米粉パン中の米粉割合推定のための競合的 PCR 法の利用

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

Competitive PCR Method for Estimation of Rice Flour Content in Rice Bread

Masahiro Kishine* and Tomoya Okunishi

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

A semi-quantitative competitive PCR method for estimating rice flour content in rice bread was developed. PCR primers were designed using sequences common to the rice and wheat chloroplast genomes and their resulting amplicons were distinguished and quantified by gel electrophoresis. Competitive PCR analysis using different DNA sources, amounts template DNA, and PCR cycles showed that the ratio of amplicons was little affected by PCR conditions, and was approximately proportional to rice flour content in rice bread, ranging between 0 and 50 %. On the other hand, the amplicon ratio was affected by material rice cultivars and possibly by bread type.

(Received May 15, 2012; Accepted Aug. 27, 2012)

Keywords : Competitive PCR, rice bread, rice, wheat

キーワード : 競合的 PCR, 米粉パン, コメ, コムギ

我が国のカロリーベースの食糧自給率は、ここ 10 年程 40 % 前後で推移している¹⁾。また、食の多様化や高齢化に伴い米の消費量も減少を続けており、昭和 37 年の一人あたり年間 118 kg をピークに現在は約 60 kg と半減している¹⁾。このような状況下、粒食としての米の消費量には限界があるため、「ご飯」としてだけでなく、「米粉」としてパン、麺類などに利用し、米の消費拡大、自給率向上を目指す取り組みが進められている。

近年、これらの米粉食品が一般の消費者に広く認知され、製造・販売が拡大しつつある。その一方で、米粉の使用割合は任意表示であることから、米粉を 0.004 % しか使用していないにもかかわらず「純米クッキー」と表示して販売されるなど²⁾、消費者に誤認を与える事例も生じている。この背景には、米粉の価格が小麦粉より一般に高いことが挙げられる。今後も同様の事例が生じる可能性が懸念されるため、米粉の配合割合を科学的に検証する手法が必要である。

これまでに、食品中に含まれるコメ、コムギ、大麦およびヒマワリをそれぞれに特異的なプライマーを用いたリアルタイム PCR 法により検出する手法が開発されているが³⁾、この手法ではあくまで食品に含まれる DNA の検出・定量にとどまり、配合割合の推定は至っていない。また米粉パンを対象として、コメとコムギを定性的に PCR 検出

する手法が開発されているが、こちらでも配合割合の定量は課題とされていた⁴⁾。一方、ヨウ素デンプン反応による吸収スペクトル測定とデンプンの顕微鏡観察を組み合わせる米粉パンにおける米粉割合をおおまかに推定する手法が開発されているが⁵⁾、PCR 検出と比較して分析に多大な時間と労力を要する。本研究では、DNA 分析を用いて米粉パンにおける米粉割合をより簡易に推定する手法開発を目指し、競合的 PCR によるコメとコムギの簡易定量法を検討した。

実験方法

1. 試料および製パン

米粉は、市販の精米を湿式気流粉碎したものおよびグルテンを含まない市販米粉 2 種（「こめ de パン（日の本製粉）」、「お米の粉（波里）」）を用いた。強力小麦粉は、カメリア（日清製粉）、ミリオンの（同）およびイーグル（日本製粉）を用い、またグルテンは A-グル GX（グリコ栄養食品）を用いた。製パンは、ホームベーカリー（SD-BMS102, Panasonic）を用い、「ドライイースト」コース・「食パン」メニューで行った。また、材料配合は、粉 250 g、バター 10 g、砂糖 17 g、塩 5 g、水 180 mL およびドライイースト 2.8 g とした。市販の米粉パンについては、①米粉使用 8 %（品種不明）と記載された揚げパン、② 20 %（コシヒカリ）の菓子パン、③ 35 %（品種不明）の菓子パンを用いた。

〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

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

図 1 コメ・コムギ競合的検出プライマー

(A) プライマー部位 (矢印)。イネとコムギの葉緑体ゲノム配列の一部のみ表示した (イネ葉緑体ゲノム, X15901, 101 297 bp-101 536 bp; コムギ, AB042240, 100 913 bp-101 223 bp)。四角で囲った領域は、コメとコムギの塩基配列間で相違のある部分。(B) コメ・コムギの品種 / 製品間におけるプライマー増幅性の確認。

2. DNA 抽出

粉 (米粉, 強力粉, その混合物およびグルテン) からの DNA 抽出は, GM quicker 2 (ニッポンジーン) キットを用い, 0.5 g の試料から添付のコメ用プロトコルに従い抽出した。一方, パンは内部の白い部分から試料を採取し, 同キット・プロトコルに従い抽出を行ったが, 供試量を半分 (0.25 g) とし, また GB1 バッファー中でベッスルを用いてパンを磨砕する操作を追加した。

3. 競合的 PCR および増幅産物の定量

競合的 PCR は, C1000 サーマルサイクラー (BioRad) を用いて, 1 反応 10 μ l あたり, 5 ng の抽出 DNA, それぞれ 0.3 μ M のプライマー (5'-CACAGAGGAATGGAAAAA-ATCG-3' および 5'-GAAATTAAATATGTAGGGGGAG-GTC-3'), 5 μ l の 2xPCR Buffer for KOD FX Neo (東洋紡), 2 μ l の 2mM dNTPs (同), 0.2 μ l の 1 U/ μ l KOD FX Neo (同) を混合し, 94 $^{\circ}$ C 2 分, 30 サイクルの 98 $^{\circ}$ C 10 秒; 62 $^{\circ}$ C 30 秒; 68 $^{\circ}$ C 15 秒の温度条件で行った。

PCR 産物は, 核酸染色剤として GelRed を含む 3% アガロースゲルで電気泳動した後, GelDoc XR + および Image

Lab ソフトウェア (BioRad) でバンドの蛍光強度を定量した。定量値の算出には, 1 つの試料からそれぞれ独立に 3 点 DNA 抽出・PCR を行った結果の平均を用いた。

実験結果および考察

1. コメ/コムギの競合的 PCR 用プライマーの作製

穀粒には, 他の植物組織と同様に核およびオルガネラのゲノム DNA が存在する。コメとコムギの種間, 品種間や栽培・乾燥条件の異なる試料間では, 単位重量当たりの DNA 量や核とオルガネラの DNA 量比は異なると考えられる一方, それらが均質に粉砕された試料では重量当たり一定の割合で核・オルガネラ DNA を含んでいると考えられる。従って, コメとコムギの粉砕試料を配合する米粉パンでは, 均質で同一な小麦粉と米粉を用いる限り, その重量比が DNA 量比に比例すると考えられるため, 両者の競合的 PCR による定量的検出を試みた。

競合的 PCR に用いるプライマーは, 両者の葉緑体ゲノム⁶⁾⁷⁾ の逆位反復配列 (IR) 領域と小単一配列 (SSC) 領域の境界領域に設計した (図 1A)。葉緑体ゲノムを用いたの

図2 競合的PCRに適したDNA抽出試料の検討

(A) 各試料からの抽出DNA. 100 ng/ レーン. (B) (A) を用いた競合的PCR. (C) (B) の定量結果 ($n=3$). いずれもコメ (コシヒカリ) 30% とコムギ (カメリア) 70% を混合.

は、核ゲノムに比べ品種間での塩基配列の相違が少なく、幅広い品種に対応可能であり、かつ細胞当たりのコピー数が多くPCR検出が容易であるためである。また、プライマーは共通配列によって両者を競合的に増幅することができる一方、コムギにおける配列欠損により、コメ (227 bp) の方がコムギ (156 bp) より71 bp 長い増幅産物が得られ、電気泳動によってどちらの増幅断片であるか容易に区別できるようにした (図1A)。

作製したプライマーを用いて、米粉用多収品種を含む数品種の米粉、市販米粉および市販強力粉の分析を行った結果、いずれも期待されるサイズの増幅産物が得られた一方、他方の増幅断片や非特異的な増幅が認められないことを確認した (図1B)。また、市販グルテンからのDNA抽出およびPCRを検討した結果、グルテンにも相当量のDNAが含まれており、PCRでもコムギ由来の増幅断片が検出されることが明らかとなった (図1B)。市販されている米粉パンの中には、米粉と小麦粉とグルテン、あるいは米粉とグルテンのみを配合する場合もあるが、グルテンを配合した米粉パンの分析は今後の検討課題とし、以降はグルテンを添加しない米粉パンのみを対象とした。

2. 競合的PCRに適したDNA抽出試料の検討

競合的PCRによる定量の対照として、濃度既知の配合試料系列を同時に分析する必要がある。この際、対照試料として用いるDNAとして、①米粉および強力粉から精製したDNAを重量比で混合したもの (以下、DNA混合)、

②米粉および強力粉を重量比あらかじめ混合した粉から抽出したもの (以下、粉混合)、③②の粉で作製したパンから抽出したもの (以下、パン混合) の3点を検討し、競合的PCR結果に対する影響を検討した。なお、いずれも米粉 (由来DNA) が、30%となるよう配合した試料で検討を行った。それぞれの試料のDNAの状態については図2Aに示す通りであり、DNA混合および粉混合試料では分解がほとんど見られないのに対し、パン混合試料のDNAでは、100-500 bpを中心とした短い断片化が観察され、製パン過程で分解が進んだものと推察された。

3種のDNAを用いた競合的PCRの定量結果では、粉混合とパン混合がほぼ同程度なのに対し、DNA混合では、それらの約2倍コメ由来バンドが多く検出された。DNA混合試料でコメ由来バンドが強く検出されたのは、コムギの核ゲノムサイズ (16 000 Mb) がコメ (390 Mb) よりも約40倍大きいこと、同じ重量のDNAに占める葉緑体ゲノムのコピー数がコメでは相対的に多くなることが起因していると考えられる。このことから、今回の手法においては、米粉パンの定量の対照としてDNA混合試料を用いることは適切でないことが明らかとなった。一方、粉混合とパン混合の定量結果を比べると、僅かに粉混合サンプルの方がコメ由来バンドが強く検出されたが、この原因には製パンによるDNA分解の影響、酵母由来のDNAの存在、あるいは粉とパンからのDNA抽出効率の違いが考えられた。結果として、米粉パンの定量の対照としては、やはりパンから抽出したDNAを用いることが最も適していることが明らかとなり、以降はパンから抽出したDNAを用いて条件検討を行った。

3. 競合的PCRの反応条件検討

競合的PCRの増幅安定性について、用いる鋳型DNA量およびPCRサイクル数の影響を検討した。鋳型として30%の米粉配合パン (コシヒカリ米粉およびカメリア) から抽出したDNAを用い、DNA量としては0.5, 5, 50 ngの3点、サイクル数としては25, 30, 35の3点とし、それらを組み合わせて検討した。その結果、増幅バンドが得られた試料については、鋳型量やサイクル数の影響による増幅産物の多少に関わらず、ほぼ一定の比率で増幅バンドが得られることが明らかとなった (図3)。このことから、それほど厳密な鋳型DNAの定量や、PCR条件の設定は必要なく、また、PCR増幅による測定誤差は大きくないことが明らかとなった。

次に、競合的PCRにおける米粉の配合割合の影響を検討した。試料には、グルテンを配合しない米粉パンとして一般的に用いられる範囲として、0, 10, 20, 30, 40, 50%の米粉配合パン (コシヒカリ米粉およびカメリア) を検討した。その結果、コメ由来バンドの占める割合は、40-50%でやや頭打ちとなるものの、米粉の配合割合にほぼ比例して増加していることが明らかとなった (図4)。また、配合

図 3 競合的 PCR に対する PCR サイクル数・鋳型 DNA 量の影響

(A) 異なるサイクル数・鋳型量を用いた競合的 PCR. (B) (A) の定量結果 ($n=3$). いずれも米粉 (コシヒカリ) 30% と強力粉 (カメリア) 70% を混合した米粉パンからの抽出 DNA を用いた.

割合が増加するにつれ、増幅バンド比の誤差が大きくなる傾向があるものの、0-50% の配合割合の範囲において、ほぼ一定の増幅バンド比が得られることが明らかとなった.

以上の結果から、均質な粉 (今回の場合にはコシヒカリ米粉とカメリア小麦粉) を配合し、一定の条件で作製した米粉パンを用いた場合には、PCR 条件に関わらず、配合割合にほぼ比例して PCR 増幅断片を検出できることが示唆された.

4. 競合的 PCR に対する使用米品種の影響と市販米粉パンの分析

競合的 PCR の増幅バンド比に対する異なるコメ品種 / 米粉の影響を検証した. コメ試料として、主食用のコシヒカリ、ひとめばれ、ヒノヒカリ、きらら 397、米粉用多収品種のタカナリ、ミズホチカラ、さらに市販の米粉 2 種を用い、それぞれの米粉 30% と強力粉カメリア 70% を配合したパンから DNA を抽出した. それぞれの競合的 PCR の結果、8 試料の平均としてはコメ由来バンドの割合が 0.3 程度であるものの、品種の違いによって 20% 程度の誤差を生じることが明らかとなった (図 5). この原因の解明は今後の検討課題であるが、遺伝的要因による重量当たりの DNA 含量の違いや、栽培・乾燥条件などの環境要因の影響が考えられた.

次に、市販の米粉パンにおける実用性を検討するとともに、ホームベーカリーで作製した食パン以外のパン種にお

図 4 競合的 PCR に対する米粉配合割合の影響

(A) 異なる配合割合の米粉パンを用いた競合的 PCR. (B) (A) の定量結果 ($n=3$). いずれもコシヒカリ米粉とカメリアの配合.

ける有効性を検討した. 市販米粉パンは、それぞれ 8%, 20%, 35% と表示された 3 種 (グルテン配合なし) を用いた. 図 6 に示す分析結果を図 4 で得られたホームベーカリーでのコシヒカリ配合系列と比較した結果、8% のサンプルではほぼ表示通りの結果が得られたが、20%, 35% のサンプルでは、図 4 の結果に照合すると、それぞれ 14%, 28% 程度の増幅バンド比を示した. 市販パン②は、図 4 と同じコシヒカリを使用しているにも関わらず、20-30% の誤差が生じたことから、前述した米粉試料の品種の違いに加え、パン種類や製パン法の違いが分析結果に影響していることが推測された.

以上のことから、本論文で示した米粉パンの米粉割合推定のための競合的 PCR 法は、同一の原料・製法を使用した米粉パンの分析では、その配合比率にほぼ比例して安定的にコメとコムギのバンドを検出可能であることが示された一方、使用する原料品種や製パン法の違いによって 20-30% の誤差が生じることが明らかとなった. この誤差を許容しおおまかな使用割合の推定を行う場合には、図 4 で行ったように任意の原料を用いてその配合比率の異なる比較系列を作製し、その比較を簡易に行うことが可能である. 一方、より正確な配合割合の推定を行うには分析対象となる試料と同一の原料・製法を用いて比較系列の作製を行う必要があると考えられる. 今後、今回の分析結果で生じた誤差がどのような要因によるものであるかをより詳細に解析できれば、比較系列作製の簡易化なども可能となると考えられる. また、既報のデンプン分析による手法では 0%

図5 競合的PCRに対する品種/製品の影響

(A) 異なる品種・製品を用いた競合的PCR. (B) (A)の定量結果 ($n=3$). いずれも米粉30%配合パンから抽出したDNAを用いた.

図6 市販米粉パンの分析

(A) 市販の米粉パンを用いた競合的PCR. (B) (A)の定量結果 ($n=3$).

と10%の米粉パンの違いは識別不可能であったのに対し⁵⁾, PCRを用いる本手法では少なくとも8%の配合割合から検出可能であるため(図6), 米粉使用の有無のみを検出するには非常に有効であると考えられた.

要 約

米粉パンにおける米粉割合を推定するための手法として半定量的な競合的PCR法を検討した. コメとコムギの葉緑体ゲノムの共通配列部分で作製したPCRプライマーを用いることにより, 両者が競合的に増幅する一方, サイズが異なる増幅断片が得られることからゲル電気泳動で区別・検出できる. 異なるDNA抽出試料, 鋳型DNA濃度およびPCRサイクルを用いた条件検討の結果, コメとコムギに由来する増幅産物の量比は, PCR条件にはほとんど影響を受けず, また0-50%の米粉パンの分析において米粉割合にほぼ比例することが明らかとなった. 一方で, 増幅産物の量比は, 米粉パンに原料として用いるコメの品種によって20%程度変動し, また, 市販パンの分析においてそのパン種によっても変動することが示唆された. これらの結果は, 本手法が米粉パンにおける米粉使用割合を大まかにではあるが簡易に推定できることを示すとともに, 分析試料に適した対象試料(使用品種・パン種)を用いれば, より正確な定量が可能となることを示唆している.

本研究の遂行あたり, 多大なるご支援を賜りましたエリザベス・アーノルド富士財団に深く感謝の意を表します.

文 献

- 1) 農林水産省: 食糧需給表(平成22年度).
- 2) 消費者庁: 株式会社大藤に対する景品表示法に基づく措置命令について(平成22年10月13日).
- 3) Hernández, M., Esteve, T. and Pla, M., Real-time polymerase chain reaction based assays for quantitative detection of barley, rice, sunflower, and wheat. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 7003-7009 (2005).
- 4) Nakamura, S. and Ohtsubo, K., PCR method for the detection and identification of cultivars of rice flours used in yeast leavened breads containing both wheat and rice flours. *J. Cereal Sci.*, **52**, 16-21 (2010).
- 5) 岡本由美, 松野和久, 津村明宏, 寺野重造, 米粉パン中における米粉割合の推定法の検討, 日本食生活学会誌, **22**, 41-48 (2011).
- 6) Hiratsuka, J. *et al.*, The complete sequence of rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: Intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.*, **217**, 185-194 (1989).
- 7) Ogiwara, Y. *et al.*, Structural features of a wheat plastome as revealed by complete sequencing of chloroplast DNA. *Mol. Gen. Genet.*, **266**, 740-746 (2002).

(平成24年5月15日受付, 平成24年8月27日受理)