

＜令和3年度助成＞

鉄・亜鉛に関わる遺伝子を改変したイネの栄養価の強化

メイ サン アウン・増田 寛志

(秋田県立大学 生物資源科学部 生物生産科学科)

1. 背景と目的

月経により定期的に鉄分を失うこともあり、日本人女性の約4割は慢性的に鉄分が足りない状態にあり、10人に1人は鉄欠乏性貧血症を患っている。また、国内の高齢者の過半数は慢性的に亜鉛欠乏の状態であり、それが寿命やQOLの低下に大きく悪影響する。亜鉛欠乏により、特に高齢者において、骨粗しょう症や味覚障害、食欲不振、治癒能力低下、物忘れ、新型コロナウイルス等の感染症リスクの増加など、様々な悪影響が生じ、死亡率の低下も引き起こしてしまう。鉄、亜鉛欠乏症共に日本の国民病とも言える。世界でも鉄欠乏や亜鉛欠乏を患う人は大変多く、隠れた飢餓として国連のSDGsでも解決

すべき重要な課題の一つとして位置づけられている。鉄、亜鉛不足を補う一般的な方法として、サプリメントを飲む、鉄・亜鉛を高く含む食品を多く摂取するなどの方法があるが、コストがかかる、調理の手間がある、個人の好みの問題などがあり、毎日継続して実施するのが難しい(図1)。

そこで我々は、日本やアジア等の多くの人々が主食としているコメの鉄・亜鉛栄養価を高めた新品種を作出し、毎日のコメ食から鉄や亜鉛を追加摂取することを目指している。これにより、継続しやすく、人類の深刻な疾病である鉄欠乏性貧血症や亜鉛欠乏症を予防するための非常に有効な方法になる(図1)。さらにコメの栄養価が高まることにより付加価値がつけば、より高値で販売できる可能性があり、生産



図1 鉄・亜鉛欠乏症を予防する4つの方法

農家にもメリットがあると考えた。鉄や亜鉛は、土壌そのものには比較的多量に存在する。

また、これまでの植物栄養学の先行研究により、イネの鉄や亜鉛の土壌からの吸収や、体内輸送に関わる分子メカニズムが解明され、その役割を担う遺伝子が単離されているため、本研究ではこの先行研究による知見を応用した。実際に、我々はイネの鉄の体内輸送や蓄積に関わる遺伝子の発現を強化し、白米の鉄を6倍に、亜鉛を1.5倍に増加させている¹⁾。さらに、ミャンマーのイネ品種においても同様に鉄を3.4倍に、亜鉛を1.5倍に増加させることに成功している²⁾。本研究では我々の過去の経験と知見を元に、より実用化しやすい方法として、変異株を用いた育種交配と、ゲノム編集による育種に注目し、以下の2つの研究課題を通じて、それぞれの方法で鉄・亜鉛栄養価の高いイネの新品種を作出することを目的とした。

研究課題1：鉄・亜鉛栄養価の高いコシヒカリ変異株を交配親に利用し、育種選抜を行う。

研究課題2：鉄・亜鉛の栄養を制御する遺伝子をゲノム編集技術により改変する。

2. 研究課題1 育種選抜

2.1 方法

研究課題1の研究方法の概要を図2に示す。以前

より我々はコシヒカリに重イオンビームを照射して、得られた変異株の集団から、玄米または白米の鉄・亜鉛栄養の高いものを5世代にわたって選抜し、通常のコシヒカリより鉄および亜鉛が1.5倍高い変異株を得ている。2019年より秋田県農業試験場と共同で、秋田県内で実用化することを考えた。しかしながら、コシヒカリの出穂日は秋田県では8月半ば以降になり、夏期の間には充分登熟させ、安定した収量を得るのが難しい。したがって、2019年に鉄・亜鉛栄養価の高いコシヒカリの変異系統と、出穂日がコシヒカリよりも早く秋田県内で栽培可能なイネ品種を交配した。2020年には交配第2世代のイネから、2021年には交配第3世代のイネから収穫した玄米の元素分析を行い、各年度における優良系統を選抜している。

本研究課題においては、2022年に東北胚232号（出穂が早く、巨大胚で玄米の食味が良い系統）とコシヒカリ変異株との交配系統、および、ゆめおぼこ（こちらも出穂が早く、耐倒伏性、耐病性、耐冷性を持ち食味の良い品種）の低カドミウム系統とコシヒカリ変異株との交配系統の第4世代の植物体を秋田県農業試験場にて圃場栽培した。また比較として東北胚232号、ゆめおぼこ低カドミウム系統、コシヒカリ変異株75番、コシヒカリ変異株931番を比較対象として合わせて栽培した。田植えは2022年6月9日に、収穫は2022年10月12日に実施し



図2 研究課題1（育種選抜）の概要

表 1 交配系統の生産力検定

品種 系統名	生産力検定								特性検定		
	出穂期 月 / 日	成熟期 月 / 日	稈長 cm	穂長 cm	穂数 本 / m ²	千粒重 g	玄米重 kg/a	基準比 %	品質 1～9	倒伏 0～5	葉 いもち
あきたこまち	7/23	9/7	81	16.3	491	22.5	60.0	100	3.0	0.3	4
ひとめぼれ	7/31	9/12	80	19.6	464	23.2	57.2		4.0	0.0	4
東北胚 × 931-49	7/26	9/8	82	15.4	520	21.0	63.2	105	4.0	0.0	4
東北胚 × 931-14	7/23	9/7	83	15.0	524	20.7	65.8	110	4.0	0.0	3
東北胚 × 75-20	7/23	9/7	80	16.9	551	20.4	62.4	104	5.0	0.0	8
ゆめおばこ lcd × 75-34	7/23	9/4	81	17.2	458	22.3	58.4	97	8.0	0.1	3
ゆめおばこ lcd × 75-52	7/24	9/7	75	17.1	456	24.0	55.6	93	8.0	0.0	3

品質は（財）日本穀物検定協会東北支部調査を参考に玄米の外見から判断

倒伏：倒伏耐性、葉いもち：葉のいもち病耐性、いずれも数値が低いほど良い。

た。栽培期間中に、表 1 に示す収量や栽培特性を調査した。各個体から得た玄米を乾燥させ、硝酸分解し、ICP-OES（Thermo Fisher Scientific）で鉄、亜鉛濃度を分析した。

2.2 結果

交配系統（第 4 世代）は、秋田の代表品種であるあきたこまちと同様に 7 月下旬に出穂し、成熟も早まり、秋田県内で問題なく栽培ができるようになった（表 1）。稈長、穂数、千粒重、玄米重量などの収量構成要素も比較対象のあきたこまち、ひとめぼれと同程度であった。交配系統は倒伏耐性、いもち病

耐性も問題のないことが確認された（表 1）。

ゆめおばこ低カドミウム系統とコシヒカリ変異株との交配系統の玄米の鉄濃度および亜鉛濃度を図 3 に示している。親系統であるゆめおばこ低カドミウム系統、さらにはコシヒカリ変異株（75 番と 931 番）と比較しても、交配系統において鉄、亜鉛の濃度が高い個体が得られた。さらに、図 3 の青い矢印で示す系統のように、鉄と亜鉛が両方とも高い系統が得られている。東北胚 232 号とコシヒカリ変異株との交配系統においても、同様に鉄、亜鉛の濃度が高い個体（F5 系統）が得られている他、平均も高くなっていた（図 4）。

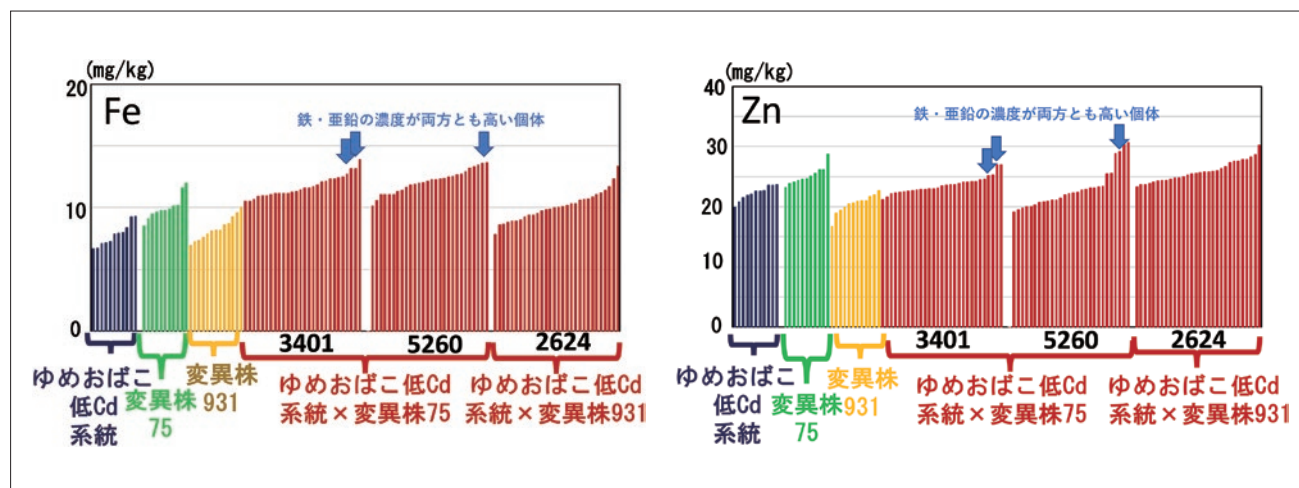


図 3 ゆめおばこ低カドミウム系統とコシヒカリ変異株（75 番、931 番）との交配系統
第 4 世代の植物体から得られた玄米の鉄濃度（左）および亜鉛濃度（右）
一つのバーが一つの個体（系統）の値を示す。玄米濃度が低い個体から高い個体に順に並べている。
図の青い矢印で示す個体は、特に鉄・亜鉛の両方が高い個体である（左右で同一の個体）。

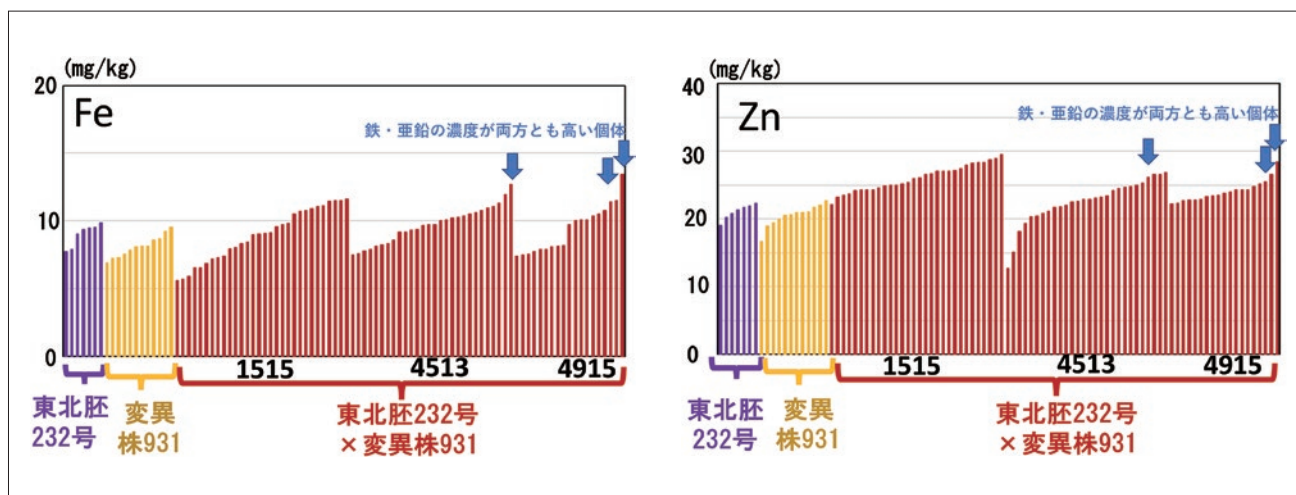


図4 東北胚232号とコシヒカリ変異株との交配系統
第4世代の植物体から得られた玄米の鉄濃度（左）および亜鉛濃度（右）
一つのバーが一つの個体（系統）の値を示す。玄米濃度が低い個体から高い個体に順に並んでいる。
図の青い矢印で示す個体は、特に鉄・亜鉛の両方が高い個体である（左右で同一の個体）。

3. 研究課題2 ゲノム編集技術

3.1 方法

鉄栄養に関連する遺伝子のうち、遺伝子の発現を抑制したり、遺伝子を破壊することにより、白米中の鉄・亜鉛栄養価が向上する遺伝子がいくつか報告されている。そのうち以下の2つの遺伝子を対象候補とし、CRISPER/Cas9を用いて遺伝子へ変異を挿入するゲノム編集用ベクターを作製した。

- 1) *OsVIT1*：イネの液胞内へ鉄を輸送する膜輸送タンパク質である。この遺伝子の機能が欠損すると鉄が液胞へ隔離されず、かわりにイネ体内を自由に移動できる鉄の量が増え、種子の鉄も増

える³⁾。

- 2) *OsYSL9*：胚乳（白米組織）から胚へ鉄を輸送する膜輸送タンパク質である。この遺伝子の機能が欠損すると、胚の鉄濃度が減少する一方で、白米の鉄濃度が増加する⁴⁾。

3.2 結果

OsVIT1、*OsYSL9* それぞれの遺伝子に対して変異を導入できるゲノム編集用のベクターを完成させた（図5）。得られた遺伝子産物が正しいことをPCRとシーケンシングによって確認した。例えば、*OsVIT1*の例では、完成したベクターのみに生じる600 bpのPCR産物が得られた⑦番のサンプルが正しいサン

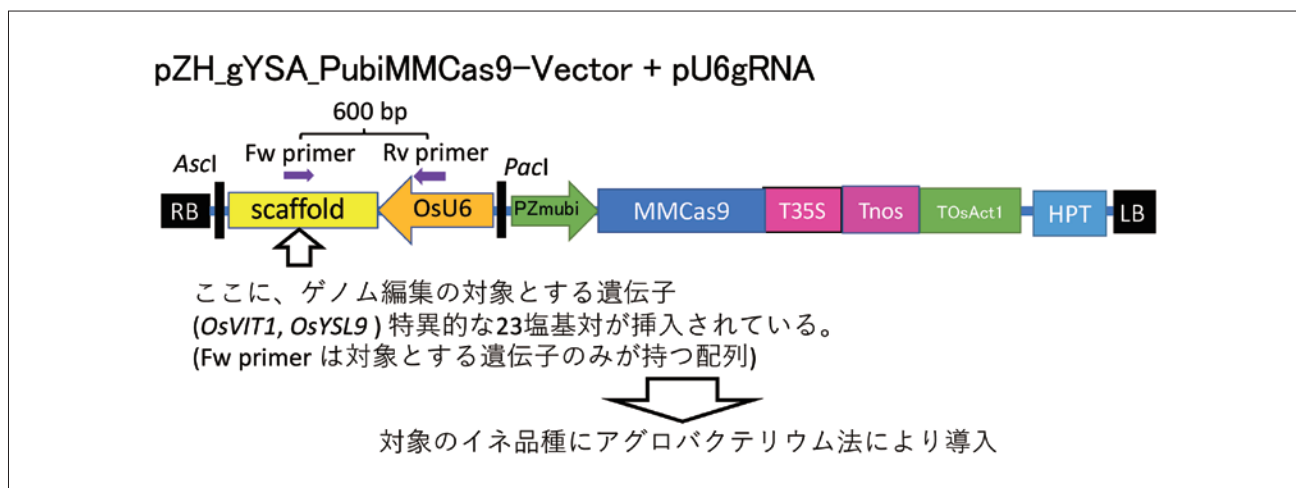


図5 ゲノム編集のためのベクターの図

プルと判断された（図 6）。現在、上記 3 種類のゲノム編集用ベクターをイネ品種“あきたこまち”に導入し、イネの形質転換を行っている（図 7）。このカルスから今後得られるイネは、*OsVIT1*、*OsYSL9*などの対象遺伝子を機能欠損し、鉄や亜鉛を種子に多く蓄積する性質を持つと考えられる。また、ミャンマーなどコメ消費量の多いアジアの発展途上国のイネ品種を対象とし、同様にイネの形質転換を進めている。

4. 考察と今後の予定

研究課題 1 について：今後も引き続き選抜を進め、形質を固定していくとともに、さらなる栽培特性の調査と食味試験、耐冷試験等を行い、秋田県内にて実用可能な品種の作出を目指す。同時に、遺伝子配列を調べ、鉄、亜鉛栄養価を高める要因となる遺伝子を探索する予定である。

研究課題 2 について：得られた植物体のポット栽培を行い、玄米と白米の元素分析を行い、鉄・亜鉛栄養価の増加を確認する。また、リアルタイム RT-PCR 法によりゲノム編集の対象遺伝子や鉄・亜鉛栄

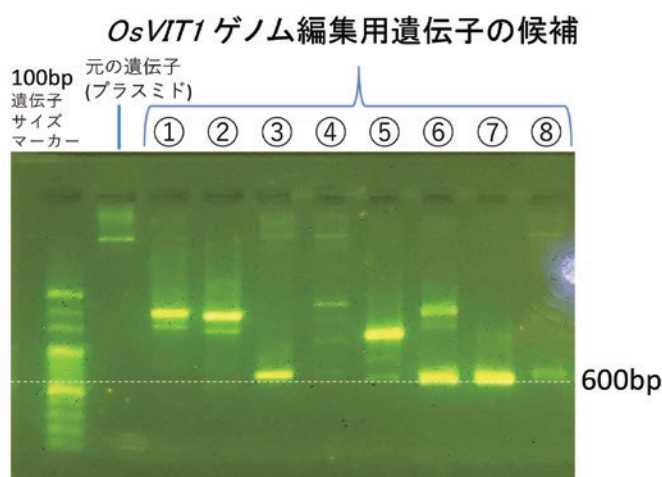


図 6 *OsVIT1* ゲノム編集用ベクターの PCR と電気泳動による確認
図 5 に示す Fw primer と Rv primer で PCR を実施した。
サンプル⑦番には、完成時に予想される 600 bp の DNA のバンドが確認された。

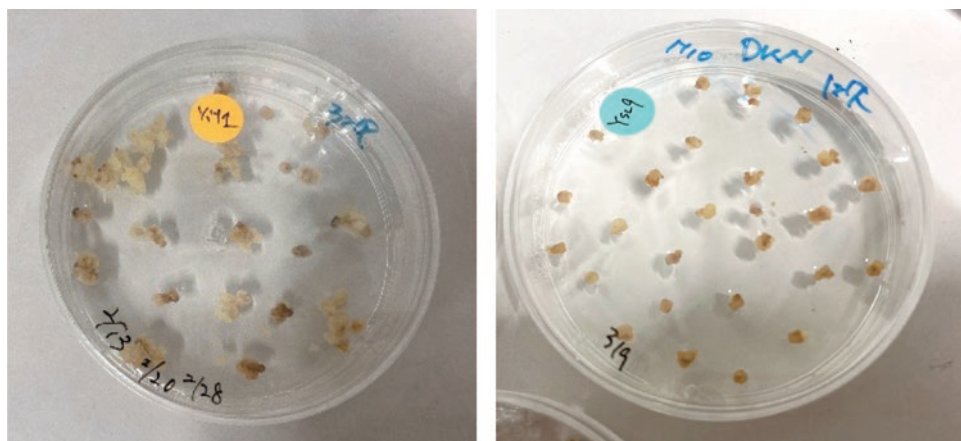


図 7 *OsVIT1* 遺伝子（左）、*OsYSL9* 遺伝子（右）を導入したイネの形質転換の様子
アグロバクテリウムに感染させ、イネ（あきたこまち）にゲノム編集用のベクターを導入したのち、選抜培地に移植して 2 週間目のカルスの様子である。カルスの新たな増殖がみられ、形質転換が順調に進んでいる。

養に関連する遺伝子の発現を調べる予定である。さらに、次の世代の植物体において、ホモで変異が挿入され、CRISPER/Cas9 のコンストラクトが外れた系統を選抜する。この系統は実質的には従来の変異育種と同等であるため、新品種として実用化が期待できる。また、研究課題 1 で育種した系統に、研究課題 2 のゲノム編集技術を適用することで、さらなる鉄・亜鉛栄養価の向上を目指したい。

謝 辞

秋田県農業試験場の高橋竜一博士には、研究課題 1 において交配と圃場栽培の助力を得ました。CRISPER/Cas9 のベクターは、農研機構の遠藤真咲博士から譲渡頂きました。また、秋田県立大学小川敦史教授、並びに同大学の高橋克巳氏、松本嵩燎氏に、研究を進める上で大変お世話になりました。さらに、本研究の遂行にあたり、研究助成金を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に深く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Masuda H, Ishimaru Y, Aung MS, Kobayashi T, Kakei Y, Takahashi M, Higuchi K, Nakanishi H, Nishizawa NK. (2012) Iron biofortification in rice by the introduction of multiple genes involved in iron nutrition. *Sci. Rep.* 2: 543.
- 2) Aung MS, Masuda H, Kobayashi T, Nakanishi H, Yamakawa T, Nishizawa NK. (2013) Iron biofortification of Myanmar rice. *Front. Plant Sci.* 4: 158.
- 3) Zhang Y, Xu YH, Yi HY, Gong JM. (2012) Vacuolar membrane transporters OsVIT1 and OsVIT2 modulate iron translocation between flag leaves and seeds in rice. *Plant J.* 72, 400-410.
- 4) Senoura T, Sakashita E, Kobayashi T, Takahashi M, Aung MS, Masuda H, Nakanishi H, Nishizawa NK. (2017) The iron-chelate transporter OsYSL9 plays a role in iron distribution in developing rice grains. *Plant Mol Biol* 95, 375-387.

Biofortification of rice by cross-breeding or engineering the genes involved in iron and zinc nutrition

May Sann Aung, and Hiroshi MASUDA

Department of Biological Production, Akita Prefectural University

Iron and zinc deficiencies are a serious problem for human nutrition worldwide, including in Japan. Producing new rice varieties with high iron and zinc in their seeds (i.e., “biofortification”) will contribute to the mitigation of this micronutrient malnutrition problem. Accordingly, we have applied two approaches to increase iron and zinc nutrition in rice seeds: 1) cross-breeding with high iron and zinc Koshihikari-mutant rice lines, and other varieties (Yumeobako-low-Cd or Tohoku-hai-232 lines) for agricultural extension in Akita prefecture; and, 2) production of new rice varieties via genome editing of the genes involved in iron and zinc homeostasis in rice.

For approach 1), we cultivated F4 cross-breeding rice lines in the field, and analyzed the yields, panicle initiation date, and mineral concentrations in brown seeds. The yields and other agricultural traits were not different in the F4 breeding lines compared to their parental lines. The panicle initiation date of F4 cross lines was the end of July, which is sufficient for cultivation in regions with shorter summers, such as Akita Prefecture. The seed iron and zinc concentrations were found to have increased by roughly 1.5-fold in the F4 cross lines, compared to the parental rice varieties.

For approach 2), we established a vector-making flow in our new laboratory. Afterwards, we constructed rice genome editing vectors for two target genes, *OsYSL9*, and *OsVIT1*, which are iron homeostasis-related genes, as knockdown or knockout of these genes will increase the iron and zinc concentrations in rice seeds. We are now processing the rice transformation of Japanese rice (Akitakomachi) and Indica rice varieties with these vectors in order to obtain genome-edited high iron and zinc rice lines.