

SSR マーカーによるニホンナシの DNA 品種識別技術

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所
独立行政法人種苗管理センター

1. はじめに

ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* Nakai) は、バラ科ナシ亜科に属する果樹であり、リンゴ、ビワなどが、同じナシ亜科に属している。セイヨウナシ (*Pyrus communis* L.)、チュウゴクナシ (*Pyrus bretschneideri* Rehd., *Pyrus ussuriensis* Maxim.) が、ニホンナシと同じナシ属 (*Pyrus* 属) に属している。

日本でのニホンナシの栽培は、総栽培面積 16,500ha である (図 1、農林水産省生産局果樹花き課「果樹農業に関する資料」(平成 17 年 3 月) から作成)。平成 15 年度の品種別栽培面積では、「幸水」が 37.6%、「豊水」が 24.5%、「二十世紀」が 9.9%、「新高」が 8.5% を占めている。最近では、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所 (以下、農研機構・果樹研究所) などから、「あきづき」、「あきあかり」、「秋麗 (しゅうれい)」、「王秋 (おうしゅう)」、「なつしずく」などの優良品種が多数育成されている。これらの優良品種の品種名の偽装表示や登録品種の海外流出は、ニホンナシ生産に大きな影響をおよぼすだけでなく、消費者に対する食の安全・安心の確保の観点からも大きな問題である。農研機構・果樹研究所では、SSR (Simple Sequence Repeat の略、別名マイクロサテライト) マーカーを開発し、本 SSR マーカーを利用して、葉、果実や穂木などを用いて、DNA 品種識別技術を確立した。

これまでに、農研機構・果樹研究所では、独立行政法人種苗管理センターと共同して、RAHM (Random Amplified Hybridization Microsatellites) 法、5' anchored PCR 法、濃縮ゲノムライブラリー法などの手法により、100 種類以上の SSR マーカーを開発し、ニホンナシを始めとするナシ類の品種識別、遺伝解析やゲノムマッピングに有効であることを報告している (参考文献 1, 2, 3, 4)。また、開発した SSR マーカーが、ニホンナシ、チュウゴクナシ、セイヨウナシや近縁種の 60 品種の識別やこれらの遺伝的多様性の解析に利用可能であることを報告している (参考文献 5)。SSR マーカーは、ヒトの DNA 鑑定や親子鑑定にも実用的に利用されている信頼度の高いマーカーであるため、ナシでの適用を試みたところ、ナシの親子関係の確認＝親子鑑定に利用可能であり (参考文献 6)、また両親が不詳となっていたニホンナシ品種「豊水」の本当の両親を同定することができた (参考文献 4)。葉のみならず、生果実、缶詰やジュース果汁からも DNA の抽出と品種の同定が可能なことを報告している (参考文献 7)。SSR マー

カーは、ナシの連鎖（遺伝子）地図作成にも有効であり、現在では、染色体基本数の 17 に収束するナシの標準連鎖地図が作成されているとともに、SSR マーカーのゲノム上の存在位置が明らかとなっている（参考文献 3, 8）。

本「SSR マーカーによるニホンナシの DNA 品種識別技術」では、これまでに開発してきた SSR マーカーから、DNA 品種識別に有効に利用可能なもの 17 種類を選定し、また遺伝的多様性の解析、親子鑑定や連鎖地図作成で得られた知見を考慮して、ニホンナシ品種の DNA 識別技術として、マニュアルを作成した。

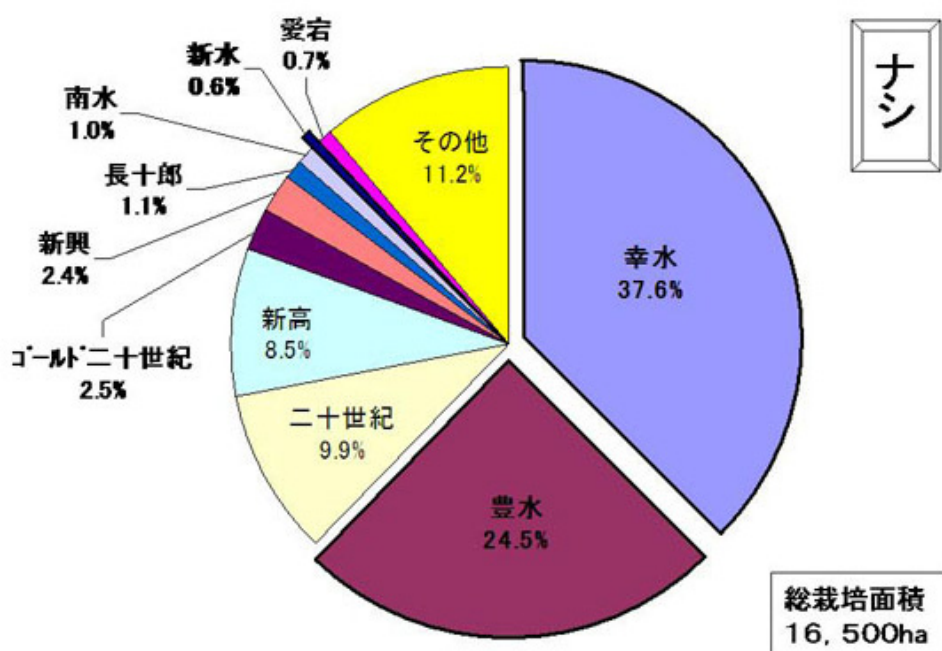


図 1 ニホンナシの品種別栽培面積（平成 15 年度）

参考文献

- 1) Yamamoto, T., T. Kimura, Y. Sawamura, T. Manabe, K. Kotobuki, T. Hayashi, Y. Ban and N. Matsuta (2002) Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. *Euphytica* 124: 129-137.
- 2) Yamamoto, T., T. Kimura, M. Shoda, Y. Ban, T. Hayashi and N. Matsuta (2002) Development of microsatellite markers in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Molecular Ecology Notes* 2: 14-16.
- 3) Yamamoto, T., T. Kimura, M. Shoda, T. Imai, T. Saito, Y. Sawamura, K. Kotobuki, T. Hayashi

and N. Matsuta (2002) Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 9-18.

- 4) Sawamura, Y., T. Saito, N. Takada, T. Yamamoto, T. Kimura, T. Hayashi and K. Kotobuki (2004) Identification of parentage of Japanese pear 'Housui'. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 73: 511-518.
- 5) Kimura, T., Y. Z. Shi, M. Shoda, K. Kotobuki, N. Matsuta, T. Hayashi, Y. Ban and T. Yamamoto (2002) Identification of Asian pear varieties by SSR analysis. *Breeding Science* 52: 115-121.
- 6) Kimura, T., Y. Sawamura, K. Kotobuki, N. Matsuta, T. Hayashi, Y. Ban and T. Yamamoto (2003) Parentage analysis in pear cultivars characterized by SSR markers. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 72: 182-189.
- 7) Yamamoto, T., T. Kimura, T. Hayashi and Y. Ban (2006) DNA profiling of fresh and processed fruits in pear. *Breeding Science* 56: 165-171.
- 8) Yamamoto, T., T. Kimura, S. Terakami, C. Nishitani, Y. Sawamura, T. Saito, K. Kotobuki and T. Hayashi (2007) Integrated reference genetic linkage maps of pear based on SSR and AFLP markers. *Breeding Science* 57: 321-329.

2. SSR マーカーによる DNA 品種識別分析での実験、試薬調製の一般的注意事項

「SSR マーカーによるニホンナシの DNA 品種識別技術」は、サンプルからの DNA 抽出工程、SSR マーカーによる PCR 実験工程、DNA シーケンサーによるフラグメント解析工程、解析結果を基にした品種識別工程に大別される。全行程に渡って注意すべき事項を以下に記した。

1. PCR 実験では、微量の鋳型 DNA であっても増幅されるので、目的以外の DNA の混入を防ぐとともに、試料の酵素的分解を防ぐため、人間の皮膚表面から分泌されている DNase の混入を防止しなければならない。コンタミネーション防止のため、適切な操作を行う必要がある。
2. 溶液類は熱に不安定なものを除いて、オートクレーブ滅菌を行う。純水は電気伝導率 0.0056 mS/m (25 °C) 以下になるように脱イオン化されたものを用い、さらに精製された超純水を用いるのが望ましい。滅菌水は純水を 121°C、15 分以上オートクレーブで処理したものを用いる。
3. チップやチューブ類は、滅菌済みのものを用い、必ず使い捨てとする。また、コンタミネーションを防ぐため、滅菌済みのフィルターチップを使用する。
4. マイクロピペットのチップ類、その他ピペット類及び 1.5 ml と 2.0 ml 等のチューブは、滅菌缶に入れオートクレーブ滅菌し、その後、乾燥器に入れ、完全に乾燥してから用いる。可能なものについては乾熱滅菌を行う。あるいは、滅菌済みの市販品を用いてもよい。
5. DNA の操作を行うときは、必要に応じてクリーンベンチを使用するとともに、実験台上をエタノールで消毒する。実験操作時は、上履きに履き替え、白衣を着用することが望ましい。必ずゴム手袋をはめ、作業中も頻繁にエタノールで消毒する必要がある。ゴム手袋はパウダー無しのものを用いるか、パウダーを洗い落としてから使用する。
6. 滅菌水や TE 緩衝液に DNase が混入すると実験全般に被害が広がるので、これらの溶液は実験者毎に別々に作成し、頻繁に（少なくとも月に 1 回程度）作り直す。
7. 特別の指定がある試薬はそれに従い、その他については JIS 特級試薬（あるいは同等のグレード）を用いること。
8. 調製試薬には試薬名や試薬の組成、濃度、調製者、調製日を明示すること。
9. 専用試薬はその旨明示すること。
10. 不要となった試薬あるいはコンタミネーションを起こした試薬は速やかに処分すること。
11. 試薬の調製は基本的な量を示しているので、使用量に合わせて適宜量を調

整すること。

12. 滅菌した試薬はクリーベンチ以外の場所で開いた場合には、内部の滅菌状態は保たれていないので、再度使用するならば再度滅菌する。
13. 試薬の調製は、ほとんどの場合、大幅に濃度、pH が違わなければそれほど厳密に行う必要はない。分析の内容をよく理解して必要な精度で試薬の調製を行えばよい。
14. DNA の取り扱いは、生化学実験室や核酸実験室などのように、外部からの土埃の混入を最小限に抑えた実験室で、分析操作を行うことが望ましい。

3. サンプルからの DNA 抽出方法

本マニュアルでは、Genomic-tip 20/G と G2 バッファーを用いる方法を 3-1 項に、DNeasy Plant Mini Kit を用いる方法を 3-2 項に記した。前者では、純度や精製度の高い DNA が抽出可能であり、信頼度の高い DNA 分析を行うために、より適した方法である。また、果実や果実加工品などの夾雑物の多いサンプルや DNA が一部損傷したサンプルにも適用可能である。一方、実験操作がやや複雑で時間がかかること、スケールが大きくなるので多検体の分析に適用が困難であること、大型の冷却遠心機が必要など機械や設備の制約を受けることが欠点である。

後者では、実験スケールが小さく、短時間で多検体を扱うことが可能であるメリットの反面、夾雑物の多いサンプルや加工度の高いサンプルでは、純度の高い DNA が得られにくいデメリットがある。

抽出した DNA の電気泳動法による定量方法を 3-3 項に、葉からの DNA 抽出操作、生果実からの DNA 抽出操作、穂木（花芽）からの DNA 抽出操作について、注意点をメインに、3-4 項、3-5 項、3-6 項に記した。

3-1. ニホンナシサンプルからのゲノム DNA 抽出方法 1

ー Genomic-tip 20/G と G2 バッファーを用いる方法ー

<準備するもの>

50 ml 遠沈管（ポリプロピレン製、滅菌済み）、1.5 ml チューブ（滅菌済み）、2 ml チューブ（滅菌済み）、メルカプトエタノール、Polyclar AT（不溶性ポリビニルピロリドン）、乳鉢・乳棒（滅菌済み、乾熱滅菌 180℃ 2 時間）、薬サジ（滅菌済み、乾熱滅菌 180℃ 2 時間）、液体窒素、G2 buffer（キアゲン社）、QBT buffer（キアゲン社）、QC buffer（キアゲン社）、QF buffer（キアゲン社）、RNase（100 mg/ml）、Genomic-tip 20/G カラム（キアゲン社）、1/10 TE バッファー（EDTA の濃度を 0.1 mM にした TE バッファー）、高速冷却遠心機 2 台（50 ml 遠沈管が使用可能なもの、1.5-2 ml チューブが利用可能なもの）、ウォーターバスなど。

<実験操作>

基本操作は、キアゲン社のプロトコールに従っているが、バッファーの液量など一部修正箇所あり。キアゲン社のプロトコール通りでも問題なく DNA 抽出が可能である。

1. 50 ml 遠沈管（ポリプロピレン製）に、10 ml の G2 buffer、200 μ l のメルカプトエタノール、100 mg の Polyclar AT、2 μ l の RNase を加える。
2. 約 1 g のサンプルを液体窒素中で、凍結状態で粉砕した後、粉砕サンプルを

上記バッファーに加える。

3. 2本ずつ重さのバランスを調節した後、ウォーターバスで、50℃2時間インキュベートする。途中で、2-3回上下反転混和する。
4. 高速冷却遠心機（佐久間製作所製 50A-IV、ロータ 50F-12A）で、6,000 rpm、30分間、4℃で遠心し、上清を 50 ml の新しい遠沈管に移す。
5. Genomic-tip 20/G カラム（以下カラム）を、2 ml の QBT buffer で平衡化しておく。
6. 5で得た上清を 2 ml ずつ数回に分けて、カラムに通す。
7. QF buffer をウォーターバスで 50℃に温めておく（サンプル数×2 ml）。
8. 2 ml の QC buffer をカラムに通す。
9. 再度、2 ml の QC buffer をカラムに通す。
10. カラムの下に 2 ml チューブを置き、50℃で温めておいた 1 ml の QF buffer を加え、DNA を溶出させる。
11. 2 ml チューブを交換し、10 の操作を再度繰り返し、DNA 溶出液を得る。
12. 10 および 11 で得られた溶出液に、0.7 ml のイソプロパノールを加え、20-30 回上下反転混和するなどして、よく混合する。
13. -20℃で 30 分間静置後、冷却遠心機（TOMY 社製 MX-160、ロータ TMA-24）で、14,000 rpm、20 分間、4℃で遠心する。
14. 上清を捨て、500 µl の 70%エタノールを加え、14,000 rpm、10 分間、4℃で遠心する。
15. 上清を捨て、スピードバックなどを用いて乾燥させる。
16. 200 µl の 1/10 TE に溶かす。
17. 4℃で静置保存し、3 日後くらいに DNA が溶解してから、電気泳動法により、抽出 DNA の濃度をチェックする。

< 各試薬の調製方法 >

・ G2 buffer の組成と調製方法

試薬	最終濃度	使用量
8M Guanidine HCl	800 mM	100 ml
1M Tris-HCl (pH 8.0)	30 mM	30 ml
0.5M EDTA (pH 8.0)	30 mM	60 ml
Tween-20	5%	50 ml
Triton X-100	0.50%	5 ml
滅菌超純水		755 ml
合計		1000 ml

・ QBT buffer の組成と調製方法

試薬	最終濃度	使用量
5M NaCl	750 mM	30 ml
1M MOPS (pH 7.0)	50 mM	10 ml
Isopropanol	15%	30 ml
Triton X-100	0.15%	0.3 ml
滅菌超純水		129.7 ml
合計		200 ml

・ QC buffer の組成と調製方法

試薬	最終濃度	使用量
5M NaCl	1 M	80 ml
1M MOPS (pH 7.0)	50 mM	20 ml
Isopropanol	15%	60 ml
滅菌超純水		240 ml
合計		400 ml

・ QF buffer の組成と調製方法

試薬	最終濃度	使用量
5M NaCl	1.25 M	50 ml
1M Tris-HCl (pH 8.5)	50 mM	10 ml
Isopropanol	15%	30 ml
滅菌超純水		110 ml
合計		200 ml

3-2. ニホンナシサンプルからのゲノム DNA 抽出方法 2

ー DNeasy Plant Mini Kit を用いる方法 ー

< 準備するもの >

1.5 ml チューブ (滅菌済み)、2 ml チューブ (滅菌済み)、ペッスル (滅菌済み)、メルカプトエタノール、Polyclar AT (不溶性ポリビニルピロリドン)、乳鉢・乳

棒（滅菌済み、180℃で2時間乾熱滅菌したもの）、薬サジ（滅菌済み、180℃で2時間乾熱滅菌したもの）、液体窒素、Buffer AP1（キアゲン社）、Buffer AP2（キアゲン社）、Buffer AP3/E（エタノール添加、キアゲン社）、Buffer AW（エタノール添加、キアゲン社）、RNase（100 mg/ml）、QIAshredder spin column（キアゲン社）、DNeasy Mini spin column（キアゲン社）、コレクションチューブ（キットに添付のもの）、1/10 TE バッファー（EDTA の濃度を 0.1 mM にした TE バッファー）、高速冷却遠心機 1 台（1.5-2 ml チューブが利用可能なもの）、ウォーターバスなど。

<実験操作>

基本操作は、キアゲン社のプロトコールに従っているが、バッファーの液量など一部修正箇所あり。キアゲン社のプロトコール通りでも問題なく DNA 抽出が可能である。

1. サンプル約 100 mg を、計量する。
2. 液体窒素中で、ペッスルと 1.5ml チューブ、または乳鉢・乳棒などを利用して、サンプルを凍結状態で粉砕する。乳鉢・乳棒を使用する場合は、粉砕後のサンプルを 1.5 ml チューブに入れる。
3. ウォーターバスで 65℃に温めておいた 450 μ l の Buffer AP1 と 8 μ l のメルカプトエタノールを 1.5 ml チューブに加えた後、手で強く上下に振ってサンプルの塊がない程度に混和する。65℃で 10 分間静置する。途中で、2-3 回上下反転混和する。

※RNase 処理を行う場合は、4 μ l の RNase A (キットに添付のもの、100 mg/ml) を加える。

4. 150 μ l の Buffer AP2 を加え、軽く混合した後、氷上で 5 分間静置する。
5. 冷却遠心機（TOMY 社製 MX-160、ロータ TMA-24）で、14,000 rpm、10 分間、15℃で遠心する。
6. 5 の遠心分離で得られた上清を、QIAshredder spin column（紫色）に加え、14,000 rpm、2 分間、15℃で遠心する。
7. QIAshredder spin column を通して得られた液に、800 μ l の Buffer AP3/E（エタノール添加を確認）を加え、ピペッティングにより混合する。
8. 7 で得られた混合液のうち 650 μ l を、DNeasy Mini spin column（白色）に加える。
9. 12,000 rpm、1 分間、15℃で遠心した後、溶出液を捨てる。
10. 7 で得られた混合液の残りを、DNeasy Mini spin column（白色）に加え、12,000 rpm、1 分間、15℃で遠心した後、溶出液を捨てる。
11. DNeasy Mini spin column を、新しいコレクションチューブ内に移し、500 μ l

の Buffer AW（エタノール添加を確認）を加え、12,000 rpm、1 分間、15℃で遠心した後、溶出液を捨てる。

12. DNeasy Mini spin column に 500 µl の Buffer AW（エタノール添加を確認）を加え、12,000 rpm、1 分間、15℃で遠心した後、溶出液を捨てる。
13. 再度、12,000 rpm、1 分間、15℃で遠心し、溶液を除去する。
14. DNeasy Mini spin column を 1.5 ml チューブに移す。
15. ウォーターバスで 65℃に温めておいた 100 µl の 1/10 TE を加え、5 分間静置した後、10,000 rpm、1 分間、15℃で遠心し、DNA 溶出液を得る。
16. 再度、65℃に温めておいた 100 µl の 1/10 TE を、DNeasy Mini spin column に加え 5 min 静置した後、10,000 rpm、1 分間、15℃で遠心し、DNA 溶出液を得る。

3-3. 抽出した DNA の電気泳動法による定量方法

抽出した DNA の定量方法には、アガロースなどの電気泳動による分析や分光光度計による分析がある。前者のアガロース電気泳動では、正確な DNA 量の値は算出されないが、抽出された DNA の量、抽出時の DNA 分解程度（DNA の長さや移動度）や夾雑物の影響の有無を確認することができる。本マニュアルでは、電気泳動法による定量方法について記す。

<準備するもの>

1.5 ml チューブ（滅菌済み）、色素液（30 %グリセロール、0.25 %ブロモフェノールブルー、0.25 %キシレンシアノール）、λ DNA 溶液（10 µl あたり 10 ng、30 ng、100 ng、300 ng に調製したもの）、0.8-1.5 %アガロースゲル、1/10 TE バッファー、TE バッファー、エチジウムブロマイド溶液（TE バッファーに、0.5-1.0 µg/ml の濃度でエチジウムブロマイドを加えた溶液）、電気泳動装置（アドバンス社、Mupid など）、紫外線照射装置、写真撮影装置など。

<実験操作>

1. 2 µl のサンプル DNA 溶液に、6.5 µl の 1/10 TE バッファーと 1.5 µl の色素液を加えて、よく混合する。
2. 調製したサンプル DNA 溶液、10 µl あたり 10 ng、30 ng、100 ng、300 ng に調製した λ DNA 溶液を、0.8-1.5 %アガロースゲルに、10 µl アプライする。
3. 電気泳動装置で、100V30 分間程度、電気泳動を行う。
4. 電気泳動済みのアガロースゲルを、エチジウムブロマイド溶液中で 15-45 分間静置して、染色する。

5. 紫外線照射装置で 254 nm や 366 nm などの紫外線を照射し、写真撮影装置で撮影する。図 2 に電気泳動図を示す。
6. DNA 溶液は-20℃以下で、凍結保存する。

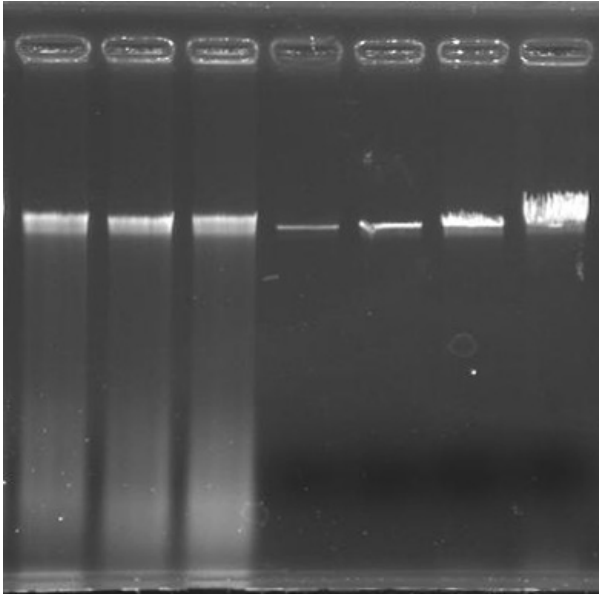


図 2 電気泳動図

左から

- ・ゲノム DNA 抽出方法 1 で抽出したニホンナシ品種「豊水」のゲノム DNA
- ・ゲノム DNA 抽出方法 1 で抽出したニホンナシ品種「二十世紀」のゲノム DNA
- ・ゲノム DNA 抽出方法 1 で抽出したニホンナシ品種「あきづき」のゲノム DNA
- ・ 10 ng の λ DNA
- ・ 30 ng の λ DNA
- ・ 100 ng の λ DNA
- ・ 300 ng の λ DNA

※抽出された DNA の量は λ DNA の濃さとの比較で定量し、抽出時の分解程度は DNA の移動度で評価し、夾雑物の影響の有無は電気泳動の流れ方（ウエルの幅と同程度に DNA が流れているかどうか）を判断の目安とする。

※※ゲノム DNA 抽出方法 2 で抽出したニホンナシ品種のゲノム DNA も、図 2 とほぼ同等の電気泳動図である。

3-4. 葉からの DNA 抽出操作

「ニホンナシサンプルからのゲノム DNA 抽出方法 1 (3-1 項)」および「ニホンナシサンプルからのゲノム DNA 抽出方法 2 (3-2 項)」の方法で、問題なく葉サンプルからの DNA 抽出が可能である。なお、ナシの葉は褐変しやすいため、メルカプトエタノール、Polyclar AT (不溶性ポリビニルピロリドン) を DNA 抽出時に加えている。

できるだけ若い未展開の葉を用いて、生のまま DNA 抽出サンプルとして供試することで、最も良好な結果が得られる。

凍結保存後に DNA 抽出を行う場合には、保存前に、生のときに必要量を計量してから、ビニール袋などに入れ密封し、 -80°C のディープフリーザーで保存する。DNA 抽出の際には、 -80°C のフリーザーからサンプルを出して、できる限り短時間 (1-3 分以内) に液体窒素中に入れて、粉碎を行う。

ナシの葉には、ポリフェノール類が多く含まれ、褐変しやすい。褐変した葉サンプルでは、経験的に純度や精製度が劣る DNA が抽出されるため、SSR マーカーでの分析時に問題が起きることが多い。凍結保存には、 -20°C では不十分で、 -80°C のディープフリーザーが必要である。また、凍結保存したサンプルを室温で長時間放置すると葉の褐変が起こるので、注意を要する。

完全展開葉、シリカゲルで乾燥させた葉、押し葉標本の葉では、うまく DNA が抽出できない場合があるので注意を要する。

3-5. 生果実からの DNA 抽出操作

生果実の果皮を用いることで、「ニホンナシサンプルからのゲノム DNA 抽出方法 1 (3-1 項)」および「ニホンナシサンプルからのゲノム DNA 抽出方法 2 (3-2 項)」の方法で、問題なく果皮サンプルからの DNA 抽出が可能である。果皮からの DNA の収量が、葉からの抽出と比較してかなり少なくなるので、「ニホンナシサンプルからのゲノム DNA 抽出方法 1 (3-1 項)」の方が、望ましい。

葉の場合と同様に、生のまま DNA 抽出サンプルとして供試することで、良好な結果が得られる。凍結保存後に DNA 抽出を行う場合には、保存前に、生のときに必要量を計量してから、ビニール袋などに入れ密封し、 -80°C のディープフリーザーで保存する。DNA 抽出の際には、 -80°C のフリーザーからサンプルを出して、できる限り短時間 (1-3 分以内) に液体窒素中に入れて、粉碎を行う。凍結保存には、 -20°C では不十分で、 -80°C のディープフリーザーが必要である。また、凍結保存したサンプルを室温で長時間放置すると劣化・褐変が起こるので、注意を要する。

なお、生果実の DNA 抽出において、Genomic-tip 20/G と G2 バッファーを用

いる方法、DNeasy Plant Mini Kit を用いる方法、CTAB 法、および Nucleon Phytopure Plant DNA Extraction Kit (Amersham Pharmacia 社) を用いる方法を比較・検討した結果を以下の論文にまとめている。

参考論文：Yamamoto, T., T. Kimura, T. Hayashi and Y. Ban (2006) DNA profiling of fresh and processed fruits in pear. *Breeding Science* 56: 165-171.

3-6. 穂木（花芽）からの DNA 抽出操作

十分に充実した穂木の花芽や葉芽を用いることで、「ニホンナシサンプルからのゲノム DNA 抽出方法 1 (3-1 項)」および「ニホンナシサンプルからのゲノム DNA 抽出方法 2 (3-2 項)」の方法で DNA 抽出が可能である。1 月以降にサンプリングした穂木の花芽や葉芽は、十分に充実しており分析に供試できる。我々の実験室では、花芽単独、葉芽単独、および花芽と葉芽を混合したサンプルからの DNA 抽出が可能であった。その他、一般的な留意事項は、葉からの DNA 抽出操作 (3-4 項) や生果実からの DNA 抽出操作 (3-5 項) と同様である。

1 月上旬～中旬にサンプリングした約 1 g のナシの冬芽サンプル（葉芽と花芽を混合したもの、鱗片を除く）から、「ニホンナシサンプルからのゲノム DNA 抽出方法 1 (3-1 項)」で、ゲノム DNA を抽出し、電気泳動で確認した結果を示す（図 3）。

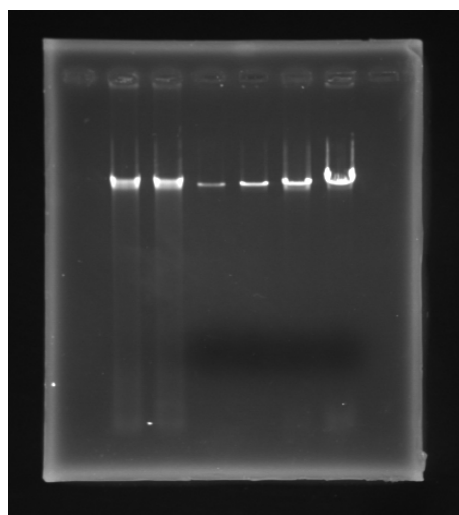


図 3 電気泳動図

左から

- ・ 冬芽 1 g からの DNA 抽出反復 1
- ・ 冬芽 1 g からの DNA 抽出反復 2
- ・ 10 ng の λ DNA

- 30 ng の λ DNA
- 100 ng の λ DNA
- 300 ng の λ DNA

1 月上～中旬にサンプリングした花芽および葉芽から、「ニホンナシサンプルからのゲノム DNA 抽出方法 2 (3-2 項)」で、ゲノム DNA を抽出し、電気泳動で確認した結果を示す (図 4)。

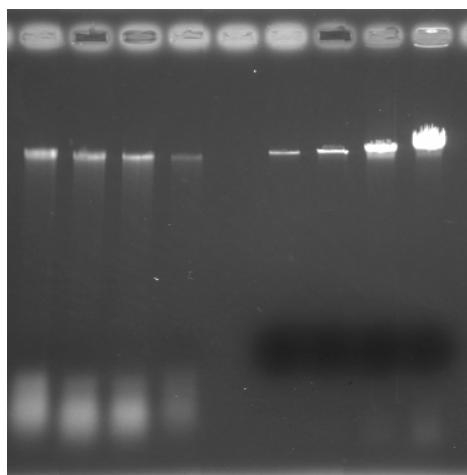


図 4 電気泳動図

左から

- 花芽 1 ケからの DNA 抽出
- 花芽 2 ケからの DNA 抽出
- 花芽 3 ケからの DNA 抽出
- 葉芽 1 ケからの DNA 抽出
- 10 ng の λ DNA
- 30 ng の λ DNA
- 100 ng の λ DNA
- 300 ng の λ DNA

4. SSR マーカーを用いた PCR 反応

ニホンナシ品種「豊水」やセイヨウナシ品種「バートレット」から開発した SSR マーカー17 種類を用いて、96 品種のナシ品種を用いて、PCR 反応を行う。PCR 反応条件は、通常の PCR と基本的に同じプロトコールである。

<準備するもの>

1.5 ml チューブ (滅菌済み)、96 穴 PCR プレート (アプライドバイオシステムズ社)、キャップまたはフルプレートカバー (アプライドバイオシステムズ社)、サンプル DNA 溶液 (10 ng/μl に調製したもの)、AmpliTaq DNA Polymerase および PCR バッファー (アプライドバイオシステムズ社)、2 mM に調製した dNTPs (dATP、dTTP、dCTP、dGTP を TE バッファーで混合した溶液、タカラバイオ社)、1/10 TE バッファー、滅菌超純水、SSR プライマー溶液 (蛍光ラベルされたフォワードプライマーとリバースプライマーを各 10 pmol/μl 含む溶液、1/10 TE バッファーで希釈)、PCR システム GeneAmp PCR System 9700 (アプライドバイオシステムズ社) など

<用いた SSR マーカー>

BGT23b、KA14、NH004a、NH005b、NH007b、NH009b、NH011b、NH014a、NB103a、NH025a、NH029a、NH039a、NH204a、NH207a、NB114a、NB135a、NB141b の 17 種類のマーカー。Fam もしくは Vic もしくは Ned もしくは Tet を一方のプライマーの 5' 端に蛍光ラベルしたものを用了。

それぞれの SSR マーカーについて、マーカー名、アニーリング温度、フォワードプライマーとリバースプライマーの塩基配列、ターゲットサイズ、連鎖地図上の座乗連鎖群 No. を、表 1 および添付の資料 1 に載せた。

<分析したナシ 96 品種>

「愛甘水 (あいかんすい)」、「赤穂 (あかほ)」、「あきあかり」、「秋高 (あきたか)」、「あきづき」、「秋栄 (あきばえ)」、「あけみず」、「旭 (あさひ)」、「愛宕 (あたご)」、「天の川 (あまのがわ)」、「石井早生 (いしいわせ)」、「市原早生 (いちはらわせ)」、「稲城 (いなぎ)」、「今村秋 (いまむらあき)」、「越後錦 (えちごにしき)」、「王秋 (おうしゅう)」、「晩三吉 (おくさんきち)」、「おきゴールド」、「おき二十世紀」、「なつしずく」、「祇園 (ぎおん)」、「菊水 (きくすい)」、「喜水 (きすい)」、「君塚早生 (きみつかわせ)」、「清澄 (きよすみ)」、「国富 (くにとみ)」、「雲井 (くもい)」、「幸菊 (こうぎく)」、「光月 (こうげつ)」、「幸水 (こうすい)」、「ゴールド二十世紀」、「寿新水 (ことぶきしんすい)」、「相模 (さがみ)」、

「三光（さんこう）」、「秀玉（しゅうぎょく）」、「秋水（しゅうすい）」、
「秋麗（しゅうれい）」、「新興（しんこう）」、「新水（しんすい）」、
「新星（しんせい）」、「新世紀（しんせいき）」、「新雪（しんせつ）」、
「翠星（すいせい）」、「清玉（せいぎょく）」、「青竜（せいりゅう）」、
「太白（たいはく）」、「多摩（たま）」、「丹沢（たんざわ）」、「筑水（ちくすい）」、
「長寿（ちょうじゅ）」、「長十郎（ちょうじゅうろう）」、「独逸（どいつ）」、
「鳥幸（とりこう）」、「なつひかり」、「南月（なんげつ）」、「南水（なんすい）」、
「新高（にいたか）」、「二十世紀（にじっせいき）」、「にっこり」、
「初秋（はつあき）」、「八幸（はっこう）」、「八達（はったつ）」、
「早玉（はやたま）」、「東野（ひがしの）」、「平塚 16 号」、「平和（へいわ）」、
「豊月（ほうげつ）」、「豊水（ほうすい）」、「北新（ほくしん）」、
「北甘（ほっかん）」、「身不知（みしらず）」、「明月（めいげつ）」、
「百枝月（ももえづき）」、「鴨梨（やーりー）」、「八雲（やくも）」、
「八里（やさと）」、「八千代（やちよ）」、「弥長（やなが）」、「吉香（よしかおり）」、
「萊陽慈梨（らいやんつーりー）」、リ-14、「若光（わかひかり）」、
「早生赤（わせあか）」、「早生幸蔵（わせこうぞう）」、162-29、42-6、75-23、C2、
266-27、48-96、イ-33、オ-9、「真鍮（しんちゅう）」、92-7、「筑波 52 号」、
「筑波 53 号」。

< 基本操作 >

1. 以下のように PCR 反応液を調製する。

AmpliTaq DNA Polymerase	0.1 µl
PCR バッファー	2.0 µl
dNTPs	2.0 µl
SSR プライマー溶液	1.0 µl
滅菌超純水	13.9 µl
サンプル DNA 溶液	1.0 µl
合計	20.0 µl

2. PCR システム GeneAmp PCR System 9700 を用いて、以下のプログラムで、PCR 反応を行う。

- ・ 94℃ 5 分間熱変性。
- ・ 94℃ 1 分間、50-55℃ 1 分間、72℃ 2 分間の反応を、35 サイクル。
- ・ 72℃ 7 分間の反応後、10℃ で ∞。

表1 用いたSSRマーカーのプライマー配列などの特徴

SSR マーカー	アニーリ ング温度 (℃)	プライマー配列 (5'-3')		ターゲット サイズ(bp)	連鎖地図 上の座乗 連鎖群No.
		Forward	Reverse		
BGT23b	55	CACATTCAAAGATTAAGAT	gtttcttACTCAGCCTTTTTTCCCAC	203+8	2
KA14	55	TCATTGTAGCATTTTTATTTTT	gtttcttATGGCAAGGGAGATTATTAG	180+8	16
NH004a	50	AGGATGGGACGAGTTTAGAG	gtttcttCCACATCTCTCAACCTACCA	113+8	14
NH005b	55	TGAGAAGAATTAGCCATGATGA	gtttcttTTACTACTTGCGTGCGTTCC	338+8	8
NH007b	55	TACCTTGATGGGAACTGAAC	gtttcttAATAGTAGATTGCAATTACTC	150+8	16
NH009b	50	CCGAGCACTACCATTGA	gtttcttCGTCTGTTTACCGCTTCT	159+8	13
NH011b	55	GGTTCACATAGAGAGAGAGAG	gtttcttTTTGCCGTTGGACCGAGC	181+8	4
NH014a	52	CAAACCTAACCCTAAATACC	gtttcttTGTTTCATATATTCATCACTC	86+8	17
NB103a	50	TTGTAGGGAAAATGATGCCA	GTGTTGATACTCTCTCTCTC	127	5
NH025a	55	CTGGACACAAACATTCAAGAGGG	CACACCAGAAACTCCAAAACAGG	99	15
NH029a	55	GAAGAAAACCAGAGCAGGGCA	CCTCCCGTCTCCCACCATATTAG	85	9
NH039a	55	TGGTTGCCGAGAAAAGTGTAG	CAAGCAAGTACAACATGAGTGG	132	10
NH204a	55	TACAAATAAATTGTTTCAATGAGCA	gtttcttATAGGCAAAGAAAAATAATGTCC	137	15
NH207a	55	ATTTATAGTTGAGGCCATGAGG	gtttcttCCCGAATGGAAAGTATGTTATC	160	12
NB114a	55	gtttcttTGTCTTCTCTCTCCGCTTATTC	AAGAAATAAAACCCACAAAGCC	123+8	8
NB135a	55	TGAGAGAAGAACAGCCAATGAT	gtttcttCTCCCACTCAGATCGCTCCT	169+8	11
NB141b	55	gtttcttCAGAGAAAGACAGAGGTAGAGAGAA	GGATTGATCGCCTTATGGTTGT	126+8	4

5. DNA シーケンサーを用いたフラグメント解析

上記 4 項で得た SSR-PCR 産物を DNA シーケンサーで分析し、フラグメント解析を行う。基本的分析操作は、アプライドバイオシステムズ社のフラグメント解析のプロトコールに従って行う。

<準備するもの>

96 穴 PCR プレートおよび 384 穴プレート (アプライドバイオシステムズ社)、TE バッファー、Genetic Analyzer Buffer with EDTA (アプライドバイオシステムズ社)、Hi-Di Formamide (アプライドバイオシステムズ社)、3100 POP-4 ポリマー (アプライドバイオシステムズ社)、3100/3130xl 36cm Capillary Array (47 cm x 50 μ m、アプライドバイオシステムズ社)、GeneScan 400HD ROX サイズスタンダード (アプライドバイオシステムズ社)、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ社)、GeneScan ソフトウェア (アプライドバイオシステムズ社)、PCR システム GeneAmp PCR System 9700 (アプライドバイオシステムズ社) など。

<基本操作>

1. 4 項で得た PCR 産物を、TE バッファーで 20-100 倍に希釈する。希釈倍率は、PCR 増幅を考慮し、フラグメント解析に適した倍率で行う。
2. 1.5 μ l の希釈 PCR 産物、0.17 μ l の 400HD ROX サイズスタンダード、8.33 μ l の Hi-Di ホルムアミドを、96 穴 PCR プレートまたは 384 穴プレートに入れ、混合する。
3. PCR システム GeneAmp PCR System 9700 などを用いて、95°C 5 分間の熱変性を行った後、直ちに氷上で 5 分間以上静置する。
4. ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer のプロトコールに従い、36cm キャピラリー、POP-4 ポリマー、専用のバッファー (Genetic Analyzer Buffer with EDTA) を用いて、分析を行う。
5. GenaScan ソフトウェアを用いて、結果の解析を行う。

6. フラグメント解析による遺伝子型判定と結果

6-1. フラグメント解析時の注意点

以下に、フラグメント解析を行う際の基本的な留意点について記した。

1. 全ての蛍光色素を表示して解析すること。これにより、PCR 増幅産物の希釈濃度が濃すぎることによって生じるフラグメントの乱れをチェックすることが可能である。サンプル濃度が濃いと、本来フラグメントのピークとして検出されるはずのない色でも検出されることがある。このような状態では、ターゲットのフラグメントも正しい結果を表していない場合があるため、PCR 産物の希釈をやり直して、再度分析を行う。
2. サイズスタンダードのピークと比較して適正な希釈濃度とすること。PCR 増幅産物の希釈濃度が薄い場合、サイズスタンダードのピークと比較して、サンプルのピークが低くなる。最も高いフラグメントのピークがサイズスタンダードの 1/3 以下の場合には別の低いフラグメントのピークを見落とす危険があるため、注意が必要である。明確に判断できない場合は、希釈をやり直して、再度分析を行う。また、希釈濃度が濃すぎるとピークの大きさが検出限界を超えてしまい、ピークの先端が表示されない。この場合、フラグメントのサイズデータが正しく表示されないため、PCR 産物の希釈をやり直して再度分析を行う。
3. サイズスタンダードの波形を確認すること。フラグメント解析におけるピークの数値は、サイズスタンダードのピークサイズをもとに作成した検量線によって計算されるため、サイズスタンダードの波形が乱れていると、正しいデータが計算できない。よってサイズスタンダードの波形が乱れていた場合は分析をやり直す。

6-2. ニホンナシ品種の遺伝子型判定

SSR 遺伝子型の判定は、ニホンナシ品種「豊水」の小さい方の対立遺伝子を「A」として、その値から何 bp 離れているかで表示した。たとえば、BGT23b マーカーでは、「豊水」の小さい方の対立遺伝子 196 (フラグメント解析・波形図の値 196.10) を A とし、もう一つの対立遺伝子を A+30 (フラグメント解析・波形図の値 226.21) とする。「豊水」の遺伝子型を「A/A+30」、「幸水」の遺伝子型を「A+30/A+30」、「二十世紀」の遺伝子型を「A/A+30」、「あきづき」の遺伝子型を「A/A+30」と表している。表 2 に、「豊水」、「幸水」、「二十世紀」、「あきづき」、「新高」、「ゴールド二十世紀」、「新興」、「長十郎」、「南水」、「新水」、「愛宕」、「王秋」、「なつしずく」の 13 品種の 17 SSR マーカーの遺伝子型を示した。

また、添付の資料 2 に、全 17 種類の SSR マーカーでの「豊水」、「幸水」、「二十世紀」、「あきづき」4 品種の波形図を示し、各品種の対立遺伝子を塗りつぶして矢印で図示した。ニホンナシ 96 品種の分析で、同一の遺伝子型を示したものが 16 品種存在した。これ以外の品種は、複数の SSR マーカーの差異で、DNA 品種識別が可能であった。

SSR マーカーの開発時に、一方のプライマーおよびプライマー対の T_m 値、プライマーダイマーやヘアピン構造を考慮して、プライマーを作成している。50℃～60℃までアニーリング温度を検討して、至適アニーリング温度の決定を行い、波形を安定させるためのテイル (gtttctt) をプライマーに付加している。しかしながら、供試品種数が多くなると、対立遺伝子間の「競合」でピークの高さがかなり違っている場合、ピークがやや判別しにくい場合が出てくる。このような時には、親子関係が正しい両親と子供で、対立遺伝子が遺伝しているか否かを確認することで、対立遺伝子の正確な同定が可能となる。

本マニュアルは、主にニホンナシ品種で最適化されたものであり、チュウゴクナシ、セイヨウナシや近縁野生種と遺伝的に関係の深い品種を対象にする場合は、本 17 種類の SSR マーカーの中で正確な結果を得ることが困難なマーカーを除外して解析を行うなど、注意が必要である。

表2 ニホンナシ13品種、17SSRマーカーの遺伝子型

	SSRマーカー								
	BGT23b	KA14	NH004a	NH005b	NH007b	NH009b	NH011b	NH014a	NB103a
豊水	A/A+30	A/A	A/A+37	A/A+4	A/A	A/A	A/A	A/A+17	A/A
幸水	A+30/A+30	A/A	A/A+22	A-16/A	A-28/A	A/A	A-8/A	A/A+27	A/A
二十世紀	A/A+30	A/A	A+22/A+37	A-16/A+4	A-28/A	A/A	A-8/A	A+27/A+27	A/A
あきづき	A/A+30	A/A	A+22/A+37	A/A+4	A/A	A/A	A/A	A+17/A+27	A/A
新高	A/A+10	A/A	A+22/A+37	A-16/A+4	A-28/A-10	A-12/A	A/A+2	A/A+17	A/A+14
ゴールド二十世紀	A/A+30	A/A	A+22/A+37	A-16/A+4	A-28/A	A/A	A-8/A	A+27/A+27	A/A
新興	A/A	A/A	A+37/A+37	A+4/A+4	A-28/A	A-4/A	A-8/A+2	A/A+27	A/A+14
長十郎	A/A+10	A/A	A+22/A+30	A-16/A+4	A-28/A	A/A	A-8/A	A/A+17	A/A+14
南水	A+10/A+30	A/A	A/A+37	A-16/A+4	A-12/A-10	A/A	A/A	A/A+27	A/A+14
新水	A+18/A+30	A/A	A/A	A/A+4	A-28/A-12	A-18/A	A/A	A+8/A+27	A/A+18
愛宕	A/A+10	A/A	A/A+30	A+4/A+4	A-28/A	A-4/A	A-8/A+2	A/A	A/A+14
王秋	A/A+34	A/A	A+22/A+37	A-16/A-16	A-14/A	A-18/A	A/A+58	A+8/A+27	A/A+14
なつしずく	A+30/A+30	A/A	A/A+22	A-16/A	A/A	A/A	A/A	A/A+17	A/A
備考	A=196	A=184	A=81	A=346	A=154	A=163	A=186	A=71	A=82

表2 ニホンナシ13品種、17SSRマーカーの遺伝子型(続き)

	SSRマーカー							
	NH025a	NH029a	NH039a	NH204a	NH207a	NB114a	NB135a	NB141b
豊水	A/A+16	A/A	A/A+11	A/A+10	A/A	A/A+2	A/A	A/A
幸水	A-15/A+16	A/A	A/A	A-2/A	A/A	A/A+2	A/A	A/A
二十世紀	A-15/A+16	A/A	A/A	A-2/A+10	A/A	A-4/A	A/A	A/A+4
あきづき	A+16/A+16	A/A	A/A	A-2/A	A/A	A/A	A/A	A/A
新高	A-6/A	A/A+8	A/A+10	A-2/A+10	A/A+6	A/A+2	A/A	A/A
ゴールド二十世紀	A-15/A+16	A/A	A/A	A-2/A+10	A/A	A-4/A	A/A	A/A+4
新興	A/A+16	A/A+8	A/A+10	A-2/A-2	A-2/A	A-4/A	A/A	A-2/A+4
長十郎	A-6/A+12	A/A	A/A	A/A+10	A-2/A	A/A+2	A/A	A/A+4
南水	A-6/A+16	A/A	A/A	A-2/A+10	A/A+6	A/A+2	A/A	A/A
新水	A-15/A+16	A-2/A	A/A	A-2/A	A/A+2	A-4/A+2	A/A	A/A+18
愛宕	A-6/A	A/A+8	A/A+11	A/A+10	A-2/A-2	A/A	A/A	A/A+4
王秋	A+12/A+16	A/A	A/A+4	A-2/A-2	A/A	A-4/A	A/A	A/A+4
なつしずく	A-15/A+12	A/A	A/A+11	A/A+10	A/A	A-4/A-4	A/A	A/A
備考	A=82	A=80	A=119	A=128	A=163	A=129	A=154	A=130

6-3. ナシ品種識別における 17 種類の SSR マーカーの特徴

本マニュアルで用いた 17 種類の SSR マーカーは、いずれも単一座由来のマーカーであり、連鎖地図上の座乗位置が明らかになっている。すなわち、ニホンナシ品種「豊水」、セイヨウナシ品種「バートレット」、「ラ・フランス」の 3 つの連鎖地図の一つ以上の地図にマッピングされている。このように、単一座由来で、連鎖地図上の位置が同定されているマーカーを用いることにより、より正確な遺伝子型の同定や品種識別が可能となる。

BGT23b は、「豊水」の第 2 連鎖群 (Ho2)、「バートレット」の第 2 連鎖群 (Ba2)、「ラ・フランス」の第 2 連鎖群 (La2) に位置付けられている。KA14 は Ba16 と La16 に、NH004a は Ho16 と Ba16 と La16 に、NH005b は Ho8 と La8 に、NH007b は Ba16 と La16 に、NH009b は Ba13 と La13 に、NH011b は Ba4 と La4 に、NH014a は Ho17 と Ba17 と La17 に、NB103a は Ba5 と La5 に、NH025a は Ho15 と Ba15 と La15 に、NH029a は Ba9 と La9 に、NH039a は Ho10 と Ba10 と La10 に、NH204a は Ho15 と La15 に、NH207a は La12 に、NB114a は La8 に、NB135a は La11 に、NB141b は Ba4 と La4 に、それぞれマッピングされている。

ニホンナシ 96 品種の分析で同一の遺伝子型を示した 16 品種を除き、それ以外の 80 品種を用いて、Cervus ソフトウェア*を用いて統計的パラメータを算出した (表 3)。17 種類の SSR マーカーで、合計 118 の対立遺伝子が得られ、最も多いもので NH014a の 12、少ないもので KA14 の 2、平均で 6.94 であった。ヘテロ接合度の観察値 H_O は、0.025 (KA14) ~ 0.900 (NH025a) で、平均で 0.498 であった。ヘテロ接合度の理論値 H_E は、0.025 (KA14) ~ 0.798 (NH025a) で、平均で 0.473 であった。また、推定ヌル対立遺伝子頻度は、 ± 0.2 以下であり、ヌル対立遺伝子の可能性が低いことがわかった。これらの統計的パラメータの値からも、17 種類の SSR マーカーが信頼度が高いことが明らかとなっている。

* Kalinowski, S.T., M. L. Taper and T. C. Marshall (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16:1099-1106.

表3 ナシ品種におけるSSR分析での統計的パラメータなどの特徴

SSR マーカー	対立遺 伝子数	ヘテロ接合度 の観察値 H_O	ヘテロ接合度 の理論値 H_E	推定Null対立 遺伝子頻度
BGT23b	11	0.738	0.730	-0.0087
KA14	2	0.025	0.025	-0.0014
NH004a	10	0.788	0.751	-0.0251
NH005b	4	0.575	0.626	+0.0441
NH007b	7	0.725	0.650	-0.0627
NH009b	5	0.400	0.434	+0.0593
NH011b	6	0.663	0.638	-0.0172
NH014a	12	0.863	0.773	-0.0609
NB103a	8	0.625	0.594	-0.0316
NH025a	9	0.900	0.798	-0.0665
NH029a	4	0.463	0.431	-0.0355
NH039a	8	0.425	0.429	+0.0139
NH204a	5	0.750	0.664	-0.0626
NH207a	4	0.525	0.500	-0.0419
NB114a	6	0.838	0.685	-0.1105
NB135a	7	0.088	0.121	+0.1918
NB141b	10	0.625	0.630	+0.0079
平均	6.94	0.498	0.473	