

Ⅲ. 良質米に向けた新たな選抜技術

1. 米の食味に関するDNAマーカーの開発と利用

佐藤 毅*

はじめに

現在の北海道米は、府県品種と比較して食味関連形質であるタンパク質およびアミロース含有率が1~2%高い傾向にある。「道水田農業の展開方向」の一つである高品質米生産割合を高めるためには、安定的にそれら含有率が低下した品種を開発する必要がある。これを達成するためには、低タンパク質の母本を利用、食味特性に関する突然変異を誘発、および道が保有する遺伝資源の中から有用素材を探索することも重要である。

平成14、15年の2年間、北海道は冷害に遭遇している。栽培的に深水灌漑等で軽減させる技術があるが、品種の穂ばらみ期および開花期の耐冷性を強化する必要がある。また、いもち病は、水稻の重要病害である。現在の良食味品種は、いもち病に弱い傾向にあり、北海道の標榜するクリーン農業のためにも、いもち病に強い耐病性良食味品種の育成が望まれている。北海道米の高位安定を維持するためには、耐冷性および耐病性の強い品種を開発することが、今後さらに重要な要件となる。

「売れる米」作りには極良食味品種開発に加え、様々なハードルが存在する。これまでの育成方法の精査、継続、材料の積み重ねさらに、新たな評価法を確立し、育成材料の選抜に応用していくことが重要である。そのため、新しい育種選抜技術のツールであるDNAマーカーを有効に育種現場で活用していくことも重要であると考えられ、以下に、その実際と活用例および上川農試での取り組みと今後の計画を記述する。

1) DNAマーカーの実際と農業形質に関するDNAマーカー

イネゲノムの解読は、急速な勢いで進み、約4億3千万の全塩基配列が決定されようとしており、イネにおける遺伝子解析が飛躍的に進むものと期待されている。さらに、近年バイオインフォマティクス(生物情報科学)の分野が発展してきているが、これは、塩基配列などの多様なゲノム情報から遺伝子領域や遺伝子機能を予測するのに有効で、膨大な量のゲノム情報を使いやすい形のデー

タベースにまとめ、様々なタイプのデータベース間を相互にリンクする上で大きな役割を果たす。これによって、目的とする遺伝子の近くの領域を特定し、その塩基配列情報とゲノム情報データベースとをコンピューター上で比較解析することにより、遺伝子の特定が可能となる。このように、イネゲノム研究においては、かつてとは比較にならないほど効率的に遺伝子を解析することが可能となってきた。

一方、1980年代に着手されたDNA多型連鎖地図の開発は、これまで解析するのが難しいとされてきた量的形質等に関する研究を大きく進展させた。同時に、農業上有用な形質と連鎖するDNAマーカーを用いた新たな選抜法、すなわちMarker-Assisted Selection「マーカー選抜育種」の可能性を提供した。DNAマーカーの利点は、表Ⅲ-1-1に示したが、目的形質との密接な連鎖関係が明らかとなったマーカーを品種育成過程における選抜に用いることにより、検定期間が限定されず、効率よく選抜が実現できる。遺伝子型が、表現型によって容易に判別しにくい形質の選抜にはマーカー育種が特に有効である。また、そうした重要形質と連鎖マーカーの蓄積により、複数の形質を同じ手法によって、同時にスクリーニングできるようになる。このような利点から、マーカー育種は次世代の育種法として注目されてきた。特に、作物の中でもイネはそのDNA多型連鎖地図を基盤としたゲノム研究が進み、様々な形質のマーカー開発が開始された。

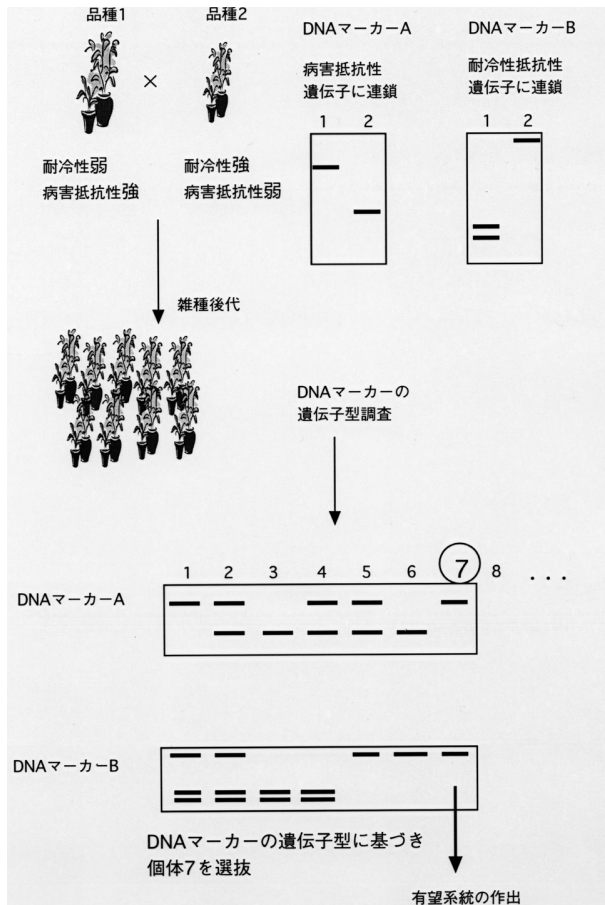
図Ⅲ-1-1には、DNAマーカーを用いた有望個体選抜のモデルを示した。両親の有用形質に關与する遺伝子に強く連鎖するDNAマーカーを同定することによって、その交配後代において有望個体をマーカーによって選抜することが可能である。それは、マーカーと連鎖する遺伝子は後代においても一緒に遺伝する確率が高いためである。これによって検定手法はそのまま、多数のマーカーを用いることにより複数の形質を選抜できることになる²⁶⁾。

一般に、品種や系統間に認められる変異(表現型の違い)の多くは、雑種後代において連続的な変異を生じる。

*上川農業試験場 078-0387 上川郡比布町

表Ⅲ-1-1 DNAマーカー育種の利点

従来育種	項目	MAS
登熟期	登熟期にならないと判定できない形質	幼苗時期に判定
交配自殖後代	優性遺伝子のホモ個体選抜	随時
植物体の育成 病原菌・害虫の飼育	病害虫抵抗性	幼苗
複数の分離世代が必要	複数遺伝子の導入	1 組合せでDNA遺伝子型を調査 不要な遺伝子を取り除くのも容易
制御された環境が必要	遺伝形質の判定	実験室で十分



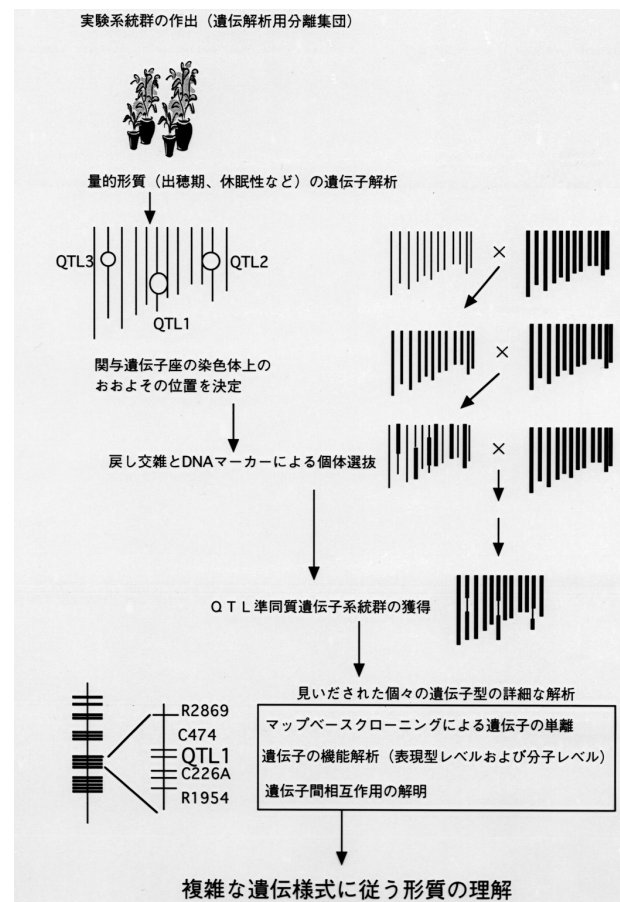
図Ⅲ-1-1 DNAマーカーによる有望個体の選抜 (矢野原図改)

このような形質は量的形質と呼ばれ、例えば、稈長、出穂期あるいは耐冷性などほとんどの作物では重要形質の多くが相当する。これに関しては、分子レベルでの解析

はもちろん従来の遺伝解析では、関与する遺伝子の個数やその存在を明確に実証することはできなかった。近年、ゲノム解析研究のDNAマーカーの蓄積によってゲノム

表Ⅲ-1-2 DNAマーカー育種への取り組み

育種目標	機関名
水稲 直播性	上川農業試験場, 北海道グリーンパイ
いもち病真性抵抗性, 耐冷性	宮城県古川農業試験場
いもち病真性抵抗性	中央農研, 北陸
いもち病圃場抵抗性	愛知県農業総合試験場
耐冷性	青森県農業試験場
食味	北海道農業研究センター
出穂性	福井県農業試験場
耐虫性 (トビイロウンカ)	生物研
多収性	作物研, 多用途研
生物研	生物研
縞葉枯病抵抗性 (陸稲由来)	近畿中四国研
陸稲 いもち病圃場抵抗性	茨城県農業総合センター



図Ⅲ-1-2 DNAマーカー利用した量的形質の遺伝解析と戻し勾配による準同質遺伝子系統の作出 (矢野原図改)

上に存在するこれらの量的形質に關与する複数の遺伝子(Quantitative trait loci: QTL)を検出し²³⁾, おおよその染色体上の位置を決定することが可能となった(図III-1-2)これにより複数の導入すべき遺伝子を望ましい品種へ同時に導入することが可能となった²⁷⁾。

また, 表III-1-2には, イネの主要形質に關してDNAマーカーを開発及び利用している研究機関を示した。近年, 「DNAマーカーによる育種」という言葉は浸透したものの, 水稻育種現場において実用化されているマーカーはまだ少ない。しかし, イネ病害抵抗性遺伝子のDNAマーカーに關しては, 抵抗性崩壊が起こりにくく安定した抵抗性を発現する実用遺伝子の識別マーカーの開発されており, 北海道農業研究センターおよび愛知県農業総合試験場の共同研究が挙げられる。これまでに, 抵抗性崩壊がみられない2つの抵抗性遺伝子: イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子*Stvb-i*および穂いもち圃場抵抗性遺伝子*Pb1*に關する解析を行い, それぞれに密接に連鎖するマーカーを見出した^{4),8),25)}。これらは実用マーカーとして愛知農総試以外, 上川農業試験場など水稻育種機関でも徐々に利用されるようになってきた。また, 平成14年には, これら両抵抗性マーカーを用いて選抜・育成された愛知SBL(愛知106号)が作出され, 品種登録出願を行っている²²⁾。

いもち病に關しては, 上記の愛知農総試の他に, 宮城県古川農試と北陸農業センターでは, 真性抵抗性遺伝子について, 陸稲を利用した圃場抵抗性については, 「嘉平」を遺伝資源とする抵抗性が茨城県農業総合センター, 「戦捷」を遺伝資源とする抵抗性については愛知農総試山間農業センターで行っている。前者は, 第4染色体, 後者は第4, 11, 12染色体に抵抗性に關与する領域が見出されている(表III-1-3)。

耐冷性に關しては, 北農研センター, 青森県農試および古川農試で実施している。遺伝資源としては, 北農研センターが中母農8 (Silewah, インドネシア品種), 11号 (Padi Labou Alumbis, マレーシア品種)および北海PL5号 (Lambayque, ペルー品種)で, 青森藤坂稲昨研究部では, インドネシア品種Pakhe Dhanであり, 古川農試はコシヒカリである。それぞれ, 耐冷性に關与する領域が見つかっている。藤坂では, 戻し交配とマーカー選抜により「ふ系175号」を4回交配した後代より, 耐冷性極強の高アミロース系統である「ふ系212号」を選抜し, 平成16年度新配付している。これまでは, 起源の異なる耐冷性遺伝子を集積することにより育種を進めてきたが, 中間母本のもつ遺伝子に対するDNAマーカーがあれば, 比較的容易に耐冷性遺伝子のピラミディング

表III-1-3 DNAマーカーが使える農業形質

農業形質	遺伝子資源	座乗染色体	効果
着粒数	ハバタキ	1	50%増
穂長		5	1cm長
一次枝梗数		6	0.8本
稈長	Kasalath	11	-2cm
縞葉枯病	陸稲関東72号	11	Stvb-I近傍
耐冷性	中母農8号	3,4	稔実率20%up 集積効果あり 稔実率10-20% up 稔実率30%up
	中母農11号	8	
	北海PL5号	4,10,11	
	Pakhe Dhna	6	
	ひとめぼれ	7	
いもち病真性	<i>Pizt</i>	6	
抵抗性遺伝子	<i>Piz</i>	6	
	<i>Pikm</i>	11	
	<i>Pita2</i>	12	
	<i>Pii</i>	9	遺伝子工学科
圃場抵抗性	戦捷	4,11,12	QTLにより 効果に差
	嘉平	4	
	ST-No1	11	優性遺伝子
トビイロウンカ	<i>O.minuta</i>	12	
	<i>O.officinalia</i>	3	<i>bph11(t)</i> ~関東IL2号
	<i>O.australiensis</i>		<i>Bph10(t)</i> 早生化, 和系154号~関東
出穂性	Kasalath	6	IL1号

化が可能となるであろう。

また, 耐虫性に關しては, 作物研究所, 九州沖縄農業研究センターにおいて西日本の主力品種である「ヒノヒカリ」に野生稲*Oryza officinalis*の抵抗性遺伝子*Bph11(t)*を導入した「関東IL2号」を育成した。収量性に關しては, インド型品種「ハバタキ」の持つ着粒数や穂長一次枝梗数, 「Kasalath」のもつ稈長について關与する領域が見出されている。

出穂性に關しては「Kasalath×日本晴」の集団を材料に複数の關与遺伝子のマッピングを行い, 少なくとも11個の遺伝子座が關与することが明らかになっている^{18),28)}。さらに戻し交配交配することによってその遺伝子座周辺のみ置換した系統(準同質遺伝子系統)を作出し, 正確なマッピングや遺伝子の機能やその作用力を検討した結果, それらの遺伝子は, 単独で働くとは限らず, 複数の遺伝子が相互作用を及ぼしあって発現している場合が多かった。また, 他のQTLの発現を制御する調節因子であることが分かっている²⁹⁾。コシヒカリのKasalath

の第 6 染色体断片を導入した和系154号～関東IL 1 号が作出された。この系統は出穂日が10日程度早くなり、玄米重は地域によっては減少した。また、耐冷性がやや弱くなり、食味はコシヒカリにやや劣ったため、熟期を変更したことにより多面的に変異が見られ、この領域を直接利用するのは難しく、今後戦略を考慮する必要があると思われる。

なお、上川農試が行っている直播性に関するDNAマーカーについては 2 章において触れる

以下に平成15年度中央農試農産工学部で開発されたいもち病真性抵抗性遺伝子Piiに関するDNAマーカー開発²⁰⁾および品種「Modan」のもつイネ縞葉枯病抵抗性マーカーと愛知総農試と北農研センターにおける穂いもち圃場抵抗性マーカー開発の実際について記する。

(1) いもち病真性抵抗性遺伝子Piiに関するDNAマーカー開発

現在、北海道では、いもち病圃場抵抗性は、真性抵抗性遺伝子別に判定している。北海道同品種が持つ真性抵抗性遺伝子は、*Pia*、*Pii*、*Pik*であり、1990年代以降*Pii*を侵すレースが主体となり、そのレースが優占する水田とそうでない水田では、圃場抵抗性の評価が大きく異なる事例が見られた。そのため、品種・系統が*Pii*を保有するか否かは早期に判別しなければならない。

イネいもち病抵抗性遺伝子Piiは、¹⁴⁾が報告しているように、第 6 染色体に座乗する*Piz*とは連鎖関係がなく、またRGN vol.12(1995)では、座乗染色体の記載がされていない。Inukaiらは、*Pi3(t)*と*Pii*が連鎖していること¹²⁾、さらに、第 9 染色体に座乗する*Pi5(t)*と*Pi3(t)*が連鎖していることを報告している¹³⁾。

そこで、公開されたばかりのイネゲノム塩基配列データを活用することにより、*Pii*遺伝子の座乗染色体を決定し、さらにその位置の絞り込みを試みた。また、*Pii*遺伝子と密接に連鎖したDNAマーカーを作出したので報告する。

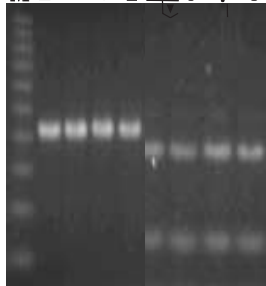
材料：北海道および本州品種・系統131種類を温室にて育成した幼苗からCTAB法によりDNAを抽出した。

方法：①RAPDプライマーによるPCR産物。②塩基配列の決定。③Web上に公開された情報による相同性検索と遺伝子座の決定。④相同性のあるクローンの情報を基にしたプライマーの設計とその近傍のクローンのSSR探索。⑤品種間のSSR近傍領域の比較。

結果：梶ら(2001)は、*Pii*遺伝子と5.9cMで連鎖しているRAPDマーカーを報告している。そこで、梶らの報告にしたがってプライマーCA05を用いて、*Pii*を持つ「石狩白毛」、「藤坂 5 号」および「ほしのゆめ」を鋳型

にPCRを行い1.6kbの特異増幅断片を得た。増幅産物1,660bpの全塩基配列を決定し、DBDJによる相同性検索を行ったところ、第 9 染色体のBACクローンAP005811の配列に98.3%の相同性でヒットした。この相同領域近傍の塩基配列情報をもとにCAPSマーカーを作製した。すなわち、プライマーCA05H-04とCA05H-05で増幅したPCR産物を制限酵素Pvu IIで処理したところ*Pii*を持つ品種でのみ断片が消化された。図Ⅲ-1-3には、各抵抗性遺伝子をもつ品種のCAPSマーカーによる判別を示した。

M 1 2 3 4 5 6 7 8



- 1: 日本晴(+)
- 2: はくちょうもち(*Pia*)
- 3: ヒメノモチ(*Pik*)
- 4: あやひめ(*Pia, k*)
- 5: 石狩白毛(*Pii*)
- 6: つがるロマン(*Pia, i*)
- 7: きらら397(*Pii, k*)
- 8: ほしのゆめ(*Pia, i, k*)

図Ⅲ-1-3 CAPSマーカーによる各品種の遺伝子型

さらに、北海道および本州品種・系統131種類を用いてCAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)分析を行った。その結果、*Pii*を持つ品種と持たない品種が完全に区別することができ、DNAマーカーによる遺伝子の有無の判別が可能となった(表Ⅲ-1-4)。

表Ⅲ-1-4 抵抗性遺伝子別のCAPS分析

真性抵抗性遺伝子型	供試した品種および系統数	CAPSマーカー* 05+04 Pvu II
+	8	0
<i>Pia</i>	26	0
<i>Pik</i>	10	0
<i>Pia, k</i>	20	0
<i>Pii</i>	20	20
<i>Pia, i</i>	23	23
<i>Pii, k</i>	3	3
<i>Pia, i, k</i>	21	21

* 数字は増幅断片がPvuIIで消化されたもの

AP005811近傍のBACクローンの配列からSSRを検索し、それを挟み込むようにプライマーを設計し、*Pii*を持つ品種と持たない品種間の多型を調査した。その結果、*Pii*遺伝子の領域は、第 9 染色体の26.7～34.4cM、約1,800 kbに絞り込むことができた。

このようにイネゲノム情報を有効に活用することによって目的とする形質の染色体上の座乗位置が、短期間に決

定することができた。全染色体を網羅するイネゲノム塩基配列データは、育種現場とゲノム研究を有機的に連結し、品種改良の新たなツールとなることが期待される。また、DNAマーカーの一つであるCAPSマーカーの優点として以下のことが挙げられる。

- (1) DNA精製度の影響が少ないため、簡易抽出法によるDNAでも使用できる。
- (2) 再現性が高い。
- (3) ホモ型とヘテロ型との区別が可能である。

平成15年研究参考事項「穂いもち圃場抵抗性検定のための遺伝子型別基準品種の選定」(中央農試)による穂いもち圃場抵抗性検定では、*Pii*および*Pik*の保有によって4つにグルーピングして基準品種を選定している。*Pik*遺伝子に連鎖しているマーカーについては、やや精度に欠けるものの、岩手県農業技術センターで開発されている。

また、*Pik-m*、*Piz-t*、*Pib*および*Pita-2*に関しては、宮城県古川農業試験場でCAPSマーカーが開発されている。Fjellstromら³⁾は、*Pik-s*および*Pik-m*についてマイクロサテライトマーカーであるRM224に0.2cMで連鎖していることを、また、林と芦川¹¹⁾は、RFLPマーカーのR1506に密接に連鎖していることを報告している。しかし、*Pik*に関しては遺伝子識別に利用可能なマーカーはまだ報告されていない。これらマーカー(*Pii*、*Pik*)を利用することにより、種子の段階でその遺伝子が推定でき、多くの育成段階の系統について圃場抵抗性の検定を効率化することができ、さらに、北海道品種・系統を用いたマルチラインの育成にも有効な手法となる。

(2) インド型品種「Modan」のもつ病害抵抗性マーカー

① イネ縞葉枯病抵抗性マーカー

北海道においては最近ほとんど発生は見られないが、本州においては1960年代に大発生したイネ縞葉枯病は、イネ縞葉枯ウイルス(RSV)によるウイルス病害のひとつである。1960年代以降、抵抗性品種の導入および継続的な抵抗性品種の作付けにより縞葉枯病の発病は抑制された状況にある。現在普及している抵抗性品種の多くに導入されている抵抗性遺伝子は、インド型イネ品種「Modan」に由来する*Stvb-i*であり、その抵抗性は、導入以後30年を経た現在も崩壊せず、安定した抵抗性を維持している。

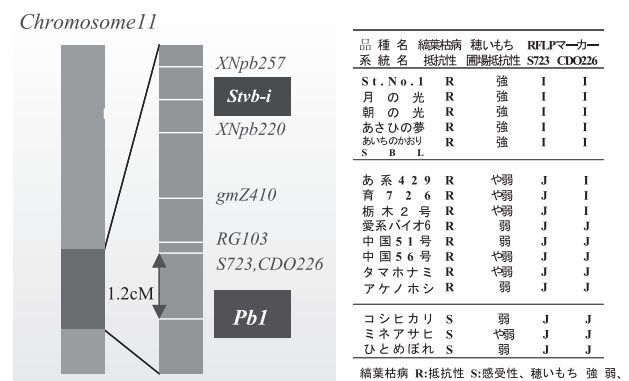
イネ縞葉枯病抵抗性マーカーST10は、この*Stvb-i*遺伝子と0.0cMで連鎖している¹⁰⁾。当初はRFLPマーカーであったが、STS化し、それぞれ20bpの長さの2種のプライマーからなるPCRマーカーに改良した⁸⁾。その後の解析によって、ST10座は抵抗性遺伝子存在領域約120

kb内に存在することが判明した⁹⁾。このため、ST10による、*Stvb-i*を有する縞葉枯病抵抗性イネ個体の選抜精度は高い。

② 穂いもち圃場抵抗性マーカー

クリーン農業を標榜する北海道においては、今後、薬剤回数の減少できるいもち病抵抗性品種開発は急務である。*Pb1*遺伝子は「Modan」に由来し、葉いもち病には罹病するが、穂いもちに対し高度な圃場抵抗性を発現する。*Pb1*は*Stvb-i*遺伝子と同じ第11染色体に座乗し、両者の遺伝距離は5.2cMとされる⁶⁾。*Pb1*を導入した水稻品種は現在までに20年以上作付けが続いているが、*Stvb-i*同様これまでのところ抵抗性崩壊は報告されず、安定した穂いもち抵抗性を保っている⁵⁾。

*Pb1*と最も近接するマーカーとして報告されているのはS723で、その遺伝距離は1.2cMある⁴⁾であるが(図Ⅲ-1-4)、選抜精度は高く、圃場における生物検定の精度に比べると穂いもち抵抗性系統の選抜には非常に有効と考えられる。また、通常1年に一度しかできない穂いもち抵抗性検定がこのマーカーを使うことにより、*Pb1*による穂いもち抵抗性導入を目的とした連続戻し交雑育種においてBCnF1個体の遺伝子型を的確に識別可能で、抵抗性育種効率を飛躍的に向上させることが可能となる。S723を含めた周辺の塩基配列をもとに、B1、B2およびB4という3つのPCRマーカーを開発し²⁵⁾、現在上川農試稲作科でも利用している。



図Ⅲ-1-4 pb1の染色体上座乗位置と密接に連鎖するRFLPマーカー (藤井原図)

愛知農総試では両マーカーの利用による育種選抜が続けられ、両マーカーを利用することによりコシヒカリに*Stvb-i*と*Pb1*を導入した水稻新品種「コシヒカリ愛知SBL」を作出し²²⁾、2002年に種苗法に基づく品種登録出願を行った。

愛知農総試ではマーカーの導入後、縞葉枯病の生物検定は導入以前と比較すると50分の1程度の規模に縮小し

ている。縞葉枯病の生物検定にはRSV保毒ヒメトビウソカ的大量飼育が必要で、生物検定のみならず保毒虫の維持管理にも多大な労力と神経の集中を必要としたが、その飼育規模も大幅に縮小された。このように、マーカーという革新技術の導入によって、水稻病害抵抗性育種システムが根本的に革新されたといえるであろう。

両マーカーは、愛知農総試の他、上川農業試験場をはじめとする複数の機関で既に選抜に利用されているが、*Stvb-i*や*PbI*による抵抗性が崩壊した報告はないが、抵抗性を打破する病原体の変異を否定できないため、マーカー選抜にのみ依存することは危険であると思われるため、これら遺伝子の活用には、細心の注意が必要である。

抵抗性育種の過程で、*PbI*遺伝子の有無の識別にDNAマーカーを用いるメリットとしては、上記の他に、①ほ場検定では困難な、出穂前の戻し交雑個体の*PbI*の有無を識別可能で、交配前に抵抗性個体の選定が完了し、戻し交雑が効率化される。②DNA操作を習得することで、誰でも*PbI*遺伝子の正確な検定が可能となる。③遺伝子組換え作物ではないので作出された品種のPublic Acceptance (PA)が容易である。

2) 食味形質に関するDNAマーカー

現在、水稻良食味品種を育成するために、一般に育種現場で用いられている食味検定には、官能検査法があり、炊飯米の外観、味、粘り、硬さおよび総合評価で判定されている。この方法は、食味を総合的に評価する最も基準的な方法であり、項目別に評価が得られるという利点もあるが、多くのサンプル量とパネラー、試験時間を必要とする問題もある。一方、物理的な測定値(テクスチュログラム特性値、アミログラム測定値)や化学分析値(タンパク質含有率、アミロース含有率等)と食味官能試験との関係、各種の食味関連測定装置(味度メーターなど)など多くの研究結果が報告されている^{19),21)}。しかし、複雑な要因がからむ炊飯米の食味を完全に推定するにはいたっていない。

近年、DNAマーカーを用いた選抜が実用化されつつあるが、食味の優れた系統を効率的に選抜するマーカーが作出されれば、育種期間の短縮、労働力および圃場面積の縮減のみならず、良食味系統の確実な選抜が可能となる。これまでに解析された例を表Ⅲ-1-5に示した。その手法は、アミロース含有率、コンシステンシー、アルカリ崩壊度が、主体であり、

また、デンプン合成に係わるWx遺伝子~granula-bo und starch synthase(GBSS)(Wx^a > Wx^b ~ 1塩基置換による活性の差)について研究例があるが¹⁷⁾、これは、

寒冷地の北海道米の食味向上には今後考慮していかなければならない。すなわち、米の食味を左右する要因の一つに胚乳中のデンプンとタンパク質の量と質が関与しており、寒い気象条件においても安定的に低アミロース米を生産することが重要である。これまで北海道でアミロースを低下させるために低アミロース遺伝子、いわゆるダル*du*遺伝子を活用して品種育成をしてきた。この遺伝子を持つ品種は、従来のうるち品種よりも温度反応性が高く、これがアミロース含有率を変動させる要因であった。アミロース含量の低い品種(AGTTATA)と高い品種(AGGTATA)ではGBSSのプラサイトに一塩基多型があり、これが穀粒発育中の温度感受性に関係している²⁾。含有率の低い品種に見られる配列が温度感受性が高いので、北海道米の食味向上には、GBSSのリーダー

表Ⅲ-1-5 食味関連形質に関するDNAマーカー

組合せ：コシヒカリ×アキヒカリ (福井農試)				
形質	染色体	マーカー	相加効果	寄与率(%)
粘り	2	C370	0.5	18.0
	2	C1137	0.4	11.5
	6	R2171	0.4	9.5
	2	R1906	0.3	8.3
	2	MS-23	0.4	7.2
	2	M235	0.4	15.8
炊飯光沢	2	C1137	0.4	11.0
	6	R2171	0.3	7.1
	2	MRG4470	-1.6	19.5
アミロース含量	6	MRG1615	-1.3	8.8 Wx
	2	C1137	0.2	14.3
粘弾性	3	C721	2.8	19.2
到穂日数	6	MRG1523	4.7	28.2
	組合せ：コシヒカリ×アキヒカリ (福井農試)			
形質	染色体	マーカー	相加効果	寄与率(%)
Amylose Content	3	R1927	0.71	1.6
	4	C1110	-0.9	2.35
	5	C624	-0.92	1.9
	6	R2869	-4.4	80.7 Wx
Alkali Spreading Score	3	C25	0.2	2.3
	6	G200	1.06	69.4 alk
Gel consistency	6	R2869	-0.36	8.1
	1	C122	5.34	9.5
	2	R712	6.11	12.37
	2	G1314B	4.47	7.36
	6	L688	-7.65	15.41 Wx
	6	C556	-4.99	8.65 Wx

イントロンのプラサイトがAGGTATAを持ちアミロース含有率の低い系統を選抜することも必要であろう。今後は、アミロース合成酵素(GBSS)の活性を左右する遺

伝子にDNAマーカーを導入し、アミロースの登熟温度変動性を少なくする育種法を検討する。

また、出穂性も食味には重要であり、これに関しては前述している(Kasalathの持つQTLを利用したコシヒカリの早生化～関東IL1号, 晩生化)。

○良食味育種への取り組み

食味関連形質のDNAマーカー開発に早期から取り組んでいる福井農試育種研究グループの成果は以下の通りである(表Ⅲ-1-5)。

1)コシヒカリ／アキヒカリの倍加半数体システムを用いたQTL解析では、コシヒカリの対立遺伝子が食味官能試験における「粘り」を増加させるQTLを第2染色体の長腕末端のMS-10, C370およびC1137近傍に検出した。

2)コシヒカリの対立遺伝子が「アミロース含量」を低下させるQTLを同染色体中央のMRG4470近傍に検出している。

3)コシヒカリを遺伝的背景とするNILでは第2染色体MS-10およびC370がアキヒカリの場合食味評価値が有意に劣ることを明らかにした。

4)アキヒカリの準同質遺伝子系統および良食味品種さきひかり／日本晴の正逆交雑の近交系統を養成中である。

5)上記の材料を解析することにより今後は、コシヒカリの「粘り」「アミロース含量」に関与する遺伝子型の一と作用力が明らかとなる。それによって食味の優れた系統を効率的に選抜するDNAマーカーが選定される。

表Ⅲ-1-5には、Zefeらの試験結果を記載した。アミロース含量、アルカリ崩壊度、ゲルコンシステンシーQTLが検出されたが、Wx遺伝子座の近傍に大きな作用力が見出されている。他論文^{1),24),31)}でも、上記のアミロース含量(AC)、アルカリ崩壊度(ASS)、ゲルコンシステンシー(GC)が主体であり、同様の位置にQTLが検出されている。また、福岡県農試では、米のアミロース含有率の量的遺伝子座(QTL)が、「あそみのり」と「IR24」の日印交雑による組換え自殖系統群を用いて染色体5の中央付近に存在することを推定した。この情報をもとに、DNAマーカー利用による新しい水稻良食味品種を育成するための効率的選抜技術を開発するため、九州大学で開発した「あそみのり」と「IR24」の染色体部分置換系統を用いて、アミロース含有率に関与するQTLの存在を明らかにし、DNAマーカーを選定中である。

さらに、「DNAマーカーによる効率的な新品種育成システム」のプロジェクトの中で食味ユニットとして作物研究所の多用途稲育種、稲育種、稲栽培整理、米品質制

御研究室および福井農試水稻育種チームがそれぞれ参画し、食味の優れた系統を効率的に選抜するマーカーの作出を目指している。その中の材料に国宝ローズ遺伝子を持つ空育162号や北海P19号が活用されようとしている。この材料は、低アミロースや低タンパク質を目指したDNAマーカー開発に利用するため、そのマーカーは北海道においてもそのまま育種現場で活用できる可能性があり、今後の開発に期待したい。

3)DNAマーカーによる農業形質の効率的選抜と今後の計画

(1) 上川農試の現状

①直播用品種の育成

北海道地域の生活の基盤を守るため、また、環境保全のためにも現状の稲作面積は維持していかなければならない。複合経営や作業集積を推進する上でも、今後の北海道稲作を担う技術の一つとして、最も省力化と低コスト化が可能となる稲作技術体系である直播栽培が必要とされる。そのためには、生産費の削減、生産量の向上、および高品質で販売ロット確保のために移植栽培も可能な直播良食味品種の育成が望まれる。現在、上育445号を育成中であるが、直播は早生種のため、知名度が劣り、大量集荷が難しく、収量、食味が劣る傾向にある。早生で上記と同様に良食味の系統育成を目指しており、現在の系統の食味は、ほしのゆめ並に向上してきたが、重要な形質である高度苗立ち性に関しては、外国稲およびそのDNAマーカーを活用している(北海道グリーンバイオ研究所と共同研究)。

○直播適性に関するDNAマーカーを利用した育種法の開発

1. 目的：直播関連形質の低温苗立ち性・発芽性のQTL解析が進展し、平成13年度にはSSRマーカーの作出(図Ⅲ-1-5)に至り、品種育成への利用がより現実的なものとなってきた。

そこで本課題では、「ほしのゆめ」に低温苗立ち性を導入した準同質遺伝子系統の育成、品種育成に有用な新配付系統への低温苗立ち性QTL導入系統の作出およびこれにより作出される準同質遺伝子系統とQTL導入系統を利用した品種育成を行うものである。

2. 方法

1)「ほしのゆめ」BC₃F₁において目的領域および背景領域のマーカー遺伝子型を確認し、そのBC₄F₂について目的領域を持つ個体を目的領域に近接する3マーカー(AC97627, AC98695, AP0615)⁷⁾でそれぞれH, H, A型(H:ヘテロ, A:「ほしのゆめ」型)を選抜し

て系統とし、各農業形質を調査した。

2) 前年夏に圃場採種した「ほしのゆめ」BC₃F₂(BC₃F₁で3マーカーがHHA型の自殖後代)を用い、水田に於いて5月23日播種の湛水直播および平均水温15℃設定の冷水掛け流しにより苗立ち性検定を行った。

3) 配付系統上育440号、新品種上育438号(以下、「大地の星」)のBC₁F₂(BC₁F₁で3マーカーがHHA型の自殖後代)をシャーレによる発芽性検定試験に供試した。

4) 「大地の星」BC₂F₂を3マーカーでHHA型を選抜し、温室で農業形質調査を行った。

5) 上育440号、「大地の星」のBC₃F₁について3マーカーでHHA型を選抜し、交配、得られたBC₄F₁の選抜を同様に行った。

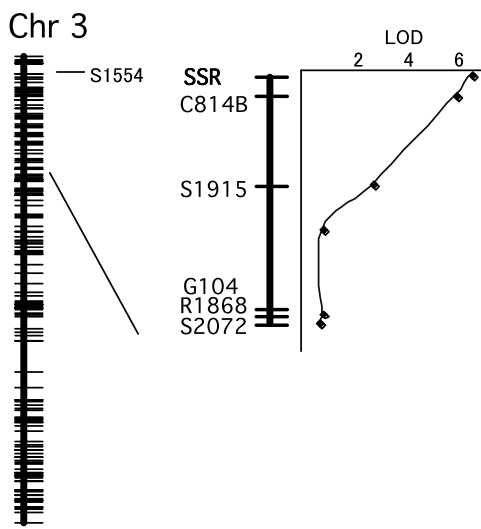


図 III-1-5 発芽に関するDNAマーカーの位置

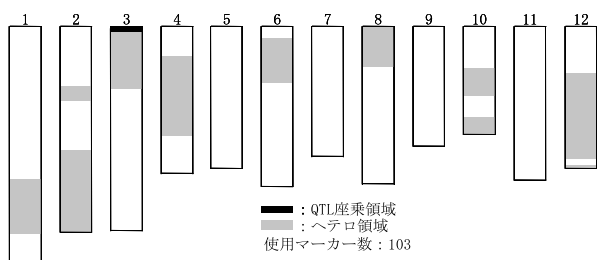


図 III-1-6 HS12(BC₃F₁)のグラフ遺伝子型

3. 結果の概要

1) SSRマーカーなどでBC₃F₁の遺伝子型を調査した結果、背景領域が十分に置換された系統は選抜できなかった(図III-1-6)。BC₄F₂の農業形質調査の結果、一部の系統に反復親と大きな差が認められた。

2) 苗立ち検定の結果、各試験4反復設定した比較品種(「ほしのゆめ」, 「Italica Livorno」および「緑育PL1」)

の発芽率の傾向が既往の評価と一致せず、検定条件が不十分であったと判断された。供試系統について、前年の発芽性の結果と対照させても、傾向は一致しなかった。

3) 上育440号、「大地の星」のBC₁F₂の発芽性検定の結果、導入形質の効果が確認された(図III-1-7)。

4) 「大地の星」BC₂F₂系統の農業形質調査の結果、出穂以外の形質は反復親との差が認められ、全DNA領域の置換が不十分であると推察された(表III-1-6)。

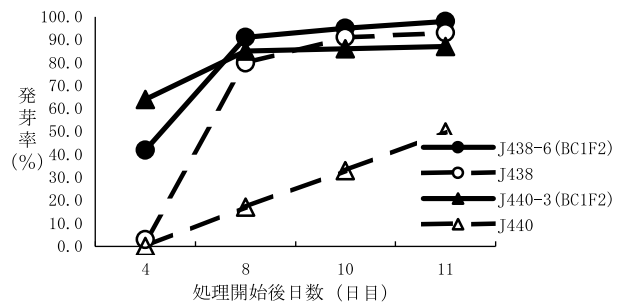


図 III-1-7 上育系統BC₁F₂のシャーレ内での発芽勢

②いもち病抵抗品種の育成

穂いもち圃場抵抗性真性遺伝子*Pb1*を保有する品種を交配し、PCRマーカーによって選抜し、生産力予備試験および葉いもち、穂いもち圃場抵抗性検定試験を行っている。平成15年度は14系統、平成16年度は、25系統供試した。系統は全てマーカーB1で*Pb1*保有しているかかはこの確認済みである。表III-1-7に平成15年度の圃場抵抗性程度を示した。14系統全て遺伝子導入元である「ほしのゆめ」のや弱より強く、「中」が5系統、「や強」が8系統で、「強」が1系統であり、遺伝子導入効果は見られた。平成16年度の結果は、病穂率が「ほしのゆめ」並みの系統は1系統あったが、他はかなり低い傾向にあった。穂いもち病における防除価が90%を越えた系統は、5系統あり、80%を越えた系統は、5系統あった。

育成した系統において*Pb1*の導入効果は認められ、今後は、検定圃場(無防除圃場)でのその系統の収量を含めた防除価を検討するとともに、反復を増やしてその効果を明確にしていかなければならない。また、悪性の随伴形質として食味を下げる因子が同時に取り込まれていないか食味試験を実施する必要がある。さらに、すでに圃場抵抗性を持つ品種系統に導入することによってこの抵抗性遺伝子がどのような効果をもつのかを見極めていきたい。IRRIからの導入材料に葉いもち病に対して高度な抵抗性を持つ系統があり、その遺伝子に対するDNAマーカーの作出、これら系統の穂いもち病に対する抵抗性、さらに組み合わせることによる両者に強い系統を作出することも考慮していく。

表Ⅲ-1-6 「大地の星」BC₂F₂の農業形質

品種・系統名	出穂期 (月・日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/株)	成熟期 (月・日)	籾重 (kg/a)	粗玄米重 (kg/a)	精玄米重 (kg/a)	標準 比率	玄米 品質
J438-5-3	8.12	68.8	14.3	23.5	10.6	95.2	78.9	77.8	142	中中
J438-6-2	8.13	67.0	16.5	13.0	10.8	62.5	51.9	51.6	94	中中
上育438号	8.12	61.7	13.6	17.9	10.8	69.4	57.1	54.9	100	中上

表Ⅲ-1-7 平成15年度 穂いもち圃場抵抗性検定

試験名	系統名	平均発病指数	判定
J190	12-6-1-1-10	2.3	や強
J191	12-6-1-1-13	2.2	や強
J192	40-9-2-1-1	1.7	強
J193	40-9-2-1-14	3.2	中
J194	40-9-2-2-4	3.5	中
J195	40-9-2-2-13	3.0	中
J196	40-9-2-2-14	2.7	や強
J197	41-5-2-3-4	3.2	中
J198	41-5-2-3-6	2.7	や強
J199	41-5-2-3-8	2.8	や強
J200	41-5-2-3-14	2.2	や強
J201	49-7-2-7-1	2.5	や強
J202	49-7-2-7-10	2.2	や強
J203	49-7-2-7-14	3.0	中
	ほしのゆめ	3.7	や弱

○今後の計画

様々な解析ツールが整ったことによって、稲において目的遺伝子に極めて密接に連鎖するマーカーを開発することが可能となってきた。そこで、北海道の稲育種において重要な農業形質に関与するDNAマーカーを活用して効率的に作業を進めていくための基礎および適用試験を行う。

目的形質：

1.いもち病：穂いもち圃場抵抗性真性遺伝子*Pb1*を保有する品種を交配し、PCRマーカーによって選抜し、育種効率を図る。

2.耐冷性：異なる遺伝資源を材料にPCRマーカーを活用し、遺伝子集積の可能性を検討する。

3.食味関連形質：粘り、アミロース含有率等に関するDNAマーカー活用の可能性を検討する。

材料：「月の光」の交配後代(穂いもち)、耐冷性解析系統、良食味系統交配後代等

解析：

1.月の光由来のいもち病真性圃場抵抗性遺伝子*Pb1*の選抜

- この形質については、生産力予備試験レベルの系統が育成されている。

- マーカーによって*Pb1*領域を保有するか調査する。

- 上記系統の穂いもち圃場検定を行い、マーカーによる選抜の有効性を検討する。

- 有望系統のバッククロスおよび選抜、さらにSSRマーカーによる背景領域の調査する。

2.各種耐冷性母本に関わるQTL領域のPCRベースマーカー利用

- 初雫、中母農8、11号のもつ耐冷性領域が明らかになっている。

- 中母農8、11号の交配後代は、養成中。

- 上記材料を系統にして、SSRマーカーで遺伝子型を調査し、耐冷性を検定する。

- 上記によってマーカー選抜の有効性を検討する。

3.良食味関連形質(粘り等、北陸農試でコシヒカリに関するSSRマーカー開発)

- 北海道良食味品種、系統で利用可能か検討する。

- アミロース含有率、炊飯光沢、粘弾性に関するマーカーも同様に調査する。

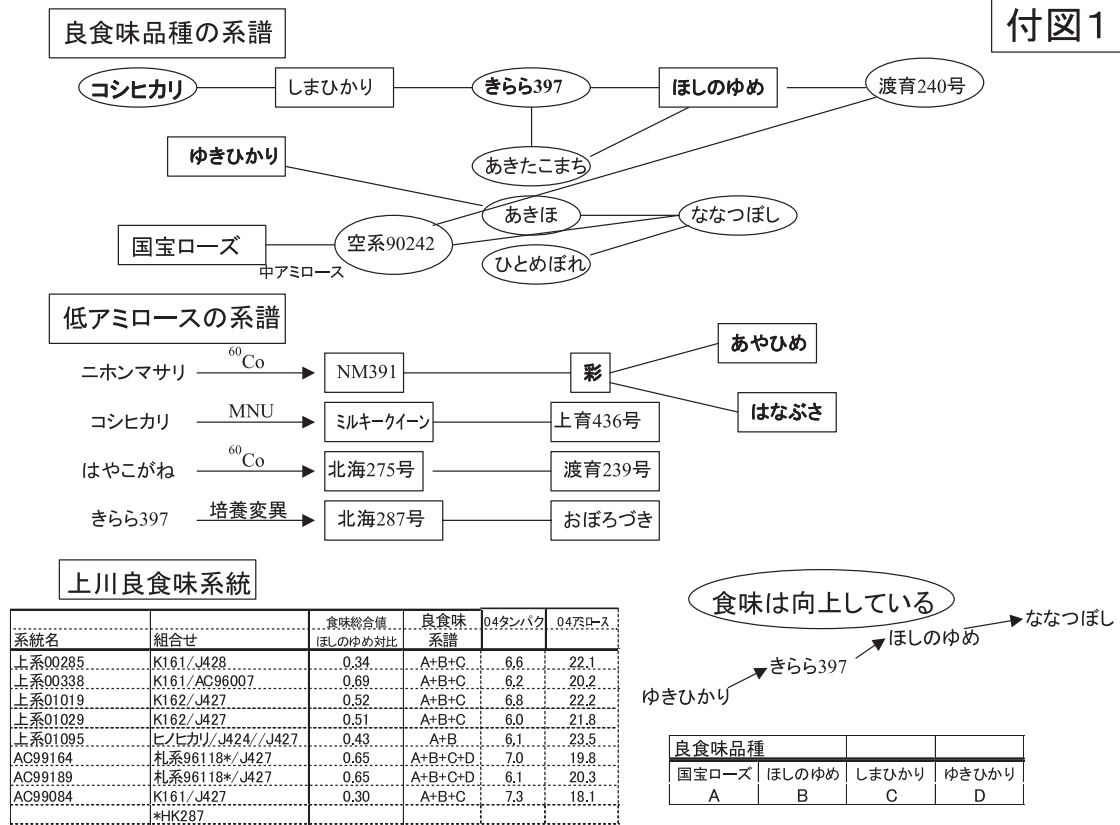
- 前述の試験で低アミロース、低タンパクのQTLを見出しつつあるのでその情報を活用する。

選抜後代の形質を評価し、遺伝的背景の調査することによって、有望系統の育成していく。その育種選抜作業の中で、DNAマーカー活用の可能性を検討する。

おわりに

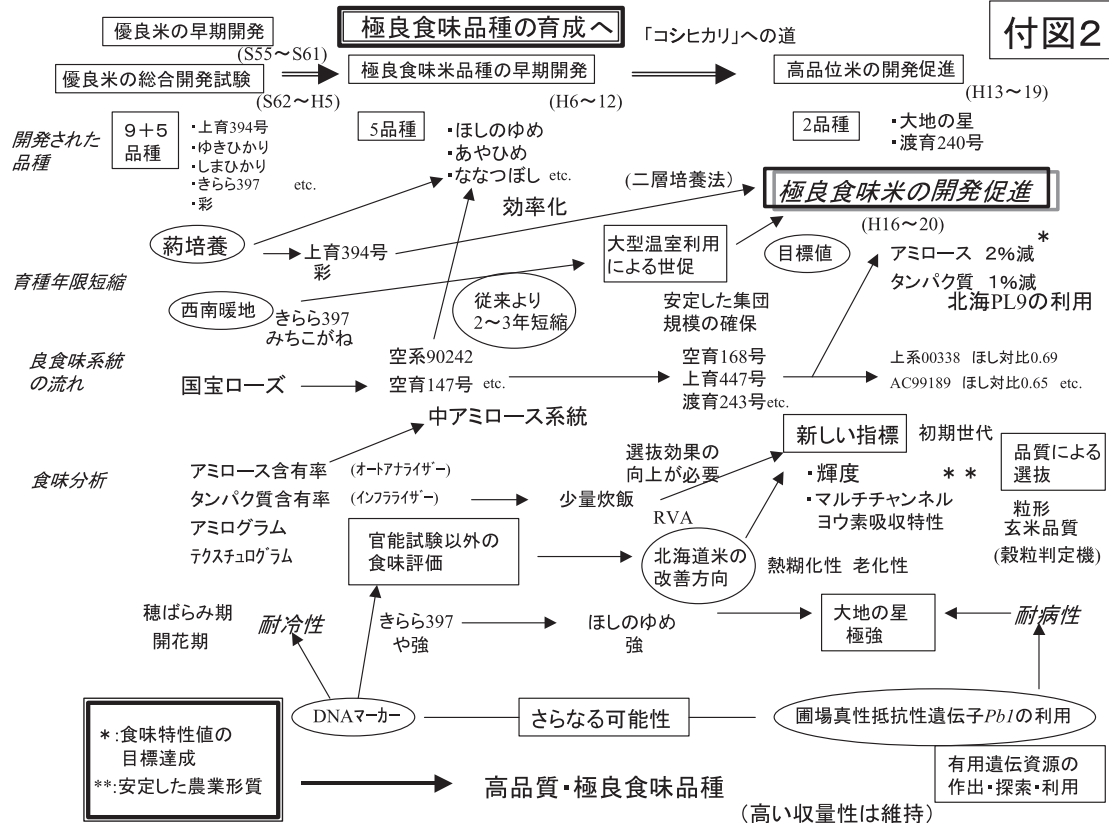
北海道産米のイメージアップに貢献した「きらら397」、良食味品種「ほしのゆめ」、さらに良食味品種「ななつぼし」に続く本州産米に匹敵する極良食味品種育成を進めていくためには、これまでの育種の積み重ね(付図Ⅲ-1-1参照)と新しい戦略(理化学分析、DNAマーカー等)が必要である。また、確固たる北海道産米の地位を築くためには、安定した良食味高品質米を毎年生産しなければならない。そのためには多収性を維持しながら高度耐冷性を持つ「コシヒカリ」並みの極良食味品種を開発する必要がある(育種戦略：付図Ⅲ-1-2参照)。すなわち、蒔培養や道南農業試験場大型温室を利用した世代短縮を活用しを世代短縮し、材料として「国宝ローズ」由来のいわゆる中アミロース系統や北海PL9のような低タンパク系統の利用、そして新しい食味指標を活用していかなければならない。

付図1



付図Ⅲ-1-1

付図2



付図Ⅲ-1-2

ここまで述べてきたDNAマーカーの有効性について杉浦ら²²⁾が耐病性(稲縞枯病, いもち病)について報告している。それによるとDNAマーカーを用いることにより外的要因の影響を受けることなく, 精度の高い抵抗性個体の選抜が可能となった。また, 共優性マーカーを用いることにより抵抗生ホモ個体を確実に選抜でき有望系統の早期固定につながった。作出した準同質遺伝子系統「コシヒカリ愛知SBL」は両者に対して抵抗性を有し, 他の形質はコシヒカリと同等であったため, DNAマーカーを取り入れた育種法により育種年限の短縮・効率化並びに確実な抵抗性の導入が両立でき, 有効性を実証している。今後, 上川農試においても同じ遺伝子を活用して育成を進めていく予定であるが, 農薬のいらぬいもち病抵抗性を持つ系統を作出し, クリーン農業の一助になることを期待する。また, 開発された良食味マーカーは北海道の材料での有効性を積極的に検討し, 将来的には自前の開発を見据えた材料養成も必要であると考えられる。

米飯の「食味」は複合形質であり, 現時点では, 育種現場にすぐに活用できるマーカーはほとんどない。しかし, 量的形質も「収量」と同様にその構成要素に分解し, それぞれの形質に対して材料を養成することによって, それに関与する領域を同定し, マーカーを付与することは可能であろう。育成早期にそれらの形質を判定し, 選抜ができれば良食味育種は加速されると思われる。

さらに, 効率的に品種育成を行うためには, 生産者・実需者の協力のもと, 各場の育成者のみならず, 栽培・環境部門さらに遺伝資源・生物工学部門と有機的に連携して事業を進めていくことは必要不可欠である。

引用文献

- 1) Bao, J.S., Sun, M., Corke, H. "Analysis of the genetic behavior of some starch properties in indica rice (*Oryza sativa* L.), thermal properties, gel texture, swelling volume". *Theor. Appl. Genet.* **104**, 408-413(2002).
- 2) Bligh, H.F.J., Larkin, P.D., Roach, P.S., Jones, C. A., Fu, H., Park, W.D. "Use of alternate splice site on granule-bound starch synthase mRNA from low-amylose rice varieties". *Plant Molecular Biology.* **38**, 407-415(1998).
- 3) Fjellstrom, R., Conaway-Bormans, C.A., McClung, A.M., Marchetti, M.A., Shank, A.R., Park, W. D. "Development of DNA markers suitable for marker assisted selection of three Pi gene conferring resistance to multiple *Pyricularia grisea* pathotypes". *Crop Sci.* **44**, 1790-1798(2004).
- 4) Fujii, K., Hayano-Saito, Y., Saito, K., Sugiura, N., Hayashi, N., Tsuji, T., Izawa, T., Iwasaki, M. "Identification of RFLP marker tightly linked to the panicle blast resistance gene, Pbl, in rice". *Breeding Science.* **50**, 183-188(2000).
- 5) 藤井 潔, 遠山孝通, 杉浦直樹, 坂 紀邦, 井澤敏彦, 井上正勝, 朱宮昭男. "イネ縞葉枯ウイルス抵抗性の日本型イネ品種月の光と姉妹系統に見いだされた穂いもち抵抗性の性質と家系分析". *育種学研究.* **1**, 69-76(1999).
- 6) 藤井 潔, 早野由里子, 杉浦直樹, 林 長生, 坂 紀邦, 遠山孝通, 井澤敏彦, 朱宮昭男. "イネ縞葉枯病抵抗性品種が有する穂いもち抵抗性の遺伝子分析". *育種学研究.* **1**, 203-210(1999).
- 7) Fujino, K., Sekiguchi, H., Sato, T., Kiuchi, H., Nonoue, Y., Takeuchi, Y., Ando, T., Lin, S.Y., Yano, M. "Mapping of quantitative trait loci controlling low-temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.)". *Theor. Appl. Genet.* **108**, 794-799(2004).
- 8) 早野由里子, 斎藤浩二, 藤井 潔, 遠山孝通, 杉浦直樹, 辻 孝子, 井澤敏彦, 岩崎真人. "イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子 Stvb-i を検出する SCAR マーカー". *育種学研究.* **2**, 67-72(2000).
- 9) 早野由里子. "イネ縞葉枯ウイルスのゲノム構造およびイネ縞葉枯病抵抗性遺伝子に関する研究". *北海道農業研究センター研究報告.* **175**, 1-45(2002).
- 10) Hayano-Saito, Y. et al. "Localization of the rice stripe disease gene, Stvbi, by graphical genotyping and analysis with molecular markers". *Theor. Appl. Genet.* **96**, 1044-1049(1998).
- 11) 林敬子, 芦川育夫. "SNPマーカーによるイネ真性抵抗性遺伝子 Pi-z, Piz-t, Pit, Pik-m の包括的なマッピング". *育種学研究.* **6**(別1), 95(2004).
- 12) Inukai, T., Nelson, R.J., Zeiger, R.S., Sarkarung, S., Mackill, D.J., Takamura, I., Kinoshita, T. "Allelism of blast resistance genes in near-isogenic lines of rice". *Phytopathology.* **87**, 1278-1283(1994).
- 13) Inukai, T., Zeiger, R.S., Sarkarung, S., Bronson, M., Dung, L.V., Kinoshita, T., Nelson, R.J. "Development of pre-isogenic lines for rice blast-resistance by marker-aided selection from a recombinant inbred population". *Theor. Appl. Genet.* **93**, 560-567(1996).

- 14) 伊勢ら. “イネのいもち病抵抗性遺伝子の連鎖分析”. 育種学雑誌(別冊 2). 388-389(1992).
- 15) 梶 亮太, 小川紹文, 西村 実, 深浦壮一, 平林秀介, 福岡律子. “いもち病および白葉枯病抵抗性遺伝子の解析. イネ・ゲノムの効率的解析手法及び遺伝子分子地図の利用技術の開発”. 農林水産技術会議事務局研究成果. **371**, 107-110(2001).
- 16) 榑淵欽也監修. “美味しいお米, 第 2 巻 米の美味しさの化学”. 農林水産技術情報協会. 87-90(1996).
- 17) Larkin,P.D., Park,W.D. "Transcript accumulation and utilization of alternate and non-consensus splice sites in rice granule-bound starch synthase are temperature-sensitive and controlled by a single-nucleotide polymorphism". *Plant Molecular Biology*. **40**, 419-727(1999).
- 18) Lin,S.Y., Sasaki,T., Yano,M. "Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa L.* using backcross inbred lines". *Theor.Appl.Genet.* **96**, 997-1003(1998).
- 19) 大坪研一. “米の品質評価”. 農業機械学会誌. **57**, 93-98(1995).
- 20) 佐藤 毅, 竹内 徹. “イネゲノム塩基配列データを利用したイネいもち病抵抗性遺伝子Piiの座乗染色体の決定”. 育種学研究. 5(別 1), 108(2003).
- 21) 佐藤弘一, 斉藤真一, 平 俊雄. “味度メーターおよびラピッド・ビスコ・アナライザーを利用した水稲良食味系統選抜”. 日作紀. 72(4), 390-394(2003).
- 22) 杉浦直樹ら. “水稲病害抵抗性付与のための連続戻し交雑育種におけるDNAマーカーの有効性の実証”. 育種学研究. **6**, 143-148(2004).
- 23) Tanksley,S.D. "Mapping polygenes". *Annu.rev. Genet.* **27**, 205-233(1993).
- 24) Tan,T.F., Li,J.X., Yu,S.B., Xing,Y.Z., Xu,C.G., Zhang,Qifa. "The three important traits for cooking and eating quality of rice grains are controlling by a single locus in an elite hybrid, Shanyou 63". *Theor.Appl.Genet.* **99**, 642-648 (1999).
- 25) 遠山孝通, 早野由里子, 杉浦直樹, 藤井 潔, 岩崎真人, 井澤敏彦, 中前 均. “水稲穂いもち抵抗性遺伝子Pb 1(t)と連鎖するPCRマーカーの開発”. 愛知県総農試研報. **30**, 27-34(1998).
- 26) 矢野昌裕. “作物育種の新戦略”. 農業技術. 51(9), 385-389(1996).
- 27) 矢野昌裕, 佐々木卓治. “イネのゲノム生物学の幕開け”. 化学と生物. **36**, 639-645(1998).
- 28) Yano,M., Harushima,Y., Nagamura,Y., Kurata, N., Minobe,Y., Sasaki,T. "Identification of quantitative trait loci controlling heading date in rice using a high-density linkage map". *Theor.Appl.Genet.* **95**. 1025-1032(1997).
- 29) Yano,M., Kojima,S., Takahashi,Y., Lin,H., Sasaki,T. "Hd1,a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene CONSTANS". *Plant Cell*. **12**, 2473-2483(2000).
- 30) Zefu,Li., Wan,J., Xia,J., Yano,M. "Mapping of quantitative trait loci controlling physico-chemical properties of rice(*Oryza sativa L.*)". *Breeding Science*. **53**, 209-215(2003).
- 31) Zhou,P.H., Tan,Y.H., He,Y.Q., Xu,C.G., Zhang, Q. "Simultaneous improvement for four quality traits of Zhenshan 97, an elite parent of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection". *Theor.Appl.Genet.* **106**, 326-331(2002).