

九州大学農学部遺伝子資源開発研究センター

第13号

二〇〇九年度

九州大学農学部
遺伝子資源開発研究センター

年報

第13号

2009

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

Number 13

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 13 号

平成 21 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	42
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	53
V. センター規程	57
VI. 英文摘要	59
VII. センター研究等配置図	61

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21年度）

センター長 麻生 陽一

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	テクニカルスタッフ	松坂 弘明
准教授	熊丸 敏博		原田 良子
		技術補佐員	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。

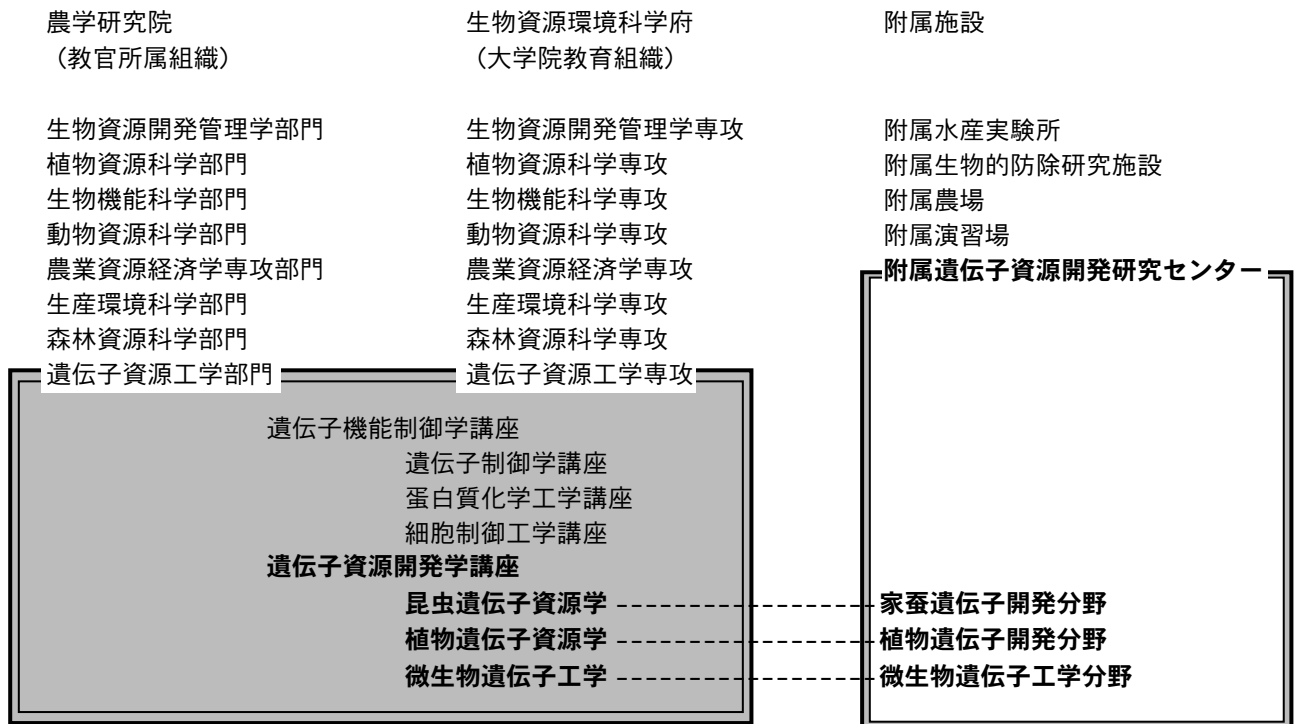
5. 運営委員会委員

（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

・上野由宣、岡田太郎、伴野豊、山本幸治、麻生陽一：熟蚕中腸膜画分における p29 を含むタンパク質複合体の変化, *Entomotech*, 33, 59-61, 2009 年 03 月.

・Kohji Yamamoto, Fumio Miake and Yoichi Aso, Satoshi Teshiba : Characterization of glutathione S-transferase of the saturniid moth, *Samia cynthia pryeri* (Lepidoptera: Saturniidae), *J. Appl. Entomol.* , 133, 278-283 , 2009 年 03 月.

・Yan Meng, Susumu Katsuma, Takaaki Daimon, Yutaka Banno, Keiro Uchino, Hideki Sezutsu, Toshiki Tamura, Kazuei Mita, and Toru Shimada : The silkworm mutant lemon (lemon lethal) is a potential insect model for human Sepiapterin reductase deficiency, *Journal of Biological Chemistry*, 284, 17, 11698-11705, 2009 年 04 月 .

・Kohji Yamamoto, Meredith Moomey, Malini Rajagopalan and Murty Madiraju : Facilitation of dissociation reaction of nucleotides bound to *Mycobacterium tuberculosis* DnaA, *J. Biochem.*, 143, 759-764, 2009 年 04 月 .

・Kohji Yamamoto, Yuichi Shigeoka, Yoichi Aso, Yutaka Banno, Makoto Kimura, Takashi Nakajima : Molecular and biochemical characterization of a Zeta-class glutathione S-transferase of the silkworm, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 94, 30-35, 2009 年 05 月 .

・ Kohji Yamamoto, Satoshi Teshiba and Yoichi Aso : Identification of glutathione S-transferase of the rice leaffolder moth, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera:Pyralidae): Comparison of its properties of glutathione S-transferases from other lepidopteran insects GST, *Pesticide Biochemistry and physiology*, 95,125-128,2009 年 5 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/>

植物遺伝子開発分野

A 原著論文

1)Y. Onda, T. Kumamaru, Y. Kawagoe. ER membrane-localized oxidoreductase Ero1 is required for disulfide bond formation in the rice endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 14156-14161 (2009)

2)T.Akasaka, N.T.Vu, K. Chaen, A.Nishi, H.Satoh, H.Ida, T.Omori, M.Kimura. The action of rice branching enzyme I (BEI) on starches. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2009)

3)K.C. She, H. Kusano, M. Yaeshima, T. Sasaki, H. Satoh, H. Shimada. Reduced rice grain production under high temperature stress is tightly correlated with ATP shortage during seed development. *Plant Biotechnology*, (2010)

4)A.Kubo, G.Akdogan, M.Nakaya, A.Shojo, S.Suzuki, H.Satoh and S.Kitamura. Structure, physical and digestive properties of starch from wx ae double mutant rice. *Agricultural*

and Food Chemistry (2010)

5)S.K.Hwang, A.Nishi, H.Satoh and T.W.Okita. Rice endosperm-specific plastidial -glucan phosphorylase is important for synthesis of short-chain malto-oligosaccharides. Archives of Biochemistry and Biophysics, (2010)

6)Kumamaru T., Y. Uemura, Y. Inoue, Y. Takemoto, S. U. Siddiqui, M. Ogawa, I. Hara-Nishimura and H. Satoh. Vacuolar processing enzyme plays an essential role in the crystalline structure of glutelin in rice seed. Plant and Cell Physiology 51, 38-46 (2010)

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

・ H. Yanai, K. Doi and T. Ohshima : *Sulfolobus tokodaii* ST0053 Produces a Novel Thermostable, NAD-Dependent Medium-Chain Alcohol Dehydrogenase, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, (6) , 1758-1763, 2009 年 04 月. (査読あり)

・ K. Doi, Y. Fujino, F. Inagaki, R. Kawatsu, M. Tahara, T. Ohshima, Y. Okaue, T. Yokoyama, S. Iwai, S. Ogata : Supersaturated silicic acid stimulated expression of a silica induced protein (Sip) in *Thermus thermophilus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 (8), 2406-2413, 2009 年 04 月. (査読あり)

・ K. Doi, Y. Nishizaki, Y. Fujino, T. Ohshima S. Ohmomo, S. Ogata : *Pepdiococcus lolii*

sp. nov. isolated from ryegrass silage, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59 (5) 1007-1010, 2009年05月。(査読あり)

・ K. Minamihata, M. Tokunaga, N. Kamiya, S. Kiyoyama, H. Sakuraba, T. Ohshima, M. Goto : Development of a novel immobilization method for enzymes from hyperthermophiles, *Biotechnol. Lett.*, 31, 1037-1041, 2009年07月。(査読あり)

・ Y. Tani, Y. Itoyama, K. Nishi, C. Wada, Y. Shoda, T. Satomura, H. Sakuraba, T. Ohshima, Y. Hayashi, T. Yabutani, J. Motonaka : An amperometric D-amino acid biosensor prepared with a thermostable D-proline dehydrogenase and a carbon nanotube-ionic liquid gel. *Anal. Sci.* 25, 919-924. 2009年07月。(査読あり)

・ M. Farahat, T. Hirajima, K. Sasaki, K. Doi : Adhesion of *Escherichia coli* onto quartz, hematite and corundum: Extended DLVO theory and flotation behavior. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 74 (1), 140-149 2009年11月。(査読あり)

・ R. Kawakami, H. Sakuraba, S. Goda S, H. Tsuge, T. Ohshima : Refolding, characterization and crystal structure of (S)-malate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*, *Biochim. Biophys. Acta*, 2009年11月。(査読あり)

・ K. Yoneda, J. Fukuda, H. Sakuraba, T. Ohshima : First crystal structure of L-lysine 6-dehydrogenase as an NAD-dependent amine dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, 2010年03月。(査読あり)

2. 原著論文要旨

家蚕遺伝子開発分野

J. Appl. Entomol.

Characterization of glutathione S-transferase in the saturniid moth, *Samia Cynthia pryeri* (Lep.: Saturniidae)

K. Yamamoto¹, F. Miake², Y. Aso¹ & S. Teshiba¹

¹ Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, Japan

² Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, Fukuoka, Japan

Keywords

Samia cynthia pryeri, glutathione, glutathione S-transferase, lepidopteran insects, lipid-peroxidation

Correspondence

K. Yamamoto (corresponding author), Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan. E-mail: yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp

Received: May 26, 2008, accepted: August 5, 2008.

doi: 10.1111/j.1439-0418.2008.01331.x

Abstract

An enzyme, which possesses glutathione S-transferase (GST) activity, has been found in the midgut of the saturniid moth, *Samia cynthia pryeri*. The enzyme was initially purified into homogeneity by ammonium sulphate fractionation, affinity chromatography, and ion-exchange chromatography. The resulting enzyme revealed a single band with a molecular mass of 23 kDa by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis under reduced conditions. When tested with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, a universal substrate of GST, the purified remnants had an optimum pH of 8.0 for enzymatic activity, and was fairly stable at pH 5–9 and at temperatures below 40°C. The enzyme was also responsive to 4-hydroxynonenal, a cytotoxic lipid-peroxidation product. The present GST was inhibited by organophosphorus and pyrethroid insecticides including fenitrothion, permethrin and deltamethrin.

Introduction

Glutathione S-transferases [GSTs, EC 2.5.1.18] are enzymes that catalyse the detoxification of xenobiotics and endogenous substances by fusing with reduced glutathione (GSH) (Listowsky et al. 1980; Armstrong 1997). To date, seven classes of mammalian GSTs have been identified. These are alpha, mu, pi, sigma, theta, zeta and omega. Differing in amino acid sequence; these GSTs reveal identities of about 50% within a class and <30% between different classes (Sheehan et al. 2001; Mannervik et al. 2005). In the case of dipteran insects, GSTs have been identified from various species mainly from the viewpoint of insecticide metabolism, and compared for their genomic sequences in the light of sequence databases determined recently for insects (Adams et al. 2000; Holt et al. 2002; Sawicki et al. 2003; Mita et al. 2004; Ranson and Hemingway 2005; Tu and Akgül 2005). In contrast, information on the GSTs of Lepidoptera is relatively scarce. We have characterized GSTs of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, a lepidopteran model insect (Yamamoto et al.

2005, 2006), and of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, one of most serious lepidopteran pests of broad-leaved trees (Yamamoto et al. 2007a,b). In the present paper, we are dealing with the GST of another lepidopteran species, the saturniid moth, *Samia cynthia pryeri*, which causes damage to the leaves of citrus, apple, sweet olive and camphor trees. Thus, it is useful to obtain data on GSTs, which will provide defense against crop damage. In this study, this enzyme, abbreviated as scGST, was purified and characterized to demonstrate detoxification abilities with pesticides. To the authors' knowledge, this may be the first report of *S. cynthia pryeri* GST.

Materials and Methods

Insects

Larvae of *S. cynthia pryeri* were collected from round-leaved holly trees in Fukuoka city (Fukuoka prefecture, Japan). These were dissected on ice, and the midgut was collected and kept at –80°C until used.

The Silkworm Mutant *lemon* (*lemon lethal*) Is a Potential Insect Model for Human Sepiapterin Reductase Deficiency*

Received for publication, January 21, 2009, and in revised form, February 18, 2009. Published, JBC Papers in Press, February 26, 2009; DOI: 10.1074/jbc.M900485200

Yan Meng¹, Susumu Katsuma¹, Takaaki Daimon¹, Yutaka Banno², Keiro Uchino³, Hideki Sezutsu³, Toshiki Tamura³, Kazuei Mita¹, and Toru Shimada^{1,4}

From the ¹Department of Agricultural and Environmental Biology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan, the ²Institute of Genetic Resources, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Science, Kyushu University, Hakazaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan, and the ³Transgenic Silkworm Research Center and ⁴Insect Sciences Department, National Institute of Agrobiological Sciences, Otsu 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan

Tetrahydrobiopterin (BH4) is an essential cofactor for aromatic acid hydroxylases, which control the levels of monoamine neurotransmitters. BH4 deficiency has been associated with many neuropsychological disorders. An inherited defect in BH4 biosynthesis is caused by the deficiency of sepiapterin reductase (SPR), which catalyzes the biosynthesis of BH4 from guanosine triphosphate at the terminal step. The human SPR gene has been mapped at the PARK3 locus, which is related to the onset of Parkinson disease. In this study, we report that mutant strains, *lemon* (*lem*) and its lethal allele *lemon lethal* (*lem^l*) with yellow body coloration, of the silkworm *Bombyx mori* could be used as the first insect model for human SPR deficiency diseases. We demonstrated that mutations in the SPR gene (*BmSpr*) were responsible for the irregular body coloration of *lem* and *lem^l*. Moreover, biochemical analysis revealed that SPR activity in *lem^l* larvae was almost completely diminished, resulting in a lethal phenotype that the larvae cannot feed and that die immediately after the first ecdysis. Oral administration of BH4 and dopamine to *lem^l* larvae effectively increased their survival rates and feeding abilities. Our data demonstrate that *BmSpr* plays a crucial role in the generation of BH4, and monoamine neurotransmitters in silkworms and the *lem* (*lem^l*) mutant strains will be an invaluable resource to address many questions regarding SPR and BH4 deficiencies.

Tetrahydrobiopterin (BH4)² is an essential cofactor for a number of enzymes, such as phenylalanine hydroxylase, tyrosine hydroxylase, tryptophan hydroxylase, and nitric-oxide synthase. These enzymes play an important role in the metabolism of aromatic amino acids and monoamine neurotransmitter biosynthesis (Fig. 1B) (1). Previous reports have shown that

BH4 deficiency is associated with numerous metabolic syndromes and neuropsychological disorders (2, 3). BH4 is synthesized from GTP through a cascade of three enzymes (i.e. GTP cyclohydrolase 1 (EC 3.5.4.16), 6-pyruvoyl-tetrahydropterin (PTP) synthase (EC 4.6.1.10), and sepiapterin reductase (SPR; EC 1.1.1.153)) (Fig. 1A).

SPR catalyzes the conversion of PTP to BH4 at the terminal step in the presence of reduced NADPH. It also catalyzes the reduction of sepiapterin (SP) to form BH4 by subsequent catalysis of dihydrobiopterin reductase (EC 1.6.99.7) (Fig. 1A). Mammalian SPRs have been a focus of study in recent years. The major symptoms of SPR deficiency are mental retardation, dystonia, spasticity, and movement disorder (1, 3). Diagnosis and therapy of SPR and/or BH4 deficiency-dependent genetic diseases, such as recessive DOPA-responsive dystonia and phenylketonuria, have been developed recently (3–5). Takazawa *et al.* (6) showed that the human SPR gene could be a causative gene for PARK3, the original reported pedigree of Parkinson disease (7). However, these findings are insufficient for developing treatments because patients from different families or regions exhibit distinct physiological and metabolic disorders due to SPR/BH4 deficiencies. Therefore, it is necessary to find or develop suitable models in other animals to obtain a better understanding of related human diseases. Recently, two groups generated *Spr* knock-out mice and concluded that these mice could be invaluable resources to address the issues regarding SPR/BH4 deficiencies (6, 8).

SPR has been previously purified from the silkworm *Bombyx mori*, and its activity in the fat body of normal larvae has been characterized (9, 10). However, the SPR gene (*BmSpr*) has not been identified yet in *B. mori*. *lemon* (*lem*) is a body color mutant of *B. mori*, which is regulated by a single recessive gene called *lem* (11). The *lem* silkworms display yellow body coloration during larval developmental stages, especially during molting, which is markedly different from that of wild-type strains (Fig. 2A). *lemon lethal* (*lem^l*) is a homozygous lethal allele of *lem*. The *lem^l* larvae grow normally in the first instar. After the first ecdysis, the *lem^l* larvae stop feeding, shake their heads frequently, and die within 3 days (Fig. 2, B and C) (12). *lem* (*lem^l*) was mapped onto the proximal end of the third linkage group of *B. mori* (11); however, the candidate gene itself remains unknown to date. Previous studies have shown that a large amount of yellow pteridines, SP, and sepiapterin accumu-

* This work was supported by a Grant-in-aid for Scientific Research 17018007 (to T. S.) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, the Professional Program for Agricultural Bioinformatics from Japan Science and Technology Agency, and Japan Society for the Promotion of Science Postdoctoral Fellowship for Foreign Researchers Grant P07427 (to Y. M.).

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EMBL Data Bank with accession number(s) AB465548–AB465551.

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 81-3-5841-5057; Fax: 81-3-5841-5089; E-mail: shimada@ssl.azb.a.u-tokyo.ac.jp.

² The abbreviations used are: BH4, tetrahydrobiopterin; PTP, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin; SP, sepiapterin; SPR, sepiapterin reductase; ORF, open reading frame; RT, reverse transcriptase; nt, nucleotide(s); aa, amino acid(s).

Facilitation of Dissociation Reaction of Nucleotides Bound to *Mycobacterium tuberculosis* DnaA

Kohji Yamamoto^{1,2*}, Meredith Moomey², Malini Rajagopalan²
and Murty V.V.S. Madiraju²

¹Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Science, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan; and ²Biomedical Research, The University of Texas Health Center at Tyler, Tyler, TX 75708-3154, USA

Received November 14, 2007; accepted February 14, 2008; published online February 22, 2008

Acidic phospholipids have been shown to promote dissociation of bound nucleotides from *Mycobacterium tuberculosis* DnaA (DnaA₇₇₃) purified under denaturing conditions [Yamamoto *et al.*, (2002) Modulation of *Mycobacterium tuberculosis* DnaA protein-adenine-nucleotide interactions by acidic phospholipids, *Biochem. J.*, 363, 305–311]. In the present study, we show that a majority of DnaA₇₇₃ in non-overproducing cells of *M. tuberculosis* is membrane associated. Estimation of phospholipid phosphorus following chloroform:methanol extraction of soluble DnaA₇₇₃ purified under native conditions (nDnaA₇₇₃) confirmed the association with phospholipids. nDnaA₇₇₃ exhibited weak ATPase activity, and rapidly exchanged ATP for bound ADP in the absence of any added phospholipids. We suggest that the outcome of intra-cellular DnaA₇₇₃-nucleotide interactions, hence DnaA₇₇₃ activity, is influenced by phospholipids.

Key words: ADP, ATP, ATPase, DNA replication, mycobacteria.

Abbreviations: *oriC*, origin of replication; Trx, thioredoxin; PEI, polyethyleneimine.

Tuberculosis is one of the most globally prevalent infectious diseases and accounts for ~3 million deaths each year. The causative agent *Mycobacterium tuberculosis*, a Gram-positive bacterium, is a slow grower with approximate doubling time of 24 h. The genus *Mycobacterium* includes other pathogens such as *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium leprae*, and non-pathogens such as *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium fortuitum*. The doubling times of these organisms range from 2 to 3 h (*M. smegmatis*, *M. fortuitum*) to 22–24 h (*M. tuberculosis*, *M. bovis*) to 185 h (*M. leprae*). The genetic and biochemical factors responsible for the differences in the growth rates of various mycobacteria are largely unknown.

Chromosomal DNA replication in bacteria is regulated at the initiation step, where the activity and quantity of the initiator DnaA protein is critically controlled (1–3). DNA replication in *Escherichia coli* is initiated by the binding of DnaA protein to the DnaA boxes in the *oriC*, the origin of chromosomal DNA replication, and these initial interactions result in the melting of the nearby A-T-rich region, thereby forming an open (initiation) complex (4, 5). DnaA protein then recruits the DnaB helicase–DnaC protein complex to form a pre-priming complex, which allows entry of primase and establishment of the replication forks.

Escherichia coli DnaA activity is proposed to be regulated by its binding of adenine nucleotides. DnaA protein has high affinity for ATP and ADP, and the

ATP-binding form of DnaA protein (ATP-DnaA) initiates DNA replication *in vitro*, whereas the ADP-binding form (ADP-DnaA) does not (6). Membrane phospholipids are believed to play a crucial role in the regulation of DnaA activity (7). They affect the dissociation of both ATP and ADP from DnaA and rejuvenate moribund DnaA in to an active species for the *oriC* (8, 9). Acidic phospholipids in a fluid membrane facilitate dissociation of ADP bound to DnaA protein *in vitro*, and the resultant free form of DnaA protein is reactivated through binding to ATP, which is present at high concentrations under physiological conditions.

The key elements involved in the initiation of *M. tuberculosis* DNA replication, namely *oriC* and DnaA, have been identified (10, 11). *Mycobacterium tuberculosis oriC* is 550-bp long (10) and recombinant DnaA₇₇₃ protein purified under denaturing conditions has been shown to associate with adenine nucleotides and *oriC* (12). DnaA₇₇₃ specifically recognizes DnaA boxes and dimethylsulphate footprinting revealed the presence of nine DnaA boxes that bear little or no sequence similarity to the five DnaA boxes of *E. coli oriC* (13). Acidic phospholipids have been shown to modulate DnaA₇₇₃ interactions with adenine nucleotide and *oriC* stabilizes DnaA₇₇₃-ATP interactions and promotes dissociation of DnaA₇₇₃-ADP complexes (12). Presumably, the interaction of DnaA₇₇₃ with phospholipids results in a decrease in the affinity of DnaA for ATP, *oriC* or both. Other results suggest that ADP-bound form of DnaA is not competent for binding and rapid oligomerization on *oriC* (13). Together, these results suggest that phospholipids regulate nucleotide bound state of DnaA and play important regulatory roles in *M. tuberculosis oriC*

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +81-92-621-4991, Fax: +81-92-624-1011, E-mail: yamamoto@agr.kyushu-u.ac.jp



Molecular and biochemical characterization of a Zeta-class glutathione S-transferase of the silkworm

Kohji Yamamoto*, Yuichi Shigeoka, Yoichi Aso, Yutaka Banno, Makoto Kimura, Takashi Nakashima

Faculty of Agriculture, Kyushu University Graduate School, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 October 2008
Accepted 18 February 2009
Available online 6 March 2009

Keywords:
Bombyx mori
Glutathione
Glutathione S-transferase
Lepidoptera
Lipid peroxidation

ABSTRACT

A cDNA encoding Zeta-class GST of the silkworm, *Bombyx mori* (bmGSTZ), was cloned by a reverse transcriptase-polymerase chain reaction. The resulting clone was sequenced and deduced for amino acid sequence, which revealed 45–50% identities to Zeta-class GSTs from other organisms. A recombinant protein (rbmGSTZ) was functionally overexpressed in *Bombyx mori* cells in a soluble form and purified to homogeneity. rbmGSTZ was able to catalyze the biotransformation of glutathione with dichloroacetic acid. We found that the present GST-catalyzed dechlorination of permethrin and distributed abundantly in silkworm strain exhibiting permethrin resistance. Our results suggest that bmGSTZ could contribute to permethrin resistance in lepidopteran.

© 2009 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) [1,2]. There have been seven classes of mammalian GSTs, Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega, and Zeta [3]. Whereas, six different GST classes, designated Delta, Epsilon, Sigma, Theta, Omega, and Zeta [4,5], have been found in dipteran insects. Although GSTs have been identified from insect species mainly from the viewpoint of insecticide metabolism [6–8], the molecular identity of lepidopteran GSTs has not been investigated in comparison with those in the dipteran species. Detoxification of DDT with dehydrochlorination was shown to catalyze by GSTs [9], and GSTs detoxified lipid peroxidation products induced by pyrethroids [10]. However, GSTs have not been directly responsible for the metabolism or degradation of pyrethroid insecticides. We have characterized GSTs of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, a lepidopteran model insect [11,12], and of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, one of most serious lepidopteran pests for broad-leaved trees [13]. In this study, we focus on a novel GST (Zeta-class GST) of the silkworm, *B. mori* (bmGSTZ). There has been no relationship between Zeta-class GST and insecticide metabolism in other species. A cDNA encoding this enzyme, abbreviated as bmGSTZ, was sequenced and overexpressed as a recombinant protein in *Escherichia coli* cells to investigate its

properties. Furthermore, the expressions of bmGSTZ and its mRNA were examined. A lot of agricultural insect pests are lepidopteran. As the 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* were reared on mulberry leaves at the Institute of Genetic Resources, Kyushu University (Fukuoka, Japan). These were dissected on ice, and the 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 Sepasol-RNA 1 (Nacal Tesque) according to the manufacturer's instructions. Total proteins were prepared by homogenization of the tissues dissected with PBS containing 0.1% Triton X-100.

2.2. Cloning and sequencing of the cDNA encoding bmGSTZ

Total RNA isolated from the fat body of the larvae was subjected to the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). First-strand cDNA was produced using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) and an oligo-dT primer. The resulting cDNA was used as a template to amplify a DNA fragment by PCR with the following two oligonucleotide primers: 5'-GAA TTGATATGGTTGAAATCGTGTGATT-3' (sense) and 5'-CCCGATCCT

* Corresponding author. Fax: +81 92 624 1011.
E-mail address: yamamoto@agr.kyushu-u.ac.jp (K. Yamamoto).



Characterization of glutathione S-transferase of the rice leaffolder moth, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae): Comparison of its properties of glutathione S-transferases from other lepidopteran insects

Kohji Yamamoto*, Satoshi Teshiba, Yoichi Aso

Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakosaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 January 2008
Accepted 10 July 2008
Available online 22 July 2008

Keywords:
Cnaphalocrocis medinalis
Glutathione S-transferase
Chlorobenzene
Lepidopteran insects
Lipid peroxidation

ABSTRACT

An enzyme that possesses the glutathione S-transferase (GST) activity was found in the rice leaffolder moth, *Cnaphalocrocis medinalis*. The enzyme was purified to homogeneity for the first time by ammonium sulfate fractionation and affinity chromatography. The resultant enzyme revealed a single band with a molecular mass of 24 kDa by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reduced conditions. When assayed with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, a universal substrate for GST, the purified GST had an optimum pH at 8.0, and was fairly stable at pH 3–10 and at temperatures below 50 °C. The enzyme was also able to conjugate glutathione to 4-hydroxynonenal, a cytotoxic lipid peroxidation product. The present GST was inhibited by fenitrothion, permethrin, and deltamethrin, suggesting that the GST could be involved in metabolizing these organophosphorus and pyrethroid insecticides.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Glutathione S-transferases [GSTs, EC 2.5.1.18] are enzymes that catalyze the detoxification of xenobiotics and endogenous substances by conjugating with reduced glutathione (GSH) [1,2]. There have been known to date seven classes of mammalian GSTs, Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Zeta, and Omega differing in amino acid sequence; these show the identities of about 50% within a class and less than 30% between different classes [3,4]. In the case of insects, GSTs have been identified from various species mainly from the viewpoint of insecticide metabolism, and compared for their genomic sequences in the light of the sequence databases determined recently for insects [5–7]. As a result, six different GST classes, designated Delta, Sigma, Epsilon, Theta, Omega, and Zeta [8,9], have been found in dipteran insects. It was notable that 12 Delta-, two Sigma-, eight Epsilon-, two Theta-, one Omega-, and one Zeta-class GSTs were found in *Anopheles gambiae* [9], whereas 11 Delta-, one Sigma-, 10 Epsilon-, four Theta-, four Omega-, and two Zeta-class GSTs were detected in *Drosophila melanogaster* [8,10]. In contrast, information on the GSTs of Lepidoptera is relatively scarce. We have characterized GSTs of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, a lepidopteran model insect [11,12], and of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, one of most serious lepidopteran pests for broad-leaved trees [13]. In the present paper, we deal with a

GST of another lepidopteran species, the rice leaffolder moth, *Cnaphalocrocis medinalis*, which is a worldwide voracious insect pest for crop leaves [14] and, in our institute, often causes damage to rice field. This enzyme, abbreviated as cmGST1, was purified and characterized to show detoxification ability for pesticides. To the authors' knowledge, this may be the first report of *C. medinalis* GST.

2. Materials and methods

2.1. Insects and purification of cmGST1

Adults of *C. medinalis* were collected in the rice field of the institute of Genetic Resources, Kyushu University Graduate School, Fukuoka, Japan. These were frozen and then kept at –80 °C until used. Unless otherwise noted, all operations below were performed at 4 °C. The frozen specimens were homogenized in ice-cold phosphate buffered saline (PBS) containing 0.1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride. The supernatant was clarified by centrifugation at 10,000g for 20 min and was used as the crude lysate. Ammonium sulfate was added to the supernatant up to 30% saturation and the precipitate was removed by centrifugation at 10,000g for 20 min. Additional ammonium sulfate was added to the supernatant up to 70% saturation. The pellet was collected by centrifugation and was redissolved with PBS. The resultant solution was dialyzed against the same buffer at 4 °C for 12 h. After centrifugation, the supernatant was loaded onto a Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences) column that has been

* Corresponding author. Fax: +81 92 624 1911.
E-mail address: yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp (K. Yamamoto).



Note

The Action of Rice Branching Enzyme I (BEI) on Starches

Taiki AKASAKA,¹ Nhuan Thi VU,¹ Kimiko CHAEN,¹ Aiko NISHI,² Hikaru SATOH,² Hiroko IDA,³ Toshiro OMORI,³ and Makoto KIMURA^{1,*}¹Laboratory of Biochemistry, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan²Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan³Frontier Research Center, Sanwa Shurai Co., Ltd., 2231-1 Yamamoto, Usa, Oita 879-0495, Japan

Received May 18, 2009; Accepted August 11, 2009; Online Publication, November 7, 2009

[doi:10.1271/bbb.90352]

The rice branching enzyme I (BEI) overproduced in *Escherichia coli* cells was investigated with respect to action on starches. BEI treatment decreased the turbidity of starch suspensions with distinct pasting behaviors from a native starch. This result suggests the great potential of BEI as a molecular tool for the production of a novel glucan polymer.

Key words: branching enzyme; cyclic glucan; *Oryza sativa*; pasting property; starch

Since branching enzyme (BE) is the sole enzyme that catalyzes the formation of α -1,6-glucosidic linkages of branch points, it plays an important role in the formation of the structure of starch in plants and of glycogen in animals and bacteria. More than a dozen BEs have been identified in a variety of organisms and characterized in terms of biochemical and structural properties.^{1,2)}

Apart from biochemical interest in BEs, the current interest in these enzymes is their use in the production of novel glucan polymers. It has been reported that the *Bacillus stearothermophilus* glycogen BE catalyzes cyclization of the α -1,4-glucan chain of the amylose molecule to form an α -1,6-glucosidic linkage.³⁾ Furthermore, highly branched amylose was prepared by incubating amylose with the *B. subtilis* 168 glycogen BE.⁴⁾ Although bacterial BEs have been used to produce modified starches, very few cases have been reported of starch BEs of plant origin.

In rice endosperm, there are three isozymes of branching enzymes, BEI, BEIIa, and BEIIb, which are encoded by distinct genes (for a review, see ref. 5). In a previous study, we overproduced BEI in *Escherichia coli* cells, and the recombinant BEI (rBEI) was characterized with respect to biochemical and crystallographic properties.⁶⁾ In this study, we further investigated its effects on starch.

rBEI was overproduced and purified by anion-exchange chromatography to homogeneity as described previously.⁶⁾ The enzymatic activity of rBEI was evaluated in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) using amylose (Type III) and amylopectin (Sigma, St. Louis, MO), as substrates as described previously, with a slight modification.³⁾ When 1 unit was defined as the amount of the enzyme that decreases the absorbance of the substrate-iodine complex by 1% per min, specific

activities were 12,258 U/mg and 1,229 U/mg towards amylose and amylopectin respectively. Starches from cassava (tapioca), corn, wheat, and potato were obtained from Chok Chai Starch (Bangkok, Thailand), Shikishima Starch (Mie, Japan), Glico Foods (Boston, MA), and JA Ohotsuku-Abashiri (Abashiri, Japan) respectively. We first examined an enzymatic effect of rBEI on starches. One g of starch granules (3% suspension) from tapioca, corn, wheat, and potato was digested with rBEI (0.5 mg) at 30°C for the indicated durations. Then the turbidity of the resulting digests was measured at a wave-length of 660 nm. Digestion apparently decreased the turbidity for all starch suspensions (Fig. 1). In particular, tapioca appeared to be modified significantly, becoming transparent, as shown in Fig. 1.

We have found that rBEI catalyzed the chain transfer of the chain length of 7–12 and 27–37 glucose units for starch granules from wheat and potato.⁶⁾ To characterize the rBEI effects on tapioca, the chain length distribution of the modified tapioca was analyzed. Tapioca (1 g) was treated with rBEI (0.5 mg), and the reaction was followed by isoamylase digestion. Then the chain-length distribution of the resulting products was examined using the P/ACE MDQ Carbohydrate System (Beckman Coulter, Fullerton, CA), as described by Nakamura *et al.*⁷⁾ As shown in Fig. 2, after incubation of tapioca with rBEI and debranching with isoamylase, the proportions of chains with $6 < DP < 12$ and $28 < DP < 43$ of the products were elevated, while those of chains with $13 < DP < 27$ and $DP > 44$ were depressed. A similar pattern of changes in the chain profiles was observed in the reaction products of starch granules from wheat and potato.⁶⁾ However, the differences between the products treated with rBEI and without rBEI for tapioca were smaller than those observed for potato and wheat previously.⁶⁾ This finding as well as the drastic decrease in turbidity described above might be attributable to a physicochemical property of tapioca. Nevertheless, the present result indicates that rBEI, like wheat and potato, preferentially catalyzes the chain transfer of chain lengths of 6–12 and 28–43 glucose units of tapioca.

In addition to inter- and intra-chain branching reactions, bacterial BE is known to catalyze the cyclization reaction of the α -1,4-glucan chain of the amylose molecule to form an α -1,6-glucosidic linkage: the yield of the glucoamylase-resistant glucans produced

* To whom correspondence should be addressed. Tel/Fax: +81-92-642-2853; E-mail: mkimura@agr.kyushu-u.ac.jp



Original paper

Rice endosperm-specific plastidial α -glucan phosphorylase is important for synthesis of short-chain malto-oligosaccharidesSeon-Kap Hwang^a, Aiko Nishi^b, Hikaru Satoh^b, Thomas W. Okita^{a,*}^a Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, WA99164-6340, USA^b Plant Genetic Resources, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 November 2009
and in revised form 24 December 2009
Available online 4 January 2010

Keywords:

 α -Glucan phosphorylase
Malto-oligosaccharide
Pho1
Rice endosperm
Starch phosphorylase
Starch synthesis

ABSTRACT

Previous genetic studies have indicated that the type I α -glucan phosphorylase (Pho1) has an essential role during the initiation process of starch biosynthesis during rice seed development. To gain insight into its role in starch metabolism, we characterized the enzymatic properties of the Pho1 recombinant form. Pho1 has significantly higher catalytic efficiency toward both linear and branched α -glucans in the synthesis direction than in the degradation direction with equilibrium constants for the various substrates ranging from 13 to 45. Pho1 activity is strongly inhibited by its own reaction product (Pi) in the synthesis reaction ($K_i = 0.69$ mM) when amylopectin is the primer substrate, but this inhibition is less pronounced ($K_i = 14.2$ mM) when short α -glucan chains are used as primers. Interestingly, even in the presence of Pi alone, Pho1 not only degrades maltohexaose but also extends them to synthesize longer MOSs. Production of a broad spectrum of MOSs (G4–G19) was stimulated by both Pi and Glc1P in an additive fashion. Thus, even under physiological conditions of high Pi/Glc1P, Pho1 extends the chain length of short MOSs which can then be used as subsequent primer by starch synthase activities. As ADP-glucose strongly inhibits Pho1 activity, Pho1 likely operates only during the initial stage and not during maturation phase of starch synthesis.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

α -Glucans, i.e. starch and malto-oligosaccharides (MOSs), constitute one of the most abundant renewable energy resources from plants. Starch is synthesized, modified and degraded in plastids of source and sink tissues in response to various physiological needs. The metabolic network for starch synthesis involves a number of enzymes which are functionally interconnected: ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase)¹, starch synthases (SSI, SSII, SSIII, and SSIV), granule-bound starch synthases (GBSSI and GBSSII), starch branching enzymes (SBEI and SBEII), and debranching enzymes (DBEs) [1–4]. Although starch phosphorylase (α -glucan phosphorylase, Pho) is readily apparent in starch containing organs, its role in starch metabolism remains largely undefined although recent genetic evidence denote its involvement in starch accumulation in developing rice seeds [5].

Pho (EC 2.4.1.1) catalyzes a reversible reaction, (α -1,4-linked glucose)_n + glucose-1-phosphate \rightleftharpoons (α -1,4-linked glucose)_{n+1} + orthophosphate. Plants contain two major Pho forms: the plastidial

Pho1 or PhoL (low glycogen affinity) encoded by the *PHO1* gene and a cytosolic Pho2 or PhoH (high glycogen affinity) encoded by the *PHO2* gene [6]. Consistent with its higher affinity to glycogen, Pho2 has higher sequence homology to glycogen phosphorylases from bacteria and animal cells than Pho1. In addition to its lower sequence homology to non-plant forms, Pho1 has an additional 80 amino acid (L80) region in the middle of its primary sequence which is suggested to be a target for proteinase and protein kinase activities [7,8]. When the region was nicked by a protease activity during root maturation in sweet potato, the kinetic properties were altered favoring the degradation of starch [7]. The two *PHO* genes also show different expression patterns in plant tissues. *PHO1* expression is readily conspicuous in starch accumulating organs such as developing rice endosperm [5], potato tubers [9] and *Arabidopsis* leaves [10], whereas *PHO2* gene is ubiquitously expressed at low levels in most tissues examined [5,9,10]. Interestingly, activity staining result shows that Pho1 protein is not detected in source tissues (leaf sheath, leaf blade, and culm) of rice plants. Contrary to BEI, BEII, and GBSSI which are found on starch granules, Pho1 protein is not associated with starch granules in rice endosperm [5]. It may form a multi-protein complex with the branching enzymes (BEI and BEIIb) as found in protein extracts from amyloplast stroma of wheat developing seed when ATP is added separately [11].

The enzyme's low affinity to Glc1P and the relatively high Pi/Glc1P ratio in plant cells suggest that the phosphorolysis (degrada-

* Corresponding author. Fax: +1 509 335 7643.

E-mail address: okita@wsu.edu (T.W. Okita).

¹ Abbreviations used: AGPase, ADP-glucose pyrophosphorylase; AGPPase, ADP-glucose pyrophosphatase; APTS, 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid; DTT, dithiothreitol; Glc1P, glucose 1-phosphate; MES, 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid; MOS, malto-oligosaccharide; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; SDS, sodium dodecyl sulfate.

Original Paper

Reduced rice grain production under high-temperature stress closely correlates with ATP shortage during seed development

Kao-Chih She^{1,†}, Hiroaki Kusano^{1,†}, Mitsuhiro Yaeshima¹, Tadamasa Sasaki¹, Hikaru Satoh², Hiroaki Shimada^{1,*}

¹ Department of Biological Science and Technology, Tokyo University of Science, Noda, Chiba 278-8510, Japan;

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

* E-mail: shimadah@rs.noda.tus.ac.jp Tel: +81-4-7124-1501 FAX: +81-4-7124-1841

Received November 10, 2009; accepted December 4, 2009 (Edited by M. Sekine)

Abstract High-temperature stresses during seed development reduces rice grain yield and causes poor milling quality because of insufficient grain filling. We monitored the progress of seed enlargement and the fluctuation in ATP content during seed development. When the rice cultivars Nipponbare and Taichung-65 seeds were developed in a high-temperature condition, a shortage in the amount of ATP was detected in the early and middle stages of seed development. This observation suggested that high temperature caused the insufficient accumulation of storage substances leading to the formation of small seeds along with chalky or white core endosperm. The *flo2* mutant, which is thought to lack a regulatory factor for storage starch biosynthesis, produced chalky endosperm that resembled the typical phenotype of the high-temperature ripening-grain. The *flo2* mutant exhibited a shortage of ATP content in immature seeds, suggesting that the gene responsible for the *flo2* mutation is also involved in ATP production during seed development. In contrast, Kinmaze seeds maintained sufficient ATP content and their features did not differ significantly between mature grains developed in the normal- and high-temperature environments. These findings suggest that Kinmaze has some trait that is involved in the tolerance to high-temperature stress.

Key words: High-temperature ripening, seed development, rice, whole white and white core endosperm.

The activity of grain production is sensitive to abiotic stresses such as high or low temperature and submergence or desiccation. The upcoming global warming will cause high-temperature stress during the grain-filling stage, which will reduce crop yield and quality (Peng et al. 2004). The panicles are extremely sensitive in the developing stage (Tashiro and Wardlaw 1991; Morita et al. 2004). During seed development, many features of the rice grains are changed by a high-temperature environment, and the grains may display chalky texture, milky appearance, and lower grain weight (Yamakawa et al. 2007). This phenomenon is considered to be caused by the formation of large airspaces in the endosperm because of the insufficient growth of starch granules (Tashiro and Wardlaw 1991; Zakaria et al. 2002). In high-temperature ripening, expression of multiple genes, such as those for starch biosynthesis in the endosperm, is repressed, resulting in reduced amylose content and aberrant amylopectin structure (Yamakawa et al. 2007).

Many rice mutants show peculiar grain features that resemble those harmed by high-temperature stress. Five

rice *floury* mutants seem to mimic the chalky endosperm seen in high-temperature-ripened grain (Satoh and Omura 1981; Kaushik and Khush 1991). Among them, the *flo2* mutant is unique because of the reduced expression of multiple genes involved in storage starch biosynthesis. This suggests that the *flo2* mutant has a defect in the activity of some regulatory network that influences multiple cellular functions and that the gene responsible for the *flo2* mutation encodes a regulatory factor (Kawasaki et al. 1996).

Cold stress increases the expression of the genes for mitochondrial adenosine triphosphate (ATP) synthesis and electron transport (Byun et al. 2009). Microarray data on high-temperature-ripened rice seeds (Yamakawa et al. 2007) show decreased expression of genes predicted to function in ATP synthesis. ATP is a representative energy compound that is essential for multiple cellular functions. We analyzed the relationship between the process of seed enlargement and fluctuations in ATP content in developing seeds and compared these between three rice cultivars and the *flo2* mutant, which had been ripened at high-temperature. Here, we report on

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; DAF, days after flowering.

[†] The first two authors contributed equally to this work.

This article can be found at <http://www.jspcmb.jp/>

Structure, Physical, and Digestive Properties of Starch from *wx ae* Double-Mutant Rice

AKIKO KUBO,^{†,§} GURAY AKDOGAN,[†] MAKOTO NAKAYA,[†] AIKO SHOJO,[†]
 SHIHO SUZUKI,^{†,||} HIKARU SATOH,[‡] AND SHINICHI KITAMURA^{*,†}

[†]Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, Sakai, Osaka 599-8531, Japan, and [‡]Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan. [§]Present address: Ezaki Glico Co., Ltd., Nishiyodogawa, Osaka 555-8502, Japan.
^{||} Present address: International Polysaccharide Engineering (IPE), Inc., Sakai, Osaka 599-8570, Japan.

Amylopectin is the principal component of starch. The *amylose extender* (*ae*) gene encodes the starch-branching enzyme IIb, which is critical in determining the fine structure of endosperm starch. To determine the relationship between the fine structure of amylopectin and its physical properties, rice mutant lines defective in the *ae* function with altered fine structure of amylopectin and in combination with the *waxy* (*wx*) background were selected for comparative studies with primary wild-type and *ae* starches. The *ae* mutant endosperms accumulated a high amylose content starch with long amylopectin chains. The *ae* and *wx ae* starches showed no significant difference in the unit chain-length distribution of amylopectin and starch granule morphology. The *wx ae* starch displayed a higher pasting temperature and higher peak viscosity. The gelatinization peak temperatures of the *wx*, *ae*, and *wx ae* starches were 2.2, 13.1, and 17.1 °C higher, respectively, than that of the wild-type starch, and the *wx ae* starch showed a retrogradation peak with a shorter cooling period than that of *ae* starch. The raw *ae* and *wx ae* starches were almost indigestible by α -amylase *in vitro*. Rats fed the *wx ae* starch showed slowly increasing blood glucose at a lower level than the rats fed the *wx* or wild-type starch. These results indicate that the primary structure of the rice *wx ae* amylopectin with enriched long chains changes the granular structure of the starch, including its crystal structure, and results in resistance to *in vitro* or *in vivo* degradation.

KEYWORDS: Amylopectin fine structure; rice; mutant; starch; *amylose extender*; *waxy*

INTRODUCTION

Starch serves a fundamental role in the life cycle of plants as the carbohydrate storage substance and the most important energy reserve in the human diet. Starch consists of two major components: amylose and amylopectin. Amylose has mainly linear molecules with α -1,4-linked D-glucosyl units and a few branches of α -1,6 linkages (*1*), whereas amylopectin is a highly branched molecule consisting of short amylose chains connected with α -1,6 linkages (*1, 2*).

One maize mutant, the *amylose extender* (*ae*) mutant, produces starch with amylose and amylopectin branch chains significantly longer than those of normal maize starch (*3–10*), as a result of a defective branching enzyme IIb function in starch synthesis (*11, 12*). The maize *ae* mutant starch shows a higher gelatinization temperature and B-type crystallinity similar to potato starch, whereas cereal starch generally shows A-type crystallinity. The amylose/amylopectin ratio and amylopectin fine structure have a significant impact on the physical properties of starch. As with the maize *ae* mutation, biochemical and genetic analyses of the rice *ae* mutation showed that the *ae* starch has a higher gelatinization temperature and contains a larger amount of amylose and

amylopectin with longer chains than wild-type starch, as a result of branching enzyme IIb deficiency (*13–15*). To eliminate the effects of amylose on the physical and structural properties of starch granules in the *ae* mutant, we tested starch from the amylose-free *ae* mutant line *wx ae*, which was produced by crossing the *ae* and *waxy* (*wx*) mutants (*15, 16*). This starch needs a higher urea concentration to gelatinize because of the enriched long chains in its amylopectin fine structure. These observations suggest that the *ae* and *wx ae* mutants might be useful in understanding not only the function of branching enzymes in starch biosynthesis but also the properties of starch as a novel material for food and industrial applications.

Resistant starch is defined as the part of starch that cannot be digested in the small intestine (*17*) and is classified into four types: (I) tissue entrapped starch, (II) native raw starch granules having the B-type polymorphism and resistant to enzyme hydrolysis, (III) retrograded amylose, and (IV) chemically modified starch. Maize high-amylose starch is classified as type-II-resistant starch, and rice *ae* starch is likely to be classified similarly. The glycemic index (GI), which characterizes the carbohydrate in foods, is ranked on the basis of the postprandial increase in blood glucose (*18*). By virtue of the slow digestion and absorption of their carbohydrate, low GI foods produce a more gradual rise in

*To whom correspondence should be addressed. Fax: +81-72-254-8163. E-mail: skita@bioinfo.osakafu-u.ac.jp.

Vacuolar Processing Enzyme plays an Essential Role in the Crystalline Structure of Glutelin in Rice Seed

Toshihiro Kumamaru^{1,*}, Yuji Uemura¹, Yoshimi Inoue¹, Yoko Takemoto^{1,4}, Sadar Uddin Siddiqui^{1,5}, Masahiro Ogawa², Ikuko Hara-Nishimura³ and Hikaru Satoh¹

¹Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki 6-10-1, Fukuoka, 812-8581 Japan

²Faculty of Human Life Science, Yamaguchi Prefectural University, Sakurabatake 3-2-1, Yamaguchi, 753-8502 Japan

³Department of Botany, Graduate School of Science, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8502 Japan

⁴Present address: National Institute of Crop Science, National Agriculture and Food Research Organization, Kannondai 2-1-18, Tsukuba, 305-8518 Japan

⁵Present address: Plant Genetic Resources Program, National Agricultural Research Center, Islamabad, 45500 Pakistan

*Corresponding author: E-mail, kumamaru@agr.kyushu-u.ac.jp; Fax, +81-92-642-3058

(Received September 2, 2009; Accepted November 13, 2009)

Regular Paper

To identify the function of genes that regulate the processing of proglutelin, we performed an analysis of *glup3* mutants, which accumulates excess amounts of proglutelin and lack the vacuolar processing enzyme (VPE). VPE activity in developing seeds from *glup3* lines was reduced remarkably compared with the wild type. DNA sequencing of the VPE gene in *glup3* mutants revealed either amino acid substitutions or the appearance of a stop codon within the coding region. Microscopic observations showed that α -globulin and proglutelin were distributed homogeneously within *glup3* protein storage vacuoles (PSVs), and that *glup3* PSVs lacked the crystalline lattice structure typical of wild-type PSVs. This suggests that the processing of proglutelin by VPE in rice is essential for proper PSV structure and compartmentalization of storage proteins. Growth retardation in *glup3* seedlings was also observed, indicating that the processing of proglutelin influences early seedling development. These findings indicate that storage of glutelin in its mature form as a crystalline structure in PSVs is required for the rapid use of glutelin as a source of amino acids during early seedling development. In conclusion, VPE plays an important role in the formation of protein crystalline structures in PSVs.

Keywords: Crystalline lattice structure • *Oryza sativa* L. • Protein storage vacuole • Seed • Storage protein • Vacuolar processing enzyme.

Abbreviations: ER, endoplasmic reticulum; MNU, *N*-methyl-*N*-nitrosourea; PB, protein body; PSV, protein storage vacuole; VPE, vacuolar processing enzyme.

The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to DDBJ under accession number AB109637.

Introduction

During seed development, most seed plants accumulate salt-soluble proteins, 11S and 7S globulins, or alcohol-soluble prolamin in protein bodies (PBs) or protein storage vacuoles (PSVs). However, rice accumulates two kinds of storage protein, glutelin and prolamin (Tanaka et al. 1980, Krishnan and White 1995). Glutelin, the dominant storage protein in rice, is homologous to leguminous 11S globulins and is accumulated in PSVs (Zhao et al. 1983). Unlike 11S globulins, however, rice glutelins are only soluble in a diluted acid solution. During seed development, rice glutelin polypeptides are initially synthesized on the endoplasmic reticulum (ER) membrane as 57-kDa proglutelin (Yamagata et al. 1982), which is then transported to the Golgi apparatus and finally to the PSVs (Krishnan et al. 1986, Yamagata and Tanaka 1986), where the proglutelin is cleaved to form acidic and basic subunits (Yamagata et al. 1982).

The PSVs of rice, which are irregularly shaped, accumulate glutelins and a small amount of globulins. The internal structure of the PSV is complex (Bechtel and Juliano 1980, Krishnan et al. 1992), and contains several protein inclusions, which appear to be composed of distinct glutelin aggregates with a crystalline lattice structure (Bechtel and Juliano 1980). Electron microscopy of protein inclusions within PSVs in monocot and dicot seeds suggests that most of the mature 11S globulins assemble to form protein crystalline structures within the PSVs.

In soybean (*Glycine max*), the 11S precursor, proglycinin, is transported into the large central vacuole (Sengupta et al. 1981) where it is proteolytically processed to a mature form. Each mature subunit of glycinin is composed of an acidic and a basic chain that are covalently linked via a single disulfide bond (Staswick et al. 1984). Cleavage of proglycinin is required for the subsequent assembly of proglycinin trimers into hexamers within the storage vacuoles, suggesting that the cleavage of the

Plant Cell Physiol. 51(1): 38–46 (2010) doi:10.1093/pcp/pcp165, available online at www.pcp.oxfordjournals.org

© The Author 2009. Published by Oxford University Press on behalf of Japanese Society of Plant Physiologists.

All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oxfordjournals.org

ER membrane-localized oxidoreductase Ero1 is required for disulfide bond formation in the rice endosperm

Yayoi Onda^a, Toshihiro Kumamaru^b, and Yasushi Kawagoe^{a,1}

^aDivision of Plant Sciences, National Institute of Agrobiological Sciences, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan; and ^bInstitute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan

Edited by Bob B. Buchanan, University of California, Berkeley, CA, and approved July 1, 2009 (received for review April 22, 2009)

The developing endosperm of rice (*Oryza sativa*, Os) synthesizes a large amount of storage proteins on the rough (r)ER. The major storage proteins, glutelins and prolamins, contain either intra or intermolecular disulfide bonds, and oxidative protein folding is necessary for the sorting of the proteins to the protein bodies. Here, we investigated an electron transfer pathway for the formation of protein disulfide bonds in the rER of the rice endosperm, focusing on the roles of the thiol-disulfide oxidoreductase, OsEro1. Confocal microscopic analysis revealed that N-glycosylated OsEro1 is localized to the rER membrane in the subaleurone cells, and that targeting of OsEro1 to the rER membrane depends on the N-terminal region from Met-1 to Ser-55. The RNAi knockdown of *OsERO1* inhibited the formation of native disulfide bonds in the glutelin precursors (proglutelins) and promoted aggregation of the proglutelins through nonnative intermolecular disulfide bonds in the rER. Inhibition of the formation of native disulfide bonds was also observed in the seeds of the *esp2* mutant, which lacks protein disulfide isomerase-like (PDIL)1;1, but shows enhanced OsEro1 expression. We detected the generation of H₂O₂ in the rER of the WT subaleurone cells, whereas the rER-derived H₂O₂ levels decreased markedly in EM49 homozygous mutant seeds, which have fewer sulfhydryl groups than the WT seeds. Together, we propose that the formation of native disulfide bonds in proglutelins depends on an electron transfer pathway involving OsEro1 and OsPDIL.

protein disulfide isomerase | seed storage protein | *esp2* | hydrogen peroxide | protein body

The developing endosperm of rice (*Oryza sativa*, Os) synthesizes a large amount of disulfide-bond-rich proteins, including 2 major groups of storage proteins, the acid- or alkaline-soluble glutelins and the alcohol-soluble prolamins. During seed development, these storage proteins are synthesized on the rough (r)ER and translocated into the rER lumen, where oxidative protein folding proceeds. Disulfide bond formation is necessary for the sorting of the proteins to the protein bodies (PBs) (1). The assembly of prolamins into the ER-derived PBs (PB-I) is stabilized by intermolecular disulfide bonds, whereas the glutelin precursors (proglutelins) form intramolecular disulfide bonds before being transported via the Golgi from the ER to the protein storage vacuole (PSV, also designated PB-II) (2–4).

Protein disulfide isomerase (PDI) is the principal catalyst for disulfide-linked protein folding in the ER lumen, functioning as the direct donor of disulfide bonds to nascent polypeptides by a thiol-disulfide exchange reaction (5). The activity of PDI depends on 2 pairs of Cys residues, each of which is found in the CGHC motif within a thioredoxin-like redox-active domain (5). The rice genome encodes 7 OsPDI-like (L) proteins containing 2 thioredoxin-like active domains with the CxxC motif, OsPDIL1;1-1;4 and OsPDIL2;1-2;3 (6). OsPDIL1;1 is an orthologue of *Zea mays* (Zm)PDIL1;1, which is by far the most highly expressed in the maize endosperm (6). Studies on the *OsPDIL1;1*-knockout rice mutant, *esp2*, showed that OsPDIL1;1 has an important role for the segregation of prolamins and proglutelins in the ER (7). Glutathi-

one constitutes the major small-molecule redox buffer in the ER. The redox state of the ER is more oxidative than that of the cytosol in eukaryotic cells. The ratio of reduced glutathione to oxidized form ([glutathione (GSH)]/[oxidized glutathione (GSSG)]) ranges from 1:1 to 3:1 in the ER, whereas it ranges from 30:1 to 100:1 in the cytosol (8). In the endosperm cells, which are devoted to the synthesis of disulfide-rich storage proteins, large amounts of reducing equivalents flux from the cytosol into the ER in the form of Cys residues during the synthesis of storage proteins, and storage proteins are sequestered from the ER lumen to the PBs. A key question is how the endosperm cells constantly establish the ER redox environment favorable for regeneration of oxidized PDIL; thus, facilitating oxidative folding of nascent polypeptides.

The flavoenzyme Ero1p was first identified in yeast by mutation studies of the temperature-sensitive conditional mutant *ero1-1*, which fails to support protein disulfide bond formation in the ER and consequently accumulates misfolded proteins (9, 10). Ero1p supplies oxidizing equivalents for disulfide bond formation in the ER, by relaying the oxidizing power from molecular oxygen to the reduced yeast Pdi1p (11–13). Ero1p directly oxidizes the active site of Pdi1p by thiol-disulfide exchange reactions with the oxidized shuttle Cys pair, Cys-100-Cys-105, the reduced form of which is reoxidized by the active-site Cys pair, Cys-352-Cys-355 (14–16). Ero1 proteins of different species characterized to date are all localized to the ER. However, the mechanisms for their ER retention appear to differ; yeast Ero1p is tightly associated with the ER membrane (9, 10), whereas human Ero1 α and Ero1 β are retained in the ER by covalent interactions with PDI and ERp44 (17). The cDNA clones encoding plant homologues of yeast Ero1p, *AERO1* and *AERO2*, have been isolated from *Arabidopsis thaliana* (18). In vitro translation analysis showed that these *Arabidopsis* Ero1 homologues are glycoproteins (18), but their localization in the cell has not been characterized.

In this study, we investigated the roles of OsEro1 protein as a source of protein disulfide bonds in the endosperm. The 3n endosperm cells are unique; the endosperm exhibits a high level of enzymatic activity to synthesize a vast amount of storage disulfide-rich proteins during early seed development; and the endosperm, but not the adjacent 2n embryo, is destined for programmed cell death during the subsequent seed desiccation and maturation phase. We studied the OsEro1 localization in the subaleurone cells by confocal microscopic and biochemical analyses, and demonstrated that the N-terminal region of OsEro1 functions as a rER membrane-targeting signal. We produced *OsERO1*-knockdown rice plants by inducing RNAi under the control of an endosperm-

Author contributions: Y.O. and Y.K. designed research; Y.O., T.K., and Y.K. performed research; Y.O. and Y.K. analyzed data; and Y.O. and Y.K. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: kawagoe@nias.affrc.go.jp.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0904429106/DCSupplemental.

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

Hisaki 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 ZnSO₄, 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.

1 **Supersaturated silicic acid stimulated expression of a silica induced protein (Sip)**
2 **in *Thermus thermophilus***

3

4 Katsumi Doi,^{1*} Yasuhiro Fujino,¹ Fumio Inagaki,¹ Ryouichi Kawatsu,¹ Miki Tahara,¹
5 Toshihisa Ohshima,¹ Yoshihiro Okau,² Takushi Yokoyama,² Satoru Iwai,³ and Seiya
6 Ogata³

7

8 *Department of Genetic Resources Technology, Faculty of Agriculture,¹ Department of*
9 *Chemistry, Faculty of Sciences,² Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku,*
10 *Fukuoka 812-8581, Japan, Department of Applied Microbial Technology, Faculty of*
11 *Bioscience, Sojo University, 4-22-1 Ikeda, Kumamoto 860-0082, Japan³*

12

13 * Corresponding author. Mailing address: Department of Genetic Resources Technology,
14 Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka
15 812-8581, Japan. Phone & Fax: 81 (0)92 642 3059. E-mail: doi@agr.kyushu-u.ac.jp

Development of a novel immobilization method for enzymes from hyperthermophiles

Kosuke Minamihata · Masamichi Tokunaga · Noriho Kamiya ·
Shiro Kiyoyama · Haruhiko Sakuraba · Toshihisa Ohshima ·
Masahiro Goto

Received: 30 January 2009 / Revised: 4 March 2009 / Accepted: 10 March 2009 / Published online: 29 March 2009
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

Abstract Peptide tags containing tyrosines (Y-tag) were introduced at the C-terminus of a hyperthermophilic enzyme, alkaline phosphatase from *Pyrococcus furiosus* (PfuAP). Immobilization of the recombinant PfuAPs onto water-in-oil-in-water (W/O/W) type

microcapsules was performed by an in situ polymerization method. All the recombinant PfuAPs prepared in this study were quantitatively immobilized onto microcapsules. The PfuAP-immobilized microcapsules showed no significant loss of enzymatic activity until the 5th round of assays. This result implies that the recombinant PfuAPs were covalently immobilized onto microcapsules. Immobilized PfuAP tagged with a Y-tag having the sequence GGYYY exhibited approximately a twofold higher catalytic activity compared with the wild-type PfuAP.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10529-009-9974-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

K. Minamihata · M. Tokunaga · N. Kamiya (✉) ·
M. Goto

Department of Applied Chemistry, Graduate School
of Engineering, Kyushu University, 744 Motoooka,
Fukuoka 819-0395, Japan
e-mail: nori_kamiya@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

N. Kamiya · M. Goto
Center for Future Chemistry, Kyushu University,
744 Motoooka, Fukuoka 819-0395, Japan

S. Kiyoyama
Department of Chemical Science and Engineering,
Miyakonojo National College of Technology,
Miyakonojo, Miyazaki 885-8567, Japan

H. Sakuraba
Department of Applied Biological Science, Faculty
of Agriculture, Kagawa University, Kagawa 761-0795,
Japan

T. Ohshima
Microbial Genetic Division, Institute of Genetic
Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University,
Fukuoka 812-8581, Japan

Keywords Enzyme · Hyperthermophilic enzyme ·
Immobilization · Microcapsules · Polymerization ·
Tyrosine · *Pyrococcus*

Introduction

Enzymes are employed in a range of biotechnology applications but, since most are soluble in water, their immobilization onto insoluble supports is often necessary for their separation and reuse, which broadens their practical utility (Sheldon 2007). In terms of stability, covalent attachment of enzymes onto support matrices reduces the loss of enzymes during use. In terms of activity, site-specific immobilization is favorable to retain catalytically active conformations of enzymes.

Rapid progress in genetic engineering makes the introduction of peptide-tags at the N- or C-terminus

An Amperometric D-Amino Acid Biosensor Prepared with a Thermostable D-Proline Dehydrogenase and a Carbon Nanotube-Ionic Liquid Gel

Yuji TANI,^{*1} Yukiko ITOYAMA,^{*1} Kenichi NISHI,^{*1} Chikahiro WADA,^{*1} Yoshio SHODA,^{*1} Takenori SATOMURA,^{*2} Haruhiko SAKURABA,^{*3} Toshihisa OHSHIMA,^{*4} Yukako HAYASHI,^{*1} Tomoki YABUTANI,^{*1†} and Junko MOTONAKA^{*1}

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

^{*2} Department of Materials Science, Yonago National College of Technology, 4448 Hikona, Yonago, Tottori 683-8506, Japan

^{*3} Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture & Graduate School of Agriculture, Kagawa University, 2393 Ikenobe, Miki, Kita, Kagawa 761-0795, Japan

^{*4} Microbial Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi, Fukuoka 812-8581, Japan

Carbon nanotube (CNT) gel, which is composed of a mixture of single-wall CNT, an ionic liquid, and a thermostable D-proline dehydrogenase (D-Pro DH) immobilized electrode was utilized for the determination of D-amino acids (DAAs) in food samples. When a critical comparison with CNT, Ketjen Black (KB), and carbon powder (CP) was also carried out, the CNT/D-Pro DH immobilized electrode showed the highest sensitivity and the lowest detection limit of D-proline. In addition, the CNT/D-Pro DH immobilized electrode was applied to detection of DAAs in rice wine and vinegar samples. The concentrations of DAAs in rice wine and vinegar samples were 0.0210 ± 0.0001 and 0.55 ± 0.05 mmol L⁻¹, respectively.

(Received March 18, 2009; Accepted May 21, 2009; Published July 10, 2009)

Introduction

Recently, progress in analytical methods has revealed the biological and physiological roles of D-amino acids (DAAs). In particular, D-serine distributes widely in the brain of schizophrenic and Alzheimer sufferer's, and is suspected to be involved in several neurological diseases.^{1,2} It is expected that DAAs enter the body through foods.³ Therefore, it is important to analyze DAAs in food for clarifying the intake process. However, data of DAAs concentration in food samples has rarely been accumulated. It is known that the D-proline concentration increases in vinegars during aging, and this phenomenon has potential as an indicator for examining the aging process.^{4,5} Furthermore, amino acids in drinks affect their taste and aroma.⁶ Erbe and Bruckner have determined the concentration of DAAs in beer to evaluate beer quality.⁷ However, conventional analytical methods for DAAs involve the use of such techniques as high-performance liquid chromatography, gas chromatography and amino acids analyzers, which are generally time-consuming processes.⁸⁻¹⁰

The electrochemical methods can be operated with small equipments, and running costs are generally low. We have already developed an amperometric DAAs sensor in which a thermostable D-proline dehydrogenase (D-Pro DH) immobilized the electrode surface within an agar gel membrane.¹¹ The D-Pro

DH/agar immobilized sensor could be simply prepared and detect D-proline up to 0.5 mmol L⁻¹.¹¹ However, the D-proline concentrations in food samples, such as vinegar (0.1 mmol L⁻¹)¹² and alcohol drinks (0.005 mmol L⁻¹),⁷ are generally low. Thus, it is necessary to improve the sensitivity for the analysis of these samples. In order to improve the sensitivity of a D-Pro DH/agar immobilized electrode, we selected carbon materials, such as carbon nanotube (CNT), Ketjen Black (KB) and carbon powder (CP). Since carbon materials have a superior electric conductivity and a large surface area, they have been widely used in electrochemical biosensors.¹³⁻¹⁵ For example, KB and CP were utilized as electrode materials for a biofuel cell¹⁴ and a pH sensor.¹⁵ Furthermore, there have been a large number of applications of CNT for biosensors. For example, a CNT/glucose oxidase (GOx) doped polypyrrole immobilized electrode and a screen-printed electrode immobilized with CNT/horseradish peroxidase (HRP)/polysulfone were reported for glucose and H₂O₂ sensors, respectively.^{16,17} Moreover, Fukushima *et al.* recently developed a CNT gel, which was a mixture of a CNT and imidazolium ion based ionic liquids.¹⁸ The CNT gel has a large potential for electrode materials because of its large surface area and easy membrane-forming performance. The CNT and ionic liquid have been used for such purposes as the formation of nanoparticles,¹⁹ lubricant additive,²⁰ actuator^{21,22} and elastic conductor.²³ To the best of our knowledge, the application of the CNT gel to a DAAs sensor has not been reported yet.

In the present work, we researched an effective carbon material for improving the sensitivity of the D-Pro DH/agar immobilized electrode. Carbon materials (CNT, KB, CP) and ionic liquid

[†] To whom correspondence should be addressed.
E-mail: yabutani@chem.tokushima-u.ac.jp



Adhesion of *Escherichia coli* onto quartz, hematite and corundum: Extended DLVO theory and flotation behavior

Mohsen Farahat^{a,*}, Tsuyoshi Hirajima^a, Keiko Sasaki^a, Katsumi Doi^b

^a Department of Earth Resources Engineering, Faculty of Engineering, Kyushu University, 744 Motooka, Nishiku, Fukuoka 819-0395, Japan

^b Department of Genetic Resources Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 February 2009
Received in revised form 9 July 2009
Accepted 14 July 2009
Available online 21 July 2009

Keywords:

Adhesion
Biosurface modification
Extended DLVO theory
Flotation
Mineral processing

ABSTRACT

The adhesion of *Escherichia coli* onto quartz, hematite and corundum was experimentally investigated. A strain of *E. coli* was used that had the genes for expressing protein for silica precipitation. The maximum cell adhesion was observed at pH <4.3 for quartz and at pH 4.5–8.5 for corundum. For hematite, cell adhesion remained low at all pH values. The microbe–mineral adhesion was assessed by the extended DLVO theory approach. The essential parameters for calculation of microbe–mineral interaction energy (Hamaker constants and acid–base components) were experimentally determined. The extended DLVO approach could be used to explain the results of the adhesion experiments. The effect of *E. coli* on the floatability of three oxide minerals was determined and the results showed that *E. coli* can act as a selective collector for quartz at acidic pH values, with 90% of the quartz floated at 1.5×10^9 cells/ml. However, only 9% hematite and 30% corundum could be floated under similar conditions. By using *E. coli* and no reagents, it was possible to separate quartz from a hematite–quartz mixture with Newton's efficiency of 0.70. Removal of quartz from the corundum mixture was achieved by *E. coli* with Newton's efficiency of 0.62.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Utilization of microorganisms as bioreagents in mineral processing (bioflotation or bioflocculation) gave hopes for upgrading minerals from ores by economical and environmentally safe processes. The separation of minerals by biobeneficiation is governed by selective adhesion of microbial cells onto mineral surfaces and the changes occurred on mineral surfaces after the biotreatment. The adhesion of microbial cells onto mineral surfaces is influenced by several properties such as the surface charge, surface free energy components, and the presence and configuration of surface polymers. In general, bacterial adhesion can be explained by surface thermodynamics and the extended DLVO theory, in which the adhesion energy between cells and substrate is calculated as a function of the separation distance [1–3]. These methods take into account Lifshitz–van der Waals interactions, electrostatic interactions, and hydrophobic/hydrophilic force (acid–base) interactions. The most important input in these calculations is the surface energy and its different components (surface charge, Hamaker constants, electron donating, and electron accepting) on the bacterial cell surface and solid substrate. The microbial adherence on mineral surface and the subsequent formation of biofilm result in changes in surface prop-

erties which can be exploited in mineral separation. For example, hematite surface gained hydrophobic properties after being treated with *Mycobacterium phlei* cells [4,5]. However, hematite gained hydrophilic properties after interaction with *Bacillus polymyxa*. *B. polymyxa* rendered quartz hydrophobic properties after sorption on its surface [6]. *Escherichia coli* was found to be act as a flotation collector for quartz under acidic conditions [7]. In this case, the *E. coli* strain was genetically modified to express silica-inducing protein (*sip*), believed to facilitate adhesion and modify mineral surface properties.

The *sip* modified strain of *E. coli* was derived from a mutation of the *E. coli* JM109 strain that has *sip* cloned in the pET32 vector. The *sip* genes were cloned from the hyperthermophilic bacteria *Thermus thermophilus* [8].

Hematite and corundum are important industrial minerals; hematite is the principle source of iron. Huge amounts are mined annually for industrial production. Corundum is used as an abrasive in the manufacture of sandpaper, polishing components and cutting tools. The presence of silica in association with hematite and corundum as gangue mineral, affects on their commercial uses. From this point of view, this study investigates the adhesion behavior of *E. coli* strain *sip* onto the three oxide minerals experimentally and theoretically by extended DLVO theory. Surface energy components of the microbe and the mineral samples (Hamaker constants and acid–base components) were experimentally determined from contact angle measurements. Subsequent changes on the min-

* Corresponding author. Tel.: +81 92 802 7780; fax: +81 92 802 3338.
E-mail address: mohsen105@hotmail.com (M. Farahat).

1Bp18

Thermus thermophilus HB8 のシリカ誘導性タンパク質の発現機構解析

○藤野 泰寛¹, 大島 敏久², 緒方 靖哉³, 土居 克実²

(¹九大院・生資環,²九大院・農,³崇城大・工・応微工)

【目的】地熱発電所の地上設備に沈着するシリカスケールより分離された *Thermus thermophilus* TMY 及び近縁種である HB8 株は、過飽和ケイ酸を含む培地中より効率よくシリカを沈降させる。その際、シリカ誘導性タンパク質 (silica-induced protein; Sip) が誘導産生されるが、Sip はそのアミノ酸配列より鉄結合性の ABC transporter と示唆された(1)。本研究では、Sip の発現がケイ酸添加またはケイ酸添加による鉄飢餓に起因するものかを明らかにし、また、*sip* プロモータを利用したタンパク質大量発現系の構築を目指し、*sip* の転写・発現機構の解析を行った。

【方法及び結果】HB8 株を、TM 培地、600 ppm シリカ添加 TM 培地、及び鉄欠乏 TM 培地でそれぞれ培養し、抽出した total RNA を用いて qRT-PCR を行った。HB8 ゲノム上には TTHA0723、TTHA0746、TTHA1628(*sip*) の 3 種の鉄結合性 ABC transporter がアノテートされているが、過飽和シリカ添加時、鉄欠乏時ともに *sip* の転写量のみが著量に増加した。また、*sip* 上流のプロモータと推定される領域に GFP 遺伝子をレポーターとして連結させ、*sip* プロモータの強度を評価している。

(1) K. Doi, et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 2406-2413 (2009)

Expression analysis of silica-induced protein(Sip) in *Thermus thermophilus* HB8

○Yasuhiro FUJINO¹, Toshihisa OHSHIMA², Seiya OGATA³, Katsumi DOI²

(¹Grad. Sch. Biores. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., ²Fac. Agric., Kyushu Univ., ³Dept. Appl. Microb. Technol., Fac. Eng., Sojo Univ.)

Key words silica, *Thermus*, expression

1Dp23

新規色素依存性L-グルタミン酸脱水素酵素の機能解析

○今田 智子¹, 中野 誠子¹, 土居 克実², 大島 敏久²
(¹九大院・生資環・遺資工, ²九大院・農・遺資工)

【目的】アミノ酸脱水素酵素にはNAD(P)とフラビンを補酵素とする2つのグループが存在する。後者のグループの酵素は、ジクロロフェノールインドフェノールなどの人工色素を電子受容体とするアミノ酸の酸化的脱アミノ反応を触媒するので色素依存性アミノ酸脱水素酵素と呼ばれ、アミノ酸の電気化学的センサーへの利用が期待できる。本研究では、高度好熱菌に新規色素依存性L-グルタミン酸脱水素酵素 (dye-GDH) を見出したので、その酵素化学的な特徴の解明を行った。

【実験方法及び結果】好熱性 *Bacillus* sp. DSM 406 株の菌体抽出液の電気泳動における活性染色により dye-GDH を見出した。本酵素を各種クロマトグラフィーにより高度に精製することに成功した。本酵素の分子質量はゲルろ過法で約270 kDa、サブユニットは105 kDaと算出され、本酵素がホモダイマー構造をとることが分かった。本酵素の N 末端アミノ酸配列 (AKQDVFNAR) を決定した。これは *Geobacillus* sp. Y412MC61 の推定アミノ酸配列と一致することが分かった。

Study on a novel dye-linked L-glutamate dehydrogenase from thermophilic *Bacillus* sp. DSM 406

○Tomoko IMADA¹, Seiko NAKANO¹, Katsumi DOI²,
Toshihisa OHSHIMA²

(¹Lab. Microb. Genet., Fac. Agri., Kyushu Univ., ²Lab. Microb. Genet.,
Fac. Agri., Kyushu Univ.)

Key words thermophilic *Bacillus* sp., dye-linked glutamate dehydrogenase, biosensor

3. 総説等要旨

家蚕遺伝子開発分野

2009. vol.5 no.2 Biophilia 41-44



NBRP(ナショナルバイオリソースプロジェクト)紹介 カイコ —日本発信のリソースとしての魅力—

Genetic Resources

九州大学大学院農学研究院 伴野 豊

はじめに

日本では養蚕業が広く行われてきた歴史があり、多様なカイコの品種や系統が国内に存在する。品種とは養蚕目的に世界各地で独自に育種された在来種やそれらを基に育種により改良されたものを、また、系統とは品種や交雑過程で発見された突然変異体(ミュータント)を維持するために作成された品種に準ずるものと捉えることが妥当と思われるが、明確な区別は難しい。

さて、大半の方はカイコといえばシルク製品を連想するであろう(図1)。もちろん、それも正解であるが、実はそのほかにカイコには知られていない魅力的な利用法がたくさんある。しかし、養蚕業が衰退し、カイコの実物を見たことがない世代も増

えている。図2にカイコの一般的な発育の様子を示した。本稿では、カイコを知らない方にもわかりやすく、その魅力とナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)・カイコについて紹介したい。

日本とカイコ

世界には大小さまざまな国や地域がある。グローバル化した現代でさえ、暮るもの、食べるもの、宗教、習慣等には地域固有のものがある。その地域性は風土に依存した長い歴史によって作られてきた。日本人は今でも大切な節目には着物を着るが、絹が最も好まれる。皇居内では、皇后様がカイコを飼育し、できあがった繭から糸を紡いで織物にして、外国からのお客様のお土産等に使って

いるそうである。

絹織物として昔から日本では馴染みのあった絹。それを作るカイコの品種や系統のパラエティ。そしてカイコに関する研究では、今でも我が国は世界をリードしている。かつて農林水産省の試験場であった農業生物資源研究所には約500種類の養蚕用品種が、筆者の所属する九州大学には約800種類の研究用系統が整備されている。図3のようにカイコにはさまざまな表現型突然変異体が存在する。

学術研究とカイコ

カイコは表1に示すように、実験生物として優れた点が多数あり、学術の発展に貢献してきた。特記されるのは、

- ①メンデルの遺伝法則が動物で初めて当てはまることが、外山亀太郎により明らかにされた(1906年)。このため、日本の遺伝学発展にカイコは大きな貢献をした。
- ②昆虫ホルモン(脱皮ホルモン、幼若ホルモン、脳ホルモン)、性フェロモンの物質精製とその機能に関する研究。

である。

昆虫は成長過程で、脱皮をして大きくなったり、蛹、蛾へと形態を劇



図1 絹製品のいろいろ
着物、風呂敷、スカーフ、ネクタイの素材として使用

突然変異体からの メッセージ



伴野 豊 BANNO Yutaka

九州大学大学院・准教授

経 歴：九州大学大学院博士後期課程修了

職 位：九州大学助手、助教授、九州大学大学院准教授

研究の専門：家畜遺伝学

生物学における分野：遺伝学

写真1
顔色には白色（4、6）以外にも紫色（1、8）、黄色（2、5）、ピンク色（3、7）等がある。人為的に染めたのではなく、カイコの繭繖によって遺伝的に決まる。また、繭の形も大きさも個性的である。



82

繭は元来黄色だった

カイコの顔色は白であると思っている人が大半であろう。ところが、元来、繭は黄色で、白繭が突然変異、すなわち変わりものであるという意外な事実が最近判明した。写真1のように実は顔色には自然の色として種々が存在する。その中で今回 Sakudo et al. により着目されたのが黄色と白色の繭である。黄色繭を調べたところ、繭にはカロチノイドと呼ばれる黄色の色素が存在した。カロチノイドはカイコ体内では作ることが出来ず、餌として食べる桑の葉に由来する。この点は白繭と黄繭の違いとしてわかっていたが、何故黄色と白の差が同じ葉を食べるのに異なるかが不思議であった。生物の多様な性質はタンパク質に由来するので、先ず、タンパク質が調べられた。その結果、黄色繭を作るカイコにはカロチノイドを吸収できるカロチノイド結合タンパク質（CBP）があり、白繭を作るカイコの体にはそのタンパク質がないことがわかった。次にそのタンパク質を支配する遺伝子を調べた。その結果、白繭のCBP遺伝子は構造上一部分が抜け落ち、欠陥があることが明らかになった。カイコの祖先種と言われるタワコの繭も黄色である。元々、黄色繭を作り出していたカイコ。しかし、進化のある時、遺伝子に欠陥が起き、その白繭を人間が広く利用し、その結果、白繭をカイコの正常タイプと思うようになったという筋道が成り立つ。顔色には写真のように色々な色がある。それらについての研究も進められている。更に意外な事実が判明するかも知れない。

突然変異体とは

白色の繭が突然変異というやや意外な話題でスタートした。ここで、突然変異体について整理しておこう。突然変異体（ミュータント）とは変った形質（生物が持つ色や形、大きさなどの特徴は遺伝学では形質と呼称）を持つ個体を指す用語である。白いカラスを見た人は誰も黒いカラスに対する変異体として即座に判定するであろう。しかし、次にあげる人間の例はどうであろう。我々人間の皮

第2部 バイオリソース

8 カイコ アジア発のカイコリソースの魅力

URL: <http://www.shigen.nig.ac.jp/silkwormbase> NBRPカイコ
(中核機関: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)

伴野 豊
Yutaka Banno

カイコはアジアの風土に育まれた昆虫であり、日本、中国、韓国などが欧米に対し優位な立場にある。遺伝的に均一な材料を万単位で安価に利用できる魅力があり、性フェロモン、昆虫ホルモンなど微量成分の単離に威力を発揮してきた。最近、化合物のバイオアッセイ系にも利用が増えている。身近な昆虫であり、実験を手軽に行えることも魅力の1つと言える。ゲノムの解読も進んでいる。現象面のみしか知られていなかったミュータントも豊富である。

key words カイコ、遺伝子、バイオリソース、実験生物、遺伝

I. リソースの特徴

カイコ (*Bombyx mori*) はシルク (生糸) を得るために人間が極度に家畜化してきたため、野外での生息は不可能で、人間が飼育することでのみ生命を維持している希少な生物である。その祖先種昆虫はクワコ (*Bombyx mandarina*) と考えられ、日本、中国、朝鮮半島、極東ロシア、台湾等東アジアに生息している。日本では弥生時代から飼育されてきたと推定され、奈良時代からは養蚕業の一部として利用され、明治、大正、昭和の時代には外貨獲得という国策のもと、大量に飼育されていた歴史がある。養蚕業が衰退した現在でも2007年度の生糸生産量から推定すると約2億匹 (頭) のカイコが日本国内で飼育されている。飼育作業はすべて手作業であるうえ、虫の動作が緩慢で観察しやすい。このため、全生活環にわたって人間の目による可視突然変異形質 (ミュータント) が多数発見され、日本各地の試験研究機関に学術用として産業界とは別途、維持されてきた。

平成14年度にスタートした文部科学省ナショナルバイオリソース事業では、国内に存在する世界最大数のカイコ突然変異体系統を中核機関 (九州大学) で一括して収集・保存する体制を確立し、世界最高水準のリソースセンターを形成し、研究コミュニティへ効率的に供給するシステムの構築を目指している。

カイコのリソースとして以下のような長所が挙げられる。
①行動がおとなしく、観察・取り扱いが容易な点である。エサがなくなっても自ら探しに行くことはせず、人間がク

ワ (エサ) を与えるまで動き回らない。成虫は雌雄とも飛翔能力を欠いている。

②1匹の雌蛾が400~600個の卵を数時間で産卵し、遺伝実験に好都合である。

③人工飼料とそれに適した実験系統が開発されているので、1年間いつでも実験が可能。

④1世代は約7週間と比較的短い (卵10~14日、幼虫20~25日、繭10~14日、成虫数日~7日)。

⑤養蚕業で培った大量飼育技術があり、100万単位で発育ステージの揃った実験材料の調達が可能。

また生物学位置は、節足動物門、昆虫綱、鱗翅目、カイコガ科、カイコ属、カイコである。

II. リソースの整備状況

カイコは完全変態昆虫であるので、発育ステージは、卵→幼虫→蛹 (繭)→蛾 (成虫) の4時期に大きく区分される (図1)。各時期に識別可能なミュータントが豊富に発見されているのがカイコリソースの特徴である。卵時期には卵の色 (標準型は紫色で、白色、赤色、褐色などの変異がある) 形、大きさに変異があるほか、卵の中に存在する胚子の発育に関する変異体が見いだされている。最も多いのが胚子期における致死遺伝子で、20種ほどが報告されているが、具体的な原因はほとんど明らかとはなっていない。また、カイコでは、通常胚子期に冬越し (休眠) するが、休眠しない変異、環境 (温度・湿度・光・栄養) によって休眠の応答が異なる変異体などがミュータント系統として確立されている。幼虫期は約20~

4. 講演要旨

家蚕遺伝子開発分野

平成 21 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第 79 回大会

224

カイコの突然変異「黄体色」(*lem*)と「黄体色致死」(*lem'*)の原因はセビアプテリン還元酵素の異常である

○孟 艶・勝間 達・大門高明(東大院農)・伴野 豊(九大院農)・三田和英(生物研)
・嶋田 透(東大院農)

カイコの突然変異体「黄体色」(*lem*)は、幼虫期に全身の皮膚が黄色を呈する。黄体色致死(*lem'*)は *lem* の対立形質であり、2 齢起蚕で摂食不能となり死亡する。*lem* は第 3 連鎖群 0.0 に座位するが、いまだクローニングされていない。既往研究で、黄体色の原因はセビアプテリン還元酵素 (SPR) の欠如により、皮膚の真皮細胞にキサンチン及びセビアルマジンを多量に蓄積すること、セビアプテリン還元酵素の活性が低いことが報告されている。我々は、カイコの EST ライブラリーと WGS ゲノム配列を利用して、カイコセビアプテリン還元酵素遺伝子 *BaSpr* を単離した。変異系統と正常系統を比較したところ、*lem* 及び *lem'* の *BaSpr* 遺伝子のタンパク質コード領域に変異があり、コードするアミノ酸配列が変異していた。続いて、*lem* と p50T の交雑後代で連鎖解析を行った。190 個体の BC1 および 187 個体の F2 個体を調べた結果、黄体色形質と *BaSpr* の変異の間でまったく組換えが起きなかった。したがって *lem* = *BaSpr* と考えられる。一方、2 齢起蚕の全身の粗抽出物、及び *BaSpr* 組み換えタンパク質を用いて SPR 活性を測定した。正常型と比べたところ、*lem* では個体、及び組換えタンパク質において、SPR 活性が正常型の 15-20% だった。さらに、*lem'* においてはまったく活性がなかった。以上より、*lem* 及び *lem'* の原因は *BaSpr* 遺伝子の変異によって SPR 活性が低下していることであると結論される。

Key words: カイコ、突然変異、黄体色、黄体色致死、セビアプテリン還元酵素

平成 21 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第 79 回大会

321

カイコ体液キモトリプシンインヒビターによって生じる熟蚕中腸細胞膜の変化

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

完全変態昆虫は幼虫期に合成したタンパク質を変態期に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が、未だに詳細な情報は得られていない。我々は、カイコキモトリプシンインヒビター、CI-8 が変態期に体液から中腸へ取り込まれることや、p29 が CI-8 の受容体様タンパク質であることを見出した。本研究では、CI-8 と中腸膜とが p29 を介してどのような相互作用しているか化学架橋法を用いて調べた。

細胞分画法を用いて、熟蚕の中腸膜けん濁液を調製し、CI-8 添加 (CI-8 区)、体液添加 (体液区)、および無添加 (対照区) に 3 分割した。各区にグルタルアルデヒドを添加し、p29 に対するウエスタンブロット分析を行った。さらに、分子サイズに基づいて、p29 と会合したタンパク質を推定した。

CI-8 区と体液区において、対照区には検出されないものや量が増加したポリペプチドが検出された。CI-8 区と体液区のポリペプチド群はきわめて類似していた。また、CI-8 区の 1 つのポリペプチドは、添加 CI-8 の量に依存して p29 との結合量が増えた。以上の結果から、CI-8 は細胞膜で p29 のみならず、他のタンパク質をも含んだ複合体を形成し、中腸に取り込まれると推察した。本報告では、取り込みのモデル機構についても考察したい。

Key words: CI-8、受容体、化学架橋剤、グルタルアルデヒド、複合体

120

BmNPV 高感受性カイコを用いた交配系統による効果的タンパク発現の試み (2)

○李 在萬(九大院農)・久保雄二(九大院生資源)・大畑 敬一(日本全業)・伴野豊・河口豊・日下部宜宏(九大院農)

昆虫を利用した組換えバキュロウイルスタンパク質生産は、細菌系と比較して可溶性で発現する確立が高いことや哺乳類に近い修飾を受けたタンパク質を得られるなどメリットがある。特に昆虫個体を用いる生産系は、昆虫細胞を用いる場合に比較し、微生物汚染が少なく、生産条件の制御が容易であるため十分な発現量を確保することが可能である。しかし、生理活性を持つ毒性タンパク質に関しては、組換えタンパク質が全く得られないか、少量しか発現されない場合も多い。本研究では格好の組換えタンパク質の発現用宿主であるカイコを利用して、他の生物では生産できない特異な生理活性を有する毒性タンパク質などを大量生産する方法の確立を目指している。まず、ネコの腎不全治療薬として開発されているネコHGFの生産に最適な系統のスクリーニングを行い、高いタンパク質生産能を有する 3 系統を同定した。この結果を受け、分泌タンパク質の産生に好適なカイコ系統が存在することが予想されたことから、ネコHGFにルシフェラーゼを融合した高分子分泌タンパク質を発現する組換えBmNPVを用いて100系統のスクリーニングを試みた。その結果、非常に高い分泌タンパク質生産能を有する感受性 8 系統を同定した。さらに、複数の分泌タンパク質を発現する組換えウイルスを用いて再現性の確認を行ったところ、g35系統、n17系統とn70系統で特に生産性が高かった。また、高い分泌タンパク質生産能を有する感受性カイコを用いたF1及び三元雑種のタンパク発現は、親系統より生産性が高かだけでなく幼虫体が大きくなることから、回収できる総タンパク質量も増加することが解った。現在、各系統より幾つかの難分泌性タンパク質の精製を行い、最終的な収量を解析中である。

Key words: バキュロウイルス, BmNPV, スクリーニング, 分泌タンパク質

413

黄蘗遺伝子 (C) は中部絹糸腺におけるキサントフィルの取り込みを支配する

北村晃利 (富士化学)・作道隆・湯浅正志・森林敦子・藤本浩文・高田直子 (感染研)・岩野秀俊 (日大生資)・伴野豊 (九大遺産)・土田耕三 (感染研)

カイコの黄蘗にはカロテノイドが蓄積している。黄蘗を作るカイコは桑葉由来のカロテノイドを中部絹糸腺まで搬送でき、白蘗を作るカイコは搬送できないと考えられている。中部絹糸腺は体液リポホリンからカロテノイドを取り込むための装置を有していることが想像され、この装置が C 遺伝子の分子実体であると考えられる。本研究では、C 系統と +^c 系統における、体液リポホリン、中部絹糸腺、蘗におけるカロテノイドの定性、定量を行い、カロテノイドの吸収や、体内搬送について考察した。

黄血黄蘗種 (YC) と黄血白蘗種 (Y+^c) は、九大保存系統 C10 と C05 とをそれぞれ用い、桑葉で飼育した。桑葉中のカロテノイド分析の結果、主たるカロテノイドとしてルテインと β-カロテンが存在していた。C10 と C05 の幼虫体液からリポホリンを精製し、リポホリン中のカロテノイドを分析したところ、主たるカロテノイドとして、両者ともにルテインと β-カロテンを検出した。中部絹糸腺から検出したカロテノイドは、C10 においてルテインであり、β-カロテンはわずかであった。C05 ではルテインのみがわずかに存在し、その量は C10 の約 1/30 であった。蘗におけるカロテノイドは、C10 から多量のルテインを検出できるものの、C05 ではわずかであり、その量は C10 の約 1/40 であった。以上の結果から、C10 と C05 は、両者ともに桑葉からカロテノイドを吸収し、ルテインと β-カロテンを体液に移行させ、さらに、この体液から、C10 系統では、中部絹糸腺にルテインのみを蓄積し、C05 はいかなるカロテノイドも中部絹糸腺に蓄積しないことがわかった。このことから、C 遺伝子は、中部絹糸腺において、β-カロテン等、炭化水素系カロテン類の取り込みに機能できず、ルテイン等、キサントフィルの取り込みに特化して機能する装置をコードすると考えられる。

Key words: C 遺伝子, カロテノイド, 黄蘗, カロテノイド分析

422

クワコの rDNA の 5.8S-28S 領域の配列を指標にした比較系統解析

川西祐一(筑大分生研)・鎌内悠(筑大理)・味村博・三田和英・山本公子(生物研)・伴野豊(九大院農)・藤本裕文(感染研)・屠振力(浙江大)・盧時甲(慶北大)・日高道雄・中島裕美子・
○前川秀彰(筑大分生研)

日本産クワコは、協調進化により生じたと考えられる rDNA クラスターの変異から約 300 万年前に中国あるいは朝鮮に生息しているクワコから分岐したと我々は推論している。rDNA の変異が日本産クワコ独特であることから、現在日本産クワコに見出されるカイコ型 rDNA は、日本に 2000 年ぐらい前に移入された養蚕用カイコから、染色体侵入という形で入り込んだ可能性を示した (Kawanishi et al., J Insect Biothec Sericol 77, 79-85, 2008)。日本産クワコの持つ変異型の rDNA では 5.8S と 28SrRNA コード領域の間に *EcoRI* 部位が存在するので、クワコ個体の持つ rDNA がどちらのタイプであるかは、そこを含む PCR 産物を *EcoRI* 消化し、2 本のバンドに分かれる (日本産クワコ型) か分かれぬ (カイコ型) かで簡単に判断できる。さらに、配列の上でもこの分離が確認されるかどうかを検証するために、日本産クワコからこの PCR 産物の塩基配列を比較したところ、日本産クワコ型とカイコ型が明確に区別できた。カイコからの PCR 産物の配列はカイコ型に分類された。日本産クワコの持つカイコ型配列は系統樹上でひとつのクラスターとなることから、特定のカイコ系統に由来している可能性が示唆された。今後より多くの中国産、韓国産、台湾産と日本産のクワコの rDNA を比較することでアジア地域でのクワコの系統関係を解析できると考えている。

Key words: rDNA, 塩基配列, クワコ, カイコ, 系統解析

426

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

○寺門真希¹・西村美香¹・山下英紀²・行弘研司³・伴野豊⁴・伊藤雅信¹(¹京工織大院応用生物・²京工織大応生・³農業生物資源研究所・⁴九大院農)

最近、カイコ家畜化の過程を明らかにする試みとして *Alp* 遺伝子領域の遺伝子間配列が比較され、カイコ品種と中国産クワコに高い類似が見いだされた。このことは全てのカイコ品種が中国起源である可能性を示唆する。一方、日本産クワコは染色体数 ($n=27$) がカイコ ($n=28$) とは異なり、中国産クワコ ($n=28$) との分岐は、カイコ家畜化に大きく先立つと考えられる。しかし日本産クワコの調査は少数の本州産個体にとどまっており、*Alp* 遺伝子の変異に関してほとんど解明されていない。そこで、新たに対馬、京都、サロベツ、利尻、のクワコを用い、カイコクワコの進化に関して総合的な推定を試みた。クワコのゲノム DNA を鋳型として *Alp* 遺伝子領域を PCR で増幅し、遺伝子間配列の構造を比較するとともに、遺伝子部分の塩基置換パターンを詳細に解析した。その結果、既知の日本産クワコとほぼ同様の大きさの PCR 産物が得られた。2 遺伝子から得られる系統樹 (NJ 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。*Alp* 遺伝子部分の変異はほとんどが 1 塩基置換だったが、複数の系統で *Alp-m* のシグナルペプチド領域でフレームシフトがみられた。McDonald-Kreitman テストを行ったところ、*Alp-m*、*Alp-s* 共に、カイコ-クワコ間、日本産クワコ-カイコ+クワコ間、のいずれにおいても、 K_a/K_s 値に有意な差は検出されなかった。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。

Key words: 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

425

日本に生息するクワコ (*Bombyx mandarina*) の遺伝的多様性

○行弘研司(生物研)・伊藤雅信(京工繊大)・秋月岳・河本夏雄・小瀬川英一・立松謙一郎・廣川昌彦(生物研)・伴野豊(九大院農)・木内信(生物研)

カイコ (*B. mori*) の雌成虫が放出する性フェロモンを用いて、クワコ雄成虫を短時間で大量に誘引し、粘着板により効率的に捕獲できることが確認された。この手法によって、これまで困難であったクワコの大量捕獲が可能となり、手付かずであったクワコ自然集団に保有される遺伝的変異の解明と種内の遺伝的多様性および集団の遺伝的構造の研究が可能となった。

我々は上記のフェロモントラップ法を用いて、北関東(茨城、群馬)、長野および北海道北部(豊富町、利尻町、利尻富士町)においてクワコ雄個体を多数採集した。採集した個体毎にゲノム DNA を抽出し、それを鋳型として個体毎にミトコンドリア *cox1* 遺伝子断片を PCR により増幅した。それぞれの増幅断片の塩基配列を決定した後、塩基配列を比較して集団内の遺伝的変異量を推定した。また、集団間で塩基配列の比較を行い、日本に生息するクワコ集団間の遺伝的分化を検討した。

母系遺伝を示すミトコンドリア DNA の解析と並行して、メンデル遺伝する常染色体上の遺伝子について遺伝的変異の評価を試みている。これは、カイコゲノム情報をもとに遺伝子の 5' フランキンク領域を増幅するように PCR プライマーを作出して、プライマー間の挿入・欠失多型を PCR 増幅断片長さとして検出するものである。この試みの進行状況および得られた多型の特性についても合わせて報告する。

Key words: クワコ、ミトコンドリア、PCR、DNA 多型

424

マリナー様転移因子の配列比較に基づく日本、韓国、中国および台湾に生息するクワコの進化解析

○川西祐一(琉大分生研)・鎌内悠(琉大理)・矢後勝也(東大院理)・小田切嗣一(九大院理)・上田恭一郎(北九州市立博物館)・伴野豊(九大院農)・Yu-Feng Hau(台湾師範大生命科学)・龍川秀彰・中島裕美子(琉大分生研)

カイコでは、マリナー様転移因子 *Cecropia*-ITR-MLE コピーのひとつが挿入した *BmTNML* 座位はゲノム中の 1 箇所だけに存在していることが示されている。日本、韓国および中国産クワコにおいても *BmTNML* 座位に相同な *BmTNML* 座位相当領域に *Cecropia*-ITR-MLE の挿入が確認され、この因子がクワコの進化を解析するための指標となりうることを示された。本研究では、各地に生息するクワコ集団の進化的な関係を明らかにすることを目的として、新たに台湾に生息するクワコを解析に加え、*BmTNML* 座位相当領域に挿入された *Cecropia*-ITR-MLE の配列比較に基づく系統解析を行い、クワコの移動経路を推定した。台湾産クワコゲノムに対する *BmTNML* 座位相当領域の PCR 増幅により予想される 2.3 kb の断片が増幅され、さらに nested PCR により *Cecropia*-ITR-MLE の全長に相当する 1.3 kb の断片が得られた。*BmTNML* 座位相当領域の増幅産物の塩基配列を決定し、日本、韓国および中国産クワコのゲノム 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、台湾産クワコのクローンは、系統樹上で中国産クワコのクローンと同じクラスターに分類されるタイプと韓国産ならびに日本産クワコのクローン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朝鮮半島から日本そして現在ではクワコの生息が確認されていない南西諸島を経由し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。

Key words: mariner-like element, *Cecropia*-ITR-MLE, *BmTNML*, クワコ

216

臭菱のイソバレリル CoA 脱水素酵素遺伝子における 1 アミノ酸置換の検討

○瀬野慶・大門高明・清水謙多郎（東大院農）・三田和英（生物研）・伴野豊（九大院農）・勝間 透・嶋田 透（東大院農）

臭菱（くさこ）はイソ吉草酸が体内に蓄積するために臭気を出して驚死するカイコの変異体であり、その原因遺伝子 *sku* は第 22 染色体 19.3 に座位する。ヒトの遺伝病の一つに同様の症状を呈するイソ吉草酸血症があり、その原因はイソバレリル CoA 脱水素酵素遺伝子 (*IVD*) であることが分かっている。そこで、臭菱においてもヒト同様に *IVD* が変異しているのではないかと考え、*sku* の原因遺伝子がカイコの *IVD* (*BaIVD*) であるか否かを検証を進めている。演者らは前年度の本大会で、臭菱では正常個体と比べて *BaIVD* の ORF 内に 1 箇所の塩基置換が起きており、この置換が 376 番目のアミノ酸をグリシンからバリンに変異させている (G376V) ことを報告した。

今回、このアミノ酸置換が *BaIVD* のタンパク質としての機能に影響を与えているかを検討するために、バキュロウイルス発現系を用いて正常型と臭菱型の *BaIVD* タンパク質を複製し、両者の酵素活性を比較した。驚くべきことに、臭菱型 *BaIVD* は正常型 *BaIVD* と比べ、わずか 0.7% の酵素活性しか持っていなかった。さらにこの 1 アミノ酸置換による *BaIVD* の分子構造の変化を検証するために、ヒト *IVD* の立体構造をテンプレートとして *BaIVD* の分子モデリングを行った。その結果、1 アミノ酸置換によるペプチド骨格の大きな構造変化は見られなかったものの、置換アミノ酸の位置が活性に必須である補酵素 FAD と近い位置にある可能性が示唆された。現在、より詳細な分子モデリングを行うことでこの可能性を検討中である。これらの結果は、*sku* 遺伝子の実体が *BaIVD* の 1 アミノ酸置換である可能性を強く示唆している。

Key words: 臭菱、1 アミノ酸置換、分子モデリング、イソ吉草酸血症、イソバレリル CoA 脱水素酵素

409

黄蘗遺伝子 (*C*) の分子遺伝学的解析

○作道隆（感染研）・飯塚智也・生川潤子・瀬野秀樹・桑崎誠剛（生物研）・伴野豊（九大院農）・高田直子・藤本浩文（感染研）・門野敬子・三田 和英・田村 俊樹・山本公子（生物研）・土田耕三（感染研）

黄蘗遺伝子 (*C*) は、脂溶性色素カロテノイドの体液から絹糸腺への移行に関与する遺伝子である。優性の対立遺伝子 *C* を持つ場合、体液がカロテノイドを豊富に含む黄血ならばカロテノイドが絹糸腺に取り込まれ、繭は黄色となる。一方、劣性の対立遺伝子 *c* をホモに持つ場合は、カロテノイドが絹糸腺に移行せず、繭は白色となる。

我々は *C* の分子実体をポジショナルクローニングによって同定することを試みた。1775 頭の BF1 個体を用いて SNP マーカーを利用した連鎖解析を行い、遺伝子の座位する範囲を第 12 染色体の 375 kb の領域に絞り込んだ。その領域には哺乳類において血漿高密度リポタンパク質から細胞への脂質移行に関与するスカベンジャー受容体クラス B タイプ 1 (SR-BI) の相同遺伝子が 2 つ存在した。この遺伝子を転写方向の 5' 側から順番に *Cameo1* (*C locus associated membrane protein homologous to SR-BI 1*) および *Cameo2* と命名した。絹糸腺における *Cameo1* と *Cameo2* の発現量を *C* 系統と *c* 系統と比較したところ、*Cameo1* については発現量の違いは見出せなかったが、*Cameo2* は *c* 系統において発現が強く抑制されていた。絹糸腺膜成分について Western 解析を行ったところ、*Cameo2* は *c* 系統においてタンパク質の発現も抑制されていた。腸や精巣における *Cameo2* の発現を調べたところ、*C* 系統および *c* 系統の両方で同様の発現が見られ、*c* 系統における発現抑制は絹糸腺特異的であることが分かった。*C* 系統と *c* 系統の F1 個体 (*C/c*) について mRNA の SNP 解析を行ったところ、*C* は *Cameo2* の発現量を絹糸腺において制御するシス制御配列であることが示唆された。

Key words: 黄蘗遺伝子、カロテノイド、脂質輸送、スカベンジャー受容体クラス B タイプ 1、ポジショナルクローニング

平成 21 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第 79 回大会

506

カイコ遺伝子資源の長期保存を目的とした凍結卵巣移植法の改良

○東田万里野・長崎紀代美・田村生・山本和典・江口誠一・西川和弘・伴野豊（九大院農）

カイコの遺伝子資源を保存するには年に一回の飼育が必須である。現在九州大学では突然変異系統を中心とする 800 系統余の遺伝子資源を保有しているが、これらの飼育には多大な時間と労力を必要とする。このため、蚕業技術研究所において開発された精子並びに卵巣の凍結保存技術を用いた、長期保存法の導入を計っている。

今回、凍結卵巣を利用した保存法を検討した。その結果、卵巣凍結時の温度降下を従来法より緩慢に行うことで、その卵巣を移植した蛾の産卵する割合が増加した。従来法では、抽出したカイコ卵巣保存液のジメチルスルホキシド濃度の段階的上昇を室温で実施し、液体窒素蒸気を用いて凍結前処理を行う。それに対し、今回改良した緩慢凍結法では、操作の簡便化と凍結処理による卵巣への影響を軽減するため、凍結前の卵巣のジメチルスルホキシドへの暴露を低温かつ短時間で実施し、-80℃までの温度低下を一定にした。この結果、従来法と比較して産卵する蛾の割合、産卵数で改善を認めた。ただし、現段階では結果にバラツキが見受けられ、卵巣凍結法として採用するには、移植手技の要所を押さえた上で判断することが求められる。また、産卵数については、まだ良好になる可能性があり、卵巣凍結法の改良により、産卵数のさらなる増加が期待される。

今後は産卵する蛾の割合を向上させる卵巣移植方法と、産卵数をより増加させる卵巣凍結方法の、二つの方法について検討する必要があると考える。

Key words: 蚕、遺伝子資源、凍結保存、卵巣、移植

平成 21 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第 79 回大会

501

カイコ・シトクロム P450 の構造解析、発現系の構築ならびに基質の探索

○山本幸治・一瀬博文・伴野豊・麻生陽一（九大院農）

鱗翅目昆虫の生体外異物代謝に関わる解毒酵素の生化学・分子生物学的研究をすすめている。これまでに、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 種の第二相解毒酵素であるグルタチオン転移酵素を同定し、それらの酵素化学的研究を行ってきた。本研究では、代表的な第一相解毒酵素であるシトクロム P450 (CYP) に着目した。CYP は、生物界に広く存在するヘムタンパク質である。その機能は、解毒に働く一方で、ホルモン合成そして脂肪酸の代謝に水酸化反応を介して関与している。本研究では 5 種類のカイコ CYP をクローニングし、組織局在性の検討、発現系の構築そして基質の探索を行った。

5 種類のカイコ CYP の配列を決定したところ、CYP4M5、6A84、6A22、9A20、9A22 のファミリーに属しており、それぞれの配列中にヘム結合部位が高く保存されていた。mRNA 組織局在性は RT-PCR 法により 5 齢 3 日目中腸、絹糸腺、脂肪組織、精巣そして卵巣を用いて調べた。その結果、CYP9A22 は中腸中にのみ存在しており、他の 4 種 CYP は絹糸腺以外の組織に分布していることが確認された。次に *Saccharomyces cerevisiae* を宿主として、CYP 還元酵素と共発現することによりカイコ CYP 発現系を作製した。本酵素群は Dicrofensae および carbazole をはじめとする 11 種類の基質に対する代謝反応に関与しないことが明らかとなった。本研究にて確立した酵母発現系を用いて、引き続きカイコ CYP 候補基質の探索を行っている。

Key words: カイコ、解毒酵素、発現、シトクロム P450

05

熟蚕中腸膜の量変化に伴うキモトリプシンインヒビター

CI-8 の結合量の変化

○上野由直・伴野 豊・麻生陽一
(九大院農)

【目的】 カイコ体液キモトリプシンインヒビターCI-8 は熟蚕期以降の中腸に存在する。また同時期中腸細胞膜にCI-8 に独立に結合するタンパク質 p29 と p60 が検出されている。これらから、CI-8 は結合タンパク質を受容体として利用し、中腸に取り込まれると考えられる。構造分析の結果、p29 は 30 kDa タンパク質である 19G1 と同定された¹⁾。しかし、これらのタンパク質を受容体としてどのように CI-8 と関わるか明らかでない。そのため、中腸細胞膜へ CI-8 結合する時のタンパク質複合体を、化学架橋剤を用いて分析した²⁾。そこでさらに、CI-8 取込み機構におけるこれらのタンパク質の関与を明らかにするため、熟蚕中腸細胞膜の量的な変化と抗体干渉実験における CI-8 の細胞膜への結合量を調べ、p29、p60 及び CI-8 の関係を調べた。

【材料と方法】 細胞分画して得た熟蚕細胞膜のタンパク質を定量後、細胞膜をニトロセルロース膜に固相化し、ファウエスタン法に用いた。結合量は相対活性として表した。抗体干渉実験は、上記ファウエスタン法を行う前に、固相化した細胞膜タンパク質を p29 に対する抗体で処理した。細胞膜を体液と混合し、細胞膜

を洗浄後、高塩濃度溶液で細胞膜からタンパク質を溶出させた。上清を Native-PAGE 後、キモトリプシンインヒビター活性染色に供した。

【結果と考察】 熟蚕中腸細胞膜のファウエスタン法を抗体干渉実験と含めて行った。その結果、細胞膜量が少なくなるほど総結合量と抗体処理した細胞膜の結合量が同一になる傾向が見られた。また、異なった細胞膜量に対する CI-8 の結合はグラフで表すと、直線関係でなく N 字型であった。また、活性染色の結果、細胞膜に結合した CI-8 は活性を保持していることが推察された。以上のことから、CI-8 と p60 との結合は、p29 に比べ大変強いことが推察された。さらに CI-8 の p29 と p60 に対する結合は CI-8 活性を保持しつつ複雑な相互作用によるものと考えられた。これらのことを、化学架橋実験の結果と合わせて、中腸への CI-8 の取込み機構のモデルを提案したい。

1) Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 70, 1557-1563, 2006

2) 平成 21 年度日本蚕糸学会第 79 回大会講演要旨集

Ueno, Y., Banno, Y., Aso, Y.: Change of binding ability of a hemolymph inhibitor, CI-8, to different dose of the midgut membrane.

10

南西諸島の地殻変動とリボゾーマルDNAの5.8S-28S間

ITS領域の配列比較に基づく日本産クワコの進化解析

○川西祐一¹・伴野 豊²・藤本浩文³・三田和英⁴・味村 博⁴・山本公子⁴・屠 振力⁵・
盧 時甲⁶・中島 裕美子¹・前川秀彰¹

(¹琉大熱生研・²九大院農・³感染研・⁴生物研・⁵産工大・⁶慶北大)

【目的】 日本産クワコのリボゾーマル RNA 遺伝子 (rDNA) 領域には日本産クワコに特異的な EcoRI サイトが存在することから、我々はこの領域を分子マーカとして日本産クワコの進化を解析してきた。塩基配列比較により EcoRI サイトを持つ日本産クワコ型と EcoRI サイトを持たないカイコ型とが系統的に分離することを明らかにした。また日本産クワコの特つカイコ型は、カイコが日本に移入された後、カイコ染色体が日本産クワコへ侵入したためであるとする仮説を提唱した (J. Insect Biotech. Ser., 2008)。しかし、現在のところ日本産クワコの特つカイコ型の由来については明確ではない。そこで物理学的な観点から日本産クワコ、2つのタイプの rDNA の由来を推定し、日本産クワコの進化を考察した。

【材料と方法】 中国産クワコ2個体、台湾産クワコ3個体、韓国産クワコ2個体および日本産クワコ4個体から抽出したゲノムDNAに対し、日本産クワコでの EcoRI 切断サイトを含む領域を増幅するためのプライマーを用いて PCR を行った。得られた増幅産物の塩基配列を決定し、5.8S と 28S のコード領域間に存在する internal transcribed spacer 2

(ITS2) 領域について比較し、系統解析を行った。

【結果と考察】 ITS2 の系統解析から日本産クワコ型とカイコ型とが明確に分離することが示された。また、日本産クワコの特つカイコ型は、中国産・台湾産・韓国産クワコのカイコ型と比べ、カイコの rDNA とは最も古い時期に分岐したことが示唆された。これは、以前に提唱したカイコ染色体の日本産クワコへの侵入仮説とは矛盾する結果となった。そこで我々は、現在の日本産クワコの特つ2つの rDNA タイプは、クワコの日本への侵入が少なくとも2度あったことを反映した結果であるとする新たな仮説を提唱する。地理学から約700万年前の中新世には南西諸島も日本も大陸と陸続きであった。この頃大陸から日本へのクワコの侵入が起こり、日本産クワコは大陸クワコと分岐、独自に進化した。そして約300万年前に rDNA が日本産カイコ型に進化したと推定される。その後地殻変動により沈降や隆起が繰り返されたが、数万年前的氷河期に再度大陸と陸続きとなった時期に日本に侵入したクワコ集団が日本産クワコ集団と交配し、その結果カイコ型 rDNA が日本産クワコに入り、日本産クワコの2つの rDNA タイプを構成したと考える。

Kawanishi, Y., Banno, Y., Fujimoto, H., Mita, K., Ajimura, H., Yamamoto, K., Tu, Z.L., Nho, S.K., Nakajima, Y., Mackawa, H.: Geographical analysis on South-west islands for evolution of *Bombyx mandarina* (Japan) using rDNA sequence.

家蚕幼虫体液の熱凝集タンパク質

○倉掛 麻衣子¹・西 愛子²・手柴智史¹・伴野 豊²・山本幸治¹・麻生陽一²
(¹九大院生資環・²九大院農)

【目的】 Small heat shock protein (sHSP) は他のタンパク質の熱凝集・沈殿を抑制する。家蚕には少なくとも6種のsHSPが存在する。我々は、そのうちsHSP19.9およびsHSP20.8を大腸菌で大量生産する系を構築し、両sHSPのタンパク化学的性質を調べている。しかしながら、これらのsHSPが、家蚕体内において何を標的にしているか不明である。そこで、本研究では、家蚕幼虫体液より熱凝集タンパク質を探索することを目的とした。

【材料と方法】 体液は5齢4日の家蚕幼虫から採取、凍結乾燥し、-30℃で保存した。緩衝液には10 mM HEPES (pH 7.7) を用いた。フェノールオキシダーゼによる酸化を防ぐために、細胞碎液にはジエチルジチオカルボン酸塩を添加した。精製にはサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) および疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) を用いた。熱凝集反応は60℃、30分間インキュベートすることで行った。光散乱の上昇は蛍光光度計あるいは分光光度計を用いて分光学的に追跡した。ポリペプ

チドは12.5% SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) で分析した。N末端アミノ酸分析は、SIMADZU PPSQ-31Aで行った。

【結果と考察】 SECでは複数であるが、特定の画分のみ高い熱凝集活性が検出された。この熱凝集はsHSP20.8の添加により効果的に抑制された。高い活性を有する画分をHICに供与した。緩衝液濃度を2 Mより直線的に下げて分離したところ、約0.8 Mで分離された画分に凝集活性が検出された。SDS-PAGEの結果、本画分には数個のポリペプチドが含まれることが分かった。熱凝集・沈殿物を回収し、SDS-PAGEで調べたところ、1つのポリペプチドだけが熱凝集タンパク質であり、その分子サイズは約80 kDaであることが分かった。N末端16残基のアミノ酸配列を調べたところ、蝾特異的貯蔵タンパク質SP1のそれと100%一致した。現在、sHSPとの相互作用について、さらに詳細を調べている。

Kurakake, M., Nihi, A., Teshiba, S., Banno, Y., Yamamoto, K. and Aso, Y.: Thermally aggregating protein from larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.

日本産クワコのアルカリ性フォスファターゼ

遺伝子領域の構造解析

○寺門真希¹・西村美香¹・山下英紀¹・行弘研司²・伴野 豊³・伊藤雅信¹
(¹京工繊大院・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、ともに2つのアルカリ性フォスファターゼ遺伝子 (*Alp-m* と *Alp-s*) が重複して存在しており、両遺伝子間の塩基配列には転移因子が関与したと考えられる複雑な構造多型が知られている。これまでに、カイコおよび中国産クワコを中心に系統解析が行われ、カイコ品種は日本産クワコよりも中国産クワコに近縁であるという結果が得られた。しかしながら日本産クワコの調査は本州産の少数個体にとどまっていた。また、同種とされながら染色体数が異なる中国産クワコとの関係や、派生起源が明らかではない。そこで、日本産クワコの遺伝的変異を明らかにするために、長崎県対馬、京都南部、北海道北部で新たにクワコを採集して *Alp* 遺伝子クラスターの構造解析を試みた。

〔材料と方法〕 野外から採集されたクワコ個体 [京都南部 (KYOsf)、北海道北部 (SRB8-1, RSR8-1)、長崎県対馬 (TSM2-271)、三重県伊勢 (IS)] からゲノム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。塩基配列のデータから、NJ法により系統関係を推定した。

〔結果と考察〕 日本産クワコの遺伝子間配列では、構造多型が3種類確認された。このうち2種類は既知の多型と同じ4.8 kbと4.3 kbの大きさのPCR産物として、京都、北海道北部、長崎県対馬のクワコに見られた。一方、伊勢個体からは、*Bam*HI サイトを欠失した新たな多型タイプ (4.1 kbのPCR産物) が見つかった。いずれの多型構造も中国産クワコおよびカイコの構造との相同性は低かった。また、遺伝子領域の塩基配列には、日本産クワコに特有の塩基置換が多く見られた。新たに決定した日本産クワコの塩基配列を加えてNJ法による系統樹を作成したところ、従来の系統樹と同様に、*Alp-m*、*Alp-s* 共に日本産クワコはカイコや中国産クワコとは独立のクラスターを形成した。日本産のクワコは、中国産のクワコからカイコが家畜化されるよりかなり早い時期に、中国のクワコと分化したことが示唆される。

Terakado, M., Nishimura, Y., Yamashita, H., M., Yukahiro, K., Banno, Y., Itoh, M.: Structural analysis of alkaline phosphatase genes in *Bombyx mandarina* inhabiting Japan.

カイコ生物遺伝資源の長期保存に関する研究

- 凍結卵巣からの再生率の向上-

○伴野 豊・東田 万里野・長崎 紀代美・山本和典・江口誠一・田村 圭・西川和弘
(九大院農)

〔目的〕 生物学領域の研究において、その対象となる生物なくして研究はあり得ない、多様で高品質な研究素材を保有することは研究発展の基盤である。しかし、我が国では生物の系統やその由来する資源、情報に関する整備やその体制整備が脆弱である。これを解消する目的で文科省は、ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) を行っており、我々はカイコの中核機関として参画している。これまでの成果として800を超えるカイコ系統が九州大学に収集されたが、カイコの系統維持には多大な努力と経費が必要となっている。また、一か所に集まった資源のバックアップ体制の構築は事故や災害からの回復のために必須である。そこで、カイコ生物遺伝資源の長期間の保存体制の構築を目的に一連の研究を行っている。

〔材料と方法〕 長期保存の方法として種々の方法が考えられ、そのいくつかを平行して進めているが、今回は凍結卵巣からの個体再生率の向上に関して検討した。主に使用したカイコ系統は2種類の復性系統 (w28, r03) 雌にp50, p20系統を交配させた F1 系統である。卵巣凍結方法は Mochida et al.

(2003) の方法を基料に改良を加えた凍結卵巣法 (東田ら, 2009) である。今回は、凍結後、融解した卵巣を移植する条件を変え、再生率を比較した。

〔結果と考察〕 従来の移植法は、液体窒素中に凍結保存しておいた卵巣を宿主の卵巣を抽出した後、同個体へ挿入する方法であった。今回は、移植する卵巣の細体 (糸状体) を長く残し、その細体を移植時に宿主卵巣に巻付ける処理を行なった。細体を巻付けた場合 (Q田村試験区)、移植後成虫になって産卵する割合は33.6~56.8%、対象区 (Q田村試験区) は3.3~20.3%であった。平均産卵数はQ田村試験区61.8~92.6粒、細体非試験区0~42.6粒であった。産卵数は細体の材料、非試験区では少なく、細体接触による卵巣発達への悪影響はなく、細体接触が、産卵率の向上に有効である。本結果が広範なカイコ系統に有効であれば、10頭の雌個体ごとの手術を施せば、3~5頭の雌個体が産卵し、その合計卵数は180~450粒となり、実用的な長期保存技術となる。

Mochida et al, *Cryobiology*, 46, 153-160, 2003.

東田ら, 日豪講演集 80, 2009.

Banno, Y., Tsukada, M., Nagasaki, K., Yamamoto, K., Eguchi, S., Tamura, K., Nishikawa K: Establishment of long term preservation on Bio-genetical resources of the silkworm, *Bombyx mori*. - Improvement of survival ratio from frozen ovary.

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

福森 寿善 カイコ成虫トロンビン様プロテアーゼに関する研究

大学院生物資源環境科学研究科（修士課程）

倉掛麻衣子 家蚕幼虫体液の熱凝集タンパク質に関する研究

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)

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

ホアン ヴァン ナム (Vietnam)

Physicochemical and Genetic Analysis of Recombinant Inbred IJwx Lines

村上 孝裕 イネグルテリン前駆体を多量に蓄積する *glup2* 変異遺伝子の連鎖地図の構築と同変異体の解析

井上 佳美 イネ胚乳における protein disulfide isomerase like 2-3 (PDIL2-3) に関する変異体の選抜と解析

田口 修也 イネ胚乳澱粉生合成における pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) の役割

白石 祥太 新たに同定したイネ胚乳澱粉合成の基質供給に関わる *shrunken3* 変異の遺伝学的研究

串間 飛志 イネの同化澱粉変異の簡易探索法の開発

大学院生物資源環境科学研究科（博士課程）

- 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
- 中村 哲洋 Study on rice sugary2 mutation altering amylopectin structure in both storage and photosynthetic tissues
- 文柳 環 The relationship between Rab5a GTPase and guanine nucleotide exchange factor in the intracellular transport of glutelin in rice seed

【微生物遺伝子工学分野】

大学院修士課程修了者

- 今田 智子 新規色素依存性 L- グルタミン酸脱水素酵素の機能解析
- 長谷川 絵里 新規遺伝子資源探索法としてのメタエンザイム法の開発
- 片山 真之 大腸菌由来耐熱性 (R)-1,2-Propanediol dehydrogenase の機能解析
- 牟田口 祐太 L 及び D- アスパラギン酸の酵素分析法の開発
- 江藤 俊介 藍建て工程に関与するインジゴ還元酵素の機能解析

趙瑩 (フォウイン・中国)

Purification and Characterization of L-Leucine Dehydrogenase from a

大学院博士課程修了者

藤野 泰寛 Molecular mechanisms of biomineralization in the formation of siliceous deposits by *Thermus* species (Thermus 属細菌による生物鉱化現象の分子機構)

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

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」

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」

基盤研究(B)「ポストゲノム時代におけるカイコランダムミュータージェネシスとその基盤研究」

若手研究(B)「新機ピレスロイド代謝酵素の機能解析ならびに並びに特異的農薬開発への応用」

その他

(財) 日本応用酵素協会「機能性タンパク質の創成を目指したスモールヒート
ショックタンパク質の構造特性の解明」

【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 (B) 研究代表 熊丸敏博
イネプロラミンの翻訳及び小胞体内への集積機構の解明,

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

生物系特定産業技術研究支援センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業
研究代表 佐藤光
画期的米油原料用稲の育種・利用に向けた基盤的技術シーズの開発

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】

共同研究

大島：北海道立食品加工研究センター 食品バイオ部 発酵食品科，魚醤油の D- アミノ酸の機能に関する研究.

大島：株式会社ミツカン ドライ事業カンパニー，醸造酢の D- アミノ酸の機能に関する研究.

受託研究

大島 文部科学省タンパク 3 0 0 0 プロジェクト 好熱菌タンパク質の機能と構造解析

3. 講演会・セミナー・講習会

【家蚕遺伝子開発分野】

2009 年 7 月

夏休み公開講座

大学でカイコの飼育と織物作りにチャレンジしよう，九州大学（福岡）

2009 年 10 月

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）

2009 年 7 ～ 8 月

吉野ヶ里公園における企画に 40 日間程協力（佐賀）

【植物遺伝子開発分野】

佐藤 光

アメリカ合衆国 Washington State University, Saturation mutagenesis by MNU treatment in rice. 2009年10月21日,

ベトナム Plant Resource Center, Vietnam Academy of Agricultural Science. Mutations modifying starch properties in rice. 2009年08月12日

中国 江蘇省農業科学院 Toward Genetic Engineering of starch in rice. 2009年11月11日

【微生物遺伝子工学分野】

・大島敏久・川上竜巳・小山正樹・櫻庭春彦

低温菌 *Janthinobacterium lividum* 由来の巨大グルタミン酸脱水素酵素も特徴, 酵素・補酵素研究会 (2009年度), 2009年07月11日, 奈良市.

・大島敏久

フラビン含有アミノ酸脱水素酵素の構造と機能、及び応用, 日本アミノ酸学会 第3回 夏のシンポジウム, 2009年07月19日, 大丸別荘 (福岡県二日市温泉).

・大島敏久・川上竜巳・小山正樹・櫻庭春彦

低温菌 *Janthinobacterium lividum* 由来の巨大グルタミン酸脱水素酵素も特徴, 酵素・補酵素研究会 (2009年度), 2009年07月11日, 奈良市.

・長谷川絵理・土居克実・大島敏久

メタゲノム法の開発, 日本生物工学会, 2009年12月05日, 九州工業大学飯塚キャンパス.

・片山真之・土居克実・大島敏久

(R) -1,2-Prpanediol dehydrogenaseno 機能解析, 日本生物工学会, 2009年12月05日, 九州工業大学飯塚キャンパス.

・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発現機構解析, 日本生物工学会 2009 年度大会, 2009 年 09 月 23 日, 名古屋大学.

・ 今田 智子・中野 誠子・土居 克実・大島 敏久

新規色素依存性 L- グルタミン酸脱水素酵素の機能解析, 日本生物工学会 2009 年度大会, 2009 年 09 月 23 日, 名古屋大学.

・ Ong Thi Anh Phuong・西崎陽祐・大桃定洋・緒方靖哉・大島敏久・土居克実

Isolation and identification of novel lactic acid bacteria from silages in Okinawa, 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部・日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部・日本食品科学工学会西日, 2009 年 10 月 31 日, 琉球大学.

・ 今田智子・中野誠子・土居克実・大島敏久

Bacillus sp. DSM 406 由来の新規色素依存性 L- グルタミン酸脱水素酵素の性質, 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部・日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部・日本食品科学工学会西日, 2009 年 10 月 31 日, 琉球大学.

・ 牟田口祐太・米田一成・櫻庭春彦・土居克実・大島敏久

D 及び L- アスパラギン酸の酵素分析法の開発, 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部・日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部・日本食品科学工学会西日, 2009 年 10 月 31 日, 琉球大学.

・ 藤野泰寛・岩井覚・緒方靖哉・大島敏久・土居克実

シリカストレスに対する Thermus thermophilus HB8 の応答, 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部・日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部・日本食品科学工学会西日, 2009 年 10 月 31 日, 琉球大学.

・ 長谷川絵理・土居克実・大島敏久

新規遺伝子資源探索におけるメタエンザイム法の開発、第 4 回日本ゲノム微生物

学会念会, 2010年03月08日, 九州大学馬出キャンパス.

・大島敏久

日本農芸化学会功績賞受賞講演、好熱菌由来の極限酵素の機能開発, 日本農芸化学会 2010年度大会, 2010年03月27日, 東京大学安田講堂.

・牟田口 祐太・大森 勇門・赤野 裕文・土居 克実・大島 敏久: 食酢の D- アミノ酸分析とその生産への乳酸発酵の関与, 日本農芸化学会 2010年度大会, 2010年03月28日, 東京大学.

・米田一成・櫻庭春彦・村岡郁夫・老川典夫・荒木朋洋・河村俊介・大島敏久: 低温菌 *Flavobacterium frigidimaris* KUS-1 由来 L- スレオニン脱水素酵素の分子特性, 日本農芸化学会 2010年度大会, 2010年03月28日, 東京大学.

・土居克実・ONG Thi Anh Phuong・藤野泰寛・大島敏久・大桃定洋・緒方靖哉: 分子系統解析に基づく新規サイレージ乳酸菌の分離・同定, 日本農芸化学会 2010年度大会, 2010年03月28日, 東京大学.

・張 小冬・原 佑介・里村 武範・土居 克実・桜庭 春彦・大島 敏久: 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 (L-ProDH) の機能解析, 日本農芸化学会 2010年度大会, 2010年03月29日, 東京大学.

・江藤俊介・城下真史・土居克実・大島敏久: 好熱菌由来のインジゴ還元酵素の機能解析, 日本農芸化学会 2010年度大会, 2010年03月29日, 東京大学.

・大森 勇門・牟田口 祐太・土居 克実・大島 敏久: ウシ血清アルブミン中の結合態 D-Asp 残基の存在, 日本農芸化学会 2010年度大会, 2010年03月29日, 東京大学.

・桶崎陽友・山口かよ・鄭海濤・米田一成・櫻庭春彦・大島敏久・末信一郎: 改変

型 L- アスパラギン酸脱水素酵素を用いた L- アスパラギン酸バイオセンサの機能改善, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 03 月 29 日, 東京大学.

・ 里村武範・原佑介・櫻庭春彦・大島敏久: 超好熱性アークア *Aeropyrum pernix* に存在する色素依存性 L- プロリン脱水素酵素の機能解析, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 03 月 29 日, 東京大学.

・ 川上竜巳・小山正樹・櫻庭春彦・大島敏久: 巨大グルタミン酸脱水素酵素の活性触媒残基の同定, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 03 月 29 日, 東京大学.

・ 藪田行哲・野々松秀明・魚住洋平・米田一成・櫻庭春彦・大島敏久・中野長久・渡辺文雄

Pyrococcus horikoshi のメチルマロニル CoA ムターゼの分子構造, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 03 月 29 日, 東京大学.

・ 山口かよ・桶崎陽友・米田一成・櫻庭春彦・大島敏久・末信一朗
バイオセンサへの応用を目指したエラープローン RCA による耐熱性 L- アスパラギン酸脱水素酵素の機能改変, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 03 月 29 日, 東京大学.

4. 海外渡航

【家蚕遺伝子開発分野】

麻生 中国、浙江省農業科学院、大学・研究室訪問、2009 年 8 月

【植物遺伝子開発分野】

佐藤光 ミャンマー, Mandarey University of Science and Technology, (2009 年 7 月)

ベトナム, Plant Resources Centre, Vietnam Academy of Agricultural Sciences, (2009年8月)

アメリカ合衆国, Washington State University, (2009年10月)

中国, 江蘇省農業科学院, (2009年11月)

熊丸敏博 アメリカ合衆国, FRC (2009年6月)

アメリカ合衆国, American Society for Plant Biology, 2009年7月

【微生物遺伝子工学分野】

大島, ドイツ, Universitat Rostock, 目的, 2009年09月

大島, イタリア, Institute of Protein Biochemistry of CNR, 目的, 2009年10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】

Christian Wandrey, 訪問教授, Institute for Biotechnology 2 Juelich Research Center, ドイツ (日本学術振興会招聘事業) 2009年4月～5月

Rolf Wichmann 訪問教授 Fachbereich Bio- und Chemieingenieurwesen, Universitat Dortmund, ドイツ, 2009年8月

Wanna Malaphan, 訪問研究員, Faculty of Science, Kasetsart University, タイ. 2010年2月～3月

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×I90,1985年）} はカネボウから春月系交雑種に生じた *I-I* 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 I90 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	2009
生物体での分譲	国内	676 件	574 件	738 件	811 件
	国外	14 件	122 件	30 件	170 件
DNA での分譲	国内	439 件	304 件	154 件	218 件
	国外	0 件	0 件	20 件	30 件

（寄託）

カイコ 62 系統から抽出した DNA リソース 620 サンプルを受入

（フランス国、INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE から寄託）

トランスジェニック蚕 20 系統

(農業生物資源研究所)

(系統保存事業の推進)

文部科学省研究振興局ライフサイエンス課

ナショナルバイオリソースプロジェクトの支援を受け実施

フランス INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE から同国で長年系と維持されてきたカイコ系統 62 種類の DNA サンプルの寄託を受けた。卵巣凍結を利用した長期保存については、移植個体の蘇生率が 40 ～ 60% にまで高まる大きな成果を得た。精子については系統による凍結耐性の異なりが大きいので今年度は精巣凍結も試行した。数例であるが蘇生する個体を得たので次年度以降、可能性を追究する。

系統管理としては、約 800 系統のカイコ系統を飼育し、卵、幼虫、蛹時期に形質の評価を行い、次年度へと継代する保存業務を行った。今年度はセラチア菌による病気の大発生があり、3 系統を失う結果となった。病気の発生が一度生じると、飼育室から短期間で病原体を除くのは困難であるため、遠隔地の指宿試験地を第 2 蚕期に利用した。この利用で被害を最小限とすることができた。防疫対策の面からも指宿試験地は維持が必要である。ところで、セラチア菌は通常、カイコ体内に侵入しても体内で異常増殖し、発病するには至らない。しかし、今年は何らかの原因でカイコ自体が虚弱であったために日和見感染となったと考えられる。桑葉の栄養状態に問題があった可能性が高かったと考え、栄養状態の良い桑葉の確保が出来るよう夏以降桑園管理を強化した。

植物遺伝子開発分野

現在保存している品種系統の分類基準とその数を以下に示す。

HO 系統	国内外の品種系統	1,398 系統
LO 系統	1962 - 1965 年収集したわが国在来品種	1,341 系統

IBP 系統	FAO 国際共同研究供試品種	276 系統
UP 系統	国内外の陸稲品種	342 系統
CM 系統	化学変異源処理突然変異系統	5,715 系統
EM 系統	胚乳形質に関する突然変異系統	1,764 系統
		計 10,836 系統

これらの系統の一部をデータベースとして公開している。

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

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

遺伝子資源系統の導入と分譲

年次	開発系統	導入（件数 - 系統数）		分譲（件数 - 系統数）	
		国内	国外	国内	国外
2009	363			9-3074	1-8

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

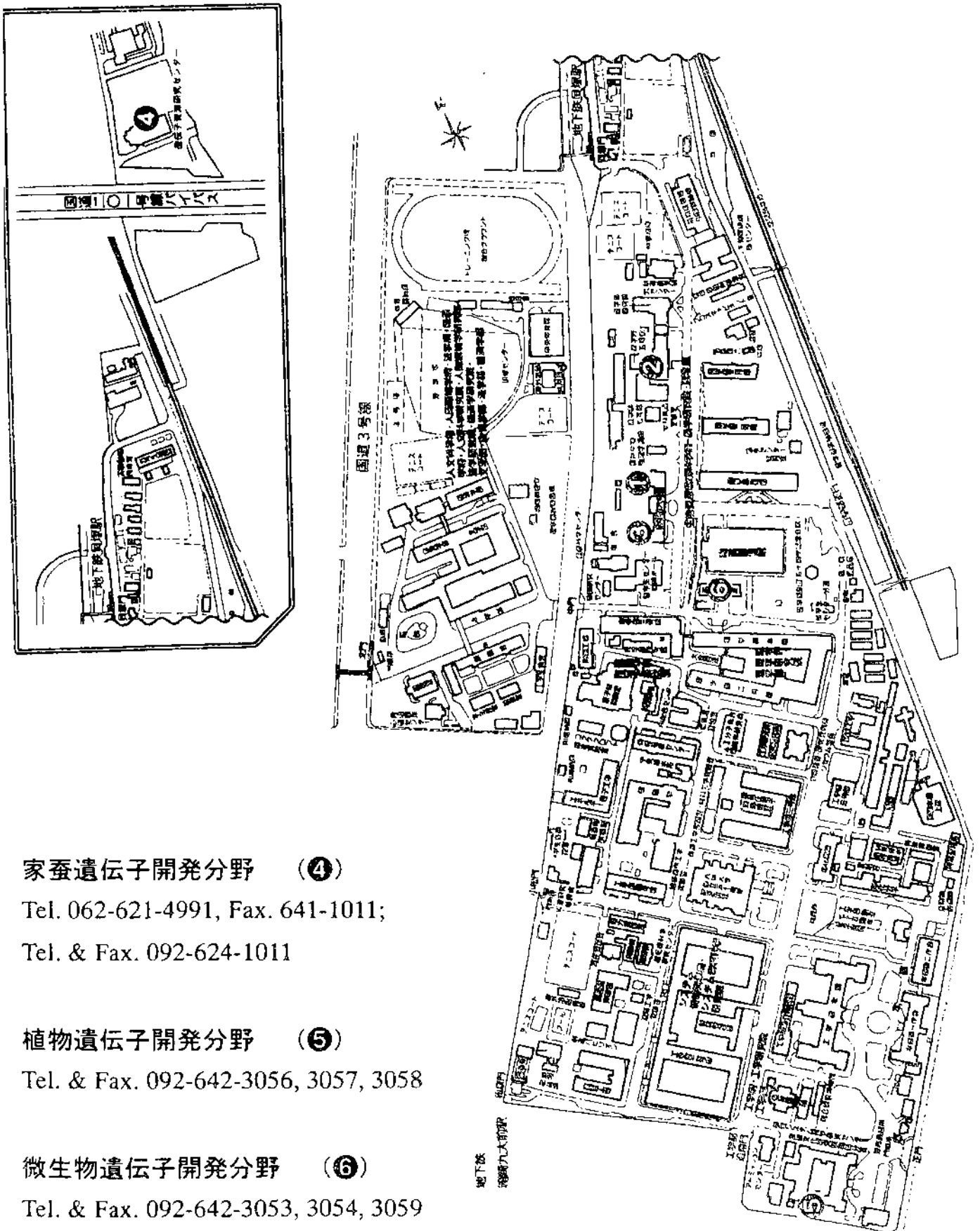
- a) Collection, evaluation and preservation of rice genetic resources
- b) Mutagenesis and mutation spectrum in rice
- c) Genetic analysis of induced mutants in rice: Starch, protein and lipid stored in grain
- d) Genome analysis of the useful genes in rice
- e) Isozyme variation in rice, barley and 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 13 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