

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：21401
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2020
課題番号：17K17998
研究課題名(和文)重イオンビーム変異とゲノム編集技術を用いたミネラル栄養価の高いコシヒカリの作出

研究課題名(英文)Producing high mineral nutrition rice by ion-beam mutation and genome editing

研究代表者
増田 寛志(Masuda, Hiroshi)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：40605268
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：鉄や亜鉛栄養価が高いイネ品種を作出出来れば、日本人の鉄欠乏性貧血症や亜鉛欠乏症の改善に貢献できる。コシヒカリの変異系統より6世代に渡り圃場栽培と鉄や亜鉛栄養価が高い系統を選抜した。また秋田県内で栽培が可能であり、かつ食味が良好なイネ品種と掛け合わせ、新たなブランド米の作出を目指した。また、次世代シーケンサーにより、変異株と野生型との戻し交配を行った系統の全ゲノム配列を解析した。変異株で染色体上に欠損が生じている範囲に、原因遺伝子があることが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会的意義：鉄や亜鉛栄養価が高いイネ品種を作出出来れば、主食であるコメ食を介して、不足しがちな日常的に追加摂取出来れば、日本人の鉄欠乏性貧血症や亜鉛欠乏症の改善に貢献できる。長年にわたり、毎日継続しやすく、追加コストも少なく済む有効な方法になる。また、これによりコメの商品価値を高めれば、米作農家にとっても利益となりうる。
学術的意義：原因遺伝子として、未知遺伝子や鉄・亜鉛栄養への関与が不明な遺伝子がある。これらの鉄・亜鉛栄養への関与が明らかになれば、学術的にも新規性が高い。

研究成果の概要(英文)：If we can produce rice varieties with high iron and zinc nutritional values, we can contribute to solve the iron deficiency anemia and zinc deficiency problems for Japanese and world population. Six generations of Koshihikari mutant lines were grown in the field and selected for their high iron and zinc nutritional values. We also crossed the lines with rice varieties that can be grown in Akita Prefecture and have good eating quality, aiming to produce a new brand of rice for local peoples and farmers. The whole genome sequences of the backcrossed lines between the mutant and the wild type were analyzed by next-generation sequencing. It suggested that the causative gene was located in the area of chromosomal loss in the mutant strain.

研究分野：植物栄養

キーワード：鉄 亜鉛 栄養強化 変異選抜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

月経で定期的に鉄分を失うこともあり、日本人の女性のうち 4 割は慢性的に鉄分が足りない状態である。女性の 10 人に 1 人は鉄欠乏性貧血症を患っている (引用文献 1)。また、国内の過半数の高齢者は慢性的に亜鉛欠乏の状態であり、寿命や QOL の低下に大きな悪影響を及ぼしている (引用文献 2)。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 (引用文献 3) など、様々な悪影響が生じ、死亡率の増加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。

鉄分や亜鉛不足を避ける方法として、サプリメントの摂取や食生活の改善が一般的に考えられている。ただし、どちらも購入して毎日飲む・食材を購入して調理するなど、特別な労力を毎日費やす必要がある。必要なコストも馬鹿にならず、長年にわたり継続して実施するのは大変困難である。特にコストの面で発展途上国では難しい。そこで日本人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の作出を研究の主目的とした。このようなコメであれば、日々のコメ食から無理なく鉄や亜鉛を追加摂取することが出来る。

2. 研究の目的

鉄や亜鉛含有量が高い品種を作出することを主目的としている。これまで重イオンビームにより変異処理を行ったイネ (コシヒカリ) から、鉄分、亜鉛栄養価の高い変異株を育種・選抜した。この変異イネを材料とし、本研究では以下の 4 つの目的を設定した。

目的 1 : 変異株の形質を固定させ、育種材料として確立させる。

目的 2 : 原因遺伝子の同定と選抜マーカーの設定を行う。

目的 3 : 鉄・亜鉛の向上に関わらない変異遺伝子の修復と、鉄・亜鉛栄養価の高い新品種の作出を目指して交配育種を行う。

目的 4 : ゲノム編集を利用し、さらなる鉄含有量の増加を目指す。

3. 研究の方法

(1) 目的 1 に対して: 圃場栽培と選抜を継続的に実施する。収量と捻実率を測定、記録する。また、硝酸分解と ICP-AES (島津製作所) または ICP-OES (Thermo Scientific) による元素分析を行い、種子の鉄・亜鉛含有量を測定する。鉄・亜鉛の高い系統を選んで次の世代の栽培を行う。これをさらに数世代に渡って繰り返し、形質を固定させる。

(2) 目的 2 に対して: 鉄、亜鉛が安定して高い変異株の系統 B と系統 C に対して、コシヒカリの野生型と戻し交配を行う。交配して得られた第二世代の種子を圃場栽培する。玄米の鉄・亜鉛含有量を測定し、それらが高い系統 10 個体、低い系統 10 個体、それぞれからゲノムを抽出し混ぜたものと、交配元の親世代に対して、次世代シーケンサーを利用して網羅的にゲノム配列を読み、ゲノムワイド解析や、QTL-seq 解析を行い、原因遺伝子や染色体上の原因領域を推定・特定する。この研究は福島大学の高橋秀和博士と共同研究により実施した。

(3) 目的 3 に対して: 秋田県農業試験場の水稻育種担当の高橋竜一博士と共同で実施する。変異株の系統 A, B, C と秋田県の奨励品種や県内で栽培可能な 4 品種・系統を交配する。交配第二世代を圃場で栽培し、収穫した玄米の鉄、亜鉛栄養価を分析し、高い系統を選抜する。

(4) 目的 4 に対して: 鉄栄養の恒常性に関係のある遺伝子候補 4 つに対して、その遺伝子の機能をゲノム編集で破壊することで、鉄栄養の恒常性が変わる。遺伝子によっては、種子の鉄栄養が向上する。例えば、葉に鉄をため込む遺伝子を破壊すれば、葉に鉄が蓄積しなくなり、その分種子へ輸送される鉄が増えることが期待される。

4. 研究成果

(1) 変異株の形質の固定について

2016年の圃場栽培の結果、選抜系統の玄米の鉄含有量は野生株と比較して最大で1.4倍に、玄米の亜鉛含有量は野生株と比較して最大で1.7倍に増加していた。この変異株の選抜系統を用いて研究を継続した。2017年度には、選抜したM6植物体を石川県立大学の圃場試験栽培を行った。収穫した種子の玄米中の鉄や亜鉛濃度が高く、その他の表現型、収量、稔実率に明確な変化が見られず野生株と同等な系統を3系統選抜した。

2019年には、選抜した第7世代(M7)の植物体を秋田県立大学の附属圃場で栽培した。秋田県ではコシヒカリの出穂が遅れ、収穫が出来ない恐れもあったが、この年の栽培では稔実率も高く十分に良好な米を収穫することが出来た。玄米の元素分析を行い、鉄・亜鉛含有量が秋田県における圃場栽培でも向上していることを確認した(図1)。

世代を経るごとに、形質は次第に安定し、より多くの個体の種子の鉄・亜鉛含有量が増加していることを確認できた。一方で、形質の安定化に多くの世代を経て選抜をする必要があったことから、原因遺伝子が複数ある可能性が考えられた。

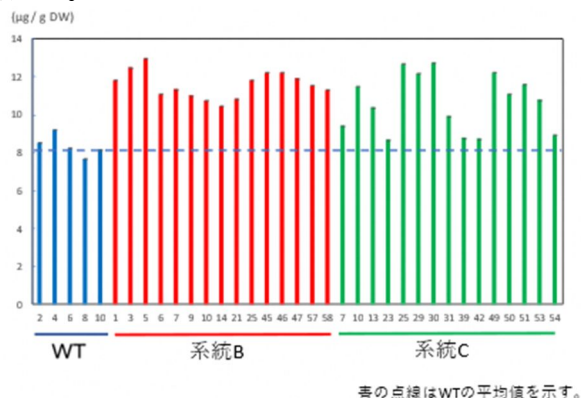


図1: 変異後7世代目の植物体から得た玄米の鉄濃度

(2) 次世代シーケンサーによる解析と原因遺伝子の同定

また、系統B、系統Cと、コシヒカリの野生型と戻し交配を行い、2017年の秋に交配種子を得た。さらに交配第一世代の植物体を冬から春にかけ温室で栽培し、2018年3月に交配第二世代の種子を得た。2018年に石川県立大学の圃場で交配第二世代の植物体を栽培した。WT10系統を含む454個体の収量を測定し、種子の鉄・亜鉛濃度を分析したところ、通常のコシヒカリより濃度は高いがばらつきがあることが分かった(図2)。

変異株と野生株の交配第二世代の遺伝子配列を次世代シーケンサーで読んだ。系統Bと系統Cでは、イオンビームで染色体上に大きな欠失が生じていた(図3)。系統Bと系統Cの欠失部位が異なり、この2系統は異なる遺伝子の突然変異であったと考えられる。また、交配第二世代には概ね修復され、大きな欠失は見られなかった。QTL-seqによる解析も合わせて行ったが、有意な結果を得ることが出来なかった。おそらく、一塩基変異で形質に明確に影響を与える遺伝子変異は無かったと考えられる。従って、交配第二世代の個体における鉄・亜鉛の高い形質は、染色体の欠失を修復する過程で生じた変異による遺伝子の機能損失が原因であると考察される。現在、原因遺伝子の絞り込みと選抜マーカーの作製を行っている。

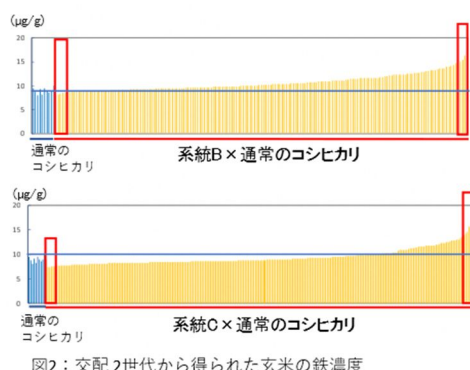


図2: 交配2世代から得られた玄米の鉄濃度

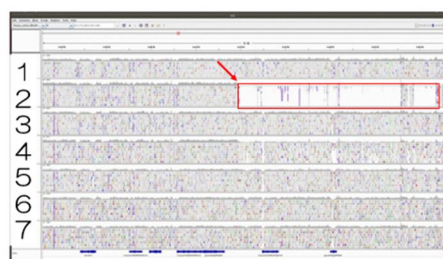


図3: 染色体上の系統Bの切断部位

(3) 鉄・亜鉛栄養価の高い地域ブランド米の作出を目指して、交配育種を行う。

鉄分や亜鉛が安定して高いコシヒカリ変異株の3系統と秋田県の奨励品種等、県内で栽培可能な4品種・系統を選択し、2019年に交配を行った。2020年に秋田県農業試験場の圃場で交配第2世代の植物体を栽培した。収穫した種子の元素分析を実施し、鉄・亜鉛含有量の多い個体を選抜した。

(4) ゲノム編集を利用し、さらなる鉄含有量の増加を目指す。

初計画と比べ、こちらの研究課題の遂行に大幅な遅れが生じてしまい、本報告書で記載可能な具体的な成果はまだ得られていない。遅れが生じた原因としては、研究代表者が秋田県立大学に異動してから、研究環境の変化や実験設備をそろえるまでに時間がかかったこと、各種実験の立ち上げの遅れがある。また、他の研究プロジェクトの実施との兼ね合いや、新型コロナウイルスの影響があった。

<引用文献>

- (1) 日本鉄バイオサイエンス学会 (2004)
- (2) 亜鉛欠乏のホームページ : <http://www.ryu-kurasawa.com/>
- (3) Wessels et al. 2020 doi:10.3389/fimmu.2020,01712

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Aung MS, Masuda H, Nozoye T, Kobayashi T, Jeon J-S, An G, Nishizawa NK.	4. 巻 10
2. 論文標題 Synthesis by OsNAS3 Is Important for Mitigating Iron Excess Stress in Rice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Sciences	6. 最初と最後の頁 660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.00660	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Masuda H, Aung MS, Kobayashi T, Hamada T, Nishizawa NK.	4. 巻 10
2. 論文標題 Enhancement of iron acquisition in rice by the mugineic acid synthase gene with ferric iron reductase gene and OsIR02 confers tolerance in submerged and non-submerged calcareous soils.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Sciences	6. 最初と最後の頁 1179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2019.01179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Masuda H, Aung MS, Maeda K, Kobayashi T, Takata N, Taniguchi T, Nishizawa NK	4. 巻 64
2. 論文標題 Iron-deficiency response and expression of genes related to iron homeostasis in poplars	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 576-588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2018.1480325	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 メイサンアウン 増田寛志	4. 巻 2
2. 論文標題 イネの鉄過剰：生理的応答と分子メカニズム	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 91-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masuda H, Shimoshi E, Hamada T, Senoura T, Kobayashi T, Aung MS, Ishimaru Y, Ogo Y, Nishizawa NK	4. 巻 12
2. 論文標題 A new transgenic rice line exhibiting enhanced ferric iron reduction and phytosiderophore production confers tolerance to low iron availability in calcareous soil	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plos One	6. 最初と最後の頁 e0173441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0173441	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Senoura T, Sakashita E, Kobayashi T, Takahashi M, Aung MS, Masuda H, Nakanishi H, Nishizawa NK	4. 巻 79
2. 論文標題 The iron-chelate transporter OsYSL9 plays a role in iron	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Mol Biol	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-017-0656-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nozoye T, Aung MS, Masuda H, Nakanishi H, Nishizawa NK	4. 巻 63
2. 論文標題 Bioenergy grass [Erianthus ravennae (L.) Beauv.] secretes two members of mugineic acid family phytosiderophores which involved in their tolerance to Fe deficiency	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Soil Sci Plant Nutr	6. 最初と最後の頁 543-552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2017.1394168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aung MS, Kobayashi T, Masuda H, Nishizawa NK	4. 巻 163
2. 論文標題 Rice HRZ ubiquitin ligases are crucial for response to excess iron	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiol. Plant.	6. 最初と最後の頁 282-296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ppl.12698	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aung MS, Masuda H, Kobayashi T, Nishizawa NK	4. 巻 64
2. 論文標題 Physiological and transcriptomic analysis of responses to different levels of iron excess stress in various rice tissues, Soil Science and Plant Nutrition	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Soil Science and Plant Nutrition	6. 最初と最後の頁 370-385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00380768.2018.1443754	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki M, Urabe A, Sasaki S, Tsugawa R, Nishio S, Mukaiyama H, Murata Y, Masuda H, Aung MS et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of a mugineic acid family phytosiderophore analog as an iron fertilizer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21837-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aung MS, Masuda H	4. 巻 11
2. 論文標題 How does rice defend against excess iron? : Physiological and molecular mechanisms.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Sciences	6. 最初と最後の頁 1102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2020.01102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 増田寛志	4. 巻 90
2. 論文標題 鉄・亜鉛栄養価の高いイネの作出に関する研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本土壌肥料学会雑誌	6. 最初と最後の頁 352-353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 増田寛志
2. 発表標題 鉄・亜鉛栄養価の高いイネの作出に関する研究
3. 学会等名 2019年度 日本土壌肥料学会東北支部会福島大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田寛志
2. 発表標題 奨励賞受賞記念講演 鉄・亜鉛栄養価の高いイネの作出に関する研究
3. 学会等名 2019年度 日本土壌肥料学会 静岡大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田寛志、メイサンアウン、前田慶介、小林高範、高田直樹、谷口亨、西澤直子
2. 発表標題 ポブラの鉄欠乏応答と鉄ホメオスタシス関連遺伝子の発現解析
3. 学会等名 第64回 日本土壌肥料学会 神奈川大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遺伝子導入により鉄の体内輸送と蓄積能を強化した高鉄米の作出
2. 発表標題 増田寛志 メイサンアウン 小林高範 石丸泰寛 高橋美智子 樋口恭子 中西啓仁 西澤直子
3. 学会等名 第36回 日本植物細胞分子生物学会 金沢大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増田寛志
2. 発表標題 樹木ポブラの鉄欠乏応答と鉄関連遺伝子の発現解析
3. 学会等名 第42回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Masuda, May Sann Aung, Takanori Kobayashi, Hiromi Nakanishi, Naoko K. Nishizawa
2. 発表標題 Iron and zinc biofortification of Koshihikari rice obtained by ion-beam irradiation
3. 学会等名 16th International Symposium on Rice Functional Genomics (ISRFG) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masuda H, Aung MS, Kobayashi T, Nakanishi H, Nishizawa NK
2. 発表標題 Iron biofortification in important rice varieties obtained by the introduction of multiple genes or ion-beam irradiation
3. 学会等名 14th International Plant Nutrition Colloquium (IPNC) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 増田寛志 MAY SANN AUNG 小林高範 西澤直子
2. 発表標題 鉄関連遺伝子 Gmferritin、HvNAS1、OsYSL2、IDS3を同時導入した高鉄米の作出
3. 学会等名 土壤肥料学会第63回仙台大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

<p>1. 著者名 Hiroshi Masuda, May Sann Aung, Takanori Kobayashi, Naoko K. Nishizawa.</p>	<p>4. 発行年 2020年</p>
<p>2. 出版社 Springer</p>	<p>5. 総ページ数 28 pages (p149-p177)</p>
<p>3. 書名 Iron Biofortification: The Gateway to Overcoming Hidden Hunger. In: Costa de Oliveira A., Pegoraro C., Ebeling Viana V. (eds) The Future of Rice Demand: Quality Beyond Productivity.</p>	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>2019年に、日本土壌肥料学会の奨励賞を受賞した。 受賞タイトル「鉄・亜鉛栄養価の高いイネの作出に関する研究」</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高橋 竜一 (Takahashi Ryuichi)	秋田県農業試験場	
研究協力者	アウン メイサン (May Sann Aung)	秋田県立大学	
研究協力者	西澤 直子 (Nishizawa Naoko)	石川県立大学	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高橋 秀和 (Takahashi Hidekazu)	福島大学	
研究協力者	小林 高範 (Kobayashi Takanori)	石川県立大学	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関