

九州大学農学部
遺伝子資源開発研究センター

年報 第 3 号

平成 11 年

九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター

目次

| | | |
|------|----------------|----|
| I. | センター概要 | 1 |
| 1. | 目的 | |
| 2. | 沿革 | |
| 3. | 組織 | |
| 4. | 研究および事業内容 | |
| 5. | 運営委員会委員 | |
| 6. | 組織図 | |
| II. | 研究成果 | 4 |
| 1. | 研究業績・出版物リスト | |
| 2. | 原著論文要旨 | |
| 3. | 総説等要旨 | |
| 4. | 講演要旨 | |
| III. | センターの活動状況 | 64 |
| 1. | 教育活動 | |
| 2. | 科学研究費・共同、受託研究等 | |
| 3. | 講演会・セミナー・講習会 | |
| 4. | 海外渡航 | |
| IV. | 遺伝子資源系統の保存・管理 | 72 |
| V. | センター規程 | 79 |
| VI. | 英文摘要 | 81 |
| VII. | センター研究棟配置図 | 83 |
| | 編集後記 | |

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。 |
| 平成3年4月 | 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9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。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。 |

3. 組織・教職員

センター長 緒方 靖哉

家蚕遺伝子開発分野

| | | | |
|-----|-------|--------|-------|
| 教授 | 藤井 博 | 技官 | 田村 圭 |
| 助教授 | 伴野 豊 | 非常勤研究員 | 夏 慶 友 |
| 技官 | 西川 和弘 | 非常勤研究員 | 大城戸利久 |
| 技官 | 西坂 章文 | 技能補佐員 | 江口 誠一 |

植物遺伝子開発分野

教授 佐藤 光

研究支援推進員 魏 晓麗

助教授 熊丸 敏博

非常勤補佐員 原田 良子

非常勤補佐員 北野久美子

微生物遺伝子開発分野

教授 緒方 靖哉

講師 土居 克実

助教授 原 敏夫

研究支援推進員 西田 壽子

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保存、開発と評価並びに遺伝子機能の発現機構の解明とトランスジェニックカイコの作製に関する研究

植物遺伝子開発分野

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

微生物遺伝子開発分野

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. 運営委員会委員

委員長 緒方 靖哉 教授 古川 謙介 (農芸化学科)

教授 藤井 博 (センター) 教授 大村 寛 (林学科)

助教授 原 敏夫 (センター) 教授 石崎 文彬 (食糧化学工学科)

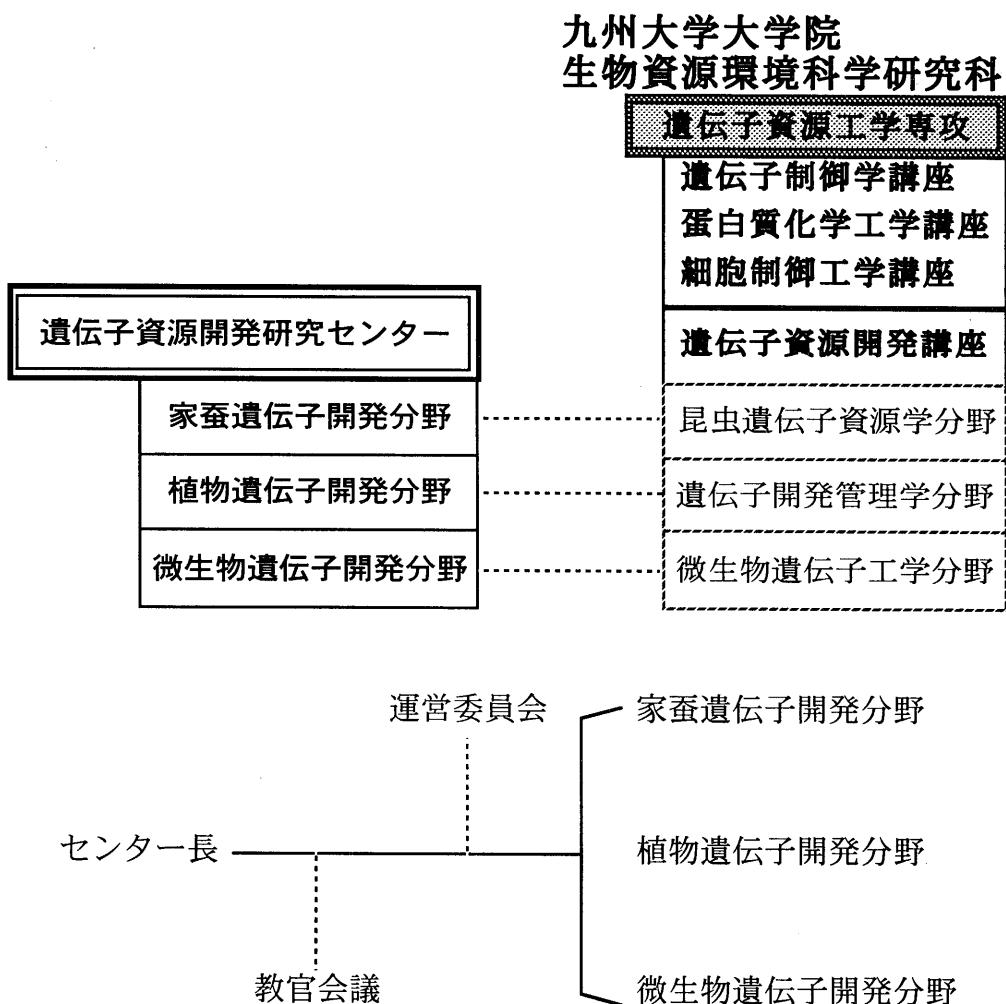
助教授 熊丸 敏博 (センター) 教授 久原 哲 (遺伝子資源工学専攻)

教授 古賀 克巳 助教授 若菜 章 (農場)

教授 佐藤 光 教授 小川 滋 (演習林)

教授 吉村 淳 (農学科)

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

- Tamura T., Kanda T., Komoto N., Yukihiko K., Hasegawa T. and Fujii H.: Rescure of *oq og abd og'* mutant by injection of xantine oxidase. *J. Seric. Sci. Jpn.*, **68**(2), 111-118. (1999)
- Nakamura T., Banno Y., Nakada T., Nho S. K., Xu M. K., Ueda K. Kawarabata, T. Kawaguchi Y., and Koga K: Geographic dimorphism of the wild silkworm, *Bombyx mandarina*, in the chromosome number and the occurrence of the retroposon-like insertion in the arylphorin gene Genome, **42**,1117-1120 (1999)
- 中村 隆・伴野 豊・河口 豊・古賀克己：効率的なクワコの採集法、日蚕雑、**68**(2), 165-166, (1999)
- 姜永煌・白井孝治・大城戸利久・伴野 豊・藤井 博：カイコ消火液 3.5Kプロテアーゼの精製、日蚕雑、**69**(1), 47-53, (2000)

B その他

- 藤井 博：「熱帯・亜熱帯の生物資源の多様性とその維持保存 一カイコの遺伝子資源一」 日本学術会議醸酵学・農産物利用学研究委員会シンポジウム
- 西坂章文・田村 圭・西川和弘・石原大輔・伴野 豊・藤井 博：第7連関群に所属するカイコの新小形卵突然変異体の遺伝学的研究、九州蚕糸、**30**、25 (1999)
- 夏 慶友・藤井 博・伴野 豊・日下部宜宏：カイコアネキシンIXの発現特性、九州蚕糸、**30**、24 (1999)
- 今田正人・伴野 豊・中村 隆・日下部宜宏・河口 豊・古賀克己・藤井 博・廬時甲・徐孟奎： $n=27$ の染色体構成を持つクワコ (*Bombyx mandarina*) のアリルフォリン遺伝子の地理的比較、九州蚕糸、**30**、26 (1999)

- ・中村 隆・伴野 豊・河原畠 勇・日下部宜宏・河口 豊・古賀克己・藤井 博・盧時甲：
クワコの染色体2型の境界について、九州蚕糸、30、27 (1999)

- ・伴野 豊・田村 圭・西川和弘・石原大輔・西坂章文・中村 隆・藤井 博：クワコ
(*Bombyx mandarina*)とカイコのF1に見出した蛹期間の延長、九州蚕糸、30、28 (1999)

植物遺伝子開発分野

A 原著論文

- ・A. Takahashi, T. Kawasaki, K. Henmi, K. Shii, O. Kodama, H. Satoh and K. Shimamoto. Lesion mimic mutants of rice with alteration in early signaling events of defense. *Plant J.*, **17**, 535-545, (1999)
- ・T. Umemoto, Y. Nakamura, H. Satoh and K. Terashima. Difference in amylopectin structure between two rice varieties in relation to the effects of temperature during grain-filling. *Starch*, **51**, 58-62, (1999)
- ・A. Kubo, N. Fujita, K. Harada, T. Matsuda, H. Satoh, and Y. Nakamura. The starch-debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiol.*, **121**, 399-409, (1999)
- ・H. Satoh, W.X. Li, Y. Takemoto, T. Ito, T. Kumamaru, L.Q. Qu and M. Ogawa. *glup4* controlling a 57H character was located on chromosome 12 in rice. *Rice Genet. Newslett.*, **16**, 98-100, (1999)
- ・K. Kusumi, H. Komori, H. Satoh and K. Iba Characterization of a zebra mutant of rice with increased susceptibility to light stress. *Plant Cell Physiol.*, **41**, 158-164, (2000)

微生物遺伝子開発分野

A 原著論文

- ・S. Ogata, T. Nishiyama, K. Doi, S. Yoshino, F. Kato and H.- W. Ackermann: A Giant phage taillike particle of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC13564, *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **44**, 127-135 (1999).
- ・土居克実, 江口智子, 崔聖賢, 大桃定洋, 緒方靖哉：サイレージ乳酸菌の機能開発 -高温環境に適応したバクテリオシン生産株の分離と利用-, 生物工学会誌, 77 (11), 472-474 (1999)

- F. Inagaki, R. Kawatsu, Y. Motomura, K. Doi, E. Izawa and S. Ogata: Effect of thermophilic bacteria on the siliceous deposition and phylogenetic analysis of bacterial diversity in silica scale, *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **44**(3・4), 309-316 (2000).
- Tahara-Hanaoka, S., Y. Ushijima, H. Tarui, M. Wada, T. Hara, S. Imanishi, T. Yamaguchi, T. Hattori, H. Nakauchi and A. Koito: Differential Level in Co-Down-Modulation of CD4 and C XCR4 Primed by HIV-1 gp120 in Response to Phorbol Ester, PMA, among HIV-1 Isolates, *Microbiol. Immunol.*, **44**, 489-498 (2000).

B 著書・総説

- 原敏夫: 放射線照射による納豆樹脂の合成とその利用, 放射線と産業, **81**, 37-41 (1999)
- 原敏夫: エポキシ樹脂による納豆の糸から吸水性樹脂の合成, 化学と工業, **52**, 624-627 (1999)
- 原敏夫, 納豆で砂漠を救う男, テクノマエストロ (実業之日本社刊) , 178-179 (1999)
- 原敏夫: 人にやさしい技術-納豆、博多、水のつながりから生まれた新樹脂素材-, Wedge, **11**, 66-67 (1999)
- 原敏夫: 放射線を利用した納豆の糸から吸水性樹脂の合成, 日本テンペ研究会誌, **4**, 25 (1999).
- 原敏夫: 砂漠の緑化, 高分子, **49**, 367-370 (2000)
- 土居克実, 緒方靖哉: 遺伝子資源として、乳酸菌とその寄生因子の特殊性と有用性を展望する. 乳酸菌学会誌, **10** (2), 72-88 (2000)

C プロシードィングス・その他

- 原敏夫, 納豆の糸から納豆樹脂の開発とその利用, 平成11年度中小企業产学研官技術交流会「新規事業発見・創造」, 14 (1999).

- ・原敏夫, ポリグルタミン酸架橋体高分子の保水性ゲル, 第26回食品の物性に関するシンポジウム, 17-19 (1999).
- ・原敏夫, 納豆の糸から生分解性吸水性樹脂の開発, 第31回繊維材料研究会要旨集, 8-11 (1999).
- ・原敏夫: テクノマエストロたちの肖像, テクノビーイング, **24**, 113 (1999).
- ・原敏夫: 納豆で地球を救え!, 学研「5年の科学」, **99**, 27-29 (1999)
- ・原敏夫: 納豆の効用, 開花, **4**, 94-95 (2000).
- ・原敏夫: 納豆の機能, わかさ, **11**, 80-81, 84-85, 86-87 (2000).
- ・原敏夫: プラスチック廃棄物の低減、砂漠の緑化に貢献する「納豆プラスチック」の幅広い付加価値, 月刊出光, **567**, 16-18 (2000).
- ・原敏夫: 納豆の「ネバネバ」から驚異の新素材, フォーネット, **14**, 8-9 (2000)
- ・土居克実: 「放線菌のDNA転移に関与する遺伝子発現制御機構の時間的・空間的解析」, 平成10、11年度科学的研究費補助金研究報告書, p.1-40 (2000)

2. 原著論文要旨

家蚕遺伝子開発分野

日蚕雑 68 (2), 111-117 (1999)
J. Seric. Sci. Jpn.

Rescue of *oq*, *og* and *og^t* mutants by injection of xanthine oxidase

TOSHIKI TAMURA^{1)*}, TOSHIO KANDA¹⁾, NATUO KÔMOTO¹⁾,
KENJI YUKUHIRO¹⁾, TSUYOSHI HASEGAWA¹⁾ and HIROSHI FUJII²⁾

1) National Institute of Sericultural and Entomological Science

2) Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyusyu University

(Received Oct 1, 1998)

To find a rescue method for the *oq* mutant and to use the mutant as a host for a transgenesis in the silkworm, transplantation of fat body, testis and ovary, and injection of xanthine oxidase were performed. The mutant ovary and testis transplanted to the normal larvae became fertile. A transplantation of the normal fat body to the mutant also recovered the fertility. Since these results agree with the hypothesis that the sterility of the mutant is due to the deficiency in xanthine dehydrogenase which is produced mainly in the fat body, we examined the effect of injection of xanthine oxidase, the enzyme with the same function of xanthine dehydrogenase, in the mutant larvae. The injection changed the mutant skin color to the normal, increased the amount of uric acid and rescued the sterile mutant. In addition, the injection showed similar effect in two other oily mutants, *og* and *og^t*, which are deficient in this enzyme activity. From the results we concluded that the sterility of these mutants is caused by the deficiency of xanthine dehydrogenase activity and can be rescued by the injection of xanthine oxidase.

Key words: Silkworm, *Bombyx*, xanthine dehydrogenase, *oq*, nitrogen pathway, transgenic

It is important to construct a transgenic silkworm for a development of new breeding methods. To construct such silkworm, a mutant strain whose character is controlled by a visible marker gene and cloning of the corresponding wild type gene are crucially important as well as the vector for the insertion of foreign genes into the chromosomes. Among many mutants reported in the silkworm (CHIKUSHI, 1972; DOIRA, 1978; SORITA, 1991), an easily distinguishable character, for examples, the color of the egg or the larval skin, is good candidate for this purpose. However, no gene which control these mutant charac-

ters was cloned yet. Recently, we succeeded to clone the silkworm xanthine dehydrogenase (E.C: 1.1.1.204) genes and identified that one of the genes, which is designated *BmXDH1*, is closely related to *oq* mutant (YASUKOCHI *et al.*, 1998; KÔMOTO *et al.*, 1999). This suggests that *BmXDH1* can be used as a visible marker and the *oq* mutant as a recipient for making a transgenic silkworm. This possibility was also given by evidence that the homologous gene and mutant are used as a tool for the construction of a transgenic fruit fly (RUBIN and SPRADLING, 1983). However, the *oq* mutant can not be used as a recipient because the mutant is sterile.

To circumvent this problem and to understand the mechanism of the sterility in the *oq* mutant, we performed experiments by transplan-

1) Owashi 1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan

2) Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

* Corresponding author



General Search Results—Full Record

Article 1 of 1

SEARCH RESULTS

Geographic dimorphism of the wild silkworm, *Bombyx mandarina*, in the chromosome number and
the occurrence of a retroposon-like insertion in the arylphorin gene
Nakamura T, Banno Y, Nakada T, Nho SK, Xu MK, Ueda K, Kawarabata T, Kawaguchi Y, Koga K
GENOME
42: (6) 1117-1120 DEC 1999

Document type: Article Language: English Cited References: 17 Times Cited: 0

Abstract:

Individuals of the wild silkworm, *Bombyx mandarina*, collected in South Korea (Taegu City) and Japan (Tsushima Islands and Fukuoka City) had the chromosome number of $2n = 54$, while those collected in China (Hangzhou City) had the chromosome number of $2n = 56$. Analysis by PCR (polymerase chain reaction) showed that the 66-bp-long retroposon-like insertion known in the arylphorin gene was present in the *B. mandarina* specimens with $2n = 54$, but not in those with $2n = 56$. Thus, dimorphism in the chromosome number coincided with the occurrence of the insertion. It is likely that the boundary dividing the two geographic *B. mandarina* populations lies somewhere in the northern part of the Korean Peninsula.

Author Keywords:

Bombyx mandarina, chromosome dimorphism, arylphorin gene, geographical popula

KeyWords Plus:

MORI, SEQUENCE

Addresses:

Banno Y, Kyushu Univ, Fac Agr, Higashi Ku, Fukuoka 8128581, Japa
Kyushu Univ, Fac Agr, Higashi Ku, Fukuoka 8128581, Japan.
Hokkaido Univ, Fac Agr, Kita Ku, Sapporo, Hokkaido 0608589, Japa
Kyungpook Univ, Coll Agr, Taegu 702701, South Korea.
Zhejiang Agr Univ, Dept Sericulture, Hangzhou 310029, Zhejiang, Peoples R China.
Kitakyushu Museum Nat Hist, Yahata Higashi Ku, Kitakyushu, Fukuoka 8050061, Jap

Publisher:

NATL RESEARCH COUNCIL CANADA, OTTA

IDS Number:

266JU

ISSN:

0831-2796

効率的なクワコの採卵方法

中村 隆・伴野 豊・河口 豊・古賀 克己

九州大学農学部
(1999年2月1日 受理)

TAKASHI NAKAMURA, YUTAKA BANNO, YUTAKA KAWAGUCHI and KATSUMI KOGA:
Improvement of mating method for the wild silkworm, *Bombyx mandarina*

Key words: *Bombyx mandarina*, wild silkworm, mating, egg rasing

クワコ (*Bombyx mandarina*) はカイコに最も類縁性が高いとされている昆虫であるが、一般にクワコの飼育はカイコに比べると困難であったために、その飼育法には改良や検討が加えられてきた(石原, 1943; 谷口・蜷木, 1983)。近年では、人工飼料を用いた全齢飼育が可能となり(蜷木・竹田, 1982; 竹田・蜷木, 1983), 飼育そのものは比較的容易になつたきた。それにともなって、クワコは実験用昆虫としての活用も可能であるが、効率的な交尾・採卵は依然として難しく、クワコに関する研究を行う上で支障をきたしている。そこで、受精卵を高率に得ることのできるクワコの一採卵方法を考案した。

材料と方法

用いたクワコは野外で採集した幼虫個体であり、蛹化後は25°Cの室内で保護し、羽化させたものである。交尾産卵のため30×40×14 cm(高さ)と30×40×7 cm(高さ)のプラスチック製笊籠を重ねた空間内(空間容積25,200 cm³)に雌雄成虫1対を入れ、24時間隔で産卵状況を調査した。120×235 mmの封筒(定型長3)内で交尾産卵させたものを対照とした。家蚕においては羽化後冷蔵などを行ふと未交尾のまま産卵を開始することが知られているので、本実験では原則的に羽化当日の雌蛾のみを用いたこととした。

結果と考察

従来からクワコの採卵法としては、一般に雌雄の蛾を1対ずつ封筒に入れて交尾・採卵を行う袋採り法(石原, 1943)が用いられている。まず、袋採り法を対照として受精卵を産下する対(雌蛾)の割合を調査した(Table 1)。供試した32対のうち15.6%にあたる5対(雌蛾)が封筒に入れた後24時間以内に受精卵を産下し、24時間から48時間までに8対(25.0%)で受精卵の産下が確認された。しかし、72時間以降までに16対(雌蛾)(50.0%)において受精卵が得られず、結果として受精卵を産下した対(雌蛾)の割合は32中16の50.0%にとどまった。また、翅を基部近くから切断して交尾させる方法(八木, 1922)を併用した場合でもその効果はほとんど認められなかった。一方、本実験ではウリキンウワバの交尾には性フェロモンが蓄積しない風通しの良い空間が必要である(佐々木, 1980)との報告を参考に、天蚕の採卵に用いられている笊採り法(中嶋, 1990)を採用することとした。このため、市販のプラスチック笊籠を用い、広い空間と通気に配慮した状況下で交尾産卵させた。供試した29対(雌蛾)うち20対が笊籠に入れた24時間以内(69.0%)に産卵した。72時間以後までに受精卵が得られなかつたのは1対(雌蛾)(3.4%)のみであった。笊籠で受精卵を産下した対の割合は95.7%であり、これは袋採りの50%と比較すると高い値であった。受精卵を産下した対(雌蛾)が最多であった時間は、袋採り法では24時間から48時間であるのに対し、笊籠法では24時間以内であった。産下された受精卵をピンセットで1蛾毎にシャーレに集め、充分保湿しながら保護

〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1
本研究の一部は文部省科学研究補助金(07406004, 08406006)によって行った。

カイコ消化液 35 Kプロテアーゼの精製

姜 永煌^{1,3)}・白井 孝治^{2,3)}・大城戸利久³⁾・伴野 豊³⁾・藤井 博³⁾

1) 中国浙江大学

2) 信州大学繊維学部

3) 九州大学農学部

(1999年5月17日 受理)

YONGHUANG JIANG^{1,3)}, KOJI SHIRAI^{2,3)}, TOSHIHISA OKIDO³⁾, YUTAKA BANNO³⁾ and HIROSHI FUJII³⁾: Purification of 35K protease from the digestive juice of *Bombyx mori*

35K protease was purified from the digestive juice of *Bombyx mori* by a series of chromatography using Butyl-Toyopearl, Sephadex G-50 and DEAE-Sephadex. The purified protease gave a single protein band with a molecular mass of 35,000 on SDS-PAGE and its pI was 9.1. It had optimal activity at pH11 and in the temperature under 40°C. The enzyme activity was almost completely lost at 60°C and at pH4. It was slightly inhibited by Cu²⁺ and Mn²⁺, and strongly by diisopropylfluorophosphate, phenylmethylsulfonylfluoride and chymostatin, suggesting that the enzyme may be a chymotrypsin-like protease.

- 1) Zhejiang University, 268, Kaixuan Road, Hangzhou, 310029, China;
- 2) Present address; Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Tokida 3-15-1, Ueda 386-8567, Japan;
- 3) Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan.

Key words: purification, characterization, 35K protease, digestive juice, *Bombyx mori*

緒 言

カイコ消化液中にはトリプシン様、キモトリプシン様やエラスターーゼ様など数種類のプロテアーゼの存在が知られている（梅津、1972；EGUCHI and IWAMOTO, 1982；SASAKI and SUZUKI, 1982；鶴山ら、1985；城戸ら、1986；古澤、1998）。これらのプロテアーゼは食下した桑葉タンパク質の消化に関わり、栄養生理の上で、またはウイルスの不活化あるいは *Bacillus thuringiensis* の封入体蛋白質の分解などの生体防御の上で重要な働きをしていると考えられる。そのため、消化液プロテアーゼについてはこれまでに数種類が分離・精製され、生化学的諸性質や

アミノ酸配列、cDNA の塩基配列などが明らかにされている（鶴山ら、1985；佐々木・吉村、1990；SASAKI et al., 1993；古澤、1998）。我々はカイコ体液キモトリプシンインヒビターの体内での作用を調べている過程で体液キモトリプシンインヒビター、CI-8 が消化液中のプロテアーゼ活性を阻害することを見出した（SHIRAI et al., 1997）。本研究では、CI-8 で阻害される同プロテアーゼを消化液中から分離・精製し、その性質を明らかにすることを目的に実験を行った。その結果、新規なプロテアーゼであると判明したので報告する。

材料と方法

消化液：供試蚕系統は九州大学農学部遺伝子資源研究センターに保存されている C 60（藤井ら、1998）である。消化液は 5 齢盛食期の幼虫を 1 日間絶食させた後、電気ショックによって吐液させ、この吐液

1) 310029, 中国浙江省杭州市凱旋路 268 号

2) 現所属 〒 386-8567 長野県上田市常田 3-15-1

3) 〒 812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense

Akira Takahashi¹, Tsutomu Kawasaki¹, Kenji Henmi¹, Katsuhiko Shii², Osamu Kodama², Hikaru Satoh³ and Ko Shimamoto^{1,*}

¹Laboratory of Plant Molecular Genetics, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5 Takayama, Ikoma 630-0101, Japan,

²Laboratory of Bioorganic and Agricultural Chemistry, School of Agriculture, Ibaraki University, Ami 300-0332, Japan, and

³Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-0053, Japan

Summary

We screened 93 lesion mimic mutants of rice for resistance to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*, and found eight mutants that exhibited significant resistance to the fungus. We called these mutants *cdr* (cell death and resistance) and further analyzed three of them. Two mutations, *cdr1* and *cdr2*, were recessive and one, *Cdr3*, was dominant. Many small brownish lesions developed over the entire leaf of the mutants 20–50 days after sowing. TUNEL staining revealed that DNA fragmentation occurred in leaf blade cells of the homozygous *Cdr3* mutants. Autofluorescence and callose deposition were visible in leaf cells of these three mutants. Activation of two defense-related genes, *PBZ1* and *PR1*, was observed in the leaves of the mutants; high expression of *PBZ1* was correlated with the lesion formation in the three mutants, whereas *PR1* was constitutively expressed in the *cdr2* and *Cdr3* mutants irrespective of the lesion formation. Levels of momilactone A, a major phytoalexin of rice, in these mutants were increased approximately 100–400-fold relative to the wild-type levels. Suspension-cultured cells of the *cdr1* and *cdr2* but not *Cdr3* produced higher levels of H_2O_2 than the wild type when treated with calyculin A, an inhibitor of protein phosphatase 1. These results suggest that biochemical lesions of *cdr1* and *cdr2* lie in the early signaling steps leading to activation of the NADPH oxidase and that type-1 protein phosphatase is operative in protein dephosphorylation involved in NADPH oxidase activation.

Introduction

Mutants that show spontaneous cell death in the absence of pathogens are called disease lesion mimics and have

Received 19 October 1998; revised 11 January 1999; accepted 11 January 1999.

*For correspondence (fax +81 743 72 5509; e-mail simamoto@bs.aist-nara.ac.jp).

been known to occur in several cereals, including maize (Johal *et al.*, 1995; Morris *et al.*, 1998; Neuffer and Calvert, 1975; Walbot *et al.*, 1983), rice (Kiyosawa, 1970; Marchetti *et al.*, 1983), and barley (Kjaer *et al.*, 1990; Schwarzbach, 1976; Wolter *et al.*, 1993). They are recessive or dominant; and almost all mutants each show a unique lesion phenotype with respect to the size of the lesion, timing of lesion formation, and colour of the lesion (Johal *et al.*, 1995). Mutant phenotypes are often influenced by environmental conditions such as light and temperature (Johal *et al.*, 1995).

More recently, systematic screening of similar mutants in *Arabidopsis* yielded a number of mutants called *acd* (accelerated cell death), *lsd* (lesion stimulating disease resistance), and *cpr5* (constitutive expresser of PR genes) (Bowling *et al.*, 1997; Dietrich *et al.*, 1994; Greenberg and Ausubel, 1993; Greenberg *et al.*, 1994; Weymann *et al.*, 1995). These *Arabidopsis* mutants have been particularly useful for studying the role of the cell death in defense response and molecular mechanisms regulating programmed cell death in plants. Detailed analysis of these mutants established that cell death is genetically programmed in plants. Furthermore, most of these mutants exhibited resistance to pathogens and concomitantly showed the typical hypersensitive response (HR) frequently observed in plants challenged with avirulent pathogens. The molecular and cytological characteristics observed in these mutants are as follows: accumulation of autofluorescent material, callose deposition, activation of defense-related genes, elevated salicylic acid level, and activation of systemic acquired resistance pathway (Dietrich *et al.*, 1994; Greenberg *et al.*, 1994; Weymann *et al.*, 1995). These findings led to the conclusion that defense responses that are normally activated upon infection by avirulent pathogens are constitutively activated in this type of mutant without pathogens.

Although studies of lesion mimic type mutants have established the relationship between the formation of spontaneous lesions and activation of defense responses, biochemical alterations associated with these mutations have not been identified. The study of the *Arabidopsis lsd1* mutants showed that treatment with extracellular superoxide induced lesion formation in the mutant leaves and that the lesion formation was reduced by treatment with diphenyleneiodonium (DPI), an inhibitor of the plasma membrane NADPH oxidase (Jabs *et al.*, 1996). These findings suggest that the formation of spontaneous lesions in the mutants is initiated by reactive oxygen species (ROS) often associated with the HR and subsequent defense

Differences in Amylopectin Structure Between Two Rice Varieties in Relation to the Effects of Temperature During Grain-Filling

Takayuki Umemoto, Akita, Yasunori Nakamura, Ibaraki, Hikaru Satoh, Fukuoka, and Kazuo Terashima, Akita (Japan)

The structure of endosperm amylopectin was compared between two rice varieties, Kinmaze (subspecies japonica) and IR36 (subspecies indica), as well as their waxy mutants, all grown under controlled temperature. The distinct varietal difference in chain length distribution of amylopectin was confirmed by high performance anion-exchange chromatography equipped with pulsed amperometric detection. Amylopectin from Kinmaze contains more very short chains with degree of polymerization (DP) between 6 and 10 and less chains with DP from 13 to 22 than amylopectin from IR36, while there is little difference in the distribution of longer chains with DP > 24 between the two varieties. Waxy mutation had little effect on chain length distribution of endo-

sperm amylopectin. The temperature during grain-filling affected the chain length distribution of amylopectin in both varieties in a similar way; grain-filling at lower temperatures lead to an increased proportion of chains of DP 6–13 and decreased the percentage of chains with DP 20–27 and DP 44–54. However, the temperature-dependent changes in chain length distribution of amylopectin were within the range of varietal difference between Kinmaze and IR36. These results strongly suggest that factors regulating the varietal difference in patterns of chain length of amylopectin are dissimilar to those causing the temperature effects on amylopectin fine structure in rice endosperm.

1 Introduction

The distribution of chain lengths in endosperm amylopectin is affected by the temperature during grain-filling in several cereals (rice [1], wheat [2], and maize [3]). In the case of rice, temperature of 30 °C decreased the proportion of short chains of amylopectin and increased that of long chains, when compared with amylopectin synthesized at 25 °C [1]. *Satoh et al.* [4] reported that also a varietal difference exists in the amylopectin chain length distribution between the two rice varieties, Kinmaze (subspecies japonica) and IR36 (subspecies indica). Analysis of debranched starch from the endosperms of both varieties by gel permeation chromatography (Sephadex G-100) revealed that amylopectin from Kinmaze has a higher proportion of short chains than IR36 [4]. However, the varieties used by *Satoh et al.* [4] were not grown under controlled condition and may have been affected differently by variation in temperature during grain-filling.

There is another factor which may affect the amylopectin structure. *Hizukuri et al.* [6] found extra long chains of endosperm amylopectin in non-waxy rice, which could not be observed in waxy (amylose free) rice. In consequence, the possibility exists that the difference in amylose content between Kinmaze and IR36 [4] influences the structure of amylopectin.

The purpose of this study was, firstly, to elucidate the existence of the varietal difference in amylopectin structure between Kinmaze (subspecies japonica) and IR36 (subspecies indica), rice varieties used by *Satoh et al.* [4]. We used rice grains developed under controlled temperature after heading and analyzed their amylopectin chain length by high performance anion-exchange chromatography with pulsed

amperometric detection (HPAEC-PAD). This technique has been successfully used to analyze the chain length distribution of amylopectin (for example [3, 5, 7]) and is much more sensitive than gel permeation chromatography. Secondly, the effects of temperature during grain-filling on the amylopectin structure of both the japonica and the indica varieties were investigated since the effects of temperature on the chain length distribution of endosperm amylopectin from indica subspecies have not been reported thus far. In addition, the possibility was examined that the difference in amylose content between Kinmaze and IR36 affects amylopectin structure by investigating the waxy (amylose free) mutants of the respective varieties.

2 Experimental

Two rice varieties, Kinmaze (subspecies japonica) and IR36 (subspecies indica), and their waxy mutants, EM-21 and EM-1109, respectively, were grown in plastic pots (159 mm in diameter, 190 mm in height) in a greenhouse. Each pot contained twenty seeds, that were sown in a circle. Tillers were cut to produce one ear on each plant and ears headed on the same day for each variety were marked. One day after heading, all plants were transferred into growth chambers in which the day/night temperatures were controlled at 25 °C/20 °C. Five days after heading, at the onset of starch deposition in the endosperm, some plants were transferred into growth chambers in which day/night temperatures were controlled at 18 °C/13 °C or 32 °C/27 °C to perform three temperature treatments. Day/night temperatures were changed at 6:00 and 18:00 (natural day length). Ears from each treatments were harvested at maturity and stored at 4 °C until used.

The Starch-Debranching Enzymes Isoamylase and Pullulanase Are Both Involved in Amylopectin Biosynthesis in Rice Endosperm¹

Akiko Kubo, Naoko Fujita², Kyuya Harada, Toshiaki Matsuda, Hikaru Satoh, and Yasunori Nakamura*

National Institute of Agrobiological Resources, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305–8602, Japan (A.K., N.F., Y.N.);

Department of Horticulture, Chiba University, Matsudo, Chiba 271–8510, Japan (A.K., K.H.); School of Agriculture, Ibaraki University, Ami, Tsuchiura, Ibaraki 300–0393, Japan (T.M.); and Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812–8581, Japan (H.S.)

The activities of the two types of starch debranching enzymes, isoamylase and pullulanase, were greatly reduced in endosperms of allelic *sugary-1* mutants of rice (*Oryza sativa*), with the decrease more pronounced for isoamylase than for pullulanase. However, the decrease in isoamylase activity was not related to the magnitude of the *sugary* phenotype (the proportion of the phytoglycogen region of the endosperm), as observed with pullulanase. In the moderately mutated line EM-5, the pullulanase activity was markedly lower in the phytoglycogen region than in the starch region, and isoamylase activity was extremely low or completely lost in the whole endosperm tissue. These results suggest that both debranching enzymes are involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. We presume that isoamylase plays a predominant role in amylopectin synthesis, but pullulanase is also essential or can compensate for the role of isoamylase in the construction of the amylopectin multiple-cluster structure. It is highly possible that isoamylase was modified in some *sugary-1* mutants such as EM-273 and EM-5, since it was present in significant and trace amounts, respectively, in these mutants but was apparently inactive. The results show that the *Sugary-1* gene encodes the isoamylase gene of the rice genome.

The super-cluster structure of amylopectin (Gallant et al., 1997) might have evolved as a fitting strategy for plant survival and must be accomplished by well-refined regulation of a network of numerous enzyme actions. The fine structure of amylopectin is distinct from that of glycogen in animals and bacteria in that glycogen is randomly branched, the branches are more numerous, and the chains are shorter compared with amylopectin. Biochemical analyses of *sugary*-type mutants of maize, rice (*Oryza sativa*), Arabidopsis, and *Chlamydomonas reinhardtii* have provided new insights needed to understand the mechanism of synthesis and construction of the amylopectin fine structure (Ball et al., 1996; Nakamura, 1996; Smith et al., 1997). Since

these mutants accumulate phytoglycogen with more branches than amylopectin (Shannon and Garwood, 1984; Nakamura, 1996), analysis of the biochemical lesion in these mutants can give clues for the assessment of the functions of enzymes involved in amylopectin biosynthesis.

Pan and Nelson (1984) first reported that the *sugary-1* phenotype is caused by the loss of the activity of a pullulanase-type starch debranching enzyme, suggesting that the debranching enzyme is also involved in starch biosynthesis. That report sharply contrasted with the well-accepted idea that the starch debranching enzymes (pullulanase and isoamylase) are only involved in starch degradation in conjunction with other hydrolytic activities. James et al. (1995) later showed by transposon tagging that the *Sugary-1* gene of maize encodes an isoamylase-like enzyme. Recently, their group reported that the *Sugary-1* gene product possesses isoamylase activity, and that *sugary-1* mutants are deficient in both isoamylase and pullulanase (Rahman et al., 1998; Beatty et al., 1999).

Nakamura et al. (1992, 1996b) assayed the major enzymes of starch and Suc metabolism in developing endosperms of *sugary-1* rice mutants. They found that while both pullulanase and starch branching enzyme I activities were significantly reduced in the mutants, the reduction of pullulanase activity was much more pronounced than that of starch branching enzyme I activity; therefore, the ratio of pullulanase to starch branching enzyme I activity is markedly lower in *sugary-1* endosperm than in normal wild-type endosperm (Nakamura et al., 1996b). In other studies, it was observed that endosperms of four out of five allelic *sugary-1* rice mutants were differentiated into an iodine-staining, starch-containing region and an iodine-non-staining, phytoglycogen-containing region (Nakamura et al., 1997). Moreover, in *sugary-1* endosperm tissues with a more extensive phytoglycogen region, the amount of phytoglycogen in the total α -polyglucan content and the reduction in the pullulanase activity become greater (Nakamura et al., 1997).

Mouille et al. (1996) isolated in *C. reinhardtii* *sugary*-like *sta7* mutants in which starch is replaced by a small amount of phytoglycogen. Isoamylase is lacking while pullulanase activity is unaffected in these mutants.

¹ This work was supported by grants from Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology, The Enhancement of Center-of-Excellence Program, Japan, and from the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan.

² Present address: Department of Bio-Production Science, Akita Prefectural University, Akita, Akita 010–0146, Japan.

* Corresponding author; e-mail nakayn@abt.affrc.go.jp; fax 81-298-38-8347.

VI. Gene and genome structure

41. *glup4* controlling a 57H character was located on chromosome 12 in rice

H. SATOH¹, W. X. LI¹, Y. TAKEMOTO¹, T. ITO¹, T. KUMAMARU¹, L.Q. QU¹ and M. OGAWA²

1) Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, 812-8581 Japan

2) Home Economy, Yamaguchi Prefecture University, Yamaguchi, 753-8502 Japan

Glutelin, a major storage protein in rice, is synthesized as 57kD glutelin precursor on the ER, transported to the vacuole *via* the Golgi apparatus, and formed by cleavaging the precursor into a subunit (40kD) and b subunit (20kD) glutelins in the vacuole (Yamagata *et al.* 1982; Takaiwa *et al.* 1986; Masumura *et al.* 1989). Kumamaru *et al.* (1988) reported a high deposition of 57kD polypeptides (57H) mutant, CM1787, which is from Japonica rice cultivar "Kinmaze" induced by MNU treatment, and revealed that this character was controlled by a recessive gene, *esp2*, located on chromosome 11. Takemoto *et al.* (1996) demonstrated that *esp2* mutation was caused by the inhibition of post-translational modification of glutelin precursor. 57H mutations are valuable materials for the study on genetic regulation of post-translational modification of glutelin precursor.

So far five genes, *esp2*, *Glup1*, *glup2*, *glup3* and *glup4* have been identified as 57H mutation in rice (Kumamaru *et al.* 1988, Satoh *et al.* 1994, Satoh *et al.* 1995). The chromosome location of *glup4* was not known. In this report, we showed that the *glup4* is non allelic to other four 57H genes and is located on chromosome 12.

EM956 and EM960 were characterized by the increased content of 57kD polypeptides with remarkably decreased 26kD globulin in addition to the decreased amount of both 40kD and 20kD glutelins in SDS-PAGE. Both the mutants were crossed with their normal parent cultivar T65. The phenotypes of F₁s were normal. The segregation of normal and mutant types in F₂ showed a good fit to a 3:1 ratio. These results indicated that the 57H character of EM956 and EM960 are due to a single recessive gene. All mutant types in F₂ population had decreased 26kD globulin together with increased 57kD polypeptide accumulation. These results suggested that the reduction of 26kD globulin was the pleiotropic effect of 57H gene in EM956 and EM960. These mutants were crossed with each other. The phenotype of F₁ was 57H type and all of the F₂ seeds derived from this cross combination were the mutant type, showing that the 57H character of EM956 and EM960 was controlled by the same gene.

Table 1 shows the segregation pattern in F₂ seeds derived from crosses between EM956 and marker lines of *esp2*, *Glup1*, *glup2* and *glup3*. F₁ seeds of the cross between *esp2* and EM956 showed the normal phenotype, and F₂ seeds were classified into normal, *esp2* and EM956 types. Since the double mutant was sterile, segregation of these three types fitted a 9:3:3 ratio.

In the cross between *Glup1* and EM956, the F₁ seeds were 57H phenotype, and F₂ seeds were classified into *Glup1*, normal, EM956 and double mutant types, of which the segregation ratio in F₂ fitted to 9:3:3:1.

F₁ seeds of the cross between *glup2* and EM956, were normal for the 57H character, and F₂ seeds were classified into normal, 57H and double mutant type. As *glup2* and EM956 types were not distinguishable from each other, the F₂ segregation ratio fitted 9:6:1.

Characterization of a *zebra* Mutant of Rice with Increased Susceptibility to Light Stress

Kensuke Kusumi¹, Hisayo Komori¹, Hikaru Satoh² and Koh Iba^{1, 3}

¹ Department of Biology, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8581 Japan

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

The rice *zebra* mutant TCM248 is a single recessive mutant. This mutant develops transverse-striped leaves with green and white sectors under alternate light/dark growth conditions. Mutants that were grown under a higher light intensity during the light period showed a more intense striped phenotype. The white tissues contained abnormal chloroplasts with few internal membrane structures, while the green tissues in the mutants contained normal chloroplasts. The white tissue contained only trace amounts of Chls and carotenoids, and mRNA accumulation of nuclear genes encoding chloroplast proteins (*rbcS*, *cab*) was strongly suppressed compared to that in the wild type plants. A series of growth condition shift experiments demonstrated that the mutant displayed the striped phenotype only if it was exposed to the alternate light/dark growth conditions during a limited stage of early leaf development. These data suggest that the *zebra* gene is involved in the acquisition of photoprotective capacity of the plants and that this gene functions at an early stage of chloroplast differentiation.

Key words: Chloroplast development — Leaf development — *Oryza sativa* — *zebra* mutant.

Photosynthetic organisms acclimate to changes in various environmental factors such as light, temperature, and nutrients by optimizing the photosynthetic apparatus. Light is a substrate for photosynthesis, but it is also a potential source of photooxidative damage to cellular and subcellular structures. When the absorbed light energy exceeds the rate of the photochemical reaction, photoinhibition, or inhibition of photosynthetic activity, occurs. Photoinhibition is a reversible process that does not directly cause chlorophyll bleaching or tissue damage. However, after a prolonged period of photoinhibition, the generated reactive oxygen species oxidatively damage plant cells, resulting in bleaching or photodestruction of chloroplast pigments and structural damage to chloroplasts and other organelles. Plants possess various protection systems against excess light stress, including regulation of pigment

biosynthesis, the xanthophyll cycle, stabilization of light-harvesting system, and scavenging reactive oxygen species (Demming-Adams and Adams 1992, Foyer et al. 1994). These systems are very complex, and their efficiency is affected by the age of the plant (Kar et al. 1993, Corona et al. 1996, Falbel et al. 1996, Mock et al. 1998) as well as other environmental factors (Pastenes and Horton 1996, Thompson et al. 1989). However, the precise mechanism that regulates these processes is still unknown.

Many mutants with enhanced sensitivity to light stress have been identified (Niyogi 1999). These mutants develop nearly normal green leaves under low light conditions. However, under middle- or high-intensity light, they suffer necrotic or chlorotic damage. Destruction of chloroplast morphology, reduced PSI and PSII activity, and activation of antioxidant enzymes are generally observed in the damaged leaf cells (Niyogi 1999). These phenotypes in the mutants have been attributed to photooxidation due to destruction of the photoprotective machinery. In fact, some light-dependent necrotic/chlorotic mutants are deficient in a specific component of the photoprotective systems. For example, barley *tigrina* mutants have a defect in the regulation of chlorophyll biosynthesis and accumulate abnormally high amounts of protochlorophyllide in the dark (Nielsen 1974, Casadore et al. 1983, Hansson et al. 1997). Under high-intensity light, the excess protochlorophyllide is photooxidized, leading to oxidative damage to the plant. The *immutans* mutant of *Arabidopsis* shows a light-dependent “variegated” phenotype. This mutant gene was cloned and found to encode a protein that seems to function in the electron transfer chain in chloroplasts (Carol et al. 1999, Wu et al. 1999). Analysis of these mutants provided a powerful tool for elucidating the mechanisms of the regulation of the photoprotection system in higher plants.

In this report we describe a rice mutant called *zebra* that is characterized by transverse green and chlorotic bands in the leaves. We found that the *zebra* mutation affects chloroplast differentiation only at a limited stage during early leaf development, resulting in light-dependent damage to leaf tissues. Within the chlorotic tissues of the mutant, carotenoid accumulation and the expression of some nuclear genes involved in the chloroplast biogenesis were suppressed. We propose that the *zebra* gene product contributes to the acquisition of the photoprotective ca-

³ Corresponding author: Fax, +81-92-642-2621; e-mail, koibascb@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp.

微生物遺伝子開発分野

J. Fac. Agr., Kyushu Univ., **44** (1·2), 127–135 (1999)

A Giant Phage Taillike Particle of *Clostridium Saccharoperbutylacetonicum* ATCC13564

Seiya Ogata,¹ Takashi Nishiyama,¹ Katsumi Doi,¹ Sadazo Yoshino,² Fumio Kato³ and Hans-W. Ackermann⁴

Microbial Genetics Laboratory, Institute of Genetic Resources,¹ Laboratory of Applied Microbiology,² Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Department of Applied Biological Science,³ Saga University, Saga 840-8502, Japan, and Department of Microbiology,⁴

Faculty of Medicine, University of Laval, Quebec, Canada G1k7P4

(Received July 30, 1999 and accepted August 24, 1999)

A unique phage taillike particle from *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC13564 has been studied by electron microscopy using negative staining. It was observed in the lysate of phage HM 3 and in the mitomycin C-induced lysate with an inducible phage taillike bacteriocin, clostocin O. It was striated rod 28 nm in diameter and 450 nm in length, ending in three helical or wavy fibers (230×12 nm) which ended in special structures like suckers or funnels. Its contracted sheath was estimated to be 350 nm in length and 32 nm in width.

INTRODUCTION

The bacteriophages (phages) are the viruses infectious to the prokaryotes. Phage research has been, and will continue to be, an important field of microbiology. It has made enormous contributions to molecular biology, biochemistry and genetics, and it is having impact in such diverse field as epidemiology of infectious diseases, agriculture and the fermentation industry (Ackermann and DuBow, 1987a; Ogata, 1982).

The electron microscopy is suitable for the detection of phages and in particular for studying their morphology and physiology. Electron microscopic investigation on the phage lysate and mitomycin C- or UV-induced lysate frequently shows that the existence (or coexistence) of a great variety of phagelike particles, such as heads, long or short tails, and their components or parts (Ackermann and DuBow, 1987a; Bradley, 1967; Tikhonenko, 1970). During the examination on the induction of phage taillike bacteriocin, clostocin O of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 13564 by mitomycin C (Ogata *et al.*, 1972; 1978), this strain was found to produce another type of phage taillike particles. The production of the giant tail particles was also induced by phage HM 3 infection. The fine structure of this kind of particles have not been reported in *Clostridium* strains.

This paper deals with the detection and morphological property of the unique phage tail particles. The particles had been found twenty years ago by Ogata and Kato, the authors of these paper, and were recently found individually by Ackermann, a coauthor. Many references for the phagelike particles of various species of *Clostridium* are cited in the reports of Ackermann and DuBow (1987c), Nieves *et al.* (1981) and Ogata and Hongo (1979).

8. サイレージ乳酸菌の機能開発： 高温環境に適応したバクテリオシン生産株の分離と利用

土居 克実¹・江口 智子¹・崔 聖賢¹・大桃 定洋²・緒方 靖哉^{1*}

我が国の酪農・畜産業において、自給粗飼料としてのサイレージの調製量は年々増加している。一年を通じて安定的に、低コストで良質のサイレージを供給することが、乳・肉製品の高品位化をもたらす重要なファクターとなっている。ところが、九州・沖縄地方のような西南暖地型気候の地域では、夏季の高温多湿が障害となり、良質のサイレージを供給することは非常に困難である。そこで、西南暖地型気候に適応したサイレージ乳酸菌の開発を目的とし、約80株のNGRI株を分離してサイレージスターとしての有用性を検討してきた。¹⁾また、これらの菌株の有用特性の利用、さらに他属菌株由来の有用特性の付与についても検討してきた。^{2,3)}

一方、東南アジア各国では牛乳をはじめとする酪農产品的需要が近年、急激に高まっているが、これら各国でも高温多湿気候あるいは乾燥期などの環境的要因によってサイレージ調製は困難になっているので、本研究によって得られた結果が応用できるのではないかと考えられる。

本報告では、我々の研究のうち東南アジアおよび日本の西南暖地でのサイレージ発酵に有用であると考えられる高温環境下でバクテリオシンの利用について述べる。

1. バクテリオシン生産株の分離と特性

サイレージは乳酸発酵によって、飼料中に乳酸を蓄積し、pHを低く保つことで酪酸菌、枯草菌などの有害微生物の生育を抑制して長期間の保藏を可能としている。乳酸発酵にはホモ型とヘテロ型があり、ホモ型発酵では資化された糖がすべて乳酸に変換されるのに対し、ヘテロ型では消費された糖は、すべて乳酸に変換されず、CO₂、酢酸やエタノールが生成されることで発酵効率が悪くなる。したがって、サイレージ調製にはホモ型乳酸菌が望まれる。また、この他に、詰め込み材料に付着したヘテロ発酵型乳酸菌や酪酸菌などの栄養分の損失を招く菌群の排除も必要である。そこで、これらの菌群の増殖抑制にバクテリオシンを用いることを試みた。特に、高温多湿環境下で生育するバクテリオシン生産菌の分離と利用を目指した。

タイ国サイレージより分離した乳酸菌についてSpot-on-lawn法およびpaper disk法を用いた試験を行い、*Enterococcus faecalis* および*E. faecium* の生育を阻害する*Enterococcus* sp. K-4を分離した。本菌株は、グラム陽性、長鎖の形態を呈しており、45°Cで生育可能であった。また、ガス生産性ではなく、pH 9.6, 6.5%のNaClを添加したMRS培地でも生育可能であった。さらに、糖の資化性および16S rDNA系統解析より、K-4株は*E. faecalis*ともっとも近縁であることが分かった。

2. *E. faecalis* K-4株の生産するバクテリオシンの特性

次に、K-4株の生産するバクテリオシンの特性を検討したところ、100°C、20分間の熱処理や弱酸性条件下では安定であったが、trypsin処理により抗菌活性は完全に失活したことから、本バクテリオシンは熱安定性のボリペプチドであると推察した。

抗菌スペクトルを検討したところ、他の*Enterococcus*属由来のバクテリオシンと同様、*E. faecalis* および*E. faecium*に抗菌作用を示したが、*Lactobacillus*属や*Pediococcus*属、*Leuconostoc*属の乳酸菌、*Staphylococcus*属、*Salmonella*属、グラム陰性菌である大腸菌、*Klebsiella*属の各種細菌に対して抗菌活性を示さなかった。

また、K-4株の生育曲線とバクテリオシン生産性について検討を行ったところ、最適増殖温度が37°Cであったのに対し、バクテリオシン生産性は43°Cでもっとも高かった(Fig. 1)。

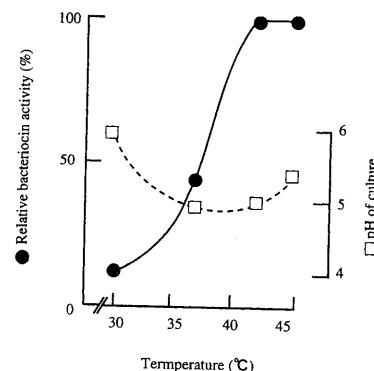


Fig. 1. Effect of temperature on the production of bacteriocin by *Enterococcus faecalis* strain K-4. The strain was cultivated in the MRS broth at various temperature. The bacteriocin activity of each culture filtrate was detected by the paper disk method.

Effect of Thermophilic Bacteria on the Siliceous Deposition and Phylogenetic Analysis of the Bacterial Diversity in Silica Scale

Fumio Inagaki, Ryoichi Kawatsu, Yoshinobu Motomura*, Katsumi Doi,
Eiji Izawa** and Seiya Ogata†

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

(Received October 8, 1999 and accepted November 5, 1999)

Silica scale, one of the major problems for geothermal power development, was formed on the copper test plates in geothermal hot water ($85 \pm 2^\circ\text{C}$, pH 7.2). Numerous bacterial shaped structures were observed and mixed bacterial population of genomic DNA was stably extracted from the silica scale. The amount of silica scale and extracted DNA increased exponentially with the time of incubation in the geothermal hot water. The molecular phylogenetic survey of extremely thermophilic bacterial diversities in silica scale was carried out by using the PCR-mediated small subunit rRNA gene (rDNA) sequencing. The community was composed mainly of three phylogenetic types in domain *Bacteria*. Cluster I was affiliated with the Aquificales and cluster II was closely related to the genus *Thermus*. Cluster III was homologous with Gram-positive anaerobic thermophilic bacteria. These bacterial communities may possibly contribute to the rapid aggregation of silica.

INTRODUCTION

Silicon is the second most abundant element in the earth's crust, which interacts with living organisms in geothermal water environments. The microbial presence of biogeological edifices coated with amorphous silica has been observed in geothermal and hydrothermal environments (Cook *et al.*, 1995; Ferris *et al.*, 1986; Zuerenberg *et al.*, 1990). The type of microorganism involved in the mechanisms of the siliceous biomineratization, however, have remained poorly understood.

We show here the microbial participation in the formation of silica scale in Otake-geothermal power plant, Oita Prefecture, Japan, and its molecular view of extremely thermophilic bacterial diversity. The silica scale formed on the surface of equipment and in pipelines of geothermal power plants presents serious economic problems, related to efficient of energy production (Fig. 1) (Yanagase *et al.*, 1970). The main objective of the present study was to analysis the microbial diversity based on the small subunit rRNA gene (rDNA) (Oyaizu 1992). Recent molecular phylogenetic study using the rDNA have indicated that the microbial diversity in variety of environments is much greater than previously assumed by the standard cultivation and isolation methods (Barns *et al.*, 1996). This research may contribute not only to the clarification of siliceous biomineratization in thermal systems but also to the regulation of silica scale formation in

* Department of Earth and Planetary Sciences, Faculty of Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

** Deartment of Mining, Faculty of Engineering, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

Differential Level in Co-Down-Modulation of CD4 and CXCR4 Primed by HIV-1 gp120 in Response to Phorbol Ester, PMA, among HIV-1 Isolates

Satoko Tahara-Hanaoka¹, Yuki Ushijima², Hiroshi Tarui², Masayuki Wada², Toshio Hara², Shigeo Imanishi³, Tomoyuki Yamaguchi¹, Toshio Hattori⁴, Hiromitsu Nakauchi¹, and Atsushi Koito^{*5}

¹Department of Immunology, Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan, ²Microbiological Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, Fukuoka 812-8582, Japan, ³Laboratory of Cell Engineering, National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305-0851, Japan, ⁴Division of Allergy and Infectious Diseases, Internal Medicine, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Sendai, Miyagi, 980-0812, Japan, and ⁵Division of Clinical Retrovirology and Infectious Diseases, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Kumamoto 860-0811, Japan

Received November 15, 1999; in revised form, March 22, 2000. Accepted March 24, 2000

Abstract: HIV-1 enters cells through interacting with cell surface molecules such as CD4 and chemokine receptors. We generated recombinant soluble gp120s derived from T-cell line-tropic (T-tropic) and macrophage-tropic (M-tropic) HIV-1 strains using a baculovirus expression system and investigated the association of CD4-gp120 complex with the chemokine receptor and/or other surface molecule(s). For monitoring the co-down-modulations of the CD4-gp120 complex, a cytoplasmic domain deletion mutant (tailless CD4), which is not capable of undergoing down-modulation by itself in response to phorbol ester PMA, was used. Our studies revealed both cell-type and HIV-1 strain-specific differences. We found that T-tropic gp120s were capable of priming co-down-modulation with tailless CD4 by interacting with CXCR4, whereas M-tropic SF162 gp120 could not after PMA treatment even in the presence of CCR5. Among the T-tropic HIV-1 envelopes, IIIB gp120 was the most potent. Furthermore, the ability of gp120 to prime the PMA induced co-down-modulation of tailless CD4 appeared to be dependent on the concentration of the principal coreceptor CXCR4. Nevertheless, the observation that IIIB gp120 strongly primed tailless CD4 co-down-modulation on human osteosarcoma HOS cells that express undetectable levels of surface CXCR4 raised the possibility that membrane component(s) other than those recently identified can be involved in down-modulation of the CD4/gp120 complexes.

Key words: HIV-1, Coreceptor, Phorbol ester, Down-modulation

The CD4 molecule has been shown to play a crucial role in thymocyte ontogeny and in the activation of mature helper T lymphocytes (for review; 21, 26). The activation of CD4⁺ T lymphocytes mediated by the T-cell receptor (TCR) causes down-modulation of CD4. For the down-modulation, a structural motif within its cytoplasmic tail is shown to be phosphorylated by the phospholipid-dependent protein kinase (PKC) in a Ca²⁺ dependent manner (1, 4). The internalized CD4 is translocated followed by degradation in lysosomes (27, 28). Phorbol esters such as PMA are known to induce a similar response. However, truncated tailless CD4 was

found to be resistant to this phorbol ester-induced down-modulation (3).

Human CD4 also acts as a primary receptor for HIV-1 infection, but cytoplasmic-dependent internalization of CD4 is not required for HIV-1 entry (3, 24). However, soluble gp120 from viruses with a T-cell line-tropic (T-tropic) phenotype could down-modulate the tailless CD4 in response to PMA on human cell lines (15). CXCR4, a receptor for the SDF-1, which is identified as a major coreceptor for T-tropic HIV-1 infection (12), is found to

Abbreviations: CCR5, CC-chemokine receptor 5; CXCR4, CXC-chemokine receptor 4; GPCRs, G-protein coupled receptors; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; PMA, phorbol 1,2-myristate-1,3-acetate; RT-PCR, reverse transcription-PCR; SDF-1, stromal cell-derived factor 1; 7TM, seven-transmembrane.

*Address correspondence to Dr. Atsushi Koito, Division of Clinical Retrovirology and Infectious Diseases, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Kumamoto 860-0811, Japan. Fax: 81-96-373-6537.

3. 総説等要旨

家蚕遺伝子開発分野

九州蚕糸 No. 30 1999

カイコにおけるアネキシン IX の発現特性

夏 慶 友・藤井 博・伴野 豊・日下部宜宏

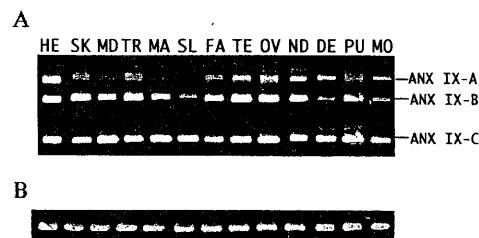
九州大学農学部

前報で我々は、カイコの未受精卵からアネキシン遺伝子をクローニングし、アネキシンファミリーのアネキシンIXと同定した(夏ら, 1998)。また、カイコアネキシンIXには、A, B, Cの三種類のアイソフォームが存在することを明らかにした。この三種類のアイソフォームが一つの遺伝子から生じ、しかもC-末端アミノ酸配列がそれぞれ異なることを明らかにした(GeneBank accession number : AB030496~8, AB031208)。つまり、アネキシンIX遺伝子C-末端の最後のエキソンのなかに、三つの3'スプライシング部位があって、mRNA前駆体がスプライシングされる時に、それぞれの3'スプライシング部位を選択的に利用することによって、アネキシンIX-A, -B, -Cの三種類のmRNAが生じる。今回は、これら三種類のアイソフォームの特異的な機能を追究する為に、カイコの組織および発育段階におけるアネキシンIX遺伝子の発現量を調べた。

材料と方法 用いた蚕品種は日02である。五齢三日目に雌雄各5頭を解剖し、氷冷した生理食塩水で各組織を洗浄した後、直ちにtotal RNAを抽出した(sepasol-RNA I, nacalai tesque社)。また、非休眠卵、休眠卵、蛹と蛾の脂肪体のtotal RNAも同じ方法で抽出した。抽出したtotal RNAの濃度を調製し、10 µg量を逆転写し(GIBCOBRL), RT-PCRを行った。PCRに用いたプライマーは、アネキシンIX-A, -B, -Cに共通する領域の配列に基づき作製した(5'プライマー: 5'-CTT CAACTCCA TCCTTATCACTCGCTCCTA-3', 塩基597~626, 3'プライマー: 5'-CTACCGTAATTCACATGCGTCAAGCGCG AC-3', 塩基1916~1945)。PCRの条件は94°C変性5分後、94°C 30秒→63°C 1分→72°C 1分のサイクルを35回行った。また、対照としてリボゾーム蛋白質L3プライマーを用い、RT-PCRを行った。PCRによる增幅産物を1.2%アガロースゲル電気泳動で分離した。

結果と考察 用いたカイコアネキシンIX-A, -B, -Cの共通のプライマー対に挟まれたA, B, Cそれぞれの部位の長さは、ゲノムにおいてはインtronを含めてそれぞれ5318bp, 4902bp, 4427bp, mRNAでは1349bp, 933bp, 458bpである。そして、RT-PCRで得た三つのバンドの長さおよび塩基配列を解析したところ、各々の

アイソフォームに対応するcDNA断片であることが判明した(図A)。また、対照のリボゾーム蛋白質L3の生成物の量に差がないことも分かった(図B)。カイコ幼虫血球(HE), 皮膚(SK), 中腸(MD), 気管(TR), マルピーギ管(MA), 紺糸腺(SL), 脂肪体(FA), 精巢(TE), 卵巣(OV), および非休眠卵(ND), 休眠卵(DE), 蛹(PU)と蛾(MO)の脂肪体を調査した結果(図A), C型は全ての組織および発育段階で強く発現していたが、AとB型は組織および発育段階によって発現量が異なっていた。発現パターンは、①A, B, Cが何れも強く発現する血球、精巢、卵巣、非休眠卵②BとCが強く発現する皮膚、中腸、気管、マルピーギ管、蛾③AとC型がB型よりも強く発現する休眠卵④C型だけが強く発現する紺糸腺の四タイプに類別された。すなわちカイコアネキシンIX遺伝子は組織および発育段階によって選択性スプライシングを受けていると言える。また、発現のパターンから、アネキシンIX-C型が構成的な働きをし、AとB型が組織および発育段階に特異的な役割をしている可能性が示唆された。



要結 カイコに存在するアネキシンIX-A, B, Cの三種類のアイソフォームの発現特性を調査した結果、アネキシンIX-C型は全組織および発育段階で強く発現していたが、AとB型は組織および発育段階によって発現量が異なっていた。

文 献

- 1) 夏 慶 友・魯 成・藤井 博・伴野 豊 (1998) : 九州蚕糸, 29, 25.

第7連閲群に所属するカイコの 新小形卵突然変異体の遺伝学的研究

西坂章文・田村 圭・西川和弘

石原大輔・伴野 豊・藤井 博

九州大学農学部

カイコでは卵サイズが小形となる突然変異体として、これまでに小形卵 (*sm*: 林, 1937; 筑紫・土井良, 1970), 第2小形卵 (*sm-2*: 土井良ら, 1974), 白妙卵 (藤川ら, 1993)などの遺伝子が報告されている (藤川ら, 1998)。1993年、農林水産省蚕糸昆虫農業技術研究所よりこれらに類似した小形卵を分離する系統の分譲を受け、*xd 34* 系統として維持している。*xd 34* より分離する小形卵形質が一劣性遺伝子によって支配されていることは既に見出していたが、本形質を支配する遺伝子が既知の小形卵遺伝子と同一であるかどうかは未確認であった。そこで、本小形卵の形質を発現させる遺伝子の連閲分析を行い、本小形卵が新しい突然変異体であるかについて遺伝的に明らかにした。

材料と方法 供試系統は九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター保存の *xd 34* 及び各連閲群を標識する遺伝子を有した系統である。卵形質を対象とする連閲検索では、雄においては形質を表現型として目視できないので小形卵を産む雌蛾を使用することが望ましい。しかし、小形卵は孵化能力を持たない。したがって他系統との交配においては再検定交雑法 (土井良ら, 1973) により、小形卵遺伝子に関しホモ型である雄蛾を確認して実験を進めた。連閲検索に用いた標識遺伝子を染色体別に示せば、*Ze* (3), *oc* (5), *q* (7), *Ia* (9), *w-1* (10), *K* (11), *ch* (13), *bl* (15), *cts* (16), *Lan* (21), *or* (22), *tub* (23), *so* (26), *Xan* (27) である。検定に際しては標識形質が劣性の場合には *F₂*において、優性の場合には本遺伝子をヘテロに持つ雄を *F₁*に交雑した世代における形質の分離を調べ、連閲の有無を判定した。

結果と考察 既存の小形卵遺伝子が *sm*, *sm-2* 遺伝子と命名されているので、今回対象とした小形卵遺伝子を *sm-3* 遺伝子と仮称して連閲検索を行った。連閲検索の結果、第3 (*Ze*), 5 (*oc*), 9 (*Ia*), 10 (*w-1*), 11 (*K*), 13 (*ch*), 15 (*bl*), 16 (*cts*), 21 (*Lan*), 22 (*or*), 23 (*tub*), 26 (*so*), 27 (*Xan*) 連閲群に対しては全て独立遺伝であることを示す分離が得られた。*sm* 遺伝子は第3連閲群に、*sm-2* 遺伝子は第13連閲群に所属するので仮称 *sm-3* 遺伝子はこれらとは独立であることになる。ところで、

第7連閲群に対しては、かすり遺伝子 *q* を標識遺伝子として用い、*F₂*における分離を調べた。2蛾区を1蛾育して幼虫形質別に卵の調査を行った。2蛾区合計の結果、総計326頭のうち + + ; 198頭, + *sm-3*; 69頭, *q* + ; 59頭, *q sm-3*; 0 頭となり、かすり個体で小形卵を産下するものは1個体も得られなかった。この結果は独立の関係を示す理論比 9:3:3:1、あるいは連閲関係にある場合の理論比 2:1:1:0 のどちらとも異なるものであった。これは *sm-3* 遺伝子をホモに持つ個体は生存力が劣り、発育途中で致死する確率が正常より高い場合が多いことによるものと思われる。このような場合、カイコでは雌個体で配偶子形成の際に交叉がおこらないため、2重劣性個体である *q* かつ *sm-3* 個体の有無が連閲か独立かの判定基準となり得る。今回の結果では326頭中2重劣性個体である *q sm-3* は1個体も生じていない。独立であるならば理論的には20頭の *q sm-3* 個体が出現するはずである。以上の点から *sm-3* 遺伝子と *q* 遺伝子は連閲関係にあると判断した。すなわち、*sm-3* 遺伝子は第7連閲群に所属する。これまでに第7連閲群には7つの遺伝子が同定されているが、卵形に関する遺伝子は存在しない。したがって本遺伝子はカイコの新しい卵形突然変異遺伝子であることになる。

要結 *xd 34* に分離する小形卵形質は連閲分析の結果、第7連閲群に所属する劣性遺伝子に支配される新しい突然変異体であることが判明した。

文 献

- 1) 筑紫春生・土井良 宏 (1970) : 日蚕雑, 39, 319-320.
- 2) 土井良 宏・木原 始・筑紫春生 (1974) : 日蚕雑, 43, 369-372.
- 3) 藤井 博・伴野 豊・土井良 宏・木原 始・河口 豊 (1998) : 家蚕遺伝子資源系統の特性情報, 54 pp., 九州大学.
- 4) 藤川和博・河口 豊・伴野 豊・土井良 宏・古賀 克己 (1993) : 日蚕雑, 62, 88-90.
- 5) 林禎二郎 (1937) : 九大農学芸誌, 7, 359-372.

n = 27 の染色体構成を持つクワコ (Bombyx mandarina) のアリルフォリン遺伝子の地理的比較

今田正人・伴野 豊・中村 隆・日下部宜宏・河口 豊
古賀克己・藤井 博・盧 時 甲*・徐 孟 奎**

九州大学農学部

*慶北大学農学部

**浙江大学農学部

カイコ (*Bombyx mori*) の祖先種と考えられているクワコ (*Bombyx mandarina*) に関しては染色体数とアリルフォリン遺伝子から見ると日本本土・対馬・韓国グループと中国の2つのグループに大別できることを報告している(中村ら, 1998)。我々はこのような2型が生じた理由に関して追究しているが、今回はその一環として、古来より大陸から日本への動植物の流入ルートに位置している朝鮮半島、対馬諸島、九州に分布している染色体数 $n = 27$ の染色体構成を持つクワコについて調査地点を広げ、アリルフォリン遺伝子の解析を行った。

材料と方法 供試材料は、福岡市東区奈多、福岡県宗像郡玄海町江口、長崎県対馬、北海道苫小牧市、長野県南安曇郡、大分県日田市、鹿児島県大口市、韓国大邱市、中国杭州市と北京市で採取したクワコおよび九州大学農学部遺伝子資源開発研究センターに保存されている日本種、中国種、ヨーロッパ種を含むカイコ34個体である。DNAの抽出は後部絹糸腺より、原(1996)の方法に従い行った。PCRに用いたプライマーは、Shimada *et al.*, (1995) をもとに MS1: 5'-TTCCACTCTCATTACCGT-TCTGGTGG-3', MS2: 5'-CCATACAGATCTCCATTAT-CTTGCCA-3' とした。両プライマーは、第3, 第4エキソンの一部、第3イントロンの全配列に対応した部位を増幅する。PCRを、変性94℃60秒、アニーリング50℃90秒、伸長反応72℃120秒の条件で40サイクル行い終了後反応液を1.0%アガロースゲル電気泳動した。500bp付近のDNA断片を QIAquick Gel Extraction Kitで回収し30 μlの溶質バッファーに溶解した。精製したDNAを LIC-4200L-2DNA シーケンシングシステムで分析した。シーケンスには福岡市東区奈多、福岡県宗像郡玄海町江口、長崎県対馬、韓国大邱市から採取したクワコを各々3個体、比較対象として中国杭州市で採取したクワコを1個体使用した。

結果と考察 PCR産物をアガロースゲルで電気泳動したところ、各地域のクワコでDNA試料から約500bpのDNA断片(以下バンドと標記する)が増幅された。それらを比較すると、杭州市のクワコは他地域よりバンドの移動度が早く、配列の長さに差が見られた。また、大邱市のクワコの中に日本各地のクワコで見られた移動度を示すバンドと杭州市のクワコのバンドの2つのバンドを持つヘテロ個体が確認された。より詳しく分析するため、バンドをゲルから切り出し精製を行い塩基配列を決定した。大邱市のヘテロ型のクワコは移動度の早いバ

ンドと遅いバンドに分けて分析を行った。まず第3, 第4エキソンについて比較した結果、今回は塩基の挿入、欠失、置換は全く見られず共通の配列を持つことがわかった。しかし、第3イントロンでは、移動度の早いバンドを持つ杭州市のクワコと大邱市のクワコ2個体では見られない66塩基対からなる配列が、福岡市東区奈多、福岡県宗像郡玄海町江口、対馬のクワコの各々3個体、大邱市のクワコ1個体に共通して存在した。この挿入配列(中村, 1998)には塩基の挿入、欠失、置換は見られなかった。大邱市のヘテロ型のクワコの移動度の遅いバンドのシーケンス分析はまだ終了していないが、日本産クワコと同様な挿入配列を持っているものと推測している。次に、塩基配列決定を行ったサンプルを除いた9つの地域から採取したクワコ、及びカイコ34個体についてはPCR産物の電気泳動結果から挿入配列の有無を推定した。移動度が遅く挿入配列があると判断されたグループには日本各地のクワコが属しており、移動度が早く挿入のないと思われるグループには中国の杭州市と北京市のクワコが含まれた。カイコはすべて挿入のないグループに属し、中国産クワコと同じであった。一方、韓国産クワコは塩基配列決定を行ったサンプルを除いた2個体を分析し、1個体は挿入配列をもつグループと判断したが、もう1個体は挿入配列のあるバンドとないバンドの2つのバンドを持つヘテロ型個体と推定された。これまでクワコは染色体数 $n = 27$ で挿入配列を持つ日本型クワコと染色体数 $n = 28$ 、挿入配列を持たない中国型クワコとに分けられると判断していたが、今回のアリルフォリン遺伝子の結果を見ると韓国型とでもいうべき第3のタイプを考える必要があることが示唆された。

要結 日本産クワコに代表される染色体数 $n = 27$ の染色体構造をもつクワコは、アリルフォリン遺伝子の第3イントロンに挿入配列があると考えてきたが、韓国産のクワコのなかには挿入配列のない個体の存在が予想された。

文 献

- 1) 中村 隆・伴野 豊・日下部宜宏・河口 豊・藤井 博・古賀克己 (1998) : 九州蚕糸, 29, 29.
- 2) 原和二郎 (1996) : 昆虫農業技術研究報告, 16, 21-30.
- 3) Shimada, T., Kurimoto, Y. and Kobayashi, M. (1995) : Mol. Phylogen. Evol., 4, 223-234.

クワコの染色体2型の境界について

中村 隆・伴野 豊・河原畠 勇・日下部宜宏

河口 豊・古賀 克己・藤井 博・盧 時 甲*

九州大学農学部

*慶北大学農学部

カイコ (*Bombyx mori*) の祖先種とされているクワコ (*Bombyx mandarina*) は東アジアに広く分布する。クワコの染色体数に関してはこれまでの文献と我々の調査結果から、日本国内や朝鮮半島南部に生息するクワコは $n = 27$ (Kawaguchi, 1928) 中国および極東ロシアに分布するクワコは $n = 28$ (Asturov et al., 1959; 蒋同慶ら, 1979) であり、両者の分布の境界は朝鮮半島にあると推定している。今回は異なる染色体構成を持つクワコが境界地域で共存した場合、雑種が形成される可能性があるか検討を行うと共に、併せて大韓民国におけるクワコの染色体数に関して3地点で調査を行った。

材料と方法 供試材料は、日本国内から福岡県福岡市、大韓民国の慶尚北道大邱広域市、京畿道水原市、江原道束草市、中国内の浙江省杭州市、浙江省湖州市で収集したクワコである。染色体観察は終齢幼虫の生殖細胞において、中山ら (1986) の方法に従い行った。クワコの飼育は透明なビニール袋内で10頭ずつ分けてを行い、1日から2日毎に1~3枚の新しい桑の葉とビニール袋とを取り替えた。

結果と考察 異なる生息地から収集した $n = 27$ と $n = 28$ のクワコの類縁性を検討するため、各々の交雑を行い、孵化状況、幼虫期の致死性及び染色体構成を追究した。いずれの交雫においても孵化が生じその割合は 64.7% であった。得られた F_1 世代の 6 婦区 300 頭について幼虫期の致死性を調べるために成虫に到達する個体の割合を調査した。その結果、死亡する個体が多く 8% (24/300 頭) の個体しか成虫に達しなかった。しかし、両親のクワコの生存率も飼育条件下では低く $n = 27$ のクワコが 5% (10/200 頭), $n = 28$ のクワコが 19.5% (39/200 頭) であったことから、 F_1 幼虫の生存率は両親と比べ差がないと判断した。さらに成虫は生殖力を持つ雌雄であり (雄40頭、雌16頭) F_3 まで形成を確認した。一方、 F_1 幼虫の染色体を観察したところ、基本的な染色体数は精原細胞は $2n = 55$ 、第一減数分裂中期の第一精母細胞では1本の3価染色体を含む27本 ($1\text{III} + 26\text{II}$) の染色体構成であったが、調査した33個体中 7 個体 (7

蛾区) は、それに加えさらに小さな断片染色体を一つ過剰に存在した。一本の3価染色体は全個体で認められることから $n = 27$ のクワコの1本の染色体は $n = 28$ のクワコの2本の染色体に対して相同であり、両親のクワコは基本ゲノムの構成は共通であると判断した。生じた小さな断片染色体は両親のゲノムの不和合性の現れと理解されるが F_2 では認められなくなった。両親の雑種は F_3 まで生存を確認しており、交雫後代が生存していく可能性が高いと考えられた。つまり、 F_1 は染色体構成が異常になりながらも後代を形成することが可能であると判明した。

次に野外の状況を把握するために、両者の境界と考えられる朝鮮半島の大韓民国3地点で採取したクワコの染色体数を観察すると、大韓民国慶尚北道大邱広域市と大韓民国京畿道水原市のクワコは $n = 27$ であった。一方、朝鮮民主主義人民共和国との国境に近い日本海沿岸の大韓民国江原道束草市付近で採取した雄の蛹1個体は、実験の都合上、福岡産クワコ ($n = 27$) と交配した。孵化した幼虫の染色体数は第一減数分裂中期において 27 本 ($1\text{III} + 26\text{II}$) であり、この個体は $n = 28$ であると考えられた。朝鮮半島には $n = 27$ のクワコが多数生息しているものの $n = 28$ のクワコも分布しており両者は交雫をしている可能性が示唆された。

要結 朝鮮半島の異なる3地点のクワコの染色体数を調査すると、朝鮮民主主義人民共和国との国境に近い日本海沿岸の地点で $n = 28$ と判定されるクワコが生息していた。

文 献

- 1) Kawaguchi, E. (1928) : Z. Zellforsch. Mikrosk. Anai. Bd, 7, 519-552.
- 2) Asturov, B. L. (1959) : Cytology, 1, 327-332.
- 3) 蒋同慶・向仲杯・吳錫梁・楊松庭 (1979) : 野桑蚕与家蚕雜向的研究 (第一報) 1-3, 西南農学院蚕桑系, 重慶 北碚.
- 4) 中山光育・伴野 豊・土井良 宏 (1986) : 九州蚕糸, 17, 65.

クワコ (*Bombyx mandarina*) とカイコとの 交雑 F_1 に見出した蛹期間の延長

伴野 豊・田村 圭・西川和弘・石原大輔

西坂章文・中村 隆・藤井 博

九州大学農学部

カイコの蛹期間は通常10日から15日の範囲であり平均的には12日である。系統により固有な長さが見られるることは蛹期間を支配する制御機構に遺伝的要因があることが予想される。発育調節には眠性遺伝子、化性遺伝子、伴性晩性遺伝子が広く関与しており、蛹期間の調節もこれらの遺伝子が関与している(諸星, 1976)。ところで今回、クワコとカイコの交雑 F_1 において蛹期間が76日とカイコと比べると極めて長い蛹期間を持つ個体を得たのでその遺伝性に着目して実験を進めることにした。

材料と方法 クワコは福岡県宗像郡玄海町江口、福岡市東区奈多、長野県南安曇郡豊科町、長野県上田市で採集した個体である。供試したカイコは九州大学遺伝子資源開発研究センター保存の系統である。

結果と考察 1999年春、福岡県宗像郡玄海町江口で採集したクワコ雌個体に九州大学農学部遺伝子資源開発研究センター保存の $u12$ 系統のカイコ雄個体を交配した F_1 を飼育したところ、7頭の蛹個体を得た。このうち雄4個体では12日から14日の蛹期間の後、羽化したのに対し、雌3個体の蛹期間は54日、64日、76日と長期化した。これ以前の観察においても1992年春長野県上田市由来のクワコ雌個体に九州大学保存の $r501$ 系統の雄個体を交配した F_1 を飼育し、雄個体では12日から16日で羽化したのに対し、雌個体では21日から29日と蛹期間が長期化する同様な事例を確認していた。クワコを雄、カイコを雌とした逆の交配形式ではこのような現象は認めていない。今回確認したクワコとカイコとの交雑 F_1 の蛹期間

が延長する事例は小林(1985, 1986)も報告しており、蛹期間を長期に持つ個体の選抜が可能であると述べている。そこで、カイコにこの性質を導入する目的で $u12$ 系統のカイコ雄個体と福岡県宗像郡玄海町江口で採集したクワコ雌個体との F_1 で得られた64日の蛹期間の後羽化した雌個体にカイコ雄を戻し交配し、その $B_1 F_1$ において蛹期間の長さを雌雄別に調べたところ、93頭の雌個体は11日~16日、90頭の雄個体では11日から19日であった。交配親のカイコ雄に比べると蛹期間は延長したが F_1 で認められたような長期には至らなかった。また、カイコとの F_1 では雌個体のみで蛹が長期化したことからY染色体上に蛹期を調節する遺伝子が想定されたが、 $B_1 F_1$ 世代では雌雄による違いはなくなり、この可能性は否定された。今試験では F_1 で見られた長期間の蛹個体は $B_1 F_1$ 世代では確認されなかった。この原因としてはクワコに由来すると判断される蛹期間を調節する遺伝子が複数で、しかも劣性遺伝子であるために数世代の選抜が必要であると考えられるので、現在後代の調査を進めている。

要結 クワコ雌とカイコ雄とを交配した F_1 世代では雌個体のみで蛹期間の長期化が起きることを観察した。

文 献

- 1) 小林 淳 (1984) : 日蚕講要, 55, 47.
- 2) 小林 淳 (1985) : 日蚕講要, 56, 58.
- 3) 諸星静次郎 (1985) : 蚕の発育生理 (第2版), 274pp., 学会出版センター.

NEWS

放射線照射による納豆樹脂の合成とその利用

原 敏夫*

1. はじめに

21世紀のキーワードは「食糧」と「環境」。1990年代に入り、世界はこれまでとはまったく違った時代を迎えている。着実に増大してきた食糧生産に陰りが差しはじめたことに多くの人々が気付きました。地球の自然システムが限界に達し、異常気象、森林伐採などの環境破壊による砂漠化、耕地の表土流出などによる生産性の低下、そして収量改善のための農業技術に限界が見えてきた。一方、第三世界を中心に世界の人口は毎年9,000万人のペースで増大し、西暦2050年には世界人口は130億人に達すると推定されているが、人口抑制プログラムが成功すれば80億人、失敗すれば140億人に達するであろう。人口増加は食糧不足をもたらすであろうし、発展途上地域の人々は一層の貧困に拍車をかけ、その結果一段と砂漠化が進むであろう。食糧不足と人口爆発の挟み撃ちにあって、地球は重大局面を迎えようとしている。

地球陸地の約25%は砂漠、半砂漠といわれている。これらの広大な地球上に残された未利用地を緑化することは地球環境保全からみて有益な手段の一つと考えられる。水を給水できれば砂漠の強烈な太陽光は植物の生育を促し、植物の葉からの二酸化炭素の吸収は、光合成作用による二酸化炭素の低減へつながる。これまで、1988年から1992年にかけてエジプトを中心に砂漠緑化計画「グリーンアース計画」が実施され、その中で高吸水性

樹脂を利用した節水型営農システムの開発が行われた¹⁾。保水持続能力、電解質溶液での吸水能力に優れた高吸水性樹脂の開発が不可欠である。

納豆の糸に放射線を照射してできる架橋体は自重の5,000倍の水を吸収できる(図-1)²⁾。しかもこの架橋体は、土中の微生物により炭酸ガスと水に分解される地球上にやさしい「ニュー・グリーンプラスチック」といえる。本稿では、納豆の糸から放射線照射による架橋体の合成とその特性を生かした環境リサイクルシステム³⁾について述べる。



図-1 納豆の糸の成分、ポリグルタミン酸に放射線照射して合成された納豆樹脂(左手前)と吸水後のハイドロゲル(ビーカーの中)

*九州大学農学部 Toshio Hara



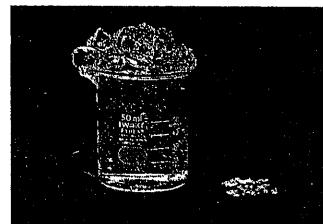
解説

エポキシ樹脂による納豆の糸から吸水性樹脂の合成

原 敏夫

Toshio HARA

納豆の糸からエポキシ樹脂を利用して吸水性樹脂を合成した。納豆の糸は再生産可能なバイオポリマーで、生分解性のポリアミノ酸 (γ -ポリグルタミン酸、PGAと略記) である。エポキシ樹脂により合成された PGA 架橋体は自重の 1,200 倍という非常に高い吸水能力を持ち、かつ、塩溶液に対する吸水性能も市販の高吸水性樹脂を上まわった。将来、砂漠の緑化など吸水性樹脂の用途はさらに広がることが予想される。



カット：PGA 架橋体（右）と吸水して膨潤した PGA ハイドロゲル（左ビーカーの中）

1. はじめに

高吸水性樹脂はイオン性基を持つ電解質ポリマーをわずかに架橋したもので、自重の数百倍から 1,000 倍という高い吸水性を持つだけでなく、水を吸収して膨潤した後に圧力をかけても離水しない保水性をもあわせ持つ材料である。1960 年代に米国で開発された機能性高分子材料の一つで、わが国では 1978 年に本格的に工業化され、生理用の衛生材に利用されたのが始まりで、現在、紙オムツの他、医療、食品、園芸、建築など多くの分野で利用されている。このような高吸水性樹脂のうち、アクリル酸系の樹脂は自重の

1,000 倍の吸水能力を有し、安価であるため、広く用いられているが、生分解性がほとんどなく、地下水汚染など環境への影響が危惧されている。

納豆菌が生産する PGA はグルタミン酸が γ 結合し、重合度が 5,000 以上ある生分解性のポリアミノ酸である。PGA は 1937 年に

Bacillus anthracis の表面成分として Ivanovics ら¹⁾により発見され、Bovarnick²⁾により *B. subtilis* の培養液中に発酵生産物として蓄積されることが認められた。一方、わが国の伝統的発酵食品である納豆の粘質物中にも含まれることが明らかになり³⁾、現在では、表 1 に示すように *Bacillus* 属の数種類の

表 1 ポリグルタミン酸産菌とその特徴

| 生産菌 | 分子量 | グルタミン酸の構成比 | | 生産量 (g/リットル) |
|--|----------------------------|------------|--------|-----------------|
| | | D型 (%) | L型 (%) | |
| <i>B. subtilis</i> NRRL B-2612 | 2.0×10^4 | 48 | 52 | 10~14 |
| <i>B. subtilis</i> F-2-01 | 5.0×10^6 | 45 | 55 | 25~50 |
| <i>B. subtilis</i> var. <i>polyglutamicum</i> | 1.1×10^6 | 40 | 60 | 16~20 |
| <i>B. licheniformis</i> ATCC 9945A | $0.8 \sim 1.2 \times 10^6$ | 45~85 | 55~15 | 16~20 |
| <i>B. subtilis</i> (natto) | 2.1×10^6 | 80 | 20 | 2~4 |
| <i>B. anthracis</i> HN | $2.1 \sim 5.3 \times 10^4$ | 100 | 0 | 1~2 |

| | |
|----------|---------------------|
| FILE NO. | □□□ |
| CATEGORY | polymer engineering |
| THEME | apply |
| TYPE | material |
| OBJECT | fiber |

納豆で砂漠を救う男

ポリグルタミン酸

原敏夫 Toshio Hara (1949~)

九州大学農学部

<http://www.kyushu-u.ac.jp/>

現在、全陸地の4分の1も
の領域で渴きが広がってい
ると言われる。その瘦せた
大地に暮らす約9億人もの
人々が飢えに苦しんでいる。
こうした危機を救うための
打開策は、納豆だった。

原は九州出身で納豆を目
にしたことがほとんどなか
った。だが、ヨーロッパから
の女子留学生が師事してい
る教授が高分子を研究して
いることがきっかけとなっ
た。その教授は高分子の新
素材の開発に取り組んでお
り、研究の一環として、バク
テリアの一種である納豆に
ついて調べてくるように命
じられたと留学生は言うの
だ。原は外国の学者が納豆
に注目していたことについ
てショックを受けた。

じつのところ、現在におい
ても納豆の糸の成分につい
てくわしいことはわかって
いない。しかし、納豆の糸に
ポリグルミタン酸というア
ミノ酸の一種が含まれてい
ることだけはわかっていた。

そこで彼は、分析のため
に、納豆の糸を水 (H_2O) と
混ぜ、放射線を当ててみた。
放射線を当てると強力なエ
ネルギーで物質の分子がは
じき飛ばされる。その結果、
水素原子 (H) がはじき飛ば
された。そして、残されたか
つては水だったもの(OH)が、
水素を取り戻すためにポリ
グルタミン酸に近づき、その
水素を横取りしてしまった
のである。

当然、水素を奪われたポリ
グルタミン酸は、穴のあいた



納豆と博多、それに水。この3つの言葉につながりを見つけるのはちょうど難しい。納豆といえば茨城県の水戸というのが相場である。まして納豆と水の関係といわれても、びんとこないところがこれらの言葉は強力に結びついている。九州大学農学部助教授、原敏夫さんがそのつなぎ役である。

原さんは納豆から新しい素材、納豆樹脂を開発した研究者である。それも納豆の糸、あの「ねばねば」から作った樹脂なのである。

大事そうに箱の中から取り出したのは、黒っぽい塊である。

「納豆樹脂を腐葉土の中に一週間ほど入れて、乾燥させたものです」

ちょうど土のような感じである。手でもめばすぐにバラバラになってしまふ。土の中に入る前の納豆樹脂は厚さ1~2mm程度、数枚角のブレート。それが膨れ上がり、ぱるぱるになってしまったのである。そう、納豆樹脂は生分解性の素材なのである。

生分解性プラスチックの専門家ならこの結果に驚くはずである。生分解性プラスチックはポリ乳酸やでんぶんを原料としている。自然界に放置しておけば、微生物が分解する素材である。しかしその分解スピードは、原料などによるが半年程度はかかるといわれる。ところが納豆樹脂はたった10日間程度でぱるぱるに分解してしまふ。それは驚異というほかはないのである。

納豆と博多、それに水。この3つの

ある。

なぜ、納豆樹脂はこれほど分解が早いのか。ここで水が関係してくる。

「分解するには微生物が必要なんですが、微生物が働くには水分が必要なんです。その水分を納豆樹脂は大量に吸収する。土の水分を吸い込むから、微生物が驚異的に分解してくれる」

吸水性が劇的に高く 1滴で5mlの水を吸う

納豆樹脂の最大の特徴のひとつは、吸水性が劇的に高いことなのである。おむづや生理用品などに使われている高吸

水性ポリマーの吸水数は、自分の重さの1000倍くらい。それに対して納豆樹脂は最高で自重の4000倍から5000倍の水を吸い込む。1gの

納豆樹脂があれば最高5mlの水をた

めこむことができる。

ここまで説明すると、納豆樹脂の特性が見えてくる。吸水性が非常に高いこと。生分解できること。しかも成型できるのである。納豆樹脂はほかの

吸水性ポリマーと異なり、形にできる

素材なのである。

「安全であるといふことです」

原さんはこの点を非常に強調した。

このゲルタミン酸に納豆菌を投入す

ると、納豆菌が身体の中でポリグルタ

ミン酸に変えてしまう。これが納豆のねばねばの成分である。ポリグルタミン酸に電子線を数秒間、照射すると

納豆樹脂ができる。見た目は白い粉である。これに熱を加えて成型

降は中小企業も対象になるし、P.E.T以外のプラスチックも回収、再商品化の義務が生じる。納豆樹脂なら、回収して土の中に入れておけば、分解できるのだから、十分、新しい容器の選択肢になる。来年の正月には納豆樹脂を使った容器が福岡の地場企業から公表される予定である。

しかし長所は時として欠点にもなる。吸水率が高いということは、水分が多い用途ではすぐに崩壊してしまう、使い勝手が悪くなることになる。だが原さん、流してことはない。

「ですから、100%納豆樹脂を使わなくていいんです。ポリ乳酸を使つた生分解性プラスチックに納豆樹脂を混ぜ込んでやる。すると崩壊のスピードがいろいろコントロールできます」

このことは生分解性プラスチックの業界に大きな影響を与えるだろう。

納豆樹脂の製造方法はほぼ確立している。原料はグルタミン酸である。

あの「味の素」と同じ原料、つまり食べられる原料なのである。もとい、えは

「安全であるといふことです」

原さんはこの点を非常に強調した。

このゲルタミン酸に納豆菌を投入す

ると、納豆菌が身体の中でポリグルタ

ミン酸に変えてしまう。これが納豆の

ねばねばの成分である。ポリグルタミン酸に電子線を数秒間、照射すると

納豆、博多、水のつながりから 生まれた新樹脂素材

日本独特の食である「納豆」から新しい素材、納豆樹脂が生まれた。その特徴は吸水性が非常に高く、生分解ができ、しかも成型できるという優れもの。

開発したのは九州大学の原助教授。量産ラインの原型は既にできあがっている。

砂漠の緑化を最終目標としているが、その応用のアイデアは多様に広がる。

しかし、その用途開発の条件は「人間が口にできるもの」、これが最優先である。

放射線を利用した納豆の糸から吸水性樹脂の合成

農学部附属遺伝子資源開発研究センター
微生物遺伝子開発分野 原 敏夫

納豆の糸に放射線（コバルト60、ガンマ線）を照射して生成する架橋体ポリマー（図1左手前）。水を吸収し、膨潤した透明なハイドロゲル（図1ビーカーの中）。保水能力は抜群。納豆のネバネバたった1グラムで5 ℥の水が蓄えられる。市販の紙オムツや生理用品の5倍の吸水力。ガンマ線照射量と納豆の糸の濃度の組合せでいろいろな性状を持つ高吸水性樹脂が得られる。放射線照射で適度の橋かけを受け、納豆の糸の間で三次元構造を取り、できたすき間に水分子が閉じ込められて吸水力が生じる。

本研究成果を基に新エネルギー・産業技術総合開発機構の平成8年度事業事前調査として「グリーン・リサイクルシステム」研究会が設立された。

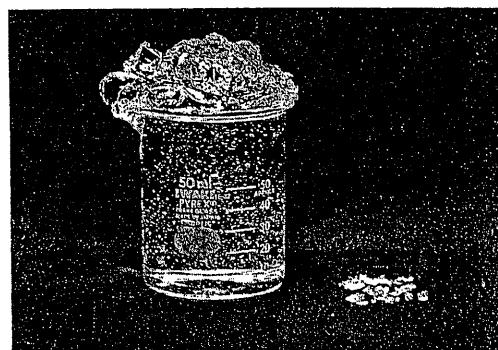


図1 納豆の糸の成分、ポリグルタミン酸に放射線を照射して合成した納豆樹脂（右）と吸水後、膨潤したハイドロゲル（左）

NHK総合テレビ「おはよう日本」平成9年1月26日放送
第3回地球温暖化防止京都会議・外務省広報ビデオ「The Challenge of Global Warning -The Japanese Way 1997-」砂漠緑化技術として5分間出演



砂漠の緑化

—高分子を利用した緑化—

原 敏夫

九州大学大学院農学研究院

納豆の糸に放射線を照射して合成できる PGA 架橋体は自重の 5,000 倍の水を吸収する。しかも土中の微生物により炭酸ガスと水に分解されるグリーン・プラスチックである。このエコ対応型生分解性吸水樹脂を活用したヘドロ・シードベレットと、砂漠にあり余るほど豊富にある太陽エネルギーを利用して新規節水農業が砂漠でできないだろうか。

1. はじめに

21世紀のキーワードは「食糧」と「環境」。1990年代にはいり、世界はこれまでとはまったく違った時代を迎えた。着実に増大してきた食糧生産に陰りが差しはじめたことに多くの人々が気づきだした。地球の自然システムが限界に達し、環境破壊がもたらす耕地の表土流失などによる生産性の低下、そして収穫改善のための農業技術に限界が見えてきた。一方、世界の人口は毎年 9,000 万人のペースで増大している。第三世界で起こる人口爆発と先進国がひき起こす環境破壊は運命共同体「地球号」の命運に多大の影響をもたらす。西暦 2050 年には地球上の人口は 100 億人を超え、食糧、とくにタンパク質の需要をどう賄うかメドはない。食糧不足と人口爆発の挟み撃ちにあって、地球は重大局面を迎えようとしている。

砂漠化による土地荒廃はきわめて明確な形で地球上に具現化する最終結末の姿である。砂漠化は十年オーダー以下のきわめて短い時間スケールで進行しており、過放牧、地下水の汲み揚げ、あるいは開発・都市化の波などが生態系の許容量を大きく超えていることによる。砂漠化による生物生産性の低下は多くの人々から食糧を奪うことを意味し、その結果、深刻な食糧不足をもたらすことになる。このことは、食糧不足からもたらされる「飢餓」とそれによる人類存続の危機を意味する。したがって、このまま状況の悪化を放置することはできない。また、乾燥地の農地を

自然利用体系から人為的に管理された利用体系へと変換できれば、食糧増産の基盤整備につながる。

1988 年から 1992 年にかけてエジプトを舞台に農業用保水剤を利用した節水型営農システムの開発・実証プロジェクト、「グリーンアース計画」が展開され、保水剤の乾燥地農業への利用がきわめて有望であることが示唆された^{1,2)}。しかし、アクリル酸系などの高吸水性合成高分子は生分解性がほとんどなく、環境汚染などの 2 次的な環境問題をひき起こす懸念が残る。近年の地球環境保全の高まりの中、平成 9 年 12 月に京都で開催された地球温暖化防止京都会議以来、「砂漠緑化」が炭酸ガス排出権と連動した経済戦略の一環として考えられるようになった。

納豆の糸(ポリグルタミン酸、以下 PGA と略)に放射線を照射して合成できる PGA 架橋体は自重の 5,000 倍の水を吸収できる。しかも土中の微生物により炭酸ガスと水に分解される地球上にやさしいニュー「グリーン・プラ」である。砂漠には豊富な太陽エネルギーがあり余るほどある。この太陽エネルギーと生分解性吸水樹脂を活用した新規節水農業が砂漠でできないだろうか。本稿では、この PGA 架橋体を活用して砂漠緑化と食糧増産に役立てる「グリーン・リサイクルシステム」³⁾について紹介する。

2. 納豆の糸から生分解性吸水性樹脂の合成

納豆菌が生産する PGA はグルタミン酸が γ 結合し、重合度が 5,000 以上ある生分解性ポリアミノ酸である。自然界に存在するアミノ酸は L 型であるが、納豆の糸の中には D 型のグルタミン酸が含まれており、納豆の熟成につれて D 型グルタミン酸の割合が 80% 以上に達する。PGA は 1937 年に *Bacillus anthracis* の夾膜成分として Ivano-vics ら⁴⁾により発見され、Bovarnick⁵⁾により *B. subtilis* の培養液中に発酵生産物として蓄積されることが認められ



Toshio HARA 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 (812-
8581 福岡市箱崎 6-10-1)・助教授、農博
1976 年九州大学大学院農学研究科修士課程
修了。専門は微生物遺伝子工学。(趣味)釣り
*Desert Greening —Greening by Utilization
of Microbial Macromolecules--*

総 説

遺伝子資源として、乳酸菌とその寄生因子の 特殊性と有用性を展望する

土居克実, 緒方靖哉*

九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター
微生物遺伝子開発分野

グラム陽性で低G+C含量DNAの乳酸菌は*Lactococcus*属, *Lactobacillus*属, *Streptococcus*属, *Enterococcus*属など多数の属に分類される。その遺伝子資源としての特殊性と有用性は、染色体の他に、寄生因子であるバクテリオファージ、プラスミド、挿入配列、トランスポゾンなどにも求めることができる。とりわけ、*Lactococcus lactis* IL1403株の全ゲノムシークエンスプロジェクトの完成によって、乳酸菌の未利用や潜在性遺伝子の利用・開発が一層活発になるであろう。また、ファージやプラスミド上にも有用遺伝子が座乗しており、特に、乳製品製造やサイレージ調製時に深刻な問題となるファージ汚染の対策のために、様々なファージ防御に関する遺伝子がファージとプラスミド上から同定され、そのいくつかは特許化されている。本稿では、乳酸菌の遺伝子資源のいくつかについて紹介し、次世紀へ向けての利用・開発を展望する。

A View of Lactic Acid Bacteria and Their Extrachromosomal Elements as Genetic Resources: Specificities and Possibilities

Katsumi DOI, Seiya OGATA*

Microbial Genetic Division, Institute of Genetic Resources,
Faculty of Agriculture, Kyushu University

The members of lactic acid bacteria (LAB) are gram-positive bacteria which have low G+C DNA in their genomes. Genus *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* belong to LAB and have been well characterized by microbiological and molecular biological studies. Their chromosomes and their genetic elements such as bacteriophages, plasmids, insertion sequences and transposons can be used as genetic resources of LAB. The completion of whole genome sequence of *Lactococcus lactis* strain IL1403 will become a major and important step toward opening new possibilities for the development of unused or unknown genes located on its chromosome and those of other related LAB. Many useful genes have also been found on bacteriophages and plasmids: Especially, many genes for resistance against bacteriophages, of which contamination result in serious damage to the dairy and silage-making fermentations, have been identified. Some of these genetic information and application have been granted patents for phage defense. Here, we introduce some genetic resources of LAB, and consider the prospect of their application, possibilities, importance and usefulness for the next century.

Key Words : lactic acid bacteria, genetic resources, bacteriophage, plasmid, application

納豆の糸から納豆樹脂の開発とその利用

九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター 原 敏夫

[研究概要]

納豆の糸がネバネバするのは γ -ポリグルタミン酸 (PGA) というポリアミノ酸に起因する。PGAは、5,000以上のグルタミン酸同士が γ 結合した納豆菌が产生するバイオポリマーで、現在、納豆菌ガムの名前で食品添加物として増粘剤などに使用されている。納豆菌が产生するPGAにガンマ線を照射するとPGA分子間で架橋反応が起こり、吸水性、生分解性、並びに可塑性を特徴とする納豆樹脂が得られる（図1）。今回、納豆樹脂の特性及びその利用例について紹介する。

納豆樹脂の合成はガンマ線の照射量に依存し、納豆の糸の成分であるPGA濃度10%、ガンマ線照射量20 kGyのとき5,000倍の吸水率に達した（図2）。また、照射線量の増加に伴い吸水率は減少し、100 kGy以上では200倍程度で一定になった。吸水率の減少は架橋密度の増加により網目構造が密になるためで、そのためゲル強度は増加し、1%寒天とほぼ同じゲル強度であった。納豆樹脂の生成メカニズムは、ガンマ線照射により水分子から解裂、生成したOHラジカルがPGA分子に移動し、このPGA分子間或いは分子内でランダムに架橋が形成されることに起因する。吸水力はグルタミン酸の α 位のカルボキシル基の数とPGA分子量に依存した。納豆樹脂は、アクリル酸系高吸水性樹脂同様、塩濃度の影響を大きく受けた。しかし、生理食塩水では蒸留水の二十分の一以下の吸水率になる（自重の160倍）が、塩溶液に対する吸水性能も市販の高吸水性樹脂を大きく上回った。

納豆樹脂は、100%天然素材からなる生分解性、吸水性及び可塑性を特徴とするきわめて新規性の高いエコマテリアルである。食品への応用を目指し、水-アルコール系での納豆樹脂の膨潤挙動を検討した。水100%ではPGAのカルボキシル基がNa塩を生じるために水との高い水和力を有し、高い膨潤度を示したがアルコール系溶媒のモル分圧が高くなるとともに膨潤度は減少し、アルコール活量が0.5付近で膨潤度は急激に低下した。これは、納豆樹脂と水との水和力よりも水とアルコール系溶媒との水和力が強くなることに起因すると考えた。PGAのソルビリティーパラメーター (Sp値) をPGAの凝集エネルギーに基づき

$\delta = (\sum \Delta e_i / \sum \Delta v_i)^{1/2}$ から算出すると14.6 (cal/cm³)^{1/2} であった。ポリマーと溶媒間の分子間力から算出した納豆樹脂の膨潤度は、アルコール系溶媒のSp値がPGAのSp値に近いほど、高い膨潤度を示した。

21世紀に向けた地球環境対策が急務となり、経済発展と環境保全の両立が産業界の課題となっている。微生物の生産活動を利用した省エネルギープロセスで生産できる本技術シーズを基盤とする資源循環型環境ビジネスの創出を目指している。将来、「納豆樹脂」を利用した「グリーン・リサイクルシステム」構想を具現化し、「砂漠緑化」事業へと昇華させねばならない。



図1 納豆樹脂（右）とハイドロゲル（左）

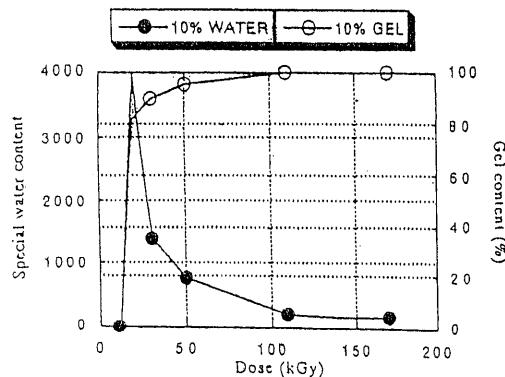


図2 照射線量の効果

ポリグルタミン酸架橋高分子の保水性ゲル

九州大学農学部遺伝子資源開発研究センター 原 敏夫

1. はじめに

納豆の糸がネバネバするのは γ -ポリグルタミン酸(PGA)というポリアミノ酸に起因する。納豆はわれわれ日本人にとっては馴染みの食べ物にも拘わらず、納豆の糸の構造、生合成経路、及びその機能はまだ明らかにされていない。納豆菌が產生するPGA水溶液にガンマ線を照射するとPGA分子間で架橋反応が起こり、吸水性、生分解性、可塑性を特徴とするPGA架橋体が得られる。今回、PGA架橋体の合成条件及びその保水性ゲルとしての特性について述べる。

2. PGA生産菌

納豆菌が產生するPGAはグルタミン酸が γ 結合し、重合度が5,000以上ある生分解性のポリアミノ酸である。PGAは1937年に*Bacillus anthracis*の表面膜成分としてIvanovicsらにより発見され、Bovarnickにより*B. subtilis*の培養液中に発酵生産物として蓄積されることが認められた。一方、わが国の伝統的発酵食品である納豆の粘質物中にも含まれることが明らかとなり、現在では、表1に示すように*Bacillus*属の数種類の微生物がPGAを生産することが知られている。現在、PGAは納豆菌ガムの名前で食品添加物として増粘剤などに使用されている。

表1 ポリグルタミン酸生産菌とその特徴

| PGA生産菌 | 分子量 | グルタミン酸の構成比 | | 生産量 (g/リットル) |
|--|----------------------------|------------|-------|-----------------|
| | | D型(%) | L型(%) | |
| <i>B. subtilis</i> NRRL B-2612 | 2.0×10^4 | 48 | 52 | 10~14 |
| <i>B. subtilis</i> F-2-01 | 5.0×10^6 | 45 | 55 | 25~50 |
| <i>B. subtilis</i> var. <i>polyglutamicum</i> | 1.1×10^6 | 40 | 60 | 16~20 |
| <i>B. licheniformis</i> ATCC 9945A | $0.8 \sim 1.2 \times 10^6$ | 45~85 | 55~15 | 16~20 |
| <i>B. subtilis</i> (natto) | 2.1×10^6 | 80 | 20 | 2~4 |
| <i>B. anthracis</i> HN | $2.1 \sim 5.3 \times 10^4$ | 100 | 0 | 1~2 |

納豆の糸から生分解性吸水性樹脂の開発

(九州大学農学部) 原 敏夫

Tel 092-642-3054 Fax 092-642-3054

1.はじめに

高吸水性樹脂はイオン性基を持つ電解質ポリマーをわずかに架橋したもので、自重の数百倍から1,000倍という高い吸水性と、水を吸収して膨潤したヒドロゲルは圧力をかけても離水しない保水性を持つ材料である。高吸水性樹脂は、1960年代に米国で開発された機能性高分子材料の一つで、わが国では1978年に本格的に工業化され、生理用の衛生材に利用されたのが始まりで、現在、紙オムツの他、医療、食品、園芸、建築など多くの分野で利用されている。このような高吸水性樹脂の中、アクリル酸系の樹脂は自重の1,000倍の吸水能力を有し、安価であるため、広く用いられているが、生分解性がほとんどなく、地下水汚染など環境への影響が危惧されている。

納豆菌が生産する γ -ポリグルタミン酸(PGA)はグルタミン酸が γ 結合し、重合度が5,000以上ある生分解性のポリアミノ酸である。PGAは1937年に*Bacillus anthracis*の表面膜成分としてIvanovicsら¹⁾により発見され、Bovarnick²⁾により*B. subtilis*の培養液中に発酵生産物として蓄積されることが認められた。一方、わが国の伝統的発酵食品である納豆の粘質物中にも含まれることが明らかになり³⁾、現在では、*Bacillus*属の数種類の微生物がPGAを生産することが知られている(表1)。PGAは納豆の糸の主成分で、納豆と一緒に摂取されており、安全性はきわめて高く、現在、PGAは納豆菌ガムの名前で食品添加物として増粘剤などに使用されている。このPGA水溶液に放射線(γ 線)を照射し、PGA分子間で架橋反応を起こすことにより、PGA架橋体が合成できる⁴⁾。このPGA架橋体は自重の5,000倍もの水を吸収し⁵⁾、生分解性を有するため、新たな機能性素材としての応用が期待されている⁶⁾。しかし、 γ 線照射によるPGA架橋体の合成コストは高く、実用化に向け γ 線照射に替わる架橋方法を開発し、コスト低減を図る必要がある。ここでは、PGA架橋体の量産化を目指し、放射線架橋体の合成とエポキシ樹脂による水系でのPGA架橋体の合成と得られた架橋体の特性について紹介する。

表1 PGA生産菌とその特徴

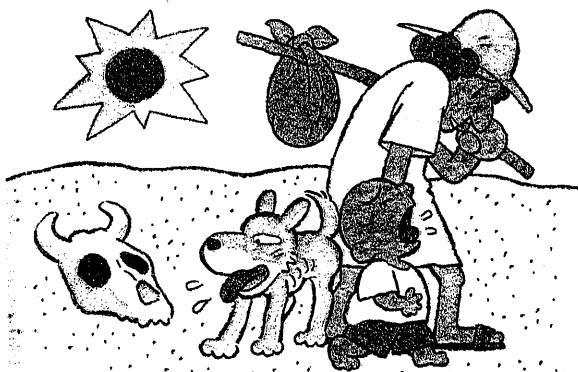
| PGA生産菌 | 分子量 | グルタミン酸の構成比 (%) | | 生産量 (g/リットル) |
|--|-------------------------------|----------------|-------|-----------------|
| | | D型 | L型 | |
| <i>B. subtilis</i> NRRLB-2612 | 2.0×10^4 | 48 | 52 | 10~14 |
| <i>B. subtilis</i> F-2-01 | 5.0×10^6 | 45 | 55 | 25~50 |
| <i>B. subtilis</i> var. <i>polyglutamicum</i> | 1.1×10^6 | 40 | 60 | 16~20 |
| <i>B. licheniformis</i> ATCC 9945A | $0.8 \sim 1.2 \times 10^6$ | 45~85 | 55~15 | 16~20 |
| <i>B. subtilis</i> (<i>natto</i>) | 2.1×10^6 | 80 | 20 | 2~4 |
| <i>B. anthracis</i> HN | $2.1 \sim 1.25.3 \times 10^4$ | 100 | 0 | 1~2 |



つまり、植物の育たない土地が地球上にどんどん増え、その結果、飢えに苦しむ人も増えていると言うわけなんだ。もしも、砂漠で作物を作ることができれば、多くの人を救うことができるのに…

水のない砂漠で作物を育てる！
ナント、この難問を解決する技術
が誕生した。ヒントは納豆。あの
ネバネバに秘密が隠されている。

納豆で砂漠に植物を
育てる！ そんな夢
のような技術を開発
した原敏夫先生
(九州大学助教授)



・協力=九州大学助教授 原敏夫 写真=O P O 学研写真部
絵=下柄棚正之 文=坂本久美



かず^{上も下も}高かつた高血圧が を毎日食べたらすっかり治った

九州大学農学部・遺伝子資源開発研究センター助教授

はら としお
原 敏夫さん



原敏夫さん

そうした食生活を実践している中の一人が、九州大学農学部・遺伝子資源開発センター助教授の原敏夫さん（五十歳）です。原さんは「究極の健康食品」といわれる納豆を食べて、健康を維持していくまです。

塩辛いものが大好きでした。血圧が上がるのも無理はないですね。そのころの原さんは、身長が一六六センチなのに對して、体重は七四キロと太りぎみ。たまに運動をするときも息が切れ、胸が苦しくなつたり、じっとしていても汗をかいたり。

とへの抵抗感も強く、すぐに
てしまつたそうです。そして
り果てた原さんが五年ほど前
食べはじめたのが納豆でした
わざか一年で
正常値に戻つた

*と太りぎみ。たまに運動をするときと息が切れて胸が苦しくなったり、じつとしていても汗をかいなりするといふことがありました。

原さんは担当の医師から、適度な運動と減食を心がけ、また塩分の多い食事を控えるよういわれました。原さんはその言葉どおりに、朝の通勤時間を利用して毎日三〇分以上歩くことのほか、我慢できる程度で食事の量を減らすこと

納豆には、血圧を下げる非常に優れた効果があるのです。私たちの体には、レニン・アンジオテンシン系という、血圧を調節するくみが備わっています。簡単に説明すると、まず腎臓や肝臓のたらんばく質や酵素(体内的化学反応を助けて活発にする成分)からアンジオ

わずか一年で
正常値に戻った

とを実行しました。すると、一年後には体重が一キロほど減つて、小便スマートになつたそうです。ところが、肝心の血圧はいつも下がる気配がありません。それどころか、年を追うごとに動悸・めまい・体のだるさなどの自觉症状が出たり、夜中に何度も起りました。医師のすすめに従つてしましました。降圧剤も飲んでみましたが、十分な効きめがないうえ、常用するとのへの抵抗感も強く、すぐにやめてしまつたそうです。そして、困り果てた原さんが五年ほど前から食べはじめたのが納豆でした。

減量しても血圧が
下がらず

の職場の健康診断で、血圧が高いことを指摘されたのです。

とを実行しました。すると、一年後には体重が一キロほど減つて、小

隠れ肥満の妙薬「納豆」は ビタミンB₂が豊富で脂肪を よく燃やし美肌もつくる

九州大学助教授
原 おとしこじら

● 脂肪を減らす成分が 豊富な納豆

無理なダイエットをくり返したために、体重は減つても隠れ肥満化した女性が増えています。食べる量を極端に減らす不健康なダイエットを続けたことが原因で、筋肉ばかりがやせ細り、脂肪はそのまま、体脂肪率(体重に占める体脂肪の量)はむしろ上昇してしまいます。苦しい食事制限の反動で、つい食べすぎてしまふと、脂肪ばかりが増え、体脂肪率はさらによくなり、本格的な肥満体になるのです。

隠れ肥満化した女性は体脂肪率が高いだけでなく、肌はカサカサし、体は冷え、生理も乱れるなど体調が悪く、精神的にも不安定な場合が少なくありません。食事を制限するだけのダイエットは、減量に効果がないだけでなく、心身の健康に多大な悪影響を

与えます。健康的に減量するには、糖質を少し減らし、たんぱく質やビタミンを十分とり、適度な運動をするなどの生活習慣の改善が必要です。そうした健康的な生

活習慣の中で、体脂肪を減らして肥満を予防・解消するため役立っていたのが納豆です。

米国では中高年になると脂肪の塊のような肥満者が続出し、肥満に伴う心臓病死の増加が社会問題化しました。心臓病のいちはんの原因は肥満で、ズボンのベルトの穴が一つ増えれば寿命は年縮むといわれるほどです。米国における国民病ともいえる肥満対策の切り札として、米国政府が注目したのが大豆でした。

良質の大豆たんぱく質を豊富に含む大豆は、肥満の予防に効果的と考えられたのです。そこで、一九七一年、学校で使うひき肉に、三〇%まで大豆たんぱく質を混入することが義務づけられました。一〇年後には、軍隊でもひき肉の

一〇%まで大豆たんぱく質を入れることが指示されました。大豆たんぱく質によって、動物性たんぱく質のとりすぎを防ぎ、子供や若者の体質を改善する試みにいち早く取り組んだのです。

米国政府が、国民の肥満や心臓病を防ぐための手立てを研究するさいの手本としたのは、実はわが国の食生活でした。日本人は肥満者も心臓病死も少ないのに、世界一の長寿です。その秘密はどうにあるのか、熱心に研究した結果、日本型食生活(米・豆類・野菜・魚をよくとり、肉・砂糖・脂肪はあまりとらない食生活)が長寿をもたらしていることが解明され、中でも大豆が注目されたのです。

大豆食品の中でも、隠れ肥満の解消と美肌に効果を現すのが、納豆です。納豆には、リンを含んだ脂質のレンチン、波み成分のサボニン、ビタミンB₂など、脂肪を減らす有効成分が豊富に含まれています。

● 納豆を常食するこ 美肌になる

いつたん体に蓄えられた脂肪は、なかなか簡単に減らせないものですが、納豆に含まれているレシチンは、過剰な脂肪を洗い流すように減らしてくれるのです。

レシチンは、過剰なコレステロールを取り除き、血管をきれいに掃除して肥満の解消を助け、高血圧や動脈硬化(血管の老化)の予防にも役立ちます。また、納豆に多いサボニンは血液中の中性脂肪を減らすほか、血管に付着したコレステロールなどの脂肪を洗い流してきれいに掃除し、動脈硬化を予防する働きを持っています。

ビタミンB₂は、脂肪の代謝(体内の化学反応)に欠かせない役割を果たしています。つまり、脂肪をエネルギーとして燃焼させるさい、ビタミンB₂がないと、その燃焼がうまくいかないのです。その脂肪を燃やすビタミンB₂が、大豆はもともと一〇〇g中に〇・三g(%)も含まれているのですが、納豆になると、なんと〇・五g(%)とほぼ倍増しています。

納豆に黒ゴマを加えた

「黒ゴマ納豆」は味がいじつで

●米国で認められた
納豆の薬効

米国食品医薬局(FDA)が、納豆や豆腐など大豆たんぱく質を豊富に含む大豆食品に、「心臓病の予防効果がある」と表示することを認めました。納豆の持つ機能性薬効が改めて確認され、今回の決定につながりました。米国での出来事ですが、まもなく日本にも波及して、さらに納豆の人気は高まるこことでしょう。

その納豆をおいしく食べやすくし、さらに薬効を高めるのが、薬味として、すつた黒ゴマと刻みネギを加えた「黒ゴマ納豆」です。古来、ゴマは仙人食といわれたほどで、小さな実の中に、驚異的な栄養がぎっしりとつまっています。黒ゴマにはたんぱく質、ミネラル(無機栄養素)が多量に含まれており、さらにはリノール酸やリノレン酸などの不飽和脂肪酸(脂肪を構成する成分の一つ)を豊富に含む

ため、浄血効果があり、血管の若返りや肌に潤いを与えるなどの効果があります。

●納豆と黒ゴマの両者に共通する優れた作用として注目されるのが、抗酸化作用です。抗酸化作用とは、体の中で有害な働きをする活性酸素(攻撃性の強い酸素)を取り除く働きです。活性酸素は、私たちが体の中に取り入れた酸素から作られる攻撃性に富む武器として働いています。

活性酸素は私たちの体を構成している細胞やDNA(遺伝子の本体)を傷つけ、いろいろな酵素の働きを抑えたりします。これが老人性痴呆(アルツハイマー病)、ガン、動脈硬化(血管の老化)、糖尿病などの生活習慣病(成人病)と密接に関係していると考えられています。

しかし、年を取ったからといって、活性酸素のせい放題にさせておくことはありません。納豆そのもの中にSODが存在します。スーパーオキシドディスクターゼ(SOD)、カタラーゼ、ペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素(酵素とは、体内での化学反応を促進する物質が、活性酸素を解毒してくれるのです)、ところが、年を取るとそれらの働きが衰えてしまっています。そのため、体の中では活性

酸素がいろいろな悪さをするようになります。老化を早め、さまざまな病気を引き起こすのです。

原 お 敏夫

ボニンにも、強い抗酸化力のあることがわかつています。

ゴマも、強力な抗酸化成分を持っています。ゴマに含まれているリグナンという食物繊維は、強力な抗酸化物質なのです。ゴマリグナンにはセサミン、セサモリン、セサミノール、セサモール、セサモリノールの主に五種類があり、その中ではセサミンの量が最も多くなっています。ゴマは長期保存が可能な食品で、密閉容器で冷蔵保存すれば、粒のままなら一年、すりゴマでも二年はもつといわれていますが、これはゴマの強力な抗酸化作用のたまものです。

●黒ゴマ納豆は強力な抗酸化食品

| 黒ゴマ納豆の主な栄養成分 | | | | |
|--------------------|------|------|------|------|
| | 納豆 | ゴマ | ネギ | |
| たんぱく質 | (%) | 16.5 | 19.8 | 1.1 |
| 脂質 | (%) | 10.0 | 51.9 | 0.1 |
| カルシウム | (mg) | 90 | 1200 | 47 |
| 鉄 | (mg) | 3.3 | 9.6 | 0.6 |
| ビタミンA(カロチン) | (μg) | 0 | 17 | 150 |
| ビタミンA(A効力) | (IU) | 0 | 微量 | 85 |
| ビタミンE効力 | (mg) | 0.9 | 1.3 | 0.2 |
| ビタミンB ₁ | (mg) | 0.07 | 0.95 | 0.04 |
| ビタミンB ₂ | (mg) | 0.56 | 0.25 | 0.06 |
| ナイアシン | (mg) | 1.1 | 5.1 | 0.3 |
| ビタミンC | (mg) | 0 | 0 | 14 |
| 食物繊維 | (g) | 6.7 | 13.2 | 2.3 |

*100g当たり IU(国際単位) (『四訂食品成分表』より)

納豆は食物繊維や消化酵素も

大変多い天然の整腸剤で肥満を招く便秘の特効薬

● 納豆菌は多くの有効成分を作り出す

納豆には、大豆の栄養が丸ごと入っているうえに、納豆菌による発酵の過程で増加した有効成分も多く、納豆ならではの力が加わっています。生きた納豆菌が豊富な納豆は、腸内細菌のバランスを整え、便秘や下痢を防ぐ、整腸剤として活躍します。

私たちの腸の中には、100種類、100兆個のバクテリア（細菌）が住んでいるといわれます。その腸内細菌には善玉と悪玉があり、両者のバランスが私たちの健康に大きな影響を及ぼしています。善玉細菌のほうは、おなかの中でビタミンを合成したり、食べ物を分解したり、消化吸収の面で役立っています。

腸内の善玉細菌の中で、特に重要な役割を果たしているのが、ビフィズス菌です。赤ん坊のときは、腸内細菌に占めるビフィズス

菌の割合は九五%以上にも達していますが、成長するにしたがって減っていき、しだいに太腸菌やウエルシユ菌などの悪玉細菌が増えていますが、健康な人ほど腸内では善玉細菌が優勢なのです。

食事によって、腸内の善玉細菌の比率は増やすことができます。ビフィズス菌はオリゴ糖（糖類の一種）や食物繊維が好物で、これらを含む食品をとればビフィズス菌が増加することがわかつています。ナ豆には、ビフィズス菌が大好きなオリゴ糖や食物繊維が豊富に含まれています。食物繊維が納豆には六・七%含まれており、納豆の働きで食物繊維の一部がオリゴ糖に分解されています。

この納豆をとれば、納豆に含まれる食物繊維とオリゴ糖が腸内のビフィズス菌などの善玉細菌を多量に繁殖させ、腸内細菌のバランスが正常に保たれて、いつまでも若さと健康を維持できるようになります。納豆はおなかのガードマ

ンといえるでしょう。

食物繊維は、最近では大腸ガンや心筋梗塞（心臓の血管がつまる病気）を予防し、悪玉コレステロール（LDLコレステロール）を減少させ、動脈硬化（血管の老化）を防ぐこともわかつています。

納豆には、納豆菌が生み出す酵素（体内での化学反応を促進する物質）が無数につまっています。これらが消化を活性化し、納豆の食物繊維とともに、私たちの腸内をきれいにしてくれます。

● 納豆は食べる整腸剤

納豆菌は三〇分ごとに倍、倍と増加していく、一袋の納豆には一〇億個以上の生きた納豆菌があります。納豆菌は、みずからが生き抜くために、大豆に含まれる成分から自分に必要な栄養分を取り出しますが、そのさい、さまざまなお豆に含まれる糖とほかの成分が結合した物質があります。サボニン（「サボ」にはシャボン（泡）の意味があり、その言葉が示すとおり、サボニンは水と油のどちらにも溶けやすい、せっけんのような性質を持っています。

そのサボニンは、まるでせっけんのように、血管に付着したコレステロールなどの脂肪を洗い流して、動脈硬化を防ぐ働きがあります。サボニンは血管の中だけでな

するプロテアーゼ、でんぶんなどの糖質を分解してブドウ糖に変え、アミラーゼ、脂肪分をグリセリンと脂肪酸（脂質の主成分）に分解するリバーゼ、纖維質を糖に変え、ペクチナーゼなどがあることが知られています。

原 とし 敏夫

の環境対応商由

光
出

プラスチック廃棄物の低減、 砂漠の緑化に貢献する 「納豆プラスチック」の幅広い附加価値

納豆といえは、成人病の予防効果が認められ、いまや世界に知られる健康食品です。今度はその納豆のネバネバの糸に含まれる成分から生分解プラスチックが開発され、またまた注目を集めています。平成一年七月、新規事業推進室に発足した環境グループでは、現在、この納豆プラスチックの量産化と用途開発に取り組んでいます。

原料はある ウマミ調味料

生分解プラスチックとは、自然界に存在する生物により消化され、最終的に二酸化炭素と水に分解される可塑性樹脂のことです。プラスチッ

クの廃棄物問題を解決する手段として期待されている素材ですが、現在市場に出ている代表的な生分解プラスチックはポリ乳酸ですが、これらは土中に埋めて完全に分解されるまでに半年以上かかるかもしれません。ところが、この「納豆プラスチッ

ク」は、わずか一週間から一〇日で崩壊してしまう、まさに究極の生分解プラスチックなんですね」

新規事業推進室環境グループ・宮山哲夫さんは、従来品ヒ一味違う納豆プラスチックについて、こう語ります。

では、納豆プラスチックとはいってもどんなものなのか。その作り方から簡単に紹介しましょう。

原料となるのは納豆のネバネバの糸の部分。まず納豆をよくかきまぜて水に溶かし、糸の部分を取り除きます。これにアルコールを加え、水と繊維質を分離。この繊維質を精製して多糖類を取り除くと、白い粉末が抽出されます。これが蛋白質の一種「ポリグルタミン酸」です。

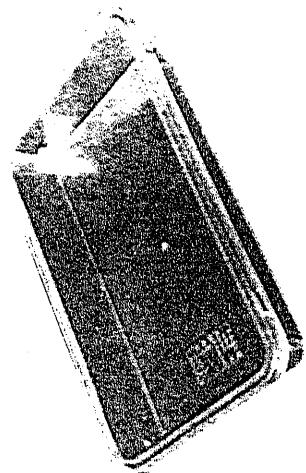
次に、この粉末を再び水に溶かし、放射線を短時間照射すると、寒

天状の物質となり、さらにこれを液結乾燥させると粉末状の納豆樹脂が得られます。

ここからは普通のプラスチックと同じように型押し成形が可能で、成形後は無色半透明の容器になります。ただし、これは実験室での作り方で、実際に量産化するには、原料に納豆を使っていたのではなくても間に合いません。そこで、実際にはウマミ調味料として知られるグルタミン酸を原料に、これに納豆菌を反応させて重合し、ポリグルタミン酸を製造しています。

辛子明太子の 容器を試作

納豆プラスチックの最大の特徴は、その吸水性にあります。現在、おもつや生理用品に使われている吸水性ポリマーは自らの重さに対して約一〇〇〇倍の吸水性を持つのに対し、納豆プラスチックは最高で四〇〇〇



納豆プラスチックを混入した生分解性食品容器の試作品

から五〇〇〇倍の吸水性があります。この吸水性があるから、土の中に埋めたとき、水を吸って表面積が飛躍的に拡大し、水と一緒に取り込まれた微生物によって分解されやすくなるという仕組みです。

吸水性がよいということは、容器などにしたとき使い勝手が悪い気もしますが、「表面をコートイングして、捨てるときに粉碎すれば、なんら問題ありません。また、ポリ乳酸を使った生分解プラスチックに納豆プラスチックを混ぜて使い、分解スピードをコントロールすることもできます」(前出・原助教授)とのことです。

実際に、プロジェクトの中では昨年七月、九州大学や辛子明太子の老舗「ふくや」と共同で、ポリ乳酸に納豆プラスチックを少量混入した生分解性の食品容器を開発しており、実機を用いた試作に成功しています。

現在の辛子明太子の容器はポリス



瞬時に味覚を判断する「味覚センサー」。さらなるコンパクト化が進む

新商品開発に役立てている。また最近では公設試験場で導入するところが目立ってきているそうだ。
都甲さんはこの味覚センサーに関して当面の課題が三つあるといふ。

この味覚センサーのさらなるコンパクト化と世界的規模で普及させるための啓蒙活動。そしてセンサーの果たす役割を分子生物学的に実証することだそうだ。

最後に将来的な野望をこう語ってくれた。「たしかに味の地図を作ることは可能になった。しかしこれは生物学的な味覚の解明とは別次元の話。今、取り組もうとしているのはカエルを使った味覚受容機構の解明です。これができたら確実にノーベル賞のですよ」。

納豆の「ネバネバ」から

驚異の新素材

九州大学農学部
原敏夫助教授

日本独特的食文化である「納豆」。

その納豆から新素材「納豆樹脂」を開発したのは九州大学農学部の原敏夫助教授である。

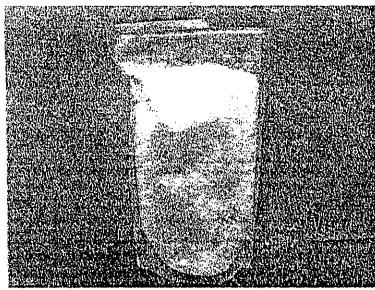
この新素材は納豆のあの「ネバネバ」の糸から作り出した樹脂。しかも、生分解性、吸水性、可塑性といふ三つの点で優れている今までない画期的なものだ。

原さんは、一昨年から地元の明太子を扱う食品メーカーと共に納豆

樹脂を使ったエコ対応型食品包装資材の研究・事業化を進めている。

ゴミのスリム化は二十一世紀の重要なテーマである。日本で一般廃棄物の約六割の容積を占める包装資材。その約四割はスーパーの食品トレイなどのいわゆる食品包装資材だ。

このゴミの問題を解決する次世代の食品包装資材として、ポリ乳酸やでんぶんを原料とする生分解性プラスチックに世界的な注目が集まっている。これは土の中などに埋め自然



無限の可能性を持つ納豆樹脂。写真はフリーズドライされたもの。手に取るとすぐに吸水しペトペトになる

界に放置しておけば、微生物が分解してくれる環境に優しい素材。しかし、その分解スピードは遅く、原料も、これが原さんが開発した納豆樹脂は、土の中に埋めると一週間前後で分解してしまう。これは驚異的なスピードだ。

なぜ可能なのか。ここで「吸水性」が関係してくる。微生物が分解するためには水分が必要となるからだ。納豆樹脂は自重の五千倍以上の水分を吸収できる素材。これはオム

マードなどに使われている高吸水性ポリマーの五倍以上の能力を持つ。納豆樹脂はその劇的な吸水性で土の中の水分を吸収するため、微生物の働きが活発になり分解スピードが早くなるというしくみだ。しかも、ほかの樹脂はその劇的な吸水性で土の中の水分を吸収するため、微生物の働きが活発になり分解スピードが早くなる

型、射出成型などが可能な可塑性素材である。

「この生分解性、吸水性、可塑性の形が食品包装資材なんです」。

しかし、吸水率が高いということは逆に水分が多い用途ではすぐに型崩れが起こり、使い勝手が悪いはずだ。しかし、原さんは動じない。

「納豆樹脂を百%使わなくても良いんです。納豆樹脂を使うことで生分解性のスピードを調節できるわけですから。例えばポリ乳酸を使つた生分解性プラスチックに混ぜ込めば、納豆樹脂が水分をポリ乳酸に水分を供給できますからね」。

なぜ納豆だつたのか? 原さんと納豆との出会いは三十年ほど前にさかのぼる。同大学研究室の助手であつたその当時、納豆を研究するために九大に来たオーストラリア人の留学生を手助けすることになった。

微生物が専門だった原さんは納豆のネバネバと納豆菌の関係を研究に取り掛かる。原さんは納豆のネバネバを決定する納豆菌のルーツを遺伝子レベルで特定し、ネバネバの構造も分析した。しかし、このどちらかというとアカデミックな研究に不満だった。

「納豆菌のリーフと納豆がなぜ良くなっているのか」という外堀を埋め

はじめに

文部省科学研究費補助金 基盤研究(C)(2)の課題研究「放線菌の DNA 転移に関する遺伝子発現制御機構の時間的・空間的解析」(研究課題番号 10660093) は、平成 10 年度、11 年度の 2 年間に行われた。本年 3 月、本研究を終了するにあたり、この間の研究成果をここにまとめて報告する。⁵⁾

放線菌(*Actinomycetes*)はグラム陽性の好気性土壌細菌であるが、カビ類にも匹敵するような複雑な形態分化(morphological differentiation)を行い、原核生物の中では最も発達した菌群であるとともに、抗生物質をはじめ、抗真菌剤、駆虫剤、免疫抑制剤などの多種多様な二次代謝産物を產生するような複雑な代謝分化(metabolic differentiation)を呈する産業上重要な菌群である¹⁾。なかでも *Streptomyces* 属放線菌は最も研究が進められており、*Streptomyces coelicolor* A3(2)、*S. lividans*、*S. griseus*、*S. ambofaciens* 等において様々な遺伝学的・分子生物学的研究が精力的に進められている²⁾。特に、英国の Sanger Centre では David A. Hopwood 博士を中心として *S. coelicolor* A3(2)のゲノムプロジェクト (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor/) が進められており、2001 年には 8Mb からなる染色体全塩基配列が決定される見込みである。

このような *Streptomyces* 属放線菌の分子生物学的研究は、*bld* や *whi* 遺伝子群を中心とした形態分化に関わる遺伝子群の構造・機能解析^{3), 4)}、A ファクターや VB (virginiae butanolide)などの γ -butyrolactone autoregulator の制御機構の解明^{5), 6)}、PKS (polyketide synthase)の解析と改変によるポリケタド抗生物質の分子設計・創薬技術の開発^{7), 8)}、プラスミド・ファージを中心とする染色体外遺伝因子の構造解析や複製・接合転移などの機構解明に焦点が向けられてきた^{9), 10)}。

上記の研究のうち、放線菌プラスミドに関する研究は、放線菌特有の”pock”形成現象の解明に端を発している¹¹⁾。特に *Streptomyces* 属放線菌では、*S. lividans* の pIJ101¹²⁾、*S. nigrifaciens* の pSN22¹³⁾、*S. ambofaciens* の pSAM2 などで研究が進んでおり¹⁴⁾、これらのプラスミドでは全塩基配列が決定され、各 ORF の機能解析が進んでいる。これらのプラスミドは全て接合伝達能を有しており、接合性プラスミド

4. 講演要旨

家蚕遺伝子開発分野

日本蚕糸学会大会（上田市）4月，1999

卵における体液のエステラーゼBesの存在とその起源

○大城戸利久・伴野 豊・藤井 博（九大農）

卵中に2本のエステラーゼが存在するが、これ以外に体液の主要エステラーゼBesと同じ移動度の位置に1本の活性帯を我々は見出している。そこで本研究では卵にBesが存在するかを調べる為に先ず、BesA(A型)及びBesO(O型)系統の卵のエステラーゼ成分を調べ、さらに胚発育におけるエステラーゼの変動を調べた。その結果A型で3本、O型で2本の活性帯が検出された。卵と体液を比較するとA、O型系統ともに卵特異的な活性帯が2本検出された。またA型系統でBesAが検出されたが、O型系統ではBesは検出されなかつた。この結果、卵中にもBesが存在することを確認した。胚発育過程において、A型系統ではBesAが産卵直後から浸酸後7日目まで検出されたが、O型系統ではどの時期にもBesは検出されなかつた。この結果からBesが卵や胚子の発育に関与することが考えられる。次に卵中のBesの由来を明らかにするために両系統間の相互交配を行った。その結果A型系統を雌にした場合は卵中にBesAが検出されたが、O型系統ではBesAは検出されなかつた。Bes^AはBes^Oに優性であることから、この結果卵中のBesの発現は母親の遺伝子に支配されることが判明した。

日本蚕糸学会大会（上田市）4月，1999

体液タンパク質からみたメキシコ・オアハカ種

○今田正人・伴野 豊・白尾 吏・中村 隆・日下部宜宏・河口 豊・古賀克己（九大農）

メキシコ、オアハカ州サンペドロカホーノスに継代されている蚕系統（オアハカ種）は400年程前にスペイン人によって導入されたカイコに起源を持つと考えられている。本系統は繭重1.01g、繭層重12.16cgであり、現行の蚕品種と比べ劣る他、紡錘形の繭、4眠蚕に3眠蚕が分離するなど通常の糸繭品種としての価値は低い。1化性、大型の卵サイズ（長径：1.57mm、短径：1.18mm）、黄繭などヨーロッパ種と共通する特徴を持つ反面、繭形、早い幼虫経過（17～20日）、3眠蚕の分離などヨーロッパ種と異なる特徴が飼育調査によって判明した。体液中のアミラーゼ（Amy-hc）、エステラーゼ（Bes）、酸性ホスファターゼ（Bph）及び幼虫型雌特異タンパク質（PfI）、貯藏タンパク質2（Pst）、30Kタンパク質（Lp）に関し遺伝的多型を分析した結果、保有する遺伝子型はカイコで見られる対立遺伝子の種類に大半が一致していた。しかし、酸性ホスファターゼではこれまでにカイコで報告されていない活性帯が電気泳動で確認された。

日本蚕糸学会大会（上田市）4月，1999

カイコ消化液35Kプロテアーゼの遺伝

姜 永煌・大城戸利久・伴野 豊・藤井 博（九大農）

我々はカイコ消化液中にこれまでに見出されていない35Kプロテアーゼが存在することを明らかにする共に、本プロテアーゼにはアイソザイムが存在することを見出している。今回、アイソザイムに関して遺伝的解析を行った。調査した55系統では、大半の系統は2本の活性帯を有するAB型であった。移動度の速いA型活性帯及び遅いB型活性帯を単独に持つ系統は数系統のみであった。A型であるc60系統とAB型のp50系統とのF₁個体はすべてAB型であった。F₁雌にc60を戻し交配したBF₁においてはA型：AB型がほぼ1：1の比に分離した。一方、AB型の雌にB型のp53系統を交配した次代の個体においてもAB型：B型が約1：1の比に分離した。35Kプロテアーゼは共優性関係にある対立遺伝子に支配されていると判断される。連関検索から35Kプロテアーゼを支配する遺伝子は第2, 3, 4, 7, 14連関群及び未知連関群を代表するE-tr遺伝子に対しては独立である。

日本蚕糸学会大会（上田市）4月，1999

カイコの新体形突然変異、短節蚕の遺伝

伴野 豊・西坂章文・西川和弘・石原大輔・国分次雄・藤井 博（九大農）

九州大学農学部遺伝子資源開発研究センター家蚕遺伝子開発分野で系統保存中のf12系統において1998年春、幼虫体形が短い1頭の雄個体が幼虫形質の遺伝特性調査中に発見された。w41(p³b1 cts)系統に交配したところ、F₁において正常体形個体と体形の短い個体が132頭：101頭に分離した。体形の短い個体にw41を戻し交配したところ正常体形個体が162頭、体形の短い個体が144頭に分離した。本変異体は優性の1遺伝子によって支配されていることが明らかとなった。そこで、広く連関検索を行った結果、同形質を支配する遺伝子は第14連関群に所属することが判明した。現在までに第14連関群には10個の遺伝子がマッピングされているが本形質に類似する遺伝子は見出されていない。したがって本変異体はカイコでの新しい自然突然変異体として認めることができます。各体節が短く、蛹、成虫は丸味を帯びる体形の特色を持つ本変異体を短節蚕（Segmentation）と命名、遺伝子記号をSegと設定する。

日本蚕糸学会大会（上田市）4月、1999

カイコ卵におけるアネキシンIX cDNAの単離と構造解析

○夏 慶友・魯 成・藤井 博・伴野 豊(九大農)

アネキシンは真核生物に広く存在するコンドネキシン型 Ca^{2+} 結合蛋白質である。現在まで、アネキシン I ~ XIII の 13種類のメンバーの存在が報告され、膜輸送の制御、炎症反応、血液凝固線溶、細胞増殖分化、情報伝達などの生理機能に関与していることが報告されている。我々は、RNA Differential Display (RDD) 法を用い、アネキシンファミリーとの間で高い相同意を示す DNA 断片を見つけた。そこで卵 cDNA ライブライマーからこの cDNA の単離を試みた。その結果、卵 total RNA にノーザン陽性の約 1.2Kb の長さの cDNA クローンを得た。その全塩基配列から推定される 323 個のアミノ酸配列は、アネキシンとの間で高い相同意を示した。また、アネキシンに特徴的な構造である C 末端の 4つのリピートがあり、各リピートには特徴的な Ca^{2+} 結合モチーフが見られた。特に、このアミノ酸配列はショウジョウバエのアネキシン IX と非常に高いホモロジーを示したことから、このクローンはアネキシン IX 相同遺伝子であると考えられる。アネキシン IX の生理機能は不明であるので、カイコ卵中に見出されたアネキシン IX の胚発生における役割および生理機能について追究する予定です。

日本蚕糸学会大会（上田市）4月、1999

カイコとクワコの遺伝的関係：ミトコンドリアチトクローム酸化酵素サブユニット I と *Bm1* インサーションに関する解析

○行弘研司・瀬筒秀樹（蚕糸昆虫研）、伴野豊（九大農）

ミトコンドリアのチトクローム酸化酵素サブユニット I (COI) 遺伝子をカイコとクワコ合計 21 系統より PCR 法により増幅しその塩基配列を決定した。その結果、9 系統の日本産のクワコとカイコ 10 系統及び大陸由来の $n=28$ のクワコ 2 系統では 714 塩基サイト中 16 サイトで種特異に異なっていた。これらの変異は統べて転位型でさらに C と T の間の転位に著しく片寄っていた。これらの結果は近隣結合法による分子系統樹に反映し、日本産のクワコとカイコ及び大陸由来のクワコ間には有意な分岐が確認された。また、日本産クワコでの地理的変異として対馬由来の $n=27$ のクワコが他の日本産ものと系統樹上で明らかに異なる位置を占めることが判明した。COI 遺伝子の多様化を踏まえて、カイコとクワコ間での核遺伝子の分化の検討を *Bm1* の挿入を指標として開始した。スクーニングされた領域はまだ少数であるが COI 遺伝子の分化パターンと一致する領域も確認されている。

植物遺伝子開発分野

日本育種学会 95回講演会 (宇都宮) 4月、1999年

308 ○曲 楽慶・熊丸 敏博・魏 曜麗・佐藤 光 (九大農) イネのグルテリン α -1H 変異体の遺伝解析

Qu, L.Q., T. Kumamaru, X. L. Wei and H. Satoh (Fac. Agr. Kyushu U.) Genetic analysis on glutelin α -1H mutant in rice

イネのグルテリンの改良には新たな遺伝子の創出と開発が不可欠である。これまでイネ受精卵の MNU 处理によって、 α -2 欠損変異体などグルテリンに関する変異体を作製し、その遺伝・育種学的特性評価を行ってきた。今回は、グルテリン α -1 サブユニット増加型 (α -1H) 変異体、EM413 の遺伝様式及びグルテリンの特性について解析した。

【材料及び方法】材料には、 α -1H 型突然変異系統 EM413 及び *Glu4a(t)* に支配される α -1H/ α -2L 突然変異系統 EM278 (Fig. 1) を用いた。EM413 が有する α -1H 変異の遺伝様式並びに *Glu4a(t)* 遺伝子との同座性を明らかにするために、EM413 と原品種「金南風」及び EM278 と正逆交配し、その F1 及び F2 の種子タンパク質について SDS-PAGE 分析を行った。

変異体の種子タンパク質特性は IEF 及び二次元 (IEF/SDS-PAGE) 電気泳動によって解析した。

【結果及び考察】EM413 と「金南風」との正逆交配で、F1 種子の α -1 サブユニットは両親の中間型を示した。F2 分析の結果、正常型、中間型、 α -1H 型は 1 : 2 : 1 に適合する分離を示し、EM413 の α -1H 変異は単一不完全優性遺伝子に支配されることが明らかとなった。

EM413 と EM278 との正逆交雑 F1 の α -1 サブユニットは両親の中間型を示し、F2 では 2 重変異体型、 α -1H 型、 α -1H/ α -2L 型、正常型が 9:3:3:1 の期待比に適合する分離を示した。これは EM413 の α -1H 変異遺伝子は *Glu4(t)* 遺伝子座と異なる遺伝子であることを示して

おり、この遺伝子を *Glu5(t)* と仮称した。

SDS-PAGE 分析では、EM413 は α -1 バンドが増加するが、他のグルテリンサブユニット及びプロラミンの変化は認められなかった。IEF 分析の結果、pI6.82 バンドの増加が認められたが、その他のバンドには大きな変化は認められなかった。さらに二次元電気泳動の結果、酸性側の pI6.82/ α -1 ホリペプチドが増加したのに加え塩基性側の pI8.74/ β -3 ホリペプチドや減少していた。しかし、他のホリペプチドの変化は認められなかった (Fig. 2)。このように *Glu5(t)* 変異体では *Glu4a(t)* 変異体で認められたような新しいホリペプチド出現せず、pI6.82/ α -1 ホリペプチドが量的に増加のみであることが明らかになった。この結果は、*Glu5(t)* のような单遺伝子座の突然変異によってイネ種子貯蔵タンパク質の量的改変が可能示唆している。

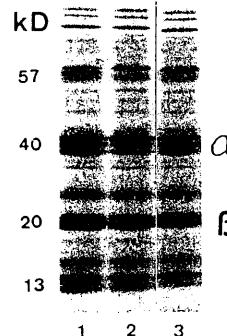


Figure 1. SDS-PAGE profile of glutelin α -1H mutants
1. Kinmaze 2. EM278
3. EM413



Figure 2. Two dimensional electrophoresis profile of glutelin α -1H mutants

1. Kinmaze 2. EM413 ↑: pI 6.82/ α -1 △: pI 8.74/ β -3

531 ○池田恭子¹・佐々直子¹・佐藤 光²・長戸康郎¹ (1.東大農学生命科学, 2.九大農) イネの穎の数とアイデンティティーに関する突然変異体について

Ikeda, K.¹, N. Sasa¹, H. Satoh², Y. Nagato¹ (1. Grad. Sch. Agric. Life Sci., U. Tokyo, 2. Fac. Agric., Kyushu U.) Mutations affecting glume number and identity in rice

イネ科の穎花は副護穎, 護穎, 外穎, 内穎という穎と呼ばれる器官を持つ。これら穎の数やアイデンティティーがどのように制御されているかは、発生学的のみならず進化学的にも興味深いが、他のイネ科植物でも明らかにされていない。そこで穎の制御機構を明らかにするための出発点として、穎の数やアイデンティティーに関わる変異体を同定した。

品種台中65号にMNUを受精卵処理したM2及びM3系統から穎に関する変異体を収穫時にスクリーニングし、実体顕微鏡下で観察した。

穎の数に関する変異体のうち、fm55, fm56, fm85と共に通して多くみられた表現型は、外穎が一枚増加しても内穎があった位置に小さめの外穎が分化し、続いて内穎が分化するというものだった(図1A)。ついで多くみられた表現型では外穎が分化した後もう一枚同程度に大きい外穎が分化し、中には細い穎状の器官が数枚みられた。

fm44は20°C以下の低温条件下では穎花を全く分化せず枝梗を繰り返し分化する。この系統を圃場(高温条件下)で育てたものを観察すると、副護穎の節間伸長と数の増加、護穎の数の減少がみられた。この野生型遺伝子は、花分裂組織の分化・維持だけでなく、副護穎、護穎の分化にも関与していると考えられる。

fm86では護穎が3枚に増加し、外穎が本来の内穎の位置に分化し、その後内穎を分化した後にさらに複数の穎を分化し、その内側に小枝梗、副護穎、護穎を持つもう一つの穎花が生じていた(図1B)。穎の数を制御していると同時に、分裂組織のアイデンティティーにも関与していると考えられる。

fm87では副護穎の数に1枚から4枚の変異があった(図1C)。護穎・副護穎間のホメオティックな転換とは完全には言えないが、この遺伝子は穎のアイデンティティー・数・伸長に関わると考えられる。

fm88は基本的に副護穎のホメオティックな変換により護穎の数が増加するもので、副護穎が2枚とも護穎に転換して4枚になるもの(図1D)、副護穎のうち2枚目だけが護穎になるものがあった。この変異体では、護穎をつくる遺伝子が副護穎を分化する時期から発現していると考えられる。

我々は既に一次枝梗を増加させる及び花器官を増加させる, を同定しているが、ととの2重変異体の解析により、は花器官数の制御にも関与していることを明らかにしている。今回穎の数の変異体が得られたので、これらを材料に、1次枝梗から雌蕊に至る穂・花の器官数の制御機構について解析していきたい。

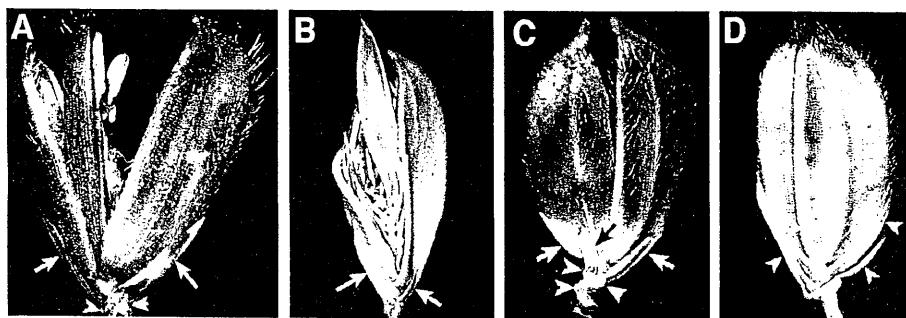


図1. 穎の変異体の表現型。

A: fm 56. B: fm 86 C: fm87 D: fm 88. 矢頭: 副護穎。矢印: 護穎。

534 ○竹本 陽子¹、小川 雅広²、熊丸 敏博¹、佐藤 光¹、T.W.Okita³ (1.九大農、2.山口県立大生活科学、3.ワシントン州立大生物化学研) イネ*esp 2*変異体はProtein Disulfide Isomeraseを欠損する
Takemoto,Y.¹, M.Ogawa², T.Kumamaru¹, H.Satoh¹, T.W.Okita³ (1.Fac.Agr., Kyushu U., 2.Fac.Life Sci., Yamaguchi P. U., 3.Inst.Biol.Chem.Washington State U.) *esp 2* mutant in rice was characterized as a PDI lacking mutant.

57H変異体、*esp 2*、*Glup 1*及び*glup 2*変異体は、登熟種子中における貯蔵タンパク質の蓄積量の推移を調査した。「金南風」の成熟型グルテリンは5日目以降に蓄積量が増大し、プロラミンは10日目以降に合成が盛んになった。*esp 2*変異体の成熟型グルテリンは、5日目から15日目にかけて蓄積し、それ以降の増加は認められなかった。前駆体はブロラミンの合成が開始する10日以降に急激に増加に分けられる。従って、57H変異体では、ソーティングとER内のシャベロンによる振り分けの2段階したことから、*esp 2*変異体ではプロラミンの合成に伴い前駆体のゴルジ体への輸送が強く阻害され、

本報告ではイネグルテリンの翻訳後の輸送及び蓄積 ER内に留められたと考えられる。この結果から、過程（以下プロセッシング）の遺伝的調節機構の解明 PDIは前駆体とプロラミンのER内の振り分けに作用を目的として、抗シャベロン抗体を用いた変異体の分用すると示唆された。

析及び登熟中の種子タンパク質とシャベロンの蓄積量の推移について調査した。 次にPDIがグルテリンとプロラミンのどちらに作用するかを明らかにするために、「金南風」の開

【実験材料】*57H*変異体として*esp* 2変異体、*G1up 1* 花後2日から10日の種子のウエスタン分析を行った変異体、*g1up 2*変異体及び原品種「金南風」の登熟種 (Fig. 2)。グルテリンは5日目に蓄積が始まり、PDI子と完熟種子を用いた。

【結果及び考察】3種類のシャペロン、Binding protein(Bip)、Protein disulfide isomerase(PDI)及びCalnexinそれぞれに対する抗体を用いてウエスタン分析を行った(Fig.1)。*Glup 1*及び*glup 2*変異体の合成が開始していた。グルテリンの合成に伴いPDIが発現していたことから、PDIは前駆体のER内に振り分けに作用する可能性が示唆された。

は「金剛風」と差異が認められなかつたが、*esp* 2変異体はPDIを完全に欠損していた。前報までに、*esp* 2型変異PBはS-S結合を介して結合した前駆体とプロ *esp* 2変異体は分子シャベロンであるPDIを欠損するラミンを蓄積することを明らかにした。以上のことから、*esp* 2変異体はPDIを欠損したためにER内での正常なS-S結合の形成が阻害され、前駆体を蓄積したと考えられる。

以上の結果から、グルテリン前駆体のソーティングに分子シャベロンの関与が必須であること、*esp* 2変異体は分子シャベロンであるPDIを欠損することによりER内でのタンパク質の振り分けが阻害され、前駆体が蓄積することが示された。*esp* 2変異体はPDIを完全に欠損することから、野生型である*Esp* 2遺伝子がPDIの構造遺伝子、もしくは、

PDIの作用を調べるために、開花後5日から30日の

日に発現が認められ、直後の8日目にプロラミンの合成が開始していた。グルテリンの合成に伴いPDIが発現していたことから、PDIは前駆体のER内振り分けに作用する可能性が示唆された。

以上の結果から、グルテリン前駆体のソーティングに分子シャベロンの関与が必須であること、*csp 2*変異体は分子シャベロンであるPDIを欠損することによりER内でのタンパク質の振り分けが阻害され、前駆体が蓄積することが示された。*csp 2*変異体はPDIを完全に欠損することから、野生型である*Esp 2*遺伝子がPDIの構造遺伝子、もしくは、その発現を制御する遺伝子であると考えられる。

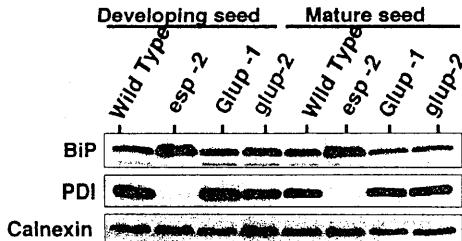


Fig. 1 Western blot analysis of 57H mutants.

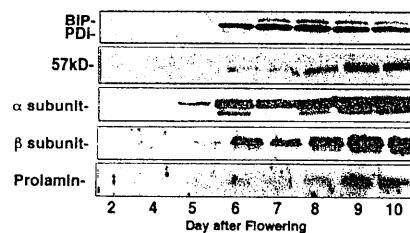


Fig. 2 Developmental changes in glutelin/prolamин accumulations and BiP/PDI activities.

118 ○一色正之¹・山本義章¹・佐藤 光²・島本 功¹ (1.奈良先端大バイオ, 2.九大農)
イネにおけるモチ変異(*waxy*)の分子的基礎。

Isshiki, M.¹, Y.Yamamoto¹, H.Satoh² and K. Shimamoto¹(1. NAIST Lab. Plant Mol. Genet., 2. Fac. Agr., Kyushu U.) The molecular basis of *waxy* mutations in rice.

イネ *waxy* 遺伝子はアミロース生合成に必要な酵素GBSSをコードしている。イネ *waxy* 遺伝子には発現量が多い *Wx^b* と第1イントロン5'スプライス部位に1塩基の変異をもち、スプライシング効率が低下している *Wx^b* のふたつの対立遺伝子が知られている。また、イネにおける *waxy* 突然変異体 (*wx*) はモチ米として知られ、強い粘りがある。これは *waxy* 遺伝子の変異によりアミロース合成ができなくなり、胚乳のデンプンがアミロベクチン100%になってしまったためである。これまでの知見では、*wx* は60kDの *Waxy* タンパク質がなくなっていることが報告されている。

wx の胚乳における *waxy* 遺伝子の発現を解析したところ、第1イントロンがスプライシングされていない転写産物の量は *Wx^b* とほぼ同じであるのに対して、成熟した *Wx* mRNA量が減少していることがわかった(図1)。そこで、この現象が *waxy* 突然変異体のどのような変異に由来するのかを確かめるためシークエンス解析を行った。用いた材料はMNUで人為的に変異を起こさせた *waxy* 突然変異体EM21と栽培品種であるムサシモチである。その結果、EM21ではエキソン7にGからAへの1塩基の置換が起こり、トリプトファンが終止コドンに変わっていた。また、ムサシモチでは第2エキソンに23塩基の重複があり、このためフレームシフトが生じ、第2エキソン内に終止コドンがきていた(図2)。

突然変異によりコード領域に終止コドンが生じ、

機能をもたないタンパク質がコードされている mRNAはnonsense-mediated mRNA decay (NMD) と呼ばれる機構により分解されてしまうことが酵母や動物で研究されている。しかし、植物での報告はほとんどない。

そこで、我々はイネのプロトプラストを用いたトランジェント解析により、終止コドンの形成がNMDを引き起こしていることを確かめるため実験を行った。コンストラクトはCaMV 35Sプロモーターにゲノミック *waxy* 遺伝子をつなぎ、EM21と同じ位置に終止コドン変異を導入した。この結果、終止コドン形成によって *waxy* mRNAの安定性が低下し、NMDが起こっていることがわかった。

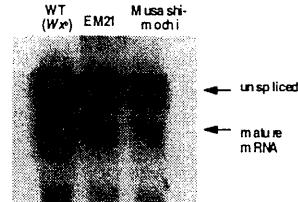


図1 *waxy* 突然変異体における *waxy* 遺伝子の発現

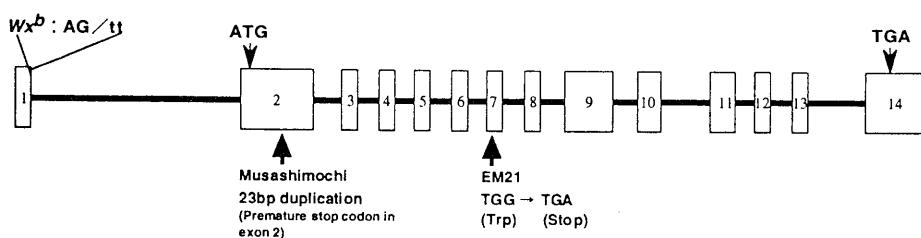


図2 *waxy* 突然変異体における変異部位

319 ° 魏曉麗・曲榮慶・竹本陽子・熊丸敬博・佐藤 光・小川雅広* (九大農、*山口県大生活科学)

イネの57H変異遺伝子*glup 4*の遺伝分析

WEI, X.L., L.Q. QU, Y. TAKEMOTO, T. KUMAMARU, H. SATOH and M. OGAWA* (Fac. Agr., Kyushu U., Dep. Life Sci., Yamaguchi Pre. U.) Genetic analysis of a 57H mutant gene, *glup 4*, in rice.

イネグルテリンはER上で57kD前駆体として合成され著な減少(26L)を示した。*glup 4*変異体とT 65との間で、ゴルジ体を経由し液胞へ輸送された後、限定分F₂種子では、正常型個体と57H/40・20L/26L個体解を受けα及びβサブユニットに開裂して蓄積する。のみが分離した。このことは*glup 4*変異体の種子貯蔵グルテリンの合成、液胞への輸送及び限定分解の遺伝子の変異は、*glup 4*遺伝子の多面発現効率的制御機構については不明である。57H変異体は、果であることを示している。

前駆体の輸送および限定分解を制御する遺伝子の変異とされる、プロセスされない前駆体を蓄積する。これまで、遺伝子座の異なる5つの57H変異遺伝子を報告したが、*glup 4*についてはその詳細な遺伝解析は行われていなかった。そこで、*glup 4*について既知の4遺伝子との相互関係を明らかにすると共に、三染色体分析を行った結果について報告する。

【材料及び方法】MNU処理によって得た57H変異系統、*glup 4*変異体EM 956及びEM 960、EM 747(*esp 2*)、EM 61(*Glup 1*)、EM 305(*glup 2*)、EM 856(*glup 3*)及び原品種「台中65号(T 65)」を用いた。

SDS-PAGE、IEF及びウエスタンプロット分析は既報の手法に従って行った。遺伝子相互作用及び座乗染色体の解析は、EM 956を既知の57H変異標識遺伝子系並びに三染色体植物と交配し、得られたF₂種子を分析して行った。

【結果及び考察】ウエスタンプロット分析の結果、EM 956及びEM 960の57kDポリペプチドはグルテリンα・β両抗体に反応し、グルテリン前駆体であることが明らかになった。IEF分析の結果、両変異体間で抽出グルテリンに差異は認められなかった。

SDS-PAGE分析の結果、*glup 4*変異2系統は、57kDポリペプチドの増加(57H)、グルテリンα・β両サブユニットの減少(40・20L)に加えて、26kDバンドの顕著な減少(26L)を示す。約10:1となり、トリソミック分離の期待比に適合する分離を示した。この結果から*glup 4*遺伝子は染色体12に座乗するものと考えられる。

Table 1. Segregation mode of 57H characters in F₂ seeds of crosses between a *glup 4* mutant, EM956, and four marker lines for 57 H gene, EM747, EM61, EM305 and EM856.

| ♀ | X | ♂ | Segregation in F ₂ | | | | Total | χ^2 (9:3:3)(9:6:1)(9:3:3:1) |
|------------------------|---|------------------------|-------------------------------|------------|------------------|----|-------|-------------------------------------|
| | | | AB | aB | Ab | ab | | |
| EM747(<i>esp 2</i>) | X | EM956(<i>glup 4</i>) | 175 | 72 | 71 | | 318 | 3.28 |
| EM305(<i>glup 2</i>) | X | EM956(<i>glup 4</i>) | 53 | | 31 | 6 | 90 | 0.36 |
| EM856(<i>glup 3</i>) | X | EM956(<i>glup 4</i>) | 52 | 18 | 15 | 5 | 90 | 0.46 |
| Cross comb. | | | Segregation in F ₂ | | | | Total | |
| ♀(M1M1) | X | ♂(m2m2) | + M1M1,M1+ | ++ M1M1 | glup 4 M1+,++ | | | χ^2 (9:3:1:3) |
| EM61(<i>Glup 1</i>) | X | EM956(<i>glup 4</i>) | 50 | 18 | 3 | 18 | 89 | 1.39 |

434 ° Siddiqui Sadar Uddin, T.KUMAMARU and H.SATOH (Fac. Agr., Kyushu U.)
Distribution and diversity of Pakistan rice germplasm (*Oryza sativa L.*) based on seed storage protein.

In order to investigate the variation in the some variations of staining intensity genetic resources of Pakistan local rice cultivars for the possible improvement of seed storage protein, the protein variation and its geographic distribution were analyzed.

475 accessions of the Pakistan rice cultivars, which were obtained from MAFF genebank, were used as materials. These cultivars were collected from 3 major rice cultivation regions of Pakistan i.e. Punjab, NWFP and Balochistan, and other locations. The storage protein extracted from the endosperm was analyzed by SDS-PAGE.

In glutelin storage protein, three levels of variation were observed, i.e. 57kD polypeptides, α -3 and α -4 subunit bands (38kD and 35kD glutelin acidic subunits, respectively). For 57 kD polypeptide, the high intensity band (57H) and low (normal) intensity band (57L) were found. In case of α -3 subunit, three types of variation occurred as low molecular weight type (α -3LM), high molecular weight type (α -3HM) and α -3LH type which contained both low and high molecular weight bands. For the α -4 band, low molecular weight and high molecular weight bands were found. The 57H variation was found in 85 accessions, but this mutation was not restricted among varieties. In addition,

The geographical distribution of 57H cultivars is shown in Table 1. The highest frequency of occurrence (89.4% of 57H mutants) was in Punjab region. The majority of varieties bearing 57H (96.5%) were distributed in low altitude range area. The distribution pattern of 57H showed a high degree of correlation in terms of altitude and geographical occurrence. The F1 seeds crossed between a Pakistan 57H cultivar (Accession 3-b) and EM 856 which is a marker line of *glup 3* showed the 57H phenotype. This result shows that 57H character found in Pakistan rice cultivars is controlled by a *glup 3* gene.

The variation for the 60 kD polypeptide (*Wx* protein) was detected. Out of 475 accessions, 51 cultivars had 60 kD low staining intensity band (*Wx*^b), of which the majority (80.4%) were distributed in NWFP/NA region. Though a small proportion of *Wx*^b was present in low altitude areas, no 57H was associated with it.

A wide variation on the prolamins in terms of the absence or presence and staining intensity of bands were also found in Pakistan rice cultivars as well as in Bangladesh rice cultivars (Minakuti et al, 1994). The details are under investigation.

Table 1: Geographical and altitudinal distribution of 57H mutation in Pakistan local rice cultivars as revealed by SDS-PAGE analysis for total seed storage proteins.

| Location Province | Total # Acc. in location | Distribution range of Acc. in location altitude | #Acc. with 57H mutation (%) | % 57H mutation | | Distribution of 57H mutants in altitude | | |
|-------------------|--------------------------|---|-----------------------------|----------------|----------|---|---------|---------|
| | | | | in location | in total | 70-370 | 730 | 1450 |
| Punjab | 139 | 70-300 | 76(89.4) | 54.7 | 16 | 76 | 0 | 0 |
| NWFP/NA | 226 | 280-2100 | 5(5.9) | 2.2 | 1.1 | 3 | 1 | 1 |
| Balochistan | 24 | 190-1230 | 3(3.5) | 12.5 | 0.6 | 3 | 0 | 0 |
| Azad Kashmir | 31 | 790-1500 | 0(0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| No data | 55 | - | 1(1.2) | 1.8 | 0.2 | - | - | - |
| Total | 475 | 70-2100 | 85(100) | | | 82(96.5%) | 1(1.2%) | 1(1.2%) |

535 ○佐藤奈美子¹・佐藤光²・長戸康郎¹ (1. 東大農学生命科学、2. 九大農) イネの栄養生長初期が継続する変異体の解析

Satoh, N.¹, H. Satoh² and Y. Nagato¹ (1. Grad. Sch. Agri. Life Sci., U. Tokyo, 2. Fac. Agri., Kyusyu U.)

Analysis of mutant defective in juvenile-to-adult phase change.

植物は、遺伝的に決められたプログラムに基づいていくつかの発生段階（胚発生-栄養生長初期-栄養生長後期-生殖生長）を通過する。本発表では、イネの栄養生長初期が継続する変異体の解析を通して、イネにおける栄養生長初期から栄養生長後期への相転換について考察した。

今回解析したodm247は、台中65号にMNU処理をおこなって得られた1遺伝子劣性変異体である。この遺伝子座に由来する対立遺伝子の変異体にはodm81があり、その形態は、odm247と類似していた。これらの変異体は、1年以上生育させても分けつは増えるが、草丈は大きくならず、花芽形成をしなかった。また、odm247の葉間期は野生型よりも短く、約1.5倍の速度で葉を分化していた（図1）。

縦断切片により、茎を観察したところ、播種後4ヶ月が経過した時点でも節および節間が形成されておらず、野生型の茎の基部のような状態が続いていることが確認された（図2）。しかし、個体によっては、播種後3ヶ月の茎頂直下の茎で、節および節間が分化する可能性も考えられた。

野生型の茎頂分裂組織では、発育とともにサイズの増大が見られるのに対し、odm247では、小さいまままで保たれており、また、その高さ/幅の値も、野生型で播種後1週間から10週間にかけて低下するのにに対し、生育ステージにかかわらず、一定であった。また、播種後1週間の植物体の茎頂分裂組織での

*histonH4*の発現を調べたところ、野生型では中央縦断切片当たり平均1.9個の細胞でシグナルが検出されたが、変異体では平均3.7個であり、変異体の茎頂分裂組織は、野生型に比べ細胞分裂が盛んであることが示された。

ここまで結果からは、odm247では、少なくとも播種後3ヶ月では栄養生長初期から栄養生長後期への相転換が起こらず、栄養生長初期が継続していると考えられ、これまでに当研究室で同定された *mori1* と非常によく似ていた。

しかし、odm247は、*mori1*変異体とは異なる表現型も示した。まず、odm247の受粉後4日目の胚から、胚盤部分に細胞の空泡化が見られるようになり、この傾向は、完成胚の胚盤や鞘葉でも観察された。また、成熟した葉の細胞においても空泡化はみられ、細胞の形も不規則であった（図3）。なお、葉は、伸長が抑制されてしまいものの、長さにばらつきがあり、その表面構造にも不規則な凸部が見られた。

以上、odm247は、イネの栄養生長初期から栄養生長後期の相転換が起こらない、少なくとも、相転換が大幅に遅れる変異体であると考えられ、この点では、イネの相転換を制御する *MORII* の変異体と似ていた。しかし、odm247の表現型は、*mori1* と明らかに異なっており、栄養生長後期への相転換には *MORII* 以外の遺伝子も関与していると考えられる。

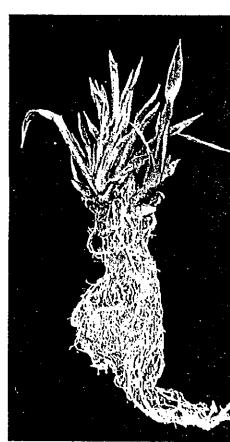


図1. 播種後6週間の odm247の植物体.



図2. A. 播種後1.5ヶ月の野生型の茎の内部構造. B. 播種後4ヶ月のodm247の茎の内部構造.

微生物遺伝子開発分野

日本農芸化学会大会（福岡） 4月、1999年

2a500B

Bacitracin-induced membrane proteins related to stimulation of spore formation and inhibition of pock formation in the thiostrepton-producing *Streptomyces cyaneus* ssp. *azureus*

○Adel K. Okba, Katsumi Doi, Shorin Matsuo and Seiya Ogata
(Inst. Genet Resources, Kyushu Univ.)

Sporulation of *Streptomyces cyaneus* ssp. *azureus* is markedly decreased by a conjugative plasmid pSA1 and its derivative pSA1.1, which caused the formation of the spontaneously developing pocks and conjugative pocks, respectively.¹⁾ The peptide antibiotic bacitracin (BC) was found to have a remarkable growth-stimulating effect on *S. c. azureus*.^{2,3)} The stimulatory effect of BC on spore formation was so significant with about 5-fold increment in the number of spores and with striking elongation of the aerial mycelia in *S. c. azureus* at 50 µg/ml. On the other hand, the number of spontaneously developing pocks and conjugative pocks were decreased by BC in comparison with that of the control without BC. The stimulatory effect of BC on sporulation seemed to be closely correlated with the inhibition of pock formation.

We found that BC induced two kinds of membrane proteins in *S. c. azureus*. These membrane proteins would alter the cell membrane function leading to the stimulation of spore formation and inhibition of pock formation. It was also said that these membrane proteins might prevent the effective transfer of plasmid pSA1 and its derivative pSA1.1.

¹⁾ Doi et al. *Seibutsu-Kogaku kaishi*, 76: 66 (1998).

²⁾ Okba et al. *J. Ferment. Bioeng.*, 86: 28 (1998).

³⁾ Ogata et al. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37: 652 (1992).

日本農芸化学会大会（福岡） 4月、1999年

3a160B *Streptomyces c. azureus* の DNA 転移に関与する *spoIIIE* 様遺伝子の解析 ○山内真理子，土居克実，西田壽子，緒方靖哉
(九大農・遺資研微生物)

【目的】*S. c. azureus* のプラスミド pSA1.1 の *spi* は胞子形成阻害と菌糸間伝達に関与しており、その推定遺伝子産物は、放線菌プラスミドの *Tra* や *B. subtilis* の *SpoIIIE* などの DNA 転移に関与するタンパク質と相同性を示す。本研究は、*Spi* のプラスミド DNA 転移機構の解明を行うとともに、*S. c. azureus* 染色体上に存在し、染色体転移に關与し *spi* の拮抗阻害を受けると推定される *spoIIIE* 様遺伝子の分離と解析を目的とした。

【方法及び結果】*Spi* の細胞内局在性と発現時期を解析するため、*spi*-His · Tag 遺伝子を PCR によって作製し発現を試みたところ、発現した *Spi*-His · Tag が膜に局在することを明らかにした。また、*S. c. azureus* のプラスミド非保持株 PK100C の染色体ミニライブラリーから *spi* をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションにより、*spoIIIE* 様遺伝子と考えられる約 3.3kb の断片を分離し制限酵素地図を作製した。現在、本断片の塩基配列の決定を行っている。

K. Doi et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62(8), 1597-1600 (1998)

日本農芸化学会大会（福岡） 4月、1999年

3a014B *Enterococcus* sp.K-4 のバクテリオシン生産に関するプラスミド

○江口智子、崔聖賢、土居克実、大桃定洋*、緒方靖哉

(九大農・遺資研、農林水産省*)

【目的】乳酸菌が他の微生物の生育を抑える原因として、乳酸や過酸化水素等の生成の他に、タンパク質性抗菌活性物質であるバクテリオシンの生産が挙げられる。本研究では新規のバクテリオシン生産性乳酸菌の分離を目的とした。特に今回は、バクテリオシン生産と密接な関連性が指摘されるプラスミドについて、バクテリオシン生産への関与について検討した。

【方法及び結果】タイのサイレージから spot-on-lawn 法により抗菌活性を示す菌株の分離を行い、*Enterococcus* sp.K-4 を単離した。本菌株は *E. faecalis* および *E. faecium* の生育を阻害した。本菌株の 16S rDNA 領域を PCR で增幅し、系統解析を行った結果、分離株は *E. faecalis* と最も近縁であることが示された。また、本菌には pEK4L (約 40kb) と pEK4S (約 35kb) の 2 種のプラスミドが存在することを確認した。次に、分離株をノボビオシンで処理し、得られたプラスミドキュアリング株についてバクテリオシン生産性の変化を検討した。この結果、pEK4L、pEK4S の両プラスミドが脱落した株では抗菌活性が消失したのに対し、pEK4Lのみが脱落した株では抗菌活性を示したので、pEK4S がバクテリオシン生産に関与していると推察した。

日本農芸化学会大会（福岡） 4月、1999年

3a161A *Streptomyces cyaneus azureus* の *minD* 様遺伝子の構造と機能

○西山孝、土居克実、緒方靖哉 (九大農・遺資研)

【目的】*S. c. azureus* PK100C 株由来の BalA1 株は、気菌糸形成欠損、抗生素生産性の変化、野生型株や他菌株に対する生育阻害と色素分泌の早期誘発などの性質を示す。この菌株が保持する多コピープラスミド上には 2.5kbp の染色体 DNA 断片が挿入されており、その中には 2 つの ORF ($\Delta minDSA$, *pspSA*) が確認された。放線菌の形態分化・代謝分化に深く関わっていると推察されるこれらの ORF について構造と機能の解析を行っている。

【方法および結果】2.5kbp 断片上の $\Delta minDSA$ の下流部をクローニングし、2 個の完全な ORF を含む 3.1kbp 断片を構築した。完全な *minDSA* のみを導入した BalA2 株は気菌糸形成能を欠いていた。同じ Bald 株でも、 $\Delta minDSA$ を持つ BalA1 株が親株 PK100C 株に比べ菌糸が長く、菌糸の分岐が少ないのに対し、BalA2 株は PK100C 株に比べ菌糸が短く、分岐の頻度が多かった。これらのことから *minDSA* 遺伝子が *S. c. azureus* の形態形成に関わり、菌体の形状に大きな影響を与えると考えられた。

さらに、液体培養における生育を比較したところ、BalA1 株、BalA2 株の菌体湿重量はそれぞれ PK100C 株の約 2 倍、約 1/3 倍であった。この差は、BalA1 株では菌糸の分岐が PK100C 株より少なくペレット形成が抑えられたため生育が促進され、また、BalA2 株では菌糸が短くなることが生育を阻害する方向に働いたために生じたと考えられた。

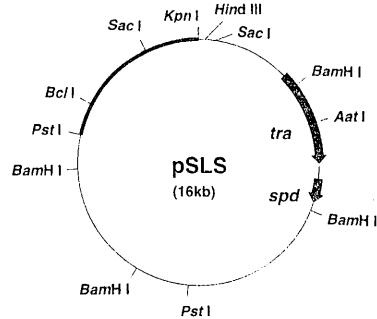
日本農芸化学会大会（福岡） 4月、1999年

3a169A *Streptomyces laurentii* の接合性組込み型プラスミド pSLS の

特性 白上知幸、○Mangkorn Rodprapakorn、伊良皆千鶴、
北原真樹、土居克実、緒方靖哉（九大・農・遺資研微生物）

【目的】放線菌の接合性環状プラスミドは、自律型で CCC 形態をとるもの（非組込み型）、自律型の CCC と宿主染色体中への組込みの 2 形態がとれるもの（組込み型）の 2 グループに分類することができる。また同グループに属するプラスミドの遺伝子間では、高い相同意性が認められている。しかし、チオストレプトン生産菌 *S. laurentii* ATCC31255 の環状プラスミド pSLS は両グループの特性を兼ね備えていることがわかったので、pSLS の全遺伝子の構造と機能の解析を試みた。

【方法と結果】 *S. laurentii* の pSLS は宿主染色体の組込み配列から自律化したプラスミドであり、その組込み部位は *BclI* 部位を含む *PstI*-*HindIII* 断片中に存在する。しかし、pSLS の菌糸間伝達機能をもつ *tra* 遺伝子は、非組込み型である *Streptomyces* プラスミド pJV1 や pSN22 の *traB* と高い相同意性を示し、また菌糸内伝達機能をもつ *spd* 遺伝子にも、pJV1 と pSN22 に高い相同意性が認められた。現在、pSLS の組込みや、*kil-kor system* に関する遺伝子等の塩基配列の比較解析を進めている。



日本農芸化学会大会（福岡） 4月、1999年

3a323A

Thermus sp. strain TMY のシリカ誘導蛋白質

○稻垣史生¹、土居克実¹、木村誠²、横山拓史³、井澤英二⁴、
緒方靖哉¹（¹九大・農・遺資研、²九大・農・生化、³九大・理・
化学、⁴九大・工・地球資源）

【目的】本研究グループは、地熱水環境下におけるシリカ鉱物の形成を検討して、熱水中に生息する細菌が溶存シリカの鉱物化に関与することを明らかにした¹⁾。また、*in vitro* 系で高度好熱菌である *Thermus* 属菌株を過飽和のシリカが溶存する培地で培養すると、過飽和分のポリマーシリカの重合を促進し、自然環境下のものと同質の非結晶質のシリカ沈殿物を短時間で形成することを認めた²⁾。本研究では、シリカ鉱物から単離した *Thermus* sp. strain TMY が、非結晶質シリカの沈殿を生成する際に誘導產生される細胞表層蛋白質について検討した。

【方法及び結果】 TMY 株によるシリカの沈殿は、培養温度 75°C での非結晶質シリカの溶解度約 450 ppm を越えるシリカ濃度で起こる。メタ珪酸ナトリウムによってシリカ濃度を調製した培地で TMY 株を 75°C で培養し、細胞を超音波処理後、不溶性画分を超遠心し、SDS-PAGE を行った結果、沈殿が生じる過飽和の条件下でのみ誘導产生される、推定分子量 35 kDa の表層蛋白質を認めた。この蛋白質を PVDF 膜にプロッティングし、N 末端アミノ酸配列の決定を行ったがブロックされており、解析が不可能であった。従って、In-Gel 法によってトリプシン消化したペプチド断片を HPLC で分離・精製し、内部アミノ酸配列を解析した。決定したアミノ酸配列を BLAST で相同検索をした結果、既知配列との相同意性は見いだせなかった。

1) F. Inagaki et al., *FEMS Microbiol. Ecol.*, **24**, 41-48 (1997)

2) F. Inagaki et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **62**, 1271-1272 (1998)

O-9

**Bacitracin-induced membrane proteins of
Streptomyces cyaneus ATCC 14921.**

○ Adel K. Okba, Shorin Matsuo, Katsumi Doi
and Seiya Ogata

(Inst. Genetic Resources, Kyushu Univ.)

The peptide antibiotic bacitracin (BC) is remarkably effective in stimulating growth of the thiostrepton-producing *S. cyaneus* (original name, *Streptomyces azureus*). The stimulatory effect of BC on spore formation was so significant with about 5-fold increment in the number of spores and with striking elongation of the aerial mycelia in *S. cyaneus* at 50 µg/ml BC. On the other hand, the number of pocks were decreased by BC in comparison with that of the control without BC. Also, BC markedly stimulated submerged mycelial growth of *S. cyaneus* after a long inhibitory lag period.

The action of BC on the change of membrane proteins of *S. cyaneus* strain PK100C was analyzed. SDS-PAGE showed that BC induced the synthesis of two membrane proteins (32 and 38 kDa). The comparison of the N-terminal amino acid sequences of 38 kDa protein with the databases showed a strong degree of similarity to ABC transporters protein from *Streptomyces* spp. and BC-producer. But, the properties of 32 kDa protein has not been clear.

The results presented in this report support the idea that BC would be able to inhibit peptidoglycan synthesis, but ABC transporter protein synthesized would be antagonize the antibiotic inhibitory action of BC. We also suggested that the two BC-induced membrane proteins would be able to alter the cell membrane function leading to the stimulation of mycelial growth and spore formation and inhibition of pock formation. It was also speculated that these membrane proteins might prevent the effective transfer of conjugative plasmids and then the killing action toward their host cells.

P-14 *Streptomyces laurentii* の接合性組込み型プラスミド pSLS の特性

Mangkor n Rodprapakorn, 酒見博士, 白上知幸, 伊良皆千鶴

○土居克実, 緒方靖哉 (九大・農・遺資研微生物)

【目的】放線菌の接合性環状プラスミドは、pJ101やpSN22のように自律複製を行い、環状構造のみをとる非組込み型プラスミドと、pSA1.1やpSAM2のような自律複製を行い、環状構造と宿主染色体中への組込み形態をとる組込み型プラスミドの2グループに分類できる。また同じグループに属するプラスミドの遺伝子間の構造には、高い相同性が認められている。

本研究ではチオストレプトン生産菌 *S. laurentii* ATCC31255 の環状プラスミド pSLS (16kb) が両グループの特性を兼ね備えていることが示されたので、pSLSの全遺伝子の構造と機能の解析を試みた。

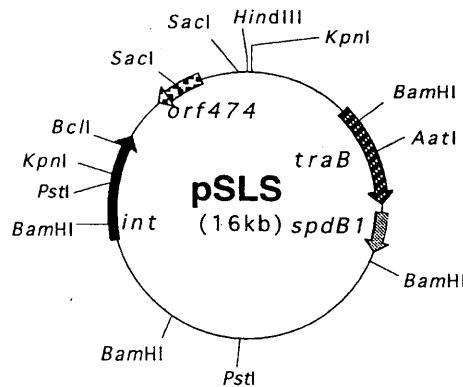
【方法と結果】塩基配列を決定しフレーム解析を行った結果、pSLSの *KpnI*-*BamHI* 断片上には、非組込み型プラスミド pJV1 や pSN22 の菌糸間伝達機能をもつ遺伝子 *tra* と菌糸内伝達機能をもつ遺伝子 *spd* とそれぞれ高い相同性を示す *orf* が存在した。

次に、pSLSをプローブとしたサザンハイブリダイゼーションの結果から、pSLS は宿主染色体の組込み配列から自律化したプラスミドであり、その組込み部位が *BclI* 部位を含む *HindIII*-*BamHI* 断片中に存在することが示された。さらに、本断片のフレーム解析の結果から、pSLS中に染色体中への組込みに必要な遺伝子 *int* を同定した。

また、pSLSの *orf474* の産物は pSAM2 の hypothetical protein 154 と高い相同性を示すことも明らかになった。

【文献】

- 1) Kinoshita-Iramina, C., Kitahara, M., Harada, Y., Doi, K. and Ogata, S., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1040-1043 (1995)
- 2) Kinoshita-Iramina, C., Kitahara, M., Doi, K. and Ogata, S., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1469-1473 (1997)



Physical and genetic map of pSLS

433

Enterococcus sp. K-4 のバクテリオシン生産に関するプラスミド

江口智子、崔聖賢、○土居克実、大桃定洋*、緒方靖哉

(九大農・遺資研、農林水産省)

【目的】乳酸菌が他の微生物の生育を抑える原因として、乳酸や過酸化水素等の生成の他に、タンパク質性抗菌活性物質であるバクテリオシンの生産が挙げられる。本研究は、高温適応性で、かつ、耐熱性のバクテリオシンを生産する乳酸菌を分離し、そのバクテリオシンの性質の解析および利用開発を目的とした。

【方法及び結果】タイのサイレージから、抗菌活性を示す *Enterococcus* sp. K-4 を分離した。本菌株の 16S rDNA 領域の系統解析から、本菌株は *E. faecalis* と最も近縁であることが分かった。本菌は pEK4L (約 40kb) と pEK4S (約 35kb) の 2 種のプラスミドを有していた。本菌株をノボビオシン処理し、pLKL のみが脱落した株を 2 株得たが、これらキュアリング株も抗菌活性を有していたので、pEK4S がバクテリオシン生産に関与していると推察した。また、野生型株とキュアリング株における生育とバクテリオシン生産の至適温度を検討したところ、生育至適温度は 37°C であったが、バクテリオシン生産の至適温度は 45°C であった。なお、本バクテリオシンは 100°C、20 分間煮沸処理後も活性を維持していた。

A bacteriocin-producing plasmid of *Enterococcus* sp. K-4

Tomoko Eguchi, Seong Hyum Choi, ○Katsumi Doi, Sadahiro Ohmomo*, Seiya Ogata
(Microbial Genet. Div., Inst. Genet. Resources, Kyushu Univ, *Ministry of Agriculture,
Forestry and Fisheries)

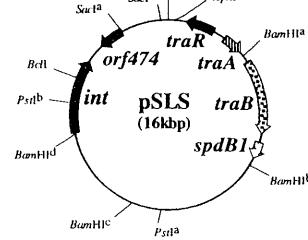
【Key words】bacteriocin, *Enterococcus*, silage, plasmid

A am 12 *Streptomyces laurentii*の接合性プラスミドpSLSの遺伝子解析

○酒見博士, Mangkorn Rodprapakorn, 白上知幸, 横山英之, 土居克実, 緒方靖哉
(九大・農・遺資研微生物)

【目的】本研究は、*S. laurentii*の胞子形成を阻害する接合性プラスミドpSLS上の遺伝子の構造と機能を明らかにすることを目的としている。これまでに菌糸間伝達に機能する遺伝子`traB`と菌糸内伝達に機能する遺伝子`spdB1`を同定している。本報告では、pSLSの`traR`遺伝子と`traA`遺伝子を同定したので報告する。

【方法と結果】pSLSの`HindIII-BamHIa`断片の塩基配列を解析した。その結果、`traB`の上流から放線菌の接合性プラスミドpJV1やpSN22の菌糸間伝達機能を有する遺伝子`traA`、さらに`traA`および`traB`遺伝子の制御に関与している遺伝子`traR`と相同性をもつ遺伝子を同定した。また、pSLSの`traR`、`traA`、`traB`、`spdB1`遺伝子の順序と向きは、pSN22およびpJV1と非常に類似していることが明らかとなった。



A am 13 *Streptomyces azureus* のバシトラシン誘起性ABCトランスポーターの遺伝子解析
(九大農・遺資研) ○山田修司, A.K.Okba, 稲垣史生, 土居克実, 緒方靖哉

【目的】バシトラシンは*Streptomyces azureus*の液体培養菌体に対し、菌体のペレット形成を抑制し、菌体量を著しく増大させた。¹⁾また、固体培養ではポック形成の抑制や胞子の早期着生などの効果を示した。本研究では、バシトラシンが菌体増殖に及ぼす影響を解明する手段として、バシトラシン添加によって顕在化する液体培養菌体の膜タンパク質について解析した。

【方法・結果】バシトラシン添加条件下で培養した*S. azureus*の菌体より分離した膜タンパク質画分のうち、38kDaと32kDaのタンパク質が、バシトラシン添加によって顕在化した。38kDaのタンパク質について、N末端配列を決定したところ、VFAYESLSKRFPRの配列が得られた。この配列は、*Streptomyces*属放線菌や他菌種のABC transporerと相同性を示した。本38kDaタンパク質は*S. azureus*のABC transporerと推定し、既報のABC transporer遺伝子の塩基配列を基に部分增幅を行った。この得られた部分配列は、*S. coelicolor* A3(2)のABC transporer遺伝子と高い相同性を示した。現在、完全な遺伝子配列の決定を進めている。

1) Okba et al., J. Ferment. Bioeng., 86 (1), 28-33 (1998)

Cpm13 バキュロウイルスを利用したポリオーマウ
イルス由来シュードプロテイン VP1 の発現
(九大農・遺資研)

°島貫恵実, 村田匡礼, 原 敏夫

ポリオーマウィルスの主要キャプシドタンパク質であるVP1は、セルファーセンブルしてシュードキャプシドを形成する。このシュードキャプシドは外来のDNAをパッケージして安定に運ぶことが可能なため、その性質を利用して遺伝子治療に用いられることが期待される。本研究では、VP1 シュードキャプシドの遺伝子治療への応用を主目的とし、バキュロウイルス発現系、特に高発現が期待できるカイコ幼虫個体を用い、VP1の大量発現を行った。VP1遺伝子を組み込んだ組換えウィルスを作製、プラーカアッセイ法により純化した。1200頭のカイコ幼虫個体に純化した組換えウィルスを摂取し、4日後に体液を回収してウエスタンブロッティング法によりVP1の発現を確認した。

21

Polypma Virus Pseudocapsids Expressed in Insect Cells and Silkworm Larvae as Efficient Carriers of Heterogous DNA into Mammalian Cells

Toshio Hara

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

hara@agr.kyushu-u.ac.jp

Gene transfer to provide long-term expression of a therapeutic product, without introducing unwelcome genetic information, is a goal being sought for therapy of both hereditary and acquired diseases. Polyoma virus pseudocapsids, generated from a VP1-expressing recombinant baculovirus, lack viral DNA and have been successfully used to introduce small exogenous genes stably into cells in vitro by a process designated 'pseudoinfection'; although pseudocapsids protect only about 3 kbp of exogenous DNA, low efficiency transfer of a larger fragment (6.2 kbp), such as a 7.2 kbp palsmid (pCMVb) encoding the beta-galactosidase gene, has been observed. Here, we introduced a signal sequence of HIV-1 gp120 into polyoma virus pseudocapsid VP1, and we have succeeded in glycosylation o f pseudocapsids VP1 expressed and secreted in insect cells and silkworm larva. Owing to its stability and tissue-specific expression, these results indicate that the VP1 pseudocapsids, coupled with their efficient transfer of biologically useful information, should make this toute of gene deliveryan attractive proposition for further exploration with regard to gene therapy.

納豆菌は地球を救う

九州大学農学部 原 敏夫

発酵食品には、乳からのチーズのように食の素材である農畜水産物の保存性を高める目的と、葡萄からのワインのようにより高い付加価値を付ける目的があります。微生物といふいわば「小さな匠」たちの力を借りて、本来の食の素材とはまったく違う味を持つ食品への加工技術を考えることができます。発酵食品には人類が歩いてきた道が濃縮されて文明の鏡として写っていえそうです。

温かいご飯に納豆。納豆は日本人の独創の産物だと信じていました。ところが、東アジア一帯に「納豆文化圏」が形成されていたのです。そのまま生では食べられない大豆を微生物を利用して摂取可能な形へと変換した発酵食品である「納豆」はまさに古代人の知恵といえるでしょう。

ところで、「食糧」とともに二十一世紀のキーワードは「環境」。なかでも地球の砂漠化。かつて中央アジアの大地を潤おしたアラル海も、今では消滅しています。ところがどうやら、砂漠の拡大防止と砂漠の緑化に「納豆」がひと役かえそうなのです。納豆の糸に放射線を照射して生成する架橋体ポリマー。放射線照射で適度の橋かけを受け、納豆の糸の間で3次元構造を取り、できたすき間に水分子が閉じ込められて吸水力が生じるのです。水を吸水し、膨潤した透明なハイドロゲル。保水能力は抜群。納豆の糸たった1グラムで5リットルの水を蓄えることができます。市販の紙オムツや生理用品の5倍の吸水力。おまけに分解して水と炭酸ガスになれば、まさに鬼に金棒。このような生分解性高吸水性樹脂の特性を活かした環境リサイクルシステム、名付けて「グリーン・リサイクルシステム」構想を提唱しています。

これこそまさしく「納豆菌は地球を救う」といえるでしょう。

二十一世紀のキーワードは「食糧」と「環境」。一見、複雑そうな事象もじっくり観察してみると、バランス感覚に富む「納豆」の一筋の糸でスープと意外なほどスッキリ解きほぐすことができそうに思えませんか。

III. センターの活動状況

1. 教育活動

【家蚕遺伝子開発分野】

大学院生物資源環境科学研究科（博士課程）

上野由宜 カイコの体液キモトリプシンインヒビターの生理機能に関する研究

李 畔 カイコの腎臓形卵の分子生物学的研究

(李 畔 氏は中国西南農業大学からの短期交換留学生)

訪問教授・研究員

盧 時甲（韓国、慶北大学 教授）

カイコとクワコの比較生物学的研究

趙 萍（中国、四川省蚕桑研究所 研究員）

カイコの体液タンパク質に関する遺伝学的研究

姜 永煌（中国、浙江大学 講師）

カイコ消化液35kプロテアーゼに関する研究

外国人来訪者

向 伸 懷（中国、西南農業大学学長）

【植物遺伝子開発分野】

大学院生物資源環境科学研究科（修士課程）

Pa Pa Aung ミャンマーイネの遺伝子資源学的研究

侍鳥亜沙子

イネのアミロペクチン枝作り酵素に関する変異体の遺伝・育種学的研究

- 泉原広和 イネ種子貯蔵タンパク質の集積過程におけるシャペロンの役割に関する研究
- 臼井基樹 イネ*shurunken*突然変異体の原因酵素の解明に関する研究
- 大学院生物資源環境科学研究科（博士課程）
- 上村祐二 イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンに関する遺伝・育種学研究
- 曲楽慶 イネグルテリン変異体に関する遺伝学的研究
- 西愛子 イネ種子胚乳デンプンの糊化特性に関する研究
- 松坂弘明 イネ種子貯蔵タンパク質プロラミンの生合成集積過程における遺伝的調節機構の解析
- 山下和宏 イネ胚乳デンプンに関する遺伝・育種学的研究
- Sadar Uddin Siddiqui パキスタンイネの遺伝子資源学的研究
- 田懷東 イネ種子貯蔵タンパク質57-H突然変異に関する遺伝学的研究
- 浅川今日子 イネ種子胚乳澱粉のフォスフォリラーゼに関する変異体の遺伝学的研究
- 外国人研究生
- Jahan MD Sarwar バングラディッシュイネの遺伝子資源学的研究
- 【微生物遺伝子開発分野】
- 大学院生物資源環境科学研究科（修士課程）
- 上田 芳久 ポリグルタミン酸の構造と機能
- 片山 聰 エンベロープ糖蛋白質HIV-1gp120の生産とその利用
- 蒲池 泰治 *Streptomyces azureus* の形態形成遺伝子*minDSA*の改変

| | |
|-------------------------|---|
| 川津 領一 | 高度好熱菌 <i>Thermus</i> sp. TMY の分類と特性 |
| 谷 育子 | 生体外蛋白質合成系の高効率化 |
| 丸山 繁美 | 硝酸還元酵素遺伝子のサイレージ乳酸菌への導入 |
| 島貫 恵実 | シュードキャップシドVP1を利用した遺伝子治療技術の開発 |
| 村田 匠札 | 生体外蛋白質合成系の高効率化 |
| 山内 真理子 | 放線菌のDNA転移に関与する <i>spoIIIE</i> 様遺伝子の構造・機能解析 |
| 山崎 かおり | ポリグルタミン酸架橋体合成プロセスの開発 |
| 大学院生物資源環境科学研究科（博士課程） | |
| 酒見 博士 | <i>Streptomyces laurentii</i> における接合性プラスミドのkil-korシステムに関する研究 |
| 江口 智子 | サイレージ乳酸菌の機能性プラスミドに関する研究 |
| 稻垣 史生 | 地熱環境下におけるシリカ鉱物形成に関する高度好熱性細菌の作用解析 |
| 西山 孝 | 放線菌の形態分化と二次代謝の多面形質発現に機能する遺伝子の解析 |
| Adel Kamal Ramadan Okba | Effects of bacitracin on mycelial growth, sporulation and pock formation in thiostrepton-producing <i>Streptomyces</i> species. |
| 樽井 寛 | 昆虫機能を利用した生体外蛋白質合成系の構築 |
| 受託研究生 | |
| 森田晴子 ((株)ふくや) | ポリグルタミン酸架橋体の蜂の巣構造解析 |

牧 祐晶 ((株)ふくや)

エコ対応型新規生分解性包装容器の開発

2. 科学研究費・共同、受託研究等

【家蚕遺伝子開発分野】

基盤研究（A）研究代表 藤井 博、分担 伴野 豊

「カイコキモトリプシンヒビターの生理機能に関する研究」

基盤研究（A）研究分担 藤井 博、伴野 豊

「カイコの胚発生・後胚子発生における構成遺伝子と特殊遺伝子の差時的発現制御機構」

国際学術研究 研究代表 藤井 博

「既知連関群とRFLP連関群及び染色体地図の統合に関する研究」

農林水産省受託研究

「カイコゲノム解析とその利用法の開発」

【植物遺伝子開発分野】

基盤研究（A）研究代表 佐藤 光、分担 熊丸敏博

「低プロラミン米の育種」

基盤研究（C）研究代表 熊丸敏博、分担 佐藤 光

「突然変異を用いたコメ貯蔵タンパク質合成関連遺伝子の単離と解析」

農林水産省受託研究

「イネ・ゲノムの有用遺伝子の単離及び機能解明と利用技術の開発」

農林水産省受託研究

「遺伝子組換え及びクローン技術による画期的な動植物の開発」

農林水産省農業生物資源研究所環境応答研究室 中村保典

「イネのアミロペクチン変異体の特性解析」

(株) レオロジー機能食品研究所

「血液レオロジー機能向上に及ぼすコメタンパク質の影響とコメタンパク質の遺伝的変異の探索」

(株) アレルゲンフリー技術研究所

「米アレルゲンの低減化に関する研究」

ワシントン州立大学 Dr. Tomas Okita

「イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンの生合成・集積過程を制御する遺伝子に関する研究」

【微生物遺伝子開発分野】

基盤研究(B) 研究代表 緒方靖哉

「好熱菌のシリカ誘導蛋白質の特性とシリカ鉱物化機構」

基盤研究(A) 研究分担 緒方靖哉

「シリカ・微生物を用いた地球表層水中のアルミニウムの制御に関する研究」

国際学術研究 研究分担 緒方靖哉

「C1 化合物に特異的な新規結晶酵素の構造と反応機構」

長瀬科学技術振興財団研究助成金 緒方靖哉

「好熱菌のシリカ誘導タンパク質の構造と機能」

財団法人福岡県産業・科学技術振興財団受託研究費 原敏夫

「納豆樹脂を応用したエコ対応新規生分解性包装資材の開発事業化」

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所受託研究費 原敏夫

基盤研究(C) 研究代表 土居克実

「放線菌のDNA転移に関する遺伝子発現制御機構の時間的・空間的解析」

三島海雲記念財団学術奨励金 研究代表 土居克実

「*Lactobacillus* 属乳酸桿菌の遺伝子操作による産業利用株の作出」

日本学術振興会特別研究員-PD 費 横山英之

「放線菌DNAの構造維持、複製および分配におけるヒストン様タンパク質の機能解析」

日本学術振興会特別研究員-DC 費 稲垣史生

「地熱水中のシリカスケール形成に関する微生物の解析と機能開発」

3. 講演会・セミナー・講習会

植物遺伝子開発分野

2000年3月21日

Dr. Thomas W. Okita (米国・ワシントン州立大学教授)

Control of Storage Protein Gene Expression by mRNA
Localization

微生物遺伝子開発分野

1999年5月31日

Dr. Jenny Littlechild (英国・エクセター大学教授)

“Cloning, overexpression and X-Ray structure of two Hyperthermophilic
Archaeal Enzymes”

4. 海外渡航

【家蚕遺伝子開発分野】

藤井 博

中華人民共和国（浙江大学）

1999年9月20日～1999年9月24日

「カイコとクワコの類縁性に関する共同研究とテレビ取材」

中華人民共和国（西南農業大学）

2000年2月29日～2000年3月7日

文部省科学研究費補助金 国際学術研究：大学間協力研究

「既知連関群とRFLP連関群及び染色体地図の統合に関する研究」の打ち合わせならびに家蚕遺伝子系統の特性調査

伴野 豊

大韓民国（慶北大学）

1999年9月7日～1999年9月10日

「カイコとクワコの類縁性に関する共同研究とテレビ取材」

中華人民共和国（西南農業大学）

1999年10月11日～1999年10月18日

西南農業大学招聘

「学術講演並びに研究交流」

中華人民共和国（吉林省蚕業科学研）

2000年1月5日～2000年1月12日

中国吉林省蚕業科学研究所招聘

「学術講演並びに研究交流」

【植物遺伝子開発分野】

熊丸敏博

アメリカ合衆国（パイオニア・ハイブリッド社、ワシントン州立大学）

1999年12月4日～12月12日

「イネ種子貯蔵タンパク質に関する研究打ち合わせ」

【微生物遺伝子開発分野】

緒方 靖哉

タイ国（チュラロンコン大学）

1999年8月1日～8月10日

「The Golden Jubilee project によるチュラロンコン大学理学部大学院学生の博士論文指導」

英国・オランダ（エクセター大学等）

1999年10月18日～11月2日

「C1 化合物に特異的な新規結晶酵素の構造と反応機構の研究」

原 敏夫

中華民国

1999年1月16日～1月18日

「アミノ酸工業会の現状調査」

外国人来訪者

Dr. Jenny Littlechild (イギリス・エクセター大学)

1999年5月29日～6月4日

高温適応性微生物の特異的酵素に関する研究開発についての討議

IV. 遺伝子資源系統の保存・管理

遺伝子資源系統の分譲・収集

家蚕遺伝子開発分野

本センター保存のカイコの系統は遺伝学を中心とする研究のための実験生物として蒐集されているものである。保存系統はまずその主要目的形質によってアルファベットで分類し、それに2位数を附し系統番号としている（同一起源の分枝系は3位数）。分類記号の内容及び1998年時における記号別保有数は以下の如くである。

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

このほか淘汰育成中のもの並びに各種実験系があるが、これらは大文字の記号を用いて区別しており、ここには記載しない。以下、各保存系統について解明された遺伝情報のほか、交配形式、起源及び導入元・発見・交雑の年次など主要な必要事項を記載する。蛋白質、酵素、染色体構成に関する情報の多くは本研究班によって解明されたものである。記載様式は系統番号、交配形式（染色体構成）、卵・幼虫・繭・蛹・成虫の遺伝形質、備考として起源・品種・交雑系統及び主要形質の誘発処理源、入手先、年次の順であるが、特記事項のない項目については省略する。また、例えば *w-3^{oe}* では白卵、幼虫皮膚透明（油蚕）、蛹・成虫の複眼白色、と種々の発育段階で変異形質を発現するが、このような場合には“卵”の項にのみ記載している。交雑によりはじめて認知され得る形質、蛋白質・酵素等の多型、未淘汰の混在系、致死性により正常を常に分離するもの、等については（ ）内に記号で記入し、特殊形質を標識するための計画的分離形質は&で併記している。また、*L*、*ms* 等については発現環節番号を（ ）内に示す。尚、交雑系統は原則として現番号で表示し、現有しないものについては品種名或いは大文字の記号を用いた。他機関からの受入系統は主形質の起源を能う限り記したが、出現から導入まで

の経緯は定かでない。例えばa80系統 {起源 春月系 (カネボウ, ×w31×w32×190, 1985年) } はカネボウから春月系交雑種に生じた*L-li*を分離する系の分譲を受け、これに本センターでw31,w32さらに190系統を1985年に交雑し*Xan*を標識形質として導入した育成系統であることを示す。遺伝子情報の概要是「家蚕遺伝子資源系統の特性情報増補第2版—1998—Genetical stocks and mutations of

Bombyx mori: important genetic resources」に記載している。

(分譲)

橋本 光政 兵庫県立伊和高校

実験観察・遺伝の交配実験材料としての蚕卵系統

p22,

c10

r03

l30

盧 時甲 韓国慶北大学天然繊維科 教授

系統分化及び発生分化に関する研究

b40

b41

b50

古沢 壽治 京都工芸繊維大学繊維学部

発生・分化に及ぼす宇宙放射線の影響に関する研究

l30

田村 俊樹 蚕糸・昆虫農業技術研究所

白卵遺伝子の解析

e 01

e 02

e 03

e 04

e 05

e 07

e 08

江口 良橘 蚕糸・昆虫農業技術研究所
病理遺伝学研究

i 30

d 16

d 17

t 51

小林 正彦 東京大学大学院農学生命科学研究所
発生・生理に関する研究

d 02

e 32

e 36

k 90

m 011

t 60

w 06

鳴 洪 九州大学比較社会文化研究科
5齢幼虫

大沼昭夫 蚕品種研究所
g 05

知識勝博 宮崎県総合農業試験場
w 32
w 30
l 012
n 50
o32
l 70

土田 耕三 感染症研究所
F 50

植物遺伝子開発分野

植物遺伝子開発分野におけるイネの遺伝子資源の収集と保存は、加藤茂包教授が当時の農林省農事試験場畿内支場に収集されていた水稻品種を九州大学に移したことから始まる。1921年の九州大学農学部開設に際し安藤広太郎教授、加藤茂包教授をはじめ当時の農事試験場のイネ学の第一線の研究者が招聘され、イネに関する様々な研究を開始した。加藤教授は研究開始当初から我國のイネの品種改良における遺伝子資源の重要性を説き、内外のイネ品種の積極的収集と保存を進め、大戦前にはすでに1,300点以上に達していた。イネの系統保存事業は農学第一(育種学)講座の盛永俊太郎、永松土巳、片山平、大村武の歴代の教授に継承され、1997年発足した遺伝子資源開発研究センター・植物遺伝子開発分野へ引き継がれ今日に至っている。1955年以降、イネの系統保存に対して文部省から特別予算措置が講ぜられた。

このように、本センターのイネの系統保存事業は九州大学農学部開設当初からイネの品種改良における遺伝子資源の開発と評価の重要性を洞見して行われてきたものである。これらのイネ品種・系統を用いて、ジャボニカ・インディカ品種の亜種的分化の発見やハイブリッドライス作出に必要な細胞質雄性不稔性の発見など先駆的研究が行われ、これらの成果はイネに関する基礎的、応用的研究に大きく貢献している。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 |
| TAL系統 | 中国在来品種・系統 | 476 系統 |
| IBP系統 | FAO 国際共同研究供試品種 | 276 系統 |
| R系統 | Lo系統と同時期に収集した県奨励品種 | 515 系統 |
| UP系統 | 国内外の陸稻品種 | 342 系統 |
| A系統 | 長崎原爆被曝再生株より採種した系統 | 100 系統 |
| FL系統 | 標識遺伝子系統 | 838 系統 |
| RT系統 | 転座系統 | 331 系統 |
| T系統 | 三染色体植物系統 | 44 系統 |
| M系統 | 放射線照射突然変異系統 | 178 系統 |
| CM系統 | 化学変異源処理突然変異系統 | 4,477 系統 |
| EM系統 | 胚乳形質に関する突然変異系統 | 1,392 系統 |
| 計 | | 11,708 系統 |

これらに加え、半数体、3倍体、4倍体等の倍数体系統、アフリカイネ(*Oryza glaberrima* Steud.)などを保存し、総保存系統数は既に1万点を越えている。さらに、近年アフリカや東南アジア諸地域への探索と世界各地の研究者との交流を通して、新たな品種・系統の導入を行っている。また、突然変異誘起処理によって新たな変異系統の作出も行っている。

遺伝子資源系統の導入と分譲

植物遺伝子開発分野では遺伝子資源研究センター設立以来、文部省科学研究費補助金海外学術調査の補助を得て1988年マダガスカル、タンザニアのアフリカ2カ国、1991年にはネパールおよびブータンのアジア2カ国への探索を行い、多数の品種・系統を導入してきた。この3年間でも、パキスタン、韓国など国内外の研究者との交流を通して、品種・系統の導入と分譲を活発に行っている。また、日本型品種ばかりでなく、印度型品種を用いて印数品種を用いて引き続きMNU受精卵処理を行い、新たな遺伝子資源の開発に努めている。

| 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 |
| 1999 | 130 | 0 | 1-30 | 7-1625 | 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 43種81株
- (B) 分離株 *Bacillus*属、*Lactobacillus*属、*Lactococcus*属、*Pediococcus*属、*Pseudomonas*属、*Enterococcus*属及び*Thermus*属 12種655株
- (C) 変異株 *Bacillus*属、*Lactobacillus*属および*Thermus*属 8種21株

II. 放線菌

- (A) 基準株 *Micromonospora*属、*Nocardia*属、*Rodococcus*属、*Streptomyces*属
および*Streptoverticillium*属 151種163株
- (B) 分離株 *Streptomyces*属 5種5株
- (C) 変異株 *Streptomyces*属 8種210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 77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
84種類
- (C) 変異・構築プラスミド 3000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
18種類
- (B) 分離ファージ 乳酸菌および放線菌系統 115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 32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*Trichoplolsia*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。

(導入)

Professor Mervyn Bibb (John Innes Institute, UK)

Streptomyces plasmid vector pIJ8600, pIJ8655, pIJ8686

理化学研究所 微生物系統保存施設

Lactobacillus casei JCM1136^T

(分譲)

九州工業大学 情報工学部 生物工学システム工学科

曾根 のぶ史 教授

Streptomyces azureus PK100C 菌株およびDNA

(寄託)

理化学研究所 微生物系統保存施設

Thermus sp. ootakeensis

V. センター規程

九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター規程

(趣旨)

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

(センターの目的)

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

(分野)

第三条 センターに、次の分野を置く。

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

(センターの長)

第四条 センターに長を置き、農学部の責任及び兼任の教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 Division

| | | |
|----------------|-------|---------------------|
| FUJII, Hiroshi | Ph.D. | Professor |
| BANNO, Yutaka | Ph.D. | Associate Professor |

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

Plant Genetic Division

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

- a) Collection, evaluation and preservation of rice genetic resources
- b) Mutagenesis and mutation spectrum in rice
- c) Genetic analysis of induced mutants in rice: Starch, protein and lipid stored in grain

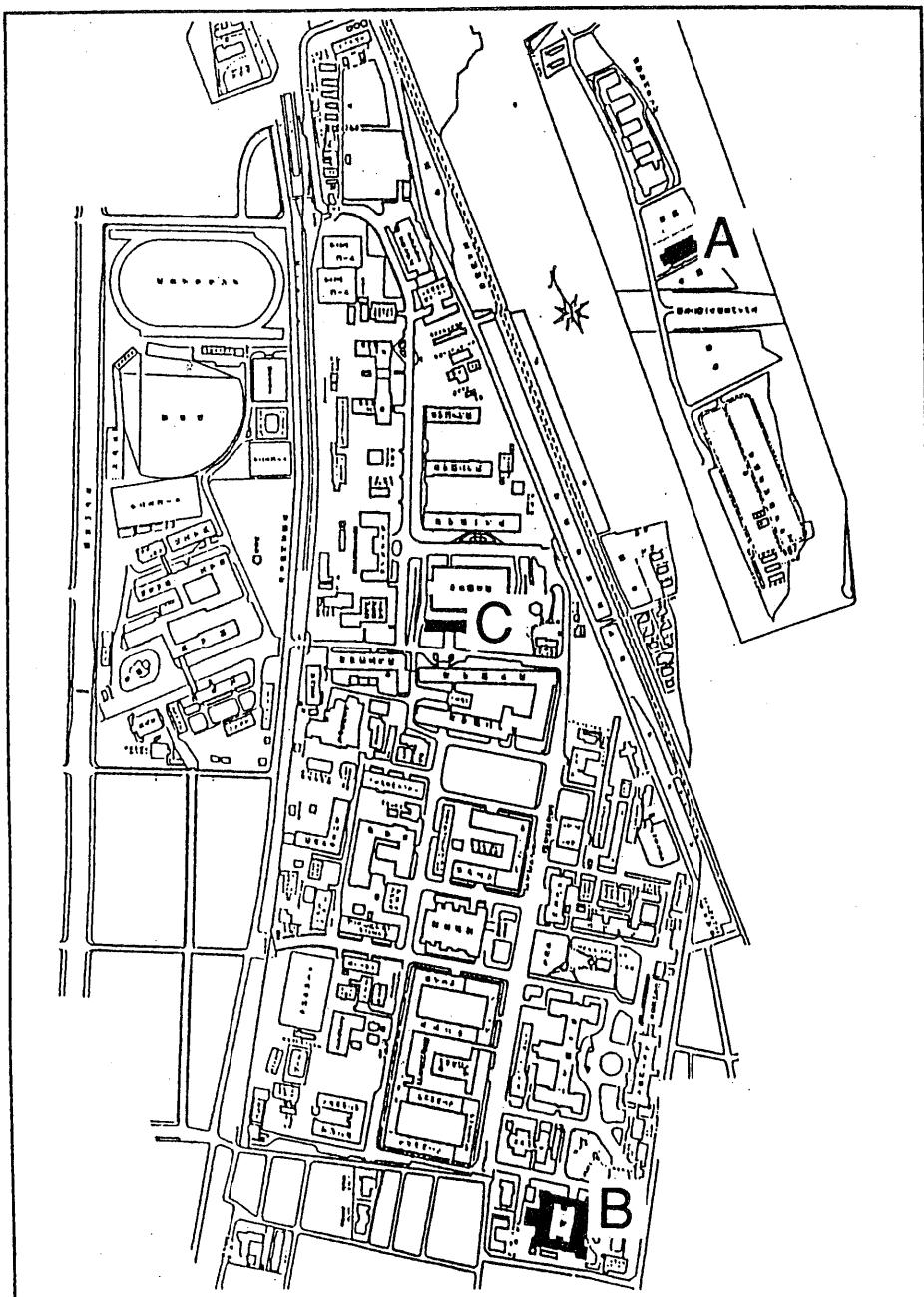
- d) Genome analysis of the useful genes in rice
- e) Isozyme variation in rice, barley and their relatives

Microbial Genetics Division

| | | |
|--------------|-------|---------------------|
| OGATA, Seiya | Ph.D. | Professor |
| HARA, Toshio | Ph.D. | Associate Professor |
| DOI, Katsumi | Ph.D. | Associate Professor |

- a) Survey, development and preservation of microbial genetic resources
- b) Genetics and breeding of industrial bacteria: *Streptomyces*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, etc
- c) Functional analysis and application of novel and useful genes found in industrial bacteria
- d) Differentiation, antibiotic production and pock formation in *Streptomyces*
- e) Genetic engineering in insect cells: Baculovirus expression vector

VII. センター研究棟配置図



A 家蚕遺伝子開発分野 :

Tel. 092 (641) 1101, Tel. & Fax. 092 (641) 2829

B 植物遺伝子開発分野 :

Tel. & Fax. 092 (642) 3056, 3057, 3058

C 微生物遺伝子開発分野 :

Tel. & Fax. 092 (642) 3053, 3054, 3059

編集後記

九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター年報第3号を発刊いたします。

本年度の年報は第2号までと異なり、発刊の時期が秋になりましたことをお詫び申し上げます。九州大学農学部では、大学院重点化が平成12度で完了いたしました。これに伴い、様々な変革の時期を迎えております。次号では重点化の完了した組織についてもご報告できることと存じます。

既に本センターが協力講座として参画しています遺伝子資源工学専攻は第一陣として、大学院農学研究科から大学院生物資源環境科学科へ移行いたし、遺伝子資源開発講座に統合され、従来の名称でそれぞれ分野を担当しております。大学院の教育・研究でも新たな気持ちで取り組んでおります。

国立大学の独立行政法人化や大学移転問題など、九州大学農学部も変革の中にあります。今後とも本年報にご意見ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

編集者

| | |
|----|-------|
| 代表 | 緒方 靖哉 |
| | 伴野 豊 |
| | 熊丸 敏博 |
| | 土居 克実 |
| | 西田 壽子 |

九州大学農学部
遺伝子資源開発研究センター年報

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

第3号

平成12年10月1日発行

九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター

〒812-8581 福岡市東区箱崎6丁目10-1

T E L 092-642-3053

F A X 同上

E-mail ogata@agr.kyushu-u.ac.jp

印刷所 門司印刷株式会社

〒801-0851

北九州市門司区東本町1丁目3番9号

T E L 093-321-4081