農研機構
NARO 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

Coding strategy of rice stripe virus and genetic analysis of rice stripe resistanc

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 早野, 由里子 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001302

北海道農研研報
175，１－45（2002）

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

早野由里子*

目　　次

Ⅰ．緒　言
Ⅱ．研究史
　１．イネ縞葉枯ウイルスに関する研究
　２．イネ縞葉枯病抵抗性に関する研究
Ⅲ．イネ縞葉枯ウイルスゲノムの構造
　１．ウイルスタンパク質の一次構造の決定
　　１）方　法
　　２）結果および考察
　２．ウイルスゲノムのコーディング様式の解明
　　１）方　法
　　２）結果および考察
　３．イネ縞葉枯ウイルスゲノムの構造に関する総合考察
Ⅳ．イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子の解析
　１．グラフィカルジェノタイプによる座乗領域の推定
　　１）材　料
　　２）方　法
　　３）結果および考察
　２．RFLP マーカーの探索と開発
　　１）材　料
　　２）方　法
　　３）結果および考察
　３．*Stvb-i* 遺伝子座の特定
　　１）材　料
　　２）方　法
　　３）結果および考察
　４．*Stvb-i* 遺伝子座領域における物理地図の作製
　　１）材料および方法
　　２）結果および考察
　５．*Stvb-i* 遺伝子座領域の限定
　　１）材　料
　　２）方　法
　　３）結果および考察
　６．DNA マーカーによるイネ縞葉枯病抵抗性個体の選抜
　　１）材　料
　　２）方　法
　　３）結果および考察
　７．イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子に関する総合考察
　　１）材　料
　　２）方　法
　　３）結果および考察
Ⅴ．イネ縞葉枯病抵抗性に関する総合考察
Ⅵ．摘　要
　謝　辞
　引用文献
　Summary

平成12年11月29日原稿受理
＊生産環境部ウイルス病研究室

Ⅰ．緒　言

イネ縞葉枯病はイネ縞葉枯ウイルス（rice stripe virus，RSV）によって引き起こされるイネの重要なウイルス病害の一つである。このウイルス病は1960年代および1980年代にわが国の稲作に甚大な被害をもたらした。縞葉枯病は，病原ウイルスを体内にもつ保毒ヒメトビウンカによってイネに媒介され，発病する。機械的接種によって感染することはないが，保毒雌虫においてRSVは約90～95%という高率で次世代に経卵伝染する。その防除は，ウイルスに直接作用する有効な薬剤がないため，殺虫剤の施用といったウイルス感染の鎖を断ち切るような間接的方法と抵抗性品種の利用に依存してきた。最近では，抵抗性品種の作付面積の拡大によって保毒ヒメトビウンカの数が年々減少し，本病害による稲作への被害は減少した。しかしながら，現在もRSVに対する有効な薬剤がないため，地域によっては大発生し，甚大な被害をもたらすことも多く，抵抗性品種の必要性は高い。

1960年代のイネ縞葉枯病の大発生以来，多くの縞葉枯病抵抗性水稲品種が作出され，利用されてきた。その多くはインド型イネ「Modan」を抵抗性遺伝子源としているが，これまでにいもち病の真性抵抗性で知られるような抵抗性の崩壊現象は報告されていない。抵抗性崩壊の不安は残るものの，現在においても「Modan」に由来する抵抗性品種が育成・栽培され続けている。縞葉枯病と同様に，多くの作物においても病虫害抵抗性は早くから育種分野で利用されてきた。しかし，抵抗性を担う遺伝子そのものや抵抗性のメカニズムについて明らかになっているものは少ない。従来行われてきた植物の遺伝子連鎖分析には材料養成のために長い期間と労力が必要とされる。加えて，検定技術や形質評価法が複雑であるものが多かったためである。「Modan」に由来する縞葉枯病抵抗性に関しても，遺伝子は利用されていても遺伝子そのものに関する研究はほとんどない。

イネ縞葉枯病がウイルス病であると判明して以後，縞葉枯病の発生生態や抵抗性品種の育成などは急速に進んだ。一方で，病原ウイルスであるRSVそのものに関する研究はなかなか進まなかった。1980年代に入り，長い糸状の粒子形態が明らかにされ，近縁のmaize stripe virusやrice grassy stunt virusなどとともに，新たな植物ウイルス群として国際的にも認められるようになった。しかし，宿主側のイネの抵抗性遺伝子と同様に，分子生物学的な解明は十分とはいえない現状にあった。

近年，植物バイオテクノロジー技術の発達に伴い，ウイルス粒子の外被タンパク質遺伝子またはその相補RNAの利用等による，宿主植物への抵抗性の付与という新たな抵抗性育種が行われるようになった。このためには病原ウイルスのゲノム構造の解明や外被タンパク質遺伝子などの単離を行う必要があった。特に，ウイルスゲノムの構造はウイルスの進化的類縁関係を明らかにする上で重要であった。一方，宿主側についても，1980年代後半からトマトやトウモロコシなど主要作物を含む，幾つかの植物において制限酵素断片長多型（RFLP）などDNA多型による連鎖地図の作製が進められてきた。このようなDNA多型連鎖地図は分子遺伝学や植物育種分野において広範な用途があるばかりでなく，遺伝子そのものを分析するために有効な手段となるものと捉えられている。日本ではイネ・ゲノムプロジェクトにおいて，イネのDNA多型連鎖地図の作製が精力的かつ組織的に進められ，分子マーカーやDNA多型連鎖地図に基づき，様々な形質に関わる遺伝子の解析が可能になりつつある。

以上の背景を踏まえて，筆者はRSVゲノムおよびイネ縞葉枯病抵抗性遺伝子の分子生物学的研究を行った。まず，形質転換によるイネ縞葉枯病抵抗性イネ作出の基盤を構築するため，病原ウイルスであるRSVのゲノム構造の解明を農業生物資源研究所で行った。次に，宿主の抵抗性について，多くのイネ縞葉枯病抵抗性品種とイネのDNA多型連鎖地図を利用して，インド型イネ「Modan」に由来するイネ縞葉枯病抵抗性遺伝子の単離を目指し，農業生物資源研究所および北海道農業試験場（現北海道農業研究センター）で研究を進めた。本研究において，抵抗性遺伝子が座乗する染色体領域の推定，密接に連鎖する分子マーカーの開発，抵抗性遺伝子の座乗位置の特定を行った。さらに，酵母人工染色体（YAC）および大腸菌人工染色体（BAC）といった巨大DNAクローンを利用し，抵抗性遺伝子の存在領域を物理地図上に限定した。また，分子マーカーによるイネ縞葉枯病抵抗性個体の選抜とそれによる育種への実用化を検討した。

本研究の一部はすでに報告（Hayano ら1990，Hayano-Saito ら1998，Hayano-Saito ら2000，早野ら2000）しており，本論文はそれらを取りまとめたものである。

Ⅱ．研究史

１．イネ縞葉枯ウイルスに関する研究

イネ縞葉枯病は1900年代に大発生したことから，本病に関する研究が開始され，その後，縞葉枯病と命名された。その後，ヒメトビウンカによって媒介されるウイルス病であることが明らかになった（栗林1931）。縞葉枯病に関する研究，なかでも，媒介昆虫とイネ縞葉枯ウイルスとの関係，媒介昆虫における経卵伝染，圃場における本病の発生動態などについては急速に研究が進んだ。しかしながら，ウイルスの生理学的研究は遅々として進まなかった。奥山・明日山（1954）は RSV の純化を最初に試み，ウイルス粒子を直径30－50nm の球形粒子と推定した。斎藤ら（1964）は RSV の純化試料中に径約30nm の球状粒子を認め，これを RSV とした。また，木谷・木曽（1968）も RSV が径30 nm の球形粒子であると報告した。小金沢ら（1975）は木谷・木曽（1968）の方法で RSV の純化を試み，粒子形態は球形ではなく，枝分かれ構造をもつ糸状粒子であると結論した。Toriyama（1982）は RSV の粒子形態を枝分かれ粒子というよりは糸状粒子であるとし，これまでに観察された枝分かれ状の形態は，粒子構造の部分的崩壊によるものでないかと推察した。さらに，この糸状粒子は３nm 幅の糸状粒子がコイル状に巻いて長い８nm 幅粒子をなしていると考えた。現在，RSV 粒子は，幅約３－８nm の長さ約500－2000nm の糸状とされている。なお，電子顕微鏡による観察では，糸状あるいは糸の両端が結合して環状になった構造体が何種類か混ざり合っているように見えると報告されている（Ishikawa ら 1989a，Toriyama 1986a）。RSV は特異な糸状の粒子構造から，maize stripe virus（MSpV，Gingery ら1981），rice grassy stunt virus（RGSV，Hibino ら1985），rice hoja blanca virus（RHBV，Morales・Niessen 1983）とともに，1983年にテヌイウイルス属に分類されるようになった（Gingery 1988，Franki ら1991）。

RSV のゲノムについては，当初，少なくとも４分節の一本鎖 RNA（ssRNA）からなると考えられていた（Toriyama 1982）。Toriyama（1986b）は，RSV 粒子に RNA 依存 RNA ポリメラーゼが存在していることをつきとめ，RSV は－鎖の RNA ウイルスであると推察した。その後，SDS およびフェノールを用いて精製 RSV 粒子からゲノム RNA の抽出を行い，アガロースゲル電気泳動では ssRNA とともに，ssRNA の長さに相当する二本鎖 RNA（dsRNA）も検出した（Toriyama・Watanabe 1989，Ishikawa ら1989b）。この際，石川らは，MSpV（Falk・Tsai 1984）と同様に，RSV においてもウイルス粒子内に＋鎖と－鎖の ssRNA が含まれていると推察した。しかし，ウイルス粒子に含まれる ssRNA の＋鎖と－鎖は等量ではなかったため，RSV のゲノム RNA が＋鎖であるか－鎖であるかの結論は得られなかった。

精製 RSV 粒子の外被タンパク質は１種類で，その分子量は32,000Da と報告されている（Koganezawa 1977，Toriyama 1982）。ゲノム RNA と外被タンパク質の結合が強固で，外被タンパク質のみ分離することが難しく，分子量の他には，酸性アミノ酸の割合が高いことが明らかになっている（鳥山 1985）にすぎなかった。

他に RSV が関係するタンパク質として，Kiso・Yamamoto（1973）は，イネ縞葉枯病感染葉に高濃度に蓄積する特異なタンパク質（感染特異タンパク質）を発見・精製した。このタンパク質は試験管内で針状結晶したことから，イネ縞葉枯病に感染した葉細胞中に観察される結晶状の封入体に相当すると思われた。さらに，RSV 感染に伴って，特異タンパク質の生成量には品種間差がみられ，縞葉枯病感受性品種では多く，抵抗性品種では少ないことが明らかにされた。また，RSV に感染したトウモコロシやコムギでも，イネと同様に特異タンパク質は生成されるが，トウモロコシでは蓄積量が極めて少ないことも明らかになっている（Toriyama 1983）。Koganezawa（1977）はこの特異タンパク質の分子量を20,000Da としたが，Toriyama（1983）は分子量のやや小さい特異タンパク質を得た。また，媒介昆虫体内においても RSV は増殖する（Toriyama 1986a）が，同様に特異タンパク質も昆虫体内で生成される（鳥山・小島 1985）。しかしながら，その生理的役割や特異タンパク質遺伝子は明らかとなっていなかった。

２．イネ縞葉枯病抵抗性に関する研究

1960年代には，縞葉枯病の大発生によって，病害防除を目的とした抵抗性品種の育成が進んだ。抵抗性品種の育成には抵抗性検定法の確立が必要であった。山口ら（1965）は早くから圃場検定を試み，日本陸稲品種や外国稲品種の大半が抵抗性を示すのに対して，日本水稲には高度抵抗性をもつ品種が存在しないと報告した。圃場検定法は実際の栽培と同じ条件で検定できるという利点はあるが，検定回数は年に１回と限られる上，検定結果が媒介昆虫の生息密度などの条件に左右されるという大きな欠点もあった。そこで，高精度で効率的な簡易検定法として幼苗検定法が開発された（桜井ら1963）。桜井ら（1964）はこの幼苗検定法によって，日本陸稲や外国稲の中に高頻度で抵抗性品種が見い出されることを示した。直ちに，幼苗検定法を活用し，抵抗性品種の育成を目指す研究が中国農業試験場で始められた。この時の研究は，のちに抵抗性の中間母本として有名になった「St. No. 1」，「中国31号」（鳥山ら1966，鷲尾ら1968b）を生み，その後の抵抗性品種の育成のみならず，現在の抵抗性遺伝子研究の基盤ともなった。鷲尾ら（1967，1968a，b，c）は数多くの品種の幼苗検定を行い，交配母本に適した素材の検索を進めると同時に，育種の基礎資料として抵抗性の遺伝様式についての解析も行った。日本陸稲品種では抵抗性と感受性の差が明確であるのに対し，外国稲品種の抵抗性は抵抗性から感受性に近いものまで多様な抵抗性反応を示した。陸稲品種の抵抗性は２対の優性補足遺伝子（*St1*と *St2*，後に *Stva* と *Stvb*）によって支配されていると推定した。また，外国稲品種「Zenith」の抵抗性についても日本陸稲と同じように２対の優性補足遺伝子に支配されているとした。さらに，鷲尾ら（1968b）は，外国稲４品種「Surjumkhi」，「Charnack」，「ロシア No.35」，「Ketan-Nangka」の抵抗性は劣性に近い不完全優性遺伝子 $St2^{i}$（後に *Stvb-i*）によって支配され，$St2^{i}$ は *St2*と複対立関係にあるとした。鷲尾ら（1968b）は，⑴縞葉枯病抵抗性遺伝子の基本遺伝子は *Stvb*（*St2*）遺伝子座にあり，作用力の異なる多くの複対立遺伝子群をなす，⑵外国稲の抵抗性品種には強度の異なるさまざまな抵抗性反応が認められる，⑶日本陸稲の *Stvb* は作用力が弱く，強調遺伝子 *Stva* と共存して完全優性の抵抗性を示す，と結論づけた。さらに，*Stva* 座は第６染色体に座乗することを示し，*Stvb-i* 座については第12染色体（現在の第８染色体）に座乗する可能性を示唆した。縞葉枯病抵抗性の遺伝解析については，1960年代に抵抗性品種の育成と平行して精力的に進められたが，その後，目立った研究の進展はない。

一方，ウイルスー宿主間の作用機作については，他の作物のウイルス病に比べて，不明な点が多く，これまでに２，３の報告がある。鷲尾ら（1968b）は，*Stvb* 複対立遺伝子群はウイルスに対する何らかの抗ウイルス性物質の生産に関与する遺伝子であり，*Stva* 遺伝子は *Stvb* 遺伝子群が関与する抗ウイルス性物質の生産を高める作用をする強調遺伝子であろうと推論した。孫工ら（1973）は血清反応を用いて，感受性品種ではウイルス濃度は高く，抵抗性品種で低いことを示した。これに対して，野田ら（1991）は *Stvb-i* 遺伝子をもつ抵抗性品種３品種と感受性品種「日本晴」の発病株におけるウイルス濃度を ELISA 法で測定し，抵抗性・感受性品種間差が認められなかったこと，また，罹病株からの無毒ヒメトビウンカによる RSV 獲得率についても，「むさしこがね」（抵抗性）と「日本晴」（感受性）間では差がないと報告した。すなわち，*Stvb-i* 遺伝子の抵抗性はウイルス感染に対するものであり，一旦感染が成立したイネでは，抵抗性品種でも RSV に全身感染し，感受性品種と同程度に増殖すると述べている。また，石川ら（1987）は RSV 抗体による ELISA 法を用いた抵抗性検定法の改良を行った。その際，RSV 感染の「むさしこがね」においては初期のウイルス検出時期がやや遅れたが，接種後７－10日では感受性品種と同様に検出が可能であった。さらに，Nemoto ら（1994）は，「ミナミハタモチ」（*Stva*，*Stvb*）や「むさしこがね」（*Stvb-i*）はウイルスの感染に対し強い抵抗性を有するが，媒介昆虫に対しては耐性を持たないと報告した。

以上のように，わが国で利用されているイネ縞葉枯病抵抗性遺伝子は *Stvb-i* 遺伝子であるが，筆者が研究を開始する時点では，その染色体上の所在や産物の機能については推論の域を出ない状況にあった。

Ⅲ．イネ縞葉枯ウイルスゲノムの構造

イネ縞葉枯病ウイルス（RSV）のゲノムは４種の一本鎖 RNA（ssRNA）からなると考えられ，ウイルス粒子内に＋鎖と－鎖の ssRNA を含むことが明らかになったが，そのコーディング様式については不明であった。RSV 外被タンパク質遺伝子の導入による水稲への RSV 抵抗性の賦与を目指し，外被タンパク質遺伝子の単離への第１歩として，ウイルスのタンパク質のアミノ酸配列を利用して，RSV のコーディング様式の解明を試みた。

１．ウイルスタンパク質の一次構造の決定

ＲＳＶに感染した植物組織においては２つの主要なタンパク質である外被タンパク質（分子量32,000）と感染特異タンパク質（分子量20,000）が生産されている。これら２つの主要タンパク質を精製し，その部分アミノ酸配列の解析を行った。

１）方法

⑴　外被タンパク質の精製

RSV 粒子（石川氏より分譲，10mg/ml）を等量の蒸留水に懸濁し，さらに，２倍容量の酢酸を添加し，よく撹拌した。氷上に15～60分静置した後，遠心（15,000rpm，20分）し，上清を得た。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE，10%ゲル，Laemmli ら1970）を行った後，ブロモフェノールブルー（BPB）染色し，外被タンパク質画分を切り出した。ゲルを蒸留水に浸し，４℃で一晩静置し，得られた溶液を精製外被タンパク質とした。

⑵　感染特異タンパク質の精製

イネ RSV 罹病葉から Kiso ら（1973）の報告にしたがって部分精製した。さらに，外被タンパク質と同様に SDS-PAGE を行い，蒸留水で抽出したタンパク質を逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって分画し，これを精製感染特異タンパク質とした。

⑶　精製タンパク質のアミノ酸配列の決定

精製タンパク質溶液に等量の20%（w/w）トリクロロ酢酸を加え，タンパク質が変性・沈殿するまで氷上に静置した。遠心（15,000rpm，20分，４℃）によって得られた沈殿物をアセトンで数回洗浄した後，蒸留水に懸濁した。0.1N 水酸化ナトリウム溶液を添加して溶解し，30%（w/w）酢酸の添加によって，pH8.1に調整した。これにタンパク質分解酵素を添加し，37℃で完全に消化した。外被タンパク質にはトリプシンを用い，感染特異タンパク質にはトリプシンとリシルエンドペプチダーゼを用いた。分解産物は μBondasphere C18 column（3.5×150 mm，Waters 社）を用いて逆相 HPLC により分画した。溶出は0.1%（w/w）塩酸を含むアセトニトリルの直線濃度勾配（０－80%）で，流速1.0ml/min（室温）で行った。それぞれの分画を再度同条件で逆相 HPLC により分画し，精製ペプチドとした。精製ペプチドは気相プロテインシークエンサー470A（Applied Biosystems 社）を用いて，エドマン法によってアミノ酸配列を決定した。

２）結果および考察

精製した RSV 外被タンパク質の消化産物を HPLC にかけたところ，外被タンパク質では34のピークを確認した（第１図）。感染特異タンパク質ではトリプシン消化産物は24のピークが，リシルエンドペプチターゼ消化産物では20のピークが確認された（第２図）。それらのピークの示すペプチドのうち，外被タンパク質については８ペプチド，感染特異タンパク質についてはトリプシン消化による８ペプチドとリシルエンドペプチダーゼ消化による３ペプチドのアミノ酸配列を決定した（第１表）。アミノ酸配列から，ST８は SL７と同一，ST９は SL９の一部，ST17は ST16の一部であると考えられた。そして，CT22は外被タンパク質の C 末端ペプチドであると思われた。これらのペプチドの総数は，それぞれの分子量から推測される全アミノ酸残基数に対し，外被タンパク質では19%，感染特異タンパク質では48%に相当していた。

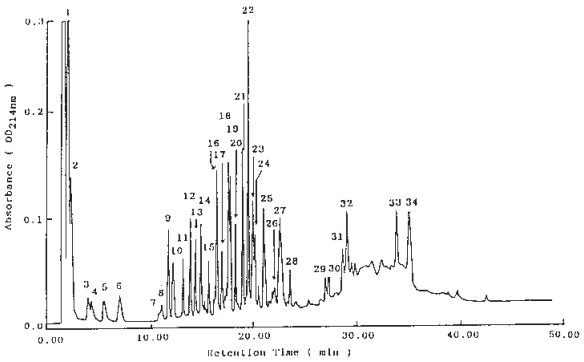
２．ウイルスゲノムのコーディング様式の解明

タンパク質のアミノ酸配列から設計したオリゴヌクレオチドをプローブとしてウイルスゲノム RNA に対してハイブリダイゼーションを行い，それぞれのタンパク質遺伝子のコーディング様式を調べた。

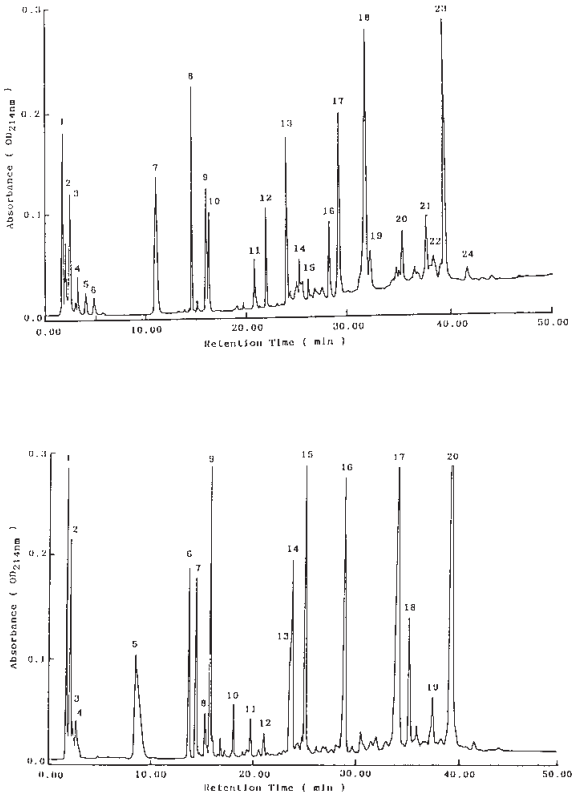
１）方法

⑴　オリゴヌクレオチドプローブの設計・合成

外被タンパク質および感染特異タンパク質の部分



第１図　RSV 外被タンパク質のトリプシン分解産物の HPLC パターン



第２図　RSV 感染特異タンパク質のトリプシン（上）およびリシルエンドペプチダーゼ（下）の分解産物の HPLC パターン

第１表　ペプチドのアミノ酸配列

タンパク質	ペプチド	アミノ配列	保持時間（分）
外被	CT 9	TMPEGK	12.0
タンパク質	CT10	QIYGVK	12.4
	CT11	VSHEVVR	13.4
	CT12	ILAENTSK	14.1
	CT13	AINDISK	14.6
	CT14	GTGFVR	15.0
	CT16	LYLAQQSK	17.0
	CT22	EFFEDEAEGADD[a)]	20.0
感染特異	ST 7	VWK	11.1
タンパク質	ST 8	AESSDTEEYEK	14.8
	ST 9	NFLR	16.0
	ST12	IAYHHPLETDTLFIK	22.0
	ST13	LLLDQIIK	24.0
	ST16	KMPTYFESIIQPLLR	28.0
	ST17	MPTYFESIIQPLLR	29.0
	ST18	TVEVHGPIVGLDYTLLYDT[b)]	32.0
	SL 6	DPERVTEDTK	13.8
	SL 7	AESSDTEEYEK	14.4
	SL 9	NFLRHPNYMHK	16.0

アミノ酸配列はシングルレターコードで示している。CTは外被タンパク質のトリプシン分解産物の，ST は感染特異タンパク質のトリプシン分解産物，SL は感染特異タンパク質のリシルエンドペプチダーゼ分解産物のペプチドを表わし，後に続く数字は，HPLC による画分（第１図および第２図参照）を示し，HPLC での保持時間を並記した。ａ）は外被タンパク質のＣ末端を，ｂ）は末尾がK（リジン）でなく，解析が未了であると考えられた。

第２表　オリゴヌクレオチドプローブの設計

peptide/probe	sequence	*Tm*(℃)
CT22	E F F E D E	42
CT(+)	5'-GAR TTY TTY GAR GAY GA-3'	
CT(-)	3'-CTY AAR AAR CTY CTR CT-5'	
NST 8	D T E E Y E K	50
NS 8 (+)	5'-GAY ACN GAR GAR TAY GAR AA-3'	
NS 8 (-)	3'-CTR TGN CTY CTY ATR CTY TT-5'	
NST12	I A Y H H P	46
NS12(+)	5'-ATH GCN TAY CAY CAY CC-3'	
NS12(-)	3'-TAD CGN ATR GTR GTR GG-5'	
NST16	K M P T Y F E	50
NS16(+)	5'-AAR ATG CCN ACN TAY TTY GA-3'	
NS16(-)	3'-TTY TAC GGN TGN ATR AAR CT-5'	

＋鎖のプローブはアミノ酸配列からコドン変異が最小となるように設計した。Ｎは４塩基に，Ｒはプリン塩基に，Ｙはピリミジン塩基に，Ｈは A，C，T に，D は A，G，T に対応する。－鎖プローブは＋鎖プローブに相補する配列とした。*Tm* 値は A/T を最も多く含む配列から次式によって算出した。

Tm＝４（G＋C）＋２（A＋T）（Itakura ら1984）

アミノ酸配列に基づき，コドン変異を最小にするようにオリゴヌクレオチドを設計した（第２表）。外被タンパク質についてはペプチドCT22のアミノ酸配列を用い，そのアミノ酸配列に対応する＋鎖をCT(+)とし，これを相補するオリゴヌクレオチドをCT(-)とした。感染特異タンパク質については，コドン変異が最小であるペプチドが３種（ST８，ST12およびST16）あったため，これらのアミノ酸配列を用いた。外被タンパク質の場合と同様に，それぞれ両方向のオリゴヌクレオチドを作製した。オリゴヌクレオチドは全自動核酸合成機（Applied Biosystems社）によって合成した。各プローブの*Tm*値は，最もA/Tを多く含んだ場合の塩基配列を基にItakuraら（1984）の式によって算出した。

⑵　フィルターの作製

RSV粒子を変性バッファー（2.4Mトリス－塩酸，２％SDS，２％２-メルカプトエタノール，10％グリセロール，0.01％BPB，pH6.8，室温）に懸濁し（Toriyama 1982），遊離したRNAを1.0％（w/v）アガロースゲル（１×TBEバッファー，0.1％SDS）で電気泳動した後，エチジウムブロマイド（EtBr，0.5μg/ml）染色し，ポラロイド撮影した。ゲルを0.1N水酸化ナトリウム溶液に浸漬し（20分，室温），５×TBEバッファー（20分，２回）および１×TBEバッファー（20分，１回）で洗浄し，セミドライブロッティングシステム（日本エイドー社）を用いて，ナイロンメンブランに転写した（200mA/5×10cm^2）。これをRSVのssRNAフィルターとした。また，Ishikawaら（1989b）の方法にしたがって，SDS－フェノールを用いてウイルス粒子より抽出したRNAも，アガロースゲル電気泳動した後，ナイロンメンブランに転写し，これをdsRNAフィルターとした。なお，ssRNAとdsRNAの識別は，電気泳動後のゲルをアクリジンオレンジで染色して行った。

⑶　ハイブリダイゼーション

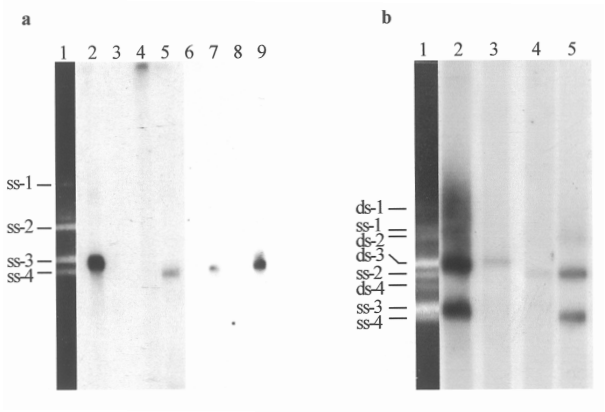
タンパク質のアミノ酸配列から推定された塩基配列から設計・合成したオリゴヌクレオチドはＴ４ポリヌクレオチドカイネースによって５’末端を^{32}Pでラベルし，これをプローブとした。ハイブリダイゼーションはラピッドハイブリダイゼーションバッファー（Amersham Pharmacia社）中で，合成オリゴヌクレオチドの塩基配列から算出された温度（*Tm*値－５）℃で２時間行った。フィルターは６×SSC（0.1％SDSおよび0.05％リン酸ピロナトリウムを含む）で洗浄（１時間および30分，各１回）後，オートラジオグラフィー（室温，一晩）によりシグナルの検出を行った。

２）結果および考察

作製したプローブ（第２表）によるRSVゲノムRNAのハイブリダイゼーションの結果を図３に示した。ssRNAフィルターを用いた場合，CT(+)プローブは第３分節RNA（RNA３）とハイブリダイズしたが，相補配列をもつCT(-)プローブはいずれのRNAにもシグナルを与えなかった（第３図a）。従って，外被タンパク質はRNA3と相補的な配列，アンチウイルスセンスにコードされていると示唆された。一方，NS(-)プローブ（NS８(-)，NS12(-)およびNS16(-)）はいずれも第４分節RNA（RNA４）にハイブリダイズしたが，その相補配列のプローブ（NS(+)）はいずれのRNAともハイブリダイズしなかった。このことは感染特異タンパク質はウイルスセンスにコードされ，RNA４は＋鎖であることを示している。RSVの主要な２つのタンパク質はそれぞれ異なる分節RNAに異なる方向でコードされていた（第４図）。

SDS－フェノールを用いてウイルス粒子より抽出したウイルスRNAは，電気泳動によってdsRNAとssRNAを観察することができる（第３図b，レーン１）。したがって，dsRNAフィルターではssRNAとdsRNAの両方が転写されている。このフィルターを用いた場合，CT(+)およびNS(-)プローブはssRNAフィルターと同様に，ssRNA３およびssRNA４にそれぞれシグナルを与えた。さらに，ssRNAから想定される移動度をもつdsRNAともハイブリダイズした（第３図b）。また，その相補配列プローブ（CT(-)およびNS(+)）はssRNAのみに極弱のシグナルを与えただけであった。

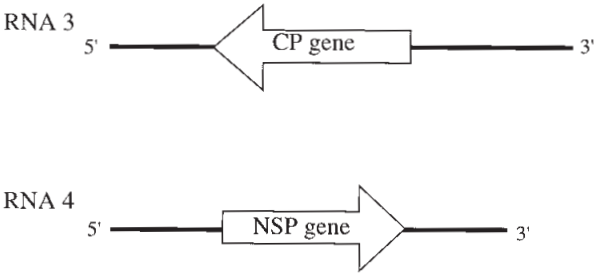
RSVゲノムはssRNAからなっており，既にMSpV（Falkら1989）やRSV（Ishikawaら1989b）で示唆されていたように，－鎖もしくは＋鎖のどちらか一方のssRNAが過剰に存在しているようである。dsRNAは穏やかな抽出条件では検出できず，SDS-フェノールを用いたRNA抽出時に生じたゲノムssRNAとその相補ssRNAによって形成された人為的産物であると考えられる。しかし，ウイルス粒子内においてssRNA分子が塩基対，つまり，



第３図　RSV　RNA のハイブリダイゼーションパターン

a：ssRNA のアガロースゲル電気泳動パターン（レーン１），左に４つの ssRNA の位置を示した。レーン２－９は，CT(+)，CT(-)，NS８(+)，NS８(-)，NS12(+)，NS12(-)，NS16(+)，NS16(-)を用いた際の ssRNA に対するハイブリダイゼーションパターン。

b：ssRNA と dsRNA のアガロースゲル電気泳動パターン（レーン１）。それぞれの RNA の位置は左側に記した。レーン２－５は，CT(+)，CT(-)，NS８(+)，NS８(-)を用いた際の ssRNA および dsRNA のハイブリダイゼーションパターン。



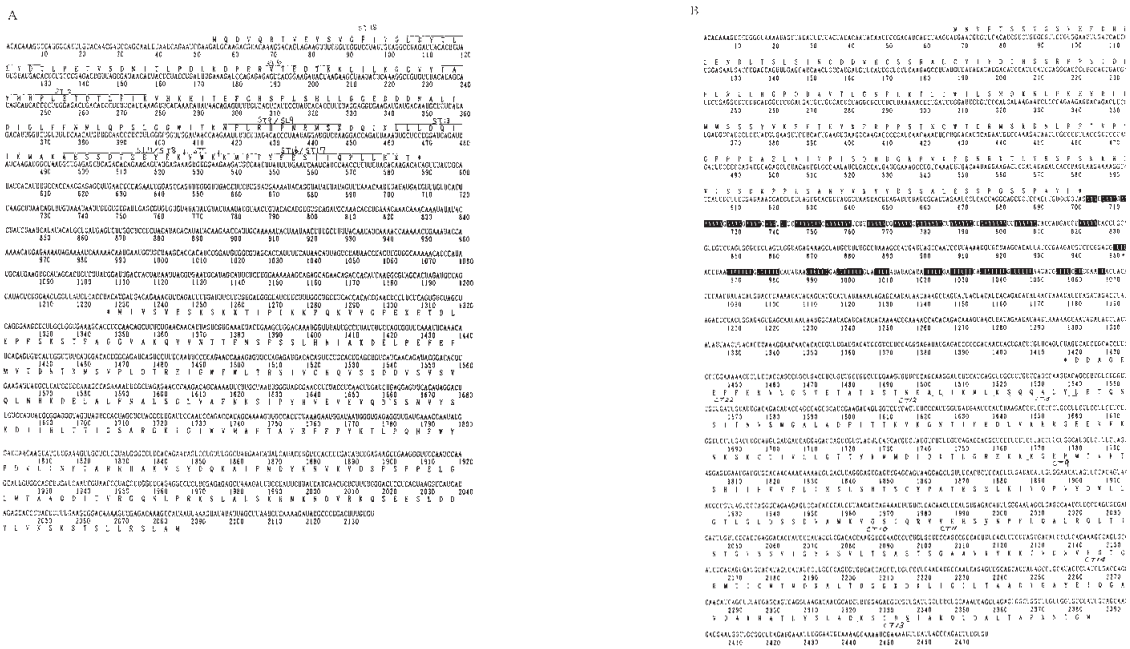
第４図　RSV 外被タンパク質（CP）と感染特異タンパク質（NSP）のコーディング様式

複製中間体を形成している可能性を排除できない。外被タンパク質はアンチウイルスセンスに，感染特異タンパク質はウイルスセンスに，とそれぞれ異なる極性で RNA３と RNA４にコードされていた（第４図）。このようなコーディング様式は，アレナウイルス（Auperin ら1984），フレボウイルス（Ihara ら1984）などで報告されているアンビセンスとよばれる特異なものであるかもしれない。それらのウイルスでは１分節 RNA に２つのタンパク質がそれぞれウイルスセンスとアンチウイルスセンスにコードされている。そのため，外被タンパク質と感染特異タンパク質がコードされる第３および第４分節 RNA が，それぞれアンビセンスであるかもしれない。また，RSV には RNA 依存 RNA ポリメラーゼが存在する（Toriyama 1986b）が，RSV のゲノム RNA にコードされる２つのタンパク質の発現は，Punta Toro virus（Ihara ら1984）で示されているように，両者で異なる機構が必要とされるかもしれない。

３．イネ縞葉枯ウイルスゲノムの構造に関する総合考察

筆者らは，タンパク質の一次構造から得られた塩基配列を利用して RSV ゲノムのコーディング様式を推定した。アンビセンスという様式は，もともと動物ウイルスのブニヤウイルス科やアレナウイルス科にみられる特異なコーディング様式である。この様式をもつ植物ウイルスは極めて珍しく，当時，Tomato spotted wilt virus（TSWV，ブニヤウイルス科トスポウイルス属）で示唆されていたにすぎない（Haan ら1990）。その後，筆者らの研究グループは，RSV の第４分節 RNA および第３分節 RNA の塩基配列の解析から，いずれの分節 RNA にも互いに異なる向きにコードする２つの ORF を見い出し，どちらの分節もアンビセンスであることを明らかにした（Kakutani ら1990，1991）。そして，表１に示したペプチドのアミノ酸配列から外被タンパク質および感染特異タンパク質遺伝子の ORF を同定した（第５図）。さらに，第３，４分節の両末端部約15塩基の配列が相補的であることを見い出した。その配列はアンビセンスウイルスであるフレボウイルスにおいて保存される配列と類似していた。フレボウイルス（ブニヤウイルス科）は媒介生物（昆虫やダニ）の中でも増殖しながら宿主（哺乳類）に感染するという，RSV（昆虫→植物）と共通する特徴があり，ゲノム構造からもこれらのウイルスは進化的に近縁であると考えられた。

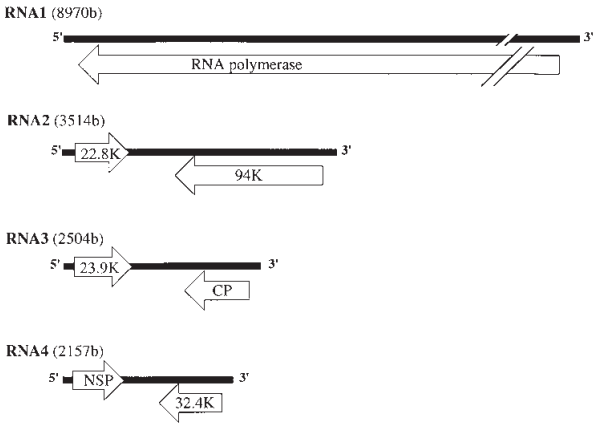
その後，RSV ゲノムは第３，第４分節のみならず第２分節 RNA もアンビセンスであることが明らかとなった（Takahashi ら1993）。第２，３，４分節いずれも５'末端側の最初のメチオニンから始まる位置に＋鎖つまりウイルスゲノムセンスにコードされる ORF があり，約300－700bp の非翻訳領域



第５図　RSV 第４（A）および第３（B）分節 RNA の塩基配列と予想される遺伝子産物のアミノ酸配列

ウイルスセンスにコードされる産物は塩基配列の上に，アンチウイルスセンスにコードされる産物は塩基配列の下に表わした。ペプチドのアミノ酸配列と一致する部分には下線を施し，ペプチド番号を記した。白抜きで示したのは A と U の連続する部分を示している。

を挟んで，３'末端側に一鎖つまりアンチウイルスゲノムセンスに別の ORF が存在している。しかしながら，第１分節には RNA 依存 RNA ポリメラーゼのみがアンチウイルスセンス RNA にコードされていることが明らかになった（Toriyama ら1994）。いずれの分節 RNA も両末端部に存在する相補的な約15塩基によりパンハンドル構造をとり，第２，３および４分節の２つの ORF に挟まれる非翻訳領域はヘアピン様構造をとることが塩基配列から推定される。これらの構造は RSV ゲノムの転写や複製機構に関与している可能性が高い。筆者らが RSV のゲノムがアンビセンスであることを示唆して以降，植物アンビセンスウイルスとしてテヌイウイルス属に関する分子生物学的研究は加速した。既に明らかとなった RSV のゲノム構造（第６図）から，RSV は同じ植物アンビセンスウイルスであるトスポウイルスやフレボウイルスと近縁であると考えられるものの，現在のところ，それらの属するブニヤウイルス科には含まれず，テヌイウイルス属として独立に分類されている。今後は，宿主体内での増殖機構の解明や RSV ゲノムの７つの ORF の内，残る４つ遺伝子産物についての生理的機能の解明が期待される。



第６図　RSV のゲノム構造

黒い線は各分節 RNA を表わす。各 ORF は矢印の向きと大きさで表わし，ウイルスセンスにコードされる ORF は RNA 上に，アンチウイルスセンスにコードされる ORF は RNA の下に記した（Toriyama ら1994を元に図示）。CP は外被タンパク質，NSP は感染特異タンパク質を表わす。

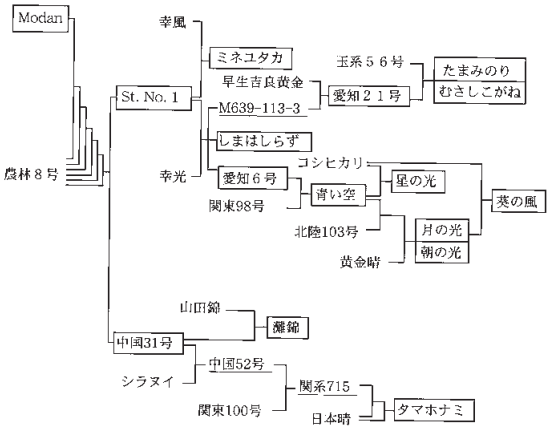
筆者らの研究グループは，本研究をもとに RSV の外被タンパク質遺伝子をクローニングし，研究開始当初の目的であった RSV 外被タンパク質遺伝子の導入による縞葉枯病抵抗性イネの作出へと研究を進めた。

Ⅳ．イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子の解析

イネ縞葉枯病は，イネ縞葉枯病ウイルスによって起こるイネのウイルス病害である。わが国においては，1960年代および1980年代に大発生し，稲作に甚大な被害を及ぼした。本病の防除法として，以前から抵抗性品種の育成・導入が進められている。現在，多くの抵抗性品種があるが，そのほとんどはパキスタン原産のインド型イネ「Modan」に由来している。「Modan」の抵抗性は不完全優性遺伝子 *Stvb-i*（Washio ら1968b，c）とされるが，その座乗染色体すら確定していなかった。そこで，DNA 多型連鎖地図をもとにして *Stvb-i* 遺伝子の単離を目指して研究を進めた。

１．グラフィカルジェノタイプによる座乗領域の推定

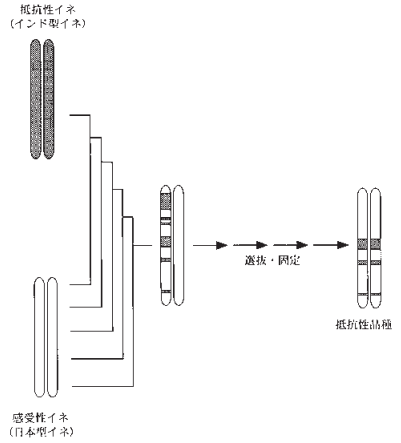
わが国においては，これまでにパキスタン原産のインド型イネ「Modan」に由来するイネ縞葉枯病抵抗性品種が数多く育成されている。「Modan」に由来する抵抗性品種の育成系譜（第７図）によれば，感受性の日本型水稲品種への「Modan」からの抵抗性の導入は１回の交配によって行われており，以後の交配は日本型イネを交配親としている。このことは，「Modan」に由来する抵抗性品種においては，抵抗性遺伝子の近傍は「Modan」に由来する領域（インド型イネ領域）が残っており，それ以外は日本型イネに置換されていると想定される。



第７図　「Modan」由来の主な縞葉枯病抵抗性品種の育成系譜

□は抵抗性品種を，下線は抵抗性系統を示す。

近年，開発されたイネの DNA 多型連鎖地図および座乗するマーカーを利用した縞葉枯病抵抗性および感受性品種群の分析により，目的遺伝子，つまり，「Modan」に由来する縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stvb-i* 近傍の染色体領域を推定することができると考えられた（インターバルマッピング，第８図）。そこで，抵抗性品種のグラフィカルジェノタイプを明らかにし，*Stvb-i* 遺伝子の座乗領域の推定を行った。



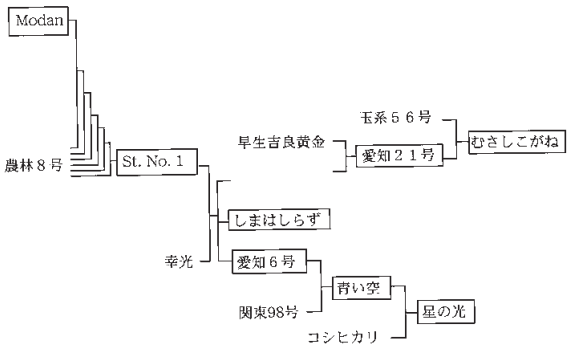
第８図　インターバルマッピング

抵抗性遺伝子源のインド型イネと感受性の日本型イネとの交配によって育成された抵抗性品種の染色体には，インド型イネに由来する領域，すなわち，抵抗性に関与する可能性をもつ領域（黒灰色部）が存在する。

１）材料

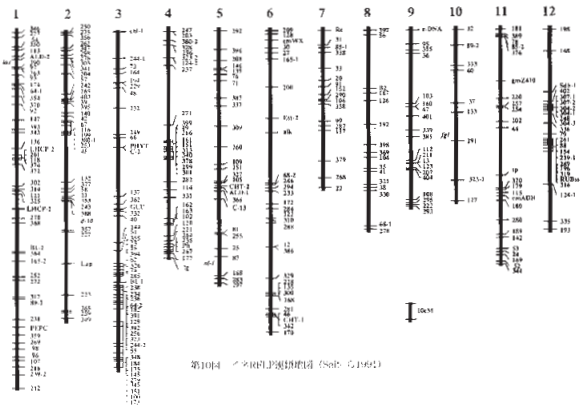
パキスタン原産インド型イネ「Modan」に由来するイネ縞葉枯病抵抗性品種およびその育成に使用された感受性の日本型水稲品種の育成系譜を第９図に示した。抵抗性品種としては「Modan」，「St. No. 1」，「ミネユタカ」，「しまはしらず」，「愛知21号」，「むさしこがね」，「愛知６号」，「青い空」，「星の光」の９品種，感受性品種としては「農林８号」，「幸光」，「早生吉良黄金」，「玉系56号」，「関東98号」，「コシヒカリ」の６品種を供試した。「ミネユタカ」は中国農業試験場より，「愛知21号」，「玉系56号」および「むさしこがね」は埼玉県農業試験場より，残り11品種は愛知県農業総合試験場より分譲を受けた。

RFLP 分析には， Saito ら（1991）のイネ RFLP 連鎖地図にある322個の RFLP マーカー（第10図）を供試した。



第９図　グラフィカルジェノタイプの解析材料とその系譜

□は抵抗性品種を，下線は抵抗性系統を示す。但し，M639-113-3は入手できず未解析。



第10図　イネ RFLP 連鎖地図（Saito ら1991）

２）方法

⑴　ゲノム DNA の精製

イネゲノム DNA の精製は CTAB 法（Murry・Tompson 1980）の変法により行った。液体窒素中で粉末にしたイネ葉（１g）に，60℃に加温した１×CTAB（１％セチルメチルアンモニウムブロマイド（CTAB），0.05M トリス－塩酸 pH8.0，0.7M 塩化ナトリウム）溶液４ml および２×CTAB 溶液１ml を加え，よく混和した。55℃の温水槽で30分加温した後，クロロホルム／イソアミルアルコール混液５ml を添加し，室温にて30分間ゆっくり振とうした。遠心（日立 RPS-４ローター，2,800rpm，15分，室温）して分離した上層と下層のうち，上層の溶液を新しい50ml チューブに移した。植物残査を含む下層から核酸成分を回収するため，下層に１×CTAB 溶液４ml を添加し，室温で20分振とうした。先と同様に，遠心（日立 RPS-４ローター，2,800rpm，15分，室温）し，分離した上層を，先の上層溶液の入っている50ml チューブに移した。これに，クロロホルム／イソアミルアルコール混液10ml を添加し，再度室温でゆっくりと振とう（30分）した。先と同条件で遠心を行って，上層を得て，１／10容量の10％CTAB 溶液を添加した。よく混和した後，等容量の沈殿用バッファー（１％CTAB，５mMトリス－塩酸pH8.0，10mM EDTA）を静かに重層し，ゆっくりと溶液を混和した。遠心（2,500rpm，７分，室温）した後，沈殿に高塩濃度 TE（１M 塩化ナトリウム，10mM トリス－塩酸 pH8.0，１mM EDTA）４ml を添加した。55℃で加温し，完全に溶解したら，イソプロパノール４ml を添加し，ゆっくりと混和した。遠心（日立 RPS-４ローター，2,500rpm，１分，室温）によって得た沈殿（DNA）を70％エタノールで洗浄し，真空乾燥した後，1/10濃度の TE（10mM トリス－塩酸 pH8.0，１mM EDTA）200μl に溶解した。RNase 処理（１ng／μl，55℃，30分）した後，一部を希釈して0.8％（w/v）アガロースゲル電気泳動により濃度を測定し，これを DNA 溶液として，以下の実験に用いた。

⑵　フィルターの作製

各品種の DNA（２μg／レーン）を４種の制限酵素（*Bam*HⅠ，*Bgl*Ⅱ，*Eco*RⅤまたは *Hind*Ⅲ，各10unit/μg DNA）で消化した。アガロースゲル電気泳動（0.8％(w/v)アガロースゲル，１×TAE バッファー）し，EtBr 溶液中で染色した後，写真撮影した。ゲルを酸溶液（0.25N 塩酸）で10分，続いてアルカリ溶液（0.5N 水酸化ナトリウム，1.5M 塩化ナトリウム）で15分間２回，さらに中和溶液（0.5M トリス－塩酸，pH7.0，1.5M 塩化ナトリウム）で30分以上振とうした後，キャピラリー法によりナイロンメンブラン（Hybond N+，Amersham Pharmacia 社）に転写した。転写後，メンブランを２×SSC で軽くすすぎ，UV 照射により DNA をメンブランに固定し，サザンハイブリダイゼーション用フィルターとした。

⑶　サザンハイブリダイゼーション

マーカー DNA のラベルおよびサザンハイブリダイゼーションは ECL ダイレクトラベリング検出システム（Amersham Pharmacia 社）を用いてそのプロトコルにしたがって行った。ハイブリダイゼー

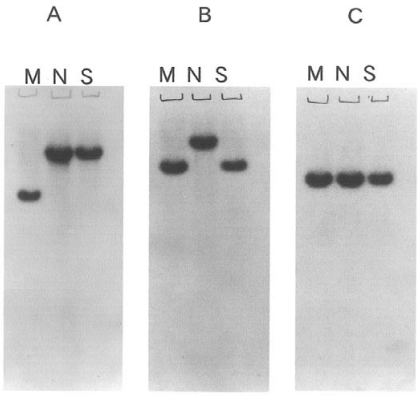
ション終了後，フィルターは洗浄用バッファー（0.5×SSC，６M 尿素および0.4%SDS）を用いて42℃ 20分，２回洗浄し，続いて，２×SSC，室温で２回軽く洗浄した。検出試薬を用いた後，X 線フィルムに約１時間露光した。

３）結果および考察

まず，抵抗性遺伝子源であるインド型イネ品種「Modan」，感受性日本型イネ「農林８号」，およびそれらの交配によって生じた中間母本「St. No. 1」について RFLP 分析を行った。供試322の RFLP マーカーのうち，約２／３に相当する215個のマーカーは交配親である「Modan」と「農林８号」との間で多型を示し，残り107個のマーカーは多型を示さなかった。多型を示した215個のマーカーのうち，16個のマーカーが「St. No. 1」において「Modan」と同じハイブリダイゼーションパターンを示した（第11図）。これらのマーカーの座乗位置から，「St. No. 1」 においては *Stvb-i* 遺伝子が存在する可能性がある染色体領域は第２， ４， ５及び11染色体上に６ヵ所あると推定された（第12図）。このうち，第11染色体の領域が最も大きく，多型を示したマーカーも６個あった。

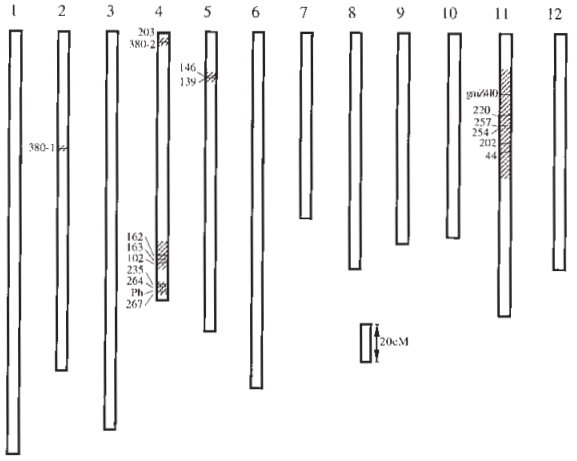
さらにその後，日本型水稲との交配が進むにつれて，抵抗性－感受性品種間で多型を示すマーカー数は減少した。その事例を第13図に示した。「Modan」由来の染色体領域は，「ミネユタカ」（第14図）では４本（第２， ４， ５，11染色体），「しまはしらず」（第15図）では３本（第４， ５，11染色体），「愛知６号」（第16図）では２本（第５，11染色体）の染色体上に見い出された。日本型イネとの交配・育成が進んだ抵抗性品種の「青い空」，「星の光」，「愛知21号」，「むさしこがね」では「Modan」に由来する染色体領域は第11染色体にのみ存在することが明らかとなった（第17図および第18図）。この「Modan」に由来する染色体領域は「星の光」においては35.85cM と算出され，この領域内に４個の RFLP マーカー（gmZ410，XNpb220，XNpb257および XNpb254）がマップされていた。一方，「むさしこがね」においてはさらに短く27.90 cM で， ２個の RFLP マーカー（gmZ410および XNpb220）のみがインド型イネの遺伝子型を示した。

「Modan」と「農林８号」間で多型の見い出せなかった領域が約１／３存在し，その領域内に抵抗性遺伝子が存在する可能性も考えられる。しかし， *Stvb-i* 遺伝子の複対立遺伝子とされる陸稲由来の *Stvb* 遺伝子も，第11染色体上の RFLP マーカーと連鎖することが報告されている（Ando ら1993）。日本型イネとの交配が進むにつれて「Modan」由来の他の染色体領域は消失しているが，示された第11染色体の領域は品種育成の過程で選択圧を受けてもなお残っていた。このことから，第11染色体上の「Modan」に由来する領域に抵抗性遺伝子が存在する可能性は高いと考えられた。



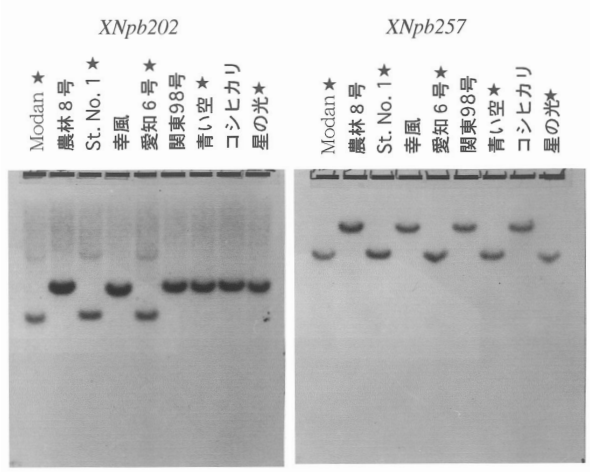
第11図　サザンハイブリダイゼーションパターン（３品種）

322の RFLP マーカーは「Modan」(M)，「農林８号」(N)および「St. No. 1」(S)のハイブリダイゼーションパターンから３つに分類された：「Modan」－「農林８号」および「St. No. 1」間で多型を示す(A)，「Modan」および「St. No. 1」－「農林８号」間で多型を示す(B)，３品種間で多型を示さない(C)



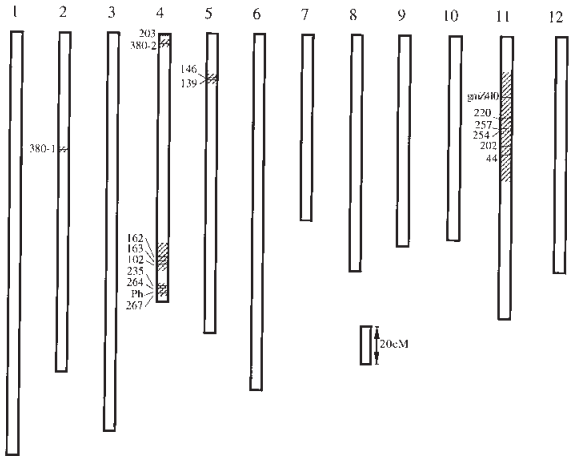
第12図　「St. No. 1」のグラフィカルジェノタイプ

白い部分は「農林８号」由来の染色体領域，斜線部は「Modan」由来の染色体領域。灰色の部分は農林８号で Modan で同じ遺伝子型を示した領域。



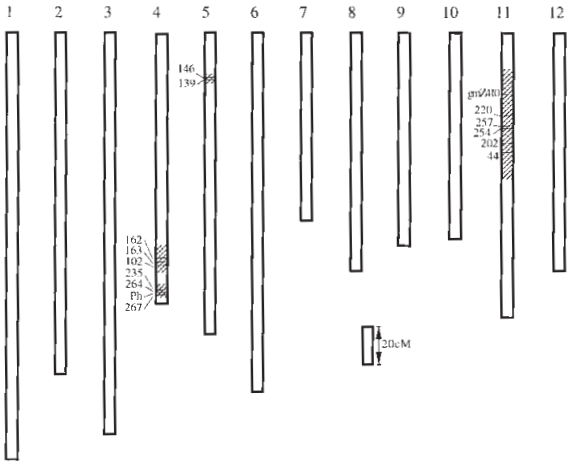
第13図　サザンハイブリダイゼーションパターン（９品種）

XNpb202では「青い空」およびその子孫品種の「星の光」では日本型イネと同じバンドパターンを示した。一方，XNpb257では供試抵抗性品種すべてが「Modan」と同じバンドパターンを示した。抵抗性品種には黒星を付した。



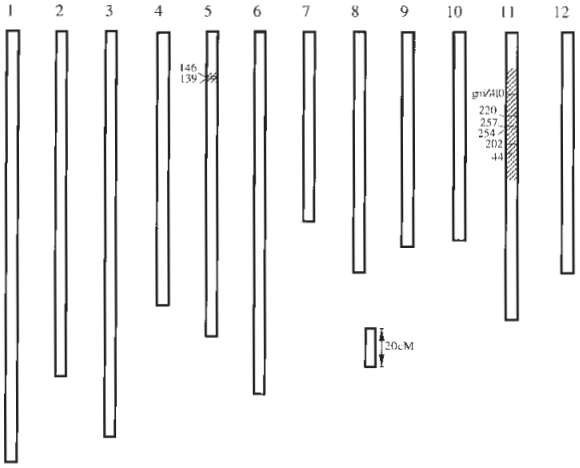
第14図　「ミネユタカ」のグラフィカルジェノタイプ

斜線部は「Modan」由来の染色体領域を示す。



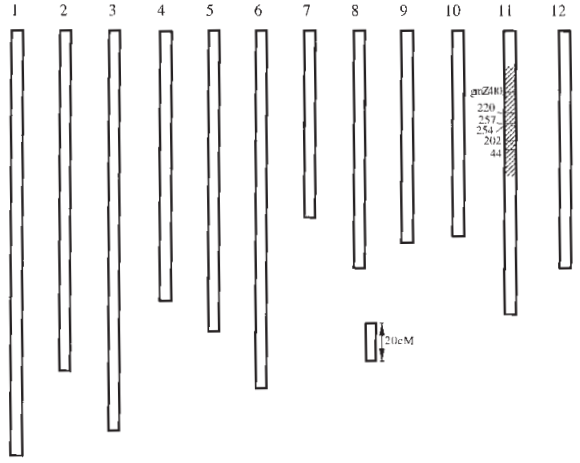
第15図　「しまはしらず」のグラフィカルジェノタイプ

斜線部は「Modan」由来の染色体領域を示す。



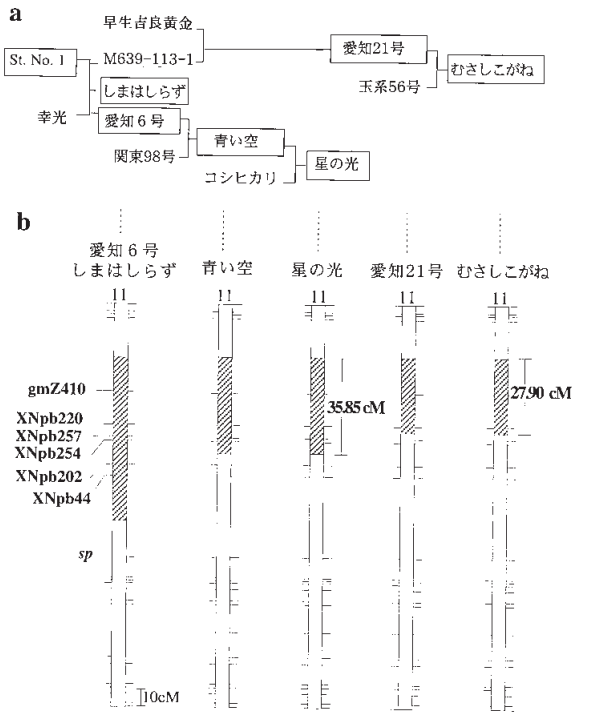
第16図　「愛知６号」のグラフィカルジェノタイプ

斜線部は「Modan」由来の染色体領域を示す。



第17図　「青い空」および「星の光」のグラフィカルジェノタイプ

斜線部は「Modan」由来の染色体領域を示す。



第18図　抵抗性品種の育成系譜（ａ）と第11染色体のグラフィカルジェノタイプ（ｂ）

ａ，抵抗性品種は四角で囲んだ，ｂ，斜線部は「Modan」に由来する染色体領域を表わす。*sp*（単穂遺伝子）はクラシカルマップとの比較のために記した。「星の光」および「むさしこがね」については「Modan」に由来する領域の長さをマーカーの座乗位置をもとに算出し，右に付した。

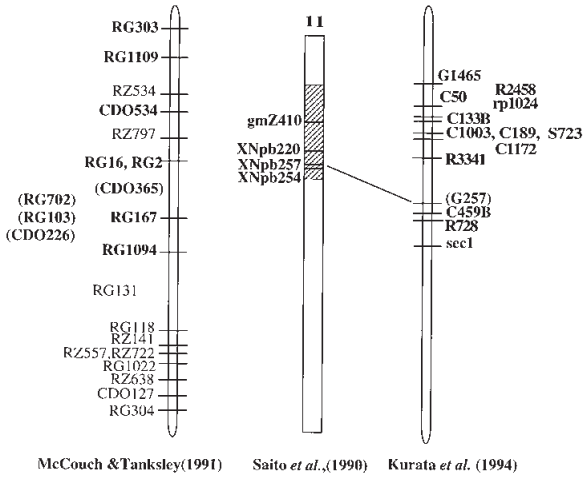
２．RFLP マーカーの探索と開発

抵抗性品種のグラフィカルジェノタイプの解析から，抵抗性遺伝子 *Stvb-i* は第11染色体に存在することが示唆された。しかし，その領域に座乗するマーカーは「星の光」では４マーカーしか見い出せなかった。抵抗性遺伝子と各マーカーの連鎖関係を調べる上ではマーカー数が多いほうが有利である。イネについては Saito ら（1991）の他にも DNA 多型連鎖地図の作製が進められていた（Kurata ら1994，Causse ら1994）。また，多型の検出方法も従来の RFLP だけでなく，PCR を利用した random amplified polymorphic DNA（RAPD，Williams ら 1990），amplified fragment length polymorphism（AFLP，Vos ら1995），sequence characterized amplified region（SCAR，Paran・Michelmore 1993），sequence-tagged site（STS，Olson ら1989），cleaved amplified polymorphic sequences（CAPS，Konieczny・Ausubel 1993），inter-simple-sequence-repeat（ISSR，Ratnaparkhe ら1998）といった新たな方法が報告された。そこで，新規の RFLP マーカーと RAPD 法を利用して，連鎖解析のための新たな連鎖マーカーの探索と開発を行った。

１）材料

RAPD 法に用いたプライマーには，オペロン社から販売されている長さ10塩基のランダムオリゴヌクレオチド（800種）を供試した。RAPD 法には「Modan」，「St. No. 1」，「朝の光」（以上抵抗性品種，第７図参照），「農林８号」および「コシヒカリ」（以上感受性品種）の計５品種を供試した。

後述する連鎖解析のために作製した F_2 集団の交配親である「コシヒカリ」（感受性品種）と「朝の光」（抵抗性品種）のゲノム DNA を RFLP 分析に供試した。RAPD 法で得られたマーカーのほかに，Kurata ら（1994）および McCouch・Tanksley（1991）のそれぞれの連鎖地図上第11染色体に座乗する13個の RFLP マーカーおよび11個の RFLP マーカーを新たに検討した（第19図）。



第19図　第11染色体の RFLP マーカー

XNpb257と G257と同一 RFLP マーカー。Saito らのマップに記した斜線部は「朝の光」における「Modan」由来の染色体領域。太字で記したマーカーを検討に供した。

２）方法

(1)　ゲノム DNA の精製

各品種の DNA の抽出は，前述の CTAB の変法により行った。

⑵　RFLP 分析

RFLP 分析は，前述のフィルターの作製およびサザンハイブリダイゼーションにしたがって行った。

⑶　RAPD 法

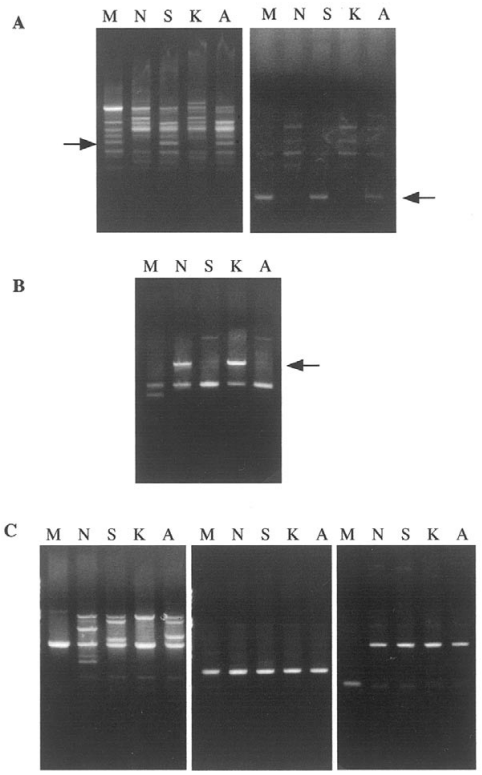
Williams ら（1990）の方法にしたがって行った。増幅 DNA 産物はアガロースゲル電気泳動（1.4%(w/v)アガロースゲル，１×TAE バッファー）により分離した。また，多型を示した DNA 断片は GENECLEAN（BIO101社）を用いて精製し，TA クローニングキット（Invitrogen 社）を用いてクローニングした。

３）結果および考察

800種のランダムプライマーから約2,200の DNA 断片が増幅され，大きく３つのグループに分類された（第20図）。抵抗性品種に特異的な DNA 断片を増幅するもの（Ａ），感受性品種に特異的な DNA 断片を増幅するもの（Ｂ），特異的な DNA 断片の増幅がみられないもの（C）の３つであった。800種のうち，５種のプライマーから増幅した５つの DNA 断片が感受性－抵抗性品種間で多型を示した。Ａタイプの４種のプライマーはそれぞれ１個の抵抗性品種に特異的な DNA 断片を増幅し，残りＢタイプの１プライマーは感受性品種に特異的な DNA 断片を１個増幅した。これらの５個の DNA 断片はいずれも抵抗性品種，あるいは，感受性品種のどちらか一方から特異的に増幅され，挿入／欠失を示す共優性型ではなかった。これら５つの特異的な DNA 断片をクローニングし，RFLP プローブとして感受性－抵抗性品種間の多型の有無を調べた。抵抗性品種から特異的に増幅された４つの断片のうち，約730bp の大きさの DNA 断片のみが両品種間で多型を示した。この DNA 断片を ST10として，前節で述べた４つの RFLP マーカー（gmZ 410，XNpb220，XNpb257，XNpb254）とともに次節で用いる連鎖解析に用いることとした。残り４断片は RFLP 分析で多型を示さず，RFLP マーカーとして用いることはできなかった。

RFLP 連鎖地図の第11染色体に座乗している新規の24個の RFLP マーカー（第19図）について，「コシヒカリ」－「朝の光」間での多型の有無を調べたところ，新たに CDO534，CDO365，CDO226，RG103（以上 McCouch・Tanksley，1981），C189，C1172，R3341および ST723（以上 Kurata ら1994）が抵抗性品種－感受性品種間で多型を示した。この８RFLP マーカーも連鎖解析に供試することにした。

RAPD 分析で，800種のランダムプライマーから約2,200の増幅 DNA 断片が検出された。しかし，わずか１個の RFLP マーカーしか得られなかった。また，新たに RFLP 分析に供試した24個の RFLP マーカーのうち，その３分の１である８個の RFLP マーカーしか多型を示さなかった。「朝の光」における「Modan」由来の染色体領域は「星の光」（第17図参照）と同じであった。この「Modan」に由来する染色体領域は35.85cM と算出されたが，実際はこれよりも短いと推察される。いずれにしても，F_2集団の交配親である「コシヒカリ」－「朝の光」間で多型を示した RFLP マーカーは全部で13個となり，これらマーカーと抵抗性遺伝子の連鎖解析を行うことにした。



第20図　RAPD 法による DNA 断片の増幅パターン

プライマーは PCR 反応産物の増幅パターンから以下の３つに分類された；抵抗性品種に特異的な DNA 断片（矢印）を増幅する（Ａ），感受性品種に特異的な断片（矢印）を増幅する（Ｂ），特異的な断片の増幅がみられない（C）。各レーンは，M：「Modan」（抵抗性，以下 R），N：「農林８号」（感受性，以下 S），S：「St. No. １」（R），K：「コシヒカリ」（S），A：「朝の光」（R）を表わす。

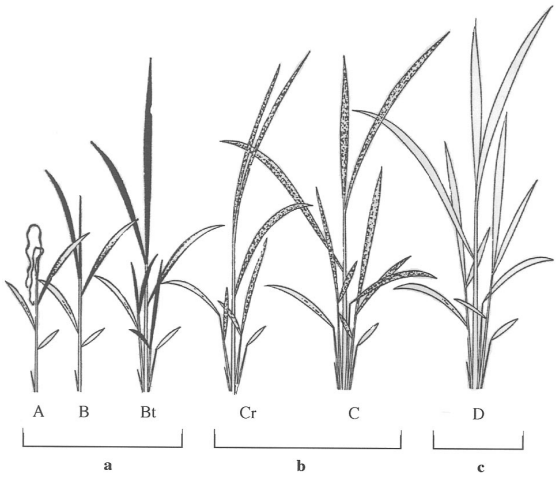
3．*Stvb-i* 遺伝子の座乗位置の特定

DNA 多型連鎖地図を利用した遺伝子単離のためには，目的遺伝子が座乗する位置周辺の詳細なマッピングが不可欠である。前述の「Modan」由来の染色体領域内にあって多型を示した13個の RFLP マーカーとイネ縞葉枯病抵抗性との連鎖解析を行い，連鎖地図への *Stvb-i* 遺伝子座の特定を行った。

1）材料

感受性品種の「コシヒカリ」と抵抗性品種の「朝の光」（第７図参照）の $F_2$120個体（愛知県農業総合試験場育成）を RFLP マーカーによる遺伝子型の解析に用い，各 F_2 個体から無作為に採種した F_3 系統をイネ縞葉枯病抵抗性検定に供試した。

連鎖解析に用いた RFLP マーカーは，「コシヒカリ」と「朝の光」の間で多型を示した12マーカーと RAPD 法より開発された RFLP マーカー ST10 を用いた。



第21図　イネ縞葉枯病抵抗性の幼苗検定法における病徴型

縞葉枯病の病徴型の分類を鷲尾ら（1968b）の図を元に示した。黒点は不連続は退緑病斑を，黒塗り部分は連続的退緑病斑を表わす。鷲尾ら（1968b）による病徴型 A－Bt を a，Cr と C を b，D を c として３階級に分類し，F_3 系統の発病指数をもとめた。なお，鷲尾ら（1968b）による病徴型では，A は生育が著しく不良で，病葉の全部または一部が枯死したもの，B は生育が著しく不良であるが，病葉が枯死しないもの，Bt は B と同様であるが，生育が良好なもの，C は生育が良好で，病斑は不連続で，健全部との境界が明瞭であるもの，Cr は C と同様であるが，病葉が多少捲葉するものまたは生育がやや不良なもの，D は生育がきわめて良好で，病徴は生育につれてマスクされるもの。

2）方法

⑴　ゲノム DNA の抽出と RFLP 分析

「朝の光」，「コシヒカリ」，$F_2$120個体のゲノム DNA は，前述の CTAB 法の変法により抽出した。RFLP 分析は，前述したフィルターの作製およびサザンハイブリダイゼーションにしたがって行った。

⑵　抵抗性検定

イネ縞葉枯病幼苗検定法（鷲尾ら1968b）に準じて行った。各 F_3 系統ごとに催芽種子30粒を小さなプラスチック皿（７cm 四方，深さ２cm）に播き，27℃で人工気象器内で育成した。1.5－2.0葉期の幼苗を25株に調製し，上部にナイロン網をかけた塩化ビニル製円筒をかぶせて RSV 保毒ヒメトビウンカ２～３齢虫（約0.07ml）を２日間放飼した。接種後，ヒメトビウンカを除き，育苗箱に移植し，３～４週間後に発病程度を調査した。なお，鷲尾らの病徴型 A－Bt を発病程度 a，Cr と C を b，D を c と３階級に分け（第21図），発病指数＝(100×a 株数＋60×b 株数＋５×c 株数)／供試検体数を算出し，感受性基準品種の発病指数を100としたときの発病指数比をもとに抵抗性型，中程度抵抗性型，感受性型に分類した。

⑶　連鎖解析

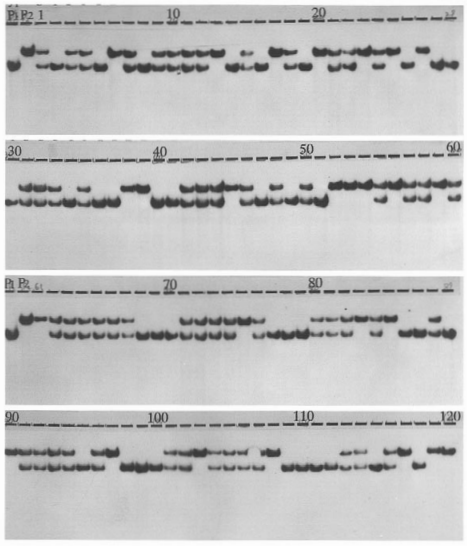
RFLP 分析による各 F_2 個体の遺伝子型と生物検定の結果をコンピューターソフト MAPL バージョン3.0（Ukai ら1995）を用いて解析し，遺伝的距離を算出した。MAPL では最尤法（Allard 1956）により組換価を計算し，得られた組換価を Kosambi の方程式（Kosambi 1944）にしたがって遺伝的距離（cM）に変換した。また，RFLP マーカーと抵抗性遺伝子（または形質）の位置は metric multidimensional scaling method によって推測した。

3）結果と考察

保毒ヒメトビウンカによるイネ縞葉枯病抵抗性の生物検定は，各 F_3 系統について６反復実施した。その結果，供試 F_2 集団は26：56：38（感受性型：中程度抵抗性型：抵抗性型）に分離した。分離比は期待された１（感受性ホモ接合型）：２（ヘテロ接合型）：１（抵抗性ホモ接合型）に適合した（x^2= 2.93，$0.10 < p < 0.30$）。この集団はやや抵抗性側に傾き，適合度はそれほど高くなかった。しかし，この集団における RFLP マーカーの遺伝子型の分

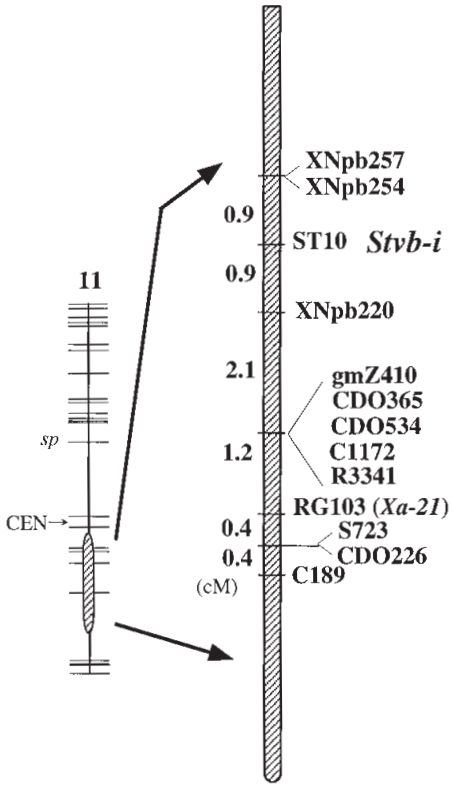
離も同様な傾向を示したことから，抵抗性検定やF_2個体の生育過程において何らかの選択圧が加わったために，抵抗性側に傾いたのではないと考えられた。

F_2集団内でのRFLPマーカーの遺伝子型および抵抗性反応の分離結果から，それらの遺伝的距離と相互位置関係を決定した。なお，XNpb257によるF_2個体のサザンハイブリダイゼーションパターンを第22図に例示した。MAPLでの解析の結果，抵抗性遺伝子 *Stvb-i* はイネ第11染色体長腕部の「Modan」由来の領域内に位置付けられ（第23図），XNpb220とXNpb257/XNpb254に挟まれる1.8cMの領域内にあり，４つのRFLPマーカー（XNpb220，XNpb257，XNpb254およびST10）と連鎖していることが示された。供試F_2集団内で，ST10と *Stvb-i* との間での組み換え個体はなく，両者は0.0 cMで密接に連鎖していた。$F_2$120個体からなる連鎖解析集団では，１個体の遺伝子型の違いが0.9cMの遺伝距離の違いを生じるため，遺伝距離の推定には十分な大きさとはいえない。しかしながら，第24図にまとめたように，*Stvb-i* 遺伝子が存在すると考えられる1.8cMの領域内での組み換え個体（F_2個体10，14，38，71）のST10座の遺伝子型とその抵抗性反応の結果から推測される *Stvb-i* 座の遺伝子型は一致しており，イネ縞葉枯病抵抗性とST10が密接に連鎖していることは明らかであった。



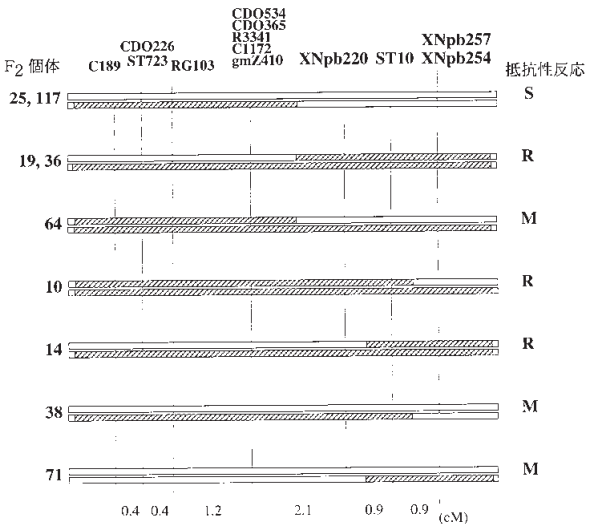
第22図　サザンハイブリダイゼーションパターン（F_2集団）

「コシヒカリ」（P１）／「朝の光」（P２）の$F_2$120個体のサザンハイブリダイゼーションパターン。プローブはXNpb257。



第23図　イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stvb-i* のマッピング

丸端はテロメア方向を，平端はセントロメア方向を表わす。長腕側を下にして，第11染色体全体を左側に示した。斜線領域は朝の光における「Modan」由来の染色体領域，CENはセントロメア，spは単穂遺伝子を表わす。



第24図　F_2（「コシヒカリ」／「朝の光」）組換え個体のグラフィカルジェノタイプと縞葉枯病抵抗性反応

左端に個体番号，右端に抵抗性反応を記した。白抜き部分は日本型イネに由来する領域，斜線部分は「Modan」に由来する領域を表わす。なお，縞葉枯病抵抗性反応はF_3による後代検定によった。Rは抵抗性，Mは中程度抵抗性，Sは感受性。

４．*Stvb-i* 遺伝子座領域における物理地図の作製

物理地図の作製には，巨大な挿入 DNA 断片を有する酵母人工染色体（yeast artificial chromosome, YAC）やバクテリア人工染色体（bacterial artificial chromosome，BAC）が用いられている。イネでは，YAC ライブラリー（「日本晴」由来，Umehara ら1995）および BAC ライブラリー（「シモキタ」由来，Nakamura ら 1997）が構築されている。これらの分譲を受け，*Stvb-i* と密接に連鎖する４つの分子マーカーを足掛りとして，*Stvb-i* 遺伝子座乗領域の物理地図の作製を進めた。

１）材料および方法

BAC および YAC ライブラリーの高密度フィルターはそれぞれ農業生物資源研究所川崎信二博士，イネゲノム研究プログラム（RGP，農業生物資源研究所 NIAR／農林水産先端技術研究所 STAFF）より分譲いただいた。クローンの選抜，クローン DNA の調製およびパルスフィールドゲル電気泳動（pulsed-field gel electrophoresis，PFGE）については，CHEF-Mapper（Bio-Rad 社）を用いて Nakamura ら（1997）または Umehara ら（1995）の方法にしたがって行った。

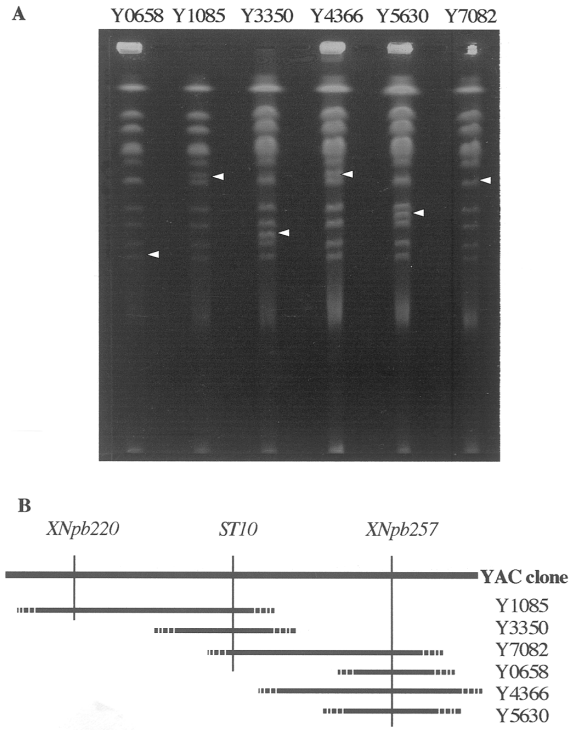
サザンハイブリダイゼーションは前述の通り ECL ダイレクト DNA ラベリング検出システム（Amersham Pharmacia 社）を用いて行った。ただし，YAC　DNA は Umehara ら（1995）の方法にしたがい単離し，その制限酵素 *Dra*I の消化産物を標識してプローブとした。

TAIL-PCR 法（Liu ら1995）によって，それぞれの BAC クローン挿入 DNA 断片の末端部配列を増幅し，TA クローニングキット（Invitrogen 社）を用いてクローニングした。これらをプローブとして，BAC クローンの *Hind*Ⅲフィルターを用いてハイブリダイゼーションを行った。さらに，各 BAC クローンの DNA の制限酵素（*Eco*RI，*Hin*dⅢ）による消化産物のバンドパターンを比較し，各クローンの相互関係を調べた。

２）結果および考察

⑴　YAC ライブラリーのスクリーニング

Stvb-i 遺伝子と連鎖する４つの RFLP マーカーのうち，XNpb220，ST10および XNpb257をプローブとして YAC ライブライリーのスクリーニングを行った。それぞれのマーカーからポジティブクローンが得られ，最終的には６個のクローンを選抜した。このうち，Y1085（620kb）は XNpb220および ST10と，Y7082（680kb）は ST10および XNpb257と，それぞれ２つの RFLP マーカーにハイブリダイズした。単純に考えると，この２つの YAC クローンにより，*Stvb-i* 遺伝子周辺をカバーできると思われた（第25図）。



第25図　選抜された YAC クローン

A，*Stvb-i* 遺伝子と密接に連鎖する３つの RFLP マーカーにより選抜された YAC クローンの PFGE 泳動パターン。白抜き三角の指すバンドが各クローンの YAC，その他のバンドは宿主酵母の染色体。

B，選抜クローンの位置。各クローンの相互関係は明らかではない。

RGP で作製した YAC ライブラリーの約40％のクローンがライゲーションの際に他の断片と結合したキメラであると報告されており（Umehara ら 1995），キメラ DNA の可能性が排除できない。Y1085と Y7082はいずれもそのインサート DNA が600kb 以上あり，ライブラリー全体の平均インサート DNA 長350kb を大きく上回っていた。そのため，キメラであるか否かを検討すべきである。しかし，YAC クローンの宿主である酵母や数百 kb の巨大 DNA を扱うことは労力を要する上に，キメラであるか否かを調べることは容易ではない。

第３表　BAC ポジティブクローン

プローブ	BAC クローン	サイズ（kb）
XNpb220	51C19	130
	104A 3	63
	105B 4	165
	116E11	101
	221D 1	116
ST10	18E 4	96
	18E 5	96
	36G 1	172
	123A 6[b]	245
	220B 5	160
XNpb254	218A12[c]	134
XNpb257	none	
Y43696[a]	40D 7	162
	56F 2	177
	82A 8	175
	82E12	144
	88C12	146
	88D 1	146
	123A 6[b]	245
	218A12[c]	134
	219H 2	125

a）Y4366クローンの *Dra*I 消化産物からなるプローブ
b）ST10および Y4366の双方で選抜されたクローン
c）XNpb254および Y4366の双方で選抜されたクローン

⑵　BAC ライブラリーのスクリーニング

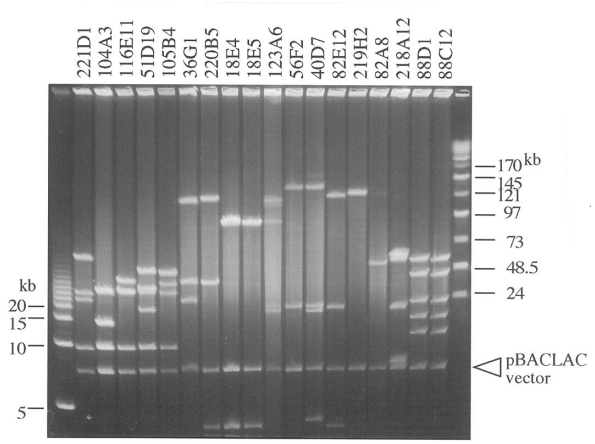
YAC の欠点を補うようなベクターとして開発が進められたのが BAC であり，インサート DNA 長が平均150kb と YAC よりもかなり短いものの，取り扱いは大腸菌と変わらないのが特徴である。BAC ライブラリーのスクリーニングを試みたところ，ST10と XNpb220からはそれぞれ５個のクローンが選抜された（第３表）。しかし，XNpb257によって，ポジティブクローンは得られなかった。XNpb257と同座とされる XNpb254からは１個のクローンを得た。XNpb257によって BAC クローンは得ることができなかったので，XNpb257の代わりに YAC クローン Y4366（630kb）の *Dra*I 消化物をプローブとして BAC ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果，明瞭なシグナルを呈した９個のクローンを選抜した（第３表）。９個のうち，123A6は ST10による選抜クローンと，218A12は XNpb254による選抜クローンと同じであった。なお，供試 BAC ライブラリーは品種「シモキタ」に由来し，XNpb257は「日本晴」に由来している。XNpb257によってクローンが選抜されなかったのは，おそらく，この XNpb257の DNA 断片が「シモキタ」において欠損しているためかもしれない。もしくは，XNpb257は，XNpb254と同座にマップされたが，物理地図上においては XNpb254から離れて，さらにセントロメア側に存在するためかもしれない。

ハイブリダイゼーションによって，Y4366自身は ST10断片を有していないことは確認している。そのため，123A６クローンは XNpb254座寄りのかなり大きな挿入断片を有していると考えられた。Y4366によって選抜されたクローン群に，ST10によって選抜されたクローンが含まれていたことは，それぞれから選抜されたクローン群が123A6を介して重なりあっていると推測された。

⑶　BAC クローンの整列化

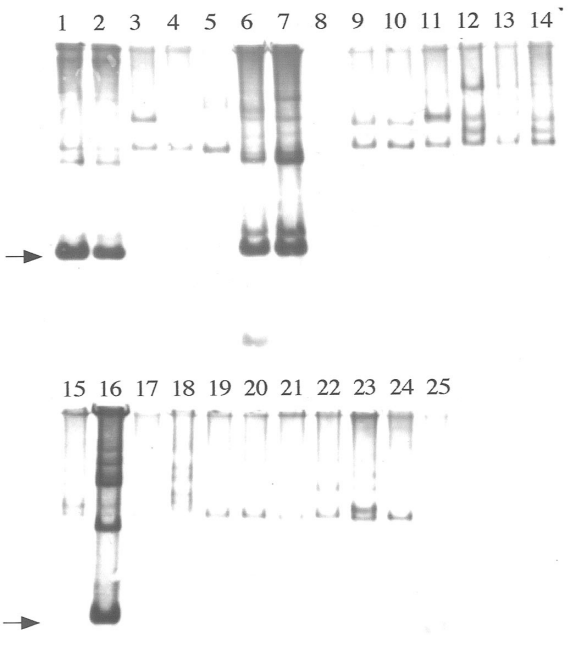
スクリーニングによって得られた18個の BAC クローンの整列化を進め，各クローンの DNA を制限酵素 *Not*I で消化し，産物を PFGE によって分離し（第26図），各バンドの合計から挿入断片の大きさを算出した（第３表）。各クローンの挿入 DNA 断片長は100～250kb であった。123A６，40D７，56F２，82E12には20kb の共通するバンドが観察され，先に推測したように，ST10によるクローン群と Y4366のクローン群とは123A６を介して重複していると推定された。さらに，TAIL-PCR 法によって得られたそれぞれのクローンの挿入断片末端部 DNA をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション（第27図）および制限酵素断片パターン（第28図）によって各クローンの相互関係を調べた。サザンハイブリダイゼーションでシグナルを呈したクローン群は重複し，制限酵素断片パターンにおいても同じバンドをもつクローンは重複していると考えられた。

以上の結果を総合して，選抜した18個の BAC クローンを整列化し，*Stvb-i* 遺伝子周辺の物理地図を得た（第29図）。XNpb220から XNpb254の座乗領域，遺伝距離にして1.8cM を BAC クローンによってカバーした。その物理距離は620kb と算出された。



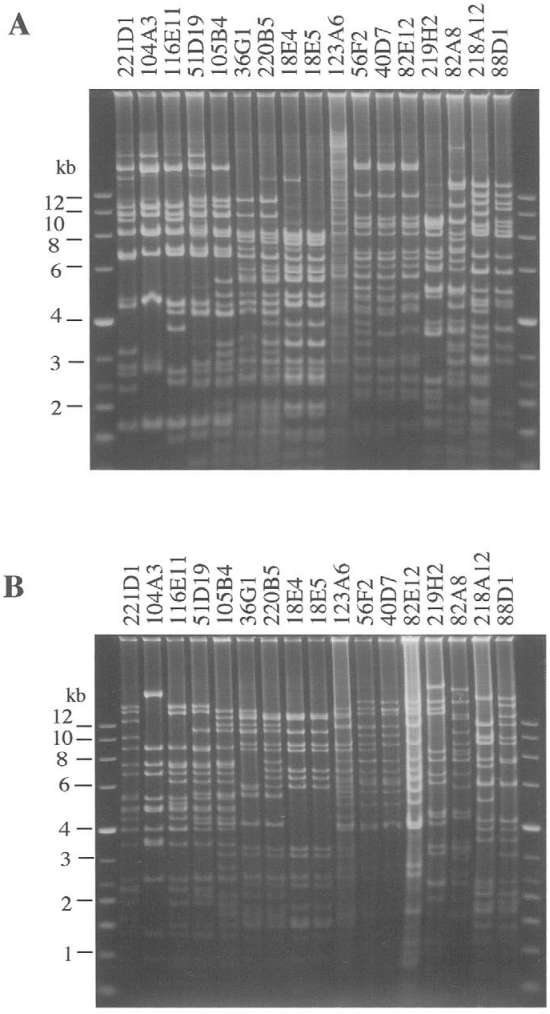
第26図 BAC クローンの *Not*I 消化断片の PFGE パターン

BAC クローンの DNA は NotI で消化した後，電気泳動した。最左レーンは５kbDNA サイズマーカー(Bio-Rad 社)，最右レーンは MidRange Ⅱ PFG DNA サイズマーカー（NEB 社)。白抜き三角はベクタープラスミド pBACLAC のバンドを指す。



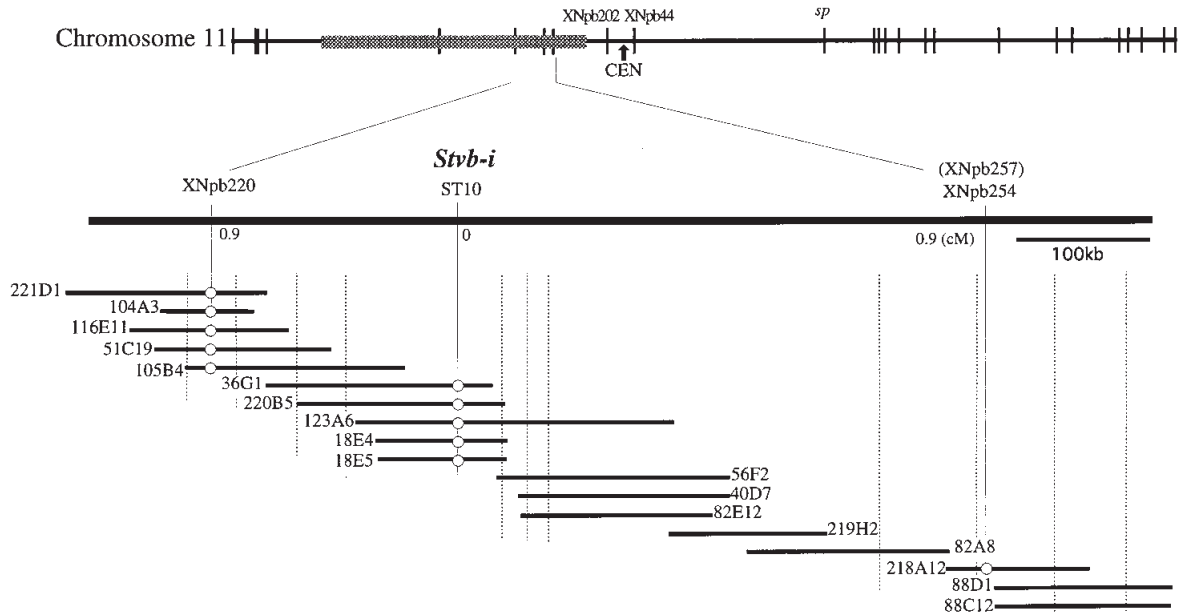
第27図 BAC クローン末端断片によるサザンハイブリダイゼーションパターン

プローブは56F２クローンの挿入断片の左側末端断片。シグナルを与えたクローンは，18E４（レーン１)，18E５（レーン２)，123A６（レーン６)，220B５（レーン７）および56F２（レーン16)。



第28図 BAC クローンの *Hind*Ⅲ（A）および *Eco*RI（B）による消化断片の泳動パターン

BAC クローンを制限酵素で消化した後，0.6%アガロースを用いて，１×TAE バッファー，20時間，20V 定電圧で泳動した。両端のレーンは PerfectDNA サイズマーカー（Novagen 社)。



第29図　*Stvb*-i 遺伝子座周辺における BAC クローンの整列化
上段：「朝の光」における「Modan」由来の染色体領域（灰色部）。CEN はセントロメア，*sp* は単穂遺伝子を示す。
下段：整列化 BAC クローン。縦点線は *Not*I サイトを表す。アルファベット入り数字は BAC クローン，その横に記した線はクローンの挿入 DNA 断片の長さを表す。

5．*Stvb-i* 遺伝子座領域の限定

YAC や BAC ライブラリーの利用によって，*Stvb-i* 遺伝子座周辺の物理地図が整った。*Stvb-i* 遺伝子座を含む XNpb220－XNpb254間は約620kb あった。これまでの解析結果から，*Stvb-i* 遺伝子は ST10極近傍に存在する可能性は高いが，確認はされていない。ポジショナルクローニングのためには，*Stvb-i* 遺伝子座の存在位置，つまり，抵抗性に関与する領域を物理地図上でより狭く限定しておくことが望ましい。そこで，*Stvb-i* 遺伝子座周辺の物理地図の作製に用いた BAC クローンを利用して新たに分子マーカーを開発し，この領域内で組換えを生じている系統・品種を解析して *Stvb-i* 遺伝子座の存在位置の限定を試みた。

1）材料

イネ縞葉枯病抵抗性品種５品種（「Modan」，「St. No. 1」，「朝の光」，「月の光」，「むさしこがね」，第７図参照）と感受性品種５品種（「農林８号」，「コシヒカリ」，「黄金晴」，「あいちのかおり」，「日本晴」）をマーカー開発のための RFLP 分析および PCR 分析に供試した。*Stvb-i* 領域の特定のために，一穂一粒選抜法によって得られたリコンビナントインブレッドライン（RIL，「黄金晴」／「月の光」F_7 種子，愛知県農業総合試験場で育成）2090系統を用いた。

2）方法

(1)　マーカーの開発

前述の挿入 DNA 末端それぞれをプローブとして，抵抗性－感受性品種間での多型の有無を調べた。RFLP マーカーとして多型を示さなかった断片，XNpb220および ST10の塩基配列は，DNA シークエンサー370A およびジェネティックアナライザー310（Applied Biosystems 社）でダイターミナルシークエンシング反応により決定した。塩基配列より設定したオリゴヌクレオチド（GIBCO-BRL 社）をプライマーとして PCR を行い，抵抗性－感受性品種間での多型の有無を調べた。

BAC クローン40D７および220B５は，制限酵素 *Hin*dⅢで消化した後，pUC118ベクターに組み込みサブクローニングした。各サブクローンの挿入 DNA 断片は BAC*Hin*dⅢおよび *Not*Ⅰフィルターに対しハイブリダイゼーションにより物理地図上での位置を推定した後，RFLP 分析により多型の有無を調べた。

⑵　RIL の選抜

RIL の１系統につき９粒の種子をオアシス育苗成形培地（日本曹達社）に埋め込み，陽光人工気象器（27℃）内で３葉期まで育成した。採取した葉から迅速単離法（劉1997）にしたがって，DNA を調製した。これを鋳型として，４種の SCAR マーカー（220，７L，ST10および21R）について PCR を行った。プライマーの配列および反応プログラムは第４表に記した。なお，PCR 反応液組成は鋳型 DNA ５～15ng，プライマー各100～200nM，dNTP 各120μM，AmpliTaqGoldDNA ポリメラーゼ（Applied Biosystems 社）0.4ユニット，10mM トリス－塩酸（pH8.0），50mM 塩化カリウム，1.5 mM 塩化マグネシウム，0.001％（w/v）ゼラチンとした。反応は，PCR9600，PCR2400または PCR 9700（いずれも Applied Biosystems 社）を用いて行った。反応終了後，反応液の一部をアガロースゲル電気泳動（2.0%(w/v)アガロース，１×TAE）し，ゲルを EtBr 染色して反応産物の確認を行った。

⑶　縞葉枯病抵抗性検定

SCAR マーカーによって選抜した RIL 系統の縞葉枯病抵抗性を検定した。検定方法および評価は前述の通り鷲尾ら（1968b）の幼苗検定法に準じて行った。１系統あたり平均30株を供試して６～８反復の検定を行った。

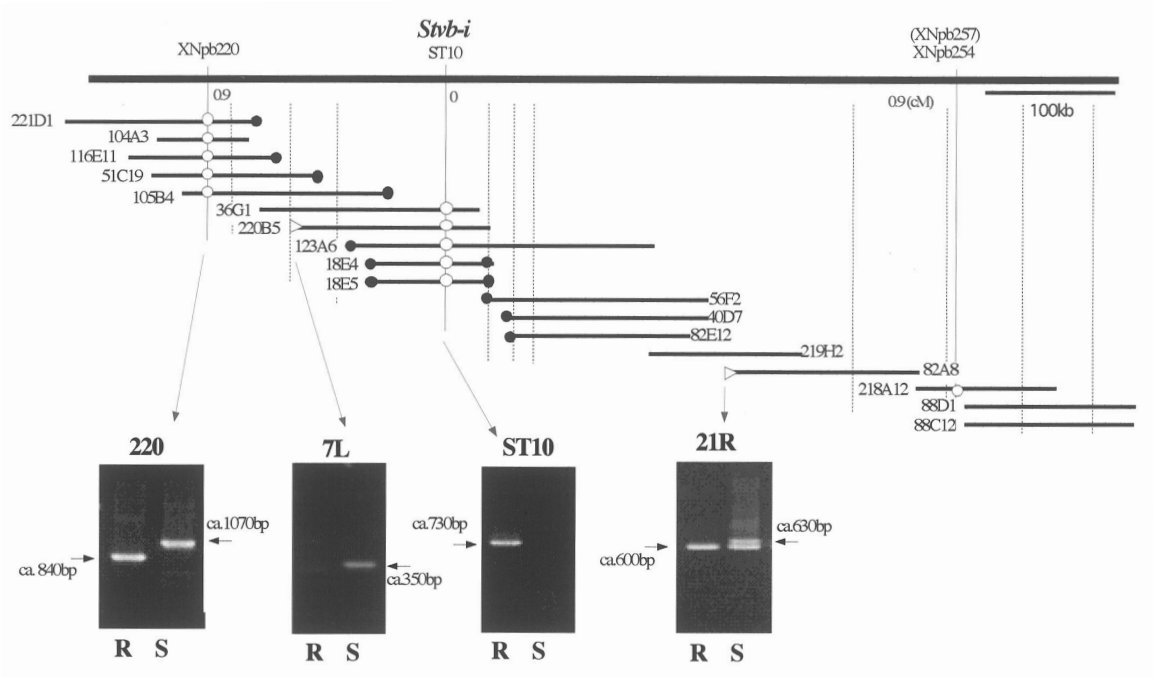
⑷　RFLP 分析

イネゲノミック DNA および BAC　DNA の調製，ハイブリダイゼーション，RFLP 分析については，前述の通り行った。

３）結果と考察

⑴　BAC 由来の分子マーカーの開発

物理地図の作製に利用した BAC クローンの各左右末端部 DNA 断片をプローブとして，縞葉枯病抵抗性および感受性イネ品種に対してサザンハイブリダイゼーションを行った。XNpb220－ST10間にある10断片のうちの７断片と，ST10－XNpb 254間にある16断片のうち５断片が抵抗性－感受性イネ間で多型を示し，RFLP マーカーとして有効であった（第30図）。多型を示さなかった末端については，塩基配列を調べ，プライマーを設定して PCR による多型の検出を試みた。その結果，220B５と82A８の末端の塩基配列を元に作製したプライマーは SCAR マーカーとして有効であった（７L および21R）。これらは感受性品種に特異的な断片（350bp，630bp）を増幅した（第４表および第30図）。さら



第30図　*Stvb-i* 遺伝子座周辺におけるマーカー

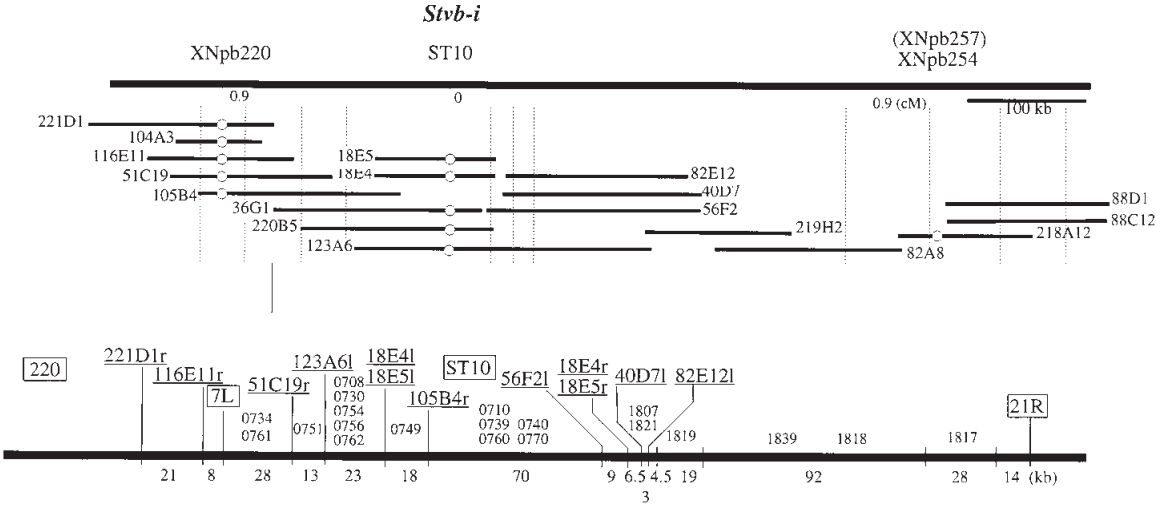
黒丸は「月の光」（抵抗性）－「コシヒカリ」（感受性）間で RFLP を示した末端。白抜き三角は SCAR マーカーとなりえた末端。写真は SCAR マーカーによる月の光（R）とコシヒカリ（S）における PCR 反応産物のアガロースゲル電気泳動パターン。

に，XNpb220およびST10の２つのRFLPマーカーについても同様にプライマーを設定し，PCRを行ったところ，抵抗性－感受性間で多型が見られた。220プライマーは抵抗性及び感受性品種からそれぞれ特異的な1071bpおよび839bpのDNA断片を増幅した（第４表および第30図）。両DNA断片の塩基配列を比較したところ，抵抗性由来の断片には感受性由来のDNA断片の中央部に，232bpのイネの反復配列の一つである*Tnr*１様の断片が挿入されていた。共優性型を判別できるマーカーと思われたが，ヘテロ接合型個体のDNAを鋳型として用いた場合には839bpの断片が優先的に増幅された。また，ST10プライマーは抵抗性イネから特異的に727bpのDNA断片を増幅し，感受性イネからの増幅は認められなかった（第４表および第30図）。以上により，４種のSCARマーカーを得ることができた。そのうち，21R，220およびST10は物理地図上において200kb間隔で存在していた。40D７および220B５に由来する31のサブクローンのうち，40D７からの６つのサブクローンが，また，220B５からの14のサブクローンがRFLPマーカーとして有効であった。なお，各サブクローンの物理地図上の位置はサザンハイブリダイゼーションによって推定した。以上のように，ST10およびXNpb220の２つのSCARマーカーとBACクローンに由来する34の分子マーカー，計36の分子マーカー（第31図）を開発した。

第４表　SCARマーカー（プライマー）の塩基配列とPCR反応プログラム

マーカー[1]	塩基配列[2]	プログラム[3]
220-f 220-r	GGG CAT CCT TTA CAG AGA AC CAT AGC CGT CTG ATT TGT AC	94℃30秒 60℃30秒 72℃１分
7L-f 7L-r	GGC CGA GAC GAA GGT GC CCC GCT GCT GAA GCA TC	94℃30秒 55℃30秒 72℃１分
ST10-f ST10-r	CGA AAG ATG GTT TCT CCA CC GAC CAA GCA ACT AAT GAC GC	94℃30秒 63℃30秒 72℃１分
21R-f 21R-r	TCC TCA GCA AAC TGT CAT CC CAC ATC TGA AAC TCT CAG TCC	94℃30秒 63℃30秒 72℃１分

１）fはforward，rはreverseを表す。
２）左側が５'末端方向，右側が３'末端方向を表す。
３）１サイクルの反応プログラムを記した。通常，DNAの変性と酵素の活性化のために95℃８分の処理を加えた後に，35～40サイクル繰り返して反応を行う。



第31図　新たに開発した分子マーカー

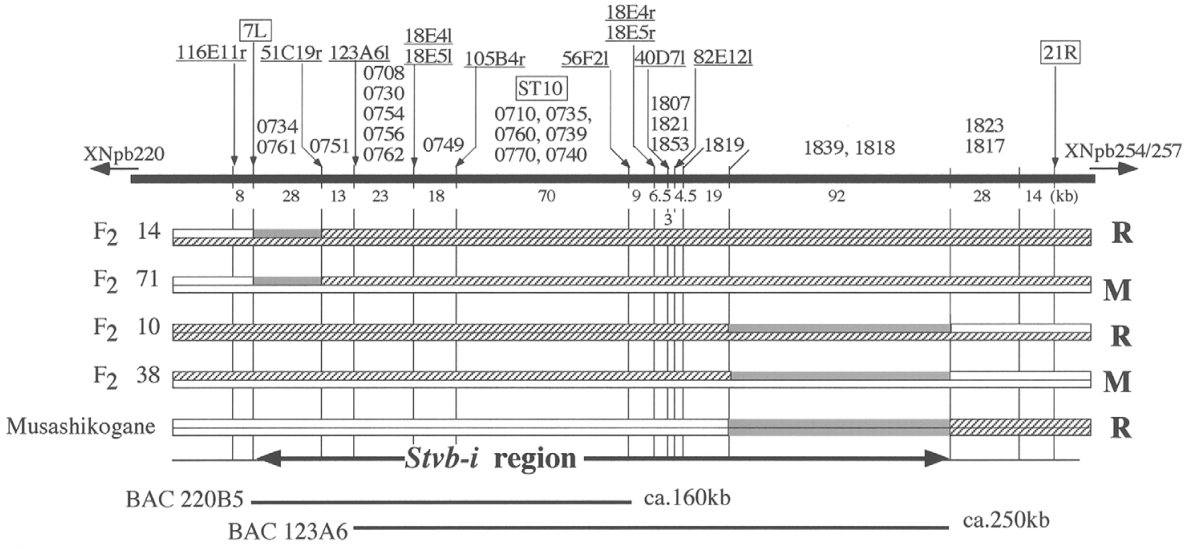
新たに開発した分子マーカーを物理地図上に記した。SCARマーカーは四角で囲んだ。下線を付したマーカーはBACクローンの末端から，４桁の数字で表したマーカーはサブクローンから生じたRFLPマーカー。サブクローン由来のマーカーは*Not*Iおよび*Hin*dⅢフィルターでサザンハイブリダイゼーションパターンから推定される位置（断片）に記した。

⑵　F_2による *Stvb-i* 遺伝子座領域の限定

先の連鎖解析に用いたF_2集団の中で，XNpb220－XNpb254間で組換えを生じている４個体（No.10，14，38および71，第24図参照）と抵抗性品種「むさしこがね」について，前項で開発したRFLPマーカーを用い，XNpb220－XNpb254間における遺伝子型を詳細に調べた。$F_2$14と71はともに0734／0761の遺伝子型と51C19rの遺伝子型とが異なり，XNpb220－ST10間の７Lと51C19rに挟まれる28kb断片で組換えを生じていたことが判明した。$F_2$10と38および「むさしこがね」では，いずれにおいても，1839と1818とで遺伝子型が異なり，両マーカーが位置する92kb断片内で組み換えが生じていたことが明らかとなった。マーカーの遺伝子型と縞葉枯病抵抗性反応から推測される *Stvb-i* 座における遺伝子型とが一致する領域が抵抗性に関与していると考えられた。以上の結果から，*Stvb-i* 遺伝子座は，SCARマーカー７L－21R間にあって，物理距離にして約286kbの領域に限定された（第32図）。この領域は，互いに重なり合う２つのBACクローン220B５および123A６によってカバーされていた。

⑶　RILによる *Stvb-i* 遺伝子座領域の限定

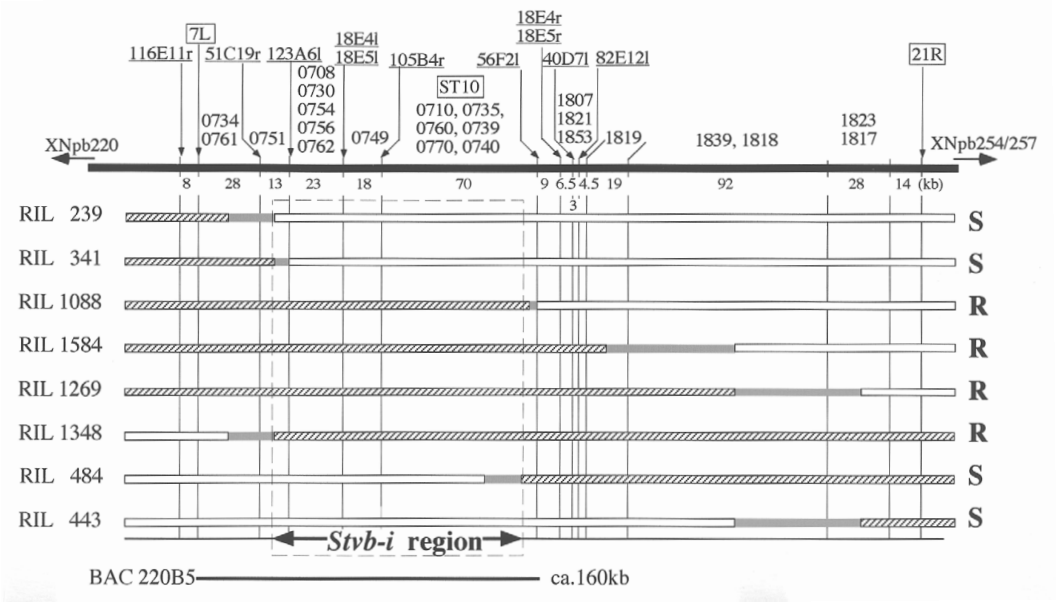
前項の結果から，RIL各系統の４つのSCARマーカー（220，７L，ST10および21R）座での遺伝子型を調べることにした。RIL2090系統から７L－21R間で組換えを起こしたと推定される約40系統を選抜した。さらに，この40系統のゲノムDNAを精製し，前項と同様にRFLP分析を行い，*Stvb-i* 座周辺における各系統の精密なグラフィカルジェノタイプを明らかにした。７R－21R間で組換えを確認できた８系統（ホモ接合型）を選抜した。この８系統について保毒ヒメトビウンカによる縞葉枯病抵抗性検定を行い，縞葉枯病抵抗性反応を調査した。８系統の抵抗性反応結果と抵抗性遺伝子領域におけるグラフィカルジェノタイプを第５表と第33図に示す。縞葉枯病に対し感受性であったRIL341はRFLPマーカー0751を含めたXNpb220側の領域が「Modan」に由来していた。RIL341においてインド型イネに由来する領域は抵抗性に関与しないと考えられた。また，RFLPマーカー0740でともにインド型イネの遺伝子型を示したRIL1088とRIL484の縞葉枯病に対する反応は全く異なっていた。0740を含めてXNpb220側を「Modan」由来領域とするRIL1088は抵抗性であった。RIL484は感受性で，0740よりもXNpb220側の領域を日本型イネに由来していた。したがって，0740を含めたXNpb254/257側の領域は抵抗性には関与しないものと考えられた。0740の正確な位置は明らかでないが，0740と同じく70kbの断片に含まれる他の６マーカー（ST10，0710，0735，0739，0760および0770）は，RIL484



第32図　F_2個体およびむさしこがねのグラフィカルジェノタイプと縞葉枯病抵抗性反応

斜線部はModanに由来する領域，白抜き部は日本型イネに由来する領域を表す。灰色部は由来が明らかでない領域，つまり，組換えを生じている領域を表す。系統番号もしくは品種名を左に，その縞葉枯病抵抗性反応を右に示した。矢印で示される領域内に *Stvb-i* 遺伝子座が存在すると推定される。この領域は２つのBACクローン220B５および123A６（最下段）によってカバーされる。

においていずれも日本型イネの遺伝子型であった。そのため，この70kb 断片に属するマーカーの中では0740が最も XNpb254／257寄りに存在することが明らかになった。以上により，*Stvb-i* 遺伝子座は，RIL341と RIL484の両系統において共に日本型を示す領域，約120kb 以内に存在すると推定された（第33図）。この領域を「Modan」に由来している系統（RIL1088，1269，1348および1584）の抵抗性程度は，RIL 集団の抵抗性親である「月の光」と同等であり（第５表および第34図），この約120kb 領域は BAC クローン220B5によってカバーされていることが明らかになった。物理地図の作製に用いた YAC や BAC クローンは，「日本晴」および「シモキタ」から作製されており，ともに *Stvb-i* 遺伝子そのものを有していないため，*Stvb-i* 遺伝子の単離に向け，抵抗性イネ品種のライブラリーを作製する必要がある。しかしながら，１個の BAC クローンで抵抗性遺伝子領域をカバーできたこと，同時に，限定された遺伝子領域内に多くの分子マーカーを得たことは，*Stvb-i* 遺伝子の単離に向けて



第33図　RIL 選抜系統のグラフィカルジェノタイプと縞葉枯病抵抗性反応

斜線部は「Modan」に由来する領域，白抜き部は日本型イネに由来する領域を表す。灰色部は由来が明らかでない領域，つまり，組換えを生じている領域を表す。系統番号を左に，その縞葉枯病抵抗性反応を右に示した。点線で囲んだ領域内に *Stvb-i* 遺伝子が存在すると推定される。この領域をカバーするBAC クローンを最下段に記した。

第34図　RIL 選抜系統の縞葉枯病抵抗性反応

幼苗検定に従い，RSV 保毒ヒメトビウンカによる接種をした後，約１ヶ月を経過した検体の様子。

第５表　RIL の抵抗性検定

品種・系統	反復数	全供試株数	罹病程度別の株数[1]			発病指数の平均（範囲）[2]	発病指数比の平均[3]
		T	a	b	c		
RIL 239	6	176	162	4	0	93(87-98)	101
RIL 341	6	176	160	8	0	93(87-98)	101
RIL1088	8	224	34	31	2	19(3-42)	21
RIL1584	8	224	38	44	3	27(14-39)	29
RIL1269	8	238	37	45	3	25(13-50)	29
RIL1348	8	225	35	56	7	28(18-40)	30
RIL 484	6	166	134	12	3	89(70-96)	96
RIL 443	6	172	147	12	0	89(85-97)	96
St. No. 1	4	103	1	10	5	6(0-10)	6
月の光	9	271	23	56	7	21(8-34)	22
黄金晴	10	299	266	19	1	93(83-100)	100
日本晴	4	121	112	7	0	95(92-100)	102

1）鷲尾ら（1968b）の病徴型 A－Bt を a，C と Cr を b，D を c に分類した。
2）各反復毎に算出した発病指数＝（100×a＋50×b＋20×c）／T の平均値を記した。
3）黄金晴の発病指数を100として算出される発病指数比の平均値を記した。

非常に有効と考えられた。加えて，スクリーニングに用いた SCAR マーカーの一つである ST10は，抵抗性であった上記 RIL 4 系統すべてから抵抗性に特異的な727bp 断片を増幅したことから，この増幅 DNA 断片は *Stvb-i* 遺伝子領域内に存在すると推察された。そのため，SCAR マーカー ST10は，選抜用マーカーとして抵抗性品種育成に利用できる可能性が高いと思われる。

６．DNA マーカーによるイネ縞葉枯病抵抗性個体の選抜

DNA 多型連鎖地図を利用した様々な形質の遺伝解析が進展し，目的形質と連鎖した DNA マーカーを利用して，間接的に形質を選抜するという新たな育種法（marker-assisted selection，MAS）が現実になりつつある。イネ縞葉枯病抵抗性検定は，保毒ヒメトビウンカを用いた強制的な生物検定に頼らざるを得ず，しかも，個体判別は極めて困難である。そこで，先に開発した SCAR マーカーである ST10プライマーを利用したイネ縞葉枯病抵抗性個体の選抜の可能性を検証した。

１）材料

PCR 分析のために，「Modan」と，「Modan」に由来する17抵抗性品種・系統（「St. No. 1」，「月の光」，「葵の風」，「祭り晴」，「あさひの夢」，「あ系584」，「愛系バイオ８-186」，「愛系バイオ８-188」，「ミネユタカ」，「中国31号」，「中国51号」，「中国56号」，「愛知21号」，「むさしこがね」，「こいごころ」，「中部89号」，「晴れすがた」），「黄金晴」／「月の光」の F_1 3 個体，「Mudgo」もしくは「IR８」に由来する抵抗性３品種（「アケノホシ」，「愛知81号」，「愛知98号」）および感受性日本型イネ10品種（「農林８号」，「コシヒカリ」，「日本晴」，「あいちのかおり」，「ミネアサヒ」，「幸風」，「レイメイ」，「玉系56号」，「早生吉良黄金」，「ひとめぼれ」）を供試した。また，*Stvb-i* 遺伝子座の解析に用いた「コシヒカリ」／「朝の光」の $F_2$120個体についても PCR 分析を行った。「Modan」以外で報告されている抵抗性品種の PCR 反応を明らかにするため，感受性・抵抗性を含めて外国稲12品種（「Mudgo」，「IR８」，「Karalath」，「Zenith」，「Pe-bi-hun」，「Surjumkhi」，「Kasalath」，「Saturn」，「Nato」，「Katakutara」，「Calorina」，「Lady Wright」）と日本陸稲10品種（「巴糯」，「黒禾」，「戦捷」，「白髭」，「陸稲農林11号」，「陸稲農林22号」，「陸稲農林24号」，「赤やかん」，「坊主糯」，「北海赤毛」）を供試した。なお，「Zenith」を除く抵抗性外国稲品種は *Stvb-i* を，「Zenith」および抵抗性日本陸稲は主働遺伝子の *Stvb* および強調遺伝子 *Stva* を持つとされる（Washio ら1968a，b，c）。上記供試品種のうち，「こいごころ」および「タマホナミ」は旧農業研究センター稲育種研究室より，「ミネユタカ，」「中国31号」，「中国51号」，「中国56号」および「アケノホシ」は旧中国農業試験場作物開発部より，「晴れすがた」は栃木県農業試験場より，「愛知21号」，「玉系56号」および「むさしこがね」は埼玉県農業試験場より，「ひとめぼれ」は宮城県農業試験場よ

り，「Kasalath」は斎藤　彰博士（九州沖縄農業研究センター）より，「Kasalath」を除く外国稲および日本陸稲品種は農業生物資源研究所ジーンバンクより分譲を受けた。

2）方法

⑴　PCR 反応

PCR 反応液組成は鋳型 DNA12.5ng，ST10プライマー（第４表）各200nM，dNTP 各120 μM，AmpliTaqDNA ポリメラーゼ（Applied Biosystems 社）0.4ユニット，10mM トリス－塩酸（pH8.0），50mM 塩化カリウム，1.5mM 塩化マグネシウム，0.001％（w/v）ゼラチンとした。反応は，PCR 9600，PCR2400またはPCR9700（いずれも Applied Biosystems 社）を用いて，94℃５分に続き，94℃ 30秒，63℃１分，72℃１分を40サイクルを基本プログラムとして行った。反応終了後，反応液の一部をアガロースゲル電気泳動（1.4または2.0％(w/v) アガロース，１×TAE）し，ゲルを EtBr 染色して反応産物の確認を行った。

⑵　イネ DNA の抽出方法

イネの DNA の調製は，前述の CTAB 法の変法にしたがって行った。また，外国稲および日本陸稲品種については，吉橋・大坪の方法（1997）にしたがい，市販の DNA 抽出キット Isoplant（ニッポンジーン社）を用いて，各品種６粒の精米から DNA を抽出した。

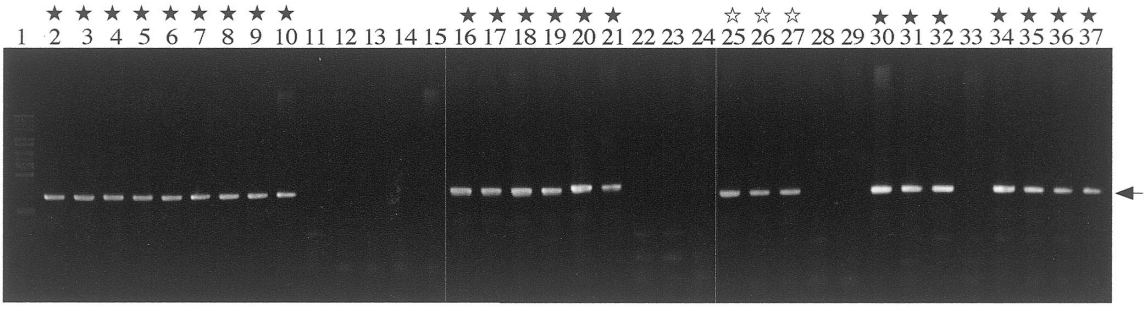
⑶　イネ縞葉枯病抵抗性検定

「Mudgo」，「Kasalath」および「Pe-bi-hun」の抵抗性反応は前述の幼苗検定法に準じて行い，抵抗性反応型の判別も同様に行った。「コシヒカリ」／「朝の光」の F_2 集団の抵抗性反応は連鎖解析のデータを用いた。「Mudgo」，「Kasalath」および「Pe-bi-hun」を除く外国稲および陸稲の縞葉枯病抵抗性反応は，鷲尾らの類別（1968b）を引用した。

3）結果および考察

⑴　生物検定との適合

ST10プライマーを用いて，日本で育成されたイネ縞葉枯病抵抗性品種・系統について PCR 分析を行ったところ，727bp の DNA 断片（以下 ST10断片）は抵抗性品種からのみ増幅した（第35図）。ヘテロ接合型個体である F_1（「黄金晴」／「月の光」）においては，抵抗性品種と同様に ST10断片が増幅し，抵抗性親の「月の光」とは区別できなかった。さらに，*Stvb-i* 遺伝子座の解析に用いた「コシカヒリ」／「朝の光」の F_2 集団120個体について，ST10プライマーを用いた PCR を行い，その遺伝子型を調べた。ST10断片が認められた F_2 個体はその F_3 系統の抵抗性反応において中程度抵抗性型もしくは抵抗性型であった（第６表)。感受性と判定されている F_2 個体からの ST10断片の増幅はなかった。以上のように，ST10プライマーによる PCR においては抵抗性イネから特異的に約730bp の



第35図　ST10プライマーによる PCR 反応産物の電気泳動パターン

各レーンは以下の通り。DNA サイズマーカー(1)，Modan(2)，St. No. 1 (3)，月の光(4)，葵の風(5)，祭り晴(6)，あさひの夢(7)，あ系584(8)，愛系バイオ８-186(9)，愛系バイオ８-188(10)，農林８号(11)，コシヒカリ(12)，日本晴(13)，あいちのかおり(14)，ミネアサヒ(15)，ミネユタカ(16)，中国31号(17)，中国51号(18)，中国56号(19)，愛知21号(20)，むさしこがね(21)，レイメイ(22)，玉系56号(23)，早生吉良黄金(24)，アケノホシ(25)，愛知81号(26)，愛知98号(27)，幸風(28)，コシヒカリ(29)，こいごころ(30)，中部89号(31)，晴れすがた(32)，ひとめぼれ(33)，月の光(34)，F_1（黄金晴／月の光）-１(35)，F_1-２(36)，F_1-３(37)。矢印は727 bp の DNA 断片の泳動位置を示す。Modan に由来する抵抗性品種・系統もしくは F_1 に黒星を，Mudgo もしくは IR８に由来する抵抗性品種に白星を付した。無印は感受性品種。

DNA 断片が増幅されるが，感受性品種からは増幅は認められなかった。したがって，この ST10断片の増幅の有無から，イネ個体における抵抗性遺伝子 *Stvb-i* の有無を推定することが可能と考えられた。前述の RIL の解析において明らかとなったように，ST10断片は *Stvb-i* 遺伝子の近傍120kb 内に存在し，ST10断片を増幅しうる RIL 系統は縞葉枯病に対して抵抗性であった。したがって，ST10断片の増幅の有無は生物検定の反応結果と良く適合しており，ST10プライマーを用いた PCR による縞葉枯病抵抗性イネの選抜効率は極めて高いと推測された。

第６表　ST10プライマーによる PCR 反応と生物検定による抵抗性反応の関係

PCR反応産物[1)]	縞葉枯病抵抗性[2)]		
	抵抗性	中程度抵抗性	感受性
＋	38	56	0
－	0	0	26

１）F_2個体（コシヒカリ／朝の光）における反応結果
２）各F_2個体[1)]のF_3系統での検定結果

⑵　DNA マーカー選抜による育種への可能性

選抜効率は非常に高いが，ST10プライマーによる PCR 反応では抵抗性ホモ接合型個体とヘテロ接合型個体とを区別することはできない。ST10プライマーは「Modan」に由来する DNA 領域の ST10断片を増幅するため，ヘテロ接合型個体からも抵抗性ホモ接合型個体と同様に727bp の ST10断片を増幅した（第35図および第６表）。育種への利用のためには，ヘテロ接合型個体を識別できる共優性型の SCAR マーカーや CAPS マーカー等のほうが得られる情報が多く，より有効であると思われる。ST10プライマーによる選抜の実施にあたっては，後代検定を行わない限り，ヘテロ接合型個体の識別が不可能であることを考慮しなければならない。

ST10プライマーでは，抵抗性ホモ接合型個体とヘテロ接合型個体とを識別することが困難であるという欠点はあるが，これによって，媒介昆虫を用いずに抵抗性遺伝子を有する個体を正確に判定できることは最大の利点である。縞葉枯病抵抗性の生物検定においては，個体検定は困難であり，そのため，F_2個体の抵抗性遺伝子型を明らかにする場合には，その後代系統を用いなければならないことから，世代を進めるのに時間を要する。これに対し，ST10プライマーを用いた場合には個体判別が可能であり，しかも，その検定は１日間でできる。また，PCR 反応を利用しているため，種子や生育初期のイネ個体の一部を検体とすることが可能で，検定時期を選ばない利点があり，生物検定全般にかかわる労力および時間を大幅に削減できると考えられる，ST10プライマーは，既に，愛知県農業総合試験場のほか，北海道立上川農業試験場，群馬県園芸試験場，埼玉県農業試験場において利用されている。

⑶　外国稲および日本型陸稲における ST10断片の有無

外国稲品種および日本陸稲の精米（各６粒）から抽出した DNA を鋳型として，ST10プライマーによる PCR を行い，ST10断片の増幅の有無を調べた。鷲尾ら（1968b）によって抵抗性および中程度抵抗性と類別されている外国稲７品種（「Modan」，「IR８」，「Karalath」，「Zenith」，「Surjumkhi」，「Saturn」，「Nato」）および生物検定によって抵抗性と判定された外国稲３品種（「Mudgo」，「Pe-bi-hun」，「Kasalath」）の計10品種のうち，「Modan」，「IR8」および「Mudgo」の３品種は ST10断片を増幅した。他の外国稲品種では，この DNA 断片の増幅はみられなかった（第７表）。「IR８」および「Mudgo」に由来するイネ縞葉枯病抵抗性品種「アケノホシ」，「愛知81号」および「愛知98号」についても「Modan」に由来する抵抗性品種と同様に ST10断片の増幅が確認された（第35図）。上記３品種以外の外国稲および日本陸稲においては，縞葉枯病抵抗性・感受性にかかわらず，ST10プライマーによる DNA 断片の増幅はみられなかった。

ST10断片の有無を調べることによって，Modan に由来する *Stvb-i* 遺伝子をもつ品種・系統・個体を判別することができる。「Modan」の他に，「Mudgo」と「IR８」も *Stvb-i* 遺伝子をもち，ST10断片が増幅されたが，これらの品種については，雑種集団を用いた ST10断片の有無と抵抗性反応の対応関係に関する解析がなされていない。そのため，現時点では，ST10プライマーによる抵抗性の判別に「Mudgo」および「IR８」に由来する品種・系統を適用しないほうがよいと思われる。一方，「Modan」，「Mudgo」および「IR８」以外の品種・系統では，*Stvb-i* 遺伝子をもつと考えられる外国

稲品種でも，ST10断片が増幅されなかった。また，日本陸稲や外国稲品種 Zenith が有する *Stvb* の有無を ST10断片によって推測することはできなかった。以上により，現時点では，ST10プライマーによる抵抗性イネ個体の判別は，「Modan」に由来する系統を対象とすることが望ましい。

DNA 多型連鎖地図の整備に伴い，様々な農業形質について遺伝解析が進み，それら農業形質と連鎖する分子マーカーが開発されている。特に，イネでは精力的に研究が進められてきた。病害虫抵抗性関連では，gall midge 抵抗性（Nair ら1995，1996）白葉枯病抵抗性（Williams ら1996），トビイロウンカ抵抗性（遠山ら1998a），穂いもち抵抗性（遠山ら1998b）等について，効率的である PCR 用マーカーが開発されている。今後，さらに多くの形質についてマーカーが開発され，そうした選抜用マーカーの蓄積によって，複数の形質をより効率的に短時間で検定することも可能となるであろう。

第７表　イネ品種における ST10断片の増幅と抵抗性反応

イネ	抵抗性反応[1]	PCR 反応産物	
		＋	－
外国イネ	抵抗性	Modan Mudgo[2] IR 8	Karalath Zenith[3] Pe-bi-hun[2] Surjumkhi Kasalath[2]
	中程度抵抗性		Saturn Nato
	感受性		Katakutara Calorina Lady Wright
日本陸稲	抵抗性		巴糯 黒禾 戦捷 白髭 陸稲農林11号 陸稲農林22号 陸稲農林24号
	中程度抵抗性		赤ヤカン
	感受性		坊主糯 北海赤毛

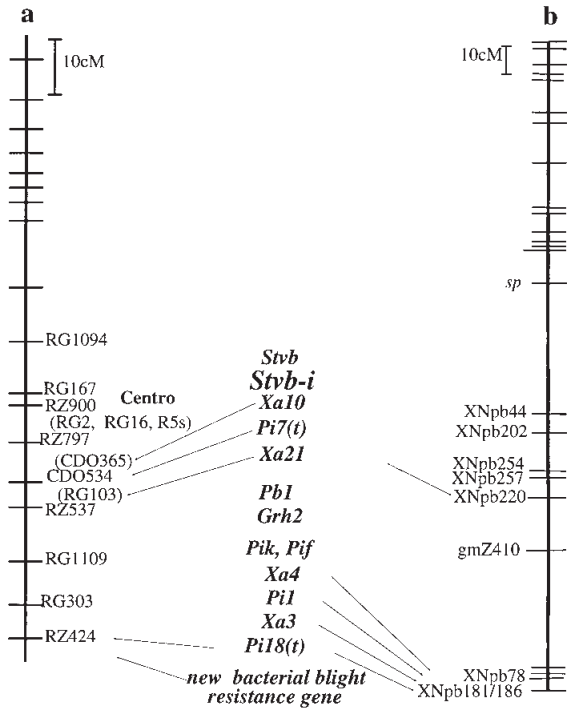
1）各品種の縞葉枯病抵抗性反応は Pe-bi-hun，Kasalath，Mudgo を除き，鷲尾ら（1968a）の記載を引用した。
2）Pe-bi-hun，Kasalath，Mudgo の３品種の抵抗性反応は北海道農業試験場で調べた。
3）Zenith と抵抗性日本陸稲は *Stva* および *Stvb* を有すると考えられる（Washio ら1968a）。

７．イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子に関する総合考察

外国稲に由来する縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stvb-i* に関するこれまでの研究（鷲尾ら1968b）では，相互転座系統を用いた解析の結果から座乗染色体を第８染色体と推測している。その後，「Modan」から導入された抵抗性遺伝子は数多くの品種に導入され，利用されてきたが，縞葉枯病の発生の収束とともに抵抗性遺伝子に関する研究の前進はなかった。しかし，「St. No.１」から多くの抵抗性品種を育成した愛知県農業総合試験場では，縞葉枯病抵抗性といもち病の圃場抵抗性（*Pif*）との連関を認識していた（香村ら1985）。*Pif* は，いもち病真性抵抗性遺伝子である *Pik* と共に第11染色体上に存在することが報告されており（篠田ら1971），育成現場においては，「Modan」に由来する縞葉枯病抵抗性遺伝子が *Pif* と同じ第11染色体に座乗する可能性が認識されていた（藤井，私信）。本研究において，「Modan」から「St. No.１」を経由する抵抗性品種のグラフィカルジェノタイプの解析によって，イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stvb-i* は第11染色体に座乗する可能性が大きいことを示した。また，*Stvb-i* の複対立遺伝子とされる *Stvb* 遺伝子も第11染色体上の RFLP マーカーと連鎖していることも報告され（Ando ら1993），本結果と一致した。さらに連鎖解析の結果，*Stvb-i* の座乗位置はイネ第11染色体長腕部にあることを明らかにした。

Stvb-i 遺伝子が座乗する第11染色体長腕部には，前述の *Pif*，*Pik* の他にも多くの抵抗性遺伝子が座乗している（第36図）；白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa*（Ronald ら1992，Yoshimura ら1993，Lin ら1995），いもち病抵抗性遺伝子 *Pi* および（Mew ら1994，Wang ら1994，Ahn ら1996），穂いもち抵抗性遺伝子 *Pb 1*（藤井ら1999），ツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子 *Grh 2*（田村ら1998）。いもち病抵抗性については非常に多くの遺伝子の存在が知られ，現在も新たな遺伝子の報告が相次ぎ，この領域においても新たな抵抗性遺伝子が座乗している。白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa21*は，イネの病害抵抗性遺伝子としては最初に単離された遺伝子であるが，クラスターを形成していることが知られている（Song ら1995）。Song ら（1997）が推測したように，病原体の変異に対応してきた結果であるならば，他の病害抵抗性遺伝子にも遺伝子クラスターをなすものがあると思われる。ここ数年，染色体や連鎖群

に関する情報や遺伝解析のための技術は格段に進歩した。特に，イネについては精力的にゲノム研究が行われ，これまで解析が困難とされていた形質に関する遺伝子を含め，多種多様な遺伝子の座乗位置が明らかになってきた。しかし，第11染色体長腕部のように多くの病害虫抵抗性遺伝子が集中して存在している領域は他には見られない。今後，座乗する遺伝子の構造や機能については，イネの染色体の塩基配列の解明と共に，このような領域を形成するに至った進化的意義が明らかになると考えられる。



第36図　イネ第11染色体に座乗する病害抵抗性遺伝子

Causse ら（a，1994）および Saito ら（b，1991）の連鎖地図上に記した。矢印は，その遺伝子が連鎖する RFLP マーカーを指している。

本研究において行った縞葉枯病抵抗性検定では，多くの場合，標準品種として抵抗性および感受性品種を各２品種ずつ用いてきた。抵抗性標準品種としては「St. No. 1」と「月の光」を主に用いてきた。「St. No. 1」は，月の光などの日本型イネとの交配が進められた抵抗性品種に比べて非常に強い抵抗性を示した。「月の光」などの抵抗性品種では発病指数比が20-35であるのに対して，「St. No. 1」ではほぼ安定して10前後であった（第５表参照）。つまり，「St. No. 1」は抵抗性程度がその後に育成された抵抗性品種より高いことを示唆しているといえる。「月の光」や「朝の光」と「St. No. 1」との差については，「St. No. 1」では第11染色体の他にも「Modan」に由来する染色体領域が存在していることと，「Modan」に由来する第11染色体領域が「月の光」や「朝の光」などの抵抗性品種に比べて長いことも関係していると推察される。「St. No. 1」以降に育成された抵抗性品種では日本型イネに替わった領域内に，抵抗性に関与する作用力の微少な遺伝子が存在している可能性もある。「St. No. 1」の第11染色体の他の領域の中には，第４染色体のように，白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa 1*，*Xa 2*（Yoshimura ら1992）や耐冷性関連遺伝子（Saito ら1995），いもち病抵抗性遺伝子などが知られており，病害抵抗性を含めたストレス耐性関連遺伝子が多く座乗している。このような領域にも縞葉枯病抵抗性に関与する遺伝子が存在するかもしれない。

Stvb-i 遺伝子は劣性に近い不完全優性とされ（鷲尾ら1968a，b），本研究においてもそのように扱ってきた。しかしながら，F_3 分離系統の抵抗性検定結果からは，罹病個体と無発病個体は同率で存在していた。もし，劣性に近い不完全優性であるならば，分離系統を検体とした場合，罹病個体が多くなり，発病指数比は感受性系統に近い値を示すものと思われる。従って，「Modan」に由来する *Stvb-i* 遺伝子は不完全優性であるが，劣性に近いものではないと考えられた。

RIL を用いた *Stvb-i* 遺伝子領域の限定の結果，RFLP マーカー ST10は *Stvb-i* 遺伝子とともに120 kb 以内に存在することが明らかとなった。その ST10から開発した SCAR マーカーでは，「Modan」，「Mudgo」，「IR 8」のみが特異的に ST10断片を増幅し，それ以外の外国稲および陸稲からの増幅は認められなかった。鷲尾ら（1968a，c）は，*Stvb* と *Stvb-i* はどちらも *Stvb* 座に存在する複対立関係にある遺伝子のひとつであり，*Stvb-i* にはさらに品種によって多様性があるとしている。つまり，*Stvb-i* とは，*Stvb* 座に存在するインド型イネを主体とした外国稲のもつ抵抗性遺伝子の総称であり，個々の品種の抵抗性遺伝子は異なると解釈できる。したがって，抵抗性を有する品種群の中で ST10断片の増幅の有無があったことは，構造の異なる抵抗性遺伝子の存在が反映された可能性がある。し

かしながら，ST10断片と「Modan」の *Stvb-i* 遺伝子との関係もまだ明らかでなく，今後，「Modan」以外の抵抗性品種の遺伝分析を含めたより詳細な研究が必要である。また，それによって，育種へのST10プライマーの適用範囲が広がる可能性はある。

鷲尾ら（1968b，c）は外国稲の抵抗性遺伝子を *Stvb-i* としたものの，それぞれの品種の抵抗性反応の強さ，つまり，その作用力が異なることから，抵抗性遺伝子 *Stvb-i* は個々の品種で異なっていると結論した。この品種間差が何に起因するのかは全く不明である。しかし，抵抗性の外国稲品種間でみられたST10断片の増幅の差は，*Stvb-i* 座を含めたゲノム領域になんらかの構造的な差異があることを示した。「Zenith」を除く外国稲に由来する抵抗性遺伝子はすべて *Stvb-i* と捉えられてきたが，*Stvb* と *Stvb-i* は *Stvb* 座に存在する複対立遺伝子であり，「Modan」以外の外国稲品種の抵抗性遺伝子とは異なると推察される。それぞれの抵抗性品種の *Stvb* 座に異なる抵抗性遺伝子が存在するかどうかは，陸稲由来の *Stvb* 遺伝子や「Modan」以外の抵抗性品種に由来する遺伝子の解析を必要とする。「Surjumkhi」と同様にST10プライマーによる反応がネガティブであった「Kasalath」については，BAC ライブラリーが構築されており（Miyazaki・Saito 1999），解析のための基盤は整いつつある。まずは，「Modan」に由来する *Stvb-i* 遺伝子の単離を契機として「Modan」以外の品種に由来する抵抗性遺伝子の存在を探ることができると考えられる。

Ⅴ．イネ縞葉枯病抵抗性に関する総合考察

イネ縞葉枯ウイルス（RSV）のコードする２つのタンパク質のアミノ酸配列の解析から，それらのタンパク質遺伝子の所在と特異なコーディング様式が明らかとなった。さらに，RSV の第３，４分節 RNA のクローニングおよび塩基配列の解明によって詳細なゲノム構造が明らかになり，RSV 外被タンパク質遺伝子が単離された。これにより，当初の目的であった外被タンパク質遺伝子の導入による抵抗性イネの作出が進められることになった。縞葉枯病感受性品種の「日本晴」に RSV 外被タンパク質遺伝子が導入された（大槻ら1990）。その後，得られた形質転換体で外被タンパク質の発現も確認され，形質転換第２世代（T_2）を用いて抵抗性検定が行われた（河又・美濃部1993）。鷲尾ら（1968 b）の幼苗検定法による生物検定ではほとんどの形質転換体が感受性を示し，目立った抵抗性を示す系統はなかった。しかし，検定時期を1.5～２葉期から4.5～５葉期に変えて生物検定を行ったところ，中程度ないし高度の抵抗性を示す系統が得られた。この結果について，河又・美濃部（1993）は抵抗性の機構が従来の宿主イネ側の抵抗性遺伝子による機構とは異なるため，幼苗検定では形質転換体の抵抗性を検知することが難しいと考えた。同時期に別の研究グループが同様に形質転換イネを作出し，その抵抗性を評価している（Hayakawa ら1992）。Hayakawa らは形質転換体での外被タンパク質の発現とウイルス病抵抗性の間に強い相関があると結論している。その生物検定は４葉期に行われており，導入外被タンパク質遺伝子による抵抗性の発現は幼苗期では効果が見られず，河又・美濃部が推測したように，イネの抵抗性遺伝子の発現機構とは全く異なると考えられる。

抵抗性を示した形質転換イネは，その後，数々の安全性評価試験を経て，縞葉枯病常発圃場にて抵抗性試験が行われたが，現在までに中間母本となり得るような抵抗性系統は得られていない（安東，私信）。常発圃場におけるウイルス感染時期は不明であるが，これまでに明らかとなっている縞葉枯病の発生とヒメトビウンカの生態から，本田移植前後にウイルス感染すると被害は甚大となる。したがって，４葉期以前から抵抗性が発現することは重要である。ウイルス病抵抗性形質転換植物はこれまでに数多く作出されてきた。ウイルスの外被タンパク質遺伝子の導入によって賦与される抵抗性の機構は干渉効果とされるが，ウイルスの種類によって異なる結果を生じており（難波ら1991），詳細については不明な点が多い。特に，RSV の場合，感染組織内での複製機構やウイルスの移行などに関する知見が少なく，外被タンパク質の過剰発現が宿主植物やウイルス感染に際しどのように影響しているのか明らかでない。従来のイネ由来の抵抗性と同等以上の抵抗性を賦与することはできなかったが，外被タンパク質の導入によって，抵抗性が発現したと思われる系統もあった。そうした系統は今後植物体内での RSV の複製や病徴の出現などの解析に役立つものと考えられる。また，

RSV のコードする遺伝子には機能の明らかでないものあり，RSV 由来の導入遺伝子として外被タンパク質遺伝子以外にもっと効果的な遺伝子がある可能性も残されている。

外来遺伝子の導入による抵抗性の賦与が必ずしも成功しないことが明らかとなる一方で，解析技術の進歩により宿主植物が本来もつ抵抗性遺伝子の単離も行われるようになった。ポジショナルクローニングやジーンタギングといった手法によって，これまでに単離された病害虫抵抗性遺伝子は10を越えている（第８表）。それらの病原体は，ウイルス，菌，バクテリア，線虫と異なっているにもかかわらず，予想される遺伝子産物の構造には共通点も多く，いくつかのタイプに分類される。ロイシンリッチリピート（leucine-rich repeat，LRR）とヌクレオチド結合領域（nucleotide binding site，NBS）を持ち，細胞内レセプター様のタンパク質をコードするものがある。それらには，さらに２つのタイプがある。ひとつはアミノ末端にロイシンジッパー（leucine zipper，LZ）が見い出されるもの（*Xa 1*，*Rps 2*など），もうひとつはアミノ末端側に LZ ではなく哺乳類やショウジョウバエのレセプター遺伝子と相同性の高いもの（*N*，*Rpp 5* など）である。他には，細胞内プロテインカイネースをコードするもの（*Pto*），細胞外 LRR をもつ細胞膜間レセプター様タンパク質をコードするもの（*Cf 9*，*Cf 2*など），*Pto* と *Cf 9* や *Cf 2* のタンパク質の構造をあわせ持つ *Xa21* のようなもの，そして，上記にあてはまらないもの（*Hm 1*）などである。単離されている抵抗性遺伝子はその病原体も植物種も異なっているにもかかわらず，ある程度の分類が可能であるということは，抵抗性を発現する経路などになんらかの共通性があると思われる。推測される構造からレセプター様のタンパク質をコードしているものが多いとされている。抵抗性遺伝子産物は個々の病原体からのシグナルを受け取り，そのシグナルは共通する反応経路に伝達される可能性が高い。Warren ら（1998）は，*RPS 5* 遺伝子の病原体の認識に重要な役割を果たしていると考えられる LRR 領域の変異系統を用いた実験から，抵抗性に共通の経路の存在を推測している。共通の反応経路が存在するならば，レース特異性のない，いわゆる durability をもった抵抗性を賦与する方法も得られる可能性がある。今後は，その共通すると考えられる反応経路の解明が重要になってくると思われる。

これまでに単離された抵抗性遺伝子の多くは，過敏感反応（Hypersensitive response，HR）に

第８表　単離された抵抗性遺伝子

抵抗性遺伝子	遺伝子産物の構造[1)]	植物	病原体	文献
Xa 1	LZ-NBS-LRR	イネ	*Xanthomonas oryzae*	Yoshimura ら（1998）
Rx	LZ-NBS-LRR	ジャガイモ	*poteto virus X*	Bendahmane（1999）
Mi	LZ-NBS-LRR	トマト	*Meloidogyne*	Milligan ら（1998）
Prf	LZ-NBS-LRR	トマト	*Pseudomonas syringae*	Salmeron ら（1996）
RPM 1	LZ-NBS-LRR	アラビドプシス	*Pseudomonas syringae*	Grant ら（1995）
RPS 2	LZ-NBS-LRR	アラビドプシス	*Pseudomonas syringae*	Bent ら（1994），Mindorinos ら（1994）
N	TIR-NBS-LRR	タバコ	*tobbaco mosic v irus*	Whitham ら（1994）
L^{6}	TIR-NBS-LRR	アマ	*Melampsora linin*	Lawrence ら（1995）
M	TIR-NBS-LRR	アマ	*Melampsora linin*	Anderson ら（1997）
RPP 5	TIR-NBS-LRR	アラビトプシス	*Peronospora parasitica*	Bent ら（1996）
Pto	protein kinase	トマト	*Pseudomonas syringae*	Martin ら（1993）
Cf-9	TM-LRR	トマト	*Cladosporium fulvum*	Jones ら（1994）
Cf-2	TM-LRR	トマト	*Cladosporium fulvum*	Dixon ら（1996）
Cf-5	TM-LRR	トマト	*Cladosporium fulvum*	Dixon ら（1998）
Xa21	protein kinase, LRR	イネ	*Xanthomonas oryzae*	Song ら（1995）
Hm 1	NADPH 依存レダクターゼ	トウモロコシ	*Cochliobolus carbonum*	Johal・Briggs（1992）

1）LZ, leucine zipper; NBS, nucleotide binding site; LRR, leucine-rich repeat; TIR, Toll/IL-1R homology region; TM, transemembrane を表わす。

よって病原体を侵入箇所で抑え込んでしまう現象を伴う抵抗性に関与している。イネで単離された *Xa21*と *Xa 1*，タバコモザイクウイルスに対する *N* 遺伝子（Whitham ら1994）は，HR を伴う抵抗性遺伝子である。最近，ジャガイモ X ウイルスに対する抵抗性遺伝子 *Rx* が単離された（Bendahmane ら1999）。*Rx* をもつジャガイモでは PVX の感染に対し抵抗性であるが，壊死を伴う HR は関与しないとされる。しかし，明らかになった遺伝子産物は，HR 型の抵抗性遺伝子である *Xa 1* や *Rps 2* と同様の NBS-LRR 構造をもつことが示唆された。

「Modan」に由来する縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stvb-i* の抵抗性でも HR がみられないので，*Stvb-i* 遺伝子産物の機能やその抵抗性機構は，HR を介する抵抗性に関与する遺伝子や *Rx* 遺伝子のものとは異なるだろうと推測している。縞葉枯病では，病原体である RSV の接種はウイルスを含む罹病植物組織を磨砕した汁液による機械的接種によって行うことができず，RSV 保毒ヒメトビウンカを用いるほかない。RSV はヒメトビウンカによる吸汁の際にイネへ伝搬されるが，ウイルスの侵入箇所を特定することは難しい。しかしながら，抵抗性イネで HR の報告はなく，筆者の実験でも全くなかった。

野田ら（1991）や Nemoto ら（1994）は *Stvb-i* 遺伝子の抵抗性はウイルス感染に対するものであり，一旦感染が成立したならば，罹病株におけるウイルス濃度には抵抗性と感受性品種間に差がないとした。一方，孫工ら（1973）は，ウイルス濃度は感受性品種では高く，抵抗性品種では低いことを示し，ウイルスの感染以後にも抵抗性が関与することを報告している。これまでの筆者の観察によれば，感受性品種の罹病株率は抵抗性品種における罹病株率よりも明らかに高かった（第５表参照）。従って，*Stvb-i* 遺伝子による抵抗性がウイルス感染に対するものであると考えられた。さらに，抵抗性品種も通常数～20数パーセントが罹病するという特徴がある。そのため，抵抗性品種のウイルス感染に対する抵抗性は，全か無かといった明瞭なものではなく，量的性質を持っていると思われる。さらに，RSV に感染し，発病した抵抗性イネの病徴は，感受性イネよりも軽い。第５表に記したように，感受性イネでは，罹病株のほとんどが葉の枯死が進行し，全身枯死に陥るか，もしくはそれに近い激しい病徴を示すａ型であった。これに対し，抵抗性品種の罹病株には，感受性品種と同様にａ型の病徴も観察されるが，明瞭でかつ不連続な退緑斑紋が観察されるものの，株自体は生存しつづけ，穂をつけることも可能であるｂ型の占める割合が高い。このことは，孫工ら（1973）が報告したように，ウイルス感染後にも作用する抵抗性の存在を示唆していると考えられる。つまり，*Stvb-i* 遺伝子をもつ抵抗性イネでは，ウイルスの感染を抑制する効果と，感染したのちウイルスの増殖を抑制して発病を軽減する効果の２つの抵抗性が存在すると推察される。そして，どちらの抵抗性も量的に作用しているように見える。その２つの抵抗性に *Stvb-i* 遺伝子が関与しているのか，それとも一方にのみ働いていて，もう一方は異なる抵抗性遺伝子が存在し，それによるものであるのかを推論することは難しい。今後，RSV の感染の成立や宿主組織における増殖機構，*Stvb-i* 遺伝子の産物を明らかにすることが抵抗性機構の解明に不可欠である。

これまでの縞葉枯病抵抗性遺伝子に関する研究で，「Modan」に由来する抵抗性遺伝子 *Stvb-i* の存在領域をカバーする BAC クローンと多くの分子マーカーによる詳細な物理地図を得た。さらに，*Stvb-i* 遺伝子を120kb 以内に限定することができた。今後，本研究で得られた情報や知見を基盤に，抵抗性品種からの *Stvb-i* 遺伝子のクローニングを進める。*Stvb-i* 遺伝子の単離は，農林水産省イネ・ゲノムプロジェクト参画課題であり，プロジェクト推進会議によって，この *Stvb-i* 遺伝子領域の120kb の塩基配列（「日本晴」）について RGP（NAIR/STAFF）の協力により進められることが決定している。「日本晴」は抵抗性品種でないため，解明される塩基配列に *Stvb-i* そのものは存在しないが，得られる情報は膨大であり，*Stvb-i* 遺伝子の単離・機能解明に向けて役立つと考えられる。また，宿主イネにおける感染の成立や RSV の増殖機構に関する知見の蓄積が抵抗性分子機作の解明に必要であろう。現在，RSV ゲノムの解析と発現タンパク質の機能解明も進展しつつあり，*Stvb-i* 遺伝子の単離・機能解明によって，宿主－寄生者の分子レベルでの相互関係が理解されるものと思う。

Ⅵ．摘　要

本研究は，イネ縞葉枯ウイルスRSVの２つの主要タンパク質遺伝子のコーディング様式の解明と，インド型イネ「Modan」に由来するイネ縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stvb-i* のポジショナルクローニングを目指して，遺伝子の染色体上座乗位置の特定およびその物理地図上における抵抗性遺伝子座の限定について研究を行った。

１．イネ縞葉枯ウイルスゲノム

RSVの２つの主要なタンパク質である外被タンパク質と感染特異タンパク質のアミノ酸部分配列を決定した。外被タンパク質は純化ウイルス粒子から，感染特異タンパク質はイネ感染組織からそれぞれ精製し，プロテナーゼ処理により生じたペプチドをHPLCにより分画し，得られたペプチドのアミノ酸配列を決定した。その結果，外被タンパク質についてはカルボキシル末端を含む８ペプチドと感染特異タンパク質については11ペプチド（うち３ペプチドは重複）のアミノ酸配列を明らかにした。

外被タンパク質および感染特異タンパク質のアミノ酸配列から設計したオリゴヌクロチドプローブを用いてウイルスゲノムRNAに対してハイブリダイゼーションを行い，それぞれのタンパク質をコードする分節RNAの特定を行った。その結果，外被タンパク質はRSVの第３分節RNAにアンチウイルスセンスにコードされ，また，感染特異タンパク質は，第４分節RNAにウイルスセンスにコードされ，それぞれ異なる極性でコードされていることが明らかとなった。このことから，RSVのコーディング様式はアンビセンスであると考えられた。

２．イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子の解析

インド型イネ「Modan」に由来するイネ縞葉枯病抵抗性品種と感受性品種のゲノムDNAを抽出し，イネ染色体上に分布する322個のRFLPマーカーのRFLP分析を行い，St. No.１およびその子孫抵抗性品種のグラフィカルジェノタイプを明らかにした。各抵抗性品種のグラフィカルジェノタイプから，「Modan」由来の染色体領域は日本型イネとの交配が進むに伴って第11染色体上の特定領域に収束した。この「Modan」に由来する染色体領域は縞葉枯病抵抗性に関与するものと考えられた。抵抗性品種「星の光」では４個のRFLPマーカー（gmZ410，XNpb220，XNpb257，XNpb254），「むさしこがね」では２個のRFLPマーカー（gmZ410，XNpb220）がインド型イネの遺伝子型を示し，抵抗性遺伝子 *Stvb-i* は第11染色体上約28～36cMの領域内に存在する可能性が高いことを明らかにした。

抵抗性遺伝子 *Stvb-i* の座乗すると考えられる第11染色体上の新規の24個のRFLPマーカーを用い，「コシヒカリ」（感受性）と「朝の光」（抵抗性）間で多型を検出できるマーカーの探索を行った。供試24個のRFLPマーカーのうち，８個のRFLPマーカーが多型を示した。また，800種の10塩基のオリゴヌクレオチドプライマーによるRAPD分析を行い，約2,200の増幅DNA断片のうち，「コシヒカリ」と「朝の光」間で多型を示す５断片を得た。これら５断片をRFLPマーカーとして検討したところ，１断片が多型を示し，これをRFLPマーカーST10とした。したがって，「コシヒカリ」と「朝の光」間で多型を示す新規の９個のRFLPマーカーを得た。「コシヒカリ」と「朝の光」間で多型を示すマーカーは，前項の４個のRFLPマーカーと合わせて13個になった。

「コヒシカリ」／「朝の光」の$F_2$120個体を用いて，交配親間で多型を示す13個のRFLPマーカーとイネ縞葉枯病抵抗性の連鎖解析を行った。$F_2$120個体からそれぞれDNAを抽出し，RFLPマーカーを用いて各個体の遺伝子型を得た。そのF_3系統を用いて縞葉枯病抵抗性検定を実施し，F_2個体の抵抗性程度を評価した。検定の結果，供試したF_2集団は26：56：38（感受性型：中程度抵抗性型：抵抗性型）に分離し，期待値１：２：１に適合した（$x^2=2.93$，$0.10<p<0.30$）。各F_2個体の遺伝子型と抵抗性反応結果との連鎖解析の結果，抵抗性遺伝子 *Stvb-i* はXNpb220とXNpb254/257に挟まれる1.8cMの領域内にあり，RFLPマーカーST10と0.0cMで連鎖していることが明らかとなった。

Stvb-i 遺伝子と連鎖する３つのRFLPマーカー（XNpb220，ST10，XNpb257）をプローブとしたYACライブラリー（「日本晴」由来）のスクリーニングによって６個のYACクローンを選抜した。同様にXNpb220，ST10，XNpb254の３つのRFLPマーカーとYACクローンY4366の切断断片をプロー

ブとして，BAC ライブラリー（「シモキタ」由来）のスクリーニングによって18個の BAC クローンを得た。各クローンの挿入 DNA 末端断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションおよび制限酵素断片の泳動パターンから BAC クローンの相互関係を調べ，18クローンを整列化した。これにより，*Stvb-i* 遺伝子座を含む1.8cM の領域を18の整列化 BAC クローンによりカバーすることができた。また，XNpb220−XNpb254/257間（遺伝距離で1.8cM）は物理距離にして約620kb に相当していた。

物理地図の作製に用いた BAC クローンの挿入 DNA 末端断片およびサブクローンから34の分子マーカー（２SCAR，32RFLP）を開発した。また，既存の RFLP マーカー XNpb220および ST10をそれぞれ SCAR マーカーに変換し，計36個の分子マーカーを得た。これらの分子マーカーを用い，連鎖解析に供試した F_2 集団の中で XNpb220－XNpb254/257間で組換えを生じていた４個体と抵抗性品種「むさしこがね」について *Stvb-i* 座領域における遺伝子型を調べた。その結果，*Stvb-i* 座は SCAR マーカー７L と21R との間，約286kb に限定された。さらに，リコンビナントインブレッドライン（「黄金晴」／「月の光」）から選抜された *Stvb-i* 座近傍での組換え系統を用いた解析から，*Stvb-i* 遺伝子は約120kb の領域内に存在することが明らかとなった。以上の結果，*Stvb-i* 遺伝子のクローニングの基盤が整った。

抵抗性遺伝子と密接に連鎖する SCAR マーカー ST10による縞葉枯病抵抗性個体の選抜の可能性を検討した。国内で育成された「Modan」に由来する抵抗性品種・系統はすべて SCAR マーカーによる DNA 断片の増幅が認められた。また，F_2 集団（「コシヒカリ」／「朝の光」）120個体について検討したところ，DNA 断片の増幅が認められた個体は，抵抗性型もしくは中程度抵抗性型であり，増幅のみられなかった個体はすべて感受性であった。SCAR マーカーによる判定と生物検定による判定は一致し，「Modan」に由来する縞葉枯病抵抗性個体・系統の選抜効率は極めて高く，DNA マーカーを利用して縞葉枯病抵抗性イネを選抜することは可能である。

謝　辞

本論文の取りまとめにあたっては，北海道大学大学院農学研究科応用生命学専攻育種工学講座植物病原学分野上田一郎教授には親切な指導とともに，綿密な校閲を賜った。また，同生物資源生産学専攻作物生産生物学講座植物病理学分野前教授生越　明博士，同生物資源生産学専攻作物生産生物学講座作物生理学分野喜久田嘉郎教授，同応用生命科学専攻育種工学講座遺伝子制御学分野三上哲夫教授には貴重なご助言とご校閲を賜った。慎んで深く感謝の意を表する。

RSV ゲノムの解析の実施にあたっては，美濃部侑三氏（前農業生物資源研究所分子遺伝部長），角谷徹二博士（国立遺伝研究所助教授），林　隆治博士（国際農林水産業研究センター），中島一雄博士（同），匠原鑑一郎博士（社団法人植物防疫協会），津田新哉博士（中央農業総合研究センター）には研究の遂行にあたって多くのご助言とご協力を頂いた。石川浩一氏（近畿中国四国農業研究センター）には貴重な実験材料である RSV を分譲して頂いた。これらの方々に心から深く感謝の意を表する。

縞葉枯病抵抗性遺伝子に関する研究の実施にあたっては，杉浦巳代治博士（国際協力事業団），斎藤彰博士（九州沖縄農業研究センター）には研究のきっかけと研究遂行にあたって非常に多くのご配慮と激励を賜った。岸本直己博士（農業生物資源研究所）には，研究遂行にあたってご配慮を頂いた。鵜飼保雄博士（前東京大学農学部教授），大澤　良博士（筑波大学農林学系助教授），原田久也博士（千葉大学農学部教授）には連鎖解析についてのご助言を頂いた。愛知県農業総合試験場作物研究所には縞葉枯病抵抗性品種の分譲と同品種に関する貴重な情報および実験材料の養成に多大なご協力を頂いた。川崎信二博士（農業生物資源研究所），イネゲノムプロジェクト（農業生物資源研究所／農林水産先端技術研究所）関係各位，McCouch 博士（コーネル大学助教授）にはクローンの分譲とご助言を頂いた。辻　孝子氏（愛知県農業総合試験場作物研究所），藤井　潔氏（同）には多くのご協力を頂いた。また，旧中国農業試験場作物開発部，埼玉県農業試験場，宮城県農業試験場，栃木県農業試験場および旧農業研究センター稲育種研究室に

は貴重な種子を分譲して頂いた。道立上川農業試験場水稲育種科の方々には早くから縞葉枯病抵抗性個体選抜用 DNA マーカーの利用にご理解を頂いた。これらの方々に心から深く感謝の意を表する。

前北海道農業試験場長稲葉忠興博士（農業技術研究機構副理事長）には本論文を作成する上で格別の御配慮を頂いた。平成12年12月に急逝された前ウイルス病研究室長故岩崎眞人博士，育種工学研究室齋藤浩二氏には研究の遂行と本論文の作成全般にわたり多くの暖かいご助言とご協力を頂いた。元場長岡田利承博士（社団法人農林水産技術情報協会），生産環境部長高橋賢司博士，前部長尾和尚人博士（新潟大学農学部教授），元部長小川　奎博士（農業技術研究機構理事），元部長井上隆弘博士（国際農林水産業研究センター理事長），元ウイルス病研究室長本田要八郎博士（中央農業総合研究センター），前研究交流科長吉野昭夫氏（財団法人北農会），農業生物資源研究所橋本純治博士，同大橋祐子博士には多くのご助言と暖かい励ましを頂いた。北海道大学大学院農学研究科応用生命学科育種工学講座植物病原学分野各位，農業生物資源研究所および北海道農業研究センターの各位から多くのご協力を頂いた。これらの方々に心から深く感謝の意を表する。

共同研究者として，人生のパートナーとして常に惜しみない協力と支援をしてくれた齋藤浩二氏に心から深く感謝する。

なお，RSV ゲノムの解析は農林水産省のプロジェクトバイテク育種，イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子の解析は同省イネ・ゲノムプロジェクトの予算により行った。

引用文献

1）Ahn, S. N., Kim, Y. K., Han, S. S., Choi, H. C., Moon, H. P., McCouch, S. R. (1996) Molecular mapping of a gene for resistance to a Korean isolate of rice blast. *Rice Genet. Newsl.* 13:74-76

2）Allard, R. W. (1956) Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilagardia* 24: 235-278

3）Anderson, P. A., Lawrence, G. J., Morrish, B. C., Ayliffe, M. A., Finnegan, E. J., Ellis, J. G. (1997) Inactivation of the flax rust resistance gene *M* associated with loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region. *Plant Cell* 9:641-651

4）Ando, I., Yoshida, T., Kishimoto, N. (1993) Genetic analysis of some traits of paddy and upland rice using doubled haploid from the F_1 plants of Koshihikari × Sensho. *Rice Genet. Newsl.* 10: 102-105

5）Auperin, D. D., Romanowski, V., Galinski, M., Bishop, D. H. L. (1984) Sequencing studies of Pichinde arenavirus S RNA indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S RNA. *J.Virol.* 52: 897-904

6）Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., Dinesh-Kumar, S. P. (1997) Signaling in plant-microbe interaction. *Science* 276:726-733

7）Bendahmane, A., Kanyuka, K, Baulcombe, D. C. (1999) The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11:781-791

8）Bent, A. F., Kunkel, B. N., Dahlbeck, D., Brown, K. L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J., Staskawicz, B. J. (1994) *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265:1856-1860

9）Bent, A. F. (1996) Plant disease resistance genes: Function meets structure. *Plant Cell* 8 :1751-1771

10）Causse, M. A., Fulton, T. M., Cho, Y. G., Ahn, S. N., Chunwongse, J., Wu, K., Xiao, J., Yu, Z., Ronald, P. C., Harrington, S. E., Second, G., McCouch, S. R., Tanksley, S. D. (1994) Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138:1251-1274

11）Dixon, M. S., Jones, D. A., Keddie, J. S., Thomas, C. M., Harrison, K., Jones, J. D. G. (1996) The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell* 84: 451-459

12）Dixon, M. S., Hatzixanthis, K., Jones, D. A., Harrison, K., Jones, J. D. G. (1998) The tomato *Cf-5* disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. *Plant Cell* 10:1915-1925

13）Falk, B. W., Tsai, J. H. (1984) Identificati on of single- and double-stranded RNAs associated with maize stripe virus. *Phytopathology* 74: 909-915

14）Falk, B. W., Klaassen, V. A., Tsai, J. H. (1989) Complementary DNA cloning and hybridization analysis of maize stripe virus RNAs. *Virology* 173: 338-342

15）Franki, R. I., Fauquet, C. M., Knudson, D. L., Brown, F. (1991) Classification and nomenclature of viruses. *Arch. Virol.* (suppl. 2): 398-399

16）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 (1999) イネ縞葉枯病抵抗性と連鎖する穂いもち抵抗性の遺伝解析．育種学研究　1:203-210

17）Gingery, R. E., Naul, L. R., Bradfute, O. E. (1981) Maize stripe virus: characteristics of a member of a new virus class. *Virology* 112: 99-108

18）Gingery, R. E. (1988) The rice stripe virus group. In: R. G. Milne (eds) The plant viruses. Plenum, New York, Vol. 4 pp297-329

19）Grant, M. R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes R. W., Dang, J. L. (1995) Structure Arabidopsis *RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 269: 843-846

20）Haan, P., Wagemaker, L., Peters, D., Goldbach, R. (1990) The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *J. Gen. Virol.* 71:1001-1007

21）Hayakawa, T., Zhu, Y., Ito, K., Kimura, Y., Izawa, T., Shimamoto, K., Toriyama, S. (1992) Genetically engineered rice resistant to rice stripe virus, an insect-transmitted virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9865-9869

22）Hayano, Y., Kakutani, K., Hayashi, T., Minobe, M. (1990) Coding strategy of rice stripe virus: major nonstructural protein is encoded in viral RNA segment 4 and coat protein in RNA complementary to segment 3. *Virology* 177:372-374

23）Hayano-Saito, Y., Tsuji, T., Fujii, K., Saito, K., Iwasaki, M., Saito, A. (1998) Localizati on of the rice stripe disease gene, *Stv-b*^{i}, by graphical genotyping and linkage analyses with molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1044-1049

24）Hayano-Saito, Y., Saito, K., Nakamura, S., Kawasaki, S., Iwasaki, M. (2000) Fine physical mapping of the rice stripe disease resistance gene locus, *Stvb-i. Theor. Appl. Genet.* 101: 59-63

25）早野由里子・斎藤浩二・藤井　潔・杉浦直樹・遠山孝通・井澤敏彦・岩崎真人（2000）イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子を検出できる SCAR マーカー．育種学研究 2:67-72

26）Hibino, H., Usugi, T., Omura, T., Tsuchizaki, T., Shohara, K., Iwasaki, M. (1985) Rice grassy stunt virus: A planthopper-borne circular filament. *Phytopathology* 75:894-899

27）Ihara, T., Akashi, H., Bishop, D. H. L. (1984) Novel coding strategy (ambisense genomic RNA) revealed by sequence analyses of Punta Toro phlebovirus S RNA. *Virology* 136: 293-306

28）石川浩一・根本博・大村敏博・土崎常男（1987）迅速・簡易 ELISA 法によるイネ縞葉枯病抵抗性検定の改良.日植病報 54: 123

29）Ishikawa, K., Ohmura, T., Hibino, H. (1989a) Morphological characteristics of rice stripe virus. *J. Gen. Viol.* 70: 3465-3468

30）Ishikawa, K., Omura, T., Tsuchizaki, T. (1989b) Association of double- and single-stranded RNAs with each four components of rice stripe virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 55: 315-323

31） Itakura, K., Rossi, J. J., Wallace, R. B. (1984) Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323-356

32) Johal, G. S., Briggs, S. P. (1992) Reductase activity encoded by the *HM1* disease resistance gene in maize. *Science* 258:985-986

33） Jones, D. A., Thomas, C. M., Hammond-Kosack, K. E., Balint-Kurti P. J., Jones, J. D. G. (1994) Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 226:789-793

34） Kakutani, T., Hayano, Y., Hayashi, T., Minobe, Y. (1990) Ambisense segment 4 of rice stripe virus: possible evolutionary relationship with phleboviruses and uukviruses (Bunyaviridae). *J. Gen Virol.* 71: 1427-1432

35） Kakutani, T., Hayano, Y., Hayashi, T., Minobe, Y. (1991) Ambisense segment 3 of rice stripe virus: the first instance of a virus containing two ambisense segments. *J. Gen. Virol.* 72:465-468

36） 河又 仁・美濃部侑三（1993）縞葉枯病抵抗性イネの分子育種.植物防疫 47: 400-404

37） Kiso, A., Yamamoto, T.(1973) Infection and symptom development in rice stripe disease, with special referenece to disease-specific protein other than virus. *Rev. Plant Prot. Res.* 6: 75-100

38） 木谷清美・木曽皓（1968）イネ縞葉枯病に関する研究.第１報イネ縞葉枯病ウイルスの純化. 四国農試報 18: 101-116

39） 小金沢碩城・土居養二・與良清（1975）イネ縞葉枯ウイルスの純化.日植病報 41: 148-154

40） Koganezawa, H. (1977) Purification and properties of rice stripe virus. *Torp. Agr. Res. Ser.* 10: 151-154

41） Konieczny, A., Ausubel, F. M. (1993) A procedureformappingArabidopsismutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 4: 403-410

42） Kosambi, D. D. (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172-175

43） 香村敏郎・朱宮昭男・釋 一郎・高松美智則・伊藤俊雄・工藤 悟・加藤恭宏・坂紀邦（1985）縞葉枯病抵抗性の新品種「月の光」.愛知県農総試研報 17: 1 -16

44） Kurata, N., Nagamura, Y., Yamamoto, K., Harushima, Y., Sue, N., Wu, J., Antonio, B. A., Shomura, A., Shimizu, T., Lin, S-Y., Inoue, T., Fukuda, A., Shimano, T., Kuboki, Y., Toyama, T., Miyamoto, Y., Kurihara, T., Hayasaka, K., Miyao, A., Monna, L., Zhong, H. S., Tamura, Y., Wang, Z-X., Momma, T., Umehara, Y., Yano, M., Sasaki, T., Minobe, Y. (1994) A 300-kilobases interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nat. Genet.* 8: 365-372

45） 栗林数衛（1931）稲縞葉枯病の伝染とヒメトビウンカとの関係に就いて（１，２）. 病虫雑 18:565-571，636-640

46) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacterophage T4. *Nature* (London) 227: 680-685

47） Lawrence, G. J., Finnegan, E. J., Ayliffe, M. A., Ellis, J. G. (1995) The *L6* gene for flax rust resistance gene is related to the Arabidopsis bacterial resistance gene *RPS2* and tobacco viral resistance gene *N. Plant Cell* 7 :1195-1206

48） Lin, X-H., Zhang, D.-P., Xie, Y.-F., Zhang, Q.-F., Gao, H.-P. (1995) Mapping a new gene for resistance to bacterial blight based on RFLP markers. *Rice Genet. Newl.* 12:234-236

49） Liu, Y-G., Whittier, R. F. (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25:674-681

50） 劉 耀光（1997）シロイヌナズナの DNA 迅速単離法.島本功・佐々木卓治監修：「新版植物

の PCR 実験プロトコール」秀潤社，pp41-43

51）Martin, G. B., Brommonschenkel, S. H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganal, M. W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E. D., Tanksley, S. D. (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262:1432-1436

52）McCouch, S. R., Tanksley, S. D. (1991) Development and use of restriction fragment length polymorphism in rice breeding and genetics. In: G. S. Kush & G. H. Toenniessen (*eds*) Rice biotechnology. CAB Int. and IRRI, Wallinford, Oxon, UK, and Philippins, pp109-133

53）Mew, T. V., Parco, A. S., Hittalmani, S., Inukai, T., Nelson, R. J., Zeigler, R. S., Huang, N. (1994) Fine-mapping of major genes for blast resistance in rice. *Rice Genet. Newl.* 11:126-128

54）Milligan, S. B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P., Williamson V. M., (1998) The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10:1307-1319

55）Mindorinos, M., Katagiri, F., Yu, G.-L., Ausubel, F. M. (1994) The A. *thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* 78:1089-1099

56）Miyazaki, C., Saito, A. (1999) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of the indica rice Kasarath. *Breed. Sci.* 49:193-201

57）Morales, F. J., Niessen, A. I. (1983) Association of spiral filamentous virus like particles with rice hoja blanca. *Phytopathology* 73: 971-974

58）Murray, M. G., Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8：4321-4325

59）Nair, S., Bentur, J. S., Prasada Rao, U., Mohan, M. (1995) DNA-markers tightly linked to a gall midge resistance gene (*Gm2*) are potentially useful for marker-aided selection in rice breeding. *Theor. Appl. Genet.* 91: 68-73

60）Nair, S., Kumar, A., Srivastava, M. N., Mohan, M. (1996) PCR-based DNA markers linked to a gall midge resistance gene, *Gm4t*, has potential for marker-aided selection in rice. *Theor. Appl. Genet.* 92: 660-665

61）Nakamura, S., Asakawa, S., Ohmido, N., Fukui, K., Shimizu, N., Kawasaki, S. (1997) Construction of an 800-kb contig in the near-centromeric region of the rice blast resistance gene *Pi-ta*^{2} using a highly representative rice BAC library. *Mol. Gen. Genet.* 254:611-620

62）難波成任（1991）ウイルス病抵抗性トランスジェニック植物開発の現状.植物防疫　45:253-261

63）Nemoto, H., Ishikawa, K., Shimura, E. (1994) The resistances to rice stripe virus and small brown planthopper in rice variety, IR50. *Breed. Sci.* 44: 13-18

64）野田　聡・大村敏博・村上正雄・土崎常男（1991）イネ縞葉枯病抵抗性品種に対するイネウイルス感染性. 日植病報 57: 259-262

65）奥山哲・明日山秀文（1959）イネ縞葉枯病ウイルスの機械的伝搬.日植病報 24: 35

66）Olson, M., Hood, L., Cantor, C., Bostein, D. (1989) A common language for physical mapping of the human genome. Science 245: 1434-1435

67）大槻義昭・広近洋彦・杉本和彦・美濃部侑三・杉浦巳代治（1990）イネ縞葉枯ウイルス外被蛋白遺伝子を導入したトランスジェニックイネの作出. 第13回日本分子生物学会年会　講演要旨集　pp296

68）Paran, I., Michelmore, R. W. (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85: 985-993

69）Ratnaparkhe, M. B., Tekeoglu, M.,

Muehlbauer, F. J. (1998) Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theor. Appl. Genet.* 97: 515-519

70）Ronald, P. C., Albano, B., Tabien, R., Abenes, L., Wu, K.-S., McCouch, S. R., Tanksley, S. D. (1992) Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight disease resistance locus, *Xa21*. *Mol. Gen. Genet.* 236: 113-120

71）Saito,A.,Yano, M.,Kishimoto, N.,Nakagahra, M., Yoshimura, A., Saito, K., Kuhara, S., Ukai, Y., Kawase, M., Nagamine, T., Yoshimura, S., Ideta, O., Ohsawa, R., Hayano, Y., Iwata , N., Sugiura, M. (1991) Linkage map of restriction fragment length polymorphism loci in rice. *Japan. J. Breed.* 41: 665-670

72）Saito, K., Miura, K., Nagano, K., Hayano-Saito, Y., Saito, A., Araki, H., Kato, A. (1995) Chromosomal location of quantitative trait loci for cool tolerance at the booting stage in rice variety 'Norin-PL8'. *Breed. Sci.* 45:337-340

73）斎藤康夫・稲葉忠興・高梨和雄（1964）イネ縞葉枯病ウイルスの純化と形態.日植病報 29: 286

74）桜井義郎・江塚昭典・岡本弘（1963）イネ縞葉枯病抵抗性の品種間差の幼苗検定法（第１報）. 中国農試報 A９: 113-124

75）桜井義郎・江塚昭典（1964）イネ縞葉枯病抵抗性の品種間差の幼苗検定法（第２報）. 中国農試報 A10: 51-70

76） Salmeron, J. M., Oldroyd, G. E. D., Rommens, C. M. T., Scofield, S. R., Kim, H.-S.,Lavelle,D.T.,Dahlbeck,D.,Staskawicz, B. J. (1996) Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. *Cell* 86: 123-133

77）篠田治躬，鳥山国士，柚木利文，江塚昭典，桜井義郎（1971）いもち病に対するイネ品種の抵抗性に関する研究（第６報）. 中国農試報 A20: 1 -25

78） Song, W.-Y., Wang, G.-L., Chen, L.-L., Kim, H.-S., Pi, L.-Y., Holston, T., Gardner, J., Wang, B., Zai, W.-X., Zhu, L.-H., Fauquet, C., Ronald, P. C. (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* 270:1804-1806

79） Song, W.-Y., Pi, L.-Y., Wang, G.-L., Gardner, J., Holsten, T., Ronald, P.C. (1997) Evolution of the rice *Xa21* disease resistance gene family. *Plant Cell* 9 :1279-1287

80）孫工弥寿雄（1973）イネ縞葉枯病に対するイネ品種抵抗性と病原ウイルスの感染並びに増殖機構に関する研究.中国農試報 E８: 1 -86

81）Takahashi, M., Toriyama, S., Hamamatsu, C., Ishihama, A. (1993) Nucleotide sequence and possible ambisense coding strategy of rice stripe virus RNA segment 2. *J. Gen. Virol.* 74:769-773

82）田村克徳，福田善通，平江雅宏，大矢慎吾，芦川育夫，八木忠之 (1998) イネのツマグロヨコバイ耐虫性に関する遺伝機構の解明 V. 西海182号の耐虫性遺伝子のマッピング. 育種学雑誌48:108

83）鳥山国士・桜井義郎・江塚昭典・鷲尾養（1966）イネ縞葉枯病抵抗性品種の育成.農業技術 21: 16-20

84) Toriyama, S. (1982) Characterization of rice stripe virus: a heavy component carrying infectivity. *J. Gen. Viol.* 61: 187-195

85）Toriyama, S. (1983) Rice stripe virus. CMI/AAB Description of plant viruses, no. 269

86）鳥山重光（1985）イネ縞葉枯ウイルス. 植物防疫. 39:508-514

87）鳥山重光・小島誠（1985）ELISA 法によるイネ縞葉枯ウイルス（RSV）特異蛋白とイネグラッシースタントウイルス（RGSV）の検出比較. 日植病報. 51：358

88） Toriyama, S. (1986a) Rice stripe virus: prototype of a new group of viruses that replicate in plants and insects. *Microbiol. Sci.* 3: 347-351

89）Toriyama, S. (1986b) An RNA-dependent RNA polymerase associated with the filamentous nucleoproteins of rice stripe virus. *J. Gen. Virol.* 67: 1247-1255

90）Toriyama, S., Watanabe, Y. (1989) Characterization of single- and double-stranded RNAs in particles of rice stripe virus. *J. Gen. Virol.* 70:505-511

91）Toriyama, S., Takahashi, M., Sano, Y., Shimizu, T., Ishihama, A. (1994) Nucleotide sequence of RNA 1, the largest genomic segment of rice stripe virus, the prototype of the tenuiviruses. *J. Gen. Virol.* 75:3569-3579

92）遠山孝通・藤　晋一・坂　紀邦・辻　孝子・井澤敏彦・中前　均（1998a）水稲トビイロウンカ抵抗性遺伝子の DNA マーカーによる解析（第２報）関東 PL５に由来する抵抗性系統から得られたクローンの STS 化. 愛知農総試研報30: 19-26

93）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（1998b）水稲穂いもち抵抗性遺伝子 *Pb1(t)* と連鎖する PCR マーカーの開発.愛知県農総試研報　30: 27-34

94）Ukai, Y., Ohsawa, R., Saito, A., Hayashi, T. (1995) A package of computer programs for construction of DNA polymorphism linkage maps and analysis of QTL. *Breed. Sci.* 45: 139-142

95）Umehara, Y., Inagaki, A., Tanoue, H., Yasukochi, Y., Nagamura, Y., Saji, S., Otsuki, Y., Fujimura, T., Kurata, N., Minobe, Y. (1995) Construction and characterization of a rice YAC liblary for physical mapping. *Mol. Breed.* 1: 79-89

96）Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Theo,　L., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J.,　Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414

97）Wang, G.-L., Mackill, D. J., Bonman, J. M., McCouch, S. R., Champoux, M. C., Nelson, R. J. (1994) RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. *Genetics* 136: 1421-1434

98）Warren, R. F., Henk, A., Mowery, P., Holub, E., Innes, R. W. (1998) A Mutation within the leucine-rich repeat domain of the Arabidopsis disease resistance gene *RPS5* partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. *Plant Cell* 10: 1439-1452

99）Washio, O., Ezuka, A., Sakurai, Y., Toriyama, K. (1967) Studies on the breeding of rice varieties resistant to stripe disease. I. *Japan. J. Breed.* 17: 91-98

100）Washio, O., Toriyama, K., Ezuka, A., Sakurai, Y. (1968a) Studies on the breeding of rice varieties resistant to stripe disease. II. *Japan. J. Breed.* 18: 96-101

101）鷲尾養，江塚昭典，鳥山国士，桜井義郎 (1968 b) イネ縞葉枯病抵抗性の簡易検定法ならびに抵抗性品種の育成に関する研究.中国農試場報 A16: 39-197

102）Washio, O., Toriyama, K., Ezuka, A., Sakurai, Y. (1968c) Studies on the breeding of rice varieties resistant to stripe disease. III. *Japan. J. Breed.* 17: 167-172

103）Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., Baker, B. (1994) The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. Cell 78: 1101-1115

104）Williams, C. E., Wang, B., Holsten, T. E., Scambray, J., de Assis Goes da Silva, F., Ronald, P. C. (1996) Markers for selection of the rice *Xa21* disease resistance gene. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1119-1122

105）Williams, J. G. K., Kubelik, A. R. Livak, K. J. Rafalski, J. A. Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535

106）山口富夫・安尾俊・石井正義 (1965) 稲縞葉枯病に関する研究　第 II 報，品種耐病性に関す

る研究.農事試研報 8：109-160
107）吉橋　忠，大坪研一（1997）米一粒からのDNA抽出法.島本功・佐々木卓治監修：「新版植物のPCR実験プロトコール」秀潤社，pp63-66
108）Yoshimura, S., Yoshimura, A., Saito, A., Kishimoto, N., Kawase, M., Yano, M., Nakagahra, M., Ogawa, T., Iwata, N. (1992) RFLP analysis of introgressed chromosomal segments in three near-isogenic lines of rice for bacterial blight resistance genes, *Xa-1, Xa-3* and *Xa-4*. *Jpn. J. Genet.* 67:29-37
109）Yoshimura, S., Yoshimura, A., Nelson, R. J., McCouch, S. R., Mew, T. V., Iwata, N. (1993) Mapping and combining of bacterial blight resistance genes in rice using molecular markers. *Japan. J. Breed.* 43:161
110）Yoshimura, S., Yamanouchi, U., Katayose, Y., Toki, S., Wang, Z.-X., Kono, I., Kurata, N., Yano, M., Iwata, N., Sasaki, T. (1998) Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1663-1668

Res. Bull. Natl. Agric. Res. Cent. for Hokkaido Reg. 175, 1－45 (2002)

Coding strategy of rice stripe virus and genetic analysis of rice stripe resistance

Yuriko HAYANO-SAITO

Summary

Rice stripe virus (RSV) is a member of the tenuivirus group of plant viruses. The filamentous shape and biological properties of RSV are similar to those of the other viruses of this group, such as maize stripe virus (MSpV) and rice grassy stunt virus (RGSV). These three viruses have four (RSV and RGV) or five (MSpV) RNAs of various size as their genomes. When either RSV or MSpV is extracted with SDS-phenol and analyzed by gel electrophoresis, a mixture of various single-stranded (ss-) and double-stranded (ds-) RNAs is detected. Therefore, this suggested that both (+) and (-) RNAs are separately encapsidated in virus particles, although one polarity of each size RNA occurs in excess. It is unclear whether this virus group belongs to the positive- or negative-strand RNA viruses.

A rice stripe resistance gene from the *indica* rice (*Oryza sativa*) cv. 'Modan' was introgressed into several Japanese rice cultivars. The gene, *Stvb-i*, has provided stable resistance to rice stripe virus since it was first introgressed into *japonica* paddy rice cultivars about 30 years ago. However, the precise chromosomal location of this resistance gene has not been not determined.

In this study, the coding strategy of two major protein genes of rice stripe virus (RSV) was revealed. For positional cloning of the stripe resistance gene *Stvb-i* derived from 'Modan', genetical and physical analyses of the rice stripe disease resistance gene *Stvb-i* using molecular markers was performed. Furthermore, DNA marker-assisted selection (MAS) of rice stripe disease resistance using a *Stvb-i*-linked marker was examined.

Received November 29, 2000

1. Coding strategy of rice stripe virus

In RSV-infected plants as in MSpV-infected maize, two major proteins, coat protein and major nonstructural protein (NS), are detected. However, the genes encoding these two proteins have not yet been identified. To characterize the RSV genome segments, these two proteins were purified and their partial amino acid sequences were determined. The purified protein was digested with proteinase trypsin or lysyl endopeptidase. The peptides fractionated by high-performance liquid chromatography (HPLC) were subjected to automated Edman degradation using a protein sequencer. Both sense oligonucleotides were synthesized on the basis of the amino acid sequence information of the two proteins and used as probes for Northern blot analyses of four ss-RNA species (segments 1-4) and four ds-RNA species of the RSV genome. The results of hybridization with ss-RNAs indicated that the coat protein and the major NS of RSV

were encoded on two different segments in opposite polarities. Briefly, segment 3 encoded the coat protein in the negative sense, while segment 4 encoded the major NS protein in the positive sense. Furthermore, the results of hybridization with both ss- and ds-RNA species suggested that the amounts of ss-RNA species are different. The amount of the species encoding two proteins was more abundant in virus particles than was the opposite sense species. Therefore, it is thought that the RSV genome consists of ssRNAs and one polarity of ssRNAs exists in excess. The coding strategy of RSV, i.e., that different viral ss-RNA species code for the coat protein and the major NS in opposite senses, as described above, is similar to the coding strategies of ambisense viruses (arenaviruses and phleboviruses). The expression of these two proteins may require different mechanisms as has been suggested for the ambisense genes of Punta Toro phlebovirus.

2. Genetic mapping of the *Stvb-i* gene introgressed from an *indica* cultivar 'Modan' to Japanese paddy rice

To identify the chromosomal segment introgressed from the *indica* rice 'Modan' into a resistant progeny, I performed RFLP analysis using 9 resistant and 6 susceptible cultivars ('Modan', 'St. No. 1', 'Mineyutaka', 'Shimahashirazu', 'Aichi 21', 'Musashikogane', 'Aichi 6', 'Aoisora', 'Hoshinohikari', 'Norin 8', 'Sachihikari', 'Wasekirakogane', 'Tamakei 56', 'Kanto 98' and 'Koshihikari'). The number of RFLP markers that hybridized with 'Modan'-specific bands decreased with each succeeding generation, and the introgressed segment derived from 'Modan' was only on chromosome 11 commonly in all tested resistant cultivars. Therefore, the segment on chromosome 11 was ascribable to 'Modan' and is associated with stripe resistance. The introgressed segment was located at 28 to 36 cM of genetic distance on chromosome 11.

A total of 120 F_2 individuals from a cross of 'Koshihikari' (susceptible) / 'Asanohikari' (resistant) were used for the linkage analysis between RFLP markers and stripe resistance. I performed a bioassay for rice stripe resistance in F_3 lines of the F_2 individuals using infective small brown planthoppers. F_3 lines segregated into 26:56:38 for susceptible homozygous (S), heterozygous (H) and resistant homozygous (R). This segregation fitted the expected 1(s):2(H):1(R) ratio (chi-square = 2.93, $0.10<p<0.30$). Thirteen polymorphic RFLP markers between the crossing parents were used to investigate the F_2 population. Based on the segregation for these markers and for stripe resistance in the F_2 population, the genetic distance and best-fit gene orders were determined using the computer program MAPL. The *Stvb-i* resistance gene was mapped into the introgressed segment on chromosome 11 and was located in a 1.8-cM interval between XNpb220 and XNpb257/XNpb254. *Stvb-i* was also linked to an RFLP marker, ST10, with 0.0 cM of genetic distance.

3. Fine physical mapping of the *Stvb-i* gene

For positional cloning, I constructed a physical map spanning 1.8-cM distance flanking markers, consisting of 18 bacterial artificial chromosome (BAC) clones, around the *Stvb-i* locus on rice chromosome 11. The 18 clones were isolated by screening of a BAC library derived from a *japonica* cultivar, 'Shimokita', with three *Stvb-i*-linked RFLP markers and *Dra*I-digested DNAs of a yeast artificial chromosome (YAC) clone. The results of Southern hybridization and restriction enzyme analysis indicated that these BAC clones were contiguous and covered about a 700-kb region containing *Stvb-i* allele. Utilizing end and internal fragments of the BAC insert

DNAs, 34 molecular markers were generated within a small chromosomal region including the *Stvb-i* locus. Genotyping analysis with these markers of a resistant cultivar and four nearby-recombinants selected from 120 F_2 individuals indicated that *Stvb-i* is contained within an approximately 286-kb region covered with two overlapping BAC clones. Using the molecular markers located in the 286-kb region, we analyzed 2090 recombinant inbred lines (RILs, F_7 generation) derived from a cross of 'Koganebare' (susceptible) / 'Tsukinohikari' (resistant). From the genotyping analysis of the RILs, 8 lines in which the recombination occurred within the 286-kb region were selected. The close relation between the graphical genotypes and stripe-resistance phenotypes of the 8 RILs indicated that the locus conferring stripe resistance existed within an approximately 120-kb region covered by one BAC clone, 220B5, on the physical map. The results described here provide the basis for isolation of the *Stvb-i* gene.

4. A SCAR marker, ST10, for marker-assisted selection of stripe resistant rice individuals

A stripe resistance gene, *Stvb-i*, was introduced from the *indica* cultivar Modan into *japonica* cultivars in Japan. A set of primers for PCR assay was designed on the basis of sequence information of the RFLP marker ST10, which is linked by 0.0 cM to the *Stvb-i* gene. This set of primers, which generate a SCAR (sequence-characterized amplified region) marker, was called ST10 primers. In PCR with the ST10 primers, a 727-bp DNA fragment was amplified specifically from all tested rice plants having the *Stvb-i* gene derived from Modan: cultivars, lines and F_1 individuals from a cross between 'Koganebare' (susceptible) and 'Tsukinohikari' (resistant). On the other hand, the fragment was not amplified in susceptible cultivars. In 120 F_2 individuals obtained from a cross between 'Koshihikari' (susceptible) and 'Asanohikari' (resistant), the resistant homozygous and heterozygous individuals showed a positive reaction in the PCR assay with the ST10 primers. The 727-bp fragment was identified as a part of the ST10 fragment (745 bp) by sequence analysis. In foreign cultivars, the ST10 primers amplified the 727-bp fragment in 3 out of 9 tested resistant cultivars that have been reported to harbor the same resistance gene, *Stvb-i*. The 3 cultivars were Modan, IR8 and Mudgo. The 727-bp fragment was not amplified in a foreign cultivar, 'Zenith', and Japanese upland cultivars harboring other resistance genes, *Stva* and *Stvb*. This SCAR marker will be useful for marker-assisted selection (MAS) of stripe resistant individuals having the *Stvb-i* gene derived from Modan. Therefore, stripe resistance can now be screened by using a vector insect-free bioassay.