

DNA 品種識別技術の妥当性 確認時の留意点



(第1版)

令和5年3月6日 制定

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

種苗管理センター

目 次

| | |
|------------------------------------|----|
| はじめに | 1 |
| 1 SSR マーカーによる分析法 | 2 |
| (1) ピークのズレ | 2 |
| (2) 対立遺伝子間の増幅差 | 3 |
| (3) スタッターバンドの基準 | 3 |
| (4) 非特異的なピークの許容範囲 | 4 |
| 2 CAPS マーカーによる分析法 | 5 |
| (1) PCR 増幅の基準 | 5 |
| (2) 制限酵素処理の再現性 | 6 |
| (3) バンドの判読基準 (サイズ差) | 6 |
| (4) バンドの判読基準 (濃淡) | 7 |
| 3 RBIP マーカーによる分析法 | 8 |
| (1) 遺伝子型判定の前提条件 | 8 |
| (2) 非特異的なバンドが見られないこと | 9 |
| (3) 偽陽性 (偽陰性) となるバンドが見られないこと | 10 |
| (4) バンドの濃淡による判読の基準 | 10 |
| 4 その他 | 11 |
| 5 謝辞 | 12 |
| 6 参考文献 | 12 |

はじめに

開発された植物の DNA 品種識別技術を依頼試験等に用いる場合、品種の遺伝子型を判定するために用いられている DNA マーカー（以下「マーカー」という。）の再現性や安定性等の妥当性が確認されていることが重要である¹⁾。再現性、安定性の確認のための国際規格としては、ISO 13495:2013「食品—特定の核酸を使用した品種識別方法の選択の原則と検証基準」において、標準サンプルの設定、分析法の再現性、安定性を確認するための室内・空間における妥当性確認のシステムが示されているが、個別の分析結果として得られるバンドパターン等の妥当性確認の視点について、技術的な観点での統一的な判定基準は示されておらず、その細部は個々の分析技術者の経験に頼らざるを得ない状況にある。このような状況の改善の一助として、農業・食品産業技術総合研究機構（以下「農研機構」という。）では、これまで種苗管理業務で実装するために実施してきた DNA 品種識別技術の妥当性確認のプロセスで得られた知見を以下に取りまとめ、公開することとした。

なお、本文書に従った妥当性確認を実施する前段においては、確認の対象となる分析手順（使用するマーカー、試薬、サンプル調製の手順等を含む）について十分な予備試験を行い、PCR による増幅や、遺伝子型の判定に支障がないマーカー及び試験方法が整っていることが前提条件となる。

なお、DNA 品種識別技術については、近年の技術革新により、次世代シーケンサ等の適用等も可能となってきているが、本文書では、これまで農研機構で主に用いられている以下の 3 つの DNA 分析手法について、マーカーの妥当性を判定する基準を示す。

- ・ SSR（Simple Sequence Repeat）マーカーによる分析法
- ・ CAPS（Cleaved Amplified Polymorphic Sequence）マーカーによる分析法
- ・ RBIP（Retrotransposon Based Insertion Polymorphism）マーカーによる分析法

1 SSR マーカーによる分析法

SSR マーカーによる分析法は、2~6 塩基を単位とした特定の配列の反復数の差によって多型を検出する方法である。1~数十塩基程度の僅かな増幅産物長の違いを確認するために、DNA シーケンサのフラグメント解析機能を用いて PCR による増幅産物長の違いを検出する。解析結果は図 1 のような波形図で示され、増幅産物がピークで表示される²⁾。品種を識別するためには、複数マーカーの結果を組み合わせる必要がある。

個別のマーカーごとに出現するピークを網羅した基準物（スタンダードセット）と比較することで、供試品種の遺伝子型の判定を行っている^{3),4),5),6),7)}。

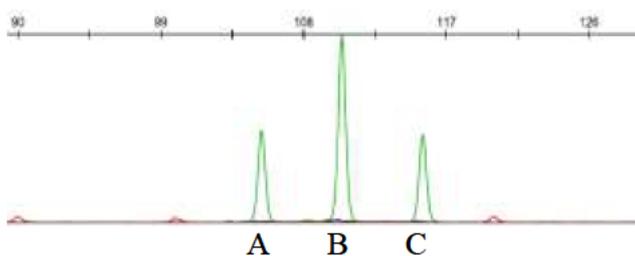


図 1. スタンダードセット[※]の波形図の例

※ 開発者が設定した基準となる単一又は複数の品種について、マーカー毎に PCR による増幅後の産物を混合して作成する標準サンプル³⁾。供試品種の遺伝子型判定の基準とするため、基準となる個々の標準サンプルの保存、作成した混合物（スタンダードセット）の保管に注意を要する。

(1) ピークのズレ

同一のロットで解析した場合でも、解析した品種間で僅かなピークのずれが生じることがある。スタンダードセットと比較して 1.0bp 以上のずれ ($\pm 0.5\text{bp}$) は別のピークと判定し、別ピークの見られるマーカーは妥当性なしと評価する⁸⁾。

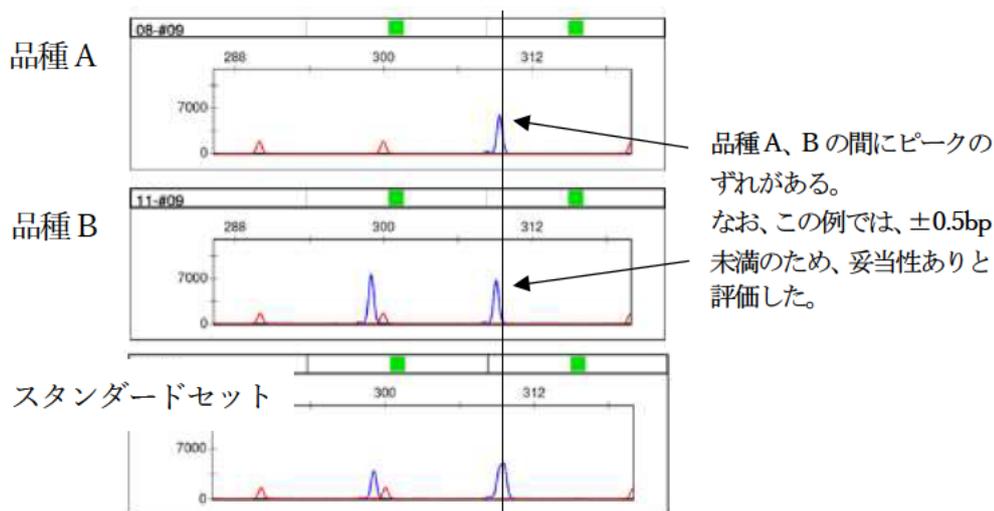


図 2. スタンダードセットとのピークのズレが見られる波形図の例

(2) 対立遺伝子間の増幅差

SSR マーカーにより増幅される対立遺伝子は、共優性であるためピークの高さは概ね倍数性が反映される。例えば、2倍体の品種において近い分子量にピークが2本出た場合、両ピークは概ね同じ高さで出現する。しかしながら、まれに倍数性と一致しない増幅差が生じる場合があり、倍数性及び事前に解析した遺伝子型を考慮した上で、このようなマーカーは妥当性なしと評価する⁹⁾。

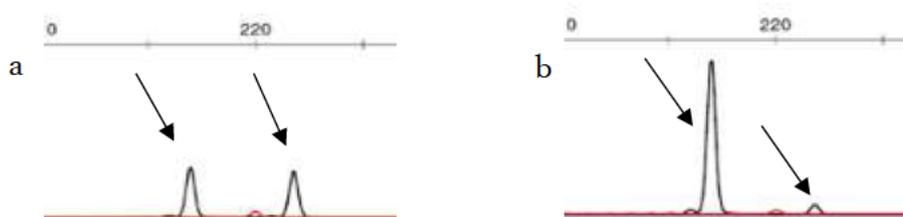


図3. 対立遺伝子間で増幅の差異がない波形図 (a) と増幅差が大きい波形図 (b)

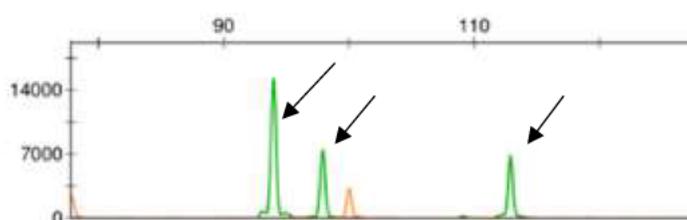


図4. 対立遺伝子の構成が2:1:1の4倍体品種の波形図

ピークの高さが2:1:1になっており、対立遺伝子の構成と一致している。

(3) スタッターバンドの基準

スタッターバンドは、PCRによる増幅の際に発生する本来の位置からずれたピークであり、正確な遺伝子型の判定を困難とする(図5)。目的とするピークとスタッターバンドの誤判定防止のため、その品種で確認された目的とするピークの高さと比べて、スタッターバンドの高さが1/10以下であることを妥当性の評価基準として運用している(図6)。そのため、図5のように本来のピークの1/10より高いスタッターバンドが見られるマーカーは妥当性なしと評価する⁹⁾。

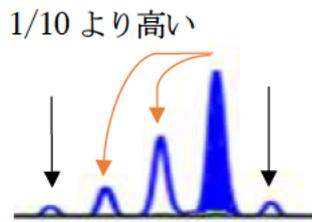


図5. 許容できないスタッターバンドの波形図の例
 青塗部が本来のピーク、矢印部がスタッターバンドを示す。橙矢印で示すピークが見られるマーカーは、妥当性なしと評価する。なお、黒矢印で示すピークは1/10 以下のため、妥当性の評価には影響しない。

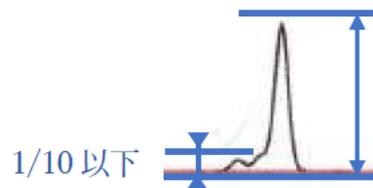


図6. 許容するスタッターバンドの波形図の例

(4) 非特異的なピークの許容範囲

スタッターバンド以外の非特異的な増幅とみられるピークについても、その隣接するピークの1/10 より高いピークであればそのマーカーは妥当性なしと評価する。

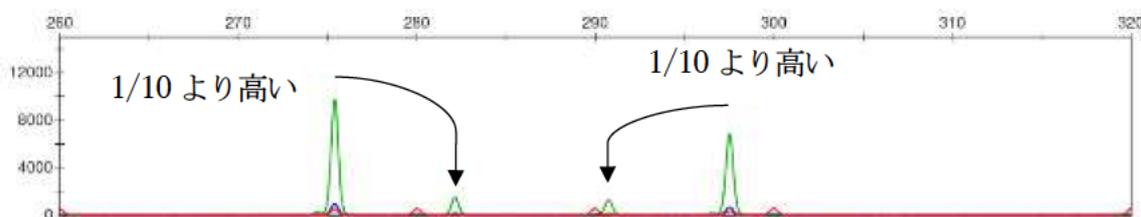


図7. 妥当性なしと評価する非特異的なピークの見られる波形図の例

2 CAPS マーカーによる分析法

CAPS マーカーによる分析法は、目的とする領域を PCR により増幅した後、特定の塩基配列を認識して DNA を切断する制限酵素でその産物を処理することによって多型を検出する方法である。目的とする PCR 増幅産物の特定の配列が品種によって異なり、制限酵素で切断した後の産物長の違い（遺伝子型）を、アガロースゲル等を用いた電気泳動により確認する²⁾。品種を識別するためには、複数マーカーの結果を組み合わせる必要がある^{10), 11), 12)}。

なお、PCR 増幅時において非特異的な増幅産物があると、その後の遺伝子型判定で誤判定につながりかねない。このため、PCR 増幅産物を電気泳動し、目的外のバンドがないことを確認している。

(1) PCR 増幅の基準

図 8a, b は、妥当性があると評価したマーカーによる PCR 増幅産物及び制限酵素処理後の電気泳動像である。PCR 増幅時（図 8a）に目的外のバンドが確認されていない。

図 8c, d は、妥当性がないと評価したマーカーによる PCR 増幅産物及び制限酵素処理後の電気泳動像である。遺伝子型を判定するバンドの位置及びその近傍に PCR 増幅の段階（図 8c）で非特異的なバンドが出現しているため、このマーカーは妥当性なしと評価する。

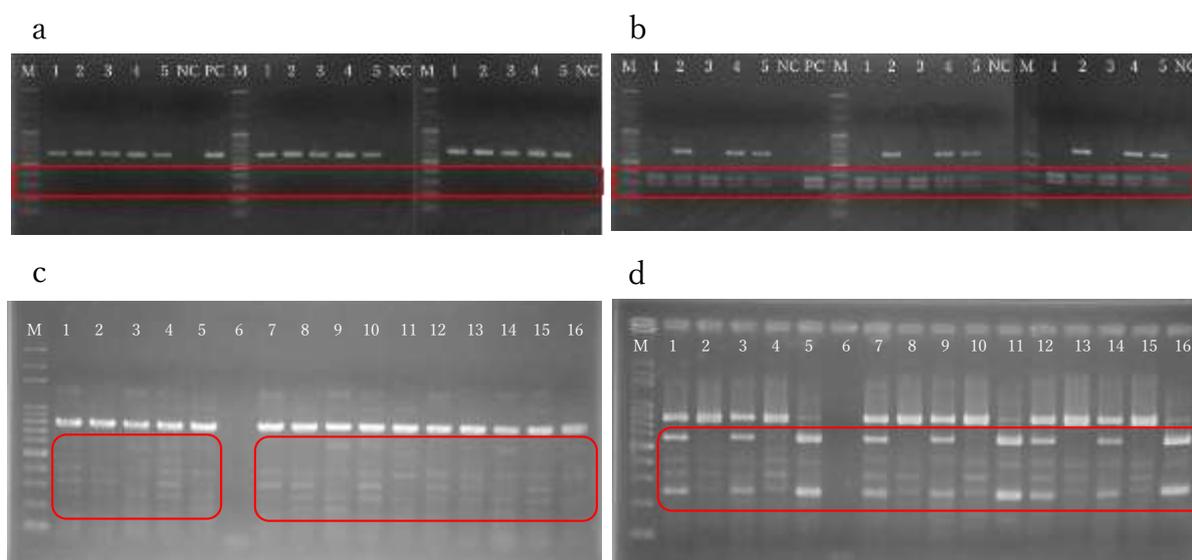


図 8. 妥当性ありと評価するマーカー (a, b) 及び妥当性なしと評価するマーカー (c, d) における PCR 増幅時(a, c)及び制限酵素処理後(b, d)の電気泳動像の比較

※赤枠は制限酵素処理後に遺伝子型を判定するバンドが出現する位置を示す。

(2) 制限酵素処理の再現性

開発者が実施した試験では制限酵素処理結果が明瞭であるが (図 9a)、別の試験室での試験では、制限酵素処理の結果が不明瞭で、切れ残りと思われるバンドが出現する場合には (図 9b)、開発者からの意見を聞いた上で試薬等を変更して再度試験を実施する。試薬等を変更してもなお、このような状態が確認されるマーカーは妥当性なしと評価する。

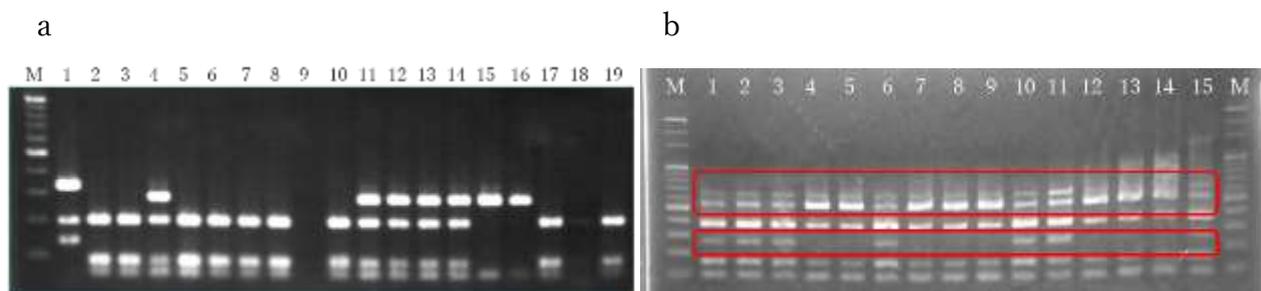


図 9. 開発元(a)及び別の試験室(b)における制限酵素処理後の電気泳動像の比較

(3) バンドの判読基準 (サイズ差)

遺伝子型を判定するバンドは、検出される場所が視覚的に異なっていることが求められる。例えば、図 10 では、遺伝子型を判定するバンドがサイズの異なる 2 本と明確に視認できるため、このマーカーは妥当性ありと評価する。



図 10. サイズの異なる 2 本のバンドと明確に視認できる制限酵素処理後の電気泳動像の例

(4) バンドの判読基準（濃淡）

図 11 は、同一の試験過程において、制限酵素処理後の電気泳動像を比較したものである。一方のマーカ（図 11a）では、赤枠で囲った部分はバンドなしと判定している。しかし、他方のマーカ（図 11b）では、赤枠で囲った部分は図 11a の赤枠部と同程度の濃度であるがバンドありと判定している。このように同一の試験過程でバンドの有無を判定する濃度に矛盾が生じることは避けるべきである。遺伝子型を判定するバンドの濃度の基準は、ひとつの試験過程で統一されている必要がある。

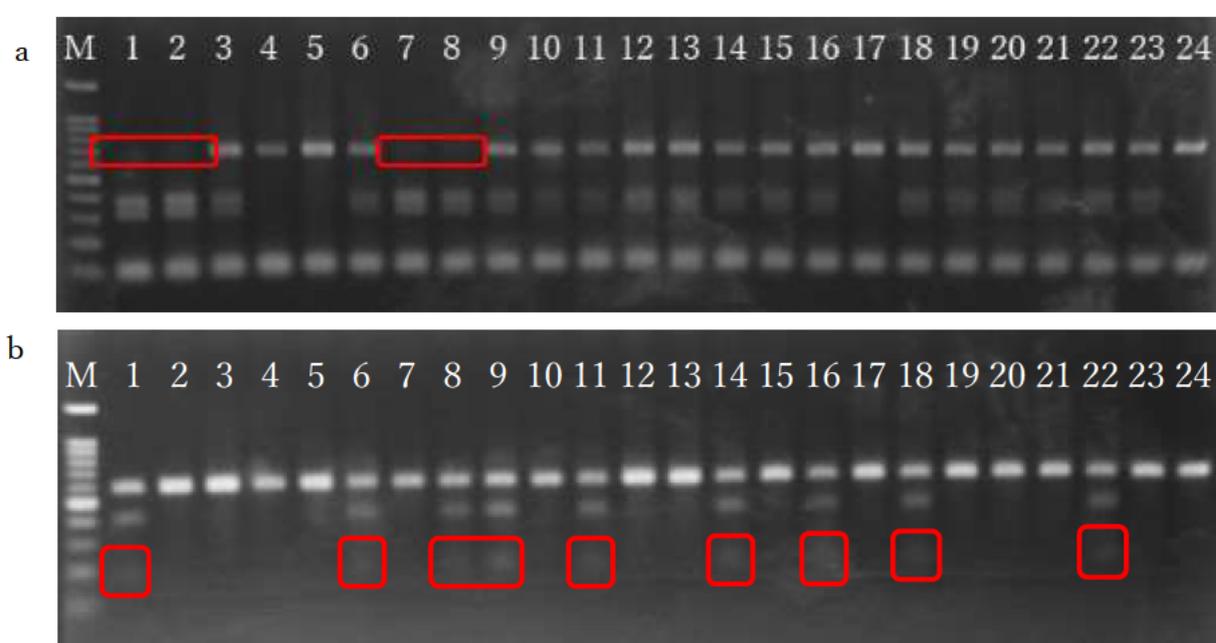


図 11. 同一の試験過程における制限酵素処理後の電気泳動像の比較例

3 RBIP マーカーによる分析法

レトロトランスポゾンとは、真核生物のゲノム内に存在する可動遺伝因子であり、コピーアンドペースト型の複製を行う。その複製配列はゲノム上に散在し、ゲノム内に挿入された後は安定的に遺伝する。RBIP マーカーによる分析法は、レトロトランスポゾンの複製配列の有無により多型を検出する方法である。具体的には、PCR による増幅産物を電気泳動し目的とするバンドの有無を判定する²⁾。品種を識別するためには、複数マーカーの結果を組み合わせる必要がある。

バンドの有無のみで遺伝子型を判定することから、PCR による増幅の成否が確認できる必要がある。このため、目的バンドを増幅するプライマーだけでなく、目的とする植物の DNA があれば確実に増幅が確認できるプライマー（陽性コントロール）を各サンプルに混合して反応させている^{2),13)}。

なお、過去に実施した妥当性確認において、陽性コントロールよりさらに大きい非特異的増幅産物は、目的とする増幅産物とは視覚的に明確に異なるため、妥当性の評価には影響しないと判断していた。しかしながら、その後の情報収集の結果、刑事事件の裁判の証拠として用いる場合、判定に疑義が生じる部分を徹底的に排除する必要があると考えられたことから、今後の妥当性の評価は以下の基準で行うこととした。

(1) 遺伝子型判定の前提条件

図 12a のように、陽性コントロールの増幅が安定している状態で、供試品種の遺伝子型を判定する。

図 12b のように、ターゲットとするバンドの増幅は見られているが、陽性コントロールの増幅濃度が不均一の場合、目的とするバンドの増幅に対しても疑義が生じるおそれがあるため、遺伝子型の判定は行わない。このように、複数のマーカーを組み合わせる場合、用いるマーカーの増幅が不均一となる分析手法は避け、目的産物と陽性コントロールの双方が安定して確認できないマーカーは妥当性なしと評価する。

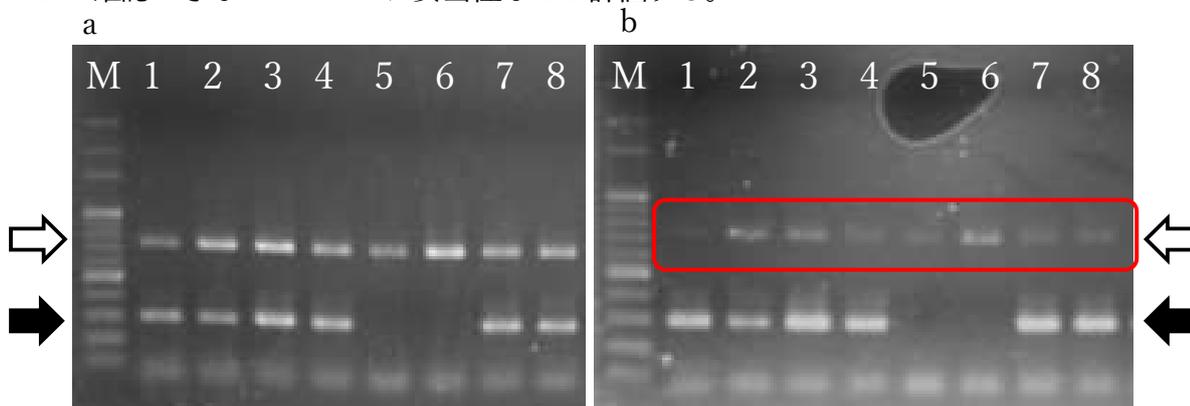


図 12. 陽性コントロールが安定している電気泳動像(a)及び不均一な電気泳動像(b)の比較
白矢印は陽性コントロールを、黒矢印は目的とするバンドを示す。

(2) 非特異的なバンドが見られないこと

目的以外のバンドが生じた場合、現象としての説明は可能であるが、このバンドが何に由来するものなのか、真に多型とは別のものであるか断言はできない。このため、品種の識別に用いるマーカーは、確認される位置によらず、目的以外の非特異的なバンドが見られないことを原則とする。

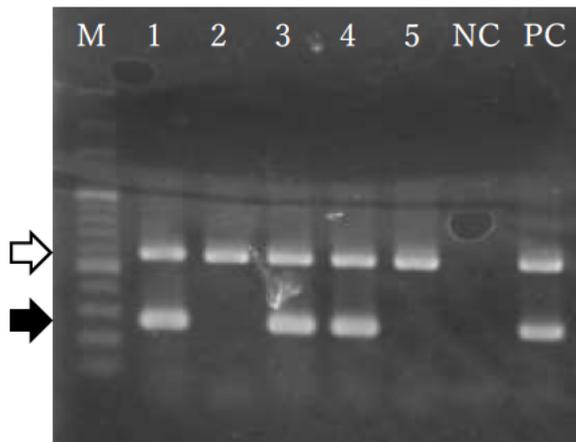


図 13. 妥当性ありと評価する電気泳動像の例

白矢印は陽性コントロールを、黒矢印は目的とするバンドを示す。

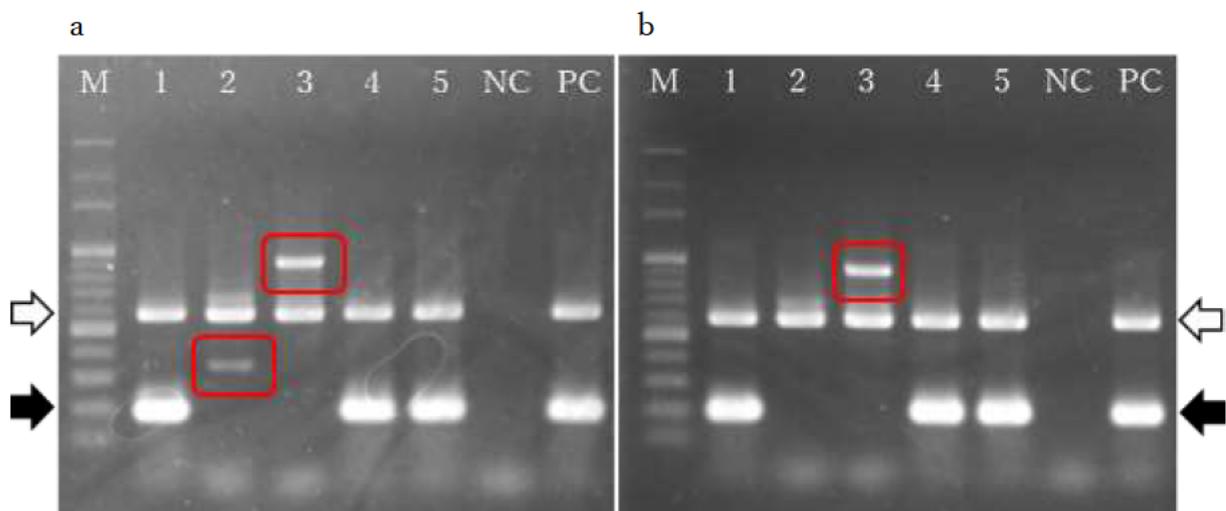


図 14. 妥当性なしと評価する電気泳動像(a,b)の例 (非特異的なバンド)

白矢印は陽性コントロールを、黒矢印は目的とするバンドを示す。

赤枠内は、妥当性がないと評価する要因となる、非特異的なバンドを示す。

(3) 偽陽性（偽陰性）となるバンドが見られないこと

目的とするバンドの位置やその近傍に目視できるバンドが見られないことが求められる。これは、(4) の条件とも関係する。

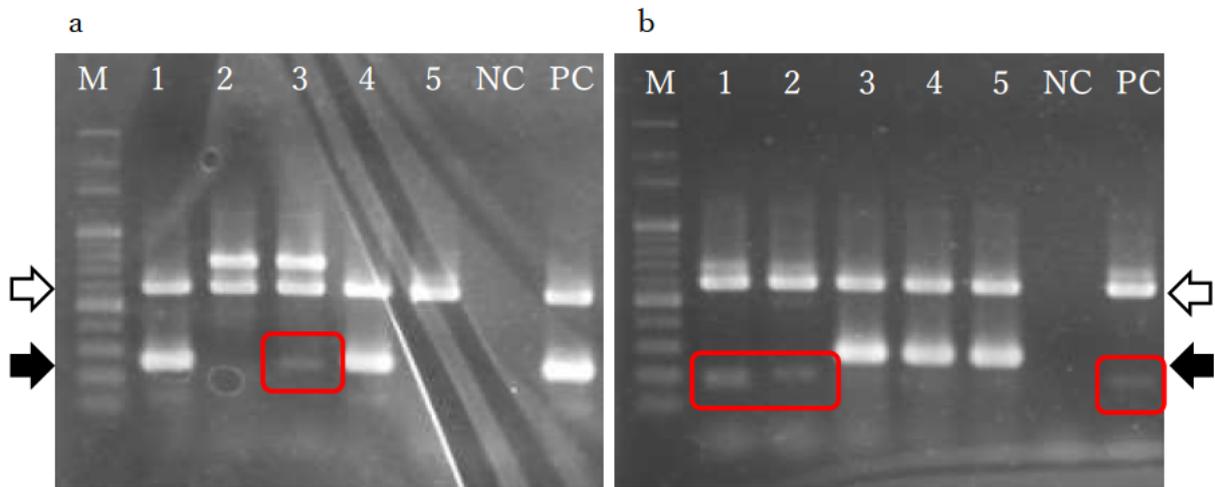


図 15. 妥当性なしと評価する電気泳動像(a,b)の例（偽陽性のおそれがあるバンド）
白矢印は陽性コントロールを、黒矢印は目的とする増幅産物を示す。
赤枠内は、妥当性がないと評価する要因となるバンドを示す。

(4) バンドの濃淡による判読の基準

2 (4) でも述べたとおり、遺伝子型を判定するバンドの濃度の基準は、ひとつの試験過程で統一されている必要がある。同一の試験過程でほぼ同一の濃度のバンドを、一方のマーカ―では「有」と判定し、他方のマーカ―では「無」と判定すると、恣意的な結果であると結論づけられるおそれがある。このため、各マーカ―で判定するバンドの濃度は同程度であることが求められる。

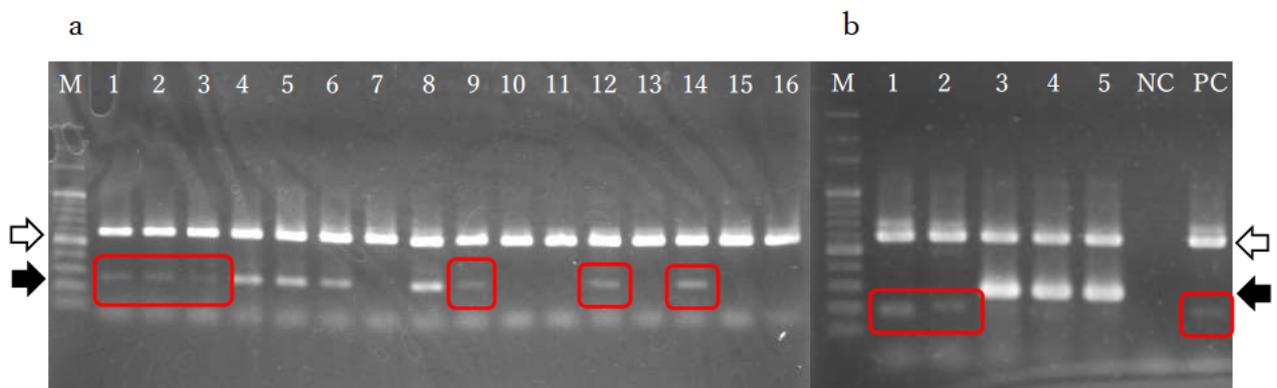


図 16. 同一の試験過程での電気泳動像の比較例

白矢印は陽性コントロールを、黒矢印は目的とする増幅産物を示す。

※図 16a 赤枠内のバンドを全て「有」とする場合には、図 16b 赤枠内も「有」とすべきである。

4 その他

妥当性確認を行った際の実験の記録は、後年の検証に対応するため、長期間の保管を行うこととしている。どのような者がみても正しく結果を判定できるようにするため、図17~20のような画像の乱れ（画像の歪み、ハレーション等）は避け、電気泳動像やフラグメント解析の波形図等は鮮明な結果を得る必要がある。それらの問題に対応するためには、日頃から実験器具等の不具合の確認・改善や実験操作における基本的な留意事項を遵守することが大切である。

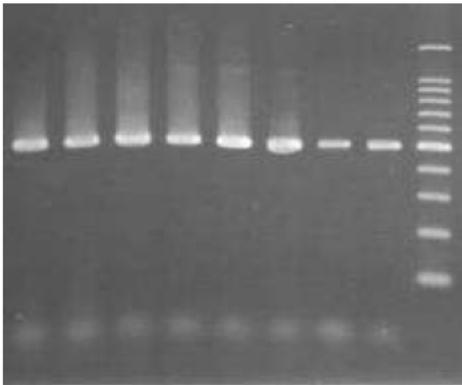


図17. スマイリングした電気泳動像
(電気泳動のバンドに歪みがみられる)

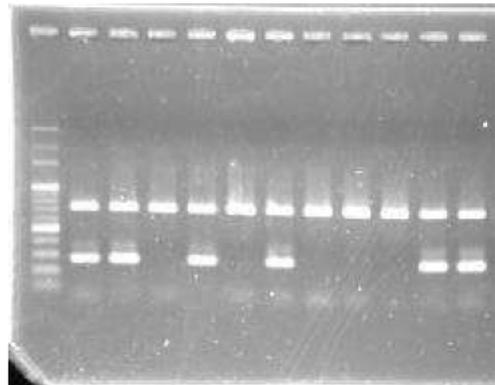


図18. ハレーションを起こした電気泳動像
(光が強すぎてバンドや画面が白くぼやけたり濁ったりしている)

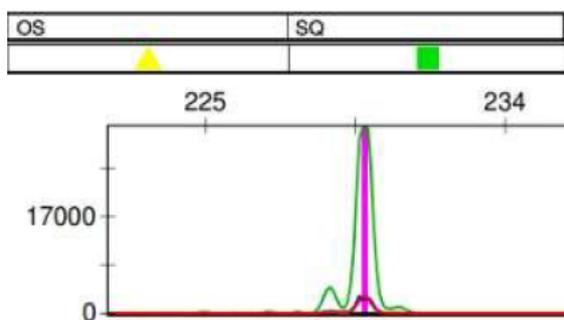


図19. ピークが振り切った波形図
(目的産物(緑色)のピークが高すぎ、他の蛍光色素(赤色や青色)の結果にも影響がみられる)

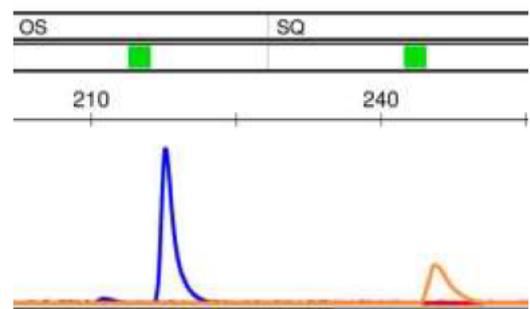


図20. テーリングした波形図
(ピークの後ろ側が間延びしている)

5 謝辞

本文書の作成にあたり、多くのご助言をいただいた農研機構本部知的財産部山本俊哉知財・育成者権管理役兼育成者権管理課長をはじめ、果樹茶業研究部門果樹品種育成研究領域果樹茶育種基盤グループ及びカンキツ研究領域カンキツ品種育成・生産グループの皆様感謝の意を表します。

6 参考文献

- 1) 知財高判平成 27 年 6 月 24 日裁判所 Web サイト (平成 27 年(ネ)10002 号).
- 2) 藤井浩, 東暁史, 伊藤剛, 大村三男, 國久美由紀, 島田武彦, 立木美保, 奈島賢児, 西谷千佳子, 沼寿隆, 宮本真理. 2016. 果樹研究のバイオインフォマティクス. 60-74.
- 3) 成田知聡, 丹羽優治, 大崎学, 寺上伸吾, 國久美由紀, 齋藤寿広, 西谷千佳子, 山本俊哉. 2014. 新たな SSR マーカーを用いた日本なし DNA 品種識別技術の開発と試験室内妥当性確認. DNA 多型. 22: 74-76.
- 4) 農研機構. 2018. ブドウ 24 品種の DNA 品種識別技術 - SSR マーカーによるブドウ 24 品種の DNA 品種識別技術 -. <https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/files/ncss_budou24_shikibetsu_manual.pdf>.
- 5) 農研機構. 2021. ブドウ 24 品種の DNA 品種識別技術 - SSR マーカーによるブドウ 24 品種の果実の DNA 品種識別技術 -. <https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/files/budou24_shikibetsu_manual2nd.pdf>.
- 6) 農研機構. 2021. SSR マーカーによるリンゴ 47 品種・系統の DNA 品種識別技術 第 2 版. <https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/files/nifts_ringo_shikibetsu_20210325.pdf>.
- 7) 農研機構. 2021. 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 -. <https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/files/nifts_cha_shikibetsu20210325.pdf>.
- 8) (独)種苗管理センター. 2008. DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン - SSR を中心として -. 32-35.
- 9) 押野秀美, 國久美由紀, 寺上伸吾, 西谷千佳子, 森谷茂樹, 岡田和馬, 阿部和幸, 山本俊哉. 2014. 新たな SSR マーカーセットを用いたリンゴの DNA 品種判別技術の開発. 園芸学研究. 13 (別 2) : 335.

- 10) 農研機構. 2007. 参考資料1: DNA マーカー (CAPS 法) によるイチゴ品種識別マニュアル. 農林水産省品種登録ホームページ. <http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_manual/san01.pdf>.
- 11) 農研機構. 2019. カンキツ 22 品種の DNA 品種識別技術マニュアル— CAPS マーカーによるカンキツ 22 品種の DNA 品種識別技術—. <https://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/130601.html>.
- 12) 農研機構. 2022. CAPS マーカーによるカンキツ 24 品種の果実の DNA 品種識別技術. <https://www.naro.go.jp/collab/breed/files/nifts_kankitsu_shikibetsu20220617.pdf>.
- 13) 成田知聡, 後藤洋, 木村鉄也, 奈島賢児, 押野秀美, 國久美由紀, 寺上伸吾, 西谷千佳子, 山本俊哉. 2016. 品種識別技術のマニュアル化とその妥当性評価について. DNA 多型. 24: 108-111.