特集記事

特許 DNA マーカーの利用と許諾の実際—イネ縞葉枯病および穂いもち抵抗性識別用マーカーの場合—

早野由里子¹⁾・藤井 潔²⁾

(¹⁾ 北海道農業研究センター, 札幌市, 〒 062-8555, ²⁾ 愛知県農業総合試験場, 愛知郡長久手町, 〒 480-1193)

The procedure for obtaining the consent to use the patented DNA markers. In case of the markers linked to the rice resistance genes to stripe disease and panicle blast

Yuriko Hayano-Saito¹⁾, Kiyoshi Fujii²⁾

(¹⁾ National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, Sapporo 062-8555, Japan, ²⁾ Aichi Prefectural Agricultural Research Center, Nagakute, Aichi-gun 480-1193, Japan)

キーワード：水稲，縞葉枯病，穂いもち，抵抗性，マーカー育種，特許，許諾

はじめに

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

ここ数年、マーカー育種という言葉は浸透したものの、水稲育種においてさえ実用に耐えうるマーカーはまだ少ない。イネ病害抵抗性遺伝子識別用マーカーに関しては、抵抗性崩壊が起きにくく安定した抵抗性を発現する実用遺伝子の識別マーカーの開発が遅れている。我々の研究グループ、北海道農業試験場（現北海道農業研究センター：以下北農研）および愛知県農業総合試験場（以下愛知農総試）では、これまでに、抵抗性崩壊がみられない2つの抵抗性遺伝子：イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stvb-i* および穂いもち圃場抵抗性遺伝子 *Pb1* に関する解析を

行い、それぞれに密接に連鎖するマーカーを見出した。そして、これらのマーカーの特許を取得し、そのマーカー選抜を検討してきた。そして、これらは実用マーカーとして愛知農総試以外の水稲育種機関でも徐々に利用されるようになってきた。昨年、両抵抗性マーカーを用いて選抜・育成された水稲新品種が作出され、両特許マーカーの利用手続きが定まった。そこで、本稿では、開発以後これまでのマーカー選抜の実際と本マーカーを利用・許諾する際の手続きの流れを示す。

1. イネ縞葉枯病抵抗性マーカー

1960年代に大発生したイネ縞葉枯病は、イネ縞葉枯ウイルス（RSV）によるイネのウイルス病害のひとつである。本ウイルスはヒメトビウンカ保毒虫によってイネに媒介される。1960年代以降、抵抗性品種の導入および継続的な抵抗性品種の作付けにより縞葉枯病の発病は抑制された状況にある。現在普及している抵抗性品種の多くに導入されている抵抗性遺伝子は、インド型イネ品種「Modan」に由来する *Stvb-i* である。*Stvb-i* による抵抗性は、導入以後30年を経た現在も崩壊せず、安定した抵抗性を維持している。

イネ縞葉枯病抵抗性マーカーST10は、この *Stvb-i* 遺伝子と0.0cMで連鎖している（Hayano-Saito *et al.* 1998）。当初はRFLPマーカーであったが、STS化し、それぞれ20bpの長さの2種のプライマーからなるPCRマーカーに改良し（早野ら2000）、「イネ縞葉枯病抵抗性を間接的に識別できる分子マーカー」の名称で特許を申請・取得した（特許3069662号）。その後の解析によって、ST10座は抵抗性遺伝子存在領域約120 kb内に存在することが判明し（早野2002）、現在ではさらに近接して存在する可能性も示唆されている。このため、ST10による、*Stvb-i* を有する縞葉枯病抵抗性イネ個体の選抜精度はほぼ100%と考えられる。

2. 穂いもち圃場抵抗性マーカー

水稻の栽培においても病防除は重要な課題である。Pb1 遺伝子は *Stvb-i* 遺伝子と同じく、「Modan」に由来し、穂いもちに対し高度圃場抵抗性を発現する。Pb1 は *Stvb-i* 遺伝子と同じ第 11 染色体に座乗し、両者の遺伝距離は 5.2cM とされる (藤井ら 1999b)。Pb1 を導入した水稻品種も現在までに 20 年以上作付けが続いているが、*Stvb-i* 同様これまでのところ抵抗性崩壊は報告されず、安定した穂いもち抵抗性を保っている (藤井ら 1999a)。

Pb1 と最も近接するマーカーとして報告されているのは S723 で、その遺伝距離は 1.2cM ある (Fujii *et al.* 2000)。やや離れている感はあるが、選抜精度は 99% で、生物検定の精度に律速要因の多い穂いもち抵抗性系統の選抜には非常に有効と考えられる。また、通常 1 年に一度しかできない穂いもち抵抗性検定を、マーカー育種では通年実施できるため、特に、Pb1 による穂いもち抵抗性導入を目的とした連続戻し交雑育種において BCnF₁ 個体の遺伝子型を的確に識別可能で、抵抗性育種効率を飛躍的に向上させることが可能となる。S723 を含めた周辺の塩基配列をもとに、B1、B2 および B4 という 3 つの PCR マーカーを開発し (遠山ら 1998)、「穂いもち抵抗性を間接的に識別できる分子マーカー」として特許を取得した (特許 3153889 号)。

3. マーカーによる抵抗性の判別

鋳型 DNA については多くの簡易調製方法があるが、今回我々が行っているアルカリ処理法 (Wang *et al.* (1993) の変法) を紹介する。幼苗期のイネ葉片 (第 3 葉以降の葉を葉脈に対して垂直に切った 1~2 mm 幅位の葉片 3~4 枚) に、0.25N NaOH を 40 μ l 加える。30 秒煮沸した後、0.25N HCl を 40 μ l 加え、さらに、緩衝液 (0.5 M Tris-HCl pH8.0, 1% (v/v) IGEPAL) を 20 μ l 加え、混和。2 分間煮沸し、調製終了。PCR 反応液 (1 $\times$ Taq 添付 buffer, 160 μ M dNTPs, 0.5U Taq Polymerase, 0.05% (v/v) IGEPAL, 200nM Primers mix) 20 μ l に対し、上記溶液 1 μ l を鋳型として加えて PCR を行っている。試料は鋳で切りとってくるだけで、すりつぶしたりしない。多試料の場合でも、鋳をアルコール綿で拭き取って繰り返し使用しており、非常に簡便に短時間で採取できる。但し、1 kb を超える DNA 断片の増幅には勧められない。調製した溶液は三週間程度なら 4°C で保存可能である。

ST10 の場合、PCR 反応は、94°C 4 分に続き、94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 1 分のサイクルを 35~45 回繰り返した後、72°C 7 分を行う。1.5% (v/v) アガロースゲルを用いた電気泳動像から増幅産物の有無を調べ、判別する。ST10 は、供試個体が抵抗性遺伝子領域をもっていれば、特異的な断片を増幅する (図 1)。そのため、感受性ホモ個体を排除することは可能であるが、ヘテロ個体と抵抗性ホ

図 1. ST10 による PCR 反応産物のアガロースゲル電気泳動パターン。各レーンは以下のとおり。レーン 1: 月の光 (抵抗性), 2: 黄金晴 (感受性), 3: F₁ (黄金晴/月の光), 4: 100 bp ラダーマーカー。

モ個体の判別は不可能である。

穂いもち圃場抵抗性マーカーの場合は、94°C 4 分に続き、94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分のサイクルを 35~45 回繰り返した後、72°C 7 分の反応を行う。B1 は抵抗性個体に、B2 は感受性個体に特異的な DNA 断片を増幅する。B1 および B2 単独では ST10 同様ヘテロ個体を見分けることはできない。B4 を用いた場合は、反応終了後、PCR 反応液 20 μ l に対し *Eco*RI (0.5~1U/ μ l) を含む 8 $\times$ 酵素添付 Buffer 溶液を 2.4 μ l 添加し、1~2 時間 37°C に加温した後、アガロースゲル電気泳動を行う。B4 は CAPS マーカーで、いずれの個体からも同じ大きさの DNA 断片を増幅するが、抵抗性個体から増幅した断片は制限酵素 (*Eco*RI) により消化されるが、感受性個体では消化されず、アガロース電気泳動像ではヘテロ個体の判別も可能である (図 2)。また、*Hind*III を用いても同様な結果が得られるが、*Eco*RI の方が判別しやすい泳動像が得られる。

4. マーカー選抜の実際

ST10 の開発の見通しがついた 1996 年、北海道農業試験場 (現北農研) および愛知農総試は、共同研究「イネ縞葉枯病及び穂いもち抵抗性の遺伝子解析と分子マーカーを利用した耐病性育種システムの開発」を開始し、イネ縞葉枯病及び穂いもち抵抗性マーカーの開発ならびに両マーカーの実用化の検討に着手した。マーカーは愛知県的水稻育種における両抵抗性の選抜に利用され、その有効性を実証し、同時に、愛知農総試における水稻のマーカー育種システムの確立へ導いた。共同研究期間終了

図2. B4 による PCR 反応産物 (*EcoRI* 処理後) のアガロースゲル電気泳動パターン. PCR 反応終了後, 制限酵素 *EcoRI* 処理した. 各レーンは以下のとおり. レーン 1: 100 bp ラダーマーカー, 2: 月の光 (抵抗性), 3: 黄金晴 (感受性), 4: F_1 (黄金晴/月の光).

(1998 年) 以後も愛知農総試では両マーカーの利用による育種選抜が続けられており, 両マーカーにより, コシヒカリに *Stvb-i* と *Pb1* を導入した水稻新品種「コシヒカリ愛知 SBL」を作出し (杉浦ら 2001), 2002 年に種苗法に基づく品種登録出願を行った.

愛知農総試ではマーカーの導入から 6 年を経た現在, 縞葉枯病の生物検定は導入以前と比較すると 50 分の 1 程度の規模に縮小している. 縞葉枯病の生物検定には RSV 保毒ヒメトビウンカの大量飼育が必要で, 生物検定のみならず保毒虫の維持管理にも多大な労力と神経の集中を必要としたが, その飼育規模も大幅に縮小された. このように, マーカーという革新技術の導入によって, 水稻病害抵抗性育種システムが根本的に革新された. また, マーカー育種により *Pb1* による穂いもち抵抗性の判別精度が大いに向上したことに担保され, 従来作物研究所 (現作物研究部: 長久手町) と山間農業研究所 (稲武町) の 2 ケ所でクロスチェックしていた穂いもち抵抗性検定を 2002 年からは山間農業研究所のみで行うようになった. 平坦部の長久手町の気候では, いろいろな手段を尽くしても, 高温年には穂いもちの発病が安定しないことがあり, それをマーカーによる選抜が代替したともいえる.

両マーカーは, 愛知農総試の他, 北海道立上川農業試験場をはじめとする複数の機関で既に選抜に利用されている. 育種システムの違いもあるため, マーカー選抜をどの段階でどのように利用するかは, それぞれの育種組織で検討されるべきことである. ただ, 縞葉枯病抵抗性

選抜においてヘテロ個体の判別が必要とされる状況もあるようで, そうしたマーカーの要望も届いている. 現在, 両遺伝子の単離に向けて研究を進めており, 新たな連鎖マーカーの作製も行っているところである. また, *Stvb-i* による抵抗性が崩壊した報告はないが, 抵抗性を打破する病原体の変異を否定できないため, マーカー選抜にのみ依存することは危険である. 一方, *Pb1* についてはマーカーによる検定精度が 100 % ではない. 従って, 選抜した有望系統については生物検定を一度は実施して抵抗性発現を確認すべきである.

5. 両マーカーの利用申請から許諾までの流れ

両マーカーの権利者は農業技術研究機構 (以下農研機構) および愛知県となっている. 昨年, 農研機構本部, 北農研および愛知県の 3 者によって本マーカーの使用許諾について協議し, 両マーカーの利用手続きが合意に至った. 要点としては, (1) 本特許の権利はマーカーの使用に関わるものであり, その権利はマーカーを使用して作出された品種数や普及量にまでは及ばない. (2) 農研機構および愛知県が使用する場合は契約を要しない. (3) 農研機構および愛知県以外の利用には契約および許諾料の納付が必要となる. (4) 希望者は担当窓口である北農研企画調整部交流調整係 (〒062-8555 札幌市豊平区羊ヶ丘 1 番地 電話 011-857-9417) へ連絡し, マーカー利用希望の旨を告げ, 必要書類の様式を受け取る. 手続きの概要を以下に記すが, 詳細については上記担当窓口へ直接連絡して頂きたい.

1) 開発機関を除く農研機構および愛知県の所属機関が利用する場合

契約ではなく許可とし, 許諾料は要しない.

- (1) 北農研担当窓口へ申込書の提出
- (2) 実施条件同意書の提出
- (3) 特許権実施許可書の送付
- (4) 実施状況報告書の提出 (利用期間中毎年度)

2) 第三者 (農研機構および愛知県外機関) が利用する場合 (図 3)

申込者の所属機関の長, 農研機構理事長および愛知県知事の三者による契約および許諾料の負担が必要. 利用機関には, 一マーカーにつき 40,000 円 (税別) が許諾料として請求される. 利用機関はこれを愛知県および農研機構へそれぞれ 20,000 円を納付する. 許諾料は一時金として設定されているこの合計 40,000 円 (税別) のみである. 契約期間の延長は可能で, その際さらなる許諾料の請求はない.

- (1) 北農研担当窓口へ申込書の提出
- (2) 農研機構総合情報管理部知的所有権課より契約書類の送付

図3. 農業技術研究機構及び愛知県以外からの利用申請手続きの流れ

- (3) 契約の締結
- (4) 許諾料納付請求に従い、許諾料納付
- (5) 実施状況報告書の提出（利用期間中毎年度）

尚、マーカーの配列等詳細についてはそれぞれの文献（ST10：早野ら 2000, B1, B2 および B4：遠山ら 1998）を参照して頂きたい。その他技術的な問題については、早野（メールアドレス hsyuriko@affrc.go.jp）へご連絡願いたい。

おわりに

両マーカーとも農林水産省イネゲノム研究プロジェクトにおいてイネ縞葉枯病抵抗性遺伝子のマッピングを推進する中で開発された。マーカーを開発した 1997 年頃は、マーカー育種という言葉が広く浸透した頃であり、マーカーの特許化を強く勧められた。時の勢いに乗って、両マーカーの特許を申請した。無事特許を取得できたものの、マーカーの権利はどこにどのように及ぶのか、その許諾料はどうしたらいいのか、等など、研究の場面ではおおよそ想像できない問題に直面することになった。当時は、関係部局係に問い合わせをしても明確な見解や回答を得られず、マーカー利用のための条件整備はなかなか進まなかった。“No probe, no problem. So many probes, so many problems.”というのが当時の心境であった。明確な対応ができなかったにもかかわらず、マーカー選抜の有効性を認め、利用に踏み切っていただいた利用者には大変感謝している。

許諾料の設定は、手続きを整備する協議において最も悩ましい事項であった。参考にできる前例もなく、マーカーの開発経費云々といえ、法外な金額になりかねない。個人的には広く利用してもらえるようにできるだけ

低く押さえたいと思う一方、特許維持経費の助けになる金額にしたいという声にも配慮したい…。最終的に、開発に関わった研究者間で相談し、試薬代程度という額に落ち着いた。幸い、「許諾料が高い。」という声がないことに安堵している。特許マーカーの利用手続きの整備は、開発以来宿題のように感じていた。マーカー育種と PCR 法に関わる特許との絡みについては課題が残されているようではあるが、このように一連の手続きが整ったことによって、イネ育種選抜に有効な DNA マーカーになったと率直に嬉しく思っている。両マーカーを水稻抵抗性育種に幅広く活用していただきたいとの思いが本稿執筆の動機である。水稻ブリーダーの皆様が本稿に興味・関心をお持ちいただければ幸甚である。

最後に、本研究を推進し 2000 年 12 月に急逝された岩崎真人博士始め多くの共同研究者の方々ならびに細々とした許諾手続きの整備を進めてくれた愛知県および農研機構の関係各位の努力に感謝の意を表したい。

引用文献

- 藤井 潔・遠山孝通・杉浦直樹・坂 紀邦・井澤敏彦・井上正勝・朱宮昭男（1999a）イネ縞葉枯ウイルス抵抗性の日本型イネ品種月の光と姉妹系統に見いだされた穂もち抵抗性の性質と家系分析。育種学研究 1: 69-76.
- 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（1999b）イネ縞葉枯病抵抗性品種が有する穂もち抵抗性の遺伝子分析。育種学研究 1: 203-210.
- Fujii, K., Y. Hayano-Saito, K. Saito, N. Sugiura, N. Hayashi, T. Tsuji, T. Izawa, M. Iwasaki (2000) Identification of a RFLP marker tightly linked to the panicle blast resistance gene, *Pb1*, in rice. Breed. Sci. 50: 183-188.
- Hayano-Saito, Y., T. Tsuji, K. Fujii, K. Saito, M. Iwasaki, A. Saito (1998) Localization of the rice stripe disease resistance gene, *Srv*

- bi*, by graphical genotyping and linkage analysis with molecular markers. Theoretical and applied genetics 96: 1044–1049.
- 早野由里子・齋藤浩二・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する SCAR マーカー. 育種学研究 2: 67–72.
- 早野由里子 (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. 北海道農業研究センター研究報告 175: 1–45.
- 杉浦直樹・井澤敏彦・辻 孝子・藤井 潔・加藤恭宏・坂 紀邦・遠山孝通・早野由里子・岩崎真人 (2001) 水稲病害抵抗性付与のための連続戻し交雑育種における DNA マーカー選抜の有効性の実証. 育種学研究 3 (別 1) 200.
- 遠山孝通・早野由里子・杉浦直樹・藤井 潔・岩崎真人・中前均 (1998) 水稲穂いもち抵抗性遺伝子 *Pbl(t)* と連鎖する PCR マーカーの開発. 愛知県農業総合試験場研究報告 30: 27–34.
- Wang, H., M. Qi and A.J. Cutler (1993) A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acid Research 21: 4153–4154.