

イネいもち病真性抵抗性遺伝子型を効率的に識別する DNA マーカーセット

中央農業総合研究センター北陸研究センター ^{はやし}林 ^{けい}敬 ^こ子

はじめに

DNA マーカーを用いた形質の選抜 (marker-assisted selection, MAS) は、新しい育種手法として期待されている。近年、イネを中心に植物のゲノム塩基配列の解読が進められているのに伴い、塩基配列情報に基づき、ターゲットとなる染色体領域に DNA マーカーを設計することが可能になりつつある。日本においてイネの最重要病害といわれるいもち病についても早期から研究の対象となっており、DNA マーカーが作出され、既に品種育成などに利用されている。

本稿では、筆者らが開発したイネのいもち病真性抵抗性遺伝子をターゲットとした DNA マーカーの特徴、利用法などについて紹介する。

I アレル特異的 PCR マーカーを用いた一塩基多型検出技術の確立

病害抵抗性などをはじめとする形質の違いは遺伝子により決定されるため、形質が異なる品種、系統間においては、遺伝子領域の塩基配列 (遺伝子型) が異なっている。DNA マーカーとは、こうした品種や系統間に見られるゲノム DNA の塩基配列の違い (多型) を検出するよう設計された遺伝標識のことである。DNA マーカーは、直接遺伝子の形質を調べるわけではない。しかし、ある形質を支配する遺伝子の塩基配列、もしくは近傍の塩基配列は、その形質と一緒に後代へ遺伝するため、これを検出する DNA マーカーは遺伝子の間接的な指標となりうる。

現在普及している DNA マーカーは、対象となる材料から抽出したゲノム DNA の目的とする塩基配列を合成 DNA 断片 (プライマーなど) に認識させ、その断片を様々な方法で検出することにより遺伝子型を識別する。実際の利用場面を考えた場合、検出手順が簡便であることはもちろんのこと、可能な限り試薬・設備等を含め低コストで、DNA 作業の取り扱い経験が浅くても容易に

使用できることが望まれる。

初期に最もよく利用されていた制限酵素断片長多型 (restriction fragment length polymorphism; RFLP) は、サザンハイブリダイゼーションを用いた方法であるが、多検体を解析するには、多量かつ高品質の DNA が必要であることや、操作の煩雑性が障害となっていた。近年、PCR (polymerase chain reaction) 法を用いた RAPD マーカー (random amplified polymorphic DNA)、AFLP マーカー (amplified fragment length polymorphism)、SSR マーカー (simple sequence repeat)、CAPS マーカー (cleaved amplified polymorphic sequence) 等が開発された (MOHAN et al., 1997)。これらのマーカーは、RFLP マーカーに比べ、使用するゲノム DNA 量が少なく済み、幼苗期での検定を可能にする。しかしながら、再現性が低い場合がある (RAPD マーカー)、PCR 反応のほかに制限酵素処理を要する (AFLP マーカー、CAPS マーカー)、検出に高価なアガロースゲルを要する (SSR マーカー) 等の欠点がある。

近年、多数の生物種においてゲノム全塩基配列が決定され、一塩基の違い (一塩基多型; SNP) と挿入・欠失 (InDel) が、植物を含む多くの生物種においてゲノム上に最も高頻度に存在する多型であることが明らかとなった (GARG et al., 1999; DRENKARD et al., 2000; BATLEY et al., 2003)。イネでは、ジャポニカイネとインディカイネのゲノム DNA 間に、平均して 170 塩基ごとに 1 個の SNP が、また、540 塩基ごとに 1 個の InDel が存在する (Yu et al., 2002)。NASU et al. (2002) も、同様の頻度で SNP が存在することを確認している。このように高頻度に出現する SNP を検出できれば、ターゲットとなる染色体領域に効率よく DNA マーカーを構築できる。

現在、医学的利用を目的とし、多数のサンプルの遺伝子型を迅速に判定できる SNP マーカーが開発されているものの、検出に高価な試薬、機器類を必要とする方法が多い。その中で、アレル特異的 PCR マーカーは、最低限の DNA 実験機器で SNP を検出できる方法として考案された (図-1; NEWTON et al., 1989)。ゲノム DNA は、アデニン (A)、チミン (T)、シトシン (C)、グアニン (G) がそれぞれに結合した 4 種類のデオキシリボヌクレオチド 3 リン酸が連結した形で構成されている。

Development of DNA Marker Sets for Nine Rice Blast Resistance Genes. By Keiko HAYASHI

(キーワード: イネいもち病, 真性抵抗性遺伝子, DNA マーカー)

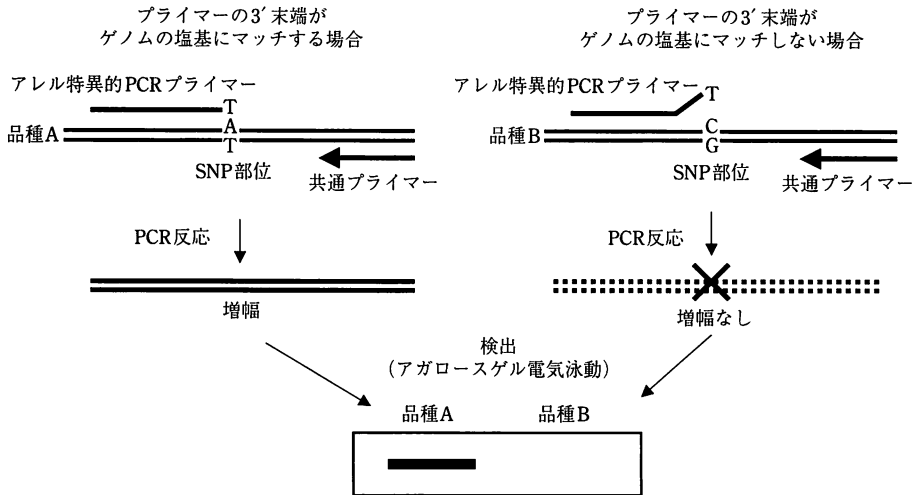


図-1 アレル特異的 PCR マーカーの検出例

アレル特異的 PCR マーカーは、ターゲットの 1 種類の塩基のみの違いを特異的に検出するように、プライマーの 3' 末端の塩基が、SNP に対応するように設計されている。このため理論的には、SNP がプライマーの 3' 末端とマッチする場合は、PCR 反応によって増幅し、マッチしない場合は増幅しないため、SNP の遺伝子型に特異的な増幅をアガロースゲル上で検出できるはずである。しかし実際には、アレル特異的プライマーの 3' 末端の塩基のみで SNP を識別させようとすると、非特異的な増幅が起きやすく、安定性に欠ける。そこで、筆者らは、アレル特異的 PCR プライマーの 3' 末端から 3 塩基目に人工的なミスマッチを導入することによって、より確実に SNP を特異的に識別できるように改良した (HAYASHI et al., 2004)。さらに、ゲノム DNA の抽出過程をより簡素化し、なおかつ、安定的に多型を検出できるよう工夫することにより、DNA マーカーの操作性をあげることができた。このことにより、多数のイネ個体における遺伝子型の検定が可能となった。

II イネいもち病真性抵抗性遺伝子検出用 DNA マーカーセットの作出

1 日本における遺伝解析の現状

日本におけるいもち病真性抵抗性遺伝子は、清沢らが中心となり構築した判別品種に集約されている (清沢, 1972; 山田ら, 1976)。これらの真性抵抗性遺伝子は、13 種類 (*Pia*, *Pii*, *Pik*, *Pik-m*, *Pik-p*, *Pik-s*, *Pik-h*, *Pita*, *Pita-2*, *Piz*, *Piz-t*, *Pib*, *Pit*) から成り、七つの遺伝子座 (*Pia*, *Pii*, *Pik*, *Pita*, *Piz*, *Pib*, *Pit*) に座乗する。*Pik* 座には、*Pik*, *Pik-m*, *Pik-p*, *Pik-s*,

Pik-h の 5 個、*Pita* 座には *Pita*, *Pita-2* の 2 個、*Piz* 座には *Piz*, *Piz-t* の 2 個の複対立遺伝子がそれぞれ見いだされている (清沢, 1974)。

これらの真性抵抗性遺伝子のうち、*Pii*, *Pia*, *Pik-s* は日本在来種の中から見いだされたが、他の真性抵抗性遺伝子は、中国型イネとインド型イネの 2 タイプの外国稲に由来する。中国型イネの主な品種としては、*Pik* の導入親である '荔支江'、'杜稻'、*Pik-m* の導入親である '北支太米'、*Pita* の導入親である 'おかいね' が知られている。一方、インド型イネの主な品種としては、*Pik-h* の導入親であるインド、ベトナム品種の 'HR-22'、'Te-tep'、*Pik-p* の導入親であるパキスタン品種の 'Pusur'、*Piz* の導入親である米国品種の 'Zenith'、*Pita-2* の導入親であるフィリピン品種の 'Taducan'、*Piz-t* の導入親であるインド品種の 'TKM.1'、'CO.25'、*Pib* と *Pit* の導入親であるインドネシア品種の 'Tjahaja' などが知られている (清沢, 1974)。日本における大多数の育成品種は、上記の品種、もしくは兄弟系統に由来する真性抵抗性遺伝子を利用している。

いもち病真性抵抗性遺伝子の遺伝解析に、DNA マーカーとその遺伝的連鎖地図が用いられ、さらにイネゲノムに関するデータベースが充実したことにより、真性抵抗性遺伝子に関わるゲノム研究は急速に進んでいる。現在までに国内外の研究室で様々な真性抵抗性遺伝子の連鎖地図が作製され、染色体上の座乗位置が明らかとなっている (MONOSI et al., 2004)。しかしながら、筆者らが 2001 年に真性抵抗性遺伝子の DNA マーカーの作出を開始した当時、日本の判別品種に用いられる真性抵抗性遺伝子の中で、遺伝子が単離されていたのは、*Pib* (WANG

et al., 1999), *Pita* (BRYAN et al., 2000) のみであり, その後, 新たに *Piz-t* (ZHOU et al., 2006) が単離されたものの, 他の遺伝子は遺伝地図と物理地図の対応も十分に把握できていない状態にあった。

2 アレル特異的 PCR マーカー

DNA マーカーの精度を考慮すれば, 真性抵抗性遺伝子の配列に対応するように DNA マーカーを設計することが望ましい。しかし, 遺伝子が単離されていないものに関しては, 可能な限り遺伝子の近傍に DNA マーカーを設定する必要がある。また, それまで報告されていたイネもち病真性抵抗性遺伝子の DNA マーカーは, 遺伝子ごとに様々な検出法を用いていたため, 育種の現場などにおいて体系的に遺伝子型を検出するには, 操作性に欠けていた。そこで, こうした問題を解決するために, 外国稲由来の *Pik*, *Pik-m*, *Pik-p*, *Pita*, *Pita-2*, *Piz*, *Piz-t*, *Pib*, *Pit* 遺伝子について, 筆者らの方法に基づき, アレル特異的 PCR マーカーを構築した。染色体上の位置が確定されていない *Pik*, *Pik-m*, *Pik-p*, *Piz*, *Piz-t*, *Pit* に関しては, 判別品種を用いた連鎖解析を最初に行い, 染色体上の位置を同定したうえで, 各遺伝子の近傍に DNA マーカーを設定した。既に遺伝子の単離, もしくは詳細な連鎖解析が行われていた *Pib*, *Pita*, *Pita-2* については, 遺伝子の配列情報を利用して DNA マーカーを構築した。表-1 に DNA マーカー作出に用いた材料を, 図-2 に作出した DNA マーカーの染色体上の位置関係を示した。

DNA マーカーは, 各遺伝子が座乗している領域とその周辺の領域にそれぞれ構築した。詳細な連鎖解析のデータについては, HAYASHI et al. (2006) を参照していただきたい。‘日本晴’のゲノムには, 真性抵抗性遺伝子の

候補と考えられている NBS-LRR (nucleotide binding site-leucine-rich repeat) ドメインをもつ遺伝子が約 500 個存在すると推定されている (MONOSI et al., 2004; ZHOU et al., 2004)。Rice genome Automated Annotation System (Rice GAAS; <http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/>) を用いて, *Piz*, *Pik*, *Pit* 遺伝子を識別するために構築した DNA マーカー周辺の ‘日本晴’ のゲノム領域を解析したところ, 3 遺伝子座すべてにおいて NBS-LRR ドメインをもつ遺伝子が検出されたため, DNA マーカーはすべて遺伝子の近傍に構築されたものと推測される。

3 マルチプレックスマーカー

構築したアレル特異的 PCR マーカーをそのまま用いて遺伝子の種類を判別しようとする, 各遺伝子について検出作業を独立に行わなければならない, 作業効率が悪い。しかし, 数種類の DNA マーカーを混合し, 一度に複数の遺伝子型を識別できるマルチプレックスマーカーとして利用すれば, 検出作業の効率を上げることができ。そこで, 各真性抵抗性遺伝子用の DNA マーカーを改良し, 検出バンドの長さの差によって, アガロースゲル上で 4 種類の遺伝子型を一度に識別できるマルチプレックスマーカーを構築した。

マルチプレックスマーカーを構築する際には, 各真性抵抗性遺伝子の座乗領域近傍において, 抵抗性品種の遺伝子型だけを特異的に識別できるように DNA マーカーを構築した。例えば, ある抵抗性遺伝子の近傍に構築した DNA マーカーがグアニンを認識する場合, その抵抗性遺伝子をもたない他の品種では, その位置の塩基は, すべてグアニン以外でなければならない。当初構築した *Piz*, *Pik*, *Pik-m*, *Pita*, *Pita-2* の 5 遺伝子の DNA マーカーは, 目的の品種以外においても非特異的なバンド

表-1 イネもち病真性抵抗性遺伝子の連鎖解析に用いた材料および個体数

真性抵抗性 遺伝子	座乗染色体	交配組み合わせ	解析個体数
<i>Pita</i>	12	ヤシロモチ (<i>Pita</i> +)/日本晴	42
<i>Pita-2</i>	12	PiNo. 4 (<i>Pita-2</i> +)/コシヒカリ	50
<i>Pib</i>	2	BL1 (<i>Pib</i> +)/コシヒカリ	42
<i>Piz</i>	6	コシヒカリ/フクニシキ (<i>Piz</i> +)	2,680
<i>Piz-t</i>	6	とりで1号 (<i>Piz-t</i> +)/コシヒカリ	2,665
<i>Pit</i>	1	コシヒカリ/K59 (<i>Pit</i> +)	2,833
<i>Pik</i>	11	関東 51 号 (<i>Pik</i> +)/OISL235	744
		関東 51 号/コシヒカリ	180
<i>Pik-m</i>	11	99-SL44/ツユアケ (<i>Pik-m</i> +)	2,118
		ツユアケ/コシヒカリ	390
<i>Pik-p</i>	11	K60 (<i>Pik-p</i> +)/コシヒカリ	309

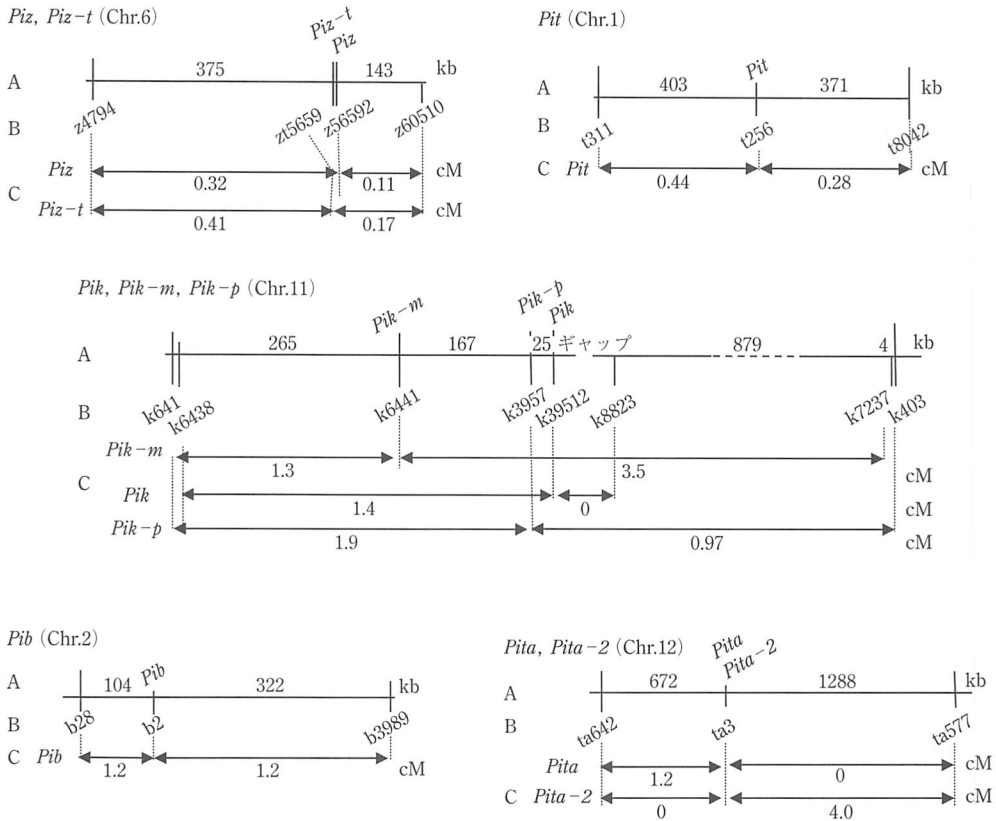


図-2 構築した DNA マーカーと遺伝子の物理位置と遺伝位置の関係

A：遺伝子と DNA マーカーの物理距離。‘日本晴’のゲノムシーケンスデータ (<http://rgp.dna.affrc.go.jp/>) を元に物理距離を算出している。B：DNA マーカー名。C：各遺伝子と DNA マーカーの遺伝距離。

の増幅が検出されてしまった。そこで、これらの 5 遺伝子について、各真性抵抗性遺伝子型に特異的に対応するような SNP を探索した。残念ながら、*Pita* と *Pita-2* 間での多型を見つけることができず、これらの 2 遺伝子を識別する DNA マーカーを構築できなかったが、他の遺伝子に関しては各遺伝子領域に特異的な SNP を見つけることができた。各 SNP を用い、新たに *Piz*, *Pik*, *Pik-m*, *Pita*, *Pita-2* に対する DNA マーカーを構築し、これらを基に、2 組の DNA マーカーセットからなるマルチプレックスマーカーを構築した。*Pita*, *Pita-2*, *Pik-m*, *Piz-t*, *Pik-p* の DNA マーカーの組み合わせをセット 1 とし、*Pit*, *Piz*, *Pib*, *Pik* の DNA マーカーの組み合わせをセット 2 とした。図-3 にマルチプレックスマーカーによる真性抵抗性遺伝子の識別例を同質遺伝子系統であるササニシキ BL の同質遺伝子系統群を用いて示した。6 種類のササニシキ BL (*Pik*, *Pik-m*, *Pita*, *Pita-2*, *Piz*, *Piz-t*) のゲノム DNA を混ぜ合わ

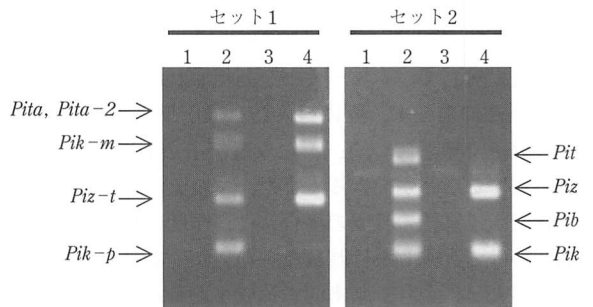


図-3 いもち病真性抵抗性同質遺伝子系統におけるマルチプレックスマーカーセットの利用例

品種・系統の DNA を鋳型とし、2 組のマーカーセットを用いて PCR を行った。1：コシヒカリ，2：9 種類の判別品種の混合，3：ササニシキ，4：6 種類のササニシキ BL 系統の混合 (*Piz*, *Piz-t*, *Pik*, *Pik-m*, *Pita*, *Pita-2*)。

せて鋳型とし、2組のDNAマーカーセットを用いてPCR反応を行ったところ、各遺伝子を識別できることが示された。

III DNAマーカーの利用法

筆者らが構築したDNAマーカーは、既に全国の多数の育種研究室で、いもち病真性抵抗性遺伝子を導入する抵抗性品種育成に利用されている。一般的に、品種育成におけるDNAマーカー選抜の利点として、①短期間に検定と選抜ができる、②遺伝子型で判別するため、優性遺伝子のヘテロ個体を判定できる、③特定検定が煩雑な形質や特定値の判定が困難な形質を判定できる、④特殊な検定施設を必要としない、等が挙げられる。

真性抵抗性遺伝子を用いた品種育成においては、従来のいもち病菌の接種による抵抗性系統の選抜の際に、いもち病菌や植物の状態、接種時期などの環境により結果が左右されやすい、検定結果を得るまでに時間がかかる、再検定を行い難い等の問題があった。特に、最近では持続的な真性抵抗性遺伝子の利用を推し進めるため、①複数の真性抵抗性遺伝子の同一品種への集積（ピラミディング）、②真性抵抗性と圃場抵抗性をあわせもつ品種の育成、③真性抵抗性遺伝子の交換栽培、④真性抵抗性品種の混合栽培・多系品種（マルチライン）の利用等が考えられている（浅賀，1987）。これらの系統育成においては、1種類の真性抵抗性遺伝子の導入を目的とした品種育成の場合よりも、さらにDNAマーカーの効果期待できる。例えば、従来のように、いもち病菌接種によって抵抗性遺伝子の有無を確認しながらピラミディングを行おうとする場合、組み合わせたい遺伝子を識別できるいもち菌の種類（レース）が存在しなければ、それらの遺伝子をあわせもつ系統を識別し、育成することはできない（HITALMANI et al., 2000）。

これに対して、本マーカーを利用すれば、遺伝子の組み合わせによらず、既に導入した遺伝子の有無をDNAマーカーで確認しつつ、新たな遺伝子をDNAマーカーで導入することができる。また、マルチラインにおける同質遺伝子系統の育成の場合には、一度に複数系統を長期間かけて育成しなければならないが、本マーカーを利用することにより、効率的に育成を進めることが可能となった。筆者らは各遺伝子の周辺領域に図-2に記載した以外にも多数のDNAマーカーを作出しているため、①目的形質の近傍に連鎖する不良形質を効率的に除去する、②目的遺伝子を含む染色体領域のできるだけ近傍が反復親に置き換わった個体を交配母本として戻し交配を繰り返すことにより、少ない戻し交配回数で同質遺伝子

系統を育成できる、という利点を生かし、系統の育成を進められる（橋本ら，2005）。また、マルチラインの栽培管理においては、外観では系統間の識別が不可能である同質遺伝子系統を適切に維持し、混合した同質遺伝子系統の種類を植物体や種子などの様々な状態で確認する必要がある。本マーカーは、各判別品種と‘コシヒカリ’、‘日本晴’の遺伝情報を用いて構築しているが、大多数の日本の栽培品種は少数の遺伝子型の組み合わせで構成されていると考えられるため（TABUCHI et al., 2007）、コシヒカリ以外の日本の品種にも十分対応できると考えている。実際、本マーカーは、新品種の母本、マルチラインの反復親としても利用されている‘ササニシキ’、‘キヌヒカリ’、‘ひとめぼれ’、‘あきたこまち’、‘ヒノヒカリ’といった多くの日本の優良品種でも使用できることを確認している。

おわりに

マルチラインに代表されるように、より体系的に真性抵抗性遺伝子を利用する方向へと品種育成や栽培技術が変貌していく中で、安定かつ効率的に品種識別を行うことができるDNAマーカーは、研究、品種育成、栽培管理等に幅広く活用されていくと思われる。その一方、新たに見いだされた真性抵抗性遺伝子についても、体系的にDNAマーカーを構築し、セット化していくことによって、積極的に抵抗性育種に利用されることを期待している。

引用文献

- 1) 浅賀 宏 (1987) : 品種の抵抗性、稲いもち病 (山口富夫, 山中 達編), 養賢堂, 東京, p. 216 ~ 249.
- 2) BATLEY, J. et al. (2003) : *Plant Physiol.* **132** : 84 ~ 91.
- 3) BRYAN, G. T. et al. (2000) : *Plant Cell* **12** : 2033 ~ 2046.
- 4) DRENKARD, E. et al. (2000) : *Plant Physiol.* **124** : 1483 ~ 1492.
- 5) GARG, K. et al. (1999) : *Genome Res.* **9** : 1087 ~ 1092.
- 6) 橋本憲明ら (2005) : *育種学研究* **7** : 143 ~ 146.
- 7) HAYASHI, K. et al. (2004) : *Theor. Appl. Genet.* **108** : 1212 ~ 1220.
- 8) ——— et al. (2006) : *ibid.* **113** : 251 ~ 260.
- 9) HITALMANI, S. et al. (2000) : *ibid.* **100** : 1121 ~ 1128.
- 10) 清沢 茂 (1972) : *育種学雑誌* **22** : 119 ~ 123.
- 11) ——— (1974) : *農業技術研究所資料 D* : 1 ~ 58.
- 12) MOHAN, M. N. et al. (1997) : *Molecular Breeding* **3** : 87 ~ 103.
- 13) MONOSI, B. et al. (2004) : *Theor. Appl. Genet.* **109** : 1434 ~ 1447.
- 14) NASU, S. et al. (2002) : *DNA Res.* **9** : 163 ~ 171.
- 15) NEWTON, C. R. et al. (1989) : *Nucleic Acids Res.* **17** : 2503 ~ 2516.
- 16) TABUCHI, H. et al. (2007) : *Breeding science* **57** : 213 ~ 221.
- 17) WANG, Z. X. et al. (1999) : *Plant J.* **19** : 55 ~ 64.
- 18) 山田 昌ら (1976) : *日本植物病理学会報* **42** : 216 ~ 219.
- 19) Yu, J. et al. (2002) : *Science* **296** : 79 ~ 92.
- 20) ZHOU, B. et al. (2006) : *Mol. Plant Microbe Interact.* **19** : 1216 ~ 1228.
- 21) Zhou, T. et al. (2004) : *Mol. Genet. Genomics* **271** : 402 ~ 415.