

CAPS マーカーによるカンキツ 22 品種の
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

2019 年 3 月 29 日 初版

－ 目 次 －

1	はじめに	1
2	一般的注意事項及びDNA抽出法について	4
3	CAPSマーカーを用いたPCR反応	4
4	アガロースゲル電気泳動による増幅断片の確認	7
5	制限酵素処理による増幅断片の消化	7
6	アガロースゲル電気泳動による多型の検出	8
7	遺伝子型判定とトラブルシューティング	9
	(1) 判定	
	(2) トラブルシューティング	
	参考資料 各マーカーで得られる電気泳動像	参-1

1. はじめに

カンキツは、ミカン科ミカン亜科のミカン属(*Citrus*)、キンカン属(*Fortunella*)およびカラタチ属 (*Poncirus*) 等に属する植物の総称である。このうち、常緑果樹として食用に用いられるのはミカン属とキンカン属の一部とされている。日本では、生食、ジュース用として「ウンシュウミカン」(*Citrus unshiu*)や「オレンジ」(*Citrus sinensis*)、香酸カンキツとして、香味や食酢用として「レモン」(*Citrus limon*)や「ユズ」(*Citrus junos*)などが利用されている。

日本でのカンキツの栽培は、総栽培面積 66,348.5 ha である(図 1、大臣官房統計部生産流通消費統計課「平成 27 年耕地及び作付面積統計」(2016 年 2 月 26 日公開) および農林水産省生産局園芸作物課「平成 27 年産 特産果樹生産動態等調査」(2018 年 2 月 20 日公開) から作成)。平成 27 年産の品種およびグループ別栽培面積では、「ウンシュウミカン」が 67.2%、「不知火」が 4.4%、「イヨ」が 3.7%、「ユズ」が 3.3%、「ポンカン」が 2.7%と続いている。特に、「ウンシュウミカン」はその他のカンキツ類より品種数が非常に多く、枝変わり等により幅広い収穫時期や優良な着色系が確立された品種によって構成されている。一方、「ウンシュウミカン」以外のカンキツはそれぞれの種内では品種数は多くないものの、上記農林水産省でデータ収集されている種は在来種や種間交雑等により 87 種類に及んでいる。

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、果樹茶部門)が育成した「不知火」は、育成品種としては 40 年ほど前に開発されたものの、平成 27 年度の栽培面積が 2,916.3ha と現在においても多くの生産地で広いシェアを誇る。近年では「みはや」、「あすみ」などの糖度が高く、「ウンシュウミカン」と同等の β -クリプトキサンチン含有量を特性とする品種が育成され、平成 26 年 9 月 30 日に品種登録されるとともに、農林水産省の補助事業を利用して海外出願もされている。これらの優良な登録品種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、侵害対策の有用な技術である。また、この技術は、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の利用も考えられ、消費者に対する食の安全・安心の確保や国内のカンキツ生産を侵害物品から守るためにも有用であると考えられる。

これまでに、果樹茶部門は、制限酵素処理により配列差を検出する Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) マーカーを 9 種類用いて、主要なカンキツ品種を含む 33 品種・系統の識別する技術について報告している(二宮ら、2015)¹。また、19 種類の CAPS マーカーを用いて、果樹茶業研究部門で育成された交雑品種を中心に 59 品種を識別する技術を報告している(Nonaka et al., 2017)²。CAPS マーカーの利点としては、安定な結果が得られやすく、実験担当者やサン

ブルの状態、DNA 抽出方法などによって結果が左右されにくいことや、手法も比較的シンプルで、DNA シーケンサなど高価な解析装置や高度な技術が必要ないことから、様々な検査機関で容易に取り組めることが挙げられる（イチゴ品種識別マニュアル、2007）³。

そこで、上記報告および Shimada ら(2014)⁴が開発した 708 個の CAPS マーカーと、その研究過程で開発した未公表となっている CAPS マーカーの中から正確な遺伝子型の判定が可能等の条件でマーカーを絞り込み、12 種類の CAPS マーカーによるカンキツ 22 品種の DNA 品種識別技術を作成した。

¹ 二宮 泰造、島田 武彦、遠藤 朋子、野中 圭介、大村 三男、藤井 浩(2015) CAPS マーカーによるカンキツの品種識別法の開発と親子鑑定. 園学研、14(2):127-133.

² Nonaka, K., H. Fujii, M. Kita, T. Shimada, T. Endo, T. Yoshioka, M. Omura (2017) Identification and parentage analysis of citrus cultivars developed in Japan by CAPS markers.

The Horticulture Journal 86 (2): 208-221. DOI <https://doi.org/10.2503/hortj.OKD-026>.

³ DNA マーカー（CAPS 法）によるイチゴ品種識別マニュアル(2007)

⁴ Shimada, T., H. Fujii, T. Endo, T. Ueda, A. Sugiyama, M. Nakano, M. Kita, T. Yoshioka, T. Shimizu, H. Nesumi, Y. Ikoma, T. Moriguchi and M. Omura. (2014) Construction of a citrus framework genetic map anchored by 708 gene-based markers. Tree Genet. Genom. 10: 1001-1013. DOI 10.1007/s11295-014-0738-9.

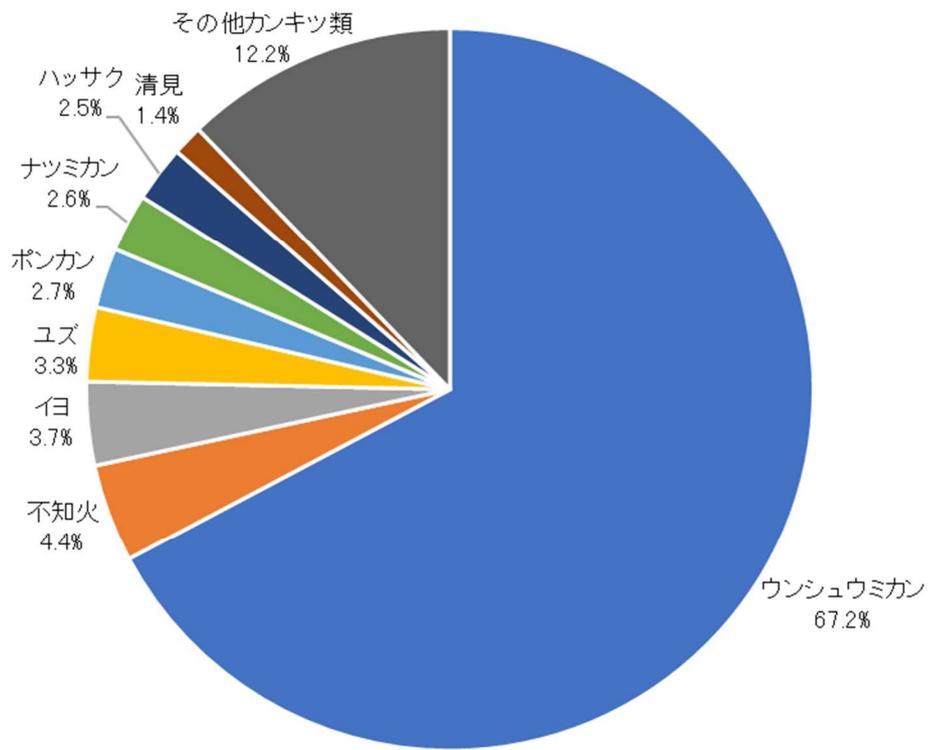


図1 カンキツの品種別栽培面積（平成27年産）
 総栽培面積 66,348.5 ha

2. 一般的注意事項及び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(http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_meeting/H20_2nd/guideline.pdf)＞を参照のこと。

3. CAPSマーカーを用いたPCR反応

バンドの検出や遺伝子型の判定が容易なことを条件として絞り込んだ、12 種類の CAPS マーカーを用い 22 品種について PCR 反応を行う。PCR 反応条件は、遺伝子型の誤判定を避けるため、非特異的なバンドの出現を抑制する温度調整を施したプロトコールである。

＜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/ Applied Biosystems 社、以下 ABI 社と記載）、キャップまたはフルプレートカバー（ABI 社）、サンプル DNA 溶液（10ng/μl に調製したもの）、AmpliTaq Gold（ABI 社）、10×PCR buffer (II)（AmpliTaq Gold 付属）、2mM dNTPs mix（AmpliTaq Gold 付属）、MgCl₂ 溶液（AmpliTaq Gold 付属）、1/10TE バッファー、滅菌超純水、CAPS 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 10pmol/μl 含む溶液、1/10TE バッファーで希釈）、PCR システム GeneAmp PCR System 9700（ABI 社）など

＜用いた CAPS マーカー＞

それぞれの CAPS マーカーについて、マーカー名、フォワードプライマーとリバースプライマーの塩基配列、ターゲットサイズ、座乗染色体番号を、表 1 に掲載した。

＜本マニュアルで識別可能なカンキツ 22 品種・系統＞

「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）」、「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（興津 60 号（おきつ 60 ごう）」、「麗紅（れいこう）」、「津之輝（つのががやき）」、「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))」。

表 1 CAPSマーカー

マーカー名	フォワードプライマー(5'-3') リバースプライマー(5'-3')	座乗 染色体 番号	増幅サイズ (bp)	制限酵素	buffer	反応温度
Bf0036-2	CAGGTTTCTTTGTTAGCATATTGCC CTGTGTGGATCAAAATGGTTCGT	1	660	Msp I	M	37°C
Bf0158-3	AAAAAGCATTACAGAGGAGTTCGAC GGAAATTCATTAACCGTATCCGCA	3	352	Pvu II	M	37°C
Tf0001	AAAAAGTTCACAAAGTACGAGGG AGCAATCCTTGAGAAATACGCA	3	650	Msp I	M	37°C
Tf0150	ACAGAAGAGGCCACAATCT TTTCTCAGCTAAAAGCGTCAC	8	489	Hinf I	H	37°C
Tf0271	AGTTATCCAAACGGAAATCT CATGGCAATACTTTGAGTTC	6	720	Rsa I	M	37°C
Tf0300	GCTGCGATTAGGGTTGC TAAACAATATCCACCGGAACAT	3	741	Dra I	M	37°C
Tf0419	GGTGATGAGAAAGCCAACTTAT ATCTTGATCATGGCGAAAT	3	644	Pvu II	M	37°C
Tf0420	TGGAGGCCATTTCTTATTAGA CTCTGACCCACGGGATCA	3	444	Hae III	M	37°C
Bf0158-2	TCCGAGATCTACCCGGAGAGGCGT GCGATAACGGCGACAGTAGAG	3	399	Pvu II	M	37°C
IF0208	AAATATTTCTGCGAATCACTGA GCAAAACACACCAAGGA	5	545	Hinf I	H	37°C
Tf0318	GACGACTACGGTACTACTAC ACAGCCAGGAACAAGCTTT	4	579	Hinc II	M	37°C
Tf0386	GACAAAGAAAATTACTATACGG GGAAATCAACCATGAGTGACA	6	469	Msp I	M	37°C

<基本操作>

(1) 以下のように PCR 反応液を調製する。

試薬名	分量
10×buffer (II)	1.0 μl
MgCl ₂	1.0 μl
dNTPs	0.8 μl
CAPS プライマー溶液	0.5 μl
AmpliTaq Gold	0.1 μl
滅菌超純水	5.6 μl
サンプル DNA 溶液	1.0 μl
計	10.0 μl

(2) PCR システム GeneAmp PCR System 9700 などを用いて、以下のプログラムで、PCR 反応を行う。

94°C 5分	
94°C 30秒	} 各1サイクル
62, 60°C 30秒	
72°C 1分	
94°C 30秒	} 2サイクル
58°C 30秒	
72°C 1分	
94°C 30秒	} 30サイクル
56°C 30秒	
72°C 2分	
72°C 7分	
4°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3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増幅産物に異常がないか確認する。

<準備するもの>

96穴PCRプレート(ABI社)又は滅菌済みテストプレート、8連キャップ(ABI社)又はプレートシール、アガロース(ニッポンジーン社)、50×TAE(ニッポンジーン社)、Loading Dye(×6又は×10)、100bp DNAラダーマーカー(バイオメディカルサイエンス社)、エチジウムブロマイド(EtBr)溶液(10 mg/ml)、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。スターラー及び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(およそ1時間)放置する。
- (2) 1.0 µlのLoading Dye(×6)を滅菌済みテストプレートへ分注し4 µlのPCR産物を添加する。全量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、Loading Dye(×6)のBromophenol Blueの色素がゲルの2/3程度に来るまで電気泳動を行う(約40分間)。
- (3) 電気泳動終了後、ゲルを約0.5 µg/mlのEtBr溶液中で30分間程度染色し、紫外線照射下で、PCR増幅産物に異常がないか確認・撮影する。

※EtBrは変異源であるので取り扱いには注意すること。

5. 制限酵素処理による増幅断片の消化

上記3項で得たPCR産物を、それぞれのマーカーに対応した制限酵素で処理し、後述の6項で遺伝子型を判定するための準備を行う。マーカーに対応した制限酵素は表1のプライマー情報を参照する。

<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(ABI社)、キャップまたはフルプレートカバー(ABI社)、PCR増幅溶液、各種制限酵素(ニッポンジーン社)、各種制限酵素付属の10×buffer、滅菌超純水、PCRシステムGeneAmp PCR System 9700(ABI社)など

<基本操作>

(1) 以下のように制限酵素反応液を調製する。

試薬名	分量
PCR 増幅溶液	4.0 μ l
10×buffer	1.5 μ l
滅菌超純水	9.3 μ l
制限酵素	0.2 μ l
計	15.0 μ l

(2) PCR システム GeneAmp PCR System 9700 などを用いて、37°C 3 時間でインキュベーションを行う。

6. アガロースゲル電気泳動による多型の検出

上記 5 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多型を確認する。

<準備するもの>

4. と同様。

<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。スターラー及び 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（およそ 1 時間）放置する。

(2) 2.0 μ l の Loading Dye (×6) を滅菌済みテストプレートへ分注し 10 μ l の PCR 産物を添加する。全量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、Loading Dye (×6) の Bromophenol Blue の色素がゲルの 2/3 程度に来るまで電気泳動を行う（約 40 分間）。

(3) 電気泳動終了後、ゲルを約 0.5 μ g/ml の EtBr 溶液中で 30 分間程度染色し、紫外線照射下で、多型を確認・撮影する。

※EtBr は変異源であるので取り扱いには注意すること。

7. 遺伝子型判定とトラブルシューティング

(1)判定

各マーカーを用いた遺伝子型は、表2のとおりである。また、それぞれのマーカーにおける電気泳動像については、参考資料を参照のこと。

(2)トラブルシューティング

①PCR 反応を行っても、目的のバンドが見られない。下の方にぼやけた像（プライマーダイマー）が出る。

ア PCR 増幅が失敗している可能性があるため、氷上操作を確実に行う。プライマーを含む溶液を4°C以上にしない。

イ プライマーの劣化の可能性があることから、凍融解を繰り返したプライマーは破棄し、新たに調製し直すこと。

ウ 上記ア、イの対策を実施しても、目的のバンドが見られない場合は、試薬を取り替える。

②PCR 反応でバンドは見られるが、制限酵素処理後に明確な品種間多型が出ない。

ア AmpliTaq Gold 以外の Taq Polymerase を使用すると、正しい多型が出ない恐れがある。

③制限酵素処理後、はっきりした品種間多型は見られるが、酵素切断の切れ残りによるバンドが現れるため、正しい多型の判断が難しい。

ア サーマルサイクラーの機種によって温度が微妙に異なる可能性があるため、適切なアニーリング温度でない場合がある。予備試験でアニーリング温度を調整し、使用する機器の最適条件を設定すること。

イ 制限酵素処理にエアーインキュベーターを用いている場合、酵素処理が不十分な可能性があるため、ウォーターバスまたはサーマルサイクラーを用いてインキュベートを行う。

④制限酵素処理後、低分子（200bp 以下）のバンドが見られない。

ア 泳動時間が長すぎる場合、200bp 以下のバンドが像として認識できなくなる（ぼやけるまたは消失する）場合がある。サブマリン型電気泳動装置（Mupid 社）使用の場合は約 40 分間を泳動時間の目安とする。

イ アガロースゲルの濃度が 2.0%より低い場合、200bp 以下のバンドが像として認識できなくなる（ぼやけるまたは消失する）場合がある。2.0%以上の濃度で泳動することが望ましい。

表2 各マーカーの遺伝子型

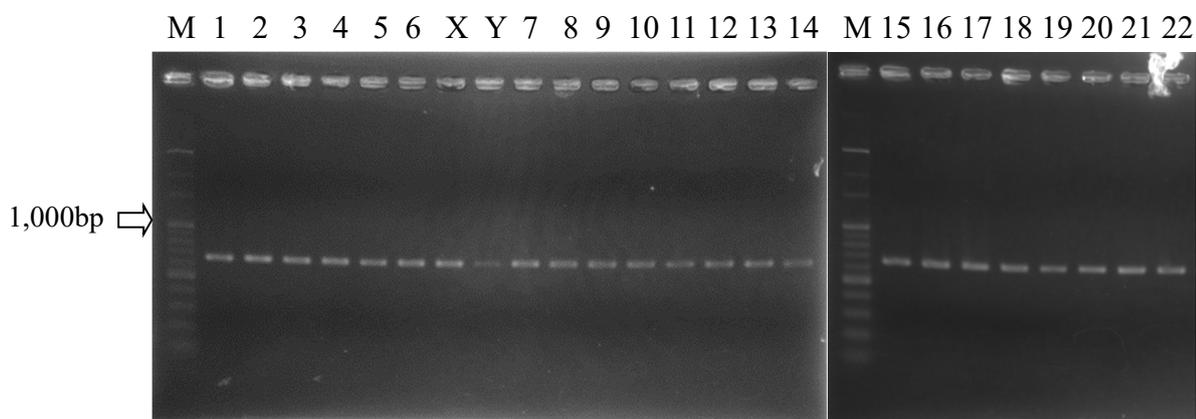
品種名	マーカー名													
	B0036-2 Msp I	B0158-3 Pvu II	T0001 Msp I	T0150 Hinf I	T0271 Rsa I	T0300 Dra I	T0419 Pvu II	T0420 Hae III	B0158-2 Pvu II	I0208 Hinf I	T0318 Hinc II	T0386 Msp I		
1 ウンジュウミカン(宮川早生)	BB	AB	AB	AB	AB	AB	BB	AB	AB	AB	BB	AA		
2 グレープフルーツ(ダンカン)	BB	BB	AA	BB	AA	AB	AB	AA	BB	AA	AB	AB		
3 スイートオレレンジ(トロビタ)	AB	AB	AB	BB	AA	AB	AB	AA	AB	AB	AB	AB		
4 レモン(リスボン)	AA	BB	ABC	AB	AA	AB	BB	AA	BB	AB	AA	BB		
5 不知火	AA	AB	AB	BB	AA	AB	AB	AA	AB	BB	BB	AB		
6 イロ(宮内伊予柑)	AB	BB	BB	AB	AA	BB	AB	BB	BB	AB	BB	AA		
7 ポンカン(太田ボンカン)	AB	AB	BB	BB	AA	BB	AB	AB	AB	BB	BB	AB		
8 璃の香	AB	AB	BC	AA	AB	AB	BB	AA	AB	AB	AA	BB		
9 みはや	AB	BB	AB	BB	AA	AB	AB	AA	BB	BB	BB	AA		
10 あずみ	AB	AB	AB	AB	AA	AB	BB	AA	AB	AB	AB	AB		
11 あずき(興津60号)	AB	AB	AB	AB	AB	AB	BB	AA	AB	BB	AB	AB		
12 麗紅	AB	AB	AB	BB	AA	AB	BB	AA	AB	BB	AB	AB		
13 津之輝	AB	AB	AB	AA	AA	AB	BB	AB	AB	BB	BB	BB		
14 西南のひかり	AB	AB	AB	AB	AB	AB	BB	AB	AB	BB	BB	AA		
15 津之望	AA	BB	AB	AB	AA	AB	BB	AA	BB	BB	BB	AB		
16 はるひ	AB	AB	AB	AB	AA	AA	AB	AA	AB	AB	AB	AA		
17 清見	AB	AB	AB	AB	AA	AB	BB	AA	AB	AB	BB	AB		
18 せとか	AB	BB	AA	BB	AA	AB	BB	AA	BB	BB	BB	AB		
19 はるみ	AB	AB	AB	BB	AA	AB	BB	AA	AB	BB	BB	AB		
20 はれひめ	AB	AB	AB	AB	AB	BB	BB	AA	AB	AB	BB	AA		
21 甘平	AB	BB	AB	AB	AA	AB	BB	AB	BB	BB	AB	AB		
22 愛媛果試第28号(紅まどんな)	AA	AA	AB	BB	AB	AB	AB	AA	AA	AB	BB	AB		

参考資料 各マーカーで得られる電気泳動像

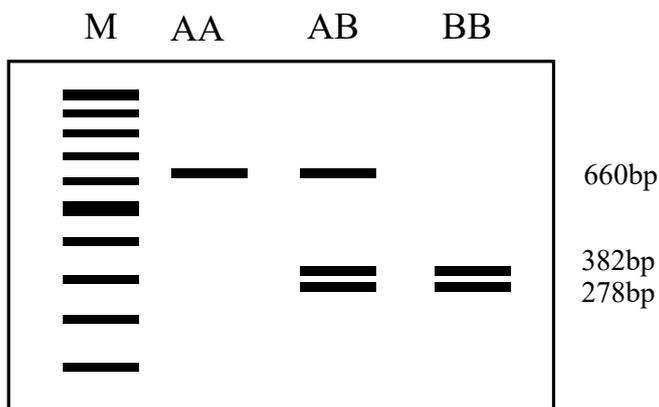
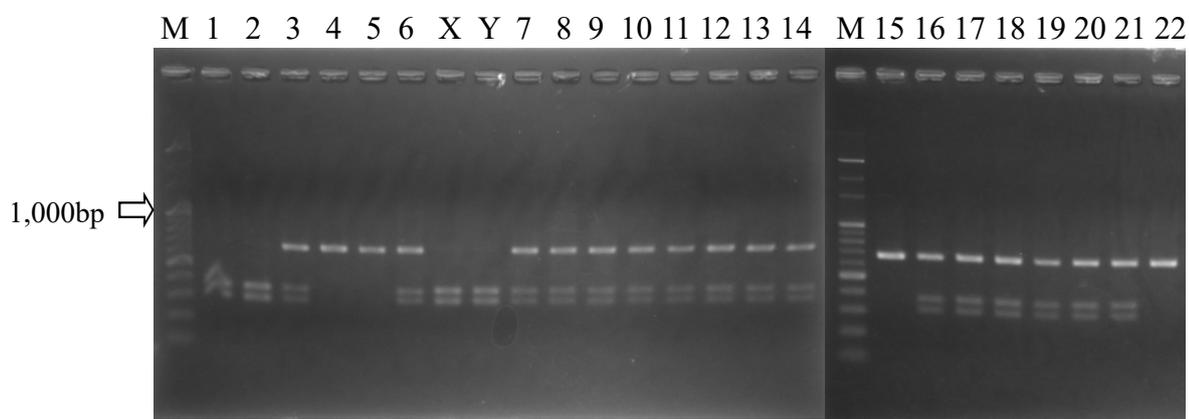
- ・各泳動写真のサンプルは、左から表2の品種名1~22に対応している。
- ※X:「ナツミカン (川野夏橙)」、Y:「ハッサク」は参考とする。
- ・「M」は100 bp DNA ラダーマーカー
- ・代表的な遺伝子型を下部の模式図に示し、制限酵素処理後のバンドサイズ(目安)を示した。

Bf0036-2/ Msp I

PCR 増幅

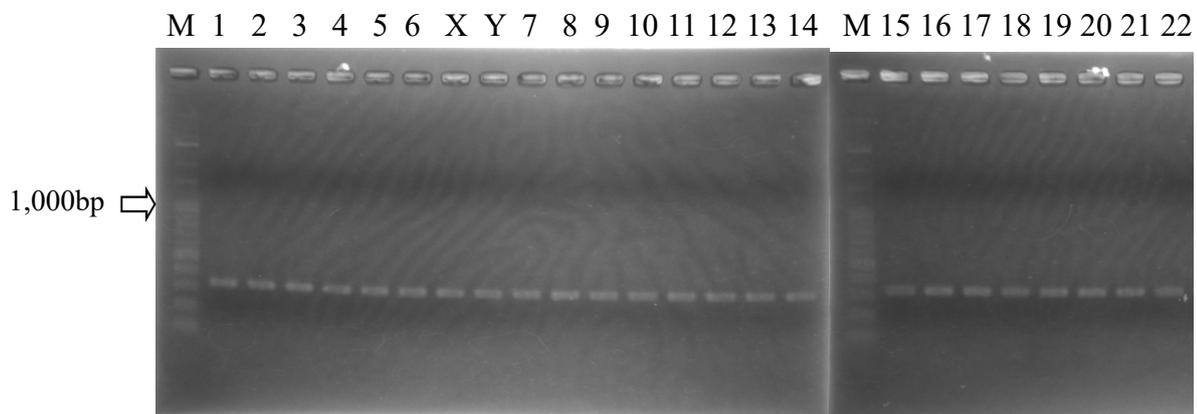


制限酵素処理後

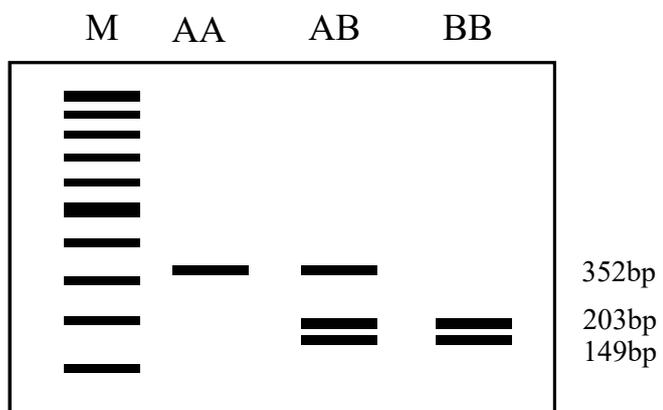
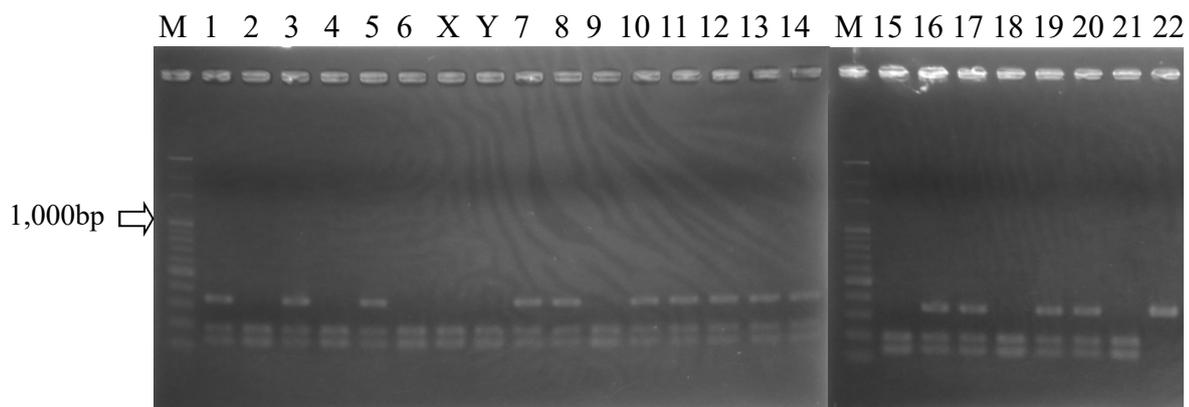


Bf0158-3/ Pvu II

PCR 增幅

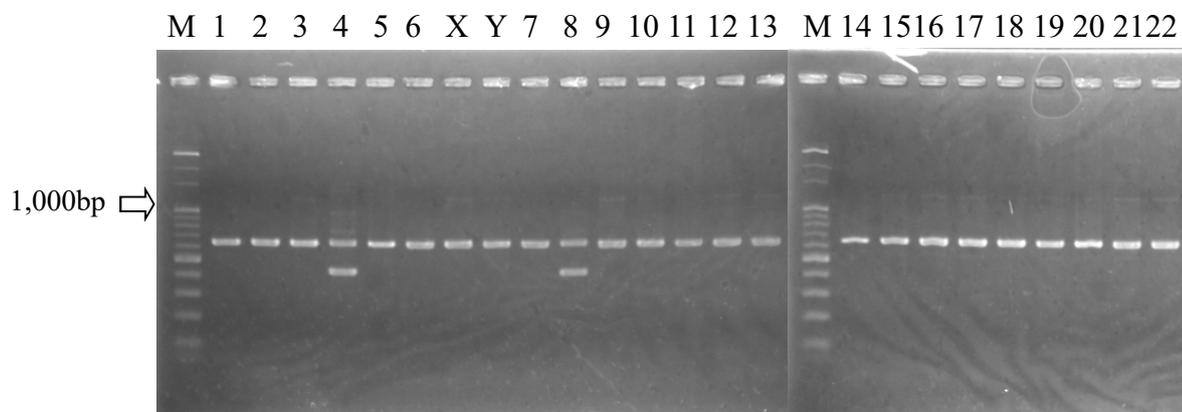


制限酵素処理後

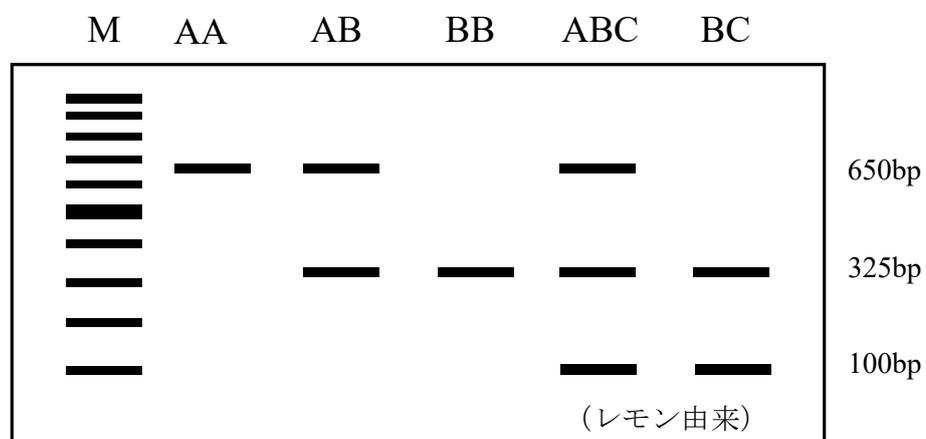
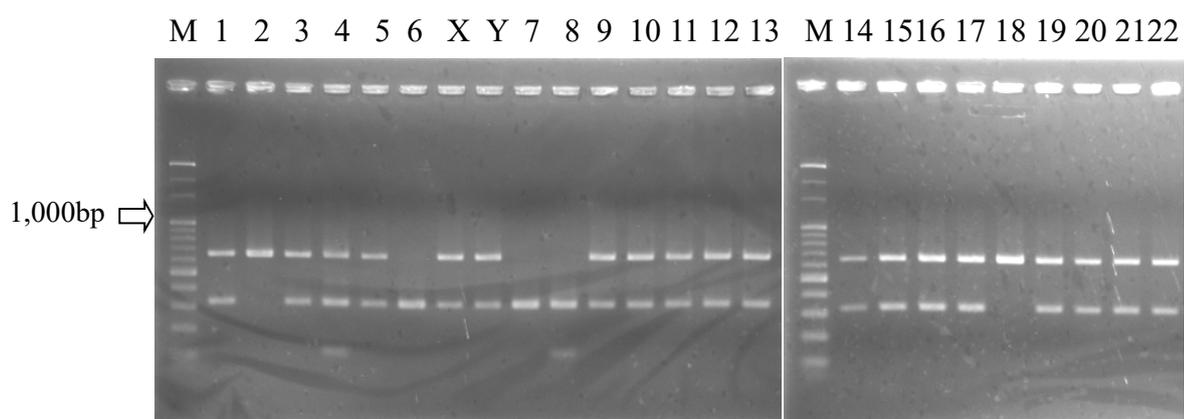


Tf0001/ Msp I

PCR 増幅

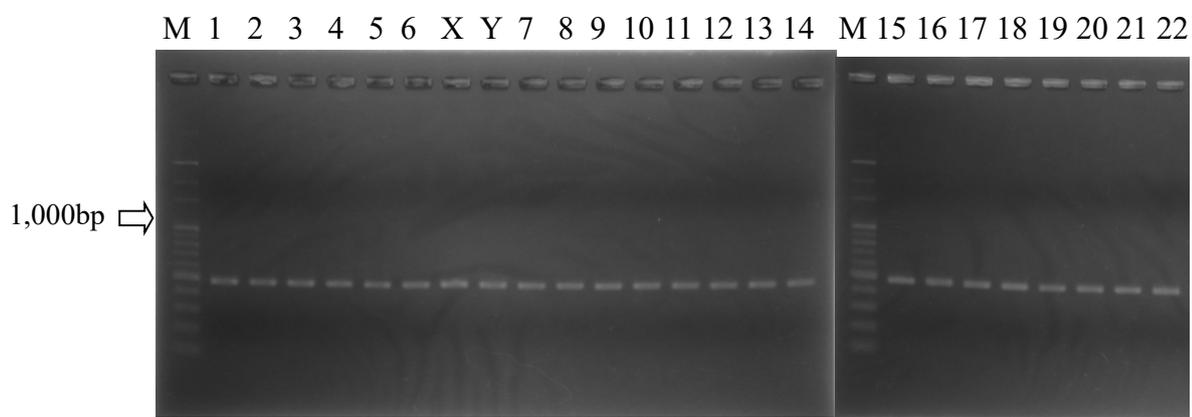


制限酵素処理後

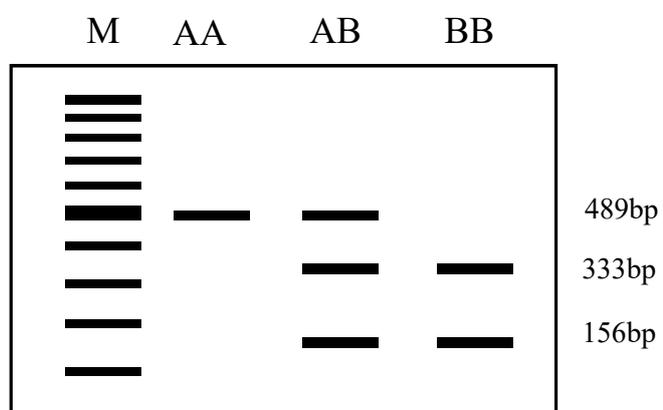
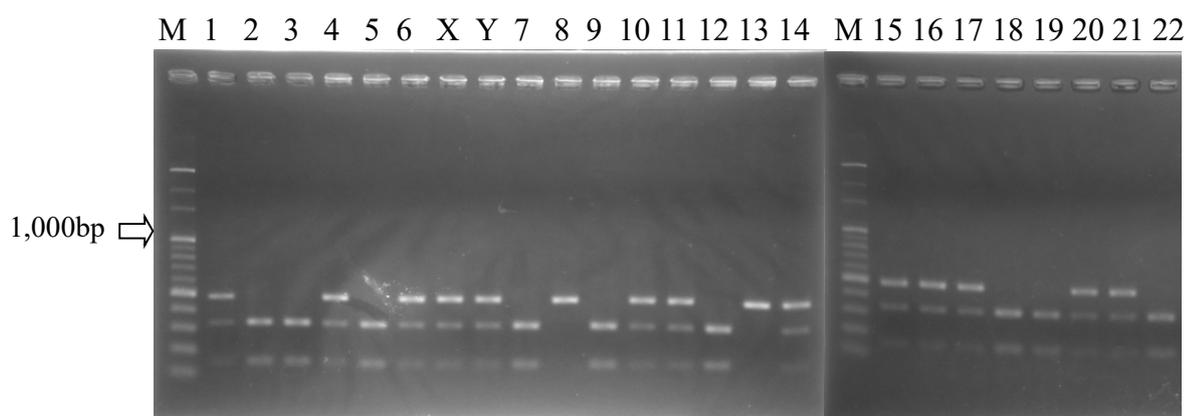


Tf0150/ Hinf I

PCR 增幅

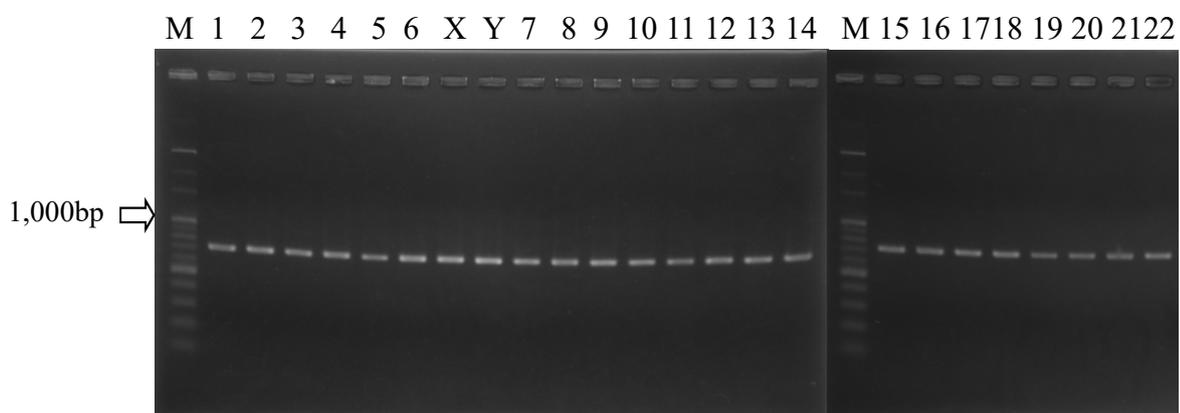


制限酵素処理後

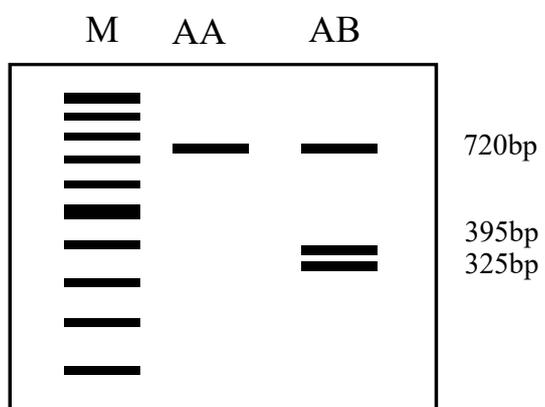
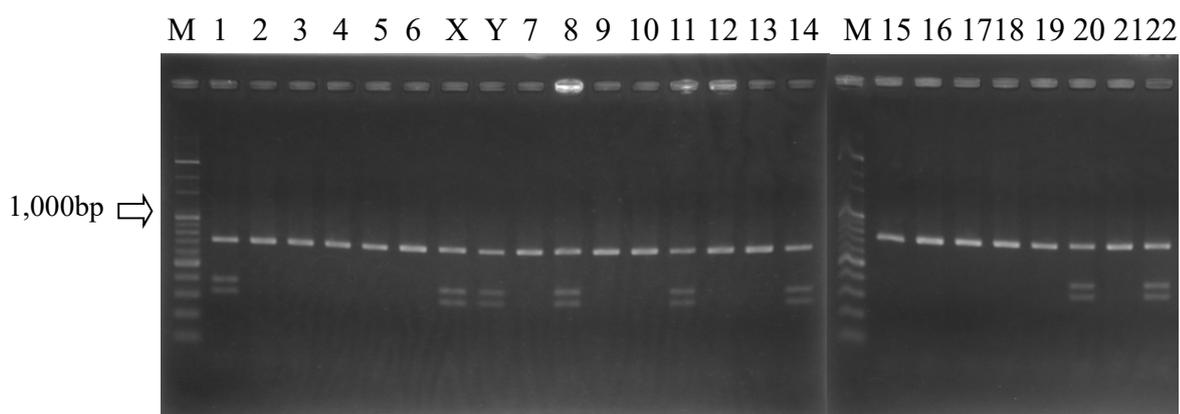


Tf0271/ Rsa I

PCR 增幅

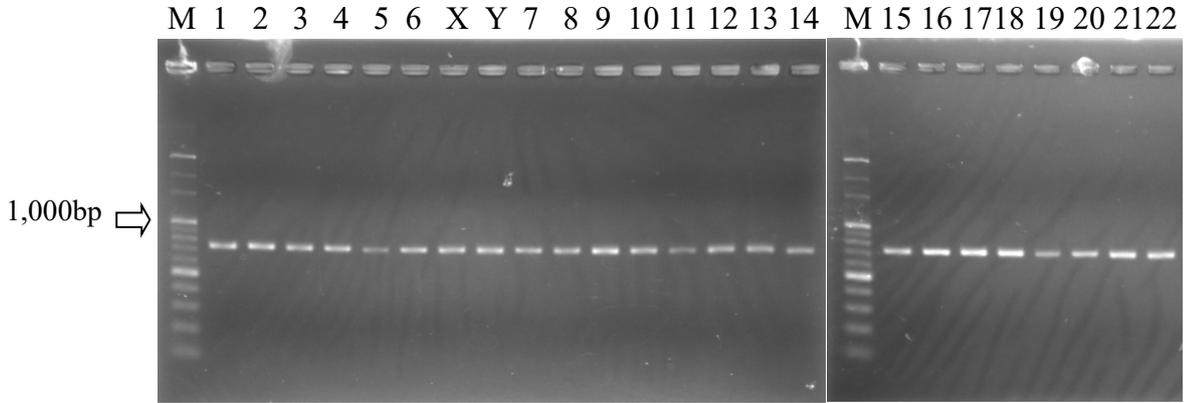


制限酵素処理後

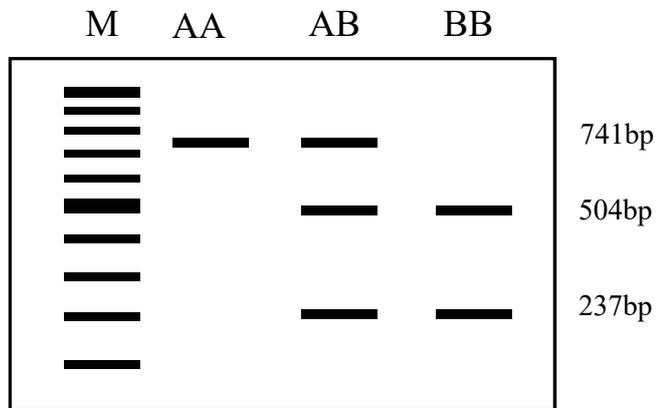
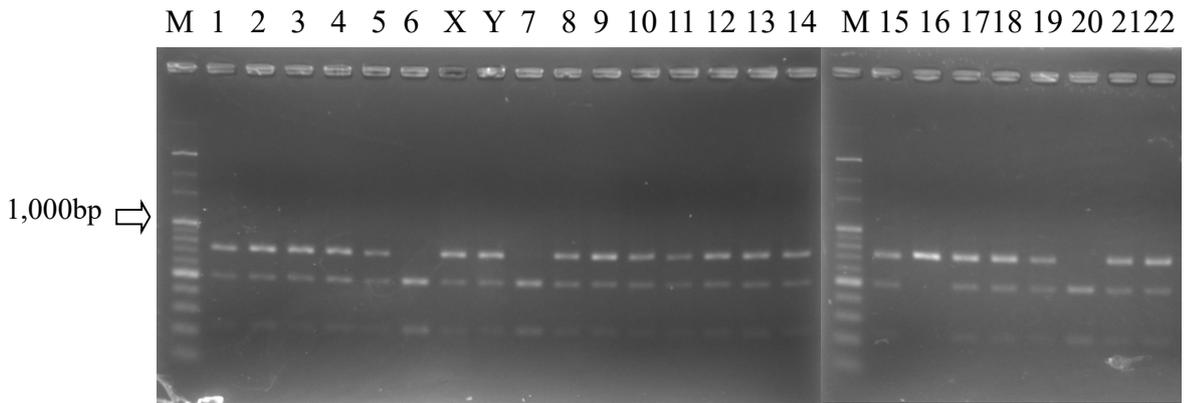


Tf0300/ Dra I

PCR 增幅

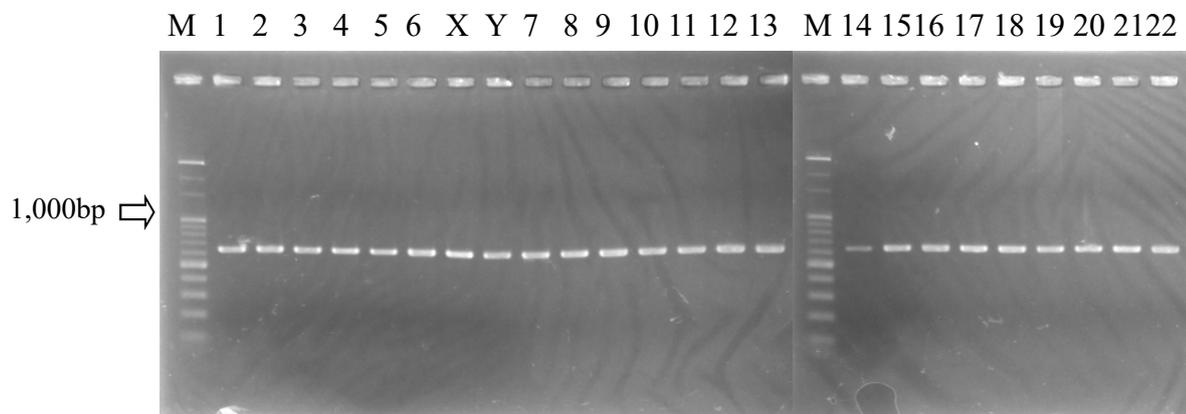


制限酵素処理後

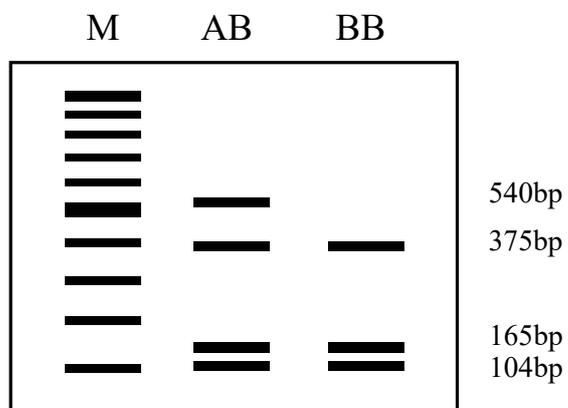
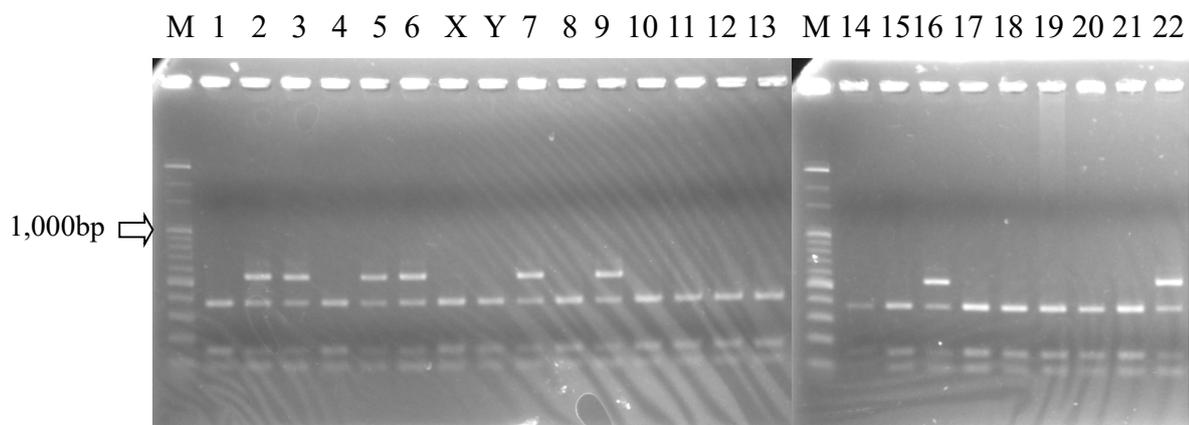


Tf0419/ Pvu II

PCR 增幅

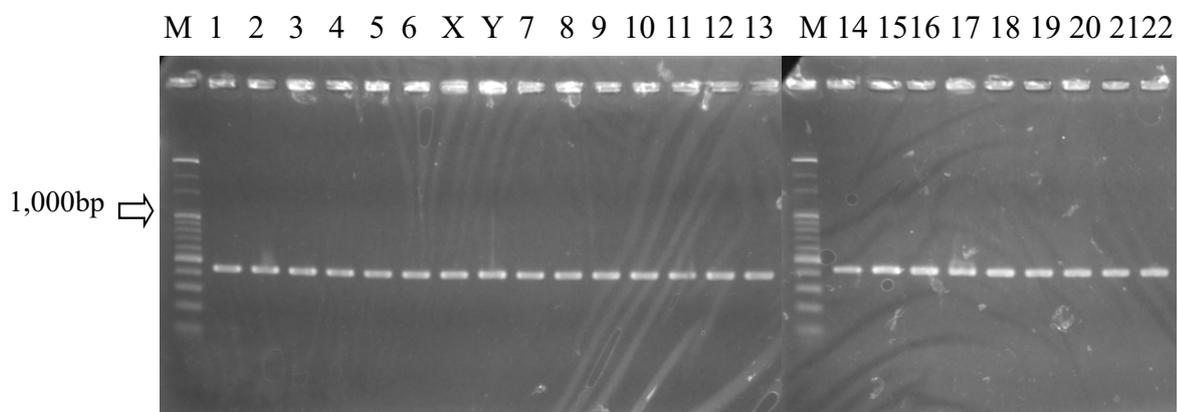


制限酵素処理後

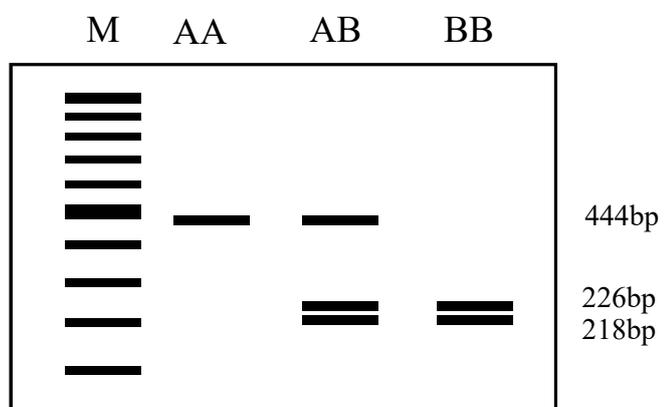
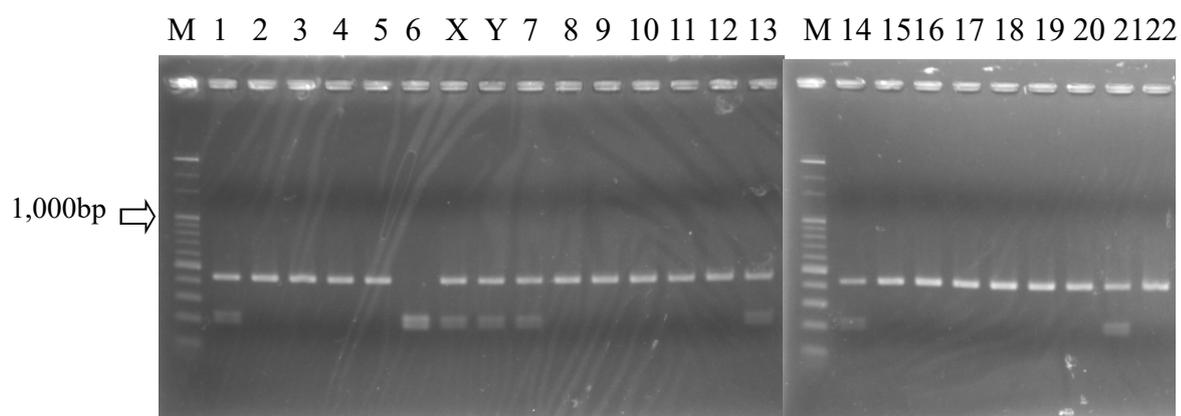


Tf0420/ Hae III

PCR 增幅

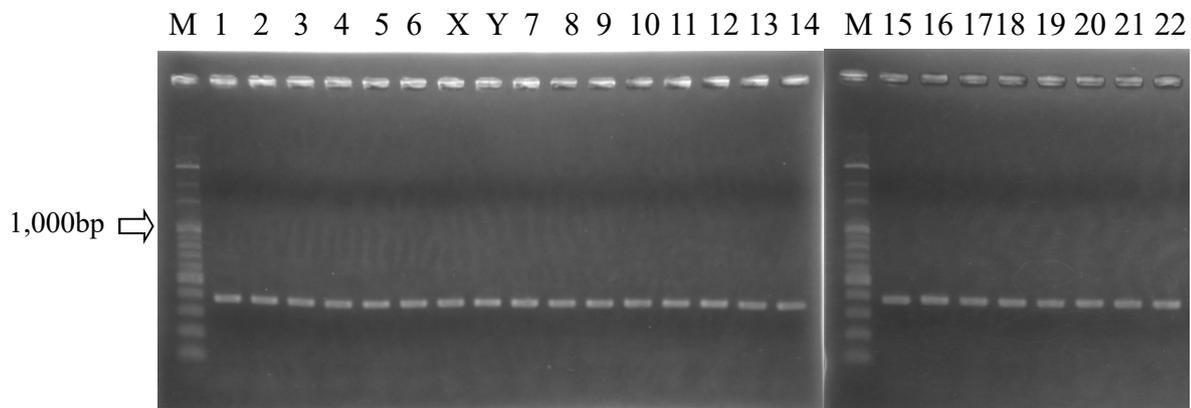


制限酵素処理

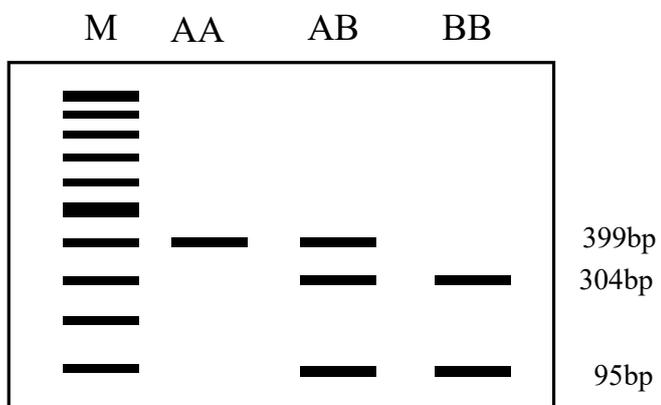
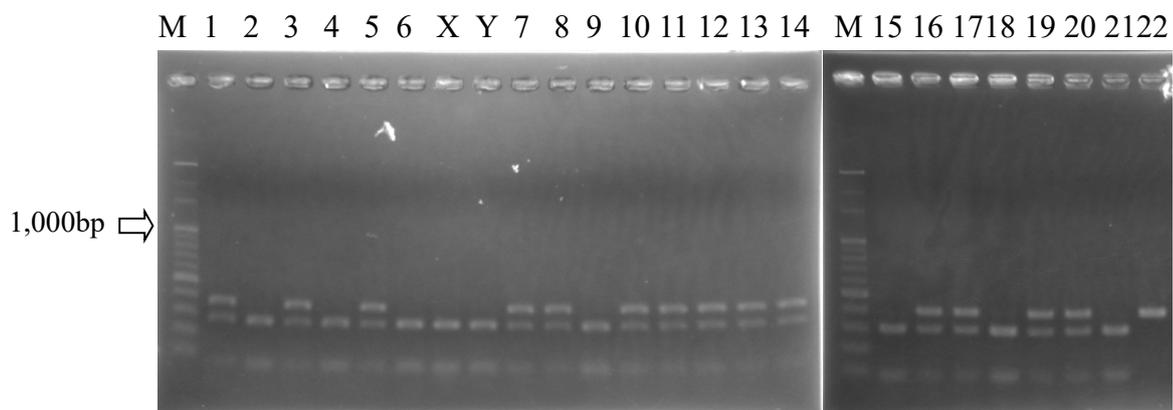


Bf0158-2/ Pvu II

PCR 增幅

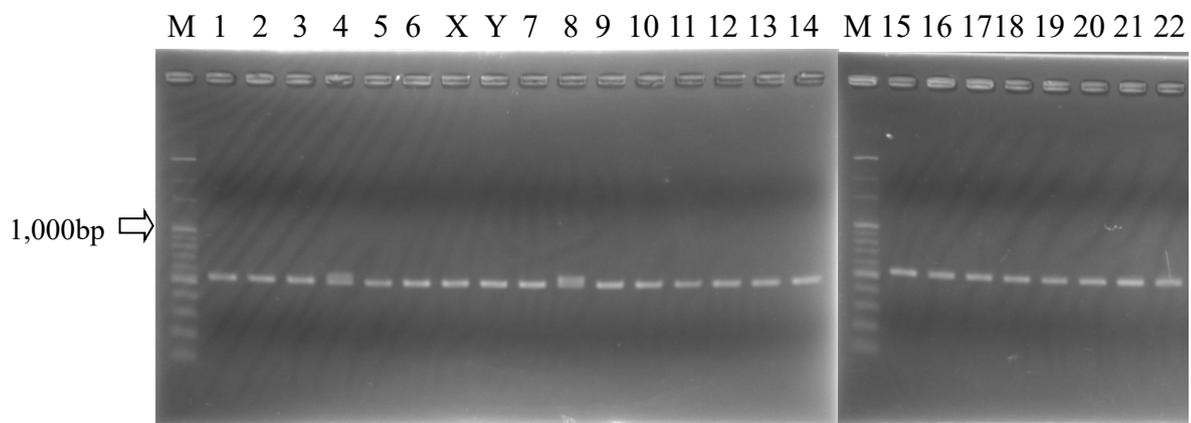


制限酵素処理後

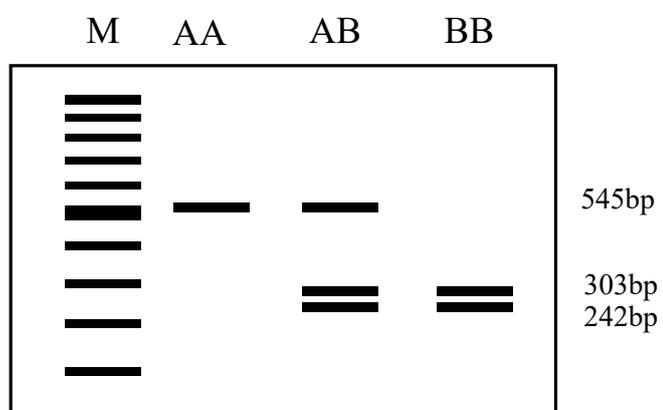
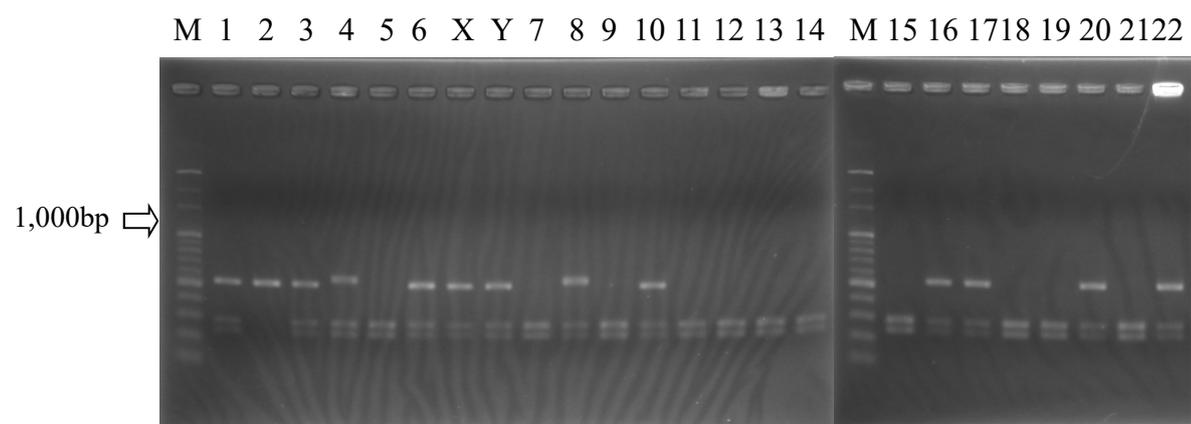


If0208/ Hinf I

PCR 增幅

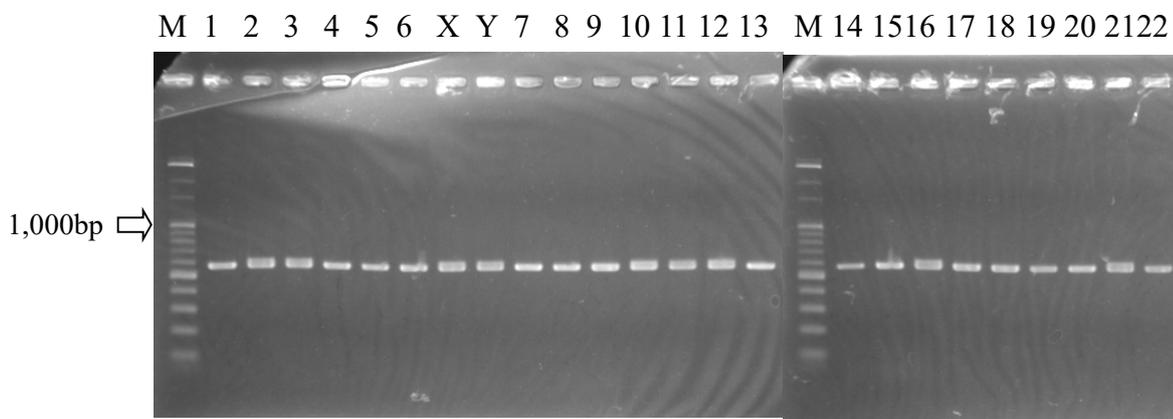


制限酵素処理

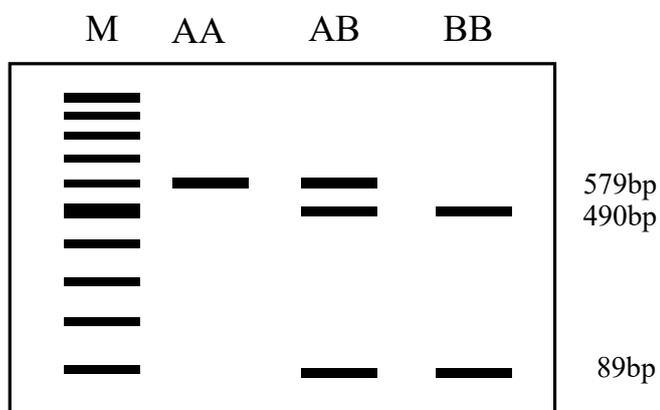
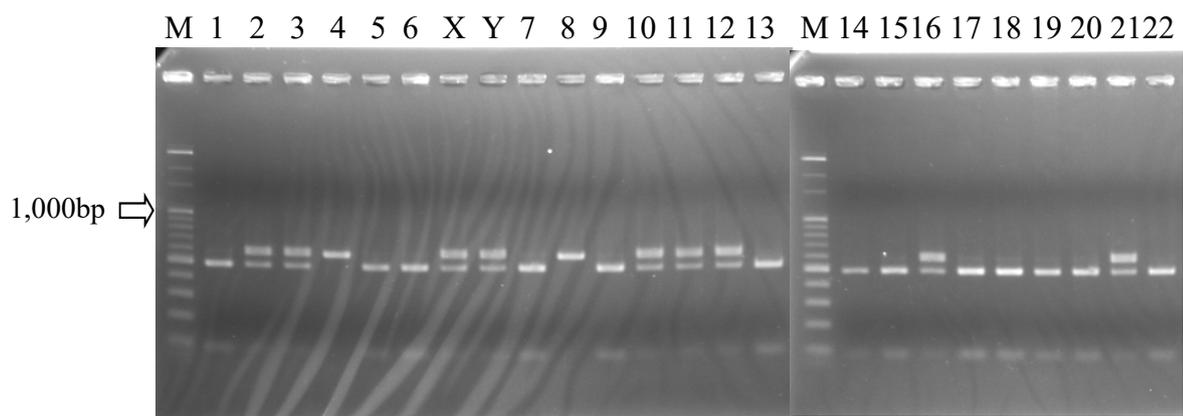


Tf0318/ Hinc II

PCR 增幅

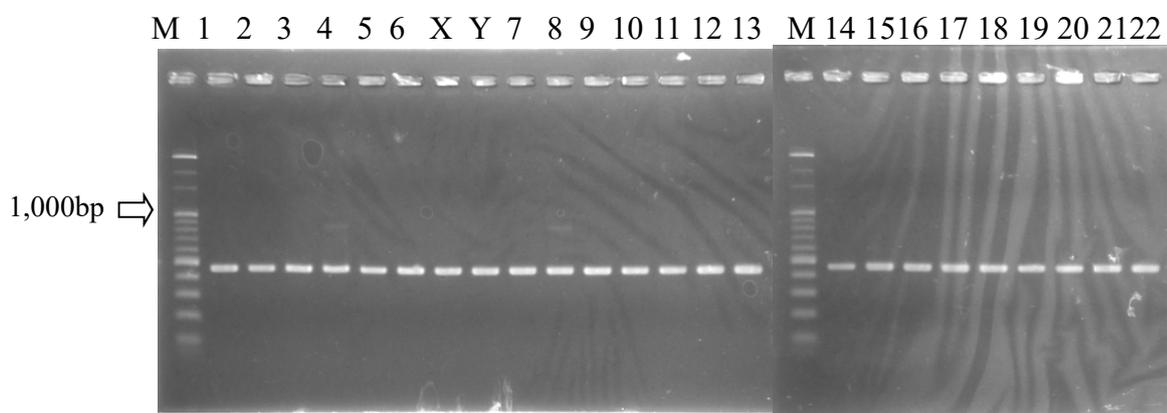


制限酵素処理

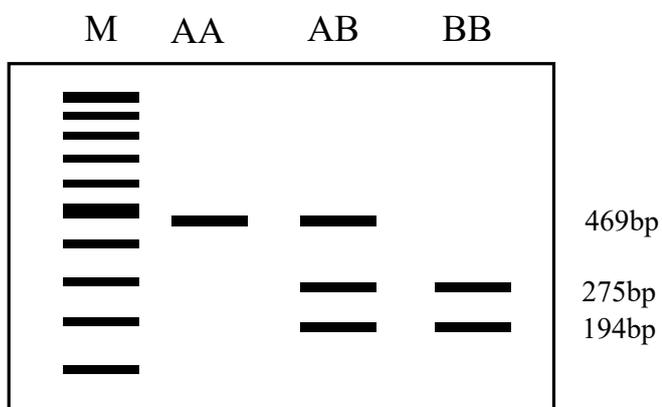
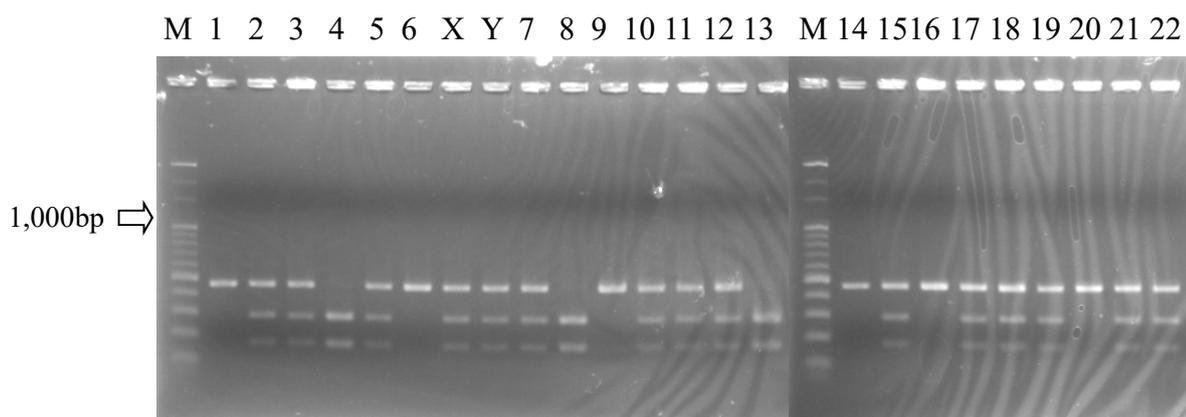


Tf0386/ Msp I

PCR 增幅



制限酵素処理



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。