

福岡県の水稲奨励品種および全国の主要品種を識別するための一塩基多型 (SNP) 情報

和田卓也*・江嶋亜祐子・平田千春・坪根正雄¹⁾・井上 敬・尾形武文

福岡県の水稲奨励品種および全国の主要品種、合計107品種を識別するための一塩基多型 (SNP) マーカーについて、検討を行った。日本型稲の品種識別に有効と判断した16種類のSNPマーカーを選定して、当該SNPの遺伝子型の確認を行った。16マーカーのうち、15マーカーが107品種間で多型を示した。供試した全107品種のうち101品種は15種類のSNPマーカーを用いて、相互に識別できることが明らかとなった。また、当該SNPの周辺領域で新たなSNPを探索し、16マーカー中10マーカーにおいて、総計20ヶ所の新規SNPを同定した。

[キーワード：一塩基多型, SNP, 水稲, 品種識別]

Single-Nucleotide Polymorphism for Differentiating between the Rice Cultivars of Fukuoka Prefecture and Major Cultivars of Japan. WADA Takuya, Ayuko ESHIMA, Chiharu HIRATA, Masao TSUBONE, Takashi INOUE and Takefumi OGATA (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 31: 1-7 (2012)

This study was performed to detect single-nucleotide polymorphisms (SNPs) among the cultivars of Fukuoka prefecture and major cultivars of Japan in order to establish a new cultivar differentiation system for rice. According to the published patent information, we tested 16 SNPs of which 15 were polymorphic among 107 rice cultivars. Furthermore, we showed that 101 of these 107 cultivars could be distinguished mutually by using these 15 SNPs. The number of alleles in all the SNP loci was 2 and not more than 3. We also detected 20 new SNPs among the 10 SNPs in the region flanking the original SNP loci.

[Key words : single-nucleotide polymorphism, SNP, rice, *Oryza sativa* L., cultivar discrimination]

緒 言

福岡県では1988年より水稲の品種育成を開始し、夢つくし (今林ら 1995), つくしろまん (濱地ら 2003), 元気つくし (和田ら 2010) などの、独自品種を育成してきた。これらの品種の県外での違法栽培、また販売面での偽装表示を防止するためには、品種識別法の確立が重要である。

水稲の品種識別法は、栽培環境等外的条件の影響を受けない塩基配列の違いを指標としたDNAマーカーを用いる方法が近年では主流となっている。DNAマーカーにはRAPD (Mackillら 1995, 大坪ら 1997), SSR (Akagiら 1997, 河野ら 2001), AFLP (Kimら 2004), SNP (Nasuら 2002, Shirasawaら 2004, Monnaら 2006, Shirasawaら 2006) などがあり、現在ではSSRマーカーを用いる識別法が主に用いられている (ビジョンバイオ (株) 2010, 三菱化学メディエンス (株) 2010)。しかし、ゲノム中の多型頻度からみるとSNPマーカーが最も優れており、本マーカーは比較的近縁な品種間でも多くの多型が認められるとともに (Nasuら 2002, Yamamotoら 2010), 解析対象品種数を増やす場合には新規マーカーを設定することが容易となる利点がある。したがって、遺伝的近縁度が高い日本型品種間の識別においては、他のDNAマーカーに比較してSNPマーカーの有用性が高く、今後はSNPマーカーを用いた識別が主流になると考えられる。

そこで、本研究では、福岡県の水稲奨励品種および全国の主要品種を相互識別するためのSNPマーカーを

同定することを目的に、既存のSNPマーカーから識別に有効なマーカー候補を抽出するとともに塩基配列を解析した。また、今後供試品種数が拡大した場合のSNPマーカーの候補領域を特定するために、既存のSNPマーカーの近傍領域における新規SNPの有無を調査した。

材料および方法

供試品種は、第1表に示す福岡県の奨励品種および全国的に生産量の多い主要品種 (農林水産省: 平成17年産米検査成績より) とした。播種後の幼苗からCTAB法 (Murray and Thompson 1980) によりDNAを抽出した。

水稲のSNPマーカーは、一般公開されている '日本晴' の全ゲノム塩基配列情報を基に探索することも可能であるが、膨大なコストと時間を要することが考えられた。これまで報告されている日本型品種同士の識別に有効なSNP情報のうち、Monnaら (2006) は主としてイントロン領域、Shirasawaら (2006) はエクソン領域のSNPをそれぞれ解析しているが、筆者らは品種識別だけでなく今後の育種計画への応用も考慮して、Shirasawaら (2006) およびShirasawaら (2007) のエクソン領域のSNP情報を利用することとした。上記SNP情報には約70種類のSNPマーカーを用いた約200品種の水稲SNP情報が含まれている。我々は ①日本型水稲に比較的偏りなく多型が認められること ②供試された200品種をおよそ半分に区分することができること ③既に選定されたマ

* 連絡責任者 (農産部: tawada@farc.pref.fukuoka.jp)

1) 現 福岡県農林水産部水田農業振興課

第1表 供試品種

1 コシヒカリ	21 まなむすめ	41 ゆきの精	61 大地の風	81 ひとごち	101 つやおとめ
2 ひとめぼれ	22 むつほまれ	42 いわてっこ	62 あやひめ	82 バンバンザイ	102 夢一献
3 ヒノヒカリ	23 アケボノ	43 きぬむすめ	63 ほほほの穂	83 あきさやか	103 ツクシホマレ
4 あきたこまち	24 めんこいな	44 ふっくりんこ	64 みえのえみ	84 アキヒカリ	104 元気つくし
5 キヌヒカリ	25 まっしぐら	45 あきろまん	65 ミネアサヒ	85 華吹雪	105 なすひかり
6 きらら397	26 てんたかく	46 イクヒカリ	66 どまんなか	86 レイホウ	106 松山三井
7 はえぬき	27 ちば28号	47 どんびしゃり	67 ゆめおうみ	87 秋田酒こまち	107 愛のゆめ
8 ほしのゆめ	28 ミルキークイーン	48 あきげしき	68 能登ひかり	88 さとじまん	
9 つがるロマン	29 彩のかがやき	49 ひたほまれ	69 八反錦1号	89 ゆきまる	
10 ななつぼし	30 おぼろづき	50 どんとこい	70 みえのえみ	90 ゴロビカリ	
11 ゆめあかり	31 ゆめみずほ	51 あきまさり	71 かけはし	91 まいひめ	
12 あさひの夢	32 夢しずく	52 たかね錦	72 まいひかり	92 トヨニシキ	
13 あいちのかおり	33 秋の詩	53 ゆきん子舞	73 にこまる	93 ニシホマレ	
14 夢つくし	34 森のくまさん	54 たんぼの夢	74 出羽燦々	94 ほしまる	
15 ササニシキ	35 朝日	55 はなさつま	75 ナツヒカリ	95 あかね空	
16 日本晴	36 ゆめひたち	56 祭り晴	76 ミルキープリンセス	96 秋晴	
17 ハツシモ	37 美山錦	57 オオセト	77 兵庫夢錦	97 越路早生	
18 ハナエチゼン	38 中生新千本	58 天使の詩	78 レーク65	98 たかねみのり	
19 こいしぶき	39 大地の星	59 ユメヒカリ	79 吟風	99 ふくみらい	
20 ふさおとめ	40 チヨニシキ	60 朝の光	80 こいもみじ	100 つくしろまん	

1) 太字は福岡県の奨励品種を示す。

第2表 供試SNPマーカー

No	マーカー名	染色体	クローン名	SNP locus	日本晴型塩基	変異型塩基	Forward Primer	Reverse Primer	product size (bp)
1	E1919	1	AP002743	149846	a	g	agctgctcgaagtgaaggag	gtaccaagcgtggttgact	733
2	C12409	2	AP004043	64615	g	a	gcagggtgtgcacaatctca	ggttatgatggcctcttca	555
3	S10844	2	AP004083	111506	g	a	tggctcgttttaggagtgct	tgtgcgcaaatatgttcgat	624
4	S13818	2	AP005287	114366	t	c	actggcttgcgaatgctttct	tgctcccaatcaaatcttctg	604
5	R2702	2	AC134045	135077	g	c	ttgcttatggtgctgctgctc	cctccagctccttcatcttg	696
6	S0651	4	OSJN00030	29000	c	t	tggacatggctgttgattgt	cagctgccacaacacaaaat	654
7	S3010	4	OSJN00186	89003	c	g	catcagcttcagcacaatga	caattgcgaaaggagacgat	404
8	E61502	6	AP003762	52178	g	a	acctgtggagtgaggatggag	tggacaggggaccttggtag	683
9	C12560	6	AP004236	112118	t	c	aaagagcaccgtaacagga	aaacatttcgtaaggcaacc	547
10	E51255	7	AP003889	6615	a	g	aggtcttgagccatgcagtt	ggttgctgggctgatttta	625
11	R2394	7	AP003888	14186	c	t	atgcacacattctcccaca	ctttccgctcacatgcttcc	652
12	S15651	8	AP004660	73982	g	c	gccctccagctcctattgctt	caccgtgtgctttgatgatt	736
13	E20920	8	AP003858	83210	c	a	tgatcaatgctcctatcctca	tgtgcctatgaaccatgaa	705
14	C52909	8	AP005301	84567	g	a	acggttgaaaccagcacttc	gcctccctttctgtgatgaa	563
15	E2439	10	AE017093	234569	c	g	gctgctgatcagttccaaca	gccatggtgtgttgctcta	649
16	E3876	11	AC121328	57646	a	g	agcatttgctcgtagcaat	gaaattggtgtgacaccttt	550

1) クローンはアメリカ合衆国国立生物工学情報センター(NCBI)に登録されているイネゲノムのクローン名。

2) SNP locusはクローンの最初の塩基からカウントしたSNP位置を示す。

カーとは異なる識別パターンを示すこと 以上を条件に総計16種類のSNPマーカーを選定した。SNPのタイピングは、以下の通り行った。最初に、SNPを含む400～800bpの領域を増幅するプライマー（第2表）をプライマー設計ソフトウェアPrimer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)を用いて設計した。次に、設計したプライマーを用いて、15mM Tris-HCl (pH8.05), 50mM KCl, 15mM MgCl₂, 160mM dNTPs, 0.3mM プライマー, DNA 40ng, 1.0unit AmpliTaq Gold DNA polymerase (アプライドバイオシステムズ社製)を含む20mLの反応液で、95℃で3分間保持した後、95℃ 1分, 60℃ 1分, 72℃ 2分を35サイクル行い、最終72℃ 5分の反応条件にて、最初のPCRを行った。PCR後の増幅産物をExoSAP-IT (GEヘルスケア)で製品プロトコルに従って処理してdNTPおよびプライマーを除去した。最後に、処理後のPCR産物を用いてサイクルシーケンス反応を、Beckman社のプロトコルを一部改変して行い、Forward, Reverseの両方から以下の手順で解析した。①サイクルシーケンス反応物を酢酸ナトリウム/エタノールを用いて精製

②最終精製物をSLS (Sample Loading Solution, ベックマンコールター社製) 30mLに溶解 ③DNAシーケンサー (Beckman CEQ8000)を用いて塩基配列を解析。

解析後のデータは、Genetics Ver6.1 (ゼネテックス社製)を用いて、塩基配列の比較を行い、当該品種の遺伝子型を決定した。塩基配列の比較を行う際は、特許情報にある既知のSNPの遺伝子型の比較を最初に行った。次に、既知情報SNP以外の新規SNPを探索するために、増幅産物全体の配列についても塩基配列の比較を行った。

結 果

1 供試品種のSNP情報

供試した107品種の各SNPマーカーの遺伝子型は、第3表の通りであった。配列解析の結果の一部を第1図に示した。16マーカー×107品種=1,712カ所のSNPの遺伝子型を比較した結果、15マーカーを用いて107品種中100品種を相互識別可能なことが明らかとなった(第3表)。R2394は供試品種間では多型が認められな

第3表 SNP領域における供試品種の遺伝子型

番号	マーカー 品種名	C12409	SI3818	S3010	E20920	E3876	C12560	C52909	SI0844	E2439	E51255	SI5651	S0651	E61502	E1919	R2702
		1	コシヒカリ	A	C	G	A	A	G	A	G	G	A	G	C	G
2	ひとめぼれ	A	T	C	A	A	G	A	A	G	A	G	C	G	G	C
3	ヒノヒカリ	G	T	C	G	A	G	A	G	G	A	C	C	G	A	C
4	あきたこまち	A	T	G	G	A	G	A	G	G	A	G	C	G	G	C
5	キヌヒカリ	G	C	G	A	G	G	G	G	C	A	G	T	G	G	C
6	きらら397	A	C	G	G	A	A	G	A	C	G	G	C	A	G	G
7	はえぬき	A	T	C	G	A	A	A	G	G	A	G	C	A	G	C
8	ほしのゆめ	A	C	G	A	A	A	G	A	G	G	G	C	A	G	G
9	つがるロマン	A	T	G	G	A	A	A	G	C	A	G	C	A	G	C
10	ななつぼし	G	T	G	A	A	A	G	G	G	G	G	C	A	G	G
11	ゆめあかり	G	C	G	G	A	G	A	G	G	A	G	T	G	G	C
12	あさひの夢	G	C	G	G	A	G	G	A	G	G	G	T	G	A	C
13	あいちのかおり	G	C	C	G	A	G	G	A	G	G	C	C	G	A	G
14	夢つくし	G	C	G	A	A	G	G	G	C	A	G	C	G	G	C
15	ササニシキ	A	C	C	G	G	G	A	G	C	A	G	C	G	G	C
16	日本晴	A	T	C	G	A	G	G	G	G	A	G	C	G	A	G
17	ハツシモ	G	C	C	G	G	G	G	G	G	A	G	C	G	A	G
18	ハナエチゼン	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	G	C	G	A	G
19	こいしぶき	A	C	C	A	A	G	A	G	G	A	G	C	G	A	C
20	ふさおとめ	A	T	G	A	A	G	A	A	G	A	G	C	G	A	G
21	まなむすめ	A	C	C	A	A	G	A	A	G	A	G	T	G	G	C
22	むつほまれ	G	T	G	G	A	G	A	G	C	A	G	T	G	G	C
23	アケボノ	G	C	G	G	A	G	G	G	G	A	G	T	G	A	C
24	めんこいな	A	T	C	G	A	G	A	A	G	A	G	C	G	G	C
25	まっしぐら	G	T	G	G	A	A	A	G	G	A	G	T	G	G	C
26	てんたかく	G	T	G	G	A	A	A	A	G	A	G	C	G	A	G
27	ちば28号	A	T	G	G	A	G	A	A	G	A	C	C	G	G	C
28	ミルクークイーン	A	C	G	A	A	G	A	G	G	A	G	C	G	G	C
29	彩のかがやき	A	T	C	G	A	G	G	A	G	G	G	T	G	A	G
30	おぼろづき	G	T	G	A	A	A	G	G	G	G	G	C	A	G	G
31	ゆめみずほ	A	T	G	A	A	G	G	G	G	A	G	C	G	G	C
32	夢しずく	A	C	C	A	G	G	A	G	G	A	G	C	G	G	C
33	秋の詩	A	C	G	G	A	G	G	G	G	A	G	C	G	A	G
34	森のくまさん	G	T	C	G	A	G	A	G	G	A	C	C	G	A	C
35	朝日	G	T	C	G	G	G	G	G	G	A	G	C	G	A	G
36	ゆめひたち	G	C	C	A	A	G	A	A	G	A	G	T	G	G	C
37	美山錦	G	T	C	A	A	A	G	A	G	A	G	C	A	A	C
38	中生新千本	A	T	C	G	G	G	G	A	G	G	G	T	G	A	C
39	大地の星	A	T	G	A	A	A	G	A	G	G	G	T	A	G	G
40	チヨニシキ	A	C	C	G	A	G	A	A	G	A	G	T	G	G	C
41	ゆきの精	G	T	G	G	A	G	G	G	G	A	G	C	G	A	C
42	いわてっこ	A	C	C	A	A	G	A	A	G	A	G	T	G	G	C
43	きぬむすめ	G	C	C	A	G	G	G	G	C	A	G	T	G	G	G
44	ふっくりんこ	A	C	G	A	A	A	G	A	G	G	G	C	A	G	G
45	あきろまん	A	T	C	G	A	G	G	A	G	G	G	T	G	A	C
46	イクヒカリ	A	T	C	A	A	G	G	A	C	A	G	T	G	G	C
47	どんびしゃり	A	T	G	G	A	G	G	G	C	A	G	C	A	G	G
48	あきげしき	G	T	C	G	A	G	A	G	G	G	G	T	G	A	G
49	ひだほまれ	G	T	G	G	G	G	A	A	G	A	G	C	G	A	C
50	どんとこい	A	T	G	A	G	G	G	A	C	A	G	T	G	G	C
51	あきまさり	A	T	C	A	G	G	G	G	C	A	G	C	G	G	C
52	たかね錦	G	T	C	A	A	A	G	A	G	A	G	C	A	A	C
53	ゆきん子舞	G	T	C	G	A	G	G	G	G	A	G	C	G	A	C
54	たんぼの夢	A	C	C	A	A	G	A	G	G	A	G	T	G	G	C
55	はなさつま	G	T	C	G	A	G	A	G	G	G	C	C	G	A	C
56	祭り晴	A	T	C	G	A	G	A	A	G	G	G	T	G	A	G
57	オオセト	G	T	C	G	A	G	G	G	C	G	G	C	G	A	G
58	天使の詩	G	T	C	G	A	G	A	G	C	A	G	C	G	A	G
59	ユメヒカリ	A	T	G	A	A	G	A	G	G	A	G	C	G	G	G
60	朝の光	G	T	C	G	A	G	A	A	G	A	G	T	G	A	G

1) 太字は福岡県の奨励品種を示す。

第3表 (続き)

番号	マーカー 品種名	マーカー														
		C12409	SI3818	S3010	E20920	E3876	C12560	C52909	SI0844	E2439	E51255	SI5651	S0651	E61502	E1919	R2702
61	大地の風	A	T	C	G	A	G	G	A	G	A	G	T	G	A	G
62	あやひめ	G	T	G	G	A	A	G	G	G	G	G	T	A	G	G
63	ほほほの穂	A	T	G	A	A	A	G	G	C	A	G	C	G	A	C
64	みえのえみ	A	T	G	A	A	G	A	A	G	A	G	C	G	G	C
65	ミネアサヒ	A	T	C	G	A	G	A	A	G	G	C	T	G	A	C
66	どまんなか	A	C	C	G	A	G	A	G	G	G	G	C	G	G	C
67	ゆめおうみ	A	T	C	G	A	G	A	G	A	G	G	C	G	A	G
68	能登ひかり	A	T	G	G	G	A	G	G	C	A	G	C	G	A	G
69	八反錦1号	A	T	C	G	A	G	G	A	G	G	C	C	G	A	G
70	みえのえみ	A	T	C	G	A	G	A	A	G	A	G	T	G	A	G
71	かけはし	G	T	C	A	A	G	G	G	G	G	G	T	G	G	C
72	まいひかり	A	T	C	A	A	G	A	G	G	A	G	C	G	G	C
73	にこまる	A	T	C	G	A	G	G	A	C	A	G	T	G	G	G
74	出羽燦々	G	T	C	A	A	A	A	A	G	A	G	C	A	G	C
75	ナツヒカリ	A	T	G	A	A	G	A	G	G	A	G	C	G	A	C
76	ミルクィープリンセス	A	T	G	G	A	G	A	G	G	A	C	C	G	G	C
77	兵庫夢錦	G	T	G	A	A	A	G	G	G	A	C	C	A	A	C
78	レーク65	G	T	G	G	A	G	A	G	C	A	C	C	A	G	C
79	吟風	A	T	G	G	A	A	A	G	G	G	C	C	A	G	G
80	こいもみじ	A	C	C	G	A	G	A	A	C	A	G	T	A	G	C
81	ひとごち	A	C	G	G	A	A	G	A	C	A	G	T	G	A	C
82	パンパンザイ	A	C	C	G	A	G	A	A	G	A	G	T	G	A	G
83	あきさやか	A	T	G	G	G	A	G	A	C	A	C	C	G	G	C
84	アキヒカリ	A	T	G	A	A	G	A	G	G	A	G	C	G	G	C
85	華吹雪	G	T	C	G	A	A	A	G	G	A	G	T	A	A	C
86	レイホウ	G	T	C	G	G	A	G	G	G	A	C	C	G	A	C
87	秋田酒こまち	G	T	G	G	A	A	G	A	G	A	G	C	A	G	C
88	さとじまん	G	T	C	G	A	G	G	G	G	A	C	T	G	A	G
89	ゆきまる	G	C	G	A	A	A	G	G	G	G	G	C	A	G	G
90	ゴロピカリ	A	T	C	G	A	G	A	A	G	A	C	T	G	A	G
91	まいひめ	G	T	G	G	A	G	A	G	G	A	G	T	G	G	C
92	トヨニシキ	A	T	G	G	G	G	A	G	C	A	G	C	G	G	C
93	ニシホマレ	G	T	C	G	A	A	G	G	G	A	C	C	G	A	G
94	ほしまる	G	C	G	A	A	A	G	A	C	G	G	T	G	G	G
95	あかね空	G	T	G	G	A	G	G	G	G	A	G	T	G	A	C
96	秋晴	A	T	C	G	G	G	A	A	G	G	C	C	G	A	C
97	越路早生	A	T	G	G	G	G	G	G	C	A	G	C	G	A	G
98	たかねみのり	G	C	G	A	A	A	G	G	G	A	G	T	A	A	C
99	ふくみらい	A	C	C	G	A	G	A	A	G	A	C	T	G	G	C
100	つくしろまん	A	C	C	G	A	G	A	A	C	A	C	C	G	G	C
101	つやおとめ	G	T	C	G	A	G	A	G	G	A	C	C	G	A	G
102	夢一献	G	T	G	A	A	G	G	G	G	A	G	T	G	G	C
103	ツクシホマレ	G	T	C	G	G	G	A	A	G	A	C	C	G	A	C
104	元気つくし	G	T	C	A	A	G	G	A	C	A	G	C	G	G	C
105	なすひかり	G	C	C	A	A	G	G	A	G	A	G	T	G	G	C
106	松山三井	G	T	C	G	A	A	G	G	G	A	G	C	G	A	G
107	愛のゆめ	G	T	C	G	A	G	G	A	G	A	C	T	G	A	G

1) 太字は福岡県の奨励品種を示す。

かった。

最初に、福岡県で最初に育成された「夢つくし」および近年育成された「元気つくし」と全国で生産量の多い上位3品種「コシヒカリ」「ひとめぼれ」「ヒノヒカリ」の遺伝子型をみると、C52909を用いれば識別できることが明らかとなった。また、地域的な特徴についてみると、E51255の遺伝子型は、北海道育成品種の「ほしのゆめ」「きらら397」「ななつぼし」において全て‘G’であり、北海道以外の育成品種のほとんどは‘A’であった。供試品種の中で多型の少ない

組合せとしては、「つやおとめ」「ヒノヒカリ」があり、この両品種は、R2702を用いないと識別できないことが判明した。いずれのSNPマーカーにおいても、検出されたアリルの数は2のみであり、アリルの数が3以上のSNPは存在しなかった。

供試した107品種のうち識別できなかった組合せは①「ななつぼし」と「おほろづき」②「ヒノヒカリ」と「森のくまさん」③「美山錦」と「たかね錦」④「コシヒカリ」と「ミルクィーQueen」⑤「ほしのゆめ」と「ふっくりんこ」⑥「まなむすめ」と「いわてっこ」

第1図 SNPマーカー「S10844」におけるSNPs

S10844-01Koshihikari.seq	1	TCTCCACAGTCTACTGCATCTAGCATCAGACTGTACCAGACTCTATCAGCTGCAAAAG	60
S10844-02Hitomebore.seq	1	TCTCCACAGTCTACTGCATCTAGCATCAGACTGTACCAGACTCTATCAGCTGCAAAAG	60
S10844-04Akitakomachi.seq	1	TCTCCACAGTCTACTGCATCTAGCATCAGACTGTACCAGACTCTATCAGCTGCAAAAG	60
S10844-10Nanatsuboshi.seq	1	TCTCCACAGTCTACTGCATCTAGCATCAGACTGTACCAGACTCTATCAGCTGCAAAAG	60
S10844-12Asahinoyume.seq	1	TCTCCACAGTCTACTGCATCTAGCATCAGACTGTACCAGACTCTATCAGCTGCAAAAG	60
S10844-14Yumetsukushi.seq	1	TCTCCACAGTCTACTGCATCTAGCATCAGACTGTACCAGACTCTATCAGCTGCAAAAG	60
S10844-01Koshihikari.seq	61	GTTTCATCGTTCATTGAAATCAACTGGCTCAGAAGTATGGGAACCGAAGCTTCTCGATAGT	120
S10844-02Hitomebore.seq	61	GTTTCATCGTTCATTGAAATCAACTGGCTCAGAAGTATGGGAACCGAAGCTTCTCGATAGT	120
S10844-04Akitakomachi.seq	61	GTTTCATCGTTCATTGAAATCAACTGGCTCAGAAGTATGGGAACCGAAGCTTCTCGATAGT	120
S10844-10Nanatsuboshi.seq	61	GTTTCATCGTTCATTGAAATCAACTGGCTCAGAAGTATGGGAACCGAAGCTTCTCGATAGT	120
S10844-12Asahinoyume.seq	61	GTTTCATCGTTCATTGAAATCAACTGGCTCAGAAGTATGGGAACCGAAGCTTCTCGATAGT	120
S10844-14Yumetsukushi.seq	61	GTTTCATCGTTCATTGAAATCAACTGGCTCAGAAGTATGGGAACCGAAGCTTCTCGATAGT	120
S10844-01Koshihikari.seq	121	GACTTGGAACTGGCGTAGAAGAGCCATGTAGGTGCCCTTGTGGGGTAATCGAGCTTGAT	180
S10844-02Hitomebore.seq	121	GACTTGGAACTGGCGTAGAAGAGCCATGTAGGTGCCCTTGTGGGGTAATCGAGCTTGAT	180
S10844-04Akitakomachi.seq	121	GACTTGGAACTGGCGTAGAAGAGCCATGTAGGTGCCCTTGTGGGGTAATCGAGCTTGAT	180
S10844-10Nanatsuboshi.seq	121	GACTTGGAACTGGCGTAGAAGAGCCATGTAGGTGCCCTTGTGGGGTAATCGAGCTTGAT	180
S10844-12Asahinoyume.seq	121	GACTTGGAACTGGCGTAGAAGAGCCATGTAGGTGCCCTTGTGGGGTAATCGAGCTTGAT	180
S10844-14Yumetsukushi.seq	121	GACTTGGAACTGGCGTAGAAGAGCCATGTAGGTGCCCTTGTGGGGTAATCGAGCTTGAT	180
S10844-01Koshihikari.seq	181	TCACATTCAACCCACTTCTACCACAGGTACAATAGAAGATAACGAGCGGTTAAAGGGTA	240
S10844-02Hitomebore.seq	181	TCACATTCAACCCACTTCTACCACAGGTACAATAGAAGATAACGAGCGGTTAAAGGGTA	240
S10844-04Akitakomachi.seq	181	TCACATTCAACCCACTTCTACCACAGGTACAATAGAAGATAACGAGCGGTTAAAGGGTA	240
S10844-10Nanatsuboshi.seq	181	TCACATTCAACCCACTTCTACCACAGGTACAATAGAAGATAACGAGCGGTTAAAGGGTA	240
S10844-12Asahinoyume.seq	181	TCACATTCAACCCACTTCTACCACAGGTACAATAGAAGATAACGAGCGGTTAAAGGGTA	240
S10844-14Yumetsukushi.seq	181	TCACATTCAACCCACTTCTACCACAGGTACAATAGAAGATAACGAGCGGTTAAAGGGTA	240
S10844-01Koshihikari.seq	241	TCTCTTTCCACTTCGCTCGACAACTGGGCATACATAATTTCCATGTTTCACACTGGAGG	300
S10844-02Hitomebore.seq	241	TCTCTTTCCACTTCGCTCGACAACTGGGCATACATAATTTCCATGTTTCACACTGGAGG	300
S10844-04Akitakomachi.seq	241	TCTCTTTCCACTTCGCTCGACAACTGGGCATACATAATTTCCATGTTTCACACTGGAGG	300
S10844-10Nanatsuboshi.seq	241	TCTCTTTCCACTTCGCTCGACAACTGGGCATACATAATTTCCATGTTTCACACTGGAGG	300
S10844-12Asahinoyume.seq	241	TCTCTTTCCACTTCGCTCGACAACTGGGCATACATAATTTCCATGTTTCACACTGGAGG	300
S10844-14Yumetsukushi.seq	241	TCTCTTTCCACTTCGCTCGACAACTGGGCATACATAATTTCCATGTTTCACACTGGAGG	300
S10844-01Koshihikari.seq	301	AGATGCAAGTGGAAAGTGAACATGTGAGAATTCAGCAGTGAAAAGTGCTTGTCTATGG	359
S10844-02Hitomebore.seq	301	AGATGCAAGTGGAAAGTGAACATGTGAGAATTCAGCAGTGAAAAGTGCTTGTCTATGG	359
S10844-04Akitakomachi.seq	301	AGATGCAAGTGGAAAGTGAACATGTGAGAATTCAGCAGTGAAAAGTGCTTGTCTATGG	359
S10844-10Nanatsuboshi.seq	301	AGATGCAAGTGGAAAGTGAACATGTGAGAATTCAGCAGTGAAAAGTGCTTGTCTATGG	359
S10844-12Asahinoyume.seq	301	AGATGCAAGTGGAAAGTGAACATGTGAGAATTCAGCAGTGAAAAGTGCTTGTCTATGG	359
S10844-14Yumetsukushi.seq	301	AGATGCAAGTGGAAAGTGAACATGTGAGAATTCAGCAGTGAAAAGTGCTTGTCTATGG	359

1)118番目の塩基が、既知のSNP。同パターンSNPは9番目と355番目、異パターンSNPは68番目と205番目である。

第4表 解析領域中に見出された新規SNPs数

マーカー名	C12409	S13818	S3010	E20920	E3876	C12560	C52909	S10844	E2439	E51255	S15651	S0651	E61502	E1919	R2702	合計
新規SNP数	1	0	0	0	2	1	1	5	2	0	2	0	1	1	4	20
同パターン	0	0	0	0	2	1	0	2	1	0	2	0	0	1	4	13
異パターン	1	0	0	0	0	0	1	3	1	0	0	0	1	0	0	7

1) 同パターン、異パターン:既知のSNPと同じ識別パターンを示すものを同パターン、異なる識別パターンを示すものを異パターンとした。

考 察

SNPは品種間の多型頻度がSSRなどの他のDNAマーカーと比較して高い特長がある。これまで日本型稲では多型の数が少ないことが品種識別を行う際には問題と考えられていたが、近年日本型品種同士の識別に有効なSNP情報の報告もなされている (Monnaら 2006, Shirasawaら 2006)。我々はShirasawaら (2006) およびShirasawaら (2007) のエクソン領域のSNP情報を活用し、15マーカーを用いれば、供試した107品種中100品種の相互識別が可能であることを示した。各品種の遺伝子型をみると、E51255の遺伝子型は北海道育成品種に特徴的な配列があることが示唆された。また「つやおとめ」は「ヒノヒカリ」と「葵の風」の交配より育成された品種であるが、その塩基配列は「ヒノヒカリ」に類似した配列が多いことが示唆された。また、識別できなかった組合せには、交配組合せからみて遺伝的に極めて近縁度が高いもの (「ヒノヒカリ」と「森のくまさん」、「まなむすめ」と「いわてっこ」など) や突然変異育種法により育成された品種とその原品種 (「美山錦」と「たかね錦」および「ミルキーQueen」と「コシヒカリ」) の組合せがあった。エクソン領域のみを解析したShirasawaら (2004) のSNP頻度とイントロン領域を含めて解析したMonnaら (2006) のそれを比較すると、後者においてより多くのSNPが

の6組合せであった。

2 新規SNP情報

第2表のプライマーを用いて増幅したPCR産物で特許情報にあるSNP以外の塩基配列を比較した結果、R2394を除く15マーカー中、10マーカーにおいて、第4表に示す新たなSNPが確認できた。この中には特許情報のSNPと品種識別の識別パターンが同じものと異なるものが存在し、S10844 (第1図)、E2439については、シーケンスした領域内に同パターンと異パターンの両SNPが認められた。また、同一領域中の各SNPの距離は18bpから269bpの範囲にあった。なお、相互識別できなかった6組合せについては、新規SNPを用いても識別は不可能であった。

報告されている。今回の試験で識別できなかった上記の組合せを識別するためには、Monnaら (2006) の SNP情報を候補として検索することも有効と考えられる。

さらに我々は特許情報にあるSNPの周辺領域を解析する中で、新規SNPを検出した。Nasuら (2002) は、イネゲノム中のSNPの頻度に偏りがあり、SNPの多い領域と少ない領域が存在することを指摘している。このことから比較的近傍に複数のSNPが存在するのは十分予想されるとしても、その複数のSNPの識別パターンが異なるという報告はこれまでにない。このため、各エクソン領域にある個別のSNP位置に限ればアレルの数は2であるものの、遺伝子としてのアレルの数は3以上である可能性がある。新規SNPは、識別対象とする品種が増加すれば、新たなマーカーとして利用することも可能と考えられる。

一方、実際の品種識別事業に用いるにはSNPの簡易な検出法が不可欠である。これまでに、Taq-man法 (Okunishiら 2005)、SSCP法 (Shirasawaraら 2004)、アシクロプライム法 (Nasuら 2002)、ドットプロット法 (Shirasawaら 2006) といった各種のSNP検出法が開発されているが、我々は本塩基配列情報を基にして九州大学と共同で、蛍光リボヌクレアーゼプロテクション法 (FRIP法, Ichinoseら 2005) を応用したSNP検出法を確立した (Kitaokaら 2010)。また、実際の品種識別の規模については、江嶋ら (2007) が二項分布を用いた統計学的解析により、白米を用いた場合の調査必要粒数を報告しており、これを基に試験設計を組めば効率的な品種識別が可能である。

福岡県では高温耐性に優れる新品種 ‘元気つくし’ が育成され (和田ら 2010)、2009年産から一般栽培も開始された。第3表にあるとおり、本品種も既に品種識別が可能な状況となっている。今後育成される品種についても、SNPマーカーを用いた品種識別を行うことにより、福岡県の知的財産の保護と活用が図られると考えられる。

謝 辞

本実験を遂行するにあたり、SNPマーカー情報の提供および技術指導にてお世話になりました、東北大学大学院農学研究科植物遺伝育種学研究室の西尾剛教授に厚く感謝申し上げます。

引用文献

Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, Fujimura T (1997) Microsatellite DNA markers for rice chromosomes *Theor. Appl. Genet.* 94 : 61-67.
 江嶋亜祐子・和田卓也・坪根正雄・尾形武文 (2007) 米の品種判別のためのSSRマーカーの選抜と効率的な品種識別システムの構築. 福岡農総試研報 26 : 19-23.
 浜地勇次・大里久美・川村富輝・今林惣一郎・西山 壽・和田卓也・吉野 稔・安長知子 (2003) 水稲新品種 ‘つくしろまん’ の育成. 福岡農総試研報 22 : 11-18.
 Ichinose H, Kitaoka M, Okamura N, Maruyama T, Kamiya N, Goto M (2005) Detection of single-base mutations by fluorogenic ribonuclease

protection assay. *Anal. Chem.* 77 : 7047-7053.
 今林惣一郎・浜地勇次・吉野久美・西山 壽・松江勇次・吉野 稔・吉田智彦 (1995) 水稲新品種 ‘夢つくし’ の育成. 福岡農総試研報 14 : 1-10.
 河野いづみ, 竹内善信, 島野公利, 佐々木卓治, 矢野昌裕 (2001) DNAマーカーによるイネ日本型品種間の多型検出頻度の比較. 育種学研究 2 : 197-203.
 Kim DS, Lee IS, Jang CS, Kang SY, Song HS, Lee YI, Seo YW (2004) Development of AFLP-derived STS markers for the selection of 5-methyltryptophan-resistant rice mutants. *Plant Cell Rep.* 23 : 71-80.
 Kitaoka M, Wada T, Nishio T, Goto M (2010) Fluorogenic ribonuclease protection (FRIP) analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in Japanese rice (*Oryza sativa* L.) DNA for cultivar discrimination. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 : 2189-2193.
 Mackill DJ (1995) Classifying Japonica Rice Cultivars with RAPD Markers. *Crop Sci.* 35 : 889-894.
 三菱化学メディアエンス (株) (2010) コメの品種識別. <http://www.medience.co.jp/food/09.html>. 10/08/30閲覧.
 Monna L, Ohta R, Masuda H, Koike A, Minobe Y (2006) Genome-wide searching of single-nucleotide polymorphisms among eight distantly and closely related rice cultivars (*Oryza sativa* L.) and a wild accession (*Oryza rufipogon* Griff.). *DNA Res.* 13 : 43-51.
 Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8 : 4321-4325.
 Nasu S, Suzuki J, Ohta R, Hasegawa K, Yui R, Kitazawa N, Monna L, Minobe Y (2002) Search for and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rice (*Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*) and establishment of SNP markers. *DNA Res.* 9 : 163-171.
 Okunishi T, Nakamura S, Ohtsubo K (2005) Quantitative identification of rice cultivars by real-time PCR. *Food Sci. Technol. Res.* 11 : 344-348.
 大坪研一・藤井 剛・橋野陽一・豊島英親・岡留博司・中村澄子・川崎信二 (1997) RAPD法を用いた国内産精米の品種判別技術. *食科工* 44 : 386-390.
 Shirasawa K, Monna L, Kishitani S, Nishio T (2004) Single nucleotide polymorphisms in randomly selected genes among japonica rice (*Oryza sativa* L.) varieties identified by PCR-RF-SSCP. *DNA Res.* 11 : 275-283.
 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.
 Shirasawa K, Maeda H, Monna L, Kishitani S, Nishio

- T (2007) The number of genes having different alleles between rice cultivars estimated by SNP analysis. *Theor Appl. Genet.* 115 : 1067-1074.
- ビジョンバイオ (株) (2010) 食品の検査・分析 - よくある質問 -. http://www.visionbio.com/etc/faq_dna.html#q05. 10/08/30閲覧.
- 和田卓也・坪根正雄・井上 敬・尾形武文・浜地勇次・松江勇次・大里久美・安長知子・川村富輝・石塚明子 (2010) 高温登熟性に優れる水稲新品種「元
- 気つくし」の育成およびその特性. 福岡農総試研報 29 : 1-9.
- Yamamoto T, Nagasaki H, Yonemaru J, Ebana K, Nakajima M, Shibaya T, Yano M (2010) Fine definition of the pedigree haplotypes of closely related rice cultivars by means of genome-wide discovery of single-nucleotide polymorphisms. *BMC Genomics* 11 : 267.