

DNA クロマトを用いたサツマイモ品種「からゆたか」「すずほっくり」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、2024 年では 7,424 トン（金額では約 33 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」は国外で大規模に栽培されていることが報告され、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 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、青果用品種「からゆたか」（図 1）および「すずほっくり」（図 2）について、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から特異的に識別する方法について記載する。



図1 「からゆたか」の塊根の写真

「からゆたか」(2016年品種登録, 登録番号: 第25553号)はいもの肥大が早く、多収の青果用品種である。いもの外観が良く、肉質はねっとりしていて、焼き芋に適する。



図2 「すずほっくり」の塊根の写真

「すずほっくり」(2019年品種登録, 登録番号: 第27622号)は、肉質が粉質で良食味の青果用品種である。いもの形状や大小の揃いがよく、焼き芋に適する。

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)>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。

本マニュアルでは、DNA 抽出用の組織として塊根または葉（茎頂付近の未展開葉）を用いる。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。これらの成分を除くため、本マニュアルでは ISOSPIN Plant DNA（ニッポンジーン社）を用いて DNA の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砕方法を中心に記載する。粉砕はペッスルを使用して手動で粉砕する場合と、ビーズ式粉砕装置（キアゲン社 TissueLyser II）を使用する場合について説明する。ペッスルを使用して手動で粉砕しても十分に粉砕することが可能であるが、サンプル数が多いと粉砕にかかる時間や労力が多くなるため、必要に応じてビーズ式粉砕装置を利用する。上記以外のビーズ式粉砕装置を使用する場合は付属の取扱説明書に従い、冷凍状態でサンプルを粉末状に粉砕する。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>

1. ISOSPIN Plant DNA（ニッポンジーン社）
2. TissueLyser II および TissueLyser Adapter Set 2 x 24（キアゲン社）：手動で粉砕する場合は不要
3. 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）
4. ペーパータオル※
5. 粉砕用消耗品※

TissueLyser II 使用時：滅菌済みの 2.0 ml キャップロックチューブ（エッペンドルフ社製など）および直径 5 mm のステンレスビーズ

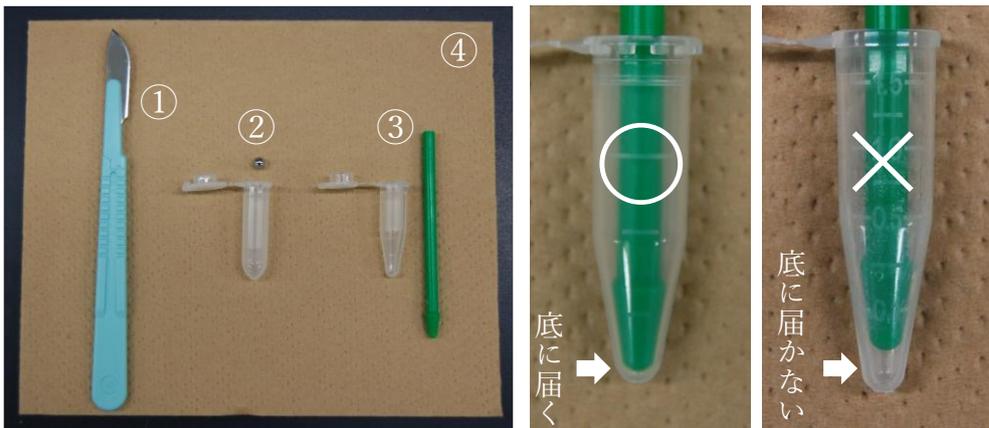


図4 抽出に使用する器具

①使い捨てメス、②2.0 ml チューブと 5 mm ステンレスビーズ (TissueLyzer II 使用時)、③使い捨てペッスルと 1.5 ml チューブ (手動粉碎時)。④ペーパータオル。③の 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。

手動粉碎時：使い捨てペッスル（ビーエム機器社「チューブミキサー 1.5 ml チューブ用」など）および滅菌済みの 1.5 ml チューブ（上記ペッスルに適合するもの、図 4 参照）

※上記 3～5 の器具についてはサンプルごとに用意する。

<基本操作>

1) 組織のサンプリングおよび粉碎

TissueLyzer II を用いる場合

(1) 塊根は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。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 程度の厚さに切り出す (図 5 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 5 C,D)。切出した内部組織を可能な限り薄くスライスし (図 5 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する (図 5 F)。細かくしたサンプルを 2.0 ml チューブに入れる (図 5 G)。葉の場合は、茎頂付近の未展開葉 (図 6 A) 50~100 mg を 2.0 ml チューブに直接サンプリングする (図 6 B)。

- (2) サンプルを入れた 2.0 ml チューブに直径 5 mm のステンレスビーズを 1 個入れる (図 5 G, 図 6 B)。
- (3) サンプルを入れたチューブと TissueLyser Adapter Set を -80°C で 30 分以上冷却する。冷却後、ステンレスビーズがチューブやサンプルと固着していないことを確認する。固着している場合はチューブを軽く弾いてステンレスビーズが動くようにする。
- (4) サンプルのチューブを TissueLyser Adapter Set に入れた後、温度が上がらないように素早く TissueLyser II にセットし、30 Hz で 1 分間粉碎する。粉碎後、サンプルが粉末状になっていることを確認し (図 7 A, B)、ISOSPIN Plant DNA の Prewash Buffer 600 μl を加え (※)、均一に懸濁されるまでボルテックスで攪拌する。サンプルが十分粉碎されておらず、懸濁した際にサンプルの塊が多く見られる場合は、使い捨てペッスルで追加の粉碎を行うか、(1)で組織をさらに細かく切断して粉碎をやり直す。

ペッスルで粉碎する場合

- (1) 塊根の場合は 200 mg を上記と同様に細断し、1.5 ml チューブに入れる (図 5 G)。葉の場合は未展開葉 50~100 mg を 1.5 ml チューブに採取する (図 6 B)。
- (2) チューブに ISOSPIN Plant DNA の Prewash Buffer 600 μl を加え (※)、使い捨てペッスルにより、均一な懸濁状態となるまで磨り潰す (図 7 C, D)。

※サンプルが塊根の場合、Buffer PE1 450 μl を加え、Prewash 操作を省略して下記の抽出操作を(3)から行うことも可能である。しかし、アントシアニンやポリフェノールを多く含むサンプルでは DNA の濃度や品質が低下する可能性があるため、その場合は Prewash 操作を行う。

2) ISO SPIN Plant DNA による抽出操作

抽出操作の詳細については ISO SPIN Plant DNA に付属のマニュアルも参照すること。

- (1) Prewash buffer に懸濁した試料を遠心 ($13,000\times g$, 10 分間, 4°C) し、試料をペレットにした上で上清をすべて除去する。

- (2) 試料に 450 μ l の PE1 Buffer を加え、使い捨てペッスル等を用いて均一な懸濁状態にする。粉碎に TissueLyzer II を用いた場合は TissueLyzer II を用いて再度 30 Hz、10 秒間程度振とうしても良い。
- (3) Buffer PE1 に懸濁した試料に 5 μ l の RNase A を加え、ボルテックスで攪拌する。

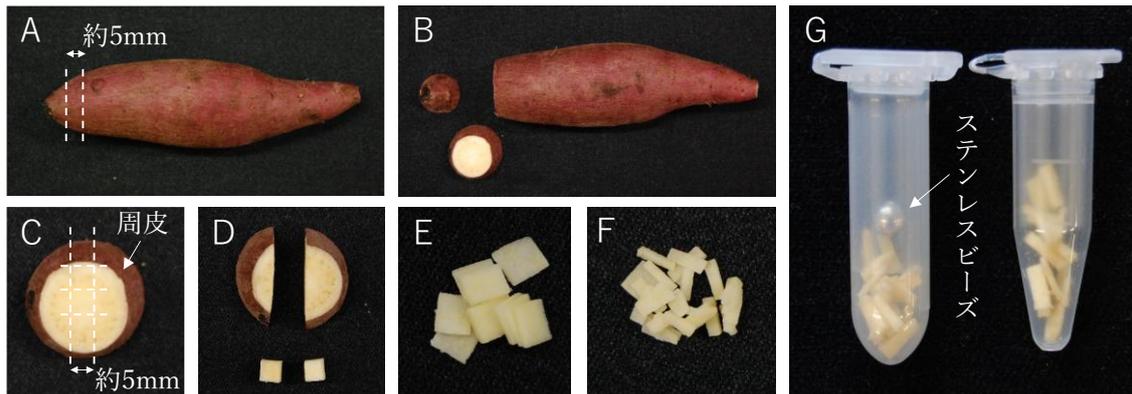


図5 塊根組織のサンプリング方法

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 程度の厚さで切出す(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)。TissueLyzer II を使用の際はステンレスビーズとともに 2.0 ml のチューブに、ペッスルで粉碎する場合は 1.5 ml のチューブに入れる(G)。

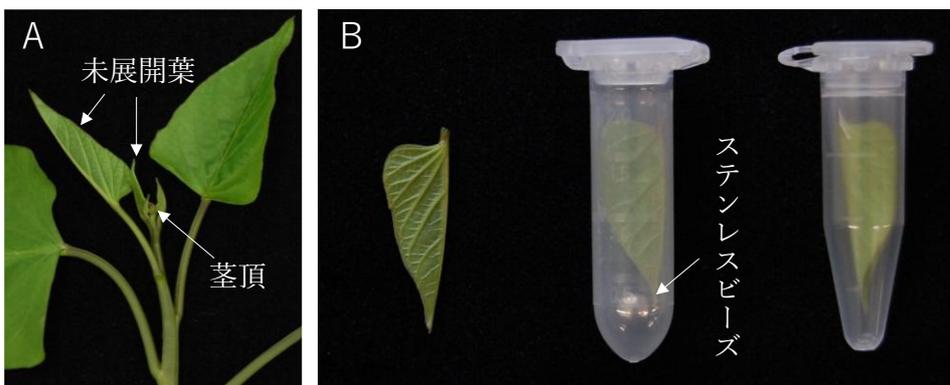


図6 葉(未展開葉)のサンプリング方法

茎頂付近の未展開葉(A) 50~100 mg を粉碎用のチューブにサンプリングする(B)。TissueLyzer II を使用する場合は 2.0 ml のチューブを用い、サンプルとともにステンレスビーズを入れる。ペッスルで粉碎する場合は 1.5 ml のチューブを用いる。

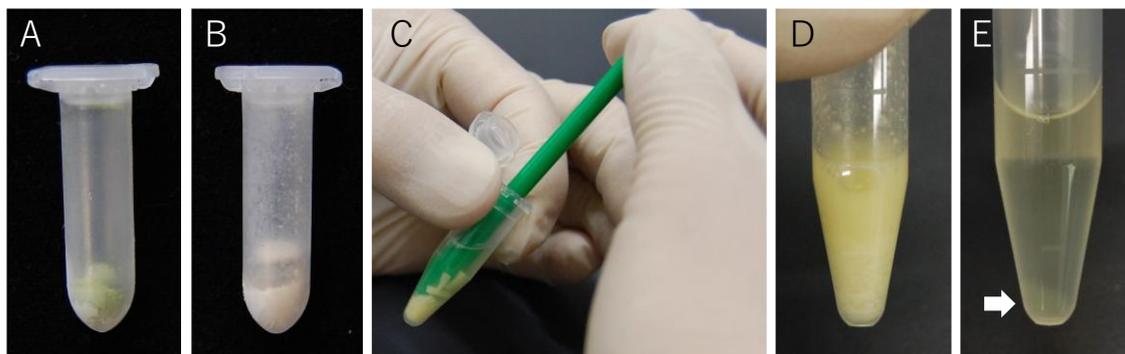


図7 TissueLyzer II で粉末状に粉碎した葉(A)および塊根(B)のサンプル、ペッスルを用いた塊根サンプルの粉碎(C)と粉碎後の様子(D)、および塊根サンプルで PB Buffer を添加した後の遠心後に見られるゼリー状の沈殿(E; 矢印)

- (4) 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。
- (5) 50 μ l の PE2 Buffer を加え、ボルテックスで 20 秒間以上攪拌する。
- (6) 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。
- (7) 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。
- (8) 遠心 (13,000 \times g, 30 秒間, 4°C) し、沈殿物を取らないように上清を新しいマイクロチューブに回収する。サンプルが塊根の場合は沈殿物がゼリー状となるため注意する (図 7 E)。特に、塊根内部にアントシアニンを含む品種ではゼリー状の沈殿物が見えにくいため、注意して上清を回収する。
- (9) Spin Column に 900 μ l の混合液 (8 で回収した上清) を添加する。
- (10) 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。
- (11) 700 μ l の PW1 Buffer を Spin Column に加える。
- (12) 遠心 (13,000 \times g, 1 分間, 4°C) し、ろ液を捨てる。
- (13) 500 μ l の PW2 Buffer を Spin Column に加え、遠心 (13,000 \times g, 1 分間, 4°C) する。
- (14) 300 μ l の PW2 Buffer を Spin Column に加える。
- (15) 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。

- (16) 50 μ l の Elution Buffer を Spin Column のメンブレン中央に滴下し、3 分間室温で静置する。
- (17) 遠心 (13,000 \times g, 2 分間, 4 $^{\circ}$ C) し、ろ液 (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 溶液の濃度および A260/A280 を分光光度計で測定する。

<準備するもの>

- サンプル DNA 溶液
- NanoDrop One (ThermoFisher Scientific 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 NanoDrop One 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) NanoDrop One の電源を入れ、装置を起動する。
- (2) イニシャライズが終了し Home 画面が表示されたら、dsDNA を選択する。
- (3) サンプル台下部に 1 μ l の Elution Buffer をのせてアームを下げ、ブランクを測定する。
- (4) サンプル台上下の Elution Buffer をキムワイプで拭きとる。
- (5) サンプル台下部に 1 μ l のサンプル DNA 溶液をのせ、アームを下げて測定し、サンプル DNA 溶液の濃度および A260/A280 の値を記録する。
- (6) サンプル台上下のサンプル DNA 溶液をキムワイプで拭きとる。
- (7) 複数のサンプルを連続して測定する場合は(5)~(6)を繰り返す。
- (8) 測定を終了する場合、画面上の End Experiment を選択して、Home 画面に戻り、装置の電源を切る。

2) サンプル DNA 溶液の品質の判定

DNA の濃度が 3 ng/μl 以上、A260/A280 の値が 1.5 以上であることが望ましい。濃度が 5 ng/μl を超える場合は Elution Buffer で 0.5~5 ng/μl (GenCheck® すすほっくり使用の場合は 2.5~5 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® からゆたか、GenCheck® すすほっくり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® からゆたか、GenCheck® すすほっくり (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、反応終了後は速やかに DNA クロマト紙による検出を行う。やむを得ず反応後に時間をおいて検出する場合は、反応液を検出まで -20°C で保存する。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® からゆたか、GenCheck® すすほっくりは、T100 サーマルサイクラー (Bio-Rad 社)、DNA Engine PTC-200 (Bio-Rad 社)、Dice TP600 Gradient (タカラバイオ社、Mode 5 で実施)、ProFlex PCR system (Thermo Fisher Scientific 社)、Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社)、Veriti 96-well サーマルサイクラー (Applied Biosystems 社) 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) 各品種のキットで、対象品種と判別できることを確認したサツマイモの品種は表 1 の通りである。

表 1 各品種のキットで対象品種と識別できることを確認した品種

用途等	品種名
青果用	みやあかり、べにひなた、ひめあずま、ゆきこまち、あまはづき、ひめあやか、あいこまち、べにはるか、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	ふくむらさき、ちゅらかなさ、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	みちしずく、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	コガネセンガン、タマアカネ、ジョイホワイト
蒸切干加工用	タマユタカ、泉 13 号
その他	農林 1 号、農林 2 号、ベニハヤト

※上記の品種に加え、GenCheck®からゆたかでは「すずほっくり」との識別が、GenCheck®すずほっくりでは「からゆたか」との識別が、可能である。

2) 検出の実例

判定を行ったサンプルが各キットの対象品種である場合、GenCheck®からゆたかでは DNA クロマト紙上に増幅確認用マーカーと識別用マーカーが各 1 本検出され（図 8）、GenCheck®すずほっくりでは増幅確認用マーカー 1 本の他に識別用マーカーが 2 本検出される（図 9）。一方、対象品種でない場合はそれぞれ図 8～9 の陰性例のようなパターンとなる。いずれのキットにおいても 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ーが検出されない場合は PCR によるマーカー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ー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。

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 2025-272715）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)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。

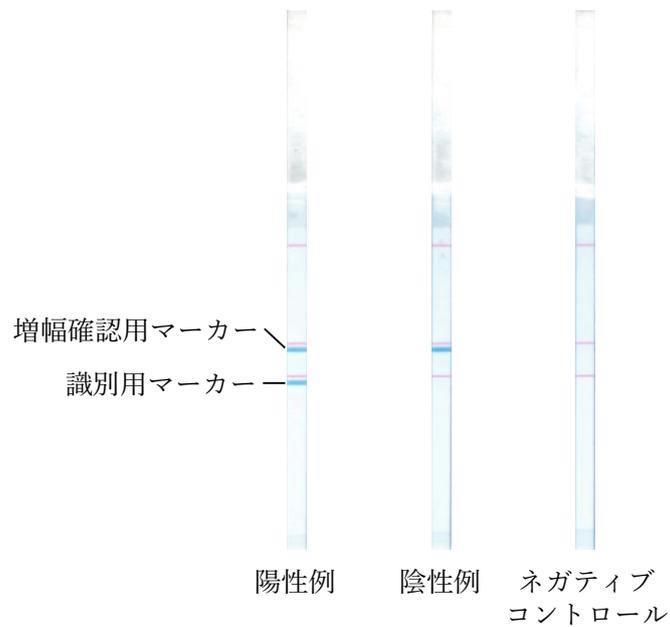


図8 GenCheck[®]からゆたかの検出例

対象品種(からゆたか)である場合、陽性例のように増幅確認用マーカ―の他に識別用マーカ―が検出される。それ以外の品種の場合、陰性例のように増幅確認用マーカ―のみが検出される。

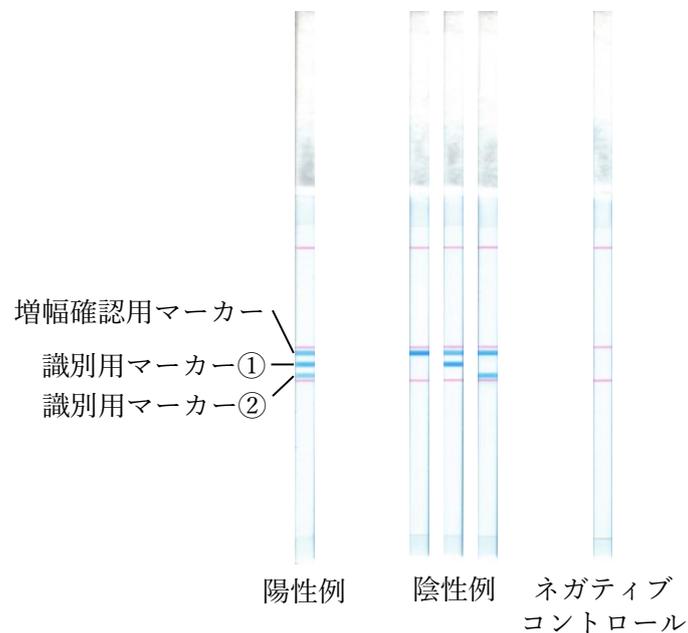


図9 GenCheck[®]すずほっくりの検出例

対象品種(すずほっくり)である場合、陽性例のように増幅確認用マーカ―の他に識別用マーカ―①と識別用マーカ―②が検出される。それ以外の品種の場合、陰性例のいずれかのパターンとなる。