

イネいもち病圃場抵抗性遺伝子の同定と抵抗性選抜マーカーの開発

福岡修一（農業生物資源研究所）

fukusan@affrc.go.jp

イネゲノム情報を活用することによって、これまで詳細な遺伝解析が困難であった我が国の陸稲品種のいもち病圃場抵抗性を支配する複数の遺伝子座を検出した。精密な連鎖解析によって最大の寄与率を示す遺伝子座では抵抗性が1個の劣性遺伝子 *pi21* に支配されることを明らかにし、原因遺伝子の構造を明らかにした。また、*pi21* と連鎖するDNAマーカーを開発し、いもち病圃場抵抗性の選抜を効率化する育種技術の開発に貢献した。

はじめに

イネには形態特性や生理的特性に多様な変異が存在し、その多くが作用力の小さな複数の遺伝子に支配される。形質の違いを決定する遺伝子の数や染色体上の位置が明らかでない場合、有用な変異を見出しても交雑育種によって品種に導入することは容易でない。1991年に開始されたイネゲノム研究は、ゲノム情報による画期的な農業技術の開発を目標としており、多数のDNAマーカーを配置した遺伝地図や、国際的な共同プロジェクトによって完全解読されたイネの塩基配列情報は、これまで困難であった、複雑な形質に関与する染色体領域を特定し関与遺伝子を単離する一連の研究を、大きく進展させている。また、イネの遺伝子破壊系統や、発現遺伝子のマイクロアレイ解析技術など遺伝子の機能解明に役立つ研究資源の充実が図られた。これらのイネゲノム情報や研究資源を最大限に生かして、環境の影響を受けやすく形質の評価自体が時間と労力を要する農業上有用な形質を効率的に選抜する技術の開発が重要な課題となっている。

2種類のいもち病抵抗性

いもち病はイネの最大病害であり、その抵抗性の付与はイネの育種にとって重要な目標である。いもち病抵抗性は、病理学的な特性に基づき真性抵抗性と圃場抵抗性に分けられている。前者はいもち病菌侵入により誘導されるイネの過敏感反応に基づく抵抗性であり、これまで20個以上の抵抗性遺伝子が同定されている。しかし、真性抵抗性はいもち病菌系の分化によって崩壊する危険性がある。たとえば、中国品種・荔支江に由来する真性抵抗性遺伝子 *Pik* を利用して育成された我が国の抵抗性品種「クサブエ」が、普及後2年で罹病化し多大な被害を受けた。一方、圃場抵抗性はいもち病菌系に対して非特異的な反応を示す量的な抵抗性である(図1)。圃場抵抗性は複数の遺伝子に支配され、持続的な抵抗性を発揮するものと考えられている。我が国の陸稲はいもち病圃場抵抗性の遺伝子給源として注目されてきたが、品質や食味などが劣り、従来の育種操作では抵抗性と不良形質との連鎖を打破できないため、有効利用されてこなかった。また、圃場抵抗性に関する遺伝子は単離されていないため、圃場抵抗性誘導の分子機構は明らかにされていない。



図1 いもち病圃場抵抗性検定

いもち病を均一に発生させ、病斑の量的な違いを評価する。左端の系統では病斑が進展が遅いのにに対し、右端の系統では進展が著しく枯死している。

圃場抵抗性に関する染色体領域の検出

水稻品種「日本晴」と高度の圃場抵抗性をもつ陸稲品種「オワリハタモチ」との交雑に由来する雑種集団において、DNA マーカーを用いた量的形質遺伝子座(QTL)解析を行った。その結果、第4染色体上の2ヶ所、第12染色体上の1ヶ所の領域においてオワリハタモチに由来する対立遺伝子が抵抗性を高め、第9染色体の1ヶ所では日本晴の対立遺伝子が抵抗性を高めることがわかった(図2)。そのうち、最も作用力の大きい第4染色体連鎖地図中央付近の QTL では、戻し交雑後代の系統における DNA マーカーの遺伝子型と圃場抵抗性(抵抗性/罹病性)の発現が対応し、抵抗性ホモ:ヘテロ:罹病性ホモ型が1:2:1に分離することから、この QTL を劣性の抵抗性遺伝子 *pi2l* と命名した^{1, 2, 3)}。

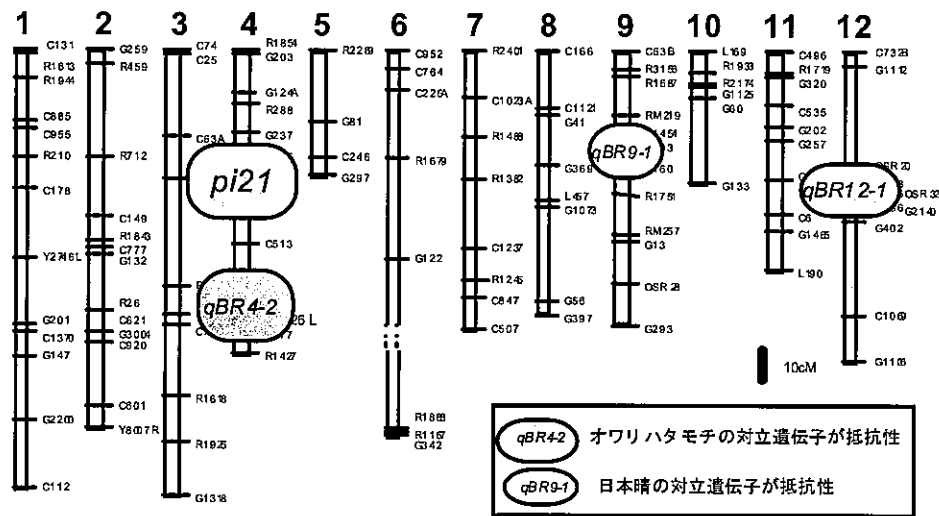
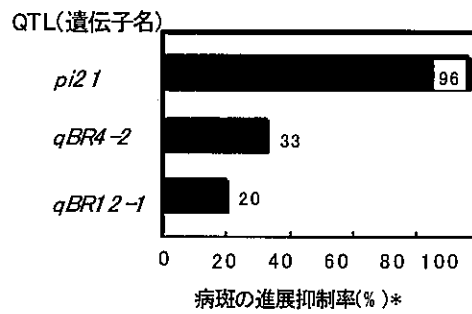


図2 雑種集団(日本晴xオワリハタモチF₄)においていもち病圃場抵抗性と関連のある染色体領域

圃場抵抗性準同質遺伝子系統の作出

QTL解析に用いた雑種後代系統の中から「オワリハタモチ」由来の抵抗性 QTL を持つ系統を選び、水稻品種「愛知旭」を戻し交雑した後代において、DNA マーカーを用いて抵抗性の QTL を個別に持つ個体を選抜した。戻し交雑を繰り返し、1 個の抵抗性の QTL を含む染色体領域以外が水稻の染色体に置換された準同質遺伝子系統を作出した。これらの系統の圃場抵抗性を評価したところ、水稻品種に比べて圃場抵抗性が向上しており、DNA マーカーを用いて圃場抵抗性を選抜できることを確認した(図3)。特に、*pi2l* 遺伝子を導入した系統では、実用に耐え得る抵抗性が付与できることが明らかとなり、*pi2l* 遺伝子を導入した系統は抵抗性の育種素材として有用であることがわかった⁴⁾。また、*pi2l* に連鎖する DNA マーカーは圃場抵抗性選抜マーカーとして有用であり、現在これを指標として圃場抵抗性の有用品種への導入を試みている⁵⁾。



*愛知旭の病斑面積に対する抵抗性QTL導入系統の病斑面積の減少率

図3 陸稲由来いもち病抵抗性 QTL の病斑の進展抑制効果

圃場抵抗性遺伝子のマップベースクローニング

これまで圃場抵抗性に関する遺伝子座が明らかでなかったため、圃場抵抗性遺伝子の作用を調べた研究はなく、圃場抵抗性の発現機作に関する知見は乏しい。そこで、圃場抵抗性の発現機作を分子的に解明するために、関与する遺伝子のひとつ *pi21* 遺伝子の単離を試みた。約 3000 個体の大規模な雑種集団を用いて精密な遺伝分析を行った結果、約 1.7kb の染色体領域に抵抗性の強弱に関連する DNA 変異が存在することがわかった。この領域内の塩基配列を罹病性の品種「日本晴」、「愛知旭」と抵抗性品種「オワリハタモチ」の間で比較したところ、抵抗性の有無と完全に一致する 2 カ所の DNA 変異を特定した。これらの変異は「日本晴」で発現する遺伝子のコード領域にあり、*pi21* 遺伝子を持つ「オワリハタモチ」ではアミノ酸レベルで欠失を生じていた。このことから、陸稲と水稲品種と *pi21* タンパク質の構造が異なることによって抵抗性に差が生じるものと考えられる。実際に抵抗性の *pi21* 遺伝子を持つ系統にアグロバクテリウム法を用いて「日本晴」の持つ *Pi21* 遺伝子を導入した個体は罹病性に形質転換されることが確認できた (図 5)。逆に、「オワリハタモチ」の持つ *pi21* 遺伝子を罹病性の *Pi21* 遺伝子を持つ系統に導入しても抵抗性は変化しなかった。このことから、*Pi21* 遺伝子が病斑の進展を促す罹病性遺伝子であることがわかった。*Pi21* 遺伝子の配列は機能の明らかな遺伝子との相同性はなく、既知の真性抵抗性遺伝子とは全く異なる構造を持つ遺伝子であることがわかった⁹。*Pi21* 遺伝子が抵抗性の程度を制御する機構は現時点では明らかではないが、今後研究を進めることで圃場抵抗性の発現機作を明らかにできるものと期待している。現在、*pi21* 以外の QTL についても同様の解析を行い、圃場抵抗性の作用機構を明らかにするための解析材料の準備を進めている。

DNA マーカーを用いた育種

圃場抵抗性を品種に導入する際に、交雑後代において抵抗性の個体を選抜し、その後代の系統を用いて他の形質を調査し、優良な形質を持つ個体を選抜する方法がとられている。特性評価は時間と多くの労力を要する上に、調査できる個体数に限りがあった。そのため、不良形質をもたらす複数の遺伝子が抵抗性遺伝子座近傍にある場合など、多くの個体を調査する必要があるときには、望む形質の個体を得ることが難しい。*pi21* 遺伝子のように抵抗性遺伝子の配列が塩基配列レベルでわかっている場合には、多数の個体の中から DNA マーカーを指標に陸稲品種に由来する染色体断片の長さが最小で抵抗性遺伝子を確実に持つ個体を選抜することが可能であり、選んだ少数の個体について形質評価を行えばよい。現在 *pi21* 遺伝子を「コシヒカリ」に導入するため、*pi21* 遺伝子に関する準同質遺伝子系統を「コシヒカリ」と交雑し選抜作業に着手したところである。ひとたび不良形質との連鎖を打破した育種素材を作成できればそれを他の品種に導入することは容易であり、圃場抵抗性の利用をさらに促進できる。

おわりに

イネゲノム研究によってこの 10 年あまりの間に予想以上の速さで研究資源や情報が整備された。いもち病圃場抵抗性に関する本研究はその成果を活用し、基礎研究と育種現場という異なる分野の研究者の連携によって実現したものである。前述のように、農業形質の多くが複数の遺伝子に支配されるため、優先して解明すべき重要な形質には解析が困難なものが多い。今後も、ゲノム情報と様々な技術を組合せながら農業形質に関わる遺伝子

pi21 抵抗性系統

Pi21 遺伝子導入
pi21 抵抗性系統

罹病性比較品種



図4 *Pi21* 遺伝子によるいもち病抵抗性の形質転換
Pi21 遺伝子を導入することによって *pi21* 抵抗性系統いもち病抵抗性が低下している。

座の検出と関与遺伝子の単離を進めることで、イネの遺伝的多様性の機能的な側面を明らかにし、遺伝資源の育種利用を促進させたい。現在普及している品種ではイネの多様性のごく一部しか利用されていない。遺伝子の宝庫である近縁の野生種や多様な在来品種など、これまで見過ごされてきた遺伝資源の可能性を正確に理解し、人類が長い歴史の過程で作りに上げてきたイネという作物の枠を広げるような研究を行いたいと考えている。

謝辞

本研究の遂行に当たりまして農業生物資源研究所奥野員敏ジーンバンク長には終始多大なるご指導を頂きました。愛知県農業総合試験場山間農業研究所の井上正勝前稲作グループ長、工藤悟稲作グループ長をはじめ多くの研究者の方々には圃場抵抗性の評価について多大なるご協力とご助言を頂きました。農業生物資源研究所佐々木卓治理事、廣近洋彦グループ長、河瀬眞琴チーム長、矢野昌裕チーム長には、研究に対する貴重な助言とご支援を頂きました。また、多くの実験材料を用いて行った本研究は、農業生物資源研究所業務科による研究材料の圃場管理、植物資源研究チーム非常勤職員によるDNA分析など、多くの皆様の献身的なご協力無しにはなし得ませんでした。ここに記して、心よりお礼申し上げます。

引用文献

- 1) Fukuoka, S. and K. Okuno (2001) QTL analysis and mapping of *pi21*, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice. *Theor. Appl. Genet.* 103: 185-190
- 2) Okuno, K. and S. Fukuoka (2001) An enhancement strategy for rice germplasm: DNA marker assisted identification of beneficial QTL for resistance to rice blast. *In Managing Plant Genetic Diversity*. (Eds.: J.M.M. Engels, V.R. Rao, A.H.D. Brown and M.T. Jackson) CABI Publishing, Oxon, UK.
- 3) 特許 奥野員敏、福岡修一 (2000.04.28 出願) イネいもち病を識別する方法, 米国, 出願番号 09/560780
- 4) Fukuoka, S, T. Shimizu, M. Yano, K. Okuno and Nagamine T. (2004) Genetic dissection and mapping of genes conferring field resistance to rice blast in Japanese upland rice. *In Rice Blast: Interaction and Control*, (Ed: S. Kawasaki) Kluwer Academic Publishers Amsterdam. , pp301-306
- 5) Saka, N. and S. Fukuoka (2005) Evaluating near-isogenic lines with QTLs for field resistance to rice blast from upland rice cultivar Sensho through marker-aided selection. *In Rice is life: scientific perspectives for the 21st century* (Eds.: K. Toriyama, K.L. Heong, and B. Hardy) IRRI, Metro Manila, pp487-489
- 6) 特許 福岡修一、河瀬眞琴、奥野員敏 (2005.06.29 出願) イネいもち病罹病性遺伝子 Pi21 および抵抗性遺伝子 pi21 ならびにそれらの利用

Identification of the gene for field resistance to rice blast and development of DNA markers for its selection

Shuichi Fukuoka (National Institute of Agrobiological Sciences)

fukusan@affrc.go.jp