

病害抵抗性に関する分子遺伝学と育種への応用

岡山大学資源生物科学研究所 本吉総男

はじめに

作物に病害抵抗性を付与することは、常に作物育種における最大級の課題である。しかし、いったん育成された優秀な抵抗性品種も、病原側にその抵抗性を克服する変異が生じると、抵抗性品種としての価値を失う。したがって、新しい抵抗性素材の探索と抵抗性育種とは、多大の努力をもって繰り返されている。新育種技術と新抵抗性遺伝子資源の開発が、病害抵抗性の育種のために望まれている。近年、植物における分子遺伝学を基礎に、各種作物におけるDNAマーカーを用いた遺伝子地図の作製が進み、また、トマト、イネなどいくつかの作物や実験植物であるシロイスナズナから病害抵抗性遺伝子が単離された。これらの研究を概説するとともに、その成果が病害抵抗性育種にどのようにかかわってくるかにつき考察する。

I 従来の育種と遺伝子操作による育種

従来の育種では、同種または交配が可能な近縁種の中の有用形質や、放射線照射などで生じた有用突然変異形質を、交雑、戻し交雑および選抜により、優良な栽培品種に導入する。一方、遺伝子操作では、有用形質を与える外来遺伝子を、アグロバクテリウムやパーティクルガンの助けを借りて、栽培品種に直接導入する。この方法は、形質転換法とも呼ばれ、あらゆる動植物や微生物の遺伝子を作物に導入し、機能させることができる。アメリカで、すでに、一部遺伝子組換え作物が商品化され、また他国への輸出が行われている現状を見ても、少なくとも一部の作物においては、遺伝子組換え体が実用における地位を確立することは間違いない。しかしながら、遺伝子操作では、作物とは無縁の異種からの遺伝子を利用するという点で、食品としての安全性や自然環境における外来遺伝子の拡散の可能性の有無を、多方面から調査しなければならない。作物と外来遺伝子の種類により、従来の育種以上に、実用に至るまで労力と時間がかかり、また多額の経費を必要とするケースも多いであ

ろう。遺伝子操作による育種が、従来の育種の地位をすべて奪ってしまうことは考えられない。

植物種はすべて、長い進化の過程を経て、それぞれの環境に適応してきた。種は、生育地域を広げ、それぞれの環境に適応すべく、遺伝的に分化し、特有の環境型を成立させ、また、長い進化の歴史の中で近縁種が分化した。しかし、これらの環境型や近縁種は、遺伝子に種々の変異が生じているとしても、基本的には共通の遺伝的構成を持ち、その中で遺伝子相互のバランスを保っている。したがって、一つの環境型や近縁種の遺伝子は、他の系統や近縁種に移されても、多くの場合、遺伝子相互のバランスを乱すことなく機能する。交雑による育種は、自然に則した方法である。近年、育種の補助手段として、DNAマーカーの利用が注目されるようになった。この新しい分子技術は、育種の効率を上げ、また劣悪な形質を取り除き、優良な品種の育成に役立つと考えられる。

II DNAマーカーと遺伝子地図

従来は、形態、色など可視的な遺伝形質がマーカーとして使われ、一步進んで、アイソザイムのゲル電気泳動による移動度がマーカーとして使われ、これらのマーカーにより、病害抵抗性遺伝子など、種々の有用遺伝子座の地図上の位置が決められてきた。しかし、これらのマーカーのみでは、密度の高い地図を作ることは不可能であった。また、マーカーによっては、その表現型が現れるまで時間がかかり、さらに、通常、優性・劣性の関係があるので、精密な交叉価を得るには、多数のサンプルを分析せねばならなかった。DNAマーカーの利用は、これらの問題を一挙に解決した。

DNAマーカーは、交雫に使われる両親の相同染色体DNA上の相同領域間の塩基配列の違いに基づくマーカーである。DNAマーカーには、制限酵素処理により相同領域から切り出される断片の長さの違いをマーカーとするもの（restriction fragment length polymorphism；RFLP、制限断片長多型）や、polymerase chain reaction（PCR、ポリメラーゼ連鎖反応）を使って相同領域から増幅する断片の有無または長さをマーカーとするもの（random amplified polymorphic DNA；RAPD任意増幅多型DNA）があり、その他数種のDNAマーカー

Molecular Genetics on Disease Resistance for Plant Breeding. By Fusao MOTOYOSHI

（キーワード：病害抵抗性育種、RFLP、RAPD、形質転換、クローニング）

一がある(倉田, 1993)。現在は、トマト、ジャガイモ(TANKSLEY et al., 1992), イネ(KURATA et al., 1994)をはじめ、多くの作物でDNAマーカーによる詳細な遺伝子地図が作製され、これらのマーカーを用いて、病害抵抗性遺伝子や各種の有用な遺伝子の地図上の位置を精密に定めることができた。なお、病害抵抗性に関しては、強い病害抵抗性を支配する遺伝子のみについて、地図上の位置が決められてきたが、量的形質遺伝子座(quantitative trait loci)をDNAマーカーによって標識する方法が開発され、量的形質として識別される弱い抵抗性遺伝子の位置も決定することが可能になった。DNAマーカーによる遺伝子地図の作製法については、他の総説を参考されたい(原田, 1990; 鶴飼, 1993)。現在は、MapMakerをはじめ、種々の遺伝子地図作製のためのソフトウェアが入手できる。

特定の遺伝子、例えば、ある病害抵抗性遺伝子近くに連鎖するマーカーを選ぶには、分子マーカーを遺伝子地図から選んで、その遺伝子との連鎖を調べる。しかし、準アイソジニック系統(遺伝的背景が大体同じで、特定の遺伝子とその周辺領域が異なる複数系統)のセットを用いると、目標とする遺伝子に近接するマーカーを比較的容易に検出することができる。筆者らは、トマトの準アイソジニック系統を用いて、トマトモザイクウイルス抵抗性遺伝子 $Tm-1$ および $Tm-2$ に近接するRAPDマーカーを選び出し、より精度の高いsequence characterized amplified region(SCAR配列特定增幅領域)マーカーに変換した(OHMORI et al., 1996; MOTOYOSHI et al., 1996)。

III DNAマーカーの育種における利用

DNAマーカーを使うと、次のようなことができる。

(1) 前述のように、有用遺伝子座をマークし、選抜のためのマーカーとして使う。その実例は、矢野(1996)を参考されたい。すでに、多くの主要作物で各種の病害抵抗性遺伝子に連鎖する分子マーカーが同定されている。

(2) 既存の品種や系統における特定の遺伝子の有無を調べるマーカーとなる。

(3) 導入遺伝子に付随する野生種からの有害な領域を取り除くためのマーカーとして使用できる。野生種から栽培種に導入された遺伝子の両側には、野生種由来のDNA領域が付随している。これらの領域が大きいほど、野生種から多くの遺伝子が持ち込まれている。遺伝子の周辺の分子マーカーを用いて、野生種由来の領域が栽培種本来の領域と組み換えられた個体を選抜すること

ができる。

(4) 共通のDNAマーカーを使った異種間の比較遺伝子地図を利用し、近縁植物中の有用遺伝子座を推定することができる。異なる近縁種は、一つの祖先種からそれぞれに進化して成立したものであり、それぞれの遺伝子が座乗する染色体領域は、共通の祖先種の染色体に由来するものである。したがって、祖先種に存在した染色体の大部分の領域は、それぞれの近縁種の染色体の構造の中に保存されている。例えば、トマトもジャガイモ(2倍種)も12対の染色体を持つ。RFLPマーカーによって調べてみると、トマトの第1染色体から第12染色体までのそれぞれの染色体は、ジャガイモの第1染色体から第12染色体までのそれと同一マーカーで標識され、ほぼ完全な同祖性が認められる(TANKSLEY et al., 1992)。のことから、トマトとジャガイモは、かなり近縁であることがわかる。したがって、比較遺伝子地図を使って、トマトに存在する種々の有用遺伝子、例えば病害抵抗性遺伝子と同等の配列を持つ遺伝子(ホモログ)のジャガイモにおける染色体上の位置を推定することができる(LEISTER et al., 1996)。また、イネ、ムギ類、サトウキビ、ソルガム、トウモロコシなどイネ科植物の間には、互いの染色体上のいろいろなブロックの中に同祖性を認めることがある(DEVOS and GALE, 1997)。染色体の部分的な同祖性は、実験植物であるシロイスナズナとブラシカとの間でも見られる(KOWALSKI et al., 1994)。

(5) 有用遺伝子のクローニングのためのマーカーとして利用する。酵母人工染色体(YAC)をベクターとして用いると、数百メガ塩基対の長いDNA断片をクローニングすることができる。このゲノムDNAライブラリーから、目標とする有用遺伝子を含むと考えられるクローンを、DNAマーカーをプローブとして選び出す。選び出されたYACクローンは、制限酵素により短い断片とし、コスミドベクターなどでサブクローン化し、目標とする遺伝子の候補となる遺伝子を探り出す。候補遺伝子が、目標とする遺伝子であるかどうかは、候補遺伝子が目標とする遺伝子と遺伝子地図上で一致するかどうかによって調べる(TANKSLEYら, 1995)。

IV 病害抵抗性遺伝子の単離と解析

育種の対象となる病害抵抗性遺伝子の多くは、单一で強い抵抗性を発現する遺伝子である。これらの抵抗性遺伝子の発現は、病原側の非病原性遺伝子との相互作用によって生じ、遺伝子対遺伝子説(gene-for-gene concept)(FLOR, 1971)によって説明してきた。この説に

表-1 単離された病害抵抗性遺伝子

植物種	遺伝子	病 原	単離に用いた手段	遺伝子のクラス ^{a)}	引 用
トマト	<i>Pto</i>	斑葉細菌病菌	遺伝子地図	III	MARTIN et al., 1993
	<i>prf</i>	斑葉細菌病菌	遺伝子地図	I	SALMERON et al., 1996
	<i>Cf2</i>	葉かび病菌	遺伝子地図	II	DIXON et al., 1996
	<i>I2</i>	萎ちょう病菌	遺伝子地図	I	ORI et al., 1997
	<i>Cf9</i>	葉かび病菌	トランスポゾン	II	JOHNS et al., 1994
タバコ	<i>N</i>	タバコモザイクウイルス	トランスポゾン	I	WHITHAM et al., 1994
シロイヌナズナ	<i>RPS2</i>	シュードモナス	遺伝子地図	I	MINDRINOS et al., 1994
	<i>RPM1</i>	シュードモナス	遺伝子地図	I	GRANT et al., 1995
	<i>RPP5</i>	ベと病菌	遺伝子地図	I	PARKER et al., 1997
テンサイ	<i>Hs1^{pro-1}</i>	シストセンチュウ	遺伝子地図	I	CAI et al., 1997
アマ	<i>L6</i>	さび病菌	トランスポゾン	I	LAWRENCE et al., 1995
	<i>RPP5</i>	さび病菌	トランスポゾン	I	ANDERSON et al., 1997
イネ	<i>Xa21</i>	白葉枯病菌	遺伝子地図	III	SONGET et al., 1995
コムギ	<i>Lr10</i>	さび病菌	ホモロジー	III	FEUILLET et al., 1997

^{a)}: I, 推定タンパク質は LRR と NBS を有する; II, LRR と膜結合部位を有する; III キナーゼ様領域を有する。膜結合部位と LRR を持たないもの (*Pto*), 膜結合部位と LRR を持つもの (*Xa21*) および膜結合部位を持ち, LRR を持たないもの (*Lr10*) がある。

よれば、抵抗性遺伝子 *R* は優性であり、*R* を有する宿主は、優性の非病原性遺伝子 *A* を持つ病原に対し抵抗性を示すが、*A* を持たず、その劣性対立遺伝子（病原性遺伝子）*a* を持つ病原に対しては感受性である。一方、*R* を持たず、その劣性対立遺伝子（感受性遺伝子）*r* を持つ宿主は、病原が *A* を持っていても、持っていないでも感受性である。その機構としては、*A* 遺伝子の産物がリガンドを、*R* 遺伝子の産物がそのリガンドに対するレセプターを持ち、リガンドとレセプターが結合することによって、抵抗性が誘導されると説明してきた。この説は、補足が必要であるとしても、基本的に正しいことがだいに明らかになった。

近年の分子技術の進歩は、抵抗性遺伝子の単離を可能にした。遺伝子の単離は、主として上述の遺伝子地図に基づくクローニング法、またはトランスポゾンタギング (transposon-tagging) 法によっている。トランスポゾンタギングには、通常、トウモロコシ由来のトランスポゾン *Ac* または *Ds* を使う。*Ac* は自立的な転移性因子であるが、*Ds* は自立的ではなく、*Ac* の共存により、転移が可能な因子である。これらのトランスポゾンは、アグロバクテリウムなどをを利用して他種の植物の DNA に導入すれば、トウモロコシにおけると同様、ゲノム DNA の中の一箇所から他の箇所に転移する。したがって、これらトランスポゾンを導入したある病害抵抗性植物において、抵抗性が感受性に変異すれば、抵抗性遺伝子にトランスポゾンが挿入された可能性がある。実際に抵抗性遺伝子にトランスポゾンが挿入されていることを

確かめた後、その個体の DNA から、目標とする遺伝子をトランスポゾンが挿入したままクローニングする。次に、クローニングされた遺伝子の一部をプローブとして、もとの抵抗性植物から、無傷の抵抗性遺伝子をクローニングする。これらの方法のほか、すでに単離された抵抗性遺伝子の塩基配列を手がかりに、同類の遺伝子を異種植物から単離することができる。これらの方法で、現在までに十数種の抵抗性遺伝子が単離されている。それらを表-1 の中にリストする。

単離された抵抗性遺伝子は、それらの暗号から推定されるタンパク質のアミノ酸配列に基づいて、いくつかのクラスに分けられる。片桐（1997）は、それらを五つのクラスに分けているが、ここでは、便宜上次の三つのクラスに分けておく（OHMORI et al., 1998）。

(1) ロイシンリッチ反復配列 (leucine-rich repeats; LRR) とヌクレオチド結合部位 (nucleotide-binding site; NBS) を有するタンパク質の遺伝子。

(2) LRR と原形質膜結合部位と推定される部分を有するタンパク質の遺伝子。

(3) タンパク質キナーゼ (protein kinase) 様タンパク質の遺伝子。

単離されたそれぞれの遺伝子がどのクラスに属するかは、表-1 に示されている。これらの遺伝子の産物は、病原側の特定の遺伝子産物を直接または間接的に認識し、抵抗性誘導を起こさせるべく、病原の接触を知らせるシグナルを核へ伝達するための一役を担うと考えられる。これらの遺伝子の抵抗性誘導機構との関係について

は、BOYES et al. (1996) や片桐 (1997) の総説があるが、この関係をより正確に理解するためには、今後の研究の進展を待たねばならない。

単離されたそれぞれの抵抗性遺伝子は、いずれも、ゲノムの中でスーパーファミリーを形成している遺伝子の一つである。筆者らは、それぞれのクラスに保存されている塩基配列を基に、トマトのゲノムDNAから増幅させたPCR産物が、既報の抵抗性遺伝子と類似の配列を持つこと、またそれらのクローニングをプローブとして、ゲノムDNAのサザンハイブリダイゼーションを行うことにより、多数の類似の配列がトマトのゲノム中に存在することを示した (OHMORI et al., 1998)。一つの植物種が、非常に多数の抵抗性遺伝子様配列をゲノムの中に蓄積していることは、その植物種が、多種の病原に対抗するための防御手段なのかもしれない。

おわりに

今後の病害抵抗性育種では、DNAマーカーと高密度の遺伝子地図の利用によって、育種の簡便化が進むことが期待される。また、QTLの遺伝解析法が確立したので、強い抵抗性遺伝子が存在しない場合にも、弱い抵抗性を標識するDNAマーカーにより、育種の効率化が図られるであろう。

従来の育種法に加えて、遺伝子組換えを利用した育種法も実用されるようになるであろう。すでに、研究のレベルでは、キチナーゼ遺伝子やウイルスゲノムの配列を導入し、作物に病原糸状菌やウイルスに対する抵抗性を与える実例が多数示されている (西口, 1994)。これらの遺伝子に加えて、これからは、植物自体が有する抵抗性遺伝子を外来遺伝子として利用するケースが増えてくるものと予想される。すでに、WITHAM et al. (1996) は、かれらがタバコから単離したN遺伝子が、トマトの中でもその機能を発揮することを報告している。

最後に一つ付け加えると、実験植物であるシロイスナズナでのゲノムおよび遺伝子研究の急激な進歩が特に注目される。病害抵抗性遺伝子の研究は、この植物では、

最も遅れて始まったにもかかわらず、いまでは最先端のレベルにある。シロイスナズナの分子遺伝学研究からの情報と遺伝子資源とは、作物育種においても、利用価値がきわめて高いと考える。

引用文献

- 1) ANDERSON, P. A. et al. (1997) : *Plant Cell* 9 : 641~651.
- 2) BOYES, D. C. et al. (1996) : *Curr. Biol.* 6 : 634~637.
- 3) CAI, D. et al. (1997) : *Science* 275 : 832~834.
- 4) DEVOS, K. M. and M. D. GALE (1997) : *Plant Mol. Biol.* 35 : 3~15.
- 5) DIXON, M. S. et al. (1996) : *Cell* 84 : 451~459.
- 6) FEUILLET, C. et al. (1997) : *Plant J.* 11 : 45~52.
- 7) FLOR, H. H. (1971) : *Ann. Rev. Phytopath.* 9 : 275~296.
- 8) 原田久也 (1990) : 育種学最近の進歩 第31集, 養賢堂, pp. 90~106.
- 9) GRANT, M. R. et al. (1995) : *Science* 269 : 843~846.
- 10) JONES, D. A. et al. (1994) : *ibid.* 266 : 789~793.
- 11) 片桐文章 (1997) : 細胞工学別冊, 植物細胞工学シリーズ8, 秀潤社, pp. 90~99.
- 12) KOWALSKI, S. P. et al. (1994) : *Genetics* 138 : 499~510.
- 13) 倉田のり (1993) : 育種学最近の進歩 第34集, 養賢堂, pp. 46~51.
- 14) KURATA, N. et al. (1994) : *Nature Genet.* 8 : 365~372.
- 15) LEISTER, D. et al. (1996) : *ibid.* 14 : 421~429.
- 16) LAWRENCE, G. J. et al. (1995) : *Plant Cell* 7 : 1195~1206.
- 17) MARTIN, G. B. et al. (1993) : *Science* 262 : 1432~1436.
- 18) MINDRINOS, M. (1994) : *Cell* 78 : 1089~1099.
- 19) MOTYOSHI, F. et al. (1996) : *Symp. Soc. Exp. Biol.* 50 : 65~70.
- 20) 西口正通 (1994) : 研究ジャーナル 17(1) : 11~15.
- 21) OHMORI, T. et al. (1996) : *Theor. Appl. Genet.* 92 : 151~156.
- 22) ——— et al. (1998) : *ibid.* (in press).
- 23) ORI, N. et al. (1997) : *Plant Cell* 9 : 521~532.
- 24) PARKER, J. E. et al. (1997) : *ibid.* 9 : 879~894.
- 25) SALMERON, J. M. et al. (1996) : *Cell* 86 : 123~133.
- 26) SONG, W.-Y. et al. (1995) : *Science* 270 : 1804~1806.
- 27) TANKSLEY, S. D. et al. (1992) : *Genetics* 132 : 1141~1160.
- 28) TANKSLEY, S. D. et al. (1995) : *Trends Genet.* 11 : 63~68.
- 29) 鵜飼保雄 (1993) : 育種学最近の進歩 第34集, 養賢堂, pp. 37~45.
- 30) WITHAM, S. et al. (1994) : *Cell* 78 : 1101~1115.
- 31) ——— et al. (1996) : *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 93 : 8776~8781.
- 32) 矢野昌裕 (1996) : 農業技術 51 : 385~389.