

[22021]

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

山本雅史^{A)}, 一谷勝之^{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)},
Masashi Yamamoto^{A)}, Katsuyuki Ichitani^{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, trifoliolate orange, and yellow koji fungus.

As for rice, we irradiated $^{12}\text{C}^{5+}$ on seeds of hybrids expected to show hybrid weakness by the complementary effect of *Hwa1-1* and *Hwa2-1* genes. Some plants deriving from the irradiated seeds showed chimeric normal growth, which was probably due to loss of function mutation of *Hwa1-1* or *Hwa2-1*, or deletion of chromosomal region containing these genes.

As for trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*), we planned to produce a thornless one by ion beam irradiation to seeds. Although a thornless plant was not appeared, the thorn of 9 out of 20 growing plants were significantly short compared with that of the non-irradiated plant. The individual with the shortest thorn was obtained in 10 Gy irradiation.

As for the koji fungi, we performed the breeding of *Aspergillus oryzae* to obtain the high high citric acid producing strain. 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 obtained a high citric acid producing strain.

Keyword: hybrid weakness, *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

雑種弱勢は、正常な系統間の雑種第一代に生じる弱々しい生育とされる。雑種弱勢そのものは有用な現象ではないが、雑種強勢の逆方向の現象であり、雑種弱勢原因遺伝子を理解することは雑種強勢の理解に繋がる^[1]。アジアの栽培イネ (*Oryza sativa* L.) における雑種弱勢現象は、Oka (1957)^[2]によって最初に報告された。報告者らは、この現象の原因遺伝子 *HWA1*, *HWA2* の連鎖分析を行い、染色体上の座乗位置を決定した^[3]が、高密度連鎖解析による遺伝子の特定は不調に終わっている。そのため、人為突然変異と次世代 DNA シークエンサーを組み合わせた遺伝子特定に取り組む。イネの遺伝学でよく用いられる日本型品種 台中 65 号 (以下 T65) に *HWA1*, *HWA2* 遺伝子座の弱勢誘発対立遺伝子 *Hwa1-1*, *Hwa2-1* をそれぞれ導入した準同質遺伝子系統 T65*Hwa1-1*, T65*Hwa2-1* を育成している (Figure 1)。

雑種弱勢現象が生じるはずの両系統間の雑種種子にイオンビームを照射し、*Hwa1-1*, *Hwa2-1* の機能喪失による正常生育への復帰個体を選抜することで、遺伝子特定の材料とする。

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* (L.) Raf.) はカンキツトリステザウイルス免疫性で、台木にすると樹体が矮化してカンキツ果実の品質が向上する。そのため、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問題がある。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カンキツかいよう病などの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^[4]、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^[5]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。

[22021]

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*) が用いられるのに対して、焼酎造りでは黒麹菌あるいは白麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) が用いられている^[6]。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^[7]。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。2021 年の秋に T65Hwa2-1 を卵親、T65Hwa1-1 を花粉親として交配し、雑種種子を得て、これを照射材料とした。イオンビーム種は $^{12}\text{C}^{5+}$ 220MeV で、15, 20 Gy 照射した。2022 年に照射種子を播き、育苗し、鹿児島大学農場に約 2500 個体栽植した (15Gy 照射と 20Gy 照射はほぼ同数)。対照として T65Hwa2-1, T65Hwa1-1 およびイオンビーム未照射の両系統の雑種を供試した。雑種弱勢の表現型を示さず、正常に生育していると思われる個体は Hwa1-1, Hwa2-1 をと密接に連鎖する DNA マーカーで雑種性を確認した。その後、それらの個体は掘り上げて、温室で株保存し、自殖種子を収穫して、2023 年度以降の遺伝子特定のための材料とした。

2.2 カラタチのイオンビーム照射

イオンビームの照射は 3 回実施した。いずれもカラタチ ‘ルビドー’ の種子を材料とした。

2019 年 12 月照射：試験区は 5, 10, 30, 50 及び 70Gy 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°C 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°C で栽培した。4 か月後の 2020 年 4 月に無加温ガラス室での植物栽培を開始し、2023 年 4 月に生存個体のトゲの長さ (先端から 5 本/植物体) を測定した。

2022 年 5 月照射：試験区は 3, 5, 10 及び 20Gy 照射の 4 区であった。1 シャーレに 10 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 30 個であった。照射後の植物体の管理は 2019 年 12 月と同様で、2022 年 10 月か

らは無加温ガラス室での栽培を開始した。

2022 年 12 月照射：試験区は 3, 5, 10 及び 20Gy 照射の 4 区であった。1 シャーレに 12 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 36 個であった。照射後照射後の植物体の管理は 2019 年 12 月と同様で、2023 年 4 月からは無加温ガラス室での栽培を開始した。

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°C, 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、2021 年度とは異なる線量のイオンビーム (100, 200, 300, 400 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。また、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、オレンジ色を呈するため、クエン酸の生産性に依って色が変化する。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。なお、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^[8,9]をコントロールとして使用した。

3. 結果と考察

3.1 イネ

雑種弱勢と正常の中間的な物を含めて、イオンビームによる突然変異誘発個体を 35 個体以上選抜した。



Figure 1. Hybrid weakness caused by two complementary genes *Hwa1-1* and *Hwa2-1*. From left to right, T65Hwa2-1, hybrid between T65Hwa2-1 and T65Hwa1-1, T65Hwa1-1, and T65. Scale bar = 10 cm.

[22021]

Hwa1 および *Hwa2* に密接に連鎖すると思われる DNA マーカー (仮称 M1 および M2) はイネゲノムの標準品種日本晴ゲノム上で約 150kb 離れている。雑種弱勢の表現型と正常な表現型が共存するキメラ個体 (Figure 2) には、正常な表現型由来の DNA を鋳型にして PCR して得られた DNA マーカーの遺伝子型がどちらか一方、または両方がホモ接合になるものが見られた。これは、DNA マーカーを含む染色体領域がイオンビーム照射により欠失した物と考えられ、雑種弱勢原因遺伝子が確かに DNA マーカー近傍に存在することを示している。弱勢の表現型由来の DNA を鋳型にすると M1, M2 がヘテロ接合を示すことから、ホモ接合になるのは交配ミスではなく、イオンビームによる突然変異がキメラ状に起こっていることを示している。今後は両 DNA マーカーの遺伝子型がヘテロ接合でかつ正常な表現型を示す個体の後代を供試し、検定交雑によって変異を起こした遺伝子を特定するとともに次世代 DNA シークエンサーによって突然変異が誘発された箇所を特定する予定である。

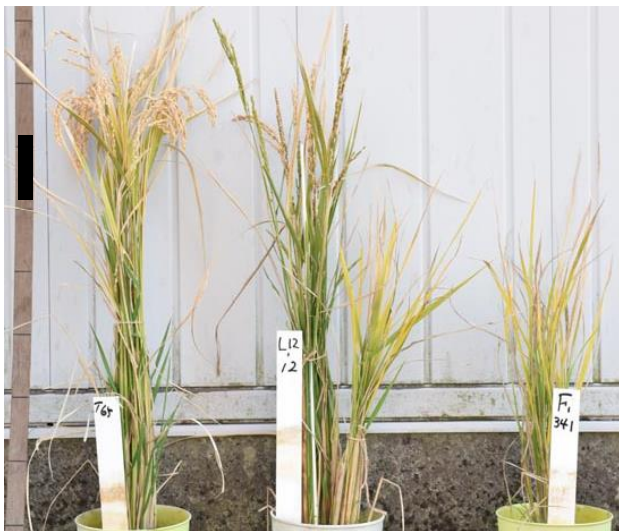


Figure 2. Mutant chimeric revertant from weakness caused by two complementary genes *Hwa1-1* and *Hwa2-1*. From left to right, T65, mutant chimeric revertant hybrid between T65*Hwa2-1* and T65*Hwa1-1*, control weak hybrid between T65*Hwa2-1* and T65*Hwa1-1*. Scale bar =10cm

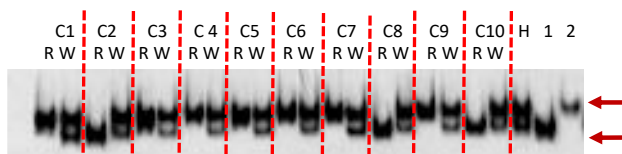


Figure 3. Banding pattern of PCR-based DNA marker linked tightly with *HWA2*. The upper arrow points the marker derived from T65*Hwa2-1*. The lower band points the marker derived from T65*Hwa1-1*. C1-C10 refer to the mutant chimeric revertant hybrid between T65*Hwa2-1* and

T65*Hwa1-1*. H, 1 and 2 respectively denote control weak hybrid between T65*Hwa2-1* and T65*Hwa1-1*, T65*Hwa1-1*, and T65*Hwa2-1*. R and W respectively denote revertant normal growth portion and weak growth one.

3.2 カラタチ

照射後の生育個体数について、2019 年照射の結果は既に報告したので、2022 年の 2 回の結果を示した (Tables 1 and 2). いずれの照射でも線量とその後生育する個体数との関係は判然としなかった。2019 年同様、一部の生育個体はイオンビームの照射を受けていない胚から発生した可能性もある。カラタチは多胚性であり、種子ごとに胚の位置が異なるので、現在の照射方法では種子の全ての胚にイオンビームを照射することは困難なのかもしれない。2022 年の照射個体については照射後の期間が短く、植物体の成長が不十分なため、トゲの有無や長短などの形質については未調査である。2023 年秋にそれらを調査する予定である。

Table 1. Number of growing plants 20 days after irradiation of ion beam in trifoliolate orange (May, 2022).

Dose (Gray)	No. of seeds	No. of growing
	irradiated	plants
3	30	10
5	30	19
10	30	13
20	30	11

Table 2. Number of growing plants 20 days after irradiation of ion beam in trifoliolate orange (Dec., 2022).

Dose (Gray)	No. of seeds	No. of growing
	irradiated	plants
3	36	16
5	36	11
10	36	10
20	36	15

2019 年 12 月照射個体の 40 か月後 (2023 年 4 月) のトゲの長さは Table 3 に示した。無照射個体のトゲは 11.0mm であった。照射個体の中で完全にトゲが消失している個体は確認できなかった。全 20 個体のうち、トゲの長さが 6.8mm 以下の 3Gy 区の 3 個体、5Gy 区の 2 個体、10Gy 区の 2 個体及び 30Gray 区の 2 個体の計 9 個体のトゲが無照射個体より有意に短かった。特に 10Gy 区の 10-21 と 30Gray 区の 30-11 はトゲの長さがそれぞれ 3.5mm 及び 4.5mm であり、1%水準での有意差が認められた。

[22021]

Table 3. Length of thorn of irradiated plants 40 months after irradiation of ion beam in trifoliate orange.

Plant (Dose-No.)	Length of thorn (mm)
3-11	5.6±0.5*
3-12	6.8±0.5*
3-21	5.0±0.4*
5-11	10.4±0.8
5-12	9.4±0.4
5-21	9.7±0.9
5-22	10.7±0.6
5-31	8.7±0.6
5-41	9.4±0.9
5-42	8.8±1.0
5-51	8.5±0.8
5-52	6.3±0.3*
5-53	6.2±0.7*
5-54	7.2±0.6
10-11	8.1±0.6
10-12	3.5±0.4**
10-13	5.7±0.4*
10-21	7.5±0.6
30-11	4.5±0.5**
30-21	5.3±0.7*
0 (control)	11.0±1.2

* and ** indicate that there is a significant difference between the control and each plant at the 5% and 1% levels, respectively.

目的とするトゲナシ個体は出現しなかったが、照射個体の半数のトゲが短かく、トゲの長さに関する変異体を得られた可能性がある。ただし、トゲの長短は植物体の生育状況の影響を受け、同一個体であっても、強い枝のトゲが弱い枝よりも長い傾向にある。今回トゲが短かった個体については、今後植物体の栽培を続けることによってトゲの状態の観察を継続する必要がある。

3.2 黄麹菌

本年度（2022年2月）は、黄麹菌の実用菌株の3菌株（A, B, C）の分生子に2021年度（2021年12月）よりも高い線量のイオンビームを照射し、生存率を測定した（Table 4）。昨年度の結果と合わせて、

25 Gy から 300 Gy まで（25, 50, 75, 100, 200, 300 Gy）は線量に依存して生存率が低下し、300 Gy と 400 Gy の線量における生存率は同様であった。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という報告^[10]に一致すると考えられた。

Table 4. Effect of ion beam on germination rate (%) of *Aspergillus oryzae* strains.

Strains	0 Gy	100 Gy	200 Gy	300 Gy	400 Gy
A	100	21	1.2	0.13	0.27
B	100	not tested	3.9	0.45	0.45
C	100	37	3.4	0.36	0.91

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においてメチルレッドを指標として有機酸生産性の高い候補株をスクリーニングした。その結果、より赤色を呈する候補株（Figure 3）が取得された。さらに、本株の有機酸生産性を測定したところ、クエン酸生産量が約 1.4 倍上昇していることを確認できた。



Figure 3. Screening of high citric acid producing strains of *Aspergillus oryzae* on PDA with methyl red. Red arrow indicates a strain producing citric acid at higher level than the other strains.

参考文献

- [1] V. Calvo-Baltanás et al., “Hybrid incompatibility of the plantimmune system: an opposite force to heterosis equilibrating hybrid performances”, *Front. Plant Sci.* 11: 576796, 2021

[22021]

- [2] H. I. Oka, “Phylogenetic differentiation of cultivated rice. XV. Complementary lethal genes in rice”, *Jpn. J. Genet.* 32: 83–87, 1957
- [3] K. Ichitani et al., “Chromosomal location of *HWA1* and *HWA2*, complementary hybrid weakness genes in rice”, *Rice* 4: 29–38, 2011
- [4] 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
- [5] 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
- [6] T. Futagami et al., “The white koji fungus *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 86: 574–584, 2022
- [7] Y. Yoshizaki et al., “The formation of β -damascenone in sweet potato *shochu*”, *J. Inst. Brew.* 117: 217–223, 2011
- [8] E. Nakamura et al., “Citrate exporter enhances both extracellular and intracellular citric acid accumulation in the koji fungi *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* and *Aspergillus oryzae*”, *J. Biosci. Bioeng.* 131: 68–76, 2021
- [9] 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
- [10] Y. Toyoshima et al., “Lethal and mutagenic effects of ion beams and γ -rays in *Aspergillus oryzae*”, *Mutat. Res.* 740: 43–49, 2012