

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9号

平成17年

九州大学大学院 農学研究院附属遺伝子資源開発研究センター

目 次

I. センター概要	1
1. 目的	
2. 沿革	
3. 組織	
4. 研究および事業内容	
5. 運営委員会委員	
6. 組織図	
II. 研究成果	6
1. 研究業績・出版物リスト	
2. 原著論文要旨	
3. 総説等要旨	
4. 講演要旨	
III. センターの活動状況	51
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	61
V. センター規程	68
VI. 英文摘要	70
VII. センター研究棟配置図	72

I. センターの概要

1. 目的

本センターは、遺伝子資源の収集、保存、開発から評価、利用に至る研究教育を遂行する。特に、高度な技法で遺伝情報の解析を行い、遺伝子レベルでの農業遺伝子資源に関する応用展開研究と戦略的プロジェクト研究の推進並びに遺伝子資源のDNA・細胞レポジトリ機能の充実を図る。

2. 沿革

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

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

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

平成9年4月 附属遺伝子資源研究センターは時限により廃止され、新たに、教授3名、助教授3名、助手2名の振替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 佐藤 光

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	技術補佐員	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	テクニカルスタッフ	松坂 弘明
助教授	熊丸 敏博	非常勤補佐員	原田 良子
		非常勤補佐員	馬場 知佐子
		非常勤補佐員	藤田 喜久男

微生物遺伝子開発分野

助教授	原 敏夫	研究支援推進員	早川 和秀
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

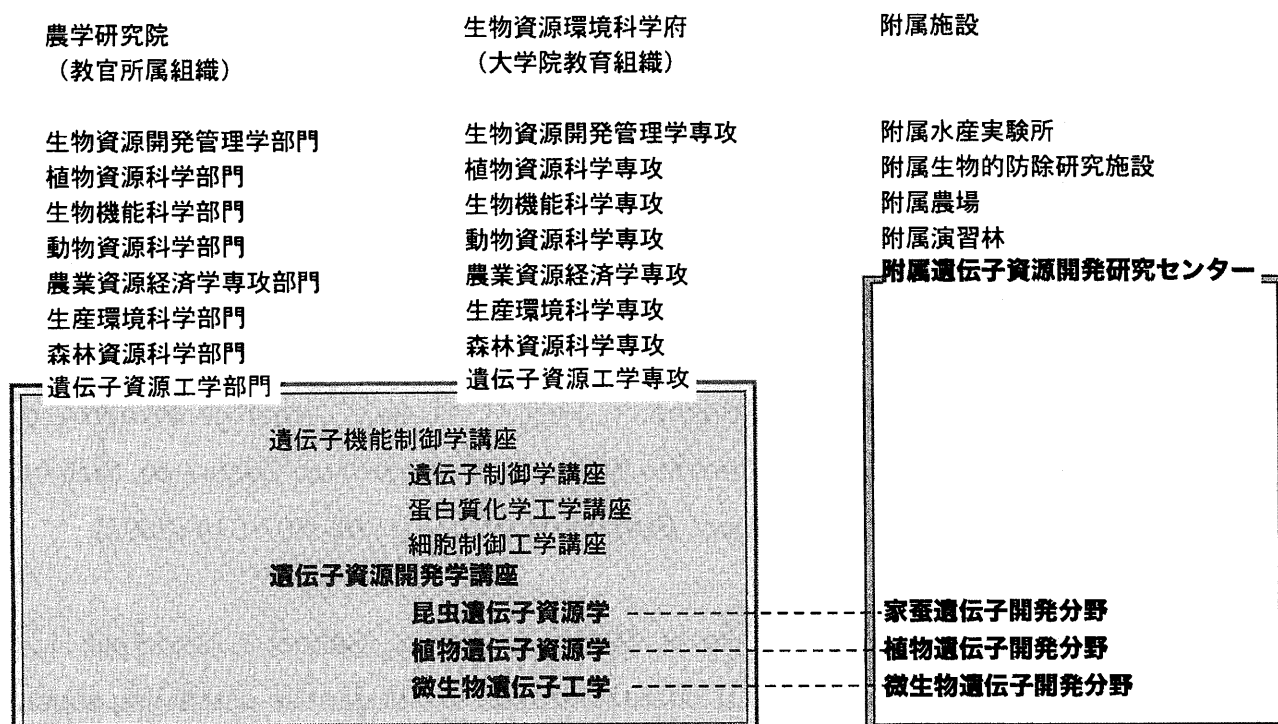
微生物遺伝子資源の探索と評価、保存と利用開発、並びに有用遺伝子の高度機能化と応用展開に関する研究

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. 遺伝子資源開発研究センター運営委員会委員（平成17年4月1日現在）

委員長	佐藤	光	
助教授	原	敏夫	（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）
教授	中司	敬	（植物資源科学部門）
教授	木村	誠	（生物機能科学部門）
助教授	山内	伸彦	（動物資源科学部門）
教授	甲斐	諭	（農業資源経済学部門）
助教授	内野	敏剛	（生産環境科学部門）
助教授	玉泉	幸一郎	（森林資源科学部門）
助教授	岡野	香	（附属農場）
助教授	大賀	祥治	（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）

6. 組織図



II. 研究成果（2005年度）

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

Yamamoto, K., Banno, Y., Fujii, H., Miake, F., Kashige, N., and Aso, Y. Catalase from the silkworm, *Bombyx mori*: Gene Sequence, Distribution, and Overexpression. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **35**, 277-28 (2005)

Yamamoto, K., Zhang, P., Banno, Y., Fujii, H., Miake, F., Kashige, N. and Aso, Y.: Superoxide Dismutase from the Silkworm, *Bombyx mori*: Sequence, Distribution, and Overexpression. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 507-514 (2005)

Yamamoto, K., Zhang, P., He, H., Wang, Y., Aso, Y., Banno, Y., and Fujii, H.: Molecular and biochemical characterization of manganese-containing superoxide dismutase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **142** (B), 403-409 (2005)

Yamamoto, K., Okada, T., He, N., Banno, Y. and Fujii, H.: Identification and overexpression of Y-box protein isoform of the silkworm, *Bombyx mori*, *Int. J. Wild Silkmoth & Silk*, **10**, 57-63 (2005)

Yamamoto, K., Zhang, P., Miake, F., Kashige, N. and Aso, Y.: Cloning, expression and characterization of theta-class glutathione S-transferase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **141**(B), 340-346 (2005)

Yasukochi, Y., Banno, Y., Yamamoto, K., Goldsmith, MR. and Fujii, H.: Integration of molecular and classical linkage groups of the silkworm, *Bombyx mori* (n = 28).

Genome, **48**, 626-629 (2005)

Zhang, P., Yamamoto, K., Aso, Y., Banno, Y., Sakano, D., Wang, Y. and Fujii, H.:
Proteomic study on isoforms of p25 component of *Bombyx mori* Fibroin, *Biosci.
Biotech. Biochem.*, **69**, 2086-2093 (2005)

B データベース

カイコ保存系統のデータベース公開

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

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

C 報告書他

伴野豊、藤井博、河口豊、山本幸治、西川和弘、西坂章文、田村圭、江口誠一：「カイコ突然変異体利用の手引き2005- 遺伝子名と遺伝子記号-」、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（2005）

藤井 博:「九大生はこれでよいのだろうか？」緑風, 3, p73-74 (2005)

植物遺伝子開発分野

A 原著論文

Crofts A J., H. Washida, T. W. Okita, M. Satoh, M. Ogawa, T. Kumamaru and H. Satoh: The role of mRNA and protein sorting in seed storage protein synthesis, transport, and deposition. *Biochem. Cell Biol.*, **83**, 728-737 (2005)

Jahan Md. S., Y. Uemura, T. Kumamaru, A. Hamid and H. Satoh: Genetic variation of glutelin acidic subunit polypeptides in Bangladesh rice genetic resources. *Genet. Res. Crop Evol.*, **52**, 977-987 (2005)

Suzuki T., M. Eiguchi, H. Satoh, T. Kumamaru and N. Kurata. (2005) A modified TILLING system for rice mutant screening. *Rice Genetics Newsletter* **22**, 89-90

Masaki Okuda, Isao Aramaki, Takuya Koseki, Hikaru Satoh, and Katsumi Hashizume Structural characteristics, properties, and *in vitro* digestibility of rice, *Cereal Chem.* **82**(4), 361-368 (2005)

Y. Kawagoe, A. Kubo, H. Satoh, F. Takaiwa and Y. Nakamura: Roles of isoamylase and ADP-glucose pyrophosphorylase in starch granule synthesis in rice endosperm, *Plant J.*, **42** : 164-174 (2005)

B. データベース

イネ保存品種データベース

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

微生物遺伝子開発分野

A 原著論文

Doi, K.: Study on Temporal and Spatial Expression of the Sporulation-inhibitory Gene of Conjugative Plasmid During Differentiation in *Streptomyces*, *Actinomycetologica*, **19**, 27-32 (2005)

B 著書・総説

原敏夫、土居克実 形質導入（ファージ取扱い技術）、 生物工学ハンドブック、コロナ社、p.52-55 (2005)

原敏夫 納豆と放射線は相性がいい！？ 原子力eye 51, 42-43 (2005)

原敏夫 株式会社ハラテックインターナショナル 2005大学発ベンチャー支援事例集 社団法人発明協会 16-17 (2005)

C プロシーディングス・報告書他

原敏夫 特願2005-129514 生分解性吸水性材料とその製造方法

原敏夫 特開2005-225692 堆肥化促進剤

原敏夫 特願2005-338695 生分解性吸水性材料とその製造方法および該生分解性吸水性材料からなる堆肥化助剤

原敏夫 特許第3713402号 無細胞抽出液及び糖タンパク質合成系

原敏夫 特許第3741364号 保湿ジェルシート及びその製造方法

2. 原著論文要旨

家蚕遺伝子開発分野



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 142 (2005) 403–409

CBP

www.elsevier.com/locate/cbpb

Molecular and biochemical characterization of manganese-containing superoxide dismutase from the silkworm, *Bombyx mori*

Kohji Yamamoto ^{a,*}, Pingbo Zhang ^a, Ningjia He ^a, Yongqiang Wang ^{a,c}, Yoichi Aso ^b,
Yutaka Banno ^a, Hiroshi Fujii ^a

^a Laboratory of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

^b Laboratory of Genetic and Protein Engineering, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

^c Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China

Received 25 May 2005; received in revised form 31 August 2005; accepted 7 September 2005

Available online 19 October 2005

Abstract

Superoxide dismutase (SOD) is responsible for the removal of superoxide anion from living organisms. In this study, cDNA encoding the manganese-containing SOD (MnSOD) from the silkworm, *Bombyx mori*, was isolated by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and sequenced. The deduced amino acid sequence of the MnSOD revealed 62% identity to that of the *Drosophila melanogaster*; both were close to each other in a phylogenetic tree. The MnSOD was overproduced in *Escherichia coli* and purified. The internal structure of the recombinant MnSOD was confirmed by peptide mass fingerprinting method. The recombinant MnSOD facilitating the reduction reaction of superoxide anion retained 75% of its original activity after incubation at pH 4–11 for 24 h at 4 °C. Its activity was never affected by incubation at pH 7 for 30 min below 50 °C.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Bombyx mori*; Manganese; Phylogenetic tree; Silkworm; Superoxide dismutase

1. Introduction

Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) is a metalloenzyme, which catalyzes the conversion of the superoxide radicals into molecular O₂ and H₂O₂. The family of SODs is involved in defense reaction to reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion (O₂^{•−}) and H₂O₂ (McCord and Fridovich, 1969; Bannister et al., 1987; Fridovich, 1975). ROS is produced by the exposure of tissues and cells to environmental stress and chemical agents (Davies and Dean, 1997; Rauen et al., 1999; Parkes et al., 1999). ROS is also generated by normal metabolism such as β-oxidation of fatty acid and electron transport in peroxisome (Sohal et al., 1990; Orr and Sohal, 1994). Since ROS causes damage to biological molecules including proteins, nucleic acids, membrane lipids and other cellular components, it is necessary for aerobic

organisms to regulate ROS (Hermes-Lima and Zenteno-Savin, 2002). SOD has been isolated from various species (Fridovich, 1986). In eukaryotes, there are two distinct isoforms of SOD that are distinguished by the type of metal bound at their active sites: copper- and zinc-containing SOD (Cu/Zn-SOD) and manganese-containing SOD. We already cloned a cDNA encoding Cu/Zn-SOD of the silkworm (Yamamoto et al., 2005a). Although MnSOD cDNAs have been cloned from diverse organisms (Hunter et al., 1997; Duttaroy et al., 1994; Beck et al., 1987; Ho and Crapo, 1987; Hallelwell et al., 1986), the cDNA encoding MnSOD of the silkworm has not yet been available. The domesticated silkworm, *Bombyx mori*, is an economically important animal. Therefore, the studies on defense reaction of silkworm are useful for the maintenance.

To understand the biochemical aspects of defense reaction to ROS, in this paper, we cloned, sequenced the cDNA encoding MnSOD from the silkworm, *B. mori* and overexpressed the recombinant enzyme in *Escherichia coli*. Furthermore, we reported the tissue distribution of the transcript of *B. mori* MnSOD.

* Corresponding author. Tel.: +81 92 621 4991; fax: +81 92 624 1011.
E-mail address: yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp (K. Yamamoto).

Proteomic Studies of Isoforms of the P25 Component of *Bombyx mori* Fibroin

Pingbo ZHANG,¹ Kohji YAMAMOTO,¹ Yoichi ASO,² Yutaka BANNO,¹
Daisuke SAKANO,¹ Yongqiang WANG,^{1,3} and Hiroshi FUJII^{1,†}

¹Institute of Genetic Resources, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

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

³Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China

Received May 11, 2005; Accepted July 26, 2005

It is recognized that P25 is one of three polypeptide components of the fibroin synthesized in the larval silk gland (SG) of silkworm, having two glycosylated isoforms. In the present study, however, eight P25 isoforms were separated by proteomics, including two-dimensional gel electrophoresis of whole SG proteins, and were identified by the peptide mass fingerprinting method. Four of the eight isoforms were identified as *Bombyx mandarina* P25s, although the SG of *Bombyx mori* has never been considered to contain the P25 from *B. mandarina*. It is suggested that this diversity of P25 isoforms depends on phosphorylation modification in addition to glycosylation.

Key words: proteomics; silkworm; P25 isoform; fibroin

Silk proteins comprising fibroin and sericin are synthesized in the silk gland (SG).¹⁾ SG is divided into the following three sub-organs: posterior silk gland (PSG), middle silk gland (MSG), and anterior silk gland (ASG). In the larva of the silkworm, *Bombyx mori*, fibroin is synthesized in the PSG, secreted into the lumen of the PSG, and associated with a sericin in the lumen of the MSG. The resulting silky fibers are secreted outwardly through the ASG, forming a cocoon. Fibroin comprises the heavy chain, the light chain, and the P25 glycoprotein (fibrohexamerin).^{2,3)} These components are also distributed in other silk-producing insects, *Bombyx mandarina*, *Dendrolimus spectabilis*, and *Papilio xuthus*.⁴⁾ *B. mori* fibroin is formed in the following manner: a disulfide bond links a heavy chain with a light chain, yielding a dimer; six sets of the dimer are non-covalently attached to a molecule of P25 and form a [(H-L)₆-P25] complex.⁵⁾ P25 has N-linked oligosaccharide chains, and its molecular size has 30 kDa and 27 kDa, depending on the degree of glycosylation.^{5,6)} This encouraged us to examine the isoforms of P25 extensively in the course of our proteomic studies of whole proteins in the *B. mori* SG.

The synthesis of fibroin accompanies changes in molecular forms of component polypeptides.⁶⁾ Hence we had a question as to whether the distribution of P25 isoforms differs depending on the site within the SG.

In this study, we dissected the SG into six parts and extracted proteins from each part. Samples prepared in this way were separately resolved by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and analyzed by the peptide mass fingerprinting (PMF) method, including in-gel tryptic digestion and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). In an extract from the MSG, we detected a total of eight P25 isoforms, including six newly found. Four of the eight were unexpectedly the P25 isoforms of *B. mandarina*. Further dephosphorylation analysis on P25 isoforms indicated that this diversity of P25 apparently ascribes to phosphorylation other than glycosylation.

Materials and Methods

Reagents, insect, and tissue dissection. Unless otherwise noted, all chemicals used were of the highest analytical grade. Pharmalyte Immobilized Drystrip (pH 3–10) and the IPGphor isoelectric focusing unit used for isoelectric focusing were from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Reductively methylated porcine trypsin was of sequencing grade from Promega (Mannheim, Germany). Calf intestinal alkaline phosphatase was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA) and used without further purification. *B. mori* larvae of FL50 strain (yellow cocoon) maintained at the Institute of Insect Genetic Resources of Kyushu University (Fukuoka, Japan) were reared on mulberry leaves. SGs were dissected from the larvae at day 5 of the fifth instar, in 0.75% NaCl at 4 °C. The SG was divided into the following parts: ASG, MSG1, MSG2, MSG3, MSG4, and PSG (Fig. 1).⁷⁾ Every part of the SG was blotted on filter paper, frozen with liquid

[†] To whom correspondence should be addressed. Fax: +81-92-621-1011; E-mail: Fujii@agr.kyushu-u.ac.jp

Abbreviations: 2-DE, two-dimensional gel electrophoresis; MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry; PMF, peptide mass fingerprinting; SG, silk gland

Identification and Overexpression of Y-box Protein Isoform of the Silkworm, *Bombyx mori*

Kohji Yamamoto¹, Taro Okada², Ningjia He¹, Yutaka Banno¹ and Hiroshi Fujii^{1,*}

¹ Laboratory of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

² Laboratory of Insect Genetic Resources, Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

* Corresponding author: mailing address, Laboratory of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan; fax, +81-624-1011; e-mail: fujii@agr.kyushu-u.ac.jp

Abstract The Y-box proteins are a family of nucleic acid binding proteins, which interact with the particular nucleotide sequence. Thus, they are thought to be involved in both transcriptional and translational regulation. Here we report the cloning and sequencing of cDNA encoding Y-box protein isoform from an experimental strain of the silkworm, *Bombyx mori*. The deduced amino acid sequence showed the cold-shock domain and RGG repeats were highly conserved, and was estimated to be close to the protein from *Drosophila melanogaster* in a phylogenetic tree. We constructed overexpression and purification system of silkworm Y-box protein. The overproduced protein was migrated at about 31 kDa in SDS-polyacrylamide gel corresponding to a predicted molecular weight of Y-box protein. Recombinant Y-box protein was detected in the soluble fraction and was purified to homogeneity by ammonium sulfate fractionation and an anion exchange chromatography.

Key words: *Bombyx mori*, silkworm, Y-box protein, cloning, sequencing

Introduction

The Y-box proteins (YBPs) are a family of nucleic acid binding proteins and play a multifunctional role in the regulation of transcription, chromatin modification, translational repression and RNA packaging (Wolffe, 1994). It is reported that YBPs bind to both RNA and DNA (Izumi, *et al.*, 2001). For example, YBP interacts with promoters containing the particular nucleotide sequence, so-called Y-box element and control gene expression (Fukuda and

Tonks, 2003). YBP is present abundantly in messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) and regulates translation for a RNA-binding protein (Minich and Ovchinnikov, 1992). Mouse *Mus musculus* YBP (Tafari *et al.*, 1993) and *Xenopus* YBP (Matsumoto *et al.*, 1996) could hold the transcribed mRNA.

The cold-shock domain (CSD) is responsible for the interaction to nucleic acid and evolutionarily highly conserved in the sequences of YBPs. It is known that the domain is related to *Escherichia coli* cold-shock proteins (Jiang, *et al.*, 1997). The human *Homo sapiens* YBP

Cloning, expression and characterization of theta-class glutathione S-transferase from the silkworm, *Bombyx mori*

Kohji Yamamoto^{a,*}, Pingbo Zhang^a, Fumio Miake^b, Nobuhiro Kashige^b, Yoichi Aso^c,
Yutaka Banno^a, Hiroshi Fujii^a

^aLaboratory of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8581, Japan

^bMicrobiology Laboratory, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, Fukuoka 814-0181, Japan

^cLaboratory of Protein Chemistry and Engineering, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

Received 21 January 2005; received in revised form 15 April 2005; accepted 18 April 2005

Abstract

This study focused on glutathione S-transferase (GST), one of the detoxification enzymes, from the silkworm, *Bombyx mori* (GSTT1). A cDNA encoding a putative GST was amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and sequenced. The deduced amino acid sequence revealed 59%, 57% and 56% identities to theta-class GSTs of *Musca domestica*, *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*, respectively. GSTT1 was also estimated to be close to those GSTs in a phylogenetic tree. Recombinant GST (rGSTT1) was functionally overexpressed in *Escherichia coli* in a soluble form, purified to homogeneity, and characterized. The pH-optimum of rGSTT1 was broad from pH 4 to 9 and rGSTT1 retained more than 75% of its original activity after incubation at pH 5–11. Incubation for 30 min at temperatures below 50 °C also affected the activity insignificantly. The Michaelis constant for 1-chloro-2,4-dinitrobenzene was 0.48 mM. © 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Antioxidant; *Bombyx mori*; Cloning; Glutathione conjugation; Glutathione S-transferase; Overexpression; Sequencing; Silkworm

1. Introduction

Glutathione S-transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) are detoxifying enzymes found in vertebrates, plants, insects, yeasts and aerobic bacteria (Sheehan et al., 2001; Ketterer, 2001). GSTs catalyze the conjugation of glutathione (GSH) to hydrophobic substrates, for example, herbicides and insecticides (Armstrong, 1997). The conjugation of GSH to the substances facilitates the following metabolism (Sheehan et al., 2001; Mannervik and Danielson, 1988; Hayes and Pulford, 1995; Eaton and Bammler, 1999). GST is also able to conjugate GSH to endogenous compounds. Toxic aldehydes were produced by the lipid peroxidation and the resulting α , β -unsaturated aldehydes, 4-hydroxynonenal (4-HNE), was established to be a substrate for GST (Alin et al.,

1985a; Halliwell and Gutteridge, 1999). Since these aldehydes are highly reactive, specific modification of proteins by 4-HNE could inhibit the protein function (Schneider et al., 2001; Esterbauer, 1993). Cytosolic GST from rat liver was shown to give specific activity with 4-HNE (Alin et al., 1985a). The *Drosophila* GST has also the ability to conjugate GSH to 4-HNE for detoxification (Sawicki et al., 2003).

GSTs have been purified from more than 24 individual insect species and the enzymes are expressed at high levels (Yu, 1996; Zhou and Sylvan, 1997). Two distinct classes were generally recognized and designated class I and II according to the classification system for insect (Fournier et al., 1992; Syvanen et al., 1994). On the other hand, the mammalian GSTs can be divided into seven distinct classes named alpha, mu, pi, sigma, theta, zeta and omega (Hayes and Pulford, 1995; Board et al., 1997). It is known that amino acid sequence identity within a class is 50%, while identity between other classes is less than 30% (Sheehan et

* Corresponding author. Tel.: +81 92 621 4991; fax: +81 92 624 1011.
E-mail address: yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp (K. Yamamoto).



Catalase from the silkworm, *Bombyx mori*: Gene sequence, distribution, and overexpression

Kohji Yamamoto^{a,*}, Yutaka Banno^a, Hiroshi Fujii^a, Fumio Miake^b,
Nobuhiro Kashige^b, Yoichi Aso^c

^aLaboratory of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8581, Japan

^bMicrobiology Laboratory, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, Fukuoka 814-0181, Japan

^cLaboratory of Genetic and Protein Engineering, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

Received 24 July 2004; received in revised form 30 December 2004; accepted 7 January 2005

Abstract

Living organisms require mechanisms regulating reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide and superoxide anion. Catalase is one of the regulatory enzymes and facilitates the degradation of hydrogen peroxide to oxygen and water. Biochemical information on an insect catalase is, however, insufficient. Using mRNA from fat body of the silkworm, *Bombyx mori*, a cDNA encoding a putative catalase was amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and sequenced. The deduced amino acid sequence comprised 507 residues with more than seventy residues forming a scaffold for a heme cofactor conserved. The sequence showed 71% and 66% identities to those of the *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera* catalases, respectively; the catalase from *B. mori* was estimated to be phylogenetically close to that from *A. mellifera*. The transcripts of the gene and the catalase activity were distributed in diverse tissues of *B. mori*, suggesting its ubiquitous nature. Using the gene, a recombinant catalase (rCAT) was functionally overexpressed in a soluble form using *Escherichia coli*, purified to homogeneity, and characterized. The pH-optimum of rCAT was broad around pH 8.0. More than 80% of the original rCAT activity was retained after incubation in the following conditions: at pH 8–11 and 4 °C for 24 h; at pH 7 and temperatures below 50 °C for 30 min. The Michaelis constant for hydrogen peroxide was evaluated to be 28 mM at pH 6.5 and 30 °C. rCAT was suggested to be a member of the typical catalase family.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Bombyx mori*; Silkworm; Catalase; Antioxidant; Hydrogen peroxide

1. Introduction

The exposure of radiation, ultraviolet rays, and some chemicals to tissues and cells results in the production of a reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide and superoxide anion (Davies and Dean, 1997). In general, ROS is harmful to living organisms because ROS tends to give oxidative damages to

proteins, nucleic acids, and lipids (Hermes-Lima and Zenteno-Savín, 2002). In this context, ROS has been recognized to be related to aging and life span (Orr and Sohal, 1994; Parkes et al., 1999; Sohal et al., 1990). ROS stimulates a signal transduction and mediates various responses such as cell growth and apoptosis (Suzuki et al., 1997). On the other hand, ROS plays a helpful role in the innate immunity system of an insect (Kumar et al., 2003; Hao et al., 2003). Living organisms thus require a regulatory system for ROS. Antioxidant enzymes are typical factors facilitating the scavengery of ROS. Catalase ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$ oxidoreductase; EC 1.11.1.6, CAT) is one of the antioxidant enzymes and

*Corresponding author. Tel.: +81 92 621 4991;

fax: +81 92 624 1011.

E-mail addresses: yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp (K. Yamamoto),
yaso@agr.kyushu-u.ac.jp (Y. Aso).

Superoxide Dismutase from the Silkworm, *Bombyx mori*: Sequence, Distribution, and Overexpression

Kohji YAMAMOTO,^{1,†} Pingbo ZHANG,¹ Yutaka BANNO,¹ Hiroshi FUJII,¹
Fumio MIAKE,² Nobuhiro KASHIGE,² and Yoichi Aso³

¹Laboratory of Insect Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

²Microbiology Laboratory, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, Fukuoka 814-0181, Japan

³Laboratory of Genetic and Protein Engineering, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

Received September 17, 2004; Accepted December 2, 2004

Superoxide dismutase (SOD) is an enzyme facilitating the removal of superoxide anions from living organisms. This study focused on SOD from the silkworm, *Bombyx mori* (bmSOD). cDNA encoding bmSOD was amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. The deduced amino acid sequence of bmSOD indicated that the residues forming the Cu/Zn binding site are conserved and that the sequence is in 60% identity to that of the *Drosophila melanogaster*. *B. mori* SOD was also close to the *D. melanogaster* SOD in a phylogenetic tree. The bmSOD mRNA and the enzyme activity were widely distributed in diverse tissues. bmSOD functionally overexpressed in *Escherichia coli* in a soluble form was purified, and its stability was examined. bmSOD at 4°C retained almost all of its original activity after incubation at pH 4–11 for 24 h. Incubation (pH 7) for 30 min at temperatures below 40°C also affected activity insignificantly.

Key words: *Bombyx mori*; silkworm; superoxide dismutase; antioxidant; oxidative stress

Exposure to radiation, ultraviolet rays, and chemical agents of tissues and cells results in the production of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion (O_2^-) and H_2O_2 .¹ ROS is toxic to living organisms, because its high reactivity causes oxidative damage to proteins, nucleic acids, and lipids.² In this context, it is believed that ROS is related to aging and life span.^{3,4} On the other hand, ROS plays a significant role in the innate immunity system of insects.^{5,6} It stimulates signal transduction and mediates different responses such as cell growth and apoptosis.⁷ Tissues and cells experience oxidative stress even during normal metabolism such as β -oxidation of fatty acids and electron transport in peroxisome.⁸ Hence, it is necessary for aerobic organisms to control ROS. Superoxide dismutase

(SOD, EC 1.15.1.1) is a ubiquitous metalloenzyme in aerobic organisms that plays a crucial role in protecting organisms against toxic effects caused by ROS.^{9,10} SOD catalyzes a dismutation reaction that converts the superoxide radicals into molecular O_2 and H_2O_2 .¹¹ SOD is widely distributed in eukaryotes.¹² Since the overexpression of SOD in the fruit fly, *Drosophila melanogaster* was found to extend its lifespan, SOD has been considered to be involved in lifespan extension.^{3,4,13} cDNAs encoding SODs from diverse organisms have been cloned, some of which were overexpressed in various hosts.^{14–21} In spite of its important role in the regulation of ROS, the cDNA encoding a SOD of the silkworm is not yet available.

In this study, we cloned, sequenced the cDNA encoding a SOD from the silkworm, *Bombyx mori* (bmSOD), and overexpressed the recombinant enzyme in *Escherichia coli*. We found that both the bmSOD mRNA are distributed in diverse tissues. This is the first report to identify SOD of the silkworm, *B. mori*.

Materials and Methods

Insect and tissue dissection. Silkworm larvae (p50) maintained at the Institute of Genetic Resources Technology, Kyushu University (Fukuoka, Japan) were reared on mulberry leaves. On d3 at the 5th instar, fat body, midgut, silk gland, ovary, and testis as well as hemocyte were dissected in ice-cold 0.75% NaCl, immediately frozen with liquid N_2 , and stored at $-80^\circ C$ until use.

Cloning of cDNA encoding SOD. Total RNA was extracted from fat bodies with Sepasol-RNA 1 (Nacalai Tesque). The first strand cDNA was synthesized from the total RNA (5 μg) using Super Script II reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo-dT primer. It was

[†] To whom correspondence should be addressed. Fax: +81-92-624-1011; E-mail: yamamok@agr.kyushu-u.ac.jp

Abbreviations: RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; SOD, superoxide dismutase; ROS, reactive oxygen species; WST-1, 4-[3-(4-indophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; IPTG, isopropyl 1-thio- β -D-galactoside; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride

Complementation of *sugary-1* Phenotype in Rice Endosperm with the Wheat *Isoamylase1* Gene Supports a Direct Role for Isoamylase1 in Amylopectin Biosynthesis

Akiko Kubo, Sadequr Rahman, Yoshinori Utsumi, Zhongyi Li, Yasuhiko Mukai, Maki Yamamoto, Masashi Ugaki, Kyuya Harada, Hikaru Satoh, Christine Konik-Rose, Matthew Morell, and Yasunori Nakamura*

Akita Prefectural University, Akita 010-0195, Japan (A.K., Y.U., Y.N.); Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan (A.K., Y.U., Y.N.); Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Plant Industry, Australian Capital Territory 2601, Australia (S.R., Z.L., C.K.-R., M.M.); Osaka Kyoiku University, Kashiwara, Osaka 582-8582, Japan (Y.M.); Kansai University of Welfare Sciences, Kashiwara, Osaka 582-0026, Japan (M.Y.); University of Tokyo, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan (M.U.); Chiba University, Chiba 271-8510, Japan (K.H.); and Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan (H.S.)

To examine the role of isoamylase1 (ISA1) in amylopectin biosynthesis in plants, a genomic DNA fragment from *Aegilops tauschii* was introduced into the *ISA1*-deficient rice (*Oryza sativa*) *sugary-1* mutant line EM914, in which endosperm starch is completely replaced by phytoglycogen. *A. tauschii* is the D genome donor of wheat (*Triticum aestivum*), and the introduced fragment effectively included the gene for ISA1 for wheat (*TaISA1*) that was encoded on the D genome. In *TaISA1*-expressing rice endosperm, phytoglycogen synthesis was substantially replaced by starch synthesis, leaving only residual levels of phytoglycogen. The levels of residual phytoglycogen present were inversely proportional to the expression level of the *TaISA1* protein, although the level of pullulanase that had been reduced in EM914 was restored to the same level as that in the wild type. Small but significant differences were found in the amylopectin chain-length distribution, gelatinization temperatures, and A-type x-ray diffraction patterns of the starches from lines expressing *TaISA1* when compared with wild-type rice starch, although in the first two parameters, the effect was proportional to the expression level of *TaISA1*. The impact of expression levels of ISA1 on starch structure and properties provides support for the view that ISA1 is directly involved in the synthesis of amylopectin.

Amylopectin is generally the major constituent of starch, accounting for about 65% to 85% of storage starch. The remainder is amylose, which is essentially linear. Amylopectin has a defined structure composed of tandem linked clusters (approximately 9–10 nm each in length), where linear α -1,4-glucan chains are regularly branched via α -1,6-glucosidic linkages, whereas the glycogens of bacteria and animals have a more randomly branched structure (Thompson, 2000). The distinct structure of amylopectin (referred to as a tandem-cluster structure) contributes to the crystalline organization of the starch granule (Gallant et al., 1997). Variation of the cluster fine structure is considered to cause variations in starch functional properties between species (e.g. maize [*Zea mays*] starch versus potato [*Solanum tuberosum*] starch), tissues (e.g. storage starch versus assimilatory starch), and genetic backgrounds (e.g. *japonica* rice [*Oryza sativa*] starch versus

indica rice starch). However, genetic engineering could remove such species-specific limitations of starch functional properties by modifying the fine structure of amylopectin in a variety of ways.

According to our current understanding, the structure of amylopectin is determined by four classes of enzymes: ADP-Glc pyrophosphorylase (AGPase), soluble starch synthase (SS), starch-branching enzyme (BE), and starch-debranching enzyme (DBE; Van den Koornhuyse et al., 1996; Smith et al., 1997; Kossmann and Lloyd, 2000; Myers et al., 2000; Nakamura, 2002; Ball and Morell, 2003; James et al., 2003). A current focus of research in starch biosynthesis is to evaluate the metabolic functions of individual enzymes involved in amylopectin biosynthesis and examine how manipulation of the enzymes can produce novel starches with distinct physicochemical properties. This will help to clarify the contribution of each enzyme to the structure of amylopectin and the impact of expression level on the structure and functionality of the starch.

Higher plants are known to have two types of DBE, isoamylase (ISA) and pullulanase (Lee and Whelan,

* Corresponding author; e-mail nakayn@akita-pu.ac.jp; fax 81-18-872-1681.

Article, publication date, and citation information can be found at www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.104.051359.

The structure of starch can be manipulated by changing the expression levels of starch branching enzyme IIb in rice endosperm

Naoki Tanaka¹, Naoko Fujita^{2,3}, Aiko Nishi⁴, Hikaru Satoh⁴, Yuko Hosaka³, Masashi Ugaki⁵, Shinji Kawasaki¹ and Yasunori Nakamura^{2,3,*}

¹National Institute of Agrobiological Sciences, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

²Department of Biological Production, Akita Prefectural University, Shimoshinjo-Nakano, Akita-City 010-0195, Japan

³Japan Science Technology, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

⁴Department of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

⁵Department of Agriculture, University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

Received 12 April 2004;

revised 11 May 2004;

accepted 14 May 2004.

*Correspondence (fax +81 18 872 1681;

e-mail nakayn@akita-pu.ac.jp)

Summary

When the starch branching enzyme IIb (*BEIIb*) gene was introduced into a *BEIIb*-defective mutant, the resulting transgenic rice plants showed a wide range of *BEIIb* activity and the fine structure of their amylopectins showed considerable variation despite having the two other BE isoforms, *BEI* and *BEIIa*, in their endosperm at the same levels as in the wild-type. The properties of the starch granules, such as their gelatinization behaviour, morphology and X-ray diffraction pattern, also changed dramatically depending on the level of *BEIIb* activity, even when this was either slightly lower or higher than that of the wild-type. The over-expression of *BEIIb* resulted in the accumulation of excessive branched, water-soluble polysaccharides instead of amylopectin. These results imply that the manipulation of *BEIIb* activity is an effective strategy for the generation of novel starches for use in foodstuffs and industrial applications.

Keywords: amylopectin, endosperm, starch, starch branching enzyme, transgenic rice.

Introduction

Starch branching enzymes (BEs) play an essential role in starch biosynthesis by introducing α -1,6-glucosidic linkages into α -1,4-glucosidic chains. Branching by BEs is specific as the branches in amylopectin are regularly arranged and account for amylopectin tandem-cluster structure (Thompson, 2000; Nakamura, 2002; Blennow *et al.*, 2004). This structure is responsible for the differences in physicochemical properties between starch and glycogen, and variations in the structure are thought to be responsible for the differences between the starches of a variety of plant species, tissues and genetic backgrounds.

Plants have two types of BE, historically designated as *BEI* and *BEII* in cereals (Boyer and Preiss, 1978) or as type B and type A in legumes and tubers, respectively (Burton *et al.*, 1995). Attempts have been made to alter the amylopectin fine structure of potato tubers by manipulating BEs through

antisense technology (Safford *et al.*, 1998) or by introducing bacterial BEs (Kortstee *et al.*, 1996). Changes in the expression of the genes encoding *BEI* and *BEII* were found to affect the physicochemical properties of tuber starches (Safford *et al.*, 1998; Jobling *et al.*, 1999; Schwall *et al.*, 2000).

Dicotyledonous plant tissues, such as pea embryo (Burton *et al.*, 1995), kidney bean embryo (Hamada *et al.*, 2001) and potato tuber (Larsson *et al.*, 1996), have only a single *BEII*-type isoform, which has also been referred to as A-type BE in the literature. On the other hand, two *BEII* isoforms, *BEIIa* and *BEIIb*, have been identified in the endosperm of cereals such as maize (Boyer and Preiss, 1978), rice (Mizuno *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1992), barley (Sun *et al.*, 1997) and wheat (Morell *et al.*, 1997). *BEIIb* is specifically expressed in the endosperm of maize (Fisher *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 1997), rice (Yamanouchi and Nakamura, 1992; Mizuno *et al.*, 1993) and barley (Sun *et al.*, 1998), whereas *BEIIa* is present in all organs examined (Yamanouchi and Nakamura, 1992). It is

Targeting of Proteins to Endoplasmic Reticulum-Derived Compartments in Plants. The Importance of RNA Localization¹

Andrew J. Crofts, Haruhiko Washida, Thomas W. Okita*, Masahiro Ogawa, Toshihiro Kumamaru, and Hikaru Satoh

Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, Washington 99164-6340 (A.J.C., H.W., T.W.O.); Department of Life Science, Yamaguchi Prefectural University, Yamaguchi 753-8502, Japan (M.O.); and Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan (T.K., H.S.)

The targeting of proteins to the endoplasmic reticulum (ER) is a topic of considerable interest since this organelle serves as an entry point for proteins destined for other organelles, as well as for the ER itself. A unique feature of plants is that they are able to store proteins in the ER in addition to other endomembrane compartments, and the deposition of such storage proteins provides important sources of both human and animal nutrition. Thus, increasing our knowledge of the mechanisms required for the targeting of storage proteins to this crucial organelle will ultimately allow the modification of critical steps, leading to improvements in plants as a protein source as well as in crop yield and productivity.

The entry of proteins into the endomembrane system is dependent on the presence of a transient N-terminal signal peptide. However, recent developments indicate that the localization of RNAs to specific ER subdomains may facilitate protein targeting within the endomembrane system. The aim of this *Update* is to introduce RNA localization as a means of targeting protein synthesis to specific intracellular locations with a focus on the localization of prolamine mRNA, and thus protein, to the ER-derived compartment known as the protein body. In addition to summarizing published research concerning prolamine mRNA localization, unpublished data showing the existence of multiple RNA localization pathways to specific ER subdomains and the role of mRNA targeting with respect to protein localization will be discussed.

RNA TARGETING: AN INTRODUCTION

In recent years, it has become clear that mRNA localization is a widespread and efficient means of targeting gene products to specific intracellular regions (for review, see Jansen, 2001; Kloc et al., 2002; Van de Bor and Davis, 2004; and for plants by Fedoroff, 2002; Okita and Choi, 2002). The localization of mRNA within the cytoplasm dictates cell polarity in both somatic cells and oocytes in addition to playing a central role in pattern formation and cell fate determination during embryonic development. This is often the result of site-specific translation of a protein that results in the formation of a morphogen gradient, typically transcription factors, that determines the overall body plan after fertilization (Ephrussi and St Johnston, 2004).

Historically, the most complete and best-characterized model systems for RNA localization are axis specification in the *Drosophila* oocyte and pole definition in the *Xenopus* embryo (Jansen, 2001; Kloc et al., 2002; Ephrussi and St Johnston, 2004). Other well-studied examples include the localization of mRNAs in polarized somatic cells such as fibroblasts and neurons (Jansen, 2001; Kloc et al., 2002). More recently, localization of *Ash1* mRNA that encodes an inhibitor of mating-type switching has been found to be targeted to the budding tip of yeast daughter cells (Chartrand et al., 2001). The latter suggests that the process of RNA localization may be common to all eukaryotes. Despite the current lack of mature model systems from the plant kingdom, several examples of RNA localization in plants are known. These include the differential segregation of expansin mRNAs to the apical or basipetal end of xylem precursor cells, and the targeting of actin mRNA during the establishment of cell polarity and early cell divisions in embryos of the brown alga *Fucus* (for review, see Okita and Choi, 2002). The RNA-dependent localization of rice (*Oryza sativa*) seed storage protein mRNAs is well characterized and will be discussed in more depth below.

¹ This work was supported by the National Science Foundation (grant no. 0235140), by the U.S. Department of Agriculture (grant no. USDA-NRICRG 2003-00934), by the Agriculture Research Center, Washington State University (Project 0590), and by the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (grant nos. 10660009 and 1213826).

* Corresponding author; e-mail okita@wsu.edu; fax 509-335-7643.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.104.048934.

20. Inheritance mode of *Glup5* gene and the genetic relationships with other 57H mutant genes

Y. UEDA¹, H. SATOH¹, M. SATOH¹, Y. TAKEMOTO¹, T. KUMAMARU¹ and M. OGAWA²

1) Laboratory of Plant Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku Fukuoka, 812-8581 Japan

2) Department of Domestic Economy, Yamaguchi Prefecture University, Sakurabatake, Yamaguchi, 753-8502 Japan

As shown in the previous report (Tian *et al.*, 2001), we have identified seven 57H mutants genes, *esp2* and *Glup1* to *glup6*. However, the detail genetic behavior of *Glup5* remained to be described. In this report, we describe the inheritance mode of *Glup5* mutant character and the genetic relationship between *Glup5* gene and other 5 genes involving in 57H mutation.

The three independent *Glup5* mutants, EM675, EM 677 and PMT 19, were so far isolated by the screening of mutant lines derived from the mutation treatment of fertilized egg cells of a rice cultivar Taichung65 (TC65) with MNU. SDS-PAGE and western blot analyses of seed storage proteins in three kinds of 57H mutants showed that *Glup5* mutations increased significantly the amount of glutelin precursor protein with M.M 60kD and decreased the accumulation of both of 40kD acidic and 20kD basic mature glutelins (Fig. 1). In addition, *Glup5* mutations decreased markedly the accumulation level of 26kD globulin and 13kD prolamin. All of *Glup5* mutations exhibited the opaque phenotype in grain in which the central portion was transparent as same as the normal grain while the outer portion was translucent and floury. F₁ seeds derived from crosses between the wild type cultivar TC65 as a female parent and a *Glup5* mutant EM675 as a male parent was normal in the SDS-PAGE profile of seed storage protein as well as in grain appearance. However, F₁ seeds from crosses between *Glup5* mutants as a female parent and TC65 as a male parent showed 57H in the seed storage proteins and opaque in the grain phenotype. In F₂ seeds derived from the self-pollinated F₁ plants, the segregation

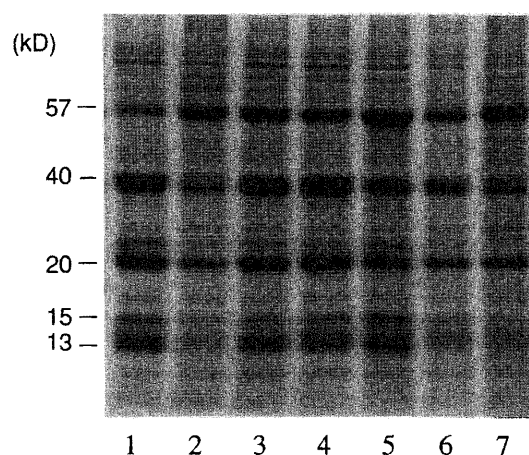


Fig. 1. SDS-PAGE profiles of seed storage proteins in six 57H mutants.

lane 1: Total storage protein of Kinmaze (Wild type), lane 2: CM1787 (*esp2*), lane 3: EM61 (*Glup1*), lane 4: EM305 (*glup2*), lane 5: EM856 (*glup3*), lane 6: EM956 (*glup4*), lane 7: EM675 (*Glup5*).

Table 1. Segregation modes of 57H and opaque endosperm in F₂ seeds derived from reciprocal crosses between EM675 (57H) and the wild type cultivar Taichung65.

21. A novel 57H mutant gene, *glup7*, located on chromosome 4

Y. UEDA¹, A. Sugino¹, Y. TAKEMOTO¹, M. SATOH¹, T. KUMAMARU¹, M. OGAWA² and H. SATOH¹

1) Laboratory of Plant Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku Fukuoka, 812-8581 Japan

2) Department of Domestic Economy, Yamaguchi Prefecture University, Sakurabatake, Yamaguchi, 753-8502 Japan

Mutants are one of the useful tools elucidating the genetic mechanism involving in above events. 57H mutants are characterized by the increased amount of proglutelin with an apparent molecular size of 57 kD while amount of mature glutelin subunits decrease (Kumamaru *et al.* 1988). Biochemical and histochemical analysis of these 57H mutants indicated that 57H mutations are caused by the lesion of genes encoding respective factors involving in the events from the translation of glutelin mRNA to the deposition in protein storage vacuole (Takemoto *et al.* 2002). So far 110 independent 57H mutants were isolated by MNU treatment and seven independent gene loci, that is, *esp2*, *Glup1* to *glup6* involving in 57H mutation have been identified (Tian *et al.* 2001). In this report, we describe a novel gene *glup7* for 57H mutation.

A kind of 57H mutant, CM935 was derived from the MNU treatment of a rice cultivar Kinmaze (Kumamaru *et al.*, 1988). The seed storage protein of this mutant was characterized by the abnormal accumulation of 57kD proglutelin with less amount of both of acidic and basic mature glutelin in addition to decreased amount of 26kD salt soluble protein (Fig. 1). The prolamin seed storage proteins were less affected by this mutation. The grain did not exhibit any aberration in appearance. F₁ seeds derived from crosses between Kinmaze and CM 935 showed the normal phenotype in the SDS-PAGE profiles of seed storage protein. The ratio of normal to 57H mutant in the F₂ seeds was 3:1 that fitted well to the expected ratio of single recessive inheritance, indicating that the 57H mutation in CM935 is controlled by a single recessive gene (Table 1).

Recombinants exhibiting the normal phenotype segregated in all of F₂s derived from crosses between CM935 and each of marker lines for 7 kinds of 57H mutant genes (Table 1), indicating that the 57H mutant gene of CM935 is independent from other seven 57H mutant genes. *glup7* was named to the gene of 57H mutation in CM935 from these results. F₂ seeds from the cross of *glup7* with *esp2* segregated into a ratio of 9 (normal): 3 (*glup7*): 4 (*esp2*) without double mutant type, suggesting that *esp2* gene is epistatic to *glup7* gene. Similar segregation modes were observed in F₂s from cross combinations between *glup7* and *glup4* and between *glup7* and *glup6*, suggesting that *glup4* and *glup6* are epistatic to *glup7*. *Glup5* is an incomplete dominant gene and shows the dosage effect in the proglutelin accumulation. In F₂s derived from a cross combination of *glup7* with *Glup5*, the segregation of both mutant types fitted the expected ratio of 3 (normal): 4 (*Glup5*): 1 (*glup7*), suggesting that *Glup5* is also epistatic to *glup7*. Although double mutant types being higher in proglutelin content than both of paren-

The role of mRNA and protein sorting in seed storage protein synthesis, transport, and deposition¹

Andrew J. Crofts, Haruhiko Washida, Thomas W. Okita, Mio Satoh, Masahiro Ogawa, Toshihiro Kumamaru, and Hikaru Satoh

Abstract: Rice synthesizes and accumulates high levels of 2 distinct classes of seed storage proteins and sorts them to separate intracellular compartments, making it an ideal model system for studying the mechanisms of storage protein synthesis, transport, and deposition. In rice, RNA localization dictates the initial site of storage protein synthesis on specific subdomains of the cortical endoplasmic reticulum (ER), and there is a direct relation between the RNA localization site and the final destination of the encoded protein within the endomembrane system. Current data support the existence of 3 parallel RNA localization pathways leading from the nucleus to the actively synthesizing cortical ER. Additional pathways may exist for the synthesis of cytoplasmic and nuclear-encoded proteins targeted to organelles, the latter located in a stratified arrangement in developing endosperm cells. The study of rice mutants, which accumulate unprocessed glutelin precursors, indicates that these multiple pathways prevent nonproductive interactions between different classes of storage proteins that would otherwise disrupt protein sorting. Indeed, it appears that the prevention of disruptive interactions between different classes of storage proteins plays a key role in their biosynthesis in rice. In addition to highlighting the unique features of the plant endomembrane system and describing the relation between RNA and protein localization, this minireview will attempt to address a number of questions raised by recent studies on these processes.

Key words: mRNA localization, protein localization, endomembrane system, seed storage proteins, rice.

Résumé : Le riz synthétise et accumule de grandes quantités de protéines appartenant à 2 classes distinctes de protéines de réserve de la graine, et les trie vers des compartiments intracellulaires séparés, ce qui en fait un modèle idéal pour l'étude des mécanismes de synthèse, de transport et de dépôt des protéines de réserve. Chez le riz, la localisation de l'ARN détermine le site initial de synthèse des protéines de réserve dans des sous-domaines spécifiques du reticulum endoplasmique (RE) cortical de sorte qu'il existe une relation directe entre le site de localisation de l'ARN et la destination finale de la protéine codée, à l'intérieur du système endo-membranaire. Les données actuelles appuient l'existence de 3 voies parallèles de localisation d'ARN, allant du noyau jusqu'au RE cortical actif en synthèse. Des sentiers additionnels peuvent exister pour la synthèse de protéines cytoplasmiques ou nucléaires ciblées vers les organelles, ces dernières étant se trouvant dans un arrangement stratifié dans les cellules de l'endosperme en développement. Chez le riz, l'étude de mutants qui accumulent des précurseurs de glutéline non mature indique que ces multiples voies préviennent les interactions non productives entre différentes classes de protéines de réserve qui, sinon, pourraient désorganiser le tri des protéines. En effet, il semble que la prévention de telles interactions entre les différentes classes de protéines de réserve joue un rôle clé dans leur biosynthèse chez le riz. En plus de souligner les caractéristiques uniques du système endomembranaire chez la plante et de décrire les relations qui existent entre l'ARN et la localisation des protéines, cette mini-revue tentera de traiter d'un certain nombre de questions soulevées par des études récentes sur ces processus.

Received 27 May 2005. Revision received 31 August 2005. Accepted 13 September 2005. Published on the NRC Research Press Web site at <http://bc.b.nrc.ca> on 8 November 2005.

A.J. Crofts, H. Washida, and T.W. Okita.² Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, WA 99164-6340, USA.

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

M. Satoh, T. Kumamaru and H. Satoh. Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan.

¹This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled CSBMCB – Cellular dynamics, and has undergone the Journal's usual peer review process.

²Corresponding author (e-mail: okita@wsu.edu).

Genetic variation of glutelin acidic subunit polypeptides in Bangladesh rice genetic resources

Md. Sarwar Jahan^{1,**}, Yuji Uemura¹, Toshihiro Kumamaru¹, Abdul Hamid² and Hikaru Satoh^{1,*}

¹Plant Genetics Laboratory, Institute of Genetic Resources, Kyushu University, Hakozaki 6-10-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan; ²Department of Agronomy, Bangabandhu Sheikh Mujibur Rahman Agricultural University, Salna, Gazipur-1703, Bangladesh; **Present address: Agrotechnology Discipline, Khulna University, Khulna-9208, Bangladesh. *Author for correspondence. (e-mail: hsatoh@agr.kyushu-u.ac.jp phone/fax: 81-92-642-3056)

Received 9 January 2003; accepted in revised form 22 October 2003

Key words: Ecotype, Electrophoresis, *Oryza sativa* L., Seed, Storage protein

Abstract

Bangladesh rice genetic resources collected from six distinct regions of the country were examined to obtain the diversity in glutelin acidic subunit polypeptides. Seed glutelins from 576 Bangladesh rice cultivars representing seven ecotypes were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), isoelectric focusing (IEF) electrophoresis and two-dimensional electrophoresis (2-DE: SDS-PAGE/IEF) analyses. Glutelin acidic subunit was separated into four bands, α -1, α -2, α -3 and α -4, and the variation in each of bands was detected by SDS-PAGE analysis. A higher molecular size component of α -1 (α -1') was identified in the cultivars tested. In case of α -2, α -2H with high molecular mass, α -2L with low molecular mass and α -2H/L were detected. α -3 band variation showed α -3H, α -3L, and α -3H/L, while for α -4, α -4H, α -4L bands were identified. In IEF analysis, a total of 16 bands with independent pI ranging from pI 6.30 to 7.52 were identified for the glutelin acidic subunit among the cultivars. The maximum and minimum numbers of IEF bands found were 13 and 9, respectively. The α -2L less cultivars were also lacking in pI 6.80 polypeptide in IEF. Result of 2-DE showed that pI 6.80 polypeptide was the main component of α -2L band. Transplanted Aman ecotype was the most diverse with respect to glutelin variation. Geographical distribution of glutelin variation in the Transplanted Aman ecotype differed according to the regions. The above results indicate that Bangladesh rice cultivars possess great genetic diversity in glutelin acidic subunit polypeptides. This study of indigenous rice cultivars from Bangladesh provides useful information regarding their breeding potential.

Introduction

Rice is the world's single most important food crop and a primary food source for more than a third of the world's population (Khush 1997). Rice plays a very significant role in providing protein to a large segment of the world's population, espe-

cially to those in developing countries where animal protein is not affordable. Rice contributes about 28–54% of the proteins in the Asian diet (Duff 1991).

It is thus important to improve the quality and nutritional value of seed proteins in rice. Seed storage proteins can be divided into four classes

Vol. 22

26. A modified TILLING system for rice mutant screening

T. SUZUKI¹, M. EIGUCHI¹, H. SATOH², T. KUMAMARU² and N. KURATA^{1,3}

1) Plant Genetics Laboratory, National Institute of Genetics, Mishima, 411-8540 Japan

2) Plant Genetics Laboratory, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, 812-8581 Japan

3) Department of Genetics, School of Life Science, Graduate University for Advanced Studies, Mishima, 411-8540 Japan

The TILLING (Targeting Induced Local Lesion in Genome) system is one of the most efficient methods to screen mutants in a large-scale mutant population (Till et al. 2003). The original TILLING system is composed of PCR amplification of interest genes with fluorescence-labelled primers, CELI digestion and a LI-COR gel electrophoresis. However, these steps take a fair amount of labor and time. To simplify and reduce these steps, we have modified the methods and reconstructed another efficient way for high-throughput TILLING. The new system is modified in two major steps; one is replacement of fluorescence primers with non-labelled primers in PCR amplification, and the other is a use of capillary gel electrophoresis. The electrophoresis is carried out by the HDA-GT12 (eGene corp., USA) that can separate DNA fragments below 2 kb within eight minutes.

The modified system could detect SNPs at any DNA regions examined between Indica and Japonica varieties. All SNPs could be detected clearly after amplification followed by digestion with CELI as two to four DNA fragments (Fig. 1). SNPs could also be detected using mixed genome DNAs of the Japonica and Indica varieties at 11:1 ratio (Fig. 2). This indicates that presence of one heterozygous mutant in a pool of six plants is sufficient to detect SNPs by the non-fluorescence TILLING. The modified TILLING method was then applied for mutation screening of an MNU-induced mutant population. We used over 700 M2 mutant lines in which six individuals were pooled for screening of mutations in a 600 bp coding region of a known gene. The first screening detected 10 candidate mutant lines. We examined sequences of six individual plants of all candidate lines and identified mutations in six lines. Additional screening and identification are now in progress and the results obtained so far showed that the mutation ratio per 1 kb region would be around 0.8 % for this mutant population. From these results, we can expect about eight different mutations for every 1 kb genome sequence in 1000 mutant lines. The mutant population with this high mutation ratio should serve as a promising TILLING resource and reverse genetic studies in rice.

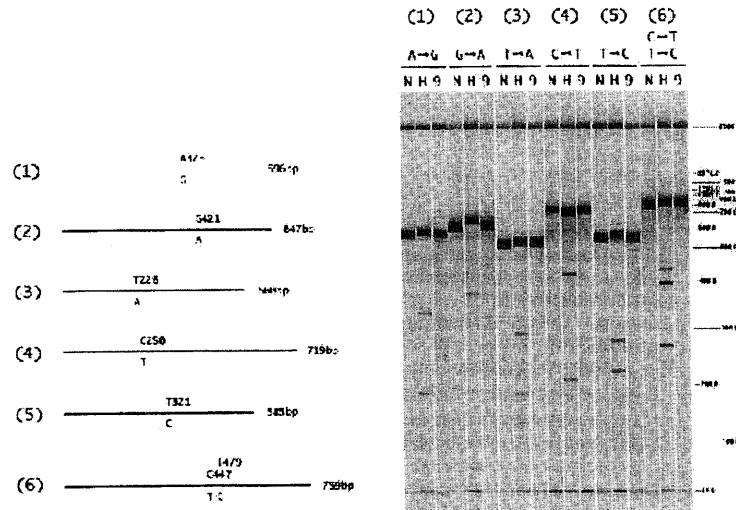


Fig. 1. Detection of six SNPs between Japonica and Indica varieties. Fragments of indicated bp length were amplified with specific primers (left panel), digested by CELI after denaturation and annealing, and electrophoresed in an HDA-GT12 capillary gel apparatus. The amplified fragments were digested at the SNP positions indicated in the left figures. Nucleotides above the DNA bars are Japonica (Nipponbare: N) and below bar are Indica (93-11; 9) at the indicated nucleotide position. Right panel shows pseudo images of electrophoresed DNA fragments. Appearance of clear fragments of expected length in the right panel revealed correct recognition and digestion of the DNA fragments at the SNP positions. N; Nipponbare, 9; 93-11, H; Mixed N and 9 by 1:1.

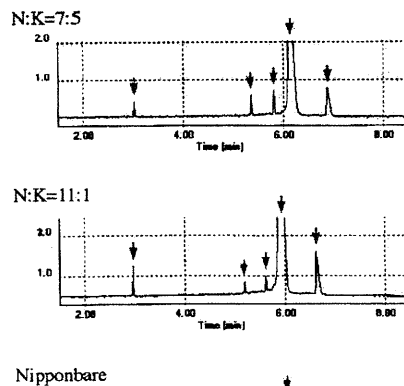


Fig. 2. SNP detection between Nipponbare (N) and Kasalath (K) genomes. A 1002 bp fragment (blue arrow) was amplified and applied for SNP detection by capillary gel electrophoresis. A SNP at 433rd base was digested and two fragments of 432 and 569 bp long (red arrows) were detected. The genome DNAs of N and K were mixed at the ratio of 7:5 (top), 11:1 (middle) and 1:0 (bottom). Black arrows are marker DNAs of 15 (left) and 5386 bp (right).

Structural Characteristics, Properties, and In Vitro Digestibility of Rice

Masaki Okuda,^{1,2} Isao Aramaki,¹ Takuya Koseki,¹ Hikaru Satoh,³ and Katsumi Hashizume¹

ABSTRACT

Cereal Chem. 82(4):361–368

Using rice samples derived from normal rice cultivars and endosperm starch mutant, we investigated key factors contributing to the enzyme digestibility of steamed rice grains. The chemical composition of polished rice grains, structural features of endosperm starch, and enzyme digestibility of steamed rice grains were examined. The protein content of polished rice grains was 4.6–9.1%, amylose content was 4–27%, the DP_n of purified amylose was 900–1,600, the amylopectin short/long chain ratio was 1.2–5.9, and the enzyme digestibilities of steamed polished rice grains were 0.9–12.6 °Brix. Amylose content and RVA parameters (viscosity, breakdown, and setback) correlated significantly with enzyme digestibility of steamed rice grains. Multiple regression formulas were

constructed to predict digestibility of steamed rice grain as a function of the molecular characteristics of the starch. When both amylose content and the short/long chain amylopectin ratio were used as predictor variables, they accounted for >80% of the observed variance in digestibility of steamed rice grains. Multiple regression revealed that the more digestible rice samples had starch with a lower amylose content and more short-chain amylopectin. Reassociation of amylose-lipid complex and recrystallization of amylopectin in the stored steamed rice grains was monitored by differential scanning calorimetry (DSC), and the observed retrogradation properties were related to the structural characteristics of starch and to the enzyme digestibility of steamed rice grains.

In the production of sake, a traditional alcoholic beverage in Japan, polished rice grains are soaked in water, steamed, and fermented with Koji mold and water. During production, starch in the endosperm is gelatinized and saccharified into glucose through the action of enzymes secreted by *Aspergillus oryzae*, the fungus in Koji. Simultaneously, liberated glucose is fermented into ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. Unlike production of other alcoholic beverages, enzyme digestibility of the steamed rice grains is an important property because the rate of the alcoholic fermentation is dependent on the digestion step. Because undigested or incompletely digested rice grains cannot be used as a carbohydrate source by *S. cerevisiae*, digestion ultimately determines the efficiency of the starch-to-alcohol conversion.

The moisture content of steamed rice grains, fermentation temperature, and enzyme activity (saccharification enzyme and proteolytic enzyme) are the major factors that influence enzyme digestion of steamed rice grains in sake production. These factors have already been used as indices of saccharification control. Crude protein content, histological structures of rice grains, and properties of endosperm starch have been considered additional key factors influencing enzyme digestibility of rice grains in sake mash (Ito et al 1988; Yanagiuchi et al 1996; Wakai et al 1997; Aramaki et al 2004a,b; Yoshizawa 2004). Wakai et al (1997) reported that amylose content of rice grains correlated negatively with enzyme digestibility of steamed rice grains. Mizuma et al (2003) showed that steamed rice grains of low amylose content were more digestible than rice with a normal amylose content. Chen et al (2003) reported that the outer portions of rice amylopectin suitable for sake production had more long chains (≈DP 13–23) and fewer short chains (≈DP 6–12) relative to cooked rice Koshihikari. Aramaki et al (2004b) reported a positive correlation between amylopectin short chains (DP 6–9) and enzyme digestibility of steamed rice grains but a negative correlation between amylopectin long chains (DP 35–41) and enzyme digestibility of the steamed rice grains. In spite of previous studies that focused independently on amylose content or on amylopectin structure, critical factors that affect enzyme digestibility of steamed rice grains remain poorly understood. Several investigations have demon-

strated that the ratio of amylose to amylopectin and the structure of amylopectin influence the texture of cooked rice, staling of starchy food, and retrogradation of starch (Lu et al 1997; Takahashi et al 1998; Jane et al 1999; Jobling et al 2002; Okamoto et al 2002).

Rice endosperm starch mutants that are impaired in endosperm starch biosynthesis, have been induced by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) treatment (Satoh et al 1981). The mutants vary in amylose-to-amylopectin ratio, starch content, and endosperm structure. Additionally, the properties of mutant gelatinized starches differ from those of their parents (Yano et al 1988; Kawasaki et al 1996; Nakamura et al 1997; Nishi et al 2001).

In the present study, we examined these rice endosperm starch mutants and other rice samples to elucidate relationships between structural characteristics and properties of endosperm starch and the enzyme digestibility of steamed rice grains. Amylose and amylopectin were fractionated, their molecular characteristics were analyzed, and physical properties of the starches and the enzyme digestibility of steamed rice grains were evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Five endosperm starch mutants, sugary-1 mutant EM5 (Nakamura et al 1997), amylose extender mutant EM10 (Nishi et al 2001), dull mutant EM12 (Yano et al 1988), floury-2 mutant EM36 (Kawasaki et al 1996), EM790 (unknown mutant locus), and the parents Kinmaze (the parents of EM5, EM10, EM12, EM36) and Taichung65 (the parent of EM790) were harvested in Fukuoka, Japan. Milky Queen (low amylose rice) was harvested in Hiroshima, Japan.

Brown rice (150 g, moisture content of 13.8%) was polished to 70% of original weight using a milling machine (TM-05; Satake Co. Ltd., Higashi-Hiroshima, Japan) at a rate of 1,000 rpm. The moisture of the polished rice was adjusted to 13.5% in a humidity chamber. Rice flour was prepared by milling the polished rice using an automated crusher (AC1A, Satake). Rice flour was passed through a 300-μm mesh sieve.

Starch was isolated from 70% polished rice grain flour by the alkali method (Yamamoto et al 1981). Fractionation of the rice endosperm starch into amylose and amylopectin was performed under a nitrogen atmosphere to avoid oxidative degradation (Lansky et al 1949) with modifications (Takeda and Hizukuri 1986). Amyloses were purified by ultracentrifugation, and purities were determined by gel-filtration chromatography (Takeda et al 1984) on Toyopearl HW-75S (Toso, Tokyo, Japan).

¹ National Research Institute of Brewing, 3-7-1, Kagamiyama, Higashihiroshima 739-0046, Japan.

² Corresponding author. Phone: +81-82-420-0812. Fax: +81-82-420-0803. E-mail: okuda@nrib.go.jp

³ Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812-8581, Japan.

Roles of isoamylase and ADP-glucose pyrophosphorylase in starch granule synthesis in rice endosperm

Yasushi Kawagoe^{1,*}, Akiko Kubo², Hikaru Satoh³, Fumio Takaiwa¹ and Yasunori Nakamura²

¹Department of Plant Biotechnology, National Institute of Agrobiological Sciences, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba 305 8602, Japan,

²Department of Biological Production, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, Shimoshinjo-Nakano, Akita-City 010 0195, Japan, and

³Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyusyu University, Hakozaki 6-10-1, Fukuoka 812 8581, Japan

Received 16 November 2004; accepted 24 December 2004.

*For correspondence (fax +81 29 838 8397; e-mail kawagoe@nias.affrc.go.jp).

The biological and chemical materials that are used in the present study will be available upon request (not commercially available).

Summary

Amyloplast-targeted green fluorescent protein (GFP) was used to monitor amyloplast division and starch granule synthesis in the developing endosperm of transgenic rice. Two classical starch mutants, *sugary* and *shrunk*, contain reduced activities of isoamylase1 (ISA1) and cytosolic ADP-glucose pyrophosphorylase, respectively. Dividing amyloplasts in the wild-type and *shrunk* endosperms contained starch granules, whereas those in *sugary* endosperm did not contain detectable granules, suggesting that ISA1 plays a role in granule synthesis at the initiation step. The transition from phytoglycogen to *sugary*-amylopectin was gradual in the boundary region between the inner and outer endosperms of *sugary*. These results suggest that the synthesis of *sugary*-amylopectin and phytoglycogen involved a stochastic process and that ISA1 activity plays a critical role in the stochastic process in starch synthesis in rice endosperm. The reduction of cytosolic ADP-glucose pyrophosphorylase activity in *shrunk* endosperm did not inhibit granule initiation but severely restrained the subsequent enlargement of granules. The *shrunk* endosperm often developed pleomorphic amyloplasts containing a large number of underdeveloped granules or a large cluster of small grains of amyloplasts, each containing a simple-type starch granule. Although constriction-type divisions of amyloplasts were much more frequent, budding-type divisions were also found in the *shrunk* endosperm. We show that monitoring GFP in developing amyloplasts was an effective means of evaluating the roles of enzymes involved in starch granule synthesis in the rice endosperm.

Keywords: rice endosperm, starch biosynthesis, isoamylase, ADP-glucose pyrophosphorylase, GFP, amyloplast.

Introduction

The two major components of starch in rice endosperm are amylose and amylopectin, which are stored together in the form of starch granules in the stroma of amyloplast. The shape and size of granules are characteristic of the tissues as well as species (Jane *et al.*, 1994). Amyloplasts in the rice endosperm contain up to 80 starch granules per amyloplast and the granule size is generally larger in the inner endosperm (Hoshikawa, 1968). A series of mutants deficient in starch biosynthesis, generated with the chemical mutagen *N*-methyl-*N*-nitrosourea (NMU), have provided new insights into the complex mechanisms of starch biosynthesis in rice endosperm (Satoh and Omura, 1981; Satoh

et al., 2003). The *sugary* (*sug*) mutants produce water-soluble α -glucan, referred to hereafter as phytoglycogen, which contains more frequent and randomly located branches throughout the molecule compared with amylopectin with repeated unit structure referred to as amylopectin cluster (Kubo *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2003). The production of phytoglycogen is caused by the reduced activity of isoamylase1 (ISA1), a starch debranching enzyme (Kubo *et al.*, 1999), encoded by a single copy gene on chromosome 8 (Fujita *et al.*, 1999). Another characteristic of *sug* is that the outer endosperm of some, but not all, mutant lines develops amyloplasts containing

Award Lecture

Study on Temporal and Spatial Expression of the Sporulation-inhibitory Gene of a Conjugative Plasmid during Differentiation in *Streptomyces*.

Katsumi Doi*

Microbial Genetics Division, Institute of Genetic Resources, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

(Received May 31, 2005)

INTRODUCTION

Streptomyces are well known for the biosynthesis of secondary metabolites such as antibiotics, and for a complex cycle of morphological differentiation on solid media. The cycle begins with a spore, which germinates to give rise to a branching network of multinucleoid hyphae known as the substrate mycelium. Morphological differentiation commences with the formation of specialized aerial hyphae, which grow into the air away from the surface of the colony. Later these aerial hyphae undergo septation into uninucleoid compartments, and metamorphose into chains of strain-specified pigmented spores. However, in many *Streptomyces* species grown in liquid culture, such complex morphological differentiation has not been observed. They generally exhibit two shapes that dispersed nutrient mycelia and pellets (a spherical dense collection of mycelia) depending on the respective culture conditions and characteristics of the strains¹.

Pock formation is a well known phenomenon in morphological differentiation of *Streptomyces* species that rise into small circular areas of retarded growth in lawns. Bibb *et al.* first reported it as the transient inhibition of growth of a *Streptomyces* culture with conjugation, and called it "lethal zygotosis" by analogy with the situation involving the F plasmid of *E. coli*². The reaction is believed to be a direct consequence of the conjugation of the plasmid from donor to recipient. If a plasmid-harboring donor is plated onto agar plates together with an excess of plasmid-free recipient, plasmid transfer is associated with the formation of characteristic pock structures due to macroscopically visible growth inhibition zones. Within this pock structure, the morphological differentiation of the recipient that has newly acquired a plasmid is temporarily retarded. Originally this effect was assumed to be an actual killing of the recipient by the conjugation process. Thus, *kil* genes were identified on many *Streptomyces* conjugative plasmids, and these genes have since been referred to as *kil/tra* in relation to their new function of intercellular plasmid transfer^{3,4}.

Ogata *et al.* first reported another kind of pock, a spontaneously developing pock, in *Streptomyces azureus* ATCC14921, and then in *Streptomyces hygroscopicus*

JCM4213⁵. In this pock, lysis of aerial and sporulating hyphae is observed with the production of a large number of defective phage or phage-like particles, but neither lysis nor phage particle production in the substrate mycelia has been observed. The spontaneously developing pocks often appear during serial subcultures of normal plate cultures. The number of spontaneously developing pocks in eroded colonies go on increasing with repeated transplantation in solid media. The eroded cultures can be readily restored to normal conditions using liquid shaking cultures⁵. The formation of spontaneously developing and conjugative pocks might share certain similarities; this because plasmids play important roles such as site-specific integration, intermycelial transfer, intramycelial transfer and growth inhibition⁶.

In this paper, I introduce the structural and functional characters of integrative and conjugative plasmids in *S. azureus* and *Streptomyces laurentii*. Especially, I analyze and describe the temporal and spatial expression of the sporulation-inhibitory (*spi*) gene in plasmid pSA1.1 during morphological differentiation in *S. azureus*.

Integrative and conjugative plasmid related with pock formation in *S. azureus*

Wild-type strain, PK0, of thiostrepton-producing *S. azureus* carried one copy or less of plasmid pSA1, which elicited pocks at 0.1 to 1.0%. The UV-irradiated mutant of strain PK0, strain PK100, carried 30 or more copies of pSA1.1, a derivative of pSA1⁷. The plasmid pSA1.1 elicited pocks at 100% and inhibited sporulation and thiostrepton production. No evident differences between pSA1 and pSA1.1 were detected by restriction analysis and Southern hybridization. A point or small mutation on a low copy number plasmid pSA1 might devolve to a multi copy derivative, pSA1.1. The size of pSA1.1 is 9,014bp (GenBank; AB010724), and 11 genes and 3 sites were identified on the plasmid (Fig. 1)⁸. The sporulation inhibitory (*spi*) gene (1,326 bp) was identified by its intermycelial transfer and sporulation-inhibitory functions that differed from the *Kil* functions of other *Streptomyces* conjugative plasmids such as pIJ101 and pSN22^{9,10,11}. The putative polycistronic operon containing the *impSA* and *impSB* genes was identified upstream of the *spi* gene from

*Corresponding author. Phone: +81-92-642-3059. Fax: +81-92-642-3059. E-mail: doi@agr.kyushu-u.ac.jp

3. 総説等要旨

微生物遺伝子分野

農芸化学の事典

・生理・代謝

533

4.4

構造・生理・代謝

4.4.1 細胞の構造

細胞は大きく2種類に分類される。一つは動物・植物および真菌・原虫を含む真核生物 (eukaryote) と呼ばれるもので、複数の染色体からなる核は核膜によって覆われ、有糸分裂を行い、小胞体やミトコンドリアなどを細胞内に保有する複雑な細胞構造をとっている。これに対し細菌は原核生物 (prokaryote) と呼ばれ、染色体は1個で核膜を有していない。このほかにも両者の間では表 4.8 に示しているような相違点がある。

a. 細菌の構造

細菌の大きさは菌種によって異なるが、0.1~数 μm である。形は桿菌、球菌、らせん菌に大きく分けられる。この形の違いは細菌細胞壁の構成基本成分であるペプチドグリカンの形成形態によって決まる。例えば、桿菌を破碎したのちに電子顕微鏡で観察すると、その細胞壁は菌の内容物が失われたあとでも桿状構造として観察される。細菌は分類上グラム陽性菌と陰性菌に大別される。これは、グラム染色法により区別されるもので、最初のクリスタル紫で染色されアルコールにより脱色されないものをグラム陽性菌といい、アルコールで脱色され、後染色のフクシン赤で染

表 4.8 細菌 (原核生物) と真菌 (真核生物) の主な相違点

主要構造物	細菌	真菌
核*	核膜なし	核膜あり
染色体	1本	複数本
ミトコンドリア	なし	あり
小胞体	なし	あり
リボソーム	70S (50S+30S)	80S (60S+40S)
細胞壁基本成分	ペプチドグリカン、 タイコ酸、LPS	キチン、 β -グルカン、 マンナン、ガラクトマンナン

* 細菌の場合は核様体とも呼ばれる

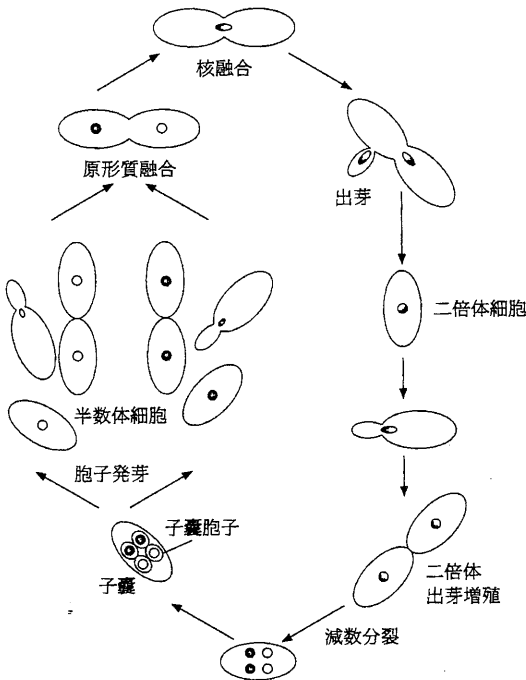


図 4.23 ヘテロタリック酵母の生活環

呼ぶ。他方、aあるいは α どちらかの接合型の胞子を分離し発芽させると、同じ接合型をもつ細胞間で接合が起こり、安定な二倍体細胞に戻る株をホモタリック株と呼ぶ。

また、粘菌 (slime molds) では、独自性をもったアメーバ状の栄養細胞が多数集合凝集して集塊状になり、分化を行い、精巧な子実体とその内部に胞子を形成するきわめて特異的な生活環が知られている。

〔梅田昭子・土居克実・緒方靖哉〕

文 献

- 1) 柳田友道：微生物科学3，形態形成，59-189，学会出版センター (1982)
- 2) Stanier, R. Y. et al.: The Microbial World, 5th ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA (1986)
- 3) 石川辰夫編著：図解 微生物学ハンドブック，丸善 (1999)

4.4.3 生育環境と生理

微生物の生育環境はきわめて多様であり、過酷な環境にも多くの微生物が生息している。微生物の生育環境は以下のように大きく三つの項目に整理できる。

4. 講演要旨

家蚕遺伝子開発分野

蛋白質と酵素の構造と機能に関するシンポジウム（長崎）

Bombyx mori 抗酸化酵素（カタラーゼならびにスーパーオキシドジスムターゼ）のクローニングとその発現解析

山本幸治、伴野 豊、藤井 博

九州大学大学院農学研究院

（目的）過酸化水素やスーパーオキシドアニオン等の活性酸素は、反応性が高く生体内においてタンパク質、DNA、炭水化物や膜脂質に障害を及ぼす。放射線、紫外線そして農薬剤などによって生じた活性酸素の毒性に対して昆虫がどのような防御機構を有するのか不明である。スーパーオキシドジスムターゼ（SOD, EC 1. 15. 1. 1）は、スーパーオキシドアニオン（ O_2^- ）を過酸化水素と酸素に分解し、またカタラーゼ（CAT, H_2O_2 oxidoreductase; EC 1. 11. 1. 6）は、過酸化水素を水と酸素に分解する反応を触媒する。そこで本研究では、カイコ *Bombyx mori* における活性酸素抑制機構を知ることが目的とし、SOD ならびに CAT 遺伝子のクローニング、塩基配列決定そしてそれらの発現解析を行った。

（方法）クローニングは、*Drosophila melanogaster* のホモログ配列ならびにカイコ EST database に登録されている配列を基にプライマーを作製し、RT-PCR にて行った。リコンビナント酵素は、大腸菌 Rosetta (DE3) 株と発現ベクター pET28a を用いて作製した。SOD 活性は、xanthine oxidase により xanthine が uric acid に触媒される過程で生じる O_2^- を用い、テトラゾリウム塩の酸化反応阻害率を指標とした。CAT 活性は、過酸化水素の分解率を指標とした。

（結果と考察）SOD 遺伝子の塩基配列はショウジョウバエ、線虫およびゼブラフィッシュのそれと 60%、CAT 遺伝子は 55-70% の相同性を示した。それらの翻訳産物が活性を有するのか、大腸菌を用いてリコンビナント酵素を作製したところ有意な活性が認められた。精製した SOD は、60°C 以下そして pH4 から 10、CAT は、50°C 以下そして pH7 から 11 の範囲で安定であった。次に幼虫の fat body, midgut, testis, ovary, hemocyte そして silk gland の SOD ならびに CAT 活性を測定したところ、すべての組織において活性が認められた。また RT-PCR を行った結果、SOD/CAT mRNA は、活性と同様すべての組織において検出され、広く分布していることが判明した。さらに、放射線（γ線、100 Gy）を幼虫に照射したところ fat body において SOD/CAT 活性ならびに mRNA 量の増加が観察されたことから、両酵素は放射線によって生じた活性酸素の抑制に関与する可能性が示唆された。今後は、SOD/CAT の発現調節について検討する予定である。

カイコの低分子熱ショックタンパク質について

○坂野大介¹・李 斌^{1,2}・重岡佑一³・中村聖子³・山本幸治¹・

伴野 豊¹・藤井 博¹・麻生陽一¹

(¹九大院農・²中国・西南大・³九大院生資環)

【目的】 低分子熱ショックタンパク質 (sHSP) は、分子量 15-30kDa のタンパク質で生体内において恒常的に発現し、熱ショックにより発現量が増加する。主にβシート構造から構成され、内部にαクリスタリン・ドメインをもつ。昆虫の sHSP に関する研究例はきわめて少なくその機能は明らかになっていない。我々は、以前報告したように 6 種類のカイコ sHSP 遺伝子の完全長配列を明らかにしている。これらの sHSP はアミノ酸配列が非常に類似しているにもかかわらず、熱ストレスに対する応答性やイントロンの有無などの相違がみられる。そこで、大腸菌による大量発現系を構築し、それぞれのタンパク質の持つ性質を明らかにする目的で以下のように研究を進めた。

【材料と方法】 sHSP19.9 および sHSP20.8 遺伝子を pET28a ベクターに挿入し大腸菌 Rosetta(DE3)株内で大量発現させ、N 末端に His-Tag が付加した組み換えタンパク質を得た。組み換え体は Ni-NTA カラムによるアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。sHSP19.9 および sHSP20.8 が分子シャペロン様の活性を有するかどうかについてクエン酸合成酵素 (CS) の熱変性による凝集の抑制を指標にして調べた。さらにオリゴマーの大きさを

セファクリル S-300 カラムのゲルろ過により調べた。ゲルろ過で分離したタンパク質ピークは超遠心によりその均一性を確認した。

【結果と考察】 どちらの sHSP も濃度依存的に CS の熱変性による凝集を抑制し、分子シャペロン活性持つタンパク質であることがわかった。ゲルろ過の結果 2 つのピークが現れた。超遠心による沈降パターン分析からゲルろ過で得られた 2 つのピークのうち分子量の大きなほうは大きさの異なる複数のオリゴマーが混在しており、低分子のピークは均一な分子種の集まりであると推察した。非還元 SDS-PAGE では sHSP20.8 は 2 量体と単量体が検出できるのに対し sHSP19.9 は単量体のみが検出された。還元 SDS-PAGE に供するとどちらのタンパク質も一本のバンドが検出できた。すなわち sHSP19.9 と sHSP20.8 はどちらも内部に一箇所システイン残基が存在するが S-S 結合の有無が異なっていた。この S-S 結合に起因するオリゴマー形成様式の相違はタンパク質の機能の違いに関連し、生体内での役割が異なるのではないかと考えている。

Sakano, D., Li, B., Shigeoka, Y., Nakamura, S., Yamamoto, K., Banno, Y., Fujii, H. and Aso, Y.: Small heat shock protein of the silkworm, *Bombyx mori*.

第 75 回日本蚕糸学会 (東京)、2005 年

101

カイコ形質連鎖地図の第 24 連鎖群と第 27 連鎖群に関する問題

○ 伴野 豊・江口誠一・田村 圭・西川和弘・西坂章文・
坂野大介・山本幸治・藤井 博 (九大院・農)

カイコ形質連鎖地図は、染色体数から予測される 28 連鎖群のうち、27 群までが明らかにされ、残る 1 つの未知群には *E-tr* が暫定的に割り与えられている (藤井ら、1998)。ところが分子マーカーを用いた解析から第 27 と第 24 形質連鎖群は異なる連鎖群ではなく、同一であると示唆される結果が得られた (伴野ら、2004)。そこで、第 24 連鎖群に所属する黄浮黄体色 *Sel*、不全翅 *tyw*、第 27 連鎖群所属の黄起 *Ym*、優性黄体色 *Xan* の各形質変異体をマーカーに連鎖関係を遺伝学的に追究した。4 つの変異体のうち、3 形質はいずれも黄体色に関する変異であるので、成虫の翅の形成が正常に比べ小さい不全翅 *tyw* と 3 種類の黄体色変異に関して連鎖関係の有無を検定した。*Sel/tyw*♀×*tyw/tyw*♂においては *Sel*+:*Sel tyw*:+ +: *tyw* の表現型が 292:9:17:224 (4 区計) に分離した。*Ym/+*, *+/tyw*♀×*+/+*, *tyw/tyw*♂では *Ym*+:*Ym tyw*:+ +: *tyw* の表現型が 351:10:41:202 (6 区計) に分離し、*Xan/+*, *+/tyw*♀×*+/+*, *tyw/tyw*♂では *Xan*+:*Xan tyw*:+ +: *tyw* が 707:2:192:518 (9 区計) に分離した。不全翅 *tyw* は形質の変異が大きく原系統のホモの相互交配でも正常な翅に近い個体が出現する場合のあること、3 種類の黄体色変異体もヘテロ個体では正常に近い形質が現れるケースも観察している。以上を考慮すると、不全翅 *tyw* と 3 種類の黄体色変異は同一連鎖群の遺伝子に支配される形質と判断される。

第 75 回日本蚕糸学会 (東京)、2005 年

311

絶食処理に伴うカイコの体液タンパク質の経時的変動とプロテオーム解析

○王 永強^{1,2} 張 平波¹ 藤井 博¹ 伴野 豊¹ 山本 幸治¹
麻生 陽一¹ (1. 九大院農、2. 中国・浙江農科院)

カイコの体液タンパク質の濃度と成分が発育に伴って大きく変動することが既に報告されている。本研究は、絶食処理に伴う生理機能の変化をタンパク質レベルで明らかにするために、絶食幼虫の体液タンパク質成分の経時的変動についてプロテオミクスを用いて分析した。材料は九州大学保存の系統 p50 の雌個体を用いた。絶食処理: 5 齢起蚕から 2 日食桑させた後、絶食させた AS 区; 3 日食桑させた後、絶食させた BS 区; 5 齢全齢期食桑させた対照区 (CONT) を設定した。各区 5 齢 2 日目から上簇まで毎日体液を採取し、それぞれのタンパク質量 (150μg) を二次元電気泳動で分離し、PD-Quest 2D-ゲル分析ソフトウェアを用いて、タンパク質パターンを比較分析した。その結果、2 日目から上簇まで AS、BS と CONT 間で異なるスポットが認められなかった。次いで、73 個タンパクスポットについて濃度変化を経時的に調べた結果、23 個 (31.5%) は、処理区と CONT 区がほぼ同じパターンを示した。22 個 (30.1%) は、処理区が高いパターンを示し、BS 区よりも AS 区が高かった。残りの 28 個 (38.4%) は、処理区が低く、AS 区が最も低かった。さらに、MALDI-TOF-MS を用いて、73 個スポットを同定した。

第 75 回日本蚕糸学会 (東京)、2005 年

312

変態期中腸の膜画分に存在する 30kDa リポタンパク質の局在様式

○ 上野由宣¹・岡田太郎¹・山本幸治²・伴野豊²・藤井博²

(1. 九大院生資環、2. 九大院農)

変態期中腸の膜画分には体液キモトリプシンインヒビターCI-8 の受容体と考えられる結合タンパク質が存在する。これらの内、一つは 30kDa リポタンパク質ファミリーに属するタンパク質であった。このタンパク質の中腸での局在様式を調べた。

熟蚕中腸を用いた組織表面標識と免疫組織学的手法により、中腸の 30kDa リポタンパク質が組織表面に存在していることを確認した。また、膜画分の 30kDa リポタンパク質は高濃度の塩では膜から溶出されないが、界面活性剤で可溶化した。このことより、30kDa リポタンパク質は中腸の膜タンパク質として存在することが予測された。次に、トリプシン処理により膜画分から 30kDa リポタンパク質の細胞外ドメイン由来のペプチドを遊離させた。遊離ペプチドを免疫沈降法で回収後、マスマッピングで分析し、30kDa リポタンパク質の細胞外ドメインを決定した。さらに、遊離ペプチドの CI-8 に対するアフィニティークロマトグラフィーを行い、回収したペプチドのマスマッピングを行った。その結果、30kDa リポタンパク質の CI-8 結合部位は細胞外ドメインの C 末端側と判明した。以上の結果から、中腸の 30kDa リポタンパク質は膜タンパク質として変態期中腸組織表面に存在し、その細胞外ドメインの C 末端部位を介して体液の CI-8 と結合する受容体として機能すると考えられた。

第 75 回日本蚕糸学会 (東京)、2005 年

319

カイコの低分子量 heat shock protein の分子シャペロン活性

○ 李 斌^{1,2}・坂野 大介¹・張 平波³・麻生 陽一¹・山本 幸治¹・伴野 豊¹・藤井 博¹ (1. 九大院農、2. 中国・西南農大、3. 九大院生資環)

我々は、homology 分析により、カイコゲノム Scaffold に 14 種類の sHSP 遺伝子が存在すると推察した。これまでに 6 種類の sHSP 遺伝子をクローニングし、その完全長の塩基配列を決定した。これらの ORF にはそれぞれ 19.9、20.1、20.4、20.8、21.4、23.7 kDa の分子量で、sHSP ファミリーに共通なドメインやシャペロン活性調節に重要な配列がコードされていた。さらに、熱ストレスに対する mRNA 発現量の応答について検討したところ、熱ストレスにより 21.4 kDa の sHSP を除くすべての sHSP の mRNA の発現量が増加することを明らかにした。sHSP タンパク質は細胞質内の他のタンパク質の成熟化や変性による凝集の阻害に関わる分子シャペロンとして機能していると考えられる。

そこで、これらのタンパク質の機能を解析するために、3 つの sHSP 配列の N 末端に 6-His 配列を付加したリコンビナント sHSP を大腸菌で発現させ、sHSP を分離精製した。これらのタンパク質を用いて、熱変性したタンパク質の凝集阻害を指標にシャペロン活性を測り、これら 3 つの sHSP タンパク質の分子シャペロン活性を比較検討した。なお、各々の sHSP がシャペロン活性に必要なオリゴマー形成をするかも検討中である。

第 75 回日本蚕糸学会 (東京)、2005 年

320

カイコ small heat shock protein と相互作用するタンパク質の探索

○坂野 大介¹・張 平波²・李 斌²・麻生 陽一¹・山本 幸治¹・伴野 豊¹・藤井 博¹ (1. 九大院農、2. 九大院生資環)

カイコの small heat shock protein (sHSP)のうち sHSP 20.8 を大腸菌内で発現させた。この発現タンパク質(rsHSP20.8)がシャペロン活性を有することを既に報告している。

sHSP は熱によって発現が誘導され単量体が複合体形成することが一般的に知られているが、相同性の高いアイソフォームが複数存在し、それらがホモ型あるいはヘテロ型で結合することで分子シャペロンとしての活性が調節されることが報告されている。

そこで、カイコ体内で sHSP20.8 と他の sHSP が複合体を形成するのか否か、そして sHSP と相互作用する sHSP 以外のタンパク質を探索する目的で、5 齢 3 日の幼虫から脂肪体および後部絹糸腺を摘出し、rsHSP20.8 に親和性を示すタンパク質を回収した。回収したタンパク質は二次元電気泳動し、36 個のスポットを検出した。これらのスポットをゲル内でトリプシン消化し、ペプチドマスフィンガープリントを行ったところ、sHSP と考えられるスポットが 6 個存在したことから、生体内での sHSP 複合体形成の存在を明らかにした。また、sHSP 以外にも rsHSP20.8 と相互作用するタンパク質が検出されたことから、sHSP が生体内で機能する上で sHSP 以外のタンパク質との相互作用が何らかの役割を果たしていると考え、解析を進めている。

第 75 回日本蚕糸学会 (東京)、2005 年

321

カイコ浸酸卵中のリン酸化 small heat shock protein (sHSP) の存在

○張 平波¹・坂野 大介²・李 斌²・麻生 陽一²・山本 幸治²・伴野 豊²・藤井 博² (1. 九大院生資環、2. 九大院農)

既に産下 20 時間後に浸酸処理をした卵と浸酸処理をしない卵の中に 11 種の sHSP が存在していることを免疫沈降法と二次元電気泳動で分析した結果、処理区では 3 種の sHSP が無処理区に比べて少し酸性側に shift することが認められた。そこで、この原因を調べるために、免疫沈降法で単離した sHSP のペプチドマスフィンガープリント分析を行い、その後、アルカリ性ホスファターゼを用いペプチドの脱リン酸化処理を行って質量を測定した。質量が 80 Da 減少すれば、リン酸化型と非リン酸化型の sHSP を区別できる。その結果、浸酸処理区の 11 種の sHSP 中 8 種の sHSP は脱リン酸化処理をしてもペプチドの質量に減少が認められなかった。しかし、24.5 kDa、25.4 kDa と 26.3 kDa の sHSP は脱リン酸化処理をしたペプチドの質量に減少が認められた。したがって、これら 3 種の sHSP はリン酸化されていることが判明した。以上より、浸酸処理卵では sHSP のリン酸化が卵の発育に重要な役割を果たしていると考えられる。

第 75 回日本蚕糸学会 (東京)、2005 年

322

大腸菌での CI-b1 の大量発現および CI-b1 結合タンパク質の探索

○何 寧佳 藤井 博 日下部宜宏 麻生陽一 伴野 豊 山本幸治
(九大農学研究科)

Kunitz 型キモトリプシンインヒビターはカイコ体液から数種が分離・精製され、そのアミノ酸配列ならびに遺伝子の塩基配列が明らかにされている。これらのインヒビターはそれぞれ別々の生理機能を担っていると考えられているが、それらの機能に関しては、いまだ解明されていない。我々は塩基性の CI-b1 に着目し研究を行っている。これまでの研究により、CI-b1 はカイコの自然免疫機構に関与する特異的な因子として働いていることが示唆されている。しかしながら、生体内で、CI-b1 と作用する内在分子の存在に関しては不明である。そこで、*in vitro* 分離系を用いて内在分子の分離を試みた。まず、N 末端にヒスチジンタグを付加したリコンビナント CI-b1 (rCI-b1) を大腸菌で大量発現させた。この rCI-b1 はタグ部分を含めて分子量約 10kDa で、生体内の CI-b1 とほぼ同一の性質を持っていた。この rCI-b1 を Ni-NTA resin と結合させた rCI-b1-Ni-NTA resin を用いて、LPS で免疫した体液との結合分析を行った。溶出画分を抗 CI-b1 抗体により Western blot を行ったところ、26kDa バンドを検出した。その結果から、CI-b1 は分子量約 16kDa のタンパク質と強く結合していることが示唆された。

第 75 回日本蚕糸学会 (東京)、2005 年

323

Bombyx mori グルタチオン S-トランスフェラーゼのクローニングならびに機能解析

○山本幸治¹・張 平波²・麻生陽一¹・伴野 豊¹・藤井 博¹
(1.九大院農、2.九大院生資環)

エネルギー代謝に伴って生じる活性酸素種により生体の構成成分は様々な修飾を受ける。活性酸素種の膜脂質への作用によって生じる脂質過酸化物は、求核化合物であり反応性が高く生体内において有害である。グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST, EC 2.5.1.18) は、化学薬剤や内因性の求核化合物にグルタチオン抱合を行い解毒に働く酵素である。カイコ (*Bombyx mori*) における脂質過酸化解毒機構を知ることを目的とし、カイコ GST をクローニングし、その機能の解析を行った。5 齢幼虫の脂肪組織、中腸、血球、絹糸腺、精巣そして卵巣に含まれる GST 活性を測定したところ、すべての組織において活性が認められた。最も活性の高かった脂肪組織より GST 遺伝子を単離した。その塩基配列はイエバエおよびショウジョウバエのそれと約 60% の相同性を示した。その配列を基に RT-PCR を行った結果、GST transcript が、活性と同様、上記すべての組織において検出された。次に大腸菌を用いて組換え GST を作製したところ、可溶性の酵素タンパク質が得られた。精製した GST は、50 °C 以下 (pH 8.5) として pH 4-11 (4 °C) で安定であった。また、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼンあるいは脂質過酸化物である 4-ヒドロキシノネナールへのグルタチオン抱合活性を有し、Km 値はそれぞれ 184 μ M および 144 μ M であった。以上のことよりカイコ GST は、膜脂質の酸化的障害の修復に関与することが示唆された。

シンポジウム

カイコ抗酸化酵素群の機能解析

山本 幸治

九州大学大学院農学研究院

酸素には、 O_2 のほか、反応性の高い活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) がある。ROS にはスーパーオキシドアニオンや過酸化水素等が含まれる。ROS は、環境変化や薬剤、放射線、紫外線などの外的刺激によって生じる。また、生体内の代謝反応、例えば電子伝達系や昆虫特有の防御反応であるメラニン化に伴って生じる。これらの要因により生成した ROS は、タンパク質、炭水化物や膜脂質に障害を及ぼす。ROS に対する防御反応を解明するため、演者は、カイコ (*Bombyx mori*) より ROS 消去能を有する数種の抗酸化酵素 (スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ (CAT) そしてグルタチオン転移酵素 (GST) を同定してきた。GST は農薬や環境汚染物質等の生体異物にグルタチオン (GSH) 抱合を行い解毒に働く薬剤代謝酵素でもある。ここでは、演者が最近行ってきた、いくつかの抗酸化酵素についての研究内容とともに、薬剤代謝酵素としての視点から GST について調べた結果を紹介したい。

(1) 抗酸化酵素の同定

SOD (EC 1. 15.1. 1) は、スーパーオキシドアニオン (O_2^-) を過酸化水素と酸素に分解し、また CAT (EC 1. 11. 1. 6) は、過酸化水素を水と酸素に分解する反応を触媒する。カイコにおける ROS 調節機構を

知ることを目的とし、2種類の SOD (銅亜鉛型 SOD; Cu/ZnSOD, マンガン型 SOD; MnSOD) ならびにヘム結合型 CAT を同定した。Cu/ZnSOD ならびに MnSOD cDNA の塩基配列はショウジョウバエ、線虫およびゼブラフィシュのそれと 60% の相同性を示し、CAT cDNA は 55-70% の相同性を示した。それらのアミノ酸配列中には、それぞれの金属結合サイトが高度に保存されていた。また、大腸菌を用いて組換え酵素を作製したところ、必須金属イオン存在下で有意な ROS 分解活性が認められた。

SOD/CAT により分解できなかった ROS は、膜脂質へ影響を及ぼす。その結果生じる脂質過酸化物は、反応性が高く生体内において有害である。その脂質過酸化物解毒機構を知ることを目的とし、カイコ GST (EC 2.5.1.18) を同定し、その機能の解析を行った。GST cDNA の塩基配列はイエバエおよびショウジョウバエのそれと約 60% の相同性を示した。大腸菌を用いて組換え GST を作製したところ、可溶性の酵素タンパク質が得られた。精製した GST は、1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB) あるいは脂質過酸化物である 4-ヒドロキシノネナール (4-HNE) へのグルタチオン抱合活性を有し、 K_m 値はそれぞれ $184 \mu M$ および $144 \mu M$ であった。以上のことからカイコ GST は、膜脂質の酸化的障害の修復に関与することが示唆された。

カイコのフィブロイン構成成分 P25 Isoforms に関するプロテオミクス研究

○張平波¹・麻生陽一²・坂野大介²・王永強^{2,3}・

山本幸治²・伴野 豊²・藤井 博²

(¹九大院生資環・²九大院農・³中国・浙江農科院・蚕研所)

【目的】 P25 は、カイコの絹糸腺で合成されるフィブロイン[(H-L)₆-P25]の構成ペプチドの 1 つである。フィブロインタンパク質 (H鎖やL鎖) には多くの変異型が存在し、それらの遺伝分析が行われた。しかしながら、P25 に関しては 30kDa と 27kDa の 2 分子の存在が報告されているが、変異型の存在は不明である。そこで、我々はフィブロイン構成成分の一つである P25 のプロテオミック解析を行い、その多型を調べた。

【材料と方法】 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 FL501 である。5 齢 5 日の絹糸腺を採取し、前部、中部そして後部より粗タンパク質抽出液を調製し、IPGphor 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等電点電気泳動を行った。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。

【結果と考察】 1) 絹糸腺の前部、中部そして後部より粗タンパク質抽出液を調製し、プロテオミクスにより調べたところ、中部糸腺に 8 つの p25 成分 (isoforms) が存在することを認めた。等電点を指標にして、P25-I (pI7.14), II (7.38), III (7.70) と IV (8.05) の 4 グループに分類した。各グループは、30kDa と 27kDa の一対の isoforms を含んでいた。2) それぞれの isoform をペプチドマスフィンガープリント法を用いて解析したところ、P25-III と IV は *B. mori* の祖先種である *B. mandarina* の P25 と一致した。*B. mori* 絹糸腺に *B. mandarina* の P25 が存在することを明らかにした。この結果は、フィブロインの進化を考える上で興味ある結果である。3) Isoform の生じる原因の 1 つの可能性としてリン酸化が考えられたので、ホスファターゼ処理を行ったところ、P25-II の 30kDa はリン酸化されていたが、P25-IV の 30kDa はリン酸化されていなかった。P25 の多様性は、グリコシル化およびリン酸化に起因することを明らかにした。

Zhang, P., Aso, Y., Sakano, D., Wang, Y., Yamamoto, K., Banno, Y. and Fujii, H.: Proteomic studies of isoforms of the P25 component of *Bombyx mori* fibroin.

19

体液キモトリプシンインヒビター CI-8 による カイコシステインプロテアーゼ BCP の阻害

○上野由宣¹・山本芳実²・高橋 進²・伴野 豊³・山本幸治³・藤井 博³

(¹九大院生資環・²山口大農・³九大院農)

【目的】 我々は、組織崩壊過程の幼虫中腸内に体液キモトリプシンインヒビター、CI-8 により阻害される 3 種類のプロテアーゼを見いだした。その一つは、カイコシステインプロテアーゼ、BCP であった。BCP はリソソーム系プロテアーゼの一つであるカテプシン L のカイコホモログで、卵では前駆体として存在し、酸性条件で自己活性化することが知られている。CI-8 はセルピン型インヒビターであり、セリンプロテアーゼと複合体を形成してその活性を阻害することが知られている。また、この反応過程でセルピンの活性部位から C 末端側のアミノ酸配列が放出されることが知られている。CI-8 がシステインプロテアーゼ BCP を阻害する機構を解析した。

【材料と方法】 CI-8 は体液より精製した。BCP は卵より精製した標品を山口大学高橋進名誉教授、山本芳実教授より恵用していただいたものである。*in vitro* による CI-8 の BCP の阻害機構解析は CI-8 に前駆体 BCP、活性化 BCP を混合し反応させた試料の抗 CI-8、抗 BCP 抗体を用いたウェスタンブロットと質量分析により行った。

【結果と考察】 精製した CI-8 と卵から精製した前駆体 BCP を用いてその阻害機構を解析した。CI-8 と前駆体 BCP を混合後、BCP を活性化した場合、CI-8 は BCP と複合体を形成し、BCP の自己活性化を停止させた。また、前駆体 BCP を活性化後、CI-8 を添加した場合、CI-8 は BCP と複合体を形成して BCP 活性を阻害した。以上から、CI-8 は標的セリンプロテアーゼを阻害するように BCP の自己活性化や活性型を阻害することが判明した。また、この反応で放出された CI-8 の C 末端アミノ酸ペプチドの質量を分析した。その結果、ペプチドの質量は中腸内腔液内の標的セリンプロテアーゼの阻害によって生じる CI-8 のペプチド質量と同一サイズであった。したがって、CI-8 は標的セリンプロテアーゼを阻害する場合と同じ活性部位を用いて BCP を阻害したと考えられる。以上のことから、CI-8 は、標的セリンプロテアーゼと同一の反応により、システインプロテアーゼ BCP を阻害すると考えられる。

Ueno, Y., Yamamoto, Y., Takahashi, S., Banno, Y., Yamamoto, K. and Fujii, H.: Inhibition of a *Bombyx* cysteine protease, BCP by a humoral chymotrypsin inhibitor, CI-8.

05

家蚕熱ショックタンパク質 sHSP20.8 の 会合状態に関する研究

○手柴智史¹・坂野大介²・重岡佑一¹・山本幸治²・伴野 豊²・

藤井 博²・麻生陽一²

(¹九大院生資環・²九大院農)

生物に熱ショックをかけると、ヒト眼球
レンズタンパク質 α -クリスタリンの特異
的ドメイン (α -クリスタリン・ドメイン)
と相同性を有し、比較的分子量の小さな
ヒートショックタンパク質 (sHSP) が誘導
される。我々は、家蚕 (*Bombyx mori*) に
は、少なくとも 6 種の sHSP をコードする
遺伝子が存在することを見出した。また、
sHSP20.8 (20.8kDa) を大腸菌で大量発現
させる系を構築し、sHSP20.8 が pH に依存
して凝集することや、クエン酸合成酵素の
熱凝集を抑制することを報告した。

本研究では、ゲルろ過 (Sephacryl S-300)
と Ni-NTA カラムを併用し、大腸菌の LB
培地 1L より、8.3mg の sHSP20.8 を得る
大量調製系を確立した。sHSP20.8 には α -
クリスタリン・ドメインから N 末端側に 1
個の Cys 残基がある。そこで、SDS-ポリ
アクリルアミドゲル電気泳動法により還元
および非還元条件下での sHSP20.8 の状態
を調べた。還元条件下では、ほぼ全ての
sHSP20.8 は単量体として検出された。一
方、非還元条件下では、大部分の sHSP20.8

がジスルフィド結合により 2 量体を形成し、
一部のみが単量体であることが分かった。

次に、ジスルフィド結合を DTT で還元し、
N-エチルマルイミドを加え Cys 残基を修飾
した。修飾 sHSP20.8 は還元および非還元
条件下のいずれの場合もすべて単量体とし
て検出された。しかしながら、DTT 還元
を行わずに修飾したものは、非修飾のもの
と同様の泳動結果となった。また、DTT
還元後、IAEDANS 試薬を用いて Cys 残基
を蛍光修飾したものは非還元条件下では
単量体であることが分かった。さらに、超
遠心機を用いた沈降速度法による分析の結
果、ジスルフィド結合の有無は sHSP20.8
の会合状態に大きな影響を及ぼしていない
ものと推測された。

Teshiba, S., Sakano, D., Shigeoka, Y., Yamamoto, K., Banno, Y., Fujii, H. and Aso, Y.: Studies on assemblage of
sHSP20.8 small heat shock protein from the silkworm, *Bombyx mori*.

S01-5(S5)

アミロペクチン構造改変に関する分子遺伝学的アプローチ

中村保典¹, 藤田直子¹, 内海好規¹, 久保亜希子², P.B. Francisco, Jr.², 大段隆史², 佐藤光³, ¹秋田県大・生物資源, ²CREST, JST, ³九州大・農

植物のアミロペクチンは高度に規則性のある構造(多数のクラスターがタンデム状に連結したタンデムクラスター構造)をしており、合成にはイネで4クラス(AGPase; Starch synthase, SS; Branching enzyme, BE; Debranching enzyme, DBE)、21種類の酵素遺伝子が関与する代謝システムを構成している。各酵素遺伝子が欠損した変異体の解析結果に基づいてデザインした形質転換イネのデンプン表現型から推定される酵素の役割について述べる。特にSSIIa, BEIIb, イソアミラーゼI (ISA1)は、クラスターの基本構造の形成に特異的に関わっており、その活性レベルに応じて顕著な構造のバリエーションが生じ、そのことが原因してデンプンの物性やデンプン粒の結晶構造も変化する。植物種には固有のクラスター構造が認められるが、その原因についても議論する。

S01-6(S6)

イネデンプン変異体の単離と特性解析

佐藤光¹, 中村保典², Tomas W. Okita³, ¹九大院・農, ²秋田県大・生物資源, ³Inst. Biol. Chem. Washington State U.

イネ胚乳澱粉は、細胞質内で基質のADP-Gluを合成後、アミロプラスト内で澱粉合成酵素(SSS)、澱粉枝作り酵素(BE)及び澱粉枝切り酵素(DBE)の共同作用によって合成される。しかし、これらの酵素には各々複数のアイソザイムが存在し、その機能と役割については不明な部分が多い。そこで澱粉生合成の遺伝的制御機構の解明を目的にMNU受精卵処理を行い、胚乳貯蔵澱粉に関する多様な変異体を作製し、解析を行った。shr1及びshr2は各々ADPase-LS及びSSに関する変異であり、澱粉蓄積量を野生型の1/5以下に低下させた。加えて、胚乳で発現する3種のBE各々に変異体を得た。BEI変異はDP13～24及びDP37以上のアミロペクチン分枝を特異的に減少させ、BEIはB1及びB3鎖の形成に関与すると考えられた。同様にBEIIb変異はDP17以下の短鎖を特異的に減少させることから、BEIIbはA鎖の形成に関わると考えられた。BEIIa変異は、胚乳澱粉では鎖長分布には顕著な差異を示さなかった。しかし、葉身澱粉ではDP12以下のアミロペクチン分枝鎖を著しく減少させることから、本酵素は短鎖の形成に関与することが示唆された。これらに加え、sug1やdul～du5、flo1～flo4、Wc1～wc4、opq等澱粉量や組成を変更する多数の遺伝子の存在を確認した。現在、これらについて解析を進めている。

42001 Mis-targeting of rice α -globulin and glutelin RNAs to distinct endoplasmic reticulum subdomains disrupts ER export and transport to the storage vacuole

Washida, Haruhiko-presenter was@wsu.edu (a) Sugino, Aya (a) Satoh, Mio (b) Crofts, Andrew J (a) Crofts, Naoko (a) Katsube-Tanaka, Tomoyuki (a) Ogawa, Masahiro (c) Kumamaru, Toshihiro (b) Satoh, Hikaru (b) Okita, Thomas W (a)

Available evidence from this laboratory has demonstrated a close relationship between the localization of seed storage proteins within the endomembrane compartment and the targeting of their respective RNAs to specific ER subdomains in developing rice endosperm. Prolamine RNAs are targeted to the PB-ER which bound the spherical-shaped prolamine intracisternal inclusion granules (called PB-I), whereas glutelins RNAs are distributed to the cisternal ER whereupon the newly synthesized polypeptide is transported to the irregular-shaped protein storage vacuole (PB-II). Similarly, the maize 10 kD δ -zein and sunflower 2S (SSA) RNAs are targeted to the PB-ER and cisternal ER, respectively and their protein localized to PB-I and PB-II, respectively. When the 10 kD δ -zein RNAs are re-directed from the PB-ER to the cisternal ER by addition of a glutelin 3'UTR, zein proteins are displaced from PB-I to PB-II. Likewise, partial mis-localization of SSA RNA to PB-ER by the addition of 10 kD δ -zein zipcode sequences results in protein localization to PB-I as well as PB-II. This relationship between RNA localization on specific ER subdomains and protein localization within the endomembrane system is seen for all RNAs examined with one exception, the 26 kD α -globulin RNA. Like glutelins, globulins are exported from the ER to PB-II where they occupy the matrix region and surround the crystalline glutelin region of this organelle. *in situ* RT-PCR and confocal microscopy, however, revealed that globulin RNAs are not located on the cisternal-ER, as expected, but instead distributed on the PB-ER. Analysis of mRNA targeting of the rice *Glup5* mutant reveals that globulin RNA is mis-localized to the cisternal-ER. Immunofluorescence and immunocytochemistry analysis shows a major disruption in PB-II formation. Both glutelin and globulin proteins are observed within large proliferating ER membrane complexes and considerable amounts of both proteins are secreted. Likewise, mis-localization of glutelin RNAs to PB-ER shows a similar disruption in PB-II formation. Overall, these results indicate that globulin and glutelin are transported to the protein storage vacuole PB-II by distinct pathways and that co-localization of their RNAs to the same ER subdomain disrupts their normal export and transport to the storage vacuole.

(a) Institute of Biological Chemistry, Washington State University (b) Faculty of Agriculture, Kyushu University (c) Department of Life Science, Yamaguchi Prefectural University

450 Rice α -globulin RNA is targeted to PB-ER and its mis-targeting results in disrupting protein transport to the protein storage vacuole

Washida, Haruhiko-presenter was@wsu.edu (a) Sugino, Aya (a) Satoh, Mio (b) Crofts, Andrew J (a) Crofts, Naoko (a) Katsube-Tanaka, Tomoyuki (a) Ogawa, Masahiro (c) Kumamaru, Toshihiro (b) Satoh, Hikaru (b) Okita, Thomas W (a)

Available evidence from this laboratory has demonstrated a close relationship between the localization of seed storage proteins within the endomembrane compartments and the targeting of their respective RNAs to specific ER subdomains in developing rice endosperm. Prolamine RNAs are targeted to the PB-ER which bound the prolamine ER-luminal inclusion granules (called spherical protein body, PB-I), whereas glutelin RNAs are sorted to the cisternal ER whereupon the newly synthesized polypeptide is transported to the irregular shaped protein storage vacuole (PB-II). Mis-targeting of maize zein and sunflower 2S Albumin RNAs from their normal sites on the PB-ER and cisternal ER, respectively, results in the mis-sorting of the newly synthesized polypeptide to the PB-II and PB-I, respectively. In addition to prolamine and glutelin, rice also accumulates significant quantities of a 26 kD α -globulin. Like glutelins, this protein is exported from the ER to PB-II where it occupies the matrix region and surrounds the crystalline glutelin region of this organelle. *in situ* RT-PCR and confocal microscopy, however, revealed that globulin RNAs are not located on the cisternal-ER, as expected, but instead distributed to the PB-ER. Analysis of mRNA targeting of the rice *Glup5* mutant reveals that globulin RNA is distributed to the cisternal-ER. Immunofluorescence and immunocytochemistry results indicate that both glutelin and globulin proteins are observed in ER lumen and at the periphery of the cells. These results indicate that globulin and glutelin are transported to the protein storage vacuole PB-II by distinct pathways and that co-localization of their RNAs to the same ER subdomain disrupts their normal transport.

(a) Institute of Biological Chemistry, Washington State University (b) Faculty of Agriculture, Kyushu University (c) Department of Life Science, Yamaguchi Prefectural University

220 ○佐藤 美緒¹、竹本 陽子¹、杉野 彩¹、熊丸 敏博¹、小川 雅広²、T.W. Okita³、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) イネ胚乳特異的 PDI 欠損変異 *esp2* の貯蔵タンパク質集積に及ぼす効果

Sato, M.¹, Y. Takemoto¹, A. Sugino¹, T. Kumamaru¹, M. Ogawa², T.W. Okita³, H. Satoh¹ (1. Fac. Agr., Kyushu U., 2. Fac. Life Sci., Yamaguchi P.U., 3. Inst. Biol. Chem. Washington State U.) Effects of *esp2* mutation deficient in endosperm specific protein disulfide isomerase on seed storage proteins in rice.

イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンとプロラミンは、異なる Protein body (PB) に集積する。しかし、*esp2* 変異は、グルテリン前駆体とプロラミンを小胞体(ER)由来の PB 内にジスルフィド(S-S)結合を介した状態で集積する。一方、本変異は S-S 結合を触媒する Protein disulfide isomerase (PDI) を欠損し、遺伝学的解析の結果 *Esp2* 遺伝子が 60kD PDI の構造遺伝子であることが示唆された (102 回大会)。この結果は、60kD PDI の欠損が、ER 内での両タンパク質の分別に重要な役割を果たすことを示している。そこで、*Esp2* 遺伝子と 60kD PDI 遺伝子の異同並びに *Esp2* 遺伝子の機能解明を目的に、ゲノム DNA 解析による *esp2* 遺伝子の変異部位の特定及びイネに存在する PDI ホモログの発現解析を行った。

【材料及び方法】*esp2* 変異系統 CM1787、EM44、EM747 及び野生型の登熟種子、葉及び根を用いた。

葉から抽出した DNA と cDNA は登熟種子由来の cDNA を用いて PDI の塩基配列を解析した。発現解析のために、野生型の種子、葉、根から RNA を調製後、各々の PDI に特異的なプライマーを用いた RT-PCR を行った。

【結果及び考察】野生型における 60kD PDI 遺伝子のゲノム DNA を解析した結果、開始コドンから終止コドンまで 3,310bp であった。さらに cDNA を解析した結果、PDI 遺伝子は 10 個のエクソンから構成され 512 個のアミノ酸をコードしていた。*esp2* 変異体の 60kD PDI 遺伝子のゲノム配列解析を行った。CM1787 は第 3 エクソンに終止コドンの形成、EM44 及び EM747 は、第 8 エクソン両端のそれぞれ第 7 及び第 8 イントロンのスプライシング部位のコンセンサス配列に一塩基置換が認められた (Fig.1)。ナンセンス変異及びスプライシング変異はいずれも正常な mRNA の発現を抑制することが知られており、これらの *esp2* 変異体の胚乳で 60kD PDI の発現が認められないこと (Takemoto et al., 2002) と良く一致する。以上のこ

とから、*Esp2* 遺伝子は、PDI の構造遺伝子であることが明らかとなった。

酵母において PDI 欠損変異体は致死となることが報告されている。*esp2* 変異は 60kDPDI を欠損するにもかかわらず、ほぼ正常な生育を示す。そこで、イネに存在する PDI ホモログをデータベースによって検索した結果、60kD PDI 以外に 8 種類の PDI ホモログが検出された。発現解析の結果、野生型胚乳では 9 種類の PDI の発現が認められ、かつ、60kD PDI 以外は葉と根でも発現が認められた。一方、*esp2* 変異では 60kD PDI 以外の PDI ホモログの発現量は全ての組織で野生型とほぼ同等であった。これらの結果は、*esp2* 変異が正常に生育することは複数の PDI ホモログの存在に起因することを示している。さらに、*esp2* 変異胚乳では PB 以外の細胞内構造はほぼ正常であったことから、60kD PDI は貯蔵タンパク質特異的に作用することを示唆している。

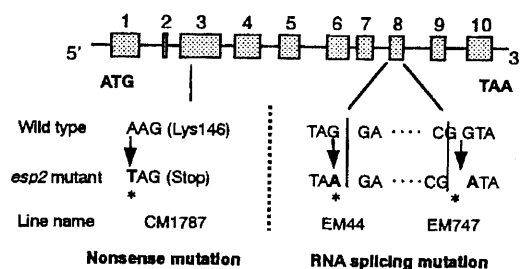


Fig.1. Sites of mutation in three kinds of *esp2* mutant genes. ATG and TAA indicate the initiation and termination codons. Open Reading Frame is consisted of 1,533 bp and deduced 511 amino acids of rice 60kD PDI. Gray boxes indicate the position of exon.

参考文献: Takemoto Y., S. J. C., T. W. Okita, H. Satoh, M. Ogawa, and T. Kumamaru 2002. The Rice Mutant *esp2* Greatly Accumulates the Glutelin Precursor and Deletes the

- 914 ○豊澤佳子¹、徳永貴史¹、井原康晴¹、佐藤 光¹、西 愛子¹、田崎三香子¹、大坪研一²
 (1. 九大農、2. 食総研) MNU 処理によるイネのプルラーゼ欠損変異の作製
 Y. Toyosawa¹, T. Tokunaga¹, Y. Ihara¹, H. Satoh¹, A. Nishi¹, M. Tasaki¹, K. Ohtsubo² (1. Fac. Agr., Kyushu U., 2. Natl. Inst. Food Sci.,) Induction of mutation deficient in a debranching enzyme, pullulanase in rice by MNU treatment.

植物の胚乳澱粉は、アミロプラスト内で ADP-グルコースを基質として、澱粉合成酵素 (SS)、澱粉枝作り酵素 (SBE) 及び澱粉枝切り酵素 (DBE) の協調作用によって形成される。DBE については、84kD のイソアミラーゼ (ISA) と 100kD のプルラーゼ (PUL) の少なくとも 2 種が認められている。ISA を欠損する変異は *sug1* として知られている。*sug1* 変異の胚乳澱粉ではアミロペクチンの短鎖の著しい増大と長鎖の減少が認められること、当核変異のコムギ ISA による形質転換植物は野生型に復帰する (Kubo et al., 2005) ことから、ISA は短鎖のトリミングと結晶化に必須の酵素であることが明らかとなっている。一方、イネにおいて 100kDPUL は胚乳中で強い発現が認められるが、その澱粉合成における作用については明らかでない。そこで、イネにおいて、100kDPUL に関する変異の作製を試みたところ、欠損型を含め数種の変異体を得ることができた。本報告では、イネ PUL 欠損型変異の澱粉化学的特性について報告する。

【材料及び方法】

材料には水稻品種「台中 65 号」の MNU 受精卵処理後代約 1,200 系統を用いた。

100kDPUL 変異の選抜は、登熟及び完熟種子の 10% acrylamide 0.1% bis を用いた SDS-PAGE 法により行った。ウエスタンブロット分析には、イネより作製した抗 100kDPUL 抗体を用いた。PUL 活性は、乳熟期登熟種子についてレッドプルラン及びアミロペクチンを用いた Native-PAGE 活性染色によって行った。澱粉の糊化程度の調査は尿素糊化法を用いた。

【結果及び考察】

MNU 受精卵処理後代約 1,200 系統について、登熟種子可溶性画分及び完熟種子の SDS-PAGE

分析を行った。100kD タンパク質には、欠損型 1 系統 (EM1003) (Fig. 1A) に加え、多くの減少型変異が得られた。減少型の多くは、*flo2*、*flo3*、*sug1* 及び *sug2* 変異であった。また、心白性を示す変異系統に減少型が認められた。これらの変異では 100kDPUL に加え複数の酵素タンパク質の減少が認められた。一方、欠損型では SDS-PAGE 分析では 100kD バンド以外に顕著な変化を示すバンドは認められなかった。100kD 欠損型変異系統 EM1003 をウエスタンブロット分析に供試したところ、PUL の発現が認められなかった (Fig. 1B)。さらに、EM1003 の乳熟期の登熟種子を用いて、レッドプルラン及びアミロペクチンを基質とした Native-PAGE/活性染色分析を行ったところ、両処理において活性バンドを欠くか、もしくは著しく減少することが明らかになった。これより、EM1003 は 100kDPUL を欠く変異体であることが明らかとなった。

減少型変異はいずれも心白性や粉質性あるいは sugary 性等澱粉蓄積量の減少を示したのに対し、PUL 欠損型変異は粒形や粒大あるいは外観形質に顕著な異常は認められなかった。本変異体胚乳澱粉の尿素糊化程度は、野生型と顕著な差異は認められなかった。

これらの結果から、EM1003 はイネの 100kDPUL 欠損変異であること、さらに PUL 活性の欠失は見かけの澱粉の形質にそれほど大きな影響を与えないものと考えられた。

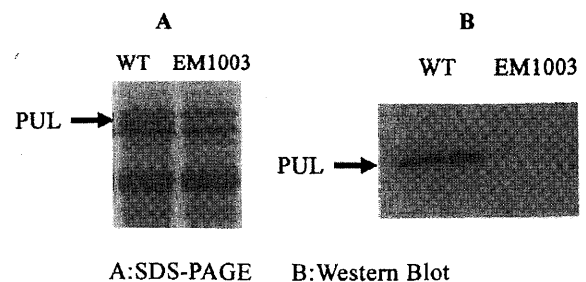


Fig.1 Mutants deficient in 100kD Pullulanase in rice.

915 ○徳永貴史¹・田中康昌¹・井原康晴¹・西愛子¹・豊澤佳子¹・大坪研一²・佐藤光¹ (1. 九大
院, 2. 食総研) MNU 処理による可溶性澱粉合成酵素(SSⅢ)欠損変異の作製と特性解析

Tbkunaga T¹, Y. Tanaka¹, Y. Ihara¹, A. Nishi¹, Y. Toyosawa¹, K. Ohtubo² and Satoh H¹ (1.
Fac.Agr., Kyushu.U., 2. Natl.Food Res.Inst) Induction of mutations for soluble starch synthase Ⅲ
in rice by MNU treatment

【目的】イネ胚乳澱粉の生合成は、アミロプラスト
内で ADP-グルコース を基質として可溶性澱粉合
成酵素(SS)、枝つけ酵素 (BE) 及び澱粉枝切り酵
素 (DBE)の一連の酵素反応により行われると考え
られている。これまで BE 及び DBE について変異体
を作製し、その機能解明を進めてきた。SS はアミロ
ペクチンの骨格をなす α -1,4 鎖の形成に関わる酵素
であるが、イネでは 10 種のアイソザイムが存在す
る。胚乳では 4 種の発現が認められているが、それ
ぞれの機能については不明な点が多い。本研究では、
SSⅢの機能解明を目的に、MNU 受精卵処理後代より
SSⅢ活性欠損変異の選抜を行うとともに、その特
性解析を行った。

【材料及び方法】材料には水稻品種「台中 65 号」
(TC65) 及び MNU 受精卵処理によって誘発した
胚乳突然変異 500 系統を用いた。SS 変異の選抜は、
native-PAGE/CBB 染色及び native-PAGE/活性染
色法 (Nishi et al. 2001)により行った。デンプン含
量は各々の完熟種子を用いてヘキシナーゼ法によ
り測定した。アミロペクチンの鎖長構造はキャピラ
リー電気泳動法によるポリグルカンの鎖長分布解析
により行った。胚乳澱粉中のアミロース含量の測定
は、ヨウ素呈色反応を用いて行った。

【結果及び考察】野生型登熟種子の活性染色分析で
は、各々の SS は異なる移動度を示し、SSⅢは最も
移動度が遅い。そこで胚乳突然変異 500 系統につい
て native-PAGE/CBB 染色分析を行い、SSⅢ活性に
対応する部位の CBB 染色バンドについて検討を行
ったところ、数種の変異を得た。これらの SS 変異
について native-PAGE/活性染色分析を行った結果、

EM679 及び EM790 はそれぞれ SSⅢ活性を欠損も
しくは著しく減少することが明らかとなった (Fig
1)。また、これらの SSⅢ変異では SSI 及び SSⅡa
の見かけの活性が増加する傾向が認められた。両 SS
Ⅲ変異系統の胚乳は部分的に心白性を示し、澱粉蓄
積量がやや減少した。EM790 の見かけのアミロ
ース含有率は 29%と野生型(24%)に比べ著しく高く、
さらに最大吸収波長や 620nm での吸光度(BV620)
も有意に高かった。トウモロコシの SSⅢ欠損変異
(*dw*)も見かけのアミロース含有率が高くなること
が報告されており、本変異の結果と良く一致する。ア
ミロペクチン鎖長分布は野生型に比べグルコース重
合度(DP)37 以上の長鎖が顕著に減少し、DP10~
DP35 の中間鎖が有意に増加した。これらの結果は、
SSⅢはアミロペクチン長鎖の伸長に関与すること
を示唆している。

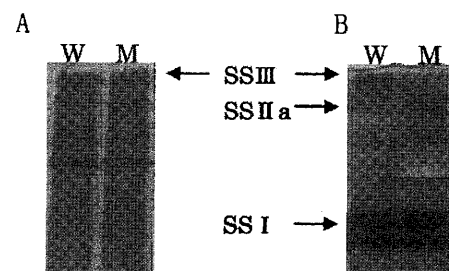


Fig.1 Screening of SSⅢ mutant by native-PAGEs
of developing seed in rice.

A:Native-PAGE/CBB staining of SSs.

B:Native-PAGE/activity staining of SSs.

W:TC65

M:EM790

916 ○西 愛子¹・佐藤 光¹・大坪研一²・中村保典³ (1. 九大農、2. 食総研、3. 秋田県立大生物資源科学) イネの胚乳澱粉難糊化性低アミロース変異 *lug* の澱粉特性

Nishi, A.¹, H. Satoh¹, K. Ohtsubo², Y. Nakamura³ (1. Fac. Agric., Kyushu U., 2. Natl. Food Res. Inst. 3. Fac. Bioresource Sci, Akita pref. U.) Effects of *lug* mutation on endosperm starch properties in rice

イネの胚乳澱粉の糊化特性は、コメの食味や加工特性に大きく影響を与える。従って、糊化特性の異なる澱粉の開発はコメの用途拡大に貢献できると考えられる。そこで、MNU 受精期処理後代より得られた胚乳突然変異系統について、尿素による簡易測定法を用いて糊化特性の異なる変異体の選抜を行ったところ、*amylose-extender* (*ae*) 変異とは異なる難糊化性を示す *lug* 変異を得た。ここでは、*lug* 変異体胚乳澱粉の特性について報告する。

[材料及び方法] 材料には、日本型水稻品種「金南風」とそのMNU受精期処理により得られた *lug* 変異体 EM420 を用いた。pH を 6.0 に調整した尿素溶液により糊化特性を測定した。また、モチ変異体を含む低アミロース変異系統及び *ae* 変異系統との検定交雑を行った。見かけのアミロース含量、アミロペクチンの鎖長分布ならびに澱粉生成に関与する酵素のウェスタンブロット分析は、既報の方法に従って行った。

[結果及び考察] *lug* 変異 EM420 の胚乳は白色半透明の外見を示した。尿素溶液を用いて糊化特性を調査したところ、野生型の胚乳澱粉は 4M で糊化を開始するのにに対し、*lug* 変異の胚乳澱粉は 5M で糊化を開始した。しかしながら、5M 尿素では全く糊化をしていない澱粉層、膨潤した澱粉層に分離した。また、糊化後の膨潤の程度は正常型と同程度だった (Fig. 1)。*lug* 変異と同様に白色半透明の外観を有する 5 種の *dull* 変異 (*du1*~*du5*) の胚乳澱粉は、4M 尿素で糊化を開始し、野生型の胚乳澱粉より高い膨潤度を示すことをすでに報告している。また、難糊化性を示す *ae* 変異の胚乳澱粉は 8M まで糊化を生じなかった (89 回大会)。これらのことから、*lug* 変異の胚乳澱粉は、*du* 変異及び *ae* 変異の胚乳澱粉とは異なる性質を有すると考えられる。

lug 変異体×野生型「金南風」の F₂ 種子の分離調査をした結果、*lug* 遺伝子は単一の劣性遺伝子に支配されていることが明らかとなった。また、*lug* 変異体と *du* 及び *ae* 変異体との相同性検定を行ったところ、*lug* 遺伝子はこれらの遺伝子とは独立であった。このことから、*lug* 遺伝子は、胚乳澱粉の糊化特性を変更する新たな遺伝子であることが示唆された。

これまでに、アミロペクチンの鎖長構造が尿素糊化反応に影響を与え、特に短鎖の有無が大きく関与ことを報告している。

そこで、*lug* 変異体胚乳澱粉の難糊化性の原因を明らかにするために、糊化の難易性に大きく影響するアミロペクチンの構造に関して調査を行った。*lug* 変異のアミロペクチンは、*ae* 変異のアミロペクチンと同様にグルコース重合度 (DP) が 17 以下の短鎖が減少していたが、その程度は *ae* 変異よりも小さかった (Fig. 2)。このことから、アミロペクチンの短鎖の減少が *lug* 変異澱粉の難糊化性の原因と考えられた。

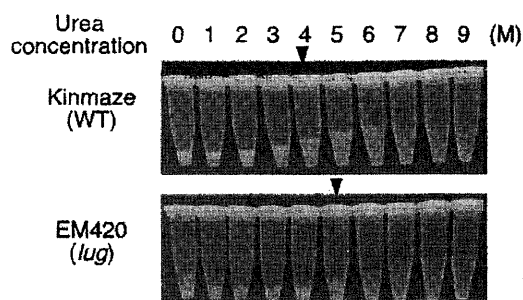


Fig. 1 Effect of *lug* mutation on gelatinization properties of starch from endosperm of mature seed. Starches from *lug* mutant and the wild type were gelatinized in urea solution with different concentrations. Arrowhead shows the urea solution by which starch is gelatinized.

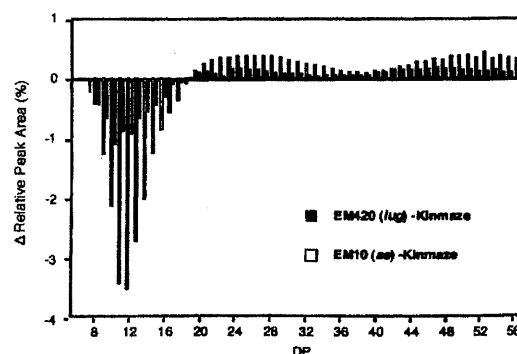


Fig. 2 The difference in amylopectin chain lengths between *lug* mutant and the wild type. The columns show the area of each peak for *lug* mutant minus the area of the corresponding peak with the same DP for the wild type.

917 ○井原康晴¹・吉田陽子¹・佐藤 光¹・大坪研一²・中村保典³ (1.九大農、2.食総研、3.秋田県立大生物資源科学) イネ胚乳中 ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit に関する変異体の作製

Ihara, Y.¹, Y. Yoshida¹, H. Satoh¹, K. Ohtsubo², Y. Nakamura³ (1. Fac. Agr., Kyushu U., 2. Natl. Food Res. Inst., 3. Fac. Bioresource Sci, Akita pref. U.) Isolation of a mutant for ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit in rice.

【目的】ADP-glucose pyrophosphorylase(以下 AGPase)は、イネ胚乳中の澱粉生合成系において律速となる ADP-glucose の合成反応を触媒する。高等植物では AGPase はそれぞれ異なる遺伝子でコードされる大小 2 つずつのサブユニットからなるヘテロ 4 量体を構成している。また細胞内に細胞質局在型とプラスチド局在型の 2 種類が存在する。これまでの研究から small subunit(以下 SS)は酵素反応の反応中心を有し、large subunit(以下 LS)は酵素のアロステリック制御に関与することが示唆されている。しかし、両サブユニットの澱粉蓄積量や澱粉の性質に与える影響については明らかでない。そこで今回、酵素反応の制御に関わりと推測され、これまで研究報告が少ない AGPase-LS の機能解明を目的として、変異体の作製と特性解析を行った。

【材料及び方法】材料には水稻品種「台中 65 号」及びその MNU 受精卵処理によって作製した shrunked 型変異系統を用いた。AGPase-LS 変異の選抜は、登熟胚乳を抗 AGPase-LS 抗体を用いた Western blot により行った。澱粉含有率はグルコースアミラーゼ法、アミロース含有率はヨウ素呈色比色法によって推定した。

【結果及び考察】抗 AGPase-LS 抗体を用いた Western blot の結果、shrunked1s 型変異 EM541 は AGPase-LS

を欠損することが確認された。一方、本変異体の AGPase-SS の発現は野生型と同等で、顕著な差異は認められなかった(Fig.1)。

Fig.2 に EM541 の玄米の外観形質を示した。粒長及び粒幅は野生型と顕著な差異は認められなかったが、粒厚は薄く粒の中央が凹む形質を示した。また蓄積した澱粉は粉質状となった。澱粉蓄積量を調査した結果、本変異体では澱粉量が野生型の約 60%に減少していた。これは AGPase-LS 欠損により澱粉合成の基質となる ADP-glucose の合成が抑制されたためと考えられる。

アミロース含有率を調査した結果、本変異体は野生型とほぼ同等であり、LS 変異は蓄積される澱粉の構造にそれほど大きな差異を与えないと考えられた。

対立性検定の結果、本変異は *shr1* 遺伝子座の変異であることが明らかとなった。加えて、LS 欠損と *shr1* 形質間に完全連鎖が認められた。このことは、本 *shr1* 形質が LS 欠損に起因することを強く示唆している。*shr1* 遺伝子は染色体 1 に座乗することが報告されている(Matsuo et al. 1986)。また染色体 1 には胚乳細胞の細胞質で発現する *OsAGPL2* 遺伝子が座乗し、ほぼ *shr1* 座と同一部位に位置する。これらのことから、*shr1* は *OsAGPL2* 遺伝子の変異である可能性が考えられる。

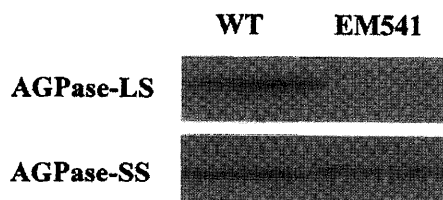


Fig.1 Western blotting analysis of AGPase-LS and AGPase-SS in EM541 and WT(TC65)

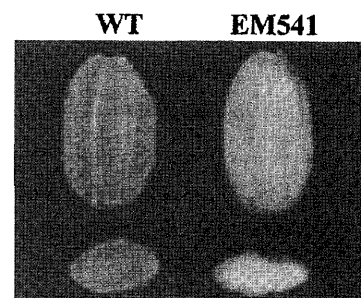


Fig.2 Kernel phenotype of EM541 and WT(TC65)

918 桐生優子¹・西 愛子¹・中村保典²・○佐藤 光¹ (1.九大農、2.秋田県大・生物資源)

イネ *flo1* 変異は PPK 遺伝子変異に起因する

Kiryu Y.¹, A. Nishi¹, Y. Nakamura², H. Satoh¹ (1. Fac. Agr., Kyushu U., 2. Fac. Biores., Akita P.U.) Rice *flo1* mutation being caused by the lesion of a gene encoding PPK.

【背景及び目的】Pyruvate Orthophosphate Dikinase (PPDK)は、ホスホエノールピルビン酸(PEP)とピルビン酸の相互変換を可逆的に触媒する酵素であるが、胚乳中における役割についてはこれまでに報告されていない。イネ *flo1* 変異は粉質性で顕著な種子重量の減少を示し原因遺伝子は染色体5に座乗する。MNU 受精卵処理によって作製した *flo1* 変異の多くで、胚乳中の分子量 94kD タンパク質の欠損が認められた。PPDK は多くの穀類胚乳中で認められ、94kD の分子量を示す。PEP 及びピルビン酸は、解糖系の重要な中間体であることから、PPDK は穀物の胚乳中において、デンプン合成の際の基質供給やエネルギー供給に関わる因子ではないかと考えられていた。そこで本研究では、胚乳中におけるより詳細なデンプン合成経路の解明を目的とし、*flo1* 変異体を用いた PPK の機能解析を行った。

【材料及び方法】(1)材料には日本型水稻品種「金南風」及び「台中 65 号」とその MNU 処理によって誘発した *flo1* 変異系統 EM17 及び EM710、並びにインディカ型水稻品種 Kasalath を用いた。

(2)方法：i) イネ胚乳中の PPK タンパク質の特定は TOF-MS を用いたアミノ酸配列分析により行った。ii) *Flo1* 遺伝子と PPK 遺伝子の異同解明は RFLP 分析により行った。iii) PPK の細胞内局在は 0.8M ソルビトールバッファーを用いて胚乳細胞の分画を行った後、イネ抗 PPK 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により解析した。iv) PPK の胚乳細胞の発育に伴う発現量の変化は RT-PCR 及びウエスタンブロッティング法により行った。v) デンプン含量測定はグルコアミラーゼ法により行った。

【結果及び考察】野生型胚乳中の 94kD タン

パク質を分取し、アミノ酸配列分析を行ったところ、イネデータベース上の PPK と極めて高い相同性を示した。また、*Flo1* 遺伝子と PPK 遺伝子の異同解明を RFLP 分析により行ったところ、組換え個体は認められず、*Flo1* 遺伝子は PPK をコードする構造遺伝子であることが明らかとなった。

次に、胚乳細胞を細胞質画分及びアミロプラスト画分に分画し、PPK の細胞内局在について調べたところ、細胞質に局在することが明らかとなった。胚乳細胞中における PPK の発現量は、種子の発達に伴って増加した (Fig. 1)。一方、*flo1* 変異では、野生型と比べ、デンプン含量が 10～20%程度減少していた。また、アミロース含有率及びアミロペクチンの鎖長分布は、野生型と大きな差異は認められなかった。

これらのことから、PPK は、胚乳の登熟中期から後期にかけて、細胞質中での基質供給に関わっている因子ではないかと考えられた。

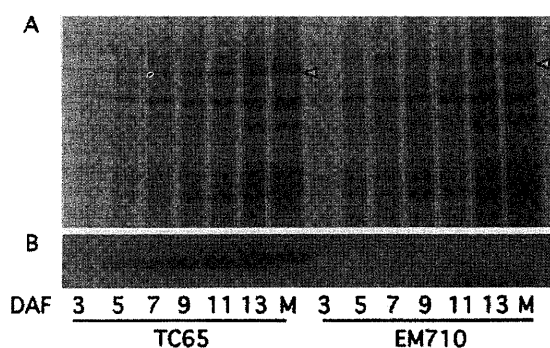


Fig.1 Temporal expression of PPK in endosperm cell during seed development. A. SDS-PAGE profile of the crude protein extract of rice endosperm. The arrowhead shows PPK. B. Western-blot analysis of PPK in rice endosperm. M shows mature seed.

919 ○上田悠加¹・竹本陽子¹・熊丸敏博¹・大坪研一²・小川雅広³・佐藤 光¹ (1.九大院農、2.食総研、3.山口県立大生活科学) イネグルテリン前駆体を集積する 57H 変異遺伝子 *Glup5* および *glup7* のトリソミック分析

Ueda, Y.¹, Y. Takemoto¹, T. Kumamaru¹, K. Ohtsubo², M. Ogawa³ and H. Satoh¹ (1.Fac. Agr. Kyushu U., 2.NFRI, 3.Fac. Human Life Sci. Yamaguchi P. U.) Trisomic analysis of 57H mutant gene, *Glup5* and *glup7*, in rice

【目的】イネ種子貯蔵タンパク質グルテリンは、小胞体(ER)上で 57 kD グルテリン前駆体として合成された後、液胞由来のプロテインボディ II (PB II) 内で成熟型グルテリンとなり蓄積する。グルテリンの輸送・蓄積経路の遺伝的制御機構の解明を目的として、MNU 受精卵処理によりグルテリン前駆体を多く蓄積する 57H 変異を作製し、これまでに 9 遺伝子座を同定した。*Glup5* 及び *glup7* 変異はグルテリン前駆体を多量に蓄積し、グロブリン蓄積量を減少させる。*glup7* の遺伝分析に関してはすでに報告した (2002)。そこで、*glup5* 遺伝子の機能を推定するために、既知の遺伝子との相互作用を解析した。また、トリソミック分析により *Glup5* 及び *glup7* 両遺伝子の座乗染色体の推定を行った。

【材料及び方法】MNU 処理によって得た *Glup5* 変異体 EM675 及び PMT19、*glup7* 変異体 CM935 を用いた。遺伝解析は既報の 57H 変異 *esp2*、*Glup1*、*glup2*、*glup3*、*glup4* 及び原品種「台中 65 号」との交配 F2 種子を用い、SDS-PAGE により種子貯蔵タンパク質を分析した。トリソミック分析は、染色体 4~12 のトリソミック植物との F2 種子の SDS-PAGE 分析により行った。

【結果及び考察】*Glup5* 変異体 EM675 及び PMT19 は粉質性を示す。*Glup5* 変異体と野生型との F2 分析の結果、野生型と 57H 型が不完全優性遺伝の期待値(AAA,Aaa):(Aaa,aaa)=1:1 に適合する分離を示した。F2 で粉質を示すものは貯蔵タンパク質が全て 57H 型となり、胚乳形質が野生型のものは、貯蔵タンパク質も野生型を示した。このことから、*Glup5* 遺伝子は不完全優性遺伝子であり、胚乳形質に多面発現効果を有することが明らかとなった。

現在までに *Esp2* 及び *Glup4* 遺伝子は ER 内におけるグルテリン前駆体とプロラミンの分別に関与し、*glup1* 及び *Gup2* 遺伝子はグルテリン前駆体の ER から液胞への輸送に、*Glup3* 遺伝子は液胞内で

のグルテリン前駆体の限定分解に関わっていることが示唆されている。*esp2* と *Glup5* 変異体との F2 では *Glup5* 型:*esp2* 型:野生型が *esp2* 遺伝子が上位である期待比 3:2:3 に適合する分離を示した。*glup4* 変異体との F2 では、二重変異型が確認できたことから、両遺伝子は相加的に作用することが示唆された。*Glup1* 及び *glup2* 変異体との F2 では、それぞれ *Glup5* 型:*Glup1* 型:野生型が 4:3:1、*Glup5* 型:*glup2* 型:野生型が 4:1:3 と、両者共に *Glup5* が上位になる期待比に適合する分離を示した。*glup3* 変異体との F2 では、*Glup5* 型:*glup3* 型:野生型が *Glup5* 遺伝子が上位である分離比、4:1:3 に適合する分離を示した。これらのことから、*glup5* 遺伝子はグルテリン前駆体の ER からの輸送よりも上流で作用すると推察された。

トリソミック分析の結果、*Glup5* 変異は Triplo12 との交配組み合わせにおいてトリソミック分離を示し(Table.1)、Triplo4~11 ではダイソミック分離を示した。従って、*Glup5* 遺伝子は染色体 12 に座乗することが推察された。グルテリン前駆体の ER から液胞への輸送に関与するとされる *glup7* 変異は、Triplo4 との F2 でトリソミック分離を示し(Table.1)、Triplo5~12 においてはダイソミック分離を示した。これは、*glup7* 遺伝子は染色体 4 に座乗することを示す。

Table.1 Segregation of 57H in F2 seeds from crosses between Triplo4 and CM935, Triplo12 and PMT19.

Cross combination	F1	Segregation in F2			χ^2 (3:1)	(1:1)
		+	57H	Total		
Triplo12 x PMT19 (<i>Glup5</i>)	2n+1	102	69	171	6.37*	0.00
	2n	54	55	109		
Triplo4 x CM935 (<i>glup7</i>)	2n+1	113	10	123	18.67*	0.21
	2n	61	18	79		

*: Significant at 0.5%

P316

Mutation in starch branching enzymes in rice

H. Satoh, A. Nishi, H. Hatae, K. Yamashita, A. Kubo, Y. Nakamura
Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki 6-10-1, Fukuoka 812-8581, Japan

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), starch branching enzyme (BE) and starch debranching enzyme (DBE). Three forms of BE, i.e., BEI, BEIIa and BEIIb, have been identified in endosperm of rice. Mutants participating in each of BEs were isolated by NMU treatment. BE IIb mutation decreased specifically the short chains with less than DP 17, suggesting that the BE IIb contributes the synthesis of A chains of amylopectin. The amylopectin of BE I mutant was characterized by the significant decrease in long chains with more than DP 38 and the short chains with DP 12 to 23, suggesting that BEI specifically synthesizes B1 chains as well as B3 chains. Notable alteration on the chain length distribution profile was not observed in BE IIa mutation. The endosperm starch from the BE I mutant had the lower onset temperature for thermo-gelatinization. By contrast, BE IIb mutant showed the higher onset temperature for thermo-gelatinization. BE IIa mutation did not influence on the gelatinization of starch but exhibited the highest enthalpy.

P288g

Genetic and histochemical analysis of glutelin precursor accumulating mutant, *glup7*, in rice

Ueda, Y.¹, Y. Takemoto¹, M. Sato¹, T. Kumamaru¹, K. Tanaka², K. Ohtsubo³, M. Ogawa⁴, H. Satoh¹

¹Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, 6-10-1, Fukuoka 812-0058 Japan, ²Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, ³National Food Research Institute, ⁴Faculty of Human Life Sciences, Yamaguchi Prefectural University

Rice glutelins are synthesized as a 57kD glutelin precursor on ER, which are transported to protein storage vacuole (PSV) by vesicle, and then accumulated in PBII. We induced the highly accumulated 57kD glutelin precursor mutant (57H mutant) by MNU treatment and identified seven 57H mutant genes, *esp2* and *Glup1* to *glup6*. The Biochemical and histochemical analyses of them indicated that 57H mutations are caused by the lesion of genes encoding respective

704 O Hoai, T., A. Nishi, T. Kumamaru and H. Satoh (Grad. Fac. Agric., Kyushu U.) Diversity of starch properties in Northern Vietnam local rice cultivars

Genetic resources on starch properties in rice are important not only to improve the quality but also to understand the starch structure and its biosynthesis. This study dealt with characterizing the endosperm starch properties of Vietnam local rice cultivars to provide the useful information to rice quality breeding program as well as the conservation of rice genetic resources.

185 local rice cultivars, which were collected from mountainous areas of Northern Vietnam and consisted of 97 waxy and 88 non-waxy rice, were used in this study. The apparent amylose content of endosperm starch was estimated by the colometric method of iodine-starch complex. The expression level of granule bound starch synthase (GBSS) was determined by SDS-PAGE and western blotting analyses. The alkali digestibility of endosperm starch was determined by 1.3% KOH. The amylopectin chain length distribution was analysed by HPAEC-PAD.

In rice endosperm, GBSS is mainly responsible for the amylose biosynthesis. Based on the expression level of GBSS, 185 rice cultivars were classified into four groups of absent, low, intermediate and high. 97 waxy rice cultivars were subdivided into three groups of low, intermediate and high based on the iodine staining intensity, though they were missing in GBSS, suggesting that the variation in iodine staining intensity is caused by the amylopectin structure. 88 non-waxy cultivars were subdivided into three groups with low, intermediate and high GBSS level. The apparent amylose content in non-waxy rice of Vietnam varied from 9 to 32% (Fig.1) and they were grouped into low (9-12), intermediate (13-18), high (19-24) and very high (≥ 25). The correlation was observed between the GBSS level and the apparent amylose content. However, the continuous variation on the apparent amylose content was found in the cultivars with intermediate and high GBSS level.

A gelatinization property, which is one of the most important determinants of cooking quality of rice, was

estimated by alkali digestibility test. The wide range in the alkali spreading scores was also observed in both of the waxy and non-waxy rice (Fig.2). 45% of the accession had the intermediate alkali digestibility (alkali score 4 to 6), while 30% showed high (1 to 3) and 25 % contained low alkali digestibility (7 to 8).

The amylopectin fine structure was significantly varied in Vietnam local rice cultivars not only on the ratios of shorter chains with $DP \leq 18$ to longer chain with $DP \geq 19$ but also on the amount of longer A chains with $DP \geq 9$. The good correlation was observed between the longer A chains and the alkali digestibility. Since the chain length distribution of amylopectin affects to the rheological properties of cooked rice, the further genetic analysis should be focus in the diversity of amylopectin structure and the relationship with physical behaviour of endosperm starch in Vietnam local rice cultivars.

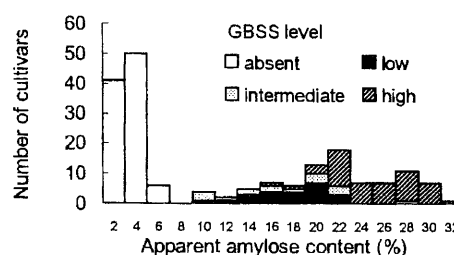


Fig.1. Frequency distribution of apparent amylose content and the relationship between apparent amylose content and GBSS level in northern Vietnam local rice cultivars.

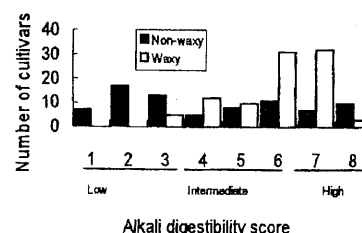


Fig. 2. Frequency distribution of alkali digestibility in northern Vietnam local rice cultivars.

125 ○一色正之¹、松田康之¹、高崎 彩¹、佐藤 光²、島本 功¹ (1.奈良先端大バイオ、2.九大農)
イネ低アミロース変異体 *dull* の原因遺伝子単離と機能解析

Isshiki M.¹, M. Matsuda¹, A. Takasaki¹, H. Satoh², and K. Shimamoto¹ (1. Lab. Plant Mol. Genet., NAIST, 2. Agri., Kyushu U.) Identification and functional analysis of *dull* genes, determinants of rice amylose content.

米の胚乳におけるアミロースとアミロペクチンの含有量の比が、コメを調理した際の食味の違いの一つの要因であることはよく知られている。いわゆるうまい米と言われているコシヒカリは基準米に比べて数%アミロース含有量が少ない。この、アミロース生合成に必須な酵素をコードしているのが *waxy* 遺伝子である。イネの *waxy* 遺伝子には、発現量の異なる 2 つの対立遺伝子座、*Wx^a* と *Wx^b* が知られている。インディカイネは主に発現量の多い *Wx^a* をもち、ジャポニカイネは発現量の低い *Wx^b* をもち、この発現量の違いにより、インディカ米はパラパラした食感になる。*Wx^b* は第 1 イントロンの 5' スプライス部位の GT が TT になる 1 塩基の変異をもつため、スプライシング効率が低下し、発現量が *Wx^a* に比べて低くなっていた (Plant J. 1998)。

dull(*du*)は、低アミロース米の表現形を示す突然変異体であり、他には目立った表現形を示さない。*waxy* 遺伝子とは異なる遺伝子座に原因遺伝子があり、5 つの遺伝子座が知られている。これまでの我々の研究により、*du1* および *du2* が *Wx^b* のスプライシングに必要な因子であることが示唆されていた (Plant J. 2000)。そこで、我々は *du1* の原因遺伝子同定のため Map-based cloning を行った。その結果、スプライシングを行うタンパク質複合体、スプライソソームの構成因子である *S.pombe* の PRP1 ホモログが原因遺伝子であることがわかった (図 1)。PRP1 の相互作用因子については、酵母やヒト

で解析されているため、イネのデータベースよりそのホモログを検索し、クローニングした。現在、これらのスプライシング因子と *Du1* タンパク質の相互作用を解析中である。

また、*du3* について、胚乳の *Wx* mRNA やタンパク質量を解析したところ、*du1* 同様にスプライシング効率の低下を示唆する結果を得た。そこで、*du3* 遺伝子の同定を行ったところ、Cap-binding protein 20kD subunit(CBP20)のホモログが原因遺伝子であった (図 2)。CBP20 は CBP80 とともに、Cap-binding complex を形成し、mRNA のキャップ構造に結合し、mRNA のスプライシング、核外輸送、安定性などに関与している。現在、トランジェント解析により、*Wx* mRNA への作用機構を解析中である。

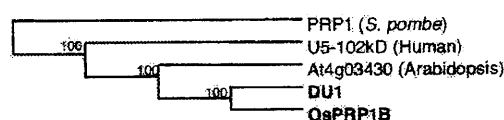


図 1 PRP1 ホモログの系統樹

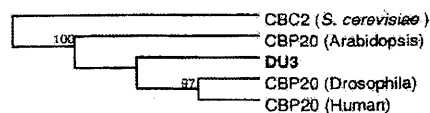


図 2 CBP20 ホモログの系統樹

微生物遺伝子開発分野

2005年度日本放線菌学会大会（木更津市）

O-15 *Streptomyces azureus* の DNA translocase 遺伝子発現の局在性および定量解析

○土居 克実、久保田 紘一郎、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、*崇城大学 生物生命学部
doi@agr.kyushu-u.ac.jp

【目的】*Streptomyces azureus* の接合性プラスミド pSA1.1 上にはプラスミドの膜貫通型転移に機能する *spi* 遺伝子が座乗している。本遺伝子産物は染色体上にある *spoIIIE/ftsK* 様遺伝子産物を拮抗阻害することで宿主の胞子形成を阻害する。両者は共に DNA translocase に属すると考えられるが、両者の遺伝子発現パターンや遺伝子産物の発現部位は不明であった。そこで、本研究では *spi* と *spoIIIE/ftsK* 遺伝子の発現時期と遺伝子産物の局在性について検討した。

【方法および結果】まず、*spi* 下流に 6×His を結合した融合遺伝子を pIJ702 および pRES18 中にクローニングし、これを *Streptomyces lividans* TK24 株に形質転換した。本形質転換株を固体培地および液体培地中で培養後、増殖した菌体を超音波破碎し、超遠心分離によって膜画分と可溶性画分に分画した。これらを抗 His-tag 抗体を用いたウエスタンブロッティングに供したところ、Spi タンパク質は膜画分に局在することが示された。このことから、*spi* は接合伝達の際、膜貫通によってプラスミド DNA を受容株に転移させることが示唆された。また、pSA1.1 を保持し、胞子形成阻害を生じる *S. azureus* PK100 株から全 mRNA を生育の各段階で抽出し、RT-PCR を行った後に Real-Time PCR によって *spi* および *spoIIIE/ftsK* 遺伝子それぞれの転写量を測定した。

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ヒビターの生理機能に関する研究

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

訪問教授・研究員

何 寧佳（中国西南農業大学校教員）

カイコの体液キモトリプシ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研究員）

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

馮 麗春（中国西南農業大学校教員）

カイコの体液キモトリプシンインヒビターに関する遺伝学的研究

李 斌（中国西南農業大学校教員）

カイコの熱ショックタンパク質に関する研究

易 発平（重慶医科大学教員）

カイコのプロテオーム解析

外国人来訪者

司馬 揚虎（中国、蘇州大学）

N. S. Reddy （インド、Dalamaner Chiftore）

K. S. Chandrakanth （インド、Central Sericultural Research Institute）

B. Rudrappa （インド、Central Sericultural Research Institute）

【植物遺伝子開発分野】

大学院生物資源環境科学府（修士課程）

上田悠加 グルテリンの細胞内輸送に関する変異体の探索とその遺伝学的研究

桐生優子 イネ*flo1*変異体の遺伝学的研究

田崎三香子 イネ登熟種子中のショ糖代謝に関わる変異体の遺伝学的研究

徳永貴史 イネの胚乳特異的ホスホリラーゼに関する遺伝学的研究

井原康晴 イネ胚乳中の細胞質局在型ADP-glucose pyrophosphorylase small subunitに関する遺伝学的研究

大窪郁 イネ胚乳におけるProtein Body Iへのプロラミン集積に関する基本的研究

小濱悠人 アミロプラスト局在AGPaseに関する変異の作製と特性解析

藤井聡子 イネの胚乳中のデンプン枝作り酵素と特異的に反応するデンプン分解酵素に関する研究

Hoai Evaluation of seed reserve in Vietnam rice genetic resources

大学院生物資源環境科学府（博士課程）

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の遺伝的制御機構

牛島智一 イネ種子貯蔵タンパク質プロラミンの生合成・集積に関わる変異体の遺伝学的研究

Phan Thi Diem Chi

ベトナム在来イネ品種の遺伝資源学的研究

【微生物遺伝子開発分野】

大学院生物資源環境科学府（修士課程）

菊次 智 固体発酵による澱粉粕からのバイオエタノール生産

北山和宏 次世代ポストゲノム研究支援ツールの開発

成宮康平 無細胞糖タンパク質合成系の高機能化に関する研究

結城 大 無細胞糖タンパク質合成用細胞抽出物の製剤キット化

八坂由季子 高温多湿地域由来サイレーシ乳酸菌の分子育種

久保田紘一郎 *Streptomyces*属放線菌のDNA転移機構の解明

2. 科学研究費・共同、受託研究等

【家蚕遺伝子開発分野】

五峯ライフサイエンス国債基金

「カイコのプロテオミクスに関する研究」

農林水産省受託研究

21世紀最大の未利用資源活用のための「昆虫テクノロジー研究」

文部科学省

ナショナルバイオリソースプロジェクト「カイコ」

【植物遺伝子開発分野】

ナショナルバイオリソース中核的拠点整備プログラム

「イネ遺伝資源実験システムの収集・保存・提供と基礎データ蓄積」

基盤研究（A）（2）研究代表 佐藤 光、分担 熊丸敏博

「イネ胚乳アミロペクチンの分枝構造の遺伝的変換に関する基礎的研究」

基盤研究（B）（2）研究代表 熊丸敏博、分担 佐藤光

「イネ種子プロラミンのプロテインボディへの集積機構の解明」

農林水産省受託研究 研究代表 熊丸敏博

「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 代表 佐藤 光、 分担 熊丸敏博

「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. Tomas Okita

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

【微生物遺伝子開発分野】

台湾大学

「納豆菌利用技術開発に関する研究」

味丹公司（台湾）

「PGA発酵生産技術の確立と事業化」

（株）丸美屋

「納豆製造技術の開発とその新展開」

（株）三菱レーヨン

「生分解性吸水性材料の開発」

カセサート大学アグロインダストリー学部 Sunee Nitisinprasert

キングモンクット大学トンブリ校 Suntud Sirianuntapiboon

「熱帯地域での乳酸菌遺伝子資源の探索と利用」

海洋科学技術センター 稲垣史生

「深海域での新規遺伝子資源の探索」

崇城大学生物生命学部 緒方靖哉、九州大学大学院理学研究院 横山拓史

「高度好熱菌のシリカ沈殿機構の解明」

3. 講演会・セミナー・講習会

【家蚕遺伝子開発分野】

平成17年11月

山本幸治

「鱗翅目昆虫の抗酸化酵素群の機能解析」 九州大学農学部遺伝子資源研究開発センターセミナー

平成17年11月

山本幸治

「カイコ抗酸化酵素群の機能解析」 日本蚕糸学会第61回九州支部、関西支部第71回合同研究発表会シンポジウム

平成17年12月

山本幸治

「*Bombyx mori*抗酸化酵素群の触媒機能と発現解析」 遺伝子資源工学専攻公開セミナー

平成18年3月

藤井 博

「研究生活40年」 九州大学農学部遺伝子資源研究開発センターセミナー

【植物遺伝子開発分野】

平成17年6月

佐藤 光

“Induction of mutations modifying starch properties in rice” Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology(KoSFoST)

平成17年10月

熊丸敏博

“Mutants for Storage Protein and Starch in Rice Endosperm” Workshop of Genetic Resources in Rice

【微生物遺伝子開発分野】

平成17年6月

土居克実

「サイレーシ乳酸菌の機能開発 ～好熱性サイレーシ乳酸菌の特性と利用～」 2005年度日本生物工学会乳酸菌工学研究部会講演会

平成17年7月

原敏夫

「大学発ベンチャーが納豆樹脂でブレイクできるか？」 バイオベンチャーフォーラム

平成18年3月

土居克実

「我が国の生物生産研究の課題と研究戦略 ～農芸化学と社会貢献～」 日本農芸化学会2006年度大会シンポジウム

4. 海外渡航

【家蚕遺伝子開発分野】

佐藤 光

大韓民国

2005年6月15日～6月18日

韓国農芸化学会

情報収集と学術研究

フィリピン

2005年11月19日～11月23日

基盤研究A(2)

情報収集と学術研究

熊丸敏博

アメリカ合衆国（シアトル）

2005年7月15日～7月22日

基盤研究（B）

Plant Biology 2005 出席

“Mis-targeting of rice a-globulin and glutelin RNAs to distinct endoplasmic reticulum subdomains disrupts ER export and transport to the storage vacuole”

フィリピン

2005年11月19日～11月23日

情報収集と学術研究

イネ種子貯蔵成分に関する研究打ち合わせ

【微生物遺伝子開発分野】

原 敏夫

台湾

2005年5月25日～5月27日

PGA発酵生産プロセスの開発

台湾

2005年12月22日～12月24日

PGA発酵生産プロセスの開発

産学官連携経費

土居

タイ王国・中華人民共和国

2005年11月27日～12月4日

「国際開発研究特別コース」の海外プロモーション活動

留学生特別事業経費

タイ王国

2006年1月8日～1月12日

日本学術振興会拠点大学方式学術交流事業に係る共同研究（研究課題 耐熱性微生物による生理活性物質の生産）

日本学術振興会拠点大学方式学術交流事業経費

ミャンマー連邦

2006年1月15日～1月19日

JDS留学生（九州大学受入分）現地面接及びミャンマー国教育機関視察,

日本国際協力センター

IV. 遺伝子資源系統の保存・管理

遺伝子資源系統の分譲・収集

【家蚕遺伝子開発分野】

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

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

このほか淘汰育成中のもの並びに各種実験系があるが、これらは大文字の記号を用いて区別しており、ここには記載しない。以下、各保存系統について解明された遺伝情報のほか、交配形式、起源及び導入元・発見・交雑の年次など主要な必要事項を記載する。蛋白質、酵素、染色体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-l*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し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*: important genetic resources」に記載している。

（分譲）

大沼 昭夫（蚕業技術研究所）	n06, t30
小川 洋子（元東京大学）	a60, a61
盧 時甲（慶北大学（韓国））	c58, c10, c15, d90, l20
土田 耕三（厚生労働省感染症研究所）	FL50（5回） FL501（5回）
天竺桂弘子（東京農工大学）	FL50、FL501, L21, L22
嶋田 透（東京大学）	t32
藤原晴彦（東京大学）	i21, g01, g32, Fw-2
中山光育（香蘭女子短期大学）	Fre

飯田（東光小学校）	交雑種
古澤寿治（京都工芸繊維大学）	80系統（詳細省略）
一田昌利（京都工芸繊維大学）	f40, l70
河本夏夫（農業生物資源研究所）	e01, e02, e03, e04, e05, r02, w14, w16
清水 進（学内）	p20, p21, p22, p24, p50, p61, p62, c40, d18, e15, k01,
高橋 進（山口大学）	d32
神崎亮平（筑波大学）	p50（10回）
G.Chavancy（国際養蚕委員会（フランス））	b50
佐原 健（北海道大学）	クワコ（地域別）
中島裕美子（琉球大学）	クワコDNA（地域別）
前川秀彰（厚生労働省感染症研究所）	クワコDNA（地域別）
Peter Andolfato（トロント大学（カナダ））	クワコDNA（地域別）

【植物遺伝子開発分野】

植物遺伝子開発分野におけるイネの遺伝子資源の収集と保存は、加藤茂包教授が

当時の農林省農事試験場畿内支場に収集されていた水稻品種を九州大学に移したことに始まる。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	476 系統
IBP系統	FAO 国際共同研究供試品種	276 系統
R系統	Lo系統と同時期に収集した県奨励品種	515 系統
UP系統	国内外の陸稲品種	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
2005		2-199		7-1052	0

微生物遺伝子開発分野

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

現在、以下のような菌株を保存している。

I. 細菌

(A) 基準株 *Bacillus*属、*Cellulomonas*属、*Lactobacillus*属、*Lactococcus*属、*Pseudomonas*属、*Thermus*属および大腸菌 47種103株

(B) 分離株 *Bacillus*属、*Lactobacillus*属、*Lactococcus*属、*Pediococcus*属、*Pseudomonas*属、*Enterococcus*属及び*Thermus*属 1150株

(C) 変異株 *Bacillus*属、*Lactobacillus*属および*Thermus*属 15種71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*Trichoplusia*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。

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

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

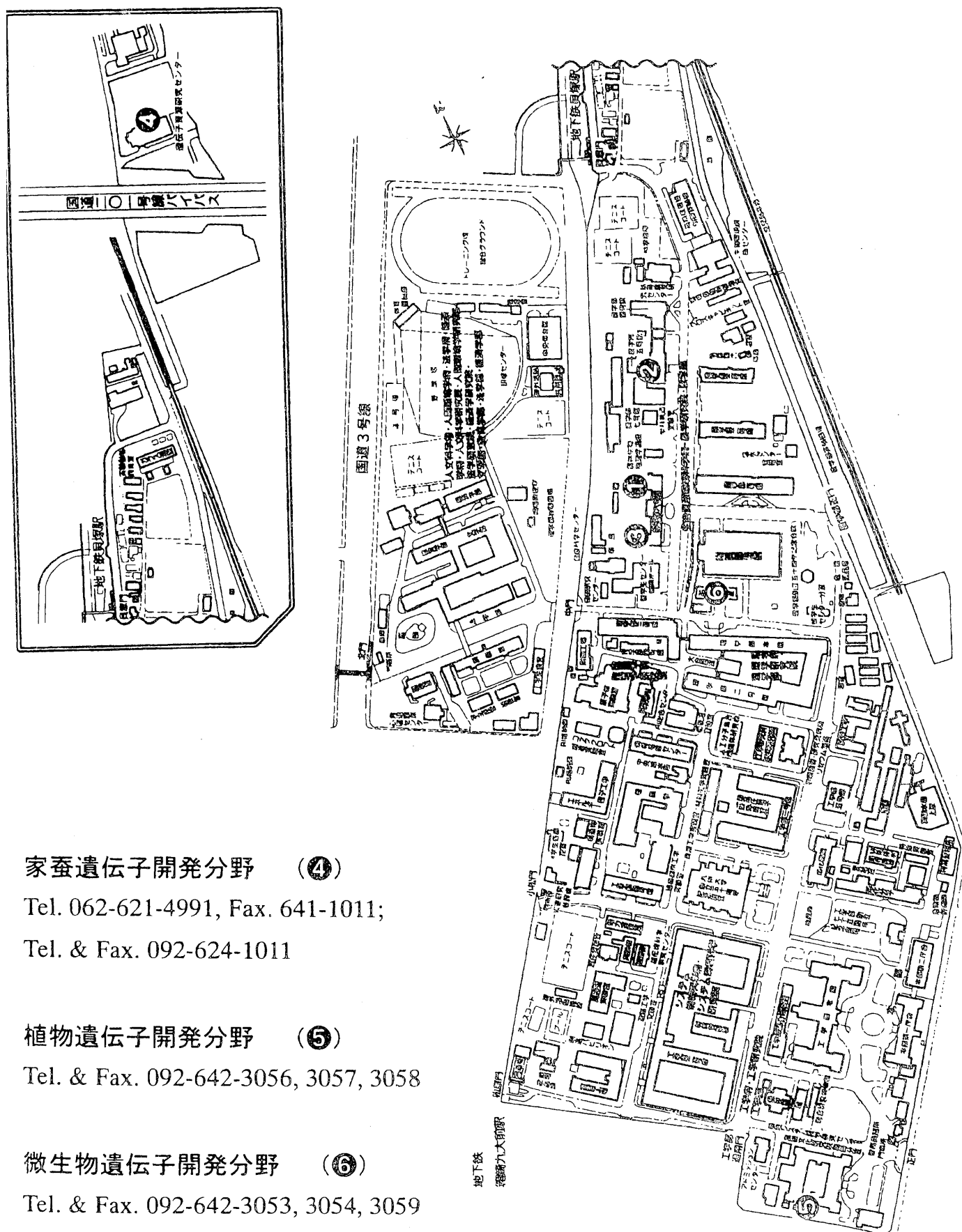
- a) Collection, evaluation and preservation of rice genetic resources

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



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 9 号

平成 20 年 2 月 29 日発行

九州大学農学部附属遺伝子資源開発研究センター

〒812-8581 福岡市東区箱崎 6 丁目 10 - 1

T E L 092 - 642 - 3053

印刷所 門司印刷株式会社

〒801-0851

北九州市門司区東本町 1 丁目 3 番 9 号

T E L 093 - 321 - 4081