

(参考資料5)

## DNA分析による小豆品種の識別

北海道立中央農業試験場

独立行政法人農業生物資源研究所

### 1 はじめに

小豆は中国、朝鮮半島、日本を中心に東アジアで栽培されてきたが、現在ではアメリカ、カナダ、オーストラリア等にも新規作物として導入され、日本に輸出されている。小豆の国内生産量は約 72,000 t でその内 85%、約 62,000 t を北海道で生産している（平成 11～15 年平均、表 1）。北海道で生産される小豆は普通小豆、白小豆及び大粒の大納言小豆に区分される。普通小豆の基幹品種は「エリモショウズ」であるが、新たに育成された耐病性の「きたのおとめ」、「しゅまり」の作付けが拡大している（表 2）。小豆の輸入量は 28,000 t で、中国、アメリカ、カナダ他から輸入されている。中国小豆は「天津小豆」、「唐山小豆」、「山東小豆」、「東北小豆」等の区分があるが、これらはいわゆる産地銘柄で複数の遺伝子型が混在している例が認められる。新規に導入されたアメリカ、カナダ、オーストラリアでは北海道の基幹品種「エリモショウズ」が普及している。近年、中国からも日本種あるいはエリモ種として日本品種の輸入が認められた。また最近では、中国を中心に加糖餡等の加工製品の輸入が急増している。

小豆の品種識別は、北海道立中央農業試験場において RAPD 法による主要品種間の多型選抜が行われ、8 種の RAPD プライマーを選抜、その内 3 種が STS 化された。これにより登録品種の「きたのおとめ」、「しゅまり」と主な普通小豆あるいは中国小豆との識別が可能であった。しかしながら、3 種の RAPD-STC マーカーのみでは識別性が十分ではないため、他のマーカー等を併用することで信頼性を向上させることが望ましい。

加糖餡など小豆加工製品では、加熱等により DNA が断片化されている。また、中国小豆を原料とした製品では複数の遺伝子型が混在している可能性もあり、完全優性の RAPD-STC マーカーでは判別が困難な場合も予想される。加工製品では断片化した DNA においても増幅が可能で、多型性の高い SSR マーカーが適している。小豆の SSR マーカーは独立行政法人農業生物資源研究所で開発が進められ、品種間で多型性の高い SSR マーカーが選抜された。

表1 小豆の国内生産量及び輸入量(t)

年次	国内生産量	北海道産	同左比(%)	輸入量	中国	米国	カナダ	その他
平成 11	80598	68298	84.7	29371	26374	1476	953	568
12	88200	75798	85.9	30498	26508	2393	965	632
13	70800	59502	84.0	24919	22429	1163	672	655
14	65898	54198	82.2	27931	24787	1440	981	723
15	58800	50100	85.2	29696	26005	1564	1567	560
平均	72859	61579	84.5	28483	25221	1607	1028	628

輸入のその他は北朝鮮、タイ、アルゼンチン、オーストラリアの合計

中国小豆の銘柄は、天津、唐山、山東、東北、宝清、陝西、山西、安徽、崇明、啓東などがある

表2 品種別作付面積(北海道、平成 15 年)

品種名	種苗登録年	作付面積(ha)
大納言		
アカネダイナゴン	-	1184
ほくと大納言	平成 12	305
とよみ大納言	平成 16	677
その他		44
普通小豆		
エリモシヨウズ	昭和 58	17033
サホロシヨウズ	平成 2	830
きたのおとめ	平成 8	6865
しゅまり	平成 15	2953
ホッカイシロシヨウズ	-	24
その他		695

## 2 小豆種子からの DNA 抽出

### (1) 試料の採取

小豆は流通上、同一のロットに複数の遺伝子型が混入している可能性があるため、試料の採取は粒単位で行い、複数の種子から独立に試料を調製する。試料を調製する種子は全体を代表する特性のものを選び、未熟、罹病、虫食い等の種子を避け、健全な種子を使用する。

### (2) 試料の調製

試料は粒単位で調製する。種子を粉砕する際は、種子間の相互汚染に注意する。2 mm 程度のドリルで種子に穴を開けると、容易に試料を調製できる。この場合、ドリルの切り屑を試料として利用する。ドリルは種子ごとに洗浄するのが望ましいが、70%のエタノールで湿らせたキムワイプで丁寧に拭き取ることで、DNA の相互汚染は回避できる。

粉砕した種子（切り屑）約 20mg を 1.5ml のマイクロテストチューブに入れ、DNA 抽出に用いる。

### (3) DNA の抽出

試料からの DNA 抽出は CTAB 法、SDS-フェノール法や市販の DNA 抽出キットで可能であるが、SDS-フェノール法について記述する。

#### 子実からの DNA 抽出 (SDS-フェノール法)

- ① 1.5ml のマイクロテストチューブに試料約 20mg を入れ、抽出液 0.2ml を加え攪拌、55°C で 20 分間加温する。
- ② テストチューブに等量の PCI を加え 2 分間激しく振とうし、14,000 rpm、5 分間遠心分離する。
- ③ 上清を新しいテストチューブに移し、0.2ml の 2-propanol を加え、転倒混和する。14,000rpm、5 分間遠心分離する。
- ④ 上清を捨て、沈殿物を風乾する。
- ⑤ テストチューブに蒸留水 0.1ml を加え、沈殿を溶解し、分光光度計で DNA 濃度を測定する。
- ⑥ DNA 溶液を 30ng/μl に希釈して、1 μl を PCR に使用する。

#### 使用する試薬溶液

抽出液：(10mM Tris-HCl pH7.8, 5mM EDTA, 0.5% SDS, 0.5% NP-40 (Nonidet P-40, nacalai tesque), 0.5% Tween-20, 80 μg/ml proteinase-K)

PCI：(TE saturated phenol / Chloroform / Isoamylalcohol) 25 : 24 : 1 (v/v/v)

2-propanol

## 3 RAPD-STS マーカーによる品種識別

### (1) RAPD (random amplified polymorphic DNA) 法による品種間多型の選抜

小豆主要品種について、10塩基のランダムプライマーを用いて PCR を行う RAPD 法により、増幅される品種間の多型断片を選抜した。さらに選

抜した DNA 断片の配列を解読し、新たに 3 組の特異プライマー対を設計した (STS 化)。STS 化することで、品種に特徴的な DNA 配列のみを増殖できるため、品種識別の信頼性が向上する。また、複数のプライマー対を混合して PCR を行うマルチプレックス PCR も可能で、品種識別の効率化が図れる。

(2) 品種識別に利用可能な RAPD、STS マーカー

普通小豆の主要 3 品種を対象に多数の RAPD プライマーを供試して品種間多型を探索した結果、8 種の RAPD 断片を品種識別用として選抜した。さらに、選抜した DNA 断片の塩基配列を解読し、新たに 3 種の STS プライマーを設計した。

表3 小豆品種識別用 RAPD マーカー

プライマー	塩基配列	多型断片 (bp)	エリモショウズ	きたのおとめ	しゅまり
ubc033	CCG GCT GGA A	700	+	+	-
ubc072	GAG CAC GGG A	1000	-	-	+
ubc327	ATA CGG CGT C	2000	+	-	-
ubc468	ACG GAA GCG C	950	+	-	-
ubc516	AGC GCC GAC G	700	-	+	-
ubc569	CGA ATT GCT G	700	-	+	+
ubc777	GGA GAG GAG A	1400	+	+	-
ubc791	GTG GGT TGT G	600	-	+	-

表4 品種識別用 STS プライマー

判別マーカー	RAPD 断片	上流プライマー	下流プライマー
SV01	ubc516- 700	CCATACATTGATGGCACTAGTG	GGCAAAGGTATGCACTTCATG
SV02	ubc777-1400	AAATGAGGGGGAGAGGAG	TAGCCACGTCACATATGGAG
SV03	ubc569- 700	GCTGCTAAGGAATCCTGGTA	CCACACAATCTCCAAGTCCA

プライマーの塩基配列は特許出願中(特願 2002-171417)

(3) PCR の条件等

① STS プライマーを用いた PCR

サーマルサイクラーはアプライドバイオシステム社の Gene Amp PCR System 9700、合成酵素は同社の AmpliTaq Gold を使用した。反応液量は  $15\ \mu\text{l}$  とし、鋳型 DNA は  $30\text{ng}$  を添加、プライマー濃度は上流、下流各  $0.15\ \mu\text{M}$  とした。合成酵素は  $0.5\text{units}$  を使用、その他の反応液組成は酵素添付のバッファーで最終濃度が  $10\text{mM Tris-HCl (pH9.0)}$ ,  $50\text{mM KCl}$ ,  $0.1\% \text{Triton X-100}$ ,  $1.5\text{mM MgCl}_2$ ,  $0.2\text{mM}$  each of dNTPs となるよう調製した。

PCR の温度サイクルは  $94^\circ\text{C}$  ; 7 分の後、 $94^\circ\text{C}$  ; 30 秒、 $55^\circ\text{C}$  ; 30 秒、 $72^\circ\text{C}$  ; 1 分を 35 回繰り返す、最後に  $72^\circ\text{C}$  ; 7 分を付加した。STS プライマーによる PCR ではホットスタート用の Taq polymerase の使用を推奨する。

・ 反応液組成

DNA 溶液 ( $30\text{ng}/\mu\text{l}$ )	$1.0\ \mu\text{l}$
$10\times\text{PCR Buffer}$	$1.5\ \mu\text{l}$
$25\text{mM MgCl}_2$	$0.9\ \mu\text{l}$
$2\text{mM}$ each of dNTPs	$1.5\ \mu\text{l}$
F-primer ( $2\ \text{pmol}/\mu\text{l}$ )	$1.1\ \mu\text{l}$
R-primer ( $2\ \text{pmol}/\mu\text{l}$ )	$1.1\ \mu\text{l}$
Taq polymerase ( $5\ \text{u}/\mu\text{l}$ )	$0.1\ \mu\text{l}$

滅菌水を加えて  $15\ \mu\text{l}$  とする。

・ PCR の温度条件

$94^\circ\text{C}$	7 分	} 35 回繰り返す
$94^\circ\text{C}$	30 秒	
$55^\circ\text{C}$	30 秒	
$72^\circ\text{C}$	1 分	
$72^\circ\text{C}$	7 分	
$4^\circ\text{C}$	$\infty$	

② RAPD プライマーを用いた PCR (参考)

RAPD プライマーによる PCR ではプライマー濃度を  $0.2\ \mu\text{M}$ 、 $\text{MgCl}_2$  濃度を  $2\text{mM}$  とし、サーマルサイクルは 45 とした。

・ 反応液組成

DNA 溶液 ( $30\text{ng}/\mu\text{l}$ )	$1.0\ \mu\text{l}$
$10\times\text{PCR Buffer}$	$1.5\ \mu\text{l}$
$25\text{mM MgCl}_2$	$1.2\ \mu\text{l}$
$2\text{mM}$ each of dNTPs	$1.5\ \mu\text{l}$

RAPD-primer (5 pmol/ $\mu$ l)	0.6 $\mu$ l
Taq polymerase (5 u/ $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l

滅菌水を加えて 15  $\mu$ l とする。

・ PCR の温度条件

94°C	7 分	} 45 回繰り返し
94°C	30 秒	
55°C	30 秒	
72°C	1 分	
72°C	7 分	
4°C	$\infty$	

③ PCR 産物の電気泳動

反応液 4  $\mu$ l にローディングバッファー 2  $\mu$ l を加えて、1.5%アガロースゲルにアプライし、1×TAE バッファーで電気泳動する。ミューピッド型の電気泳動槽では 100 ボルトで約 20 分間泳動する。泳動後のゲルは SYBR Green I 又はエチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射下で写真撮影し増幅断片の有無や大きさを確認する。

(4) RAPD-STC マーカーによる小豆の品種識別

3 種の RAPD-STC プライマー (SV01、SV02、SV03) を用いることで、北海道の普通小豆の主要品種 5 品種及び大納言 3 品種間の識別が可能である。また輸入小豆 7 銘柄を検定した結果、登録品種「きたのおとめ」、「しゅまり」と同じ遺伝子型を示す小豆は認められなかった (表 5)。

育成品種を含む小豆の遺伝資源 88 点を検定した結果、登録品種「しゅまり」と同じ遺伝子型を示す遺伝資源が 19 点、「きたのおとめ」と同じ遺伝子型を示す遺伝資源が 8 点認められた。RAPD マーカーを 4 種併用すると、「しゅまり」と同じ遺伝子型は大納言の 2 品種、「きたのおとめ」と同じ遺伝子型は島根県の在来種 1 点であった (表 6)。

表5 RAPD-STS マーカーによる小豆の品種識別

	SV01 550bp	SV02 430bp	SV03 340bp
普通小豆			
エリモシヨウズ	-	+	-
きたのおとめ	+	+	+
しゅまり	-	-	+
サホロシヨウズ	-	+	+
ホッカイシロシヨウズ	+	+	-
その他			
大納言			
アカネダイナゴン	+	-	-
とよみ大納言	-	+	+
ほくと大納言	-	-	+
その他			
輸入小豆			
東北小豆-1	+	-	+
東北小豆-2	+	-	-
天津小豆	+	-	+
宝清小豆-1	+	-	+
宝清小豆-2	+	-	-
河北小豆	+	-	+
山西小豆	+	-	+
延辺小豆-1	-	+	+
延辺小豆-2	+	-	+
陝西小豆	+	-	+

表6 小豆遺伝資源の識別結果

品種名	地域	SV 01	SV 02	SV 03	ubc033	ubc072	ubc327	ubc791
		550bp	430bp	340bp	700	1000	2000	600
しゅまり	北海道	-	-	+	-	+	-	-
ほくと大納言	北海道	-	-	+	-	+	-	-
カムイダイナゴン	北海道	-	-	+	-	+	-	-
ときあかり	北海道	-	-	+	+	+	-	-
アケノワセ	北海道	-	-	+	-	+	+	-
円葉1号	北海道	-	-	+	+	-	-	-
高橋早生	北海道	-	-	+	+	+	-	-
早生円葉	北海道	-	-	+	+	+	-	-
剣先	北海道	-	-	+	+	-	+	ns
ベニダイナゴン	北海道	-	-	+	+	+	-	-
早生大納言	北海道	-	-	+	+	+	-	-
十育146号	北海道	-	-	+	+	+	+	-
紅南部	府県	-	-	+	+	-	-	-
岩手163-西根在来1b	府県	-	-	+	-	-	-	-
岩手181-オモダカ	府県	-	-	+	+	-	-	-
岩手205	府県	-	-	+	+	-	-	+
石川49	府県	-	-	+	+	+	+	-
兵庫69	府県	-	-	+	+	-	-	-
岡山16	府県	-	-	+	+	+	-	-
台湾7-呉鳳郷紅豆b	台湾	-	-	+	+	+	-	-
きたのおとめ	北海道	+	+	+	+	-	-	+
島根12	府県	+	+	+	+	-	-	+
ハツネショウズ	北海道	+	+	+	-	-	-	+
新備中大納言	府県	+	+	+	+	+	+	+
石川36	府県	+	+	+	+	+	+	+
台湾5-桃源郷紅豆a(梅山)	台湾	+	+	+	+	+	-	+
台湾9-屏東在来	台湾	+	+	+	+	+	-	+
竹小豆	中国	+	+	+	-	+	+	-
中国21-啓東	中国	+	+	+	-	+	+	+
北海道品種(29)		0.276	0.448	0.759	0.621	0.483	0.414	0.276
府県遺伝資源(16)		0.250	0.500	1.000	0.875	0.438	0.250	0.313
海外遺伝資源(43)		0.953	0.209	0.535	0.581	0.907	0.837	0.884

下段の北海道品種(29)以下は遺伝子型の存在比を示す

#### 4 SSR マーカーによる小豆の品種識別

##### (1) 品種識別に利用可能なSSR (Simple Sequence Repeat) マーカー

北海道の登録品種「きたのおとめ」、「しゅまり」と海外の在来種が識別可能な SSR プライマーを選抜する目的で、小豆主要品種 8 品種と海外の小豆在来種 239 点について、シークエンサーによるフラグメント解析を行った。その結果、「きたのおとめ」及び「しゅまり」と海外の在来種と識別可能な SSR プライマー対 5 種類を見出した (表 7)。さらに、品種識別の信頼性の向上と効率化を図るために、複数のプライマー対を混合するマルチプレックス PCR を開発した。

表 7 品種識別用 SSR プライマー

SSR プライマー対	上流プライマー (5'→3')	下流プライマー (5'→3')
CEDG008	AGGCGAGGTTTCGTTTCAAG	GCCCATATTTTTAGCCAC
CEDG029	GATTGCTTTTAGCAGAGGGC	GAAGAAACCCATCTCGATCC
CEDG007	GTGCAGCCACTACATGAATG	GAAGTTGACACTCATCCACC
CEDG015	CCCGATGAACGCTAATGCTG	CGCCAAAGGAAACGCAGAAC
CEDG024	CATCTTCCTCACCTGCATTC	TTTGGTGAAGATGACAGCCC

(各プライマー対は上流及び下流プライマーを混合し、各々の終濃度がプライマー溶液中で 5 pmol/μl となるように調製した。)

##### (2) PCR の条件と検出方法

###### ① SSR プライマーを用いた PCR

サーマルサイクラーはアプライドバイオシステム社の GeneAmp® PCR System 9700、PCR 用酵素は TOYOBO 社の KOD-Plus- を使用した。反応液量は 10 μl とし、鋳型 DNA 溶液、プライマー対 (5 pmol/μl)、酵素に添付の 10x Buffer、2mM dNTPs 及び 25mM MgSO<sub>4</sub> を混合した。

PCR の温度サイクルは 94°C ; 2 分のポリメラーゼの活性化後、94°C ; 15 秒、55°C ; 15 秒、68°C ; 15 秒の 40 回繰り返しからなる。

###### ・ 反応液組成

DNA 溶液 (10ng/μl)	1.0 μl
10x PCR Buffer	1.0 μl
2mM dNTPs	1.0 μl
25mM MgSO <sub>4</sub>	0.6 μl
プライマー対 (5 pmol/μl)	0.6 μl
KOD-Plus (1unit/μl)	0.2 μl
滅菌水を加えて 10 μl とする。	

- ・ PCR の温度条件

94°C	2 分	} 40 回繰り返す
94°C	15 秒	
55°C	15 秒	
68°C	15 秒	
4°C	∞	

- ② SSR プライマーを用いたマルチプレックス PCR

サーマルサイクラーはアプライドバイオシステム社のGeneAmp® PCR System 9700、マルチプレックスPCRにはQIAGEN社のQIAGEN® Multiplex PCR Kitを使用した。反応液量は10 μ lとし、キットに含まれる 2 x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix及び 5 x Q-solutionに、鋳型DNA10ngと各プライマー対(5pmol/μ l)を混合した。下記の 2 反応で、合計 5 種類のSSRマーカーが分析可能である。

PCR の温度サイクルは 95°C ; 15 分のポリメラーゼの活性化後、94°C ; 30 秒、57°C ; 90 秒、72°C ; 1 分を 40 回繰り返す、最後に 72°C ; 10 分の伸長反応を行った。

- ・ 反応液組成 (CEDG008 と CEDG029 のマルチプレックス)

DNA 溶液 (10ng/μ l)	1.0 μ l
2 x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	5.0 μ l
5 x Q-solution	2.0 μ l
CEDG008 プライマー対 (5 pmol/μ l)	0.4 μ l
CEDG029 プライマー対 (5 pmol/μ l)	0.4 μ l
滅菌水を加えて 10 μ l とする。	

- ・ 反応液組成 (CEDG007、CEDG015 と CEDG024 のマルチプレックス)

DNA 溶液 (10ng/μ l)	1.0 μ l
2 x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	5.0 μ l
5 x Q-solution	2.0 μ l
CEDG007 プライマー対 (5 pmol/μ l)	0.4 μ l
CEDG015 プライマー対 (5 pmol/μ l)	0.4 μ l
CEDG024 プライマー対 (5 pmol/μ l)	0.4 μ l
滅菌水を加えて 10 μ l とする。	

- PCR の温度条件
 

95°C	15 分	}	40 回繰り返す
94°C	30 秒		
57°C	90 秒		
72°C	1 分		
72°C	10 分		
4°C	∞		

### ③ PCR 産物の電気泳動

- 電気泳動試薬の準備

PCR 産物はスラブ型電気泳動槽 (ATTO 社) を用いて 7.5% ポリアクリルアミドゲルで泳動した。アクリルアミド溶液は BIORAD 社のアクリルアミド/ビス 40% 溶液 (19 : 1) を使用した。また、ローディング溶液は 500  $\mu$ l の精製水に 25mg ブロモフェノールブルー、25mg キシレンシアノール、400  $\mu$ l のグリセロール及び 2  $\mu$ l の 0.5MEDTA (pH8.0) を加えて良く攪拌した後、精製水で 1ml とした (冷蔵保存可)。10x TBE は、27g の Tris、13.8g のホウ酸、10ml の 0.5M EDTA (pH8.0) を混合し、精製水を加えて 250ml とした (常温保存可)。

- ポリアクリルアミドゲルの作成

スラブ型電気泳動槽用のガラス板を良く洗浄し、組み立てた。7.5% ポリアクリルアミドゲルは以下のように試薬を混合した。

40%アクリルアミド溶液 (19 : 1)	3.75 ml
10%過硫酸アンモニウム溶液	0.2 ml
10x TBE	2 ml
精製水	14.05 ml

これに TEMED20 $\mu$ l を添加・攪拌後、ガラス板の中に流し込み、コームを差して室温で 30 分間固化させた。

- PCR 産物の電気泳動

ガラス板からコームを静かに引き抜き、ガラス板を電気泳動槽にセットし、1x TBE バッファーを流し込んだ後、定電圧 200V (5V/cm) で 30 分間プレランした。PCR 反応液 10  $\mu$ l にローディング溶液 2  $\mu$ l を加え攪拌した後、3  $\mu$ l をゲルにアプライし、200V (5V/cm) で約 3 時間 40 分泳動した。この時、キシレンシアノールはゲルの末端 (泳動距離 12cm) まで移動している。泳動後のゲルは、10  $\mu$ l の SYBR Green I (Molecular Probes) を 100ml の TE バッファー (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) で希釈した溶液 (暗所) で 40 分間染色し、254nm 紫外線照射下で写真撮影し、増幅断片の大きさを確認した (図 1)。分子量マーカーは 50ng/  $\mu$ l に調製済みの 10bp DNA Ladder (Invitrogen)

及び 100bp DNA Ladder (NEB) を 3  $\mu$  l 使用した。

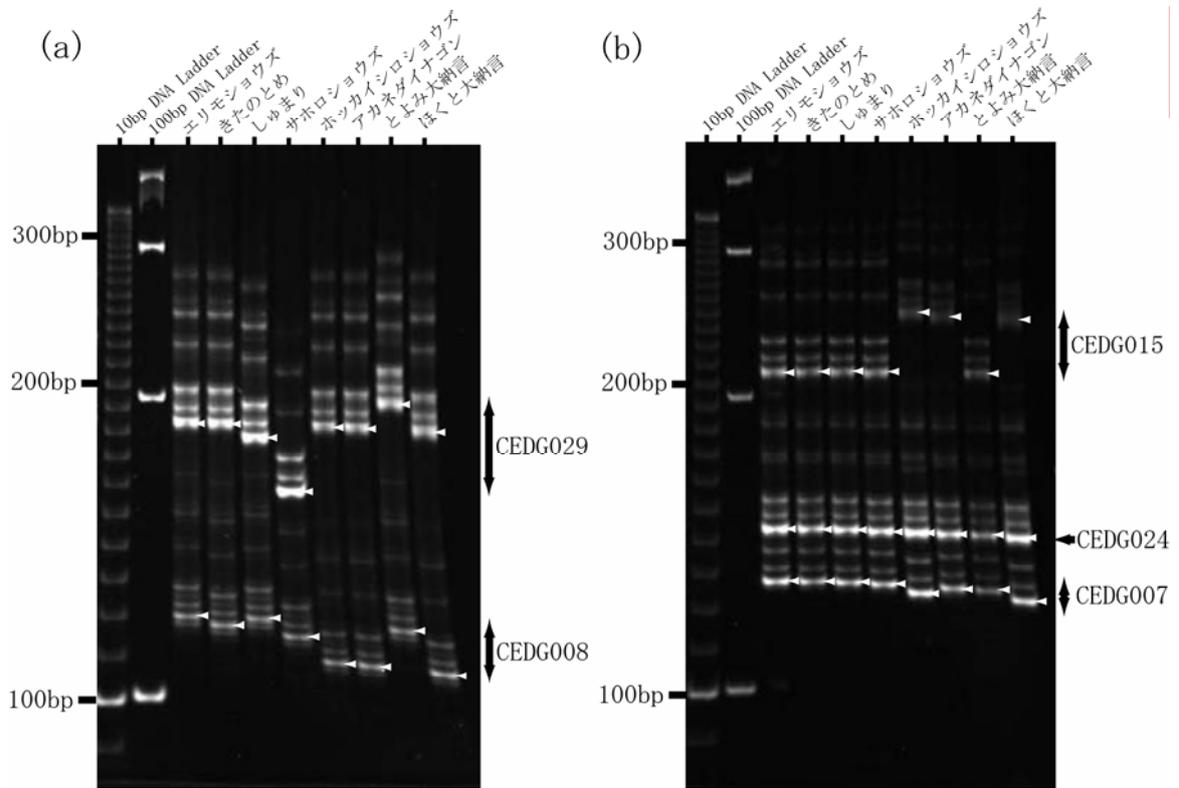


図1 増幅 DNA の電気泳動結果 (a: CEDG008 と CEDG029 のマルチプレックス PCR、  
b: CEDG007、CEDG015 と CEDG024 のマルチプレックス PCR、白矢印は各マーカーの識別バンド  
を示す)

(3) SSR マーカーによる小豆の品種識別

5種類の SSR マーカーを用いることで、北海道の普通小豆の主要品種 5 品種及び大納言 3 品種間の識別が可能であった (表 8)。さらに 5 種類の SSR マーカーを用いて海外の小豆在来種 239 点 (中国 81、韓国 118、台湾 40) を検定したところ、登録品種「しゅまり」や「きたのおとめ」と同じ遺伝子型を示すものは認められなかった。1 マーカーでは、「しゅまり」や「きたのおとめ」と同じような増幅 DNA 断片長をもつ海外小豆在来種が認められたが (図 2)、複数のマーカーから判別すると、輸入検査品の遺伝子型が偶然に「しゅまり」や「きたのおとめ」と一致する確率は低くなる (表 9)。輸入検査品の増幅 DNA 断片長が 5 種類の SSR マーカー全てにおいて「しゅまり」や「きたのおとめ」と一致した場合は混入の可能性が高く、続いて RAPD-STS プライマーで検定すればより確実に判定可能と思われる。

輸入小豆 7 銘柄について、それぞれ数粒の種子を検定したところ、輸入小豆は非常に雑多であることがわかった (表 10)。なお、これらのなかには登録品種「きたのおとめ」、「しゅまり」と同じ遺伝子型を示す小豆は認められなかった。

表 8 SSR マーカーによる北海道小豆の品種識別 (数字は目視によるおおよその bp 値)

	CEDG029	CEDG008	CEDG015	CEDG024	CEDG007
普通小豆					
エリモシヨウズ	185	120	206	144	128
きたのおとめ	185	118	206	144	128
しゅまり	179	120	206	144	128
サホロシヨウズ	157	116	206	144	128
ホッカインシロシヨウズ	185	110	244	144	126
大納言					
アカネダイナゴン	185	110	242	144	128
とよみ大納言	195	120	206	144	128
ほくと大納言	185	110	242	144	126

表9 輸入検査品が「きたのおとめ」及び「しゅまり」と一致する確率

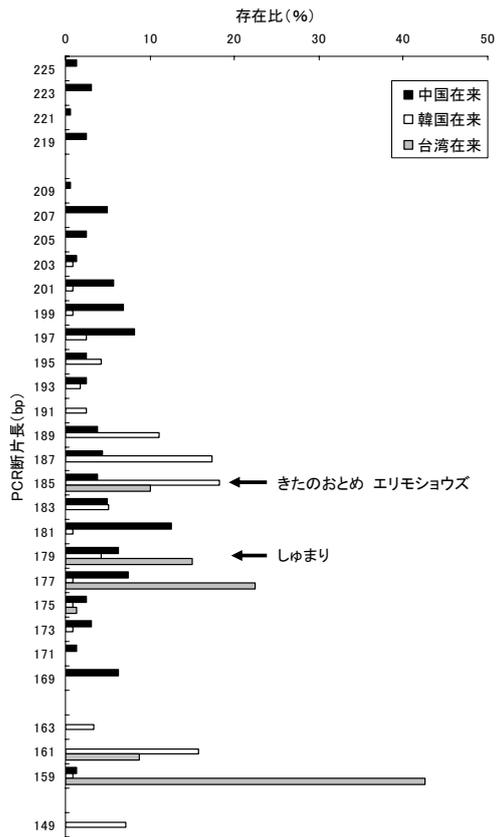
輸入品の 検査対象	マーカー 数	遺伝子型が偶然 一致する確率	識別に用いるマーカー*				
			CEDG 029	CEDG 008	CEDG 015	CEDG 024	CEDG 007
きたのおとめ	3	0.205	0.12	0.12	0.07		
しゅまり	3	0.020	0.07	0.02	0.07		
きたのおとめ	4	0.081	0.12	0.12	0.07	0.37	
しゅまり	4	0.007	0.07	0.02	0.07	0.37	
きたのおとめ	5	0.025	0.12	0.12	0.07	0.37	0.29
しゅまり	5	0.002	0.07	0.02	0.07	0.37	0.29

\*:海外遺伝資源における「きたのおとめ」と「しゅまり」の対立遺伝子頻度を示す

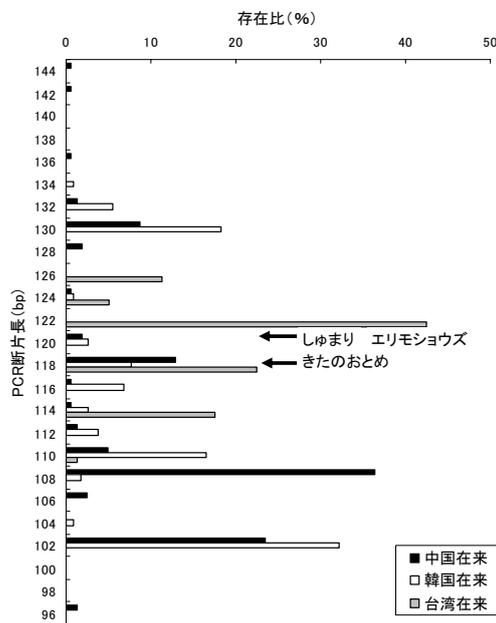
表10 SSR マーカーによる輸入小豆の検定結果(数字は目視によるおおよその bp 値)

	CEDG029	CEDG008	CEDG015	CEDG024	CEDG007
天津小豆_01	175	130	208	132	130
天津小豆_02	197	130	212	136	128
天津小豆_03	197	110	212	132	128
天津小豆_04	197	108	212	136	128
天津小豆_05	179	108	210	136	126
天津小豆_06	177	130	212	136	128
天津小豆_07	171	114	208	134	128
天津小豆_08	197	110	212	132	128
天津小豆_09	185	110	242	144	126
天津小豆_10	197	110	212	132	128
東北小豆_01	183	108	212	132	128
東北小豆_02	193	102	204	136	128
東北小豆_03	185	120	206	144	128
東北小豆_04	183	108	212	132	128
東北小豆_05	183	108	212	132	128
東北小豆_06	165	108	212	132	128
東北小豆_07	207	118	210	132	128
東北小豆_08	205	102	212	132	128
東北小豆_09	207	102	200	136	128
東北小豆_10	187	108	212	132	128
宝清小豆_01	197	118	212	136	128
宝清小豆_05	187	110	240	144	126
宝清小豆_06	207	118	200	136	128
宝清小豆_07	187	110	242	144	126
河北小豆_1	183	108	210	136	126
河北小豆_2	223	108	210	136	126
河北小豆_3	181	108	210	136	126
河北小豆_4	181	106	208	136	126
山西小豆_1	179	110	206	132	124
山西小豆_2	175	108	200	138	126
山西小豆_3	183	108	210	136	128
山西小豆_4	177	128	206	132	126
山西小豆_5	185	108	210	136	126
山西小豆_6	177	108	206	132	126
延辺小豆_01	195	110	204	144	126
延辺小豆_02	199	118	212	132	130
延辺小豆_03	195	110	204	144	126
延辺小豆_04	197	110	204	144	126
延辺小豆_05	195	110	202	144	126
延辺小豆_06	189	102	210	132	126
延辺小豆_07	195	110	204	144	126
延辺小豆_08	209	118	218	132	128
延辺小豆_09	195	110	204	144	126
延辺小豆_10	195	110	204	144	126
延辺小豆_11	195	110	204	144	126
延辺小豆_12	195	110	204	144	126
陝西小豆_01	171/183*	108	210	132	128
陝西小豆_02	179	108	210	136	126
陝西小豆_03	197	110	212	132	128
陝西小豆_04	179	108	210	136	128

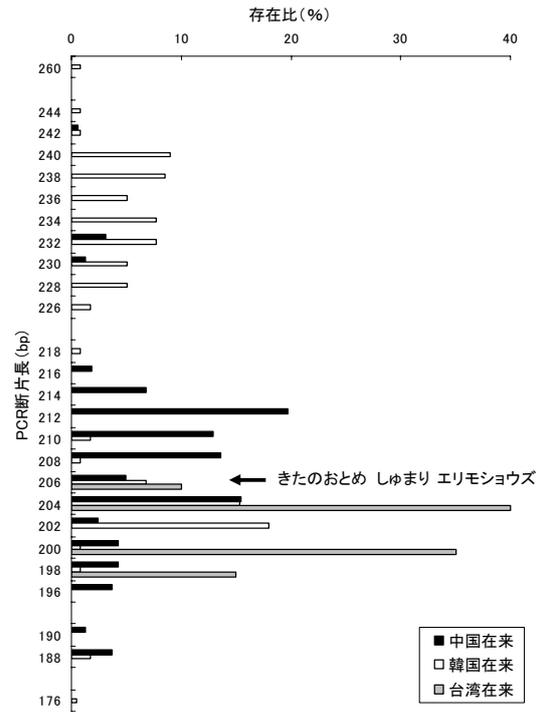
\* はヘテロ接合型であったことを示す



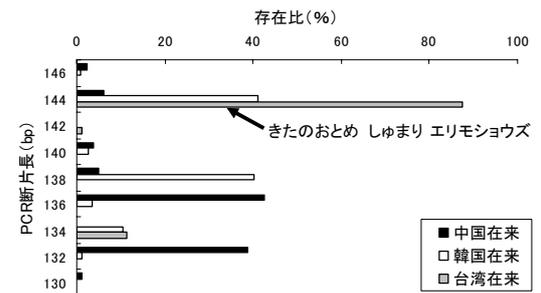
CEDG029



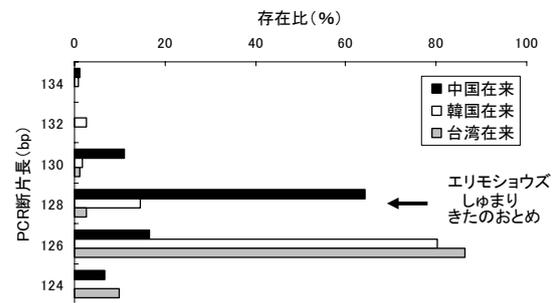
CEDG008



CEDG015



CEDG024



CEDG007

図2 海外の在来品種についてマルチプレックス PCR を行い、増幅産物をアクリルアミド電気泳動した際の予想 bp 値(左: マルチプレックス(a)、右: マルチプレックス(b))

#### (4) シークエンサーによる品種識別

より確実に品種識別を行うには、シークエンサーによるフラグメント解析が有効である。シークエンサーでは PCR 産物と内部標準を同時に電気泳動するので、再現性のある正確な DNA 断片長の測定が可能で、DNA 断片長を数値化できる等の利点がある。

シークエンサーを用いた解析では、あらかじめ蛍光標識したプライマーを用いて PCR を行う。蛍光プライマーが取り込まれた PCR 産物はシークエンサーによる電気泳動中にリアルタイムで検出される。また、1 サンプルに含まれている複数の蛍光色素を同時に検出できるので、下記のような複数の蛍光プライマーを混ぜ合わせたマルチプレックス PCR 1 反応分を 1 回電気泳動するだけで、全マーカーに関するデータが一度に得られるのが特徴である。

シークエンサーの種類やバージョンによって導入されているフラグメント解析用ソフトウェアの種類や仕様が異なるので、ここではアプライドバイオシステム社の GeneScan™ ソフトウェアがインストールされた ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer を用いた解析例を示す。

##### ① フラグメント解析の準備

Install Capillary Array Wizard に従い、キャピラリー [3100 36cm Capillary Array (47cm x 50  $\mu$  m)] を ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer に取り付け、Spatial Calibration を実行した。Change Polymer Wizard に従い、ポリマー (3100 POP-4) をシリンジに充填した。5 種類の蛍光色素 [6-FAM (青色)、NED (黄色)、PET (赤色)、VIC (緑色)、LIZ (橙色)] を用いたフラグメント解析を行うために、マニュアルに従って 3100 Matrix Standard Set DS-33 による Spectral Calibration を行い、Filter set G5 を Genetic Analyzer に導入した。

##### ② 蛍光化 SSR プライマーの合成

蛍光化 SSR プライマーの合成にはアプライドバイオシステム社受託合成サービスの DNA フラグメント解析用カスタム蛍光プライマーを利用した。表 11 に示した蛍光色素で上流プライマーの 5' 端を標識した。各プライマー対は上流及び下流プライマーを混合し、各々の終濃度がプライマー溶液中で 5 pmol/ $\mu$ l となるように調製した。

表11 品種識別用 SSR プライマー

SSR プライマー対	上流プライマー (5'→3')	蛍光色素	下流プライマー (5'→3')
CEDG008	AGGCGAGGTTTCGTTTCAAG	6-FAM	GCCCATATTTTTACGCCAC
CEDG029	GATTGCTTTTAGCAGAGGGC	NED	GAAGAAACCCATCTCGATCC
CEDG007	GTGCAGCCACTACATGAATG	PET	GAAGTTGACACTCATCCACC
CEDG015	CCCGATGAACGCTAATGCTG	VIC	CGCCAAAGGAAACGCAGAAC
CEDG024	CATCTTCCTCACCTGCATTC	VIC	TTTGGTGAAGATGACAGCCC

③ 蛍光化 SSR プライマーを用いたマルチプレックス PCR

サーマルサイクラーはアプライドバイオシステム社のGeneAmp® PCR System 9700、マルチプレックスPCRにはQIAGEN社のQIAGEN® Multiplex PCR Kitを使用した。反応液量は10 $\mu$ lとし、キットに含まれる2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix及び5 x Q-solutionに、鋳型DNA10ngと各プライマー対(5 pmol/ $\mu$ l)を混合した。

PCR の温度サイクルは 95°C ; 15 分のポリメラーゼの活性化後、94°C ; 30秒、57°C ; 90秒、72°C ; 1分を40回繰り返し、最後に72°C ; 10分の伸長反応を行った。

・ 反応液組成

DNA 溶液 (10ng/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix	5.0 $\mu$ l
5x Q-solution	2.0 $\mu$ l
CEDG007 プライマー対 (5pmol/ $\mu$ l)	0.4 $\mu$ l
CEDG008 プライマー対 (5pmol/ $\mu$ l)	0.4 $\mu$ l
CEDG015 プライマー対 (5pmol/ $\mu$ l)	0.4 $\mu$ l
CEDG024 プライマー対 (5pmol/ $\mu$ l)	0.4 $\mu$ l
CEDG029 プライマー対 (5pmol/ $\mu$ l)	0.4 $\mu$ l

・ PCR の温度条件

95°C	15 分	} 40 回繰り返し
94°C	30 秒	
57°C	90 秒	
72°C	1 分	
72°C	10 分	
4°C	$\infty$	

#### ④ シークエンサーの準備

シークエンサーのマニュアルに従い、シークエンサー、コンピューター、3100 Data collection ソフトウェアを起動し、泳動バッファー及び精製水を交換した。場合によってはキャピラリー[3100 36cm Capillary Array (47cm x 50  $\mu$ m)]の交換やポリマー (3100 POP-4) の充填を行う。次に 3100 Data collection ソフトウェアを使用して、Plate Record を作成した。Sample Name の欄にサンプル名を書き込み、各サンプルについて Standard Dye 「0」、Project 「3100Project1」、DyeSet 「G5」、Run module 「GeneScan36\_POP4DefaultModule」を選択した。

#### ⑤ PCR 産物の電気泳動

PCR産物と内部標準[GeneScan™ 500 LIZ Size standard]を同時に電気泳動することで、正確な断片長の測定が可能になる。ここで用いた内部標準とは、塩基数既知の分子量マーカが橙色の蛍光標識されたものである。Hi-Di™ FormamideはPCR産物を変性状態に保つために使用した。

##### ・ 電気泳動サンプルの準備

シークエンサーに適合したMicroAmp® 96-well Reaction Plateを用いて、以下のように LIZ Size standard、Formamide 及び PCR 産物を混合した。Size standard と Formamide は予め混ぜあわせておく。

GeneScan™ 500 LIZ Size standard	0.05 $\mu$ l
Hi-Di™ Formamide	9.45 $\mu$ l
PCR 産物	0.5 $\mu$ l

よく攪拌した後、95°Cで5分間加熱して変性させ、氷上で急冷した。

##### ・ 電気泳動

96-well Reaction Plate にセプタ、リテーナー及びベースを取り付け、シークエンサーにセットし、電気泳動を開始した。一回 (16 サンプル) の電気泳動に約 50 分程度必要である。

#### ⑥ 電気泳動データの解析

GeneScan™ソフトウェアを用いて電気泳動データを解析する。このソフトウェアはシークエンサーで検出された PCR 産物を蛍光色ごとに選り分けて、DNA断片のサイズと蛍光強度を表やグラフに表示させる機能がある。また、新しいソフトウェアGeneMapper™が利用できれば、一連のデータ解析やデータベース化がよりスムーズに行える。

- GeneScan™ソフトウェアの設定  
解析をはじめる前に、マニュアルに従い Analysis parameter、Size Standard を作成した。Size Standard の Dye は LIZ に相当する「0」を選択する。
- データの解析  
GeneScan™ソフトウェアを起動し、新規プロジェクトファイルに電気泳動データファイル（サンプル名.fsa）を取り込んだ。設定済みの SizeStandard 及び Analysis parameter を選択し、サンプルを解析した。
- 解析結果の表示方法  
Result Control ウィンドウから表示したいサンプルを選択する。横軸には DNA 断片のサイズ、縦軸には蛍光強度が表示される。目的のピークを選択すると、そのサイズや蛍光強度の数値化が表示される。
- 解析の注意点  
LIZ Size standard の分子量はソフトウェアによって自動的に割り当てられるが、しばしばノイズに誤って割り当てられることがあるので、解析終了後に確認が必要である。また、供試サンプルのピークが検出限界を超えた場合は PCR 産物を水で 1/5～1/10 に希釈し、再度電気泳動する必要がある。

#### ⑦ アリアルデータの取得

小豆の品種識別に用いる SSR マーカーは、 $(AG)_n$  からなる 2 塩基の反復配列を含むので、図 3 のように約 2 bp おきにスタッターとよばれるピークが現れる。品種識別では右側の最も高いピーク（矢印）の bp 値をアリアルデータ（識別に用いるピークの DNA 断片長）として使用する。ただし、CEDG015 で増幅されるピークは、229bp 以上になると一番右のピークが右から二番目のものより低くなる場合があるが（図 3 c 2）、一番右のピークの bp 値をアリアルデータとして記録する。

シーケンサーから得られるマーカーのアリアルサイズはポリアクリルアミドゲルの結果と若干異なるので注意が必要である。シーケンサーから得られた北海道産普通小豆の主要品種 5 品種及び大納言 3 品種のアリアルサイズは表 12 に、海外小豆在来種 239 点（中国 81、韓国 118、台湾 40）のアリアルサイズの頻度分布は図 4 に示した。なお、表 12 及び図 4 の bp 値は、ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer で測定された LIZ Size standard に対する相対値の小数点以下を四捨五入した値である。この値は解析機器や電気泳動条件等によって若干変動するので、絶対値ではない。品種を判定する場合には、必ず検査品と対象品種の増幅 DNA 産物を同時に電気泳動し、アリアルサイズが一致するかどうかの確認が必要である。

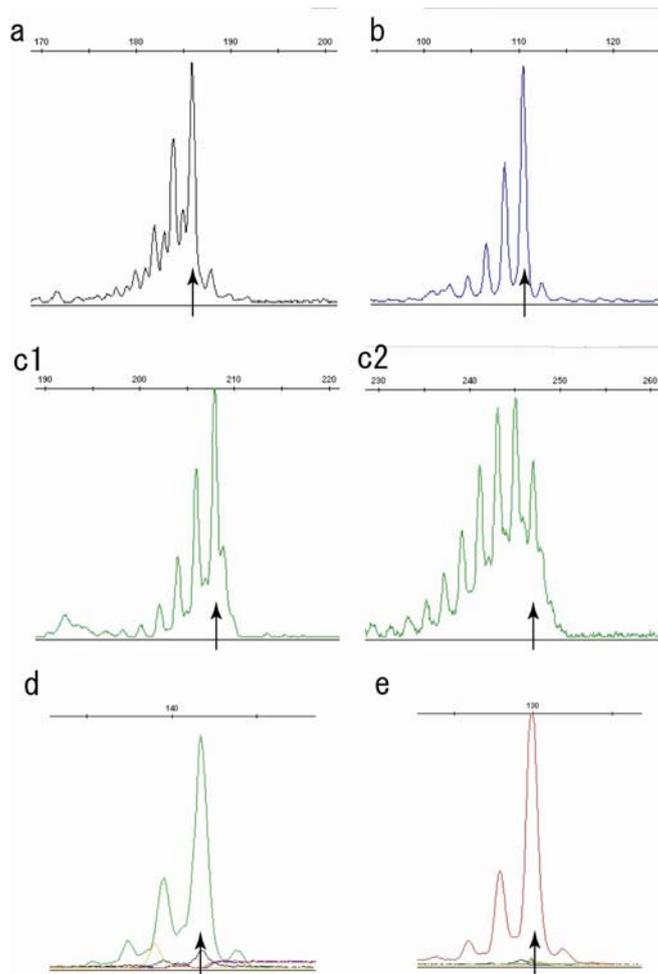


図3 SSR マーカーのピーク画像 (a: CEDG029, b: CEDG008, c: CEDG015, d: CEDG024, e: CEDG007)、黒矢印は識別に用いたピーク

表12 北海道小豆品種のアリールサイズ (数値はシーケンサーで測定された bp 値)

	CEDG029	CEDG008	CEDG015	CEDG024	CEDG007
普通小豆					
エリモショウズ	186	120	212	141	130
きたのおとめ	186	118	212	141	130
しゅまり	180	120	212	141	130
サホロショウズ	158	116	212	141	130
ホッカイシロショウズ	186	110	249	141	128
大納言					
アカネダイナゴン	186	110	247	141	130
とよみ大納言	196	120	212	141	130
ほくと大納言	186	110	247	141	128

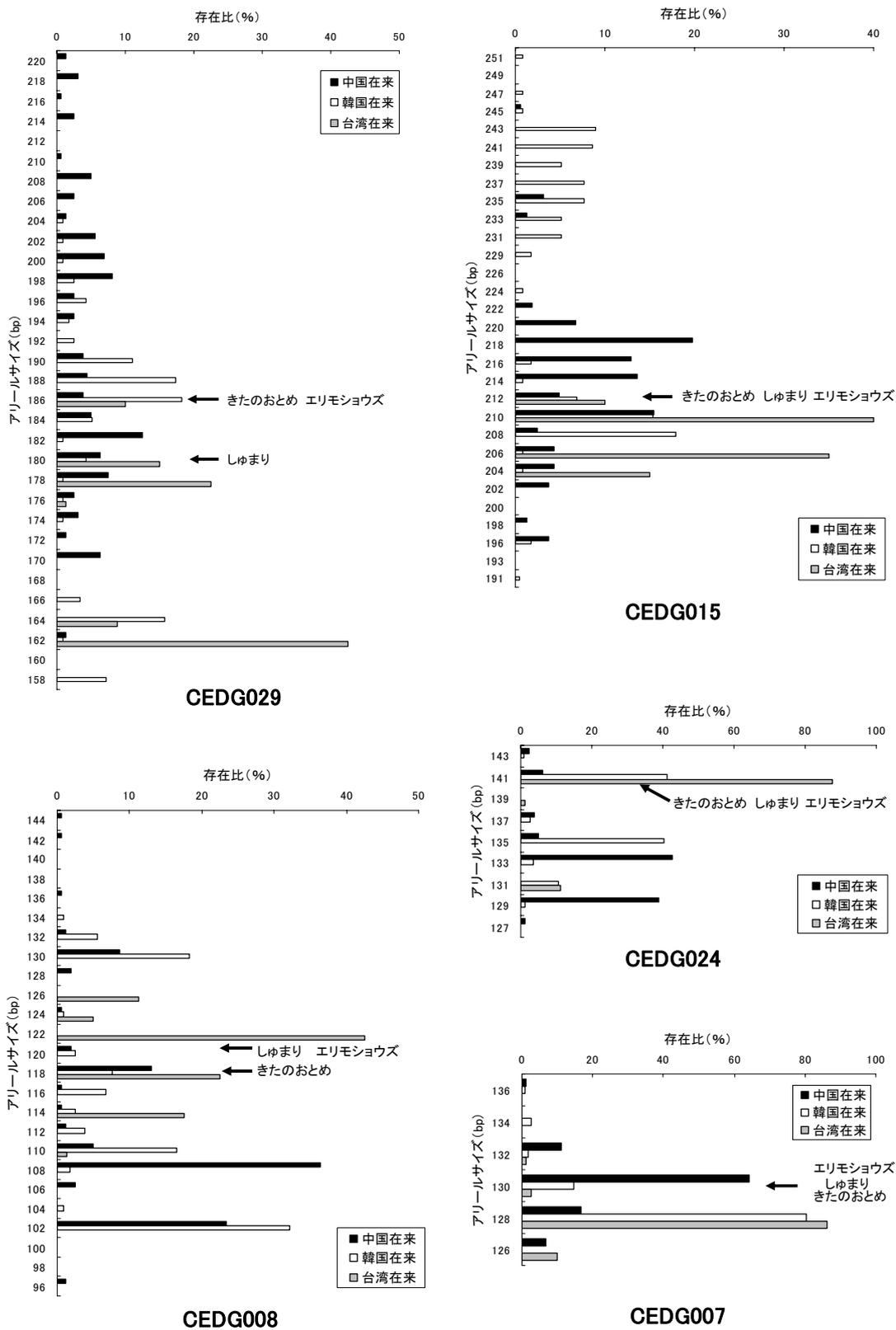


図4 シークエンサーで検出された海外の小豆在来種 239 点(中国 81、韓国 118、台湾 40 点)の  
アリーの頻度分布