

「DNA品種識別技術の海外開発状況等
調査事業」
(平成18年度知識集約型産業創造対策事業)

植物の DNA 品種識別技術の開発状況等 調査報告書

平成19年3月

社団法人 農林水産先端技術産業振興センター

目次

| | | |
|---------------------------------------|-------|-----|
| はじめに | ----- | 1 |
| 植物の DNA 品種識別技術の開発状況 | ----- | 2 |
| 1 各植物の DNA 品種識別技術の開発状況 | ----- | 3 |
| 1) 花き | ----- | 3 |
| (1) バラ (花き研究所 八木雅史) | ----- | 3 |
| (2) カーネーション (花き研究所 八木雅史) | ----- | 7 |
| (3) キク (広島大学 近藤勝彦) | ----- | 10 |
| (4) ユリ (北海道大学 山岸真澄) | ----- | 18 |
| (5) ヨーロッパ現地調査報告 (国際農林水産業研究センター 神代隆 他) | ----- | 20 |
| 2) 果樹 | ----- | 34 |
| (1) 落葉果樹 (モモ、ナシ、リンゴ) (果樹研究所 山本俊哉) | ----- | 34 |
| (2) カンキツ (果樹研究所 清水徳朗) | ----- | 43 |
| (3) オウトウ (山形県農業総合研究センター 高品善) | ----- | 49 |
| 3) 野菜 | ----- | 55 |
| (1) ネギ類 (野菜茶業研究所 塚崎光) | ----- | 55 |
| (2) イチゴ (野菜茶業研究所 松元哲) | ----- | 60 |
| (3) ハクサイ (大阪府立食とみどりの総合技術センター 古川真) | ----- | 65 |
| (4) ナス (大阪府立食とみどりの総合技術センター 古川真) | ----- | 69 |
| 4) 穀類 | ----- | 72 |
| (1) コメ (食品総合研究所 大坪研一) | ----- | 72 |
| (2) コムギ (岡山大学 田原誠) | ----- | 77 |
| (3) オオムギ (近畿中国四国農業研究センター 柳沢貴司) | ----- | 81 |
| 5) マメ類 | ----- | 85 |
| (1) ダイズ (千葉大学 原田久也) | ----- | 85 |
| (2) インゲンマメ (北海道立中央農業試験場 紙谷元一) | ----- | 91 |
| (3) アズキ (千葉大学 原田久也) | ----- | 94 |
| (4) ダイズ分子細胞生物学会報告 (千葉大学 坪倉康隆) | ----- | 96 |
| 6) イモ類 | ----- | 104 |
| (1) ジャガイモ、サツマイモ (筑波大学 渡邊和男 他) | ----- | 104 |
| 7) 工芸作物 | ----- | 108 |
| (1) コンニャク (群馬県農業技術センター 飯塚弘明) | ----- | 108 |
| 8) キノコ類 | ----- | 110 |
| (1) キノコ類 (森林総合研究所 馬場崎勝彦) | ----- | 110 |
| 9) その他 | ----- | 119 |
| (1) イグサ (熊本県農業研究センター 飯牟禮和彦) | ----- | 119 |
| (イグサは、著者のご意向により P D F 版からは省略いたしました。) | | |

| | | |
|---|-------|-----|
| (2) チャ (野菜茶業研究所 氏原ともみ) | ----- | 122 |
| 10) UPOV 生化学及び分子技術作業部会 (BMT) 報告 (種苗管理センター 大川雅央) | ----- | 125 |
| 2 植物のDNA品種識別技術の開発状況とりまとめ | ----- | 133 |
| | | |
| II 国内における先行特許取得状況 (平木国際特許事務所) | ----- | 140 |
| | | |
| 1 SSR、SNP 技術に関する出願・特許状況 | ----- | 141 |
| 1) SSR 技術に関する出願・特許状況 | ----- | 141 |
| (1) SSR 関連技術の技術分野別出願・特許動向 | ----- | 141 |
| (2) マーカー関連出願の植物別出願件数 | ----- | 142 |
| 2) SNP 技術に関する出願・特許状況 | ----- | 143 |
| (1) SNP 関連技術の技術分野別出願・特許動向 | ----- | 143 |
| (2) マーカー関連出願の植物別出願件数 | ----- | 143 |
| 2 先行特許の概要 | ----- | 145 |
| 1) SSR 技術の先行特許の概要 | ----- | 145 |
| 2) SNP 技術の先行特許の概要 | ----- | 149 |
| 3 海外での特許状況 | ----- | 156 |
| 1) SSR 技術の海外での特許状況 | ----- | 156 |
| 2) SNP 技術の海外での特許状況 | ----- | 157 |
| 4 基本特許及びその周辺技術について | ----- | 158 |
| 5 参考資料 | ----- | 159 |
| 1) SSR 公開及び特許公報一覧 | ----- | 159 |
| 2) SNP 公開及び特許公報一覧 | ----- | 162 |
| | | |
| III 効率的・効果的なDNA品種識別技術研究推進とその利活用に向けて | | |
| (近畿中国四国農業研究センター 矢野博) | ----- | 172 |
| | | |
| おわりに | ----- | 177 |

はじめに

我が国の植物新品種の育成者権の保護、侵害対策の充実等を図るためには、違法に海外に持ち出された品種が無断で増殖され、我が国に輸入されることのないよう、水際で防止することが重要であり、これには DNA 品種識別技術が不可欠である。また、DNA 品種識別技術は、我が国の植物品種の積極的海外進出を担保するためにも欠かすことができないものであり、その技術開発が急がれている。

国際的な枠組みにおいて、品種登録出願時の条件として DNA 品種識別情報の追加が検討されていることからしても、我が国のみならず、各国において、当該技術の開発が積極的に進められていくものと考えられる。海外で開発された技術の中には、我が国において効率的に技術開発を進めていく上で有用なものも多いと考えられるが、現状では、各国における技術開発に関する情報は、体系的に収集・整理されていない状況にある。

また、DNA 品種識別技術に用いられる DNA マーカーとしては、様々な種類があり、今後もこれらのマーカーを利用した DNA 品種識別技術開発が積極的に進められようとしているが、これら技術の知的財産取得状況に係る正確な情報整理はまだなされていない。DNA マーカー技術には特許登録されているものもあり、DNA 品種識別技術開発を進める上で、それらの特許に抵触してしまうと、権利調整やライセンス料の発生等により、技術の活用に着しい支障が出てくる恐れもある。

このため、本年度、(社)農林水産先端技術産業振興センターでは、農林水産省の補助事業として「DNA 品種識別技術の海外開発状況等調査事業」において、我が国における DNA 品種識別技術の開発・実用化の効率化と円滑な活用に資するため、海外を中心とした DNA 品種識別技術の開発状況及び国内における DNA 品種識別技術に係る先行特許取得状況を調査することとした。本報告書は、上記事業の調査結果を取りまとめたものである。

本事業の実施に当たっては、最新の情報をご提供頂いた研究者の先生方など多くの方々から懇切なご協力とご支援を頂いた。千葉大学の原田久也 特命教授、(独)農業・食品産業技術総合研究機構近畿中国四国農業研究センターの矢野博 品種識別・産地判別研究チーム長、平木国際特許事務所の島村直己 顧問弁理士、キリンビール(株)の戸栗敏博 主任研究員、(株)サカタのタネの加々美勉 研究本部部長には、検討会に参加頂き、事業の調査計画の検討、調査結果の取りまとめ等について、貴重なご意見を頂いた。特に、矢野氏、島村氏には、事業分担者として本事業を担当して頂き、また、原田氏には、本報告書の取りまとめに当たって全体の監修をして頂いた。ここに記して御礼申し上げます。

I 植物のDNA品種識別技術の開発状況

我が国において、育成者権の侵害等が問題化している植物を中心に 25 種選定し、独立行政法人研究所、県の試験研究機関、大学において DNA 品種識別技術開発に取り組んでいる研究者に、各植物についての技術開発状況について、海外の情報を中心に執筆を依頼した。

花きについてはヨーロッパの関係機関を訪問し、マメ類については米国の学会に参加し、それぞれ現地調査を行った。また、昨年 11 月、韓国において開催された植物新品種保護国際同盟（UPOV）の第 10 回生化学及び分子技術作業部会（BMT）の参加者に、会議での概要について、執筆を依頼した。

対象植物・テーマ、執筆者は下記の通りである。

| 対象植物・テーマ | | 研究者 | |
|-------------|-----------------|--------------------------------------|---------|
| 分類 | 植物名等 | 所属 | 氏名 |
| 花き | バラ | 花き研究所 新形質花き開発研究チーム | 八木 雅史 |
| 花き | カーネーション | 花き研究所 新形質花き開発研究チーム | 八木 雅史 |
| 花き | キク | 広島大学 大学院理学研究科附属 植物遺伝子保管実験施設 | 近藤 勝彦 |
| 花き | ユリ | 北海道大学大学院農学研究院 助教授 | 山岸 真澄 |
| 花き | ヨーロッパ現地調査 | 国際農林水産業研究センター 生物資源領域長 | 神代 隆他 |
| 果樹 | 落葉果樹(モモ、ナシ、リンゴ) | 果樹研究所 果樹ゲノム研究チーム長 | 山本 俊哉 |
| 果樹 | カンキツ | 果樹研究所 果樹ゲノム研究チーム 上席研究員 | 清水 徳朗 |
| 果樹 | オウトウ | 山形県農業総合研究センター 農業生産技術試験場 バイオ育種科 専門研究員 | 高品 善 |
| 野菜 | ネギ類 | 野菜茶業研究所 野菜育種研究チーム | 塚崎 光 |
| 野菜 | イチゴ | 野菜茶業研究所 野菜ゲノム研究チーム 上席研究員 | 松元 哲 |
| 野菜 | ハウサイ | 大阪府立食とみどりの総合技術センター 食品・資源部 | 古川 真 |
| 野菜 | ナス | 大阪府立食とみどりの総合技術センター 食品・資源部 | 古川 真 |
| 穀類 | コメ | 食品総合研究所 食品素材科学研究領域長 | 大坪 研一 |
| 穀類 | コムギ | 岡山大学 自然科学研究科 植物・微生物機能開発学講座 | 田原 誠 |
| 穀類 | オオムギ | 近畿中国四国農業研究センター 大麦・はだか麦研究チーム | 柳沢 貴司 |
| マメ類 | ダイズ | 千葉大学 園芸学部 特命教授 | 原田 久也 |
| マメ類 | インゲンマメ | 北海道立中央農業試験場 企画情報室 | 紙谷 元一 |
| マメ類 | アズキ | 千葉大学 園芸学部 特命教授 | 原田 久也 |
| マメ類 | ダイズ分子細胞生物学会 | 千葉大学 園芸学部 特任教員 | 坪倉 康隆 |
| イモ類 | ジャガイモ、サツマイモ | 筑波大学 生命環境科学研究科 教授 | 渡邊 和男 他 |
| 工芸作物 | コンニャク | 群馬県農業技術センター こんにゃく特産研究センター | 飯塚 弘明 |
| キノコ類 | キノコ類 | 森林総合研究所 きのこ微生物研究領域 きのこ研究室長 | 馬場崎勝彦 |
| その他 | イグサ | 熊本県農業研究センター 農産園芸研究所 バイオ育種研究室 | 飯牟禮和彦 |
| その他 | チャ | 野菜茶業研究所 野菜・茶の食味食感・安全性研究チーム | 氏原ともみ |
| UPOV BMT 報告 | | 種苗管理センター 業務調整部 調査研究課 調査研究調整役 | 大川 雅央 |

1 各植物のDNA品種識別技術の開発状況

1) 花き

(1) バラのDNA品種識別技術の開発状況

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
花き研究所 新形質花き開発研究チーム 八木雅史

1. 育成者権侵害事例

国内では、育種会社の啓蒙活動および取締り等により、無断増殖を行う農家はほとんどなくなっているが、海外ではまだそのような問題が残っているようである。そのほとんどはアジアで、中国、インド、韓国で見られ、日本の登録品種が海外へ持ち出され、無断増殖され、その国で流通するとともに、逆輸入の形で日本に入ってくるケースがあるようである。詳しい実情についてはあまり把握していない。

2. 国内での開発状況

国内では 1990 年代に DNA マーカーによるバラ属の系統分類の研究が行われてきた (Matsumoto et al., 1997; Matsumoto et al., 1998; Takeuchi et al., 2000)。品種識別については、その当時、岐阜大の福井らのグループが 3つの RAPD プライマーを用いて 9 品種のバラを識別したことを報告している (Matsumoto and Fukui, 1996)

近年では、種苗管理センターの木村鉄也氏 (現職 農林水産技術会議事務局) らが SSR マーカーを用いた品種鑑別に取り組み、13 種類の SSR マーカーを新規に開発し、24 品種を識別したことを報告している (Kimura et al., 2006)。その後、木村氏の異動とともに開発は中断されており、作成したマーカーの利用が待たれる。

3. 海外での開発状況

1) ヨーロッパ各国

ヨーロッパでは現在、リファレンスコレクション (種苗登録時に審査対象となりうる既存品種) の維持管理のためのデータベースを構築するプロジェクトが今年度まで進行しており、その中の特性データの一つとして DNA マーカーの情報を記載することが試みられている (Vosman et al., 2006)。

バラは、1867 年に最初のハイブリッド・ティー品種 ‘ラ・フランス’ が誕生してから、ハイブリッド・ティー系の品種だけでも 10,000 品種以上が世に送り出されているが、ヨーロッパでは毎年およそ 80 品種が品種登録出願されている。現在、品種登録時の審査では、UPOV のガイドラインに従って、形態的・生理的違いに基づいて審査が行われているが、登録される品種は毎年増加しており、また遺伝的背景もかなり狭くなっているため、同じような特性をもつ品種が多数存在しており、既存の品種から対照品種を絞り込むことが困難になってきている。また、これらの対照品種を維持するための労力と費用も増大している。そのような背景から、諸特性や写真を収録したデータベースを構築し、種苗審査

の負担軽減および信頼性の向上を図るためにこのプロジェクトを立ち上げた。また、将来的には DNA マーカーを用いて新規性を審査することを目標に、DNA マーカーによる品種の遺伝子型のデータの登録も進めている。このプロジェクトは UPOV の作業部会 BMT において議論されている。このプロジェクトには研究機関として、オランダの PRI (Plant Research International)、イギリスの NIAB (National Institute of Agricultural Botany)、ドイツの BSA (Bundessortenamt) が参加しており、予算は CPVO (EU 品種庁) が半分と各国政府が半分以上を拠出して行われている。

このプロジェクトの中で用いられるマーカーは SSR マーカーであり、SSR マーカーを用いてバラの品種識別が可能なことを PRI の B. Vosman のグループが論文で公表している (Esselink et al., 2003)。筆者らがヨーロッパを訪問した際の情報ではこれまでに 11 個の SSR マーカーを用いて、730 品種を識別しており、識別能力の高いマーカーを使えば、最終的には 4 個か 5 個のマーカーでこの程度の品種数を識別可能ではないかということであった。

また、ヨーロッパでは、ドイツの花き育種研究所の Debener (現在ハノーファー大学) らのグループが、積極的に連鎖地図の作成や病害抵抗性遺伝子のマッピングを進めており、PRI で開発した SSR マーカー等の利用も進めている (Yan et al., 2005, Linde et al., 2006)。これまでに、545cM の統合連鎖地図を作成しており、AFLP、SSR、PK (protein kinase)、RGA (resistance gene analogues)、RFLP、SCAR マーカーがマッピングされている (Yan et al., 2005)。

2) アメリカ

クレムソン大学の Rajapakse らが 4 倍体のバラで最初の連鎖地図の作成を報告をしている (Rajapakse et al., 2001)。最近になって、作成した連鎖地図を統合することを目的に SSR マーカーの開発を試みており、実際に連鎖地図上へのマッピングも行っている (Zhang et al., 2006)。文献の最後にはこれらのマーカーは品種判別にも有効であることを述べている。

文献検索によれば、詳細は不明であるがアジア各国では、RAPD マーカーによる品種識別の事例が見られる。

3) インド

インド農業研究所の Kumar ら (2005) が RAPD マーカーを用いてインドで育成された 21 品種のバラの識別を試みている

4) 中国

南京の Jiangsu Academy of Forestry の GuoLiang ら (2001) が RAPD マーカーを用いて 45 品種の識別を試みた報告がある。

5) 韓国

全南大学の GiJun ら (2006) は RAPD マーカーを用いた品種識別を試みている。そのデータはホームページ (<http://hanth.jnu.ac.kr>) に記載されているようであるが、韓国語のため詳細は不明である。

6) その他

- 過去には、RAPD や RFLP を用いた品種識別の事例があるが、識別数は極めて少ない。
- ・ RFLP (Rajapakse et al., 1992 : アメリカ)
 - ・ mini, micro-satellite プローブを用いた RFLP (Vainstein and Ben-Meir, 1994 : イスラエル)
 - ・ RAPD (Torres et al., 1993 : スペイン : Martin et al., 2001 フランス)

<引用文献>

- Esselink, G. D., M. J. M. Smulders and B. Vosman (2003) Identification of cut rose (*Rosa hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers. *Theor. Appl. Genet.* 106: 277-286.
- GiJun, K., C. JeongKeun, G. GwangYeon, L. KiByung and H. TaeHo(2006) Selection of RAPD primers for efficient fingerprinting in roses. *Korean J. Hort. Sci.* 24: 253-257(Korean).
- GuoLiang, W., U. Yoshihiro and Wu ShuiChing(2001) Study on the discrimination of cut rose varieties and their sports by means of RAPD. *J. Jiangsu Forestry Sci. tech.* 28: 1-9(Chinese).
- Kimura, T., C. Nishitani, H. Iketani, Y. Ban and T. Yamamoto (2006) Development of microsatellite markers in rose. *Molecular Ecology Notes* 6:810-812.
- Kumar, S., K. V. Prasad, S. Kumar, V. S. Chauhan and M. L. Choudhary (2005) Genetic variability and relatedness among Indian bred rose cultivars based on Random Amplified Polymorphic DNA. *Indian J. Hort.* 62: 370-374.
- Linde, M., A. Hattendorf, H. Kaufmann and Th. Debener (2006) Powdery mildew resistance in roses: QTL mapping in different environments using selective genotyping *Theor. Appl. Genet.* 113: 1081-1092.
- Martin, M., F. Piola, D. Chessel, M. Jay and P. Heizmann (2001) The domestication process of the Modern Rose: genetic structure and allelic composition of the rose complex. *Theor. Appl. Genet.* 102: 398-404.
- Matsumoto, S. and H. Fukui (1996) Identification of rose cultivars and clonal plants by random amplified polymorphic DNA. *Scientia Hort.* 67: 49-54.
- Matsumoto, S., H. Wakita and H. Fukui (1997) Molecular classification of wild roses using organelle DNA probes. *Scientia Hort.* 68: 191-197.
- Matsumoto, S., M. Kouchi, J. Yabuki, M. Kusunoki, Y. Ueda and H. Fukui (1998) Phylogenetic analyses of the genus *Rosa* using the *matK* sequence: molecular evidence for the narrow genetic background of modern roses. *Scientia Hort.* 77: 73-82.
- Rajapakse, S., M. Hubbard, J. W. Kelly, A. Abbott, and R. Ballard (1992) Identification of rose cultivars by restriction fragment length polymorphism. *Sci. Hort.* 52: 253-260.
- Rajapakse, S., D. H. Byrne, L. Zhang, N Anderson, K. Arumuganathan and R. E. Ballard (2001) Two genetic linkage maps of tetraploid roses. *Theor. Appl. Genet.* 103: 575-583.
- Takeuchi, S., K. Nomura, H. Uchiyama and K. Yoneda (2000) Phylogenetic relationship in the Genus *Rosa* based on the restriction enzyme analysis of the chloroplast DNA. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 69: 598-604.

- Torres, A. M., T. Millian and J. I. Cubero (1993) Identifying rose cultivars using random amplified polymorphic DNA markers. *Hortsci.* 28: 333-334.
- Vainstein, A. and H. Ben-Meir (1994) DNA fingerprint analysis of roses. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1099-1103.
- Vosman, B., E. Scott, B. Spellerberg, J. Barendrecht, S. Tams, H. Jones and D. Esselink (2006) A European reference collection of rose varieties. UPOV document BMT/10/16.
- Yan, Z., C. Denneboom, A. Hattendorf, O. Dolstra, T. Debener, P. Stam and P. B. Visser (2005) Construction of an integrated map of rose with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers. *Theor. Appl. Genet.* 110-766-777.
- Zhang, L. H., D. H. Byrne, R. E. Ballard and S. Rajapakse (2006) Microsatellite marker development in rose and its application in tetraploid mapping. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 131: 380-387.

(2) カーネーションのDNA品種識別技術の開発状況

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
花き研究所 新形質花き開発研究チーム 八木雅史

1. 育成者権の侵害事例

カーネーションでは、無断増殖苗から生産された切り花が中国から違法輸入されている事例がマスコミを通じても大々的に取り上げられている。近年、中国からのカーネーションの輸入量は急増している（約 5500 万本、平成 17 年）が、中国では、流通している種苗のうち正規の契約に基づいて生産された種苗は 20%以下であると言われている。そのため、ほとんどの苗は育成者の許諾を得ずに増殖された無断増殖苗であり、無断増殖苗から得られた切り花のうち、日本に登録されている品種については育成者権侵害に該当し、輸入差し止めを申請することができる。ただし、現状では侵害容疑品については、挿し穂で増殖して比較栽培試験を行った上でしか輸入差し止めを申請できないため、その場で違反品として鑑定することができず、DNA 品種鑑別技術の開発への要望が高まっている。

2. 国内での技術開発

国内でのカーネーションの品種識別を目的にした研究は 1 件のみである。

種苗管理センターの木村鉄也氏（現職 農林水産技術会議事務局）らは SSR マーカーを用いた品種鑑別に取り組み、新規に 15 種類の SSR マーカーを開発し、枝変わりの 2 品種以外の 31 品種について識別が可能であることを報告している（木村ら、2006）。その後、木村氏の異動とともに開発は中断されているが、現在、筆者らのグループでこれらの過程で取得した SSR マーカーについて連鎖地図へのマッピングを試みているところである。

3. 海外での技術開発状況

これまでにカーネーションの品種識別についての報告は、オランダ Plant Research International (PRI) の B. Vosman らのグループの報告のみである。

1) オランダ Plant Research International

開発の背景には、ヨーロッパにおいても種苗登録される品種数の増加に伴い、DUS 試験に用いるための対照品種の選定に苦慮しており、また、それら対照品種を維持するための労力と費用が増大している現状がある。そこで、DNA 品種識別によりこれらの問題を克服することができないかということでプロジェクトを立ち上げ、オランダ政府からの予算を獲得できたことから開始されたようである。

彼らは、最初に、ヨーロッパの塩基配列情報のデータベースである EMBL から、既知のカーネーション遺伝子の配列情報を取得し、その中から SSR の領域を特定し、5 種類の SSR マーカーの開発を行った (Smulders et al., 2000)。その後、カーネーションの栽培品種から SSR の濃縮ライブラリーを作成し、8 種類の SSR マーカーを用いて、枝変わり品種以外の 76 品種を識別した (Smulders et al., 2003)。現在までのところ 13 個の SSR マーカー用いて、枝変わり品種以外の 118 品種を識別できたと報告している (Arens et al., 2006)。

また、筆者らが 2006 年 11 月下旬に実際に PRI を訪問した際の情報では、実績はない様であるが、品種鑑別サービスを行っているとのことである。費用としては 10 サンプルの識別の依頼であれば、1 サンプル当り 150Euro、実際に利用可能なマーカーの提供は、7 個の識別マーカーと multiplex 化の情報がセットで 10000Euro とのことであった。これらのマーカーで実際に何品種が識別可能なのかの情報は得られていない。

2) ヨーロッパにおける民間企業の動向

筆者らがヨーロッパを訪問した際の情報では、現在、ヨーロッパのカーネーション育種会社 (Hilverda、P. Kooji、Selecta、B&B) が共同して、スペインの農業検査会社 Applus+ にマーカー開発及びデータベースの作成を依頼しているとのことであった。それらの情報は依頼した会社内で共有し、公開する予定はないとのことである。

また、Hilverda 社の Tas 氏によれば、カーネーションを含め花きは枝変わり品種が非常に多いため、枝変わり品種が識別できない SSR マーカーによる品種識別技術には不満があり、枝変わり品種も識別できる技術の開発を強く望んでいた。行政サイドとしては、枝変わり品種は従属品種となることから、区別できなくてもかまわないと考える向きもあるが、枝変わり品種の識別技術の開発が今後の課題になるであろう。

3) カーネーションにおけるゲノム研究

カーネーションではそもそもゲノム研究は進展しておらず、連鎖地図の作成も筆者らが最初の報告である (Yagi et al., 2006)。筆者らは、カーネーションの基本染色体数 15 より一つ多い 16 の連鎖群からなる全長 605.0cM の連鎖地図を作成し、萎凋細菌病抵抗性の QTL 解析を行った。作成した連鎖地図には 137 個の RAPD マーカーと先述の Vosman 氏らが開発した SSR マーカー (Smulders, 2000, 2003) のうち 9 個がマッピングされている。

また、育種への利用を目的とした DNA マーカーに関する研究の報告も以下の通り極めて少なく、イスラエルの Vainstein らのグループ、イタリアの De Benedetti らのグループ、筆者らの 3 グループの報告があるのみである。

- ・ 花型 (一重) に連鎖した RAPD、RFLP マーカー (Scovel et al., 1998)、
- ・ 花型 (一重) に連鎖した RAPD、STS マーカー (小野崎ら, 2006)
- ・ フザリウムによる萎凋病抵抗性に連鎖した RAPD、RFLP マーカー (Scovel et al., 2001)
- ・ 花持ち性に連鎖した RAPD マーカー (De Benedetti et al., 2003)
- ・ 萎凋細菌病抵抗性に連鎖した DNA マーカー (Onozaki et al., 2004)

もともと研究者が少ない上に、カーネーションはナデシコ科に属しており、キクやバラといった他の花きに比べても広範な園芸植物含む科に属していないことから、シンテニーを利用できる環境になく、今後もゲノム研究が急速に進展する見込みは少ないと思われる。

4) 今後の課題等

ヨーロッパでは、育成者権を有する民間の種苗会社が自分たちの権利を守るために DNA データベースを構築する動きがある。しかし、開発したデータベースは全て非公開であるため、育成者権侵害の事例が発生し、DNA 品種識別を証拠とした場合に、その技術の信頼性を誰が担保していくのかという問題点がある。一方で DNA 品種識別が侵害防止への抑止

力となるとも考えられ、DNA 品種判別技術の開発の意義は大きい。

また、SSR マーカーを用いて実際に全ての品種が識別できるかは未知数であり、識別能力の高いマーカー開発、およびデータベースの拡充にかかるコストを誰が負担するのか課題となる。

<引用文献>

- Arens, P., D. Esselink, Y. Noordijk, L. Kodde, L. Hof, W. Wietsma and B. Vosman (2006) Microsatellite markers for identification of carnation varieties. UPOV Document BMT/10/17.
- De Benedetti, L., G. Burchi, S. Bruna, A. Mercuri and T. Schiva. 2003. Use of molecular markers to improve cut flowers longevity in carnation. *Acta Hort.* 624: 343-348.
- 木村鉄也・八木雅史・西谷千佳子・小野崎隆・伴義之・山本俊哉 (2006) カーネーションの SSR マーカーの開発 II. 品種識別と親子鑑定. *園学雑.* 75 (別2). 576.
- Onozaki, T., N. Tanikawa, M. Taneya, K. Kudo, T. Funayama, H. Ikeda and M. Shibata. 2004. A RAPD-derived STS marker is linked to a bacterial wilt (*Burkholderia caryophylli*) resistance gene in carnation. *Euphytica* 138: 255-262.
- 小野崎 隆・吉成 強・吉村正久・八木雅史・能岡 智・種谷光泰・柴田道夫 (2006) ダイアンサス属野生種 *Dianthus capitatus* ssp. *andrzejowskianus* 由来の劣性一重咲き遺伝子に連鎖した DNA マーカー. *園学研.* 5 : 363-367.
- Scovel, G., H. Ben-Meir, M. Ovadis, H. Itzhaki and A. Vainstein. (1998) RAPD and RFLP markers tightly linked to the locus controlling carnation (*Dianthus caryophyllus*) flower type. *Theor. Appl. Genet.* 96: 117-122.
- Scovel, G., M. Ovadis, A. Vainstein, M. Reuven and Y. Ben-Yephet. (2001) Marker assisted selection for resistance to *Fusarium oxysporum* in the greenhouse carnation. *Acta Hort.* 552: 151-156.
- Smulders, M.J.M., W. Rus-Kortekaas, B. Vosman (2000) Microsatellite markers useful throughout the genus *Dianthus*. *Genome* 43:208-210.
- Smulders, M.J.M., Y. Noordijk, W. Rus-Kortekaas, G.M.M. Bredemeijer, B. Vosman (2003) Microsatellite genotyping of carnation varieties. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1191-1195.
- Yagi, M., T. Onozaki, M. Taneya, H. Watanabe, T. Yoshimura, T. Yoshinari, Y. Ochiai and M. Shibata (2006) Construction of a genetic linkage map for the carnation by using RAPD and SSR markers and mapping quantitative trait loci (QTL) for resistance to bacterial wilt caused by *Burkholderia caryophylli*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 75: 166-172.

(3) キクの DNA 品種識別技術の開発状況

広島大学大学院理学研究科附属植物遺伝子保管実験施設
近藤勝彦

イエギク（栽培ギク栽培品種；以下キクと呼ぶ）は、日本古来の伝統的栽培鑑賞のための栽培品種収集と育成から始まり、現代では仏花からアレンジ・ポット仕立てに至るまで数千にも及ぶ栽培品種をかかえて、プロ、セミプロ、アマチュアが入り乱れての切花生産と鉢植え生産により、日本全国花卉生産量約 40%のシェアで世界の生産量を長年維持し続けている。その中心は愛知県、沖縄県である。しかし、近年のオランダ、マレーシア、ベトナム、中華人民共和国、台湾、大韓民国など諸外国が、安価な育苗生産コストで航空運搬コストがかかってもまだ採算の取れる現状で、どんどん切花輸出を進めて日本を含む世界のマーケットを目指している。大韓民国ではキクの試験場を設立させるほどの熱のいれようである。ロシア連邦のフロリスト店頭で販売されている切花ギクはモスクワなどヨーロッパ圏はともかくも極東圏のウラジオストックに至るまで、オランダから発送されたもので占められて、日本発の商品は1本も無い。このような状況の下で、日本に輸入される切花等について、知的財産保護の観点で定められた植物品種保護制度にもとづく税関での摘発例が出だして問題になりはじめている。日本国内でもいくつかの摘発例がみられる。しかし、農林水産省種苗課で種苗登録された我が国オリジナルの品種が、正規の契約をもって利用されているかということに対しては、育成者侵害が発生すると訴訟を起こすのは大変なことなので、賠償金の範囲で止めておいたり、予防のために専門の弁護士と調査員を雇用して、定期的に一定面積以上の契約栽培農家を巡回して、問題を起こさないようにしているのが現状のようである。このようなキク事業が直面する問題において、グローバル・スタンダードを企画・開始し、振興させようとしているのが、農林水産省の輸出倍増計画にもとづく農林水産物輸出倍増推進事業の中の、品種保護に向けた環境整備事業である。その項目（2）に、花卉種苗における DNA 品種識別技術の確立があるが、その中心は未開発分野ということでキクが対象となっているようである。

育成者権の侵害事例

国内では、種苗登録されたキク栽培品種のうちのいくらかに育成者権侵害があり、告発問題となった事例があったようであるが、育成者権をもつ企業体は分かっても侵害した農家とは当事者同士の問題で、詳細が外部に漏れにくく、どの栽培品種が侵害を受けたのかは分かりにくいので本稿では具体的記述はしない。また、毎年多数の栽培品種が世に出、そのうちのいくらかが種苗登録されているが、はやりすたりが激しく、短期間の勝負が求められているため、育成者の侵害事例が発生しても十分取り合っている暇が無いというのも現状ではなかろうか。

また日本に輸入される切花ギクでも、税関申告時の審査で育成者権侵害が見つかるようである。これらは、育成者が種苗登録申請時に提出が義務づけられている品種特性の記録文書で輸入切花を比較することにより、ほとんどすべてが明瞭に区別され、解決しているようである。

国内での技術開発状況

国内でキク栽培品種特性に影響を及ぼすような遺伝子マーカーについての重要研究例は主要学会誌掲載論文には無いといってよい。キク栽培品種識別についてはこれまで伝統的に外部形態を目で見て確認するオーソドックスな方法論が主流であり続けて、要求を満たしてきたために、DNA 品種識別技術の開発に注目しなかったというのが理由であろう。

そして、実際にキク新栽培品種を作出、開発をしている企業によるキク栽培品種の DNA 品種識別技術の開発は（社）農林水産先端技術産業振興センター（STAFF）の共同プロジェクトとして、今始まろうとしているところである。

海外での技術開発状況

①開発の背景

1. キク類の交配様式は一般に他家受精（自家受精が作動することもある）の性質が強く、種間、栽培品種間などで交雑しやすいこと、2. 正逆交雑で多数の変異ある雑種兄弟が出現し、そこから商品価値の高くなりそうな個体を選抜し、品種化してきた、3. 突然変異が起き易く、さらにはγ線やX線などの放射線照射によって突然変異出現が助長され、優良品種から花色や葉形態、姿態の違う系統を生ずる、4. 栽培品種によっては表現型に不安定さがあり、染色体数の増減（一般に栽培品種は、染色体数 $2n=54$ で六倍体であり、そこから数の増減があるとされる）に起因するか、5. キメラに起因するか、などの現象があり、いまだ完全に掌握し、栽培品種の定義を固定化できないままに、種苗法での各栽培品種くくりが進められてきた。キク栽培品種によく見られるこれら現象を個々の栽培品種が持つ DNA の違いで捉えて区別、同定、識別の可能性を探っているうちに、それらのデータ集積により品種識別技術開発へ目が向けられていったと考えられる。また、その後は、本報告書でまとめようとされている育成者権を守るための手段としての DNA による品種識別技術開発が要求されるに至っている。

②開発機関・研究者

オランダ、ライデン大学進化・生態学研究所、TNO 栄養・食糧研究所 Kirsten Wolff 氏、H. Hofstra 氏、J. Peters-Van Rijn 氏、ワーゲニンゲン大学植物研究国際施設 Rene Smulders 氏、カナダ、モントリオール大学医学部 E. Zietkiewicz 氏、台湾、台中区農業改良場 黄勝忠氏、蔡奇助氏、許謙信氏、ポーランド、ワルシャワ農業大学 M. Zalewska 氏、中華人民共和国、北京大学生命科学部 Wenhua Yang 氏、Guang-Yuan Rao 氏、連合王国、ケンブリッジ大学植物科学 Beverley J. Glover 氏、中華人民共和国、Fudan University 生命科学部 Ji Yang 氏、インド、ハリヤナ農業大学園芸学科 S. K. Sehrawat 氏、R. Kumar 氏、D. S. Dahiya 氏、など。

③用いられている技術の種類、改良状況、新技術

Random amplified polymorphic DNAs (RAPD) マーカーによる分析、inter simple sequence repeat (ISSR) マーカー分析、restriction fragment length polymorphism (RFLP) 分析、葉緑体 simple sequence repeat (SSR) マーカー分析、マイクロサテライト・マーカー分析、

amplified fragment length polymorphism (AFLP) 分析

④マーカー数/識別可能な品種数

どの公表論文にも、研究の結果に得られたマーカー数という書き方は無かったので、バンド数/プライマー数/栽培品種または個体の数の順に列記した。すなわち、25/6/13 5/44/20 26/4/24 4/33/18 9/18/15 7/22/7 257/31/13 127/9/110 163/9/110 12/10/110 などの発表がある。目的は、変異性の多いキク栽培品種において、栽培品種毎の識別ができないか、DNA フィンガープリンティングの安定性が得られるのか、突然変異やキメラがとらえられないか、両親と雑種は区別できないか、種内同質倍数体や組換え体が区別できないか、などで、栽培品種育成者を守るための DNA による品種識別技術開発という言葉はどこにもない。

⑤ゲノム研究との関連、シンテニーの利用

近藤等は 1989 年より中華人民共和国中国科学院と、その後ロシア連邦ロシア科学アカデミーならびにモスクワ国立教育大学と協定を締結した。これとともにモスクワ国立大学、アルタイ国立大学とフィールドの協力体制の下、2002 年の日露政府間協議による第 8 回日露科学技術協力計画で『極東ロシアの日本フロラ関連絶滅危惧植物保全のための分子細胞遺伝学的特性研究』という課題で共同研究が承認されている。以来、現在第 2 期に入った本共同研究は継続されている。この共同研究での中心課題は、野生ギクの種間関係の解明である。このように、近藤等は研究ならびに系統保存対象を日本国内のキクからアジア大陸（ユーラシア大陸）に拡大し、日本産野生ギクにごく近縁なアジア大陸産野生ギクの研究を展開するようになった。研究が進むと、キク属 (*Chrysanthemum*) が含まれる Anthemideae 連 108 属 1,741 種の殆どが近縁で、相互に人為で属間、種間雑種が難易度に差はあれ作出できることが判明してきた。これは Anthemideae 連に分類される多様な属、種が、これまで考えられてきた以上に近縁であることを示している。それとともに、1) キク類特有の減数分裂における異親対合が起きる要因の究明、2) トランスポゾンに起因すると考えられる染色体変異の問題（属間種間交雑による雑種では、体細胞内相互転座が時々現れるが、この現象もトランスポゾンに原因するものではないかと推察し、近藤等は現在分析しているが、難問である）および 3) 遠縁交雑による雑種静止期核内での両親由来ゲノム領域が、他科の雑種のものとは異なる動態を示し、また普通動植物の体細胞静止期核では観察不可能な染色体が、特に疎遠な属間雑種の体細胞静止期核をゲノミック・インシチュ・ハイブリダイゼーション (GISH) で染め分けるときれいな形を作ってみえる現象をどのように解釈していくのか、など新しい問題が次々にでて、キク独自の今後の重点的な研究課題として挙げられる。特に 3) の問題は、ポストゲノムの一つであるエピジェネティクス研究（これは普遍的な生命現象を明らかにする試みであるが）を牽引するために必要不可欠なものである。しかしながら分子細胞生物学的手法の確立がなされていない多くの動植物では、各リンケージ単位をゲノム全体の中で直感的に把握することができないため、このような研究に事実上着手することは不可能である。キク属ではこの分野に直接せまることが可能な技術をすでに近藤等が先駆的に開発しており、その準備は整っている。現在、アラビドプシスをはじめとするモデル植物の研究情報と動向を踏まえた上で、

キク科における今後の新たな展開として、技術的に解決可能な興味深いテーマが次々に浮上している。

キク科は、地球上の全高等植物 25 万種のうちの 1/10 を占め、双子葉植物で最も進化している科である。特定の属内、属間および種間で様々なグループをつくりながらも、一定のシンテニーを形成・維持していることは他科に余り類をみない。我々は 1993 年からの一連の野生広義キク属の細胞遺伝学や雑種の研究を通して、*Anthemideae* 連大所帯の種が最大規模のシンテニーで結びつきあっていると提唱するに至り、これを我々は『広義キク属』と呼んでいる(Kondo *et al.* 2003)。ハマギク (*Nipponanthemum nipponicum*) は、世界的植物育種学者バーバンクが作出したジャスターデイジー (*Chrysanthemum burbankii*) の片親としてあまりにも有名であり、その他にはホソバナセイタカギク (*Leucanthemella linearis*) と容易に人為雑種ができるが、それ以外は交配できないという間違った情報が、現在でもまことしやかにあちらこちらのプロの現場で聞かされる。しかし、現実として、我々の交配研究からは、ほぼどの属、種とも難易度に違いはあれ、雑種ができる。勿論、広義キク属に含まれる狭義各属各種とキク栽培品種の間にも、組合せで難易度の差はあるが、雑種が作出できる。いずれにせよ、広義キク属がもつ巨大な種数とゲノムの複雑性が、このような情報の混乱を招いていることに疑いの余地はなく、これまでの国内外の情報交換の経緯をふりかえるだけでも、キクの種数に対して見合うだけのデータ (特にシンテニーについて) とそれを産するだけの研究者が国際的に不足していることは十分に認識するところである。

キク科各属種は、フロラを特徴づけている「生態型」という用語を誕生させた (Turesson 1922, 1925) 植物研究材料であり、このことから伺えるように、環境条件への適応度が非常に高く、高度に分化している分類群である。*Anthemideae* 連も同じで、生態型モデル植物として大きな形態的多様性を示す。その反面、核 DNA 塩基配列は高い相同性をもち (Kondo *et al.* 2003; 増田・近藤 発表準備中)、かつ殆どが染色体基本数 $X=9$ でまとまっている。ただし基本数を単位とするゲノム構成は、倍数性のシリーズをモデル的にもち、二倍体 ($2n=18$) ~ 十倍体 ($2n=90$) まで分化している (Kondo *et al.* 2003)。各種モデル生物ゲノムプロジェクトが進む中、最近、キクの倍数性に関する研究は、ロシア、スペイン、オーストラリア、アメリカ合衆国の近藤の共同研究者達によって別々に追従され始めた。2006 年 8 月 17 日、アメリカ合衆国カリフォルニア大学デイビス校ゲノム・バイオメディカルサイエンス施設が国際会議キク・ゲノム・プロジェクト *Compositae Whitepaper Meeting* を主催し、共同でキク・ゲノムプロジェクトを展開しようという動きがある。ここでも、近藤の説明により *Anthemideae* 連におけるシンテニーという用語の適用は十分理解されている。

キク栽培品種は六倍体 ($2n=54$) が最も安定して利用され続け、それらに六倍体由来の異数体だけでできあがってきたものがわずかに加わり長期にわたり利用されてきた (遠藤の 1960~1970 年代の仕事; 青山等 1997)。広義キク属各種の染色体を我々が分析して得た知見では、種内倍数性が頻繁にみられ、属内種間雑種だけでなく属間の種間雑種も人為でよくできる。このような中であって両親から配偶子を経て、接合体を得る過程で単純理論上理解できない染色体数や突然変異がよくみられ、雑種に継がれる。この中であって、キク栽培品種集団は同数でしかも高次の六倍体 ($2n=54$) と一部六倍体を基本とした異数体でまとまっている。このことは、六倍体の人為選抜が高度にマッチしているにほかなら

ず、この優先性をつくる原因または現象そのものは非常に興味深く、突然変異の利用を含めた育種の応用面からも研究する価値は大いにある。

現在の国際的な共通認識として、キク科にあっては、シンテニー間の相互遺伝的関係を十分考えていかなければならないという基本概念がある。シンテニーの全貌をさらに明確にしていく作業を通じて、キク科の全種に渡せることの可能な橋を具現化することができる。またイネ科にみられるような従来のシンテニー解析法と平行して、モデルとなる種を選びゲノムプロジェクト(全ゲノムの塩基配列決定)を視野に入れる動きもある。*Leontodon taraxacoides* ssp. *taraxacoides* [2n=2X=8; ゲノムサイズ 1C 0.29/0.30pg; イネゲノムよりも小さい; Baak and Rieseberg 未発表] は日本にも移入されて有害雑草となりつつある植物だが、今のところゲノム解析のための最良のモデル植物として最有力視されている。ただし、我々がこれまでも行っている核形態学的研究を順調にかつ広範囲に進めていくことで、さらに小さいゲノムサイズをもつキク科植物が今後見つかる可能性は十分に残されている。近い将来において確認されれば、それはキク科シンテニー利用の中心的存在になるであろう研究材料候補 *Leontodon taraxacoides* ssp. *taraxacoides* にとってかわるのは必至である。

⑥技術開発の課題と問題点、方向性

野生狭義キク属では種分化の中心は、同質倍数性と生態型である。その中のキク栽培品種集団は、一部に異数体があるものの基本は六倍体といわれている。それら野生種および栽培品種は高次の同質倍数性と同数性、そして核 DNA 塩基配列に高い相同性をもっている (Kondo *et al.* 2003; 増田・近藤 発表準備中)。シンテニーを考慮せず遺伝子特定部位の塩基配列をコンピューター分析させるとその解析効率是他の二倍体高等植物に比べ極端に落ちる。そして、同一シンテニー内の比較的疎遠な属の種を用いて解析する場合には、分析効率の向上は、理論上ではあるが大きく改善されることは明らかである。高次倍数体を構成する各ゲノムの同質性に少しの異質性が存在するキク栽培品種ではシンテニーを考慮した解析は重要である。そして、同質性の高いゲノムから構成される系統間においては、近縁性が高いので、塩基配列を解析する部位の選択と配列の長さを増やす必要がある。塩基配列の高い相同性にもかかわらず、外部形態や花色は大きな多様性を示すことは、キクで普通に見られる。このことは、突然変異がおきる頻度の高さを示すものであり、また特定の属間あるいは種間交雑組み合わせでは、体細胞染色体間相互転座といった現象も含めてトランスポゾンが原因するものではないかと推察する小さいが沢山の変異が時々現れる。場合によってはキメラも出現し、分析をより複雑にさせている。このように高次倍数体におけるゲノム構成の問題と同時に、交雑によるゲノムの新たな組み合わせが引き起こす変異の高頻度誘発の問題をキクは併せ持っており、これらを取りまく周辺現象も含めると、未解決部分は多い。

一方、広義キク属において、GISH 法により、雑種由来の染色体を、それぞれの両親から抽出した全 DNA をプローブにしてハイブリダイズさせ、ゲノム領域を分析すると、疎遠属間種間雑種では各親由来染色体の識別が可能となる。これらを並べると広義キク属内狭義属間種間の系統樹ができる。狭義属内のやや離れた近縁種間雑種では、一般的な傾向として、各親の全 DNA にブロッキング DNA を加えなければ、各親由来染色体は識別できない。極近縁の雑種、例えば狭義キク属内種間雑種では、各親由来染色体の識別は、た

とえブロッキング DNA を加えたとしても、不可能である。ただし、この中にまれに1～2個の区別できるエイリアン染色体が出現することもあるが、それがどこからやってきたかは今のところ不明である。

RAPD 分析を連鎖解析に用いる場合、プライマーを予備実験で探り当て、最終的に広義キク属狭義属間雑種での両親とその雑種第2代で分離比をはっきりと示すようなプライマーを見つけだすまでには、多大な労力と時間を費やす。RAPD 検出マーカーはそのほとんどが優性遺伝のため、ヘテロ接合とホモ接合の区別がつきにくく、また連鎖解析の場合には、別の人為雑種グループには、当然のことながら全く使うことはできない。

対象的にキクの栽培品種の DNA 判別を目的とした場合では、RAPD を強力なツールの筆頭として、シーケンシング、ISSR 等を利用した解析が行われている。また手法だけでなくターゲットとなる DNA も多岐にわたり、過去 10 年間でも数多くの報告がされている。しかしながら、キクの野生種および栽培品種全体からみれば、ほんのわずかな種および系統を材料に研究が行われているにすぎない。それでも現時点において蓄積されたデータから研究傾向をみると、多型の出現頻度と簡便さから RAPD 法に集中している。つまり、SSR や品種判別に有効となる DNA 領域の STS 化の試みはあっても効果的な報告はなく、全品種に普遍的に使える実用的マーカーまたはシステムの確立には達していないのが今の現状である。

⑦行政面での技術開発に関する取組み、業界・民間企業のマーカー技術の戦略

我が国の農林水産事業の1課題として、下部組織農林水産先端技術産業振興センターが主導して、今まさにキク栽培品種のDNA品種識別技術の共同開発を開始しようとし、キク育種を命題としている。また、キク栽培品種育種を命題の1つとして取り組んでいる企業とともに具体的プランをまとめているところである。外国では栽培品種のDNA品種識別技術の開発についての話はオランダやポーランドで語られ、研究が少しされている程度である。アメリカ合衆国ではキク科ではレタスとヒマワリならびにそれらのシンテニーの分子遺伝学的研究が主流で、切花用キク栽培品種を重視した研究は殆ど無い。

⑧その他有用な技術情報

以上述べてきたようにごく近縁なキク栽培品種全体をカバーできる DNA 品種識別技術の開発には大変な困難さを伴う様相である。中長期的な基礎研究および産業的視点で現在最も重要なことは、この困難さを早期に解決できるだけの遺伝資源(材料となるキク系統)を確保しつつ、品種の特定に重要でありながら不足している以下のDNA情報を生産することである。1)一部のキクで公開されている rbcL や rDNA などのユニバーサルプライマーが利用可能な領域を対象にした polymerase chain reaction (PCR)からのダイレクトシーケンシングによる塩基配列の比較解析および系統樹作成をイエギク栽培品種にも広範囲に適用していくことと同時に、2) RAPD 後に得られた系統を反映する特徴的なDNA断片のクローニング、3) 制限酵素等を用いたディファレンシャルディスプレイ法による種および品種特異的 DNA の解析、4) ゲノム濃縮法による SSR マーカー領域を集積させたライブラリーの作成、5) これらを駆使し、種および栽培品種識別を可能とする新規プライマーの開発。これは、現在問題となっている海外への遺伝子流出と不正な使用を、唯一阻

止することが可能な DNA 診断をキクに特化して実用化させるための基礎研究である。迅速かつ正確に行うためのキク診断システムの確立は、わが国のブランド化を重視したキクの産業分野を担うシステムを保守する上で、必要不可欠な重要戦略である。

現在、アラビドプシスのゲノム研究情報をもとに、葉、花などの形質に関与する遺伝子をインターネット情報から吊上げ、別の分類群への研究に適用することで、迅速かつ低コストに遺伝現象や発生研究を飛躍的に進展させるケースも最近の報告では目立ちつつある。キク栽培品種で対応する部位に対して詳細な分析を仕掛けることなども考えられる。このような研究は基礎研究における生命現象を解き明かすための重要な戦略である。しかし、生命現象解明の研究では、その準備段階である植物の大量増殖技術とそれに続くトランスジェニック技術の開発の方が産業面からすると社会的ニーズは大きいようである。すなわち、最新研究がもたらす社会的インパクトからみれば、先に述べた品種判別のための研究自体はより実用的な基礎研究である。

いずれにしても、片手間程度に分析技術の開発を試みることは不可能で、真剣に取り組む莫大な人材と時間がかかえられる開発費が必要となる。

<引用文献>

- Huang, S., Tsai, C. and Sheu, C. 2000. Genetic analysis of *Chrysanthemum* hybrids based on RAPD molecular markers. Bot. Bull. Acad. Sin. 41: 257-262.
- Kondo, K., Abd El-Twab, M. H., Idesawa, R., Kimura, S. And Tanaka, R. 2003. Chapter 6. Genome phylogenetics in *Chrysanthemum sensu lato*, p. 117-200. In: A. K. Sharma and A. Sharma, Eds., Plant Genome, Biodiversity and Evolution, Vol. 1, Part A, Phanerogams. Science Publ., Inc., Plymouth, United Kingdom, pp. 386.
- Lema-Rumińska, J., Zalewska, M. and Sadoch. 2004. Radiomutants of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) of the Lady group: RAPD analysis of the genetic diversity. Plant Breed. 123: 1-4.
- Lema-Rumińska, J., Zalewska, M., Sadoch, Z. and Jerzy, M. 2005. Identification of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) mutants of nero and wonder groups using RAPD markers. Electro. Journ. Polish Agric. Univs.8(2): 1-7.
- Scott, M. C., Caetano-Anollés, G. and Trigiano, R. N. 1996. DNA amplification fingerprinting identifies closely related *Chrysanthemum* cultivars. Journ. Amer. Soc. Hort. Sci. 121: 1043-1048.
- Trigiano, R. N., Scott, M. C. and Caetano-Anollés, G. 1998. Genetic signatures from amplification profiles characterize DNA mutation in somatic and radiation-induced sports of *Chrysanthemum*. Journ. Amer. Soc. Hort. Sci. 123: 642-646.
- Wolff, K. 1996. RAPD analysis of sporting and chimerism in chrysanthemum. Euphytica 89: 159-164.
- Wolff, K. and Peters-Van Rijn, J. 1993. Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. Heredity 71: 335-341.
- Wolff, K., Zietkiewicz, E. and Hofstra, H. 1995. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. Theor. Appl. Genet. 91: 439-447.
- Yang, W., Glover, B. J., Rao, G. Y. and Yang, J. 2006. Molecular evidence for multiple polyploidization

and lineage recombination in the *Chrysanthemum indicum* polyploidy complex (Asteraceae). *New Phytol.* 171: 875-886.

(4) ユリの DNA 品種識別技術の開発状況

北海道大学大学院農学研究院
助教授 山岸真澄

ユリ属には 130 を超える種が存在し、交配親和性に基づいていくつかの節（亜属）に分類されている。園芸品種は、単一の種の中で交配・選抜を行い有望な品種を育成しているテッポウユリのような例はあるが、その様な例はユリの育種の中ではマイナーで、大部分は種間交雑によって新品種が育成されている。アジアティックハイブリッド（スカシユリ）はコオニユリやマツバユリなど *Sinomartagon* 節の種がもともとの親となって育成された交雑群であり、オリエンタルハイブリッドはヤマユリやカノコユリなど *Archelirion* 節の種がもともとの交雑親として用いられている。同じ節に属する種同士の交雑では比較的簡単に雑種が得られるが、未熟胚培養など種間雑種を得るための技術が向上した結果、最近では節間の交雑に由来する雑種（OA ハイブリッド（オリエンタルハイブリッド x アジアティックハイブリッド）など）も育成されている。

ユリ属はゲノムサイズが大きい（ 3.6×10^{10} bp）ので、サザン法に基づく DNA マーカーは検出が難しい。そこで PCR を用いるマーカーが汎用性の高いマーカーとして用いられる。これまでに RAPD マーカー（van der Meulen-Muisers et al., 1995, Yamagishi, 1995, Straathof et al., 1996, Yamagishi et al., 2002）、ISSR マーカー（単純な反復配列（simple sequence repeat）の一部をプライマーにして反復配列と反復配列の間を増幅し長さの多型を得るマーカー）（Yamagishi et al., 2002）、AFLP マーカー（van Heusden et al., 2002）が PCR を利用するマーカーとして報告されている。品種識別や雑種判定はもとより自然に自生している個体の識別にこれらのマーカーが用いられており（Yamagishi, 1995, Persson et al., 1998, Wiejacha et al., 2001, Arzate-Fernández et al., 2005, Ploszaj et al., 2005）、もともと種間雑種で品種が育成されているからだと思われるが、品種間で多型は得やすい。花持ちや耐病性に関わる遺伝子座と連鎖する RAPD マーカーも見いだされている（van der Meulen-Muisers et al., 1995, Straathof et al., 1996）。またこれらのマーカーを用いてユリの連鎖地図も作製されており、花色形質や耐病性に関わる遺伝子座がマッピングされている（Abe et al., 2002, van Heusden et al., 2002）。有用な形質と連鎖するマーカーはマーカー選抜に利用できる。スカシユリなどの品種の識別はアイソザイムマーカーによっても可能である（Arzate-Fernández et al., 2005）。

カノコユリとキカノコユリから LINE と LTR レトロトランスポゾンがそれぞれ単離されている（Smyth et al., 1989, Leeton and Smyth, 1993）。これらの研究はマーカーの開発を直接目的としたものではないが、タイプ I（RNA 型）トランスポゾンの末端配列は IRAP や S-SAP 等のマーカーとして利用できる（Waugh et al., 1997, Kalendar et al., 2004）ため、マーカーの開発に繋がると期待される。

<引用文献>

Abe, H., M. Nakano, A. Nakatsuka, M. Nakayama, M. Koshioka and M. Yamagishi (2002) Genetic

- analysis of floral anthocyanin pigmentation traits in Asiatic hybrid lily using molecular linkage maps. *Theoretical Applied Genetics* 105: 1175-1182.
- Arzate-Fernández, A., C. Mejía-González, T. Nakazaki, Y. Okumoto and T. Tanisaka (2005) Isozyme electrophoretic characterization of 29 related cultivars of lily (*Lilium* spp.). *Plant Breeding* 124: 71–78.
- Arzate-Fernández, A., M. Miwa, T. Shimada, T. Yonekura and K. Ogawa (2005) Genetic diversity of Miyamasukashi-yuri (*Lilium maculatum* Thunb. var. *bukosanense*), an endemic and endangered species at Mount Buko, Saitama, Japan. *Plant Species Biology* 20: 57-65.
- Kalendar, R., T. Grob, M. Regina, A. Suoniemi and A. Schulman (2004) IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical Applied Genetics* 98: 704-711.
- Leeton, P. and D. Smyth (1993) An abundant *LINE*-like element amplified in the genome of *Lilium speciosum*. *Molecular General Genetics* 237: 97-104.
- Persson, H., K. Lundquist and H. Nybom (1998) RAPD analysis of genetic variation within and among populations of Turk's-cap Lily (*Lilium martagon* L.). *Hereditas*, 128: 213-220.
- Ploszaj, B., S. Stojalowski, L. Startek and A. Zawadzinska (2005) Distant hybrids and their verification by means of RAPD. *Acta Horticulturae* 673: 625-631.
- Smyth, D., P. Kalitsis, J. Joseph and J. Sentry (1989) Plant retrotransposon from *Lilium henryi* is related to *Ty3* of yeast and the *gypsy* group of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 5015–5019.
- Straathof, T., J. van Tuyl, B. Dekker, M. van Winden and J. Sandbrink (1996) Genetic analysis of inheritance of partial resistance to *Fusarium oxysporum* in Asiatic hybrids of lily using RAPD markers. *Acta Horticulturae* 414: 209-218.
- van der Meulen-Muisers, J.&.e.;J., J. van Oeveren, J. Sandbrink and J. van Tuyl (1995) Molecular markers as a tool for breeding for flower longevity in Asiatic hybrid lilies. *Acta Horticulturae* 420: 68-71.
- van Heusden, A., M. Jongerius, J. van Tuyl, TH. Straathof and J. Mes (2002) Molecular assisted breeding for disease resistance in lily. *Acta Horticulturae* 572:131-138.
- Yamagishi, M. (1995) Detection of section-specific random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Lilium*. *Theoretical Applied Genetics* 91: 830-835.
- Yamagishi, M., H. Abe, M. Nakano and A. Nakatsuka (2002) PCR-based molecular markers in Asiatic hybrid lily. *Scientia Horticulturae*, 96: 225-234.
- Waugh, R., K. McLean, A. Flavell, S. Pearce, A. Kumar, B. Thomas and W. Powell (1997) Genetic distribution of *BARE-1*-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Molecular General Genetics* 253: 687-694.
- Wiejacha, K., A. Marasek, I. Sabala and T. Orlikowska (2001) Molecular markers in detection of distant hybrids in *Lilium*. *Acta Horticulturae* 546: 281-285.

(5) ヨーロッパ現地調査報告

海外調査団：神代 隆・八木雅史・川畑真人

I. はじめに

・ 調査の概要

欧州における DNA マーカーを用いた品種識別技術の開発、および利用状況を調査するために、平成 18 年 11 月 27 日～12 月 2 日までフランス、オランダ、英国の関連する機関を訪問し、特に花卉に関する状況を調査した。

調査には、神代 隆（国際農林水産業研究センター）、八木雅史（花き研究所）および川畑真人（農林水産先端技術産業振興センター）の 3 名があたった。

調査先としては、DNA 品種識別技術開発のプロジェクトに資金提供を行っている EU 品種庁（フランス）と、その EU 品種庁によるバラの品種識別プロジェクトの参画機関である Plant Research International（オランダ）、National Institute of Agricultural Botany（英国）を選定した。

また、種苗会社における DNA 品種識別技術に対する考え・動向を調査するため、カーネーション等の花卉の生産企業である Hilverda 社（オランダ）も訪問することとした。さらに、DNA 品種識別技術の開発企業の考え・動向も調査するため、AFLP 等の DNA マーカー技術の開発企業である Keygene 社（オランダ）も訪問することとした。

・ 訪問機関の概要

1) EU 品種庁（Community Plant Variety Office; CPVO）

フランス・アンジェに事務所を有する EU の一機関。1994 年設立、1995 年より活動開始。EU 域内における品種保護システムの運用を行う。独立採算制で、EU からの予算提供は受けていない。組織は、長官、副長官のもと、情報技術部門、技術部門、管理・財政部門、法律部門、人事部門よりなる。職員は約 40 人。12 の国籍よりなる。2005 年の出願受理数は約 2,700。DUS テストは、EU 各国の機関に割り振り、実施している。

対応者：Mr. Jean Maison（Deputy Head Technical Unit）

2) Plant Research International（PRI）

オランダ・ワーゲニンゲンにある独立採算制の研究機関。ワーゲニンゲン大学・植物科学部門と Applied Plant Research と共に、Plant Sciences Group を形成している。Plant Research International の年間研究費は約 4200 万ユーロ（このうち 460 万ユーロが製品販売、ライセンス収入、500 万ユーロが競争的外部資金）。約 300 名のスタッフが勤務する。組織は、生物科学研究部門、生物相互作用研究部門、農業システム研究部門、植物育種部門、バイオメトリクス部門よりなる。

対応者：Dr. Ben Vosman（Research Group Leader Plant Breeding）

3) Keygene

オランダ・ワーゲニンゲンにあるバイオテクノロジー企業。1989年に、複数のオランダの種子会社により設立された。当初は、オランダの野菜種苗企業と育種家とのコンソーシアムにより出発したが、現在では、オランダの Enza Zaden 社、De Ruiter Seeds 社、Rijk Zwaan 社、フランスの Vilmorin Clause & Cie 社、タキイ種苗の5社が株主となっている。DNA マーカー技術として広く用いられている AFLP (増幅断片長多型) の特許を有している。最近では、ジェノタイピング技術である CRoPS、SNP 検出技術である SNPWave 等を開発している。

開発技術の野菜への利用は株主のみに対してであり、その他の作物への応用については自由にクライアントを選定できる。

対応者 : Dr. Mark J.J. van Haaren (Manager, Business Development)

Dr. Jeroen Rouppe van der Voort (Manager, Applied Research)

4) Hilverda

1909年にロシアへの花輸出事業、花卉生産を目的として設立された歴史ある花卉会社であり、1956年にカーネーションの育種を開始した。現在、アルスメールの本社には87名の職員を配置し、そのうち育種は6名(各品目に2名)である。カーネーション、リモニウム、アルストロメリアの育種、苗生産を行う一方、アルスメール花市場に近接して広大集荷、加工、輸出施設を持ち、世界の70以上の国へのほとんど全品目の花卉の輸出を行っている。独自品種のロイヤルティ収入が最大の収入源となっている。輸出、販売事業の売り上げでは60%が外国(58カ国)、40%がオランダ国内となっている。

対応者 : Dr. Marius Tas (General Manager)

5) National Institute of Agricultural Botany (NIAB)

英国・ケンブリッジにある独立採算制の研究機関。1919年に公立研究機関として設立され、1996年に非営利の企業になった。現在は、Defra (Department for Environment, Food and Rural Affairs) からのプロジェクト委託による研究費は全体の40%程度である。ケンブリッジの本所には約150名のスタッフが勤務している。英国各地に10の支所を有している。研究部門は、「植物品種・種子」、「耐病性・遺伝子診断」、「植物遺伝学・育種・評価」の3部門に分かれている。植物の遺伝的、物理的特性等の研究を実施し、技術的サービスの提供もしている。主要業務は、品種の特性解明と評価、種子のテストなどである。

対応者 : Dr. John Hutchins (Center Head for Plant Varieties & Seeds)

Dr. Elizabeth Scott (Head of Ornamental Crops, Varieties & Seeds Group)

II. 調査結果

1. 識別技術の開発の背景

EU 品種庁 (CPVO) は、UPOV 会員として UPOV での議論に参加し、その議論にしたがった考え方を採用している。UPOV では現在、BMT (Biochemical and Molecular Techniques and DNA profiling in particular) 作業部会を通じて DNA マーカーの品種識別への利用可能性を検討している。この背景には、品種の特性の評価には長時間を要し、侵害が疑わしい材料が比較に耐える量がない場合が多く、DUS 試験により記載されたものと現在の材料とが必ずしも一致しないこと、さらに 2 品種の比較場所、栽培条件が DUS 試験と異なる場合が多いなどで、育成者にとっては育成者権の行使は必ずしも容易ではないという UPOV の認識がある。したがって、BMT への委任事項は、第 1 段階として、従属品種および品種の識別に関する生化学・分子的な技術についての議論の場を提供することであり、次の段階は、それらの分子的な技術をどのように品種判別に用いるかについての議論の場を提供することである。

CPVO は、後述のように、品種識別を目的としたいくつかのプロジェクトに部分的に資金を提供しており、それらの研究結果は BMT 作業部会で発表されている。

Plant Research International (PRI) は 90 年代はじめからトマトの品種識別のための分子マーカーに高い関心を寄せ、園芸植物ではキク、バラ、カーネーションで DNA マーカーの開発を行ってきた。DNA マーカーの以前は、ユリ、チューリップではアイソザイムによる識別を行った経験もある。

PRI の Ben Vosman 氏は、個人的には DNA マーカーのデータは品種識別の有効な指標となりうるので、将来は品種登録時に DNA マーカーのデータも特性データとして扱うべきと考えている。これにより、広範な品種をカバーする DNA のデータベースが構築できることになる。データベースの保存はリファレンスコレクションの維持よりはるかに容易という長所がある。この際、品種登録時の DNA を保存しておくことが重要となる。

NIAB はこれまで品種登録時の DUS 試験に深く関わってきたこともあり、DNA マーカーにより DUS 試験に用いる対照品種を絞り込める可能性があることから種々の技術を用いて DNA マーカー開発を推進してきた。

花卉種苗会社の DNA マーカーに寄せる期待は大きく、直接的な使用を考えている。Hilverda は DNA マーカーを品種識別にはきわめて有力なツールとみなし、理想的には、カーネーションの全品種について DNA マーカーおよび他の形質データを含むデータベースを構築したいと考えている。種苗の育種会社は独自でマーカー開発をすることはまれであり、DNA マーカーについては外部機関へ委託を行っている。

得られたマーカーは水際で違法品の DNA 識別を行い、輸入の差し止め、あるいは訴訟の証拠として使用することを考えているが、そのためには、判定の迅速性と汎用性（データベースがカバーする品種数）が重要であり、このような検査サービスが可能な委託先を

探している。

品種識別とは若干異なるが、品種の均一性を検定するために DNA マーカーの使用が検討されている。オランダ植物防疫局の管理下にある独立機関 NAK tuinbouw (Dutch Ornamental Plant Inspection Service) は、観賞用品種の DUS 試験、ウイルス検定などの現行サービスに加えて DNA マーカーを用いた品種識別を行うべく技術の立ち上げ中である。

2. 開発機関・研究者

1) 手法の開発

DNA マーカーを獲得するための技術そのものを開発しているのは、今回の訪問機関では Keygene、および Plant Research International である。新しい技術の方向は、SNP の検出でありその検出効率を高めることを目指している。

新しい技術としては、

- ・ SNPWave™ Multiplex SNP (Keygene),
- ・ CRoPS (Keygene)
- ・ Motif Direct Profiling (Plant Research International)

これらの技術内容の概要については別紙 1 に記載した。

2) マーカー開発

主流は各植物種について品種識別が可能となる DNA マーカーの開発であり、実際のマーカー開発は Plant Research International、NIAB、Keygene で、基本的には、受託ベースで実施されている。また、EU 品種庁は特定の植物種でのマーカー開発について、他の機関（各国農業省など）と共同で資金を提供し援助している。

訪問先ではないが、スペインの農業関係の検査会社である Applus+, IRTA Gen は品種識別のための DNA マーカー開発を受託ベースで行っており、現在、カーネーションの品種識別マーカー開発について委託先と協議中である。

3. 用いられている技術の種類・改良技術・新技術

EU 品種庁は、現段階で品種識別の目的で最も使用されているのは SSR (マイクロサテライトマーカー) であるが、将来的には、SNP の利用が増加するという見解である。

Plant Research International は SSR を主体として開発してきた。その理由は 1 ヶ月あれば、マーカーを獲得できるからである。それに SSR の結果は再現性が高く、研究所が異なっても同じ結果が得られることが大きな有利性である。AFLP に関する経験もあるが、AFLP では事前の塩基配列情報がなくとも、数多くのマーカーを得られるという大きな利点がある一方、装置や場所が異なると、得られる結果が異なる場合があるので、信頼性が低いと感じている。

(AFLPによる再現性に関する問題は、実施場所、使用機器によるものであり、技術そのものの不安定性から来るものではなく、再現性の高い結果を得るためには、マニュアルに記載されている範囲を越えて慎重に実施する必要があるためと推察される。別の表現をすれば、再現性の高い結果を得るためにはある種職人芸が必要となる。)

NIABは、これまでいろいろな手法を経験しているが現在主流のSSRを用いた方法に大きな問題はないと感じている。将来の手法としてはSNPが有力と見ている。

AFLPを開発したKeygeneは、AFLP技術は事前に塩基配列情報がない生物種にも適用でき、さらに、長期間にいろいろな場所で使用された技術的蓄積があり、現在でも十分使用できる技術と考えている。現段階で比較検討すべき識別技術はSSRとSNPであり、SSR、SNPは、いずれも事前に塩基配列情報が必要なことが欠点である。その点、AFLPはそのような塩基配列情報を必要とせず、初期投資額については最低のものである。将来の識別技術としてはSNPを利用したものと考えており、そのラインで手法開発を行っている。

4. マーカー数、識別可能な品種数

Plant Research Internationalでは11個のマイクロサテライトマーカーを用いてバラ(Hybrid Tea)の730品種を識別できたが、このケースでは4~5個のマーカーでも十分識別可能であると考えている。小麦、トマトでは20個のマイクロサテライトマーカー、アゼリアでは7個のマーカーを開発した。このような経験に基づき、品種の多様性にもよるが、10個、少ないケースでは、4~5個のマイクロサテライトマーカーがあれば、500品種程度の識別は可能と見ている。品種内の変異がないこともあり、栄養繁殖性の植物種の方が、種子繁殖性植物よりマーカーの獲得は容易である。

CPVOが資金提供したバラの識別マーカー開発プロジェクトでは、NIABは当初15個のマイクロサテライトマーカーを用いていたが、最終的には9個のマーカーで約380以上の品種を識別することができている。

5. ゲノム研究との関連、シンテニーなどのゲノム情報の利用

訪問機関では、特に、各種植物のゲノム研究を実施しているところはなかった。したがって、シンテニーなどのゲノム情報の活用もない。これは、DNAマーカーの開発関連の研究開発すらほとんど委託で実施されており、独自の研究資金を種々の植物のゲノム解析等の基礎的・基盤的な分野に投入する余裕がないためであると考えられる。

6. 技術開発の課題と問題点、方向性

1) データベースの充実

品種識別サービスを行う場合、いかに多くの品種についての DNA マーカーのデータを保有するかが判断の正確さに大きく影響するので、データベースのサイズが大きな競争力となる。この調査からはバラのデータベース構築についての情報を得たが、300~700 品種程度であり、バラ全体の 20,000 品種からは程遠い状況である。

データベースの充実は誰もが必要性を認めるであろうが、問題はその開発に必要な資金を誰が負担するかである。

2) 突然変異体の検出

栄養繁殖の花弁品種では、突然変異で得られた品種が多いが、変異体は元の親品種と同じ DNA マーカーのパターンを示すことが多い。所詮、従属品種でありこのような変異体を DNA レベルで識別する必要はないという見解 (NIAB) もあるが、種苗会社としては、これらの品種も DNA レベルで識別したいと願っている。変異体を識別するためには、変異遺伝子領域から DNA マーカーを探すことであり、その獲得にはかなりの時間と労力が必要であるが、効率的に変異体を識別できる DNA マーカーを獲得する技術が必要である。

7. 行政面での技術開発に関する取組み

1) UPOV

UPOV では BMT 作業部会を通じて、DNA マーカー技術をどのような場面で使用できるかの技術的検討を行っているが、以下の点を、今後の検討課題としてあげている。

- ・ 種苗登録時に添付された DNA マーカーの法的な扱い
- ・ DNA マーカーは公的な種苗登録の記載事項となるか
- ・ 品種特性記載に DNA マーカーは標準とすべきか、要求によってのみ記載するのか?
- ・ DNA マーカーは育成者権の決定権者は法的にはどう扱うのか?
- ・ 特性記載には合致するが、DNA マーカーでは異なる品種の扱いは?
- ・ DNA マーカーの正確性は誰が確認するのか?
- ・ DNA マーカー開発に必要なコストは誰が負担するのか?
- ・ 育種家は DNA マーカーのパターンが安定で均一な品種を維持できるか?

2) CPVO

CPVO は 2003 年から品種識別を目的とした分子技術のプロジェクトについて共同で資金提供を開始した。EU 域内の品種特性検定を担当する機関がこのプロジェクトの実施機関である。

DNA マーカー関連のプロジェクトは 3 つの Option に分類している。

- ・ Option 1a : 形質とマーカーの連鎖が確認された場合には DUS 試験の実施項目へ加えることが検討できるレベル。
- ・ Option 1b : 形質に連鎖する量的形質のマーカーが獲得できた場合。
- ・ Option 2 : 形質とマーカーとの遺伝的距離の推定にさらに研究が必要で、当面、リファレンスコレクションの管理目的のために使用されるレベル。

- ・ **Option 3** : 手法開発を目的とするレベルであり、現時点ではこのレベルのプロジェクトはない。バラのプロジェクトはリファレンスコレクションの管理のためにはさらに項目が必要である。

現在進行中のプロジェクトは以下のとおり。

① バラ品種のリファレンスコレクション

参加機関：PRI、NIAB、BSA (Bundessortenamt: ドイツ)

目的：形態形質、形態写真および分子マーカーを含む小規模データベースの作成。

このデータベースは DUS 試験および、品種保護の質を向上させるためである。ここではマイクロサテライトマーカーが使用された。なお、この研究によってできたバラ品種約 400 を含むデータベースの公開は予定されていない。

バラのプロジェクトは今年で終わりである。今後はモモの DNA マーカープロジェクトに資金を提供することを考えている。

バラを選定したのは、品種登録数が園芸植物の中で最も多く、育種家あるいは育種会社からの要望が強いためである。

② 冬ナタネのリファレンスコレクションの管理

参加機関：NIAB、GEVES (Groupe d'étude et de contrôle des variétés et des semences: フランス)、DIAS (Danish Institute of Agricultural Sciences: デンマーク)、BSA

冬ナタネの品種識別のための DNA マーカーのプロジェクトは現在も進行中である。このプロジェクトの目的は DNA マーカーを用いて、DUS 試験に供試する対照品種を DNA レベルで最も類似した品種にすることである。Option 2 の位置づけのプロジェクト。

③ トマト病害抵抗性遺伝子に連鎖したマーカーの開発

参加機関：PRI、NAK tuinbouw、GEVES、OEVV (Spanish Plant Variety Office: スペイン)、INIA (National Institute for Agricultural and Food Research and Technology: スペイン)

トマトの病害抵抗性に連鎖した DNA マーカーを開発するプロジェクトが進行している。このプロジェクトは Option 1 に位置づけられる。

3) 各国政府

オランダ農務省は、識別マーカーは基本的には育種家にメリットをもたらし、受益者である種苗会社が研究をサポートすべきと考えているため、品種識別のためのマーカー開発を援助してはいない。農務省は政策に応じてプロジェクトを企画しており、そのプロジェクトを受託すれば資金提供が受けられる。現在、有機栽培農産物の生産は政策と合致するので有機栽培関連のプロジェクトを PRI は受託している。残念ながら、品種識別は現在の農務省が大きな関心を寄せる分野ではないので、この分野の受託プロジェクトはない。

英国政府は育成者権行使については、法が要求している範囲のみの薄い関与に留まっており、権利行使を強化しようとはしていない。しかし、DNA マーカー技術には高い関心を寄せている。これは育成者権行使の強化のためでなく、この技術を用いることで DUS 試験用の対照品種を減少させることができ、DUS 試験に関わるコストが削減できる可能性があるからである。

8. 業界・民間企業のマーカー技術の開発戦略

1) 種苗業界

花卉の種苗会社は独自で自社開発品種を識別するための DNA マーカー開発を行うのではなく、マーカー開発を請け負う機関に委託することが一般的である。カーネーションについてのきわめて最近の動きとして、以下の例がある。

オランダ、ドイツ、スペインのカーネーション育種会社 Hilverda、P. Kooji (オランダ)、Selecta (ドイツ)、B&B (スペイン) が、品種識別マーカーおよびデータベースの構築を行うため、委託先として、オランダの Plant Research International とスペイン公的研究機関からスピンアウトした農業関連の検査会社である APPLUS+との比較を行っている。Plant Research International の場合、開発費は高く、開発に長時間を要し、さらにデータベースの共有は困難という条件であり、他方の APPLUS+では、開発費は低く、開発に要する時間は短く、そしてデータベース共有は可能である。

2) マーカー開発機関

Plant Research International では、独自のマーカー開発としては、PRI の育種プログラムをサポートするために病害抵抗性遺伝子にリンクしたマーカーを開発しているが、品種判別のために PRI の判断でマーカー開発をすることはしない。品種識別マーカーに関しては、基本的には受託ベースで種苗会社などのクライアントの要望に応じたマーカー開発を行っている。委託で開発した DNA データベースは非公開となる。これまで、PRI でデータベースを構築した植物種の数は多くない。

NIAB においても、独自で植物種を選定して品種識別マーカーを開発することはなく、研究資金を確保するために、常にクライアントからの依頼で行い、共同開発体制をとる。資金提供元は、UPOV、CPVO、イギリス農務省であり、オランダの PRI、ドイツの BSA 等との共同開発体制で実施することが多い。

園芸作物としては、CPVO の資金援助を受け、バラでの DNA マーカーの開発を行った。その経緯は以下のとおりである。

1980 年代後半からスペイン等で、ごく小規模にバラの分子マーカーに関する研究が開始された。NIAB はこの頃からバラの DNA マーカーに興味を示し、多くのバラ遺伝資源に関してこの研究を拡大したいと思っていたが、研究資金が得られなかった。

CPVO にバラの DNA マーカーの企画を提出し、CPVO の資金提供限界は 50%であり、残りの 50%の資金を確保すれば資金提供ができるとの回答を得た。そこで、NIAB は英国

農業省へ資金提供を依頼し、それが認められた。同様にオランダでは PRI、ドイツでは BSA がそれぞれの農業省からの資金を獲得し、バラのプロジェクト開始の目処が立った。その後、バラ品種を供給する育種会社との調整を行い、DNA マーカーのみならず、形態特性、および花の写真もデータベースに含めることとなった。このデータベースは一般には公開されず、関与した関係者のみに公開されることとなった。

このように、ある植物種についてのマーカー開発を行うためには、CPVO も含めて多くの機関への提案が必要であり、開発資金が確保できて初めて研究が開始できる状況である。新たに新規の植物種について開発を開始する場合にも同じような手順を踏む必要がある。

3) マーカー開発の委託サービス

Plant Research International および Keygene では、品種識別マーカーについてサービスを実施しており、その委託料についての情報を入手した。

・ PRI での品種判別サービス

PRI が開発したマーカーで品種識別を行う場合、10 サンプルの識別であれば 1 サンプルあたり 150 Euro であり、1 サンプルだけの識別であれば 1,500 Euro となる。

・ PRI で開発したマーカー情報のライセンス

マーカー情報のライセンスに際しての前提条件は、①マーカー情報は非独占的に提供、②マーカー情報の第三者への開示、販売は禁止、③マーカー情報の知的財産権（ノウハウ情報）は PRI の所有物、④マーカーを使用した研究結果の公表にあたってはマーカーそのものに関する情報の開示は禁止し、マーカーの入手先を明記、⑤契約違反では 25,000 Euro の罰金。

マーカー情報提供の対価は、最初の 3 マーカーまでは、マーカーあたり 2,300 Euro、次の 3 マーカーはマーカーあたり 1,400 Euro、さらに次の 3 マーカーについてはマーカーあたり 700Euro である。さらに、カーネーションについては特別価格を設定しており、7 個の識別マーカーと Multiplex に関する情報セットを 10,000 Euro でライセンスしている。なお、カーネーションマーカーがどれだけの品種識別能力があるかについては情報を得ていない。

・ 新規にマーカーを開発するサービス

標準的な開発フローは、①マイクロサテライト濃縮ライブラリーの作成（約 1 か月）、②小規模な標準品種（特性が異なるもの）を使って多型の頻度、マーカーの安定性などで、それぞれのマーカーを評価（植物種、マーカー数にもよるが約 1 か月必要）、③マーカーの選定（クライアントと協議）、対象とする品種群を用いた多型検出である。一般的には、およそ 10 マーカーのうち 1 個が再現性高く、品種識別に使用できるレベルのマーカーとなる。

識別に使用できる 10 マーカーを開発する際の標準的なコストは、植物種により変動するが 40,000 Euro 程度と推定している。

・ Keygene

AFLP 技術に関して広範な権利を保有する Keygene では AFLP 技術そのもののライセンスアウトは限定的に実施しているのみで、研究目的で AFLP キットを 3 社の代理店を通じて供給している。

このような技術を販売する一方で、品種識別サービスも行っており、この価格は 96 サンプルの解析あたり、4,000 Euro である。

9. 知的財産に関する考え方

1) ライセンスアウト

Plant Research International ではマーカー検出技術の開発は行っていないので技術そのものを特許化してはいない。品種識別マーカーについては、プライマーの組合せ、識別マーカーの塩基配列は特許で保護するのではなくノウハウとして保護している。したがって、識別マーカー、プライマーについて公表しないのが基本的スタンスである。時に、マーカーに関する知見を科学論文に投稿することもあるが、それらは、ベストのものではないとのことである。このように、特許化していなくとも、顧客の要望に応じてこれらの品種識別マーカーをライセンスすることはでき、実際、各種のサービスを実施している (PRI の識別サービスの詳細は上述のとおり)。

NIAB では、通常、受託ベース、あるいは共同研究体制で DNA マーカーの開発を行っているのでマーカーあるいはプライマーについての情報を公開、発表するかは相手方との相談となる。基本的にはこれらの情報は共同研究体制の中でのみ扱われるべきであり、公開すべき情報ではないと考えている。

2) 他社技術のライセンスイン

NIAB では、ライセンスが必要な技術を使用しようとして、ライセンス交渉を開始したが、ライセンスを受ける前に、その製品の販売が中止となった。必要であれば、ライセンスを受けて使用することが基本である。

直接技術開発を行っていない CPVO の考え方は明確である。他社が特許化している技術であっても、識別に有力なツールとなれば、使用権の獲得のために交渉を行い、その技術を利用する。そして、ライセンスを受けるために必要なコストは、マーカーの利用の際にコストに反映させるという見解である。

3) Keygene の AFLP 技術の商業化ライセンス

AFLP について、Keygene は 90 年代初頭にきわめて広範囲の請求項の特許を取得した (日本では、特許 3236295、特開 2001-61486、いずれも優先日 1991.9.24)。

民間会社が商業目的でこの技術を使用したい場合は Keygene からのライセンスが必要である。AFLP キットは Invitrogen、Applied Biosystems などが Keygene からのライセンスを受けて販売しているが、研究目的のみの使用を認めているので、民間会社がキット

を使用して品種識別などのいわゆる「業」を行うことはできない。

商業化ライセンスについては、現段階では、信頼性のある会社に限定的に実施している。その一例が、オランダ・アルスメールの花弁種苗の品質検査機関、NAK tuinbouw、である。

10. 育成者権の侵害事件とDNAマーカーの扱い

1) CPVO

バラの違法な増殖が、アフリカ、南アメリカなどで起きている。

育成者権侵害では、バラ、柑橘、かすみ草等について訴訟まで至っている。スペインの柑橘品種についての訴訟ではDNAマーカーのデータが証拠として取り上げられて、権利保持者の勝訴となった。ドイツのかすみ草についての訴訟事件は現在も係争中であり、ここでもDNAマーカーデータが取り上げられている。

このようなケースはあるが、訴訟まで至るケースはそんなに多くない。それは、育成者権の侵害で、権利保有者がクレームを付ければ、侵害者は引き下がる場合が多く、保有者も侵害者は基本的には顧客であるので訴訟まで持ち込むケースは多くないからであると思われる。

CPVOの法務担当者が、訴訟まで発展した事件も含め、育成者権侵害の事例のデータベースを作成中であり、このデータベースは公開を予定している。

次のステップとしては、育成者権侵害事件の訴訟はあまり頻繁に起こっていないので、裁判官、判事などの法務関係者と育成者権、DNAマーカー関連の情報を共有化し、啓蒙することが重要と考えている。

2) PRI

育成者権の侵害のケースでDNAマーカーデータが証拠として扱われる場合もあるが、係争案件、あるいは国により取り扱われ方は異なる。しかし、DNAマーカーのデータを侵害者に提示することによって、侵害者が真に侵害していればその意識があるので、ライセンスを獲得に来る場合があり、裁判まで進展することは少ない。

また、品種識別マーカーを持っていることが、侵害を未然に防ぐ抑止力として作用することも確かである。したがって、品種を識別するマーカーを持つことは育成者権行使の観点からは大きな意味、意義がある。

オランダではかすみ草の育成者権についての裁判が現在も進行中であり、その中ではDNAマーカーが他の形質データとともに証拠として採用されている。

3) NIAB

英国では育成者権侵害事件でDNAマーカーが証拠として扱われた例はない。外国では、かすみ草、柑橘などいくつかの例がある。

NIABは育成者権の被侵害者へのデータ提供サービスも行っており、必要であれば法廷での説明も引き受ける（これまで1件の侵害事件で訴訟準備のサービスを行ったが法廷での説明までには至らなかった）。

育成者権侵害訴訟での問題点は、法務関係者が育成者権についてこれまで多くの経験がないので、データの証拠としての扱われ方が、研究者とは全く異なることである。法務関連者への情報提供、啓蒙が必要であると考えている。

4) Hilverda

EU 域内ではスペインで育成者権の侵害が発生している。訴訟に発展しているが、スペインの地方政府が育成者権の認定に否定的である（社会的問題が背景にあると思われる）。

ドイツではエリカの育成者権侵害が発生し、訴訟では DNA マーカーのデータが証拠として採用された。この件については、CIOPOLA の Dr. Edgar Krieger (Executive Secretary) が詳しい。

トルコでも花卉品種に関する侵害が発生している。違法に生産された生産物がトルコ国境を越える際に輸入業者へロイヤルティ支払いの証明書の提出を求め、証明書がない場合は生産物の廃棄を要求している。

コロンビアは 15 年前には育成者権の保護の概念さえなく、80%は育成者権の侵害であったが、現在は UPOV に加盟したこともあり、90%は種苗法を遵守して問題はなくなってきた。これは長年の育成者権に関する啓蒙、教育、協議によるものである。しかし、10%はまだ問題あり。

マレーシア、インドも同じような経過を辿り、現在では問題はなくなってきた。

中国は UPOV に加盟しており、その種苗法では苗の自家増殖は認められている。しかし、中国国外への輸出は認められていないので、違法な増殖による生産物に対しては、水際で差し止めを行い、生産物の破棄を要求している。カーネーションでは、ライセンスを受けた生産者には生産物 100 本に対して 100 円のシールを貼ることとしている。これはライセンスのひとつの方法であり、さらに良い生産者と悪い生産者を類別する方法としても機能する。

【別紙1】 新しいDNA マーカー開発技術

1. CRoPS (Complexity Reduction of Polymorphic Sequences) Keygene

Keygene 社が特許を有する AFLP を用いて増幅された領域のシーケンスを大規模に行い、SNPs や SSR 等の多型を効率よく見出すことのできる技術である。シーケンスには RocheGS20 システム* (454 Life Sciences 社) を用いる。RocheGS20 システムは一度の解析で、平均 100bp の配列を 20 万個以上読むことが可能である。得られた結果について、重複配列や既知のゲノム情報等を統合し、多型の存在する領域を特定する。この方法を用いることで、多型が少なく、繰り返し配列の多い、多くの作物においても効率よくマーカーを作成できる。現在、トウガラシやトウモロコシで利用を進めている。

【品種鑑別への利用】ゲノム全体の配列情報を大量に取得することができ、品種鑑別に有効と考えられる SNPs や SSR 等を見出すことができるので、既知のゲノム情報が少ない品目でマーカーを作成する際に有効な手段と考えられる。ただし、コストおよび実用性については未知数であり、今後の研究の進展により判断すべき。

* 454 Life Science 社の RocheGS20 システム

300-500bp 程度の短い断片に切断した DNA にアダプターを付加し、変性を行うことで single-strand template DNA (sstDNA) 断片を生成する。それぞれの sstDNA は、ビーズに一つずつ固定され、さらにそれぞれのビーズは増幅試薬を含むマイクロリアクター中 (油水コロイド) に一つずつ取り込まれる。マイクロリアクターはそれぞれマイクロ反応槽としての役割をはたす。これらマイクロリアクターを一本の PCR チューブに集め、増幅反応を行うことで、それぞれのビーズは数万コピーものクローナルに増幅された一本鎖 DNA に覆われる。sstDNA が結合した DNA ビーズと酵素を含むエンザイムビーズは遠心操作により、PicoTiterPlate のそれぞれの Well に一つずつ落ちる。そしてこの PicoTiterPlate がゲノム GS20 にセットされると、プレート上にそれぞれの塩基が順番に流され、それぞれ取り込まれた塩基からの化学発光を CCD カメラで検出することで、シーケンス情報を得ることができる。

2. SNPWave™ Keygene

本手法は、キャピラリーシーケンサー、複数の蛍光ラベル等を組み合わせて使用することで、一度に多数のサンプルの SNPs を解析できる技術である。この中にも Keygene 社の AFLP の技術を採用している。

一本鎖に変性したテンプレートにアリル特異的プローブ (circularizing padlock ligation probes) をライゲーションさせる (このとき、ミスマッチを生じるプローブの場合、以後の PCR で増幅は起きない)。次に選択的 AFLP プライマー (2 塩基付加) を用いて増幅を行い、蛍光強度を測定し、SNP を検出する。それぞれのプローブは、各対立遺伝子間で 2bp、SNP 座間で 3bp ずつ離れた位置に検出されるようにプローブの長さを調節しており、140bp 程度の短い run で 10 の座の SNPs が検出できるように工夫されている。今後、様々な種においてマッピングや多様性解析、マーカー育種選抜に利用できる。

【品種鑑別への利用】本方法は、SNPs を一度の解析で多数の検体から多数の座について検出する際に有効な手段である。品種鑑別マーカーとして SNPs が利用可能になった際の検出方法の一つに挙げられる。

3. DArT (Diversity Arrays Technique) Plant Research International, CAMBIA

基本的にはマイクロアレイを利用した技術で、CAMBIA (オーストラリア) の Kilian らのグループが 2001 年に開発した。まず、ゲノム DNA (gDNA) を制限酵素で切断し、アダプターを付加する。その後 1~3 塩基を付加した選択的プライマーを用いて増幅を行う (gDNA の 'Representation' を作る操作)。増幅産物をベクターへ挿入してクローニングを行った後、インサートの増幅産物をガラススライド上にスポットし、アレイを作成する。多型の検出は、目的の個体と同様に 'Representation' を作成し、Cy3 や Cy5 といった蛍光色素でラベリングした後、ハイブリダイゼーションを行い、蛍光を検出することで行う。シロイヌナズナ、ユウカリ、大麦、小麦、キャッサバ等で利用実績があるが、PRI では使用する予定はない。

【品種鑑別への利用】PRI の B. Vosman 氏が再現性を疑問視していることからわかるように、高い信頼性を求められる品種鑑別においての利用はかなり限定的であると考えられる。

4. Motif-Directed Profiling (MDP) Plant Research International

ゲノム中に存在する重要な形質を支配する遺伝子は、シングルコピーで存在する場合よりジーンファミリーを形成していることのほうが多い。このようなジーンファミリーの例としては、抵抗性遺伝子 (R gene)、プロテインカイネース、MADS box 遺伝子等が挙げられ、それらのジーンファミリーは共通したドメインを有している。そこで、これらの保存された領域でプライマーを設計し、PCR による増幅を行うことで保存された領域をもつ遺伝子を多型として検出する手法である。具体的な例を NBS profiling をもとにして以下に示す。

多くの病害抵抗性遺伝子 (R gene) は NBS (nucleotide-binding site) と LRR (leucin-rich repeat) の両者をもつグループに分類される。また、様々な種において、NBS 中には高度に保存された領域 (P-loop、Kinase-2 モチーフ、GLPL モチーフ等) が存在することが明らかになっている。そこで、これらの保存された領域をもとにプライマーを設計し、PCR により増幅を行うことで、効率的に多数の R gene や RGA s (R gene analogs) を得ることができ、多型として検出された遺伝子はマーカー化し、マッピングをすることができる。この手法は、ジャガイモ、トマト、オオムギ、レタス、リンゴ、イネにおいて利用できる。

【品種鑑別への利用】本技術は形質に連鎖したマーカーを直接取得する上で有効な手段であり、品種鑑別への利用は念頭においていない。

2) 果樹

(1) 落葉果樹(モモ、ナシ、リンゴ)の DNA 品種識別技術の開発状況

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
果樹研究所 果樹ゲノム研究チーム長 山本俊哉

1. 落葉果樹について

主要な落葉果樹には、リンゴ、ニホンナシ、セイヨウナシ、ビワ、マルメロ、カリン、モモ、アーモンド、スモモ、ウメ、アンズ、セイヨウスモモ（プルーン）、甘果オウトウ、酸果オウトウ、ブドウ、カキ、クリなどがある。その中で、バラ科に属する落葉果樹は、日本の果樹生産の約半分、また日本の落葉果樹生産の 80%以上を占める重要なものである。バラ科果樹は大別して、ナシ亜科に属する果樹、サクラ亜科（サクラ属）に属する果樹類がある。ナシ亜科には、リンゴ、ニホンナシ、セイヨウナシ、ビワ、マルメロ、カリンなどが含まれ、サクラ属には、モモ、アーモンド、スモモ、ウメ、アンズ、セイヨウスモモ、甘果オウトウ、酸果オウトウなどが分類される。さらに、サクラ属を細分すると、モモ、アーモンド（以上モモ亜属）、スモモ、ウメ、アンズ、セイヨウスモモ（以上スモモ亜属）、甘果オウトウ、酸果オウトウ（以上サクラ亜属）に分けることができる。ここでは、モモ、ナシ、リンゴを始めとするバラ科果樹の DNA 品種判別技術について述べる。

2. 国内外での落葉果樹類での DNA マーカーの開発

1) モモおよび核果類

これまでに、モモ、ナシ、リンゴなどのバラ科果樹では、アイソザイム法、RAPD 法、RFLP 法、AFLP 法、CAPS 法、SSR 法、SNP 法などが開発され、品種判別に用いられてきた。また、自家不和合性が存在する多くのバラ科果樹では、自家不和合性の遺伝子型による品種のタイピングも精力的に進められてきた。種々の DNA マーカーによる品種判別の報告が多数あるが、現在では、SSR マーカーが品種判別のみならず、遺伝資源の評価、連鎖地図作成、DNA マーカー選抜のための標準 DNA マーカーになっている。

モモでは多数の SSR マーカーが開発され、品種判別に用いられている。現在、モモを始めとする核果類果樹では、SSR マーカーが品種判別のための標準 DNA マーカーになっている。これまでに、複数のグループから合計約 500 種類ほどの SSR マーカーが開発されている（Cipriani et al. 1999; Testolin et al. 2000; Sosinski et al. 2000; Aranzana et al. 2002; Dirlewanger et al. 2002; Aranzana et al. 2003a; Yamamoto et al. 2002d; Howad et al. 2005）。Testolin et al. (2000)は、26 種類の SSR マーカーを開発し、品種判別に利用可能であること、および枝変わり品種の中には原品種と差異が検出できたものがあることを報告している。Aranzana et al. (2002)は、35 種類の SSR マーカーを開発し、モモ 14 品種とネクタリン 11 品種を含む 25 品種で品種判別を行ったところ、1 組を除いてすべてが判別可能であった。Dirlewanger et al. (2002)は、モモから 41 種類の SSR を開発し、モモ 27 品種とオウトウ 21 品種で品種判別を行ったところ、すべてが判別可能であった。その他、AFLP 分析による品種判別も報告されており、Aranzana et al. (2003b)は、モモ

210 品種を AFLP マーカーを用いて分析を行ったところ、196 品種が可能であった。用いた枝変わり品種 11 品種のうち、6 品種が判別可能であった。

SSR マーカーは、サクラ属内での汎用性が知られており、Martinez-Gomez et al. (2003a, 2003b)は、同じ SSR マーカーを使って、モモ、アーモンド、近縁種の台木の DNA 品種判別が可能であることを報告している。Serrano et al. (2002)は、18 種類の SSR マーカーを用いて、25 の台木用品種・系統をすべて識別することができたことを報告している。近縁種のアンズでも SSR マーカーが開発されている (Lopes et al. 2002)。Zhebentyayeva et al. (2004)は、30 種類の SSR マーカーを開発し、それを用いて 74 品種のアンズすべてが識別できたことを報告している。また、AFLP マーカーを用いたアンズの品種判別の報告もあり (Hagen et al. 2004)、世界各地からの 47 品種・系統をすべて識別している。その他、RFLP や RAPD の報告もある。Kaneko et al. (1988)は、サクラ属 11 種の葉緑体 DNA の RFLP (cpDNA-RFLP) 分析により、7 つのグループに分類・識別できたことを報告している。Shimada et al. (2001)は、RAPD 法によりサクラ属 29 種からの 40 品種・系統を分析したところ、すべてが識別可能であった。

2) ナシ

ナシでは、現在までに 100 種類以上の SSR マーカーが開発されており、品種判別のための標準 DNA マーカーになりつつある (Yamamoto et al. 2002a, 2002b)。Kimura et al. (2002)は、9 種類の SSR マーカーを用いて、ニホンナシ、セイヨウナシ、チュウゴクナシなど 58 品種の判別を試みた。異名同品種、クローン以外の品種はすべて判別可能であった。その他、各種 DNA マーカーを用いて品種判別が試みられてきた。Teng et al. (2002)は、RAPD マーカーを用いてナシ 118 品種すべてが判別できることを報告している。Monte-Corvo et al. (2001)は、ISSR マーカーがセイヨウナシ 24 品種の識別に有効であったことを報告している。ナシの持つ自家不和合性遺伝子 S-RNase の配列の差異により、品種判別が試みられてきた (Ishimizu et al. 1999)。多くの複対立遺伝子が存在すること、および機能 (自家不和合性) と結びついていることから有効であり、ニホンナシやセイヨウナシにも適用可能である。ただし、自家不和合性遺伝子のみで全品種を判別することは困難である。細胞質の葉緑体 DNA の RFLP や塩基配列の差異を利用して品種のグループ分けも報告されている (Iketani et al. 1998; Kimura et al. 2003)。

ナシと同じバラ科ナシ亜科に属するビワやマルメロでも DNA 品種判別法の報告がある。ビワでは、RAPD 法による品種判別 (福田ら 2002) やリンゴ由来の SSR マーカーによる品種判別 (Sariano et al. 2005)、マルメロではリンゴおよびナシ由来の SSR マーカーによる品種判別 (Yamamoto et al. 2004a) が報告されている。

3) リンゴ

リンゴでは、現在までに約 300~400 種類ほどの SSR マーカーが開発されており、品種判別のための標準 DNA マーカーとして利用されている (Guilford et al. 1997; Gianfranceschi et al. 1998; Liebhard et al. 2002; Silfverberg-Dilworth et al. 2006)。リンゴの SSR マーカーを最初に作成した Guilford et al. (1997)は、14 種類の SSR マーカーを開発し、21 のリンゴ品種の判別が可能であった。次いで、Gianfranceschi et al. (1998)は、16 種類の SSR マーカーを開発し、19 のリンゴ品種で評価し判別が可能であった。Hokanson et al. (2001)は、8 種類の SSR マーカーにより 23 の Malus 属から選んだ 142

品種の判別が可能であることを報告している。ごく最近では、Silfverberg-Dilworth et al. (2006)により、約 150 種類の SSR マーカーが報告されている。これまでに種々の分子マーカーにより、品種判別が試みられてきた。まず最初にアイソザイムが試みられた。Weeden and Lamb (1983)は、6 種類のアイソザイムで 54 のリンゴ品種のほとんどが識別可能であったことを報告している。RAPD 法も品種判別に有効であることが報告されている (Harada et al. 1993; Oraguzie et al. 2001)。Oraguzie et al. (2001)は、9 種類の RAPD プライマーを用いて 155 の品種・系統を判別した。Goulao and Oliveira (2001)は、SSR 法と ISSR 法により 41 のリンゴ品種を解析した。得られた品種の遺伝的関連性は、RAPD 法や AFLP 法とほぼ同様の結果であった。Coart et al. (2003)は、野生のリンゴ、栽培リンゴ品種、およびその雑種を、AFLP 法と SSR 法を組み合わせることで評価した。Kitahara et al. (2005a, 2005b)は、SSR マーカーと自家不和合性遺伝子 (S-RNase) を組み合わせることで解析を行い、品種の判別、親子鑑定、枝変わりかどうかの判定および親品種の同定を報告している。

3. 国内での落葉果樹の DNA 品種判別技術の開発

国内で栽培される落葉果樹類では、ほとんどの樹種で DNA 品種判別技術が開発されている。モモおよびその近縁種であるオウトウ、スモモ、ウメ、アンズの種類判別技術、リンゴ、ナシ、ビワの種類判別技術が開発されている。いずれも、DNA マーカーとして、SSR マーカーが用いられている。モモ、オウトウ、スモモ、ウメ、アンズは、同じバラ科サクラ属に分類され、遺伝的に近い。モモ (一部はアンズやオウトウ) で開発された SSR マーカーにより、これらの果樹の種類判別が可能である。モモでは「白鳳」、「あかつき」、「川中島白桃」、「日川白鳳」、「清水白桃」など約 50 品種が識別可能 (Yamamoto et al. 2003a, 2003b)、オウトウでは「佐藤錦」、「ナポレオン」、「高砂」、「紅秀峰」、「紅さやか」など約 100 品種が識別可能である。スモモでは「大石早生」、「ソルダム」、「太陽」など約 120 品種、ウメでは「南高」、「白加賀」、「豊後」、「小梅」など約 40 品種、アンズでは「信州大実」、「ハーコット」、「アーリーオレンジ」など約 20 品種の識別が可能である。

リンゴ、ナシ、ビワは、同じバラ科ナシ亜科に分類され、植物的に近い果樹である。リンゴでは 300~400 種類の SSR マーカーが、またナシでは 100 種類以上の SSR マーカーが開発されており、品種判別や連鎖地図作成に利用されている。リンゴでは、リンゴで開発された SSR マーカーを用いて、「ふじ」、「つがる」、「王林」、「ジョナゴールド」、「千秋」、「陸奥」など約 80 品種が識別可能である。ナシ類では、ナシで開発された SSR マーカーを用いて、「幸水」、「豊水」、「二十世紀」、「新高」、「長十郎」、「あきづき」などニホンナシ約 100 品種が識別可能であり、さらに主要なセイヨウナシ品種「ラ・フランス」、「パートレット」、「バラード」、チュウゴクナシ品種「鴨梨」、「蜜梨」などの識別にも利用可能である (Kimura et al. 2002)。ビワでは、リンゴやナシの SSR が適用可能で、「茂木」、「田中」、「長崎早生」、「楠」、「大房」、「房姫」など約 30 品種の識別が可能になっている。

4. 果実および果実加工品の DNA 品種判別技術の開発

果実では、糖類・多糖類やポリフェノール類等の夾雑物が多量に含まれており、また多量の水分が含まれるので、DNA 抽出の収率が非常に低い。加工製品の場合は、加熱や薬

品による処理および水溶液中での保存でゲノム DNA が損傷・断片化し、DNA を単離することすら困難な場合も多い。ツナの缶詰では、DNA がひどく損傷して断片化しているが、短いサイズの DNA でも分析可能な工夫をすることにより、かろうじて DNA 解析ができると報告されている (Ram et al. 1996; Quinteiro et al. 1998)。

ナシ果実で、4 種類の DNA 抽出方法を試みた結果、いずれの方法でも分析に利用可能な長いサイズの DNA が抽出できたが、収量は葉からの場合と比較して数十分の一であった (Yamamoto et al. 2006)。Q 社の Genomic-Tip のキットで比較的収量が良かった。ナシの果実加工品として、ドライフルーツ、セイヨウナシ缶詰、ジュースを用いて、Q 社の Genomic-Tip のキットで分析を試みた。ドライフルーツでは、DNA がやや損傷し断片化していたが、長いサイズの DNA も多く存在していた。缶詰果実では、抽出された DNA は、ひどく損傷しており、かなり短いサイズに断片化されていた。ジュースも同様で、DNA を抽出することができたが、損傷がひどくかなり短いサイズになっていた。SSR マーカーで分析したところ、長さが 150bp 以下の SSR マーカーではバンドが得られ、150bp 以上のマーカーではバンドは得られなかった。抽出された DNA がひどく損傷して短いサイズになっていることから、より短いサイズの SSR マーカーを選ぶことによって、DNA 鑑定が可能であることが明らかとなった。果実加工品は種類が多く、なかには DNA の抽出が困難なサンプルもある。ジャム、塩漬け、果実酒など、DNA の損傷が非常に大きいと考えられる加工品で、同じ手法が利用できるのかどうか、今後の検討課題である。

5. 育成者権の侵害事例

落葉果樹類では、これまでに登録品種の育成者権の侵害事例は少なく、数件程度である。「やたか」というリンゴの登録品種を、無断で接ぎ木して増殖し許可なく販売したとして、昭和63年に育成者が苗木商を告訴した例がある。最近では、山形県農業総合研究センターが育成し、平成3年11月19日登録した「紅秀峰」がオーストラリアに持ち出されて生産され、日本に果実が輸入されかけた事例がある。平成11年にオウトウ品種「紅秀峰」と「佐藤錦」の苗木がオーストラリアのタスマニアに持ち出された。その後、現地で苗木が増殖・栽培された。「紅秀峰」の果実が日本に輸入される可能性があることが雑誌などで紹介され、平成17年11月に、山形県が豪の果実生産会社役員を告訴した。山形県農業総合研究センターが、「DNA分析によるおうとう品種の識別 (<http://www.hinsyu.maff.go.jp/>)」マニュアルを作成した。

日本で育成された多くの優良果樹品種が、無断で国外に持ち出されている可能性が指摘されている。今後、国内での育成者権の侵害のみならず、海外に無断で持ち出された品種の生産物が、違法に輸入される可能性が高まっている。

6. ゲノム研究との関連やシンテニーの利用

1) モモおよび核果類

前述のように、モモを含む核果類はバラ科サクラ亜科 (サクラ属) に分類され、遺伝的に近い。モモ、アーモンド (以上モモ亜属)、スモモ、ウメ、アンズ、ヨーロッパスモモ (以上スモモ亜属)、甘果オウトウ、酸果オウトウ (以上サクラ亜属) に分類される。最近の研究では、核果類の持つ8対の染色体の構造やその中に含まれている遺伝子がかなり保存さ

れていること、すなわち相同性が高いことが明らかになっている。

これまでに、モモとアーモンドの雑種由来の集団（アーモンド品種 Texas とモモ品種 Earlygold の交雑）を用いて、「サクラ属の世界標準連鎖地図」が完成している (Dirlewanger et al. 2004)。この世界標準地図は、562 種類の DNA マーカーから構成される 8 連鎖群で距離が 519cM の地図となっている。染色体基本数の 8 本と同じで、おそらく核果類のゲノム全域を網羅している完成度の高い地図である。その後、さらに日本（果樹研）を含む 5 ヶ国の共同研究によって、400 種類ほどの信頼度の高い SSR マーカーを開発し、標準地図上へのマッピングあるいは標準地図上の存在領域が明らかになっている (Howad et al. 2005)。

現在までに 10 種類以上の連鎖地図が核果類品種で作成されている。モモの種内交雑で 5 種類の連鎖地図、アンズとアーモンドでそれぞれ 2 種類の連鎖地図、酸果オウトウで 2 種類、モモとアーモンドの雑種で 1 種類、ミロバランスモモで 1 種類の連鎖地図などである。これらはすべて標準地図と対応付けられている。また、合計で 30 種類ほどのメンデル遺伝する重要形質がいろいろな樹種で解析され、相対的な位置が標準地図上に位置付けられている。これらの情報の大部分が、クレムゾン大学のデータベース GDR (Genome Database for Rosaceae, <http://www.mainlab.clemson.edu/gdr/>) にまとめられており、世界の研究者に公開されている。

2) ナシ

ナシのゲノム研究は、欧米では未だ低いレベルに留まっている。日本でのナシゲノム研究が最も進んでおり、ニホンナシやセイヨウナシで、ゲノム全域をカバーする高密度連鎖地図が作成されている (Yamamoto et al. 2002c; Yamamoto et al. 2004b)。ナシは、後述のリンゴと同じバラ科ナシ亜科に属しており、ゲノムレベルでの相同性が非常に高い。かなりの割合の SSR マーカーが、リンゴ、ナシ、ビワ、カリン、マルメロなどの果樹で相互に利用可能であることが明らかになっている。

3) リンゴ

ヨーロッパ、アメリカ、ニュージーランドで、精力的にリンゴのゲノム解析研究がなされている。ヨーロッパでは、HiDRAS (High-quality Disease Resistant Apples for a Sustainable Agriculture, <http://www.hidras.unimi.it/index.html>) という名前の EU プロジェクトが 2003 年 1 月から開始され、4 年間で数億円以上の予算が付いている。文字通り、複数の病害抵抗性を持つ高品質のリンゴ品種を育成するためのプロジェクトで、10 ヶ国以上が参加している。多数の SSR マーカーの開発、連鎖地図の作成 (Liebhard et al. 2003; Silfverberg-Dilworth et al. 2006)、黒星病抵抗性やうどんこ病抵抗性のマッピングと連鎖マーカーの取得、果実の高品質に関連する遺伝子の解析が進められている。また、リンゴの黒星病抵抗性遺伝子 Vf のポジショナルクローニングに成功しており、塩基配列が明らかになっている (Belfanti et al. 2004)。

アメリカでは、イリノイ大学やコーネル大学を中心に、複数の連鎖地図の作成、黒星病抵抗性の解析が進められている。最近では、多数の ESTs (発現遺伝子) が取得されるとともに、BAC ライブラリーや物理地図の作成が進められている。

<引用文献>

- Aranzana, M.J., J. Garcia-Mas, J. Carbo and P. Arus (2002) Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breed.* 121: 87-92.
- Aranzana, M.J., A. Pineda, P. Cosson, E. Dirlewanger, J. Ascasibar, G. Cipriani, C.D. Ryder, R. Testolin, A. Abbott, G.J. King, A.F. Iezzoni and P. Arus (2003a) A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the *Prunus* genome. *Theor. Appl. Genet.* 106: 819-825.
- Aranzana, M.J., J. Carbo and P. Arus (2003b) Using Amplified Fragment-length Polymorphisms (AFLPs) to identify peach cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128: 672-677.
- Belfanti, E., E. Silfverberg-Dilworth, S. Tartarini, A. Patocchi, M. Barbieri, J. Zhu, B.A. Vinatzer, L. Gianfranceschi, C. Gessler and S. Sansavini (2004) The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 886-890.
- Cipriani, G., G. Lot, W.G. Huang, M.T. Marrazzo, E. Peterlunger and R. Testolin (1999) AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): Isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor. Appl. Genet.* 99: 65-72.
- Coart, E., X. Vekemans, M.J.M. Smulders, I. Wagner, J. van Huylenbroeck, E. van Bockstaele and I. Roldan-Ruiz (2003) Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. *Mol. Ecology* 12:845-857.
- Dirlewanger, E., P. Cosson, M. Tavaud, M.J. Aranzana, C. Poizat, A. Zanetto, P. Arus and F. Laigret (2002) Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor. Appl. Genet.* 105: 127-138.
- Dirlewanger, E., E. Graziano, T. Joobeur, F. Garriga-Caldere, P. Cosson, W. Howad and P. Arus (2004) Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9891-9896.
- 福田伸二、長門潤、山本俊哉、稗圃直史、寺井理治。(2002) RAPD 分析によるビワ品種・系統の識別。園芸学会雑誌。71: 826-828.
- Gianfranceschi, L., N. Seglias, R. Tarchini, M. Komjanc and C. Gessler (1998) Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1069-1076.
- Goulao, L. and C.M. Oliveira (2001) Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica* 122: 81-89.
- Guilford, P., S. Prakash, J.M. Zhu, E. Rikkerink, S. Gardiner, H. Bassett and R. Forster (1997) Microsatellites in *Malus x domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 94: 249-254.
- Hagen, L., B. Khadari, P. Lambert and J.M. Audergon (2004) Genetic diversity in apricot revealed by AFLP markers: species and cultivar comparisons. *Theor. Appl. Genet.* 105: 298-305.
- Harada, T., K. Matsukawa, T. Sato, R. Ishikawa, M. Niizeki and K. Saito (1993) DNA-RAPDs detect genetic variation and paternity in *Malus*. *Euphytica* 65: 87-91.
- Hokanson, S.C., W.F. Lamboy, A.K. Szewc-McFadden and J.R. McFerson (2001) Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. *Euphytica* 118: 281-294.

- Howad, W., T. Yamamoto, E. Dirlewanger, R. Testolin, P. Cosson, G. Cipriani, A.J. Monforte, L. Georgi, A.G. Abbott and P. Arus (2005) Mapping with a few plants: using selective mapping for microsatellite saturation of the *Prunus* reference map. *Genetics*. 171: 1305-1309.
- Iketani, H., T. Manabe, N. Matsuta, T. Akihama and T. Hayashi (1998) Incongruence between RFLPs of chloroplast DNA and morphological classification in east Asian pear (*Pyrus* spp.). *Genet. Res. Crop Evol.* 45: 533-539.
- Ishimizu, T., K. Inoue, M. Shimonaka, T. Saito, O. Terai and S. Norioka (1999) PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanese pear cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98: 961-967.
- Kaneko, T., T. Terachi and K. Tsunewaki (1988) Studies on the origin of crop species by restriction endonuclease analysis of organellar DNA II. Restriction analysis of ctDNA of 11 *Prunus* species. *Jpn. J. Genet.* 61: 157-168.
- Kimura, T., Y.Z. Shi, M. Shoda, K. Kotobuki, N. Matsuta, T. Hayashi, Y. Ban and T. Yamamoto (2002) Identification of Asian pear varieties by SSR analysis. *Breed Science* 52: 115-121.
- Kimura, T., H. Iketani, K. Kotobuki, N. Matsuta, Y. Ban, T. Hayashi and T. Yamamoto (2003) Genetic characterization of pear varieties revealed by chloroplast DNA sequences. *J. Hort. Sci. Biotech.* 78: 241-247.
- Kitahara, K., S. Matsumoto, T. Yamamoto, J. Soejima, T. Kimura, H. Komatsu and K. Abe (2005a) Parentage identification of eight apple cultivars by S-RNase analysis and simple sequence repeat markers. *HortScience* 40: 314-317.
- Kitahara, K., S. Matsumoto, T. Yamamoto, J. Soejima, T. Kimura, H. Komatsu and K. Abe (2005b) Molecular characterization of apple cultivars in Japan by S-RNase analysis and SSR markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130: 885-892.
- Liebhart, R., L. Gianfranceschi, B. Koller, C.D. Ryder, R. Tarchini, E. Van de Weg and C. Gessler (2002) Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Mol. Breed.* 10: 217-241.
- Liebhart, R., B. Koller, L. Gianfranceschi and C. Gessler (2003) Creating a saturated reference map for the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1497-1508.
- Lopes, M.S., K.M. Sefc, M. Laimer and A. Da Camara Machado. (2002) Identification of microsatellite loci in apricot. *Mol. Ecol. Notes* 2: 24-26.
- Martinez-Gomez, P., S. Arulsekhar, D. Potter and T.M. Gradziel (2003a) Relationships among peach, almond, and related species as detected by simple sequence repeat markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128: 667-671.
- Martinez-Gomez, P., S. Arulsekhar, D. Potter and T.M. Gradziel (2003b) An extended interspecific gene pool available to peach and almond breeding as characterized using simple sequence repeat (SSR) markers. *Euphytica* 131: 313-322.
- Monte-Corvo, L., L. Goulao and C. Oliveira (2001) ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127: 262-270.
- Oraguzie, N.C., S.E. Gardiner, H.C.M. Basset, M. Stefanati, R.D. Ball, V.G.M. Bus and A.G. White (2001) Genetic diversity and relationships in *Malus* sp. germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126: 318-328.

- Quinteiro, J., C.G. Sotelo, H. Rehbein, S.E. Pryde, I. Medina, R.I. Perez-Martin, M. Rey-Mendez and I.M. Mackie (1998) Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1662-1669.
- Ram, J.L., M.L. Ram and F.F. Baidoun (1996) Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2460-2467.
- Serrano, B., J. Gomez-Aparisi and J.I. Hormaza (2002) Molecular fingerprinting of *Prunus* rootstocks using SSRs. *J. Hort. Sci. Biotech.* 77: 368-372.
- Shimada, T., H. Hayama, K. Nishimura, M. Yamaguchi and M. Yoshida (2001) The genetic diversities of 4 species of subg. *Lithocerasus* (*Prunus*, Rosaceae) revealed by RAPD analysis. *Euphytica* 117: 85-90.
- Silfverberg-Dilworth, E., C.L. Matasci, W.E. Van de Weg, M.P.W. Van Kaauwen, M. Walser, L.P. Kodde, V. Soglio, L. Gianfranceschi, C.E. Durel, F. Costa, T. Yamamoto, B. Koller, C. Gessler and A. Patocchi (2006) Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics and Genomics* 2: 202-224.
- Soriano, J.M., C. Romero, S. Vitanova, G. Llacer and M.L. Badenes (2005) Genetic diversity of loquat germplasm (*Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl) assessed by SSR markers. *Genome* 48: 108-114.
- Sosinski, B., M. Gannavarapu, L.D. Hager, L.E. Beck, G.J. King, C.D. Ryder, S. Rajapakse, W.V. Baird, R.E. Ballard and A.G. Abbott (2000) Characterization of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Theor. Appl. Genet.* 101: 421-428.
- Teng, Y., K. Tanabe, F. Tamura and A. Itai (2002) Genetic relationships of *Pyrus* species and cultivars native to East Asia revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127: 262-270.
- Testolin, R., T. Marrazzo, G. Cipriani, R. Quarta, I. Verde, M.T. Dettori, M. Pancaldi and S. Sansavini (2000) Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genomic origin of cultivars. *Genome* 43: 512-520.
- Weeden, N.F. and R.C. Lamb (1983) Identification of apple cultivars by isozyme phenotypes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110: 509-515.
- Yamamoto, T., T. Kimura, Y. Sawamura, T. Manabe, K. Kotobuki, T. Hayashi, Y. Ban and N. Matsuta (2002a) Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. *Euphytica* 124:129-137.
- Yamamoto, T., T. Kimura, M. Shoda, Y. Ban, T. Hayashi and N. Matsuta (2002b) Development of microsatellite markers in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Mol. Ecol. Notes* 2: 14-16.
- Yamamoto, T., T. Kimura, M. Shoda, T. Imai, T. Saito, Y. Sawamura, K. Kotobuki, T. Hayashi and N. Matsuta (2002c) Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears. *Theor. Appl. Genet.* 106: 9-18.
- Yamamoto, T., K. Mochida, T. Imai, Y.Z. Shi, I. Ogiwara and T. Hayashi (2002d) Microsatellite markers in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) derived from an enriched genomic and cDNA libraries. *Mol. Ecol. Notes* 2: 298-301.
- Yamamoto, T., K. Mochida and T. Hayashi (2003a) Shanghai Suimitsuto, one of the origins of

- Japanese peach cultivars. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 72: 116-121.
- Yamamoto, T., K. Mochida, T. Imai, T. Haji, H. Yaegaki, M. Yamaguchi, N. Matsuta, I. Ogiwara and T. Hayashi (2003b) Parentage analysis in Japanese peaches using SSR markers. *Breed. Sci.* 53: 35-40.
- Yamamoto, T., T. Kimura, J. Soejima, T. Sanada, Y. Ban and T. Hayashi (2004a) Identification of quince varieties using SSR markers developed from pear and apple. *Breed. Sci.* 54: 239-244.
- Yamamoto, T., T. Kimura, T. Saito, K. Kotobuki, N. Matsuta, R. Liebhard, C. Gessler, E. van de Weg and T. Hayashi (2004b) Genetic linkage maps of Japanese and European pears aligned to the apple consensus map. *Acta Hort.* 663: 51-56.
- Yamamoto, T., T. Kimura, T. Hayashi and Y. Ban (2006) DNA profiling of fresh and processed fruits in pear. *Breed. Sci.* 56: 165-171.
- Zhebentyayeva, T., G. Reighard, V. Gorina and A. Abbott (2004) Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 106: 435-444.

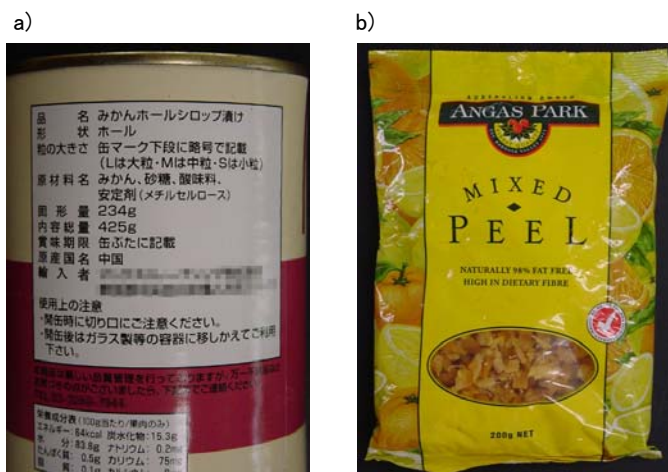
(2) カンキツの DNA 品種識別技術の開発状況

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
果樹ゲノム研究チーム 上席研究員 清水徳朗

1. カンキツの品種構成と品種判別の背景

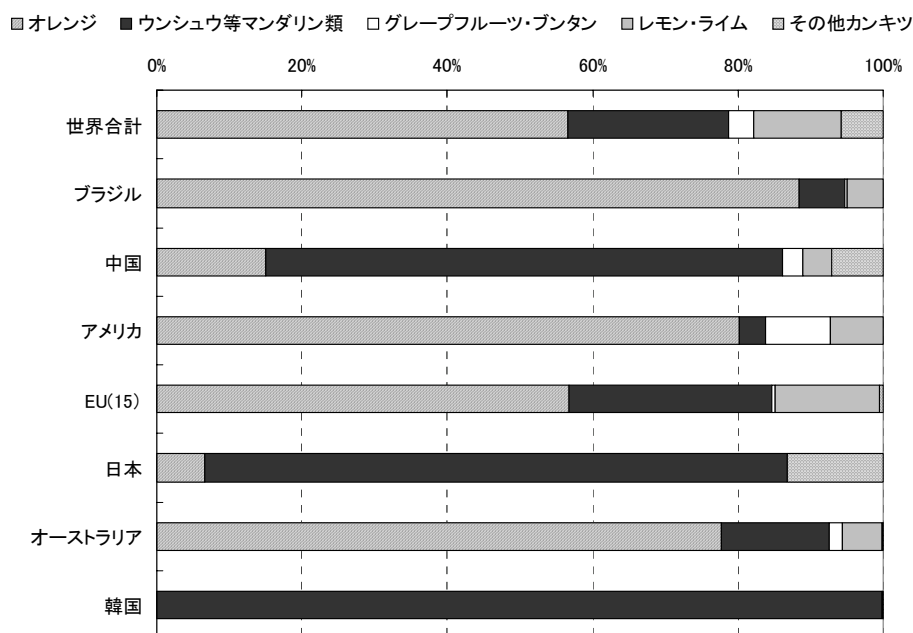
カンキツ類にはウンシュウミカンやポンカン、スイートオレンジ、ブンタン、レモン、ライムを含むカンキツ属（学名 *Citrus*）に加え、広義にはキンカン属（学名 *Fortunella*）やカラタチ属（学名 *Poncirus*）も含まれ、これまでに多数の遺伝資源が世界各地で収集されている（果樹研究所では約 1,500 点を保有）。カンキツ類はインドから中国南部を起源に発生したと考えられているが、現在では熱帯から温帯地域の世界各地で広く生産されており、ブドウ、リンゴとならぶ主要な果樹の一つである。果実は世界的な規模で流通して重要な貿易品目となっており、生果実としてだけでなく、ジュース、缶詰、ジャムやマーマレードなどの加工製品としても利用されるほか、特有の芳香を有する乾燥果皮は調味料や漢方薬の原料、香料原料として流通している（第1図）。

カンキツ類をオレンジ類と、ウンシュウミカンやクレメンチンなどのマンダリン類、グレープフルーツ・文旦、レモン・ライム、およびそれ以外のカンキツ品種に大別し、主要な生産地での品種構成を比較すると、ブラジル、アメリカ、オーストラリアでは生産される果実の大部分はオレンジであり、世界的にもオレンジは全生産量の 60% 近くを占めている（第2図）。一方、日本を始め、中国、韓国ではウンシュウミカンが過半数を占めており、日本、中国ではその他のカンキツも 1 割程度生産されているのが特色である。また、EU 圏内の生産量はオレンジが主体であるものの、マンダリン類やレモン、ライムも一定規模生産されている。以上のような国・地域ごとの品種構成の特徴を反映して、品種判別技術の開発も主たる品種を中心に各国が特色ある取り組みを進めてきた。



第1図 カンキツの果実加工品

a) みかんシロップ漬け缶詰（中身は中国からの輸入品）、b) 果皮加工品（オレンジ、レモン、グレープフルーツなどの混合果皮；オーストラリアで購入）。



第2図 世界の各カンキツ生産地域における、オレンジ、マンダリン(ウンシュウミカン、クレメンチンなどを含む)、グレープフルーツ(文旦を含む)、レモン・ライム、および、その他カンキツの生産量に対する割合。 FAOSTAT (<http://faostat.fao.org/site/336/default.aspx>) 2005 年より抜粋

2. カンキツの品種判別技術の取り組み

カンキツの主要な品種や遺伝資源間での遺伝的多様性は比較的広く、RAPD 法などでも比較的容易に多型を見出すことができる。これまでに各国の国立研究機関や大学が中心となり、カンキツの育成品種とその両親、遺伝資源の分類などを対象として多型の検出と品種判別への利用が試みられてきた。アイソザイム分析¹⁻³⁾に始まり、これまでに RAPD 法⁴⁾ や RFLP 法³⁾、 AFLP 法^{5,6)}、 CAPS 法⁷⁾、 SSR 法⁸⁾ や ISSR 法⁹⁾、また RLGS 法¹⁰⁾ などを利用して多型の検出とマーカーの開発が進められてきた(第1表)。また、比較的遠縁な品種間では、葉緑体 DNA の多型を利用した品種判別が用いられる場合もある。カンキツを始めとする果樹では樹体の大きさと長い幼若期間のために、多数の分離集団を育成

第1表 カンキツで開発されたDNAマーカーの例

| マーカータイプ | 適応対象 | 文献 |
|-------------|------------------------|------|
| アイソザイム | 各種カンキツ品種、系統 | 1-2) |
| RFLP,アイソザイム | ポメロ×カラタチ | 3) |
| RAPD,RFLP | ポメロ×カラタチ | 4) |
| AFLP | カシーパペダ×サワーオレンジ | 5) |
| | ウンシュウミカン | 6) |
| CAPS | ウンシュウミカン、清見 | 7) |
| SSR | ラングプールライム×カラタチ | 8) |
| ISSR | スイートオレンジ、グレープフルーツ、レモン等 | 9) |
| RLGS | ウンシュウ | 10) |

し、評価することは困難である。そのため、これまで報告のある DNA マーカーは特定の組合せでのみ有効と考えられるものも多い。しかし近年、CAPS マーカーや SSR マーカーのように移植性の高い共優性マーカーの作成が進められ、これらを使うことで多様な品種、遺伝資源を識別することが可能となってきた。実際、我々は清見×ウンシュウ‘宮川早生’の分離集団で作成した CAPS マーカーを他のカンキツ品種、遺伝資源に適応し、そのうち 81 個の多型マーカーを用いることで、果樹研究所で育成した品種をはじめ、その親品種・系統などを複数の CAPS マーカーで特定できる結果を得ており、現在の品種だけでなく、今後育成される品種の識別にも適応できると考えられる。SSR マーカーについては 2007 年になり 100 個程度のマーカー作成がようやく報告されるようになった。各国の研究者間での相互利用と連鎖地図の統合などへの活用が予定されており、品種判別の基盤としての整備も進むと期待される。

3. 加工品を対象とした品種判別分析の取り組み

表示偽装問題は、特にカンキツ果汁において古くから問題となっている。国外ではオレンジジュースやグレープフルーツジュースに他品種の果汁や添加物を加える事例が多く、TLC や HPLC を利用した判別が行われてきた。日本でも最近、機能性成分を多く含有するシイクワシャージュースと偽って機能性成分をほとんど含まないカラマンシージュースが販売される事例が多発し、カラマンシー果汁に特異的な物質を利用した判定技術が開発されている¹¹⁾。含有物質を利用した判定技術は簡易である反面、分析範囲は判定に利用可能な物質の有無に左右され、物質ごとに異なる分析方法を開発する必要がある。そのため、広範囲な品種を対象に混合された果汁の品種と混入割合を簡易に推定するために、果汁中の DNA を利用した分析が試みられている。また、果皮や缶詰などにおいても、不当表示や育成品種の不正な利用を防止する目的で、DNA を利用した品種判別技術の開発が進められている。たとえば、Liu ら¹²⁾ は変性グラジエントゲル電気泳動 (DGGE) を用いてオレンジジュース中の混合物の検出を試みている。しかしながら彼らの結果は不明瞭で実用的な判別は困難であることから、より適切な判別法が開発が求められている。

果汁や缶詰などの加工品では、DNA が分解している場合が多い。乾燥果皮の製造工程では 200°C 近い温度で 1 時間以上加熱され、また、缶詰でも最後の滅菌工程で加熱されて、この間に DNA の分解が進む。果汁においても同様であり、これらの材料から抽出した DNA はしばしば数百 bp 程度の非常に短い断片にまで分解されており、加工品での品種判別では SNP の利用が望ましい。我々はこれまでに交雑で育成した品種を中心に多数のカンキツ品種を対象としたゲノム配列の解析からダイレクトに SNP を検出し、TaqMan システムを利用したアレルの判別分析に成功している。これまでに開発した SNP マーカーのうち、8 個の SNP マーカーを利用し、果樹研究所で育成されたカンキツ品種をすべて識別できることを確認した。この手法では定量的な分析も可能であり、混合果汁中の品種の混合割合を推定することもできる。しかし現段階ではコストが高価であり、数%以下の混合果汁の検出は困難であるなど、課題も多い。また、清澄果汁からは DNA 自体の抽出が困難であるという問題もある。これらの技術はまだ研究段階のものであるが、SNP 検出システムを利用した品種識別技術は現在盛んに研究が進められており、各社からさまざまな分析機器やキット、アプリケーションが発売されてコストも急激に低下しつつある。カン

キツに限らず、果樹など園芸作物全般においても将来確実に普及するものと考えられ、今後も最新技術を積極的に取り込み、低コスト化を見込んで汎用化を図ることが求められる。

5. 国内のカンキツ品種の特徴と技術開発の位置づけ

カンキツでは近年既存の品種・系統の交配によって育成された品種がある一方で、他の果樹と同様に偶発実生として発見されたものが多い。なかでもウンシュウミカンやスイートオレンジ、ナツミカン、クレメンチンなど主要なカンキツ品種では、枝変わりや珠心胚実生から選抜された優良品種・系統が特色ある品種・系統群を構成している。枝変わりは各地で栽培されている過程で栽培特性の変化が確認されたものであり、また、珠心胚実生では多くのカンキツ類に認められる多胚性を利用している。いずれも、もとの品種の優れた特性を残しながら特定の形質のみを変化させ、短期間で形質の改良が見込めることからカンキツの重要な育種法の一つとなっている。枝変わりと同様、珠心胚実生から選抜されたこれら品種・系統も突然変異を利用しているため、もとの品種・系統との遺伝的な違いは非常に小さく、これまでさまざまな方法が試みられてきているものの、品種判別に利用可能な多型の検出に成功した例は非常に少ない。

日本ではウンシュウミカンだけでも 60 以上の品種、系統が知られており、スイートオレンジやクレメンチンなどでも同様である。これらは現在も各国のカンキツ生産の基幹品種であり、またそれぞれに育成権者が存在するが、現在これらの品種を確実に識別するための技術は存在しない。日本では果樹研究所や各地域の公立試験研究機関で多様なカンキツ品種や系統が発見、開発されており、特定の地域で高い評価を受けたものは地域ブランドとなっているものも多い。近年育成された品種では、たとえば「不知火（デコポン）」や「はるみ」のように産地での導入機運が高いものもある一方で、ウンシュウミカンのように枝変わりとして見出されたものや、珠心胚実生から選抜されたものも重要な品種を構成している。枝変わりや珠心胚実生の利用はウンシュウミカン以外のカンキツにおいても重要な育種手法であり、今後も積極的な利用が見込まれることから、それと連動した品種判別技術の開発も視野に入れる必要がある。我々は RLGS 法による解析が多数の多型の検出に有効である結果を得ており¹⁰⁾、今後、実用化に向けて積極的に取り組みを推進する。

6. ハイスループット化を目指した取り組み

発現遺伝子のゲノムワイドな解析を目的に、いくつかの大規模マイクロアレイがカンキツで開発されている。我々はウンシュウミカンの EST と、公的データベースに公開されているカンキツやカラタチの EST 情報をもとに、21,495 個の非重複プローブを搭載したマイクロアレイを開発し、さまざまな発現解析に利用している¹³⁾。スペインも、独自に解析したクレメンチンなどの EST 情報をもとに、現在大規模マイクロアレイの開発とそれを利用した大規模遺伝子発現解析に取り組んでいる。一方、Affymetrix 社は、カリフォルニア大学リバーサイド校と協力し、公的データベースに公開されているカンキツの EST を利用してマイクロアレイを開発し、2006 年から一般発売を開始した¹⁴⁾。このカンキツアレイには 30,171 個のカンキツ由来配列から設計したプローブのほかに、5,023 個の SNP プローブ、カラタチのカンキツトリステザウィルス抵抗性遺伝子が座乗すると推定されているゲノム領域のタイリングプローブなどが搭載されたユニークな構成となっている。今

回発売されたマイクロアレイに搭載されている SNP プローブは既存の EST 配列等から試験的に設計されたものであり、ゲノム DNA を用いた品種判別への利用については今後具体的なデータの積み重ねが必要である。マイクロアレイを利用した品種識別は多数の多型を一度に把握できる優れた方法であるが、現時点では分析費用や分析機器が非常に高価で、高度な技術と手法を必要とするなど、実用化には乗り越えなければいけない障害が多い。目的に応じた必要最小限の DNA マーカーのみの構成として低コスト化を図り、また余分な機能を省いて低価格化を図った普及型の分析機器の開発などが進むことで、実用化の機運が高まるものと考えられる。

7. カンキツのゲノム研究から期待される品種識別技術の新展開

2003 年に日本を含む 9 カ国が集まり「国際カンキツゲノムコンソーシアム」を結成し、DNA マーカーを含む研究リソースの相互利用と公開を目標の一つとして活動を進めている¹⁵⁾。全ゲノム解析では連鎖地図、物理地図、発現遺伝子情報の収集やデータベースなどの研究蓄積が重要であり、これまでに、日本、アメリカ、スペインにおいてウンシュウミカン、スイートオレンジ、クレメンチンの連鎖地図が作成されている。一方、物理地図も日本、アメリカ、スペインで作成が進められており、現在、共通マーカーを利用して両者の統合が進められているほか、発現遺伝子情報は、前述のように各種のマイクロアレイが日本、アメリカ、スペインにおいて開発され、解析に利用されている。今後、品種識別のための DNA マーカーの標準化も検討される予定であるが、2007 年に、アメリカカリフォルニア大学リバーサイド校の M. Roose らが JGI (DoE Joint Genome Institute) と協力してスイートオレンジ “Ridge pineapple” のゲノムシーケンス解析を完了した¹⁶⁾。今回の解析では BAC ライブラリを利用してゲノムサイズの 1.2 倍相当量の配列を決定し、順次公開が進みつつある。

第 2 図に示したようにカンキツの主要品種は生産地によってさまざまであるが、主要な品種間での塩基配列の相同性は非常に高い。今回得られた配列はゲノムの 70% 程度に相当すると考えられているが、部分配列とはいえ、遺伝地図や物理地図を利用して他のカンキツと比較することが可能となる。オレンジであきらかになった塩基配列をウンシュウミカンに適応する過程で必然的に品種間の多型情報も把握することができ、他の品種との比較についても同様に可能となる。今後、短期間で多数の高精度 DNA マーカーが開発され、品種判別を始めとするさまざまな研究を飛躍的に加速し、新たな産業のシーズになると期待される。

終わりに

最近、カンキツ果実に含まれる β -クリプトキサンチンやノビレチン、オーラプテンなどの機能性成分を含有するウンシュウミカン、シイクワシャーや、特有の風味を持つヘベス、ジャバラなどの特産カンキツが注目されている。インターネット等を通じてこれら品種への関心が高まる一方、それらの生産量は一部の品種を除けば極めて限られており、急激な需要の伸びに十分対応できていない。そのため、シイクワシャージュースのように表示を偽装して販売される事例が増加するのではないかと危惧されている。一方でスイートオレンジなど主要な品種は遺伝的多様性が極めて狭く、今後予想される環境変動や消費者ニーズ

への対応が困難であることから、アメリカやブラジル等は遺伝資源の探索や他国で育成された品種の調査、導入を積極的に進めている。遺伝資源と同様、育成品種も長年にわたって開発した知的財産であり、関係者の権利を適切に保護するためにも、品種識別技術の開発と実用化への取り組みを今後も継続する必要がある。

<参考文献>

- 1) 上野勇. ザイモグラフィーのカンキツ育種への応用(2). 1976. 果樹試験場報告 B(興津) **3**: 9-24.
- 2) AM Torres, RK Soost, U Diedenhofen. 1978. Leaf Isozymes as Genetic Markers in Citrus. *American Journal of Botany* **65**: 869-881.
- 3) R. E. Durham, P. C. Liou, F. G. Gmitter Jr., G. A. Moore. 1992. Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in Citrus. *Theoretical and Applied Genetics* **84**: 39-48.
- 4) Q. Cai, C. L. Guy, G. A. Moore. 1994. Extension of the linkage map in Citrus using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and RFLP mapping of cold-acclimation-responsive loci. *Theoretical and Applied Genetics* **89**:606-614.
- 5) M. De Simone, M. P. Russo, G. Puleo, P. A. Marsan, C. Lorenzoni, A. Marocco, G. R. Recupero. 1998. Construction of genetic maps for *Citrus aurantium* and *C. latipes* based on AFLP, RAPD and RFLP markers. *Fruits* **53**: 383-390.
- 6) H. Yano, K. Harada. 1999. Fingerprinting of plant genomic DNAs using AFLP technique. *DNA polymorphism* **7**:219-222.
- 7) M. Omura, T. Ueda, M. Kita, A. Komatsu, Y. Takanokura, T. Shimada, T. Endo-Inagaki, H. Nesumi, T. Yoshida. 2000. EST Mapping of Citrus. *Proc. Intl. Soc. Citriculture*. IX. 71-74. (Florida, USA).
- 8) J. M. Kijas, J.C. Fowler, M.R. Thomas. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species. *Genome* **38**:349-355.
- 9) D. Q. Fang, M. L. Roose. 1997. Identification of closely related Citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* **95**: 408-417.
- 10) T. Shimizu, H. Fujii, T. Shimada, T. Endo, M. Omura. 2006. Restriction Landmark Genomic Scanning Reveals DNA Diversity and Phylogeny in Satsuma Mandarin Cultivars. *Proc. Plant and Animal Genome XIV*. 223. (San Diego, USA).
- 11) カラマンシー混入シイクワシャー製品の判定技術の開発 (平成16年8月3日)
http://www.fruit.affrc.go.jp/announcements/kisya/h16-08-03/karaman_hantei.html
- 12) Yu-Shan Liu, Yuan-Tay Shyu. 2006. Adulteration Identification of Citrus Juice by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Journal of Food and Drug Analysis* **14**:44-49.
- 13) T. Shimizu, H. Fujii, T. Shimada, T. Endo, M. Omura. 2006. Characterization of gene expression during fruit development in citrus by microarray analysis. *Proc. 8th Intl. Cong. Plant Mol. Biol.* 187. (Adelaide, Australia).
- 14) カンキツ GeneChip. <http://www.affymetrix.com/products/arrays/specific/citrus.affx>
- 15) 清水徳朗. 果樹ゲノム解析・利用の国際潮流ーカンキツ, 果実日本 (in press).
- 16) *Why Sequence Sweet Orange?* <http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/sweetorange.html>

(3) オウトウの DNA 品種識別技術の開発状況

山形県農業総合研究センター 農業生産技術試験場
バイオ育種科 専門研究員 高品善

はじめに

オウトウ (*Prunus avium* L., Sweet cheery, 一般名称：さくらんぼ) は *Prunus* 属に属し、モモ (*P. persica* (L.) Batsch) やプラム (*P. domestica*)、スモモ (*P. salicina*) 等とならんで、核果類の重要な作物の1つである。国内生産のおよそ7割が山形県で産出され、その産出額は年間およそ220～230億円である。また、さくらんぼ狩りなどの観光産業等を含めた経済効果は年間800億円に上るといわれ、山形県の重要産業となっている。山形県の作付け品種は、ブランド品種である‘佐藤錦’が約75%、‘ナポレオン’が約12%、‘紅秀峰’が約6%と上位3品種で全体の90%以上を占める。近年、新たなブランド品種として、本県育成の晩生品種‘紅秀峰’(91年11月種苗登録)や早生品種‘紅さやか’、極晩生品種‘紅てまり’(オウトウ農林1号)などの作付けが増加している。

すでに報道されているとおり、山形県が育成し、種苗法に基づく品種登録を行っているオウトウ品種‘紅秀峰’の種苗(穂木)が不法に海外に持ち出されたことが判明し、平成17年11月に種苗を海外に持ち出した当事者を刑事告訴するという事案が発生した。

今後、海外農産物の輸入増加や国内農産物の輸出に関する取組が始められている状況下において、開発品種の権利化と権利侵害に対する的確な措置が産地にも求められており、当センターとしては、DNA 品種識別技術の開発に取り組んでいる。

なお、オウトウ (Cherry) には、甘果オウトウ [英名: Sweet cherry (*P. avium*)]、酸果オウトウ [英名: Sour cherry (*P. cerasus*)]、中国オウトウ (暖地オウトウ) (*P. pseudocerasus*) の3種類がある。国内で流通するオウトウは甘果オウトウ (Sweet Cherry) であるため、ここでは Sweet cherry (*P. avium* L.) について記述する。

1) 国内での技術開発状況

オウトウの主産地である山形県では、2003年度より DNA マーカーによるオウトウの品種識別技術の開発を開始し、2005年12月に、果実1個のサンプルからでも最短2日間で品種識別が可能な「DNA 分析によるおうとう品種の識別」を農林水産省/品種登録ホームページ (<http://www.hinsyu.maff.go.jp/>) に掲載した。本識別法は、(独)農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所(以下、(独)果樹研)の協力のもと、(独)果樹研および海外研究機関において開発されたモモ等の Simple Sequence Repeats (以下、SSR) マーカーをオウトウの品種識別に応用したものである。山形県農業総合研究センター農業生産技術試験場では2005年12月までに、当試験場保存のオウトウ栽培品種96品種・系統について、50SSR マーカーの遺伝子型データを収集した。本マニュアルでは、50SSRのうち、対立遺伝子数の多い12マーカーをオウトウ品種の識別に用いている。この12マーカーを用いて品種識別をする場合、未知の品種が偶然12マーカー全ての遺伝子型において‘紅秀峰’の遺伝子型と完全一致する確率を、枝変わり等を除く独立した品種の遺伝子型頻度から計算すると、 10^{-8} オーダーとなる。よって、12マーカー

全てが一致した場合には、‘紅秀峰’であると認識できる。

2) 海外での技術開発状況

オウトウにおいても品種の識別は、その他の果樹と同様、形態的特徴（主に果実形質等）に基づいて行われている。しかしながら形態的特徴は、その個体の栽培環境（気象、土壌、剪定、台木等）の影響により変動がある。また、その評価にも複数年を要するため、草本植物に比べ品種識別に多大な労力がかかる。そこで、育成者権の保護の観点からも、迅速に、確実に、判定できる品種識別法が望まれている。近年の分子生物学の発展により、RAPD (Random amplified polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990)、AFLP (Amplified fragment-length polymorphisms) (Vos *et al.*, 1995)、Microsatellite markers (SSR: Simple Sequence Repeats) (Litty and Ludy, 1989; Tautz, 1989) などに基づく DNA 多型分析法が開発され、種々の植物について品種および個体識別の有効性が示された。オウトウにおいても、これらの手法による品種識別技術の開発がなされている。

RAPD 法を用いた品種識別技術の開発は、Gerlach and Stösser (1998)が Sweet cherry 18 品種について行い、また Shimada *et al.*(1999)が Sweet Cherry 18 品種、Sour Cherry 6 品種を含むサクラ類 56 品種について行った。AFLP 法では、Tavaud *et al.* (2001)がフランスの Sweet cherry 63 品種について解析を行った。また Struss *et al.*(2003)が Sweet cherry 15 品種について行った。RAPD マーカーは、少量のゲノム DNA から PCR 法で検出が可能であるが、ランダムプライマーを使用するため、再現性に問題がある。片や AFLP マーカーは、一度により多くの多型を検出できる利点はあるが、精製度の高いゲノム DNA を必要とするため試料の調整等が煩雑であること、優性マーカーであること等から、品種識別を目的とした少量サンプルにおける迅速な解析にはあまり向いていない。

SSR マーカーは、単純反復配列の両側の保存性の高い領域に特異的なプライマーを設計するため、再現性が非常に高い。また、PCR ベースの共優性マーカーであり、少量の DNA サンプルから検出することが可能である。そのため、最近のオウトウの品種識別には、主に SSR マーカーが用いられている。一方、SSR マーカーの開発には多大な労力がかかる欠点があるが、一度開発すると近縁の種においても利用できるため、*Prunus* 属ではそれぞれの樹種で開発された SSR マーカーを共用し、品種識別等に利用している。なお、これまでに開発された SSR マーカーは、モモが最も多い。

モモの SSR マーカーを用いた品種識別は、Wünsch and Hormaza (2002)が Sweet cherry 76 品種、Dirlewanger *et al.* (2002)が 21 品種、Bowley (2003)が 40 品種、Yildis *et al.* (2005)が 10 品種、Pedersen (2006)が 6 品種について行った (表 1)。また、Sweet cheery から独自に単離した SSR を用いた品種識別では、Boritzki *et al.* (2000)が Sweet cherry 188 品種、Clarke *et al.* (2003)が 14 品種、Struss *et al.* (2003)が 15 品種、Vaughan and Russell (2004)が野生種 16 系統について行った (表 1)。さらにオウトウ台木の品種識別は Struss *et al.* (2002)が 8 系統、Wünsch *et al.*(2004)が 17 系統について行った (表 1)。品種識別に用いられたオウトウ栽培品種の一覧を表 2 に示す。

市場や園地のオウトウの種識別に SSR マーカーを用いた事例として、以下の 2 つがある。事例 1) Struss *et al.* (2003)は、Sweet cherry の葉および果実より抽出した DNA から SSR 分析を行い、同じ品種では SSR マーカーの遺伝子型が全て同じであり、流通する果実でも

表 1 DNA 品種識別技術開発一覧

| 研究機関機関 | 国 | 著者 | マーカーの種類 | 樹種 | 品種数 | マーカー数 | SSRの由来 |
|---|----------------------------|--|-------------|---|---|-----------------------------------|--|
| Institut für Obst-, Gemüse- und Wienbau | Germany | H.K.Gerlach R.Stosser | RAPD | Sweet cherry | 18 | 23 | - |
| National Institute of Fruit Tree Science, Fac. of Agri, Kobe Univ. Yamagata Hort. Exp. Stan. Fac of Agri, Utsunomiya Univ. | Japan | T.Shimada, T.Shiratori, H.Hayama, K.Nishimura, M.Yamaguchi, M.Yoshida | RAPD | Sweet cherry. | 56 (sweet19, sour6) | 6 | - |
| Institute for Plant Genetics and Crop Plant Research | Germany | M.Boritzki, J.Plieske D.Struss | AFLP SSR | Sweet cherry | 128(AFLP), 188(SSR) | AFLP124 , SSR13 | sweet cherry cultivar 'Valerij Tschkalov' |
| INRA | France | M.Tavaud, A.Zanetto, F.Santi, E..Dirlewanger | AFLP | Sweet cherry | 63 French cultivated + 165 wild cherry=233 | 76 | - |
| Unidad de Fruticultura, Servicio de Investigació n Agroalimentaria, | Spain | A.WÜnsch, J.I.Hormaza | SSR | Sweet cherry | 76 | 34 | Peach |
| Dep.of Pomology,Univ. of California, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Dep.of Hort. Michigan State Univ. | USA, Germany | D.Struss, M.Boritzli, R.karle, A.F.Iezzoni | SSR | P.avium (rootstock) | 8 | 14 | Sweet cherry Sour cherry |
| INRA | France | E.Dirlewanger, M.Tavaud, M.J.Aranzana, Cpoizat, A.Zanetto, P.Arus, F.Laigret | SSR | Peach Sweet cherry | peach 27, sweet cherry 21 | 8 | Peach |
| Horticulture Research International, East Malling, | UK | J . B . CLARKE and K. R. TOBUTT | SSR | Sweet cherry | 14 | 21 | sweet cherry cultivar 'Napoleon' |
| Dep.of Pomology, Univ. of California Davis, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, | USA , Germany | Darush Struss, Riaz Ahmad, Stephne M.Southwick, Manuela Boritzki(G) | SSR AFLP | Sweet cherry | 15 | SSR 15, AFLP EcoRI- MseI | sweet cherry cultivar 'Valerij Tschkalov' |
| Dep.of Plant Agriculture/Univ. of Guelph | Canada | Stephen Bowley | SSR | Sweet cherry, peach, plum, strawberry | sweet cherry 40, rootstock 6 | | Sweet cherry, Sour cherry, Peach |
| Unidad de Fruticultura. SIA-DGA Estación , Experimental La Mayora-CSIC | Spain | A. Wünsch and R. Gella, J.I. Hormaza | SSR | P.avium, P. cerasifera, P. cerasus, P. mahaleb, and Prunus interspecific hybrids | 17 | 9 | Peach |
| University of Cukurova, Michigan State University, Sabanci University | Turker, USA, Turker, | Yildis A. Kacar, A.F.Iezzoni, Selim Cetiner, | SSR | Sweet cherry | 10 | 13 | Peach, Sweet cherry , Sour cherry |
| Fac. of agri, Univ. of Cukurova, Univ. of Sabanci, Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree, Michigan State University | Turker, Italy, USA | Yildis A. Kacar, M. Selim Cetiner, Claudio Cantini, A.F.Iezzoni | SSR | Turkish Sour Cherry | 81 | 5 | Sweet cherry, Sour cherry, Peach |
| Danish Institute of Agricultural Sciences, Department of Horticulture, Research Centre Aarslev, | Denmark | B.H.Pedersen | SSR | Sweet cherry Sour cherry | 51 | 10 | Sweet cherry, Sour cherry |
| 山形県農業総合研究センター・農業生産技術 試験場, (独)果樹研究所, (独)種苗管理センター | Japan | T.Takashina, T.Yamamoto, T.Kimura | SSR | Sweet Cherry | 85 | 50 | Sweet cherry, Sour cherry, Peach |

表2 SSR マーカーによる品種識別に供試された Sweet cherry 品種一覧

| | Gerlach (1998) | Simada (1999) | Boritzki (2000) | Tavaud (2001) | |
|----|-------------------------------------|---------------------|----------------------------|----------------------------|------------------|
| 1 | Büttner's Späte Rote Knorpelkirsche | Bigarreau Jaboulay | Altenburger Melonenkirsche | Abesse d'Oignies | Napoléon 2 |
| 2 | Glemser | Bing | Drogans Gelbe | Abouriou Boissière | Noir de Chlumeac |
| 3 | Gr.Schw.Knorpel Typ Geisenheim | Colt | Kordia | Aciba Corse | Olivette |
| 4 | Große Prinzessinkirsche | Compact Stella | Krupnoplodnaja | Belge | Précoce Bernard |
| 5 | Große Schwarze Knorpel Typ Diemitz | Early Purple Guigne | Merla | Belliquette | Précoce d'Isigny |
| 6 | Hedelfinger | Governor Wood | Merpat | Bigarreau Blanc du Carmel | Sainte Marie |
| 7 | Kassins Frühe | Hokkou | Merpet | Bigarreau Courte Queue | Sander |
| 8 | Knauffs Schwarze | May Duke | Na35 Nadino | Bigarreau d'Or | St. Gauthier |
| 9 | Querfurter Königskirsche | Mazzaed 79067F | Querfurter Königskirsche | Bigarreau d'Orléans | Tardive Gauthier |
| 10 | Sam | Nanyou | Sam | Bigarreau de mal | Targonnais |
| 11 | Schmahfelds Schwarze | Napoleon Bigarreau | Schneiders Späte Knorpel | Bigarreau de Mézel | Tombret |
| 12 | Schneiders Späte Knorpel | Rockport Bigarreau | Teickners Schwarze Herzk | Bigarreau Grand | Turque |
| 13 | Spansche Knorpel | Sapikisa | Valerii Tschkalov | Bigarreau Guillaume | Vesseaux |
| 14 | Spitze Braune | SatouNishiki | | Bigarreau Marbré | |
| 15 | Starking Hardy Giant | Summit | | Bigarreau Maria Gaucher | |
| 16 | Teickners Schwarze | Ulster | | Bigarreau Marmotte | |
| 17 | Unterländer | Van | | Bigarreau Moreau | |
| 18 | Werdersche Braune | Vic | | Bigarreau noir | |
| 19 | | | | Bigarreau noir d'Ecully | |
| 20 | | | | Bigarreau prélassier | |
| 21 | | | | Blancale précoce Boissière | |
| 22 | | | | Blancale tardive medge | |
| 23 | | | | Bruelles | |
| 24 | | | | Caillou | |
| 25 | | | | Cerise cure | |

| | Wunsch (2002) | Stark Hardy Ginat | Britzki (2003) | Yildiz A.K (2005) | PEDERSEN (2005) |
|----|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| 1 | Ambunes | Lambert | Bing | 0900 Ziraat | Newster |
| 2 | Arcina | Lamida | Sue | Brooks | Sam c. Aarslev |
| 3 | Belge | Lapins | Sumesi (12S-8-33) | Chelan | Sam c. BHP |
| 4 | Bing | Larian | Summit | Chinook | Bing |
| 5 | Bianca de Provenza | Marmotte | Sunburst | Early Burlat | Sam c. EL |
| 6 | Brooks | Marvin (Niram) | Sweetheart | Early Coral | Malatya Dalbasti |
| 7 | Burlat | Moreau | Sylvia | Index | Mustafa Kemal Pasa |
| 8 | Burlat C-1 | Napoleon | Tareguera Bullante | Jubilee | Noir de Guben |
| 9 | Celeste (Sumpaca) | Newster | Tiger | King | Omerli |
| 10 | Chinook | Pico Colorado | Van | Larian | Starks Gold |
| 11 | Compact Stella | Pico Negro | Van Spur | Sam | Uluborlu |
| 12 | Coralise (Gardel) | Precoce Bernard | Vega | Skeena | |
| 13 | Corum | Rainier | Vic | Tulare | |
| 14 | Cristalina (Sumnue) | Rann Oliva | Vignola (Duroni 2) | Van | |
| 15 | Cristobalina | Reverchon | Vittoria | Vista | |
| 16 | Duroni 3 | Royalton | | | |
| 17 | Earlise (Riverdel) | Rudy | | | |
| 18 | Earlstar | Sam | | | |
| 19 | Early Van Compact | Samba (Sumste) | | | |
| 20 | Ferrovia | Santina | | | |
| 21 | Garnet (Major) | Skeena | | | |
| 22 | Gil Peck | Somerset | | | |
| 23 | Georgia | Sonata (Sumleta) | | | |
| 24 | Hartland | Spalding | | | |
| 25 | Hebelfinger | Star | | | |

品種識別ができることを示した。また市販の Sweet cherry ‘Bing’ の果実 1 2 サンプルを分析し、このうちの 1 サンプルが異なる遺伝子型を示したことを報告した。事例 2) Pedersen (2006)は、形態的特徴が異なる Sweet cherry ‘Sam’ の 4 クローンについて分析し、各クローンの遺伝子型がそれぞれ異なり、導入品種の表示に混乱が生じていることを報告した。

行政が品種識別に関わっている事例としては次のことがある。事例 3) カナダ・オンタリオ州農務省 (Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs) の New Directions Research Program Funded Projects によって、Bowley (2003)が州内で栽培されている Sweet cherry 4 0 品種の遺伝子型を分析した。SSR マーカーによる品種識別が、果樹苗の増殖現場において、品種の取り違えを検出する方法として有効であると述べている。一方、SSR マーカーでは花の色が変わるなどの点突然変異を識別することは困難であることを指摘している。

苗木業者および果樹生産者に対し SSR マーカーが利用された事例として、次のことがある。事例 4) 1999年、アメリカにおいてアウトウ台木 Gisela 5 と 6 の混乱(Gregory 1999)が発生した。これはドイツ Gisela 社のわい性台木 Gisela 6 を Gisela 5 として誤って苗木業者に配布し、増殖された台木が販売された事件である。Gisela 社とミシガン州立大学の Dr. Amy Iezzoni 教授、Darush Struss 氏と International Dwarf Fruit Tree

Association との共同研究によって、SSR マーカーによる台木品種の識別技術が開発された (Struss *et al.* (2002))。この事件に関係した苗木業者を調査した結果、1997年と1998年の春に苗木業者に配布された Gisela 5 が、Gisela 6 であることが確認された。よって、これらの苗木業者から Gisela 5 として売られた台木と、1999年春に定植するために生産者に配達された Gisela 5 は、Gisela 6 であったと判明した。また、一部の生産者が注文した2000年春定植用の Gisela 5 が Gisela 6 であることも判明した。この情報は、1999年7月には Gisela シリーズをライセンスしている苗木業者に伝えられた。また、関係する顧客 (果樹研究者を含む) にも判明後、わずか1ヵ月半の間に連絡された。

上記事例以外にも、多くの研究者等によって SSR マーカーによる品種識別技術が、苗木の信頼性確保や育成者権の保護に有効であることが述べられているが、商業ベースで品種識別技術を利用しているとの情報は、今のところ把握していない。

<引用文献>

- Boritzki *et al.* (2000) Cultivar identification in sweet cherry (*Prunus avium* L.) using AFLP and microsatellite markers. Proc. EUCARPIA Symp. on Fruit Breed. and Genetics. Acta Hort. 538:505-509.
- Bowley, S. (2003) Application of SSR markers for DNA fingerprinting of *Prunus* and *Fragaria* Varieties. New Directions research Program Funded Projects.
- Clarke, JB and K.R. Tobbut (2003) Development and characterization of polymorphic microsatellites from *Prunus avium* 'Napoleon'. Molecular Ecology Notes 3 :578-580.
- Dirlewanger E. *et al.* (2002) Development of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch)) and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry. Theor. Appl. Genet. 105:127-138
- Gregory, A.L. (1999) Managing for possible mixup of Gisela 5 and Gisela 6 rootstocks. The Fruit Growers News. October 1999 Edition (<http://www.virtualorchard.net/glfgn/default.html>).
- Gerlach, H.K. and R. Stösser (1998) Sweet cherry cultivar identification using RAPD-derived DNA fingerprints. Proc. Third Int. Cherry Sym. Acta Hort. 468:63-69.
- Litty M. and Ludy JA. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am. J. Hum. Gen. 44:397-401.
- Pedersen, BH. (2006) DNA fingerprints of 51 sweet and sour *Prunus* accession using Simple Sequence Repeats. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 81(1):118-124.
- Shimada, T. *et al.* (1999) Genetic diversity of cherries characterized by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 68(5):984-986.
- Struss, D. *et al.* (2002) Microsatellite markers differentiate eight Giessen cherry rootstocks. Hort Science 37(1):191-193.
- Struss, D. *et al.* (2003) Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128(6):904-909.
- Tautz D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucl. Acids Res.17:6463-6471.

- Tavaud, M. *et al.* (2001) Structuration of genetic diversity in cultivated and wild cherry trees using AFLP markers. Proc. Int. Symp. On Molecular Markers. Acta Hort. 546:263-269.
- Vaughan, S.P. and K. Russell (2004) Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium*. Molecular Ecology Notes 4(3):429–431.
- Vos P. *et al.* (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res.23(21):4407-4414.
- Williams J.G.K *et al.* (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18:6531-6535.
- Wünsch, A. and J.I. Hormaza (2002) Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences. Heredity 89:56–63.
- Wünsch, A. *et al.* (2004) Molecular Characterization of Rootstocks for sweet cherry (*Prunus avium* L.). Proc. 1st IS Rootstocks – Decid. Fruit. Acta Hort 658:599-602.
- Yildis, A.K. *et al.* (2005) Sweet cherry cultivar identification by using SSR markers. Journal of Biological Sciences 5(5):616-619.

3) 野菜

(1) ネギ類の DNA 品種識別技術の開発状況

独立行政法人 農業・食品産業総合技術研究機構
野菜茶業研究所 野菜育種研究チーム 塚崎光

ネギ属 (*Allium*) に属する野菜として、ネギ (*A. fistulosum* L.)、タマネギ (*A. cepa* L. Common onion group) 等がある。これらの国内生産量はほぼ横ばいであるが、近年の輸入増加により、現在の国内流通量に占める輸入品の割合は、ネギでは約 13%、タマネギでは約 20% となっている。ネギではこれらの輸入品のほぼ全てが、タマネギでは約 60% が中国からの輸入であり、国内の産地を圧迫している。このため、ネギにおいては 2001 年にセーフガード暫定措置 (4/23-11/8 の 200 日間) が発動された経緯がある。また、これらの輸入ネギの中には国内品種が海外で栽培されたものがあり、産地を偽装する事例や、冷凍輸入ネギから残留農薬が検出される事例も生じた。同様にタマネギにおいても、輸入量の増加に伴い、生産調整のための産地廃棄や輸入品を国産とする等の産地偽装問題が生じている。このため、ネギ類における品種・原産地判別の重要性が高まっている。

一方、タマネギおよびネギでは、農業形質についてより高い均一性を示す F₁ 品種が主流となっている。わが国では、タマネギは昭和 30 年代後半から、ネギでも昭和 50 年代から F₁ 品種が育成されるようになり、現在では、国内産の大部分は F₁ 品種が占めている。このため、ネギ類においては種子純度検定も重要な問題である。一般にネギ類の F₁ 採種は細胞質雄性不稔 (CMS) を利用しているため、原種が適性に管理されていれば、F₁ 採種した種子の中に自殖あるいはきょうだい交配した種子が混在する可能性は低いものの、維持系統中に稔性回復遺伝子の混入または突然変異による稔性回復遺伝子の発現等により、CMS 系統の中で稔性回復してしまう株が出現することがあり、F₁ 採種において自殖またはきょうだい交配した種子が混入する可能性がある。また、F₁ 親系統が十分に揃っていない場合や F₁ 採種時に他の花粉が流入した場合にも品種の揃いが悪くなり、結果として、育成者 (種苗会社等) の信用問題に進展する。一般に種子純度検定には、実際栽培による調査の他に、生化学的調査、アイソザイムや RAPD 法、または STS マーカーによる PCR などの方法が行われている。しかし、形態観察は時間がかかり、気候や観察者の経験によるところが大きいこと、RAPD 法は優性マーカーであることや再現性の問題があること、アイソザイムは安価で共優性マーカーであるものの識別できる組合せが限られるなどの問題がある。

これらの理由により、ネギおよびタマネギにおいて、簡便な DNA 分析による品種識別技術の開発が望まれている。しかし、ネギやタマネギは他殖性作物であり、自殖弱勢が顕著であるため、F₁ 親系統にはある程度のヘテロ接合性が存在し、このため F₁ 品種においてもある程度の遺伝的異質性が保持されていると考えられる。

<国内での技術開発状況>

タマネギにおいては、(独) 農研機構 食品総合研究所を中心として、RAPD 由来 STS マーカーによる品種識別技術の研究が行われている。品種内での遺伝的異質性を考慮して、

同一品種 15 個体について 19 マーカー座を調査し、各座における増幅頻度と既知の 70 品種のデータとを比較することにより、品種識別を行うものである。

一方、筆者ら（(独) 農研機構 野菜茶業研究所）は、ネギにおいて SSR マーカーを用いた品種識別技術の研究を実施している。我々は、F₁ 品種を含む 8 品種（各品種 33 個体）を用いて、14 SSR 座（Song *et al.*, 2004）における品種内多型程度を調査した（Tsukazaki *et al.*, 2006）。その結果、全品種のほぼすべての座において高い異質性が存在することを明らかにし、既存品種において品種を特定する遺伝子型を決めることは不可能であると結論付けた。このため、品種内で高い異質性をもつ作物において、品種同定を容易かつ正確に行うことを可能にする「SSR-tagged breeding 法（SSR マーカーによる品種標識法）」を提案した（図）。これは、原原種圃で少数の SSR 座について特定の遺伝子型がホモの個体を選抜して採種を行う方法である。本法は、ネギのみならず自殖弱勢が著しい他殖性作物全般に適用可能であり、品種内多型の存在により DNA マーカーによる同定や純度検定が困難であった作物においても品種同定や F₁ 純度検定を可能にする、簡便かつ有効な育種法であると考えている。

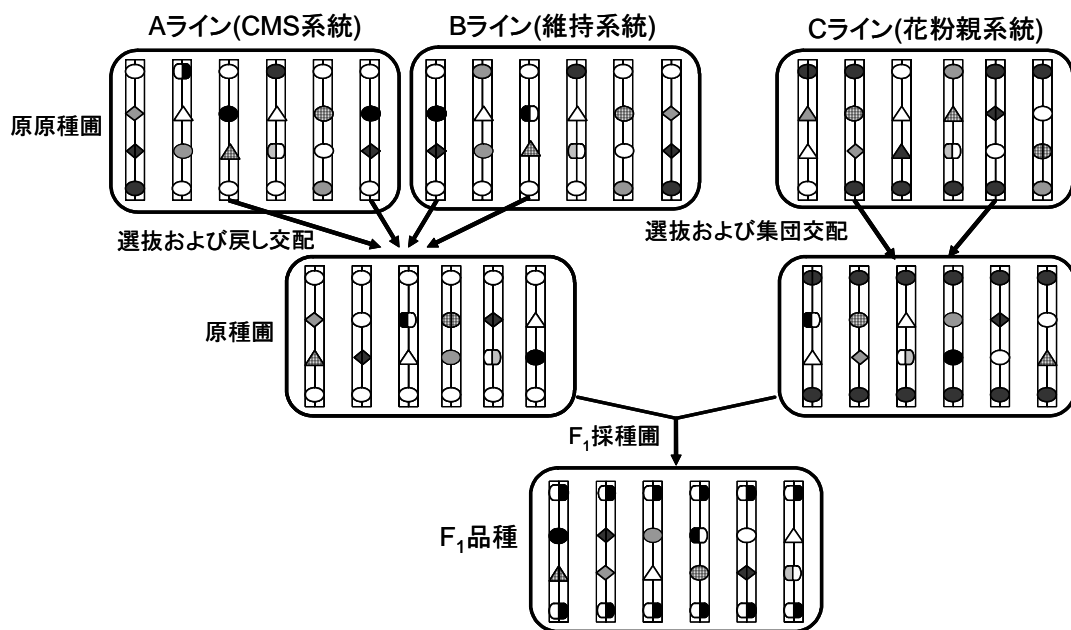


図. ネギにおける品種識別を可能にするための SSR マーカーによる「品種標識法」（Tsukazaki *et al.*, 2006 を改変）。

この図において、図形の位置は SSR 座、形および色は遺伝子型を示している。現在の品種は、種子親、花粉親とも遺伝的には十分に固定されていない。この図の場合、一番上と一番下の SSR 座について、種子親については白丸のホモ型で固定している個体を選抜し、花粉親については黒丸ホモ型で固定している個体を選抜する。これらの個体について、種子親については維持系統による戻し交雑、花粉親については集団交配を行い、その後 F₁ 採種を行う。これにより、任意の SSR 座について特定の遺伝子型に固定した F₁ 品種ならびに親系統を育成することができ、これらの SSR 座を調査することにより、品種識別や

F₁ 純度検定を可能にする。また、それ以外の SSR 座については従来の F₁ 品種と同程度のヘテロ性が保持されているため、自殖弱勢は生じないと考えられる。

<海外におけるネギ類のゲノム研究>

タマネギでは、アメリカ農務省およびウィスコンシン大学の M.J. Havey 教授を中心としてゲノム研究が進められている。これまでに、RFLP および RAPD マーカーによる連鎖地図作成 (King *et al.*, 1998)、CMS-稔性回復遺伝子座 (*Ms*) のマッピング (Gökçe *et al.*, 2002)、乾物重、辛味、抗血小板凝集活性のマッピング (Galmarini *et al.*, 2001) 等の研究が精力的に行われている。さらに、大量の発現遺伝子タグ (EST) シーケンスが行われ、11,726 クローンの EST 情報を TIGR (The Institute for Genomic Research) のデータベースに公開するとともに (Kuhl *et al.*, 2004)、これらの EST マーカーを利用してタマネギ染色体地図を作成した (Martin *et al.*, 2005)。

一方、ヨーロッパでは、オランダのワーゲニンゲンにある Plant Research International において、C. Kik 博士 (現 Centre for Genetic Resources, the Netherlands (CGN)) を中心として、SSR マーカーによるネギ属植物種の分類 (Fischer and Bachmann, 2000)、タマネギと近縁野生種およびネギとの種間雑種集団を用いた AFLP マーカーによる連鎖地図作成およびべと病抵抗性遺伝子座のマッピング (van Heusden *et al.*, 2000) および GISH による組換え位置の可視化による物理地図と遺伝地図との統合 (Khrustaleva *et al.* 2005) 等の研究が行われている。

<海外での品種識別技術開発状況>

海外においても、育成者権保護または種子純度検定を目的として、DNA によるネギ類の品種識別技術開発について強い感心があるようである。しかし、ネギは主として東アジアで栽培されているため、これまで海外におけるネギの品種識別技術に関する研究は行われていない。一方タマネギにおいては、アメリカおよびニュージーランドで研究が開始されたところである。しかし、ゲノム研究が行われているヨーロッパでは、これまでネギ類の品種識別技術開発に関する研究は行われていない。

アメリカウィスコンシン大学の M.J. Havey 教授のグループは、ニュージーランド作物食料研究所の J. McCallum 博士らと共同で、タマネギ EST 由来 47 マーカー (一塩基多型 (SNP) マーカーおよび挿入/欠失 (indel) マーカー 10 個および SSR マーカー 37 個) を用いて、アメリカ、ヨーロッパ、日本の品種を含むタマネギ 35 品種・系統 (各品種 50 個体以上) について遺伝子型を調査した。その結果、合計 398 個の多型を検出し、遺伝子型の出現頻度を基に系統分類を試みた (Jakše *et al.*, 2005)。SSR マーカーによる分類では、育成地および品種群の分類とよく一致していたが、SNP あるいは indel マーカーによる分類では、明確な傾向は見出せなかった。この理由の一つとして、SNP および indel マーカーは、同一ゲノムに存在する複数の遺伝子座 (パラログ (paralog)) を増幅した可能性を示唆している。しかしながら、開発したマーカーは PCR ベースのマーカーであることから、採種種子の品質管理等において有効なツールとなりうると報告している。

また、ニュージーランド作物食料研究所の J. McCallum 博士らは、世界各国から導入したタマネギ品種・遺伝資源および近縁種 94 品種・系統を用いて EST 由来 48 SSR マーカー

による系統分類を行い、アメリカ、ニュージーランド、インドから導入した品種群がそれぞれのクラスターに分類されることを明らかにした (McCallum, 未発表)。

一方、ネギ類と属は異なるが同じユリ科に属するアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) では、「UC157」(日本では「ウェルカム」という品種名で輸入販売されている) 等いくつかの F₁ 品種について、DNA 分析により 100%F₁ 雑種であることを証明した種子であることをうたって販売しているようである (<http://www.calif-asparagus-seed.com/>)。このホームページにおけるマーカーの種類および数については不明であるが、この技術の基礎となったと考えられる研究は、カリフォルニア大学リバーサイド校の M.L. Roose 教授のグループにより行われたようである。アスパラガスにおいても収量および品質の面から F₁ 品種が優れているが、比較的容易に自殖種子が得られるために、販売先での自家採種による F₂ 種子の栽培が問題となっている。このため、DNA マーカーにより F₁ 品種とその後代との識別を可能とすることで、販売種子の品種保証と F₂ 採種の牽制を意図しているようである。なお、論文として発表されているのは、ランダムプライマー F13 (オペロン社) で増幅するバンド (F13-430) から得られた優性の SCAR マーカーであり (Roose and Stone, 1996)、このマーカー等を利用して商業的に品種保証を行っていると考えられる。

<品種識別技術開発における問題点>

ネギ類において、現在の F₁ 品種の親系統は、種子親は、雄性不稔系統 (A ライン) へ維持系統 (B ライン) を連続戻し交雑することにより採種し、維持系統および花粉親については、自殖あるいは戻し交雑を数回行った後に集団採種を行い、親系統としている。特に花粉親 (C ライン) については、A ラインおよび B ラインと比較して遺伝的均一性は低いことが多く、十分に遺伝的に固定されているとはいえない (塚崎, 未発表)。したがって、ネギ類の F₁ 品種における遺伝的均一性は、自殖性作物や栄養繁殖性作物と比較して著しく低く、品種内でも高い異質性を保持しており、個体レベルでの品種識別は非常に難しいと考えられる。このため、品種内の遺伝子型出現頻度に基づく集団遺伝学的手法による品種分類に頼らざるを得ないのが現状である。このような手法では、採種年次や採種地といったロットの違いにより遺伝子型出現頻度に差異が生じる可能性があり、種子純度検定には使用できても育成者権保護のための品種識別技術としての利用については問題点が残る。

これに対して、任意の SSR 座について特定の遺伝子型ホモで固定した個体から採種する「品種標識法」は、固定した遺伝子座については自殖性作物や栄養繁殖性作物と同様に扱うことが可能である。しかし「品種標識法」についても、たまたま別の品種がターゲットとなる SSR 座についてホモ型で固定している可能性も考えられるため、同一品種につき複数の個体について遺伝子型を解析し、調査個体全てが目的とする SSR 座が同一の遺伝子型であることにより、他品種との識別が可能となる。

いずれの手法にしろ、ネギ類は自殖弱勢が著しい他殖性作物であり、完全な固定系統を利用した F₁ 品種育成は非常に難しい。このため、品種内にある程度の異質性を保持しつつ、品種内で固定した遺伝子座を利用することにより、品種識別を行う必要がある。

<引用文献>

- Fischer and Bachmann (2000) *Theor. Appl. Genet.* 101: 153-164.
- Galmarini *et al.* (2001) *Mol. Genet. Genomics* 265 : 543-551.
- Gökçe *et al.* (2002) *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127: 944-946.
- Jakše *et al.* (2005) *J. Amer. Hort. Sci.* 130: 912-917.
- King *et al.* (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96: 52-62.
- Khrustaleva *et al.* (2005) *Genetics* 169: 1673-1685.
- Kuhl *et al.* (2004) *Plant Cell* 16: 114-125.
- Martin *et al.* (2005) *Mol. Gen. Genomics* 274: 197-204.
- Roose and Stone (1996) *Acta. Hort.* 415: 129-135.
- Song *et al.* (2004) *Breed. Sci.* 54: 361-365.
- Tsukazaki *et al.* (2006) *Breed. Sci.* 56: 321-326.
- van Heusden *et al.* (2000) *Theor. Appl. Genet.* 100: 18-126.

(2) イチゴの DNA 品種識別技術の開発状況

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
野菜茶業研究所 野菜ゲノム研究チーム
上席研究員 松元哲

1) 育成者権の侵害事例

イチゴはイグサやインゲンマメなどと同様に育成者権の侵害事例が報告されている。国内で育成された品種が日本周辺のアジア諸国に無断で持ち出され、逆輸入されているケースも目立っている。特に韓国のイチゴ栽培では、基本的な技術を日本から導入した経緯があるため、生産されているイチゴのほとんどが日本の品種である（小林、2003）。実際に筆者も韓国のイチゴ栽培で、「さちのか」（野菜茶業研究所育成）や「とちおとめ」（栃木県育成）等、育成者に無断で持ち出され栽培、流通している現場を確認している（松元、2004）。また係争事例にも発展し、韓国で普及面積が最も多い「レッドパール」の育成者である西田朝美氏が違法な業務を行っていた業者を訴えた裁判では、結果的に西田氏の主張が全面的に認められた形で決着がついている。また韓国からの輸入イチゴの中に「さちのか」が含まれていたことを DNA マーカーによって明らかにしている（國久ら、2005）。

2) 国内での技術開発状況

DNA 多型を用いたイチゴ品種識別は、最初に RAPD マーカーによる識別が試みられ、主要品種を識別することが可能になるなどの一定の成果は挙げられた。平成 13 年より野菜茶業研究所が「さちのか」の権利侵害を防止する目的で、**Cleaved Amplified Polymorphism Sequence (CAPS)** マーカーによる品種識別技術の開発を開始した（Kunihisa ら、2003、2005）。現在では 25 個のマーカーを用いることにより、日本で登録された 100 を超えるほとんどの品種を同定するまで技術が高度化されている。ただし既存の品種から突然変異により得られた品種については、元品種と識別できるマーカーは見出されていない。突然変異系統を識別可能なマーカーの開発は、コストの面で非常に困難であると考えられる。また平成 14 から 16 年度まで実施された農林水産省先端技術を活用した農林水産研究高度化事業「野菜・茶およびウメの原産地表示判別技術の開発」に参画した栃木県が RAPD-STC 化マーカーにより「とちおとめ」「とちひめ」に特異的なマーカーを開発し、福岡県が SSR マーカーによるイチゴの品種識別への応用を行った（Shimomura ら、2006）。

3) 海外での技術開発状況

(1) アメリカ・カリフォルニア

カリフォルニアはアメリカのイチゴ生産が最も盛んな州の一つであり、カリフォルニア産のイチゴは、夏季に主にケーキ用として日本に輸出されている。カリフォルニアで栽培されているイチゴ品種の 80 パーセント以上はカリフォルニア大学デービス校で育成されたものである。イチゴ苗の生産者はカリフォルニア大学デービス校植物サービス財団（FPS）に委託してウィルスチェックと DNA フィンガープリンティングによる最新品種の種苗管理を行っているようである。

FPS の研究者である Gerald Dangle は、DNA フィンガープリンティングでイチゴ品種を同定する技術を開発した。品種同定に用いられている DNA マーカーは、**U.S. Department of Agriculture Agricultural Research Service Fruit Lab (USDA ARSFL)** の Kim Lewers によって開発された SSR マーカーのセットから選ばれたものである。Gerald Dangle は UC デービスがパテントをもつ 40 以上のイチゴ品種の DNA フィンガープリントのデータベースを構築している。この技術は苗の品質管理に日常的に FPS や品質管理を請け負う私的な検査機関でも用いられている。

California Seed and Plant Lab, Incorporated (Cal-SPL) のホームページ (<http://www.calspl.com/site/index.php>) では、イチゴ品種同定業務が記載されている。同社の Parm Randhawa によるとアメリカとスペインの 70-75 品種を 2 または 3 個の SSR マーカーによって同定しているとのことである。ただし、マーカーの情報、品種のリストや多型情報などは非公開である。同社の検出が SSR であることは明らかであるが、Gerald Dangle や Kim Lewers が開発した技術を使用しているかどうかは不明である。現在の品種のデータベースの中には日本の品種は含まれていないが、希望があれば日本のイチゴのサンプルを郵送すれば同定することは可能であろうとのことであった。現在年間 1000 件程度の依頼を請け負っており、依頼主の多くは苗生産業者であり、品種の混ざりを防止することが第一の目的であり、育成者権保護の目的での依頼もあると言う。ホームページによると鑑定に要する料金は、1 品種あたり 40 ドルで最低 295 ドルから請け負うことが記されている。

Kim Lewers の研究グループはイチゴの SSR 解析により、バラ科植物の遺伝的な多様性、イチゴ連鎖地図の構築、それに品種同定に関する研究成果を発表している (Davis ら)。8 倍体栽培イチゴ品種 ‘Strawberry Festival’ の cDNA ライブラリーから 37 個の SSR プライマーセット (EST-SSRs) を構築している (Bassil ら)。この中の 13 個は 70 品種を用いた多型解析の結果、1 つのマーカーで 5~32 個の対立遺伝子を推定しており、極めて多型性に富んでいることを報告している。本論文では、37 個の SSR マーカーについて、遺伝子座名、ジーンバンクのアクセッションナンバー、プライマーシーケンス、SSR のモチーフ、増幅断片長および *F. x ananassa*, *F. vesca*, *F. chiloensis*, *F. virginiana* での増幅の有無などの情報が記載されている。しかし品種ごとの増幅断片長については記載がなく、11 個のマーカーについての推定した対立遺伝子数のみの記載に留まっている。

品種同定に用いるマーカーではそれぞれに一長一短があるが、SSR は EST やゲノム情報が整備された環境においては開発もそれほど困難ではなく、最も強力なツールとなると考えられる。その理由は共優性であり情報量が多いこと、品種間の多型の割合が他のマーカーに比較して高いこと、それに PCR 後のサンプルを電気泳動するだけで多型を分離、検出可能な簡便な操作性が挙げられる。イチゴの SSR では、2 倍体の *F. vesca* と栽培イチゴである *F. x ananassa* の種間に保存性が高く、2 倍体種でクローニングされた SSR が栽培種でも利用可能である。Kim Lewers の研究グループによれば、8 倍体の *F. x ananassa* から開発された 23 個の SSR を他の種での増幅性を確かめた結果、*F. vesca* で増幅した割合が 98.4% であり、同様に *F. iinumae*(93.8%)、*F. nubicola*(93.8%)、*F. mandshurica*(87.5%)、*F. nilgerrensis*(75%)、*F. viridis*(73.4%) とそれぞれ増幅率が高いことが示された。イチゴのゲノムデータベースの構築が今以上に進めば、DNA 品種識別技術もはるかに向上することが期待できる。

Kim Lewers らは前述した論文の中で、5~37 個、平均すると 16.1 の複対立遺伝子を推定している。確かに複対立遺伝子数の増加は個々の遺伝子頻度を小さくするとともに、数少ないマーカー数で同定率が向上されることを意味する。しかしながら、37 個が一時に増幅すると断片が多すぎて非常に識別しにくいことも想定され、慎重な実験操作が求められる。

(2) オーストラリア

Primary Industries Research Victoria (PIRVic) の Keny Andrew らは栽培イチゴの EST-SSR を開発している。14 個のプライマーによって 13 品種の遺伝子型を同定している。SSR マーカーの増幅 DNA の再現性と多型性に優れていることを示し、市販品種の遺伝解析に使用できることを発表している (Keniry ら、2006)。

(3) イタリア

Udine 大学の Cipriani らは自ら開発した SSR と公表されている SSR を用いて、栽培イチゴ品種間の SSR の増幅度合いを調べている。その結果、選抜した 20 個のプライマーペアの中で、*Fragaria* 族植物で増幅するものは 69%であることを報告している (Cipriani, 2006)。また同氏は SSR によりイチゴ品種の同定を試みている (Bonoli ら、2005) が、詳細は不明である。

(4) フランス

BioGEVES の Arnau らは ISSR の増幅パターンにより 30 品種を識別している (Arnau ら、2003)。検出した 390 個の増幅断片長の中で、113 個の断片が多型を示し、特定の 1 個のプライマーを用いることにより、すべての品種を識別可能な増幅断片のパターンを得ている。またこれらの増幅断片の再現性が高いことを報告している。ISSR がイチゴ品種識別に極めて有用であることを報告している。

(5) そのほか RAPD による論文報告事例

RAPD 分析は簡易ではあるが、DNA マーカーの再現性に問題のあることが指摘されている。しかしながら、CAPS、SSR など再現性の高いマーカー種類が開発される以前には、品種識別技術として論文が多数報告されていたのでその一部を紹介する。

Garcia ら (2002) はアルゼンチンの主要 8 品種 ‘Camarosa’, ‘Sweet Charlie’, ‘Selva’, ‘Milsei’, ‘Tudla’, ‘Chandler’, ‘Pajaro’ (‘Pajaro Mendoza’, ‘Pajaro Corrientes’, ‘Pajaro Salta’ の 3 個の異なるアクセッションから構成されている) を用いて RAPD と形態学的な特徴により品種を分類している。13 個のプライマーを用いて再現性の高い 37 種類の増幅 DNA 断片をマーカーに用いている。3 個のプライマーの使用で得られる DNA 断片の検出パターンから使用した 8 品種の識別を可能にしている。

ブラジルで栽培されている主要なイチゴ品種 (‘Dover’, ‘Campinas’, ‘Milsei-Tudla’, ‘Aromas’, ‘Camarosa’, ‘Oso Grande’, ‘Sweet Charlie’, ‘Santa Clara’, ‘Vila Nova’, ‘Bürkley’) を 14 プライマーにより 114 の断片を増幅しこのうち 84 個が多型性を識別している。特に加工用品種の ‘Santa Clara’, ‘Vila Nova’, ‘Bürkley’ は他の 7 品種と大別された。同じ交配親から育成された ‘Santa Clara’ と ‘Vila Nova’ は遺伝的な類似性が高いことを裏付けている (Radmann ら、2006)。

イスラエル、アメリカ、ポーランドの研究グループは、アメリカとカナダで栽培されている主要な 41 品種について RAPD による品種識別を行っている (Degani ら、1998)。10 プライマーセットで 15 種類の多型を示す断片を検出し、これらは 41 品種を識別するのに

十分であった。特に7プライマーセットから増幅される10種類の断片をマーカーにして、品種識別が可能であることを示している。またこの研究グループは AFLP がイチゴ品種識別に有用性であることも報告している (Degani ら、2001)。

4) 技術開発の課題と問題点、方向性

DNA マーカーを活用した品種識別技術は、育成者権の保護、不正表示の防止、種苗や遺伝資源の管理に極めて有用な技術であり、将来的には品種登録にも利用されることも考えられる。そこで重要なことは、データベースを開示し透明性を図るとともに分析技術の正確性と再現性の十分な確保である。

識別技術の正確性においては、鵜飼により DNA マーカーを用いた場合の品種同定理論が提示されている (鵜飼、2004)。品種識別に必要な正確性はそれぞれのアプリケーションによって異なる。例えば2つの品種のイチゴ苗が混ざってしまい、それを判定する場合と品種名が全く未知の果実から品種を同定する場合とでは用いるマーカーの数と得られる正確性に違いが生じる。前者の場合には当該の2つの品種間で多型を示す1つの DNA マーカーを用いることにより、誤差なく識別することができる。一方で後者の場合には DNA マーカーのデータベースから複数のマーカーを選抜し遺伝子型を決定しても、100%同定できるわけではない。ただマーカー遺伝子型の情報を駆使することにより、可能な限り100%に近づけることはできる。そのためには DNA マーカー情報を開示し、その判断根拠を明らかにする必要がある。野菜茶業研究所では国内で育成されている70品種・系統のマーカー情報を開示し (松元ら、2006)、さらに登録されている品種について可能な限りマーカー遺伝子型を決定し、公開することを進めている。

分析技術の再現性に関して、DNA マーカーを利用したイチゴ品種識別では国際的に認知されている技術はない。定量、定性をはじめとする化学分析法の妥当性確認には、アメリカの The Association of Official Analytical Chemists (AOAC) の Validation のプロトコール等がある。このプロトコールの中には、10研究室以上で、明らかにする分析項目1つについて6反復以上を実施する試験室間妥当性試験が課せられている。そこで野菜茶業研究所で開発した DNA 多型によるイチゴ品種識別技術を標準的な手法にすべく、試験室間妥当性試験を実行中である。2005年度の結果では、参加した大部分の研究室のほとんどで再現性の高いことが裏付けられた (上田ら、2006)。今後、品種識別技術については開発コストと成果の波及効果とが精査され、個々の作物の品種識別の重要度に基づいた技術開発が進むと予想される。イチゴなど重要な品目については、国際的に認知された識別法の確立が求められるであろう。

<引用文献>

- Arnau G., J. Lallemand and M. Bourgoïn (2003) Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Euphytica* 129, 69-79.
- Bassil N. V., M. Gunn, K. Folta and K. Lewers (2006) Microsatellite markers for *Fragaria* from 'Strawberry Festival' expressed sequenced tags. *Molecular Ecology Notes* 6, 473-476
- Bonoli M., G. Cipriani, L. Manzecchi and W. Faedi (2005) Use of molecular microsatellite markers in varietal

- characterization of strawberry. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofrutticoltura*. Gruppo Calderini Edagricole Srl, Bologna, Italy, 67, 30-32.
- Cipriani G. (2006) A new set of microsatellite markers for *Fragaria* species and their application in linkage analysis. *J. Hort. Sci. & Bio.* 81, 668-675.
- Degani C., L. J. Rowland, A. Levi, J. A. Hortynski and G. J. Galletta (1998) DNA fingerprinting of strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica* 102, 247-253.
- Degani C., L. J. Rowland, J. A. Saunders, S. C. Hokanson, E. L. Ogden, A. Golan-Goldhirsh and G. J. Galletta (2001) A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) based on AFLPs, RAPDs, and pedigree data. *Euphytica* 117, 1-12.
- Davis T. M., L. M. DiMeglio, R. Yang, S. M. N. Styan and K. S. Lewers (2006) Assessment of SSR marker transfer from the cultivated strawberry to diploid strawberry species: functionality, linkage group assignment, and use in diversity analysis. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 131, 506-512.
- Radmann E. B., V. J. Bianchi, R. P. Oliveira and J.C. Fachinello (2006) Characterization and genetic diversity of strawberry cultivars. *Horticultura Brasileira*. 24.
- Garcia M.G., M. Ontivero, J. C. Diaz Ricci and A. Castagnaro (2002) Morphological traits and high resolution RAPD markers for the identification of the main strawberry varieties cultivated in Argentina. *Plant Breeding* 121, 76-80.
- Keniry A., C. J. Hopkins, E. Jewell, B. Morrison, G. C. Spangenberg, D. Edward and J. Batley (2006) Identification and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers from *Fragaria x ananassa* expressed sequence. *Molecular Ecology Notes*. 6, 319-322.
- 小林彰一(2003) 韓国のイチゴ産業の現状と未来. 日本イチゴセミナー紀要 11, 33.
- Kunihisa. M., S. Matsumoto and N. Fukino (2003) Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. *Euphytica* 134, 209-215.
- Kunihisa. M., N. Fukino and S. Matsumoto (2005) CAPS markers improved by cluster-specific amplification for identification of octoploid strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars, and their disomic inheritance. *Theor. Appl. Genet.* 110, 1410-1418.
- Radmann. E. B., V. J. Bianchi, R.P. de Oliveira and J.C. Fachinello (2006) Characterization and genetic diversity of strawberry cultivars *Hortic. Bras.* 24,84-87.
- Shimomura.K. and K. Hirashima (2006) Development and characterization of simple sequence repeats (SSR) as markers to identify strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 75,399-402.
- 國久美由紀、松元哲、吹野伸子 (2005) DNA品種識別技術を用いた韓国産輸入イチゴ果実の分析. 野菜茶業研究所報告 4, 71~76.
(http://vegetea.naro.affrc.go.jp/print/bulletin/4/4_071-076.pdf)
- 松元哲(2004) 韓国のイチゴ生産事情. 施設と園芸 126.
- 松元哲・上田浩史・國久美由紀・吹野伸子(2006) 日本のイチゴ品種同定に必要な DNA マーカーの選定、園芸学会雑誌. 75 (別1) , 323
- 上田浩史・國久美由紀・松元哲・吹野伸子 (2006) イチゴ DNA 品種判別法の試験室間共同試験による妥当性確認、園芸学会雑誌 75 (別1) , 324
- 鵜飼保雄(2004) 植物品種における品種同定理論. 農業および園芸 79,194-198.

(3) ハクサイの DNA 品種識別技術の開発状況

大阪府立食とみどりの総合技術センター
食品・資源部 生物資源グループ 古川真

ハクサイでは、病害抵抗性等の品種育成を目標とした遺伝連鎖地図の構築に向け、RAPD、RFLP、AFLP、SSR 等の DNA マーカーが盛んに開発されている。これらの DNA マーカーは、識別対象のハクサイ品種間での多型を検証することによって、品種識別用 DNA マーカーとして使用が可能となる。ここでは、ハクサイの品種識別用として確立された DNA マーカーの研究事例と、ハクサイ品種識別への適用が可能と推察される遺伝子解析用の DNA マーカーの研究事例について、携わっている研究機関、研究者、DNA マーカーの種類や研究内容について紹介する。

1. 育成者の侵害事例

表だった侵害事例はないようである。

2. 国内での技術開発状況

<品種識別を目的とした DNA マーカーの研究事例>

(1) ① 開発機関：大阪府立食とみどりの総合技術センター¹⁾

研究者：古川 真、谷本秀夫、橋田浩二、西岡輝美

② 技術の種類等：SSR

ハクサイ品種識別用 SSR マーカーは、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所で開発された *Brassica rapa* の SSR マーカーの中から、ハクサイ品種識別用として適しているものを選抜した。現在のところ、5 種類の SSR マーカーにより、ハクサイ 16 品種の識別が可能となっている。

<遺伝子解析を目的とした DNA マーカーの研究事例>

(2) ① 開発機関：独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所

②-1 研究者：釘貫靖久、鱒坂秀敏、由比真美子、吉川宏昭、飛驒健一、平井正志

技術の種類等：RAPD²⁾

根こぶ病抵抗性遺伝子の解析において、3 種類の RAPD マーカーが同一の遺伝子座に連鎖していることを明らかとしている。

②-2 研究者：菊池幹之、鱒坂秀敏、釘貫靖久、平井正志³⁾

技術の種類等：RAPD (STS 化)

根こぶ病抵抗性遺伝子の座に連鎖している 3 種類の RAPD マーカーの STS 化を行った。また、これらの DNA マーカーが、ハクサイ F1 品種間で多型を示すことを明らかとしている。

②-3 研究者：諏訪部圭太ら⁴⁾

技術の種類等：SSR

遺伝子解析に利用している 35 種類の SSR マーカーが、ハクサイ 5 品種間で多型を示すことを明らかにしている。

(3) ① 開発機関：京都府立大学⁵⁾

研究者：平井正志ら

② 技術の種類等：RAPD

RAPD マーカーを利用して、根こぶ病耐性遺伝子のマッピングを行っている。

3. 海外での技術開発状況

<品種識別を目的とした DNA マーカーの研究事例>

(1) ① 開発機関：北京野菜研究センター（中国）⁶⁾

研究者：Zheng X.、Song S.、Liu H.、Dore C.、Dosba F.、Baril C.

② 技術の種類等：RAPD

RAPD プライマーによる 3 個の多型と、アイソザイムによる 9 個の多型を併せて評価することにより、ハクサイ 21 品種の識別を可能としている。

(2) ① 開発機関：台湾農業研究所（台湾）⁷⁾

研究者：Hsue-Yu Chuang、Shing-Jy Tsao、Jaw-Neng Lin、Kan-shu Chen、
Tsung-Dao Liou、Mei-Chu Chung、Yaw-Wen Yang

② 技術の種類等：RAPD

8 種類の RAPD プライマーを用いて、非結球ハクサイ 30 系統の識別を可能としている。

<遺伝子解析を目的とした DNA マーカーの研究事例>

(3) ① 開発機関：National Institute of Agricultural Biotechnology(NIAB)（大韓民国）⁸⁾

研究者：Kim JS、Chung TY、King GJ、Jin M、Yang TJ、Jin YM、Kim HI

② 技術の種類等：RFLP

遺伝連鎖地図の構築に、520 種類の RFLP マーカーと 25 種類の PCR-based マーカーを利用している。

(4) ① 開発機関：忠南大学校（大韓民国）⁹⁾

研究者：Jeong Hee Kim、Chang-Soon Jang、Kyo-Won Cho、Yong Pyo Lim

② 技術の種類等：AFLP、RAPD

36 種類の AFLP プライマーと 28 種類の RAPD プライマーにより、470 個の多型を検出し、根こぶ病抵抗性遺伝子の解析に利用している。

(5) ① 開発機関：ロシア科学アカデミー・バイオエンジニアリングセンター（ロシア）¹⁰⁾

研究者：Ignatov AN、Kuginuki Y、Suprunova TP、Pozmogova GE、Seitova

AM、Dorokhov DB、Hirai M

② 技術の種類等：RAPD

980 種類の RAPD マーカーを、黒腐病抵抗性に関する遺伝子解析に利用している。

(6) ① 開発機関：華中農業大学（中国）¹¹⁾

研究者：Liu RH、Meng JL

② 技術の種類等：RFLP、AFLP

166 種類の RFLP マーカーと 2 種類の AFLP マーカーを用いて、22 系統の *Brassica rapa* から多型を検出している。

(7) ① 開発機関：北京野菜研究センター（中国）¹²⁾

研究者：Yu SC、Wang YJ、Zheng WY

② 技術の種類等：AFLP、RAPD

AFLP マーカーと RAPD マーカーの合計 352 種類の DNA マーカーで構築した遺伝連鎖地図を用い、形態的特徴に関する QTL 解析を行っている。

<引用文献>

- 1) 古川 真, 谷本秀夫, 橘田浩二, 西岡輝美. ハクサイ加工品(キムチ)の材料品種判別における SSR マーカーの利用, 園芸学雑誌 75(1):422. 2006.
- 2) Yasuhisa Kuginuki, Hidetoshi Ajisaka, Mamiko Yui, Hiroaki Yoshikawa, Ken-ichi Hida and Masashi Hirai. RAPD markers linked to a clubroot-resistance locus in *Brassica rapa* L. Euphytica volume98, Number3. 1997.
- 3) Kikuchi M, Ajisaka H, Kuginuki Y, Hirai M. Conversion of RAPD markers for a clubroot resistance gene of *Brassica rapa* into sequence : Tagged sites (STSs), Japanese Society of Breeding. 49:83-88. 1999.
- 4) K. Suwabe, H. Iketani, T. Nunome, T. Kage, M. Hirai. Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. Theoretical and Applied Genetics 104(6-7):1092-1098. 2002.
- 5) Hirai M, Harada T, Kubo N, Tsukuda M, Suwabe K, Matsumoto S. A novel locus for clubroot resistance in *Brassica rapa* and its linkage markers. Theoretical and Applied Genetics 108(4):639-43. 2004.
- 6) Zheng X, Song S, Liu H, Dore C, Dosba F, Baril C. Identification of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*) cultivars with isozyme, RAPD and AFLP markers. ISHS Acta Horticulturae 546:543-549. 2000.
- 7) Hsue-Yu Chuang, Shing-Jy Tsao, Jaw-Neng Lin, Kan-Shu Chen, Tsung-Dao Liou, Mei-Chu Chung, and Yau-Wen Yang. Genetic diversity and relationship of non-heading Chinese cabbage in Taiwan. Bot.Bull.Acad.Sin. 45:331-337. 2004.
- 8) Jung Sun Kim, Tae Young Chung, Graham J. King, Mina Jin, Tae-Jin Yang, Yong-Moon Jin, Ho-Il Kim and Beom-Seok Park. A Sequence-Tagged Linkage Map of *Brassica rapa*. Genetics. 174(1):29-39. 2006.

- 9) Jeong Hee Kim, Chang-Soon Jang, Kyoo-Won Cho, Yong Pyo Lim. AFLP and RAPD mapping of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis*). Plant & Animal Genome VII Conference. P141. 1999.
- 10) Ignatov AN, Kuginuki Y, Suprunova TP, Pozmogova GE, Seitova AM, Dorokhov DB, Hirai M. RAPD-markers linked to the locus for resistance to the race 4 pathogen for black rot, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pamm.) Dow., in *Brassica rapa* L. Genetika. 36(3):357-360. 2000.
- 11) Liu RH, Meng JL. RFLP and AFLP analysis of inter- and intraspecific variation of *Brassica rapa* and *B. napus* shows that *B. rapa* is an important genetic resource for *B. napus* improvement. Yi Chuan Xue Bao. 33(9):814-23. 2006.
- 12) Yu SC, Wang YJ, Zheng XY. Mapping and analysis QTL controlling some morphological traits in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). Yi Chuan Xue Bao. 30(12):1153-1160. 2003.

(4) ナスの DNA 品種識別技術の開発状況

大阪府立食とみどりの総合技術センター
食品・資源部 生物資源グループ 古川真

ナスでは、形態的特徴に関する遺伝子解析や有用形質を獲得した品種育成を目標とした遺伝連鎖地図の構築に向け、多数の DNA マーカー (RAPD、RFLP、AFLP、SSR、SNP 等) が開発されてきている。それらの遺伝連鎖地図用 DNA マーカーは、品種間での多型検出能力を検証することにより、品種識別用 DNA マーカーとしての利用が可能である。そこで、ナスにおける品種識別用 DNA マーカーと、遺伝連鎖地図用の DNA マーカーの両方における開発状況について紹介する。

1. 育成者の侵害事例

表だった侵害事例はないようである。

2. 国内での技術開発状況

<品種識別を目的とした DNA マーカーの研究事例>

(1) ① 開発機関：大阪府立食とみどりの総合技術センター^{1),2)}

研究者：谷本秀夫、古川 真

②-1 技術の種類等：RAPD

5'末端を DIG 修飾したプライマーを用いた RAPD 法により、ナス品種識別を目的とした RAPD マーカーの開発を行った。シークエンスゲルを用いた電気泳動後、ナイロンメンブレンフィルターへの転写及び検出により品種識別を行う。6 種類の RAPD マーカーを用いることにより、ナス 12 品種の識別が可能である。

②-2 技術の種類等：SSR

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所で開発されたナスのマイクロサテライトマーカーを利用して、品種識別用 SSR マーカーを開発した。11 種類の SSR マーカーにより、ナス 28 品種の識別が可能となっている。

(2) ① 開発機関：独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所³⁾

② 技術の種類等：SNP

ナスの各組織で発現する遺伝子配列を 1 万個以上解読し、その情報に基づいて DNA 品種識別に利用可能な 1 塩基多型マーカーを開発している。

<遺伝子解析を目的とした DNA マーカーの研究事例>

(3) ① 開発機関：独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所³⁾

②-1 研究者：布目 司

技術の種類等：RAPD

104 種類の RAPD プライマーにより、ナス品種間における 115 個の多型を検出しており、それらを遺伝連鎖地図の構築に利用している。

②-2 研究者：布目 司

技術の種類等：AFLP

43 種類の AFLP プライマーにより、ナス品種間における 104 個の多型を検出しており、遺伝連鎖地図の構築に利用している。

②-3 研究者：布目 司、諏訪部圭太、宮武宏治、大山暁男、福岡浩之

技術の種類等：SSR

SSR 濃縮ライブラリの塩基配列情報から作製した 987 種類の SSR マーカーを STS 化した。そのうち 504 種類の SSR マーカーは、ナス 6 系統間での多型を検出することを明らかとしている。

3. 海外での技術開発状況

<品種識別を目的とした DNA マーカーの研究事例>

(1) ① 開発機関：インド農業研究機構（インド）⁴⁾

研究者：A.K.Singh、Major Singh、Rakesh Singh、Sanjeev Kumar、G.Kaloo

② 技術の種類等：RAPD

14 種類の RAPD プライマーを用いて、インド国内から集められたナス 28 系統を識別しており、遺伝的多様性の研究に利用している。

<遺伝子解析を目的とした DNA マーカーの研究事例>

(2) ① 開発機関：ヨルダン大学（ヨルダン）⁵⁾

研究者：Sadder,Mother,T.、Al-Shareef,Rami,M、Haitham,Hamdan

②-1 技術の種類等：RAPD

ヨルダンの在来ナス 10 品種を材料とした RAPD 分析により、9 種類の RAPD プライマーで 81 本の多型を検出しており、遺伝的多様性の解析に利用している。

(3) ① 開発機関：ペローナ大学（イタリア）⁶⁾

研究者：Furini A、Wunder J

② 技術の種類等：AFLP

ナスとナス近縁種を含む 94 系統の形態特性の遺伝子解析に、AFLP マーカーを利用している。

(4) ① 開発機関：コーネル大学（アメリカ）⁷⁾

研究者：Frary A、Doganlar S、Daunay MC、Tanksley SD

② 技術の種類等：RFLP

Solanum melongena と野生種との F2 系統を材料とした QTL 解析に、207 種類の RFLP マーカーを利用している。

(5) ① 開発機関：National Bureau of Plant Genetic Resources（インド）⁸⁾

研究者：J.L.Karihaloo、S.Brauner、L.D.Gottfried

② 技術の種類等：RAPD

ナス 52 系統を用いた遺伝子解析において、21 種類の RAPD プライマーで 130 個の多型を検出している。

<引用文献>

- 1) 谷本秀夫, 古川 真, 古川 一. DIG-RAPD 法による *Solanaum melongena* の DNA 多型検出. 大阪農技セ研報. 36:38-42. 2000.
- 2) 古川 真, 谷本 秀夫, 橘田 浩二, 西岡 輝美. SSR マーカーによるナスの品種判別技術の開発とナス加工品への適用. DNA 多型 Vol. 15. (印刷中)
- 3) 布目 司. ナスの分子遺伝マーカー開発と有用形質との連鎖解析に関する研究. 野菜茶業研究所研究報告 4:39-69. 2005.
- 4) A. K. Singh, Major Singh, Rakesh Singh, Sanjeev Kumar, G. Kalloo. Genetic diversity within the genus *Solanum* (Solanaceae) as revealed by RAPD markers. *Current Science* 90(5):10. 2006.
- 5) Sadder, Mother, T., Al-Shareef, Rami, M., Haitham, Hamdan. Assessment of genetic diversity among Jordanian eggplant (*Solanum melongena* L.) landraces using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Solanaceae/PAA 2006 abstract ID:485*. 2006.
- 6) Furini A, Wunder J. Analysis of eggplant (*Solanum melongena*)-related germplasm: morphological and AFLP data contribute to phylogenetic interpretations and germplasm utilization. *Theoretical and Applied Genetics*. 108 (2):197-208. 2004.
- 7) Frary A, Doganlar S, Daunay MC, Tanksley SD. QTL analysis of morphological traits in eggplant and implications for conservation of gene function during evolution of solanaceous species. *Theoretical and Applied Genetics*. 107(2): 359-370. 2003.
- 8) JL.Karihaloo, S.Brauner, L.D.Gottfried. Random amplified polymorphic DNA variation in the eggplant, *Solanum melongena* L. (Solanaceae). *Theoretical and Applied Genetics*. 90(6):767-770. 1995.

4) 穀類

(1) 米の DNA 品種識別技術の開発状況

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
食品総合研究所 食品素材科学研究領域長 大坪研一

1. 育成者権の侵害事例

①夢つくし

福岡県農業試験場で育成された良食味米「夢つくし」が正式な実施許諾なしに他県で流通・販売された。福岡県警は DNA 鑑定により当該米が「夢つくし」であることを確認した。この鑑定では食総研の開発した「コシヒカリ判別キット」が使用された。

②新潟コシヒカリ

新潟県農総研ではいもち病に強いコシヒカリ（コシヒカリ新潟 BL）を育成して品種登録し、平成 17 年度から、4 種類の BL を混植したマルチラインに全面的に作付け転換した。他県の農業者が正式な許諾を受けずに縁故米として種子の分譲を受けて栽培しようとする投書が新聞に掲載されたが、その場合は育成者権の侵害に当たると考えられる。

2. 国内での技術開発状況

従来は稲の幼苗や葉を試料とする RFLP 法による品種判別が育種研究者によって行われてきた。食総研および三井バイオは、1997 年に、独立に、種子（米）を試料とする DNA 品種判別技術を開発した。タカラバイオは食総研の開発した「コシヒカリ判別用キット」を企業化し、市販を開始した。海外貨物検査では、米国での判別（SSR 法）による米の品種の依頼鑑定を日本で初めて開始した。続いて、穀物検定協会や三菱化学 BCL も DNA 鑑定を企業化した。穀物検定協会は食総研の RAPD 法、三菱化学 BCL は SSR を用いた。その後、サタケ、ビジョンバイオ、植物ゲノム開発センターも依頼鑑定を企業化した。福岡県農試は RAPD 法による貯蔵水稻種子の品種鑑定を行い、作物研では、ミルキークイーン判別技術を開発した。その後、植物ゲノム開発センターと東北大学は SNP 法を開発し、穀物検定協会では SNP 法も併用している。サタケでは DNA 自動判別装置を開発し、市販を開始している。食総研は、種苗管理センターと共同で、150 品種の登録品種についてデータベースを作成した。現在、農水省の委託プロジェクト「安全で信頼性の高い食品のためのプロジェクト」において、食総研が他機関と共同で妥当性確認のための共同試験を実施中である。また、種苗法改正によって加工品にも育成者権が及ぶことになったことを受け、米飯等の米加工品を試料とする DNA 判別技術を同プロジェクトにおいて開発中である。

3. 海外での技術開発状況

米は小麦、トウモロコシとともに、世界の三大穀物とされており、年間生産量は約 6 億トン（籾重量）である。世界の過半の人口の主食であり、アジアを中心に自給的作物である。生産量の多い国は、中国（約 2 億トン）、インド（約 1 億 5 千万トン）、インドネシア

(約4千万トン)、バングラディッシュ(約2千万トン)、ベトナム等である。

世界の稲品種は10万以上あるとされ、きわめて多様である。アフリカ稲(オリザ・グラベリマ)以外の栽培稲の大多数はアジア稲(オリザ・サティバ)であり、インディカ亜種とジャポニカ亜種に分類される。

米の品種識別には、従来、①植物体の形態的特徴、②交配・稔実の可否、③玄米粒の外観的特徴、④酵素多型、等が用いられてきた。植物体を離れた米粒の近縁種同士を識別するためには、DNA判別が適している。

遺伝資源センターに保管する多様な稲遺伝資源の特徴を把握・記録するため、DNAマーカーが活用される(Virk et al, 1995)。

初期には、遺伝子を抽出して各種の制限酵素で分解して得られる断片長による識別(RFLP)が利用された(Helentjaris et al, 1985)(Tanksley et al, 1989)(Virk et al, 1995)。RFLPは、アジア稲の分類(Wang et al, 1992)やインディカとジャポニカの識別にも利用された(Zang et al, 1992)。

ランダムプライマーを用いるPCR法(RAPD法)による米の遺伝的多様性が米国テキサス技術大学で調べられ、RAPD法の結果と従来のエステラーゼを用いる酵素多型法の結果が一致すること、インディカとジャポニカの相違が大きく、インディカ内の水稻と陸稲の遺伝的変異は小さいことが報告された(Yu and Nguyen, 1994)。RAPD法は、Koらによって、オーストラリア米の品種判別にも適用された(Ko et al, 1994)。

イタリアのパビア大学では、中国科学院遺伝研究所と共同で、RAPD法による中国北部のハイブリッドライスの両親、維持系統及びF1種子のDNA分析を行い、RAPD法が近縁種の判別にも有効であることを示した(Wang, et al, 1994)。

中国科学院遺伝研究所では、稲、小麦、トウモロコシの半粒種子を試料とするRAPD分析を行い、葉を資料とするRAPD分析と同じ結果がえら得ること、この方法が病害抵抗性種子の選抜に有効であることを報告した(Zhai et al, 1997)。

イギリスのバーミンガム大学では、国際稲研究所の保有する稲遺伝資源についてDNA抽出法、RAPD法による分析、結果の数値化の検討を行い、再現性の良いことを示した(Virk et al, 1995)。米国カリフォルニア大学では、RAPD法を用い、10種類のプライマーによってインディカとジャポニカの分類を行うとともに、134種類のジャポニカを熱帯ジャポニカ群と温帯ジャポニカ群に分類できることを報告した(Mackill, 1995)。米国ルイジアナ州立大学では、アイオワ大学と共同で、長粒・短粒および登熟時期の異なる26種類の稲について、220種類の市販RAPDプライマーによるRAPD分析を行い、69種類のプライマーによる92種類の多型を見出し、7種類のプライマーで26種類の稲を全て分類できた(Cao and Oard, 1997)。

RAPD法以外に、DNAの反復配列の相違による判別も行われた(マイクロサテライト法、SSR法)。米国コーネル大学では、20種類の稲試料でマイクロサテライト反復数の変動を調べ、SSRマーカーはRFLPマーカーより識別性の高いこと、インディカ亜種とジャポニカ亜種を識別するプライマーのあることが報告された(Wu and Tanksley, 1993)。米国ジョージア大学では、国際稲研究所の20種類の稲試料を用いてSSRマーカーが遺伝的に保存されるので関連地図作製に有用であること、病虫害抵抗性遺伝子の分析に活用できることが示された(Zhao and Kochert, 1993)。米国バージニア州立大学では、稲の238

種類の在来種及び品種を試料とし、10種類のSSRマーカーを用いて多型を調べ、SSRマーカーが、稲遺伝系統の識別と作物進化の研究に有用であることを報告した (Yang et al, 1994)。

米国カリフォルニア大学では、インディカ亜種2種類、熱帯ジャポニカ亜種4種類、温帯ジャポニカ亜種8種類を試料とし、RAPD法、マイクロサテライト法、AFLP法(2種類の制限酵素で試料DNAを分解し、末端特異的なプライマーでPCR増幅して多型を検出する方法)の3種類の方法で分析した。その結果、AFLP法は、RAPD法およびマイクロサテライト法と同じ分類傾向が認められ、多数の多型が検出される有望な方法であることが報告された (Mackill et al, 1996)。

米国コーネル大学では、ジャポニカ亜種(台中65号)とインディカ亜種の同質遺伝子系統を試料とし、核由来DNAの制限酵素分解によって得られる特異的DNA断片をアダプター特異的PCR法で増幅し、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて増幅DNAを分離して対象DNAを抽出し、それを鋳型としてさらにPCRを行うことで目的DNAをクローニングする技術を開発した。これにより、インディカ亜種とジャポニカ亜種の相違と関係する多型マーカーを多数検出することができた (Cho et al, 1996)。

同大学では、259個体、71品種を試料とし、植物形態による分類、RFLP法およびマイクロサテライト法による分類の比較を行った。その結果、RFLP法およびマイクロサテライト法により、同一品種内にも多くの多型が認められ、在来種の場合には固定品種の場合よりさらに多くの品種内多型が認められた。RFLPマーカーよりマイクロサテライトマーカーの方が多型検出能力が優れており、特に4種類の有用マーカーを組み合わせることで試料の分類効率が向上した (Olufowote et al, 1997)。

日本の神戸大学では、稲の遺伝的由来を調べる目的で、A-ゲノム型の29種類の稲のRAPD分析を行い、*O.sativa*と*O.glaberrima*は、それぞれ、*O.perennis*および*O.breviligulata*から由来すると推定した (Ishii et al, 1996)。さらに、RAPD法、RFLP法(制限酵素断片長分析)およびSSLP法を用いてA-ゲノム型稲の遺伝的多型性を調べ、それぞれの方法による分類図を作成した (Bautista et al, 2001)。

インドの国立化学研究所では、インドの42種類の優良稲品種を試料として、RAPD法、反復配列同士の間隔を分析するISSR法、マイクロサテライトDNAの配列に基づいた特定プライマーを使用するSTMS法という3種類のDNAマーカーを使用して遺伝的多型性を調べた。3種類の方法の多型性平均値は、それぞれ2.21、4.05、5.49であった。これら3種類のDNA分析を併用することによって幅広い対象の稲を分類できると報告されている (Davierwala et al, 2000)。

米国のアーカンソー大学では、いもち病抵抗性及びワキシー遺伝子近傍のSSRマーカーを用い、食味と耐病性のDNA選抜を開始している (Johnson et al, 2003)。

イタリアのフェララ大学では、2地域、4品種の米を試料とし、RAPD法によるDNA判別及び、脂肪酸組成、無機成分組成等の化学分析を行い、結果の主成分分析により、品種と産地の判別を検討した結果、RAPD法により近縁種でも品種判別が可能であり、化学分析によって地域間差の検出が可能であることを示した (Brandolini et al, 2006)。

<引用文献>

- Bautista, N.S., Solis, R., Kamijima, O., and Ishii T., 2001, RAPD, RFLP and SSLP analyses of phylogenetic relationships between cultivated and wild species of rice, *Genes Genetics Syst.*, 76, 71-79.
- Brandolini, V., Coisson, J.D., Tedeschi, P., Barile, D., Cereti, E., Maietti, A., Vecchiati, G., Martelli, A., Arlorio, M., 2006, Chemometrical characterization of four Italian rice varieties based on genetic chemical analyses, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9985-9991.
- Cao, D and Oard, J.H., 1997, Pedigree and RAPD-based DNA analysis of commercial U.S. Rice cultivars, *Crop Science*, 37, 1630-1635.
- Cho, Y.G., Blair, M.W., Panaud, O., McCouch, S.R, 1996, Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: amplified fragment length polymorphisms (AFLP) from silver-staining polyacrylamide gels, *Genome*, 39, 373-378.
- Daviewwala, A. P., Chowdari, K. V., Kumar, S., Reddy, A. P. K., Ranjekar, P. K., and Gupta, V. S., 2000, Use of three different marker systems to estimate genetic diversity of Indian elite rice varieties, *Genetica*, 108, 269-284.
- Helentjaris, T, King, G., Slocum, M., Siedenstrang, C., and Wegman, S, 1985, Restriction fragment polymorphism as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding, *Plant Molecular Biology*, 5, 109-118.
- Ishii, T., Nakano, T., Maeda, H., Kamijima, O., 1996, Phylogenetic relationships in A-genom species of rice as revealed by RAPD analysis, *Genes Genet. Syst.*, 71, 195-201.
- Johnson, V.A., Redus, M.A., Gibbons, J.W., Moldenhauer, K.A.K., Jiang, J., Jia, Y., 2003, Improving efficiency of DNA marker technology for use in marker-assisted selection, *AAES Research Series* 517, 58-64.
- H. L. Ko, D. C. Cowan, R. J. Henry, G. C. Graham, A. B. Blakeney, and L. G. Lewin, 1994, Random amplified polymorphic DNA analysis of Australian rice (*Oryza sativa* L.) varieties, *Euphytica*, 80, 179-189.
- Mackill, D.J., 1995, Classifying Japonica rice cultivars with RAPD markers, *Crop Science*, 35, 889-894.
- Mackill, D.J., Zhang, Z., Redona, E.D., Colowit, P.M., 1996, Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice, *Genome*, 39, 969-977.
- Matsue, Y., Uchimura, Y., Sato, H., 2000, Comparison of producibility and growth habit between stored and newly harvested rice seeds, and identification of the cultivars of stored rice by RAPD method, *Jpn. J. Crop Sci.*, 69, 38-42.
- K. Ohtsubo, H. Toyoshima, and H. Okadome, 1998, Quality assay of rice using traditional and novel tools, *Cereal Foods World*, 43, 203-206.
- K. Ohtsubo, S. Nakamura, H. Morooka, T. Fujii, T. Fuse, and S. Kawasaki, 1999, Cultivar identification of rice using a single kernel of boiled rice, *Nippon Shokuhin Kagakukougaku Kaishi* (in Japanese language with English summary), 46, 262-267.
- K. Ohtsubo, S. Nakamura, and T. Imamura, 2002, Development of the primer sets for identification of a rice cultivar, Koshihikari, by PCR (in Japanese language with English summary), *Nippon*

- Nogeikagaku Kaishi, 76, 388-397.
- Olufowote, J.O, Xu, Y., Park, W.D., Beachell, H.M, Dilday, R.H., Goto, M., McCouch, R., 1997, Coparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers, nome, 40, 370-378.
- P. S. Virk, V. Brian, F-L Michael, T. Jackson and H. John, 1995, Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections, Heredity, 74, 170-179.
- Shirasawa, K., Shiokai, S., Yamaguchi, M., Kishitani, S., Nishio, T., 2006, Dot-blot-SNP analysis for practical plant breeding and cultivar identification in rice, Theor. Appl. Genet., 113, 147-155.
- Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson A. H., and Bonierbale, M.W.,1989, RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. Bio/Technology, 7, 258-264.
- G. Wang, S. Castiglione, J. Zhang, R. Fu, J. Ma, W. Li, Y. Sun, and F. Sala, 1994, Hybrid rice (*Oryza sativa* L.): identification and parentage determination by RAPD fingerprinting, Plant Cell Reports, 14, 112-115.
- Wang, Z. Y. and Tanksley, S. D., 1992, Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs, Theoretical and Applied Genetics, 83, 565-581.
- Wu, K-S, Tanksley, S.D., 1993, Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice, Mol. Gen. Genet., 241, 225-235.
- Yang, G.P., Saghai Maroof, M. A., Xu, C. G., Zhang, Q., and Biyashev, R. M., 1994, Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice, Molecular and General Genetics, 245, 187-194.
- Yu, L-X, and Nguyen, H.T., 1994, Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars., Theoretical and Applied Genetics, 87, 668-672.
- Zhai W., Lu, C., Zhu, L., Yang, W., Zhang, Q., 1997, PCR analysis of half-seeds of cereal crops and its application in marker-assisted selection and breeding, Chinese Journal of Biotechnology, 12(4), 249-255.
- Zang, Q., Saghai Maloof, M.A., Lu T.Y. , and Shen, B.Z., 1992, Genetic diversity and differentiation of Indica and Japonica rice detected by RFLP analysis, Theoretical and Applied Genetics, 83, 495-459.
- Zhao, X. and Kochert, G., 1993, Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)_n microsatellites from rice (*Oryza sativa* L.), Plant Molecular Biology, 21, 607-614.

(2) 小麦の DNA 品種識別技術の開発状況

岡山大学 自然科学研究科 (農学系)
植物・微生物機能開発学講座 田原誠

1. 小麦の品種識別技術開発についての背景

小麦の品質は、同じ品種であっても栽培された土地や栽培年度の気象条件により変化するので、小麦製品の品質を一定にするために、小麦流通や製粉などの段階において、複数の品種や産地の異なるものをブレンドして調整している (長尾、1995)。コムギの品種は、品質以外にも、収量性、耐病性、耐乾性などの栽培特性がそれぞれ異なるので、コムギの生産者にとって品種選択は重要な要件であるものの、製粉以降の加工の段階においては、製品 (小麦粉) の品質が一定の基準に収まっている限り、その原料となったコムギ品種が意識される機会は少ない。これは、精白米が最終製品となり、特定の品種とその品質が消費者に意識されることのあるイネとは大きな違いである。実際、コムギについては、生産者の側でも、生産の安定をねらいとして、複数の品種を混播する栽培が米国の冬コムギ地帯の一部で行われている (Kansas Agricultural Statistic Service, 2006)。

近年、新品種の育成者の権利が国際的に法制化され、さらに、その権利の範囲が従来の種苗から生産物にまで拡大された。育成者の権利が種苗の生産・流通までに限定される場合は、栽培段階での調査も現実的なものであり、保護品種の同定は植物体の形態形質による判定でも十分であったものと考えられる。しかし、コムギの生産物にも育成者の権利が及ぶこととなり、コムギの子実、小麦粉、加工製品などを分析して、正確に品種を識別し同定する技術の開発が急遽必要となってきた。同時に、新品種保護規定に基づく登録には、新品種が既存品種のいずれとも異なり (Distinct)、品種内では均質であり (Uniform) かつ遺伝的に安定 (Stable) であることを示す必要 (DUS テスト) があるが、コムギは既存の品種数が多く、登録品種数が増加した場合に多数の品種との比較は困難が予想されるので、信頼性の高い品種識別方法の開発とそのデータ・ベース化が求められている。

また、コムギの育種は、各国において、これまでに改良を加えてきた材料 (品種) にさらなる改良を加える方法 (Mainstream breeding) が採られているために、最近育成された品種については、遺伝的な違いが少なくなる傾向がある。このため、新たな同定方法は遺伝的に同質性の高い品種群であっても明確に識別できるものでなければならない。

従来、コムギ品種の分類は、胚乳の貯蔵タンパク (グルテニンやグリアジンなど) の組成をもとに行われてきた。最近、これらのタンパクの組成を二次元電気泳動法を利用して詳細に解析し、それぞれの品種に固有のタンパクを見いだすことで品種の同定が可能であり (Skylas ら、2001)、さらに 2~3 種類の品種をブレンドした小麦粉においても分析できることが示された (Yahata ら、2005)。また、品種固有のタンパクに反応する抗体を作成すれば、簡易な分析方法の開発も可能であるとされている (Skylas ら、2001)。しかし、加工製品を分析対象とする場合には、タンパクは加熱による変成や発酵に伴う酵素分解を受けやすく、電気泳動をはじめ抗体利用の場合でも分析が困難になることが知られている (Dien ら、2002)。これに対して、DNA は、1) 耐熱性があり、部分的に分解されても

分析対象となる、2) 生育ステージや組織を問わず分析対象とすることができる、3) PCR法を利用して特定の塩基配列を極めて高感度かつ正確に検出できるなどの特徴がある。実際、PCR法を利用したDNA分析では、小麦粉はもとより、焼いてから日数が経過したパンであってもDNAを抽出でき、さらに、加工によってDNAが断片化されていても、抽出される平均的な長さ以下であれば、遺伝子のコピー数に関わりなく検出が可能であることが示された(Tilley, 2004)。このため、コムギの品種識別に適したDNAマーカーの比較検討が進められてきている。そのようなマーカーとしては、RFLP、RAPD、STSマーカー、AFLP、SSRなどが検討されてきたが、1) 品種間の多型を示すマーカー数が多く確保できる、2) 共優性マーカーで異質接合性を検出できる、3) 検査の自動化が比較的容易できるなどの特徴から、現時点では、SSRを中心に研究が行われている。

2. 欧米におけるコムギ品種識別技術開発に向けての取り組み

コムギ品種識別の研究開発について、まず、米国では、農務省の植物品種保護担当部局は品種識別のための栽培試験を行わず、また、出願者がDNAマーカーによる情報を登録に必要な情報に補足する形で提供した場合には、区別性が明確な証拠に限って認めることとしている(Canadian Food Inspection Agency, 2005)。このような状況のため、農務省としてはコムギの品種識別のためのDNAマーカーの開発を行っていないものと見られる。また、2005年から開始されたコムギのDNAマーカー開発とこれに基づく選抜方法を開発するための農務省の大型プロジェクト(Wheat CAP: Coordinated Agriculture Project)においても品種識別を直接の目的とする研究課題は見受けられない。

これに対して、ヨーロッパでは、1994年に欧州連合による植物品種保護制度が樹立され、連合加盟国は自国からの出願についてUPOVに準じたDUSテストを実施し、連合内の品種保護を承認することができる。欧州連合内のDUSテストにおいては、DNAを含めた分子マーカーによる試験は使われていないが、連合は、その開発に向けた研究に資金提供を行って検討を進めている。また、UPOVでは、その組織にBiochemical and Molecular Techniques and DNA-Profiling in Particular (BMT)というワーキング・グループを2001年2月に設置して検討を進めているが、コムギについては、英国環境食糧省植物研究所が中心となって研究を行ってきている。以下、植物研究所が行った研究とその結果についてとりまとめる。

3. コムギのDUSテストにおける従来法と分子マーカー法の比較試験(実施主体: 英国環境食糧省植物研究所のR, J, Cookeら)

1) 第1期(1996年6月から2002年5月)

50個のSSR(STMS: Sequence Tagged Microsatellite Site)マーカーを導入し、コムギ40品種について、従来の形態形質に基づく方法と同様の取り扱いによりDUSテストを行って比較した。その結果、これら40品種を効率よく識別することのできるSSRマーカーを選定することができた。SSRに基づく分子マーカー法には明らかな優点が存在しているが、品種内多型の検出など、実際のDUSテストに利用するためには、現有制度との調整など、修正すべき点があると結論している(英国環境食糧省研究開発最終報告書、プロジェクト・コードVS0118)。

なお、SSR マーカーによるコムギ品種の識別能力と分析の再現性を調査するため、英国環境食糧省植物研究所は、ドイツの Institute for Plant Genetics and Crop Plant Research、フランスの Agrogene、オランダの Plant Research International と共同して、最近登録されたコムギ 502 品種をヨーロッパの 15 カ国から収集し、19 個の SSR マーカーで分析した。その結果、全品種の区別が可能であり、対照とするために重複させた品種や異なる国の研究所の間の試験結果で良好な再現性 (99.5%以上) が得られた。また、約 25%の品種においては品種内の多型が検出された。このため、SSR は多数のコムギ品種について、分子マーカーによる識別情報データベースを構築するのに適したマーカーであると結論している (Röder ら、2002)。

2) 第 2 期 (2002 年 12 月から 2003 年 8 月)

第 2 期の研究開始にあたり、前述した BMT ワーキング・グループが、分子マーカー法を UPOV のシステムに導入する際の 3 つのオプションを提言していた。オプション 1 : 形態形質と連鎖した分子マーカーを開発・利用する、オプション 2 : 既存品種の分類管理に用いる (既存品種について、従来の形態形質による分類を分子マーカーに基づく分類によって置き換える)、オプション 3 : 分子マーカーを利用して全く新たな新品種登録システムを作る。

第 1 期の研究は、結果として、オプション 3 の手法開発に関与したものであった。第 2 期には、前期に続き、SSR マーカーの選抜と最適化を進めたほか、既存の DUS データ (形態形質) による分類、第 1 期に最適化した 8 個の SSR マーカーによる分類、さらに、遺伝子領域の SSR マーカー (ヨーロッパのコムギ SSR データ・ベースのプロジェクトからの分譲) による分類をコムギ 40 品種にそれぞれ適合し、これら 3 者の結果を比較して、オプション 2 の検討を行った。分類を比較するために使った複数の方法の間では結果に矛盾がなかったものの、形態形質に基づく系統間の距離と SSR 座の類似性に基づく系統間の遺伝距離の相関は低く、SSR マーカーを既存品種の分類管理に適用するためには、さらなる研究が必要であるとの結論となった (英国環境食糧省研究開発最終報告書、プロジェクト・コード VS0131)。

4. SSR マーカーの検索

コムギの SSR については、前述の Wheat CAP など、染色体のマッピングとこれを利用したマーカー選抜の実用化に向けてのプロジェクトが進行している。SSR マーカーを効率的に見だし、また、STM 化する手法も開発されたため、多数の SSR マーカーが知られるようになっており、米国農務省が管理する下記のサイトで検索が可能である。なお、SSR マーカーを品種保護制度の新品種識別マーカーとして利用するためには、英国環境食糧省植物研究所の R. J. Cooke らが行った上述のような最適化の検討が必要であろう。

1) GrainGenes: A Database for Triticeae and Avena の Microsatellites and STS's

<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/quickquery.shtml#microsats>

2) Triticeae EST-SSR Coordination!

<http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/EST-SSR/>

5. SSR マーカーによる小麦粉混入検出方法の開発

普通コムギに存在するがマカロニ・コムギには存在しない D ゲノムに特異的な SSR マーカーを開発することで、マカロニ・コムギの小麦粉に混入していた普通コムギの小麦粉を PCR によって高感度に検出・定量できることが示された (Bryana ら、2002)。同様に、スペルト・コムギ製品への普通コムギの小麦粉混入を検出する方法も報告されている (Büreu ら、2001)。

<引用文献 (引用順) >

長尾精一編 小麦の科学、朝倉書店、1995

Kansas Agricultural Statistic Service, Wheat Variety, 2006

Skyllas *et al.*, Proteomics 1:1542-1546, 2001

Yahata *et al.*, Proteomics 5:3942-3953, 2005

Dien *et al.*, Cereal. Chem. 79:582-585, 2002

Tilley, M, Cereal. Chem. 81:44-47, 2004

Canadian Food Inspection Agency, Report of Proceedings of the Seminar on the use of Molecular Techniques for Plant Variety Protection, June 16 and 17, 2005

Röder *et al.*, Theoretical & Applied Genetics, 106:67-73, 2002

Bryana *et al.*, J. Cereal Science, 28:135-145, 2002

Büreu *et al.*, Eur. Food Res. Technol. 212:234-239, 2001

(3) オオムギの DNA 品種判別技術開発の状況

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
近畿中国四国農業研究センター
大麦・はだか麦研究チーム 柳沢貴司

はじめに

オオムギは日本国内ではビール、味噌、焼酎、麦茶、麦飯などの多様な食品の原料として用いられている。一方、海外の多くの国では飼料用を除けばほとんどがビール用として使われている。品種毎にビール醸造特性は異なり、麦芽として使用するビール麦品種の純度管理は、麦芽の品質成分と同様にビール醸造上の重要な管理項目である。したがってビール会社の中には国内、海外でも自社ビールを特徴づける原材料である大麦の品種判別について取り組みがなされている。

以前はアイソザイムや種子貯蔵タンパク質の電気泳動パターンによる品種判別が試みられてきた。例えば四半世紀前の米国中西部の六条性のビール麦は種子の形態やアイソザイムや種子貯蔵蛋白質の電気泳動パターンを用いて容易に判別できていた。しかしながら優良な系統を交配母本として極めて狭い遺伝子資源を利用して品種改良が進み、品種の近縁度が高くなってきたことから、上述した手法では判別は現在は困難である。したがって現在は最も有効な手法として DNA 多型を用いた品種判別技術の開発が進められている。

DNA マーカーの開発

DNA マーカー開発初期には RFLP マーカーや RAPD マーカーの報告が多くあった。RFLP マーカーは DNA 断片の制限酵素処理や電気泳動、サザン解析などの実験操作が必要で、煩雑なのが欠点であり、RAPD マーカーによる多型検出は、PCR のプライマーが手軽に利用できる反面、結果の再現性や安定性に欠けるという欠点があった。

現在利用価値が高いと考えられているのはゲノム中に非常に多く存在している単純反復配列 (SSR: Single Sequence Repeat) の繰り返しの差を利用した SSR マーカー (マイクロサテライトマーカー) と考えられている。これらのマーカーは染色体地図上にマッピングされて、単純反復配列の両側のプライマー配列を用いて PCR を実行すると得られる増幅産物のサイズが知られている (Saghai-marooft et al. 1994; Becher and Heun 1995; Liu et al. 1996; Struss and Plieske 1998; Ramsay et al. 2000)。

このマーカーは共優性を示すことや遺伝子座特異的であること、反復数の繰り返しの差を検出するために一つのマーカーでいくつもの多型が出現することから、多くの国や研究機関で品種判別に有効性が指摘されている。

現在、graingenes (<http://www.graingenes.org/cgi-bin/ace/search/graingenes>) などの Web 上で数百種類のマーカーが公開されているので、世界中のどの場所からでもこれを利用することが可能である。これらのマーカーを複数用いることで、多数の品種でも判別可能となっている。

北米を中心にオオムギのゲノムプロジェクトが進行しているが、ゲノムの単純反復配列 (例: AT, CCG 等) を標的とした濃縮ライブラリーや cDNA ライブラリーから見つけるこ

とができる。SSR マーカーで増幅される分子量は 100-200bp 前後が多い。電気泳動は数塩基の違いを検出できるシーケンスゲルを用いた方法の報告もあるが、汎用性を考えた場合には 2-3%アガロースゲルを用いる手法が簡便と考えられる。また DNA 抽出にはキット化されたものなどなるべく簡易な手法が良く、マニュアル化された手法で精度を高めるといった技術開発が望まれる状況である。

また一塩基多型 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) を用いたマーカーの開発も進んでいる。SNP を利用したマーカーには、増幅産物の内部の制限酵素認識部位の有無で判別を行う CAPS マーカーやその応用方法である dCAPS マーカーが利用できる。またこれらのマーカーを利用して定量的 PCR といった手法により品種の混入比率を判定できる可能性があり、これからの開発が期待されている。現在、SNP のデータベースは Web 上で公開されている。(http://bioinf.scri.sari.ac.uk/barley_snpdb/index.html) またこれに関しては Pyrosequencing 法による品種判別の試みがなされている (Pacey-Miller and Henry 2003)。また変性濃度勾配ゲル電気泳動を用いた RAPD 解析が、予算の少ない研究室には向くという報告がある (Bahieldin et al. 2006)。PCR を基本とした技術に比べて実験操作に習熟度が必要であるが、今後の技術開発が期待される分野である。

品種の中には突然変異に由来する品種や特定の形質を付与するために戻し交雑を繰り返した品種 (従属品種) がある場合、SSR マーカーでは判別できない可能性もある。これについては SNP による判別やゲノム中の塩基の欠失や挿入 (in/del) を利用したマーカーによってのみ原品種と判別可能となるので、SSR マーカーだけに全面的に頼るわけにはいかない場面が出てくるであろう。

品種判別の状況

先に述べたように SSR マーカーは PCR の装置とプライマーおよび PCR 用のキットさえあればどの研究機関でもすぐに利用可能であるので、手にある材料をすぐに解析することが可能である。日本国内では二条オオムギの CAPS マーカー (9 種類のマーカーと 6 種類の制限酵素の組み合わせ) により国内の 22 品種と海外の 2 品種を判別したという報告がある (Ucimura et al.2004)。また 18 品種を 5 種類の SSR マーカーのみで判別したという報告がある (Turuspekov et al 2001)。CAPS マーカーは PCR での増幅産物を制限酵素処理を行う必要があるために SSR マーカーより操作が煩雑となる欠点がある。

海外での状況であるが、カナダの六条性のビール麦は以前はすべて穀粒の糊粉層が青色を呈していたために他国産のビール麦と判別が容易であった。しかし現在ではそのような見目で判別できる指標がなくなったために、カナダ穀物局の穀物研究所では品種判別技術開発がなされており、8 種類の SSR マーカーにより、2003 年時点で登録されている二条性の 67 の品種すべてを判別可能であり、六条性についてはビール麦 17 品種はそれぞれがすべて判別可能であり、非ビール麦の 85 品種とも判別可能という報告がある。

([http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/fcd7439?opendocument#top](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/fcd7439?opendocument#top))

イギリスでは 29 の SSR マーカーを用いて 134 品種中 116 品種が判別可能であったという報告がある (Southworth et al. 2004)。オーストラリアでは 17 の SSR マーカーを用いて 180 の品種のうち 90%以上の品種判別が可能であったという報告がある(<http://www.regional.org.au/au/abts/1999/holton.htm>)。またオオムギの中で皮が容易にはずれ、食用での利用があ

る裸麦の遺伝資源がチベットでは豊富にあり、これらの品種判別の試みが中国でなされている (Yu et al. 2002)。このように大学や行政機関の研究所が中心となって判別技術の開発とその実証性の解析が進められている。

国内では 15 種類のオオムギの品種判別を請け負う会社が営業している。海外ではオオムギ品種の開発は大学や企業が担っているところがある。ビール会社、製麦会社では麦芽品質に加えて、上述したマーカーを用いて扱う品種の情報を解析しているが、どの程度有して、どのように使っているかは不明である。

ゲノムのシンテニーを考慮した場合、イネやコムギのゲノムプロジェクトで開発されたマーカーの利用も可能であるが、信頼性、再現性という観点から品種判別という目的からすればオオムギで開発されたマーカーを利用するのが望ましいと考えられる。

葉などの新鮮な植物体からの DNA 抽出方法は確立されており、PCR を基本としたマーカーを増やすことで判別する品種が増えてもその対応は可能と考えられる。現在、筆者らは加工品由来の DNA を判別する技術開発を進めているが、加工食品だと味噌であれば発酵工程、麦茶であれば焙煎工程、麦飯であれば圧扁工程を経るために DNA の断片化や消失が起きていると考えられており、増幅効率を考慮して増幅配列を 150bp 以下の短いサイズとすべきことや、DNA の抽出時になるべく損傷を与えない方法を取るなどの工夫が必要であり、これから技術を確立していく必要がある分野である。

また品種間差を検出するのに SSR マーカーは有効であるが、その基となる単純反復配列の反復単位の繰り返しの数の差は変異が起こりやすいことも指摘されている。自殖性作物であっても世代を進めていくうちに品種内の個体差が出現する可能性も否めない。したがって複数のマーカーを用意してチェックしておく必要がある。

将来の展望

筆者の知る範囲ではオオムギにおいて育成権を侵害した事例はないが、こういった技術開発が進むことにより、意図的な品種の混入や偽装表示などの不法行為の抑止力となると考えられている。

現在、国内でも海外でも品種を登録する際に表現形質での判別が行われており、品種の均一性、他品種との識別性は登録要件の重要な項目である。品種の登録に必須である品種の識別性について、これからますます品種の近縁度が高まり、優良系統のゲノムを一部を置き換えて耐病性等を付与した品種が多く現れると考えられる。こうした品種の識別性には今までの表現型の判別だけでは困難であるため、DNA 情報を登録する必要は出てくるのではないかと考えられる。この際に判別に簡便性や迅速性が求められること、また品種での差は出現するが、品種内の個体での差が均一であることが求められるために DNA マーカーの開発はさらに重要になると考えられる。

<参考文献>

- Becher and Heun (1995) Barley microsatellites: allele variation and mapping . Plant Mol. Biol. 27:835-845
- Bahieldin et al. (2006) DGGE-RAPD analysis as a useful tool for cultivar identification. African Journal of Biotechnology 5:566-569

- Liu et al. (1996) Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 93:869-876.
- Pacey-Miller and Henry (2003) Single-nucleotide polymorphism detection in plants using a single-stranded pyrosequencing protocol with a universal biotinylated primer. *Analytical Biochemistry* 317:165-170.
- Ramsay et al. (2000) A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics* 254: 330-336
- Saghai-marooft et al. (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosome locations, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 91:5466-5470.
- Southworth et al. (2004) Differentiation of UK barley varieties using microsatellite markers. *Proceedings of 9th International Barley Genetics Symposium* 123-130.
- Struss and Plieske (1998) The use of microsatellite markers for the detection of genetic diversity in barley populations. *Theor. Appl. Genet.* 97:308-315.
- Turuspekov et al. (2001) Genetic diversity of Japanese barley cultivars based on SSR analysis. *Breeding Sci.* 51:215-218
- Uchimura et al. (2004) Identification of Japanese two-rowed barley cultivars by DNA markers. *Jpn. Crop Sci.* 73:35-41 (in Japanese)
- Yu et al. (2002) RAPD markers in diversity detection and variety identification of Tibetan hullless barley. *Plant Molecular Biology Reporter* 20:369-377.

5) マメ類

(1) ダイズの DNA 品種識別技術の開発状況

千葉大学 園芸学部 特命教授 原田久也

ダイズ (*Glycine max*) はマメ科、ダイズ属、*Soja* 亜属に分類される栽培植物である。もともと中国、日本、インドネシアなどのアジアの限られた地域で主に栽培されていたが、1900 年頃から米国で油糧作物として栽培されて以来、南米、タイ、インド、アフリカ諸国でも栽培されるようになり、トウモロコシ、コムギ、イネについて生産量の多い作物となった。世界的には油脂源と飼料としての利用が多いが、アジアでは伝統的な食品に加工され、主食のイネと共に最も重要な作物である。最近では良質なタンパク質が種々の食品の素材として利用され、未熟種子（エダマメ、ムキマメ）の利用も世界的な広がりを見せている。米国、南米のダイズはほとんどが組換え体であるのも大きな特徴である。輸出国である米国やブラジル、日本と同様に国内生産を行いながら輸入している韓国、エダマメ品種の栽培の多い台湾、最近急速に輸入が増えている中国について DNA 品種識別技術の開発状況を調査した。

1) 育成者権の侵害事例

我が国では特定の種苗会社が開発したエダマメ品種のコピーと思われるものが見出されていた。また台湾や中国から輸入されている冷凍エダマメの中には日本の品種を持ち出して増殖したものが多く使われていた。しかし育成者権の侵害として取り上げられたことはない。最近では台湾政府が自国の開発したエダマメ品種が海外に流出していることを懸念し始めている。

2) 国内での技術開発状況

川井ら (2001) は千葉大学で開発した 6 種の SSR マーカーによりダイズ 24 品種の識別が可能であることを示した。北海道立中央農業試験場では USDA の 4 種の SSR マーカーにより 16 品種が識別可能であったことを報告している (2002 年作成成績概要書)。種苗管理センターの小曾納と伴 (2004) は USDA の開発した SSR マーカー 7 種によりエダマメ用登録品種 14 品種、冷凍エダマメ 9 サンプルのうち、19 種について識別が可能であったこと、登録品種は 4 種類の SSR マーカーで識別できたことを報告している。国内ではエダマメのブランド化が進んでいるが、山形大学の泉館と阿部 (2006) は山形県で栽培されているダダチャマメ系統を中心にした 11 品種のうち、7 品種は千葉大学が開発した 4 種の SSR マーカーで識別が可能であることを示した。煮豆、エダマメとして需要の多い丹波黒系統についても小坂 (2004) が加工品を含めて SSR マーカーによる識別を報告している。それによると USDA の 30 種類の SSR マーカーを用いて、丹波黒標準系統は 4 グループに分類されている。福田等 (2006) はエンレイ、オオツル種子の純度管理のため、SSR マーカーの選抜を行い、千葉大学が開発したひとつの SSR マーカーで 10 粒に 1 粒までの混入の検出が可能であったと報告している。

3) 海外での技術開発状況

① 開発の背景

アメリカでは限られた遺伝資源から品種開発が行なわれているため、品種登録の際の基本的な形質調査だけでは新規性を確認できない場合が増えて来ている。その場合区別出来ない登録品種と比較するための新たな生育調査が必要になるが、DNA マーカーを用いてあらかじめ識別を行うことにより、比較する品種数を減らしたり、新たな生育調査を行わないで済ませることが出来る。そのため、アメリカ農務省の Plant Variety Protection Office での新規性確認のための調査項目には、形態的特性、病害抵抗性、ダイズシストセンチュウ抵抗性、土壌中の成分に対する生理反応、虫害抵抗性、除草剤抵抗性、導入遺伝子の構造（ベクターの種類と構成、導入遺伝子）、に加えて遺伝的マーカーがある。遺伝的マーカーの中には、アイソザイム、RFLP マーカー、SSR マーカーがあるが、最近では SNP マーカーも検討されている。

中国ではダイズ、ツルマメについて多数の遺伝資源を保有しているため、DNA マーカーを用いた遺伝資源の分類については多くの研究があるが、育成者権保護のための DNA マーカーの開発についての研究は極めて少ない。

韓国では国内産のダイズと中国、アメリカからの輸入ダイズで価格に大きな違いがあるため、品種識別のための DNA マーカー開発が国立研究機関で行なわれている。主に SSR マーカーが用いられているが、SNP マーカーの開発も検討されている。

台湾では高雄地区農業改良場、台南地区農業改良場で開発したエダマメ新品種の登録に際して inter-SSR マーカーが用いられている。台湾政府は最近、自国が開発したエダマメの新品種が海外に流出することに注意するようになっており、その点からも品種識別のための DNA マーカー開発を支援していると考えられる。

ブラジルの農牧供給省品種保護部局の回答では、品種保護を目的とした DNA マーカーの開発は行なわれていないようである。

② 開発機関・研究者

アメリカでは USDA-ARS の Soybean Genomics and Improvement Laboratory の Perry B. Cregan 博士を中心に品種識別のための DNA マーカーの開発が行なわれている。

中国では吉林省農業科学院で、DNA フィンガープリントによる品種識別の報告があるが、国の機関では今のところ、DNA マーカーによる品種識別技術は行なわれていない。

韓国では National Institute of Agricultural Biotechnology、農村振興庁 (RDA) の Institute of Crop Science、Gene Bank で DNA マーカーの開発が行なわれている。

台湾では国立台湾大学の Shun-Fu Lin (林 順福) 博士が品種識別のための DNA マーカーの開発を行なっている。

ブラジルでは EMBRAPA-Cenargen の Dario Gratapaglia 博士が DNA シーケンサーを用いた遺伝子型の解析を行なっているが、品種識別のための DNA マーカー開発は行なわれていないようである。

③ 用いられている技術の種類、改良状況、新技術

アメリカ農務省の Perry B. Cregan 博士のグループ (1999) は 3 塩基をコアとする 48 の SSR マーカーから品種識別に適したものを選び出すための解析を行なった。アメリカ品種のもとになっている 35 の祖先品種と 66 の優良品種の遺伝子型を DNA シーケンサーで決定して、どの 2 つの座位についてもアリアルサイズの範囲が重ならないこと、各座位のアリアルサイズの差異が 3 塩基以上であることを条件として、まず 30 の SSR が選び出された。次に 66 の優良品種のデータから、30 の SSR 間の距離を計算してクラスター解析を行い、66 品種について特異的なアリアルサイズパターンを示すこと、1~2 枚のゲルで容易に解析できること、なるべく多くの連鎖群に属することを考慮して 13 の SSR を選択した。それらは 20 連鎖群のうち、12 連鎖群からのものであった。最近彼らは 13 の SSR マーカーに代わるものとして、19 の連鎖群にある 23 の SNP マーカーを新たに提案している (Yoon 等 2007)。

中国吉林省農業科学院では吉林省の 64 品種を識別するために 140 のプライマーペアから 3 つの RAPD マーカーを選択した (Zhao 等 2000)。

韓国では非常に多型性の高い SSR マーカーの探索を行っており、少数のマーカーで韓国の約 90 品種の識別を行なおうとしている。また SNP マーカーの開発も予定している。

台湾では 12 のコアプライマーを用いて 25 の inter-SSR マーカーをエダマメ品種の識別のために開発した。

④ マーカー数、識別可能な品種数

アメリカ農務省の Perry B. Cregan 博士のグループ (1999) は選択した 13 の SSR マーカーの有効性を確かめるために、形態的、器官の色調、伸育性が類似している品種を 4 つの成熟群から新たに 36 品種 (I から 10 品種、II から 7 品種、IV から 10 品種、VI から 9 品種) 選び、解析を行なった (Song 等 1999)。その結果すべての品種の識別が可能であった。従ってこの 13 の SSR マーカーで少なくとも 137 品種の識別が可能であることがわかる。

中国吉林省で開発された 3 つの RAPD マーカーで吉林省の 60 品種の識別が可能であると報告されている (Zhao 等 2000)。

韓国では 5 つの SSR マーカーだけで、1913 以来開発された韓国の品種の 90% が識別可能であったらしい (投稿中)。この論文は未だ発表されていない。用いられた非常に多型性が高い SSR マーカーがどのような構造をしているか興味のあるところである。

⑤ ゲノム研究との関連、シンテニーの利用

ダイズはゲノムサイズが比較的大きく (1.12×10^9 bp)、反復した領域がゲノム中に散在して複雑なゲノム構造をしていること、染色体数が多い、塩基配列の多型性が低いなどの理由で、主要作物の中ではゲノム研究が遅れていた。ダイズでは RFLP マーカー、SSR マーカー、AFLP マーカーが主に開発されている。ダイズでも SSR マーカーがかなりの多型を示すことが、Akkaya 等 (1992)、Morgante and Olivieri (1993)、Rongwen 等 (1995)、Maughan 等 (1995) により報告された。Dwian and Cregan (1997) はアメリカのダイズ品種識別に有効な 20 の SSR マーカーについて述べている。また彼等は 3 色の蛍光色素でラベルしたプライマーを用いたマルチプレックス PCR を行い、品種識別に有効である

ことを示した。現在ではダイズの SSR マーカーはかなりの数に達している。USDA ではゲノムから約 2000、かずさ DNA 研究所では EST から約 7000、千葉大学ではゲノムと EST から約 1400 の SSR マーカーを開発している。最近 Southern Illinois University の D.A. Lightfoot 博士のグループは BAC の末端配列から 853 の SSR マーカーを作出した(投稿中)。その他 EST や RFLP マーカー、AFLP マーカー、BAC クローンの末端配列から STS 化された DNA マーカーが多数開発されている。アメリカ農務省では約 2000 のマーカーから成る統合連鎖地図を作成している (Song 等 2004)。千葉大学でもマーカー数約 1300 の連鎖地図を作成した(未発表)。また最近 Perry B. Cregan 博士のグループは SNP を利用して、1183 の遺伝子と 250 の BAC クローンを位置づけた地図を作成した(未発表)。既に 962 の QTL (量的形質遺伝子座) を含む多数の農業形質遺伝子座が位置づけられていて、それらの形質を選抜するために多くの DNA マーカーが開発されている。ダイズは公的データベースに 35 万以上の EST 情報があり、理化学研究所ではダイズの完全長 cDNA ライブラリーを作製しており、独立した約 16000 クローンの末端塩基配列が決定されている。これらの情報から遺伝子特異的な DNA マーカーを新たに作出することが可能である。一方遺伝資源の遺伝的多様性の解析と分類については、RAPD、AFLP、SSR マーカーが利用した多くの論文が発表されている。従って現在ダイズで利用できる DNA マーカーはかなりの数に及び、今後も増加することが期待される。特にアメリカエネルギー省と農務省が 2006 年からダイズゲノム塩基配列解読(対象は Williams 82)を開始しており、農林水産省は 2007 年度にダイズゲノム塩基配列解読(対象はエンレイ)を含むプロジェクトを開始することは確かであるので、DNA マーカーを作出するために利用できる情報は飛躍的に増加すると考えられる。これらの DNA マーカーの中からダイズの品種識別に適したマーカーのセットを選択する基準を確立することが必要である。

マメ科のモデル植物として、日本が中心となっているミヤコグサ (*Lotus japonicus*) とアメリカ、フランスが強く支援しているタルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) がある。いずれも遺伝子領域の塩基配列解読が進んでいて、ダイズとのシンテニーがあるので、その情報を DNA マーカーの作出に利用することが出来る。千葉大学とかずさ DNA 研究所は協力してダイズとミヤコグサのマクロ、マイクロシンテニーの解析を行なっている。それによると、ミヤコグサ染色体上の特定の領域に着目すると、ダイズ染色体の複数の領域とマクロシンテニーが存在する。このシンテニーブロックは短く分断されていて、極めて複雑である。しかし特定の形質遺伝子近傍の塩基配列を比較すると、遺伝子の並び方と各遺伝子の向きを含めてマイクロシンテニーは高く保存されている。そのため、ダイズの形質遺伝子の近傍に DNA マーカーを作出するためにミヤコグサの塩基配列情報を利用することが出来る。それは主に選抜マーカーとして用いられるが、品種識別のためにも利用することが可能である。

⑥ 技術開発の課題と問題点、方向性

多数の DNA マーカーの中から品種識別に適したものを選択して、国際標準を確立することが課題である。ゲノム上で独立に遺伝する領域にあり、多型性が高いものが望ましい。それを満たすものは、SSR マーカー、SNP マーカーが主要なものになると考えられる。前者は非常に多型性が高いものがあるが、変異を起こし易い。Perry B. Cregan 博士ら

(1997、1999) は減数分裂当たり約 2×10^{-4} の割合で新しいアレルが生じると推定している。そのため特定の品種の遺伝子型を決定する場合は 1 個体からではなく、30-50 個体からのバルク DNA を用いることを推奨している。後者はアレルの数は SSR よりも一般に少ないが、遺伝子型の同定が自動化できる利点がある。表現形質と対応する遺伝子構造の関係がわかって来ると、形質の評価が遺伝子の SNP で精密に行なうことが出来るようになる予想される。

⑦ 行政面での技術開発に関する取組み、業界・民間企業のマーカー技術の戦略

アメリカ、韓国、台湾は公的機関が積極的に DNA マーカー技術の開発を行なっている。中国、ブラジルでは未だ手をつけていないがその必要性は認識している。民間企業からは情報を得ることが出来なかった。組換え体以外の品種については、DNA マーカーを開発していると思われるが、マーカーや手法についてはすべて秘密事項として取り扱われている。

<引用文献>

1. 川井 尚・Khawaja G. Hossain・石川恵子・木庭卓人・原田久也 (2001) ダイズにおけるマイクロサテライトマーカーの開発と多様性の解析 育種選抜のための DNA マーカーの開発 (平成 9 年~平成 12 年度科学研究費補助金 (基盤研究(A)(2)) 研究成果報告書) 27-76
2. 小曾納雅則・伴 義之 (2004) DNA マーカー (SSR マーカー) を利用したダイズ品種 (エダマメ用) および輸入加工品の品種識別 農業および園芸 79 : 190-193
3. 泉館 聡・阿部利徳 (2006) SSR マーカーによるエダマメ用ダイズ品種の判別 育種学研究 8 (別 1) : 266
4. 小坂英樹 (2004) 丹波黒およびその加工品の SSR 分析 第 10 回豆類利用研究会 8-14
5. 福田真紀子・蛭谷武志・宝田 研・小島洋一郎・表野元保・船根政治 (2006) DNA マーカーを用いたダイズの品種判別 北陸作物学会報 第 42 号 (別号) : 2
6. Q.J. Song, C.V. Quigley, R.L. Nelson, T.E. Carter, H.R. Boerma, J.L. Strachan and P.B. Cregan (1999) A selected set of trinucleotide simple sequence repeat markers for soybean cultivar identification. *Plant Varieties and Seeds* 12: 207-220
7. M. S. Yoon, Q. J. Song, I. Y. Choi, J. E. Specht, D. L. Hyten, P. B. Cregan (2007) BARCSoySNP23 : a panel of 23 selected SNPs for soybean cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics* 2007 Jan. 12
8. H. Zhao, Q. Li, Y. Wang, M. Zhang and B. Zhuang (2000) DNA fingerprint of the main parents and current varieties of soybean in Jilin province. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences* 22: 12-16
9. M.S. Akkaya, A.A. Bhagwat and P.B. Cregan (1992) Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132: 1131-1139
10. M. Morgante and A. M. Olivieri (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* 3: 175-182
11. J. Rongwen, M.S. Akkaya, U. Lavi and P.B. Cregan (1995) The use of microsatellite DNA

- markers for soybean genotype identification. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 43-48
12. P.J. Maughan, M.A. Saghai Maroof and R.G. Buss (1995) Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome* 38: 715-723
 13. Q.J. Song, L.F. Marek, R.C. Shoemaker, K.G. Lark, V.C. Concibido, X. Delanny, J.E. Specht and P.B. Cregan (2004) A new integrated linkage map of the soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 109 :122-128

(2) インゲンマメの DNA 品種識別技術の開発状況

北海道立中央農業試験場
企画情報室 紙谷元一

1. 我が国におけるインゲンマメの需給状況と育成者権の侵害事例

インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) の原産地は中南米とされ、16世紀頃にヨーロッパで栽培が始まり、現在では世界各地で栽培されている。我が国では北海道がインゲンマメの主産地となっており、2005年度の国内生産量は25,700 t、その内24,600 t (95.7%)を北海道で生産している。海外からの輸入量は44,900 tで消費量は68,900 tであった(日本豆類基金協会 2006)。

北海道で栽培されているインゲンマメの内、白インゲンマメの手亡は一般に大手亡と呼ばれ、白餡の原料として北海道の特産品になっている。栽培されている品種は主に「姫手亡」及び「雪手亡」の2品種で、「雪手亡」は平成4年に育成された登録品種であり、育成者権は北海道が所有している。従来、海外では手亡に相当するインゲンマメの生産はなく、同じインゲンマメの「GREAT NORTHERN BEAN」や「PEA BEAN」、またはライマメ (*Phaseolus lunatus* L.) の「BUTTER BEAN」や「BABY LIMA BEAN」等が輸入され、白餡原料として利用されている。

北海道における手亡の作付面積は4,000~6,000haを維持していたが、1997年以降OTEBO(大手亡)と称する海外産豆の輸入が急増し、北海道の作付面積は半減した(図1)。北海道立中央農業試験場では豆類の品種判別法の開発を行い、輸入大手亡の検定を行った結果、輸入大手亡は北海道で栽培されている品種と同じ「姫手亡」または「雪手亡」であることが明らかとなった(図2、紙谷ら2002)。「雪手亡」は北海道が育成者権を持つ登録品種であり、無断で種子を海外に持ち出し、生産して輸入することは種苗法に違反する。このため、北海道は豆類の輸入業界に申し入れを行い、協会として違法輸入が行われないよう自主検査を実施することとなった。

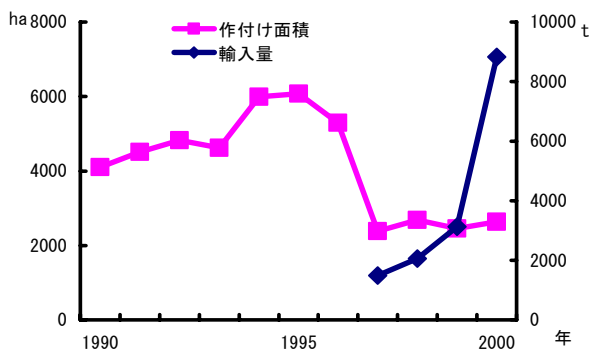


図1 北海道の手亡作付面積と大手亡の輸入量

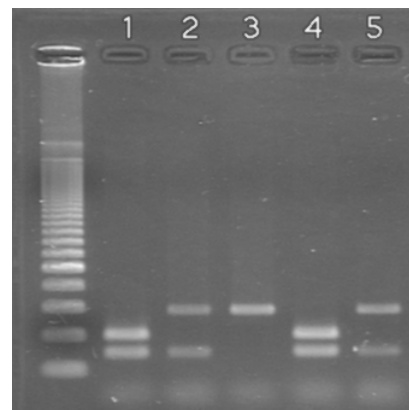


図2 輸入大手亡の検定結果

SP01+SP02のマルチプレックスPCR、1：雪手亡、2：姫手亡、3：銀手亡、4：輸入大手亡-1(雪手亡)、5：輸入大手亡-2(姫手亡)

2. インゲンマメ DNA 品種識別技術の国内における開発状況

1) 開発機関・研究者

前述の大手亡の輸入増加に対応して、北海道立中央農業試験場では道費課題「遺伝子診断による豆類の品種判別法の確立（1999～2001年度）」を実施し、豆類の DNA 品種判別技術を開発した、担当者は以下の3名である（表1）。

表1 試験担当者（所属、職名は担当時）

| 所 属 | 職 名 | 氏 名 |
|-------------------|---------|-------|
| 北海道立中央農業試験場 農産工学部 | 主任研究員 | 紙谷 元一 |
| | 遺伝子工学科長 | 竹内 徹 |
| | 研究職員 | 楠目 俊三 |

2) 用いられている技術の種類、改良状況等

試験開始当初、インゲンマメに関する塩基配列情報が少なかったため、ランダムプライマーによる品種間多型の探索を行い、8個の RAPD マーカーを選抜した（表2）。しかし、RAPD マーカーは再現性に劣り、また多型断片の特定に熟練を要するため、識別性の高い3種を STS 化した（表3）。その結果、手亡の登録品種「雪手亡」と既存の手亡品種や白餡原料として輸入される海外産の白インゲンマメとの識別が可能であった（表4）。

表2 判別用 RAPD マーカー

| プライマー | 塩基配列 | 多型断片 (bp) |
|--------|------------|-----------|
| ubc105 | CTCGGGTGGG | 1000 |
| ubc157 | CGTGGGCAGG | 500 |
| ubc218 | CTCAGCCCAG | 1500 |
| ubc245 | CGCGTGCCAG | 500 |
| ubc276 | AGGATCAAGC | 1300 |
| ubc289 | ATCAAGCTGC | 1900 |
| ubc355 | GTATGGGGCT | 1200 |
| ubc375 | CCGGACACGA | 1200 |

表3 RAPD マーカーの STS 化

| マーカー | RAPD 断片 | STS プライマーの塩基配列 |
|------|-------------|---|
| SP01 | ubc218-1500 | CTCAACGGATGCAAACACTTG CTCCATTTGGAAGACTAGAC |
| SP02 | ubc375-1200 | ACGAGGCACCACATTTAATG ATGTAGTGGTGAAAGACATAC |
| SP03 | ubc289-1900 | TGAGTGTCTACGCTCGATG ACCAAACGCAGCTAGCTG |

表4 RAPD-STS マーカーによる判別

| 品種・銘柄名 | SP01 | SP02 | SP02 | SP03 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------------|
| | 290bp | 390bp | 560bp | 800bp 450bp |
| 雪手亡 | + | + | - | - + |
| 姫手亡 | + | - | + | - + |
| 銀手亡 | - | - | + | - - |
| GREAT NORTHERN BEAN | - | - | + | + - |
| PEA BEAN | - | - | + | + + |
| 小白芸豆 | - | + | - | - - |
| 大白芸豆 | - | - | - | - - |
| BABY LIMA BEAN | - | - | - | - - |
| BUTTER BEAN | - | - | - | - - |

3) マーカー数、識別可能な品種数等

3種のRAPD-STSマーカーで海外産白インゲンマメ遺伝資源98点を検定した結果、登録品種「雪手亡」と同じ遺伝子型を示す遺伝資源が3点認められた。しかしこれらの遺伝資源はいずれも粒大が小さく、子実の外観形質で「雪手亡」との識別が可能であり、またRAPDマーカーを用いることでも「雪手亡」との識別が可能であった(表5)。

表5 海外産遺伝資源の検定結果

| 品種名 | 百粒重 (g) | SP01 290bp | SP02 390bp | SP02 560bp | SP02 800bp | SP03 450bp | ucb105 1000bp | ucb355 1200bp |
|-------------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------------|------------------|
| 雪手亡 | 32.7 | + | + | - | - | + | + | + |
| 姫手亡 | 32.7 | + | - | + | - | + | + | - |
| Pearl Bean | 17.2 | + | + | - | - | + | - | - |
| Michigan Pea Bean | 20.2 | + | + | - | - | + | - | - |
| Merton | 18.7 | + | + | - | - | + | - | - |
| 遺伝資源98点中の増幅点数 | | 15 | 38 | 55 | 7 | 63 | 34 | 11 |

手亡と同時に小豆の品種判別用STSプライマー3種も開発した。これらのSTSプライマーは特許出願中であり(特願2002-171417)、北海道システムサイエンス株式会社から販売されている。本法(紙谷ら2004)による品種判別法をマニュアル化し、農林水産省種苗課のホームページ(<http://www.hinsyu.maff.go.jp/>)に公開した。また、民間企業においても本法による品種判別の検査が受託されている。

国内で、大豆に関しては(独)種苗管理センターや(株)フジッコにおいて、SSRマーカーによる品種判別の報告があるが、インゲンマメに関する報告は他に認められない。

3. 海外における品種識別技術の開発状況

インゲンマメの遺伝子解析等に関しては、カリフォルニア大、フロリダ大、パリ大等で連鎖地図が作製され、それらの統合が進められている(Freyreら1998)。これらのマップはRFLP及びRAPDマーカーによるが、新たにSSRマーカーの開発も進められている(Yuら2000)。しかし、これらマーカーを利用した品種判別に関する報告は知られていない。

北海道立中央農業試験場ではYuらの報告したSSRマーカーを用い、インゲンマメ品種判別の検討を進めている。

<引用文献等>

Freyreら(1998) Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core

linkage map and alignment of RFLP maps. *Theor Appl Genet* 97: 845-856

紙谷ら(2002) DNA多型による輸入大手亡の品種判別. *北農* 69: 323-326

紙谷ら(2004) DNA多型による白インゲンマメ品種「雪手亡」の識別. *育種学研究* 6: 29-32

日本豆類基金協会(2006) 雑豆に関する資料

Yuら(2000) Integration of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Into a Molecular Linkage Map of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *The Journal of Heredity* 91: 429-434

(3) アズキの DNA 品種識別技術の開発状況

千葉大学 園芸学部 特命教授 原田久也

アズキ (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi) はもともと日本、中国、朝鮮半島、台湾で栽培されていたが、その祖先野生種ヤブツルアズキ (*Vigna angularis* var. *nipponesis* (Ohwi) Ohwi & Ohashi) はネパール、ブータン、インドヒマラヤ、ミャンマー北部、中国、台湾、朝鮮半島、日本まで分布している。日本ではヤブツルアズキの他にアズキとヤブツルアズキの中間的生育特性を示す雑草アズキが広く分布している。現在アズキは北アメリカ、アルゼンチン、オーストラリアでも栽培されており、日本は国内生産の方が多いが、中国、アメリカ、カナダ、アルゼンチン、オーストラリア、タイ、北朝鮮から輸入している。栽培種の成立過程を DNA 多型分析により探る研究は RAPD 法、AFLP 法を中心に大変多いがアズキの品種識別に関する研究は極めて少ない。Wan ら (2004) は SSR マーカーを 401 種開発しているが、アズキの DNA マーカーは十分とは言えない状況である。岡山大学のレトロトランスポゾンを利用した DNA マーカーは品種識別には有効であると期待される。

1) 育成者権の侵害事例

海外に流出した北海道の優良なアズキ育成品種が海外品種に混ざって輸入されていた。

2) 国内での技術開発状況

道立中央農試では北海道のアズキ品種「エリモショウズ」、「きたのおとめ」、「しゅまり」を輸入される中国品種と判別するための RAPD-STC マーカーを 3 種を開発して民間企業より販売している。農業生物資源研究所では「きたのおとめ」、「しゅまり」と海外の在来品種との識別に利用できる SSR マーカーを 5 種類選出された。また 2 種類のマルチプレックス PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析することにより、国産優良品種が識別できる条件を決定した。さらに蛍光シークエンサーにより、国産加糖餡の原材料の特定に成功した。

3) 海外での技術開発状況

① 開発機関・研究者

中国農業科学院作物品種資源研究所の Zong Xu-xiao ら (2003) はアズキとアズキの祖先種ヤブツルアズキを含めた識別を行なった。

国立台湾大学の Shu-Fu Lin 博士はアズキの品種識別を行なっており、高雄地区農業改良場、台南地区農業改良場で開発したアズキの新品種登録に役立てている。

② 用いられている技術の種類、改良状況、新技術

中国農業科学院作物品種資源研究所では AFLP マーカーによりアズキとツルアズキを含めたアクセッションの識別を行なった。

国立台湾大学では inter-SSR マーカーを開発している。

③ マーカー数、識別可能な品種数

中国農業科学院作物品種資源研究所では 12 のプライマーペア (313 の多型バンド) を用いた AFLP 法により、146 のアクセッションのうち、143 を識別することが出来た。国立台湾大学では 7 個の inter-SSR マーカーが開発されているがその詳細は公表されていない。

<引用文献>

- X. W. Wang, A. Koga, N. Tomooka, D. A. Vaughan (2004) The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in azuki bean (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi). *Theor. Appl. Genet.* 109: 352-360
- X. Zong, D. Vaughan, N. Tomooka, A. Kaga, X. Wang, J. Guan, S. Wang (2003) Preliminary study on geographical distribution and evolutionary relationships between cultivated and wild adzuki bean (*Vigna angularis* var. *angularis* and var. *nipponensis*) by AFLP analysis. *Scientia Agricultura Sinica* 36: 367-374

(4) ダイズ分子細胞生物学会報告

千葉大学 園芸学部 特任教員 坪倉康隆

本学会について

ダイズ分子細胞生物学会（英題：Molecular and Cellular Biology of the Soybean）はアメリカ合衆国で隔年開催されており、今回はその11回目となる。今年の幹事校はネブラスカ大学リンカーン校で、ネブラスカ州の州都であるリンカーンが開催地であった。ネブラスカ州はアメリカ北中部に広がる主要なダイズ生産地の一つであり、本学会開催に当たってはネブラスカダイズ評議会（Nebraska Soybean Board）からもサポートを受けている。参加者はアメリカのみならず、カナダ、ブラジルそして、アジアからは日本、中国、韓国、と世界中からダイズを研究対象とする研究者、育種家等が大学、公的研究機関、民間企業（Dupont、Monsanto、Syngenta等）から参加し、総勢209名（事前登録者数）、一つの作物を対象とした分子細胞生物学会としては非常に大きな規模となっている。世界中の研究者が一堂に会する本学会は、様々な立場からの意見・情報を一カ所で得ることができる点で効率的である反面、行政関係者等、学術関係者以外の参加はほとんどなく、そのような方々からの意見をいただくには至らなかった。発表は口頭発表が48題、ポスター発表が87題であり。その細目は以下の通りであった。

| Subjects | Oral | Poster |
|--------------------------------|------|--------|
| Abiotic Stress | 7 | 3 |
| Biotic Stress | 7 | 14 |
| Metabolic Engineering | 7 | 4 |
| Molecular Breeding | 7 | 21 |
| Nutritional Genomics | 6 | 1 |
| Structural/Functional Genomics | 7 | 43 |
| Others | 7 | 1 |
| Total | 48 | 87 |

不良環境耐性や病虫害抵抗性といった典型的な育種学的研究に加えて、脂肪酸組成の改変や、イソフラボン、トコフェロールといった機能性成分の発現量を向上し、健康面での優位性を高めた品種の育成も盛んに行われていた。またバイオマス作物としてのダイズの利用についても多くの研究発表があった。新品種の育成に当たっては、マーカー選抜育種のほか、パーティクルボンバードメント法を用いた遺伝子導入法も頻繁に利用されており、本学会ではDHA、EPA産生、除草剤耐性等多くの形質転換体作出の報告があった。

口頭発表

Session: Molecular Breeding

Marker-Assisted Selection and Its Contribution to Soybean Product Development...

Glancing Back, Look Forward

Daria H. Schmidt and D. J Cahill

Pioneer Hi-Bred, International, A Dupont Company, Johnston, IA, 50131

病害抵抗性に連鎖する DNA マーカーを利用して、従来の育種法に比べ低コスト短期間での新品種作出に成功しているという発表内容であった。マーカーを利用する事で抵抗性の検定をする回数を大幅に減らすことができるうえに、取り扱う集団の規模も小さくて済む、また同時に複数の遺伝子座にある抵抗性遺伝子を効率的に評価する事ができるという点も大きなメリットである。こうしてシスト線虫抵抗性品種が作出された。Pioneer Hi-Bred 社では 10 年以上前からダイズの新品種作出に DNA マーカーを利用しており、マーカー選抜育種は、育種効率を向上し高付加価値品種の作出を加速し、Pioneer Hi-Bred 社の市場でのシェア拡大に貢献しているとまとめていた。近年ダイズの形質転換が一般的な技術として定着しつつあるが、量的形質や遺伝子の単離されていない形質、評価が容易でない形質などの育種には DNA マーカーが活用されており、Pioneer Hi-Bred 社のような大企業でも形質転換ばかりではなく、マーカー選抜育種も精力的に行っている。

ポスター発表

Session: Genomics/Functional Genomics, 発表番号 1 1

SNP Discovery in Soybean Genes and BAC-end Sequence

I.-Y. Choi¹, D.L. Hyten¹, L.K. Matukumalli², S.-I. Yi³, and P.B. Cregan¹

¹ Soybean Genomics and Improvement Lab, USDA, ARS, BARC-West Beltsville, MD

² Bovine Functional Genomics Laboratory, USDA, ARS, BARC-West Beltsville, MD

³ National Seed Management Office, Anyang-Si, Kyungi-Do, South Korea

発現配列タグ (EST) / 完全長 cDNA 配列、BAC 末端配列を用いて、13546 のプライマーセットを設計し、PCR で単一の増幅産物がえられたものについて 6 種類の品種/系統間 (Archer, Minsoy, Noir 1, Peking, Evans, PI209332) の一塩基多型が調査されている。このポスター発表の内容から EST 情報や完全長 cDNA 等の遺伝子をコードする領域 (以後、コード領域) と非コード領域^{注1}との間で多型検出頻度の違いやマーカー化の効率を比較する事ができ、今後ダイズの DNA マーカー開発を進める上で、有益な情報が提供されている。実験の第一段階である PCR 産物の電気泳動で、単一の増幅断片が得られたプライマーセットの割合は、コード領域で 66.4%、非コード領域で 87.1% と大きな開きがあるが、その増幅断片の塩基配列解析を行うと、異なる遺伝子座から増幅された複数の断片を含んでいる場合が多くあり、最終的に STS 化できた割合はコード領域 44.1%、非コード領域 45.8%、と大きな開きはなかった。BAC 末端配列のように、ゲノム中から無作為に得られた塩基配列は遺伝子領域に比べて Nucleotide diversity (塩基多様性) が約 2 倍高いという利点はあるものの、これを根拠に遺伝子領域より 2 倍効率的にマーカー開発が可能であると考えるのは危険だという事が明らかとなった。コード領域、非コード領域について設計されたプライマーセットはいずれも過半数が一塩基多型の探索より以前のステップで使えなくなっている。ただし供試した 6 種類の品種/系統間で STS 化された領域に一つ以上の一塩基多型が含まれる割合は、コード領域 47.5%、非コード領域 56.3% であり、増幅断片の平均鎖長がコード領域 579 塩基、非コード領域 485 塩基であることから、STS 化

以降の多型検出効率は非コード領域のほうが約 1.5 倍高いと言える。サイズは4倍体由来すると考えられておりゲノムの重複もこのような一因としてあげられるが、この点についてはコード領域についても同じ事が言える。それ以上に非コード領域には反復配列などが多く含まれる事で、STS化を困難にしていると考えられる。ゲノムシテニーの解析等、DNA マーカーの利用法によっては遺伝子そのものをマーカーとした方が良い場合もある。DNA マーカー開発の際 EST 情報を利用することがゲノム上から無作為に選ばれた配列に基づくものに比べて効率が極端に下がるということにはならないことが本発表で明らかとなった。13546 プライマーセットという膨大なデータに基づく結果であり信頼性も高く、サイズの品種識別マーカー開発に当たっては参考にするべき内容であるといえる。

注1 BAC 末端配列には遺伝子が含まれる場合もあるが、発現領域と比較する上で便宜的に非コード領域とした。本学会における Shoemaker らの発表(Sequencing Duplicated Regions of Soybean Genome) によれば 20 個の BAC クローンの塩基配列決定により、遺伝子の出現頻度は 1gene/11kb と見積もられている。

Table 1. Number of PCR primers designed and results of sequence diversity analysis in six soybean genotypes (Poster 11)

| | Genes | | | | BAC-end sequence | | | |
|---|--------------|---------------|--------------|--------------|------------------|-------------|--------------|--|
| | 3'unique | GenBank mRNAs | EST clusters | Total | Williams 82 BES | Forrest BES | Total | |
| Primers designed | 557 | 773 | 572 | 10232 | 2546 | 768 | 3314 | |
| Primers producing a single band | 5774 67.24 % | 504 65.20 % | 516 59.17 % | 6794 66.40 % | 2186 85.86 % | 701 91.28 % | 2887 87.12 % | |
| Multiple amplicon | 1955 22.77 % | 302 39.07 % | 192 22.02 % | 2449 23.93 % | 1268 49.80 % | 106 13.80 % | 1374 41.46 % | |
| Multiple band | 806 9.39 % | 88 11.38 % | 65 7.45 % | 959 9.37 % | 177 6.95 % | 22 2.86 % | 199 6.00 % | |
| Multiple sequence | 722 8.41 % | 101 13.07 % | 81 9.29 % | 904 8.84 % | 682 26.79 % | 91 11.85 % | 773 23.33 % | |
| Paralogous sequence | 427 4.97 % | 113 14.62 % | 46 5.28 % | 586 5.73 % | 409 16.06 % | 59 7.68 % | 468 14.12 % | |
| Single amplicon verified with sequence analysis | 3919 45.64 % | 271 35.06 % | 321 36.81 % | 4511 44.09 % | 1055 41.44 % | 464 60.42 % | 1519 45.84 % | |
| Fragments with at least 1 SNP | 1794 20.89 % | 121 15.65 % | 226 25.92 % | 2141 20.92 % | 584 22.94 % | 271 35.29 % | 855 25.80 % | |
| Total SNPs | 4847 | 377 | 688 | 5912 | 2155 | 1071 | 3226 | |
| Sequence length (bp) | 2223045 | 174785 | 214223 | 2612053 | 492803 | 244091 | 736894 | |
| Theta ($\theta \times 1000$) | 0.955 | 0.945 | 1.407 | 0.991 | 1.915 | 1.922 | 1.917 | |

Session: Genomics/Functional Genomics, 発表番号 8 4

Development and Mapping of BAC-End Sequence Derived SSR Markers Linked to Candidate Loci from the Soybean Sequence Ready Physical Map (SoyGD).

Samreen Kazi, Jeffery Shultz, Ahmed Afzal, Rabia Bashir, Deepak Jaya Kumaran, M. Javed Iqbal, David A. Lightfoot

Genomics Core Facility, Southern Illinois University, Carbondale, IL62901 USA

BAC末端塩基配列を利用し、サイズ分子連鎖地図上に残るギャップ (10~15cM) を埋めることを目的として、1053のSSRマーカーを設計し一定の成果をあげている。また上記のポスター発表で紹介されていたSoyGD (URL: <http://soybeangenome.siu.edu/>)は必要な情報のみを利用者が選択し表示させる機能を有しており、使い勝手の良いデータベースとなっている。品種はForrestを使用しており、現在NSF (National Science Foundation)、エネルギー省、農務省の協力により進行中のサイズゲノム完全解読で利用されている品種Williams 82とは異なる。BACライブラリーの整列化という点では、アイオワ州立大学が中心となってWilliams 82をもとに作製が進んでいる物理地図 (URL: <http://soybeanphysicalmap.org/>)の方がギャップも比較的少なく先行している。またホールゲノムショットガン法によるサイズゲノム完全解読を進めているエネルギー省・JGI (Joint Genome Institute)はWilliams 82のBACを500 クローンまで研究機関の要請に応じて (1 研究機関当たり 10 クローンまで申請可能) 完全長塩基配列決定を行うことを表明しており、以

下のホームページhttp://soybase.org/community_BAC_sequencing.html から受け付けている。SSRマーカーはPCRと電気泳動という比較的簡便な操作のみで多型検出できることから、今後も広く利用されていくものと考えられる。

Session: Molecular Breeding, 発表番号 4 1

Genetic Diversity and Quality Attributes of Food-Grade Soybeans from North America and Asia

Bo Zhang and Pengyin Chen

Dep. of Crop, Soil, and Environmental Sciences, University of Arkansas, Fayetteville, AR72701

豆腐、味噌、納豆といった加工向けの品種はバラエティーダイズと呼ばれ市場価格は1ブッシェル約9\$と搾油用(5.65\$)と比較して約1.6倍の高値で取引されている(USDA 2005)。またダイズの栄養補助食品材料としての需要の高まりもあり、食品用品種の育成はダイズ栽培における収益性を高める上で重要性を増している。そこで北米54品種、アジア51品種について、たんぱく質含量、オイル含量、カルシウム含量等ダイズの加工適正に関する量的形質遺伝子座についてSSRマーカーを利用して遺伝子型を同定し、遺伝的多様性について調査を行ったのが本発表である。100粒重が20g以上の大粒品種と10g未満の小粒品種とで比較を行っているが、タンパク含量、オイル含量については大粒-小粒間に明確な差はなく、カルシウム含量、硬度、は小粒品種が高かった。日本、中国、韓国由来のアジア品種とアメリカの品種を比較したところ、従来北米のダイズ品種は遺伝的多様性が低いとされてきたが、本発表において調査された食品用品種に関しては、アジア由来の品種を上回る遺伝的多様性を示していた。現在、アメリカ合衆国で栽培されているダイズはその大半が搾油用に利用されているが、食品用ダイズの研究も収益性を高めるという観点から注目されている。

民間企業からの聞き取り調査

SCHILLINGER SEEDINC. (4200 Corporate Drive, Suite 106 West Des Moines, IA 50266 アイオワ州、URL: <http://www.schillingerseed.com>) ならびに Hartland fields, LLC (所在地 SCHILLINGER 社に同じ、URL: <http://www.heartlandfields.com>) の最高経営責任者 (CEO) である John A. Schillinger 博士とお話しする機会を得て、民間企業の経営者からの意見を頂く事ができた。SCHILLINGER 社では日本市場を視野に入れた品種開発を行っており、すでに品種 240F.Y (F: 高豆腐加工特性、Y: 白目の意) について三井物産を通して日本に輸出している。また現在豆腐加工用として高タンパク質品種を、枝豆用品種として低リポキシゲナーゼ、高糖含量品種の開発に取り組んでおり、優良形質の選抜を、赤外線を利用した装置により自動化している。高タンパク品種については44%まで高めることに成功している。アメリカ合衆国の中規模の企業が日本市場に特化した品種開発を行っているということからも、我が国の育成者権保護政策が今後重要度を増して行くことがうかがえる。品種開発に当たっては、病害抵抗性、収量、タンパク含量、脂質含量、糖含量といった形質に連鎖するSNPsを利用していることを、学会の後日、電子メ

ールにて教えていただいた。自社品種の保護に関してどのような対策をとられているのか伺ったところ、可能であれば SSR や SNP といった分子マーカーを利用して自社品種を識別可能な状態にしていきたいが、開発段階ですでに多額の投資を行っており経費のかかることは避け、個々の農家との信頼関係でビジネスが成立しているというお話であった。また行政に対する要望を伺ったところ、民間企業の営利事業に行政機関が手を貸してくれる可能性は低いのではないかと、否定的な見解を述べられた。

Southern Illinois University の David A. Lightfoot 博士より Pioneer Hi-Bred 社(19741 Illinois Hwy 26 North Princeton, IL 61356-0513 イリノイ州) の Senior Research Scientist である Paul A Stephens 博士をご紹介いただき、品種識別技術ならびに germplasm security についてお話を聞くことができた。既存の多くの品種 (germplasm を含んでの考えと思われる) を正確に識別することはいまだ難しいのではないかと、私に取っては意外な意見であった。ただ一定数の品種に限定して適切な分子マーカーを選抜し、識別技術を確立することは十分に可能な状況にあるので、保護対象とする品種数を絞り複数の PIC 値の低い分子マーカーを個々の品種にふりわけることが重要と考えられる。自社品種の保護のあり方については、分子マーカーよりも、契約をしっかりと交わして行くことだと述べられた。行政の立場からはなにをするべきかという問いに対しては Schillinger 博士と同様のご意見で、「仮に政府が我々 (民間企業) に手を貸してくれたとして、それは正しい税の使い方だろうか？」とおっしゃられた。本学会での発表で優良形質の導入は3割ほどが遺伝子組み換え技術によるものであり、自社品種の識別の為に多数のマーカーが必要になるケースを想定していないものと思われる。

MONSANTO imagine 社 (800 North Lindbergh BLVD Mail Zone E3NA St.louis, Missouri 63167 ミズーリ州) の Project Manager である Tim Ulmasov 博士からは Monsanto 社の主力商品の一つであるラウンドアップレディー (除草剤耐性ダイズ) についてお話を聞くことができた。種子販売するのではなく契約をかわし栽培権を売るというビジネスモデルも北米 (カナダ、アメリカ) では成立しているものの、南米では (国名の限定はありませんでした) 無断で栽培されるケースがあるとの情報を頂くことができた。ラウンドアップレディーの場合、栽培試験で容易に品種が同定できることや、導入遺伝子の検出によって DNA レベルでの識別も簡単であることから、DNA マーカーの重要度は低く見積もられているように感じた。従来 of 育種法によって育成された品種の場合と、遺伝子組み換え技術によって作出された品種との間では分子マーカーの重要性やその構築の難易が全く異なり、日本の保有する多くの品種のおかれている状況と、Monsanto 社等で開発の進む遺伝子組み換え作物とでは全く異なる取り組みが要求されることが改めて明らかとなった。また北米における遺伝子組み換えダイズの割合は、80%を超えていると言われており、この地域における収益性を考えれば、南米での違法な栽培を積極的に取り締まる必要がないことが示唆される。とはいえ、正式な手続きのもと契約を結び使用料を納めている北米の農家にしてみれば無断で採種し栽培している者を見過ごされては不公平感が生ずると思われ、Monsanto 社もさらなる策を講じる必要にせまられているのではないだろうか。この構図はコンピューターのソフトウェアの不正コピー問題と類似しているよう

に感じられる。

Performance Plants 社 (101-108 Research Drive, Saskatoon, SK S7N 3R3 サスカチュワン州カナダ) の Jifeng Yin 博士からは小規模の企業が知財保護の負担を回避するビジネスモデルについてお話を伺うことができた。Performance Plants 社では乾燥耐性をもつ育種材料を Monsanto 社から購入し、この形質を導入したダイズ品種を育成した後に、その品種に関する販売権を Monsanto 社に買い取ってもらうという形の事業を行っており、品種を不法に栽培されることによって Performance Plants 社に直接的な不利益が生じることはないとのことであった。ただし従業員数 38 人という小規模の会社ではあるものの、特許出願等の知財保護手続きの担当者を 1 人配置しているとのことであった。

以上の民間企業からの聞き取り調査で得られた品種開発と知財保護に関する情報をまとめると personal relationship を大切にする SCHILLINGER 社、statement を重視する Monsanto imagine 社/Pioneer Hi-Bred 社、そして品種開発にのみ事業を集中し、品種の販売については大企業 (Monsanto) にまかせ、種子 (知財) 管理において起こりうるリスクを回避している Performance Plants 社と見る事ができる。事業規模によって品種保護に対する姿勢が明確に異なっているという興味深い情報を得ることができた。北米では栽培面積の 87% が遺伝子組み換え技術によって作出された品種であり、DNA マーカーによる品種識別技術がかならずしも重要ではないことがうかがえる。種子の販売に際し自家採種の禁止等を明文化し契約することで権利の侵害を未然に防ぐことなどの自衛策を主軸にしており、DNA マーカーによる品種保護はあくまでパッシブセーフティーととらえられていた。ダイズ種子の価格は豆腐等の食品用品種が遺伝子組み換えによって作出された品種の約 1.6 倍の価格で取引されており、加工適正を高めた品種、いわゆるバラエティーダイズ等は利益の大きい品種として今後も一定のシェアを保つものと考えられる。また両国のダイズの自給率を比較すると日本が 4 % であるのに対し、米国は 160% である (05')。従って両国の種苗会社の立場はそのマーケットの規模の違いからも明らかに異なっており、食糧の安定供給の為に行政機関が果たすべき責任もはるかに大きい。

公的機関所属の研究者からの聞き取り調査

USDA-ARS (Donald Danforth Plant Science Center, 975 North Warson Street, St. Louis, Missouri 63132) の Eliot M. Herman 博士からのご指摘は PI アクセションが USDA から公開されており誰でも配布を受けられる状況にあるが、日本が germplasm security を高めた場合、研究に支障が出るのではないかと心配されていた。Herman 博士はダイズのアレルゲンの一つである Gly m Bd 30k を欠失させる研究を行っており、ツルマメもその研究対象としている。米国内の品種は変異が少なく (今回のポスター発表の中には多いという結果もある)、日本、中国、韓国、ロシア等、広くアジアに分布するツルマメや在来種、品種等はアメリカ合衆国におけるダイズ育種にとって貴重な遺伝資源であり、これらの利用に当たって保有国が制限をかけることは望ましくないとのことである。低アレルゲン化という大規模な商業栽培には不向きな研究に取り組んでいる為か公益性を優先すべきとの意見であった。適正な知財保護という観点からの質問であることをお話した。

USDA-ARS (Plant Genetics Research Unit, University of Missouri Columbia, MO 65211 ミズーリ州) の Hari B. Krishnan 博士は、ダイズ種子貯蔵タンパク質の含硫アミノ酸含量の向上による栄養性改善に関する研究を行っており、私のポスター発表で使ったツルマメが10年も前に発見されているにもかかわらず、特許を取得していない事に驚かされていた。特許を取る事によってその権利の所在が明らかにならない限り、それを正式な手続きのもとに利用する事が難しいことを指摘された。特許を取得しないことがかえって、知財の有効利用を妨げていることに気づかされた一言であった。

Greenhouse and Processing Crops Research Centre (2585 County Road 20 Harrow, Ontario, CANADA N0R 1G0 オンタリオ州カナダURL: http://res2.agr.ca/harrow/index_e.htm) のResearch ScientistであるVaino W Poysa博士からは交配と選抜を主軸とする育種を行っている研究者としての立場からご意見を頂くことができた。分子マーカーの開発や遺伝子組み換えによる有用形質の導入が進む中、従来の育種法でダイズ育種を行っている人々と分子マーカーを開発している研究者との連携がまだまだ少ないことを問題視されていた。このことは日本においても深刻な状況にあると考えられる。マーカー選抜育種は単に選抜の能率を向上させるだけではなく、このときに利用したマーカーがその品種を特定する為のマーカーの一つと成ることも利点としてあげられる。育種家と研究者のギャップを埋め、育種の現場で分子マーカーの利用がすすむことが望まれる。

総論

本学会に参加し、アメリカ合衆国においては、社会問題と直結したダイズ育種が省庁を超えた枠組みで行われていることを再認識した。また複数の省庁のみならず、育種家、研究者、エンジニア、経済学者、弁護士などがワークグループを形成して、ダイズを原料とした石油代替燃料の開発に当たっている姿は、エネルギーの安定供給に向けた対策が国を揚げての取り組みであるということをはっきりと示している。こうした取り組みは今後ダイズの工業分野での需要を急激に押し上げる要因となるうえ、近年中国の輸入量が激増しており、ダイズの大半を輸入に頼っている日本が大きな影響を受けることが懸念される。国内の生産量を高め、自給率を上げることが最重要課題ではあるものの、過去30年以上にわたり日本のダイズ自給率が10%を上回った年はなく、ダイズの栽培面積は平成15年より2年連続して減少している。以上の点からも日本が今後短期間に自給率を高めることが容易ではないことは明らかである。ダイズの効率的な安定供給のためには日本への輸出を前提とした品種育成や栽培普及を公的機関が後押しすることも必要な対策のひとつとなるのではないだろうか。ホンダ技研工業の子会社であるホンダトレーディング社ではアメリカ合衆国オハイオ州を拠点として日本向け食品用ダイズ「珠美人」の契約栽培を行っている。品種の育成からホンダトレーディング社が自ら行い、栽培農家に品質の安定化、遺伝子組み換え品種との分別等を徹底させた上でダイズ栽培を委託しており、この5年間で生産量を2倍に増加させている。このような取り組みは日本におけるダイズの安定供給にとって非常に重要であり、DNA マーカーによる識別が品種の保護のみならず流通段階における分別・管理においても重要な役割を担うことが予想される。欧州同様、日本でも

遺伝子組み換え作物に対する消費者の反応は厳しく、2004年5月に行われた内閣府食品安全委員会の調査では消費者の77%が遺伝子組み換え食品に対して何らかの不安を感じていることが明らかとなっている。食品用品種の開発に当たっては、形質転換法は利用しにくい状況にあり、このような状況下でこそマーカー選抜育種や開発品種の保護のためのDNAマーカーの重要性が増して行くと考えられる。一方、アメリカ合衆国ではすでにダイズの87%が遺伝子組み換え品種であり、その大半が除草剤耐性という評価の容易な形質を付与されていることから、DNAマーカーを利用した品種識別がアメリカ合衆国においてはあまり重要視されていないようであった。またダイズの品種育成を行っている民間企業はそれぞれの事業規模に応じた知財保護の対策を行っており、それは種子の不正利用を未然に防ぐことを優先し、DNAマーカーはあくまで権利の侵害があった場合に予備的に利用する技術であるととらえられていた。非遺伝子組み換え品種においては品種識別マーカーがその保護において一定の役割を果たすものと考えられるが、本学会では品種識別マーカーに関する発表はなかった。しかしDNAマーカーそのものが重要視されていない訳ではなく、マーカー選抜育種や物理地図の作製においてDNAマーカーはむしろ頻繁に活用されていた。そのため前述のように間接的に品種識別マーカーの作出に関する技術・情報を得ることができた。小～中規模、低コストでの遺伝子型決定にはSSRマーカーに利点が多い。しかし分子遺伝学の分野では様々な場面でハイスループットな情報集積技術が要求されており、この分野ではDNAマーカーはSSRからSNPsへとトレンドが移行しつつある。Illumina社のBeadstation 500を利用した塩基特異的蛍光標識による遺伝子型決定法や、質量分析によって塩基を同定するシステムSequenome社のMassARRAYなどがその例であり、PCRと電気泳動という従来のシステムでは得られないハイスループットな解析速度を持っている。USDA/ARS Soybean Genomics and Improvement Lab.のPerry B. Creganらはこれらの機器を利用してSNPの探索を大規模に行っており、品種識別マーカーの作製において有効な情報が提供されると考えられる。

ダイズは世界で9100万ha栽培されているがそのうち5500万ha(約60%)は遺伝子組み換え品種であり作物中でもっとも広い面積で組み換え体が栽培されている(国際アグリバイオ事業団2005)。こうした理由もあってダイズにおいてはDNAマーカーによらない品種保護が主流となっている。国(先進国/発展途上国)、事業規模、作物、自殖性/他殖性によって品種保護のあり方は千差万別であり、ダイズにおいては遺伝子組み換え品種の有無を検出する技術は必要とされているものの、現時点で個々の品種を特定する必要性はあまり高くないようである。第一段階としては日本の品種が海外の品種と比較して高いプライオリティーを持っている農作物について優先的に品種識別マーカーの作出と保護を行うべきである。これと平行してダイズにおいてもそのような魅力的な品種を育成し日本の品種が海外に進出できるレベルにあってこそDNAマーカーによる品種識別が知財保護の有効な手段となってくると考えられる。

6) イモ類

(1) ジャガイモ、サツマイモのDNA品種識別技術の開発状況

筑波大学大学院生命環境科学研究科・遺伝子実験センター
渡邊和男、菊池彰

I. ジャガイモ

1) 育成者権の侵害事例

日本で育成された品種が公的な材料譲渡の手続きなしに海外流出した例は多々ある。デジマが南米に持ちだされ、アルゼンチンやウルグアイで主要品種になった例が典型である。欧米においては、UPOV で強化されている親系統・品種についての育成者権が頻繁に取りざたされることがあり、品種のカタログは進んでいる。

使用目的に応じたジャガイモの育種および品種の分化は、日本や欧米で進んでいる。各国種苗法による品種の登録は、公的な品種の汎用性の保護、育種家の権利保護、特定品種の権利確保や海外に不正流出した場合の権利侵害の追求などに資する。

栄養体繁殖で、容易に塊茎や組織培養で材料を増やせるジャガイモでは、品種のカタログ化や特定の同定技術は上記の権利の確保や品種品質の保証などで重要となる。特に、スナックフード等加工用の品種は、特定企業に帰属する個別の品種権があり、品種の特性や同定法については各組織の興味の高いところである。

2) 国内での技術開発状況

a) 品種のカタログ化

品種の同定には、一般的な形質を記載したカタログと DNA マーカーによる品種のフィンガープリンティングがある。ジャガイモは、塊茎の形状や色などの特性や植物体形態および開花特性など、形質評価化しやすく品種の識別も他の作物と比べると相対的に行きやすい。品種のカタログは、(独) 種苗管理センター (<http://www.ncss.go.jp/>)、北海道道立中央農業試験場 (<http://www.agri.pref.hokkaido.jp/chuo/>)、ホクレンやカルビーポテトなどで配布されている。また、産官学連携の日本イモ類研究会 (<http://www.jrt.gr.jp/>) や高く評価できる個人の情報サイト (<http://www.geocities.jp/a5ama/>) もある。

b) 開発機関および用いられている技術の種類、改良状況、新技術など

日本品種の DNA マーカーによる多様性同定は神戸大学の保坂教授らにより古くは RAPD 等で 1990 年代前半から行われており、品種同定の基盤はできている。さらに、ジャガイモでは、ナス科の近縁種であるトマトのマーカー情報等を利用することもでき、基本的な遺伝学的研究基盤はできている (Celebi-Toprak et al. 2005)。

日本国内では、筆者らの筑波大遺伝子実験センターグループが、RFLP マーカーの STS 化、ジャガイモおよびトマトの SSR マーカー確保、そして、形質選抜用の SCAR や CAPS などの各種分子マーカーや基本マップを充実させている (Yamanaka et al. 2005)。フィンガープリンティングを行うための遺伝材料として、遺伝子の機能性領域の共通性から設

計された PCR ベースのマーカーも開発されている (Yamanaka et al. 2003)。また、トマトゲノムを主体としたナス科ゲノムの国内コンソーシウム (学術振興会第 178 委員会) が 2006 年より機能しており、今後マーカーやゲノム情報の提供を受けることができるようになる。

遺伝子発現の網羅的解析のためにマイクロアレイが公的に紹介されている。病虫害抵抗性の発現系解析を目的とした 10K の cDNA アレイは TIGR (<http://www.tigr.org/>) によって公表されている。また、環境ストレスおよび病虫害誘導について 20K のオリゴアレーが筆者らによって作成され、アジレント社から共同研究契約を結ぶことによって提供されるようになっている。これらアレイにより品種の耐性或抵抗性をプロファイリングすることで詳細に渡る品種の特性の情報化も可能である。一方、マイクロアレイの使用の標準化や当該システムの適用場面などについてコスト面や利用の最終目標点を検討する必要がある。

3) 海外での技術開発状況

a) 学会・ネットワーク

ジャガイモには国際学会が存在し、これらが育種や品種の保護についての情報を交換している。北米では、Potato Association of America (<http://www.umaine.edu/PAA/>) が活発に活動している。欧州では、European Potato Association (<http://www.eapr.net/>) があり、品種の特性や同定法などを発表している。またそれぞれの機関紙である American Journal of Potato Research や Potato Research には、品種育成時に品種の特性が報告されている。また、フィンガープリンティングの記事なども随時掲載されている。また、ジャガイモ遺伝資源を取り扱う国際ジーンバンクでも品種のカタログや同定法について情報を提供している。これらには、国際イモ類研究センター (CIP, <http://www.cipotato.org/>) や USDA-GRIN のネットワーク傘下にある NRSP-6 (<http://www.ars-grin.gov/nr6/>) などがある。そして、国際ジーンバンク共通のデータベースも設けられている (<http://www.potgenbank.org/>)。

ジャガイモには産業界の強い関心があり多様な組織が存在しこれらで品種権の保護が議論されている。これらには、世界的会合である World Potato Congress (<http://www.potatocongress.org/>) や Europe Potato Organization (http://www.europotato.org/varietyindex.php?page_no=5) などがあり、国別では、US National Potato Council (<http://www.nationalpotatocouncil.org/>)、UK Potato Council (<http://www.potato.org.uk/>)、NETHERLANDS CONSULTATIVE POTATO INSTITUTE (NIVAA) (http://www.potatonews.com/pressreleases/press_company.asp?Source=NIVAA) などがある。

b) 開発機関・研究者

世界的にみて、上記ジャガイモ専門学会誌などでの DNA フィンガープリンティング自体の研究報告例は多数あり、1980 年代後半からの報告がみられる (Watanabe 1994)。品種識別等のために DNA フィンガープリンティングを積極的にとりいれている組織は、モンサント社等の遺伝子組換え品種や Frito-Lay のような自社開発自社使用を行っているスナックフード会社を除きあまりない。一方、個別の機関としては、オランダの Wageningen University からスピンアウトした Keygene 社が AFLP を主体とした DNA フィンガー

プリンティングについてサービス業務を行っている (http://www.keygene.com/technologies/technologies_aflp.htm)。

欧州では、個別の研究機関での品種の DNA フィンガープリンティングの試みはある。ジャガイモ由来の SSR マーカーや AFLP 等が用いられている。これらには、ドイツのケルンの Max Planck Institute for Plant Breeding Research (<http://www.mpiz-koeln.mpg.de/english/index.html>)、オランダの Wageningen 大学 (<http://www.pbr.wur.nl/UK/Research/>) や英国の Scottish Crop Research Institute (<http://www.scri.sari.ac.uk/>) 等がある。

北米では、カナダの Agriculture and Agrifood Canada (<http://www.agr.gc.ca/index>) の Fredricton 試験場ジャガイモ育種部門にて SSR マーカーでの品種同定の試みがあるが、米国等他所では積極的な検討は見られない。

II. サツマイモ

サツマイモにおいても、品種の海外流出の例は多々ある。日本の新品種が、ベトナム等の東南アジア圏で同時期に栽培され出すなど、正しい材料譲渡の手続きなしの品種の流出がみられる。品種の同定はジャガイモと同じく形質に基づくカタログが基本となっている。サツマイモは育種および品種の多様性拡大は、日本が世界的に進んでいる。一分子マーカー作成や DNA マーカーによるマップの作成の試みは海外でも進んでいる (渡邊・中谷 2005)。日本では、筑波大学の藤村教授らによる SSR マーカー等の開発があるが、品種同定等には適用されていない。

III. 総括

ジャガイモおよびサツマイモともに作物の形質に基づくカタログ化が進んでおり、これらによる品種同定が一般的となっている。品種権保護や取引上の原材料の均一性検査などの場面で精度の高い DNA フィンガープリンティングを適用することは考えられる。DNA マーカー利用によるフィンガープリンティングを運用する際に、ジャガイモおよびサツマイモともにマーカーはすでに存在している。しかしながら、品種同定のための技術支援体制は国内外ともに技術者層の人材不足や修練の必要性があるため保守性の高い業界では、迅速にはなかなかなじめないのではという見解もある。そして、適用場面、コスト省力化、手法の標準化など、実際の運用面での課題は多数あり、学術的な研究として認知されにくいためもあり、研究者は敬遠している。また、このような品種の DNA フィンガープリンティングは、品種権保護のための訴訟等の場面での情報として使用されることはあっても、種苗管理手法としては、原原種などの特殊な種苗を除き、未だなじめない様相であることが国内外の関係者から指摘されている。

<引用文献>

- Celebi-Toprak, F., J. A. Watanabe and K. N. Watanabe 2005. Chapter 6: Molecular Markers in Identification of Genotypic Variation. In: Genetic Improvement of Solanaceous Crops, Vol. 2: "Potato" (Eds. M. K. Razdan and A. K. Mattoo), Science Publishers Inc., USA. 117-140p.
- Watanabe, K. N. 1994. Potato Molecular Genetics. In J. E. Bradshaw and G. Mackey (eds.), Chapter

- 10, Potato Genetics, CAB International, Wallingford, UK, pp. 213-235. ISBN 0-85198-869-5
- 渡邊和男・中谷誠 2005. ジャガイモとサツマイモゲノム研究について. *Techno Innovation (STAFF)*57: 95-102.
- Yamanaka, Y., E. Suzuki, M. Tanaka, Y. Takeda, J. A. Watanabe & K. N. Watanabe. Assessment of cytochrome P450 sequences offers a useful tool for determining genetic diversity in higher plant species. *Theor. Appl. Genet.* 108:1-9.
- Yamanaka, S., S. Ikeda, A. Imai, Y. Luan, J. A. Watanabe and K. N. Watanabe 2005. Genetic mapping of newly developed markers in the diploid potato (*Solanum tuberosum*) and their integration into existing maps. *Breed. Sci.* 55(2): 223-230.

7) 工芸作物

(1) コンニャクの DNA 品種識別技術の開発状況

群馬県農業技術センター
こんにゃく特産研究センター 飯塚弘明

1) 育成者権の侵害事例

これまでに、我が国で育成されたコンニャク品種に関して、海外で育成者権侵害が公式に報告された事例はないが、その危険性は年々高まっている。世界的に見てコンニャクを栽培、加工、市場流通させている国は、日本と中国、ミャンマーだけである。近年、中国において外貨獲得と内陸部農業を振興するため、コンニャクの増産が地方政府主導で進められている。中国におけるコンニャク産地は、主に雲南省や四川省など内陸の山間部で、これらの地域は目立った産業もなく、圃場も狭小で水の少ない土地である。これら地域ではその土地に古くから自生していたコンニャクを種芋として栽培しているが、腐敗病、白絹病等の病害対策や生産性向上の点から、我が国で育成した品種に強い興味を示している。既に、国内主要栽培品種「あかぎおおだま」の種芋が中国に輸出された事例が確認されており、(財)日本こんにゃく協会が毎年実施している現地調査において、雲南省で「あかぎおおだま」の試験栽培が行われていることを確認している。また、中国で出版された出版物においても、「あかぎおおだま」が日本農林二号(花魔芋)としてその特性が紹介されており、品種の持ち出しは確実なものとなっている。しかし、「あかぎおおだま」は1970年に品種登録された古い品種であり、既に育成者権の保護対象から外れた品種であるため、対策が取れない状況にある。

また、中国国内においてコンニャク製品加工に携わる業者により組織された中国魔芋協会、コンニャク研究をリードする中国西南大学、および雲南省科学院等では新品種「みやままさり」(2004年品種登録)に強い興味を示しており、「あかぎおおだま」同様に中国に持ち出されるのは時間の問題となっている。

育成者権侵害以外では、LDC(後発開発途上国:発展途上国の中で最も開発の遅れた国)援助のため、2007年4月よりLDC諸国から無税無枠措置による農産物輸入が開始される見込みである。対象国にはミャンマーが含まれており、今後輸入の増加が見込まれるが、ミャンマーは中国と国境を接していることから、LDC無税無枠措置を悪用した我が国への中国産原料(荒粉・精粉)の迂回輸入が懸念されている。高品質な中国産原料の迂回輸入を防ぐためにも品種判別技術の確立は急務となっている。

2) 国内での技術開発状況

国内においてコンニャクの品種判別を目的とした研究が始まったのは1994年頃である。群馬県農業試験場(現群馬県農業技術センター)の木暮らによって、Operon Biotechnologies から市販されている10種類のランダムプライマーを用いたRAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)分析による品種判別が試みられた。国内で収集した34の品種・系統を解析したが、形態的な特徴から区分される品種群(在来種群、支

那種群、備中種群)での多型は見られたが、個々の品種・系統を特定する多型までは確認できなかった(未発表)。

また、1998年には三重大学の江原ら¹⁾によって三重県内で収集した「多気在来種」と埼玉県で収集した「秩父在来種」を用いた PAPP 分析による多型解析が行われた。この研究では RAPD 分析の品種判別への適用性を主にしており、供試材料が 2 系統だけであるため品種判別マーカーの開発や STS 化は行われていない。

2005 年には(独)農業生物資源研究所の奥泉ら²⁾³⁾により RLGS (Restriction Landmark Genomic Scanning) 法による多型解析が行われ、国内で栽培される主要品種「あかぎおおだま」「みやままさり」を含む 8 品種・系統を解析し、23 の多型スポットを検出、この内 8 マーカーを用いて品種の遺伝子型プロファイリングを実施している。また、九州東海大学の山下ら⁴⁾は FRGP (Fluorescence Representational Genomic Profiling) 法により「あかぎおおだま」を含む 4 品種を解析し、23 の多型スポットを検出し、11 マーカーを用いてプロファイリングを試みた。なお、RLGS 法および FRGP 法で検出された多型マーカーについては現在 STS 化が進められている。

3) 海外での技術開発状況

世界的に見てコンニャクの栽培に力を入れている国は、日本以外では中国だけであるため、技術開発も中国以外の事例は見あたらない。

中国では Southwest Agricultural University の Zhang Yu-jin ら⁵⁾により、40 種類のプライマーを用いた RAPD 分析により、主に中国国内で収集されたコンニャクおよび *Amorphophallus* 属の近縁種、22 品種・系統を解析している。プライマーは CyberSyn.co.Ltd.Beijing から市販されているキットを用いており、特に STS 化の操作は行われていない。研究は中国国内の栽培種、近縁種を含めた系統解析、遺伝的多様性の評価を目的としており、品種判別まで踏み込んではいない。

また、興味深いことには供試した 22 品種・系統の 1 つに「日本農林二号花魔芋」(あかぎおおだま)が含まれており、これは中国の研究機関において「あかぎおおだま」が保存・研究されていることを示している。

<参考文献>

- 1) 江原 宏, 大宮邦雄, 三重県における新規な生物資源高度利用法に関する調査と探索研究報告書, 54-60 (1998)
- 2) 飯塚弘明, 細渕朗子, 奥泉久人 他, DNA 多型, 14:151-153 (2006)
- 3) 野口友嗣, 細渕朗子, 高宮知子 他, DNA 多型学会第 15 回学術集会抄録集, p75 (2006)
- 4) 山下秀次, 作村健彦, 本田大輔 他, DNA 多型, 14:141-143 (2006)
- 5) Zhang Y, Zhang X, Liu P and Feng C, Journal of Southwest Agricultural University, 23,5:418-421 (2001)

8) キノコ類

(1) キノコ類のDNA品種判別技術の開発状況

森林総合研究所 きのこ微生物研究領域
きのこ研究室長 馬場崎勝彦

1) 育成者権の侵害事例

＜育成者権を侵害したとして起こった訴訟＞：

- (1) エノキタケの育成者権者であるA社がB社の育種した純白系品種を育成者権の侵害として訴えた。
- (2) エリンギの育成者権者であるA社がC社の生産するエリンギを育成者権の侵害として訴えた。
一方、C社は、既に、韓国で名称登録されているエリンギ（クヌタリ）とA社のエリンギが同等なので、そもそも、A社に育成者権が存在しないと登録の抹消を行政へ請求。
- (3) D社が、E社をナメコ及び細胞融合マツタケの種菌並びに生産技術提供に係わる問題で訴えた。

＜侵害と考えられる事例＞

- (4) 中国から輸入されたシイタケの品種調査から、輸入シイタケの主要品種が、日本の古い登録品種であることが分かった。
- (5) ナメコ、白色エノキタケ、ブナシメジ等、我が国が育種・栽培化したきのこが、中国や欧米で商業生産されている。一方で、エリンギ、バイリング、茶樹菇、ササクレヒトヨタケ等、中国や台湾等で栽培化されたきのこが我が国で商業生産されている。
(理由：シイタケについては、種菌の輸出に関しては大臣決裁が必要であり、また、他のきのこについても、育成者権をもつ種菌会社は、海外へ販売しないため。)

2) 国内での技術開発状況

昭和53年の種苗法の改正で、きのこも種苗登録可能になった。これに伴い、種苗審査基準も策定され品種判別が可能となった。きのこの品種判別で最も重要な指標は、栄養繁殖体不和合性試験（対峙培養）であるが、現状では、対照品種を適切に揃えることが難しい問題があり、正確な判別を困難にしている。現在32種のきのこが種苗登録可能であるが、2006年11月までに13種324品種が登録されている。主要な種としては、シイタケ、エノキタケ、ブナシメジ、マイタケ、ナメコ、ヒラタケ、エリンギとなる。

日本でのDNA品種判別法は、予備的な研究は別として、1990年頃から森林総合研究所で始まり、ミトコンドリアDNAのRFLP法やRAPD法を用いて、ナメコ市販品種56品種を23系統に判別したり、市販エノキタケ10菌株が2系統に判別できること等を報告した。続いて、2001年の対中国輸入生シイタケのセーフガード発動を、技術的に補完する形で、森林総合研究所の馬場崎らは、RAPD法等により輸入シイタケの系統判別を行い中国

産シイタケの主系統が、我が国の古い品種に酷似することを報告した。また、2002年菌蕈研究所の寺島らが、AFLP法でシイタケの栽培品種50品種以上を判別したと報告した。同年群馬大学の斉藤らはシイタケ16品種の判別にIGS1及びIGS2のDNAシーケンス多型解析が有効であると報告した。さらに、2004年九州大学の田中らはシイタケのSCARマーカーを報告した。一方、2006年森林総合研究所の馬場崎は、市販シイタケ140品種のIGS1のDNAシーケンスを解析して、その結果をDNA Data Bank of Japan (DDBJ)に登録して、インターネットを介してIGS1 dna シーケンスによるシイタケの品種照合を世界的に可能にした。

シイタケ以外のきのこのDNA判別法については、ハタケシメジでは、2004年三重県科学技術振興センターの橋爪らが10系統を3種類のプライマーにより7個の多型として判別したRAPD法、エリンギでは、2004年菌蕈研究所の小畠らの国内外の17系統を3種類のプライマーを用いて判別したRAPD法、2005年森林総合研究所の馬場崎らの栽培品種バイリング10品種の判別を行ったIGS1及びITS-DNAシーケンス解析法、マツタケでは、2005年森林総合研究所の村田らの開発したレトロトランスエレメントのLTRをプライマーとするPCR法、マジックマッシュルームでは、2003～2006年国立医薬品衛生研究所の丸山らが幻覚性及び非幻覚性きのこを迅速に判別したTaqMan PCR法並びにITS及び28SrDNA DNAシーケンス解析法が上げられる。

3) 海外での技術開発状況

世界的には、栽培きのこといえば、ツクリタケ(*Agaricus bisporus*)で、続いて、ヒラタケ(属)、シイタケ、フクロタケ、キクラゲの順となる。欧米ではツクリタケに生産の重点があり、ヒラタケ属が次に続く。種菌開発・販売は、民間企業が携わる。中国、東南アジア等の開発途上国では、きのこを安価なタンパク質源と位置づけ、環境に合うヒラタケ、フクロタケ、キクラゲの生産と国内消費が推進される一方で、欧米、日本等先進国で需要の高いツクリタケ、シイタケを安価に栽培・輸出し外貨を獲得する政策も取られる。このため、先進国にとっては安価なきのこによって、先進国のきのこ生産がダメージを受ける等の貿易摩擦が引き起こされ問題となる。開発途上国では、種菌開発や供給は国が直接的に係わる場合が多く、また、育成者権に対する認識が十分でない場合が多い。日本でなじみ深いエノキタケ、ブナシメジ、マイタケ、ナメコ等は、世界的には、特産きのこ(speciality mushroom)、東洋的なきのこ(exotic mushroom)として位置づけられ生産されるグルメ(高級)食材である。このような背景から、海外での品種判別技術の開発は、ツクリタケ、シイタケ、ヒラタケ属のきのこに関するものが中心となる。

ツクリタケは交雑能のある2つの核が1つの胞子の中に対になって入っている胞子をもつ二次的ホモタリズムのきのこであり交雑に必要な胞子を得ることが困難なため、1970年代まで交雑品種で種菌を作ることが出来なかった。1970年代にオランダのMushroom Experimental Stationで親株H97やH39を用いて優れたハイブリッド品種Horst-U1とU3が作られた。今日ツクリタケ(White Button Mushroom)の種菌ほとんどは、このハイブリッド品種に由来するとされている。また、その種菌も世界的な種菌会社であるSylvan社等大手が押さえている。

ツクリタケのDNA等系統判別法としては、1988年イギリスのマンチェスター大学と園

芸研究所の Loftus らのゲノミックライブラリーをプローブ DNA とする RFLP 法、1992 年 USA の Monterey Laboratories 社の Khush らの RAPD 法での 8 系統の判別法、1998 年カナダのトロント大の Xu ら、USA の Sylvania 社の Kerrigan、オランダの Mushroom Experimental Station の Sonnenberg、フランスの INRA-CTC, Station de Recherches sur les Champignons の Callac のグループの、441 系統を 140 mtDNA 系統に判別する mtDNA-RFLP 法、1999 年オランダの Mushroom Experimental Station の Sonnenberg らの旧来栽培品種 8 系統と交雑種 9 系統を、3 系統（ホワイト系、オフホワイト系、現行品種）に判別するツクリタケのトランスポゾン様エレメント Abr1 (300bp) をプローブとするサザンブロット法による RFLP 法、2000 年フランスのボルドー第二大学の Barroso ら、オランダの Mushroom Experimental Station の Sonnenberg らの栽培品種 4 系統（ホワイト系 2 種、オフホワイト系 1 種、スノーホワイト種）を判別する DAMD (Directed Amplification of Microsatellite-region DNA)-PCR 法、2001 年スペインのナバラ大学 (Universidad Publica de Navarra) の Ramires らの分子指標法、2001 年イギリスの Horticulture Research International の Moore らの 20 種のプライマーを用い 24 栽培品種を含む 26 系統のツクリタケを 211 個の RAPD 指標で判別した RAPD 法、2002 年ポーランドの Research Institute of Vegetable Crops の Staniaszek らのポーランドと中国のツクリタケ 26 系統を、4 種のプライマーによる 24 個の指標 DNA バンドを用いて 14 系統に判別した RAPD 法、2002 年カナダの McMaster 大学の Xu らの 2 つの自然集団から採取した 50 系統を判別したミトコンドリア及び核 DNA の RFLP 分析法、並びに、multilocus enzyme electrophoretic polymorphisms 分析法が上げられる。

シイタケ(*Lentinula edodes*)の天然分布は、中国、日本、PNG、ニュージーランド等であるため欧米よりは日本や中国で研究が盛んである。本きのこの DNA 判別法としては、1991 年 USA の University of Utah Research Park の Kulkarni のシイタケ 7 系統を判別したシイタケの Low-copy genome DNA をクローニングした組換えプラスミドをプローブとするサザンブロット法による RFLP 法、1995 年 USA の American Type Culture Collection の Zhang らのシイタケ 15 系統を、7 種類のプライマーと 12~19 本の指標 DNA バンドを用いて 13 系統に判別した RAPD 法、1996 年香港の香港大学の Chiu らの中国で栽培されるシイタケ 19 系統を、AP-PCR 法で 4~14 指標、RAPD 法で 1~9 指標、及び rDNA-RFLP 法で 5 種の制限酵素による断片プロファイルを指標として 3 系統に判別した方法、2006 年中国の Nanjing Agricultural University の Qin らの intersimple sequence repeats marker に対する一組の SCAR プライマーを用いて 85 系統の判別を行った SCAR マーカー法が上げられる。

ヒラタケ(*Pleurotus ostreatus*)の系統判別法としては、1994 年 USA の Duke 大学の Vilgalys らの北半球のヒラタケ属の種判別とその関係推定を行い、祖先種を推定した 28SrDNA と ITS-DNA シーケンス解析法、1999 年スペインのナバラ大学の Larraya らのヒラタケの染色体をパルスフィールド電気泳動法によって染色体長多型を分析した Molecular Karyotype 法、2003 年中国の Sichuan University の Meng らのヒラタケ 14 系統を E-AGC/M-CAT プライマーペアを用いて AFLP 指標 184 本を増幅し、内 101 本は系統間で多型を示すことを報告した AFLP フィンガープリント法、2006 年ロシアの研

究者のロシアの温帯林から得たヒラタケとウスヒラタケを判別した交配試験と RAPD 法が上げられる。

エリンギ(*Pleurotus eryngii*)の系統判別法としては、2001 年ギリシャの Institute of Kalamata の Zervakis らの宿主植物 (*Eryngium* spp., *Ferula communis*, *Cachrys ferulacea*, *Thapsia garganica*, *Eleoselinum asclepium* subsp. *asclepium*) から分離したヒラタケ属 4 6 系統を 35 種類のザイモグラムと 42 種類の RAPD パターンから宿主特性にあった 5 群に分類したアイソザイム分析法及び RAPD 法、2005 年イタリアの Università degli Studi di Bari の De Gioia らのイタリア全土から集めたエリンギ類(*P. eryngii* var. *eryngii*, var. *ferulae*, var. *nebrodensis*)154 系統を判別した質的量的形質解析法並びに RAPD 法及びマイクロサテライト DNA 法、2005 年中国の Institute of Agricultural Resouse and Regional Planning の Zhang らの宿主植物 (*Ferula sinkiangensis*)から分離したヒラタケ属 1 7 系統の種判別 (*Pleurotus eryngii* var. *ferulae* 1 系統と *Pleurotus nebrodensis* 1 6 系統) には交配試験、ITS-DNA シーケンス解析法、および IGS1-RFLP 法が有効で、IGS2-RFLP 法は *P. nebrodensis* 16 系統を 4 群に判別するために有効であることを示した交配試験、ITS-DNA シーケンス解析法、IGS1-RFLP、及び IGS2-RFLP 法が上げられる。

オオヒラタケ(*Pleurotus cystidiosus*)の系統判別法としては、2003 年ブラジルの Instituto de Botanica の Capelari らの *P.smithii* と *P.cystidiosus* を区別出来ないとした RAPD 法、2004 年ギリシャの Institute of Kalamata の Zervakis らのヒラタケ属のコレミアを形成する亜属を 5 種 *P. australis* (in New Zealand and Australia), *Pleurotus abalonus* (in Asia and Hawaii), *Pleurotus fuscusquamulosus* (in Africa and Europe), *Pleurotus smithii* (in Mexico) and *Pleurotus cystidiosus* sensu stricto (in North America)に分類した交配試験及び ITS-DNA シーケンス解析法が上げられる。

その他栽培きのこの系統判別法としては、マイタケでは、2002 年 USA のペンシルベニア大学の Shen らの北アメリカ 2 1 系統、アジア 2 7 系統、ヨーロッパ 1 系統、アメリカでの市販品種 1 系統、産地不明 1 系統の計 5 1 系統を調べ、アメリカ、アジアの産地判別が可能で、アメリカの市販品種は、アジア産であることを解明した ITS 及び β -チューブリン DNA のシーケンス解析法、マンネンタケ属では、1996 年台湾の国立台湾大学の Hseu らのマンネンタケ属の種判別に ITS-DNA シーケンス解析法が有効で、系統判別には RAPD 法が有効であることを示した ITS-DNA シーケンス解析法及び RAPD 法、並びに、2005 年中国の中国科学アカデミー微生物学研究所の Wang らのマンネンタケ属を代表する 4 種において、各系統当たり 2~5 種の ITS-DNA シーケンス多型が見られることを示した ITS-DNA シーケンス解析法、ヤマブシタケでは、2002 年中国の Nanjing Normal University の Lu らの中国の伝承医薬品ヤマブシタケを判別する ITS-DNA シーケンス解析法、冬虫夏草では、1999 年中国の中国科学アカデミー動物学研究所の Chen らの Qinghai-Tibet 台地から得た *Cordyceps sinensis* の 29 系統を 100 本の RAPD 指標を用いて 3 群 (北、中央、南群) に判別した RAPD 法、2005 年 USA の USDA-ARS の Rehner

らの世界中から集めた *Cordyceps teleomorpha* 86 系統を 6 群に判別した ITS 及び EF1- α DNA シーケンス解析法、並びに、2006 年台湾の National Cheng Kung University の Kuo らの 10 系統の *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc を 6 系統に判別した ITS2-PCR-SSCP 法、マジックマッシュルームでは、2000 年台湾の Central Police University の Lee らのシビレタケ属等のマジックマッシュルームの同定法として AFLP 法、2002 年イギリスの University of Strathclyde の Linacre らの DNA profiling 法並びに 2004 年カナダのトロント大学の Nugent らの 28SrDNA の 5 末端配列が幻覚性、非幻覚性きのこの判別の指標となること示した ITS1 及び 28SrDNA の DNA シーケンス解析法、ヒメマツタケでは、2002 年ブラジルの Universidade Paranaense の Colauto らの 5 系統を判別した RAPD 法が上げられる。

その他非栽培きのこの系統判別法としては、トリフでは、2004 年フランスの Murt らのフランス、北西イタリア、スペインから得た *Tuber melanosporum* 188 系統の判別を行った ITS-DNA シーケンス解析法、アミガサタケ属では、1996 年フランスの Universite Henri Poincare の Mipf らのアミガサタケとトガリアミガサタケの種判別を行った ITS-DNA シーケンス解析法、並びに、1999 年のアミガサタケ属 11 種、シトネタケ属 3 種を含む 66 系統の判別を行った ITS-DNA の RFLP 分析法、ナラタケ属では、1994 年カナダのトロント大学の Smith らの北アメリカのオニナラタケのタイピングを行ったミトコンドリア DNA-RFLP 法、及びミトコンドリア遺伝子 DNA をプローブに用いるサザンハイブリダイゼーション法、並びに、2004 年チェコ共和国の Masryk の Lochman らの土壌資料中のナラタケ属の種判別を行った ITS の増幅に nested PCR 法 (external primers ITS1 and ITS4, internal primers AR1 and AR2) を用い RFLP 分析に ion-exchange HPLC 法を用いる ITS-RFLP 法並びに ITS-DNA シーケンス解析法、スレヒロタケでは、2001 年 USA の Duke 大学の James らの全世界から集めたスエヒロタケ 195 系統の IGS-DNA をシーケンスして、143 系統に判別した IGS1-DNA シーケンス解析法、イグチ類では、2001 年イギリスの Horticulture Research International の Manian らの *Suillus* 属の 7 種に属する 22 系統を判別した ITS1 及び ITS2-DNA シーケンス解析法が上げられる。

<参考文献等>

ツクリタケ (*Agaricus bisporus*)

- 1) Loftus M.G., Moore D. and Elliott T.J. (1988) DNA polymorphisms in commercial and wild strains of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. Theoretical and Applied Genetics 76(5):712-718
- 2) Khush R.S., Becker E. and Wach M. (1992) DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Appl. Environ. Biotechnol. 58(9):2971-2977
- 3) Xu J., Kerrigan R.W., Sonnenberg A.S., Callac P., Horgen P.A. and Anderson J.B. (1998) Mitochondrial DNA variation in natural populations of the mushroom *Agaricus bisporus*. Molecular Ecology 7(1):19-33
- 4) Sonnenberug A.S., Baars J.J., Mikosch. T.S., Schaap P.J. and Griensven L.J. (1999) Abr1, a transposon-like element in the genome of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange)

Imbach. Appl. Environ. Microbiol. 65(8): 3347-3353

- 5) Barroso G., Sonnenberg A.S., Griensven L.J. and Labarere J. (2000) Molecular cloning of a widely distributed microsatellite core sequence from the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Fungal Genetics and Biology 31:115-123
- 6) Ramires L., Muez. V., Alfonso M., Garcia Barrenechea A., Alfonso L. and Pisabarro A.G. (2001) Use of molecular markers to differentiate between commercial strains of the button mushroom *Agaricus bisporus*. FEMS Microbiol. Lett 198(1):45-48
- 7) Moore A.J., Challen M.P., Warner P.J. and Elliott T.J. (2001) RAPD discrimination of *Agaricus bisporus* mushroom cultivars. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55(6):742-749
- 8) Staniaszek M., Marczewski W., Szudyga K., Maszkewicz J., Czaplicki A. and Qian G. (2002) Genetic relationship between Polish and Chinese strains of the mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) Sing., determined by the RAPD method. J. Appl. Genet. 43(1): 43-47
- 9) Xu J., Desmerger C. and Callac P. (2002) Fine-scale genetic analyses reveal unexpected spatial-temporal heterogeneity in two natural populations of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. Microbiology 148(pt5):1253-1262

シイタケ(*Lentinula edode*)

- 1) Kulkarni R.K. (1991) DNA Polymorphisms in *Lentinula edodes*, the Shiitake Mushroom. Appl. Environ Microbiol. 57(6):1735-1739
- 2) Zhang Y. and Molina FI (1995) Strain typing of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA assay. FEMS Microbiol Lett. 131(1):17-20
- 3) Chiu S.-W., Ma A.-M., Lin F.-C. and Moore D. (1996) Genetic homogeneity of cultivated strains of shiitake (*Lentinula edodes*) used in China as revealed by the polymerase chain reaction. Mycological Research 100(11): 1393-1399
- 4) Qin L.H., Tan Q., Chen M.J., and Pan Y.J. (2006) Use of intersimple sequence repeats markers to develop strain-specific SCAR markers for *Lentinula edodes*. FEMS Microbiol Lett. 257(1):112-116

ヒラタケ属

ヒラタケ

- 1) Vilgalys R. and Sun B.L. (1994) Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(10):4599-4603
- 2) Larraya L.M., Perez G., Penas M.M., Baars J.J., Mikosch T.S., Pisabarro A.G. and Ramirez L. (1999) Molecular karyotype of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. 65(8):3413-3417
- 3) Meng Y., Jiang C.S., Liao W.T. and Zhang YZ. (2003) AFLP fingerprinting map analysis of *Pleurotus ostreatus*. Yi Chuan Xue Bao 30(12):140-1146
- 4) Shnyreva A.V., Belokon' IuS, Belokon' M.M. and Altukhov IuP. (2004) Interspecific genetic variability of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* as revealed by allozyme gene analysis. Genetika 40(8):1068-1080

ウスヒラタケ

- 1) Shnyreva A.V. and Shtaer O.V. (2006) Differentiation of closely related oyster fungi *Pleurotus*

pulmonarius and *P. ostreatus* by mating and molecular markers Genetika 42(5):667-6674

エリンギ

- 1) Zervakis G.I., Venturella G. and Papadopoulou K. (2001) Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. Microbiology 147(Pt 11):3183-94
- 2) De Gioia T., Sisto D., Rana G.L. and Figliuolo G. (2005) Genetic structure of the *Pleurotus eryngii* species-complex. Mycological Research 109(1):71-80

バイリング

- 1) Zhang J.X., Huang C.Y., Ng T.B. and Wang H.X. (2006) Genetic polymorphism of ferula mushroom growing on *Ferula sinkiangensis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71(3):304-306

オオヒラタケ類

- 1) Capelari M. and Fungaro M.H. (2003) Determination of biological species and analysis of genetic variability by RAPD of isolates of *Pleurotus* subgenus *Coremiopleurotus*. Mycological Research 107(9):1050-1054
- 2) Zervakis G.I., Moncalvo J.M. and Vilgalys R. (2004) Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. Microbiology 150(3):715-726

マイタケ

- 1) Shen Q. and Geiser D.M. and Royse D.J. (2002) Molecular phylogenetic analysis of *Grifola frondosa* (maitake) reveals a species partition separating North American and Asian isolates. Mycologia 94(3):472-482

マンネンタケ属

- 1) Hseu R.S., Wang H.H., Wang H.F. and Moncalvo J.M. (1996) Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. Appl. Environ. Microbiol. 62(4):1354-1363
- 2) Wang D.M. and Yao Y.J. (2005) Intrastrain internal transcribed spacer heterogeneity in *Ganoderma* species. Can. J. Microbiol. 51(2):113-121

アミガサタケ属

- 1) Mipf D. and Munch J.C., Botton B. and Buscot F. (1996) DNA polymorphism in morels: complete sequences of the internal transcribed spacer of genes coding for rRNA in *Morchella esculenta* (yellow morel) and *Morchella conica* (black morel). Appl. Environ. Microbiol. 62(9):3541-3543
- 2) Mipf D., Fribourg A., Munch J.C., Botton B. and Buscot F. (1999) Diversity of the internal transcribed spacer of rDNA in morels. Canadian J. Microbiol./Rev. can. microbiol. 45(9):769-778

トリフ

- 1) Murt C., Diez J., Luis P., Delaruelle C., Dupre C., Chevalier G., Bonfante P. and Martin F. (2004) Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. New Phytologist doi 164(2):401-411

ネナガノヒトヨタケ

- 1) Zolan M.E., Heyler H.K. and Stassen N.Y. (1994) Inheritance of chromosome-length polymorphisms

in *Coprinus cinereus*. Genetics 137(1):87-94

ナラタケ属

- 1) Smith M.L. and Anderson J.B. (1994) Mitochondrial DNAs of the fungus *Armillaria ostoyae*: restriction map and length variation. Current Genetics 25(6):545-553
- 2) Lochman J. Sery O. and Mikes V. (2004) The rapid identification of European *Armillaria* species from soil samples by nested PCR. FEMS Microbiol. Lett. 237(1):105-110

スエヒロタケ

- 1) James T.Y., Moncalvo J.M., Li S. and Vilgalys R. (2001) Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. Genetics 157(1):149-161

マジックマッシュルーム

- 1) Lee J.C., Cole M. and Linacre A. (2000) Identification of hallucinogenic fungi from the genera *Psilocybe* and *Panaeolus* by amplified fragment length polymorphism Electrophoresis 21(8):1484-1487
- 2) Linacre A., Cole M. and Lee J.C. (2002) The Analysis of Psilocybin and Psilocin from Fungi Sci. Justice 42(1):50-54
- 3) Nugent K.G. and Saville B.J.(2004) Forensic analysis of hallucinogenic fungi: a DNA-based approach. Forensic Sci Int 140(2-3):147-57

ヤマブシタケ

- 1) Lu L., Li J. and Cang Y. (2002) PCR-based sensitive detection of medicinal fungi *Hericium* species from ribosomal internal transcribed spacer (ITS) sequences. Biol. Pharm. Bull. 25(8):975-980

冬虫夏草

- 1) Chen Y., Zhang Y.P., Yang Y. and Yang D. (1999) Genetic diversity and taxonomic implication of *Cordyceps sinensis* as revealed by RAPD markers. Biochem. Genet. 37(5-6):201-13
- 2) Rehner S.A. and Buckley E. (2005) A Beauveria phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. Mycologia 97(1):84-98
- 3) Kuo H.-C., Su Y.-L., Yang H.-L., Huang I.-C. and Chen T.-Y. (2006) Differentiation of *Cordyceps Sinensis* by a PCR-Single-Stranded Conformation Polymorphism-Based Method and Characterization of the Fermented Products in Taiwan. Food Biotechnology 20(2):161-170

ヒメマツタケ

- 1) Colauto N.B., Dias E.S., Cimenes M.A. and Eira A.F. (2002) Genetic Characterization of Isolates of the Basidiomycete *Agaricus brazei* by RAPD. Brazilian Journal of Microbiology 33:131-133

イグチ類

- 1) Manian S., Sreenivasaprasad S., Bending G.D. and Mills P.R. (2001) Genetic diversity and interrelationships among common European *Suillus* species based on ribosomal DNA sequences. FEMS Microbiol Lett. 204(1):117-121

サケツバタケ

- 1) Yan P.-S., Jiang J.-H., Li G.-F. and Deng C.-L. (2003) Mating system and DNA polymorphism of monokaryons with different mating type of *Stropharia rugoso-annulata*. Biomedical and Lif

Science 19(7):737-740

チチタケ属、ベニタケ属、テングタケ属

- 1) Redecker D., Szaro T.M., Bowman R.J. and Bruns T.D. (2001) Small genets of *Lactarius xanthogalactus*, *Russula cremoricolor* and *Amanita francheti* in late-stage ectomycorrhizal successions. Mol Ecol. 10(4):1025-1034

(2) チャの DNA 品種識別技術の開発状況

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
野菜茶業研究所 野菜・茶の食味食感・安全性研究チーム
氏原ともみ

1) 育成者権の侵害事例

現在のところ、日本産品種の国内・海外における育成者権侵害事例は報告されていない。

2) 国内での技術開発状況

品種識別に用いる DNA マーカーとしては、野菜・茶業試験場（現 野菜茶業研究所）の Kaundun と松元により、13 の CAPS マーカーが開発され、46 品種が識別可能であることが報告されている（現在、識別可能な品種は 60 となっている）。これらの CAPS マーカーに利用した部位の塩基配列を決定、品種間で比較した結果、配列内に存在する indel (insertion/deletion)を検出する 4 つのマーカーが開発され、また 5 つの SSR マーカーと併せて、44 の品種について遺伝子型が解析されている¹⁾⁻³⁾。CAPS マーカーを用いて、市販緑茶の分析が可能であることが示されている^{2),4)}。

3) 海外での技術開発状況

海外においては、品種識別そのものを目的とした技術開発よりは、各国の遺伝資源や品種、または近縁種も含めた系統解析、遺伝的多様性の評価を目的とし、DNA マーカーによる遺伝子型の解析が行われるケースが多い。そのうちで、チャ品種を材料としているものについて以下に記し、また表 1 にまとめた。

3-1 韓国における技術開発

韓国では、Kyungpook National University の Kaundun らにより、17 のプライマーを用いた 58 の RAPD マーカーが開発され、韓国産 14 品種の他日本産 8 品種、台湾産 3 品種の遺伝子型が解析されている⁵⁾。また、Sunchon National University の Lee らにより、同じく RAPD マーカーが開発され、20 プライマーを用いた 212 マーカーにより 23 個体の韓国野生チャおよび 25 の日本産品種の遺伝子型が解析されている⁶⁾。いずれも市販のプライマーを用いたスクリーニングから開発されたマーカーであり、Kaundun らは Operon Technologies Inc. および Korean Biotech Inc. のキットを、Lee らは Operon Technologies および Takara Co. Ltd. のキットを使用し、STS 化などの操作は行われていない。

3-2 中国における技術開発

中国では、Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences の Chen らにより、20 のプライマーを用いた 31 の RAPD マーカーにより、中国産 15 品種の遺伝子型が解析されている⁷⁾。Shanghai Sangon Bioengineering Technology Service Co. Ltd. のキットがスクリーニングに用いられ、STS 化などの操作は行われていない。

表1 海外における DNA 品種識別技術開発状況

| 開発国 | 開発者 | マーカーの種類 | マーカー数 | 識別可能な品種数 |
|------|-----------------------------|------------|---------|-----------------|
| 韓国 | Kaundun <i>et al.</i> | RAPD | 58 | 25 ^a |
| | Lee <i>et al.</i> | RAPD | 212 | 48 ^b |
| 中国 | Chen <i>et al.</i> | RAPD | 31 | 15 |
| 台湾 | Lai <i>et al.</i> | RAPD, ISSR | 53, 56 | 37 |
| インド | Mondal | ISSR | 108 | 25 |
| | Balasaravanan <i>et al.</i> | AFLP | 1555 | 49 |
| | Mishra and Sen-Mandi | RAPD | 132 | 10 |
| ケニア | Wachira <i>et al.</i> | RAPD | 157 | 38 |
| | Wachira <i>et al.</i> | RAPD, AFLP | 176, 90 | 48 ^c |
| イギリス | Paul <i>et al.</i> | AFLP | 73 | 32 |

^a: 日本品種 8 種を含む

^b: 日本品種 25 種を含む

^c: 日本産の 8 系統を含む

3-3 台湾における技術開発

台湾では、National Chung Hsing University の Lai らにより、12 プライマーを用いた 53 の RAPD マーカー、および 6 プライマーを用いた 56 の ISSR マーカーが開発され、31 品種と 6 個体の台湾山茶の遺伝子型が解析されている⁸⁾。RAPD マーカー開発では、Operon Technologies Inc. のキットが使用され、また ISSR マーカーの開発には University of British Columbia の primer set が用いられている。いずれも STS 化などの操作は行われていない。

3-4 インドにおける技術開発

インドでは、Uttar Banga Krishi Viswavidyalaya の Mondal により 12 プライマーを用いた 108 の ISSR マーカーによる 25 品種の遺伝子型の解析が行われている⁹⁾。プライマーには University of British Columbia の primer set が用いられている。また、UPASI Tea Research Foundation の Balasaravanan らは 3 組のプライマーを用いた 1555 の AFLP マーカーにより、49 のインド産品種の遺伝子型を解析している¹⁰⁾。また、Bose Institute の Mishra と Sen-Mandi は、11 のプライマーを用いた 132 の RAPD マーカーにより 10 品種の遺伝子型を解析している¹¹⁾。いずれも STS 化などの操作は行っていない。

3-5 ケニアにおける技術開発

ケニアでは、Tea Research Foundation of Kenya の Wachira らにより 21 プライマーを用いた 157 の RAPD マーカーにより、38 品種の遺伝子型が解析されている¹²⁾。STS 化などの操作は行われていない。また Wachira らはケニア産 8 品種、インド産 9 品種、

スリランカ産 4 品種、中国産 8 品種、台湾山茶 4 個体、日本産 8 系統、ベトナム産 4 品種および近縁種 4 種の 48 サンプルについて、37 プライマーを用いた 176 の RAPD マーカーおよび 90 の AFLP マーカーでの遺伝子型を解析している¹³⁾。いずれも STS 化などの操作は行っていない。

3-6 イギリスにおける技術開発

Scottish Crop Research Institute の Paul らにより、5 組のプライマーを用いた 73 の AFLP マーカーが開発され、インド産の 15 品種およびケニア産の 17 品種の遺伝子型が解析されている¹⁴⁾。STS 化などの操作は行われていない。

<参考文献>

- 1) Kaundun SS and Matsumoto S, *Theor Appl Genet* 106:375-383 (2003)
- 2) Kaundun SS and Matsumoto S, *J Sci Food Agric* 84:895-902 (2004)
- 3) Kaundun SS and Matsumoto S, *J Agric Food Chem* 51:1765-1770 (2003)
- 4) Ujihara T, Matsumoto S, Hayashi N and Kohata K, *Food Sci Technol Res* 11:43-45 (2005)
- 5) Kaundun SS, Zhyvoloup A and Park YG, *Euphytica* 115:7-16 (2000)
- 6) Lee SH, Choi HS, Kim RH, Lee HY and Nou S, *J Kor Tea Soc* 1:129-148 (1995)
- 7) Chen L, Gao QK, Chen DM and Xu CJ, *Biodiversity and Conservation* 14:1433-1444 (2005)
- 8) Lai JA, Yang WC and Hsiao JY, *Bot Bull Acad Sin* 42:93-100 (2001)
- 9) Mondal TK, *Euphytica* 128:307-315 (2002)
- 10) Balasaravanan T, Pius PK, Kumar RR, Muraleedharan N and Shasany AK, *Plant Science* 165:365-372 (2003)
- 11) Mirshra RK and Sen-Mandi S, In: *Proceedings of 2001 International Conference on O-Cha (Tea) Culture and Science (Section II), 5-8 October 2001, Shizuoka, Japan*, pp. 66-69 (2001)
- 12) Wachira FN, Waugh R, Hackett CA and Powell W, *Genome* 38:201-210 (1995)
- 13) Wachira F, Tanaka J and Takeda Y, *J Horticult Sci Biotech* 76: 557-563 (2001)
- 14) Paul S, Wachira F, Powell W and Waugh R, *Theor Appl Genet* 94:255-263 (1997)

10) UPOV第 10 回生化学及び分子技術作業部会(BMT)報告

種苗管理センター 業務調整部 調査研究課
調査研究調整役 大川雅央

UPOV 第 10 回生化学及び分子技術作業部会 (BMT) は 2006 年 11 月 21 日～23 日まで韓国 (ソウル) において開催された。以下、会議の内容を報告する。

1. これまでの経緯

生化学及び分子技術に関する UPOV におけるこれまでの議論の経緯の概要が UPOV 事務局より説明された。

(1) BMT の役割 (付託事項) (BMT/10/2)

BMT は DUS 専門家、生化学及び分子技術の専門家及び育種家にかかれたグループである。主な役割は生化学及び分子技術の DUS 試験や植物育種への応用、生化学及び分子情報のデータベースに関するガイドラインの作成、品種同定 (variety identification) と本質的に由来する品種 (「従属品種」といわれる、以下「本質由来品種」という) を考慮して生化学及び分子技術の使用に関する議論の場を提供すること等とされている。

なお、上記最後の BMT の役割から見て、現在の BMT への付託事項を変更することなく BMT において育成者権の行使 (enforcement) に関する議論をすることができると判断されている。

(2) 考えられ分子技術導入のモデル (TC/38/14-CAJ/45/5)

現在 UPOV では以下のオプション 1 (a) の提案 1 とオプション 2 の提案 2 は、一定の前提の下で UPOV 条約と整合し、UPOV 制度における保護の有効性を害しないと判断している。なお、提案 2 については形態的差異と分子的差異の間の相関を改善するため更に調査が必要とされている。また、オプション 3 については、合意が得られていない。

オプション 1 : 形態特性の指標 (predictor) としての分子特性

(a) 形態特性に直接リンクしている分子特性の使用 (遺伝子特異的マーカー)

提案 1 : 遺伝子組み換えによる除草剤抵抗性に対する遺伝子特異的マーカー (フランス)

標準的な DUS 試験においては、ほ場で除草剤を散布して除草剤抵抗性を調査することは困難であるため、除草剤散布による栽培試験を行うことなく除草剤抵抗性遺伝子とリンクした分子マーカーにより抵抗性を判定する。

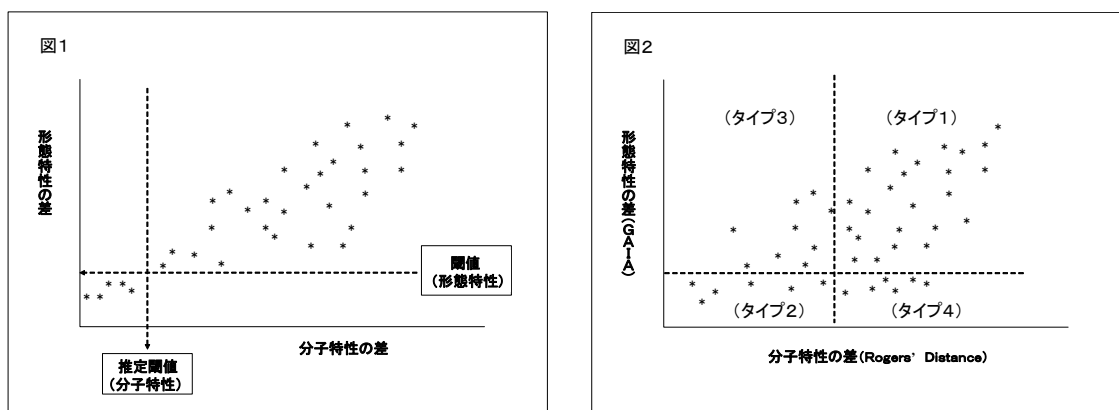
(b) 形態特性を推定するに当たっての信頼性のある一組の分子特性の使用 (例えば量的特性の遺伝子座)

オプション 2 : 形態特性の最小距離 (閾値) に対応する分子特性の閾値の設定

提案 2 : アブラナ、トウモロコシ及びバラの比較品種の管理 (フランス)

このオプションは特性を個々に比較するのではなく遺伝的距離の分析を基礎とし、レファレンスコレクション (栽培試験に用いる比較品種、以下「比較品種」という) の管理 (裁

培試験から除外できる比較品種の選定等)に使用する。なお、形態特性の差(GAIA法(TWA/30/15)による)と分子特性の差(Rogers' distance)に相関関係がある場合(図1)には、どちらの特性の差を使用しても同じ結果となる。しかし、相関関係が低い場合(アブラナ)に分子特性の差を利用すると、形態特性で区別性のない品種ペアを分子特性で明らかな区別性有りと判定し(図2の(タイプ4))、本来は比較(対照)品種としなければならない品種を栽培試験から除外してしまう危険があるという問題点がある。



オプション3：新たな制度の導入

このオプションは分子特性において明確に区別できる差を区別性を判断する閾値水準としてとらえる。また、分子特性を既存の非分子特性と同じように使用することを基礎とする。

提案3：ばらの1組の分子的特性を既存の非分子的特性と同様に使用(オランダ)

品種内の個体のマーカースイトに突然変異が起こることを考慮し、3バンド以上の差がある場合に品種は明確に区別できると判定する。STMS(sequence tagged micro-satellite)マーカースイトは既存のUPOVテストガイドラインの特性とリンクしていないことに留意する。

2. 生化学及び分子技術における最近の状況の概要発表

(1) イタリアでブドウのゲノム解析が進んでいる。オプション1アプローチや本質的由来の研究に有用である。

(2) CPVO(EC 共同体植物品種庁)は育種家が育成者権を行使できるように適切な支援をすることが重要であると考えている。このため、権利行使に関するセミナーを2005年にブラッセル、2006年にワルシャワで開催し、2007年2月にマドリッドで開催予定である。育種家は権利行使するためのより効果的な手法を求めており、BMTはそのような手法開発に貢献できる。CPVOはこの観点からいくつかのプロジェクトを財政的に支援しており、今回のBMTにおいてその内容が報告される予定である。

(3) CIOPORA(国際栄養繁殖性花き・果樹育成者権者団体)では本質由来品種に関するポジションペーパーを2007年4月の会合で採択する予定である。この文書は分子的手法による類似性判定のための閾値を設定することを基礎としている。

(4) ISF(国際種子連盟)はトマトのF1品種の親系統を調査するためのSSR(Simple

sequence repeat: マイクロサテライト) マーカーに関する新たなプロジェクトを開始した。結果は1年半以内にトマト小委員会に報告予定である。DUS試験と品種同定に分子技術を用いることに関するISFのポジションペーパーはインターネット上で公開している。

(http://www.worldseed.org/Position_papers/Use_DNA_Markers.htm)。

ISFのポジションペーパーによると、ISFはDNAマーカーを単独でDUS試験に使用することには現時点では反対であり、使用に先立って①区別性を判定するための最小距離の定義、②均一性、安定性の考え方に及ぼす影響等について明確にする必要があるとしている。DNAマーカーの使用は最小距離を狭くして、保護の水準が低下する恐れがあること等を理由とする。一方、DNAマーカーは登録品種やF1品種の親品種の同定に使用できると考えている。また、DNAマーカーは本質的由来が疑われる場合に紛争解決の手続きをとるかどうかを判断する基準となる遺伝的同一性に関する閾値レベルの決定にも使用できると考えている。

(5) 中国では出願数(2005年で950件)の70%をトウモロコシと稲が占めている。農業省では品種同定のためトウモロコシでは20のSSRマーカー、稲では24のSSRマーカーを選定した。現在、トウモロコシのDNAデータベースを構築中である。

3. 作物ごとの分子技術に関する最新の研究報告の要旨

<栄養繁殖性作物>

(1) 「SSRマーカーを用いたEU共通カタログのバレイショ品種の同定」(BMT/10/5)

CPVOの資金提供により英国においてドイツ、オランダ、ポーランド及び英国のDUS試験の担当者と協力し、EU共通カタログのバレイショ品種(1093品種)の内の576品種について、9つのSSRマーカーを使用して得られたデータと主な形態的特性からなるデータベースを構築した。いくつかの例外(突然変異体及び取り違い(ラベルミス)品種)を除き、すべての品種を同定することができた。しかし、品種コレクションの数が多くなると人為ミスから品種の取り違いが起り、その発見は通常では困難であるという問題があることが明確になった。このことから、分子技術はDUS試験を補完する技術として重要である。

(2) 「ブドウ品種の同定と法的保護のためのSSRマーカーによる手法」(BMT/10/13)

ブドウの品種同定(品種の同定、DUS試験、本質由来品種の同定)に使用することを目的に9つのSSRマーカーを開発・選定した。マーカーの選定にあたっては、自由に利用できること、遺伝的に独立していること(マップ上の位置)、遺伝的多型度が高いこと、対立遺伝子のサイズがmultiplex PCR法が利用できる範囲内にあること等を考慮した。この9つのSSRを使用する手法によりヨーロッパブドウ1300品種以上を分析した。その結果、この手法は品種同定と法的保護(DUS試験)に利用可能であることが示された。品種同定に関しては、マーカーの完全一致は同一品種(又は突然変異若しくは本質由来品種)であることを意味し、法的保護に関しては、2対立遺伝子の相違が最小距離(明確な区別性)であると言える。この手法は現在スペイン植物品種庁(OEUV)のすべての比較品種の特性調査に使用されている。なお、この研究はスペイン植物品種庁の主導で開始されたが、OEUV及びCPVOはDUSの判定にあたってSSRマーカーの情報を採用していないとの

ことである。スペインは CPVO の委託を受けてブドウ品種の DUS 試験を行っている。

(3) 「バラ品種の欧州比較品種」(BMT/10/16)

CPVO、オランダ、英国、ドイツ当局の資金提供により、SSR マーカーを使ったバラ約 380 品種の分子データ、形態的データ及び写真等からなる実験的データベースを構築した。SSR によるバラの品種同定はオランダと英国で実施した。交配で育成された品種はすべて識別できたが、突然変異品種とその親品種は同じパターンを示した。なお、両者で得られたデータの一部に差異が認められた。この原因は電気泳動で生じる弱いピークをマーカーの発現と捉えるかどうか、抽出した DNA に不純物が含まれているかどうか等と関係している。このため両者のデータを統合することは不可能と判断し、オランダのデータのみを使用した。今後、サンプル処理、DNA 抽出法、分子データ（弱いピーク）の評価等を標準化するための試験が必要である。なお、この総合データベースの用途としては、比較品種の特性評価、適当な対照品種の事前スクリーニングと選定、出願品種に関する栽培試験場所間のデータ交換、審査当局内の品質保証（品種の同一性又は真偽の検査）が考えられる。

(4) 「カーネーション品種の同定のための SSR マーカー」(BMT/10/17)

本研究はオランダ政府の資金で行われた。Naktuinbouw（オランダの園芸関係の種子検査や栽培試験等を行う公的機関）において 13 の SSR マーカーを使用し 172 のサンプルを分析した。この結果、来歴の分かっている突然変異品種とその親品種はすべて同じグループに分類できた。これらの突然変異品種と同一品種を除いた 118 品種（別品種と考えられる）の内、2 対立遺伝子の相違が閾値であることを考慮して 111 品種は識別できたが、残りの 7 品種は 2 対立遺伝子以下の相違を示し説明できない 3 グループに分類された。今後の研究が必要であるが、異なる品種間で高い遺伝的同一性を示す理由の一つは、カーネーションに倍数体（時に異数体）の性格があることを考慮すると、SSR では対立遺伝子の有無により遺伝的同一性を判定するため対立遺伝子の量の違いは識別できないことによるのかもしれない。

意見交換：ISF の代表から遺伝的同一性の 85%（Jaccard 係数）は本質由来品種を判定する閾値と考えてよいかとの質問があった。これに対し、カーネーションの分析の結果はバラの場合と一致しているが、遺伝的に近いが突然変異ではない 7 品種 3 グループがどういふ品種か現時点ではわからないので、調査が必要とした。また、議長よりデータベースの利用法として品種同定以外にどんな使用法が考えられるかとの質問があった。これに対し、一つはマーカーを品種の区別性の判定に使った時どういふ結果になるかを見るために使用できる。なお、データベースは育成者権の行使のために迅速な品種同定法が必要であるので育成者からの要望で構築したと説明した。

< 自殖性作物 >

(5) 「オオムギの春化要求性に関する SNP マーカー：オプション 1」(BMT/10/6)

本研究は英国政府の資金で行われた。DUS 栽培試験においてオオムギの春化の特性を調査するには春に広い面積に出願品種を播種する必要があるが、春の播種では秋播性品種は

出穂しないため他の特性について別途栽培試験をする必要がある。このため、春化要求性に関する既存の DUS 試験法に替わる簡便な手法として春化に関わる遺伝子と直接リンクした分子マーカーの利用により春化特性を評価する手法開発を行った。オオムギの春化特性は2遺伝子座が関与する質的なものである。本研究ではこれらの遺伝子座の対立遺伝子の塩基配列を解読し、これらを基に開発した PCR 法により、オオムギ 96 品種すべてを正確に分類できた。また、この手法は出願品種を受領してから2日以内に分析を完了できる。今回の結果は、DUS 特性と関連する特定遺伝子の相違に着目した DNA 試験法の開発に成功した初めての例と思われる。今後、DUS 試験において分子マーカーを使用するオプション1のアプローチは有益と思われる。なお、この分子手法は均一性の評価に応用するためには改良が必要である。

(6) 「トウガラシの辛み特性の研究：オプション1」(BMT/10/7)

トウガラシの辛み特性は UPOV のテストガイドラインでは官能試験により判定することになっているが、一人が一度に調査できる品種数は限られている。そこで、韓国において従来手法に替わる分子マーカーを利用した辛み特性の迅速な評価法の検討を行った。トウガラシの辛み特性は単一の優性遺伝子に依存する質的特性である。この遺伝子配列情報を基に開発した分子マーカーによりトウガラシ 136 品種を分析した結果、辛み特性に関する表現型と遺伝子型がすべて一致した。以上から、このマーカーを利用する手法により辛み特性を決定することができる。

(7) 「トウモロコシ近交系統の DUS 試験のための分子特性と表現型特性の理想バランスに関する研究」(BMT/10/8)

DUS 試験に分子技術を将来的に使用することに関して、表現型特性と分子マーカーを組み合わせて使用することが将来方向になりうるとの合意が形成されつつある。この場合、どの表現型特性と分子マーカーを使用するかが問題となる。そこで、アメリカのトウモロコシ 687 近交系統の表現型に関するデータベースと 400 の SSR マーカーを使用して、特性の最適組み合わせを調査中である。これまでの結果では、表現型特性は正確度が増す程、品種を区別する能力が高くなる。一方、均一性に関しては、特性の数が増加する程又特性の正確度が増加する程、均一性が無くなるリスクが増加する。今後の計画の一つとしては、association genetics を使って類似する情報を持つ分子マーカーと表現型特性を特定することである。これにより一定の表現型特性を分子マーカーで置き換えることができるかもしれない(オプション1)。なお、ISF で 2007 年 1 月の会合で本報告を検討予定である。

(8) 「トウモロコシの DUS 試験に分子技術を使用する可能性について：オプション2」(BMT/10/14)

フランスでは 2005 年にトウモロコシ 279 品種の出願が有り、2,673 系統の比較品種を管理している。DUS 試験における区別性評価の現在の質を低下させることなく増え続ける品種数を処理するため、形態的データと電気泳動データの併用により実際に栽培試験を行う品種を効率的に選定(最少化)するための GAIA 法を開発し現在使用している。現在、表現型特性と組み合わせて約 30 の SSR マーカーから計算される遺伝的距離 (Roger's

distance) を導入することにより、栽培試験や比較品種管理をより効率化できるかどうか検討している。詳細な結果は 2007 年の夏頃まとまる予定である。なお、遺伝的距離を一つの特性とは考えていない。

(9) CPVO 共同出資研究「冬アブラナ比較品種の管理：オプション 2」(BMT/10/11)

冬アブラナ（主に放任受粉品種）の栽培試験において、SSR マーカーを使ってほ場に播種する前に出願品種と比較品種を比べ、出願品種とは明らかに区別できる比較品種は除外することにより実際に栽培する品種数を減少させると共に、栽培試験の現在の水準を維持することのできる比較品種の事前選抜法の開発を目指している。この手法はオプション 2 であり、遺伝的な距離と表現型の距離の間に相関関係がある場合にのみ取りうる手法である。今後は遺伝的及び形態的距離の決定、SSR データの GAIA 法への適用、SSR データベースの構築を行う。この研究は 2008 年完了予定であり、次回 BMT で詳細を報告する。

(10) 「大豆の DNA ベース識別システム」(BMT/10/15)

本研究の目的は SSR マーカーを使用して自殖性作物である大豆の信頼できる品種同定法を開発することである。これまでのアルゼンチンにおける研究では一品種あたり 180 粒を 1 粒ずつ繰り返し DNA 分析することにより、その品種に特有の主要対立遺伝子を 1% 以下の低い頻度で現れる対立遺伝子から明確に区別できた。しかし、この手法ではコストがかかりすぎる。本研究では、1 品種約 100 粒を 1 サンプルとし、まとめて DNA 抽出し分析することにより、主要対立遺伝子のみの SSR パターンを得ることができた。この手法では、仮に大豆 100 粒中 1 粒のみが低い頻度の対立遺伝子を含む（100 粒中 1 粒のみヘテロ）とすると、この対立遺伝子は PCR 分析において量の多い主要対立遺伝子との競争に負けて発現しない。なお、ISF は 100 粒単位で分析することは育成者権行使との関連で大豆の均一性の無さを克服する興味ある手法であると述べた。

<他殖性作物>

文書なし。

<BMT 議長の要約>

栄養繁殖性作物の場合、精度の高いデータベースが構築されており、品種同定や DUS 目的に使用できる大きな可能性を秘めている。報告された作物は高いヘテロ接合性を持ち、形態的及び分子的に大きな差異がある。分子技術の識別力は突然変異個体や本質由来品種を除き非常に高いが、品種保護の有効性を害するような分子技術の使用をしないよう注意が必要である。

自殖性作物の場合には、オプション 1 (a) に該当する分かりやすい提案がいくつかなされ、コストや運営面で大きな利益があることが示された。オプション 2 に関しては、形態的距離と分子的距離の相関関係よりも、分子的閾値と形態的閾値をいかに設定するかに焦点が置かれている。形態的に明らかに異なる品種が栽培試験に紛れ込んだ場合に第二水準のミスが起こる（これは栽培試験で排除できる）。しかし、第一水準のミスは、形態的特性において区別できない品種が栽培試験から除外されてしまう場合に起こる。オプション

2を発展させるにはもっとデータが必要である。この点でトウモロコシとアブラナに関しては調査が進行中であり、分子的情報と形態的情報の相乗効果が期待できるのでオプション2は実施可能かもしれない。また、大豆の研究によると均一性の問題は重要な事項であるが過小評価される恐れがあることを示している。

4. DNA分析のためのガイドライン：分子マーカー選択とデータベース構築（BMT ガイドライン）

本文書は調和のとれた手法により質の高い分子データを得ると共に、そのデータを使ったDNAデータベースを構築するためのガイドラインである。中核となる持続可能なDNAデータベースを構築するための分子マーカーの選定と利用にあたって推奨される手法を要約すると以下の通りである。なお、本ガイドラインは将来の技術進歩等を考慮し、SSRとSNP（Single nucleotide polymorphisms：一塩基多型）に絞って作成した。

- (1) 作物ごとのアプローチの検討
- (2) マーカーの種類（SSR、SNP等）とその入手先についての合意
- (3) 分析機器についての合意
- (4) 試験に参加する実験室についての合意
- (5) DNAの品質に関する合意
- (6) 使用する植物材料の入手先の確認
- (7) 事前共同評価段階においてどのマーカー及び分析機器を使用するかに関する合意
- (8) 評価の実施
- (9) 分子データを数値化するためのルール作り（弱いバンドをどう見るか等）
- (10) 分析する植物材料とその入手先の合意
- (11) 合意した品種について異なる実験室で異なる機器を使って2サンプル分析、問題がある場合にはサンプル又はDNA抽出物を交換
- (12) すべての分析において参照用の品種/DNAサンプル/対立遺伝子を使用
- (13) できる限りすべての過程（データ入力等）を自動化
- (14) データベースを使って異なる実験室で盲検試験（blind test）の実施
- (15) 新しいデータを追加する手続きの採択

5. 分子データの交換可能なデータベース開発の試行実施（BMT/10/4）

植物品種の分子データの交換可能なデータベースの開発に関しては、前回会合において作物を限定して試行実施することが提案された。今回の会合においてはBMTとしてアブラナ、バレイショ、バラにおいてデータベースの構築を試行実施することを次回の第43回技術委員会に提案することが合意された。この試行実施には米国、オランダ及び英国の専門家が参加の意向を表明した。今後、次回技術委員会において当該作業チームへの委任事項が決められる予定である。

6. 本質的由来の試験における分子技術の使用

この件に関しての文書は提出されなかった。
<本質由来品種の取り扱いに関するISF、CIOPORAの現状>

ある品種が原品種（保護品種）に本質的に由来することが疑われる場合、ISFにおいては分子マーカーを使用して遺伝的距離を決定することが認められている。両品種間の類似度が一定の閾値レベルを超える場合には、ISFの仲裁（法的拘束力あり）に持ち込むことができ、同時に挙証責任が転嫁され、本質由来品種であると疑われている品種を利用している者が原品種に本質的に由来していないことを証明するか、あるいは原品種がそもそも他の品種に本質的に由来している品種であると反論する必要がある。ISFはこの閾値は作物ごとに設定すべきであるとの意見である。現時点で閾値が決められている作物はトウモロコシの85%、アブラナと綿の87.5%、レタスの96%である。なお、レタスの場合は10個のAFLPマーカーを使用し、バンドが現れた場合は1、現れない場合は0として、両品種に共通に現れたバンドの数をどちらかの品種に現れたバンドも含めたすべての数で割った割合で表されるJaccard係数 $(n_{11}/(n_{11}+n_{10}+n_{01}))$ により遺伝的類似性を計算し閾値が決定されている。また、CIOPORAにおいても本質由来品種の取り扱いに関するポジションペーパーを2007年4月の会議で決定予定である。

7. 品種同定への分子技術の使用 (BMT/10/10)

CPVOより文書BMT/10/10の報告があった。育種家から権利侵害への対応が困難であるとの指摘が常にある。育成者権の行使を容易にするため、育成者権を認める際に従来の品種記述に加え品種のDNA情報を添付することが可能かどうか検討すべきとの提案もされている。この件に関してはDNA情報の添付を義務づけるかどうか等の技術上及び法律上の多くの問題点が指摘されている。次回BMTにおいてCPVOがこの問題に対応するためのより具体的な提案をすることで合意された。また、ISTA（国際種子検査協会）においても品種同定にDNA分析の利用を検討していることから、次回BMTにおいてISTAの進捗状況が報告されることとなった。

8. 今後

次回のUPOV第11回BMTはスペインで2008年5月に開催される予定である。

2 植物のDNA品種識別技術の開発状況とりまとめ

各植物のDNA品種識別の開発状況について、その概要を、海外、国内に分けて、以下の表にとりまとめた。

各植物のDNA品種識別技術開発状況の概要

| 植物 | 海外における開発状況 | 国内における開発状況 |
|--|---|---|
| <p>1) 花き</p> <p>①バラ</p> <p>②カーネーション</p> <p>③キク</p> | <p>諸特性や写真を収録したデータベースを構築し、種苗検査の負担軽減及び信頼性の向上を図るためのプロジェクトが立ち上がっており、オランダの Plant Research International (PRI)、イギリスの National Institute of Agricultural Botany (NIAB)、ドイツの Bundessortenamt (BSA) が参画している。PRI は、これまでに 11 個の SSR マーカーを用いて、730 品種を識別している。</p> <p>ドイツの花き育種研究所は、連鎖地図の作成や病害抵抗性遺伝子のマッピングを進めており、AFLP、SSR、RFLP、SCAR マーカーなどを用いている。米国のクレムソン大学は、SSR マーカーの開発を試み、これらのマーカーは品種識別にも有効であることを述べている。インドでは、RAPD マーカーにより、21 品種の識別が試みられている。その他、中国、韓国、スペイン、フランスなどにおいて、RAPD や RFLP マーカーを用いた品種識別の事例がある。</p> <p>オランダの PRI により、13 個の SSR マーカーを用いて、枝変わり品種以外の 118 品種を識別できたことが報告されている。PRI では、品種鑑別サービスを行っており、費用は 10 サンプルの識別依頼で、1 サンプル当たり 150 ユーロ、実際に利用可能なマーカーの提供は、7 個の識別マーカーとマルチプレックス化の情報がセットで 10,000 ユーロである。</p> <p>また、ヨーロッパのカーネーション育種会社 (Hilverda, P. Kooji, Selecta, B&B) とスペインの農業検査会社 Applus+が共同で DNA マーカーの開発に取り組んでいる。</p> <p>オランダのライデン大学進化・生態学研究所、TNO 栄養・食糧研究所、ワーゲニンゲン大学植物研究国際施設、カナダのモントリオール大学、台湾の台中区農業改良場、ポーランドのワルシャワ農業大学、中国の北京大学、Fudan 大学、インドのハリヤナ農業大学などが品種識別技術の開発に取り組んでいる。</p> <p>技術としては、RAPD、ISSR、RFLP、SSR、AFLP、葉緑体 SSR 分析などが用いられているが、多型の出現頻度と簡便さから RAPD 法に集中している。しかし、SSR や品種識別に有効となる DNA 領域の STS 化の試みはあっても効果的な報告はなく、全品種に普遍的に使える実用的マーカーまたはシステムの確立には達していない。</p> | <p>1990 年代から、DNA マーカーによるバラ属の系統分類の研究が行われてきた。品種識別については、当時、岐阜大の福井らが 3 つの RAPD プライマーを用いて 9 品種を識別したことを報告している。</p> <p>近年では、種苗管理センターの木村らが SSR マーカーを用いた品種鑑別に取り組み、13 種類の SSR マーカーを新規に開発し、24 品種を識別したことを報告している。</p> <p>種苗管理センターの木村らは SSR マーカーを用いた品種識別に取り組み、15 種類の SSR マーカーを開発し、枝変わりの 2 品種以外の 31 品種について識別が可能であることを報告している。現在、果樹研究所が、これらの過程で取得した SSR マーカーについて、連鎖地図へのマッピングを試みている。</p> <p>実際にキク新栽培品種を作出、開発をしている企業によるキク栽培品種の品種識別技術の開発は (社) 農林水産先端技術産業振興センター (STAFF) の共同プロジェクトとして、今始まろうとしているところである。</p> |

| 植物 | 海外における開発状況 | 国内における開発状況 |
|--|--|---|
| ④ユリ | <p>ユリ属は、ゲノムサイズが極めて大きく、全 DNA を用いたサザン法に基づく DNA 品種識別技術の利用は難しい。そのため、PCR 法を用いた汎用性の高い RAPD、ISSR、AFLP などを用いて、品種識別や雑種判定、さらには自然に自生している個体の識別などが報告されている。しかし、ユリは、もともと種間雑種で新品種が育成されていることから、品種間で多型は得やすく、アイソザイムマーカーによっても識別できる。また、花持ちや耐病性に関わる遺伝子座と連鎖する RAPD マーカーが見出されているが、連鎖地図の作成や有用形質のマーカー選抜への利用を主としている。</p> | <p>北海道大学の山岸らにより、RAPD、ISSR マーカーなどが開発されている。</p> |
| <p>2) 果樹</p> <p>①モモ</p> <p>②ナシ</p> <p>(ピワ)</p> <p>(マルメロ)</p> <p>③リンゴ</p> | <p>これまでに複数のグループから、合計約 500 種類ほどの SSR マーカーが開発され、枝変わり品種と原品種、ネクタリンやオウトウ品種との識別が可能である。フランスの国立農業研究所は、41 種類の SSR マーカーを開発し、モモ 27 品種とオウトウ 21 品種で品種判別を行った。</p> <p>SSR マーカーはサクラ属内で汎用性があり、モモ、アーモンド、近縁種の台木との識別、近縁種のアズでも利用できる。また、AFLP 分析では、モモ 210 品種を用いて 196 品種を識別し、枝変わり品種 11 品種のうち 6 品種が識別可能である。</p> <p>品種識別技術開発を含め、ゲノム研究は日本が進んでいる。日本の果樹研究所等が、100 種類以上の SSR マーカーを開発しており、9 種類の SSR マーカーを用いて、ニホンナシ、セイヨウナシ、チュウゴクナシなど 58 品種及び異名同品種、クローン以外の品種はすべて識別可能となっている。また、RAPD マーカーを用いてナシ 118 品種すべてが識別できる。また、ISSR マーカーはセイヨウナシ 24 品種の識別に有効である。</p> <p>ピワやマルメロはナシと同じバラ科ナシ亜科に属する。ピワでは、RAPD 法による品種識別やリンゴ由来 SSR マーカーによる品種判別が可能である。</p> <p>マルメロでは、リンゴ及びナシ由来の SSR マーカーによる品種識別が報告されている。</p> <p>ヨーロッパ、米国、ニュージーランドで、精力的にゲノム解析研究がなされている。ヨーロッパでは、HiDRAS (EU のプロジェクト) に 10 カ国以上が参加して、多数の SSR マーカーの開発、連鎖地図の作成、遺伝子解析等が進められている。</p> <p>これまでに、約 300 ~ 400 種類の SSR マーカーが開発されており、米国の USDA-ARS は、8 種類の SSR マーカーにより、142 品種が識別可能であることを報告している。また、SSR マーカーと自家不和合性遺伝子 (S-RNase) を組み合わせる解析を行い、品種の識別、親子鑑定、枝変わりかどうかの判定及び親品種の同定も報告されている。また、RAPD 法も品種識別に有効であり、9 種類の RAPD プライマーを用いて 155 の品種・系統を識別できる。</p> | <p>果樹研究所等において、「白鳳」、「あかつき」、「川中島白桃」、「日川白鳳」、「清水白桃」など約 50 品種が識別可能な SSR マーカーが開発されている。</p> <p>果樹研究所等において、「幸水」、「豊水」、「二十世紀」、「新高」、「長十郎」、「あきづき」などニホンナシ約 100 品種が識別可能な SSR マーカーが開発されている。主要なセイヨウナシ品種「ラ・フランス」、「パートレット」などの識別にも利用可能である。</p> <p>ピワでは、リンゴやナシの SSR が適用可能で、「茂木」、「田中」など約 30 品種の識別が可能になっている。</p> <p>果樹研究所等において、「ふじ」、「つがる」、「王林」、「ジョナゴールド」、「千秋」、「陸奥」など約 80 品種が識別可能な SSR マーカーが開発されている。</p> |

| 植物 | 海外における開発状況 | 国内における開発状況 |
|--|--|--|
| <p>④カンキツ</p> <p>⑤オウトウ</p> | <p>日本、米国、スペイン等9カ国による「国際カンキツゲノムコンソーシアム」が結成されており、ゲノム研究からの品種識別技術への展開が期待されている。これまでに、日本、アメリカ、スペインにおいては、ウンシュウミカン、スイートオレンジ、クレメンチンなどの連鎖地図の作成が進展している。</p> <p>カンキツの育成品種とその両親、遺伝資源の分類などを対象とした品種識別は、アイソザイム分析に始まり、これまでにRAPD、RFLP、AFLP、CAPS、SSR、ISSR、RLGS マーカーなど開発されてきた。比較的遠縁な品種間では、葉緑体 DNA の多型を利用した品種識別が用いられる場合もある。しかし近年、CAPS マーカーや SSR マーカーが作成され、品種識別をはじめ、その親品種・系統なども特定することが可能である。また、果汁や缶詰などの加工品での品種識別では、SNP マーカーが利用されている。</p> <p>日本の果樹研究所が、RAPD マーカーにより、Sweet Cherry 18 品種、Sour Cherry 6 品種を含むサクラ類 56 品種の識別について報告している。AFLP 法では、フランスの INRA は、Sweet Cherry 63 品種について識別が可能であることを報告している。</p> <p>そのほか、ドイツ、スペイン、米国、イギリス、カナダ等でも技術開発が行われており、技術としては RAPD、AFLP 以外にも、SSR マーカーが用いられている。モモの SSR マーカーも利用されている。</p> | <p>果樹研究所が、自らの育成品種全てを識別可能な 8 種類の SNP マーカーを開発している。また、CAPS マーカー、RLGS 法も実施している。</p> <p>果樹研究所が、RAPD マーカーにより、Sweet Cherry 18 品種、Sour Cherry 6 品種を含むサクラ類 56 品種の識別について報告している。山形県では、栽培品種 96 品種・系統について、50 種類の SSR マーカーの遺伝子型データを収集した。これらのうち、対立遺伝子数の多い 12 マーカーを品種識別に用いている。</p> |
| <p>3) 野菜</p> <p>①ネギ類</p> <p>(アスパラガス)</p> <p>②イチゴ</p> | <p>ネギにおいては、品種識別技術に関する開発は行われていない。</p> <p>タマネギでは、米国ウィスコンシン大学、ニュージーランド作物食料研究所が、EST 由来の 47 種類の SNP マーカーを用いて、35 品種・系統について 398 個の多型を検出したが、品種識別には至っていない。また、ニュージーランドでは、世界各国から導入したタマネギ品種・遺伝資源および近縁種 94 品種・系統を用いて EST 由来 48 SSR マーカーによる系統分類を行い、米国、ニュージーランド、インドから導入した品種群をそれぞれのクラスターに分類した。</p> <p>アスパラガスは、ネギ類と属は異なるが同じユリ科に属する。米国のカリフォルニア大学において F1 雑種の品質管理に RAPD 法が用いられている。</p> <p>米国のカリフォルニア大学、オーストラリアの Primary Industries Research Victoria (PIRVic)、イタリアの Udine 大学、フランスの BioGEVES 及びイスラエル、ポーランドの研究グループ等、多くの国と機関が DNA 品種識別技術の開発に取り組んでいる。</p> <p>RAPD、RAPD-STS、CAPS、SSR マーカー等が開発されており、カリフォルニア大学などでは、品種同定業務として実用化されている。また、California Seed and Plant Lab. Incorporated (Cal-SPL) のホームページには、イチゴ品種同定業務が記載されている。オーストラリアの PIRVic では、EST-SSR を開発し、14 個のプライマーによって 13 品種の遺伝子型を識別している。イタリアの Udine 大学では、SSR マーカーにより品種識別を試みている。フランスの BioGEVES では、ISSR の増幅パターンにより 30 品種を識別している。</p> | <p>野菜茶業研究所が、ネギについて SSR マーカーを用いて、F1 品種を含む 8 品種を用いて、14SSR 座における品種内多型程度を調査した。既存品種において品種を特定する遺伝子型を決めることは不可能であると結論付けた。このため、新たな方法「SSR-tagged breeding 法」を提案した。</p> <p>タマネギについては、食品総合研究所が、RAPD 由来 STS マーカーにより、同一品種 15 個体について 19 マーカー座を調査している。</p> <p>研究開始当初は、RAPD マーカーによる識別が試みられていた。その後、野菜茶業研究所が「さちのか」の権利侵害を防止する目的で、CAPS マーカーによる品種識別技術の開発を開始した。現在では 25 個のマーカーを用いることにより、日本で登録された 100 以上の品種を同定するまで技術が高度化されている。また、栃木県が RAPD-STS 化マーカーにより「とちおとめ」、「とちひめ」に特異的なマーカーを開発している。福岡県は SSR マーカーによる品種識別開発を行っている。</p> |

| 植物 | 海外における開発状況 | 国内における開発状況 |
|-------------------------------------|---|---|
| <p>③ハクサイ</p> <p>④ナス</p> | <p>中国の北京野菜研究センターは、RAPD プライマーによる 3 個の多型と、アイソザイムによる 9 個の多型を併せて評価することにより、21 品種の識別を可能としている。また、台湾の台湾農業研究所では、8 種類の RAPD プライマーを用いて、非結球ハクサイ 30 系統の識別を可能としている。以後の報告は、品種識別技術の開発を目的としていないが、520 種類の RFLP マーカーによる遺伝連鎖地図の構築（韓国・National Institute of Agricultural Biotechnology (NIAB)）、36 種類の AFLP プライマーと 28 種類の RAPD プライマーにより、470 個の多型を検出した根こぶ病抵抗性遺伝子の解析（韓国・忠南大学校）、980 種類の RAPD マーカーを黒腐病抵抗性に関する遺伝子解析に利用（ロシア科学アカデミー・バイオエンジニアリングセンター）など、遺伝子解析を目的とした DNA マーカーの開発と利用に関する研究は活発に行われている。</p> <p>インド農業研究機構において、14 種類の RAPD プライマーを用いて、インド国内から集められた 28 系統を識別している。以後の事例は、いずれも品種識別技術を目的として開発されたものではないが、ヨルダン大学では、在来の 10 品種を材料とした RAPD 分析により、9 種類の RAPD プライマーで 81 本の多型を検出しており遺伝的多様性の解析に利用している。イタリアのペローナ大学では、ナスとナス近縁種を含む 94 系統の形態特性の遺伝子解析に、AFLP マーカーを利用している。米国のコーネル大学では、QTL 解析に、207 種類の RFLP マーカーを利用している。ナスでは、遺伝子解析や品種育成を目標とした遺伝連鎖地図の構築に向け、多数の DNA マーカーが開発されてきている。</p> | <p>大阪府立食とみどりの総合技術センターが、野菜茶業研究所で開発された Brassica rapa の SSR マーカーの中から、ハクサイ品種識別用として適しているものを選抜した。現在のところ、5 種類の SSR マーカーにより、16 品種の識別が可能となっている。</p> <p>大阪府立食とみどりの総合技術センターが、12 品種の識別が可能である 6 種類の RAPD マーカーを開発した。また、同センターは、野菜茶業研究所で開発されたマーカー情報を利用して、28 品種の識別が可能な SSR マーカーを開発した。食品総合研究所では、各組織で発現する遺伝子配列を 1 万個以上解読し、その情報に基づいて DNA 品種識別に利用可能な SNP マーカーを開発している。</p> |
| <p>4) 穀類</p> <p>①コメ</p> <p>②コムギ</p> | <p>研究開始当初は、RFLP が利用されたが、その後、米国テキサス技術大学、イタリアのパビア大学、中国科学院遺伝研究所、イギリスのバーミンガム大学等では RAPD が用いられた。また、米国のコーネル大学、ジョージア大学等では、SSR が用いられた。その他、SSLP、ISSR、STMS といった手法も用いられている。</p> <p>米国バージニア州立大学では、稲の 238 種類の在来種及び品種を試料とし、10 種類の SSR マーカーを用いて多型を調べ、SSR マーカーが、稲遺伝系統の識別と作物進化の研究に有用であることを報告している。その他、各機関により、様々な研究成果が報告されている。</p> <p>EUにおいて、DUS テストにおける DNA マーカーの利用が検討されている。技術としては、RFLP、RAPD、STS、AFLP、SSR などが検討されている。SSR マーカーについては、識別能力と分析の再現性を調査するため、イギリスの環境食糧省植物研究所、ドイツの Institute for Plant Genetics and Crop Plant Research、フランスの Agrogene、オランダの PRI が共同で、19 個の SSR マーカーにより、502 品種の識別を行った。</p> <p>米国では、農務省の植物品種保護担当部局は品種識別のための栽培試験を行わず、出願者が DNA マーカーによる情報を登録に必要な情報に補足する形で提供した場合には、区別性が明確な証拠として認めることとしている。</p> | <p>食品総合研究所及び三井バイオは、種子を試料とする DNA 品種判別技術を開発した。タカラバイオは食総研の開発した「コシヒカリ判別用キット」を企業化し、市販を開始した。海外貨物検査、穀物検定協会、等が DNA 鑑定を企業化した。マーカーとしては、RAPD、SSR が用いられた。作物研究所では、ミルキークイーン判別技術を開発した。植物ゲノムセンターと東北大学は SNP を開発した。食総研は、150 品種の登録品種についてデータベースを作成した。食総研は、米飯等の米加工品を試料とする DNA 判別技術を開発中である。</p> <p>近畿中国四国農業研究センターにおいて、SDS-PAGE 法により、主要麺用 12 品種のバンドパターンを決定し、識別可能とした。また、PCR 法を用いて 4 種類の DNA マーカーにより、国内に流通する 57 品種のうち、20 品種を個別に判別、37 品種を 11 グループに分類することを可能とした。</p> |

| 植物 | 海外における開発状況 | 国内における開発状況 |
|---|--|---|
| ②オオムギ | <p>カナダ、オーストラリア、イギリス等を中心に、ゲノムプロジェクトが進行していることから、SSR や SNP 等のデータは Web 上で公開されており、これらの DNA マーカーは品種識別技術への適用が可能である。</p> <p>SSR マーカーで 18 品種を識別したという報告がある。また、カナダ穀物局の穀物研究所では、二条性の 67 の品種すべてを識別可能であり、六条性についてはビール麦 17 品種はそれぞれがすべて識別可能であり、非ビール麦の 85 品種の識別も可能である。イギリスでは 29 の SSR マーカーを用いて 134 品種中 116 品種が識別可能である。また、オーストラリアでは 49 のマーカーを用いて 180 の品種のうち 90%以上の品種識別が可能である。</p> | <p>福岡県農総試が、CAPS により、二条大麦 24 品種を識別可能であると報告している。</p> |
| 5) マメ類 ①ダイズ ②インゲンマメ ③アズキ | <p>米国の農務省、USDA-ARS、中国の吉林省農業科学院、韓国の農村振興庁、台湾の国立台湾大学、高雄地区農業改良場、台南地区農業改良場などで品種識別のための DNA マーカー開発が行われている。とりわけ、米国、韓国、台湾の公的機関や民間企業において積極的に DNA マーカーの開発を行っているが、民間企業では極秘事項として取り扱われている。</p> <p>米国の農務省では、13 の SSR マーカーにより、137 の優良品種を識別している。中国の吉林省では、60 品種を識別するため 3 つの RAPD マーカーを選抜した。韓国では、5 つの SSR マーカーにより 90 品種の識別を試みている。台湾では、エダマメ品種の識別のために 25 の ISSR マーカーを開発している。</p> <p>米国のカリフォルニア大学、フロリダ大学、フランスのパリ大学等で連鎖地図が作成され、それらの統合が進められている。これらのマップは RFLP 及び RAPD マーカーによるが、新たに SSR マーカーの開発も進められている。しかし、これら DNA マーカーを利用した品種識別に関する報告は知られていない。</p> <p>栽培種の成立過程を DNA 多型分析により探る研究は RAPD 法、AFLP 法を中心に大変多いが、品種識別に関する研究は極めて少ない。SSR マーカーが 401 種開発されているが、アズキの DNA マーカーは十分とは言えない状況である。</p> <p>中国農業科学院作物品種資源研究所において、アズキとアズキの祖先種ヤブツルアズキを含めた識別を行っている。国立台湾大学ではアズキの品種識別を行っており、高雄地区農業改良場、台南地区農業改良場で開発したアズキの新品種登録に役立っている。中国農業科学院作物品種資源研究所では、AFLP マーカーによりアズキとツルアズキを含めたアクセッションの識別を行った。国立台湾大学では ISSR マーカーが開発されている。</p> | <p>千葉大学が、6 種類の SSR マーカーによりダイズ 24 品種の識別が可能であることを示した。北海道立中央農業試験場では USDA の 4 種の SSR マーカーにより 16 品種が識別可能であったことを報告している。種苗管理センターは、USDA の開発した SSR マーカー 7 種によりエダマメ用登録品種 14 品種、冷凍エダマメ 9 サンプルのうち、19 種について識別が可能であったこと、登録品種は 4 種類の SSR マーカーで識別できたことを報告している。</p> <p>北海道立中央農業試験場が、ランダムプライマーによる品種間多型の探索を行い、8 個の RAPD マーカーを選抜し、識別性の高い 3 種を STS 化した。その結果、「雪手亡」と既存の手亡品種や白餡原料として輸入される海外産の白インゲンマメとの識別を可能とした。</p> <p>北海道中央農業試験場では、北海道育成の「エリモショウズ」等 3 品種と中国品種と判別するための RAPD-STSS マーカー 3 種を開発して民間企業より販売している。農業生物資源研究所では「きたのおとめ」、「しゅまり」と海外の在来品種との識別に利用できる SSR マーカーを 5 種類選び出した。またマルチプレックス PCR の利用により、国産優良品種が識別できる条件を決定した。さらに蛍光シーケンサーにより、国産加糖餡の原材料の特定に成功した。</p> |

| 植物 | 海外における開発状況 | 国内における開発状況 |
|--|--|---|
| <p>6) イモ類 ①ジャガイモ</p> <p>②サツマイモ</p> | <p>World Potato Congress など世界的な会合や、国際学会（北米の Potato Association of America、ヨーロッパの European Potato Association）の機関誌には、DNA フィンガープリントの記事などが随時掲載されている。また、国際ジーンバンクにも品種のカタログや同定法についての情報が提供されている。多くの国と産業界からの強い関心があるが、品種識別技術の開発は、モンサント社等の遺伝子組換え品種や Frito-Lay のような自社で開発し自社で使用しているスナックフード会社を除いてあまりないのが現状である。個別機関としては、オランダの Keygene 社が AFLP を主体とした DNA フィンガープリンティングについてサービス業務を行っている。また、ドイツのマックスプランク研究所、オランダのワーゲニンゲン大学、イギリスの Scottish Crop research などでは、SSR や AFLP などにより、フィンガープリンティングが試みられている。カナダの Agriculture and AgriFood Canada の Fredrickson 試験場では、SSR マーカーによる品種同定の試みがある。</p> <p>サツマイモにおいても、品種の同定は、ジャガイモと同じく形質に基づくカタログが基本となっており、DNA マーカーはマップの作成の試みを主として開発されている。DNA 品種識別に利用する DNA マーカーは、ジャガイモと同様に既に存在しているが、保守性の高い業界では、実際の運用場面を想定した研究開発に取り組んでいないのが現状である。</p> | <p>日本品種の DNA マーカーによる多様性同定は神戸大学の保坂らにより、古くは RAPD 等で 1990 年代前半から行われており、品種同定の基盤はできている。</p> <p>筑波大学のグループが、RFLP マーカーの STS 化、ジャガイモおよびトマトの SSR マーカー確保、そして、形質選抜用の SCAR や CAPS などの各種分子マーカーや基本マップを充実させている。フィンガープリンティングを行うための遺伝材料として、遺伝子の機能性領域の共通性から設計された PCR ベースのマーカーも開発されている。</p> <p>日本では、筑波大学の藤村教授らによる SSR マーカー等の開発があるが、品種同定等には適用されていない。</p> |
| <p>7) 工芸作物 ①コンニャク</p> | <p>コンニャクの栽培に力を入れている国は、日本以外では中国だけであるため、DNA 品種識別技術の開発も中国以外の事例は見られない。中国の Southwest Agricultural University においては、40 種類のプライマーを用いた RAPD 分析により、中国国内で収集されたコンニャク及び近縁種の 22 品種・系統を解析している。研究の目的は、中国国内の栽培種、近縁種を含めた系統解析、遺伝的多様性の評価であり、品種識別にまでには踏み込んでいない。しかし、供試した 22 品種・系統の一つに、日本農林二号花魔芋（あかぎおおだま）が含まれている。</p> | <p>1994 年頃から、品種識別を目的とした研究が始まっている。群馬県農業試験場は、10 種類のプライマーを用いた RAPD 分析により、国内で収集した 34 の品種・系統を解析している。個々の品種・系統を特定するには至っていない。2005 年には、農業生物資源研究所が、RLGS 法により、国内で栽培される主要品種「あかぎおおだま」を含む 8 品種・系統の解析と遺伝子型プロファイリングを実施している。また、九州東海大学では、FRGP 法により、遺伝子型プロファイリングが試みられている。</p> |
| <p>8) キノコ類 ①キノコ</p> | <p>キノコ類は、ツクリタケ、シイタケ、ヒラタケ、エリンギ、オオヒラタケに関するものが中心となる。ツクリタケは、イギリスのマンチェスター大学、その他、カナダ、米国、オランダ、フランス、ポーランドなどで系統識別法が開発されている。シイタケは、米国の University of Utah Research Park、その他、香港、中国において、ヒラタケは、米国の Duke 大学、その他、スペイン、中国、ロシア等において、エリンギは、ギリシャ、イタリアにおいて、オオヒラタケは、ブラジル、ギリシャなどで系統識別法が開発されている。</p> <p>ツクリタケでは、RFLP、RAPD、mtDNA-RFLP や DAMD-PCR などが、シイタケでは、RAPD、AP-PCR、rDNA-RFLP 及び SCAR マーカーなどが開発されている。また、ヒラタケについては、RAPD、28S rDNA、ITS-DNA シーケンス解析、パルスフィールド電気泳動による Molecular Karyotype 法、AFLP などが開発されている。また、エリンギでは、RAPD、SSR、ITS-DNA シーケンス解析、IGS1-RFLP、IGS2-RFLP 法などが挙げられる。オオヒラタケでは、RAPD 法、ITS-DNA シーケンス解析法などが開発されている。</p> | <p>森林総合研究所が、RAPD 法等により輸入シイタケの系統判別を行い、中国産シイタケの主系統が、我が国の古い品種に酷似することを報告した。また、市販シイタケ 140 品種の IGS1 の DNA シーケンスを解析して、その結果を DDBJ に登録して、インターネットを介して IGS1 DNA シーケンスによるシイタケの品種照合を世界的に可能にした。</p> <p>シイタケ以外については、ハタケシメジでは三重県科学技術振興センターにおいて、エリンギでは菌茸研究所、森林総合研究所において、マツタケでは、森林総合研究所において、それぞれ技術開発が行われている。</p> |

| 植物 | 海外における開発状況 | 国内における開発状況 |
|-----------------------------------|--|--|
| <p>9) その他 ①イグサ</p> <p>②チャ</p> | <p>海外での DNA 品種識別技術の開発については、情報や報告が無いため、行われていないと考えられる。</p> <p>遺伝資源や品種、または近縁種を含めた系統解析を目的とする研究が多いが、主として、韓国の Kyungpook National University、中国の Tea Research Institute、Chinese Academy of Agricultural Sciences、台湾の National Chung Hsing University、インドの Uttar Banga Krishi Viswavidyalaya、ケニアの Tea Research Foundation of Kenya、イギリスの Scottish Crop Research Institute などにおいて品種識別技術が開発されている。</p> <p>韓国、中国、台湾、インド、ケニアでは、RAPD マーカーを、また、台湾、インドでは ISSR マーカーを、また、インド、ケニア、イギリスでは、AFLP マーカーがそれぞれ開発されており、韓国産、日本産、台湾産、インド産などの品種の遺伝子型（識別）を解析している。</p> | <p>農業生物資源研究所では RLGS 分析により、近畿中国四国農業研究センターでは ISSR により、九州沖縄農業研究センターでは SNP により、熊本県農業研究センターでは RAPD、AFLP により、それぞれ技術開発が行われている。</p> <p>熊本県農業研究センターでは、RAPD により、1 種類の 10 塩基プライマーを使用することにより、「ひのみどり」を他の主要品種と識別できる多型バンドを検出した。AFLP では、16 組合せ・28 個の多型バンドでそれぞれ「ひのみどり」を他の主要品種と識別できた。</p> <p>野菜茶業研究所が 13 の CAPS マーカーを開発し、46 品種が識別可能であることが報告している（現在、識別可能な品種は 60 となっている）。これらの CAPS マーカーに利用した部位の塩基配列を決定、品種間で比較した結果、配列内に存在する indel を検出する 4 つのマーカーが開発され、また 5 つの SSR マーカーと併せて、44 の品種について遺伝子型が解析されている。CAPS マーカーを用いて、市販緑茶の分析が可能であることが示されている。</p> |

II 国内における先行特許取得状況

平木国際特許事務所

調査の目的

植物育成者権をより強固に保護するため、わが国では様々な品種に関する DNA マーカーが多数開発されている。

DNA マーカーに用いられる技術には、RFLP、RAPD、AFLP、CAPS、SSR、ISSR、SNP などがあり、これらを利用した DNA マーカーや DNA 品種識別に関する技術開発が積極的に進められようとしている。特に、SSR、SNP を利用した技術の実施および開発は、今後ますます増えると予想される。しかし、DNA 品種識別技術について国内での特許状況が整理された情報はほとんどない。

そこで、DNA マーカーや DNA 品種識別に関連する技術、特に SSR および SNP について、国内での特許出願・特許取得状況を調査した。

調査手順

<SSR>

① 発明者からの検索

SSR に関する論文から、研究者（例えば Tautz, D.ら）について、IPDL（特許電子図書館）、esp@cenet で公開および特許公報を検索した。

② キーワード検索

SSR、repeat、ミニサテライト、STR、繰返し、C12Q（IPC（国際特許分類））などをキーワードとして、IPDL、esp@cenet、WIPO の公開および特許公報を検索した。

<SNP>

① 発明者からの検索

SNP に関する論文から、研究者（例えば Caskey ら）について、IPC を「C12Q1/68 OR C12N15/09」に限定して IPDL、esp@cenet で公開および特許公報を検索した。

② 先行技術からの検索

公開または特許公報に記載されている先行技術から公開および特許公報を検索した。

③ キーワード検索

SNP、多型、多形、一塩基多型、一塩基多形、一ヌクレオチド多型、一ヌクレオチド多形、植物などをキーワードとして、「C12Q1/68 OR C12N15/09」に限定して IPDL で公開および特許公報を検索した。

1 SSR、SNP 技術に関する出願・特許状況

1) SSR 技術に関する出願・特許状況

(1) SSR 関連技術の技術分野別出願・特許動向

上記調査手順により検索された公開および特許公報（全 104 件）から、DNA 品種識別技術に関連すると思われる発明(71 件)を以下の 4 つの技術分野に分類し、各技術分野の出願件数、特許件数、拒絶件数などを図 1 に示す。

技術分野 1：検出原理

（増幅法、プライマーの設計、ハイブリダイゼーション、酵素による切断の改変などに関する）

技術分野 2：検出方法・解析フォーマット

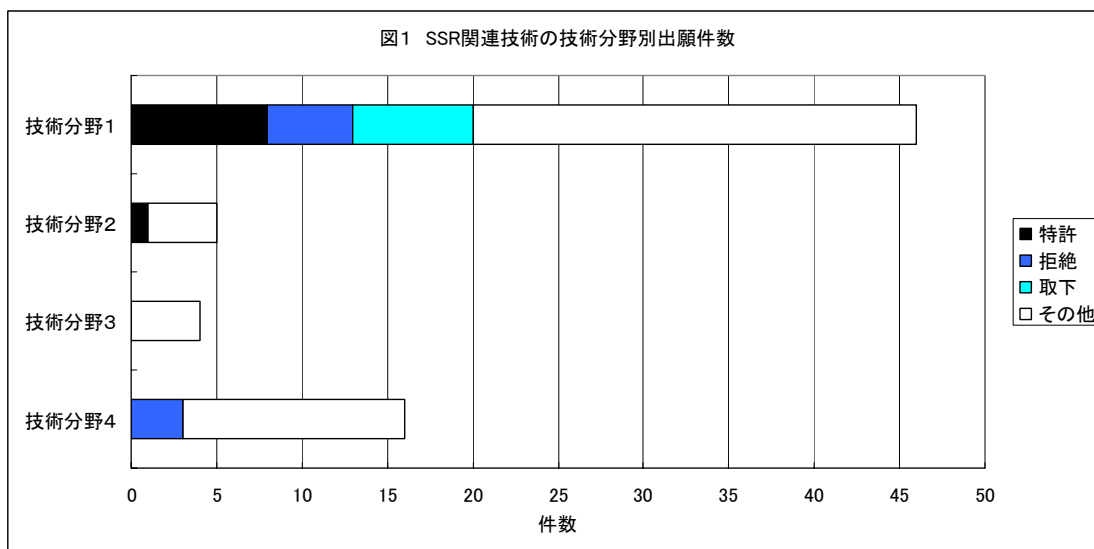
（比色、蛍光、化学発光などによる検出方法の改変、マイクロアレイ、ウェル、ビーズ、電気泳動などの解析フォーマットの改変に関する）

技術分野 3：前処理・核酸抽出精製法

（サンプルの前処理、核酸精製法の改変などに関する）

技術分野 4：マーカー関連

（植物品種識別マーカーに関する）

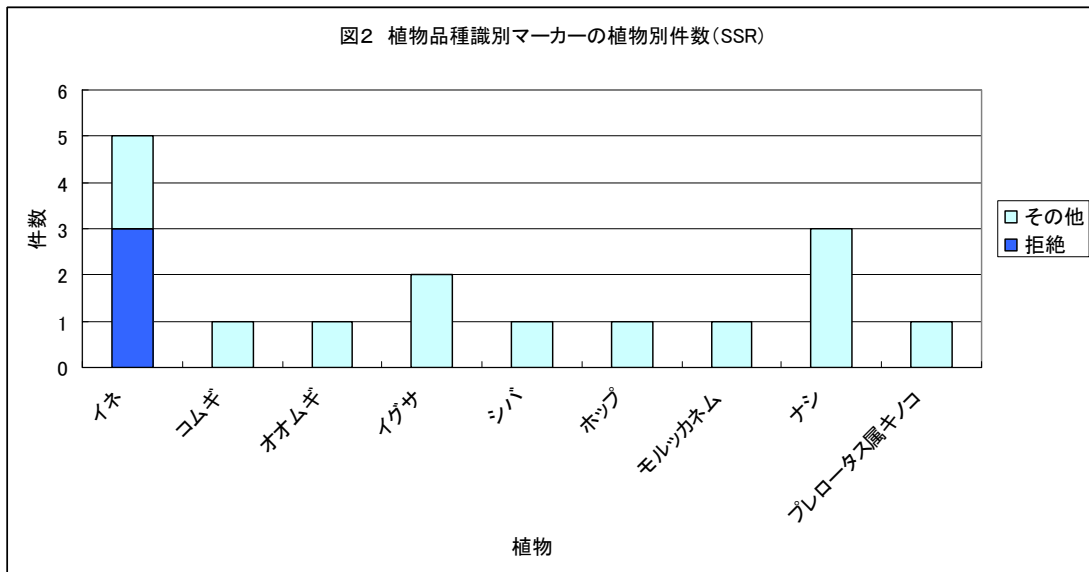


※ 図1の「その他」は、査定が出ていない出願（審査中、審査未請求）を示す。

技術分野1の検出原理の出願は46件であり、特許査定は8件、拒絶査定は5件、取下が7件であった（2006年12月31日現在、以下同様）。技術分野2の検出方法・解析フォーマットの出願は5件であり、特許査定は1件であった。技術分野3の前処理・核酸抽出精製法の出願は4件であった。技術分野4のマーカー関連の出願は16件であり、拒絶査定は3件であった。

(2) マーカー関連出願の植物別出願件数

マーカー関連出願（技術分野 4）の植物別出願の件数を図 2 に示す。



※ 図 2 の「その他」は審査中または審査未請求である。

以下に、公開番号を挙げる。

- ・イネ：特開平 11-206374、特開平 11-253167、特開平 10-57073（以上の 3 件は拒絶査定）、特開 2004-65251、特開 2003-319782
- ・コムギ：特開 2003-189885
- ・オオムギ：特開 2004-298098
- ・イグサ：特開 2005-168308、特開 2005-168310
- ・シバ：特開 2005-027566
- ・ホップ：特開 2006-034142
- ・モルッカネム：特開 2006-141368
- ・ナシ：特開 2002-34597、特開 2002-34567、特開 2002-034562
- ・キノコ：特開 2005-261228

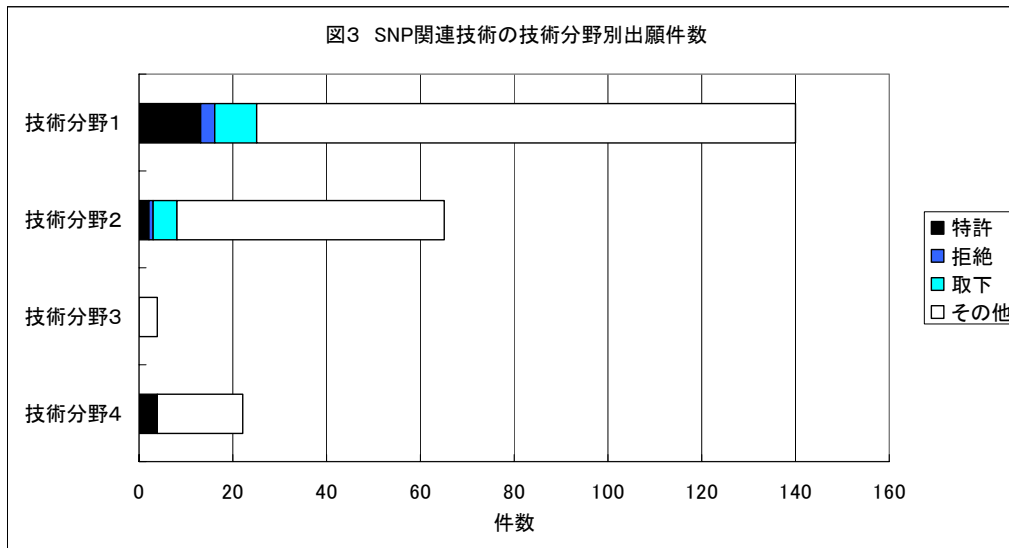
なお、参考として、技術分野 4（植物品種識別マーカー）には入っていない、特定の植物遺伝子マーカーに関連する出願の公開番号を挙げる。

- ・特開平 09-313187（イネ細胞質雄性不稔回復遺伝子マーカー）
- ・特開 2004-135554（アブラナ科植物根こぶ病抵抗性遺伝子マーカー）
- ・特開 2004-321055（オオムギ小穂非脱落性遺伝子マーカー）

2) SNP 技術に関する出願・特許状況

(1) SNP関連技術の技術分野別出願・特許動向

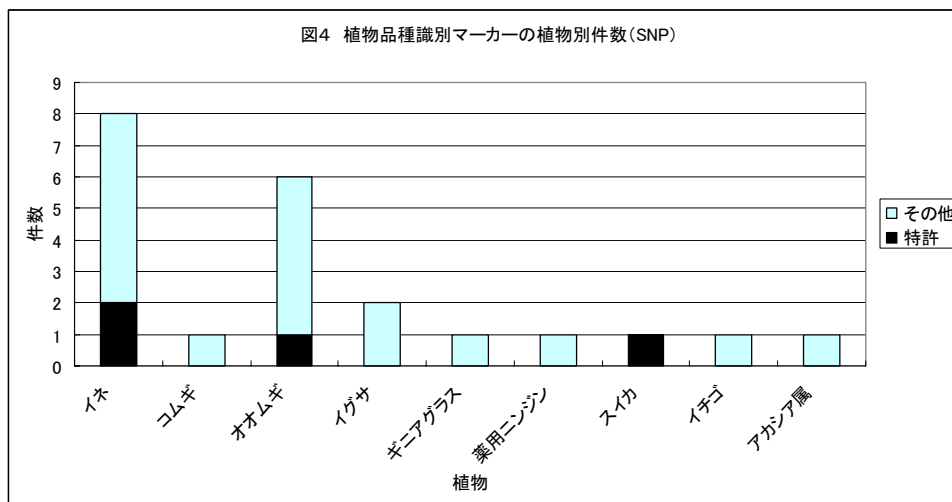
上記調査手順により検索された公開および特許公報（全 369 件）から、DNA 品種識別技術に関連すると思われる発明（231 件）を上記 4 つの技術分野に分類し、各技術分野の出願件数、特許件数、拒絶件数などを図 3 に示す。



技術分野 1 の検出原理の出願は 140 件であり、特許査定は 13 件、拒絶査定は 3 件、取下は 9 件であった。技術分野 2 の検出方法・解析フォーマットの出願は 65 件で、特許査定は 2 件、拒絶査定は 1 件、取下が 5 件であった。技術分野 3 の前処理・核酸抽出精製法の出願は 4 件であった。技術分野 4 のマーカー関連の出願は 22 件であり、特許査定は 4 件であった。

(2) マーカー関連出願の植物別出願件数

マーカー関連出願（技術分野 4）の植物別出願の件数を図 4 に示す。



マーカー関連出願 22 件のうち、4 件が特許査定であった。以下に、マーカー関連出願の特許番号、公告番号、公開番号を挙げる。

- ・イネ：特許 3685478、特許 3569746、特開 2006-174714、再表 03/104491、特開 2005-245244、特開 2006-158253、特開 2005-073655、特開 2004-248635
- ・コムギ：特開 2003-259898
- ・オオムギ：特許 3660699、特開 2004-113234、特開 2003-245075、特開 2003-245074、特開 2003-180370、特開 2003-180369
- ・イグサ：特開 2005-168309、特開 2003-265173
- ・ギニアグラス：特開 2005-080520
- ・薬用ニンジン：特開 2001-186886
- ・スイカ：特公平 07-016421
- ・イチゴ：特開 2005-102535
- ・アカシア属：特開 2005-295925

なお、参考として、技術分野 4（植物品種識別マーカー）には入っていない、特定の植物遺伝子マーカーに関連する出願の公開番号等を挙げる。

- ・イネ：再表 03/070934（植物 sd-1 遺伝子マーカー）
- ・オオムギ：特開 2005-278487（オオムギ遺伝マーカー）
 - 特開 2005-229854（開閉花性支配遺伝子座に連鎖する遺伝マーカー）
 - 特開 2005-229853（小穂脱落性支配遺伝子座連鎖遺伝マーカー）
 - 特開 2005-229852（糊粉層色支配遺伝子座に連鎖する遺伝マーカー）
 - 特開 2005-229851（穂のロウ質支配遺伝子座連鎖遺伝マーカー）
 - 特開 2005-229850（千粒重関与遺伝子座に連鎖する遺伝マーカー）
 - 特開 2005-229849（休眠性関与遺伝子座に連鎖する遺伝マーカー）
 - 特開 2005-229848（穂軸節間長関与遺伝子座連鎖遺伝マーカー）
 - 特開 2005-229847（穂長関与遺伝子座に連鎖する遺伝マーカー）
 - 特開 2005-229845（護穎長関与遺伝子座に連鎖する遺伝マーカー）
 - 特開 2005-229844（小穂段数関与遺伝子座に連鎖する遺伝マーカー）
 - 特開 2005-229842（稈長関与遺伝子座に連鎖する遺伝マーカー）
 - 特開 2005-224221（穎色支配遺伝子座に連鎖する遺伝マーカー）
 - 特開 2005-224220（出穂期関与遺伝子座に連鎖する遺伝マーカー）
 - 特開 2004-321055（小穂非脱落性遺伝子等についての遺伝マーカー）
 - 特開 2004-298098（新規遺伝マーカー）
 - 特開 2004-298094（深播耐性等関与遺伝子等の遺伝マーカー）
 - 特開 2004-215604（オオムギ渦遺伝子の直接検出方法）
 - 特開 2005-040125（皮裸性遺伝子に連鎖する遺伝マーカー）
- ・植物一般：特開 2003-199446（植物品種の識別剤及び識別方法）
 - 特開 2003-093098（植物個体識別方法及び植物育種方法）

2 先行特許の概要

1) SSR 技術の先行特許の概要

上記技術分野 1～4 の特許発明 9 件（図 1 の黒のバーに該当する出願）の概要を、以下の SSR パテントマップに、技術分野別に優先日の早い順に示す。

SSR パテントマップ

| 技術分野 | 課題 | 解決手段 | 特許番号 (公告番号) 出願日 (第一優先日) 特許権者 存続期間満了日 | クレーム |
|------|---------|-----------------|--|--|
| 1 | 検出効率の向上 | プローブ | 特許 2136364 (特公平 4-63680) 1985. 10. 17 (1984. 11. 12) リスター・インスティテュート・オブ・フリンディング・メディスン(イギリス) 2002. 10. 12 (権利消滅) | 1. 1 又は複数の対照と関連付けることによりゲノム DNA の試験試料を特性決定する方法であって、該試験試料をポリヌクレオチドプローブにより探索し、DNA のハイブリダイズした断片を検出し、そして該ハイブリダイズした断片を前記 1 又は複数の対照と比較することを含んで成り、ここで、前記ポリヌクレオチドプローブは、ゲノムのミニサテライト領域と該プローブとのハイブリダイゼーションを可能にする程度にゲノムのミニサテライト領域に対して相同性である配列の少なくとも 3 個のタンデム反復（正確な反復である必要はない）を含むポリヌクレオチドを含んで成り（必要であれば標識された成分又はマーカ成分を含む）、そして前記試料の DNA は、前記タンデム反復に対応する配列を有意な程度に開裂しない 1 又は複数の制限酵素により断片化されており、そして (a) 前記反復の各々はコアーを含有し、このコアーは異なるゲノム遺伝子座からの複数のミニサテライト中に存在する類似の長さのコンセンサスコアー領域に対して少なくとも 70% 相同性であり； (b) 前記コアーは 6～16 ヌクレオチド長さを有し； (c) 前記反復単位中の前記コアーに寄与しないヌクレオチドの合計数は 15 以下であり；そして (d) 複数の多型性ミニサテライト領域又は超可変遺伝子座に関連付けることにより前記ハイブリダイズした断片が前記試料の DNA を区別することを特徴とする方法。 |
| 1 | 検出効率の向上 | プローブにおける共通配列の利用 | 特許 2750228 1985. 10. 17、特公平 4-63680 の分割 (1984. 11. 12) ロイヤル ナショナル オーサビティック ホスピタル リスター・インスティテュート オブ フリンディング・メディスン(イギリス) 2003. 2. 20 (権利消滅) | 1. 遺伝的特性決定用ポリヌクレオチド試薬であって、5'→3'の意味に読まれる次の一般式： $H \cdot (J \cdot \text{コアー} \cdot K) n \cdot L$ (1) 〔式中、“コアー”は 7 個以上の連続するヌクレオチドを有する配列を表わし、該ヌクレオチドは同じ意味に読まれる次の配列： GGAGGTGGGCAGGAXG (2) AGAGGTGGGCAGGTGG (3) GGAGGYGGGCAGGAGG (4) GGAGGAGGGCTGGAGG (5) (式中、X は A 又は G であり、Y は C 又は T であり、そして n は 3 以上である) のいずれかの中から選択され； J 及び K は一緒になって、反復単位内の 0～15 個の追加のヌクレオチドを表わし；そして H 及び L はそれぞれ、反復配列の端に位置する 0 又は 1 以上の追加のヌクレオチドを表わし；そして次のこと、すなわち：(i) “コアー”並びに J 及び K は各 (J・コアー・K) 反復単位中同じ配列又は長さを有することは必ずしも必要でなく； (ii) 全 n 反復配列中の実際の合計コアー配列は、同じ数 n の反復単位において、式 (2)～(5) について上に定義した“真の”合計コアー配列に対して 80%～100% の相同性を有する〕を有するポリヌクレオチド、あるいはこれに対して相補的な配列のポリヌクレオチドを含んで成り、複数のミニサテライト領域又は超可変遺伝子座を検出することができる試薬。 |

| 技術分野 | 課題 | 解決手段 | 特許番号 (公告番号) 出願日 (第一優先日) 特許権者 存続期間満了日 | クレーム |
|------|----------------|------------------|---|--|
| 1 | ゲノムにおける遺伝子座の同定 | ミニサテライトに特異的なプローブ | 特許 1907803 (特公平 6-30636) 1987. 3. 19 (1986. 3. 19) インペリアルケミカルインダストリーズパブリックリミテッドカンパニー(イギリス) 2007. 3. 19 | <p>【請求項 1】 1 又は複数の対照と関連付けることによりゲノム DNA の試験試料を特性決定する方法であって、タンDEM配列に対応する配列を有意な程度に開裂させない 1 又は複数の制限酵素により試料 DNA を断片化し、単一のミニサテライト領域又は超可変遺伝子座について特異的でありそして前記単一のミニサテライト領域又は超可変遺伝子座からのミニサテライトを含有する対応する DNA 断片とハイブリダイズすることができる程度に該単一のミニサテライト領域又は超可変遺伝子座に対して相同性であるヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド又はポリヌクレオチドプローブにより前記 DNA 断片を検索し、DNA のハイブリダイズした断片を検出し、そして該ハイブリダイズした断片を前記 1 又は複数の対照と比較することを含んで成り；</p> <p>前記単一のミニサテライト領域又は超可変遺伝子座が次の配列： <u>AGGAATAGAAAGCCGGYGGTGTGGCCAGGCAGCGGC</u> <u>3</u> <u>GTGGAYAGG</u> <u>4</u> <u>TGGGAGGTGGRYAGTGTCTG</u> <u>5</u> <u>GAATCGAGCAGGYGRCCAGGGTGACTCA</u> <u>6</u> <u>GGGCTGGGGAGATGGTGGAGGAGGTGTGG</u> <u>7</u> <u>AGGCTGGGGAGATGGTGGAGGAAGAGTAC</u> <u>8</u> <u>TGTGTGTAATGGGTATAGGGAGGGCCCCGGGAAGGGGCTGTGGYX</u> <u>9</u></p> <p>(式中、YはC、T又はUであり、XはG又はCであり、RはA又はGであり、そしてTはT又はUである) から選択されたいずれか 1 個の配列もしくはそのタンDEM反復又はこれらに対して相補的な配列を含んで成るポリヌクレオチドプローブにより特異的に同定され得るものである、ことを特徴とする方法。</p> |
| 1 | 時間の短縮自動化への適用 | プライマー | 特許 3218318 1989. 10. 11 (1988. 10. 11) マックスプランクゲゼルシャフト・ツァ・フェルデルンク・デア・ウイッセンシャフト・エー・フ・オ(ドイツ) 2009. 10. 11 | <p>【請求項 1】 (a) 分析しようとする DNA と少なくとも 1 つのプライマー対とのアニーリング [ここに、プライマー対の分子の一方は、3 から 6 のヌクレオチドを含有する短い DNA モチーフを 12 から 100 のタンDEM反復をもって含有している単純な DNA 配列、または偶発的な頻度よりも高いが、不規則である短い DNA モチーフのダイレクト反復である潜在的に単純な DNA 配列における 5'または 3'フランキンク領域の相補鎖の 1 つと実質的に相補的であり、一方該プライマー対分子の他方は該 DNA 配列における 3'または 5'フランキンク領域の相補鎖の他方と実質的に相補的であり、そして 50~500 ヌクレオチド離れた距離での、分析しようとする DNA とプライマー対とのアニーリングは、プライマーの 1 つによるプライマー-制御重合反応によって得られる合成産物が、変性後に、他のプライマーとアニーリングする鑄型となり得るような方向で起こるものである]、(b) プライマー制御した PCR 反応、および (c) PCR 反応の反応産物の分離および分析からなることを特徴とする、DNA 領域の長さ多型に基づいて生物体の同一性および血族関係を決定するための方法。</p> |

| 技術分野 | 課題 | 解決手段 | 特許番号 (公告番号) 出願日 (第一優先日) 特許権者 存続期間満了日 | クレーム |
|------|-----------------------|-------------------------|--|--|
| 1 | 染色体特異的な繰返しヌクレオチド配列の同定 | 低 相 同 性 領 域 の 利 用 | 特許 2777170 1989. 2. 14 (なし) アメリカ合衆国 2001. 5. 1 (権利消滅) | 【請求項 1】繰返し配列のファミリーを有する組換え体 DNA クローンのライブラリーから染色体特異的繰返し DNA 配列を選択する方法であって：以後の調査に供するクローンを、これらのクローンが属する繰返し DNA ファミリーにおける優勢なファミリーメンバーの配列と 80%以下の低い相同性をもつ配列を含むものであることを条件に、選択する工程；選択された前記のクローンを全体的なゲノム DNA に対してハイブリダイズする工程；前記の各々のファミリーにより示される優勢なハイブリダイゼーション・パターンとは似ていないハイブリダイゼーション・パターンをもつ変異体クローンを選択する工程；前記変異体クローンを、染色体特異的なもの、染色体優先的なもの、あるいは染色体非特異的なものとして分類する工程；他のファミリー・メンバーの既知配列および前記染色体優先的クローンのための繰返し DNA ファミリーの共通配列に対して低い相同性を備えた配列を有する前記染色体優先的クローンの領域を決定する工程；および前記の低相同性領域を染色体とハイブリダイズして、通常のストリンジェンシー・レベルでの in situ 染色体特異性を与えるのに有効なヌクレオチド配列を選択する工程からなることを特徴とする、組換え体 DNA クローンを用いて染色体特異的繰返し DNA 配列を選択する方法。 |
| 1 | STR 座位の多重分析 | プ ラ イ マ ー | 特許 3602142 1997. 4. 15 (1996. 4. 15) プロメカ コーポレーション (アメリカ) 2017. 4. 15 | 【請求項 1】1 以上の DNA サンプルに由来する少なくとも 4 つの STR 座位に存在する対立遺伝子を同時測定する方法であって、 a) 分析する少なくとも 1 つの DNA サンプルを得る工程、 b) 分析する該 DNA サンプルと一緒に増幅することができる少なくとも 4 つの STR 座位からなるセットを選択する工程であって、該少なくとも 4 つの座位からなるセットが、 D3S1539、D7S820、D13S317、D5S818； D17S1298、D7S820、D13S317、D5S818； D20S481、D7S820、D13S317、D5S818； D9S930、D7S820、D13S317、D5S818； D10S1239、D7S820、D13S317、D5S818； D14S118、D7S820、D13S317、D5S818； D14S562、D7S820、D13S317、D5S818； D14S548、D7S820、D13S317、D5S818； D16S490、D7S820、D13S317、D5S818； D17S1299、D7S820、D13S317、D5S818； D16S539、D7S820、D13S317、D5S818； D22S683、D7S820、D13S317、D5S818； D16S753、D7S820、D13S317、D5S818；及び、 D16S539、D7S820、D13S317、HUMvMFA31 からなる群より選ばれる工程、 c) 多重増幅反応において、該座位のセットを同時増幅する工程であって、反応産物が、該セット内において同時増幅した各座位に由来する増幅した対立遺伝子の混合物である工程、及び、 d) 該混合物中の該増幅した対立遺伝子を評価し、該 DNA サンプル内のセットにおける分析された各座位に存在する対立遺伝子を測定する工程、 を含むことを特徴とする方法。 |

| 技術分野 | 課題 | 解決手段 | 特許番号 (公告番号) 出願日 (第一優先日) 特許権者 存続期間満了日 | クレーム |
|------|--------------------------------|-------------|--|---|
| 1 | 反復単位数の決定 | 不連続プライマーの伸長 | 特許 3509025 1998. 5. 11 (1997. 5. 27) アプレ コホレシヨ (アメリカ) 2018. 5. 11 | 【請求項 1】 標的核酸の反復領域における反復単位数を決定するための方法であって：(a) 該標的核酸のプライマー相補性部分をプライマーにアニーリングさせる工程であって、それによって標的-プライマーハイブリッドを形成する、工程； (b) 第 1 のプライマー伸長試薬を使用して第 1 のプライマー伸長反応を行う工程； (c) 該標的-プライマーハイブリッドと未反応の該第 1 のプライマー伸長試薬を分離する工程； (d) 第 2 のプライマー伸長試薬を使用して第 2 のプライマー伸長反応を行う工程であって、ここで該第 1 または第 2 のプライマー伸長試薬の少なくとも 1 つが、ヌクレオチドに結合された標識を有する伸長可能なヌクレオチドを含む、工程； (e) 該標的-プライマーハイブリッドを未反応の該第 2 のプライマー伸長試薬から分離する工程； (f) 該標識によって生成されるシグナルを測定する工程； (g) 該標識を検出不能にさせるように、該標識を処理する工程； (h) 該シグナルが前回のサイクルにおいて検出されるシグナルより少なくなるまで該工程 (a) ~ (g) のサイクルを反復する工程；ならびに (i) 該標的核酸の反復領域における反復単位数を決定する工程、を包含する、方法。 |
| 1 | 反復構造の長さの解析 | 融解温度解析 | 特許 3844996 2001. 11. 13 (2000. 11. 15) エフ・ホフマン・ロシュ・アーク - (スイス) 2021. 11. 13 | 【請求項 1】 a) (1) 非反復領域に相補的な第 1 のセグメントと、隣接反復領域に相補的であり、かつ定められた数の反復 (n 反復) からなる第 2 のセグメントとからなる 1 種の、100ヌクレオチド以下のポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブと、(2) 試料中の標的核酸とのハイブリダイゼーションを行なうステップ；及び b) 該標的核酸と前記ハイブリダイゼーションプローブとの間で形成されたハイブリッドの融解点温度を決定するステップを含む、0 ~ n 間の数の反復をもつ反復配列と非反復配列とからなる標的核酸の解析方法。 |
| 2 | DNA の電気泳動後のメンブランフィルターへの移転効率の向上 | 紫外線照射と加熱 | 特許 1985341 (特公平 7-8240) 1989. 5. 1 (1988. 5. 2) ネーデルランセ・オルハニサチエ・フォルトウーバ・スト - ナツル・ウエーテンシヤッペ・ルック・オンデ・ルスク・テ・エヌオー (オランダ) 2009. 5. 1 | 【請求項 1】 下記のステップからなる遺伝的変異を検出する方法。 a) 二本鎖 DNA を 1 種または 2 種以上の制限酵素により断片化し、b) 得られたフラグメントを、電気泳動により、フラグメントの長さに基づく次元とフラグメントの塩基対配列に基づく次元という 2 の独立した基準に基づいて二次元的に分離し、c) 得られた分離パターン中のフラグメントを照射によりさらに断片化し、d) 任意に、さらに上記の分離されたパターンを加熱により変性し、e) 得られたフラグメントまたは変性された分離パターンまたはその両方をメンブランフィルターに移し、f) 該メンブランフィルター上で、ミニサテライト配列またはその他の GC に富む反復配列の 1 種または 2 種以上のコアを含む標識された DNA または RNA 分子を、DNA または RNA プローブとして、DNA 変性条件下でハイブリダイズし、そして、g) 該標識を視覚化する。 |

2) SNP 技術の先行特許の概要

上記技術分野 1～4 の特許発明 19 件（図 3 の黒のバーに該当する出願）の概要を、以下の SNP パテントマップに、技術分野別に優先日の早い順に示す。

SNP パテントマップ

| 技術分野 | 課題 | 解決手段 | 特許番号 (公告番号) 出願日 (第一優先日) 特許権者 存続期間満了日 | クレーム |
|------|--------------------|--|---|---|
| 1 | 特定の核酸配列の大量生産 | プライマーと重合試薬を用いて段階(a)-(c)を反復 | 特許 2093730 (特公平 4-67957) 1986. 3. 28 (1985. 3. 28) I7. ホマン-ラ ロシアクティンゲルシャフト(スイ) 2006. 3. 28 (権利消滅) | 1. 同一の長さまたは異なる長さの 2 つの別個の相補的鎖からなる核酸又はその混合物中に含まれる少なくとも 1 種類の特定の核酸配列の増幅方法であって、 (a)前記鎖を、2 以上のオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、増幅されるべき核酸配列について該核酸配列の鎖に相補的なプライマーの伸長生成物を合成し、ここで、前記プライマーは、特定の核酸配列の鎖と実質的に相補的であり、且つ増幅されるべき核酸配列の両端を規定し、各プライマーから合成された伸長生成物とその相補体から分離された場合に異なる合成のための鑄型として機能することができるように選択され； (b)前記プライマー伸長生成物をそれらが合成された鑄型から分離して単鎖分子を生成せしめ； (c)段階(b)から生じた単鎖分子を段階(a)のプライマーにより処理して、段階(b)において生成した各単鎖分子を鑄型として用いてプライマー伸長生成物を合成する； ことを含んで成る方法。 |
| 1 | 試料中に存在する核酸配列の増幅と検出 | プライマーと重合試薬を用いて増幅し、ハイブリダイゼーションにより増幅したかを検出 | 特許 2093731 (特公平 4-67960) 1986. 3. 28 (1985. 3. 28) I7. ホマン-ラ ロシアクティンゲルシャフト(スイ) 2006. 3. 28 (権利消滅) | 1. 核酸又はその混合物を含むと予想される試料中に少なくとも 1 種類の特定の核酸配列が存在するか否かを検出し、あるいは該試料中の 2 種類の異なる核酸配列を区別する方法であって、まず、前記 1 種類の核酸配列又は複数種類の核酸配列を、 (a)オリゴヌクレオチドプライマーにより、増幅されるべき核酸配列の鎖について核酸鎖に相補的なプライマーの伸長生成物が合成されるように前記試料を処理し、ここで、前記プライマーは、特定の核酸配列の鎖に実質的に相補的であり、且つ増幅されるべき核酸配列の両端を規定し、各プライマーから合成された伸長生成物とその相補体から分離された場合に異なる合成の鑄型として機能するように選択され； (b)前記プライマー伸長生成物をそれらが合成された鑄型から分離して単鎖分子を生成せしめ；そして (c)段階(b)において生成した各単鎖分子を鑄型として用いてプライマー伸長生成物が合成されるように段階(b)から生じた単鎖分子を段階(a)のプライマーにより処理する； ことを含む段階により増幅し；そして次に (d)前記増幅が生じたか否かを決定する； ことを特徴とする方法。 |

| 技術分野 | 課題 | 解決手段 | 特許番号 (公告番号) 出願日 (第一優先日) 特許権者 存続期間満了日 | クレーム |
|------|------------------------------|-------------------|---|---|
| 1 | ハイブリダイゼーション法の迅速化、感度、再現性などの向上 | 2回以上の濾過工程 | 特許 2705811 1988. 10. 8 (1987. 10. 9) サンゲテク モレキュラー デイアグノスティクス アクチボラゲット(スウェーデン) 2008. 10. 8 | 【請求項 1】ハイブリダイズされた、もしくはハイブリダイズされていない核酸試料を容器に接続されたフィルターを通して該容器に濾過して入れて該核酸試料から不溶物を除き、該容器中で該核酸試料があらかじめハイブリダイズされていないばあいは該容器内で標的核酸をハイブリダイズし、該容器内の粒子、もしくはハイブリダイゼーションののちに該容器に加えた粒子に核酸プローブの介在によって固定するか、または標的核酸分子のコピーを該容器に入れ、該コピーがあらかじめハイブリダイズされていないばあいは該容器内で標的核酸分子のコピーをハイブリダイズし、該容器内の粒子、もしくはハイブリダイゼーションののちに該容器に加えた粒子に該標的核酸分子のコピーの重合に用いた修飾されたプライマーの介在によって固定し、そののち粒子を濾過し、該容器において粒子を洗浄し、標的核酸を検出することを特徴とするハイブリダイゼーション法により核酸を検出する方法。 |
| 1 | 簡便で迅速な単一の塩基の変異の検出 | 競合的二重鎖形成 | 特許 2760553 1989. 3. 17 (1988. 3. 18) ベイラー カレッジ オブ メディシン(アメリカ) 2009. 3. 17 | 【請求項 1】少なくとも2つのプライマーを含み、その1つが特定の既知の配列に本質的に相補的で、少なくとも1つは、その特定の配列について1つの塩基ミスマッチがある。競合オリゴヌクレオチドプライマーを核酸、または核酸混合物試料に加え、競合するような条件下で特定の既知の配列に対して、本質的に相補的なプライマーを選択的にハイブリダイズさせ、プライマーがハイブリダイズされるヌクレオチド鎖に相補的な伸長産物を合成するために、その3'末端から選択的にハイブリダイズしたプライマーを伸長させ、その伸長産物を同定するステップを含む、特定の既知の核酸配列の有無を検出する、或いは色々な配列の違いを見分ける方法。 |
| 1 | ヌクレオチド変異検出の容易化 | ヌクレオチドトリホスフェートの使用 | 特許 2786011 1991. 2. 15 (1990. 2. 16) サンゲテク モレキュラー デイアグノスティクス アクチボラゲット(スウェーデン) 2011. 2. 15 | 【請求項 1】少なくとも1つの増幅プライマーがプライマーに結合した第1の付着部分を含有している修飾増幅反応を行なうことにより、検出可能な量の標的核酸ポリマーをえて、(a) 段階 (b) の前に標的核酸ポリマーを固体支持体に固定化すること、(b) 検出可能な量の標的核酸ポリマーを、一本鎖のかたちでオリゴヌクレオチドプライマー、すなわち複数のヌクレオチド残基からなる検出段階プライマーであって、定められた部位から3'末端方向に配置された領域において関心のあるヌクレオチド配列と相補的であり、かつ定められた部位はプライマーの3'末端に隣接しているプライマーとハイブリダイズすること； (c) 第1および/または第2のいずれかのヌクレオチド残基に相補的な少なくとも1つの標識化ヌクレオシドトリホスフェート、任意に他の種類のヌクレオチド残基に相補的な1またはそれ以上の読終りヌクレオシドトリホスフェートおよびポリメライジングエージェントを含有している混合物中、プライマーを延長すること；ならびに (d) ヌクレオシドトリホスフェートの取り込みを検出し、それによって定められた部位のヌクレオチド残基が何であるか決定することを含んでなる、第1のヌクレオチド残基が第2のヌクレオチド残基によって置換されている標的核酸ポリマー中の定められた部位での特定のヌクレオチド変異を検出するための方法。 |

| 技術分野 | 課題 | 解決手段 | 特許番号 (公告番号) 出願日 (第一優先日) 特許権者 存続期間満了日 | クレーム |
|------|----------------|-------------------------------------|---|--|
| 1 | 熱安定酵素の提供 | T. litoralis から入手 | 特許 3229886 1991. 4. 26 (1990. 4. 26) ニュー・イングランド・バイオレイブス・インコーポレイテッド (アメリカ) 2011. 4. 26 | 【請求項 1】 100℃における半減期が安定剤の非存在下で60分および安定剤の存在下で95分であるように温度安定性であり、分子量が90,000から95,000ダルトンであり、上記安定剤は非イオン界面活性剤およびタンパク質からなる群より選択される、サーモココカス・リトラリス (Thermococcus litoralis) から得られるDNAポリメラーゼ。 |
| 1 | 一本鎖の核酸分子の切断 | DNAポリメラーゼの5'エキソヌクレアーゼ活性の利用 | 特許 3518884 1993. 12. 7 (1992. 12. 7) ウイスコンシンアラマイリサーチフロンティオン(アメリカ) 2013. 12. 7 | 【請求項 1】 (a) 標的核酸及びパイロット核酸を含んでなる切断構造を形成する工程であって、標的核酸の第一領域がパイロット核酸とアニーリングされて二重らせんを形成し、かつ二重らせんに隣接する標的核酸の第二領域がパイロット核酸とアニーリングされないで二重らせん領域と非アニーリング領域の間で接合部位を形成する工程 (b) 切断構造を、切断構造の配列に依存せずに標的部位で切断構造を優先的に切断することができる切断剤に接触させる工程、及び (c) 切断構造と切断剤を、切断が起こり得る条件下で温置する工程の各工程を含んでなり、前記切断剤がDNAポリメラーゼのドメインであるか又はバクテリオファージT7の遺伝子6生産物である、特異的標的部位で標的核酸を切断する方法。 |
| 1 | 伸長後の一本鎖核酸分子の生成 | ホスホロチオエートヌクレオチド誘導体を用いたエキソヌクレアーゼ耐性付与 | 特許 3330946 1994. 1. 18 (1993. 1. 15) オーキッド・バイオサイエンス・インコーポレイテッド (アメリカ) 2014. 1. 18 | 【請求項 1】 相補的な配列の核酸分子を実質的に含まない、所望の一本鎖核酸分子の生成方法であって、下記工程：(A) 前以て選択した核酸分子をプライマー分子の存在下でインキュベートし、その際、該プライマー分子は該前以て選択した分子にハイブリダイズすることができ、該プライマー分子は該プライマー分子の5'末端に少なくとも4つのホスホロチオエートヌクレオチド残基の領域を含み； (B) 鋳型に依存した該プライマーの伸長を行って該所望の核酸分子を生成させ；ついで (C) 該前以て選択した核酸分子を除去するに十分な条件下で該インキュベーション液に5'→3'エキソヌクレアーゼを加え、それにより相補的な配列の核酸分子を実質的に含まない該所望の一本鎖分子を得るからなることを特徴とする方法。 |

| 技術分野 | 課題 | 解決手段 | 特許番号 (公告番号) 出願日 (第一優先日) 特許権者 存続期間満了日 | クレーム |
|------|----------------|------------------------------------|---|--|
| 1 | 伸長後の一本鎖核酸分子の生成 | ホスホロチオエートヌクレオチド誘導体によるエキソヌクレアーゼ耐性付与 | 特許 3421664 1994. 1. 18、特許 3330946 の分割 (1993. 1. 15) オキッド・パトイサイエンス・インコーポレイテッド (アメリカ) 2014. 1. 18 | 【請求項 1】 目的核酸中の特定の位置におけるヌクレオチド塩基を同定する方法であって、(A) 2つのプライマー分子および鋳型としての該目的核酸を用いて複製連鎖反応を行い、その際、該プライマー分子の一つは該プライマーの 5' 末端に少なくとも 4つのホスホロチオエートヌクレオチド残基の領域を含み、該反応は二本鎖増幅生成物を生成するに充分なものであり、(B) オリゴヌクレオチドにエキソヌクレアーゼに対する耐性を付与する充分な数のホスホロチオエート結合を欠くオリゴヌクレオチドを分解する条件下、該増幅生成物を 5'→3' エキソヌクレアーゼで処理して、少なくとも 4つのホスホロチオエートヌクレオチド残基の領域を含む一本鎖の目的核酸を得、(C) 工程 (B) からの一本鎖の目的核酸を、ハイブリダイズ条件下、同定しようとするヌクレオチド塩基の直ぐ隣に目的核酸中に存在するヌクレオチド塩基の連なりとハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチドプライマーと接触させて該プライマーと該目的核酸との間に二本鎖を生成させることにより、同定しようとするヌクレオチド塩基が該二本鎖中のプライマーの 3' 末端の直ぐ下流の鋳型中の最初の不对塩基となるようにし、(D) 工程 (C) からの二本鎖を、dATP、dCTP、dGTPまたはdTTPの実質的不在下、少なくとも 2つの異なるヌクレオシド三リン酸誘導体と接触させ、該誘導体は該最初の不对塩基に相補的な誘導体を含み、核酸鋳型に依存したプライマー伸長反応のターミネーターであり、その際、該ターミネーターの少なくとも一つは検出可能なマーカで標識されており、該接触を該相補的ターミネーター誘導体と該最初の不对塩基との塩基対形成を可能とするに充分な条件下で行い、(E) 該相補的ターミネーター誘導体をプライマーの 3' 末端中に導入するに充分な鋳型依存プライマー伸長反応を起こさせ、ついで (F) 該導入された誘導体を同定し、それにより該目的核酸中の特定の位置におけるヌクレオチド塩基を同定する方法。 |
| 1 | 能率的で正確な核酸配列の決定 | プライマーセットのプライマーが 1塩基対異なる | 特許 3722833 1994. 6. 22 (1993. 6. 22) ジーイー・ヘルスケア・パトイサイエンス・アクチボラグ (スウェーデン) ペイラー・カレッジ・オブ・メディスン (アメリカ) 2014. 6. 22 | 【請求項 1】 既知の配列を有する対象ポリヌクレオチドにおける変異領域の存在を確認するための、下記のステップを含む該対象ポリヌクレオチドの配列の分析法。 a) 各々が同一数の塩基を有すると共に、既知の配列を有する任意の数のオリゴヌクレオチドプライマーを含む組であって、1番目のオリゴヌクレオチドプライマーが第 1～第 N塩基を有し、2番目のオリゴヌクレオチドプライマーが、第 1オリゴヌクレオチドプライマーの第 2～第 N塩基および第 N+1 塩基を有し、以下 n番目 (n<N) のオリゴヌクレオチドプライマーが、n-1番目のオリゴヌクレオチドプライマーの第 2塩基以降の全ての塩基および第 N+(n-1) 塩基を有するように、n番目のオリゴヌクレオチドプライマーと n-1番目のオリゴヌクレオチドプライマーとを成長端において互いに一塩基だけ異ならした前記組の 1つ以上を持つアレイに、ハイブリッド形成条件で対象ポリヌクレオチドをアニールしてアニールプライマーを発生させ、 b) 四つの塩基の各々に相応するヌクレオチドをアニールプライマーに与える単一塩基拡張反応にアニールプライマーを付して、終止ヌクレオチドを付加することによりアニールプライマーを拡張し、 c) アニールプライマーに付加した各終止ヌクレオチドを同定し、その位置を見る、各ステップを備え、 ステップ a) における各オリゴヌクレオチドプライマーは、前記対象ポリヌクレオチドにおける前記変異領域の直近にアニール可能である分析法。 |

| 技術分野 | 課題 | 解決手段 | 特許番号 (公告番号) 出願日 (第一優先日) 特許権者 存続期間満了日 | クレーム |
|------|----------------------|--|---|---|
| 1 | 部位特異的に核酸開裂構造体を開裂する方法 | 酵素の5'ヌクレアーゼ活性で開裂 | 特許 3665648 1997. 1. 22 (1996. 1. 24) サトウ ケンゴ テクノロジーズ, インコーポレーテッド (アメリカ) 2017. 1. 22 | <p>【請求項 1】 標的核酸分子の存在を検出するための方法であって、</p> <p>a) 標的核酸と、第1オリゴヌクレオチドと、第2オリゴヌクレオチドとで開裂構造体を形成させること、</p> <p>ただし、標的核酸は第1領域、第2領域および第3領域を有し、該第1領域は第2領域に隣接してその下流に位置し、該第2領域は第3領域に隣接してその下流に位置するものであり、</p> <p>上記第1オリゴヌクレオチドは、3'部分と5'部分を持ち、該第1オリゴヌクレオチドの3'部分は標的核酸の前記第3領域に完全に相補的な配列を含んでおり、該第1オリゴヌクレオチドの5'部分は、該第1オリゴヌクレオチドの3'部分に隣接しており、かつ標的核酸の前記第2領域に完全に相補的な配列を含んでおり、</p> <p>上記第2オリゴヌクレオチドは、3'部分と5'部分を持ち、該5'部分は標的核酸の前記第1領域に完全に相補的であり、</p> <p>上記開裂構造体は、第1オリゴヌクレオチドが標的核酸の上記第3領域および上記第2領域にアニーリングし、かつ第2オリゴヌクレオチドが標的核酸の第1領域にアニーリングし、該第2オリゴヌクレオチドの3'部分は、標的核酸の第2領域にアニーリングした第1オリゴヌクレオチドの該5'部分の配列からなるヌクレオチドとオーバーラップするように形成され、</p> <p>b) 耐熱性5'ヌクレアーゼにより、上記開裂構造体を構成している上記第1オリゴヌクレオチドを開裂させ、上記第1オリゴヌクレオチド由来の非標的開裂産物を生成させること、</p> <p>該耐熱性5'ヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼ活性を有しており、上記開裂構造体を認識してそこに含まれる第1オリゴヌクレオチドを第2オリゴヌクレオチドすなわちインベーター指令部位にて開裂させることができるものである、および、</p> <p>c) 上記開裂構造体を構成している上記第1オリゴヌクレオチドの開裂を検出することにより、標的核酸分子の存在を検出すること、を含む上記方法。</p> |
| 1 | SNP検出の正確性向上 | 3'末端からDNA伸長反応が開始されず、塩基配列に応じてヌクレアーゼ切断が左右されるようなヌクレオチドの作製 | 特許 3681729 2002. 2. 14 (2001. 2. 15) カウハイツ株式会社 2022. 2. 14 | <p>【請求項 1】 標的核酸上の特定の塩基における塩基置換の有無を検出する方法であって、</p> <p>(1) 標的核酸を含有する試料とヌクレオチドとを混合する工程：ここで当該ヌクレオチドは、</p> <p>A) その3'末端が当該末端からのDNAポリメラーゼによる伸長が起こらないように修飾されており、</p> <p>B) 標的核酸上の前記特定の塩基を含有する領域にアニーリングしうる塩基配列を有しており、</p> <p>C) 当該ヌクレオチドと標的核酸とから形成される複合体において、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在する場合にはヌクレオチドはヌクレアーゼによる切断を受けず、かつ、前記特定の塩基と該塩基に対応するヌクレオチド上の塩基との間にミスマッチが存在しない場合にはヌクレオチドがヌクレアーゼにより切断されて新たな3'末端を生じるような配列を含有しており、</p> <p>(2) 前記混合物をヌクレアーゼ、およびDNAポリメラーゼで処理する工程：および</p> <p>(3) ヌクレアーゼによるヌクレオチドの切断の有無を検出する工程、を包含することを特徴とする塩基置換の検出方法。</p> |

| 技術分野 | 課題 | 解決手段 | 特許番号 (公告番号) 出願日 (第一優先日) 特許権者 存続期間満了日 | クレーム |
|------|-------------------------|-------------------------------------|--|--|
| 1 | 特異性の高い SNP 解析 | 一塩基短く一塩基異なるプローブ | 特許 3697436 2002. 9. 30 (なし) 株式会社東芝 2022. 9. 30 | 【請求項 1】第 1 の標的部位と第 1 の配列を含む第 1 のプローブと、第 1 の配列よりも 1 塩基だけ短く、第 1 の標的部位の位置に対応する第 2 の標的部位の 1 塩基を除いて相同な配列を含む第 2 のプローブとに対して、試料中の核酸を適切なハイブリダイゼーションの生じる条件下で反応させることを具備し、 前記第 1 の標的部位と第 2 の標的部位の塩基の組み合わせが、チミンとグアニン、アデニンとグアニン、シトシンとアデニン、シトシンとチミン、ウラシルとグアニン、シトシンとウラシルからなる群より選択されることを特徴とする核酸配列の解析方法。 |
| 2 | ゲル電気泳動を用いない SNP 検出方法 | 1 塩基がターゲット核酸配列と相補的でないプライマーとピロリン酸の利用 | 特許 3638516 2000. 9. 28 (なし) 株式会社日立製作所 2020. 9. 28 | 【請求項 1】ターゲット核酸の特定の配列の領域に相補的な配列を含み、3' 末端から 3 塩基目の塩基が前記ターゲット核酸配列と相補的でない塩基であるプライマーを、前記ターゲット核酸にハイブリダイズさせる工程と、 複数の核酸基質とポリメラーゼとを用いて、前記ターゲット核酸を鋳型とし、前記プライマーを始点とする相補鎖伸長反応を行なわせる工程と、 前記相補鎖伸長反応の反応副産物として生じるピロリン酸を ATP に変換し、前記 ATP と酵素を用いて発光反応を行なわせる工程と、 前記発光反応で生ずる発光を検出する工程とを有し、前記特定の配列の領域は 1 塩基置換の部位を含み、前記プライマーは前記 3' 末端が前記 1 塩基置換の部位と相補鎖結合を生じ得るものであり、前記検出する工程では前記 1 塩基置換の有無を検出することを特徴とする核酸検出方法。 |
| 2 | 簡易かつ高感度の核酸検出による SNP の判別 | 無機リン酸による検出 | 特許 3672036 2003. 3. 17 (2002. 3. 19) 松下電器産業株式会社 2023. 3. 17 | 【請求項 6】核酸を検出する方法であって、 該核酸の配列に相補的な配列を持つ DNA プローブ、DNA ポリメラーゼ、デオキシヌクレオチドを含む反応系に試料を供し、該 DNA プローブを伸長させ、ここでピロリン酸が該 DNA プローブの伸長反応に伴って生成される工程； 試料中の生成されたピロリン酸を無機リン酸に変換する工程； 該試料を、グリセルアルデヒド-3-リン酸、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド又は酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸、グリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ、ジアホラーゼ、および電子メディエータを含む測定系に供する工程； および該測定系において電流値を測定する工程を包含し、ここで、該電流値が、該試料中の特定配列を有する核酸の濃度を示し、 前記測定系に試料を供してから 100 秒以内に核酸が検出される、 核酸の検出方法。 |
| 4 | スイカ品種識別と F1 種子の純度検定 | 任意な配列を持つ合成オリゴヌクレオチドを用いた PCR | 特許 1991519 (特公平 7-16421) 1992. 10. 5 (なし) 農林水産省 野菜・茶業試験場長 2012. 10. 5 | 【請求項 1】下記の配列から成るスイカ F1 品種の識別に用いる合成オリゴヌクレオチド。 5' - ACCACCTGGCTC - 3' 【請求項 2】スイカより抽出した DNA を鋳型とし、請求項 1 記載の合成オリゴヌクレオチドを用いたポリメラーゼ連鎖反応により DNA の増幅を行い、得られた増幅産物を電気泳動分析することを特徴とするスイカ品種の識別方法。 |

| 技術分野 | 課題 | 解決手段 | 特許番号 (公告番号) 出願日 (第一優先日) 特許権者 存続期間満了日 | クレーム |
|------|--------------------------|----------|--|---|
| 4 | 醸造用オオムギまたは麦芽の品種識別 | プライマーの設計 | 特許 3660699 1994. 9. 29 (なし) サポール株式会社 2014. 9. 29 | 【請求項 1】 配列番号 1 に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び配列番号 2 に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドからなるプライマー対と、配列番号 3 に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド及び配列番号 4 に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドからなるプライマー対とを用いて PCR 法により大麦又は麦芽のゲノム DNA を増幅し、増幅した DNA の塩基配列の違いによって大麦又は麦芽の品種をあまぎ二条、はるな二条、ミサトゴールデン、Clipper、Schooner、Stirling、Harrington、Manley、Ellice 及び Alexis の 10 品種のうちのいずれかであると識別する方法 |
| 4 | 米試料（米飯等を含む）の品種判別 | プライマーの設計 | 特許 3685478 2000. 7. 27 (1999. 7. 27) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 2020. 7. 27 | 【請求項 1】 品種間の識別性の高い識別バンド S13、M2CG、M11、B1、WKA9、J6、F6、B7 および A7 からなる群より選択された識別バンドから抽出された DNA 塩基配列のフォワード側及びリバース側から 8 ～ 50 塩基となるように設計された対合プライマーとして、S13F25（配列表の配列番号 1）および S13R24（配列表の配列番号 2）；S13R-8（配列表の配列番号 3）の対称配列；M2CGF17（配列表の配列番号 4）および M2CGR15（配列表の配列番号 5）；M2CGF50（配列表の配列番号 6）および M2CGR50（配列表の配列番号 7）；M11F20（配列表の配列番号 8）および M11R20（配列表の配列番号 9）；B1F25（配列表の配列番号 12）および B1R20（配列表の配列番号 13）；WKA9F20（配列表の配列番号 16）および WKA9R20（配列表の配列番号 17）；J6F18（配列表の配列番号 20）および J6R20（配列表の配列番号 21）；F6F25（配列表の配列番号 36）および F6R20（配列表の配列番号 37）；F6F21（配列表の配列番号 38）および F6R27（配列表の配列番号 39）；F6F50（配列表の配列番号 40）および F6R50（配列表の配列番号 41）A7F50（配列表の配列番号 46）および A7R50（配列表の配列番号 47）；B7F22（配列表の配列番号 34）および B7R17（配列表の配列番号 35）；A7F19（配列表の配列番号 32）および A7R16（配列表の配列番号 33）；A7-8（配列表の配列番号 54）の対称配列からなる群より選択された 1 ～ 4 種類のいずれかを用いて、米試料から抽出した DNA を鋳型とする PCR 法を行い、品種間の識別性の現れるバンドのみを増幅させ、電気泳動により検出することを特徴とする米試料の品種判別方法。 |
| 4 | 低アミロース米品種シキケイン及び同系統品種の識別 | プライマーの設計 | 特許 3569746 2001. 5. 23 (なし) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 2021. 5. 23 | 【請求項 1】 配列番号 1 に示す塩基配列のうち、少なくとも 27 番目の塩基を含み、かつ連続する少なくとも 20 塩基からなる塩基配列を有する DNA 断片。 【請求項 2】 請求項 1 記載の DNA 断片を含むプライマー。 |

3 海外での特許状況

上記技術分野 1～4 に分類された、日本で査定が確定した出願（SSR：特許 9 件、拒絶 9 件、SNP：特許 19 件、拒絶 4 件）について、US および EP における対応出願の状況を調査した。

1) SSR 関連技術の海外での特許状況

| 発明の名称 (優先権主張国又は出願国) | 日本 (特許、公告又は 公開番号) | US (特許又は 公開番号) | EP (特許又は 公開番号) |
|--|-------------------------|----------------------|----------------------|
| ポリヌクレオチドプローブ (イギリス) | 特許 特公平 4-63680 | 特許 USP5413908 | 特許 EP0186271B1 |
| 遺伝的特性決定用ポリヌクレオチド(特公平 4-63680 の分割) (イギリス) | 特許 特許 2750228 | 特許 USP5413908 | 特許 EP0186271B1 |
| 遺伝的特性決定方法 (イギリス) | 特許 特公平 6-30636 | 特許 USP5175082 | 特許 EP0238329B1 |
| DNA 領域における長さ多型を検出する方法 (ドイツ) | 特許 特許 3218318 | 特許 USP5766847 | 特許 EP0438512B1 |
| 組換え体 DNA 加断を用いて染色体特異的繰返し DNA 配列を選択する方法 (アメリカ) | 特許 特許 2777170 | 特許 USP5064948 | 特許 GB2215724B 等 |
| STR 座位の多重増幅 (アメリカ) | 特許 特許 3602142 | 特許 USP5843660 | 特許 EP0960207B1 |
| 不連続プライマー伸長による核酸の反復配列長 の決定 (アメリカ) | 特許 特許 3509025 | 特許 USP67738872 | 特許 EP1135528B1 |
| 反復性 PCR 産物の融解曲線解析方法 (EP) | 特許 特許 3844996 | 特許 USP6664064 | 特許 EP1207210B1 |
| 遺伝的変異を検出する方法 (オランダ) | 特許 特公平 7-8240 | 特許 USP5068176 | 特許 EP0349024B1 |
| 確認法 (イギリス) | 拒絶 特開平 6-205700 | 特許 USP5811235 | 特許 EP0530009B1 |
| 遺伝的特性決定用ポリヌクレオチド(特公平 6-30636 の分割) (イギリス) | 拒絶 特開平 5-276948 | 特許 USP5175082 | 特許 EP0238329B1 |
| 遺伝的多型の検出のための複合マイクロサテライト プライマー (アメリカ) | 拒絶 特表平 10-509594 | 特許 USP5955276 | 特許 EP08046181B |
| サテライト配列の単離方法 (日本) | 拒絶 特開 2000-60559 | 特許 USP6919443 | 出願中 EP1106687A1 |
| ターゲット核酸の反復数を決定するための方法 (日本) | 拒絶 特開 2004-065125 | パテントファミリー なし | パテントファミリー なし |
| トランスポゾン様 DNA およびその利用方法 (日本) | 拒絶 特開平 11-206374 | パテントファミリー なし | パテントファミリー なし |
| イネ品種識別用マイクロサテライトマーカーおよび植物種子 の純度検査方法 (日本) | 拒絶 特開平 10-57073 | パテントファミリー なし | パテントファミリー なし |
| 半矮性遺伝子の近傍に位置するマイクロサテラ イトマーカーおよびこれを用いた半矮性遺伝子 の検定方法 (日本) | 拒絶 特開平 11-253167 | パテントファミリー なし | パテントファミリー なし |
| 体の細胞質雄性不稔回復遺伝子の近傍に位置す る DNA マーカーおよび DNA 診断法 (日本) | 拒絶 特開平 09-313187 | パテントファミリー なし | パテントファミリー なし |

2) SNP 関連技術の海外での特許状況

| 発明の名称 (優先権主張国又は出願国) | 日本 (特許、公告又は 公開番号) | U S (特許又は 公開番号) | E P (特許又は 公開番号) |
|---|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 核酸配列の増幅方法 (アメリカ) | 特許 特公平 4-67957 | 特許 USP4683202 | 特許 EP0201184B1 |
| 核酸配列の増幅及び検出方法 (アメリカ) | 特許 特公平 4-67960 | 特許 USP4683195 | 特許 EP0509612B1 |
| 核酸を検出する方法、それに用いる器具および キット (フィンランド) | 特許 特許 2705811 | パテントファミリー なし | 特許 EP0317074B1 |
| 競合オリゴヌクレオチドのプライミングによる 変異の検出法 (アメリカ) | 特許 特許 2760553 | 特許 USP5578458 | 特許 EP0333465B1 |
| 特定のヌクレオチド変異の決定のための方法お よび試薬 (アメリカ) | 特許 特許 2786011 | 特許 USP6013431 | 特許 EP0648280B1 |
| THERMOCOCCUS LITORALIS から入手可能な精製熱 安定 DNA ポリメラーゼ (アメリカ) | 特許 特許 3229886 | 特許 USP5210036 | 特許 EP0455430B1 |
| 核酸分子の切断方法 (アメリカ) | 特許 特許 3518884 | 特許 USP5422253 | 特許 EP0601834B1 |
| 一本鎖DNA分子の生成方法 (アメリカ) | 特許 特許 3330946 | 特許 USP5518900 | 特許 EP0679190B1 |
| ヌクレオチド塩基の同定方法 (特許 3330946 の 分割) (アメリカ) | 特許 特許 3421664 | 特許 USP5518900 | 特許 EP0679190B1 |
| 核酸配列分析の平行プライマー拡張手法 (スウェーデン) | 特許 特許 3722833 | 特許 USP6153379 | 特許 EP0705349B1 |
| 核酸の侵襲的開裂 (アメリカ) | 特許 特許 3665648 | 特許 USP5985557 | 出願中 EP0904286A1 |
| 塩基置換の検出方法 (日本) | 特許 特許 3681729 | 特許 USP7135291 | 出願中 EP1367136A1 |
| 核酸配列の解析方法、フロー固定化基体、アッセイ キットおよびフローセット (日本) | 特許 特許 3697436 | パテントファミリー なし | パテントファミリー なし |
| 核酸検出方法および核酸検出キット (日本) | 特許 特許 3638516 | 特許 USP6750018 | パテントファミリー なし |
| 無機リン酸、ピロリン酸及び核酸の検出方法並びに DNA の SNP 配列をタイピングする方法 (日本) | 特許 特許 3672036 | 出願中 US2004171100 | 出願中 EP1378575A1 |
| スイカ F 1 品種の識別に用いる合成オリゴヌク レオチド (日本) | 特許 特公平 07-016421 | パテントファミリー なし | パテントファミリー なし |
| 遺伝子診断を用いた大麦又は麦芽の品種識別方 法及びそのプライマー (日本) | 特許 特許 3660699 | 特許 USP5807676 | 特許 EP0704540B1 |
| 米試料の品種判別方法 (日本) | 特許 特許 3685478 | パテントファミリー なし | パテントファミリー なし |
| 低アミロース米品種ミルキーQueen及び同系 系統品種に特異的なDNA断片、プライマー及び 品種識別方法 (日本) | 特許 特許 3569746 | パテントファミリー なし | パテントファミリー なし |
| 塩基置換の検出方法 (特許 3681729 の分割) (日 本) | 拒絶 特開 2004-298200 | 特許 USP7135291 | 出願中 EP1367136A1 |
| 塩基置換の検出方法 (特開 2004-298200 の分割) (日本) | 拒絶 特開 2005-245465 | 特許 USP7135291 | 出願中 EP1367136A1 |
| 欠失を検出するための複数染色体DNA増幅法 (アメリカ) | 拒絶 特開平 7-136000 | 特許 USP5582989 | 特許 EP0364255B1 |
| 遺伝子検査方法 (日本) | 拒絶 特開 2003-135098 | 出願中 US2003087272 | パテントファミリー なし |

4 基本特許およびその周辺技術について

SSRの基本特許と考えられる特許第3218318号発明は、「3から6のヌクレオチドを含有する短いDNAモチーフ」をタンデム反復でもって含有している単純なDNA配列等を利用すること、PCR反応の反応産物の分離および分析を行うこと等を特徴とする。一方、上記DNAモチーフより長いDNAモチーフ（ミニサテライト）を利用した特公平4-63680号および特許第2750228号に係る特許権は、存続期間満了によりすでに権利は消滅している。また、PCR反応以外の増幅法も存在する。

したがって、上記の権利が消滅している特許に係る技術を用いたり、PCR反応以外の増幅法を使用することにより、上記基本特許に係る発明を利用せずに、SSRにより品種識別を行える可能性がある。

SNPについては、特許権が存続しているものとしては、特許第2760553号発明が基本特許と考えられる。特許権の効力は、先願の明細書中に記載された発明、又は出願前公知の発明には及ばない。今回の調査では、上記基本特許の効力を制限すると思われる先願は見出せなかった。

なお、SSRの基本特許と考えられる特許第3218318号は、特許権者であるMax Plank社から独占的な実施権を与えられているPromega社にコンタクトすることによりライセンスを受ける条件を知ることができる。また、SNPの基本特許と考えられる特許第2760553号は、特許権者であるBaylor College of Medicineから独占的な実施権を与えられているAbbott Molecular社にコンタクトすることによりライセンスを受ける条件を知ることができる。

5 参考資料

1) SSR 公開および特許公報一覧(全 104 件)

| 技術分野 | 特許、公告又は公開番号 | 発明の名称 |
|---------------|--------------------------------------|---|
| 1 | 特許 3218318 | DNA領域における長さ多型を検出する方法 |
| | 特公平 4-63680 (特許 2136364) | ポリヌクレオチドプローブ |
| | 特許第 2750228 号 (特公平 4-63680 の分割出願) | 遺伝的特性決定用ポリヌクレオチド |
| | 特公平 6-30636 (特許 190783) | 遺伝的特性決定方法 |
| | 特開平 3-27300 | 試料DNA断片化の評価方法 |
| | 特開平 2-231100 | 伸長されたヌクレオチド配列 |
| | 特開平 6-205700 | 確認法 |
| | 特表平 10-507366 | PCRによるテロメアDNAの変異の特性決定法 |
| | 特開平 5-276948 (特公平 6-30636 の分割出願) | 遺伝的特性決定用ポリヌクレオチド |
| | 特開 2005-27567 | マイクロサテライト多型を利用した混合キメラの定量法 |
| | 特表 2005-514902 | マイクロサテライトの増幅において不連続を減少させるための方法 |
| | 特表 2004-537987 | ソルビトールを使用するマイクロサテライトの増幅において不連続を減少させるための方法 |
| | 特表平 10-509594 | 遺伝的多型の検出のための複合マイクロサテライトプライマー |
| | 特開 2002-291500 | 核酸溶解曲線及び核酸解離曲線を用いた核酸変異検出法 |
| | 特許 3844996 | 反復性PCR産物の融解曲線解析方法 |
| | 特開 2000-60559 | サテライト配列の単離方法 |
| | 特開平 11-318498 | 改良されたプライマー伸長増幅PCR方法 |
| | 特表 2006-520206 | プローブ、バイオチップおよびそれらの使用方法 |
| | 特表 2006-512094 | 核酸増幅 |
| | 特表 2005-527220 | 単一のポリマー分析を使用する方法および装置 |
| | 特表 2005-508196 | 核酸分析の汎用ヌクレオチド |
| | 特表 2004-526402 | リガーゼ検出反応を用いた核酸配列の違いの検出のための位置特定可能なアレイの設計方法 |
| | 特表 2003-520570 | 位置特定可能なアレイによるリガーゼ検出反応を用いた核酸配列差異の検出 |
| | 特表 2002-540799 | 新規なタイプのトランスポゾンに基づいた遺伝子マーカー |
| | 特表 2001-519648 | アドレス可能アレイでのリガーゼ検出反応を用いた核酸配列の相違の検出 |
| | 特表 2001-511018 | 多型核酸フラグメントを分析または型分類するためのポリメラーゼおよびその使用 |
| | 再表 03/097877 | 遺伝子多型の検出方法 |
| | 特許 3602142 | STR座位の多重増幅 |
| | 特開 2004-313199 | STR座位の多重増幅 |
| | 特表 2001-516594 | 電気泳動用のDNAブラケット遺伝子座適合標準 |
| | 特開平 07-246099 | 単純な繰り返し配列とオリゴヌクレオチド連結とを用いたヌクレオチド配列の検出 |
| 特表平 11-502406 | 単純反復配列の増幅 | |
| 特許 3509025 | 不連続プライマー伸長による核酸の反復配列長の決定 | |

| 技術分野 | 特許、公告又は公開番号 | 発明の名称 |
|------|----------------|--|
| 1 | 特許 2777170 | 組換え体DNAクローンをを用いて染色体特異的繰返しDNA配列を選択する方法 |
| | 特開 2006-246769 | 繰返し核酸配列の検査方法 |
| | 特開 2004-065125 | ターゲット核酸の反復数を決定するための方法 |
| | 特開 2001-275699 | 反復配列の多型を分析する方法 |
| | 特表 2005-515778 | 非標的核酸依存性増幅の低減：反復核酸配列の増幅 |
| | 特表 2003-505022 | フレキシブルin-situ合成アレイを用いた反復的プローブ設計および詳細な発現プロファイリング |
| | 特表 2002-531106 | 不連続プライマー伸長による核酸反復配列の長さ決定 |
| | 特表 2002-530121 | 短いタンDEM反復遺伝子座の多重増幅 |
| | 特表 2002-502606 | 中型縦列繰返しDNAマーカーを特定し分析するための材料と方法 |
| | 特表 2006-507792 | 反復オリゴヌクレオチド合成を使用する分子検出システム |
| | 特表 2005-537799 | 遺伝子解析および認証方法 |
| | 特表 2003-534778 | 普遍的な可変断片 |
| | 特表 2002-519998 | DNA中の配列長多型性の検出用の方法および装置 |
| 2 | 特公平 7-8240 | 遺伝的変異を検出する方法 |
| | 特開 2004-073188 | 同定される物体のマーカー |
| | 特開 2003-093075 | 電気抵抗を利用した核酸変異検出法 |
| | 特開 2002-325581 | 核酸溶解曲線及び核酸解離曲線を用いた未知あるいは既知核酸変異検出法及び表示法 |
| | 特開 2005-237334 | 反復配列長の検出方法 |
| 3 | 特開 2006-055028 | 核酸調製方法、並びに、それを用いた核酸増幅方法、核酸標識方法及び核酸検出方法 |
| | 特表平 11-511020 | 生物学的物質からの核酸を精製、安定化又は単離する方法 |
| | 特表 2003-507049 | DNAの同時単離及び定量化 |
| | 特表 2002-529734 | 生物学的高分子を分離するための方法および処方物 |
| 4 | 特開 2005-168308 | SSR法によるイグサ品種識別 |
| | 特開 2004-65251 | マイクロサテライトマーカーを用いるイネ品種の識別法 |
| | 特開 2002-34597 | ナシ類植物由来の新規マイクロサテライトDNA及びそれを用いるナシ類植物の識別方法 |
| | 特開 2002-34567 | 新規マイクロサテライトDNAを用いるナシ類植物の識別方法及びそれに利用される新規マイクロサテライトDNA |
| | 特開平 11-206374 | トランスポゾン様DNAおよびその利用方法 |
| | 特開平 10-57073 | イネ品種識別用マイクロサテライトマーカーおよび植物種子の純度検査方法 |
| | 特開 2006-034142 | マイクロサテライトDNAを用いたホップ品種鑑定法 |
| | 特開 2005-168310 | イグサ品種「ひのみどり」のISSR法に由来する識別マーカー |
| | 特開 2002-034562 | ナシ類の新規マイクロサテライトDNA |
| | 特開平 11-253167 | 半矮性遺伝子の近傍に位置するマイクロサテライトマーカーおよびこれを用いた半矮性遺伝子の検定方法 |
| | 特開 2006-141368 | モルッカネムの個体識別用プライマーセットおよびそれを用いた個体識別方法 |
| | 特開 2005-261228 | ブレロータス属のこの品種識別方法、該品種識別用マーカー及び該マーカーの製造方法 |
| | 特開 2005-027566 | シバ属植物の個体識別方法 |
| | 特開 2004-298098 | 新規遺伝マーカーおよびその利用法 |

| 技術分野 | 特許、公告又は公開番号 | 発明の名称 |
|----------------|---|---|
| 4 | 特開 2003-319782 | イネの品種の識別方法 |
| | 特開 2003-189885 | コムギ由来セントロメア局在性反復配列 |
| その他 | 特開 2006-087388 | 核酸増幅分析法および装置 |
| | 特開 2006-006224 | 細胞組織培養管理方法及びシステム |
| | 特開 2005-031051 | 核酸塩基配列データベース、核酸塩基配列情報の記録方法及び核酸塩基配列決定方法 |
| | 特開 2004-158005 | データベースを作成する方法および多型遺伝的マーカーを同定するためのデータベース |
| | 特開 2004-113007 | コムギの選抜方法 |
| | 特開 2004-016195 | 対象における変異を検出する方法 |
| | 特開 2003-329682 | 微小物体の光固定化方法、微小物体固定化担体及び微小物体の観察方法 |
| | 特開 2003-259897 | 生体由来異物検査法 |
| | 特開 2003-180362 | イネ科植物の選抜方法 |
| | 特開平 09-313187 | イネの細胞質雄性不稔回復遺伝子の近傍に位置するDNAマーカーおよびDNA診断法 |
| | 特表 2006-519436 | 表現型形質に影響する特定の遺伝子座を予測するシステムおよび方法 |
| | 特表 2005-537030 | 核酸を分析する方法 |
| | 特表 2005-516310 | 遺伝子を特定し、形質に関連する経路を明らかにするコンピュータ・システムおよび方法 |
| | 再表 01/079482 | 遺伝子マッピング法 |
| | 特開 2005-065617 | 個人識別法 |
| | 特開 2005-013226 | サイズの検査方法 |
| | 特開 2003-157004 | 識別手段を付加する添加物及びその添加物を含有する識別情報保持物 |
| | 特開 2002-288579 | DNA情報生成シミュレーション方法および装置と該方法を実施するプログラムを格納した記録媒体とそのプログラム |
| | 特表 2004-533840 | ファージディスプレイによるPDZドメインリガンド |
| | 特表 2003-514571 | タバコ消費の遺伝子インジケーター |
| | 特表 2003-512848 | 遺伝的診断、修飾および増殖のための一倍体ゲノムの使用 |
| | 特表 2002-505088 | 生物学的試料の一意的識別子 |
| | 特開 2004-283029 | 長鎖反復配列クラスターDNA |
| | 特開 2001-086993 | 反復配列の多型分析用装置 |
| | 特開平 6-086697 | 反復配列染色体特異的核酸プローブ |
| | 特表 2005-524384 | ゲノム核酸におけるランダム分布反復配列への検出可能なプローブ結合の抑制に関する方法、キットおよび組成物 |
| | 特表 2005-537030 | 核酸を分析する方法 |
| | 特表 2005-516310 | 遺伝子を特定し、形質に関連する経路を明らかにするコンピュータ・システムおよび方法 |
| | 特表 2004-531255 | 誘導可能なアポミクシス |
| | 特表 2003-519829 | データベースを作成する方法および多型遺伝的マーカーを同定するためのデータベース |
| 特開 2004-135554 | アブラナ科植物根こぶ病に対する抵抗性遺伝子検出用マイクロサテライトマーカー、およびその利用 | |
| 特開 2004-321055 | 小穂非脱落性遺伝子等についての新規遺伝マーカーおよびその利用法 | |
| 特開平 06-153954 | レセプター同定法 | |

2) SNP 公開および特許公報一覧(全 369 件)

| 技術分野 | 特許、公告又は公開番号 | 発明の名称 |
|----------------|------------------------|---|
| 1 | 特許 2760553 | 競合オリゴヌクレオチドのプライミングによる変異の検出法 |
| | 特許 3722833 | 核酸配列分析の平行プライマー拡張手法 |
| | 特開平 07-136000 | 欠失を検出するための複数染色体 DNA 増幅法 |
| | 特開 2004-089094 | 倍数性生物におけるSNP解析方法 |
| | 特許 2786011 | 特定のヌクレオチド変異の決定のための方法および試薬 |
| | 特表平 6-505394 | ターミネーター複合物を利用するオリゴヌクレオチドのポリメラーゼ伸張による核酸分類 |
| | 特許 3330946 | 一本鎖 DNA 分子の生成方法 |
| | 特許 3421664 | ヌクレオチド塩基の同定方法 |
| | 特表 2002-508664 | 複数の単一ヌクレオチド多型を単一の反応で検出する方法 |
| | 特公平 4-67957 | 核酸配列の増幅方法 |
| | 特公平 4-67960 | 核酸配列の増幅及び検出方法 |
| | 特許 3518884 | 核酸分子の切断方法 |
| | 特許 3665648 | 核酸の侵襲的開裂 |
| | 特許 3229886 | THERMOCOCCUS LITORALIS から入手可能な精製熱安定 DNA ポリメラーゼ |
| | 特表 2005-528053 | 多重 PCR |
| | 特表 2006-500959 | 動的サンプリング結合によるポリヌクレオチド合成および標識化 |
| | 特表 2003-521252 | ユニバーサルプライミングを用いる核酸検出方法 |
| | 特開 2006-182757 | π 共役型電気化学活性非天然ヌクレオチドを用いる相補鎖核酸分子配列検出方法及びSNP検出方法 |
| | 特開 2006-141255 | 遺伝子変異を検出する方法 |
| | 特開 2006-101844 | 標的核酸を検出又は定量する方法 |
| | 特開 2006-094725 | 核酸のミスマッチ塩基対検出方法 |
| | 特開 2005-328758 | 核酸増幅方法及びこれを利用した一塩基多型の解析 |
| | 特開 2005-295860 | 核酸解析方法 |
| | 特開 2005-287447 | プローブ及びプライマーおよびこれらを用いた核酸断片相補鎖合成法 |
| | 特開 2005-245465 | 塩基置換の検出方法 |
| | 特開 2005-198581 | 複数の標的領域を同時に PCR 増幅する方法 |
| | 特開 2005-160430 | 遺伝子配列の検査方法 |
| | 特開 2005-087157 | ハイブリダイゼーション法による多型核酸の検出方法 |
| | 特開 2005-000168 | 核酸の検出方法 |
| | 特開 2004-350563 | 変異解析方法及びそのためのシステム |
| | 特開 2004-298200 | 塩基置換の検出方法 |
| | 特開 2004-298082 | 不一致増幅物質を含むプローブ核酸を用いる標的配列の検出方法、プローブ核酸および標的配列検出用アッセイキット |
| | 特開 2004-194619 | 競合核酸を使用した酵素反応方法 |
| | 特開 2004-141158 | プライマーの伸長反応検出方法、塩基種判別方法、塩基種判別装置、ピロリン酸の検出装置、核酸の検出方法および試料溶液導入チップ |
| 特開 2004-041109 | 核酸検出方法およびそれに使用されるプライマー | |
| 特開 2003-284597 | 標的核酸の測定方法及びそのためのキット | |
| 特開 2003-116598 | 遺伝子の検出方法 | |
| 特開 2003-061656 | 標的核酸の検出方法及びキット | |

| 技術分野 | 特許、公告又は公開番号 | 発明の名称 |
|----------------|----------------|--|
| 1 | 特開 2003-052372 | 簡易 SNP 検出法(SSD) |
| | 特開 2002-355081 | オリゴヌクレオチドによる自己集合体の作製方法及び遺伝子の検出方法 |
| | 特許 3697436 | 核酸配列の解析方法、プローブ固定化基体、アッセイキットおよびプローブセット |
| | 特表 2006-517786 | 未増幅 DNA を用いた直接的 SNP 検出 |
| | 特表 2006-511239 | DNA の単一分子増幅および検出 |
| | 特表 2006-504436 | 組み合わせた指数関数的および直線的増幅 |
| | 特表 2005-507668 | 変異、一ヌクレオチド多型、および特定の配列のRecA補助検出 |
| | 特表 2005-500067 | DNA 配列分析 |
| | 特表 2004-535769 | 結合した核酸の比較定量的ための方法 |
| | 特表 2004-532643 | DNA の迅速増幅方法 |
| | 特表 2004-526453 | ヌクレオチド分析のための方法および組成物 |
| | 特表 2004-523221 | 部分相補的プローブを用いた遺伝子型分類 |
| | 特表 2004-521634 | MutS および RecA を使用する変異検出 |
| | 特表 2004-516806 | プライマー伸長法を用いた対立遺伝子識別のためのプロセス |
| | 特表 2003-530893 | ポリメラーゼのブルーフリーディング活性によるヌクレオチド配列変異の検出 |
| | 特表 2003-523752 | DNA プローブにおいてシトシンのメチル化を検出するリガーゼ/ポリメラーゼ法 |
| | 特表 2003-523211 | DNA プローブの中のシトシンメチル化の検出方法 |
| | 特表 2003-511056 | 5-位置メチル化変性体の識別方法 |
| | 特表 2003-507024 | PNA-DNA キメラの3'末端でのポリメラーゼ伸長 |
| | 特表 2002-542811 | タグ化配列の分解を使用する検出 |
| | 特表 2002-537780 | SNP 検出 |
| | 特表 2002-528096 | ゲノム DNA の複雑性制御および分析 |
| | 特表 2002-525127 | 遺伝子型決定および DNA 分析に関する、方法および生成物 |
| | 特表 2002-518024 | ポリメラーゼシグナル形成アッセイ |
| | 再表 02/086160 | ハイブリダイゼーションプローブ |
| | 再表 02/018642 | 遺伝子の検出方法 |
| | 特開 2006-238782 | Mu フェージトランスポゼースを用いた突然変異又は遺伝子多型の検出方法 |
| | 特開 2006-101715 | 遺伝子多型検出方法及び遺伝子増幅方法 |
| | 特開 2006-020514 | 塩基多型の同定方法 |
| | 特開 2005-323583 | 遺伝子多型の検出方法 |
| | 特開 2005-323565 | 標的 DNA 配列において一塩基変異多型の存在を検出する方法及びキット |
| | 特開 2005-287499 | 塩基多型の同定方法 |
| | 特開 2005-027518 | 塩基多型の検出方法 |
| | 特開 2005-000127 | 多型検出方法 |
| | 特開 2004-201676 | 遺伝子多型の簡易検出方法および検出用試薬 |
| | 特開 2004-129544 | 塩基多型検出プローブと塩基多型検出方法 |
| | 特開 2004-121232 | 塩基多型の同定方法 |
| | 特開 2004-121088 | 1塩基多型の検出方法 |
| | 特開 2004-121087 | 1塩基多型の検出方法 |
| | 特開 2004-033003 | PNA および一本鎖核酸切断ヌクレアーゼを用いた一塩基多型を含む核酸内の変異の非標識検出方法 |
| | 特開 2003-144163 | 塩基多型の同定方法 |
| 特開 2003-135069 | 塩基多型の同定方法 | |
| 特開 2003-009890 | 高処理能多型スクリーニング | |

| 技術分野 | 特許、公告又は公開番号 | 発明の名称 |
|----------------|----------------------|--|
| 1 | 特開 2002-272463 | 一塩基多型の型を判定する方法 |
| | 特開 2002-253271 | 転移因子を利用した植物ゲノム多型検出用マーカーおよびその作成方法 |
| | 特開 2002-209584 | 塩基多型を検出する方法 |
| | 特開 2002-186499 | 三本鎖 DNA 形成技術を応用した DNA 多型検出方法 |
| | 特開 2002-171986 | 塩基多型の同定方法 |
| | 特開 2002-034599 | 1塩基多型を検出する方法 |
| | 特開 2002-034598 | 塩基多型を検出する方法 |
| | 特開 2002-017399 | 塩基多型を検出する方法 |
| | 特開 2001-095574 | 塩基多型を検出する方法 |
| | 特開平 06-030797 | 遺伝子多型解析方法 |
| | 特表 2004-522444 | 多温度一本鎖コンフォメーション多型性 |
| | 特表 2003-518951 | 多型核酸配列の同時増幅およびリアルタイム検出のための方法 |
| | 特表平 11-514525 | 二本鎖高次構造多型分析 |
| | 特表平 09-504699 | 変異及び多型性の検出、増幅された DNA サンプルの精製、及び対立遺伝子の同定のための、固定化ミスマッチ結合蛋白質の使用 |
| | 再表 2005/001091 | 核酸の変異及び多型の検出用プローブセット、それを固相化した DNA アレイ、並びにそれらを用いた変異及び多型の検出方法 |
| | 再表 2004/027060 | 核酸増幅方法、核酸増幅用試薬キット、一塩基多型検出方法、及び、一塩基多型検出用試薬キット |
| | 再表 2004/022743 | 多型配列部位を有する核酸の識別方法 |
| | 再表 01/042498 | 塩基多型の検出方法 |
| | 再表 01/034838 | 変異および/または多型の検出方法 |
| | 特開 2006-087388 | 核酸増幅分析法および装置 |
| | 特開 2004-242585 | RNA 断片を用いたオリゴヌクレオチドによる自己集合体の形成方法、自己集合体及び遺伝子の検出方法 |
| | 特開 2004-141159 | 核酸沈澱剤を利用した核酸増幅産物のハイブリダイゼーションアッセイ |
| | 特開 2004-113241 | 複数の核酸配列バリエーションの検出のための方法 |
| | 特開 2004-113240 | 二次構造形成の破壊による向上したハイブリダイゼーションアッセイを提供するための二目的プライマーおよびプローブ |
| | 特開 2004-097209 | ポリヌクレオチドの分析方法 |
| | 特開 2004-016071 | ポリヌクレオチドの選択的吸着方法および判定方法 |
| | 特開 2003-159100 | 改良された遺伝子の変異検出方法 |
| | 特開 2003-125798 | 試料遺伝子中の塩基配列の確認方法 |
| | 特開 2001-309785 | 遺伝子配列間の相違検出方法 |
| | 特開 2001-057892 | 核酸配列変異を検出するための方法とオリゴヌクレオチド |
| | 特表 2006-520206 | プローブ、バイオチップおよびそれらの使用方法 |
| | 特表 2006-507792 | 反復オリゴヌクレオチド合成を使用する分子検出システム |
| | 特表 2005-536998 | 高親和性および高特異性を組み合わせた固相ベースの核酸アッセイ |
| | 特表 2005-527220 | 単一のポリマー分析を使用する方法および装置 |
| | 特表 2005-522223 | 変異の検出および同定 |
| | 特表 2005-522190 | ハイブリダイゼーション部分調節オリゴヌクレオチド及びその用途 |
| | 特表 2005-519643 | ニック形成剤を用いる核酸の指数関数的増幅 |
| | 特表 2005-518819 | 酵素的連結に基づく核酸配列の同定 |
| | 特表 2005-512549 | 環状プローブを用いた複数の標的配列の分析と検出 |
| | 特表 2005-512055 | 対立遺伝子変体のためのタンパク質アレイおよびその使用 |
| 特表 2005-511096 | アニーリング調節プライマーおよびその使用 | |

| 技術分野 | 特許、公告又は公開番号 | 発明の名称 |
|------|----------------|---|
| 1 | 特表 2004-536562 | 増幅プライマーおよびプールされた試料における突然変異の検出 |
| | 特表 2004-535814 | ニック形成エンドヌクレアーゼを使用する指数関数的核酸増幅 |
| | 特表 2004-532615 | 核酸の検出および識別のためのプライマーおよび方法 |
| | 特表 2004-529618 | 核酸の分析の方法 |
| | 特表 2004-528016 | ゲノム DNA の直接多重処理による性状分析 |
| | 特表 2004-521630 | 変更検出のための方法 |
| | 特表 2004-520812 | 対立遺伝子を決定するための方法 |
| | 特表 2004-511220 | 型特異的ハイブリッド捕捉法による核酸の検出方法 |
| | 特表 2004-511210 | 配列変動を検出する、DNA を遺伝分析するための方法 |
| | 特表 2004-506409 | 核酸分析のための新規アッセイ |
| | 特表 2004-502431 | ロリポッププローブを用いたシグナル増幅 |
| | 特表 2003-535567 | 核酸ハイブリッドの検出 |
| | 特表 2002-530120 | 核酸を検出するためのドナー分子およびアクセプター分子を利用するプライマー伸長方法 |
| | 特表 2002-527040 | 浅溝バインダに共役結合されたヌクレオチドを使用するハイブリダイゼーション及び不一致識別 |
| | 再表 03/040367 | 遺伝子増幅反応で合成されたオリゴヌクレオチドによる自己集合体の形成方法、自己集合体及び遺伝子の検出方法 |
| | 特開昭 59-208465 | DNA および RNA における突然変異の検出方法 |
| | 特許 3681729 | 塩基置換の検出方法 |
| | 特許 2705811 | 核酸を検出する方法、それに用いる器具およびキット |
| 2 | 再表 2004/097015 | 支持体上に固定化した物質を染色体の順あるいは配列位置情報を付加して配列するアレイおよびその製造方法、アレイを用いた解析システム、並びにそれらの利用 |
| | 特表 2001-520323 | 精密蛍光染色された粒子及びその製造及び使用方法 (SAT(Suspension Array Technology)) |
| | 特許 3638516 | 核酸検出方法および核酸検出キット |
| | 特表 2002-528053 | 核酸分析物における蛍光偏光 |
| | 特開 2004-065242 | 生体関連物質マイクロアレイ及びそれを用いた植物の品種判別法 |
| | 特開 2006-006274 | 遺伝子検査方法 |
| | 特開 2005-192418 | 検出すべき特定配列の簡易検出方法 |
| | 特開 2005-080637 | 蛍光性分子のモノマー発光とエキシマー発光のスイッチングを利用した分子ビーコンを用いる DNA 検出法 |
| | 特開 2004-357570 | 電気法による遺伝子変異の検出方法 |
| | 特開 2004-261068 | 一塩基置換検出方法及び一塩基置換検出用キット |
| | 特開 2004-229582 | 標的塩基配列の検出方法、並びに検出感度増強試薬及び検出用キット |
| | 特開 2004-073188 | 同定される物体のマーカー |
| | 特開 2004-065199 | ビーズ上で行う核酸増幅方法および核酸検出方法 |
| | 特開 2003-325200 | 新規高感度核酸解析法 |
| | 特開 2003-164299 | オリゴヌクレオチド自己集合体の検出方法及び遺伝子の定量分析方法 |
| | 特開 2003-156444 | 蛍光性スフェアを用いての分子の簡易比色アッセイ |
| | 特開 2003-135098 | 遺伝子検査方法 |
| | 特開 2001-346579 | SNP 検出用オリゴヌクレオチド |
| | 特開 2001-050931 | 遺伝子の一塩基置換SNPと点突然変異を検出する方法、並びに検出装置及び検出チップ |

| 技術分野 | 特許、公告又は公開番号 | 発明の名称 |
|----------------|--------------------------|---|
| 2 | 特許 3672036 | 無機リン酸、ピロリン酸及び核酸の検出方法並びにDNAのSNP配列をタイピングする方法 |
| | 特表 2006-507014 | 汎用タグアッセイ |
| | 特表 2005-525781 | 高処理能検定システム |
| | 特表 2005-524849 | ラマン分光分析のフィンガープリントを備えた分析物質検出用のナノ粒子プローブ |
| | 特表 2005-519593 | 平面導波路を使用する1塩基多型の検出法 |
| | 特表 2004-532805 | 不斉キサンテンフルオレセイン色素のアトロプ異性体およびDNA配列決定フラグメント分析の方法 |
| | 特表 2004-520595 | 微細流路の側壁に形成されたMOSFETよりなる物質検出用チップ、これを含む物質検出装置、及び物質検出装置を利用した物質検出方法 |
| | 特表 2004-520052 | 遺伝的特性を検出するための生化学的方法及び装置 |
| | 特表 2004-508536 | 複合核酸分析用の多機能性担体物質 |
| | 特表 2004-502468 | バイオチップ上のヌクレオチド標的配列の同定及び／又は定量のための反転検出 |
| | 特表 2004-500033 | 電子検出を用いる核酸の配列決定 |
| | 特表 2004-500020 | 半導体マイクロチップ上の電子的ドットプロットアッセイによる一塩基多型の識別 |
| | 特表 2003-528626 | ハイブリダイゼーション・ピーコン、並びに迅速に配列を検出および判別する方法 |
| | 特表 2003-527846 | 新規な DNA チップ |
| | 特表 2003-510034 | 流体の静電容量の変化を検出するためのマイクロ流体およびナノ流体電子素子並びに使用方法 |
| | 特表 2002-541823 | バイオエレクトリック・マイクロチップを用いる単一核酸多型の決定方法 |
| | 特表 2002-513586 | 膜に結合した核酸の非放射性検出法及びその検査キット |
| | 再表 2004/058793 | ヌクレオチド誘導体とDNAマイクロアレイ |
| | 再表 03/029441 | DNA チップのシグナル増幅方法(取下書提出) |
| | 再表 02/092813 | 生体分子基板ならびにそれを利用した検査および診断の方法および装置 |
| | 再表 01/044509 | 標的塩基配列の検出方法 |
| | 特開 2006-020517 | 塩基多型の同定方法 |
| | 特開 2006-020516 | 塩基多型の同定方法 |
| | 特開 2006-020512 | 塩基多型の同定方法 |
| | 特開 2006-020510 | 塩基多型の同定方法 |
| | 特開 2005-168350 | ポリヌクレオチドの一塩基多型あるいは変異の有無の判定方法 |
| | 特開 2004-187581 | 標的核酸の多型決定方法 |
| | 特開 2003-189862 | ターゲット検出方法、DNA 塩基配列の一塩基多型検出用試薬及び一塩基多型検出方法 |
| | 特開 2002-078500 | 遺伝子多型解析方法 |
| | 特開 2002-000275 | 新規な定量的多型解析方法 |
| | 特開 2001-269198 | 多型遺伝子の型を決定する方法 |
| | 特表 2003-535569 | ペプチド標識オリゴヌクレオチドと抗体アレイを用いた核酸多型の検出方法 |
| | 特表 2003-522527 | 一塩基多型の検出 |
| | 特表 2002-526123 | 核酸多形現象の検出 |
| 特表 2001-520895 | フローサイトメトリーを用いるDNA多型の同定方法 | |
| 特開 2006-284231 | 遺伝子断片中のヌクレオチドの種類の特定方法 | |
| 特開 2006-177915 | 核酸の検出方法およびセンサーチップ表面 | |

| 技術分野 | 特許、公告又は公開番号 | 発明の名称 |
|----------------|--|--|
| 2 | 特開 2005-224110 | ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの検出方法、およびマイクロ流体デバイス |
| | 特開 2004-187545 | 核酸配列の検査方法及び試料調製方法 |
| | 特開 2002-272475 | 蛍光偏光法による核酸増幅産物の検出方法 |
| | 特表 2006-503590 | 飽和色素を用いたアンプリコン溶融解析 |
| | 特表 2006-501817 | 新規高密度アレイおよび検体分析方法 |
| | 特表 2005-536211 | 遺伝子解析用オリゴヌクレオチドタグ化ヌクレオシド三リン酸 (OTNTP) |
| | 特表 2005-518810 | 核酸プローブとその合成および使用 |
| | 特表 2005-512544 | 核酸の合成後ラベリングとその使用 |
| 特開 2004-008037 | 一本鎖 DNA 分解酵素を利用した塩基配列検出方法及び該検出法を実行する検出装置 | |
| 3 | 特開 2006-280277 | 核酸の抽出方法 |
| | 特表 2005-525797 | 核酸又はタンパク質を用いるサブマイクロリットル反応の実施方法及び装置 |
| | 特開 2005-095003 | 核酸の分離精製方法 |
| | 特開 2002-306173 | 餅試料の原料米の品種判別方法 |
| 4 | 特開 2006-174714 | イネゲノム多型マーカー、およびその利用 |
| | 再表 03/104491 | イネの品種鑑別法 |
| | 特開 2004-113234 | 植物の遺伝子に生じた特徴的な塩基配列、及びそれを利用する方法 |
| | 特開 2003-245075 | 植物の遺伝子に生じた特徴的な塩基配列、及びそれを利用する方法 |
| | 特開 2003-245074 | 植物の遺伝子に生じた特徴的な塩基配列、及びそれを利用する方法 |
| | 特開 2003-180370 | 植物の遺伝子に生じた特徴的な塩基配列、及びそれを利用する方法 |
| | 特開 2003-180369 | 植物の遺伝子に生じた特徴的な塩基配列、及びそれを利用する方法 |
| | 特公平 07-016421 | スイカ F1 品種の識別に用いる合成オリゴヌクレオチド |
| | 特許 3685478 | 米試料の品種判別方法 |
| | 特許 3660699 | 遺伝子診断を用いた大麦又は麦芽の品種識別方法及びそのプライマー |
| | 特許 3569746 | 低アミロース米品種ミルキークイーン及び同系統品種に特異的な DNA 断片、プライマー及び品種識別方法 |
| | 特開 2006-158253 | 米の品種識別器具 |
| | 特開 2005-295925 | アカシア属植物由来の新規 DNA およびそれらを利用したアカシア種間雑種の識別方法 |
| | 特開 2005-245244 | 米品種の識別方法 |
| | 特開 2005-168309 | イグサ品種「ひのみどり」の識別マーカー |
| | 特開 2005-102535 | イチゴの品種識別方法 |
| | 特開 2005-080520 | ギニアグラスの品種識別用オリゴヌクレオチド、および該オリゴヌクレオチドを用いたギニアグラス品種の識別方法 |
| | 特開 2005-073655 | 米の品種識別方法 |
| | 特開 2004-248635 | イネゲノムの1塩基多型判別法の開発とイネ品種識別への応用 |
| | 特開 2003-265173 | イグサ品種「ひのみどり」の識別マーカー |
| 特開 2003-259898 | 小麦品種の識別方法 | |
| 特開 2001-186886 | 薬用ニンジン品種識別用合成オリゴヌクレオチド及び塩基配列 | |
| その他 | 特許 2766003 | ヌクレオチドシーケンス決定方法およびシーケンス決定用キット |
| | 特表平 9-507027 | 自動遺伝子型決定 |
| | 特開 2003-265181 | 動物および植物由来核酸分子の検出法 |
| | 特許 3818265 | 微小物体の光固定化方法、微小物体固定化担体及び微小物体の観察方法 |
| | 特許 3723767 | 生物学的な配列情報処理方法および装置 |
| | 特許 3685989 | 遺伝子の検出用チップ、検出装置、並びに検出方法 |

| 技術分野 | 特許、公告又は公開番号 | 発明の名称 |
|------|----------------|---|
| その他 | 特開 2006-223126 | 反応容器、遺伝子多型検出方法及び装置、並びに診断方法及び装置 |
| | 特開 2006-223125 | 反応容器、遺伝子多型検出方法及び装置、並びに診断方法及び装置 |
| | 特開 2006-197906 | 反応容器、遺伝子多型検出方法及び装置、並びに診断方法及び装置 |
| | 特開 2006-153839 | ジップコード方式を用いたPNAチップ及びその製作方法 |
| | 特開 2006-006220 | 核酸配列解析方法 |
| | 特開 2005-331365 | DNA 診断装置および DNA 判別方法 |
| | 特開 2005-121489 | バイオアッセイ装置及び方法 |
| | 特開 2005-091125 | 基板、検査システム、検査装置および方法、記録媒体、プログラム、データ記憶媒体、並びにデータ構造 |
| | 特開 2005-087160 | 機能性核酸の設計支援方法 |
| | 特開 2005-058189 | ハイブリダイゼーションによる配列解析の誤りを補正して正確な配列を解読する方法 |
| | 特開 2005-031066 | 固定化核酸プローブの処理方法、核酸の検出方法、核酸濃度分析方法、および核酸検出用キット |
| | 特開 2004-234105 | アナリシセットデータ作成装置、および、アナリシセットデータ作成方法をコンピュータに実行させるプログラム |
| | 特開 2004-234100 | 連鎖不平衡部位抽出装置、および、連鎖不平衡部位抽出方法をコンピュータに実行させるプログラム |
| | 特開 2004-229512 | 連鎖不平衡状態可視化装置、および、連鎖不平衡状態可視化方法をコンピュータに実行させるプログラム |
| | 特開 2004-229511 | ハプロタイプ解析装置、および、ハプロタイプ解析方法をコンピュータに実行させることを特徴とするプログラム |
| | 特開 2004-215503 | 遺伝子発現解析方法 |
| | 特開 2004-132954 | 一個または複数個の分析物を検出するための方法および装置、ならびに装置の使用 |
| | 特開 2004-125777 | 塩基配列検出装置及び塩基配列自動解析装置 |
| | 特開 2004-093331 | 高感度アフィニティー反応検出チップ及びその作製方法並びに検出装置 |
| | 特開 2004-078371 | データ処理装置、方法及びコンピュータプログラム |
| | 特許 3752499 | 遺伝子検査方法 |
| | 特開 2003-299500 | DNA 塩基配列における SNPs 検出方法 |
| | 特開 2003-289885 | 植物遺伝子のマッピング用プライマー及びマッピング方法 |
| | 特開 2003-265190 | 核酸の定量方法及び核酸定量キット |
| | 特開 2003-189899 | SNP 判別方法およびSNP部位判別用センサー |
| | 特開 2003-164293 | DNA センサー |
| | 特開 2003-139773 | アフィニティー反応プローブビーズ及び検出システム |
| | 特開 2002-311027 | ビーズ、ビーズ製造方法、フローサイトメータ及びプログラム |
| | 特開 2002-306180 | 核酸塩基配列解析法および核酸塩基配列解析試薬キットおよび核酸塩基配列解析装置 |
| | 特開 2002-176991 | コドン走査アルゴリズムを用いるDNAチップ |
| | 特開 2001-333800 | RNA 量および DNA 量の比較検出方法 |
| | 特表 2006-519977 | DNA コピー数変化を同定するための方法 |
| | 特表 2006-503586 | アレイオリゴマー合成および使用 |
| | 特表 2005-537799 | 遺伝子解析および認証方法 |
| | 特表 2005-531853 | SNP 遺伝子型クラスタリングのためのシステムおよび方法 |
| | 特表 2005-528120 | 直接 PCR 定量 |
| | 特表 2005-517902 | DNA バイオチップ作製法およびその適用法 |

| 技術分野 | 特許、公告又は公開番号 | 発明の名称 |
|----------------|---------------------------------------|--|
| その他 | 特表 2005-516310 | 遺伝子を特定し、形質に関連する経路を明らかにするコンピュータ・システムおよび方法 |
| | 特表 2005-512175 | 複合遺伝子学的分類子の遺伝子特徴を識別する方法 |
| | 特表 2005-505288 | 遺伝子配列を検出するための装置及び方法 |
| | 特表 2005-503813 | オリゴマー及び／又はポリマーを適用した支持体を含む印刷物、その製造方法、ならびにその配送及び／又は保管方法 |
| | 特表 2005-500023 | 生体分子のアレイ型ゲノム核酸解析を行うための組成物および方法 |
| | 特表 2004-535815 | ニック形成剤を用いた核酸フラグメントの増幅 |
| | 特表 2004-529650 | 核酸鎖の解析方法 |
| | 特表 2004-524032 | 組み合わせオリゴマーならびにそれらの調製のためのライブラリーに適する、方法、キット、および組成物 |
| | 特表 2004-522739 | ポリヌクレオチド二本鎖損傷を検出するための方法および組成物 |
| | 特表 2003-530631 | ショットガンデータ集合を用いた全ゲノムのアセンブリのための方法及びシステム |
| | 特表 2003-521057 | ゲノムウェブポータルを提供するための方法、システムおよびコンピュータソフトウェア |
| | 特表 2003-521024 | ハプロタイプデータの入手および使用のための方法 |
| | 特表 2003-506098 | 細胞応答をリアルタイムで測定するための装置および方法 |
| | 特表 2003-502059 | ゲノムプロファイリング: 多種生物の存在について複雑な生物学的試料を試験するための迅速な方法 |
| | 特表 2003-501620 | 遺伝子アッセイシステム |
| | 特表 2003-500205 | 複数流体サンプルプロセッサおよびシステム |
| | 特表 2002-538837 | 遺伝子分析 |
| | 特表 2002-525072 | 多重シーケンス法 |
| | 特表 2002-513915 | DNA 配列の個体間差異の識別及び表示方法 |
| | 再表 2005/001125 | 核酸の変異及び多型の判定方法 |
| | 特許 3748877 | 融解温度多形性の高電場検出 |
| | 特許 3710142 | 融解温度多形性の高電場検出 |
| | 特許 3175110 | リガーゼ／ポリメラーゼ媒体された単一ヌクレオチド多型のジェネティックビットアナリシスおよび遺伝子解析におけるその使用 |
| | 特開 2006-141301 | 遺伝子多型の検出方法 |
| | 特開 2005-218310 | 遺伝子検出電界効果デバイスおよびこれを用いた遺伝子多型解析方法 |
| | 特開 2003-067389 | 遺伝子多型関連解析方法およびそのプログラム |
| | 特開 2002-209583 | 多型頻度を解析する方法 |
| | 特開 2001-167123 | 遺伝子配列多型クラスの管理方法 |
| | 特表 2005-526952 | 個体群における多型マーカーを同定するための方法 |
| | 特表 2004-500073 | 増幅に基づく多型の検出 |
| | 特表 2003-510054 | 単一ヌクレオチド多形性の平行遺伝子型決定のための三次元マイクロアレイシステム |
| | 特表 2002-534098 | ゲノムシーケンシングにおける単一ヌクレオチドの多型の加速度的な同定およびクローンの整列化 |
| 特表 2001-515234 | 多型性データベースを提供するためのシステム | |
| 特表 2001-511018 | 多型核酸フラグメントを分析または型分類するためのポリメラーゼおよびその使用 | |
| 特許 3657912 | 定差圧限外濾過による配列決定反応物の浄化方法 | |

| 技術分野 | 特許、公告又は公開番号 | 発明の名称 |
|----------------|--|--|
| その他 | 特許 3325270 | ゲノム上不均一な細胞サンプルにおける形質転換細胞のクローン集団検出のための方法 |
| | 特開 2006-258702 | 塩基配列判定方法、塩基配列判定システム及び塩基配列判定プログラム |
| | 特開 2005-304445 | PCR 増幅反応装置、ならびに、該装置を利用する PCR 増幅反応方法 |
| | 特開 2005-182815 | ハプロタイプデータの保存、整列、及び検索方法 |
| | 特開 2004-294240 | 核酸固定化方法およびそれを用いるバイオセンサの製造法 |
| | 特開 2002-214196 | DNA 解析システム |
| | 特開 2001-112486 | 遺伝子解析結果の記録方法 |
| | 特表 2006-519436 | 表現型形質に影響する特定の遺伝子座を予測するシステムおよび方法 |
| | 特表 2006-515987 | 配列変化検出及び発見用の断片化をベースとする方法及びシステム |
| | 特表 2006-504392 | 遺伝分析の系および方法 |
| | 特表 2005-537030 | 核酸を分析する方法 |
| | 特表 2005-534304 | 核酸の断片化、標識および固定化の方法 |
| | 特表 2005-533636 | マイクロ流体とナノ流体間のインターフェース用勾配構造と、その製造方法および使用方法 |
| | 特表 2005-518553 | 細胞およびウイルスの迅速かつ高感度な検出方法 |
| | 特表 2005-516310 | 遺伝子を特定し、形質に関連する経路を明らかにするコンピュータ・システムおよび方法 |
| | 特表 2005-505754 | 高スループットのマクロ分子分析用のナノチャンネル・アレイ並びにその準備および使用 |
| | 特表 2004-533608 | 固相捕獲可能なジデオキシヌクレオチドおよび質量分析を使用する高い忠実度の DNA シーケンシング |
| | 特表 2004-531255 | 誘導可能なアポミクス |
| | 特表 2004-510433 | DNA および RNA を解読するための大量並行方法 |
| | 特表 2004-500062 | 核酸を選択的に単離するための方法 |
| | 特表 2003-532367 | ポリマーの識別、確認、マッピングおよび分類手法 |
| | 特表 2003-515149 | 核酸プローブアレイ |
| | 特表 2003-506098 | 細胞応答をリアルタイムで測定するための装置および方法 |
| | 特表 2003-505038 | オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション特異性及び感受性を決定する方法 |
| | 特表 2003-501620 | 遺伝子アッセイシステム |
| | 特表 2002-532104 | ポリメラーゼ合成による、単一分子の核酸の配列決定のためのシステムおよび方法 |
| | 特表 2002-512814 | 核酸を検出するためのプライマ伸長法 |
| | 特表 2002-506347 | シラン化固相表面への非修飾核酸の付着 |
| | 特表 2001-511359 | 質量分析によって核酸を分析するための方法および化合物 |
| | 特表 2000-510710 | ジスルフィド結合による核酸分子の固相への共有結合による固定化 |
| | 再表 2004/061100 | 核酸の変異解析方法および遺伝子の発現解析方法 |
| | 再表 01/011533 | 遺伝子解析結果の記録方法 |
| | 特表平 3-502041 | DNA および RNA の迅速塩基配列決定方法 |
| | 特表平 6-507486 | DNA ヌクレオチド配列決定方法およびそれを実施するための装置 |
| 特開 2006-055081 | 遺伝子多型のタイピング方法 | |
| 特開 2002-300894 | 一塩基多型タイピング方法 | |
| 再表 03/070934 | 植物の sd-1 遺伝子周辺領域の遺伝子型判定方法、および該方法を用いた植物の半わい性形質の検査方法 | |

| 技術分野 | 特許、公告又は公開番号 | 発明の名称 |
|----------------|--|-------------------------------------|
| その他 | 特開 2005-278487 | ビール大麦の育種に利用可能な遺伝マーカーおよびその利用 |
| | 特開 2005-229854 | 開閉花性を支配する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用 |
| | 特開 2005-229853 | 小穂脱落性を支配する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用 |
| | 特開 2005-229852 | 糊粉層色を支配する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用 |
| | 特開 2005-229851 | 穂のロウ質を支配する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用 |
| | 特開 2005-229850 | 千粒重に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用 |
| | 特開 2005-229849 | 休眠性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用 |
| | 特開 2005-229848 | 穂軸節間長に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用 |
| | 特開 2005-229847 | 穂長に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用 |
| | 特開 2005-229845 | 護穎長に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用 |
| | 特開 2005-229844 | 小穂段数に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用 |
| | 特開 2005-229842 | 稈長に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用 |
| | 特開 2005-224221 | 穎色を支配する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用 |
| | 特開 2005-224220 | 出穂期に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用 |
| | 特開 2004-321055 | 小穂非脱落性遺伝子等についての新規遺伝マーカーおよびその利用法 |
| | 特開 2004-298098 | 新規遺伝マーカーおよびその利用法 |
| | 特開 2004-298094 | 深播耐性等に関与する遺伝子等についての新規遺伝マーカーおよびその利用法 |
| | 特開 2004-215604 | オオムギ渦遺伝子の直接検出方法 |
| | 特開 2003-199446 | 植物品種の識別剤及び識別方法 |
| | 特開 2003-093098 | 植物個体識別方法及び植物育種方法 |
| 特開 2005-040125 | 皮裸性遺伝子に連鎖する遺伝マーカー、及びその利用 | |
| 特許 3516146 | 核酸の高密度固定化 | |
| 特許 3668075 | 遺伝物質シーケンス決定用懸濁系、その懸濁系を用いた遺伝物質シーケンス決定方法およびその懸濁系を用いた SNPs 高速スコアリング方法 | |

Ⅲ 効率的・効果的なDNA品種識別技術研究推進とその利活用に向けて

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
近畿中国四国農業研究センター
品種識別・産地判別研究チーム長 矢野博

はじめに

Jeffreysらが、ミニサテライトDNA(33.6、33.15)をマルチローカスプローブとしてDNAフィンガープリント法を考案・命名したのは、1985年の頃である。その後、20年以上を経た現在では、「DNA鑑定」が犯罪捜査や親子鑑定に役立ったことが新聞記事やテレビニュースなどで話題になるなど、すっかり市民権を得た感がある。

また、DNA鑑定技術については、Jeffreysらが開発したミニサテライトDNAを用いたDNAフィンガープリント法から、識別能を大幅に上回るマイクロサテライト多型分析へと移行した。また、PCR法が報告されて以来、DNA鑑定への応用とその利活用はめざましいものがあり、DNA量が極微量しか得られない血痕、毛髪、精液など犯罪の痕跡を対象とすることが可能となり、DNA鑑定技術の精度と感度は飛躍的に進展・向上した。

現在、法医鑑識領域における個人識別においては、犯罪の多国籍化などによる国際協調と情報交換に支障があることなどから、昨年末、DNA鑑定において、別人である確率は約77兆分の1(それまでは、約1億8000万分の1)と飛躍的に向上する高精度なDNA鑑定法を導入する方針を警察庁が明らかにしたところであり、DNA鑑定技術は、確実な方法としてほぼ確立され、法廷でも十分に信頼されるものとなっている。

植物分野においても、当初は、ランダムプライマーを用いたRAPD: Random Amplified Polymorphic DNAが主として用いられてきたが、この数年の間、幾つかの植物においてゲノム解析が進み、これらの研究から得られたマイクロサテライト(SSR: Simple Sequence Repeatとも呼ばれ、法医学領域ではSTR: Simple Tandem Repeatとも呼ばれている。)が数多く報告されてきたことから、植物体や種子などのみならず、高度なDNAの分解などが考えられる陳旧化の進んだ資料や収穫物を原料とした加工製品などを対象とした、DNA品種識別技術の開発が、急速に進んでいる。

また、種苗法や関税込率法が改正され、育成者権侵害の立証を容易にするため、科学的裏付けとなるDNA品種識別技術の開発と法的な利活用のための整備と施策が急務とされている。DNA品種識別技術が、これらの要請に的確に対応できるほど多くの植物の種類において開発されている現状では無いものの、前述したように、技術的な条件整備は整いつつある。

本報では、法医学領域における親子鑑定や犯罪捜査における鑑識事例をもとに、今後、実用化場面を想定した(効率的な)DNA品種識別技術開発の取り組むべき課題と、(効果的な)育成者権侵害に係る法的な利活用のためのあり方について述べてみたい。

1) 現状

植物品種に関する的確な保護を図るため、1991年3月に植物新品種保護国際条約(UPOV)が改正され、この中で育成者の権利を強化する観点から、ある品種(原品種)の形質をわずかに変更した品種(従属品種)には原品種の効力が及ぶこととする新规定が設けられた。これにともない、社団法人日本果樹種苗協会は、平成5年度より3年間、従属品種判定技術確立対策事業を実施し、(株)帝人バイオ・ラボラトリーズ(現在は、(株)エスアールエル 羽村ラボ 病理・遺伝子検査課に組織再編されている。)に判定技術の開発調査を依頼している。依頼を受けた(株)帝人バイオ・ラボラトリーズは、「はじめに」の冒頭に記したJeffreysらが設立した世界最初の民間のDNA鑑定会社であるCellmark Diagnostics社(英国)より、ミニサテライトDNA(33.6、33.15)をマルチローカスプローブとした「DNAフィンガープリント法」の独占的实施権を取得し、日本で初めて親子鑑定の受託事業を開始した会社である。

調査を受託した(株)帝人バイオ・ラボラトリーズは、平成5年度には「DNAフィンガープリントによるカンキツの系統分析」を、平成6年度には、新たに、リンゴ及びバラに関して従属品種判定技術の開発調査に取り組んでいる。その内のカンキツの調査報告については、原品種と従属品種の関係を含む14品種・系統を材料として、系統が異なる品種間(5品種)での識別は可能である一方、原品種と珠心胚実生、芽条変異、実生などの従属品種間においては、DNAフィンガープリント(バンドパターン)に差は観察されず、識別することが不可能であることから、新品種が従属であるか否かを識別できる見通しを得たと報告している。

以上のように、カンキツで得られた成果は、リンゴやバラにおいても同様であり、また、日本DNA多型学会などにおいても報告され、法医学領域の研究者や民間のDNA鑑定会社においては、人獣領域のみならず、農産物を対象したDNA鑑定が注目され始めた時期でもあった。

しかしながら、文字通り、ヒトの指紋にも匹敵するほどの多様性と高い個人識別能をもっていたDNAフィンガープリント(遺伝子指紋)法であったが、現在では、ミニサテライトDNA(33.6、33.15)から、マイクロサテライトDNAの反復配列の繰り返し数の差異を検出する方法が主流となっている。マイクロサテライト(SSRもしくはSTR)は、ミニサテライトより小さいTG、CAGなどの数塩基の繰り返し反復配列領域であり、一連の反復配列が短いためにPCRにも適している。また、PCR増幅産物のサイズの判定は、全自動DNAシーケンサーを用いて自動化することが可能であり、しかも短時間で分析することができる。

前述したように、DNA鑑定において、別人である確率は、2003年8月には約1億8000万分の1であったが、2006年10月には、確率を約77兆分の1と飛躍的に向上する高精度なDNA鑑定法を導入するに至っている。このように、法医学領域におけるDNA鑑定は、現在では、技術的にも高精度で、確実な方法としてほぼ確立されており、法廷においても十分に信頼されるものになっている。

一方、農産物を対象としたDNA鑑定においても、ゲノム解析研究が精力的に推進され、連鎖地図の作成のために開発されたSSRマーカーが多数報告されている。また、DNAマーカー選抜による効率的な育種法の開発は、世界各国での取り組みが加速化しつつあり、特に果樹類においてはEU諸国やアメリカを中心に活発に研究されている。公開されたゲノ

ム情報は多くないものの、カンキツにおいては、国際カンキツゲノムコンソーシアムが設立され、カンキツゲノム情報についての各国の研究者との情報交換や DNA マーカー等の交換を通じた研究協力が予定されている。果樹では昨年をはじめ、オレンジの全ゲノム配列が公表され、今後これらの情報を積極的に活用した研究は加速化されるであろう。すなわち、DNA 品種識別に利用することが可能な DNA マーカーは既に存在しているのである。

しかしながら、ヒトの領域における技術のレベルに劣らない現状に至っているとは言え、最も識別能力が高いと言われている SSR マーカーが見出されている植物種の数は限られている。また、今回の海外開発状況等の調査においても知ることができるように、ゲノム解析研究のために研究開発されてはいるが、品種識別などの実用化場面で用いられた事例は極めて少ないのが現状であろう。

2) 今後の動き

植物分野では、これまで、RFLP、RAPD、AFLP 法などを用いて、各種農産物の品種識別が行われてきたが、バンドの有無やバンドパターンで判定する RAPD 等は再現性を確保することが困難であり、DNA 鑑定には不向きである。そのため、鑑定そのものが上手く行われているのかの判定の指標になるインナーマーカー（必ず、検出される DNA マーカー（バンド））などをキットに含ませる。また、DNA マーカーを特異的に PCR 増幅するようにプライマーを再設計して STS (Sequence Tagged Site) 化するなど、DNA 鑑定用の DNA マーカーとして再構築することが必要不可欠である。しかしながら、これらについて、今回の海外における開発状況等の調査事業から得られた事例報告で、どの程度、検討されているのかは定かでない。

これまでの DNA 品種識別技術の開発は、その大方が、個々の研究室において行われた技術開発である。また、ゲノム解析から得られた DNA マーカー選抜による育種の加速化が主な研究目的であり、今回の調査においてもその大半を占めた。いわゆる、有用な表現形質に関わる遺伝子領域を単離し、それを DNA マーカーとして選抜育種に利用するものである。

また、染色体地図の作成や QTL 解析などのゲノム解析においても DNA マーカーが利活用される。この場合に供試される DNA マーカーの大方は、DNA 品種識別にも用いられるマイクロサテライト、ミニサテライト、RFLP、AFLP、RAPD 等の DNA マーカーである。従って、これらゲノム解析研究の一環として、DNA 品種識別技術の開発が行われてきたことは否めないが、このような研究室における基礎研究的なゲノム解析と、実際の社会での利用を目的とした実用化技術の開発とその確立が主となる DNA 品種識別技術の開発研究とは、大きく次元が異なる研究内容と言っても過言ではない。

すなわち、DNA 品種識別技術の開発研究は、実用化場面を想定した技術の信頼性・再現性・妥当性等を客観的に保証された技術開発でなければならず、ゲノム解析等の基礎研究とは大きく異なる。そのため、研究開発された DNA 品種識別技術については、信頼性・妥当性・再現性等を客観的に保証されるよう評価・認証されるべきものである。

しかしながら、法医学領域も同様であるが、開発された DNA 品種識別技術の信頼性・再現性・妥当性を客観的に保証するシステムや仕組みが全く整備されていないのが現状である。農産物分野では、このようなシステムの必要性が取り沙汰されなかったことは、これ

までの育成者権侵害紛争等において、DNA 品種識別技術を持って法廷で争われたことが無かったこと、また、マスコミ報道等で話題となった事例においても、その大方が、和解に至っていることによるものと考えられる。

その点については、数々の経験と事例を基に培ってきたヒトの DNA 鑑定の取り組みについて見習うべきことが多いであろう。しかしながら、数多くの法廷裁定について経験と事例を持つヒトの DNA 鑑定においても、DNA 鑑定に関する品質保証システムやマニュアルの構築が遅れていることは否めず、DNA 鑑定実務者と弁護士等の法律家との間で DNA 鑑定の信頼性・妥当性の是非や品質保証システムの信憑性等について、未だに、論争が繰り広げられている現状にあり、これらの今後の動向に注目しつつ連動した施策に取り組む必要がある。

3) 今後の施策のあり方

ヒトの場合においては、刑事裁判と民事裁判とでは、DNA 鑑定に対する重要性が異なってくる。しかし、DNA 鑑定実務者にとっては、民事裁判とか刑事裁判とかに関わらず、DNA 鑑定を適正に実施してはいるものの、その判決に重要な影響を及ぼすことから、DNA 鑑定の信頼性、妥当性を、客観的に保証されるシステムへの準拠と遵守が強く求められる。客観的に保証されるシステムとしては、実験室における ISO の取得と準用なども重要な取り組みのひとつと言える。

また、DNA 鑑定を確実なものにするためには、「妥当性」「製品化」「裁判での利用」「社会への貢献」などの要素を取り組んだ組織的な取組が必要になってくるが、かなりの資金が必要である。また、鑑定手法の妥当性を確保するためには、DNA 鑑定を研究目的に特化した法医学・日本 DNA 多型学会、さらには遺伝学会・分子生物学などの基礎研究分野を含む横断的な学会の創設と、学会における国際標準化した鑑定手法の審議と指針（ガイドライン）を公表することなどが必要である。

実際に、ヒトの DNA 鑑定について見てみると、1997 年に、日本 DNA 多型学会の設立を機に、当学会の DNA 鑑定検討委員会から「DNA 鑑定についての指針（1997 年）」という、刑事鑑定と親子鑑定を含む DNA 鑑定の基本的な指針が我が国ではじめて作成された。この原案は、日本 DNA 多型学会の学術集会においても発表され、会員に対して意見の要請もなされている。さらには、1999 年に、日本法医学会のワーキンググループによる「親子鑑定についての指針（1999 年）」がまとめられている。

これらの指針は法廷での信頼性の向上に大きく貢献したが、法律家は、DNA 鑑定の適正な発展と運用、より一層の科学的な研究と議論が盛んになること、そして裁判が誤りなく適正に行われることなどを願いつつ、DNA 鑑定が採用された実際の刑事事件等を事例として、反対意見や原案の修正を求めるなど、活発な論議が行われ、幾つかの箇所については撤回ないし修正も行われている。

植物分野においても DNA 品種識別のための研究開発が進んできたことなどを背景に、DNA 品種識別技術検討会（事務局：農林水産省生産局種苗課）が設置された。平成 14 年 9 月以降 3 回にわたる検討を行い、平成 15 年 1 月には、「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 -」を取りまとめている。

この基本的留意事項の「はじめに」には、今後のDNA品種識別技術の開発・精度の向上が一層促進され、また、育成者権者をはじめ関係者による適切な利用のための本技術への理解が促進されるよう、分析・判定に当たっての基本的留意事項について学問的見地から取りまとめたものである、と記されているとおり、この基本的留意事項は、前記した、ヒトのDNA鑑定についての指針に見習ったものとは言え、内容は、技術開発者と利用者への理解の促進を主旨とするものである。

このため、先般、農林水産省では、DNA品種識別技術検討会を再開し、信頼性や妥当性を確保するための検討を始めており、また、DNA品種識別の基準となる標準サンプルとして登録品種のDNAを保存する取組みも（独）種苗管理センターによって進められようとしている。また、一部の植物の識別技術については、DNA鑑定の開発段階および実用化段階における妥当性確認試験への取組みが始められており、今後はこれらについての重要性が幅広く理解されなければならないものとする。

以上のように、DNA鑑定技術が、社会での活用や法廷裁定などにおいて、決定的な証拠となり得るか否かは、信頼性や妥当性の確保を客観的に保証・認知するシステムが整備されているか否かに依るものであり、最も重要な今後の施策と言えるであろう。

<引用資料>

- 1) 勝又義直 (2006) DNA鑑定 その能力と限界 名古屋大学出版会
- 2) 福島弘文 (2003) DNA鑑定のはなしー犯罪捜査から親子鑑定までー 裳華房
- 3) 日本弁護士連合会人権擁護委員会編 (1998) DNA鑑定と刑事弁護 現代人文社
- 4) 永田忠博編 (2007) 食品分析法の妥当性確認ハンドブック サイエンスフォーラム
- 5) 矢野 博 (1993) DNAフィンガープリント法による作物の品種・系統識別 農業および園芸 68(1): 25-31
- 6) 矢野 博 (1993) DNA多型検出技術とその利用 農業技術 48(12): 544-549
- 7) 平成5年度農林水産省委託調査 従属品種判定技術確立対策調査報告書 かんきつの従属品種判定技術開発調査 (日本果樹種苗協会:(株)ティーエスエル (旧:(株)帝人バイオ・ラボラトリーズ)
- 8) (株)ティーエスエル (旧:(株)帝人バイオ・ラボラトリーズ) DNA親子鑑定資料

おわりに

植物育成者権は、農業分野の代表的な知的財産であり、攻めの農政を支える基盤の一つとして、重要性が増大しつつある。平成 18 年 2 月に立ち上げられた「農林水産省・知的財産戦略本部」においても具体的な検討課題の筆頭に「植物新品種の育成者権の保護・活用」が掲げられ、その中で輸出差止制度の新設、DNA 品種識別技術の開発等が取り上げられている。今後は、我が国が育成した品種の侵害対策、海外への出願・権利許諾等を積極的に進め、植物育成者権を有効に活用していくための体制を整えていく必要があり、これを技術的に支える基盤として、DNA 品種識別技術開発の重要性が増しつつある。

本調査事業においては、育成者権の侵害が問題化している花きや果樹等の植物について、研究者からの情報提供、現地調査により、DNA 品種識別技術の開発状況を調査し、これまで体系的には整理されていなかった海外における技術開発状況を取りまとめることができた。また、DNA マーカー技術のうち、特に需要が高いと考えられる SSR マーカー、SNP マーカー関連の先行特許について、網羅的に情報を収集・整理し、技術自体に係っている基本特許などを明らかにすることができた。

今後、我が国で DNA 品種識別技術開発を進めていくに当たっては、どの植物を対象とすべきか、侵害事例の調査を進め、育成者権者の希望も聞きながら、検討していくべきである。利用する技術についても、基本特許等の知的財産面についても十分に留意して、どの技術を利用すべきか、検討する必要がある。我が国として、全く新規のマーカー技術を新たに開発していくという方向性も考えられる。

DNA 品種識別技術の開発は、必ずしも一つの機関でというのではなく、複数の機関で分担して実施することもあり得る。独立行政法人研究所、都道府県試験場、大学、民間企業が十分な連携の下に、技術開発を進め、DNA 品種識別技術開発を実施していくことが期待される。

本報告書が、我が国における DNA 品種識別技術の開発・利活用の推進に、さらには、我が国の植物新品種の育成者権の保護、侵害対策の充実等に貢献することを期待する。

植物の DNA 品種識別技術の開発状況等調査報告書

(平成 18 年度知識集約型産業創造対策事業
「DNA 品種識別技術の海外開発状況等調査事業」)

平成 19 年 3 月

社団法人 農林水産先端技術産業振興センター
(STAFF)

〒107-0052

東京都港区赤坂 1-9-13 三会堂ビル 7 階

TEL 03-3586-8644