

## 米粒からの簡易な DNA 抽出と RAPD 法による兵庫県奨励品種の識別

吉田晋弥\* · 李余良\*\* · 玉木克知\* · 塩飽邦子\*

### 要 約

DNA による兵庫県産米の品種判別を行うため、生葉および米粒から抽出した DNA を用いて RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 法による品種間の多型解析を行った。

- 1 生葉から抽出した DNA での RAPD 解析により、「コシヒカリ」や「山田錦」等の兵庫県における水稲主要品種の判別が可能であることが明らかとなった。
- 2 米粒での品種判別を行うために、米粒からの簡易 DNA 抽出法を検討した結果、ペンチで砕いた米粉に直接抽出液を加えることにより容易に DNA が抽出できた。また、抽出時を室温条件で行っても PCR の鑄型とするに十分な量の DNA が得られるが、米粉を含む抽出液を 60°C で 1 時間保温処理するとより効果的であった。
- 3 米粒からの DNA を用いた RAPD 法による多型解析の結果は、生葉から抽出した純度の高い DNA を用いた場合とよく一致し、この方法によっても品種判別が可能であった。

### Rapid DNA Extraction from Rice Grain and Identification of Rice Cultivars Produced in Hyogo Prefecture by the RAPD Method

Shinya YOSHIDA, Yu-Ling Li, Katutomo TAMAKI and Kuniko SHIWAKU

### Summary

DNA polymorphism was analyzed by the RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) method to discriminate rice varieties cultivated in Hyogo prefecture, using DNA extracted from fresh leaves and the grain.

- 1 It became possible to identify the major varieties in Hyogo prefecture by this method, using DNA extracted from fresh leaves.
- 2 Rice grain DNA was rapidly extracted from flour which was made by crushing the grain with a pairs of plier and was directly dipped into the extraction buffer. Although the DNA was sufficiently extracted by the incubation of the extraction buffer containing rice flour at room temperature for three hours, the grain DNA extraction was more efficiently achieved by the incubation at 60°C for one hour.
- 3 RAPD patterns observed in the grain DNA corresponded to those of the DNA extracted from fresh leaves of the same varieties. Therefore, it is considered that the RAPD method using the DNA extracted from the grain is applicable to the discrimination of rice varieties.

キーワード：水稲，DNA，抽出，RAPD，品種判別

### 緒 言

近年の水稲品種の多様化に伴い、栽培および流通段階における的確な品種判別が求められている。特に、兵庫県産の酒米品種「山田錦」は高い評価を得ており、その地位を維持するためにも流通段階での米粒における品種判

別は極めて重要である。

米の品種判別については、従来から粒形の外観の画像解析からの判別法が松永ら<sup>5)</sup>により報告されているが、その判定には、限界があると共に、精米条件等の異なる白米においては、品種を判別することは、極めて困難とされてきた。一方、DNA レベルでの遺伝的多型に基づくイネ品種の判別は、生葉あるいは、核から抽出した DNA を用いた制限酵素断片長多型(RFLP)を中心に研究が進められてきたが<sup>2,9,11)</sup>、本法は、比較的少量の DNA を必要

1999年8月30日受理

\* 中央農業技術センター

現中華人民共和国広東省農業科学院作物研究所

\*\* 中央農業技術センター海外技術研修員(1998.8~1999.3)

とすると共に、多型の検出手順が煩雑なため、米粒への適用は困難であった。しかし、任意の塩基配列を有する合成 DNA をプライマーとした PCR (Polymerase Chain Reaction) による DNA 多型 (Random Amplified Polymorphic DNA, 以下 RAPD) 検出法は、非常に強力な品種同定技術として、各種作物で利用されつつある<sup>10)</sup>。イネ品種においては、外国産米を中心とした研究が進められてきていたが、近年、国内産米の品種間でも RAPD 法により判別可能であることが報告されている<sup>1,4,8)</sup>。

そこで、本報告では、兵庫県における奨励品種の判別を行うために、生葉を用いた RAPD 検出におけるプライマーの選定とそのタイピングを行うと共に、玄米等の米粒からの簡易な DNA 抽出法を検討し、品種判定の可能性を考察した。

なお、本研究の実施に当たっては、中央農業技術センター・農業試験場作物部および酒米試験地より材料等を提供していただき、感謝の意を表する。

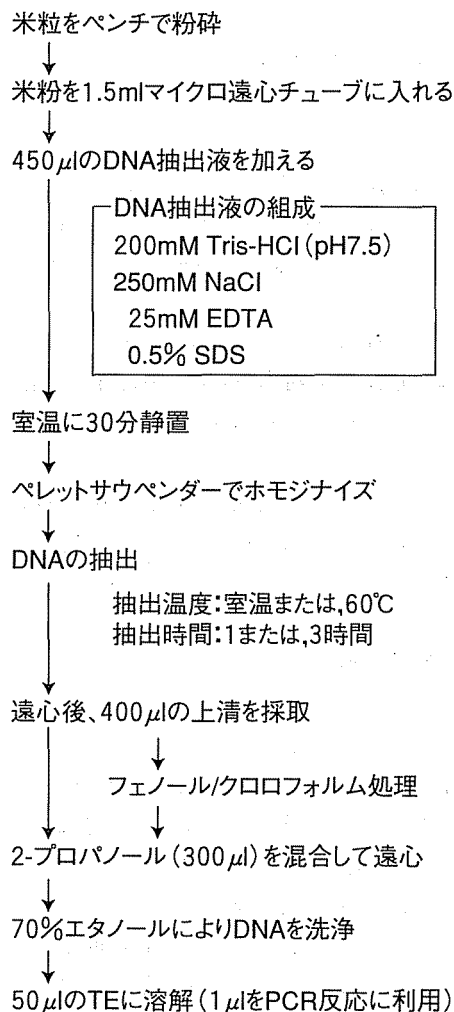


図1 米粒から DNA 抽出手順

## 材料および方法

### 1. イネ生葉からの DNA 抽出

RAPD による多型解析のための材料としては、本県の奨励品種である20品種を供試した。圃場で生育中の個体から8月上旬に採取した各品種の展開直後の生葉 (約5g) を液体窒素中で磨碎し、Murray と Thompson (1980)<sup>7)</sup>の方法により DNA を抽出した。

### 2. 米粒からの DNA 抽出

玄米試料は、当センター農業試験場作物部で栽培された平成10年産の酒米品種を用いた。白米は、試験用精米機 (佐竹製作所) により90, 75及び60%に搗精し、供試試料とした。米粒からの DNA の抽出は、葉組織からの簡易 DNA 単離法<sup>3)</sup>を参考に、図1に示した抽出条件の検討を行った。

### 3. 抽出 DNA 量の測定

米粒から粗抽出された DNA 溶液 (10 $\mu$ l) に RNaseA (1 mg/ml) を 2 $\mu$ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間 RNA を分解した。この DNA 溶液は、TE (10mM Tris, 1 mM EDTA) で 50 $\mu$ l とし、25 $\mu$ l の 20% ポリエチレングリコール6000 溶液を加えて 0 $^{\circ}$ C で 1 時間氷冷後、15,000 rpm で 15 分間の遠心により沈殿した DNA を 50 $\mu$ l の蒸留水に溶解して、260nm の吸収率で定量した。

### 4. PCR による DNA の増幅

生葉あるいは、米粒から抽出した DNA を鋳型とし、Perkin-Elmer 社製 DNA サーマルサイクラー (Gene Amp PCR system 9600) を用いて、PCR を行った。プライマーとしては、大坪ら<sup>8)</sup>、及び Mackill<sup>4)</sup> の報告を基に Operon Technologie 社より市販されているランダムプライマー 20 種類 (OPA-2, 8, OPB-18, OPC-7, 15, OPD-3, 8, 12, OPE-6, OPF-4, OPG-2, 5, 9, OPI-16, OPM-2, 11, OPQ-16, OPS-13, OPT-8, 16) を用いた。反応液には、15mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM KCl 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 25 $\mu$ l の緩衝液中に、10ng 鋳型 DNA, 1 $\mu$ M プライマー, 各 200 $\mu$ M dNTP, および、DNA 合成酵素として 0.5Unit の AmpliTaq Gold<sup>TM</sup> (Perkin Elmer 社製) を加えた。サーマルサイクラーの設定は、95 $^{\circ}$ C (30秒), 40 $^{\circ}$ C (30秒), 72 $^{\circ}$ C (1分30秒) の条件で、45 サイクルとした。

### 5. PCR 増幅 DNA の電気泳動

10 $\mu$ l の PCR 反応液は、0.5 $\times$  TBE (45mM Tris, 45mM ホウ酸, 1 mM EDTA) 緩衝液中の 1.5% アガロースゲルに添加して電気泳動を行った。泳動後の DNA は、臭化エチジウムで染色し、紫外線照射により観察した。

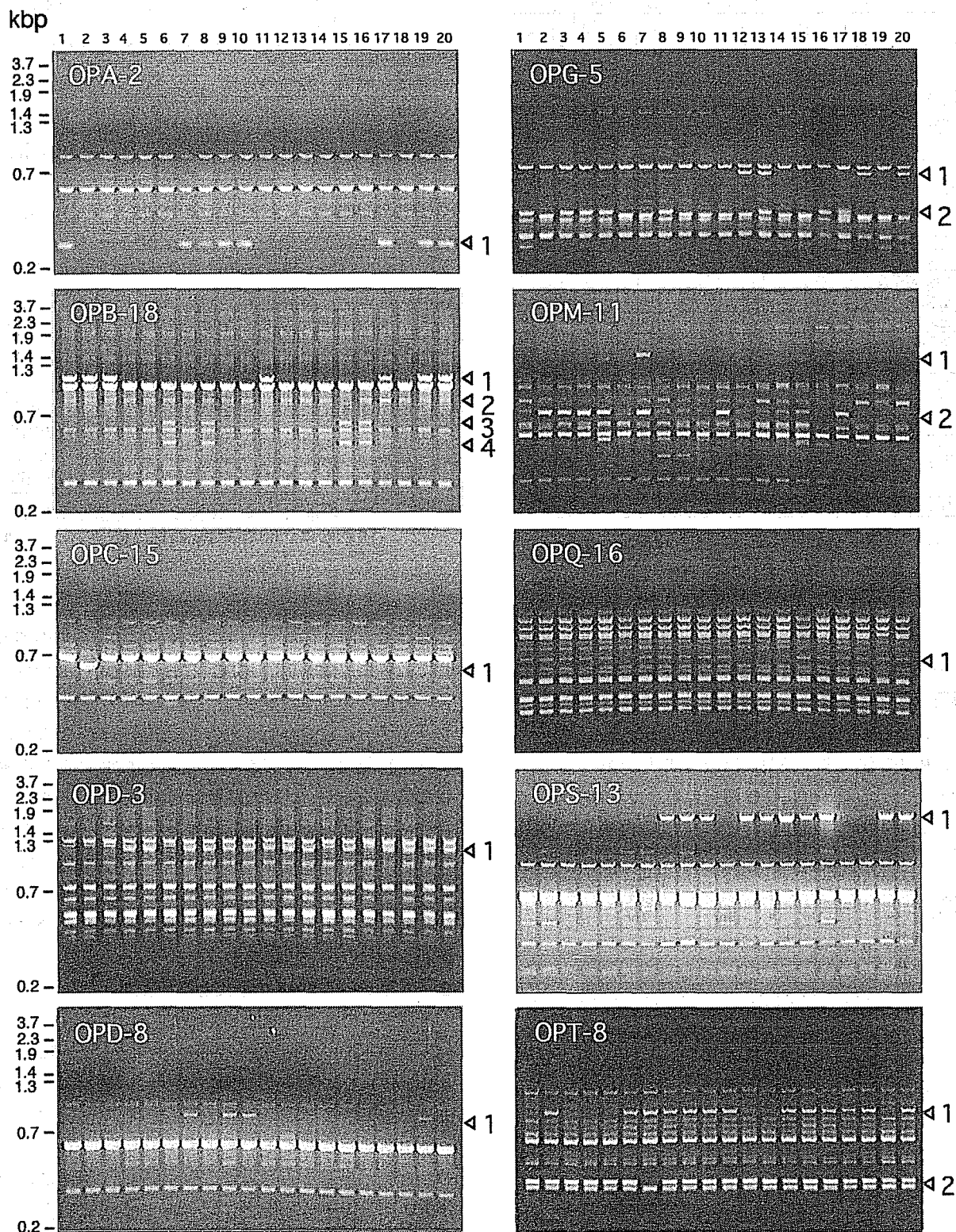


図2 兵庫県における水稻奨励品種 DNA を用いた RAPD の電気泳動パターン

図中の矢印は、品種間で多型を示したバンドをしめす。

各レーン番号の品種名：1はごぜん, 2フクヒカリ, 3コシヒカリ, 4キヌヒカリ, 5どんとこい, 6日本晴, 7あじまる, 8ヤマビコ, 9中生新千本, 10金南風, 11ヒノヒカリ, 12五百万石, 13たかね錦, 14兵庫北錦, 15兵庫夢錦, 16山田錦, 17ハツキネ, ヤマフクモチ, 19しろたえもち, 20はりまもち

品種の種類	品種名	プライマーの種類と大型バンド									
		OPA-1	OPA-18	OPC-15	OPD-3	OPD-8	OPG-5	OPG-11	OPQ-16	OPS-13	OPT-6
普通うるち品種	はつごぜん	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	フクヒカリ	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	コシヒカリ	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	キヌヒカリ	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	どんとこい	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	日本晴	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	あじまる	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	ヤマビコ	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	中生新千本	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	金南風	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
ヒノヒカリ	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
酒米品種	五百万石	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	たかね錦	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	兵庫北錦	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	兵庫夢錦	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
もち品種	山田錦	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	ハツキネ	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	ヤマフクモチ	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	しろたえもち	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
	はりもち	■	■	■	■	■	■	■	■	■	

図3 兵庫県水稲推奨品種におけるRAPDパターン

■はバンド有り、□はバンド無し

1. 生葉からの抽出DNAを用いたRAPD法による兵庫県奨励品種の多型解析

まず、比較的良質なDNAが多量に抽出可能な生葉を用いて、RAPD法による多型検出の可能性について、調査を行った。その結果、RAPD解析に用いたランダムプライマー20種類中10種類のプライマーによるPCR増幅DNA

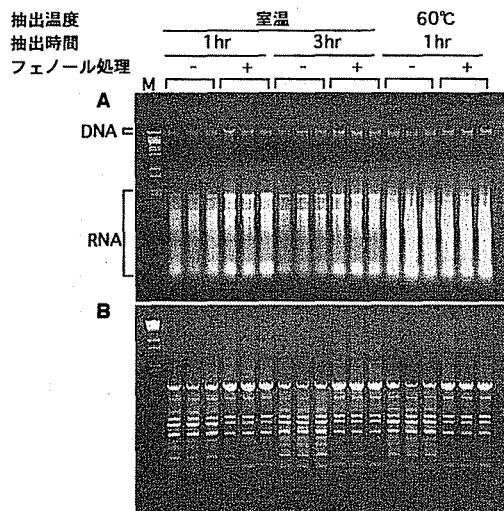


図4 米粒(山田錦玄米)から抽出したDNA(A)とOPB-18プライマーを用いたPCR増幅産物(B)の比較

表1 各種抽出条件における米1粒からのDNA抽出量の比較

抽出温度	抽出時間	フェノール処理の有無	DNA抽出量 (ng)	標準偏差
室温	1時間	-	272	± 97
		+	230	± 20
	3時間	-	546	± 92
		+	436	± 68
60°C	1時間	-	372	± 131
		+	454	± 70

注) DNAの抽出量は、10粒での平均値を示した。

表2 精米程度の異なる米からの抽出DNA量の比較

精米程度	1粒あたりのDNA抽出量 (ng)	標準偏差
玄米	331	± 148
90%	483	± 216
75%	338	± 15
60%	241	± 50

注1) DNAの抽出量は、10粒での平均値を示した。  
 2) 各DNAは、60°Cで1時間抽出後、フェノール処理を行った。

において、図2に示すように比較的明瞭な多型が観察された。特に、OPB-18、OPG-5およびOPT-8では、複数の多型バンドが観察され、品種識別のためのランダムプライマーとして有効であることが判った。図3に示すように10種類のプライマーを用いたPCRにより増幅される明瞭な多型バンドの総数は16種で、これらの多型バンドにより、「キヌヒカリ」と「どんとこい」および「中生新千本」と「金南風」以外のすべての品種の判別が可能であった。図2に示した以外にも、比較的増幅率の低い多型バンドが観察されたが、再現性が低いために品種識別への利用は、困難であった。

2. 米粒からのDNAの抽出と品種識別

米粒からの抽出法では、吸水処理およびホモジナイズの段階が非常に困難であったが、あらかじめ、厚手のアルミホイルに挟み込んだ米粒をペンチで碎き、直接抽出液を加えることにより簡便に処理することができた。

抽出条件については、室温での静置でも可能であったが、60°Cで保温することで、より短時間で効率的な抽出が行えた。表1に示すように、抽出DNA量は、室温1時間抽出で玄米1粒当たり約250ngであるのに対して、60°C処理では、約2倍の500ngであった。また、フェノール/クロロフォルム処理は、抽出DNA量には、影響がなかった。

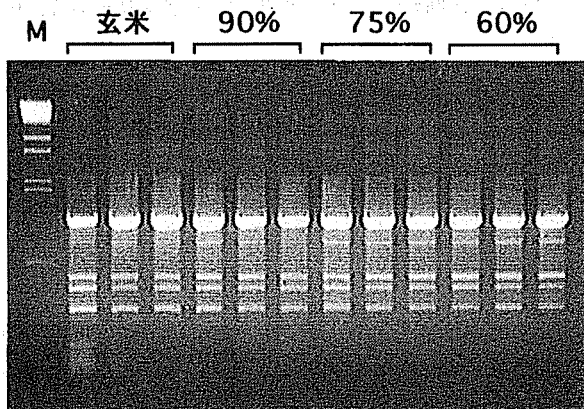


図5 精米程度の異なる米（山田錦）から抽出した DNA を用いた PCR 産物の比較  
プライマーの種類：OPB-18

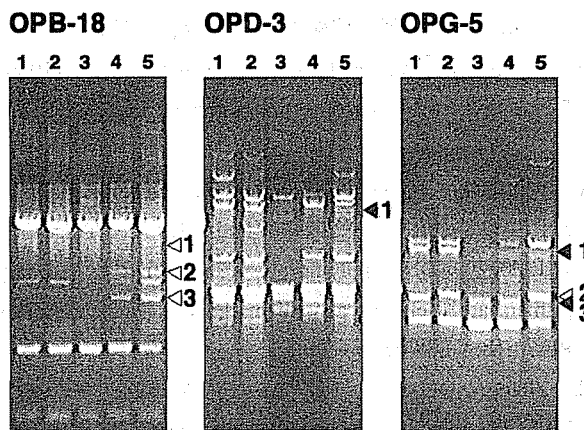


図6 酒米玄米から抽出した DNA を鋳型として OPB-18, OPD-3 および OPG-5 のプライマーを用いた RAPD の電気泳動パターン  
品種名:1;五百万石 2;たかね錦 3;兵庫北錦 4;兵庫夢錦 5;山田錦  
◁: 山田錦で検出される多型バンド  
◀: 山田錦以外の品種で検出される多型バンド

各抽出条件から得た DNA 溶液を用いた PCR 産物を比較した結果、図4に示すように、フェノール/クロロホルム処理を行わない場合、比較的長い DNA 領域の増幅率が低下する傾向を示した。

精米歩合の異なる米からの1粒当たりのDNA抽出量は、表2に示すように、玄米粒と比較して60%精白米粒で低下したが、粒重当たりの抽出量は、向上する傾向を示した。さらに、それぞれの搗精歩合の精米から抽出したDNAを鋳型としたPCR産物を比較した結果、図5に示すように、搗精歩合の高い米から抽出したDNAを用いた方がより明瞭な泳動像が得られた。「山田錦」を他の品種

から判別できる OPB-18, OPD-3 および OPG-5 をプライマーとして、酒米5品種の米粒からの簡易抽出DNAによるRAPD解析を行った結果、図6に示すように、生葉から抽出した高純度DNAにおいて検出された多型バンドと同一のパターンが検出され、品種の判別が可能であった。

### 考 察

兵庫県産米における各品種のRAPD解析による多型バンドは、大坪ら<sup>8)</sup>の報告とほぼ一致する結果を得ることができた。しかし、一部のプライマー(OPM-2およびOPT-16)では、明瞭な多型バンドのパターンを観察することができなかった。これは、PCRにおけるアニーリング温度を大坪ら<sup>8)</sup>の場合36℃としているのに対して、この試験では、パターンにおける不安定な増幅バンドを低減させる目的で、40℃でアニーリングしたことによると思われる。また、今回用いたランダムプライマーによるパターンタイピングでは、「キヌヒカリ」と「どんとこい」および「中生新千本」と「金南風」の判別ができなかった。前者の場合、「どんとこい」の育成において「キヌヒカリ」が交配親とされており、遺伝的に近縁なためと考えられる。平成10年度における兵庫県内の普通うるち米品種では、「コシヒカリ」が12,035haで全水稲作付け面積の28%を、また、醸造用うるち米品種では、「山田錦」が5,022haと全水稲作付け面積の11.7%を占めており、他品種と比較して作付け面積が大きいとともに、高品質米として取引価格が高いことから、これらの品種が他の品種と判別できることの意義は、大きいと考えられる。

近年、現地栽培圃場において、異形株が見られる場合があり、品種の混在によるかどうかを明らかにすることが求められる事例があり、こうした状況でのDNAによる水稲の品種判別に対しては、生葉からの常法によるDNA抽出が可能である。一方、育苗前の種子の検定や流通段階における混米等については、玄米あるいは、搗精後の白米からの簡易なDNA抽出法の確立が必要である。米粒からのDNA抽出に関しては、大坪ら<sup>8)</sup>や荒巻<sup>1)</sup>の報告があるが、前者については、市販キットを用いた比較的少量(約6g)の米粉からの抽出であり、米1粒単位での厳密な判定が行えない。後者については、米1粒からの抽出ではあるが、米粒の粉碎および、抽出操作が煩雑であり、比較的高価な試薬が必要なことから、多点試料の迅速な判別には、改善が求められる。そこで、今回米粒に対して、通常の葉組織からの簡易DNA抽出法を一部改変することによりRAPD解析に十分な量と質のDNAの抽出が

可能となった。特に抽出量については、玄米粒では、荒巻らの方法と比較して、やや抽出量が劣る傾向が見られるが、精白米では、ほぼ同等の値を示し、RAPD法による米粒の品種判別のためのDNA抽出法としては、今回の簡易法が効率的であることが判った。

以上の結果から生葉から抽出したDNAと同様に、米粒においても簡易に抽出したDNAにより品種判別が可能であることが明らかとなったが、よりの確な判別を行うために、今後以下の点に関してさらなる調査が必要と考えられる。まず、今回の調査で判別の困難であった品種間の判別に利用できるランダムプライマーを検索するとともに、RAPDにより検出されたDNA多型をSTS (Sequence Tagged Sites) 化<sup>6)</sup>することで、より再現性の高い多型検出法の確立が必要である。また、地域における特産米を目指して多様な品種が作付けされたり、酒米のように酒造メーカーとの契約栽培において、本県の奨励品種以外の品種が栽培されたりすることがあるので、さらに幅広い品種でのDNA多型のタイピングを確立する必要がある。

#### 引用文献

- (1) 荒巻功・大井信積・樋口恭子・佐無田隆(1998):RAPD法による酒造用原料米の品種判別:(未定稿)
- (2) Ishii, T., T. Terachi, N. Mori and K. Tsunewaki (1993) : Comparative study on the chloroplast, mitochondrial and nuclear genome differentiation in 2 cultivated rice species, *Oryza sativa* and *Oryza glaberrima*, by RFLP analyses : Theor. Appl. Genetics **86**, 88-96
- (3) 川崎努(1997):PCR解析用の簡便なイネゲノムDNAの単離法:細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ 7, 67-68
- (4) Mackill, D. J. (1995) : Plant genetic resources: Classifying *japonica* rice cultivars with RAPD markers : Crop Sci. **35**, 889-894.
- (5) 松永隆司・田村真八郎(1989) コメの産地品種銘柄の判別:食の科学 **131**, 60-71
- (6) Monna, L., A. Miyano and T. Inoue (1994) : Determination of RAPD markers in rice and their conversion into sequence tagged sites (STSS) and STS-specific primers : DNA Res. **1**, 139-148.
- (7) Murray, G. C. and W. F. Thompson (1980) : Rapid isolation of high molecular weight DNA : Nucleic Acids Res. **8**, 4321-4325.
- (8) 大坪研一・藤井剛・橋野陽一・豊島英親・岡留博司・中村澄子・川崎信二(1997):RAPD法を用いた国内産精米の品種判別技術:食科工 **44**, 386-390
- (9) Wang, Z. Y. and S. D. Tanksley : (1989) Restriction fragment length polymorphism in *Oryza sativa* L. : Genome **32**, 1113-1118
- (10) Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey (1990) : DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers : Nucleic Acids Res. **18**, 668-672.
- (11) Zhang, Q. F., M. A. F. Maroof, T. Y. Lu and B. Z. Shen (1992) : Genetic diversity and differentiation of *indica* and *japonica* rice detected by RFLP analysis : Theor. Appl. Genetics **83**, 495-499