

カンキツ品種「みはや」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

2021年2月26日 初版

カンキツ品種「みはや」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

1. はじめに

我が国におけるカンキツ類の栽培面積の 60%以上はウンシュウミカンが占めている。特に年内に出荷されるカンキツ類の大部分がウンシュウミカンであり、この時期に出荷できる品種の多様化を図ることが消費拡大のうえで重要である。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）は、11 月から収穫、出荷が可能で、食味が優れ、剥皮しやすく食べやすく、ウンシュウミカンと区別性のある新品種「みはや」を育成した（図 1）。

「みはや」は 11 月下旬に成熟期を迎える早生品種で、果皮が赤橙色で外観が美しく、糖度（Brix 値）が高くて酸味が少なく、芳香があり、食味が優れている。また、多くが種なし果となり、じょうのう膜がやや軟らかく、食べやすい品種である。ウンシュウミカンと比べ、果実は 190g 程度と大きく、果皮が赤く、浮皮が発生しにくい、芳香があるなどの特長がある。機能性成分の β -クリプトキサンチン含量はウンシュウミカンと同程度に多く含まれ、商品性の高い品種である。

「みはや」は平成 23 年 12 月 7 日に品種登録出願し、平成 24 年 3 月 16 日に品種登録出願公表、平成 26 年 9 月 30 日に品種登録（品種登録番号: 第 23722 号）され、農林水産省の補助事業を利用して海外出願している。「みはや」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の利用も考えられる。また、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。農研機構はこれまでに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（Shimada ら、2014¹）を用いて、主要なカンキツ品種・系統を識別する技術を報告している（二宮ら、2015²、Nonaka ら、2017³、Fujii ら、2019⁴）。また、カンキツの品種識別に利用する DNA マーカーの開発を支援するミカンゲノムデータベース（Kawahara ら、2020⁵）を作成し、Web サイト (<https://mikan.dna.affrc.go.jp>) で公開している。これまでに開発した CAPS マーカーの中から正確な遺伝子型の判定が可能など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 品種識別技術を開発し、「CAPS マーカーによるカンキツ 22 品種の DNA 品種識別技術マニュアル」⁶ として公開している。近年、

「みはや」の穂木が海外へ不当に流出していることが顕在化し、海外で無断栽培された果実が日本へ逆輸入される懸念が生じている。このため、PCR と電気泳動のみで、「みはや」を主要なカンキツ 23 品種から、特異的にかつ簡易に識別できる DNA マーカーを開発した。

¹ 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 Genetics & Genomes 10: 1001-1013. DOI 10.1007/s11295-014-0738-9.

² 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.

³ Nonaka, K., H. Fujii, M. Kita, T. Shimada, T. Endo, T. Yoshioka and 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>.

⁴ Fujii, H., T. Narita, H. Oshino, T. Endo, T. Kawakami, H. Goto, T. Yoshioka, M. Omura and T. Shimada (2019) CAPS markers with stability and reproducibility for discriminating major citrus cultivars in Japan. DNA Polymorphism 27: 71-79.

⁵ Kawahara, Y., T. Endo, M. Omura, Y. Teramoto, T. Itoh, H. Fujii and T. Shimada (2020) Mikan genome database (MiGD): integrated database of genome annotation, genomic diversity, and CAPS marker information for mandarin molecular breeding. Breeding Science 70 (2): 200-211. DOI: <https://doi.org/10.1270/jsbbs.19097>.

⁶ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 (2019) CAPS マーカーによるカンキツ 22 品種の DNA 品種識別技術マニュアル. https://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/130601.html.

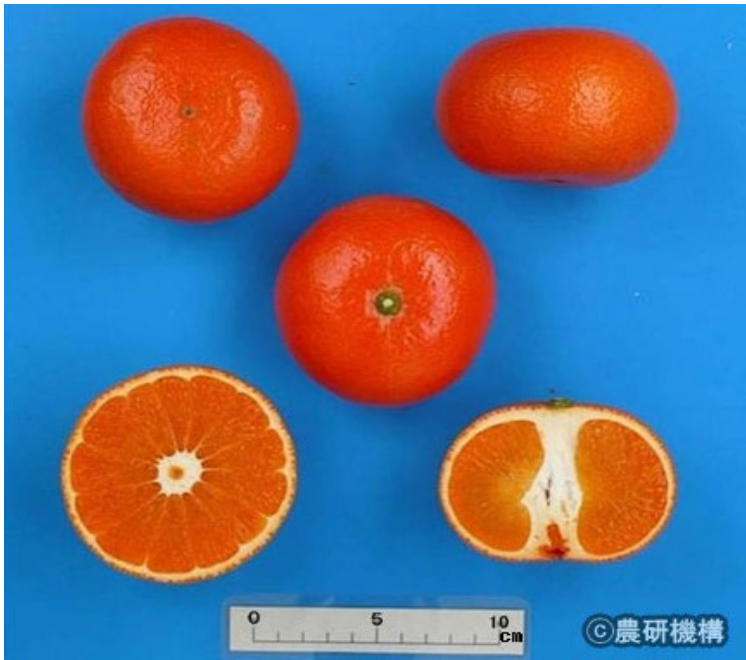


図1 「みはや」の果実の写真

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。本マニュアルでは、上記ガイドラインを参照することで、様々なカンキツの組織から、十分な質と量のゲノム DNA の抽出が可能であり、「みはや」の特異的 DNA 品種識別に適用可能である。カンキツの果肉や果皮から抽出した DNA には PCR 反応を阻害する多糖類やポリフェノールなどが混入することがあることから、本マニュアルでは DNeasy Plant Mini kit (キアゲン社) を用いて DNA 抽出をおこなっている。

<準備するもの>

1.5ml チューブ (滅菌済み)、乳鉢・乳棒 (滅菌済み、180°Cで2時間乾熱滅菌したもの)、薬さじ (滅菌済み、180°Cで2時間乾熱滅菌したもの)、液体窒素、QIAshredder Mini Spin Column (キアゲン社)、DNeasy Mini Spin Column (キアゲン社)、コレクションチューブ(2ml) (キアゲン社)、Buffer AP1 (キアゲン社)、Buffer P3 (キアゲン社)、Buffer AW1 (エタノール添加、キアゲン社)、Buffer AW2 (エタノール添加、キアゲン社)、Buffer AE (キアゲン社)、RNase A ストック溶液 (100 mg/ml) (キアゲン社)、滅菌超純水、高速遠心機 1 台 (1.5~2.0ml チューブが利用可能なもの) 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、キアゲン社のプロトコールに従っている。

- (1) 新鮮な果実からフラベド (外果皮、図 2) を切り出し、約 500mg を計量する。凍結した果実を用いる場合、計量中に解凍しないよう迅速に行う。
- (2) 液体窒素で乳鉢・乳棒などを利用して、サンプルを凍結状態で粉砕する。
- (3) 冷却した薬さじを用いて粉砕したサンプル約 50mg (薬さじの小さじ 1 杯程度) を 1.5ml チューブに入れる。サンプルの挿入前に 400 μ l の AP1 と 4 μ l の RNase A ストック溶液 (100 mg/ml) を 1.5ml チューブに予め加えておく。サンプル挿入後に激しくボルテックスする。
- (4) 混合液を 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チューブを 2~3 回転倒混和する。

- (5) 130 μ l の Buffer P3 を混合液に添加後、混和し、5 分間氷上でインキュベートする。
- (6) 20,000 \times g、5 分間、室温で遠心する。
- (7) 2 ml コレクションチューブ中にセットした QIAshredder Mini Spin Column (薄紫色) に(6)の上澄み液 をピペットで入れ、20,000 \times g、2 分間、室温で遠心する。
- (8) (7)のろ液画分を新しい 1.5ml チューブに移す。
- (9) 清澄済み混合液に 1.5 倍容量の Buffer AW1 を添加し、ピペットで混和する。
- (10) (9)の混合液 (形成した沈殿物を含む) 650 μ l を、2 ml のコレクションチューブに装着した DNeasy Mini Spin Column (透明) にピペットで移す。
- (11) 6,000 \times g、1 分間、室温で遠心し、ろ液を棄てる。
- (12) (9)の残った混合液は(10)と(11)を繰り返す。
- (13) DNeasy Mini Spin Column を新しい 2 ml のコレクションチューブに装着し 500 μ l の Buffer AW2 を添加する。6,000 \times g、1 分間、室温で遠心し、ろ液を棄てる。
- (14) 500 μ l の Buffer AW2 を DNeasy Mini Spin Column に添加し、20,000 \times g、5 分間、室温で遠心してメンブレンを乾燥させる。
- (15) DNeasy Mini Spin Column を新しい 1.5 ml チューブに移し、50 μ l の Buffer AE を DNeasy メンブレン上に直接ピペットで添加する。室温 (15 ~ 25 $^{\circ}$ C) で 5 分間インキュベートした後、6,000 \times g、1 分間、室温で遠心し、ろ液を回収する。

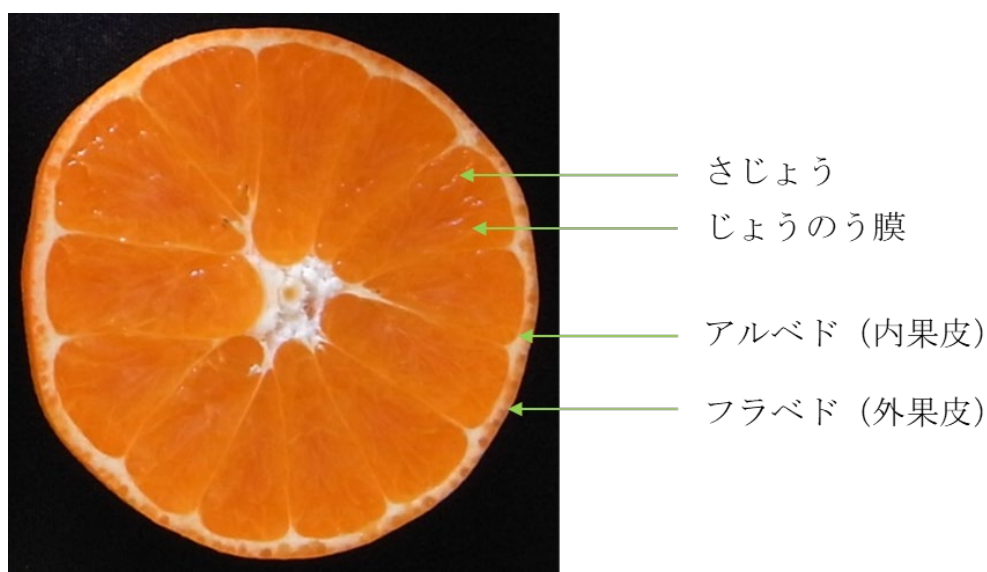


図 2 カンキツの果実組織の名称

カンキツ果実は、フラベド、アルベド、じょうのう膜（さじょうを包む膜）、さじょうなどで構成されている。

<本マニュアルで供試した DNA サンプル>

「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）」、「ナツミカン（川野夏橙（かわのなつだいだい）」、「ハッサク」、「ポンカン（太田ポンカン（おおたぽんかん）」、「璃の香（りのか）」、「みはや」、「あすみ」、「あすき」、「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（つものぞみ）」、「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）」の葉またはフラベドから上記の実験操作で抽出した DNA。

なお、「3. DNA 溶液の品質の確認」で、判定基準をクリアした DNA であることを確認した。

3. 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

上記 2 で得たサンプル DNA 溶液の 260nm 吸光度と 230nm 吸光度を分光光度計で測定し、判定基準（260nm 吸光度と 230nm 吸光度の比率（A260/230 比）の値が 1.8 以上）をクリアしていることを確認する。

<準備するもの>

NanoDrop1000（Thermo Fisher Scientific/ Applied Biosystems 社、以下 ABI 社と記載）、滅菌超純水、Buffer AE（キアゲン社）、キムワイプ（日本製紙クレシア社）、サンプル DNA 溶液など。

<基本操作>

- (1) PC の電源を入れ、ND-1000 ソフトウェアを起動する。
- (2) メインメニューが表示されるので“Nucleic Acid”をクリックする。
- (3) “Initialize instrument”のメッセージが表示されるので、アームを開き、測定部をきれいにし、3 μ l の滅菌水をのせる。
- (4) アームを閉じ、“OK”をクリックする。
- (5) 表示された測定画面の“Sample type”の中から“2 重鎖 DNA...DNA-50”を選択する。

- (6) 測定部の滅菌水をキムワイプで拭き取り、測定部にブランク用の 3 μ l の Buffer AE (ブランク溶液) をのせる。
- (7) 測定画面の“Blank”をクリックする。
- (8) 測定部のブランク溶液をキムワイプで拭き取り、3 μ l のサンプル DNA 溶液をのせ、“Measure”をクリックする。
- (9) サンプル DNA 溶液の 260nm 吸光度の値、260nm 吸光度と 230nm 吸光度の比率 (A260/230 比) の値を記録する。
- (10) 測定終了後は、サンプル DNA 溶液をキムワイプで拭き取り、3 μ l の滅菌水をのせてキムワイプで滅菌水を拭き取り、測定部をきれいにする。
- (11) ソフトを終了し、PC をシャットダウンする。
- (12) A260/230 比の値を確認する。1.8 未満の場合は、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の混入が考えられるため、DNA 抽出からやり直す。

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

上記 2 で得たサンプル 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>

1.5ml 又は 2.0ml チューブ (滅菌済み)、アガロース (ニッポンジーン社)、50 \times TAE (ニッポンジーン社)、Lambda DNA-*Hind*III Digest (タカラバイオ社)、エチジウムブロマイド(EtBr)溶液(10 mg/ml)、ゲルメーカー(Mupid 社)、6 \times Loading Buffer (タカラバイオ社)、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。スターラー及び 1 \times 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 チューブに 25ng 程度を含有する 5 μ l のサンプル DNA 溶液と 1 μ l の 6 \times Loading Buffer を加え、ピペットで混ぜる。Lambda DNA-*Hind*III Digest 溶液 (2 μ l の Lambda DNA-*Hind*III Digest 原液、3 μ l の滅菌水、1 μ l の 6 \times Loading Buffer を加えたもの)と 6 \times Loading Buffer を加えたサンプル DNA 溶液を、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×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、ゲルを約 0.5 $\mu\text{g/ml}$ の EtBr 溶液中で 20 分間程度染色し、紫外線照射下で、DNA サンプルを確認・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。

- (4) Lambda DNA-*Hind*III Digest の 23.1kbp のバンド付近に単一のバンドがみられない、バンドにテイリングがみられる場合は、DNA の分解、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の混入が考えられるため、DNA 抽出からやり直す。

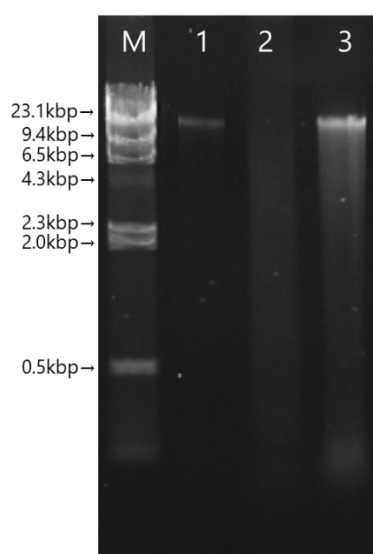


図 3 抽出したサンプル DNA の電気泳動図

M: Lambda DNA-*Hind*III Digest、1: A260/230 比が 1.8 以上の品質を持つサンプル DNA、2: バンドが分解したサンプル DNA、3: バンドにテイリングがみられるサンプル DNA。

3) DNA 溶液の判定

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

4. PCR 反応

「みはや」の果実サンプルを PCR 増幅バンドのパターンで簡易に識別できるように設計したプライマーを用いて PCR 反応を行う。PCR 反応は、簡便性、高速性、正確性を持つ改変型 KOD DNA polymerase(UKOD) (TOYOBO 社) を用い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 (ABI 社)、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 (5ng/μl に調製したもの)、KOD One PCR Master Mix-Blue- (TOYOBO 社)、1/10TE バッファー、滅菌超純水、プライマー溶液 (セット 1 のフォワードプライマー1 とリバースプライマー1 : 各 1pmol/μl、セット 2 のフォワードプライマー2 とリバースプライマー2 : 各 4pmol/μl、1/10TE バッファーで希釈)、PCR システム ProFlex PCR System (ABI 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、スイートオレンジの葉緑体 DNA の rbcL 遺伝子の配列 (GenBank アクセッション番号 : DQ864733) を参照に設計したフォワードプライマー 1 とリバースプライマー 1 を用いている。プライマーの塩基配列は以下のとおり。

セット 1

フォワードプライマー1

5'-ACAGAGACTAAAGCGAGTGTTG-3'

リバースプライマー1

5'-TAAATGGTTGGGAGTTCACGTTC-3'

セット 2

フォワードプライマー2

5'-CTGAAAGTTTCTATGCAGTTGA-3'

リバースプライマー2

5'-CCACAATAAATGGAAGTCATGAG-3'

<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
2×KOD One PCR Master Mix -Blue-	5.0 μl
プライマー溶液	1.0 μl
滅菌超純水	3.0 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。

98°C 1 秒

98°C 10 秒	}	32 サイクル
56°C 5 秒		
68°C 2 秒		

68°C 30 秒

4°C ∞

5. 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>

1.5ml 又は 2.0ml チューブ (滅菌済み)、アガロース (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 (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、固まるまで放置する。
- (2) 6µl の 100bp DNA ラダーマーカーと 10µl 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、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、ゲルを約 0.5µg/ml の EtBr 溶液中で 20 分間程度染色し、紫外線照射下で、PCR 増幅産物の多型を確認・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。

6. 遺伝子型判定とトラブルシューティング

1) 判定

「みはや」の簡易判別マーカーを用いた電気泳動図は、図3のとおりである。約620bpのバンドは全てのカンキツ品種においてPCRで増幅することを確認しており、PCR反応のポジティブコントロールとして利用している。約400bp、約200bpのバンドは、品種により増幅の有無がみられる(表1)。サンプル番号11番の「みはや」は、約620bpと約400bpの2本のバンドがPCRで増幅される。

表1 供試した品種のPCR増幅産物の構成

番号	品種名	PCR増幅産物のサイズ		
		620 bp	400bp	200bp
1	ウンシュウミカン (宮川早生 (みやがわわせ))	+	+	+
2	グレープフルーツ(ダンカン)	+	+	+
3	スイートオレンジ (トロビタ)	+	+	+
4	レモン (リスボン)	+	+	+
5	不知火 (しらぬひ)	+	+	+
6	イヨ (宮内伊予柑 (みやうちいよかん))	+	+	+
7	ナツミカン (川野夏橙 (かわのなつだいでい))	+	+	+
8	ハッサク	+	+	+
9	ボンカン (太田ボンカン (おおたぼんかん))	+	+	+
10	璃の香 (りのか)	+	+	+
11	みはや	+	+	-
12	あすみ	+	-	+
13	あすき	+	-	+
14	麗紅 (れいこう)	+	+	+
15	津之輝 (つのかがやき)	+	+	+
16	西南のひかり (せいなんのひかり)	+	+	+
17	津之望 (つなのぞみ)	+	+	+
18	はるひ	+	-	+
19	清見 (きよみ)	+	-	+
20	せとか	+	+	+
21	はるみ	+	-	+
22	はれひめ	+	-	+

23	甘平 (かんぺい)	+	-	+
24	愛媛果試第 28 号 (えひめかしだい 28 ごう) (紅まどんな (べにまどんな))	+	+	+

注) + : PCR 増幅産物あり、- : PCR 増幅産物なし

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。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廃棄し、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。

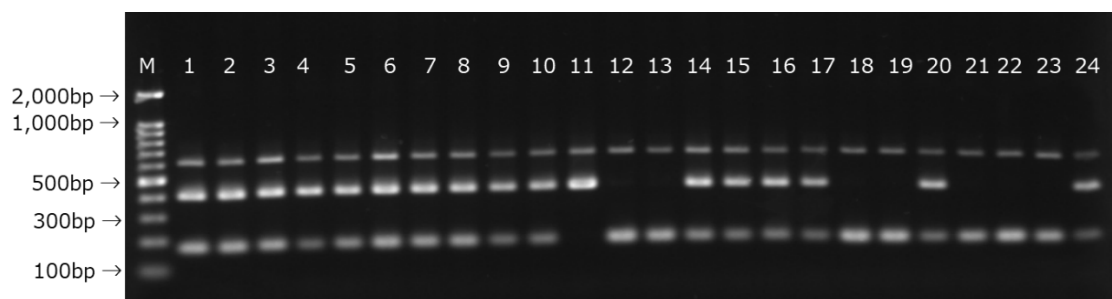


図3 「みはや」の簡易識別マーカーの電気泳動図

M: 100bp ラダー、1: 「ウンシュウミカン (宮川早生 (みやがわわせ))」、2: 「グレープフルーツ (ダンカン)」、3: 「スイートオレンジ (トロビタ)」、4: 「レモン (リスボン)」、5: 「不知火 (しらぬひ)」、6: 「イヨ (宮内伊予柑 (みやうちいよかん))」、7: 「ナツミカン (川野夏橙 (かわのなつだいだい))」、8: 「ハッサク」、9: 「ポンカン (太田ポンカン (おおたぽんかん))」、10: 「璃の香 (りのか)」、**11: 「みはや**」、12: 「あすみ」、13: 「あすき」、14: 「麗紅 (れいこう)」、15: 「津之輝 (つのかがやき)」、16: 「西南のひかり (せいなんのひかり)」、17: 「津之望 (つこのぞみ)」、18: 「はるひ」、19: 「清見 (きよみ)」、20: 「せとか」、21: 「はるみ」、22: 「はれひめ」、23: 「甘平 (かんぺい)」、24: 「愛媛果試第 28 号 (えひめかしだい 28 ごう) (紅まどんな (べにまどんな))」。

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。

2021年2月26日 初版