

[成果情報名]リアルタイムPCRによる混米率の測定法

[要約]三重県育成品種「みえのえみ」等の主品種に混入した他品種の割合（混米率）をリアルタイムPCRによって定量的に測定する方法を開発した。混米サンプルをバルクでDNA抽出するため、1粒ごとの判別による定量に比べ労力を大幅に軽減できる。

[キーワード]イネ、混米率、リアルタイムPCR、定量

[担当]三重科技・農業研究部・経営植物工学グループ

[代表連絡先]電話0598-42-6356、kikaku@mate.pref.mie.jp

[区分]関東東海北陸農業・生物工学

[分類]科学・参考

-----  
[背景・ねらい]

消費者が自己の判断による選択を行えるようにすることを目的にJAS法の改正が行われ、品種、その割合、産地および産年等の表示が義務づけられた。これに対応すべくDNAによる品種判別技術が開発され、コメ品種を定性的に分別することが可能になった。既に市販品の判別キットが開発され、民間検査機関による受託分析も行われている。しかしながら、現時点では品種の混合割合は通常数10粒のコメを1粒ずつ定性的に判別するという擬似的な定量法により行われており、多大な労力と時間がかかる上、サンプリングの仕方によって実際の母本における混米率と大きく異なる可能性がある。

そこで、数100～数1000粒のコメを粉碎・均一化して抽出したDNAを鋳型とし、リアルタイムPCRによって省力的、かつ精度の高い混米率の測定法を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. ブレンダーで粉碎した米粉からDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社製)を使ってDNAを抽出する。混入品種検出用マーカーとしてプライマーセットE30q (Okunishi et al., Food sci. technol. Res., 2006)、コメ共通遺伝子用マーカーとして同Wxq (ibid) を用いる (表1、表2)。
2. 反応液は、鋳型DNA (20ng/ $\mu$ L) 2.5  $\mu$ L、2×SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems社製) 12.5  $\mu$ L、Primer mixture 0.05  $\mu$ Lとし、全量で25  $\mu$ L/wellとする。リアルタイムPCR (Applied Biosystem社製ABI PRISM 7900HT) の反応は、50℃ 10分→95℃ 2分→(95℃ 30秒→59℃ 1分)×45サイクルとする。
3. 5%から25%位の範囲で、「みえのえみ」に「ヤマヒカリ」、「うこん錦」のどちらかが混入した場合でも期待値に近い測定値が得られる (表3)。
4. 混入率を50%の場合ではやや誤差が大きくなり、期待値より2～3割高い測定値となる (表3)。
5. わずか1%の混入でも測定値はやや高くなるが、検知は可能である (表3)。

[成果の活用面・留意点]

1. 「みえのえみ100%」等と表示された商品について、他品種の混入率を省力的、かつ高感度で測定できる。これにより、検査する米の表示の信頼度を高めることができる。
2. 県が配付するイネ原種について、わずかな混入も見逃さないことで純度を確保でき、県産米の信頼性の向上に寄与できる。
3. 定性判別等により混入している品種の情報が分かった場合、それに応じたプライマーを選択することで、銘柄米と混入品種の様々な組み合わせについても応用することができる。

[具体的データ]

表1 混入品種検出用プライマーセットE30qに対する各品種の反応性

増幅領域なし(-)	みえのえみ、コシヒカリ、あきたこまち、キヌヒカリ、どんとこい、ヒノヒカリ、きらら397、ほしのゆめ、はえぬき等
増幅領域あり(+)	ヤマヒカリ、うこん錦、みえのゆめ、ササニシキ、あいちのかおり等

太字は三重県奨励品種

表2 供試したリアルタイムPCR用プライマーの塩基配列

プライマーセットE30q(品種特異的)	5'-TACCTGGTTGATGTATACAGATCTGGTT-3'
	5'-TGGCAATGAGAGCAAACGGTGTAAGG-3'
プライマーセットWxq(全品種に共通)	5'-CTCAAAGCTCTGTGCATCTC-3'
	5'-ACTTAAGGAGCAGGTTCTTG-3'

表3 リアルタイムPCRによる混米率測定

(a) ヤマヒカリ混入区

試験区	みえのえみ	ヤマヒカリ	測定値(%)	
ヤマヒカリ 1%混入区	99%	1%	1.54	± 0.08
ヤマヒカリ 5%混入区	95%	5%	4.20	± 0.50
ヤマヒカリ 10%混入区	90%	10%	9.73	± 1.21
ヤマヒカリ 25%混入区	75%	25%	28.57	± 0.95
ヤマヒカリ 50%混入区	50%	50%	65.74	± 3.05

(b) うこん錦混入区

試験区	みえのえみ	うこん錦	測定値(%)	
うこん錦 1%混入区	99%	1%	1.34	± 0.14
うこん錦 5%混入区	95%	5%	4.82	± 0.36
うこん錦 10%混入区	90%	10%	10.84	± 1.64
うこん錦 25%混入区	75%	25%	27.89	± 4.43
うこん錦 50%混入区	50%	50%	60.30	± 0.54

注) サンプルの混入率は玄米の重量比

測定値はコメ共通用マーカーによる増幅に対する混米品種特異的マーカーによる増幅の比  
検量線用として「ヤマヒカリ」、又は「うこん錦」が100%のDNAを使用

[その他]

研究課題名：三重県特産品に対するDNA鑑定・品種識別手法の開発

予算区分：県単

研究期間：2003～2004年度

研究担当者：橋爪不二夫、林克弘(三重科技保環研部)、奥西智哉(食総研、現中央農研)