

[2024203001]

# イオンビームによる有用な農作物および醸造微生物の変異体の作出とその利用

## Generation and utilization of Mutants of Crops and Brewing Microorganisms by Ion Beam Irradiation

山本雅史 #A), 二神泰基 A), 加藤太一郎 B), 志水勝好 A), 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), 一谷勝之 A)

Masashi Yamamoto #A), Taiki Futagami A), Dai-ichiro Kato B), Katsuyoshi Shimizu A), Hisanori Tamaki A), Riichiro  
Yoshida A), Shigehisa Okamoto A), Keiichi Shimizu A), Masahira Onoue C), Katsuyuki Ichitani 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 trifoliolate orange, rice, koji fungus and nylon-degradation and biopolymer-production bacteria.

Regarding the trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*), our objective was to produce a thornless one through the application of ion beam irradiation to seeds and scions. Seed: In the 2023 experiments, the desired outcome was not achieved. The relationship between dose and length of thorn remains to be clarified. The length of thorn in plants irradiated in November 2024 will be evaluated in November 2025. Scion: most of the scions that were exposed to the ion beam irradiation perished within two months of the procedure.

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. Among them, one mutant line named XM289 was subjected to genome analysis to detect the causal mutation of *Xoo* resistance. One base insertion of the coding sequence of a gene not reported as *Xoo* resistance gene was thought to be involved in the resistance.

As for *koji* fungi (*Aspergillus luchuensis*), we conducted a genome analysis of a low citric acid-producing mutant strain obtained through ion beam irradiation. We successfully obtained nearly complete genome sequences of both the mutant and the parental strains. Comparative genomic analysis revealed the mutation sites in the genome of the mutant strain.

As for nylon-degradation and biopolymer-production bacteria, we conducted a study to determine the appropriate ion beam irradiation dose for generating mutant strains, with the aim of enhancing the capabilities of microorganisms involved in nylon-degradation and the production of marine biodegradable polymers.

**Keyword:** trifoliolate orange *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Oryza sativa*, disease resistance, *Aspergillus luchuensis*, citric acid, nylon-degradation and biopolymer-production bacteria

## 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、柑橘、穀類および微生物にイオンビーム照射を行い、変異体の作出とその利用を検討した。本年度はカラタチ、イネ、麹菌、ナイロン分解微生物・バイオポリマー生産菌において得られた成果を報告する。

### 1.2 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<sup>[1]</sup>、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<sup>[2]</sup>、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。

### 1.3 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<sup>[3]</sup>。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<sup>[4-6]</sup>。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原因遺伝子の探索を行い、抵抗性遺伝子の有無を検出できる DNA マーカーの開発を目指した。

#### 1.4 麹菌

麹菌は、酒類や発酵食品の製造において、 $\alpha$ -アミラーゼやグルコアミラーゼなどの酵素を供給し、原料に含まれるデンプンを分解する役割を担っている。日本の伝統発酵産業で利用されている麹菌は *Aspergillus* 属に分類される。黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は清酒、味噌、醤油などの製造に、黒麹菌およびその白色変異株である白麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) は焼酎の製造に利用されている。

黒麹菌および白麹菌は、デンプン分解酵素に加えてクエン酸を高分泌生産する特徴をもつ<sup>[7]</sup>。焼酎は主に九州の温暖な気候で製造されており、これらの麹菌が産生するクエン酸は、もろみの pH を低下させることで雑菌汚染を防ぐ役割を果たしている。しかし、黒麹菌および白麹菌におけるクエン酸生産の制御機構については、未だ不明な点が多い。

先行研究において、イオンビームを変異原として黒麹菌 RIB2601 株からクエン酸の生産レベルが低下した変異株 BM40 が取得された。この変異株におけるクエン酸低生産の原因を解析することで、クエン酸生産の制御機構の解明につながる事が期待される。そこで、RIB2601 株および BM40 株の比較ゲノム解析を実施し、変異の同定を実施した。

#### 1.5 ナイロン分解微生物・バイオポリマー生産菌

プラスチックの一種であるナイロンは、耐熱性・耐薬品性に優れており、衣類や自動車部品など我々の身の回りの様々な素材・製品に利用されている。しかし難分解性で生分解を受けないため使用後の環境負荷問題が顕在化しており、また効果的なりサイクル方法も確立されていないのが現状である。近年の検討で我々は、ナイロンオリゴマーを資源化する微生物を多数取得すると共に、これら微生物から得た酵素を利用して、バイオ技術を活用した高分子量ナイロンのケミカルリサイクル技術(BMR)を確立することに成功している<sup>[8,9]</sup>。また海洋生分解性ポリマーの生産能力を有する微生物も発見している。本研究ではポリアミド分解および海洋生分解性ポリマー生産微生物の能力向上育種を目的として、変異株作出のためのイオンビーム照射量を決定する検討を行った。

## 2. 材料及び方法

### 2.1 カラタチのイオンビーム照射

イオンビームの照射は2024年11月にした。カラタチ‘ルビドー’の種子および穂木を材料とした。

種子：試験区は5, 10, 20及び50Gy照射の4区であった。1試験区当たりの処理種子数は40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℃で生育させた。14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。照射22日後の生育状況を調査した。2025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。照射種子と同じ条件で運搬・保管した無照射(0Gy)の10種子を対照とした。

穂木：試験区は30および60Gy照射の2区であった。1試験区当たりの処理穂木数は50本であった。照射後、種子は鹿児島大学農学部を持ち帰り、鹿沼土に挿し木し、最低気温10℃の加温硬質プラスチックハウスで栽培した。照射67日後の生育状況を調査した。照射穂木と同じ条件で運搬・保管した無照射(0Gy)の30穂木を対照とした。

2023年11月に照射し、2024年4月から無加温ガラス室で栽培した照射植物体のトゲの長さおよび樹高を2024年12月に調査した。試験区は3, 5, 10, 20及び40Gy照射の5区であった。

### 2.2 イオンビーム照射によって得られたイネ *Xoo* 抵抗性突然変異系統のゲノム解析ならびに DNA マーカーの開発

2018年のイネ品種 IR24 へのイオンビーム照射によって得られた *Xoo* 抵抗性突然変異系統 XM289 は、外観上、IR24 と遜色ない生育を示すことから、実用上、有用な抵抗性遺伝子をもつと考えられたため、本研究の対象とした。IR24, XM289, 2023年に栽培した IR24 × XM289 の F<sub>2</sub> 集団における *Xoo* 抵抗性個体のバルクから DNA を抽出し、NovaSeq 6000 (Illumina) によるショートリードのゲノム解析を実施した。公開されているイネゲノム Os127742RS1 を参照配列として上記 3DNA を比較することで、*Xoo* 抵抗性個体のバルクに高頻度で見られる XM289 特異的な塩基配列を取得した。PCR, 制限酵素処理, 電気泳動でこの配列を検出可能な DNA マーカーを作出し、2024年に栽培した IR24 × XM289 の F<sub>2</sub> 集団に適用した。

### 2.3 麹菌のゲノム解析

先行研究にて取得したクエン酸低生産株 BM40 のゲノム情報を取得するために、まず HiSeq 2000 (Illumina) によるショートリードのゲノム解析を実施した。続いて、MinION (Oxford Nanopore Technologies) によるロングリードのゲノム解析を行った。なお、MinION による解析では、ligation 1D キット (SQK-LSK109) をライブラリ調製に用いた。また、取得したロングリードは Canu v2.0 でアセンブリし、HiSeq 2000 のショートリードにより修正した。最終的に、Funannotate v1.8.1 を用いてアノテーション

ンを実施した。得られた BM40 株のゲノム情報は、親株である RIB2601 株のゲノム情報<sup>[10]</sup>と比較した。

## 2.4 ナイロン分解微生物・バイオポリマー生産菌のイオンビーム照射

イオンビーム照射に供した微生物は① *Arthrobacter* sp. KI72, ② *Agromyces mediolans* NK15Y-CL, ③ *Sulfitobacter gulosus* Umi7-B1, ④ *Pseudophaeobacter* sp. E1-1, ⑤ *Cupriavidus necator* NBRC 102504, ⑥ *Planctobacterium* sp. MND-2, および ⑦ *Pseudoxanthomonas mexicana* RND-1 の 7 種である。各種微生物を生育させたプレート(数=2)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(10, 100, 500, 1,000 Gy)を照射した。照射した試料を 20%滅菌グリセロール 1mL にて懸濁し菌体を回収した。回収操作は 2 回行い微生物懸濁液 2mL を得た。懸濁液を 100 万倍程度に希釈し、プレートに塗布、25°Cにて静置培養した。コロニー形成数から各種微生物の生存率を算出した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 カラタチ

2024 年 11 月に照射した種子の生育状況を Table 1 に示した。全体として高照射区で生育植物体数が少なかった。また、高照射区ほど植物体の生育が緩慢であった。イオンビーム照射が植物の生育に及ぼす影響は明らかであった。植物体が小さく、トゲの長さを計測する段階にないので、これらは生育 1 年後にトゲの長さおよび樹高を計測する予定である。なお、5 および 10Gy 区では播種数よりも生育個体数が多いが、これはカラタチが多胚性のためであり、異常な数値ではない。

照射後 67 日目で、30Gy 区の穂木はすべて枯死、60Gy 区では 98%が枯死した。0Gy 区の枯死は 37%であったことから、30Gy 以上は穂木への照射量としては適切でなかったと考えられる。また、本来、挿し木はカラタチの生育期間である春に実施すべきであるが、照射時期の関係で、冬に挿し木をすることとなった。加温したとはいえ、不適切な時期での挿し木の実施になったので、それも穂木の生存に影響した可能性もある。

2023 年照射種子に由来する植物の 1 年後のトゲの長さおよび樹高を Table 2 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、いずれも樹高が低く、生育不良のためトゲが短くなっている可能性もある。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。

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、今後も種子および穂木への照射を続ける必要がある。

Table 1. Number of Growing Plants 22 Days after Irradiation of Ion Beam in Trifoliate Orange

Dose (Gray)	No. of seeds irradiated	No. of growing plants
0	10	10
5	40	43
10	40	46
20	40	33
50	40	11

Irradiation: November, 2024.

Table 2. Length of Thorn of Irradiated Plants One Year after Irradiation of Ion Beam in Trifoliate Orange

Dose (Gray)	No. plants	Length of thorn (mm)	
		Range	Mean
0	5	4.7 - 9.4	8.0
3	28	3.8 - 10.3	6.9
5	30	1.8 - 8.6	6.0
10	26	4.1 - 9.4	6.8
20	10	4.9 - 8.3	6.7
40	4	6.4 - 8.6	6.9

Irradiation: November, 2023.

### 3.2 イネ

*Xoo* 抵抗性個体のバルクに高頻度で見られる XM289 特異的な塩基配列は第 3 染色体の遺伝子のコード領域に見出された 1 塩基の挿入でフレームシフトをもたらすと考えられた。この遺伝子は *Xoo* 抵抗性遺伝子として報告されていないため、新規抵抗性遺伝子と考えられる。1 塩基の挿入を検出可能な DNA マーカーを作出し、2024 年に栽培した IR24 x XM289 の F<sub>2</sub> 集団に適用したところ、1 塩基の挿入をホモ接合でもつ XM289 ホモ接合型の病斑長は他の遺伝子型に比べて明らかに短かった (Figures 1 and 2)。XM289 の第 3 染色体にはこれ以外の突然変異が誘発されていないことがゲノム解析で判明していることから、上記 1 塩基挿入が抵抗性をもたらしていると考えられた。開発した DNA マーカーは抵抗性遺伝子を他の品種に導入する際に有用である。

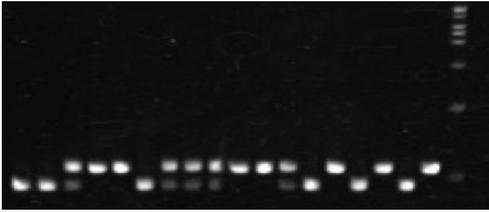


Figure 1. Electrophoretic banding pattern of PCR products from a tentative *Xoo* resistant gene, followed by digestion by a restriction enzyme. Upper bands and lower bands correspond to IR24 allele and XM289 allele, respectively.

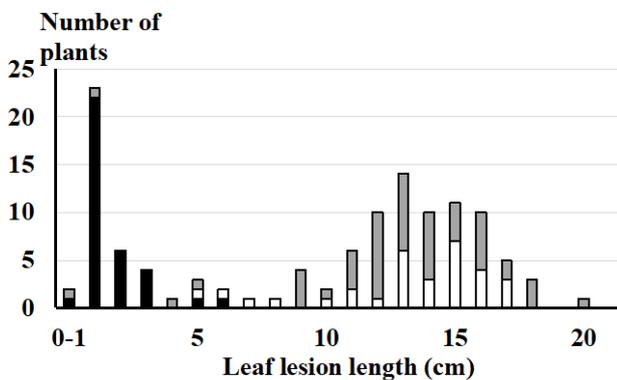


Figure 2. Frequency distribution of leaf lesion length in the F<sub>2</sub> population from the cross between IR24 and XM289 after *Xoo* Japanese race IIA (strain R7147) inoculation. Three classified genotypes were assessed for the DNA marker detecting the XM289-specific mutation on chromosome 3 as indicated: black, homozygous for XM289; gray, heterozygous; white, homozygous for IR24.

### 3.3 麹菌

黒麹菌 RIB2601 株と BM40 株 (Figure 3) の比較ゲノム解析を行った。その結果、BM40 株では染色体 DNA の再編成が起きており、それにより Velvet ファミリータンパク質をコードする *veA* 遺伝子に破壊的変異が生じていることが示唆された。VeA は、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* において有性生殖や二次代謝に関与することが知られているが、これまで VeA とクエン酸生産の関連性についての報告はない。そこで、BM40 株がクエン酸低生産となった原因の候補遺伝子として *veA* を解析した。まず、グルホシネート耐性遺伝子 *bar* と RIB2601 の野生株に由来する正常な *veA* 遺伝子 (プロモーターとして上流 1 kbp, ターミネーターとして下流 0.6 kbp を含む) を連結し、それを BM40 株の染色体 DNA に非同相末端結合によりランダムに挿入し、BM40+*veA* 株を構築した。合計 4 株の BM40+*veA* 株を取得し、その有機酸生産を評価した結果、BM40+*veA* 株においてクエン酸生産が RIB2601 株と同程度まで回復していた。これらの結果から、BM40 株のクエン酸低生産性は *veA* への破壊的変異が原因であることが示唆された。

# yamasa@agri.kagoshima-u.ac.jp

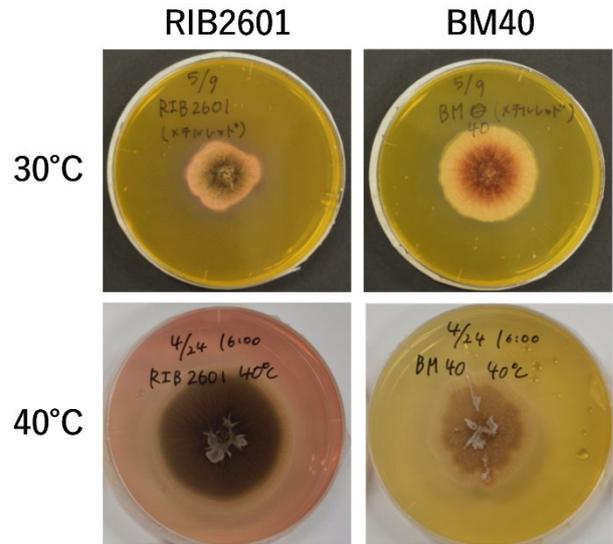


Figure 3. Colony formation of *Aspergillus luchuensis* RIB2601 and BM40 strains on agar medium containing methyl red. Methyl red appears red color at pH 4.4 or lower. The BM40 strain does not exhibit a red coloration even at 40°C due to its low citric acid production.

### 3.4 ナイロン分解微生物・バイオポリマー生産菌

2024 年度は、初年次検討のため、7 種の微生物に対する照射条件の予備的検討を行った。具体的には、照射量を 10, 100, 500, 1,000 Gy と 4 水準にて大きく変化させた際の微生物生存率を確認し、次年度以降の本格的な照射実験のための条件決定を目指した。結果を Figure 4 に示す。イオンビームの照射を行わなかった試料の生存率を 100 とした相対活性にて示している。その結果、② *A. mediolanensis* NK15Y-CL, ③ *S. gulosus* Umi7-B1, ⑥ *Planctobacterium* sp. MND-2, および⑦ *P. mexicana* RND-1 の 4 種では照射量 100 Gy と 500 Gy の間で、④ *Pseudophaeobacter* sp. E1-1 株では照射量 0 Gy と 10 Gy の間で、⑤ *C. necator* NBRC 102504 株では照射量 10 Gy と 100 Gy の間で生存率が大きく低下することが分かった。また① *Arthrobacter* sp. KI72 では照射量に従って徐々に生存率が低下していた。このように微生物種によって多少の差異は見られるものの、大まかには 500 Gy の照射量では生存率が確実に低下することを確認した。そこで来年度は、本検証結果を基に 500 Gy 以上のイオンビーム照射を実施し、ポリアミド分解能力や海洋生分解性ポリマー生産能力等の表現型の変化した変異株の選抜にトライする計画である。

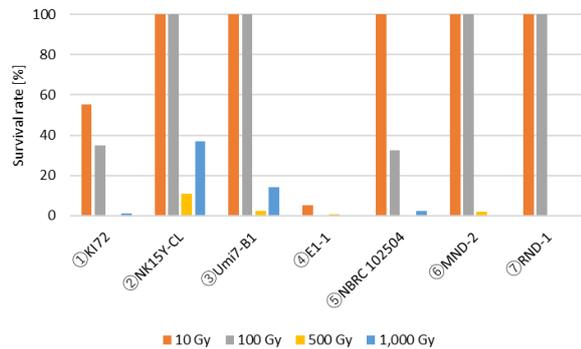


Figure 4. Effect of ion beam on viability (%) of nylon-degradation and biopolymer-production bacteria.

## 参考文献

- [1] 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
- [2] 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
- [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
- [4] 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
- [5] 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
- [6] 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.
- [7] 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
- [8] 加藤太郎ら, "ナイロン加水分解酵素群(Nyl series)の遺伝子・酵素学的研究の進展と効率的な酵素的モノマー化への展開", *プラスチックのリサイクルと再生材の改質技術*, 技術情報協会, 第2章第10節, pp.170-190, 2024.
- [9] Y. Shiraishi et al., "Quantitative nylon monomerization by the combination of chemical pretreatment and enzymatic hydrolysis using nylon hydrolases", *PLOS One*, 20: e0318641, 2025.
- [10] K. Mori et al., "Chromosome-level genome sequence of the black koji fungus *Aspergillus luchuensis* RIB2601", *Microbiol Resour. Announc.* 10: e0038421, 2021