

サブテーマ名：D 高速分子進化の環境応用
小テーマ名：D3 病虫害耐性植物の分子育種

フェーズ I<3-2-c>

[概要]

病虫害耐性をもった水稻遺伝系統を確実に選抜し、遺伝子導入なしに優良形質を保持した育種を可能にするために、ツマグロヨコバイ耐性水稻 DNA マーカーを同定した。その利用技術を開発し、さらに高速分子進化技術を取り入れて水稻の有用遺伝子強化を目指す。

[フェーズ I の研究成果]：

(1) ツマグロヨコバイ耐性水稻の準同質遺伝子系統の作成と検定

水稻のツマグロヨコバイ耐性系統と感受性系統を交配して得た F₂ 個体について、ツマグロヨコバイによる生物検定を実施した。

(2) ツマグロヨコバイ耐性の遺伝子解析

高速化 RDA 法を開発し、水稻遺伝子の解析条件を確立した。AFLP 法による解析の結果、ツマグロヨコバイ耐性に連鎖するマーカー開発の可能性が示唆された。詳細に検討するため RDA 法を行いツマグロヨコバイ耐性イネ系統由来の DNA 断片を得た。

[フェーズ II の研究成果]：

(1) ツマグロヨコバイ耐性水稻の準同質遺伝子系統の育成と検定

ツマグロヨコバイ耐性を有する準同質系統(NIL)3 系統を人為的に交配し、耐性遺伝子の固定化を行った。精密な検定等を実施し、個体レベルでの耐性、感受性系統を育成した。

「彩のかがやき」と「コシヒカリ」の交配種を作成し 2004 年春まで戻し交雑を行い耐性遺伝子の選抜を行った。その後 2005 年より作成品種同士を組み合わせることにより遺伝的性質の固定化を進めた。「コシヒカリ」のツマグロヨコバイ耐性同質遺伝子系統の候補であるコシ GRH1, GRH2, GRH4, GRH5 について生産力検定及びイネの止葉葉身によるツマグロヨコバイ耐性検定を行った。「コシヒカリ」と比べた各系統の主な特性概要は「コシヒカリ」と同等であった。GRH5 はツマグロヨコバイ耐性は中もしくは弱であった。「コシヒカリ」のツマグロヨコバイ耐性同質遺伝子系統として有望な 3 系統 (GRH1, GRH2, GRH4) を選抜した。

(2) ツマグロヨコバイ耐性特異的 DNA 断片の機能解析及び DNA マーカーの開発

耐性品種特異的 DNA 断片をもとに耐性品種由来の DNA を特異的に検出する手法を開発するとともに耐性品種特異的 DNA マーカーを用いた選抜手法 (MAS) を検討した。

(2-1) RDA による耐性系統特異的 DNA 断片の解析

耐性品種特異的 DNA 断片検出には RDA 法 (Lisitsyn ら 1993, 1994) を用いた。イネゲノムの切断、各種アダプタの切断には制限酵素 *Hind*III、*Bgl*III 及び *Ban*HI を使用した。RDA 解析は四サイクルの比較を行い、得られた断片の解析を行った。

その結果、RDA 解析よって 22 本の耐性特異的と思われる DNA 断片が検出され、同時に行った cDNA-RDA 解析からその一部のは発現していることが確認された。その後解析を進め、合計 74 本の DNA 断片を得た。RDA 解析によって得られた 74 本の DNA 断片を解析した結果、いくつかの配列は重複も認められ、検出した DNA 断片の多くがイネゲノムの特定領域に集中していることが示唆された。

(2-2) BLAST 解析による耐性遺伝子断片の検索

RDA によって検出・解析された DNA 断片の配列情報を解析プログラム BLAST によって処

理し、得られた結果をイネゲノム DNA データベースと比較して検出断片のゲノムマップ上の位置を推定した。

また、RDA 及び mRNA finger printing の結果を照合し、両者が一致する断片の同定を行った。RDA によって得られたこれらの DNA 断片中よりツマグロヨコバイ耐性遺伝子を含むものを選抜する必要があるため、BLAST 解析を行い、検出断片がゲノムのどの領域に由来するのかを調査した。

その結果、いくつかの領域で高い重複率が確認され、RDA で検出された断片がゲノムの特定領域に集中していることが明らかとなった。

次にそれらの配列の内訳を確認したところ、ゲノムプロジェクトで解析された DNA データベースの配列と RDA で検出した断片の配列との間に差異のあることが示唆された。これは RDA では小さな DNA 断片として検出されたものがゲノムデータベースでは大きくかけ離れた二つの配列であることを示すデータが得られるためである。しかしながら RDA で得られた DNA 断片の末端にプライマーを設定して PCR を行うと検出断片同様の大きさの DNA 断片が増幅され、この結果から RDA で得られた DNA 断片は耐性系統内に一つの連続した配列として存在していることが示唆された。

さらに mRNA finger printing の結果に対して BLAST 解析を行い、RDA の結果と一致するものがあるかどうかを検討した。その結果、一部で重複する領域を確認することができた。

(2-3) mRNA finger printing による発現差異の比較

mRNA finger printing を用いて Grh11R(Bc₆F₁) 耐性系統と「コシヒカリ」(感受性系統)についてその差異を解析した。解析は 1 系統につき末端配列 3 種類及びプライマー 25 本×2 セットの 150 の組み合わせを行い、解析後得られた DNA 断片を解析した。

その結果、両者に明確な差異のある 38 本の差異のある DNA 断片が検出され、そのうち 35 本の配列をクローニングしその塩基配列を解析した。

RDA の結果を照合したところ、重複する断片をいくつか検出することができた。この結果は RDA によって得られた配列の中に耐性系統と感受性系統との差異を示す因子が存在している可能性が示唆された。

(2-4) ツマグロヨコバイ耐性特異的 DNA マーカーの作成

耐性マーカー候補を絞り込み実用化へ向けた試行を行った。これまでに得られた DNA 断片の解析結果を基に耐性マーカー候補となる領域を絞り込み、DNA マーカーを作出した。

領域内の DNA 断片を基にプライマーを設計した結果、一部の配列でマーカーとして利用できる可能性のある断片を複数得た。次に 50 種類のオリゴヌクレオチドを作成し、DNA マーカーの有効性を検討した結果、2 プライマーセットで耐性系統にのみ特異的な断片が認められ、DNA マーカーとして利用できる可能性が示唆された。

[今後の展開] :

- 開発した DNA マーカーと既存の DNA マーカーを用いた複合抵抗性分子育種
- 周辺情報検索により DNA マーカーの特許出願の可否を判断
- 耐性品種より検出した DNA 配列がどのように抵抗性に影響しているか検討するため、耐性遺伝子の断定と耐性機構の解明を目指した機能的解析