LAMP 法を利用したコシヒカリの高精度・迅速識別

岸根雅宏*, 奥西智哉

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

Rapid Identification of Rice Cultivar “Koshihikari” Using Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Masahiro Kishine* and Tomoya Okunishi

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

A simple and rapid method for identification of rice cultivar “Koshihikari” has been developed using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Primers for detection of Koshihikari (positive primer) and cultivars other than Koshihikari (negative primer) were designed for blast resistant gene *Pi5-1* and its susceptible allele. DNA amplification analysis of the top 48 cultivars using positive and negative primers showed that both primers had approximately 90% accuracy in detecting Koshihikari and cultivars other than Koshihikari. For rapid detection from rice grains, a simple DNA extraction method using sodium hydroxide was developed. LAMP amplification using DNA extracted by this method was almost equivalent to that using column-purified DNA. Using these methods, we tested LAMP detection of Koshihikari and Hitomebore (representative of cultivars excluding Koshihikari) grain contamination, and showed that both primers could detect 1% contamination.

(Received Jul. 25, 2011 ; Accepted Aug. 22, 2011)

Keywords : loop-mediated isothermal amplification, Koshihikari, cultivar identification, rice

キーワード : LAMP 法, コシヒカリ, 品種識別, コメ

JAS 法に基づき、精米・玄米には品種とその使用割合の表示が義務づけられており、表示と異なる品種を使用することや、複数品種からなるブレンド米に単一原料米の表示を行うことは違反となる。しかしながら、コシヒカリを中心とした良食味品種への偽装表示がこれまで度々問題となってきたため、消費者への信頼性の確保として DNA 分析を用いた品種識別技術が求められ、種々の手法開発が行われてきた。一方、平成 22 年より施行された米トレーサビリティー法により、取引記録の作成・保存が義務づけられたことから、米穀の流通時における品種等の情報管理をより厳密に行う必要性が高まっている。そのため、今後は生産・流通・加工等の各段階において、簡易かつ迅速に品種を識別する技術が必要となると考えられる。

従来、コメの品種識別には random amplified polymorphic DNA (RAPD) や single nucleotide polymorphisms (SNPs), simple sequence repeat (SSR) などのマーカーを利用した手法が用いられてきた^{1)~4)}。これらはいずれも、複数のマーカーを用いて PCR を行い、得られた増幅多型パターンを基準となる品種と比較して品種を同定することを基本とする。そのため、DNA 抽出から PCR、電気泳動、

データ解析まで少なくとも半日から 1 日程度が必要であり、また、品種混入サンプルでは多型パターンの解析が困難となる場合が多い。一方、コシヒカリなどの識別に特化した簡易 PCR キットでは、多型解析が容易であり、品種混入にも対応可能であるが²⁾、検出時間の面では通常の識別手法と大きくは変わらない。

Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法は、近年開発された遺伝子増幅法であり⁵⁾、一定温度で反応が進行するためサーマルサイクラーを必要とせず、反応後の電気泳動による増幅確認も不要なため、1 時間以内に反応が終了する。イネにおいては、育種における遺伝子マーカーの簡易選抜への利用が報告されているが⁶⁾⁷⁾、品種識別での利用例はこれまで知られていない。これはおそらく、日本のイネ主要品種のほとんどが近縁な関係にあるため、従来のように複数マーカーによる多型パターン解析でなければ識別を行うことが難しく、LAMP 法の簡易性を活用できるマーカー（すなわち、品種特異的マーカー）の開発が困難であるためと考えられる。言い換えれば、品種特異的なマーカーを見いだすことができれば、LAMP 法による簡易・迅速な品種識別が可能となると考えられる。

本報では、日本で最も流通量の多いコシヒカリを対象として、その陽性・陰性を簡易に判定できる LAMP マーカー

〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

* 連絡先 (Corresponding author), kishine@affrc.go.jp

の開発を行った。また、コメ粒サンプルからの簡易 DNA 抽出法もあわせて検討し、LAMP 法を用いたコメ品種識別の実用的手法開発を行った。

実験方法

1. 試料および DNA 精製

LAMP 法および簡易 DNA 抽出法の条件検討には、いずれも市販の茨城県産コシヒカリ、ひとめぼれを用いた。また、PCR によるマーカーの多型確認には、各都道府県より入手した原種もしくはそれに準ずる種子を用いた。精製 DNA の調整には GM quicker 2 (ニッポンジーン) キットを用い、玄米 0.5 g (20~25 粒程度) から、添付のプロトコルに従い抽出した。

2. LAMP 反応

LAMP プライマーの作製には、陰性プライマー (コシヒカリ以外の品種を検出) として、いもち病抵抗性遺伝子 *Pi5-1* (Accession: EU869185) の第 1 イントロン配列を、陽性プライマー (コシヒカリを検出) として日本晴の感受性遺伝子座の相当配列を用いた。プライマー設計には、LAMP 法プライマー設計支援ソフト PrimerExplorer V4 (<http://primerexplorer.jp/>) を利用した。

反応液組成は、20 mM Tris-HCl (pH8.8), 10 mM KCl, 8 mM MgSO₄, 0.1% Tween20, 0.8 M Betain, 1.0 mM dNTPs, 0.2 μM の F3 および B3 プライマー, 1.6 μM の FIP および BIP プライマー, 0.8 μM の LF および LB プライマー, 6.4 unit の *Bst* DNA polymerase (New England Biolabs), 2 μL の DNA 溶液を含む全量 20 μL とした。また、LAMP 反応は、リアルタイム濁度測定装置 Realoop-30 (昭光サイエントフィック) を用いて 63°C, 1 時間の反応を行い、増幅反応の副産物であるピロリン酸マグネシウムによる濁度変化を増幅の指標として検出した。

3. プライマーの識別精度の確認

PCR によるプライマーの識別精度の確認は、C1000 サーマルサイクラー (BioRad) を用いて、反応液 10 μL あたり、5 ng の抽出 DNA, 0.25 μM の F3 および B3 プライマー, 5 μL の 2xGotaq Master Mix (Promega) を混合し、95°C 2 分, 30 サイクルの 95°C 30 秒; 50°C 30 秒; 72°C 30 秒, 72°C 5 分の温度条件で行った。PCR 産物は、2% アガロースゲルで電気泳動し、増幅の有無を確認した。

4. コメからの簡易 DNA 抽出

簡易 DNA 抽出の材料には、米粒 (玄米および精米) とフードミル (Iwatani IMF-100) で粉碎した粉末試料 (玄米および精米) を用いた。米粒の場合は、1 粒ずつ PCR 用 8 連チューブに入れ、50 μL の 50 mM NaOH を加え、激しく 1 分間ボルテックスにより攪拌した。卓上の簡易遠心機で遠心分離した後、上清を TE にて 10 倍希釈し、2 μL を LAMP 反応に用いた。粉末試料の場合は、2 倍量 (v/w) の 50 mM NaOH を加え、ボルテックス、遠心分離したの

ち、上清を 50 倍希釈し、2 μL を LAMP 反応に用いた。なお、LAMP 反応が阻害されるため、上清を回収する際には浮遊物をできるだけ含まないようにした。

混入試料を用いた感度検討には、コシヒカリおよびひとめぼれの粉末試料を全量 10 g となるよう混合した試料を作製し、それから簡易抽出を行った。

実験結果および考察

1. コシヒカリ識別用 LAMP プライマーの作製

コシヒカリに特異的な LAMP プライマーについては、いもち病抵抗性遺伝子をターゲット領域として作製することとした。コシヒカリは、いもち病に弱く、抵抗性遺伝子を持たない (推定遺伝子型が「+」) とされている一方、近代の稲育種においては、いもち病抵抗性は最も重要な選抜形質の 1 つであり、ほとんどの新規育成品種がいずれかの抵抗性遺伝子を保有している。特に、主要ないもち病真性抵抗性遺伝子である *Pii* については、コシヒカリを除く生産上位品種はいずれも保有していることから、これを利用してコシヒカリ識別用 LAMP プライマーを作製することとした。ただし、*Pii* についてはその遺伝子が第 9 染色体上に存在することが明らかになっているものの未だ同定されていないため、*Pii* と同一遺伝子あるいは極近傍に存在すると考えられている抵抗性遺伝子 *Pi5-1* の塩基配列を用いることとした⁸⁾⁹⁾。

Pi5-1 と日本晴のもつ *Pi5-1* 対立遺伝子 (感受性遺伝子) との塩基配列を比較したところ、第一イントロンに相当する領域で両者が大きく異なることが明らかとなった。そこで、コシヒカリ検出用プライマー (すなわち *Pii* および *Pi5-1* 感受性マーカー、以下陽性プライマーとする) として *Pi5-1* の日本晴対立遺伝子の配列を、コシヒカリ以外の品種検出用プライマー (すなわち *Pii* および *Pi5-1* 抵抗性マーカー、以下陰性プライマーとする) として *Pi5-1* の配列を用い、LAMP プライマーの設計を行った。いずれも数組のプライマーを作製しその反応性を検討した結果、増幅の立ち上がり時間が最も短かったものを最終的なプライマーセットとして採用した (表 1)。

2. コシヒカリ識別 LAMP プライマーの識別精度

作製したコシヒカリ識別用 LAMP プライマーは、*Pi5-1*、すなわち *Pii* の有無を基盤としているため、育成時等に検定される *Pii* の推定遺伝子型から、その識別性を推定することが可能であった。しかし、作製したプライマーが推定通りの識別性を示すか否か、また、どの程度の精度でコシヒカリを識別可能であるかを改めて確認する必要がある。LAMP 用プライマーのうち F3 および B3 のみを用いて PCR による解析を行った。なお、対象には、平成 22 年産うるち米検査数量の 96.7 % を占める上位 48 品種を用いた¹⁰⁾。

PCR による確認の結果、17 位までの品種ではコシヒカリは陽性プライマーにのみ検出され、それ以外の品種はい

表 1 コシヒカリ識別用 LAMP プライマー

識別性	プライマー	配列
陽性 (P)	P-F3	GAGACCCTTTCTTTATACAGCT
	P-B3	TCGGAAGCCAATCTCTT
	P-FIP	GGCACCCTAGAATGGCTTG-GGAAAAATCCCAATCCGAG
	P-BIP	CGTGCCCTACTAATACACTCC-CCAGAAGAATTCCTTCTGCA
	P-LF	TTGCCTAACTGCGAATCAG
	P-LB	GATCCAATCACCGGCTAATTCC
陰性 (N)	N-F3	ACACTCCTAATCTCATAACTGAG
	N-B3	CATTCTTTTCTTTCATCGGTA
	N-FIP	CATCCTTAGTTACTGCATAGGCAAT-GCTTCAAGCTTTTCCTCC
	N-BIP	CCTGCCCATAGTAATACACCTCT-TTTTAGAATGCCCCGCAA
	N-LF	CCATTGTCCAAAAAATTTGAAGC
	N-LB	ACATCTCATTAATGTAGATCCATTC

図 1 陽性および陰性プライマーの増幅多型

P, 陽性プライマー. N, 陰性プライマー. 1, コシヒカリ (福井); 2, ひとめぼれ (宮城); 3, あきたこまち (秋田); 4, ヒノヒカリ (宮崎); 5, ななつぼし (北海道); 6, はえぬき (山形); 7, きらら 397 (北海道); 8, まっしぐら (青森); 9, つがるロマン (青森); 10, こしいぶき (新潟); 11, キヌヒカリ (滋賀); 12, あさひの夢 (愛知); 13, ほしのゆめ (北海道); 14, ふさこがね (千葉); 15, ハナエチゼン (福井); 16, 夢つくし (福岡); 17, ふさおとめ (千葉); 18, めんこいな (秋田); 19, ササニシキ (宮城); 20, あいちのかおり SBL (愛知); 21, ゆめぴりか (北海道); 22, ふっくりんこ (北海道); 23, 日本晴 (滋賀); 24, アケボノ (岡山); 25, おほろづき (北農研セ); 26, ゆめみづほ (石川); 27, 夢しずく (佐賀); 28, てんたかく (富山); 29, ハツシモ (岐阜); 30, 彩のかがやき (埼玉); 31, さがびより (佐賀); 32, きぬむすめ (島根); 33, ミルキークイーン (作物研); 34, チヨニシキ (愛知); 35, 森のくまさん (熊本); 36, まなむすめ (宮城); 37, つや姫 (山形); 38, 秋の詩 (滋賀); 39, なすひかり (栃木); 40, にこまる (長崎); 41, ゆきん子舞 (新潟); 42, イクヒカリ (福井); 43, ゆめひたち (茨城); 44, あきまさり (熊本); 45, 朝日 (岡山); 46, ゴロビカリ (群馬); 47, いわてっこ (岩手); 48, むつほまれ (青森). サンプル番号は検査数量の多い順.

ずれも陰性プライマーで検出されることが確認され, 上位品種については識別プライマーが有効であることが示された (図 1). 一方, めんこいな (18 位), ササニシキ (19 位), 日本晴 (23 位), アケボノ (24 位), ハツシモ (29 位), ミルキークイーン (33 位), チヨニシキ (34 位), 秋の詩 (38 位), ゆめひたち (43 位), 朝日 (45 位), いわてっこ (47 位), むつほまれ (48 位) の 12 品種については, 陽性プライマーで検出されることが確認され, コシヒカリと誤判定されることが示された. ただし, これら 12 品種を合計した検査数量はうるち米全体の 4.0% に過ぎず, コシヒカリ (同 34.3%) と比較して十分に小さい. 従って, 上位 48 品種に限定した中では, 陽性プライマーによって検出された品種が正しくコシヒカリである確率は, $34.3 / (4.0 + 34.3)$

$= 89.5\%$ となり, 比較的高精度にコシヒカリを識別できることが明らかとなった.

一方, 新潟県のコシヒカリについては, 平成 17 年よりいもち病抵抗性遺伝子を導入したコシヒカリ新潟 BL に全面的に切り替えられている. コシヒカリ新潟 BL は, 異なるいもち病抵抗性遺伝子を導入したコシヒカリを複数混植するマルチラインとして栽培されており, この構成品種のうち, コシヒカリ新潟 BL2 号, 10 号および 11 号は抵抗性遺伝子として *Pii* を持っている. 平成 23~25 年産米では, 2 号および 11 号と *Pii* を持たない 1 号と 4 号の品種構成が予定されており, 新潟県産コシヒカリのバルク検査では, 陽性・陰性のどちらのプライマーも反応することが予想される. 新潟県産コシヒカリは, うるち米全体の検査数量の

うち 6.7% (全産地のコシヒカリのうち 19.5%) を占めているが¹⁰⁾、陰性プライマーで検出される 35 品種 (図 1) は全体の 58.3% である。従って、上位 48 品種に限定した中では、陰性プライマーで検出された品種が正しくコシヒカリ以外の品種である確率は、 $58.3 / (6.7 + 58.3) = 89.7\%$ となり、陰性プライマーも比較的高精度にコシヒカリ以外を識別できることが明らかとなった。

3. 精製 DNA を用いた LAMP プライマーの検出感度

作製した LAMP プライマーの鋳型 DNA 濃度による検出感度を検討した。DNA は、コシヒカリおよびひとめぼれ (コシヒカリ以外の品種の代表) の玄米から抽出キットで精製したものを利用した。鋳型濃度を 10 倍ごとに变化させたサンプルを分析した結果、どちらのプライマーも 1 反応あたり 10 pg 以上の DNA を添加した場合に検出可能であることが明らかとなった (図 2)。また、立ち上がり時間と最大濁度を考慮すると 10 ng もしくは 1 ng の精製 DNA を鋳型として用いることが最も適しており、その場合には 15~20 分には濁度変化の立ち上がりが認められ、30 分までには十分な増幅が確認できることが明らかとなった。

一般に、LAMP 法では 1 反応あたり 10 コピー程度の初期鋳型量から増幅可能であるとされている。イネでは核ゲノムサイズが 390 Mb と推定されているため¹¹⁾、1 コピーは約 0.43 pg と計算できる。10 コピーでは約 4.3 pg となり、抽出 DNA には葉緑体などのオルガネラゲノムが存在していることを考慮すれば、10 pg という検出限界は妥当な値であると考えられた。

4. コメからの簡易 DNA 抽出

LAMP 法の利点を活用し迅速な品種識別法とするためには、DNA 抽出もキットを用いた手法ではなく、より簡易な手法開発が必須であると考えられた。そこで、米粒もしくはコメ粉末試料からの簡易 DNA 抽出法について、これまでに報告されている手法等を検討した結果、水酸化ナトリウム溶液による抽出法が簡易性および LAMP 反応性に優れていることが明らかとなった。本手法は、試料に 2 倍量 (v/w、米粒の場合は 50 μ L) の 50 mM 水酸化ナトリウム溶液を加え激しく混合し、遠心分離した上清を TE で 10~50 倍に希釈して、その一部を LAMP 反応用いるもので、操作に磨砕や加熱を必要としない。

本手法で抽出した DNA とキットで精製した DNA とを LAMP 反応に供試した結果、陽性および陰性プライマーどちらも立ち上がり時間が精製 DNA に比べわずかに遅れるものの、ほぼ同等の反応性を示し、水酸化ナトリウム溶液による簡易抽出が実用性の高い手法であることが確認された (図 3)。また、本手法を用いることで、16 サンプル以下であれば 30 分以内に DNA が調製できることから、LAMP 反応と合わせても 1 時間程度での検出が可能であることが示された (データ略)。

図 2 精製 DNA を用いた LAMP プライマーの検出感度

(A) 陽性プライマー、(B) 陰性プライマー。NC (negative control) は、(A) ひとめぼれ DNA 10 ng、(B) コシヒカリ DNA 10 ng。

なお、本簡易手法で抽出した DNA を PCR に用いた場合は、クルードサンプル用 PCR 酵素を用い、かつ TE による希釈倍率を 1~5 倍程度にした場合にのみ増幅が認められた (データ略)。従って、本手法による DNA 抽出は、高感度かつ夾雑物の影響を受けにくいという LAMP 法の特長に適合したものであり、PCR に用いるには上記のような条件をさらに検討する必要があると考えられた。

5. 混入試料を用いた LAMP プライマーの検出感度

開発した LAMP プライマーおよび簡易 DNA 抽出法が、品種混入の検出においてどの程度有効であるかを確認するため、あらかじめコシヒカリとひとめぼれを一定割合で混合した試料を作製し、その検出を試みた。それぞれ、0%、1%、5%、20%、100% 混入したサンプルを分析した結果、どちらのプライマーも、混入量の減少に伴って立ち上がり時間が遅くなるものの、60 分以内に 1% の混入サンプルから検出可能であった (図 4)。ただし、5% 以上の混入についてはほぼ安定して検出可能であるのに対し、1% の混入は、立ち上がり時間がかなりばらつく傾向が認められた。

図 3 簡易 DNA 抽出サンプルの LAMP 反応性

(A) 陽性プライマー。PC, コシヒカリ精製 DNA10ng; NC, ひとめぼれ精製 DNA10ng. (B) 陰性プライマー。PC, ひとめぼれ精製 DNA10ng; NC, コシヒカリ精製 DNA10ng.

図 4 品種混入サンプルを用いた検出感度

(A) 陽性プライマー, (B) 陰性プライマー。パーセンテージは、ひとめぼれ (A), コシヒカリ (B) に対する他方の品種の混入率。

め、操作上のコンタミネーションを加味すれば、5% 以上の混入に対して実用的に使用できると結論づけた。

本報で開発したコシヒカリの迅速識別法は、(1) コメ試料からの DNA 抽出～LAMP 法による検出まで約 1 時間で終了、(2) 1 プライマーによる分析だけで約 90% の確度でコシヒカリおよびそれ以外を検出可能、(3) 少なくとも 1% の品種混入から検出可能、という利点を有しており、迅速性が求められるスクリーニング用途において特に有用であると考えられる。また、開発したコシヒカリ検出用陽性・陰性プライマーは、実質的には *Pii* 遺伝子の有無を検出しているため、これらのプライマーはイネ育種における *Pii* 選抜マーカーとしても非常に有効であると考えられた。今後は、コシヒカリだけでなく他の品種においても品種特異的マーカーを作製することにより、LAMP 法の利点を活かした迅速・簡易な品種識別法が開発できると期待される。

要 約

LAMP 法を用いた簡易で迅速なコシヒカリの識別技術を開発した。コシヒカリを検出するプライマー（陽性プライマー）およびコシヒカリを除く品種を検出するプライマー（陰性プライマー）は、いもち病抵抗性遺伝子である *Pi5-I* とその感受性対立遺伝子の配列を用いて作製した。陽性および陰性プライマーによる上位 48 品種の増幅解析の結果、両プライマーは、それぞれコシヒカリもしくはコシヒカリ以外の品種を約 90% の確度で検出可能であることが示された。また、粒サンプルからの迅速な識別を目指し、水酸化ナトリウムを用いた極簡易 DNA 抽出法の開発も合わせて行った。簡易法で抽出した DNA は、キットで精製した DNA とほぼ同等の LAMP 増幅を行うことが可能であった。これらの手法を組み合わせ、コシヒカリとひとめぼれ（コシヒカリ以外の品種の代表）間における試料混入の検出を試みた結果、どちらのプライマーも 1% の混入から検出可能であることが示された。

本研究を行うにあたり、種子を分与いただいた各機関に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 大坪研一, 藤井 剛, 橋野陽一, 豊島英規, 岡留博司, 中村澄子, 川崎信二, RAPD 法を用いた国内産精米の品種判別技術, 日本食品科学工学会誌, **44**, 386-390 (1997).
- 2) 大坪研一, 中村澄子, 今村太郎, 米の PCR 品種判別におけるコシヒカリ用プライマーセットの開発, 日本農芸化学会誌, **76**, 388-397 (2002).
- 3) 新村和則, 金川 寛, 三上隆司, 福森 武, イネ品種判別用マルチプレックス PCR プライマーセットの開発, 育種学研究, **7**, 87-94 (2005).
- 4) Nasu, S., Suzuki, J., Ohta, R., Hasegawa, K., Yui, R., Kitazawa, N., Monna, L. and Minobe, Y., 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 (2002).
- 5) Notomi, T.H., Okayama, H., Masubuchi, T., Yonekawa, K., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T., Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acid Res.*, **28**, E63 (2000).
- 6) 水上優子, 福田至朗, 石田 朗, 加藤恭宏, 上田淳一, 神戸三智雄, イネ育種選抜 DNA マーカーへの Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法の適用, 育種学研究, **6**, 225-228 (2004).
- 7) 黒柳 悟, 水上優子, 福田至朗, 早野由里子, 城田雅毅, 山田真人, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を利用したイネ縞葉枯病抵抗性個体の簡易選抜法, 愛知農総試研報, **41**, 13-20 (2009).
- 8) Jeon, J.-S., Chen, D., Yi, G.-H., Wang, G.L. and Ronald, P.C., Genetic and Physical mapping of *Pi5(t)*, a locus associated with broad-spectrum resistance to rice blast. *Mol. Gen. Genomics*, **269**, 280-289 (2003).
- 9) Lee, S.-K., Song, M.-Y., Seo, Y.-S., Kim, H.-K., Ko, S., Cao, P.-J., Suh, J.-P., Yi, G., Roh, J.-H., Lee, S., An, G., Hahn, T.-R., Wang, G.-L., Ronald, P. and Jeon, J.-S., Rice *Pi5*-mediated resistance to *Magnaporthe oryzae* requires the presence of two coiled-coil-nucleotide-binding-leucine-rich repeat genes. *Genetics*, **181**, 1627-1638 (2009).
- 10) 農林水産省, 平成 22 年産米の検査数量 (速報値) (平成 23 年 5 月末現在), <http://www.maff.go.jp/j/soushoku/syoryu/kensa/kome/index.html>
- 11) International Rice Genome Sequencing Project, The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, **436**, 793-800 (2005).

(平成 23 年 7 月 25 日受付, 平成 23 年 8 月 22 日受理)