

[18012]

## イオンビーム照射による農業・醸造業にとって有用な遺伝資源の作出

### Production of Genetic Resources Useful for Agriculture and Brewing by Applying Ion Beam Irradiation

一谷勝之<sup>A)</sup>, 二神泰基<sup>A)</sup>, 玉置尚徳<sup>A)</sup>, 橋本文雄<sup>A)</sup>, 岡本繁久<sup>A)</sup>, 吉田理一郎<sup>A)</sup>, 内海俊樹<sup>B)</sup>,  
尾上昌平<sup>C)</sup>, 清水圭一<sup>#,A)</sup>,

Katsuyuki Ichitani<sup>A)</sup>, Taiki Futagami<sup>A)</sup>, Hisanori Tamaki<sup>A)</sup>, Fumio Hashimoto<sup>A)</sup>, Shigehisa Okamoto<sup>A)</sup>, Riichiro  
Yoshida<sup>A)</sup>, Toshiki Uchiumi<sup>B)</sup>, Masahira Onoue<sup>C)</sup>, Keiichi Shimizu<sup>#,A)</sup>,

<sup>A)</sup> Faculty of Agriculture, Kagoshima University

<sup>B)</sup> Faculty of Science, Kagoshima University

<sup>C)</sup> Research Support Center, Institute for Research Promotion, Kagoshima University

#### Abstract

The ion-beam research group established at the Kagoshima University has studied the production of useful mutants by applying ion beam irradiation to crops such as rice, lisianthus, and tomatoes, and to fermentation microorganisms. In this progress report, we present the results obtained for fermentation microorganisms (*Aspergillus luchuensis*) and rice.

Although high citric acid production by *A. luchuensis* is an important property for several industrial processes, the precise mechanism remains unclear. Therefore, in this study, we used ion beam irradiation mutagenesis to obtain a low-citric acid producing mutant, which is useful for identifying novel genes involved in citric acid production in *A. luchuensis*. We succeeded in obtaining a strain with low citric acid production and attempted to identify the genes responsible using next-generation sequencing.

As for rice, we collected the basic information on the effect of irradiation of  $^{12}\text{C}^{6+}$ , an ion beam new to our group, on  $\text{M}_1$  generation of rice plants. The seed fertility of individuals varied as the irradiation dose increased. In addition, the seed fertility varied widely between panicles in an individual. These results suggest that the susceptibility to  $^{12}\text{C}^{6+}$  irradiation varied among cells constituting embryo.

**Keyword:** *Aspergillus luchuensis*, citric acid, seed fertility

## 1. はじめに

鹿児島大学のイオンビーム利用グループは、これまでにイネ、トルコギキョウ、トマト等の作物や、醸造微生物へイオンビーム照射を行い、有用変異体の作出を検討してきた。本年度は黒麹菌とイネにおいて得られた成果を報告する。

焼酎の製造において、麹菌は $\alpha$ -アミラーゼやグルコアミラーゼを分泌生産することで、原料である米、大麦、サツマイモに含まれるデンプンをグルコースに分解する役割がある。焼酎の製造には、主に黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* と白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* が用いられている。これは、黒麹菌と白麹菌が、清酒、味噌、醤油などの製造に用いられる黄麹菌 *Aspergillus oryzae* にはないクエン酸を高分泌生産するという性質をもつからである。

温暖な南九州地域において行われる伝統的な芋焼酎の製造では、甕壺などを用いて解放状態により発

酵を進行させるため、雑菌が醪の中に混入するリスクがある。しかし、黒麹菌や白麹菌が生産するクエン酸が醪の pH を酸性に保つことによって雑菌の増殖を防いでいる。このように、黒麹菌と白麹菌によるクエン酸高生産は、産業上重要な性質であるが、そのメカニズムには不明な点が多く残されている。そこで、本研究では逆遺伝学の手法によりクエン酸生産に関連する新規な遺伝子を探索することを目的として、黒麹菌へのイオンビーム照射により、クエン酸低生産変異株を取得することを目的とした。

イネ *Oryza sativa* は、主要穀物であると同時に単子葉類のモデル植物でもある。従って、イオンビームによる新規突然変異体の獲得や効率的な変異体獲得法の開発は、イネの遺伝学研究に貢献すると考えられる。また、農業上、有用な変異体の選抜は品種改良に直結する。これまで、イネの乾燥種子に  $^{12}\text{C}^{5+}$  220MeV のイオンビームを照射して突然変異を誘発してきたが、サイクロトロン改修に伴い、 $^{12}\text{C}^{6+}$  190MeV というこれまでと異なるイオンビーム種

[18012]

を用いることとなった。 $^{12}\text{C}^{6+}$  190MeV をイネの突然変異の誘発に用いた論文が見つからなかったため、突然変異に適した線量を明らかにするべく、線量を様々に変えて照射を行った。

## 2. 材料及び方法

### 2.1 使用菌株および培養条件

黒麹菌は、*A. luchuensis* RIB2601 株を使用した。培地は、分生子形成培地 (Bacto peptone 1 g, Bacto yeast extract 5 g,  $\text{NaNO}_3$  1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_3$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, glucose 10 g, malt extract 10 g, agar 15 g, all per L)<sup>[1]</sup>と CAP 培地 (glucose 100 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.01 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.00005 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.0025 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.0006 g, all per L, pH 4.0)<sup>[2]</sup>を使用した。クエン酸生産を評価する際には、分生子形成培地に pH 指示薬であるメチルレッド (20 ml/L) を添加した。

### 2.2 クエン酸低生産変異株のスクリーニング

黒麹菌を分生子形成培地 (寒天培地) に植菌し、 $30^\circ\text{C}$  で約 5 日間培養して分生子を形成させた。寒天培地に対してイオンビーム ( $^{12}\text{C}^{6+}$  190MeV, 25 Gy, 50 Gy, 75 Gy, 100 Gy) を照射した後、分生子を 0.1% Triton 溶液を用いて回収した。1 つの分生子に由来するシングルコロニーが形成される濃度まで段階希釈し、メチルレッドを含有する分生子形成培地に塗布した。メチルレッドは pH 4.4 以下では赤色になり、pH 4.4 以上では黄色、オレンジ色になるために、クエン酸の有無で色が変わる。クエン酸生産がある場合、pH が低下することによりコロニーの周囲が赤色を呈するが、クエン酸生産性が低下した場合、赤色を呈さないことを指標として、クエン酸低生産変異株を選択した。

### 2.3 クエン酸低生産変異株のスクリーニング

取得したクエン酸低生産変異株のクエン酸の排出量を比較するために黒麹菌 RIB2601 株とクエン酸低生産変異株を用いて 3 連で麹を製造し、有機酸濃度を測定した。種付けは分生子の懸濁液によって行い、分生子数  $1 \times 10^6$  個/g (蒸煮前の米 1 g あたり) とした。出麹 10 g を蒸留水 50 ml に懸濁し、 $25^\circ\text{C}$  で 3 時間かけて有機酸を抽出した。有機酸抽出液をフィルター濾過した後、液体クロマトグラフィーにより有機酸の定量を行った。

### 2.4 イネ

台湾のイネ品種で温帯日本型の台中 65 号供試した。この品種は、イネの遺伝学的研究で非常に多く用いられている。イオンビーム照射方法は Ichiatni et

[ここに入力]

al. (2014) に従った<sup>[3]</sup>。簡単に記すと、照射前日に種子の籾殻を除去して玄米にし、胚が上を向くようにして直径 6cm のプラスチックシャーレの中心近くに 90 粒を両面テープで貼り付けた。胚の上部からイオンビームを照射した。イオンビーム種は  $^{12}\text{C}^{6+}$  190MeV で 5, 10, 15, 20, 25, 30 Gy 照射した。照射、冷却後、鹿児島に持ち帰り、プラスチックシャーレに貼り付けたままの状態ですべて殺菌剤である PPM 1% 液に浸種、翌日、水道水に入れ替え、浸種後 5 日目に播種した。40 日後に  $7.5\text{cm} \times 25\text{cm}$  の栽植密度で移植した。個体ごとに収穫し、各処理区から 6 本以上分けつを発生した個体から 10 個体を無作為に選抜し、1 穂ごとに種子稔性を調査し、1 個体あたり 5 穂調査した。解析には 1 穂ごとの種子稔性 (1 穂中の稔種子 / 1 穂中の全種子) と、5 穂全体の種子稔性 (5 穂中の稔種子 / 5 穂中の全種子) の両方を用いた。5 穂全体の種子稔性を個体の種子稔性と定義する。

## 3. 結果と考察

### 3.1 麹菌

クエン酸低生産変異株に関しては、イオンビーム

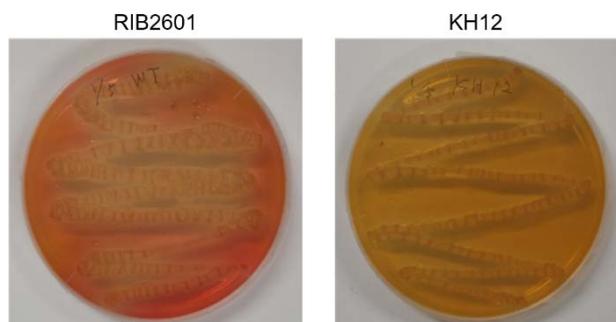


Figure 1. Growth of *A. luchuensis* RIB2601 and KH12. The strains were cultivated on agar medium containing methyl red as pH indicator.

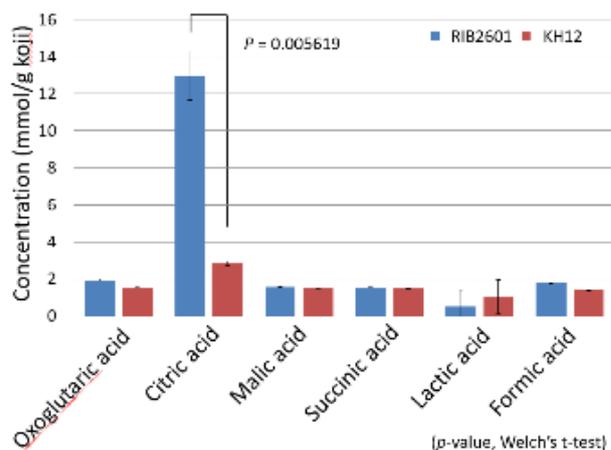


Figure 2. Production of organic acids by *A. luchuensis* RIB2601 and KH12.

[18012]

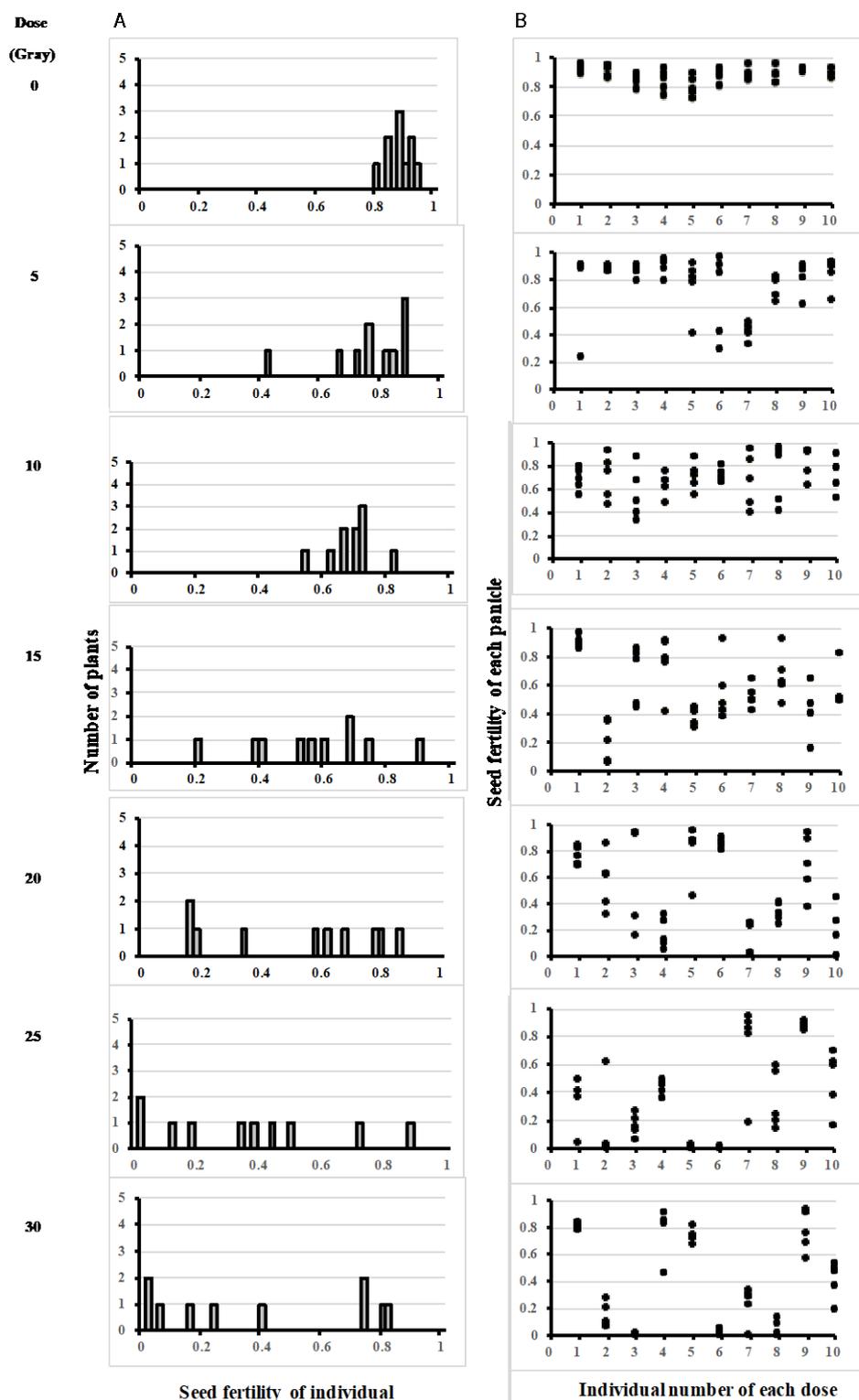


Figure 3. Seed fertility of rice M<sub>1</sub> generation irradiated with <sup>12</sup>C<sup>6+</sup> ion beam. A. Distribution of seed fertility of individuals defined as number of fertile seeds on five panicles divided by number of all seeds on the same five panicles. Number of plants for each dose is ten. B. Seed fertility of each of five panicles defined as number of fertile seeds on a panicle divided by number of all seeds on the same panicle.

[ここに入力]

[18012]

を照射した黒麹菌分生子に由来する約 4200 のコロニーを観察した結果、コロニー周囲の赤色化が親株である RIB2601 株よりも弱い菌株を 1 株取得した。本菌株をクエン酸低生産変異株の候補として KH12 株とした (Fig. 1)。そこで、KH12 株のクエン酸生産を定量的に評価するために、RIB2601 株と KH12 株を用いて米麹を製造し、麹における有機酸生産を分析した (Fig. 2)。その結果、KH12 株のクエン酸生産能は親株である RIB2601 株の約 20% 程度に低下したことが明らかになった。今後、本菌株のゲノム配列を解析することによって、クエン酸クエン酸低生産の原因となった遺伝子を同定する予定である。

### 3.2 イネ

個体の種子稔性の分布を照射線量ごとに Fig. 3A に表した。また、各個体の 1 穂ごとの種子稔性の分布を Fig. 3B に表した。Fig. 3A から照射線量が大きくなると個体の種子稔性は大きくばらつくことが分かる。個体の種子稔性の平均値は 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 グレイでそれぞれ 0.87, 0.75, 0.68, 0.55, 0.50, 0.35, 0.38 であった。また、Fig. 3B から 1 個体内であってもイオンビーム照射区では種子稔性が大きくばらつくことが分かる。以上の結果はイオンビーム照射から受ける影響は胚の細胞ごとに大きく異なることを示唆している。突然変異誘発の観点からは、種子稔性と突然変異体出現率の関係を明らかにすることが重要である。

### 参考文献

- [1] T. Kojo, et al., "Characterization of amylolytic enzyme overproducing mutant of *Aspergillus luchuensis* obtained by ion beam mutagenesis", *Journal of General and Applied Microbiology*, 63:339-346, 2018
- [2] C. Kadooka, et al., "Mitochondrial citrate transporters CtpA and YhmA are required for extracellular citric acid accumulation and contribute to cytosolic acetyl coenzyme A generation in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*", *Applied and Environmental Microbiology*, 85:e03136-18, 2019
- [3] K. Ichitani, et al., "Genetic analysis of ion-beam induced extremely late heading mutants in rice". *Breeding Science* 64: 222-230, 2014

[ここに入力]