

[21015]

イオンビームによる農作物と醸造微生物の有用変異体の作出

Generation of Useful Mutants of Crops and Brewing Microorganisms by Ion Beam Irradiation

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

Katsuyuki Ichitani^{A)}, Masashi Yamamoto^{A)}, Katsuyoshi Shimizu^{A)}, Fumio Hashimoto^{A)}, Toshiki Uchiumi^{B)}, Hisanori
Tamaki^{A)}, Riichiro Yoshida^{A)}, Shigehisa Okamoto^{A)}, Keiichi Shimizu^{A)}, Masahira Onoue^{C)}, Taiki Futagami^{#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, citrus and fermentation microorganisms. In this progress report, we present the results obtained for rice, trifoliate orange, and yellow koji fungus

As for rice, we irradiated ¹²C⁵⁺ on 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, to select mutants against *Xoo*. A total of 92 tentative resistant M₂ plants from 54 M₂ lines were harvested for progeny test using M₃ generation, with the result that 12 M₃ lines deriving from 7 M₂ lines were fixed for *Xoo* resistance. Their agronomic traits were evaluated.

As for trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*), we planned to produce a thornless one by ion beam irradiation to seeds (5, 10, 30, 50, and 70 Gy). Although a thornless plant was not appeared, one individual with short thorn was obtained in 5 Gy irradiation.

As for the koji fungi, we started a project to breed the high citric acid producing *Aspergillus oryzae* strains. In this study, three different industrial strains of *A. oryzae* was subjected to the ion beam mutagenesis. We measured the survival rate of conidia of *A. oryzae* strains to evaluate the suitable ion beam irradiation condition. In addition, we established the culture condition to screen the high acid producing mutants.

Keyword: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Poncirus trifoliata*, *Aspergillus oryzae*

1. はじめに

1.1 試料について

鹿児島大学のイオンビーム利用グループは、穀類、柑橘、および醸造微生物にイオンビーム照射を行い、有用変異体の作出を検討した。本年度はイネ、カラタチ、黄麹菌において得られた成果を報告する。

1.2 イネ

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^[1]。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^[2-4]。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。IR24 の乾燥種子に 10、15、20、25 Gy のイオンビームを照射し、M₂ 世代で選抜した抵抗性個体の自殖後代 M₃ 系統を 2021 年に供試し、後代検定を行った。

1.3 カラタチ

一般にカンキツ栽培においては台木が用いられる。カラタチ (*Poncirus trifoliata*) を台木にするとカンキツ果実の品質が向上して樹体が矮化するため、日本ではカンキツのほぼすべての台木がカラタチであり、世界的にも主要な台木となっている。しかし、カラタチには長大なトゲが存在するため、苗木養成過程の作業性に問題があるだけでなく、トゲによる葉の付傷に起因する病害発生の危険性もある。従って、トゲナシカラタチの育成が望まれている。既にトゲナシは不完全劣性であることが解明されており^[5]、ガンマ線照射によってトゲナシカラタチは作出されているが、トゲの有無以外に望ましくない変異も誘発されており^[6]実用には不適である。そのため、イオンビーム照射によりトゲのみ消失し、その他の形質は維持したカラタチを作出することを目的として本研究を実施した。

1.4 黄麹菌

発酵食品および酒の製造において、麹菌は α -アミラーゼやグルコアミラーゼなどのデンプン分解酵素を供給する役割がある。清酒、味噌、醤油などの製造に黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) が用いられるの

[21015]

に対して、焼酎造りでは黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) あるいは白麹菌 (*Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*) が用いられている^[7]。これは、黒麹菌と白麹菌がデンプン分解酵素に加えてクエン酸を高分泌生産するためである。クエン酸はもろみの pH を酸性に保つことによって腐造を防ぐ他、蒸留時の化学反応を変化させることで酒の香味にも影響を及ぼす^[8]。またクエン酸は、爽やかな酸味を呈するため、近年、クエン酸を生産する黒麹菌や白麹菌を用いて清酒や発酵調味料を製造することが行われるになっている。このようにクエン酸を高生産する性質は、麹菌にとって重要な性質である。そこで、本研究ではクエン酸を高生産する黄麹菌の育種を目的として、黄麹菌へのイオンビーム照射を行った。

2. 材料及び方法

2.1 イネのイオンビーム照射

イオンビーム照射方法は 2020 年度の報告書に記載した。イオンビーム種は $^{12}\text{C}^{5+}$ 220MeV で、10、15、20、25 Gy 照射した。2020 年に鹿児島大学農場に 311 の M_2 系統を 1 系統あたり 15 個体栽植し、文献^[2]の方法に従って、日本産白葉枯病菌レース II を穂孕み期に接種し、18 日目における病斑の伸長程度を達観で評価し、病斑の伸長が約 2 cm 以下を抵抗性個体と評価した。54 M_2 系統の 92 個体を抵抗性個体と評価した。2021 年には抵抗性と評価された個体の自殖後代 M_3 系統 1 個体あたり 10 個体を同農場に栽植し、2020 年と同じ方法で抵抗性を評価した。達観で明らかに抵抗性と判断された系統については、1 個体あたり 3 枚の葉の病斑長を物差しで測定するとともに、成熟期に稈長と穂数を調査した。

2.2 カラタチのイオンビーム照射

カラタチ‘ルビドー’の種子を材料とした。試験区は 5、10、30、50 及び 70 Gy 照射の 5 区であった。1 シャーレに 16 種子を入れて照射した。各試験区 3 シャーレを用いたので 1 試験区当たりの処理種子数は 48 個であった。照射は 2019 年 12 月に実施した。

照射後、種子は鹿児島大学農学部を持ち帰り、シャーレ内の湿潤濾紙上に播種して暗黒、25℃で生育させた。20 日後に発根した種子を鹿沼土に移植した。その後は 14 時間日長、25℃で栽培した。4 か月後に無加温ガラス室での植物栽培を開始し、2022 年 4 月に生存個体のトゲの長さ (5 本/植物体) を測定した。

2.3 黄麹菌のイオンビーム照射

黄麹菌の 3 菌株 (A、B、C) の分生子を PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) 培地で培養 (30℃、約 5 日間) 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 (25、50、75、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。分生子懸濁液の濃度をセルカウンタープレート (Thoma タイプ、Watson) で測定し、PDA 培地に塗布し、コロニー形成数をカウントすることで分生子の生存率を算出した。

次に、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培地 (酵母エキス 10 g/l、ペプトン 20 g/l、可溶性デンプン 20 g/l、寒天 15 g/l、メチルレッド溶液 20 ml/l、Triton X-100 2.5 ml/l、pH 6.5) 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するようになる。これを指標として、クエン酸高生産変異株を選択した。その際、クエン酸高生産能を遺伝子組換えにより付与した黄麹菌^[7]を使用した。クエン酸排出輸送体をコードする *cexA* 遺伝子、および *cexB* 遺伝子をアミラーゼのプロモーターで過剰発現する菌株を寒天培地に塗布し、そのコントロール株のコロニーの周囲が赤色を呈しないのに対して、クエン酸高生産株のコロニーの収支が赤色を呈するかどうかを確認した。

3. 結果と考察

3.1 イネ

7 M_2 系統由来の 12 M_3 系統が抵抗性で固定していた (Table 1)。各 M_2 系統にそれぞれ由来する 1 M_3 系統 計 7 系統の病斑長、稈長、穂数の平均値を Table 2 に示す。 M_2 、 M_3 の 2 回 白葉枯病菌を接種することで遺伝的に固定した白葉枯病抵抗性 M_3 系統を複数選抜することに成功した。1 M_3 系統 (仮称 R-1) の白葉枯病菌に対する反応を Figure 1 に示す。前述のように、これまでに化学変異原メチルニトロソウレアによって IR24 に誘発された抵抗性系統は供試された白葉枯病菌レース全てに対して抵抗性を示す。そのため、本報告で選抜された抵抗性 M_3 系統については、2022 年度に自殖次代 M_4 系統を供試し、日本産白葉枯病菌の全 5 レースを接種して抵抗性を調査する予定である。

Table 1. Frequency of M_2 Lines Producing Mutant against *Xanthomonas oryzae* (*Xoo*) Japanese Race IIA, of which *Xoo* Resistance Were Verified in M_3 Generation

Dose of irradiated ion beam (Gy)	No. of M_2 lines tested	No. of M_2 lines producing mutants against <i>Xoo</i>	Frequency of M_2 lines producing mutants against <i>Xoo</i>
10	69	0	0
15	63	4	0.063
20	86	2	0.023
25	93	1	0.011

[21015]

Table 2. Selected M₃ Lines Genetically Fixed for Resistance against *Xanthomonas oryzae* Japanese Race IIA

Line name	Dose of irradiated ion beam (Gy)	Lesion length (mm)	Culm length (cm)	Panicle number
Original cultivar				
IR24	Not irradiated	93.1	60.8	8.8
Resistant M ₃ line				
R-1	15	4.3	57.4	10.6
R-2	15	14.2	61	8.7
R-3	15	8.6	60.9	12.2
R-4	15	11.9	50.1	9.3
R-5	20	10	54.2	5.2
R-6	20	5.5	45.2	6.3
R-7	25	5.6	64.5	12



Figure 1. Reaction of IR24 (left three leaves) and R-1 line (right three leaves) to *Xanthomonas oryzae* (Xoo) Japanese race IIA. The scale bar indicates 1cm. This photo was taken 19 days after Xoo inoculation.

3.2 カラタチ

照射後の生育個体数は 5 Gy 区で最高で、10 及び 30 Gy 区で低下したが、50 及び 70 Gy 区で増加した (Table 3)。50 及び 70 Gy 区での生育個体は発根の状態も良く、これはイオンビームが届いていない胚から発根したものと考えられた。そのため、これらの植物体は鹿沼土に移植しなかった。その後、植物

体の栽培を続けたところ 10 及び 30 Gy 区では 10 Gy 区の 1 個体を除いて生育が不良で最終的には枯死した。5 Gy 区では 26 個体中 11 個体が生育を続けた。

Table 3. Number of Growing Plants 20 Days after Irradiation of Ion Beam in Trifoliate Orange

Dose (Gy)	No. of seeds irradiated	No. of growing plants ^a
5	48	26
10	48	8
30	48	8
50	48	17 ^z
70	48	14 ^z

^a These plants were probably appeared from non-irradiated portion of embryo.

照射 28 か月後の生育植物体のトゲの長さは Table 4 に示した。無照射個体のトゲは 10.8 mm であった。5 Gy 区の 10 個体および 10 Gy 区の 1 個体のトゲの長さは無照射区と大差なかった。一方、‘5-53’ はトゲの長さが 4.8 mm と無照射区の約半分であった。

Table 4. Length of Thorn of Irradiated Plants 28 Months after Irradiation of Ion Beam in Trifoliate Orange

Plant (Dose-No.)	Length of thorn (mm)
5-11	7.6 ± 0.2
5-12	8.4 ± 0.3
5-21	9.5 ± 0.3
5-22	8.3 ± 0.6
5-31	8.7 ± 0.4
5-41	8.1 ± 0.6
5-42	10.5 ± 0.4
5-51	10.7 ± 0.5
5-52	9.8 ± 0.3
5-53	4.8 ± 0.5
5-54	9.4 ± 0.8
10-1	9.0 ± 0.6
0 (control)	10.8 ± 0.7

研究目的のトゲナシカラタチの作出はできなかったが、トゲの短い変異体が得られた可能性が認められた。ただし、トゲの長さは樹体の状態と密接な関係にあり、一般には同一個体であっても、強い枝の

[21015]

トゲが弱い枝よりも長い。‘5-53’は他の個体よりも樹勢が弱く、それがトゲの長さに影響した可能性がある。また、トゲの長さ以外にも樹勢が弱くなる変異が誘起された可能性もある。これらの点については、今後この植物体の栽培を続けることによって検討する必要がある。

また、イオンビームが胚に照射されていない種子があったことが推察された。照射時の種子の配置等を改良することにより、全種子の胚に効果的に照射される手法を開発することも必要である。

3.2 黄麹菌

黄麹菌の実用菌株の3菌株（A、B、C）の分生子にイオンビームを照射し、生存率を測定した（Figure 2）。その結果、菌株AとCについては線量に依存して生存率が低下した。先行研究において我々の研究グループは黒麹菌と白麹菌に対してイオンビームを照射したが^[9]、その結果と同じ傾向であった。一方、菌株Bについては、25 Gyよりも50 Gyの方が分生子の生存率が高いという結果が得られた。本実験は、n数が1で実施したため、菌株Bの分生子の生存率については再現性を取得して議論する必要がある。また、いずれの菌株も75 Gyと100 Gyにおける生存率に大きな違いは見られなかった。先行研究において黄麹菌へのイオンビーム照射が最大700 Gyまで検討されており、400 GyにおいてATP sulfurylaseをコードするsC遺伝子への変異導入の効率が高いことが報告されている^[10]。本実験は最大100 Gyで実施しており、今後より高い線量での条件検討も実施する必要があると考えられる。

次に、イオンビームを照射した黄麹菌の分生子からクエン酸生産量が上昇した変異体をスクリーニングするための培地^[11]を改良し、メチルレッドを指標として有機酸生産性の高い株を取得できることが示唆された。

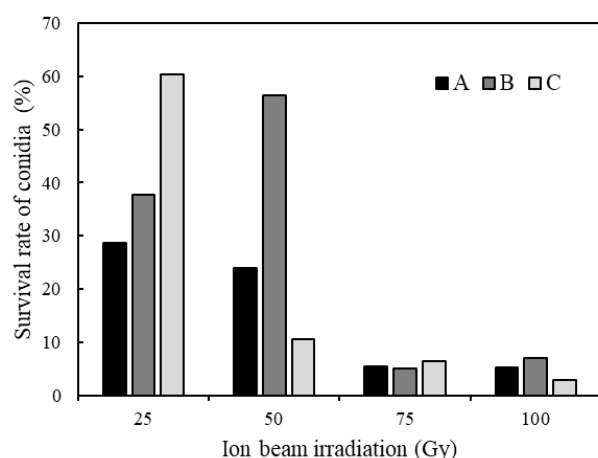


Figure 2. Effect of ion beam on germination rate of *Aspergillus oryzae* strains.

参考文献

- [1] 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
- [2] C. Busungu et al. “Identification and linkage analysis of a new rice bacterial blight resistance gene from XM14, a mutant line from IR24”, Breeding Science 66:636-645, 2016
- [3] A. J. Msami et al., “Linkage analysis of rice bacterial blight resistance gene xa20 in XM6, a mutant line from IR24”, Breeding Science 71:144–154, 2021
- [4] S. Taura et al., “Induction of mutants resistant to bacterial blight in rice”, Japan. J. Breed. 41:279-288, 1991
- [5] T. Yoshida et al., “Inheritance of thornlessness in trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.)”, Journal of Japanese Society for Horticultural Science 68:1104–1110, 1999
- [6] 吉岡ら, “ガンマ線照射により誘発されたカラタチのとげなし変異体の特性”, 園芸学会雑誌, 74 (別冊 2) : 111, 2005
- [7] T. Futagami et al., “The white koji fungus *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*”, Biosci. Biotechnol. Biochem. 86:574–584, 2022
- [8] Y. Yoshizaki et al., “The formation of β -damascenone in sweet potato *shochu*”, J. Inst. Brew. 117:217–223, 2011
- [9] T. Kojo et al., “Characterization of amylolytic enzyme overproducing mutant of *Aspergillus luchuensis* obtained by ion beam mutagenesis”, J. Gen. Appl. Microbiol. 63:339–346, 2018
- [10] Y. Toyoshima et al., “Lethal and mutagenic effects of ion beams and γ -rays in *Aspergillus oryzae*”, Mutat. Res. 740:43–49, 2012
- [11] C. Kadooka et al., “LaeA controls citric acid production through regulation of the citrate exporter-encoding *cexA* gene in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*”, Appl. Environ. Microbiol. 86:e01950-19, 2020