

DNA 品種識別技術の紹介



農林水産省輸出・国際局知的財産課 次席審査官
杉澤 武

育成者権の侵害立証への活用が期待されているDNA品種識別技術には様々な方法があるが、それぞれの技術でどのようなことが行われ、どのように植物等¹の品種間の異同を判定していくかを理解するに当たっては、一定程度の専門的な知識が必要である。もっとも、技術の内容を専門家が「正確に」伝えようとする、どうしても専門的な用語が多くなるため、一般の方々にとってなかなか理解しにくくなってしまふ。そこで、特集「育成者権の侵害立証におけるDNA品種識別技術の現在地」（知財ぷりずむ2023年3月号30頁以下）では、山本俊哉・平井佑希両氏による「DNA品種識別技術に関する基本的な前提知識（Q&A）」において、法律実務家を含む品種登録制度のユーザー向けに、技術面の解説をいただいたところである。本稿では、そこで紹介された具体的なDNA品種識別技術（DNAマーカー）のうち代表的なものをピックアップして、更に解説を行うこととする。DNAマーカーを用いた分析技術に馴染みのない方に大まかな内容をイメージしてもらうことに主眼を置いていることから、以下の説明や図は技術内容を簡略化したものであることを、ご容赦願いたい。

具体的には、SSR（Simple Sequence Repeat）とCAPS（Cleaved Amplified Polymorphic Sequence）によるDNAマーカー（ゲノム上の目印）の検出方法と、検出された結果からどのように判定を行っているかについて説明する。

1. PCR（Polymerase Chain Reaction）によるDNAの増幅

SSRとCAPSによるDNAマーカーの説明の前に、どちらのマーカーを利用する際にも共通して使われる技術であるPCRについて、簡単に説明する。新型コロナウイルスの検査方法として一般の方々にもすっかりお馴染みの用語になったPCRであるが、プライマーと呼ばれる短いDNAを2つ使って、その間のDNAを増やす技術のことをいう。PCRでDNAの特定の部分を増やすことで、後述する電気泳動でその部分の長さや数の違いを可視化することができる。

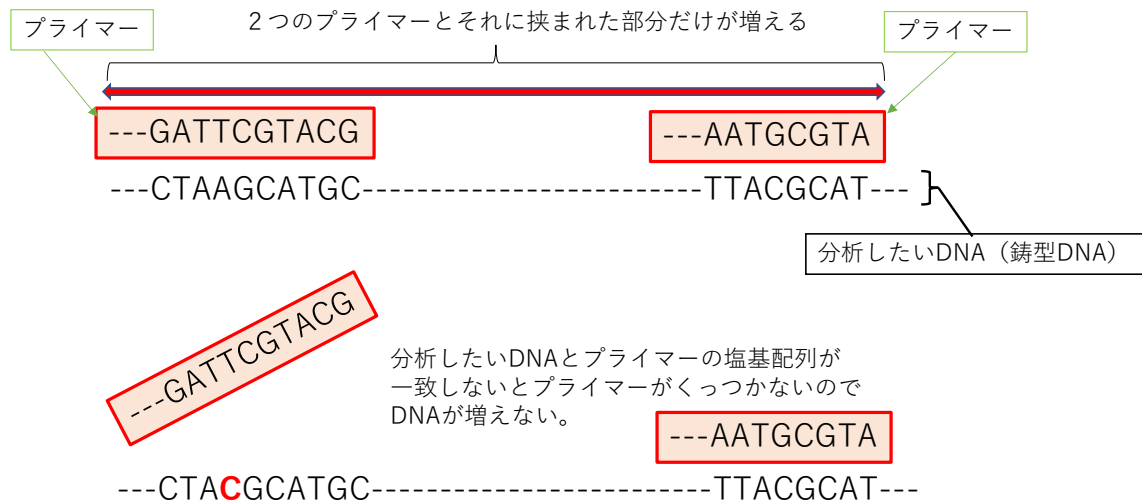
DNAはA（アデニン）、T（チミン）、C（シトシン）、G（グアニン）の4つの塩基で構成されていて、AはTとだけ、CはGとだけくっつく（これを相補性という）。そのため、分析したいDNA（鋳型DNA）の中に2つのプライマーに相補的な塩基配列が両方ともあればDNAは増幅されるが、どちらか一方でも無ければDNAは増幅されない。

1 種苗法で保護されている農林水産植物には多細胞の藻類や政令で定める32種類（令和4年4月現在）のきのこも含まれている。

プライマーは、分析対象となる植物等で塩基配列が同じ部分に作る（設定する）ことが多い。そうすることで、全ての分析対象から増幅されたDNA（増幅産物）を得ることができる。

一方、プライマーとプライマーの間の塩基配列は分析対象間（品種間）で違いがあるということも品種識別においては必須条件である。プライマー間にどのような塩基配列の違いがあるかで使用する分析技術が異なることになる。

PCRのイメージ

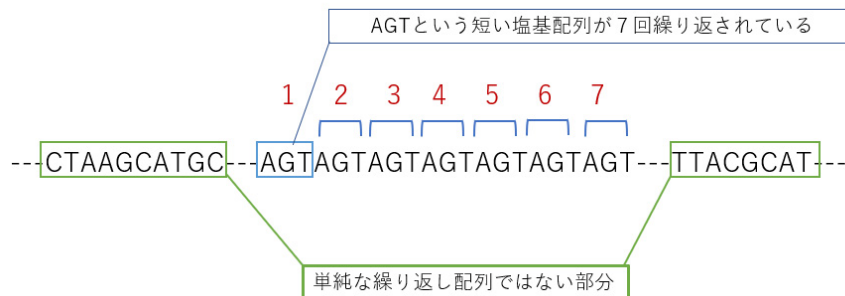


注：わかりやすくするために鋳型DNAを一本鎖で表している

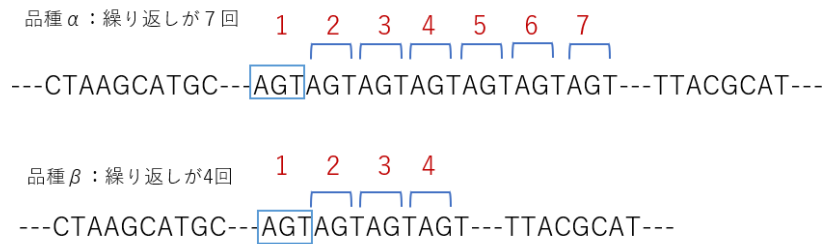
2. DNAマーカーを用いた分析技術

(1) SSR (Simple Sequence Repeat)

SSRとは、DNA配列中にある短い塩基配列の繰返しのことであり、下図における「AGT」がそれにあたる。



例えば、品種 *a* と品種 *b* があつたときに、品種 *a* はAGTの繰返しが7回、品種 *b* は4回だつたとする。



プライマーは品種αと品種βで塩基配列が同じ部分に作られて（設定されて）いるので、この場合、品種αと品種βから増幅されるDNAは、長さが異なる。この長さの違いをPCRすることによって可視化することができる。



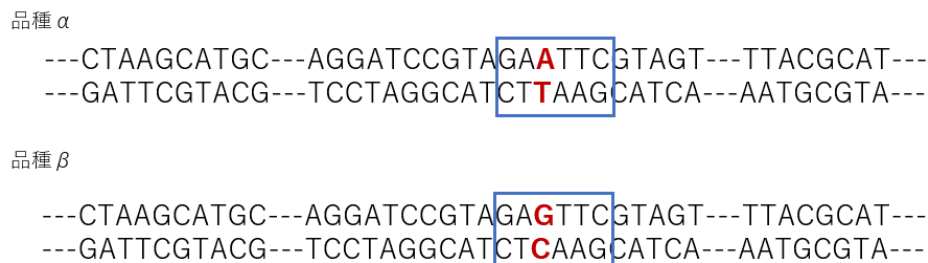
繰り返し配列の数の違いで増幅産物の長さが変わる

注：わかりやすくするために鋳型DNAを一本鎖で表している

このようにSSRは増幅産物の長さの違いによって、品種を識別するものである。

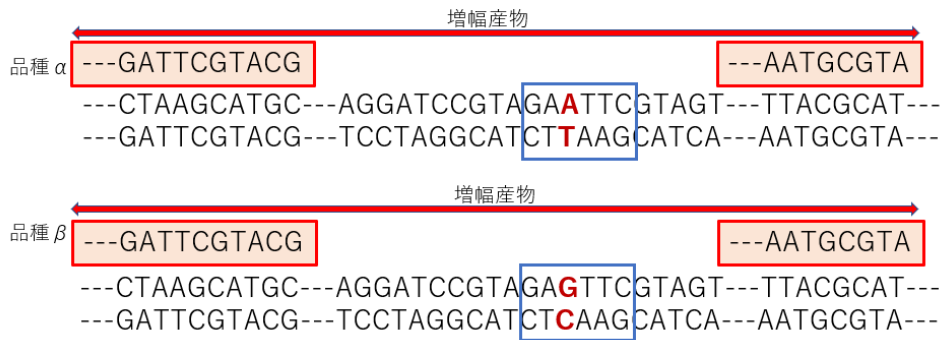
(2) CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)

例えば下図のように、DNA配列上で一つの塩基のみが異なる品種αと品種βがあったとする（枠内の太字の部分）。



プライマーは品種αと品種βで塩基配列が同じ部分に作られて（設定されて）おり、かつこの場合、プライマー間の塩基の数も同じなので、PCRをすると同じ長さのDNAが増幅される。

2つの品種を同じプライマーでPCRすると・・・

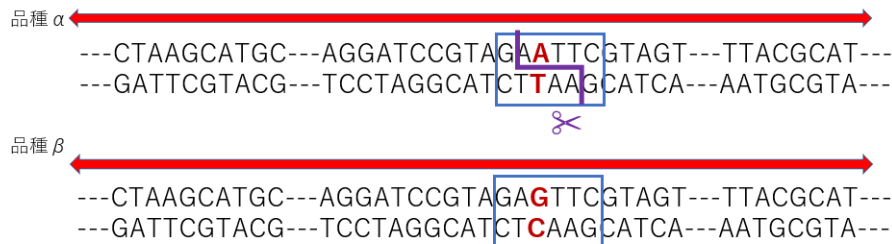


プライマー間の塩基の数が同じなので増幅産物の大きさに差はない。

ここで、増幅産物を制限酵素で処理する。制限酵素はDNAの特定の塩基配列を認識して切る酵素である。ここでは、Eco R I という制限酵素で処理した場合を示す。下図の例では品種αの増幅産物は切断されるが、品種βの増幅産物は切断されない。

品種αと品種βの増幅産物に制限酵素「Eco R I」を反応させると・・・

「Eco R I」は GAATTC
CTTAAG というDNAを認識すると G LAATTC
CTTAA T G こんな感じにDNAを切るので・・・



品種αの増幅産物は切れて、品種βの増幅産物は切れない

このようにCAPSでは、PCRをただだけでは品種間の塩基配列の違いを可視化できない場合においても、制限酵素の性質を利用して、下図のように増幅産物の長さや数で違いを可視化できるようになる。



品種αと品種βは増幅産物の長さや数で識別できるようになる

(3) DNAマーカーとは

上記で説明したように、SSRでもCAPSでも、2つのプライマー間に品種間を識別するゲノム上の目印（標識）となる特定のDNA配列（塩基配列）があるが、これらの特定のDNA配列（塩基配列）のことをDNAマーカーという（SSRの場合はSSRマーカー、CAPSの場合はCAPSマーカーともいう）。

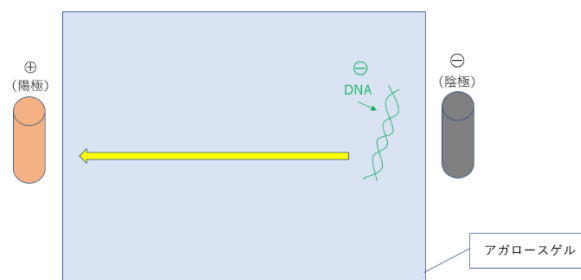
3. アガロース電気泳動による長さの可視化

ここまで、SSRとCAPSで異なる長さの増幅産物が得られることを説明したが、次に、その長さの違いをどのようにして可視化するのかについて説明する。

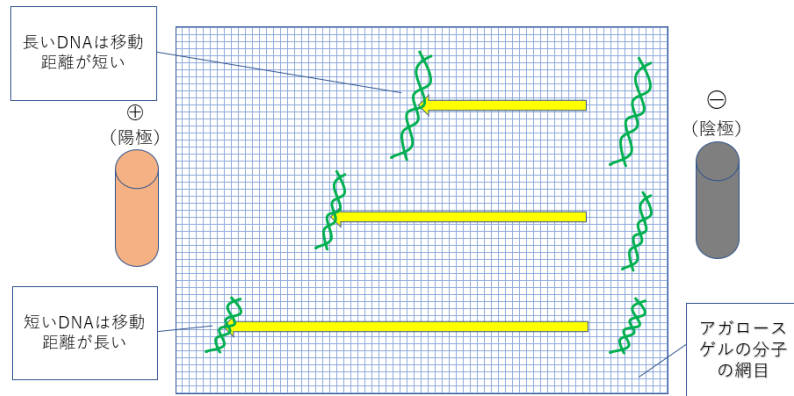
可視化する方法はいくつかあるが、ここではアガロース電気泳動の例で説明する。アガロースという言葉は聞きなれないかもしれないが、ゼリー状の寒天のようなものをイメージしてほしい。また、電気泳動は中学の理科の授業で行う電気分解の実験のようなもので、溶液中に電気を通すことで、陽極（+）側にマイナスに荷電している物質を、陰極（-）側にプラスに荷電している物質を引き寄せるものである。DNAはマイナスに荷電しているため、下図のように陰極（-）側から陽極（+）側に移動する。



これをアガロースゲルの中で行うと、DNAはアガロースゲルの中を通過して陽極（+）側に移動する。

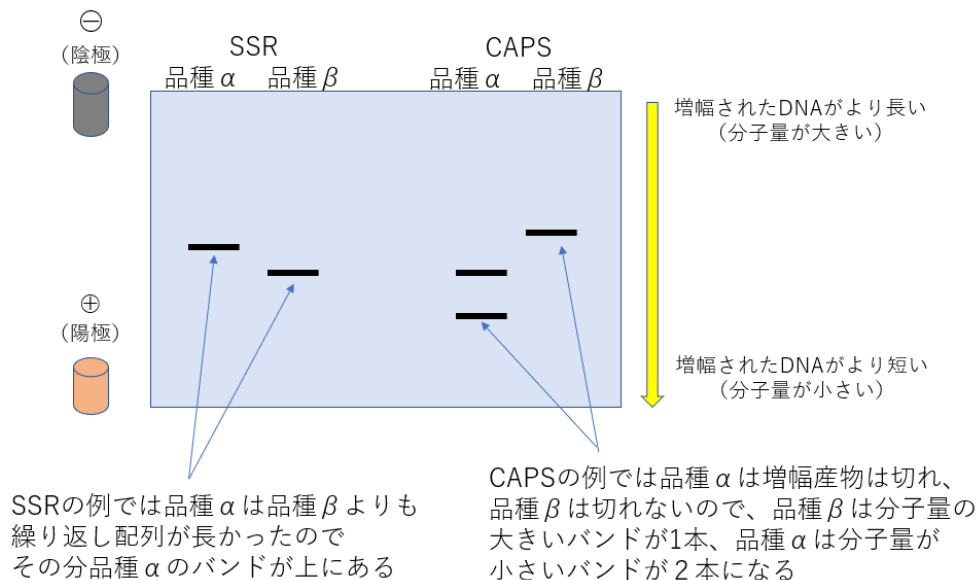


アガロースゲルには分子の網目があり、DNAはその網目を通して移動することになる。このため、DNAが長いと網目に引っ掛かりやすいので、移動が遅くなる。逆にDNAが短いと網目に引っ掛かりにくいので、早く移動する。その結果、DNAが一定時間にアガロースゲルの中を移動する距離によって、DNAの長さ（分子量の大きさ）を見分けることができる。



上図では、DNAが右から左に移動しているが、実際の電気泳動の画像は、通常上が陰極（-）側、下が陽極（+）側なので、下に行くほどDNAが短い（分子量が小さい）ことになる。

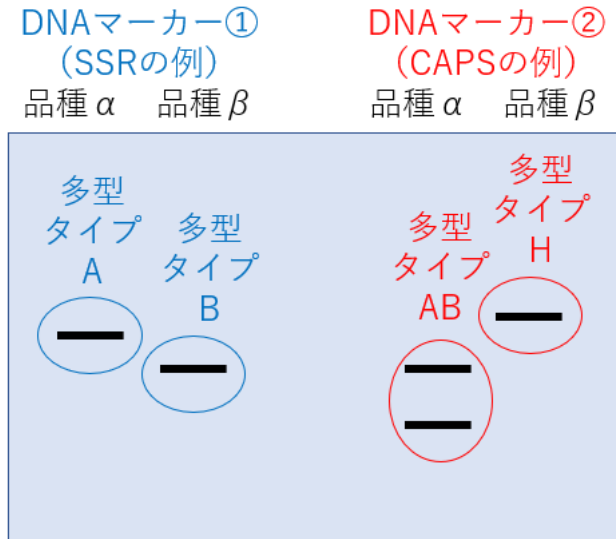
ここで、2.(1)SSRと2.(2)CAPSの例で示した品種 α と品種 β の増幅産物をアガロース電気泳動した場合、それぞれの増幅産物の長さの違いは下図のように可視化される。



4. マーカー情報の整理

2. で説明したDNAマーカーで検出されるDNA配列の違いを「多型」という。SSRやCAPSにおいては、多型をタイプごとに名前を付けて（記号化して）整理することが多い。

下図では、SSRの例で示したDNAマーカーにおいて、品種 α のようにAGTを7回繰り返しているものを多型タイプA、品種 β のようにAGTを4回繰り返しているものを多型タイプBとした。また、CAPSの例で示したDNAマーカーにおいて、品種 α のように増幅産物が制限酵素EcoRIで2つに切れるものを多型タイプAB、切れないものを多型タイプHとした。



これらの情報は表のようにして整理されることが多い。例えば、上記のDNAマーカー①と②を含め、3種類のDNAマーカーを用いて5つの品種の多型タイプの情報を記号で整理したときに、下表のようになったとする。

	品種Ⅰ	品種Ⅱ	品種Ⅲ	品種Ⅳ	品種Ⅴ
マーカー①	A	A	A	B	B
マーカー②	AB	H	AB	H	AB
マーカー③	X	BB	BB	BB	X

この場合、マーカー①は品種Ⅰ、Ⅱ、Ⅲと品種Ⅳ、Ⅴとを識別することはできるが、品種ⅠとⅡや、品種ⅣとⅤを、識別することはできない。しかし、マーカー①、②及び③の3つのマーカーを使えば、品種Ⅰ～Ⅴを全て識別できることが、表中の記号から読み取れる。

このように、DNAマーカーは特定のDNA配列（又は塩基配列）によって供試品種を2～数種類の多型タイプに分けることができるが、供試品種が多くなると、1つのDNAマーカーでは識別できなくなることが多い。そのため、いくつかのDNAマーカーを組み合わせることで、多くの品種を識別できるようにしたものがマーカーセットである。

また、マーカーセットにおけるマーカーの組合せは必ずしも固定されているわけではない。例えば、新たに別の品種を追加して識別しようとしたときに、それまでのマーカーセットでは識別できないことがある。

下表の例では、先の例に品種Ⅵを追加した場合を示している。この場合、マーカー①、②及び③だけでは、品種ⅤとⅥを識別することができないが、マーカー④を追加すれば識別ができることが、表中の記号から読み取れる。

	品種Ⅰ	品種Ⅱ	品種Ⅲ	品種Ⅳ	品種Ⅴ	品種Ⅵ
マーカー①	A	A	A	B	B	B
マーカー②	AB	H	AB	H	AB	AB
マーカー③	X	BB	BB	BB	X	X
マーカー④	E	G	E	G	E	G

このように、十分な識別力があり、かつ効率的といえるためのマーカーの組合せは、識別したい品種の数や種類等によって変わることが多い。なお、上の例では、理論上識別可能となる最低限のマーカー数を示したが、実際にマーカーセットを開発する際には、より多くの数のマーカーを開発することで識別の精度を上げることができる。

5. 終わりに

以上、SSRとCAPSを例に、DNAマーカーの検出方法と検出された結果による判定方法を説明した。上記からもわかる通り、1つ1つのSSRマーカーやCAPSマーカーだけでは識別できる品種の数に限りがあることなどから、多くの品種が存在する植物種等の品種識別を行うためには、まずは対象とする植物種等に含まれる多くの品種を分析し、得られた多型情報（SSRの例でいえば、品種 α と品種 β それぞれにおける「AGT」配列の繰返し回数。CAPSの例でいえば、DNA配列のうち一部の塩基のみが異なる部分）から、それらを効率的に識別するのに十分な数のマーカーを開発することが必要である。その際、いくつかの注意すべき点がある。

まずは、多型情報を得るために供試する品種のサンプルが品種を代表するものとして適切であるかである。栄養繁殖性の品種であれば原木や元株、種子繁殖性の品種であれば、育成者や第三者機関で適切に保存・管理している等、由来が明確で、後々検証可能なサンプルであることが望ましいが、入手が簡単ではないことも多い。

次にマーカー性能の検証である。多型を検出できるマーカーであっても、実際に使ってみると増幅効率が良くないものや多型の識別がしにくいものもある。このようなマーカーはマーカーセットからは除外しなければならない。

そして、適切なサンプルとマーカーから得られた多型情報は上述したように表(データベース)にしてまとめるが、新たに流通するようになった品種等の多型情報も適宜追加し、かつ適宜マーカーを追加することが有益である。このため、データベースは継続的にアップデートされることが必要である。

以 上