

[17012]

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 (Final Report in the Term 2015 - 2017)

橋本文雄^{A)}, 清水圭一^{A)}, 二神泰基^{A)}, 玉置尚徳^{A)}, 一谷勝之^{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)}

Fumio Hashimoto^{A)}, Keiichi Shimizu^{A)}, Taiki Futagami^{A)}, Hisanori Tamaki^{A)}, Katsuyuki Ichitani^{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)} Research Support Center, Institute for Research Promotion, Kagoshima University

Abstract

In the final report of the 2015 - 2017 term, we present the recent progress in our breeding research with ion-beam irradiation, especially regarding to Eustoma flower (*Eustoma grandiflorum*) and black koji mold (*Aspergillus luchuensis*). Eustoma mutants with visible phenotypes in floral organs were obtained in the M₁ generation by irradiating the seeds of with an ion-beam, in which the probability of mutation rate was 1.7%. The typical mutants' trait was observed to be a chimeric fashion of the petal with decrease of pigmentation. This appearance of variegation in M₁ generation could be possibly thought to be an activation of some gene related to a transposable element as in the case observed in the commercial cultivar 'Spica Roman'. As for black koji mold, a U1 mutant strain with a higher saccharification activity was obtained by ion-beam irradiation in 2016. To elucidate the mechanisms underlying this industrially-valuable trait, the mutant has been analyzed molecularly and biochemically. Then, the mutant phenotype was disclosed to be caused by increase in the activities of several starch-degrading enzymes such as α -amylase, glucoamylase and α -glucosidase. Furthermore, the secretion of the former two enzymes was likely enhanced in this mutant, but it was not due to transcriptional activation of these genes. Additionally, in this term, we organized a lecture meeting regarding the applied uses of ion-beam to general citizens in Kagoshima as an enlightenment activity. Furthermore, we also took our graduate student to Takasaki Advanced Radiation Research Institute for educational purpose.

Keyword: *Eustoma grandiflorum*, flower color, anthocyanin, *Aspergillus luchuensis*, starch-degrading activity

1. はじめに

1999 年以来、鹿児島大学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) を利用させていただき、醸造微生物から農作物に至る様々な産業生物の放射線育種研究に取り組んできた。今タームの最終年に当たる本年度報告書では、花卉類(トルコギキョウ)と産業微生物(黒麹菌)に関する最新の成果を報告すると共に、学術啓蒙活動として昨年度開催した市民向け講演会について言及する。

2. 研究成果

第 1 章 トルコギキョウ変異体の作出

1.1 育種の背景

トルコギキョウは園芸カタログに 1934 (昭和 9) 年、キキョウと紹介されて以来、日本を中心に品種

改良が進められ、また、昭和 25 年頃には長野県で切り花用として品種改良がおこなわれていた。当時、矮性紫色品種と高性白花品種が導入され、昭和 50 年代には長野県・千葉県を中心に、桃色花と八重咲き品種が出現したとされている。終戦直後に品種改良されていた品種は紫色花の濃淡品種が主であり、岐阜市の福花園種苗によって昭和 30 年に「高性リシアンサス」として販売が開始された。現在、国内の種苗会社を中心に園芸品種は 700 品種以上であり、開花期、草姿、草勢、花色と花形の斉一性の観点と、非ロゼット性、強幼若性、摘蕾不要性、低温開花性を備えた F₁ 品種の育成が推奨され、新たな F₁ 品種が販売されている。産業上、日本の三大切り花：キク、バラ、カーネーションに猛追しており、国内作付面積はキク、ユリに次いで 3 位、産出額はカーネーションに次ぐ僅差の 5 位となり、日本で育成された品種は世界でも高いシェアを占めている。

[17012]

1.2 これまでの研究成果と目的

当該研究グループは、トルコギキョウ花色の育種関連研究を継続中で、特に、花色の遺伝が 4 つの複対立遺伝子で制御されており、この遺伝子によるフラボノイド生合成の前駆体の水酸化レベルが花色発現に大きく寄与することを見出した^[1-1]。また、花冠形質に係る遺伝においては、かすり花は *B/b*、覆輪花は *E/e* により、黄色花はカロテノイド (CD) 生合成に関係する *Y/y* と、CD を分解する *C/c* の、2 種類の遺伝子型により制御され^[1-2]、花形は八重咲 D^D 型、一重咲 D^S 型、野生種由来一重咲 D^W 型の遺伝子型により制御され、 $D^D D^W$ ヘテロ型が二重咲き形質を発現することを明らかにし^[1-3]、 $D^X D^X \cdot B/b \cdot E/e \cdot Ans/ans \cdot H^X H^X \cdot Pg/pg \cdot Y/y \cdot C/c$ の遺伝子型により目標 F_1 品種を作出できることを実証した^[1-4]。このような中、2000 年から放射線育種に着手し、2008 年には 20-100Gy のイオンビーム線量を照射することにより、効率よく M_1 世代で変異体を獲得することに成功した^[1-5,6]。しかしその後、照射条件の変更等があったことから変異体を得ることができなかつたため鋭意実験を継続し、今回 M_1 世代で再度変異体を獲得できたので報告する。

1.3 材料および方法

トルコギキョウの種子 (100-1,000 粒程度) をカプトン膜 (4 cm × 4 cm) に分封し、照射用のサンプルとした。平成 27-29 年度にかけてイオンビームを 30-100Gy の範囲で照射し、照射した種子は、鹿児島大学農学部実験圃場にて文献記載の方法^[1-3]で播種し、栽培した。今回は、平成 28 年度照射種子について変異体獲得に成功したので、これについて報告する。

1.4 結果

21 系統 359 個体についてイオンビームを照射し、目視により変異が認められたものは 6 個体 (1.7%) であった (Table 1_1)。2008 年に得られた M_1 変異体の確率は 5%前後であったことから^[1-5,6]、今回の変異体獲得率は比較してかなり低くなった。6 個体の系統名は HN12, HN38, HN114, KM11, KM17, KM35 であり、HN38, HN114, KM17, KM35 については非照射個体との比較を行った。一方、HN12 と KM11 については通常個体の開花の確認が次年度となったので、前年度交配組み合わせから通常個体の形質を予測し比較した。

- HN38 由来の変異体

HN38 は TH120 (遺伝子型 $D^D D^S B-eeH^D H^D Ansans$) と TH82 (遺伝子型 $D^D D^W BbEeH^T H^T PgPg Ansans$) の交配による F_1 系統であり、後代母集団として正常花は八重・二重・一重、かすりと全色、白地と緑地に分離し、また、花色は白色花と紫色花に分離した (確認済み)。HN38 の正常花の一例を写真に示す (Fig. 1_1)。写真の個体の遺伝子型は $D^D D^S bbeeH^D H^T Pg-Ans-$ と属される。イオンビーム照射後生育が認められたのは

18 個体で、この内 1 個体に変異が認められた (Table 1)。本変異体の遺伝子型は $D^D D^S B-EeH^D H^T Pg-Ans-$ と帰属される (Fig. 1_2)。花色や花柄には変異は認められなかったが、花形が全体的に崩れた形質が観察された。

Table 1_1. Mutation Percentages by Ion Beam Radiation

| Lines | No. of stocks | mutants | (%) |
|-------|---------------|---------|------|
| TH19 | 35 | 0 | 0 |
| TH62 | 52 | 0 | 0 |
| TH136 | 15 | 0 | 0 |
| TH158 | 11 | 0 | 0 |
| HN7 | 6 | 0 | 0 |
| HN12 | 15 | 1 | 6.7 |
| HN34 | 11 | 0 | 0 |
| HN36 | 46 | 0 | 0 |
| HN38 | 18 | 1 | 5.6 |
| HN40 | 3 | 0 | 0 |
| HN43 | 1 | 0 | 0 |
| HN114 | 28 | 1 | 3.6 |
| KM2 | 3 | 0 | 0 |
| KM4 | 16 | 0 | 0 |
| KM10 | 41 | 0 | 0 |
| KM11 | 18 | 1 | 5.6 |
| KM17 | 15 | 1 | 6.7 |
| KM18 | 16 | 0 | 0 |
| KM22 | 0 | 0 | 0 |
| KM24 | 0 | 0 | 0 |
| KM35 | 9 | 1 | 11.1 |
| Total | 359 | 6 | 1.7 |



Figure 1_1. F_1 Progeny Example of HN38 (Normal Flower)



Figure 1_2. M_1 Individual of HN38 (Mutated Flower)

- HN114 由来の変異体

HN114 は TH141 (遺伝子型 $D^D D^S bbeeH^T H^T PgPg Ansans$) と TH137 (遺伝子型 $D^D D^W BbEeH^D H^D Ansans$) の交配による F_1 系統であり、後代母集団として正常花は八重・二重・一重、かすりと全色、白地と緑地に分離し、また、花色は全色花の紫色花であった (確認済み)。HN114 の正常花の一例を写真に示す (Fig. 1_3)。写真の個体の遺伝子型は $D^D D^S BbEeH^D H^T Pg-Ans-$ と帰属される。イオンビーム照射後生育が認め

[17012]

られたのは 28 個体で、この内 1 個体に変異が認められた (Table 1) . 本変異体の遺伝子型は $D^S D^S BbeeH^D H^T Pg-Ans$ -と帰属される (Fig. 1_4) . 全色紫色花の一部にキメラ上に白色化した部分が観察された.



Figure 1_3. F₁ Progeny Example of HN114 (Normal Flower)



Figure 1_4. M₁ Individual of HN114 (Mutated Flower)

- KM17 由来の変異体

KM17 は HA105 (遺伝子型 $D^W D^W BBeeH^2 H^2 pgpg AnsAns$) と HA1 (遺伝子型 $D^D D^S bbeeH^D H^D pgpg AnsAns$) の交配による F₁ 系統であり、後代母集団として正常花は二重・一重に分離し、また、花色は全色花の紫色花であった (確認済み) . KM17 の正常花の一例を写真に示す (Fig. 1_5) . 写真の個体の遺伝子型は $D^D D^W BbeeH^D H^D pgpg Ans$ -と帰属される. イオンビーム照射後生育が認められたのは 15 個体で、この内 1 個体に変異が認められた (Table 1) . 本変異体の花は見かけ上正常に開花したが、葉の縮れなどの形態異常が観察された (Fig. 1_6) .

- KM35 由来の変異体

KM35 は RIO73 (遺伝子型 $D^D D^S B-eeH^E H^E pgpg ansans$) と HA112 (遺伝子型 $D^W D^W BBeeH^E H^E pgpg AnsAns$) の交配による F₁ 系統であり、後代母集団として正常花は二重・一重に分離し、また、花色は全色花の紫色花であった (確認済み) . KM35 の正常花の一例を写真に示す (Fig. 1_7) . 写真の個体の遺伝子型は $D^D D^W B-eeH^E H^E pgpg Ansans$ -と帰属される. イオンビーム照射後生育が認められたのは 9 個体で、この内 1 個体に変異が認められた (Table 1) . 本変異体の遺伝子型は $D^S D^W B-eeH^E H^X pgpg Ansans$ と帰属される (Fig. 1_8) . 全色紫色花の一部にキメラ状に白色化した部分が観察された.

- HN12 由来の変異体

HN12 は TH38 (遺伝子型 $D^D D^D BBeeH^T H^T PgPg ansans$) と TH36 (遺伝子型 $D^S D^S BBeeH^T H^T PgPg AnsAns$) の交配による F₁ 系統であり、後代母集団として得られる正常花は八重・全色花の桃色花と推定され、遺

伝子型も $D^D D^S BBeeH^T H^T PgPg Ansans$ と予測される. イオンビーム照射後生育が認められたのは 15 個体で、この内 1 個体に変異が認められた (Table 1) . 本変異体の遺伝子型は $D^D D^S BBeeH^T H^T PgPg Ansans$ と帰属される (Fig. 1_9) . 全色桃色花の一部にキメラ上に白色化した部分が観察された.



Figure 1_5. F₁ Progeny Example of KM17 (Normal Flower)



Figure 1_6. M₁ Individual of KM17 (Mutated Leaves)



Figure 1_7. F₁ Progeny Example of KM35 (Normal Flower)



Figure 1_8. M₁ Individual of KM35 (Mutated Flower)

- KM11 由来の変異体

KM11 は FSP17 (遺伝子型 $D^W D^W BBeeH^E H^O PgPg AnsAns$) と HA60 (遺伝子型 $D^D D^D BBeeH^T H^T PgPg AnsAns$) の交配による F₁ 系統であり、後代母集団として得られる正常花は二重・全色花の紫色花または桃色花と推定され、遺伝子型も $D^D D^W BBeeH^T H^T PgPg AnsAns$ と予測される. イオンビーム照射後生育が認

[17012]

められたのは 18 個体で、この内 1 個体に変異が認められた (Table 1) . 本変異体の遺伝子型は $D^D D^W B B e e H^0 H^1 P g P g A n s A n s$ と帰属される (Fig. 1_10) . 全色桃色花の一部にキメラ上に白色化した部分が観察された。



Figure 1_9. M₁ Individual of HN12 (Mutated Flower)



Figure 1_10. M₁ Individual of KM11 (Mutated Flower)

1.5 考察

花卉のイオンビーム育種に関して、カーネーションの葉片または花卉由来の組織片に照射することにより多様な花色の変異体の作製に成功している^[1,7]。一方、トルコギキョウの種子への照射が報告されているが花色の変異は報告されていない^[1,8]。当該研究グループが行った実験では、2008 年に得られた M₁ 変異体の確率は 5%前後であって^[1,5,6]、今回得られた個体は 6 個体であり、確率は 1.7%と低い値となった。照射一代目に変異が認められることは非常に希と考えられており、通常、変異は劣性遺伝であるため、変異二代目 (M₂ 世代) で得られることが一般的である。今回は確率としては低い値であったが、M₁ 世代で変異体を得られることを追認したことは、今後の研究を計画する上で大変価値のある結果であると言えよう。

当該研究グループは花色に関わる色素 (フラボノイド) 生合成の水酸化に複対立遺伝の法則が適用されることを提案した^[1,1]。この方法を用いることでヘテロ型を保有する個体にイオンビームを照射することにより、M₁ 世代 (照射当代) で容易に突然変異を生じせしめることを見出している^[1,5]。今回も得られた 6 個体の変異体はいずれもヘテロ型の遺伝子型であり、M₁ 世代で形質の変異を目視により確認できることができた。しかし、2008 年以降、M₁ 世代の自殖による M₂ 世代以降での変異体の獲得を目指したが、変異体は獲得できなかった。一つの理由として、M₁ 世代で変異が出たものの M₂ 世代の自殖により復帰遺伝子等が働き、元の形質に戻った可能性がある。今後もこの現象の解明を続ける予定である。

一方、変異の形質を観察すると、そのほとんどが花卉の縦に対してキメラ状に斑が入る形質が多いことが明らかとなった。例えば、2008 年に得られた M₁ の一例を示す (Fig. 1_11) . 近年、トルコギキョウ‘スピカロマン’ (Fig. 1_12) の斑入りに関する遺伝子の検討を行った結果、薄紫部位の *F3H* 遺伝子の塩基配列中の第 2 エクソンの領域に約 5.6kbp の挿入配列を見出した^[1-9]。この挿入配列は両端に *E/Spm* 系のトランスポゾンの特徴を有する末端逆位反復配列を有し、本トランスポゾンを *dTeg1* と命名した。一方、‘スピカロマン’の濃紫花卉の *F3H* 遺伝子には数塩基 (3-36bp) の欠失がみられた。この欠失部位は、薄紫花卉の *dTeg1* 挿入配列部位と同じ位置であったことから、*dTeg1* の離脱に伴う欠失と考えられた。したがって、‘スピカロマン’にみられる花卉の斑入りの薄紫部位と濃紫花卉は、それぞれ *dTeg1* 挿入や *dTeg1* の離脱に伴う塩基配列の欠失により *F3H* 遺伝子の機能が抑えられ、発現しているのではないかと推測している。‘スピカロマン’は全色個体との交配による F₁ 後代では斑入りは消失する。そのため斑入り形質は潜性と考えられる。これらのことを考慮すると、イオンビーム照射 M₁ 当代での斑入りの出現や、M₂ 世代以降での斑入りの消失などは、一つの可能性としてトランスポゾンに係る形質の変異と考えられるのではないかと。



Figure 1_11. M₁ Individuals Obtained by 60Gy Irradiation^[1-5]



Figure 1_12. Commercial Cultivar ‘Spica Roman’^[1-9]

1.6 摘要

- イオンビームをトルコギキョウの種子へ照射することにより、M₁ 当代で変異体を得られることを追認した。また、その確率は小さく 1.7%であった。
- 変異は、花卉の縦に対してキメラ状に斑が入

[17012]

る形質が多いことが明らかとなった。

- イオンビーム照射 M₁ 当代での斑入りの出現は、一つの可能性としてトランスポゾンに係る遺伝子の変異と考えられた。

参考文献

- [1_1] Hashimoto F, et al., “Multiple allelism in flavonoid hydroxylation in *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. flowers”, *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 73, 235–240, 2004
- [1_2] 高取由佳, 他, “トルコギキョウにおける黄色花の遺伝様式”, 園芸学研究 (名城大学), 第 15 卷 (別冊 2, P210, pp481), 2016
- [1_3] 高取由佳, 他, “野生種トルコギキョウを起源とする二重咲き花形の遺伝様式”, 園芸学研究, 第 14 卷 4 号, 341–348, 2015
- [1_4] 橋本文雄, 他, “トルコギキョウの新品種作出方法”, 特許第 6153213 号, 2017
- [1_5] 福徳康雄, 他, “イオンビーム累代照射による農作物変異体の作出”, 原子力研究所成果報告書, 2008
- [1_6] 橋本文雄, 他, “花卉の突然変異体を作成する方法”, WO2009119914, 2009
- [1_7] 岡村正愛, “イオンビーム育種の実用化—カーネーション品種シリーズの育成—”, 放射線と産業, No.95, 57–63, 2002
- [1_8] 宮坂昌実, 他, “トルコギキョウ吸水種子への重イオンビーム照射の影響”, 園芸学雑誌, 第 72 卷, 別冊 1, p114, 2003
- [1_9] 江上大貴, 他, “トルコギキョウの花弁の斑入りに関する研究”, 植物色素研究会, 第 29 回集会 (熊本・崇城大学), 発表要旨集 p4, 2017

第 2 章 黒麹菌デンプン高分解株の作出

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* は、泡盛と焼酎の製造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^[2-1,2]。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^[2-3]。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^[2-4]。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. 2_1)。

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°C 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

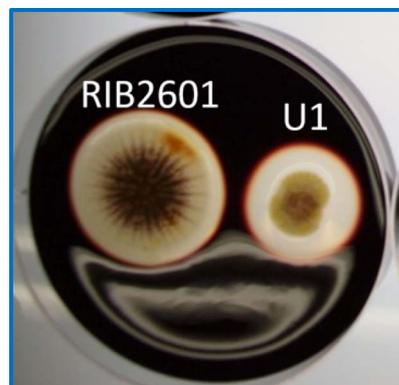


Figure 2_1. Colony Formation And Starch Degradation Test of *A. luchuensis* RIB2601 And Strain U1

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。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 株よりも有意に高いことが明らかになった (Fig. 2_2)。

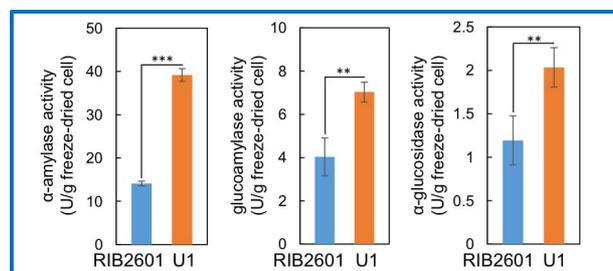


Figure 2_2. Amylolytic Enzyme Activities of *A. luchuensis* RIB2601 Wild Type Strain and Strain U1 The mean values and the standard deviations were determined from the results on four agar plates. Asterisks indicate statistical significance: ** p < 0.01, *** p < 0.001 (Welch's t-test).

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°C 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. 2_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 massspectro-meter, Bruker Daltonics) により解析し、タンパク質を同定した。活性染色の結果、

[17012]

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

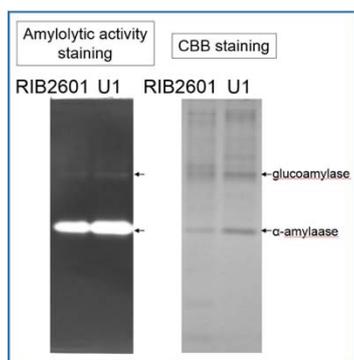


Figure 2_3. Secreted Proteins of *A. luchuensis* Wt And Strain U1 Amyolytic activity staining was performed after native PAGE of secreted enzymes. CBB staining was performed after de-staining of the starch iodine reaction. The bands detected by CBB staining were isolated and identified by MALDI-TOF MS.

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^[2,5]。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。

次に、実際に現場で使用される麴造りにおけるデンプン分解酵素の生産を評価した。米 100 g (蒸す前の重量) あたり RIB2601 株と U1 株の 10^8 の分生子を接種し、一般的な製麴条件で温度と湿度を管理し^[2,6]、培養開始 30 時間後の仕舞仕事と、40 時間後の出麴でサンプリングを行った。また、麴中の菌体量を細胞壁構成成分の 1 つである N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の量を指標として推定した。その結果、まず、U1 株において凍結乾燥菌体あたりの GlcNAc 量が、野生株の 1.3 倍に上昇していることが示唆された (Fig. 2_4)。また、GlcNAc 量に基づいて麴における菌体量を推定した結果、麴における U1 株の菌体量は野生株の 10 分の 1 にまで低下したことが示唆された。

次に、それぞれの麴のデンプン分解酵素活性として 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 (Fig. 2_5)。その結果、U1 株の麴 1g あたりの酵素活性は、出麴の α -アミラーゼ活性、および仕舞仕事のグルコアミラーゼ活性が野生株よりも優位に高い活性を示した。また、麴に含まれる GlcNAc 量から推定した菌体量あたりの酵素活性は、いずれの条件でも U1 株が野生株よりも優位に高い活性を示した。これらの結果より、U1 株によ

り製造した麴は野生株のものと同様以上のデンプン分解酵素を供給できることが示唆された。

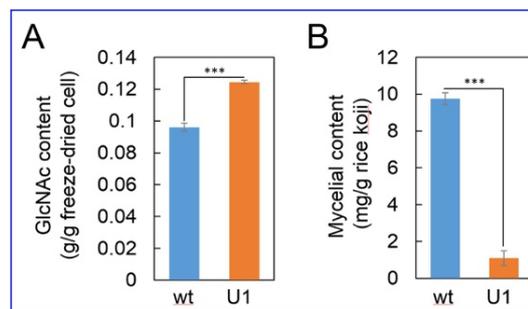


Figure 2_4. Comparison of Growth of *A. luchuensis* Wt and Strain U1 in Rice Koji Based on The GlcNAc Content The GlcNAc content of the cell wall fraction from wt and strain U1 (A). The putative mycelial content of wt and strain U1 in the dekoji of rice koji (B). The putative mycelial content was estimated by the GlcNAc contents of cell wall and rice koji. Asterisks indicate statistical significance: *** $p < 0.001$ (Welch's t-test).

次に、U1 株は菌体あたりの GlcNAc 含量が増加したことから細胞壁合成が変化していると考えられたため、細胞壁合成阻害剤に対する感受性を試験した (Fig. 2_5)。また同時に温度感受性についても試験した。その結果、U1 株が高温 (42°C) 感受性を示すことが示唆された。また、グルカン結合薬剤であるコンゴレッドには高感受性は示さないが、キチン結合試薬であるカルコフルオロホワイトに対して高感受性を示すことが示唆された。この結果は、U1 株においてキチン構成糖である GlcNAc 含量が増加しているためであると推察された。

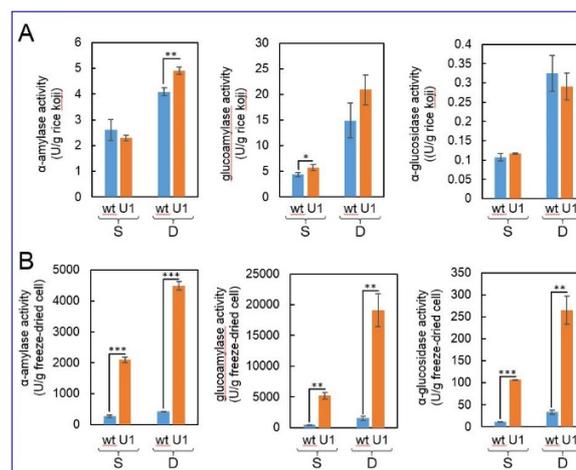


Figure 2_5. The Activity of Amyolytic Enzymes of *A. luchuensis* Wt And Strain U1 in Rice Koji The enzymatic activity on the basis of koji weight (A) and mycelial weight (B). Rice koji was prepared in triplicate and the amyolytic enzyme activities were measured in triplicate using independently prepared samples. The mean values and the standard deviations were determined. Abbreviations: S, shimaishigoto; D, dekoji.

[17012]

Asterisks indicate statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Welch's t-test).

次に、U1 株においてグルコアミラーゼと α -アミラーゼが野生株よりも高分泌生産される原因が、これらをコードする遺伝子の発現上昇によるものであるかどうかを調べるために、麹における遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR により測定した (Fig. 2_6)。その結果、 α -アミラーゼをコードする *amyA* と *aamA*、およびグルコアミラーゼをコードする *glaA* のいずれの遺伝子も野生株と U1 株との間で遺伝子発現レベルに有意な違いがないことが示唆された。したがって、U1 株におけるデンプン分解酵素の分泌量の上昇は、転写量の変化によるのではなく、別の機構によることが示唆された。

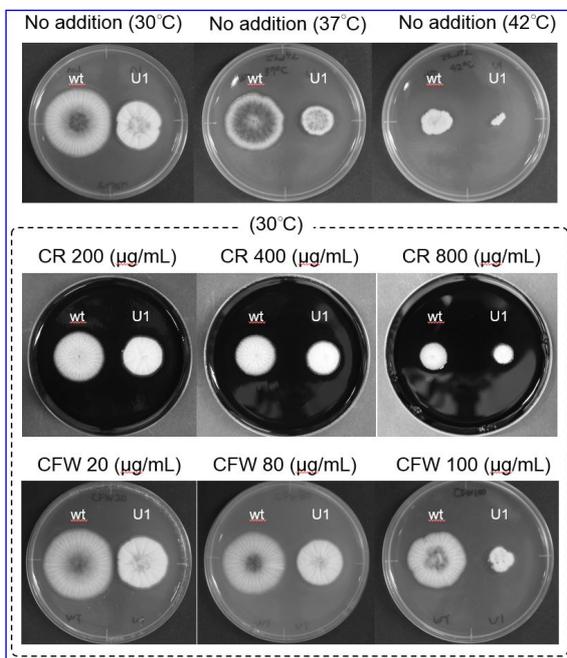


Figure 2_6. Effect of temperature and inhibitors of cell wall biogenesis on the growth of *A. luchuensis* wt and strain U1. The colony formation of wt and strain U1 was compared. Abbreviations: CR, Congo red; CFW, calcofluor white.

次に、U1 株においてデンプン分解酵素が高分泌する原因を解明するために、RIB2601 株と U1 株の比較 RNA-seq 解析を行い、転写プロファイルと比較した (Fig. 2_7)。その結果、RIB2601 株と比較して、U1 株では少なくとも 281 遺伝子の発現が上昇し、323 遺伝子の発現が減少していることが示唆された。これらの発現変動遺伝子の中に、U1 株においてデンプン分解酵素が高分泌される理由と直接結びつく変動は見られなかった。また、デンプン分解酵素遺伝子発現レベルは変化していないことが支持された。次に、これらの発現変動遺伝子を Gene Ontology Enrichment 解析した結果、U1 株において MFS (Major Facilitator Super) family 輸送体やアミノ酸輸送体などを含むト

ランスポーター、GlcNAc の代謝に関与する遺伝子等の発現が顕著に変化していることが示唆された (Fig. 2_8)。この結果から GlcNAc 代謝関連遺伝子の発現変動が、U1 株における GlcNAc 含量増大の原因であると考えられた。

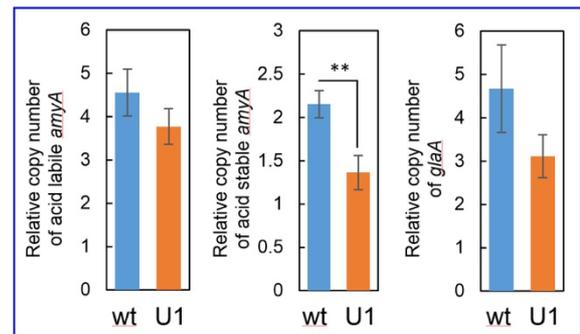


Figure 2_7. Transcription of genes of *A. luchuensis* wt and strain U1 in rice koji. Real-time RT-PCR was performed for the *amyA*, *aamA*, and *glaA* genes. The copy numbers were normalized to the actin gene and the data are presented as relative numbers. Asterisks indicate statistical significance: ** $p < 0.01$ (Welch's t-test).

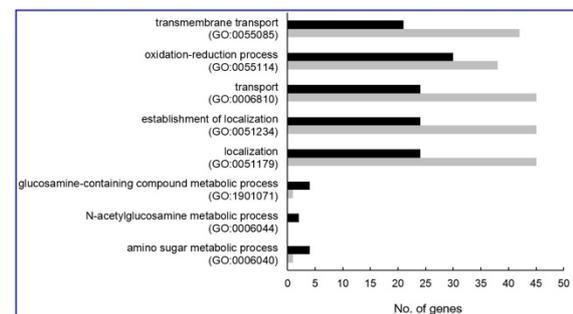


Figure 2_8. Biological process Gene Ontology (GO) terms. The GO terms were identified by GO enrichment analysis of genes showing significant changes in gene expression in strain U1. A set of 604 differentially expressed genes in rice koji was used for the analysis. The GO terms are shown in order of p-value (from lowest to highest; all p-values are < 0.01).

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。その原因として α -アミラーゼ遺伝子やグルコアミラーゼ遺伝子が高発現するようになったのではなく転写後の過程が関わっていることが示唆された。

[17012]

参考文献

- [2_1] Amsal A, et al., Increased digestibility of raw starches by mutant strains of *Aspergillus awamori*. Food science and technology research. 5, 153–155, 1999
- [2_2] Toyoshima Y, et al., Lethal and mutagenic effects of ion beams and γ -rays in *Aspergillus oryzae*. Mutat Res. 740, 43–49, 2012
- [2_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
- [2_4] Kojo T, et al., Characterization of amylolytic enzyme overproducing mutant of *Aspergillus luchuensis* obtained by ion beam mutagenesis. J. Gen. Appl. Microbiol. 63, 339–346, 2018
- [2_5] Suganuma T, 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
- [2_6] Shiraiishi Y, et al., Characteristic odour compounds in shochu derived from rice koji. J. Inst. Brew., 122, 381–387, 2016

3. 教育成果

今タームにおいては、上述の学術研究に加えて、鹿児島市民向けの講演会【暮らしを豊かにする放射線・イオンビーム】(H29年10月15日)を開催した。講演会の目的は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公開することで、放射線の民間利用に関して理解を得ることである。

2011年に起きた福島第一原子力発電所の事故により、国民の放射線嫌い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さえ悪いイメージを抱く人も多い。しかし、放射線が、種々の産業分野で広範に利用され、人々の生活に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の成果の一端を紹介することは、放射線の民間利用に対する国民の理解と容認を得るため重要と考えるに至った。

当日は鹿大イオンビーム利用研究グループから3名、鹿児島県農業開発センターから1名の計4名の講師を迎えて講演会を実施した。聴衆から多くの質問が投げかけられ、放射線に対する市民の関心の高さを感じることができた。特に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、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。このことから、鹿児島市内外に住む市民を対象とした講演会は、一定程度の成功を取れたものと考えられる。しかしながら、少数とはいえネガティブな意見も見られ、放射線教育や放射線の民間利用に関する啓蒙活動の難しさも感じた。今後も定期的に講演会の開催を続けて行くことで、市民の理解を高めていけたらと思う。

振り返って、鹿大グループのメンバー個々にとって講演会は、市民のニーズや不安を直接聞く機会を

与えてくれた。これらの意見はメンバーが研究を継続・発展させて行く上で大きな指針になると考えられる。

最後に、東大開放研のご厚意により修士学生1名を高崎量子応用研究所に帯同し、研究所施設や大型機器、また実際にイオンビーム照射実験を見学させることができたことを此処に記す(2015)。このことは、当該学生に対する放射線教育として多大な効果があったと考えられる。

4. 謝辞

今ターム(平成27-29年)の実験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(開放研)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。また、イオンビーム照射施設を利用させていただくと共に、きめ細やかなご指導・サポートをいただいた量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所の諸氏に感謝申し上げます。