

解説



米，米飯，餅の DNA 鑑定による 品種判別技術

本研究は，食糧法制定を契機に，コメの包装に，品種，産地，産年の表示がされるようになり，内容物の科学的判別が必要になって始められた。我が国の近縁種同士の識別が可能な簡易判別技術の開発が課題であった。幸い，精米に限らず，「酵素法」によって米飯一粒や餅からでも品種判別が可能となり，育種の段階から，流通加工段階を経て消費者の段階まで，幅広く利用できる品種判別技術になったと考えている。

大坪 研一

1 はじめに

近年，消費者の良食味指向が進み，コシヒカリ，ひとめぼれ，ヒノヒカリ，あきたこまち等の良食味米の生産が増加し，流通市場でも他の米に比べて高い値段で取引されている（表1）。食糧法のもとで精米の表示に品種，産地，産年を表示することになったが，平成13年4月からの改正JAS法の施行によっても，こうした米の品種や産地の表示制度は維持・拡大されることになった。

従来，稲の品種判別は，草型，交配稔実性^{ねんじつ}，籾の形状等によって行われてきた¹⁾²⁾。玄米のレベルでは，食糧庁の農産物検査官によって，粒形や外観上の様々な特徴に基づいて判別されてきた。食品総合研究所（食総研）の松永・田村らが開発した画像解析による粒形判別技術は，この方法を機器によって客観化，迅速化したものであり，標準試料と比較することによって，産地間差や年次間差の判別にも応用できる可能性がある³⁾。

一方，DNA判別技術は，米のゲノム遺伝子のわずかな構造上の相違をPCR（ポリメラーゼチェーンリアクション：DNAの特定部分を，変性，結合，伸長の三つの反応の30～40サイクルの繰り返しによって10億倍～1兆倍程度に増幅させる技術）やRFLP法（制限酵素断片長多型検出法）等によって識別するものであり，著者らは，現在のところ，品種間差のみを検出して産地や貯蔵の影響を受けない識別プライマーのみを選定して用いている⁴⁾。PCR法では，様々な装置や条件で搗精された精米や，精米粉末，米飯や餅等にも適用できるという長所がある。代表的な品種判別技術を表2に示す。

2 米のDNA品種判別技術とは

DNA品種判別技術は，PCR法とRFLP法に大別される。PCR法は，試料DNAをPCRによって増幅する

表1 コシヒカリの作付け量と価格

| 順位 | 品種名 | 作付け面積* | 割合 | 価格** |
|----|--------|----------|-------|-------------|
| 1 | コシヒカリ | 54.7万 ha | 35.5% | 26279/16500 |
| 2 | ひとめぼれ | 14.9 | 9.7 | 16300 |
| 3 | ヒノヒカリ | 13.9 | 9.0 | 15653 |
| 4 | あきたこまち | 13.0 | 8.5 | 16697 |
| 5 | きらら397 | 7.3 | 4.8 | 14803 |
| 6 | キヌヒカリ | 5.6 | 3.6 | 15208 |
| 7 | はえぬき | 4.2 | 2.7 | 16352 |
| 8 | ほしのゆめ | 4.0 | 2.6 | 15001 |
| 9 | 日本晴 | 2.0 | 1.3 | 15041 |
| 10 | つがるロマン | 2.0 | 1.3 | 15200 |

*：平成12年産米

**：平成13年11月自主流通米入札取引結果

表2 イネおよび米の各種の品種判別方法

| 方法 | 対象 | 特徴 | 問題点 |
|-------|-------|-------------|-----------|
| 交配・草型 | 稲植物体 | 品種判別の基準的方法 | 米に適用が困難 |
| 粒形 | 米粒 | 食糧検査の方法を客観化 | 標準試料が必要 |
| 酵素多型 | 稲，米，粉 | 世界の幅広い米に適用 | 近縁種の識別が困難 |
| RFLP | 同上 | 近縁種の識別可能 | 試料DNA量が必要 |
| PCR | 同上 | 同上，微量DNAで可能 | PCRの再現性 |

際の，プライマー（複製開始用DNA断片）の試料DNAへの結合部位における塩基配列の相違によって識別する。従って，PCRで増幅が可能な量の試料DNAがあれば適用可能であり，精米や米飯のようにデンプンやタンパク質などのDNA以外の成分を多く含み，抽出可能なDNA量が少ない場合に適している。PCR法の問題点としては，増幅装置や条件によって結果が異なる場合がある点が挙げられる。PCR法による米の品種判

Cultivar Identification Method Using DNA from Rice, Cooked Rice and Rice Cake.

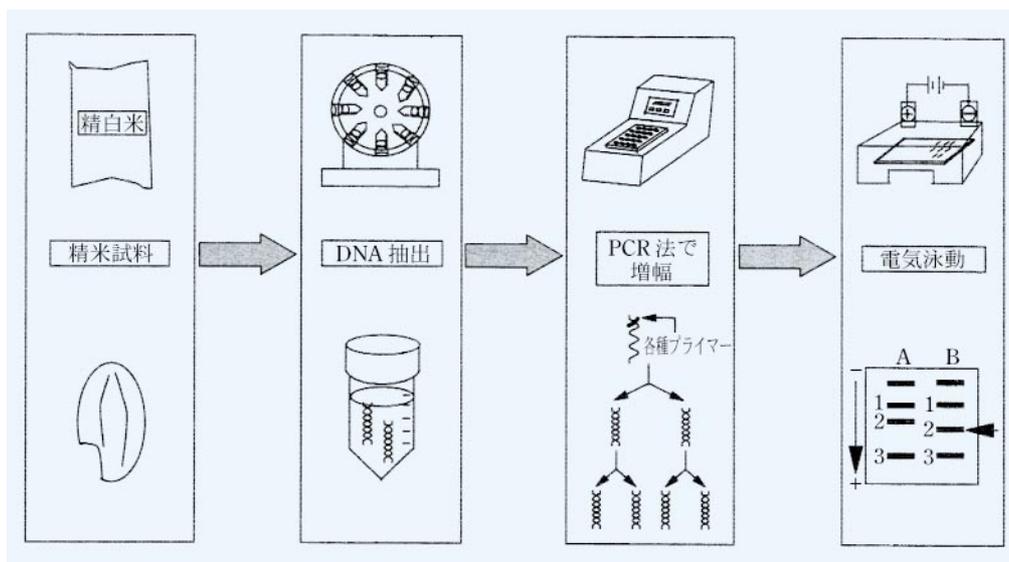


図1 PCR法による米の品種判別技術の概要図

別の概要を図1に示す。

一方、RFLP法は、試料DNAを様々な制限酵素（切断部位の塩基配列が決まっているDNA分解酵素）によって切断し、試料DNAの塩基配列の相違に基づいて切断されたDNA断片の長さが異なってくること（多型と呼ぶ）を利用した識別方法である。この方法は、PCR法に比べて多量の試料DNAを必要とするという問題はあるが、結果の再現性が高いこと、日本晴やカサラスのようなゲノム解析に用いられている基準的な品種では、制限酵素切断部位や、対象遺伝子の座乗染色体およびその位置に関する情報が蓄積されているという長所がある。

3 PCR法におけるDNAの抽出と精製

穀類種子からの代表的なDNA抽出法はCTAB（セチルトリメチルアンモニウムブロミド）法である。この方法は、デンプン、タンパク質、脂質等の夾雑物の多い穀類種子からのDNA抽出に適している⁴⁾⁵⁾。また、精米一粒からDNAを抽出して品種識別に用いる場合には、市販のDNA抽出キット（ニッポンジーン社製ISOPLANTやBIO 101社製FastDNA Kitなど）も使用可能であり⁶⁾⁷⁾、簡便性、迅速性の点で優れている。最近登場した改良キット（ニッポンジーン社製ISOPLANT II）は、迅速性および抽出DNAの精製度の点で改善が行われ、使いやすくなっている。

4 PCR法による国内産米の品種判別例

筆者の研究室では、コシヒカリ、ひとめぼれ等、平成6年度の国内産作付け上位10品種を対象に、PCR法（RAPD法：任意増幅断片多型DNA法）による品種判別技術の検討を行い、8種類のランダムプライマーによ

る結果を総合することによって、上記10品種の識別を可能とする技術開発を行った⁴⁾（図2）。使用したランダムプライマーは、産地や貯蔵の影響が現れないものを選択して使用した（図3、表3）。

5 PCR法による県産米のDNA品種判別例

秋田県総合食品研究所では、県産の「あきたこまち」の品種保証にPCR法による品種判別を適用し、県経済連を通じて実用化した⁸⁾。その技術は同研究所で独自に開発されたものであるが、研究開発の初期には、使用プライマー8種類の配列情報の提供などで食総研も協力を行った。同研究所では使用プライマー2種類のSTS（sequence tagged site、後述）化にも成功している⁹⁾。秋田県以外に、滋賀県農業試験場、熊本県農業研究センター、福岡県総合農業試験場、新潟県総合農業研究所などにおいても、RAPD法による自県産米の品種判別が行われ、PCRによるDNA判別法は普及と実用化が進みつつある。

6 米飯一粒による品種判別技術

学校や会社における給食や持ち帰り弁当、冷凍米飯や無菌包装米飯などの加工米飯を含めた米飯市場は年間2兆円を超えるとされており、現在も市場が拡大しつつある。そこで、筆者の研究室では、DNA品種判別技術を米飯の品種判別にも適用すべく検討を行った。精米に比べての米飯の場合の問題点は、1炊飯加熱を受けてDNAの一部が分解されており、抽出量が少ない、2炊飯によってデンプンが糊化しており、DNAの抽出を妨げる、3炊飯加熱によって変性したタンパク質がDNAの抽出を妨げる、4異なる品種を混合炊飯した場合にDNAが溶出混合しないか？などの点であった。

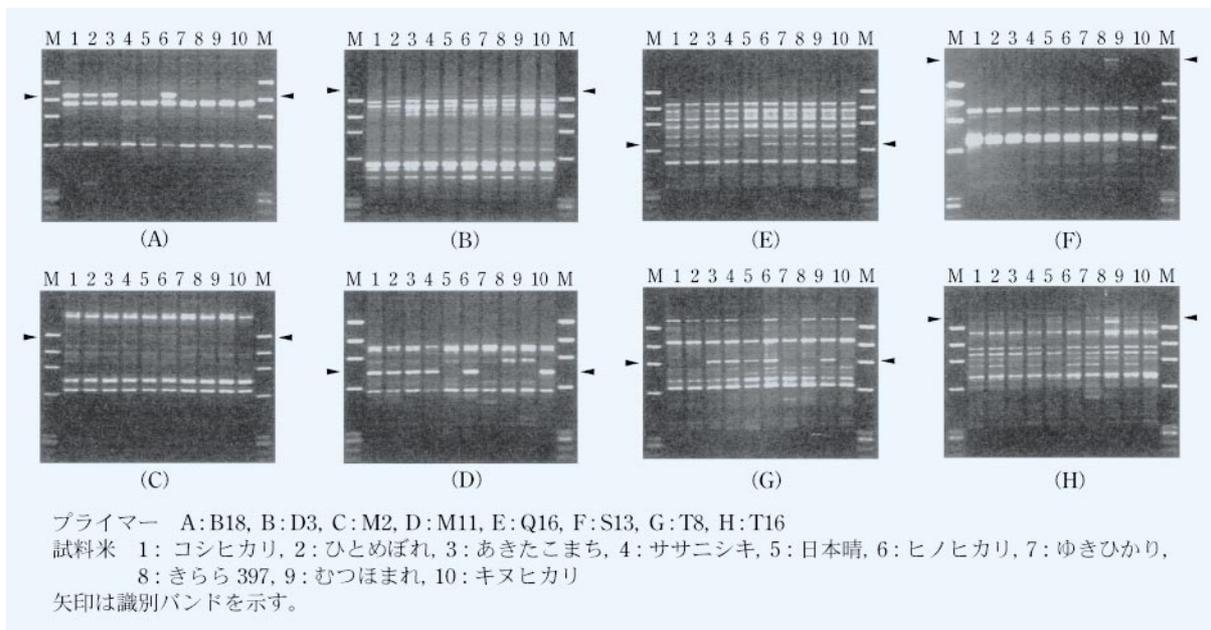


図2 PCR法(RAPD法)による増幅DNAの電気泳動結果

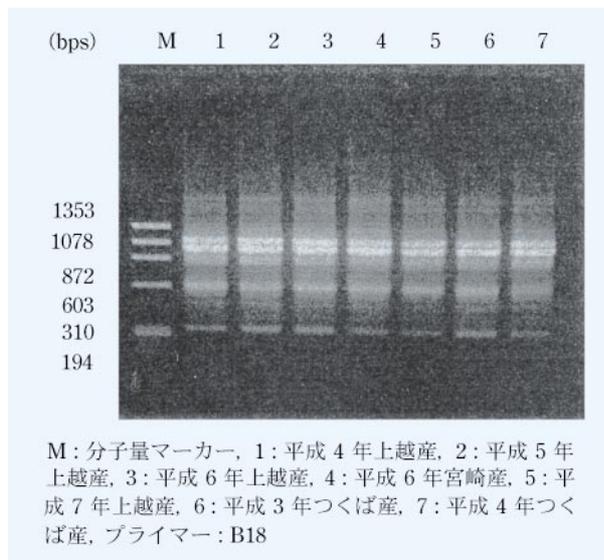


図3 産地, 年産の異なるコシヒカリの増幅DNAの電気泳動結果

表4 3種類のDNA抽出法による抽出DNAの比較

| 品 種 名 | 酵素法 | CTAB法 | ISOPLANT法 |
|---|-----------------|----------------|-----------------|
| コシヒカリ DNA量 μg (OD 260/OD 280) | 9.89 (1.84) | 3.10 (1.95) | 7.08 (2.06) |
| ひとめぼれ DNA量 μg (OD 260/OD 280) | 8.67 (1.80) | 1.97 (1.97) | 11.88 (2.01) |
| あきたこまち DNA量 μg (OD 260/OD 280) | 11.63 (1.94) | 3.79 (2.17) | 10.31 (2.10) |
| ササニシキ DNA量 μg (OD 260/OD 280) | 10.70 (1.84) | 3.69 (2.03) | 9.18 (2.10) |
| 日 本 晴 DNA量 μg (OD 260/OD 280) | 14.04 (1.88) | 4.96 (1.89) | 8.03 (1.99) |
| ヒノヒカリ DNA量 μg (OD 260/OD 280) | 11.50 (1.76) | 3.68 (2.17) | 8.57 (2.06) |
| ゆきひかり DNA量 μg (OD 260/OD 280) | 9.80 (2.02) | 4.25 (2.12) | 9.65 (1.74) |
| きらら 397 DNA量 μg (OD 260/OD 280) | 16.70 (1.88) | 5.47 (2.09) | 10.31 (2.10) |
| むつほまれ DNA量 μg (OD 260/OD 280) | 11.57 (1.97) | 4.20 (2.17) | 7.94 (2.20) |
| キヌヒカリ DNA量 μg (OD 260/OD 280) | 8.46 (1.73) | 2.96 (2.05) | 9.15 (2.10) |
| 平 均 DNA量 μg (OD 260/OD 280) | 11.30 (1.87) | 3.81 (2.06) | 9.21 (2.06) |
| 標準偏差 | 2.38 | 0.95 | 1.33 |

DNA量はOD 260により測定し, 1粒あたりの抽出量を示す。

表3 使用プライマーの塩基配列

| No. | プライマー名 | 塩基配列 |
|-----|--------|------------|
| 1 | B 18 | CCACAGCAGT |
| 2 | D 3 | GTCGCCGTCA |
| 3 | M 2 | ACAACGCCTC |
| 4 | M11 | GTCCACTGTG |
| 5 | Q 16 | AGTGCAGCCA |
| 6 | S 13 | GTCGTTCTCG |
| 7 | T 8 | AACGGCGACA |
| 8 | T 16 | GGTGAACGCT |

A: アデニン, T: チミン, G: グアニン, C: シトシン

そこで, 従来から精米に用いているCTAB法, 市販キット法, 酵素法の3種類のDNA抽出・精製方法を10種類の品種に用いて比較を行った。その結果, 抽出されるDNAの量と質の点で, 表4に示すように酵素法が最も良好な結果を示した。筆者の研究室で開発した酵素法の概要を図4に示す。

また, 「日本晴」と「コシヒカリ」の各精米粒に印を付けて単独炊飯および混合炊飯し, 試料米飯のDNAを

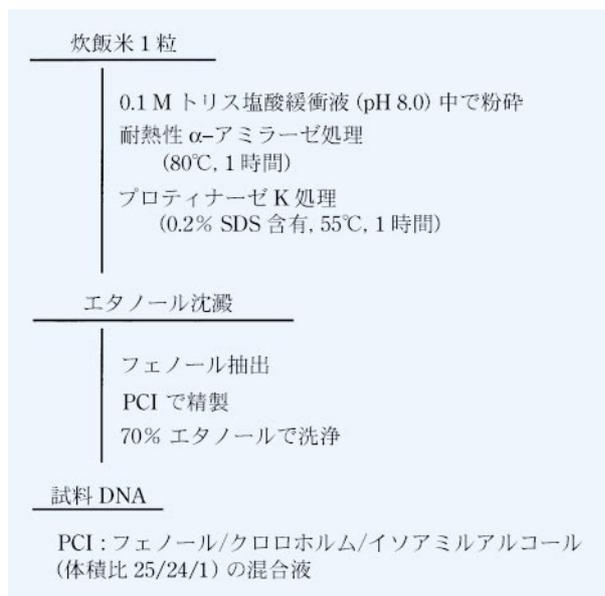


図 4 炊飯米 1 粒からの DNA 抽出・精製方法 (酵素法)

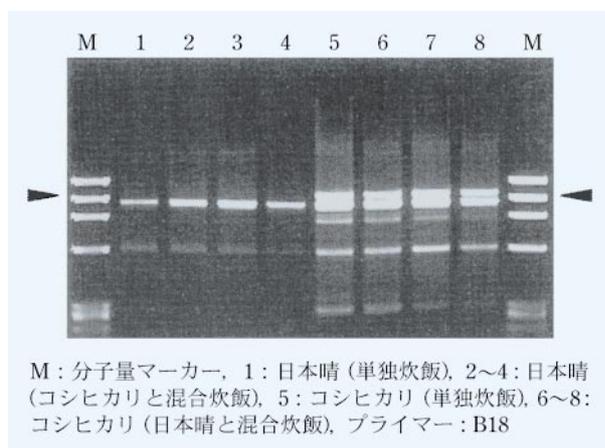


図 5 混合炊飯の米粒から抽出した DNA の PCR 増幅結果

酵素法で抽出して調べた結果, 図 5 に示すように, 混合炊飯した場合にも DNA が混じり合うことなくそれぞれの品種判別が可能であることを示した。これらの結果を踏まえて, 使用プライマーを選択することにより, 精米の場合と同様に, 米飯一粒の場合にも主要な品種の識別が可能になっている¹⁰⁾¹¹⁾。

7 プライマーの STS 化

PCR 法による DNA 品種判別には, 簡便性の点から, 従来は RAPD 法が用いられてきた。RAPD 法の場合には市販の千種類以上の 10 量体, 12 量体のランダムプライマーの中から品種判別に有用なものを選択し, 使用プライマーごとに数種類の PCR および同数のアガロースゲル電気泳動を行う。操作が煩雑となる上に, 各電気泳動において, 多数の共通バンドの中から識別バンドを選定し, 識別する必要がある。従って, 正確さ, 再

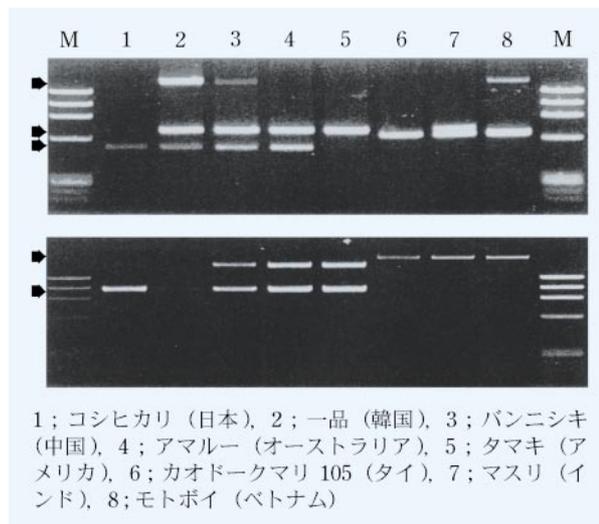


図 6 STS 化プライマーを用いた 2 回の PCR による外国産米の識別 (精米試料)

現性の点で問題を生じることがあるので, 使用する PCR 装置, PCR 条件, 使用プライマーと識別バンドの選定に注意を払う必要がある。

上記の問題は, 使用するプライマーを STS 化することによって解決される。すなわち, 1 ランダムプライマーによる RAPD 法を行い, 有用な識別バンドを選定する, 2 電気泳動したゲルから識別バンドを切り出して DNA を抽出する, 3 その DNA を大腸菌に組み込んで増幅する, 4 増幅した DNA の塩基配列を決定する, 5 決定した塩基配列に基づいて, フォワード側およびリバース側の両側から長いプライマーの対を設計する。この一連の操作により, 一つの識別プライマーあたり, 数種類の対をなすプライマー (STS 化した対合プライマー) を設計することができる。この STS 化プライマーを RAPD 法におけるランダムプライマーと同様に鋳型 DNA 溶液に混合して PCR かけると, RAPD 法とは異なり, ランダム結合に基づく各品種共通の多数のバンドが消失し, 求める識別バンドのみが出現する。これによって RAPD 法の問題とされていた再現性, 識別誤認の問題が解決される。

筆者の研究室では, このようにして約 20 種類の対合プライマーを設計し, 適正な PCR 条件とプライマー選定によって, 複数のプライマーを同時に使用する「マルチプレックス法」を確立した。これにより, RAPD 法における数種類の PCR と同数の電気泳動という煩雑な操作と, 多数の共通バンドの中から識別バンドを選んで判定するという問題点が解消された。すなわち, 1 種類か 2 種類の PCR を行い, 識別バンドのみがバーコードのように現れる電気泳動によって再現性よく品種識別を行うことが可能になった。STS 化プライマーを用いたマルチプレックス法の結果を図 6 に示す¹²⁾。この「STS 化マルチプレックス法」は, 米飯試料の場合にも

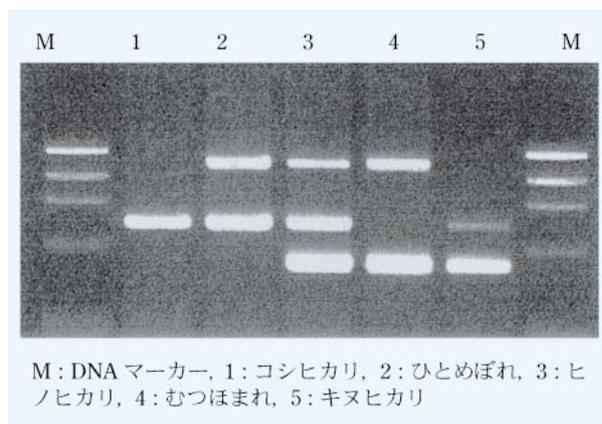


図7 マルチプレックス PCR 法による 5 品種の識別 (米飯 1 粒試料)

適用可能であり、コシヒカリ、ひとめぼれ、キヌヒカリ等の近縁種の識別結果を図 7 に示す¹³⁾。

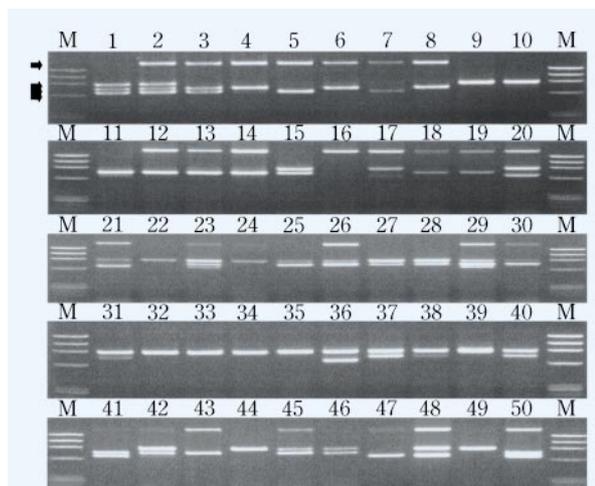
8 コシヒカリ判別用プライマーセットの開発

前述の STS 化プライマーによるマルチプレックス法をさらに実用的なものとするために、「コシヒカリ判別用プライマーセット」を開発した。すなわち、全国の 33 府県におけるコシヒカリ原種あるいは原原種を試料とし、各府県産米の間で相違が現れず、他の品種とは識別性のあるマルチプレックスプライマー組み合わせを検討した。この場合、1 プライマーセットの各プライマーがプライマーダイマーを構成したりして互いに干渉することなく、明確にそれぞれの識別バンドが現れること、2 各府県のコシヒカリ同士で相違が現れないこと、3 ひとめぼれ、あきたこまち、ヒノヒカリ等の主要な類縁品種とも明瞭に識別ができること、の三つのポイントが重要であった。当研究室で開発したコシヒカリ判別用プライマー組み合わせでの一例を図 8 に示す¹³⁾。

9 餅を試料とする原料米の品種判別

餅の原料米においても炊飯用^{うるち} 粳米の場合と同様に「コシヒカリ」に相当する「こがねもち」等の良質品種があり、原料米の品種判定は原料米の産地のみならず、餅製造企業、流通業界、消費者にとって重要である。餅は蒸しや餅搗きあるいは練りだし等の工程を経ており、米飯よりも一層組織構造の破壊と成分の変性が進行している。

この餅を試料として DNA を抽出し、品種を判別することができるかどうか、検討を加えた。DNA 抽出方法を検討した結果、米飯用に開発した「酵素法」の条件を強化することによって PCR にかけるに十分な良と質の DNA をとれることが明らかになった。次いで PCR には筆者の研究室でこれまでに開発した各種の STS 化プライマーを用いて適性を調べた。その結果、こがねも



M : 分子量マーカー, 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: ながのほまれ, 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
矢印は配合した 4 種類のプライマーによる識別バンドの位置を示す。

図8 コシヒカリ判別用のプライマーセットによる 50 品種の識別結果

ち、ヒヨクモチ、はくちょうもち、輸入^{もちごめ} 糯米等の主要な糯米を識別できるプライマーが選定された。これらを用いて、糯米原料米および餅製品から抽出した DNA を用いて行った主要糯米品種の識別例を図 9 に示す。これにより、プライマーの単独使用あるいはマルチプレックス化による餅原料米の品種判別が可能となった¹⁵⁾。

10 まとめ

米の品種の DNA 判別法について、方法の概要と特徴を紹介した。これらの技術は日進月歩の分子生物学の先端技術を米および米加工品の分野に応用したものであり、当該分野の進歩の速さから、今後ますますの進展が予想される。方法の簡便化や基準化がさらに進むことが期待される。ここで紹介した筆者の研究室の成果は、研究室の同僚たちの努力によるものであるが、同時に農業生物資源研究所、食糧庁消費改善課品質管理室との共同で進められたものである。また、貴重な米試料を提供いただいた全国の稲育種研究室の皆様へ深く謝意を表したい。

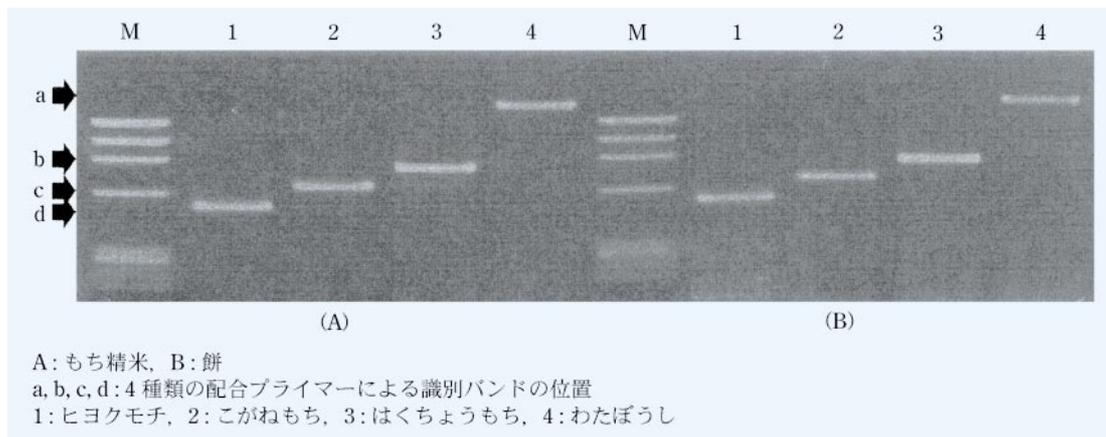


図9 マルチプレックスPCR法による精米および餅を試料とする原料米の品種判別

文 献

- 1) 松尾孝嶺：農業技術研究所研究報告，D3, p. 1 (1952).
- 2) 中川原捷洋：“稲と稲作のふるさと” p. 72 (1985), (古今書院).
- 3) 松永隆司, 田村真八郎：食の科学, 131, 60 (1980).
- 4) 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：食科工, 44, 386 (1997).
- 5) 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：食科工, 46, 117 (1999).
- 6) 大坪研一, 吉橋 忠, 中村澄子, 川崎信二：育種学雑誌, 47 (別2), 258, 1997.
- 7) 吉橋 忠, 中村澄子, 藤井 剛, 川崎信二, 大坪研一：食科工, 46, 250 (1999).
- 8) 小笠原博信：ジャパンフードサイエンス, 8月号, 27 (1998).
- 9) 小笠原博信, 高橋砂織：食科工, 47, 632 (2000).
- 10) 大坪研一, 中村澄子, 諸岡 宏, 藤井 剛, 布施 隆, 川崎信二：食科工, 46, 262 (1999).
- 11) 食品総合研究所：日本特許第 3048149 号, 2000 年 3 月 24 日.
- 12) 大坪研一・與座宏一：精米工業, No 183, p. 10 (2000).
- 13) 大坪研一：食糧振興, No 68, p. 4 (2000).
- 14) 大坪研一・中村澄子・今村太郎：農化, 76, 388 (2002).
- 15) 大坪研一・中村澄子・與座宏一・穴戸功一：食科工, 48, 306 (2001).



大坪研一 (Ken-ichi OHTSUBO)
 独立行政法人食品総合研究所 (〒305-6842 茨城県つくば市観音台 2-1-12)。東京大学理学部生物化学科卒。農学博士。
 現在の研究テーマ 米の食味評価, 品種判別, 遺伝子組換え等。主な著書 “米の科学”(朝倉書店)。趣味 読書, ソフトボール。
 E-mail: kenohitsu@nfri.affrc.go.jp

新刊紹介

食と健康

情報のウラを読む

村上 明・森光康次郎 編

また出たか、という感のある「食」と「健康」にかかわる解説書。TV, 新聞, 週刊誌と巷にあふれかえる, 時にへんな思い入れに支配された, 時に不十分な, 時に不正確な, 「食」と「健康」にかかわる情報に関して, 現場の研究者を中心にそのおのおのが専門とする分野ごとに 12 章に分けて, 正確さを保

ちつつ比較的分かりやすく一般向けに書かれている。第 1 章がダイエットの科学, 第 2 章がサプリメントの科学, 以下, 特定保健用食品の科学, 魚, 野菜, フルーツ, 豆類, 香辛料, お茶の科学と続き, 次にいわゆる健康食品の多くが絡んでいる活性酸素と抗酸化物質の科学, さらに遺伝子組み換え作物の科学, さらに環境ホルモンの科学と, この問題の広範な領域を一応カバーしている。前書きの中で編者が, 「一般消費者が認識している健康情報と科学的事実のギャップにメスを入れることを執筆方針の核とした。」と述べているが, 各章ごとで若干その程度には差があるものの, 科学的に必要なことは BOX を作ってそこで解説をする, という方法も手伝って, 比較的よく達成されているように見られ, 巷にあふれている情報を整理してみるためにも役に立ちそうな一冊である。

(ISBN 4-621-07121-1・四六判・302 ページ・2,200 円 + 税・2002 年刊・丸善)