

市販キットを用いたコメの品種鑑別法の検討

浜崎志帆・宮崎悦子

福岡市保健環境研究所保健科学課

Identification of Rice Cultivars using Commercial PCR Kits

Shiho HAMASAKI and Etsuko MIYAZAKI

Health Science Section, Fukuoka City Institute of Health and Environment

要約

福岡市内を流通するコメの品種の表示に係る検査体制の整備を目的とし、市販キットを用いたコメの品種鑑別法の検討を行った。5品種のコメ及びコシヒカリに5%の夢つくしを混入した粉碎試料を対象に、市販キット5種で鑑別した結果、品種特定キットAが品種を全て正しく鑑別した。このAキットを用いて夢つくしから抽出したDNAに、ヒノヒカリから抽出したDNAを0, 0.5, 2, 3, 4, 5, 10, 100%混入して鑑別したところ、0.5%以上のヒノヒカリが混入した場合に検出可能であった。同様に、ヒノヒカリが混入した夢つくしの粉碎試料の場合は、2%以上のヒノヒカリが混入した場合に検出可能であった。コメ一粒からのDNA抽出法を検討したところ、ビーズ法が適していた。ビーズ法によるDNA抽出とAキットを組合せて6品種のコメを一粒ずつ鑑別したところ、全て表示と一致した。Aキットによる粉碎試料及びコメ一粒ごとの鑑別を単独または組み合わせることで、コメの品種の表示事項に係る検査に対応可能であると考えられた。

Key Words : コメ Rice, 鑑別 Identification, 品種 Cultivars, PCR法 PCR method

1 はじめに

コメは主食として身近で重要な食品であるが、産地及び品種の「銘柄」が市場価格に反映されるため、表示偽装は度々問題となっている。

精米及び玄米の品種、産地及び産年等の表示は食品表示法¹⁾により規定されている。平成28年度から福岡市は食品表示法の品質事項に係る事務を執行することとなった。福岡市保健環境研究所では、所管課からの市内流通生鮮食品の品質事項の調査に対応する検査体制の整備への要望を受け、平成30年度から、まずはコメの品種鑑別の検討を行うこととした。

コメの品種鑑別は、既に大坪らによる Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法²⁾、赤木らによる Simple Sequence Repeats (SSR) 法³⁾、田淵らによる一塩基多型 (SNPs) 法⁴⁾ など多くの報告がなされており、これらを基にした複数のPCRキットが市販されている。コメの品種鑑別では、単一原料米表示のコメを一定量の粉碎試料にして異品種が混入していないかを鑑別する定性検査と、試料からランダムに20粒程度のコメを採り、

一粒ごとのコメの品種を鑑別して異品種の混入割合を求める定量検査の2種類がある。

国内農産物の検査実施マニュアル⁵⁾によると、「DNA分析を用いて異品種の混入状況について確認する場合の異品種の混入限度は5%」であることから、検査では5%の異品種の混入を検知できる必要がある。

そこで、市内を流通するコメ品種の表示事項の調査に対応する検査体制の整備を目的として、複数の市販キットを用いて、粉碎試料に対し、品種鑑別及び5%の異品種の混入の鑑別が可能かを検討した。次に、異品種の鑑別と混入割合の定量のために、コメ一粒ごとの品種鑑別に適したDNA抽出法の検討を行い、品種鑑別を行ったのでその結果を報告する。

2 実験方法

2.1 試料

コメから抽出されるDNAの収量は、品種によらず精米より玄米の方が少ない⁷⁾ため、試料は全て、より厳しい条件となる玄米を用いた。

対象とするコメの品種は、国内の作付面積の上位4品種であるコシヒカリ、ひとめぼれ、ヒノヒカリ、あきたこまちと、福岡県の作付面積上位3品種である夢つくし、コシヒカリ、元気つくしの6品種に加え、福岡市内で入手可能であったにこまる、あきげしきの計8品種とし、いずれも単一原料米表示のものを用いた。

2.2 機器等

ミルサー：岩谷産業（株）製 IFM-720G

ビーズ式粉碎機：サーモフィッシャーサイエンティフィック（株）製 FastPrep FP120

分光光度計：サーモフィッシャーサイエンティフィック（株）製 Nano Drop ONE

サーマルサイクラー：バイオ・ラッドラボラトリーズ（株）製 iCycler

UV 撮影装置：UVP 製 UV Transilluminator NM-20

2.3 PCR 試薬キット

使用した PCR キットを表1に示す。市販キットで入手可能なもののうち、品種の組み合わせ等を考慮し、100種以上の品種を特定できる品種特定キット2種（A、B）と、コシヒカリかその他の品種かを鑑別するコシヒカリ鑑別キット3種（C～E）の計5種を使用した。

表1 使用した PCR キット

キット	キット名	メーカー	種類
A	コメ奉行シリーズ ②品種特定キット	(株) コッケン	品種特定
B	お米鑑定団 Ver.4	(株) ビジョンバイオ	品種特定
C	コメ奉行シリーズ ①コシヒカリ判別キット	(株) コッケン	コシヒカリ鑑別
D	コメ判別用 PCR Kit I	タカラバイオ (株)	コシヒカリ鑑別
E	コメ判別用 PCR Kit II	タカラバイオ (株)	コシヒカリ鑑別

2.4 その他試薬

シリカゲル膜タイプ DNA 抽出精製キット：(株) ニッポンジーン製 GM quicker 2

2-プロパノール：富士フィルム和光純薬（株）製 分子生物学用

2% アガロースゲル：サーモフィッシャーサイエンティフィック（株）製 E-Gel

2.5 粉碎試料の調製

単一原料米と表示された玄米50gをミルサーで粉碎し均質化したものを粉碎試料とした。単一品種に重量比で異品種を混入させた試料は、例えばコシヒカリに夢つく

しを重量比で5%混入させた場合は「5%夢つくし混入コシヒカリ」というように表記した。

2.6 粉碎試料からの DNA 抽出

A, C, D, E キットを使用する場合は、コメの DNA 抽出に適した⁷⁾ シリカゲル膜タイプ DNA 抽出精製キット GM quicker2 を用いて、GM quicker2 に添付の「コメ DNA 抽出プロトコール」の一部を改変して、各検体につき1回 DNA を抽出した。粉碎試料 0.5 g を 2.0 mL チューブに採取し、700 μ L の GE1 Buffer, 20 μ L の Proteinase K, 2 μ L の α -amylase, 10 μ L の RNase A を順に添加後、ボルテックスミキサーで 60 秒間攪拌し、65°C で 30 分間加温した。85 μ L の GE-K Buffer を添加し、ボルテックスミキサーで混和後、13000 \times g で 5 分間、室温で遠心した。上清を 400 μ L を 1.5mL チューブに採り、150 μ L の GB3 Buffer, 150 μ L の 2-プロパノールを添加し混和後、Spin Column に全量負荷し、650 μ L の GW Buffer で洗浄し、50 μ L の TE buffer で溶出したものを DNA 溶液とした。得られた DNA 溶液の吸光度を分光光度計で測定し、260 nm の吸光度 (A_{260}) から濃度、260 nm と 280 nm の吸光度比 (A_{260}/A_{280}) から純度を測定し、20 ng/ μ L となるよう滅菌水で希釈した。

B キットの場合は、キットに付属の試薬、器具を用いて、DNA 抽出を行い、抽出液をそのまま鋳型として使用した。

2.7 コメ一粒からの DNA 抽出

コメ一粒を薬包紙に包んで木槌で粉碎したものを試料とした。試料をビーズの入ったホモジネートチューブに移し GE1 Buffer 250 μ L を添加した後、ビーズ式破碎機にて、6.0 m/s, 2 分間破碎した。それ以降の操作は、GM quicker2 添付の「コメ1粒からの DNA 抽出プロトコール」に従い行った。すなわち、10 μ L の Proteinase K, 2 μ L の α -amylase, 5 μ L の RNase A を順に添加後、ボルテックスミキサーで 30 秒間攪拌し、65°C, 15 分間加温した。40 μ L の GE-K Buffer を添加し、ボルテックスミキサーで混和後、13000 \times g で 5 分間、室温で遠心した。上清を 200 μ L を 1.5mL チューブに採り、75 μ L の GB3 Buffer, 75 μ L の 2-プロパノールを添加し混和後、Spin Column に全量負荷し、650 μ L の GW Buffer で洗浄し、50 μ L の TE buffer で溶出したものを DNA 溶液とした。2.6 と同様に、得られた DNA 溶液は分光光度計で測定し、濃度と純度を確認し、20 ng/ μ L となるよう滅菌水で希釈した。

2.8 PCR と鑑別方法

抽出した DNA を鋳型として、各キットに示された方法に従い PCR を行った。PCR 産物を 2%アガロースゲル

による電気泳動後、UV 撮影装置でバンドを確認し、鑑別を行った。品種特定用の A 及び B キットでは、鑑別結果と表示が一致するかどうかを確認した。

A キットでは、4 種類のプライマー混合物 (a~d) を使用し、それぞれ最大で a は 5 本、b は 4 本、c は 5 本、d は 5 本のバンドが検出され、そのバンドの有無から、品種鑑別表に従って鑑別した。A キットの品種鑑別表のうち試料に用いた 7 品種のパターンを抜粋して表 2 に示す。

B キットでは、8 種類の PCR 反応を行い、キットに添付のポジティブコントロールと試料それぞれの PCR 産物のバンドの高さを比較し鑑別を行った。

C キットでは、2 種類のプライマー混合物 (negative, positive) を使用し、それぞれ最大で negative は 5 本、positive は 5 本のバンドが検出され、そのバンドの有無から鑑別を行った。

D 及び E キットでは、1 種類のプライマー混合物を使用し、最大で 4 本のバンドが検出されるバンドの有無から鑑別を行った。

表 2 A キット品種鑑別表

プライマー混合物種類	Size (bp)	コメ品種								
		コシヒカリ※	コシヒカリ※	ひとめぼれ	あきたこまち	あきげしき	ヒノヒカリ	元気つくし	夢つくし	にこまる
a	594	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	493	-	-	-	+	+	+	-	-	+
	369	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	270	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	187	-	-	-	-	+	-	-	-	+
b	707	+	+	+	-	-	-	-	+	+
	401	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	252	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	198	-	-	-	-	-	-	-	-	-
c	817	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	665	+	+	-	+	-	-	-	+	-
	516	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	332	+	+	-	+	+	+	-	+	+
	236	+	-	-	+	+	+	-	-	+
d	757	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	576	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	412	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	275	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	185	+	+	+	-	+	+	+	+	+

+ : バンドあり - : バンドなし

※コシヒカリは、c の 236bp のバンドが増幅するものではないものの 2通り

3 結果及び考察

3.1 粉碎試料の品種鑑別

九州内での作付面積の上位であるコシヒカリ、夢つくし、ヒノヒカリ、元気つくし、にこまる及び 5%夢つくし混入コシヒカリの粉碎試料を対象として、A~E キットによる鑑別を行った。結果を表 3 に示す。

品種特定用の A 及び B キットでは、コシヒカリ、夢つくし、ヒノヒカリ、元気つくし及びにこまるの鑑別結果は、いずれも表示の品種と一致した。

A キットでは、検体から夢つくしとコシヒカリの両方の遺伝子を検出した場合、バンドパターンから夢つくしと鑑別される。5%夢つくし混入コシヒカリの鑑別結果は夢つくしであり、正しく鑑別された。一方、B キットにおける 5%夢つくし混入コシヒカリの鑑別結果は夢つくしが検出されず、コシヒカリと鑑別された。

コシヒカリ鑑別用の C, D, E キットでは、コシヒカリはコシヒカリと鑑別され、表示と一致した。DNA 量が不足し、鑑別ができなかった例外を除き、C, D, E キットでは、夢つくし、ヒノヒカリ、元気つくし、にこまるは、コシヒカリではないと正しく鑑別された。また、C 及び E キットでは、5%夢つくし混入コシヒカリはコシヒカリではないと正しく鑑別された。しかし、D キットでは 5%夢つくし混入コシヒカリはコシヒカリと鑑別され、5%夢つくしの混入を検出できず、正しく鑑別されなかった。

当所では、DNA 抽出に GMquicker2 とは異なるシリカゲル膜キット (DNeasy Plant Mini kit) を使用した場合に、D キットで 5%夢つくし混入コシヒカリは鑑別が可能であったことを報告している⁸⁾。今回 B 及び D キットで 5%夢つくし混入コシヒカリを正しく鑑別できなかった原因として、DNA 抽出方法の違いによる DNA 収量の減少、PCR 阻害物質の除去が不十分であった可能性等が考えられた⁹⁾。また、コシヒカリを対象品種とする場合、C 及び E キットを組み合わせることは有用と考えられるが、当所の検査においてコシヒカリだけを鑑別する可能性は低く、使用するキットには幅広い品種の鑑別に対応可能である必要がある。

よって、本市におけるコメの品種に係る表示の検査には、5 品種のコメを正しく鑑別し、コシヒカリ中の 5%夢つくしの混入を鑑別可能であった A キットを用いることとした。

3.2 DNA 混入溶液中の異品種の検出

A キットを用いて、コメ DNA 中に異品種のコメ DNA が混入したとき、どの程度の混入割合を検出可能か確認した。夢つくしの粉碎試料から抽出した DNA (以下、「夢つくし DNA」とする。) 及び夢つくしとバンドのパターンが異なり鑑別可能なヒノヒカリの粉碎試料から抽出し

表3 粉砕試料の A-E キットによる鑑別結果

粉砕試料	判定結果				
	Aキット	Bキット	Cキット	Dキット	Eキット
コシヒカリ	コシヒカリ	コシヒカリ	コシヒカリ	コシヒカリ	コシヒカリ
夢つくし	夢つくし	夢つくし	コシヒカリではない	コシヒカリではない	コシヒカリではない
ヒノヒカリ	ヒノヒカリ	ヒノヒカリ	コシヒカリではない	コシヒカリではない	コシヒカリではない
元気つくし	元気つくし	元気つくし	-	コシヒカリではない	コシヒカリではない
にこまる	にこまる	にこまる	コシヒカリではない	コシヒカリではない	コシヒカリではない
5%夢つくし混入コシヒカリ	夢つくし	コシヒカリ	コシヒカリではない	コシヒカリ	コシヒカリではない

(-; DNA 不足により鑑別せず)

表4 1粒から抽出した DNA 濃度及び純度

検体名	処理なし		ペッスル法		ビーズ法	
	DNA濃度 (ng/μL)	A260/A280	DNA濃度 (ng/μL)	A260/A280	DNA濃度 (ng/μL)	A260/A280
元気つくし	3.1	1.8	8.3	2.5	19.3	1.5
コシヒカリ	2.3	2.5	7.8	3.0	20.4	1.7
あきたこまち	2.6	2.6	8.0	2.9	22.0	2.0
あきげしき	2.2	3.0	8.1	2.3	17.7	2.8
夢つくし	2.7	1.9	10.0	2.3	18.6	3.0
ひとめぼれ	2.4	1.9	6.2	2.4	19.7	1.8

た DNA (以下, 「ヒノヒカリ DNA」とする.) を用いて, 夢つくし DNA にヒノヒカリ DNA を 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 100% 混入したものを A キットで鑑別した.

その結果の電気泳動パターンを図 1 に示す. プライマー混入物 a の 493 bp, c の 236 bp 及び d の 275 bp の各バンド (図 1 の矢印) は, 夢つくしには検出されず, ヒノヒカリに検出されるバンドであるため, これら 3 つのバンドをヒノヒカリ検出の指標とした. 0.5~100% ヒノヒカリ DNA を混入した試料でヒノヒカリが検出された. よって, DNA 試料では, 少なくとも 0.5% 以上含まれる場合に異品種の混入を検出可能であった.

3.3 粉砕試料中の異品種の検出

実際の異品種混入コメを想定して, 夢つくしにヒノヒカリを重量比で 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 100% 混入した粉砕試料を A キットで鑑別した.

その結果の電気泳動パターンを図 2 に示す. 3.2 と同様に鑑別したとき, 0.5~1% ヒノヒカリ混入夢つくしではヒノヒカリの指標とするバンドは明確には検出されず, 夢つくしと鑑別された. 2~100% ヒノヒカリ混入夢つくしではヒノヒカリの指標とするバンドが検出された. よって, 品種の差による感度の差を考慮しても粉砕試料の場合, 2% 以上の異品種を検出可能であり, 混入限度の 5% を目安とする異品種の混入を検出するには十分であると考えられた.

3.4 一粒ごとの鑑別

粉砕試料で表示と異なる鑑別結果となり異品種の混入が疑われた場合には, 一粒ごとの鑑別をして, 異品種の鑑別と混入割合の定量が必要となる.

そこで, A キットを用いた一粒ごとの品種鑑別が可能かを確認した. GMquicker2 を用いてコメ一粒から DNA を抽出したが, A キットで PCR に最低限必要とされる DNA 濃度 10 ng/μL を満足しなかった. そこで, 一粒あたりの DNA 収量を上昇させることを目的として, 粉砕試料を 2.0 mL チューブに移し, GE1 Buffer 250 μL を添加した後に追加する処理工程を検討した.

手動式ホモジナイザーペッスルですりつぶす方法 (以下, 「ペッスル法」とする.) と, ビーズ式破砕機にて, 6.0m/s, 2 分間破砕する方法 (以下, 「ビーズ法」とする.) で得られた DNA 溶液の濃度及び純度 (A₂₆₀/A₂₈₀) を比較した. 結果を表 4 に示す. 従来の場合と比較して, ペッスル法, ビーズ法ともに DNA 収量の改善が認められたが, より DNA 収量が多く, 全ての試料で 10 ng/μL 以上が得られたビーズ法を用いることとした.

次に, ビーズ法を用いて, 単一原料米表示のあるコメ 6 品種 (あきげしき, あきたこまち, 元気つくし, コシヒカリ, ひとめぼれ, 夢つくし) の鑑別を行った. その結果を図 3 に示す. すべてのコメは, 表示の品種と一致

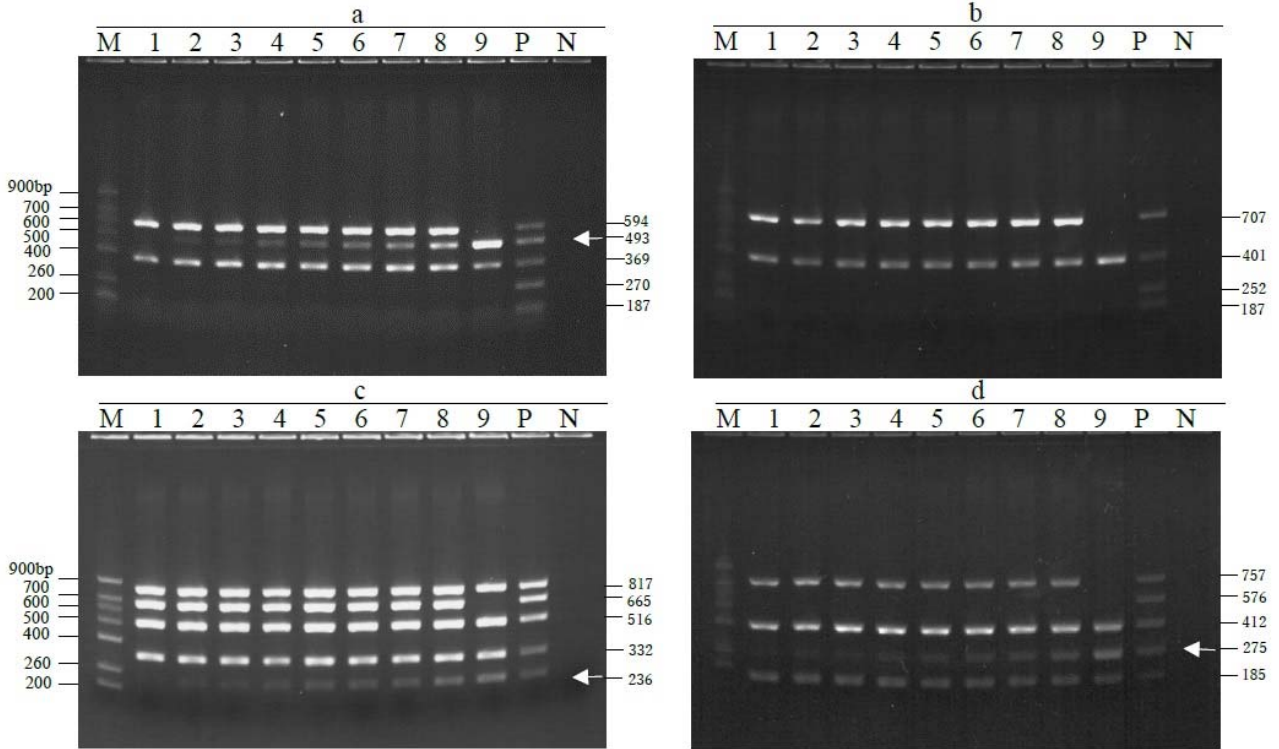


図1 ヒノヒカリ DNA が混入した夢つくし DNA 溶液の電気泳動結果

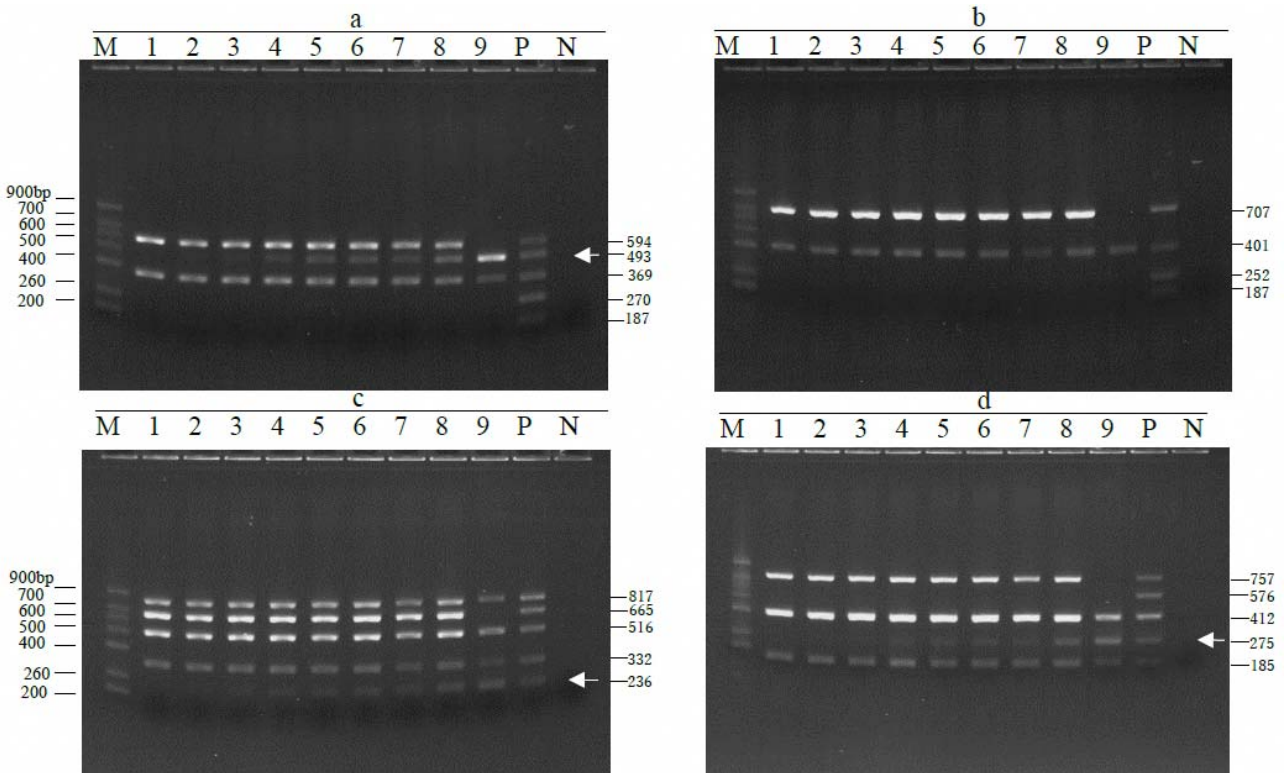


図2 ヒノヒカリが混入した夢つくし粉砕試料の電気泳動結果

M : DNA Size Marker, 1 : 夢つくし 100%, 2 : ヒノヒカリ 0.5%混入夢つくし, 3 : ヒノヒカリ 1%混入夢つくし, 4 : ヒノヒカリ 2%混入夢つくし, 5 : ヒノヒカリ 3%混入夢つくし, 6 : ヒノヒカリ 4%混入夢つくし, 7 : ヒノヒカリ 5%混入夢つくし, 8 : ヒノヒカリ 10%混入夢つくし, 9 : ヒノヒカリ 100%, P : ポジティブコントロール, N : ネガティブコントロール, 矢印はヒノヒカリのみ検出のバンドを示す

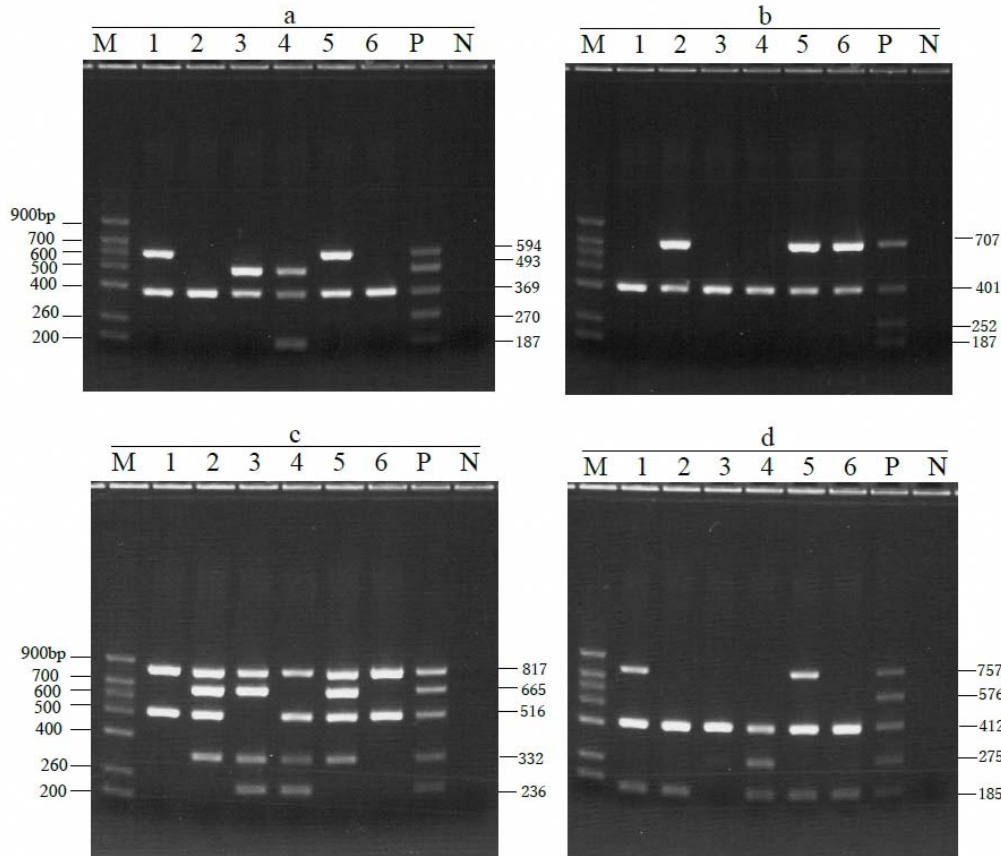


図3 1粒分析の電気泳動結果

M : DNA Size Marker, 1 : 元気つくし, 2 : コシヒカリ, 3 : あきたこまち, 4 : あきげしき, 5 : 夢つくし, 6 : ひとめぼれ, P : ポジティブコントロール, N : ネガティブコントロール

した。よって、一粒ごとの鑑別による定量検査が必要となった場合にも対応可能であると考えられた。

実際のコメの品種に係る検査では、品種の鑑別を行い、表示と一致するかを確認する。まず、Aキットによる粉碎試料を用いた鑑別を定性検査として実施し、表示と一致しない結果の場合には、20粒程度のコメを一粒ごとに鑑別を行い、異品種の鑑別とその混入割合を定量する。ただし、表2の品種鑑別表に示すように、増幅バンドの数が多く検出される品種を検査対象とするとき、異品種の検出の困難が予想される。例えば、夢つくしに、元気つくしやひとめぼれが混入していた場合には元気つくし、ひとめぼれを検出できない。よって、そのような場合には粉碎試料によるスクリーニングは行わず、スクリーニングに適した粒数を考慮して一粒ごとに鑑別を行うことが適当であると考えられる。

4 まとめ

市内で流通するコメの品種に係る表示の調査に対応する検査体制の整備を目的として、市販キットを用いたコ

メの品種鑑別について検討した。5品種のコメ及び重量比で5%の夢つくしが混入したコシヒカリの粉碎試料を対象に、品種特定用キット2種と、コシヒカリ鑑別用キット3種を用いて鑑別を行った。その結果、本市のコメの品種の表示に係る検査には、5品種の品種を正しく鑑別し、5%の夢つくしが混入したコシヒカリから混入した夢つくしを検出可能であった品種特定用のAキットを用いることとした。

Aキットは、夢つくしDNAに異品種ヒノヒカリDNAを0~100%混入した場合、0.5%以上ヒノヒカリが混入した場合に検出が可能であり、同様に、夢つくしに重量比でヒノヒカリを0~100%混入した粉碎試料の場合、ヒノヒカリが2%以上混入したとき検出が可能であった。これらのことから、コメ試料中への5%の異品種の混入を確認するには十分な感度であると考えられた。

次に、コメ一粒からのDNA抽出法の検討を行ったところ、ビーズ法が適していた。ビーズ法とAキットを用いて6品種のコメを品種鑑別したところ、すべて表示の品種と一致した。

よって、Aキットを用いた粉碎試料による定性検査並

びに、コメ一粒ごとの鑑別及び定量検査を行うことで、当所におけるコメの品種の表示事項に係る検査に対応可能と考えられた。

文献

- 1) 内閣府令第10号：食品表示基準 別表第24 玄米及び精米，平成27年3月20日
- 2) 大坪研一，他：米のPCR品種鑑別におけるコシヒカリ用鑑別プライマーセットの開発，日本農芸化学会誌，76，388～397，2002
- 3) 赤木宏守：DNA多型によるイネの品種鑑別，育種学研究，2，89～96，2000
- 4) 田淵宏朗，他：米の品種識別用SNP/STSマーカー，国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 HP，中央農業総合研究センター成果情報，2002
- 5) 農林水産省総合食料局長通知総食第213号：農産物検査に関する基本要領 別紙5 国内産農産物の検査実施マニュアル，平成21年5月29日
- 6) 渡邊敬浩，他：安全性未審査遺伝子組換えコメ(LLRice)を対象とした検知技術の開発と評価，食品衛生学雑誌，48，170～178，2007
- 7) 吉川ひとみ，他：市販キットによるコメの品種識別，分析化学64，661～667，2015
- 8) 宮崎悦子，他：PCRキットを用いたコシヒカリ100%表示米の品種鑑別，福岡市保健環境研究所報，30，161～163，2004
- 9) 島本功，他：新版植物のPCR実験プロトコール-核酸の単離法とゲノム・遺伝子発現の最新解析法-，63～66，秀潤社（東京），2000