

農作物のカドミウム吸収抑制のために（3）低蓄積品種

（独）農業環境技術研究所 土壤環境研究領域 石川 覚

1. はじめに

カドミウム（Cd）は「イタイイタイ病」の原因物質として知られているが、自然界では普遍的に存在する重金属元素である。Cd を多く含む食品を長年にわたり摂取し続けると、腎機能障害等の人体への悪影響を及ぼす危険性が指摘されている。食品に含まれるカドミウム濃度の国際基準値は1998年にコーデックス委員会（FAO/WHOの合同食品規格委員会）によって基準値案が提案され、その後2006年に最終決定された。それを受けて我が国のコメの基準値は2011年に、従来の1 mg/kg（玄米1kg当たり1mgのCd）未満から、0.4 mg/kg（玄米・精米）以下に引き下げられた。

このような国内外の動向に対応すべく、（独）農業環境技術研究所ではCdの主要な摂取源であるコメを中心に、作物のCd吸収抑制技術等に関する研究を2000年から開始した。コメのCd汚染をなくす手段として、これまで客土による土壤修復対策が講じられてきた。富山県神通川流域の客土事業は33年もの長い年月と407億円という莫大な予算によって昨年完了したが、未だ客土対象に指定される地域も存在し、修復にかかる期間やコストの問題から客土に替わる新たな土壤修復技術が求められている。そこで、当研究所ではこれまで有望な土壤修復技術として化学洗浄法（Makino et al. 2007, 2008）とCd高集積イネ品種によるファイトレメディエーション（Murakami et al. 2009）を開発し、実証事業等でその効果の検証を実施しつつ、技術普及に努めている。一方、基準値を超える恐れがある地域では出穂前後の湛水管理を徹底することで水稻のCd吸収を抑制しており、現在、日本全国の約4万ヘクタールの水田で実施されている。しかしながら、夏期に多量の農業用水を確保することは困難なことが多く、また、長期にわたる湛水管理は水稻の生育やコメの品質、収穫時の作業性等にも影響を与える。それゆえ、これまでの栽培体系を変えることなく、安価で広範囲に適用できる「低Cd品種」のニーズが高まっている。

通常、品種育成は10年以上の歳月を費やす場合が多く、加えて育種の素材となるCd吸収の少ない品種を見つけなくてはならない。あいにく、日本の品種は世界の品種に比べてもCd濃度が低い部類に属するため（Arao and Ae 2003, Uruguchi et al. 2009）、人工交配によって、日本の品種をさらに低Cdにすることは非常に困難である。そこで我々は、従来の交配育種ではなく、花卉類の品種改良によく利用されているイオンビームによる突然変異によって、Cd吸収に関わる遺伝子に人工的に変異を与え、低Cd品種を開発することに成功した。本シンポジウムではその概要を紹介する。

2. イオンビームによる突然変異

植物の突然変異は、紫外線等の影響で自然条件下においても極めて低頻度で起こりうるが、種子や培養組織への放射線照射や化学物質処理等で人為的に誘発することもできる。人為的な突然変異を利用して、多様な形質を持つ品種がこれまで育成されている。イネでは、半矮性品種の「レイメイ」、低グルテリン米の「LGCI」、低アミロース米の「ミルキークイーン」等がその代表例である。放射線の一種であるイオンビームは、水素イオンや炭素イオンなどを加速器（サイクロトロン）を使った高速に

加速させたイオン粒子である。ガンマ線やエックス線に比べてイオンビームは以下のような特徴を持つことが報告されている (Tanaka et al. 2010)。1) ガンマ線などに比べてイオンビームでは数倍から十数倍突然変異率が高いので、少ない材料で効率良く目的とする変異体が得られる。2) ガンマ線などに比べて突然変異のスペクトルが広く、色々な種類の突然変異を引き起こすことができるため、これまで得られなかった新しい形質を作り出せる可能性がある。3) イオンビームで作った突然変異体には付随する変異が少なく、目的とする特性をピンポイントで改良することができる。なお、イオンビーム照射で作出された変異体は、遺伝子組換え植物ではないので、生産現場での栽培が即可能である。

2. 低Cd コシヒカリ変異体の選抜

コシヒカリは日本で最も栽培面積が多く、品種育成の親として頻繁に使われている。それゆえ、コシヒカリを低Cdに変えることで、全国的に普及しやすく、新たな品種も作りやすいと言える。コシヒカリ種子へのイオンビーム照射は (独) 日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所のイオン照射施設 (TIARA) 内にある AVF サイクロトロンを利用して実施した。種子に炭素イオン ($^{12}\text{C}6+$) を 40 グレイの強さで照射し、照射後の種子 (M1) から第2世代の種子 (M2) を得て、低Cd変異体の選抜に供試した。約 3,000 個体を Cd 汚染土壌で栽培し、その各々から玄米を収穫した後、個体別に Cd 濃度を測定した。

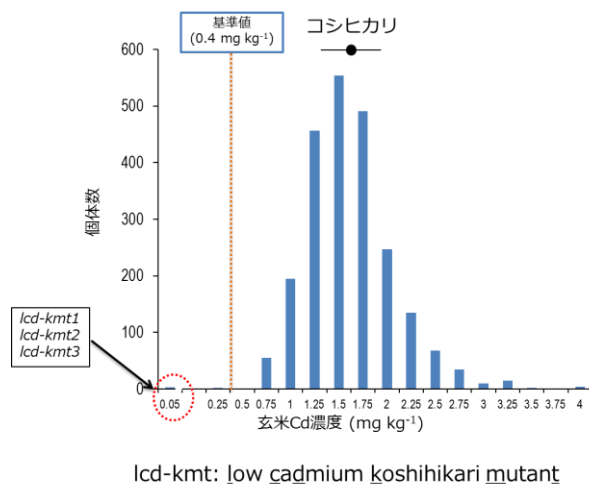


図1 変異体の玄米Cd濃度の頻度分布

比較のために同一条件で栽培した通常コシヒカリ (照射していないコシヒカリ) の玄米Cd濃度は、 1.73 mg kg^{-1} (図1の●) と基準値の 0.4 mg kg^{-1} を大幅の超す値となった。これはCd汚染土壌で栽培したことに加え、Cd吸収を促進させる節水管理で実施したためである。ほとんどの変異体のCd濃度はコシヒカリ並であったが、基準値を大幅に下回る 0.05 mg kg^{-1} 以下の変異体を3個体見つけることに成功した (図1、赤丸)。各々の変異体を lcd-kmt1、lcd-kmt2、lcd-kmt3 (low cadmium koshihikari mutant) と名付けた。

2. 低Cd コシヒカリ変異体の特性

(1) 低Cdの要因解析

選抜された変異体の低Cd要因を探るため、水耕試験を行い、根のCd吸収性を評価した。その結果、いずれの変異体も根のCd吸収が著しく抑制されていることがわかった。Cdは亜鉛や鉄などの必須重金属元素を輸送するタンパク質を介して根細胞内に取り込まれることが予想される。低Cd変異体の場合、亜鉛、鉄、銅の濃度は根部・茎葉部ともにコシヒカリと同程度であったが、マンガン (Mn) 濃度はコシヒカリに比べ著しく低く、根で約 1/4、茎葉部で 1/10 以下であった。なお、Mn 以外の他の必須養分 (例えばカリウム、カルシウム、マグネシウム等) には影響がなかった。このことから、Cdは

Mn と同じ輸送システムを介してイネの根に取り込まれるが、低 Cd 変異体はその輸送系に変異が生じたため、吸収できないと考えられた。

(2) 現地圃場試験による低 Cd 性の検証

土壌 Cd 濃度が異なる 3 カ所の現地圃場に、コシヒカリと lcd-kmt1 および lcd-kmt2 を栽培し、玄米と稲わらのカドミウム濃度を比較した (図 2)。早期に落水した影響で、いずれの圃場でもコシヒカリの玄米 Cd 濃度は 0.4mg/kg を大幅に超過していたのに対し、低 Cd 変異体は 0.03mg/kg 以下となり、基準値を大幅に下回った。稲わらの Cd 濃度も同じ傾向で、変異体で著しく低くなった。このように圃場試験においても低 Cd 性が証明できた。

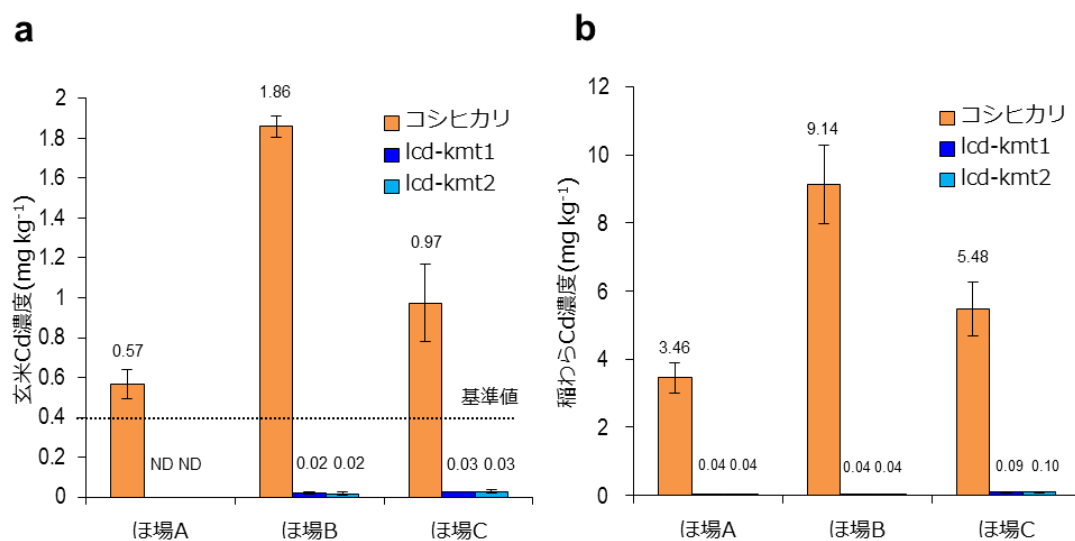


図 2 高 Cd 圃場で栽培時の玄米・稲わら Cd 濃度 (a:玄米、b:稲わら)

ND は定量限界値以下 (<0.01mg/kg) を示す

データは割愛するが、早期の落水は低 Cd 変異体の Mn 吸収を著しく抑制し、コシヒカリの Mn 濃度に比べて、玄米で 1/3、稲わらで 1/30 となった。一方、慣行の水管理条件 (例えば間断灌漑) で栽培すると、土壌中の可給性マンガン濃度にも依存するが、低 Cd 変異体の玄米 Mn 濃度はコシヒカリ並かやや低い程度、稲わらはコシヒカリの 1/5 程度まで回復する。その一方、Cd 濃度は低いままを維持する。現在、様々な地域での栽培を通して、低 Cd 変異体の Mn 濃度への影響を調査している。

(3) 生育特性

(独) 農業環境技術研究所の水田圃場にて、2つの低 Cd 変異体 (lcd-kmt1 と lcd-kmt2) を 2年間栽培した時の生育特性を表 1 に示した。さらに同圃場での生育状況および草姿、籾、玄米形質を図 3 に示した。なお、lcd-kmt3 は弱勢個体であったため、生育データは割愛する。低 Cd 変異体の出穂期はコシヒカリよりも 1 日~2 日程度遅く、成熟期は同じである。稈長、穂長、穂数はコシヒカリとほぼ同等であり、草姿はコシヒカリと変わりなく、見た目では区別することは難しい (図 3)。精玄米重および玄米千粒重ともにコシヒカリ同等である。玄米の外観形質にも違いはない。低 Cd 変異体の倒伏性は弱、耐冷性は極強、穂発芽性は難、いもち病抵抗性は弱、白葉枯病抵抗性は中であり、コシヒカリと同じ

評価である。lcd-kmt1 のタンパク質含有率はコシヒカリよりも 0.2% 高く、逆にアミロース含有率は同品種よりも 1% 高い。20 名のパネラーによって評価された低 Cd 変異体の食味はコシヒカリ同等である。このように、形態的特徴や収量等の農業形質、食味はコシヒカリと同等であり、非常に実用性の高い変異体であることがわかった。

表 1 低カドミウムコシヒカリ変異体の生育特性

品種・系統名	出穂期 (月日)	成熟期 (月日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/m ²)	精玄米重 (kg/a)	玄米千粒重 (g)	タンパク含有率 (%)	アミロース含有率 (%)	食味
lcd-kmt1	8.04	9.05	90	17.3	317	54.8	21.0	7.3	16.4	0.00
lcd-kmt2	8.05	9.05	88	17.2	330	54.4	21.0	7.1	17.4	0.20
コシヒカリ	8.03	9.05	90	17.5	336	54.6	21.0	7.0	17.2	(±0.00)

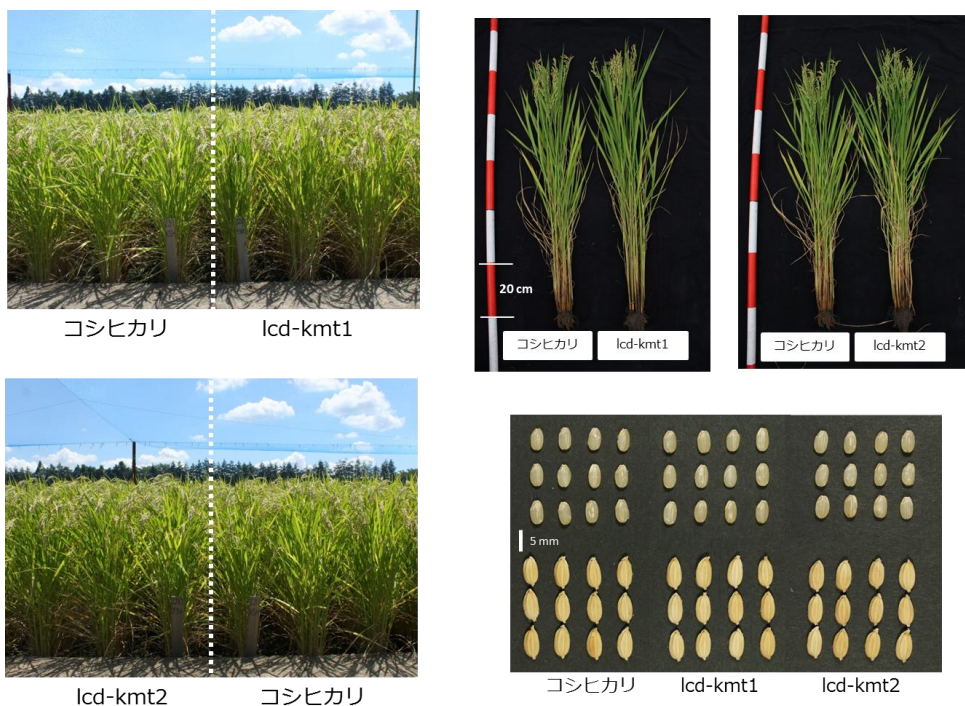


図 3 低 Cd コシヒカリ変異系統の圃場での生育、一株の草姿、もみ・玄米の外観形質

3. 原因遺伝子の特定と DNA マーカーの開発

(1) 原因遺伝子の特定

植物の根表面には土壌中の栄養素を根に取り込むためのトランスポーターと呼ばれる膜輸送タンパク質がある。Cd 等の重金属もトランスポーターによって根に吸収され、その働きは遺伝子によって制御されている。我々の研究グループは、低カドミウム変異体の原因遺伝子を特定する目的で、まず lcd-kmt1 を Cd 高集積のインディカ品種であるカサラスを交配し、遺伝解析用の実験材料を作成した。雑種第 2 代の分離集団をカドミウムで処理し、各個体の茎葉 Cd 濃度を測定したところ、分離比が 1 : 3 (低 : 高) となり、低 Cd の形質は 1 つの劣性遺伝子で支配されていることが推定された。次にマップベースクローニング法 (遺伝地図をもとに DNA マーカーで候補染色体領域を絞り込み目的遺伝

子を特定する手法) によって原因遺伝子を含む染色体領域を絞り込み、イネゲノムデータベースを活用しながら、一つの遺伝子を特定することに成功した。原因遺伝子である *OsNRAMP5* は、細胞膜上に存在する重金属トランスポーターをコードする。得られた3つの変異体はすべてこの遺伝子に変異が挿入されていたが、その挿入パターンに大きな違いが見出された。*lcd-kmt1* 変異体は、*mPingA1* と呼ばれる 433bp (bp は塩基対) からなるトランスポゾン (転移因子) が挿入されていた。トランスポゾンとは DNA 上の位置を転移できる塩基配列のことを言い、遺伝子に挿入されると、その機能が失われる。一方 *lcd-kmt2* 変異体は、*OsNRAMP5* に 1bp の欠損があることで、アミノ酸の読み取り枠にずれが生じ、mRNA 上に新たなストップコドンが出現したことで、正常なタンパク質への翻訳が途中で停止した。*lcd-kmt3* は *OsNRAMP5* を含む約 277kbp の大きな塩基の欠損があり、12 個の遺伝子が失われていた。*lcd-kmt3* の生育が不良であった理由は、多くの遺伝子が喪失したためと考えられる。3 つの異なる変異はすべて *OsNRAMP5* の重金属トランスポーターとしての機能を失わせ、根の Cd 吸収が抑制されたことで、結果的に玄米の Cd 濃度が著しく低下したと考えられた (図 4) (Ishikawa et al. 2012)。

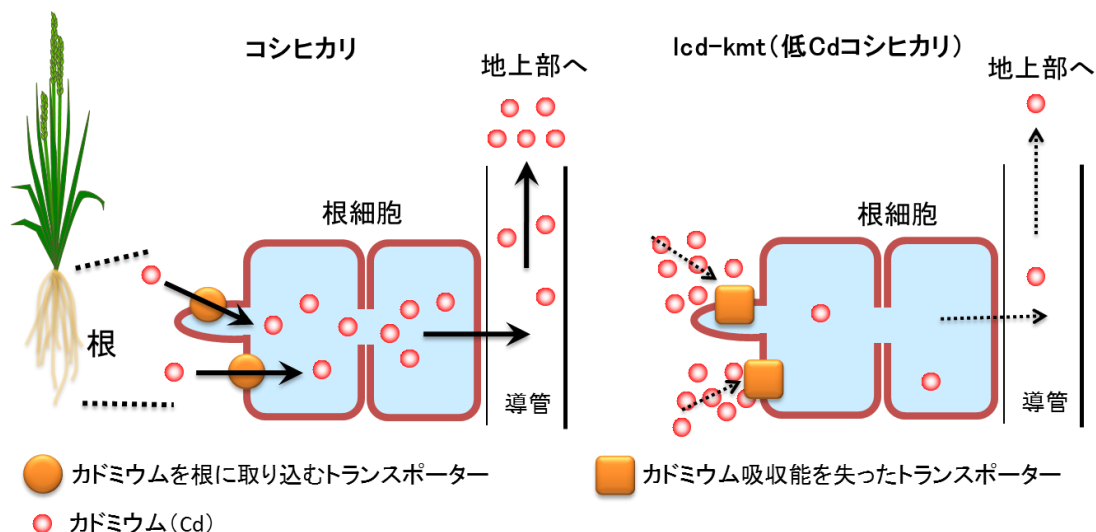


図4 低カドミウムコシヒカリのカドミウム吸収制御のしくみ

(2) DNA マーカーの開発と育種への利用

低 Cd をもたらす *OsNRAMP5* の変異遺伝子を他の品種に導入し、新たな低 Cd 品種を作出することも可能である。その際、DNA マーカーは非常に有効なツールになり得る。低 Cd 変異体の *OsNRAMP5* 遺伝子は人工的な変異により、コシヒカリや他の品種とは異なる塩基配列を持つ。その塩基配列の違いは個体を識別する際の目印 (マーカー) となるため、これを DNA マーカーと呼ぶ。変異が挿入された部位周辺の DNA 断片を PCR で増幅し、電気泳動すると図 5 のような増幅断片の大きさ (バンドの位置) に違いが現れる。*lcd-kmt1* の場合、433bp の挿入があるため、その分コシヒカリよりも上方に増幅断片が現れる (図 5a)。*lcd-kmt1* とコシヒカリを交配した第 1 雑種世代 (F1) は、ヘテロ接合体 (両親の遺伝子型を持つ) のため、2 本バンドが現れる。これは交配できたかどうかの目印にもなる。一方、*lcd-kmt2* は 1bp のみの欠損であるため、変異領域を増幅させただけではコシヒカリと区別が付かない。しかし、コシヒカリでは切断されないが、*lcd-kmt2* のみで切断される制限酵素サイトが 1bp の

欠損で生じたため、FspI 処理で lcd-kmt2 の増幅断片は等分され、コシヒカリの断片と識別可能になる (図 5b)。DNA マーカーを活用して、他品種に低 Cd を付与する方法の概略図を図 6 に示した。例えば、A という品種を低 Cd に変えたいとする。その場合、A 品種と低 Cd 変異体を交配し、F1 を作る。F1 は両親の遺伝子をすべてヘテロで持つため、さらに A 品種を繰り返し戻し交配し、低 Cd 遺伝子をホモ型で持つ個体のみを図 5 にある DNA マーカーで選抜する。そうすることで、低 Cd の性質を持ち、

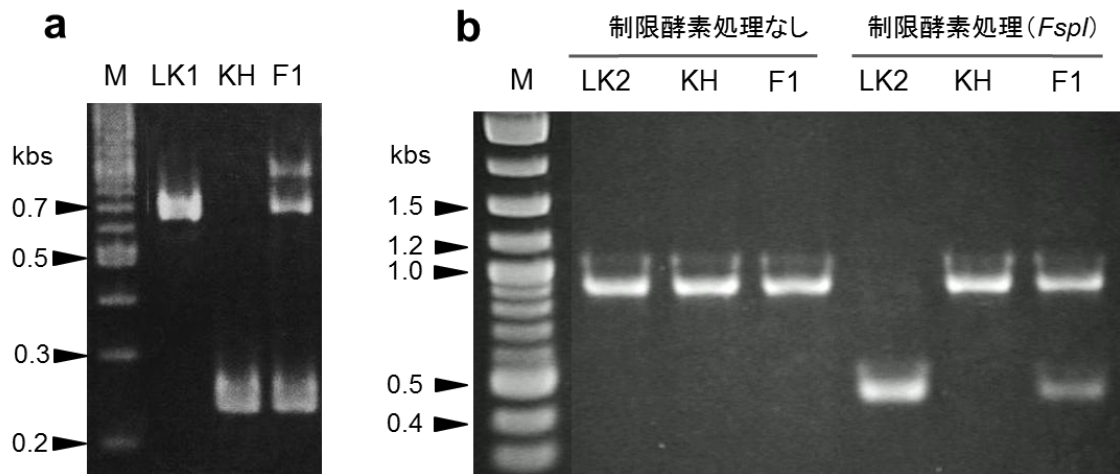


図5 コシヒカリと低カドミウム変異体を識別できる DNA マーカー

(a) M: マーカーサイズ、LK1: lcd-kmt1、KH: コシヒカリ、F1: lcd-kmt1 x コシヒカリの F1 個体

(b) M: マーカーサイズ、LK2: lcd-kmt2、KH: コシヒカリ、F1: lcd-kmt2 x コシヒカリの F1 個体、FspI: 制限酵素

lcd-kmt2 とコシヒカリを識別する際には、DNA の増幅断片を制限酵素 (FspI) で切断する必要がある。

その他の性質は A 品種と全く同じという新たな低 Cd 品種を短期間に作る事ができる。

4. 展望

低 Cd コシヒカリ変異体である lcd-kmt2 を本年 8 月に品種登録出願した。開発した DNA マーカーをし

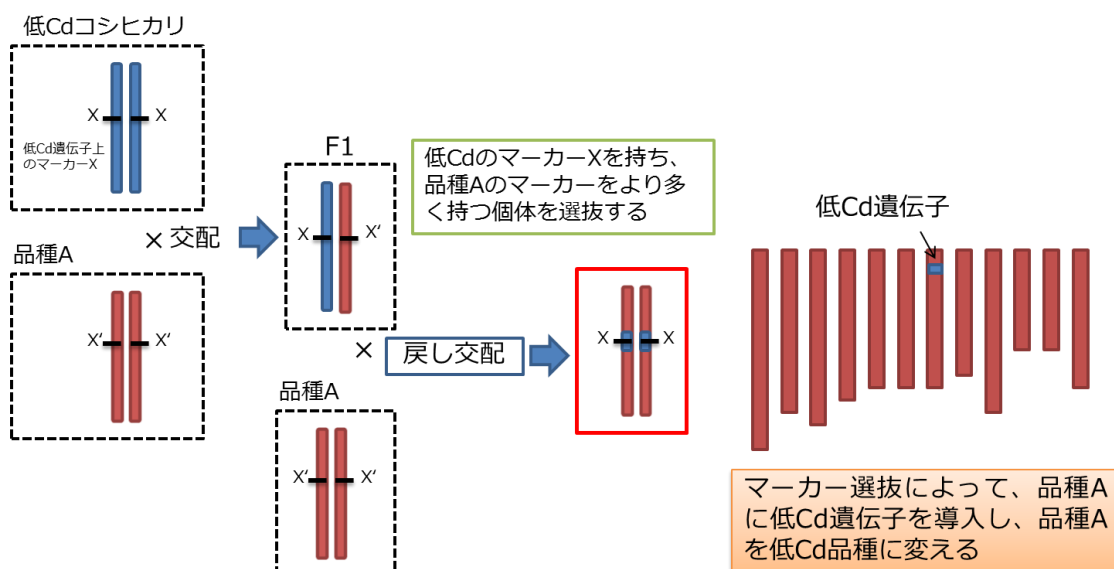


図 6 DNA マーカーを用いた他品種への低 Cd 遺伝子導入 (概略図)

て、各地域のブランド品種や有望系統に低 Cd 遺伝子を導入する計画が進行中である。長期間の湛水管理は、温室効果ガスであるメタンの発生を助長させる、コメ中のヒ素濃度を増加させる、等の新たな環境問題を引き起こす。低 Cd のコシヒカリ変異体や低 Cd 変異遺伝子を付与した新たな品種を導入すれば、安定的に Cd 吸収が抑えられるだけでなく、出穂期前後の湛水管理が不要になるので、メタン発生削減やヒ素濃度の低減にも貢献できる。低 Cd の変異遺伝子を世界中のイネ品種に導入することで、コメを主食とする人々の Cd 摂取による健康被害リスクを最小限にすることが可能になると期待できる。

5. 謝辞

本成果は生物系特定産業技術研究支援センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業「食の安全を目指した作物のカドミウム低減の分子機構解明」の予算によって得られた(平成19年度~23年度)。共同研究者をはじめ関係者に心より感謝申し上げます。

引用文献

- Makino T et al. (2007): Remediation of cadmium-contaminated paddy soils by washing with calcium chloride: Verification of on-site washing. *Environmental Pollution*. 147, 112-119
- Makino T et al. (2008): Restoration of cadmium-contaminated paddy soils by washing with ferric chloride: Cd extraction mechanism and bench-scale verification. *Chemosphere*. 70, 1035-1043
- Murakami M et al. (2009): Phytoextraction by Rice Capable of Accumulating Cd at High Levels: Reduction of Cd Content of Rice Grain. *Environmental Science & Technology*. 43, 5878-5883
- Arao T and Ae N (2003): Genotypic variations in cadmium levels of rice grain. *Soil Science and Plant Nutrition*. 49, 473-479
- Uraguchi S et al. (2009): Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major process determining shoot and grain cadmium accumulation in rice. *Journal of Experimental Botany*, 60. 2677-2688
- Tanaka A et al. (2010): Studies on Biological Effects of Ion Beams on Lethality, Molecular Nature of Mutation, Mutation Rate, and Spectrum of Mutation Phenotype for Mutation Breeding in Higher Plants. *Journal of Radiation Research*. 51, 223-233
- Ishikawa S et al. (2012): Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109, 19166-19171