

[15015]

農業と醸造業にとって有用な生物素材開発のためのイオンビーム活用

APPLICATION OF ION BEAM TO DEVELOP BIOLOGICAL MATERIALS USEFUL FOR AGRICULTURE AND BREWING INDUSTRY IN FUTURE (progress report 2015)

一谷勝之^{A)}, 玉置尚徳^{A)}, 橋本文雄^{A)}, 清水圭一^{A)}, 吉田理一郎^{A)}, 内海俊樹^{B)}, 福德康雄^{C)}, 尾上昌平^{C)},
岡本繁久^{#A)}

Katsuyuki Ichitani^{A)}, Hisanori Tamaki^{A)}, Fumio Hashimoto^{A)}, Keiichi Shimizu^{A)}, Riichiro Yoshida^{A)}, Toshiki
Uchiumi^{B)}, Yasuo Fukutoku^{C)}, Masahira Onoue^{C)}, Shigehisa Okamoto^{#A)}

^{A)} Faculty of Agriculture, Kagoshima University

^{B)} Faculty of Science, Kagoshima University

^{C)} Natural Science Centre for Research and Education, Kagoshima University

Abstract

Since 1999, several crop plants as well as industrially important microorganisms have been subjected to ion-beam irradiation for breeding of novel cultivars and strains with agronomically and industrially useful traits respectively, by an ion-beam utilizing group organized in Kagoshima University. In this progress report, we present a part of recent advances in our research, especially regarding to rice (*Oryza sativa*) and black koji (*Aspergillus luchuensis*). As for rice, we found that seed fertility of M₁ generation decreased dose-dependently of an ion-beam but mutation rates did not concomitantly increase, and that the irradiation at 1.25Gy resulted in the best value of mutation rates in the case of wet hushed rice grains, whereas that at 10-15Gy resulted in the best value of mutation rates in the case of dry grains. As for black koji, we could successfully obtain four candidate colonies with a starch-degrading activity much higher than a parental *A. luchuensis* RIB2601 strain, upon a combination of ion-beam irradiation with an appropriate and simple screening procedure.

Keyword: *Oryza sativa*, fertility, leaf-color aberrancy, dwarf, *Aspergillus luchuensis*, starch-degrading activity

1. はじめに

鹿児島大学のイオンビーム利用グループは、平成 11 年にトルコギキョウとイネの種子にイオンビームを照射して以来、花卉類ではデルフィニウム、穀類ではアワ、野菜類では矮性トマトやアイスプラントへと照射対象を広げてきた。さらに、前回のタムからは醸造微生物を対象に加え、イオンビームの育種利用への有効性を検証してきた。本年度は、進捗状況が良好なイネと黒麹菌を用いて得られた成果を報告する。

イネ *Oryza sativa* は、主要穀物であると同時に単子葉類のモデル植物でもある。従って、イオンビームによる新規突然変異体の獲得や効率的な変異体獲得法の開発は、イネの遺伝学研究に貢献すると考えられる。また、農業上、有用な変異体の選抜は品種改良に直結する。実際、イネ種子へのイオンビーム照射によって、従前にはない突然変異体が多数得られてきた^[1]。しかし、高線量のイオンビームを照射した場合、照射当代 (M₁ 世代) において稔性が著しく低下するため次代において突然変異選抜の際に効率が悪くなるというところも分かってきた。本年度の研究では、

効率よく変異体を選抜するための基礎知見を得るためイオンビーム照射条件を変え、M₁ 1 個体あたり 5 穂を供試し、M₂ 世代の突然変異個体出現を詳細に調査した。

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* は、焼酎と泡盛の製造に利用されている麹菌であり、原料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。さらに、黒麹菌はクエン酸を高生産する性質をもち、焼酎、泡盛の製造過程においてもろみの pH を下げて腐敗を防ぐという役割もある。これらの有用な性質のメカニズムを解明することは、産業利用の観点から重要であり、黒麹菌をはじめ黄麹菌 *Aspergillus oryzae* などの有用微生物のイオンビームによる変異株の取得、育種への応用について研究が行われてきた^[2,3]。

昨年度、われわれのグループではイオンビームを利用して黒麹菌の突然変異株を効率よく取得するための条件検討を行った^[4]。本年度は、実際に黒麹菌のデンプン分解活性の高い変異株の取得に利用できるのかどうかを検討した。

2. 材料と方法

2.1 イオンビーム照射条件

イオンビーム照射は国立研究開発法人日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所の AVF サイクロトロンを用いて行った。イオンビームのイオンは炭素イオン、エネルギーは 220 MeV であった。

2.2 イオンビーム照射に供試するイネ種子の調製と調査項目

供試材料としては、これまでイネの遺伝学研究に頻繁に利用されてきた台湾品種で温帯日本型の台中 65 号(以下, T65)を用いた。イオンビームの照射は Yamaguchi et al. (2009)^[5]の方法に従い、以下の通り行った(Fig.1)。発芽前の種子に照射する場合は、照射の前日に籾殻を除去して玄米にし、胚が上を向くようにして両面テープでシャーレに貼り付けた。発芽後の種子に照射する場合にはシャーレに 10mm の 1%寒天を敷き詰め、同じく照射前日に籾殻を除去した玄米の胚を上向にして種子の半分が埋まるように寒天に置床した。照射後は、1 シャーレごとに直径約 15cm のポリポットに播種し、播種後約 50 日で鹿児島大学農学部附属農場に移植した。M₁ 世代を個体ごとに収穫し、個体毎に平均的な穂を 5 本選び、種子稔性を調べるとともに、穂の状態のまま浸種し、浸種後 2 週間目に M₂ 世代の葉色変異の有無を調査した。

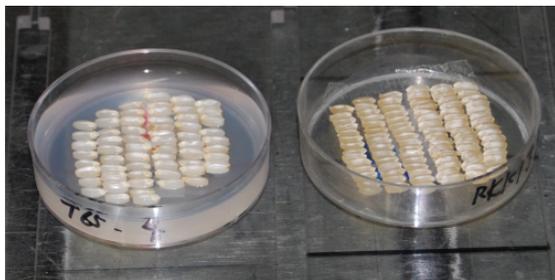


Figure 1. Wet and dry grains of husked rice prepared for ion-beam irradiation.

2.3 イオンビーム照射に供試する黒麹菌の調製

黒麹菌として *A. luchuensis* RIB2601 株を使用した^[6]。黒麹菌の分生子を分生子形成培地に植菌し、30°C で 7 日間培養後、シャーレにカプトン膜で蓋をしてイオンビームを照射した。

2.4 高デンプン分解活性変異株の取得

糖化力に変異が生じた変異株の獲得と、変異の安定性の確認のために、多段階のスクリーニングを行った。変異株の選別は、不溶性デンプン培地を用いてデンプンが糖化されてできた透明なハローを指標として行った。

3. 結果と考察

<イネ>

Fig. 2 に示す通り、イネの湿潤種子にイオンビームを照射した場合、線量依存的に稔性低下が認められた(2.5 & 5Gy)。同様の結果は乾燥種子にイオンビームを照射した場合も見られたが、稔性の低下をもたらす線量は湿潤種子の場合に比べて高かった(5-20Gy)。また、高い線量においても発芽率が高いものもあり、稔性のバラツキが大きくなる傾向がみられた。一方、変異率(M₂世代)は、線量依的に上昇することはなく、湿潤種子を用いた場合は 1.25Gy でピークになり、その後、減少した(Table 1)。乾燥種子に照射した場合も、同様の結果が得られた。変異率のピークは 10Gy と 15Gy の約 17%で湿潤種子に比べて高かった。20Gy については供試個体が少ないため、実験データを追加する必要がある。葉色に関してはアルビノの他、クロリナ、ヴィレッセントなど複数種の変異が認められた。また、同じ個体の同じ穂から種類の異なる変異もみつけた(Fig. 4)。変異個体の出現様式は、5 穂中の 1 穂の 1 粒(個体)だけの場合から、1 穂の中でおよそ 1/4 の割合で出現するもの、5 穂からそれぞれ出現するものまで様々であった。以上の結果をまとめると、湿潤種子を用いた場合でも乾燥種子を用いた場合でも、ある程度以上線量が高くなると変異率が低くなる傾向がみられた。湿潤条件に比べて乾燥条件で変異率が高いことから、この点について、今後は乾燥条件を重点的に調査する予定である。変異個体の出現様式のばらつきは「標的細胞」(大曾根 1983)^[7]の差に起因すると考えられるので、イオンビームの照射深度を変える、または安定させることで変異個体の出現様式を揃えることができるかもしれない。

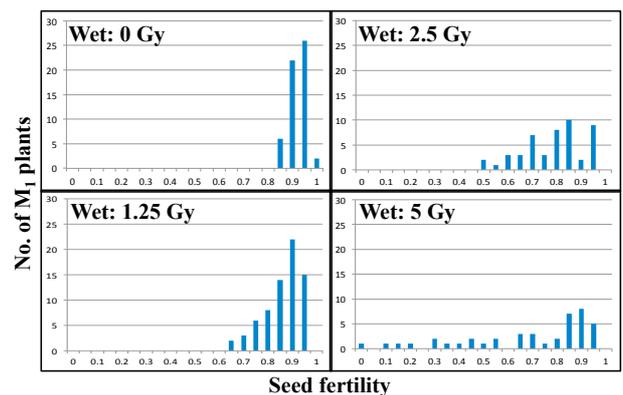


Figure 2. Dose-dependent effects of ion-beam irradiation on M₁ seed fertility.

Table 1. Effects of Ion-beam Irradiation on Seed Fertility in M₁ Generation and Mutation Rate in M₂ Generation

Seed condition	Ion beam dose (Gy)	Seed fertility in M ₁ generation (%)	No. of M ₂ lines tested	No. of M ₂ lines in which putative mutants appeared	Mutation rate (%)*
Wet	0	89.3	55	0	0.0
	1.25	83.6	70	7	10.0
	2.5	76.4	48	2	4.2
	5	65.7	42	2	4.8
Dry	0	88.2	40	1	2.5
	5	71.3	31	3	9.7
	10	59.4	54	9	16.7
	15	42.2	40	7	17.5
	20	31.2	22	2	9.1

* Mutation rate is calculated as No. of M₂ lines in which putative mutants appeared / No. of M₂ lines tested.



Figure 4. Two different mutants, albino (right) and chlorina (left), obtained from a single rice panicle.

<黒麹菌>

一次スクリーニングでは、イオンビームを照射した黒麹菌の分生子を不溶性デンプン培地に植菌して 30℃で 2 日間培養した。この時生じるハローが野生型に比べ大きなコロニーを、高デンプン分解活性を有する変異株の候補として選抜した (Fig.5)。



Figure 5. A photograph showing the 1st screening for isolation of black koji mutants with a higher starch-degrading activity.

一次スクリーニングで選抜された麹菌のコロニーは二次スクリーニングに供試するため、不溶性デンプン培地に継代した。一枚のシャーレに、野生株と 3 つの変異株候補をそれぞれ 3 連で植菌して、30℃で 2 日間培養した。培養後、コロニーの直径とコロニーを含むハローの直径を測り、ハローの割合を算出した。ハローの割合が野生株より有意に大きな株を高デンプン分解活性を有する候補株として絞り込んだ (Fig.6)。得られたコロニーは、さらに同様の三次、四次スクリーニングに供試し、最終的に 4 つの候補株を取得することができた。

以上の結果をまとめると、黒麹菌 *A. luchuensis* RIB2601 株に由来する高デンプン分解活性を示す変異株のスクリーニングを行った結果、一次スクリーニングで 267 株、二次スクリーニングで 85 株、三次スクリーニングで 25 株、四次スクリーニングで 4 株の候補株を取得することに成功した。それぞれのスクリーニングの段階で候補株が減少した原因として、ハローによる活性測定の定量性が低いことや黒麹菌が多核体であるための復帰変異等が挙げられる。最終的に取得された 4 株の高デンプン分解活性株は、野生株と比較して、ハローのサイズが 3, 11, 8, 6%増大した。

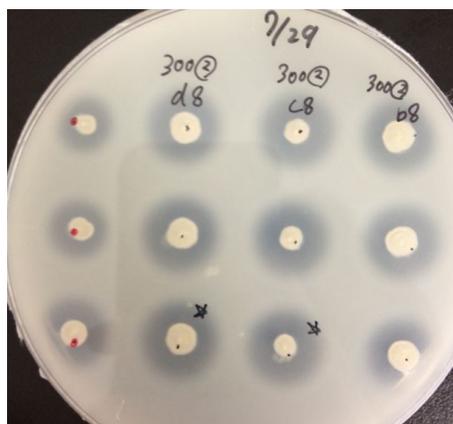


Figure 6. A photograph showing the 2nd screening.

謝辞

本研究は原子力機構施設利用共同研究制度の支援を受けて行われました。記して、厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] 田中 淳, 特集/イオンビー育種研究の最前線 イオンビー育種技術の開発と特徴 放射線と産業 Radiation & Industries No. 99, 4-10, 2003
- [2] A.Amsal, et al., Increased digestibility of raw starches by mutant strains of *Aspergillus awamori*. Food science and technology research. 5: 153-155, 1999
- [3] Y.Toyoshima, et al., Lethal and mutagenic effects

- of ion beams and γ -rays in *Aspergillus oryzae*.
Mutat Res. 740: 43–49, 2012
- [4]平成 26 年度原子力機構施設利用共同研究
一般共同研究 成果報告書
- [5] H.Yamaguchi, et al., Mutagenic effects of ion
beam irradiation on rice. *Breeding Science.* 59:
169–177, 2009
- [6] O.Yamada, et al., Molecular biological researches
of Kuro-Koji molds, their classification and safety.
J Biosci Bioeng. 112: 233–237, 2011
- [7]大曾根兼一 キメラと突然変異. 渡辺好郎・
山口彦之監修, 突然変異育種 1983, 養賢堂