

食の安心・安全に貢献する作物の品種識別技術の開発

門 田 有 希

岡山大学学術研究院環境生命自然科学学域 准教授

緒 言

現在、日本の農業の活性化を図るため、国産農作物の諸外国への輸出が強化されており、政府は2025年までに2兆円、2030年までには5兆円とする輸出額目標を設定している。このような輸出拡大に向けた取り組みが強化される一方、近年、日本国内で育成された優良な作物品種が海外へ不当に流出し、無断栽培される事態が発生しており、社会的な問題となっている。流出国から第3国への輸出や日本への逆輸入等が進むと日本からの輸出機会が大きく減少してしまうため、経済的損失も大きくなる。昨今、権利侵害に関するニュースがメディアで報じられる機会も増えており、2020年には法改正が行われる（改正種苗法の成立）など、品種保護に対する気運が大きく高まっている。

このような権利侵害を立証し、育成者権を保護するためには作物品種を正確かつ迅速に識別できるDNA検査技術の開発が不可欠である¹⁾。しかしながら、既存的手法では検査に時間がかかる上、高価な機器や設備も必要とされるため、税関など現場での利用は困難である。さらには現行法ではジャムや小麦粉など複数品種がブレンドされた加工品に含まれる原料品種を特定できない、と言った課題があった。

そこで我々は、これら問題点を克服した新たな品種識別技術を開発するため、技術開発を進めた。レトロトランスポゾンという真核生物のゲノム中に存在する複製DNA配列を高速シーケンサーで解析することで品種を正確に識別できるDNAマーカーを開発し、さらにはC-PAS法やLAMP法などの検査法を導入することで簡易・迅速に品種を特定できる技術を確立した。また従来法では困難であった複数品種がブレンドされた加工品における品種の特定にも成功した。以上のことから、私たちの開発した手法は現場での利用が期待される画期的な技術であり、国産ブランド品種の保護や競争力の強化、侵害物品の取り締まりなどに向けた有効なDNA検査法となることが期待される。

実験方法と結果

私たちは、レトロトランスポゾンという真核生物のゲノム中に散在する複製DNA配列に注目し、品種識別技術の開発を進めた。レトロトランスポゾン配列は自身のコピー配列を複製するDNA配列で、複製されたコピー配列はゲノム内に挿入される。コピー配列が挿入される際、数百Mbあるいは数Gbといった膨大な長さの染色体上のたった1か所に、ランダムに挿入される。そのため、新たに生じた挿入部位の特異性はきわめて高くなる。また、一旦挿入されたコピー配列は安定して遺伝する。そのため、品種間で異なる挿入部位配列は非常に優れた目印、つまりDNAマーカーとなる²⁾。候補者らは、このレトロトランスポゾンの品種特異性や遺伝的安定性に注目し、品種を正確に識別可能なDNAマーカーを開発することとした。

まずは次世代シーケンサー（Next-generation sequencer：以降、NGSとする）を活用することで、ゲノム中に存在する膨大なレトロトランスポゾンファミリーを解析し、挿入部位を効率的に同定する独自の解析手法を確立した³⁾⁻⁵⁾。得られた挿入部位情報については品種間で比較し、品種識別に適した挿入部位を選定した。選定された挿入部位については、PCRプライマーを設計し、その品種識別性を調査した。このような挿入部位マーカーは、PCRのみで該当品種か否かを簡便に特定することができる（図1）。候補者らはこの手法を様々な作物種に応用し、イチゴ、リンゴ、サツマイモ、ブドウ、カンキツなど、多種多様な作物品種においてレトロトランスポゾンを利用した品種識別マーカーを開発した^{4), 6)-18)}。

また、簡便かつ迅速なDNA検査法を確立するため、C-PAS法やLAMP法といったDNA検査法やDNA増幅法を取り入れた技術開発も進めた。C-PAS法は小型のメンブレンスティックを15分間DNA溶液に浸すだけでDNAシグナルを検出できる手法であり、高額な実験機器も不要で迅速にDNAを検出できる。またLAMP法は、温度サイクル反応が不要で、等温反応で高速に

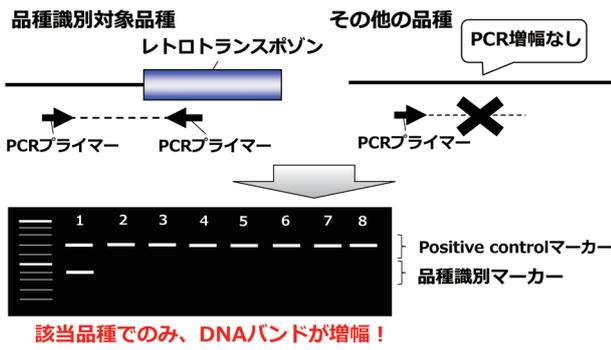


図1 レトロトランスポゾン挿入部位を利用したDNAマーカーの模式図

品種識別対象品種ではPCRによりDNA産物が増幅する一方、その他の品種ではレトロトランスポゾン配列が存在しないため、DNA産物は増幅しない。アガロースゲル電気泳動によるDNAバンドの有無で、該当品種か否かを即座に判定することができる。

DNAを増幅可能である。私たちは、本手法をレトロトランスポゾン挿入部位の検出に採用することで、新しい品種識別技術を考案した。従来法では、DNAの電気泳動や染色、可視化などの実験操作に2時間程度を要するが、私たちの開発した手法では高額な実験機器も不要で、DNA増幅後15分程度の反応で品種を特定することができた(特願：2021-200402, 2022-196625, 2023-208031)¹⁷⁾⁻²¹⁾。

また、レトロトランスポゾンマーカーを用いれば、これまで難しかった加工品における品種識別検査も可能であることを示した¹⁴⁾。これは、レトロトランスポゾン挿入部位の特異性が極めて高いこと、また挿入部位に該当する短い領域(100 bp程度)を増幅するだけで検出することに起因する。通常、加工品に含まれるDNA断片は熱処理や加工により断片化されている。これがDNA検査を極めて困難とするが、我々の検査法では加工品においても品種を特定することが可能であった¹⁴⁾。

以上のことから、私たちの開発した手法は従来法と比較し、優位性・新規性が高く、かつ現場での利用が期待される画期的な技術であると考えられる。現在、私たちは、企業や共同研究機関と連携し、新しい品種識別検査キットの開発を進めている。令和2年度からスタートした農林水産研究推進事業委託プロジェクト研究の「次世代育種・健康増進プロジェクト」における「品種識別技術の開発」(課題番号：20319911)では、ブドウ、カンキツ、リンゴ、サツマイモ、キクなど多様な植物種を対象に品種識別技術を開発している。これまでの成果において、カンキツ品種(「あすみ」、「みはや」、「紅まどんな」など)を迅速・簡便に識別可能な検査キットを開発した

(日刊工業新聞の「For future先端技術」(2023/7/17)、日本種苗新聞(2023/7/21)、日本経済新聞(2023/5/24)、日経バイオテック(2023/5/17)での報道¹⁷⁾)。また同様の手法を用いて、サツマイモ品種(「べにはるか」および「ふくむらさき」)についても検査キットを開発し¹⁸⁾、複数研究機関での妥当性・再現性試験も終えている。関連マニュアルについては農研機構のHPから公開されている(https://www.naro.go.jp/collab/breed/hinshu_shikibetsu/index.html)。

考察と要約、今後の展望

上記の通り著者らは、レトロトランスポゾンの遺伝的特徴に着目し、さらに新しいDNA検査法も組み合わせることによって、画期的な品種識別技術を開発した。レトロトランスポゾン配列は植物を含め、真核生物のゲノム中に膨大な数存在しており、その中から品種識別に有用な挿入部位を見つけ出すことは容易ではない。著者はNGSを利用した解析手法を独自に考案し、品種特異的な挿入部位を効率的に同定する新しい解析法を確立した。それにより、一気に品種識別マーカーの開発が進み、研究が加速化した。また、レトロトランスポゾンの品種特異性、検出の簡便性等を大いに活用することで、加工品への適用も可能となった。また著者は、別の研究テーマにおいて、大きく遅れていた倍数性作物種の遺伝育種学的解析やDNAマーカーによる選抜育種を加速化させる育種基盤を構築している。特に重要な農業形質である病害抵抗性について、作用力の大きい遺伝子座を世界に先駆けて同定し、抵抗性個体を高効率に選抜可能なDNAマーカーも開発するなど、この数年で同質六倍体サツマイモの遺伝解析を飛躍的に発展させている²²⁾⁻²⁶⁾。そこで今後は見つかった遺伝子の機能証明や機能解析、そして分子メカニズムの解明に向け、倍数体作物のゲノム編集技術や形質転換植物の作出などにも力を入れたいと考えている。

上記のような研究を進めていくことで、様々な作物種における優良品種育成の加速化、育種基盤の構築、さらには育成された品種の育成者権の保護、逆輸入の阻止による海外への国産品種輸出の強化を通じて、日本の農業の発展・競争力強化にも貢献したいと考えている。

謝 辞

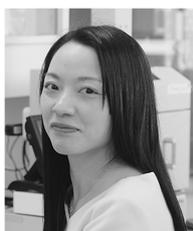
この度、大変名誉ある三島海雲記念財団学術賞を賜り、選考委員の先生方および同財団の関係者の皆様に厚

く御礼申し上げます。また、本賞に推薦していただきました日本育種学会前会長加藤鎌司先生および学会関係者の皆様にも感謝申し上げます。また本研究を遂行するにあたりお世話になった岡山大学の田原誠先生、進藤彰子様、一緒に実験をしてくれた学生さん達にも心より感謝申し上げます。そしてともに研究を進めてくださり、日々貴重なご助言や多大なるサポートをしてくださる共同研究者の方々（磯部祥子先生（現東京大学）はじめ多くの方々。あまりにも数が多く、皆さまのお名前を書ききれないこと、ご容赦ください。）にも感謝の意を表します。なお、本研究の一部は平成27年度（第53回）三島海雲記念財団の学術研究奨励金の助成を受けて遂行しました。重ねてお礼申し上げます。

文 献

- 1) 門田有希：化学と生物, **55**, 817–824, 2017.
- 2) Y. Monden and M. Tahara: *Hort. J.*, **84**, 283–294, 2015.
- 3) Y. Monden, et al.: *Genome*, **57**, 245–252, 2014.
- 4) Y. Monden, et al.: *DNA Res.*, **21**, 491–498, 2014.
- 5) Y. Monden, et al.: *Current Plant Biology*, **1**, 40–44, 2014.
- 6) 門田有希ほか：DNA多型, **21**, 47–54, 2013.
- 7) 秋竹広翔ほか：DNA多型, **21**, 64–72, 2013.
- 8) 門田有希ほか：DNA多型, **22**, 60–65, 2014.
- 9) 湯浅まり恵ほか：DNA多型, **23**, 34–38, 2015.
- 10) 奈島賢児ほか：DNA多型, **23**, 29–33, 2015.
- 11) 田中勝ほか：DNA多型, **24**, 115–118, 2016.
- 12) 西谷千佳子ほか：DNA多型, **24**, 101–107, 2016.
- 13) 門田有希ほか：DNA多型, **25**, 68–71, 2017.
- 14) C. Hirata, et al.: *Breed. Sci.*, **70**, 231–240, 2020.
- 15) 高田翔太ほか：DNA多型, **28**, 46–50, 2020.
- 16) 田中勝ほか：DNA多型, **31**, 57–62, 2023.
- 17) M. Okamoto, et al.: *Breed. Sci.*, **73**, 146–157, 2023.
- 18) Y. Monden, et al.: *Breed. Sci.*, **73**, 313–321, 2023.
- 19) Y. Monden, et al.: *J. Biotech.*, **185**, 57–62, 2014.
- 20) 高崎一人ほか：DNA多型, **24**, 134–137, 2016.
- 21) 笹井瑠美ほか：DNA多型, **25**, 88–91, 2017.
- 22) Y. Monden, et al.: *Breed. Sci.*, **65**, 145–153, 2015.
- 23) R. Sasai, et al.: *DNA Res.*, **26**, 399–409, 2019.
- 24) Y. Okada, et al.: *Plant Cell Rep.*, **38**, 1383–1392, 2019.
- 25) E. Haque, et al.: *Breed. Sci.*, **70**, 283–291, 2020.
- 26) N. Obata, et al.: *Front. Plant Sci.*, **13**, 858747, 2022.

著者紹介



門田 有希 (モンデン ユキ)

2007年3月 京都大学農学部 卒業
 2009年3月 京都大学大学院 農学研究科修士課程修了
 2009年4月 日本学術振興会特別研究員 (DC1)
 2012年3月 京都大学大学院 農学研究科博士課程修了
 2012年4月 岡山大学 特任助教
 2015年4月 岡山大学 助教
 2018年3月 岡山大学 准教授

〈研究テーマと抱負〉

専門分野：農学（植物遺伝育種学）

学生さんたちと汗を流しながら圃場で作物を栽培しつつ、DNAを使った実験や情報解析を通じて農学分野に貢献したい。