

イネ品種育成におけるDNAマーカー技術の展開

(独) 農業・生物系特定産業技術研究機構・中央農業総合研究センター

芦川育夫

序

アラビドプシスとイネを中心として進められてきた植物ゲノム研究は、その第一段階をほぼ終了した。国際共同研究として進められてきたイネの全塩基配列解読も完了し、農水省系の研究機関が中心となり行ってきたイネ・ゲノム研究プロジェクトも、2005年度からは新しい体制へ移行すると聴いている。この10数年の研究により生み出された精密な遺伝地図や塩基配列情報は、イネの染色体の構造や様々な形質を支配する遺伝子がどのようなものであったのかを解明する上で大きな威力を発揮した。得られた成果の大きさを考えれば、つくばのイネゲノム研究チームが採用した、連携的な研究開発の方法論が正しかったことがわかる。一方、研究の進展が必ずしも十分でなかった分野もあった。例えば、演者が今回話題を提供するDNAマーカーの品種育成への適用は、イネゲノム研究発足当時から、ゲノム研究の成果の最も大きな出口の一つと考えられてきたが、マーカーを系統選抜の一部にでも採用している育種現場は依然として数少ない。普及が遅れている原因は1つに特定できるわけではないが、マーカーを開発するゲノム研究分野の研究者と、マーカーを用い稲の品種を育成する育種家との間の考え方が必ずしもうまく合っていたとは言えない点が要因の1つであったと思われる。

今回は、稲育種現場でマーカー選抜技術を普及させるにはどうすればよいか、という考えに基づいた試みを含む演者らの2つのイネゲノム関連研究につき話題を提供したい。この要旨では、その2つのうちで主たる話題であるイネいもち病抵抗性マルチライン育成に用いるDNAマーカー群の開発について記す。

イネいもち病抵抗性選抜用のPCR-based SNP マーカー群の開発

育種選抜において表現形質に代えてDNAマーカーによる選抜を行えば、1) 表現形質による評価より簡便で信頼のおける評価、選抜ができる、2) 幼苗から開花後までの植物のどの成長段階においても、植物体からDNAが抽出できさえすれば、遺伝子型の判別ができる。幼苗期に遺伝子型を判別できれば、結果として世代を促進することにつながり、育成期間を短縮することができる、という長所が有ると従来から言われてきた。しかし、実際にこのような利点を発揮できるマーカーによる遺伝子型判別システムは最近に至るまで実用的になっていたわけではなかった。演者らは、上述の2つの利点をできるだけ満たすマーカー系を構築し、それを育種現場にできるだけ普及させようという試みを行った。このような考えに基づき開発したマーカーが、育種サイドで実際に選抜に採用されるか、どのように評価されるか、を試す事も研究の目的の1つであった。

演者らは、PCR反応でゲノム上のSNP(1塩基多型)の遺伝子型を判別するマーカー系を採用し、DNAの簡易抽出法等と組み合わせ、できるだけ簡易な操作で選抜育種ができる

ようにした。現在は、PCR 型のマーカーの代表は SSR (マイクロサテライト) マーカーであるが、マイクロサテライトはゲノム上の出現頻度が低く、目的とする遺伝子の極近傍にマーカーを設定することができない、あるいは難しいという問題があった。また、SSR は、見分けるべき 2 つの allele 間からの PCR 産物のサイズの差がたいてい小さく、遺伝子型識別における電気泳動に慎重さを要する点も難である。SNP はゲノム上で最も頻度高く存在する多型であり、イネであれば、公開されている DNA 塩基配列を用いることにより、遺伝子に極近接するマーカーを比較点短期間で作出する事が出来る。SNP の遺伝子型識別は、ヒトの遺伝病の診断に使われるため、現在では様々な方法が考案され、実用化されている。極めて高効率な genotype を可能にする機械も開発されているが、1 つの稲育種現場では、1 シーズンで DNA マーカーにより選抜する個体数はせいぜい数百であり、1 日に 1 千~数百個体の遺伝子型判別が行える高価な装置は必ずしも適していない。むしろ、PCR のように、どこにでもある機械で、ある程度の効率で選抜が進められる手法が適している。遺伝子型判定は、図 1 のような操作で進める。当初、演者らは PCR 後の電気泳動なしで遺伝子型判別を行えるような系 (non-Gel による判別) の開発を目指したが、そこまでには至っていない。

この操作で用いる PCR 反応は、allele-specific PCR というもので、この手法を SNP の判別に用いるという考え方自体は 10 年以上前から報告されている。最初は SNP の 2 つの遺伝子型を見分けるために、PCR プライマーの 3' 端の塩基を 2 つの allele のそれぞれの塩基に相補的にさせ、相補的なプライマーを用いた場合 PCR 産物が増幅し、相補的でない場合増幅がない、という基準で識別しようとした。残念ながら、この方法では相補的でない場合にも PCR 増幅が起こる場合が多く、安定的な allele 間の識別はできなかった。その後、プライマーの 3' 近傍のどこかに人工的なミスマッチを入れ、識別を安定化させようという考え方が提出された (図 2 A)。演者らは、プライマーのどこに、どのようなミスマッチ、すなわち塩基置換、を入れれば、安定的に SNP を識別できるマーカーが設計できるかどうか見つけるため、幾つもの SNP サイトにつき、様々な塩基置換を入れたプライマーを設計し、PCR 反応により識別性を試した (図 2 B)。結果として、プライマーの 3' 端から 3 塩基目に、(プリン塩基/ピリミジン塩基) 置換によるミスマッチを作れば、高い確率で、安定的な SNP 識別が行えるマーカーが作出できることがわかった。

Allele-specific PCR によるマーカーは dominant 型であり、1 つの SNP の遺伝子型判別には 2 回の独立な PCR が必要である。操作をより簡易にするために、極めて近接する 2 つの SNP を用い、dominant 型マーカーを co-dominant 型に変換させることも可能である (図 3)。ただし、co-dominant マーカーを用いると、2 つの allele から増幅したサイズの差が小さい PCR 産物をゲル上で見分けなければならず、SSR を用いた場合と同様な状態に陥り、電気泳動がやや簡便でなくなる。

演者らは、この改変型 allele-specific PCR マーカー系を用い、イネいもち病抵抗性選抜用 DNA マーカーセットを構築した。いもち病は、日本の稲栽培においては最も大きな被害

を与える病気である。一方、イネのある品種は、進化に伴いもち病に対する抵抗性遺伝子を獲得したものがあり、既に多くのもち病抵抗性遺伝子の存在が知られている。この抵抗性遺伝子を既存の品種へ導入すれば、原理的にはもち病に対して抵抗性の稲を作出できるはずだが、残念ながらある1つの抵抗性遺伝子を導入した稲は、数年間栽培すると、もち病菌の非病原遺伝子の変異により、抵抗性を失ってしまう（抵抗性のブレイクダウン）。遺伝子のブレイクダウンを防ぎ、もち病に対する抵抗性を維持させるために、マルチラインという栽培法が提唱されている。これは、幾つもの抵抗性遺伝子の中の1つ、1つを既存の品種に導入する（IL化、同質遺伝子系統化）、例えばもち病抵抗性遺伝子 *Pib* を持つ同質遺伝子系統、*Piz* を持つ系統、*Pita* を持つ系統、*Pik* を持つ系統を個々に育成し、これらの系統を混合して栽培することにより、抵抗性遺伝子のブレイクダウンを防ぐ方法である。コシヒカリでは、既にもち病抵抗性遺伝子を導入した幾つもの同質遺伝子系統が育成されており、マルチライン栽培でブレイクダウンが起りにくくなったことが確認されている。現在、コシヒカリ以外の優良品種でのマルチライン化が進められている。ある品種のマルチライン化を行うには、何回ものバッククロスと抵抗性選抜を重ねることにより、幾種類かのもち病抵抗性遺伝子を並行的に導入していく。演者らは、この育成過程での選抜に DNA マーカーが有効であると考え、日本で育種的に用いられている抵抗性遺伝子について選抜用の DNA マーカーセットを整備することを行った（表1）。*Piz*, *Piz-t*, *Pit*, *Pik-m*, *Pik* に関しては、大規模な分離集団を解析し、遺伝子位置あるいは遺伝子の極く近傍にマーカーを設定した。遺伝子クローニングなどにより染色体上の位置が決まっている遺伝子 *Pita*, *Pib* に関しては、遺伝子の位置情報を利用して遺伝子内、あるいは近接してマーカーを設定した。*Pita-2* に関しては、*Pita* との対立性関係を用いて、位置を推定し、マーカーを設定した。他の研究グループの情報で作出した、*Pita*, *Pita-2*, *Pib* は、マーカーが目的とした場所に設定されているかを、50 個体程度の小さな分離集団を用いて確認した。演者らが作出したマーカー群は、コシヒカリに対し遺伝子を導入するためのものとなっているが（コシヒカリとドナー品種の DNA 多型を識別するマーカー）、現在日本で栽培されている優良品種はコシヒカリと遺伝的に極めて近いものであり、我々のマーカー群は大部分の品種にそのまま適用可能である。図4に、*Piz* 選抜用に開発したマーカーでの適用例を示す。

演者らは、抵抗性遺伝子の遺伝子位置、あるいは極近傍に設定したマーカーに加え、染色体上で遺伝子からある程度離れた位置にもマーカー群（フランキングマーカー）を設定した。これらフランキングマーカーを用いれば、育成途上、あるいは育成した同質遺伝子系統の遺伝子部分に、ドナーからの DNA がどの程度の長さで導入されているかを見積もることができる。図5は、*Piz* 遺伝子を導入した準同質遺伝子系統において、ドナーである Zenith からの導入 DNA 断片の大きさを見積もったものである。キヌヒカリに *Piz* を導入した北陸 IL では導入 DNA 断片は比較的小さくなっているが、他の準同質遺伝子系統では、極めて大きな断片が残っていることがわかる。

まとめ

演者らが開発したいもち病抵抗性選抜マーカー群は、既にコシヒカリ I L 育成の一部（新潟県、富山県）、ハナエチゼン I L（福井県）の育成に利用されており、ヒノヒカリ I L の育成に用いられる予定である。これらマーカー群は I L 群の育成に加え、いもち病抵抗性 I L が実用化された場合、稲植物体、稲種子にどの遺伝子が入っているのかを確認する上で有効であろう。導入されている抵抗性遺伝子を迅速に確認するための、マーカーを混合して PCR を行う Multiplex PCR の操作も現在開発中である。

DNA マーカーの持っている利点をできるだけ生かす、という発想のもとに研究を進めてきたが、マーカーの稲育種現場への普及という点ではある程度の成果を得た。しかし、現段階では、マーカーの持つ利点のうち、形質評価に関わる作業の低減や正確な抵抗性判定という意味でのみマーカーが用いられており、さらに進めて世代促進と組み合わせる育成年限を短縮するということまでは至っていない。マーカーの普及を図ろうとすれば、ただ単にマーカーを開発し育種現場へ渡す、というだけに留まらず、マーカーを用いる意味が生きる育成法に関しても、育種グループと開発を進めていく努力が必要であると思われる。

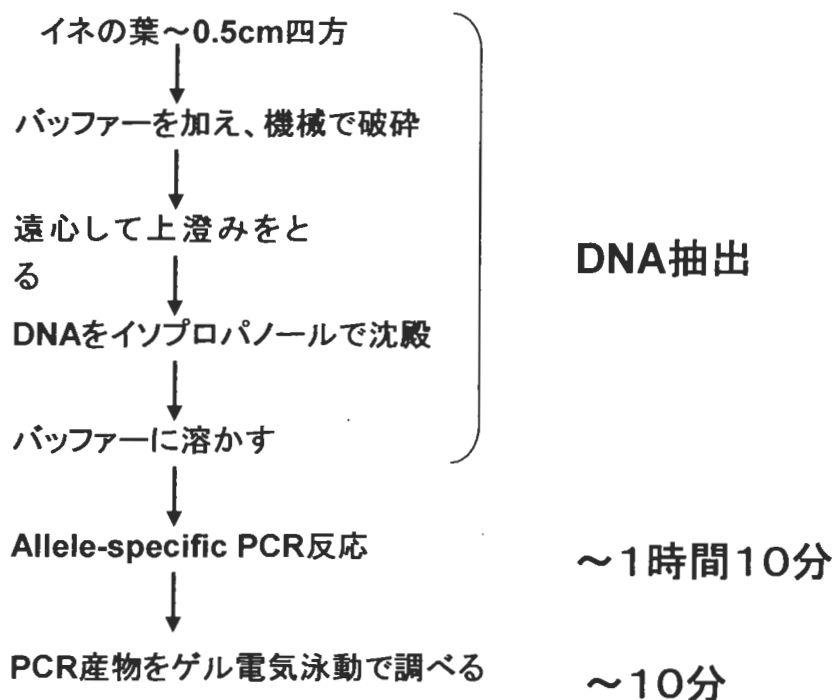


図1. PCR-based SNP 遺伝子型判別法によるDNAマーカー系

(詳細は、Hayashi et al. Theor. Appl. Genet. (2004) 108, 1212-1220 に記載)

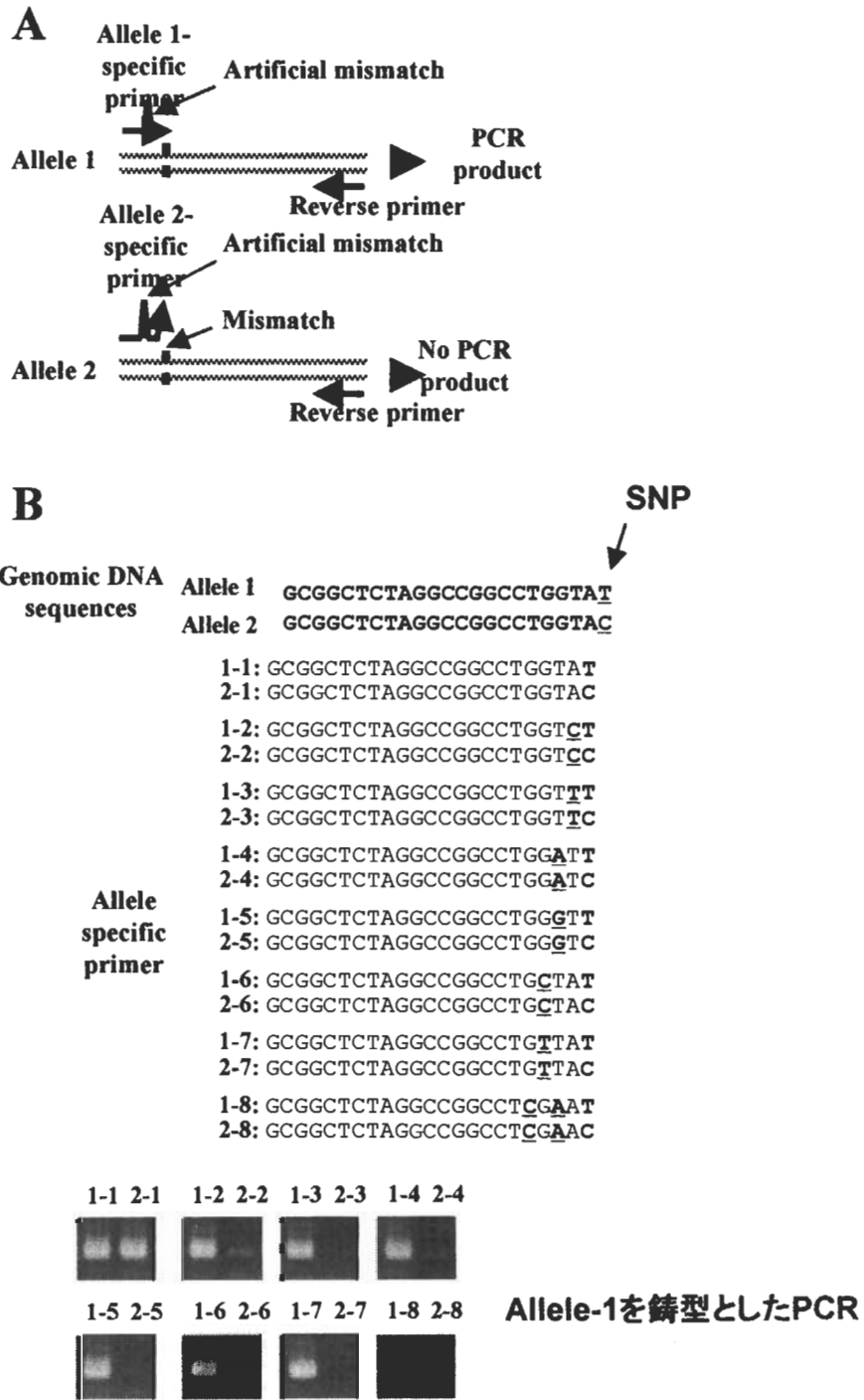


図2. (A) allele-specific PCR の原理 (B) 十分な選択性をもつ genotypingのためのプライマーデザイン法の探索

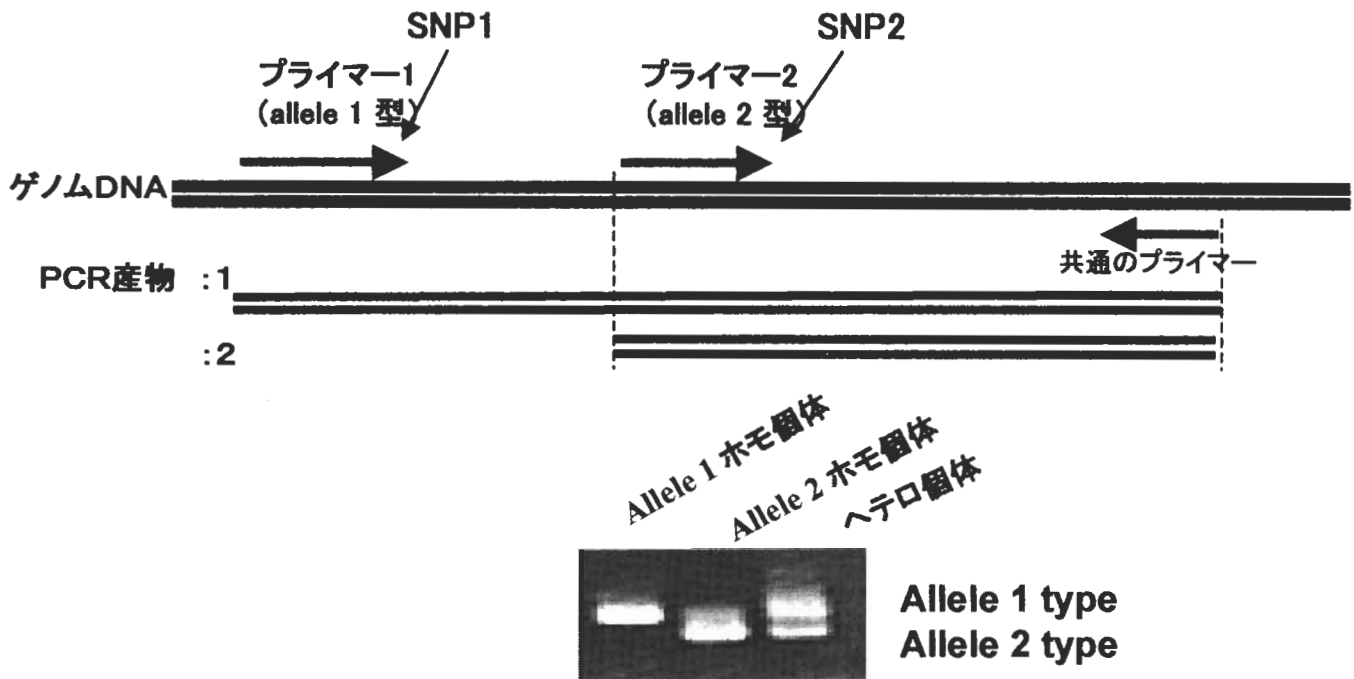


図3 co-dominant マーカーへの変換
2つの近接するSNPを使い、それぞれのalleleのマーカーを設定

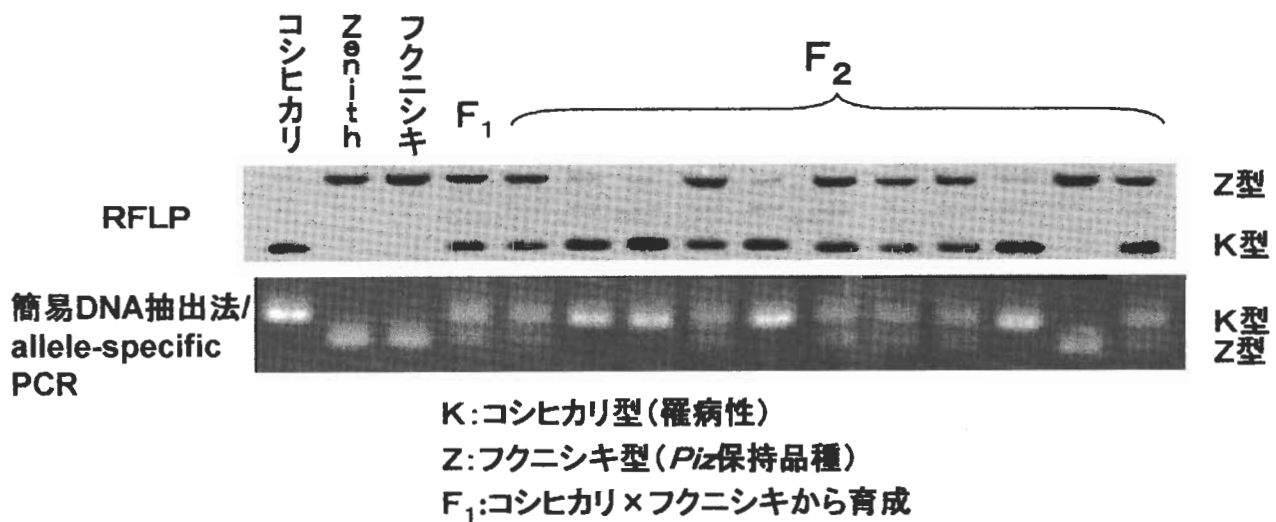


図4 *Piz* 選抜用に作成したマーカーでの genotyping の例 (下側)
RFLP (上側) に相当する情報が容易に得られる

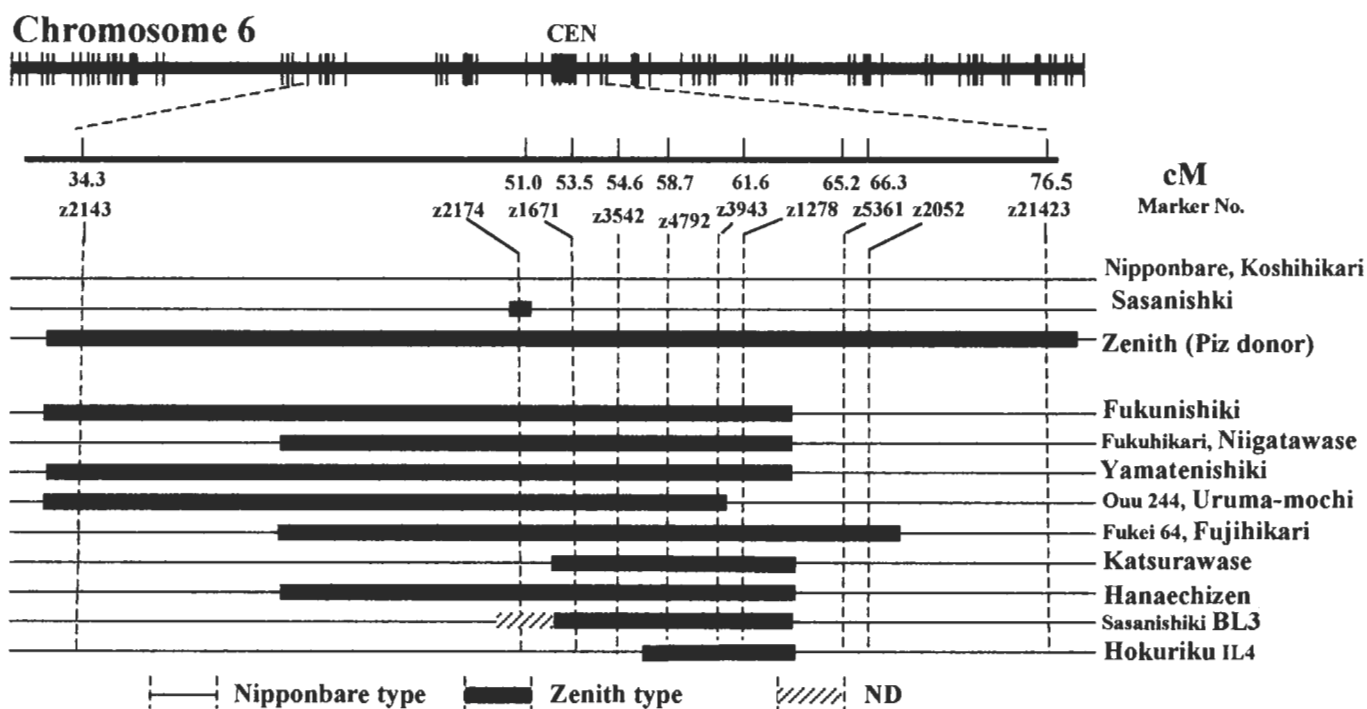


図5 *Piz*選抜用に開発したマーカー群で、*Piz*-準同質遺伝子系統に導入されたドナーからのDNA断片サイズを見積もる

表1 いもち病抵抗性選抜用マーカー開発のための遺伝解析に用いた材料

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	0 cMに設定したマーカー名
<i>Piz</i>	6	コシヒカリ/フクニシキ	2680	z 5659
<i>Piz-t</i>	6	とりで1号/コシヒカリ	2665	zt5659
<i>Pit</i>	1	コシヒカリ/K59	2833	t255
<i>Pik</i>	11	関東51号/OSIL235	744	
<i>Pik</i>	11	関東51号/コシヒカリ	180	k3951
<i>Pik-m</i>	11	99-SL44/ツユアケ	2118	
<i>Pik-m</i>	11	ツユアケ/コシヒカリ	390	k6441
<i>Pita</i>	12	ヤシロモチ/日本晴 (確認用)	42	ta3
<i>Pita-2</i>	12	PiNo. 4/コシヒカリ (確認用)	50	ta3
<i>Pib</i>	2	BL1/コシヒカリ (確認用)	42	b2