

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23号

令和元年

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

巻頭言	1
I. センターの概要	3
1. 目的	3
2. 沿革	3
3. 組織・教職員	4
4. 研究と事業内容	5
5. 遺伝子資源開発研究センター運営委員会委員（令和2年3月31日現在）	5
6. 組織図	6
II. 研究成果	7
1. 研究業績・出版物リスト	7
2. 原著論文要旨	13
III. センターの活動状況	32
1. 教育活動	32
2. 科学研究費・共同、受託研究等	33
3. 講演会・セミナー・講習会	34
4. 海外渡航	35
5. 訪問研究員等	35
IV. 遺伝子資源の保存、収集の状況	36
V. センター規程	44
VI. 英文摘要	46
VII. センター研究棟配置図	48

巻頭言

リソースなくしてリサーチなし

研究をおこなうためには研究材料が必須である。「リソースなくしてリサーチなし」と言われるゆえんである。ライフサイエンスは、生物系統や細胞、遺伝子、などの生物研究材料（バイオリソース）を研究者間で共有することにより大きく発展してきた。バイオリソースは一度絶えたら二度と復活はできないし、遺伝的な変化もするという特別の性質を持っている（ライフサイエンス委員会バイオリソース整備戦略作業部会より抜粋）。バイオリソースの維持には特別な配慮を必要とする。1921（大正10）年の九州大学農学部開設当初から歴代の諸教授によって、農業ならびに学術研究上、重要なバイオリソースの収集が行われ、学問の発展に寄与してきた。中でも、カイコ・イネ・発酵微生物等に関しては系統数の増加・多様化が顕著で、保有系統の維持・管理業務のために、さらに高度な遺伝情報の解明と新規系統の開発が必要とされた。バイオリソースの維持・評価・開発・提供を専門として取り扱うために、遺伝子資源研究センターが1987年に設置された。設立当初は10年時限の施設であったが、10年時限の到来を機会に遺伝子資源開発研究センターとして恒久的な施設に変身した。伊都キャンパスに移転とともに、カイコ及びイネは新設した各バイオリソース施設においてリソースの維持・評価などを行っている。さらに、イネとカイコについては2002年より国家プロジェクトとして発足したナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)に当初より参画し、バイオリソースの開発、評価、維持、提供事業に益々拍車がかかることとなった。

本センターが有するバイオリソースは国内外の研究者等に提供されており、ライフサイエンスに関する数多くの優れた研究成果を生み出している。詳しくは遺伝子資源開発研究センターのHPを参照されたい。

「バイオリソースは一度失うと復元が難しい」。バイオリソース関係者の間では、2011年の東日本大震災後にこの言葉が現実味を増して感じられるようになった。同震災でのバイオリソースの被害は比較的少なく済んだといわれているが、東北大学では実験中のマウスリソース全てが犠牲になった。こうした現実を踏まえ、震災を含めた自然災害や火災などの事故に備えた取り組みが必要である。イネについては国立遺伝学研究所（遺伝研）とリソース種子を交換してそれぞれバックアップとして保管しており、遺伝研所有の種子稔実率が低い野生イネの一部を本学指宿試験地で栽培している。カイコについては卵を長野県にある天然の冷蔵庫である風穴（ふうけつ）にバックアップ保存している。風穴は昭和初期までは全国で蚕の保存に用いられていた。前近代的と思われるかもしれないが停電の心配は無用で、この10年着実にバックアップ機能を果たしている。微生物は遺伝研のIBBPプロジェクトに参画し、微生物資源の消失リスクの軽減化を行なっている。また、九州が誇る地熱地域からの微生物分離や九州が地理的・環境的にも近い東南アジアの微生物資源

の探索も行い、世界規模での微生物資源の維持・管理に務めている。こうした自然災害に加え、2020年に発生し世界を震撼させているコロナ渦においてもリソースの維持は継続しなければならない。少人数で効率よく安全にリソースを次代へ継承する方策もまた我々の喫緊の宿題となっている。

こうした様々な難問が尽きないバイオリソース事業であるが、そのためには後進となる人材の育成が重要である。バイオリソース業務は直接の論文にほとんど結びつかない。当センター教員は、研究者として自身の研究を遂行することが重要であることはもちろんであるが、決して少ないといえないエフォートを使って論文にならないバイオリソース業務を遂行していかねばならない。このような人材は一朝一夕に育つものではないにもかかわらず、人材が育たなければバイオリソースの維持が困難となることは明らかである。

遺伝子資源開発研究センターでは「リソースなくしてリサーチなし、リサーチなくしてリソースなし」を肝に銘じながら、教職員一丸となって粛々と事業を進めており、今後も事業の発展を期しながら事業を進めていく。現在、全分野の教授は前身となる遺伝子資源研究センター設立以来4代目もしくは3代目である。今後、初代教授より受け継いできた、加えて九州大学農学部創立以来の歴代の諸教授より受け継いできたバイオリソースを継承していくことは当然として、新奇バイオリソース開発、バイオリソース維持、評価のための新奇技術開発等に真摯に取り組み、社会的責務を果たしていく決意を九州大学農学部創立100年という歴史の節目に立ち、新たにしている。

遺伝子資源開発研究センター長 熊丸敏博
(九州大学農学部創立百周年記念誌より)

I. 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に努める。

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名の振替え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 遺伝子資源開発学講座（昆虫遺伝子資源学分野、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。 |
| 平成22年4月 | 農学研究院・学府組織改組に伴い、昆虫遺伝子資源学分野、植物遺伝子資源学分野は、生命機能科学部門 システム生物学講座に、微生物遺伝子工学分野は分子微生物学・バイオマス資源科学講座に所属し、教育に参画した。 |

3. 組織・教職員

センター長 熊丸 敏博

家蚕遺伝子開発分野

教授	伴野 豊	技術職員	西川 和弘
助教	山本 幸治	技術職員	田村 圭
学術研究員	藤井 告	技術職員	山本 和典
学術研究員	福森 善寿		

植物遺伝子開発分野

教授	熊丸 敏博	テクニカルスタッフ	原田 良子
准教授	久保 貴彦	技術補佐員	池田 恵利佳
学振特別研究員	福田 真子		
学術研究員	松坂 弘明		
学術研究員	中村 哲洋		

微生物遺伝子開発分野

教授	土居 克実	研究支援推進員	山口 幸子
助教	藤野 泰寛		

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NBRP（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

- ・イネ種子貯蔵タンパク質の生合成・集積を制御する遺伝的機構の解明
- ・イネの生殖発生と進化に関わる機構の解明
- ・ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)におけるイネ突然変異系統の整備
- ・在来イネ遺伝子資源の保存と特性評価に関する研究

微生物遺伝子開発分野

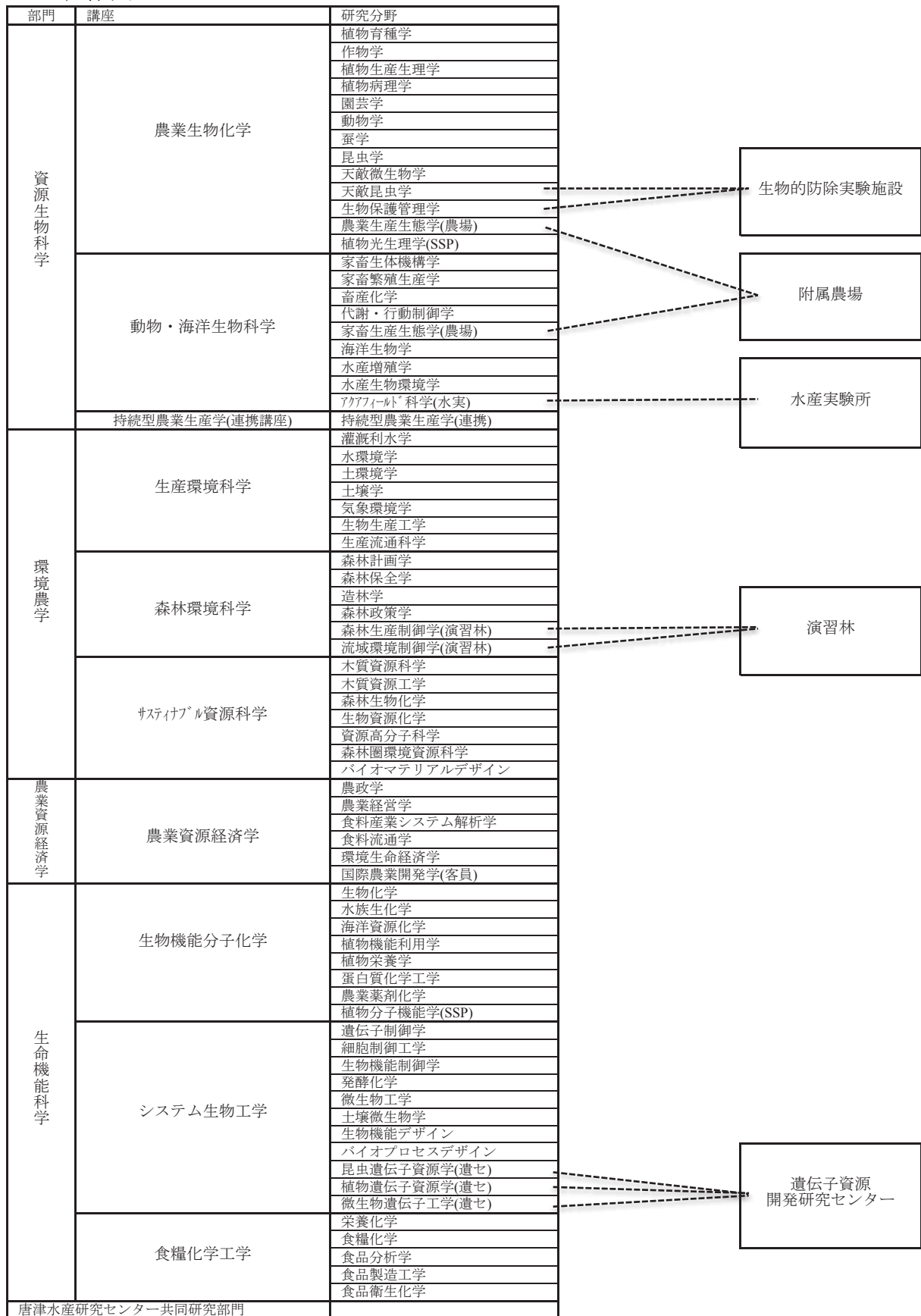
- ・微生物遺伝子資源の探索と評価、保存と利用開発、並びに有用遺伝子の高度機能化と応用展開に関する研究

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. 遺伝子資源開発研究センター運営委員会委員（令和2年3月31日現在）

委員長	日下部 宜宏	(資源生物科学部門)
教授	熊丸 敏博	(遺伝子資源開発研究センター)
教授	伴野 豊	(遺伝子資源開発研究センター)
教授	土居 克実	(遺伝子資源開発研究センター)
准教授	田代 康介	(生命機能科学部門)
准教授	片倉 喜範	(生命機能科学部門)
教授	吉村 淳	(資源生物科学部門)
准教授	小名 俊博	(環境農学部門)
教授	南石 晃明	(農業資源経済学部門)
教授	望月 俊宏	(附属農場)
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

- 1) Haque MR, Hirowatari A, Nai N, Furuya S, Yamamoto K,
Serine hydroxymethyltransferase from the silkworm *Bombyx mori*: Identification, distribution, and biochemical characterization,
Archives of Insect Biochemistry & Physiology, **102**, e21594 (2019)
- 2) Haque MR, Hirowatari A, Saruta F, Furuya S, Yamamoto K,
Molecular survey of the phosphoserine phosphatase involved in L-serine synthesis by silkworms (*Bombyx mori*),
Insect Molecular Biology, **29**, 48-55 (2019)
- 3) Saruta F, Yamada N, Yamamoto K,
An omega-class glutathione S-transferase in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* exhibits glutathione transferase and dehydroascorbate reductase activities,
Archives of Insect Biochemistry & Physiology, **102**, e21599 (2019)
- 4) Saruta F, Yamada N, Yamamoto K,
Functional analysis of an epsilon-class glutathione S-transferase from *Nilaparvata lugens*,
Journal of Insect Science, **19**, 1-7 (2019)
- 5) Yamamoto K, Tsubota T, Uno T, Tsujita Y, Yokota S, Sezutsu S, Mita K,
A defective prostaglandin E synthase could affect egg formation in the silkworm *Bombyx mori*,
Biochemical and Biophysical Research Communications, **521**, 347-352 (2019)
- 6) Nagaoka S, Yamamoto K,
Identification and characterization of superoxide dismutase in silkworm seminal fluid,
Journal of Insect Biotechnology & Sericology, **88**, 39-47 (2020)

B. 著書・総説

なし

C. 学会発表

- 1) Haque MR, Hirowatari A, Koyanagi A, Ichinose T, Abiru M, Mohri S, Furuya S, Yamamoto, K,
Molecular characterization and expression analysis of a phosphoserine aminotransferase involving L-serine synthesis from silkworm, *Bombyx mori*
第56回化学関連支部合同大会, 2019年07月13日, 北九州.

- 2) 福森寿善, 吉田美紀代, 伴野豊,
カイコ除殻卵の保存最適時期の検討と超低温処理期間の影響,
Cryopreservation Conference 2019, 2019年11月18日, つくば市.
- 3) 福森寿善, 吉田美紀代, 伴野豊,
カイコ除殻卵の超低温処理期間の影響,
Cryopreservation Conference 2019, 2019年11月19日, つくば市.
- 4) Fujii T, Fukumori H, Yamamoto K, Tamura K, Nishikawa K, Banno Y,
An attractive bioresource in Kyushu University supported by NBRP,
25th ISC Congress-2019, 2019年11月19日, つくば市
- 5) Fukumori H, Nagasaki K, Eda Y, Fujii T, Shimada T, Kajiura Z, Banno Y,
Cryopreservation of Bombyx mori and other wild silkmoths using frozen gonads,
25th ISC Congress-2019, 2019年11月20日, つくば市
- 6) 福森寿善, 吉田美紀代, 藤井告, 伴野豊,
カイコ除殻卵のガラス化处理が胚子組織の構造に及ぼす影響,
日本蚕糸学会第90回大会, 2020年3月7日, 信州大学
- 7) 藤井告, 山本和典, 田村圭, 西川和弘, 伴野豊,
RNA-seq 解析とゲノム編集による p 油 (*op*) の原因遺伝子の解明
日本蚕糸学会第90回大会, 2020年3月7日, 信州大学

【植物遺伝子開発分野】

A. 原著論文

- 1) Kubo F. C., Y. Yasui, T. Kumamaru, W. Tanaka, H. Hirano.
DWARF WITH SLENDER LEAF1 encoding a histone deacetylase plays diverse roles in rice development.
Plant and Cell Physiology **61**, 457-469 (2020) Doi: org/10.1093/pcp/pcz210
- 2) Shenton M, Kobayashi M, Terashima S, Ohyanagi H, Copetti D, Hernández-Hernández T, Zhang J, Ohmido N, Fujita M, Toyoda A, Ikawa H, Fujiyama A, Furuumi H, Miyabayashi T, Kubo T, Kudrna D, Wing R, Yano K, Nonomura KI, Sato Y, Kurata N.,
Evolution and diversity of the wild rice *Oryza officinalis* complex, across continents, genome types, and ploidy levels.,
Genome Biology and Evolution, **12**, 4, 413-428 (2020) doi:10.1093/gbe/evaa037
- 3) Tian L., H. Chou, M. Fukuda, T. Kumamaru, T. W. Okita.
mRNA localization in plant cells.
Plant Physiology **182**, 97-109 (2020) Doi: 10.1104/pp.19.00972
- 4) Chou H., T. Li, M. Fukuda, T. Kumamaru, T. W. Okita.
The role of RNA binding protein OsTudor-SN in post-transcriptional regulation of seed storage proteins and endosperm development.

Plant and Cell Physiology **60** (10), 2193-2205 (2019) Doi: org/10.1093/pcp/pcz113

- 5) Chou H., L. Tian, H. Washida, M. Fukuda, T. Kumamaru, T. W. Okita.
The rice storage protein mRNAs as a model system for RNA localization in higher plants.
Plant Science **284**, 203-211 (2019) Doi: org/10.1016/j.plantsci.2019.04.014
- 6) Ikeda T., Tanaka W, Toriba T., Suzuki C., Maeno A., Tsuda K., Shiroishi T., Kurata T. Sakamoto T., Murai M., Matsusaka H., Kumamaru T., Hirano H.,
BELL1-like homeobox genes regulate inflorescence architecture and meristem maintenance in rice,
The Plant Journal **98** (3), 465-478, (2019) doi.org/10.1111/tpj.14230
- 7) Kato K., Y. Suzuki, Y. Hosaka, R. Takahashi, I. Kodama, K. Sato, T. Kawamoto, T. Kumamaru, N. Fujita.
Effect of high temperature on starch biosynthetic enzymes and starch structure in japonica rice cultivar 'Akitakomachi' (*Oryza sativa* L.) endosperm and palatability of cooked rice.
Journal of Cereal Science **87**, 209-214 (2019) doi. org/10.1016/j.jcs.2019.04.001

B. 著書・総説

- 1) 福田真子, 熊丸敏博
「コメ貯蔵タンパク質グルテリンの細胞内輸送機構の解明」
Plant Morphology **31**, 31-35 (2019)

C. 学会発表

- 1) 永松 志朗, 和田 卓也, 松島 良, 藤田 直子, 三浦 聡子, クロフツ 尚子, 保坂 優子, 熊丸 敏博,
イネデンプン構造変異系統の胚乳特性解析および原因遺伝子探索,
日本育種学会第137回講演会, 2020年3月 東京大学
- 2) 福田真子, 熊丸敏博,
Thomas W. Okita, Golgi Transport 1 (GOT1B) は貯蔵タンパク質 RNA の特定小胞体領域への局在及びグルテリンと α - グロブリンの小胞体からの効率的な輸送に必要である,
第 61 回日本植物生理学会年会, 2020 年 3 月. 大阪大学
- 3) 河村敏貴, 小林奈通子, グエンタンハオ, 石川亮, 且原真木, 田野井慶太郎, 松坂弘明, 熊丸敏博,
イネのTILLING 変異系統を用いたOsHKT1;4 Na⁺ 輸送体の塩ストレス下における生理機能の解明,
第61回日本植物生理学会年会, 2020年3月. 大阪大学
- 4) Tran Hong Quan, Hiroaki Matsusaka, Tomokazu Ushijima, Takahiko Kubo, Toshirhiro Kumamaru,

Identification of genomic region harboring Endosperm Storage Protein (ESP) 3 gene regulating the Cysteine-rich prolamine by MutMap,

日本育種学会第14回九州育種談話会, 2019年11月. 東海大学

- 5) 中村哲洋, Tho Nguyen, 久保貴彦, 熊丸敏博,
超軟質米の作出に向けた Isoamylase 1 活性低下変異の単離および解析,
日本育種学会第14回九州育種談話会, 2019年11月. 東海大学
- 6) ラハマ シティ ナル アジザ フォージヤティ, 熊丸 敏博, 久保 貴彦,
イネ雑種雄性不稔に関与する INK 遺伝子のファインマッピング,
日本育種学会第 136 回講演会, 2019 年 9 月. 近畿大学
- 7) グエン ティ フオング トー, 中村 哲洋, 熊丸 敏博, 久保 貴彦,
Characterization of a new gene involved in starch metabolism of rice,
日本育種学会第136回講演会, 2019年9月. 近畿大学
- 8) 和田卓也, 松島良, 藤田直子, 三浦聡子, クロフツ尚子, 保坂優子, 永松志朗, 熊丸敏博,
難消化性澱粉を保有するイネ澱粉構造変異系統の胚乳特性解析,
第68回日本応用糖質科学会大会, 2019年9月. 岐阜大学
- 9) Masako Fukuda, Toshihiro Kumamaru, Thomas W. Okita,
GOT1B is required for localization of storage protein RNA and for export of proglutelin from ER,
American Society of Plant Biologist, 2019年8月. 米国

D. 特許出願

- 1) 鈴木保宏、長谷川陽一、永田俊文、濱田茂樹、秋田祐介、熊丸敏博、松坂弘明
トリアシルグリセロールリパーゼ変異植物
優先権主張 特願 2014-058474 (平成 26 年 3 月 20 日出願)
特願 2015-52078 (平成 27 年 3 月 16 日出願) 特開 2015-192662 (平成 27 年 11 月 5 日)
特許 6558825 (令和 1 年 7 月 26 日登録)

E. データベース等

突然変異系統データベース (Oryzabase上)

<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabaseV4/>

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

F. その他

TILLINGオープンラボ(Oryzabase上)

<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabaseV4/tilling/openLab>

【微生物遺伝子開発分野】

A 原著論文

- 1) Sirinthorn Sunthornthummas, Katsumi Doi, Achariya Rangsiruji, Sukhumaporn Krajangsung, Siriruk Sarawaneeyaruk, Onanong Pringsulaka,
Isolation and characterization of spontaneous phage-resistant mutants of *Lactobacillus paracasei*,
Food Control, **99**, 114-123, (2019)

B. 著書・総説

- 1) 藤野泰寛、土居克実,
シリカを誘導剤とする異種タンパク質発現システム,
バイオサイエンスとインダストリー, **77** (5), 380-381, (2019)
- 2) 緒方靖哉、西山孝、土居克実,
改訂 ウイルス分類,
化学と生物, **58** (1), 20-33 (2020)

C. 学会発表

- 1) 副島春香, 中村彩乃, 藤野泰寛, 土居克実,
好熱性繊維状ファージにおける推定SSBタンパク質の機能解析,
第26回 日本生物工学会九州支部 長崎大会, 2019.12.
- 2) NguyenCongThanh, YasuhiroFujino, YasuakiHiromasa, KatsumiDoi,
Characterization and genome structure of virulent phage ϕ EM4 infected to *Enterobacter* sp. M4, a cause of soft rot disease of plants,
日本農芸化学会 2019 年度 西日本・中四国支部合同沖縄大会, 2019.11.
- 3) KOJIMA K, GODA A, MAEDA J, FUJINO Y, DOI K,
Elucidation of the metabolic mechanism of D-BCAA produced by *Lactobacillus otakiensis*,
JSBBA West 2nd Student Forum, 2019.11.
- 4) YOSHIDA N, YAMASAKO A, FUJINO Y, DOI K,
Functional analysis of Receptor Binding Protein of *Lactococcus* phage Q1 isolated from lactic acid fermentation plant,
JSBBA West 2nd Student Forum, 2019.11.
- 5) N. Tsuchiya, Y. Suematsu, Y. Fujino, K. Doi,
A new gene expression system for a thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*, using a silica-inducible promoter,
iBS2019, 2019.10.

- 6) XAYAPATHASOULIYA, NGUYEN CONGTHANH, 藤野泰寛, 土居克実,
Isolation and characterization of plant pathogenic microorganisms from Southeast Asia,
第56回化学関連支部合同九州大会, 2019.07.
- 7) 木室綾華, 山迫彩華, 藤野泰寛, 廣政恭明, 土居克実,
乳酸発酵現場で単離されたファージゲノムの特性と宿主におけるプロファージ誘導,
第56回化学関連支部合同九州大会, 2019.07.

Molecular survey of the phosphoserine phosphatase involved in L-serine synthesis by silkworms (*Bombyx mori*)

M. R. Haque, A. Hirowatari, F. Saruta, S. Furuya and K. Yamamoto

Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University Graduate School, Fukuoka, Japan

Abstract

Phosphoserine phosphatase (PSP) catalyses the synthesis of L-serine via the phosphorylated pathway by facilitating the dephosphorylation of phosphoserine. A cDNA encoding PSP from the silkworm *Bombyx mori* (bmPSP) was isolated using reverse transcription-PCR and then sequenced. The resulting clone encoded 236 amino acids with a molecular weight of 26 150, exhibiting 14–60% sequence identity with other PSPs. The recombinant PSP was overexpressed in *Escherichia coli* and purified. Kinetic studies showed that bmPSP possessed activity toward L-phosphoserine, and Asp20, Asp22 and Asp204 in bmPSP were found to be critical for modulating bmPSP activity. Real-time PCR analysis provided evidence that the amount of *bmpsp* transcript was reduced in middle silk glands of a sericin-deficient silkworm strain. These findings revealed that bmPSP may play important roles in synthesizing one-carbon donors of L-serine, which is abundant in silk, as well as other cell metabolites in *B. mori*.

Keywords: phosphoserine phosphatase, serine, silkworm, phosphorylated pathway.

Introduction

There are two pathways for the biosynthesis of L-serine (Wang *et al.*, 2002; El-Hattab, 2016). The first pathway is the conversion from glycine, in which serine is produced


from glycine and 5,10-methylenetetrahydrofolate via the activity of serine hydroxymethyltransferase (SHMT). The second pathway is the de-novo phosphorylated pathway, in which serine is produced from D-3-phosphoglycerate via the activity of three enzymes: D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, phosphoserine aminotransferase (PSAT) and phosphoserine phosphatase (PSP). PSP [EC: 3.1.3.3] catalyses the dephosphorylation of L-phosphoserine to L-serine in this phosphorylated pathway (Neuhaus and Byme, 1958). To date, two types of PSPs have been identified, ie the Mg²⁺-dependent PSP belonging to the haloacid dehalogenase (HAD) superfamily (Borkerhagen and Kennedy, 1959; Koonin and Tatusov, 1994) and the metal-independent PSP present in autotrophic bacteria (Chiba *et al.*, 2012, 2013; Kim *et al.*, 2017). L-serine acts as a hub of one-carbon metabolism because of its role as a main 1C donor (Ducker and Rabinowitz, 2017). Thus, L-serine plays critical roles in the synthesis of essential cell metabolites, including glycine, cysteine, methionine, purines and thymidine, in living cells (Ducker and Rabinowitz, 2017). This non-essential amino acid is also necessary for the production of sphingolipids, porphyrins and neuromodulators in living organisms (Snell, 1984; Snyder and Kim, 2000).

Silkworm (*Bombyx mori*) is a lepidopteran model organism and economically crucial insect that has been used as a molecular genetic resource to elucidate various biological processes. Silk is a major economic component that is synthesized in the silk glands of silkworms. Silk fibres are composed of two types of protein, ie fibroin and sericin, which contain high serine, glycine and alanine content (Takasu *et al.*, 2002). Serine synthesis by specific enzymes is related to the high serine content of silk. Therefore, identification and biochemical characterization of PSPs are essential for elucidating the mechanisms of serine production and biosynthesis of silk fibres and various cell metabolites in silkworms. Although several studies have evaluated the roles of PSPs with regard to their metabolic significance, no reports have described the functions of PSPs in silkworms.

First published online 11 July 2019.

Correspondence: Kohji Yamamoto, Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University Graduate School, 744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan. Tel.: + 81 92 802 4819; fax: + 81 92 802 4822; e-mail: yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp

Serine hydroxymethyltransferase from the silkworm *Bombyx mori*: Identification, distribution, and biochemical characterization

Mohammad R. Haque | Aiko Hirowatari | Nonoko Nai |
Shigeki Furuya | Kohji Yamamoto 

Department of Bioscience and Biotechnology,
Kyushu University Graduate School, Nishi-ku,
Fukuoka, Japan

Correspondence
Kohji Yamamoto, Department of Bioscience
and Biotechnology, Kyushu University
Graduate School, 744 Motoooka, Nishi-ku,
Fukuoka 819-0395 Japan.
Email: yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp

Funding information
JSPS KAKENHI Grant/Award Numbers:
JP15H04611, 17K19272

Abstract

Serine hydroxymethyltransferase (SHMT) catalyzes the interconversion of serine and tetrahydrofolate (THF) to glycine and methylenetetrahydrofolate. cDNA encoding *Bombyx mori* SHMT (bmSHMT) was cloned and sequenced. The deduced amino acid sequence consisted of 465 amino acids and was found to share homology with other SHMTs. Recombinant bmSHMT was overexpressed in *Escherichia coli* and purified to homogeneity. The enzyme showed optimum activity at pH 3.0 and 30°C and was stable under acidic conditions. The K_m and k_{cat}/K_m values for THF in the presence of Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺) were 0.055 mM and 0.081 mM⁻¹ s⁻¹, respectively, whereas those toward NADP⁺ were 0.16 mM and 0.018 mM⁻¹ s⁻¹ and toward L-serine were 1.8 mM and 0.0022 mM⁻¹ s⁻¹, respectively. Mutagenesis experiments revealed that His119, His132, and His135 are important for enzymatic activity. Our results provide insight into the roles and regulation mechanism of one-carbon metabolism in the silkworm *B. mori*.

KEYWORDS

biosynthesis, cobalamin, one-carbon metabolism, site-directed mutagenesis, tetrahydrofolate

1 | INTRODUCTION

One-carbon metabolism contributes to the synthesis of purines, the metabolism of amino acids, and the production of glutathione, adenosine triphosphate, and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺) (Locasale, 2013;

An omega-class glutathione S-transferase in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* exhibits glutathione transferase and dehydroascorbate reductase activities

Fumiko Saruta | Naotaka Yamada | Kohji Yamamoto 

Department of Bioscience and Biotechnology,
Kyushu University Graduate School, Fukuoka,
Japan

Correspondence

Kohji Yamamoto, Department of Bioscience
and Biotechnology, Kyushu University
Graduate School, 744 Motooka, Nishi-ku,
819-0395 Fukuoka, Japan.
Email: yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp

Abstract

A complementary DNA that encodes an omega-class glutathione S-transferase (GST) of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (nIGSTO), was isolated by reverse transcriptase polymerase chain reaction. A recombinant protein (nIGSTO) was obtained via overexpression in the *Escherichia coli* cells and purified. nIGSTO catalyzes the biotransformation of glutathione with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, a general substrate for GST, as well as with dehydroascorbate to synthesize ascorbate. Mutation experiments revealed that putative substrate-binding sites, including Phe28, Cys29, Phe30, Arg176, and Lue225, were important for glutathione transferase and dehydroascorbate reductase activities. As ascorbate is a reducing agent, nIGSTO may participate in antioxidant resistance.

KEYWORDS

glutathione, glutathione transferase, *Nilaparvata lugens*, oxidative stress

1 | INTRODUCTION

Glutathione S-transferases (GSTs [EC 2.5.1.18]) are involved in conjugation reaction of glutathione (GSH) to exogenous compounds, as well as to endogenous materials (Armstrong, 1997; Hayes, Flanagan, & Jowsey, 2005; Listowsky, Abramovitz, Homma, & Niltsu, 1988). GST is recognized to be responsible for the metabolism of exogenous compounds and the regulation of endogenous materials. GSTs exist widely in both prokaryotic and eukaryotic species. Mammalian GSTs containing several classes have been reported: alpha, mu, pi, omega, sigma, theta, and zeta (Ferguson & Bridge, 2019; Mannervik, Board, Hayes, Listowsky, & Pearson, 2005), whereas six

Functional Analysis of an Epsilon-Class Glutathione S-Transferase From *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)

Fumiko Saruta,¹ Naotaka Yamada,¹ and Kohji Yamamoto^{1,2}

¹Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu University Graduate School, 744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan, and ²Corresponding author, e-mail: yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp

Subject Editor: Joanna Chiu

Received 13 June 2019; Editorial decision 3 September 2019

Abstract

Glutathione conjugation is a crucial step in xenobiotic detoxification. In the current study, we have functionally characterized an epsilon-class glutathione S-transferase (GST) from a brown planthopper *Nilaparvata lugens* (nIGSTE). The amino acid sequence of nIGSTE revealed approximately 36–44% identity with epsilon-class GSTs of other species. The recombinant nIGSTE was prepared in soluble form by bacterial expression and was purified to homogeneity. Mutation experiments revealed that the putative substrate-binding sites, including Phe107, Arg112, Phe118, and Phe119, were important for glutathione transferase activity. Furthermore, inhibition study displayed that nIGSTE activity was affected by insecticides, proposing that, in brown planthopper, nIGSTE could recognize insecticides as substrates.

Key words: *Nilaparvata lugens*, glutathione, glutathione transferase, insecticide, site-directed mutagenesis

Glutathione S-transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) are widely present in both prokaryotic and eukaryotic cells. They are involved in glutathione (GSH) conjugation, which contributes in xenobiotic(s) detoxification and regulates endogenous compounds (Listowsky et al. 1988; Armstrong 1997). Previously, two GSTs (delta and sigma classes of GST) from *Nilaparvata lugens* have been identified (Yamamoto et al. 2015, 2017). Dipteran insects such as *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) (Ranson and Hemingway 2005) and *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) (Sawicki et al. 2003; Tu and Akgul 2005) have been reported to possess six GST classes (delta, epsilon, omega, sigma, theta, and zeta). In silkworm (*Bombyx mori* [Lepidoptera: Bombycidae]), we have characterized delta, epsilon, omega, sigma, theta, zeta, and an unclassified GST isoform (Yamamoto et al. 2005, 2006, 2009a,b, 2011, 2013). Apart from this, we have also identified a sigma-class GST from the fall webworm *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Erebidae); a serious lepidopteran pest of the broad-leaved trees (Yamamoto et al. 2007).

Among the GST classes, delta and epsilon are insect specific. The involvement of delta-class GSTs of *A. gambiae* and *D. melanogaster* has been observed in dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) detoxification (Ranson et al. 1997a, b; Low et al., 2010). Expression of delta-class GST in *Liposcelis entomophila* (Psocoptera: Liposcelididae), *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae), and *Pieris rapae* was noted as upregulated by insecticide application (Han et al. 2016; Jing et al. 2017; Liu et al. 2017), whereas the activity of epsilon-class GST of *Spodoptera exguia* (Lepidoptera: Noctuidae) was inhibited by insecticides (Wan et al. 2016). In *Musca domestica* (Diptera:

Muscidae), the epsilon-class GST exhibited activity toward insecticide (Wei et al. 2001) and, in *A. gambiae*, it displayed DDT detoxification (Wang et al. 2008). So far, we have identified and characterized unclassified GST2 of *B. mori* (bmGSTu2) that catalyzes GSH conjugation to organophosphorus insecticide and is closely related to epsilon-class GST (Yamamoto and Yamada 2016). *N. lugens* is a major agricultural pest of the rice crop and, in this study, we focus on the uncharacterized epsilon-class GST (nIGSTE) of the brown planthopper (*N. lugens*). An understanding of this pest's detoxification capacity, particularly with respect to GSTs function, could provide leads for pest control. In this study, we have identified and characterized nIGSTE complementary DNA (cDNA), which was overexpressed in *Escherichia coli* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae) cells and the properties of the synthesized recombinant proteins were investigated.

Materials and Methods

Insects

Adult brown planthoppers *N. lugens* (Izumo) obtained from the National Agriculture and Food Research Organization, Tsukuba, Japan, were used for total RNA isolation with RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Sequencing of nIGSTE cDNA

First-strand cDNA was synthesized from the total RNA, derived by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

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

A defective prostaglandin E synthase could affect egg formation in the silkworm *Bombyx mori*



Kohji Yamamoto^{a, *}, Takuya Tsubota^b, Tomohide Uno^c, Yutaro Tsujita^e, Shingo Yokota^e, Hideki Sezutsu^b, Kazuei Mita^d

^a Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu University Graduate School, Fukuoka, 819-0395, Japan

^b Transgenic Silkworm Research Unit, Institute of Agrobiological Sciences, National Agriculture and Food Research Organization, 1-2 Owashi, Tsukuba, Ibaraki, 305-8634, Japan

^c Department of Biofunctional Chemistry, Faculty of Agriculture, Kobe University, Kobe, 657-8501, Japan

^d State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Biological Science Research Center, Southwest University, Chongqing, 400716, China

^e Department of Agro-environmental Sciences, Kyushu University Graduate School, Fukuoka 819-0395, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 September 2019

Accepted 14 October 2019

Available online 24 October 2019

Keywords:

Prostaglandin E synthase

Bombyx mori

Genome-editing

Chorion genes

Egg formation

ABSTRACT

We had previously reported a prostaglandin E synthase (bmPGES) in the silkworm *Bombyx mori* that catalyzes the isomerization of PGH₂ to PGE₂. The present study aimed to provide a genome-editing characterization of bmPGES in *B. mori*. Results showed bmPGES gene disruption to result in a reduced content of PGE₂. The change affected the expression of chorion genes and egg formation in silkworms. Collectively, the results indicated that bmPGES could be involved in reproduction of *B. mori*. Therefore, this study provides insights into the physiological role of bmPGES and PGE₂ in silkworms.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Glutathione (GSH) conjugation is essential for detoxification of xenobiotics and endogenous compounds such as unsaturated aldehydes and prostaglandins (PGs) [1,2]. Isomers of PG such as PGH₂, PGD₂, PGE₂ and PGF₂, are also known [3,4]. We had previously reported the identification and structural characterization of *Bombyx mori* prostaglandin E synthase (bmPGES), which catalyzes the isomerization of PGH₂ to PGE₂ in silkworm. In bmPGES structure, we had determined the amino acid residues related to glutathione-binding site and electron-sharing network [5]. PGES enzymes in mammals are homologs of sigma-class glutathione transferases (GSTs), same as bmPGES [6–8]. PGs are known to be involved in a variety of physiological and pathological processes in mammals.

Reports on PGE₂ in insects are gradually increasing. PGE₂ affects oviposition behavior in the cricket *Teleogryllus commodus* [9] and

cellular immune reaction in the greater wax moth *Galleria mellonella* [10]. In *Spodoptera exigua*, PGE₂ influences the defense reaction via the release of prophenoloxidase, which is a crucial protein for the insect immune response [11]. In *B. mori*, inhibitors of cyclooxygenase involved in PG signaling have been shown to influence oogenesis [12]. However, knowledge about PGE₂ signaling and the role of PGE₂ in *B. mori* remain unclear. To elucidate the roles of prostaglandin synthase and its product PGE₂ in *B. mori*, here, we have provided genome-editing characterization of a PGE₂-metabolizing glutathione S-transferase in *B. mori*. Analysis of bmPGES gene disruption helped to clarify how PGE₂ affects insect physiology and contributes to a more detailed understanding of PGE₂ signaling system.

2. Materials and methods

2.1. Immunohistochemistry

Anti-bmPGES antibody was raised against internal amino acid sequences: ²⁸FEDNRISSENWPEF⁴² and ¹⁶⁸QKPDLEQKYPAFRK¹⁸¹. Ovaries were placed on a slide, dried for 2 min, and incubated in 0.2 ml PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, and 2 mM

Abbreviations: bmPGES, Prostaglandin E synthase; GSH, Glutathione; PGs, Prostaglandins; TALEN, transcription activator-like effector nuclease.

* Corresponding author. 744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan.

E-mail address: yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp (K. Yamamoto).

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.10.121>

0006-291X/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Identification and characterization of superoxide dismutase in silkworm seminal fluid

Sumiharu Nagaoka^{1, 2*} and Kohji Yamamoto³

¹ Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

² The Center for Advanced Insect Research Promotion (CAIRP), Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

³ Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu University Graduate School, 744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan

(Received April 18, 2019; Accepted May 14, 2019)

Long-term exposure of human sperm cells to reactive oxygen species (ROS) can cause decreased motility and viability, as well as DNA fragmentation. An antioxidant defense system, called a preventive antioxidant system, is therefore needed to maintain low ROS concentrations in sperm and seminal plasma. Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), one of the most important antioxidant enzymes, catalyzes the conversion of superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) to hydrogen peroxide (H_2O_2) and molecular oxygen (O_2). In this report, we documented a high SOD activity level in the reproductive organs of the male silkworm (*Bombyx mori*, L.), particularly in the glandula lacteola, and found that about 90% of the SOD activity was transferred to females by ejaculation and maintained. We characterized three cDNAs from the adult male reproductive system: a soluble cytoplasmic copper/zinc SOD (Cu/Zn SOD, SOD1) and two extracellular forms of copper/zinc SOD (EC-SOD, SOD3). The levels of transcription and protein accumulation of *Bombyx* SOD1 indicated that it is abundantly present in the extracellular fluid of the male glandula lacteola, which transfers to the female during ejaculation. Furthermore, it was observed that some of the transferred SOD1 exists in the sperm fraction stored in the mating female's bursa copulatrix. Our present results demonstrate the origins of seminal SOD activities and suggest that SOD might be a potential source and function of antioxidants in semen and also may control the amount of extracellular ROS involved in sperm quality maintenance.

Key words: antioxidant activity, superoxide dismutase (SOD), seminal fluid proteins, spermatozoa, *Bombyx mori*

INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) including superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical (HO \cdot), hydrogen peroxide (H_2O_2), and singlet oxygen (1O_2), are by-products of either cellular metabolism during aerobic respiration or oxidoreductase activity (Sies, 1985). Common features of different ROS are the high level of transience due to their high levels of chemical reactivity and the capacity to damage or destroy proteins, DNA, and lipids (Li *et al.*, 1997; Halliwell and Gutteridge, 2007). However, in some cases, elevated ROS plays a part in the physiological regulation of intracellular signaling pathways (D'Autréaux and Toledano, 2007; Schieber and Chandel, 2014). Mammalian spermatozoa are also susceptible to ROS (Jones *et al.*, 1979; Alvarez *et al.*, 1987). *In vitro*, low concentrations of ROS promote hyperactivation (de Lamirande and Gagnon, 1993a; 1993b), capacitation (Griveau *et al.*, 1994; Zini *et al.*, 1996; Leclerc *et al.*, 1997; Baumber *et al.*, 2003; Rivlin *et al.*, 2004), the acrosome reaction (Aitken *et al.*, 1995; Griveau *et al.*, 1995; de Lamirande *et al.*, 1998), and sperm-oocyte fusion (Aitken *et al.*, 1995; 1998), while high levels of ROS induce an irreversible arrest of motility,

damage to membranes due to lipid peroxide formation, and fragmentation of DNA (Aitken *et al.*, 1994; Baker *et al.*, 2004; Peris *et al.*, 2007). In at least 25% of infertile male patients, ROS formation is detected at elevated levels in both semen and spermatozoa (Gagnon *et al.*, 1991; de Lamirande *et al.*, 1995; Agrwal *et al.*, 2006; Aitken and Baker, 2006). Considering that low levels of ROS are required for the physiological sperm functions described above, the balance between ROS generation and neutralization is crucial. Therefore, the role of antioxidants in sperm longevity has been substantiated in several vertebrates, but there is little information on this role in insects (Chaimanee *et al.*, 2016).

Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1, SOD) detoxifies highly reactive and toxic superoxide ($O_2^{\cdot-}$) by converting it to less-toxic hydrogen peroxide (H_2O_2), and in this way, is thought to function as an important protective enzyme that reduces oxidative risk. SOD activities observed in human seminal plasma are significantly lower in infertile patients than in healthy sperm donors and correlate positively with semen quality parameters (e.g., viable sperm concentration and total motility) (Murawski *et al.*, 2007). The SOD enzyme is a ubiquitous metalloenzyme in aerobic organisms, and occurs in three forms in humans: SOD1 is localized to the cytosol and nucleus, SOD2 is a mitochondrial matrix enzyme, and SOD3 is the extracellular form found in plasma, lymph and synovial fluids, and tissues

*To whom correspondence should be addressed.

Fax & Tel: +81-75-724-7769.

Email: nagaoka@kit.ac.jp

DWARF WITH SLENDER LEAF1 Encoding a Histone Deacetylase Plays Diverse Roles in Rice Development

Fumika Clara Kubo¹, Yukiko Yasui^{1,4}, Yoshihiro Ohmori², Toshihiro Kumamaru³, Wakana Tanaka¹ and Hiro-Yuki Hirano^{1*}

¹Department of Biological Sciences, School of Science, The University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8654 Japan

²Department of Agricultural and Environmental Biology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657 Japan

³Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Institute of Genetic Resources, Kyushu University, Motooka 744, Fukuoka, 819-0395 Japan

⁴Present address: Department of Plant Gene and Totipotency, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8502 Japan

*Corresponding author. E-mail, hyhirano@bss.u-tokyo.ac.jp; Fax, +81-3-5841-4056.

(Received August 1, 2019; Accepted November 4, 2019)

In plants, reversible histone acetylation and deacetylation play a crucial role in various biological activities, including development and the response to environmental stress. Histone deacetylation, which is generally associated with gene silencing, is catalyzed by multiple histone deacetylases (HDACs). Our understanding of HDAC function in plant development has accumulated from molecular genetic studies in *Arabidopsis thaliana*. By contrast, how HDACs contribute to the development of rice (*Oryza sativa*) is poorly understood and no rice mutants of HDAC have been reported. Here we have characterized a new rice mutant showing semi-dwarfism, which we named *dwarf with slender leaf1* (*dsl1*). The mutant showed pleiotropic defects in both vegetative and reproductive developments; e.g. *dsl1* produced short and narrow leaves, accompanied by a reduction in the number and size of vascular bundles. The semi-dwarf phenotype was due to suppression of the elongation of some culm (stem) internodes. Interestingly, despite this suppression of the upper internodes, the elongation and generation of lower internodes were slightly enhanced. Inflorescence and spikelet development were also affected by the *dsl1* mutation. Some of the observed morphological defects were related to a reduction in cell numbers, in addition to reduced cell division in leaf primordia revealed by *in situ* hybridization analysis, suggesting the possibility that *DSL1* is involved in cell division control. Gene cloning revealed that *DSL1* encodes an HDAC belonging to the reduced potassium dependence3/histone deacetylase1 family. Collectively, our study shows that the HDAC *DSL1* plays diverse and important roles in development in rice.

Keywords: Dwarf • Histone deacetylase • Inflorescence development • Leaf development • Rice (*Oryza sativa*).

Accession numbers: The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to GenBank/EMBL/DDBJ databases with the following accession numbers: *DSL1* (LC494512). Microarray data were deposited in the Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under accession number GSE138876.

Introduction

Plant development is governed by the activity of the shoot apical meristem (SAM), where stem cells are maintained (Ha et al. 2010, Aichinger et al. 2012, Somssich et al. 2016). Lateral organs such as the leaf and flower differentiate from cells supplied from stem cells at the peripheral region of the meristem. During organ development, three developmental axes (apical–basal, adaxial–abaxial and centrolateral axis) are established and specific types of cells differentiate along these axes.

Plant architecture depends on the shape and size of the lateral organs and the arrangement of the secondary shoots. Rice (*Oryza sativa*) reiteratively generates leaves and secondary shoots in the vegetative phase (Hoshikawa 1989, Itoh et al. 2005). As the stem does not elongate in either the primary or secondary shoots during this phase, the apparent architecture of rice is influenced by the shape and size of the leaves. After flower induction, the vegetative SAM changes its properties and becomes the inflorescence meristem, which generates inflorescences comprising branches and spikelets (Tanaka et al. 2013). The shape and size of these inflorescences affect plant architecture in the reproductive phase.

Rice leaves comprise the leaf blade and leaf sheath, which are connected by a boundary region (lamina joint) harboring the ligule and auricle (Hoshikawa 1989). In the leaf blade, two types of longitudinal vascular bundles, termed large and small, differentiate to transport water and nutrients. Relative to the small vascular bundle, the large bundle contains many cells and different types of cells. Viewed from the outside, the two types of vascular bundles are visible as large and small veins, with 5–6 small veins between the large veins in wild type (WT).

Leaf morphogenesis and regulation of leaf size have been studied by using narrow-leaf mutants such as *narrow leaf2* (*nal2*), *nal3*, *nal7/constitutively wilted1* (*cow1*), *leaf lateral symmetry1* (*lsy1*) and *slender leaf1* (*sle1*)/*narrow leaf and dwarf1* (*nd1*) (Woo et al. 2007, Fujino et al. 2008, Li et al. 2009, Cho et al. 2013, Ishiwata et al. 2013, Yoshikawa et al. 2013, Kubo et al. 2017, Honda et al. 2018). The narrow width of the leaf blade is associated with a decrease in the number of either large or small

Evolution and Diversity of the Wild Rice *Oryza officinalis* Complex, across Continents, Genome Types, and Ploidy Levels

Matt Shenton^{1,8}, Masaaki Kobayashi², Shin Terashima², Hajime Ohyanagi³, Dario Copetti^{4,5,9,10}, Tania Hernández-Hernández^{4,11}, Jianwei Zhang⁴, Nobuko Ohmido⁶, Masahiro Fujita¹, Atsushi Toyoda¹, Hiroshi Ikawa¹, Asao Fujiyama¹, Hiroyasu Furuumi¹, Toshie Miyabayashi¹, Takahiko Kubo^{1,12}, David Kudrna⁴, Rod Wing^{4,5,7}, Kentaro Yano², Ken-Ichi Nonomura¹, Yutaka Sato^{1,*}, and Nori Kurata¹

¹National Institute of Genetics, Mishima, Japan

²School of Agriculture, Meiji University, Tokyo, Japan

³Computational Bioscience Research Center (CBRC), King Abdullah University of Science and Technology (KAUST), Thuwal, Kingdom of Saudi Arabia

⁴Arizona Genomics Institute, BIOS Institute and School of Plant Sciences, University of Arizona

⁵T.T. Chang Genetic Resources Center, International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines

⁶Division of the Living Environment, Kobe University, Japan

⁷Biological and Environment Science and Engineering Division, King Abdullah University of Science and Technology (KAUST), Thuwal, Kingdom of Saudi Arabia

⁸Present address: Institute of Crop Science, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Tsukuba, Japan

⁹Present address: Molecular Plant Breeding, Institute of Agricultural Sciences, ETH Zurich, Zurich, Switzerland

¹⁰Present address: Department of Evolutionary Biology and Environmental Studies, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, Zurich, Switzerland

¹¹Present address: Catedrática CONACYT asignada a Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, CINVESTAV IPN, Irapuato, Guanajuato, Mexico

¹²Present address: Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, Japan

*Corresponding author: E-mail: yusato@nig.ac.jp.

Accepted: February 25, 2020

Data deposition: The sequence data that support the findings of this study has been deposited in the DNA Databank of Japan (DDB) under the accession numbers PRJDB4701, PRJDB4700, PRJDB4699, PRJDB4659, PRJDB4658, PRJDB4641, PRJDB4640, PRJDB4639, PRJDB4620, PRJDB4554, PRJDB4547, PRJDB4534, PRJDB2848, and PRJDB2223. Assembled *Oryza officinalis* chromosomes and scaffolds are deposited under the accession numbers BDMV01000001–BDMV01000084. Gene and repeat annotations, and OrthoMCL defined gene families are available at Cyverse Data Commons, <https://doi.org/10.25739/awh3-dm39>. Phylogenetic trees are available at <http://itol.embl.de/shared/mshenton>.

Abstract

The *Oryza officinalis* complex is the largest species group in *Oryza*, with more than nine species from four continents, and is a tertiary gene pool that can be exploited in breeding programs for the improvement of cultivated rice. Most diploid and tetraploid members of this group have a C genome. Using a new reference C genome for the diploid species *O. officinalis*, and draft genomes for two other C genome diploid species *Oryza eichingeri* and *Oryza rhizomatis*, we examine the influence of transposable elements on genome structure and provide a detailed phylogeny and evolutionary history of the *Oryza* C genomes. The *O. officinalis* genome is 1.6 times larger than the A genome of cultivated *Oryza sativa*, mostly due to proliferation of *Gypsy* type long-terminal repeat transposable elements, but overall syntenic relationships are maintained with other *Oryza* genomes (A, B, and F). Draft genome assemblies of the two other C genome diploid species, *Oryza eichingeri* and *Oryza rhizomatis*, and short-read resequencing of a series of other C genome species and accessions reveal that after the divergence of the C genome progenitor, there was still a substantial degree of variation within the C genome species through proliferation and loss of both DNA and long-terminal repeat transposable

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Molecular Biology and Evolution. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

mRNA Localization in Plant Cells¹[OPEN]Li Tian,^{a,2,3} Hong-Li Chou,^b Masako Fukuda,^{a,c} Toshihiro Kumamaru,^c and Thomas W. Okita^a^aInstitute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, Washington 99164-6340^bHuck Institutes of the Life Sciences, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania 16802^cPlant Genetics Laboratory, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 819-0395, Japan

ORCID IDs: 0000-0003-1497-7923 (L.T.); 0000-0002-6355-9034 (H.-L.C.); 0000-0003-4870-1247 (T.K.); 0000-0002-2246-0599 (T.W.O.)

Localization of mRNAs at the subcellular level is an essential mechanism for specific protein targeting and local control of protein synthesis in both eukaryotes and bacteria. While mRNA localization is well documented in metazoans, somatic cells, and microorganisms, only a handful of well-defined mRNA localization examples have been reported in vascular plants and algae. This review summarizes the function and mechanism of mRNA localization and highlights recent studies of mRNA localization in vascular plants. While the emphasis focuses on storage protein mRNA localization in rice endosperm cells, information on targeting of RNAs to organelles (chloroplasts and mitochondria) and plasmodesmata is also discussed.

WHAT IS MRNA LOCALIZATION?

Localization of mRNAs was initially discovered in the 1980s, when β -actin mRNA was found to be asymmetrically distributed in ascidian eggs and embryos (Jeffery et al., 1983). This nonuniform spatial distribution pattern was later observed for maternal mRNAs in *Xenopus* (Rebagliati et al., 1985) and *Drosophila* oocytes (Frigerio et al., 1986; Berleth et al., 1988) and supported the proposal of prelocalized RNA during early development (Davidson, 1971; Kandler-Singer and Kalthoff, 1976). Subsequently, mRNA localization was observed in a variety of somatic cells such as fibroblasts (Lawrence and Singer, 1986), oligodendrocytes (Trapp et al., 1997), and neurons (Garner et al., 1988). Today, mRNA localization is prevalent in bacteria, yeast, algae, vascular plants, and metazoans and, therefore, is an ancient, universal, evolutionarily conserved mechanism.

Our understanding of mRNA localization stems mainly from research in *Xenopus*, *Drosophila*, budding yeast, fungi, and structurally polarized animal cells (Holt and Bullock, 2009; Martin and Ephrussi, 2009; Medioni et al., 2012; Shahbadian and Chartrand, 2012; Weatheritt et al., 2014; Weil, 2014; Chin and Lécuyer,

2017; Lazzaretti and Bono, 2017; Teimouri et al., 2017). By contrast, only a handful of examples for mRNA localization have been observed in plants. Nevertheless, substantial progress has been made over the years. Here, we discuss the importance and mechanism of mRNA localization, summarize mRNA localization studies in land plants, and provide suggestions for future research in plants.

ADVANCES

- Proteomic analyses have identified more than 200 cytoskeleton-associated RNA-binding proteins (RBPs) or associated factors from rice endosperm, many of them involved in transporting RNAs to specific intracellular locations.
- Analysis of TILLING mutants and T-DNA insertion lines in genes for the RNA-binding proteins Tudor-SN, RBP-P, and RBP-L indicate that these zipcode-binding proteins are required for storage protein mRNA localization in rice endosperm cells.
- Mitochondrial targeting requires the N-terminal leader and 3'UTR sequences.
- Recent advances of fluorescence-based mRNA labeling systems combined with high-resolution confocal microscopy provide promising approaches to visualize the real-time trafficking of mRNAs in plant cells.

¹This work was supported by grants from the National Science Foundation (MCB-1444610 and IOS-1701061), from the Japan Society for the Promotion of Science (to M.F. and T.K.), and the U.S. Department of Agriculture National Institute of Food and Agriculture (Hatch Umbrella Project 1015621 and Multistate Research Project NC1200).

²Author for contact: li.tian@wsu.edu.

³Senior author.

L.T. and T.W.O. developed the ideas and the initial framework; L.T. prepared the figures; the article was written by L.T., H.-L.C., M.F., T.K., and T.W.O.

[OPEN] Articles can be viewed without a subscription.
www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.19.00972

The Role of RNA-Binding Protein OsTudor-SN in Post-Transcriptional Regulation of Seed Storage Proteins and Endosperm Development

Hong-Li Chou^{1,2}, Li Tian¹, Masako Fukuda^{1,3}, Toshihiro Kumamaru³ and Thomas W. Okita^{1,*}

¹Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, Washington, DC 99164-63401, USA

²The Huck Institutes of the Life Sciences, Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA

³Plant Genetics Laboratory, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 744 Motooka Nishi-ku, Fukuoka, 819-0395 Japan

*Corresponding author: E-mail: okita@wsu.edu; Fax, +1-509-335-7643.

(Received December 2, 2018; Accepted May 28, 2019)

Regular Paper

Tudor-SN is involved in a myriad of transcriptional and post-transcriptional processes due to its modular structure consisting of 4 tandem SN domains (4SN module) and C-terminal Tsn module consisting of Tudor-partial SN domains. We had previously demonstrated that OsTudor-SN is a key player for transporting storage protein mRNAs to specific ER subdomains in developing rice endosperm. Here, we provide genetic evidence that this multifunctional RBP is required for storage protein expression, seed development and protein body formation. The rice EM1084 line, possessing a nonsynonymous mutation in the 4SN module (SN3 domain), exhibited a strong reduction in grain weight and storage protein accumulation, while a mutation in the Tudor domain (47M) or the loss of the Tsn module (43M) had much smaller effects. Immunoelectron microscopic analysis showed the presence of a new protein body type containing glutelin and prolamine inclusions in EM1084, while 43M and 47M exhibited structurally modified prolamine and glutelin protein bodies. Transcriptome analysis indicates that OsTudor-SN also functions in regulating gene expression of transcriptional factors and genes involved in developmental processes and stress responses as well as for storage proteins. Normal protein body formation, grain weight and expression of many genes were partially restored in EM1084 transgenic line complemented with wild-type OsTudor-SN gene. Overall, our study showed that OsTudor-SN possesses multiple functional properties in rice storage protein expression and seed development and that the 4SN and Tsn modules have unique roles in these processes.

Keywords: Mutant analysis • Protein body • Rice • Rice transformation • RNA-binding protein • Storage proteins • Transcriptomics • Tudor-SN.

Introduction

Rice is unique among flowering plants in that its seeds synthesize and accumulate substantial quantities of two major types of storage proteins: the acid- and alkali-soluble glutelins and the alcoholic-soluble prolamines as well as minor amounts of the

saline-soluble α -globulins (Muench et al. 1997). Prolamines accumulate as ER-luminal intracisternal granules (PB-I), whereas glutelins and globulins are deposited in the protein storage vacuole (PSV; PB-II) (Krishnan et al. 1986, Yamagata and Tanaka 1986). The mRNAs that encode for prolamines, glutelins and α -globulins are targeted to morphologically distinct ER membranes in developing endosperm cells. Prolamines and globulin mRNAs are asymmetrically distributed to the rough ER membranes (PB-ER) delimiting the prolamine intracisternal granules while glutelin mRNAs are located on adjacent cisternal-ER (Li et al. 1993, Choi et al. 2000, Hamada et al. 2003a, Washida et al. 2012). The distribution of prolamine and glutelin mRNAs to distinct subdomains of the cortical-ER contribute to the distribution of their protein products to different locations within the endomembrane system (Washida et al. 2004, Washida et al. 2012).

RNA transport is a multistep processes that requires *cis*- (Singer 1993) and *trans*-elements for modulating its localization (Martin and Ephrussi 2009; Medioni et al. 2012; Hermesh and Jansen 2013; Eliscovich and Singer 2017). Results from previous studies from this laboratory (Hamada et al. 2003b, Washida et al. 2009, Yang et al. 2014) have shown that specific *cis*-sequences (zipcodes), located in the coding sequence and 3'UTR of the prolamine and glutelin mRNAs, are required for targeting of these mRNAs to their respective ER subdomains. Several RBPs that recognize and bind to these zipcode sequences have been identified as potential *trans*-factors (Doroshenko et al. 2009, Crofts et al. 2010, Doroshenko et al. 2014, Yang et al. 2014, Tian et al. 2018). These RBPs bind to the zipcode sequences and form a ribonucleoprotein (RNP) complex soon after transcription in the nucleus.

In addition to RBPs that recognize zipcode mRNA sequences, additional RBPs are required for basal processes of mRNA transport and localization. One such RBP is OsTudor-SN, which was initially identified as a major cytoskeletal RBP in developing rice seeds that binds specifically to the 3'UTR sequences of prolamine and glutelin mRNAs (Sami-Subbu et al. 2000, Sami-Subbu et al. 2001). The role of this RBP in mRNA localization has been suggested via *in vivo* analysis of RNA-IP and immunofluorescence studies of GFP-tagged prolamine mRNA (Wang et al. 2008). Direct evidence for a role for



Contents lists available at ScienceDirect

Plant Science

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

Review article

The rice storage protein mRNAs as a model system for RNA localization in higher plants

Hong-Li Chou^{a,1,2}, Li Tian^{a,1}, Haruhiko Washida^{a,3}, Masako Fukuda^{a,b}, Toshihiro Kumamaru^b, Thomas W. Okita^{a,*}^a Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, WA, 99164-6340, United States^b Faculty of Agriculture, Kyushu University, 744 Motoooka Nishi-ku, Fukuoka, 819-0395, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

RNA localization
Oryza
Storage proteins
Zipcodes
RNA binding proteins
Membrane trafficking

ABSTRACT

The transport and targeting of mRNAs to specific intracellular locations is a ubiquitous process in prokaryotic and eukaryotic organisms. Despite the prevalent nature of RNA localization in guiding development, differentiation, cellular movement and intracellular organization of biochemical activities, only a few examples exist in higher plants. Here, we summarize past studies on mRNA-based protein targeting to specific subdomains of the cortical endoplasmic reticulum (ER) using the rice storage protein mRNAs as a model. Such studies have demonstrated that there are multiple pathways of RNA localization to the cortical ER that are controlled by cis-determinants (zipcodes) on the mRNA. These zipcode sequences are recognized by specific RNA binding proteins organized into multi-protein complexes. The available evidence suggests mRNAs are transported to their destination sites by co-opting membrane trafficking factors. Lastly, we discuss the major gaps in our knowledge on RNA localization and how information on the targeting of storage protein mRNAs can be used to further our understanding on how plant mRNAs are organized into regulons to facilitate protein localization and formation of multi-protein complexes.

1. Introduction

RNA localization is an efficient process in concentrating proteins within specific locales in the cell. Since the first discovery of RNA localization in structurally polarized animal cells [1], it has been found to be prevalent in bacteria, micro-organisms, and plants for localized translation and efficient intracellular stratification of the gene product [2–7].

In eukaryotes, RNA localization is initiated in the nucleus where cis-localization elements or zipcode sequences [8] within the RNA transcript are recognized by specific trans-factors, RNA binding proteins (RBPs), to form a ribonucleoprotein (RNP) complex [5,9]. Once exported from the nucleus to the cytoplasm, the RNP complex is remodeled where one or more protein factors are removed and others added [6,7,10]. One set of proteins that must be added to the exported RNP are adaptor and motor proteins enabling long distance transport of the remodeled RNP along microtubules or microfilaments to targeted regions of the cell. At the destination site, further remodeling of the

RNP may occur enabling anchoring of the RNP complex, followed by translation, processing in processing bodies (P-bodies), or storage in stress granules.

Despite the ubiquitous nature of this process in prokaryotic and eukaryotic cells, there are relatively few examples in plant cells [11]. In addition to the localization of rice storage protein mRNAs in developing endosperm, which is the main focus of this review, other examples include the differential localization of Expansin mRNAs, ZeExp1 and ZeEXP2, to the apical end, and ZeExp3 to the basal end of cells located below the apical meristem in *Zinnia elegans* [12]; the concentration of profilin mRNAs on the tips of growing root hairs [13]; and the biased spatial distribution of carbonic anhydrase [14] and *knox-1* [15] mRNAs in the unicellular green macroalgae *Acetabularia acetabulum*. Nuclear-encoded mRNAs are also observed on the surface or in close proximity to chloroplasts [16–18] and mitochondria [19–21] suggesting a co-translational import of the coded protein product. Other than the case for mitochondria [20,22] and rice storage protein mRNAs [11,23–27], there has been little effort to elucidate the molecular basis for RNA

* Corresponding author.

E-mail address: okita@wsu.edu (T.W. Okita).¹ Co-first authors.² Present address: The Huck Institutes of the Life Sciences, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania 16802.³ Present address: Organic Nico Co. Ltd., Kyodai Katsura Venture Plaza, Goryo-Ohara, Nishikyo-ku, Kyoto, 615-8245 Japan.<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.04.014>

Received 20 March 2019; Received in revised form 9 April 2019; Accepted 15 April 2019

Available online 17 April 2019

0168-9452/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

BELL1-like homeobox genes regulate inflorescence architecture and meristem maintenance in rice

Takuyuki Ikeda¹, Wakana Tanaka¹, Taiyo Toriba^{1,†}, Chie Suzuki¹, Akiteru Maeno², Katsutoshi Tsuda², Toshihiko Shiroishi², Tetsuya Kurata^{3,‡}, Tomoaki Sakamoto^{3,§}, Masayuki Murai⁴, Hiroaki Matsusaka⁵, Toshihiro Kumamaru⁵ and Hiro-Yuki Hirano^{1,*}

¹Department of Biological Sciences, School of Science, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8654, Japan,

²National Institute of Genetics, Mishima 411-8540, Japan,

³Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, Ikoma 630-0192, Japan,

⁴Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University, Monobe, Nankoku 783-8502, Japan, and

⁵Faculty of Agriculture, Kyushu University, Motoooka, 744, Fukuoka 819-0395, Japan

Received 17 October 2018; revised 26 December 2018; accepted 10 January 2019.

*For correspondence (e-mail hyhirano@bs.s.u-tokyo.ac.jp).

[†]Present address: Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Sendai 980-8578, Japan.

[‡]Present address: Edit Force Inc., 4th Fl. Tenjin Fukuoka Seimei Bldg. Tenjin 1-9-17, Fukuoka 810-0001, Japan.

[§]Present address: Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University, Motoyama, Kamigamo, Kita-Ku, Kyoto 603-8555, Japan.

SUMMARY

Inflorescence architecture is diverse in angiosperms, and is mainly determined by the arrangement of the branches and flowers, known as phyllotaxy. In rice (*Oryza sativa*), the main inflorescence axis, called the rachis, generates primary branches in a spiral phyllotaxy, and flowers (spikelets) are formed on these branches. Here, we have studied a classical mutant, named *verticillate rachis (ri)*, which produces branches in a partially whorled phyllotaxy. Gene isolation revealed that *Ri* encodes a BELL1-type homeodomain transcription factor, similar to Arabidopsis PENNYWISE/BELLRINGER/REPLUMLESS, and is expressed in the specific regions within the inflorescence and branch meristems where their descendant meristems would soon initiate. Genetic combination of an *ri* homozygote and a mutant allele of *Ri-LIKE1 (RIL1)* (designated *ri ril1/+* plant), a close paralog of *Ri*, enhanced the *ri* inflorescence phenotype, including the abnormalities in branch phyllotaxy and rachis internode patterning. During early inflorescence development, the timing and arrangement of primary branch meristem (pBM) initiation were disturbed in both *ri* and *ri ril1/+* plants. These findings suggest that *Ri* and *RIL1* were involved in regulating the phyllotactic pattern of the pBMs to form normal inflorescences. In addition, both *Ri* and *RIL1* seem to be involved in meristem maintenance, because the *ri ril1* double-mutant failed to establish or maintain the shoot apical meristem during embryogenesis.

Keywords: BELL1-type transcription factor, homeobox gene, inflorescence architecture, meristem, rice (*Oryza sativa*), meristem maintenance, branch phyllotaxy, internode, micro-computer tomography scanning.

INTRODUCTION

Inflorescence architecture is a major determinant of plant form, and shows enormous diversity in angiosperms. The phyllotactic patterns of flowers and branches are major factors that characterize inflorescence morphology. Lateral organ phyllotaxy is regulated by a local accumulation of auxin, whose action is well understood in leaf initiation in *Arabidopsis thaliana* (Reinhardt *et al.*, 2003; for review, see Kuhlemeier, 2007). Auxin also plays a crucial role in inflorescence development, because a mutation in the gene encoding PINFORMED1, which is required for polar transport of auxin, results in a pin-formed inflorescence stem without any flowers (Okada *et al.*, 1991). By contrast, the

genetic mechanism underlying the fine-tuning of inflorescence development, such as the regulation of phyllotactic pattern or internode length, is not fully understood.

Grasses such as rice (*Oryza sativa*) and maize (*Zea mays*) generate unique inflorescences including a spikelet, in which the flowers (florets) are formed (for review, see Bell, 2008; Thompson and Hake, 2009; Tanaka *et al.*, 2013). Spikelets are attached directly to the main axis of the inflorescence (rachis) in barley (*Hordeum vulgare*) and maize female inflorescences, but are formed on branches diverging from the rachis in rice and maize male inflorescences. The branches are arranged in a spiral phyllotaxy in rice inflorescences, whereas the spikelets are arranged in a



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Cereal Science

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

Effect of high temperature on starch biosynthetic enzymes and starch structure in japonica rice cultivar 'Akitakomachi' (*Oryza sativa* L.) endosperm and palatability of cooked rice

Kazunao Kato^{a,b}, Yuta Suzuki^c, Yuko Hosaka^c, Ryuichi Takahashi^a, Ikuko Kodama^a, Kensuke Sato^a, Tomohiko Kawamoto^a, Toshihiro Kumamaru^b, Naoko Fujita^{c,*}

^a Akita Prefectural Agricultural Experiment Station, Akita City, Akita, 010-1231, Japan

^b Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, 819-0395, Japan

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Amylopectin
Amylose
High temperature
Palatability

ABSTRACT

Reduction in crop yield and quality due to global warming is a major concern. In this study, we investigated the effects of high temperature during endosperm development on the level of starch biosynthetic enzymes, including granule-bound starch synthase I (GBSSI), branching enzyme (BE)IIb, and SSI, and structure of starch in the endosperm using japonica rice cultivar, 'Akitakomachi'. We also performed palatability sensory evaluation of rice grown under different temperatures after cooking. At high ripening temperature, the number of seeds showing opaque regions was significantly increased, and seed weight was significantly decreased. The apparent amylose content and ratio of short to long chains of amylopectin in seeds developed at high temperature was significantly lower and higher, respectively, than that in seeds developed at lower temperature; this was because of low levels of GBSSI and BEIIb, respectively. In general, the amylose content correlates negatively with the stickiness and taste of cooked rice. Rice grains developed at high temperature were less palatable after cooking than those developed under normal conditions, although their amylose content was lower, indicating that the structure of amylopectin has a major impact on the palatability of cooked rice.

1. Introduction

Rice (*Oryza sativa* L.) is the leading food crop in the world, after maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.), and is grown throughout the world including in Asia, North and South America, the European Union, the Middle East, and Africa. However, in recent years, rice has been exposed to elevated temperature, especially at ripening stages, which has a negative impact on the yield and quality of rice grains and taste of cooked rice (Tashiro and Wardlaw, 1991). The Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) 2013 warned that climate change may further increase the global temperature.

High temperature during grain filling results in low seed weight, and the quality of brown rice declines because of an increase in the number of white immature grains (Yamakawa et al., 2007). White immature grains reduce the commercial value of rice, as these grains are brittle and crack during milling, resulting in higher numbers of

crushed rice grains (Fitzgerald et al., 2009). The chalky appearance of rice grains is reported to be associated with the development of numerous air spaces between loosely packed starch granules and a change in light refraction (Zakaria et al., 2002). The growth rate of grains increases under high temperature during endosperm development; however, reduction in the duration of grain filling results in low grain weight (Yamakawa et al., 2007). High temperature induces the expression of genes encoding α -amylase in developing seeds and suppresses the α -amylase repressing plant hormone abscisic acid, suggesting that starch is degraded by α -amylase in developing endosperm under high temperature. Therefore, α -amylase inhibits starch accumulation, resulting in white immature grains (Hakata et al., 2012). An increase in the number of white immature grains negatively impacts the taste of cooked rice (Yamakawa et al., 2007).

Starch is composed of amylose and amylopectin. Amylose is primarily a linear molecule composed of glucose units linked by α -1,4-

* Corresponding author.

E-mail addresses: katou-kazunao@pref.akita.lg.jp (K. Kato), yuta.suzu0221@gmail.com (Y. Suzuki), kouyu@akita-pu.ac.jp (Y. Hosaka), takahashi-ryuichi@pref.akita.lg.jp (R. Takahashi), k-ikuko@pref.akita.lg.jp (I. Kodama), sa-ke@pref.akita.lg.jp (K. Sato), kawamoto-tomohiko@pref.akita.lg.jp (T. Kawamoto), kumamaru@agr.kyushu-u.ac.jp (T. Kumamaru), naokof@akita-pu.ac.jp (N. Fujita).

<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.04.001>

Received 28 December 2018; Received in revised form 25 March 2019; Accepted 1 April 2019
Available online 09 April 2019

0733-5210/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

コメ貯蔵タンパク質グルテリンの細胞内輸送機構の解明

福田真子, 熊丸敏博

九州大学大学院農学研究院 〒819-0395 福岡市西区元岡744

要旨: コメにはデンプンのみならず, 約7~8%の貯蔵タンパク質が含まれている。コメ貯蔵タンパク質は溶媒溶解性の違いによってグルテリン, プロラミン, グロブリンの3種類に分類され, これらは澱粉性胚乳に存在する2種のプロテインボディ(PB)に蓄積されている。グルテリンとグロブリンは液胞由来のII型プロテインボディ(PBII)に, 一方プロラミンは小胞体由来のI型プロテインボディ(PBI)にそれぞれ蓄積されている。コメ貯蔵タンパク質は日本酒の醸造特性やコメの製パン特性等に大きく寄与することから, 貯蔵タンパク質の合成, 輸送, 蓄積に関わる因子の機能解明は, 新たな加工特性を有したコメの開発につながり, ひいてはコメの需要拡大に貢献できると期待される。

我々はこれまでに, イネ胚乳細胞内におけるグルテリンの合成・輸送・蓄積に関わる因子を複数同定し, 解析してきた。組織学的解析結果をもとに, グルテリンの細胞内輸送機構についての知見を紹介する。

Regulation of intracellular transport of the glutelin in the rice endosperm cell

Masako Fukuda, Toshihiro Kumamaru

Faculty of Agriculture, Kyushu Univ., Motoooka744, Nishiku, Fukuoka, 819-0395 Japan

Author for correspondence: T. Kumamaru, kumamaru@agr.kyushu-u.ac.jp

Summary: Rice contains the storage proteins consisting of 7~8 % of rice seed. Rice storage proteins are classified three types, such as glutelin, prolamine and globulin, and they are deposited in two kinds of protein bodies (PBI and PBII) in the starchy endosperm. Glutelin and globulin are accumulated within the vacuolar PBII. On the other hand, prolamine is accumulated within PBI within ER lumen. The content and property of rice storage proteins affect highly the qualities of sake and rice-bred, therefore the elucidation of genes participating to biosynthesis, intracellular transport and deposition of rice storage proteins contributes to improvement of rice grain qualities. We have identified several genes concerning to biosynthesis, transport and deposition of glutelin and analyzed them. We introduce the knowledge about intracellular transport mechanism of glutelin based on the results of histological analysis.

Key words: glutelin, mutant, rice, storage proteins, transport

はじめに

コメ貯蔵タンパク質は溶媒溶解性に基づきグルテリン, プロラミン, グロブリンに分類される。グルテリンは酸・塩基可溶性で, 貯蔵タンパク質の約60%を占める。アルコール可溶性であるプロラミンは約20%, 塩可溶性であるグロブリンが10%を占める。これら3種類の貯蔵タンパク質は粗面小胞体上で合成され, 小胞体内腔に転送される。小胞体内腔に転送されたプロラミンはそのまま小胞体内で凝集し, PBIを形成する。一方, グルテリンは, 粗面小胞体上で前駆体として合成され, 小胞体内腔に転送された後, 前駆体のまま小胞体からゴルジ体を経由し, 貯蔵型液胞へと輸送される。グルテリン前駆体は貯蔵型液胞内で2つのサブユニットに開裂し, 成熟型グルテリンとしてPBIIを形成する。グロブリンはグルテリンと同様, 小胞体上で合成され, グルテリンと共に貯蔵型液胞(PBII)内に蓄積する。

グルテリンは小胞体で合成後, 貯蔵型液胞へと輸送, 蓄積することから, 各オルガネラに輸送・蓄積に機能する因子の存在が考えられた。これらの因子を明らかにするために, グルテリン前駆体を多く蓄積する変異体に着目した。グルテリンは前駆体として合成され輸送されることから, これら因子に機能阻害が生じた際に同前駆体が高蓄積する

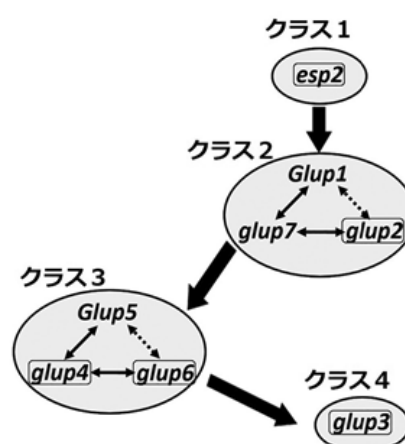


図1 グルテリン前駆体を多く蓄積する変異の遺伝子間相互作用。esp2及^Uglup/Glup変異遺伝子間の関係において, esp2は, 最上位のクラス1に位置し, glup3は最下位のクラス4に位置することを示している。Glup1, glup2, glup7の変異体はクラス2に, glup4, Glup5, glup6の変異体はクラス3に分類された。実線の矢印は相加性関係を表わし, 点線は不明である(Ueda et al, 2010改変) □はこれまでに明らかにされた変異遺伝子を示す。

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6558825号
(P6558825)

(45) 発行日 令和1年8月14日(2019.8.14)

(24) 登録日 令和1年7月26日(2019.7.26)

(51) Int. Cl.

F 1

AO1H 5/00	(2018.01)	AO1H 5/00	Z N A A
AO1H 5/08	(2018.01)	AO1H 5/08	
AO1H 5/10	(2018.01)	AO1H 5/10	
C12N 15/55	(2006.01)	C12N 15/55	
C11C 3/00	(2006.01)	C11C 3/00	

請求項の数 14 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2015-52078 (P2015-52078)
 (22) 出願日 平成27年3月16日(2015.3.16)
 (65) 公開番号 特開2015-192662 (P2015-192662A)
 (43) 公開日 平成27年11月5日(2015.11.5)
 審査請求日 平成29年10月3日(2017.10.3)
 (31) 優先権主張番号 特願2014-58474 (P2014-58474)
 (32) 優先日 平成26年3月20日(2014.3.20)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 日本国(JP)

(73) 特許権者 501203344
 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
 研究機構
 茨城県つくば市観音台3-1-1
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 聡
 (74) 代理人 100180954
 弁理士 漆山 誠一
 (72) 発明者 鈴木 保宏
 茨城県つくば市観音台2丁目1-18 独
 立行政法人農業・食品産業技術総合研究機
 構 作物研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トリアシルグリセロールリパーゼ変異植物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1に示すアミノ酸配列からなるイネ由来のトリアシルグリセロールリパーゼ、
 又はその他種オルソログのトリアシルグリセロールリパーゼにおいて、該トリアシルグリ
 セロールリパーゼ活性が欠失した又は抑制された変異型トリアシルグリセロールリパーゼ
 をコードする変異遺伝子を有する植物であって、

前記他種オルソログのトリアシルグリセロールリパーゼが

(a) 配列番号1に示すアミノ酸配列において1若しくは2～20個のアミノ酸が欠失
 、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は

(b) 配列番号1に示すアミノ酸配列に対して10%以上の同一性を有するアミノ酸配列
 からなる、前記植物。 10

【請求項2】

前記変異型トリアシルグリセロールリパーゼが

(i) 配列番号1に示すアミノ酸配列において52位のバリン、160位のグリシン、162位
 のセリン、164位のグリシン、168位のアラニン、179位のグリシン及び247位のトレオニン
 のいずれか一以上のアミノ酸が欠失又は置換された変異、又は

(ii) 前記(a)若しくは(b)に示すアミノ酸配列において(i)に示すアミノ酸
 に相当するアミノ酸が欠失又は置換された変異
 を少なくとも有する、請求項1に記載の植物。

【請求項3】

20

フロントページの続き

〔出願人による申告〕平成24年度、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構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」委託事業、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願。平成25年度、農林水産省、「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」委託事業、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(72)発明者 長谷川 陽一

秋田県能代市海跡坂11-1

(72)発明者 永田 俊文

茨城県つくば市観音台2丁目1-18 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所内

(72)発明者 濱田 茂樹

青森県弘前市文京町3番地

(72)発明者 秋田 祐介

埼玉県深谷市普濟寺1690

(72)発明者 熊丸 敏博

福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内

(72)発明者 松坂 弘明

福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 国際公開第2014/003197 (WO, A1)

特開2009-215437 (JP, A)

米国特許出願公開第2006/0150283 (US, A1)

特開2008-245638 (JP, A)

国際公開第2010/088426 (WO, A1)

FFIジャーナル, 2012, Vol. 217, No. 3, pp. 275-283

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDSCAplus/REGISTRY (STN)

(STN)



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

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

Isolation and characterization of spontaneous phage-resistant mutants of *Lactobacillus paracasei*

Sirinthorn Sunthornthummas^a, Katsumi Doi^b, Achariya Rangsiruji^a, Sukhumaporn Krajangsung^c, Siriruk Sarawaneeyaruk^c, Onanong Pringsulaka^{c,*}

^a Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok, 10110, Thailand

^b Laboratory of Microbial Genetic Technology, Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, 812-8581, Japan

^c Department of Microbiology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok, 10110, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords:

Lactic acid bacteria
Lactobacillus paracasei
Fermented milk
Bacteriophage
Spontaneous phage-resistant mutants

ABSTRACT

Spontaneous phage-resistant mutants were isolated from *Lactobacillus paracasei* LPC by agar plate (AP) and secondary-culture (SC) methods. They were characterized by cell and colony morphologies, carbohydrate fermentation patterns, phage resistance stability, efficiency of plaquing (EOP), acidifying and milk acidification kinetics. Only 98 out of 175 isolates (56%) proved to be true phage-resistant mutants and the SC method was more efficient than the AP method. Although the phage resistance stability varied among the mutants isolated, the EOP values were mostly very high ($< 10^{-11}$). Three phage-resistant strains were selected based on their extreme resistance capacity to the phage Φ T25 (EOP $< 10^{-10}$) and their nonlysogenic property. Acidifying activity did not differ between phage-sensitive strains and their three respective phage-resistant derivatives. Most of the mutants were completely or partially unable to adsorb phage particles. Restriction-modification type systems were not detected in all phage-resistant derivatives. All three selected mutants were identical to the corresponding parent strain of *L. paracasei* LPC in the cell and colony morphologies. The comparison of random amplified polymorphic DNA profiles obtained with four arbitrary primers also revealed the highest similarity coefficient (87%) among the parent strain and the three mutants, indicating that each mutant has been derived from this parent strain. A good performance during milk fermentation and the subsequent refrigerated storage were obtained when these mutants were employed. These phage-resistant derivatives could be used as improved strains or for strain rotation programs when commercial strains become sensitive to the phages present in industrial environments.

1. Introduction

Advanced research on lactic acid bacteria phages has progressed significantly over the past decades, but phage contamination is still nowadays recognized as one of the persistent problems of dairy industry. Several strategies have been invested to control phage infection of starter cultures, such as uses of phage inhibitory media or phage-resistant cultures, and optimization of sanitation. Traditionally, the phage-resistant cultures have been obtained by recombinant DNA technology (Casjens & Gilcrease, 2009) or conjugal transfer of plasmids conferring phage resistance (Samson & Moineau, 2013). However, isolation of spontaneous phage-resistant mutants can be advantageous because it is simple, rapid and involves no genetic manipulation (Binetti, Sua'ez, Tailliezb, & Reinheimer, 2007; Fernández et al., 2017).

In the dairy industry, the development of bacteriophage-insensitive mutants of important fermentation strains is a crucial short-term measure used to counter the phage problems (Coffey & Ross, 2002; Mills et al., 2007). Unfortunately, less efficient phage-resistant derivatives were normally recovered with unsatisfied characteristics such as slow growth, low or diminished acidifying power, low proteolytic activity, and reversion to a phage-sensitive phenotype (Coffey, Coakley, Mc Garry, Fitzgerald, & Ross, 1998; Klaenhammer, 1984; Moineau, 1999; Sturino & Klaenhammer, 2004).

Lactobacillus paracasei is a species of lactic acid bacteria which involves in manufacturing of fermented dairy products. It is present naturally in fermented vegetables, milk and meat, and has been isolated from cheeses made from both pasteurized and non-pasteurized milk (Christiansen, Nielsen, Vogensen, Brogren, & Ardö, 2006). Specific

* Corresponding author.

E-mail address: onanong@g.swu.ac.th (O. Pringsulaka).

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.037>

Received 4 September 2018; Received in revised form 22 November 2018; Accepted 27 December 2018

Available online 28 December 2018

0956-7135/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.



シリカを誘導剤とする 異種タンパク質発現システム

藤野 泰寛・土居 克実

はじめに

高温の熱水が湧出する地熱地帯には多様な好熱性微生物が棲息している。高温・高圧の地下深部から地表へと噴出した地熱熱水は、シリカ (SiO₂) に関して過飽和となる。筆者らは過飽和シリカと地熱環境に優占的に生育している高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の相互作用に関して研究を行ってきた。その中で、当該菌が過飽和シリカ存在下でのみ特異的なタンパク質、Silica-induced protein (Sip) を産生することを見いだした¹⁾。本稿では Sip の発現メカニズムと、それを利用した異種タンパク質発現システムの構築に関する取組みを紹介する。

1. Sip の機能と転写誘導メカニズム

T. thermophilus は培養温度 70℃でのシリカの溶解度 (400 ppm) を超える過飽和シリカ溶液に曝露すると、ある特異的なタンパク質 (Sip) を誘導産生する。Sip

はそのアミノ酸配列から鉄輸送に係る ABC transporter の基質結合サブユニットであることが推定された。大腸菌で発現させた組換え Sip を用いた鉄イオンとの滴定試験において、Sip は 1 分子あたり 1 個の鉄イオンを吸着したことから、Sip は鉄結合性タンパク質であることが分かった。以降、Sip は鉄輸送タンパク質であることを踏まえ、TtFbpA (ferric binding protein A in *Thermus thermophilus*) と表記する。

Fbp は多くの細菌で保存されており、その転写は Fur (ferric uptake regulator) と呼ばれるリプレッサーにより制御されていることが知られている。*T. thermophilus* HB8 株においても、*TtFbpA* 推定プロモーター領域に対して Fur ホモログを用いたゲルシフトアッセイを行ったところ、*TtFbpA* は Fur の制御下にあることが確認された²⁾。

Fur は鉄が豊富な条件下ではオペレーター部位に結合し、下流の鉄取り込み遺伝子の転写を制御することで、細胞内への過剰な鉄取り込みを抑制している。過飽和シリカ条件下で TtFbpA が過剰発現していることから、過飽和シリカ存在下では鉄欠乏が起こっているものと推察された。

そこで、過飽和シリカを含む培地からコロイドシリカ粒子を除いて溶存鉄濃度を測定したところ、遊離の鉄濃度はシリカを含まない培地の半分以下であった。以上のことから、過飽和シリカ添加による *Thermus* 属細菌の TtFbpA 過剰発現のメカニズムは図 1 のように推定される。

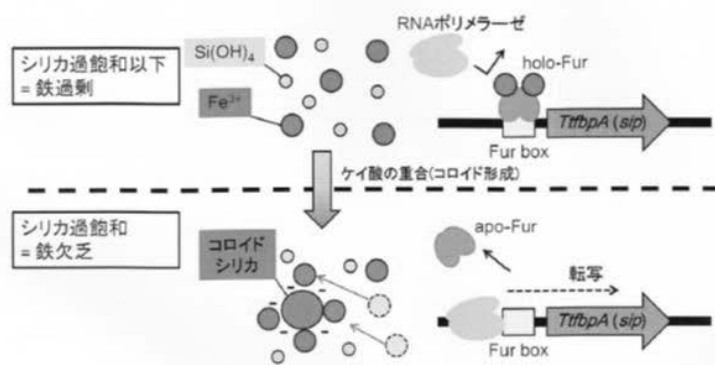
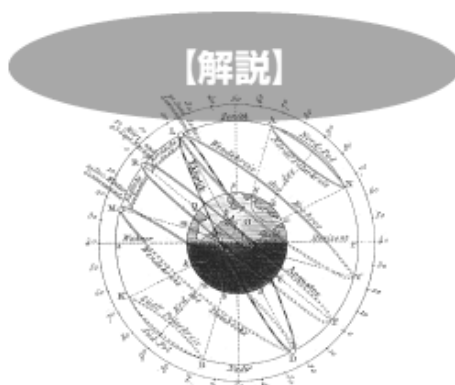


図 1 *TtFbpA* の過飽和シリカによる転写誘導メカニズム

過飽和シリカ条件下では、生成したコロイドシリカに鉄イオンが捕捉され、細胞は鉄不足に陥り、Fur の脱抑制を経て、鉄取り込みタンパク質である *TtFbpA* が転写誘導される。(文献²⁾より改変転載)

筆者紹介：ふじの・やすひろ (FUJINO, Yasuhiro) 九州大学大学院農学研究院 (Fac. of Agric., Kyushu Univ.) 助教 2010 年九州大学大学院生物資源環境科学府博士後期課程修了 博士 (農学) 専門：応用微生物学
連絡先：〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744 E-mail: fusion@agr.kyushu-u.ac.jp (勤務先)
どい・かつみ (DOI, Katsumi) 同上 教授 1993 年九州大学大学院農学研究院博士後期課程修了 博士 (農学) 専門：微生物遺伝子資源学 連絡先：同上 E-mail: doi@agr.kyushu-u.ac.jp (勤務先)



改訂 ウイルス分類

話題のウイルスの知見と動向

緒方靖哉*¹, 西山 孝*², 土居克実*³

近年、国内では全国規模での豚コレラの感染拡大やマダニ感染症による死亡例が大きなニュースとなり、国外でのエボラ出血熱やジカ熱などの蔓延が東京オリンピックを控えた我が国の大きな問題となっている。また、ゲノム解析技術の進展から新たなウイルスの存在が多数報告されている。このようなウイルスによる新興や再興感染症および環境ウイルスが注目を浴びている一方、これらのウイルスの分類について顧みられることは少ない。本稿では、ウイルス分類学の定義に基づいて、話題のウイルス、分類の改訂されたウイルス、さらに新たに発見されたウイルスについて紹介する。なお、本稿には、興味のあるウイルスを手軽に検索できる索引リストを併記した。

序文

世界的大流行で4,000万人が死亡したと言われているスペイン風邪インフルエンザの発生から100年経ち、新型のインフルエンザをはじめ世界的な大流行の恐れのある

ウイルスの出現（パンデミック）の可能性が専門家間で懸念されている。確かに、ウイルスがマスコミに取り上げられ、世の中を騒がせている回数が増えている。しかし、下記の項目イロハ順に示すように、次々ウイルス名は学がっているが、“これらのウイルスがどんな仲間に関属するか”についてはほとんど触れられていない。本稿では、新聞、雑誌、テレビ、Wikipediaなどのネットで話題になっているウイルスを拾い上げて、下記の項目1, 2で示す9th ICTV Report^[1]の分類法に従って、これらウイルスの所属と若干の性質を記述する。なお、本稿は、先報^[2, 3]をベースに、その後から平成末までの知見を加え改訂したものである。分類にはICTVの年次Reportなども利用し、ウイルス名にはできる限りカナ表現を付けた。ウイルス名のカナ表現や性状などは文末の文献^[4-12]も参考にした。本稿を、「ウイルス分類への理解」と「平成ウイルス騒乱の覚書」に利用していただければ幸いである。

イ. 毎年、世界中を騒がせ、新型出現の話題で賑わすインフルエンザウイルス (V群1本鎖RNA: この表記法は下記「1. 核酸形状と発現様式」参照のこと); 老人泣かせのノロウイルス (VI群1本鎖RNA); 毎年1億人以

Revised Edition of Virus Taxonomy: Information and Trend of Important Viruses in Topic and Public
Seiya OGATA, Takashi NISHIYAMA, Katsumi DOI, *¹九州大学名誉教授, *²崇城大学生物生命学部応用生命科学科, *³九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門

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府（修士課程）

吉永 啓恵 カイコの生殖細胞を用いた凍結保存に関する研究

大学院生物資源環境科学府（博士課程）

Md. Rezwanul Haque Study on serine synthesis pathway in silkworm
池永照美 テキスタイル素材としてのカイコ遺伝資源特性の評価に関する研究

【植物遺伝子開発分野】

大学院生物資源環境科学府（修士課程）

Rahma Siti Nur Azizah Genetic and evolutionary study of *INCENTIVE FOR KILLING*
Fauziyati *POLLEN (INK)* gene responsible for hybrid male sterility in rice
Nguyen Thi Phuong Tho Characterization of *SUGARY2* gene involved in rice starch metabolism
Hran Hong Quan The construction of the genetic linkage map of Endosperm Storage Protein (ESP)3 gene regulating the cysteine rich prolamines

大学院生物資源環境科学府（博士課程）

加藤 和直 登熟温度が異なる米の食味と胚乳澱粉の特性解析

【微生物遺伝子開発分野】

農学部生物資源環境科学科（学士課程）

森田 大幹 乳酸菌におけるD-アミノ酸生成機構の解明
上土井 達哉 シイタケ腐敗菌に感染するバクテリオファージの性状解析
村山 友香 乳酸菌プロファージ誘導の分子メカニズム

大学院生物資源環境科学府（修士課程）

吉田 直己 乳酸菌ファージφQ1の感染機構の解明
出口 朋也 好熱性ファージφOH2の溶原化機構の解明
小島 賢太 乳酸菌のD-アミノ酸生合成経路の解明
白澤 拓海 ファージ由来Holを用いたガン治療法の開発
Xayapatha Souliya Identification of plant pathogenic microorganisms in Laos.
飯田 拳史 *Thermus*属細菌を宿主とする新規異種タンパク質発現系の開発

副島 春香	繊維状ファージにおけるg5p (single strand binding protein)の特性解析
木室 綾香	乳酸発酵現場で単離されたファージのゲノム特性とプロファージ誘導

大学院生物資源環境科学府（博士課程）

Nguyen Cong Thanh	Application of phage therapy to plant disease in Vietnam
土谷 直史	地熱発電所における好熱性微生物の網羅的解析
下元 仁美	浴室汚染菌の性状・ゲノム解析

2. 科学研究費・共同、受託研究等

【家蚕遺伝子開発分野】

ナショナルバイオリソースプロジェクト中核的拠点整備プログラム

課題管理者 伴野 豊

「カイコバイオリソースの収集・高品質化と効率的保存・供給体制の整備」

ナショナルバイオリソースプロジェクト基盤技術整備プログラム

課題管理者 伴野 豊

「カイコ及び近縁野蚕の凍結保存技術の高度化」

挑戦的研究 研究代表 山本 幸治

「X線結晶構造を用いた農薬開発」

国際共同研究加速基金 研究代表 山本 幸治

「タンパク質構造情報を基礎とした昆虫成長阻害剤の創出」

JASRI 研究代表 山本 幸治

「アルドケト還元酵素の構造解析」

【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

機関代表 熊丸敏博 「イネ属の多様性を生かすリソース基盤の構築（多様な高品質イネ実験系統の整備）」

National Science Foundation, Plant Genome Research Project, Co-PI, Toshihiro

Kumamaru, "Deciphering the role of RNA binding proteins in RNA transport, localization and

post-transcriptional processes in plants”

JFCインターナショナル国際共同研究（米国）加州米品種改良プロジェクト
研究分担 熊丸敏博

基盤研究(B) 研究代表 熊丸敏博

「イネ種子の細胞内物質貯蔵における小胞体機能タンパク質の機能解明とその育種的利用」

基盤研究(C) 研究代表 久保 貴彦

「花粉キラーを制御する分子ネットワークの解明」

【微生物遺伝子開発分野】

九州自然エネルギー推進機構, 第2回研究助成金 研究代表 土居克実
好熱性微生物を利用した地熱発電におけるシリカスケール形成防止素材の開発

島原半島ジオパーク協議会, 島原半島ユネスコ世界ジオパーク学術研究奨励事業,
研究代表 土居克実, 島原半島内の地熱熱水域に生息する好熱性微生物の地理多様性解析.

東洋水産財団, 研究代表 土居克実

生鮮食品保蔵のためのフェージセラピー技術の開発.

3. 講演会・セミナー・講習会

【家蚕遺伝子開発分野】

伴野 豊

JST 主催サイエンスアゴラ企画出展 「カイコと日本」をテーマに日本蚕糸学会と共同で開催、
テレコムセンタービル 2019年11月

農学部同窓会主催 新キャンパスツアーで、同窓生にカイコの施設紹介を行った。
2019年5月

その他、富岡勉衆議院議員視察（文部科学省研究振興局村田局長随行、9月24日）、久留米市、
文部科学省視察など、新キャンパスオープン（2年目であるが）に伴う視察を多数受け入れた。

【植物遺伝子開発分野】

熊丸敏博

福岡県立明善高等学校 総合的な学習時間「大学セミナー」:農学部の特徴と生物資源について, 2019年7月

4. 海外渡航

【家蚕遺伝子開発分野】

山本 幸治

Korea, Daegu, Kyunpook National University, 2019年10~11月, 2020年1~2月

【植物遺伝子開発分野】

熊丸敏博

ミャンマー, Ministry of Agriculture, Department of Agricultural Research (ネピドー), 2020年2月

久保貴彦

ミャンマー, Ministry of Agriculture, Department of Agricultural Research (ネピドー), 2020年2月

5. 訪問研究員等

【植物遺伝子開発分野】

Nguyen Thi Lan Hoa, 訪問研究員, トウモロコシの遺伝的多様性に関する研究. Plant Resources Center, Vietnam Academy of Agricultural Science, Hanoi, ベトナム, 2019年5月~8月.

Nguyen Thi Bich Thuy, 訪問研究員, トウモロコシの貯蔵タンパク質に関する研究. Plant Resources Center, Vietnam Academy of Agricultural Science, Hanoi, ベトナム, 2019年5月~7月.

IV. 遺伝子資源の保存、収集の状況

【家蚕遺伝子開発分野】

本センター保存の家蚕（カイコ）系統は、アカデミックリソースとしては、世界最大のコレクションであり、カイコ研究の拠り所として国の内外の研究者から利用されている。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（NBRP）のカイコの中核拠点として本分野は指定され、本センターの果たすべき役割は益々高まっている。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。それらは、下記の系統約500系統がコアとなっている。コア系統の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されている。

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

コア系統以外に TG（ゲノム改変カイコ）系統138系統、クワコヘカイコを連続戻し交配して作成した染色体置換系統53系統、ケミカルミュータジェネシス(ENU)25系統、他機関から寄託された系統等が維持されている。

p（地域型品種）	23	a（胚子、幼虫期致死）	20
b（繭形・繭質）	17	c（繭色）	25
d（卵形・卵殻色）	35	e（卵色）	28
f（幼虫肢・斑紋）	38	g（幼虫斑紋）	17
i（幼虫眼紋・頭尾斑）	13	k（幼虫体色）	24
l（幼虫体色）	28	m（モザイク・畸形）	17
n（幼虫体形）	28	o（油蚕）	40
r（染色体異常・交叉率）	16	t（発育・眠性）	25
u（蛹・成虫）	21	w（連関分析用合成系）	27
x（分析未了の新突然変異）	14		

（提供：系統の分譲件数）

本分野の過去5年間のカイコ系統の分譲件数を示す。分譲依頼者は、研究、教育関係が大半である。突然変異体系統に加え、最近は大規模、雌雄鑑別が容易な系統の利用が広がっている。理学、農学系、薬学系からの依頼が中心となっている。

		2015	2016	2017	2018	2019
生物体での分譲	国内	609件	680件	763件	862件	806件
	国外	128件	115件	163件	188件	202件
DNAでの分譲	国内	205件	64件	30件	0件	0件

（カイコバイオリソースに関する専門知識・情報の提供）

リソース分譲の増加と共にカイコに関する生物学的知識、利活用に関する専門知識、技術相談、研修依頼、また来訪者への対応が増大している。その主な項目を下記に列挙する。括弧内は主な対象者。

- ・カイコ突然変異体を中心とした形質特性、起源に関する情報提供（研究者、院生）
- ・研究に適した系統の選出依頼や、研究計画に対する助言依頼（研究者、院生）

- ・カイコバイオリソースに関する遺伝を中心とした文献や知識の提供（研究者、院生）
- ・カイコの系統維持に関する専門知識の提供（研究者、教育関係者）
- ・カイコ系統の凍結保存に関する技術移転に関する相談（研究者）
- ・桑の分譲、栽培に関する専門知識の提供（研究者、一般）
- ・カイコ全般に関する知識提供（教員、一般）
- ・養蚕に関する知識、技術の提供（農業関係者、一般）
- ・カイコの教材としての活用方法に関する相談（教員、教育関係者）
- ・報道、出版機関からのカイコ、養蚕に関する問い合わせや専門用語の解説依頼や知識の提供、監修依頼（報道、出版関係者）
- ・カイコを用いたイベント開催に関するアドバイスや講演依頼（教員、自治体関係者、一般）

（カイコ系統の保存事業）

日本医療研究開発機構(AMED)のナショナルバイオリソースプロジェクト NBRP 採択による経費、文部省の系統保存費の補助金を受け、本分野のメイン事業として行っている。ここでは、NBRP 活動を中心に抜粋し、報告する。本年度の NBRP 事業は、先端科学に対応し得る高品質なカイコバイオリソースを収集・保存・提供する基盤を構築することを目的に、九州大学（中核機関）、学習院大学（分担機関）、信州大学（分担機関）と共同で事業を行った。

- ・中核機関である本分野のコアリソース約 500 種類は長野県松本市の風穴、信州大学の野蚕系統は九州大学でバックアップ保存した。遺伝子組換え系統の大半（約 150 系統）は凍結保存によって維持している。
- ・分担機関（学習院大学）で行なっている坂戸系クワコ・イチジクカサンの保存・提供業務を中核機関へ集約した。
- ・カイコで開発した卵巣の凍結保存方法により分担機関（信州大学）が保有するエリサンの凍結保存を行った。
- ・ニュースレター“おかいこさま”を 2 回（4 月、12 月）発行し、研究コミュニティに配布した。新規ユーザーの拡大を目指し、カイコリソースに関する解説書を日本語版と英語版で作成した。
- ・遺伝学研究所川本祥子准教授と連携して、データベース SilkWormBase の更新、データの拡充を行った。
- ・運営委員会（2020 年 1 月 21 日）を開催するとともに日本蚕糸学会とは連携を密に行い、ユーザーの意見を収集し事業に反映させた。

＜個別の事業概要＞

①カイコバイオリソースの収集と高品質化

- ・ゲノム改変系統 13 系統、ENU 系統を 4 系統収集した。p20 系統で置換したクワコのコンソミック系統の育成を行い、38 系統について高度化を進めた。
- ・薬物評価、病態モデル、有用タンパク質の発現に適した 3 系統のカイコ系統の配布を始めた。
- ・保有系統のうち 600 系統に関し、卵、幼虫、蛹時期に形質の評価を行い、高品質化をはかった。

②カイコバイオリソースの保存・提供

- ・新規に 50 系統の凍結保存を行った。
- ・致死遺伝子 1 系統、不妊突然変異 1 系統について、分子マーカーによる管理を可能とした。
- ・飼育室環境の管理、良質桑を確保するための桑園管理（福岡市 3 ヶ所、指宿市 1 ヶ所）を行った。
- ・第 1 期でコア系統を中心に採卵し、それを基本に、年間計 6 回の飼育により、卵から成虫の各ステージでの提供事業を行い、提供件数は 1008 件であった。

③桑園管理

カイコ飼育には餌となる桑の確保が必要で、本分野の業務は桑園管理から行われている。桑園管理は、施肥、除草、病害虫、剪定、収穫など幅広い分野に関する知識と経験が必要な業務であり、本分野の技術職員が主導して行った。カイコの飼育は5月から6月の第1期の飼育が最も多い。2019年の第1期は伊都移転後の初めての飼育期となった。この時期には5トンから6トンの桑が必要で移転以前にはこの量の確保が課題であった。失敗は許されないので慎重にシミュレーションを行ってきた。実際の運用では予想を上回る収穫ができ、無事に第1期の飼育が行うことができた。伊都地区での桑不足や、新施設での飼育で異常が生じた場合に備える為、箱崎地区の桑園と飼育施設建物は2019年8月まで維持することを申請し、認められていた。幸いにも箱崎の桑園や施設を利用することはなく乗りきることができた。学内の関係者には箱崎地区施設の延長使用では大変お世話になった。関係者にはこの書面でお礼を申し上げる次第である。

指宿試験地には太田幸一技術専門職員(2019年1月逝去)の後任として6月から木村友祐氏が採用された。

◎2019年度(2019.4~2020.3、H31/R1)の桑園移管理業務の主なものは以下の通りである。

4月

第3工区(H26=2014年3月、H27=2015年3月植付け)、第4工区17、18、19圃場(H28=2016年3月桑植え付け)、20、21、22圃場(H29=2017年3月新植)、H30=2018年3月新植した第4工区建物前の0.2haの総面積約2.6haの管理を行う。箱崎地区は建物周囲と2号桑園、線路脇桑園の管理を6月まで行った。箱崎地区はシルバー(溝口さん)が担当した。箱崎で100年続いたカイコ飼育は完全に終了する。鹿児島本線沿いにあった桑園は通勤客にも知られていたもので一抹の寂寥感有。

5月

伊都地区桑園の利用による初めての春蚕飼育(第1期)。箱崎ではシルバー人材センターに依頼していた桑摘、草刈作業だが、伊都キャンパス移転により学外より学内への入構手続や案内の煩雑さから学生アルバイトに桑摘を依頼。また4工区急斜面及び一部株間の草刈は業者依頼。大きな問題もなく1期系統保存終了。(1期桑葉収穫圃場3-1、3-2、4-3、4-4)。

6月

箱崎地区旧2号圃場アメリカシロヒトリ発生。近隣住民より苦情あり。初回技術職員対応。後は昆虫ゲノム科学が対応(桑葉収穫の為)。

7月

田主丸農家が針桑(ハリグワ:柘)について増殖の相談があり、対応し挿し木をする。3工区イノシシ侵入防止柵設置(写真参照)。

8月

5期用桑葉確保の為、4-1圃場中間伐採。建物前基部条切。全圃場外周、4工区斜面草刈業者に依頼。針桑挿木乾燥し枯死。ただし、業者圃場では一部生育。

12月

4工区桑園の斜面草刈業者に依頼(写真)。

2020年

1月

4工区(20.21.22)を春刈り、矮小枝切り&条粉碎。指宿試験地よりNBRP依頼の桑葉発送。

2月

全桑園堆肥まき&耕運、株間草刈。指宿試験地シマグワの挿木。指宿試験地よりNBRP依頼の桑葉発送。

3月

全桑園にカミキリ殺虫剤注入。丸桑肥料全桑園施肥(写真参照)



2019.7月 3工区 (野球場上)
イノシシ柵設置



2019.12月 4工区 (南ゲート近辺)
斜面草刈 (業者依頼)



2020.1月 指宿ハウス桑



2020.1月 指宿挿木



2020.2月 全桑園堆肥散布



2020.3月 丸桑肥料全桑園散布

【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/>

NBRPにおいて開設したTILLINGオープンラボに国内外の研究者を受け入れている。

<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabaseV4/tilling/openLab>



また、水田圃場を学内外の研究者に開放するオープンフィールドを開催した（左写真）。オープンフィールドでは九大圃場施設内で研究対象となる系統リソースの形態観察や計測が可能である。本活動は大規模圃場を持たない遺伝子資源ユーザーの研究支援とリソースの有効活用につながっている。



収穫期におけるコンクリート水田と温室群



IR64由来のMNU変異体のスクリーニング

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
2016	569			6-70	1-5
2017	402			18-3,855	2-2
2018	474			14-145	2-17
2019	470			12-542	2-14

【微生物遺伝子開発分野】

微生物遺伝子開発分野における菌株の収集と保存は、発酵学講座、微生物工学講座など応用微生物関連講座での有用微生物の探索とその研究過程で得られた分離株及び変異株の収集・保存に始まる。これら菌株の多くはアルコール、有機酸、アミノ酸、核酸、抗生物質、酵素等の発酵、食品、医薬、化学工業にまたがる広範囲の各種有用物質の生産に利用されている。また、産業廃棄物の処理と資源化、炭酸ガス処理を含む地球環境の改善に係わる環境科学の基礎的・応用的研究にも大きく貢献している。

現在、以下のような菌株を保存している。

I. 細菌

- (A) 基準株 *Bacillus* 属, *Cellulomonas* 属, *Lactobacillus* 属, *Lactococcus* 属, *Pseudomonas* 属, *Thermus* 属および大腸菌
66 種 147 株
- (B) 分離株 *Bacillus* 属, *Geobacillus* 属, *Ureibacillus* 属, *Lactobacillus* 属, *Lactococcus* 属, *Pediococcus* 属, *Pseudomonas* 属, *Enterococcus* 属及び *Thermus* 属
43 種 1104 株
- (C) 変異株 *Bacillus* 属, *Geobacillus* 属, *Lactobacillus* 属および *Thermus* 属
23 種 185 株

II. 放線菌

- (A) 基準株 *Micromonospora* 属, *Nocardia* 属, *Rodococcus* 属, *Streptomyces* 属および *Streptoverticillium* 属
155 種 171 株
- (B) 分離株 *Streptomyces* 属
5 種 5 株
- (C) 変異株 *Streptomyces* 属
10 種 311 株

III. プラスミド

- (A) 導入プラスミドベクター 大腸菌、枯草菌（含む納豆菌）、乳酸菌、放線菌および酵母系統
165 種類
- (B) 分離プラスミド 枯草菌（含む納豆菌）、乳酸菌および放線菌系統
127 種類
- (C) 変異・構築プラスミド 4300 種類以上

IV. ファージ

- (A) 導入ファージ・ファージベクター 大腸菌、乳酸菌、放線菌系統
35 種類
- (B) 分離ファージ 乳酸菌および放線菌、アーキア系統
207 種類
- (C) 変異・構築ファージ 大腸菌、乳酸菌および放線菌系統
85 種類

V. 糸状菌

(A) 基準株 *Aspergillus* 属, *Mucor* 属および *Penicillium* 属
3 種 25 株

VI. 酵母

(A) 基準株 *Saccharomyces* 属および *Candida* 属
3 種 3 株

VII. 昆虫培養細胞

Bombyx 属, *Spodoptera* 属及び *Trichoplusia* 属
7 種 11 株

VIII. 昆虫ウイルス及び組換え体

(A) 昆虫ウイルス 5 種類

(B) 組換え体ウイルス 6 種類

上記以外の有用微生物資源については、現在、発酵学教室及び微生物工学教室においてそれぞれ保存・管理されている。

V. センター規程

九州大学農学研究院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授のうちから教授会の議を経て選定する。

- 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助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、助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助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助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、議事を開き、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 Laboratory

BANNO, Yutaka	Ph. D.	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 Laboratory

KUMAMARU, Toshihiro	Ph. D.	Professor
KUBO, Takahiko	Ph. D.	Associate Professor

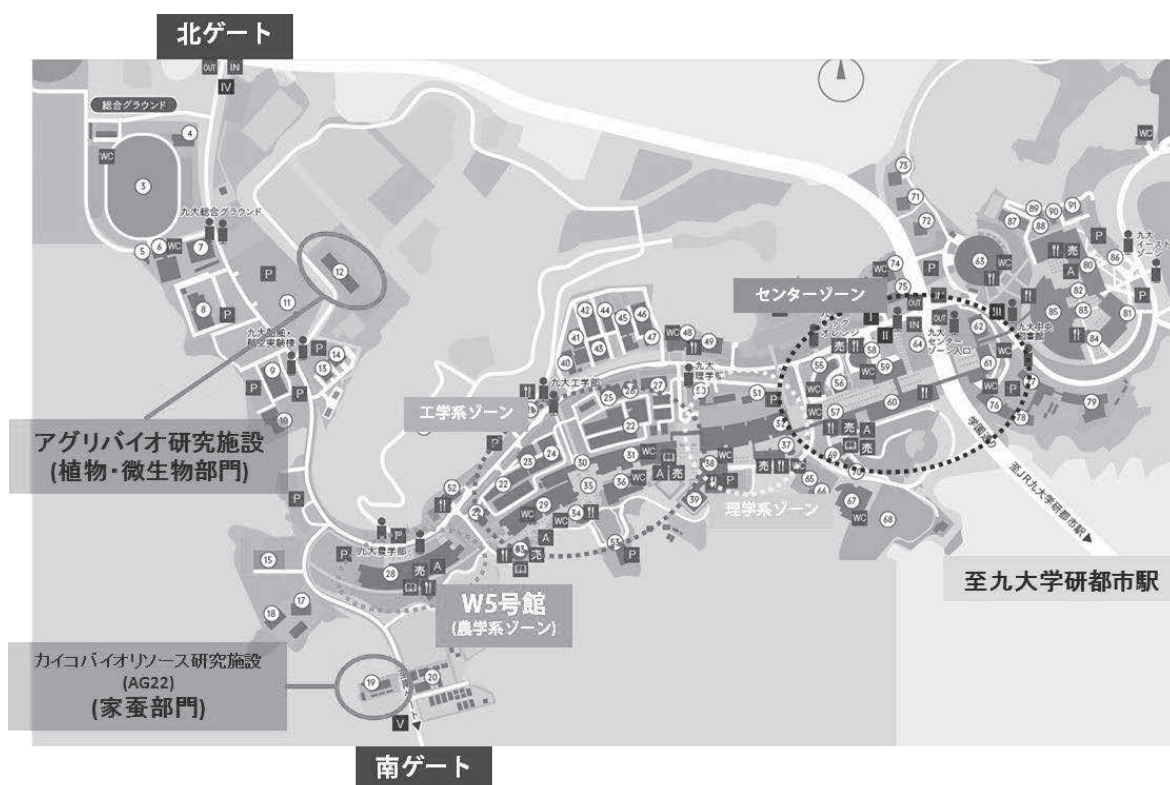
- a) Resolution of the mechanism controlling the transport and the accumulation of the seed storage proteins in rice.
- b) Identification and functional analysis of genes involved in reproductive development and evolution of rice.
- c) Construction of the rice mutation pool.
- d) Conservation and evaluation of rice genetic resources.

Microbial Genetics Laboratory

DOI, Katsumi	Ph. D.	Professor
FUJINO, Yasuhiro	Ph. D.	Assistant Professor

- a) Survey, development and preservation of microbial genetic resources
- b) Genetics and breeding of industrial bacteria: *Streptomyces*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Thermus*, etc.
- c) Functional analysis and application of novel and useful genes found in industrial bacteria
- d) Isolation and characterization of bacterial and archaeal viruses
- e) Investigation of biomineralization in geothermal environment

VII. センター研究棟配置図



家蚕遺伝子開発分野

(AG22棟：カイコバイオリソース研究施設)

Tel.& Fax. 092-802-4820, 4819, 4816, 4822



植物遺伝子開発分野

(アグリ・バイオ研究施設棟)

Tel. & Fax. 092-802-4842, 4844, 4843

微生物遺伝子開発分野

(アグリ・バイオ研究施設棟)

Tel. & Fax. 092-802-4845, 4846

編集後記

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

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

第 23 号

令和 3 年 3 月 1 日 発行

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

〒819-0395 福岡市西区元岡 744

T E L 092 - 802 - 4842

印刷所 門司印刷株式会社

〒801-0833

北九州市門司区清滝 3 丁目 4 番 28 号

T E L 093 - 321 - 4081