

## DNA クロマトを用いたサツマイモ品種「べにはるか」「ふくむらさき」の品種特異的 DNA 品種識別技術

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構  
九州沖縄農業研究センター  
食品研究部門

国立大学法人岡山大学農学部  
公益財団法人かずさ DNA 研究所  
株式会社ファスマック  
株式会社ニッポンジーン

### 1. はじめに

サツマイモの輸出は 2010 年以降急激に増加しており、2020 年では 5,268 トン（金額では約 20 億円）が輸出されている。サツマイモは生産物である塊根（いも）を萌芽させることで苗を生産し、容易に増殖が可能であるため、生の塊根の輸出は種苗の国外流出の危険性を伴う。すでに青果用の主力品種である「べにはるか」が国外で大規模に栽培されていることも報告されている。今後、「べにはるか」以外の品種についても種苗の流出が懸念される。

令和 2 年に改正された種苗法では登録品種の種苗を指定国以外の国へ持ち出すことを育成者権者が制限できることになっており、違反した場合には罰則も設けられている。しかし、塊根の外観のみでは品種の判定が難しい場合も多く、国産品種の不正な持ち出しや生産物の逆輸入を水際で防ぐためには、遺伝子の本体である DNA の情報を利用して簡便かつ確実に品種を判定できる DNA 品種識別技術の確立が必要である。

本マニュアルでは種苗の流出の報告がある「べにはるか」に加え、近年育成された紫肉色の青果用品種であり、今後海外輸出の増加が見込まれる「ふくむらさき」について、生の塊根や葉から抽出した DNA を用い、DNA クロマト法をベースにした簡易識別キットにより、国内の主要なサツマイモ品種 47 品種から特異的に識別する方法について記載する。



図1 「ベにはるか」の塊根の写真

「ベにはるか」(2010年品種登録, 登録番号: 第19255号)は蒸いもの糖度が高く、食味の良い品種である。塊根の皮色は赤紫色で、肉色は黄白色である。食味だけでなく外観や収量性も優れている。



図2 「ふくむらさき」の塊根の写真

「ふくむらさき」(2021年品種登録, 登録番号: 第28530号)は、濃い紫色の肉色を持つ食味の良い品種である。塊根の皮色は赤紫色で、蒸いもや焼いもにした時の糖度は「ベにはるか」並みに高く、肉質は中からやや粘質でしっとりした食感である。

## 2. 一般的注意事項及びDNA抽出法について

本マニュアルの利用にあたり、DNA抽出やPCRなど一般的な分子生物学的手法の経験があることが望ましい。DNA品種識別分析における一般的注意事項については、<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—([http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna\\_manual/guideline.pdf](http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_manual/guideline.pdf))>及び<DNA品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン（令和4年度改訂版）([https://www.maff.go.jp/j/kanbo/tizai/brand/b\\_syokubut/attach/pdf/index-111.pdf](https://www.maff.go.jp/j/kanbo/tizai/brand/b_syokubut/attach/pdf/index-111.pdf))>を参照のこと。

サツマイモの組織にはPCR反応を阻害する多糖類やポリフェノールなどが含まれることから、本マニュアルではISOSPIN Plant DNA（ニッポンジーン社）を用いてDNA抽出をおこなっている。抽出操作は、キットのマニュアルに詳しいため、ここでは組織のサンプリングおよび粉碎方法を中心に記載する。また、ここで記載する方法は、生の塊根や葉を対象とした抽出方法であり、加熱、冷凍、乾燥等により加工した塊根は対象としていない。

### <準備するもの>

- ISOSPIN Plant DNA（ニッポンジーン社）
- 使い捨てペッスル（ビーエム機器社「チューブミキサー 1.5ml チューブ用」など）※
- 1.5 ml チューブ（滅菌済み、上記ペッスルに適合するもの、図3参照）
- ペーパータオル※
- 使い捨てのメスまたはカミソリ（秋山製作所「スカルペル（エルプ） No.22」など）※

※印の器具についてはサンプルごとに交換する。

### <実験操作>

抽出操作は基本的にISOSPIN Plant DNAに付属のマニュアルに従うため、ここでは塊根のサンプリングと粉碎方法を中心に記載する。葉を材料とする場合は、茎先端付近の未展開葉を約100 mg用い、ISOSPIN Plant DNAに付属のマニュアルに従って粉碎及び抽出を行う（塊根からの抽出では省略しているオプションのPrewash操作も実施する）。

- (1) 塊根から土などの汚れを流水でよく洗い落としたのち、ペーパータオルで表面の水分を取り除く。
- (2) 新しいペーパータオル等の上で、塊根末端に近い部分を使い捨てのメス等を用いて、5 mm 程度の厚さに切出す (図 4 A,B)。切出した組織から周皮を含まない内部組織を 5 mm 角程度の大きさに 2 個切出す (図 4 C,D)。切出した内部組織を可能な限り薄くスライスし (図 4 E)、約 200 mg を計量する。計量したスライスをさらに細かく切断し (図 4 F)、1.5 ml チューブに入れる (図 4 G)。

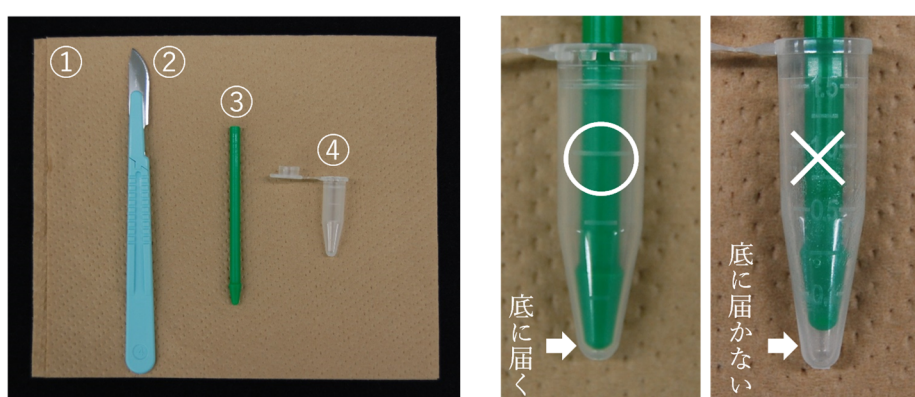


図3 抽出に使用する器具

①ペーパータオル、②使い捨てメス、③使い捨てペッスル、④1.5 ml チューブ。1.5 ml チューブはペッスルの先端が底に届くものを使用する。

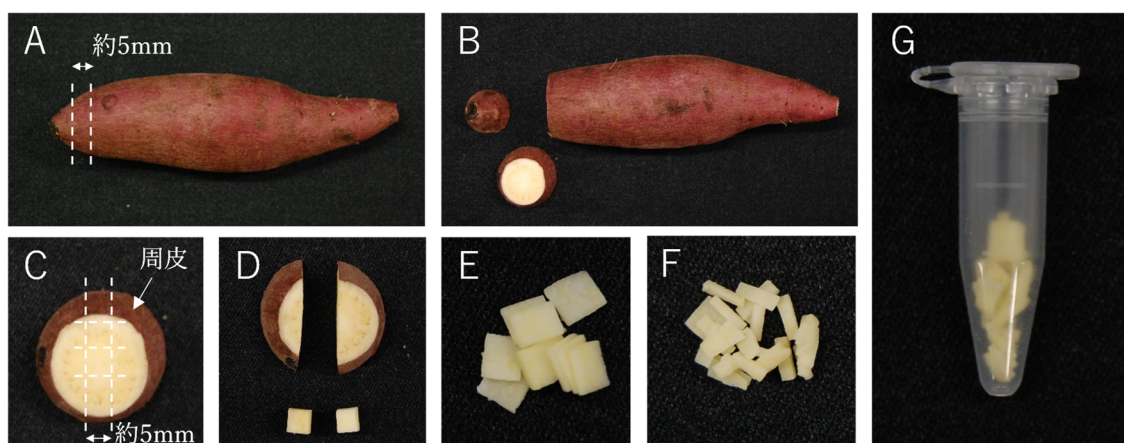


図4 塊根組織のサンプリング方法

使い捨てのメスやカミソリを用いて、塊根の端に近い部分(末端の乾燥した組織は含まない)を 5 mm 程度の厚さに切出す(A, B)。周皮を含まない内部組織を約 5 mm 角で切出す(C, D)。切り出した組織を薄くスライスする(E)。スライスした組織を 200 mg 測り取った後、さらに細かく刻む(F)。1.5 ml チューブに入れる(G)。

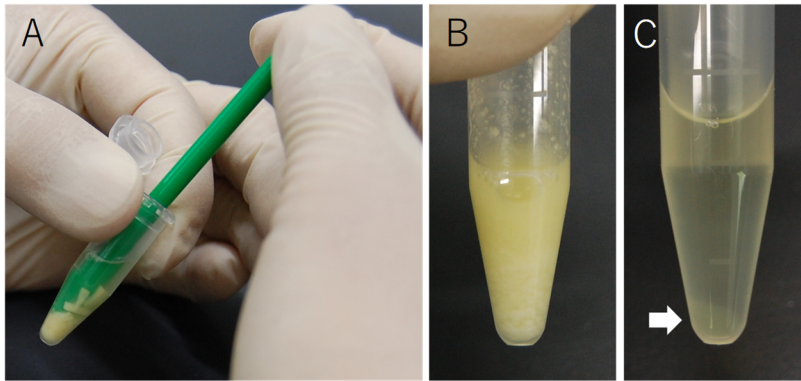


図5ペッスルを用いた塊根サンプルの粉碎(A)と粉碎後の様子(B)、およびPB Bufferを添加した後の遠心後に見られるゼリー状の沈殿(C)

- (3) チューブに ISOSPIN Plant DNA の PE1 Buffer を 450  $\mu$ l 加え、使い捨てペッスルを用いて均一な懸濁状態となるまで磨り潰す (図 5 A,B)。
- (4) 5  $\mu$ l の RNase A を加え、ボルテックスで攪拌する。
- (5) 65°C で 10 分間加温する。加温中、3 分おきに 20 秒間以上ボルテックスで攪拌する。
- (6) 50  $\mu$ l の PE2 Buffer を加え、ボルテックスで 20 秒間以上攪拌する。
- (7) 遠心 (13,000 $\times$ g, 10 分間, 4°C) し、上清を新しいマイクロチューブに回収する。
- (8) 上清に対して等量の PB Buffer を加え、均質になるまで転倒混和する。
- (9) 遠心 (13,000 $\times$ g, 30 秒間, 4°C) し、ゼリー状の沈殿物 (図 5C) を取らないように混合液 (上清) を新しいマイクロチューブに回収する。
- (10) Spin Column に 900  $\mu$ l の混合液を添加する。
- (11) 遠心し (13,000 $\times$ g, 1 分間, 4°C) 、Spin Column の Collection Tube にたまったろ液を捨てる。
- (12) 700  $\mu$ l の PW1 Buffer を Spin Column に加える。
- (13) 遠心 (13,000 $\times$ g, 1 分間, 4°C) し、ろ液を捨てる。
- (14) 500  $\mu$ l の PW2 Buffer を Spin Column に加え、遠心 (13,000 $\times$ g, 1 分間, 4°C) する。
- (15) 300  $\mu$ l の PW2 Buffer を Spin Column に加える。
- (16) 遠心 (13,000 $\times$ g, 2 分間, 4°C) し、Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml チューブの上に移す。

- (17) 50  $\mu$ l の Elution Buffer をメンブレンの中央に滴下し、3 分間室温で静置する。
- (18) 遠心 (13,000 $\times$ g, 2 分間, 4 $^{\circ}$ C) し、DNA 溶液を 1.5 ml チューブに回収する。

### 3. DNA 溶液の品質の確認

#### 1) 分光光度計による測定

上記で得たサンプル DNA 溶液の 260 nm, 280nm および 320nm の吸光度 ( $A_{260}$ ,  $A_{280}$ ,  $A_{320}$ ) を分光光度計で測定する。

#### <準備するもの>

- サンプル DNA 溶液
- SimpliNano (Biochrom 社) または同等の微量分光光度計
- ISOSPIN Plant DNA の Elution Buffer (ニッポンジーン社)
- キムワイプ (日本製紙クレシア社)

#### <基本操作>

以下に SimpliNano を用いる場合について操作の概略を記載する。より詳しい操作方法や他の装置を用いる場合については装置のマニュアルを参照すること。

- (1) SimpliNano の電源ボタンを押し、装置を起動する。
- (2) メインメニューが表示されるので、1 の DNA を選択する。
- (3) 装置の検出部の蓋を取り、2  $\mu$ l の Elution Buffer をのせる。
- (4) 「0A/100%」ボタンを押し。
- (5) 検出部の Elution Buffer をキムワイプで吸い取る。
- (6) 検出部に 2  $\mu$ l のサンプル DNA 溶液をのせ、測定ボタンを押し。
- (7) サンプル DNA 溶液の  $A_{260}$ ,  $A_{320}$  の値を記録する。
- (8) 検出部のスリット部分の DNA をキムワイプで吸い取る。
- (9) 複数のサンプルを連続して測定する場合は(6)~(8)を繰り返す。
- (10) 測定終了後、ESC ボタン、電源ボタンの順に押し、装置をシャットダウンする。



## 2) サンプル DNA 溶液の品質の判定

DNA 溶液の濃度 (ng/μl) は  $50 \times (A_{260} - A_{320})$  で計算する。DNA の濃度が 3 ng/μl 以上、 $(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$  の値が 1.5 以上であることが望ましい。濃度が 10 ng/μl を超える場合は Elution Buffer で 1~10 ng/μl となるように希釈する。

## 4. DNA クロマトを用いた品種の判定

株式会社ファスマックの GenCheck<sup>®</sup> べにはるか・ふくむらさきに付属の取り扱い説明書に従い、目的の品種であるか否かを判定する。

### <準備するもの>

- 1.5 ml 又は 2.0 ml チューブ (滅菌済み)
- 96 穴 PCR プレートまたは 8 連チューブ
- PCR プレート用シーリングマットまたは 8 連チューブキャップ
- サンプル DNA 溶液
- KOD One PCR Master Mix (TOYOBO 社)
- GenCheck<sup>®</sup> べにはるか・ふくむらさき (ファスマック社)
- PCR 装置 (Thermo Fisher Scientific 社の ProFlex PCR System など)

### <基本操作と判定>

取り扱い説明書に従って実施する。PCR 反応液の混合や分注、PCR 装置へのセットは室温で行い、反応終了後は直ちに DNA クロマト紙による検出を行う。また、ネガティブコントロールとしてサンプル DNA 溶液の代わりに ISOSPIN Plant DNA の Elution Buffer を加えた反応も実施することが望ましい。GenCheck<sup>®</sup> べにはるか・ふくむらさきは、T100 サーマルサイクラー (Bio-Rad 社)、Proflex PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)、Biometra TOne (Analytic Jena 社)、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem 社)、TaKaRa Thermal Cycler Dice Gradient TP600 (タカラバイオ社、Mode 5 で実施) の各 PCR 装置で、安定してマーカーが検出できることを確認している。

1) 検出キットで、陰性となることを確認したサツマイモの品種（塊根または葉から抽出した DNA を用いて確認）

青果用品種：「べにひなた」「ひめあずま」「ゆきこまち」「あまはづき」「すずほっくり」「からゆたか」「ひめあやか」「あいこまち」「べにまさり」「クイックスイート」「九州 121 号」「春こがね」「ベニオトメ」「ベニアズマ」「ベニコマチ」「高系 14 号」「安納紅」「安納こがね」「紅赤」「シルクスイート（登録名 HE306）」

紫サツマイモ品種：「むらさきほまれ」「アケムラサキ」「ムラサキマサリ」「アヤムラサキ」「パープルスイートロード」「九州 137 号」「ナカムラサキ」「ちゅら恋紅」「沖夢紫」「備瀬」「種子島紫（白皮）」「宮農 36 号」

でん粉原料用品種：「こないしん」「こなみずき」「コナホマレ」「ダイチノユメ」「シロユタカ」「シロサツマ」「ミナミユタカ」

焼酎原料用品種：「コガネセンガン」「タマアカネ」「ジョイホワイト」

干しいも（蒸切干）加工用品種：「タマユタカ」「泉 13 号」

その他品種：「農林 1 号」「農林 2 号」「ベニハヤト」

2) 「べにはるか」「ふくむらさき」の検出の実例

DNA クロマト紙で検出されたマーカのパターンを図 6 に示す陽性例、陰性例と比較して、「べにはるか」または「ふくむらさき」であるか否かを判定する。増幅確認用マーカが検出されない場合は PCR によるマーカの増幅が不成功であるため、PCR または DNA 抽出をやり直す。また、ネガティブコントロールの反応でマーカが検出された場合は、使用した試薬や器具への DNA のコンタミネーションや、非特異的な増幅の発生が考えられる。その場合は、使用する試薬や器具を交換して再度実験を行う。



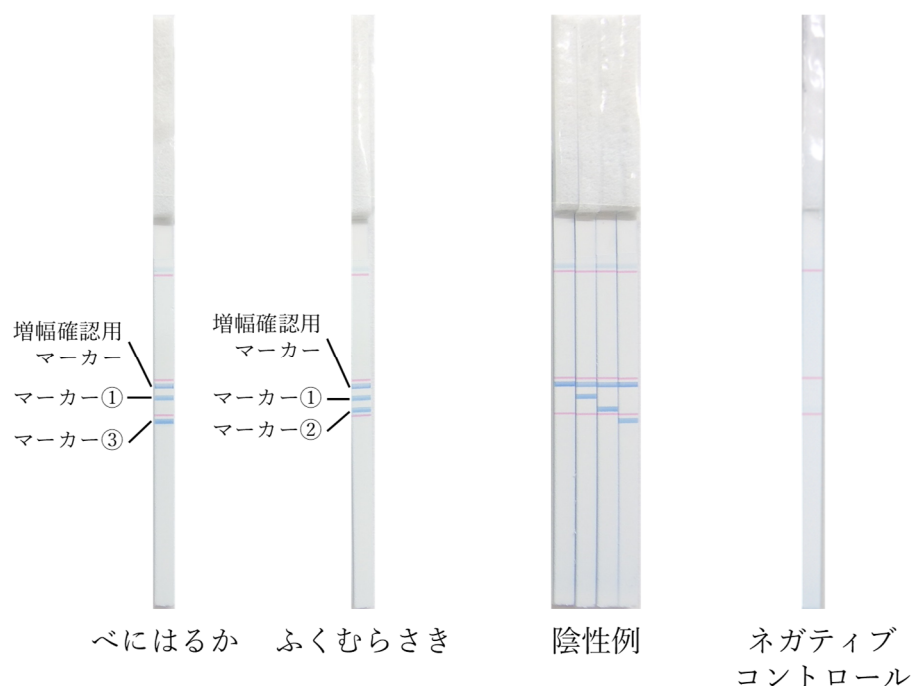


図6「ベにはるか」、「ふくむらさき」の検出例と陰性例

増幅確認用マーカーの他に、「ベにはるか」ではマーカー①と③が、「ふくむらさき」ではマーカー①と②が検出される。他の品種では陰性例のいずれかのパターンとなる。また、ネガティブコントロールの反応ではいずれのマーカーも検出されない。

### 著作権に関する事項

本技術に掲載された内容は、「私的使用」または「引用」など著作権法上認められた場合を除き、無断で転載、複製、販売などの利用はできません。

### 免責事項

記載された技術を利用したこと、あるいは技術を利用できないことによる結果について、農研機構は一切責任を負いません。

### 特許権等

本技術については、特許出願中（特願 2021-200402）です。本マニュアルを業として利用する場合には、特許許諾について農研機構までご相談下さい。

<<https://prd.form.naro.go.jp/form/pub/naro01/patent>>

## 妥当性の確認

本技術マニュアルは、「DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン（令和4年度改訂版）」（令和5年3月 農林水産省輸出・国際局知的財産課作成）([https://www.maff.go.jp/j/kanbo/tizai/brand/b\\_syokubut/attach/pdf/index-111.pdf](https://www.maff.go.jp/j/kanbo/tizai/brand/b_syokubut/attach/pdf/index-111.pdf))に記載の事項を満たした試験構成で妥当性確認試験を行い、妥当性を確認しています。

## 謝 辞

本技術マニュアルは、農林水産研究推進事業 委託プロジェクト研究「品種識別技術の開発」及び、みどりの食料システム戦略実現技術開発・実証事業のうち「農林水産研究の推進」（委託プロジェクト研究）の「品種識別技術の開発」の支援を受けて、開発したものです。