

DNA品種識別技術の妥当性確認のための 標準的な手順書2007(案)

(SSR分析において)

標準的な手順書の目次

- I. 妥当性確認試験の必要性和コンセプト
- II. 試験室間共同試験の基準
- III. 試験室間共同試験の範囲
- IV. 試験を実施する前の確認事項
- V. マーカーの妥当性試験の方法
- VI. マーカーの妥当性確認試験
- VII. DNA抽出法の妥当性確認試験
- VIII. SSRの波形の分析方法
- IX. 品種データの表示形式
- X. 試験データの提出

I . DNA品種識別技術の妥当性確認試験の必要性

- 植物新品種の育成者権は重要な知的財産権であり、その保護、活用を技術的に支える基盤として、DNA品種識別技術の重要性が増してきている。
- 開発された技術を品種識別に利用する上で、技術の妥当性の検討や分析結果の品質保証等が課題となっている。
- AOAC Internationalでは食品関連分野における分析法の妥当性確認に関する国際的な基準を作成しているが、植物のDNA品種識別技術に関する妥当性の確認方法は現状では報告されていない。
- このため、植物共通の妥当性確認マニュアルを提案することでDNA品種識別技術の妥当性をシステマティックに確認する体制を構築し、育成者権の適切な公使に向けた環境を整備する。

I. 妥当性確認試験のコンセプト

- 発表されている植物ごとのDNA品種識別技術において、操作手順を忠実に実行した場合に、開発した機関以外の機関においても結果に再現性があること(試験室間における再現性)を確認すること。
- 試験室間における再現性が確認された結果から、技術の妥当性が保証できる範囲を明確にすること。

Ⅱ. 試験室間共同試験の基準①

- 現状ではDNA品種識別技術の妥当性確認試験として定められた方法はない。
- このため、より効率的な基準が設定されるまではAOAC OFFICIAL METHOD ANALYSIS APPENDIX D による定性法の試験室間共同試験の基準(CRITERIA)を参考にする。

報告機関数

10機関以上(棄却検定後に残った機関数)

分析レベル

マトリックスごとに2レベル以上

レベルごとの試料数

6点以上

ネガティブコントロール

マトリックスごとに6点以上

Ⅱ．試験室間共同試験の基準②

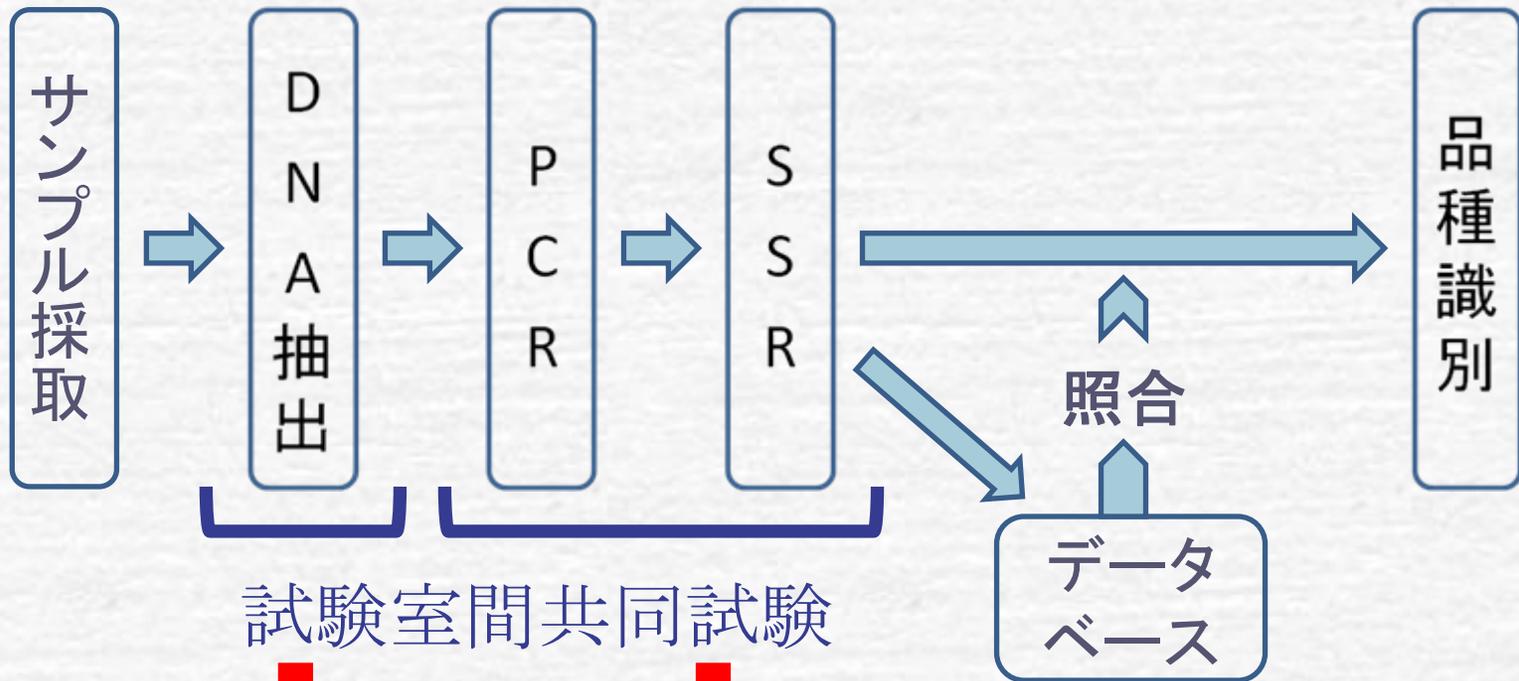
SSR分析の経験や実績が十分にある少数の試験室で試験室間共同試験を行う。

- 10試験室以上にこだわると技術レベルの低い試験室が入る可能性。
- 植物種ごとに10試験室以上で妥当性試験を行うと労力・時間・コストが膨大になる。継続性に疑問。
- 妥当性試験が未実施でも、実際に裁判(人のDNA鑑定)や行政(東京都が米の虚偽表示調査に使用)の場面で使用されている。



具体的な基準は？

Ⅲ. 試験室間共同試験の範囲



① DNA抽出法の
妥当性試験

② マーカーの
妥当性試験

本調査では分割しておこなうが、通しておこなってもよい。

IV. 試験を実施する前の確認事項

1. サンプルについて
2. DNA抽出法について
3. マーカー及びPCRについて
4. 器具について
5. 試薬について
6. 操作について

1. サンプルについて(品種内多型)

- 品種内で多型が存在すると、DNA品種識別技術では品種を判別することができない。このため、品種識別におこなうDNA領域に**品種内多型が存在しないことを確認**しておくことが必要である。
- 品種内多型は時間の経過や異なる環境下で発生する確率が高くなることから、**古くから広く流通している品種**を用いて、DNA品種識別で用いるマーカーにおいて、多型が検出されないことを確認すること。**地理的に離れた個体と時間的に離れた個体**(元株、原木と流通している個体)を比較する。

1. サンプルについて(品種の由来)

- 既知の品種としてDNA品種識別に供試するサンプルはその**品種を代表**するものでなければならない。
- このため、供試する**品種の由来**は正確に把握すること。登録品種等は元株や原木由来のサンプルであることが望ましい。それが確保できない場合、少なくとも、**別品種とのコンタミ等がない**ことが担保できるサンプルを用いること。

1. サンプルについて(部位)

- DNA品種識別は植物体の全てがなくても分析ができることが利点の一つである。
- この利点を生かすために、DNA品種識別に供試するサンプル部位としては、**流通する部位**及び**通年を通して採取できる部位**の中から選択すること。
- (葉、茎、果実等の)サンプル部位の違いがDNA品種識別の結果に影響するかを確認すること。影響を与える場合、サンプル採取について詳細に記述すること。

1. サンプルについて(サンプルの状態)

- 流通している(果実等の)植物体の一部は、通常、徐々に老化・腐敗が進行している状況下にある。
- DNAは生きた細胞内で安定的に存在するが、細胞が死ぬとDNAも分解され、DNA抽出時の収量が落ちる。
- このため、このような流通部位をサンプルとする場合、DNA品種識別に供試できるDNAが抽出可能な**サンプルの状態(限界)**を把握しておくことが重要である。

1. サンプルについて(保存)

- 採取したサンプルは他のサンプルと混同しないように、袋等に入れ、ラベリングすること。
- 採取した場所や日付等を記録すること。また採取時のサンプルの状態がわかる写真を撮影してから保存すること。
- 保存方法はサンプル部位やDNA抽出までの時間によって、適した方法を選択すること。ただし、冷凍保存する場合は、以下のことに注意すること。
- サンプルは急速に冷凍すること。
- 液体窒素を利用する場合は、袋の破れ等によるコンタミに気をつけること。
- 冷凍庫はできるだけ -30°C 以下に設定し、庫内にサンプルを詰め込みすぎないこと。
- サンプルの出し入れ時の融解に気をつけること。

2. DNA抽出法について

- できる限り**市販のキット**を用いて、プロトコル通りにDNA抽出を行うこと。試薬等を自作すると試薬についても妥当性を確認しなければならないため。
- サンプル部位ごとに**DNA抽出法が異なる**場合、それぞれの抽出法について妥当性を確認すること。

3. マーカー及びPCR条件について

- 試験に供試するマーカーは結果が安定しているものを選択すること。テイルドを付加することで結果を安定させる場合は、供試する全てのマーカーにテイルドを付加すること。
- 安定したフラグメントを検出するためのAnnealing温度の範囲等のPCR条件を確認すること。
- マーカーの独立性とヘテロ接合度の理論値と観測値等の統計的パラメーターが確認できているかを把握すること。

4. 器具について

- 使用する器具はできる限り、滅菌済みの使い捨てプラスチック器具を用いること。ガラス器具を用いる場合は、乾熱滅菌(180°C2時間)済みの器具を使用すること。

5. 試薬について

- 試薬は原則として、試験の主体となる機関が指定・配布したものを使用する。同じ試薬であっても、別の実験で使った試薬は使用しない。
- 使用する機械等の違いにより、使用する試薬が異なる場合は、機械にあった試薬を使用する。
- 自作した試薬は使用しない(キットのプロトコルに記載がある場合を除く)。

6. 操作について

- DNA抽出をおこなうエリアとPCRをおこなうエリアは物理的に離すこと。通常の業務でDNA抽出をおこなっているエリアを本試験でのPCRのエリアとしないこと。
- DNAサンプル及びPCR産物を扱う行程では必ず手袋を着用すること。
- 操作中に気づいたこと(不具合やサンプル間の差)は、必ずメモをとること。

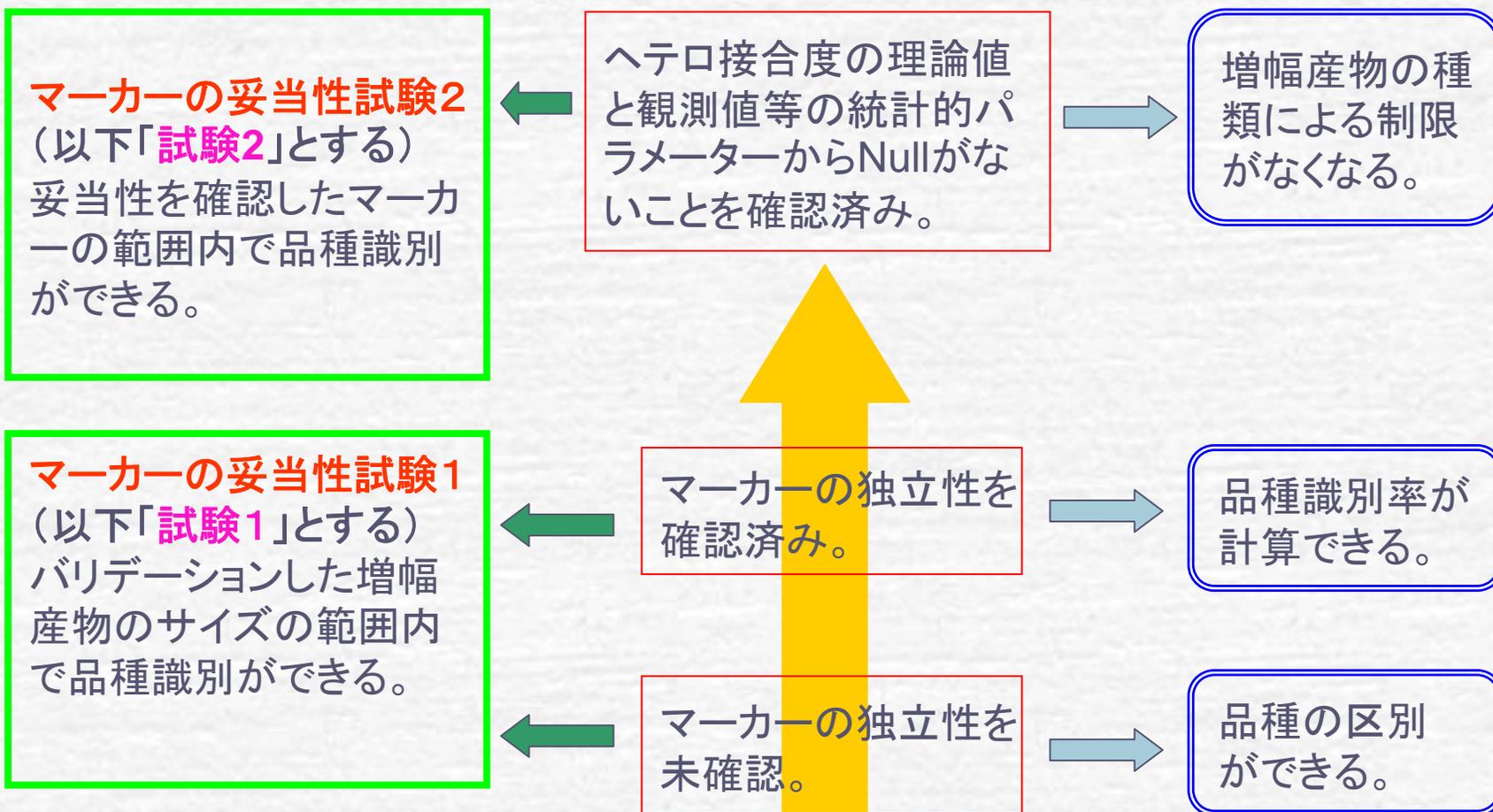
V. マーカーの妥当性試験の方法

1. マーカーの妥当性試験の種類
2. 試験1について
3. 試験2について
4. 試験1及び2の比較

1. マーカーの妥当性試験の種類

- マーカーの妥当性試験は、下記の事項が開発されたDNA品種識別技術において、確認されているかで、その方法と汎用性が決まる。
- マーカーの独立性が確認されていない場合、品種Aと品種Bとの間で、SSR分析の結果に差があれば、別品種とすることができるが、差がなかった場合、「何%の確率で同一品種である」等の確率を出すことができない。
- 供試するマーカーがヘテロ接合度の理論値と観測値等の統計的パラメーターからNull対立遺伝子頻度が確認されていれば、SSR分析で得られる結果は供試品種の遺伝子型を正確に反映していると考えられるため、各品種のSSR分析の結果を個々に妥当性確認しなくてもよくなる。

1. マーカーの妥当性試験の種類



2. 試験1について

特徴

供試品種をSSR分析したときに検出される
全ての増幅産物サイズの再現性を確認する。
(分析レベルが増幅産物のサイズ)



- 供試品種が多いと試験規模が大きくなる。
- 試験室間共同試験を行った増幅産物サイズ以外は妥当性が確認されない。
- Nullがあるマーカーでも使用可能。

試験1の例

品種名	マーカーA	マーカーB
品種a	138/173	216/224
品種b	138/138	216/224
品種c	138/150	216/224
品種d	150/173	218/224
品種e	150/173	224/224
品種f	140/152	216/218

マーカーAには138, 140, 150, 152, 173の**5つ**の増幅産物サイズある。
マーカーBには216, 218, 224の**3つ**の増幅産物サイズがある。
試験室間共同試験ではそれぞれの増幅産物サイズの再現性を6反復ずつおこなう
ことで確認する。よって、試験サイズ(タイピング数)は

$$5 \times 6 + 3 \times 6 = \mathbf{48 \text{ (タイピング)}} \text{ となる。}$$

(各品種の増幅産物サイズを組み合わせることで、タイピング数を減らすことが可能)

3. 試験2について

特徴

供試したマーカーが目的のローカスにアニーリングする
(結果的に目的のアリールを増幅する)ことを確認する。
(分析レベルが対立遺伝子)



- 供試品種は最小で1品種(6反復)。
- 試験室間共同試験を行ったマーカーによるSSR分析の妥当性が確認される。
- ヘテロ接合度の理論値と観測値等の統計的パラメーターでNullがないと考えられるマーカーのみ使用可能。

試験2の例



アレルを増幅するために設計されたマーカが、設計通りにアレルだけを増幅するかを確認する。このため反復配列領域の長さの違いはマーカの性能に関係しない。1マーカにつき特定のフラグメントサイズを6反復する。2マーカなら最少で

$2 \times 6 = 12$ (タイピング) となる。

4. 試験1及び2の比較

	試験1	試験2
分析レベル	増幅産物のサイズ	対立遺伝子
試験の規模	増幅産物のサイズと識別したい品種数との関係から、試験の規模が大きくなる。	1マーカ―に対し、1品種の増幅産物の6反復でも可。
新マーカ―を加えたとき	新マーカ―の増幅産物のサイズを、それぞれに10機関以上で6反復する。	新マーカ―に対し、1品種の増幅産物について、10機関以上で6反復する。
既存のマーカ―で新たな増幅産物が検出されたとき	新たに検出された増幅産物のサイズについて、10機関以上で6反復する。	追加試験なし。
増幅産物のサイズの再現性確認	供試品種における増幅産物のうち 全ての種類 (サイズ)を10試験室で直接確認する。	供試品種における増幅産物の 特定の種類 (サイズ)を10試験室で直接確認する。

VI. マーカーの妥当性確認試験

1. 試験設計
2. PCRについて
3. SSRについて

1. 試験設計

- ① 試験設計(共通の検討事項)
- ② 試験設計(試験1の検討事項)
- ③ 試験設計(試験2の検討事項)

①試験設計(共通)

- マーカーの独立性とヘテロ接合度について確認し、妥当性確認試験の1または2のどちらで実施するかを検討する。
- 当該植物のDNA品種識別技術を開発した機関等と協議をし、試験室間共同試験に供試する(妥当性を確認する)品種の範囲及びそれらの品種の識別に必要なマーカーを選択する。
- マーカーの独立性が確認されている場合は、品種識別率も考慮してマーカー数を決定する。
- マーカーは識別に必須のものの中から増幅がよいものや波形が見やすいものを選ぶ。
- 「V. 試験を実施する前の確認事項」をチェックし、必要であれば、確認のための試験を行う。
- 協力機関と協議し、具体的な試験方法について調整する。
- 標準品種を選定する(「参考:標準品種の選定」参照)。

②試験設計(試験1)

- ✔ 妥当性を確認するマーカーとその増幅産物サイズ数を選定する。
- ✔ マーカー数は品種識別率を考慮して決めるが、必要に応じて試験規模も考慮する。
- ✔ 妥当性を確認する増幅産物サイズ数(種類)をもとに供試する品種を選び、試験規模を決める。
- ✔ 基準品種の増幅産物サイズは全て妥当性を確認する。

③試験設計(試験2)

- 供試品種には必ず基準品種を入れ、基準品種の増幅産物を6反復することで、基準品種については、増幅産物サイズも妥当性を確認する。

2. PCRについて

- PCR条件や試薬は主体となる機関の指定に従うこと(試験条件の統一のため)。
- 操作はDNA抽出を行ったエリアから物理的に離れた場所で行うこと(コンタミ防止のため)。
- 手袋を着用し、コンタミに気をつけること。
- サーマルサイクラーの機種によって、PCRの結果に差が出る可能性があることに留意すること。

3. SSR分析

- 主体となる機関から特に指定がない限り、各機関のシーケンサーの機種に合った試薬・操作方法で使用する（試験条件の統一のため）。

VII. DNA抽出法の妥当性確認試験

- 原則として他品種の混入がない**サンプル単位**（**葉一枚、果実1個等**）でおこなう（コンタミ防止のため）。
- 抽出された**DNAの質と量**がDNA品種判別に供試するサンプルとして十分であることを確認することを目的としておこなう。

1. サンプルの摩砕

- サンプルの摩砕時は他の品種とのコンタミに気をつけること。特に乳鉢を用いた摩砕においては周辺へのサンプルの飛散していることを想定し、手袋等はサンプルごとに代えること。
- 凍結サンプルを扱う場合は、融解に気をつけること(融解するとDNAの抽出効率が落ちるため)。
- 摩砕方法は主体となる機関から特に指定がない限り、サンプル部位、サンプル数、試験室の設備等から最適な方法を選択すること。

2. DNA抽出

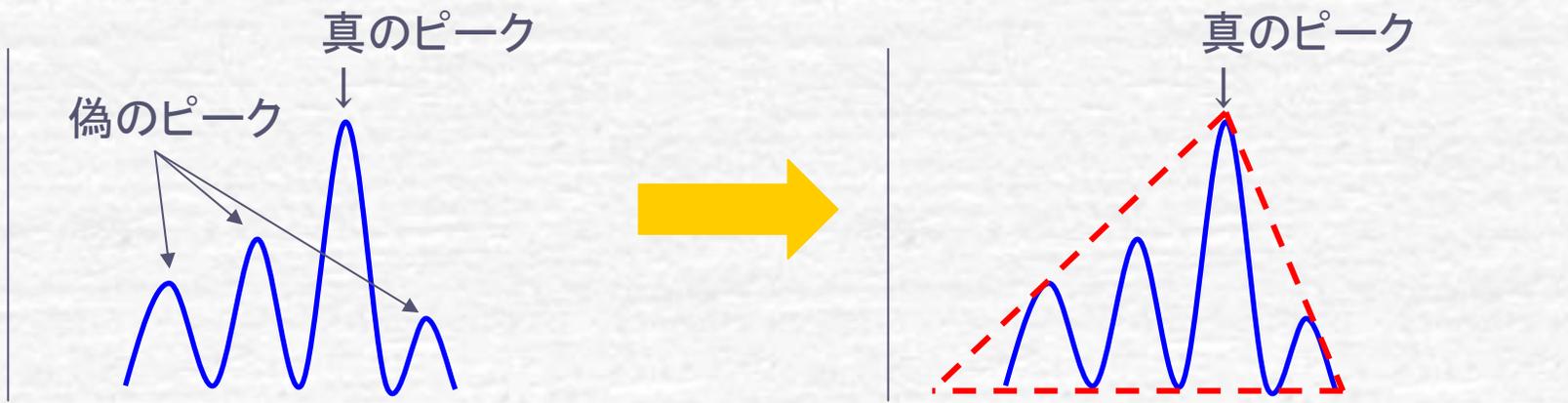
- キットを用いてDNA抽出を行う場合、主体となる機関から特に指定がない限り、キットのプロトコルに従って、作業を行うこと(試験条件の統一のため)。

3. DNA濃度の確認

- 抽出したDNAはPCRに供試する前に、必ず濃度を確認すること(DNAの濃淡がPCR反応の結果に影響を与えないようにするため)。
- 確認方法は主体となる機関が特に指定しない限り、実施機関の判断で選んでよい。ただし、分光光度計で行う場合は、RNAが処理できていることを、確認してから行うこと(分光光度計はRNAもDNAと同じ波長で検出するため)。

VIII. SSRの波形の分析方法

- SSR分析で得られた波形は通常、下図のような形状となる。

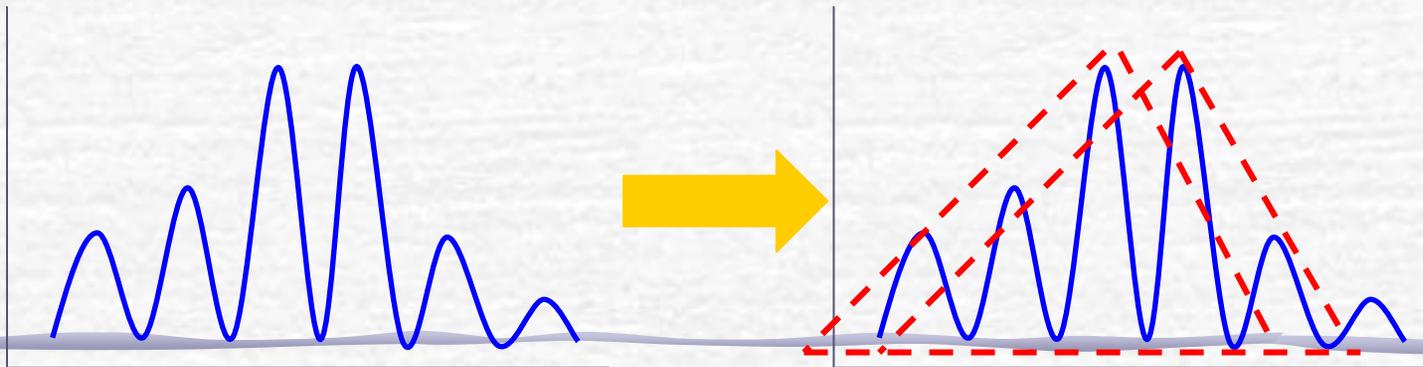
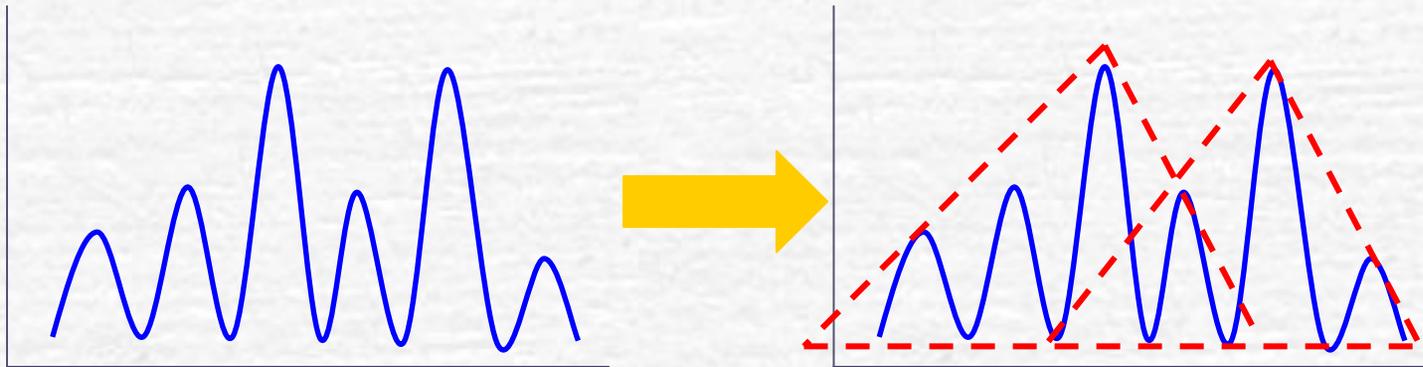


一番高いピークを示す「真のピーク」の前後にピークの低い「偽のピーク」が表れる。

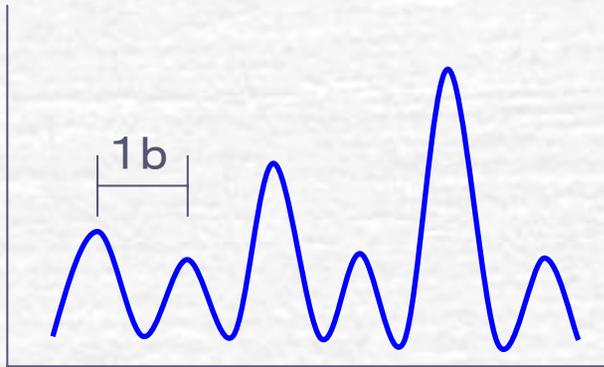
上図のような真のピークを頂点とした三角形がイメージできる。

波形の分析例①

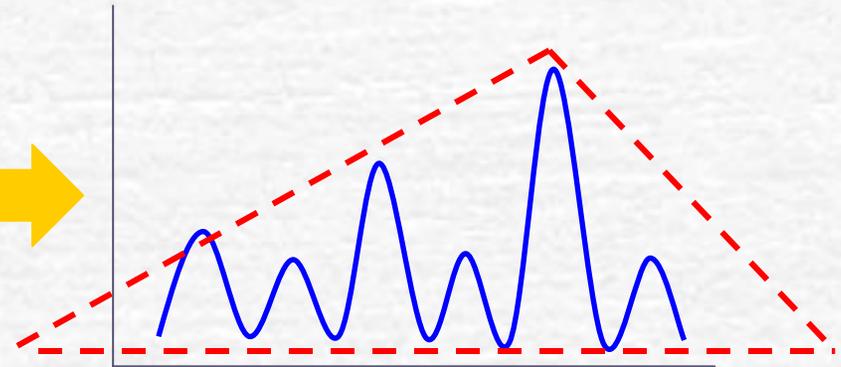
2つのピークがあると判断される波形の例。



波形の分析例②

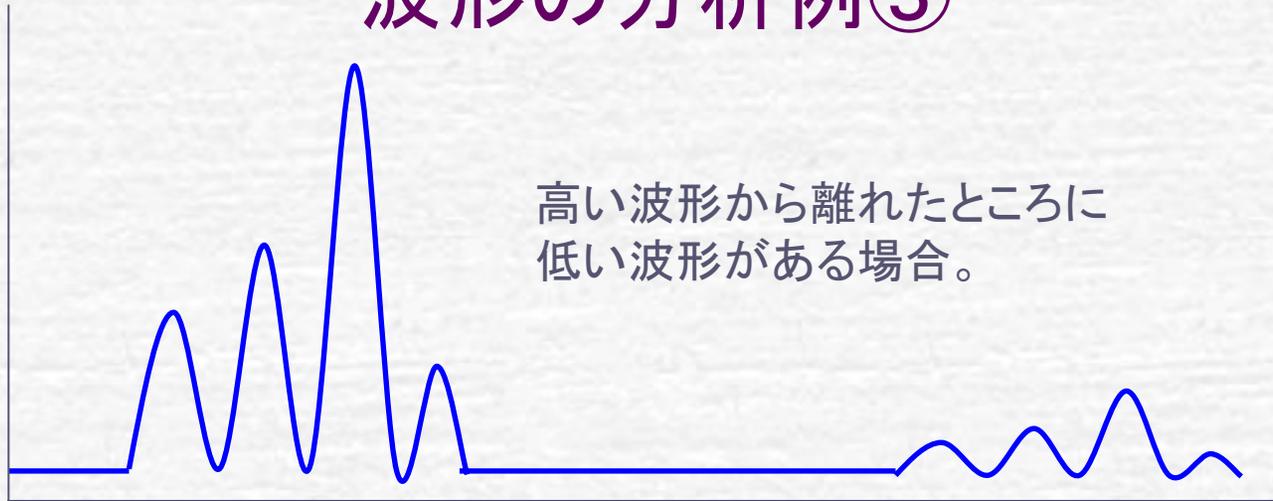


2bリピートのSSRなのに
1b単位の波形があるときは・・・。

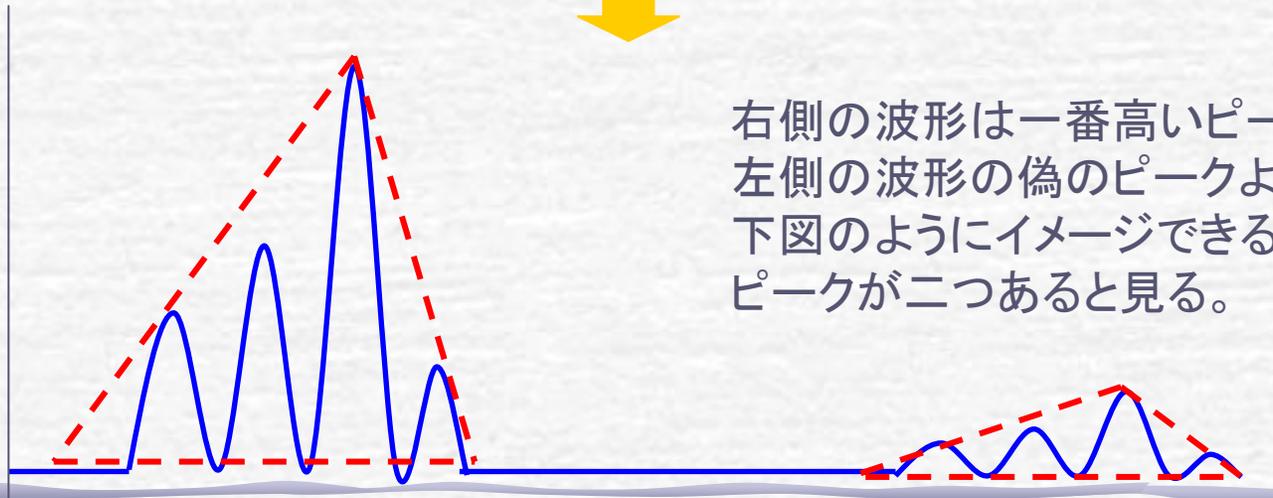


一番高いピークの頂点から2b単位の
ピークのみを見る。

波形の分析例③



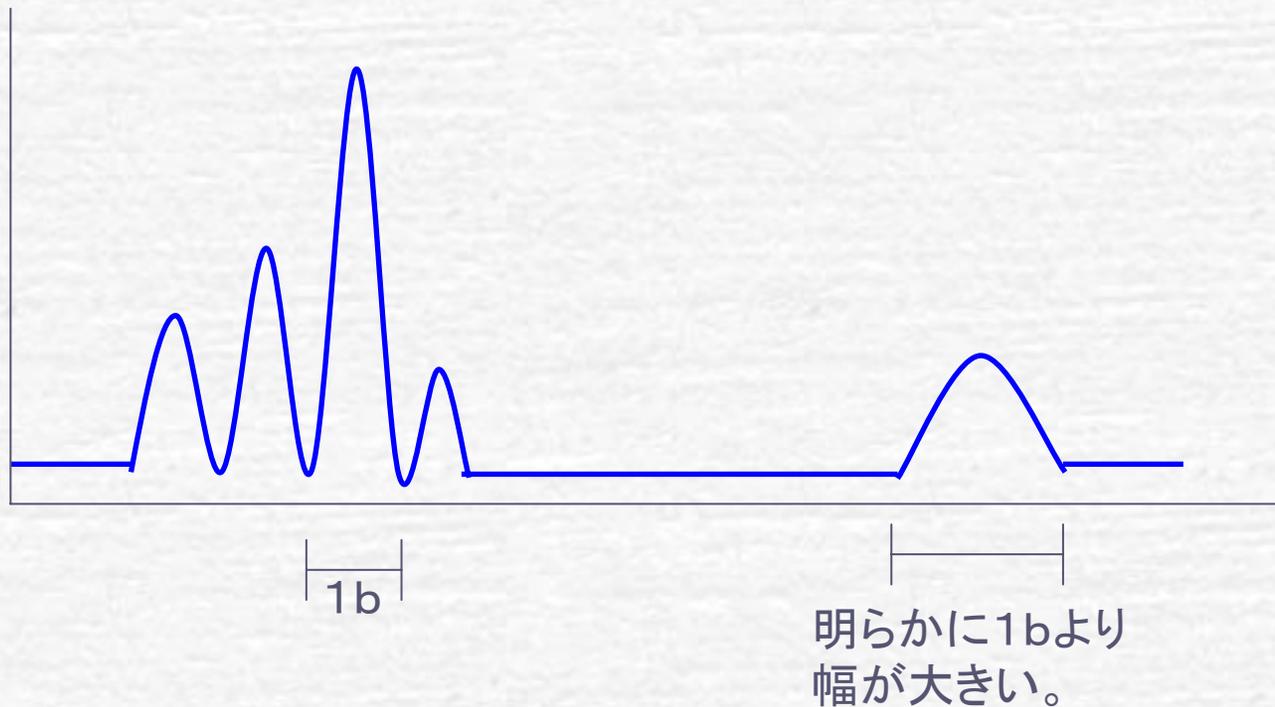
高い波形から離れたところに
低い波形がある場合。



右側の波形は一番高いピークでも
左側の波形の偽のピークよりも低い
が、
下図のようにイメージできる場合は
ピークが二つあると見る。

波形の分析例④

- ピークの幅が1bより明らかに広い場合は、DNAのピークではない。

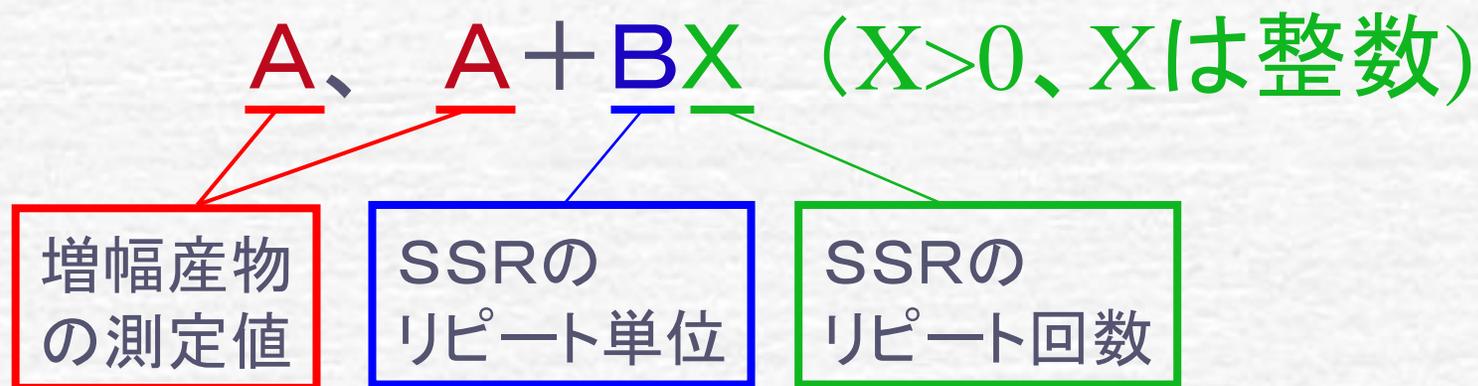


Ⅸ. 品種データの表示形式

- SSR分析で得られたピークの値は、機械(シーケンサー)ごとに4~5b程度のズレが見られることが知られている。このため、ピークの値は**絶対値としては扱わない**。
- 植物ごとに**基準品種**を設定し、分析する品種のピーク値と基準品種の**ピーク値の距離**を分析する品種のデータ値とする。

1. 品種データの表示方法

増幅産物のピーク値は下記のように表す。



2倍体・SSRが2塩基リピート・ヘテロであれば

$$A, A + 2X$$

となる。(ホモであればAのみ)

1. 基準品種のデータの表示方法(例)

SSRが2塩基リピートで増幅産物のピーク値が100.2bと110.4bだった場合。

「 $A = 100.2$ 」となり、

「 $A + BX$ 」は「 $100.2 + 2 \times X$ 」となる。

110.4は「 $100.2 + 2 \times 5.1$ 」となる。

X は整数なので5.1を四捨五入して5とする。

よって、100.2bと110.4bは A 、 $A + 10$ となる。

2. 分析する品種のデータ表示(例)

- 基準品種のピーク値が100.2と110.4であった。
- よって $A=100.2$
- 分析した品種のピーク値が106.4と112.6であった。
- よって、それぞれ「 $A+6.2$ 」、「 $A+12.4$ 」となり、
- 「 $A+2 \times 3.1$ 」、「 $A+2 \times 6.2$ 」となり、
- Xを四捨五入して、「 $A+2 \times 3$ 」、「 $A+2 \times 6$ 」とする。
- よって、分析する品種のデータ表示は
- 「 $A+6$ 」、「 $A+12$ 」となる。

X. 試験データの提出

協力機関は設定された期間内に作成した下記の試験データを主体となる機関に提出する。

- ✔ DNA濃度が確認できる資料とSSR分析の波形図（DNA抽出の妥当性試験）。
- ✔ SSR分析の波形図と品種のデータ値（マーカーの妥当性試験）。
- ✔ 試験に使用した機器（機種名）と試薬。
- ✔ プロトコルを逸脱した（可能性がある場合の）情報

参考：基準品種選定の基準

- SSR分析における基準品種は増幅産物サイズの基準になるので、当該植物のDNA品種識別を行う際には必ず必要になる。このため基準品種は、①由来が明確な株や木（母株や原木）がきちんと（責任を持って）管理されている品種、②手に入りやすい品種であることが望ましい。
- なお、基準品種の数は使用するマーカーが示す「対立遺伝子数」や「対立遺伝子のサイズの範囲」等によって変動する。