DNA 判別による米の食味推定[†]

大坪研一[§], 中村澄子, 岡留博司

独立行政法人食品総合研究所

Investigation on Estimation of Rice Palatability by DNA Analysis (Studies on Estimation of Rice Palatability by DNA Analysis Part I)

Ken'ichi Ohtsubo[§], Sumiko Nakamura and Hiroshi Okadome

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

To estimate the palatability of rice, DNA analysis based on PCR method was investigated. As template DNAs for PCR, genomic DNAs of sample milled rice were extracted and purified by the cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB) method. Rice genomic DNAs were proliferated by PCR with the use of various kind of "sequence-tagged site" (STS) primers. Discriminative DNA bands were binarized as 0 (appeared) or 1 (disappeared) and were subjected to the multi-variate analyses. The results of PCR were used as independent variables and the results of sensory test, "palatability evaluation values" or the results of physical properties of the cooked rice grains were used as dependent variables in the multiple regression analyses. Four kind of palatability estimation equations were developed and applied to the rice samples of the different crop-year. Validation test showed that these four equations can be applied to the unknown rice samples because the multiple regression coefficients were 0.80, 0.91, 0.75 or 0.91, respectively. According to this method, palatability of a single grain of raw rice or cooked rice can be estimated using its DNA as sample. It became possible to develop the various kind of palatability estimation equations based on DNA analysis by PCR method against the data by the sensory test, physicochemical measurements or the spectrophotometric measurements. Palatability estimation equations based on DNA analysis has promising possibility to be applied for the breeding of high-palatability rice or the evaluation of cooked rice palatability of the rice products in the market. (Received Aug. 21, 2002 ; Accepted Dec. 13, 2002)

消費者の良食味指向を受けて、コシヒカリ等の良食味米が市場で高く評価されている。新しい良食味米の開発、生産、流通、消費の各段階における米の食味評価を適切に行うために、客観的で正確な食味評価技術の開発が必要とされている。

従来、米の食味は、炊飯後に試食を行い、パネリストが総合、外観、香り、味、硬さ、粘り等の項目ごとに採点し、統計処理する方法、すなわち、官能検査法¹⁾²⁾が最も基準的とされている。また、精米の食味関連成分であるアミロース含量やタンパク質含量等の化学成分の測定値や、少量炊飯における膨張率や加熱吸水率等を測定する炊飯特性値、精米粉のアミログラフやラピッドビスコアナライザーによる糊化粘度特性値、あるいはテクスチュロメーターやテンシプレッサー等による米飯の物理特性測定値などを基にして食味を推定する理化学的評価方法も用いられてきた³⁾⁴⁾。

さらに、最近、米や米飯を試料とする近赤外分光分析や可視光の反射、透過率を基に、分光学的に食味を推定する、いわゆる「食味計」が開発され、簡便・迅速性と客観性が評価されて広く普及しつつある⁵⁾⁶⁾。

しかしながら、官能検査は、基準的ではあるものの、国や地域による嗜好性の相違があり、多量の試料および労力と時間を要するという問題がある。理化学的評価は、客観的・普遍的手法ではあるものの、単一の測定では食味の推定精度がまだ十分に高いとは言えず、複数の測定値を組み合わせて統計処理する必要があるという問題がある。分光学的手法は、簡易迅速で客観的ではあるものの、装置メーカー（機種）による変動があり、測定精度も改善されたとはいえず、まだ充分とは言えない⁷⁾。

諸外国でも、官能検査の客観化を求めた分析型官能検査⁸⁾、新しい物理化学的評価手法の導入⁹⁾、近赤外分光法による理化学特性値の推定¹⁰⁾等が行われており、有意義な研究ではあるが、試料量を必要とすること、良食味品種の育成には使えないこと、一粒での評価が困難なことなどの点でいずれもまだ問題が残されている。

[†] DNA 判別による米の食味評価に関する研究（第1報）

〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

[§] 連絡先 (Corresponding author), kenotsu@nfri.affrc.go.jp

本研究では、これまで述べてきた従来の米の食味研究とは異なる視点から食味評価方法の開発を試みたものである。すなわち、当研究室では、これまで、コシヒカリ等の品種判別を、その遺伝子を鋳型とする PCR によって行う技術について研究を行い、結果を発表してきた¹¹⁾¹²⁾。食糧研究所の谷、竹生らは、「米の食味に影響する最大の因子は品種である」と述べており²⁾、このことは、現在でも、米研究者の間で広く認められている。そこで、われわれは、品種判別に用いている各種の STS (sequence tagged site) 化プライマーによる識別バンドの有無 (+あるいは-) を (1 あるいは 0) と 2 値化して説明変数として用い、目的とする食味評価値、例えば、日本穀物検定協会の食味ランキングや稲育種研究者による官能検査結果、あるいは当研究室で行った理化学測定の数値など、各種の食味評価値を目的変数として用いる多変量解析によって米の遺伝子構造に基づく食味推定を行うことを試み、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

実験試料として、2 種類の米試料を使用した。第一のグループは、DNA 品種判別に食糧庁から提供された平成 11 年作付け上位 20 品種の原種あるいは原々種である。第二のグループは、農水省の農業試験場で栽培されたコシヒカリ、ひとめぼれ、ヒノヒカリ、さらさら 397、キヌヒカリ、ほしのゆめ、むつほまれ、日本晴、ササニシキ、ハツシモ、初星、朝の光、月の光、中生新千本、アケボノ、朝日である。これらの試料は、恒温恒湿機で水分含量を $14 \pm 0.5\%$ に調整した。粳試料をケット科学研究所製の試験用粳摺り器で粳摺りし、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 種類の精米及び粉碎終了後ごとに内部を清掃して使用した。

2. 食味評価方法

(1) 官能検査

官能検査は、平成 9 年産、10 年産、11 年産の農林水産省農業試験場の試料米を用い、各地域農業試験場の稲育種研究室で実施した。パネルの人数は試験場によって異なるが、男女の比を等しくなるようにし、12 名～24 名で行った。評価項目は、総合評価、外観、味、やわらかさ、粘りである。各試験場の総合評価値を平均して総合評価値とし、PCR 結果と比較検討した。

(2) 食味ランキングによる方法

平成 12 年産米の日本穀物検定協会の食味ランキングの「特 A」を 5 点、「A」を 4 点、「A'」を 3 点、「B」以下を 2 点と数値化した。また、「米品種大全¹³⁾」(米穀データバンク社)に記載されている各品種の食味評価値 (1～5 個に分

類され、星の数の多いものほど良食味) を同様に 1～5 に数値化し、これら 2 種類の食味評価値を加えた数値を各試料品種米の食味評価値とした。

(3) 米飯物性測定による方法

各試料精米を少量炊飯し、その米飯物性によって食味評価値として代表させることとした。すなわち、各試料米 10 g をプリンカップに秤取し、25℃ の純水 16 ml を加えて 1 時間浸漬した。ついでこれらのプリンカップ 5 個を電気釜 (東芝製 RC-300) に入れ、釜に 75 ml の水を加えて炊飯した。スイッチが切れた後に 15 分間蒸らした後、プリンカップごとポリエチレン袋に密封し、25℃ で 2 時間静置した。そののち、テンシプレッサー (タケトモ電機製マイボーイ) を用いて、岡留らの方法¹⁴⁾ により低圧縮試験 (圧縮率 25%) および高圧縮試験 (圧縮率 90%) を行い、各試料ごとに 20 粒ずつ測定して付着量 (L3)、バランス度 (= 粘り / 硬さ) 等、各物性値の平均値を得た。測定は温度調節可能な実験室で行い、測定温度は 25℃ であった。

3. STS 化プライマーによる PCR

(1) 各試料精米からの鋳型 DNA の調製

1 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 トリスヒドロキシメチルメタン・塩酸緩衝液 (トリス緩衝液, pH8.0) 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。次いで冷却遠心機 (日立 Himac CR21F) によって遠心分離 (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、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, pH8.0, 10 mM EDTA, 1% CTAB) を加え、-80℃ で 5 分間静置し、沈殿を生成させた。遠心分離 (8000×g, 15 min) で沈殿を回収し、0.2 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 (8000×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 の牛脾臓由来 RNase A (ニッポンジーン社製) を 1 μl 加え、55℃ 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/イソアミルアルコール液 (容量比 25:24:1) 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 倍容の水冷エタノール

を加えて DNA を沈殿させ、70% エタノール 50 μ l で洗浄した後、30 μ l の 1/10 TE で溶解し、鋳型 DNA とした。各鋳型 DNA の濃度を分光光度計（島津製作所製 UV1600）による 260 nm での吸光度によって測定し、DNA の純度は、「OD₂₆₀/OD₂₈₀ $\geq$ 1.8」であることを確認して PCR に供した。

(2) PCR に用いる STS 化プライマー

前報で報告した STS 化プライマー¹⁶⁾を使用した。STS 化プライマー共存下で増幅される識別バンド DNA の配列を既知の DNA 塩基配列と比較し、食味特性と関連のあるプライマーを検索した。

(3) PCR による DNA の増幅

各試料米から調製した DNA を鋳型 DNA とし、前報¹⁵⁾¹⁸⁾で報告した各種の STS 化対合プライマーを用いて先に報告した RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法¹¹⁾と同様の方法で PCR を行なった。STS 化プライマーとは、RAPD 法等で見いだされた識別バンド DNA の塩基配列を決定し、当該 DNA のみが増幅するように設計された対合プライマーのことである¹⁶⁾¹⁸⁾。本研究で検討した各種の STS 化プライマーの塩基配列を表 1 に示す。

ただし、PCR における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。すなわち、鋳型 DNA 400 ng, PCR 用 10 倍濃度緩衝液 2 μ l, 25 mM MgCl₂ 2 μ l, dNTPs 2 μ l の混合液に、5 pmole/ μ l の STS 化対合プライマー 0.1~0.8 μ l (G22 は 0.1 μ l, A6, A7, B1, J6, M2CG および M11 は 0.2 μ l, B43 と S13 は 0.3 μ l, F6, G4, G28, P5 および WK9 は 0.4 μ l, T16 は 0.8 μ l) を加え、滅菌水によって総液量を 20 μ l とした。オイルを重層した後、TaKaRa PCR サーマルサイクラー MP (タカラバイオ (株) 製) を使用し、変性 (96°C) 1 分間、アニーリング (62°C) 1 分間、伸長 (72°C) 2 分間を 35 サイクル繰り返して DNA の PCR 増幅を行った。

反応終了後、オイルを除去し、3 μ l の色素液 (0.25% ブロムフェノールブルー、50% グリセロール) を添加した後、上記の反応液 12 μ l をアガロースゲルに添加し、試験用小型電気泳動装置 ミューピッド (コスモバイオ製) を用いて 100V, 40 分間泳動し、エチジウムブロミドで染色した後、画像解析装置 (エムエス機器製バイオプリント) によって

表 1 STS 化プライマーの塩基配列

プライマーの名称		塩 基 配 列
A6	フォワード	CCAGCTGTACGCCTGTACTAC
	リバース	CCAGCTGTACGTCTTCCCCAGC
A7	フォワード	TGCCTCGCACCAGAAATAG
	リバース	TGCCTCGCACCATGAG
B1	フォワード	GTTTCGCTCCTACAGTAATTAAGGG
	リバース	GTTTCGCTCCCATGCAATCT
B43	フォワード	GGCCGGCATGACTCAC
	リバース	ACTGGCCGGCATCAAGAC
F6	フォワード	ACCACTCCATATATATCATCCAAAG
	リバース	ACCACTCCATATCACCACAAGG
G4	フォワード	GAGACCGATATGCGATTTC
	リバース	GTGGTGTTTAGATCCAGAGACTTA
G22	フォワード	CTCACTCAAATTTACAGTGCATTTTCTTG
	リバース	AGGGCCATGATACAAGACTCTGT
G28	フォワード	GGCGGTCGTTCTGCGAT
	リバース	GGAGAATCCACAGTAAGTTTTTCTTTG
J6	フォワード	GTCGGAGTGAGTCAGACCG
	リバース	GTCGGAGTGAGTGGAGTAGC
M2CG	フォワード	ACAACGCCTCCGATGA
	リバース	ACAACGCCTCCGACAACAAGAT
M11	フォワード	GTCCACTGTGACCACAACAT
	リバース	GTCCACTGTGGGGATTGTTC
P5	フォワード	ACAACGGTCCGTCCTTGCTT
	リバース	ACAACGGTCCAACAGATACTTTTGA
S13	フォワード	GTCGTTCCCTGTGGTTAGGACAGGGT
	リバース	GTCGTTCCCTGCTGGTGTCTCAGAT
T16	フォワード	GGTGAACGCTGTAGTTGGAATATA
	リバース	GGTGAACGCTCAGATTTAAATATAAT
WK9	フォワード	CCCGCAGTTAGATGCACCATT
	リバース	CCCGCAGTTAGATCAAGTGGC

泳動結果を撮影・記録した

- (4) 食味官能検査結果に対する PCR 食味推定式の作成とその適用性の検定

3(2)項で述べた PCR における各識別バンドの出現の有無を数値化した。すなわち、バンドが出現した場合を 1、出現しなかった場合を 0 として説明変数とし、他のバンドに比べて薄いバンドの場合も、バンドが出現していれば 1 とした。このようにして数値化した説明変数を用い、2(1)で述べた食味官能検査結果（11 年産米）を目的変数として重回帰分析を行った。統計処理は Microsoft 社の Excel2000 の統計ソフトウェアを使用した。得られた食味推定式の適用性を検定するために、異なる産年の試料米（10 年産米）の官能検査結果に対する本推定式による重相関係数を求めた。

- (5) 「食味評価値」に対する PCR 食味推定式の作成と適用性の検定

3(2)項で述べた PCR における各識別バンドの出現の有無を 2 値化した。すなわち、バンドが出現した場合を 1、出現しなかった場合を 0 として説明変数とし、2(2)で述べた「食味評価値」を目的変数として重回帰分析を行った。統計処理は Excel2000 の統計ソフトウェアを使用した。得られた食味推定式の適用性を検定するために、3(3)項で述べた食味官能検査結果（平成 11 年産米）に対して本推定式を適用した場合の重相関係数を求めた。

- (6) 米飯物性値に対する PCR 食味推定式の作成とその

適用性の検定

3(2)項で述べた PCR における各識別バンドの出現の有無を 2 値化した。すなわち、バンドが出現した場合を 1、出現しなかった場合を 0 として説明変数とし、2(3)で述べた米飯物性測定値（10 年産米）を目的変数として重回帰分析を行った。統計処理は Excel2000 の統計ソフトウェアを使用した。得られた食味推定式の適用性を検定するために、異なる産年の試料米（11 年産米）の米飯物性測定値に対して本推定式を適用した場合の重相関係数を求めた。

実 験 結 果

1. STS 化プライマーによる各品種の PCR 結果

各品種の精米試料から調製した鋳型 DNA を用い、各種の STS 化プライマー単独あるいは複数の STS 化プライマーを組み合わせることで反応液に共存させて PCR を行った結果を表 2 および図 1、図 2 および図 3 に示す。また、そのうちで、良食味米に特に顕著に識別バンドが表れる例と比較的食味の劣る米に現れやすい例の電気泳動結果を図 4 に示す。

2. 官能検査の結果

2(1)で述べた平成 9 年産、10 年産、11 年産の試料米を用い、各地域農業試験場の稲育種研究室で実施した官能検査の結果（総合評価）を表 3 に示す。

3. 食味ランキングに基づく「食味評価値」

2(2)で述べた平成 12 年産米の日本穀物検定協会の食味ラ

表 2 PCR における試料米と STS 化プライマーの関係

試料米	食味評価 値	PCR に用いたプライマーの種類														
		A6 730	A7 550	B1 530	B43 870	F6 1180	G4 830	G22 650	G28 460	J6 1070	M2CG 1240	M11 770	P5 580	S13 1680	T16 1070	WK9 1600
1 コシヒカリ	10	—	+	—	+	—	—	+	+	+	—	+	+	—	—	—
2 ひとめぼれ	9	—	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+
3 ヒノヒカリ	8	—	+	+	—	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—	+
4 あきたこまち	8	—	+	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	—	—	+
5 きらら 397	7	—	+	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+
6 キヌヒカリ	8	+	+	+	—	—	—	—	+	+	—	+	+	—	+	+
7 ほしのゆめ	8	—	+	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	+	—	+
8 はえぬき	9	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	+
9 むつはまれ	6	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—	+	—
10 日本晴	6	—	—	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—
11 ササニシキ	7	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—
12 つがるロマン	8	—	+	—	—	+	—	—	+	+	—	+	+	—	—	+
13 ハナエチゼン	6	—	—	—	+	—	—	—	+	+	+	+	+	—	+	+
14 夢つくし	8	—	+	+	+	—	—	—	+	+	—	+	+	—	—	+
15 ハツシモ	8	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	—	—	+	—
16 朝の光	5	—	—	+	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	+	+
17 月の光	4	—	—	+	+	+	—	—	—	+	+	—	—	—	+	+
18 あいちのかおり	8	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	+	+
19 祭晴れ	6	—	—	+	—	+	—	—	—	+	—	+	—	—	+	+
20 あきほ	5	—	+	—	+	—	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+

注) +, 識別バンドが出現, —, 識別バンドが出現せず

各プライマーの下の数値は増幅 DNA の分子量 (bps) を示す

図 1 各種の STS 化プライマーを用いた PCR の結果

A, プライマー P5; B, プライマー G4; C, プライマー A7; D, プライマー J6

M, DNA 分子量マーカー (和光純薬工業製, Marker 4, ϕ X174 フェージ, *Hae* III, 分子量は上から順に 1353 bps, 1078 bps, 872 bps, 603 bps, 310 bps)

矢印は識別バンドを示す

PCR におけるプライマー使用量は, 濃度 5 pmole/ μ l で P5 は 0.4 μ l, G4 は 0.4 μ l, A7 は 0.2 μ l, J6 は 0.2 μ l である。

No 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; 祭晴れ, 20; あきは

シキング及び「米品種大全」に記載されている各品種の食味評価値を数値化して算出した各試料品種米の食味評価値を表 2 および表 3 に示す。

4. 米飯物性測定結果

2(3)で述べた, 少量炊飯した各試料米の米飯物性測定値を表 3 に示す。測定は低圧縮試験 (圧縮率 25%) および高圧縮試験 (圧縮率 90%) の 2 種類を行い, 各試料ごとに 20 粒ずつ測定した平均値を物性値とした。

5. 官能検査結果に基づく PCR 食味推定式の作成及びその適用性の検討

表 2 の PCR 結果のうち, B1, F6, G28, M11, P5 の 5 個のプライマーによる PCR の結果を実験方法 3(4)で述べた方法によって 2 値化し, 平成 11 年産米の官能検査を目的変数とする重回帰分析を行った結果, 下記の式 (1) を得た。

$$Y = 0.75 - 0.50 \times B1 - 0.22 \times F6 + 0.13 \times G28 - 0.15 \times M11 + 0.60 \times P5 \quad \text{式 1}$$

ここで Y は平成 11 年産米の各品種の官能検査結果 (総合評価値) であり, B1, F6, G28, M11, P5 はそれぞれ対応する STS 化プライマーを用いた PCR における識別バンドの出現の有無を表す (1 は出現, 0 は出現せず)。0.75

は定数項であり, -0.50, -0.22, 0.13, -0.15, 0.60 は, それぞれの重みを表す係数である。この重回帰式の重相関係数 (R) は, 0.80 であった。

この重回帰分析に基づく食味推定式(1)の, 未知試料に対する適用性を検定するために, 表 3 に示す平成 9 年産米の官能検査に対して式(1)を適用した場合の重相関係数は 0.80 であった。この場合の散布図を図 5 に示す。

6. 「食味評価値」に基づく PCR 食味推定式の作成及びその適用性の検討

3で述べた PCR における 7 種類の STS 化対合プライマーに対応する識別バンドの出現の有無を 2 値化して説明変数とし, 3(5)で述べた「食味評価値」を目的変数とした重回帰分析の結果, 下記の PCR 食味推定式を得た。

$$Y = 4.19 + 0.65 \times A6 + 1.07 \times A7 + 1.75 \times M11 + 1.42 \times S13 - 1.27 \times T16 - 0.36 \times WK9 + 1.81 \times J6 \quad \text{式 2}$$

ここで Y は各品種の「食味評価値」であり, 4.19 は定数項であり, A6, A7, M11, S13, T16, WK9, J6 はそれぞれ対応する STS 化プライマーを用いた PCR における識別バンドの出現の有無を表す (1 は出現, 0 は出現せず)。0.65, 1.07, 1.75, 1.42, -1.27, -0.36, 1.81 はそれぞれの重

図 2 各種の STS 化プライマーを用いた PCR の結果

A, プライマー A6; B, プライマー T16; C, プライマー G28; D, プライマー B1

M, DNA 分子量マーカー (和光純薬工業製, Marker 4, ϕ X174 フェージ, *Hae*Ⅲ, 分子量は上から順に 1353 bps, 1078 bps, 872 bps, 603 bps, 310 bps)

矢印は識別バンドを示す

PCR におけるプライマー使用量は、濃度 5 pmole/ μ l で A6 は 0.2 μ l, T16 は 0.8 μ l, G28 は 0.4 μ l, B1 は 0.2 μ l である。

No 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; 祭晴れ, 20; あきは

みを表す係数である。この重回帰式の重相関係数 (R) は、0.95 であった。散布図を図 6 A に示す。

この重回帰分析に基づく食味推定式 (2) の、未知試料に対する適用性を検定するために、表 3 に示す平成 11 年産米の官能検査に対して式 (2) を適用した場合の重相関係数は 0.91 であった。この場合の散布図を図 6 B に示す。

7. 米飯物性測定値に基づく PCR 食味推定式の作成及びその適用性の検討

3 で述べた PCR における 5 種類の STS 化プライマーに対応する識別バンドの出現の有無を 2 値化して説明変数とし、実験方法 3(6) で述べた米飯物性測定値のうち、平成 10 年産米の低圧縮試験の付着量 (L3) を目的変数とした重回帰分析の結果、下記の PCR 食味推定式を得た。

$$Y = 1.142 + 0.0821 \times B43 - 0.295 \times F6 + 0.23 \times G22 + 0.221 \times M2CG - 0.0332 \times P5 \quad \text{式 3}$$

ここで Y は各品種の米飯物性低圧縮試験の付着量 (L3) であり、1.142 は定数項であり、B43, F6, G22, M2CG, P5 はそれぞれ対応する STS 化プライマーを用いた PCR における識別バンドの出現の有無を表す (1 は出現, 0 は出現せず)。-0.0821, -0.295, 0.23, 0.221, -0.0332 は、それぞれ

の重みを表す係数である。この重回帰式の重相関係数 (R) は 0.97 であった。散布図を図 7 A に示す。

この重回帰分析に基づく食味推定式 (3) の、未知試料に対する適用性を検定するために、表 3 に示す平成 11 年産米の物性測定値 (L3) に対して式 (3) を適用した場合の重相関係数は 0.75 であった。この場合の散布図を図 7 B に示す。

同様に、3 で述べた PCR における 5 種類の STS 化プライマーに対応する識別バンドの出現の有無を 2 値化して説明変数とし、実験方法 3(6) で述べた米飯物性測定値のうち、平成 10 年産米の高圧縮試験のバランス度 (A6/A4) を目的変数とした重回帰分析の結果、下記の PCR 食味推定式を得た。

$$Y = 0.2023 + 0.045 \times A7 + 0.01375 \times B1 + 0.01075 \times G4 + 0.025 \times G22 - 0.032 \times T1 \quad \text{式 4}$$

ここで Y は各品種の米飯物性高圧縮試験のバランス度 (A6/A4) であり、0.2023 は定数項であり、A7, B1, G4, G22, T16 はそれぞれ対応する STS 化プライマーを用いた PCR における識別バンドの出現の有無を表す (1 は出現, 0 は出現せず)。0.045, 0.01375, 0.01075, 0.025, -0.032 は、

図 3 各種の STS 化プライマーを用いた PCR の結果

A, コシヒカリ判別用プライマーセットを用いた識別例

プライマー, WK9, B43, M11, G22

B-1, コシヒカリ混米判別用プライマーセットを用いた識別例

プライマー, WK9, M2CG

B-2, コシヒカリ混米判別用プライマーセットを用いた識別例

プライマー, S13, F6, E30

M, DNA 分子量マーカー (和光純薬工業製, Marker 4, ϕ X174 フェージ, *Hae* III, 分子量は上から順に 1353 bps, 1078 bps, 872 bps, 603 bps, 310 bps)

矢印は識別バンドを示す

PCR は, A の場合は, タカラバイオ(株)製コメ判別キット (I) の取り扱い説明書に従って行った. B-1 の場合は, 濃度 5 pmole/ μ l で WK9 を 0.2 μ l, M2CG を 0.2 μ l 使用し, B-2 の場合は, 濃度 5 pmole/ μ l で S13 を 0.6 μ l, F6 を 0.8 μ l, E30 を 0.4 μ l 使用した.

No 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; 祭晴れ, 20; あきは

それぞれの重みを表す係数である. この重回帰式の重相関係数 (R) は 0.957 であった. 散布図を図 8 A に示す.

この重回帰分析に基づく食味推定式 (4) の, 未知試料に対する適用性を検定するために, 表 3 に示す平成 11 年産米の物性測定値 (バランス度, A6/A4) に対して式 (4) を適用した場合の重相関係数は 0.907 であった. この場合の散布図を図 8 B に示す.

考 察

消費者の良食味指向を受けて, 品種育成, 米の生産・流通及び米の利用・加工の各段階において良食味米が求められている. そのために, 米の食味を精度良く評価する技術の開発が必要である. 従来は, 官能検査, 物理化学的評価, 分光学的測定等が用いられてきた. これらの食味評価方法はそれぞれ特徴があり, それぞれが必要である.

本研究では, 米の食味に品種特性が大きく影響するこ

と²⁾³⁾に注目し, 分子生物学的手法, 特に PCR による微量食味評価手法の開発を主な目的に検討を加えた.

本研究は, 米の食味推定式を, 各種の物理化学的変数 (タンパク質, 炊飯液ヨード呈色度, 3つのアミログラフィ粘度の合計 5 変数) による重回帰分析によって作成した竹生らの食味推定式³⁾や, 各種の分光測定値に基づいて食味を推定する食味計の開発⁵⁾などと同じ流れにある. 異なる点は, 食味評価の目的変数を食味官能検査のみに限らず, 米業界での一般的評価を取り入れた「食味評価値」を加えたこと, 及び, 世界各国における食味嗜好の相違を考慮して客観的な食味指標の一つである「米飯物性測定値」を目的変数の一つに加えた点である. また, 食味推定式作成のための説明変数として, 従来の物理化学的測定値や分光学的測定値ではなく, 筆者らがこれまでに米の品種判別に用いてきた各種の STS 化プライマー共存下での PCR 結果を用いた点が異なっている.

図 4 食味の傾向を示すプライマーによる PCR 結果

A : 比較的良食味とされる米に識別バンドが出現しているプライマーの例

プライマーは M11

B : 比較的低食味とされる米に識別バンドが出現しているプライマーの例

プライマーは F6

1~20 : 平成 12 年産の作付け上位 20 品種

M : DNA 分子量マーカー (和光純薬工業製, Marker 4, ϕ X174 フェージ, *Hae* III, 分子量は上から順に 1353 bps, 1078 bps, 872 bps, 603 bps, 310 bps)

No. 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 13, 14 : 良食味とされている品種

No. 5, 7, 9, 10, 16, 17 : 中~低食味とされている品種

矢印 : プライマーに基づいて出現する識別バンド位置

PCR におけるプライマー使用量は, 濃度 5 pmole/ μ l で M11 は 0.2 μ l, F6 は 0.4 μ l である.

表 3 試料米の食味評価値, 官能検査結果及び米飯物性測定結果

No	試料米	食味評価値	官能検査結果 (総合)			米飯物性 (L3)		同 (A6/A4)	
			平成 9	平成 10	平成 11	平 10	平 11	平 10	平 11
1	コシヒカリ	10	1.09	1.32	0.37	1.44	1.50	0.284	0.275
2	ひとめぼれ	9	1.01	1.21	0.68	1.39	1.70	0.269	0.276
3	ヒノヒカリ	8	0.53	1.35	*	1.48	*	0.286	*
5	きらら 397	7	-0.09	0.98	*	*	*	0.251	*
6	キヌヒカリ	8	0.87	0.55	0.21	1.19	1.23	0.241	0.266
7	ほしのゆめ	8	0.39	1.14	0.18	1.35	1.43	0.272	0.258
9	むつぼまれ	6	0.17	0.18	-0.62	1.07	1.21	0.243	0.236
10	日本晴	6	0.00	0.00	0.00	1.01	1.15	0.216	0.233
11	ササニシキ	7	0.50	0.60	0.15	1.26	1.45	0.264	0.279
15	ハツシモ	8	0.66	0.95	0.42	1.15	1.42	0.203	0.233
16	朝の光	5	-0.25	-0.13	-0.94	1.10	1.08	0.181	0.215
17	月の光	4	*	*	-1.39	1.05	1.01	0.187	0.219

* : 測定せず

$n=11$, 決定係数 $R^2=0.641$, 重相関係数 $R=0.801$

図 5 食味推定式の平成 9 年産米への適用結果

表 1 に示す各品種と各プライマーの関係から、プライマーを 3 種類のグループに分けることができる。すなわち、M11, P5 のように、コシヒカリ等の良食味米に多く識別バンドが出現するグループ、F6, T16 のように、比較的食味の劣る品種に特有に識別バンドが出現するグループ、P3, M2CG, G22 のように、食味とは直接関係なく識別バンドが出現するグループの 3 種類である。しかし、PCR 食味推定式の作成に際しては、第 1, 第 2 のグループのプライマーのみが用いられるわけではなく、全てのプライマーのうちから、式全体として適用性の高い式となるように各種のプライマーが選定される。

PCR 食味推定式(1)とその適用性について考察すると、わが国の育種研究室における食味嗜好に代表される「軟らかくて粘りの強い米飯となるコシヒカリのような米」の評価が高い。この官能検査結果を目的変数として重回帰式を作成し、その回帰式が異なる年次の米にもある程度適用性

A 推定式の作成

B 推定式の検定

図 6 食味評価値を変数とする DNA 食味推定式とその適用結果

A 推定式の作成

B 推定式の検定

$n=12$, 決定係数 $R^2=0.983$, 重相関係数 $R=0.991$ $n=10$, 決定係数 $R^2=0.778$, 重相関係数 $R=0.882$

図 7 米飯物性測定値 (L3) を変数とする DNA 食味推定式とその適用結果

A 物性実測値を説明変数とする食味推定式の作成

N=12, 決定係数=0.916, 重相関係数=0.957

B 食味推定式の検定

N=10, 決定係数=0.823, 重相関係数=0.907

図 8 米飯物性測定値を変数とする DNA 食味推定式とその適用結果

が高いということが示されたと言える。このことは、別の見方をすれば、「良食味品種は年次間差違が小さく、年次を越えても、重相関係数が 0.8 というレベルで PCR 食味推定式の適用が可能」とも言えよう。

PCR 食味推定式(2)とその適用性について考察すると、日本穀物検定協会による食味ランキングは、3 年間の食味試験結果を総合的に評価したものであり、わが国の食味嗜好を代表したものである。また、「米品種大全」に記載されている米の食味評価も、米の流通・販売業界における大勢の評価を表したものであり、この両者を合計することによってわが国における米の代表的食味評価を数値化したと言えよう。これらの数値は順序数値とも考えられるが、両者とも一定の基準を設けてのランク付けがなされており、数値化することによって目的変数として使用できると考えた。この「食味評価値」を目的変数として作成した重回帰式(2)が、未知試料としての検定試験の結果、育種研究室における食味官能検査結果ともよく一致した（重相関係数 R が 0.91）ということは、PCR 食味推定式(2)の普遍性を裏付けるものと言えよう。

食味推定式(3)および(4)とその適用性については、前述の(1)(2)式とは少し意味が異なっている。日本人の米飯食味嗜好性については上記の 2 種類の方法によって食味評価値を得ることが可能であるが、世界各国には幅広い品質特性の米があり、各国の国民はそれぞれ異なった食味嗜好を持っており、日本人の嗜好性をもって普遍的な数値とすることはできない。例えば、インドやタイでは日本人とは逆に、硬くて粘りの少ない米の方が好まれる。そこで、普遍的な食味評価方法が必要となる。食味推定式(3)および(4)は、わが国における食味嗜好を表した推定式ではあるものの、その根拠は官能検査ではなく、世界各国に共通な米飯物性測定値である。本論文では、わが国の消費者の嗜好と比較的相関の高い、低圧縮試験の付着量 (L3) および高圧縮試験

のバランス度 (A6/A4) を目的変数に選択して重回帰式を作成したが、別の米飯物性測定値を目的変数に選択することにより、世界各国のそれぞれの食味嗜好に応じた PCR 食味推定式を作成することが可能である。

以上、PCR 食味推定式(1), (2), (3)および(4)について考察したが、これらの PCR 食味推定式の場合は、従来の食味官能検査、物理化学的測定値あるいは分光学的測定値に基づいた食味推定とは異なる視点から米の食味を推定しようとしたものであり、遺伝子構造に基づく品種特性から食味を推定しようとした点に特徴がある。したがって、本論文で提示した PCR 食推定技術は、官能検査、物理化学的食味評価とは異なる分子生物学的食味評価と位置づけることができる。

しかし、注意を要する点は、個別のプライマーによる増幅 DNA は、G4 のような例を除くと、転写・翻訳されて RNA やタンパク質になる意味のある配列（構造遺伝子の配列）である場合とそうでない部分（イントロンのように意味のない配列）である場合とがあり、品種判別に用いられる配列では後者の例が多いということである。従って、本論文で提示した 4 種類の DNA 食味推定式は、重回帰式の作成に用いた試料米とは異なる試料（たとえば異なる年次の試料米）でそれらの式の適用性を検定する必要がある。本研究では、それぞれ、0.80, 0.91, 0.75 および 0.91 であり、決定係数の概念からは、対象とする食味（官能検査、食味評価値、米飯物性）の約 56%～83% を説明できるものと考えられる。

また、PCR 食味推定技術は、遺伝子の配列に基づく方法であるため、①栽培、貯蔵、精米などの品種以外の食味要因が反映されない、②食味推定式の理論的基盤がまだ確立されていないなどの問題点も残されている。

今回検討したプライマーのうちで、G4 によって増幅する識別バンド DNA は、ホモロジー検索の結果、デンブ

の枝作り酵素 (branching enzyme) との高い相同性が認められた。他の多くの識別バンドについてはまだ機能の明らかな遺伝子とのホモロジーが確認されていないが、今後さらに各識別バンド DNA の機能についても検討を加え、食味推定式の改良を図る予定である。

今後、本研究の成果である各種の PCR 食味推定式を、米の育種、生産、流通、利用の各分野で実際に使用し、推定式の効果あるいは問題点を明らかにしていくことが必要である。例えば、育種の分野においては、粳や玄米の胚芽と反対側の半粒から DNA を抽出して PCR を行い、PCR 食味推定式に基づいて良食味米候補を選抜し、DNA を抽出した残りの胚芽含有半粒を用いて次世代を育成していくといった PCR 半粒育種の実用化につながっていく可能性が期待される。一方、米の利用の分野においては、市販の弁当の米飯一粒から DNA を抽出して PCR を行い、PCR 食味推定式にあてはめて、どの程度の食味の原料米がその弁当に使用されているかを推定することも可能となろう。これらの例にとどまらず、PCR 食味推定技術が今後、広く利用されることが期待される。

要 約

1. 試料米から DNA を抽出して鋳型とし、STS 化プライマーあるいはそのセット共存下で PCR を行い、識別バンド出現の有無を 1 または 0 に 2 値化して説明変数とし、食味官能検査結果を目的変数とする重回帰分析を行い、米の DNA 食味推定式を作成した。

2. 同じ説明変数を使用し、目的変数として、食味ランキング等に基づく「食味評価値」あるいは米飯物性測定値を用いることによる別の PCR 食味推定式を作成した。

3. これらの PCR 食味推定式は、異なる年次の試料米などの未知試料に対しても比較的高い重相関係数を示し、適用性の高いことが示された。

4. PCR 食味推定技術は、一粒の米粒や米飯粒を試料として食味の推定が可能、年次を越えて食味推定式の適用が可能、従来の官能検査、物理化学的測定値、分光学的測定値に基づく食味評価ともよく適合する様々な食味推定式の作成が可能、STS 化プライマーの塩基配列が、今後の食味要因の解明や食味の分子育種の役立つ可能性がある、等の特色がある。

本研究の一部は、生研機構基礎研究「広範な特性の米および変異米の食味特性の解明および新評価技術」の中で実施され、日本食品科学工学会第 48 回大会において発表された。本研究の実施にあたり、貴重な米試料を提供頂いた農業研究機構作物研究所の井邊時雄稲研究部長、統計解析にご協力頂いた当研究所品質情報解析研究室の内藤成弘主

任研究官、プライマー等の有益な情報を提供頂きました(財)日本穀物検定協会中央研究所の真鍋 勝前所長、橋野陽一氏に感謝申し上げます。また、当研究室の馬場ヨシ子女史、宮本幸子女史、永戸博美女史、小野寺幸子女史、矢口未季女史に謝意を表します。

文 献

- 1) 吉川誠次, 米の食味試験, 食糧, 4 号, 29-38 (1961).
- 2) 谷 達雄, 吉川誠次, 竹生新治郎, 堀内久弥, 遠藤 勲, 柳瀬 肇, 米の食味評価に関係する理化学的要因 (I), 栄養と食糧, **22**, 452-461 (1969).
- 3) 竹生新治郎, 渡辺正造, 杉本貞三, 真部尚武, 酒井藤敏, 谷口嘉廣, 多重回帰分析による米の食味の判定式の設定, 澱粉科学, **32**, 51-60 (1985).
- 4) 大坪研一, 米の品質評価について, 食品工業, **42**, 55-61 (1999).
- 5) 山縣一郎, 安藤光夫, 柳瀬 肇, 米の食味評価装置の試験結果, 精米工業, 123 号, 10-20 (1990).
- 6) 食糧庁, 米の食味改善に関する委員会報告書 (1997).
- 7) 春日井 治, 米の食味とは何か, 米の食味評価最前線 (全国食糧検査協会, 東京), pp. 7-12 (1997).
- 8) Bett-Garber, K.L., Champagne, E.T., McClung, A.M., Moldenhouer, K.A., Linscombe S.D. and McCkenzie, K. S., Categorizing rice cultivars based on cluster analysis of amylose content, protein content and sensory attributes, *Cereal Chem.*, **78**, 551-558, 2001.
- 9) Grimm, C.C., Champagne, E.T. and K.Ohtsubo : Analysis of volatile compounds in the headspace of rice using SPME/GC/MS. In "Flavor, Fragrance and Odor Analysis," (Marcel Dekker, Inc., New York), pp.229-248 (2001).
- 10) Barton, F.E., Himmelsbach, D.S., McClung, A.M. and Champagne, E.T., Rice quality by spectroscopic analysis ; precision of three spectral regions, *Cereal Chem.*, **77**, 669-672 (2000).
- 11) 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, RAPD 法を用いた国内産精米の品種判別技術, 食科工, **44**, 386-390 (1997).
- 12) 大坪研一, 中村澄子, 諸岡 宏, 藤井 剛, 布施 隆, 川崎信二, RAPD 法による米飯一粒の品種判別, 食科工, **46**, 262-267 (1999).
- 13) うるち米編, (米品種大全, 米穀データバンク, 東京), pp. 19-248 (1999).
- 14) 岡留博司, 豊島英親, 須藤 充, 安東郁男, 沼口憲治, 堀末登, 大坪研一, 米飯 1 粒の多面的物性測定に基づく米の食味評価, 食科工, **45**, 398-407 (1998).
- 15) 大坪研一, 與座宏一, 藤井 剛, 川崎信二, 米試料の品種判別方法, 特願平 2000-226854 (2000 年 7 月 27 日).
- 16) 大坪研一, 岡留博司, 中村澄子, 原口和朋, 與座宏一, 奥西智哉, 鈴木啓太郎, 米の DNA 食味判定技術及び粳/玄米半粒による良食味米選抜方法, 特願平 2001-273689 (2001 年 9 月 10 日).
- 17) 大坪研一, 中村澄子, 岡留博司, 熊丸敏博, 佐藤 光, PCR による米の食味判別技術, 農化大会講演要旨集, p. 18, 仙台 (2002).
- 18) 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判別プライマーセットの開発, 農化, **76**, 388-397 (2002).

(平成 14 年 8 月 21 日受付, 平成 14 年 12 月 13 日受理)