DNA品種識別技術に関する基本的な前提知識（Q＆A）

回答（A）：国立研究開発法人
農業・食品産業技術総合研究機構
知的財産部 知財・育成者権管理役　**山本　俊哉**

質問（Q）：弁護士知財ネット・農水法務支援チーム
桜坂法律事務所　弁護士・弁理士　**平井　佑希**

育成者権の侵害事案においては、ＤＮＡ品種識別技術は非常に有用な立証ツールであろうかと思われますところ、今回はその技術的側面にスポットライトを当てて、品種登録制度の制度ユーザーの皆様方（法律実務家等を含む）の理解に資するように、Q&A形式で解説させていただきました。

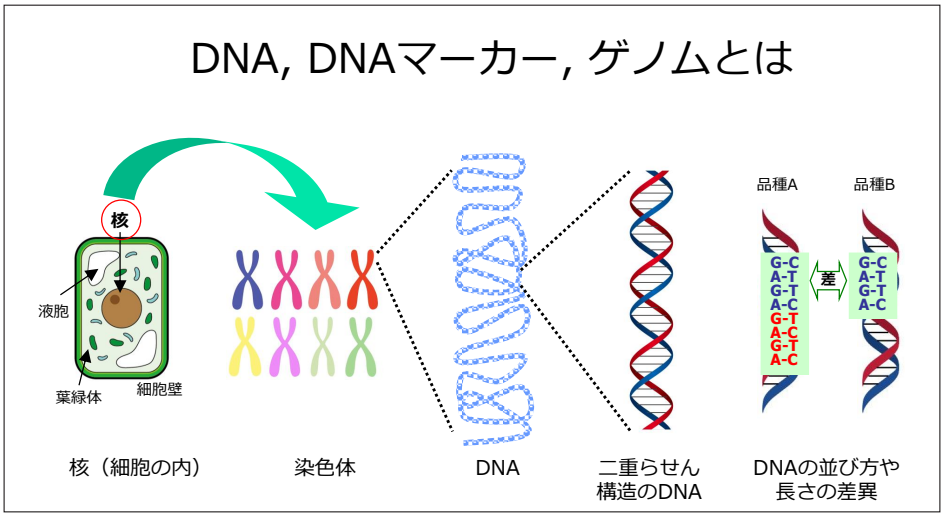
Q1　ＤＮＡ品種識別というのは、どのようなものでしょうか。原理を理解するための基本的な考え方や用語についてご教示ください。

A　DNA品種識別とは、DNAの構造が品種によって異なるという特徴を利用して、特定の品種を識別するものです。

品種間でのDNA塩基配列の違いを識別するための、ゲノム上の標識（目印）のことをDNAマーカーといいますが、染色体上の遺伝子内あるいはその近傍の塩基配列の違いを識別して、それをDNAマーカーとして利用します。DNAマーカーによって、特定の遺伝子を含む染色体のある領域が親から子へ受け継がれたかどうか調べることができます。これらを用いて、品種・個人の識別や親子の判定を行うことが可能です。

ヒトについては、1984年に、レスター大学の遺伝学者アレック・ジェフリーズ博士が、「ヒトのDNA型は十分に個性があり不同性がある。そして終生不変である」こと、したがってDNAで「個人の特定ができる」ことを説き、科学雑誌「ネイチャー」に論文を発表しました。ヒトでは、親子関係の確認や個人の識別を行う方法が開発され、現在ではSTR法（Short Tandem Repeat法）により、同じ型の別人が現れる確率は４兆7000億人に１人とされています[1]。植物分野でも、ヒトのDNA識別やDNA型鑑定を参考にして、様々なDNA品種識別手法が開発されてきました。

1　John M. Butler［著］、福島弘文、五条堀孝［監訳］、藤宮仁、玉田一生、福間義也、長崎華奈子［訳］．DNA鑑定とタイピング　遺伝学・データベース・計測技術・データ検証・品質管理．共立出版．ISBN978-4-320-05682-4．592頁．2009.



«用語の解説»

・ゲノムとは、遺伝子（gene）と染色体（chromosome）から合成された言葉で、DNAのすべての遺伝情報のこと

・DNAはデオキシリボ核酸の略称で、アデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、シトシン (C)の4種類の塩基が連なる遺伝情報の本体のこと。この４種類の並び方をDNA配列（あるいは塩基配列）という。1953年にワトソンとクリックは、DNAが二重らせん構造になっていることを提唱し、DNAが遺伝情報を狙う物質であり複製の仕組みを説明する証拠となった。長く繋がったDNAがヒストンなどのタンパク質と結合して、複雑に折りたたまれて、染色体を形成する。植物や動物のように有性生殖を行う多くの種では、対（セット）になる染色体の片方が母親から遺伝し、もう片方が父親から遺伝し、受け継いでいる。例えば、リンゴは17対34本の染色体をもち、イネは12対24本の染色体を持ち、ヒトでは23対46本の染色体を持つ。

・DNAマーカーとは、品種間や個体間での違いを識別するゲノム上の目印（標識）となる特定のDNA配列（あるいは塩基配列）のこと

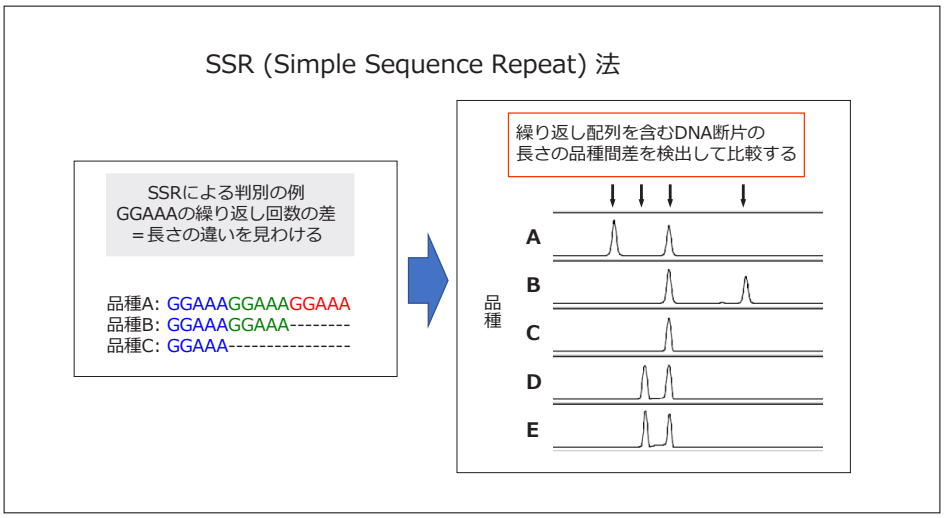
Q2 ＤＮＡ品種識別では、長大な全ゲノムを対比することはしないのでしょうか？代表的なＤＮＡ品種識別の手法（種類）を教えてください。

A リンゴは7.5億、イネは5.65億、ヒトは30億の総塩基数を持ち、このような長大なゲノム全体を対比させることは、膨大なデータ量を取得する際の予算やエラー、膨大なデータ量を比較処理する際のソフトウエアの性能やバイアスを考えると、現実的ではありませんでした。そこで、ゲノム全体から特徴的な部分を抽出して、差異を検出する手法が多く採用されてきました。

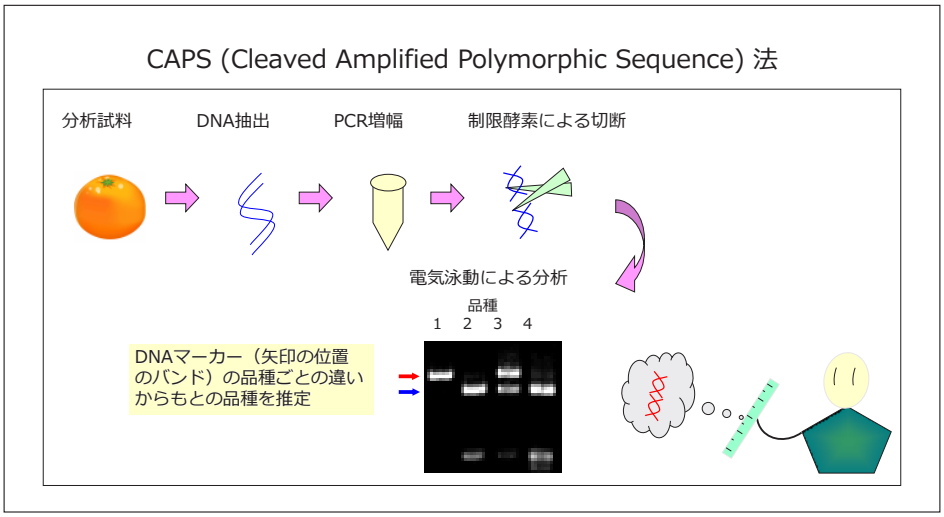
以下に、代表的な４種類のDNA分析方法､SSR（Simple Sequence Repeat）法､CAPS（Cleaved Amplified Polymorphic Sequence）法、SNP（Single Nucleotide Polymorphism）法、レトロトランスポゾン挿入多型マーカー法を紹介します。

SSR法は、ヒトのSTR法と同義で、数個の短いDNA繰り返し配列を利用して、PCR法で増幅したDNAの長さの差異を検出します。繰り返し配列領域は、反復数で変異を起こしやすいことから、DNAの長さを高精度で分析することにより、近縁な品種同士でも判別が可能です。品種の遺伝子型を示すSSR領域を特異的に増幅するマーカーを用いることにより、ブドウ、リンゴ、ニホンナシ、チャ等のDNA品種識別で利用されています。なお、異なる場所・染色体に存在する多数（10-20以上）のDNAマーカーを組み合わせることにより、識別精度を向上させることが

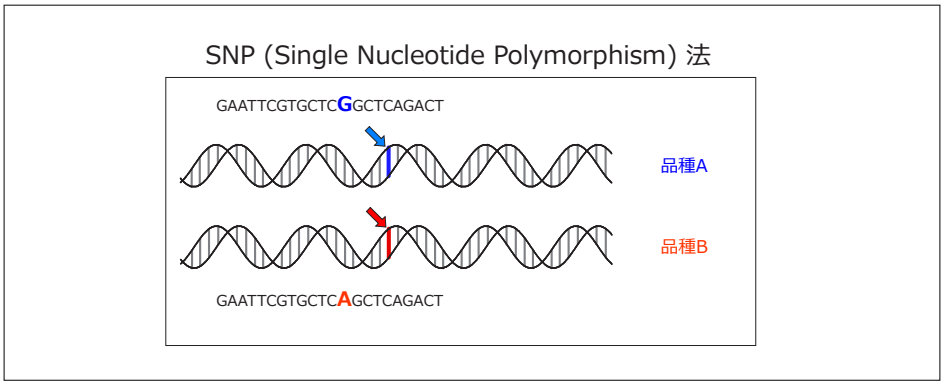
できます。



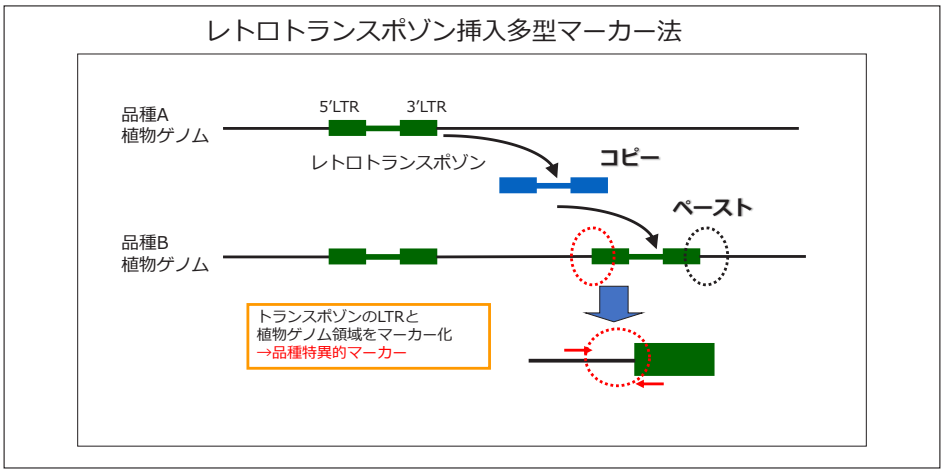
CAPS法は、対象とするDNAの領域をPCR法で増幅した後、制限酵素で特定のDNA配列を切断して長さの違いを検出する方法です。特定のDNA配列の違いにより、制限酵素で切断されるか／切断されないかを、DNAバンドの違いで検出し、イチゴやカンキツ等のDNA品種識別で利用されています。DNAバンドとは、DNAサンプルを電気泳動で分子量の違いで分離した後に、バンド状に可視化したものであり、比較的簡単な操作で正確な結果が得られます。



SNP法は、DNA配列を品種同士でくらべると１つのDNAの違いがあちこちに見つかります。これらはSNPと呼ばれ、１つのDNAの違いを利用することで品種を識別する方法がSNP法です。現時点ではまだ高度な技術と分析コストが必要ですが、CAPS法やSSR法がDNAの長さを比較するのにくらべ特定のDNA配列の違いを直接見分けるため信頼性の高い分析が可能で、今後最も期待される方法です。



レトロトランスポゾン挿入多型マーカー法は、真核生物に存在するレトロトランスポゾンという可動性の因子が、ゲノム中をコピーアンドペースト方式で移動する際に、品種間でレトロトランスポゾンの挿入部位が異なり、挿入部位は安定して遺伝することから品種特異性が極めて高く、品種識別マーカーとして利用価値が高いといえます。挿入部位の有無をDNAバンドの有無で検出する方法で、アズキやカンショ等で利用されています。



Q3 ＤＮＡ品種識別の手法は、どのように開発されるのでしょうか。開発のためにどれくらいの数の品種がサンプルとして供試され、開発された手法はどれくらいの数の品種の識別に適用できるのでしょうか。

A ある植物の種類でDNA品種識別技術を開発する際に、世界に存在する全品種を識別できるDNAマーカーのセットを開発するのが理想ですが、「経済流通している品種は何品種くらい存在するのか不明」、「基準になる個体がどの程度存在するのか不明」、「他者の登録品種は入手困難な場合が多い」、「国外での流通品種は入手困難な場合が多い」など、様々な困難に直面します。

そこで、どの品種を、どれくらいの品種の中から区別したいのかを考慮して、品種の種類・数を決定するのがよいと考えられます。例えば、農研機構でブドウ24品種のDNA品種識別技術マニュアル（https://www.naro.go.jp/collab/breed/hinshu_shikibetsu/index.html）を作成した際

には、「シャインマスカット」、「オリエンタルスター」、「クイーンニーナ」、「サンヴェルデ」、「グロースクローネ」等の農研機構登録品種を、日本で経済流通しているブドウの90%以上を占める品種（「巨峰」、「デラウエア」、「ピオーネ」、「キャンベルアーリー」、「ナイアガラ」、「マスカット・ベーリーA」、「甲州」、「スチューベン」、「藤稔」）や今後の普及が期待される「ナガノパープル」、「ルビーロマン」から識別することを目的にして、24の品種を選定しました。DNA品種識別手法の開発時には、その信頼性を担保するために、登録品種は原原種、原木（やそれに準じる基準樹）からサンプルを入手し、一般品種や遺伝資源は農業生物資源ジーンバンクに登録されているもの等由来が明らかなものを利用するのが望ましいです。

対象の品種数を増やすことにより、多くの品種を識別可能な汎用性の高いDNA品種識別技術の開発が可能で、またDNAマーカーの数を増やせば増やすほど偶然一致する確率が小さくなるので、精度の高いDNA品種識別技術となります。そこで、上の例では、ブドウ24品種について全品種が相互に識別でき、偶然一致する確率が0.1%以下になるように、12種類のSSRマーカーを開発しました。この場合、例えば「シャインマスカット」の分析結果が他の23品種と偶然一致する確率は、対象品種数（24品種）及びDNAマーカーの数（12）の遺伝子型から、0.00004と算定されます。なお、植物の品種のように人為的に選抜された個体では、限定された遺伝子型データを基にした計算値となります。

Q4 植物体の表現型に影響するＤＮＡというのは、ＤＮＡの１つの箇所が決定的な役割を果たしているのか、それともいろいろな箇所のＤＮＡが複層的に作用するということもあるのでしょうか？

A 従来の遺伝学では、質的形質には少数の遺伝子が関与し、量的形質には多数の遺伝子が関与するとされてきました。メンデルの遺伝の法則で有名なエンドウの種子の形（丸、しわ）、種皮の色（有色、無色）、成熟したさやの形（ふくれ、くびれ）、未熟なさやの色（緑、黄色）、背の高さ（高い、低い）、花の色（紫色、白色）では、それぞれ１つ（少数）の遺伝子が表現型に決定的な役割を果たしています。

量的形質では、たとえばイネでは穂数（数）、収量（重さ）、草丈（長さ）、開花期（時間）、果樹類では熟期（時間）、果実重（重さ）、糖度（含量）などは、多数の遺伝子が関与していることが明らかとなっており、いろいろな箇所のDNAが複層的に作用していると言えます。

Q5 ＤＮＡ品種識別によって、何が理解できるのでしょうか。例えば、被疑侵害品である植物体ＸのＤＮＡ分析結果が品種Ａと一致しないと判断された場合、植物体Ｘと品種Ａの特性（種苗法上の重要な形質に係る特性。以下同じです。）は異なると言えるのでしょうか。

分析結果が一致しなかったが、現実の植物体の特性の発現では同じように発現するという事象（他人のそら似）はないのでしょうか？

A ゲノム全体の特徴的な部分を抽出して差異を検出する手法で異なると判定された場合、ゲノム全体では相当な差異が存在すると考えられ、表現型に影響を与える程度の遺伝子の違いがあると考えられるため、植物体ＸのDNA分析結果が品種Ａと一致しないと判定された場合は、植物体Ｘと品種Ａの表現型には違いがあると考えられます。そのため、表現型が適切に「重要な形質」に指定されていれば、「特性」に差があると考えられます。したがって、他人のそら似（DNA分析結果が異なるのに現実の植物体の表現型は同じように発現すること）は、ほぼ生じないと言ってよいです。

Q6 では、植物体ＸのDNA分析結果が品種Ａと一致すると判定された場合は、植物体Ｘと品種Ａの特性は同じと言えるのでしょうか。

A 植物体ＸのDNA分析結果が品種Ａと一致すると判断された場合は、全ゲノムにおいて遺伝子に差がないことを確認しているわけではないため、品種Ａとは別品種である（いずれかの特性が異なる）のに偶然に分析結果が一致したという可能性は否定できません。もっとも、当該識別手法が識別対象とする品種及びDNAマーカーの数が多ければ多いほど、分析結果が他品種と偶然一致する確率を小さくすることができ、精度の高いDNA品種識別が可能となります。

Q7 ＤＮＡ品種識別では、どのような結論を出してもらえるのでしょうか。「●％の確率で品種Ａのクローンである」などと判断してもらえるのでしょうか？

A DNA品種識別の依頼を受けた機関によると思われますが、例えば「試料Ｘを10種類のDNAマーカーで分析した結果、10種類のマーカーで品種Ａと同一のマーカーの遺伝子型を示した。」、「試料Ｘを10種類のDNAマーカーで分析した結果、９種類のマーカーで品種Ａと異なる結果であり、データベースに記載の40品種のいずれもＸと同一の遺伝子型を示すものはなかった」などのように、事実のみを示すものになると考えられます。試料Ｘが品種Ａである確率を出してもらうことは難しいと考えられます。

Q8 植物の種類によって、ＤＮＡ品種識別の可否や精度などに違いはありますでしょうか。

A 以前は、植物から高純度のDNAを抽出することが困難であったため、DNA品種識別の可否はDNA抽出方法の良し悪しに影響されていました。すなわち、植物の細胞壁は破壊が難しく、植物組織中には、高濃度のタンニン、多糖類およびポリフェノール等の夾雑物が含まれているため、植物サンプルからのDNA抽出は非常に困難とされてきました。現在では、広範囲の植物組織（芽、皮、葉、種子、花）からDNA抽出がより簡単になり、なおかつ高収量、高純度のDNA抽出が実現となっています。

植物の種類によって、DNA鑑定の可否や精度は、ほとんどないと考えられます。前述のブドウのDNA品種識別では、交雑種子由来の24品種が識別可能でした。一方、例外は突然変異した品種で、異なる特性がある（例えば、元の品種と花の色のみが異なる）ものの遺伝子のごく一部が変化しているのみであることから、DNAでの品種識別は非常に困難であると考えられます。

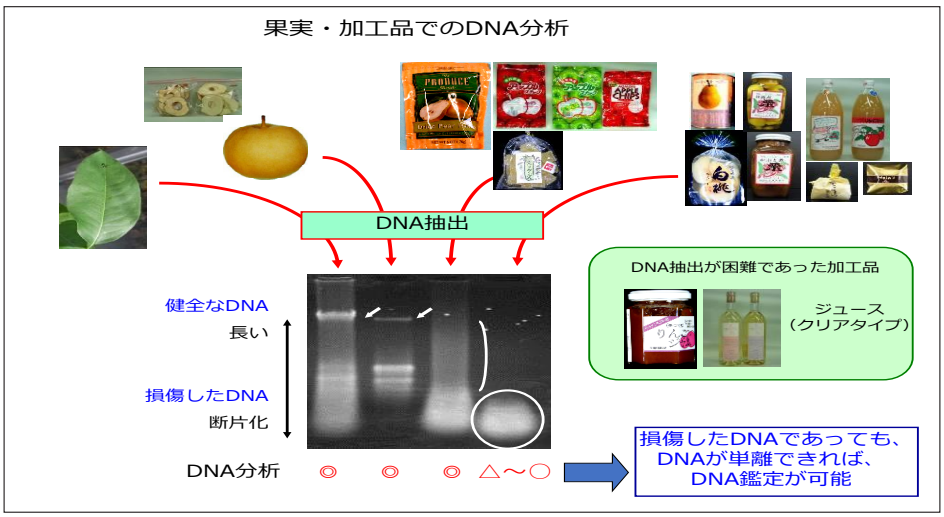
Q9　ＤＮＡ品種識別を行う場合、サンプルはどのように用意するのでしょうか。例えば、葉と果実など、異なる部位であっても、ＤＮＡ品種識別を行うことは可能でしょうか。また、加工品（缶詰、ジャム、焼き芋・干し芋、米飯など）でもＤＮＡ品種識別を行うことは可能でしょうか。

A　被疑侵害品のDNA品種識別を行うサンプルの採取は、農研機構種苗管理センターの品種保護Gメンや弁護士の立ち合いの下で実施し、採取したサンプルの一部は公的機関へ寄託するなど、サンプルの真正性を担保できる方法によることが望ましいといえます。

植物の場合、葉、茎、果実、根、花弁など異なる部位であっても、同一の植物体に由来するサンプルはDNA品種識別に利用可能で、良質のDNAが抽出できれば、同じ結果が得られる。ヒトの一般サンプルでも、血痕・血液、精液、体液、尿、毛髪、爪、血清、臓器、骨、歯などの異なる部位でも、DNAが抽出できれば同じ結果が得られるのと同様です。

一方、種子は、次の世代になるので注意を要します。イチゴ果実では、表面にある小さな粒の中に種子があるので、へたの部分を使うのがよいでしょう。クリ果実では、可食部である子葉を避けて、鬼皮を使います。ブドウ果実では、種子ではなく、果皮あるいは果軸（房の中心にある軸）を使います。

缶詰、ジャムなどの加工品では、DNAが分解されていることが多いため、良質のDNAが抽出できた場合にはDNA品種識別が可能ですが、DNAが完全分解している場合にはDNA品種識別はできません。経験上、クリアタイプのジュース、酒（特に蒸留酒）では、DNAが高度に分解しており、DNA鑑定は困難です。他方、登録品種の育成者権が及ぶとされている加工品（種苗法２条４項、種苗法施行令２条。例えば、焼き芋・干し芋、米飯など）については、DNA品種識別技術が開発されています。



Q10 農研機構のウェブサイトでは、いくつかの品目のＤＮＡ品種識別技術が、「妥当性試験により確立された技術」であると紹介されています。この妥当性は、どのように判断されるのでしょうか。

A 開発されたDNA品種識別技術の妥当性を確認するために、一般的には、ISO/IEC 17025（General requirements for the competence of testing and calibrations laboratories）やISO/FDIS 13495（Foodstuffs–Principles of selection and criteria of validation for varietal identification methods using specific nucleic acid特定の核酸を用いた品種判別法の選定の原則及び妥当性確認のための基準）に準じて、安定性試験と再現性試験を行うことによって、DNAマーカーの妥当性確認が行われます。安定性試験では、同一条件下で同じ結果が出ることを確認し、再現性試験では、異なる条件下で（日時または実施者を変えて）同じ結果が出ることを確認します。

妥当性試験により確立された技術を用いた場合は、DNA品種識別技術マニュアルどおりに分析が行われていれば、正確なDNA分析が可能であり、結果の信頼度が高くなります。できるだけ「妥当性試験により確立された技術」を使うことをおすすめします。

Q11 「妥当性が確立された技術」としてのＤＮＡ品種識別が可能な場合に要する期間、費用はどのくらいでしょうか。

A 植物では、DNA品種識別やDNA分析サービスを提供している機関が少なく、またDNA品種識別が可能な作物が限定される。以下に、DNA品種識別サービスを提供している例を紹介します。

農研機構種苗管理センターでは、妥当性が確立されたDNA品種識別技術を用いて、DNA分析を行なっています。権利の有効な登録品種を守るサポートとして、「育成者権の侵害が疑われる場合」に限り、利用可能となっており、対象の植物は、イチゴ、カーネーション、カンキツ、チャ、トウモロコシ、ニホンナシ、ブドウ、リンゴ等で、費用は１報告書当たりの基本手数料は34,980円です。

コメ、ダイズ、コムギ、オオムギ、アズキ、白インゲンでは、複数の民間の検査会社でDNA品種識別を引き受けており、費用は５～10万円程度、期間は１週間程度となっています。また、公益財団法人かずさDNA研究所では、ゲノム情報や分析ノウハウを利用して、主に実用植物や微生物を対象とするさまざまなDNA分析や実用技術開発の受託サービスを行っています。ラッカセイ、シバ、サトイモ、カンショ、イチゴなどについて、DNAマーカーを用いたDNA型解析を行っています。

Q12 未だ妥当性が確立されたＤＮＡ品種識別技術（ＤＮＡマーカー）が存在していない植物品種の異同が問題となったときに、どこかの機関に依頼したら簡単に当該品種についての識別技術を開発してもらえたりするものなのでしょうか？

A DNAマーカーやDNA品種識別の報告はあるが、研究段階に留まっていたり、妥当性が確立されていない植物の種類が多数あります。その場合、DNAマーカーの詳細が公的な遺伝子データベースに登録・公表されていること、DNA品種識別技術が査読のある学術雑誌に論文として掲載されていること等、研究成果として認知され、第三者によって検証されうる場合には、妥当性が確立されたDNA品種識別技術に準じた取り扱いが可能と考えます。

これまでの回答のとおり、DNA品種識別の精度を上げるためには、識別可能な植物の種類及び品種並びにDNAマーカーを増やしていくことが重要です。農林水産省の設置した「海外流出防止に向けた農産物の知的財産管理に関する検討会」において、我が国における育成者権管理機関のあり方について示されていますが、こういったオールジャパンによる取組の中で、研究機関との連携が進み、これまでDNA品種識別手法がなかった品種についても識別対象に取り入れられていくことが期待されます。