

[16015]

農業と醸造業にとって有用な生物素材開発のためのイオンビーム活用

Application of Ion Beam to Develop Biological Materials Useful for Agriculture and Brewing Industry in Future (Progress Report 2016)

二神泰基^{A)}, 玉置尚徳^{A)}, 一谷勝之^{A)}, 橋本文雄^{A)}, 清水圭一^{A)}, 吉田理一郎^{A)}, 内海俊樹^{B)}, 福德康雄^{C)},
尾上昌平^{C)}, 岡本繁久^{#,A)}

Taiki Futagami^{A)}, Hisanori Tamaki^{A)}, Katsuyuki Ichitani^{A)}, Fumio Hashimoto^{A)}, Keiichi Shimizu^{A)}, Riichiro Yoshida^{A)}, Toshiaki Uchiumi^{B)}, Yasuo Fukutoku^{C)}, Masahira Onoue^{C)}, Shigehisa Okamoto^{#,A)}

^{A)} Faculty of Agriculture, Kagoshima University

^{B)} Faculty of Science, Kagoshima University

^{C)} Natural Science Centre for Research and Education, Kagoshima University

Abstract

So far, we have applied carbon ion-beam (IB) on crops and industrial microorganisms to breed new cultivars and strains with agronomically- and industrially-useful traits. In a progress report of 2016, we present recent advance in our research focusing on black koji fungus (*Aspergillus luchuensis*), which is often used in making of distilled spirits in Kagoshima (Imo-Shouchu) and Okinawa (Awamori) regions. Last year, we successfully obtained four mutant strains with high starch-degrading activity from the ion-beam irradiated koji fungus conidia. Among them, a strain named “U1” was chosen and further investigated regarding amylolysis as its activity was stronger than those of the other three although its growth was slower than them. The results obtained demonstrate that the U1 strain has much stronger activities in amylolytic enzymes such as α -amylase, glucoamylase and α -glycosidase, and that secretion of the former two enzymes was likely raised in this mutant. In addition, we report here contents at an IB lecture meeting, which was held in October, 2016, to educate general citizens living in Kagoshima area for knowledge and performance of radio-isotope as well as ion beams used to make their lives better.

Keyword: *Aspergillus luchuensis*, starch-degrading activity, amylolysis

1. はじめに

平成 11 年以来、鹿児島大学のイオンビーム利用研究グループは、高崎量子応用研究所のイオン照射研究施設 (TIARA) を使わせていただき、花卉類 (トルコギキョウやデルフィニウム)、穀類 (イネ)、野菜 (トマトやアイスパラント) の放射線育種や遺伝研究に取り組んできた。加えて、前回のタームからは醸造微生物 (酵母や麹菌) を対象に加え、育種利用におけるイオンビームの可能性を検証してきた。本年度は、進捗状況が良好な黒麹菌を用いて得られた成果を報告する。また、同グループは TIARA へ修士を帯同するなどして学生の放射線教育にも本事業を積極的に活用してきた。今年度、学術啓蒙活動の一環として市民向け講演会【鹿児島大学市民セミナー ～暮らしを豊かにする放射線・イオンビーム～】を開催したので、このことについても報告する。

に利用されている微生物であり、米や大麦、サツマイモなどの原料に含まれるデンプンをグルコースに分解する重要な役割がある。さらに、黒麹菌はクエン酸を高生産する性質をもち、泡盛、焼酎の製造過程において醗の pH を下げて腐敗を防ぐという役割もある。これらの有用な性質のメカニズムを解明することは、産業利用の観点から重要であり、黒麹菌をはじめ黄麹菌 *A. oryzae* などの有用微生物のイオンビームによる変異株の取得、育種への応用について研究が行われてきた [1,2]。

昨年度、われわれのグループではイオンビームを利用して黒麹菌 *A. luchuensis* RIB2601 の突然変異株を効率よく取得するための条件を検討し、さらにデンプン分解活性の高い変異株を 4 株取得した [3]。本年度は、これらの中でも生育が悪いにも関わらずデンプン分解活性が高いという特徴をもつ変異株を U1 株と名付け、その諸性質を解析した [4]。RIB2601 株と U1 株のデンプン分解のハローを比較した結果を示す (Fig. 1)。

2. 研究成果

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* は、泡盛と焼酎の製造

[16015]

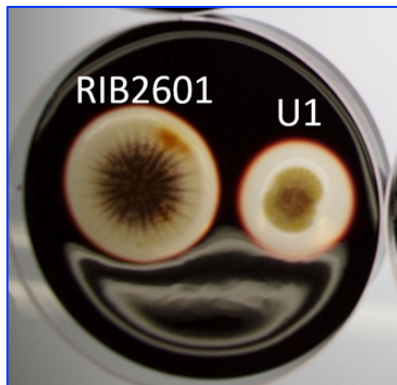


Figure 1. Colony formation and starch degradation test of *A. luchuensis* RIB2601 and strain U1.

まず, RIB2601 株と U1 株のデンプン分解酵素活性を比較した. RIB2601 株と U1 株の分生子を可溶性デンプン含有寒天培地に植菌して, 30 度で 2 日間培養した. その後, タンパク質抽出バッファー (10 mM 酢酸ナトリウム, 0.5% [wt/vol] NaCl, pH 5.5) を寒天培地に注いで, 4℃で 16 時間静置した. この溶液を分泌タンパク質抽出液として, デンプン分解に関わる α -アミラーゼ, α -グルコシダーゼ, およびグルコアミラーゼの酵素活性を α -アミラーゼ測定キットと糖化力分別定量キット (キッコーマンバイオケミファ) を用いて測定した.

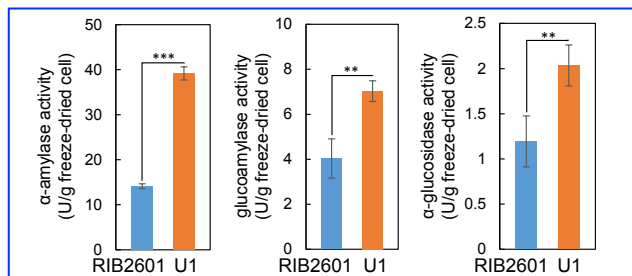


Figure 2. Amylolytic enzyme activities of *A. luchuensis* RIB2601 wild type strain and strain U1. The mean values and the standard deviations were determined from the results on four agar plates. Asterisks indicate statistical significance: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Welch's t-test).

酵素活性 (U) の測定は, キット付属の説明書に従った. また, 菌体量あたりのデンプン分解活性を調べるために, 加熱により培地中の寒天を溶かして菌体を回収した. 菌体を凍結乾燥して重量を測定し, 凍結乾燥菌体 1 g あたりの酵素活性 (U) を計算した. その結果, U1 株の α -アミラーゼ, α -グルコシダーゼ, およびグルコアミラーゼ活性はいずれも親株である RIB2601 株よりも優位に高いことが明らかになった (Fig. 2)

次に, 分泌タンパク質抽出液を限外ろ過 (Vivacon 500, > 50 kDa, Sartorius) により濃縮し, 10%アクリルアミドゲルを用いた Native-PAGE に供した. その後, ゲルを 3%の可溶性デンプンを含む 100 mM 酢酸バッファー (pH5.5) に浸して 30℃で 1 時間振とう

し, ヨードチンキによるデンプン分解活性の活性染色を行った (Fig. 3). 続いて, ヨードチンキを脱色した後に CBB

で再染色し, CBB により染色されたバンドをゲルから切り出して MALDI-TOF MS (Ultraflex massspectrometer, Bruker Daltonics) により解析し, タンパク質を同定した.

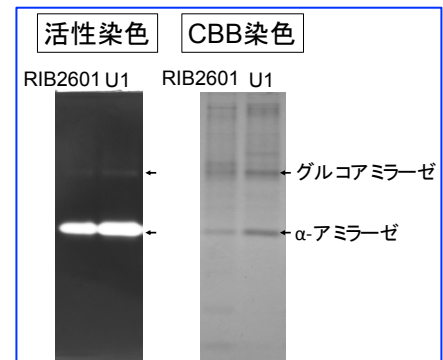


Figure 3. Secreted proteins of *A. luchuensis* wt and strain U1. Amylolytic activity staining was performed after native PAGE of secreted enzymes. CBB staining was performed after destaining of the starch iodine reaction. The bands detected by CBB staining were isolated and identified by MALDI-TOF MS.

活性染色の結果, U1 株は野生株よりもデンプン分解によるバンドが濃く, さらに CBB 染色と MALDI-TOF MS 解析により, 当該バンドが α -アミラーゼに由来することが明らかになった. また, CBB 染色においても α -アミラーゼ由来のバンドは野生株より濃いことから, U1 株において α -アミラーゼの発現量が上昇していることが示唆された. なお, 黒麹菌は中性 α -アミラーゼと耐酸性 α -アミラーゼの 2 種類を生産することが知られている [5]. 検出された α -アミラーゼは前者のタイプであった. また, グルコアミラーゼに由来するデンプン分解のバンドも活性染色により確認され, CBB 染色の結果, α -アミラーゼと同様にグルコアミラーゼも発現量が上昇していることが示唆された.

以上の結果をまとめると, イオンビームにより取得した糖化力の強い黒麹菌 U1 株は, デンプン分解酵素である α -アミラーゼ, グルコアミラーゼ, および α -グルコシダーゼの菌体あたりの酵素活性が上昇していることが明らかになった. また, α -アミラーゼとグルコアミラーゼに関しては菌体あたりの分泌生産量が上昇していることが示唆された.

参考文献

- [1] A. Amsal, et al., Increased digestibility of raw starches by mutant strains of *Aspergillus awamori*. Food science and technology research. 5: 153–155, 1999
- [2] Y. Toyoshima, et al., Lethal and mutagenic effects of ion beams and γ -rays in *Aspergillus oryzae*. Mutat Res. 740: 43–49, 2012
- [3] 平成 27 年度原子力機構施設利用共同研究 一般共同研究 成果報告書
- [4] T. Kojo, et al., Characterization of amylolytic enzyme overproducing mutant of *Aspergillus luchuensis* obtained

[16015]

by ion beam mutagenesis. J. Gen. Appl. Microbiol. in press

[5] T. Suganuma, et al., Some distinguishable properties between acid-stable and neutral types of alpha-amylases from acid-producing koji. J. Biosci. Bioeng., 104: 353–362, 2007

3. 教育成果

平成 28 年 10 月 15 日(土), 鹿児島大学・郡元キャンパスにて市民向け講演会【暮らしを豊かにする放射線・イオンビーム】を開催した。当日は、冷たい秋雨の中、20 歳前半から 60 歳後半まで幅広い年齢層の市民が参加してくれた。講演会は、鹿児島大学イオンビーム利用研究グループが企画したもので、今回が平成 21 年 12 月 24 日(木)以来 2 度目の開催となる。前回の講演会が鹿児島大学の教員や学生を対象として同グループの研究成果を周知するために行われたのに対して、今回の目的は鹿児島県内に住む市民に対する学術啓蒙活動の一環として、放射線に関する正しい情報を提供すること、鹿児島大学や鹿児島県が行ってきたイオンビーム研究の内容を市民一般に公開することである。

講演会を企画した背景は、以下の通りである。2011 年に福島第一原子力発電所が重大事故を起こした。事故後、市民の放射線アレルギーは増すばかりで暮らしや産業における放射線利用に対して嫌悪感を抱く向きも現れた。しかしながら、放射線は、これまでも農業、工業、医療などの分野で広範に利用され、人々の生活に様々な形で役に立ってきたことは紛れもない事実である。そこで、放射線に対する基本知識を講義し、また、農業・食品分野における放射線活用成果の一端を紹介することは、放射線利用の安全性や有効性をアピールし、公の理解と認知を得るために大変重要との考えに至ったからである。

鹿児島大学から 3 名、鹿児島県農業開発センターから 1 名の 4 名の講師を迎えて行った講演(表 1)では、数多くの質問がなされ、参加者の放射線に対する関心の高さを感じることができた。特に市民生活に直接関わる微生物や農作物、例えば、焼酎や発酵食品製造に頻繁に利用される麹菌や、主食であるイネ、生活に潤いを与える花卉植物などを対象としたイオンビーム育種に対する興味と期待の高さを伺わせた。

ロビーで行われたポスターセッションにおいても、市民と研究者が演題の前で活発な質疑応答を行っていた。加えて、展示物を子細に観察し、また、それらの説明に熱心に聞き入る市民も数多く見受けられた。講演会終了時にとったアンケート結果を含め、参加者の感想や意見は概ね良好なものであった。例えば、【兎角、負のイメージがつきまとう放射線に対して正しい知識を得ることで考えを変えた】とか、【医学のみならず工学分野でも利用されており、非常に応用範囲の広いものであることが分かった。】と

いうポジティブな意見があった。このことから、鹿児島市内外に住む市民を対象とした本セミナー(学術講演会)は、一定程度の成功を収めたものと考えられる。しかしながら、少数とは言え、【放射線に対する負のイメージを払拭できるまでには至らなかった。】などのネガティブ意見も見受けられ、放射線教育や、放射線の産業利用に関しての市民啓蒙や理解啓発の難しさも強く感じた。

振り返って、鹿児島大学イオンビーム利用研究グループのメンバーにとっては、講演会は市民のニーズや不安を直接聞く機会を与えてくれたという意味で大きな意義があった。本講演会は、同グループが今後イオンビーム研究を継続・発展させて行く上で重要な契機になったと考えている。

講師氏名	所属	講演内容
福徳 康雄 氏	自然科学教育支援センター アイソトープ実験施設	生活の中の放射線利用
尾上 昌平 氏	自然科学教育支援センター アイソトープ実験施設	鹿児島大学におけるイオンビーム利用
玉置 尚徳 氏	農学部附属 焼酎・発酵学 教育支援センター	イオンビーム照射を利用した焼酎麹菌の育種
上野 敬一郎 氏	鹿児島県農業開発総合 センター	イオンビームを使ったキクの品種改良とブランド

(表 1 鹿児島大学市民セミナー【暮らしを豊かにする放射線・イオンビーム】の講師と講演タイトル)

Table 1. Lecturers and speech titles in IB meeting held at Kagoshima University.



Figure 4. Photographs showing a lecturer and audiences at IB meeting.

4. 謝辞

平成 28 年度実験計画を遂行するに当たり、東京大学原子力専攻共同利用管理本部の皆様方には、本学の遠隔地所在をご考慮いただき、格別のご配慮を賜ったことを此処に記し、心よりの感謝を申し上げます。