

北海道における分子マーカーを利用した 病害虫抵抗性育種

北海道立中央農業試験場 ^{たけ}竹 ^{うち}内 ^{とおる}徹

はじめに

分子マーカーとは DNA マーカーともいい、ゲノム上の存在位置の目印となる DNA 配列のことである。作物育種の場面では、有用遺伝子もしくはその近傍のゲノム領域の塩基配列の違い（多型）を検出する PCR マーカーのことを指すことが多い。多型を PCR で検出できるようにすると、PCR だけで目的の遺伝子をもっているか、つまり、目的の形質を示すかどうか判定できる。分子マーカーを利用して目的の個体を選抜することをマーカー選抜 (MAS: maker-assisted selection) という。

我が国における病害虫抵抗性育種のための実用的分子マーカー第 1 号は、北海道農業研究センターと愛知県農業総合試験場の研究グループが開発したイネ縮葉枯病抵抗性遺伝子 *Stvb-i* (早野ら, 2000) および穂もち圃場抵抗性遺伝子 *Pb1* の分子マーカーで、全国各地で利用されている。研究グループは、有用なマーカーを開発・実用化しただけでなく、権利問題など利用場面での問題点を整理するなど我が国の分子マーカー利用における貢献は極めて大きい (早野・藤井, 2003)。

I 分子マーカーのメリット

分子マーカーによる抵抗性選抜には、これまでの手法にない様々なメリットがある。

(1) 抵抗性検定の手間とエラーが低減できる

圃場試験で抵抗性検定する病害虫では、環境による影響で精度が落ちることがある。また、接種検定が面倒な病害虫では、多くの材料の検定は困難である。

アズキ落葉病のような土壌病害虫では、汚染を均一とする圃場の維持に多くの労力を要する。ジャガイモ Y ウイルスの接種検定は、温室内で約 3 か月を要し、多くの材料の検定は難しい。このような病害虫では、分子マーカーによる抵抗性検定のメリットは大きい。

一方、幼苗検定などで簡単に判定できる病害虫では、開発コストに見合うだけのメリットは得られない。

(2) 複数の抵抗性を一度に検定できる

これまでの検定法では、同一の個体を使って異なる病害虫に対する抵抗性を検定することはできない。しかし、1 個体由来の DNA を別々の分子マーカーを使って検定すれば、同時に複数の抵抗性が評価できる。例えば、ダイズでは同一個体を用いて、ダイズわい化病、ダイズシストセンチュウ、ジャガイモモヒゲナガアブラムシに対する抵抗性を判定できる (表-1)。

(3) 育成期間を短縮できる

通常の育種選抜では、1 個体から種子を取り、その種子を使った後代検定で判定することが多い。しかし、分子マーカーでは当代で個体単位の検定ができるため、育種年限を短縮することができる。

(4) ホモ型とヘテロ型の区別ができる。

ホモ型とヘテロ型の区別ができる共優性マーカー (図-1) を使うことにより、抵抗性ホモ型に固定した個体を選抜できる。後代の分離はなく、次世代の検定が不要となり効率的である。

II 分子マーカーを開発するためには

抵抗性品種は、防除が困難で被害が大きい病害虫でこそ必要とされる。また、分子マーカーによる抵抗性選抜は、抵抗性検定が困難な病害虫で威力を発揮する。表-1 に示すように、北海道立農業試験場で開発された分子マーカーの対象が「ウイルス病」や「土壌伝染性病害虫」であるのは必要性によるところが大きい。

抵抗性育種には、有効な抵抗性遺伝資源の存在が前提となる。使う遺伝資源は、抵抗性に関与する遺伝子数が少なく、効果が高い抵抗性遺伝子をもっているとよい。効果が低い微働遺伝子の集積による抵抗性では、抵抗性に連鎖したマーカー開発が困難なばかりか、抵抗性品種育成の効率も悪い。

抵抗性が利用しやすい遺伝資源かどうかを把握するためには、遺伝解析、すなわち、抵抗性親と感受性親の交配後代について抵抗性検定を行い、抵抗性の出現頻度を調べる必要がある。1 遺伝子支配であれば有望で、そうでなくても抵抗性の出現頻度が高ければ効果が高い抵抗性遺伝子の存在が期待できる。逆に、抵抗性の出現頻度が低いようであれば有効なマーカー開発も期待できない。

表-1 道立農試で利用している病害虫抵抗性に関する分子マーカー

作物	病害虫名	病原	抵抗性遺伝子
イネ	イネ縞葉枯病	<i>Rice stripe virus</i>	<i>Stvb-i</i>
	穂いもち	<i>Magnaporthe grisea</i>	<i>Pb1</i>
コムギ	赤かび病	<i>Fusarium graminearum</i>	複数の QTL
ダイズ	ダイズわい化病	<i>Soybean dwarf virus</i>	<i>Rsdv1</i> ^{a)}
	ジャガイモヒゲナガアブラムシ	<i>Aulacorthum solani</i>	<i>Raso1</i> ^{a)}
	ダイズシストセンチュウ	<i>Heterodera glycines</i>	<i>Rhg1</i> ^{a)} , <i>Rhg4</i> ^{a)}
アズキ	アズキ落葉病	<i>Phialophora gregata</i> f. sp. <i>adzukicola</i>	<i>Pga1</i> ^{a)}
インゲンマメ	インゲンマメ黄化病	<i>Soybean dwarf virus</i>	<i>Sdvy-1</i> ^{a)}
ジャガイモ	ジャガイモ Y ウイルス	<i>Potato virus Y</i>	<i>Ryhc</i> ^{a)}
	ジャガイモシストセンチュウ	<i>Globodera rostochiensis</i>	<i>H1</i> ^{a)}

QTL：量的形質を支配する遺伝子座 (Quantitative Trait Locus). ^{a)} 道立農試の研究グループが開発した分子マーカー。

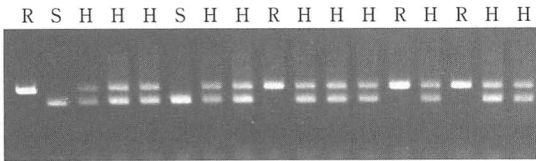


図-1 アズキ落葉病抵抗性遺伝子 *Pga1* を検出する共優性マーカー
R：抵抗性, S：感受性, H：ヘテロ。

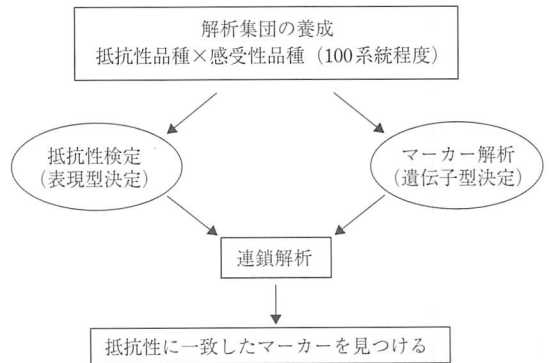


図-2 分子マーカー開発の手順

マーカー開発では、抵抗性検定の精度の重要性を強調しておきたい。マーカー開発は、表現形質（抵抗性）との連鎖関係で解析する。抵抗性と連鎖したゲノム領域を探すわけだから、抵抗性評価の精度が低ければ、実用的な分子マーカーを見つけることは難しい。

善林ら（2000）は、イネいもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* の解析において、抵抗性系統‘中部 32号’の抵抗性検定方法について詳細な検討を行い、精度良く判定できる検定法を確立した。分子マーカーを開発するうえで良いお手本である。

- ①効果が高い抵抗性遺伝子をもつ遺伝資源
 - ②精度が高い抵抗性検定方法
- いきなりゲノム解析に取りかかるのではなく、この二つが揃って初めて分子マーカー開発に進むべきである。

III 分子マーカーの開発手順

分子マーカー開発の手順は、通常、連鎖解析によって行う。大まかには以下のとおりである（図-2）。

- ①抵抗性品種（系統）と感受性品種とを交配し、解析集団を養成する。
- ②100～200系統からなる解析集団について抵抗性検定を行い、抵抗性を判定する。

③解析集団について各染色体に散在するマーカーの遺伝子型を決定する。

④抵抗性とよく一致した、つまり連鎖したマーカーを探す。

イネ、コムギ、ダイズのようにゲノム情報が豊富で、連鎖地図（どの位置にどのマーカーが座乗しているか）が整備されている作物の場合は、染色体あるいは連鎖群に散在するマーカーを片端から調べ、抵抗性、感受性とよく一致したマーカーを探せばよい。北海道立中央農業試験場では、連鎖解析によって、ダイズわい化病抵抗性遺伝子 *Rsdv1*（内堀ら，2007）、ジャガイモヒゲナガアブラムシ抵抗性遺伝子 *Raso1*（紙谷ら，2008）に連鎖した分子マーカーを開発している。

しかし、ゲノム情報が乏しく、連鎖地図が整備されていない作物ではこのような連鎖解析はできない。自前で連鎖地図の作成から始めなければならないが、全ゲノムを網羅するマーカーと連鎖地図の作製には多大な労力を要する。

1 遺伝子支配の抵抗性で、しかも精度が高い検定法があれば、バルク解析 (バルク (bulk) : ひとまとめにする、一括する) (MICHELMORE et al., 1991) という手法をとることができる。北海道立農業試験場の研究グループでは、この方法で多くの実用的な分子マーカーを開発している。以下にその方法を簡単に説明する。

まず、抵抗性親と感受性親を交配した後代を用いて抵抗性検定を行い、分離比から抵抗性が1遺伝子支配であることを確認する。バルク解析には、操作がやや煩雑だが多型検出効率に優れた AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法 (Vos et al., 1995) を利用している。抵抗性、感受性個体由来の DNA をそれぞれ同数ずつ等量混合したバルク DNA を作製し、AFLP 法による解析を行う。増幅断片のパターンは、混合した各個体のパターンをすべて合わせたものになるが、抵抗性個体のみ出現する断片は抵抗性バルクのみで検出され、感受性バルクでは検出されない (図-3)。つまり、抵抗性遺伝子をもつ個体のみがもつゲノムの配列を反映した特異断片を検出できる。

AFLP 法は操作が煩雑なので、育種現場における選抜のためのマーカーとしてそのまま持ち込むことはできない。そこで、AFLP 特異断片およびその周辺領域の塩基配列を Inverse PCR または Tail PCR を利用して解析し、同じ領域の感受性個体の塩基配列と比較する。配列の違いをうまく利用し、PCR ベースのマーカーとして使えるようにプライマーを設計すると、DNA を取って PCR だけで抵抗性の判定ができる。

AFLP 法によるバルク解析は、連鎖地図が整備されていない作物でも効率良く分子マーカーを見つけることができる。しかし、その解析原理から明かなように、精度の高い抵抗性評価が前提条件となる。感受性バルクの

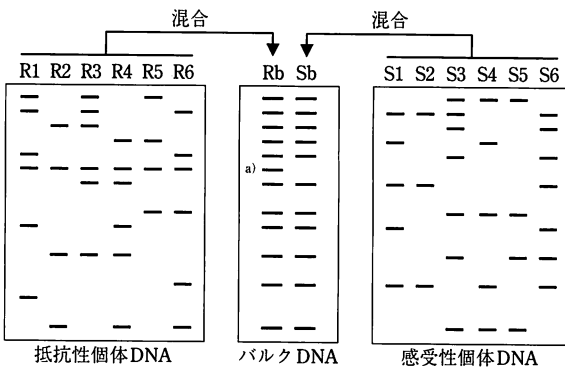


図-3 バルク解析の原理

抵抗性、感受性それぞれ6個体のDNAを混合した場合を示した。a) 抵抗性個体DNAのみの特異断片。

中に抵抗性個体のDNAが混入していれば、目的とする分子マーカーを永遠に得ることができない。

道立中央農試では AFLP 法を用いたバルク解析によって、ジャガイモYウイルス抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* (竹内ら, 2005), ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *H1* (竹内ら, 2008), インゲンマメ黄化病抵抗性遺伝子 *Sdvy-1* (竹内ら, 2008), アズキ落葉病抵抗性遺伝子 *Pga1* (鈴木ら, 2005; 吉井ら, 2005) に関する分子マーカーを開発し、利用している。

IV 分子マーカーによる抵抗性育種の実例

道立農試が取り組んでいる分子マーカー選抜育種の具体的事例として、ジャガイモYウイルス (PVY) 抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}*, ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *H1* のマーカー選抜について紹介する。

(1) PVY 抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}*

PVY 抵抗性遺伝子には起源の異なる *Ry_{adg}*, *Ry_{sto}*, *Ry_{chc}* など、複数の遺伝子がある。北海道立北見農業試験場では、北海道育成の一部品種が有する *Solanum chacoense* 由来の優性1対のPVY抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* を利用した抵抗性品種の育成を進めている。しかし、多くの検定材料を対象にした精度が高いウイルス抵抗性検定は技術的に難しい。そこで、*Ry_{chc}* 遺伝子の分子マーカーを開発した。

PVY 抵抗性品種‘コナフブキ’×感受性系統‘根育39号’の交配集団のゲノムDNAを用い、AFLP法によるバルク解析を行った。AFLP法には *EcoRI* は3塩基、*MseI* は4塩基選択のプライマーを用いて1,536の組み合わせについて行い、約60,000断片を検出した。これらの断片から、抵抗性バルクでのみ検出されたAFLP特異断片を探索し、その周辺領域の配列を解析することによりPCRベースの分子マーカーを得た。さらに、大規模集団による解析によって、高密度連鎖地図を作成した (図-4)。抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* は、二つの分子マーカーの両側それぞれ0.07 cMと0.05 cMの間にマッピングされた。これら二つのマーカーで検定を行った場合の精度

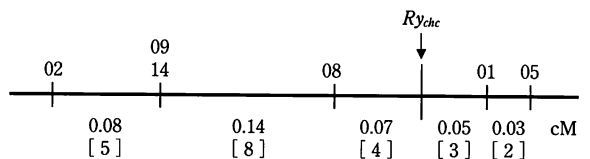


図-4 PVY 抵抗性遺伝子 *Ry_{chc}* 近傍の高密度連鎖地図

集団の大きさは $N = 5,897$ 。01 ~ 14: マーカー番号を示す。cM: 地図距離, []: マーカー間の組換え個体数。

は、この間での二重乗換えの頻度が0.0000003であることから、理論上99.99997%となり、極めて高い精度で判定できる。

(2) ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *H1*

ジャガイモシストセンチュウ (PCN) は、ジャガイモ栽培における重要病害虫で、1986年に我が国初の抵抗性品種‘トヨアカリ’が育成されて以来、抵抗性を付与することが新品種育成の必要条件とされ、北海道で育成された優良品種のほとんどすべてが同抵抗性をもつ。PCN 抵抗性は、*Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC1673 由来の優性1対の *H1* 遺伝子が利用されている。抵抗性選抜は、汚染地域の現地圃場で検定しなければならないが、汚染地では汚染程度を抑えるための対策を講じているため、汚染程度が高い圃場の確保は極めて困難である。そこで、汚染圃場または汚染土によらない抵抗性選抜のために、*H1* 遺伝子の分子マーカーの開発に取り組んだ。*Rychc* と同様、AFLP 法によるバルク解析によって分子マーカーを実用化することができた。マ

ーカー精度向上のため、高密度連鎖地図を作成した(図-5)。抵抗性遺伝子 *H1* は、二つの分子マーカーの両側それぞれ0.01 cMと0.01 cMの間の二つのマーカー上に0.000 cMでマッピングされた。両側マーカーで検定を行った場合、この間での二重乗換えの頻度が0.00000001であることから、その精度は、理論上99.999999%となり、極めて高い精度で判定できる。

現在、北海道立北見農業試験場におけるバレイショの品種育成では、交配後に個体選抜された全系統を冬期間に分子マーカーで選抜し、抵抗性系統のみを次年度以降の育種試験に供している。

V 道立農試における取り組み

道立農試で育種を実施している作物は、イネ、コムギ、ダイズ、アズキ、インゲンマメ、ジャガイモ等他品目にわたるが、様々な作物で分子マーカーを利用した抵抗性育種の取り組みが積極的に進められている(表-1)。

道立農試では、DNA抽出とPCRによるマーカー検定は道立中央農試が担当している。DNA抽出は細胞破砕器を利用して多検体に対応し、マーカー選抜に供する検体数は年間1万点を超えている(表-2)。シーズンを迎えると、育成場から各作物のサンプルが次から次へと届き、研究室はさながら工場と化す。マーカー選抜の結果は即時に育成場へ送られ、その後の育種プログラムの中に組み込まれて有効活用されている。

マーカー育種は、より効率的に抵抗性品種が育成できるよう育成場と協議しながら進めている。

おわりに

これまで作物のゲノム研究に莫大な予算が投じられてきたが、それに見合うだけの社会貢献がなされているだろうか。分子マーカーはあくまでも手段であり、製品

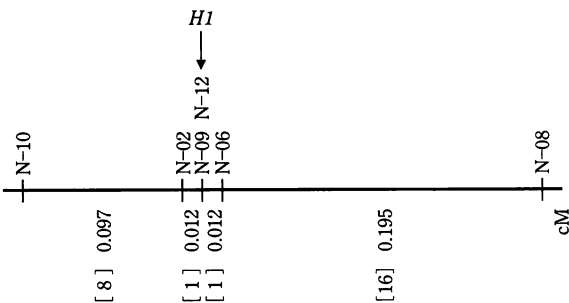


図-5 ジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝子 *H1* 近傍の高密度連鎖地図
 集団の大きさは $N = 8,225$ 。N-02 ~ N-12 : マーカー番号を示す。cM : 地図距離, [] : マーカー間の組換え個体数。

表-2 道立中央農試で実施している病害虫抵抗性育種のためのマーカー選抜

作物	抵抗性遺伝子	マーカー選抜に供した検体数			育成場所
		2005年	2006年	2007年	
コムギ	赤かび病抵抗性 QTL	100	1,500	3,000	道立北見農試
ダイズ	<i>Rsdv1</i>	1,200	1,500	3,400	道立中央農試, 道立十勝農試
	<i>Raso1</i>	500	500	700	道立中央農試
	<i>Rhg1, Rhg4</i>	1,500	1,500	3,800	道立中央農試, 道立十勝農試
アズキ	<i>Pga1</i>	1,500	1,000	800	道立十勝農試
インゲンマメ	<i>Sdvy-1</i>	3,000	3,000	500	道立十勝農試
ジャガイモ	<i>Rychc</i>	500	200	300	道立北見農試
	<i>H1</i>	800	800	1,400	道立北見農試
合計		9,100	10,000	13,900	

(抵抗性品種)が開発され、それが使われる(栽培)ことによって初めて産業(農業)に対する貢献となる。しかし、これまでのところ、マーカーを利用して開発された品種はほとんど栽培されていない。この現実を謙虚に受け止め、利用者、受益者の立場を忘れずに、今後もマーカー育種技術の開発と利用に取り組んでいきたい。

引 用 文 献

1) 内堀 篤ら (2007): 日植病報 (講要) 73: 79.

- 2) 早野由里子ら (2000): 育種学研究 2: 67 ~ 72.
- 3) ———・藤井 潔 (2003): 同上 5: 121 ~ 125.
- 4) 紙谷元一ら (2008): 同上 10: (印刷中).
- 5) MICHELMORE, R. W. et al. (1991): Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 9828 ~ 9832.
- 6) 鈴木孝子ら (2005): 日植病報 (講要) 71: 81.
- 7) 竹内 徹ら (2005): 同上 (講要) 71: 279 ~ 280.
- 8) ———ら (2008): 育種学研究 10: (印刷中).
- 9) Vos, P. et al. (1995): Nucleic Acids Research 23: 4407 ~ 4414.
- 10) 吉井孝光ら (2005): 日植病報 (講要) 71: 81.
- 11) 善林 薫ら (2000): 北日本病虫研報 51: 23 ~ 25.

(新しく登録された農業 21 ページからの続き)

「除草剤」

●カフェンストロール・ダイムロン・ハロスルフロメチル・ベンゾビシクロン粒剤

22111: オークス 1 キロ粒剤 (日産化学) 08/02/06

22112: SDS オークス 1 キロ粒剤 (エスディーエス) 08/02/06

カフェンストロール: 3.0%, ダイムロン: 5.0%, ハロスルフロメチル: 0.60%, ベンゾビシクロン: 2.0%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ (北海道を除く), ヘラオモダカ (北海道, 東北), ヒルムシロ, セリ, アオミドロ・藻類による表層はく離 (関東・東山・東海を除く), 水田一年生雑草

●ピラクロニル・ピラゾレート・ベンゾビシクロン粒剤

22116: イネキング 1 キロ粒剤 (三共アグロ) 08/02/20

ピラクロニル: 2.0%, ピラゾレート: 10.0%, ベンゾビシクロン: 2.0%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ヘラオモダカ (北海道, 東北), ミズガヤツリ (北海道を除く), ウリカワ, ヒルムシロ, アオミドロ・藻類による表層はく離 (北陸を除く)

●ピラクロニル・ベンゾビシクロン粒剤

22117: サンシャインジャンボ (エスディーエス) 08/02/20

ピラクロニル: 6.6%, ベンゾビシクロン: 6.7%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ (北海道を除く), ヘラオモダカ (北海道, 東北, 九州), ヒルムシロ

●ピラクロニル・ベンゾビシクロン粒剤

22118: サンシャイン 1 キロ粒剤 (エスディーエス) 08/02/20

22119: 協友サンシャイン 1 キロ粒剤 (協友アグリ) 08/02/20

ピラクロニル: 2.0%, ベンゾビシクロン: 2.0%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ (北海道を除く), ヘラオモダカ (北海道, 東北), ヒルムシロ, クログワイ (東北, 近畿・中国・四国), オモダカ (東北, 関東・東山・東海), コウキヤガラ (九州)

●クミルロン・ピラクロニル粒剤

22120: ピラクロショット 1 キロ粒剤 (協友アグリ) 08/02/20

クミルロン: 12.0%, ピラクロニル: 1.8%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ヘラオモダカ (北海道), ミズガヤツリ (北海道を除く), ウリカワ (九州を除く), ヒルムシロ (九州を除く), クログワイ (北海道を除く)

●ピラクロニル・ベンゾビシクロン・ベンゾフェナップ粒剤

22121: ピラクロエースジャンボ (協友アグリ) 08/02/20

ピラクロニル: 3.6%, ベンゾビシクロン: 4.0%, ベンゾフェナップ: 14.5%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ヘラオモダカ (北海道, 東北), ミズガヤツリ (北海道を除く), ウリカワ, ヒルムシロ, アオミドロ・藻類による表層はく離 (北海道, 近畿・中国・四国)

●ピラクロニル・プロモプチド・ペンシルフロメチル粒剤

22123: 日農イッポン 1 キロ粒剤 75 (日本農業) 08/02/20

22124: イッポン 1 キロ粒剤 75 (デュボン) 08/02/20

ピラクロニル: 2.0%, プロモプチド: 9.0%, ペンシルフロメチル: 0.75%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ヘラオモダカ, ミズガヤツリ (東北), ウリカワ, ヒルムシロ, セリ, アオミドロ・藻類による表層はく離

●イソキサベン・トリフルラリン粒剤

22127: スナップショット粒剤 (ダウケミカル) 08/02/20

イソキサベン: 0.50%, トリフルラリン: 2.0%

樹木類: 一年生雑草

日本芝: 一年生雑草