

九州大学農学部遺伝子資源開発研究センター

第12号

二〇〇八年度

九州大学農学部
遺伝子資源開発研究センター

年報

第12号

2008

**Annual Report
of
Instiute of Genetic Resources
Faculty of Agriculture
Kyushu University**

Number 12

九州大学大学院 農学研究院
遺伝子資源開発研究センター

年報

第 12 号

平成 20 年

九州大学大学院 農学研究院附属遺伝子資源開発研究センター

目 次

I. センター概要	1
1. 目的	
2. 沿革	
3. 組織	
4. 研究および事業内容	
5. 運営委員会委員	
6. 組織図	
II. 研究成果	6
1. 研究業績・出版物リスト	
2. 原著論文要旨	
3. 総説等要旨	
4. 講演要旨	
III. センターの活動状況	35
1. 教育活動	
2. 科学研究費・協同、受託研究等	
3. 講演会・セミナー・講習会	
4. 海外渡航	
IV. 遺伝子資源系統の保存・管理	47
V. センター規程	49
VI. 英文摘要	51
VII. センター研究等配置図	53

1. センターの概要

1. 目的

本センターは、遺伝子資源の収集、保存、開発から評価、利用に至る研究教育を遂行する。特に、高度な技法で遺伝子情報の解析を行い、遺伝子レベルでの農業遺伝子資源に関する応用展開研究と戦略的プロジェクト研究の推進並びに遺伝子資源のDNA・細胞レポジトリ機能の充実を図る。

2. 沿革

昭和62年5月 本学附属家蚕遺伝子実験施設を振替え、附属遺伝子資源研究センターが10年の時限施設として設置され、教授、助教授、助手各2名が配置された。

平成元年4月 教授、助教授各1が追加配置された。
本学大学院農学研究科に設置された独立専攻遺伝子資源工学専攻の協力講座として、昆虫遺伝子資源学、遺伝子開発管理学の2講座に参加した。

平成3年4月 遺伝子資源工学専攻に微生物遺伝子工学講座が新設され、これに参加した。

平成9年4月 附属遺伝子資源研究センターは時限により廃止され、新たに、教授3名、助教授3名、助手2名の振替によって附属遺伝子資源開発研究センターが設置された。

平成12年4月 大学院重点化に伴い、大学院 農学研究院附属遺伝子資源開発研究センターに改組された。また、大学院教育として生物資源環境科学府 遺伝子資源工学専攻 遺伝子資源開発講座（昆

虫遺伝子資源分野、植物遺伝子資源学分野、微生物遺伝子工学分野) に改組された。

3. 組織・教職員（平成20年度）

センター長 佐藤 光

家蚕遺伝子開発分野

教授	麻生 陽一	技術職員	西川 和弘
准教授	伴野 豊	技術職員	田村 圭
助教	山本 幸治	技術職員	山本 和典
		技術補佐員	江口 誠一

植物遺伝子開発分野

教授	佐藤 光		
准教授	熊丸 敏博	テクニカルスタッフ	松坂 弘明
			原田 良子
		非常勤補佐員	藤田喜久男
			阿部 靖子
			有隅久美子
			須山奈緒美
		研究支援推進員	西 愛子

微生物遺伝子工学分野

教授	大島 敏久
准教授	原 敏夫
講師	土居 克実

4. 研究と事業内容

家蚕遺伝子開発分野

・カイコ遺伝子資源の収集、開発、評価、保存、活用並びに遺伝子機能の発

現機構の解明

- ・ 文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト（カイコ）の中核機関として我国のバイオリソース事業への貢献

植物遺伝子開発分野

イネ遺伝子資源のDNAレベルでの開発と評価、保存と利用、並びに遺伝子工学的手法を用いた新遺伝子資源の開発に関する研究

微生物遺伝子工学分野

微生物遺伝子資源の探索と評価、保存と利用開発、並びに有用遺伝子の高度機能化と応用展開に関する研究

各分野とも、所定の許可を得た本学部内外の学生や研究者等に対し、研究の場や遺伝子資源材料を提供し、さらに研究指導と教育を行っている。

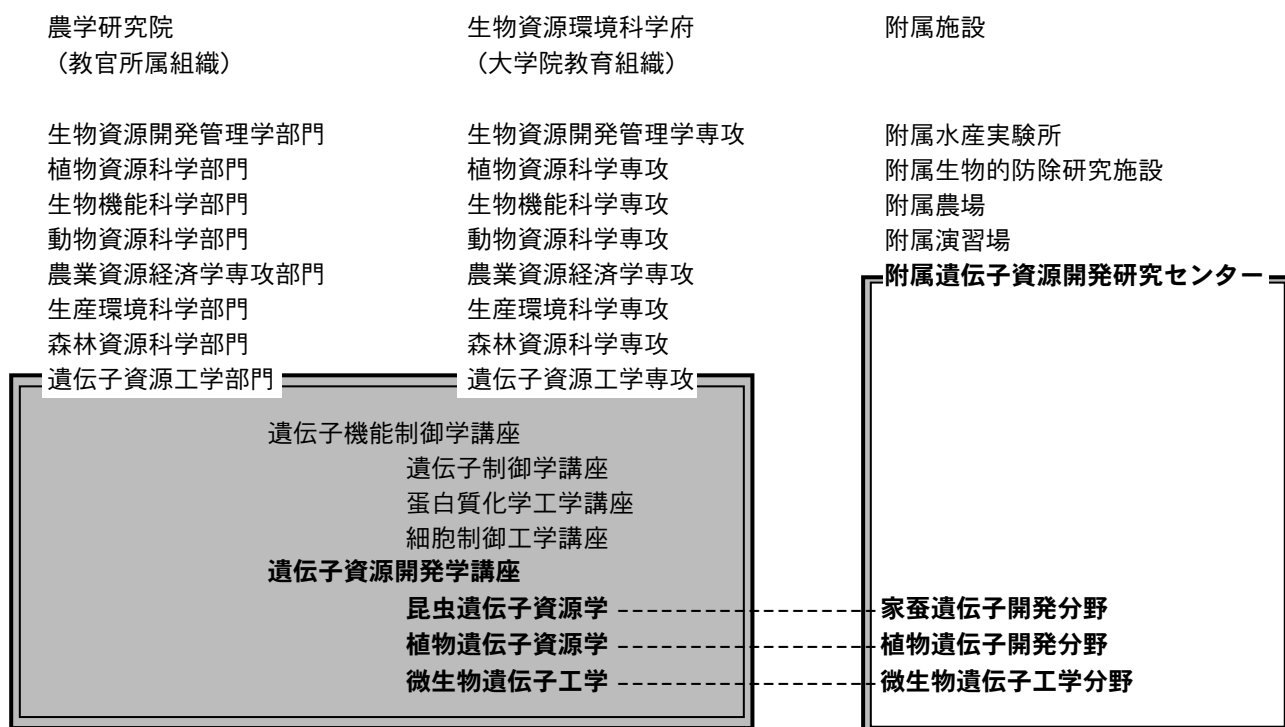
5. 運営委員会委員

（任期：平成20年4月1日～平成22年3月31日）

委員長	佐藤 光	
准教授	大島 敏久	（遺伝子資源開発研究センター）
准教授	熊丸 敏博	（遺伝子資源開発研究センター）
教授	麻生 陽一	（遺伝子資源開発研究センター）
教授	久原 哲	（遺伝子資源工学部門）
准教授	片倉 喜範	（遺伝子資源工学部門）
教授・准教授	吉村 淳	（生物資源開発管理学部門）
教授・准教授	中司 敬	（植物資源科学部門）
教授・准教授	木村 誠	（生物機能科学部門）
教授・准教授	山内 伸彦	（動物資源科学部門）
教授・准教授	南石 晃明	（農業資源経済学部門）

教授・准教授	内野 敏剛	(生産環境科学部門)
教授・准教授	玉泉 幸一郎	(森林資源科学部門)
教授・准教授	望月 俊宏	(附属農場)
教授・准教授	大賀 祥治	(附属演習林)

6. 組織図



II. 研究成果

1. 研究業績・出版物リスト

家蚕遺伝子開発分野

A 原著論文

・ Kaoru Sato, Tomoko Matsuoka Matsunaga, Ryo Futahashi, Tetsuya Kojima, Kazuei Mita, Yutaka Banno and Haruhiko Fujiwara : Positional Cloning of a Bombyx Wingless Locus flugellos (fl) Reveals a Crucial Role for fringe That Is Specific for Wing Morphogenesis, *Genetics* 179:875-885, 2008年06月.

・ Ryo Futahashi, Jotaro Sato, Yan Meng, Shun Okamoto, Takaaki Daimon, Kimiko Yamamoto, Yoshitaka Suetsugu, Junko Narukawa, Hirokazu Takahashi, Yutaka Banno, Susumu Katsuma, Toru Shimada, Kazuei Mita and Haruhiko Fujiwara : yellow and ebony Are the Responsible Genes for the Larval Color Mutants of the Silkworm Bombyx mori, *Genetics*, 180:1995-2005, 2008年12月.

・ Kohji Yamamoto, Sumiharu Nagaoka, Yutaka Banno, Yoichi Aso : Biochemical properties of an Omega-class glutathione S-transferase of the silkworm, Bombyx mori, *Comp. Biochem. Physiol. PartC*, 149C, 461-467, 2008年10月.

B データベース

カイコ保存システムのデータベース公開

<http://silkworm.nbrp.jp/>

C 報告書他

山本幸治：2007年度アジア地域重点学術研究報告書 2008年04月.

山本幸治：平成18年度国際共同調査研究 2008年05月.

山本幸治、辻幸子：農学研究院若手教員支援事業報告書 2008年12月.

植物遺伝子開発分野

A 原著論文

1) N. Fujita, Y. Toyosawa, Y. Utumi, T. Higuchi, I. Hanashiro, A. Ikegami, S. Akuzawa, M. Yoshida, A. Mori, K. Inomata, R. Itoh, A. Miyao, H. Hirochika, H. Satoh, Y. Nakamura. Characterization of pullulanase (PUL) -deficient mutants of rice (*Oryza sativa* L.) and the function on starch biosynthesis in the developing rice endosperm. *Journal of Experimental Botany* 60, 1009-1023 (2009)

2) K. Asano, M. U.-Tanaka, K. Hirano, R. Angeles-Shim, T. Komura, H. Satoh, H. Kitano, M. Matsuoka, M. Ashikari. Isolation and characterization of a dominant dwarf gene, *Slr1-d*, in rice. *Journal of Molecular Gene and Genetics*, (2008)

3) A. Kubo, Y. Yuguchi, M. Takemasa, S. Suzuki, H. Satoh, Shin-ichi Kitamura. The use of micro-beam X-ray diffraction for the characterization of starch crystal structure in rice mutant kernels of waxy, amylose extender, and sugary1. *Journal of Cereal Science* (2008)

4) T. T. Hoai, T. Kumamaru, H. Satoh. Diversity of glutelin seed storage protein forms from local rice cultivars in North Vietnam. *Rice Genetics Newsletter* 12, 59-61 (2008)

5) T. T. Hoai, T. Kumamaru and H. Satoh. Variation of seed storage prolamin from North Vietnam local rice cultivar., Rice Genetics Newsletter 12, 65-67 (2008)

6) 熊丸敏博・小川雅広・佐藤光・Thomas W. Okita. イネ種子貯蔵タンパク質集積の遺伝的制御機構. 種子の科学とバイオテクノロジー, 原田久也ら (種子生理生化学研究会) 編, 学会出版センター (2009)

7) 熊丸敏博、牛島智一、佐藤光、川越靖. プロラミンの集積に関する遺伝子及びその利用. 特願 2008-290180 特開 2010-115141

8) 川越靖、熊丸敏博、左藤光、恩田弥生、高星千恵美. パン類の製造に適した米粉組成物およびその利用. 特願 2008-058057 特開 2009-213370

B. データベース等

イネ保存品種データベース

http://w3.grt.kyushu-u.ac.jp/Rice_Kyushu/rice-kyushu/htdocs/main.html

突然変異系統データベース

<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top/top.jsp>

微生物遺伝子工学分野

Haruhiko Sakurba, Kazunari Yoneda, Kiyo Takeuchi, Hidehiko Tsuge, Nobuhiko Katunum, Toshihisa Ohshima : Structure of an archaeal alanine : glyoxylate aminotransferase, Acta Cryst., D-64, 696-699, 2008 年 05 月. (査読あり)

H. Yanai, K. Doi, T. Ohshima : Sulfolobus tokodaii ST0053 produces a novel thermostable, NAD-dependent medium-chain alcohol dehydrogenase, Appl. Environ. Microbiol., 75 (6) :

1758-1763, 2009 年 02 月. (査読あり)

H. Sakuraba, K. Yoneda, T. Satomura, R. Kawakami, T. Ohshima : Structure of a D-tagatose 3-epimerase-related protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 65, 199-203, 2009 年 01 月. (査読あり)

T. Satomura, R. Kawakami, H. Sakuraba, T. Ohshima : A Novel FAD containing D-Lactate Dehydrogenase from the Thermoacidophilic Crenarchaeon *Sulfolobus tokodaii* strain: Purification, Characterization and Expression in *Escherichia. coli*, *J. Biosci. Bioeng.*, 106, 16-21, 2008 年 06 月. (査読あり)

H. Sakuraba, K. Yoneda, K. Takeuchi K, H. Tsuge, N. Katunuma, T. Ohshima : Structure of an archaeal alanine:glyoxylate aminotransferase. Structure of an archaeal alanine:glyoxylate aminotransferase. *Acta Crystallogr D Biol. Crystallogr.* 64t (6), 696-699. 2008 年 06 月. (査読あり)

Y. Tani, K. Tanaka, T. Yabutani, Y. Mishima, H. Sakuraba, T. Ohshima, J. Motonaka : Development of a D-amino acids electrochemical sensor based on immobilization of thermostable D-proline dehydrogenase within agar gel membrane, *Anal. Chim. Acta*, 619 (2) :215-220., 2008 年 05 月. (査読あり)

2. 原著論文要旨

家蚕遺伝子開発分野

Copyright © 2008 by the Genetics Society of America
DOI: 10.1534/genetics.107.082784

Positional Cloning of a Bombyx Wingless Locus *flügellos* (*fl*) Reveals a Crucial Role for *fringe* That Is Specific for Wing Morphogenesis

Kaoru Sato,* Tomoko Matsuoka Matsunaga,*¹ Ryo Futahashi,* Tetsuya Kojima,*
Kazuei Mita,¹ Yutaka Banno¹ and Haruhiko Fujiwara*²

*Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, Bioscience Building 501, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan, ¹Laboratory of Insect Genome, National Institute of Agrobiological Sciences, Otsuashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8643, Japan and ²Laboratory of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

Manuscript received October 2, 2007
Accepted for publication March 26, 2008

ABSTRACT

Mutations at the *flügellos* (*fl*) locus in *Bombyx mori* produce wingless pupae and moths because of the repressed response of wing discs to ecdysteroid. Four recessive *fl* alleles occurred spontaneously and were mapped at 13.0 of the silkworm genetic linkage group 10. By positional cloning, we confirmed that the gene responsible for *fl* is *fringe* (*fng*) encoding Fng glycosyltransferase, which is involved in regulating the Notch signaling pathway. In four different *fl* alleles, we detected a large deletion of the *fng* gene in *fl*¹ and nonsense mutations in *fl*², *fl*³, and *fl*⁴. In the wild-type (WT) silkworms, *fng* is expressed actively in the wing discs, brain, and reproductive organs from the fourth to final instars but barely in the other tissues tested. *In situ* hybridization showed that *fng* mRNA is expressed in the dorsal layer of the WT wing discs. The wingless (*wg*) mRNA, a downstream marker of Fng-mediated Notch signaling, is localized at the dorsoventral boundary in the WT wing discs but repressed markedly in the *fl* wing discs. Although null mutants of *Drosophila fng* result in postembryonic lethality, loss of *fng* function in *Bombyx* affects only wing morphogenesis, suggesting different essential roles for *fng* in tissue differentiation among insects.

WING formation is a major morphological change during larval-pupal development in holometabolous insects. Wings develop from the wing imaginal discs, which differentiate in response to insect hormones, juvenile hormone, and pulses of ecdysteroid (NARDI and WELLIS 1979; BLAIS and LAFONT 1980; FUJIWARA and HOJYO 1997; FUJIWARA and OGAI 2001; TRUMAN and REDDIFORD 2007). The wing disc of *Drosophila* is a well-studied model system for identifying numerous genes involved in pattern formation and understanding the genetic regulation of morphological processes (WILLIAMS *et al.* 1993). However, whether the mechanism revealed in *Drosophila* is actually applicable to other insect species remains to be clarified. Furthermore, although many studies have shown the effects of ecdysteroid on the development of cultured wing discs *in vitro* (NARDI and WELLIS 1979; BLAIS and LAFONT 1980; FUJIWARA and OGAI 2001; TRUMAN and REDDIFORD 2007), little is known about the molecular

mechanisms of hormone-mediated wing morphogenesis and tissue differentiation during metamorphosis.

The silkworm *Bombyx mori* has three wing-deficient mutants: *flügellos* (*fl*), *Vestigial* (*Vg*), and *rudimentary wing* (*rw*) (FUJII *et al.* 1998). The recessive homozygote of the *fl* mutant has the most severe phenotype of the three, with almost undetectable wings in the pupal and adult stages (Figure 1). Four recessive *fl* mutants (*fl*¹, *fl*², *fl*³, and *fl*⁴) occurred spontaneously and independently (KATSUKI 1935; HARIZUKA 1948; UEDA *et al.* 1959; FUJII *et al.* 1998) and were mapped at the same position (13.0) of the silkworm genetic linkage group 10 (LG10) (Figure 2A; FUJII *et al.* 1998). Despite the complete loss of wings, other larval and adult organs appear normal in the *fl* mutants. Histological studies revealed that, although the *fl* wing discs are slightly smaller than those of the wild type (WT), they develop normally until the fourth larval instar (FUJIWARA and HOJYO 1997). In the fifth instar, however, developmental events such as wing epithelial invagination and tracheal migration into the lacunal space do not occur (NAGATA 1962; HOJYO and FUJIWARA 1997). Moreover, *fl* wing discs cultured in medium containing 20-hydroxyecdysone (20E) do not develop, whereas the WT wing discs differentiate normally under the same conditions (FUJIWARA and HOJYO 1997). During the prepupal stage, the transcription of two ecdysteroid-induced genes, *BHR3* (early-late gene; *Bombyx* homolog of *DHR3*) and *Urbanis* (wing-specific

Sequence data from this article have been deposited with the GenBank Data Libraries under accession nos. AB360596-AB360599.

¹Present address: Department of Molecular Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

²Corresponding author: Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, Bioscience Bldg. 501, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan.
E-mail: haruh@bk.u-tokyo.ac.jp

Genetics 178: 875-885 (June 2008)

yellow and ebony Are the Responsible Genes for the Larval Color Mutants of the Silkworm *Bombyx mori*

Ryo Futahashi,^{*,1,2} Jotaro Sato,^{2,3} Yan Meng,^{2,4} Shun Okamoto,^{*} Takaaki Daimon,²
Kimiko Yamamoto,² Yoshitaka Suetsugu,² Junko Narukawa,² Hirokazu Takahashi,²
Yutaka Banno,⁵ Susumu Katsuma,² Toru Shimada,² Kazuei Mita²
and Haruhiko Fujiwara^{*,2}

¹Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, Kashima, Chiba 277-8562, Japan, ²Laboratory of Insect Genome, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8643, Japan, ³Department of Agricultural and Environmental Biology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Hongo-ku, Tokyo 113-8657, Japan and ⁴Laboratory of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

Manuscript received September 18, 2008
Accepted for publication October 10, 2008

ABSTRACT

Many larval color mutants have been obtained in the silkworm *Bombyx mori*. Mapping of melanin-synthesis genes on the *Bombyx* linkage map revealed that *yellow* and *ebony* genes were located near the *chocolate* (*ch*) and *sooty* (*so*) loci, respectively. In the *ch* mutants, body color of neonate larvae and the body markings of elder instar larvae are reddish brown instead of normal black. Mutations at the *so* locus produce smoky larvae and black pupae. F₂ linkage analyses showed that sequence polymorphisms of *yellow* and *ebony* genes perfectly cosegregated with the *ch* and *so* mutant phenotypes, respectively. Both *yellow* and *ebony* were expressed in the epidermis during the molting period when cuticular pigmentation occurred. The spatial expression pattern of *yellow* transcripts coincided with the larval black markings. In the *ch* mutants, nonsense mutations of the *yellow* gene were detected, whereas large deletions of the *ebony* ORF were detected in the *so* mutants. These results indicate that *yellow* and *ebony* are the responsible genes for the *ch* and *so* loci, respectively. Our findings suggest that *Yellow* promotes melanization, whereas *Ebony* inhibits melanization in Lepidoptera and that melanin-synthesis enzymes play a critical role in the lepidopteran larval color pattern.

THE extremely diverse lepidopteran color pattern is evolutionarily interesting because of its association with natural selection. Much research has focused on adult wings to study the molecular mechanisms of color patterns. Some of the most convincing data comes from comparative studies between different species (CARROLL *et al.* 1994; BRUNETTI *et al.* 2001; REED and SERVAS 2004; MONTEIRO *et al.* 2006), phenotypically differentiated laboratory strains, or spontaneous mutants within species (BRAKEFIELD *et al.* 1996; BRUNETTI *et al.* 2001, BELDADE *et al.* 2002). A candidate gene approach revealed that the *Distal-less* gene segregates with the eyespot size phenotype, explaining up to 20% of the phenotypic difference between the selected lines in *Bicyclus anynana* (BELDADE *et al.* 2002). To determine the responsible genes for color pattern polymorphisms or mutants, an AFLP-based linkage map has been

developed in several butterfly species (reviewed in BELDADE *et al.* 2008). Recently, the linkage of forewing color pattern and mate preference with the *singlex* gene in two *Heliconius* species (KRONFORST *et al.* 2006) and the linkage of the mimicry locus H with the *invected* gene in *Papilio dardanus* have been reported (CLARK *et al.* 2008), although these reports have not elucidated whether *singlex* or *invected* is the responsible gene for wing color pattern variation. Until now, no color pattern genes have been elucidated by positional cloning in Lepidoptera.

Like the adult wings, the larvae of butterflies and moths, often preyed on by other animals, also show various color patterns. In the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*, several melanin-synthesis genes are associated with stage-specific larval color patterns (FUTAHASHI and FUJIWARA 2005, 2006, 2007, 2008a). Melanin-synthesis genes are responsible for pigmentation mutants in *Drosophila melanogaster* (WRIGHT 1987; WITTKOPP *et al.* 2002a); however, the connection between these genes and the color pattern mutants in other insects has not been elucidated.

Although larval color variations are often observed in many Lepidoptera, the genes responsible for color patterns have not yet been identified by mutation studies.

Sequence data from this article have been deposited with the EMBL/GenBank Data Libraries under accession nos. AB438996–AB439000, AB439286–AB439288, and AB455226–AB455233.

*These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, Bioscience Bldg. 501, 5-1-5 Kashwanoha, Kashima, Chiba 277-8562, Japan.
Email: haruh@bk.u-tokyo.ac.jp



Biochemical properties of an omega-class glutathione S-transferase of the silkworm, *Bombyx mori*

Kohji Yamamoto^{a,*}, Sumiharu Nagaoka^b, Yutaka Banno^a, Yoichi Aso^a

^a Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyoto University Graduate School, 6-10-1 Nakozaki, Higashi-ku, Fushimi-ku, Kyoto 612-8581, Japan

^b Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology, Goshokacho, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 August 2008

Received in revised form 24 October 2008

Accepted 27 October 2008

Available online 3 November 2008

Keywords:

Bombyx mori

Glutathione

Glutathione S-transferase

Lepidoptera

Lipid peroxidation

ABSTRACT

A cDNA encoding an omega-class glutathione S-transferase of the silkworm, *Bombyx mori* (bmGSTO), was cloned by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. The resulting clone was sequenced and deduced for amino acid sequence, which revealed 40, 40, and 39% identities to omega-class GSTs from human, pig, and mouse, respectively. A recombinant protein (rbmGSTO) was functionally overexpressed in *Escherichia coli* cells in a soluble form and purified to homogeneity. rbmGSTO was able to catalyze the biotranslation of glutathione with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, a model substrate for GST, as well as with 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation. This enzyme was shown to have high affinity for organophosphorus insecticide and was present abundantly in silkworm strain exhibiting fenitrothion resistance. These results indicate that bmGSTO could be involved in the increase in level of insecticide resistance for lepidopteran insects.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Glutathione conjugation is known to be a major pathway for the detoxification of xenobiotics as well as the homeostasis of endogenous compounds. Glutathione S-transferases [GSTs, EC 2.5.1.18] are enzymes widespread in both prokaryotic and eukaryotic cells and catalyze the glutathione conjugation reaction with reduced glutathione (GSH) [Listowsky et al., 1998; Armstrong, 1997]. There have been seven classes of mammalian GSTs, alpha, mu, pi, omega, sigma, theta, and zeta [Mannervik et al., 2005], whereas, six different GST classes, designated delta, epsilon, omega, sigma, theta, and zeta [Tu and Akgul, 2005; Ranson and Hemingway, 2005], have been found in dipteran insects such as *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. Although GSTs have been identified from insect species mainly from the viewpoint of insecticide metabolism [Li et al., 2007; Ranson and Hemingway, 2005; Sawicki et al., 2003], the molecular identity of lepidoptera GSTs has not been investigated in comparison with those in dipteran species. We have characterized GSTs of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, a lepidopteran model insect [Yamamoto et al., 2005; Yamamoto et al., 2006], and of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, one of most serious lepidopteran pests for broad-leaved trees [Yamamoto et al., 2007]. In this study, we focus on a novel GST (omega-class GST) of the silkworm, *B. mori*

(bmGSTO). The omega-class GST had been found in humans for the first time [Board et al., 2002], and putative omega-class GSTs were also occurred in some species including dipteran insects. The physiological function of omega-class GSTs is largely unknown. A cDNA encoding this enzyme, abbreviated as bmGSTO, was sequenced and overexpressed as a recombinant protein in *Escherichia coli* cells to examine its biochemical properties. Furthermore, the expression of bmGSTO mRNA was examined by northern hybridization. A lot of agricultural insect pests are lepidopteran. As silkworm is a model animal for lepidopteran insects, it is useful to obtain information concerning its detoxification capacity, in particular the novel GST identified in the current study, for application to other pests.

2. Materials and methods

2.1. Insects and tissue dissection

Fifth-instar larvae of the silkworm, *B. mori* (Kinshu × Showa strain) were reared on artificial diets at the Kyoto Institute of Technology (Kyoto, Japan). These were dissected on ice, and fat body, midgut and silk gland were collected and kept at -80°C until use. Total RNAs were rapidly extracted from the tissues dissected with GeneElute Mammalian Total RNA extraction kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions.

2.2. Cloning and sequencing of the cDNA encoding bmGSTO

Total RNA isolated from the fat body of the larvae was subjected to the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). First-

Abbreviations: CBB, Coomassie Brilliant Blue R250; CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; ECA, ethacrynic acid; GSH, glutathione; GPX, glutathione peroxidase; GST, glutathione S-transferase; 4-HNE, 4-hydroxynonenal; IPTG, isopropyl 1-thio- β -D-galactoside; 4-NPS, 4-nitrophenyl acetate; LB, Luria-Bertani; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

* Corresponding author. Tel.: +81 92 621 4091; fax: +81 92 624 1011.

E-mail address: yamamoto@agr.kyoto-u.ac.jp (K. Yamamoto).

RESEARCH PAPER

Characterization of pullulanase (PUL)-deficient mutants of rice (*Oryza sativa* L.) and the function of PUL on starch biosynthesis in the developing rice endosperm

Naoko Fujita^{1,*†}, Yoshiko Toyosawa^{*2}, Yoshinori Utsumi¹, Toshiyuki Higuchi³, Isao Hanashiro³, Akira Ikegami⁴, Sayuri Akuzawa⁴, Mayumi Yoshida¹, Akiko Mori¹, Kotaro Inomata¹, Rumiko Itoh¹, Akio Miyao⁵, Hirohiko Hirochika⁵, Hikaru Satoh² and Yasunori Nakamura¹

¹ Department of Biological Production, Akita Prefectural University, Akita City, Akita, 010-0195 Japan

² Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyusyu University, Hakozaki, Fukuoka, 812-8581 Japan

³ Department of Biochemical Science and Technology, Kagoshima University, 1-21-24, Korimoto, Kagoshima, 890-0065 Japan

⁴ Department of Nutritional Science, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1, Sakuragaoka, Setagayaku, Tokyo, 156-8502 Japan

⁵ NIAS, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki, 305-8602 Japan

Received 29 September 2008; Revised 8 December 2008; Accepted 8 December 2008

Abstract

Rice (*Oryza sativa*) allelic *sugary1* (*sug1*) mutants defective in isoamylase 1 (ISA1) accumulate varying levels of starch and phytoglycogen in their endosperm, and the activity of a pullulanase-type of a debranching enzyme (PUL) was found to correlate closely with the severity of the *sug1* phenotype. Thus, three PUL-deficient mutants were generated to investigate the function of PUL in starch biosynthesis. The reduction of PUL activity had no pleiotropic effects on the other enzymes involved in starch biosynthesis. The short chains (DP \leq 13) of amylopectin in PUL mutants were increased compared with that of the wild type, but the extent of the changes was much smaller than that of *sug1* mutants. The α -glucan composition [amylose, amylopectin, water-soluble polysaccharide (WSP)] and the structure of the starch components (amylose and amylopectin) of the PUL mutants were essentially the same, although the average chain length of the B₂₋₃ chains of amylopectin in the PUL mutant was \sim 3 residues longer than that of the wild type. The double mutants between the PUL-null and mild *sug1* mutants still retained starch in the outer layer of endosperm tissue, while the amounts of WSP and short chains (DP \leq 7) of amylopectin were higher than those of the *sug1* mutant; this indicates that the PUL function partially overlaps with that of ISA1 and its deficiency has a much smaller effect on the synthesis of amylopectin than ISA1 deficiency and the variation of the *sug1* phenotype is not significantly dependent on the PUL activities.

Key words: Amylopectin, debranching enzyme, isoamylase, mutant, pullulanase, rice endosperm, starch biosynthesis.

Introduction

It is generally accepted that ADP-glucose pyrophosphorylase, starch synthase, and starch branching enzymes are involved in starch biosynthesis in higher plants. The fourth kind of enzymes, namely, starch debranching enzymes, are

also thought to play an essential role in starch biosynthesis; a recent analysis of *sugary1* mutants, which accumulate highly branched phytoglycogen instead of starch in maize (Pan and Nelson, 1984; James *et al.*, 1995), rice (Nakamura

* These authors contributed equally to the paper.

† To whom correspondence should be addressed: E-mail: naokof@akita-pu.ac.jp

© 2009 The Author(s).

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Downloaded from <http://jxb.oxfordjournals.org> at (D) Kyushu U Rigakubu on 24 February 2010

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-213370

(P2009-213370A)

(43) 公開日 平成21年9月24日(2009.9.24)

(5) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
A 2 1 D	2/36	(2006.01)	A 2 1 D	2/36	Z N A	4 B 0 2 4
A 2 1 D	13/00	(2006.01)	A 2 1 D	13/00		4 B 0 3 2
A 2 1 D	13/08	(2006.01)	A 2 1 D	13/08		
A 2 1 D	8/02	(2006.01)	A 2 1 D	8/02		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A	

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2008-58057(P2008-58057)
 (22) 出願日 平成20年3月7日(2008.3.7)

(出願人による申告)平成19年度独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」、産業技術力強化法第19条の適用を受けるもの

(71) 出願人 501167644
 独立行政法人農業生物資源研究所
 茨城県つくば市観音台2丁目1-2

(71) 出願人 504145342
 国立大学法人九州大学
 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号

(74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス

(72) 発明者 川越 靖
 茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内

(72) 発明者 恩田 弥生
 茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】パン類の製造に適した米粉組成物およびその利用

(57) 【要約】

【課題】粉食に適した米品種から作製された、製造工程の作業性がよく、かつ伸展性および可塑性の優れたパン類の原料となる米粉組成物を提供すること、米粉を原料として用いた作業効率のよいパン類の製造方法、および小麦粉と同等以上の品質をもつパン類を提供すること。

【解決手段】上記課題を、野生型と比較して胚乳内にグルテリン前駆体をより多く含む改良米から作製された米粉を単独または小麦粉と混合させて得た米粉組成物、並びに上記米粉組成物を主原料とするパン類およびその製造方法を提供することにより解決する。

【選択図】なし

The use of micro-beam X-ray diffraction for the characterization of starch crystal structure in rice mutant kernels of *waxy*, *amylose extender*, and *sugary1*

Akiko Kubo^a, Yoshiaki Yuguchi^b, Makoto Takemasa^a, Shiho Suzuki^a,
Hikaru Satoh^c, Shinichi Kitamura^{a,*}

^aGraduate School of Life and Environmental sciences, Osaka Prefecture University, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

^bDepartment of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Osaka Electro-Communication University, Neyagawa, Osaka 572-8530, Japan

^cFaculty of Agriculture, Institute of Genetic Resources, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan

Received 11 June 2007; received in revised form 15 August 2007; accepted 16 August 2007

Abstract

Micro-beam X-ray diffraction analyses were carried out on slices from wild-type rice and mutants. The method permitted the crystalline structure to be analyzed with less destruction of cells and fewer artificial effects that occur during the purification of starch from tissue and provided information concerning the localization and crystalline structure of starches distributed in the endosperm. The starch on kernel slices from the wild-type and *waxy* mutant, carrying a defect for the *Granule-bound starch synthase I (GBSSI)* gene, displayed an A-type of diffraction pattern; no difference in the crystalline patterns between starches located in the inner and outer region in a kernel were observed. A double mutant of the *waxy* and *amylose extender (ae)* mutant carrying a defect for the *Starch branching enzyme IIIb* gene accumulated amylose-free B-type starches. The kernel slice from the double mutant of *waxy* and *sugary1*, mutated on the *Isoamylase I* locus, displayed an A-type diffraction pattern in the outer region and was amorphous in the inner region. A chain-length distribution analysis of polyglucans in kernels from wild-type and mutants showed that *ae* amylopectin had more long chains and less short chains than the wild-type and *waxy* amylopectin. On the other hand, the water-soluble polysaccharide in the inner region of the *sugary1* endosperm had more short chains than the amylopectin in the outer region counterparts. These results indicate that branch chain length in amylopectin is crucial in determining the formation of A- and B-type starches.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Starch; Rice grain; Micro-beam X-ray diffraction; Mutant; Crystal structure

1. Introduction

Starch consists of mainly two chemically distinguishable polysaccharides: amylose, an essentially linear (1→4)- α -D-glucan and amylopectin, a branched glucan that contains largely α -(1→4) linkages, but with branches attached by α -(1→6) linkages. It occurs as water insoluble particles in the form of “starch granules” in the seeds, tubers, and other parts of plants, and is generally classified into three types (A, B, and C) according to the X-ray diffraction pattern given by their amylopectin crystalline structures. It

is well known that cereal starch including normal rice starch gives an A-type X-ray diffraction pattern, tuber starch a B-type, and bean and root starch a C-type, a mixture of A- and B-types (Cairns et al., 1997; Hizukuri et al., 1961; Katz and van Itallie, 1930).

X-ray powder diffraction analysis has been typically used to characterize the crystalline structure of starch. For the analysis, starch is generally extracted and purified from tissue. During the procedure, information on starch localization in the tissue is lost and starch granules can be damaged. The localization of starch granules in the endosperm is important, because it influences the gelatinization properties of rice grains. Recently, generation techniques for a high flux X-ray beam with an undulator

*Corresponding author. Tel.: +81 72 2549457; fax: +81 72 2549458.
E-mail address: skita@bioinfo.osakafu-u.ac.jp (S. Kitamura).

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-115141

(P2010-115141A)

(43) 公開日 平成22年5月27日(2010.5.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	2B030
C07K 14/415 (2006.01)	C07K 14/415	4B024
A01H 1/00 (2006.01)	A01H 1/00 A	4H045
A01H 5/00 (2006.01)	A01H 5/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2008-290180 (P2008-290180)	(71) 出願人 504145342 国立大学法人九州大学 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号
(22) 出願日 平成20年11月12日(2008.11.12)	(71) 出願人 501167644 独立行政法人農業生物資源研究所 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
特許法第30条第1項適用申請有り 平成20年5月12日、 http://seika.nii.ac.jp/search_pjno.html?PJNO=16380009 を通じて発表	(74) 代理人 100140109 弁理士 小野 新次郎
	(74) 代理人 100089705 弁理士 社本 一夫
	(74) 代理人 100075270 弁理士 小林 泰
	(74) 代理人 100080137 弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロラミンの集積に関与する遺伝子及びその利用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 植物種子におけるプロラミン集積性を制御するポリヌクレオチド (Esp1遺伝子) 及びそれによりコードされるタンパク質およびプロラミン集積性が制御された植物 (好ましくはイネ) の作出方法を提供する。

【解決手段】 特定のヌクレオチド配列を有するEsp1遺伝子であって、前記遺伝子はプロラミンの構造遺伝子ではなく、その生合成の過程に関与する遺伝子である。またプロラミン低集積性である系統においては、Esp1遺伝子内においてヌクレオチドの置換が生じる。

【選択図】 なし

Sulfolobus tokodaii ST0053 Produces a Novel Thermostable, NAD-Dependent Medium-Chain Alcohol Dehydrogenase[†]

Hisaaki Yanai, Katsumi Doi, and Toshihisa Ohshima*

Microbial Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

Received 21 June 2008/Accepted 4 January 2009

An alcohol dehydrogenase (ADH) gene, ST0053, from *Sulfolobus tokodaii* was expressed in *Escherichia coli*. The purified recombinant enzyme was an NAD-dependent medium-chain ADH with high thermostability and tolerance of a wide range of pHs. This is the first step in creating an experimental functionality library of 10 genes annotated as ADHs in the *S. tokodaii* genome.

NAD(P)-dependent alcohol dehydrogenases (ADHs; EC 1.1.1.1 and EC 1.1.1.2) catalyze the reversible oxidation of alcohols to their corresponding aldehydes or ketones. Many kinds of ADHs have been identified in a variety of microorganisms and are utilized for the production and detection of alcohols, aldehydes, and ketones (1, 11). Particularly useful are ADHs from thermophiles and hyperthermophiles, which are often more stable than their counterparts from mesophiles and psychrophiles (6, 7). These thermostable enzymes provide us with long-term functionality and novel reaction systems, such as the enzymatic vapor reaction under high temperature. Ten different genes have been annotated as NAD(P)-dependent ADHs in the genome of the hyperthermophilic and acidophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain 7 (13). We have been interested in compiling the structural and functional characteristics of their products into a library. Such a library would provide much useful information that could facilitate their application. We here describe the expression of ST0053, one of the 10 ADH genes in the *S. tokodaii* genome, and the subsequent purification and characteristics of its product.

Cloning and expression of ST0053. A hybrid DNA plasmid, pET11a/ST0053, whose ST0053 open reading frame was amplified by PCR and inserted into the NdeI-BamHI site of pET11a (Novagen), was provided by Seiki Kuramitsu (Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka University, Osaka, Japan). The plasmid was transformed into *E. coli* strain Rosetta(DE3), after which the transformants were cultured for 16 h in 10 ml of Luria-Bertani medium containing ampicillin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) at 37°C with shaking at 120 rpm. This culture medium was then added to 1 liter of Luria-Bertani medium containing the same amount of antibiotic in a 2-liter Erlenmeyer flask and incubated at 37°C with shaking at 220 rpm. Once the optical density at 660 nm reached 0.5, expression was induced by the addition of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG; 1 mM final concentration) and cultivation was continued at 37°C for an additional 4 h. The culture was harvested by centrifugation at $10,000 \times g$ for 10 min at 4°C, the

cells were washed with 0.85% NaCl and pelleted, and then the cell pellet was stored at -80°C .

Purification. To purify ADH, the stored cells (wet weight, about 2.55 g) were suspended in 10.2 ml of 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 0.01% 2-mercaptoethanol (2-ME) (buffer A) and then disrupted by ultrasonication on ice (Tomy Ultrasonic Disruptor UD-201 set at an output level of 2 and a 50% duty cycle; three sonications for 3 min each with 5-min intervals). The resultant homogenate was centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min at 4°C, after which the supernatant was incubated at 70°C for 40 min, and the precipitate was removed by centrifugation at $10,000 \times g$ for 15 min at 4°C. Solid ammonium sulfate was then added to the supernatant up to 20% saturation, and the solution was loaded onto a Butyl Sepharose column (2.5 by 5.0 cm) previously equilibrated with 150 ml of buffer A containing 20% saturated ammonium sulfate. After the column was washed with 300 ml of the same buffer at room temperature, the ST0053 product was eluted with a linear gradient of 20% to 0% saturated ammonium sulfate in buffer A (120 ml) at room temperature. The column elution was monitored for protein at 280 nm and for ADH activity. The active fractions were collected, and the solution was concentrated by the addition of solid ammonium sulfate to 80% saturation. After centrifugation at $10,000 \times g$ for 15 min at 4°C, the precipitate was collected and dissolved in 2 ml of 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.01% 2-ME. This enzyme solution was dialyzed against 1,000 ml of the same buffer (three time changes, 5 h-5 h-overnight) at 4°C, and the dialyzate was stored at 4°C until used as the purified enzyme.

Gel electrophoresis. Disc gel electrophoresis of the native enzyme was carried out with a 7.5% polyacrylamide gel by the method of Davis (5), after which ADH activity staining was carried out for 10 min at 50°C in the presence of a mixture of 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 10 mM benzyl alcohol, 1.25 mM NAD, 1 mM ZnSO_4 , 0.1 mM 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride, and 0.04 mM 1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate (24). In addition, the protein band was stained with Coomassie brilliant blue (CBB) R-250. About 10 μg of purified protein was used for each gel. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out with a 10% polyacrylamide gel according to the procedure of Laemmli (14).

* Corresponding author. Mailing address: Microbial Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan. Phone and fax: 81-92-642-3053. E-mail: ohshima@agr.kyushu-u.ac.jp.

[†] Published ahead of print on 9 January 2009.

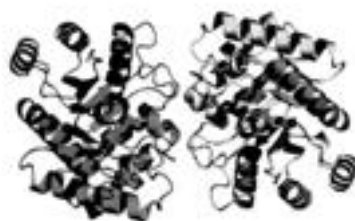
Haruhiko Sakuraba,^a Kazunari Yoneda,^b Takenori Satomura,^c Ryushi Kawakami^d and Toshihisa Ohshima^{e*}

^aDepartment of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, 2393 Benobe, Miki-cho, Kita-gun, Kagawa 761-0795, Japan, ^bDepartment of Bioscience, School of Agriculture, Tokai University, Aso, Kumamoto 869-1404, Japan, ^cDepartment of Materials Science, Yonago National College of Technology, Yonago, Tottori 683-8506, Japan, ^dAnalytical Research Center for Experimental Sciences, Saga University, Saga 840-8502, Japan, and ^eMicrobial Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

Correspondence e-mail:
ohshima@agr.kyushu-u.ac.jp

Received 14 November 2008
Accepted 16 January 2009

PDB Reference: D-tagatose 3-epimerase-related protein, 2zvr, r2zvf.



© 2009 International Union of Crystallography
All rights reserved

Structure of a D-tagatose 3-epimerase-related protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*

The crystal structure of a D-tagatose 3-epimerase-related protein (TM0416p) encoded by the hypothetical open reading frame TM0416 in the genome of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* was determined at a resolution of 2.2 Å. The asymmetric unit contained two homologous subunits and a dimer was generated by twofold symmetry. The main-chain coordinates of the enzyme monomer proved to be similar to those of D-tagatose 3-epimerase from *Pseudomonas cichorii* and D-psicose 3-epimerase from *Agrobacterium tumefaciens*; however, TM0416p exhibited a unique solvent-accessible substrate-binding pocket that reflected the absence of an α -helix that covers the active-site cleft in the two aforementioned ketohexose 3-epimerases. In addition, the residues responsible for creating a hydrophobic environment around the substrate in TM0416p differ entirely from those in the other two enzymes. Collectively, these findings suggest that the substrate specificity of TM0416p is likely to differ substantially from those of other D-tagatose 3-epimerase family enzymes.

1. Introduction

D-Tagatose 3-epimerase (DTE) family enzymes catalyze C3 epimerization of various ketohexoses, including rare sugars that exhibit unique properties and may even exert beneficial health effects in humans (Livesey & Brown, 1996; Levin, 2002; Takata *et al.*, 2005). Indeed, it is hoped that DTE-family enzymes can serve as useful catalysts for the commercially viable production of these otherwise rare sugars (Takeshita *et al.*, 2000; Granström *et al.*, 2004). To date, however, detailed descriptions of the structure and of the relationship between structure and enzymatic properties have been reported for only two DTE-family enzymes: DTE from *Pseudomonas cichorii* (Yoshida *et al.*, 2007) and D-psicose 3-epimerase (DPE) from *Agrobacterium tumefaciens* (Kim *et al.*, 2006).

In recent years, much effort has gone into the isolation and characterization of enzymes from hyperthermophiles, to a large extent because their greater thermostability represents a significant advantage over their counterparts from mesophiles. In particular, thermostable enzymes that are involved in carbohydrate metabolism are very attractive for industrial applications (Lee *et al.*, 2004). Although genome analysis has enabled the identification of several DTE homologues from hyperthermophiles, the structures and true functions of these enzymes remain unclear. For example, TM0416p, which is encoded by a hypothetical open reading frame (ORF ID TM0416) in the genome of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, is predicted to be a DTE homologue (Kim *et al.*, 2006), but the structural and functional details of TM0416p have not yet been reported. In the present study, therefore, we determined the crystal structure of TM0416p at 2.2 Å resolution. This is the first description of the structure of a DTE-related protein from a hyperthermophile and we found the active-site architecture to be quite unique and to differ substantially from those of previously described DTE-family enzymes.

available at www.sciencedirect.com

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Development of a D-amino acids electrochemical sensor based on immobilization of thermostable D-Proline dehydrogenase within agar gel membrane

Yuji Tani^a, Katsuhito Tanaka^a, Tomoki Yabutani^{a,*}, Yuji Mishima^b, Haruhiko Sakuraba^a, Toshihisa Ohshima^c, Junko Motonaka^a

^a Department of Chemical Science and Technology, Institute of Technology and Science, The University of Tokushima, Minami-josanjima 2-1, Tokushima 770-8506, Japan

^b Tsurumi Chemical Co. Ltd., 2-1-1 Niihama Arai-cho, Takasago, Hyogo 676-8686, Japan

^c Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku 6-10-1, Fukuoka 812-8581, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 March 2008

Received in revised form

26 April 2008

Accepted 29 April 2008

Published on line 8 May 2008

Keywords:

Electrochemical biosensor

Thermostable enzyme

Agar

Amino acids

D-Proline

D-Amino acid sensor

ABSTRACT

A novel biosensor for determination of D-amino acids (DAAs) in biological samples by using an electrode based on immobilization of a thermostable D-Proline dehydrogenase (D-Pro DH) within an agar gel membrane was developed. The electrode was simply prepared by spin-coating the agar solution with the D-Pro DH on a glassy carbon (GC) electrode.

An electrocatalytic oxidation current of 2,6-dichloroindophenol (DCIP) was observed at -100 mV vs. Ag/AgCl with the addition of 5 and 20 mmol L⁻¹ D-proline. The current response and its relative standard deviation were 0.15 μ A and 7.6% ($n=3$), respectively, when it was measured in a pH 8.0 phosphate buffer solution containing 10 mmol L⁻¹ D-proline and 0.5 mmol L⁻¹ DCIP at 50 °C. The current response of D-proline increased with increase of the temperature of the sample solution up to 70 °C. The electrocatalytic response at the D-Pro DH/agar immobilized electrode subsequently maintained for 80 days. Finally, the D-Pro DH/agar immobilized electrode was applied to determination of DAAs in a human urine sample. The determined value of DAAs in the human urine and its R.S.D. were 1.39 ± 0.12 mmol L⁻¹ and 8.9% ($n=3$), respectively.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Recently, D-amino acids (DAAs) have been researched in various scientific fields [1–3]. For example, it has been known that D-serine has a function to adjust glutamatergic neurotransmission in brain [4,5]. Furthermore, D-aspartic acid, which is usually found in an internal secretion of rats, may control production of hormones [6–8]. D-Proline has been also found in human saliva [9], gastric juice [10], mouse urine [11], brain [12], beer [13], and maple syrup [14]. In addition, an accumulation

to stomach cancer [10] and neural toxicity of D-proline [15,16] was reported. However, biological functions of DAAs including D-proline to human body have been rarely cleared. Therefore, reliable determination methods for DAAs are necessary for clarifying their biological and physiological roles.

Several analytical methods such as high-performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC) and amino acid analyzer have been utilized for the determination of DAAs in biological and food samples because of their sensitivity and selectivity [17]. However, these instruments are

* Corresponding author. Tel.: +81 88 656 7413; fax: +81 88 656 7413.

E-mail address: yabutani@chem.tokushima-u.ac.jp (T. Yabutani).
0003-2670/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.aca.2008.04.063

4. 講演要旨

家蚕遺伝子開発分野

平成 20 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会—日本蚕糸学会第 78 回大会—

C09

複数の遺伝子座におけるカイコ、日本産クワコそれぞれの種内変異および両者の種間変異

○行弘研司、河本夏雄（生物研昆虫ゲノム）、小瀬川英一（生物研ジーンバンク）、
廣川昌彦（生物研昆虫ゲノム）、立松憲一郎（生物研組換えカイコセンター）、伴野豊（九大農）

近年、カイコゲノム研究の急速な進展と並行して、遺伝子組換えカイコの産業利用の期待が高まり、より高度な利用を図る上で一種使用が求められている。一種使用を行うには、生物多様性への影響評価を行う必要があり、その対象は形態的にも細胞学的にも明白な違いが観察されるが、カイコと交配し、妊性のある子孫を残すとされる日本産クワコである。両種の雑種には生殖力があり、さらに我が国への養蚕の到来以来 1000 年以上の歳月が経過しているのもならず、自然界ではカイコの表現型を示す個体は自立的に生息したという報告はない。これは、中国産のクワコを祖先とするとされるカイコは、自然界に生息するには有害な突然変異を多数蓄積しており、両者の雑種は継続的に発生しても野生条件下では子孫を残し続けることができないと解釈できる。しかし、有害遺伝子は速やかに自然淘汰で排除されても、それとは強く連鎖していない有害ではないカイコ特異的な DNA 断片が、日本産クワコでどの程度の頻度で維持されているかについては、未だ十分に調査されていない。この問題は、遺伝子組換えカイコの 1 種利用を進める上で、両種の遺伝的交流を検討するために重要であるとともに、カイコとの比較ゲノム研究を進展させる上でも不可欠である。

本発表では、ミトコンドリアの *cox1* 遺伝子および、染色体上の複数の遺伝子を対象として、カイコと日本産クワコ間の対立遺伝子間の塩基多型および挿入・欠失多型を検討し報告する。

キーワード：カイコ、日本産クワコ、遺伝的変異

平成 20 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会—日本蚕糸学会第 78 回大会—

C10

リボソーム DNA を指標にした日本産クワコへのカイコ染色体侵入状況の解析

○川西祐一（琉球大・遺伝子）、屠振力（浙江大）、伴野豊（九大・農）、藤本浩文（感染研・放）、
三田和英（生物研・ゲノム）、中島裕美子（琉球大・遺伝子）、前川秀彰（琉球大・遺伝子）

日本産クワコとカイコとの間でリボソーム DNA の配列に差があることが指摘されており、既にこの差を利用した簡便な判定法を提案した。rDNA 遺伝子の 5.8S と 28S rRNA の間のスペーサーに日本産クワコでは *EcoRI* 部位が存在する。この差はそれぞれの rDNA クラスター全体にわたって保持されていることが明らかになっている。本判定法は、その *EcoRI* 部位の両側にある rRNA コーディング領域に設計したプライマーを用いて PCR 増幅した産物を *EcoRI* で消化後、予想された位置での切断の有無を検出し、日本産クワコ由来かカイコ由来かを判定するものである。この方法により各地のクワコを調べた結果、中国および韓国産クワコの rDNA は全てカイコタイプであった。北海道から対馬までの地域で採集された日本産クワコは、日本産クワコタイプを示すものも有ったが、殆どからカイコタイプが検出された。これは、日本に 2000 年前に移入されたカイコの rDNA を持つ染色体#11 がクワコに侵入したことを示唆する。いくつかの PCR 産物からクローンを取り塩基配列を決定したところ、日本産クワコとカイコの両タイプを持つ日本産クワコからは NJ 法の系統樹で明確にそれぞれのグループに分類されることが明らかとなった。このことから染色体#11 がカイコから日本産クワコへ侵入したことが示された。rDNA のクラスターは、協調進化により進化すると考えられている。これは基本単位に変異が生じるとその変異した単位がクラスター内の全ての単位と置き換わる現象である。このため、提示した方法を利用すれば簡便に染色体の侵入を検索できることになる。また、差の出た領域の配列を比較することにより、中国、韓国、台湾を含む東アジアのクワコの進化的動きを推定することが出来ると考えている。

キーワード：クワコ、カイコ、rDNA、PCR、協調進化、系統樹

C11

アルカリ性フォスファターゼ遺伝子 (*Alp*) 領域によるカイコとクワコの系統解析

西村美香 (京工織大院応用生物)・〇寺門真希 (京工織大院応用生物)

・行弘研司 (農業生物資源研究所)・伴野豊 (九大院農)・伊藤雅信 (京工織大院応用生物)

カイコ第 3 染色体上の 2 つの *Alp* 遺伝子 (*Alp-m* と *Alp-s*) は祖先遺伝子の重複によって生じたと考えられる。同様の重複構造はクワコにも存在することから、これを指標にカイコ品種と日本産および中国産クワコの系統関係の推定が可能である。これまでに、主として 2 遺伝子間の介在配列の構造多型から、中国産クワコがカイコ品種の共通祖先である可能性が示されたが、その内容はかならずしも明らかでなかった。そこで調査範囲をカイコ 13 系統 (青熱、カンボージュ、大造など)、中国産クワコ 4 ゲノム、および日本産クワコ 8 ゲノムに拡大するとともに、遺伝子部分の塩基置換パターンの詳細な解析を加え、総合的な推定を試みた。

その結果、介在配列の多型では、C タイプ (6, 7kb) がカイコゲノムの半数以上を占めた。大造の介在配列は既知タイプにあてはまらない新規の構造 (約 15kb) だった。中国産クワコ 4 ゲノムのうち 3 つはカイコ C タイプとまったく同じ構造であり、1 つは C タイプから一部欠損により派生したと考えられた。日本産クワコ 8 ゲノムには 2 つのタイプが混在するが、カイコ配列とは大きく構造が異なっていた。一方、*Alp* 遺伝子部分の塩基配列の変異はほとんどが一塩基置換だった。McDonald-Kreitman テストにより、クワコにおける染色体数分化やカイコ家畜化の前後で両 *Alp* 遺伝子に対する淘汰圧に大きな変化がなかったことが示された。2 遺伝子の分子系統樹はほぼ一致し、調査したすべてのカイコ *Alp* 遺伝子が日本産クワコより中国産クワコ遺伝子により近縁だった。以上の結果は、調査したカイコ系統 (中国、日本、ヨーロッパ、熱帯品種) 全てが単系統で、その共通祖先が中国産クワコに由来する可能性を示唆する。

キーワード: アルカリ性フォスファターゼ、遺伝子重複、カイコクワコ、系統解析

C12

日本産クワコとカイコゲノムから特定遺伝子をスクリーニングするときの差を利用した家畜化関連遺伝子迅速単離方策への提言

尾根力 (中国・浙江大)、川西祐一 (琉球大・遺伝子)、伊等雅信 (京都工織)、

伴野豊 (九大・農)、藤本浩文 (感染研・放)、佐原健 (北大・農)、三田和英

(生物研・ゲノム)、中島裕美子 (琉球大・遺伝子)、〇前川秀彰 (琉球大・遺伝子)

家畜化関連遺伝子の単離は、クワコとカイコのゲノムを比較し、差がある領域を精査することで可能である。日本のクワコゲノム中にはカイコが中国から移入されてからの 2000 年間にカイコの染色体が侵入し混成状態が生じていると言える。しかし、クワコに必須の遺伝子はクワコに保存されているはずなので、この差の検出により家畜化関連遺伝子を見出すことは労力を厭わなければ可能である。しかし、より簡便な方法があれば時間と労力の短縮に繋がる。ここではクワコのどの染色体を標的にすれば、家畜化関連遺伝子を見出すことが出来るかの方策を提言する。

日本産クワコとカイコとの間で遺伝子に差がある場合、両者で機能的に同等であれば、日本産クワコから日本産クワコタイプとカイコタイプの両方のクローンが単離されてくるのが rDNA の解析から示された。もし、カイコで単一と判定されている遺伝子を日本産クワコから単離したとき、日本産クワコタイプのもののみがスクリーニングされてくるのであれば、この遺伝子が局在している染色体にはクワコに必須の遺伝子が存在すると考えられる。マリナー様因子 (MLE) にレトロトランスポゾン LIBa と BMC1 が入れ子に挿入された配列 BaTnML は、データベース検索および FISH 法によりカイコゲノム中の 1 箇所にのみ存在すると推定された。そこで、この部位を日本産クワコゲノムからスクリーニングしたところ、カイコタイプは単離されなかった。

同様に染色体 #3 の重複したアルカリ性フォスファターゼ遺伝子の間の配列はクワコ特有であった。さらに染色体が融合して出来た M 染色体も関連遺伝子をコードしていると推察できる。染色体 #3、#6 及び M には眠性、食性、行動の遺伝子が局在しておりクワコ特有の遺伝子が単離されるはずである。

キーワード: 家畜化関連遺伝子、rDNA、アルカリ性フォスファターゼ、M 染色体、PCR

C15

臭蚕におけるイソバレリルCoA脱水素酵素遺伝子の変異

○浦野慶・大門高明（東大農）・三田和英（生物研）・伴野豊（九大農）
・勝間達・嶋田透（東大農）

臭蚕はイソ吉草酸が体内に蓄積するために異臭を発して斃死する変異体であり、その原因遺伝子 *sku* は第 22 染色体 19.3 に座位する。ヒトにおいても同様の症状を呈するイソ吉草酸血症が知られており、その原因はイソバレリルCoA脱水素酵素遺伝子 (*IVD*) である。*sku* 遺伝子の実体がカイコの *IVD*/*BmIVD* であるか否かを検証するために、九大 a85 系の臭蚕における *BmIVD* の cDNA の全長配列を読んだところ、正常個体に比べて 1 箇所の塩基置換が見出された。この塩基置換は 376 番目のアミノ酸をグリシンからバリンに変異させる。この残基は、他生物の *IVD* では例外なくグリシンであり、活性に必須である補酵素 FAD と相互作用しうる位置にあるので、この置換が臭蚕形質の原因になっている可能性がある。a85 系統の継代中に分離する臭蚕と正常蚕の計 133 個体において、*BmIVD* の遺伝子型を検定したところ、*BmIVD* と *sku* 型の間で全く組換えが起きなかった。また、ノーザン法で 5 齢 3 日の幼虫における *BmIVD* の発現を調査したところ、中腸・脂肪体・マルピーギ管においてほぼ等量の mRNA が検出され、正常蚕と臭蚕間で mRNA の量やサイズに差は見られなかった。よって上述の *BmIVD* の点変異が臭蚕の原因である可能性が高い。現在、バキュロウイルス発現系を用いて正常型と臭蚕型の *BmIVD* タンパク質を作製し、両者の間で酵素活性を比較する実験を進めている。

キーワード：臭蚕、原因遺伝子、アミノ酸代謝異常、イソバレリルCoA脱水素酵素

C17

カイコの眠性変異体の分子遺伝学的解析

○ 大門高明（東大院農）・篠田徹郎（生物研）・山本公子（生物研）・三田和英（生物研）
・伴野豊（九大院農）・勝間達（東大院農）・嶋田透（東大院農）

昆虫の脱皮は脱皮ホルモン (ecdysteroids) がトリガーとなって実行され、脱皮の質は幼若ホルモン (JH) によって決定される。*Drosophila* を用いた分子遺伝学的解析によって、脱皮ホルモンの受容体やその下流のシグナルカスケードの分子機構について多くの知見が得られているが、その一方で、JH の作用機作はほとんど不明のままであり、その受容体も未だ同定されていない。また、JH がもつ意味も昆虫種によって大きく異なり、例えば、JH 投与に対する *Drosophila* の応答は、鱗翅目や鞘翅目のそれと異なる。鱗翅目や鞘翅目では幼虫の齢数の増加や蛹から蛹への脱皮という "status quo" の応答が観察されるが、*Drosophila* ではそのような現象は全く観察されない。この点で、JH action の解明には、カイコやコクヌストモドキなどの *non-Drosophila* モデルを用いた解析が重要であると考えられている。

カイコには脱皮・変態に関する突然変異系統が多数存在するが、その中でも特に眠性変異体 (幼虫の脱皮回数が正常のものとは異なる変異体) は昆虫の脱皮・変態の「質」や「タイミング」の決定機構を解明する上で極めて重要であると考えられる。我々は、眠性変異体のうち *mod* (2 眠) と *rt* (劣性 3 眠) について、その原因遺伝子の同定を試みており、今回はその進行状況について報告する。p50T と *mod* 系統あるいは *rt* 系統との BCl 世代を作成し、常法に従ってポジショナルクローニングを行ったところ、*mod* が座乗する領域を約 400 kb、*rt* が座乗する領域を約 500 kb に絞り込むことができた。現在、その領域内に存在する遺伝子について解析を進めている。

キーワード：カイコ、ecdysteroid, juvenile hormone, *mod*, *rt*

C25

カイコ幼虫体色変異体—赤蠶・煤色—はメラニン合成遺伝子に変異が生じている

○ 二橋亮 (生物研)・岡本俊 (東大)・伴野豊 (九大)・山本公子・三田和美 (生物研)
・藤原晴彦 (東大)

演者らは、アゲハ幼虫において、メラニン合成に関わる酵素遺伝子 (*tyrosine hydroxylase*(TH), *dopa decarboxylase*(DDC), *ebony*, *yellow*) が、幼虫体色の黒や赤の紋様形成に関わっていることを既に報告している。さらに、カイコの黒縞系統でもこれらの遺伝子の発現が幼虫の紋様変化に関連して変化していることを見出してきた。カイコには体色が変化する変異系統が複数知られているが、演者らは今回、これらのメラニン合成酵素が、体色変異体の原因遺伝子である可能性があるのではないかと考えて解析を行った。遺伝子のマッピングの結果から、*yellow* と *ebony* 遺伝子がそれぞれ赤蠶、煤色の近傍に位置することが示唆された。さらに、*yellow* と *ebony* は、それぞれ赤蠶と煤色系統において ORF に重大な変異が生じていることも確認された。メラニン合成に関わる遺伝子と、カイコの幼虫体色との関連、さらに体色変異体との関連について考察したい。

キーワード：カイコ、赤蠶、煤色、メラニン合成酵素

E01

高効率の組換えタンパク質発現用宿主としてのカイコ系統の開発 (3)

○ 幸 在萬・張平波・伴野 豊・河川 豊・日下部 宜宏 (九大院農)

本研究では、既存の組換えAcNPVおよび組換えBmNPVの両系を用いて、安定したタンパク質の大量生産ができるカイコ系統の選抜とその大量生産に寄与する分子機構の解析を行っている。これまで我々はAcNPVを利用した組換えタンパク質生産能を指標にカイコ突然変異体259系統のスクリーニングを行い、非常に高いタンパク質生産能を有する感受性系統を2系統とAcNPVが増殖できない抵抗性3系統同定した。今回もルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして組み込んだ組換えバキュロウイルス (AcNPV) を用いて、合計100系統について組換えタンパク質生産能のスクリーニングを行った。その結果、100系統の内7系統がAcNPVによる組換えタンパク質高生産性を示すことが解った。これらの系統の中には、既存の組換えタンパク質高生産性系統d17とf38の生産能と同等のものがあることが解った。

一方、これまでに組換えタンパク質高生産性の形質は系統内に固定されており、単一の遺伝子により支配されている可能性があることから、組換えタンパク質の高生産に寄与する原因遺伝子の同定を試みた。方法としては、高低のタンパク質生産能を示すカイコ系統d17 (高生産性) 系統とw05 (低生産性) 系統を用いてバキュロウイルス (AcNPV) 感染後の体液タンパク質動態変化を2次元電気泳動により解析した。その結果、d17 (高生産性) 系統とw05 (低生産性) 系統の体液血清を用いた2次元電気泳動像の比較から、相違の認められるスポットとして、30kDaタンパク質を見いだした。現在は30kDaタンパク質の過剰発現カイコ培養細胞株を作成し、AcNPV感受性試験を行っている。

キーワード：バキュロウイルス、AcNPV、スクリーニング、高生産性系統

E22

シンジュサン中腸のグルタチオン転移酵素

○山本幸治、手塚智史、伴野 豊、麻生陽一（九大院農）

シンジュサン (*Samia cynthia pyralis*) は、柑橘類やリンゴ、モクセイなど数多くの樹木の葉を食害する鱗翅目昆虫である。シンジュサンの農薬（生体外異物）代謝に関する分子生物学的な研究はほとんど報告されていない。その代謝機構に関する知見を得ることは、シンジュサン防除法を考えるうえで重要である。本研究では代表的な第二相解毒酵素であるグルタチオン転移酵素（GST, EC 2.5.1.18）に着目してシンジュサンの農薬代謝について調査することを目的とする。これまでに我々は、鱗翅目昆虫のカイコより 4 種、アメリカシロヒトリより 2 種そしてコブノメイガより 1 種の GST を同定し、それらの酵素化学的研究をすすめてきた。その研究過程で確立した実験手法を用いて、シンジュサンより GST (scGST) を精製し、その諸性質について調べた。シンジュサン中腸を採取し、プロテアーゼ阻害剤を含むリン酸緩衝化生理食塩水中で磨砕した。次いで遠心分離により得られた上清画分を精製の初発材料とし、30~70% 硫酸分画そして GSH アフィニティークロマトグラフィーへ供与し、scGST の精製を行った。その結果、精製 scGST の収量は 11% であり、比活性は 0.41 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった。精製標品を SDS-PAGE へ供し、scGST は電気泳動的に均一に精製されていることを確認した。その分子サイズは 22kDa であり、カイコ由来 GST のそれと類似であった。1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB) を基質とし GSH 転移活性を測定したところ、scGST の最適 pH は 8 であり、40 °C 以下ならびに pH 5-9 の範囲で安定であることが分かった。また本酵素は、農薬ピレスレイド剤と親和性を有することが見いだされた。以上のことから scGST は生体外異物 (CDNB ならびに農薬剤) の代謝に関与することが示唆された。

キーワード：シンジュサン、中腸、グルタチオン転移酵素、精製

公開講演

多数のポリペプチドから成るタンパク質の 構造特性

麻生 陽一

九州大学大学院農学研究院教授

生物は、しばしば、同種や異種の生体高分子を組み合わせて複合体として利用している。ほぼ等量のタンパク質と RNA とで構成され、遺伝子の翻訳の場を提供するリボソームはその典型的な例である。異種の生体高分子の組み合わせは研究者にとっては分析が非常に厄介になるが、生物にとっては機能の向上を獲得する巧みな方策だと思われる。生体高分子の中で、特にタンパク質は複数のポリペプチドが会合体を形成していることが多い。これは、他の分子と相互作用するための空間（ドメインやサイト）となったり、活性の調節に利用されたりしている。このとき、成分が同一であればホモオリゴマー、異なる場合はヘテロオリゴマーと称される。代謝系における一連の連続した反応を触媒するいくつかの酵素タンパク質は本来緩く会合しているが、精製操作で分離されることが知られている。マルチ酵素複合体 (multienzyme complex) と称されるものは、複合体を形成した酵素タンパク質が連続した数ステップの反応を触媒するが、酵素タンパク質間の親和性が高く複合体のまま精製される。一方、生体内には、オリゴマーとは呼びにくいほど、

複合体を形成するポリペプチドの数が多いものがある。ポリペプチドが多数ある理由は、現時点で必ずしも断定的には理解されていないが、他のタンパク質を空間的にうまく配置させるための足場であったり、ターゲットを包み込むためであったりと、機能的な理由が考えられる。

最近の研究の発展や機器の進歩から、抗原抗体反応のような強く特異性が高い相互作用だけでなく、弱く特異性が低い相互作用にも次第に目が向けられるようになった。たとえば、共有結合に比べて水素結合は非常に弱く、比較的特異性が低い。しかしながら、多数の水素結合が環境の変動に応じて柔軟に生成・消滅することは、生体高分子の構造と機能に大きく寄与している。同様に、分子間や分子内の多数の弱い相互作用は、たとえ、従来は非特異的相互作用としてネガティブなイメージで見られていたとしても、生命現象の仕組みを理解する上で重要な意味を持つ可能性がある。多様な相互作用のある系の性質は、そのコンポーネントを系から純粋に単離し、個々について詳細に調べるだけでは説明出来ない。本講演では、多数のポリペプチド、すな

09

カイコ品種大造のアルカリ性フォスファターゼ遺伝子介在配列について

○寺門真希¹・西村美香¹・行弘研司²・伴野 豊³・伊藤雅信³
(¹京工繊大院応用生物・²生物研・³九大院農)

【目的】 カイコ (*Bombyx mori*) およびカイコ近縁種のクワコ (*B. mandarina*) ゲノムには 2 つのアルカリ性フォスファターゼ遺伝子 (*Alp-m* と *Alp-s*) が重複している。両遺伝子間に存在する数 Kb の介在配列には、転移因子が関与したと思われる数種類の構造多型が知られており、これまでに、日本産クワコの *Alp* 遺伝子との比較等から多型の発生過程が推定され、中国系、日本系、ヨーロッパ系、熱帯系カイコ品種および中国産クワコに関して、それらの類縁関係が解析されてきた。しかしながら、中国系カイコ品種の中でもカイコゲノムプロジェクトに使用されている品種については解析が進んでおらず、介在配列多型の構造が明らかにされていない。そこで、カイコ品種の由来と類縁関係の全容を解明するために、調査範囲を拡大して *Alp* 遺伝子領域の比較を行った。

【材料と方法】 カイコ *Bombyx mori* (品種：大造 338) のゲノム DNA を抽出し、これを鋳型として *Alp* 遺伝子クラスターを PCR により増幅した。得られた PCR 産物をクローニングして塩基配列を決定した。

【結果と考察】 大造の *Alp* 遺伝子クラスター介在配列は約 13 kb の大きさで、これは他のタイプの介在配列多型の 2 倍ほどの大きさであった。全塩基配列を決定したところ、祖先型の多型と考えられている C タイプの介在配列に、数箇所塩基の挿入が起こったと考えられる新しいタイプの介在配列多型であった。挿入された塩基配列は合計で約 6 kb もあり、挿入位置から大造の介在配列多型は D タイプではなく C タイプから派生したことが示唆された。したがって、ゲノムプロジェクトに用いられている大造は、他の品種に比べてクワコからより分岐が進んだ品種であると推測される。また、すべての地域系統の品種で C 対応介在配列が見られ、このことは、カイコは中国にて家畜化された単系統の種であるということを示唆している。

Terakado, M., Nishimura, M., Yukahiro, K., Banno, Y. and Itoh, M.: Intergenic region of *Alp* genes in the strain DAIZO of *Bombyx mori*.

10

カイコ終齢致死突然変異体の遺伝学的研究

○野田一隆¹・山本公子²・生川潤子²・山本幸治³・
麻生陽一³・伴野 豊³
(¹九大院生資環・²生物研・³九大院農)

【目的】 カイコでは多くの致死突然変異体が存在するが、幼虫期後期に致死する変異体の報告は限られている。今回、自然突然変異体として発見された終齢致死突然変異体(遺伝子名:終齢致死, 遺伝子記: *l-l*, lethal last instar larvae)を対象に実験を行った。この変異体は、幼虫期5齢期に致死性を発現する。本変異体は死ぬ数時間前までは正常体と外見からの識別は全く不可能である。致死の兆候は食欲が不活発になる点であるが、その判定も難しく死に至る外見的变化を含め不明な点が多い。ところで、5齢期は、カイコの発育ステージから見ると成長速度が最大となる時期である。更に、この後に起こる蛹変態への準備期としても非常に重要な時期である。本変異体の原因究明は、完全変態昆虫の発生・分化のプロセス解明に非常に有益であると考え、原因となる遺伝子の同定および致死メカニズムの解明を最終目的に研究を行っている。

【材料と方法】 供試系統は、九州大学大学院農学研究院遺伝子資源開発研究センターに保存されている *a80* である。致死遺伝子である *l-l* はホモ致死であるため、この系統はヘテロで維持されている。このため、実験の第1段階として、致死変(遺伝子型 *l-l/l-l*) を効率よく得られる系統の育成を行った。得られた致死変及び正常変

における発現形質を外部形態、内部組織観察により詳細に明らかにするとともに、プロテオーム解析および遺伝子解析の材料とした。

【結果と考察】 形態観察の結果、本変異体は、外見的には正常変と比べ第4・5体節が伸長することで先ず識別されることが判明した。また、内部的には中腸組織が破れ、そのことが急速な致死を引き起こしていると思われた。当初は気づかなかったが、組織別に詳細に形態観察を行った結果、外見的に伸長した第4・5体節の脂肪組織の発達が著しく劣っていること、中腸組織の破れも同体節で始まることを見出した。

形態観察の結果を受け、異常が見られた中腸組織を採取し、二次元電気泳動による発現タンパク質の解析を行った。正常変との比較で、複数のタンパク質の発現状況に差異があることを見出している。一方、SNPs 解析の結果、原因遺伝子は第24染色体の下流部 600 kbp 領域に存在する可能性が高いことがわかった。

Noda, K., Yamamoto, K., Nanikawa, J., Yamamoto, K., Aso, Y. and Banno, Y.: Profiles of the lethal mutant controlled *l-l* gene in *Bombyx mori*.

台湾産クワコからの マリナー様転移因子の単離とその系統解析

○鎌内 悠¹・川西祐一²・矢後勝也³・小田切顕一⁴・上田恭一郎⁵・
伴野 豊⁶・前川秀彰²・Yu-Feng Hsu⁷・中島裕美子²
(¹琉大理・²琉大分子生命研・³東大院理・⁴九大院理・⁵北九州市立博物館・
⁶九大院農・⁷Department of Life Science, National Taiwan Normal University)

【目的】 カイコでは、マリナー様配列 *Cecropia*-*ITR*-*MLE* コピーのひとつである *BmTNML* がゲノム中の 1 箇所だけに存在していることが示されている。本研究では、台湾産クワコの由来を明らかにするために、台湾産クワコゲノムから *BmTNML* 座位相当領域に局在すると予想される *Cecropia*-*ITR*-*MLE* を単離し、系統解析を行なった。

【材料と方法】 台湾の増殖および復元から採集されたクワコ幼虫から調製したゲノム DNA に対し、カイコ *BmTNML* 座位に特異的なプライマー UP500 及び DOWN500 を使って PCR 増幅を行なった。さらに増幅産物に *Cecropia*-*ITR*-*MLE* が挿入されていることを予測するため、セクロピアサン *MLE* の *ITR* をプライマーとした nested PCR を行なった。塩基配列決定後、中国、韓国、日本産クワコから単離した *BmTNML* 座位相当領域の *Cecropia*-*ITR*-*MLE* と比較した。

【結果と考察】 台湾産クワコゲノムに対する UP500 および DOWN500 プライ

マーを用いた *BmTNML* 座位相当領域の PCR 増幅により、予想される 2.3 kb の断片が得られた。この増幅産物に対して nested PCR を行なったところ、*Cecropia*-*ITR*-*MLE* の全長に相当する 1.3 kb の断片のみが増幅された。*BmTNML* 座位相当領域の増幅産物の塩基配列を決定し、中国、韓国、日本産クワコのゲノム DNA から同じプライマーで PCR 増幅して得られたクローンとともに、*Cecropia*-*ITR*-*MLE* について分子系統解析を行った。その結果、系統樹上で中国産と同じクラスターに分類されるタイプと韓国産・日本産と同じクラスターに入るタイプとの 2 つのタイプに分かれた。このことから台湾産クワコは、中国からのルートと日本から南西諸島が大陸と繋がっていた時代に伝わったと考えられるルートの 2 つのルートによって台湾へ移入した可能性が示唆された。

Kamauchi, Y., Kawanishi, Y., Yago, K., Odagiri, K., Ueda, K., Bunso, Y., Mackawa, H., Hsu, Y.-F. and Nakajima, Y.: Isolation and phylogenetic analysis of mariner-like elements of *Bombyx susaniformis* inhabiting Taiwan.

カイコ体液キモトリプシンインヒビターの 中腸細胞膜結合によって生じる 受容体関連タンパク質複合体の形成

○上野由宣¹・岡田太郎²・伴野 豊¹・山本幸治¹・麻生陽一¹
(¹九大院農・²フェニックスバイオ)

【目的】 完全変態昆虫は変態期に幼虫期に合成したタンパク質を組織内に吸収し、成虫組織構築のアミノ酸源として利用すると考えられている。しかし最近これらに関する研究はほとんどない。そのため、変態における生理現象を最近の知見と合わせた理解が難しくなっている。

我々は、体液キモトリプシンインヒビター CI-8 が変態期カイコ中腸へ取り込まれることを見出し、またその受容体様タンパク質 p29 を同定した。そこで、このインヒビターと中腸膜を用いて取り込み機構の解明し、昆虫における変態機構の一端を明らかにしようとした。

【材料と方法】 体液キモトリプシンインヒビター CI-8、熟蚕中腸細胞膜、体液をそれぞれ既報に準じて精製及び分離した。細胞膜けん濁液をリン酸緩衝液によって作成した。この液に CI-8 と体液、リン酸緩衝液をそれぞれ加え反応後、反応液にグルタルアルデヒドを加え混合した。リン酸緩衝液を添加したけん濁液は対照区とした。液中のグルタルアルデヒドの反応をトリス緩衝液によって停止後、中腸膜を分離し、受容体様タンパク質の抗体を用いたウエスタンブロット法を用いて膜タンパク質を検出した。

【結果と考察】 対照区反応液及び CI-8、体液をそれぞれ加えた反応液から中腸膜を分離し、ウエスタンブロット法で膜タンパク質バンドを検出した。対照区では受容体様タンパク質以外に 50 kDa までのバンド群を検出した。CI-8 と体液の添加区では、対照区で検出したバンド群以外に対照区で検出されない高分子バンド群を検出した。これらのバンド群はほぼ同じパターンを示した。また、50 kDa を示すバンドの増強が観察された。以上検出されたバンドの分子量から、結合し得るタンパク質を推量した。この内、50 kDa バンドのタンパク質は *in vitro* において、CI-8 量依存的に形成される p29 を含む 2 量体タンパク質の可能性を示した。以上の結果から、CI-8 は受容体と結合後、受容体を含む高分子複合体を形成し、この複合体内の反応を介して取り込まれると推察された。またさらに、その取り込み機構を予想した。今後、受容体関連タンパク質を同定してマーカーとし、様々な化学架橋剤を用いて分析することにより、CI-8 取り込み機構が明らかになると期待される。

Ueno, Y., Okada, T., Banno, Y., Yamamoto, K. and Aso, Y.: Appearance of the receptor-related high molecular complexes by interaction of a α -chymotrypsin inhibitor with the midgut membrane of the silkworm, *Bombyx mori*.

2P0291A 内陸性超好熱性アーキア *Pyrobaculum calidifontis* 由来色素依存性L-プロリン脱水素酵素 (ProDH) の機能解析

○張 小冬、原 佑介¹、里村 武範¹、土居 克実、櫻庭 春彦²、大島 敏久 (九大・農・遺伝子資源工、¹米子高専・物質工、²香川大・農)

【目的】 ProDHはDCIPを電子受容体としてL-プロリンの脱水素反応を行う酸化還元酵素である。既に *Pyrococcus horikoshii* などの海洋性の嫌気性超好熱アーキアに2種類のフラビン含有ProDH($\alpha\beta\gamma\delta$ 型と $\alpha_4\beta_4$ 型)を見出し、それらの機能と構造解析を進めている。一方、生育条件が全く異なる内陸性の好気性超好熱アーキアである *P. calidifontis* にも、ProDHを検出したので、本研究では、その精製と酵素化学的性質の解明を行った。

【方法と結果】 細胞抽出液から精製した酵素は、SDS-PAGE分析により、 α と β サブユニット (分子質量： $\alpha=60$ と $\beta=43$ kDa) からなる複合体酵素であると予想できる。 α のN末端アミノ酸配列は決定できなかったが、 β のそれはMYDYVVであった。この配列情報とゲノム情報から、 β 遺伝子としてFAD dependent oxidoreductase (PC1655) を見出し、大腸菌内で発現させ、精製した遺伝子産物はProDH活性を示した。現在、この酵素複合体の詳細な機能の解析を進めている。

2P0292B NMRを用いた超好熱性アーキア由来色素依存性D-乳酸脱水素酵素の構造解析

○里村 武範、飯塚 舜介¹、櫻庭 春彦²、大島 敏久³ (米子高専 物質工、¹鳥取大院医、²香川大農 応用生物、³九州大院 農学研究院)

【目的】 我々の研究グループでは超好熱菌由来色素依存性脱水素酵素の構造と機能の解析を進めている。しかしながら色素依存性脱水素酵素の多くは膜結合性酵素であるためタンパク質の結晶化が困難であり立体構造が明らかになっているものはほとんど無い。そこで、タンパク質の結晶化を行う必要がなく立体構造解析が可能なNMR法によって色素依存性脱水素酵素の構造解析を行うことを目的とした。本研究では、これまでに明らかにしてきた色素依存性脱水素酵素の中でも *Sulfolobus tokodaii* 由来色素依存性D-乳酸脱水素酵素をターゲットとして解析を行った。

【方法・結果】 NMR法によるタンパク質の立体構造解析は分子量2万以上になると困難になる。そこで標的タンパク質の二次構造を予測しNMR解析が可能な分子量2万以下になるようにタンパク質発現系を構築した。その結果、D-乳酸脱水素酵素のN末端側 (14 kDa) の発現系の構築に成功した。

- 2P0293A 超好熱アーキア由来L-プロリン脱水素酵素複合体の機能解析
○川上 竜巳、櫻庭 春彦¹、大島 敏久² (佐賀大・総合分析セ、
¹香川大農・応生科、²九大院農院・遺資工)

我々はこれまでに、*Thermococcus*属や*Pyrococcus*属の超好熱アーキアに、L-プロリンからピロリン-5-カルボン酸への脱水素反応を触媒するL-プロリン脱水素酵素 (PDH) を見出し、その詳細な機能解析を行っている。この酵素は4種類の異なるサブユニットからなる α β γ δ 構造の複合体酵素であり、各サブユニットの機能解析から、 α サブユニット (53kDa) はNADH脱水素酵素活性を持つこと、 β サブユニット (42kDa) がPDH活性を有すること、 γ (19kDa) 及び δ サブユニット (10kDa) は電子伝達タンパク質であることなどを明らかにし、この酵素が2種類の異なる脱水素反応を触媒できる新規な酵素複合体であることを明らかにしている。さらに最近我々は、このPDH複合体がL-プロリンとNAD共存下で、NADHを生成する反応を触媒できることを明らかにした。このことは、複合体全体では、 β サブユニットで引き抜かれたL-プロリンの電子が、 γ 及び δ サブユニットを介して、 α サブユニットでNADを還元し、NADHを生成したことを強く示唆している。

- 2P0294B 低温菌*Flavobacterium frigidimaris* KUC-1由来L-スレオニン脱水素酵素の構造解析
○米田 一成、櫻庭 春彦¹、大島 敏久²、河村 俊介、荒木 朋洋、
村岡 郁夫³、老川 典夫³ (東海大・農・バイオ、¹香川大・農・応用生物科学、²九大院・農・遺資工、³関西大・工・生物工)

NAD依存性L-スレオニン脱水素酵素(L-ThrDH, EC:1.1.1.103)はNADを補酵素としてL-スレオニンからL-2-アミノ-3-オキソ酪酸への脱水素反応を触媒する酵素である。既知のL-ThrDHはMedium chain NAD dependent, and zinc containing alcohol/polyol dehydrogenase familyに属し、これまでに常温菌や真核生物由来の酵素で機能解析が、超好熱菌由来の酵素では立体構造解析が行われている。一方、南極から単離された低温菌*F. frigidimaris* KUC-1由来のL-ThrDHは、既知のL-ThrDHと1次構造上非常に低い相同性しか持たないだけでなく、既知の本酵素の活性発現に必須とされるZinc結合モチーフもなく、代わりにEpimeraseに特有のモチーフを有することから、特異的な脱水素酵素であることが知られている。本研究ではこの特異的な好冷性L-ThrDHの立体構造を酵素/NAD/MES/PEG600/Glycerolの複合体構造として分解能2.06Åで決定することに成功した。

2P0295A 低温菌 *Sporosarcina psychrophila* DSM 3由来のL-ロイシン脱水素酵素の精製と機能解析

○趙 登、土居 克実、¹ 寿彦¹、大島 敏久 (九大院・生資環・遺資工、¹香川大・農)

【目的】L-ロイシン脱水素酵素(LeuDH)はNAD⁺を補酵素としてL-ロイシンから4-メチル-2-オキソペンタン酸(2-ケトイソバチル酸)への脱水素反応を触媒する酵素である。これまでに常温菌と好熱菌由来のLeuDHの機能と構造、及び応用研究が行われているが、低温菌由来のLeuDHに関する機能と構造解析は進んでいない。本研究では、30℃以下でしか生育しない低温菌 *S. psychrophila* DSM 3にLeuDHを見出したので、その酵素科学的特徴を明らかにするために精製と機能解析を行った。【方法と結果】*S. psychrophila*の細胞抽出液を熱処理後、三種の異なるクロマトグラフィーを用いてLeuDHを均一に精製した。精製酵素の酵素科学的特徴を調べた結果、*S. psychrophila*由来のNAD依存性LeuDHは分子量約346 kDaで8量体構造をとることが判った。活性の温度依存性は、最大活性が50℃に認められ、5℃でもその7%の活性を示した。本酵素は熱処理(10分間、pH 7.2)では、50℃までほぼ100%の活性を持ち、低温菌由来の酵素としては、高い耐熱性を示し、低温でも高活性でかつ耐熱性が高い酵素としての特徴が認められた。

2P0296B *Janthinobacterium lividum*由来巨大グルタミン酸脱水素酵素のアミノ酸による活性化の特徴

○小山 正樹、川上 竜巳¹、大島 敏久² (佐賀大農・応生科、¹佐賀大・総合分析セ、²九大院農院・遺資工)

グルタミン酸脱水素酵素(GDH)は、NAD(P)を補酵素としてL-グルタミン酸と2-オキソグルタル酸の可逆的なアミノ化・脱アミノ化反応を触媒する酵素である。既知のGDHのほとんどは、サブユニット分子量50 kDaのホモヘキサマー構造をとるが、長野県の低温土壌より単離した *Janthinobacterium lividum*のGDHは、サブユニット分子量170 kDaのホモヘキサマー構造をとる巨大なNAD依存性GDHであることを明らかにした。この酵素は脱アミノ化反応において、L-アスパラギン酸やL-アルギニンなどのアミノ酸の添加、特にL-アスパラギン酸の添加で、L-グルタミン酸に対するKm値はほとんど変わらないのに対して、Vmaxは17倍に増加するなど、著しい活性化を示すことを明らかにしている。今回我々は、本酵素のアミノ化反応における機能解析を行った。脱アミノ化反応のときと同様に、L-アスパラギン酸やL-アルギニンなどのアミノ酸の添加により活性化することが分かったが、脱アミノ化反応のときと異なり、Vmaxの増加だけでなく、Km値も大きく減少するなどその活性化機構が異なることが明らかになった。

2P0004B 耐熱性L-アスパラギン酸脱水素酵素を用いたL-アスパラギン酸の電気化学的バイオセンシング

○桶崎 陽友、鄭 海濤¹、米田 一成²、櫻庭 春彦³、大島 敏久⁴、末 信一朗（福井大院工・生応化、¹天津工大・材料化工、²東海大農・バイオサイエンス、³香川大農・応生、⁴九大院農・遺資工）

【目的】L-アスパラギン酸(L-Asp)は輸液などの医薬品や人工甘味料の原料として広く利用されているため、その簡便なセンシングは有用性が高い。そこでL-Asp定量法として、超好熱性アーキア *Archaeoglobus fulgidus* 由来の耐熱性NAD-依存性L-アスパラギン酸脱水素酵素(L-AspDH)を用いた電気化学的バイオセンサを検討した。【方法・結果】センサの分子識別素子として組換え大腸菌から精製したL-AspDHを用いた。電解酸化重合によりカーボン電極上にメディエータである3,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドを固定化し、L-AspDHとNAD⁺の存在下で+350 mV(vs. Ag/AgCl)の印加電圧をかけ、L-Aspを逐次添加し酸化電流の増大を測定した結果、L-Asp濃度10-70 μMの範囲で直線的な電流応答が得られることを確認した。さらに、このバイオセンサを用いて実試料の分析を行うと共に、現在、本バイオセンサの応答性および安定性向上を検討している。

3P0619A *Lactobacillus*属細菌のパウチ法-サイレージにおける乳酸生産と硝酸還元能の検討-

○徳永 雄平、福田 耕才、土居 克実¹、大桃 定洋²、野村 善幸、緒方 靖哉（崇城大・応微、¹九大院・農、²アサマ化成）

【目的】本研究では、牧草・飼料作物中の過剰な硝酸態窒素を、サイレージ発酵過程で除去・低減化できる乳酸菌スターターの開発を目的とし、*Lactobacillus*属乳酸菌について、パウチ法サイレージ発酵系における乳酸生産性および硝酸資化性の検討を行った。

【方法・結果】九州・沖縄地方のサイレージより分離した高乳酸生産性の*L. plantarum* NGRI0101と硝酸資化性の*L. rhamnosus* NGRI0110を用いた混合培養について、液体培養法とパウチ法とで乳酸生産性および硝酸資化性を比較評価した。両菌株とも、単独培養では液体培養およびパウチ培養共に、*L. plantarum*では乳酸を培養初期から良好に生産したのに対し、*L. rhamnosus*では乳酸生産が培養後期に上昇した。また、両菌株を1:1の混合培養することで、長期間に渡って菌体生育と乳酸生成が持続できることが分かった。*L. rhamnosus*については、液体培養で約10%の硝酸資化性が認められたが、パウチ法では明瞭な硝酸資化性を測定できなかった。

3SY15-3

地熱環境における高度好熱菌の生存とシリカ鉱物化

○土居 克実、藤野 泰寛¹、大島 敏久、緒方 靖哉² (九大院農院・遺資工、¹九大院生資環・遺資工、²崇城大工・応機工)

シリカ(SiO₂)は地殻中に最も多く存在する物質であり、水にはケイ酸(Si(OH)₄)として溶解し、その飽和濃度は温度・圧力・pHに依存する。ケイ酸は温度・圧力の低下により過飽和になると互いに脱水縮合し、ポリケイ酸を形成してコロイドとなり水溶液中に安定に存在するため、過飽和シリカ溶液から固体状シリカは沈降しにくい。しかし、地熱地帯では地表付近の熱水中ケイ酸濃度は過飽和に達しているにも関わらず、シンターと呼ばれるシリカ沈殿物が散見され、それらの中に多数の微生物様構造が見られる。また、地熱発電所のパイプライン中で形成されるシリカスケールは、操業トラブルの原因となっているが、その原因は不明であった。

我々は、地熱発電所でのシリカスケール形成メカニズムを解明する中で、シリカスケール内に多数の微生物様構造が存在することを見出し、シリカスケールより高度好熱菌の菌相解析を行った。その結果、主要菌群であった*Thermus*菌株を分離し、その特性を検討した。分離株*T. thermophilus* TMYは過飽和シリカ溶液を含有培地中で培養すると、シリカ沈殿物を生成し、この際、表面タンパク質Sipが著量生産されることが判った。アミノ酸配列を基に、*T. thermophilus* HB8のゲノムと相同性検索を行なったところ、Sipは鉄結合性ABC transporterのsolute-binding proteinと高い相同性を示した。一般に、鉄結合性ABCトランスポーターはsolute-binding protein以外にpermease、ATPaseから構成されているが、シリカ誘導ではSipのみしか発現が確認できなかった。*sip*を大腸菌に形質転換し、高濃度シリカ溶液中で培養したところ、沈殿が観察された。本沈殿は特性X線解析などから、シリカスケール同様、高純度シリカで形成されていることも判った。

以上から、Sipは過飽和シリカの誘導を受け、過剰発現すること、生産されたSipがシリカスケール様沈殿を形成することが判ったが、Sipは鉄結合性ABC transporterと相同性を示したことから、鉄およびシリカによる刺激応答、特に転写機構について検討した。プライマー伸長法および5'-RACE法にて*sip*の転写開始点を決定し、その上流を検索したが、鉄結合性ABC transporterの制御領域であるFur boxの保存領域は検出できなかった。また、ノーザン解析および定量RT-PCR解析の結果からもSipはシリカ刺激に強く応答していることが示された。さらに、*Thermus*菌株は過飽和シリカ含有培地で培養すると、バイオフィーム様物質を著量産生してプラスチック壁面に付着することから、*sip*または関連遺伝子は菌体のバイオフィーム形成に関与することも推察された。これは、高度好熱菌が熱湯出口など限られた至適温度環境に留まるための生存戦略ではないかと推察している。

参考文献

Y. Fujino, R. Kawatsu, F. Inagaki, A. Umeda, T. Yokoyama, Y. Okaue, S. Iwai, S. Ogata, T. Ohshima and K. Doi, *Thermus thermophilus* TMY isolated from silica scale taken from a geothermal power plant, *J. Appl. Microbiol.*, **104**, 70-78 (2008)

III. センターの活動状況

1. 教育活動

【家蚕遺伝子開発分野】

大学院生物資源環境科学研究科（博士課程）

MD.TOFAZZAL HOSSAIN

Studies on the Properties of Silkworm Small Heat Shock Proteins:
sHSP19.9 and sHSP20.8

重岡 佑一 好熱菌リポ酸アセチルトランスフェラーゼに関する研究

手柴 智史 スモールヒートショックタンパク質に関する研究

大学院生物資源環境科学研究科（修士課程）

野田 一隆 カイコにおける終齢致死変異体の遺伝学的研究

上田 敏史 カイコ sHSP20.8 のサブユニット会合状態に及ぼす温度および
圧力の影響

研究生

なし

訪問教授・研究員

Hossain MD Tofazzal (Bangladesh Agricultural University, Bangladesh)

【植物遺伝子開発分野】

大学院生物資源環境科学研究科（修士課程）

- 中村 哲洋 イネ同化澱粉の代謝機構に関わる変異の遺伝学的研究
- 野口 亮介 イネ種子におけるグルテリン前駆体を多量に蓄積する *glup2* 変異の遺伝学的解析
- 川口 穰 Functional analysis of AGPase LS2 in rice
- 藤本 若菜 イネ種子プロラミン mRNA の特定小胞体への局在化に関する Tudor-SN の突然変異
- 吉川 尚樹 イネ種子における PDI2-3 の貯蔵タンパク質の集積に対する機能解明

ホアン ヴァン ナム (Vietnam)

Physicochemical and Genetic Analysis of Recombinant Inbred IJwx Lines

大学院生物資源環境科学研究科（博士課程）

- 豊澤 佳子 イネ種子デンプン生合成に関するプルラナーゼ型デンプン枝切り酵素の機能解析
- 上田 悠加 イネ種子貯蔵タンパク質グロブリンの細胞内輸送に関する変異体の遺伝学的研究

福田 真子 イネ種子グルテリンのゴルジ体から貯蔵型液胞への細胞内輸送に関する遺伝的制御機構

長嶺 愛 イネ胚乳におけるプロラミンの小胞体内腔への集積に関わる分子機構の解明

【微生物遺伝子工学分野】

大学院修士課程修了者

八坂由季子 「好熱菌 *Bacillus* sp. DSM 405 由来 NAD (P) 依存性セリン脱水素酵素の発見とその機能解析」

樋野絵美沙 「海生好熱性カビの分離と新規脱水素酵素の検索」

津田 浩介 「小浜温泉より分離した *Thermus* バクテリオファージの特性解析」

塚副 耕大 「色素依存性 L- プロリン脱水素酵素を素子とするアミノ酸電池の開発」

津浦 逸美 「超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* strain 7 の xylose 代謝経路の解析：xylonate dehydratase の存在と性質」

箆島 秀幸 「無細胞糖タンパク質合成系における糖鎖付加に関する研究」

大学院博士課程修了者

矢内 久陽 「超好熱好酸性アーキア *Sulfolobus tokodaii* のアルコール脱水素

酵素推定遺伝子の網羅的機能解析」

2. 科学研究費・協同、受託研究等

【家蚕遺伝子開発分野】

文部科学省

ナショナルバイオリソースプロジェクト「カイコ」中核拠点整備プログラム

科研費

基盤研究(A)分担「イネのアミロプラストエンジニアリングに関する基礎的研究」

特定領域研究分担「カイコゲノムの物理地図と転写地図の整備並びに機能解析システムの確立」

若手研究(B)「鱗翅目昆虫の農薬耐性獲得の分子基盤」

【植物遺伝子開発分野】

ナショナルバイオリソース中核的拠点整備プログラム

「イネ遺伝資源実験システムの収集・保存・提供と基礎データ蓄積」

基盤研究(A) (2) 研究代表 佐藤光、分担 熊丸敏博

イネのアミノプラストエンジニアに関する基礎的研究

基盤研究(A) 研究分担 佐藤光

産業用素材としてのデンプンを合成する育種素材の作出

農林水産省受託研究 研究代表 佐藤光

アミロペクチン長鎖型硬質米による米粉新需要食品の開発

ワシントン州立大学 . Tomas Okita

「イネ種子成分の集積を制御する遺伝子に関する研究」

【微生物遺伝子工学分野】

・ 文部科学省・日本学術振興会科学研究費補助金の受入れ

「萌芽研究」メタエンザイム法の開発, 大島 (代表), 2200 千円

「基盤研究 (B)」超好熱菌の色素依存性脱水素酵素複合体の機能, 構造解析と応用, 大島 (代表), 3500 千円

「萌芽研究」透過型浄化壁における微生物群集構造の長期モニタリング, 土居 (分担)

「萌芽研究」メタエンザイム法の開発, 土居 (分担), 200 千円

・ 学内研究経費の受入れ

「九州大学教育研究プログラム・研究拠点形成プロジェクト (B タイプ)」, 土居 (分担), 1350 千円

・ 奨学寄付金の受入れ

「ビタミン, バイオファクターに関する国際学会参加費の補助」日本ビタミン学会, 大島, 100 千円

「ビタミン B に関する研究件助成」社団法人ビタミン協会, 大島, 250 千円.

「高度好熱性細菌によるシリカスケール形成の防除法と高濃度ケイ酸集積法の開発 ～地熱エネルギーの効率的利用法の創成～」岩谷直治記念財団, 土居, 2000 千円

・その他の外部研究資金の受入れ

「日本学術振興会 酵素科学とその生物学への新展開に関する日本 - オランダ共同セミナー」大島, 2483 千円

「NPO 法人 ジオバイオテクノロジー新興会議 コア土壌資料からの有用酵素遺伝子資源の探索」大島, 1500 千円

「財団法人岡山県産業振興財団 新色相開発により国産ジーンズ発祥の地児島技術活用の高度化, コスト低減天然藍染料スクモの高速生産技術の開発」大島, 1613 千円

3. 講演会・セミナー・講習会

【家蚕遺伝子開発分野】

福岡県平成 19 年度箱崎中学校職場体験学習協力、九州大学（福岡）

夏休み公開講座『大学でカイコの教育と織物作りにチャレンジしよう！』（福岡）

【植物遺伝子開発分野】

熊丸敏博

平成 20 年 12 月

明善高等学校, 総合的な学習時間「大学セミナー」

【微生物遺伝子工学分野】

末信一郎・吉川達剛・桶崎陽友・鄭海濤・米田一成・大島敏久

好熱菌由来の L- リジン脱水素酵素を用いた L- リジンバイオセンシングシステム, 日本生物工学会 2007 年度大会, 2008 年 05 月 01 日, 広島大学.

米田一成・櫻庭春彦・大島敏久・村岡郁夫・老川典夫

低温菌 *Flavonobacterium frigidimaris* KUX-1 由来 L-スレオニン脱水素酵素の構造解析, 日本ビタミン学会, 2008年06月13日, 仙台国際センター.
藤野泰寛・大島敏久・緒方靖哉・土居克実

Thermus thermophilus HB8 のシリカ誘導性タンパク質の転写解析, 日本生物工学会 2008年度大会, 2008年08月27日, 東北学院大学土樋キャンパス.

矢内久陽・前田華奈・土居克実・大島敏久

超好熱好酸性アーキア *Sulfolobus tokodaii* str. 7 由来アルコール脱水素酵素の酵素機能のライブラリー化, 日本生物工学会 2008年度大会, 2008年08月27日, 東北学院大学土樋キャンパス.

櫻庭春彦・大島敏久

超好熱菌由来アルドラーゼの結晶構造解析, 日本生物工学会, 2008年09月01日, 広島大学.

大島敏久

ゲノム情報と酵素機能の解析による超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* の L-セリン生合成経路の解明, ビタミンB研究委員会, 2008年09月05日, 彦根市 キャッスルホテル.

大島敏久・谷祐児・田中勝人・藪谷智規・本仲純子・櫻庭春彦

高度耐熱性の D-プロリン脱水素酵素の寒天固定化電極による D-アミノ酸の電気化学的センシング, 第4回 D-アミノ酸研究会, 2008年09月20日, 名古屋大学野依記念学術交流館.

矢内久陽・前田華奈・土居克実・大島敏久

超好熱好酸性アーキア *Sulfolobus tokodaii* str. 7 アルコール脱水素酵素遺伝子の機能ライブラリー, 平成20年度日本農芸化学会西日本支部大会,

2008年09月20日，長崎大学文教キャンパス.

大島敏久

新色相開発により国産ジーンズ発祥の地児島技術活用の高度化，コスト低減天然藍染料スクモの高速生産技術の開発とインジゴ還元酵素の生化学的特徴の解析，2008年11月05日，テクノサポート岡山.

樋野絵美沙・土居克実・大島敏久

海生好熱性カビの分離と新規脱水素酵素の検索，日本生物工学会九州支部大会，2008年12月06日，崇城大学.

津浦逸美・土居克実・大島敏久

超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* strain 7 のキシロース代謝経路の解明：xylonate dehydratase の存在，日本生物工学会九州支部大会，2008年12月06日，崇城大学.

八坂由季子・土居克実・大島敏久

好熱菌 *Bacillus* sp. DSM405 由来新規 NAD 依存性セリン脱水素酵素の性質，日本生物工学会九州支部大会，2008年12月06日，崇城大学.

徳永雄平・木村佑子・渡辺誠人・岩井覚・福田耕才・土居克実・大桃定洋・緒方靖哉

サイレージ乳酸菌の機能開発 -*Lactobacillus* 属乳酸菌の硝酸還元性の検討，日本生物工学会九州支部大会，2008年12月06日，崇城大学.

岩井覚・福田耕才・土居克実・緒方靖哉

アルミニウムイオンに対する *Thermus* 属細菌の応答，日本生物工学会九州支部大会，2008年12月06日，崇城大学.

大島敏久

新色相開発により国産ジーンズ発祥の地児島技術活用の高度化，コスト低減天然藍染料スクモの高速生産技術の開発，地域活性型研究開発事業，2009年01月23日，岡山口イヤルホテル。

里村武範・飯塚舜介・櫻庭春彦・大島敏久

MRIを用いた超好熱性アーケア由来色素依存性D-乳酸脱水素酵素の構造解析，日本農芸化学会，2009年03月27日，福岡国際会議場。

川上竜巳・櫻庭春彦・大島敏久

超好熱アーケア由来L-プロリン脱水素酵素複合体の機能解析，日本農芸化学会，2009年03月27日，福岡国際会議場。

樋崎陽友・鄭海寿・米田一成・櫻庭春彦・大島敏久・末信一郎

耐熱性L-アスパラギン酸脱水素酵素を用いたL-アスパラギン酸の電気化学的バイオセンシング，日本農芸化学会，2009年03月27日，福岡国際センター。

山本幸治・米田一成・大島敏久・麻生陽一

カイコ由来オメガクラス・グルタチオン転移酵素の発現ならびに機能解析，日本農芸化学会，2009年03月27日，福岡国際センター。

小山正樹・川上竜巳・大島敏久

Janthinobacterium lividum 由来巨大グルタミン酸脱水素酵素のアミノ酸による活性化の特徴，日本農芸化学会，2009年03月27日，福岡国際センター。

張小冬・原佑介・里村武範・土居克実・櫻庭春彦・大島敏久

内陸性超好熱性アーキア *Pyrobaculum calidifontis* 由来色素依存性L-プロリン脱水素酵素 (ProDH) の機能解析，日本農芸化学会 2008年度大会，2009年03月27日，マリンメッセ福岡。

米田一成・櫻庭春彦・大島敏久・川村俊介・荒木朋洋・村岡郁夫・老川典夫
低温菌 *Flavonobacterium frigidimaris* KUX-1 由来 L-スレオニン脱水素酵素の構造解析, 日本農芸化学会, 2009 年 03 月 27 日, 福岡国際センター.

趙瑩・土居克実・櫻庭春彦・大島敏久

低温菌 *Sporosarcina psychrophila* DSM 3 由来の L-ロイシン脱水素酵素の精製と機能解析, 日本農芸化学会 2008 年度大会, 2009 年 03 月 27 日, マリンメッセ福岡.

岩井覚・福田耕才・土居克実・緒方靖哉

アルミニウムイオンに対する *Thermus* 属細菌の応答 (その 2), 日本農芸化学会 2008 年度大会, 2009 年 03 月 28 日, マリンメッセ福岡.

徳永雄平・福田耕才・土居克実・大桃定洋・野村善幸・緒方靖哉

Lactobacillus 属細菌のパウチ法 - サイレージにおける乳酸生産と硝酸還元能の検討, 日本農芸化学会 2008 年度大会, 2009 年 03 月 28 日, マリンメッセ福岡.

土居克実・藤野泰寛・大島敏久・緒方靖哉

地熱環境における高度好熱菌の生存とシリカ鉱物化, 日本農芸化学会 2008 年度大会, 2009 年 03 月 29 日, 福岡国際会議場.

4. 海外渡航

【家蚕遺伝子開発分野】

なし

【植物遺伝子開発分野】

佐藤 光 フランス, University of Science and Technology of Lille, 2008年08月

熊丸敏博 中国, 南京農業大学, 2008年11月

【微生物遺伝子工学分野】

海外出張・研修出張

大島, The University of Georgia (United States of America), 国際会議, 2008年10月～2008年10月

大島, Forschungsanlage Juelich, Institut fuer Biotechnologie 2 (Germany),

その他, 2008年04月～2008年04月

原, IRA (その他), 国際会議, 2008年11月～2008年11月

土居, カリフォルニア大学デービス校 (United States of America), その他, 2008年08月～2008年09月

土居, 大邱漢医大学校 (Korea), 国際会議, 2008年10月～2008年10月

土居, カトマンズ大学 (Nepal), 大学・研究所訪問, 2009年03月～2009年03月

5. 外国人来訪者

【家蚕遺伝子開発分野】

Hossain MD Tofazzal (Bangladesh Agricultural University, Bangladesh)

【微生物遺伝子工学分野】

Buckel, 訪問教授, Max-Planck Institute Marburg, Germany.

Wei Wen Su, 訪問教授, Hawaii 大学, United States of America.

IV. 遺伝子資源系統の保存・管理

遺伝子資源系統の分譲・収集

家蚕遺伝子開発分野

本センター保存のカイコの系統は遺伝学を中心とする研究のための実験生物として蒐集されているものである。保存系統はまずその主要目的形質によってアルファベットで分類し、それに2位数を附し系統番号としている（同一起源の分枝系は3位数）。分類記号の内容及びおよび、記号別保有数は以下の如くである。2002年7月からスタートした文部科学省ナショナルバイオリソースのカイコの中核拠点として本分野は活動している。それらは、下記の系統約500系統がコアとなっていって行なわれている。

p (地域型品種)	1 8	a (胚子, 幼虫期致死)	1 8
b (繭形・繭質)	1 7	c (繭色)	2 6
d (卵形・卵殻色)	3 0	e (卵色)	2 8
f (幼虫肢・斑紋)	3 7	g (幼虫斑紋)	1 6
i (幼虫眼紋・頭尾斑)	1 3	k (幼虫体色)	2 3
l (幼虫体色)	2 8	m (モザイク・畸形)	1 6
n (幼虫体形)	2 6	o (油蚕)	3 5
r (染色体異常・交叉率)	1 5	t (発育・眠性)	2 2
u (蛹・成虫)	2 0	w (連関分析用合成系)	2 7
x (分析未了の新突然変異)	1 3		

上記のほか淘汰育成中のもの並びに各種実験系があるが、これらは大文字の記号を用いて区別しており、ここには含まれていない。以下、各保存系統について解明された遺伝情報のほか、交配形式、起源及び導入元・発見・交雑の年次など主要な必要事項を記載する。蛋白質、酵素、染色体構成に関する情報の多くは本研究班によって解明されたものである。記載様式は系統番号、交配形

式（染色体構成）、卵・幼虫・繭・蛹・成虫の遺伝形質、備考として起源・品種・交雑系統及び主要形質の誘発処理源、入手先、年次の順であるが、特記事項のない項目については省略する。また、例えば *w-3^{oe}* では白卵、幼虫皮膚透明（油蚕）、蛹・成虫の複眼白色、と種々の発育段階で変異形質を発現するが、このような場合には“卵”の項にのみ記載している。交雑によりはじめて認知され得る形質、蛋白質・酵素等の多型、未淘汰の混在系、致死性により正常を常に分離するもの、等については（ ）内に記号で記入し、特殊形質を標識するための計画的分離形質は&で併記している。また、L、ms 等については発現環節番号を（ ）内に示す。尚、交雑系統は原則として現番号で表示し、現有しないものについては品種名或いは大文字の記号を用いた。他機関からの受入系統は主形質の起源を能う限り記したが、出現から導入までの経緯は定かでない。例えば a80 系統 {起源 春月系（カネボウ，× w31 × w32 × 190,1985 年）} はカネボウから春月系交雑種に生じた l-li を分離する系の分譲を受け、これに本センターで w31,w32 さらに 190 系統を 1985 年に交雑し Xan を標識形質として導入された育成系統であることを示す。遺伝子情報の詳細はナショナルバイオリソースプロジェクトのホームページに掲載している。

<http://www.shigen.nig.ac.jp/silkwormbase/index.jsp>

（分譲）

		2006	2007	2008
生物体での分譲	国内	676 件	574 件	738 件
	国外	14 件	122 件	30 件
DNA での分譲	国内	439 件	304 件	154 件
	国外	0 件	0 件	20 件

（開発）

広食性カイコ 73 系統：京都工芸繊維大学飼料の人工飼料利用

V. センター規程

九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター規程

(趣旨)

第一条 この規程は、九州大学農学部附属遺伝子資源研究センター（以下「センター」という。）の組織及び運営に関し必要な事項を定める。

(センターの目的)

第二条 センターは、遺伝子の保存、開発及び利用に関する研究を行うことを目的とする。

(分野)

第三条 センターに、次の分野を置く。

- 一 家蚕遺伝子開発分野
- 二 植物遺伝子開発分野
- 三 微生物遺伝子開発分野

(センターの長)

第四条 センターに長を置き、農学部の責任及び兼任の教員のうちから教授会の識を経て選定する。

2 センターの長は、センターの管理及び運営を総括する。

3 センターの長の任期は、二年とする。

4 センター長は、再任されることができる。

(運営委員会)

第五条 センターの管理運営に関する重要な事項を審議するため、遺伝子資源開発センター運営委員会（以下「運営委員会」という。）を置く。

第六条 運営委員会は、委員長及び次の各号に掲げる委員をもって組織する。

- 一 センターの専任の教官のうちから選ばれた者三人
- 二 農学科、農芸化学科、林学科及び食糧化学工学科の専任の教授及び准教授のうちから選ばれた者各一人
- 三 前二号に掲げる者以外の農学科の専任の教授、准教授及び講師のうちから選ばれた者一人

四 農学部附属農場及び演習林の専任の教授及び准教授のうちから選ばれた者各一人

五 農学研究科遺伝子資源工学専攻の専任の教授及び准教授のうちから選ばれた者一人

2 委員の任期は、二年とする。ただし、委員に欠員が生じた場合の後任者の任期は、前任者の残任期間とする。

3 委員は、再任されることができる。

4 委員は、農学部長が委嘱する。

第七条 委員長は、センターの長をもって充てる。

2 委員長は、運営委員会を召集し、その議長となる。

3 委員長に事故等があるときは、あらかじめ委員長の指名する委員がその職務を代行する。

第八条 運営委員会は、委員の過半数の出席がなければ、議事を聞き、議決をすることができない。

2 運営委員会の議事は、出席した委員の過半数をもって決し、可否同数のときは、議長の決するところによる。

(雑則)

第九条 この規程に定めるもののほか、センターの管理運営に関し必要な事項は、運営委員会の議を経て、センターの長が定める。

附則

1 この規程は、平成九年四月一日から施行し、平成九年四月十六日から適用する。

2 九州大学農学部附属遺伝子資源研究センター規程(昭和六十二年五月二十九日施行)は、廃止する。

VI. 英文摘要

INSTITUTE OF GENETIC RESOURCES

The institute of Genetic Resources had been established in May, 1987, and was then reorganized in April, 1997, within the Faculty of Agriculture, Kyushu University. The Institute is devoted to basic and applied studies on genetics with special interest in the stock maintenance of agriculturally important organisms. Silkworm, rice and fermentative microorganisms are chosen as the main materials from the viewpoint that their scientific researches have been carried out and developed chiefly in Japan. Emphasis has also been placed on studies at molecular level to contribute to the development of biotechnology and to establish gene libraries of these biological resources.

Silkworm Genetics Division

BANNO, Yutaka	Ph.D.	Associate Professor
YAMAMOTO, Koji	Ph.D.	Assistant Professor

- a) Linkage analysis of silkworm
- b) Mutagenesis and teratogenesis in silkworm
- c) Analysis of gene expression
- d) Maintenance of the mutant stocks
- e) Construction of a genetic linkage map of silkworm genome
- f) Cytological studies of the deficient and translocated chromosomes

Plant Genetic Division

SATOH, Hikaru	Ph.D.	Professor
KUMAMARU, Toshihiro	Ph.D.	Associate Professor

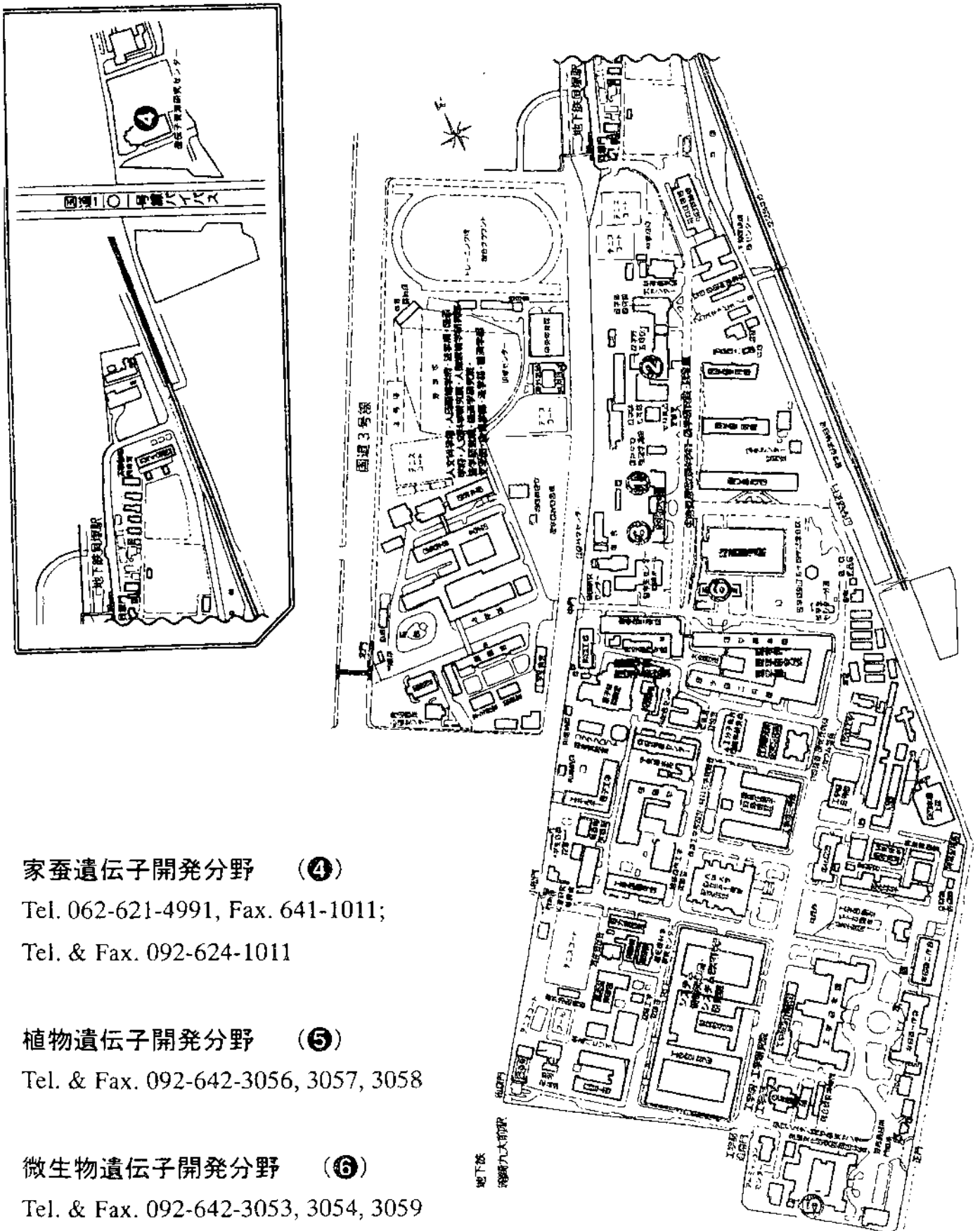
- a) Collection, evaluation and preservation of rice genetic resources
- b) Mutagenesis and mutation spectrum in rice
- c) Genetic analysis of induced mutants in rice: Starch, protein and lipid stored in grain
- d) Genome analysis of the useful genes in rice
- e) Isozyme variation in rice, barley and their relatives

Microbial Genetics Division

OHSHIMA, Toshihisa	Ph.D.	Professor
HARA, Toshio	Ph.D.	Associate Professor
DOI, Katsumi	Ph.D.	Associate Professor

- a) Screening of useful enzymes from Extremophiles
- b) Structural and functional analyses of extremozymes
- c) Genetics and breeding in industrial microorganisms (Gene manipulation, Gene cloning and analysis, Gene expression and regulation)
- d) Survey, development and preservation of microbial genetic resources (New enzymes and metabolites, Growth factors)
- e) Differentiation and antibiotics production in genus *Streptomyces* (Genetics, Gene expression, Bioactive substances)
- f) Bacteriophages and plasmids of industrial bacteria (Contamination and control, Functional analysis, Recombinant DNA, Vectors, Lytic enzymes)
- g) Cell free translation / glycosylation system (Post-proteomics, Glycoprotein, Cell extracts, High throughput)

Ⅶ. センター研究等配置図



家蚕遺伝子開発分野 (④)

Tel. 062-621-4991, Fax. 641-1011;

Tel. & Fax. 092-624-1011

植物遺伝子開発分野 (⑤)

Tel. & Fax. 092-642-3056, 3057, 3058

微生物遺伝子開発分野 (⑥)

Tel. & Fax. 092-642-3053, 3054, 3059

九州大学農学部

遺伝子資源開発研究センター年報

Annual Report of Institute of Genetic Resources,
Faculty of Agriculture, Kyushu University

第 12 号

平成 24 年 3 月 30 日発行

九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター

〒812-8581 福岡市東区箱崎 6 丁目 10 - 1

T E L 092 - 642 - 3053

印刷所 門司印刷株式会社

〒801-0851

北九州市門司区東本町 1 丁目 3 番 9 号

T E L 093 - 321 - 4081