

[2023203001]

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)},
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 koji fungus.

As for rice, we irradiated $^{12}\text{C}^{5+}$ 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 7 resistant mutant lines against Japanese *Xoo* race II have been obtained. In the present study, resistance of these lines against five Japanese *Xoo* races were evaluated for two years. Two lines proved to be highly resistant against the all *Xoo* races. The other lines showed weak resistance to several *Xoo* races.

As for trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*), we planned to produce a thornless one by ion beam irradiation to seeds. A thornless plant was not appeared in three experiments conducted during 2019 – 2022. The relationship between dose and length of thorn was unclear. The length of thorn of plants irradiated in November 2023 will be evaluated in November 2024.

As for the koji fungi (*Aspergillus oryzae*), we performed the evaluation of ion beam irradiation condition to increase the survival rate of conidia during the sample transfer from Kagoshima to Takasaki. In addition, we performed the evaluation of mycolytic enzyme activity of the strains, which were candidates of the high citric acid producing mutants obtained by the ion beam irradiation at the experiment performed in 2022.

Keyword: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Oryza sativa* disease resistance, *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、ボタンンボウフウ、クズ、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、化学突然変異原メチルニトロソウレア (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、評価した。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。これにより抵抗性と評価された系統の後代を 2022, 2023 年の 2 カ年に供試し、複数の白葉枯菌株に対する抵抗性を評価した。

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* (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^[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。

[2023203001]

1.4 麹菌

麹菌は、酒類、および発酵食品の製造において、 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重要な役割をもつ。日本で使用される麹菌には2種あり、一般的に清酒、味噌、醤油などの製造には黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*)、焼酎の製造には黒麹菌あるいは白麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) が用いられる。黒麹菌と白麹菌は、デンプン分解酵素に加えてクエン酸を高分泌生産するのに対して、黄麹菌はクエン酸をほとんど分泌生産しないという違いがある。先行研究において、黄麹菌ではクエン酸分泌生産に必要なクエン酸排出輸送体遺伝子の発現レベルが低いために、クエン酸を分泌生産しないことが示唆された^[7]。このことから、黄麹菌においてクエン酸排出輸送体遺伝子が高発現する変異体を取得することで、クエン酸高分泌生産株を育種できる可能性があると考えられた。クエン酸は爽やかな酸味を呈するため、クエン酸を高分泌生産する黄麹菌を育種できれば、新しいタイプの酒類、清酒、味噌、醤油の製造に利用できる可能性がある。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 $^{12}\text{C}^{5+}$ 220 MeV で、10, 15, 20, 25 Gy 照射した。2020年に鹿児島大学農学部附属農場に311のM₂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 II 群菌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た。2021年には抵抗性と評価されたM₂個体の自殖後代M₃系統1個体あたり10個体を同農場に栽植し、日本産白葉枯病菌 II 群菌を穂孕み期に接種して抵抗性を再評価した。その結果、7系統が抵抗性と評価された。

2022, 2023 年、上記7系統に日本産白葉枯病菌 I, II, III, IV, V 群菌を穂孕み期に接種し、複数菌株に対する抵抗性を評価した。

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4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70 Gy 照射の5区であった。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11月に生育個体のトゲの長さ（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20 Gy 照射の4区であった。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。2023年11月に生育個体のトゲの長さを測定した。

2022年12月照射：試験区は3, 5, 10及び20 Gy 照射の4区であった。1試験区当たりの処理種子数は36個であった。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。2023年11月に生育個体のトゲの長さを測定した。

2023年11月照射：試験区は3, 5, 10, 20及び40 Gy 照射の5区であった。1試験区当たりの処理種子数は57個であった。照射後の植物体の管理は2019年12月と同様であったが、移植は14日後とした。2024年4月からは無加温ガラス室での栽培を開始する予定である。

2.3 ボタンボウフウとクズのイオンビーム照射

ボタンボウフウおよびクズの種子に対するイオンビームの照射を行い、発芽試験を行った。ボタンボウフウには10, 20, 30 Gy を照射し、クズの種子には3, 5, 10, 50及び100 Gy を照射した。

2.4 麹菌のイオンビーム照射

黄麹菌の実用株 (A, B, C) に対するイオンビームの照射を、2022年度の報告書に記載した方法とは異なる方法で行い、生存率を比較した。実用株を製造する種麹会社において、粉状種麹（種麹から分生子のみを取り抱いたもの）を調製した。鹿児島大学農学部附属焼酎・発酵学教育研究センターにおいて、この粉状種麹をカプトン膜（東レ・デュボン株式会社）で覆い、乾燥剤の存在下で高崎量子応用研究所（高崎量子技術基盤研究所）へ移送し、イオンビーム（50, 100, 200, 400 Gy）を照射した。照射した試料は乾燥剤の存在下で、鹿児島大学農学部附属焼酎・発酵学教育研究センターに移送し、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。

また、2022年度に取得した黄麹菌のクエン酸高分泌生産候補株を用いて、 α 化米（60%精米、徳島製麹社）により米麹を製造した。その際、温度と湿度の設定は、最初の24 h は、温度40°C、湿度95%、次の6 h は、温度35°C、湿度95%、最後の12 h は、温度30°C、湿度90%とした。また、培養を開始してから18, 23, および26 h 後に計3回の手入れを実施した。製造した麹は、 α -アミラーゼ活性の測定を行った。 α -アミラーゼ活性の測定には、 α -アミラーゼ測定キット（キッコーマンバイオケミファ）を使用した。

3. 結果と考察

3.1 イネ

日本産イネ白葉枯病各菌株に対する抵抗性反応は一部を除き、年次間で同様の反応を示した (Figure 1). 15-1 (照射線量・枝番、以下同じ)、15-4 は全菌株に対

[2023203001]

し強い抵抗性を示した。また、この系統は擬似病斑を形成した。15-2 は 2022 年は全菌株に対して強い抵抗性を示したが、2023 年は III, IV, V 群菌に対する抵抗性は弱かった。これまでに MNU によって IR24 に誘発された抵抗性系統と同じように 15-1, 15-4 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し、白葉枯病抵抗性育種の素材として有望視される。15-3, 20-1, 25-1 のような一部の菌株に抵抗性の系統は菌株特異的な抵抗性の機構解明のための有望な研究材料となる。現在、次世代 DNA シークエンサーにより白葉枯病抵抗性系統の変異箇所を調査しており、Mutmap 法によって抵抗性遺伝子を特定する予定である。

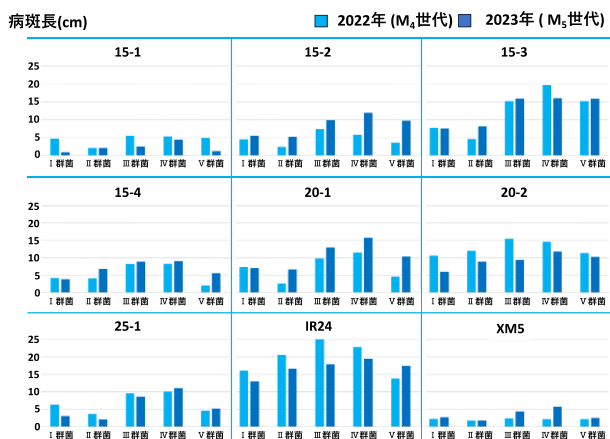


Figure 1. Reaction in lesion length of rice mutant lines 18 days after inoculation of Japanese *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) races I, II, III, IV and V. 15-1, 15-2, 15-3, 15-4, 20-1, 20-2 and 25-1 were induced by ion-beam irradiation. XM5 were induced by a chemical mutagen N-methyl-N-nitrosourea, and has been reported to be resistant against the above five *Xoo* races [4]. IR24 is the original cultivar of the above eight mutant lines, and has been reported to be susceptible to the above five *Xoo* races [2,4].

3.2 カラタチ

2019 年 12 月、2022 年 5 月及び 2022 年 12 月照射の植物体について、2023 年 11 月に照射後、各 47, 18 及び 11 か月のトゲの長さを評価した。その結果を Table 1, 2, 3 に示した。目的のトゲ無し個体の出現は認められなかった。一部、無照射個体よりもトゲの短い個体も出現したが、目的とした実用的な面での価値は低いものと考えられた。また、調査の範囲では照射量とトゲの長さとの関係も判然としなかった。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。そのため、高照射量であっても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。

Table 1. Length of Thorn of Irradiated Plants 47 Months after Irradiation of Ion Beam in Trifoliate Orange

Dose (Gray)	No. of plants	Length of thorn (mm)	
		Range	Mean
0	1	11.0	11.0
3	6	4.2 - 10.3	8.0
5	11	5.8 - 13.6	9.4
10	4	6.5 - 8.8	7.8
30	2	5.3 - 8.5	6.9

Irradiation: December, 2019.

Table 2. Length of Thorn of Irradiated Plants 18 Months after Irradiation of Ion Beam in Trifoliate Orange

Dose (Gray)	No. of plants	Length of thorn (mm)	
		Range	Mean
0	3	5.6 - 6.3	6.0
3	4	2.6 - 6.8	4.0
5	12	2.8 - 8.8	6.3
10	6	3.7 - 7.7	6.3
20	8	3.3 - 9.0	6.2

Irradiation: May, 2022.

Table 3. Length of Thorn of Irradiated Plants 11 Months after Irradiation of Ion Beam in Trifoliate Orange

Dose (Gray)	No. of plants	Length of thorn (mm)	
		Range	Mean
0	10	7.0 - 9.4	7.8
3	15	6.9 - 11.0	8.5
5	9	5.3 - 9.4	7.3
10	7	6.9 - 9.3	8.0
20	9	7.1 - 9.5	8.8

Irradiation: December, 2022.

2023 年 11 月の照射個体については照射後の期間が短いので、照射 14 日後の生育個体数を示した (Table 4)。照射量と生育個体数との間にはそれほど明瞭な関係が認められなかった。ただし、その後の植物体の成長は低照射量区の方が優れる傾向が認められた。これらのトゲの長さは照射約 1 年後に調査する予定である。

残念ながら、目的としたトゲ無し個体の作出には至っていない。突然変異育種の成功のためには多数の供試個体数を用いることが必須であるので、今後とも種子への照射を続ける必要がある。また、果樹で

[2023203001]

は穂木への放射線照射で突然変異体の作出の成功例がある^[6]。本研究においても、穂木への照射を検討する必要があるものと考えられる。

Table 4. Number of Growing Plants 14 Days after Irradiation of Ion Beam in Trifoliate Orange

Dose (Gray)	No. of seeds irradiated	No. of growing plants
0	10	8
3	57	32
5	57	33
10	57	30
20	57	24
40	57	26

Irradiation: November, 2023.

3.3 ボタンボウフウとクズ

2021 年度に行ったボタンボウフウ種子への照射(10, 20, 30 Gy)では照射レベルを下げてでも種子の発芽が見られなかった。2022 年度からはクズの種子をサンプルとし、10, 50, 100 Gy で照射し、発芽試験を行ったが発芽は見られなかった。野生植物の種子は照射に対し耐性が低い可能性があり、そこで照射レベルを下げ 2023 年度は 3, 5, 10 Gy とし、現在、発芽試験により発芽できる最高照射レベルを調べている。

3.4 麹菌

本年度(2023 年 11 月)は、これまでと異なる方法で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)。これは、過去のイオンビーム照射において、照射を行わないネガティブコントロールにおいても分生子の発芽率が低く、試料の移送時における生存率の低下が示唆されたからである。これまで(2021 年度, 2022 年度)は、麹菌の分生子を PDA (Potato Dextrose Agar) 培地に塗布して培養(30°C, 約 5 日間)することで分生子を形成させ、その寒天培地の表面をカプトン膜(東レ・デュポン株式会社)で覆った状態で移送を行った。麹菌の分生子は水分活性の高い状態で生存率が低下することが経験的に知られているため、培地に含まれる水分が分生子の生存率の低下を引き起こした可能性があると考えた。そこで、本年度は種麹会社において粉状種麹を調製し、乾燥剤により乾燥状態を保つことで生存率が改善するかを試験した。その結果、今回の方法においてイオンビームの照射を行わなかった試料の生存率は、10~30%程度であった(Figure 2)。この結果は、PDA 培地を用いた過去の結果と比較して若干低い数値であり、粉状種麹を使用しても生存率は改善しないことが示唆された。

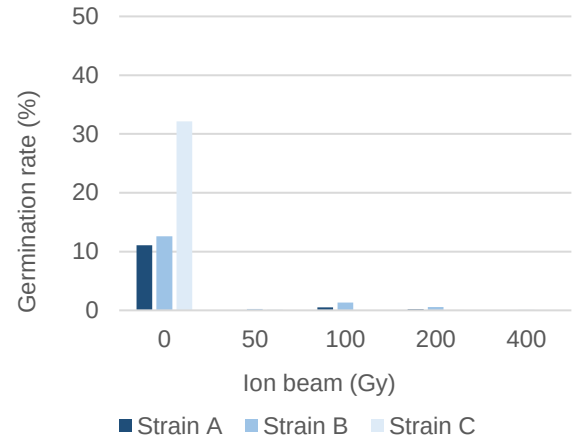


Figure 2. Effect of ion beam on germination rate (%) of *Aspergillus oryzae* industrial strains A, B, and C.

次に、2022 年度に黄麹菌の実用菌株 A からスクリーニングしたクエン酸高分泌生産株の候補株を用いて米麹を製造し、発酵食品等の製造に必要なデンプン分解酵素の活性を測定した(Figure 3)。その結果、菌株 1 で製造された米麹には、親株である A よりも有意に高い (p -value < 0.05, Student's t-test) α -amylase 活性が検出された(Figure 3)。また、菌株 2, 3, 4 に関しては親株 A と同等レベル、菌株 5 に関しては親株 A よりも低い α -amylase 活性が検出された。この結果から、菌株 1, 2, 3, 4 に関しては、今後さらに諸性質の検証を行うことで、実用化できる可能性があると考えられた。

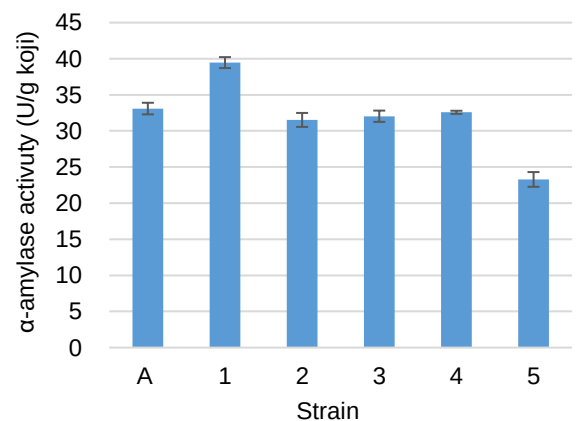


Figure 3. α -amylase activity of the *Aspergillus oryzae* strains cultivated on rice. Strain A is a parental strain for the strains 1, 2, 3, 4, and 5, which are the candidates of high citric acid producing strains obtained by ion beam irradiation.

[2023203001]

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, K. Ichitani, “Chromosomal location of *xa19*, a broad-spectrum rice bacterial blight resistant gene from XM5, a mutant line from IR24”, Plants 12: doi: 10.3390/plants12030602. 2023.
- [5] T. Yoshida et al., “Inheritance of thornlessness in trifoliate 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] 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
- [8] 澤野ら, “黒斑病耐病性ナシ ‘静喜水’の育成”, 静岡県農林技術研究所研究報告, 4: 45-49, 2011