

調製食料品の DNA 分析における米を含むものか否かの 判別についての検討

池田 啓久*, 森 賢一郎**, 山岡 裕貴***, 菅野 達朗****, 杉島 紋子*****, 中山 清貴*

Study of methods to discriminate rice contained in prepared foodstuffs by DNA analysis

Yoshihisa Ikeda*, Kenichiro Mori**, Yuki Yamaoka***, Tatsuro Kanno****, Ayako Matsushima*****, Kiyotaka Nakayama*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

** Present address: Higashimikawa Agriculture, Forestry and Fisheries Office, Aichi Prefectural Government

11-40, Takayama, Imure-chou, Toyohashi, Aichi 440-0833 Japan

*** Present address: Tokyo Customs Laboratory

2-56, Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-8615 Japan

**** Present address: Hakodate Customs Laboratory

24-4 Kaigan-cho Hakodate, Hokkaido 040-8561 Japan

***** Present address: Yokohama Customs General Management Dept.

1-1, Kaigan-dori Naka-ku Yokohama, Kanagawa 231-8401 Japan

For classification in the Japanese Customs Tariff Schedule, it is necessary to determine whether or not prepared foodstuffs contain rice. However, it is difficult to conduct such discrimination on the basis of morphological observation. Accordingly, in this study we used a DNA analytical method to determine whether prepared foodstuffs contain rice. In this study, we tried to design a new primer specific for genus *Oryza* (family *Gramineae*) in the chloroplast *trnL* region and then to determine whether the crop of genus *Oryza* was present in a mixture of crops by a PCR method with the designed primer. Furthermore, we determine partial nucleotide sequences of three different regions (*rbcL*, ITS1 and *trnL*) for rice samples and to identify them at the species level by searching DDBJ (DNA Data Bank of Japan) data. As a result, we found that by using the newly designed primer, though it was not possible for all the rice samples to identify them at the species level, it was possible to determine as to whether the mixtures of crops contained rice crops (genus *Oryza*).

1. 緒 言

近年、北米での干ばつ及び冷害、並びにウクライナ東部における紛争に起因するロシアへの経済制裁により、小麦価格が高騰している。それを受けて、小麦の代替品として米を使用した調製食料品が流通しており、肉のつなぎ、揚げ物の衣及び菓子類等、数多く使用されている。

調製食料品の関税率表上の分類は、経済連携協定を締結している国からの輸入であれば、米を含むものとその他のもので異なり、米を含むものは協定税率が適用されるが、その他のものは EPA 税

率が適用となり、比較的低い税率となっている。これらの間には税率格差があることから、調製食料品中に米を含むか否かの判別は、関税分類における重要な分析である。しかし、調製食料品の状態では、形態学的な特徴は残っておらず、外観での判別は困難である。そのため、米を含むか否かの判別には DNA 分析が有効であると考えられる。

輸入統計品目表中の米には学名が記されていないが、一般的には米は稲の果実であり¹⁾、生物学的に稲とはイネ科(*Gramineae*)イネ属(*Oryza*) (以下、「イネ属」という)の植物をいう²⁾。イネ属には 22 種が知られており、そのうち 20 種は野生種で、食用として栽

* 財務省関税中央分析所	〒277-0882	千葉県柏市柏の葉 6-3-5
** 現在所属 愛知県東三河農林水産事務所	〒440-0833	愛知県豊橋市飯村町高山 11-40
*** 現在所属 東京税関業務部	〒135-8615	東京都江東区青海 2-56
**** 現在所属 函館税関業務部	〒040-8561	北海道函館市海岸町 24-4
***** 現在所属 横浜税関総務部	〒231-8401	神奈川県横浜市中区海岸通 1-1

培されているものは *Oryza sativa* L.(アジアイネ)及び *O. glaberrima* Steud.(アフリカイネ)の2種である。*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ている一方、*O. glaberrima* は西アフリカで局地的に栽培されているのみである²⁾。上記一般論に対し狭義にはイネとは *O. sativa* を指し³⁾、当該定義から米を *O. sativa* の種実であるとする文献も存在する⁴⁾。以下、本稿においては一般的な定義に従い、米をイネ属植物の果実であるとする。

植物に対する DNA 分析について、これまでの研究で、広範囲の植物に使用できるユニバーサルプライマーがいくつか知られており、その中でも植物種の違いを反映する特定の遺伝子領域の塩基配列を用いて、種の同定を行う DNA バーコーディングの研究が進められている⁵⁻¹²⁾。陸上植物のバーコード領域としては、葉緑体 DNA の *rbcL* 遺伝子の部分領域(以下、「*rbcL* 領域」という)及び葉緑体DNAの *matK* 遺伝子の部分領域が提案されている^{8,12)}。しかし、ユニバーサルプライマーを用いた DNA バーコーディングは試料中に単一種の植物のみが含まれている場合には有効であるが、試料中に複数種の植物を含有する調製食料品の場合は単一の増幅 DNA を得ることができないことから不適当である。

本研究では、インターネット上の DNA Data Bank of Japan (以下、「DDBJ」という)に公表されている葉緑体 DNA の *trnL*(UAA)遺伝子のイントロン領域のデータを比較し、当該遺伝子領域中でイネ属に共通して特有な遺伝子領域(以下、「*trnL* 領域」という)を増幅するプライマーを設計し、当該プライマー並びに *rbcL* 領域及び核リボソーム DNA の internal transcribed spacer の前半領域(以下、「ITS1 領域」という)に対するユニバーサルプライマーの計3種類のプライマーを用いて、米と米以外のイネ科植物である小麦及びとうもろこし並びにそれらの混合品の DNA を抽出、PCR 法により増幅し、その結果の比較を行うことで、イネ属に特有な遺伝子領域を増幅するプライマーを用いて調製食料品中に米を含むか否かについて判別可能であるかを検討した。

2. 実 験

2.1 試料

試料は、市販の米(25品)及び小麦粉、コーンミールを用いた。検体名は商品のラベルに表示されていた名称を用いた。詳細については以下に示す。

市販の米(25品)

日本米こしひかり玄米、日本米もち米白米、日本米胚芽米、日本米つや姫玄米、古代米黒米、古代米赤米、日本米ひのひかり玄米、日本米あきたこまち玄米、日本米精白米、ひとめぼれ玄米、日本

米粳付き玄米、日本米米粉、日本米酒米 70%精白米、日本米もち米玄米、みどり糯、オーストラリア米短粒種、ウルグアイ米短粒種、イタリア米カルタローリ、タイ米、タイ米ジャスミンライス、アメリカ米短粒種、中国米短粒種、韓国米短粒種、カナダ米ワイルドライス、パキスタン米バスマティライス

小麦粉

日清フラワー薄力粉

コーンミール

TOMIZAWA 製

2.2 プライマー及び分析装置

プライマー

rbcL 領域

*rbcLa_F*⁸⁾ 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'

*rbcLa_R*⁸⁾ 5'-GTAAATCAAGTCCACCRCG-3'

ITS1 領域

ITS-A⁶⁾ 5'-GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG-3'

ITS-C⁶⁾ 5'-GCAATTCACACCAAGTATCGC-3'

trnL 領域

rice *trnL-F*1 5'-GTTGCTAGCGGAAGTCCCTTC-3'

*trnL_D_R*⁵⁾ 5'-GGGATAGAGGGACTTGAAC-3'

分光光度計 : SHIMAZU UV-2550 UV-VISIBLE
SPECTROPHOTOMETER

PCR 増幅装置 : Veriti 96well Thermal cycler (Applied Biosystems)

画像解析装置 : BIO-PROFILE System2 (VILBER LOURMAT)

DNA シークエンサー : 3500 XL Genetic Analyzer
(Applied Biosystems)

2.3 実験

2.3.1 米からの DNA 抽出方法

予めタングステン・ビーズ1個を入れた1.5 mL容のエッペンチューブに乳鉢と乳棒を用いてすりつぶした米粉を入れ、振動粉砕機で約30秒粉砕し、CTAB法でDNAを抽出した。

2.3.2 米、小麦粉及びコーンミールの混合物 DNA の抽出方法

予めタングステン・ビーズ1個を入れた1.5 mL容のエッペンチューブに乳鉢と乳棒を用いてすりつぶした米粉、小麦及びコーンミールの混合試料を合計150 mgとなるように量り取った。その際、カナダ米ワイルドライスを除くすべての外国米及び日本米精白米について一定の割合で混合し、小麦及びコーンミールを混合した。それらの混合物を振動粉砕機で約30秒粉砕し、CTAB法でDNAを抽出した。試料採取量の詳細についてはTable 1に示す。

Table 1 The content of rice in simulated samples

Content of rice (%)	Weight of rice	Weight of wheat flour	Weight of cornmeal
30%	50 mg	50 mg	50 mg
10%	15 mg	67.5 mg	67.5 mg
5%	7.5 mg	71.25 mg	71.25 mg
5%	7.5 mg	141.5 mg	
5%	7.5 mg		141.5 mg
3%	4.5 mg	72.75 mg	72.75 mg
1%	1.5 mg	74.25 mg	74.25 mg
0%		75 mg	75 mg

2.3.3 PCR 法によるユニバーサル領域並びに米に特異的なプライマーの設計領域の増幅及び塩基配列の決定

各試料から抽出した DNA を鋳型として、*rbcL* 領域、ITS1 領域、*trnL* 領域の 3 領域を TaKaRa *Ex Taq* polymerase を用いて PCR 法で増幅した。PCR の反応溶液は、いずれの領域においても、DNA 抽出液 (約 500 ng/μL) : 1 μL, 10×*Ex Taq* buffer : 5.0 μL, dNTP mixture (2.5 mM each) : 4 μL, プライマー (20 μM) : 各 1 μL, *Ex Taq* polymerase (5 U/μL) : 0.25 μL, 滅菌水 : DNA 抽出液の DNA 濃度に依存 (合計 50 μL に調製) とした。PCR の反応条件は、いずれの領域においても、熱変性 98°C (3 分) を行った後、98°C (10 秒)、55°C (30 秒)、72°C (1 分) のサイクルを 30 回繰り返した後、伸長反応 72°C (1 分) を行った。

1%アガロースゲル電気泳動により、増幅した DNA 断片 (PCR 産物) の有無を確認した後、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 反応と同じプライマーを用いて、Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit で、添付のプロトコルに従いサイクルシーケンシング反応を行った。

サイクルシーケンシング反応後、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。得られた塩基配列からプライマー配列を除去した後、DDBJ のサービスである Basic Local Alignment Search Tool (以下、「Blast」という) で検索を行った。

3. 結果及び考察

3.1 DNA 抽出

米 100% の試料 (米 25 品種) 並びに米 (外国米 9 品+日本米精白米)、小麦粉及びコーンミールの混合物の DNA 抽出液を 1% アガロースゲル電気泳動した結果を Fig.1 及び Fig.2 に示す。各試料間で DNA の濃度 (バンドの濃さ) に違いはあるが、すべての試料で DNA を抽出することができた。

3.2 米 100% (25 品種) の PCR 産物の電気泳動

3.1 で得られた DNA 抽出液の内、米 100% の試料の DNA 抽出液に対し、*rbcL* 領域、ITS1 領域及び *trnL* 領域の計 3 領域のプライマーを用いた PCR 産物のアガロースゲル電気泳動結果を Fig.3 に示す。

rbcL 領域及び、ITS1 領域においては、すべての検体でそれぞれ 600 bp 及び 300 bp 付近に単一のバンドが確認された。また、*trnL* 領域において、カナダ米ワイルドライスを除くすべての検体で 400 bp 付近に単一のバンドが確認された。

カナダ米ワイルドライスにおいて、植物のユニバーサル領域である *rbcL* 領域及び ITS1 領域の PCR の結果、単一のバンドが確認され、イネ属に特異的にアニーリングするよう設計した *trnL* 領域での PCR の結果、バンドが確認されなかったことについて、カナダ米ワイルドライスはイネ科 (*Gramineae*) マコモ属 (*Zizania*) であることから、今回設計したプライマーを用いて PCR 反応が起こらなかったことによるものと考えられる。

3.3 混合物 (米、小麦、とうもろこし) の PCR 産物の電気泳動

3.1 で得られた DNA 抽出液の内、混合物の試料の DNA 抽出液に対し、*rbcL* 領域、ITS1 領域及び *trnL* 領域の計 3 領域のプライマーを用いた PCR 産物のアガロースゲル電気泳動結果を Fig.4 から Fig.6 に示す。

rbcL 領域ではすべての検体で 600 bp 付近に、ITS1 領域ではすべての検体で 300 bp 付近に単一のバンドがそれぞれ確認された。これは、ユニバーサルプライマーを用いて PCR 法による増幅を行うと、小麦及びとうもろこしも米とほぼ同一の長さの部分領域が増幅されることを示す。このことから、ユニバーサルプライマーを用いて、混合物中に米を含むか否かについて判別することは困難であることが示唆される。

trnL 領域においては、米を含む試料では、400 bp 付近に単一のバンドがすべての検体で確認されたが、米を含まない試料では、バンドが確認できなかった。これは、混合物中からイネ属の DNA が選択的に増幅されたことを示す。このことから、今回設計したプライマーを用いた PCR 法により、混合物中にイネ属植物を含むか否かについて判別可能であることが判明した。また、米の混合割合は 1% 程度含有していれば判別可能であることが判明した。

3.4 塩基配列の決定及びデータベースとの照合

3.2 で得られた PCR 産物に対し、DNA シーケンサーにより塩基配列を決定し、得られた塩基配列を用いて、インターネット上の DDBJ で Blast 検索を行った。いずれの検索結果においても、イネ属の複数の種の登録データと高い相同性で一致した。検索結

果の例として栽培種である *O. sativa* 及び *O. glaberrima*、並びに *O. sativa* の直接祖先種である *O. rufipogon* 及び *O. nivara* の計 4 種との相同性についてまとめたものを、Table 2 から Table 4 に示す。

3.3 で得られた PCR 産物の内 *tmL* 領域に係る PCR 産物について

は Table 4 と同様の結果となった。

このことは、今回増幅したいずれの領域についても、属中の種間の塩基配列にほとんど差がなく、種の判別には至らないことを示唆している。

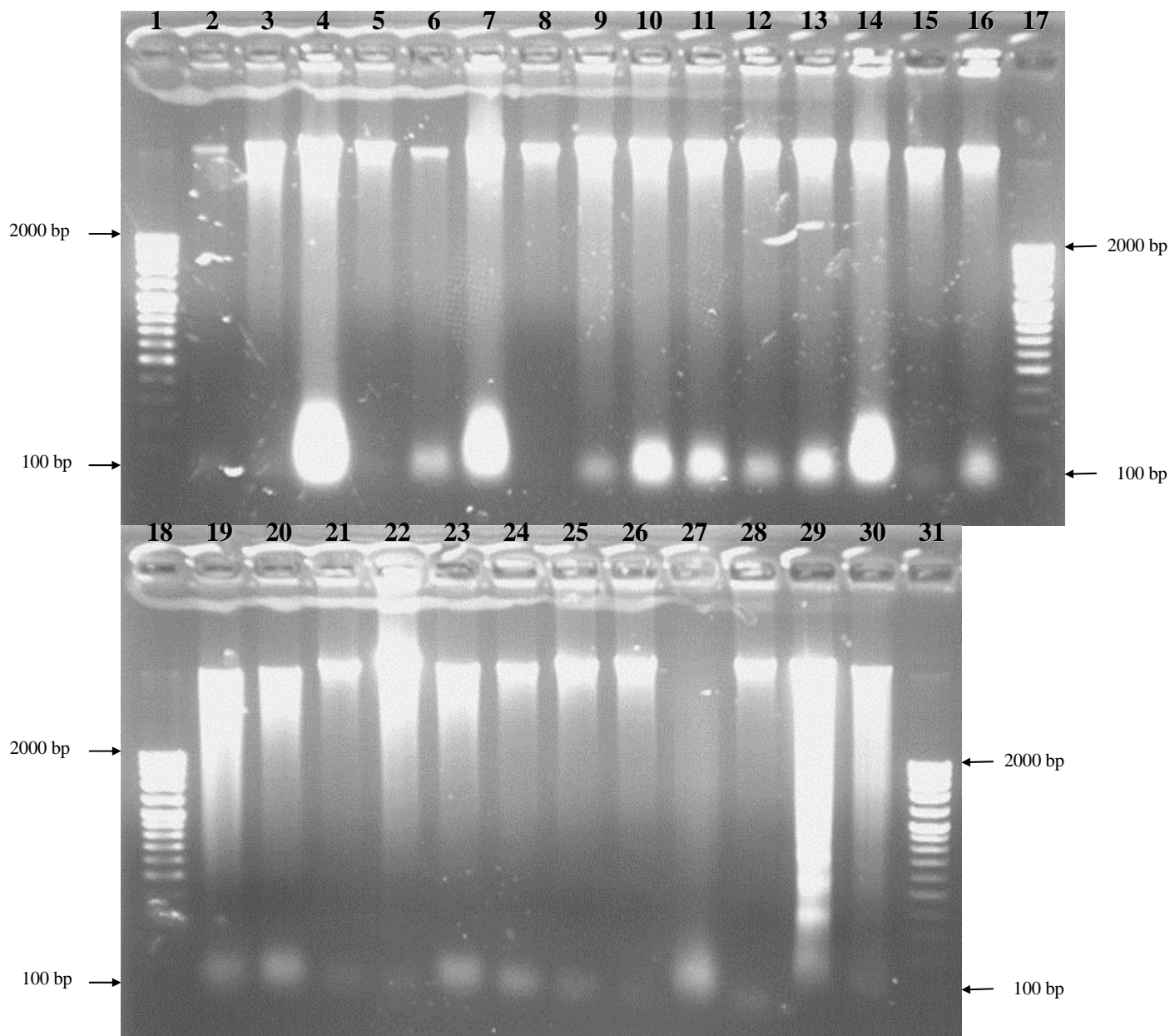


Fig.1 DNA extracted from rice.

Lane 1: 100 bp DNA ladder, Lane 2: Japanese polished rice, Lane 3: Japanese powder rice, Lane 4: Japanese whole rice, Lane 5: Unpolished rice with paddy, Lane 6: Japanese brewers 70% polished rice, Lane 7: Japanese glutinous polished rice, Lane 8: Japanese glutinous unpolished rice, Lane 9: Japanese unpolished rice "Koshihikari", Lane 10: Japanese unpolished rice "Hinohikari", Lane 11: Japanese unpolished rice "Akitakomachi", Lane 12: Japanese unpolished rice "Hitomebore", Lane 13: Japanese unpolished rice "Tsuyahime", Lane 14: Japanese glutinous rice "Midori", Lane 15: Ancient black rice, Lane 16: Ancient red rice, Lane 17: 100 bp DNA ladder, Lane 18: 100 bp DNA ladder, Lane 19: Australian short grain rice, Lane 20: Uruguayan short grain rice, Lane 21: Italian karuta lorry, Lane 22: American short grain rice, Lane 23: Chinese short grain rice, Lane 24: Korean short grain rice, Lane 25: Canadian wild rice, Lane 26: Pakistani basmati rice, Lane 27: Thai rice, Lane 28: Thai jasmine rice, Lane 29: Wheat flour, Lane 30: Cornmeal, Lane 31: 100 bp DNA ladder

Each electrophoresis was performed on 1% agarose gel in TAE buffer. After the electrophoresis, the gels were dyed by ethidium bromide.

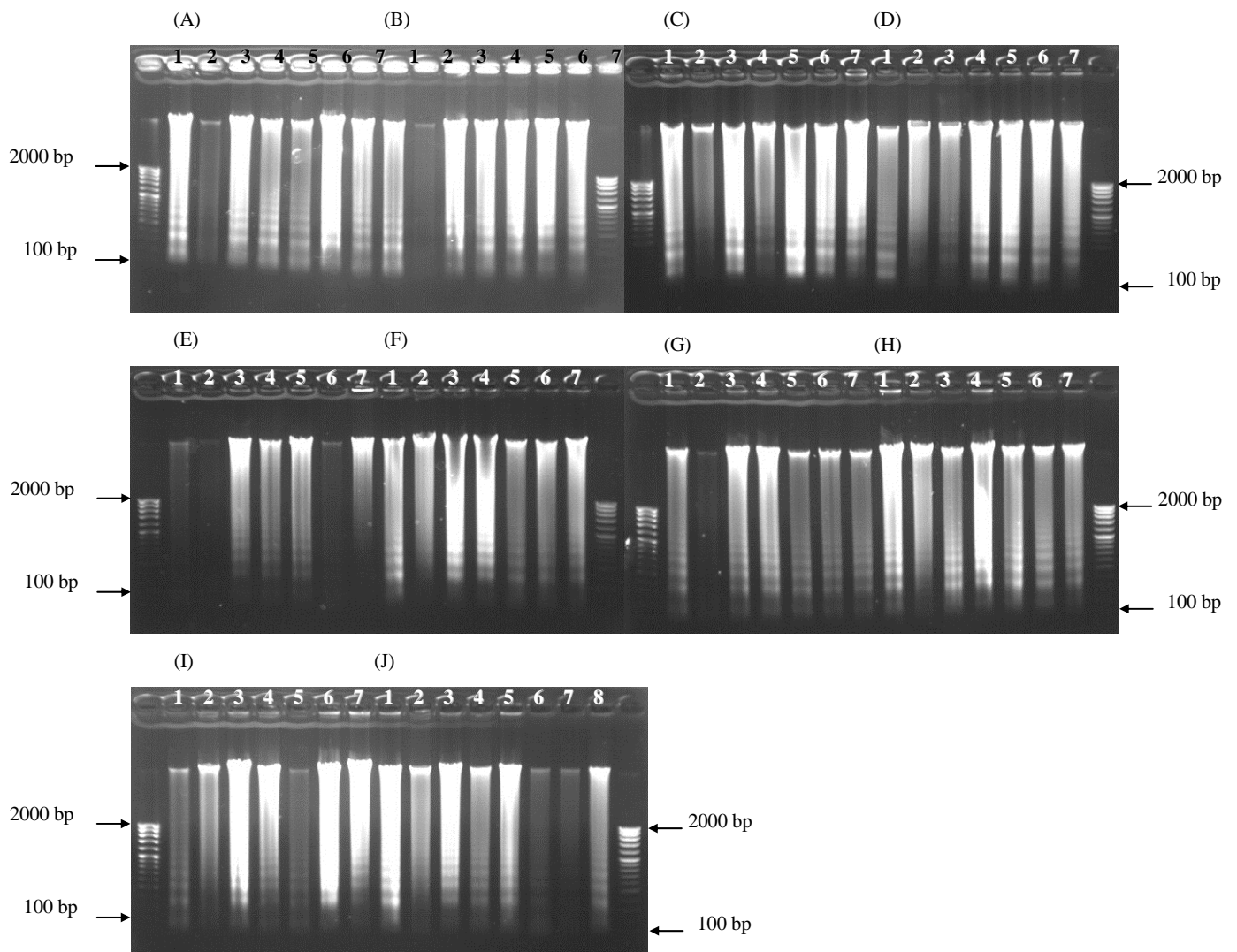


Fig.2 DNA extracted from a mixture of rice, wheat flour and cornmeal.

A: Australian short grain rice, B: Uruguayan short grain rice, C: Italian karuta lorry, D: Thai rice, E: Thai jasmine rice, F: American short grain rice, G: Chinese short grain rice, H: Korean short grain rice, I: Pakistani basmati rice, J: Japanese polished rice

Lane 1: 5% rice with wheat flour, Lane 2: 5% rice with cornmeal, Lane 3: 1% rice with wheat flour and cornmeal, Lane 4: 3% rice with wheat flour and cornmeal, Lane 5: 5% rice with wheat flour and cornmeal, Lane 6: 10% rice with wheat flour and cornmeal, Lane 7: 30% rice with wheat flour and cornmeal (Except J, Lane 8: wheat flour and cornmeal)

The lanes located at both sides of numbered lanes are 100 bp DNA ladder.

Each electrophoresis was performed on 1% agarose gel in TAE buffer. After the electrophoresis, the gels were dyed by ethidium bromide.

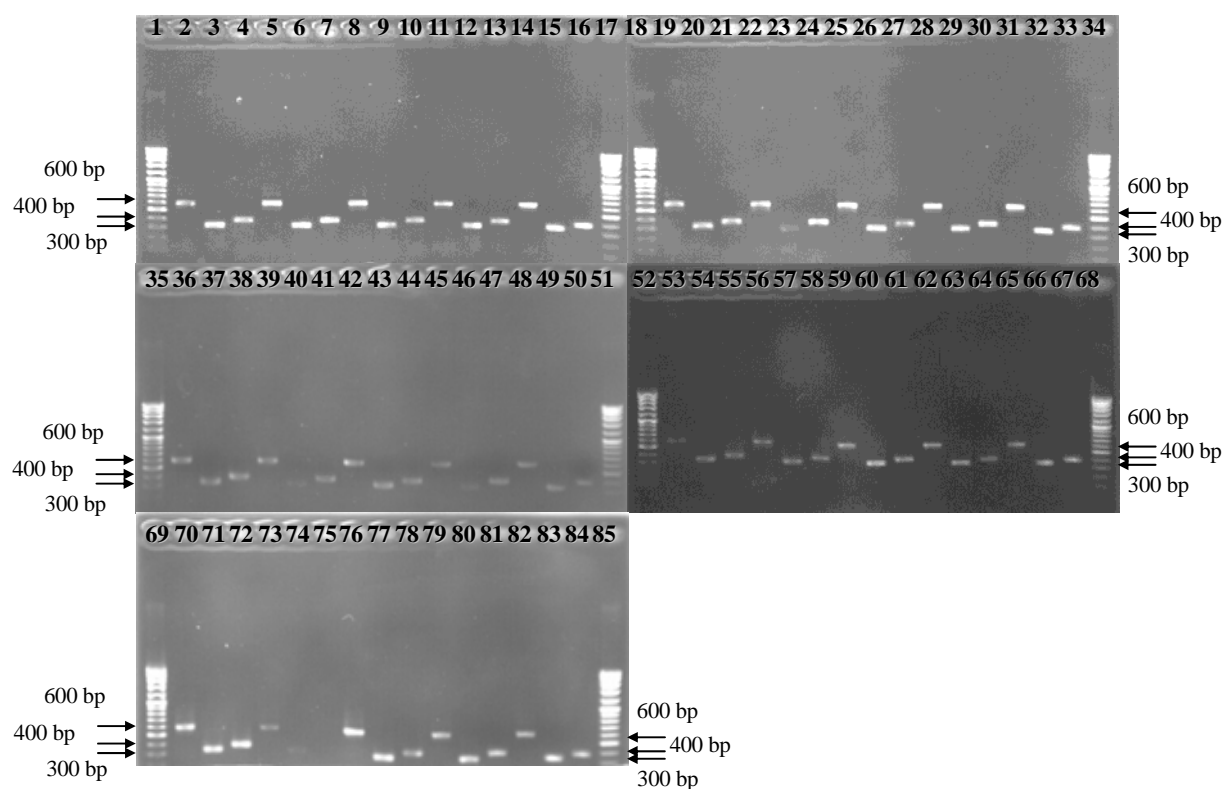


Fig.3 PCR amplification of DNA extracted from the rice for 3 regions, left to right: *rbcL* region, ITS1 region and *trnL* region.

Lane 1: 100 bp DNA ladder, Lane 2 to 4: Japanese polished rice, Lane 5 to 7: Japanese powder rice, Lane 8 to 10: Japanese whole rice, Lane 11 to 13: Unpolished rice with paddy, Lane 14 to 16: Japanese brewers 70% polished rice, Lane 17 and 18: 100 bp DNA ladder, Lane 19 to 21: Japanese glutinous polished rice, Lane 22 to 24: Japanese glutinous unpolished rice, Lane 25 to 27: Japanese unpolished rice "Koshihikari", Lane 28 to 30: Japanese unpolished rice "Hinohikari", Lane 31 to 33: Japanese unpolished rice "Akitakomachi", Lane 34 and 35: 100 bp DNA ladder, Lane 36 to 38: Japanese unpolished rice "Hitomebore", Lane 39 to 41: Japanese unpolished rice "Tsuyahime", Lane 42 to 44: Japanese glutinous rice "Midori", Lane 45 to 47: Ancient black rice, Lane 48 to 50: Ancient red rice, Lane 51 and 52: 100 bp DNA ladder, Lane 53 to 55: Australian short grain rice, Lane 56 to 58: Uruguayan short grain rice, Lane 59 to 61: Italian karuta lorry, Lane 62 to 64: American short grain rice, Lane 65 to 67: Chinese short grain rice, Lane 68 and 69: 100 bp DNA ladder, Lane 70 to 72: Korean short grain rice, Lane 73 to 75: Canadian wild rice, Lane 76 to 78: Pakistani basmati rice, Lane 79 to 81: Thai rice, Lane 82 to 84: Thai jasmine rice, Lane 85: 100 bp DNA ladder

Each electrophoresis was performed on 1% agarose gel in TAE buffer. After the electrophoresis, the gels were dyed by ethidium bromide.

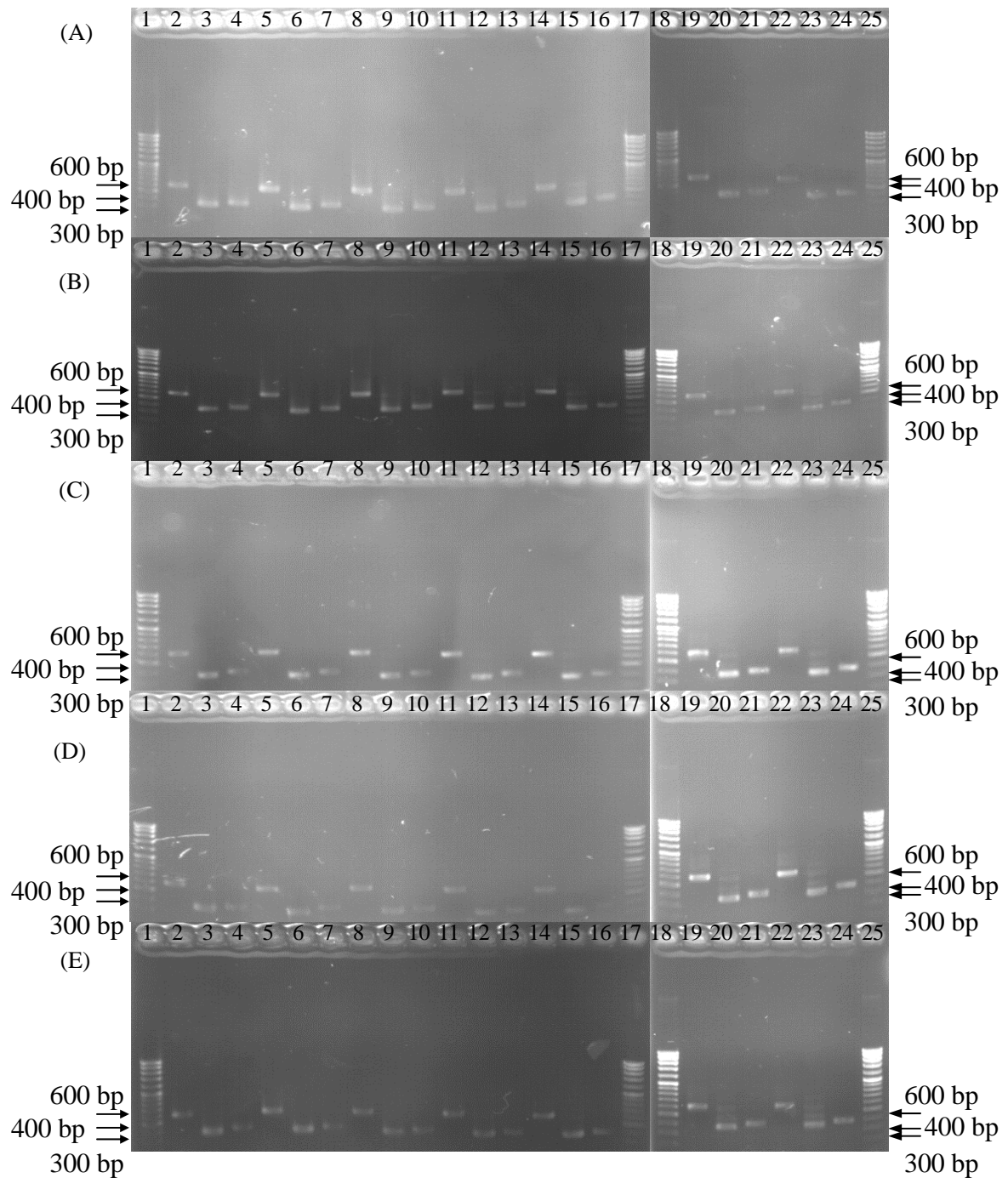


Fig.4 PCR amplification of DNA extracted from the mixture of rice, wheat flour and cornmeal for 3 regions, left to right: *rbcL* region, ITS1 region and *trnL* region.

A: Australian short grain rice, B: Uruguayan short grain rice, C: Italian karuta lorry, D: Thai rice, E: Thai jasmine rice

Lane 1: 100 bp DNA ladder, Lane 2 to 4: 5% rice with wheat flour, Lane 5 to 7: 5% rice with cornmeal, Lane 8 to 10: 5% rice with wheat flour and cornmeal, Lane 11 to 13: 3% rice with wheat flour and cornmeal, Lane 14 to 16: 1% rice with wheat flour cornmeal, Lane 17 and 18: 100 bp DNA ladder, Lane 19 to 21: 10% rice with wheat flour and cornmeal, Lane 22 to 24: 30% rice with wheat flour and cornmeal, Lane 25: 100 bp DNA ladder

Each electrophoresis was performed on 1% agarose gel in TAE buffer. After the electrophoresis, the gels were dyed by ethidium bromide.

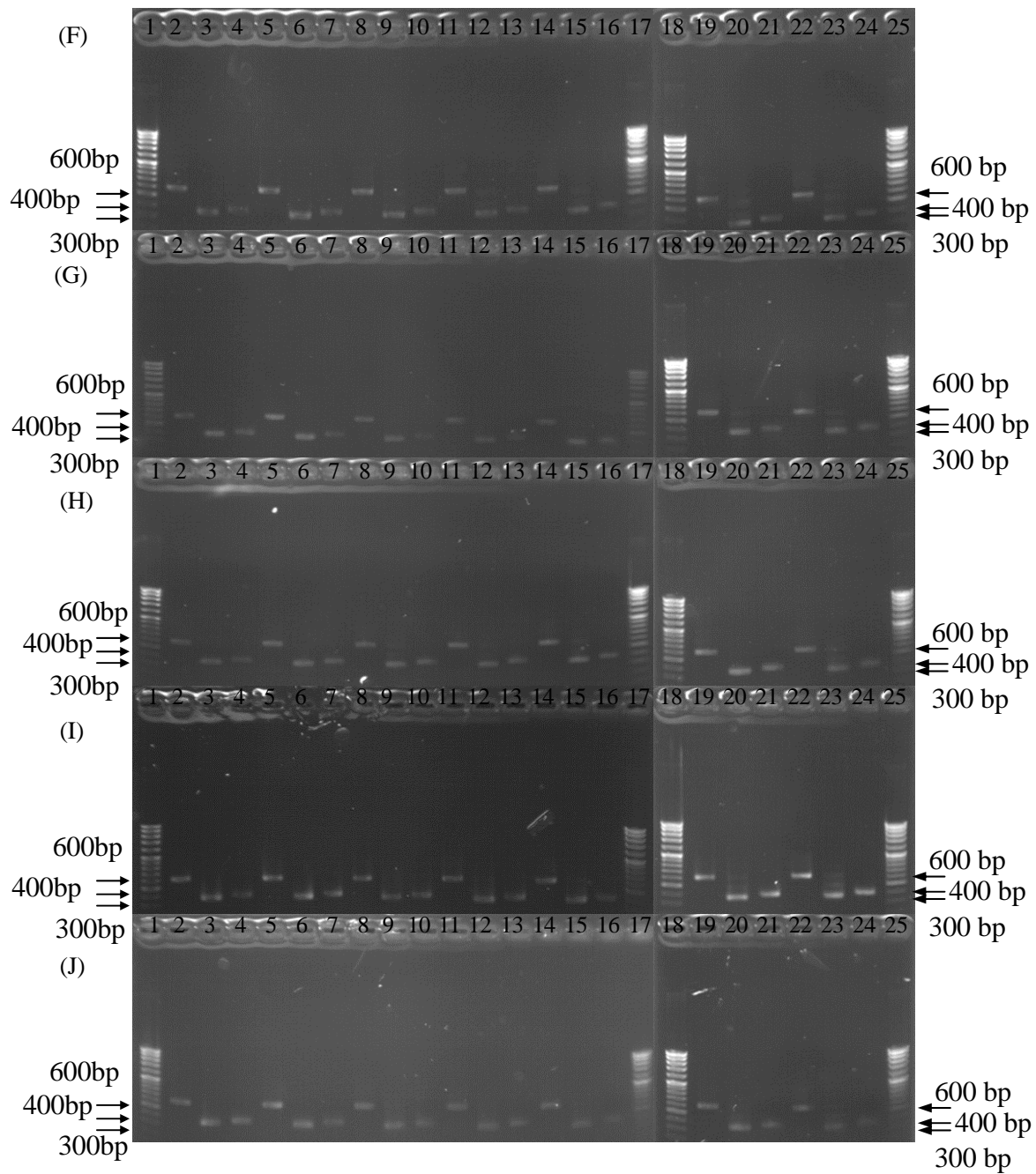


Fig.5 PCR amplification of DNA extracted from the mixture of rice, wheat flour and cornmeal for 3 regions (cont.), left to right: *rbcL* region, ITS1 region and *trnL* region.

F: American short grain rice, G: Chinese short grain rice, H: Korean short grain rice, I: Pakistani basmati rice, J: Japanese polished rice

Lane 1: 100 bp DNA ladder, Lane 2 to 4: 5% rice with wheat flour, Lane 5 to 7: 5% rice with cornmeal, Lane 8 to 10: 5% rice with wheat flour and cornmeal, Lane 11 to 13: 3% rice with wheat flour and cornmeal, Lane 14 to 16: 1% rice with wheat flour cornmeal, Lane 17 and 18: 100 bp DNA ladder, Lane 19 to 21: 10% rice with wheat flour and cornmeal, Lane 22 to 24: 30% rice with wheat flour and cornmeal, Lane 25: 100 bp DNA ladder

Each electrophoresis was performed on 1% agarose gel in TAE buffer. After the electrophoresis, the gels were dyed by ethidium bromide.

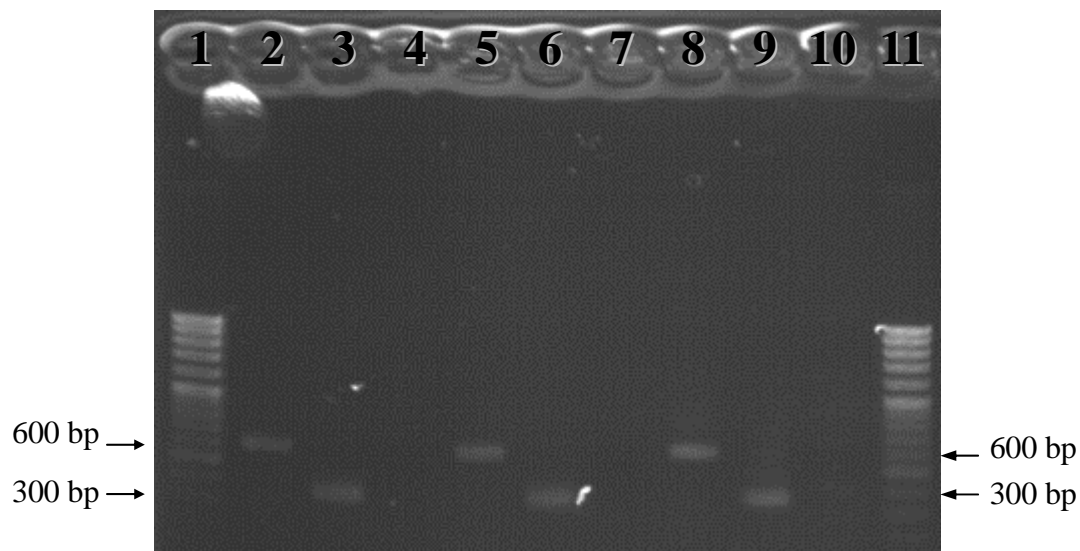


Fig.6 PCR amplification of DNA extracted from wheat flour and cornmeal for 3 regions, left to right: *rbcL* region, ITS1 region and *trnL* region.

Lane 1: 100 bp DNA ladder, Lane 2 to 4: wheat flour, Lane 5 to 7: cornmeal, Lane 8 to 10: mixture of wheat flour and cornmeal, Lane 11: 100 bp DNA ladder
Each electrophoresis was performed on 1% agarose gel in TAE buffer. After the electrophoresis, the gels were dyed by ethidium bromide.

Table 2 The homologies of Blast search in DDBJ for PCR products amplified at the *rbcL* region.

* indicates accession number in DDBJ.

	<i>O. sativa</i> (L20473)*	<i>O. glaberrima</i> (KJ513090)*	<i>O. rufipogon</i> (KF562709)*	<i>O. nivara</i> (AP006728)*
Japanese polished rice	99%	99%	99%	99%
Japanese powder rice	99%	99%	99%	99%
Japanese whole rice	99%	99%	99%	99%
Unpolished rice with paddy	99%	99%	99%	99%
Japanese brewers 70% polished rice	99%	99%	99%	99%
Japanese glutinous polished rice	99%	99%	99%	99%
Japanese glutinous unpolished rice	99%	99%	99%	99%
Japanese unpolished rice "Koshihikari"	99%	99%	99%	99%
Japanese unpolished rice "Hinohikari"	99%	99%	99%	99%
Japanese unpolished rice "Akitakomachi"	99%	99%	99%	99%
Japanese unpolished rice "Hitomebore"	99%	99%	99%	99%
Japanese unpolished rice "Tsuyahime"	99%	99%	99%	99%
Japanese glutinous rice "Midori"	99%	99%	99%	99%
Ancient black rice	99%	99%	99%	99%
Ancient red rice	99%	99%	99%	99%
Australian short grain rice	99%	99%	99%	99%
Uruguayan short grain rice	99%	99%	99%	99%
Italian karuta lorry	99%	99%	99%	99%
American short grain rice	99%	99%	99%	99%
Chinese short grain rice	99%	99%	99%	99%
Korean short grain rice	99%	99%	99%	99%
Pakistani basmati rice	99%	99%	99%	99%
Thai rice	99%	99%	99%	99%
Thai jasmine rice	99%	99%	99%	99%

Table 3 The homologies of Blast search in DDBJ for PCR products amplified at the ITS1 region.

* indicates accession number in DDBJ.

	<i>O. sativa</i> (AP009051)*	<i>O. glaberrima</i> (AY749364)*	<i>O. rufipogon</i> (JN402202)*	<i>O. nivara</i> (AY749362)*
Japanese polished rice	100%	99%	100%	100%
Japanese powder rice	100%	99%	100%	100%
Japanese whole rice	100%	99%	100%	100%
Unpolished rice with paddy	100%	99%	100%	100%
Japanese brewers 70% polished rice	100%	99%	100%	100%
Japanese glutinous polished rice	100%	99%	100%	100%
Japanese glutinous unpolished rice	100%	99%	100%	100%
Japanese unpolished rice "Koshihikari"	100%	99%	100%	100%
Japanese unpolished rice "Hinohikari"	100%	99%	100%	100%
Japanese unpolished rice "Akitakomachi"	100%	99%	100%	100%
Japanese unpolished rice "Hitomebore"	100%	99%	100%	100%
Japanese unpolished rice "Tsuyahime"	100%	99%	100%	100%
Japanese glutinous rice "Midori"	100%	99%	100%	100%
Ancient black rice	100%	99%	100%	100%
Ancient red rice	100%	99%	100%	100%
Australian short grain rice	100%	99%	100%	100%
Uruguayan short grain rice	100%	99%	100%	100%
Italian karuta lorry	100%	99%	100%	100%
American short grain rice	100%	99%	100%	100%
Chinese short grain rice	100%	99%	100%	100%
Korean short grain rice	100%	99%	100%	100%
Pakistani basmati rice	100%	99%	100%	100%
Thai rice	100%	99%	100%	100%
Thai jasmine rice	100%	99%	100%	100%

Table 4 The homologies of Blast search in DDBJ for PCR products amplified at the *trnL* region.

* indicates accession number in DDBJ.

	<i>O. sativa</i> (GU595138)*	<i>O. glaberrima</i> (AY792516)*	<i>O. rufipogon</i> (GU595130)*	<i>O. nivara</i> (AP006728)*
Japanese polished rice	100%	100%	100%	100%
Japanese powder rice	100%	100%	100%	100%
Japanese whole rice	100%	100%	100%	100%
Unpolished rice with paddy	100%	100%	100%	100%
Japanese brewers 70% polished rice	100%	100%	100%	100%
Japanese glutinous polished rice	100%	100%	100%	100%
Japanese glutinous unpolished rice	100%	100%	100%	100%
Japanese unpolished rice "Koshihikari"	100%	100%	100%	100%
Japanese unpolished rice "Hinohikari"	100%	100%	100%	100%
Japanese unpolished rice "Akitakomachi"	100%	100%	100%	100%
Japanese unpolished rice "Hitomebore"	100%	100%	100%	100%
Japanese unpolished rice "Tsuyahime"	100%	100%	100%	100%
Japanese glutinous rice "Midori"	100%	100%	100%	100%
Ancient black rice	100%	100%	100%	100%
Ancient red rice	100%	100%	100%	100%
Australian short grain rice	100%	100%	100%	100%
Uruguayan short grain rice	100%	100%	100%	100%
Italian karuta lorry	100%	100%	100%	100%
American short grain rice	100%	100%	100%	100%
Chinese short grain rice	100%	100%	100%	100%
Korean short grain rice	100%	100%	100%	100%
Pakistani basmati rice	100%	100%	100%	100%
Thai rice	100%	100%	100%	100%
Thai jasmine rice	100%	100%	100%	100%

以上の結果から、調製食料品中に米が含まれているか否かの判別は、今回設計したプライマーを用いた PCR 法で 400 bp 付近のバンドを確認することで可能であることが判明した。

4. 要 約

米及び米の類縁種並びにその混合物を対象として、イネ属に特異な領域(*trnL* 領域)を増幅するプライマーを設計し、混合物中に米を含むか否かの判別が可能であるか検討した。その結果、今回用いた模擬試料において、PCR 法により判別が可能であることが判明した。

文 献

- 1) “広辞苑 第五版”, P.1006 (1998), (岩波書店)
- 2) “最新農業技術事典”, P.105 (2006), (農山漁村文化協会)
- 3) “作物学用語事典”, P.218 (2010), (農山漁村文化協会)
- 4) “商品大辞典”, P.1004 (1976), (東洋経済)
- 5) Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J: *Plant Molecular Biology*, **17**, 1105 (1991).
- 6) Blattner FR: *BioTechniques*, **27**, 1180 (1999).
- 7) Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, Haidae N, Savolaine V: *Philosophical Transactions of the Royal Society Series B Biological Sciences*, **360**, 1889 (2005)
- 8) CBOL Plant Working Group: *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 12794 (2009).

- 9) Li FW, Kuo LY, Rothfels CJ, Ebihara A, Chiou QL, Windham MD, Pryer KM: *PLos ONE*, **6**, e26597 (2011).
- 10) de Groot GA, During HJ, Maas JW, Schneider H, Vogel JC, Erkens HJ: *PLos ONE*, **6**, e16371 (2011).
- 11) Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP: *PLos ONE*, **6**, e19254 (2011).
- 12) Bafeel SO, Arif IA, Bakir MA, Al Homaidan AA, AL Farhan AH, Khan HA: *Genetics and Molecular Research*, **11**, 1934 (2012)