

受託事業実施報告書

マイタケDNA品種識別技術の妥当性の検証

平成 28 年 3 月 24 日

特定非営利活動法人 DNA 鑑定学会

目 次

「DNA品種識別技術の妥当性の検証」実施の概要	3
DNA分析によるマイタケの品種識別手法の 妥当性確認方法の決定	5
「DNA分析によるマイタケ品種の識別手法」の妥当性確認試験 . .	9

添付資料

1. DNA 鑑定提供までのジョブフローと規則
2. SSR マーカーによるマイタケの DNA 品種識別マニュアル
3. マイタケの品種識別マニュアルの妥当性検査データ（品種識別検査）
4. 品種判定結果一覧
5. 品種毎のマーカーサイズ一致率の詳細
6. マイタケの品種識別マニュアルの妥当性検査データ（品種内多型調査）
7. 許容範囲毎の品種内多型検査結果

「DNA品種識別技術の妥当性の検証」実施の概要

1. 目的

H27 年度の品種保護に向けたDNA品種識別技術確立事業におけるDNA品種識別技術の妥当性の検証事業（以下「本事業」という。）は、ホクト株式会社が作成した「SSRマーカーによるマイタケのDNA品種識別マニュアル」について、一部の品種に対するマーカーと識別手法の一部の妥当性の検証を行うことを目的とする。

2. 事業内容

1) DNA品種識別手法における妥当性確認方法等の決定

マイタケの品種識別マニュアルに記載されているマーカーと識別手法の一部につき、平成19年度農業・食品産業競争力強化支援事業により独立行政法人種苗管理センターが作成した「DNA品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン」（<http://www.ncss.go.jp/main/DNA/DNAguideline.pdf>、以下「妥当性ガイドライン」という。）に基づいて一部の品種について妥当性の検討を行い、マーカーと識別手法の妥当性を検証する。

2) 妥当性検証試験・試験結果のとりまとめおよび技術の妥当性の検証

マイタケの品種識別について、妥当性検証試験を実施してその結果のとりまとめを行い、技術の妥当性について検証する。

3. 報告書の内容

本事業の報告書においては、下記の3項目に分けて報告する。

- 1) 「DNA品種識別技術の妥当性の検証」実施の概要
- 2) DNA分析によるマイタケの品種識別手法の妥当性確認方法の決定
- 3) 「DNA分析によるマイタケ品種の識別手法」の妥当性確認試験

DNA分析によるマイタケの 品種識別手法の妥当性確認方法の決定

1. 妥当性確認方法の概要

妥当性確認事業は、DNA鑑定学会の認証規則に基づいて実施した。すなわち、各工程における主な問題点を洗い出し、是正の参考となるように配慮して実施した。

1) 委員会の設置

本学会員で委員会を構成し、妥当性確認試験結果の検討・確認を行った。

2) 認証規則

平成21年度に当学会で設定し、その後漸次改訂した、「DNA 鑑定提供までのジョブフローと規則」（添付資料1）を、認証のガイドラインとした。

3) 実施内容

(1) マイタケの DNA 品種識別手法における妥当性確認方法の決定

(2) マイタケの DNA 品種識別における識別マーカーの妥当性確認試験

2. 実施形態

妥当性確認試験の手順

妥当性確認試験は、品種識別マニュアルに記載されている内容について検査を行い、マーカーおよび識別手法の妥当性を検証するものである。検証は以下の手順で実施した。

(1) 品種識別マニュアルの受入れ

依頼元にマニュアルの提示を求め、内容について検討を行い、適宜修正を求めると共に、マニュアル完成時の自己検査をどの程度実施したかを確認し、これによりマニュアルの信頼度をチェックした。依頼元であるホクト株式会社より提出された自己検証報告によれば、今回の妥当性検証に供された12品種について、多型のないことを確認したとのことであった。

(2) サンプル収集

依頼元より、一部の品種の品種識別検査および品種内多型検査を実施するために必要な量の、基準DNAサンプルおよび検査用サンプルの提供を受けた。

(3) 検証機関の選定と検査の実施

品種識別の検査を実施する機関を決定した。妥当性を考慮し、また、依頼元の課題提案書に従って、複数機関として3機関を選定した。依頼元より提供されたサンプルをこれらの機関に配布し、検証機関毎に妥当性確認のための検査を実施した。

(4) 実施報告書の作成

各検査機関で実施した検査結果を当学会で集計・解析し、報告書原案を作成した。

3. 実施内容

1) 妥当性確認試験の受入れ

妥当性確認試験を受け入れる際に、以下の条件を設けて受入を実施した。

(1) 品種識別手順のマニュアル化

マイタケの品種識別マニュアルを提出してもらい、標準操作マニュアル (Standard Operation Procedure) として、妥当性確認試験の受入を実施した。目次や記載内容は、当学会の「DNA鑑定提供までのジョブフローと規則」(添付資料 1) の「品種識別マニュアルの書き方」に準じた変更を要請した。

(2) マーカー開発元の最終的な自己検証

自己検証は、品種識別試験については、対象品種全てにおいて、3名の試験者による同一菌株各1回ずつの試験、および、多型の有無を確認するための試験3回(同一菌株について2回)を行ったとの報告を受けた。

(3) サンプル収集

品種識別検査を実用的なものとするため、基準株サンプル、生産者株サンプルおよび品種内多型調査用サンプルの三種類を収集した。基準株サンプルはマニュアル作成元がDNA抽出を行い、これを基準DNAとして生産者株サンプルについて識別検査を実施した。また、同じ基準DNAを用いて、同一品種内における多型頻度の調査を行った。

(4) 検証機関の選定

品種識別の検査を実施する機関を決定した。信頼性を考慮して3機関を選定した。

① 検証機関選定の手順

機関数 : ホクト株式会社が農林水産省に提出した課題提案書に従い、3機関とした。

選定条件 : ISO9001 または ISO17025 を取得している機関。

② 選定した検証機関 : 機関名および各機関の取得認証は、下記「表2 検証機関の一覧」の通りである。

表1 検証機関の一覧

項番	機関名	ISO 認証項目
1	株式会社 LSI メディエンス	● 食品検査センター : ISO9001 ● 臨床検査 : ISO15189, ISO14001, CAP(米国臨床病理医協会) ● ドーピング検査 : ISO17025, WADA (世界アンチドーピング機構)
2	ビジョンバイオ株式会社	ISO17025
3	株式会社ファスマック	ISO9001

(5) 検査の実施

収集した生産者サンプルに、検証機関にとってはブラインド・テストとなるように、DNA 鑑定学会にて新たにサンプル番号を付与した。それらのサンプルを各検証機関に送付して、検証実験を行った。同時に、品種内多型調査用サンプルも、各検証機関に送付して、検証実験を行った。

(6) 実施報告書

各機関で実施した検査結果のデータを DNA 鑑定学会に送付してもらい、それらを集計・解析して、報告書を作成した。

「DNA 分析によるマイタケ品種の識別手法」の妥当性確認試験

1. 妥当性確認試験の受入れ

1) 検証依頼を受けた品種識別手順のマニュアル（添付資料 2）

題名 : S S R マーカーによるマイタケの DNA 品種識別マニュアル
作成元 : ホクト株式会社

2) サンプル収集

ホクト株式会社研究農場より、マイタケの基準(株)品種 1 品種の DNA ならびに生産者株サンプル 12 品種各 5 株、および品種内多型調査用サンプル 1 品種 30 株の菌糸が、DNA 鑑定学会に送付された。(表 2 参照)

表 2 サンプル一覧表

植物種類	種類別	品種名	試料形態	量	入手先
マイタケ	基準株	Grifon120	DNA	500ng × 3	ホクト株式会社
	生産者株 (12品種)	Grifon120	凍結菌糸	5株 × 3	
		MH182011		5株 × 3	
		MH182012		5株 × 3	
		MH182116		5株 × 3	
		MH182117		5株 × 3	
		MH182166		5株 × 3	
		MH182168		5株 × 3	
		MH182170		5株 × 3	
		MH182171		5株 × 3	
		MH182172		5株 × 3	
		MH182216		5株 × 3	
		MH182243		5株 × 3	
	多型	Grifon120	凍結菌糸	30株×3	
	マーカー 配列情報	マーカー6種	配列情報	配列情報	

2. 検証の形態

検証は、下記の物品を検証機関へ配布して実施した。

1) サンプル

(1) 配布内容

3 機関各々に、下記のサンプルを配布した。

- ① マイタケの基準株 DNA 溶液 1 種
(基準株 Grifon120 の DNA 1 チューブ、500ng / チューブ)
- ② 品種識別用のマイタケの菌糸 60 株
(生産者株サンプル 12 品種の菌糸 各 5 株)

- ③ 品種内多型調査用のマイタケの菌糸 30 株
(基準株の Grifon120 の菌糸)

(2) 配布方法

① 基準マーカーDNA

ホクト株式会社から DNA 鑑定学会に送付された 1 品種 (Grifon120) の DNA 溶液を、3 箇所の検証機関の全てに、各 1 チューブ (500ng / チューブ) ずつ送付した。

② 品種識別用の生産者株のサンプル

ホクト株式会社から、12 品種の生産者株の菌糸のサンプルが、DNA 鑑定学会に送付された。サンプルは 1 サンプルずつ 2ml のマイクロチューブに密封され、品種毎にまとめて袋に入れられており、計 12 袋のサンプルが DNA 鑑定学会に届けられた。

品種識別検査をブラインドで行うため、DNA 鑑定学会において、これらの菌糸サンプルごとにランダムにサンプル番号をふり直した。学会で新たに付与したサンプル番号は下記の「表 3 品種識別用サンプル番号対応表」の通りである。この結果、ホクト株式会社から送付された品種識別用サンプルは、DNA 鑑定学会で、新たなサンプル番号を持つこととなった。これら三組の各々を、3 箇所の検証機関へ送付した。

表 3 品種識別用サンプル番号対応表

品種	サンプル数	通し番号	品種	サンプル数	通し番号	品種	サンプル数	通し番号
Grifon120	5	29	MH182117	5	2	MH182171	5	42
		14			46			10
		18			47			26
		57			12			38
		43			25			32
MH182011	5	3	MH182166	5	4	MH182172	5	30
		11			6			13
		7			28			59
		36			8			48
		24			52			53
MH182012	5	49	MH182168	5	20	MH182216	5	34
		33			22			55
		5			41			50
		21			9			15
		40			45			44
MH182116	5	16	MH182170	5	23	MH182243	5	37
		54			17			19
		1			58			39
		27			31			51
		60			35			56

③ 品種内多型調査用のサンプル

多型調査用の株のサンプルについては、ホクト株式会社から、1 品種（Grifon120）の多型調査用株の菌糸のサンプル 90 個が、1 サンプルずつ 2ml のマイクロチューブに密封された状態で、DNA 鑑定学会に送付された。DNA 鑑定学会において、1 サンプル毎に 3 組の 1～30 の番号をふり、1～30 番を一組とした同一構成の検査用サンプル 3 組を作成して、各組を 3 箇所の検証機関の各々へ送付した。

2) 「SSR マーカーによるマイタケの DNA 品種識別マニュアル」 （添付資料 2）

提供元 : ホクト株式会社

作成機関 : ホクト株式会社きのこ総合研究所

メール添付にて各検証機関に送付した。

3) マイタケの検査項目

仕様書は DNA 鑑定学会で作成し、メール添付にて各検証機関に送付した。

各検証機関にメール添付で配布した検査項目表を表 4 に示した。

表 4 検査項目（1 検証機関当たり）

種類別	品種名	形態	量	実験	実験数
				繰り返し数	
基準品種	Grifon120	DNA	500ng	依頼元で提供	
マーカーの塩基配列	マーカー数:6種	配列情報	配列情報		
生産者株	12品種	凍結菌糸	5株／品種	2回	120
品種内多型調査株	Grifon120	凍結菌糸	30株	1回	30

4) マイタケ検査結果票検証機関が検査結果を記入する表として、DNA 鑑定学会で作成し、メール添付にて各検証機関に送付した。（解答解析済みの結果票は添付資料 3 および 6 を参照のこと）

3. 検査と結果

1) 検査内容

品種識別マニュアルの付属文書 2. に記載されている各マーカーのタイプと、基準品種である **Grifon120** のマーカー毎のフラグメント長をもとに、DNA 鑑定学会において、数値で表したサイズ表を作成し直した(表 5 品種識別マーカーのサイズ表)。これをもとに、「表 4 検査項目 (1 検証機関当り)」に従って検査を実施した。この検査手法は、キャピラリー電気泳動において、基準品種のマーカー DNA 断片とサンプルの DNA 断片を比較し、サイズを判断してマーカータイプを決定し、それらと品種毎のマーカータイプの比較を行って品種を識別するものである。

表 5 品種識別マーカーのサイズ表

品種 番号	品種名	マーカー											
		msGf-1		msGf-2		msGf-3		msGf-4		msGf-5		msGf-6	
1	Grifon120	112	136	145	157	167	0	140	0	120	144	120	132
2	MH182115	112	0	139	145	167	172	136	0	153	0	120	0
3	MH182082	112	0	139	145	167	172	136	140	120	0	120	0
4	MH182116	112	136	139	157	167	0	140	0	144	153	120	0
5	MH182117	112	136	139	157	167	172	140	0	144	153	120	0
6	MH182240	136	0	157	0	167	0	140	0	120	144	120	132
7	MH182243	112	136	145	157	167	0	140	0	120	0	120	132
8	MH182011	112	130	139	175	152	0	136	140	120	153	120	0
9	MH182012	130	136	175	187	167	172	132	0	124	128	114	0
10	MH182022	112	112	139	145	162	172	132	140	120	0	120	0
11	MH182041	112	118	121	139	167	0	140	0	136	0	120	0
12	MH182156	112	0	121	139	162	0	136	0	153	0	120	0
13	MH182157	118	130	109	175	162	0	132	136	136	140	120	0
14	MH182166	112	124	145	0	162	167	0	0	136	0	120	126
15	MH182168	112	130	145	151	162	0	132	136	124	153	114	120
16	MH182169	112	0	127	139	162	172	132	0	128	0	120	0
17	MH182170	112	124	139	145	162	167	136	140	120	0	120	0
18	MH182171	112	130	139	175	167	172	136	140	153	0	120	0
19	MH182172	112	0	139	145	162	0	132	136	120	124	120	0
20	MH182216	112	0	139	0	172	0	132	140	120	153	120	0
21	MH182015	112	0	145	0	167	0	136	0	128	136	114	120
22	MH182099	112	136	145	175	162	0	136	140	124	0	120	132
23	MH182190	112	136	95	163	152	162	136	140	124	0	114	120
24	MH182191	112	0	139	145	162	167	132	0	120	128	120	0
25	MH182192	112	0	133	139	162	0	132	136	120	0	120	0
26	MH182193	112	0	139	157	162	167	132	0	153	0	114	120
27	MH182194	112	0	133	145	162	167	136	0	136	0	120	0
28	MH182215	112	142	157	0	162	0	136	0	124	132	114	120
29	MH182223	112	0	139	0	152	162	144	0	128	0	120	0
30	MH182214	130	136	151	163	162	0	132	0	124	0	114	0

2) マイタケの検査結果

検証機関によるマイタケの検査結果を DNA 鑑定学会が回収し、サンプルのブラインド化情報と突き合わせて、正答率を求めた。

(1) 品種識別結果

詳細なデータは、添付資料 3 「マイタケの品種識別マニュアルの妥当性検査データ（品種識別検査）」参照のこと。

検査全数に対する正答率を品種ごとに集計した結果を、下記の表 6 に示した。

表 6 品種別の品種名正答率

品種	検査数					回答数				回答率			
	機関毎 検体数	機関毎 検査回数	機関毎 検査数	検証 機関数	全体 検査数	正答数	誤答数	未答数	全体	正答率	誤答率	未答率	全体
Grifon120	5	2	10	3	30	30	0	0	30	100%	0%	0%	100%
MH182011	5		10		30	30	0	0	30	100%	0%	0%	100%
MH182012	5		10		30	30	0	0	30	100%	0%	0%	100%
MH182116	5		10		30	30	0	0	30	100%	0%	0%	100%
MH182117	5		10		30	28	2	0	30	93%	7%	0%	100%
MH182166	5		10		30	27	2	1	30	90%	7%	3%	100%
MH182168	5		10		30	27	2	1	30	90%	7%	3%	100%
MH182170	5		10		30	30	0	0	30	100%	0%	0%	100%
MH182171	5		10		30	28	2	0	30	93%	7%	0%	100%
MH182172	5		10		30	30	0	0	30	100%	0%	0%	100%
MH182216	5		10		30	30	0	0	30	100%	0%	0%	100%
MH182243	5		10		30	28	2	0	30	93%	7%	0%	100%
全体	60	各2	120	3	360	348	10	2	360	96.7%	2.8%	0.6%	100.0%

品種名の回答は、全体として、回答率 99.4%、未答率 0.6%であり、回答の正答率 96.7%、誤答率 2.8%であった。（詳細なデータは、添付資料 4 「品種判定結果一覧」参照のこと。

また、品種毎の正答率は 90%～100%という高い数値であった。

次に、検証機関毎の品種別正答率を下記の表 7 でみると、3 か所の検証機関いずれもが、全ての品種について 70%～100%の比較的高い正答率を示した。正答率が 100%に満たなかった品種は検証機関によって異なっていた。

このことから、本マニュアルに従って品種識別検査を行えばかなり高い精度で品種識別が可能であるが、検証機関または担当者の習熟度や検査環境により、検査精度が影響を受ける場合のあることが伺える。

表 7 検証機関毎の品種別正答率

品種	正答率			
	B社	F社	L社	平均
Grifon120	100%	100%	100%	100.0%
MH182011	100%	100%	100%	100.0%
MH182012	100%	100%	100%	100.0%
MH182116	100%	100%	100%	100.0%
MH182117	80%	100%	100%	93.3%
MH182166	100%	100%	70%	90.0%
MH182168	100%	80%	90%	90.0%
MH182170	100%	100%	100%	100.0%
MH182171	100%	80%	100%	93.3%
MH182172	100%	100%	100%	100.0%
MH182216	100%	100%	100%	100.0%
MH182243	100%	100%	80%	93.3%
平均	98.3%	96.7%	95.0%	96.7%

これらの結果より、本マニュアルに基づくこれら 12 品種のマイタケの品種識別は、かなり高い精度で行えるが、検査者側の状態による精度の低下を防ぐための改良ができれば、なお望ましいと考えられる。

続いて、マーカー毎の集計を行った。

今回検証したマニュアルでは、マーカー毎に 1~2 本のフラグメントを検出する計 6 種類の品種識別マーカーを用いている。

まず、総検査数を下記の表 8 で算出したところ、検証機関毎に 1,440 本ずつ、全体で 4,320 本のフラグメントの有無とサイズの検査が必要であった。

表 8 機関毎のマーカーフラグメントの総検査数

検証機関	マーカー数	マーカー毎 検査フラグメント数	検体数	検体毎 検査回数	総検査 マーカー数
B社	6	2	60	2	1440
F社	6	2	60	2	1440
L社	6	2	60	2	1440
全体	18	各2	各60	各2	4320

これらの数にもとづき、各サンプルについて、マーカーのうちどれだけが、正解品種のマーカーとサイズが一致したかを、品種毎に集計した。また、マーカーサイズは機器ごとのばらつき等により多少の誤差が生じることに鑑み、サイズの誤差が±0、±1以内、±2以内、±3以内をそれぞれ正解の許容範囲とする4段階に分け、別々に集計を行った。この結果を示したのが、下記の「表9 許容範囲別の品種毎のマーカーサイズ一致率」である。

表9 品種毎のマーカーサイズ一致率

A. 許容範囲±0

品 種 名	マーカー 最大一致数	マーカーサイズ一致数				マーカーサイズ一致率			
		B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均
Grifon120	120	84	81	40	68.3	70%	68%	33%	56.9%
MH182011		39	33	10	27.3	33%	28%	8%	22.8%
MH182012		10	10	10	10.0	8%	8%	8%	8.3%
MH182116		81	79	40	66.7	68%	66%	33%	55.6%
MH182117		74	67	30	57.0	62%	56%	25%	47.5%
MH182166		21	26	19	22.0	18%	22%	16%	18.3%
MH182168		77	59	26	54.0	64%	49%	22%	45.0%
MH182170		84	82	30	65.3	70%	68%	25%	54.4%
MH182171		62	65	30	52.3	52%	54%	25%	43.6%
MH182172		90	95	40	75.0	75%	79%	33%	62.5%
MH182216		30	30	20	26.7	25%	25%	17%	22.2%
MH182243		30	34	28	30.7	25%	28%	23%	25.6%
平均マーカー一致率		56.8	55.1	26.9	46.3	47.4%	45.9%	22.4%	38.6%

B. 許容範囲±1

品種名	マーカー 最大一致数	マーカーサイズ一致数				マーカーサイズ一致率			
		B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均
Grifon120	120	108	102	54	88.0	90%	85%	45%	73.3%
MH182011		40	36	18	31.3	33%	30%	15%	26.1%
MH182012		20	20	10	16.7	17%	17%	8%	13.9%
MH182116		110	107	42	86.3	92%	89%	35%	71.9%
MH182117		108	104	33	81.7	90%	87%	28%	68.1%
MH182166		30	30	22	27.3	25%	25%	18%	22.8%
MH182168		100	82	39	73.7	83%	68%	33%	61.4%
MH182170		100	96	42	79.3	83%	80%	35%	66.1%
MH182171		99	92	42	77.7	83%	77%	35%	64.7%
MH182172		100	95	61	85.3	83%	79%	51%	71.1%
MH182216		30	30	24	28.0	25%	25%	20%	23.3%
MH182243		40	44	28	37.3	33%	37%	23%	31.1%
平均マーカー一致率		73.8	69.8	34.6	59.4	61.5%	58.2%	28.8%	49.5%

C. 許容範囲±2

品種名	マーカー 最大一致数	マーカーサイズ一致数				マーカーサイズ一致率			
		B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均
Grifon120	120	110	102	78	96.7	92%	85%	65%	80.6%
MH182011		40	36	30	35.3	33%	30%	25%	29.4%
MH182012		20	20	29	23.0	17%	17%	24%	19.2%
MH182116		110	107	76	97.7	92%	89%	63%	81.4%
MH182117		108	104	68	93.3	90%	87%	57%	77.8%
MH182166		30	30	47	35.7	25%	25%	39%	29.7%
MH182168		100	82	71	84.3	83%	68%	59%	70.3%
MH182170		100	96	100	98.7	83%	80%	83%	82.2%
MH182171		100	96	90	95.3	83%	80%	75%	79.4%
MH182172		100	95	99	98.0	83%	79%	83%	81.7%
MH182216		30	30	30	30.0	25%	25%	25%	25.0%
MH182243		40	44	38	40.7	33%	37%	32%	33.9%
平均マーカー一致率		74.0	70.2	63.0	69.1	61.7%	58.5%	52.5%	57.5%

D. 許容範囲±3

品種名	マーカー 最大一致数	マーカーサイズ一致数				マーカーサイズ一致率			
		B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均
Grifon120	120	110	102	119	110.3	92%	85%	99%	91.9%
MH182011		40	36	30	35.3	33%	30%	25%	29.4%
MH182012		20	20	30	23.3	17%	17%	25%	19.4%
MH182116		110	107	112	109.7	92%	89%	93%	91.4%
MH182117		108	104	112	108.0	90%	87%	93%	90.0%
MH182166		30	30	51	37.0	25%	25%	43%	30.8%
MH182168		100	85	105	96.7	83%	71%	88%	80.6%
MH182170		100	96	120	105.3	83%	80%	100%	87.8%
MH182171		100	96	118	104.7	83%	80%	98%	87.2%
MH182172		104	96	119	106.3	87%	80%	99%	88.6%
MH182216		30	30	40	33.3	25%	25%	33%	27.8%
MH182243		40	44	66	50.0	33%	37%	55%	41.7%
平均マーカー一致率		74.3	70.5	85.2	76.7	61.9%	58.8%	71.0%	63.9%

全体を平均してのマーカーサイズ一致率は、許容正解の許容範囲を±0にとると38.6%、±1にとると49.5%、±2にとると57.5%、±3にとると63.9%となり、許容範囲を広く取っても高いとは言えない値であった。品種毎・検証機関毎にばらつきが見られたが、特に品種間のばらつきが大きかった。

品種毎のマーカーサイズ一致率は、正解の許容範囲正解の許容範囲を±0にとると8.3～62.5%、±1にとると13.9～73.3%、±2にとると19.2～82.2%、±3にと

ると 19.4～91.9%であり、品種間で正解率のばらつきが非常に大きく、その傾向は、許容範囲を広げても、変わらず認められた。

また、検証機関毎のマーカサイズ一致率は、正解の許容範囲を±0にとると 22.4～47.4%、±1にとると 28.8～61.5%、正解の許容範囲を±2にとると 52.5～61.7%、正解の許容範囲を±3にとると 58.8～71.0%であり、許容範囲が広がると差は小さくなるものの、検証機関相互間のばらつきもかなり大きかった。この結果から、検証機関または担当者の習熟度や検査環境により、検査精度が大きく影響を受けること、それがマーカとしての精度に影響を与えていることが伺える。

当然のことながら、正解の許容範囲を狭く設定するほど、品種別にも検証機関別にもマーカサイズの一致率は低くなり、許容範囲を±1以内に設定すると、半数近くの品種の一致率が 50%を割る低い値となった。このため、より精度の高い結果を得られるようなマーカとマニュアルの改良が望まれる。

なお、マーカサイズ一致率が低いことと、品種名による識別結果が検証機関別で 90～100%、平均値で 97%であったこととを考えあわせると、今回検証に供された 6 種類のマーカによる品種識別は、個々のマーカサイズの精度ではなく、検査結果全体をパターンとして捉えて品種間の比較を重視することで、より高い品種識別結果を得られる仕組みになっていると考えられる。このような検査法で精度の高い結果を得るためには、検査者側の習熟度が高いことや検査環境の良いことなどが必要と考えられるため、検査者を問わず精度の高い結果を得るために、マーカとマニュアルの改良が望まれる。

結果の詳細は、添付資料 5「品種毎のマーカサイズ一致率の詳細」を参照。

また、これらの表に基づいて、品種毎に正解の許容範囲の変化に伴うマーカ一致率の変化をグラフにしてみると、下記の図 1 のようになり、どの品種においても、正解の許容範囲を広げるとマーカ一致率が高くなる傾向が明確に見られた。

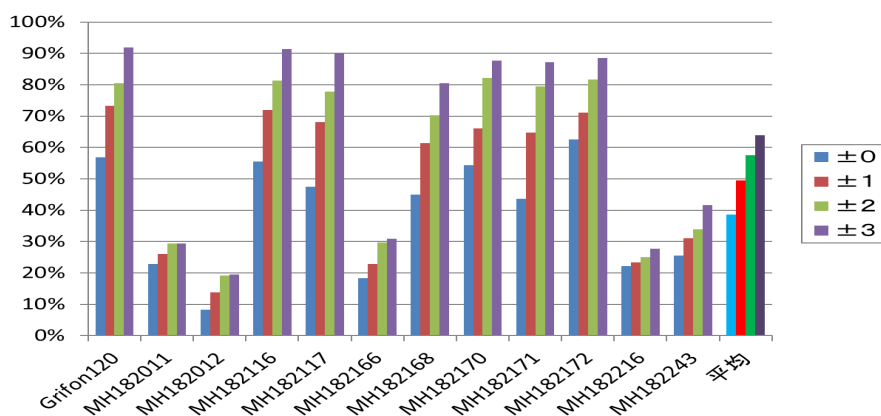
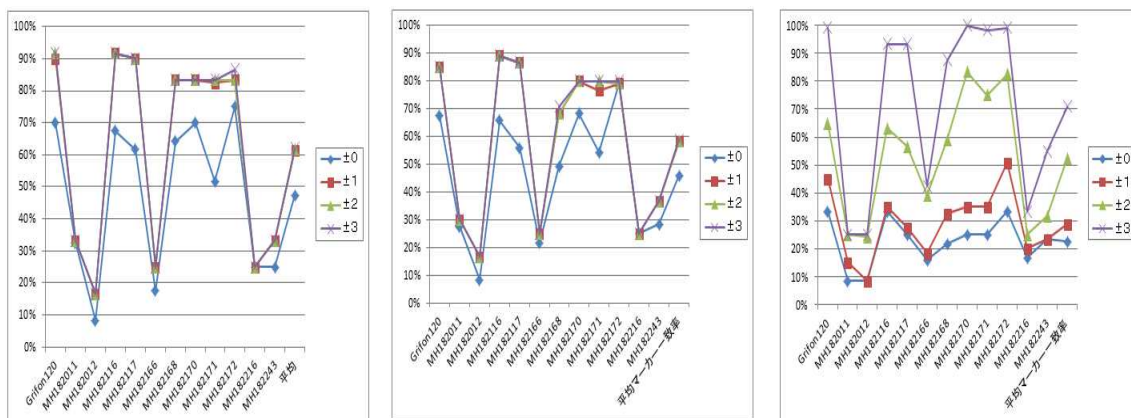


図 1 正解の許容範囲と品種毎のマーカサイズ一致率の関係

さらに、検証機関毎に正解の許容範囲の相違に伴うマーカー一致率の相違をグラフにしてみると、下記の図2のようになり、正解の許容範囲を広げるとマーカー一致率が高くなる傾向が見られた。

また、品種によってフラグメントサイズの一致率に違いが見られ、特に MH182011、MH182012、MH182166、MH182216 の4つのマーカーは、3つの検証機関の全てで、許容範囲を±3まで広げても、フラグメントサイズの一致率が50%に満たないことが明確に見てとれた。



B 社

F 社

L 社

図2 正解の許容範囲と検証機関毎のマーカーサイズ一致率の関係

次に、各サンプルのマーカーのうちどれだけが正解品種のマーカーサイズと一致したかを一致数と一致率で算出し、マーカー毎に集計したのが、下記の表10である。

表10 マーカー毎の一致状況

A. マーカーサイズ一致数

サンプル 番号	マーカー 総数	検査機関	msGf-1		msGf-2		msGf-3		msGf-4		msGf-5		msGf-6		平均
±0	120	B社	65	11	63	64	44	89	0	60	61	65	90	70	56.8
		F社	77	10	67	77	77	77	77	60	58	53	56	69	63.2
		L社	0	10	0	10	0	58	0	60	1	30	85	69	26.9
		平均	47.3	10.3	43.3	50.3	40.3	74.7	25.7	60.0	40.0	49.3	77.0	69.3	49.0
±1		B社	100	90	69	79	69	98	0	60	80	80	90	70	73.8
		F社	100	89	67	77	77	77	77	60	78	78	56	69	75.4
		L社	27	10	0	10	10	58	0	60	47	36	87	70	34.6
		平均	75.7	63.0	45.3	55.3	52.0	77.7	25.7	60.0	68.3	64.7	77.7	69.7	61.3
±2		B社	100	90	70	80	70	98	0	60	80	80	90	70	74.0
		F社	100	89	67	77	77	77	77	60	78	78	56	69	75.4
		L社	98	81	51	20	27	65	69	99	49	40	87	70	63.0
		平均	99.3	86.7	62.7	59.0	58.0	80.0	48.7	73.0	69.0	66.0	77.7	69.7	70.8
±3		B社	100	90	70	80	70	98	2	62	80	80	90	70	74.3
		F社	100	89	67	77	77	77	77	60	78	78	56	69	75.4
		L社	98	89	79	89	89	95	72	99	84	71	87	70	85.2
		平均	99.3	89.3	72.0	82.0	78.7	90.0	50.3	73.7	80.7	76.3	77.7	69.7	78.3

B. マーカーサイズ一致率

サンプル 番号	マーカー 総数	検査機関	msGf-1		msGf-2		msGf-3		msGf-4		msGf-5		msGf-6		平均
±0	120	B社	54%	9%	53%	53%	37%	74%	0%	50%	51%	54%	75%	58%	47.4%
		F社	64%	8%	56%	64%	64%	64%	64%	50%	48%	44%	47%	58%	45.9%
		L社	0%	8%	0%	8%	0%	48%	0%	50%	1%	25%	71%	58%	22.4%
		平均	39.4%	8.6%	36.1%	41.9%	33.6%	62.2%	21.4%	50.0%	33.3%	41.1%	64.2%	57.8%	38.6%
B社		83%	75%	58%	66%	58%	82%	0%	50%	67%	67%	75%	58%	61.5%	
F社		83%	74%	56%	64%	64%	64%	64%	50%	65%	65%	47%	58%	58.2%	
L社		23%	8%	0%	8%	8%	48%	0%	50%	39%	30%	73%	58%	28.8%	
平均		63.1%	52.5%	37.8%	46.1%	43.3%	64.7%	21.4%	50.0%	56.9%	53.9%	64.7%	58.1%	49.5%	
B社		83%	75%	58%	67%	58%	82%	0%	50%	67%	67%	75%	58%	61.7%	
F社		83%	74%	56%	64%	64%	64%	64%	50%	65%	65%	47%	58%	58.5%	
L社		82%	68%	43%	17%	23%	54%	58%	83%	41%	33%	73%	58%	52.5%	
平均		82.8%	72.2%	52.2%	49.2%	48.3%	66.7%	40.6%	60.8%	57.5%	55.0%	64.7%	58.1%	57.5%	
±3		B社	83%	75%	58%	67%	58%	82%	2%	52%	67%	67%	75%	58%	61.9%
		F社	83%	74%	56%	64%	64%	64%	64%	50%	65%	65%	47%	58%	58.8%
		L社	82%	74%	66%	74%	74%	79%	60%	83%	70%	59%	73%	58%	71.0%
		平均	82.8%	74.4%	60.0%	68.3%	65.6%	75.0%	41.9%	61.4%	67.2%	63.6%	64.7%	58.1%	63.9%

全体としてのマーカー一致率は、正解の許容範囲を±0にとると 38.6%、±1にとると 49.5%、±2にとると 57.5%、±3にとると 63.9%であり、高いとは言えない。また、正解の許容範囲を±3まで広げても、一致率の最高値は 82.8%で、一致率が最高で 50%に満たないマーカーも見られた。検査結果に疑問が生じる危険性を避けるためには、マーカーやマニュアルに改良の余地があると考えられる。

3 検証機関のデータを比較すると、検証機関毎にマーカー一致率が大きく異なっているが、その原因は、品種ごとの正解率の分析で前述したように、マーカーパターンを正確に検出・識別する能力や、マーカーの一致率が低くても、全体の傾向などから品種を判定する経験値の違いによるものと思われる。常に正確な検査結果を得るためには、検証機関の能力に依存することなく正解を得られるマニュアルやマーカーへと改良を行う必要がある。

(2) 品種内多型調査の結果

品種内多型調査のための検査は、Grifon120 の 1 品種のみにつき、1 機関当たり 30 株を用いて行った。ホクト株式会社から、90 個の Grifon120 の菌糸サンプルが、DNA 鑑定学会宛てに配送された。DNA 鑑定学会でこれらを 1 番から 30 番までの続き番号を付した 3 組のサンプルに分け、それぞれの組のサンプルを、3 箇所の検証機関に配布し、検査を行った。

詳細なデータは、「添付資料 6 マイタケの品種識別マニュアルの妥当性検査データ（品種内多型調査）」参照のこと。

正解の許容範囲別に、各検証機関の検査結果のフラグメントサイズの一致数と一致率のまとめを下記の表 1 1 に示した。

表 1 1 Grifon120 の品種内多型検査のマーカーサイズ一致状況

許容範囲	マーカー総数	マーカーサイズ一致数				マーカーサイズ一致率			
		B社	F社	L社	平均	B社	F社	L社	平均
±0	12	9	7	3	7.6	73%	57%	24%	51.4%
±1	12	11	9	4	8.1	92%	75%	35%	67.1%
±2	12	11	9	7	9.7	92%	75%	56%	74.3%
±3	12	11	9	9	9.6	92%	75%	73%	80.0%

全体としてのマーカー一致率は、正解の許容範囲として±0をとると 51.4%、±1をとると 67.1%、±2をとると 74.3%、±3をとると 80.0%と、許容範囲を広げるにしたがって上がるものの、決して高い値とはいえなかった。

なお、今回の検証実験においては、30 株ずつ 3 社に送られた合計 90 株の全てが異なる個体であり、3 社に同一株由来のサンプルが送られたわけではない。また、検査のための実験回数も、1 サンプル当たり 1 回のみである。したがって、正解と一致の見られなかった 1 つの検証機関の 1 個体の 1 種のマーカーについては、それが実験誤差に由来するものなのか、実際その個体とそのマーカーに多型を持つ個体であったのかを区別することができない。このため、この結果をもって、特に許容範囲を狭くとした場合に一致率のばらつきが大きい原因を、一概に機関毎の検査環境や検査者個々の習熟度などの相違に起因すると判断することはできない。

しかし、基準品種とする 1 種の検査においてこれだけのばらつきや不完全な一致率がみられることは、鑑定自体の精度に直接、影響を及ぼすと考えられる。

サンプル毎のマーカーサイズの一致数および一致率の詳細なデータは、「添付資料 7 許容範囲毎の品種内多型調査結果」参照のこと。

次に、マーカーの一致率を図3に示した。これを見ると、フラグメントサイズの違いの許容範囲を±3まで広げても、基準品種のマーカーサイズと100%一致するマーカーは1つしかなかった。本検査が品種識別検査の基準品種についての結果であることに鑑みると、全体的な一致率の低さはそのまま、検査基準の精度の低さにつながるため、マニュアル、マーカーの双方につき、十分な検討と改良が必要と思われる。

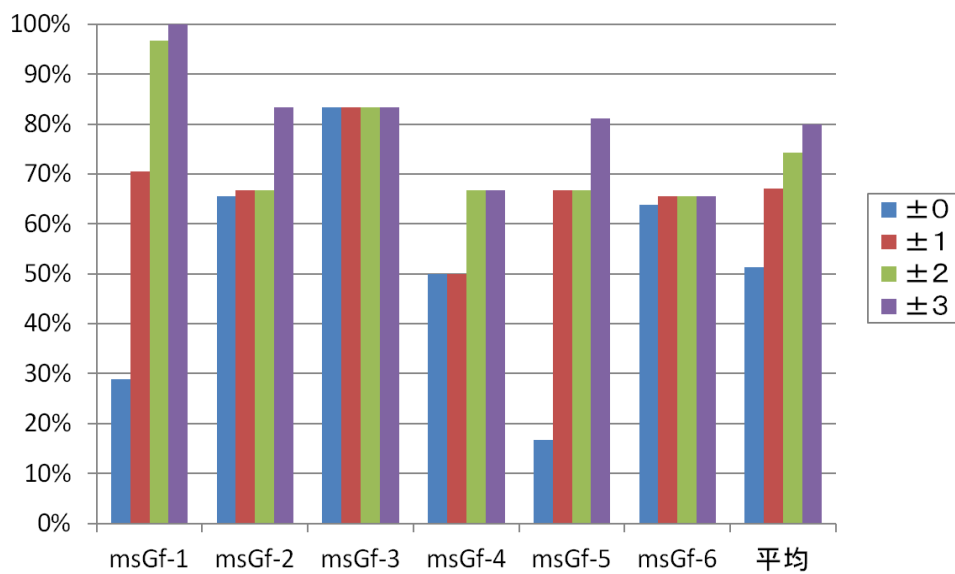


図3 品種内多型調査におけるマーカー毎の一致率

4. 「SSR マーカーによるマイタケの DNA 品種識別マニュアル」評価

上記の結果により、「SSR マーカーによるマイタケの DNA 品種識別マニュアル」の評価は、下記の表 1 2 の通りである。

表 1 2 「SSR マーカーによるマイタケの DNA 品種識別マニュアル」の評価

マニュアル	提供されたマニュアルによる品種名の認証率は、Grifon120、MH182011、MH182012、MH182116、MH182117、MH182166、MH182168、MH182170、MH182171、MH182172、MH182216、および MH182243 の 12 品種の品種識別においては、全体として、回答率 99.4%、未答率 0.6%であり、回答の正答率 96.7%、誤答率 2.8%であった。また、品種毎の正答率は 90%～100%という高い数値であった。 したがって、提供されたマニュアルは、これら 12 品種の相互間での識別を、かなりの信頼性を持って行えるマニュアルであると言える。 しかしながら、3 検証機関のデータを比較すると、検証機関毎にマーカー一致率が大きく異なっていた。その原因は、後述するように、マーカーサイズ情報の精度が低いマーカーが複数存在することにあると考えられる。このため、正しい品種識別結果を導き出すためには、マーカーパターンを正確に検出・識別する能力や、マーカーサイズの一致率が低くても、全体の傾向などから品種を判定する経験値などの検査担当者個人の力量の高さや、厳密な精度管理などに基づく検査機器の精度の高さなど検証機関の検査環境の優良さが必要と思われる。したがって、初めての実験者でもどこの検査機関でも高いマーカー一致率が得られ、その結果として精度の高い安定的な品種識別を行えるよう、マニュアルの改良を検討することが望ましい。 一方で、マーカーの正確なサイズは、使用する機器や実験技術者個人の力量によっても変わる可能性があるため、本システムのように、厳密なマーカーサイズ測定結果でなくても高い精度で品種識別ができるシステムは、判定の精度を高く保つ良い方法と思われる。
マーカー	提示されたマーカー毎の認証率は、検査値の正解とのずれを最大±3 ベースまで許容した場合でも、全体として 63.9%というあまり高いとは言えない数値であった。また、品種毎にみたマーカーの認証率は、やはり最大±3 ベースまでを許容範囲と考えた場合には、19.4～91.9%であり、マーカー間で大きなばらつきが見られた。このため、認証率の低いマーカーの改良により、品種識別の精度を高める工夫が必要と考えられる。
妥当性 総合評価	今回の検証に用いた 1 2 品種のマイタケの品種識別を行った場合の認証率は 96.7%で、品種識別結果は精度が高いが、個々のマーカーの検査精度を高めるための改良が必要である。

添付資料 1

DNA 鑑定提供までの
ジョブフローと規則

DNA鑑定提供までのジョブフローと規則

- DNA鑑定提供までのジョブフロー
- マーカー開発規則
- 認証規則
- DNA鑑定の検査規則
- ライセンス規則と責任
- DNA鑑定の品質確保
- 品種識別マニュアルの書き方

特定非営利法人 DNA鑑定学会
妥当性委員会



(H25.6.7)

更新経歴表

更新月日	内容
2009/6/16	添付資料1に「品種識別マニュアルの目次」を追加した。
2009/6/22	「3. 1. 2 妥当性実施機関の条件」を追加した。 それに伴い、「3. 1委員会」を「3. 1. 1」に変更し、3. 1には「3. 1妥当性の確保」を設けた。
	「図1 DNA鑑定サービスまでのジョブフロー」にstep5として「DNA鑑定の品質確保」を追加した。
	「6. DNA鑑定の品質確保」を追加した。
2009/7/8	「2. 2 権利関係」の文章表現を分かり易くした。内容に変更なし。
	「3. 認証規則」の序論に「同一内容の検証を複数機関へ依頼し、複数機関の検証データを総合的に分析して認証の妥当性を求める」を追加した。
	「2. 4 自己検証」 (1) 以下の株で品種判別を実施すること。 基準株：分譲元 生産者：分譲先生産者の産物 市販品：種苗会社などの流通品 を追加した。
2010/11/2	「4. 2. 4 2 検体の比較検査」を追加
	「4. 2. 5 基準値マーカーの扱い方」を追加
	添付資料1に「品種識別マニュアルの目次」を削除し、 「7. 品種識別マニュアルの書き方」を追加
	タイトルを「DNA鑑定サービスまでのジョブフローと規則」から 「DNA鑑定提供までのジョブフローと規則」
2011/7/5	「2. 3. 1 マーカーの開発」の「(3) 2bp 以上の SSR マーカー」と「(4) 誰でも活用できる検査技術」を追加

目次

1.	DNA鑑定提供までのジョブフロー	2
2.	マーカー開発規則	3
3.	認証規則	5
4.	DNA鑑定の検査規則	10
5.	ライセンス規則と責任	13
6.	DNA鑑定の品質確保	18
7.	品種識別マニュアルの書き方	19

1. DNA鑑定提供までのジョブフロー

本ジョブフローは、研究開発の成果を産学官の協力で実社会に提供することを目的とし、提供までに必要な事柄とそのガイドラインをジョブフローとして図1に現します。

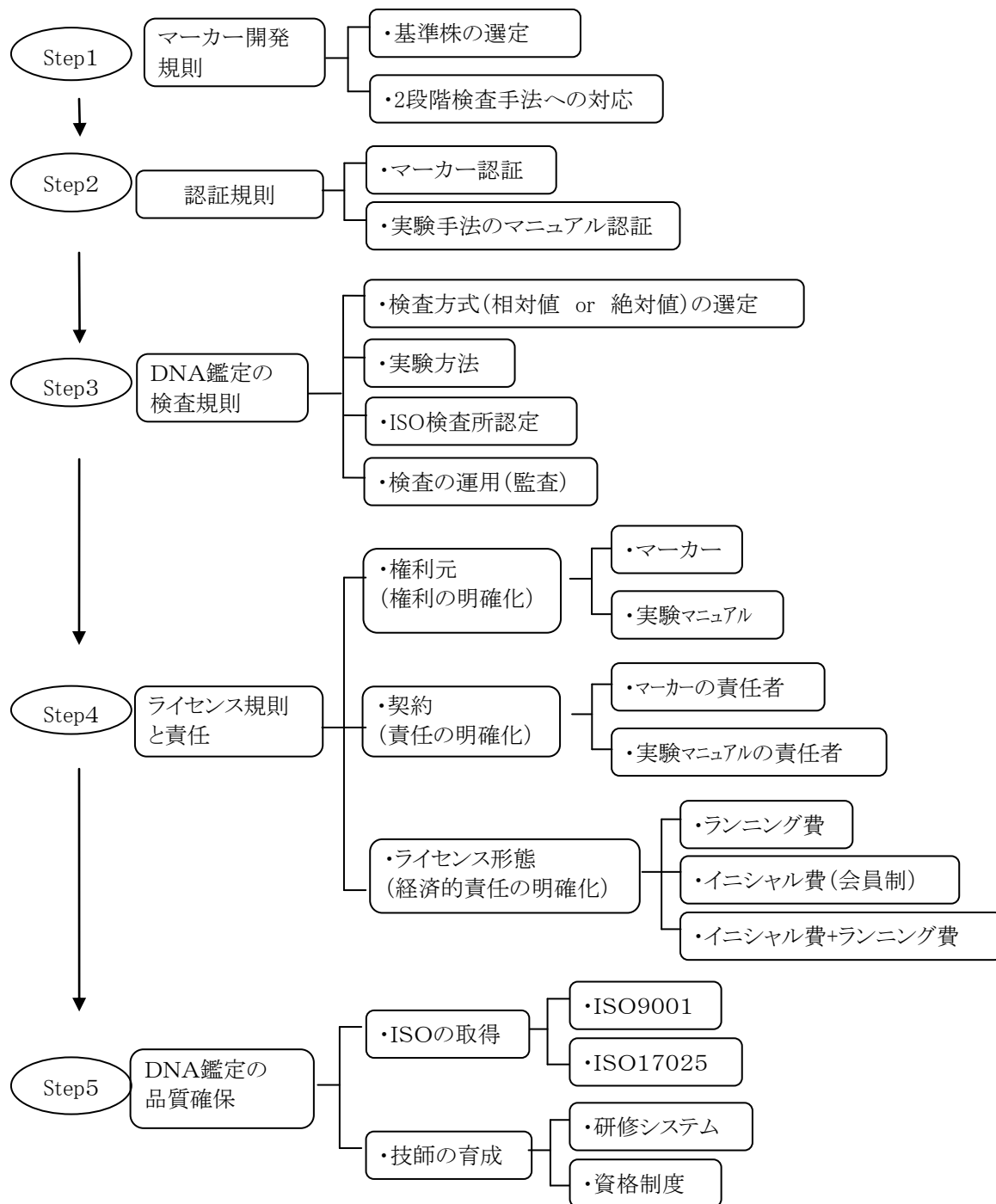


図1 DNA鑑定サービスまでのジョブフロー

2. マーカー開発の規則

2. 1 基本的な考え方

DNA鑑定に必要な要素を、識別するための「マーカー」と、マーカーを検出するための「実験方法」とに区別して定義する。また、権利も各々で異なり、規則も権利に従って設定する。

2. 2 権利関係

識別の開発で発生する知的所有権は、品種などを識別する「識別マーカー」と、識別マーカーを用いて判別する実験手段を記載した品種識別マニュアルとがある。

「品種識別マーカー」は、特許権としての権利となり、識別するための実験手段を書いた手順書の「識別マニュアル」は著作権としての権利となる。

2. 3 開発

2. 3. 1 マーカーの開発

品種識別などのマーカー開発をするにあたって、基本的に以下の事項を考慮して開発しなくてはならない。

(1) 基準株を明確に定めて開発

マーカーを開発するにあり、分譲している基準株を用いて開発をおこなうこと。

(2) 2段階検査に対応したマーカーの開発

簡易検査と精密検査との2段階で検査を可能としたマーカーであること。簡易検査とは断片長などの簡易的な手法で判別がおこなえること。精密検査とは現在の技術でベストと思われる判別手法の塩基配列で判別できること。

(3) 2bp以上のSSRマーカー

電気泳動の誤差が2bp程度生じるため、4bp以上のSSRマーカーが好ましい。

(4) 誰でも活用できる検査技術

エチプロなど健康面で問題とされている物を使用しない方式とする。

2. 3. 2 品種識別マニュアルの開発

品種識別マニュアルとは、識別マーカーを使って識別する実験方法を記載するもので、学会で指定する目次に従って記載すること。内容は、第三者が使用して品種識別が出来る内容でなくてはならない。ただし、新たな技術が開発され、マニュアルに記載されている内容で実験することが出来ないようなときは、新たに

マニュアルを作成し、定義して実施すること。このとき、マーカーの変更をしてはならない。

2. 4 自己検証

信頼性を確認するため、品種識別の開発終了時、以下の条件で最終確認をおこなうこと。

- (1) マーカー開発した人物と異なる人物で最終確認を実施することが好ましい。
- (2) 品種識別マニュアルで検証作業を実施すること。
- (3) 以下の株で品種判別を実施すること。
 - 基準株：分譲元
 - 生産者：分譲先生産者の産物
 - 市販品：種苗会社などの流通品
- (4) 実験の繰り返し回数を複数回おこなうこと。
- (5) 品種確認は同一品種別個体で5個体以上の個体検査をおこない、検証結果を提示できる状況にしておくこと。

3. 認証規則

認証業務とは、依頼元から提供されたマニュアルに記載している「DNAマーカーと検査手順」について、同一内容の検証を複数機関へ依頼し、複数機関の検証データを総合的に分析して認証の妥当性を求めるものである。

検証業務とは、マニュアルに従って検査を実施し、手順の再現性確認と識別の認証率を求めるものである。

認証率とは、サンプル採取した複数の生物検体を、マニュアルに従って検査をおこない、DNAマーカーによる判別の結果をデータ評価したもので、DNAマーカーでの品種一致率を求めたものである。

3. 1 妥当性の確保

妥当性を確保するために、委員会を設け、妥当性に相応しい機関で実施しなくてはならない。

3. 1. 1 妥当性委員会の設置

認証業務は複数人の第三者委員会（中立委員を委員長として、大学、独立法人研究機関、民間等の専門家から構成）で構成させ、検証機関の選定、サンプルの採取および認証率を合議の上で決定し、図2の認証業務フローに従って遂行すること。

3. 1. 2 妥当性実施機関の条件

妥当性とは、品種基準株の選定、品種識別マーカーの開発方法、マーカーの認証率およびDNA鑑定検査方法を検証して評価し、その妥当性を判別することである。そのため、妥当性には中立性と公平性が要求されるため、以下の業務に係わっている機関が妥当性業務を実施してはならない。

(1) 品種識別マーカーの開発業務

(2) DNA鑑定による検査業務

(3) 種苗の管理業務

3. 2 認証基準

委託された認証業務において、帳票にて申請を受付け、以下の条件をクリアした申請のみを受け入れるものとする。検査手順のマニュアルがあること。

(1) 検査手法の中にコントロールマーカーが定義されていること。

(2) マーカー判別手法において、最終的に塩基配列を読み取ることで正確な判別できる方式であること。

(3) マーカーの探索において、以下の条件を実施して決めること。

・同一DNAで繰返し実験をし、再現性の確認をおこなう。

- ・同一品種の複数個体との比較を実施する。
- ・異なる品種に対しても、1品種複数個体で比較を実施する。

3. 3 検証機関の選定基準

検証機関の選定基準とは、検証業務を実施する機関を選定するための基準について定義したものである。(基本的にはISO17025の試験所認定機関のレベルに準拠した検証機関であることが望ましい)

1) 機関選定の手法

学会の法人会員に対して公募をおこない、応募機関の中から選定することを原則とする。ただし、応募の中に認証を取得している機関が無い、あるいは何らかの都合で公募がおこなえないときは、委員会で協議して検証先を決定する。

2) 検証機関の選定基準

認証資格として、ISO17025, ISO15189 または ISO9001 を取得している機関を優先することを原則とする。但し、何らかの事情により、認証を取得していない機関を選定対象とするときは、以下に述べるチェック項目に従い当該機関のチェックを委員会でおこなう。

- (1) 検証機関に試験所品質管理マニュアル相当のマニュアルがあること。
- (2) 検証機関は検証業務に関する権限と責任を明確にした組織表が作成されていること。(機密保持体制、職員への内圧外圧の排除を含む)
- (3) 品質マニュアルには品質管理者、技術管理者の権限と責任が明確に記載されていること。
- (4) 検証機関の品質マニュアルには品質目標、品質方針の記載があること。
- (5) 検証機関は文書管理体制(品質マニュアル等の配布管理、文書ファイル、文書改定、文書保管管理、文書取扱責任者など)が整っていること。
- (6) 検証機関では依頼内容の確認、記録が取られていること。
- (7) 検証業務に使用する検査機器、試薬などの購買、受入検査の記録を保持していること。
- (8) 検証業務に関する不適合試験業務の管理(不適合処理、是正処置、予防処置)が行われていること。
- (9) 検証業務の見直しのための内部監査及びマネジメントレビューが行われていること。
- (10) 検証業務に関与する職員の教育訓練、資格認定を実施していること。
- (11) 検証業務に関する施設の適合性の記録(温度、湿度、環境制御など)を取っていること。
- (12) 検証業務に関する試験方法及び妥当性確認(検査手順書の適合性、検査

手順書の改定、対応規格の有無、対応試験方法の有無、不確かさレベルの確認など)

- (13) 検証業務に関する検査機器の保全計画及び実績、検査機器の設備管理台帳、ソフトウェアの管理記録を整備していること。
- (14) 検証業務、測定トレーサビリティの確保がおこなわれていること。(認証標準物質又は標準物質、検査機器、試薬など)
- (15) 検証業務に関する試験試料の識別管理、保管管理を行っていること。
- (16) 検証業務に関する品質の保証(精度管理:正確さ、再現精度の管理)を行っていること。
- (17) 検証業務に関する鑑定の報告実績があること。

以上のチェック項目に関して70%以上の適合性があることが望ましい。

認証機関の選定確認用のチェックリストは別添の「ISO17025試験所またはISO17025試験所相当レベルに該当するかどうかを確認するための監査チェックリスト」を使用する。

3.4 サンプルの採取基準

マニュアルに記載されているDNAマーカで判別を実施するためのサンプル採取基準を定義する。サンプルは以下の観点で採取する。

1) 標準株

標準株を管理している機関から、同一株を複数個採取する。これは、DNAマーカが標準株に対して、どの程度の妥当性があるか判別するためである。

2) 市販品

市販されている株を複数個所から購入し、DNAマーカで判別する。これは、DNAマーカと市販品株とにどの程度の差異が生じているか判別するためのものである。

3) 多品種との妥当性

上記、1)、2)は同一品種株に対する妥当性評価のためであるが、異なる品種に対しても同様の判別を実施すること。

3.5 認証率

妥当性を確保するために、検証機関を複数機関選定し、各機関に同一のサンプルを与えて検証業務を実施させる。認証率は、依頼されたDNAマーカと標準株および市販品との一致率をまとめて求める。

3.6 是正処置及び予防処置

学会での認証活動において発生した問題点とその対策を記録し、是正処置を講じる

ことで、その後の予防処置をおこなう。

学会での認証活動は、認証委員会での討議内容を議事録として残し、是正処置が発生した場合は是正処置内容を対象の検証機関に報告して、1ヶ月以内に是正処置報告書を検証機関に提出してもらいその内容を再度認証委員会にて審議して最終的な検証機関の選定を行う。

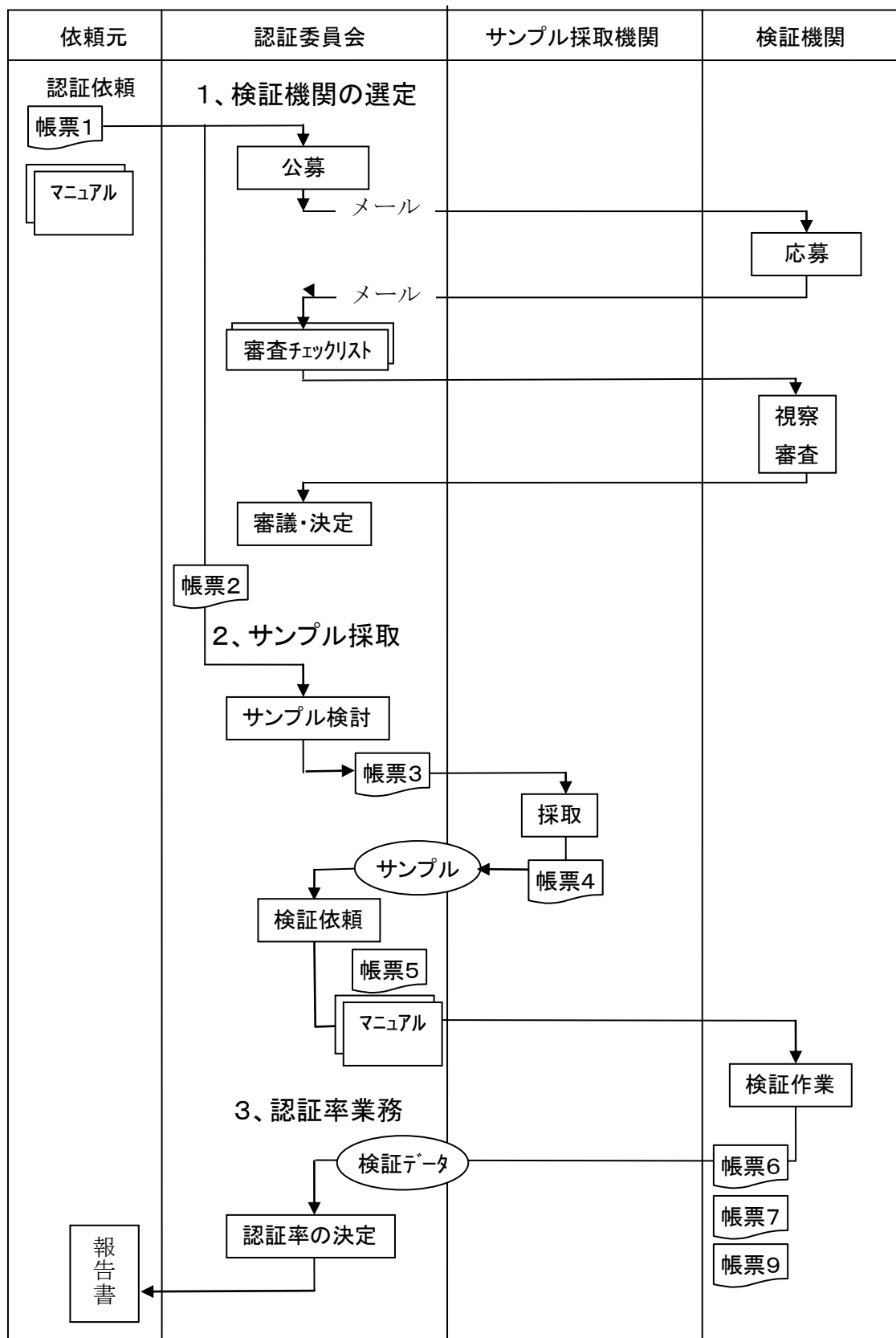


図2 認証の業務フロー

4. DNA鑑定の検査規則

4. 1 基本的な考え方

DNA鑑定において、品種識別マニュアルで識別の実験方法などを記載しているが、全機関がマニュアルに記載されている同一の環境で実験することは現実的でない。そのため、以下の指針を設けることで、DNA鑑定の品質を確保する。

(1) 検査の手法

基準品種と被検査物のマーカーを一緒に、あるいは平行に測定し、基準品種マーカーと被検体のマーカーを相対比較する。

(2) 基準品種の設定

検査の前に基準品種を設定して検査をおこなう。

(3) 2段階検査

簡易検査と精密検査の2段階検査方式とし、精密検査では塩基配列で判別する。

4. 2 DNA鑑定の検査

4. 2. 1 検査の手法

DNA鑑定の検査は大きく分けて、基準品種のマーカー値を基準値として定義して置き、被検体のマーカー測定値と基準値とを比較して判別する方法の絶対値方式と、基準品種のDNAと被検体のDNAとを一緒に、あるいは平行に測定する相対値方式とに区別することが出来る。絶対値方式では、検査に使用する機器など、各検査機関の環境が異なると、測定値にバラツキが生じる。そのため、判別の信頼性を確保するためには、各検査機関の環境が異なっても、同じ測定結果を得ることができる相対値方式を用いるものとする。

4. 2. 2 基準品種の設定

前記の相対値方式によるDNA鑑定方法は、基準品種のDNAを保存して置き、そのDNAを使用する方法と、基準品種の固体を保存して置き、検査に時にDNAを抽出して使用する方法がある。相対値方式ではどちらの手段を用いてもよい。基準品種のDNAを抽出して使用する方法は、品種の基準株を複数個体用意し、個々のマーカーを測定して同一の測定値が多く存在したDNAを基準DNAとして使用する。

4. 2. 3 2段階検査

現在のバイオテクノロジーにおいて、十分な証拠能力を有する検査結果を出すためには、最終的にマーカー部位の塩基配列で判別を行なうことが最善の手法である。しかし、常に塩基配列を読取って判別することはコスト面から現実的でない。そこで、まず簡易検査によって基準品種と異なる品種の疑いがあるかどうかのスクリーニングを行い、その結果、基準品種と異なる品種の疑いがあるものについては、精密検査としての塩基配列決定を行なうという2段階の検査システムを採用する。

この2段階検査の方式は、以下のような利点を持つ。

- (1) 簡易検査の結果により精密検査の必要性を判断できるため、手間と費用のかかる精密検査を行なう件数を減らすことができる。
- (2) 簡易検査のみでは証拠として不十分とされる危険性を、精密検査の結果によって払拭することが可能となり、十分な証拠能力を有する検査を行なうことができる。

従って、簡易検査は、後に精密検査を行なうことを考慮して、精密検査を行うに十分な量と質の検体または検体から抽出したDNAを保存できるような簡易検査でなくてはならない。

4. 2. 4 2検体の比較検査

2検体を電気泳動の分離で比較するときは、検体ごとに異なる蛍光色素を標識して、一緒に電気泳動させる。これは、検体を別々に電気泳動すると電気泳動の環境が毎回異なるため、誤差が生じることを防ぐためである。

4. 2. 5 基準値マーカーの扱い方

検体が多くて一緒に電気泳動できない様なときは、基準マーカー&サイズマーカーを用いてマーカーと一緒に検体と電気泳動させる。基準マーカー&サイズマーカーの測定値を基準として、検体の測定値を正規化し、比較する。このとき、電気泳動が異なると基準マーカーやサイズマーカーの測定値にも誤差が生じることを考慮する必要がある。

4. 3 検査機関の認定

検査機関の認定は、以下に示す検査方法に準じて作を実施できる機関を認定する方式とし、DNA鑑定品質監査を定期的におこない品質を維持させることを目的とする。

- (1) 識別マーカーは学会で指定するものを使用すること。
- (2) 基準品種株は学会が指定したものを使用すること。
- (3) 測定は相対値方式でおこなうこと。
- (4) 自機関における実験用マニュアルの作成をおこない、当該マニュアルの更新経歴管理など品質を維持するためのシステムを向けていること。

- (5) マニュアルは学会で指定する目次に従って記載すること。
- (6) 実験マニュアルの妥当性として、一定量の品種識別を実施したデータを学会に提示すること。
- (7) 各実験過程において記録を取り、ドキュメント管理をおこなうこと。
- (8) 学会は、認定機関に対してのクレーム窓口を用意すること。

5. ライセンス規則と責任

5. 1 目的

DNA鑑定サービスをビジネス社会に組み入れるためには、トラブル発生時の対処ができるよう責任の所在や関連する知的財産などの権利を明確にしておかなくてはならない。そのためには、関係する機関との権利関係を明確にし、契約書を結んで鑑定サービスを実施しなくてはならない。

特許登録済のマーカ－：実施権のライセンス契約（ライセンス費）を結ぶ。

特許未登録のマーカ－：技術コンサル（技術指導費）という形で契約を結ぶ。

責任の所在や権利を明確にし、技術漏洩および無断使用の状況にならないようにする。特に営利企業へ技術供与する場合には特に注意する必要がある。

5. 2 権利内容

DNA鑑定の技術に関連して発生する権利には、識別をするための「識別マーカ－」と実験手法を記載した「検査マニュアル」の二種類の知的所有権があり、各々の権利は表1に表すように権利の種類が異なる。

識別マーカ－を権利化するためには特許を取得することによって権利を主張することができる。検査マニュアルについては刊行物と同様、著作物として権利化することができる。ただし、検査マニュアルに記載している内容を権利化するときは、新規性のある内容について特許を取得する必要がある。

表1 知的所有権

種類	知的所有権		実施権
識別マーカ－	特許権	発明者	出願人であるが、一般的に委託開発費で開発した場合は、全ての権利（研究成果）が委託開発の依頼元に所有する旨の契約条項が記載されている。
識別マニュアル	著作権	作成者	著作物であり、多方面へ配布するなどの場合には、作成者の了解が必要であるが、一般的に委託開発費で開発した場合は、委託契約書（または研究成果の納入）で依頼元に権利が帰属される。

5. 3 権利の帰属

権利の帰属先は開発の条件によって異なるが、一般的には図3に示すような構成に

なっている。権利は発明者が権利化し、出願人が実施権を持つために発明者との間で取り決めを交わす。例えば、特許ロイヤリティまたは製品化などで得た利益をどのように分配するかを決めておくなどの方法で、利益を発明者に還元するためである。

基本的には実施権は出願人に帰属するが、委託研究によって生まれた発明については、委託契約書で依頼元に帰属する契約となっていることが一般的である。ただし、国の委託研究などでは、依頼先が大学などの非営利団体のときは申請すれば依頼先へ帰属させることができる場合もある。そのため、権利を実施したい者は権利の帰属している機関を探して、そことライセンス契約を結ぶ必要がある。

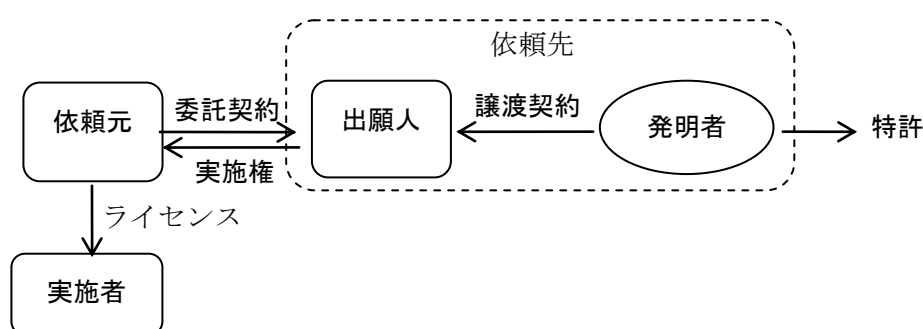


図3 権利関係

5. 4 実施時の責任関係

DNA鑑定の実施形態における責任の所在は、知的所有権を権利化した場合と権利化しなかった場合とで異なる。開発と権利関係を図4にDNA鑑定と責任の所在を表2に表して説明する。

5. 4. 1 開発と権利関係

DNA鑑定の開発に関係する機関としては下記の機関が存在し、その役割と権利関係を下記のように定義する。

開発依頼元：識別マーカーの開発を依頼する。

開発機関：開発依頼元から依頼された識別マーカーの開発をおこなう。

認証機関：開発された識別マーカーの妥当性として、基準株や品種識別の認証率などの評価をおこなう。

検査機関：開発された識別マーカーでDNA鑑定サービスをおこなう。

一般的に、識別マーカーの開発をおこなう場合、全ての権利が開発依頼元に所属するよう委託契約書に記載されているため、ライセンスの契約は開発依頼元と契約することになる。しかし、国の委託研究では、開発機関が大学などの非営利のときは、権利の譲渡を申請することにより、開発機関に帰属させることができる。このようなと

きのライセンス契約は開発機関と結ぶことになる。

そのため、企業がDNA鑑定サービスを実施するときは、権利の帰属先を明確にして、ライセンス契約を結ぶ必要がある。

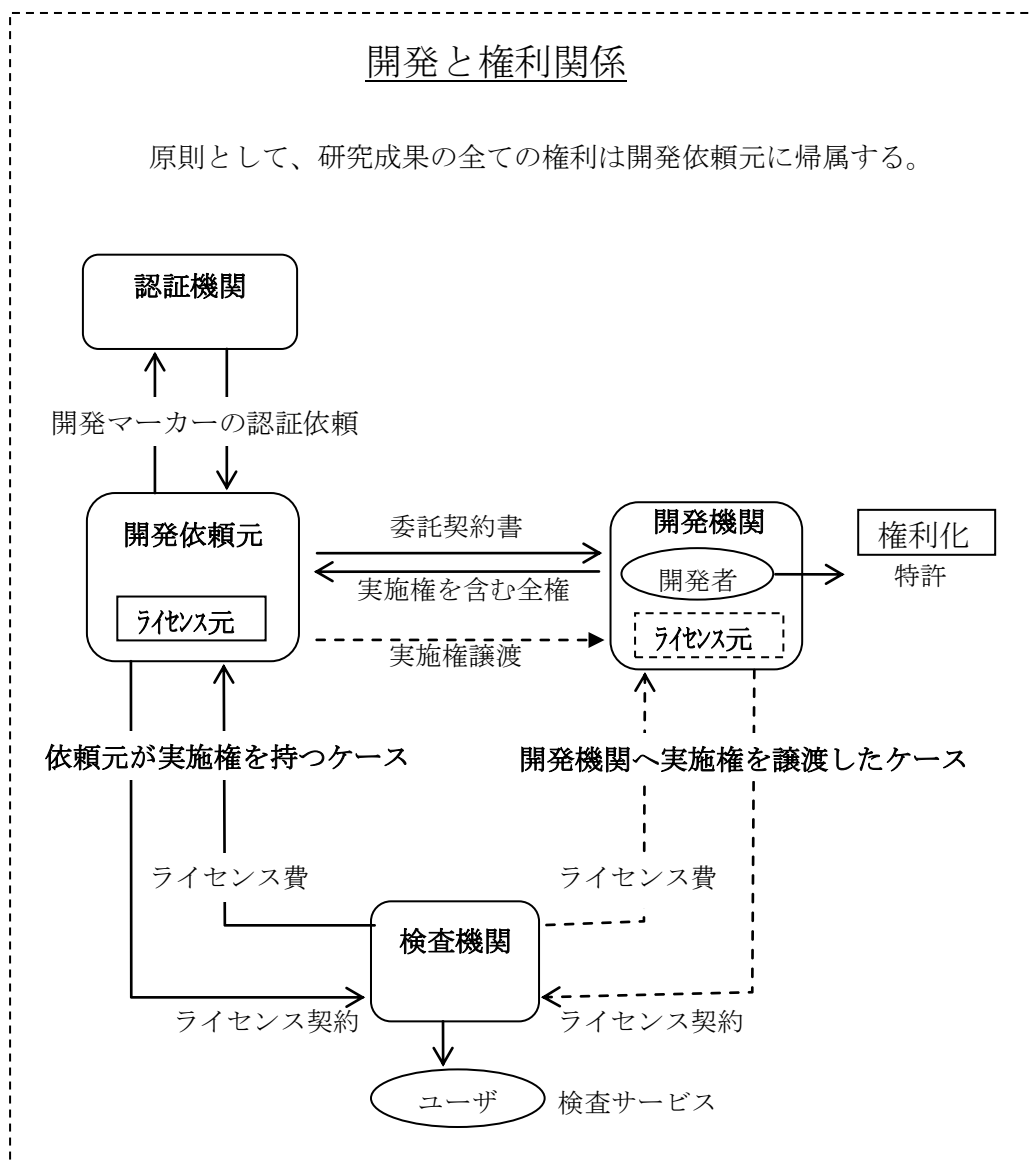


図4 権利化した場合

5. 4. 2 DNA鑑定と責任の所在

DNA鑑定における責任の所在として、ライセンス元、検査機関および認証機関の3機関が存在し、知的所有権を権利化した場合としなかった場合で責任の所在も異なる。

DNA鑑定結果で生じる問題としては以下の事象が予想され、そのときの責任の所在を表2に示す。

(1) 検査作業における瑕疵義務

検査時の作業ミスで結果が正確にでなかった。

検査機関の問題であり、権利関係の責任とは関係ない。

(2) 検査マニュアルの不備

検査マニュアル通りに実施したが検査結果が正確にでなかった。

一般的に検査機関では検査マニュアル採用時に不備を確認するため、通常では起こりえないが、起こった場合は契約条項に従う。

(3) 識別マーカの認証率

定義されている認識率の精度で識別できない。

認証における責任の所在は、権利化の形態に関係なく、妥当性評価を実施した場合、評価した認証機関の責任となる。妥当性評価を実施していない場合は、ライセンス契約の有無で異なり、契約しているときは、ライセンス元の責任となり、未契約のときは検査機関の責任となる。

表2 DNA鑑定と責任の所在

形態	ライセンス契約		妥当性の実施	検査結果の責任(検査の瑕疵は除く)		
				ライセンス元	検査機関	認証機関
知的所有権を権利化した場合	必要	有	実施			○
			未	○		
		無	実施			○
			未		○	
知的所有権を権利化しなかった場合	不要	有	実施			○
			未	○		
		無	実施			○
			未		○	

5. 5 ライセンス費

ライセンス契約を結んでDNA鑑定サービスを実施するときは、知的所有権者に対してロイヤリティの費用を支払う必要がある。一般的にロイヤリティの支払い方法には、「イニシャル費」、「ランニング費」および「イニシャル費+ランニング費」の3タイプがあり、契約時に明確にしておく必要がある。

イニシャル費： ライセンス費として、最初に一度だけロイヤリティ費を支払う。

ランニング費： 1回ごとの検査に対してロイヤリティを支払うもので、検査費用の%で支払う。

イニシャル費+ランニング費： 初期にロイヤリティを支払い、且つ、検査時にも1回ごとのロイヤリティを支払う。

6. DNA鑑定の品質確保

DNA鑑定の実施にあたってISOの取得、また、検査を実施する検査技術者の技術水準を維持するなど、品質を確保することが必要である。

6. 1 ISOの取得

DNA鑑定を実施する機関は、国際水準の品質保証を確保するため、ISOを取得することが望ましい。

ISO 9001：品質保証の認証

ISO 17025：検査所の認定

6. 2 技師の育成

DNA鑑定の検査を実施する技師の水準を確保するため、資格制度を設け、検査する技師の技術水準を基準化する。さらに、技術を維持するための仕掛けを設け、変化するDNA鑑定技術に対応できるようにする。

7. 品種識別マニュアルの書き方

【基本的な書き方】

- 1) 表現は大きいや暖かいなどの曖昧な表現ではなく、 $XXX \pm YY$ や $XX^{\circ}C \sim XX^{\circ}C$ の様に数値で表す。色が必要なときは、写真などで貼り付けることが望ましい。
- 2) マニュアル使用の対象者は、当該種を扱った経験の無い検査技師であることを前提に記載する。

【目次】

1. 適用範囲（具体的な適用の範囲や目的を述べる）

このマニュアルで検査できる対象範囲を記載する。

例：北海道立十勝農業試験場で保存している小豆が対象である。対象試料は粒であり、加工品は対象としていない。

2. 一般事項（識別に必要とされる一般的な規格、指針、ガイドなどがあれば記載する） 一般的に注意しておく事項について記載する。

例：

- ・ 本技術については、技術開発元の〇〇が特許出願中（出願番号 XXXX）であるため、業務利用については出願者の許諾が必要である。
- ・ 品種DNAと被検体DNAとの相対値での検査でおこなうこと。
- ・ JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 改訂第2版
（平成14年6月20日 （独）農林数遺産消費技術センター）を参照。

3. 測定の方法（測定の方法を簡潔に述べる。識別能力にも言及する）

DNAマーカー及び識別方法の原理について記載する。

例：

- ・ 〇〇を利用した品種特異的マーカーの測定法。××種類の品種識別が可能。
（以下、具体的な品種名を列挙）

4. 識別方法（具体的な識別方法名を記載する）

識別方法の手段について記載する。

例：

- ・ 本技術は、作物の進化過程において発生した、ゲノム上の品種特異的な short sequence repeat (SSR) マーカーの反復回数の違いを、SSRを含んだゲノム領域の増幅鎖長の違いにより識別する、SSR法である。

4. 1 方法の要旨

この方法を用いた趣旨を記載する。

例：

- ・ 近年増加しつつある海外からの〇〇の輸入に際し、国内生産者の育成者権保護のために、類似品種の識別の必要性が増大している。輸入品の場合、輸送・保存のための加工処理により DNA が断片化する場合が多い。SSR 法はゲノム DNA の非常に短い領域のみを検査対象とするため、断片化した DNA でも、高感度かつ高精度に品種識別が可能である。また、本法において利用する××種類の SSR マーカーは品種ごとの多型性が高く、多型間のマーカーサイズの違いも大きいいため、相互に明確な識別が可能である。

4. 2 検査試料

検査試料の種類および量や、入手先の選定理由について記載する。

例：

- ・ 〇〇の葉、子実、葉柄を検査試料対象とし、病害や虫害等の損傷のない健全な組織を用いる。1 サンプルは1 葉、1 子実、または1 本の葉柄（各××グラム程度）とし、複数の検査試料を複数回検査する。検査試料は、依頼元より提供された。基準とする〇〇は、△△研究所より、凍結葉を入手する。入手した検査試料は、-20℃以下に冷凍保存する。

4. 3 購入試薬

購入する試薬を記載する。

例：

- ・ エタノール（96-100%）（和光純薬、Cat No：057-00451）
- ・ マーカーA 特異的プライマーペア（受託会社に合成を発注）

A-F：GACTCGATAGTTACGATC

A-R：TCAGTTACGATCGAGCTA

4. 4 調製試薬

調整・保存方法を記載する。

例：

- ・ マーカー特異的プライマー

滅菌蒸留水を用いて各 10pmol/ μ l に調製。1.5ml チューブに 100 μ l ずつ分注し、-20℃以下で凍結保存。一度検査に用いたチューブに残った溶液は破棄。

4. 5 機器・プログラム

使用する機材を記載する。

例：

- ・ 粉砕器：本法では、水分含量の高い試料に適したものを用いる。分解洗浄、滅菌が出来るものが望ましい。△△は DNA を分解するため使用してはならない。
- ・ DNA 溶液濃縮装置：（品名）遠心濃縮機 （メーカー・型番）TOMY CC-105

4. 6 実験操作

色々な方式があると思われるが、下記の趣旨に従って記載すること。また、各工程において、実験時の注意事項を記載すること。（例えば、泡を取り除いてから処理するなど）

4. 6. 1 操作準備作業

基準を設けて実施する。

例：

- ・ 安全確保：検査者は、白衣、防護用眼鏡、ゴム手袋を着用する。
- ・ 実験準備：恒温槽を〇〇℃に調整しておく。

4. 6. 2 操作場所

実験する場所を記載する。

例：

- ・ 有機溶媒の分注操作はドラフト内で行う。
- ・ DNA 抽出と PCR 増幅反応は別室で行う。

4. 6. 3 試薬及び器具

使用する試薬や機器の種類を記載する。検査の各過程に必要なものをすべて列挙する。

例：

購入試薬

・ DNA 合成酵素 品名：KOD FX メーカー・型番：TOYOBO KFX-101

調整試薬

・ 電気泳動溶液

1) 2000ml プラスチック体積計で超純水 1960ml を計量し、2000ml プラスチックびんに入れる。

2) 50ml ピペットで 50X TAE 40ml を計量し、超純水に加える。

3) 2000ml プラスチックびんの蓋をしっかりと閉め、20 回転倒混和し、電気泳動溶液とする。

(室温で 1 カ月保存可能)

4. 6. 4 試験材料の取り出し

マーカー開発に使用した株や自己検証に用いた株とその調達先を記載する。

4. 6. 5 DNA の抽出操作

操作手順を記載する。

「試料の 2～3 倍程度」、「〇〇の一部を別に取り」などの曖昧な表現を避け、「試料重量の 2.5 倍」、「〇〇の $\times \times \mu\text{l}$ を微量分注器で別の 1.5ml チューブに取り分け」など、全ての操作について、具体的な操作が迷いなくできる表現にする。

4. 6. 6 PCR 増幅操作

DNA の増幅方法を記載する。(コントロールを入れて確認する)

コントロールは何をどれだけどのように用意するか、なども具体的に記載する。

4. 6. 7 DNA マーカーの検出方法について説明する。

電気泳動による DNA の分離での検出や、塩基配列読み取りなどの方法の種類、コントロールには何をどれだけどのように用いるか、なども、数量的な表現で明確に記載する。

検出の有無を判断する場合には、たとえば、「〇〇機の $\times \times$ の条件における読み取り結果のピーク値が $\Delta\Delta$ 以上」など、その根拠を明確にする。

4. 6. 8 データ解析、判定

複数回の実験を実施してデータを解析する。

判定基準を明確に記載する。基準値との比較をする場合には、基準値の定義と不確かさおよび検査値とその不確かさを明確に記載する。基準値を複数設定する場合には、それらの利用法とその根拠を記載する。「実験によっては」のでは、正確な判定はできない。

複数の基準値を解析や判定に用いる場合には、その必要性の根拠、用い方などを具体的に明確に記載する。

4. 6. 9 実験操作フロー図

実験手順のジョブフローを記載する。

サンプルから DNA 抽出、識別用反応、識別操作、判定までの全体の流れを、方法の名称（PCR、DNA シーケンサーによる鎖長解析など）とともに 1 枚の図にする。上から下へ、矢印で各作業をつなぐ。

5、トラブルシューティング

実験時のトラブル対策についての Q & A を、上記本文中の記載に対応して記述する。

例：

- ・ DNA 濃度が $○○\text{ng}/\mu\text{l}$ に満たない場合

エタノール沈殿で濃縮を行う。

具体的には、 $××\mu\text{l}$ の $\Delta\Delta$ を加え、・・・

(本文の手順中では「DNA 濃度が $○○\text{ng}/\mu\text{l}$ 以上であることを確認後」などと記載があり、脚注などで、「DNA 濃度が $○○\text{ng}/\mu\text{l}$ に満たない場合についてはトラブルシューティング参照のこと」と書いておくことが前提)

6、是正処置

是正依頼票など是正が必要と思われる事項についての情報収集をおこなう仕組みを記載する。

例：

- ・ 実験操作内容改善、プロトコールの不明箇所改善、手法改善等に役立てるため、マニュアル使用者に「問題票（別紙 001）」を配布し、記入してもらって回収する。記載された事項について、是正処置担当者は、原因を究明し、適切な是正処置を選択して、是正依頼票を作成する。文書発行責任者の承認後、是正依頼票をマニュアル作成者へ渡し、マニュアル作成者はマニュアルの是正を行う。マニュアル作成者が是正処置を行った場合、審査、承認を経て本プロトコールの「変更改訂履歴」へ内容を記載し、マニュアル使用者へ報告する。是正処置担当者は、是正されたマニュアルの使用者に聞き取りを行い、是正処置が効果的に行われて問題が解決されたかどうかを監視する。問題が解決されない場合は再度、是正処置を行う。

実験操作については操作の順番に従った操作フロー図（作業ブロック図）を付けることが推奨される。

付属文書：（本文規定以外に参考になる文書や文献があればそれらを付属文書として番号をつけて記述する。）

参考文献：（本文での引用文献名、参考文献名とそれらの引用番号を本文に1）、2）のようにつけてその文献名称を順番にリストアップする）

添付資料 2

マイタケの DNA 品種識別マニュアル

SSR マーカーによるマイタケの DNA 品種識別マニュアル

ホクト株式会社きのこ総合研究所

Ver3.4
2016/01/28

マイタケの DNA 品種識別マニュアルの目次

目次

1. 適用範囲
2. 一般事項
3. 測定の原理
4. 識別方法
 4. 1 方法の要旨
 4. 2 検査試料
 4. 3 購入試薬
 4. 4 調製試薬
 4. 5 機器・プログラム
 4. 6 実験操作
 4. 6. 1 操作準備作業
 4. 6. 2 操作場所
 4. 6. 3 試薬および器具
 4. 6. 4 試験材料の取り出し
 4. 6. 5 DNA 抽出操作
 4. 6. 6 DNA の定量
 4. 6. 7 PCR 増幅操作
 4. 6. 8 PCR 産物の増幅確認試験
 4. 6. 9 SSR マーカーの検出方法
 4. 6. 10 データ解析、判定
 4. 6. 11 実験操作フロー図
5. トラブルシューティング
6. 是正処理

参考データ：

1. マイタケ品種識別に用いる 6 種類の SSR マーカーの詳細
2. 6 種類の SSR マーカーによる 30 品種のフラグメント長
3. 参考文献

参考資料：

農林水産省品種登録ホームページより「植物品種識別における品種同定理論」

http://www.hinsyu.maff.go.jp/pvr/dna_manual/betten.pdf

独立行政法人 種苗管理センターより「DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン」

<http://www.ncss.go.jp/main/DNA/DNAguideline.pdf>

この目次リストは ISO 規格や JIS 規格の試験方法の様式に準拠したものです。

1. 適用範囲

マイタケ (*Grifola frondosa*) は、1970 年代半ば頃に人工栽培方法が確立された。最初に栽培が行われた頃は、原木栽培で生産されたが、1990 年代頃から菌床栽培方法が普及し安価な菌床栽培によるものが広く流通している。国内生産量が増加し、現在では多くの品種が農林水産省に登録されるに至った。

品種登録では、マイタケの重要な形質に基づいて品種が判断されるため、栽培試験による特性調査を行う必要がある。そのため品種を識別するためには数ヶ月の期間を要する。品種識別の簡易的な方法として、審査基準 (<http://www.hinsyu.maff.go.jp/>) にあるように、対峙培養試験が有効とされているが、対峙培養試験であっても品種を識別するには 1 ヶ月程度要する。税関で育成者権侵害物品を取り締まるためには、短期間で侵害嫌疑貨物を疎明することが必要となる。

そこで、マイタケの品種識別法を確立することを目的に、マイタケにおいて多数の SSR (Simple Sequence Repeat の略、別名マイクロサテライト) 領域を同定し、そのうちの 6 種類の品種識別に有用な SSR マーカーを開発した。このマーカーにより当社保有の登録品種「Grifon120 (品種登録番号: 第 18914 号)」と、持ち込まれたサンプル品種との異同の鑑定が可能である。

基準品種 : Grifon120 (品種登録番号 : 第 18914 号)

被検査物 : 子実体 菌糸体 (マイタケ加工品は対象外)



図1 子実体 (左図) と菌糸体 (右図)

2. 一般事項

本 DNA 品種識別マニュアルは、ホクト株式会社きのこ総合研究所 (長野県長野市下駒沢 800-8) で維持・栽培されている既存栽培品種の 20 品種 (Grifon120、MH182115 (ホクト MY-75 号)、MH182082 (ホクト MY-95 号)、MH182116 (ホクト NT-100 号菌)、MH182117 (ホクト NT-115 号菌)、MH182240 (Grifon1488)、MH182243 (Grifon-7)、MH182011 (森 51 号菌)、MH182012、MH182022、MH182041、MH182156、MH182157、MH182166、MH182168、MH182169、MH182170、MH182171、MH182172、MH182216)、野生品種である 10 品種 (MH182015、MH182099、MH182190、MH182191、MH182192、MH182193、MH182194、MH182214、MH182215、MH182223) の計 30 品種を用いて、解析・作成されたものである。

本 DNA 品種識別マニュアルは、子実体または菌糸体から抽出した DNA を用いて、SSR マーカーによる分析法を確立し、マニュアルとして作成したものである。

3. 測定の原理

SSR とは、Simple Sequence Repeat の略称であり、法医学では、Short Tandem Repeat と呼ばれ、STR と略称されている。SSR 分析は、2～数塩基の反復配列からなる SSR 領域を特異的に増幅するプライマーを用い、PCR 法で増幅した DNA 断片の長さの差異（遺伝子型）を検出する方法である。反復配列領域は、その反復回数に突然変異を起こしやすいとされており、DNA 断片の長さを高精度で分析することにより、近縁な品種間でも判別が可能である。その測定手順は、

- 1) マイタケのサンプルから、ゲノム DNA を抽出する。
- 2) SSR 領域を特異的に増幅するプライマーを用いて、マイタケのサンプルから抽出したゲノム DNA と Grifon120 のゲノム DNA を鋳型にして PCR 増幅を行う。PCR の際に、一方のプライマーの 5' 端に蛍光標識したものをを用いる。
- 3) 蛍光 DNA シーケンサーを用いて、PCR 増幅産物を電気泳動で分離し、検出する。
- 4) 内部標準のサイズスタンダードを基に、フラグメント解析用ソフトウェアを用いて、PCR 増幅産物の長さで遺伝子型を決定する。
- 5) 矛盾が生じたときは、2)～4) の反復実験を行い試験結果に矛盾がないか検討する。
(トラブルシューティング参照)
- 6) サンプルのマイタケは Grifon120 を基準として、品種識別をおこなう。

4. 識別方法

DNA マーカーの一種である SSR マーカー 6 種類を用いた識別方法である。

4. 1 方法の要旨

ゲノム中に豊富に散在している 4 塩基以上の反復配列を挟み込むように設計したプライマーを用いて、PCR 増幅断片長の差異を蛍光 DNA シーケンサーで分析する。SSR 領域はその反復回数に突然変異を起こやすく、塩基置換と比較して変異頻度が 1～2 ケタ大きいとされている。

本マニュアルで利用する 6 種類の SSR マーカーは、ホクト株式会社きのこ総合研究所保有菌株「Grifon120」のゲノム DNA 配列を次世代シーケンサーによって決定し、得られた配列を基に 4 塩基以上の反復配列を探索し、開発したものである。「表 1. マイタケ品種識別に用いる 6 種類の SSR マーカーの特徴」と「参考データ 1. マイタケ品種識別に用いる 6 種類の SSR マーカーの詳細」に詳細なデータを記している。

表1.マイタケ品種識別に用いる6種類のSSRマーカーの特徴

SSR マーカー	アニー リング 温度(°C)	プライマー配列 (5'-3')	
		Forward	Reverse
msGf-1	59	CGGACTCACTGTCGCATCTA	TACAACCTTCGTCGCTGCGT
msGf-2	59	AGACGAAGACGATGTCGATGT	ACCTCACATTGACACTGC
msGf-3	59	AAGGTGTTCGAACGAGATCA	TTGTACCAGCACATTCGAGC
msGf-4	59	ACATACACGGCAGCCTGAG	AGCGTTCTGGTATGTTGCAC
msGf-5	59	ATGGTTTCCACACGGTGAGT	CGATATCGCTCTTCCCTACG
msGf-6	59	TGACTTTCCTGAAAGGCGAC	ACGAGCCATCCCTACGGT

4. 2 検査試料

マイタケの子実体、菌糸体を検査対象試料とし、病害、虫害、その他の被害を受けていない健全な組織を用いる。1 サンプル 1 子実体、または 1 菌糸体とする。

基準とする Grifon120 の DNA、もしくは子実体、菌糸体は、ホクト株式会社きのこ総合研究所より入手する。入手した検査試料は、4℃で保存する。

4. 3 購入試薬

- ・ フォルテクター II (消毒用エタノール)(日本化薬フードテクノ株式会社)
- ・ Plant Geno-DNA-TemplateTM (Geno Technology社, code: 786-135)
 - Template Extraction Buffer
 - pink RESIN
 - Wash- I
 - Wash- II (要調製)
 - スピンカラム
 - TE Buffer
 - RNase
- ・ クロロホルム(Wako, code:038-02606)
- ・ エタノール(99.5) (Wako, code:057-00456)
- ・ SSR プライマーセット (脱塩精製以上の精製度)

表 1 に記した msGf-1、msGf-2、msGf-3、msGf-4、msGf-5、msGf-6 の 6 種類のマーカーを使用する。蛍光プライマーの合成には、アプライドバイオシステムズ社受託合成サービスの DNA フラグメント解析用カスタム蛍光プライマーを利用する。フォワードプライマーの 5'端に NED で蛍光ラベルしたものを用いる。リバーズプライマーは、ノンラベルとし、オプションでテイル配列を付ける。
- ・ AmpliTaq Gold 360 Master Mix (アプライドバイオシステムズ社)
- ・ ゲルローディング溶液 (シグマアルドリッチジャパン社)
- ・ DNA マーカー 100bp DNA Ladder One (ナカライテスク社)
- ・ TBE バッファー (10x) (Tris-Borate-EDTA buffer 10x) (シグマアルドリッチジ

ジャパン社)

- Agarose 900 (株式会社 同仁化学研究所)
- エチジウムブロマイド粉末 (Sigma Aldrich)
- Genetic Analyzer Buffer with EDTA (アプライドバイオシステムズ社)
- Hi-Di Formamide (アプライドバイオシステムズ社)
- 3130 POP-7 ポリマー (アプライドバイオシステムズ社)
- 3100/3130xl 50cm Capillary Array (61cm×50μm、アプライドバイオシステムズ社)
- GeneScan 600LIZ サイズスタンダード (アプライドバイオシステムズ社)

4. 4 調製試薬

• SSR プライマー溶液

6 組の蛍光ラベルされたフォワードプライマーとリバースプライマーのペアを、それぞれ 10pmol/μL の濃度になるように滅菌超純水に溶解した溶液を、6 マーカーそれぞれに対応して用意する。保存は-20℃以下で冷凍保存する。

• Wash- II

使用前に 99.5%エタノールを 80ml 加え、ストック溶液として保存する。保存は説明書に記載されている方法に従う。

• TBE バッファー (10x)

使用時に、超純水で 10 倍希釈したものを以後使用する TBE バッファーとして用いる。常温保存可能。

• 70%エタノール (DNA 抽出用)

99.5%エタノールを滅菌超純水希釈して 70%エタノールを調製する。常温保存可能。

• エチジウムブロマイド溶液 (ゲル染色用)

滅菌超純水で 10 mg/ml にエチジウムブロマイド粉末を希釈する。その希釈液を 0.5 ug/mL (20000 倍希釈) になるよう TBE バッファー (10 倍希釈した調整済みの溶液) へ滴下したものを染色用のエチジウムブロマイド溶液とする。遮光して常温で保存する。

4. 5 機器・プログラム

- フリーザー (-20℃以下)
- 凍結乾燥機 (EYELA FDU-1100)
- ボルテックスミキサー
- 高速冷却遠心機 (1.5-2 ml チューブが利用可能なもの)
- 分光光度計 (Thermo Scientific 社 Multiskan GO)
- PCR Thermal cycler (BIO-RAD 社 C1000 Thermal Cycler)
- 電気泳動装置 (アドバンス社、Mupid)
- 紫外線照射装置
- 振盪装置
- 電子天秤

- ・ オートクレーブ
- ・ 超純水製造装置
- ・ 恒温機（ヤマト科学株式会社 DG400）
- ・ Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer（アプライドバイオシステムズ社）
もしくはこれに準じる蛍光 DNA シーケンサー
- ・ Gene Mapper ソフトウェア（アプライドバイオシステムズ社）

※上記の機器に関して、その機器と同等の機能および性能を有するものであればメーカーなどは問わない。

4. 6 実験操作

4. 6. 1 操作準備作業

DNA 実験操作は、実験開始前に実験台上を 70%エタノールで消毒する。また、無菌作業が必要なとき、主に 4. 6. 4 の菌糸体を検査対象試料とする場合の作業時はクリーンベンチを使用する。実験操作時は、白衣、ゴム手袋、眼鏡、上履きを着用する。

4. 6. 2 操作場所

DNA 抽出から PCR 増幅、DNA シーケンサー分析まで、供試サンプル以外 の DNA が混入しないクリーンな環境で操作する。

4. 6. 3 試薬および器具

- ・ 上記の購入試薬、調製試薬
- ・ 滅菌超純水
- ・ ポテトブドウ糖寒天培地（分包：造粒タイプ）（ニッスイ株式会社）
- ・ ラップ
- ・ アルミホイル
- ・ 輪ゴム
- ・ 新聞紙
- ・ 9cm 滅菌シャーレ
- ・ スパーテル
- ・ 白金耳
- ・ メス
- ・ ピンセット
- ・ ステンビーカー(容量 1000ml)
- ・ ソコレックス SH 容量 5ml(連続式自動分注器)（アズワン株式会社）
- ・ 1.5 ml チューブ
- ・ 2 ml チューブ
- ・ パラフィンフィルム
- ・ ホモジナイゼーション用ペッスル（フナコシ社）
- ・ マイクロピペット各種容量
- ・ マイクロピペット用チップ

- ・ 96 穴 PCR プレートまたは 8 連 PCR チューブ（アプライドバイオシステムズ社）
- ・ PCR 用 96 穴シーリングマット
- ・ 96 穴プレートセプター

純水は電気伝導率 0.0056 mS/m（25℃）以下になるように脱イオン化されたものをさらに精製した超純水を用いる。滅菌水は超純水を 120℃、20 分間オートクレーブで処理したものを用いる。

特別の指定がある試薬はそれに従い、その他については JIS 特級試薬（あるいは同等のグレード）を用いること。

チップやチューブ類は、滅菌済みのものを用い、必ず使い捨てとする。マイクロピペットのチップ類、その他マイクロピペット類及び 1.5 ml と 2.0 ml 等のチューブは、オートクレーブ滅菌(120℃、20 分)し、その後、60℃に設定した恒温器に入れ、完全に乾燥してから用いる。なお、マイクロピペットでオートクレーブ不可能なものは 70%エタノールを用いて外装を丁寧に拭いてから用いることとする。

4. 6. 4 試験材料の取り出し

サンプルの取り出し・取り扱い時には、サンプル間で相互に混入しないように、サンプル毎に作業台や電子天秤等の清掃を十分に行うとともに、操作に細心の注意を払う。

子実体を検査対象試料とする場合、汚れていない子実体の内側を使用するため、根元から傘を一枚切り取る。根元の外皮を削ぐように切り落とし内側を露出させる。それをメスとピンセットを用いて 5mm 角程度の大きさに切り分けて 1.5 または 2ml のチューブに 8 粒程度入れ、-20℃以下のフリーザーで凍結させ、DNA 抽出直前に凍結乾燥し、4. 6. 5 の DNA 抽出操作に用いる。

菌糸体を検査対象試料とする場合、まず、ポテトデキストロース（PDA）平板培地を 9cm シャーレに作製する。ポテトブドウ糖寒天培地分包 1 袋をステンレスビーカーに開け、超純水 400ml を加えてよく混和する。ラップをし、アルミホイルで蓋をして輪ゴムでとめる。ソコレックス SH をアルミホイルで包み、さらに新聞紙で全体を包み輪ゴムでとめる。ポテトブドウ糖寒天培地とソコレックス SH をオートクレーブで 121℃、15 分間高圧蒸気滅菌をする。培地が 60℃まで冷めたらクリーンベンチ内で、ソコレックス SH を用いて、ポテトブドウ糖寒天培地を 9cm 滅菌シャーレに 16ml ずつ分注する。25 枚ほど作製できる。培地が固まるまで 1 時間ほどクリーンベンチ内で静置する。作製した PDA 平板培地 4 枚(予備 1 枚含む)の中央部付近に、クリーンベンチ内で菌糸体または子実体の小片を接種し、25℃、3 週間培養後、気中菌糸を集菌する（0.1g-0.5g で可、0.3g が適量）。まず、スパーテルを用いて菌糸を集める。このとき、寒天培地を削り取らないように注意する。次に、集めた菌糸を 1.5 または 2ml チューブに入れる。チューブ 1 本に PDA 平板培地 3 枚分の気中菌糸を集菌し、-20℃以下のフリーザーで凍結させ、DNA 抽出直前に凍結

乾燥し、4. 6. 5 の DNA 抽出操作に用いる。

いずれの場合も、DNA 抽出の際には、凍結乾燥機からサンプルを出して、できる限り短時間(15 分以内)に扱うことが重要である。室温で長時間放置すると吸湿し、糖質がでてくるため、粉砕が困難になる。なお、凍結サンプルを保存したい場合は-20℃以上のフリーザーで、チューブにパラフィンフィルムをまいて保存するようにする。

4. 6. 5 DNA 抽出操作

基本操作は、Geno Technology 社の Plant Geno-DNA-Template™ のプロトコルに従っている。

1. 4.6.4 で 1.5 または 2ml チューブに作製した凍結サンプルを凍結乾燥し、ホモジナイゼーション用ペッスルを用いてそのサンプルを粉状になるまで丁寧に粉砕する。
2. 600μl の Template Extraction Buffer を添加し、ボルテックスミキサーを使用して Buffer とサンプルが均一になるよう混合させ、室温で 20 分間放置する。
3. 200μl のクロロホルムを添加し、数回反転させて混合する。
4. 冷却遠心機で、15,000 x g、15 分間、10℃で遠心する。(この遠心中に、恒温機を 60℃に設定し、その中に TE buffer を入れて温めておく)
5. 4 の遠心分離で得られた上清を、新しい 1.5ml チューブに回収し、等量(600μl)の 70%エタノールを添加する。
上清を回収する際、上清と沈殿したクロロホルムを混合しないために、中間層にある粉砕した子実体または菌糸体の凝集物に触れないよう静かに上清を吸い取るようにする。また、70%エタノールを添加する際、上清との境界を乱さないよう、チューブ壁を伝わらせて静かに重層する。
6. 40μl の *pink* RESIN を添加後、数回反転させて混合し、室温で 5 分間放置。(ときどき混合して懸濁状態を保つ)
7. 15,000xg、5 分間、10℃で遠心し、デカンテーションして上清を除去する。
8. チューブをタッピングして沈殿をほぐし(ボルテックスミキサーを用いてはならない)500μl の Wash- I を添加して、*pink* RESIN をタッピングで懸濁する。
9. 15,000xg、5 分間、10℃で遠心し、上清を除去する。
10. 新しい 1.5ml チューブにスピнкаラムをセットし、そこに 500μl の Wash- II に再懸濁した *pink* RESIN を添加する。
11. 3,600xg、1 分間室温で遠心し、溶出された洗液を除去し、調製済みの Wash- II で同様に、さらに 2 回遠心洗浄する。2 回目の遠心は、カラムから洗液を完全に除去するよう、10 分間行う。
12. スピнкаラムを新しい 1.5ml チューブに移し、1μl の RNase と 50μl の TE Buffer (50~60℃)を添加して、ピペットチップを用いて RESIN を懸濁し、室温で 10 分間静置する。

13. 3,600xg、10 分間、室温で遠心し、DNA 溶出液を得る。DNA 溶液は 4°C 保存する。長期保存の場合は -20°C 保存し、凍結融解を繰り返さないように注意する。

4. 6. 6 DNA の定量

抽出したDNAの定量方法には、アガロースなどの電気泳動による分析や分光光度計による分析がある。本マニュアルでは、分光光度計による定量を行う。本分析については通常の分子生物実験でのDNA濃度測定法に準じたものであればよい。

1. 5 μ l のサンプル DNA に 995 μ l の滅菌超純水を添加し、DNA 溶液を 1/200 に希釈する。
2. 260nm と 280nm の吸光度を測定する(図 2 参照)。
260nm/280nm の値の比が 1.8-2.0 になることを確認する(トラブルシューティング参照)。
DNA濃度計算は吸光度 1 の時の濃度が50 μ g/ml であるので、
DNA 濃度 (μ g/ml) = 260nmの吸光度 $\times$ 50 $\times$ 200で計算できる。
3. SSR分析用に、50-100ng/ μ lの調製DNA溶液を、滅菌超純水を溶媒として作成する。
4. 元の DNA 溶液および調製 DNA 溶液は-20°C以下で凍結保存し、凍結・融解を繰り返して使用するのはこの調製 DNA 溶液とする。調製 DNA 溶液がなくなるまたは調製 DNA 溶液を作成してから 1 ヶ月程度経過した際に元の DNA 溶液を再度融解し、調製 DNA 溶液を作成するようにする。

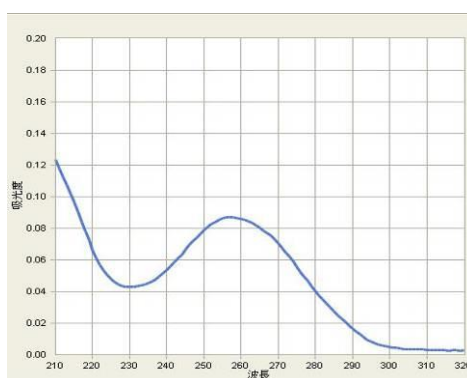


図 2 分光光度計を用いた DNA の波長

このような山成の形状になり、260nm付近にピークがくる形が望ましい

なお、NanoDrop などの微量サンプル測定機器による DNA 吸光度の測定でも同様の結果が得られればサンプルを使用してよい。

4. 6. 7 PCR 増幅操作

PCR 増幅操作は以下の通りである。なお、PCR 実験では、微量の鋳型 DNA であっても増幅されるので、目的以外の DNA の混入を防ぐとともに、試料の酵素的分解を防ぐため、人間の皮膚表面から分泌されている DNase の混入を防止しなければならない。コンタミネーション防止のため、実験の際はマスクと手袋を必ず着用する。また、PCR 反応液の調製はすべて氷上で行う。

1. PCR反応液の調製（1 サンプル分）

サンプル DNA 溶液（50-100 ng/μl）	1.0 μl
SSR プライマー溶液	1.0 μl
AmpliTaq Gold 360 Master Mix	10.0 μl
滅菌超純水	8.0 μl
合計	20.0 μl

なお、SSR マーカー毎の組成の誤差を防ぐために、30 サンプル分+ロス分を見込んだ量(31 サンプル分)の、SSR プライマー溶液を除く試薬の混合液を予め作成し、チューブに 1 反応分ずつの液量を分注してから、各々のチューブにプライマー溶液を加えるようにする。

2. PCR システムを用いて、以下のプログラムで PCR 反応を行う。

※不必要な PCR 産物の増幅を最小限に抑えるため、ステップダウン PCR 法を用いて行う。これによりフラグメント解析が容易になる。

- ・ 95℃10 分間熱変性。
- ・ 95℃30 秒間、62℃30 秒間、72℃15 秒間の反応を、5 サイクル。
- ・ 95℃30 秒間、60℃30 秒間、72℃15 秒間の反応を、5 サイクル。
- ・ 95℃30 秒間、58℃30 秒間、72℃15 秒間の反応を、35 サイクル。
- ・ 72℃7 分間の反応後、4℃で∞。

3. 反応終了後にサンプルを保存する場合は、プライマーの蛍光標識を失活させないようにするためアルミホイルで遮光し、-20℃で保存する。

4. 6. 8 PCR 産物の増幅確認試験

4. 6. 7 で作成した PCR 産物の増幅を確認するため、アガロースゲル電気泳動を行う。増幅が確認された場合は 4. 6. 9 へ、増幅がみられなかった場合にはトラブルシューティングを参照し、再度 4. 6. 7 の PCR 増幅操作を行い、産物を得るようにする。

1. 泳動用アガロースゲルと泳動用バッファの作成

TBE バッファを、電気泳動装置に入れ、また 200ml 程度の三角フラスコに TBE バッファ 70ml と Agarose 900 を 1.05mg 加えて濃度が 1.5% のゲルを作成する。フラスコにラップをかけて電子レンジで溶解させる。このとき、

突沸が起きないように 500W を数十秒単位でかけながら内部を確認する。一度かけたら、アガロースを融解させるようにゆっくりとフラスコを回すように混ぜる。内部にアガロースの粒が見えなくなったら、ゲル板に溶液を流し込んで固まるまで静置する。

なお、30 品種の泳動を効率よく行うには、Mupid-ex モデルの場合、ゲルトレイ大（ゲルサイズ 125mm(W)×123mm(L)）で 1 枚のゲルを作成し、ウェルを 36 個以上できるようにコームを差してゲルを作成する。Mupid-2 モデルの場合、ゲルトレイ L(ゲルサイズ 106mm(W)×60mm(L))を 2 枚、それぞれ 17 個のウェルができるようにコームを差してゲルを作成する。

2. サンプルの泳動

ゲルが作成できたら、電気泳動装置に入れてゲルが浸ることを確認してからアプライを行う。サンプルの一部（5 μ l）を未使用の PCR チューブまたは 8 連チューブに移し、そこにゲルローディング溶液を 1 μ l 加えて計 6 μ l とする。一番左に 100bp のラダーマーカを 5 μ l アプライし、その他のサンプルも順次アプライする。アプライが完了したら、100V25 分または 125V20 分で泳動を行う。この条件に関してだが、バンドがしっかり分離でき、産物の有無が確認できればよいので電圧と時間は適宜変更してもかまわない。

3. ゲルの染色

泳動が完了したら、300ml の純水にエチジウムブロマイド溶液を 3~5 μ l 混合したゲル染色液を作成し、その中に泳動したゲルを浸して 20~30 分ほど振盪し、染色する。染色後、手袋をした手でゲルを紫外線照射装置にのせ、254nm や 366nm などの紫外線を照射する。バンドが確認されたらそのサンプルを 4. 6. 9 のフラグメント解析に用いる。（トラブルシューティング参照）

4. 6. 9 SSR マーカーの検出方法

前項で得た SSR マーカーによる PCR 産物を DNA シーケンサーで分析し、フラグメント解析を行う。基本的分析操作は、アプライドバイオシステムズ社のフラグメント解析のプロトコルに従って行う。

1. 前項で得た PCR 産物を、滅菌超純水で 100 倍に希釈する。※ただし、条件によりフラグメント解析で得られる値が変わってくる場合が多いため、希釈倍率は PCR の結果および得られたデータを考慮して適した倍率で行う。（15 ページ 2 参照）
2. 1.0 μ l の希釈 PCR 産物、0.5 μ l の 600LIZ サイズスタンダード、10 μ l の Hi-Di ホルムアミドを、96 穴 PCR プレートに入れ混合し、シーリングマットで蓋をする。
3. PCR システムなどを用いて、95℃3 分間熱変性を行った後、直ちに氷上で 5 分間以上静置する。
4. Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer のプロトコルに従い、50cm キャピラリー、POP-7 ポリマー、専用のバッファー（Genetic Analyzer Buffer

with EDTA) を用いて、分析を行う。

5. Gene Mapper ソフトウェアを用いて、結果の解析を行う。

4. 6. 10 データ解析、判定

表 2 に Grifon120 の 6 SSR マーカーの遺伝子型(フラグメント長)を示す。フラグメント長は 600LIZ サイズスタンダードに対しての相対値を表している。また、スラッシュ区切りで 2 つの数字が並んでいるものは、同一プライマーセットで 2 本の鎖長の異なるフラグメントが増幅することをあらわしている。参考データ 2 に、全 6 種類の SSR マーカーでの既存栽培品種の 20 品種 (Grifon120、MH182115、MH182082、MH182116、MH182117、MH182240、MH182243、MH182011、MH182012、MH182022、MH182041、MH182156、MH182157、MH182166、MH182168、MH182169、MH182170、MH182171、MH182172、MH182216)、野生品種である 10 品種 (MH182015、MH182099、MH182190、MH182191、MH182192、MH182193、MH182194、MH182214、MH182215、MH182223) の計 30 品種の 6 SSR マーカーの遺伝子型を示した。この計 30 品種を 6SSR マーカーで識別を行うと、すべての品種を区別することが可能である。

表 2-1 Grifon120 の 6 SSR マーカーの遺伝子型 (フラグメント長)

	SSRマーカー					
	msGf-1	msGf-2	msGf-3	msGf-4	msGf-5	msGf-6
Grifon120	112/136	145/157	167	140	120/144	120/132

※フラグメントが複数検出された箇所は、サイズの大きい方がターゲットとした鎖長である

6SSR マーカーにおける Grifon120 の遺伝子型と全て同じ遺伝子型をもつマイタケサンプルがあれば、同一品種の可能性を疑うことになる。農林水産省品種登録ホームページに記載されている「植物品種識別における品種同定理論」 (http://www.hinsyu.maff.go.jp/pvr/dna_manual/betten.pdf) を参照し(参考資料)、ある持ち込まれた品種 V が Grifon120 のバンドパターンと偶然一致する確率を算出したところ、比較対照品種 30 品種を母集団とし、6 種類の SSR マーカーを用いた場合は、0.0001 の確率であった。この低い確率の下で、もし品種 V が Grifon120 と同じマーカー型を示した場合、同一品種である可能性が高いと考えられる。

なお、表 2-1 に示した遺伝子型は絶対値で表した各マーカーのフラグメント長である。しかし、試験を行う条件や環境によって測定誤差が生じるため、絶対値ではなく、バンド間のフラグメント長差の相対値で判定をおこなう。同一試行回 (比較する菌株の PCR を同時に行い、その産物のフラグメント解析を同一の泳動で行うことを指す) においてはフラグメント長差の数値は保存される (参考資料「DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン」参照)。これにより、誤差を解消し、再現性を確保している。本マニュアルに記載のマーカーに関して、誤差の修正を行った値をまとめたものを表 2-2 にフラグメント長差で示す。

表 2-2 Grifon120 の 6 SSR マーカの遺伝子型 (フラグメントパターン)

	SSRマーカー					
	msGf-1	msGf-2	msGf-3	msGf-4	msGf-5	msGf-6
Grifon120	A/A+24	B/B+12	C	D	E/E+24	F/F+12

試験を開始する前に基準品種のフラグメント長を確認する必要がある。例えば、Grifon120 においてその日に得られた msGf-1 の値が「114/138」であればその値を「A/A+24」として解析を行うこととする。以下同様に、msGf-2 で得られた Grifon120 の値を「B/B+12」、msGf-3 で得られた値を「C」、とアルファベット順に記号化していく。

この結果より、表 2-2 に示したフラグメントパターンを基にして、参考データ 2 の詳細と照らし合わせて品種識別を行うこととする。

SSR マーカーの開発時に、プライマー対の T_m 値、プライマーダイマーやヘアピン構造を考慮して、プライマーを作成している。50℃～63℃までアニーリング温度を検討して、至適アニーリング温度の決定を行い、波形を安定させるためのテイル配列をプライマーに付加している。

以下、データ解析、判定に際しての注意点を記す。

1. まず、全ての蛍光色素を表示して波形を確認する。次に NED の蛍光色素である黄色のピークのみを表示して解析を行う。これにより、PCR 増幅産物の希釈濃度が濃すぎることによって生じるフラグメントの乱れをチェックすることが可能である。サンプル濃度が濃いと、本来フラグメントのピークとして検出されるはずのない色が検出されることがあり、ターゲットのフラグメントの正しい値を表していないことがある。その場合は、原則として高い値を示している上位二本のピークを選びこれを遺伝子型とする。
2. PCR 増幅産物はサイズスタンダードのピークと比較して適正な希釈濃度にする。PCR 増幅産物の希釈濃度が低い場合、サイズスタンダードのピークと比較して、サンプルのピークが低くなる。最も高いフラグメントのピークがサイズスタンダードの 1/3 以下の場合は別の低いフラグメントのピークを見落とす危険があるため、注意が必要である。明確に判断できない場合は、希釈倍率を 2 倍～4 倍程度低くして、濃度のより高い希釈液を作製し直し段落の 4. 6. 9 の 1 から再度調製と分析を行う。また、希釈濃度が濃すぎるとピークの大きさが検出限界を超えてしまい、ピークの先端が表示されない（波形の蛍光強度が大きすぎる）。この場合、フラグメントのサイズデータが正しく表示されないため、4・6・9 の 1 からやり直し、PCR 産物の希釈倍率をさらに 10～50 倍希釈してピークが上限を超えないように調製する。（図 3）
3. サイズスタンダードの波形を確認する。フラグメント解析におけるピークの数値は、サイズスタンダードのピークサイズをもとに作成した検量線によって計算されるため、サイズスタンダードの波形が乱れていると、正しいデータが計算できず、結果が表示されない。よってサイズスタンダードの波形が乱れていた場合は分析をやり直す。また、ピークが検出されているが検量線が引けない場合には、ピーク全体が右方向へシフトしているために規定数のピークが得られていない可能性がある。この場合は 4. 6. 9 の 2 で、サイズスタンダードの濃度を 5～10 分の 1 にすることにより問題を解決できる。

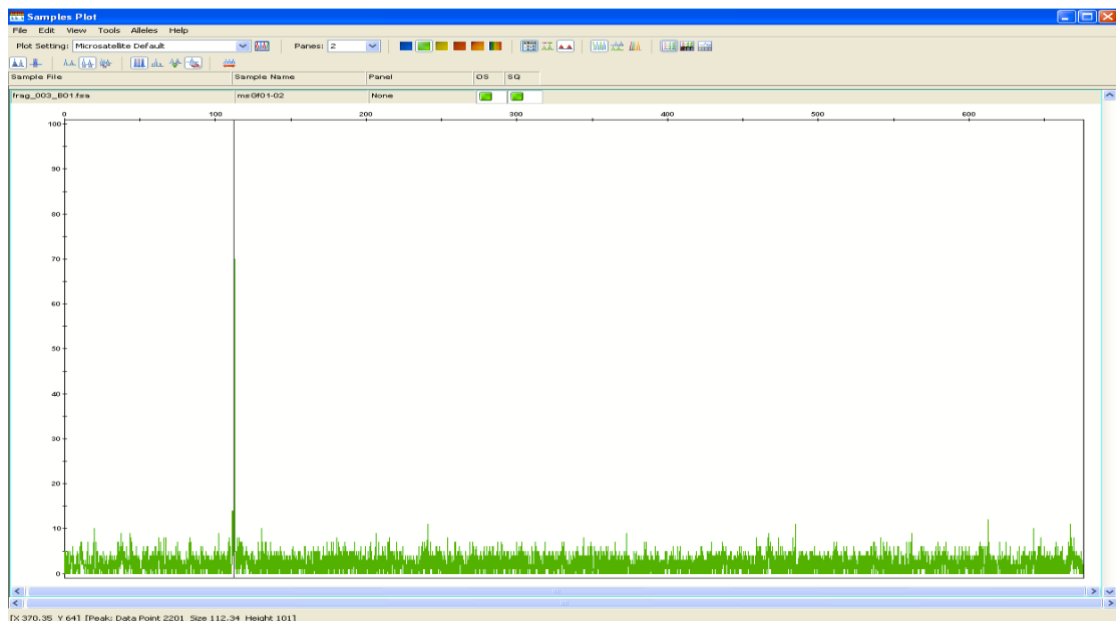


図 3-1 フラグメント解析結果の良い例

ピークが 1 箇所に表示されており、そのピークの値も上限を超えていない。図内の上部に OS, SQ という表示が緑印になっているのはサイズスタンダードの波形、サンプルの波形がともに安定しているということであるため、信頼性の高いデータといえる。

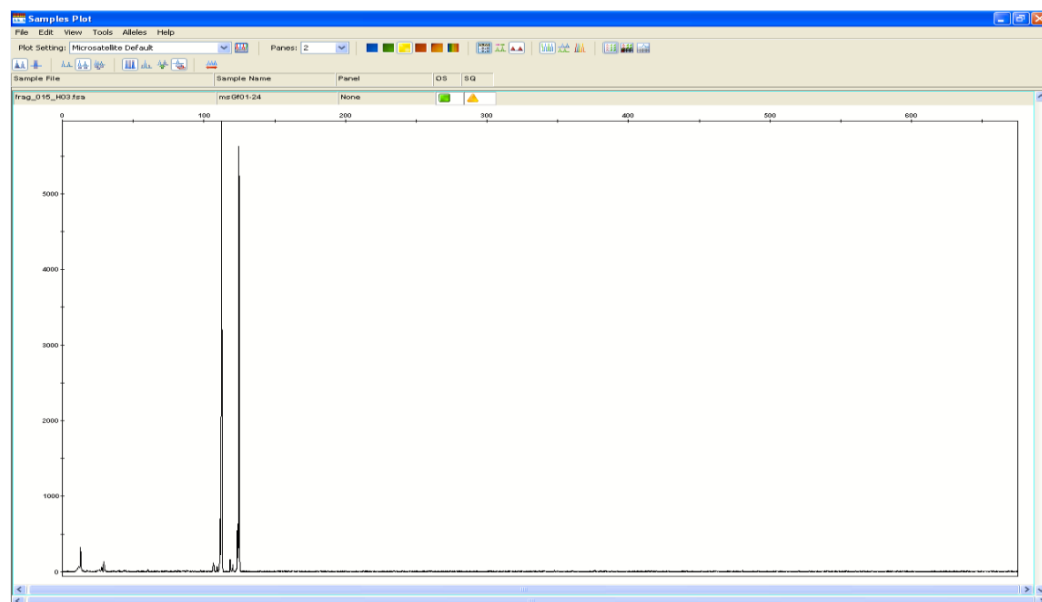


図 3-2 フラグメント解析結果の良くない例

ピークが 2 箇所に表示されているが、ピークの値が 6000 以上の高い値になってしまっている。この場合、非特異的なバンドが存在していたときにピークが 3 本同様の高さとなってしまう見分けがつかなくなる可能性がある。また、ピークが高すぎるためにサンプルの

波形に信頼性がない、ということで黄色い三角印（SQ）が表示されてしまう。
このようにメジャーな2本がはっきりとわかる場合はそのままデータとして用いて問題ないが複数のピークが出てしまって判断できないときは希釈倍率を変更して再度フラグメント解析を行う。なお、フラグメント解析は図 3-1 で見られるピークの高さより、100 程度の蛍光の強さでも問題なく検出できることから、あまりにピークが高いときは希釈倍率をかなり上げて問題ない。

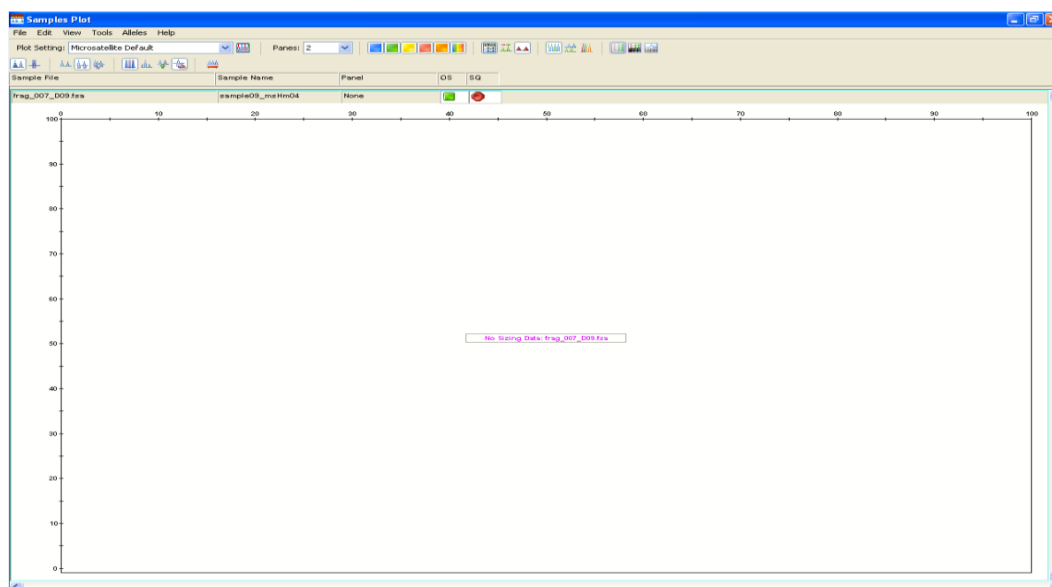


図 3-3 フラグメント解析結果が表示されない例

サンプルの濃度が高すぎるか、サイズスタンダードが何らかの原因で検出されなかった。図の例では SQ に赤い四角が表示されているため、サイズスタンダードが原因となりピークが検出できない状態になっている。サイズスタンダードが濃いために検出できなかった場合は濃度を 1/5～1/10 程度に希釈をして再度解析を試みる。サイズスタンダードが薄すぎて検出できなかった場合は濃度を 3～5 倍程度の容量を用いて再試験する。なお、サイズスタンダードの濃度が濃すぎる場合、LIZ 蛍光（オレンジ色）の波形が図 3-2 の様なピークが出てしまいソフトウェアがピークを検出できなくなる。濃度が低すぎる場合、LIZ 蛍光の波形がすべて強度 100 前後程度になってしまい、同様にピークを検出できない。これらの判断はソフトウェア中の **Size Match Editor** を用いることで可能である。

4. 6. 1 1 実験操作フロー図

サンプル採取	マイタケ子実体もしくは菌糸体 ↓
DNA抽出	Plant Geno-DNA-Template™キットを用いる方法または、同等の濃度及び純度のDNA が抽出できる方法 ↓
DNA 濃度測定 (分光光度計)	DNA量の確認、DNAの質の確認(吸光度260nm/280nm比)、DNA溶液 (50-100ng/μl) の調製 ↓
PCR増幅	PCR反応 記載の方法に従って溶液を調製しプログラムを入力してPCRを行う。 ↓ ※4. 6. 7 参照 PCR 産物の増幅を電気泳動で確認 ↓ 産物ありの場合は次のステップへ 産物がない場合は再度 PCR 反応を行う
フラグメント解析	希釈PCR産物+サイズスタンダード+HiDiホルムアミド ↓ DNAシーケンサー分析 ↓ GeneMapperソフトウェアによる解析、 遺伝子型決定 ↓ 同じパターン ↓ Grifon120と同一品種の可能性あり 栽培試験等のさらなる詳細な解析が必要 ↘ 違うパターン ↓ Grifon120と同一品種ではない (解析終了)

5. トラブルシューティング

問題点	対応
反復実験で同じ結果が得られない	鋳型とする DNA (テンプレート DNA) とプライマーがすべての試験で同一の場合、PCR で増幅される産物は原則として同一のものが得られるはずである。従って、反復実験で同じ結果が得られない原因としては①テンプレート DNA が純粋なものではない②フラグメント解析での希釈率が適正でないため波形が安定しない、の2つがあげられる (②に関しては P15 の注意点を参照すること)。 よって、同一の結果が得られなかった場合は 1) の DNA 抽出までさかのぼり、実験を再度行う必要がある。
抽出 DNA の 260nm と 280nm の吸光度の 260nm/280nm 比が 1.8-2.0 にならない	分光光度計を用いて抽出した DNA の純度を測定した際、図 2 のような波形にならなかった場合、まず 260nm の部分にピークがあるかどうかを確認する。ピークがあった場合、そのまま次の行程に進み、PCR 産物が増幅されたらそのままテンプレート DNA として用いてよい。増えなかった場合はトラブルシューティング「SSR-PCR 反応で増幅がうまくいかない」を参照。ピークがなかった場合は、再度 DNA 抽出を行う。その際、試料をより細かくホモジナイズすること、上清を取るときに下層と混じり合わないことなどを注意すると改善される可能性がある。

SSR-PCR 反応で増幅がうまくいかない	抽出 DNA の質や夾雑物の混在に問題がある場合(抽出 DNA の 260nm と 280nm の吸光度の 260nm/280nm 比が 1.8-2.0 にならない場合)、テンプレート DNA を滅菌超純水で 5-10 倍希釈することで、増幅が向上する。希釈しても増幅が見られないときは、再度 DNA 抽出を行う。PCR 機の温度制御は、メーカー／機種によって異なるため、PCR Thermal cycler は BIO-RAD 社 C1000 Thermal cycler を推奨機器としている。異なるメーカー／機種を用いて、SSR-PCR 反応の増幅が悪い場合、アニーリング温度を 2-5℃下げる。一方、非特異的なバンドが多数出る場合には、アニーリング温度を 2-5℃上げる。
フラグメント解析の際に波形がみられない	蛍光標識をつけた PCR 産物は光に弱く、遮光保存を行わないと失活してしまう。PCR 産物を作成し、それらを保存しておいてから後日フラグメント解析を行った際に波形がみられなかった場合、PCR 産物が失活している可能性が高いため、再度 PCR からやり直す。

6. 是正処理

本マニュアルの使用者からの情報収集として、改善依頼票を設けて情報交換を行い、必要に応じてマニュアル等の是正処理を行う。

参考データ：

1. マイタケ品種識別に用いる 6 種類の SSR マーカーの詳細
2. 6 種類の SSR マーカーによる 30 品種のフラグメント長
3. 参考文献

参考資料：

農林水産省品種登録ホームページより「植物品種識別における品種同定理論」

http://www.hinsyu.maff.go.jp/pvr/dna_manual/betten.pdf

独立行政法人 種苗管理センターより「DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン」

<http://www.ncss.go.jp/main/DNA/DNAguideline.pdf>

参考データ 1. マイタケ品種識別に用いる 6 種類の SSR マーカーの詳細

※注 参考データ 1 は、Roche GS-FLX の結果を基に作成した参考データである。実際は、配列をアセンブルする際に **Variant** が複数箇所に存在するので本来の配列とは数塩基程度異なる場合がある。そのため、プライマー 1 とプライマー 2 で挟み込まれている塩基数と本文中で表記されているフラグメント長には差が生じているが、本文のフラグメント長を基準とする。

SSR マーカー名 : msGf-1

作成に用いた材料品種：Grifon120

至適アニーリング温度：59℃

プライマー1* : CGGACTCACTGTCGCATCTA<青字>

プライマー 2 **: TACAACCTTCGTCTGCGT<青字>

反復モチーフ：(ACGATG)₆<赤字>

塩基配列**：

CGGACTCACTGTCGCATCTAATGGGATGGGCAATGAAAATGAAGATGATGACGATGACGA
TGACGATGACGATGACGATGACGATGACGACGAAGATGAAGATGACCGTGACGATATTGA
CGCAGACGACGAAGTTGTA

*プライマー1はNEDの蛍光修飾を行う。

****プライマー2** には tail 配列を付加する。

SSR マーカー名：msGf-2

作成に用いた材料品種：Grifon120

至適アニーリング温度：59℃

プライマー 1*：AGACGAAGACGATGTCGATGT<青字>

プライマー 2**：ACCTCACATTTGCACACTGC<青字>

反復モチーフ：(ATGTCG)5<赤字>

塩基配列**：

AGACGAAGACGATGTCGATGTATGTCGATGTCGATGTCGATGTCGATGTCGATGCACTGA
AGAGGAAGATGTGGTGGTCAAATTTTGGCTCGGTGTTGTTGGCCGCCTGGTCTGTCTCCG
CGCTTTCCTTGGAGCAGTGTGCAAATGTGAGGT

*プライマー 1 はNEDの蛍光修飾を行う。

**プライマー2 には tail 配列を付加する。

SSR マーカー名：msGf-3

作成に用いた材料品種：Grifon120

至適アニーリング温度：59℃

プライマー 1*：AAGGTGTTTCGAACGAGATCA<青字>

プライマー 2**：TTGTACCAGCACATTCGAGC<青字>

反復モチーフ：(ATCTT)5<赤字>

塩基配列**：

AAGGTGTTTCGAACGAGATCATCGTGGCCGTCGAGCCTGTCGAGCAGCTCGGATCGAGCGT
CGATCATATCGGTC**ATCTTATCTTATCTTATCTTATCTT**ACCAGGCTCCAACTGCATTTCTC
AGCATGCAACTCGCAGCTGTGCAAACAAACGAGACGTTTACAAAGGCTGGGTGTCCTGCG
CTCGAATGTGCTGGTACAA

*プライマー 1 はNEDの蛍光修飾を行う。

**プライマー 2 には tail 配列を付加する。

SSR マーカー名：msGf-4

作成に用いた材料品種：Grifon120

至適アニーリング温度：59℃

プライマー 1*：ACATACACGGCAGCCTGAG<青字>

プライマー 2**：AGCGTTCTGGTATGTTGCAC<青字>

反復モチーフ：(ACAG)6<赤字>

塩基配列**：

ACATACACGGCAGCCTGAGTGTGTGCCGCAGGAACGTACGGCTGACATCGCGACGGACAG
ACAGACAGACAGACAGACAGATCATTAGCAACGTTACAGGCGACGCCGGAAGACCGCGTC
GACGACTCTCAGCCCGATCACCCCTTGACGGTCAGATCGTGCAACATACCAGAACGCT

*プライマー 1 はNEDの蛍光修飾を行う。

**プライマー2 には tail 配列を付加する。

SSR マーカー名：msGf-5

作成に用いた材料品種：Grifon120

至適アニーリング温度：59℃

プライマー 1*：ATGGTTTCCACACGGTGAGT<青字>

プライマー 2**：CGATATCGCTCTTCCCTACG<青字>

反復モチーフ：(TCTG)₈<赤字>

塩基配列**：

ATGGTTTCCACACGGTGAGTTGTGCGGCTTCGAAGACTAAAGAAGTTCTCTGAGCTCTCT
GTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGATCAATCCAGGGCTCGCTCGACATGGACGGT
CGTAGGGAAGAGCGATATCG

*プライマー 1 はNEDの蛍光修飾を行う。

**プライマー 2 には tail 配列を付加する。

SSR マーカー名：msGf-6

作成に用いた材料品種：Grifon120

至適アニーリング温度：59℃

プライマー 1*：TGACTTTCCTGAAAGGCGAC<青字>

プライマー 2**：ACGAGCCATCCCTACGGT<青字>

反復モチーフ：(CGACAT)5<赤字>

塩基配列**：

TGACTTTCCTGAAAGGCGACCTCGGCGACGACACCGACATCGACATCGACATCGACATCG
ACATCTTGCTCAAACCTTAATCGTATTCAAATTTAACATTTAACGGTTAACCGTAGGG
ATGGCTCGT

*プライマー 1 はNEDの蛍光修飾を行う。

**プライマー 2 には tail 配列を付加する。

参考データ 2. 6 種類の SSR マーカーによる 30 品種のフラグメント長

品種名	マイタケSSRマーカー					
	msGf-1	msGf-2	msGf-3	msGf-4	msGf-5	msGf-6
Grifon120	A/A+24	B/B+12	C	D	E/E+24	F/F+12
MH182115	A	B-6/B	C/C+5	D-4	E+33	F
MH182082	A	B-6/B	C/C+5	D-4/D	E	F
MH182116	A/A+24	B-6/B+12	C	D	E+24/E+33	F
MH182117	A/A+24	B-6/B+12	C/C+5	D	E+24/E+33	F
MH182240	A+24	B+12	C	D	E/E+24	F/F+12
MH182243	A/A+24	B/B+12	C	D	E	F/F+12
MH182011	A/A+18	B-6/B+30	C-15	D-4/D	E/E+33	F
MH182012	A+18/A+24	B+30/B+42	C/C+5	D-8.	E+4/E+8	F-6
MH182022	A	B-6/B	C-5/C+5	D-8/D	E	F
MH182041	A/A+6	B-24/B-6	C	D	E+16	F
MH182156	A	B-24/B-6	C-5	D-4	E+33	F
MH182157	A+6/A+18	B-36/B+30	C-5	D-8/D-4	E+16/E+20	F
MH182166	A/A+12	B	C-5/C	-	E+16	F/F+6
MH182168	A/A+18	B/B+6	C-5	D-8/D-4	E+4/E+33	F-6/F
MH182169	A	B-18/B-6	C-5/C+5	D-8	E+8	F
MH182170	A/A+12	B-6/B	C-5/C	D-4/D	E	F
MH182171	A/A+18	B-6/B+30	C/C+5	D-4/D	E+33	F
MH182172	A	B-6/B	C-5	D-8/D-4	E/E+4	F
MH182216	A	B-6	C+5	D-8/D	E/E+33	F
MH182015	A	B	C	D-4	E+8/E+16	F-6/F
MH182099	A/A+24	B/B+30	C-5	D-4/D	E+4	F/F+12
MH182190	A/A+24	B-50/B+18	C-15/C-5	D-4/D	E+4	F-6/F
MH182191	A	B-6/B	C-5/C	D-8	E/E+8	F
MH182192	A	B-12/B-6	C-5	D-8/D-4	E	F
MH182193	A	B-6/B+12	C-5/C	D-8	E+33	F-6/F
MH182194	A	B-12/B	C-5/C	D-4	E+16	F
MH182215	A/A+30	B+12	C-5	D-4	E+4/E+12	F-6/F
MH182223	A	B-6	C-15/C-5	D+4	E+8	F
MH182214	A+18/A+24	B+6/B+18	C-5	D-8	E+4	F-6

フラグメント長は600LIZサイズスタンダードに対しての相対値を表している。また、スラッシュ区切りで2つの数字が並んでいるものは、同一プライマーセットで2本の鎖長の異なるフラグメントが増幅することをあらわしている。- はフラグメントが増幅されないことをあらわしている。

※本表は、基準品種である Grifon120 の値と比較してどの程度異なるのかを対象品種全てに対してまとめたもの。表記されているアルファベットは、4. 6. 10の表2-2と同じ意味である。

参考データ 3. 参考文献

- 1) Bell, C J and Ecker, J R: Genomics, **19**, 137-144 (1994)
- 2) Davis, T M, DiMeglio, L M, Yang, R, Styan, M N S and Lewers, K S: J Amer Soc Hort Sci, **131**, 506-512 (2006)
- 3) Dirlewanger, E, Cosson, P, Tavaud, M, Aranzana, M J, Poizat, C, Zanetto, A, Arús, P and Laigret, F: Theor Appl Genet, **105**, 127-138 (2002)
- 4) Foulongne-Oriol M, Spataro C and Savoie, J M: Appl Microbiol Biotechnol, **84**, 1125-1135 (2009)
- 5) Hossain, K G, Kawai, H, Hayashi, M, Hoshi, M, Yamanaka, N and Harada, K: DNA Res, **7**, 103-110 (2000)
- 6) Ito Y, Fushimi, T and Yanagi, S O: Mycoscience, **39**, 361-365 (1998)
- 7) Kimura, T, Shi, Y Z, Shoda, M, Kotobuki, K, Matsuta, N, Hayashi, T, Ban, Y and Yamamoto, T: Breed Sci, **52**, 115-121 (2002)
- 8) Kresovich, S, Szewc-McFadden, A K, Bliek, S M and McFerson, J R: Theor Appl Genet, **91**, 206-211 (1995)
- 9) 北村眞希・石井 真・星 雅子・稲富 聡・原田久也：日本きのこ学会誌, **18**, 7-12 (2010)
- 10) Panaud, O, Chen, X and McCouch, S R: Genome, **38**, 1170- 1176 (1995)
- 11) Rosa, V D, Cappuccio, I, Fanelli, C and Urbanelli, S: Mol Ecol Notes, **4**, 271-273 (2004)
- 12) Röder, M S, Plaschke, J, König, S U, Börner, A, Sorrells, M E, Tanksley, S D and Ganai, M W: Mol Gen Genet, **246**, 327-333 (1995)
- 13) Röder, M S, Wendehake, K, Korzun, V, Bredemeijer, G, Laborie, D, Bertrand, L, Isaac, P, Rendell, S, Jackson, J, Cooke, R J, Vosman, B, and Ganai, M W: Theor Appl Genet, **106**, 67-73(2002)
- 14) Rozen, S and Skaletsky, H: Methods Mol Biol, **132**, 365-386 (2000)
- 15) Song, Q J, Quigley, C V, Nelson, R L, Carter, T E, Boerma, H R, Strachan, J L and Cregan, P B: Plant Var Seeds, **12**, 207-220 (1999)
- 16) Song, S, Su, W, Zeng, W and Wang, Z: Science and Cultivation of Edible Fungi, Balkema, Rotterdam, The Netherlands, pp 191-199 (2000)
- 17) 砂川政英・根田 仁・宮崎和弘：木材学会誌, **41**, 949-951 (1995)
- 18) Turuspekoy, Y, Nakamura, K, Yoshikawa, R and Tuberosa, R: Breed Sci, **51**, 215-218 (2001)

記 号						
品種名	マイタケSSRマーカー					
	msGf-1	msGf-2	msGf-3	msGf-4	msGf-5	msGf-6
Grifon120	A/A+24	B/B+12	C	D	E/E+24	F/F+12
MH182115	A	B-6/B	C/C+5	D-4	E+33	F
MH182082	A	B-6/B	C/C+5	D-4/D	E	F
MH182116	A/A+24	B-6/B+12	C	D	E+24/E+33	F
MH182117	A/A+24	B-6/B+12	C/C+5	D	E+24/E+33	F
MH182240	A+24	B+12	C	D	E/E+24	F/F+12
MH182243	A/A+24	B/B+12	C	D	E	F/F+12
MH182011	A/A+18	B-6/B+30	C-15	D-4/D	E/E+33	F
MH182012	A+18/A+24	B+30/B+42	C/C+5	D-8.	E+4/E+8	F-6
MH182022	A	B-6/B	C-5/C+5	D-8/D	E	F
MH182041	A/A+6	B-24/B-6	C	D	E+16	F
MH182156	A	B-24/B-6	C-5	D-4	E+33	F
MH182157	A+6/A+18	B-36/B+30	C-5	D-8/D-4	E+16/E+20	F
MH182166	A/A+12	B	C-5/C	-	E+16	F/F+6
MH182168	A/A+18	B/B+6	C-5	D-8/D-4	E+4/E+33	F-6/F
MH182169	A	B-18/B-6	C-5/C+5	D-8	E+8	F
MH182170	A/A+12	B-6/B	C-5/C	D-4/D	E	F
MH182171	A/A+18	B-6/B+30	C/C+5	D-4/D	E+33	F
MH182172	A	B-6/B	C-5	D-8/D-4	E/E+4	F
MH182216	A	B-6	C+5	D-8/D	E/E+33	F
MH182015	A	B	C	D-4	E+8/E+16	F-6/F
MH182099	A/A+24	B/B+30	C-5	D-4/D	E+4	F/F+12
MH182190	A/A+24	B-50/B+18	C-15/C-5	D-4/D	E+4	F-6/F
MH182191	A	B-6/B	C-5/C	D-8	E/E+8	F
MH182192	A	B-12/B-6	C-5	D-8/D-4	E	F
MH182193	A	B-6/B+12	C-5/C	D-8	E+33	F-6/F
MH182194	A	B-12/B	C-5/C	D-4	E+16	F
MH182215	A/A+30	B+12	C-5	D-4	E+4/E+12	F-6/F
MH182223	A	B-6	C-15/C-5	D+4	E+8	F
MH182214	A+18/A+24	B+6/B+18	C-5	D-8	E+4	F-6

	SSRマーカー					
	msGf-1	msGf-2	msGf-3	msGf-4	msGf-5	msGf-6
Grifon120	A/A+24	B/B+12	C	D	E/E+24	F/F+12

数 値						
品種名	マイタケSSRマーカー					
	msGf-1	msGf-2	msGf-3	msGf-4	msGf-5	msGf-6
Grifon120	112/136	145/157	167	140	120/144	120/132
MH182115	112	139/145	167/172	136	153	120
MH182082	112	139/145	167/172	136/140	120	120
MH182116	112/136	139/157	167	140	144/153	120
MH182117	112/136	139/157	167/172	140	144/153	120
MH182240	136	157	167	140	120/144	120/132
MH182243	112/136	145/157	167	140	120	120/132
MH182011	112/130	139/175	152	136/140	120/153	120
MH182012	130/136	175/187	167/172	132	124/128	114
MH182022	112	139/145	162/172	132/140	120	120
MH182041	112/118	121/139	167	140	136	120
MH182156	112	121/139	162	136	153	120
MH182157	118/130	109/175	162	132/136	136/140	120
MH182166	112/124	145	162/167	-	136	120/126
MH182168	112/130	145/151	162	132/136	124/153	114/120
MH182169	112	127/139	162/172	132	128	120
MH182170	112/124	139/145	162/167	136/140	120	120
MH182171	112/130	139/175	167/172	136/140	153	120
MH182172	112	139/145	162	132/136	120/124	120
MH182216	112	139	172	132/140	120/153	120
MH182015	112	145	167	136	128/136	114/120
MH182099	112/136	145/175	162	136/140	124	120/132
MH182190	112/136	95/163	152/162	136/140	124	114/120
MH182191	112	139/145	162/167	132	120/128	120
MH182192	112	133/139	162	132/136	120	120
MH182193	112	139/157	162/167	132	153	114/120
MH182194	112	133/145	162/167	136	136	120
MH182215	112/142	157	162	136	124/132	114/120
MH182223	112	139	152/162	144	128	120
MH182214	130/136	151/163	162	132	124	114

	SSRマーカー					
	msGf-1	msGf-2	msGf-3	msGf-4	msGf-5	msGf-6
Grifon120	112/136	145/157	167	140	120/144	120/132

