

調製食料品中における米由来 DNA の検出法

中西 理紗*, 五十嵐 智大*, 片山 貴之*

Discrimination method of rice in prepared foodstuffs by DNA analysis

Risa NAKANISHI*, Tomohiro IGARASHI* and Takayuki KATAYAMA*

* Central Customs Laboratory, Ministry of Finance, 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

Some prepared foodstuffs of meat or fish are classified differently in the Customs Tariff Schedule depending on whether they include rice or not. But it is difficult to judge that from their appearance. Currently, the presence or absence of rice content is determined by DNA analysis using PCR but this method requires improvement in its accuracy.

Consequently, in this study, we designed primers for four specific regions of rice chloroplast DNA at the matK, rbcL, trnL and psbA regions. Using these primers, we investigated mixtures which contained rice contents and verified whether or not the presence of rice was able to be detected. As a result, we were able to selectively detect the presence of rice by using any of the newly designed primers.

1. 緒 言

2. 実 験

関税率表において肉や魚の調製食料品は第 16 類に分類され、米を含有するか否かによって関税率表上の分類が異なる場合がある。調製食料品のうち経済連携協定を締結している国からの輸入品は、米を含有するものは協定税率が適用される一方で、その他のものは比較的低い税率となる EPA 税率が適用され、税率格差が生じることから、調製食料品中に米を含有するか否かを判別することは重要である。調製食料品において食感の改良やアレルギー対策を目的として材料となる小麦の一部または全部を米粉で代用することがあるが、多くの場合は形態学的特徴が残っていない。このように外観からの判別が困難な場合の分析手法として、生物の遺伝情報に着目した DNA 分析が有効である。

DNA 分析による米を含有するか否かの判別は現在、関税中央分析所報第 55 号により、種特異的プライマーを用いて PCR を行い、増幅の有無によって判別する手法により行われているが、この分析法では小麦のみが含まれ米が含まれない試料において米を検出した場合と類似の反応が見られた例があった。そのため PCR 法によって米の含有の有無を判別するためには精度の向上が必要である。

本研究では、イネ科植物の葉緑体 DNA 中の複数の領域 (matK 領域, rbcL 領域, trnL 領域, psbA 領域) における塩基配列を比較し、各領域においてイネ属に特有の塩基配列をプライマーとして設計して用いることで、PCR により調製食料品中に米を含むか否かについて正確に判別できるかを検討したので報告する。

2.1 試 料

米 (*O. sativa*)

日本米 : 15 検体

8 品種 (こしひかり, 古代米黒米, 古代米赤米, つや姫, ひのひかり, あきたこまち, ひとめぼれ, みどり糯米), 日本米精米, 日本米もみ付き玄米, 日本米米粉, 日本米胚芽米, もち米精米, もち米玄米, 酒米 70% 精米

外国米 : 9 検体

オーストラリア米, ウルグアイ米, イタリア米カルナローリ, タイ米, タイ米ジャスミンライス, アメリカ米, 中国米, 韓国米, パキスタン米バスマティライス

イネ科植物 (イネ属以外のもの)

ワイルドライス : 1 検体

小麦粉 : 8 検体

ひえ : 1 検体

あわ : 1 検体

きび : 1 検体

大麦 : 1 検体

市販の米含有製品

米粉含有パン粉 : 3 検体

参考に主なイネ科植物の生物学的分類を Table1 に示す。なお、関税率表には米の学名が記載されていないが、一般的に米とは稲

の果実を指す²⁾。稲はイネ科イネ属の植物の総称であり、栽培種としては *Oryza sativa* (アジアイネ) 及び *O. glaberrima* (アフリカイネ) の 2 種が存在する。 *O. sativa* はアジア、ヨーロッパ、南北アメリカ大陸、オーストラリア、アフリカで広く栽培される一方で、 *O. glaberrima* の分布は西アフリカの一部地域に限られている³⁾。また、 *O. sativa* の改良品種は優れた精米加工特性・品質特性を持つのに対し、 *O. glaberrima* は赤米で市場価値が低く、碎米になりやすい⁴⁾ことが知られており、一般的に流通していない。これらのことから、本研究では米として *O. sativa* のみを対象とした。

Table 1 Biological classification of samples we used.

Order	Family	Subfamily	Genus	Species
Poales	Poaceae	Ehrhartoideae(Oryzoideae)	<i>Oryza</i>	<i>O. sativa</i>
			<i>Zizania</i>	<i>Z. aquatica</i>
	Pooideae		<i>Hordeum</i>	<i>H. vulgare</i>
			<i>Triticum</i>	<i>T. aestivum</i>
			<i>Panicum</i>	<i>P. miliaceum</i>
	Panicoideae		<i>Echinochloa</i>	<i>E. esculenta</i>
			<i>Setaria</i>	<i>S. italica</i>

2.2 試 薬

DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社製)

TaKaRa Ex Taq™ (タカラバイオ社製)

プライマー (シグマ - アルドリッチ社製)

ABI PRISM® Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems 社製)

2.3 装 置

PCR 増幅装置: GeneAmp® PCR System 9700 (Life technologies 社製)

DNA シーケンサー: 3500XL Genetic Analyzer (Life technologies 社製)

画像解析装置: BIO-PROFILE Systems2 (VILBER LOURMAT 社製)

2.4 実 験

DNA の抽出は、各試料を粉砕したものを CTAB 法により行った。試料として使用したすべての米及びイネ科植物については、ユニバーサルプライマーを用いて塩基配列を確認し、種を同定した。また、粉砕した米を任意の重量割合 (0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%) で小麦粉と均一になるよう混合し、米・小麦粉混合試料として同様に抽出を行った。

ユニバーサルプライマーを用いた PCR は、各試料から抽出した

DNA 抽出液について、TaKaRa Ex Taq™を用いて行った。PCR の反応溶液は、DNA 抽出液: 2 µL, 10×Ex Taq buffer: 3 µL, dNTP mixture: 2.4 µL, プライマー (5 µM): 各 2 µL, Ex Taq polymerase (5 U/µL): 0.15 µL, 滅菌水: 18.45 µL (合計 30 µL に調製) を基準とし、DNA 抽出液の DNA 濃度等に応じて、DNA 抽出液及び滅菌水の量を変更した。PCR の反応条件は、熱変性を 98 °C で 3 分間行った後、98 °C (10 秒), 55 °C (15 秒), 72 °C (1 分) のサイクルを 30 回繰り返し、72 °C で 1 分間伸長反応を行った。

米特異的プライマーを用いた PCR は、各試料から抽出した DNA 抽出液について、上記と同様に調製した反応溶液を用いて行った。PCR の反応条件は、熱変性を 95 °C で 4 分間行った後、95 °C (10 秒), アニーリング温度 (以下 Tm と略す) (15 秒), 72 °C (30 秒) のサイクルを 35 回繰り返し、72 °C で 5 分間伸長反応を行った。ユニバーサルプライマー及び米特異的プライマーにより増幅した PCR 産物は、0.01%エチジウムブロマイドを添加した 2 %アガロースゲルを用いて、電気泳動を行った後、画像解析装置で確認した。

塩基配列の確認は、PCR により得られた PCR 産物をイソプロパノール沈殿により精製し、PCR 反応に使用したプライマー及び Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いて行った。添付のプロトコルに従いサイクルシーケンス反応を行った後、エタノール沈殿法により未反応蛍光色素を除去し、DNA シーケンサーにより各 PCR 産物の塩基配列を決定した。得られた塩基配列の確認は DNA Data Bank of Japan (以下「DDBJ」) のサービスである Basic Local Alignment Search Tool (以下「Blast」) により行った。

3. 結果及び考察

3.1 米及びイネ科植物の種の確認

試料として使用したすべての米及びイネ科植物について、Table2 に示すユニバーサルプライマーを用いて PCR を行った。得られた電気泳動図を Fig.1 に示す。すべての試料で 600bp 付近にバンドが確認できた。得られた PCR 産物について DNA シーケンサーにより塩基配列を決定し、DDBJ の Blast 検索を行ったところ、すべての試料は各種の登録データと高い相同性を示した。また、得られた塩基配列を基に近隣接合法により分子系統解析を行ったところ、いずれの試料もイネ科植物の生物学的分類と比較して矛盾しない結果となった。作成した分子系統樹を Fig.2 に示す。これらの結果から、試料として使用したイネ科植物はいずれも想定した種と同一の種であることが確認できた。

Table2 List of primers used for universal PCR.

region	primer		Sequence
<i>rbcL</i>	forward	<i>rbcLa_F</i> ¹⁾	5'- ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC -3'
	reverse	<i>rbcLa_R</i> ¹⁾	5'- GTAAAATCAAGTCCACCRGC -3'

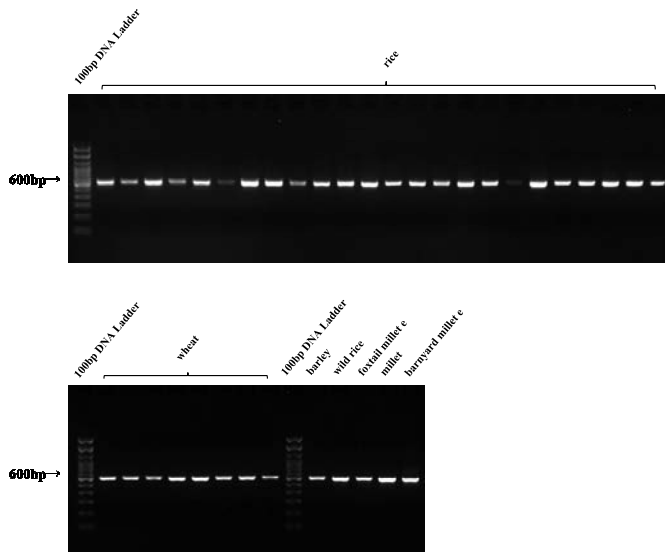


Fig.1 Electrophoresis image of PCR products of the *rbcL* gene region with 2% agarose-TAE gel. *rbcLa_F* and *rbcLa_R* are used as primers.

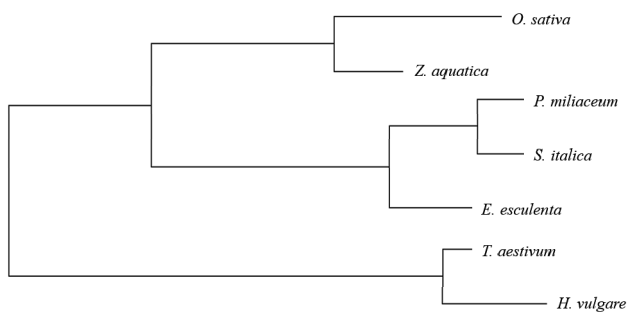


Fig.2 Phylogenetic tree of all samples.

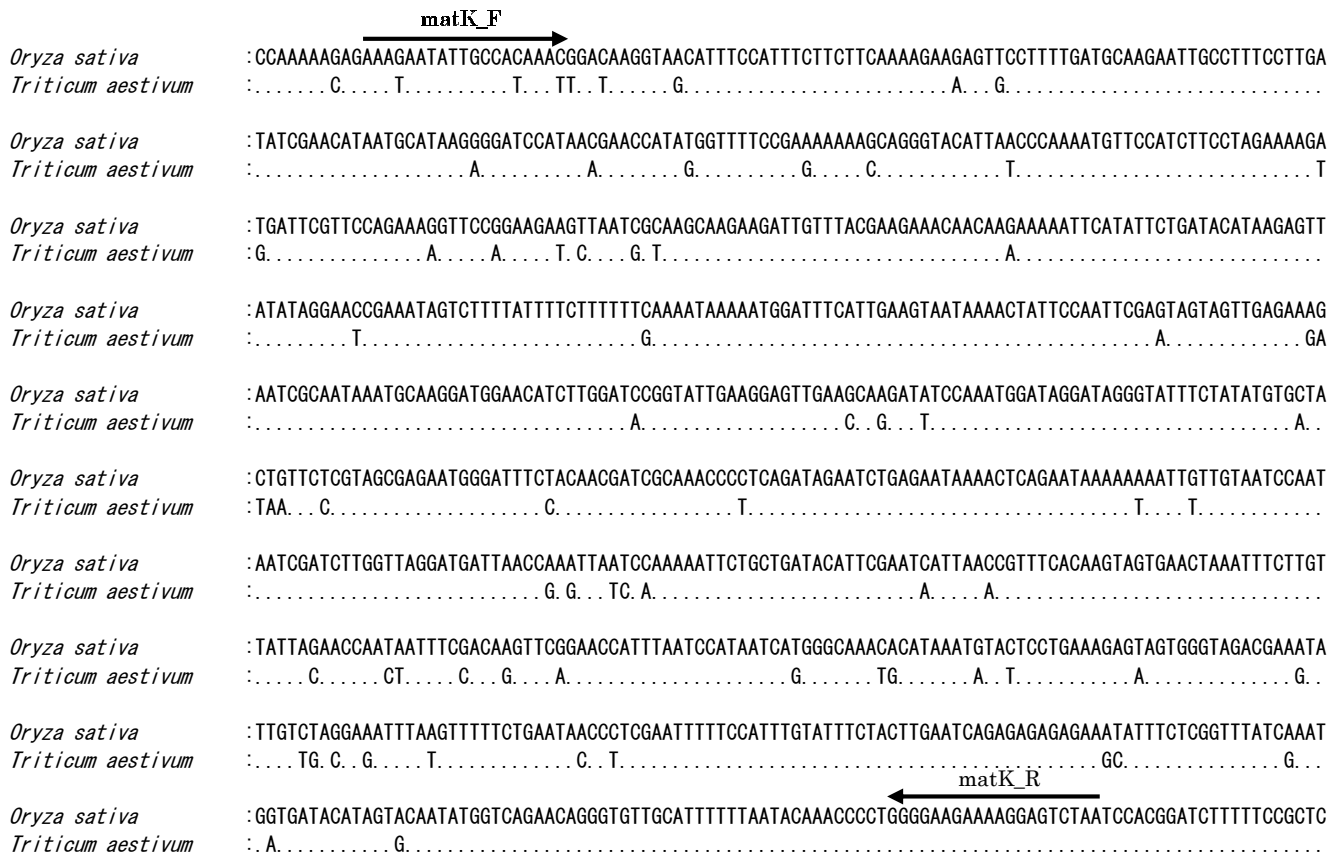
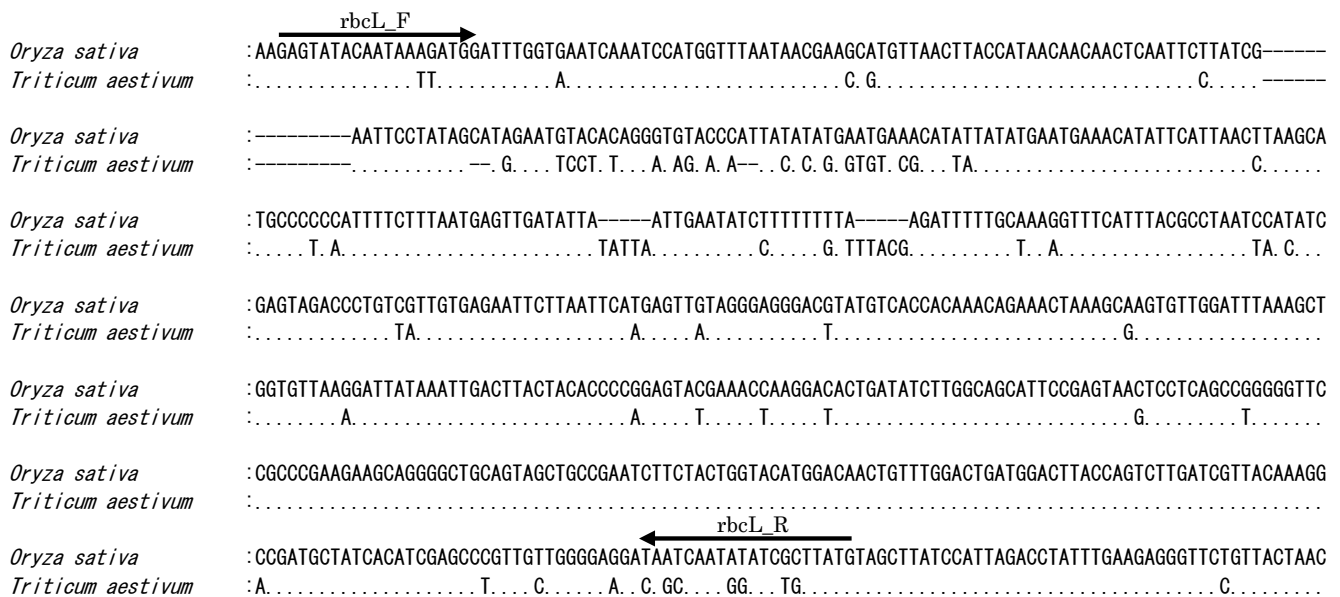
3.2 米特異的プライマーによる米及びイネ科植物の PCR 結果

米特異的プライマーは、DDBJ に登録されている米及びイネ科植物の一部の種について葉緑体 DNA の塩基配列を取得し、米と米以外のイネ科植物の配列が異なる部位を対象として設計した。設計したプライマーの塩基配列及び T_m を Table3 に、米及び一部のイネ科植物の各塩基配列における各プライマーの位置を Fig.3-6 に示す。

米及びイネ科植物の全ての試料における DNA 抽出物について、Table3 に示したプライマーを用いて PCR を行った。得られた PCR 産物の電気泳動図を Fig.7-10 に示す。*matK* 領域のプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図 (Fig.7) において、米は 1050bp 付近にバンドが確認でき、その他イネ科植物は PCR による増幅が認められなかった。同様に、*rbcL* 領域のプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図 (Fig.8) においては 700bp 付近に、*trnL* 領域のプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図 (Fig.9) においては 900bp 付近に、*psbA* 領域のプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図 (Fig.10) においては 1000bp 付近に、米のみバンドが確認でき、その他イネ科植物は PCR による増幅が認められなかった。このことから、設計したプライマーはいずれも米のみを特異的に増幅させることが確認できた。

Table3 List of primers used for specific PCR.

region	primer		Sequence	$T_m(^{\circ}\text{C})$
<i>matK</i>	forward	<i>matK_F</i>	5'- AAAGAATATTGCCACAAACG -3'	62
	reverse	<i>matK_R</i>	5'- TTAGACTCCTTTTCTTCCCC -3'	
<i>rbcL</i>	forward	<i>rbcL_F</i>	5'- GAGTATACAATAAAGATGG -3'	50
	reverse	<i>rbcL_R</i>	5'- CATAAGCGATATATTGATTA -3'	
<i>trnL</i>	forward	<i>trnL_F</i>	5'- ATACTCTAAAAAAGGAACGC -3'	60
	reverse	<i>trnL_R</i>	5'- GTATTCCATTGAATCTTAAACC -3'	
<i>psbA</i>	forward	<i>psbA_F</i>	5'- ATTGGTTGAAATTGAATCCG -3'	54
	reverse	<i>psbA_R</i>	5'- TGTATGGATATACAACCTGTC -3'	

Fig.3 Partial DNA sequence of the matK gene region (mitochondrial DNA) from *Oryza sativa* and *Triticum aestivum*. Arrows indicate the position of primers.Fig.4 Partial DNA sequence of the rbcL gene region (mitochondrial DNA) from *O. sativa* and *T. aestivum*. Arrows indicate the position of primers.

		trnL_F
<i>Oryza sativa</i>	: TGATTTTGAATACTCTAAAAAGGAACGCGGTAGGTGGGGGAGAGAAAAACCTTGGGATATATTGATTCGCATTGAATTGCAAATACATCAACGATAGAA	
<i>Triticum aestivum</i>	: . A . . . G A - . T . GA . . G T T . T G G	
<i>Oryza sativa</i>	: TCAATTCAATGCTGAATTGCAATAAGC—GGAGTCTCTCAACTAGAGACGAACCG—CTAGACTACATAGAGTAATGAATTCAACGATTCAAAAA	
<i>Triticum aestivum</i>	: T AAGC. AG. A T T. AACTG. G. T G C . . . T	
<i>Oryza sativa</i>	: AAATAACAGATGGAGGAAATTGCACAAGGAATCCTGGTCTCAAAGAAAAAGAAAATGGGGATATGGCGAAATCGGTAGACGCTACGGACTTGATTGTAT	
<i>Triticum aestivum</i>	: G T A G . G . G	
<i>Oryza sativa</i>	: TGAGCCTTGGTATGGAACCTGCTAAGTGGCAACTTCCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAATAAGGGGCAATCCTGAGCCAAATCCATGTTTTGAGA	
<i>Triticum aestivum</i>	: T - G	
<i>Oryza sativa</i>	: AAACAAGCGGTTCTCGAACTAGAACCCAAAGGAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACGAATCGAGTTAATTACGTTGTGTTGCTA	
<i>Triticum aestivum</i>	: G TA T	
<i>Oryza sativa</i>	: GCGGAATCCCT—TCTAATTAGGGAAGAAGGGCTTTTCGAA—ATCTAATACACAGTATAGATACTGGCATAGCAAACGATTAATCACA	
<i>Triticum aestivum</i>	: . T . . . T . . . T. CTAAT. A G . . . T . . AT. CCTTATAC. . T A A	
<i>Oryza sativa</i>	: GAACATCATCATA—ATATAGGTTCTTTAATCTTTTTTAAATGAAAATAGGAATGAT—TATGAAATAGAAAATTCATAAT—	
<i>Triticum aestivum</i>	: T . . TTATAATTATA. - . CT A T A AATGAT. A C AAAC	
<i>Oryza sativa</i>	: ————TTTTTTAGAATTGTTGTGAATCCATTCCAATCGAATATTGAGTAATCAAATCCTTCAATTCATA——GTTTTCGAAATCTTTTAA—	
<i>Triticum aestivum</i>	: TCATATCATAA. TTC. A C A T A . TTCAA. G AA. -	
<i>Oryza sativa</i>	: ————AAAGCGGATTAATCGGACGAGGATAAAGAGAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACTGACAACAATGAAATTTCTAGTAAAAGGAAAATCCGTCGA	
<i>Triticum aestivum</i>	: ———— . . . T C	
<i>Oryza sativa</i>	: CTTTCTAAGTCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAAACCTCTTTTATTCCTAACT——CTAGTATTATCCTGTTTTTTT——	
<i>Triticum aestivum</i>	: A T T ATACTATATTAT. . T C TCTTTTT	
		trnL_R
<i>Oryza sativa</i>	: ATTAATAGGTTTAAAGATTCAATGGAATAC—	
<i>Triticum aestivum</i>	: . . C . . G ————TTAGCTTTCTCATTCTACTCTTTCACAAAGGAATGCGAAGAGAACTCAATGGATCTTATCCTATTCTATTGA	
<i>Oryza sativa</i>	: ————ATTTCTTTTTTATT———ATAGTATCGGCAAGGAATGTCGATTATTAATCTC—GATATTTAAATATTATTAATAGG	
<i>Triticum aestivum</i>	: ATAG——— G A . . . C . T . G . . . C . . . —T . . T . . . G . T . . . — . A .	

Fig.5 Partial DNA sequence of the trnL gene region (mitochondrial DNA) from *O.sativa* and *T.aestivum*. Arrows indicate the position of primers.

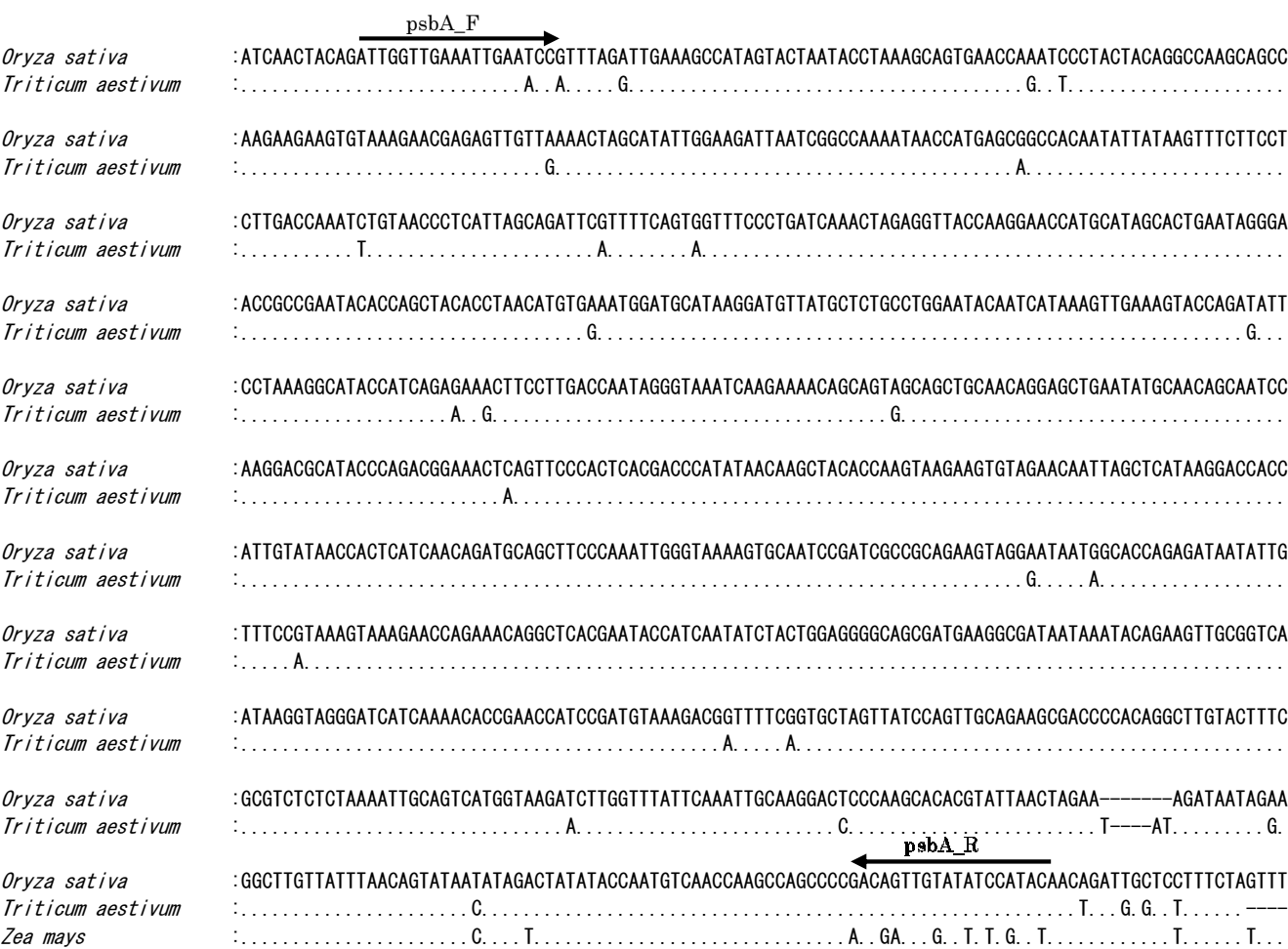


Fig.6 Partial DNA sequence of the psbA gene region (mitochondrial DNA) from O.sativa and T.aestivum. Arrows indicate the position of primers.

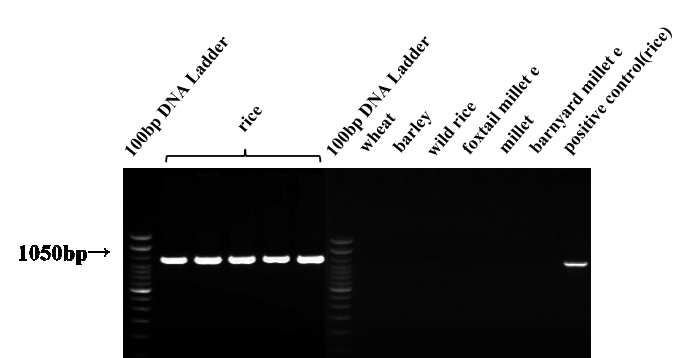


Fig.7 Electrophoresis image of PCR products of the matK gene region with 2% agarose-TAE gel. matK_F and matK_R are used as primers. Other samples we used show the same amplification pattern.

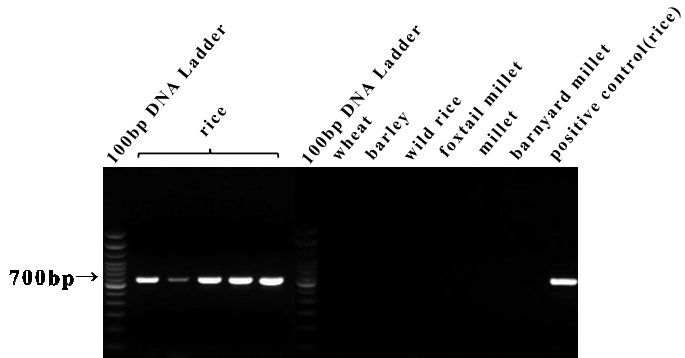


Fig.8 Electrophoresis image of PCR products of the rbcL gene region with 2% agarose-TAE gel. rbcL_F and rbcL_R are used as primers. Other samples we used show the same amplification pattern.

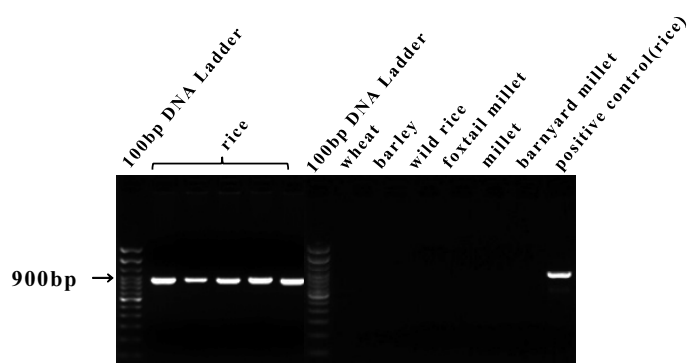


Fig.9 Electrophoresis image of PCR products of the trnL gene region with 2% agarose-TAE gel. trnL_F and trnL_R are used as primers. Other samples we used show the same amplification pattern.

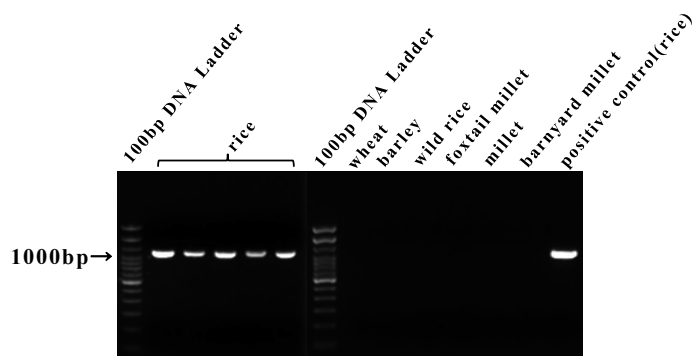


Fig.10 Electrophoresis image of PCR products of the psbA gene region with 2% agarose-TAE gel. psbA_F and psbA_R are used as primers. Other samples we used show the same amplification pattern.

3.3 米特異的プライマーによる増幅部位の確認

3.2 により増幅が確認できた米の PCR 産物について、DNA シーケンサーにより塩基配列を決定し、DDBJ の Blast 検索を行った。

すべての米の PCR 産物の塩基配列は、*O. sativa* の登録データと目的の領域において 100% の一致率を示した。このことは、設計したプライマーによって目的の DNA 領域が増幅されたことを示す。

3.4 米含有混合物についての PCR 結果

すべての米・小麦粉混合試料及び市販の米含有製品である米粉含有パン粉の DNA 抽出物について、Table3 に示した米特異的プライマーを用いて PCR を行った。得られた PCR 産物の電気泳動図を Fig.11-14 に示す。matK 領域のプライマーを用いた PCR 産物

の電気泳動図 (Fig.11) において、1050bp 付近にバンドが確認でき、同様に、rbcL 領域のプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図 (Fig.12) においては 700bp 付近に、trnL 領域のプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図 (Fig.13) においては 900bp 付近に、psbA 領域のプライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図 (Fig.14) においては 1000bp 付近にバンドが確認でき、いずれの領域においても、米のみを PCR した場合と同じ位置にバンドが確認できた。このことから、米以外の原料を含む混合物であっても米を 0.1% 以上含有している場合に米の検出が可能であることを確認した。さらに、パン粉のように一度焼成され加工が進んだ試料でも米の検出が可能であることが確認できた。

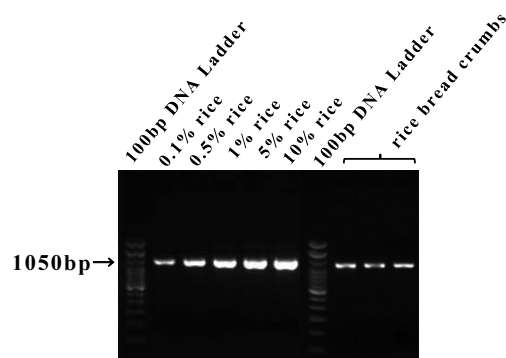


Fig.11 Electrophoresis image of PCR products of the matK gene region with 2% agarose-TAE gel. matK_F and matK_R are used as primers.

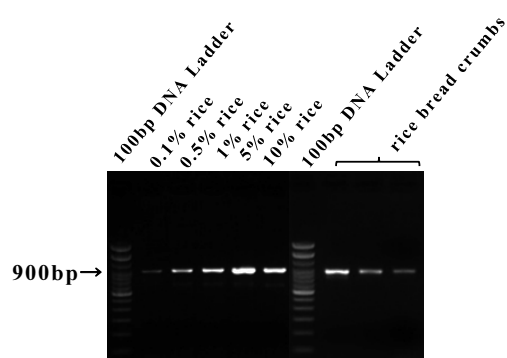


Fig.13 Electrophoresis image of PCR products of the trnL gene region with 2% agarose-TAE gel. trnL_F and trnL_R are used as primers.

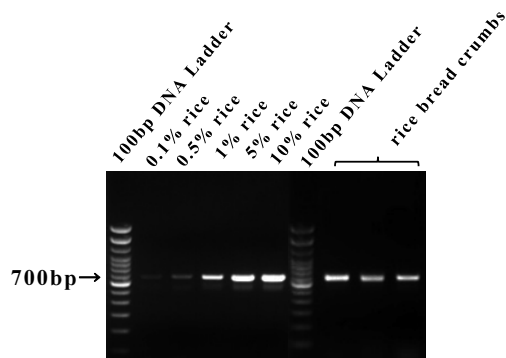


Fig.12 Electrophoresis image of PCR products of the rbcL gene region with 2% agarose-TAE gel. rbcL_F and rbcL_R are used as primers.

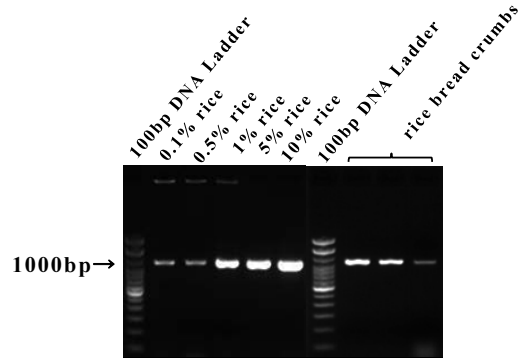


Fig.14 Electrophoresis image of PCR products of the psbA gene region with 2% agarose-TAE gel. psbA_F and psbA_R are used as primers.

4. 要 約

イネ科植物について、葉緑体 DNA 中の種間変異に着目し、米のみを特異的に増幅するプライマーを 4 つの DNA 領域において設計し以下の①-③を確認した。

① 設計したプライマーは PCR により米を特異的に検出した。

② 米を 0.1%以上含有する場合に米の検出が可能であった。

③ 市販の米粉含有製品についても米の検出が可能であった。

以上のことから、調製食料品中に米を含有するか否かについて、複数の DNA 領域におけるプライマーによる PCR が可能となったことから、塩基配列の変異等による誤判定の可能性がより少なくなり、判別の精度が向上した。

文 献

- 1) 池田啓久，森賢一郎，山岡裕貴，菅野達朗，松島紋子，中山清貴：関税中央分析所報，**55**，97(2015)
- 2) “広辞苑 第五版”，P.1006(1998)(岩波書店)
- 3) 鶴飼保雄：“植物育種学”，P.45(2003)(東京大学出版会)
- 4) 渡邊英夫，二口浩一，Ibrahim TESLIM，Benjamin A. SOBAMBO：熱帯農業，**46**(1)，47(2002)