

千葉県水稻奨励品種のDNAによる識別方法

小原 麻里・鎌形 民子・大越 一雄

キーワード；イネ、品種識別、DNA、PCR

I 結 言

日本農林規格及び食品の品質表示基準を定めた「農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律（JAS法）」が2000年に改正され、国内を流通する精米については、産地、品種、産年、精米年月日、内容量を表示することが義務付けられ、違反者に対する公表の迅速化や罰則強化の措置も設けられた。これに対し水稻の生産流通現場では、種子生産から栽培、出荷にわたって、品種の厳密な管理や信頼性が強く求められるようになった。

一方で、激化する産地間競争のなかで、いわゆるブランド米や県独自の品種開発が盛んに行われるようになり、これらの権利保護の必要性も高まってきた。

このような背景から、気象などの外的要因に変動することなく、科学的な観点から品種を判別する方法として、DNAの遺伝情報を利用した技術が注目されるようになった。

水稻では大坪ら（2002）の開発した「コシヒカリ判別キット」（特願平13250308）が市販され、「コシヒカリ」と他の主要品種との識別や、「コシヒカリ」に混入した異品種の検出が可能となった。このキットによって、33府県の「コシヒカリ」間で識別パターンに差がないことが確認されており、信頼性の高い方法として定着しつつある。本県の生産現場においても、このような方法を取り入れて、品種の確認に活用したいとの要望が出された。

しかし「コシヒカリ判別キット」は、「コシヒカリ」と「コシヒカリ」以下に位置する1999年産の国内作付け上位49品種との識別を目的に開発されたものであり、この49品種に該当しない本県の育成品種や糯品種などの識別パターンについては不明であるため、これらを明らかにする必要があった。また、混入した異品種の検出限界については言及されておらず、これらの事項を確認し、本県での品種識別や混入検出に対応できる技術とする必

要があった。さらに、大坪らの方法では検出に用いるDNAの抽出方法について、作業手順の煩雑なCTAB法を推奨しており、直ちに生産現場で利用することは難しいと考えられた。そこで、このような技術をもとに、本県水稻の種子生産から集出荷までの場面で活用できる、簡便で確実な識別方法を確立したので報告する。

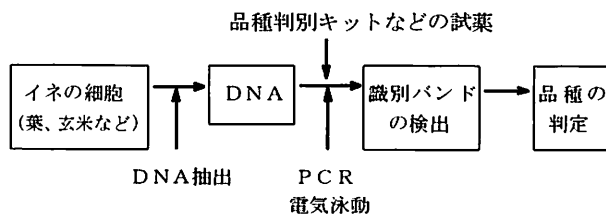
本研究の実施に当たり、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所大坪研一博士にはプライマー情報の提供などの御協力とアドバイスをいただいた。ここに記して感謝の意を表す。

II 材料及び方法

1. 供試品種

千葉県の2005年度奨励10品種に、新品種「ゆめかなえ」及び育成した有望系統「千葉糯23号」を加えた下記の11品種1系統を供試した。すなわち、水稻粳では「はなの舞い」、「ふさおとめ」、「初星」、「ちば28号」、「ひとめぼれ」、「コシヒカリ」、「ゆめかなえ」、水稻糯では「ヒメノモチ」、「ツキミモチ」、「千葉糯23号」、陸稲糯では「トヨハタモチ」、酒造好適米では「総の舞」である。

奨励品種のDNA抽出用サンプルは、育種研究所水稻育種研究室成東育成地（山武市）で1998年～2005年に採種された原原種とした。新品種及び有望系統のDNA抽出用サンプルは、育種研究所水稻育種研究室（香取市）で2005年に採種された原種とした。抽出には、これらの種子から調整した玄米及びこれらの種子から栽培した葉身を用いた。精米については、主に抽出量を確認するための実験であるため、品種が明確な市販品を用いた。



第1図 品種識別作業のながれ

2. DNAの抽出

品種識別作業のながれを第1図に示した。玄米及び精米からDNAを抽出する方法として、市販キットである「Nucleon Phytopure」(Amersham Biosciences製、以下「Phytopure」とする)、「Isoplant II」(ニッポンジーン製)及びCTAB法の3方法を試験した。CTAB法は、抽出時間や検出の良否を比較するために行った。

DNAの抽出は、玄米及び精米1粒で判定を行う場合は、1粒ずつ乳鉢で粉末にしたものを全量使用し、多粒で判定を行う場合は、20粒程度を粉末にし、そのうち0.1gを1サンプルとして抽出した。これに、各方法で使用する抽出バッファー及び耐熱性 α -アミラーゼ(*Bacillus licheniformis*由来、SIGMA製)40mg/ml溶液を8 μ l混合し、以降は各キットの操作手順に従った。

それぞれの方法で得られた沈澱を、RNase(ニッポンジーン製)10mg/mlを含む1/10TE*15~20 μ lに溶解し、37℃で30分間の温度処理をした後4℃で保存した。

葉身からのDNA抽出については、液体窒素で凍結させた成葉0.1gを乳鉢で粉砕し、「Phytopure」により抽出した。沈澱は玄米DNAサンプルと同様の溶液30 μ lに溶解し、37℃で30分間温度処理した後に4℃で保存した。

DNAの収量については、溶液のうち1~2 μ lを0.8%アガロースゲルで電気泳動し、既知濃度の λ ファージDNAと比較して算出した(ミニゲル法、RiceGenome Reserch Program, 2000)。

*TE: 1mM Tris-HCl(pH8.0)、0.1mM EDTA
(pH8.0)

3. PCRによる識別バンドの検出

識別バンドの検出には、「コシヒカリ判別キットI、II」、「北海道61」(TAKARA製)のSTS化プライマーセットを使用した。また、大坪ら(2003)によるSTS化プライマー(A6、A7、B1、G4、G28、J6、P5、T16)、中村ら(2004)による同プライマー(NK4、Pro13FN)、(独)食品総合研究所(2005)の報告にある同プライマー(B7、P3)の12種類を(株)インビトロジェンにおいて合成して用いた。

抽出したDNA溶液のうち、玄米及び精米では0.1~5 μ l、葉では0.05~0.1 μ lを鋳型とし、これらをPCRの反応試薬とともに氷上で混合した。反応は1サンプル当たり10又は20 μ lの液量とし、「コシヒカリ判別キット」の試薬及び温度条件でGeneAmp PCR System 9700(ABI製)により行った。

得られたPCR産物のうち10 μ lを2%アガロースゲルに電気泳動(ミュージッド、アドバンス製)した後、1mg/mlエチジウムブロマイドで20分間染色し、プリントグラフ(ATTO製)によりゲルを紫外線照射して、識別バ

ンドを検出した。

4. 混入異品種の検出

「コシヒカリ」に混入した異品種の検出限界を明らかにするため、「コシヒカリ」に「ふさおとめ」を混合した玄米粉末からDNAを抽出し、「コシヒカリ判別キットII」でPCRを行った。「ふさおとめ」の混合割合は、重量で0.1、0.2、1、2、及び5%とした。

III 結果及び考察

1. DNAの抽出方法

DNAで品種識別を行う場合、鋳型となるDNAの純度がPCRの結果に大きく影響するため、DNA抽出方法の検討は重要である。またこの試験では、生産現場で活用することを念頭に置き、簡便かつ低コストである方法を検討することとした。CTAB法は、「コシヒカリ判別キット」において推薦されている方法であるが、試薬調整が必要なことや作業が煩雑であることなどから、これに代わる方法を検討するため、2種類の抽出キットを選定し比較した。

玄米からDNAを抽出する方法を選定するにあたり、まず「Phytopure」のプロトコールに従って抽出を試みたところ、多糖類と思われる白色沈澱が生じてDNAの抽出を阻害する傾向がみられ、特に糯品種で著しかった。このため、大坪ら(2001)が飯米のDNA抽出に効果を上げている「酵素法」を参考に、「Phytopure」で耐熱性 α -アミラーゼ処理を試したところ、多糖類の沈澱は生成されなくなった。また、沈澱が生じたサンプルではPCRにおける増幅が不良となることが多かったが、この処理により、常に安定した増幅が得られるようになった。よって、以降の玄米・精米のDNA抽出試験には、すべて α -アミラーゼ処理を行うこととした。この結果、玄米1粒から100ng前後のDNAが比較的安定して得られた。一方、精米1粒では20ng前後とDNAの収量が低く、バンドが検出できなかったサンプルもあるなど、方法よりもサンプル間によるばらつきの方が大きかった。

DNA溶液の状態では、「Isoplant II」の溶液に、玄米、精米ともにやや粘りがみられ、電気泳動後も溶液の一部がウェルに残る場合が多かった(第2図)。

8サンプルの抽出にかかる時間を比較すると、CTAB法が6時間程度で最も長く、次いで「Phytopure」が4時間程度、「Isoplant II」が3時間程度であった。

それぞれの方法で抽出したDNAが、PCRで正しくバンドを増幅できるかどうかを、4本すべての識別バンドが検出される「ひとめぼれ」を供試して調査した。また、投入する鋳型DNA溶液の量を、0.1~5 μ lまで増やし、不

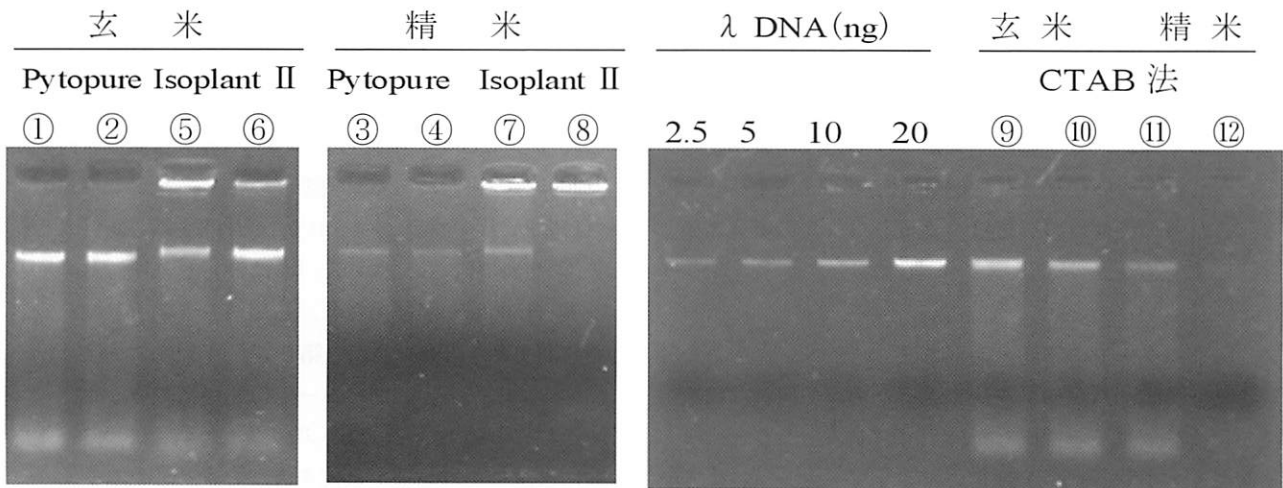
第1表 DNA抽出方法及び鋳型DNA量の違いが「コシヒカリ判別キットI」のPCRに及ぼす影響

抽出方法	部位	サンプル No.	DNA 溶液の 濃度(ng/μl)	DNA 溶液投入量によるバンドの検出					
				0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	5.0 (μl)
Pytopure	玄米	①	8	×	×	△	△	×	×
	〃	②	8	×	○	○	○	○	×
	精米	③	1	×	×	×	○	○	×
	〃	④	1	×	×	×	△	×	×
Isoplant II	玄米	⑤	4	×	×	×	×	×	×
	〃	⑥	8	×	×	×	×	×	×
	精米	⑦	2	×	×	×	×	×	×
	〃	⑧	0.5 以下	×	×	×	×	×	×
CTAB法	玄米	⑨	8	○	○	○	○	○	○
	〃	⑩	5	○	×	○	○	○	○
	精米	⑪	3	○	○	○	○	○	○
	〃	⑫	0.5	○	△	○	○	○	○

注1) 供試品種は、4本すべての識別バンドが検出される「ひとめぼれ」とした
 2) 濃度はミニゲル法で判定した
 3) 検出は、○：4本すべてが明瞭なバンド、△：4本のうち1本が不明瞭、
 ×：検出されないバンドが1本以上とした

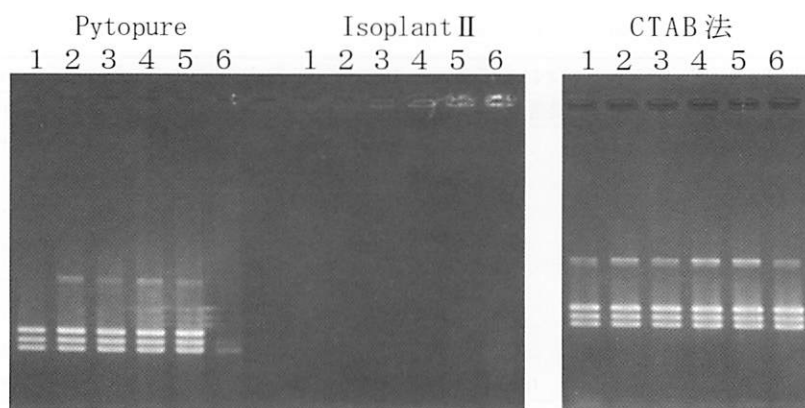
純物の影響を調査した。その結果、第1表及び第3図に示したように、最も良好な増幅を示した方法はCTAB法であり、すべての区でバンドが正しく検出された。また「Phytopure」では、鋳型DNA量が玄米で0.2~2 μl、精米で1~2 μlの範囲で正しく検出されたが、これ以外の範囲では検出されないバンドが生じた。一方、「Isoplant II」ではすべての区で検出されなかった。これらの結果から、抽出時間はやや長いが、PCR結果が良好な「Phytopure」を採用することとした。ただし、こ

の方法で玄米と精米から明瞭なバンドを検出するためには、投入量に注意が必要となる。すなわち不純物の混入を防ぐため、溶液量をできるだけ控え、かつ鋳型として不足しない量(1~2 ng以上)とすることである。具体的には、まずコメ1粒から、α-アミラーゼ処理を加えた「Phytopure」でDNAを抽出し、15 μlの溶液として調整する。このDNA溶液を、玄米1粒では0.5~1 μl、精米1粒では1 μl投入し、10又は20 μl容量でPCRを行うことを、品種識別に使用するDNAの抽出条件とし

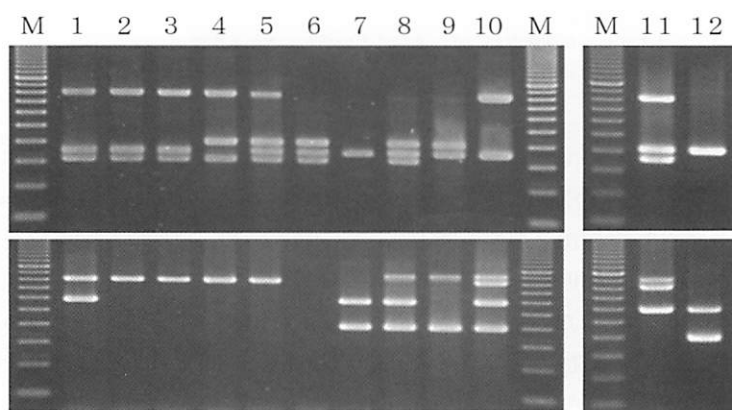


第2図 抽出キット及びCTAB法で抽出したコメ1粒DNAの電気泳動像

「ひとめぼれ」のコメ1粒から抽出したDNA溶液15 μlのうち、2 μlを泳動した。レーンの番号は、第1表のサンプルNo.と対応する。左から、Pytopure玄米No.①、同玄米No.②、Isoplant II玄米No.⑤、同玄米No.⑥、Pytopure精米No.③、同精米No.④、Isoplant II精米No.⑦、同精米No.⑧、λ DNA2.5ng、同5ng、同10ng、同20ng、CTAB法玄米No.⑨、同玄米No.⑩、同精米No.⑪、同精米No.⑫



第3図 DNA抽出方法及び鋳型DNA量の違いが「コシヒカリ判別キット I」のPCRに及ぼす影響
鋳型DNA量として、1:0.1 μ l、2:0.2 μ l、3:0.5 μ l、4:1 μ l、5:2 μ l、6:5 μ l、反応総量を10 μ lとした



第4図「コシヒカリ判別キット」による2005年度奨励品種及び新品種・系統のDNA識別パターン
写真上:コシヒカリ判別キットI、写真下:コシヒカリ判別キットII
M:サイズマーカー(200bpラダー)、1:「はなの舞い」、2:「ふさおとめ」、3:「ちば28号」、4:「初星」、5:「ひとめぼれ」、6:「コシヒカリ」、7:「ヒメノモチ」、8:「ツキミモチ」、9:「トヨハタモチ」、10:「総の舞」、11:「ゆめかなえ」、12:「千葉糯23号」

た。この条件により、第4図のような明瞭な結果が安定して得られるようになった。DNA抽出からPCRに至るまでの、これらの条件については、プロトコルの概要を第5図にまとめた。

2. 識別パターンの確認と識別方法

各品種の識別パターンを決定するため、原原種又は原種の葉及び玄米から抽出したDNAを使用し、「コシヒカリ判別キット I、II」の7種類のプライマーセットによるPCRを行なった。この結果、「ふさおとめ」と「ちば28号」が同一パターンであり、両者は識別できないことが明らかとなった。しかし、その他の9品種1系統については相互に識別することが可能であった(第2表、第4図)。

「ふさおとめ」と「ちば28号」を識別するため、さら

に大坪ら(2003)、中村ら(2004)、(独)食品総合研究所(2005)の報告にある単独のプライマーや「北海道61」(TAKARA製)のプライマーセットでPCRを試した。この結果、「北海道61」において、「ちば28号」に明瞭な識別バンド(1500bp)が検出され、このバンドの有無で、両者を識別することができた(第2表、第6図)。なお、同一品種の葉と玄米の識別パターンはすべて一致した。

これらの結果から、以下の確立した手順により、本試験に供試した11品種1系統を識別できることを明らかにした。すなわち「コシヒカリ判別キット」で「ふさおとめ」と「ちば28号」以外の10品種1系統を判定する。「ふさおとめ」のパターンを示したサンプルについては、さらに「北海道61」でバンドが検出されたサンプルを「ちば28号」と判定することができる。