

DNA によるコメの品種判別

田嶋玄一

1. 目的

農業，医療，犯罪捜査などさまざまな場面で使われるようになった DNA 鑑定の技術は，PCR という分子生物学の基本的な技術をもとにしている．コメを材料として DNA 鑑定を実際に行なうことで，DNA 鑑定の基本的な原理を学び，あわせて分子生物学の基本技術である PCR の原理を理解する．

2. 材料と方法

A. 材料と試薬，および器具

1) コメ試料

コシヒカリ，ササニシキ，ひとめぼれ，あきたこまち，ミヤコガネ（もち米）の玄米を試料として用いた．ただし，実験開始時には試料番号（A - E）のみが示されており，どの試料がどの品種かは実験結果によって初めて明らかとなった．

2) DNA 抽出

コメ試料からのゲノム DNA の抽出には，「穀物からの DNA 抽出キット（GM Quicker 2，ニッポンジーン社）」を用いた．

3) PCR

品種判別のための PCR には，「コメ判別用 PCR キット I（タカラバイオ社）」を用いた．サーマルサイクラーはエッペンドルフ社の Mathercycler を用いた．

4) 電気泳動

PCR 産物の分離分析は，アガロース電気泳動によって行なった．電気泳動装置は Mupid-21（コスモバイオ社）を用いた．泳動後のゲルは 1 µg/ml のエチジウムブロマイドで染色し，ゲル撮影装置（BioDoc-It Imaging System，UVP 社）によって写真に記録した．分子マーカーには 1 kb DNA ladder とコメ判別キット付属の分子マーカーを用いた．前者には，250，500，750，1000，1500，2000，3000，4000，5000，6000，7000，8000，9000，10000 bp の 14 種類の DNA 分子が，後者には 650，770，870，1600 bp の 4 種類の大きさの分子が含まれている．

5) その他の器具

その他，以下の器具を用いた．

マイクロピペット（Nichipet-EX，NICHIRYO 社）

遠心機（DISKBOY，Kurabo 社）

ドライブロックバス（DTU-18，タイテック社）

バルテックスミキサー（HM-1，アズワン社）

マイクロチューブ，1.5 ml ストックチューブと 0.6 ml PCR チューブ

B. 実験方法

1) コメ試料からのゲノム DNA の抽出

コメ 1 粒をアルミ箔で覆って金槌で粉碎し，粉状になった試料を 1.5 ml マイクロチューブに入れた．

ゲノム抽出キットの GE1 buffer を 250 μ l , proteinase K を 10 μ l , RNase を 5 μ l , alpha-amylase を 2 μ l 入れ , ポルテックスミキサーで 30 秒間攪拌した . これをドライブロックパスで 60 , 15 分間インキュベートした .

<以下省略>

（この先の実験手順はゲノム DNA 抽出キット通りの作業となるため）

2) コメ判別用 PCR キットによる PCR

上記で得られたコメ試料のゲノム DNA を純水で 10 倍に希釈して PCR の鋳型(template)として用いた . PCR 反応液の組成は , 1 反応あたり , 以下のとおりとした .

PCR buffer	5 μ l	
25mM MgCl ₂	5 μ l	
dNTPs		4 μ l
primer mix	2.5 μ l	
template		5 μ l
Taq DNA polymerase	0.5 μ l	
純水		28 μ l
total		50 μ l

ただし , 鋳型 DNA 溶液以外の試薬は酵素液として , あらかじめ TA が準備してくれたので , 私たちは酵素液と鋳型溶液と純水で反応液を作成した .

また , positive control として , 鋳型 DNA を , コメゲノム DNA 溶液の代わりに , コメ判別キット付属の positive control 用鋳型溶液としたものを , また , negative control として鋳型 DNA 溶液を純水に置き換えたものを用意し , 試料と一緒に PCR を行なった .

PCR の条件は以下の通りとした .

熱変性	94	1 分
アニーリング	62	1 分
DNA 伸長	72	2 分
サイクル数	35 回	

3) 電気泳動による PCR 産物の分離・分析

PCR を終えた反応液に , 電気泳動用色素を 1/10 量加え , 攪拌して , 電気泳動用試料とした . アガロースゲルのウェルに 1 レーンあたり 10 μ l の試料を入れ , 泳動装置にセットして泳動を開始した . 泳動開始後 , 27 分後に泳動を終了した (終了のタイミングは TA に確認してもらった) .

泳動を終えたゲルは 0.1% エチジウムブロマイド溶液で 15 分間染色した後 , ゲル撮影装置にセットして撮影した (染色および撮影の作業は TA に行なってもらった) .

3. 結果

5種類のコメ試料のうち、私が選んだのはBだったが、肉眼による観察では他の試料との違いは分らなかった。ただし、試料Eのコメは他のものより丸みを帯び、色が白っぽく、もち米のように思われた。

コメ判別キットによるPCRの結果は図1のようになった。

<図省略>

レーンは右端から、1. DNA分子マーカー(1 kb DNA ladder) 2. positive control 3. negative control, 4. 試料A, 5. 試料B, 6. 試料D, 7. 試料E, 8. DNA分子マーカー(キット付属マーカー)の順である。

まずDNA分子マーカーのレーンについて見ると、1.のレーンでは全部で14本のDNAバンドが見られた。泳動距離の大きい方から250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 bpとなる。一方、8.のキット付属マーカーのレーンでは4本のバンドが見られ、これらは泳動距離の大きい方から650, 770, 870, 1600 bpである。

次に、positive controlのレーンには2本のバンドが見られた。テキストによれば、positive controlでは880 bpと2700 bpの2種類のDNAが増幅されるはずである。DNA分子マーカーのレーンと比較してみると、ここで見られた2本のバンドは、泳動距離の大きい方は750 bpと1000 bpの間にあり、移動距離の小さな方は3000 bpより少し先まで移動しており、テキストの記述通りの結果となった。一方、negative controlのレーンには何もバンドは見られなかった。

私の試料を流した5番のレーンでは、DNAバンドが1本だけ見られた。分子マーカーと比較すると分子の大きさは770 bpである。

その他の試料のレーンについては、まず試料Aの4番には3本のバンドが見られた。分子マーカーと比較すると、分子の大きさは650, 770, 870 bpである。ただし、650 bpのバンドは非常に薄かった。試料Dの6番では2本のバンドが見られ、分子の大きさは770 bpと1600 bpであった。試料Eの7番では、3本のバンドが見られ、分子の大きさは650, 770, 870 bpであった。

4. 考察

まず、positive controlとnegative controlの結果について考察する。positive control実験では、私たちの抽出したゲノムDNAの代わりにキットに付属する鋳型を用いてPCRを行なうので、PCR実験がうまくいけば必ず結果が出るようになっている。この結果がうまく出なかった場合には、PCRの温度や時間、サイクル数などの条件のどこかに不備があることになる。一方、negative control実験では、鋳型DNAを入れずにPCRを行なっているため、DNAはまったく増えないはずであり、ここで何かのバンドが見られた場合、実験途中で別のDNAが混入したことを疑う必要がある。今回の実験では、どちらも予想通りの結果となり、PCRの条件には問題がなく、また別のDNAの混入もなく、実験結果は信頼できると考えられる。

実験後配付された結果判定資料にしたがって、各コメ試料の品種を推定する。まず、試料Aと試料Eはどちらも650, 770, 870 bpの3本のバンドが見られた。これらはコシヒカリかミヤコガネのどちらかだと推定される。玄米を観察したときに試料Eはもち米だと思われたので、試料Eがミヤコガネ、試料A

がコシヒカリだと考えられる．試料Bは770 bpの1本だけで，これに相当するのはササニシキだけであり，この試料はササニシキだと考えられる．試料Dは770，1600 bpで，あきたこまちだと考えられる．

実験後に明らかにされた各試料の品種は，A；コシヒカリ，B；ササニシキ，C；ひとめぼれ，D；あきたこまち，E；ミヤコガネであった．実験結果はこれらの品種を正しく判別することができたと思われる．

しかし，コシヒカリとミヤコガネについては，PCRの結果だけでは品種の判別はつかなかった．このコメ判別キットは4種類のDNA断片の増幅の有無で品種を判別する．したがって，16種類の品種しか判別できないことになる．そのなかには一つのDNAも増えない場合が含まれているから，実際には15種類の判別しかできないことになる．PCRで増幅する部分をもっと増やせば，判別できる品種は増えるが，日本だけでも2000種類以上の品種があるというから（参考文献1），これらを一度に判別することは困難だと考えられる．授業中の説明では，このコメ判別キットは，じっさいにはコシヒカリ判別キットであるということだった．つまり，市場価格の高いコシヒカリに，他の品種を偽装することを防ぐ（コシヒカリでないことを判別する）のが目的だという．今回，ミヤコガネでコシヒカリと同じ結果が出たが，ミヤコガネはもち米なので偽装は目で見て分かってしまうので問題ないということだろう．

参考文献

- 1．西沢江美子 米をつくる米でつくる．岩波書店 p.19