

[19014]

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^{A)}, 二神泰基^{A)}, 玉置尚徳^{A)}, 橋本文雄^{A)}, 岡本繁久^{A)}, 吉田理一郎^{A)}, 内海俊樹^{B)}, 山本雅史^{A)}
尾上昌平^{C)}, 清水圭一^{#,A)},

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

^{A)} Faculty of Agriculture, Kagoshima University

^{B)} Faculty of Science, Kagoshima University

^{C)} 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 tomato, and to fermentation microorganisms. In this progress report, we present the results obtained for fermentation a microorganism (*Aspergillus luchuensis*) and rice.

Melanin has an important role in conidial pigmentation and tolerance to environment stress in filamentous fungi. A white koji fungus, *A. luchuensis* mut. *kawachii*, was isolated as an albino mutant from the black koji fungus, *A. luchuensis*. In this study, we found that *A. luchuensis* mut. *kawachii* produces black colored conidia by complementation of the wild type *pksP* gene, which encodes a polyketide synthase involved in biosynthesis of dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin. The *pksP* complementation and overexpression strain showed higher resistance against ultraviolet, hydrogen peroxide, and ion beam than the control strain.

As for rice, we collected the basic information on the effect of irradiation of $^{12}\text{C}^{5+}$ on M_1 generation of an Indica rice cultivar IR24, which is susceptible to most *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) races, and has been used for the genetics of *Xoo* resistance in rice. The average seed fertility of the main culm was 0.928, 0.652, 0.66, 0.561 and 0.472, at irradiation dose of 0, 10, 15, 20 and 25 Gy, respectively. The seed fertility of the main culm varied as the irradiation dose increased.

Keyword: *Aspergillus luchuensis*, melanin, 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。本年度は麹菌とイネにおいて得られた成果を報告する。

白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* は、黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の白色突然変異体、いわゆるアルビノであり、主に焼酎の製造に使用されている。糸状菌において分生子の色調は分類の指標となり、それに関わる遺伝子の解析が進んでいる。黒麹菌 *A. luchuensis* RIB2604 株では黒色素である dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin の骨格合成を担うポリケチド合成酵素をコードする *pksP* を破壊すると、*A. luchuensis* mut. *kawachii* と同様の白色分生子を形成したことから、*pksP* は白色化の原因遺伝子であると推測された[1]。

また、白麹菌 *A. luchuensis* mut. *kawachii* NBRC 4308 株のゲノム解析の結果、*pksP* に 1 塩基欠損によるフレームシフト突然変異が生じていることが明らかになり、白色化の原因として推定された [2]。そこで本研究では、NBRC 4308 株において野生型 *pksP* を発現する株を構築し、黒色化することを確認した。

また、白麹菌の黒色化が紫外線 (UV)、過酸化水素 (H_2O_2)、およびイオンビーム等へのストレス耐性に及ぼす影響について評価した。

インド型イネ品種 IR24 は国際イネ研究所が育成した多収性イネ品種である。ほとんどすべての白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) レースに対して感受性であることが知られており、白葉枯病抵抗性遺伝子の同質遺伝子系統シリーズの育成が行われている[3]。また、化学突然変異原 MNU を利用して突然変異抵抗性系統の育成が試みられ、MX5, XM6, XM14 などが育成されている[4]。遺伝子分析の結果、これらの 3 系統はいずれも 1 劣性抵抗性遺伝子をもち、供試されたすべての白葉枯病菌レースに抵抗性を示す。本研究では、IR24 へのイオンビーム照射による新たな抵抗性系統の作出を試みた。これまで当研究グループでイオンビーム照射の研究に用いたイネ品種はすべて日本型品種の台中 65 号であったため、本研究では、IR24 の乾燥種子に 10, 15, 20, 25Gy のイオンビームを照射し、照射当代の種子稔性に与える影響を調査した。

[19014]

2. 材料および方法

2.1 使用菌株

白麹菌 *A. luchuensis* mut. *kawachii* NBRC 4308 株に由来する *CpksP* 株 (*pksP* 相補株), *OEpkpP* 株 (*pksP* 過剰発現株), $\Delta ligD \Delta sC$ (メチオニン要求性株), $\Delta ligD \Delta argB$ (アルギニン要求性株) を使用した。コントロール株は、比較対象の菌株と同じ栄養要求性を示す株を定義した。*CpksP* 株のコントロール株は $\Delta ligD \Delta sC$ であり, *OEpkpP* 株のコントロール株は $\Delta ligD \Delta argB$ である。

2.2 紫外線 (UV) 耐性試験

各菌株の分生子 (1.0×10^5) を PD 寒天培地 (BD Difco™) にスポットし, 30℃で5日間培養し, 分生子懸濁液を調整した。PD 寒天培地に分生子 (約 100) を塗布した後, クリーンベンチ内において UV ランプから 30 cm の距離で UV を照射した。その後, 30℃で3日間培養し, 出現したコロニー数を計数した。同様の操作で, UV を照射しない試料を調整し, 出現したコロニー数を分母として生存率 (%) を算出した。

2.3 酸化ストレス耐性試験

各菌株の分生子懸濁液は, 上述した UV 耐性試験に用いたものと同じものを使用した。各菌株の分生子を 100 mM, あるいは 200 mM の H_2O_2 で, 室温で 15 分間処理した。その後, PD 寒天培地に分生子 (約 100) を塗布し, 30℃で3日間培養し, 出現したコロニー数を計数した。同様の操作で, H_2O_2 で未処理の試料を調整し, 出現したコロニー数を分母として生存率 (%) を算出した。

2.4 イオンビーム耐性試験

各菌株の分生子 (5.0×10^6) を PD 寒天培地に塗布し, 30℃で7日間培養した。プレートのカプトン膜 (東レ・デュポン) で覆い, 上部からイオンビームを照射した。イオンビーム種は $^{12}C^{5+}$ 220 MeV で, 50, あるいは 100 Gy 照射した。滅菌水で分生子を回収し, PD 寒天培地に約 100 個の分生子を塗布し, 30℃で3日間培養し, 出現したコロニー数から生存率 (%) を算出した。

2.6 イネ

イオンビーム照射方法は[5]に従った。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 $^{12}C^{5+}$ 220 MeV で, 10, 15, 20, 25Gy 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3日目に播種した。31日後に 15cm x 30cm の栽植密度で移植した。これまでの研究により ([Ichitani et al, in preparation], [6]), 主稈に着いた穂に突然変異個体が出現しやすいことが判明しているため, 本研究では

1 個体からそれぞれ主稈についた穂を収穫し, 種子稔性を調査した。種子稔性は穂の上位 50 粒における稔種子の割合で評価した。

3. 結果及び考察

3.1 黒色化によるストレス耐性の付与

多くの真菌において, melanin は UV 等の DNA 損傷ストレスへの耐性に重要な役割をもつことが知られている。そこで, 白麹菌 NBRC 4308 における *pksP* の発現による黒色化 (Fig. 1) が UV, 酸化ストレス, イオンビームへの耐性に及ぼす影響を評価した。

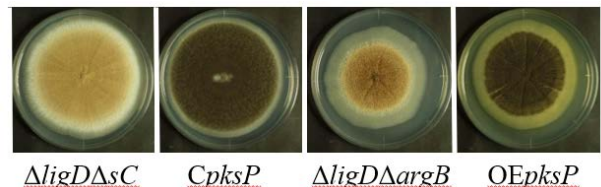


Figure 1. Colony of *A. luchuensis* mut. *kawachii* strains. Conidia (1.0×10^5) were inoculated onto PD agar medium and incubated for 5 days.

まず, *CpksP* 株はコントロール株よりも, UV 照射 45 秒と 60 秒において, それぞれ約 1.6 倍, 約 2.3 倍高い生存率を示した (Fig. 2A)。また, *OEpkpP* 株もコントロール株よりそれぞれ約 2.4 倍, 約 3.3 倍高い生存率を示した。

次に, 活性酸素種を産生し酸化ストレスを引き起こす H_2O_2 に対する耐性について解析した結果, 100 mM および 200 mM の H_2O_2 曝露に対して, コントロール株と比較して, *CpksP* 株はいずれも約 1.2 倍, *OEpkpP* 株はそれぞれ約 1.2 倍, 約 1.3 倍の高い耐性を示した (Fig. 2B)。

さらに, 突然変異育種の変異源として利用されるイオンビームに対する耐性を比較した。*CpksP* 株は 50 Gy, および 100 Gy の炭素イオンビームに対して, コントロールと比較して, それぞれ約 1.5 倍, 約 1.8 倍耐性が増加した (Fig. 2C)。また, *OEpkpP* 株では 50 Gy のイオンビームに対して約 2.8 倍耐性が増加した。

以上の結果より, 黒色色素は分生子の UV やイオンビーム等の DNA 損傷ストレス耐性, および H_2O_2 等の酸化ストレス耐性に関与しており, *pksP* の相補, あるいは過剰発現によってこれらのストレス耐性が上昇することが示唆された。

[19014]

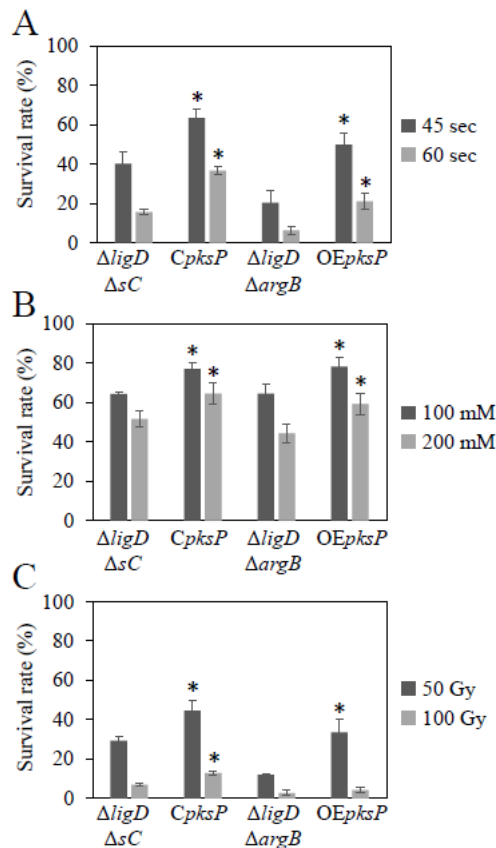


Figure 2. The survival rates (%) of conidia after the treatment of UV irradiation (UV lamp irradiation for 45 sec or 60 sec) (A), oxidative (100 mM or 200 mM H_2O_2 for 15 min) (B), or ion beam irradiation (50 Gy or 100 Gy) (C). The mean and standard deviation were determined from the results of 3 independent experiments. *, Statistically significant difference ($p < 0.05$, Welch's t-test) relative to results for the control strain.

3.2 イネ

種子稔性の分布を Fig. 3 に示した。10Gy, 15Gy ではほとんどの個体の主稈の種子稔性は 0.4 以上を示したが、20Gy, 25Gy では 0 から 1 の範囲で大きくばらつき、20Gy, 25Gy と線量が高くなるにつれて、種子稔性が下がる傾向が見られた。2018 年度の報告では、1 個体内の 5 穂の種子稔性の個体内のばらつきを報告したが、主稈についた穂に絞った 2019 年度の報告では個体間で種子稔性が大きくばらついた。しかし、出穂日、稈長、分げつ数では、照射線量間で肉眼で認識できるような大きな差は認められなかった。2020 年度は M_2 世代を水田に展開し、白葉枯病菌を接種することにより、抵抗性個体を選抜する予定である。

No of
 M_1 plants

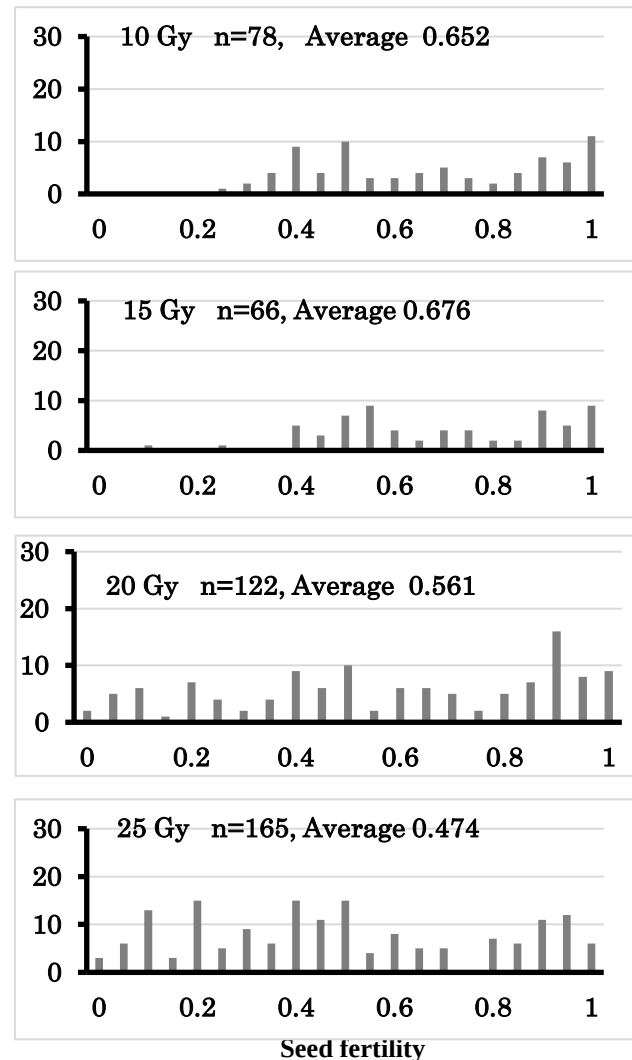


Figure 3. Distribution of seed fertility of rice M_1 generation irradiated with $^{12}C^{5+}$ ion beam. Seed fertility was evaluated by collecting 50 seeds from the upper side of the panicle of the main culm.

参考文献

- [1] T. Takahashi, et al., "Development of an efficient gene-targeting system in *Aspergillus luchuensis* by deletion of the non-homologous end joining system", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112, 529–534, 2011, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.08.007
- [2] 後藤正利ら, "焼酎麹菌の Identity を探る", 日本醸造協会誌, 109, 219 - 227, 2014, DOI:

[19014]

10.6013/jbrewsocjapan.109.219

- [3] T. Ogawa et al., Breeding of near-isogenic lines of rice with single genes for resistance to bacterial blight pathogen (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*), Japan. J. Breed., 41, 523–529, 1991, DOI:10.1270/jsbbs1951.41.523
- [4] C. Busungu, et al., Identification and linkage analysis of a new rice bacterial blight resistance gene from XM14, a mutant line from IR24, Breed. Sci., 66, 636–645, 2016, DOI: 10.1270/jsbbs.16062
- [5] K. Ichitani, et al., Genetic analysis of ion-beam induced extremely late heading mutants in rice, Breed. Sci., 64: 222–230, 2014, DOI:10.1270/jsbbs.64.222
- [6] K. Osone, Studies on the developmental mechanism of mutated cells induced in irradiated rice seeds, Japan. J. of Breed, 13, 1–13, 1963, DOI:10.1270/jsbbs1951.13.1