

## DNA クロマトを用いたリンゴ新品種の品種特異的 DNA 品種識別技術（第1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

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、リンゴでも2000年代に輸出量が急激に増加している。2024年のリンゴ輸出額は201億円であり、主要6品目（リンゴ、ブドウ、モモ、ナシ、温州ミカン、カキ）の合計319億円のうち6割程度を占めている。一方、海外で無断栽培された果実が日本に逆輸入される懸念もある。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。

本操作手順書は、近年育成されたリンゴ品種の「ローズパール」、「ルビースイート」、「錦秋」に焦点を絞り、これらの品種を、国内で流通している代表的なリンゴ24品種から識別する方法を記載する。この方法は、これまでに報告している60品種間で互いを識別するSSRマーカーによる品種識別とは異なり、着目した3品種について当該品種か否かを、クロマト紙を用いて簡易迅速に識別できる方法である。

<SSRマーカーによるリンゴのDNA品種識別技術>参照2025年8月5日

([https://www.naro.go.jp/collab/breed/files/nifts\\_apple\\_shikibetsu20250305.pdf](https://www.naro.go.jp/collab/breed/files/nifts_apple_shikibetsu20250305.pdf))



図1 「ローズパール」果実

「ローズパール」（品種登録番号 第24267号 登録日2015年3月15日 育成者権の存

続期間 30 年) は、果肉が桃色に着色して酸味が程良い生食加工兼用リンゴ品種である。



図2 「ルビースイート」果実

「ルビースイート」(品種登録番号 第 24268 号 登録日 2015 年 3 月 26 日 育成者権の存続期間 30 年) は、果肉が赤く食味の良い生食加工兼用リンゴ品種である。



図3 「錦秋」

「錦秋」(品種登録番号 第 27428 号 登録日 2019 年 4 月 23 日 育成者権の存続期間 30 年) は甘味が多く食味の優れた中生のリンゴ品種で、果皮は濃赤色で着色しやすく、多汁で肉質が良いのが特徴である。

## 2. 一般的注意事項及びDNA抽出法について

本操作手順書の利用にあたり、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—> 参照 2024-10-01

([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>参照 2024-10-01

([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。

コンタミネーションの防止等については、

<JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル第3版>参照 2024-10-02

[http://www.famic.go.jp/technical\\_information/jashandbook/\\_doc/manual\\_3.pdf](http://www.famic.go.jp/technical_information/jashandbook/_doc/manual_3.pdf)

のコンタミネーション防止編)を参照のこと。

本操作手順書では、DNAの抽出にはDNeasy®PlantMiniKit(キアゲン社)を用いた葉からのDNA抽出手順を記載している。果実等、他の組織から同キットで抽出したDNA溶液についても、「3. DNA溶液の品質の確認」の「(2)サンプルDNA溶液の品質の判定」に示すDNA品質の基準を満たせば、DNAクロマト紙を用いた品種識別に利用できることを確認している。缶詰などの加工品から抽出したDNAは、本操作手順書のDNA品質に満たない場合も多く、使用にあたって十分に注意すること。

### <準備するもの>

#### ■サンプル破碎

- ・使い捨てペッスル
- ・ペッスルに合う1.5 mLチューブ

#### ■DNA抽出キット

- ・DNeasy®PlantMiniKit(キアゲン社 69104 等)

#### ■器具・消耗品・装置

- ・手袋
- ・使い捨て剃刀
- ・ピンセット
- ・ペーパータオル
- ・1.5 mLチューブ
- ・ピペット
- ・ピペットチップ
- ・量り
- ・1.5 mLチューブを加熱可能なブロック恒温槽等の装置
- ・高速微量遠心機

### <基本操作>

以下に、DNeasy® Plant Mini Kitを用いた場合の操作の概略を記載する。より詳細な手順については、キアゲン社のプロトコルを参照すること。なお、「ISOSPIN Plant DNA キット」(ニッポンジーン)を使用した場合においても、DNAクロマトを用いた品種判定の工程において反応性を確認している。

- (1) リンゴ葉の表面をペーパータオルで軽く拭く。
- (2) 使い捨てビニール手袋を用いて葉を約 20 mg 量り取る。手袋、剃刀、ピンセットは 1 サンプル毎に交換する。
- (3) 1.5 mL チューブに入れる (図 4)。

(4) 上記(1)~(3)の操作を各サンプルについて繰り返す。

(5) すりつぶす前に 50  $\mu$ L の AP1 を加えペッスルで葉片を破碎する (図 5)。1 サンプルあたり 3 分程度行う (図 6)。ここに AP1 を 400  $\mu$ L 加え、DNeasy®PlantMiniKit 付属の抽出プロトコールに従って DNA 抽出を行う。(使い捨てペッスルを用いてサンプルをすり潰す際、ペッスルはサンプル毎に交換する。)

(6) キアゲン社のプロトコールに従って DNA を抽出する。



図 4 20 mg の葉

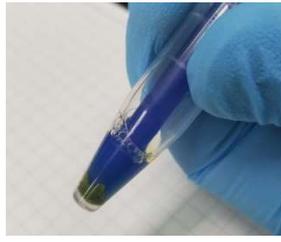


図 5 50  $\mu$ L の AP1 を加えた後



図 6 破碎 3 分後

### 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 230 nm および 260 nm の吸光度 (A230, A260) を NanoDrop1000 (サーモフィッシャー社) などの分光光度計で測定する。サンプル DNA 溶液の 260 nm 吸光度の値、260 nm 吸光度と 230 nm 吸光度の比率 (A260/230 比) の値を記録する。

(2) サンプル DNA 溶液の品質の判定

DNA 濃度が 3 ng/ $\mu$ 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 10 ng/ $\mu$ l 以上の場合、滅菌水で 10 ng/ $\mu$ 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 GenCheck® 「ローズパール」、GenCheck® 「ルビースイート」、GenCheck® 「錦秋」、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® 「ローズパール」、GenCheck® 「ルビースイート」、GenCheck® 「錦秋」 (ファスマック社)
- ・ PCR 装置 (Thermo Fisher Scientific 社の GeneAmp PCR System 9700 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。各品種の検出キットは、Veriti Proflex PCR、GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific 社)、T100 サーマルサイクラー (Bio-Rad 社)、等の 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リンゴ品種

「ふじ」、「つがる」、「玉林」、「ジョナゴールド」、「シナノスイート」、「シナノゴールド」、「北斗」、「陸奥」、「秋映」、「紅玉」、「きおう」、「金星」、「陽光」、「千秋」、「世界一」、「さんさ」、「デリシャス」、「もりのかがやき」、「トキ」、「ぐんま名月」、「ローズパール」、「ルビースイート」、「紅みのり」、「錦秋」

#### 2) 「ローズパール」、「ルビースイート」、「錦秋」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または、図 7 から図 9 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。

クロマト紙の 3 本のピンクのラインは位置マーカを示す。DNA クロマト紙で検出されたマーカのパターンを、キットの図に示す陽性例、陰性例と比較して、当該品種か否かを判定する。

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、PCR による増幅が不成功であるため、PCR または試料調製をやり直す。また、ネガティブコントロール (DNA を入れずに PCR だけ行ったもの) の反応でいずれかの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。

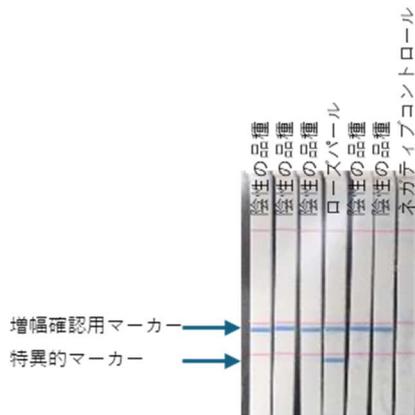


図7「ローズパール」の陽性例と陰性例

増幅確認用マーカーのほかに、「ローズパール」特異的マーカーが検出される。

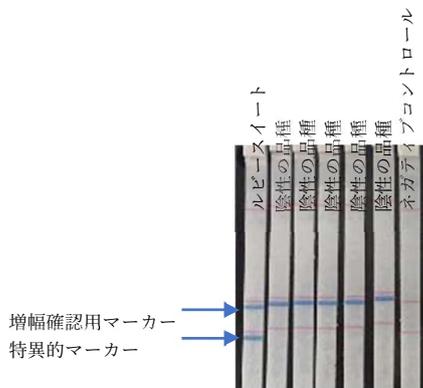


図8「ルビースイート」の陽性例と陰性例

増幅確認用マーカーのほかに、「ルビースイート」特異的マーカーが検出される。

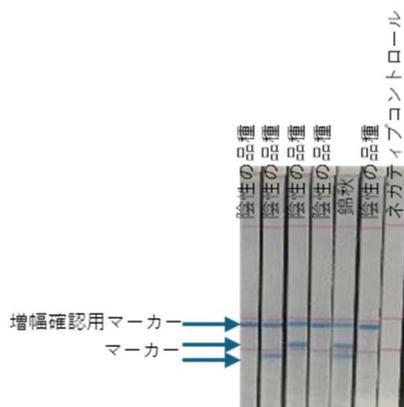


図9「錦秋」の陽性例と陰性例

増幅確認用マーカーのほかに、2本のマーカーが検出され、合計3本のマーカーが検出される。増幅確認用マーカーのほかに、1本のマーカーのみが検出され、合計2本のマーカーが検出されるものは陰性であり、他の品種である。

### 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、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、特許出願中です（「ルビースイート」；特願 2025-031368、「ローズパール」；特願 2025-031369、「錦秋」；特願 2025-031374）。本操作手順書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

本操作手順書は

< DNA 品種 識別 技術 の 妥当 性 確 認 の た め の ガ イ ド ラ イ ン > 参 照 2024-10-01  
([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。

### 本操作手順書で使用する品種識別技術の原理に関する参考文献

GenCheck®の各キットの品種識別は、レトロトランスポゾンの挿入部位に基づくマーカー技術を用いたものです。技術の詳しい背景や検出方法については、以下の文献に詳しく記載されていますので、必要に応じてご参照ください。門田（2018）「高速シーケンサーによるレトロトランスポゾン遺伝解析技術の開発とその活用」育種学研究 20: 185–191.

Okamoto et al., 2023 A target cultivar-specific identification system based on the chromatographic printed array strip method for eight prominent Japanese citrus cultivars. Breeding Science 73(2): 146-157

### 謝 辞

本操作手順書は、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。