

《科学先取り岡山コース》一般公開講座

DNA鑑定で和菓子の“あん”を 調べてみよう



岡山大学

Okayama University



岡山大学大学院自然科学研究科

田原 誠

中川 藍

藤原早希

山崎浩二

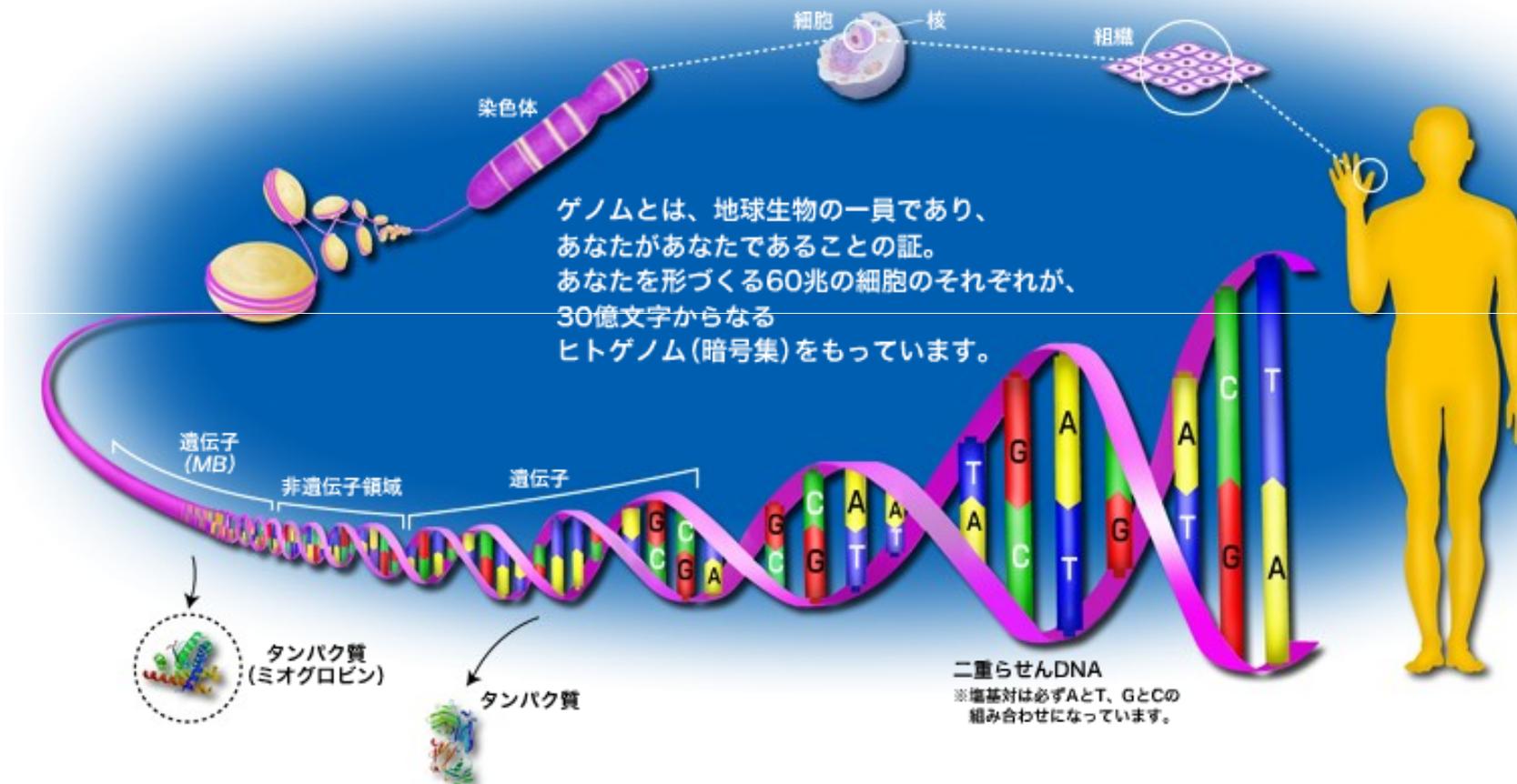
平成20年10月25日(土)

話 題

- 組織, 細胞, 核, DNA
- DNA増幅法1: PCR
- DNA増幅法2: LAMP法
- DNA鑑定
- 農作物の品種
- 品種識別技術が必要な理由
- 転移因子(レトロトランスポゾン)
- レトロトランスポゾンによる品種識別技術の開発

身体, 組織, 細胞, 核, DNA(1)

ゲノムとは…



ヒトゲノムマップ

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/genomemap/>

身体，組織，細胞（2）

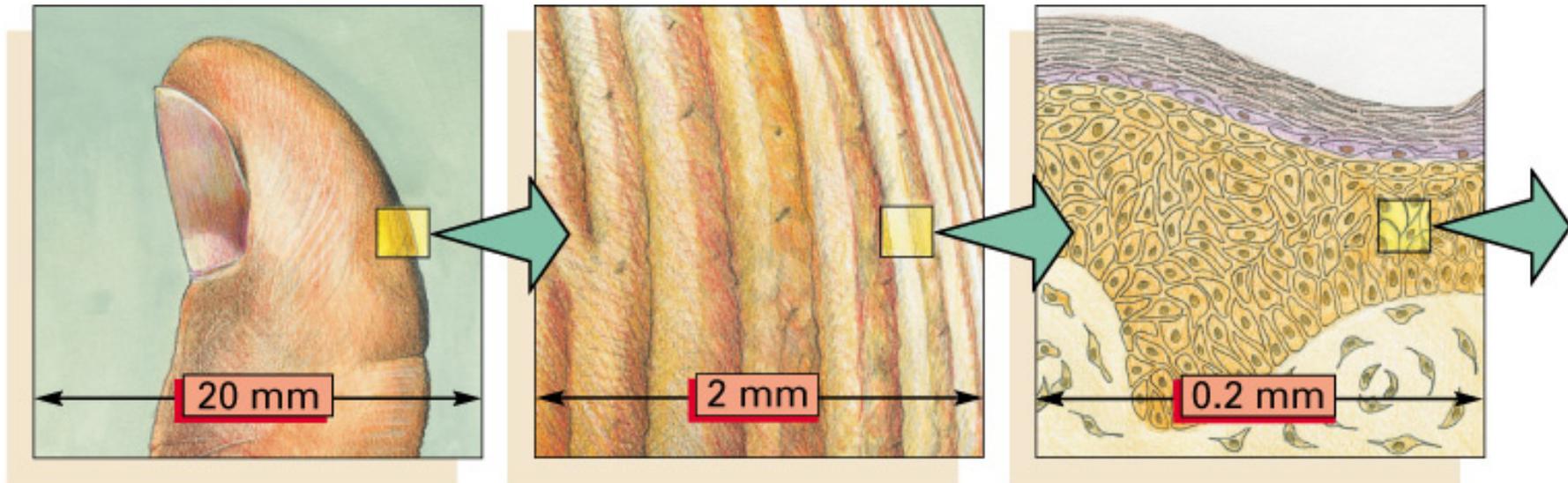
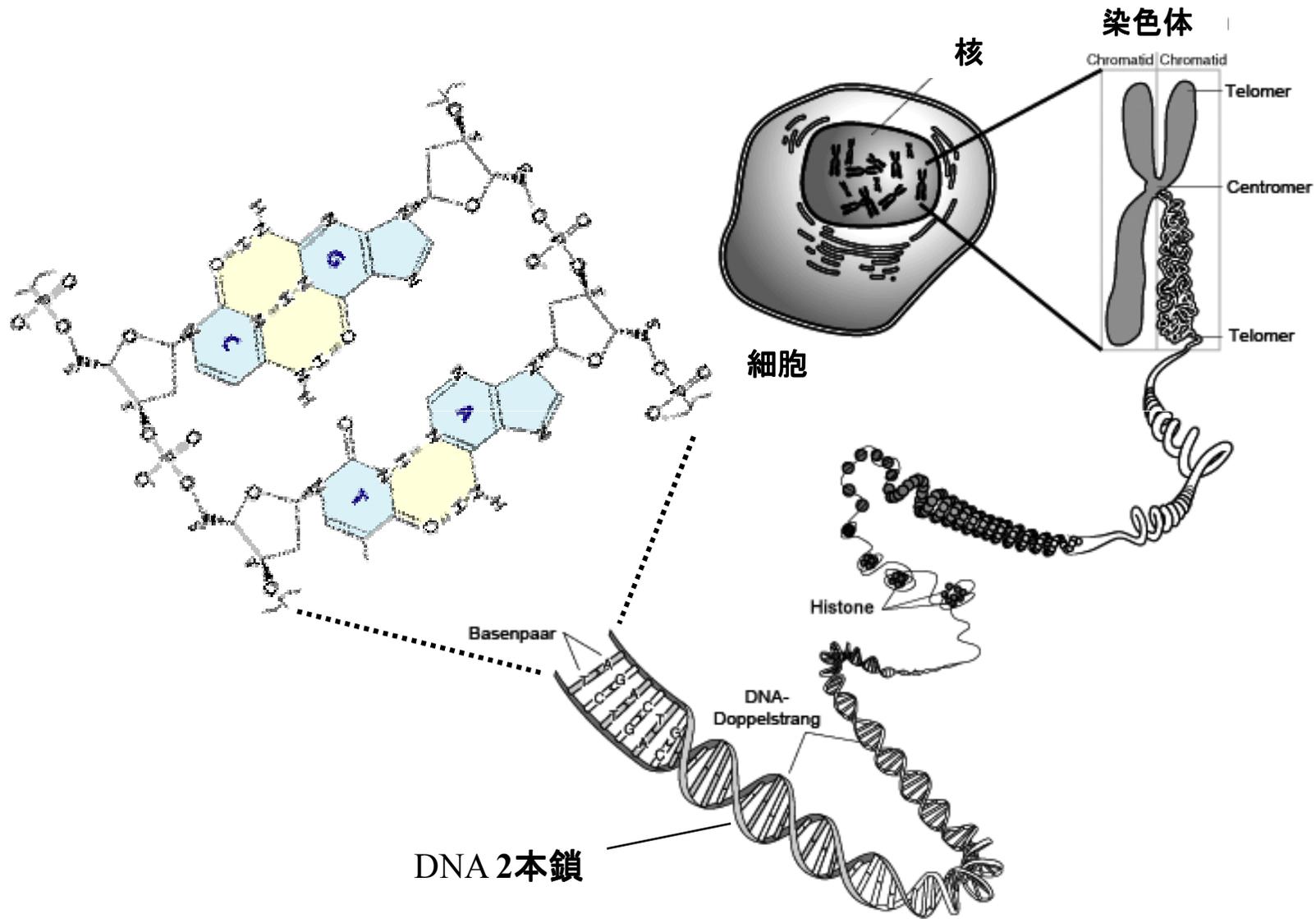
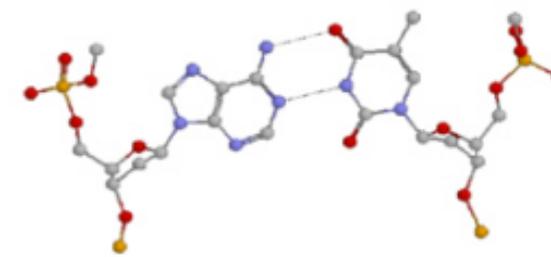
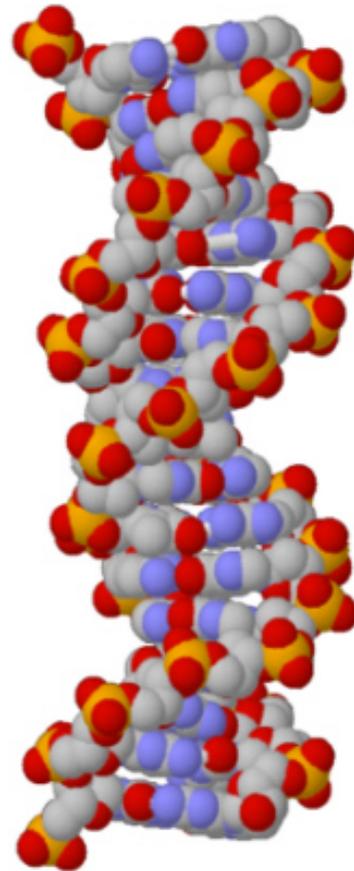
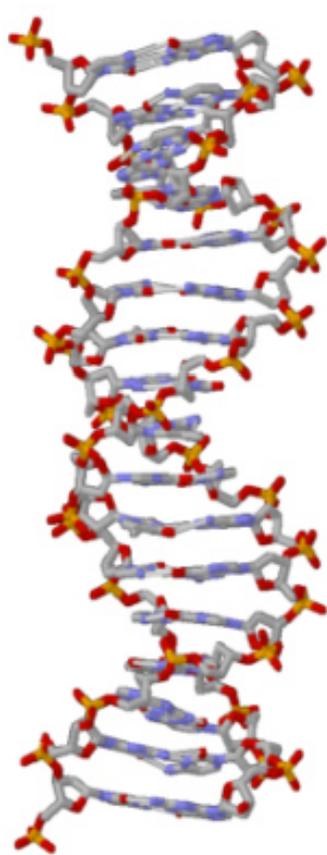


Figure 9-1 part 1 of 3. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

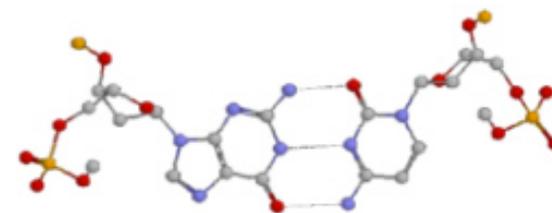
細胞, 核, DNA (3)



DNAの構造模型

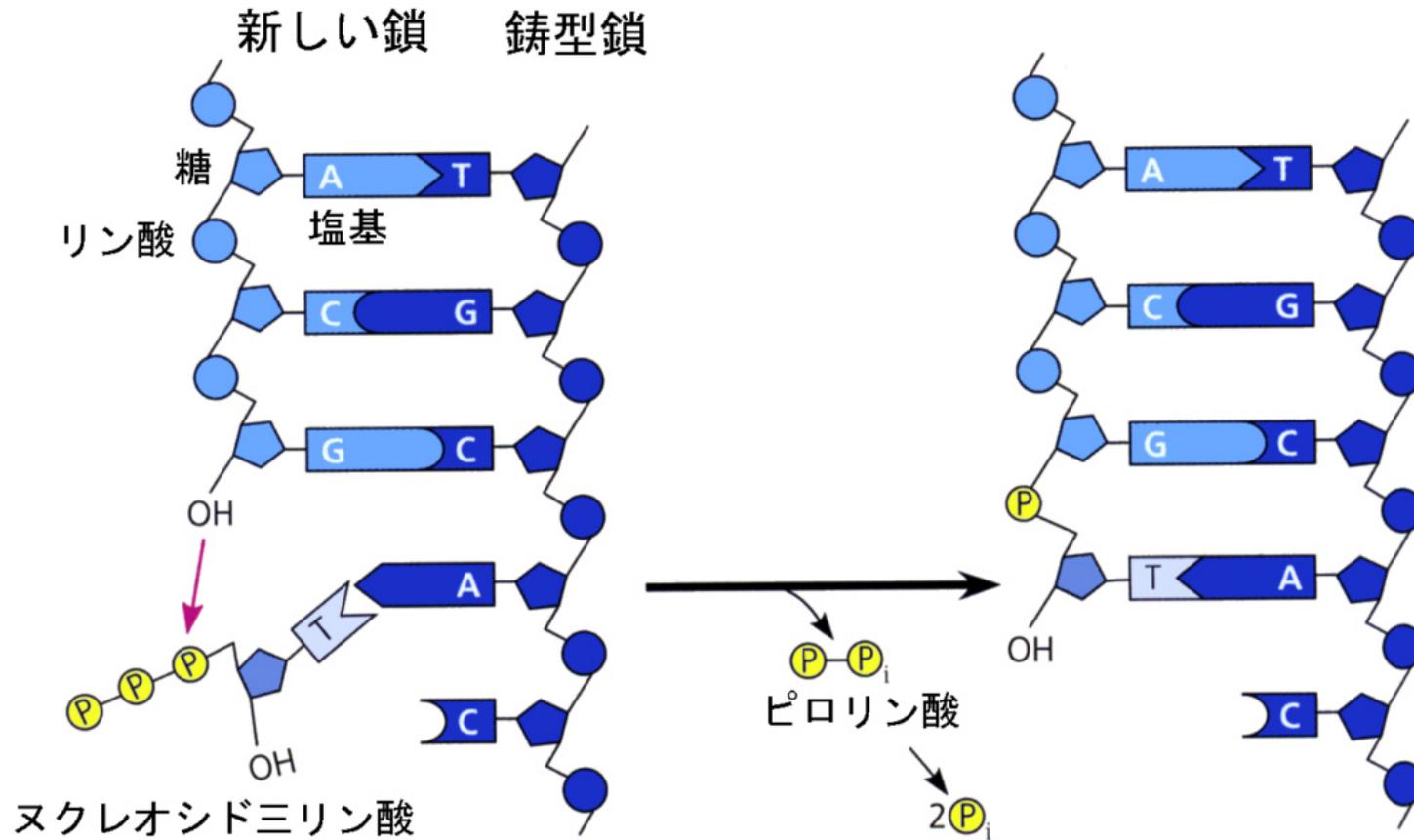


アデニン:チミン

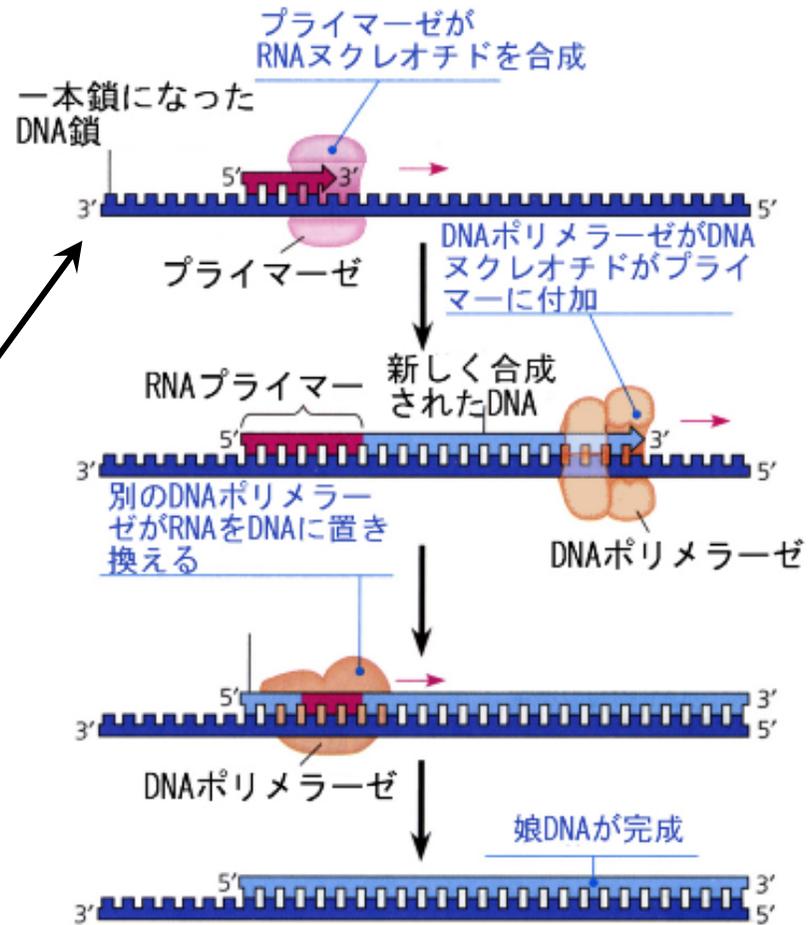
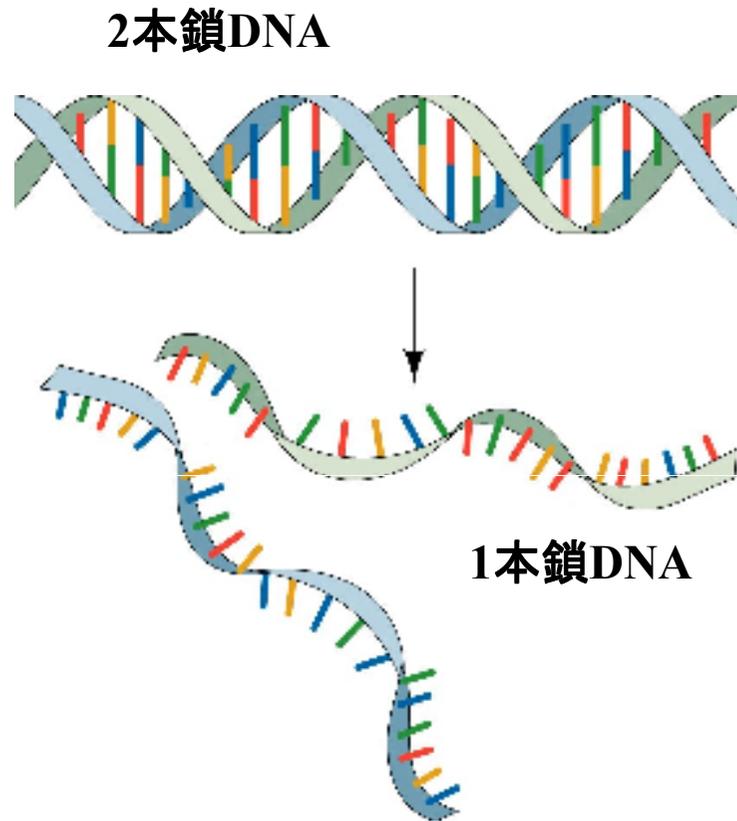


シトシン:グアニン

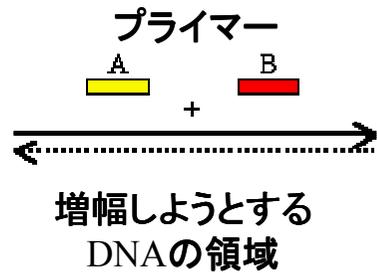
DNAの構造と複製



DNAの複製



PCRの原理



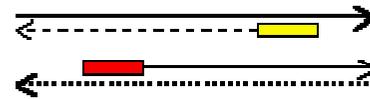
PCR反応液

1. プライマー2種類(A,B)
2. 鋳型になるDNA
3. DNAポリメラーゼ
(複製酵素)
4. 合成に使われる核酸

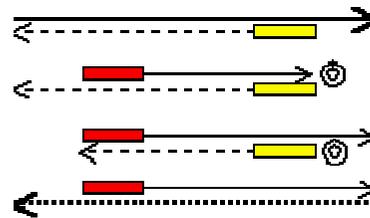
PCRサイクル

1. 熱変性
2. プライマー結合
3. プライマー伸長反応

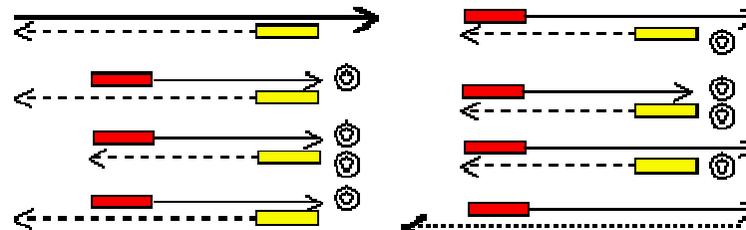
PCRサイクル1



PCRサイクル2 ↓



PCRサイクル3 ↓



PCRサイクル4~25
1サイクルごとに2倍

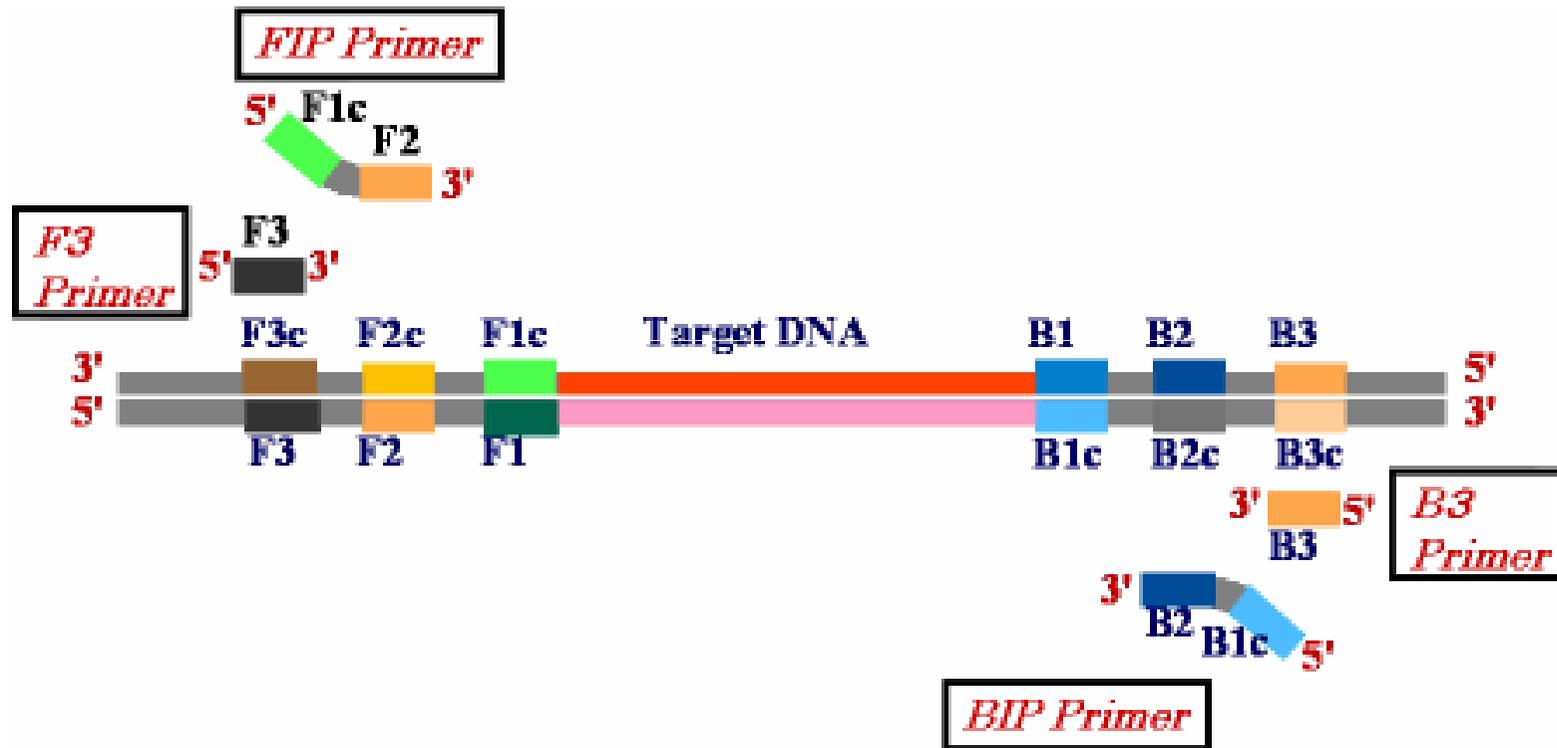
$$\rightarrow 2^{25} = 33,224,432$$

1985年、Mullisによって考案された画期的なDNA増幅法。
1988年、耐熱性のDNAポリメラーゼ (*Taq* DNAポリメラーゼ) が導入され、実用化された。

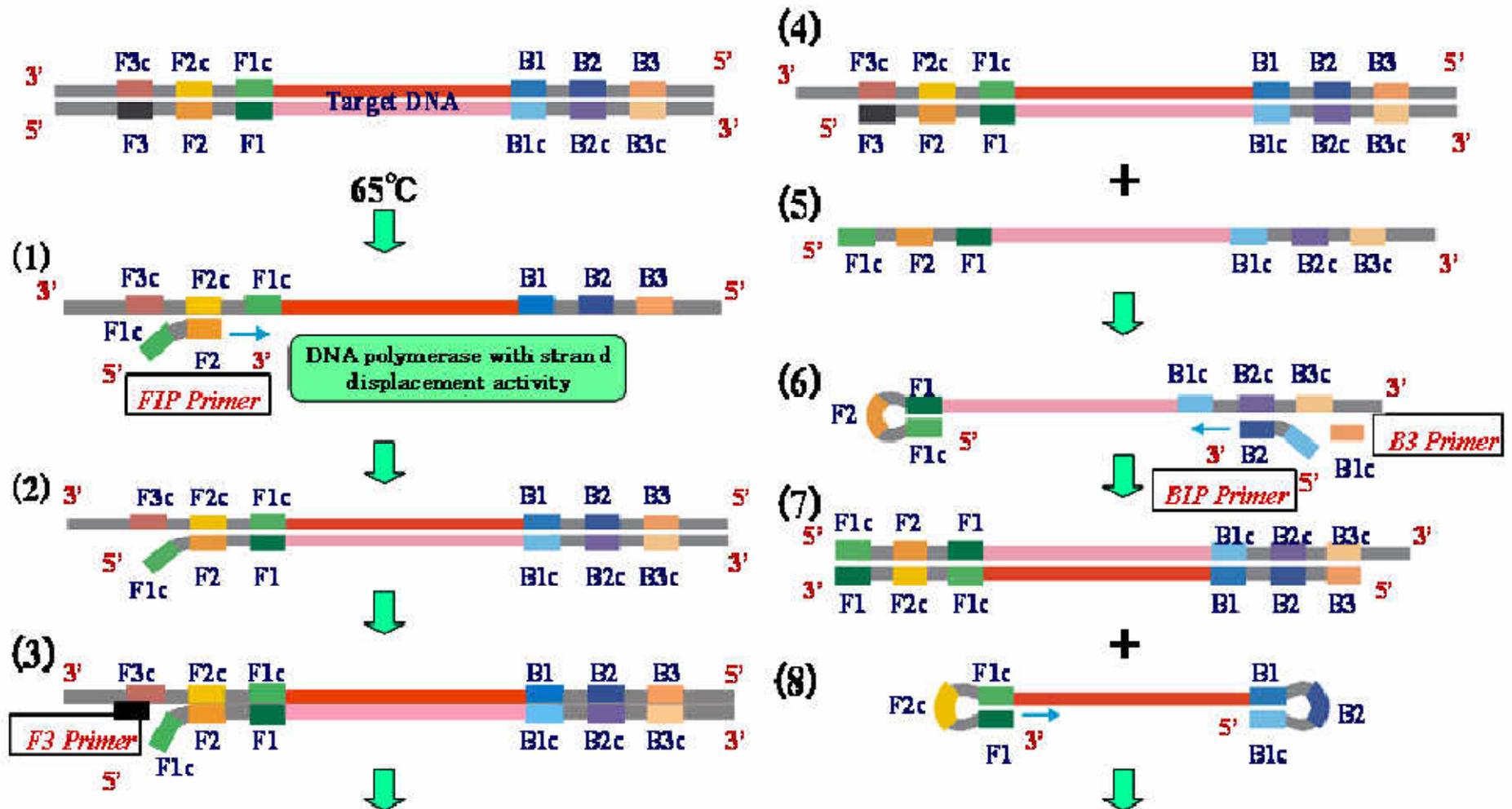
PCRサイクルを25回ほど繰り返すことにより、プライマーに挟まれたDNAの領域を、短時間にかつ簡便に百万倍以上に増幅できる。

LAMP法の原理(1)

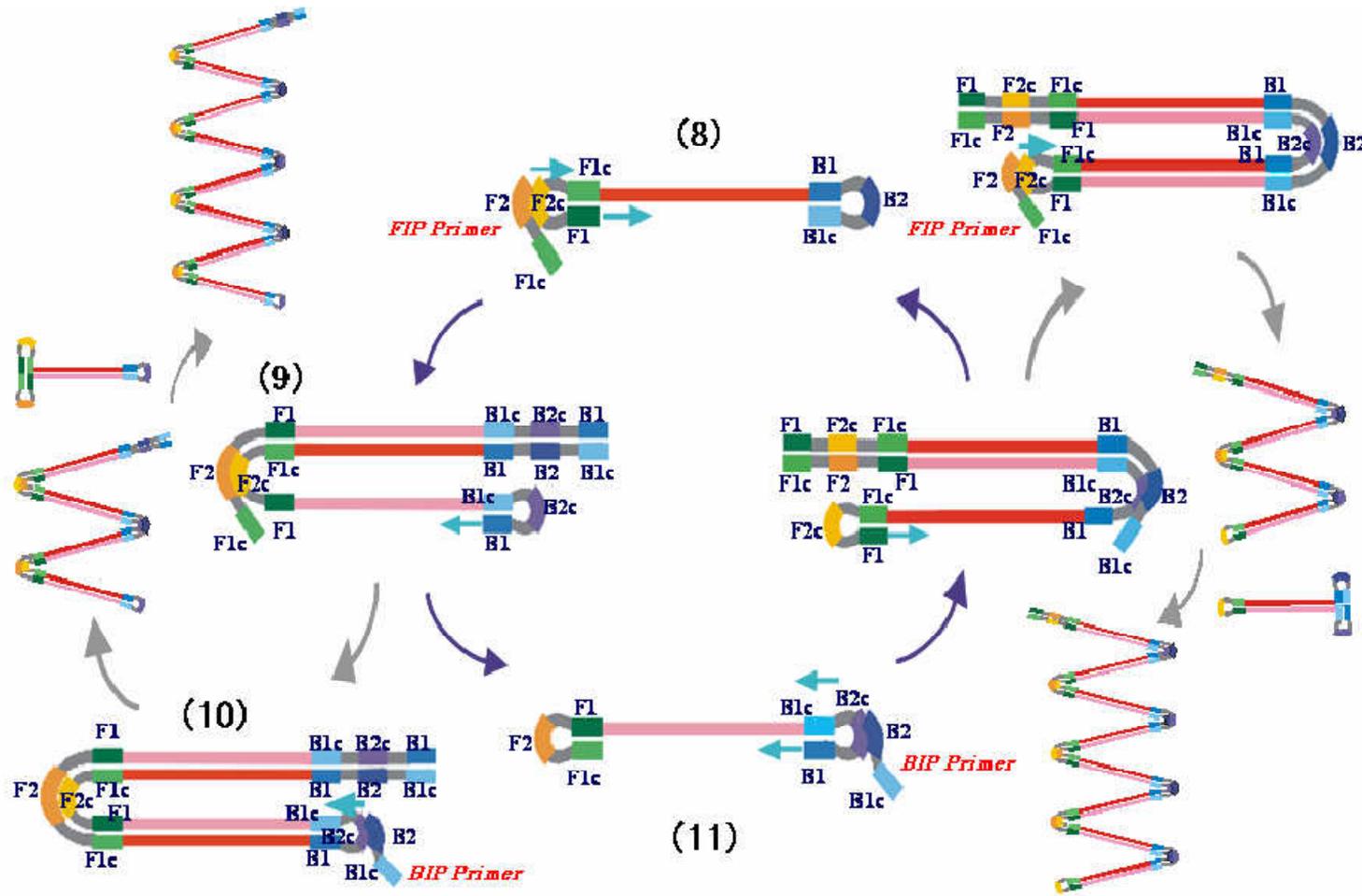
LAMP: Loop-Mediated Isothermal Amplification



LAMP法の原理(2)



LAMP法の原理(3)



栄研化学のHPから <http://loopamp.eiken.co.jp/lamp/principle.html>

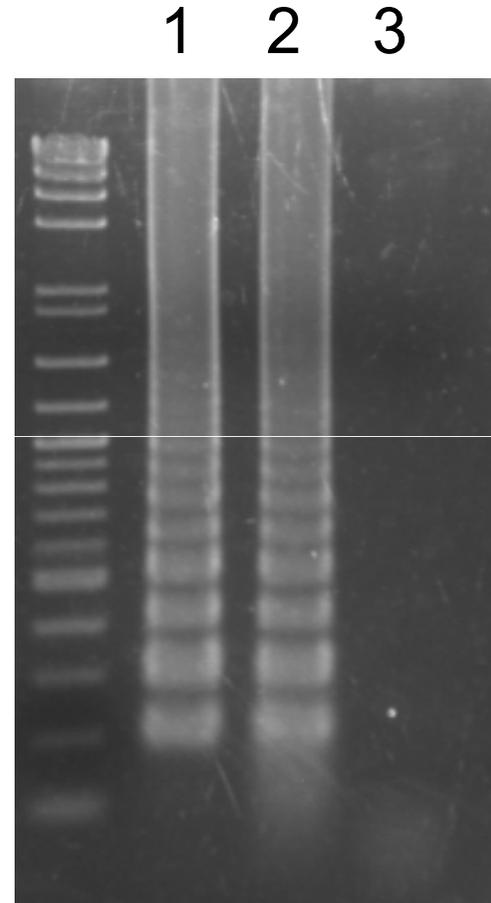
LAMP法実験結果

きたのおとめマーカー

試料添加65°C 1時間反応後



1. きたのおとめ 葉抽出DNA
2. きたのおとめ 加糖餡抽出DNA
3. エリモショウズ 葉抽出DNA



左のLAMP反応液を電気泳動したもの

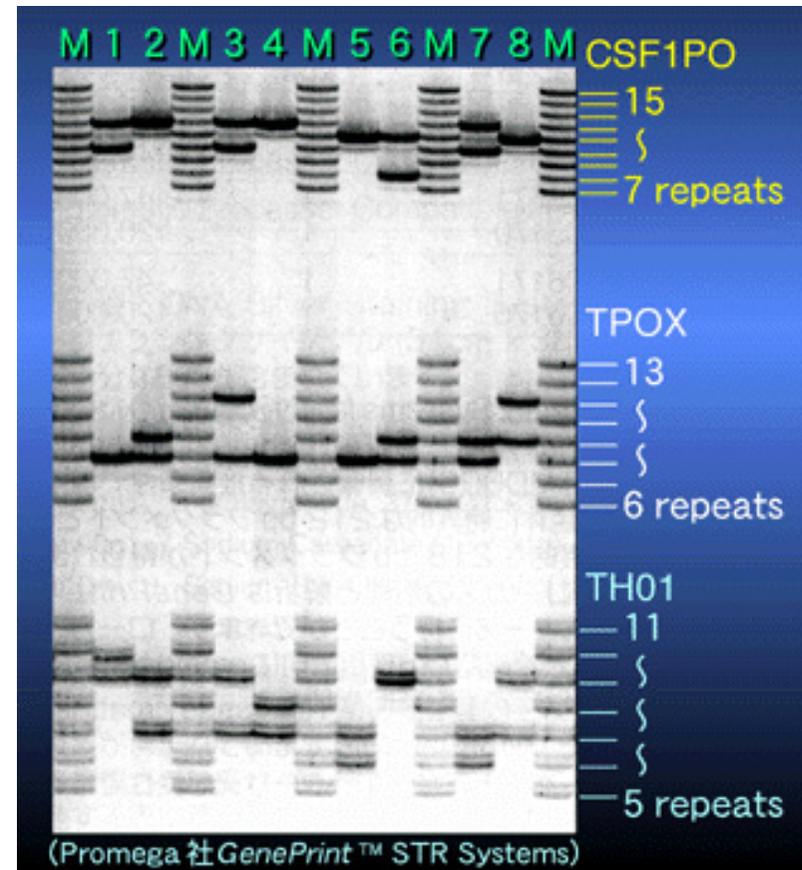
DNA合成の副産物、ピロリン酸とマグネシウムイオンの結合により白濁

ヒトのDNAとDNA鑑定

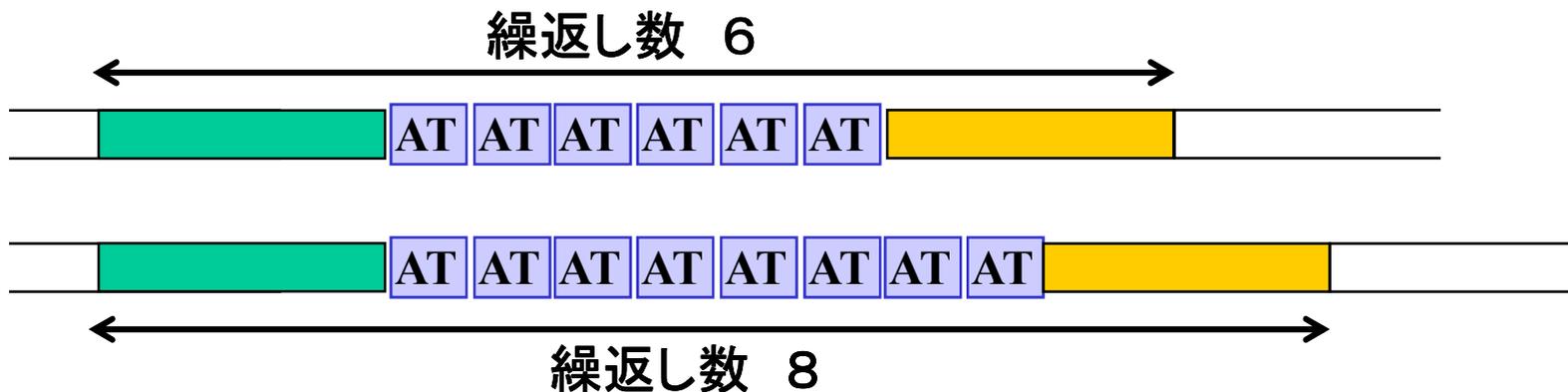
- 一つの細胞に約28.5億の塩基対
- そのうちの約2%だけが遺伝子として働く
- DNA(型)鑑定は、遺伝子ではない領域のなかで、同じ配列が繰り返し現れる場所を利用(SSR: Simple Sequence Repeat または、STR: Short Tandem Repeat)
- 作物のDNA品種識別の多くはSSR(STR)法を使う。

SSR (STR) 法

・単純な塩基配列(例:AT)が繰り返し現れる場所のDNAをPCRと呼ばれる方法で増幅し、繰り返し数の違いを検出する。



同一の遺伝子座



農産物の品種とは

- ・農作物のうち、遺伝的な特徴により同種の農作物の他のものとは区分されるもの



www.page.sannet.ne.jpから

コシヒカリ



www.naxnet.or.jpから

清水白桃



www.rakuten.co.jpから

ピオーネ

新品種育成者の権利保護

・新しい品種の育成には、育成者の創意工夫に基づく研究が必須。

・新品種は、「知的財産」として、「種苗法」により育成者の権利が保護されている。

・種苗法：育成者は他者による育成品種の増殖、販売、輸出入を制限できる。

・さらに、育成者権侵害物品は、輸入禁止
— 関税定率法(2003年7月改正) —

新品種保護の困難性

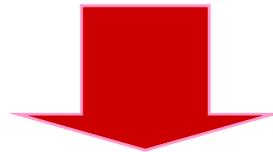
- ・種子、いも等で自己増殖する農作物では、新品種の不正な種子増殖と栽培を防ぐことが極めて困難。
- ・産物では、外見での品種の識別が極めて困難。

・さらに、商品の不正表示も問題になることがある。

〇〇産コシヒカリ 100%



実は安価な別品種を混米



DNAに基づく鑑定技術の開発が急務

品種識別のために既に関発 されているDNA分析法の原理

・品種の間に違いが生じる遺伝子を見出し、そのような違いを、いくつかの遺伝子について組み合わせて、品種を特定できるパターンを得る。

・ヒトのDNA鑑定に使われている SSR (Simple Sequence Repeat) 法が、農作物の品種識別にも多く利用されている。

DNA分析法による農産物品種識別

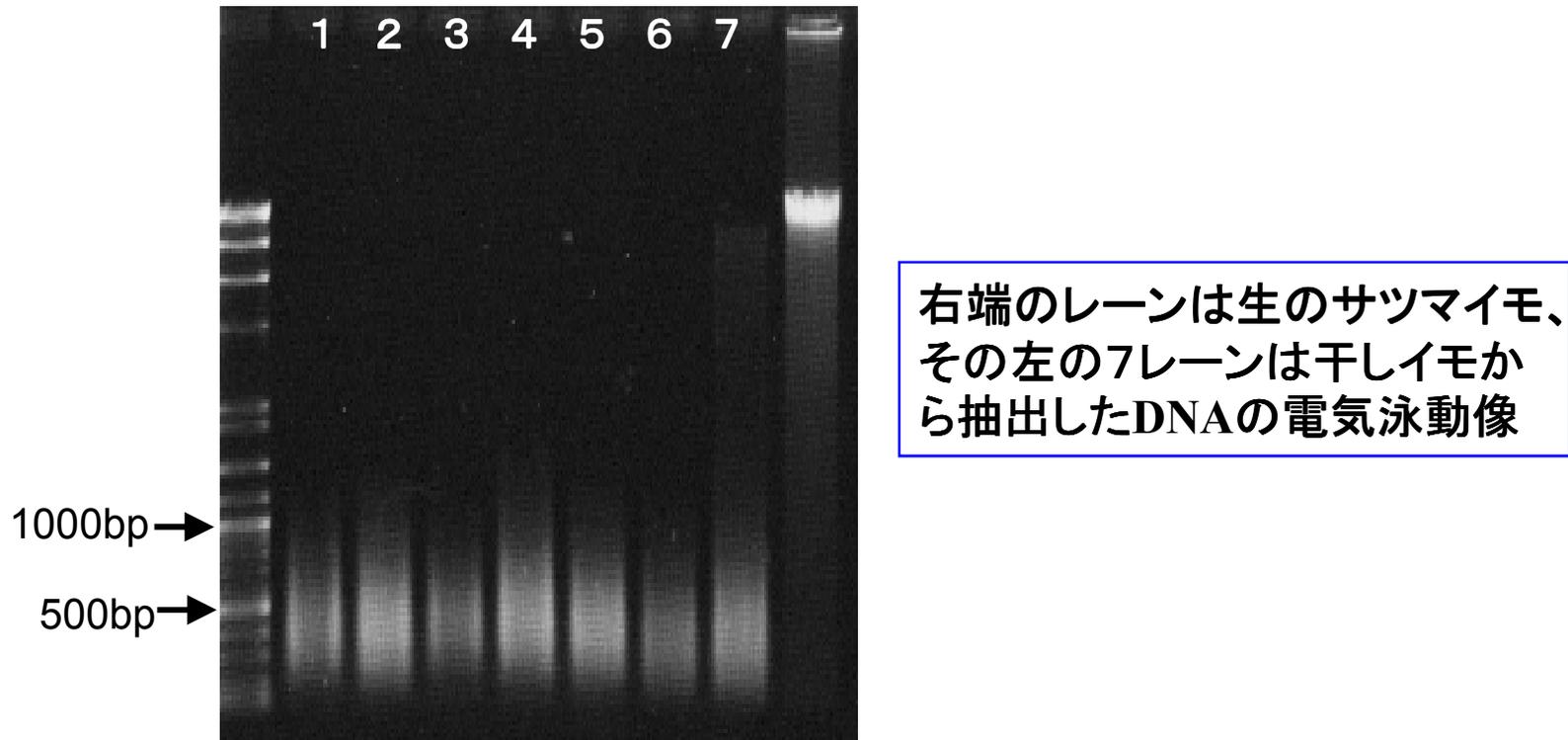
- 品種の間で違いが生じる対立遺伝子を見出し、そのような違いを、いくつかの遺伝子座について組み合わせて、品種を特定できるパターンを得る。
- **SSR (Simple Sequence Repeat) 法**
- **RAPD-STS (Random Amplified Polymorphic DNA)**
- **CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)**

RAPD-STSによるアズキ品種の識別(北海道中央農試)

品種名	RAPD-STS		
	SV01	SV02	SV03
エリモシヨウズ	-	+	-
きたのおとめ	+	+	+
しゅまり	-	-	+
サホロシヨウズ	-	+	+
ホツカイシロシヨウズ	+	+	-

農産物加工品分析における課題(1)

・加工による検査DNAの断片化



・対応：短いDNAでも分析可能な方法を採用する。

農産物加工品分析における課題(2)

- ・加工工程での原料品種のブレンド
－小麦粉製品, 練り製品, お茶,

RAPD-STSによるアズキ品種の識別(北海道中央農試)

品種名	RAPD-STS		
	SV01	SV02	SV03
エリモショウズ	-	+	-
きたのおとめ	+	+	+
しゅまり	-	-	+
サホロショウズ	-	+	+
ホッカイシロショウズ	+	+	-

- ・「しゅまり」と「ホッカイシロショウズ」の「練りあん」からは、「きたのおとめ」のパターンが検出。

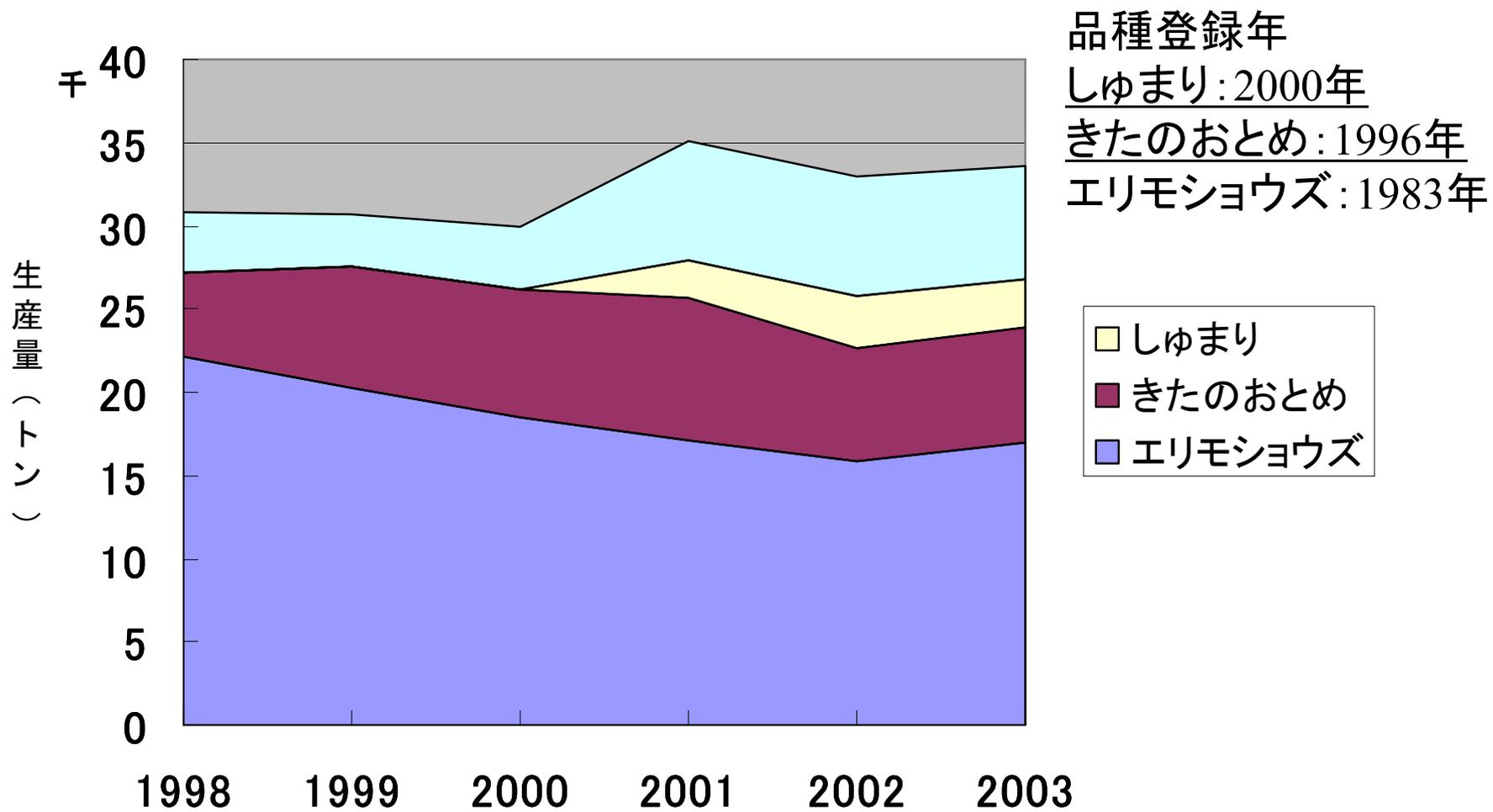
農産物加工品分析における課題(2)

・加工工程での原料品種のブレンド

・課題: 遺伝子座の対立遺伝子の組合せの固有性を原理とする方法では、品種識別が困難。

・対応: 目的品種に固有の遺伝的なマーカーを開発する。

北海道のアズキ品種別生産量の推移



レトロトランスポゾン

- ・植物や動物の染色体に、多種類かつ多数存在する「転移因子」とよばれる遺伝子の一種。
- ・細胞へのストレスなどにより、自らのコピーを作り、染色体の別の場所に挿入（「転移」と呼ばれる）する。

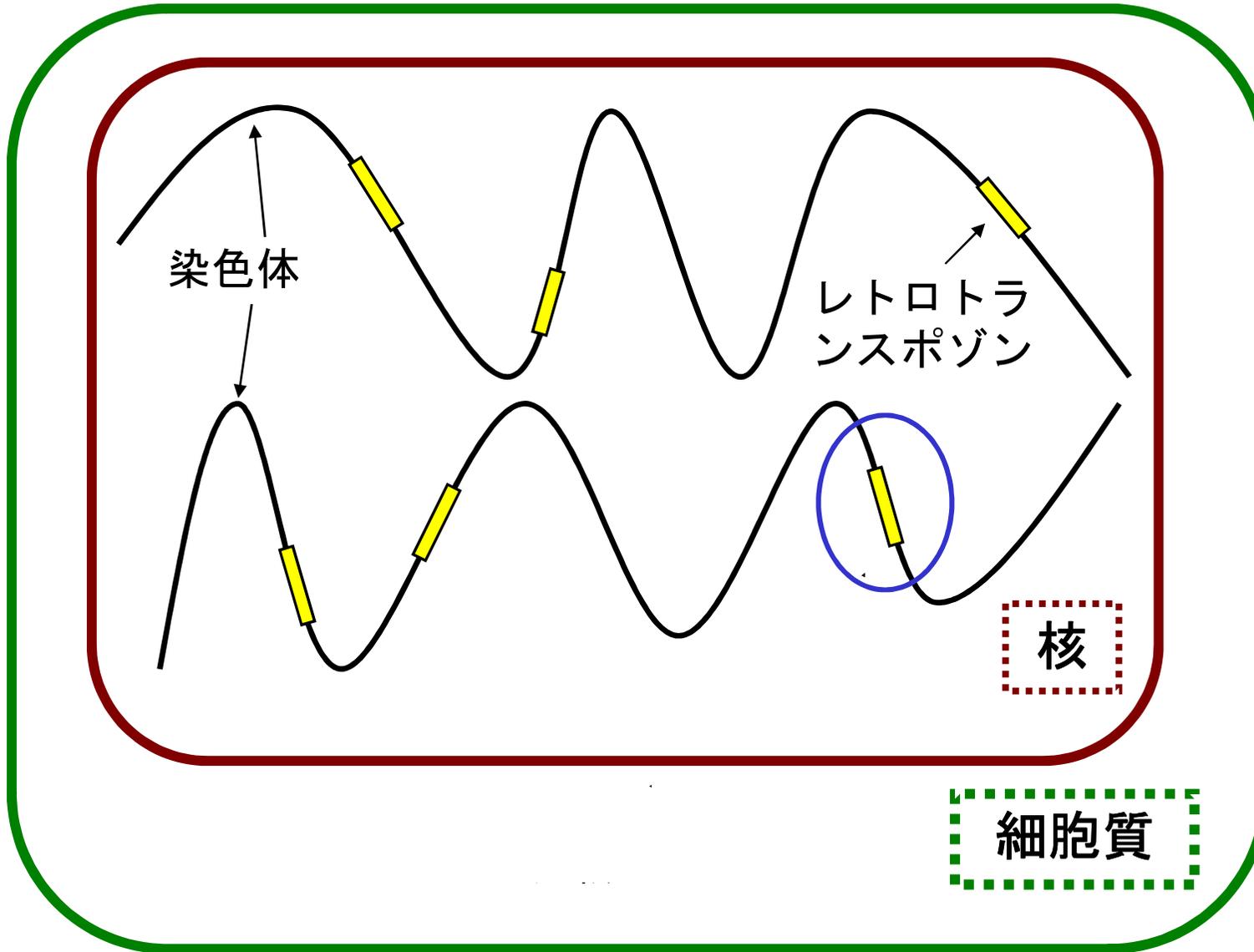
LTR型(例: Ty1-Copia レトロトランスポゾン)



非LTR型(例: LINE レトロトランスポゾン)

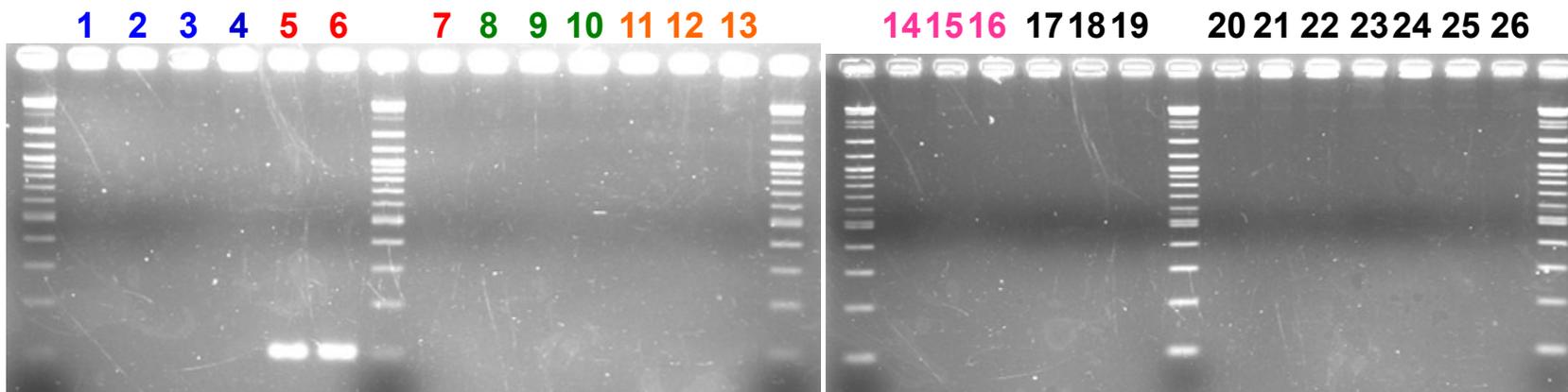


レトロトランスポゾンの複製・転移



平成19年度研究成果

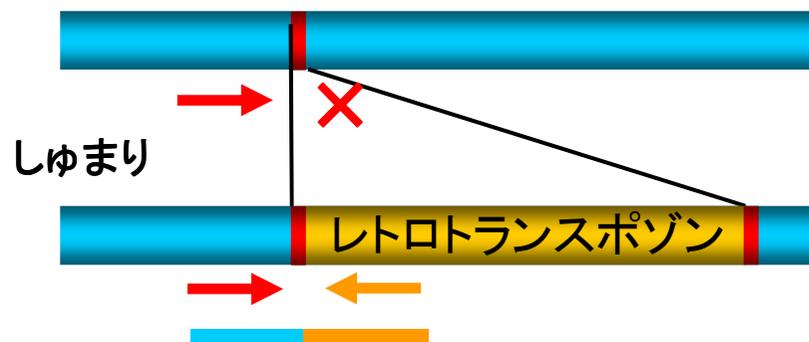
アズキ品種「しゅまり」に高度に特異的なレトロトランスポゾン・マーカ



- | | |
|---------------|---------------|
| 1:きたのおとめ(子) | 14:きたろまん(子) |
| 2:エリモショウズ | 15:十育137号 |
| 3:宝小豆 | 16:十育138号 |
| 4:円葉 | 17:きたほたる |
| 5:しゅまり(子) | 18:ホッカイシロショウズ |
| 6:十育130号 | 19:とよみ大納言 |
| 7:十系486号 | 20:東北小豆 |
| 8:ほくと大納言(子) | 21:延辺小豆 |
| 9:十育80号 | 22:河北小豆 |
| 10:ベニダイナゴン | 23:山西小豆 |
| 11:サホロショウズ(子) | 24:天津小豆 |
| 12:アカネダイナゴン | 25:宝清小豆 |
| 13:中国在来 | 26:陝西小豆 |

「しゅまり」に高度に特異的なレトロトランスポゾン挿入部位を見だし、接続部にプライマーを作りPCRマーカ化。

しゅまり以外の栽培品種など



国内アズキ品種における品種判別

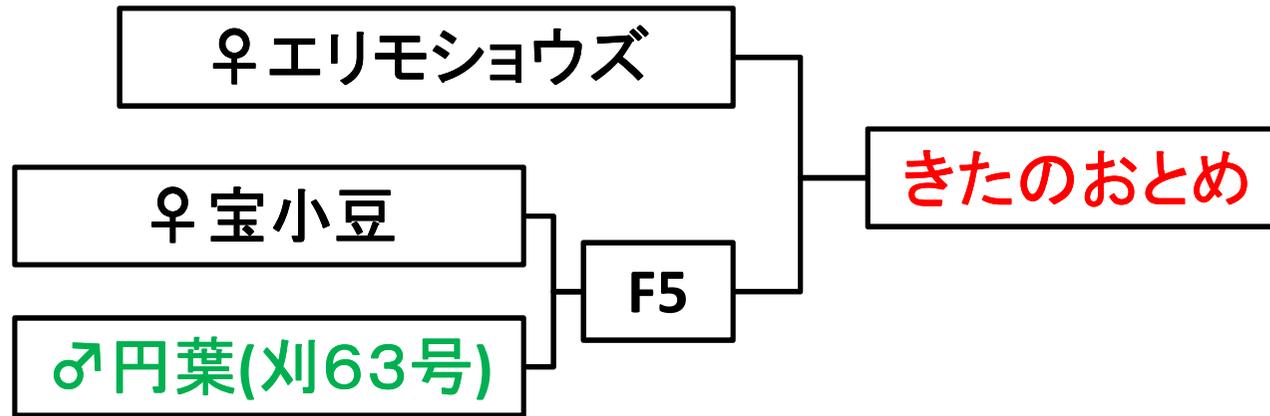
品種名	「きたのおとめ」 特異マーカー	「しゅまり」 特異マーカー
きたのおとめ*	+	-
しゅまり*	-	+
きたろまん*	-	-
きたほたる*	-	-
ときあかり*	-	-
とよみ大納言*	-	-
ほくと大納言*	-	-
エリモシヨウズ	-	-
サホロシヨウズ	-	-
アカネダイナゴン	-	-
ホツカイシロシヨウズ	-	-
兵庫大納言	-	-
アケノワセ	-	-
新備中大納言	-	-
カムイダイナゴン	-	-
ハツネシヨウズ	-	-
ベニダイナゴン	-	-
ハヤテシヨウズ	-	-
栄小豆	-	-
寿小豆	-	-
岩手大納言	-	-
暁大納言	-	-
光小豆	-	-
宝小豆	-	-
円葉1号	-	-
早生大粒1号	-	-
高橋早生	-	-
早生大粒	-	-
早生大納言	-	-
早生円葉	-	-
茶殻早生	-	-
剣先	-	-

□:平成19年12月の
段階で北海道が育
成者権を持つ品種

+:増幅あり

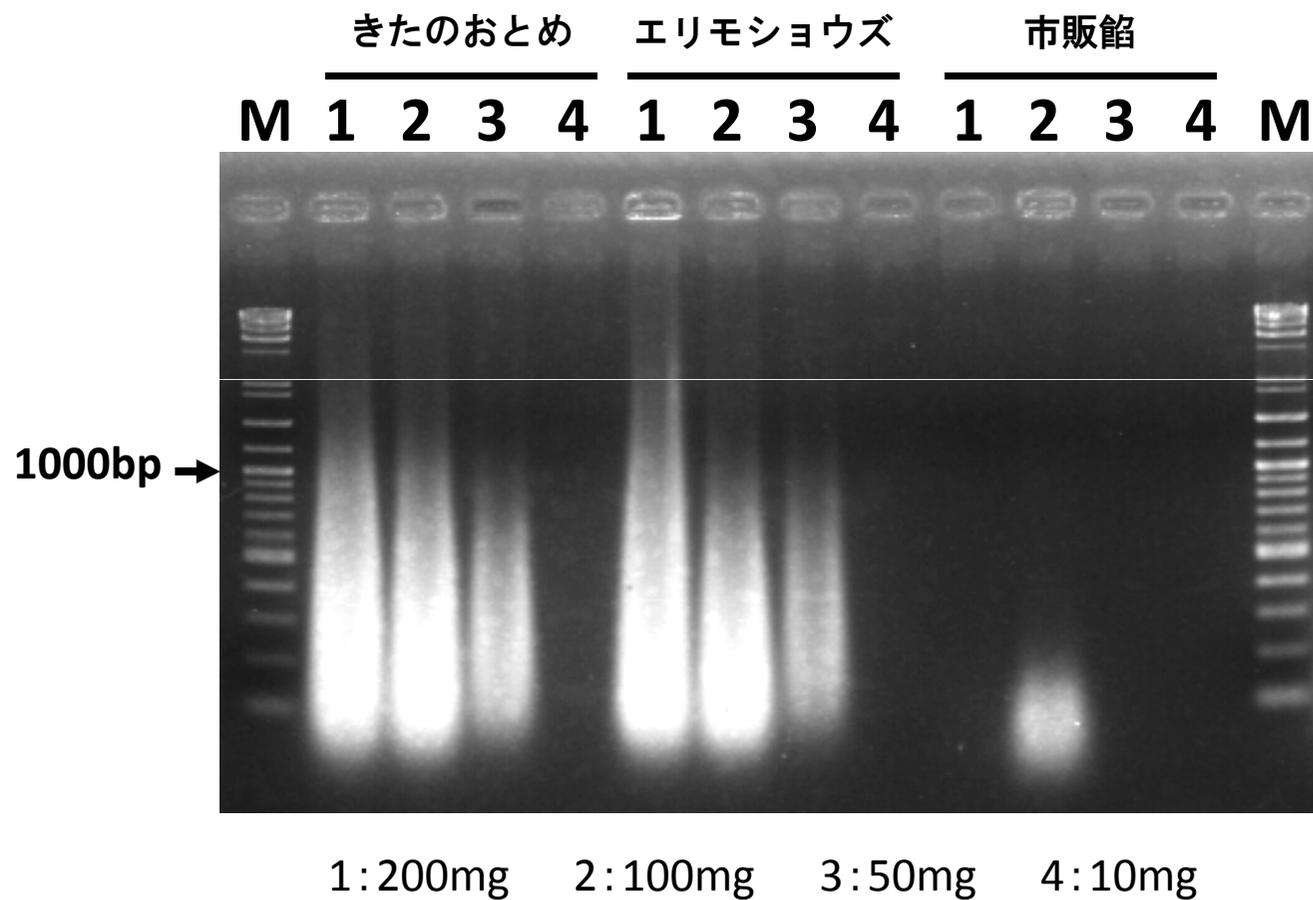
-:増幅なし

きたのおとめ識別マーカの特異性



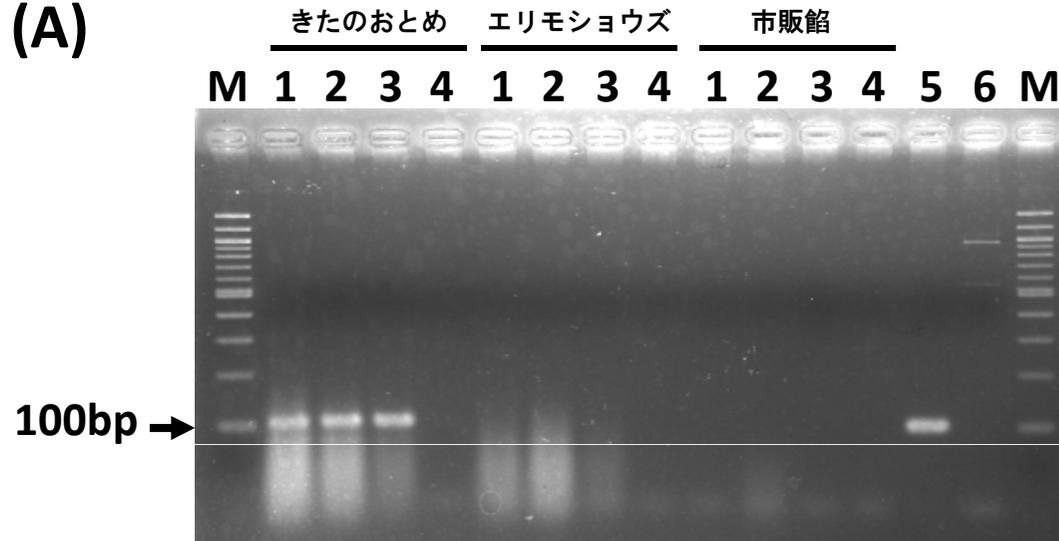
	P1-Kit	QC
きたのおとめ	○	○
円葉(刈63号)	○	○
日本在来2系統	○	○
他81品種	×	○

加熱加工エアズキ餡からのDNA抽出

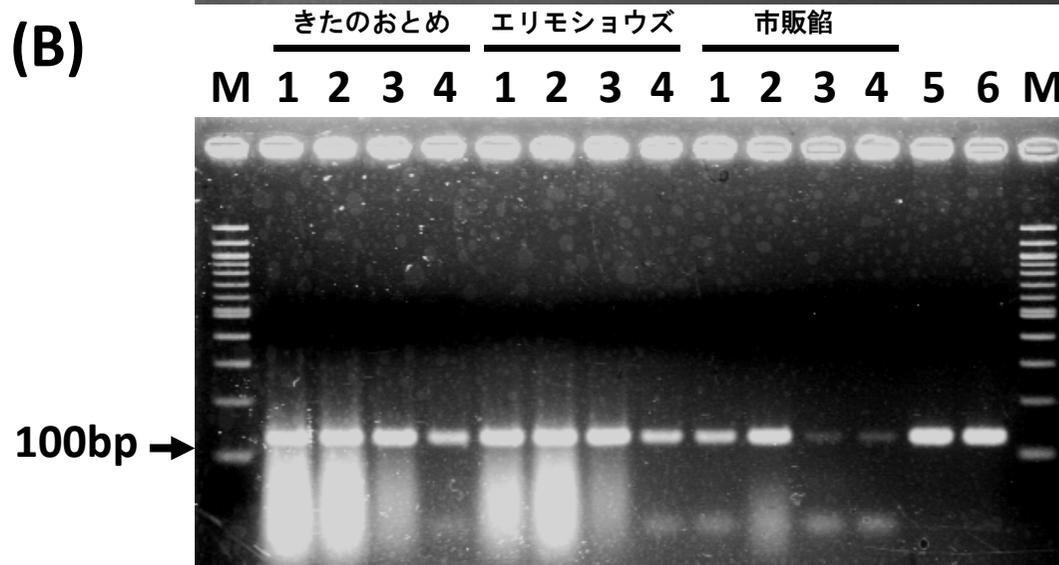


加熱加工アズキ餡における品種識別実験

(A)



(B)



(A)きたのおとめ識別マーカー

(B)クオリティーチェックマーカー

1:200mg

2:100mg

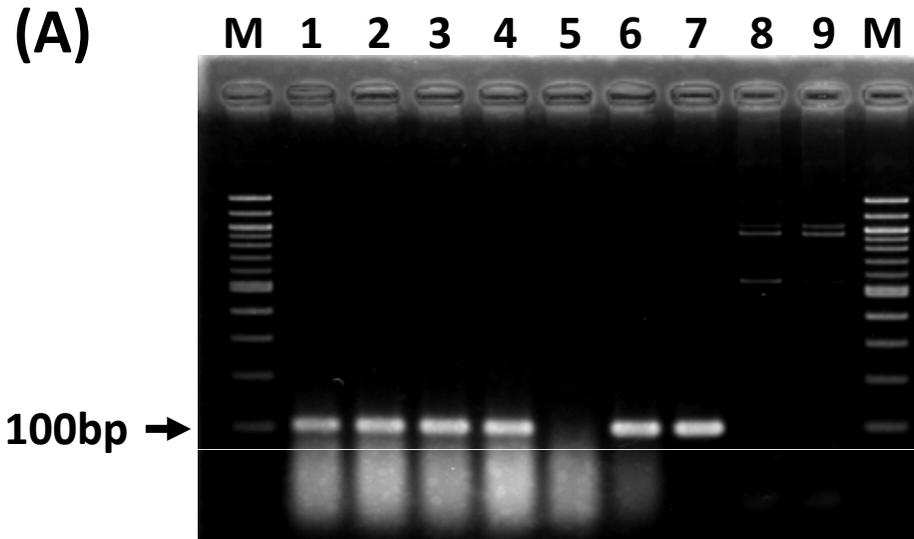
3:50mg

4:10mg

5:きたのおとめゲノムDNA

6:エリモショウズゲノムDNA

混合した加熱加工アズキ餡における品種識別実験



(A)きたのおとめ識別マーカー

(B)クオリティーチェックマーカー

・餡

きたのおとめ:しゅまり:エリモショウズ

1: 1mg: 100mg: 100mg

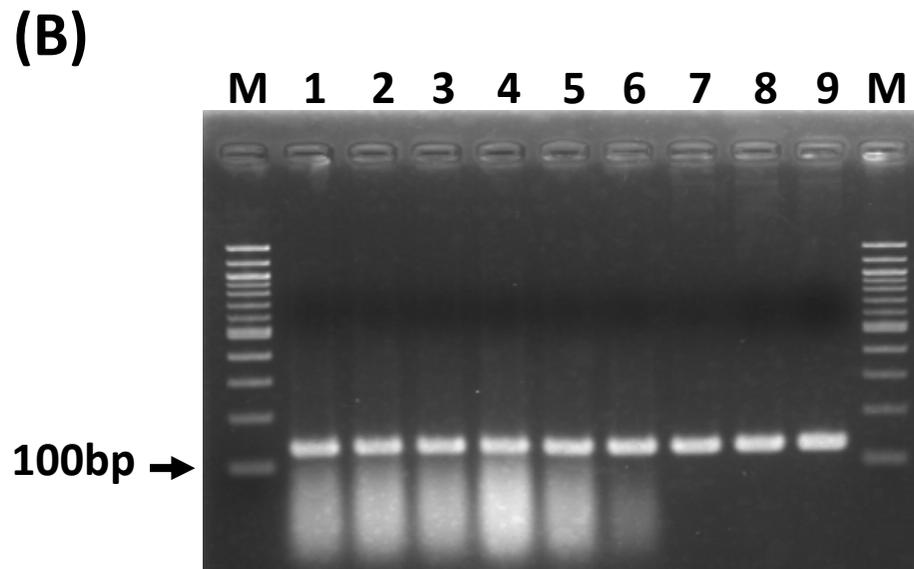
2: 10mg: 100mg: 100mg

3: 50mg: 100mg: 100mg

4: 100mg: 100mg: 100mg

5: 0mg: 100mg: 100mg

6: きたのおとめ 200mg



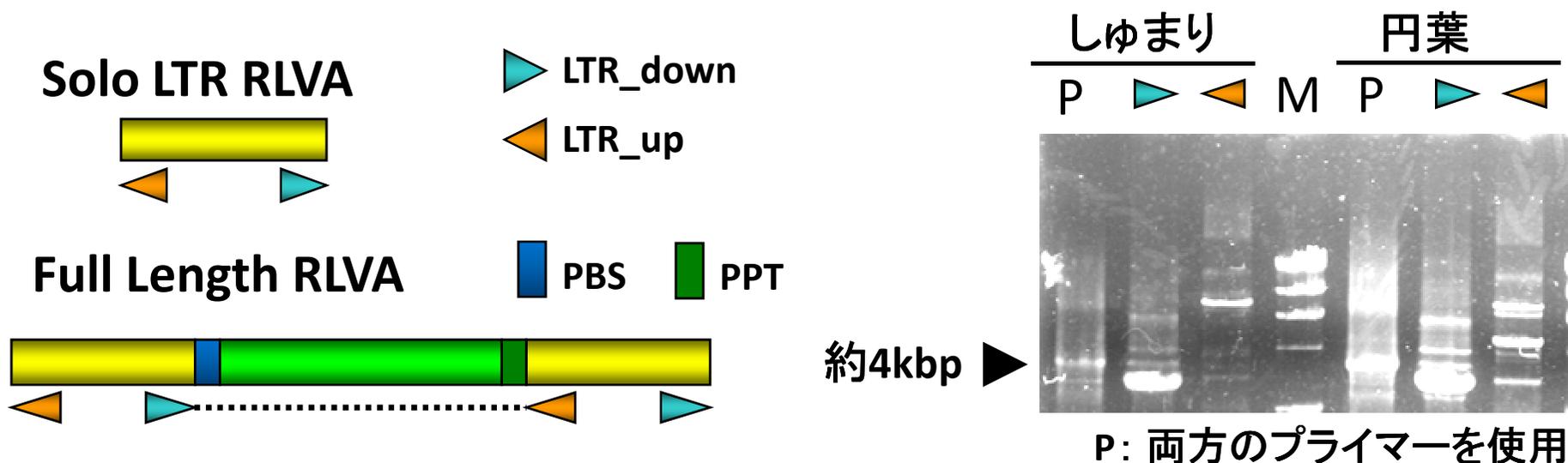
・ゲノムDNA

7: きたのおとめ

8: しゅまり

9: エリモショウズ

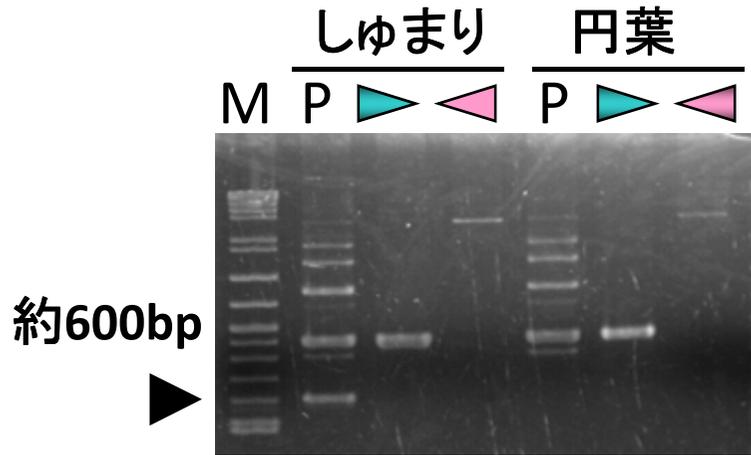
RLVA内部配列の調査



- ・2品種の配列は相同であったが、LTRには含まれた領域には、**既知のレトロトランスポゾンのORF構造と一致する配列は得られなかった**
- ・5'LTRに内接するPBS (Primer Binding Site)は存在: tRNA_{asp}の3'末端相補配列であった
- ・ダイズ・レトロトランスポゾン*Diaspora*の相同配列の部位があった

➡ 相同性がある領域にプライマー (Diaspora_up) を設計し、IRAP (Inter-Retrotransposons Amplified Polymorphism) 調査

IRAP産物調査



P: 両方のプライマーを使用

▶ LTR_down

◀ Diaspora_up

【しゅまり:S32】



【しゅまり以外】

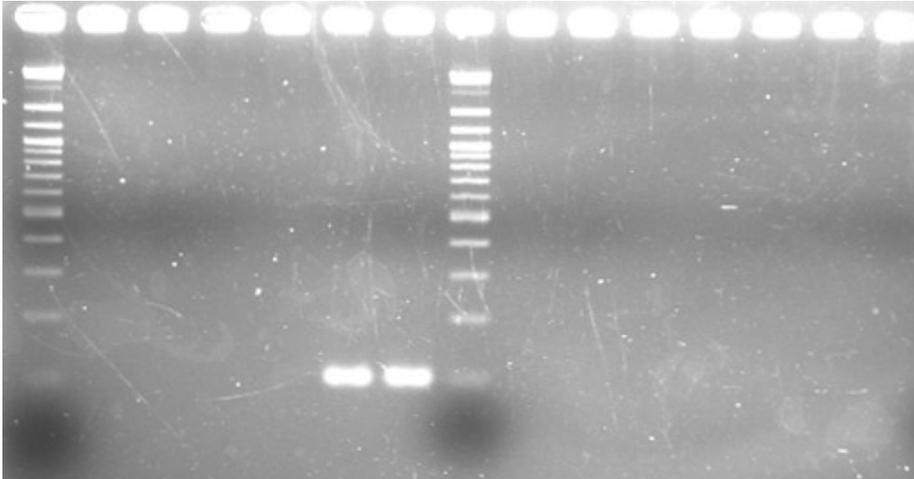


しゅまりの約600bpの増幅をシーケンスした(S32)

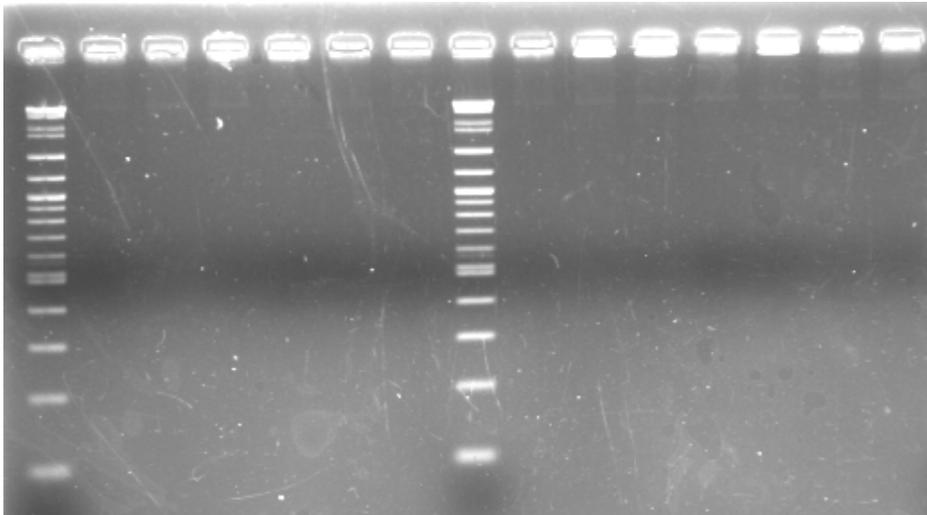
- ・しゅまりのRVLAのこの挿入部位のPBSには、tRNA_aspの全長配列75塩基が存在(tRNAの全長がDNAに逆転写されて、挿入されたことが示唆)

しゅまり特異的PBS領域の品種間多型調査

M 1 2 3 4 5 6 M 7 8 9 10 11 12 13



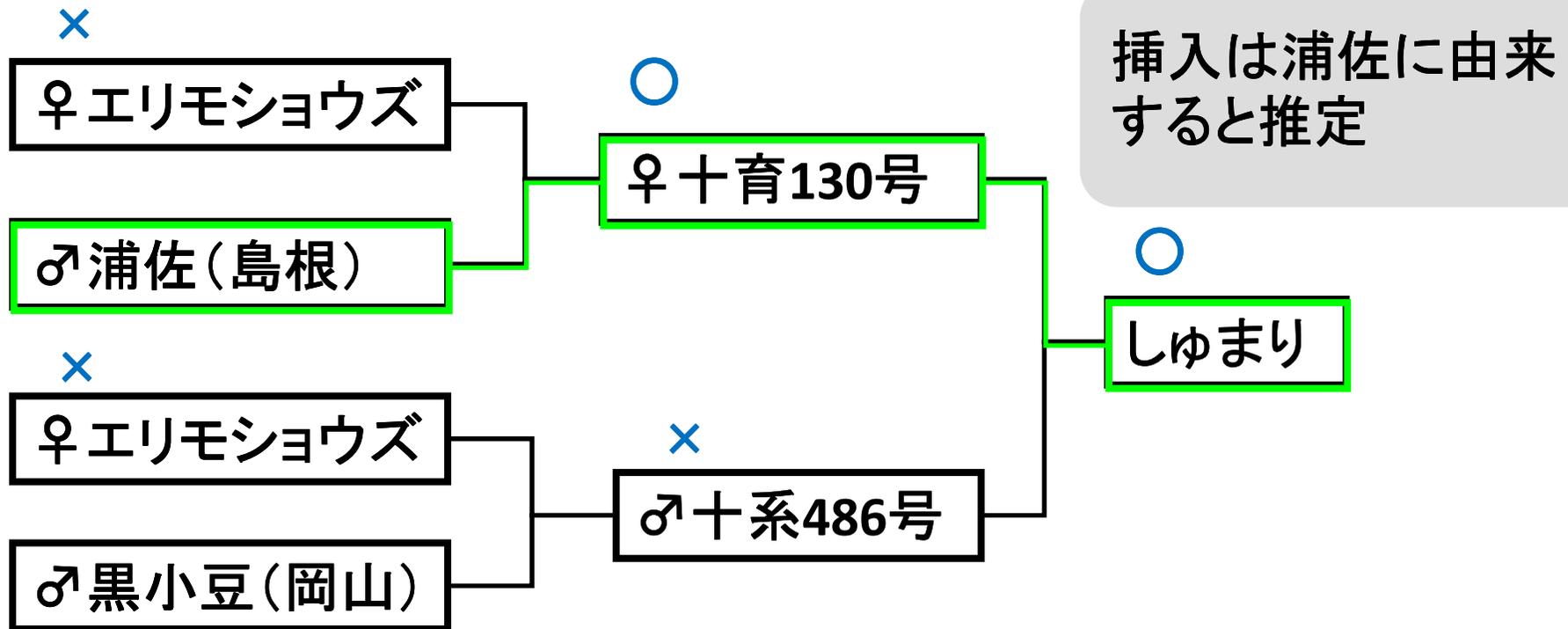
M 14 15 16 17 18 19 M 20 21 22 23 24 25 26



- | | |
|---------------|---------------|
| 1:きたのおとめ(子) | 14:きたろまん(子) |
| 2:エリモシヨウズ | 15:十育137号 |
| 3:宝小豆 | 16:十育138号 |
| 4:円葉 | 17:きたほたる |
| 5:しゅまり(子) | 18:ホッカイシロシヨウズ |
| 6:十育130号 | 19:とよみ大納言 |
| 7:十系486号 | 20:東北小豆 |
| 8:ほくと大納言(子) | 21:延辺小豆 |
| 9:十育80号 | 22:山西小豆 |
| 10:ベニダイナゴン | 23:天津小豆 |
| 11:サホロシヨウズ(子) | 24:宝清小豆 |
| 12:アカネダイナゴン | 25:宝清小豆 |
| 13:中国在来 | 26:陝西小豆 |

※M:λHindⅢ + 100bp ladder Marker

しゅまりの系譜



【品種識別マーカーとしての実用性】

北海道立中央農業試験場が国内外のアズキ遺伝資源について調査した結果、このPCRマーカーは、「しゅまり」を識別するために、**極めて実用性が高い**ことが判明

レトロトランスポゾン・マーカークの利点

- 1) 品種内系統から作物種のレベルまで、識別性の極めて高い固有マーカークの開発が可能。
- 2) 加工によりDNAが断片化した製品にも対応可能。
- 3) LAMP法による簡易検出技術や原料品種の構成割合を推定する技術(リアルタイムPCR)への利用が容易。
- 4) 品種育成の系譜に由来する固有マーカークは、品種内多型の可能性が極めて低い。
- 5) 活動型配列の同定により、将来育成される品種への対応が可能。

レトロトランスポゾン・マーカークの課題

- 1) 新品種にはその品種に固有の挿入部位を同定する必要がある。
- 2) 品種や系統に固有のマーカークを開発するためには、活動型のレトロトランスポゾン配列を同定する必要がある。

まとめ

- 農作物の加工品について原料品種を識別するためには、断片化したDNAでも対応が可能な品種固有マーカークの開発が必要。
- サツマイモ: 高系14号の系統群で活動型のレトロトランスポゾンを見出し、加工品にも対応した系統固有マーカーク開発。
- アズキ: 開発が望まれていた2品種でレトロトランスポゾンによる固有マーカーク開発。
→ DNA鑑定学会による妥当性の試験実施中
- レトロトランスポゾンによる品種固有マーカークの開発には活動型の配列の同定が重要。

謝辞

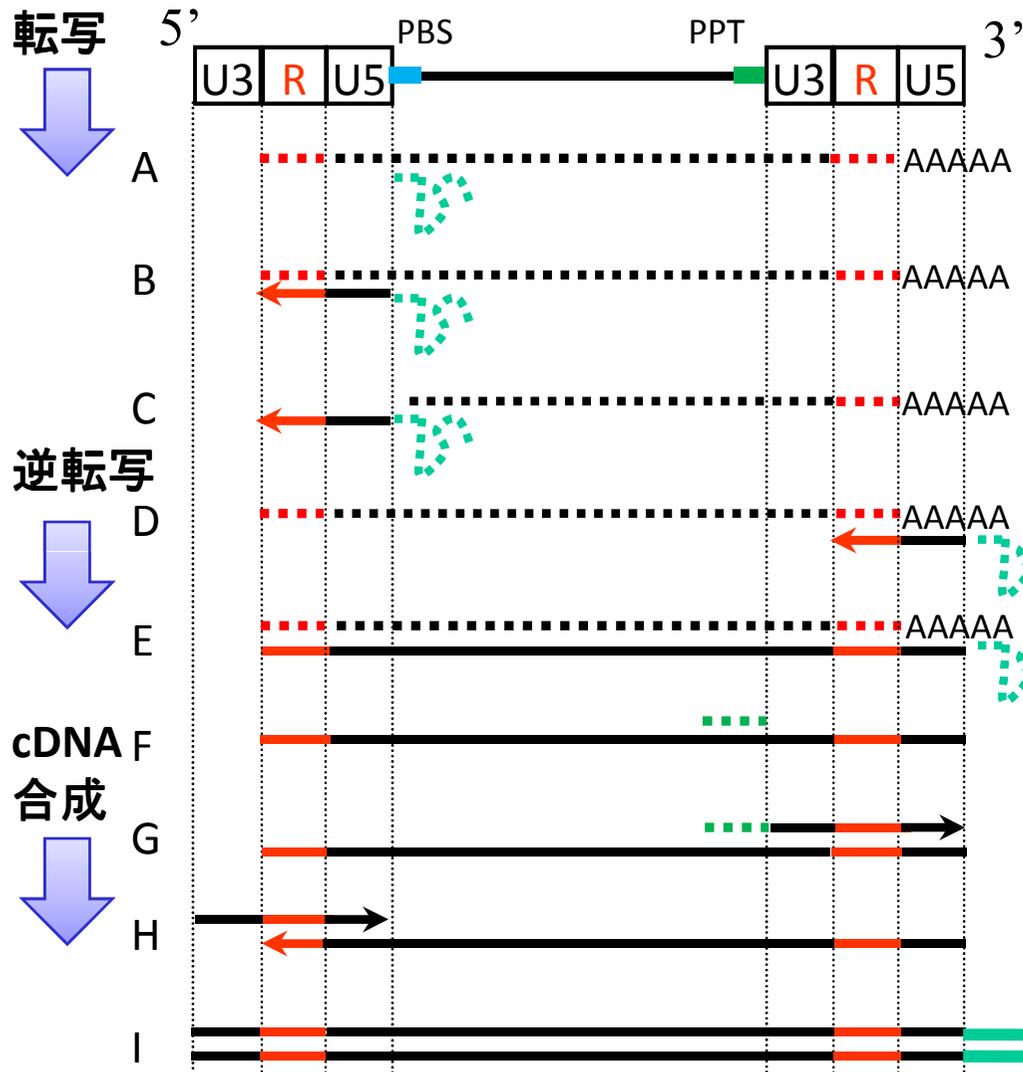
研究者

- ・岡山大学大学院自然科学研究科：山下裕樹（学振特別研究員）、中川 藍，松嶋兼弘（（株）ロッテ）、大山由美（海外貨物検査株式会社）
- ・北海道立中央農業試験場：竹内 徹主任研究員

資金助成

- ・農林水産省 研究高度化事業
- ・農林水産省 安全で信頼性、機能性が高い食品・農産物供給のための評価・管理技術の開発

逆転写・2本鎖DNA複製のステップ

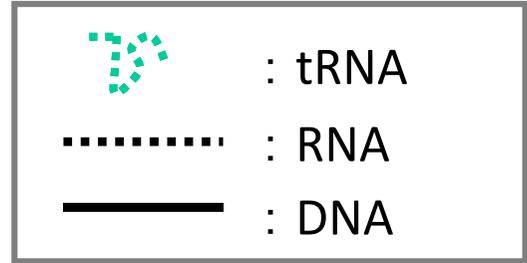


tRNAをプライマーとした逆転写開始

RNaseHによるRNA分解

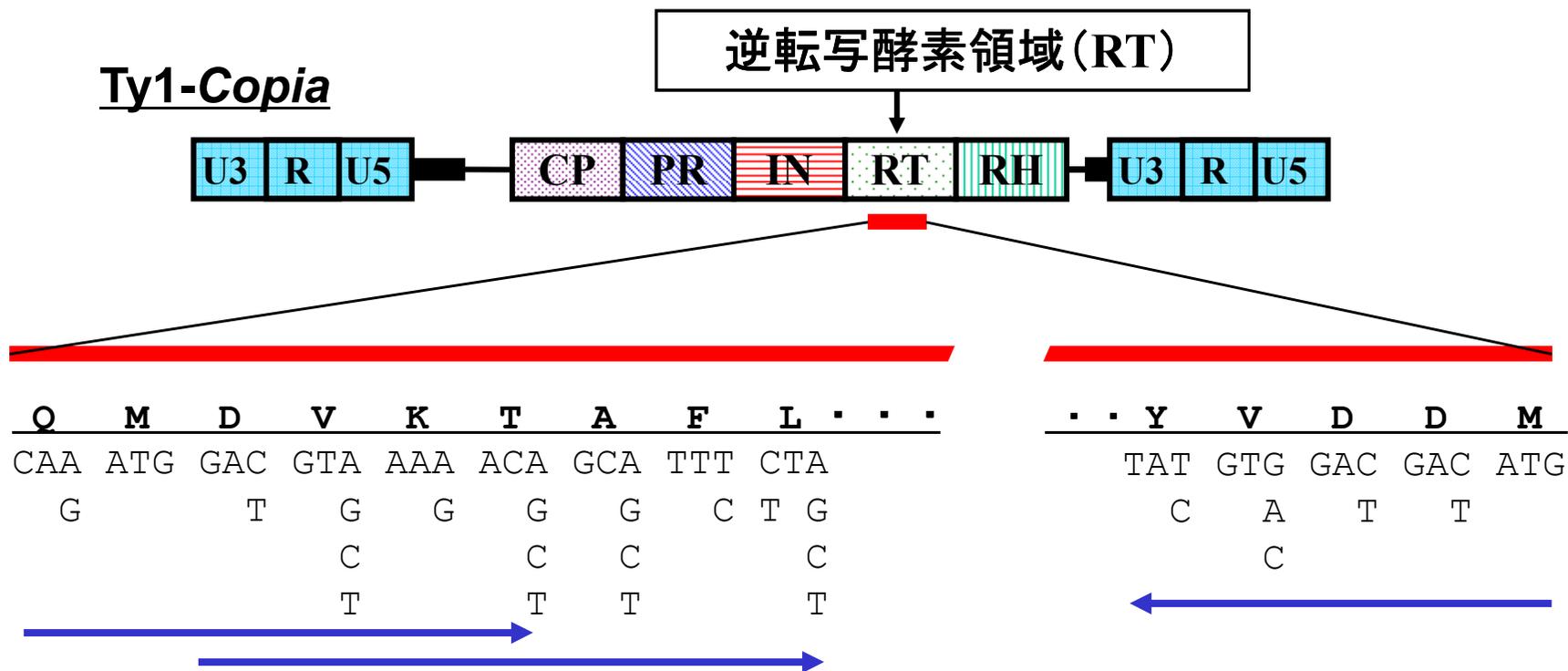
ss(strong stop)DNAの転移

RNaseHによるPPT領域以外のRNA (tRNA含む)分解



この部位に挿入配列として存在している理由は不明

サツマイモLTR型レトロトランスポゾン*Rtsp-1*



LTR型レトロトランスポゾンの逆転写酵素領域に見られる保存アミノ酸配列から、縮重DNAプライマーを設計し、ゲノムDNAを鋳型にPCRを行うことで、ゲノムに存在する配列を網羅的にクローニングした。

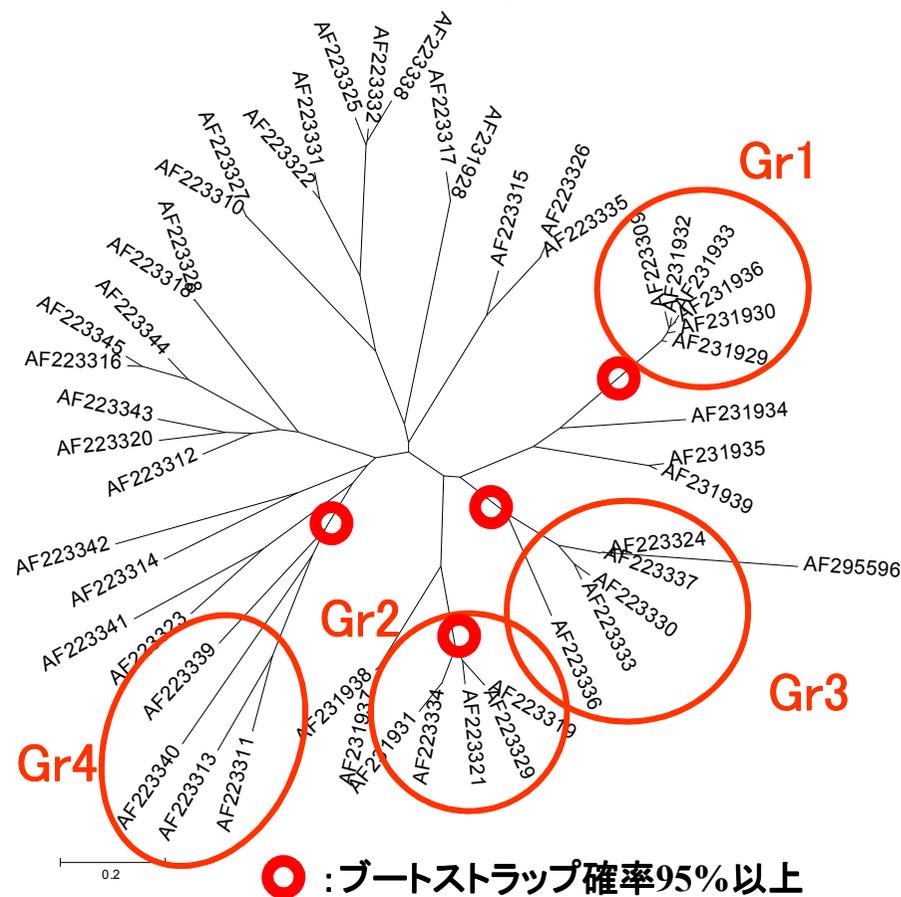
転移活性のある配列を単離するための方法

仮定

- ・最も最近の時点で転移したファミリーの配列は、ほぼ同一。
- ・長い期間転移していないファミリーの配列は分化。

・ サツマイモTy1-Copia型レトロトランスポゾン逆転写酵素(RT)の50配列について、系統樹を作成。

クラスターが最小のGr1を最も最近転移した配列のコピーと推定。



転移活性のある配列を単離するための方法(続き)

- ・ Gr1の配列を基に、このファミリーに特異性の高い3'RACEプライマー(Gr1,Gr1_down)を設計し、このファミリーの転写配列を選択的に検出。

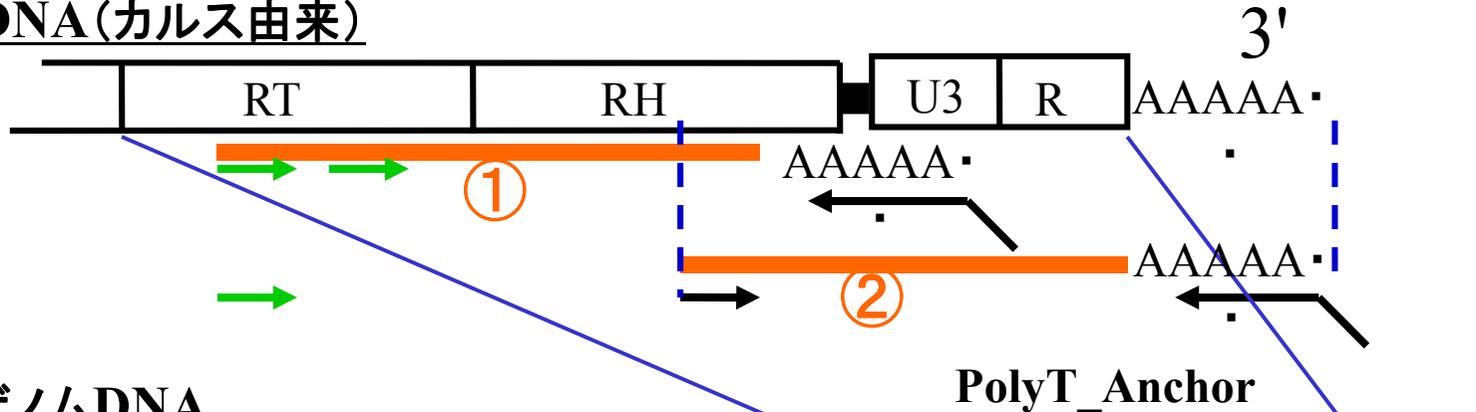
```
Gr1  DGCBTTYCTTCATGGAGATCTTGAAGAAGAGATATATATGCTCCAGCCTGAAGGATTGA
Gr2  AGCATTCCTTAAYGGTGATCTAGAAGAGGGWGGTTTWTATGAAACAACCTGAAGGWTTCTC
Gr3  CGCTTTCTTRAATGGTGARTTAGATGAGGAAATCTAYATGRAVCAACCHGAAGGBTTTRT
Gr4  -----GAATGGTVMTYTVDCWGAAACDGTNTWTATGHRWCAACCDCCDGGKTATDN
      * **      *      **      * * ***  ** **      * * *
      Gr1          Gr1_down
      →          →
Gr1  AGACAAAGAGAATCAGAACTTGGTTTGCAGGTTGAACAAATCTCTRTACGGTYTAAAGCA
Gr2  TTCTAGKRAWGGTGAGMAYTTRGTTTGYAAGCTYAAGAARTCCATWTAYGGAYTAAACA
Gr3  KGTTBCDGGCCAAGAAARDAAAGTDTGYAAATTRGTTAARTCRYHTATGGYTTGAARCA
Gr4  TGATVHVHDCWTCCDGATCATGTDGYYDNTTRAARMGVTCBTTATATGGBTTAAGCA
      ** **      *      ** * ** ** * ** **
```

各グループの合意配列の一部とプライマー設計位置

転写配列(*Rtsp-1*)の単離

- ・高系14号カルス由来のcDNAについて、RT配列上に設計したプライマーにより、3'RACEを行い、RH領域でポリアダニル化された産物(①)、3'末端のLTR(U3,R領域)を含む断片をクローニング(②)
- ・両端のLTRは同じ配列であることにより、U5領域の配列決定(③)

cDNA(カルス由来)



ゲノムDNA

