【解説】

植物品種識別における DNAマーキングという考え方

松山知樹

栄養繁殖作物では、枝変わりなどの小さい変異で優良形質を得ることができる反面、品種・産地判別や権利保護のためにはDNAレベルの新しいトレーサビリティ手法の開発が必要な状況にある。これに対応すべく、物理的変異原処理後、形態・形質に変異のない個体を選抜し、ゲノムDNA中の反復配列から変異領域を見いだすことで品種内識別に資する「DNAマーク」の作成を行なった。ここでは、この一連のスキームを「DNAマーキング」として紹介する。同時に、膨大な非遺伝子領域を含む塩基配列情報をもたらした基礎ゲノム研究の成果が実用段階に直結のツール開発につながった事例として、キク・ランの実例を挙げて解説する。

品種名・産地偽装による「食の安全」を脅かす事件や優良品種の「育成者権」を侵害するような事態が続いており、このような状況への対応として様々なテクノロジーが導入されている。このうち農産物の品種・産地判別については、環境要因に影響されず、生産から流通・消費に至るあらゆるステップでの安定した検出能を有するDNAマーカーの開発が多くの植物種を対象として進められている。これは、法医学分野における個人識別や親子鑑別に用いられるDNA鑑定と同様のものであり、

DNA Marking: Development of 'DNA Marks' for Specific Cultivar Identification Using Repeated Sequences and Physical Mutagens
Tomoki MATSUYAMA, 独立行政法人理化学研究所基幹研究所

ゲノムDNA中の高い変異性を示す領域や一塩基置換情報をもとに、ごく微量のDNAからPCR (Polymerase Chain Reaction) を利用して行なわれる。

植物のDNA鑑定においてはヒトの個人は品種レベルに相当しており、数々の品種間を識別できるDNAマーカーが作出されている。図1-Aにあるように、元品種aに品種1を交配することでa1-1, a1-2...と新品種を育成した場合、aと1が純系であり異なるパターンを示せば、それぞれの親由来のバンドを有し、品種識別も親子鑑別も可能となる（同じパターンになるケースもあるので、通常、複数のマーカーを用意しておく）。現在行なわれている品種識別プロジェクトの多くはこのようなケースのDNAマーカー開発を進めており、多大な成果をあげている。しかし、花きや果樹のような栄養繁殖作物では、枝変わりや芽条変異など、ごく小さな突然変異により有用形質を付与し品種化できるものが多く、事情が異なる。これらは交雑を経ずに増殖できるため、ヒトをはじめとする動物の場合に当てはめると、クローン個体を識別するのとはほぼ等しいことになり、元品種との識別は困難を極める（図1-B）。一方で、日本産の優良栄養繁殖作物品種では、挿し木、接ぎ木などのクローン増殖が容易であるため、不法流出による海賊版生産物の流通、国外からの安価な形での流入による国内生産者への圧迫、

用語解説

RLGS 法: Restriction Landmark Genomic Scanning 法。ゲノム DNA を 8 塩基認識の制限酵素で処理し、その切断サイトそのものを放射標識した後、アガロースゲル電気泳動で一次元目の分画を行なう。分画しやすい断片長にするために 6 塩基認識の制限酵素でもう一度処理する場合もある。さらに、そのゲルをそのまま制限酵素処理し、アクリルアミドゲルで二次元目の電気泳動を行なう。これにより、放射標識された制限酵素認識配列がランドマークとなり、タンパク質の二次元電気泳動パターンのようなスポットとして検出され、一度に 2,000 個程度まで解析可能となる変異検出法である。シグナル強度はスポットのコピー数を明瞭に反映するため、DNA メチル化感受性制限酵素を利用することでエピジェネティクス研究に用いられるケースが多い。

AFLP 法: Amplified Fragment Length Polymorphism 法。まず、ゲノム DNA を 6 塩基と 4 塩基の認識制限酵素で処理する。それぞれに二本鎖のアダプターを結合し、アダプターの塩基配列とそれに隣接する 1～3 塩基を調製することで、選択的な PCR を行なう。プライマーを変えることで多数のゲノム DNA 断片の変異を調べることが可能となる。ゲノム DNA の情報を必要とせず、安定性も高いため情報量の多い手法として頻繁に利用される。

RAPD 法: Random Amplified Polymorphism DNA 法。ゲノム DNA を鋳型にして、10 塩基程度のランダムプライマーにより PCR 増幅し電気泳動パターンを比較することで変異検出を行なう。ゲノム DNA 情報を必要とせず、簡便に検出できることからよく利用される手法であるが、不安定性もあるため、得られた結果はクローン化して確認する必要がある。

図 1 ■ 品種育成と DNA マーカーの電気泳動パターン

A: 交雑による場合, B: 突然変異による場合

あるいは市場での不適当な評価といった問題が生じている。これらは検査のために栽培試験に長い時間と労力を要し、水際措置での対応や育成者権の保護に向け、DNA レベルでの識別による迅速な対応が必要となっている。筆者らは、これらの問題点の解決を目指し、「DNA マーキング」と称した研究スキームを提案し、現在、栄養体繁殖作物のうち花き・果樹を中心としてプロジェクトを

進めている。本稿ではキク、ランの日本産優良品種を供試した事例を挙げてこの研究内容を紹介する。

キクでの DNA マーク作出事例

前述のような海外への種苗の不法流出が危惧される作物の一例として、鹿児島県の秋輪ギク「新神」が挙げら

図2 ■秋輪ギク「神馬」と「新神」を識別する DNA マークの作成

A:「神馬」と「新神」イオンビーム照射により育成した「新神」での側枝着生. B:レトロトランスポゾン配列を利用したゲノムスクランニング. 矢印は「新神」において明らかにシグナル強度が小さいバンド. C:「新神」DNA マーク (矢印は「新神」のみ検出されない変異バンド)

れる. これは, 全国で栽培されている主要品種「^{じんば}神馬」にイオンビーム照射し(日本原子力研究機構・高崎), 年内の作型において側枝の発生が少なくなる形質を付与した品種である(図2-A^(1,2)). この新形質により栽培過程における側枝を摘むための屈む作業が大幅に少なくなり, 摘花作業の労力や負担が著しく軽減されたが, 市場に出回り商品となった際には, 側枝の有無は関係なく, 両品種の外見による判別は困難である. この場合, DNA鑑定が有効な手段となるが, 「新神」は突然変異誘発によって育成した品種であるため元品種とほぼ同じ遺伝質であり, 従来法での識別は難しい.

キクに対して, これまで筆者がゲノムワイド変異検出に利用してきた RLGS (Restriction Landmark Ge-

nomic Scanning) 法を行なったところ^(3,4), DNAメチル化感受性制限酵素を用いた際の検出スポット数が著しく少なく, CGやCNG配列の高度なメチル化が示唆された. また, 6倍体でゲノムサイズが大きいことから, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法などの制限酵素を利用する方法やアレー, サブトラクションといった変異検出法の適用には難があると考え, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法などのPCR増幅産物によるDNA長の変異を検出する方法に絞って検出を進めることとした. イオンビームによる生物照射では, 塩基置換の他に挿入や転座, 数bpから数十kb程度の欠失を誘発している例が報告されており^(5~7), これらのある程度の効率で検出できれば有効な

情報となる。「新神」と同様に「神馬」へのイオンビーム照射により作出された「今神」では約 2% のゲノム DNA 量減少があり⁽⁸⁾、原報に従う市販のプライマーセット (Operon Biotechnologies Inc.) を用いた RAPD 法による変異検出が報告されている^(9,10)。しかし、「新神」においては同様の方法では検出に至らなかった。また、リボソーム RNA 遺伝子クラスターや単純反復配列などの縦列型反復配列は構造上の特徴から高変異性を示し、個人識別、親子鑑定などの DNA 鑑定に供されてきたが、これまでのテストでは、どの配列を利用しても変異を示す結果は得られなかった⁽¹¹⁾。一方で、現在は諸所のゲノム解析プロジェクトの多大な努力により非遺伝子領域を含む膨大な塩基配列情報の集積がなされ、これらの解析結果あるいは進行中のデータを利用できる状況にある。そこで、以下のような特徴があり、変異の集積が期待できる散在型の特定領域、特にレトロトランスポゾンとその近傍領域にターゲットを絞った変異検出を試みることとした。

1) 非遺伝子領域であり、変異が起きても表現型への影響はない、もしくは少ない。

2) 数 kb 程度の長さを単位として、ゲノム上に散在している。

3) 動植物種の区別なく、進化を通して保存されているタイプがあり、構造上保存された領域もある。

これらにより、多種類のレトロトランスポゾン塩基配列情報を得ることができ、かつ、一つの情報でゲノム上の複数の領域を一度に効率よく調べることも可能となる。また、ゲノム解析がまったく進んでおらず、塩基配列情報がほとんどないキクのような園芸作物をサンプルとした場合でも開発研究を進めることが可能となる。

本研究では、レトロトランスポゾンとしての構造がコンパクトにまとまっているトウモロコシ TRIM⁽¹²⁾ やキクの情報を含む *pol* 領域の RT (Reverse Transcriptase) 遺伝子領域の情報が豊富な gypsy タイプの塩基配列情報を主に利用した⁽¹³⁾。これらの中で構造上保存されている LTR (Long Terminal Repeat) や *gag*・*pol* 領域、PBS (Primer Binding Sequence)、ppt (polypurine tract) に注目し、プライマーデザインを行なった。まず、これらのプライマーによりレトロトランスポゾン内の増幅を試みた。55℃ および 37℃ のアニール温度での PCR 解析を行なったが、変異の検出はなかった。さらに、異なるレトロトランスポゾン配列からのプライマーセットで PCR 増幅を進めたところ、TRIM の ppt とキク RT 遺伝子の一部からデザインしたセットで「新神」において再現性高く、薄くなるバンドが見つかった (図 2-B)。

「神馬」において相当するバンドをクローニングし、塩基配列を決定したところ、レトロトランスポゾンの特徴づける領域は認められなかったが、「神馬」と「新神」に対し、この配列内の PCR 増幅を行なった際に、明瞭に両品種を識別することができた。さらに、想定される実用場面・現場でのハンドリング・安定性を考慮し、500 bp 前後の PCR 産物で明瞭に「神馬」2 本、「新神」のみ 1 本となるバンドパターンを作出した⁽¹⁴⁾。図 2-C に示すように、この変異は育成の過程で「新神」のゲノムに固定されており、保存株、農家などに供給する生産株双方において安定して検出できること、および、どの「神馬」系品種でも 2 本出現し、「新神」のみ 1 本となるパターンであることも確認した。以上の結果は、全国の「神馬」系品種の中で鹿児島県育成の「新神」を明瞭に特徴づけるものであり、これを品種内識別に資する「DNA マーク」とした。

ランでの品種内識別事例

ランは茎頂分裂組織に由来する PLB (プロトコーム状球体: Protocorm-like body) と呼ばれる形態で大量増殖し、メリクローン苗の供給を行なう栄養繁殖作物であり、「新神」と同様に優良品種における海賊版生産物の流通が危惧されている。(株)向山蘭園では、ランのうちシンビジウムの主力品種である「インザムード」に対し、重イオンビーム照射 (理研仁科加速器センター) による通常の突然変異育種による新品種選抜を進めていた。図 3-A にあるように、花色変異体を選抜した後、変異が観察されなかった残りの照射済系統群から数系統を供試し (図 3-B)、キクと同様にレトロトランスポゾン塩基配列情報を利用したゲノムスキニングを行なった。キクと同様にランもゲノム情報がほとんどなく、RLGS 法による高度な DNA メチル化を示唆する結果を得ていた。また、供試品種が 4 倍体であることもあり、DNA 長変異の検出を進めることとしたが、通常の RAPD 法 (Operon Biotechnologies Inc.) では変異の検出はなかった。さらに、TRIM や gypsy などのレトロトランスポゾンのユニット内の増幅、あるいは「新神」のときのようにそれらの組み合わせを変えた PCR 増幅でも変異領域の検出はなかった。

そこで、一つの試みとして、一方をランのゲノム DNA に相同領域が存在することが確認されたレトロトランスポゾンの塩基配列情報でデザインしたプライマーとし、もう一方を RAPD プライマーとした組み合わせで PCR 増幅を行なった。その際、レトロトランスポゾ

図3 ■ラン・シンビジウム品種「インザムード」のDNAマーク作成

A: イオンビーム照射後の変異体選抜, B: 野生型と照射後形態形質に変異のなかった植物体 (系統R), C: 15 mer-RAPD プライマーによる系統Rの変異検出例 (矢印). 1~4 はインザムードの別系統, 5~8 は系統Rの異なるバルブを表わす. D: 系統RのDNAマーク (矢印は変異検出バンドを示す)

ンプライマーは 55℃ のアニーリング温度を想定してデザインされているので, RAPD プライマー側を原報通りの 10 mer から 15 mer 程度まで伸ばし (15 mer-RAPD プライマー), 両方の T_m 値をほぼ合せてから PCR 増幅に供した. T_m 値を RAPD プライマー側に合わせ, レトロトランスポゾン側を短くして 37℃ のアニーリング温度で増幅を行なった場合は, ほとんどバンドの検出はなかったが, 15 mer-RAPD プライマーを使った PCR 増幅ではほぼすべてのトライアルでバンド数が多く, 情報量の多いパターンが検出された. 結果として, 3 系統で特異的パターンの検出に至り, うち図 3-B に示す系統 R では 3 セットのプライマーで系統特異的パターンを検出できた. 図 3-C にゲノムスキニングの一例を示す. 変異バンドを元品種からクローニングし, 得られた塩基配列より「インザムード」の品種内 (系統間) 識別可能な DNA マークも作成できた (図 3-D). その際, キメラの可能性やマーク検出の安定性をチェックするため, 同じ系統由来の株 (バルブ) 毎でのデータもと (図 3-C, D 中のレーン 5~8), 確認しながら進めた. この系統は PLB 由来メリクローン苗での DNA マークの保存を確認後, 大量増殖ステージに進んでおり, 他の系統についても, 順次, DNA マーク作成および大量増殖を進めている.

「DNA マーキング」という考え方

単純反復配列 SSR (Simple Sequence Repeat) や一塩基置換 SNP (Simple Nucleotide Polymorphism) を利用した解析による品種識別・同定は多方面のプロジェクトにより進んでおり, 成果をあげている (<http://www.hinsyu.maff.go.jp/>). これらにおいては, 同一品種内, 系統内は同じパターンになることが前提となっている. 栄養繁殖作物の花きや果樹では, 前述のように枝変わりや芽条変異によって育成し品種登録されるものがあり, 元品種と新品種において「品種」の前提となる遺伝質はほぼ同一のままである. その識別のために, ごく小さい変異を膨大なゲノムから探し出す作業は現実的ではない. したがって, このような場合の品種識別には, 積極的に変異を誘発するという工程を経て, その変異を探し出すという作業が必要と考える. 今回, 「新神」について元品種「神馬」との DNA 鑑定による識別が実現したことは問題解決の糸口を示すものであり, これを受けて, 筆者らは「DNA マーキング」と称した研究スキームを提案した.

従来の突然変異育種の選抜においてイオンビームなどの物理的変異原に代表される人為的変異誘発照射後, 形態・形質に変異のあった個体を除き, これまでは捨てていた照射体プールを保存する (図 4-①). その中から, 遺伝子をコードしておらず, 変異が起きても表現型に出ない, ないしは出にくいレトロトランスポゾンのような反

図4 ■ 栄養繁殖作物における品種識別・産地判別のための研究スキーム：DNA マーキング

反復配列をターゲットとしてゲノムスキャンニングし、変異を検出する (図4-②)。前述のキク・ランのDNA マークは、いずれも、直接的な証拠となる既知配列との相同性は認められなかったが、反復度が高いことはハイブリダイゼーションなどによるコピー数検定で明らかになっている。しかし、ゲノム解析の進んだ供試サンプルであれば必ずしも反復配列にこだわる必要はない。表現型に関与がなく (あるいは少なく)、PCR による検出が容易なゲノム DNA 領域の情報を予め用意しておく戦略も考えられる。これらの場合、ターゲットと定めた配列・領域に変異が入るのを待って選抜をするということになり、このステップは「トラップ」というイメージの捉え方もできる。変異の検出された個体は、クローン増殖することで特有の「DNA マーク」を有した系統として維持する (図4-③)。

以上のスキームは、結果的に DNA に対し積極的な印づけ処理を施したことになり、これを「DNA マーキング」とした。このような DNA マークをもつ系統を複数用意できれば、最初から産地ごとにあるいは業者ごとに配布することで産地判別や同一品種内での識別ができ、生産から流通・消費に至る過程でのトレーサビリティが可能となる。従来からの既存品種および従属品種の品種間識別プロジェクトをヨコ軸とするならば、本プロジェクトは品種内識別を目指しており、タテ軸という位置付けになるかと考えている。

この手法は、ごく近い品種ないしは同じ品種内で DNA に「マーク」を付すことを特徴とする。この場合、第一に DNA 組換えによる手法がイメージされるが、現時点ではすべてのマーケットのコンセンサスは得られておらず、全植物種・品種で形質転換が容易に行なえるわけではないため、「食の安全確保」や「育成者権の保護」といった今現在の問題への迅速な対応として現実的ではない。また、産地判別のためには複数系統必要となるが、この場合も変異誘発による手法のほうが効率よく、汎用性も高い。さらには、物理的変異原による照射後、商品価値への影響がないという点での選抜を受けていれば、この手法はどのような作物あるいはどのような生物種でも基本的には適用可能であり、多方面での利用が期待できる。

展望

平成 19 年度より、イオンビーム照射済みのキク、ラン、ナシ優良品種を供試して「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」の中で「DNA マーキングによる栄養繁殖作物の品種・産地判別技術の開発」とする課題研究を開始した。DNA マーク作出の過程において、シロイヌナズナやイネなどのモデル植物と比べて、DNA 抽出や反復配列の PCR 増幅などにおいて安定性に難がある園芸作物特有の技術的な難しさを経験した。

反復配列のゲノムスキニングについては、不安定でフェイクが出現するケースがあったため、供試サンプルのオリジナル塩基配列情報に基づくプライマーデザインを経たPCR産物で見極める必要があった。この手法には、扱う反復配列の種類や検出方法にまだ検討の余地があると感じている。

その一方で、キクについて「新神」の他に2品種/系統、ランについても前述の系統の他に、いくつかのイオンビーム照射済みシンビジウム品種において特有のDNA変異領域が見いだされている（未発表）。当初、想定していたよりもキクとランの変異バンドは明瞭に検出され、前述の点に気をつけながらの作業自体はスムーズに進行した。この要因として、供試サンプルの倍数性によりイオンビームや培養による変異が予想よりも多く集積していたこと、反復配列に多様性がありPCR増幅される領域が選択的になったことなどが挙げられる。また、環境適応性が高いとされるキク、ランのゲノム動態による高い順応能も一因にあるのではなかろうか。いずれにせよ、これらの点は本プロジェクトには利点となったが、今後、汎用性を示すためにはさらに多くの植物種で実例を挙げる必要はあるであろう。同時に、前述の問題点を整理し、最終的にはフィールド研究者との連携を図り、本スキームが農産物の信頼確保、育成者権や地域ブランド保護などにおける実用性の高い技術開発へつながることを願っている。

謝辞：本稿で紹介した内容は「新たな農林水産政策を推進する実用技術

開発事業」における鹿児島県バイオテクノロジー研究所、(株)向山蘭園、果樹研究所、理化学研究所仁科加速器センターとの共同研究の一端である。キク、ランの写真はそれぞれ、白尾 吏研究員（鹿児島バイオ研）、古川浩二博士（向山蘭園）より供与を受けた。ここに感謝の意を表する。

文献

- 1) 今給黎征郎, 永吉実孝, 郡山啓作, 上野敬一郎: 鹿児島県農業試験場研究報告, **34**, 15 (2006).
- 2) K. Ueno, S. Nagayoshi, Y. Hase, N. Shikazono & A. Tanaka: *JAERI-Rev.*, **2003-033**, 52 (2003).
- 3) T. Matsuyama, M. T. Kimura, K. Koike, T. Abe, T. Nakano, T. Asami, T. Ebisuzaki, W. A. Held, S. Yoshida & H. Nagase: *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4490 (2003).
- 4) T. Matsuyama: *FEBS J.*, **275**, 1607 (2008).
- 5) N. Shikazono, C. Suzuki, S. Kitamura, H. Watanabe, S. Tano & A. Tanaka: *J. Exp. Bot.*, **56**, 587 (2005).
- 6) Y. Kazama, H. Saito, M. Fujiwara, T. Matsuyama, Y. Hayashi, H. Ryuto, N. Fukunishi & T. Abe: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2864 (2007).
- 7) H. Ichida, T. Matsuyama, H. Ryuto, Y. Hayashi, N. Fukunishi, T. Abe & T. Koba: *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **639**, 101 (2008).
- 8) K. Ueno, S. Nagayoshi, Y. Hase, N. Shikazono & A. Tanaka: *JAERI-Rev.*, **2004-025**, 53 (2004).
- 9) 白尾 吏, 上野敬一郎, 松山知樹, 阿部知子: DNA多型, **16**, 108 (2008).
- 10) J. G. K. Williams, A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski & S. V. Tingey: *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6531 (1990).
- 11) 松山知樹: *BRAIN TECHNO NEWS*, **129**, 7 (2008).
- 12) C.-P. Witte, Q.H. Le, T. Bureau & A. Kumar: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 13778 (2001).
- 13) H. Ohtsubo, N. Kumezawa & E. Ohtsubo: *Genes Gen. Syst.*, **74**, 83 (1999).
- 14) 特開 2007-244334 キク品種識別方法.

プロフィール

折谷 隆之 (Takayuki Oritani) <略歴> 1966年東京大学大学院農学系研究科農芸化学専攻博士課程修了(農博)/1967年東北大学農学部農芸化学科助手/1979年同助教授/1991年同大学応用生物化学科教授/2001年同大学定年退官/同年同大学名誉教授。この間、1975~77年英国グラスゴー大学化学科博士研究員<研究テーマと抱負>天然の生物制御物質に関する生物有機化学的研究。微生物酵素を用いる光学分割など<趣味>海釣り(全日本磯釣連盟東北支部長), 水墨画(雅号: 谷仙), 家庭菜園

川又 理樹 (Masaki Kawamata) <略歴> 2002年東北大学農学部卒業/2007年同大学大学院農学研究科博士課程後期3年修了(農博)後、国立がんセンター研究所がん転移研究室リサーチレジデント, 現在にいたる<研究テーマと抱負>20年間成し遂げられていないノックアウトラット作製技術の開発を行なっている<趣味>(フジ)ロックフェス(で酒を飲む), 球技

神崎 浩 (Hiroshi Kanzaki) <略歴> 1981年京都大学農学部農芸化学科卒業/1983年同大学大学院農学研究科修士

課程修了/1986年同博士後期課程修了(日本学術振興会特別研究員)/1987年岡山大学大学院自然科学研究科助手/1993年同大学農学部助教授/1999年同大学大学院自然科学研究科助教授/2004年同教授/2007年同大学農学部学部長(兼任), 現在にいたる。この間1988~89年米国公衆衛生研究所博士研究員<研究テーマと抱負>面白い化合物を酵素でつくること, つぶしのきく学生を育てること<趣味>スポーツをすること・見ること, 学生と話をすること