

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-55254
(P2012-55254A)

(43) 公開日 平成24年3月22日(2012.3.22)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N	15/00 A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q	1/68 Z N A A	4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2010-202984 (P2010-202984)	(71) 出願人	501203344 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 茨城県つくば市観音台3-1-1
(22) 出願日	平成22年9月10日 (2010.9.10)	(74) 代理人	100089118 弁理士 酒井 宏明
		(72) 発明者	岸根 雅宏 茨城県つくば市観音台2-1-12 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所内
		(72) 発明者	奥西 智哉 茨城県つくば市観音台2-1-12 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所内
		Fターム(参考)	4B024 A A11 CA01 DA01 HA14 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 国産および外国産のイネまたはそれに由来する組織、あるいはそれらの加工品の識別法

(57) 【要約】

【課題】 国産米と外国産米の品種を識別する方法を提供すること。

【解決手段】 国産および外国産のイネまたはそれに由来する組織、あるいはそれらの加工品の識別法であって、被験ゲノムDNAにおいて、m P i n g 挿入部位の遺伝的多型に基づいて、イネまたはそれに由来する組織、あるいはそれらの加工品が国産または外国産であるかを識別することを含み、m P i n g 挿入部位が、第6染色体中に見出される3番目のm P i n g 挿入部位、またはノおよび第12染色体中に見出される1番目のm P i n g 挿入部位である、識別法；イネにおけるm P i n g 挿入部位の有無を検出し得る2以上のプライマーおよびそのセット。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

国産および外国産のイネまたはそれに由来する組織、あるいはそれらの加工品の識別法であって、

被験ゲノムDNAにおいて、m P i n g 挿入部位の遺伝的多型に基づいて、イネまたはそれに由来する組織、あるいはそれらの加工品が国産または外国産であるかを識別することを含み、

m P i n g 挿入部位が、第 6 染色体中に見出される 3 番目の m P i n g 挿入部位、または / および第 1 2 染色体中に見出される 1 番目の m P i n g 挿入部位である、識別法。

【請求項 2】

10

前記 m P i n g 挿入部位の遺伝的多型として、前記 m P i n g 挿入部位が確認された場合に、イネまたはそれに由来する組織、あるいはそれらの加工品が、国産のものであると識別する、請求項 1 記載の識別法。

【請求項 3】

前記 m P i n g 挿入部位の遺伝的多型として、前記 m P i n g 挿入部位が確認されなかった場合に、イネまたはそれに由来する組織、あるいはそれらの加工品が、外国産のものであると識別する、請求項 1 記載の識別法。

【請求項 4】

以下からなる群より選ばれるプライマーの組合せを含む、イネにおける m P i n g 挿入部位の有無を検出し得る 2 以上のプライマー：

20

1 a) 配列番号 1 に示される塩基配列における 1 ~ 2 2 8 5 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第 1 のプライマー、および配列番号 1 に示される塩基配列における 2 7 1 6 ~ 5 0 0 0 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第 2 のプライマーの組合せ；

1 b) 配列番号 1 に示される塩基配列における 1 ~ 2 2 8 5 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第 1 のプライマー、および配列番号 1 に示される塩基配列における 2 7 1 6 ~ 5 0 0 0 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第 2 のプライマーの組合せ；

1 c) 配列番号 1 に示される塩基配列における 1 ~ 2 2 8 5 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第 1 のプライマー、および配列番号 1 に示される塩基配列における 2 2 8 6 ~ 2 7 1 5 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第 2 のプライマーの組合せ；

30

1 d) 配列番号 1 に示される塩基配列における 1 ~ 2 2 8 5 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第 1 のプライマー、および配列番号 1 に示される塩基配列における 2 2 8 6 ~ 2 7 1 5 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第 2 のプライマーの組合せ；

1 e) 配列番号 1 に示される塩基配列における 2 2 8 6 ~ 2 7 1 5 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第 1 のプライマー、および配列番号 1 に示される塩基配列における 2 7 1 6 ~ 5 0 0 0 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第 2 のプライマーの組合せ；

40

1 f) 配列番号 1 に示される塩基配列における 2 2 8 6 ~ 2 7 1 5 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第 1 のプライマー、および配列番号 1 に示される塩基配列における 2 7 1 6 ~ 5 0 0 0 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第 2 のプライマーの組合せ；

2 a) 配列番号 2 に示される塩基配列における 1 ~ 2 2 8 5 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第 1 のプライマー、および配列番号 2 に示される塩基配列における 2 7 1 6 ~ 5 0 0 0 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第 2 のプライマーの組合せ；

2 b) 配列番号 2 に示される塩基配列における 1 ~ 2 2 8 5 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第 1 のプライマー、および

50

配列番号 2 に示される塩基配列における 2716 ~ 5000 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第 2 のプライマーの組合せ；

2 c) 配列番号 2 に示される塩基配列における 1 ~ 2285 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第 1 のプライマー、および配列番号 2 に示される塩基配列における 2286 ~ 2715 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第 2 のプライマーの組合せ；

2 d) 配列番号 2 に示される塩基配列における 1 ~ 2285 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第 1 のプライマー、および配列番号 2 に示される塩基配列における 2286 ~ 2715 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第 2 のプライマーの組合せ；

2 e) 配列番号 2 に示される塩基配列における 2286 ~ 2715 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第 1 のプライマー、および配列番号 2 に示される塩基配列における 2716 ~ 5000 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第 2 のプライマーの組合せ；

2 f) 配列番号 2 に示される塩基配列における 2286 ~ 2715 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第 1 のプライマー、および配列番号 2 に示される塩基配列における 2716 ~ 5000 番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第 2 のプライマーの組合せ。

【請求項 5】

請求項 4 記載の 1 a) ~ 1 f) のいずれか 1 つのプライマーの組合せ、および請求項 4 記載の 2 a) ~ 2 f) のいずれか 1 つのプライマーの組合せを含む、2 以上のプライマーのセット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、国産および外国産のイネまたはそれに由来する組織（例、国産米・外国産米）、あるいはそれらの加工品の識別法などに関する。

【背景技術】

【0002】

2008 年、本来非食用として売却された事故米穀が、食用として転売される「事故米不正転売事件」が発覚した。この事件では、主にミニマムアクセス米として輸入された外国産米が事故米穀として販売されていた。したがって、米を加工原料とする食品関連企業では、品質保証のため、外国産米を簡易に検出する技術を必要としている。また、事件を受けて、米の原産地（国）表示を義務化する米トレーサビリティ制度が導入されることとなり、それを実効力あるものとするためにも国産米・外国産米の識別技術が必要である。

【0003】

従来技術では、RAPD - STS 法（特許文献 1、2）、SNP 法（特許文献 3、4）、SSR 法（特許文献 5 ~ 7）などを利用して米の品種を識別することを目的に技術開発が行われてきた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開 2001 - 095589

【特許文献 2】特開 2005 - 073655

【特許文献 3】特開 2004 - 248635

【特許文献 4】特開 2009 - 219498

【特許文献 5】特開平 10 - 057073

【特許文献 6】特開 2004 - 065251

【特許文献 7】特開 2007 - 037468

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、従来は、あらかじめ基準となる品種群の分析データの蓄積を行い、検査対象の結果をそのデータベースに照合することによって品種が識別されていた。そのため、外国産米を識別するには、基準となる品種を数多く収集・分析することが必要であるが、そもそも外国産米では品種の概念が曖昧な場合も多く、また我が国に輸入される米を網羅することは困難である。さらに、従来技術は分析対象が単一の品種である場合には効果を発揮するが、2品種以上が混在した試料や、わずかに外国産米が混入した試料では、分析結果が複雑になり識別が困難となる。

【0006】

したがって、本発明の目的は、国産米と外国産米の品種を簡便に識別する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、鋭意検討した結果、国産米と外国産米の品種を高度に識別し得る、ゲノム上の2種のヌクレオチド領域(トランスポゾン的一种であるmP i n gの挿入部位)を同定することに成功した。また、かかる領域を同定することにより、国産米と外国産米の品種を識別する方法などを開発することに成功し、本願発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明は、被験ゲノムDNAにおいて、mP i n g挿入部位の遺伝的多型に基づいて、イネまたはそれに由来する組織、あるいはそれらの加工品が国産または外国産であるかを識別する、国産および外国産のイネまたはそれに由来する組織、あるいはそれらの加工品の識別法、ならびにイネにおけるmP i n g挿入部位の有無を検出し得る2以上のプライマーおよびそのセットを提供する。

【発明の効果】

【0009】

本発明では、国産のイネに特異的なmP i n g挿入部位の解析によって、国産品種と外国産品種を大きく大別するための手法を提供する。従来技術のように品種自体を同定するのではないため、品種データの蓄積は必要でない。また、たった2種のDNAマーカーの簡便な分析により、国産品種と外国産品種とを高度に識別できる。さらに、複数品種の混合サンプルの場合にも、外国産米の混入を容易に検出することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、国産のイネに特異的である、第6染色体中に見出される3番目のmP i n g挿入部位(6-3)を検出するためのプライマー対のタイプを示す図である。

【図2】図2は、国産のイネに特異的である、第12染色体中に見出される1番目のmP i n g挿入部位(12-1)を検出するためのプライマー対のタイプを示す図である。

【図3】図3は、国産のイネの一品種である日本晴のmP i n g挿入部位(6-3)周辺(第6染色体:30096255~30101254)の塩基配列(5000bp)を示す図である。ボックス部分は、mP i n g挿入部位(6-3)を示し、下線を付記した部分は、実施例で用いられたプライマーの位置を示す(図4も同様)。なお、染色体上の位置は、MSU Rice Genome Annotation Release 6.1(<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>)に従っている(図4も同様)。

【図4】図4は、国産のイネの一品種である日本晴のmP i n g挿入部位(12-1)周辺(第12染色体:836319~841318)の塩基配列(5000bp)を示す図である。

【図5】図5は、2種のマーカーを用いた日本(16種)、タイ(18種)およびベトナム(13種)のイネの品種の分析結果を示す図である。日本のイネの品種:左から順に(1)日本晴;(2)コシヒカリ;(3)ひとめぼれ;(4)ヒノヒカリ;(5)あきたこ

10

20

30

40

50

まち；(6)はえぬき；(7)キヌヒカリ；(8)きらら397；(9)ななつぼし；(10)つがる口マン；(11)ほしのゆめ；(12)まっしぐら；(13)あさひの夢；(14)あいちのかおり；(15)夢つくし；(16)こしいぶき。タイのイネの品種：左から順に(1')RD6；(2')RD21；(3')Kha o Tah Hang 17；(4')Jek Chuey；(5')Sow Hai；、(6')Kha o Dawk Mali 105；(7')CNT1；(8')RD8；(9')Lenang Pra Tew 123；(10')Chainat 1；(11')Suphanburi 1；(12')Suphanburi 2；(13')名称不明の品種(1)；(14')名称不明の品種(2)；(15')名称不明の品種(3)；(16')名称不明の品種(4)；(17')名称不明の品種(5)；(18')TH。ベトナムのイネの品種：左から順に(1'')P4；(2'')Tam Ap Be；(3'')Bac Huong；(4'')Tam Xoan；(5'')IR64；、(6'')Ai64；(7'')X21；(8'')Q5；(9'')C70；(10'')Khang Dan；(11'')XI23；(12'')108AV；(13'')IR352。1品種の例外(*)を除いて、日本品種では、サイズの大きなDNA(L)の増幅が認められ、タイ・ベトナム品種では、サイズの小さなDNA(S)の増幅が認められる。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明は、国産および外国産のイネまたはそれに由来する組織、あるいはそれらの加工品(以下、必要に応じて、「イネ等」と省略する)の識別法を提供する。

【0012】

一実施形態では、本発明は、国産および外国産のイネの識別法に関する。本発明において、「イネ」とは、成長した植物体および未熟な植物体(例、苗)のみならず、枯れた植物体である稲わらをも意味するものとする。イネとしては、国産のイネおよび外国産のイネが挙げられる。

【0013】

国産のイネは、ジャポニカ種のイネであり得る。このような国産のイネの品種としては、例えば、てんたかく、てんこもり、とがおとめ、にこまる、あいちのかおり、なつしずか、はなの舞い、アケボノ、朝日、吉備の華、ちゅらひかり、農林48号、あきろまん、中生新千本、ハウレイ、広島21号(こいもみじ)、あきたこまち、でわひかり、たかねみのり、めんこいな、淡雪こまち、なすひかり、ゴロピカリ、さわびかり、コシヒカリ、ハナエチゼン、フクヒカリ、イクヒカリ、あきさかり、キヌヒカリ、どんとこい、きぬむすめ、晴るる、せとのにじ、ヒノヒカリ、まいひかり、さきひかり、きらり宮崎、夢しずく、天使の詩、さがびより、たんぼの夢、レイハウ、日本晴、秋の詩、レーク65、ゆめおうみ、吟おうみ、祝、雄山錦、誉富士、ひだほまれ、雄町、八反錦1号、八反(八反35号)、千本錦、こいおまち、秋田酒こまち、とちぎ酒14、舞風、山田錦、兵庫夢錦、兵庫北錦、神の舞、佐香錦、改良雄町、西都の雫、はなかぐら、さかの華、玉栄、吟吹雪、総の舞、とみちから、らいちょうもち、新大正糯、ひみこもち、するがもち、峰の雪もち、たかやまもち、ヤシロモチ、マンゲツモチ、たつこもち、きぬのはだ、モチミノリ、タンチョウモチ、カグラモチ、はりまもち、ヤマフクモチ、ミコトモチ、ミヤタマモチ、ヒヨクモチ、ヒデコモチ、滋賀羽二重糯、ハクトモチ、鈴原糯、ヒメノモチ、ユメヒカリ、おおいた11、ちば28号(ふさこがね)、ふさおとめ、ヤマヒカリ、おまちなね、ヤマハウシ、いわてっこ、どんびしゃり、かけはし、愛のゆめ、松山三井、森のくまさん、くまさんの力、あきまさり、あきげしき、いただき、ゆめひたち、オオセト、さぬきよいまい、あいちのかおりSBL、あさひの夢、大地の風、ミネアサヒ、チヨニシキ、祭り晴、みねはるか、つや姫、はえぬき、里のゆき、秋晴、きらりん、天竜乙女、ナツヒカリ、南国そだち、黄金錦、さわかおり、アキツホ、土佐錦、はなさつま、あきほなみ、彩南月、夢はやと、みえのゆめ、みえのえみ、ひとめぼれ、ササニシキ、まなむすめ、トヨニシキ、たきたて、やまのしずく、ゆきむすび、ななつぼし、きらら397、ほしのゆめ、ふっくりんこ、ゆめぴりか、大地の星、あやひめ、ほしまる、ゆきひかり、ふくみらい、ま

10

20

30

40

50

いひめ、つがるロマン、まっしぐら、むつほまれ、ねばりゆき、どまんなか、アキヒカリ、ミルキークイン、おぼろづき、あきさやか、露葉風、吟ぎんが、ぎんおとめ、ひたち錦、若水、夢山水、出羽燦々、出羽の里、美山錦、ひとごち、金紋錦、しらかば錦、もち美人、カグヤモチ、ココノエモチ、恵糯、喜寿糯、こゆきもち、でわのもち、ユキモチ、アネコモチ、もちひかり、モリモリモチ、さつま雪もち、さとじまん、ミルキープリンセス、萌えみのり、スノーパール、夢つくし、つくしろまん、元気つくし、つやおとめ、夢一献、ハツシモ岐阜SL、ハツシモ、こしいぶき、ゆきん子舞、ゆきの精、越路早生、トドロキワセ、なごりゆき、朝の光、彩のかがやき、彩のほほえみ、彩のみのり、能登ひかり、ほほほの穂、ゆめみづほ、吟の夢、神の穂、蔵の華、吟風、彗星、夢の香、華吹雪、華想い、五百万石、越淡麗、さけ武蔵、石川酒52号、みやこがねもち、はくちょうもち、風の子もち、しろくまもち、式部糯、朝紫、夕やけもち、紫こぼし、わたぼうし、こがねもち、白山もち、新羽二重糯が挙げられる。なお、これらの240品種は、日本の米の流通量の99.4%を占める。国産のイネとしては、上記以外にも、国産のイネに挿入されているm P i n g挿入部位を検出できるものが存在し得る。

【0014】

外国産のイネは、インディカ種のイネであり得る。このような外国産のイネとしては、例えば、東南アジア産のイネが挙げられる。東南アジア産のイネとしては、例えば、タイ産のイネ、およびベトナム産のイネが挙げられる。タイ産のイネの品種としては、例えば、RD6、RD21、Khao Tah Hang 17、Jek Chuey、Sow Hai、Khao Dawk Mali 105、CNT1、RD8、Lenang Pra Tew 123、Chainat 1、Suphanburi 1、Suphanburi 2、THが挙げられる。ベトナム産のイネの品種としては、例えば、P4、Tam Ap Be、Bac Huong、Tam Xoan、IR64、Ai64、X21、Q5、C70、Khang Dan、XI23、108AV、IR352が挙げられる。なお、外国産のイネとしては、上記以外にも、国産のイネに挿入されているm P i n g挿入部位を検出できないものが存在し得る。

【0015】

別の実施形態では、本発明は、国産および外国産のイネに由来する組織の識別法に関する。本発明において、「イネに由来する組織」とは、イネの植物体の一部を意味するものとし、例えば、茎、葉、根部、米（即ち、イネ種子）が挙げられる。米は、玄米または精米のいずれであってもよい。米としてはまた、うるち米、もち米、醸造用米が挙げられる。うるち米、もち米、醸造用米の品種は、表2～4の記載より明らかである。

【0016】

さらに別の実施形態では、本発明は、国産および外国産のイネまたはそれに由来する組織の加工品の識別法に関する。本発明において、イネまたはそれに由来する組織の「加工品」とは、イネまたはそれに由来する組織（例、米）を含む加工物であって、本発明により使用され得るイネDNAを抽出できるものである限り特に限定されない。このような加工品としては、例えば、米の加工品（例、炊飯米、加工米飯、みそ、米菓、米穀粉、包装もち、ビーフン、玄米茶、米粉パン、米粉麺、日本酒、ビール）、稲わらの加工品（例、飼料、敷料、床敷、民芸品）が挙げられる。本方法では、加工品自体が、国産または外国産のイネまたはそれに由来する組織から作成されているか否か、あるいは加工品に含まれる材料または成分が、国産または外国産のイネまたはそれに由来する組織に由来するか否かが識別され得る。

【0017】

本発明の識別法は、被験ゲノムDNAにおいて、国産のイネに特異的なm P i n g挿入部位の遺伝的多型に基づいて、イネまたはそれに由来する組織、あるいはそれらの加工品が国産または外国産であるかを識別することを含む。

【0018】

本発明の識別法で利用される、国産のイネに特異的なm P i n g挿入部位は、国産のイネで高度に保存されている、第6染色体中に見出される3番目のm P i n g挿入部位（6

10

20

30

40

50

- 3)、および第12染色体中に見出される1番目のmP i n g挿入部位(12-1)である。mP i n gは、数あるトランスポゾン的一种であり、国産米の一品種である日本晴のゲノム配列中には、全50箇所のmP i n g挿入部位が見出されている(表1を参照)

【0019】

本発明において、「第6染色体中に見出される3番目のmP i n g挿入部位」とは、日本米の一品種である日本晴を基準とした場合に、第6染色体の5'末端から数えて3番目に見出されるmP i n g挿入部位をいう。より具体的には、日本晴では、第6染色体中に見出される3番目のmP i n g挿入部位は、MSU Rice Genome Annotation Release 6.1(<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>)に従うと、第6染色体の30098540~30098969番目のヌクレオチド残基に対応する。第6染色体中に見出される3番目のmP i n g挿入部位は、表6に記載されるように、236品種の国産米(表2~4に記載される240品種のうち、雄山錦、ひだほまれ、ヒメノモチ、白山もちの4品種を除く)で確認されている。第6染色体中に見出される3番目のmP i n g挿入部位は、本明細書中において、「6-3」(または単に「6」)と略記される場合がある。

10

【0020】

本発明において、「第12染色体中に見出される1番目のmP i n g挿入部位」とは、日本米の一品種である日本晴を基準とした場合に、第12染色体の5'末端から数えて1番目に見出されるmP i n g挿入部位をいう。より具体的には、日本晴では、第12染色体中に見出される1番目のmP i n g挿入部位は、MSU Rice Genome Annotation Release 6.1(<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>)に従うと、第12染色体の838604~839033番目のヌクレオチド残基に対応する。第12染色体中に見出される1番目のmP i n g挿入部位は、表6に記載されるように、231品種の国産米(表2~4に記載される240品種のうち、あきろまん、中生新千本、ヤシロモチ、ハクトモチ、土佐錦、喜寿糯、さつま雪もち、なごりゆき、彗星の9品種を除く)で確認されている。第12染色体中に見出される1番目のmP i n g挿入部位は、本明細書中において、「12-1」(または単に「12」)と略記される場合がある。

20

【0021】

本発明の識別法で利用される、国産のイネに特異的なmP i n g挿入部位は、6-3および12-1のいずれか1つでもよいが、6-3および12-1の2つでもよい。

30

【0022】

本発明の識別法では、上述したmP i n g挿入部位の遺伝的多型として、上述したmP i n g挿入部位が確認された場合に、イネ等が国産のものである(または外国産のものではない)と識別され得る。具体的には、上述したmP i n g挿入部位として、6-3の存在が確認された場合、または12-1の存在が確認された場合に、イネ等が国産のものであると識別してもよいが、好ましくは、6-3および12-1の双方の存在が確認された場合に、イネ等が国産のものであると識別される。

40

【0023】

一方、上述したmP i n g挿入部位の遺伝的多型として、上述したmP i n g挿入部位が確認されなかった場合に、イネまたはそれに由来する組織、あるいはそれらの加工品が、外国産のものである(または国産のものではない)と識別され得る。具体的には、上述したmP i n g挿入部位として、6-3の存在が確認されなかった場合、または12-1の存在が確認されなかった場合に、イネ等が外国産のものであると識別してもよいが、好ましくは、6-3および12-1の双方の存在が確認されなかった場合に、イネ等が外国産のものであると識別される。

【0024】

具体的には、本発明の識別法は、被験ゲノムDNAにおいて、国産のイネに特異的なmP i n g挿入部位の有無を検出することにより、国産および外国産のイネ等を識別するこ

50

とによって達成される。被験ゲノムDNAは、イネ等（例、米）から自体公知の方法によって調製できる。具体的には、国産および外国産のイネ等（例、国産米および外国産米）の識別は、a) イネに由来する組織（例、米）あるいはイネまたはイネに由来する組織の加工品からイネのゲノムDNAを抽出し、次いで、b) DNA解析法により、国産のイネに特異的なmP i n g挿入部位の有無を検出し、次いで、c) 国産のイネに特異的なmP i n g挿入部位の有無に基づいて、イネ等が国産のものであるか、または外国産のものであるかを識別することにより、行われる。識別はまた、標品を併用することにより、被験物および標品との間において、DNA解析法による国産のイネに特異的なmP i n g挿入部位の検出の有無またはノおよび検出プロファイルの概要を比較することにより行なわれてもよい。標品は、任意のイネの品種であり特に限定されないが、例えば、基準品種である日本晴、ならびに被験物と同じ品種であることが疑われる特定の品種が挙げられる。本発明の識別法は、例えば、国産米の検出、外国産米の混入の検出などに有用である。

10

【0025】

本発明の識別法では、イネ等の識別において、遺伝子増幅法（例、PCR、LAMP、ICAN）等のDNA解析法が用いられる。本発明はまた、このような用途に使用できる、国産のイネに特異的なmP i n g挿入部位の有無を検出し得る2以上のプライマーを提供する。なお、本発明において、「2以上のプライマー」とは、特定の1つの領域を検出するための2以上のプライマーの組合せを意味する。アッセイに必要なプライマーの数は、用いられる遺伝子増幅法の種類によっても異なり得るので、プライマー数は適宜調整できる。以下、国産のイネに特異的なmP i n g挿入部位を増幅するための2以上のプライマーの代表例について、詳述する。

20

【0026】

1) 第6染色体中に見出される3番目のmP i n g挿入部位(6-3)

6-3のmP i n g挿入部位は、配列番号1に示される塩基配列(6-3のmP i n g挿入部位周辺の塩基配列)において、2286~2715番目のヌクレオチド残基からなる領域に存在する(図3)。したがって、6-3のmP i n g挿入部位を検出するための2以上のプライマーとして、本領域の上流部位(センス鎖またはアンチセンス鎖)に対応する第1のプライマー、および本領域の下流部位(アンチセンス鎖またはセンス鎖)に対応する第2のプライマーの組合せ(トランスポゾンの有無に応じてサイズの異なる増幅産物を得ることにより、トランスポゾンの有無を検出し得るプライマーの組合せ)、ならび

30

に本領域の上流部位(センス鎖またはアンチセンス鎖)、または本領域の下流部位(アンチセンス鎖またはセンス鎖)に対応する第1のプライマー、および本領域(センス鎖またはアンチセンス鎖)に対応する第2のプライマーの組合せ(増幅の有無によりmP i n g挿入部位の有無を検出し得るプライマーの組合せ)を用いることができる。このような2以上のプライマーとしては、例えば、以下が挙げられる(例、図1を参照)：

1a) 配列番号1に示される塩基配列における1~2285番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第1のプライマー、および配列番号1に示される塩基配列における2716~5000番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第2のプライマーの組合せ；

40

1b) 配列番号1に示される塩基配列における1~2285番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第1のプライマー、および配列番号1に示される塩基配列における2716~5000番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第2のプライマーの組合せ；

1c) 配列番号1に示される塩基配列における1~2285番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第1のプライマー、および配列番号1に示される塩基配列における2286~2715番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第2のプライマーの組合せ；

50

一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第2のプライマーの組合せ；

1 e) 配列番号1に示される塩基配列における2286～2715番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第1のプライマー、および配列番号1に示される塩基配列における2716～5000番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第2のプライマーの組合せ；

1 f) 配列番号1に示される塩基配列における2286～2715番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第1のプライマー、および配列番号1に示される塩基配列における2716～5000番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第2のプライマーの組合せ。

【0027】

2) 第12染色体中に見出される1番目のm P i n g 挿入部位(12-1)

12-1のm P i n g 挿入部位は、配列番号2に示される塩基配列(12-1のm P i n g 挿入部位周辺の塩基配列)において、2286～2715番目のヌクレオチド残基からなる領域に存在する(図4)。したがって、12-1のm P i n g 挿入部位を検出するための2以上のプライマーとして、本領域の上流部位(センス鎖またはアンチセンス鎖)に対応する第1のプライマー、および本領域の下流部位(アンチセンス鎖またはセンス鎖)に対応する第2のプライマーの組合せ(トランスポゾンの有無に応じてサイズの異なる増幅産物を得ることにより、トランスポゾンの有無を検出し得るプライマーの組合せ)、ならびに本領域の上流部位(センス鎖またはアンチセンス鎖)、または本領域の下流部位(アンチセンス鎖またはセンス鎖)に対応する第1のプライマー、および本領域(センス鎖またはアンチセンス鎖)に対応する第2のプライマーの組合せ(増幅の有無によりm P i n g 挿入部位の有無を検出し得るプライマーの組合せ)を用いることができる。このような2以上のプライマーとしては、例えば、以下が挙げられる(例、図2を参照)：

2 a) 配列番号2に示される塩基配列における1～2285番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第1のプライマー、および配列番号2に示される塩基配列における2716～5000番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第2のプライマーの組合せ；

2 b) 配列番号2に示される塩基配列における1～2285番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第1のプライマー、および配列番号2に示される塩基配列における2716～5000番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第2のプライマーの組合せ；

2 c) 配列番号2に示される塩基配列における1～2285番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第1のプライマー、および配列番号2に示される塩基配列における2286～2715番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第2のプライマーの組合せ；

2 d) 配列番号2に示される塩基配列における1～2285番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第1のプライマー、および配列番号2に示される塩基配列における2286～2715番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第2のプライマーの組合せ；

2 e) 配列番号2に示される塩基配列における2286～2715番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第1のプライマー、および配列番号2に示される塩基配列における2716～5000番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第2のプライマーの組合せ；

2 f) 配列番号2に示される塩基配列における2286～2715番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列の相補配列を有する第1のプライマー、および配列番号2に示される塩基配列における2716～5000番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列またはその均等な塩基配列を有する第2のプライマーの組合せ。

【0028】

上述した「均等な塩基配列」は、イネの品種間における塩基配列のバリエーションに対応する塩基配列であり得る。したがって、所定の塩基配列(例、配列番号Xに示される塩

10

20

30

40

50

基配列においてY～Z番目の塩基配列の少なくとも一部の塩基配列)に均等な塩基配列は、所定の塩基配列において数個(例えば1～10個、好ましくは1～5個、より好ましくは1、2または3個)の塩基の修飾(例、置換、欠失、挿入、付加)を含む塩基配列であり得る。このような均等な塩基配列は、当該技術分野における当業者にとって明らかであり、イネの品種の遺伝子情報を登録しているデータベースを参照することにより、あるいはイネの品種における上記6-3および12-1の領域周辺の塩基配列を解読することにより、決定できる。

【0029】

プライマーを構成するヌクレオチド残基(標的部位にアニーリングする相補部分のヌクレオチド残基)の数は、プライマーが標的部位にアニーリングして、目的産物を特異的に増幅できる限り特に限定されず、例えば、15個以上、16個以上、17個以上、18個以上、または20個以上であってもよい。また、プライマーを構成するヌクレオチド残基の数は、例えば、50個以下、40個以下、または30個以下であってもよい。

10

【0030】

プライマーは、増幅産物の検出のため、蛍光物質で標識されていてもよい。このような蛍光物質としては、例えば、6-FAM、VIC、NED、PETが挙げられる。

【0031】

増幅産物のサイズは、測定機器において、測定対象であるmPing挿入部位を検出できるようなサイズである限り特に限定されない。例えば、増幅産物の下限サイズ(例、mPing挿入部位を検出可能な増幅産物のサイズの下限值)は、例えば、50bp以上、100bp以上、150bp以上、200bp以上であってもよい。増幅産物の上限サイズ(例、mPing挿入部位を検出可能な増幅産物のサイズの上限值)は、特に限定されないが、アッセイの簡便化等(例、PCR等による増幅時間の短縮、ゲル電気泳動時間の短縮)の観点から、例えば、5000bp以下、4500bp以下、4000bp以下、3500bp以下、3000bp以下、2500bp以下、2000bp以下、1500bp以下、1000bp以下、900bp以下、800bp以下、700bp、600bp以下、500bp以下であってもよい。したがって、2以上のプライマーは、このような長さの増幅産物が増幅されるように、このような長さで離れている2つの領域に対して設計されてもよい。

20

【0032】

上述したように、本発明の識別法は、イネ等の識別において、遺伝子増幅法等のDNA解析法を利用することにより達成できるが、本発明はまた、このような用途に使用できる、上記1a)～1f)のいずれか1つのプライマーの組合せ、および上記の2a)～2f)のいずれか1つのプライマーの組合せを含む、2以上のプライマーのセット(例、4以上のプライマーの組合せ)を提供する。本発明の知見なしに、上述した2以上のプライマーを2つ組み合わせる動機付けは、従来存在しない。本発明の試薬に含まれる2以上のプライマーは、異なる蛍光色を発する別々の蛍光物質により標識されたものであってもよい。

30

【0033】

以下に、本発明を詳細に説明するが、本実施例により本発明が限定されるものではない。

40

【実施例】

【0034】

実施例1：米を用いた国産米のゲノムDNAにおけるトランスポゾンmPingの解析
mPingは、MITE(miniature inverted repeat transposable element)と呼ばれるクラスのトランスポゾンの1種であり、MITEとして初めてイネにおいて転移活性を有していることが報告された。mPingは、日本晴とコシヒカリといった近代に育種された品種間でも挿入多型が存在することが報告されていることから、mPingの挿入多型が近縁な国産米の品種間の識別に利用可能であると推測された。そこで、国産米の一品種である日本晴における全50箇所のmPing挿入部位が、他の国産米(全240品種：表2～4を参照)でも保存されて

50

いるか否かについて網羅的に検討した。なお、表2～4に記載される240品種の国産米は全てジャポニカ種であり、これらの240品種は、日本の米の流通量の99.4%を占める。

【0035】

【表1】

表1. 日本晴におけるmP i n g挿入部位

番号	染色体	染色体上の位置*
1-1	第1染色体	17512788～17513217
1-2		23331503～23331932
1-3		24778727～24779156
1-4		25260068～25260497
1-5		29930472～29930901
2-1	第2染色体	214437～214866
2-2		617949～618378
2-3		13161934～13162363
2-4		18528918～18529347
2-5		22543246～22543675
2-6		28002472～28002901
2-7		29238458～29238887
3-1	第3染色体	5503299～5503728
3-2		6512589～6513018
3-3		9239010～9239439
3-4		9426056～9426485
3-5		9567606～9568035
3-6		12734474～12734903
3-7		17574499～17574928
3-8		21025082～21025511
3-9		21358630～21359059
3-10		34585415～34585844
4-1	第4染色体	18849101～18849530
4-2		32836755～32837184
4-3		34117741～34118170
4-4		34503196～34503625
4-5		35236685～35237114
5-1	第5染色体	18684981～18685410
5-2		19266102～19266531
5-3		22173035～22173464
6-1	第6染色体	13736619～13737048
6-2		18135425～18135854
6-3		30098540～30098969

番号	染色体	染色体上の位置*
7-1	第7染色体	4559976～4560405
8-1	第8染色体	1018674～1019103
8-2		4711973～4712402
8-3		16680874～16681303
8-4		20439703～20440132
8-5		20671524～20671953
8-6		28183527～28183956
9-1	第9染色体	693483～693912
9-2		16697140～16697569
10-1	第10染色体	21644867～21645295
11-1	第11染色体	392600～393029
11-2		22733976～22734405
12-1	第12染色体	838604～839033
12-2		1044463～1044892
12-3		2733543～2733972
12-4		3284790～3285219
12-5		9948516～9948945

10

20

30

*染色体上の位置は、MSU Rice Genome Annotation Release 6.1 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) に従っている。

40

【0036】

【表 2】

表 2. 国産米の分析品種 (その 1)

番号	種別	登録品種名
1	うるち	てんたかく
2	うるち	てんこもり
3	うるち	とがおとめ
4	うるち	にこまる
5	うるち	あいちのかおり
6	うるち	なつしずか
7	うるち	はなの舞い
8	うるち	アケボノ
9	うるち	朝日
10	うるち	吉備の華
11	うるち	ちゅらひかり
12	うるち	農林48号
13	うるち	あきろまん
14	うるち	中生新千本
15	うるち	ハウレイ
16	うるち	広島21号
17	うるち	あきたこまち
18	うるち	でわひかり
19	うるち	たかねみのり
20	うるち	めんこいな
21	うるち	淡雪こまち
22	うるち	なすひかり
23	うるち	ゴロピカリ
24	うるち	さわびかり
25	うるち	コシヒカリ
26	うるち	ハナエチゼン
27	うるち	フクヒカリ
28	うるち	イクヒカリ
29	うるち	あきさかり
30	うるち	キヌヒカリ
31	うるち	どんとこい
32	うるち	きぬむすめ
33	うるち	晴るる
34	うるち	せとのにじ
35	うるち	ヒノヒカリ
36	うるち	まいひかり
37	うるち	さきひかり
38	うるち	きらり宮崎
39	うるち	夢しずく
40	うるち	天使の詩

番号	種別	登録品種名
41	うるち	さがびより
42	うるち	たんぼの夢
43	うるち	レイホウ
44	うるち	日本晴
45	うるち	秋の詩
46	うるち	レーク65
47	うるち	ゆめおうみ
48	うるち	吟おうみ
49	醸造用	祝
50	醸造用	雄山錦
51	醸造用	誉富士
52	醸造用	ひだほまれ
53	醸造用	雄町
54	醸造用	八反錦1号
55	醸造用	八反
56	醸造用	千本錦
57	醸造用	こいおまち
58	醸造用	秋田酒こまち
59	醸造用	とちぎ酒14
60	醸造用	舞風
61	醸造用	山田錦
62	醸造用	兵庫夢錦
63	醸造用	兵庫北錦
64	醸造用	神の舞
65	醸造用	佐香錦
66	醸造用	改良雄町
67	醸造用	西都の雫
68	醸造用	はなかがら
69	醸造用	さかの華
70	醸造用	玉栄
71	醸造用	吟吹雪
72	醸造用	総の舞
73	もち	とみちから
74	もち	らいちょうもち
75	もち	新大正糯
76	もち	ひみこもち
77	もち	するがもち
78	もち	峰の雪もち
79	もち	たかやまもち
80	もち	ヤシロモチ

10

20

30

40

【 0 0 3 7 】

【表 3】

表 3. 国産米の分析品種 (その 2)

番号	種別	登録品種名
8 1	もち	マンゲツモチ
8 2	もち	たつこもち
8 3	もち	きぬのはだ
8 4	もち	モチミノリ
8 5	もち	タンチョウモチ
8 6	もち	カグラモチ
8 7	もち	はりまもち
8 8	もち	ヤマフクモチ
8 9	もち	ミコトモチ
9 0	もち	ミヤタマモチ
9 1	もち	ヒヨクモチ
9 2	もち	ヒデコモチ
9 3	もち	滋賀羽二重糯
9 4	もち	ハクトモチ
9 5	もち	鈴原糯
9 6	もち	ヒメノモチ
9 7	うるち	ユメヒカリ
9 8	うるち	おおいた11
9 9	うるち	ちば28号
1 0 0	うるち	ふさおとめ
1 0 1	うるち	ヤマヒカリ
1 0 2	うるち	おまちかね
1 0 3	うるち	ヤマホウシ
1 0 4	うるち	いわてっこ
1 0 5	うるち	どんびしゃり
1 0 6	うるち	かけはし
1 0 7	うるち	愛のゆめ
1 0 8	うるち	松山三井
1 0 9	うるち	森のくまさん
1 1 0	うるち	くまさんの力
1 1 1	うるち	あきまさり
1 1 2	うるち	あきげしき
1 1 3	うるち	いただき
1 1 4	うるち	ゆめひたち
1 1 5	うるち	オオセト
1 1 6	うるち	さぬきよいまい
1 1 7	うるち	あいちのかおりSB
1 1 8	うるち	あさひの夢
1 1 9	うるち	大地の風
1 2 0	うるち	ミネアサヒ

番号	種別	登録品種名
1 2 1	うるち	チヨニシキ
1 2 2	うるち	祭り晴
1 2 3	うるち	みねはるか
1 2 4	うるち	つや姫
1 2 5	うるち	はえぬき
1 2 6	うるち	里のゆき
1 2 7	うるち	秋晴
1 2 8	うるち	きらりん
1 2 9	うるち	天竜乙女
1 3 0	うるち	ナツヒカリ
1 3 1	うるち	南国そだち
1 3 2	うるち	黄金錦
1 3 3	うるち	さわかおり
1 3 4	うるち	アキツホ
1 3 5	うるち	土佐錦
1 3 6	うるち	はなさつま
1 3 7	うるち	あきほなみ
1 3 8	うるち	彩南月
1 3 9	うるち	夢はやと
1 4 0	うるち	みえのゆめ
1 4 1	うるち	みえのえみ
1 4 2	うるち	ひとめぼれ
1 4 3	うるち	ササニシキ
1 4 4	うるち	まなむすめ
1 4 5	うるち	トヨニシキ
1 4 6	うるち	たきたて
1 4 7	うるち	やまのしずく
1 4 8	うるち	ゆきむすび
1 4 9	うるち	ななつぼし
1 5 0	うるち	きらら397
1 5 1	うるち	ほしのゆめ
1 5 2	うるち	ふっくりんこ
1 5 3	うるち	ゆめぴりか
1 5 4	うるち	大地の星
1 5 5	うるち	あやひめ
1 5 6	うるち	ほしまる
1 5 7	うるち	ゆきひかり
1 5 8	うるち	ふくみらい
1 5 9	うるち	まいひめ
1 6 0	うるち	つがるロマン

10

20

30

40

【 0 0 3 8 】

【表 4】

表 4. 国産米の分析品種 (その 3)

番号	種別	登録品種名
161	うるち	まっしぐら
162	うるち	むつほまれ
163	うるち	ねばりゆき
164	うるち	どまんなか
165	うるち	アキヒカリ
166	うるち	ミルキークイーン
167	うるち	おぼろづき
168	うるち	あきさやか
169	醸造用	露葉風
170	醸造用	吟ぎんが
171	醸造用	ぎんおとめ
172	醸造用	ひたち錦
173	醸造用	若水
174	醸造用	夢山水
175	醸造用	出羽燦々
176	醸造用	出羽の里
177	醸造用	美山錦
178	醸造用	ひとごこち
179	醸造用	金紋錦
180	醸造用	しらかば錦
181	もち	もち美人
182	もち	カグヤモチ
183	もち	ココノエモチ
184	もち	恵糯
185	もち	喜寿糯
186	もち	こゆきもち
187	もち	でわのもち
188	もち	ユキミモチ
189	もち	アネコモチ
190	もち	もちひかり
191	もち	モリモリモチ
192	もち	さつま雪もち
193	うるち	さとじまん
194	うるち	ミルキープリンセ
195	うるち	萌えみのり
196	うるち	スノーパール
197	うるち	夢つくし
198	うるち	つくしろまん
199	うるち	元気つくし
200	うるち	つやおとめ

番号	種別	登録品種名
201	うるち	夢一献
202	うるち	ハツシモ岐阜SL
203	うるち	ハツシモ
204	うるち	こしいぶき
205	うるち	ゆきん子舞
206	うるち	ゆきの精
207	うるち	越路早生
208	うるち	トドロキワセ
209	うるち	なごりゆき
210	うるち	朝の光
211	うるち	彩のかがやき
212	うるち	彩のほほえみ
213	うるち	彩のみのり
214	うるち	能登ひかり
215	うるち	ほほほの穂
216	うるち	ゆめみづほ
217	醸造用	吟の夢
218	醸造用	神の穂
219	醸造用	蔵の華
220	醸造用	吟風
221	醸造用	彗星
222	醸造用	夢の香
223	醸造用	華吹雪
224	醸造用	華想い
225	醸造用	五百万石
226	醸造用	越淡麗
227	醸造用	さけ武蔵
228	醸造用	石川酒52号
229	もち	みやこがねもち
230	もち	はくちょうもち
231	もち	風の子もち
232	もち	しろくまもち
233	もち	式部糯
234	もち	朝紫
230	もち	夕やけもち
236	もち	紫こぼし
237	もち	わたぼうし
238	もち	こがねもち
239	もち	白山もち
240	もち	新羽二重糯

10

20

30

40

【0039】

具体的には、国産米におけるm P i n g挿入部位の保存性の解析は、日本晴におけるm P i n g挿入部位の上流部位および下流部位に対するプライマー対を設計し、このプライマー対を用いて定法によりPCRを行い、得られた増幅産物のサイズに基づいて行った。PCRにおけるテンプレートとしては、米から定法により抽出したゲノムDNAを用いた。得られた増幅産物のサイズが大きい場合(L)は、解析領域内にm P i n g挿入部位が存在することを示す。一方、得られた増幅産物のサイズが小さい場合(S)は、解析領域内にm P i n g挿入部位が存在しないことを示す。結果を、以下の表5に示す。

【0040】

50

【表 5】

表 5. 国産米の品種の遺伝的多型

番号	国産米の 240 品種	
	L	S
1-1	88/240	151/240
1-2	70/240	170/240
1-3	103/240	136/240
1-4	105/240	134/240
1-5	126/240	112/240
2-1	83/240	156/240
2-2	102/240	136/240
2-3	169/240	71/240
2-4	156/240	84/240
2-5	21/240	218/240
2-6	106/240	133/240
2-7	111/240	129/240
3-1	146/240	94/240
3-2	139/240	101/240
3-3	208/240	32/240
3-4	204/240	36/240
3-5	203/240	37/240
3-6	92/240	147/240
3-7	75/240	165/240
3-8	80/240	160/240
3-9	74/240	166/240
3-10	169/240	70/240
4-1	35/240	204/240
4-2	101/240	137/240
4-3	98/240	141/240
4-4	97/240	142/240
4-5	89/240	150/240
5-1	118/240	121/240
5-2	114/240	126/240
5-3	205/240	34/240
6-1	129/240	111/240
6-2	79/240	159/240
6-3	236/240	4/240

番号	国産米の 240 品種	
	L	S
7-1	108/240	132/240
8-1	125/240	114/240
8-2	131/240	108/240
8-3	98/240	142/240
8-4	39/240	201/240
8-5	68/240	168/240
8-6	172/240	68/240
9-1	8/240	232/240
9-2	106/240	134/240
10-1	17/240	223/240
11-1	132/240	108/240
11-2	61/240	179/240
12-1	231/240	9/240
12-2	171/240	66/240
12-3	122/240	117/240
12-4	193/240	46/240
12-5	50/240	177/240

10

20

30

注) 240 品種の国産米を用いているものの、LおよびSの合計が240にならない場合がある。これは、増幅が確認されないもの、および品種内で多型を示すもの（LおよびSの双方の増幅を示すもの）があるためである。

【0041】

40

その結果、国産米の品種の識別のためのDNAマーカーとしてmP i n g挿入部位が使用できるかどうかを調べるという当初の目的とは異なっていたが、6-3および12-1のmP i n g挿入部位が、他のmP i n g挿入部位に比し、国産米の品種間で極めて高度に保存されていることが見出された（表5、および図5における「日本」のレーンを参照）。6-3および12-1のmP i n g挿入部位について、国産米の240品種の分析結果の詳細を、表6に示す。また、6-3および12-1のmP i n g挿入部位の有無の確認のために用いたプライマー対の詳細を、以下の表7に示す。

【0042】

【表 6】

表 6. 2種のマーカー (6-3、12-1) を用いた日本稲 240 品種の分析結果の詳細

	6	12		6	12		6	12		6	12
てんたかく	L	L	山田錦	L	L	チヨニシキ	L	L	もち美人	L	L
てんこもり	L	L	兵庫夢錦	L	L	祭り晴	L	L	カグヤモチ	L	L
とがおとめ	L	L	兵庫北錦	L	L	みねはるか	L	L	ココノエモチ	L	L
にこまる	L	L	神の舞	L	L	つや姫	L	L	恵糯	L	L
あいちのかおり	L	L	佐香錦	L	L	はえぬき	L	L	喜寿糯	L	S
なつしずか	L	L	改良雄町	L	L	里のゆき	L	L	こゆきもち	L	L
はなの舞い	L	L	西都の雫	L	L	秋晴	L	L	でわのもち	L	L
アケボノ	L	L	はなかくら	L	L	ざらりん	L	L	ユキミモチ	L	L
朝日	L	L	さかの華	L	L	天竜乙女	L	L	アネコモチ	L	L
吉備の華	L	L	玉栄	L	L	ナツヒカリ	L	L	もちひかり	L	L
ちゅうひかり	L	L	吟吹雪	L	L	南国そだち	L	L	モリモリモチ	L	L
農林48号	L	L	総の舞	L	L	黄金錦	L	L	さつま雪もち	L	S
あきろまん	L	S	とみちから	L	L	さわかおり	L	L	さとじまん	L	L
中生新千本	L	S	らいちょうもち	L	L	アキツホ	L	L	ミルキープリンセス	L	L
ハウレイ	L	L	新大正糯	L	L	土佐錦	L	S	萌えみのり	L	L
広島21号 (こいもみじ)	L	L	ひみこもち	L	L	はなざつま	L	L	スノーパール	L	L
あきたこまち	L	L	するがもち	L	L	あきほなみ	L	L	夢つくし	L	L
でわひかり	L	L	峰の雪もち	L	L	彩南月	L	L	つくしろまん	L	L
たかねみのり	L	L	たかやまもち	L	L	夢はやと	L	L	元気つくし	L	L
めんこいな	L	L	ヤシロモチ	L	S	みえのゆめ	L	L	つやおとめ	L	L
淡雪こまち	L	L	マンゲツモチ	L	L	みえのえみ	L	L	夢一献	L	L
なすひかり	L	L	たつこもち	L	L	ひとめぼれ	L	L	ハツシモ岐阜SL	L	L
ゴロビカリ	L	L	きぬのはだ	L	L	ササニシキ	L	L	ハツシモ	L	L
さわびかり	L	L	モチミノリ	L	L	まなむすめ	L	L	こしいぶき	L	L
コシヒカリ	L	L	タンチョウモチ	L	L	トヨニシキ	L	L	ゆきん子舞	L	L
ハナエチゼン	L	L	カグラモチ	L	L	たきたて	L	L	ゆきの精	L	L
フクヒカリ	L	L	はりまもち	L	L	やまのしずく	L	L	越路早生	L	L
イクヒカリ	L	L	ヤマフクモチ	L	L	ゆきむすび	L	L	トドロキワセ	L	L
あきさかり	L	L	ミコトモチ	L	L	ななつぼし	L	L	なごりゆき	L	S
キヌヒカリ	L	L	ミヤタマモチ	L	L	きらら397	L	L	朝の光	L	L
どんとこい	L	L	ヒヨクモチ	L	L	ほしのゆめ	L	L	彩のかがやき	L	L
きぬむすめ	L	L	ヒデコモチ	L	L	ふっくりんこ	L	L	彩のほほえみ	L	L
晴るる	L	L	滋賀羽二重糯	L	L	ゆめびりか	L	L	彩のみりのり	L	L
せとのにじ	L	L	ハクトモチ	L	S	大地の星	L	L	能登ひかり	L	L
ヒノヒカリ	L	L	鈴原糯	L	L	あやひめ	L	L	ほほほの穂	L	L
まいひかり	L	L	ヒメノモチ	S	L	ほしまる	L	L	ゆめみづほ	L	L
さきひかり	L	L	ユメヒカリ	L	L	ゆきひかり	L	L	吟の夢	L	L
きらり宮崎	L	L	おおいた11	L	L	ふくみらい	L	L	神の穂	L	L
夢しずく	L	L	ちば28号 (ふさこがね)	L	L	まいひめ	L	L	蔵の華	L	L
天使の詩	L	L	ふさおとめ	L	L	つがる口マン	L	L	吟風	L	L
さがびより	L	L	ヤマヒカリ	L	L	まっしぐら	L	L	彗星	L	S
たんぼの夢	L	L	おまかかね	L	L	むつほまれ	L	L	夢の香	L	L
レイホウ	L	L	ヤマホウシ	L	L	ねばりゆき	L	L	華吹雪	L	L
日本晴	L	L	いわてっこ	L	L	どまんなか	L	L	華想い	L	L
秋の詩	L	L	どんびしゃり	L	L	アキヒカリ	L	L	五百万石	L	L
レーク65	L	L	かけはし	L	L	ミルキークイーン	L	L	越淡麗	L	L
ゆめおうみ	L	L	愛のゆめ	L	L	おぼろづき	L	L	さけ武蔵	L	L
吟おうみ	L	L	松山三井	L	L	あきさやか	L	L	石川酒52号	L	L
祝	L	L	森のくまさん	L	L	露葉風	L	L	みやこがねもち	L	L
雄山錦	S	L	くまさんの力	L	L	吟ぎんが	L	L	はくちようもち	L	L
養富士	L	L	あきまさり	L	L	ぎんおとめ	L	L	風の子もち	L	L
ひだほまれ	S	L	あきげしき	L	L	ひたち錦	L	L	しろくまもち	L	L
雄町	L	L	いただき	L	L	若水	L	L	式部糯	L	L
八反錦1号	L	L	ゆめひたち	L	L	夢山水	L	L	朝葉	L	L
八反 (八反35号?)	L	L	オオセト	L	L	出羽燦々	L	L	夕やけもち	L	L
千本錦	L	L	さぬきよいまい	L	L	出羽の里	L	L	紫こぼし	L	L
こいおまち	L	L	あいちのかおりSBL	L	L	美山錦	L	L	わたぼうし	L	L
秋田酒こまち	L	L	あさひの夢	L	L	ひとごち	L	L	こがねもち	L	L
とちぎ酒14	L	L	大地の風	L	L	金紋錦	L	L	白山もち	S	L
舞風	L	L	ミネアサヒ	L	L	しらかば錦	L	L	新羽二重糯	L	L

注) 「6」は、「6-3」を示す。「12」は、「12-1」を示す。「L」は、大きなサイズの増幅産物が得られたこと (すなわち、m P i n g 挿入部位が存在すること) を示す。「S」は、小さなサイズの増幅産物が得られたこと (即ち、m P i n g 挿入部位が存在しないこと) を示す。

10

20

30

40

【表 7】

表 7. プライマー配列

領域	プライマー	増幅長(bp)*
6-3	Forward: GCTGTGCGTCCAAAAGGTAG (配列番号 3)	L: 633
	Reverse: GAACAGCAGGAGGCAGCAG (配列番号 4)	S: 200
12-1	Forward: CCTGGTCACTGCTCACATCG (配列番号 5)	L: 830
	Reverse: TGGACGGCGTGAGTATGGAC (配列番号 6)	S: 397

*LおよびSの増幅長の差は、433bp [mP i n g 自体 (430bp) とTSD (Target Site Duplication) と呼ばれるmP i n g 挿入の際に生じる重複配列 (3bp) との合計] である。

10

【0044】

実施例 2 : 米を用いた外国産米のゲノムDNAにおけるmP i n g 挿入部位の有無の解析
次いで、国産米の品種間で極めて高度に保存されている6-3および12-1のmP i n g 挿入部位が、外国産米 (全31品種 : 18品種のタイ米 + 13品種のベトナム米 : 表8を参照) でも保存されているかどうかについて検討した。なお、表8に記載される31品種の外国産米は全てインディカ種である。

【0045】

【表 8】

20

表 8. 外国産米の分析品種

番号	タイ米の品種名	番号	ベトナム米の品種名
1	RD6	1	P4
2	RD21	2	Tam Ap Be
3	Khao Tah Hang 17	3	Bac Huong
4	Jek Chuey	4	Tam Xoan
5	Sow Hai	5	IR64
6	Khao Dawk Mali 105	6	Ai32
7	CNT1 (Chainat 1?)	7	X21
8	RD8	8	Q5
9	Lenang Pra Tew 123	9	C70
10	Chainat 1	10	Khang Dan
11	Suphanburi 1	11	XI23
12	Suphanburi 2	12	108AV
13	名称不明の品種 (1)	13	IR352
14	名称不明の品種 (2)		
15	名称不明の品種 (3)		
16	名称不明の品種 (4)		
17	名称不明の品種 (5)		
18	TH		

30

【0046】

具体的には、外国産米におけるmP i n g 挿入部位の保存性の解析は、実施例 1 と同様に、日本晴におけるmP i n g 挿入部位の上流部位および下流部位に対するプライマー対を設計し、このプライマー対を用いて定法によりPCRを行い、得られた増幅産物のサイズに基づいて行った (用いたプライマー対の詳細は、表7を参照)。PCRにおけるテンプレートとしては、米から定法により抽出したゲノムDNAを用いた。結果を、以下の表9に示す。

【0047】

40

【表 9】

表 9. 外国産米の品種の遺伝的多型

番号	タイ米 (18品種)		ベトナム米 (13品種)	
	L	S	L	S
6-3	0/18	18/18	0/13	13/13
12-1	1/18	17/18	0/13	13/13

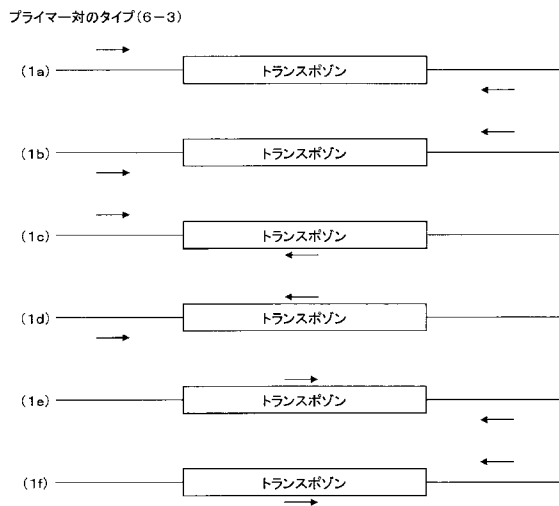
【0048】

10

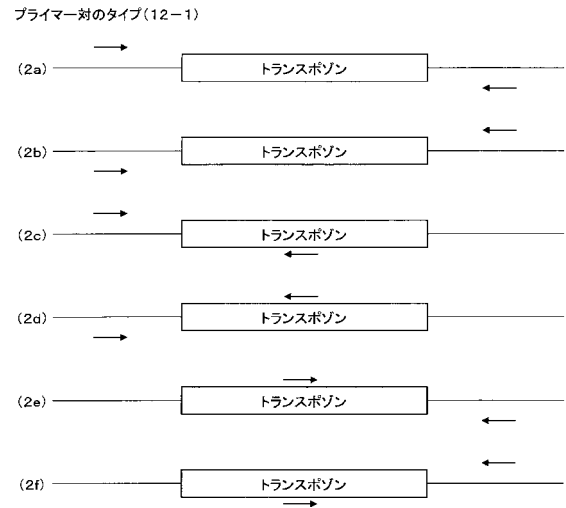
その結果、外国産米では、6-3および12-1のmP i n g挿入部位が、一例(タイ米の一品種についての12-1)を除き、保存されていなかった(表9、および図5における「タイ」および「ベトナム」のレーンを参照)。

以上より、国産米の品種間で極めて高度に保存されている6-3および12-1のmP i n g挿入部位が、国産米・外国産米の品種の識別のためのDNAマーカーとして優れることが示された。

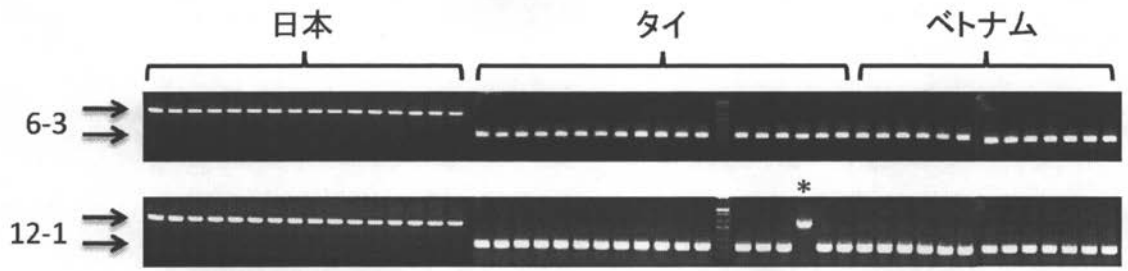
【図 1】



【図 2】



【 図 5 】



【 配列表 】

2012055254000001.app

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B063 QA13 QQ04 QQ42 QR32 QR55 QR73 QS34 QX01