

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24号

2020

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

Number 24

目 次

巻頭言	2
I. センターの概要	4
1. 目的.....	4
2. 沿革.....	4
3. 組織・教職員.....	5
4. 研究と事業内容.....	6
5. 遺伝子資源開発研究センター運営委員会委員（令和3年3月31日現在）	6
6. 組織図.....	7
II. 研究成果.....	8
1. 研究業績・出版物リスト	8
2. 原著論文要旨.....	12
III. センターの活動状況	25
1. 教育活動.....	25
2. 科学研究費・共同、受託研究等.....	26
3. 講演会・セミナー・講習会.....	27
4. 海外渡航.....	27
5. 訪問研究員等.....	28
IV. 遺伝子資源の保存、収集の状況.....	28
V. センター規程.....	38
VI. 英文摘要.....	40
VII. センター研究棟配置図.....	42

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な性質を持っている（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なければならない。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を図る。

2. 沿革

- | | |
|-------------|---|
| 昭和 62 年 5 月 | 本学附属家蚕遺伝子実験施設を振替え、附属遺伝子資源研究センターが 10 年の時限施設として設置され、教授、助教授、助手各 2 名が配置された。 |
| 平成元年 4 月 | 教授、助教授各 1 が追加配置された。本学大学院農学研究科に設置された独立専攻遺伝子資源工学専攻の協力講座として、昆虫遺伝子資源学、遺伝子開発管理学の 2 講座に参加した。 |
| 平成 3 年 4 月 | 遺伝子資源工学専攻に微生物遺伝子工学講座が新設され、これに参加した。 |
| 平成 9 年 4 月 | 附属遺伝子資源研究センターは時限により廃止され、新たに、教授 3 名、助教授 3 名、助手 2 名の振替によって附属遺伝子資源開発研究センターが設置された。 |
| 平成 12 年 4 月 | 大学院重点化に伴い、大学院 農学研究院附属遺伝子資源開発研究センターに改組された。また、大学院教育として生物資源環境科学府 遺伝子資源工学専攻 遺伝子資源開発学講座（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	福森 寿善	技術職員	山本 和典

植物遺伝子開発分野

教授	熊丸 敏博	学術研究員	松坂 弘明
准教授	久保 貴彦	テクニカルスタッフ	原田 良子
学振特別研究員	福田 真子	技術補佐員	池田 恵利佳
海外学振特別研究員	Elakhdar Ammar	技術補佐員	松尾由起恵

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

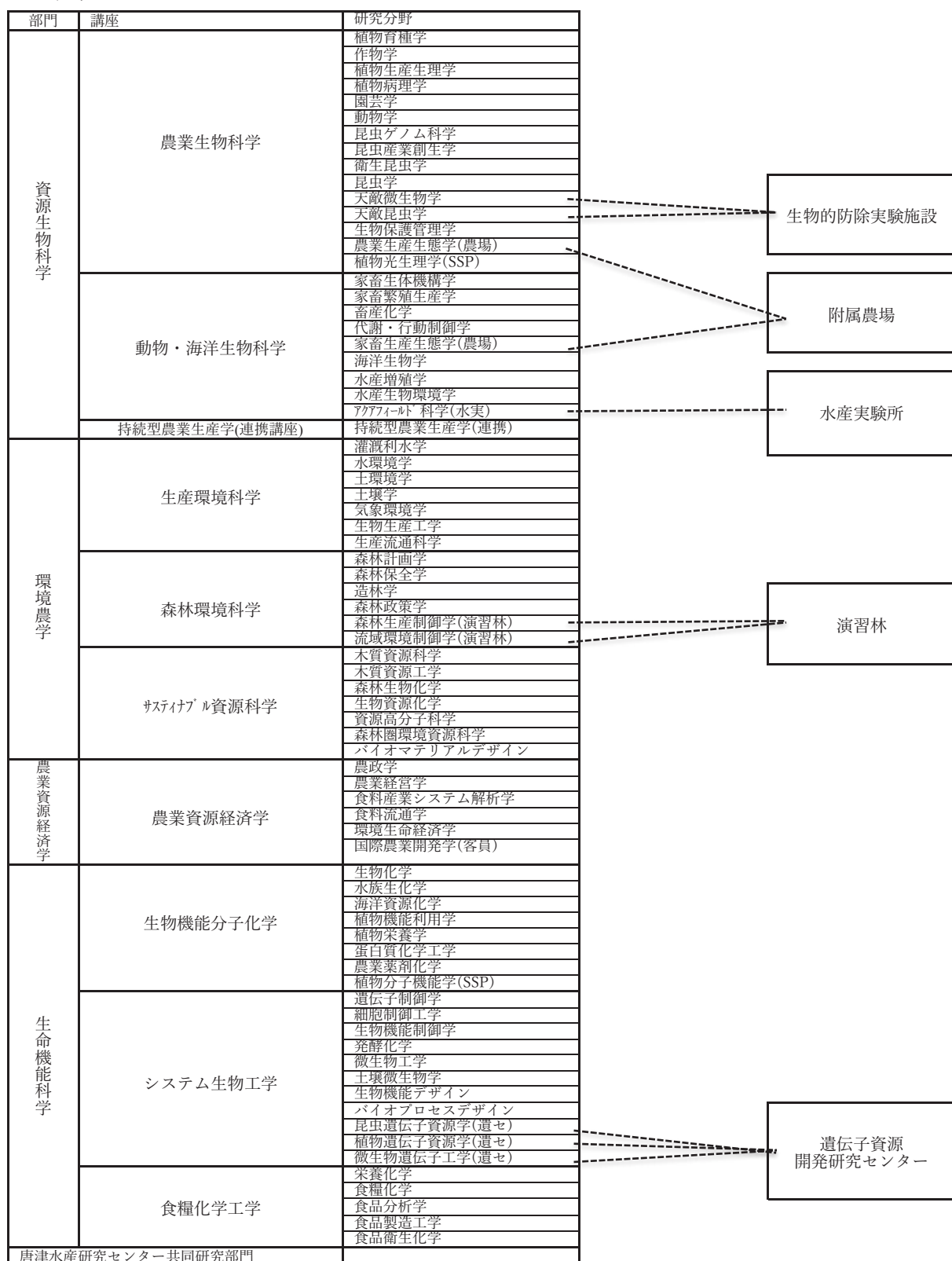
- ・微生物遺伝子資源の探索と評価、保存と利用開発、並びに有用遺伝子の高度機能化と応用展開に関する研究

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3年3月31日現在）

委員長	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	久保 貴彦	(遺伝子資源開発研究センター)
教授	片倉 喜範	(生命機能科学部門)
教授	日下部 宜宏	(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)

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) Bairam AF, Kermasha ZW, Liu MC, Kurogi K, Yamamoto K,
Functional analysis of novel sulfotransferase in the silkworm, *Bombyx mori*,
Archives of Insect Biochemistry & Physiology, **104**, e21671 (2020)
- 2) Fukumori H, Yoshida M, Tanaka D, Banno Y,
Embryonic stage selection for cryopreservation of the silkworm *Bombyx mori* and
the effects of cryopreservation on embryo tissues,
Cryobiology, **95**, 9-14 (2020)
- 3) Yamamoto K, Yamaguchi M, Endo S,
Functional characterization of an aldose reductase (bmALD1) obtained from the
silkworm *Bombyx mori*,
Insect Molecular Biology, **29**, 490-497 (2020)
- 4) Fujii T, Kakino K, Tanaka M, Lee JM, Kusakabe T, Banno Y,
A defect in purine nucleotide metabolism in the silkworm, *Bombyx mori*, causes a
translucent larval integument and male infertility,
Insect Biochem. Mol. Biol., **126**, 103458 (2020)
- 5) Yamamoto K, Yamaguchi M, Yamada N,
Investigation of the active site of an unclassified glutathione transferase in
Bombyx mori by alanine scanning,
Journal of Pesticide Science, **45 (4)**, 238-240 (2020)
- 6) Yamamoto K, Mohri S, Furuya S,
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase from the silkworm *Bombyx mori*:
Identification, functional characterization, and expression,
Archives of Insect Biochemistry & Physiology, **2020**, e21751 (2020)
- 7) Yamamoto K, Yamaguchi M,
Differences in prostaglandin E-related factors between silkworm strains
[Lepidoptera: Bombycidae] producing small eggs (d32) and giant eggs (d40),
Journal of Insect Biotechnology and Sericology, **90**, 17-20 (2021)

B. 著書・総説

- 1) 福森寿善, 藤井告, 日下部宜宏,
九州大学カイコ系統を用いた組換えタンパク質生産工場
蚕糸・昆虫バイオテック, **89 (2)**, 77-83 (2020)

C. 学会発表

- 1) 福森寿善, 梶浦善太, 伴野豊,
ヤマユガおよびサクサンの超低温保存の可能性,
Cryopreservation Conference 2020, 2020年11月26日, オンライン.

- 2) 山本幸治、水光正仁、榊原陽一、黒木勝久、
ポリフェノール類を代謝する昆虫・硫酸転移酵素の機能解析、
第46回日本農薬学会, 2021年03月09日, on-line.
- 3) 藤井告, 田中未祐, 柿野耕平, 福森寿善, 金兎雄, 李在萬, 日下部宜宏, 伴野豊,
カイコの尿酸代謝を支配する抗酸化酵素の同定
日本蚕糸学会第91回大会, 2021年03月19日, オンライン.
- 4) 山本幸治、遠藤智史,
アルデヒド類を代謝するカイコ・アルドケト還元酵素の機能解析,
日本蚕糸学会第91回大会, 2021年03月20日, on-line.
- 5) 福森寿善, 江田将子, 長崎紀代美, 藤井告, 伴野豊,
カイコへのクワコ精巣移植の可能性について,
日本蚕糸学会第91回大会, 2021年03月20日, オンライン.
- 6) 伴野豊, 福森寿善, 藤井告, 梶浦善太, 嶋田透,
世界最高水準のカイコリソースの魅力,
第65回日本応用動物昆虫学会大会, 2021年03月25日, 島根大学 (オンライン).
- 7) 藤井告, 柿野耕平, 李在萬, 日下部宜宏, 伴野豊,
混合サンプルのRNA-seq 解析によるカイコの致死遺伝子の迅速同定,
第65回日本応用動物昆虫学会大会, 2021年3月25日, 島根大学 (オンライン).

D. 特許出願

無し

E. データベース等

無し

F. その他

無し

【植物遺伝子開発分野】

A. 原著論文

- 1) Li Tian, Kelly A. Doroshenk, Laining Zhang, Masako Fukuda, Haruhiko Washida, Toshihiro Kumamaru, Thomas Okita.
Zipcode RNA-Binding proteins and membrane trafficking proteins cooperate to transport glutelin mRNAs in rice endosperm.
The Plant Cell **32**, 2566-2581 (2020) Doi: 10.1105/tpc.20.00111
- 2) Kihara, M., Ushijima, T., Yamagata, Y., Tsuruda, Y., Higa, T., Abiko, T., Kubo, T., Wada, M., Suetsugu, N., Gotoh, E.
Light-induced chloroplast movements in *Oryza* species.
Journal of Plant Research, **133** (4), 525-535 (2020)
Doi: org/10.1007/s10265-020-01189-w

B. 著書・総説

無し

C. 学会発表

- 1) 北嶋諒太郎, 松田修, 熊丸敏博, 久米篤,
稲穂の色と高さが穂温に与える影響について,
日本農業気象学会, 2021年3月 大阪府立大学
- 2) 福田真子, 松坂弘明, 長嶺愛, 熊丸敏博,
Serine hydroxymethyltransferase (SHMT)はイネ種子のシステイン高含有貯蔵
タンパク質の合成に關与する,
第62回日本植物生理学会年会, 2021年3月 島根大学

D. 特許出願

無し

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) Nguyen Cong Thanh, Yuko Nagayoshi, Yasuhiro Fujino, Kazuhiro Iiyama, Naruto Furuya, Yasuaki Hiromasa, Takeo Iwamoto, Katsumi Doi, Characterization and Genome Structure of Virulent Phage EspM4VN to Control *Enterobacter* sp. M4 Isolated From Plant Soft Rot, *Frontiers in Microbiology*, **11**:885. doi: 10.3389/fmicb.2020.00885 (2020)
- 2) Yasuhiro Fujino, Shuichiro Goda, Yuri Suematsu, Katsumi Doi, Development of a new gene expression vector for *Thermus thermophilus* using a silica-inducible promoter, *Microbial Cell Factories*, **19**, 126 doi:10.1186/s12934-020-01385-2, (2020)
- 3) Nguyen Cong Thanh, Yasuhiro Fujino, Yasuaki Hiromasa, Katsumi Doi, Draft Genome Sequence of *Enterobacter kobei* M4-VN, Isolated from Potatoes with Soft Rot Disease, *Microbiology resource announcements*, **9**, 36, doi: 10.1128/MRA.00908-20. (2020)

B. 著書・総説

無し

C. 学会発表

- 1) Thanh Nguyen Cong, Fujino Yasuhiro, Tashiro Kosuke, Iwamoto Takeo, Hiromasa Yasuaki, Doi Katsumi, Characterization and genome structure of broad host range phage vB_EkoM5VN infecting *Enterobacter* and *Citrobacter* species, 日本農芸化学会 2021 年度大会, 2021.03.
- 2) 松中 南, 上土井 達哉, グエン コン タイン, 飯田 拳史, 金 相完, 田代 康介, 大森 勇門, 大島 敏久, 岩本 武夫, 廣政 恭明, 土居 克実, *Bacillus cereus* に感染する広宿主域ジャンボファージ vB_BceM_WH1 の特性とゲノム解析, 日本農芸化学会 2021 年度大会, 2021.03.
- 3) Iida T, Fujino Y, Suematsu Y, Doi K, Development of a new gene expression vector for *Thermus thermophilus* using a silica-inducible promoter, JSBBA West 3rd Student Forum, 2020.12.

D. 特許出願

無し

E. データベース等

無し

F.その他

無し

2. 原著論文要旨

家蚕遺伝子開発分野

Received: 24 October 2019 | Revised: 5 March 2020 | Accepted: 7 March 2020

DOI: 10.1002/arch.21671

RESEARCH ARTICLE

Archives of
INSECT BIOCHEMISTRY
AND PHYSIOLOGY

WILEY

Functional analysis of novel sulfotransferases in the silkworm *Bombyx mori*

Ahsan F. Bairam^{1,2} | Zainab W. Kermasha² | Ming-Cheh Liu² |
Katsuhisa Kurogi³ | Kohji Yamamoto⁴ 

¹Department of Pharmacology, College of Pharmacy, University of Kufa, Najaf, Iraq

²Department of Pharmacology, College of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of Toledo, Toledo, Ohio, USA

³Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Miyazaki, Japan

⁴Department of Bioscience and Biotechnology, Kyushu University Graduate School, 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: JP16KK0172, 17K19272; College of Pharmacy of the University of Toledo

Abstract

Sulfoconjugation plays a vital role in the detoxification of xenobiotics and in the metabolism of endogenous compounds. In this study, we aimed to identify new members of the sulfotransferase (SULT) superfamily in the silkworm *Bombyx mori*. Based on amino acid sequence and phylogenetic analyses, two new enzymes, swSULT ST1 and swSULT ST2, were identified that appear to belong to a distinct group of SULTs including several other insect SULTs. We expressed, purified, and characterized recombinant SULTs. While swSULT ST1 sulfated xanthurenic acid and pentachlorophenol, swSULT ST2 exclusively utilized xanthurenic acid as a substrate. Based on these results, and those concerning the tissue distribution and substrate specificity toward pentachlorophenol analyses, we hypothesize that swSULT ST1 plays a role in the detoxification of xenobiotics, including insecticides, in the silkworm midgut and in the induction of gametogenesis in silkworm ovary and testis. Collectively, the data obtained herein contribute to a better understanding of SULT enzymatic functions in insects.

KEYWORDS

Bombyx mori, detoxification, pentachlorophenol, sulfotransferase, xanthurenic acid



Contents lists available at ScienceDirect

Cryobiology

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/cryo>

Embryonic stage selection for cryopreservation of the silkworm *Bombyx mori* and the effects of cryopreservation on embryo tissues

Hisayoshi Fukumori^a, Mikiyo Yoshida^a, Daisuke Tanaka^b, Yutaka Banno^{a,*}

^a Silkworm Resource Division, Institute of Genetic Resources, Kyushu University Graduate School of Bioreources and Bioenvironmental Science, 744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka, 819-0395, Japan

^b Genetic Resources Conservation Research Unit, Genetic Resources Center, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, 305-8602, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:
Embryo
Cryopreservation
Vitrification
Stage selection
Cuticle damage
Midgut damage
Bombyx mori

ABSTRACT

Successful cryopreservation of the important silkworm bioresource, *Bombyx mori*, is essential. In this study, we aimed for successful cryopreservation using vitrification of silkworm embryos. Furthermore, the embryos were assessed for the most appropriate sampling stage. We found that vitrified embryos developed to the serosa ingestion stage when they were vitrified at embryonic stage 24–25. The most suitable stage for vitrification was around a 5–10 h period when the tracheal fibers were elongating in stage 25. None of the vitrified embryos developed into larvae, although some did develop to the pre-hatching stage. From histological analysis, we found that several small cracks formed on the cuticle covering the hypodermis in the vitrified embryos. Additionally, the midgut epithelium was detached from the midgut wall and mixed with the yolk in the midgut lumen. We speculate that the vitrified embryos died from a rapid loss of body water from the small cracks formed in the cuticle. We also suggest that the vitrified embryos may have resulted in dysfunction of the midgut.

1. Introduction

The silkworm, *Bombyx mori*, is an important bioresource. For example, approximately 820 strains are maintained by continuous rearing at the Institute of Genetic Resources at Kyushu University [3]. To maintain these strains, preserving them safely for long periods using methods such as cryopreservation is necessary. Two methods are currently available for the cryopreservation of *B. mori*: one uses frozen sperm [20,21] and the other uses frozen ovaries [2,13]. These methods are already being applied to most silkworm strains, but operational difficulties are associated with both methods: the former requires artificial insemination, the latter requires transplantation of ovaries after rearming. Thus, to avoid these difficulties, we are investigating another *B. mori* cryopreservation method, in which embryos are used. In this method, larvae originating from the preserved embryos are expected to be obtained only by incubating of embryos after rearming.

Cryopreservation of embryos has been successful in some species of insects including the fruit fly *Drosophila melanogaster* [11], the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* [15], the green bottle fly *Lucilia sericata*, the housefly *Musca domestica* [17], the pink bollworm moth *Pectinophora gossypiella* [16], and the firefly *Luciola praenata* Kiesenwetter [10]. Because insect embryos are covered by a chorion that inhibits

permeability it is necessary to dechorionate and permeabilize the eggs prior to vitrification to permit access of cryopreservation solution to the embryo. Eggs are commonly treated with chemicals such as sodium hypochlorite and some organic solvents for dechorionation and permeabilization, respectively. However, a side-effect of this treatment is that these chemicals damage the embryos [16]. For *B. mori* eggs, dechorionation using a surgical blade is possible [6,8]. These dechorionated eggs could also be vitrified smoothly and rapidly using the V-cryoplate paper-mounting and -removing method with aluminum cryoplates [7].

Treating the embryos at the correct stage of development is crucial to the success of insect cryopreservation. For example, dipteran embryos can only be cryopreserved at a precise developmental stage during late organogenesis [9,15]. Higher hatching rates can be obtained by aligning egg development and strictly selecting developmental stages [15,17]. For silkworms, high cold tolerance has been reported during late embryonic development [6]. In the present study, we investigated the developmental stage most appropriate for the cryopreservation of *B. mori*, and we examined the damage to treated embryos through histological analysis of vitrified specimens.

* Corresponding author.
E-mail address: banno@agr.kyushu-u.ac.jp (Y. Banno).

<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.06.016>

Received 8 March 2020; Received in revised form 7 June 2020; Accepted 30 June 2020

Available online 1 July 2020

0011-2240/© 2020 Published by Elsevier Inc.

Functional characterization of an aldose reductase (bmALD1) obtained from the silkworm *Bombyx mori*

K. Yamamoto*, M. Yamaguchi* and S. Endo†

*Faculty of Agriculture, Kyushu University Graduate School, Fukuoka, Japan; and †Laboratory of Biochemistry, Gifu Pharmaceutical University, Gifu, Japan

Abstract

We describe a new member of the aldo-keto reductase (AKR) superfamily in the silkworm *Bombyx mori*. On the basis of its amino acid sequence and phylogenetic tree, this AKR belongs to the AKR1B family and has been designated as bmALD1. In the current study, recombinant bmALD1 was overexpressed, purified to homogeneity and kinetically characterized. We discovered that bmALD1 uses NADPH as a coenzyme to reduce carbonyl compounds such as DL-glyceraldehyde, glucose and 2-nonenal. No NADH-dependent activity was detected. To the best of our knowledge, bmALD1 is only the third AKR characterized in silkworm which, given its substrate specificity, could play a major role in glucose metabolism and antioxidant reactions. Our data provide an increased understanding of insect AKR function.

Keywords: aldo-keto reductase, antioxidant, substrate specificity, NADPH.

Introduction

Aldo-keto reductase (AKR) catalyses NAD(P)(H)-dependent reversible reactions and participates in the reduction of aldehydes, ketones, steroid hormones and monosaccharides (Bohren et al., 1989). AKR family members act as hydroxysteroid dehydrogenases, aldose reductases, prostaglandin synthases and are involved in the detoxification of xenobiotics, reduction of intrinsic substrates including carbohydrates, steroid hormones, phospholipid aldehydes and other aldehydes (Jin and Penning, 2007). AKR families and subfamilies have been categorized based

First published online 7 August 2020.

Correspondence: Kohji Yamamoto, Faculty of Agriculture, Kyushu University Graduate School, 744 Motooka, Nishiku, Fukuoka 819-0395, Japan. Tel: +81 92 8024822; fax: +81 92 8024819; e-mail: yamamoto@agr.kyushu-u.ac.jp

on differences in their amino acid sequences and substrate specificities (Jin and Penning, 2007). All characterized AKR structures contain the Rossmann fold (TM barrel) motif, which was first discovered in lactate dehydrogenase (Rao and Rossmann, 1973). The typical fold comprises six parallel β -strands surrounded by six α -helices running anti-parallel to the strands. One of the functions of the Rossmann fold is cofactor binding, which is essential for activity. Amino acids that contribute to cofactor binding, as well as the catalytic pocket tetrad Asp, Tyr, Lys and His, are all highly conserved in AKRs (Penning and Drury, 2007).

Previously, we identified two AKRs (AKR2E4 and AKR2E5) from the silkworm *Bombyx mori* (Yamamoto and Wilson, 2013; Yamamoto et al., 2016). In *B. mori*, a model Lepidoptera, the mRNA encoding AKR2E4 is induced in response to diazinon, an insecticide used worldwide (Yamamoto and Wilson, 2013). We found that a new member of the AKR superfamily, designated as bmALD1, was also induced in response to diazinon. Accordingly, in the current study, we performed a biochemical characterization of this enzyme. Our kinetic studies demonstrated that bmALD1 recognizes 2-nonenal as a substrate, suggesting that bmALD1 contributes to antioxidant defence. In addition, glucose reduction by bmALD1 could elucidate the glucose metabolism pathways in *B. mori*. It is possible that *B. mori* could be used as a model for several diseases including diabetes mellitus, because it has been previously used to screen for anti-diabetic drugs (Matsumoto et al., 2011).

Results

Identification and sequencing of bmALD1

bmALD1 cDNA was generated by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) from total RNA isolated from the fat body of *B. mori*. The nucleotide sequence of bmald1 has been deposited in GenBank (accession number LC375687). The gene contains a coding sequence of 1,023 bp that encodes a predicted protein of 340 amino acid residues (Fig. 1). The calculated molecular mass and isoelectric point of bmALD1 are 38,892 and 5.79, respectively. A BLAST search showed that the deduced bmALD1 amino acid



Contents lists available at ScienceDirect

Insect Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibmbA defect in purine nucleotide metabolism in the silkworm, *Bombyx mori*, causes a translucent larval integument and male infertilityTsuguru Fujii^{a,*}, Kohei Kakino^b, Miyu Tanaka^b, Jae Man Lee^a, Takahiro Kusakabe^b, Yutaka Banno^c^a Laboratory of Creative Science for Insect Industries, Kyushu University Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Motooka 744, Nishi-ku, Fukuoka, 819-0395, Japan^b Laboratory of Insect Genome Science, Kyushu University Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Motooka 744, Nishi-ku, Fukuoka, 819-0395, Japan^c Laboratory of Silkworm Genetic Resources, Institute of Genetic Resources, Graduate School of Bioresources and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, Fukuoka, 812-8581, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

Purine nucleotide
Cytosolic 5'-nucleotidase
Nitrogen excretion
Inosine monophosphate (IMP)
Inosine
Uric acid

ABSTRACT

p-oily (op) is a novel mutant of *Bombyx mori* exhibiting translucent larval integument and male infertility. Elucidation of the causative gene of the *op* mutant will help understand the genetic mechanism underlying larval integument coloration and male fertility. Using polymorphisms between *B. mori* and *B. mandarina*, the *op* locus was narrowed down to a 375-kb region. Using RNA-seq analysis, we found that *op* mutants have a frameshift mutation in the *KWMTBOMO13770* gene located in the 375-kb region. A database search indicated that this gene is the human cytosolic 5'-nucleotidase II gene (*cN-II*) homolog in *Bombyx*, which mediates the conversion of inosine monophosphate (IMP) to inosine, a precursor of uric acid. CRISPR/Cas9-mediated knockout mutants of the *Bm-cN-II* gene showed translucent integuments, and there appeared translucent larvae in the crosses between knockout moths and *+/+* moths. Moreover, the translucent phenotype of, and decreased uric acid content in the larval integument caused by the mutations in the *Bm-cN-II* gene were rescued by oral administration of inosine. These results indicated that the *Bm-cN-II* gene is responsible for the *op* phenotype and that the molecular function of the *Bm-cN-II* gene is the conversion of IMP to inosine. We also discuss the genetic relationship between the *Bm-cN-II* gene and male fertility.

1. Introduction

Animals have a system for the detoxication of toxic ammonia generated by amino acid catabolism. Generally, ammonia is fixed into the amide of glutamine, which works as a primary intermediate in ammonia detoxication. The silkworm, *Bombyx mori*, possesses two main routes to excrete ammonia. In the first route, glutamine is transported to the silk gland, which has high glutamate synthase activity, which is converted to glutamate (Hirayama et al., 1997; Hirayama and Nakamura, 2002). Glutamate is used as a source of amino acids to synthesize silk protein. In this route, excess ammonia is excreted in the form of silk thread during the spinning stage. In the second route, the excretion of excess nitrogen is linked to the purine nucleotide synthesis pathway. In this pathway, glutamine is a source of nitrogen to form inosine monophosphate (IMP) (KEGG, https://www.genome.jp/kegg-bin/show_path

[way?bmor00230](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_path?bmor00230)) (Fig. 1). IMP is a precursor of uric acid, which is an end product of nitrogen metabolism in terrestrial insects (O'Donnell, 2008). Purine nucleotides are also synthesized from IMP (Fig. 1), suggesting that there is a system for balancing the synthesis of purine nucleotides with the excretion of excess nitrogen.

Although Lepidopteran insects excrete uric acid as feces, uric acid is stored in the larval epidermis as a white pigment and a barrier from sunlight (Lhonoré et al., 1980; Buckner and Newman, 1990; Tamura and Akai, 1999; Timmerman and Berenbaum, 1999; Matsuo and Ishikawa, 1999; Hu et al., 2013). In *B. mori*, a lack of uric acid in the larval integument results in a translucent integument (Tamura and Akai, 1999). To date, more than 30 loci have been identified that govern the translucent phenotype (SilkwormBase, <https://shigen.nig.ac.jp/silkwormbase/top.jsp>). The translucency of the larval integuments varies according to specific mutants. Several translucent mutants with a

* Corresponding author.

E-mail address: t.fujii@agr.kyushu-u.ac.jp (T. Fujii).<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103458>

Received 24 April 2020; Received in revised form 14 August 2020; Accepted 18 August 2020

Available online 27 August 2020

0965-1748/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

■■■■■■■■■■
Note
 ■■■■■■■■■■

Investigation of the active site of an unclassified glutathione transferase in *Bombyx mori* by alanine scanning

Kohji YAMAMOTO,* Misuzu YAMAGUCHI and Naotaka YAMADA

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

(Received June 19, 2020; Accepted July 20, 2020)

Glutathione transferase (GST) is an important class of detoxification enzymes that are vital for defense against various xenobiotics and cellular oxidative stress. Previously, we had reported an unclassified glutathione transferase 2 in *Bombyx mori* (bmGSTu2) to be responsible for detoxifying diazinon. In this study, we aimed to identify the amino acid residues that constitute a hydrogen-bonding network important for GST activity. Site-directed mutagenesis of bmGSTu2 suggested that residues Asn102, Pro162, and Ser166 contribute to its catalytic activity.

Keywords: glutathione, glutathione transferase, Lepidoptera, site-directed mutagenesis.

Introduction

Glutathione transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) are ubiquitously expressed and are responsible for intracellular detoxification of various xenobiotic and endogenous substances by catalyzing conjugation with glutathione (GSH).^{1,2} Insect GSTs and their role in insecticide metabolism have been of particular research interest. Various GST classes (delta, omega, sigma, and zeta), as well as unclassified GSTs, have been characterized in *Bombyx mori*.^{3–10} Recently, X-ray structures of delta-class (bmGSTD), sigma-class (bmGSTS), omega-class (bmGSTO), unclassified (bmGSTu), and unclassified 2 (bmGSTu2) GSTs in *B. mori* have been determined.^{5,6,8,9,11} We have reported bmGSTu2 (Protein Data Bank (PDB) ID: 5ZFG) to catalyze diazinon metabolism, thus explaining its role in the insecticide resistance of *B.*

mori. To improve our understanding of the molecular basis of bmGSTu2 catalysis, we have examined the structure and catalytic function of bmGSTu2. Silkworms provide a suitable model for studying lepidopterans; therefore, comprehensive studies on GSTs in *B. mori* could provide better insight into ways of combatting species that are considered agricultural pests.

Materials and Methods

1. Protein preparation

Recombinant bmGSTu2 was overexpressed and purified according to previously published methods.¹² bmGSTu2 mutants were constructed with a plasmid containing the coding sequences of wild-type bmGSTu2 and amino acid substitutions using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) in accordance with the manufacturer's recommendations. The nucleotide sequence of full-length mutant cDNA was checked by DNA sequencing.

2. Enzymatic activity

GST activity was measured spectrophotometrically using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and 5 mM GSH as standard substrates. Each sample was measured three times (number of occurrences (n): 3), and each independent experiment was repeated three times (number of repetitions (N): 3). Data from assay conditions, under varying substrate concentrations in the presence of 5 mM GSH, underwent nonlinear regression analysis using the least squares method on KaleidaGraph software (HULINKS Inc., Tokyo, Japan), to determine the kinetic parameters, K_m and k_{cat} .

Results and Discussion

1. Amino acid residues of bmGSTu2 interacting with GSH

A phylogenetic tree showed bmGSTu2 to be close to delta- and epsilon-class GST, which are insect-specific GSTs.¹⁶ Previously, we had identified the amino acid residues (Ile54, Glu66, Ser67, and Asn68) for the GSH-binding site using modeled bmGSTu2 and adGSTd1-6 (PDB ID: 1PN9).¹⁶ The structure of apo-bmGSTu2 was also determined by X-ray crystallography.¹⁰ Since the crystal structure of bmGSTu2 is the apo form, amino acid residues interacting with GSH could be identified by superimposition with GST structures including GSH followed by alanine scanning. Comparing the structures of bmGSTu2 (PDB ID: 5ZFG) and adGSTd1-6 (root mean square deviation (RMSD) = 1.4 Å) revealed that the GSH-binding site of bmGSTu2 was unchanged.


2. Hydrogen-bonding network

A hydrogen-bonding network is considered essential for GSH ionization, which, in turn, is required for catalysis.^{17–19} The active sites of insect GSTs and the hydrogen-bonding network have been well characterized in *Anopheles dirus* GST D3-3 (adGSTD3-3).²⁰ Configuration of the glutamyl α -carboxyl group

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp

Published online August 27, 2020

 © Pesticide Science Society of Japan 2020. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

D-3-phosphoglycerate dehydrogenase from the silkworm *Bombyx mori*: Identification, functional characterization, and expression

Kohji Yamamoto  | Shinya Mohri | Shigeki Furuya

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

Correspondence

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

Abstract

D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) is a key enzyme involved in the synthesis of L-serine. Despite the high serine content in silk proteins and the crucial role of PHGDH in serine biosynthesis, PHGDH has not been described in silkworms to date. Here, we identified PHGDH in the silkworm *Bombyx mori* and evaluated its biochemical properties. On the basis of the amino acid sequence and phylogenetic tree, this PHGDH has been categorized as a new type and designated as bmPHGDH. The recombinant bmPHGDH was overexpressed and purified to homogeneity. Kinetic studies revealed that PHGDH uses NADH as a coenzyme to reduce phosphohydroxypyruvate. High expression levels of *bmphgdh* messenger RNA (mRNA) were observed in the middle part of the silk gland and midgut in a standard strain of silkworm. Moreover, a sericin-deficient silkworm strain displayed reduced expression of *bmphgdh* mRNA. These findings indicate that bmPHGDH might play a crucial role in the provision of L-serine in the larva of *B. mori*.

KEYWORDS

Bombyx mori, D-3-phosphoglycerate dehydrogenase, NADH, serine

1 | INTRODUCTION

D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) is a key enzyme involved in one of the two metabolic pathways used for the synthesis of L-serine (El-Hattab, 2016; Wang et al., 2002). In the first pathway, serine is produced from glycine and 5,10-methylenetetrahydrofolate by serine hydroxymethyltransferase. In the second pathway, the de

Differences in Prostaglandin E–Related Factors between Silkworm Strains [Lepidoptera: Bombycidae] Producing Small Eggs (d32) and Giant Eggs (d20)

Kohji Yamamoto* and Misuzu Yamaguchi

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

(Received October 30, 2020; Accepted December 17, 2020)

Key words: prostaglandin E, prostaglandin E synthase, egg formation.

INTRODUCTION

Prostaglandins (PGs) play an important role in a variety of physiological phenomena in mammals, and their isomers such as PGH_2 , PGD_2 , PGE_2 , and PGF_2 are well-studied (Milton and Wendlandt, 1971, Smith and Marnett, 1991). PGE_2 functions in the regulation of inflammation, pain sensation, and fever in mammals (Morimoto *et al.*, 2014). However, there are only a few reports on the function of PGs in insects; for example, PGE_2 plays a role in oogenesis in *Drosophila melanogaster* (Spracklan *et al.*, 2019) and cellular immune reactions in *Manduca sexta* (Kwon *et al.*, 2020). We previously identified and characterized the structure of a prostaglandin synthase from silkworm, *Bombyx mori* (Linnaeus) prostaglandin E synthase (*bmpGES*), which isomerizes PGH_2 to PGE_2 . We identified the glutathione-binding site and electron-sharing network in the *bmpGES* structure (Yamamoto *et al.*, 2013b). *bmpGES* are members of sigma-class glutathione transferases, similar to *PGES* enzymes in mammals (Kanaoka *et al.*, 1997, Tanioka *et al.*, 2000, Yamamoto *et al.*, 2013a).

Inhibition of the cyclooxygenase related to PG signaling affects oogenesis in *B. mori* (Machado *et al.*, 2007). Previously, we employed a genome-editing technique to disrupt the *bmpGES* gene (Yamamoto *et al.*, 2020) and observed that this change influenced the PGE_2 content, expression of chorion mRNAs, and egg formation in silkworms. Consequently, the egg size in the *bmpGES*-knock-out mutant strain was smaller than that in the control strain (Yamamoto *et al.*, 2020).

Silkworms are model animals for studying lepidopteran insects, which include many agricultural pests. Our laboratory has many silkworm mutants, including those exhibiting variations in egg sizes. In this study, we chose two mutants, one producing small eggs (d32 strain) and another producing giant eggs (d20 strain). To understand the roles of *bmpGES* and its product PGE_2 in *B. mori*, we examined the differences in PGE -related factors among these

two strains and a control strain (p50). We expect that understanding the functions of *bmpGES* and PGE_2 will help elucidate how PGE_2 and the PG signaling system influence insect physiology.

MATERIALS AND METHODS

Tissue dissection

The d32 and d20 silkworm strains were bred on a diet of mulberry leaves and maintained at the Kyushu University Graduate School, Japan. On day 5 after pupation, the ovarioles were taken out on ice. The ovary is located at the starting point of the ovariole. The chorionic period was separated into four stages (groups 1–4) from the initial stage to the mature stage, as described previously (Yamamoto *et al.*, 2020). The ovarioles were frozen at -80°C .

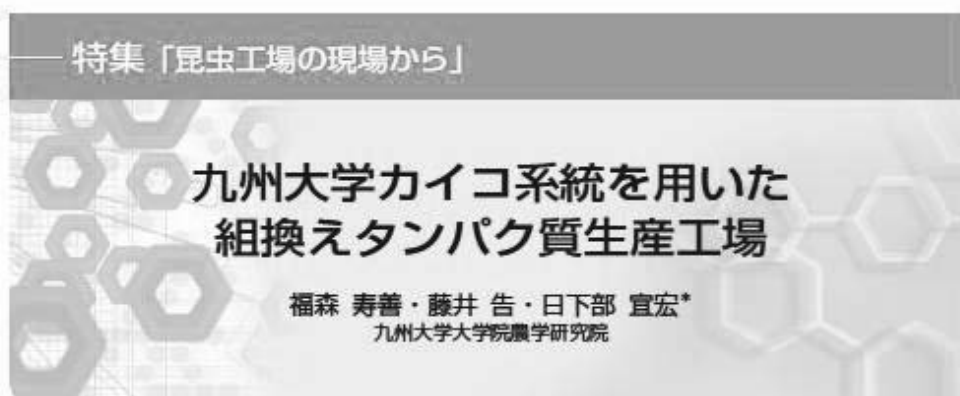
Expression of the early chorion genes

Reverse transcription-PCR was used to detect the expression of early chorion genes. Total RNA extraction from each ovariole group was performed using the RNeasy[®] Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). SuperScript II reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) and oligo-dT primers (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) were used to synthesize first-strand cDNA from total RNA, according to the manufacturer's instructions. PCR was performed as previously described (Yamamoto *et al.*, 2020). The housekeeping gene, *B. mori* ribosomal protein 49 (*bmrp49*), was used as an internal control. The PCR primers specific for *bmrp49* are summarized in Table 1. Unique primers were used for each of the early chorion genes, and differences in expression of the chorion genes were observed among the d20 strain, d32 strain, and p50 control strain.

Analysis of *bmpGES* expression

The expression of *bmpGES* was examined using real-time quantitative PCR (qPCR). The total RNA was reverse-transcribed using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and random hexamers, according to the manufacturer's instructions. The primer

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



1. はじめに

バイオテクノロジーの急速な革新により、近年の世界のバイオ医薬品の市場規模は拡大を続けている。世界のバイオ医薬品の売り上げは、2020年には30兆円に迫ると予想されており、日本も例外ではない。現在、バイオ医薬品の主流は抗体医療であり、この傾向はしばらく続くと考えられる。その需要の大きさから組換え抗体の生産技術については、莫大な費用を投じた多様な研究開発が展開され、哺乳類培養細胞を用いた大量生産系が確立しつつある。日本国内に限っても組換え抗体の取引量は2トン近くあり、その需要の大きさがうかがえる。一方、タンパク質の中には薬理作用が明らかであるにも関わらず、大量生産技術が確立されていないが故に研究開発が進まないタンパク質も多数存在する。生体中では、様々な組織や細胞が、多様なタンパク質の働きにより恒常性を保って機能しており、その変調や老化に伴う機能低下、あるいは、感染症による機能阻害は、生命の維持に破綻をもたらすことがある。特に、調節機能をもつタンパク質の中には、数量でも劇的な生体反応を引き起こすタンパク質が存在する。人類は、生体内には微量しか存在しないこれら有用タンパク質をバイオ医薬品として利用するテクノロジーを獲得したが、全てのタンパク質分子種について万能というわけではない。

*〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744
九州大学大学院農学研究院 資源生物科学部門
農業生物科学講座 昆虫ゲノム科学分野
E-mail: kusakabe@agr.kyushu-u.ac.jp
Tel: 092-802-4570

一方、基礎研究分野におけるタンパク質の機能や構造解析に目を向けると、解析機器の技術革新により、従来法による解析に必要なタンパク質量は少量で十分となっているが、新たな研究手法の出現により、要求量は増える傾向にある。生命の設計図であるゲノムDNAの構造解析技術も急速に進歩し、哺乳類のほぼ全てのタンパク質の一次構造は明らかになっているが、配列情報のみからその機能を推定することが困難なタンパク質が多く、このような場合にも、組換えタンパク質を入手し、その機能解析を行う必要がある。組換えタンパク質の生産には細菌、酵母、哺乳類や昆虫の培養細胞などの多様な宿主系が用いられるが、どれも一長一短がある。また、どのような状態（タンパク質の精製度や構造、生理活性）のタンパク質をどのくらい必要なのかについても、研究目的とそのタンパク質の特性に応じて使用する発現系が変わってくる。組換えタンパク質発現実験の成否についても、基礎研究においては、経費は考慮せずに数マイクログラムの精製タンパク質が得られれば成功という場合もあれば、企業が製品化・販売する場合には必要とされる一部の機能さえ保持していれば良く、一方で、1グラム当たり数千円で生産できなければ失敗ということもある。本稿で取り上げるカイコ-バキュロウイルス発現系には、上記の理由などから他の発現系では発現が困難なタンパク質の大量発現系としての期待がある。

2. カイコ-バキュロウイルス発現系

完全変態昆虫であるカイコは、孵化から終齢幼虫の最大体重に至るまで約4週間を要するが、その間、体重が約1万倍に増加する。また、変温動物であるが故に、飼料効率が良く、生体内のタンパク質含量も高いことから、



Zipcode RNA-Binding Proteins and Membrane Trafficking Proteins Cooperate to Transport Glutelin mRNAs in Rice Endosperm^[OPEN]

Li Tian,^{a,1} Kelly A. Doroshenko,^a Laining Zhang,^a Masako Fukuda,^{a,b} Haruhiko Washida,^{a,2} Toshihiro Kumamaru,^b and Thomas Okita^{a,1}

^aInstitute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, Washington 99164–6340

^bFaculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 819–0395, Japan

ORCID IDs: 0000-0003-1497-7923 (L.T.); 0000-0002-6841-1733 (K.A.D.); 0000-0001-6806-1641 (L.Z.); 0000-0002-3225-4828 (M.F.); 0000-0001-7372-9503 (H.W.); 0000-0003-4870-1247 (T.K.); 0000-0002-2246-0599 (T.O.)

In rice (*Oryza sativa*) endosperm cells, mRNAs encoding glutelin and prolamine are translated on distinct cortical endoplasmic reticulum (ER) subdomains (the cisternal-ER and protein body-ER), a process that facilitates targeting of their proteins to different endomembrane compartments. Although the *cis*- and *trans*-factors responsible for mRNA localization have been defined over the years, how these mRNAs are transported to the cortical ER has yet to be resolved. Here, we show that the two interacting glutelin zipcode RNA binding proteins (RBPs), RBP-P and RBP-L, form a quaternary complex with the membrane fusion factors *N*-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) and the small GTPase Rab5a, enabling mRNA transport on endosomes. Direct interaction of RBP-L with Rab5a, between NSF and RBP-P, and between NSF and Rab5a, were established. Biochemical and microscopic analyses confirmed the co-localization of these RBPs with NSF on Rab5a-positive endosomes that carry glutelin mRNAs. Analysis of a loss-of-function *rab5a* mutant showed that glutelin mRNA and the quaternary complex were mis-targeted to the extracellular paramural body structure formed by aborted endosomal trafficking, further confirming the involvement of endosomal trafficking in glutelin mRNA transport. Overall, these findings demonstrate that mRNA localization in plants co-opts membrane trafficking via the acquisition of new functional binding properties between RBPs and two essential membrane trafficking factors, thus defining an endosomal anchoring mechanism in mRNA localization.

INTRODUCTION

Localization of mRNAs is a universal mechanism to efficiently drive protein targeting in eukaryotes and prokaryotes. The targeting of mRNAs facilitates the accumulation of the locally translated proteins to specific cellular compartments and, hence, is an essential mechanism in establishing cell polarity, patterning, and fate determination as well as protein sorting (Herbert and Costa, 2019; Hughes and Simmonds, 2019; Tian et al., 2019b, 2020).

mRNA localization occurs as a multistep process. After transcription, *cis*-acting elements (RNA zipcodes) are recognized and bound by *trans*-acting factors, mainly RNA binding proteins (RBPs) to form a primary mRNA–nucleoprotein (mRNP) complex. After export to the cytoplasm, the mRNP complex undergoes extensive remodeling with recruitment of new factors and detachment of others enabling cytoskeletal-based transport to the destination site (Blower, 2013; Weis et al., 2013; Tian and Okita, 2014).

Although extensive knowledge on mRNA localization has been acquired by studies in *Drosophila melanogaster*, yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), and mammalian cells, only a few examples have emerged from higher plants. The best-defined model in plants is storage protein mRNA localization in developing rice (*Oryza sativa*) endosperm cells, where mRNAs encoding glutelin and prolamine are recognized by zipcode RBPs and transported to two distinct cortical endoplasmic reticulum (ER) subdomains, the cisternal-ER, and protein body-ER (PB-ER), respectively (Chou et al., 2019; Tian et al., 2019b). Translation of prolamine mRNAs on the PB-ER results in the assembly of prolamine intracisternal granules that form an ER-derived protein body I (PB-I), while glutelin precursors are exported to the Golgi and then transported to protein storage vacuoles (PSVs) for processing and storage (Chou et al., 2019; Tian et al., 2019b). Although several cytoskeleton-associated RBPs required for mRNA localization have been identified (Doroshenko et al., 2009, 2012), information on how these mRNAs are transported to distinct ER subdomains remains elusive.

Emerging evidence from fungal model systems reveals the intimate link of mRNA transport with membrane trafficking (Schmid et al., 2006; Jansen et al., 2014; Haag et al., 2015; Niessing et al., 2018). Several mRNAs from yeast, *Candida albicans*, and *Ustilago maydis* are co-transported with mobile ER or shuttling endosomes (Schmid et al., 2006; Jansen et al., 2014; Haag et al., 2015; Pohlmann et al., 2015; Niessing et al., 2018). *ASH1* as well as other mRNAs are co-transported on tubular ER that moves to the emerging bud or daughter cell in yeast. This process is

¹ Address correspondence to li.tian@wsu.edu or okita@wsu.edu.

² Current address: Organic Nico Co., Ltd, Goryo-Ohara, Nishikyoku-ku, Kyoto 615–8245, Japan.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is Thomas Okita (okita@wsu.edu).

^[OPEN]Articles can be viewed without a subscription.

www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.20.00111

Light-induced chloroplast movements in *Oryza* speciesMiki Kihara¹ · Tomokazu Ushijima^{1,5} · Yoshiyuki Yamagata¹ · Yukinari Tsuruda¹ · Takeshi Higa³ · Tomomi Abiko¹ · Takahiko Kubo¹ · Masamitsu Wada⁴ · Noriyuki Suetsugu² · Eiji Gotoh¹Received: 22 January 2020 / Accepted: 6 April 2020
© The Botanical Society of Japan 2020

Abstract

Light-induced chloroplast movements control efficient light utilization in leaves, and thus, are essential for leaf photosynthesis and biomass production under fluctuating light conditions. Chloroplast movements have been intensively analyzed using wild-type and mutant plants of *Arabidopsis thaliana*. The molecular mechanism and the contribution to biomass production were elucidated. However, the knowledge of chloroplast movements is very scarce in other plant species, especially grass species including crop plants. Because chloroplast movements are efficient strategy to optimize light capture in leaves and thus promote leaf photosynthesis and biomass, analysis of chloroplast movements in crops is required for biomass production. Here, we analyzed chloroplast movements in a wide range of cultivated and wild species of genus *Oryza*. All examined *Oryza* species showed the blue-light-induced chloroplast movements. However, *O. sativa* and its ancestral species *O. rufipogon*, both of which are AA-genome species and usually grown in open condition where plants are exposed to full sunlight, showed the much weaker chloroplast movements than *Oryza* species that are usually grown under shade or semi-shade conditions, including *O. officinalis*, *O. eichingeri*, and *O. granulata*. Further detailed analyses of different *O. officinalis* accessions, including sun, semi-shade, and shade accessions, indicated that the difference in chloroplast movement strength between domesticated rice plants and wild species might result from the difference in habitat, and the shape of mesophyll chlorenchyma cells. The findings of this study provide useful information for optimizing *Oryza* growth conditions, and lay the groundwork for improving growth and yield in staple food crop *Oryza sativa*.

Keywords Chloroplast movement · Light adaptation · Mesophyll chlorenchyma cell · *Oryza*

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10265-020-01189-w>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Noriyuki Suetsugu
n.suetsugu@gmail.com

✉ Eiji Gotoh
eiji.gotoh@agr.kyushu-u.ac.jp

¹ Department of Forest Environmental Sciences,
Faculty of Agriculture, Kyushu University, Motooka,
Fukuoka 819-0395, Japan

² Department of Botany, Graduate School of Science, Kyoto
University, Kyoto 606-8502, Japan

³ Institute for Protein Research, Osaka University, Suita,
Osaka 565-0871, Japan

⁴ Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan
University, Tokyo, Japan

⁵ Present Address: Department of Agricultural Science
and Technology, Faculty of Agriculture, Setsunan University,
Hirakata, Osaka 573-0101, Japan

University, Tokyo, Japan

⁵ Present Address: Department of Agricultural Science
and Technology, Faculty of Agriculture, Setsunan University,
Hirakata, Osaka 573-0101, Japan

Introduction

Chloroplasts use solar light energy for photosynthesis. Although increasing light intensity induces greater photosynthetic performance, excess light causes photodamage. Thus, chloroplast light utilization should be tightly regulated under fluctuating natural light conditions. Light-induced chloroplast movement is one of the most efficient strategies to control chloroplast light utilization (Suetsugu and Wada 2012). Chloroplasts can migrate inside a cell according to the light condition to use light efficiently; they move toward weak light and accumulate on the pellicular cell walls perpendicular to the light direction to maximize light capture (chloroplast accumulation response). In contrast, chloroplasts move against strong light and accumulate on the anticlinal cell walls to minimize exposure to excess light and photodamage (chloroplast avoidance response). In general, blue light is effective in controlling chloroplast movement (Suetsugu and Wada 2007). A photoreceptor kinase

and photodamage (chloroplast avoidance response). In general, blue light is effective in controlling chloroplast movement (Suetsugu and Wada 2007). A photoreceptor kinase



Contents lists available at ScienceDirect

International Dairy Journal

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

Genomic characterisation of *Lactocaseibacillus paracasei* phage Φ T25 and preliminary analysis of its derived endolysin



Sirinthom Sunthomthummas^{a,b}, Katsumi Doi^c, Yasuhiro Fujino^c, Achariya Rangsiruji^a, Siriruk Sarawaneeyaruk^d, Kedvadee Insian^d, Onanong Pringsulaka^{d,*}

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

^b Medical Proteomics Unit, Office for Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Centre for Research in Complex Systems Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

^c Laboratory of Microbial Genetic Technology, Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 819-0395, Japan

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 July 2020

Received in revised form

14 December 2020

Accepted 14 December 2020

Available online 16 January 2021

ABSTRACT

Bacteriophage infection is a serious problem in milk fermentation where it causes a delay in the fermentation process and reduces product quality. This study provides the first molecular characterisation of a lactic acid bacteriophage from spoiled fermented milk tanks in the dairy industry in Thailand. Bacteriophage Φ T25 is virulent, and shows strong lytic activity against *Lactocaseibacillus paracasei* LPC. Genome analysis demonstrated that phage Φ T25 possesses a linear, double-stranded DNA genome of 38,421 bp. To assay endolysin activity of phage Φ T25 (ORF35), Lysin vector pET21a was constructed by cloning the lysinT25 gene into plasmid pET21a. The size of lysinT25 endolysin was predicted to be ~41 kDa. LysinT25 was able to lyse a wide range of lactic acid bacteria and other Gram-positive bacteria, such as *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. In addition, this endolysin has a synergistic inhibitory effect against *Escherichia coli* when combined with chloroform as an outer-membrane permeabiliser.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Members of *Lactocaseibacillus* (formerly known as the *Lactobacillus casei* group) are commonly used as starter cultures in the dairy fermentation process; however, the increasing use of these strains can lead to bacteriophage (phage) infection in dairy processing plant environments (Holzapfel, Haberer, Geisen, Björkroth, & Schillinger, 2001). In the release of phage progeny, all double-stranded (ds) DNA viruses follow a lysin-mediated breakdown of peptidoglycan (PG) with endolysin (Lood et al., 2015; Pohane & Jain, 2015; Young, 2014). Endolysins are PG hydrolases produced by phages, which lyse the host bacterial cell. In the past decade, interest in endolysin has increased as an alternative preservative and antimicrobial to destroy pathogens in food and medical processes (Schmelcher, Donovan, & Loessner, 2012a; Young, Wang, & Roof, 2000).

Endolysins are considered as a new class of antibiotics as they can destroy the PG of Gram-positive bacterial cell walls. Endolysins targeting Gram-positive bacteria are separated into two distinct types of functional domains termed cell wall binding domains (CBDs) and enzymatically active domains (EADs) (Schmelcher et al., 2012a). The N-terminus generally contains the EAD that confers the catalytic activity of the endolysin, while the C-terminal CBD enables the endolysin to selectively and specifically bind to the target bacterial cell wall (Fenton, Ross, McAuliffe, O'Mahony, & Coffey, 2011; Schmelcher, Powell, Becker, Camp, & Donovan, 2012). Based on the specific PG bond attacked by the EAD, endolysins can be classified into at least five different groups: muramidase (lysozyme), transglycosylase, glucosaminidase [digests N-acetylmuramic acids (NAM) and N-acetylglucosamine (NAG)], amidase (digests NAM and peptides), and endopeptidase (digests within the peptide chain of PG) (Borysowski, Weber-Dabrowska, & Górski, 2006). Advances in the bioinformatic analysis of whole genome sequencing data have identified multiple endolysins from the genomes of isolated phages (Fernández-Ruiz, Coutinho, & Rodríguez-Valera, 2018). An endolysin of phage Φ L-1 of *L. casei* (Kashige,

* Corresponding author. Tel.: +66 2 649 5000 ext 18517.
E-mail address: onanong@ig.swu.ac.th (O. Pringsulaka).

RESEARCH

Open Access



Development of a new gene expression vector for *Thermus thermophilus* using a silica-inducible promoter

Yasuhiro Fujino¹, Shuichiro Goda², Yuri Suematsu¹ and Katsumi Doi^{1*}

Abstract

Background: Thermostable enzymes are commonly produced in mesophilic hosts for research and bioengineering purposes. However, these hosts do not overexpress the active forms of some biologically functional thermoenzymes. Therefore, an efficient thermophilic expression system is needed. *Thermus thermophilus* contains an easily manipulable genome and is therefore among the best candidate microbes for a "hot" expression system. We previously identified a strong and inducible promoter that was active in *T. thermophilus* under supersaturated silica conditions. Here, we report a new heterologous gene expression system based on a silica-inducible promoter in *T. thermophilus*.

Results: A *Thermus* sp. A4 gene encoding thermostable β -galactosidase was cloned as a reporter gene into the expression vector pSix1, which contains a selection marker that confers thermostable resistance to hygromycin and a 600 bp DNA region containing a putative silica-inducible promoter. β -galactosidase activity was 11-fold higher in the presence than in the absence of 10 mM silicic acid. SDS-PAGE revealed a prominent band corresponding to 73 kDa of β -galactosidase, and this enzyme was expressed as an active and soluble protein (yield: 27 mg/L) in *Thermus* but as an inclusion body in *Escherichia coli*. Truncation of the putative silica-inducible promoter region in *Thermus* expression vector improved the yield of the target protein, possibly by avoiding plasmid instability due to homologous recombination. Finally, we developed an expression vector containing the pSix1 backbone and a 100 bp DNA region corresponding to the silica-inducible promoter. We used this vector to successfully express the active form of glutamate dehydrogenase from *Pyrobaculum islandicum* (PisGDH) without additional treatment (yield: 9.5 mg/L), whereas the expression of active PisGDH in *E. coli* required heat treatment.

Conclusion: We successfully expressed the thermostable β -galactosidase and PisGDH in *T. thermophilus* as active and soluble forms and achieved with our system the highest known protein expression levels in this species. These thermoenzymes were expressed in active and soluble forms. Our results validate the use of our silica-inducible expression system as a novel strategy for the intracellular overexpression of thermostable proteins.

Keywords: Silica, Gene expression, Inducible, *Thermus thermophilus*

Background

Enzymes from thermophiles are highly stable and have attracted significant interest in both basic research and bioengineering applications [1–3]. Currently, thermostable enzymes used in these contexts are produced commonly in mesophilic hosts [4], especially *Escherichia coli*. These surrogate hosts can successfully express soluble forms of the target proteins. Although

*Correspondence: doi@agr.kyushu-u.ac.jp

¹Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.



Draft Genome Sequence of *Enterobacter kobei* M4-VN, Isolated from Potatoes with Soft Rot Disease

Nguyen Cong Thanh,^{a,b} Yasuhiro Fujino,^a Yasuaki Hiromasa,^c Katsumi Doi^a

^aMicrobial Genetic Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, Japan

^bPlant Protection Research Institute, Hanoi, Vietnam

^cAttached Promotive Center for International Education and Research of Agriculture, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, Japan

ABSTRACT *Enterobacter kobei* M4-VN, isolated from potatoes with soft rot disease in Vietnam, contains a total of 4,754,309 bp with 4,424 predicted coding sequences and a G+C content of 55.1%.

Enterobacter species are Gram-negative facultatively anaerobic bacteria belonging to the family *Enterobacteriaceae* (1, 2). Mostly, the species have been reported to be nosocomial pathogens showing resistance to disinfectants and antimicrobial chemicals (3). However, some of them have been reported as phytopathogens, such as *Enterobacter asburiae* isolated from konjac (*Amorphophallus konjac*) in China and *Enterobacter cloacae* isolated from chili pepper (*Capsicum annuum* L.) and dragon fruit (*Hylocereus* spp.) (4–7). Identification of the order *Enterobacteriales* has been difficult with the 16S rRNA gene approach and other single-gene and limited multigene approaches (2). Therefore, sequencing the whole genome might be useful for species differentiation and prediction of pathogenicity (8).

The strain used in this study (M4-VN) was isolated from potatoes with soft rot disease in Hanoi, Vietnam. The potatoes were washed with sterile water and 70% alcohol to remove surface contaminants, rinsed with sterile distilled water, and cut into specimens. The specimens that had the disease were selected and streaked onto lysogeny broth (LB) plates and inoculated at 37°C for 24 to 48 h. The bacterial colonies were purified with serial streaking.

A single colony was then cultivated anaerobically overnight at 37°C in LB. Genomic DNA was then extracted and purified as described by Marmur (9), with some modifications. A sequencing library was prepared for the HiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA) with the VAHTS universal DNA library prep kit, following the manufacturer's instructions. The resulting library was sequenced on an Illumina HiSeq platform using a 2 × 150-bp paired-end configuration, generating a total of 14,421,674 raw reads (Genewiz, China). Low-quality read filtering was performed using Cutadapt ver. 1.9.1 (10). *De novo* assembly was performed with KmerGenie (ver. 1.6982), Velvet (ver. 1.2.10), SSPACE (ver. 3.0), and GapFiller (ver. 1–10) (11–15). Annotation was performed using the DFAST pipeline (16, 17). Determination of closely related strains was performed using the TYGS platform (18).

The assembled genome of *Enterobacter* sp. strain M4-VN contained 18 contigs with a total of 4,754,309 bp (G+C content, 55.1%), an N_{50} value of 636,975 bp, an average sequencing depth of 449.97, and minimum and maximum contig lengths of 1,812 and 949,261 bp, respectively. Annotation revealed 4,424 predicted coding regions, 65 tRNA genes, 7 rRNA genes, and 1 CRISPR gene. From the annotation, we identified a gene encoding pectinesterase (19, 20), the TonB protein, 4 genes encoding the TonB-dependent receptor, a gene encoding the M16 proteases (*fusC*) (21), and genes related to susceptibility to antibacterial plant chemicals (*tolC*) (22). The results of digital

Citation Thanh NC, Fujino Y, Hiromasa Y, Doi K. 2020. Draft genome sequence of *Enterobacter kobei* M4-VN, isolated from potatoes with soft rot disease. *Microbiol Resour Announc* 9:e00908-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.00908-20>.

Editor Irene L. G. Newton, Indiana University, Bloomington

Copyright © 2020 Thanh et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Katsumi Doi, doi@agr.kyushu-u.ac.jp.

Received 31 July 2020

Accepted 13 August 2020

Published 3 September 2020

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（博士課程）

Md. Rezwanul Haque 池永 照美	Study on serine synthesis pathway in silkworm 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）

Hran Hong Quan	The construction of the genetic linkage map of Endosperm Storage Protein (ESP)3 gene regulating the cysteine rich prolamines
Thein Lin	Identification of genes related to starch synthesis in rice endosperm

大学院生物資源環境科学府（博士課程）

Rahma Siti Nur Azizah Fauziyati	Genetic and evolutionary study of <i>INCENTIVE FOR KILLING POLLEN (INK)</i> gene responsible for hybrid male sterility in rice
------------------------------------	--

【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）

水島 淑華	<i>Geobacillus kaustophilus</i> を宿主とする好熱性ファージの特性解析
権藤 万弥	乳酸菌プロファージの誘導メカニズム解析
長岡 未久	好熱性ファージ ϕ OH3 由来 integrase の機能解析

大学院生物資源環境科学府（修士課程）

Xayapatha Souliya	Identification of plant pathogenic microorganisms in Laos.
飯田 拳史	<i>Thermus</i> 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 (ssDNA binding protein) の特性解析
木室 綾香	乳発酵現場で単離されたファージのゲノム特性解析
Yang pui yung	乳酸菌における D-アミノ酸生成機構の解明
森田 大幹	発酵茶葉中の D-アミノ酸動態及び菌叢解析
松中 南	シイタケ軟腐病菌を宿主とするバクテリオファージの特性解析
堀江 裕介	ファージ由来 holin タンパク質を利用したがん治療法の基礎研究

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」

基盤研究(B) 研究代表 伴野 豊

「染色体のパッケージングによるカイコとクワコの形質差に関与する遺伝子のトラッキング」

JASRI 研究助成金

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システムの整備）」

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】

基盤研究(B) 研究代表 土居克実

好熱性繊維状ファージの生活環と宿主応答から辿る極限環境での遺伝子水平伝播と進化

共同研究 株式会社ダスキン 研究代表 土居克実

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 株不活性化資材の探索

共同研究 株式会社レオロジー機能食品研究所 研究代表 土居克実

プラズマローゲン生産性細菌の探索と遺伝子解析

3. 講演会・セミナー・講習会

【家蚕遺伝子開発分野】

無し

【植物遺伝子開発分野】

無し

【微生物遺伝子開発分野】

無し

4. 海外渡航

【家蚕遺伝子開発分野】

無し

【植物遺伝子開発分野】

無し

【微生物遺伝子開発分野】

無し

5. 訪問研究員等

【家蚕遺伝子開発分野】

無し

【植物遺伝子開発分野】

無し

【微生物遺伝子開発分野】

無し

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。本センターの保存系統はアルファベットで大きく目的形質で分類、2けたの数字を用いて更に細かく分類している。分類記号の内容及びおよび、記号別保有数は以下の通りである。これらの系統は本学の開学以来、100年にわたって世界から収集されたもので約500系統にのぼる。これらをコア系統と呼んでいる。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）系統約150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約80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）	29	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）	37	e（卵色）	28
f（幼虫肢・斑紋）	40	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）	31	m（モザイク・畸形）	23
n（幼虫体形）	31	o（油蚕）	46
r（染色体異常・交叉率）	16	t（発育・眠性）	27

u (蛹・成虫)	2 1	w (連関分析用合成系)	2
x (分析未了の新突然変異)	1 4	S (スペイン由来他)	8

(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、最近は大型、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。

		2016	2017	2018	2019	2020
生物体 での分譲	国内	680件	763件	862件	806件	449件
	国外	115件	163件	188件	202件	97件
DNA での分譲	国内	64件	30件	0件	0件	40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。

- ・イチジクカサンに関する業務は令和元年度までは学習院大学で行っていたが、今年度から代表機関へ集約し、学習院大学はバックアップ機関として保存業務を行った。

- ・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）が保有するサクサン、シンジュサンへの応用を検討し、可能であることを確認した。実用化についてはさらに検討が必要である。

- ・ニュースレター“おかいこさま”を 3 回発行し、研究コミュニティに配布した。

- ・遺伝学研究所川本祥子准教授と連携して、データベースの更新・拡充を行った。

- ・運営委員会（2021 年 2 月 15 日）をオンライン開催するとともに日本蚕糸学会とは理事会、代議員会において事業内容を報告するなど連携を密に行い、ユーザー意見を収集し、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 10 系統、ENU 系統を 3 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（29 系統）の高品質化を行った。

- ・保有系統のうち約 500 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 53 系統の凍結保存を行った。

- ・致死遺伝子 2 系統(a47, a85)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、桑園管理（伊都地区、指宿地区）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、卵から成虫の各発育段階での提供事業を行った。飼育数を新型コロナウイルス対応のため限定したため、提供数は目標数の半数程度の546件であった。

③生物遺伝資源整備体制の強化

・新型コロナウイルス感染拡大の影響下でも着実に事業を行うため、飼育室消毒、分譲用リソース管理、桑園管理、母蛾検査の省力に資する設備を設置し、事業に活用した。

④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なっている。桑園管理は、施肥、除草、病虫害、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る。本年は新型コロナウイルスの対応で少人数でも桑園管理を可能とする為に乗用草刈機と深耕ロータリーを伊都地区に、耕運機を指宿に配置した。伊都では1台の乗用草刈機で省力化をはかってきたが、追加配備で除草作業がより容易になった。また、深耕ロータリーによる耕運で、草の生育が抑制された。指宿は耕運機による圃場耕運で草の管理の省力化が可能となった。いずれの機械も文部科学省 NBRP による補正予算で措置された。迅速な援助をいただきコロナ禍の事業推進に役立ったことにお礼申し上げる。

◎2020年度(2020.4~2021.3、R1/R2)の桑園管理業務の概要

4月

3工区1、2圃場(H26=2014年3月、H27=2015年3月植付)、4工区1、2、3圃場(H28=2016年3月植付)、4、5、6圃場(H29=2017年3月植付)、カイコバイオリソース研究施設建物前圃場(H30=2018年3月植付)、以上総面積約2.6haの管理を行う。ハリグワ苗植付(田主丸農家より譲渡)。全桑園株間を中心に除草。

5月

伊都地区桑園の利用による春蚕飼育(第1期)。例年この時期の幼虫飼育期間中は約6トンの桑を必要とする。このため、シルバー人材センターあるいは学生アルバイトに桑摘作業を依頼していたが、本年は新型コロナ感染症の影響により中止。職員のみで桑摘作業を行うこととなり、使用する桑量を抑えるため飼育においては継代に必要な最低限の飼育区数、飼育頭数で行う。15系統は長野県上田市の上田蚕種株式会社へ飼育委託した。1期の収穫圃場は3-1、3-2、4-1であった。1期桑葉収穫圃場の条切、条粉碎を行った。

6月

1期桑葉収穫圃場丸桑3号肥料散布、トラクタ耕運（圃場ナンバー：3-1、3-2、4-1）。

8月

5期飼育用桑葉確保のため4-2中間伐採、条粉碎。丸桑3号（日本肥料）肥料散布、トラクタ耕運。

9月

カイコバイオリソース研究施設前のパイプハウスおよび4-5圃場のパイプハウス内のシマグワの中間伐採。丸桑3号（日本肥料）肥料散布。

10月

全桑園除草。

11月

カイコバイオリソース研究施設前のパイプハウスおよび4-5圃場のパイプハウスにビニール覆いをかける。

12月

矮小枝の剪定&粉碎

2021年

1月

2期飼育用桑葉確保のため、4工区17、20、21、22圃場の春刈、条粉碎。指宿試験地よりNBRP依頼の桑葉発送。

2月

全桑園堆肥散布&耕運。伊都桑園シマグワ挿木。指宿試験地においてもシマグワ挿木。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3号肥料（日本肥料）散布&耕運。



施設前パイプハウス



5期用中間伐採桑園



ハリゲワ



シマグワ挿木苗

©covid19 拡大影響への対応として行われた在宅養蚕



新型コロナウイルス拡大の影響を受け、教員宅で行われた在宅養蚕（写真）。大学の飼育室での3密を回避する措置として、40系統について3齢から5齢期の在宅養蚕を行った。納屋を保有するテクニカルスタッフ宅でも60系統余の在宅養蚕を行った。100年余りの系統保存でも初めての事例と思われる。飼育業務には大きな

影響が出たが、1系統も失うことなく維持できたことはスタッフの努力によるものとして特記できよう。

【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

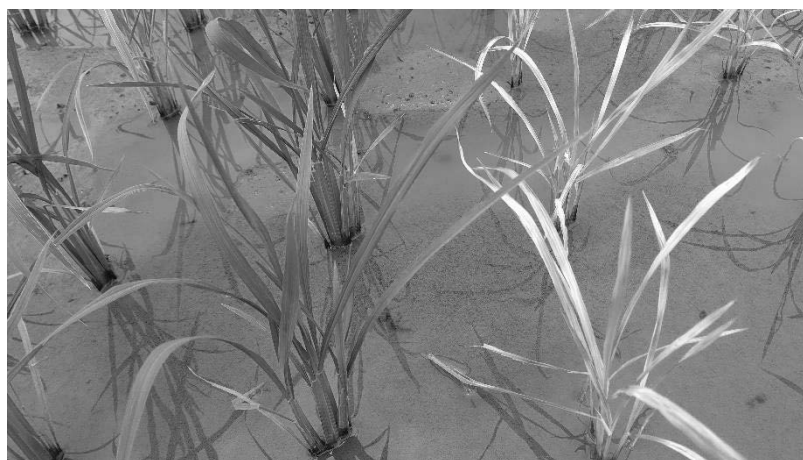
EM 系統 胚乳形質に関する突然変異系統 1,764 系統

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/>



indica 型栽培品種に由来する新規変異体



コンクリート水田で栽培中の開発系統

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
2020	863			15-2018	0-0

【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内規

(趣旨)

第1条 この内規は、九州大学大学院農学研究院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2条 センターは、遺伝子資源の保存、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3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4条 センターに長（以下「センター長」という。）を置き、農学研究院の専任の教授をもって充てる。センター長は、センターの管理及び運営を総括する。

- 2 センター長は、次の各号に掲げる事項に該当する場合に選考する。
 - 一 センター長の任期が満了するとき。
 - 二 センター長が辞任を申し出て、研究院教授会の承認を得たとき。
 - 三 センター長が欠員となったとき。
- 3 センターの長の任期は、4月1日から翌々年の3月31日までの2年とし、再任を妨げない。ただし、引き続き二期を超えて在任することはできない。
- 4 第2項第二号及び第三号の場合における後任者の任期は、前項本文の規定にかかわらず、前任者の残任期間とする。ただし、この残任期間が1年以上の場合は、これを一期とみなす。
- 5 センター長の選考は、研究院教授会において行い、有効投票の過半数の獲得によりセンター長候補者を決定する。

(運営委員会)

第5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6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 センターに勤務を命じられた農学研究院の専任の教員のうちから選ばれたもの3人
 - 二 各部門（農学部附属農場、農学部附属演習林、生物的防除研究施設及びセンターに勤務を命じられた農学研究院の専任の教員を除く。）の専任の教授及び准教授のうちから選ばれた者各1人
 - 三 農学部附属農場、農学部附属演習林及び生物的防除研究施設に勤務を命じられた農学研究院の専任の教授及び准教授のうちから選ばれた者各1人
- 2 委員の任期は2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、研究院長が委嘱する。

第7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8条 運営委員会は、委員の過半数が出席しなければ、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9条 この内規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、センター長が定める。

附則

- 1 この規程は、平成12年4月1日から施行する。
- 2 この規定施行後、最初に任命されるセンター長は、この規定に基づき選考された者とみなし、その任期は第4条第3項の規定にかかわらず、平成13年3月31日までとする。

- 3 農学部附属遺伝子資源開発研究センター規定(平成9年2月12日施行)は廃止する。

附 則

この内規は、平成12年11月8日から施行する。

附 則

この内規は、平成19年4月1日から施行する。

附 則

この内規は、平成22年4月1日から施行する。

附 則

この内規は、平成25年4月1日から施行する。

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

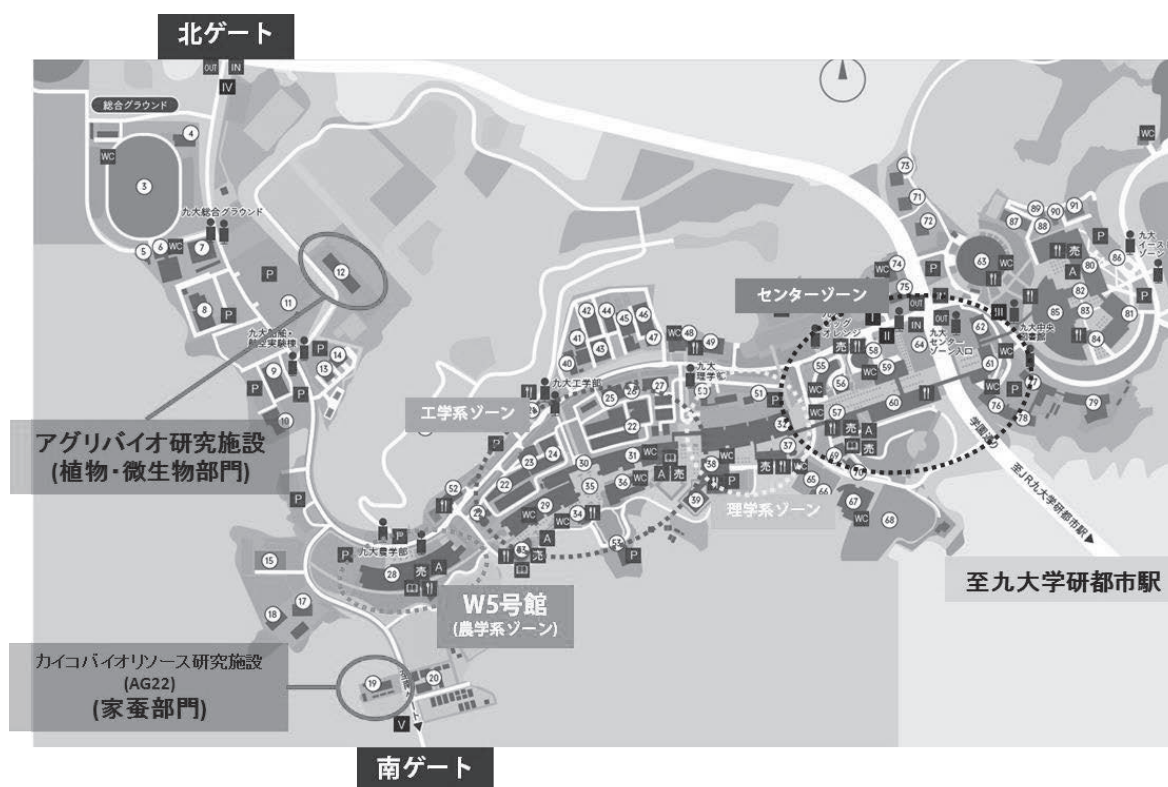
- a) Resolution of the mechanism controlling the transport and the accumulation of the seed storage proteins in rice.
- b) Identification and functional analysis of genes involved in reproductive development and evolution of rice.
- c) Construction of the rice mutation pool.
- d) Conservation and evaluation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