

DNA クロマトを用いたカンキツ新品種の品種特異的 DNA 品種識別 技術（第2版）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
果樹茶業研究部門
食品研究部門
愛媛県農林水産研究所果樹研究センター
みかん研究所
国立大学法人岡山大学農学部
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

近年、農産物の輸出拡大に向けた取り組みが進められ、カンキツでは2020年以降に輸出量が急激に増加しており、2021年には前年度比の約60%増となる1697トン（金額では約9.4億円）が輸出されている。一方、「みはや」、「あすみ」、「愛媛果試28」（紅まどonna）などの近年に育成された新品種の穂木が海外へ不当に流出していることが顕在化し、海外で無断栽培された果実が日本へ逆輸入される懸念が生じている。農産物の国産ブランドの保護や産業競争力の向上を進めるためには、知的財産権を積極的に確保し、保護する取り組みが必要である。

令和2年に改正された種苗法では登録品種の種苗の国外への持ち出し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。農産物の国内外での種苗の管理、侵害物品への権利行使のためには、侵害か否かを迅速に判定する技術が必要である。DNA品種識別は、簡易で迅速に品種識別が可能であり、登録品種の偽装表示、税関による侵害物品の水際取締りなどへの利用も考えられる。

本マニュアルでは、海外へ品種登録した「みはや」、「あすみ」、「あすき」、「璃の香」、「愛媛果試第28号」（紅まどonna）、「媛小春」および「愛媛果試第48号」（紅プリンセス）について、DNA抽出、PCR法による核酸の増幅、DNAクロマト紙による判別の3工程で、国内で流通する主要なカンキツ26品種から特異的に識別できる方法について記載する。



図1 「みはや」の果実の写真

「みはや」（品種登録番号: 第23722号）は11月下旬に成熟期を迎える早生品種である。果実は190g程度で、果皮が赤く、浮皮が発生しにくい、芳香があるなどの特長がある。



図2 「あすみ」の果実の写真

「あすみ」（品種登録番号: 第23723号）は、2月上旬に成熟期を迎える中生品種である、果実は150g程度、糖度（Brix値）が概ね15%以上と極めて高く、芳香があり、食味が優れるなどの特徴がある。



図3 「あすき」の果実の写真

「あすき」(品種出願番号: 第 32235 号) は、3 月頃に成熟期を迎える晩生品種である。果実は 180g 程度、果皮は橙色で、浮皮の発生はほとんど見られず、果肉部をナイフでカットした後のドリップがオレンジと同程度に少ないなどの特徴がある。



図4 「璃の香」の果実の写真

「璃の香」(品種登録番号: 第 24081 号) は、11 月下旬頃から成熟果実が収穫できる品種である。果実は 200g 程度、果皮が薄く、果肉の割合や搾汁率が高く、加工適性に優れるなどの特徴がある。



図5 「愛媛果試第28号」(紅まどonna)の果実の写真

「愛媛果試第28号」(紅まどonna)(品種登録番号:第12981号)は、12月上旬頃に成熟し、果肉がゼリー状で良食味を持つなどの特徴がある。



図6 「媛小春」の果実の写真

「媛小春」(品種登録番号:第17067号)は1月下旬頃に成熟し、「黄金柑」由来の優れた食味を持つなどの特徴がある。



図7 「愛媛果試第48号」(紅プリンセス)の果実の写真

「愛媛果試第48号」(紅プリンセス)(品種出願番号:第33840号)は、3月中旬頃に成熟し、ゼリー状の食感と濃厚な甘みを持つなどの特徴がある。

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及び実験、サンプルからのDNA抽出方法については、<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)>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)>を参照のこと。

カンキツの果肉や果皮から抽出したDNAにはPCR反応を阻害する多糖類やポリフェノールなどが混入することから、本マニュアルではDNeasy® Plant Mini Kit(キアゲン社)を用いてDNA抽出をおこなっている。本マニュアルでは、サンプルの粉砕に多検体細胞破碎装置シェイクマスターオート(BMS社)を使用している。他のメーカーのビーズ式多検体粉砕装置を使用する場合、付属の取扱説明書に従い、サンプルを粉砕する。本マニュアルでは、DNeasy® Plant Mini Kit(キアゲン社)を用いた果皮のフラベドからDNA抽出手順を記載している。葉等の他の組織から同キットで抽出したDNA溶液についても項目3に記したDNA品質の基準を満たせば、DNAクロマト紙を用いた品種特異的DNA品種識別技術に利用できることを確認している。ジャムや缶詰などの加熱や化学処理した加工品から抽出したDNAは、本マニュアルで定めたDNA品質の基準に満

たない低分子に断片化されている懸念があり、使用にあたって十分に注意すること。

<準備するもの>

- 多検体細胞破碎装置シェイクマスターオート (BMS 社)
- オート用 2ml アルミブロック (BMS 社)
- ステンレスビーズ 6.0mm (BMS 社)
- 2.0ml マスターハードチューブ (BMS 社)
- DNeasy® Plant MiniKit (キアゲン社)
- 使い捨てのカミソリ (フェザー安全剃刀社など)
- ペーパータオル
- 1.5ml チューブ (滅菌済み)

<基本操作>

基本操作は、キアゲン社のプロトコールに従っている。

- (1) 果実からフラベド (外果皮、図 8) を切り出し、約 30mg を計量し、短冊状に細かく切断して、2 個の破碎用のステンレスビーズ 6.0mm と共に 2.0ml マスターハードチューブに挿入する。凍結した果実を用いる場合、上記の作業を素早く行う。サンプルを挿入した 2.0ml マスターハードチューブをオート用 2ml アルミブロックに装填し (図 9)、液体窒素で冷却する。なお、カミソリ、チューブ類を介してサンプルが混合しないよう、使い回しを避ける等十分注意する。

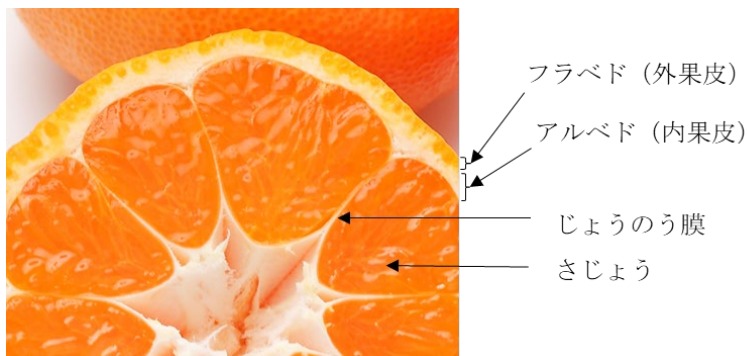


図 8 カンキツの果実組織の名称

カンキツ果実は、フラベド、アルベド、じょうのう膜 (さじょうを包む膜)、さじょうなどで構成されている。

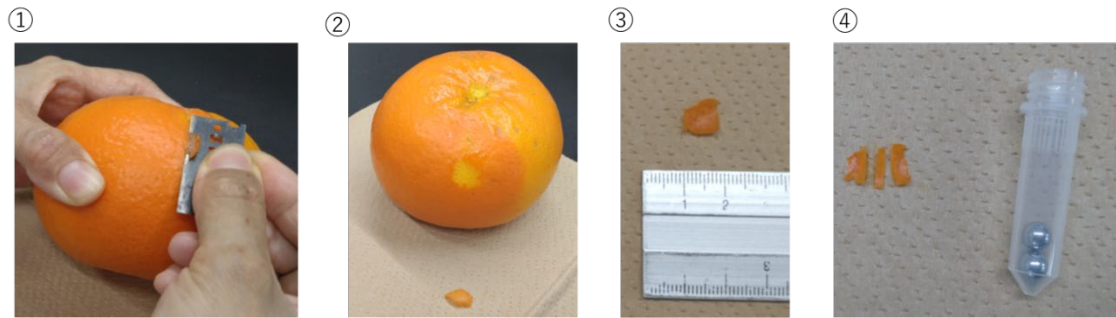


図9 果皮をサンプリングする様子

アルベドをなるべく含まないようにフラベドをカミソリで切り出し (①、②)、約 30mg の重さとなるように調整し (③)、短冊状に細かく切ってからシェイクマスター用のチューブにピンセットで挿入する。

- (2) 多検体細胞破碎装置シェイクマスターオートに冷却したオート用 2ml アルミブロックを装着し、800rpm で2分間、サンプルを粉碎する。(粉碎装置が利用できない場合は、計測したサンプルを液体窒素で乳鉢・乳棒などを利用して、サンプルを凍結状態で粉碎し、1.5ml チューブに入れる)
- (3) 2.0ml マスターハードチューブ内のサンプルが粉末状に粉碎していることを確認し、400 μ l の AP1 と 4 μ l の RNase A ストック溶液 (100 mg/ml) を加える。サンプル挿入後に激しくボルテックスする。
- (4) 混合液を 65 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートする。インキュベーション中にチューブを 2~3 回転倒混和する。
- (5) 130 μ l の Buffer P3 を混合液に添加後、混和し、5 分間氷上でインキュベートする。
- (6) 6,000 \times g、5 分間、室温で遠心する。
- (7) 2 ml コレクションチューブ中にセットした QIAshredder Mini Spin Column (薄紫色) に(6)の上澄み液 をピペットで入れ、20,000 \times g、2 分間、室温で遠心する。
- (8) (7) のろ液画分を新しい 1.5ml チューブに移す。
- (9) 清澄済み混合液に 1.5 倍容量の Buffer AW1 を添加し、ピペットで混和する。
- (10) (9)の混合液 (形成した沈殿物を含む) 650 μ l を、2 ml のコレクションチューブに装着した DNeasy Mini Spin Column (透明) にピペットで移す。
- (11) 6,000 \times g 以上、1 分間、室温で遠心し、ろ液を棄てる。
(ろ液の粘性が高く、カラム内に残留する場合は、20,000 \times g での遠心を推奨する)

- (12) (9) の残った混合液は(10)と(11)を繰り返す。
(ろ液の粘性が高く、カラム内に残留する場合は、 $20,000\times g$ での遠心を推奨する)
- (13) DNeasy Mini Spin Column を新しい2 ml のコレクションチューブに装着し500 μ l の Buffer AW2 を添加する。 $6,000\times g$ 以上、1 分間、室温で遠心し、ろ液を棄てる。
- (14) 500 μ l の Buffer AW2 を DNeasy Mini Spin Column に添加し、 $20,000\times g$ 、2 分間、室温で遠心してメンブレンを乾燥させる。
- (15) DNeasy Mini Spin Column を新しい1.5 ml チューブに移し、50 μ l の Buffer AE を DNeasy メンブレン上に直接ピペットで添加する。室温 (15 ~ 25 $^{\circ}$ C) で5 分間インキュベートした後、 $6,000\times g$ 以上、1 分間、室温で遠心し、ろ液を回収する。(Buffer AE を予め65 度に温めると DNA の収量が増加する)

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 230nm および 260nm の吸光度(A230, A260)を分光光度計で測定する。

<準備するもの>

- NanoDrop1000 (サーモフィッシャー社)
- サンプル DNA 溶液
- 滅菌超純水と Buffer AE (キアゲン社)
- キムワイプ (日本製紙クレシア社)

<基本操作>

以下に

- (1) PC の電源を入れ、ND-1000 ソフトウェアを起動する。
- (2) メインメニューが表示されるので“Nucleic Acid”をクリックする。
- (3) “Initialize instrument” のメッセージが表示されるので、アームを開き、測定部をきれいにし、3 μ l の滅菌水をのせる。
- (4) アームを閉じ、“OK”をクリックする。
- (5) 表示された測定画面の“Sample type”の中から“2 重鎖 DNA...DNA-50”を選択する。
- (6) 測定部の滅菌水をキムワイプで拭き取り、測定部にブランク用の 3 μ l の Buffer AE (ブランク溶液) をのせる。

- (7) 測定画面の“Blank”をクリックする。
- (8) 測定部のブランク溶液をキムワイプで拭き取り、3 μ lのサンプルDNA溶液をのせ、“Measure”をクリックする。
- (9) サンプルDNA溶液の260nm吸光度の値、260nm吸光度と230nm吸光度の比率（A260/230比）の値を記録する。
- (10) 測定終了後は、サンプルDNA溶液をキムワイプで拭き取り、3 μ lの滅菌水をのせてキムワイプで滅菌水を拭き取り、測定部をきれいにする。
- (11) ソフトを終了し、PC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濃度が3ng/ μ l以上、A260/230比の値が1.4以上であることが望ましい。濃度が10ng/ μ l以上の場合は、滅菌水で10ng/ μ l以下となるように希釈する。品質判定で基準値を満たすサンプルDNA溶液は、速やかにDNAクロマトを用いた品種の判定に使用することが望ましい。品質判定後に、一定の期間が経ったサンプルDNA溶液については、使用前に品質判定を再度実施することを推奨する。

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「みはや」、「あすみ」、「あすき」、「璃の香」、「愛媛果試第28号」、「媛小春」および「愛媛果試第48号」の検出キット（GenCheck® みはや・あすみ・あすき・璃の香・愛媛果試第28号・媛小春・愛媛果試第48号）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>

- 1.5mlチューブ（滅菌済み）
- PCR用8連チューブ（滅菌済み）
- PCR用8連チューブキャップ（滅菌済み）
- サンプルDNA溶液
- KOD One PCR Master Mix（TOYOBO社）
- GenCheck® みはや・あすみ・あすき・璃の香・愛媛果試第28号・媛小春・愛媛果試第48号（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い、実施する。キットごとに PCR の反応条件や付属の試薬が最適化されていることから、複数のキットを同時に使用する際には、PCR 反応プログラムを確認し、付属の試薬を流用しないように実施する。

本マニュアルに掲載する各品種の検出キットは、ProflexPCR (Thermo Fisher Scientific社)、サーマルサイクラー2720 (Applied Biosystems社)、T100サーマルサイクラー (Bio-Rad社)、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems社)、Veriti 96-Well サーマルサイクラー (Applied Biosystems社) のPCR反応装置で、安定してバンドが検出できることを確認している。

1) 各品種の検出キットで、目的の品種と判別できることを確認したカンキツの品種

「ウンシュウミカン (宮川早生 (みやがわわせ))」、「グレープフルーツ (ダンカン)」、「スイートオレンジ (トロビタ)」、「レモン (リスボン)」、「不知火 (しらぬひ)」、「イヨ (宮内伊予柑 (みやうちいよかん))」、「ナツミカン (川野夏橙 (かわのなつだいたい))」、「ハッサク」、「ポンカン (太田ポンカン (おおたぼんかん))」、「璃の香 (りのか)」、「みはや」、「あすみ」、「あすき」、「麗紅 (れいこう)」、「津之輝 (つのがやき)」、「西南のひかり (せいなんのひかり)」、「津之望 (つなのぞみ)」、「はるひ」、「清見 (きよみ)」、「せとか」、「はるみ」、「はれひめ」、「甘平 (かんぺい)」、「愛媛果試第 28 号 (えひめかしだい 28 号) (紅まどんな (べにまどんな))」、「愛媛果試第 48 号 (えひめかしだい 48 号) (紅プリンセス (べにぷりんせす))」、「媛小春 (媛小春) の葉またはフラベドから上記の実験操作で抽出した DNA。なお、「3. DNA 溶液の品質の確認」で、判定基準をクリアした DNA であることを確認している。

2) 「みはや」、「あすみ」、「あすき」、「璃の香」、「愛媛果試第 28 号」、「媛小春」および「愛媛果試第 48 号」の検出の実例

各品種のキットに付属の DNA クロマト紙で検出されたバンドパターンと図 10 および図 11 に示す陽性例と陰性例と比較して、目的の品種であるか否かを判定する。

なお、クロマト紙に着色している薄いオレンジ色が消えない場合や最上部のPCR 反応の陽性コントロールとして使用している増幅確認用マーカの青色のバンドが出現しない場合は、再検査を行う。

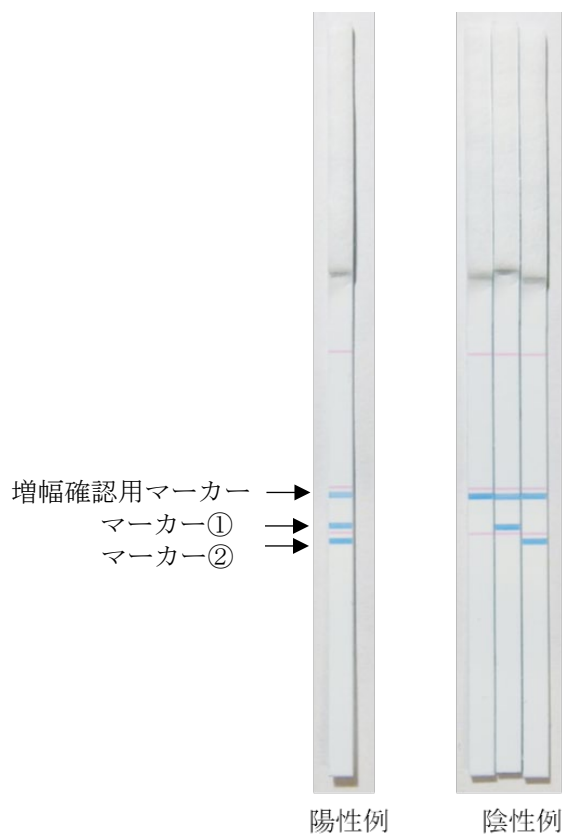


図10 「みはや」、「あすみ」、「あすき」、「愛媛果試第48号」（紅プリンセス）の陽性例と陰性例

増幅確認用マーカの他に、「みはや」、「あすみ」、「あすき」、「愛媛果試48号」（紅プリンセス）ではマーカ①とマーカ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。

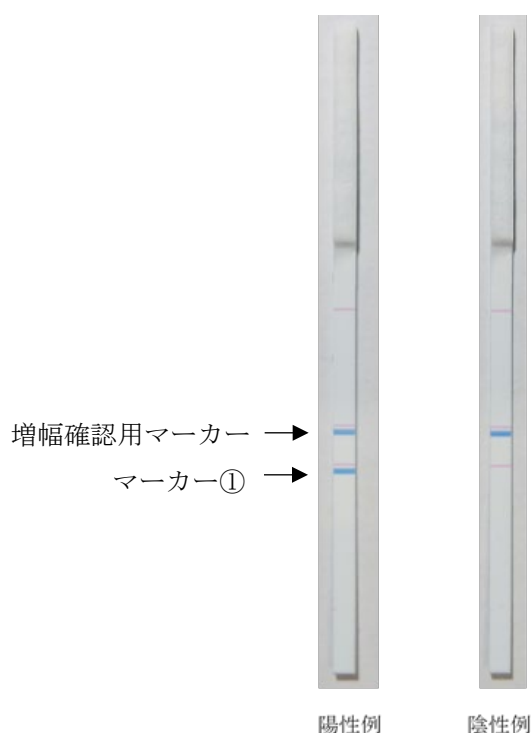


図1-1 「愛媛果試28号」（紅まどonna）、「璃の香」、「媛小春」の陽性例と陰性例

増幅確認用マーカーの他に、「愛媛果試28号」（紅まどonna）、「璃の香」、「媛小春」ではマーカー①が検出される。他の品種では増幅確認用マーカーのみが検出される。

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

利用者が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、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 2022-196625）です。

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)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、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）「品種識別技術の開発」の支援を受けて、開発されたものです。

初 版 2023年7月28日

第2版 2024年6月5日 初版として公表したものに、新たに「みはや」、「あすき」、「愛媛果試第48号」（紅プリンセス）の品種特異的DNA識別技術を追加して更新。