

イネいもち病抵抗性育種とファンクショナルマーカー

—いもち病抵抗性遺伝子 *Pit* を例に—

農研機構 中央農業総合研究センター 病害虫研究領域 ^{はやし}林 ^{けい}敬 ^こ子

はじめに

作物の品種育成において DNA マーカーは重要な役割を果たしている。従来の品種育成では親品種を交配して有用な形質を持つ交配後代を目視などで選抜することにより新しい品種や系統が育成される。その一方、目覚ましいゲノム研究の進展に伴い、病害抵抗性などの有用な農業形質が品種に確実に導入されているかを DNA レベルで確認できる DNA マーカーの開発が進められた。現在では、交配後代系統に目的（ターゲット）とする形質が遺伝しているかを確認するために複数の DNA マーカーが利用されている。

I ファンクショナルマーカーとは

DNA マーカーは、品種育成時の系統選抜（DNA マーカー育種）に利用されることから、親品種の目的の形質が確実に交配後代系統に遺伝しているかを確認できればよいように設計される（図-1）。一般的には、ターゲットとしたい形質を持つ親品種（もしくは系統）とその形質を持たない品種の DNA 配列を比較し、ターゲットとなる形質を支配する遺伝子、もしくは、遺伝子近傍の領域の DNA 配列に違い（多型）がある箇所に DNA マーカーを設定する。この方法で作出された DNA マーカーは、目的の形質を支配する遺伝子の位置情報を示すだけで、遺伝子の特性を示さない場合が多い。そのため、DNA マーカーを品種育成に利用するためには、目的形質の導入親として、DNA マーカー作成に利用した親品種、もしくは、確実に親品種と同じ形質であることが確認された品種や系統を用いる必要がある。また、形質が導入される側の品種や系統においても、DNA マーカー作成に利用された品種や系統と異なる場合には、その DNA マーカーが交配後代の選抜に利用できるかを事前に確認するなど、注意して選抜作業を行う必要がある。

事前に DNA マーカーの特性を十分に把握したうえで、注意して利用すれば、現行の DNA マーカーでも有効に品種育成に利用できる。しかしその一方、このような方

法で作成された DNA マーカーは、本来の DNA マーカーの特性である「遺伝子診断」の側面を十分に活かしているとは言い難い。仮に DNA マーカーがターゲットとなる形質の特性を確実に反映できるように設計されていれば、例えば、交配に利用する品種や系統の特性を予測したり、目的の形質を持つ品種や系統を探し出したりする等、従来の DNA マーカーで行えなかったような検定が可能となり、DNA マーカーの活用範囲が大幅に広がる。このような「遺伝子診断」の観点を視野に入れて構築された DNA マーカーは、しばしばファンクショナルマーカーと呼ばれる（図-2）。ファンクショナルマーカーは、草型、出穂期のように目視で確認し難い形質、例えば病害抵抗性遺伝子などの検出に対しては極めて有効に働くと考えられる。しかしながら、病害抵抗性品種育成用の DNA マーカーとしては、単純に遺伝子付近に存在する多型を検出するだけの従来型の DNA マーカーが大多数を占めており、遺伝子診断を意識したファンクショナルマーカーの構築例は非常に少ない。

そこで、本研究においては、稲の主要病害であるイネいもち病の抵抗性遺伝子の一つである *Pit* 遺伝子をモデルに、イネの品種や系統に関係なく、*Pit* 遺伝子を保有するか否かを判別できるファンクショナルマーカーの構築を試みた。

II イネいもち病抵抗性遺伝子 *Pit* のファンクショナルマーカー

イネにおいて病害抵抗性遺伝子をターゲットとしたファンクショナルマーカーの構築は困難である。その理由として、抵抗性遺伝子として機能する可能性のある遺伝子がイネには数多く存在し、それらの遺伝子構造は互いに似ているだけでなく、抵抗性機能を持たない品種にも抵抗性機能がある遺伝子と似た配列が存在することなどがあげられる。特に、病害抵抗性遺伝子の主要な構造の一つである NBS-LRR 構造の遺伝子は、イネのゲノム上に 400 以上存在すると報告されている（Zhou et al., 2004）。さらに、複数の遺伝子は、互いが隣接して存在するクラスター構造をとっている。クラスター領域内にある遺伝子同士は配列に違いが少なく、安定的に検出できる DNA マーカーを設定すること自体が困難であるな

Functional Markers for Detection of the Blast Resistance Gene *Pit*
in Rice Cultivars. By Keiko HAYASHI

（キーワード：イネいもち病、抵抗性育種、DNA マーカー）

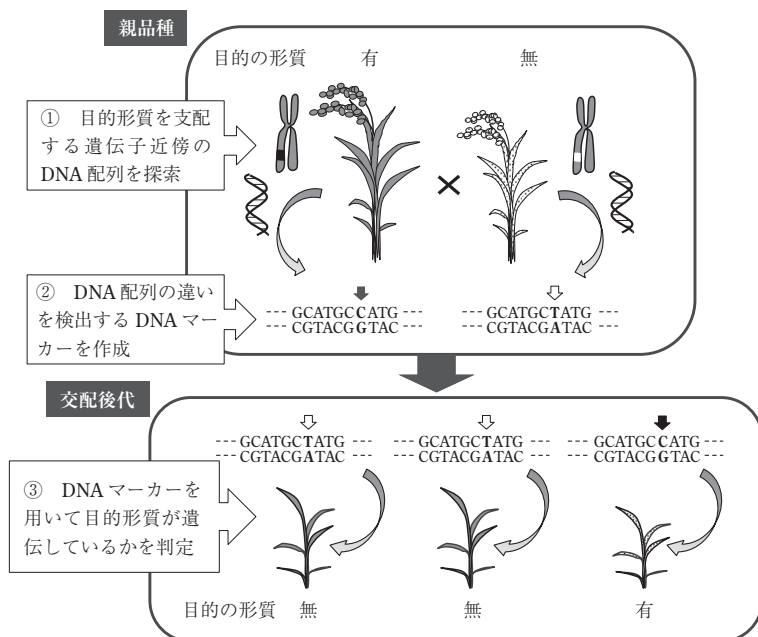


図-1 DNAマーカーを用いた交配後代系統の形質判定 (DNAマーカー育種)

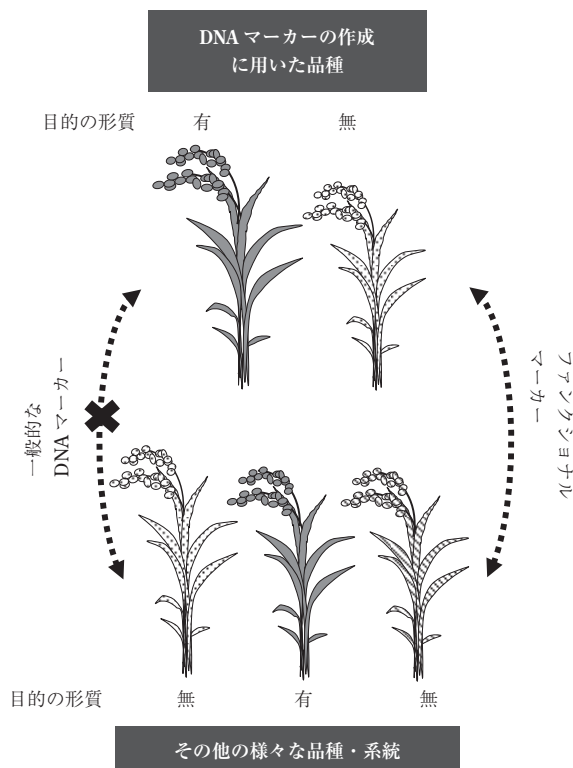


図-2 一般的なDNAマーカーとファンクショナルマーカーの違い

ど、ファンクショナルマーカーを構築するには多くの課題が存在する。

イネいもち病抵抗性遺伝子 *Pit* のファンクショナルマーカーの構築にあたり、遺伝子単離、遺伝子周辺のDNA配列比較、遺伝子の機能解析によるDNAマーカーのターゲットとなる配列の絞り込み、品種を使った検証と、四段階に分けて実験を行った (HAYASHI and YOSHIDA, 2009; HAYASHI et al. 2010) (図-3)。最初に、*Pit* 遺伝子保有品種 'K59' と *Pit* 遺伝子由来の抵抗性を持たない感受性品種 'コシヒカリ' との交配後代を用いたマップベースクローニング法により、*Pit* 遺伝子の位置を特定した。その後、予想される *Pit* 遺伝子領域を感受性品種に導入して、抵抗性が付与されるかを解析する相補性検定を行い、特定した領域から見いだされた遺伝子配列が *Pit* の機能を示すことを確認した。*Pit* 遺伝子は様々なイネの病害抵抗性遺伝子として知られている NBS-LRR 構造の遺伝子であった。次に、*Pit* 遺伝子の周辺の配列を解析した。その結果、*Pit* 遺伝子は小さなクラスターを形成しており、*Pit* 遺伝子と似た NBS-LRR 構造の配列が存在していた。また、感受性品種である 'コシヒカリ' や '日本晴' 等の品種にも 'K59' と同じ位置に NBS-LRR 構造の配列が存在することが明らかとなった。

遺伝子が発現するには、タンパク質に翻訳される領域である「翻訳領域」と、タンパク質に翻訳されないが転

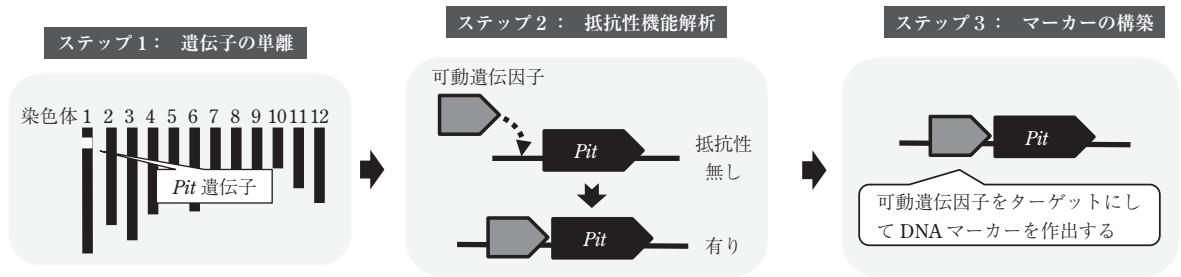


図-3 ファンクショナルマーカーの構築方法

写・翻訳等のタンパク質の発現制御に関係する「5' 非翻訳領域」と「3' 非翻訳領域」と呼ばれる三つの DNA 領域が必要である。最初に、*Pit* 遺伝子の「翻訳領域」の配列の違いを利用して DNA マーカーを作成できないか検討した。*Pit* クラスターにあるもう一つの NBS-LRR 遺伝子は、比較的 DNA 配列が異なっており、*Pit* と確実に識別できる可能性が高い。その一方、感受性品種の NBS-LRR 構造の配列とは非常に配列が似ているうえ、DNA 配列が異なる多型位置が感受性品種によって異なっており、どの配列の違いが *Pit* の抵抗性機能に関係しているかを特定できなかった。そのため、単純に *Pit* 遺伝子領域に DNA マーカーを構築しただけでは、*Pit* 抵抗性を持たない品種と識別できなかった。そこで次に、*Pit* 遺伝子の上流・下流に存在する遺伝子の発現調節領域（「5' 非翻訳領域」、「3' 非翻訳領域」）について、*Pit* 遺伝子を保有する抵抗性品種「K59」と *Pit* 活性を持たない感受性品種「日本晴」の DNA 配列を比較した。その結果、「K59」の *Pit* 遺伝子の上流配列のみにレトロトランスポゾンと呼ばれる可動遺伝因子が挿入されていることが明らかとなった。挿入位置が *Pit* の発現制御に関係しそうな「5' 非翻訳領域」であり、可動遺伝因子の存在が *Pit* の抵抗性機能に影響を与える可能性が高いことから、組換え体などを用いた抵抗性機能解析を行った。その結果、*Pit* 遺伝子の上流領域に挿入された可動遺伝因子は *Pit* 遺伝子の転写量の上昇を介して発現量を増加させ、抵抗性を付与すること、また感受性品種の「日本晴」の *Pit* 遺伝子位置に対応する NBS-LRR 構造の配列でも転写量を上げれば、抵抗性が付与されることを明らかにした。これらの結果より、*Pit* 遺伝子の場合、抵抗性遺伝子の蛋白翻訳領域の DNA 配列の違いより、*Pit* 遺伝子の上流領域の違いが抵抗性に重要な役割を果たすことが明らかとなった。この抵抗性機能解析の結果より、*Pit* 遺伝子の上流領域に挿入された可動遺伝因子が DNA マーカーのターゲットとして利用できる可能性が示された。

最後に、世界中から集められたインド型、日本型を含

むイネ品種で構成されている「世界のイネコアコレクション（農業生物資源研究所より分譲）」を用い、*Pit* 遺伝子の近傍に挿入された可動遺伝因子領域の有無を識別する DNA マーカーが、ファンクショナルマーカーとして *Pit* 遺伝子の同定に利用可能かを検証した。「世界のイネコアコレクション」の 68 品種に対して解析を行った結果、「Asu」（ブータン）、「Deng Pao Zhai」（中国）、「Neang Menh」（カンボジア）、「Neang Phtong」（カンボジア）、「Padi Kuning」（インドネシア）の 5 品種に可動遺伝因子の挿入が認められた。これら 5 品種の *Pit* 遺伝子周辺の配列は、*Pit* の保有品種である「K59」の *Pit* 遺伝子の配列と完全に一致し、抵抗性機能の主要因である転写量も「K59」の *Pit* 遺伝子と同程度であった。さらに、いもち病菌に対する各品種の反応パターンも「K59」と同一であることから、5 品種は「K59」型の *Pit* を保有すると考えられた。「K59」の *Pit* 遺伝子は、インドネシア品種である「Tjahaja」由来であると考えられている。「世界のイネコアコレクション」は、日本、アフリカ、米国、オーストラリア、アジア等の国から集められた遺伝資源により構成されているが、5 品種はすべて東南アジアの品種群である。これらの結果は *Pit* がインドネシアの品種に由来することと矛盾しておらず、*Pit* がこれらの東南アジアに広く分布する抵抗性遺伝子であることもわかった。

この一連の実験により、*Pit* の抵抗性機能を決定する要因の「5' 非翻訳領域」の配列の違いを利用した DNA マーカーが、ファンクショナルマーカーとして利用できる、日本型、インド型を含む国内外のイネ品種から確実に *Pit* 保有品種を特定できることを示した。

III いもち病抵抗性育種とファンクショナルマーカー

今回の *Pit* 遺伝子の DNA マーカー構築にかかわる一連の実験により、遺伝子単離、遺伝子領域周辺の配列比較、遺伝子の機能解析によるターゲット領域の絞り込みとステップを踏むことで、ファンクショナルマーカーを構築できる可能性を示した。

イネ品種は、抵抗性遺伝子を複数種類保有する場合が多いことが知られている (山崎・高坂, 1980; YASUDA et al., 2008; SHARMA et al., 2012)。そのため品種が保有する抵抗性遺伝子を同定するには、複数の種類の菌を組合せる必要がある。*Pit* 遺伝子を例にとると、'K59' には、*Pit* 遺伝子以外にも抵抗性遺伝子があることが確認されており、その一つが八反と呼ばれる遺伝子である。*Pit* 遺伝子は比較的大きな「ひがさ病斑」を形成する遺伝子である一方、八反は「無病徴病斑」である。この 2 遺伝子を保有する 'K59' に対して病斑の形状で判断する接種検定法を行った場合、接種に選んだ菌の種類により、八反由来の病斑のみが観察され、*Pit* 遺伝子を保有しているのか判断できない場合がある。このような関係は、*Pit* 遺伝子のみならず、多くの抵抗性遺伝子においても同様の可能性が高い。つまり、一見抵抗性の遺伝子などの特性がわかっていると考えられている既存の多くの品種にも、適当な菌が見つからない限り見いだすことができない多数の抵抗性遺伝子が眠っている可能性がある。このようないもち病菌を用いた検定の複雑性を踏まえ、従来の品種育成用 DNA マーカーより多数の要素を考えてマーカーを作出する必要があるとはいえ、ファンクショナルマーカーをいったん構築すれば、いもち病菌を用いた検定だけでは抵抗性遺伝子の存在が確認できなかった品種においても、抵抗性遺伝子を見いだすことができる可能性があるなど、非常に有用な手法であるといえる。

近年では、国内消費用の米飯用の品種ばかりでなく、加工用、飼料用やバイオエタノール用等、イネの用途が広がり、親品種として使うイネ品種のバリエーションも広がってきた。一方、国際的に植物遺伝資源に対する保護意識は高まっており、国外の遺伝資源をもちいた品種育成は困難になりつつある。このような状況を踏まえ、米飯用の日本型の品種のみならず、利用可能なインド型の品種などから、従来のいもち病菌をもちいた検定では見いだせなかった抵抗性遺伝子をファンクショナルマーカーで同定し、活用することも視野に入れていく必要が

ある。

イネのいもち病抵抗性品種育成は非常に重要であることから、国内外の研究室で積極的に遺伝子同定や遺伝子単離が進められており、SHARMA et al. (2012) のレビューによれば、100 程度の遺伝子が単離、もしくは同定されている。イネに関しては他の作物に比べ研究にかかわる情報が充実している。次世代シーケンスのようなイネの全 DNA 配列を確定する技術も普及してきており、ファンクショナルマーカーの構築に必要な DNA 配列の比較が可能になりつつある。さらに、機能解析の実験に必要な組換え体の作出方法が確立している点など、他の作物に比べ容易に構築できる環境にある。今後、海外で既に同定された遺伝子に対してもファンクショナルマーカーを構築できれば、仮に目的の病害抵抗性遺伝子を保有する品種が手に入らなくても、他の品種から遺伝子を見つけて出して品種育成に利用することが可能になるかもしれない。

お わ り に

今回は、抵抗性遺伝子、主にいもち病の抵抗性遺伝子について話を進めたが、様々な農業形質に関与する遺伝子の単離、機能解析が行われ、多数の有用な形質の遺伝子が明らかとなってきている。このような形質においても、遺伝子の機能解析の知見をうまく活かして DNA マーカーを設計することで、従来よりも信頼性と汎用性の高いファンクショナルマーカーを構築できる。病害抵抗性のみならず、様々な農業的に有用な形質のファンクショナルマーカーが開発されれば、品種育成に限らず、より幅広い用途での活用が可能になるであろう。

引 用 文 献

- 1) HAYASHI, K. and H. YOSHIDA (2009): Plant J. 57: 413 ~ 425.
- 2) ——— et al. (2010): Theor. Appl. Genet. 121: 1357 ~ 1367.
- 3) SHARMA, T. R. et al. (2012): Agric. Res. 1: 37 ~ 52.
- 4) YASUDA, N. et al. (2008): Plant Disease 92: 1144 ~ 1149.
- 5) 山崎義人・高坂卓爾 (1980): イネのいもち病と抵抗性育種, 博友社, 東京, p. 229 ~ 284.
- 6) ZHOU, T. et al. (2004): Mol. Gen. Genomics 271: 402 ~ 415.