九州大学大学院　農学研究院
遺伝子資源開発研究センター

年報　　第6号

平成14年

九州大学大学院　農学研究院附属遺伝子資源開発研究センター

目　次

I.　センター概要・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　1

1. 目的
2. 沿革
3. 組織
4. 研究および事業内容
5. 運営委員会委員
6. 組織図

II.　研究成果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　5

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・　72

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・・・・・・・・・・・・・・　81

V.　センター規程・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　89

VI.　英文摘要・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　91

VII.　センター研究棟配置図・・・・・・・・・・・・・・・・・　93

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・細胞レポジトリー機能の充実を図る。

2. 沿革

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

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

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

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

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

3. 組織・教職員

センター長　藤井　博

家蚕遺伝子開発分野

教授	藤井　博	技官	西坂　章文
助教授	伴野　豊	技官	田村　圭
助手	山本　幸治	技能補佐員	江口　誠一
技官	西川　和弘	教務補佐員	何　寧佳

植物遺伝子開発分野

教授	佐藤　光	非常勤研究員	竹本　陽子
助教授	熊丸　敏博	非常勤技術員	上村　祐二、西　愛子
		非常勤補佐員	原田　良子、北野久美子、馬場知佐子

微生物遺伝子開発分野

助教授	原　敏夫	研究支援推進員	西田　壽子
講師	土居　克実		

4. 研究と事業内容

家蚕遺伝子開発分野

カイコ遺伝子資源の保存、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

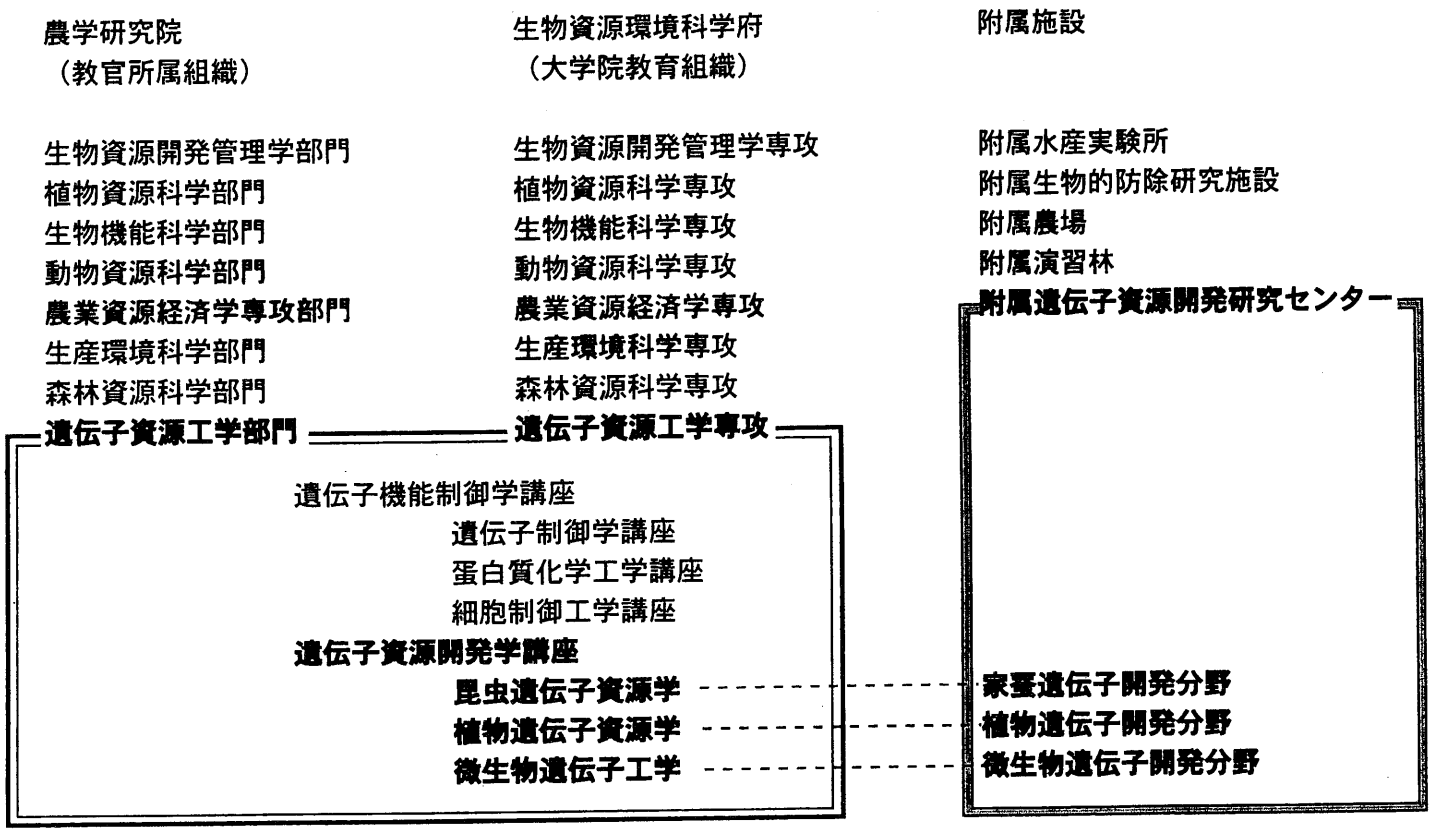
微生物遺伝子開発分野

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（平成15年4月1日　現在）

委員長	藤井　博	
教授	藤井　博	（遺伝子資源開発研究センター）
助教授	熊丸　敏博	（遺伝子資源開発研究センター）
講師	土居　克実	（遺伝子資源開発研究センター）
教授	吉村　淳	（生物資源開発管理学部門）
助教授	齋藤　和幸	（植物資源科学部門）
教授	木村　誠	（生物機能科学部門）
教授	服部　眞彰	（動物資源科学部門）
教授	村田　武	（農業資源経済学部門）
助教授	小林　哲夫	（生産環境科学部門）
教授	堤　祐司	（森林資源科学部門）
助教授	岡野　香	（附属農場）
教授	小川　滋	（附属演習林）
教授	久原　哲	（遺伝子資源工学部門）
助教授	麻生　陽一	（遺伝子資源工学部門）


農学研究院
（教官所属組織）
生物資源環境科学府
（大学院教育組織）
附属施設
生物資源開発管理学部門
植物資源科学部門
生物機能科学部門
動物資源科学部門
農業資源経済学専攻部門
生産環境科学部門
森林資源科学部門
遺伝子資源工学部門
生物資源開発管理学専攻
植物資源科学専攻
生物機能科学専攻
動物資源科学専攻
農業資源経済学専攻
生産環境科学専攻
森林資源科学専攻
遺伝子資源工学専攻
附属水産実験所
附属生物的防除研究施設
附属農場
附属演習林
附属遺伝子資源開発研究センター
遺伝子機能制御学講座
遺伝子制御学講座
蛋白質化学工学講座
細胞制御工学講座
遺伝子資源開発学講座
昆虫遺伝子資源学
植物遺伝子資源学
微生物遺伝子工学
家蚕遺伝子開発分野
植物遺伝子開発分野
微生物遺伝子開発分野

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

Tabunoki, H., Tanaka, H., Fujii, H., Banno, Y., Jouni, Z., Kobayashi, M., Sato, R., Maekawa, H., and Tsuchida, K. (2002) Isolation, characterization, and cDNA sequence of a carotenoid-binding protein from the silk gland of *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, **277**(35), 32133-32140

Ujita, M., Kimura, A., Nishino, D., Yokoyama, H., Banno, Y., Fujii, H. and Hara, H. (2002) Silkworm *Bombyx mori* 30-kDa Lipoproteins specifically Bind to Glucose-containing Carbohydrates. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**(10), 2264-2266

Song F. Zhang P., Yi F., Hong X., Lu C., Banno, Y., Fujii, H. and Koga, K. (2002) Study on fibroin heavy chain of the silkworm *bombyx mori* by fluorescence *in situ* hybridization. (FISH) *Science in china*, **45**(6), 663-668

Yukuhiro, K., Sezutsu, H., Itoh, M., Shimizu, K., and Banno, Y. (2002) Significant Levels of Sepuence Divergence and Gene Rearrangements have Occurred Between the Mitochondrial Genomes of the Wild Mulberry Silkmoth, *Bombyx mandarina*, and its Close Relative, the Domesticated Silkmoth, *Bombyx mori*. *Mol. Biol. Evol.* **19**(8), 1385-1389

B データベース

カイコの保存系統データベース

http://kaiko.kyushu-u.ac.jp/index.html

C プロシーディングス・その他

He Ningjia, Fujii, H., Yasukochi, Y., Banno, Y., and Yamamoto, K. (2002) Comparison of Genomic Structure of two Kunitz-type Chymotrypsin Inhibitor Genes in *Bombyx mori*. *Proc. The first international workshop of lepidoptera genomics* (Tsukuba, Japan), 52-53

Banno, Y., and Fujii, H., Linkage studies in the silkworm, Bombyx mori-Status puo in 2002. *Proc. The first international workshop of lepidoptera genomics* (Tsukuba, Japan), 92-93 (2002)

植物遺伝子開発分野

A 原著論文

Kumamaru T., Y. Uemura, Y. Takemoto, M. Ogawa and H. Satoh (2002) High-resolution mapping of *glup3* gene accumulating high amount of glutelin precursor. *Rice Genetics Newsletter* **19**: 62-63

Mizobuchi, R., H. Hirabayashi, R. Kaji, Y. Nishizawa, H. Satoh, T. Ogawa and M. Okamoto (2002) Differential expression of disease resistance in rice lesion-mimic mutants. *Plant Cell Reports* **21**, 390-396

Mizobuchi, R., H. Hirabayashi, R. Kaji, Y. Nishizawa, A. Yoshimura, H. Satoh, T. Ogawa and M. Okamoto (2002) Isolation and characterization of rice lesion-mimic mutants with enhanced resistance to rice blast and bacterial blight. *Plant Science*, **163**, 345-353

Pa Pa Aung, T. Kumamaru and H. Satoh (2002) Genetic diversity of seed storage prolamins, in Myanmar local rice cultivars. *Rice Genetics Newsletter* **19**, 65-67

Qu L. Q., X. L. Wei, H. Satoh, T. Kumamaru, M. Ogawa and F. Takaiwa (2002) Inheritance of alleles for glutelin α-2 subunit genes in rice and identification of their corresponding cDNA. *Theor. Appl. Genet.* **105**, 1099-1108

佐藤　光　(2002)　変わりゆく遺伝資源　–イネを例として-,
農林水産技術研究ジャーナル　25巻1号　pp. 43-46

Takemoto Y., S. J. Coughlan, T. W. Okita, H. Satoh, M. Ogawa and T. Kumamaru (2002) The rice mutant *esp2* greatly accumulates the glutelin precursor and deletes the protein disulfide isomerase. *Plant Physiol.*, **128**, 1212-1222

Umemoto, T., M. Yano, H. Satoh, A. Shomura, Y. Nakamura (2002) Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between japonica-type and indica-type rice varieties. *Theor. Appl. Genet.*, **104**, 1-8

Ushijima, T., H. Satoh and T. Kumamaru (2002) Mapping of *esp1* gene for cystein-poor (CysP) prolamin decreased mutant in rice. *Rice Genetics Newsletter* **19**, 64-65

B　データベース等

イネ保存系統データベース公開

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

微生物遺伝子開発分野

A　原著論文

土居克実、岩武敦司、江口智子、大桃定洋、緒方靖哉（2002）サイレージ発酵におけるバクテリオシンの有効利用と高生産性の追究、*生物工学会誌*、**80**, 578.-580

K. Doi, T. Eguchi, S-H. Choi, A. Iwatake, S. Ohmomo and S.Ogata (2002) Isolation of Enterocin SE-K4-Encoding Plasmid and a High Enterocin SE-K4 Producing Strain of *Enterococcus faecalis* K-4, *J. Biosci. Bioeng.*,**93**, 434-436

O. Pringsulaka, S. Chavanich, K. Doi and S. Ogata (2002) Changes in the population of a wide host range actinophage isolated from Thai soil and host streptomycetes in Thai and Japanese soil, *Actinomycetol.*,**16**, 21-25

関範雄、伊藤国億、原敏夫、船岡正光（2002）植物系天然素材による環境配慮型生活材料の開発に関する研究（第 6 報）、平成 14 年度　岐阜県生活技術研究所研究報告　5

H. Sakemi, S. Nishitake, M. Rodprapakorn, T. Shirakami, S. Takechi, K. Doi and S. Ogata (2003) Nucleotide Sequence of Conjugative and Integrating Plasmid pSLS from *Streptomyces laurentii* ATCC31255, *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **47**, 407-417.

B　著書・総説

緒方靖哉: (2002)「新規微生物現象の解明と応用に関する研究」, *日本農芸化学会誌* **76** (2), 102-113

緒方靖哉: (2002)「乳酸菌工学の未来像　–バイオプリザベーションとプロバイオティクス-」, *生物工学会誌*, **80** (12), 568 (2002).

原敏夫（2003）「納豆樹脂」グリーンプラジャーナル　12

因京子、土居克実（2003）「留学生に関する報告」、九州大学留学生教育・研究環境調査報告書、九州大学留学生教育・研究環境調査委員会編、p.7-33

C　プロシーディングス他

原敏夫: (2002)「先駆者に聞く！」, JBDA News Letter, 5,

原敏夫: (2003)「納豆の糸から化粧品素材を開発」, 日経バイオビジネス,（2003. 7）, 61

原敏夫: (2002)「放射線照射による納豆樹脂の合成とその利用」,　放射線利用試験研究DB-020155

原敏夫: (2002)　九大学生新聞

原敏夫: (2003)「納豆の糸から樹脂を生成　多彩な用途に夢がふくらむ」, 鴻都, **56**, 24

原敏夫: (2003)「『夢・創造博覧会2003』　開催」, 九大広報、**29**、9

原敏夫:（2003）「納豆樹脂を利用した沙漠緑化戦略　–グリーン・リサイクルシステム構想–」, さばく、**38**

原敏夫:（2003）「納豆樹脂でふん尿たい肥化」、十勝毎日新聞

T. Hara (2003 Production and application of degradable biopolymer, poly(γ-glutamic acid), in Japanese vegetable cheese, "natto". Japan/Taiwan Symposium on molecular biology of functional regulation in plant and microbe (Saga, Japan)

K. Doi, S. Nitisinprasert, S. Ohmomo and S. Ogata (2002) Isolation and characterization of a high enterocin SE-K4 producing thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4 from Thai silage, The 3rd joint seminar on development of thermotolerant microbial resources and their applications (Chiangmai, Thailand), p.143.

緒方靖哉、土居克実（2003）「シリカの鉱物化に好熱菌が作用する」九州大学研究紹介, **20**, 51-1～51-2

2. 原著論文要旨

家蚕遺伝子開発分野

The Journal of Biological Chemistry

Vol. 277, No. 35, pp. 32133~32140 (2002)

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 277, No. 35, Issue of August 30, pp. 32133–32140, 2002
Printed in U.S.A.
© 2002 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Isolation, Characterization, and cDNA Sequence of a Carotenoid Binding Protein from the Silk Gland of *Bombyx mori* Larvae*

Received for publication, May 8, 2002
Published, JBC Papers in Press, June 6, 2002, DOI 10.1074/jbc.M204507200

Hiroko Tabunoki‡, Hiromu Sugiyama§, Yoshiro Tanaka¶, Hiroshi Fujii‖, Yutaka Banno‖, Zeina E. Jouni, Masahiko Kobayashi‡‡, Ryoichi Sato‡, Hideaki Maekawa§§, and Kozo Tsuchida§§¶¶**

*From ‡Bio-Application and System Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, Koganei, Tokyo 183-0054, Japan, the §Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan, ¶Lion Corporation, Edogawa, Tokyo 132-0035, Japan, the ‖Center of Genetic Resources, University of Kyushu, Fukuoka 812-0053, Japan, the **Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, University of Arizona, Tucson, Arizona, 85721, the ‡‡Department of Agrobiology, University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan, and the §§Department of Radiological Protection, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku, Tokyo 162-8640, Japan*

A carotenoid binding protein (CBP) has been isolated from the silk glands of *Bombyx mori* larvae. The protein has an apparent molecular mass of 33 kDa and binds carotenoids in a 1:1 molar ratio. Lutein accounts for 90% of the bound carotenoids, whereas α-carotene and β-carotene are minor components. Immunological analysis demonstrated the presence of CBP only in the yellow-colored tissues of the silk gland, midgut, testis, and ovary. Several phenotypes of *B. mori* mutants linked to carotenoid transport have been utilized to characterize CBP. The *Y* (yellow hemolymph) gene controls uptake of carotenoids from the midgut lumen into the midgut epithelium, and larvae with the $+^{Y}$ gene lack this property. Immunoblotting analysis confirmed the presence of CBP in mutants with the dominant *Y* gene only. Immunohistochemistry verified the localization of CBP in the villi of the midgut epithelium, indicating that CBP might be involved in absorption of carotenoids. A cDNA clone for CBP encoding a protein of 297 amino acids has been isolated from the *B. mori* silk gland cDNA library. The deduced amino acid sequence revealed that CBP is a novel member of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein family with its unique structural feature of a StAR-related lipid transfer domain, known to aid in lipid transfer and recognition. Lutein-binding capacity of the recombinant CBP (rCBP) determined by incubating rCBP with lutein followed by immunoprecipitation using anti-CBP IgG conjugated to protein A-Sepharose, demonstrated the formation of a lutein-rCBP complex. Sequence analyses coupled with binding specificity suggest that CBP is a new member of the StAR protein family that binds carotenoids rather than cholesterol.

Carotenoids play important and diverse roles in insects. For **example**, a deficiency of carotenoids in *Drosophila melanogaster* **causes** a decrease in visual sensitivity (1). Phototactic responses are lost when the silkworm *Bombyx mori* larvae are reared on a carotenoid-free diet (2). The green color, a product of yellow and blue bile pigments, serves a camouflage role in insects (3). The production of a yellow cocoon in *B. mori* is dependent on the availability of carotenoids in the silk gland site of silk production. How dietary carotenoids are transferred from the midgut to the silk gland via the hemolymph is unclear. The existence of cellular carrier proteins that facilitate this transfer process has been predicted for many years (4). A lutein binding protein (LBP)[1] was purified from *B. mori* midgut (5). LBP is a 35-kDa, water-soluble protein found in the midgut, testis, and fat body. However, the role of this protein in lutein transfer and its sequence has not been reported. In mammalian systems many carotenoid-specific binding proteins have been identified (6–8). Three cytosolic retinol binding proteins, type I, II, and III, and two cytosolic retinoic acid binding proteins have been described (8). Retinoid binding proteins belong to the lipocalin family, the members of which share a very low sequence identity. The ligand-binding sites of these lipocalins differ in their structural details providing distinct ligand selectivity (9).

In insects, transport of absorbed carotenoids by hemolymph lipoprotein, lipophorin, has been documented by many investigators (10, 11). Lipophorin serves as a reusable shuttle, which moves lipids from one tissue to another without itself entering the site (12, 13). Transfer of carotenoids from midgut to lipophorin or from lipophorin to silk gland occurs at the interface between cell plasma membrane and hemolymph. Lipophorin selectively deposits certain lipids at specific tissues. For example, during the larval stage lipophorin delivers diacylglycerol mainly to fat body, hydrocarbon to integument, and carotenoids to silk gland and reproductive tissues. The observed selectivity is not fully understood or characterized, although some of the proteins such as lipid transfer particle (14) and the lipophorin receptor (15) involved in lipid mobilization have been identified. It is conceivable that other cell surface components are present to facilitate the selective lipid delivery.

Genetic linkage mapping has identified three genes whose products control the uptake and transport of carotenoids in

* **The costs of** publication of this article were defrayed in part by the payment **of page** charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate **this fact.**

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the DDBJ/GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s) AF309498.

¶¶ To **whom** correspondence should be addressed: Division of Radiological Protection, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku, Tokyo 162-8640, Japan. Tel.: 81-3-5285-1162; Fax: 81-3-5285-1162; E-mail: kozo@nih.go.jp.

[1] The abbreviations used are: LBP, lutein-binding protein; CBP, carotenoid-binding protein; rCBP, recombinant CBP; StAR, steroidogenic acute regulatory protein; START, StAR-related lipid transfer; IPTG, isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside; *Y*, yellow hemolymph; *I*, yellow inhibitor; *C*, golden yellow cocoon; BSA, bovine serum albumin; PBS, phosphate-buffered saline; RACE, rapid amplification of cDNA ends; HPLC, high-performance liquid chromatography.

Biosci. Biotechnol. Biochem., 66 (10), 2264-2266 (2002)

Biosci. Biotechnol. Biochem., 66 (10), 2264-2266, 2002

Note

Specific Binding of Silkworm *Bombyx mori* 30-kDa Lipoproteins to Carbohydrates Containing Glucose

Minoru UJITA,[1,2,†] Akihiro KIMURA,[1] Daisuke NISHINO,[1] Eiji YOKOYAMA,[2] Yutaka BANNO,[3] Hiroshi FUJII,[3] and Akira HARA[1,2]

[1]*Laboratory of Biological Chemistry, Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture and* [2]*Agricultural High-Tech Research Center, Meijo University, Tempaku-ku, Nagoya 468-8502, Japan*
[3]*Institute of Genetic Resources, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan*

Received April 5, 2002; Accepted June 5, 2002

Insect lectins are important as part of nonspecific self-defense, but their antifungal mechanisms remain to be elucidated. Fungi contain glucans on the cell surface and insect glucan-binding proteins are considered to be essential for antifungal mechanisms. We purified glucose-binding proteins from hemolymph of pupae of the silkworm *Bombyx mori*, and the amino acid sequence analysis showed that their two proteins are 30-kDa lipoproteins, major components of *B. mori* hemolymph. These lipoproteins specifically bound to glucose and glucans, suggesting that they are involved in insect self-defense systems.

Key words: *Bombyx mori*; hemolymph; fungi; glucan; lipoprotein

Insects have self-defense systems against invading microorganisms such as bacteria and fungi, as vertebrates do.[1] Vertebrates have acquired immunity, and invertebrates, including insects, have innate immunity consisting of non-specific factors, instead of acquired immunity. Insect immunity consists of cellular and humoral reactions, and both reactions work in concert to prevent insects from acquiring infections of microorganisms. Humoral reactions involve a lot of immune proteins such as lectins and binding proteins triggering immune reactions. In many instances, however, antifungal mechanisms are not clearly known compared to antibacterial mechanisms. Fungi contain glycoproteins, glucans, and chitin on the cell wall.[2] The major structural components of the fungal cell wall are α-1,3-, β-1,3-, and β-1,6-glucans. α-1,3-Glucan is found on the cell surface of several pathogenic fungi and may be an important common virulence determinant.[3] Here we describe the purification and characterization of glucan-binding proteins in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.

The p22 strain of *B. mori*, maintained in the Silkworm Genetic Division, Institute of Genetic Resources, Kyushu University, was used. The hemolymph of *B. mori* pupae was put on a column of maltose-agarose (Honen) or glucan (from *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma) in a loading buffer containing 125 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, and then washed with the loading buffer.[4] The glucan column was prepared by packing insoluble glucan in a column. In some cases, 2.5 mM EDTA instead of $CaCl_2$ or 100 mM competing monosaccharides and 5 mg/ml glucans (glycogen and dextran) were added to the loading buffer and samples. The column was eluted with the elution buffer (125 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 100 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5). The bound proteins were put through 10% SDS-PAGE, and detected by silver staining or electroblotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Sequi-Blot, Bio-Rad).[5] The proteins were cut from the PVDF membranes and sequenced by automated Edman degradation on a gas-phase protein sequencer (PPSQ-21A, Shimadzu).

Glucose-binding proteins were purified from the pupal hemolymph of the silkworm *B. mori* by affinity chromatography on maltose-agarose. Several proteins bound to glucose in a calcium-independent way (Fig. 1). The N-terminal amino acid sequences of two 30-kDa glucose-binding proteins were analyzed, and we found that they were *B. mori* 30-kDa lipoproteins (19G1 and 6G1), major plasma proteins of *B. mori* (Fig. 2).[6-8] However, the amino acid sequences of other glucose-binding proteins from the hemolymph could not be identified, probably because they are N-terminally blocked. The binding of these lipoproteins to maltose-agarose was inhibited by glucose, glycogen, or dextran, but not by the other monosaccharides as *N*-acetylglucosamine, galactose, *N*-

† To whom correspondence should be addressed. Tel: +81-52-832-1151 ext. 6076; Fax: +81-52-835-7450; E-mail: ujita@ccmfs.meijo-u.ac.jp

Abbreviations: PVDF, polyvinylidene difluoride

SCIENCE IN CHINA (Series C), Vol. 45, No. 6, 663-668, 2002

Vol. 45 No. 6 SCIENCE IN CHINA (Series C) December 2002

Study on fibroin heavy chain of the silkworm *Bombyx mori* by fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

SONG Fangzhou (宋方洲)[1,2], ZHANG Pingbo (张平波)[2,3], YI Faping (易发平)[1,2], HONG Xijun (洪锡钧)[3], LU Cheng (鲁 成)[2], Yutaka Banno[4], Hiroshi Fujii[4] & Katsumi Koga[4]

1. College of Basic Medical Sciences, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China;
2. Key Sericultural Laboratory of Agriculture Ministry, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China;
3. School of Life Science, Southwest China Normal University, Chongqing 400715, China;
4. Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, 812-8581, Japan
Correspondence should be addressed to Song Fangzhou (email: fzsong@swau.cq.cn)

Received February 25, 2002

Abstract The sericulture industry plays a very important role in our national economy. Silkworm (*Bombyx mori*) is always regarded as a model animal and biological reactor. There have been detailed studies on the structure, expression and control and molecular evolution of silk genes. However, few, if any, reports are available on the localization of structural genes in silkworm by molecular cytogenetics. The present experiment has tentatively localized the *Fib-H* gene at the distal end of the 25th linkage group, namely at the 25-0.0 position, and verified that *Fib-H* has only one locus, thus providing a temporary solution to the problem about its localization.

Keywords: silkworm *Bombyx mori*, fibroin gene, fluorescence *in situ* hybridization, gene localization.

Silkworm (*Bombyx mori*), an insect of economic importance and a typical animal, comparable with fruit fly (*Drosophila melanogaster*) which has normally been used in classic genetic studies, has attracted wide attention for a long time. Fibroin is the key albumen of silk, which determines weight- and quality-related characteristics of cocoon silk. In 1972, Suzuki[1] first isolated and identified the mRNA of fibroin in the posterior part of silk gland of silkworm and determined some of its nucleotide sequences. In 1977, Ohshima[2] succeeded in cloning the whole fibroin gene and its flanking sequences at both ends and found that fibroin consisted mainly of heavy (H)-chain polypeptide of approximately 350 kD, (L) light-chain polypeptide of 25.8 kD and P25 protein. Researchers have done detailed studies on the structure of the H-chain gene[3—5], expression and control[6,7] and molecular evolution[8]. In experimental genetic studies, on the other hand, it has been made certain that the fibroin heavy chain gene (*Fib-H*) is located in the 25th linkage group, though its exact site on the chromosome remained unclear. Furthermore, there are no reports on the localization of other structure genes in silkworm by molecular cytology. In the present study, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed to investigate gene location of the chromosomes of silkworm in different phases of cell division so as to clarify the actual location of *Fib-H* gene on the chromosome. The results showed that *Fib-H* gene was located at the distal end

Mol. Biol. Evol. 19 (8): 1385-1389. 2002

Letter to the Editor

Significant Levels of Sequence Divergence and Gene Rearrangements have Occurred Between the Mitochondrial Genomes of the Wild Mulberry Silkmoth, *Bombyx mandarina*, and its Close Relative, the Domesticated Silkmoth, *Bombyx mori*

Kenji Yukuhiro, Hideki Sezutsu,*[1] Masanobu Itoh,† Koichi Shimizu,† and Yutaka Banno‡*

*Insect Genetics and Evolution Department, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki, Japan; †Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan; and ‡Division of Silkworm, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, Japan

The metazoan mitochondrial (mt) genome is typically a circular, double-stranded DNA molecule between 14 and 18 kb in size. This molecule encodes 37 genes: 13 protein genes, 2 ribosomal RNA genes, and 22 tRNA genes (Wolstenholme 1992). The order of these genes varies among metazoans (Boore 1999).

The mt genomes of 14 insects have been completely sequenced. These include (1) seven flies (Diptera), *Drosophila yakuba* (Clary and Wolstenholme 1985—X03240), *D. melanogaster* (Lewis, Farr, and Kaguni 1995—U37541), *D. mauritiana*, *D. sechellia*, *D. simulans* (Ballard 2000—AF200830 and AF200831 for *D. mauritiana*, AF200832 for *D. sechellia*, and AF200834, AF200841, and AF200852 for *D. simulans*), *Ceratitis capitata* (Spanos et al. 2000—AJ242872), and *Cochliomyia himinivorax* (Lessinger et al. 2000—AF260826); (2) two mosquitoes (Diptera), *Anopheles quadrimaculatus* (Mitchell, Cockburn, and Seawright 1993—L04272) and *A. gambiae* (Beard, Hamm, and Collins 1993—L20934); (3) the domesticated silkmoth (Lepidoptera), *Bombyx mori*, the Backokjam strain (Lee et al., unpublished data, but available in GenBank, accession number AF149768); (4) the honeybee (Hymenoptera), *Apis mellifera* (Crozier and Crozier 1993—L06178); (5) the locust (Orthoptera), *Locusta migratoria* (Flook, Rowell, and Gellisson 1995—X80245); (6) the kissing bug (Hemiptera), *Triatoma dimidiata* (Dotson and Beard 2001—AF301594); and (7) the Wallaby louse (Phthiraptera), *Heterodoxus macropus* (Shao, Campbell, and Barker 2001—AF270939). In all sampled insects other than the Wallaby louse, all mt gene rearrangements involve only tRNA genes.

Bombyx mandarina is a probable wild ancestor of the domesticated silkmoth, *B. mori*. *Bombyx mandarina* includes significant variation within species, e.g., a difference in chromosome number: whereas 27 chromosomes are seen in the haploid genome of this organism living in Japan (Sasaki, 1889), individuals in China and Far Eastern populations carry 28 chromosomes per haploid genome (Kawaguchi, 1928; Astaurov, Golisheva, and Roginskaya 1959). Note that *B. mori* carries 28 chromosomes per haploid genome. In this article, the gene rearrangements and sequences are compared between the mt genomes of Japanese *B. mandarina* and *B. mori*.

A *B. mandarina* sample was collected in Tsukuba, Ibaraki, Japan. *Bombyx mori* C108 strain has been maintained in the National Institute of Agrobiological Sciences. The entire mt genomes of *B. mandarina* and *B. mori* C108 strain were PCR-amplified in 13 and 11 overlapping fragments, respectively. As template in PCR, genomic DNA was prepared from a pair of silk glands of a final instar larva based on the standard extracting technique for genomic DNA (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989, p. 9.16–9.19). PCR primers were initially designed based on the sequences of Simon et al. (1994), and some of them were modified using the mt nucleotide sequence of *B. mori* Backokjam strain described earlier. The PCR amplifications were carried out in a 25-μl mixture containing 10 ng of total genomic DNA as a template, 200 nM of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 2.5 μl of TaKaRa Ex-*Taq*® buffer, and 1.25 U of TaKaRa Ex-*Taq*® (TaKaRa). All PCRs were performed using the following conditions: 3 min at 96°C, followed by 35 cycles of 15 s at 96°C, 15 s at 40–45°C, and 1–3 min at 68°C (1 min for each kb) followed by 5 min at 68°C. The two PCR-amplified fragments that contain the A+T-rich region and the alanine tRNA (*trnA*) gene, respectively, were fractionated by agarose-gel electrophoresis using SeaKem GTG agarose (BMA) and were purified using a QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen). These were subcloned into the pGEM-T Vector (Promega) and were sequenced with dRhodamine-terminator chemistry and BigDye-terminator chemistry using two vector-specific primers and internal primers. The remaining PCR-amplified fragments were purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and were directly sequenced using BigDye-terminator chemistry with the PCR primers and internal primers when necessary. All products were analyzed on an ABI 377 sequencer (ABI, Perkin-Elmer).

Nucleotide sequences of mt protein-, ribosomal RNA-, and tRNA-coding genes of *B. mandarina* and *B. mori* C108 strain were identified through BLAST searches in NCBI and were confirmed by homology search to mt DNA sequences of *D. yakuba* and *B. mori* Backokjam strain using Genetyx Mac version 10.1 (SDC). The invertebrate mt genetic code was used for

[1] Present address: Bioinfomatics group, RIKEN GSC, Yokohama, Kanagawa, Japan.

Abbreviations: *atp*, ATP synthase F0 subunit; *cob*, cytochrome *b*; *cox*, cytochrome *c* oxidase subunit; *nad*, NADH dehydrogenase subunit; *rrn*, ribosomal RNA; *trn*, transfer RNA.

Key words: mitochondrial genome, *Bombyx mandarina*, *Bombyx mori*, genetic differentiation.

Address for correspondence and reprints: Kenji Yukuhiro, Insect Genetics and Evolution Department, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan. E-mail: kygnis@affrc.go.jp.

Mol. Biol. Evol. 19(8):1385–1389. 2002
© 2002 by the Society for Molecular Biology and Evolution. ISSN: 0737-4038

Plant Cell Rep (2002) 21:390–396
DOI 10.1007/s00299-002-0525-1

BIOTIC AND ABIOTIC STRESS

R. Mizobuchi · H. Hirabayashi · R. Kaji
Y. Nishizawa · H. Satoh · T. Ogawa · M. Okamoto

Differential expression of disease resistance in rice lesion-mimic mutants

Received: 3 June 2002 / Revised: 9 August 2002 / Accepted: 12 August 2002 / Published online: 26 September 2002
© Springer-Verlag 2002

Abstract Lesion-mimic mutants are useful for investigating mechanisms of disease resistance. We have characterized five lesion-mimic mutants of rice (*Oryza sativa* L.): *spotted leaf 5–2* (*spl5–2*), *Spl12*, *spl13*, *spl14*, and *Spl15*, that have broad-spectrum resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* and the bacterial blight pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. Autofluorescence, a sign of disease resistance response, was detected in leaf-sheath cells of the *spl* mutants in the absence of pathogens. In addition, three pathogenesis-related genes, *PBZ1*, *PR1*, and *Cht3*, were expressed in *spl5–2*, *Spl12*, and *Spl15* after the appearance of lesion-mimicry. In contrast, expression of these genes in *spl13* and *spl14* started before lesion formation. Interestingly, in *spl13* and *spl14*, enhanced resistance to rice blast and bacterial blight was also induced before the appearance of lesion-mimicry. These results demonstrate that disease resistance is differently expressed in the *spl* mutants.

Keywords Rice · Mutation · Lesion-mimic · *Magnaporthe grisea* · *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*

Communicated by H. Uchimiya

R. Mizobuchi (✉) · R. Kaji · M. Okamoto
National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, Chikugo, Fukuoka 833–0041, Japan
e-mail: ritsuko@affrc.go.jp
Tel.: +81-942-523101, Fax: +81-942-537776

H. Hirabayashi
National Institute of Crop Science, Tsukuba, Ibaraki 305–8518, Japan

Y. Nishizawa
National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305–8602, Japan

H. Satoh
Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812–0053, Japan

T. Ogawa
National Agricultural Research Center for Western Region, Fukuyama, Hiroshima 721–8514, Japan

Abbreviations *HR*: Hypersensitive response · *PR*: Pathogenesis-related · *SA*: Salicylic acid · *SAR*: Systematic acquired resistance

Introduction

Cell death and disease resistance are intimately connected in plants (Shirasu and Schulze-Lefert 2000). One obvious cell death program in plants is the hypersensitive response (HR) to pathogens (Levine et al. 1994; Lamb and Dixon 1997). After the formation of a necrotic lesion, either as a part of a HR or as a symptom of disease, the systematic acquired resistance (SAR) pathway is activated. SAR activation results in the development of broad-spectrum, systemic resistance (Ryals et al. 1996; Smith 2000). Since lesion-mimic mutants form brown spots as a result of cell death, and some exhibit resistance to some pathogens, they are useful for investigating mechanisms of disease resistance. Therefore, lesion-mimic mutants have been isolated and characterized in many plant species (Dangl et al. 1996), including *Arabidopsis* (Greenberg and Ausubel 1993; Dietrich et al. 1994, 1997; Greenberg et al. 1994; Weymann et al. 1995; Rate et al. 1999), maize (Johal et al. 1995; Hu et al. 1996; Gray et al. 1997), barley (Jørgensen 1992; Wolter et al. 1993; Büschges et al. 1997), and rice (Sekiguchi and Furuta 1965; Kiyosawa 1970; Marchetti et al. 1983; Takahashi et al. 1999; Arase et al. 2000; Yin et al. 2000).

In the model dicot *Arabidopsis*, *acd* (*accelerated cell death*) and *lsd* (*lesions simulating disease*) mutants have been analyzed (Greenberg and Ausubel 1993; Dietrich et al. 1994; Greenberg et al. 1994, 2000; Weymann et al. 1995; Rate et al. 1999; Greenberg 2000). The *lsd1* mutants are resistant to both the fungal pathogen *Peronospora parasitica* and the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* (Dietrich et al. 1994). Recently, the *LSD1* gene was cloned; the predicted protein contains three zinc-finger domains and is hypothesized to regulate transcription, via either repression of a path-

ELSEVIER

Plant Science 163 (2002) 345–353

PLANT SCIENCE

www.elsevier.com/locate/plantsci

Isolation and characterization of rice lesion-mimic mutants with enhanced resistance to rice blast and bacterial blight

Ritsuko Mizobuchi [a,*], Hideyuki Hirabayashi [b], Ryota Kaji [a], Yoko Nishizawa [c], Atsushi Yoshimura [d], Hikaru Satoh [d], Tsugufumi Ogawa [e], Masahiro Okamoto [a]

[a] *National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, Chikugo, Fukuoka 833-0041, Japan*
[b] *National Institute of Crop Science, Tsukuba, Ibaraki 305-8518, Japan*
[c] *National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan*
[d] *Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-0053, Japan*
[e] *National Agricultural Research Center for Western Region, Fukuyama, Hiroshima 721-8514, Japan*

Received 7 February 2002; received in revised form 30 April 2002; accepted 6 May 2002

Abstract

We isolated five lesion-mimic mutants that showed reduced symptoms after infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* from 13 000 M_2 lines of rice (*Oryza sativa* L.). Genetic analysis showed that one mutant was allelic to *spl5* and this was named *spl5-2*; the other four were derived from new loci and named *Spl12, spl13, spl14, and Spl15. Spl12* and *Spl15* were dominant mutations, while the others were recessive. Lesions were visible in the dominant mutants (*Spl12* and *Spl15*) from an early developmental stage, while lesions were visible in the recessive mutations (*spl5-2*, *spl13*, and *spl14*) from 8–10 weeks after sowing. We analyzed the resistance to rice blast and bacterial blight using *spl* mutants derived from 14 loci. Resistance to two virulent strains of *M. grisea* was induced in *spl4, spl5-1, spl5-2, spl7, spl10, Spl12, spl13, spl14*, and *Spl15* plants. Moreover, growth of the bacterial blight pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* was also suppressed in these nine mutants. These results demonstrate that many of the *SPL* genes enhance general disease resistance. © 2002 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Rice; Mutation; Lesion-mimic; *Magnaporthe grisea*; *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*

1. Introduction

Cell death is a basic biological process that functions in many aspects of animal and plant development. One obvious cell death program in plants is the hypersensitive response (HR) to pathogens. The HR is characterized by a rapid collapse of infected tissues. Although recent studies have demonstrated that the several morphological and biochemical pathways in apoptosis are common to animals and plants [1,2], not all apoptotic events in animals occur during plant cell death [3–5]. This means that plants have acquired their own mechanisms for cell death when attacked by pathogens.

Lesion-mimic mutants are known in plants. These spontaneously form brown spots on leaves similar to lesions induced by pathogens. Since the brown spots are caused by cell death and the mutants eventually exhibit resistance to some pathogens, lesion-mimic mutants are expected to be useful for investigating mechanisms of disease resistance. Lesion-mimic mutants have been isolated in many plant species [6], including *Arabidopsis* [7–12], maize [13–15], barley [16–18], and rice [19–24].

In the well-known model dicot, *Arabidopsis*, *acd* (accelerated cell death) and *lsd* (lesions simulating disease) mutants have been identified and characterized [7–9,11,12,25,26]. Recently, the *LSD1* and *ACD2* genes were cloned [10,27].

* Corresponding author. Tel.: +81-942-52-3101; fax: +81-942-53-7776.
E-mail address: ritsuko@affrc.go.jp (R. Mizobuchi).

0168-9452/02/$ - see front matter © 2002 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.
PII: S0168-9452(02)00134-6

Theor Appl Genet (2002) 105:1099–1108
DOI 10.1007/s00122-002-1046-6

L.Q. Qu · X.L. Wei · H. Satoh · T. Kumamaru
M. Ogawa · F. Takaiwa

Inheritance of alleles for glutelin α-2 subunit genes in rice and identification of their corresponding cDNA clone

Received: 5 December 2001 / Accepted: 7 January 2002 / Published online: 30 October 2002
© Springer-Verlag 2002

Abstract Rice glutelins consist of acidic (α) and basic (β) subunits which are further separated into three polypeptide components assigned as α-1, α-2, and α-3 subunit components and β-1, β-2 and β-3 subunit components. Nine rice mutant lines with a decreased amount of the glutelin α-2 subunit component (α-2L) were obtained by screening about 6,800 potential mutant lines derived from the fertilized egg treatment with N-methyl-N-nitrosourea (MNU) using the SDS-PAGE method. The mutants were classified into three types of the increased α-1 subunit (α-1H/α-2L), the decreased β-2 subunit (β-2L/α-2L) and the increased α-3 subunit (α-3H/α-2L) represented by EM278, CM1707 and EM659, respectively. Iso-electric focus (IEF) analysis revealed that all of the mutants had an extremely low amount of a polypeptide with a 6.71 pI value, whereas a polypeptide with either a 6.50 pI value or with a 6.90 pI value increased significantly in α-1H/α-2L mutants or in α-3H/α-2L mutants, respectively. The β-2L/α-2L mutants had a decreased amount of a basic polypeptide with a 8.74 pI value. Genetic analysis revealed that the three types of mutants were controlled by a single incomplete dominant gene respectively, and the three are alleles. The gene was temporarily named *glu4*, which was found to be located on chromosome 1 linked with the *eg* and *spl6* genes. Two-dimensional electrophoresis analysis revealed that the *glu4* encoded polypeptides of pI 6.71/α-2 and pI 8.74/β-2. Amino acid sequence analysis suggested that the mutated acidic polypeptide was the product of a GluA subfamily gene. Northern and RT-PCR analyses revealed that *glu4* corresponded to the GluA-1 gene.

Keywords Rice glutelin · Mutant · Alleles · Gene function

Communicated by H.F. Linskens

L.Q. Qu (✉) · X.L. Wei
Institute of Genetics and Developmental Biology,
the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China
e-mail: lqqu@genetics.ac.cn
Tel.: 86-10-6487-8103, Fax: 86-10-6487-3482

L.Q. Qu · H. Satoh (✉) · T. Kumamaru
Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Hakozaki 6-10-1, Fukuoka 812-8581, Japan
e-mail: hsatoh@agr.kyushu-u.ac.jp
Tel.: 81-92-642-3056, Fax: 81-92-642-3056

M. Ogawa
Department of Life Science, Yamaguchi Prefectural University,
Sakurabatake, Yamaguchi 753-8502, Japan

F. Takaiwa
Institute of Agro-biological Resources, Kannodai 2-1-2,
Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

Introduction

Rice is not only one of the most important food resources but also one of the most important protein sources for humans worldwide, especially for those in developing countries where animal proteins are not easily available. Therefore, it is important to improve the quality and nutritional value of the protein in rice. Unlike other cereal crops those deposit prolamine as their main storage protein, rice stores a high content of glutelin accounting for more than 70% of total proteins on a weight basis (Ogawa et al. 1987; Li and Okita 1993). Compared to prolamine, glutelin is more easily digestible and contains a higher amount of the essential amino-acid lysine (Tanaka et al. 1975; Ogawa et al. 1987; Resurreccion et al. 1993). Since glutelin is the pre-dominate storage protein in rice seed, any change of this protein will certainly alter the seed quality.

It was confirmed that rice glutelin is synthesized as proglutelin with *Mr* 57,000 (57 kDa) on the membrane-bound polysomes, and that the proglutelin is processed proteolytically into acidic (α) and basic (β) subunits with *Mr* 40,000 (40 kDa) and *Mr* 20,000 (20 kDa), respectively, within the protein storage vacuole called the protein body II (PB II) (Yamagata et al. 1982; Zhao et al. 1983; Furuta et al. 1986; Krishnan and Okita 1986; Yamagata and Tanaka 1986). Kagawa et al. (1988) fractionated the acidic and basic subunits into three bands each, namely α-1, α-2 and α-3, and β-1, β-2 and β-3, respectively.

Theor Appl Genet (2002) 104:1–8
© Springer-Verlag 2002

T. Umemoto · M. Yano · H. Satoh · A. Shomura
Y. Nakamura

Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between *japonica*-type and *indica*-type rice varieties

Received: 29 January 2001 / Accepted: 12 April 2001

Abstract The present investigation revealed that the *alk* and *gel(t)* genes, which cause the differences between a *japonica* rice variety Nipponbare and an *indica* rice variety Kasalath in terms of the disintegration of endosperm starch granules in alkali solution and their gelatinisation in a 4 M urea solution, respectively, cosegregated in backcross inbred lines derived from a cross between the two varieties. The segregation pattern of the profile for amylopectin chain-length, which was distinguished by enrichment in short chains of DP≦11 and depletion in intermediate-size chains of 12≦DP≦24 in *japonica* as compared with *indica*, was exactly the same as those of the above physico-chemical properties of starch granules, and the gene was designated as *acl(t)*. Gene-mapping analysis showed that the *starch synthase IIa* (*SSIIa*) gene is located at the *alk* locus on chromosome 6 in the rice genome. These results lead us to the possibility that different alleles of the *SSIIa* gene are responsible for differences in amylopectin structure between the two varieties, in that SSIIa plays a distinct role in the elongation of short chains within clusters (A+B_1 chains) of amylopectin. It is proposed that the activity of SSIIa in *japonica* rice is reduced in amount or functional capacity relative to the activity of this enzyme in *indica* rice. This, in turn, would explain why starch from *japonica* rice has a lower gelatinisation temperature than starch from *indica* rice and is more susceptible to disintegration in alkali or urea. The evidence for this hypothesis is that the *alk(t)*, *gel(t)*, *acl(t)* and *SSIIa* genes all map to the same locus.

Keywords *Indica* rice · *Japonica* rice · Amylopectin · Starch · Starch synthase

Communicated by J.W. Snape

T. Umemoto
Tohoku National Agricultural Experiment Station, Omagari, Akita 014-0102, Japan

M. Yano · A. Shomura
National Institute of Agrobiological Sciences, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

H. Satoh
Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

Y. Nakamura (✉)
Akita Prefectural University, Akita-City 010-0195, Japan
e-mail: nakayn@akita-pu.ac.jp
Fax: +81-18-872-1650

Present address:
T. Umemoto, National Agriculture Research Center, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

Introduction

It is known that the structure and crystalline organization of starch granules, and the molecular fine structure of amylopectin and amylose, are distinctly different among plant species and tissues. Rice (*Oryza sativa* L.) varieties have been classified into either *japonica*-type or *indica*-type (Oka and Morishima 1997) based on their morphological and physiological differences in, for example, the length of hull-hairs, seed dormancy, cold tolerance, and the disintegration of endosperm starch granules in alkali solution. Varietal differences in the disintegration of endosperm starch granules in alkali (KOH) solution were reported first by Warth and Darabsett (1914). Later, an association between the alkali disintegration and cooking property of rice was found (Little et al. 1958). A significant correlation was also found between disintegration in alkali and the gelatinisation temperature of milled rice (Juliano et al. 1964). Genetic studies with rice of *japonica*-type and *indica*-type revealed that a gene controlling the varietal difference in the alkali disintegration of starch granules, designated the *alk* gene, mapped on chromosome 6 (Kudo 1968). However, identification of the gene remained to be discovered.

Starch is composed of linear amylose and branched amylopectin. Amylose is synthesised by starch granule-bound starch synthase I (GBSSI) encoded by the *waxy* gene. The fact that amylose content is usually higher in endosperm starch of *indica* rice than that of *japonica* rice

The Rice Mutant *esp2* Greatly Accumulates the Glutelin Precursor and Deletes the Protein Disulfide Isomerase[1]

Yoko Takemoto, Sean J. Coughlan, Thomas W. Okita, Hikaru Satoh, Masahiro Ogawa, and Toshihiro Kumamaru*

Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812–8581, Japan (Y.T., H.S., T.K.); DuPont Agricultural Experimental Station, 402/4251, Wilmington, Delaware 19880–0402 (S.J.C.); Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, Washington 99164–6340 (T.W.O.); Department of Life Science, Yamaguchi Prefectural University, Sakurabatake, Yamaguchi 753–8502, Japan (M.O.)

Rice (*Oryza sativa*) accumulates prolamins and glutelins as storage proteins. The latter storage protein is synthesized on the endoplasmic reticulum (ER) as a 57-kD proglutelin precursor, which is then processed into acidic and basic subunits in the protein storage vacuole. Three *esp2* mutants, CM1787, EM44, and EM747, contain larger amounts of the 57-kD polypeptide and corresponding lower levels of acidic and basic glutelin subunits than normal. Electron microscopic observation revealed that *esp2* contained normal-appearing glutelin-containing protein bodies (PB-II), but lacked the normal prolamin-containing PB (PB-I). Instead, numerous small ER-derived PBs of uniform size (0.5 μm in diameter) and low electron density were readily observed. Immunoblot analysis of purified subcellular fractions and immunocytochemistry at the electron microscopy level showed that these new PBs contained the 57-kD proglutelin precursor and prolamin polypeptides. The 57-kD proglutelin was extracted with 1% (v/v) lactic acid solution only after removal of cysteine-rich prolamin polypeptides, suggesting that these proteins form glutelin-prolamin aggregates via interchain disulfide bonds within the ER lumen. The endosperm of *esp2* mutants contains the lumenal chaperones, binding protein and calnexin, but lacks protein disulfide isomerase (PDI) at the protein and RNA levels. The transcript of PDI was expressed in the seed only during the early stage of seed development in the wild type. These results suggest that PDI plays an essential role in the segregation of proglutelin and prolamin polypeptides within the ER lumen.

All plants utilize storage proteins as a reserve of nitrogen, sulfur, and carbon in the form of salt-soluble globulins or alcohol-soluble prolamins (Shewry and Casey, 1999). In addition to the alcohol-soluble prolamins typically found in cereals (Shewry and Tatham, 1999), rice (*Oryza sativa*) also accumulates glutelins, which are proteins homologous to the 11S globulin of soybean (*Glycine max*) and pea (*Pisum sativum*; Zhao et al., 1983; Takaiwa et al., 1987; Shotwell and Larkins, 1989). Although both storage proteins are initially synthesized on the endoplasmic reticulum (ER) membrane (Yamagata et al., 1982) and are translocated into the ER lumen, they are stored in morphologically distinct protein bodies (PB; Tanaka et al., 1980; Krishnan et al., 1986; Yamagata and Tanaka, 1986). Prolamins are stored as intracisternal inclusion granules within the ER lumen (PB-I), whereas glutelins are packaged in a protein storage vacuolar compartment (PB-II; Tanaka et al., 1980; Krishnan et al., 1986). These PBs are readily distinguishable at the light and electron microscopy levels. The prolamin-containing PB-I is spherical, with a diameter of about 1 to 2 μm, and exhibits concentric rings of varying electron density (Bechtel and Juliano, 1980; Tanaka et al., 1980; Krishnan et al., 1986; Yamagata and Tanaka, 1986). In contrast, the glutelin-containing PB-II is larger (3–4 μm), irregularly shaped, and of highly uniform staining density.

The cellular processes responsible for PB-I and PB-II formation are poorly understood. Although prolamin polypeptides are retained and assembled as intracisternal inclusion granules within the ER lumen, these proteins lack the usual ER retrieval/retention peptide signal at their C terminus. The rice prolamins may contain an unidentified ER retention signal like those proposed in a previous report to exist for the ER retention of other cereal prolamins (Altschuler et al., 1993). In an alternate manner, PB-I formation is the result of protein-protein interactions when the lumenal concentration of prolamins attains a critical level. Cellular processes have been identified that would elevate the local concentration of prolamin polypeptide within specific ER regions (subdomains). First, prolamin RNAs are not randomly distributed on the ER; rather, they are localized to the ER membranes that delimit PB-I (Li et al.,

[1] This work was supported by the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (grant nos. 10660009 and 12130826) and by the National Science Foundation (grant no. IBN–9982483 to T.W.O.). This research study is part of Project 0590 of the Agricultural Research Center, Washington State University.

* Corresponding author; e-mail kumamaru@agr.kyushu-u.ac.jp; fax 81–92–642–3057.

Article, publication date, and citation information can be found at www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.010624.

25. High-resolution mapping of *glup3* gene accumulating high amount of glutelin precursor

T. KUMAMARU[1], Y. UEMURA[1], Y. TAKEMOTO[1], M. OGAWA[2] and H. SATOH[1]

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

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

The major storage proteins of rice consist of 40 kDa acidic and 20 kDa basic glutelin subunits, 26 kDa globulin polypeptide, and 16 kDa, 14 kDa, 13 kDa and 10 kDa prolamin polypeptides (Tanaka *et al.* 1980). Seed protein extracted from *glup3* mutant lines, which were introduced from North Asian countries and preserved in Kyushu University, contain higher quantities of 57 kDa polypeptides and lower levels of 40 kDa acidic and 20 kDa basic glutelin subunits compared to Taichung 65 (Satoh *et al.* 1995).

Glutelins are initially synthesized as a 57 kDa precursor and transported to the vacuole where they are proteolytically processed into acidic and basic subunits (Yamagata *et al.* 1982). The 57 kDa polypeptide accumulated in *glup3* mutants is the proglutelin precursor. The *glup3* mutation is not a glutelin structural gene but a gene that likely affects the efficient processing of proglutelin precursor to mature glutelin subunits. The proglutelin precursor is accumulated in PBII, with the mature glutelin polypeptide in *glup3* mutant (unpublished data). Based on these, the analysis of *glup3* mutant, and the isolation and characterization of *Glup3* gene may lead to an understanding of the mechanism of glutelin accumulation.

To investigate the key gene of *glup3* mutant, we constructed the high-resolution linkage map of *Glup3* gene on chromosome 4. A *glup3* mutant line, EM856, was used. EM856 was induced from *japonica* rice variety Taichung 65. Linkage analysis was conducted using 50 homozygous plants for *glup3* from F2, a cross between EM856 and *indica* rice variety

26. Mapping of *esp1* gene for cystein-poor (CysP) prolamin decreased mutant in rice

T. USHIJIMA[1], T. KUMAMARU[1], M. OGAWA[2] and H. SATOH[1]

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

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

Rice endosperm accumulates both major types of storage proteins, prolamins and glutelins. Prolamins synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) retained within the ER lumen and accumulated in the protein body I (PB I) (Tanaka *et al.* 1980). However, it remains to be seen what kind of genes regulate the synthesis and accumulation process of rice prolamin polypeptides. Rice prolamins consist of more than 20 polypeptides. These prolamin polypeptides are divided into two classes: cystein-poor (CysP) and cystein-rich (CysR) prolamins. Probably, there are at least two regulation mechanisms for the synthesis and accumulation process of rice prolamins (Matsusaka ***et al.*** 2000). Prolamin mutants *esp1*, *esp3* and *Esp4*, were reported previously by Kumamaru ***et al.*** (1987). *esp1* mutant decreased several CysP prolamin polypeptides simultaneously, though it did not decrease the remaining CysP and CysR prolamin polypeptides. This suggests that *esp1* mutation is not involved in a structural gene encoding prolamin polypeptide, but a gene for the synthesis and accumulation process of some CysP prolamin polypeptides. The isolation and characterization of *Esp1* gene may lead to an understanding of the genetic regulation mechanism of synthesis and accumulation of prolamin polypeptides. In this study, as a first step for the isolation of *Esp1* gene, we determined the position of *Esp1* gene on chromosome 7.

To isolate *Esp1* gene, *esp1* mutant induced from a *japonica* rice cv. Kinmaze was crossed with an *indica* rice cv. Kasalath. F_1 plants were grown and self-pollinated to obtain F_2 seeds. F_2 seeds were cut into half and then the half with embryos were sown. The plants were cultivated to isolate the genomic DNAs from leaves. The remaining half without embryos were used for selecting the homozygous genotype for *esp1*, based on the storage protein profile by SDS-PAGE analysis. Result of linkage analysis using 109 *esp1* homozygous F_2 plants showed that the *Esp1* locus was mapped within 1.4 cM region, between a PCR marker e81.9-8.2 and an RFLP marker R2677 on chromosome 7 (Fig. 1). To decide the more precise position of *Esp1* gene, 910 *esp1* homozygous plants selected from other F_2 population, by SDS-PAGE, were used for linkage analysis with two PCR markers, e81.9-8.2 and e83.3-13. Thirty five and twenty seven recombinant plants were observed for e81.9-8.2 and e83.3-13, respectively (Fig. 1). We produced several PCR markers within 1.4 cM region, between 81.9 cM and 83.3 cM from the short arm terminal of chromosome 7. The recombinant plants will be useful for the

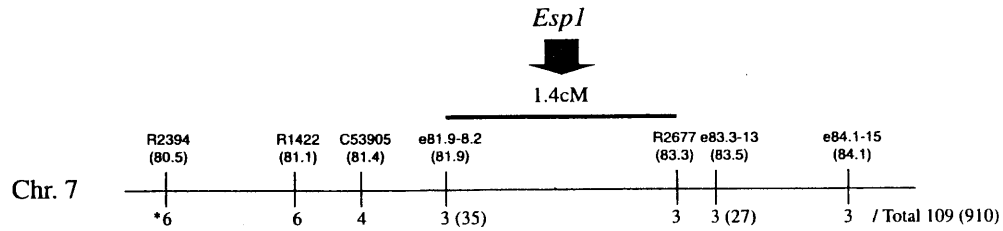


Fig. 1. Chromosomal location of *Esp1* gene. The number within the parenthesis is the distance from short arm terminal. *, number of recombinant plant.

27. Genetic diversity of prolamin polypeptides in Myanmar local rice cultivars

PA PA AUNG, T. KUMAMARU and H. SATOH
Plant Genetics Laboratory, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka, 812-8581 Japan

Alcohol-soluble proteins, prolamins, comprise about 18 to 20% of the total endosperm protein in rice. Prolamins are classified into 10, 13, 15 and 16 kD polypeptide groups, each of them is composed of several components with different isoelectric points (Hibino *et al.* 1989). The number and staining intensity of prolamin polypeptide bands greatly differ among cultivars from different countries (Satoh *et al.* 1990, Minakuchi *et al.* 1994). Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and isoelectric focusing gel electrophoresis (IEF) are useful not only for revealing variations but also for identification of a variety in seed storage proteins. Seed storage proteins are primary gene products, therefore, the variation in protein composition corresponds to genotypic variation. This paper deals with the genetic variation of a seed storage protein, prolamin, in Myanmar local rice cultivars.

A total of 350 local rice cultivars collected from seven distinct regions of Myanmar were obtained from the Seed Bank of Myanmar. These cultivars were analyzed by SDS-PAGE and IEF. *Japonica* rice Kinmaze and *indica* rice IR36 were used as controls. Prolamins were extracted with 5% 2-mercaptoethanol and 60% n-propanol; SDS-PAGE was carried out using the discontinuous buffer system of Laemmli (1970).

Prolamins were separated into 16, 15, 13 and 10 kD polypeptide groups by SDS-PAGE. Prolamins from Myanmar local rice cultivars widely varied in the presence or absence, and staining intensity of their respective polypeptide bands. Kinmaze and IR36 showed similar SDS-PAGE profiles. Myanmar local cultivars were divided into at least seven types of prolamins based on SDS-PAGE profiles (Fig. 1). Lane 1 showed 14 kD band present type. Lane 2 showed 13 kD and 15 kD bands with high intensity, which was identical to Kinmaze and IR36. Lane 3 showed 12.5 kD band present type. Lane 4 showed 13 kD band with high intensity, and 15 kD band with low intensity. Lane 5 showed the presence of 14 kD band and high intensity 15 kD band. Lane 6 showed both 13 and 15kD band, with low intensity. Lane 7 showed 13 kD band absent type.

IEF analysis was carried out because prolamins varied in their electric charges and isoelectric point (pI), in addition to molecular mass (M. M). IEF gels were prepared according to the modified method of Uemura *et al.* (1996). pI 7.1 and 6.95 bands were specific to Kinmaze; pI 6.90 and 6.35 bands were specific to IR 36. The SDS-PAGE pattern of prolamins extracted

28. Genetic variation of granule-bound starch synthase (GBSS) level in Myanmar local rice cultivars

Pa Pa Aung, A. Nishi, T. Kumamaru and H. Satoh
Plant Genetics Laboratory, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka, 812-8581 Japan.

Amylose content is one of the most important factors affecting the cooking and processing behavior of rice. Amylose is synthesized by granule-bound starch synthase (GBSS); the expression level seems to control the amylose content (Sano 1984). This paper deals with the genetic variation of GBSS level in Myanmar local rice cultivars.

A total of 350 local rice cultivars were obtained from the Seed Bank of Myanmar. Kinmaze, IR36 and their respective *waxy* mutants, EM21 and EM2009, were used as controls. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of crude proteins extracted from seed samples were performed by the method of Laemmli (1970). Apparent amylose content in endosperm starch was colorimetrically determined by DU 7500 Spectrophotometer (Beckman).

Kinmaze and IR36 showed low and high GBSS level, respectively. GBSS were absent in their *waxy* mutants. Myanmar local rice cultivars were classified into four types of GBSS levels; high, intermediate, low and absent, based on staining intensity of 60 kD band and western blot analysis using antiserum raised against the waxy protein from wheat endosperm (Figs. 1A and B). This result indicates that GBSS level is diverse in Myanmar local rice cultivars.

The apparent amylose content of Myanmar local rice cultivars varied from 0 to 30%. The 350 accessions analyzed were classified into five apparent amylose content groups: waxy (0-6%), very low (6-12%), low (12-18%), intermediate (18-24%) and high (>24%). The relationship between GBSS level and the apparent amylose content was investigated by half seed

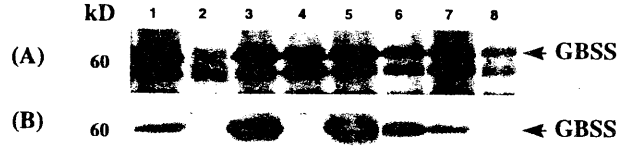


Fig. 1. Variation for GBSS level in Myanmar local rice cultivars. (A) SDS-PAGE; (B) Western blotting using antiserum raised against the waxy protein from wheat endosperm. 1: Kinmaze, 2: EM21, 3: IR36, 4: EM2009, Lanes 5 to 8: Myanmar local rice cultivars (5: High, 6: Intermediate, 7: Low, 8: Absent). Lanes 2 and 4 are *waxy* mutants induced from Kinmaze and IR36, respectively.

29. Diversity of granule-bound starch synthase (GBSS) level in Bangladesh rice cultivars

M.S. JAHAN[1], T. KUMAMARU[1], A. HAMID[2] and H. SATOH[1]

1) Plant Genetics Laboratrory, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, 812-8581 Japan

2) Department of Agronomy, Bangabandhu Sheikh Mujibur Rahman Agricultural University, Gazipur-1703, Bangladesh

The *waxy* gene of rice encodes starch granule-bound starch synthase (GBSS, or more commonly, *Wx* protein with molecular mass of 60 kD) which is responsible for the synthesis of amylose in rice endosperm. Two wild-type alleles, Wx^a and Wx^b, predominate at the *Waxy* (*Wx*) locus of cultivated rice. The expression level of Wx^a is 10-fold higher than that of Wx^b at the RNA and protein levels. High expression of Wx^a results in high amylose content, which makes cooked rice discrete; lower expression of Wx^b results in stickier rice. Wx^a has a wider geographical distribution than Wx^b. The geographical distribution of these two alleles reflects local preference for stickiness. In this article, we report the variations of *Wx* protein expression levels observed in Bangladesh rice cultivars and the relationship between *Wx* protein and apparent amylose content.

Five hundred and seventy five Bangladesh rice cultivars were used in the study as well as three rice cultivars Kinmaze, EM21 and IR36 as controls. Crude proteins were extracted from 20 mg rice powder with buffer solution containing 0.125 M Tris, 4% SDS, 5% 2-Mercaptoethanol and 8 M Urea (pH 6.8). Waxy proteins were extracted from 20 mg fine rice powder with 1.2 ml solution A (0.055 M Tris, 2.5% SDS, 5% 2-Mercaptoethanol, pH 6.8) and dissolved in SDS-PAGE sample buffer solution containing 8 M Urea. SDS-PAGE was carried out on a gel containing 10% (w/v) acrylamide and 0.035% (w/v) bisacrylamide according to the method of Laemmli (1970). The proteins were transferred electrophoretically to a nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech). Bands were detected using horseradish peroxidase-labelled goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad) and an ECL detection reagent (Amersham Pharmacia Biotech). The apparent amylose content of endosperm starches from brown rice grains was

30. Variation in amylopectin fine structure of Bangladesh rice cultivars

M. S. JAHAN[1], A. NISHI[1], A. HAMID[2] and H. SATOH[1]

1) Plant Genetics Laboratrory, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, 812-8581 Japan

2) Department of Agronomy, Bangabandhu Sheikh Mujibur Rahman Agricultural University, Gazipur-1703, Bangladesh

Gelatinization property is one of the most important rheological indicators of cooking quality and processing characteristics of rice starch. Juliano *et al.* (1964) found a significant correlation between disintegration of rice endosperm starch granule in alkali (KOH) solution and gelatinization temperature of milled rice. Rice with low gelatinization temperature disintegrates almost completely in 1.7% KOH solution, whereas rice with intermediate gelatinization temperature shows partial disintegration. Rice with high gelatinization temperature remains largely unaffected in 1.7% KOH solution. Amylopectin side chains play a distinct role in the disintegration of rice endosperm starch granules in alkali solution and their gelatinization in urea solution (Nishi *et al.* 2001, Umemoto *et al.* 2002). Starch granules containing amylopectin enriched in shorter chains ($A+B_1$) are more easily disintegrated in alkali solution than starch granules having amylopectin enriched in longer chains. Varietal differences in amylopectin fine structure were reported by Nakamura *et al.* (2002). This report deals with the variations in alkali digestibility of Bangladesh rice cultivars and the relationship between alkali digestibility and amylopectin fine structure.

Alkali digestibility of 575 Bangladesh rice cultivars as well as two standard cultivars, Kinmaze and IR36, were determined on a single grain basis according to the method of Little *et al.* (1958). The amylopectin structure of 15 rice cultivars were determined by HPAEC-PAD as described by Nishi *et al.* (2001).

All of the alkali digestion types, i.e. high, intermediate and low, were observed in the rice cultivars tested (Fig. 1). Low alkali digestibility consisted of the alkali spreading scores 1 and 2, as determined by the degree of spreading of rice kernels in 1.7% KOH solution after 24 hours of immersion at room temperature. Intermediate alkali digestibility comprised alkali spreading scores 3, 4 and 5; high alkali digestibility consisted of alkali spreading scores 6 and 7. More than 90% of the cultivars studied possessed alkali spreading scores of 1 and 2 (Fig. 2), suggesting that most of the Bangladesh rice cultivars tested are resistant to alkali.

Clear differences were observed in the proportions of amylopectin side-chain fractions

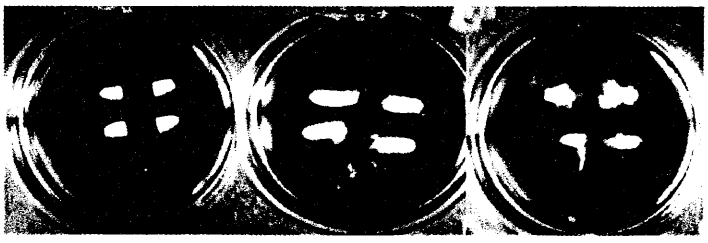


Fig. 1. Variation of alkali digestibility in Bangladesh rice cultivars. Low, intermediate and high digestibility consist of alkali spreading scores 1 and 2, 3 to 5, and 6 and 7, respectively.

農林水産技術研究ジャーナル２５（６）　２００２

〔連載：未来につなぐ遺伝資源〕

変わりゆく遺伝資源
—イネを例として—

佐藤　光
九州大学 大学院農学研究院

イネは日本人の生活と文化に最も大きく関わってきた作物である。弥生以前に渡来したイネは，今日にいたる栽培の過程で多様な変異−遺伝資源が選びだされ，食糧の安定供給に寄与するとともに，豊かな食生活や食文化を作りあげてきた。イネの遺伝資源の保存と開発は，われわれの未来を開くといえよう。しかし，地球環境の悪化とともに自然界にある遺伝資源の消失は急速に進んでおり，これらの維持・保存が精力的に行われるとともに，種々の手法を用いて人為的な遺伝資源の開発が行われている。また，イネは単子葉植物のゲノム研究のモデル植物として，その遺伝資源は広く植物のバイオテクノロジーへの貢献が期待されている。

１．はじめに

私達が日常食している作物・野菜・果樹などは，その野生祖先種から長い間の改良が加えられ，今日の多様な品種・系統が成立してきた。米を例にとっても，糯と粳，また，粳米でも良食味の代表「コシヒカリ」や寿司米として好適な「朝日」といった品種，あるいはピラフやチャーハンに適したインディカ米などさまざまな米が分化している。私達の食卓を賑わすこのような多様性は，遺伝子の違いによって生じている。言い換えると，遺伝子の多様性が作物や生物の多様性を生んでいるといえる。

生物の種の多様性は衣食住などの主原料として人間の生命・生活を維持するばかりでなく，花や香料など生活とアメニティーの向上にも不可欠であり，国連環境会議でも主要議題に生物の種の多様性の維持，すなわち遺伝資源の保存と有効利用が挙げられている。

わが国でもイネや麦など各種生物の遺伝資源の探索・収集，保存と特性評価が行われ，それに基づいて遺伝資源の活用が図られ，多くの成果を挙げてきた。ここでは，イネを例として遺伝資源の過去，現在，未来について紹介したい。

Hikaru Satoh：The present status and future of rice genetic resources in Japan.

２．遺伝資源…拡大再生産が可能な資源

生物のあらゆる形質は遺伝子によって支配されている。遺伝子の実体はDNAであり，遺伝子の有する遺伝情報は染色体上の４種の塩基によって決定される。生物は種に固有の特性を遺伝情報として蓄えており，多様な特性−遺伝情報−を有する生物はそれ自体が貴重な資源といえる。遺伝資源は独自の進化の歴史をもつさまざまな生物の生命機構を，遺伝子を共通項として解明するための欠くことのできない素材である。これらは，「生命の理解」，「ヒト」の健康保持および「生物環境の解明」につながるバイオサイエンス研究の重要な素材であり，これらの研究を通して，食糧の増産，人の健康保持，自然環境の保全・改良につなげることが期待されている。しかし，生物資源は鉱物資源と異なり，飼育，栽培，培養などによる拡大再生産が可能で無限の再利用性を有する反面，一旦失われるとその再生はまず不可能である。

生物工学会誌, **80** (12), 578-580 (2002).

サイレージ発酵におけるバクテリオシンの有効利用と高生産性の追究

土居　克実[1]*・岩武　敦司[1]・江口　智子[1]・大桃　定洋[2]・緒方　靖哉[1]

サイレージは乳酸菌の働きを利用して保蔵性を高めた飼料であり，特に飼料作物の不足する冬季には有効な飼料である.[1] 放牧地の少ない我が国において，サイレージは自給粗飼料として多用されており，通年サイレージ給与体系が一般化しつつある．近年では，自給されている飼料作物の約8割がサイレージとして調製されている．サイレージ原料には，アルファルファ，ギニアグラスなどの牧草からトウモロコシ，マメ，イネなどと広範な適用が行われつつあり，また従来までの乳牛，肉牛への給与から豚，羊，馬に至るさまざまな家畜に適用されていることからも，今後，安価でかつ高品質なサイレージの安定供給に対する要求がさらに高まることは容易に予想できる．さらに，東南アジア諸国においても乳製品の需要の高まりから安価なサイレージが求められているが，これらの国では気温・湿度が高いため，乳酸発酵が進まず，良質なサイレージの生産と高い保蔵性を得ることは容易ではない．

サイレージの保蔵性は，嫌気条件下で乳酸菌が生産する乳酸による低pHによるものであり，pHを下げることで変敗の原因となる酪酸菌，枯草菌などの増殖を抑制することによって保蔵性が保たれている．しかし，近年，省力化・低コスト化のために，大規模設備を要するタワーサイロによるサイレージ調製は減少し，1985年に導入された取扱いの簡便なロールベールサイレージが多数を占めるようになっている．ロールベールサイレージは取扱いの容易さの一方で，密封が不完全なため空気が入ることによる変敗（好気的変敗）が起こる．好気的変敗は上記の細菌以外に野生酵母，カビ類，*Listeria*などによっても引き起こされる．特に*Listeria*は牛の敗血症や流産の原因となることが知られており，本菌の生育を抑制し，サイレージの変敗を防止する新しい技術の開発が求められている．また，良質なサイレージを調製するためには効率的に乳酸を生成するホモ発酵性乳酸菌の使用が不可欠である．しかし，開放系で行われるサイレージ発酵では対糖乳酸生成率の低いヘテロ乳酸発酵菌の混入が考えられる．このような変敗や低乳酸生成を防止する一手段としてバクテリオシンの活用が考案されている．バクテリオシンはバイオプリザバティブとして近年着目されており，食品保存に有用であると考えられている．また，家畜飼料への抗生物質添加は体内残留の恐れがつきまとうが，バクテリオシンはプロテアーゼによって分解されるため，抗生物質のように家畜体内に残留する可能性はない．このことからもバクテリオシンはサイレージ発酵における有用因子として期待されている．

我々のグループでは，このようなバクテリオシンを日本および東南アジアのサイレージ発酵に有効に利用するために，サイレージ発酵過程で生産可能かつ有用な特性をもつ耐熱性バクテリオシンの探索と特性解明を行ってきた.[2] その結果，タイ国のサイレージより分離した耐熱性乳酸菌*Enterococcus faecalis* K-4株を選抜し，本菌株の生産するenterocin SE-K4がclass IIaバクテリオシンに分類され，熱安定性と*Listeria monocytogenes*に対する抗菌活性を有することを示した.[3] 本バクテリオシンの有効性が確認されたことから，サイレージ発酵過程におけるenterocin SE-K4の利用に必要不可欠な本バクテリオシンの発現機構の解明と生産性の向上が必須である．本稿では，高温環境に適応したバクテリオシンの高生産を目指した試みについて紹介する．

1. バクテリオシン生産に関わる遺伝子の解析

*Enterococcus*属ではバクテリオシン生合成に関与する遺伝子群はプラスミド上にコードされている場合が多く，*E. faecalis* K-4株もプラスミドpEK4S（約60 kb）上にenterocin SE-K4生合成遺伝子が座乗していた(Fig. 1)．*orf6*はその推定アミノ酸配列が精製したenterocin SE-K4のものと一致したため，enterocin SE-K4の構造遺伝子であることが確認された．さらに，*orf6*の推定アミノ酸配列上には，*sec*依存型分泌を行うタンパク質のシグナルペプチダーゼによる切断箇所，およびpediocin familyの保存配列が検出され，特に*E. faecalis* YI717株の生産するbacteriocin 31と高い相同性を示した.[4] ところが，*orf6*下流に*orf6*ときわめて相同性の高いORF (*orf8*) が存在していた．本ORFの推定アミノ酸配列上にも分泌に必要なVEA配列とpediocin familyの保存配列が検出された．しかし，*orf6*と*orf8*はサイズが異なり，また，推定されるC末端側のアミノ酸配列に相同性が認められないことか

*著者紹介（代表）　九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門（講師）　〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1
TEL. & FAX. 092-642-3059　　E-mail: doi@agr.kyushu-u.ac.jp
[1]九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門，[2]国際農林水産業研究センター

JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING
Vol. 93, No. 4, 434–436. 2002

Isolation of Enterocin SE-K4-Encoding Plasmid and a High Enterocin SE-K4 Producing Strain of *Enterococcus faecalis* K-4

KATSUMI DOI,[1]* TOMOKO EGUCHI,[1] SEONG-HYUN CHOI,[1] ATSUSHI IWATAKE,[1] SADAHIRO OHMOMO,[2] AND SEIYA OGATA[1]

Laboratory of Applied Microbial Genetics, Faculty of Agriculture, Graduate Schools, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan[1] and Japan International Research Center for Agricultural Sciences, 1-1 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8686, Japan[2]

Received 18 October 2001/Accepted 12 January 2002

***Enterococcus faecalis* K-4, which produces a class IIa bacteriocin, enterocin SE-K4, carries two plasmids, pEK4S (approximately 60 kb) and pEK4L (approximately 75 kb). Plasmid-curing experiments showed that pEK4S was involved in the production of and immunity to enterocin SE-K4 in strain K-4. A derivative strain, M6, with pEK4S produced a higher amount of enterocin SE-K4 than the parental strain K-4, although its growth rate was lower than that of parental strain K-4. Phenotypic changes in strain M6 are attributed to an increase in plasmid copy number.**

[**Key words:** plasmid-encoded bacteriocin, enterocin-encoding plasmid, *Enterococcus faecalis*]

Bacteriocins produced by enterococci have gained interest because bacteriocin-producing strains can readily be isolated from fermented foods and silages (1, 2) and many of them are active against food-borne pathogens. We isolated *Enterococcus faecalis* K-4, which produces enterocin SE-K4, a small, heat-stable and antilisterial bacteriocin, from grass silage in Thailand (3). Seven bacteriocins of *E. faecalis* are biochemically and genetically separated into four types (4). Genes required for production of these seven bacteriocins are encoded by plasmids. We isolated a plasmid pEK4S from *E. faecalis* K-4 which apparently encodes the genes for production of enterocin SE-K4.

E. faecalis K-4 was grown aerobically at 37°C in Bacto Lactobacilli MRS Broth (Becton, Dickinson and Campany, USA). Plasmid DNA from strain K-4 was isolated using the method of Anderson and Mckay (5), and agarose gel electrophoresis was carried out for 3.5 h at 50 V with 0.3% agarose in TAE buffer. The electrophoresis revealed two plasmids, pEK4L (approximately 75 kb) and pEK4S (approximately 60 kb) (Fig. 1). The sizes of the plasmids were estimated by restriction analysis using various restriction enzymes, and a restriction map of pEK4S was constructed (Fig. 2).

To determine if production of and immunity to enterocin SE-K4 in strain K-4 were related to the plasmids, plasmid-curing experiments were carried out, as described by Ruiz-Barba *et al.* (6). Strain K-4 was incubated at various concentrations of novobiocin (0.1–0.7 μg/ml) for 72 h at 37°C. Cultures that grew at the highest concentration of the curing reagent were serially diluted with MRS broth and inoculated on MRS agar plates. After 48-h incubation at 37°C, the colonies grown were examined for the existence of plasmids. Three derivatives were obtained: M6 and M10 that lack plasmid pEK4L, and K-4N that lacks both pEK4L and pEK4S (Fig. 1).

The bacteriocin production of strain K-4 and its three isolate derivatives was examined using a paper disk method (7) with *E. faecium* IFO 13712 as the indicator strain. Derivatives M6 and M10 harboring pEK4S produced enterocin SE-K4 and exhibited immunity to high concentrations of enterocin SE-K4. Strain M6 exhibited immunity to the highest concentration of enterocin SE-K4 (over 135,000 AU/ml), while strains K-4 and M10 exhibited resistance against 8500 AU/ml enterocin SE-K4. The derivative K-4N harboring no plasmid lost the potential to produce enterocin SE-K4 (see Fig. 3B), and became sensitive to its own bacteriocin (data not shown). These results indicate that the genes encoding enterocin SE-K4 and immunity protein are located in pEK4S.

The relationship between the growth and bacteriocin production of the four strains was examined. All strains were cultivated aerobically at 37 and 43°C in MRS medium, then centrifuged at 11,000×*g* for 15 min at 4°C. Bacteriocin activity was determined by agar well diffusion (8), using the indicator strain mentioned above. A 30-μl portion of the supernatant of each culture was placed in a well (10 mm in diameter) in MRS agar plates seeded with the indicator strain (ca. 10^6 CFU/ml). The plates were left for 2 h at 25°C until the bacteriocin diffused, and then incubated overnight at 37°C. After incubation, the clear zone around the agar well was measured and bacteriocin activity calculated (3).

Strain K-4 showed a much higher enterocin SE-K4 productivity in MRS medium than in TGE medium (3): the

* Corresponding author. e-mail: doi@agr.kyushu-u.ac.jp
phone/fax: +81-(0)92-642-3059

Actinomycetol. (2002) 16:21–25 VOL. 16, NO. 2

Changes in the Population of a Wide Host Range Actinophage Isolated from Thai Soil and Host Streptomycetes in Thai and Japanese Soil

Onanong Pringsulaka[1]*, Surina Chavanich[1], Katsumi Doi[2] and Seiya Ogata[2]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
[2]Microbial Genetic Division, Institute of Genetic Resources, Kyushu University, Fukuoka 812–8581, Japan
(Received Sep. 12, 2002 / Accepted Nov. 11, 2002)

We monitored the fate of actinophage Yok-15 isolated from Thai soil, and of its host bacteria, *Streptomyces* sp. strain 15 (just like Yok-15, both were isolated from Thai soil), *S. coelicolor, S. griseus,* and *S. viridochromogenes* in two kinds of Thai and Japanese sterile soil using batch microcosms. Phage Yok-15 had a wide host range and infected 39 important strains of *Streptomyces* species among the 48 strains tested. In two kinds of Thai soil, phage Yok-15 multiplied to a maximum titer, and then the titer decreased rapidly during incubation with strain 15. However, multiplication of phage YoK-15 was nil during incubation with three other streptomycetes in Thai soil, as well as with all the streptomycetes used in Japanese soil. During incubation with these streptomycetes, the phages decreased more rapidly in titer than did free phages in both Thai and Japanese soil. Therefore, the nature or conditions of the soil and host streptomycetes used affected the survival and multiplication of phages in soil. On the other hand, the survival of host streptomycetes seemed to be more strongly affected by conditions of soil rather than by phage infection.

INTRODUCTION

Soil serves as a well-enriched habitat for isolation of bacteriophages (phages) infectious to soil bacteria such as *Streptomyces* and *Bacillus*[1–4]. Many kinds of actinophages toward various *Streptomyces* species have been isolated from soil[1–3, 5]. We are interested in the growth and proliferation of *Streptomyces* species in relation to infection of actinophages, and are also focusing on factors affecting the host-phage interaction in natural habitats. *Streptomyces* phages were numerous in energy-rich habitats, especially in garden compost[3]. Ogata *et al.* investigated actinophage occurrence in natural garden soil enriched with a large number of *Streptomyces azureus, S. griseus* or others[6, 7]. Phages were found after placement of inoculant bacteria into the garden soil for 1 week or longer, and concentrations gradually increased and then decreased when cell feeding was halted. Therefore, many bacterial cells are present, with the rapid appearance of phages and increasing concentrations in the soil even under natural conditions. This enrichment procedure was effective for isolation of phages with high host specificity. In addition, we were able to observe the development (or fate) of phages to much greater extent than that of host cells, because an enormous number of many different kinds of microbes is presented in the natural soil. The filamentous nature of streptomycetes also caused problems in quantification. There have been several reports on the development (or fate) of actinophages and on the growth and interaction of streptomycetes and phages in soil[8–14].

We monitored the fate of an actinophage with a wide host range and of its streptomycete hosts, 4 strains of *Streptomyces*, in three types of sterile soil in simple batch microcosms.

MATERIALS AND METHODS

Organisms

Four organisms were used: *Streptomyces* sp. strain 15, *Streptomyces coelicolor* ATCC 23899, *S. griseus* NRRL B-2926, and *S. viridochromogenes* IFO 12337. Many other *Streptomyces* strains were also used in order to investigate the host range of phages.

Streptomyces sp. strain 15 was isolated from Thai soil collected from Nakhonnayok Province, using humic acid vitamin agar medium[15].

To prepare a spore suspension, these strains were cultured on a rye-flake agar medium (rye flakes [rye from the U.S.A. flaked using a Wiley pulverizer], 1%; glucose, 0.2%; yeast extract, 0.1%; $CaCO_3$, 0.2%; agar, 1.5% [pH 7.2]) at 30°C for 7–14 days until a large amount of spores was obtained. The spores were suspended in 20% (W/V) glycerol and then stored at −20°C until use.

Phage

Phage Yok-15 was used, after being isolated from the Thai soil collected from Nakhonnayok Province using strain 15 as host.

Soil

Three types of soil were used. The first type, Thai soil, collected from Nakhonnayok Province at a depth of 7–10 centimeters, was used for screening *Streptomyces* strains and phages, and had a pH value of 7.4. The second type,

* Corresponding author. Fax: +66-2-252-7576. E-mail: opringsulaka@hotmail.com

植物系天然素材による環境配慮型生活材料の開発に関する研究（第6報）リグノフェノール系架橋体とその吸水特性

関　範雄[*1]、伊藤国億[*1]、原敏夫[*2]、舩岡正光[*3]

Study on design for an ecological type of life materials from lignocellulosic components (VI)
Cross-Linkaged Lignophenols and Their Water-Absorbing Properties

Norio SEKI, Kuniyasu ITOH, Toshio HARA and Masamitsu FUNAOKA

相分離変換システムから変換分離されたリグノフェノールを長期循環利用するため、リグノフェノールおよびその誘導体から水溶性架橋剤を用い、架橋ポリマーの合成を行った。その結果、リグノフェノールおよびその誘導体分子内の官能基が、架橋剤に含まれるグリシジル基と反応し、リグノフェノール分子内および分子間でのエステルまたはエーテル架橋によってリグニン系架橋体が形成された。架橋体が低架橋度の場合、水不溶性リグニン系誘導体は水溶性の特性を有するようになり、高架橋度の架橋体では、水溶性、水不溶性リグノフェノール試料のいずれからも、高い吸水性特性を有するハイドロゲルとして合成された。特に、水溶性カルボキシメチル化リグノフェノールから架橋体の吸水特性高く、芳香族性の架橋ポリマーにも関わらず、自重の数百倍から千倍程度の吸水特性を発現した。

1. 緒言

異種ポリマーの複合有機資源である植物資源からその構成素材へと精密に変換、分離する技術として相分離システムが開発された[1)]。このシステムによって誘導された植物系分子素材を長期循環型材料原料として活用することが、「循環型システムの構築」、「枯渇する石油依存型システムからの脱却」にとって重要である。

生物はその生命体を自然界で維持させるための様々な構成要素を自身で合成し、生物が生命活動を停止した後、その構成要素はそれぞれ自然界に必要な要素として様々な機能・役割を発現し、循環される。循環機能を有さない物質を生命体内で合成する生物は、すでに自然界から淘汰されてきたと考えられる。

私たちが生物、植物材料を活用するためには、さらに、植物をその構成素材に分離し利用するならば、その要素が有する自然界での循環機能を大きく逸脱してはならず、循環できないような構造体へと変換することは避けなければならない。自然界に適応できない物質を合成、生産する生物は、自然淘汰される可能性があると考えるからである。

我々は、相分離変換システムによって変換された素材、リグニン系素材であるリグノフェノールの合成高分子にはない循環活用可能な機能を見出した。この機能を高度に活用し、よりステップワイズな長期循環利用を目的として、研究を行っている。本報告では相分離変換システムによって植物体中のリグニンから誘導されたリグノフェノールの長期循環活用の一環として、リグノフェノールを用いた架橋体としてハイドロゲルポリマーへの変換とその特性について検討した。

2. 実験

2.1 リグニン試料

リグノフェノールおよびその誘導体、リグニンアルカリ（Aldrich社製）、カルボキシメチル化リグニンアルカリ（Aldrich社製）、オルガノソルブリグニン（Aldrich社製）が架橋体の合成に用いられた。また、リグニン試料の他、カルボキシメチル化セルロース（和光純薬工業社製）も架橋体の

[*1] 試験研究部（機能材料研究室）、[*2] 九州大学大学院農学研究院、[*3] 三重大学生物資源学部

J. Fac. Agr., Kyushu Univ., **47** (2), 407–417 (2003)

Nucleotide Sequence of Conjugative and Integrating Plasmid pSLS from *Streptomyces laurentii* ATCC31255

Hirohito SAKEMI*, Sayuri NISHITAKE*, Mangkorn RODPRAPAKORN, Tomoyuki SHIRAKAMI**, Shinpei TAKECHI*, Katsumi DOI and Seiya OGATA†**

Laboratory of Microbial Genetics, Division of Applied Genetic Resources, Department of Genetic Resources Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812–8581, Japan

(*Received October 31, 2002 and accepted November 7, 2002*)

The complete nucleotide sequence of a conjugative and integrative plasmid, pSLS, in the thiostrepton–producing *Streptomyces laurentii* ATCC31255 was determined. The circular DNA molecule was 15,398 bp in length and contained 70.8% G+C content. Computer–assisted analyses indicated that pSLS contained 10 open reading frames (ORFs), *orf1* to *orf10*, located on both strands of pSLS.

The *orf1* encoded for a predicted protein (200 aa) showed high similarity to TraA protein of non–integrative plasmid pJV1 in *Streptomyces phaeochromogenes* involved in plasmid transfer and pock–formation. The *orf2* coded for a protein of 660 aa that shared homology with TraB proteins encoded by other *Streptomyces* plasmids. Proteins encoded by *orf3* (170 aa), *orf4* (408aa) and *orf5* (148aa) shared homology with *Streptomyces* proteins, SpdB1, SpdB2 and SpdB3, respectively, which were also involved in plasmid spreading. The *orf8* encoded a polypeptide of 458 aa that shared homology with Int protein of integrative plasmid pSAM2 in *Streptomyces ambofacience*.

This report manifests that pSLS is unique chimeric episomal element that contains gene cluster from non–integrative plasmid and genes for site–specific integration from integrative plasmid.

INTRODUCTION

Streptomyces spp. are Gram–positive soil bacteria that undergo a complex cycle of morphological differentiation and synthesize multiple medically and industrially useful secondary metabolites (Chater, 1989; 1993). Conjugative plasmids isolated from *Streptomyces* species include autonomous circular plasmids (e.g., pIJ101 [Kieser *et al.*, 1982], pJV1 [Servín–Gonzáles, 1993] and pSN22 [Kataoka *et al.*, 1994]) and linear replicons (e.g., pBL1 [Zotchev *et al.*, 1994], pSLA2 [Qin and Cohen, 1998] and SCP1 [Yamasaki *et al.*, 2001]). In the circular plasmids, some plasmids are generated by site–specific excision of chromosomal DNA segments and capable of reintegrating site specifically into *Streptomyces* chromosomes (e.g., SLP1 [Omer *et al.*, 1988], pSAM2

* Laboratory of Microbial Genetics Technology, Division of Applied Genetic Resources, Department of Genetic Resources Technology, Graduate School of Division of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University

** Laboratory of Microbial Genetics Technology, Department of Genetic Resources Technology, Division of Agriculture, Graduate School, Kyushu University

† Corresponding author (E–mail: ogata@agr.kyushu–u.ac.jp)

3. 総説等要旨

家蚕遺伝子開発分野

THE FIRST INTERNATIONAL WORKSHOP OF LEPIDOPTERA GENOMICS (TSUKUBA), OCTOBER, 2002

Linkage studies in the silkworm, *Bombyx mori* – Status quo in 2002.

Yutaka Banno and Hiroshi Fujii

Silkworm Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Graduated School, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

More than 400 hereditary traits have been so far analyzed and then 27linkage groups have been established. Since the haploid chromosome number of *B. mori* is 28, the remaining unknown linkage group is one. The number of gene loci determined on the linkage map amounts to 204 in total, though 34 of which should be determined with regard to their map units – Status quo in 2002.

In 1998 we described linkage maps in article of "GENETICAL STOCKS AND MUTAIONS OF *BOMBYX MORI*:IMPORTANT GENETIC RESOURCES. The mutants mapped on during 1999 to 2002 are briefly described as follows. Gene symbols are followed by parentheses in which gives the location, and then gene name is given in second parentheses.

Linkage Group 1

ro (55.4) (rouge) Spontaneous; eye spots on the second segment reddish brown.

Linkage Group 2

nm-f (0.0) (non-molting of f) Spontaneous; homozygotes can survive 5days to two weeks after hatching, but more than 90% individuals of them died without molting, a few larvae pass through first and second molt and then die.

Linkage Group 5

ows (22.1) (wild silkworm translucent) Spontaneous; larval skin highly translucent, found in B1F2 progenies from the cross between *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina* collected in Fukuoka prefecture Japan.

Linkage Group 7

sm-3(?) (small egg 3) Spontaneous; egg size small like *sm* and *sm-2*, sterile lacking.

Linkage Group 10

nm-is (?) (non-molting of ishihara) Spontaneous; homozygotes survive about one week as first instar larvae without moltig and then die.

Linkage Group 14

Seg(33.1) (Short Segment) Spontaneous; Heterozygotes and homozygotes manifest short length in each segment during all developmental stage.

THE FIRST INTERNATIONAL WORKSHOP OF LEPIDOPTERA GENOMICS
(TSUKUBA), OCTOBER, 2002

Comparison of Genomic Structure of two Kunitz-type Chymotrypsin Inhibitor Genes in Bombyx mori.

He Ningjia, H. Fujii, Y. Yasukochi, Y. Banno and K. Yamamoto
e-mail address: fujii@agr.kyushu-u.ac.jp TEL: 092-621-4991 FAX: 092-624-1011

The Kunitz-type inhibitor family is one of the most extensively studied group of inhibitors. Molecules belonging to this family with low molecular weight generally have six cystine residues which are identically spaced relative to each other and form three disulphide bonds (1). Members of this inhibitor family have been identified and isolated from various insect hemolymph such as *M. mori*, M. sexta, and *S. bullata* (2,3,4,5,6). In silkworm hemolymph, 9 kinds of this type inhibitors have been detected and named as CIs-b1, -b2, -1, -2, -2', -9, -10, -13, -13' for their inhibitory activity against chymotrypsin. Among above peptides, b1, b2, 1, 2, and 13 have been purified and characterized. (7,8). Comparison of the primary structures among CIs showed that these five peptides share 81%-95% similarity at the amino acid sequence level with broad pI values from 4.5-10.2. Analysis of the known amino acid sequences of these peptides indicates that they fell into two groups; Group 1 has 62 residues with neutoral and basic isoelectric point (pI) including CI-1, -2, -b1, -b2 controled by *Ict-H* gene. Group 2 has 63 residues and acidic pI value. Peptide belongs to group 2 is CI-13 controlled by *Ict-A* gene.

The structure of these peptides has been studied intensively, but no detail information about their genomic structure is available and the physiological roles of these proteins in silkworm hemolymph are unclear (9). A clue to the physiological functions of Kunitz type CIs in silkworm hemolymph may depend on the knowledge of genomic sequences. Following this strategy, CI-b1 and CI-13 represented two different groups were chosen as research interest. The cDNA of CI-b1 and CI-13 had been cloned by RT-PCR as a first step to elucidate genome sequences of CI-13 and -b1. Therefore, we constructed a sub-library of a BAC clone which was identified to compose of these two CIs. The resultant BAC sub-libray was screened by colony hybridization with cDNA probes. The positive clones contained the two genes were then isolated. And the full length of two genes with 5'-flanking regions were determined. To our knowledge, it is the first time to report the genomic structures of Kunitz-type chymotrypsin inhibitors. The sequences data indicate that both genes consist of three exons interspersed by two introns. The consensus sequences for the intron-exon junction were completely conserved and followed the GT-AG rule. The deduced amino acid sequences matched very well with the data from amino acid sequences of purified proteins. The data also showed that sequences similar to Bm1 exist in the 5'-flanking region and intron part. In addition, a functionally unknown repetitive DNA element locates near the exon 3.

生物工学会誌, **80** (12), 568 (2002).

特集

〔生物工学会誌　第80巻　第12号　568–586. 2002〕

乳酸菌工学の未来像
—バイオプリザベーションとプロバイオティクス—

特集によせて

緒方　靖哉

乳酸菌は，古来より人類が仲良く付き合ってきた細菌であり，我々の生活に深く根付いている細菌である．“乳酸菌”という単語を聞いて不快感や不安感を抱く人は皆無であろう．この安心感はどこから来るのであろうか．少し前であれば，その答えは，乳酸菌を常に愛用し使用し続けた祖先から伝わった「先人の知恵」や「経験的知識」で言い表していたであろう．しかし，現在，我々が示す言葉は「バイオプリザベーション (biopreservation)」であり，「プロバイオティクス (probiotics)」である．これら2つの単語は，10年位前にはごく限られた研究者などの間でしか通用しない専門用語であったのであるが，近年急速に一般に認知されつつある．

バイオプリザベーションは，乳酸菌の発酵を利用した伝統的な食品保存法である．これは，Rayらによって定義された，抗菌作用を示す化合物であるバイオプリザバティブに由来し，それらを利用した保存法であるバイオプリザベーションが生まれた.[1] 今日，乳酸菌が生産する乳酸を代表とする有機酸やバクテリオシン，ロイテリンなど多種多様な物質とそれらを利用したさまざまな保存法が報告されている.[1] このように，バイオプリザベーションの見地に立つと，乳酸菌は我々の食生活を守る矢弾として働いてしているとイメージできる．

一方，Metchnikoffの「ヨーグルト不老長寿説」以来，健康と乳酸菌の関係は切っても切れないものとなり，乳酸菌の健康への寄与は大多数の人が認めるところである．ここに，抗生物質 (antibiotics) に対応する概念として，プロバイオティクスが登場した．プロバイオティクスは，Fullerによって，「消化管内の細菌叢を改善し，宿主に有益な作用をもたらしうる有用な微生物と，それらの増殖促進物質」と定義される.[2] 乳酸菌は，まさにプロバイオティクスの代表であり，機能性食品の源流として，また本流として，その利用開発研究の最先端での確固たる地位を築きつつある．この現状は，健康志向とも相まって，我々が自らの体を乳酸菌の力によって体の内から壮健にしたいと考える意欲の表れでもあり，また乳酸菌が我々の体を守る盾の役割を担ってくれる期待感の表れでもあろう．

バイオプリザベーションとプロバイオティクスは共に新しい言葉であるが，我々にとって重要なキーワードになる．この応用分野は何も乳製品に限ったものではなく，さまざまな食品，飲料，さらに畜産業にも適用されつつある．バイオプリザベーションとプロバイオティクスを語ることで，乳酸菌研究・開発の新たなる展開が見えるのではなかろうか．

日本生物工学会乳酸菌工学研究部会では，乳酸菌を基礎研究，開発，生産，製品管理などのさまざまな面で研究・討論を遂行している.[3] その領域も微生物学，分子生物学，生物工学，発酵学，製造工学など多岐に亘っている．本特集では，乳酸菌工学研究部会で講演いただいた研究の中からバイオプリザベーションとプロバイオティクスについての斬新なトピックを紹介していただく．本特集によって，読者各位が乳酸菌研究に対して興味を抱いていただき，さまざまな提言を賜れば幸甚である．

文　献

1) Ray, B. and Daeschel, M.: *Food Biopreservatives of Microbial Origin*, p. 209, CRC Press (1992).
2) Fuller, R.: *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 365 (1989).
3) 緒方ら：生物工学, **79**, 171 (2001).

著者紹介　九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門（教授），遺伝子資源開発研究センター（併任，センター長）
〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1
TEL. & FAX. 092-642-3053　E-mail: ogata@agr.kyushu-u.ac.jp

グリーンプラ最前線

納豆樹脂

九州大学
大学院農学研究院 助教授
原 敏夫

はじめに

日本の食生活の好みを探ると、面白いことに気づく。どの地方で納豆がよく食べられているか分析すると、食の好みに江戸時代の箱根の関所がいまだにあることに驚かされる。箱根の関所を境にしてその東、つまり関東、東北では発酵食品である納豆も、関西ではあたかも腐った煮豆として受け取られてきた。納豆ほど好みの分かれる食べ物はない。ところが、その関西で納豆の消費額が5年間で倍増し、納豆産業にはいまなお神風が吹いている。国民の健康志向が地味な食品の代表だった納豆のイメージを大きく変えている。

数年前、「納豆の容器を生分解性の素材でつくれないか」という納豆連合会のある幹部の一言から納豆樹脂の開発が始まった。食品包装資材は、プラスチックの使用割合が高く、特に、食品産業に起因する容器包装廃棄物は容積比で容器包装廃棄物全体の5割強を占めることから大量の廃棄物を排出している。丈夫で長持ちするという使用上の利点が災いし、埋め立てても重量の割には嵩張り、自然環境下では分解されず、半永久的に残存し、環境破壊を引き起こしている。食品産業から排出される容器包装廃棄物をリサイクルする場合、付着物による汚れ、回収の困難さや効率の悪さなどが指摘されている。

食品容器に使用できる生分解性プラスチック樹脂としてはポリ乳酸がある。しかしながら、ポリ乳酸は生分解能が低く、埋め立て処分やコンポスト化を試みても分解までに時間がかかる。そこで、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「吸水性」、「生分解性」および「可塑性」をキーワードとして持つ納豆樹脂を活用し、ポリ乳酸と混合することにより、吸水して膨潤した納豆樹脂が起爆剤となり生分解速度を制御できるエコ対応生分解性包装資材の開発を実施した。*1 本稿では、納豆樹脂の合成とその特徴を活用したエコ対応生分解性容器の試作について述べる。

納豆の糸から納豆樹脂の開発

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。また、PGA間のペプチド結合はγ結合で、自然界のタンパク質ではL型アミノ酸がα結

写真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（手前）と吸水後のハイドロゲル（ビーカーの中）

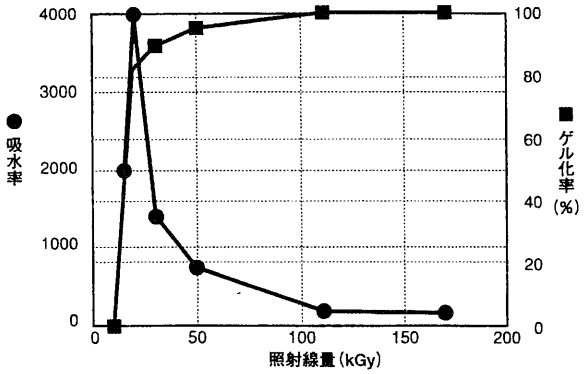


図1 吸水率に及ぼす放射線照射線量

執筆担当：因　京子（留学生センター）
土居　克実（農学研究院）

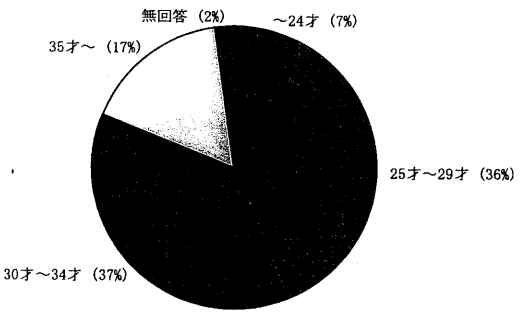
1 フェースシートから眺めた九州大学の留学生

本アンケートに回答してもらった九州大学留学生の概観を知ることは、本アンケートを解析するために重要である。よって、フェースシートから九州大学の留学生を眺めてみることにする。

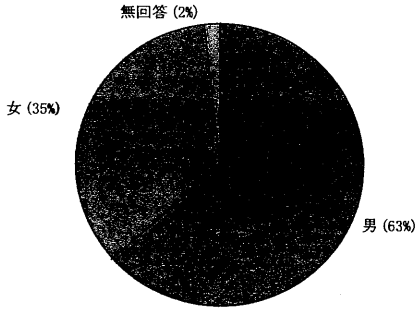
年齢は30才前後（25～34才）までが74%を占めており、母国で高等教育（大学または大学院）を受けてきた者が大半と思われる。また、その多くが日本人学生よりも年齢が高いことも見て取れ、これが留学生の日本人学生に対する意識に多少なりとも影響を及ぼしているようにも考えられる。また、35才以上の留学生は全体の約17%を占め、彼らの就学上および日常生活での悩みが最も深い印象を得る。さらに、24才以下の留学生数が少ないことは九州大学が研究留学生として大学院生を受け入れている事を物語っており、今後の留学生施策の方向性によって、この数は変動することも考えられる。

次に、性別は男女比がおおよそ２：１となっている。性別によって問題意識、悩み、大学生活・日常生活に対する考え方に相違が見られる。この事は留学生のケアにとって重要なヒントを与えてくれるものと考えられる。

S 49. 九州大学留学生の年齢



S 50. 九州大学留学生の性別



また、出身地は圧倒的に東アジアが多く、７割強の留学生が当該地域（おそらく、中国、韓国）の出身である。したがって、東アジア出身留学生の声が九大留学生のマジョリティーを形成すると考えられる一方で、このような纏め方では、中国出身留学生と韓国出身留学生の声が見分けられず、それぞれの出身国に特有な傾向の解析は不可能であった。逆に北米、オセアニア出身留学生は非常に少数であり、これもまた、大学の留学生受け入れ施策の方針によって今後の変動が予想される。

さらに、年齢が30才前後であったことからも分かるように、大学院生の割合が80%と大多数を占めていることが分かる。特に博士（後期）課程留学生は全体の約半数を占めている。これらの留学生が学位取得の問題に直面していることは想像に難くなく、彼らのフォローを如何に行うかが重要であり、また、彼らが帰国後、母国で研究者・教育者等も指導的立場につく可能性は高く、彼らに適切な指導・助言を行うことが、将来的にも九州大学に良い留学生を迎え入れる礎となるものと考えられる。

最後に、専門分野別で見ると理系が７割、文系が３割に分けられる。特に工学系が約４割と多数を占め、人文社会学系が約３割、理学系と生命科学系が15%前後となっている。従って、理系学生の声が本アンケート中では割合多く聞こえてくると推察された。このような条件を基にして、以下に、各項目別の解析を記す。

Leading off BIO Vol.3 先駆者（パイオニア）に聞く!

JBDAの専務理事・村井深が、毎回バイオベンチャーの経営者、研究者に話を聞くこのコーナー。今回登場するのは九州大学大学院・農学研究院助教授であり、納豆の糸から作る納豆樹脂の研究で知られる、原敏夫先生です。

九州大学大学院農学研究院　助教授
原　敏夫

九州大学大学院農学研究科食糧化学工学専攻修士課程修了。現在、同大学院農学研究院遺伝子資源工学部門・遺伝子資源開発学講座微生物遺伝子工学分野助教授。昭和59年には菌体外高分子物質、特に核酸の遺伝情報に関する研究で、日本農芸化学会奨励賞受賞。「環境」と「食糧」をキーワードに、発酵微生物と人類の共生システムの開発を考えている。

村井／原先生は、納豆菌のことで著名な方だと伺っておりますが、納豆はお好きなんですか（笑）。

原／あまり納豆は食べません。納豆との関わりは、25年ほど前、ちょうど助手になった頃です。オーストリアのインスブルック大学から女子留学生が修士論文を書きに来たんです。ヨーロッパから白人の女性が一人で、しかも関門海峡を渡ってくるわけです（笑）。とても珍しいかったですね。しかも納豆の研究が目的だと言われて、一同唖然としました。これが私と納豆菌との出会いです。その頃は、納豆は人間の食べ物ではないと考えていました（笑）。

村井／関西は納豆を食べない方が多いですよね。

原／発酵ではなく腐敗という認識ですよね。

村井／先生の研究に関わっているのは、納豆のネバネバした糸のほうですね。僕はこれをすごく夢のある話として聞いたんですけど、それを砂漠の緑化に使おうということをなさってるんですよね?

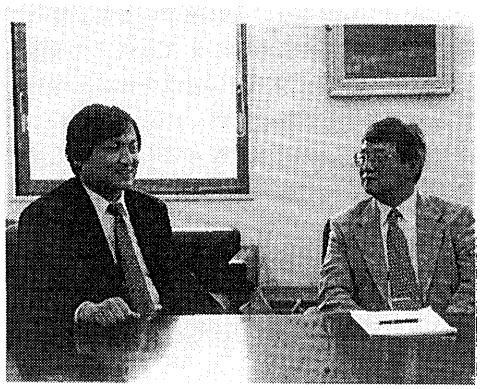
原／放射線重合という現象があります。放射線を照射するとラジカル反応が起こり、高分子間や高分子内で橋架けが形成されます。身近では自動車のタイヤ、プールのビート板、電線のコード等が放射線重合を利用しています。納豆の糸は、グルタミン酸が五千個以上つながったポリグルタミン酸と呼ばれるタンパク質です。これに放射線を照射すると橋架けが起こり、ポリグルタミン酸架橋体が合成されます。この架橋体は高い吸水率をもちます。私はこれを納豆樹脂と呼んでいます。

村井／非常に高い吸水率の素材が出来ると。これは今までの、例えば寒天とかいろいろなものがあると思うんですけど、それに比べてどれくらいのものなんですか?

原／皆さんの口に入っている吸水性の高分子というと、最も有名なのはコンニャクマンナンですね。コンニャクマンナンで吸水率が30～33倍といわれています。

村井／よくダイエットに使われてますよね、マンナンて。

原／そうですね。ほかにも紙おむつに使われる吸水率が1000倍ほどのアクリル酸ポリマーがあります。納豆樹脂の吸水率は5000倍。1グラムの納豆樹脂で5リッターの水を吸水できます。また、納豆は食材ですから、納豆樹脂も食べられる。生分解性があるといえます。さらに加熱すると柔らかくなって樹脂が伸びる、すなわちプラスチックのように成形加工ができます。吸水性、生分解性、そして可塑性という3つのキーワードを持つ、新しい素材が出来上がったんですね。



納豆の糸から化粧品素材を開発

会社概要

会社名：有限会社ハラテック
代表取締役社長：柏原繁郎
所在地：東京都千代田区
設立：2003年2月
資本金：400万円
主要出資者：原敏夫ほか
特徴：納豆菌が作りだすバイオポリマー「納豆樹脂」の研究成果を基に、化粧品素材に展開。

「納豆樹脂とは別に、環境関連でもベンチャーの立ち上げを考えている」と言う九州大学の原敏夫助教授

九州大学発のベンチャー企業ハラテックは、納豆菌由来のバイオポリマー「納豆樹脂」の生産技術を開発、化粧品原料などとして発売を目指している。納豆樹脂は、樹脂の網目に水分を多量に抱え込む性質によって保水性に優れた素材。生分解性で生物に対する毒性もないようだ。

兼業承認をとってハラテックを立ち上げ、取締役に就任したのは九州大学大学院農学研究院の原敏夫助教授。同助教授は1980年代前半の助手時代に納豆菌の研究を始めた。当初のテーマは、納豆菌の遺伝子解析から食文化のルーツを探ったり、納豆成分の分析をすることだったが「納豆は先人が作りあげたもの。分析だけではおもしろくない」（原助教授）と考えて新素材の研究を開始、納豆樹脂の開発に至った。

納豆樹脂の原料は納豆が引く「糸」で、グルタミン酸が約5000重合した繊維。このグルタミン酸の繊維に放射線を照射すると、繊維の中のグルタミン酸同士が架橋されて樹脂になることを原助教授らは見いだし、特許出願している（特願平09-240688、審査請求中）。

納豆樹脂の最大の特徴は高い吸水性と保水性。1cm³の納豆樹脂に1.5リットル以上の水分を保持できる。これは紙おむつや生理用品に求められる吸水能力にも勝るレベルだ。また生分解性の特徴も持ち、温度や水分などの条件を整えて微生物の多い土壌中に放置しておくと1週間程度で形状が完全に崩壊する。

保水能力が評価され、現在、実用化の検討がもっとも進んでいるのは化粧品素材の用途だ。「既存の化粧品素材のヒアルロン酸より保水性が高い。化粧品メーカーで安定性試験などを行っていて、化粧品により適した納豆樹脂にするための生産技術をハラテックで開発中だ。今年中には納豆樹脂を成分とする化粧品が発売されるだろう」と原助教授は言う。納豆菌由来といえばニオイが気になるところだが、精製により「無色、無臭」（原助教授）。この点の評価も高い。

コストダウンで用途拡大狙う さらに低コスト新素材開発も

研究初期の段階では実際に納豆から糸を集めていたが、工業生産のために納豆菌の培養で効率的に「糸」を生産させる生産法を確立。3tの液体培地から30gのポリグルタミン酸が取れるようになった。台湾の発酵関連企業に生産を委託するなどコスト圧縮の方策も講じ、化粧品向けの高付加価値素材としては妥当な価格で供給可能になっている。

しかし紙おむつなどの廉価なトイレタリー商品向けには、まだコスト高が課題。「キロ当たり1万円を切ることを目標に改良を進めている。それぐらいになれば様々な用途が視野にはいるだろう」（原助教授）

用途開発ではさらに、家畜の糞尿をコンポストに変える際に、水分を調整して微生物の活動を高める素材として、あるいは砂漠緑化を目的に、種子とともに播種して樹木が育ちやすくする素材としても検討を続けている。しかし、これらの用途で要求される供給単価はキロ当たり数十円から数円程度で「そこまでのコストダウンは納豆樹脂では難しい」（原助教授）。

そのため、別の低コスト保水素材の開発も、納豆樹脂の実用化と並行して進める。完成すれば納豆樹脂に続いて、ハラテックで事業化することになる。（小田修司）

放射線利用試験研究DB － 020155

データ番号： 020155

放射線照射による納豆樹脂の合成とその利用

詳細説明：

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1976年に本格的に工業化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悪影響が危惧されている。

納豆菌が生産するg-グルタミン酸(PGA)はグルタミン酸がg結合し、重合度が5,000以上ある生分解性ポリアミノ酸で、.位のカルボキシル基が削除されるとナイロン4と同じ構造をとる。PGAは1937年にBacillus anthracisの夾膜成分として発見され、次いで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、現在ではBcillus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。自然界に存在するアミノ酸はL型であるが、PGAの中にはD型のグルタミン酸が含まれており、特に、納豆ではその熟成につれて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、納豆菌ガムの名前で増粘剤などに使用されている。　このPGA水溶液に放射線を照射すると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（図１）。

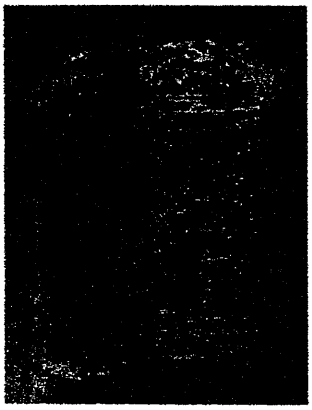


図1　納豆の糸の成分、ポリグルタミン酸に放射線照射して合成された納豆樹脂(左手前)と給水後のハイドロゲル(ビーカーの中)　(原論文1より引用)

PGA架橋体の合成は放射線の照射線量に依存し、吸水率はPGA濃度10%、放射線照射線量20kGyのとき自重の5,000倍に達し、新たな機能性素材として応用が期待されている。PGA架橋体の生成機構は、放射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、PGA分子間あるいはPGA分子内でランダムに架橋が形成されることに起因する。照射線量の増加とともに吸水率は減少し、100kGy以上では200倍で一定になった（図２）。

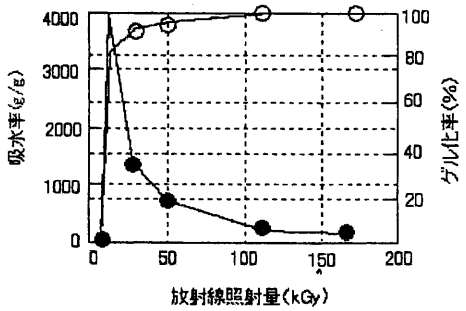


図2　給水率に及ぼす放射線量　シンボル：給水率(●)、ゲル化率(○)　(原論文1より引用)

九大学生新聞
（1）　平成14年（2002年）11月15日

教員のベンチャー設立
本学、認可の見通し

九大が教員の研究成果を生かしたベンチャー企業の設立を初めて認める見通しになった。人事院の認可が必要だった国立大教員による会社役員兼業が十月から各大学の学長の同意のみで認められることになったのを受けて、農学研究院の原敏夫助教授が申請していた。すでに同研究院教授会が承認しており、学内に設置された審査委員会を経て、今月下旬にも正式決定される。

原助教授が設立を目指しているのは有限会社「ハラテック」。納豆の糸を原料にした「納豆樹脂」から、たい肥に混ぜる水分調整材や化粧品の原料などを製造・販売する。

原助教授は九四年に納豆のネバネバした糸の成分であるポリグルタミン酸に放射線を当てる方法で納豆樹脂を開発した。納豆樹脂には強い保水効果があり、樹脂一グラムで最高五リットルの水を蓄えることができる。また、土中に埋めれば自然分解しゴミにならない。

通常、家畜のふん尿をたい肥化する際には、水分を低く抑えるために、ふん尿とほぼ同じ量のおがくずが必要だが、納豆樹脂なら、二トンのふん尿に対しわずか十キロで済む。こうした特性を生かし、同社はまず、おがくずに代わる水分調整材の商品化を目指す。その後、保湿ローションや環境にやさしいトレー容器の原料などの製造に乗り出す計画だ。資本金三百万円は原助教授が出資。知人が社長になり、原助教授は役員に就く。

国立大の教官が研究成果を活用する場として民間企業の役員になったり、会社を設立したりすることは二〇〇〇年四月に認められ、今年九月末までに全国で延べ百三十六人が認可を受けている。役員の兼業には大学、文部科学省を通じて人事院の認可が必要だったが、大学発のベンチャー企業を奨励するため、人事院規則の改正によって手続きが簡略化された。

TECHNO NEWS REPORT

納豆の糸から樹脂を生成 多彩な用途に夢がふくらむ

九州大学大学院 農学研究院［原 敏夫助教授］

上／左から納豆の糸，樹脂体（納豆の糸がゲル化したもの），納豆樹脂，化粧品（ローション）

下左／原 敏夫助教授

健康食品として人気の高い納豆。あの特有のネバネバが実は大変な〝パワー〟を秘めていることを、九州大学大学院農学研究院の原敏夫助教授がこの20数年間、一歩一歩科学的に解明してきた。最近ではその応用例として化粧品や繊維の製造、果ては中国の砂漠緑化にも役立つことが分かり、国のプロジェクト事業への採用など具体的な展望が開けてきた。何とも不思議な納豆パワーなのである。

ネバネバの特異な成分と構造

納豆のあのネバネバ糸は、グルタミン酸が何個も長い鎖のように繋がったポリグルタミン酸と、フラクタンと呼ばれる多糖類の混合物から出来ている。前者がネバネバの本体だが、この中には自然界には珍しいD型のグルタミン酸が含まれており、しかもグルタミン酸の繋がり方はγ（ガンマ）結合という特異な形態であることが分かった。この結合はちょうどクッションのように折り畳まれた形で、これが納豆の糸がスーツと伸びるわけだろうと考えられている。

合成繊維のナイロンが絹の魅力を求めて開発されたことはよく知られるが、その中にナイロン4という種類がある。このナイロン4の構造が実は納豆の糸によく似ている。このことから、紡糸・製膜技術を工夫すると、納豆から夢の繊維やプラスチックができると考えられる。

納豆樹脂の驚くべき吸水性

さて、これからが原助教授のオリジナルだ。氏は9年前、納豆のポリグルタミン酸にγ線を照射してゲル状に固め、それを凍結乾燥して「納豆樹脂」を合成することに成功した（特許取得）。この納豆樹脂は吸水性、生分解性、可塑性を特徴とする自然物質で、とりわけ吸水性に優れ、1グラムで実に4リットルの水を吸収できる（4千倍！）。

これを使って、さまざまな実用例が拡がった。まず、化粧品の保湿成分として。また焼却処分が不要な紙オムツや生分解性の良いプラスチック容器、さらには家畜の糞尿に水分調整剤として混ぜて堆肥作り――といろいろな実証試験も進行中だ。堆肥作りは国のプロジェクト事業にも採用された。

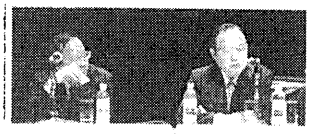
氏は、知人を代表に、自分は研究担当役員として「有限会社ハラテック」を設立。大学からの承認も得て2月末、法人登記を済ませた。九州大学では初の「大学発ベンチャー企業」である。

砂漠緑化にも意欲

21世紀の大きな課題は「環境」と「食糧」。氏は砂漠緑化に関心が深い。やっかいもの扱いの淡滓（たんさい）ペドロを植物培養土に使い、植物の種子と納豆樹脂を混和造粒した「ペドロ・シードペレット」を砂漠にまく。納豆樹脂は接着剤と保水剤の役割を果たし、植物の発芽率を高める。中国での実験は目前だ。

吸水した納豆ゲル

今年10月の統合を控え、九州大学と九州芸術工科大学による初めての協同イベント「産学官連携セミナー夢・創造博覧祭2003」が、3月7－9日の3日間、福岡市・天神イムズで開催されました。本イベントは、統合後の九州大学が日本を含めたアジア地域に対してどのような社会貢献ができるかをテーマに、基調講演・シンポジウム（イムズホール）および展示（イムズプラザ）において行われました。初日は、アサヒビール（株）会長の福地茂雄氏により「『明日の日本』への課題　～企業経営の立場から～」という題目で基調講演を頂き、引き続き都市・大学シンポジウムが「東アジア地域における実効的な国際社会連携体制構築」をテーマに行われました。



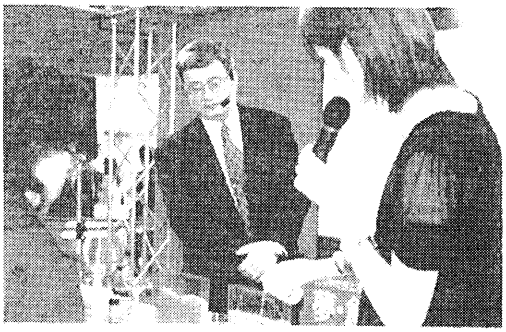
九州大学・九州芸術工科大学産学官連携セミナー「夢・創造博覧会2003」開催

産学連携推進機構 技術移転推進室 助教授　古川　勝彦

2日目は、本学医学研究院の飯田三雄教授により「生活習慣病の過去・現在・未来　～久山町研究から～」に関してのキーノートスピーチの後、「治す医療から予防する医療・科学へ」をテーマに医療シンポジウムが行われました。最終日は、（株）カフェグローブ・ドット・コム代表取締役の矢野貴久子氏により「ネットが変えるこれからのライフスタイル」に関してのキーノートスピーチの後、「技術および感性の高度化がもたらす豊かな生活」をテーマに生活シンポジウムが行われました。3つのシンポジウムの共通したまとめとして、これから生き残るのはオーダーメイドであること。つまり、独り善がりではなく、様々な人・機関と上手くコミュニケーションをとり、相手との関係性を頭にいれながら、教育、研究を進めることが、大学にとって決定的に重要となるという結論に至りました。

展示は、大学や企業の技術が描き出す「未来」を博覧会形式で紹介しました。その中では、映像や音声もふんだんに取り入れ、統合後の九州大学の存在価値や研究内容、社会貢献成果をアピールしました。展示は「都市・大学」「医療」「生活」の三つのブロックに分かれ「都市・大学」分野では本学新キャンパスの模型、福岡市営地下鉄3号線の予想図、そして韓国・釜山と福岡を結ぶ海底トンネルを走る列車「マリーンエクスプレス」の模型を展示しました。「医療」分野では、福岡県久山町での疫学調査研究、遠隔操作低侵襲手術ロボット「ゼウス」などをパネルで解説しました。「生活」分野では、納豆樹脂による砂漠化研究をステージで発表しました。またロボットの実物操作、味覚センサーによる九州各地の水・塩の測定＆試飲会も行いました。3日間とも盛況で、一般市民の方が大学の研究成果展示を興味深く見学されている姿も見受けられました。

九州大学は今回のイベントを手始めとして、社会との積極的なコミュニケーションをもとに、それらを充分に活かして「教育」、「研究」を進めてまいります。今後とも学内外の皆様のご支援・ご鞭撻を頂きますようお願いいたします。（ふるかわ　かつひこ　産学連携、物理化学）



特集2 沙漠緑化技術Ⅱ

納豆樹脂を利用した沙漠緑化戦略

九州大学大学院農学研究院　原　敏夫

納豆といわれて最初に思い浮かぶものは、やっぱり納豆のネバネバした糸以外にはないでしょう。この納豆のネバネバ、ポリグルタミン酸にガンマー線を照射すると、寒天が固まったようなゲルになります。このゲルをフリーズドライすると吸水性、生分解性及び可塑性を特徴とするエコマテリアル、納豆樹脂が得られます（図１左手前）。納豆樹脂は驚くほど吸水性に富み、自分の重さの五千倍もの水を吸収できます（図１ビーカーの中）。

沙漠に豊富にある太陽エネルギーと納豆樹脂を活用して沙漠緑化と食糧増産に役立てる環境保全システム、「グリーン・リサイクルシステム構想」を提唱しています。この中で主役を演じるのがヘドロ・シードペレットです。沙漠化と水圏の汚濁化と富栄養化は同時に進行しており、沙漠化対策は、陸圏と水圏の生態系を相互に連動して再生することが必要です。有機物と土壌粒子とが結びつき生成した沈殿物をヘドロと考えると、ヘドロは窒素やリンを含む有機資源に一変します。このヘドロを植物の種子と納豆樹脂とともに混和、造粒したヘドロ・シードペレットを沙漠や乾燥地帯に散布し、給水すると、出芽率と活着率が向上し、植物はすくすく育ち、収穫された作物が現地の現金収入源となります。

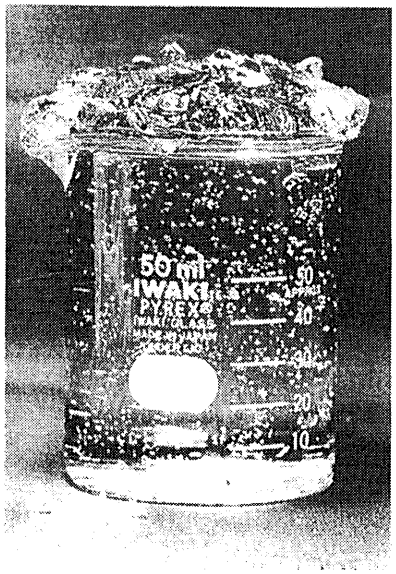


図１　吸水した納豆ゲル

とはいっても納豆樹脂は万能ではありません。物事には二面性があります。納豆樹脂の生分解性は優れた特徴ですが、自然界では分解を受けて水を保持できる期間が短いという欠点になります。納豆樹脂は生育期間が長い樹木の植林には適しません。現在、シロクローバーのような牧草の種子をモデル植物として利用していますが、前にも述べた通り種子の出芽率と活着率を上げ、短期収穫ができる換金作物の栽培試験に取組む予定です。

21世紀のキーワードは「環境」と「食糧」。納豆樹脂の特徴を自然界における「非蓄積性」とコンポスト化による「再資源化」と考えれば、納豆樹脂は「バイオリサイクル」の一翼を担う素材と位置づけられ、きわめて今日的な素材といえます。定住化により沙漠化が進行する地域の飛砂防止のための植林活動と連動し、居住区と防砂林の空間の緑化がターゲットとなります。そのため、沙漠緑化実践協会と連動した取り組みが必須と認識しています。

一見、複雑そうな事象もじっくりと観察してみると、バランス感覚に富む「納豆」の一筋の糸でスーッと意外なほどスッキリと解きほぐすことができそうに思えてなりません。

2003年(平成15年)6月9日(月曜日)

十勝毎日新聞

発行所 十勝毎日新聞社

新加工の時代

□□1□□

農プラス

年間キャンペーン2003

新産業への挑戦

納豆樹脂でふん尿たい肥化

実用化実験 十勝でも

納豆の糸が細菌を殺す…。そんな不思議な「ねばり」がもしかしたら、十勝ならではの強い味方が、意外の糸を超え、思いもよらない「納豆樹脂」という夢の可能性を切り開いている。

「吸水性に優れる納豆樹脂は、さまざまな用途に利用できる」。この特殊な樹脂を開発した九州大大学院の原敏夫助教授(54)は熱っぽく語る。有機廃棄物のリサイクルや砂漠緑化―使い道には無限性が広がっている。

高吸水性に着目

「なぜ納豆の糸ができるのか」。原助教授は5年前、この疑問に遺伝子レベルで答えを出そうと考えた。それが納豆研究の原点だった。遺伝子の多様な働きや納豆の機能解明などを経て、1993年、納豆の糸に注目し、樹脂開発が原助教授に「宿」を預けたのは99年。「九州でも挑戦(しょうちゅう)の酒造問題などがあり、廃棄物処理のモデルとして有望な『糸』を持つ。

同年、中札内村や新得町、帯広市の酪農家で実証試験を実施。「冬でも内部は凍らなかった」と驚きが広がった。「まだ確実な評価ができる段階ではないが、試験は続けていきたい」と今後の進展を見守る。

台湾に生産拠点

ふん尿には多くの水分が含まれる。紙などに吸わせるためには、固形と液体を分離するが、麦がんなどを混ぜ、水分を調整するしかない。しかし、麦がん設備が要り、水分を含むと容量が増えるという問題があった。ふん尿に対して数の振り掛けるだけで済む納豆樹脂は、関係者に「夢の素材」を持つ。

ながが、今年5月に南水町で新しい樹脂を使ってみたところ、ふん尿が固まってしまった。

さらに、究極の目標がある。それは「納豆樹脂を使った砂漠緑化」だ。栄養分を含む納豆樹脂と混和し、砂漠や乾燥地帯に散布する計画。大量の水を必要とする納豆樹脂ならではの活用法といえる。

「いずれは水と二酸化炭素に分解されるこの樹脂は、これからの時代の要請にたえるもの」。納豆の一粒の糸が、コストダウンや実用化への課題として浮上した。

単価を下げるため、生産拠点を台湾に置いた。効率的に納豆の糸を入手できるよう、菌はたがる」と原助教授は今年5月、納豆樹脂の製造や販売などを手掛ける大学のベンチャー企業を設立、年内にも化粧品の増粘剤として供給を予定している。

夢の砂漠緑化も

「高品質で適正価格の製品を作ることができれば実用化は十分可能」と原助教授。

台湾に生産拠点

ふん尿には多くの水分が含まれる。紙などに吸わせるためには、固形と液体を分離するが、麦がんなどを混ぜ、水分を調整するしかない。しかし、麦がん設備が要り、水分を含むと容量が増えるという問題があった。ふん尿に対して数の振り掛けるだけで済む納豆樹脂は、関係者に「夢の素材」を持つ。

同年、中札内村や新得町、帯広市の酪農家で実証試験を実施。「冬でも内部は凍らなかった」と驚きが広がった。「まだ確実な評価ができる段階ではないが、試験は続けていきたい」と今後の進展を見守る。

さらに、究極の目標がある。それは「納豆樹脂を使った砂漠緑化」だ。栄養分を含む納豆樹脂と混和し、砂漠や乾燥地帯に散布する計画。大量の水を必要とする納豆樹脂ならではの活用法といえる。

「いずれは水と二酸化炭素に分解されるこの樹脂は、これからの時代の要請にたえるもの」。納豆の一粒の糸が、コストダウンや実用化への課題として浮上した。

単価を下げるため、生産拠点を台湾に置いた。効率的に納豆の糸を入手できるよう、菌はたがる」と原助教授は今年5月、納豆樹脂の製造や販売などを手掛ける大学のベンチャー企業を設立、年内にも化粧品の増粘剤として供給を予定している。

夢の砂漠緑化も

「高品質で適正価格の製品を作ることができれば実用化は十分可能」と原助教授。

納豆樹脂を手にする原助教授。左手に持つ茶色の製品は別の樹脂を混ぜた物で、実用化に向けたコストダウンの取り組みが進められている

年間キャンペーン 第3部「農プラス加工」

Japan/Taiwan Symposium on molecular biology of functional regulation in plant and microbe
(Saga, Japan)

Production and application of degradable biopolymer, poly(γ-glutamic acid), in Japanese vegetable cheese, "natto".

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

1. Introduction

Together with "food", the "environment" will be another important key word in the 21st century, and in this regard, the desertification of the earth in particular. As we entered the 1990s, humanity confronted a situation that they have not experienced in their history. Increasing number of people is aware of a cloud hanging over the food production which has all-time steadily increased. The earth's natural system has almost reached its tolerance to pollution and destruction of the environment such as outflow of surface soils caused decline in the productivity of crop plants. Agricultural technologies can no longer improve yields to the levels as they used to do. On the other hand, world population is increasing 90 million each year. Facing food shortage and overpopulation, this planet is gradually approaching a critical point.

Population explosion in the third world and destruction of the environment in developed countries jointly bring serious consequences to the fate of the earth. By A.D. 2050, the world population will exceed 10 billion but we have no vision on how to feed them. It is definitely clear that we will no be able to rely on animal protein for food supply and we have no choice but greatly increasing the production soybean, a major source of plant protein, to secure nutrition for humans. This in turn calls for expansion of farmland acreage through changing arid lands to cultivable one so that soybeans and other crops can be grown.

It now appears that, Japanese vegetable cheese, "natto", may take part in greening deserts. This project aims to green the deserts by using highly efficient water-absorbing resins that were developed from poly(γ-glutamic acid) (PGA), a component of the thready substance in "natto".

2. γ-PGA-producing microorganisims

"Natto" is one of the traditional non-salty fermented soybeans foods in Japan grown by *Bacillus subtilis* (*natto*). The natto threads consist of over 5,000 of glutamic acid

The 3rd joint seminar on development of thermotolerant microbial resources and their applications (Chiangmai, Thailand), p. 143.

P3-27

Isolation and characterization of a high enterocin SE-K4 producing thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4 from Thai silage.

Kasumi DOI[1], Sunee NITTSINPRASERT[2], Sadahiro OHMOMO[3] and Seiya OGATA[1]

[1]*Laboratory of Applied Microbial Genetics, Faculty of Agriculture, Graduate Schools, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan*
[2]*Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, 50 Paholyothin Rd., Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand*
[3]*Japan International Research Center for Agricultural Sciences, 1-1 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8686, Japan*

Enterococcus sp. K-4, with a bacteriocin-like activity against *E. faecium*, was isolated from grass silage in Thailand. Morphological, physiological, and phylogenetic studies clearly identified strain K-4 as a strain of *E. faecalis*. Strain K-4 produced a maximal amount of bacteriocin at 43--45° C. We purified, for the first time, the bacteriocin produced at high temperature by *E. faecalis* to homogeneity, using adsorption on cells of the producer strain and reversed-phase liquid chromatography. The bacteriocin, designated enterocin SE-K4, is a peptide of about 5 kDa as measured by SDS-PAGE, and Mass spectrometry analysis found the molecular mass of 5356.2, which is in good agreement. The amino acid sequencing of the N-terminal end of enterocin SE-K4 showed apparent sequence similarity to class IIa bacteriocins. Enterocin SE-K4 was active against *E. faecium*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *Clostridium beijerinckii*, and *Listeria monocytogenes*. Enterocin SE-K4 is very heat stable.

Strain K-4 carries two plasmids, pEK4S (approximately 60 kb) and pEK4L (approximately 75 kb). Plasmid-curing experiments showed that pEK4S was involved in the production of and immunity to enterocin SE-K4 in strain K-4. A derivative strain, M6, with pEK4S produced a higher amount of enterocin SE-K4 than the parental strain K-4, although its growth rate was lower than that of parental strain K-4. Phenotypic changes in strain M6 are attributed to an increase in plasmid copy number.

九州大学研究紹介，20，51-1～51-2

研究活動

“シリカの鉱物化に好熱菌が作用する”

大学院農学研究院　遺伝子資源工学部門　微生物遺伝子工学分野（附属遺伝子資源開発研究センター）　教授　緒方　靖哉
講師　土居　克実

好熱菌のシリカ鉱物化作用機構に関する研究は、現在農学研究院が中心となり、工学研究院、理学研究院、国内外の諸大学に属する異なる専門家の集まりで進めている上に、微生物遺伝子資源の探索と維持管理並びに微生物の有用物質生産機能開発に関する基礎的・応用的研究を行っている本講座の命題をも実によく包括しているので、紹介させていただくことにした。

【研究の端緒】９年前の秋、通勤電車の中で、井澤英二教授（工学研究院地球資源システム工学部門（現名誉教授）が「緒方さん、シリカは地球上で最も多い元素の一つですが、地殻から湧水する地熱水環境下、また地熱発電所のタービンや熱水配管中では短期間に多量のシリカ沈殿物（シリカスケール）ができ鉱物化するのに、*in vitro* 系では殆どでできないのですよ。シリカの鉱物化の過程に、微生物が何か重要な役割をしている可能性はありますか」。緒方は、シリカやシリカ鉱物については全く門外漢であったが、自らの好奇心に駆られて、さらに「シリカスケールの制御・防止は地熱発電技術にとって解決すべき長年の課題なのですよ」の２言目に、発酵のお助け人の心意気も刺激され、「先生の疑問の解決にお手伝いをしましょう」と見得を切ってしまった。

【研究組織】緒方靖哉、木村誠、土居克実（農学研究院）、稲垣史生（農学研究科、現海洋科学技術センター研究員）、井澤英二、渡辺公一郎（工学研究院）、横山拓史、本村慶信（理学研究院）、田口幸洋（福岡大学）、中曽根薫（近畿大学）、Donald R. Lowe（スタンフォード大学）。

【研究資金】“熱水からのシリカスケール生成における微生物活動とスケールの制御に関する研究：平成６～８年度科研費基盤研究（A）、井澤代表”、“地球環境における微生物活動とシリカの沈殿：平成８～９年度科研費国際学術研究、井澤代表”、“シリカと微生物を用いた地球表層水中のアルミニュムの制御に関する研究：平成10～13年度科研費基盤研究（A）、井澤代表”、“未知遺伝子資源の探索と利用法の確立：平成10年度文部省在外研究員創造開発研究派遣費、土居”、“地熱水中のシリカスケール形成に関与する微生物の解析と機能開発：平成11年度日本学術振興会特別研究員費、稲垣”、“好熱菌のシリカ誘導蛋白質の構造と機能：平成11年度長瀬科学技術振興研究奨励資金、緒方”、“好熱菌のシリカ誘導蛋白質の特性とシリカ鉱物化作用機構：平成11～14年度科研費基盤研究（B）、緒方代表”、その他。

【研究の経過】本研究は九重火山系や米国イエローストン国立公園の地熱水湧出地帯での予備調査から始めた。まず、顕微鏡観察でシンター等のシリカ鉱物に微生物様の構造体や珪化された細菌類の痕跡が確認できたことから、シリカ鉱物化現象には熱水系に生息する微生物が関与していると想定した。次いで、シリカスケールの形成過程と環境ゲノム（DNA）の相関を解析して、大岳地熱発電所等のシリカスケール中の菌相を明らかにし、好熱菌が熱水に溶存しているシリカの急速な鉱物化に関与することを提示した。さらに、シリカスケールから分離した優占菌 *Thermus thermophilus* に属する高度好熱菌株 TMY を用い、メタ珪酸ナトリウムを溶解させた培地を用いた *in vitro* 培養系で、高純度非結晶質のシリカスケール生成にはじめて成功した。TMY 株はポリマーシリカが300ppm 超えた過飽和存在する場合に、対数増殖期の後期頃から過飽和分のポリマーシリカを短時間に著しく沈殿させる。このシリカ沈殿に対応して、沈殿反応に重要な作用をしていると推測される細胞表層蛋白質 Sip（Silica-induced protein）の産生が起こった。Sip の産生はシリカの非存在下では殆ど検出できない。対数増殖期の菌体に過飽和のシリカを添加した場合、Sip 産生は約１時間後に顕著になり、時間経過に伴いその量は増加する。Sip は分子量約35kDa で、部分アミノ酸配列から新規の蛋白質と推測している。この間、TMY 株をはじめ多種多様の好熱菌を分離した。

【研究の効果】Sip 遺伝子の解析が完了すれば、Sip とその遺伝子は特異的な蛋白質の知見を提供するのみならず、微生物作用によるシリカ鉱物形成機構およびその制御機構の解明などに役立つと推察される。

4. 講演要旨

家蚕遺伝子開発分野

日本蚕糸学会（福岡）、４月、２００２年

日本産クワコとカイコのゲノム構成の差に関する細胞遺伝学的解析 ：カイコ第14連関群染色体の関与について

○伴野　豊・中村　隆・藤井　博・土井良　宏（九大院農）・長島栄一（信大繊）

カイコの染色体数と中国大陸に生息するクワコの染色体数が n=28 であるのに対し，日本産クワコの染色体数は n=27 である（韓国内には n=27 と n=28 が生息する）．日本産クワコとカイコの交雑 F_1 では第一減数分裂期に 26Ⅱ＋1Ⅲの染色体構成が観察されることから、日本産クワコにはカイコの２本の染色体が融合した染色体が１本存在することが予想されていた．我々はこの問題について長年，細胞遺伝学的に追究してきたが，カイコ第 14 連関群染色体が融合染色体に関与することを認めたので報告する．福岡市及びその近郊、長野県南安曇郡、上田市等で採集したクワコを各連関群の標識遺伝子をもつカイコに交配し F_1 を作成した。この F_1 雌に対象とする標識遺伝子が劣性の場合は標識遺伝子系統のカイコ雄を、優性の場合には正常形質を持つカイコ雄個体を戻し交配し，BF_1 に分離した標識形質個体と正常形質個体の染色体を観察した。第一減数分裂中期に 26Ⅱ＋1Ⅲと 28Ⅱの染色体構成が標識形質個体と正常形質個体で共に確認された場合は当該遺伝子の属する連関群は融合染色体とは独立である。一方、標識形質個体全てが 28Ⅱの染色体構成、正常形質個体全てが 26Ⅱ＋1Ⅲの染色体構成となった場合は、同連関群が関与していると判定される。調査した既存の 27 連関群のうち 26 連関群とは独立であった。ところが、第 14 連関群に関して *U* 遺伝子を標識遺伝子として解析した場合、*U* 個体は全て 28Ⅱの染色体構成であったのに対し、＋個体は全てが 26Ⅱ＋1Ⅲの染色体構成であり、第 14 連関群染色体がクワコの融合染色体に関係していることが明瞭に認められた。

セルピン型タンパク質CI-8に対するレセプターの同定および精製

°上野由宣　何率佳　伴野豊　藤井博

（ 九大院農 ）

完全変態昆虫の変態機構の解明は，組織構築，維持，改変の研究モデルとして幅広い情報を提供すると考えられる．本研究ではカイコ中腸の組織崩壊におけるセルピン型タンパク質 体液キモトリプシンインヒビター8（CI-8）の機能の解明を目指している．変態期中腸では新生細胞が縞型細胞に分化する一方で，幼虫組織崩壊が進行する．この時，CI-8は崩壊する幼虫中腸に時期特異的に取り込まれる．この変態期のCI-8の挙動から幼虫中腸組織崩壊機構を解明する．その最初のステップとして，中腸に存在すると考えられる CI-8 に対するレセプターの同定をファーウエスタン法で行った．リガンドとして精製 CI-8をビオチン化した．他方，組織崩壊が進行している幼虫中腸の細胞分画を行い，膜画分を抽出した．さらに，膜タンパク質を SDS-PAGE後ニトロセルロース膜に転写した．リガンドと膜タンパク質との相互作用を西洋わさびパーオキシダーゼとECLにより検出した．この結果，CI-8と直接相互作用するタンパク質として60KDaおよび29KDaのタンパク質を検出した．さらに，CI-8固相化アフィニティクロマトグラフィーにより，60KDa タンパク質をSDS-PAGE 後の銀染色により単一バンドとして精製した．現在，クローニングのためのアミノ酸情報の取得を目指し，60KDa タンパク質の大量調整を行っている．

日本蚕糸学会（福岡）、４月、２００２年

カイコ体液 Kunitz 型キモトリプシンインヒビターの 系統間 ゲノム構造解析

○何率佳　上野由宣　藤井博　伴野豊　（九大院農）

カイコ幼虫体液中に存在する低分子のKunitz型キモトリプシンインヒビターは*Ict-H*, *Ict-A*, *Ict-B*遺伝子および新たに見い出した遺伝子によって支配され，これらの遺伝子は第2連関群の23.7に座上することが明らかにしている．そこで，各遺伝子のゲノム上の配列および転写調制領域の構造を明らかにするためにゲノム構造の解析を試みた．その結果，signal peptide領域を含む261bpのCI-13 cDNAおよび258bpのCI-1，２とb１の cDNA をクローニングし，塩基配列を明らかにした．この配列に基にづきプライマーを合成し，様々な系統を用いて，ゲノム解析を行ったところ，長さの違う4つ断片（0.8kb，1.0kb，1.4kb，1.8kb）を得った，4つの断片はともに３つのエキソンと２つのイントロンから構成されていた．この中，1.8kbと0.8kb断片はそれぞれCI-13をコードしていた．これまでCI-13遺伝子は１つであるといわれていたが，今回の結果によってゲノム上に二箇所存在することを明らかにした．1.8kb断片中のイントロン1と2の大きさは0.8kbのものよりも大きかった．1.8kb断片中のイントロン1と2にはカイコのgypsy-Ty3-like retrotransposable elementsの一部の配列に95％の相同性をもつ配列が１ケ所づつ存在した．また，1.4kbと1.0kbの断片中には既知の4つのcDNAと90％以上の相同性をもつ配列が認められた．それは同じファミリの未知遺伝子と思われる．

カイコカロチノイド繭色突然変異体の脂質輸送について

○土田耕三(感染研)・天竺桂弘子(農工大)・田中嘉郎(株ライオン)・片桐千仭（北大）
伴野豊・藤井博（九大）・森林敦子・高田直子・橋戸和夫・前川秀彰（感染研）

カロチノイドは、中腸から体液にでて絹糸腺等に移行する。カロチノイドの輸送に関して突然変異体が知られ、カロチノイドの中腸透過性を支配する *Y* や *I* 遺伝子の存在が知られている。昨年の本大会において、*Y* 遺伝子をもつ系統はカロチノイド結合タンパクが中腸や絹糸腺にあり、$+^{Y}$ 遺伝子を持つ系統にはないことを報告した。 *Y* や *I* 遺伝子は、カロチノイドの中腸細胞内の移行に関与することは明らかであるが、カロチノイド以外の疎水性物質、たとえば脂質の中腸透過性も支配している可能性については不明である。

YI, $Y+^{I}$, $+^{Y}I$ および $+^{Y}+^{I}$ 系統の幼虫を用いて、脂質の動きを調べた。$Y+^{I}$ 系統リポホリン中のカロチノイドは *YI* 系統の 50~100 倍も多いのに対し、ジアシルグリセロールの含量には差がなかった。*Y* や *I* 遺伝子は、カロチノイドのみの透過性を支配し、中腸で物質の特異輸送が行われていることを示していた。

Bulletin of Sericult. Sci. of Kyushu
日蚕九州講演集 No.3 (2002)

A 10

第3小形卵遺伝子 "*sm-3*" の座位

○西坂章文・伴野 豊・西川和弘・田村 圭・江口誠一・山本幸治・藤井 博
(九州大学大学院・農学研究院)

九州大学において維持されてきた xd34 系統に見られる小卵形質に関して遺伝学的に連鎖解析を行い，同小形卵形質を発現する遺伝子は第7連鎖群に所属する単一の劣性遺伝子によることを明らかにし，その遺伝子を *sm-3*（第3小形卵）と命名した（西坂ら，1999）．その後，同連鎖群に所属する *q*（かすり）遺伝子を標識遺伝子（マーカー遺伝子とも呼称）として *sm-3* 遺伝子をホモに持つ個体とヘテロに持つ個体とを外見から識別可能な d33 系統（交配形式：*q sm-3* / + + ♀ × *q sm-3* / *q sm-3* ♂）を育成した．本実験では同育成系統を用いて *sm-3* 遺伝子の座位を決める3点実験を行った．先ず，第7連鎖群に所属する浮きちぢら遺伝子 *Fl* 遺伝子を持つ b30 系統雌に *q sm-3* 遺伝子をシス型にもつ d33 系統雄を交配した．その F_2 世代における形質の分離は＋＋ *Fl*：1513頭，*q sm-3*＋：308頭，＋ *sm-3*＋：18頭，*q*＋ *Fl*：16頭，＋＋＋：181頭，*q sm-3 Fl*：97頭，＋ *sm-3 Fl*：9頭，*q*＋＋：4頭（25区計2146頭）であった．本分離結果から，3遺伝子の配列順は起点から *q* — *sm-3* — *Fl* となる．＋ *sm-3*＋：18頭，*q*＋ *Fl*：16頭が *q* — *sm-3* 間の単交叉型，＋＋＋：181頭，*q sm-3 Fl*：97頭が *sm-3* — *Fl* 間の単交叉型，＋ *sm-3 Fl*：9頭，*q*＋＋：4頭が2重交叉型ということになる．本交配系では各種の交叉型は実際の半数しか検出されないので遺伝子間の距離を求める場合には2倍する必要がある．これによって遺伝子間の組換価を算出すると，*q* — *sm-3* 間 4.38，*sm-3* — *Fl* 間 27.12 *q*— *Fl* 間 29.07 となる．現行の第7連鎖地図上 *q* — *Fl* 間は 32.1 とされているのでこの価で補正を行うと *q* — *sm-3* 間は 4.5 となる．*q* 遺伝子が第7連鎖群の起点 0.0 であるので *sm-3* 遺伝子は同群の 4.5 の位置を占めることになる．

文　献

西坂章文・伴野 豊・西川和弘・田村圭・江口誠一・藤井 博（1999）：九州蚕糸 No.30, 25.

Linkage studies on the small egg 3 (*sm-3*) in the silkworm, *Bombyx mori*

Bulletin of Sericult. Sci. of Kyushu
日蚕九州講演集 No.3 (2002)

A 11 k不眠蚕における2次元電気泳動によるタンパク質組成の解析.

○ 野田 真路・伴野 豊*・山本 幸治*・藤井 博* (九州大学大学院・生物資源環境科学府*九州大学大学院・農学研究院)

カイコには，孵化した幼虫が桑葉を食べ成長する初期の 1～2 齢期に，発育が遅れ致死する遺伝的不眠蚕と呼ばれる変異体がこれまでに多数報告されている。その数は遺伝的に解析され現存する遺伝子座に限っても 8 染色体 9 遺伝子座に上っている。これら不眠蚕は，主として 1 齢幼虫のまま発育が遅れ脱皮することなく致死する共通した特徴を発現する。著者らはこれら一群の遺伝的不眠蚕が幼虫初期発育の形質発現を解明する好個な材料になると考え追究している。今回，遺伝的不眠蚕の原因を明らかにするための一助として 2 次元電気泳動を用いて体液，whole body におけるタンパク質の発現の相違について正常との比較分析を行った。

供試系統は九州大学大学院農学研究院遺伝子資源開発研究センター保存の a49 で，第 4 連鎖群 26.8 に占座する *nm-k* 遺伝子の支配を受け不眠蚕を分離する。同系統において分離する正常蚕と k 不眠蚕 (*nm-k*) の幼虫個体を用いて経過を追って whole body および体液を採取し，直ちに－80 ℃に保存した後，供試直前に融解して実験に用いた。体液タンパク質の濃度は伴野ら (1993) の結果を参考に調製した。試料は平野(2001)の方法に準じて，溶解バッファー(8 M 尿素, 2 M チオ尿素, 4% w/v CHAPS, 30 mM DTE, 20 mM トリス塩基, 2% v/v p*H* 3-10 のキャリアアンフォライト) で調製した。1 次元目は，IPG ストリップ (11cm)，IPGphore 等電点電気泳動システム (アマーシャムファルマシア)，2 次元目は 15% SDS-PAGE 縦形電気泳動を使用した。分離した正常個体と *nm-k* 個体の体液の 2 次元電気泳動像を比較したところ，9 個のスポットに相違が認められた。一方，whole body の 2 次元電気泳動像では正常個体と *nm-k* 個体において 15 個のスポットに相違が認められた。

文　献

1) 伴野 豊・栃原 真二・河口 豊・土井良 宏 (1993)：日蚕雑，62，187-194.
2) 平野 久 (2001)：プロテオーム解析-理論と方法-，321pp.，東京化学同人.

Protein profiles after two-dimensional gel electrophoresis in the *nm-k* mutant of *Bombyx mori*.

Bulletin of Sericult. Sci. of Kyushu
日蚕九州講演集 No.3 (2002)

B 14

カイコ Y-box protein 遺伝子のクローニングと全塩基配列決定及び卵巣における発現部位

○岡田太郎・何 寧佳・山本幸治*・伴野 豊*・藤井 博*
(九州大学大学院・生物資源環境科学府, *九州大学大学院・農学研究院)

発生の初期段階におけるタンパク質合成は時期や部位特異的に促進または抑制されることが知られており, その多くは新生 mRNA ではなく母性 mRNA を基にすると考えられている. カイコにおける母性 mRNA は未受精卵中の RNA 顆粒 (RNP) に存在することが示され, 時期特異的なタンパク質合成を促進することが明らかにされている (Fujii *et.al.*,1982) . Y-box protein はヒト, アフリカツメガエル, ショウジョウバエなどの幅広い生物種において, RNP を構成する主なタンパク質として知られている. またアフリカツメガエル由来の Y-box protein (FRGY2) は母性 mRNA と結合することにより翻訳抑制を行うと考えられている. しかし, カイコ Y-box protein に関する知見はみられない.そこでカイコ由来の Y-box protein の機能を明らかにすることを目的として, Y-box protein 遺伝子をクローニングし, その全塩基配列を決定した.さらに Y-box protein 遺伝子の発現部位を明らかにするために in situ hybridization 法を用いて, 卵巣における Y-box protein mRNA の局在性について解析した. ショジョウバエ Y-box protein 遺伝子の塩基配列及び Silk base を基にプライマーを設計した. このプライマーを用いて RT-PCR を行い, カイコ Y-box protein 遺伝子をクローニングした. ORF の全塩基配列は 819bp であり, 273 残基のアミノ酸配列に相当した. N 末側には Y-box protein の共通構造として知られている cold shock domain (CSD) が存在していた. CSD の相同性はショウジョウバエと 98%,FRGY2 とは 95%であり, 他の生物における Y-box protein の CSD とも同じように高い相同性が認められた. 一方, Y-box protein の C 末側は生物種によって多様性に富んでいる. カイコ Y-box protein の C 末側にはショウジョウバエやアメフラシに認められる RGG の繰り返し構造と同じ構造をもつことが明らかになった. カイコ Y-box protein の塩基配列を基にプローブを作製し in situ hybridization を行った結果, Y-box protein mRNA は卵巣の濾胞細胞に局在していることが明らかになった.

Bulletin of Sericult. Sci. of Kyushu
日蚕九州講演集 No.3 (2002)

B 17 *Cecropia*-ITR-MLE に分類されるマリナー様配列比較によるカイコとクワコの分岐についての考察

○中島裕美子・藤本浩文・中村 隆・伴野 豊・橋戸和夫・土田耕三・高田直子・前川秀彰
(琉球大学・遺伝子実験センター、東京大学大学院・農学生命科学研究科、九州大学大学院・農学研究院、国立感染症研究所・放射能管理室)

我々は、セクロピア蚕マリナー様配列の末端逆位繰り返し配列（*Cecropia*-MLE-ITR）が、鱗翅目昆虫を主とした日本列島に生息する生物種において水平伝播型のマリナー全長配列を単離するのに有効なPCRプライマーであることを発表し(Nakajima *et al.*, 1998, 1999, 2002)、この手法によって単離された配列の比較から、地理的移動も含めた種の分岐の解析に使えることを提示した。この手法がカイコとクワコの移動と分岐の解析に使えるかどうか検討したので報告したい。カイコは中国で約 5000 年前にクワコから家畜化されて養蚕に使われるようになり、約 1500 年前に中国から日本に移入されたと考えられている。クワコは日本にも生息しており、その染色体数が 27 本で、カイコ及び中国に現在生息しているクワコの 28 本と異なることが知られている。これまで、日本、韓国、中国に生息しているクワコの個体形態、タンパク質多型、アリルフォリン遺伝子の塩基配列などを指標として地理的変異を含めた比較が行われ、日本のカイコが中国のクワコ及びカイコと同じ性質をもっていることが示されてきた。この結果は、日本に生息するクワコは人為的に移入されたカイコと異なるルートで日本に伝播したことを支持するものである（Maekawa *et al.*, 1989)。推測されている朝鮮半島及び日本列島の形成年代から、日本に現在生息しているクワコの伝播ルートを調べ、分岐の年代を算定する試みの一環として、ゲノムにおけるマリナー様配列の動向に着目した。*Cecropia*-MLE-ITR をプライマーとしてアジア各地に分布しているクワコに対して PCR 増幅を行った結果、マリナー全長に相当する約 1.3 kb のバンドの他に、0.5kb から 4.2kb にわたる数多くの長さのバンドが検出された。更に、これらの中には地域ごと特徴的な長さのバンド（2.0kb、2.5kb、4.2kb）が存在していることが確認された。4.2kb のバンドは、2 種類の起源を同じくすると考えられるレトロトランスポゾン *BMC1* と *L1Bm* が入れ子状態に挿入されたマリナー様配列であり、カイコを特徴づけるバンドであることが報告されている（Tomita *et al.*, 1997; Nakajima *et al.*, 1999)。マリナー様配列に別の配列が挿入される、あるいはマリナー配列の一部が欠失して生じたと思われるこれらの異なる長さのバンドを指標としてクワコが中国から朝鮮半島を経て日本へ移動したと考えられるルートについて考察する。

Bulletin of Sericult. Sci. of Kyushu

日蚕九州講演集 No.3 (2002)

C 1

カイコ脂肪体のプロテオーム解析

○張 平波・山本 幸治*・伴野 豊*・藤井 博*（九州大学大学院・生物資源環境科学府、*九州大学大学院・農学研究院）

カイコの脂肪体で合成発現されるタンパク質の全体像はまだ理解されていない。本研究の目的は二次元電気泳動とマトリックスアシステッドレーザー励起イオン化（MALDI）飛行時間型質量分析計（TOF/MS）を用いて,カイコ脂肪体で発現されているタンパク質の全体像を再現よく呈示し，その特徴を解析することである。供試系統は九州大学農学部遺伝子資源開発研究センター保存の p50 である。5 齢 5 日の脂肪体を採取し，直ちに−80℃に保存し，供試直前に融解して用いた。タンパク質粗抽出液を溶解バッファーに完全に溶かしてサンプル調製を行った。一次元目は，IPGphor 等電点電気泳動システム(アマーシャムファルマシア)を用いてインゲル膨潤法に準じて行った。二次元目は,15% SDS - PAGE ゲル縦型電気泳動を行った。泳動後 TOF/MS 分析用の銀染色キットを用いて蛋白質を染色し，スポットを切り取り，5-10 ng/μl のトリプシンでインゲル消化を行った後，MALDI-TOF/MS を用いてペプチドマスフィンガープリント分析を行った。

その結果，二次元電気泳動を用いたカイコ脂肪体のタンパク質パターンが再現性良く分離できる方法を確立した。p*I* 3-10 で 758 スポット，p*I* 4-7 で 964 スポットが検出された。そのうち 154 スポットを MALDI-TOF/MS を用いて分析し，カイコの in-house データベースで検索を行った。検索基準は Coverage が 60％以上で Matching peptides が 3 以上とした。また Silkbase と SWISS-PROT による検索の結果，154 スポットのうち 21％は代謝に関する酵素，62％は構造と細胞のシグナル分子，9％はその他のタンパク質であることが明らかとなった。残りの 8％にあたる 12 スポットは未知のタンパク質であった。さらに同じステージの雌雄カイコの脂肪体タンパク質を比較したところ，雌雄でタンパク質に違いが認められた。

Overexpression and Purification of Y-box Family Protein of the Silkworm, *Bombyx mori*

Kohji Yamamoto, Taro Okada, He Ningjia, Yutaka Banno and Hiroshi Fujii
Laboratory of Insect Genetic Resources, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Science, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

The Y-box proteins are a family of nucleic acid binding proteins, which interact with the particular nucleotide sequence, so-called Y-box element and are thought to be involved in both transcriptional and translational regulation. Previously, we identified RNPs (ribonucleoprotein particles) including maternal mRNA in an unfertilized egg of *Bombyx mori* and demonstrated that protein synthesis was fluctuated during embryonic development (1). It is also reported that Y-box proteins have been found to be a core responsible for the formation of RNPs (2). Taken together, it has been postulated that Y-box family proteins may be associated with embryogenesis in silkworm egg.

To elucidate the function of Y-box protein, we have cloned gene encoding silkworm Y-box protein using RT-PCR with primers based on the Silkbase. We have also sequenced the gene and identified the open reading frame containing cold shock domain (CSD) at N-terminal region and RGG repeat at C-terminal region. CSD is known to be required for sequence-specific recognition of RNA and highly conserved among Y-box proteins from bacteria to human. Here, we constructed overexpression and purification system of Y-box protein of the silkworm, *Bombyx mori*. The structural gene was ligated into pET11b expression vector and the resultant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3), which was grown at 37 °C to an A_{600} of 0.7. Y-box protein was induced by the addition of IPTG to a final concentration of 1 mM for 3hr. The overproduced protein was migrated at about 31 kDa in SDS-polyacrylamide gel corresponding to a predicted molecular weight of Y-box protein. Cultures were harvested by centrifugation and cell pellet was sonicated. Recombinant Y-box protein was detected in the supernatant after centrifugation. After ammonium sulfate precipitation, the pellet was dialyzed against 10 mM phosphate buffer (pH 6.5) with 0.1 M KCl and loaded onto an anion exchange chromatography equilibrated with the same buffer. The column was run with a linear gradient of KCl from 0.1 to 0.4 M. The silkworm Y-box protein was purified to near homogeneity on SDS-PAGE by ammonium sulfate fractionation and an anion exchange chromatography.

References

(1) Fujii H., *et. al.* (1982) *J. Seric. Sci. Jpn.* **51** (6), 503-509.
(2) Murray M. T., *et. al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 11-15.

日本育種学会　１０１回　（東京）　　２００２年３月

208　○牛島智一，熊丸敏博，佐藤光（九大農）イネ種子におけるプロラミン変異遺伝子 *esp1* のマッピング
USHIJIMA, T., T. KUMAMARU and H. SATOH (Fac. Agr., Kyushu U.)　Mapping of a mutant gene, *esp1*, for prolamin in rice seed.

イネ種子プロラミンは少なくとも 20 種以上の分子種から構成されるが，これらは溶媒溶解性の違いにより cystein poor (CysP)プロラミンと cystein rich (CysR)プロラミンの二群に分類される．しかし，両プロラミン群の発現時期が異なること，さらに，それぞれのプロラミン群を特異的に減少させる変異体が得られたこと（Kumamaru et al. 1987）から，CysP プロラミン群と CysR プロラミン群にはそれぞれに特異的な遺伝的発現制御機構が存在しているものと考えられる．そこでプロラミン分子の生合成，集積の遺伝的制御機構を明らかにすることを目的に，CysP プロラミン群が減少した *esp1* 変異体（Fig.1）について解析を行った．

（結果及び考察）等電点電気泳動(IEF)分析の結果，Kinmaze では CysP プロラミンは少なくとも５つ以上の分子種から構成されることが明らかとなった．*esp1* 変異体では pI6.65，6.95 及び 7.1 の CysP プロラミン分子が減少し，pI6.85 及び 7.4 のプロラミン分子はほとんど変化が認められなかった．Kinmaze と IR24 及び IR36 の交雑 F2 集団を用いて，これら５種のプロラミン分子の遺伝様式について検討した．少なくとも pI6.65，6.85 及び 6.95 の３プロラミン分子はそれぞれ単遺伝子支配で，かつ，独立した遺伝子によってコードされていた．これらの結果から，*esp1* 変異体はプロラミン構造遺伝子の変異ではなく，プロラミン分子の発現調節機構に関わる遺伝子の変異であることが強く示唆された．

次に，登熟過程におけるプロラミン分子の発現の変化について検討した．Kinmaze では CysP プロラミンは CysR プロラミンにやや遅れて発現し，その後急速に集積量が増大した．*esp1* 変異体の CysP プロラミンも Kinmaze 同様登熟初期から発現し，その後も CysP/CysR プロラミン比はほぼ一定であった．このことから，*esp1* 変異体における CysP プロラミンの減少は，発現が登熟後期に移行したためではなく，発現量そのものが減少したことによると考えられた．

Esp1 遺伝子のポジショナルクローニングを目的に，Kasalath と *esp1* 変異体の交雑 F2 を用いて小規模集団による *esp1* 遺伝子のマッピングを行った．この結果，*esp1* 変異遺伝子を RFLP マーカー，R1422（短腕末端からの距離 81.1cM）と R2677（83.3cM）の間，2.2cM の領域内に位置づけることができた（Fig.2）．

今後，大規模集団を用いて高密度連鎖地図を構築し，*Esp1* 遺伝子の単離及び機能解析を行い，プロラミンの生合成，集積機構を明らかにしていく予定である．

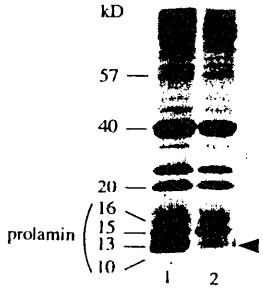


Fig.1. SDS-PAGE profile of *esp1* mutant .
1, wild type; 2, *esp1* mutant; ◄, CysP prolamin

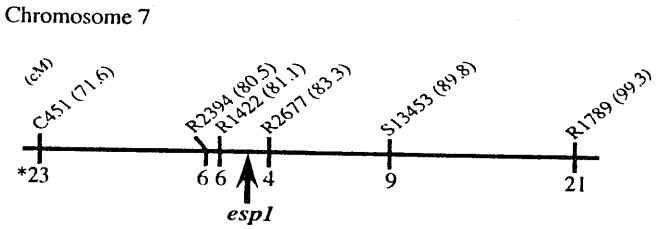


Fig. 2. Chromosomal location of *esp1* gene .
＊, recombinant plants number.

412　○熊丸敏博[1]、上村裕二[1]、石原大輔[1]、竹本陽子[1]、小川雅広[2]、佐藤光[1]（1.九州大院農、山口県立大生活科学）イネ種子におけるグルテリン前駆体を多量に蓄積する変異遺伝子 *glup3* の解析

Kumamaru, T.[1], Y. Uemura[1], D. Ishihara[1], Y. Takemoto[1], M. Ogawa[2], H. Satoh[1](1.Fac. Agr. Kyushu U.; 2.Fac. Human Life Sci. Yamaguchi Pre. U.) Analysis of *glup3* gene which accumulates greatly the glutelin precursor in rice seed

イネ種子中のグルテリンは小胞体で翻訳された後、ゴルジ体を経て液胞に輸送され、限定分解を受け成熟型グルテリンとして液胞内に蓄積する。グルテリンの輸送から蓄積までを制御する遺伝的機構の解明を本研究の目的とする。これまでに、グルテリン前駆体を多量に蓄積する 57H 変異体を多数選抜し、独立の 7 変異遺伝子を同定した。これらの内の一つ、*glup3* 変異体を解析した結果を報告する。

材料に用いた *glup3* 変異体は多量のグルテリン前駆体の蓄積と共に、成熟型グルテリン量の減少を伴う。他の 57H 変異体、*esp2* 変異体ではグルテリン前駆体は小胞体由来の PB 内にプロラミン分子と共存する (Takemoto et al, 2002)。*glup3* 変異体におけるグルテリン前駆体の蓄積部位特定のために、ショ糖密度勾配遠心分離によって *glup3* 変異体の PB 画分を解析した結果、本変異体のグルテリン前駆体は液胞由来の PB に成熟型グルテリンと共存することが示唆された。

高精度連鎖地図を用いて *glup3* 変異体の原因遺伝子の単離を試みた。*glup3* 変異体とインド型品種 Kasalath との交雑 F2 種子より、*glup3* 遺伝子ホモ個体約 2200 個体を選抜した。播種後、CAPS マーカーと RFLP マーカーにより *glup3* 遺伝子近傍の組換え個体を選抜した。その結果、*glup3* 変異遺伝子は RFLP マーカー L1091 と R2783 間の 0.5cM の領域に位置していた(図 1)。両マーカーは、それぞれ BAC クローン 0SJNBa0091D06 と OSJNBa0011L07 に対応していた。

これらの BAC クローン内の配列を元に CAPS マーカーを作製し連鎖分析を行った結果、*Glup3* 遺伝子は前者の BAC クローン内の約 95kb の領域内に存在することが明らかとなった。

この BAC クローンの遺伝子配列のアノテーションの結果、95kb の領域内に他植物の液胞プロセッシング酵素（vacuolar processing enzyme: VPE）と高い相同性を有する配列を検出した。VPE は、液胞内においてタンパク質を前駆体型から成熟型に限定分解する酵素である。*glup3* 変異体ではグルテリン前駆体と成熟型が液胞内で共存していることから、この変異体は VPE に関する変異の可能性を示唆している。そこで BAC クローンに含まれる VPE と相同性が高い配列を *Glup3* 候補遺伝子とした。

glup3 変異体における *Glup3* 候補遺伝子の種子での発現を RT-PCR によって調査した。他植物と相同性がない配列をプライマーとした場合、*glup3* 変異体では野生型と比較して非常に弱いシグナルが検出された。他植物と相同性がある配列をプライマーとした場合では、野生型とほぼ同じ強度のシグナルが検出された。これらの結果は、*glup3* 変異体では *Glup3* 候補遺伝子の発現が抑えられていること、イネでは *Glup3* 候補遺伝子以外にも VPE と相同性を有する遺伝子が存在することを示唆している。

今後、*Glup3* 候補遺伝子による相補性検定を実施する予定である。

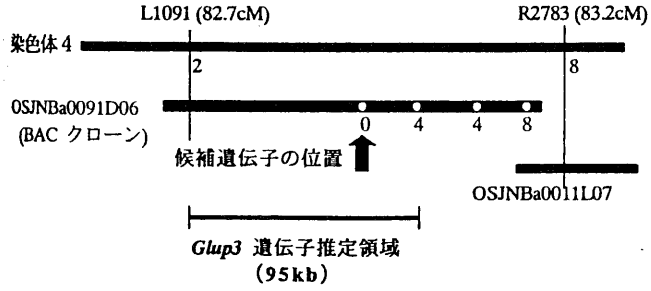


図 1.　*Glup3* 遺伝子近傍の連鎖地図
連鎖地図上側は RFLP マーカー名と短腕末端からの距離を、BAC クローン内の白丸は CAPS マーカーの位置を、連鎖地図下側及び BAC クローン下側の数字は組換え個体数を示す。

605　○佐藤 美緒[1]、杉野 彩[1]、竹本 陽子[1]、熊丸 敏博[1]、小川 雅広[2]、T.W.Okita[3]、佐藤 光[1]（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科学研）　*Esp2* 遺伝子はイネ胚乳特異的 Protein disulfide isomerase の構造遺伝子である

Sato,M.[1], A.Sugino[1], Y.Takemoto[1], T.Kumamaru[1], M.Ogawa[2], T.W.Okita[3], H.Satoh[1](1.Fac.Agr., Kyushu U., 2.Fac.Human Life Sci., Yamaguchi P.U., 3.Inst.Biol.Chem.Washington State U.) *Esp2* is a structural gene encoding endosperm specific protein disulfide isomerase in rice.

イネ種子中のグルテリンは、小胞体で翻訳された後液胞へ輸送され、限定分解を受け成熟型グルテリンとして蓄積する。一方、プロラミンは小胞体由来のプロテインボディ（PB）に蓄積する。57H 変異体は、57kD グルテリン前駆体を多量に蓄積する変異体である。57H 変異体の１つ *esp2* 変異体は、小胞体由来の変異型 PB 内にジスルフィド結合(S-S 結合)を介してグルテリン前駆体とプロラミンを蓄積するが、同時に S-S 結合を触媒するタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)を欠損する。これらの結果から、PDI が小胞体内でのグルテリンとプロラミン両タンパク質の選択的分別に関与することが強く示唆された。

本研究では、 *esp2* 変異が PDI の欠損変異に起因するか否か、 *Esp2* 遺伝子と PDI 遺伝子が同一の遺伝子であるか否かを明らかにすることを目的として、遺伝学的解析を行なった。

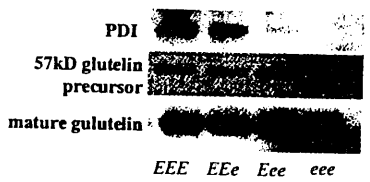
【材料及び方法】*esp2* 変異体と原品種「金南風」を正逆交雑して得た F_1 及び F_2 種子について、SDS-PAGE 並びに PDI 抗体を用いたウエスタンブロット分析を行った。さらに、インド型品種「Kasalath」と *esp2* 変異体 PM162 の交雑 F_2 集団中の *esp2* 遺伝子をホモに持つ個体について、PDI cDNA クローンをプローブとする RFLP 解析を行った。

【結果及び考察】まず、*esp2* 変異が PDI の欠損変異に起因するか否かを明らかにするために、「金南風」と *esp2* 変異体の F_2 種子を分析した。57H 変異個体、すなわち *esp2* ホモ個体は全て PDI を欠損し、野生型個体は全て PDI を有していた(Table1) 。このことから、*esp2* 変異におけるグルテリン前駆体の蓄積は PDI の欠損に起因することが示された。

次に、*Esp2* 遺伝子と *PDI* 遺伝子が同一の遺伝子であるか否かを明らかにするために、正逆交雑 F_1 種子の分析並びに「Kasalath」と PM162 の F_2 集団における RFLP 分析を行なった。正逆交雑 F_1 種子では、*Esp2* 遺伝子数の減少に伴い PDI タンパク質量が減少し、遺伝子量効果が認められた。同時に、グルテリン前駆体蓄積量も *Esp2* 遺伝子数の減少に伴い、PDI タンパク質量とは反比例に増加が見られ、遺伝子量効果が認められた(Fig.1.)。

「Kasalath」と *esp2* 変異体 PM162 の交雑より得た *esp2* ホモ 103 個体について、PDI cDNA クローンをプローブとする RFLP 分析を行ったところ、全て PM162 型を示した。これらの結果は、*Esp2* 遺伝子が PDI の構造遺伝子であることを強く示唆している。

現在、相補性検定を行うために PDI の cDNA クローンを用いた形質転換実験を行っている。



E : Wild type gene; *e* : *esp2* gene
EEE : Kinmaze, *Eee* : F1 seed of the cross between Kinmaze×*esp2*
Eee : F1 seed of the cross between *esp2*×Kinmaze, *Eee* : *esp2*

Fig.1. Gene dosage effect of *Esp2* gene on PDI and glutelin precursor.

Table 1. Segregation modes of *57H* type and PDI deficiency in F_2 seeds derived from a cross between *esp2* mutant and the wild type.

Cross Combination	Segregation in F_2 seeds				Total	$\chi^2_{(3:1)}$
	Normal type		57H type			
	PDI+	PDI-	PDI+	PDI-		
esp2×Wild type	69	0	0	21	90	0.133
	85	0	0	31	116	0.084
Total	154	0	0	52	206	0.006

606

○竹本陽子[1]・佐藤美緒[1]・杉野　彩[1]・熊丸敏博[1]・小川雅広[2]・佐藤　光[1]（1.九大農、2.山口県立大生活科学、）57H 変異遺伝 *glup7(t)*の遺伝学的解析

Takemoto,Y.[1], M.Sato[1], A.Sugino[1], T.Kumamaru[1], M.Ogawa[2] and H.Satoh[1] (1. Fac. Agr., Kyushu U., 2. Fac. Human Life Sci., Yamaguchi P.U.) Genetic analysis of a novel 57H mutant gene, *glup7(t)*, in rice.

【目的】イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンの輸送蓄積経路の遺伝的制御機構の解明を目的として、57kD グルテリン前駆体を蓄積する 57H 変異に関し、これまで 7 遺伝子座を同定した。この機構をさらに詳細に解析するために、MNU 受精卵処理後代より 57H 変異体を選抜し、遺伝解析を行った結果、新たな変異遺伝子 *glup7(t)*を同定したので報告する。

【材料及び方法】水稲品種「金南風」由来の変異体 CM935 を材料に用いた。遺伝分析は既報の 57H 変異遺伝子系統 *esp2, Glup1, glup2, glup3, glup4, Glup5, glup6* 及び野生型(WT)との交配 F2 種子の SDS-PAGE 分析により行った。CM935 の特性解析は、抗グルテリン抗体を用いたウエスタンブロット分析により行った。胚乳組織における 57kD 前駆体の存在部位の推定は、ショ糖密度勾配（SDG）遠心分離法による PB の分画により行った。

【結果】CM935 は、57KD ポリペプチドが増加に伴って成熟型グルテリンがわずかに減少するが、プロラミンの染色程度及び組成は WT とほぼ同一であった。ウエスタンブロット分析の結果、CM935 に蓄積する 57kD ポリペプチドはグルテリン前駆体であることが明らかになった。これらの結果は、CM935 はグルテリン前駆体の輸送蓄積のみが阻害される変異体であることを示している。

WT×CM935 の交配 F2 種子の分析結果、WT 型と 57H 型の分離が 3:1 の期待比に適合することから、CM935 の 57H は単劣性遺伝子支配であることが示された。対立性検定の結果、CM935 の 57H 変異遺伝子は既報の 7 遺伝子とはいずれも独立であった。この結果に基づき、CM935 を支配する 57H 変異遺伝子を *glup7(t)*と命名した。(Table1)

esp2, glup4 及び *glup6* との F2 では、全ての組み合わせで WT: aB :Ab+ab が 9:3:4 の期待比に適合する分離を示し、*glup7(t)*はグルテリン前駆体とプロラミンの ER 内分別に関与すると考えられる 3 遺伝子に対し下位であるとが示された。一方、*Glup1*、*glup2*、*glup3*、*Glup5* との F2 では、両劣性型が確認できたことから、*glup7(t)*は、これら 4 遺伝子とは相加的に作用することが明らかになった(Table1)。

SDG 遠心分離法の結果、CM935 に蓄積する前駆体はプロテインボディ I(PB I)及び PBII とは異なり、全画分にほぼ均一に分布した(Fig.1)。この結果は、CM935 のグルテリン前駆体は PBI 及び PBII ではなく、新たに小胞を作って蓄積する、もしくは既報の *Glup1* 及び *glup2* と同様に ER 内で前駆体が小顆粒を作って集積している可能性を示している。

以上の結果より、CM935 を支配する *glup7(t)*はグルテリンの輸送蓄積経路において、ER からの輸出以降 PBII への輸送までの段階に関与すると予想される。

Table1. Segregation mode of 57H character in F2 seeds derived from between CM935 and seven marker lines for 57H gene.

Cross comb.	Segregation in F2 seeds WT	57H	Total	χ^2 (3:1)
CM935×Kinmaze(WT)	75	21	96	0.5

(aa)×(bb)	Segregation in F2 seeds AB	aB	Ab	ab	Total	χ^2 (9:3:4)	(9:6:1)	(9:3:3:1)
CM935×*esp2*	50	15	18		83	0.26		
CM935×*glup2*	50	37	6		93		0.24	
CM935×*glup3*	53	18	18	6	95			0.01
CM935×*glup4*	54	19	23		96	0.10		
CM935×*glup6*	58	16	22		96	0.69		

(aa)×(BB)	Segregation in F2 seeds Ab	AB	ab	aB	Total	χ^2 (3:10:3)	(3:12:1)
CM935×*Glup1*	18	69	5		92	11.03	0.13
CM935×*Glup5*	20	70	6		96	9.89	0.28

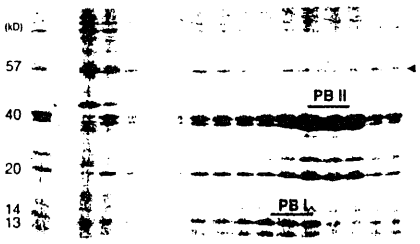


Fig.1 Resolution of PBs and membranes from CM935 by SDG centrifugation.
◄ :57kD glutelin precursor

607　○杉野　彩[1]・竹本陽子[1]・佐藤美緒[1]・熊丸敏博[1]・小川雅広[2]・佐藤　光[1](1.九大農、2. 山口県立大生活環境科学) 新たに作出したイネ57H変異体EM660の遺伝分析

A. Sugino[1], Y.Takemoto[1], M.Sato[1], T.Kumamaru[1], M.Ogawa[2] and H.Satoh[1] (1. Fac.Agr.Kyushu U., 2. Fac.Human Life Sci., Yamaguchi P.U.) Genetic analysis of a novel 57H mutant, EM660, in rice.

【目的】イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンは小胞体上で57kD前駆体として合成され、液胞由来のプロテインボディII (PBII)に輸送された後、成熟型グルテリンに開裂し蓄積する。一方プロラミンは小胞体由来のPBⅠに蓄積する。グルテリンの輸送･蓄積経路の遺伝的制御機構の解明のため、グルテリン前駆体を蓄積する57H変異体を作製し、現在までに8遺伝子座を同定した。今回、新たな57H遺伝子座の変異体EM660を同定したので報告する。

【材料及び方法】材料には「台中65号」のMNU処理によって誘発した57H変異体EM660を用いた。グルテリン前駆体変異体の確認は抗グルテリン抗体を用いたウエスタンブロット分析によって行った。遺伝分析には、野生型及び既報の8種の57H標識系統との交配F2種子を用いた。胚乳組織における57kDグルテリン前駆体の蓄積部位はショ糖密度勾配（SDG）遠心分離法によるPBの分画により推定した。

【結果】EM660は57kDポリペプチドの増加に伴って成熟型グルテリンがやや減少し、プロラミンは野生型とほぼ同一であった。ウエスタンブロット分析の結果、EM660に蓄積した57kDポリペプチドはグルテリン前駆体であることが確認できた。これらの結果、EM660はグルテリン前駆体の輸送・蓄積のみが阻害された変異体であると考えられる。

野生型×EM660の交配F2種子では、野生型、ヘテロ型、57H型が1:2:1の期待比に適合する分離を示したことから、EM660の57H変異は単一の不完全優性遺伝子支配であることが明らかになった。対立性検定の結果、EM660の57H変異遺伝子は既報のいずれの遺伝子座とも独立であったことから、本変異遺伝子を*Glup8 (t)*と命名した(Table1)。*esp2*, *glup4*及び*glup6*とEM660のF2では、AB、Ab、aB+abが9:3:4の期待比に適合する分離を示した。これは*Glup8(t)*はグルテリン前駆体とプロラミンの小胞体内選別に関与すると考えられる3遺伝子に対して下位であることを示している。*glup7(t)*とEM660では、AB+aB、Ab、abが12:1:3の期待比に適合する分離を示し、*Glup8(t)*は*glup7(t)*に対して上位であることが示された。*Glup1*, *glup2*, *glup3*及び*Glup5*とEM660のF2では、それぞれ両劣性型が確認されたことから*Glup8(t)*はこれら4遺伝子と相加的に作用することが明らかになった。しかし、*Glup1*, *Glup5*及び*glup2*とのF2ではそれぞれ独立分離の期待比から大きく外れる分離を示した。これら3遺伝子は染色体9で連鎖していることから、*Glup8(t)*も同じ染色体で連鎖している可能性が考えられる。

SDG遠心分離法の結果では、EM660のグルテリン前駆体は主に細胞小器官膜の画分に分画された。これは、EM660のグルテリン前駆体はPBⅠとは異なる小胞体由来のPBに蓄積している可能性が考えられる。

以上の結果より、EM660を支配する*Glup8(t)*はグルテリンの輸送･蓄積経路において、小胞体での選別からPBⅡに輸送されるまでの過程に関与するものと考えられる。

Table1. Segregation mode of 57H character in F2 seeds of crosses between EM660 and eight marker lines for 57H gene.

cross comb.	Segregation in F2 seeds				Total	$\chi^2_{(1:2:1)}$
	WT	Hetero	57H			
EM660×TC65	20	47	26		91	0.78
(AA×bb)	Segregation in F2 seeds				Total	$\chi^2_{(12:1:3)}$
	AB	aB	Ab	ab		
EM660×*esp2*	55	17	20		91	0.62
(aa×BB)	Segregation in F2 seeds				Total	$\chi^2_{(9:3:4)}$
	AB	Ab	aB	ab		
glup4×EM660	56	16	22		94	0.43
glup6×EM660	52	19	21		92	0.31
	Segregation in F2 seeds				Total	$\chi^2_{(12:1:3)}$
	AB	aB	Ab	ab		
glup7(t)×EM660	66		10	20	96	3.39
	Segregation in F2 seeds				Total	$\chi^2_{(9:3:3:1)}$
	AB	Ab	ab	aB		
glup3×EM660	53	21	13	7	94	2.06
(AA×BB)	Segregation in F2 seeds				Total	
	AB	Ab	aB	ab		
Glup1×EM660	1	177	10		188	
Glup5×EM660	3	183	10		196	
(aa×BB)	Segregation in F2 seeds				Total	
	AB	ab	Ab	aB		
glup2×EM660	81		1	2	84	

709　○Jahan, M.S., T. Kumamaru, H. Satoh (Fac. Agr., Kyushu U.) Diversity of prolamin polypeptides in Bangladesh rice germplasm

Bangladesh rice genetic resources collected from different parts of the country were analyzed for seed storage prolamins to obtain the breeding materials for grain quality improvement.

Seed prolamins from 576 Bangladesh rice cultivars representing 7 ecotypes were analyzed by SDS-PAGE on a single seed basis. IEF analysis of the extracted prolamins from endosperm of 40 cultivars was also done.

The result showed that prolamins were separable into 16, 15, 13 and 10 kD polypeptide groups. Prolamins from Bangladesh rice cultivars varied widely on the presence or absence and the staining intensity of 15 and 13 kD bands. Besides, two bands different in apparent molecular mass were observed among the cultivars tested. The band between 16 and 15 kD was termed 15.5 kD, while the intermediate band between 15 and 13 kD was termed 14 kD band. Prolamins from the cultivars tested were classified as 13-15, 14 and 15.5 kD groups (Fig. 1). The 13-15 kD group had the same intensity of 13 and 15, high intensity 13 and low intensity 13 kD bands (Types a, b and c). The 14 kD band was found in types d and e. The 15.5 kD group showed a low intensity 15 (Type f) and the presence of 14 (Type g) in the absence of 15 kD band. The number of varieties in types a to g were 256, 39, 156, 71, 37, 11 and 6, respectively. The ecotypic distribution of prolamin variation indicated that type a was most frequent in almost all of the ecotypes. Nearly all of the cultivars showing types f and g were confined to T. aman and B. aman ecotypes.

A wide variation was also observed in prolamins by IEF analysis. The staining intensity, pI or the number of bands varied among the tested cultivars. More than 26 IEF bands were identified among the cultivars, which ranged from pI 5.0 to 8.0. The number of bands varied from 6 to 12 (Fig. 2). Each of the SDS-PAGE type showed a wide variation on the pI and number of bands in IEF, suggesting that SDS-PAGE and IEF variations were not strongly correlated. Therefore, both of the SDS-PAGE and IEF analyses are vital for revealing prolamin variations in rice.

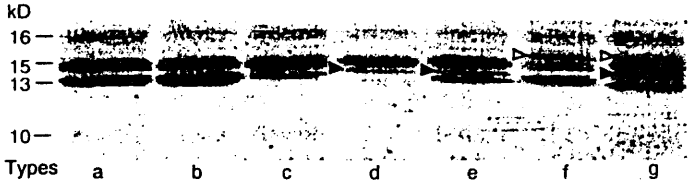


Fig. 1. SDS-PAGE variation of prolamin polypeptides in Bangladesh rice cultivars. ▶: 14 kD, ▷: 15.5 kD

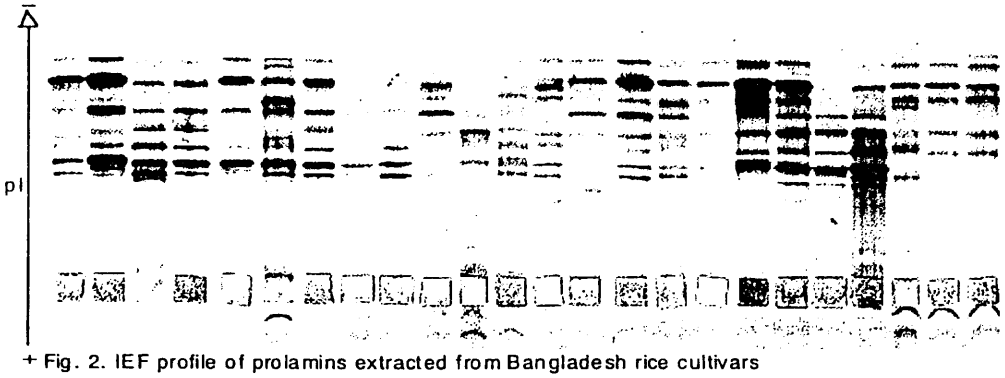


Fig. 2. IEF profile of prolamins extracted from Bangladesh rice cultivars

710　○Pa Pa Aung, T. Kumamaru, H. Satoh (Fac. Agr. Kyushu U.) Genetic variation of Granule Bound Starch Synthase (GBSS) level in Myanmar local rice cultivars.

Rice is the most important crop in Myanmar, both in term of the local consumption and the export. To evaluate genetic variation of local rice germplasm and to promote the utilization for the rice grain quality, 350 local rice cultivars, which were collected from 7 distinct regions of Myanmar and stocked at Seed Bank of Myanmar, were analyzed based on the variation in GBSS level and apparent amylose content. Their geographical distribution patterns were also investigated.

GBSS is responsible for the amylose synthesis in cereal endosperm. Myanmar local rice cultivars were classified into the 4 expression types for GBSS level by SDS-PAGE and western blotting analyses, i.e. high, intermediate, low and absent based on staining intensity of 60kD bands (Fig.1A, B). The regional distribution pattern of GBSS level variation shows that cultivars with intermediate GBSS level were observed restrictively in three mountain regions, i.e. western mountain region (WMR), northern mountain region (NMR) and eastern mountain region (EMR) (Table1). Cultivars showing the high level of GBSS were distributed over all area and 60% of Myanmar local rice cultivars belonged to this type.

The apparent amylose content of Myanmar local rice cultivars varied from 0 to 30% (Fig.2). 350 accession analyzed were classified into 4 apparent amylose content groups; i.e. very low (12%<), low (12-18%), intermediate (18-24%) and high (24%>). The continuous variation in apparent amylose content was recorded for Myanmar local rice cultivars. The relationship between the apparent amylose content and GBSS level is under investigation.

This result suggests that the mountain region in Myanmar is an important area maintaining rice genetic resources for amylose properties.

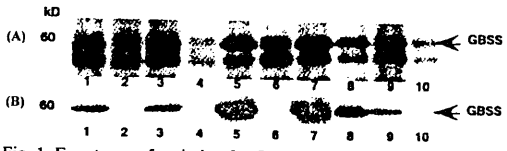


Fig. 1. Four types of variation for GBSS level in Myanmar local rice cultivars.

1: Kinmaze; 2: EM21; 3: T65; 4: EM583; 5: IR36; 6: EM2009; 7: High level; 8: Intermediate level; 9: Low level; 10: Absent; (2, 4 and 6 are waxy mutant induced from Kinmaze, T65, and IR36, respectively. 7 to 10 are Myanmar local rice cultivars. (A) SDS-PAGE; (B) Western Blotting.

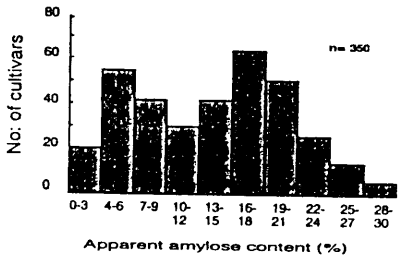


Fig. 2. Frequency distribution of apparent amylose content (%) in Myanmar local rice cultivars.

Table 1. Regional distribution patterns of GBSS level in Myanmar local rice cultivars.

GBSS level	Regions								
	WMR	NMR	EMR	DA	CDZ	WCSR	SCSR	Total	Freq: (%)
High	35	37	34	69	15	8	9	207	60%
Intermediate	4	15	28	0	0	0	0	47	13%
Low	2	9	18	7	11	0	2	49	14%
Absent	10	11	22	3	1	0	0	47	13%
Total	51	72	102	79	27	8	11	350	

*WMR= Western Mountain Region; NMR= Northern Mountain Region; EMR= Eastern Mountain Region; DA= Delta Area; CDZ= Central Dry Zone; WCSR= Western Coastal Strip Region; SCSR= Southern Coastal Strip Region.

I-14

Isolation and Genetic Characterization of the amylopectin of Starch Mutants in Rice

Hikaru SATOH

Plant Genetic Resources, Faculty of Agriculture. Kyushu University

Mutants modifying starch properties encourage not only to improve the starch quality but also to elucidate the genetic regulation mechanism of starch biosynthesis. We had treated the fertilized egg cells of japonica rice cultivars by N-Methyl-N-Nitrosourea and obtained various kinds of mutants that altered the structure and rheological properties of endosperm starch or modified the starch content.

Many mutants lowering amylose content were obtained in rice in addition to waxy mutants, of which amylose content varied from 0 % to 12 %. Although some of low amylose mutants were caused by the mutation of waxy gene encoding GBSS, most of low amylose mutants were independent from waxy locus. Five different gene loci for low amylose mutation were so far identified in rice. Genetic and molecular analyses suggested that some of them affect the splicing of japonica GBSS (Wx-b) transcripts. At least four kinds of enzymes are involved in the biosynthesis of amylopectin in the amyloplast, i.e., ADPglucose pyrophosphorylase (AGPase), soluble starch synthase (SSS), branching enzyme (BE) and debranching enzyme (DBE). Three forms of BE, BEI, BEIIa and BEIIb have been identified in endosperm of rice. Mutants participating in each of BEs were isolated by this treatment. Some of amylose-extender mutants such as EM 10 and EM 529 were lacking in BE IIb. In a mutant, EM 557, BE I enzyme was defected or extremely decreased and its amylopectin was characterized by the decrease amount of a part of short chain fractions in addition to long chains. Recently a mutant decreasing extremely BE IIa activity in developing endosperm, EM19, was isolated. Genetic analysis suggested strongly that they are mutants of genes encoding the respective enzymes. Two types of sugary mutations were identified in rice. Sugary 1 mutation decreased the activity levels of DBEs, isoamylase and pullulanase (PUL) and produced the highly branched starch with the extremely increased amount of short chains. Sugary 2 mutation was also characterized by the amylopectin with increased amount of short chains and decreased amount of long chains. Three mutant loci were identified on the floury mutations and all of mutations altered amylopectin structure. Although the flo 2 mutants exhibited extremely reduced level of BEI, they also decrease the levels of other starch-synthesizing enzymes, suggesting that the wild type Flo 2 gene co-regulates expression of the genes participating in starch synthesis in trans in a seed-specific manner. In addition to these mutants, mutants modifying the activity level of AGPase were also isolated in rice as well as in other plant species. Shr 2 mutation of rice reduced greatly the protein level of AGPase small subunit.

日本遺伝学会第74回大会
公開市民講演会

くらしのなかの遺伝学

「遺伝子組換え農作物の現状」

熊丸　敏博

遺伝子組換え技術は、交雑不可能な遠縁種や異なる種の有用遺伝子、さらには他の生物種が持つ有用遺伝子の利用を可能にする技術である。

遺伝子組換え農産物の世界的な作付け面積は1996年では170万ヘクタールであったが、2001年には5,260万ヘクタールとなった。作物別でみると、ダイズが3,330万ヘクタール（ダイズの全栽培面積の46％）、トウモロコシが980万ヘクタール等となっている。1996年以降厚生省が遺伝子組換え食品として安全性を確認したものについて輸入が可能になった。2001年4月現在、安全性が確認されたダイズ、トウモロコシ、ナタネ、ジャガイモ、テンサイ等の6作物について、醤油や油などさまざまな加工食品の原材料になって、私たちの口に入っている。

現在市場化されている遺伝子組換え作物には、除草剤耐性や病虫害耐性をつけたダイズやトウモロコシ等、日持ち性のよいトマト等、健康によいオレイン酸を含むダイズ等が挙げられる。何れも交配や突然変異を用いた育種では困難性が高かった形質である。

遺伝子組換え農作物の安全性は、栽培段階での安全性と食品としての安全性の2点について評価される。前者は非組換え作物と導入遺伝子以外での同等性を主眼に評価される。後者は、新たに付与した遺伝子由来のタンパク質のアレルギー性や毒性等について評価が実施される。

本講演において、遺伝子組換え植物の目的、作成方法、対象植物、対象となる農業形質、安全性評価試験、問題点、世界の動き、日本の現状等に焦点を当てる。

【講演者プロフィール】

熊丸　敏博（くまるとしひろ）
九州大学大学院農学研究院助教授
1989年　九州大学大学院農学研究科修了（農学博士）
1989年　日本たばこ産業株式会社遺伝育種研究所研究員
1993年　同　主任研究員
1996年　九州大学農学部助教授
2000年　九州大学大学院農学研究院助教授

平成14年9月29日（日）
13:00～17:00
あいれふホール（10F）

日本放線菌学会大会（つくば市）　5月、2002年

O3　*Streptomyces azureus* の接合性プラスミド pSA1.1 の *spi* 遺伝子発現制御に関する時間的・空間的解析

○土居　克実、大山　由紀子、木久山　礼憲、横山　英之、緒方　靖哉
（九州大学大学院　農学研究院　遺伝子資源工学部門　微生物遺伝子工学分野）

【目的】*Streptomyces azureus* の接合性プラスミド pSA1.1 に座乗する *spi* 遺伝子は、他の放線菌接合性プラスミドと同様に菌糸間伝達と宿主の生育阻害に機能しており、その推定産物 Spi は Tra タンパク質の放線菌プラスミドや *B. subtilis* の SpoIIIE などと同様に膜貫通を伴った DNA 転移に機能することが示唆されている。また、*spi* の上流には本遺伝子の転写を制御すると推定される *imp* オペロンが存在する。本研究では *spi* の発現時期と局在性、および、*imp* オペロンによる発現制御を *in vivo* で明確にすることを目的とした。

【方法および結果】*spi* の遺伝子量を調節し、レポーター遺伝子による発現を確認するためにベクターとして pIJ702 および pRES18 に *spi-his-tag* または *spi-egfp* カセットを導入した 4 種の組換えプラスミドを構築し、それぞれ *S. lividans* TK24 株に形質転換した。さらに同様の組換えプラスミドを、あらかじめ pSA1.1 を導入した TK24 株に形質転換した。それぞれの形質転換株を液体培養したところ、TK24(pIJ702-*spi-his-tag*) と TK24(pIJ702-*spi-his-tag*, pSA1.1) の生育が TK24(pRES18-*spi-his-tag*) および TK24(pRES18-*spi-his-tag*, pSA1.1) に比べて遅延していた。これは pIJ702 中にクローニングした *spi* の遺伝子量が pRES18 中にクローニングした *spi* の遺伝子量に比して多いため、阻害の程度が高いと推測した。また、pSA1.1 の共存により阻害の程度が軽減したことから pSA1.1 上の *imp* オペロンが *spi* の発現を抑制していることが推察された。同様の傾向は固体培養においても観察され、TK24(pIJ702-*spi-his-tag*) では基底菌糸・気菌糸の形成が強く阻害され、また、TK24(pRES18-*spi-his-tag*) では気菌糸形成阻害が認められたが、pSA1.1 の導入により両株共に菌糸形成能を回復した。

また、EGFP をレポーターとした共焦点レーザー顕微鏡観察を行ったところ、TK24(pRES18-*spi-egfp*, pSA1.1) では、胞子セプタ形成時において菌糸全体での明瞭な蛍光が観察された。蛍光は胞子形成に至るまで持続し、前胞子においては局所的に非常に強い蛍光が観察された。これらの蛍光強度を蛍光光度計により定量したところ、基底菌糸伸長時・気菌糸形成時には微弱な蛍光が検出されたが、セプタ形成時に蛍光強度が約5倍に上昇した。引き続き、前胞子形成開始時に蛍光強度は最大となり、胞子の dechaining に伴って減衰した。なお、液体培養菌体でも微弱な蛍光が検出された。以上のことから *spi* は基底菌糸伸長時・気菌糸形成時より発現が開始され、宿主の生育を阻害しセプタ形成時に次いで前胞子形成時に著しく発現量を増して胞子形成を阻害していると推定された。さらに、*spi* は菌糸内で均一に発現されるが、前胞子形成時には局所的に大量発現されて胞子形成を阻害することが示唆された。

日本農芸化学会大会西日本支部大会（熊本市）　9月、2002年

1am5　*Thermus* sp. TMY株の増殖に及ぼすシリカとアルミニウムの作用（その2）

○権藤 友昭、川津 領一、稲垣 史生*、土居 克実、井澤 英二**、緒方 靖哉
（九大院農・遺資工、*海洋科技セ・地殻内微生物、**九大院工・地球工）

[目的]　シリカスケールから分離された *Thermus* sp. TMY株は8 ppm以上のAlによって生育阻害を受けるが、Al添加培地で前培養した菌体はAl-toleranceを示した。またAlによる生育阻害は培地中へのシリカの添加によって軽減された。本研究では異なる濃度のAlを添加した培地で前培養したTMY株が示すAl-toleranceの差違と過飽和シリカによって誘導されるタンパク質Sipの産生におよぼすAlの影響について検討した。
[方法および結果]　Alをそれぞれ8, 20, 65 ppm含んだTM液体培地で対数増殖期後期まで培養したTMY株を各濃度のAlを含むTM培地に移植し、菌体の増殖を検討した。その結果、前培養液中のAl濃度に比例して誘導期が短くなり、定常期のOD値が増加した。また、Al添加培地での培養によって試験管内に付着物が観察され、培地中のAl濃度の増加に伴い付着量も増加した。さらに、Al添加培地で前培養すると、無添加培地で前培養した場合よりも付着量が減少した。一方、シリカ誘導性タンパク質SipはAlによって発現が抑制された。

日本農芸化学会大会西日本支部大会（熊本市）　9月、2002年

2pm2　高度好熱菌 *Thermus* sp. TMY株の自然形質転換と制限修飾系に関する研究

○藤井秀俊、稲垣史生*、土居克実、緒方靖哉（九大院・生資環、*海洋科学技術センター・深海環境フロンティア）

[目的]これまでに、シリカ鉱物から分離した高度好熱菌 *Thermus* sp. TMY株が、溶存シリカの鉱物化に関与することを明らかにした。本株が産生するシリカ誘導性タンパク質Sipの大量調製のため、TMY株を宿主としたタンパク質大量発現系の確立を検討しており、TMY株の自然形質転換能を検討したので報告する。
[方法および結果]自然形質転換能を利用し、発現ベクターpPP442-mをTMY株、*T. thermmophilus* HB8^{T}株、*T. thermmophilus* HB27株に形質転換したところ、形質転換効率はそれぞれ 3.1×10^{-8}、3.1×10^{-5}、2.7×10^{-4} であった。また、エレクトロポレーションによる形質転換効率は自然形質転換と同程度であった。次に、TMY株の形質転換体からベクターDNAを抽出し、TMY株に再導入したところ、転換効率は 1.2×10^{-5} に上昇し、また、導入されたベクターDNAは30継代まで安定的に保持された。これらの結果からTMY株における形質転換効率の低さは、本株の制限-修飾系によることが示唆された。

日本農芸化学会大会西日本支部大会（熊本市）　9月、2002年

2pm4 *Bacillus licheniformis* No.161 の *nar* オペロンの解析と硝酸還元能の応用
○川原優佳、丸山繁美、大桃定洋*、土居克実、緒方靖哉（九大院・農・遺資工、*農林水産省）

[目的] 集約農業における窒素肥料の使用量増加は、植物中への硝酸態窒素の蓄積などの様々な環境問題を引き起こしている。本研究では、強力な硝酸還元能を有する *Bacillus licheniformis* No.161 株の硝酸還元酵素群の遺伝子解析を行い、さらにこれら遺伝子機能の硝酸態窒素低減化への応用開発を目的としている。
[方法および結果] No.161 株の硝酸還元酵素遺伝子は *B. subtilis* の *nar* オペロンと近似したオペロン構造をとっており、*narGHJI* はポリシストロニックに転写されると考えられた。プロモーター領域を含む *narG* の上流域が *B. subtilis* では約200bpであるのに対して、No.161株は約 2.5kb であった。No.161 株の本領域には、補酵素 PQQ 合成タンパク質やモリブデン・コファクター合成タンパク質と相同性が高い 1185bp の ORF が検出された。本 ORF は強い硝酸還元能に関与すると推定された。

日本農芸化学会大会西日本支部大会（熊本市）　9月、2002年

2am15 放線菌の自然誘発性 pock 形成に及ぼす UV 照射の促進および阻害作用
○山田修司、土居克実、緒方靖哉（九大院・農・遺資工）

[目的] *Streptomyces azureus* ATCC14921 の固体培地上の菌叢で形成される自然誘発性 pock (S pock) は、接合伝達性プラスミド pSA1 および溶原性ファージ SAt2 がその形成因子としている関与している（農化誌, **76**, 102 (2002)）。S pock は中心部に多数の SAt2 粒子の存する径約 0.4mm の溶菌ゾーンとその周囲に約 1mm の胞子形成抑制ゾーンからなる。本研究では、S pock 形成並び形態に及ぼす UV 照射線量の影響を検討した。
[方法・結果] 非 UV 照射胞子から生育した菌叢中の S pock の直径が約 1.3mm であるのに対し、7.1, 14.2, 21.3×10^2 μW・erg・cm^{-1} 線量で UV 照射した菌叢では、それぞれ約 0.4, 2.2, 0.5mm であった。また、pock 数はそれぞれ 85, 100, 170 相対%を示した。S pock 直径の拡大・縮小および数の増減は遊離型 pSA1 量の増減と連動しており、UV による染色体上の $pSA1^{int}$ の遊離化と UV による遊離型 pSA1 の増幅抑制が推測された。pSA1 と SAt2 は自然誘発性であるが、それぞれ 14.2, 21.3×10^2 μW・erg・cm^{-1} の UV 照射で最大誘発活性を示した。

426　放線菌の自然誘発性pock形成に及ぼすUV照射の促進および阻害作用

○緒方靖哉，土居克実，山田修司（九大院・農・遺資工）

【目的】 *Streptomyces azureus* ATCC14921株の固体培地上の菌叢で形成される自然誘発性pock (S pock) は、接合伝達性プラスミドpSA1および溶原性ファージSAt2が関与している（農化誌，76, 102 (2002)）。S pockは中心部に径約0.4mmの多数のSAt2粒子の存する溶菌ゾーンとその周囲に約1mmの胞子形成抑制ゾーンからなる。本研究では、S pock形成並び形態に及ぼすUV照射線量の影響を検討した。

【方法と結果】 非UV照射胞子から生育した菌叢中のS pockの直径が約1.3mmであるのに対し、3.5, 7.1, 10.6, 14.2, 17.7, 21.3×10^2μW・erg・cm^{-1}線量でUV照射した菌叢では、それぞれ約1.3, 0.4, 0.4, 2.2, 2.2, 0.5mmであった。また、pock数はそれぞれ85, 80, 80, 100, 94, 170相対%を示した。特に、3.5, 7.1, 10.6×10^2μW・erg・cm^{-1}線量でUV照射した菌叢では胞子形成抑制ゾーンが小さくなり、7.1×10^2μW・erg・cm^{-1}では溶菌ゾーンのみからなるpockになった。照射線量を上げると胞子形成抑制ゾーンは再び形成され、その大きさは14.2, 17.7×10^2μW・erg・cm^{-1}では非UV照射対照よりも拡大していた。しかし、21.3×10^2μW・erg・cm^{-1}線量では胞子形成抑制ゾーンは再び消失し、溶菌ゾーンのみからなるpockになった。どの溶菌ゾーン中にも多数のSAt2粒子が存在していた。次に、pSA1に及ぼすUV強度の影響をサザンブロッティングにより検定した。その結果、S pock直径の拡大・縮小および数の増減は遊離型pSA1の濃度の増減と連動しており、UV照射による染色体上の$pSA1^{int}$からの遊離化とUVによる遊離型pSA1の増幅抑制が推測された。pSA1とSAt2は自然誘発性であるが、それぞれ14.2, 21.3×10^2μW・erg・cm^{-1}のUV照射で最大誘発活性を示した。

Stimulatory and inhibitory responses of formation of spontaneously developing pocks to UV-doses in *Streptomyces azureus*

○ Seiya Ogata, Katsumi Doi, Shuji Yamada (Lab. Microb. Genet. Technol., Fac. Agri., Kyushu Univ.)

Key words Streptomyces, spontaneously developing pocks, conjugative plasmid, UV-damage, UV-induction

404　分子系統解析から見た西南暖地型サイレージ乳酸菌株の多様性

○西崎陽祐[1]，土居克実[1]，大桃定洋[2]，緒方靖哉[1]（[1]九大院・農・遺資工，[2]農水省）

【目的】九州・沖縄地方の西南暖地型サイレージより分離した乳酸菌11菌株について、種々の菌学的特徴を基に分類を行ってきたが、確実な同定には至らなかった。今回、これら分離菌株について、分子生物学的な手法を用いた正確な同定を試みた。
【方法及び結果】16S rDNA V2-V3 region の配列解析により、分離菌は全て、*Lactobacillus* 属に分類されたが、明瞭な種の同定には至らなかった。次に、16S rDNA と同様に全ての乳酸菌属が有し、種間で変化が認められる遺伝情報である 16S-23S intergenic spacer region の解析を行ったところ、5菌株が *L. plantarum* もしくは *L. pentosus* と、1菌株が *L. casei* と高い相同性を示した。しかし、これら以外の5菌株は、既知の種と有意な相同性が認められなかったため、RAPD-PCR による解析を行った。その結果、基準株と近似した泳動パターンが認められ、RAPD-PCR を用いた当該菌株の同定は可能であると示唆された。また、分離菌株は、基準株と若干異なった泳動パターンを示した。これは、分離菌株が高温適応性や耐酸性など、基準株と異なる特性を有しているために、ゲノムレベルで多少の変異が生じていると推察した。現在、既知種と有意な相同性が認められなかった分離菌株について、DNA-DNA 相同性試験などによる種の同定を行っている。

Molecular taxonomy of *Lactobacillus* spp. isolated from silages in south-west Japan

○ Yousuke Nishizaki[1], Katsumi Doi[1], Sadahiro Oomomo[2], Seiya Ogata[1]([1]Lab. Microb. Genet. Technol., Fac. Agri., Kyushu Univ., [2]MAFF)

Key words *Lactobacillus* spp., silage, molecular taxonomy, 16S-23S intergenic spacer region, RAPD-PCR

日本農芸化学会大会（藤沢市）　3月、2003年

3A09a02　*Streptomyces azureus*の溶原性ファージSAt2ゲノムの構造解析
○平山 直樹、山田 修司、土居 克実、緒方 靖哉（九大院生資環・遺資工）

［目的］*S. azureus*野生型株PKOの固体培地上で形成される自然誘発性pock（S pock）中にはファージSAt2粒子が検出され、S pock形成への関与が推察された。本研究では、SAt2ファージの特性を検討し、DNAの構造解析を行うことを目的とPした。
［方法・結果］*S. azureus* PKO株のpockの発生している固体培養菌叢からSAt2ファージを抽出した。本ファージはPKO株のゲノムに組込まれている溶原性ファージであるが、PKO株に対して感染能を有していたことから、免疫非感受性であると推定した。次に、SAt2の宿主域を検討したところ、*S. azureus*の他に*S. ambofasciens*に対して感染能を示した。ファージ粒子より精製したSAt2 DNAは、3'突出末端を形成する*cos*配列を有していた。SAt2 DNAは*Ban*Ⅲで4箇所、*Hin*dⅢで2箇所、*Nhe*Ⅰで2箇所、*Mun*Ⅰで1箇所切断され、全長は約55kbであった。さらに、ファージDNA中に*int*遺伝子などを検出した。

日本農芸化学会大会（藤沢市）　3月、2003年

3A09a03　*Streptomyces azureus*のABCトランスポーター遺伝子の解析
○酒井 博司、木久山 礼憲、土居 克実、緒方 靖哉（九大院農院・遺資工）

【目的】*S. azureus* ATCC 14921は自然誘発性ポック（S pock）を形成する。抗生物質バシトラシン（BC）は、S pock形成を抑制すると共に菌糸の生育促進をもたらす。生育促進が起こった菌体では、2種の膜タンパク質（38kDa、32kDa）の発現が確認された。本研究ではBC誘導性膜タンパク質の特性を明らかにすることを目的としている。
【方法と結果】38kDaのタンパク質のN末端アミノ酸配列は、*S. coelicolor* A3(2)のABCトランスポーターと高い相同性を示すことが確認された。本タンパク質をコードしている遺伝子（*abcSA1*）のクローニングを行い*abcSA1*とその周辺の塩基配列を決定した。その結果、*abcSA1*は*S. coelicolor* A3(2)の*abc*などの数種のABCトランスポーターと高い相同性を示した。また、本断片を高コピーベクターpIJ702と低コピーベクターpRES18に導入し、*S. lividans* TK24に形質転換し、表現型の変化を観察した。

3A09a04　*Lactobacillus plantarum* NGRI 0101株の増殖に関与するプラスミド

○藤 良江、土居 克美、西崎 陽祐、大桃 定洋[1]、緒方 靖哉[2]（九大院・農・遺資工、[1]農水省、[2]九大院農・遺資工）

[目的]　サイレージ乳酸菌*Lactobacillus plantarum* NGRI 0101株(以下0101株)のプラスミドpLKLをキュアリングした0101N株は親株と比較して増殖が抑制された。本プラスミド上に宿主の増殖に関与する遺伝子がコードされていると推定し、pLKLの構造および機能を解析した。

[方法・結果]　pLKLの大きさは6.8kbで、*Lactobacillus*属ファージであるφgleの遺伝子群と非常に高い相同性が認められた。また、pLKLのコピー数は約20で、サザンハイブリダイゼーションにより、本プラスミドはローリングサークル型の複製様式を取らないことが確認された。しかし、Rep配列において他のθ型複製様式を持つプラスミドのRepと有意な相同性は認められなかった。一方、0101N株をMRS培地中に静置培養すると、親株には認められない菌体の凝集が生じた。本現象にもpLKLの関与を推察している。

サイレージ乳酸菌の機能開発
～簡便迅速な同定法の開発と有用遺伝子機能の付与～

土居克実、大桃定洋*、緒方靖哉
（九州大学大学院　農学研究院、*国際農林水産業研究センター）

サイレージは *Lactobacillus casei* や *Lactobacillus plantarum* 等の乳酸桿菌の機能を十分に活用した発酵粗飼料である。サイレージは開放系で調製が行われるため、材料草に付着した乳酸菌の種類と菌数が発酵の成否に大きく左右する。したがって、有用菌株の選抜や効果的な増殖法などが検討されると共に近年では安定したサイレージ発酵を行わせるために、サイレージスターターの使用頻度が高まっている。効率的なサイレージスターター開発のためには有用特性の検討と共に菌株同定、新種の命名・登録が必須である。しかしながら、これらの同定作業は時間を要すとともに広範な適用性がない点が問題である。他方、飼料草への多量の施肥によってサイレージ中の硝酸塩蓄積が原因となる家畜の中毒や湖沼などへの硝酸塩の流入による環境汚染が問題となっており、サイレージ発酵過程での硝酸態窒素の低減化が重要な課題となっているが、サイレージ乳酸菌では有効な硝酸還元能のある菌株の報告例はない。

本講演会では、分子系統解析を中心とした簡便迅速な優良菌株の同定法開発の試みとサイレージ中の硝酸態窒素を低減させるのに有効な遺伝子の同定と特性について報告する。

【1】簡便迅速なサイレージ乳酸菌同定法の開発

九州・沖縄地方において良質サイレージの調製を可能にするために、30℃以上の高温でも増殖可能で、pH4.0 以下で増殖する有用特性を持った分離株のうち、11 株について菌学的特徴に基づいた同定を試みた。その結果、分離株は *Lactobacillus casei* や *Lactobacillus plantarum* などの基準株と菌学的特徴が類似していたものの、同定には至らなかった。

そこで、16S rDNA (V2-V3 region)、および 16S-23S intergenic spacer region (ISR)の塩基配列を解析した。16S rDNA 配列から分離株全てが *Lactobacillus* 属に属することが示され、さらに、ISR 解析から 5 菌株が *L. plantarum* もしくは *L. pentosus* と高い相同性を示し、1 菌株は *L. casei* と高い相同性が認められた。これらの塩基配列解析の結果はそれぞれの菌株が示す菌学的特徴と合致した。しかし、他菌株については有意な相同性を見出すことはできなかった。そこで、さらに迅速かつ有効な菌株同定を行うため、RAPD-PCR を行った。RAPD-PCR 多型解析では、近縁種である *L. plantarum* と *L. pentosus* を明瞭に分類することが可能であり、*L. plantarum* 菌株を同

III. センターの活動状況

1. 教育活動

【家蚕遺伝子開発分野】

大学院生物資源環境科学府（博士課程）

上野 由宜　　カイコの体液キモトリプシンインインヒビターの生理機能に関する研究

大学院生物資源環境科学府（修士課程）

趙　　萍　　カイコの体液キモトリプシンインインヒビターに関する遺伝学的研究

張　平波　　カイコの胚子発生過程におけるタンパク質の動的変化に関する研究

岡田 太郎　　カイコの胚子発生過程に関与するRNA結合タンパク質に関する研究

野田 真路　　カイコK不眠蚕に関する研究

訪問教授・研究員

趙　巧玲（中国農業科学院蚕糸科学研究所）、
カイコの体液キモトリプシンインインヒビターに関する遺伝学的研究

王　永強（浙江省農業科学院蚕業研究所）
カイコ中腸におけるタンパク質の動的変化に関する研究

【植物遺伝子開発分野】

大学院生物資源環境科学府（博士課程）

田　懐東	イネ種子貯蔵タンパク質57H突然変異に関する遺伝学的研究
Jahan M Sarwar	バングラディシュイネの遺伝子資源学的研究
Pa Pa Aung	ミャンマーイネの遺伝子資源学的研究
吉田 陽子	イネのAGPase に関する変異体の生理遺伝学的研究
佐藤 美緒	イネ種子貯蔵タンパク質の小胞体における選択的分別に関与する変異体の解析

大学院生物資源環境科学府（修士課程）

牛島 智一	イネの低システインプロラミンの生合成・集積に及ぼす*Esp1*遺伝子の効果
柴原 賢介	イネ胚乳特異的Starch Phosphorylaseに関する変異体の遺伝学的研究
田中 康昌	イネの*flour3* 変異体に関する遺伝学的研究
杉野　彩	イネグルテリンの細胞内輸送に関する変異体の遺伝解析

【微生物遺伝子開発分野】

大学院生物資源環境科学府（博士課程）

村田　匡礼	生体外蛋白質合成系の高効率化
酒見　博士	*Streptomyces laurentii*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

山田　修司	*Streptomyces azureus* のpock形成に関わる不完全ファージ遺伝子の作用機構
木久山　礼憲	*Streptomyces*属放線菌のDNA転移に関わる遺伝子の解析

大学院生物資源環境科学研究科（修士課程）

川原　優佳	硝酸還元菌 *Bucillus licheniform*is No.161の硝酸還元オペロンの解析と機能開発
小島　美樹	放線菌の細胞分化に関与する*spoIIIE*様遺伝子の機能解析
権藤　友昭	高度好熱菌*Thermus* sp. TMYによるシリカ沈殿機構の解析
武智　慎平	*Streptomyces* 属放線菌のPhosphoserine phosphatase様遺伝子の機能解析
西崎　陽祐	サイレージ乳酸菌の分子系統解析と有用遺伝子の解析
藤井　秀俊	高度好熱菌における大量発現系の確立
酒井　博司	*Streptomyces azureus*のバシトラシン誘導性膜タンパク質の構造と機能
藤　　良江	*Lactobacillus*属乳酸菌の増殖を制御するプラスミド遺伝子の解析
平山　直樹	*Streptomyces azureus* の溶原性ファージSAt2ゲノムの構造解析

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インヒビターの生理機能に関する研究」

研究成果公開促進費　研究代表　藤井　博、分担　伴野　豊
「カイコ遺伝子資源データベース」

基盤研究（B）研究代表　伴野　豊、分担　藤井　博
「DNA・精子レポジトリーの構築によるカイコ遺伝子資源の活用と保存」

基盤研究（B）分担　伴野　豊
「鱗翅目昆虫における無核精子の機能解明と精子保存への機能利用―無核精子の機能を利用した凍結精子人工授精による家蚕遺伝子資源の恒久保存への応用―」

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」

文部科学省ナショナルバイオリソース事業
「カイコ遺伝子資源の収集・高品質化と効率的保存・供給体制の整備」

【植物遺伝子開発分野】

特定領域研究（B）（2）研究代表　佐藤　光、分担　熊丸敏博
「イネにおけるプロテインボディへの輸送・蓄積を制御する遺伝的メカニズム」

ナショナルバイオリソース中核的拠点整備プログラム
「イネ遺伝資源実験系統の収集・保存・提供と基礎データ蓄積」

生研機構受託研究　研究代表　佐藤　光、分担　熊丸敏博
「イネ種子胚乳貯蔵成分に関する遺伝子新素材の開発と特性評価」
農林水産省受託研究

3. 講演会・セミナー・講習会

【家蚕遺伝子開発分野】

平成14年3月29日
藤井　博
公開シンポジウム　歴史と今後の研究開発日本人の生活・文化を育んだ動植物-未来に語り継ぐべき遺伝子資源「カイコとクワ」日本学術会議遺伝資源研究連絡委員会、動育種学研究連絡委員会、玉川大学農学部、玉川大学工学部など主催

平成14年7月3日
藤井　博
ナショナルバイオリソースプログラム発足記念シンポジウム　「カイコ」
主催　文部科学省．日本薬学会 薬学会館 長井近年ホール

平成14年8月7日
藤井　博・伴野　豊・山本幸治
福岡市中学校理科研究会研修の受入
「カイコの教材としての利用価値」
　体験学習：まゆからの糸取り，織物作り
九州大学遺伝子資源開発研究センター

平成14年9月24日
伴野　豊
「Expert consultation on promotion of global exchange of sericulture　genetic resources」
主催　FAO．バンコク．タイ

平成14年12月12日
伴野　豊
「昆虫ゲノムの特異性と多様性」
―世界的なバイオリソース化を目指したカイコ遺伝子資源の整備―
日本分子生物学会ワークショップ
パシフィコ横浜、横浜

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」

福岡県産官学共同研究開発事業
「県育成酒米品種を用いた福岡オリジナル清酒の開発」

秋田県立大学　中村保典
「イネのアミロペクチン変異体の特性解析」

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」

株式会社　オリノバ
「イネの胚乳成分に関する育種」

【微生物遺伝子開発分野】

基盤研究 (B)　研究代表　緒方靖哉　研究分担　土居克実
「好熱菌のシリカ誘導蛋白質の特性とシリカ鉱物化機構」

萌芽研究　研究代表　原　敏夫
「糖鎖付加を伴う無細胞タンパク質合成系の機能化」

株式会社産学連携機構九州
「多目的コンポスト化システムの開発」

海洋科学技術センター
「北部沖縄トラフ熱水系の微生物・地球科学的研究」

【植物遺伝子開発分野】

平成14年12月6日
佐藤　光
「What is Sakamai ？ -山田錦は何故酒米か- 」　福岡酒造組合セミナー

平成14年11月26日
熊丸敏博
「遺伝子組み換え農産物」　城南高等学校

平成14年9月29日
熊丸敏博
「遺伝子組換え農作物の現状」
日本遺伝学会第74回大会　公開市民講演会「くらしのなかの遺伝学」

【微生物遺伝子開発分野】

平成14年7月12日
土居克実
「サイレージ乳酸菌の機能開発　～簡便迅速な同定法の開発と有用遺伝子機能の付与～」
2002年度日本生物工学会　乳酸菌工学研究部会講演会

平成15年1月25日
緒方靖哉
「発酵の仕事人、最後の挑戦“好熱菌のシリカ鉱物形成促進作用”の究明」
平成14年度　日本農芸化学会　西日本支部講演会

平成15年3月7日～9日
原敏夫
「納豆樹脂の開発と応用展開」
九州大学・九州芸術工科大学産学官連携イベント「夢・創造博覧祭2003」

4. 海外渡航

【家蚕遺伝子開発分野】

藤井　博

中華人民共和国
2002年9月～10月
中国　西南農業大学招聘
「学術講演並びに研究交流」

伴野　豊

タイ王国
2002年9月20日～2002年9月26日
第１９回国際養蚕委員会総会
文部科学省基盤研究費
「世界におけるカイコ・桑遺伝子資源に関する情報収集とFAOが主催するデータベース化事業への協力」

イタリア共和国・フランス共和国
2002年10月7日～10月17日，11月15日～25日
国際連合食糧農業機関本部，イタリア養蚕研究所，
フランス養蚕研究所，国際養蚕委員会本部等
文部科学省創造開発研究在外研究費
「カイコ遺伝子資源の効率的利用法と開発に関する調査研究」

フランス共和国・チェコ共和国・ドイツ連邦共和国
2002年12月20日～2003年1月31日
国際養蚕委員会本部，南ボヘミア大学，リューベック大学
文部科学省在外研究費
「ヨーロッパにおけるカイコおよび鱗翅目昆虫の染色体研究とその応用技術の動向調査」

山本　幸治

大韓民国
2002年10月17日～10月19日
Joint meetings of Korean Society of Sericultural Science and Japanese Society of Sericultural Science
「Overexpression and purification of Y-box family protein from the silkworm, *Bombyx mori*」

【植物遺伝子開発分野】

佐藤　光

アメリカ合衆国（ワシントン州立大学）
2002年9月19日～9月23日
生研機構
イネ貯蔵成分に関する遺伝子新素材の開発と特性評価に関する調査研究

中華人民共和国（南京農業大学）
2002年11月25日～11月29日
生研機構
中国のイネ遺伝資源に関する調査研究

【微生物遺伝子開発分野】

緒方 靖哉

フランス共和国、連合王国（エクスター大学他）
2002 年 7 月 25 日～8 月 7 日
文部科学省創造開発研究在外研究費
「微生物遺伝子資源の効率的利用法と開発に関する調査研究」

原　敏夫

中華民国
2002年5月22日～5月24日、7月16日～19日、11月26日～29日、
12月27日～12月29日、2003年1月22日～24日、3月20日～22日
多目的コンポスト化システムの開発

米国（ハワイ）
2003年3月26日～30日
多目的コンポスト 化システムの開発

外国人来訪者

李　振泰（大韓民国　慶山大學校　副教授）
「乳酸菌を用いた化粧品の開発に関する研究打ち合わせ」

学会賞受賞等

【家蚕遺伝子開発分野】

藤井　博　　社団法人　日本蚕糸学会　「蚕糸学賞」受賞

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）	１８	a （胚子，幼虫期致死）	１８
b （繭形・繭質）	１７	c （繭色）	２６
d （卵形・卵殻色）	３０	e （卵色）	２８
f （幼虫肢・斑紋）	３７	g （幼虫斑紋）	１６
i （幼虫眼紋・頭尾斑）	１３	k （幼虫体色）	２３
l （幼虫体色）	２８	m （モザイク・畸形）	１６
n （幼虫体形）	２６	o （油蚕）	３５
r （染色体異常・交叉率）	１５	t （発育・眠性）	２２
u （蛹・成虫）	２０	w （連関分析用合成系）	２７
x （分析未了の新突然変異）	１３		

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¥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×l90,1985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l90系統を1985年に交雑し*Xan*を標識形質として導入ｵた育成系統であることを示す。遺伝子情報の概要は「家蚕遺伝子資源系統の特性情報増補第２版—１９９８—Genetical stockes and mutations of Bombyx mori: importanrt genetic resources」に記載している.

（分譲）

小林　正彦　　東京大学
w30, t32, w07

桑原　鉄二　　長崎県立長崎南高等学校
交雑種

田村　俊樹　　独立法人農業生物資源研究所
e02, e03

土田　耕三　　厚生労働省感染症研究所
FL50（2回）, w12

広川　昌彦　　独立行政法人農業生物資源研究所
f10, f26

M. jade zee　　オレゴン大学（米国）
f10, f11, f06, f19, f13, f07, f03, f32, f31, f02, f20

横山　岳　　東京農工大学
b60（2回）, b602

橋本光政　　兵庫県山崎高等学校
r03, FYLU, 交雑種

古澤寿治　　京都工芸繊維大学
l03, f11, w05

河本夏夫　独立行政法人農業生物資源研究所

o55, o06, o37, 035

清水　進　学内

p20, p21, p22, p23, p24, p31, p44, p50, p61, p62, p63, p64, p65, a43, c40, c42, c44, d18, e02, e03, e15, e34, f40, g65, k01, l20, o01, o51, o66, t91, xt80

鐘　伯雄　浙江大学（中国）

c108, p50

日下部　宜宏　学内

m042, m04, n22, l02, k90

中西　秀典　藍染協会

b02, b03, b04, b10, b20, b22, b31, b40, b41, b602, c40, c50, c44, c55, c57, c58, t01, t011, t10, t11, p21, p22, p33, p41, クワコ(北海道), クワコ(対馬), クワコ(福岡), クワコ(熊本), クワコ(山東省),クワコ(江蘇省), クワコ(浙江省), クワコ(福岡×浙江F_1),クワコ(カイコ×中国クワコF_1), クワコ(カイコ×クワコ)×クワコB_1F_1,

東　政明　鳥取大学

b40, b50

神崎亮平　筑波大学

p05, p22, p62, m22, p50

G.Chavancy　国際養蚕委員会（フランス）

b40（2回）, b50（2回）

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稲品種を九州大学に移したことに始まる。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。2002年より、文部科学省ナショナルバイオリソース中核的拠点整備プログラムのサブセンターとして、栽培イネ実験系統群について特性情報の高度化と充実、再現性・安定性の高い高品質素材の供給を図るとともに、円滑な提供を実施できる体制の整備を開始した。

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、ジャポニカ・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	76 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	国内外の陸稲品種	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

これらの系統の一部をデータベースとして公開している。
(http://w3.grt.kyushu-u.ac.jp/Rice_Kyushu/rice-kyushu/htdocs/main.html)

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
2002	320	1-30		9-269	

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、*Pseudomonus*属、*Thermus*属および大腸菌　47種103株

（B）分離株　*Bacillus*属、*Lactobacillus*属、*Lactococcus*属、*Pediococcus*属、*Pseudomonus*属、*Enterococcus*属及び*Thermus*属　24種955株

（C）変異株　*Bacillus*属、*Lactobacillus*属および*Thermus*属　15種70株

II. 放線菌

（A）基準株　*Micromonospora*属、*Nocardia*属、*Rodococcus*属、*Streptomyces*属および*Streptoverticillium*属　155種171株

（B）分離株　*Streptomyces*属　5種5株

（C）変異株　*Streptomyces*属　10種311株

III. プラスミド

（A）導入プラスミドベクター　大腸菌、枯草菌（含む納豆菌）、乳酸菌、放線菌および酵母系統　135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　107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　35種類

（B）分離ファージ　乳酸菌および放線菌系統　152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　51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

VII. 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）

理化学研究所　微生物系統保存施設

Lactobacillus plantarum JCM1057

Lactobacillus rhamnosus JCM1136

Lactobacillus pentosus JCM1558

Streptomyces abikoensis JCM4002

Streptomyces bikiniensis JCM4011

Streptomyces lincolnensis JCM4287

Streptomyces nodosus JCM4297

（分譲）

星野貴行教授（筑波大学　応用生物科学系）

Lactobacillus plantarum NGRI0101他　乳酸菌25種

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
YAMAMOTO, Koji	Ph.D.	Assistant Professor

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

Plant Genetic Division

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

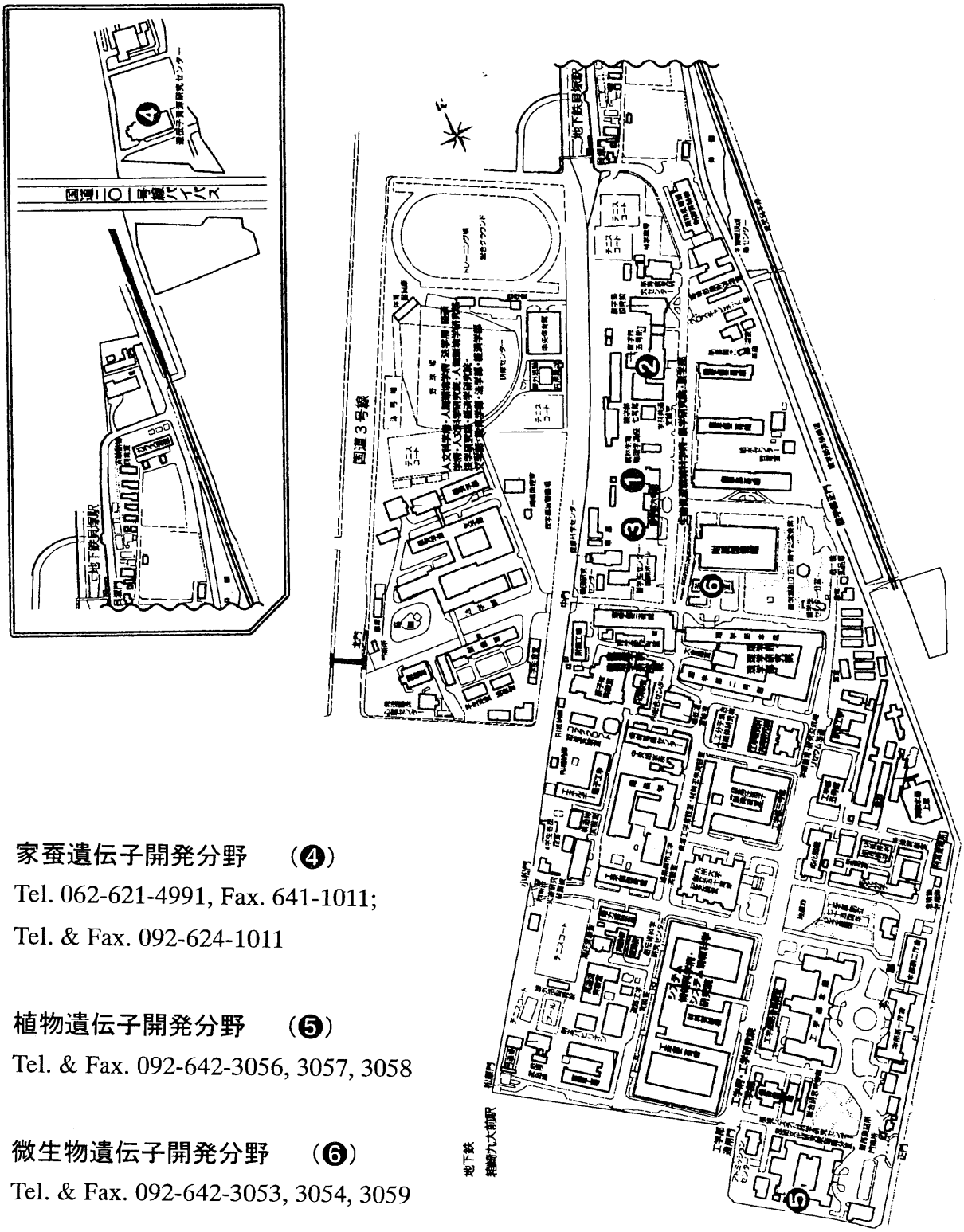
a) Collection, evaluation and preservation of rice genetic resources
b) Mutagenesis and mutation spectrum in race
c) Genetic analysis of induced mutants in rice: Starch, protein and lipid stored in grain
d) Genome analysis of the useful genes in rice
e) Isozyme variation in rice, barley and their relatives

Microbial Genetics Division

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



家蚕遺伝子開発分野　（❹）
Tel. 062-621-4991, Fax. 641-1011;
Tel. & Fax. 092-624-1011

植物遺伝子開発分野　（❺）
Tel. & Fax. 092-642-3056, 3057, 3058

微生物遺伝子開発分野　（❻）
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6号を発刊いたします。平成15年3月末日をもちまして、前遺伝子資源開発研究センター長　緒方靖哉　先生が定年退官されました。先生にはセンター長の任を4年間務められ、また、微生物遺伝子分野の初代教授として、本センターの運営、教育・研究活動について多大なご尽力を賜りました。ここに御礼を申し上げます。今後とも本センターにご助言・ご助力いただきますようお願い申し上げます。緒方センター長に替わり、平成14年度より藤井博教授がセンター長に就任されました。藤井センター長のもと、センター各員一層精励してセンターの活動に励んでいく所存です。

時あたかも平成16年度より、国立大学は国立大学法人へと移行して参ります。また、九州大学では元岡地区での新キャンパス工事も進んでおります。学術研究におきましては、ポストゲノム時代を迎えつつあり、リバースジェネティクスによるゲノム学と物質代謝学を融合させた斬新な研究分野であるメタボロニクスのテクノロジー産業市場は拡大を続け、米国、ヨーロッパ、および、日本を併せた売上高は2007年に2億2500万ドルの規模になると推定されております。このような内外の情勢を鑑み、本センターが所有する家蚕、イネ、微生物などの遺伝子資源は時代の要求するtreasureとなりうるものであると確信しております。これらの期待・責務に応えられるよう、センター各員が力を併せて奮闘努力する所存であります。

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　藤井　博
熊丸　敏博
土居　克実
山本　幸治
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 6 号
平成15年8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
TEL 092－642－3053
FAX 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
TEL 093－321－4081