

**植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項
技術開発と利用のガイドライン**

DNA 品種識別技術検討会

平成 15 年 1 月

目 次 -

1	はじめに	1
2	植物品種識別の基本的事項	1
3	一般的注意	2
	(1)用語	
	(2)試料の由来	
	(3)検査の品質と再検査への配慮	
	(4)試料から得られる外観形質等の情報	
4	品種識別について	3
(1)	分析上の注意	3
	試料 DNA の性状	
	サザンブロット法についての特別な注意	
	PCR 法についての特別な注意	
(2)	多型領域の選択	5
	マルチローカスの多型検出	
	特定領域の多型検出	
	品種識別マーカーの有効性と識別能力	
(3)	個々の分析検査法について	6
	RFLP	
	RAPD	
	AFLP	
	CAPS	
	SSR	
	ISSR	
	SNP	
5	おわりに	9
	【DNA 品種識別技術検討会委員】	10
	【別添資料】 植物品種識別における品種同定理論	別 - 1
	【参考資料】	
	DNA 分析によるいちご品種の識別	参 1 - 1
	DNA 分析による白いんげんまめ(手亡)品種の識別	参 2 - 1
	DNA 分析による稲品種の識別	参 3 - 1

1 はじめに

植物新品種を保護する品種登録制度は昭和 53 年に発足し、平成 10 年の種苗法改正により育成者の権利が強化される等制度整備がなされてきている。現在、本制度による品種登録件数は世界でもトップレベルとなっているが、他方で、育成者の権利が侵害される事例が増加してきている。

政府においては、知的財産立国に向けた基本的な構想としての「知的財産戦略大綱」を平成 14 年 7 月に決定し、これを受けて「知的財産基本法」が 11 月 27 日に成立したところであり、植物新品種の育成者権を含めた知的財産権の創造・保護・活用を一層図っていくこととされている。

先般、植物新品種の育成者を対象に行われたアンケート調査によると、全回答者のうち約 3 割が権利侵害を受けた又はその疑いがあると回答しており、その内訳をみると、国内での種苗の無断増殖などのほか、海外に無断で持ち出された種苗から得られた収穫物が我が国に輸入されると疑われる等の権利侵害も見られる。こうした育成者権の侵害に対しては、育成者権者が侵害事実を立証する必要があるが、特に、品種の同一性の判定について迅速・的確に行うための技術の早期確立が強く求められている。

これまで、ヒトの個人識別等においては DNA 分析技術が活用されてきており、分析技術の進歩とともに、植物分野においても DNA 分析技術を活用した品種識別のための研究開発が進められてきているが、侵害立証のための品種識別は必ずしも一般的には行われていない状況にある。DNA 分析による品種識別技術は、簡易・迅速であること、比較栽培のための植物体への再生が困難な試料でも識別が可能であること、生産現場の環境の影響を受けず結果が客観的で安定していること等の利点を有しており、品種の同一性を立証する技術の早期開発への強い要請に応えうるものである。しかし、その分析に当たっては細心の注意を要することはいうまでもない。

DNA 品種識別技術検討会（事務局：農林水産省生産局種苗課）は、こうした状況を背景に開催され、平成 14 年 9 月以降 3 回にわたる検討を行い、今後、DNA 品種識別技術の開発・精度向上が一層促進され、また、育成者権者をはじめ関係者による適切な利用のための本技術への理解が促進されるよう、分析・判定に当たっての基本的留意事項について学問的見地から取りまとめを行ったものである。

なお、本検討会で取りまとめた「基本的留意事項」は、学問及び技術開発の進歩及び品種識別への利活用の進展より得られる新たな知見等によって今後適切に改訂されるべきである。

2 植物品種識別の基本的事項

(1) 植物品種は、形態的・生態的な形質に係る特性の全部又は一部によって他の植物体の集合と区別することができ、かつ、その特性の全部を保持しつつ繁殖させることができる植物体の集合である。こうした品種固有の特性（ここでは「表現型」という。）は、遺伝子型又はその組合せにより生ずるものである。

このため、DNA 塩基配列の分析による植物品種の識別は、品種内の個体間で相同であるが品種間では相違がある領域を検出することにより行われる。

(2) 品種内個体間の DNA 塩基配列の異同は、植物品種の繁殖様式によって差異がある。

栄養繁殖による植物品種（挿し芽や株分け等により繁殖）や種子繁殖性植物のうち自家受粉で繁殖する自殖性の植物品種（他の個体との自然交雑が極めて少ない）については品種内個体

間の DNA 塩基配列はほぼ同一である。

他方、主として他家受粉で繁殖する他殖性の植物品種については、一般には集団内個体間で遺伝的に異なるが、集団全体としての表現型は安定し、繁殖を繰り返してもその特性が実用的に保持されるように育種がなされている。このため、品種内の個体間での DNA 塩基配列には、共通する部分も多いが栄養繁殖性の品種等と比べて差異のある部分が多く見られることから、特に、他殖性植物品種の識別を行う場合は、品種内個体間の多型の存在とその頻度を十分に考慮しなければならない。

(3) 異なる品種間では DNA の塩基配列において相違する領域(多型領域という)が必ず存在する。こうした多型領域は、DNA の中に一般に多数存在し、表現型の発現に関与している領域のほか、表現型の発現に関与していない領域にも存在する。

しかしながら、表現型と遺伝子型との関係は、現在、栽培植物の中で最も研究が進んでいるイネにおいても全ての遺伝子の機能解明にまでは至っておらず、他の植物を含めて、表現型と遺伝子型との関係は必ずしも明かにはなっていない。

このため、単に、ある DNA 領域での塩基配列が相違することのみをもって別品種と判断することはできず、予め品種内の各個体間で相同でかつ品種間で相違することが確認されている領域での異同を品種識別の根拠とすべきである。また、育成者権を有する登録品種は、特性(表現型)の全部又は一部によって他の品種と明確に区別されることが要件(種苗法第3条第1項)となっており、仮に、明確に区別されない他の品種が育成された場合にはその品種にも育成者権が及ぶこととなるが、この明確に区別されない品種と登録品種の間には DNA 塩基配列において差異が存在するものであることにも留意すべきである。

3 一般的注意

(1) 用語

本稿で使用する主な用語とその意味は次のとおりである。

多型： ここでは特定の DNA 領域の塩基配列の違いを指す。DNA 多型ともいう。

植物の品種や個体間での多型の検出方法は、一般には直接に塩基配列を比較するのではなく、間接的に特定の領域の多型を見出し比較する種々の方法が開発されている。また、塩基配列を直接比較する場合には、その差異を効率よく検出する手法が開発されている。

ローカス： ゲノム DNA の特定の領域をローカスと呼ぶ。多型が見いだされるローカスは遺伝子又はその一部であることもあるし、遺伝子以外の領域であることもある。

アリアル： ひとつのローカスで多型を示す個々の塩基配列をアリアルと呼ぶ。アリアルはある DNA 領域の塩基配列の一部が置換、挿入、欠失したもの、縦列反復配列における反復単位の数(反復数)の違いによるもの等がある。

プライマー： テンプレート(鋳型) DNA に相補的な配列を持ち、DNA 合成酵素(DNA ポリメラーゼ)により2本鎖 DNA を合成するのに使われる短い1本鎖 DNA をプライマーと呼ぶ。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に必要である。

プローブ： 特定の塩基配列を持つ DNA を検出するために、その配列に相補的な配列を持つ DNA 断片をプローブと呼ぶ。1本鎖にしてハイブリッド結合を行わせる。

DNA マーカー： 多型分析に用いたプライマー、プローブ、制限酵素等を用いて、特定の DNA 領域の特定の多型を表わす記号を DNA マーカーと呼ぶ。

植物品種 DNA 識別では核ゲノム、葉緑体ゲノム、ミトコンドリアゲノム内の DNA 領域の多型を用いる。

ローカス、アليل、DNA マーカーの名称は学会で命名法が定められている場合にはそれに従うべきである。核ゲノムの場合、DNA マーカーに由来する名称をローカスの名称とすることが多い。

(2) 試料の由来

DNA 識別に用いる試料がどの器官、組織由来のものかを確認する必要がある。また採取時期が明らかになっていることが望ましい。ひとつの品種から複数の個体の試料が必要である。特に他殖性の品種の場合は、品種内の個体間の多型を検証する上で品種毎の試料個体数が考慮されなければならない。

また DNA の低分子化が起こらないように、試料の採取、受け渡し、保管等が適切に行われていることを確認する必要がある。

(3) 検査の品質と再検査への配慮

DNA 品種識別を実施する機関は、分析手法として確立され、一般に許容され得る検査法を識別に用いるべきであり、またその検査法に習熟していなければならない。識別検査過程を詳細に記録したノートを保管しておき、法廷等の求めがあれば識別検査に関する根拠を提示しなければならない。

提出された試料は可能な限り再検査の可能性を考慮して、DNA 未抽出の試料の一部とともに、分析に用いられた抽出された DNA が保存されることが望ましい。また、試料全量を消費する場合、識別検査を行った者はそうせざるを得なかった状況を含め、識別検査経過を詳細に記録するように努めるべきである。

(4) 試料から得られる外観形質等の情報

DNA 分析結果をもとに品種を識別・判定する際には、分析機関は DNA 識別に用いられる試料から得られる外観特性の情報に大きな関心をはらうべきである。

品種はその表現型によりその他の品種と区別されるものであり、一般に、DNA 識別に用いられる茎葉、種子、果実等の試料から得られる外観等の特性は、品種識別に極めて有効な情報をもたらす場合が多い。このため、分析依頼者は、分析機関に持ち込む試料に併せて、それを採取した植物体の可能な限り詳細な特性情報を分析機関に提供することが望ましい。

もとより、DNA 品種識別は、提出された試料について実施されるものであり、分析機関は DNA 分析結果以外について責任を持つものではないが、品種識別に有効な外観等の特性情報をも踏まえて、DNA 分析による的確な識別・判定に努めるべきである。

4 品種識別について

(1) 分析上の注意

試料 DNA の性状

品種識別では、一般に不純物の少ない高分子 DNA が要求されるが、その抽出は比較的容易である。しかし、植物によっては果実など多糖類を多く含む採集部位からの DNA 抽出は難しいこ

ともあるので、試料 DNA は植物種、植物体の器官・組織に応じた適切な方法で抽出・定量され、検査法に適した量が用いられるべきである。また、DNA 断片のサイズが問題になる場合は、DNA 鑑定に用いた手法に誤りがないことを示すため、アリーのすべてをカバーするサイズマーカーを用いる必要がある。

サザンブロット法についての特別な注意

サザンブロット法とは、試料 DNA を特定の塩基配列部位を認識して切断する酵素（制限酵素）を用いて切断し、電気泳動法により DNA のサイズに従って分離した後、2 本鎖 DNA を一本鎖に解離し、ナイロン製の膜上に転写する。さらに、ナイロン製膜上に転写した一本鎖 DNA に対して、一本鎖 DNA 断片（プローブ）を用いて DNA - DNA ハイブリッド結合を行えば、多数の DNA 断片の中からプローブと相補的な部位をもつ DNA 断片が検出できる。プローブをアイソトープ等によって標識しておけば、ハイブリッド結合した DNA 断片は X 線フィルム上等にバンドとして検出され、バンドの違い（RFLP：個々の分析検査法を参照）で品種間差を検出できる。サザンブロット法とは、このような一連の技法を総称して命名されたものである。

サザンブロット法で特に留意すべき点は、電気泳動法、プローブの標識方法及びナイロン製の膜上への転写方法等によって、ハイブリッド結合した DNA 断片（バンド）の検出精度が異なり、マイナーバンドの検出に大きく影響することである。このことから、再現性を十分に確認し、分析毎の誤差等を少なくするため同一のナイロン製膜上での多型の検出が望まれる。また、サザンブロット法は、プローブの種類によって、マルチローカスを検出する方法と特定 DNA 領域を検出する方法に分けられる。（（2）多型領域の選択を参照）

PCR（ Polymerase Chain Reaction ）法についての特別な注意

ポリメラーゼという DNA 合成酵素を使って、プライマーで挟まれた特定領域の DNA 断片を増幅（複製）する方法であり、わずかな量の DNA から短時間に大量の DNA 増幅断片を得ることができる。

PCR 法で特に留意すべき点は、検査材料（DNA）が極微量であることから、試料とは別に混在（コンタミネーション）した DNA を増幅してしまうことである。この点を確認するため、陽性対照と共に必ず陰性対照を同時に増幅すべきである。また、試料からの DNA 抽出の段階から再度の検査を行い再現性を確認することが望ましい。なお、通常の PCR 法では、1 ng 程度以上の DNA 量がないと十分な増幅産物が得られないので、無菌操作ないしそれに準じた操作などを行って、コンタミネーションが否定できる根拠を明らかにしなければならない。

また、コンタミネーションで最も注意すべきことは、他の検査作業で PCR 増幅した DNA の混入である。200 塩基対程度の PCR 産物は、1 pg でも数百万コピー存在することになり、増幅後の試料を扱う器具と増幅前の試料を扱う器具は厳重に分けなければならない。

次に留意すべき点は、ゲノムの一方のアリールが増幅されず、ヘテロ接合体であるにもかかわらず、見かけ上ホモ接合体と判断される場合があることである。これは、一方のアリーのプライマーの接合部位に変異があつてプライマーが結合できない場合（アリールドロップアウト）あるいは一方のアリールが長くて増幅効率が低下した場合（アリールフェイドアウト）などに生じる。従って、ヘテロ接合体の植物の識別に用いるローカスは、PCR 増幅が容易なサイズを有するものを選択することが望ましい。

また、PCR 反応の結果は、RAPD 法（（3）個々の分析検査法を参照）の問題点として記載されているように、僅かな PCR 条件（鋳型 DNA とプライマーとの量比、アニーリング温度、

PCR 装置など)によって結果が異なる場合があり、PCR の反応条件(変性、結合、伸長の各温度と時間)、試薬や装置(製造社、機種)などは詳細に記録するように努めるべきである。

(2) 多型領域の選択

マルチローカスの多型検出

マルチローカスプローブ(multi-locus probes : MLPs)やランダムプライマーを用いた品種識別の特徴は、1つのプローブやプライマーペアで数十本の DNA バンドが検出されることである。このことは、1度に数十のローカスを分析していることになり、その情報量は極めて多い。しかし、どのローカスを分析しているのか特定されていないことや一般に個々のバンドを明確に認識することが困難な場合があることなどから、品種識別には必ずしも適しているとは言えない。但し、厳重な品質管理と検査結果が明確でかつほぼ安定していれば、品種識別を初めて試みる場合、近縁系統間交雑育種や突然変異育種に由来する品種など DNA レベルでの変異が極めて少ないと考えられる場合などに識別の手がかりとして利用するには有効である。また、DNA バンドが両親のいずれかに由来する場合の交配親(親子)検査や DNA バンドの一致率から系統樹(デンドログラム)の作成と遺伝的類縁関係を調査することにも適している。

PCR に基づくマルチローカスの多型検出法は、特定領域の多型検出法に変換できる。その場合は、マルチローカスのうちの品種に特徴的な特定バンドの塩基配列を挟み込む形で特定領域を特異的に増幅するプライマーを設計することにより行われるが、この操作を STS (Sequence Tagged Site : 配列タグ部位)化という。

特定領域の多型検出

シングルローカスプローブ(single-locus probes : SLPs)や特異的プライマーを用いた品種識別の特徴は、1つの定まったローカスを特異的にハイブリッド結合するプローブや特定部位を PCR 増幅するプライマーを用いて分析することから、再現性が極めて高いことである。また、数種の SLPs プローブや特異的プライマーによる複数の特定領域の多型を用いることにより、多型情報量が増加し、品種識別能力と信頼度も向上する。一般的には、単離された DNA 領域(核 DNA、ミトコンドリア DNA、葉緑体 DNA、ミニサテライト、マイクロサテライト等)がプローブとして、あるいはミニサテライトやマイクロサテライト等を特異的に PCR 増幅するプライマーが用いられる。ミトコンドリア DNA や葉緑体 DNA は、一般に母性遺伝することから母親の推定などにも利用できる。また、特定領域の PCR 増幅産物を用いた品種間差の検出は、DNA 量が極微量しか得られない種子や芽生えなどを対象とする場合に有効である。

特定領域のプライマーの設計に当たっては、既知の連鎖地図や塩基配列情報があれば、これを活用して効率的な開発が可能である。

品種識別マーカーの有効性と識別能力

品種識別に用いられるローカスは、一般的に、タンパク質に翻訳されないいわゆる非コード領域にあることが多く、品種の特性との関連はほとんどないものである。また、植物品種の全 DNA 配列には、品種間で多型のみられる領域(ローカス)が極めて多数存在し、現在の DNA 多型の分析方法は、これらのうちのごく一部のローカスのアリアル型を分析しているものであることから、実際の識別能力は用いられたローカスの数や性状、検査手法、さらには品種毎のローカス・アリアル情報の多寡に大きく依存している。

このため、品種識別に用いるローカスは、そのアリアルが品種内の各個体間で相同であり、品

種間では相違するものを選択する必要がある。特に、マルチローカスの多型を検出する場合やヘテロ接合体の植物を識別する場合には、品種内の個体間及び品種間でのアレルの異同が明確に現れるローカスが選択されることが望ましい。

複数のローカスを用いる場合は少なくともアレルの品種間の相関の低いもの、連鎖地図上の情報がある場合には遺伝的に独立なものを選択することが効果的である。また、一般に共優性マーカーの方が優性マーカーよりも望ましい。特に、ヘテロ接合体の植物の識別には共優性マーカーが有効である。

実際の品種識別は、予め品種毎に確認されているローカス毎のアレル型と比較することにより行われるので、確認されているローカス数が多いほど識別能力は高まる。

ローカスの各アレルの一般集団 (= 遺伝資源の集合) における出現頻度が明らかにされている場合は、既存品種中に少なくとも1品種が同一の遺伝子型を偶然に持つ確率を求めることができる。その理論及び数値計算結果は別添「植物品種識別における品種同定理論」を参照されたい。なお、確率計算に用いられるローカスは、どのローカス対についてもアレルの品種間分布の相関ができるだけ低いものを選択することが望まれる。

このような個々のローカスの選択及び検査手法の信頼性は、法廷等の求めがあれば検査事例毎に証明されなければならない。

品種識別に用いられるローカスは、検査結果の再現性はもとより、学会での公表、共同研究、データ交換などにより多くの機関で有効性が確認されていることが望ましく、また、交配親、系譜関係の明確な家系についての調査により矛盾がないことが示されていることが望ましい。

(3) 個々の分析検査法について

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

特定の DNA 領域について制限酵素認識部位の塩基置換や認識部位には含まれた部位での欠失や挿入があると制限酵素断片のサイズに差異を生じる。この多型を RFLP(制限酵素断片長多型) と呼ぶ、ゲノム DNA を制限酵素で処理して電気泳動により制限酵素断片を分離後、ナイロン膜に転写し、1本鎖に変性して特定の DNA 領域に相当する標識したプローブ DNA とハイブリッド結合させ、X線フィルムに感光させることにより検出することができる。この操作により制限酵素処理で生じた多数の DNA 断片の内、特定の領域の RFLP を見いだすことができる。

RFLP 分析により得られるマーカーは一般に共優性である。アレルの数は2であることが多い。複数の制限酵素を用いてどれかで RFLP が見いだされる頻度は生物種によって異なるが、特定領域の未知の塩基配列の多型を見いだす手法として優れている。反復配列のようにゲノムの複数の領域と相補的であり、かつ多型性の高いプローブ DNA を用いると識別能力が高くなる。

本分析検査法は、RFLP を検出する操作が煩雑で、検出に時間を要すること、検出に多量の DNA を必要とするため微量のサンプルからの検出には使用できないなどの問題がある。また、ハイブリッド結合やその後の操作の条件により結果が異なることがある。RFLP 分析を品種識別に利用する場合には制限酵素で完全に消化できる高品質の DNA を用いて、明確なバンドの差違が見いだされるような制限酵素で処理して、同一のナイロン膜上で比較することが重要である。

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

ゲノム DNA をテンプレート (鋳型) にして、ランダムプライマーの存在下で PCR によって増幅した時、ゲノム DNA の塩基配列に差異があると、プライマーの結合に差異が生じランダム

プライマーで PCR 増幅される DNA 断片のサイズや数が異なることがある。その差異をアガロースやポリアクリルアミドのゲルによる電気泳動で検出するのが RAPD 法である。RAPD マーカーは一般に優性マーカーである。

RAPD法の特徴は、市販のランダムプライマーを用いるので方法が簡易である点、高価な精密電気泳動装置等を必要としない点、ランダムプライマーが10塩基や12塩基であるために多数の増幅DNA断片が得られる点などが挙げられる。従って、RAPD法自体による品種識別も可能であるが、STS化プライマーの設計の前段階としての一次スクリーニングとして用いることもできる。

本分析検査法の問題点としては、僅かなPCR条件（鋳型DNAとプライマーとの量比やアニーリング温度、PCR装置など）によって結果が異なる場合があること、増幅バンドが多いことから識別判定に誤りを生じる可能性があることなどが挙げられる。また、異なるプライマーの併用が困難であるため、使用するプライマーの数だけPCRおよび電気泳動を行う必要があり、時間と労力を要することになる。

品種識別における留意点としては、識別性の高いランダムプライマー（PCRで増幅される識別用DNAバンドが明瞭なもの）を選択することが重要であり、識別バンドの有無に迷うようなプライマーは使用しないことが勧められる。また、結果の再現性を高めるために、鋳型DNAの精製過程を増やしてDNAの純度を高めることが有効である。また、PCRの条件（変性、結合、伸長の各温度と時間）を明確に揃え、できれば装置も同じ物（製造社、機種）を用いることが勧められる。

STS化プライマーの場合は、各品種共通の不要バンドが消失し、識別バンドのみが出現するので、RAPD法の問題とされていた再現性、識別誤認の問題が解決される。

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

AFLP法は、1種類又は2種類の制限酵素で処理した制限酵素断片をPCRで増幅して、増幅断片長の多型を解析する手法である。PCRプライマーとの結合に関係する塩基配列の差異と制限酵素断片長の差異を同時に検出していることになる。一般的には、切断される認識配列が比較的高い頻度で現れる4塩基認識制限酵素と低い頻度で現れる6塩基認識酵素の2種類を用い、両端が異なる制限酵素で切断された断片の両端にそれぞれ二本鎖アダプターを結合する。これをテンプレート（鋳型）にして、アダプターの塩基配列とアダプターに隣接する制限酵素切断部位、さらに3'側の1～3塩基を特定した塩基配列をもつプライマーを用いて、選択的なPCRを行う。この時、2回のPCR（ネステッドPCR）を行うことにより再現性を高めている。3'側の特定の塩基配列を変えることにより、お互いに重複しない多くの制限酵素断片を増幅して多型を調べることが出来る。増幅されたDNA断片長の多型の検出は電気泳動により分離して行う。一方のプライマーの5'末端を蛍光色素などでラベルして変性ポリアクリルアミドゲルにより増幅断片を検出する方法が最も分解能が高い。AFLP法は一回の反応で多数のゲノムDNA領域の多型を分析できる利点がある。RAPD法よりはるかに再現性は高く、ゲノムDNAのフィンガープリンティングとして最も優れている。AFLPマーカーは優性であることが多いが共優性の場合もある。

AFLP法を品種識別に用いる場合には、制限酵素で完全消化できる高品質のDNAを用いる必要がある。特定のバンドの多型のみを解析するために、STS化をするとさらに再現性が高まる。

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)

CAPS法はPCR-RFLP法とも呼ばれる。PCR増幅産物を特定の制限酵素で切断してRFLPを見いだす手法である。CAPS法は増幅産物の塩基配列が判っていない場合でも利用することができるが、増幅産物の塩基配列情報があると使いやすい。特定領域のDNA断片の塩基配列を比

較して制限酵素認識部位での塩基配列の差異があればその制限酵素を用いる。適当な制限酵素認識部位での差異がない場合はプライマーを工夫してPCR増幅産物に制限酵素認識部位を導入するdCAPS (derived CAPS)法が使われることが多い。

CAPS マーカーあるいはdCAPS マーカーは共優性マーカーで、1塩基の多型を検出することもできる。

SSR (simple sequence repeats)

SSR はマイクロサテライト又はSTRとも呼ばれ、2～6塩基を単位とした縦列反復配列であり、ゲノム中に多数散在している。SSRは反復単位の繰り返し数の変異が大きい。SSRに隣接している特異的な配列をプライマーとしたPCRにより、SSRを含むDNA断片を増幅し、電気泳動によりPCR増幅産物のサイズをサイズマーカーと比較することで多型を検出する。プライマーの設計にはゲノムDNAからSSRを含む領域を単離し、塩基配列を決定し、SSRの隣接領域の配列を知る必要がある。塩基配列データベースからSSRを含む領域を見出して利用することもできる。

SSRマーカーは、一般に共優性であり、アレルの数が多い。このため、1つのSSRマーカーで複数の品種識別ができることが多いが、複数のSSRマーカーを用いると品種識別能力は非常に高くなる。SSRマーカーのプライマーの設計に費用と労力がかかることが欠点である。

プライマーの一方の5'末端を標識して、PCR産物を変性ポリアクリルアミドゲルで分離するとSSRの2塩基の差異まで検出することができる。増幅されたバンドにはマイナーなバンドが含まれることがあるので、どれが識別の対象とするバンドであるかを明らかにしておく必要がある。

ISSR (Inter - Simple Sequence Repeat)

SSRにはゲノム中に比較的密に並んでいる種類があり、これらのSSRに挟まれた領域をPCRで増幅するとSSRの間の長さやSSR自身の長さの相違がPCR増幅断片のサイズの差異として現れる。このサイズの差異を電気泳動で検出するのがISSR法である。プライマーはSSRの反復配列の3'か5'側に1～4塩基のランダムな配列を付加した約17～20塩基の配列を用いることが多い。反復配列のモチーフとランダムな配列を変えることにより、種々の領域の多型を調べることができる。また、塩基配列情報がなくとも利用することができる点で、RAPD法と同様な簡便さがある。

ISSRマーカーは主に優性マーカーである。また、STS化により再現性を高めることができる。

SNP (single nucleotide polymorphism)

SNPは1塩基多型のことである。ゲノムDNAのある領域の塩基配列を直接比較したデータに基づき、特定の1塩基多型を効率よく検出する手法が多数開発されている。ほとんどのSNPは2つのアレルしかないが、複数のSNPを組み合わせることにより、識別能力が高くなる。多型検出には電気泳動法の他にマイクロアレイ、質量分析装置、プレートリーダー等が用いられる。これらの手法は今後さらに改良され、自動化の可能性もあるので、識別検査に適したものを選択する必要がある。

手法	識別方法の特徴	多型性 (アリール数)	再現性	一度に 解析できる ローカス数	分析操 作の難 易度	開発費用 と労力	利点	留意点
RFLP	制限酵素で切断 サザンブロット	中	中	少	難	中	・共優性マーカーであり識別能 が高い。	操作が複雑 ・多量の DNA が必要。
RAPD	ランダムプライマー による PCR	中	低	中	易	低	・簡便・安価。	・再現性を高めるため STS 化が 推奨される。
AFLP	制限酵素切断 + PCR	中	中	多	難	中	・1回の操作で多数の多型マ ーカーを検出可能。	・再現性を高めるため STS 化が 推奨される。
CAPS	特定領域の PCR + 制限酵素切断	中	高	1	中	中	・共優性マーカーであり識別能 が高い。	・予め塩基配列情報が必要。
SSR	縦列反復配列領域 の PCR	高	高	1	易	高	・マーカー当たりの多型数が 多く識別能が高い。 ・開発されたマーカーは非常 に使い易い。	・開発費用と労力が大きい。
ISSR	縦列反復配列領域 間の PCR	高	低	多	易	低	・簡便・安価。	・再現性を高めるため STS 化が 推奨される。
SNP	1塩基レベルの多型	中	高	1	易～中	高	・複数用いると識別能及び効 率が極めて高い。	・開発費用と労力が大きい。

5 おわりに

本稿は、的確な分析技術の開発と分析の実施及び分析結果の適切な利用が図られるよう、現時点における DNA 品種識別技術の基本的留意事項を整理し、公表したものである。

今後、研究者や関係者からのさらなる意見を踏まえ、また、多くの植物での品種識別技術の開発、DNA 品種情報データベースの充実、分析の簡便化・自動化等の識別技術の進歩とともに、これらの技術が利活用されることにより得られる知見等をもとに、適切に見直されることを期待する。

本稿には、その理解を助けるために、現在開発されている「いちご」、「いんげんまめ」、「稲」の品種識別技術の事例を参考に添付したが、これらについても多くの分析機関で利用され、併せて、さらなる識別能力及び精度の向上等のための研究が進められることを期待する。

DNA 品種識別技術検討会委員

(平成 14 年 9 ~ 11 月)

鷓飼 保雄 元東京大学農学部教授

大坪 研一 (独)食品総合研究所食品素材部穀類特性研究室長

沖村 誠 (独)農業技術研究機構九州沖縄農業研究センター野菜花き研究部野菜育種研究室長

紙谷 元一 北海道立中央農業試験場農産工学部主任研究員

壽 和夫 (独)農業技術研究機構果樹研究所遺伝育種部ナシ・クリ育種研究室長

徳永 國男 (独)種苗管理センター計画課長

野口 博正 (株)サカタのタネ技術顧問

原田 久也 千葉大学園芸学部教授 【座長】

伴 義之 (独)種苗管理センター調査研究課長

福嶋 雅明 タキイ種苗(株)研究農場次長

松元 哲 (独)農業技術研究機構野菜茶業研究所機能解析部遺伝特性研究室長

矢野 博 (独)農業技術研究機構近畿中国四国農業研究センター作物開発部育種工学研究室長

矢花 公平 TOKYO大樹法律事務所弁護士

(五十音順)

DNA 品種識別技術検討会事務局 農林水産省生産局種苗課