

[20014]

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

The black koji fungus *Aspergillus luchuensis* produces a large amount of citric acid, which play an important role in preventing the microbial contamination during the fermentation process of shochu. We obtained the low citric acid producing mutant of *A. luchuensis* to clarify the mechanisms underlying the high citric acid production using ion beam irradiation mutagenesis. We are currently performing the comparative genome analysis of the parental strain and the mutant to identify the genes responsible for the citric acid productivity.

As for rice, we collected the basic information on the effect of irradiation of $^{12}\text{C}^{5+}$ on M_2 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. On M_1 plant basis, 20Gy irradiation induced the most frequent chlorophyll mutation, followed by 25Gy, 10Gy, 15Gy. No clear relationship between the seed fertility of M_1 plant and emergence of chlorophyll mutant in M_2 generation was observed.

Keyword: citric acid, shochu, *Aspergillus luchuensis*

1. はじめに

発酵食品の製造において、麹菌は α -アミラーゼやグルコアミラーゼなどの糖質加水分解酵素を生産することで、原料である穀類や芋類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。清酒、味噌、醤油などの製造に黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) が用いられるのに対して、焼酎造りでは主に黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) と、そのアルビノである白麹菌 (*Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*) が用いられている^[1]。これは、黒麹菌と白麹菌が、クエン酸を高分泌生産する性質も有するからである。焼酎の文化は温暖な九州地域において発展してきたことから、雑菌が醪の中に混入し、増殖するリスクが高い。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腐造を防いでいる。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^[2]。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^[3]。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持ち、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、イオンビーム線量と照射当量 (M_1 世代) の種子稔性並びに M_2 世代における葉色突然変異出現頻度に与える影響を調査した。

2. 材料及び方法

2.1 使用菌株および培養条件

[20014]

黒麹菌 *A. luchuensis* RIB2601 株を使用した。各菌株は、分生子形成培地 (Bacto peptone 1 g/L, Bacto yeast extract 5 g/L, NaNO₃ 1 g/L, K₂HPO₃ 1 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, glucose 10 g/L, malt extract 10 g/L, agar 15 g/L)^[4] とクエン酸生産誘導培地 (glucose 100 g/L, (NH₄)₂SO₄ 3 g/L, KH₂PO₄ 0.01 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.00005 g/L, ZnSO₄·5H₂O 0.0025 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.0006 g/L, pH 4.0)^[5] を使用した。クエン酸低生産株をスクリーニングする際には、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寒天培地に植菌し、30℃で約 5 日間培養して分生子を形成させた。寒天培地の表面をカプトン膜 (東レ・デュポン株式会社) で覆い、イオンビーム (¹²C⁶⁺ 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。分生子懸濁液を 1 つの分生子に由来するシングルコロニーを形成する濃度に希釈し、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、クエン酸の生産性に応じて色が変化する。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し、クエン酸生産性が低下した場合、赤色を呈さない。これを指標として、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の有機酸生産性を評価した。まず、分生子懸濁液を調製し、100 mL の分生子形成誘導培地に 2×10⁷ の分生子を植菌した。これを 30℃で振とう培養し、培養上清を回収した。培養上清をフィルター濾過した後、電気伝導度検出器を装備した液体クロマトグラフにより有機酸の定量を行った^[4,5]。

2.4 イネのイオンビーム照射

イオンビーム照射方法は^[6]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 ¹²C⁵⁺ 220MeV で、10, 15, 20, 25 グレイ (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に殺菌剤である 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)^[7]、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。種子稔性の調査後、1 穂に稔った全種子を脱穀し、畑土を詰めた直径 10cm のポリポットに無作為選抜した 20 粒を播種し、播種後約 2 週間目に葉色突然変異体の出現の有無を調査した。播種後約 50 日後に水田に移植し、穂孕期に白葉枯病菌を剪葉法^[8]により接種し、接種後 2 週間目に病斑の伸びを目視で評価し、病斑の伸びが抑制された個体の種子を収穫した。

3. 結果と考察

3.1 麹菌

イオンビームを照射した黒麹菌の分生子に由来するコロニーを観察した結果、コロニー周囲の赤色が親株である RIB2601 株よりも弱い菌株を 5 株取得し、BM40~44 とした。これらのうち BM41~44 の 4 株は、30℃で培養するとコロニー周囲は赤色を呈さなかったが、40℃で培養すると赤色を呈した (Figure 1)。一方、BM40 株は 40℃で培養してもコロニーの周囲は赤色を呈さなかった。このことから、BM40 株はクエン酸低生産変異株であると考えられた。

そこで次に、クエン酸生産誘導液体培地に RIB2601 株と BM40 株の分生子を接種し、30℃で振とう培養を行い、培養開始 14 日目の培養上清に含まれる有機酸濃度を高速液体クロマトグラフィーにより分析した (Table 2)。その結果、RIB2601 株の培養上清には α-ケトグルタル酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸が検出されたのに対して、BM40 株の培養上清にはクエン酸とコハク酸を検出できなかった。以上のことから、BM40 株はクエン酸だけでなくコハク酸の生産性も低下した株であることが示唆された。現在、RIB2601 株と BM40 株のゲノム配列を解析しており、それらを比較することによってクエン酸低生産の原因となった変異を同定する予定である。

3.2 イネ

供試全 M₁ 個体の種子稔性の頻度分布を Figure 2 に、M₂ 世代で葉色突然変異体が出現した M₁ 個体の種子稔性の頻度分布を Figure 3 に示した。また一部の葉色突然変異体の外観を Figure 4 に示した。M₂ 世代で葉色突然変異体が生じた M₁ 個体の頻度は 20Gy が 12.8%で最も高く、次いで 25Gy が 9.7%、10Gy が 5.8%、15Gy が 1.6%であった。同一照射線量における供試全 M₁ 個体の種子稔性の頻度分布と M₂ 世代で葉色突然変異体が出現した M₁ 個体の種子稔性の頻度分布は似通っており、種子稔性と突然変異個体出現との間に明瞭な関係はないと考えられた。

白葉枯病抵抗性個体の選抜では、54M₂ 系統で抵抗性個体が出現したが、葉色突然変異より高い頻度で出現することは考えにくいため、白葉枯病菌接種が不十分であった可能性が考えられる。抵抗性個体の後代 M₃ 系統を 2021 年に栽植して後代検定することにより、真に抵抗性の系統を選抜する予定である。

[20014]

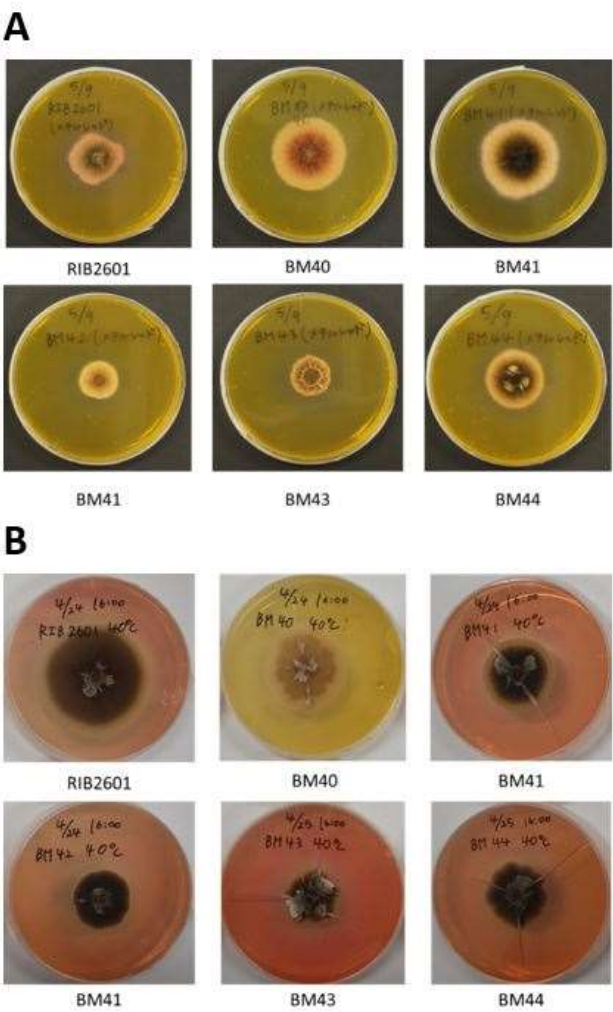


Figure 1. Colony formation of *A. luchuensis* strains at 30°C (A) or 40°C (B). The strains were cultivated on agar medium containing methyl red as pH indicator.

参考文献

[1] 門岡千尋 ら., “白麴菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* NBRC 4308 のアルビノ表現型の原因遺伝子の解析”, *日本醸造協会誌*, 115:369–377, 2020

[2] 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

[3] 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

[4] 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

[5] 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

[6] K. Ichitani et al., Genetic analysis of ion-beam induced extremely late heading mutants in rice. *Breed. Sci.* 64: 222–230. DOI:10.1270/jsbbs.64.222, 2014

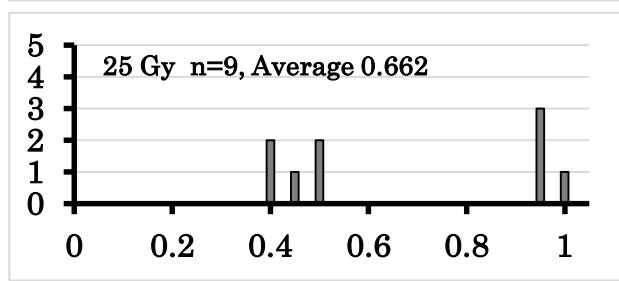
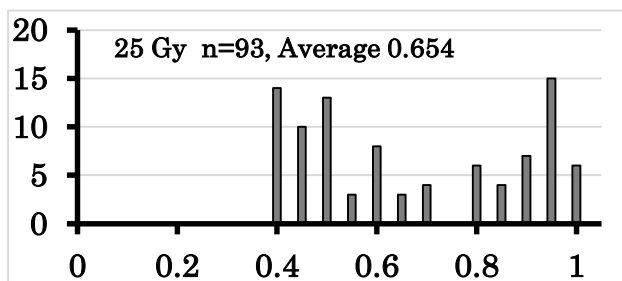
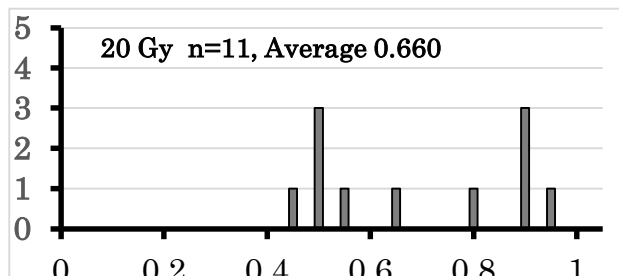
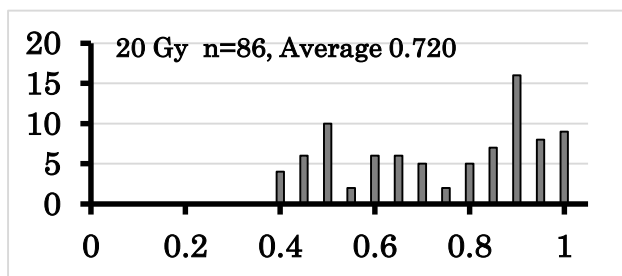
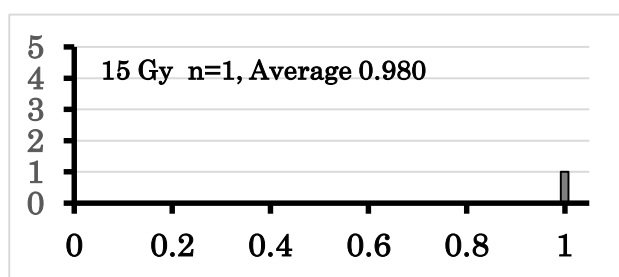
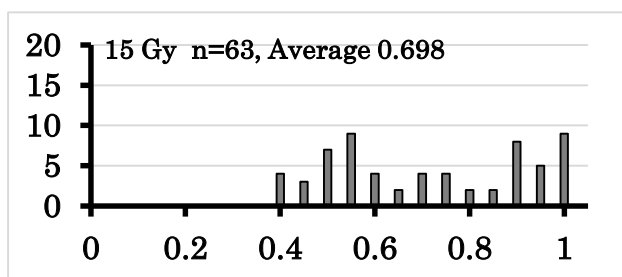
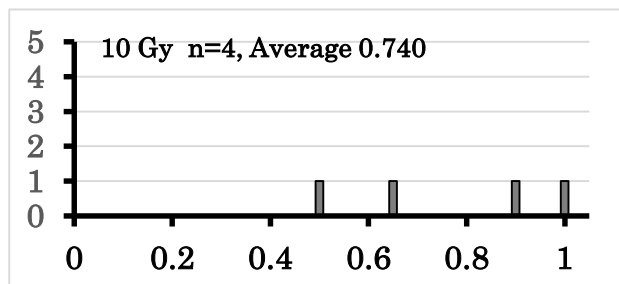
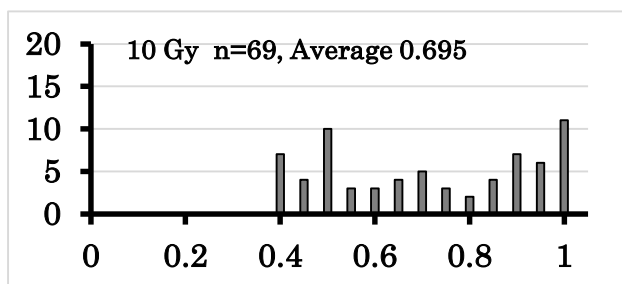
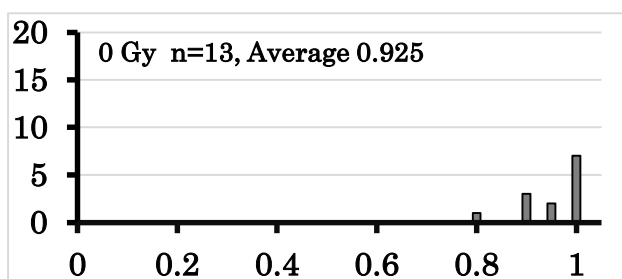
[7] K. Osone, Studies on the developmental mechanism of mutated cells induced in irradiated rice seeds. *Japan. J. of Breed.* 13: 1-13, 1963

[8] H. E. Kauffman et al., An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*, *Plant Dis. Rep.*, 57: 537–541, 1973

Table 1. Organic acid production of *A. luchuensis* strains.

Strain	Organic acid concentration (mM)			
	alpha-Keto	Citric	Malic	Succinic
	glutaric acid	acid	acid	acid
RIB2601_1	1.4	1.1	1.2	1.6
RIB2601_2	1.2	1	1.2	1.6
BM40_1	1.9	n.d.	1.1	n.d.
BM40_2	1.7	n.d.	1.1	n.d.

[20014]



Seed fertility

Figure 2. Distribution of Seed fertility of rice M₁ plants irradiated with $^{12}\text{C}^{5+}$ ion beam. Seed fertility was evaluated by collecting 50 seeds from the upper side of the panicle of the main culm.

Seed fertility

Figure 3. Distribution of Seed fertility of the rice M₁ plants irradiated with $^{12}\text{C}^{5+}$ ion beam, from which the M₂ lines with chlorophyll mutants originated. Seed fertility was evaluated by collecting 50 seeds from the upper side of the panicle of the main culm.

[20014]

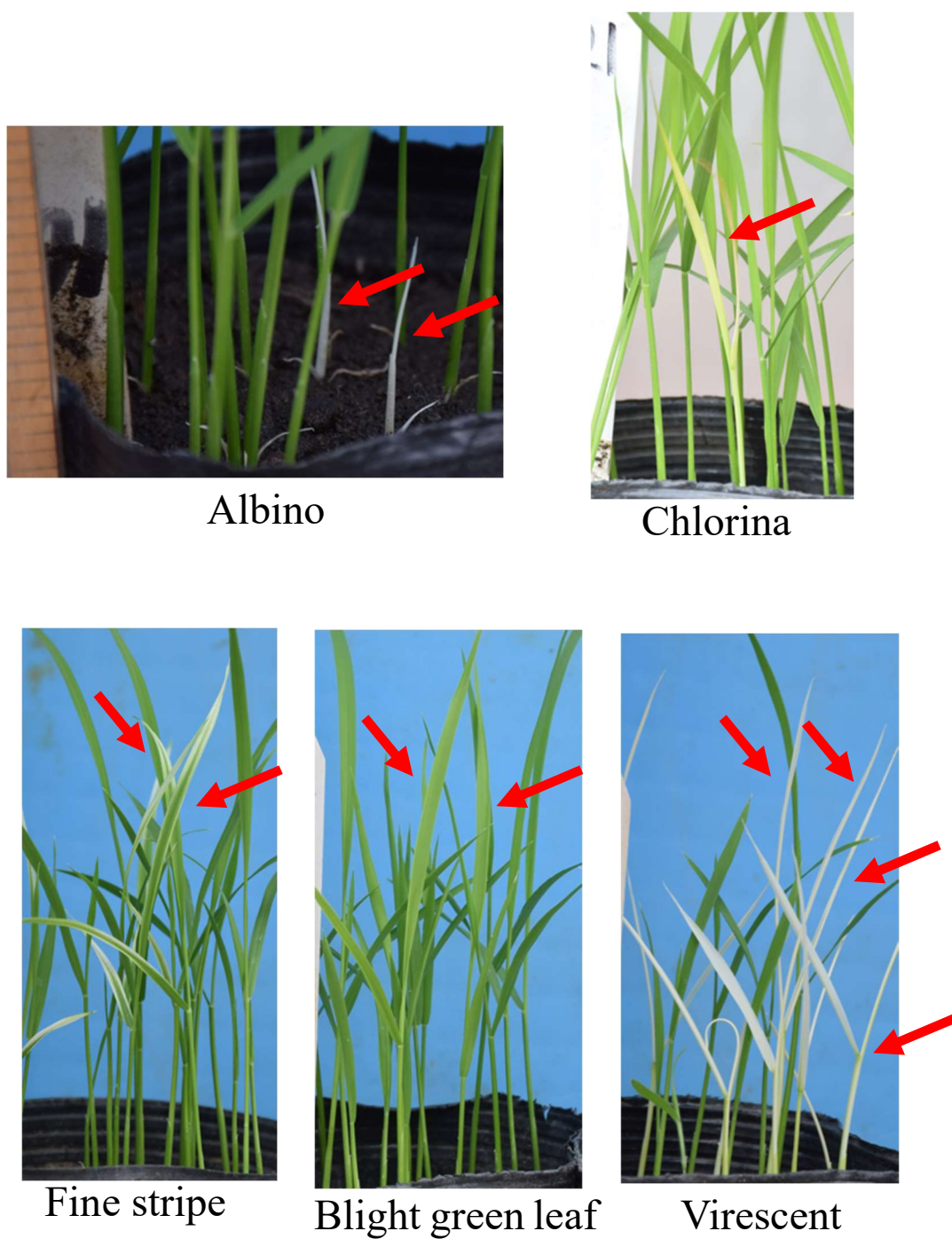


Figure 4. Examples of rice chlorophyll mutants obtained in this study.