米の PCR 品種判別におけるコシヒカリ用判別プライマーセットの開発

大坪 研一, 中村 澄子, 今村 太郎
(独立行政法人食品総合研究所)

平成 13 年 11 月 21 日受理

Development of the primer sets for identification of a rice cultivar, Koshihikari, by PCR

Ken'ichi OHTSUBO, Sumiko NAKAMURA, and Taro IMAMURA

National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

As it is obligated, by the revision of the JAS Act, that cultivars, location, and year of production should be discribed on a bag of milled rice grains, the technology to identify them by objective methods is indispensable. Milled rice grains produced at the several Agricultural Experiment Stations as their fundamental cultivars were analyzed to the PCR method for their identification. Promising RAPD primers were used to select the discriminating DNA bands, which were extracted from agarose gels after electrophoreses and cloned into a PCR-XL-TOPO vector followed by sequencing. Forward primers and reverse ones (15 to 28 mers) were designed starting from the RAPD primer portions as sequence-tagged site primers. These STS primers were combined together and suitable primer sets to discriminate Koshihikari from other cultivars were selected as positive and negative sets. By PCR using these primer sets, 33 Koshihikaris from different prefectures showed the same DNA pattern and the other 49 cultivars revealed different DNA patterns. It became possible by this technology not only to identify Koshihikari using a single rice grain sample but also detect different mislabeled cultivar rice grains using these primer sets.

(Received November 21, 2001)

Key words: rice; cultivar identification; PCR; primer; Koshihikari

緒 言

消費者や食品産業等の良食味米指向を受けて、コシヒカリに代表される良食味米の作付けが増加し、高価格で流通している。コシヒカリは平成 12 年度産で全国の作付け面積の約 35% を占める第一位であるが、実際に市場で「コシヒカリ」として流通している米はさらに多いとされており、コシヒカリ以外の米が混米されている場合のあることが指摘されている。年間を通じて一定の食味の米を提供したり、寿司用、ピラフ用、チルド米飯用などの用途別の適正品質を得るための混米は有意義な技術であるが、前記のような表示を偽る「不正混米」は消費者に誤った情報を与えることになるので好ましくない。

新食糧法および改正 JAS 法のもとで、米の品種、産地、産年を表示することになり、包装の表示と内容物とが一致するかどうかを科学的に判定する技術の開発が必要とされている。

従来、イネや米の品種判定には、草型¹⁾、粒形²⁾、酵素多型³⁾などが用いられてきたが、精米や米飯のもつ情報のみを基にして、コシヒカリを中心とする近縁種同士を正確に識別する

ためには、DNA 鑑定が有用である。

作物の DNA 品種判別については、これまでに矢野^{4), 5)}, Ko⁶⁾, Fukuoka⁷⁾ らが馬鈴薯やイネ幼苗などで報告しており、Akagi ら^{8), 9)} は反復配列に着目した米の品種判別技術について報告している。筆者らもこれまでに市販のランダムプライマーを用いる RAPD 法^{10)~12)}、米飯 1 粒を試料とする判別技術¹³⁾、STS 化プライマーによる粳米の判別技術¹⁴⁾、同じく餅の原料米判別技術¹⁵⁾などについて報告してきた。

STS 化プライマーによるあきたこまちなど、県産米の品種判別については小笠原¹⁶⁾ が報告している。

本論文では、良食味米の代表であり、生産量および消費量の最も多いコシヒカリを対象に、実用段階での簡易で正確な品種判別技術の開発を目的とした。すなわち、対象試料米に、コシヒカリではない米が混入しているかどうかを判別するためのプライマーセット（ネガティブキット、以下ネガキットと略称する）および対象試料米がコシヒカリであるかどうかを判別するためのプライマーセット（ポジティブキット、以下ポジキットと略称する）の 2 種類を開発し、その有用性を確かめたので報告する。

実験方法

(1) 試料

コシヒカリ試料米として、食糧庁消費改善課品質管理室よ

略語の解説: PCR (polymerase chain reaction), DNA (deoxy-ribonucleic acid), CTAB (cetyl-trimethyl-ammoniumbromide)

図1 RAPD 法による作付け上位品種の識別例

1: コシヒカリ, 2: ひとめぼれ, 3: ヒノヒカリ, 4: あきたこまち, 5: きらら 397, 6: キヌヒカリ, 7: ほしのゆめ, 8: はえぬき, 9: むつはまれ, 10: 日本晴

M: DNA 分子量マーカー (ϕ X174 フェージ, *Hae*III)

矢印 1: プライマー S13 の識別バンド, 2: プライマー M11 の識別バンド

図2 STS 化プライマーによる PCR 結果

1: コシヒカリ, 2: ひとめぼれ, 3: ヒノヒカリ, 4: あきたこまち, 5: きらら 397, 6: キヌヒカリ, 7: ほしのゆめ, 8: はえぬき, 9: むつはまれ, 10: 日本晴

M: DNA 分子量マーカー (ϕ X174 フェージ, *Hae*III)

矢印 1: プライマー S13 の識別バンド, 2: プライマー M11 の識別バンド

り提供された平成 12 年産の全国 33 産地の原種あるいは原々種を使用した。33 産地とは、山形、福島、栃木、茨城、埼玉、千葉、新潟、石川、富山、福井、山梨、長野、静岡、愛知、岐阜、三重、滋賀、京都、兵庫、岡山、広島、島根、

鳥取、山口、香川、高知、福岡、大分、佐賀、長崎、熊本、宮崎、鹿児島である。

また、コシヒカリの年次間差異の検討を行うために、平成 11 年産米についても同様に原種あるいは原々種の提供を受

表1 STS 化プライマーの塩基配列

プライマー名	塩基配列
WKA 9	F CCCGCAGTTAGATGCACCAT R CCGCAGTTAGATCAAGTGGC
M 11	F GTCCACTGTGACCACAACAT R GTCCACTGTGGGATTGTTC
G 22	F CTCACTCAAATTTACAGTGCATTTTCTTG R AGGGCCATGATACAAGACTCTGT
B 43	F TGGCCGGCATGACTCAC R ACTGGCCGGCATCAAGAC
S 13	F GTCGTTCTGTGGTTAGGACAGGGT R GTCGTTCTGTGGTGTCTCAGAT
M2CG	F ACAACGCCTCCGATGA R ACAACGCCTCCGACAACAAGAT
E 30	F TACCTGGTTGATGTATACAGATCTGGTT R ATCCCTCGATCCCTCTAGCATTAT
F 6	F ACCACTCCATATATATCATCCAAAG R ACCACTCCATATCACCACAAGG

F: フォワード側プライマー, R: リバース側プライマー

けて試料とした。

コシヒカリ以外の試料米としては、平成 11 年産の全国作付け上位 20 位までの品種、すなわち、ひとめぼれ、ヒノヒカリ、あきたこまち、きらら 397、キヌヒカリ、ほしのゆめ、はえぬき、むつほまれ、日本晴、ササニシキ、つがるロマン、ハナエチゼン、夢つくし、ハツシモ、朝の光、月の光、あいちのかおり、祭晴れ、あきほの 19 品種を農水省農業試験場の稲育種研究室および育成地より提供を受けて使用した。さらに、コシヒカリ判別キットの実用性を確かめるために、有力 30 品種を加えて使用した。農水省食糧庁計画課の統計¹⁷⁾によれば、平成 11 年産米の作付け上位 10 品種で 78%、上位 20 品種で 86%、上位 50 品種で約 95% のシェアを有するので、50 品種の中でコシヒカリと同じ DNA パターンを示す品種がなければ実用的に使用可能であると考えた。

(2) 試料の調製

① 精米粉末試料

初試料をケット科学研究所製の試験用攪拌器で攪拌し、ケット科学研究所製の試験用精米機（パーレスト）を用いて精米歩留まり 90% の精米試料を得た。この精米試料をイワタニ製のミルサー (IFM-100) を用いて粉碎し、粉末試料とした。精米あるいは粉碎時の試料混入を避けるために、1 種類の精米および粉碎終了後ごとに内部を清掃して使用した。

② CTAB 法による DNA の抽出および精製

前項のように調製した精米粉末試料 0.4 g を 2 mL 容の微量遠心チューブに採り、2×CTAB 液 (2% セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB), 20 mM エチレンジアミン 4 酢酸 (EDTA), 1.4 M NaCl, 0.1 M トリスヒドロキシルアミノメタン・塩酸緩衝液 (トリス緩衝液, pH 8.0) 0.6 mL に滅菌水 0.2 mL を加えた水溶液により、65℃ で 30 分間抽出し

表2 コシヒカリポジキットによる判別結果

品種/プライマー	WKA9	B43	M11	G22
1 コシヒカリ	—	+	+	+
2 ひとめぼれ	+	+	+	+
3 ヒノヒカリ	+	—	+	+
4 あきたこまち	+	—	+	—
5 きらら 397	+	—	—	+
6 キヌヒカリ	+	—	+	—
7 ほしのゆめ	+	—	—	+
8 はえぬき	+	—	+	—
9 むつほまれ	—	+	—	—
10 日本晴	—	+	—	—
11 ササニシキ	—	—	+	—
12 つがるロマン	+	—	+	—
13 ハナエチゼン	+	+	+	—
14 夢つくし	+	+	+	—
15 ハツシモ	—	+	+	—
16 朝の光	+	—	—	—
17 月の光	+	+	—	—
18 あいちのかおり	+	—	+	—
19 祭の晴	+	—	+	—
20 あきほ	+	+	—	+
21 ゆきまる	+	+	—	+
22 むつかおり	—	+	—	—
23 まなむすめ	+	+	+	+
24 かけはし	+	+	—	—
25 キヨニシキ	—	+	+	—
26 どまんなか	+	+	+	—
27 越路早生	—	+	+	—
28 ゆきの精	—	+	+	—
29 ほほほの穂	+	+	+	+
30 ゆめあかり	+	+	+	—
31 能登ひかり	—	+	+	—
32 アキツホ	—	+	—	—
33 アケボノ	—	+	—	—
34 朝日	—	+	—	—
35 ヤマホウシ	—	+	—	—
36 ヤマヒカリ	—	+	—	+
37 黄金錦	—	+	+	—
38 コガネサリ	—	+	+	—
39 レイホウ	—	+	—	—
40 ミネアサヒ	—	+	+	—
41 ふさおとめ	+	—	+	+
42 かりの舞	+	+	+	+
43 どんとこい	+	—	+	—
44 アキニシキ	—	+	—	—
45 ながのはまれ	+	+	+	—
46 フクヒカリ	—	+	+	—
47 ゴロビカリ	+	—	—	+
48 初星	+	+	—	+
49 中生新千本	—	+	—	—
50 森のくまさん	+	—	+	+

た。同液に等量のクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1, v/v) を加え、ローテーターによって 15 分間、緩やかに攪拌した。ついで冷却遠心機 (日立 Himac CR21F) によって

図3 コシヒカリポジキットによる全国のコシヒカリの検定結果

1~33: 全国の33産地のコシヒカリ原種あるいは原々種

M: DNA分子重量マーカー (ϕ X174 ファージ, *Hae*III)

矢印 1: B43, 2: M11, 3: G22

遠心分離 (8000 *g*, 15 min) を行い, 上層を新しい微量遠心チューブに移した。これに 10% CTAB 液 0.08 mL と 0.8 mL のクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1, v/v) を加え, 15 分間, ローテーターで緩やかに攪拌した後に遠心分離 (8000 *g*, 15 min) を行い, 上層を新しいチューブに移した。この液に 2.5 倍容の沈殿用緩衝液 (50 mM トリス緩衝液, pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% CTAB) を加え, -80°C で 5 分間静置し, 沈殿を生成させた。遠心分離 (6000 *g*, 15 min) で沈殿を回収し, 1 M NaCl を含むトリス・EDTA 緩衝液 (TE) 0.5 mL に溶解し, 等量のイソプロピルアルコールを添加した。転倒混和した後, 遠心分離 (6000 *g*, 15 min) を行い, 沈殿を回収した。沈殿を 0.2 mL の TE に溶解し, 10 mg/mL の RNase (ニッポンジーン(株) 製, 牛脾臓 RNase A) を 1 μL 加え, 55°C で 1 時間, RNA 分解を行った。処理後, 等量の中性フェノールを加えて精製し, 遠心分離 (8000 *g*, 15 分間) を行った後, 上層を新しいチューブに移した。これに等量のフェノール-クロロホルム (1:1, v/v) を加え, 遠心分離 (8000 *g*, 15 分間) を行い, 上層を新しいチューブに移した。これに 0.2 M の NaCl と 2 倍容の氷冷エタノールを加えて DNA を沈殿させ, 70% エタノール 50 μL で洗浄した後, 30 μL の 1/10 TE で溶解し, 鋳型 DNA とした。

③ RAPD 法

前報¹⁰⁾と同様の方法で RAPD 法による DNA の増幅を行った。すなわち, 滅菌水 10.8 μL , DNA ポリメラーゼ (宝酒造(株) 製, Taq polymerase, 5 U/ μL) 0.2 μL , 反应用緩衝液 (12 mM トリス塩酸, 60 mM KCl, pH 8.3) 2.0 μL , 25 mM の MgCl_2 2.0 μL , 鋳型 DNA 400 ng/1 μL , dNTPs (デオキシリボヌクレオチド 3 リン酸混合液, 100 μM) 2 μL を混合して調製し, PCR に用いる対合プライマーとして, オペロン社 (10 量体) および和光純薬工業(株) (12 量体) の市販ランダムプライマー 2 μL を加えて液量の合計を 20.0 μL とし, ミネラルオイルを重層した。PCR 装置はアステック社のもの (PC-700, 0.5 mL 用ブロック) を用いた。PCR 条件は, 変性を 94°C で 1 分間, アニールを 36°C で 1 分間および伸長を 72°C で 2 分間を 1 セットとし, これを 40 回反復した。

PCR 終了後の反応液にローディングバッファー (1 mM EDTA, グリセリン 30%, ブロモフェノールブルー 0.25%, 滅菌水 69.5%) を 3 μL 加え, 100 μL のクロロホルムでミネラルオイルを除去した後, 12 μL を試料とする 2% 濃度のアガロースゲル (サワデーテクノロジー(株) 製 Ultra-pure Agarose) 電気泳動によって各 DNA を分離し, エチジウム

図4 コシヒカリポジキットによる50品種の識別結果

1: コシヒカリ, 2: ひとめぼれ, 3: ヒノヒカリ, 4: あきたこまち, 5: きらら397, 6: キヌヒカリ, 7: ほしのゆめ, 8: はえぬき, 9: むつはまれ, 10: 日本晴, 11: ササニシキ, 12: つがるロマン, 13: ハナエチゼン, 14: 夢つくし, 15: ハツシモ, 16: 朝の光, 17: 月の光, 18: あいちのかおり, 19: 祭り晴, 20: あきは, 21: ゆきまる, 22: むつかおり, 23: まなむすめ, 24: かけはし, 25: キヨニシキ, 26: だまんなか, 27: 越路早生, 28: ゆきの精, 29: ほほほの穂, 30: ゆきあかり, 31: 能登ひかり, 32: アキツホ, 33: アケボノ, 34: 朝日, 35: ヤマホウシ, 36: ヤマヒカリ, 37: 黄金錦, 38: コガネマサリ, 39: レイホウ, 40: ミネアサヒ, 41: ふさおとめ, 42: かりの無い, 43: どんとこい, 44: アキニシキ, 45: ながのはまれ, 46: フクヒカリ, 47: グロピカリ, 48: 初星, 49: 中生新千本, 50: 森のくまさん

M: DNA 分子量マーカー (ϕ X174 フェージ, *Hae*III)

矢印 1: WKA9, 23 B43, 3: M11, 4: G22

ブロミド染色 (500 ng/mL, 1 時間) を行い, 紫外線照射により品種識別に好適な DNA バンドの探索を行った. 電気泳動装置はコスモバイオ(株) 製ミューピッドを使用し, 100 V で 30 分間泳動した. DNA 分子量マーカーは和光純薬工業(株) 製 Marker 4 (ϕ X174 フェージ, *Hae*III) を使用した.

④ STS 化対合プライマーの調製

RAPD 法で得られた品種識別に好適なバンドの DNA をアガロースゲルから切り出し, ゲル重量の 3 倍量のヨウ化ナトリウムによって DNA を溶出した後, ガラスビーズ (宝酒造(株) 製 EASY TRAP™ Ver. 2) に吸着させて精製した. 得られた DNA を Invitrogen 社製 TOPO XL Cloning Kit によりクローニングした.

⑤ DNA のシーケンシング

前項の方法でクローニングした DNA のシーケンシングを以下の方法で行った. Cy5 存在下の M13 による一本鎖増殖 PCR を行い, 得られた DNA をシークエンサー (Applied

Biosystems 社製 ABI PRISM 310) により配列を決定した. 増殖 PCR の組成は, ABI 社のキットを使用した.

PCR 装置は宝酒造(株) 製 TaKaRa PCR Thermal Cycler MP を使用した. 得られた塩基配列の中からランダムプライマー相当部分を決定し, そこから 3' 側に数残基から十数残基延長することにより, フォワードおよびリバースの各種の対合プライマーを設計した. 対合プライマーの合成はエスベックオリゴサービス株式会社に依頼した.

⑥ STS 化プライマーを用いる PCR

「コシヒカリ」および比較品種から調製した DNA を鋳型 DNA とし, 前項で得られた各種の STS 化対合プライマーを用いて試料の調製③で述べた RAPD 法と同様の方法で PCR を行なった. ただし, アニーリング温度は, 各種の STS 化プライマーの融解温度をもとに, RAPD 法の場合より高い温度 (62°C) を採用した.

図5 コシヒカリポジキット/ネガキットによる混米の検出例
 A: コシヒカリポジキット (プライマー 1: B43, 2: M11, 3: G22)
 B: コシヒカリネガキット I (プライマー 4: WK9)
 C: コシヒカリネガキット II (プライマー 5: F6)
 M: DNA 分子量マーカー (ϕ X174 フェージ, *Hae*III)
 矢印 1: B43, 2: M11, 3: G22, 4: M2CG, 5: F6
 混米割合 1: 0%, 2: 5%, 3: 25%, 4: 50%, 5: 75%, 6: 100%

⑦ マルチプレックス PCR による「コシヒカリ」の識別
 STS 化 PCR の結果に基づいて、「コシヒカリ」と他の品種との識別に有用な STS 化プライマーを各種組み合わせで複数併用して PCR を行い、品種間の差異を生じ、産地および年産の差異を生じない組み合わせを選定した。すなわち、複数年次の全国 33 産地における「コシヒカリ」の原種あるいは原々種のサンプルに対して同じ識別パターンを示し、他の主力品種とは異なる識別パターンを示す STS 化対合プライマーの組み合わせについて探索・検討を行った。

ついで、全国の複数年次の「コシヒカリ」では識別バンドが全く現れず、他の品種の場合には識別バンドが出現するような STS 化対合プライマーの組み合わせ（「コシヒカリネガキット」）についても探索・検討を行った。

実験結果

(1) RAPD 法の結果

RAPD 法の例として、M11 と S13 のプライマーを用いて PCR を行った 10 品種の電気泳動の結果を図 1 に示す。S13 の場合は、「きらら 397」と「ほしのゆめ」のみに 1.8 kbp の識別バンドが出現し、他の品種では出現しなかった。M11 の場合には、「コシヒカリ」、「ひとめぼれ」、「ヒノヒカリ」、「あ

きたこまち」、「キヌヒカリ」、「はえぬき」の場合に識別バンドが出現し、その他の品種では識別バンドが出現しなかった。

(2) STS 化プライマーによる PCR の結果

各種の STS 化プライマーを用いて PCR および電気泳動を行った例を図 2 に、各種の STS 化対合プライマーの塩基配列を表 1 に示す。プライマーの STS 化により、RAPD 法で現れた多数の共通バンドが消失し、識別バンドのみが出現するようになった。

(3) STS 化プライマーの単独使用

前報¹⁰⁾で報告したように、RAPD 法によっても 8 種類のランダムプライマーによる PCR と電気泳動を行うことによって作付け上位 10 品種間の識別が可能であったが、表 1 に示す各種 STS 化プライマーを単独使用した場合においても、その結果を総合することによって、「コシヒカリ」を主力 49 品種のすべてと識別することが可能であった。例えば、平成 11 年産で作付け 2 位の「ひとめぼれ」、同 3 位の「ヒノヒカリ」、同 4 位の「あきたこまち」は、いずれも「コシヒカリ」に他の品種を交配して育成された品種であるが、「ひとめぼれ」とは WKA9 と、「ヒノヒカリ」とは WKA9 および B43、「あきたこまち」とは WKA9, B43, および G22 によって「コシヒカリ」の識別が可能であった。

表3 コシヒカリネガキットによる判別結果

品種/プライマー	WKA9	F6	S13	E30	M2CG
1 コシヒカリ	-	-	-	-	-
2 ひとめぼれ	+	-	-	+	+
3 ヒノヒカリ	+	-	-	-	+
4 あきたこまち	+	-	-	-	-
5 きらら397	+	-	+	-	+
6 キヌヒカリ	+	-	-	+	-
7 ほしのゆめ	+	-	+	-	+
8 はえぬき	+	-	-	-	+
9 むつほまれ	-	+	-	-	+
10 日本晴	-	+	-	-	+
11 ササニシキ	-	-	-	+	-
12 つがりロマン	+	+	-	-	-
13 ハナエチレン	+	-	-	-	+
14 夢つくし	+	-	-	-	-
15 ハツシモ	-	-	-	+	+
16 朝の光	+	+	-	-	-
17 月の光	+	+	-	-	+
18 あいちのかおり	+	-	-	+	+
19 祭り晴	+	+	-	-	-
20 あきほ	+	-	-	-	+
21 ゆきまる	+	-	-	-	+
22 むつかおり	-	-	-	+	+
23 まなむすめ	+	-	-	-	+
24 かけはし	+	-	-	+	+
25 キヨニシキ	-	+	+	+	+
26 どまんなか	+	-	-	-	+
27 越路早生	-	-	-	+	+
28 ゆきの精	-	+	+	-	+
29 ほほほの穂	+	-	-	-	-
30 ゆめあかり	+	-	-	-	+
31 能登ひかり	-	-	-	+	-
32 アキツホ	-	-	+	-	+
33 アケボノ	-	+	-	-	+
34 朝日	-	+	+	-	+
35 ヤマホウシ	-	-	+	+	+
36 ヤマヒカリ	-	+	-	+	-
37 黄金錦	-	+	+	+	+
38 コガネマサリ	-	-	-	-	+
39 レイホウ	-	+	+	+	+
40 ミネアサヒ	+	-	-	+	+
41 ふさおとめ	+	-	-	-	+
42 かりの舞	+	+	-	-	-
43 どんとこい	+	-	-	-	+
44 アキニシキ	-	+	-	+	+
45 ながのほまれ	+	-	-	-	+
46 フクヒカリ	-	-	-	+	-
47 グロビカリ	+	-	-	-	+
48 初星	+	-	-	-	+
49 中生新千本	-	+	+	+	+
50 森のくまさん	+	-	-	-	+

(4) マルチプレックス PCR による「コシヒカリ」と他の品種との識別

プライマーの STS 化の特徴を活かして, PCR において数

種類の STS 化プライマーを併用し, 1 回の PCR と電気泳動で「コシヒカリ」を他の品種と識別可能なプライマーの組み合わせ(コシヒカリキット)を探索した。

その結果, 前項(試料の調製③)の RAPD 法におけるランダムプライマーに代えて, 4 種類の STS 化対合プライマー, すなわち, WKA9F20 および WKA9R20 各 0.3 μ L, M11F20 および M11R20 各 0.15 μ L, B43F17 および B43R18 各 0.05 μ L, G22F29 および G22R23 各 0.15 μ L を併用し, アニール温度を 62°C で PCR を行った場合に「コシヒカリ」と他の品種とが明瞭に識別可能であり, 複数年次の全国のコシヒカリでは共通の結果が得られることが明らかになった。ここで, 各対合プライマー名称の F はフォワード側, R はリバース側を意味し, 数値はヌクレオチドの量体数を表している。PCR の結果を表 2 および図 3, 図 4 に示す。図 3 では高分子側から, プライマー B43, M11, G22 による 3 本のバンドが 33 産地のコシヒカリすべてで共通に現れ, 図 4 では, 上記 3 本のバンドに, 最も高分子側に現れるプライマー WKA9 による識別バンドを加えた 4 本のバンドの有無により, 供試した 50 品種のうちに, コシヒカリと同じ多型を示す品種のないことが示された。

(5) 「コシヒカリ」ネガキットの検討

ポジティブキットにより, 純品種や試料米 1 粒の比較の場合には「コシヒカリ」と他の品種との識別が可能と考えられる。しかし, コシヒカリポジティブキットで WKA9 の識別バンドが出現する品種ならば少量混米されても検出が可能であるが, B43, M11, G22 のいずれかがマイナスとなることで「コシヒカリ」と識別される品種, 例えば図 4 における「むつほまれ」, 「日本晴」などを少量混米した場合には, 「コシヒカリ」のポジティブバンドに隠れて検出が困難となる場合が想定される。

「コシヒカリ」に他の品種を少量混合した場合にも検出できることを目標に, STS 化プライマーの適用を試みた。すなわち, 「コシヒカリ」DNA に「むつほまれ」DNA を 0%, 5%, 25%, 50%, 75% それぞれ混合し, コシヒカリポジティブキットおよび①WKA9 および M2CG, ②S13, F6, E30 の 2 種類のマルチプレックスの合計 3 種類の PCR と電気泳動を行った。その結果を図 5 に示す。コシヒカリポジティブキットでは「むつほまれ」75% 混合の場合にようやく M11 および G22 のバンドが薄くなってきたが, 5~50% の少量混合の場合は検出がほとんど不可能であった。一方, 上記①および②の場合には, M2CG(①)あるいは F6(②)の識別バンドにより, 「むつほまれ」5% 混合の場合でも検出が可能であった(図 5)。

さらに, 実用的に使用しやすいプライマーセットとして, STS 化プライマーによるマルチプレックス PCR を「コシヒカリネガティブキット」として, 「コシヒカリ」とそれ以外の多種の品種との識別性について検討した。その結果, 前述の①WKA9 および M2CG, ②S13, F6, E30 の 2 種類のマ

図6 コシヒカリネガキットIによる50品種のPCR結果

左図: 50品種のPCR結果

1: コシヒカリ, 2: ひとめぼれ, 3: ヒノヒカリ, 4: あきたこまち, 5: きらら397, 6: キヌヒカリ, 7: ほしのゆめ, 8: はえぬき, 9: むつほまれ, 10: 日本晴, 11: ササニシキ, 12: つがるロマン, 13: ハナエチゼン, 14: 夢つくし, 15: ハツシモ, 16: 朝の光, 18: あいちのかおり, 19: 祭り晴, 20: あきは, 21: ゆきまる, 22: むつかおり, 23: まなむすめ, 24: かけはし, 25: キヨニシキ, 26: だまんなか, 27: 越路早生, 28: ゆきの精, 29: ほほの穂, 30: ゆきあかり, 31: 能登ひかり, 32: アキツホ, 33: アケボノ, 34: 朝日, 35: ヤマホウシ, 36: ヤマヒカリ, 37: 黄金錦, 38: コガネマサリ, 39: レイホウ, 40: ミネアサヒ, 41: ふさおとめ, 42: かりの舞い, 43: どんとこい, 44: アキニシキ, 45: ながのほまれ, 46: フクヒカリ, 47: ゴロビカリ, 48: 初星, 49: 中生新干本, 50: 森のくまさん

M: DNA分子量マーカー (ϕ X174 フェージ, *Hae*III)

矢印 1: WKA9, 2: M2CG

右図: コシヒカリの検定結果

1~33: 全国の33産地のコシヒカリ原種あるいは原々種

A: ひとめぼれ, B: きらら397, C: ほしのゆめ, D: はえぬき

M: DNA分子量マーカー (ϕ X174 フェージ, *Hae*III)

矢印 1: WKA9, 2: M2CG

ルチプレックスの場合、主力品種のほとんどで識別バンドが出現し、「コシヒカリ」では全国の33産地(平成12年産)すべてで識別バンドが出現しないことを確認した。この結果を表3および図6、図7に示す。すなわち、図6では、高分子側から、プライマーWKA9およびM2CGによる識別バンドのいずれかがコシヒカリ以外の多くの品種で出現し、図7では、高分子側から、プライマーS13、F6、E30による3本の識別バンドのいずれかがコシヒカリ以外の多くの品種で出現する。表3に示すように、供試50品種のうち、コシヒカリ以外の49品種すべてにおいて、これら5本の識別バンドのうちのいずれかが現れることが明らかになった。

考 察

食糧庁の調査¹⁸⁾によれば、米を購入する場合に、最も重視する項目は食味である。また、Kagatsumeによると、食味関

連項目の中でも、特に品種と産地による「銘柄」が重視される¹⁹⁾。食糧研究所の報告でも、品種が米の食味に最も強く影響すると述べられている²⁰⁾。

「コシヒカリ」は良食味であり、栽培面積は34.6% (平成11年産)と、わが国で第1位である¹⁷⁾。しかし、「コシヒカリ」と表示すれば高価で販売されるので、「コシヒカリ」ではない米を「コシヒカリ」と表示したり、「コシヒカリ」に他の米を混合しながら、「コシヒカリ100%」と表示する例がある。

本研究は、PCRマルチプレックス法の有用性を明らかにすることを目的とし、具体的には、「不正混米」を検出する技術の開発を実用例として示すことを目的に行われたものである。

従来のRAPD法でもランダムプライマーの種類およびPCRの回数の増加によってこの目的を達成することは不可能ではない^{10)~12)}が、多数の共通バンドの中から1~2本の

図7 コシヒカリネガキット II による 50 品種の PCR 結果

左図: 50 品種の PCR 結果

1: コシヒカリ, 2: ひとめばれ, 3: ヒノヒカリ, 4: あきたこまち, 5: きらら 397, 6: キヌヒカリ, 7: ほしのゆめ, 8: はえぬき, 9: むつはまれ, 10: 日本晴, 11: ササニシキ, 12: つがるロマン, 13: ハナエチゼン, 14: 夢つくし, 15: ハツシモ, 16: 朝の光, 17: 月の光, 18: あいちのかおり, 19: 祭り晴, 20: あきは, 21: ゆきまる, 22: むつかお, 23: まなむすめ, 24: かけはし, 25: キヨニシキ, 26: どまんなか, 27: 越路早生, 28: ゆきの精, 29: ほほほの穂, 30: ゆきあかり, 31: 能登ひかり, 32: アキツホ, 33: アケボノ, 34: 朝日, 35: ヤマホウシ, 36: ヤマヒカリ, 37: 黄金錦, 38: コガネマサリ, 39: レイホウ, 40: ミネアサヒ, 41: ふさおとめ, 42: かりの舞い, 43: どんとこい, 44: アキニシキ, 45: ながのほまれ, 46: フクヒカリ, 47: ゴロピカリ, 48: 初星, 49: 中生新千本, 50: 森のくまさん

M: DNA 分子量マーカー (ϕ X174 フェージ, *Hae*III)

矢印 1: S13, 2: F6, 3: E30

右図: コシヒカリの検定結果

1~33: 全国の 33 産地のコシヒカリ原種あるいは原々種

A: きらら 397, B: ほしのゆめ, C: むつはまれ, D: 日本晴, E: カカニシキ, F: あいちのかおり

M: DNA 分子量マーカー (ϕ X174 フェージ, *Hae*III)

矢印 1: S13, 2: F6, 3: E30

識別バンドの有無を判断するために識別の誤りを犯す可能性があること, 多数のプライマーと PCR を使用することは時間と経費の点から実用的ではないことなどの理由から, STS 化プライマーを組み合わせた判別用プライマーセット (マルチプレックスキット) を開発することが必要とされていた。

今回, 前報までに報告したプライマーに新しいプライマーを探索・追加し, 両方を合わせて STS 化を行った。その結果, WKA9, B43, M11, G22 の 4 種類のプライマーを選定した。各プライマーが独立と仮定するならば, 4 種類のプライマーの場合は 2^4 で 16 種類の場合が想定される。幸い, この 4 種類のプライマーセットの場合には, 「コシヒカリ」と同パターンを示す品種は, 供試 50 品種中になかった。

また, 実験結果 (5) で述べたように, 「コシヒカリ判別キット」の場合は, 全国の 33 産地の「コシヒカリ」では差異が現れてはならず, 年次間差異も現れてはならない。そこで 33

産地について平成 11 年産, 平成 12 年産の原種あるいは原々種で差異のないことを確認し, 入手可能な平成 10 年産「コシヒカリ」についても年次間差異の現れないことを確認した。

本キットの限界として, 今回対象としなかった栽培面積の少ない品種や新品種の中には, 今後, 「コシヒカリ」と同じパターンを示すものが現れる可能性もある。しかし, 表 1 に示した他種プライマーや後述のネガティブキットにより, 最終的な識別は可能と考えられる。

ポジティブキットにより, 純品種や試料米 1 粒の比較の場合には「コシヒカリ」と他の品種との識別が可能となったが, 米の流通, 消費の段階では, 各種の混米の可能性が考えられる。すなわち, コシヒカリポジティブキットで WKA9 の識別バンドが出現する品種ならば少量混米されても検出が可能であるが, B43, M11, G22 のいずれかがマイナスとなるこ

とで「コシヒカリ」と識別される品種、例えば、図 4 に示す「むつはまれ」、「日本晴」などを少量混米した場合には、「コシヒカリ」のポジティブバンドに隠れて検出が困難となる場合がある。こうした場合に対処するために、実験結果 (6) で述べた「コシヒカリネガティブキット」の開発を行った。

すなわち、「コシヒカリ」の場合には識別バンドが現れず、「コシヒカリ」以外の品種では識別バンドが現れるプライマーを選択してマルチプレックス化することにより、「コシヒカリネガティブキット」を作製した。併用した場合、プライマー同士の影響があるので、1 種類のセットにまとめることは不可能であったが、「WKA9, M2CG」および「S13, F6, E30」の 2 種類のネガキットを作成した。これらのプライマーセットを用いることにより、「コシヒカリ」に混米された少量の他品種米を検出することが可能となった。すなわち、多量に存在するコシヒカリでは識別バンドが出現しないので、5 種類のプライマーに相当する何らかの識別バンドが出現すれば、他品種米が混合されていることが判明する。

この「コシヒカリネガティブキット」の場合も、全国の「コシヒカリ」原種および原々種で 2 年間にわたって検定を行い、識別バンドが全く出現しないことを確かめた。

PCR 品種判別は、①育種段階での品種の確認、②種子の保存、配布段階での品種の保証、③米の生産、集荷段階での品種の確認、④農産物検査における品種の鑑定、⑤卸、精米など、米の流通・一次加工段階での原料米（玄米）および出荷製品（精米）の品種の判定、⑥委託炊飯や市販弁当などの米飯段階での原料米の品種判定、など米を巡る育種・生産から消費・加工の段階まで、幅広く利用されることが期待される。最近、新しい品種である「ミルキークイーン」の DNA 品種判別技術の報告²¹⁾や AFLP などの利用²²⁾も報告されており、この分野の技術開発は日進月歩であるので、今後ますます DNA を利用した判別技術の改善、開発が進むものと期待される。

要 約

精米の袋に品種、産地、生産年を表示することが義務づけられたため、客観的方法によって表示の正否を確かめるための技術開発が必要とされている。そこで、農業試験場の基準品種を試料とし、PCR 法による実験に供試した。有望な RAPD プライマーを用いて品種識別バンドを選定し、アガロースゲルから切り出した DNA を大腸菌に組み込んで増幅し、その塩基配列を決定した。その配列の RAPD プライマー部分から延長して 15~29 量体のフォワードプライマーおよびリバースプライマーを設計した。こうして作成した STS 化プライマーを組み合わせることにより、「コシヒカリ」を他の品種と識別するためのポジティブプライマーセットおよびネガティブプライマーセットを開発した。これらのセットを

用いる PCR により、全国の 33 産地の「コシヒカリ」では同一の DNA パターンが得られ、「コシヒカリ」と他の 49 品種との識別が可能であることが明らかとなった。このプライマーセットの開発により、1 粒の米試料による「コシヒカリ」の同定が可能であるばかりでなく、他品種米の混入も簡易かつ明瞭に検出することが可能となった。

謝 辞 本研究は、生研機構基礎研究「広範な特性の米及び変異米の食味特性の解明および新評価技術」の中で行われた。

基準品種の提供をいただいた食糧庁消費改善課品質管理室およびプライマーの合成と配合にご協力いただいた宝酒造株式会社バイオ営業部の宮村 毅、雲 聡の両氏に感謝いたします。

また、有益なご助言をいただいた農業生物資源研究所の川崎信二博士に感謝いたします。

- 1) 松尾孝嶺：農業技術研究所研究報告，D3.1, 1-111 (1952).
- 2) 松永隆司・田村真一郎：食の科学，No. 131, 60-71 (1989).
- 3) M. Nakagahra: *Trop. Agr. Res. Ser.*, **11**, 77-82 (1978).
- 4) 矢野 博：農業及び園芸，**68**, 25-31 (1993).
- 5) 矢野 博・原田久也：DNA 多型，**7**, 219-222 (1999).
- 6) H. L. Ko, D. C. Cowan, R. J. Henry, G. C. Graham, A. B. Blakeney, and L. G. Lewin: *Euphytica*, **80**, 179-189 (1994).
- 7) S. Fukuoka, K. Hosaka, and O. Kamijima: *Japan J. Genet.*, **67**, 243-252 (1992).
- 8) H. Akagi, Y. Yokozeki, A. Inagaki, and T. Fujimura: *Theor. Appl. Genet.*, **93**, 1071-1077 (1996).
- 9) 赤木宏守：米麦改良，2 月号，14-24 (2001).
- 10) 大坪研一，藤井 剛，橋野陽一，豊島英親，岡留博司，中村澄子，布施 隆，川崎信二：日本食品科学工学会誌，**46**, 117-122 (1999).
- 11) 橋野陽一，藤井 剛，中村澄子，吉橋 忠，布施 隆，真鍋勝，川崎信二，大坪研一：食品総合研究所研究報告，No. 62, 9-12 (1998).
- 12) 吉橋 忠・中村澄子・藤井 剛・川崎信二・大坪研一：日本食品科学工学会誌，**46**, 250-254 (1999).
- 13) 大坪研一・中村澄子・諸岡 宏，藤井 剛・布施 隆・川崎信二：日本食品科学工学会誌，**46**, 262-267 (1999).
- 14) 大坪研一・與座宏一：精米工業，No. 183, 10-13 (2000).
- 15) 大坪研一，中村澄子，與座宏一，穴戸功一：日本食品科学工学会誌，**48**, 306-310 (2001).
- 16) 小笠原博信・高橋砂織：日本食品科学工学会誌，**47**, 632-633 (2000).
- 17) 食糧庁計画課：米穀の品種別作付け状況，p. 16 (2001).
- 18) 秋元菜穂子：食糧月報，**5**, 46-52 (2000).
- 19) M. Kagatsume: Quality Evolution and the Rice Marketing Policy in Japan, in *International Symposium on Rice Quality*, Nottingham, UK, Nov. 24, 1997).
- 20) 谷 達雄，吉川誠次，竹生新治郎，柳瀬 肇，堀内久弥：食糧研究所技術普及シリーズ No. 7, pp. 29-42 (1969).
- 21) 佐藤宏一，鈴木保宏，坂井 真，井辺時雄：育種学研究，**3** (別 2)，170 (2001).
- 22) 河野いずみ，竹内善信，島野公利，佐々木卓治，矢野昌裕：育種学研究，**2**, 197-203 (2000).