

チャ品種「せいめい」の特異的 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
果樹茶業研究部門
種苗管理センター

2025 年 3 月 3 日

目次

1.	一般的注意事項および DNA 抽出法について	2
2.	葉からの DNA 抽出	2
3.	PCR 反応.....	5
4.	アガロースゲル電気泳動による増幅断片の確認.....	8
5.	遺伝子型判定.....	8

はじめに

茶（チャ、*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze）は、ツバキ科ツバキ属に属する常緑樹である。中国南部が原産地とされ世界中の約 50 カ国で栽培されている。茶は世界で最も親しまれているノンアルコール飲料の一つとされ、全世界で 1 日 20 億杯が消費されていると言われている。また、その健康機能性への着目等により世界中で人気が高まっており、世界全体の生産量は 1980 年に約 190 万トンであったのが 2019 年には約 650 万トンに増加している（FAO STAT）。

近年、日本国内主産県の荒茶生産量合計は 75,000 トンから 80,000 トン前後を推移している。2023 年の全国の茶栽培面積は 36,000 ha であり（農林水産省生産統計）、品種別のシェアを見ると、「やぶきた」が 66.7%、「ゆたかみどり」が 6.7%、「さえみどり」が 5.3%、「おくみどり」が 3.8%となっている（農林水産省 2023 年）。全国的に見ると、「やぶきた」の栽培面積が長年その大部分を占めているが、一部の産地では、早生、晩生の品種導入により摘採期の分散が図られている。

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（以下、農研機構果樹茶部門）では、摘採期の分散化を見据えた早生・晩生品種、病虫害抵抗性品種、香味に特徴のある品種、健康機能性成分に特徴のある品種等の育種目標を掲げ、多くの品種を育成している。その中で、2020 年 3 月 30 日に品種登録された「せいめい」は、煎茶だけではなく、抹茶や粉末茶にも適しており、近年国内外で需要が高まっている抹茶や粉末茶の生産性向上および付加価値向上に寄与することが期待されている。

これら優良品種に関する品種名の偽装表示や登録品種の海外流出は、農研機構が保有する知的財産権（育成者権）の侵害につながる可能性があるだけでなく、公正に品種を扱う茶生産者や流通関係者に多大な影響を及ぼす。また、消費者に対する食の安全・安心の確保の観点から見ても、極めて重大な問題である。

農研機構果樹茶部門は、2021 年に「茶 44 品種・系統の DNA 品種識別技術－SSR マーカーによる植物体から採取した生葉サンプルの品種識別技術－」を公表している。この技術は、農研機構種苗管理センターにおいて室内妥当性確認が行われ、同センターの品種類似性試験でも使用されている。この SSR マーカーによる品種識別技術は、「せいめい」の識別も可能であるが、高額なキャピラリー DNA シーケンサーが必要であるため、技術の導入に一定のハードルがある。現在、「せいめい」の普及が急速にすすんでいることから、本品種を特定するニーズが高まっているため、導入が容易な PCR とアガロースゲル電気泳動による検出を用いた品種識別技術として、挿入欠失多型（Indel）を利用した DNA 品種識別技術を開発した。

1. 一般的注意事項および DNA 抽出法について

DNA 品種識別分析における一般的注意事項およびおよび実験、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)> および <DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン

(http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_meeting/H20_2nd/guideline.pdf)>を参照のこと。サンプル間のコンタミネーションが生じると誤判定につながることから、すべての実験操作について十分にコンタミネーションの防止を図るとともに、ネガティブコントロールを供試することによって実験の有効性を確認することが重要である。

<JAS 分析ブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 第 3 版 (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>等参照

なお、本技術は植物体から採取した製茶加工を施していない生葉を対象としており、製茶加工したサンプルには適用されない。

2. 葉からの DNA 抽出

2.1. DNA 抽出の手順

(1) 葉は未展開の幼葉ではなく、完全に展開した成葉を使用する。硬化した成葉も適用できる。採取後、すぐに DNA 抽出を行わない場合は、シリカゲルと共に密封して乾燥させて保存するか、凍結乾燥処理を施した後にデシケーターで保存するか、または未乾燥の状態でも -20°C 以下で凍結保存する方法のいずれかで保管する。

(2) DNA 抽出は DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN 社)を用いて、QIAGEN 社が提供するキットプロトコールに従って抽出する。

<準備するもの>

多検体細胞破碎装置シェイクマスター (バイオメディカルサイエンス社)、凍結破碎用ラック 2ml アルミブロック (バイオメディカルサイエンス社)、ステンレスビーズ 6.0mm (バイオメディカルサイエンス社)、2.0ml マスターチューブハード (バイオメディカルサイエンス社)、1.5ml チューブ (滅菌済)、液体窒素、QIAshredder Mini Spin Column (QIAGEN 社)、DNeasy Mini Spin Column (QIAGEN 社)、コレクションチューブ 2ml (QIAGEN 社)、Buffer AP1 (QIAGEN 社)、Buffer P3 (QIAGEN 社)、Buffer AW1 (エタノール添加、QIAGEN 社) Buffer AW2 (エタノール添加、QIAGEN 社)、RNaseA ストック溶液 (100mg/ml) (QIAGEN 社)、メルカプトエタノール、1/10 バッファー (EDTA の濃度を

0.1mMにした TE バッファー)、高速遠心機、ブロックインキュベーターなど。
Buffer AP1 の溶液中に析出がみられた場合は使用前に 65°Cで保温する。

<実験操作>

基本操作は QIAGEN 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。QIAGEN 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) 生葉サンプル 100mg を破碎用ビーズの入った 2.0ml マスターチューブハードに取る。
- (2) 凍結破碎用アルミブロックに、サンプルを入れたマスターチューブをセットし、液体窒素で冷却する。
- (3) シェイクマスターで破碎する(1,000rpm、20 秒)。
破碎装置が利用できない場合は乾熱滅菌した乳鉢・乳棒などを用いてサンプルを凍結状態で破碎し、1.5ml チューブへ入れる。
- (4) サンプルが粉末状に粉碎していることを確認し、65°Cに温めておいた 450µL の Buffer AP1 を加え、ボルテックスでサンプルの塊がない程度に混和する。その後、4µL の RNase ストック溶液を加え再度ボルテックスする。
- (5) 65°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 2-3 回転倒混和する。
- (6) 150µL の Buffer P3 を添加し、混和後、氷上で 5 分間インキュベートする。
- (7) 14,000rpm、10 分、室温で遠心する。
- (8) 上清を QIAshredder Mini Spin Column(紫)に添加し、14,000rpm、2 分、室温で遠心する。
- (9) ろ液画分を新しい 1.5ml チューブに移す。
- (10) 1.5 倍量の Buffer AW1 を添加し、ピペットで混和する。
- (11) (10)の混合液 650µL を DNeasy Mini Spin Column (白)へ添加する。
- (12) 12,000rpm、1 分、室温で遠心し、ろ液を棄てる。
- (13) 残りの混合液を加え、12,000rpm、1 分、室温で遠心し、ろ液を棄てる。
- (14) DNeasy Mini Spin Column を新しいコレクションチューブへ移し、500µL の Buffer AW2 を添加する。
- (15) 12,000rpm、1 分、室温で遠心し、ろ液を棄てる。
- (16) 再度、500µL の Buffer AW2 を添加し、12,000rpm、1 分、室温で遠心し、ろ液を棄てる。
- (17) 12,000rpm、1 分、室温で遠心し、メンブレンを乾燥させる。
- (18) DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5ml チューブに移し、150µL の 1/10TE を添加し、室温で 5 分インキュベート後、10,000rpm、1 分、室温で遠心し、DNA 溶液を回収する。

<本マニュアルで供試した DNA サンプル>

「りょうふう」、「茶中間母本農 3 号」、「はるみどり」、「そうふう」、「茶中間母本農 4 号」、「茶中間母本農 5 号」、「茶中間母本農 6 号」、「サンルージュ」、「しゅんたろう」、「さえあかり」、「なんめい」、「せいめい」、「さやまかおり」、「やぶきた」、「あさつゆ」、「おくみどり」、「かなやみどり」、「さえみどり」、「ゆたかみどり」、「きよか」、「MK5601」、「かなえまる」、「りんめい（野茶研 02 号）」、「国研 01 号」、「暖心 37」、「おくはるか」、「きらり 31」、「さいのみどり」、「さきみどり」、「なごみゆたか」、「はると 34」、「はるのなごり」、「はるもえぎ」、「みやまかおり」、「むさしかおり」、「ゆめかおり」、「ゆめわかば」、「べにふうき」、「さやまあかり」、「ふうしゅん」、「ゆめするが」、「しずかおり」、「香駿」、「つゆひかり」の葉から上記実験操作で抽出した DNA。

2.2. DNA 溶液の品質の確認

1) 分光光度計によるサンプル DNA 溶液の品質の確認

抽出した DNA 溶液の 230nm、260nm および 280nm の吸光度を分光光度計で測定する。OD260/OD230 は 1.5 以上であること、OD260/OD280 は 1.7~2.0 の範囲であることが望ましい。

2) アガロースゲル電気泳動によるサンプル DNA 溶液の品質の確認

抽出したサンプル DNA 溶液を 1.0%アガロースゲルにアプライし、電気泳動により、夾雑物や分解が少なく、単一のバンドとして検出できる高分子の DNA が抽出できていることを確認する。

<準備するもの>

アガロース S (ニッポンジーン社)、50×TAE (ニッポンジーン社)、10×Loading Buffer (タカラバイオ社)、λ DNA 溶液 (タカラバイオ社製を事前に希釈して終濃度 5ng/μL とした溶液を調製しておく。なお、10×Loading Buffer も全液量の 1/10 量を加えておく) もしくは λ *Hind*III digest (タカラバイオ社、添付の 6×Loading Buffer を DNA 溶液の 1/5 量加えておく)、GelGreen™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium 社) もしくはエチジウムブロマイド溶液、ゲルメーカー (Mupid 社)、サブマリン型電気泳動装置 (Mupid 社)、ゲル撮影システム (アトー社) など。

<基本操作>

- (1) アガロースゲル(1.0%)を作製する。1.0g のアガロースを計量し、300 ml 三角フラスコに入れる。スターラーバーおよび 1×TAE 100 ml を加えてよく混ぜる。電子レンジ内で温めてアガロースを溶解させる。この時、完全に溶解していることを確認する。コームを立てたゲル作製用ユニットの中に、泡立たないように流し込み、固まるまで放置する。

- (2) 1.5ml チューブもしくは 8 連 PCR チューブ等に 2 μ L のサンプル DNA 溶液と 0.5 μ L の 10 \times Loading Buffer、滅菌水 2 μ L を加え、ピペットで混ぜる。10 \times Loading Buffer を加えたサンプル DNA 溶液と、 λ DNA 溶液 10 μ L もしくは λ *Hind*III digest 溶液 1.2 μ L を、泳動槽にセットした 1.0%アガロースゲルにアプライし、1 \times TAE 中で、青色の色素がゲルの 2/3 程度に来るまで電気泳動を行う。
- (3) 電気泳動終了後、ゲルを 3 \times GelGreen™ Nucleic Acid Gel Stain 溶液（もしくはエチジウムブロマイド溶液*）中で 15 分間程度染色し、シアン LED 照射下（エチジウムブロマイドの場合は UV 照射下）で、PCR 増幅産物の多型を確認・撮影する。（*エチジウムブロマイドは変異原性物質であるため取り扱いに注意すること。）
- (4) λ DNA のバンド付近に単一のバンドがみられない場合や、バンドがスメア状になる場合は、DNA の分解や PCR 反応を阻害する多糖類やポリフェノールなどの夾雑物が混入している可能性があるため、DNA 抽出からやり直す。

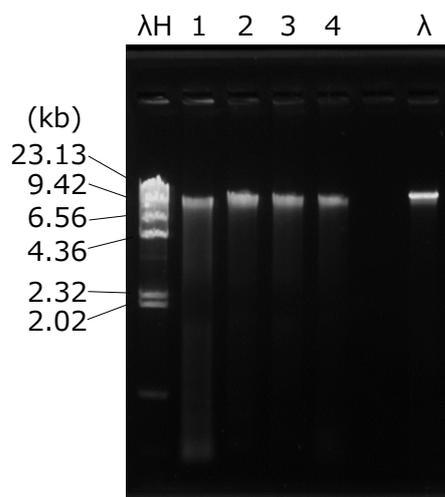


図1 アガロースゲル電気泳動による抽出 DNA の確認
 λ H : λ *Hind*III digest、1~4 チャ DNA、 λ : λ DNA

(3) DNA 溶液の判定

上記 1)、2) の確認により、判定基準をともにクリアしたサンプル DNA 溶液を PCR 反応に供試する。

3. PCR 反応

CsID0013 とその他のマーカーでは、プライマー溶液の組成と PCR 溶液の組成が異なるので注意する。

<準備するもの>

1.5ml 又は 2.0ml チューブ (滅菌済み)、96穴PCR プレート又は 8 連チューブ (Thermo Fisher Scientific 社)、キャップまたはフルプレートカバー (Thermo Fisher Scientific 社)、サンプル DNA 溶液 (5ng/μL に調製したもの)、Go Taq® G2 Hot Start Master Mix (Green、Colorless いずれも可、Promega 社)、1/10TE バッファー、滅菌超純水、rbcL プライマー溶液 (フォワードプライマーとリバースプライマーを各 5 pmol/μL 含む溶液、1/10TE バッファーで希釈)、CsID プライマー溶液 (CsID0013: フォワードプライマー 7 pmol/μL とリバースプライマー 10 pmol/μL、その他のマーカー: 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、1/10TE バッファーで希釈)、PCR システム ProFlex™ PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) など

<用いた PCR プライマー>

PCR 反応のポジティブコントロールとして、日本バーコードオブライフ・イニシアチブ記載の rbcLa 配列を用いた。

rbcLa_F : 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'

rbcLa_R : 5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3'

CsID0013F : 5'-TGCTGGTGGTGGTGGTGGGAATGAG-3'

CsID0013R : 5'-TCCTCCTCCTTGCCTCGTGA-3'

CsID0053F2 : 5'-CCCACGATCAAAGTGCCAAG-3'

CsID0053R : 5'-GCATGAGTCACAGGGTTTCC-3'

CsID0065F : 5'-GGGGTGGATGACTCAGGTTA-3'

CsID0065R : 5'-CCAGGTAATTAGGCCCTTGC-3'

CsID0090F : 5'-GAGAGCACTAGAGTGGGAGT-3'

CsID0090R2 : 5'-TGTCCTCTCCATATTTCTGCTTTG-3'

<基本操作>

(1) 以下のようにPCR 反応液を調製する。

・ CsID0013

Go Taq® G2 Hot Start Master Mix (Green、Colorlessいずれも可)	5.0μL
CsIDプライマー溶液	0.2μL
rbcLプライマー溶液	0.07μL
滅菌超純水	3.73μL
サンプルDNA 溶液	1.0μL
合計	10.0μL

・ その他のマーカー

Go Taq® G2 Hot Start Master Mix (Green、Colorlessいずれも可)	5.0μL
CsIDプライマー溶液	0.2μL
rbcLプライマー溶液	0.1μL
滅菌超純水	3.7μL
サンプルDNA 溶液	1.0μL
合計	10.0μL

ネガティブコントロールとして、サンプルDNA溶液の代わりに滅菌水1.0μLを使用する反応も行う。

(2) PCR システムProFlex™PCR System を用いて、以下のプログラムで、PCR 反応を行う。

94° C	5分	
↓		
94° C	1分	} 合計30サイクル
アニーリング	1分 (62°C→55°C 1サイクル1°Cずつ下げる)	
72° C	1分	
↓		
72° C	7分	
10° C	∞	

4. アガロースゲル電気泳動による増幅断片の確認

上記4項で得た反応溶液を2.0%アガロースゲルにアプライし、電気泳動により以下の方法でPCR増幅産物の有無を確認する。

<準備するもの>

アガロースS (ニッポンジーン社)、50×TAE (ニッポンジーン社)、100bp DNA ラダーマーカー (ニッポンジーン社)、GelGreen™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium 社) もしくはエチジウムブロマイド溶液、10×Loading Buffer (タカラバイオ社)、ゲルメーカー (Mupid 社)、サブマリン型電気泳動装置 (Mupid 社)、ゲル撮影システム (アトー社) など。

<基本操作>

- (1) アガロースゲル(2.0%)を作製する。2.0gのアガロースを計量し、300 ml 三角フラスコに入れる。スターラーおよび1×TAE 100 mlを加えてよく混ぜる。電子レンジ内で温めてアガロースを溶解させる。この時、完全に溶解していることを確認する。コームを立てたゲル作製用ユニットの中に、泡立たないように流し込み、固まるまで放置する。
- (2) 1μLの100bp DNA ラダーマーカーと3μLのPCR反応液を、泳動槽にセットした2.0%アガロースゲルにアプライし、1×TAE中で、色素 (GoTaq G2 Hot Start Green Master Mixの場合は黄色、10×Loading Bufferの場合は青色) がゲルの2/3程度に来るまで電気泳動を行う。
- (3) 電気泳動が終了した後、ゲルを3×GelGreen™ Nucleic Acid Gel Stain 溶液 (またはエチジウムブロマイド溶液) に15分間程度浸し、シアンLED照射下 (エチジウムブロマイド染色の場合はUV照射下) で、PCR増幅産物の多型を確認し、撮影する。

5. 遺伝子型判定

1) 判定

「せいめい」識別マーカーを用いた電気泳動図は、図2～6の通りである。44品種・系統について4種類のマーカーの増幅パターンは表1にまとめた。

44品種・系統中で、4種類のマーカーがすべて増幅されるのは「せいめい」のみである。ポジティブコントロールとして使用される rbcL マーカーが増幅されていないサンプルは、DNAの品質や量が不十分であるなどの理由から

PCR反応が正常におこなわれていないと考えられるため、遺伝子型判定には使用しない。

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
マーカー名	りょうふう	茶中間母本農3号	はるみどり	そうふう	茶中間母本農4号	茶中間母本農5号	茶中間母本農6号	サンルージュ	しゅんたろう	さえあかり	なんめい	せいめい	さやまかおり	やぶきた	あさつゆ	おくみどり
CsID0013	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
CsID0053 (250bp)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CsID0065 (220bp)	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
CsID0090	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

No.	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
マーカー名	かなやみどり	さえみどり	ゆたかみどり	きよか	MK5601	かなえまる	りんめい	国研01号	暖心37	おくはるか	きらり31	さいのみどり	さきみどり	なごみゆたか	はると34	はるのなごり
CsID0013	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
CsID0053 (250bp)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CsID0065 (220bp)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
CsID0090	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

No.	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
マーカー名	はるもえぎ	みやまかおり	むさしかおり	ゆめかおり	ゆめわかば	べにふうき	さやまあかり	ふうしゅん	ゆめするが	しずかおり	香駿	つゆひかり
CsID0013	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
CsID0053 (250bp)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CsID0065 (220bp)	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CsID0090	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+

表1 供試した品種・系統のマーカーごとの増幅パターン (+増幅、-増幅せず)

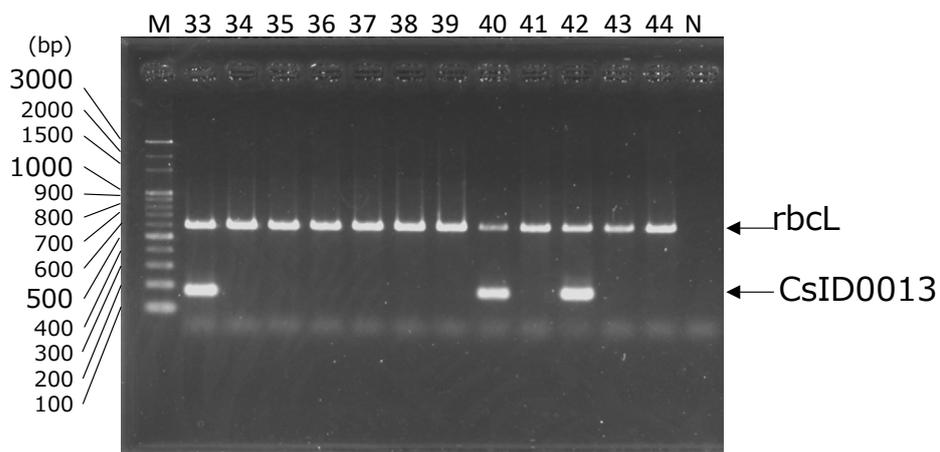
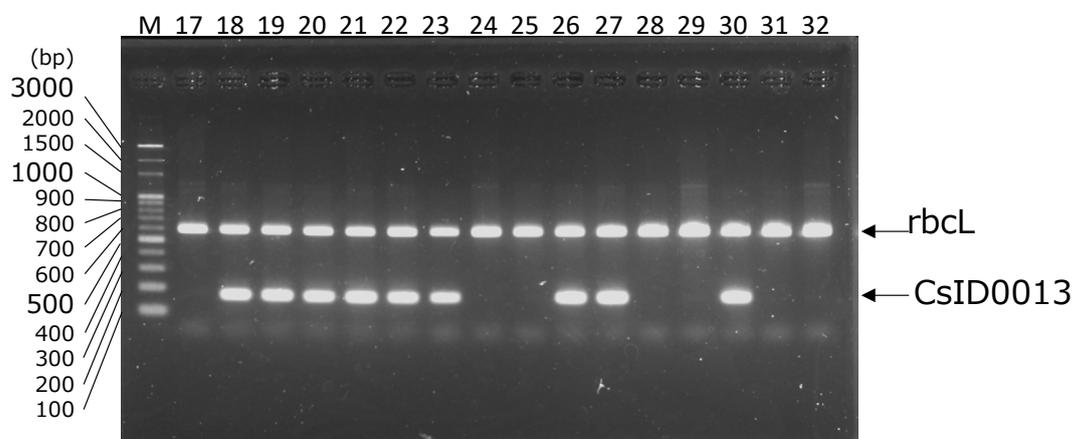
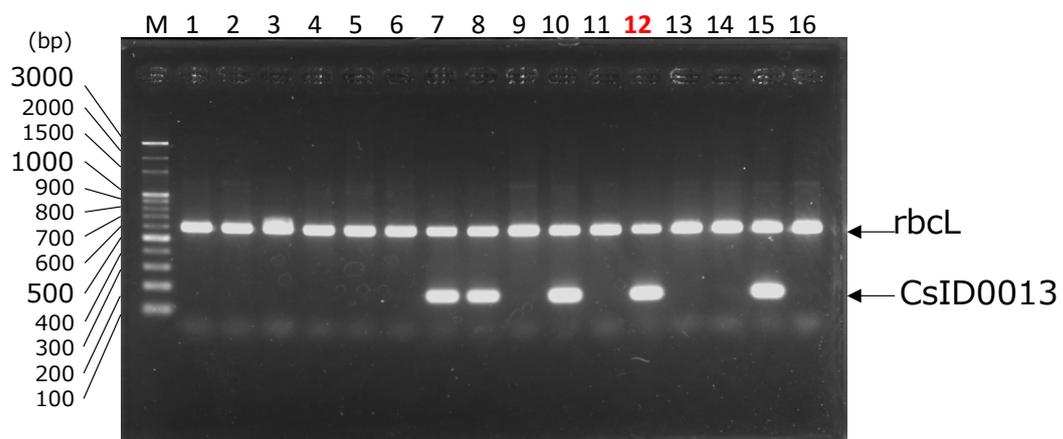


図2 CsID0013 の泳動図

M: 100bp DNA ラダーマーカー、1 から 44 のサンプルは表 1 の通り、N: ネガティブコントロール

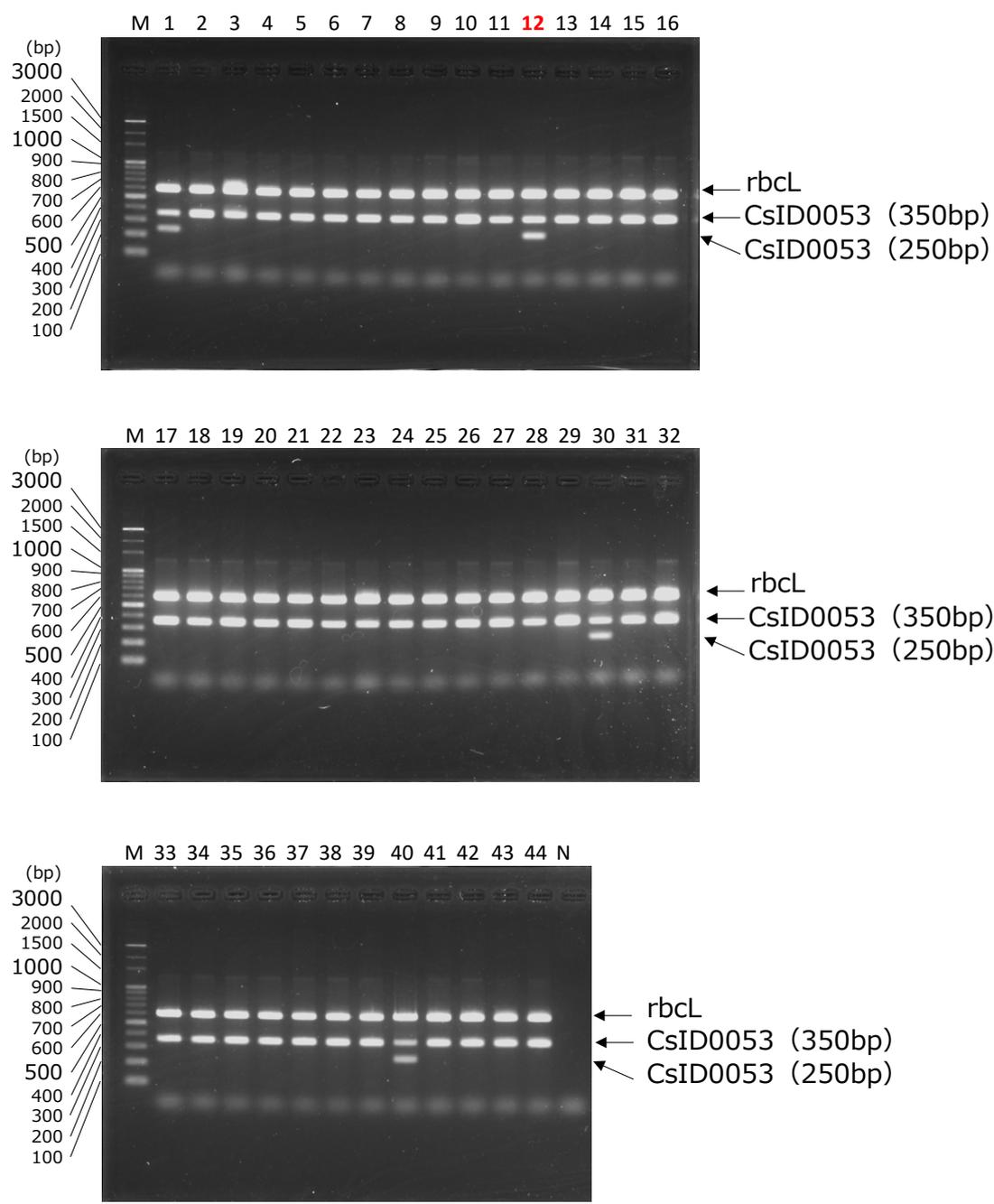


図3 CsID0053

各レーンの記号、番号については CsID0013 と同じ。CsID0053 (250bp)の有無を判定に使用する。

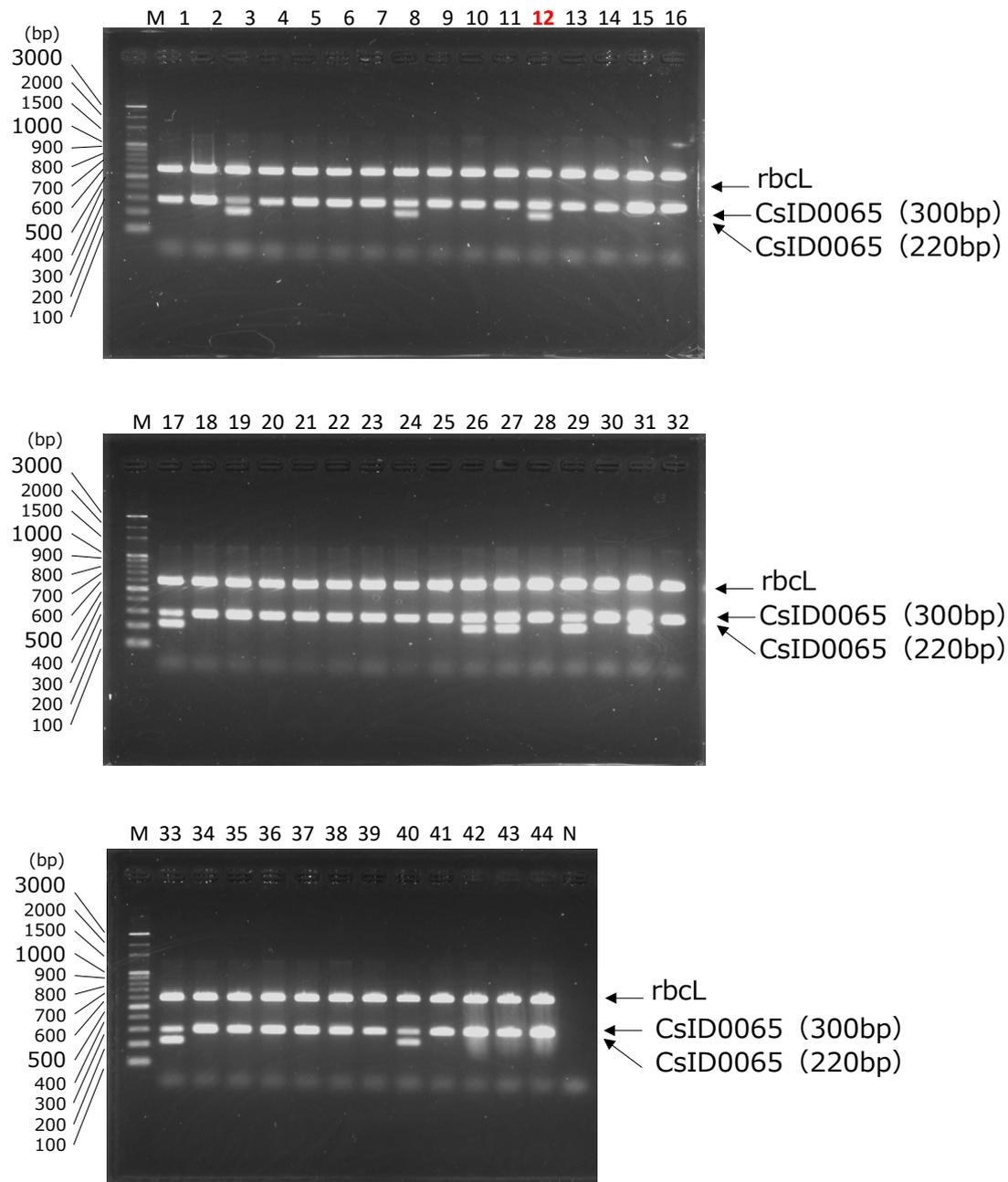


図4 CsID0065

各レーンの記号、番号については CsID0013 と同じ。CsID0065(220bp)の有無を判定に使用する。

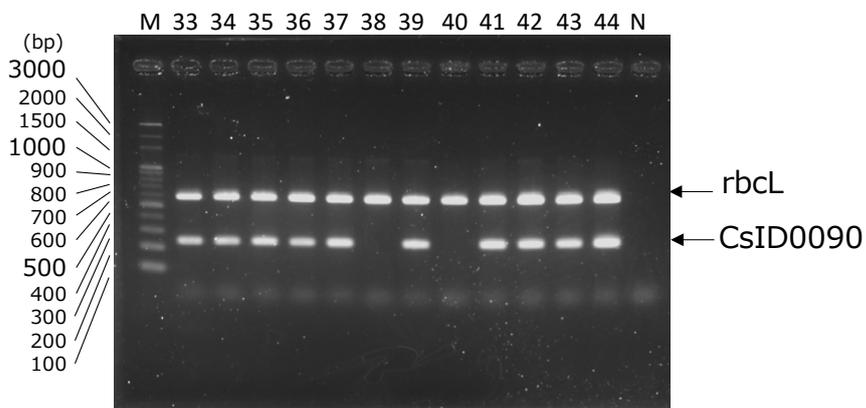
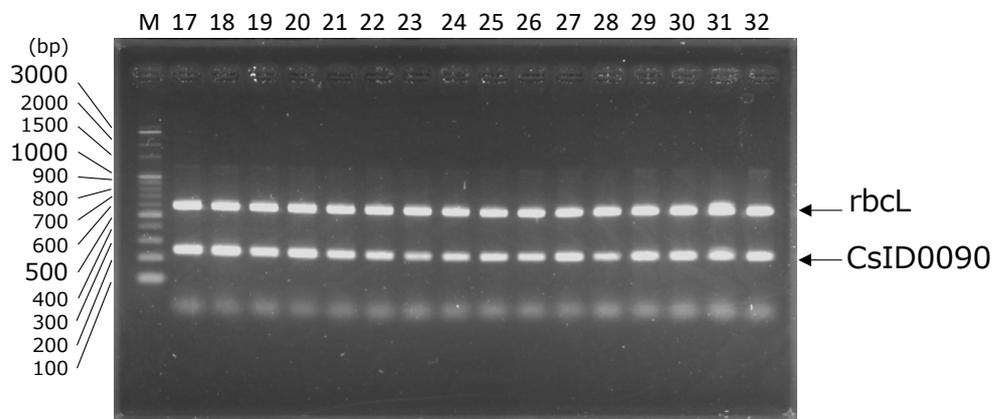
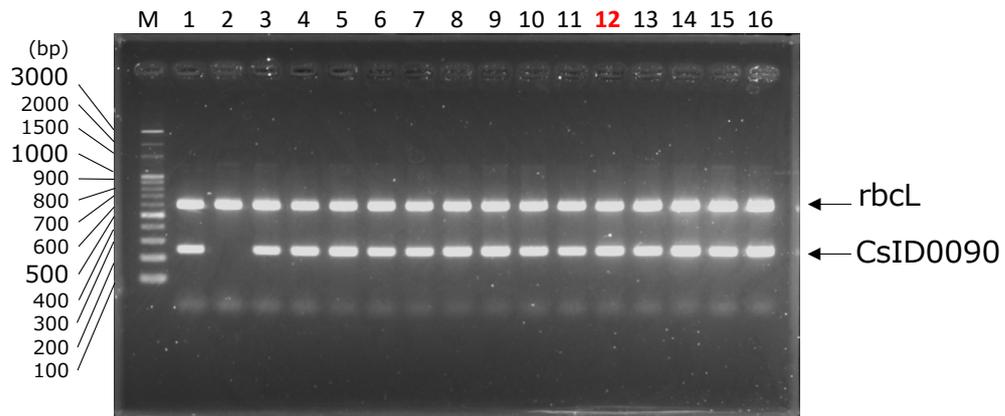


図5 CsID0090

各レーンの記号、番号についてはCsID0013と同じ。

2) トラブルシューティング

(1) PCR 反応を行っても目的のバンドが見られない。

ア 特定のサンプルにおいてポジティブコントロールの rbcL の増幅が確認できない場合は、DNA の品質が不十分である可能性が高いため、DNA 抽出をやり直す。

イ 多くのサンプルで PCR 増幅が見られない場合、プライマーが劣化している可能性があるため、凍融解を繰り返したプライマーは廃棄し、新たに調製する。

ウ 上記ア、イの対策を実施しても目的のバンドが確認できない場合は、新しい試薬に交換する。

本マニュアルの識別マークは農研機構種苗管理センターにおいて、ISO13495 に基づいた室内妥当性確認がなされています。

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、特許出願中です。

2025年3月3日 初版