

# 阿波ポーク食肉識別技術の開発 — ミトコンドリアDNAからのアプローチ —

新居 雅宏・柏岡 静・森 直樹

## 要 約

阿波ポークの食肉識別技術の開発を目的にアワヨーク、阿波ポークおよび一般肉豚等のミトコンドリアDNA非コード領域について1塩基置換(SNP)を基にハプロタイプを再構成した母系解析を行った。

1. 繁殖に供用している17ラインのうち15ラインについてミトコンドリアDNA(mtDNA)非コード領域1005bpの塩基配列を決定した。結果、西洋系と東洋系からなる6種類のハプロタイプに集約され、そのうちの1種類はアワヨークの独自性の高いことが示唆された。

2. 県外産一般肉豚96頭について1.と同様にmtDNAを調査した結果、21種類のハプロタイプに集約された。このうち、アワヨークと同じハプロタイプを持つ頻度は17.7%(17/96)であり、阿波ポークとそれ以外の豚肉を識別可能な割合は78.1%(75/96)であった。

3. アワヨークは600bp程度の配列情報を基にしたハプロタイプの再構成により6種類に分類されることから、652bpの塩基配列を基に県内産豚肉の共進会開催時の35頭の阿波ポークを含む170サンプルについてハプロタイプを再構成した結果、19種類に集約された。このうちアワヨークと同じハプロタイプを持つ個体は54頭であり、40%(54/135)の個体が阿波ポークとの識別が不可能であった。一方、阿波ポークについては全てアワヨークと同じハプロタイプを持っており、信頼性は100%(35/35)であった。

全ての肉豚について652bpで比較した場合、県外産豚肉ではアワヨークと同じハプロタイプを保有する割合が19.8%(19/96)であるのに対し、県内産豚肉では40%(54/135)の割合を示し高い結果となった。畜産研究所ではアワヨークの始祖豚、系統造成途中世代豚を広く県内に払い下げ、種豚の改良に利用されたことが県内と県外産の判定率の差に影響したことも推察された。以上のことより、mtDNA非コード領域の情報を利用した食肉識別はアワヨークに特異性の高い系統を利用しつつ、農家情報等の生産履歴を組み合わせることで有効な手段となりうることが示唆された。

## 目 的

品物を提供する生産者は購入者である消費者の要望に応える必要がある。近年、農畜産物の偽装表示が相次いで発覚し、食品表示に対する消費者の不信感は高まっている。生産者は誠意を持って安全な豚肉を生産する義務がある。一方で、適正に生産された生産物が科学的に検証される手法の確立が消費者と生産者の信頼関係構築の一助となることが推察される。豚では耳標、更にはマイクロチップを利用した生産履歴追跡システム等が一部で実用化されている

が、生産・加工・流通のフードチェーン各段階で証明するには技術的な問題が残されている。一方、最近の分子生物学の進展により、DNAを生体あるいは生産物となった状態から簡単に取り出し個体あるいは系統を識別する手法が試みられている。牛肉ではAFLPマーカーを利用した国産牛肉識別技術が開発され(Sasazakiら2004)、黒豚では毛色関連遺伝子の多型情報を利用した判別技術が実用化されている(奥村ら2000)。

徳島県では系統造成豚「アワヨーク」を

基礎豚とした阿波ポークの銘柄化を推進している。阿波ポークはアワヨーク雌にランドレース (L) 雄を交雑した F1 雌 (WL) に最終的にデュロック (D) を交配した三元交雑 (WLD) の生産様式により生産されていることからアワヨーク由来の核 DNA を識別マーカーとして用いた場合、目的とするマーカーを偶然的に落とす要素が各染色体につき 1/2 の確率で存在することから、マーカーとしての信頼性に劣る。一方、ミトコンドリア DNA(mtDNA) は完全母系遺伝することから、阿波ポークの祖母にあたるアワヨークでは同じ mtDNA 配列を持つ。mtDNA は細胞中に核ゲノムに比べ数百倍の DNA セットを持っており、また、ハム等の加工食品からも DNA の精製が可能である。これらのことより、ミトコンドリア DNA の中でも遺伝子をコードしておらず遺伝的変異に富む遺伝子非コード領域 (Brown ら 1979) に注目し、アワヨークの母系解析による食肉識別技術の開発について検討した。

## 材料と方法

### 1) 供試動物

#### (1) 純粋種豚由来 mtDNA の決定

アワヨーク雌 35 頭 (15 ライン)、他県より導入した大ヨークシャー雄 3 頭およびデュロック雄 2 頭について組織より DNA を精製した。また、既に登録されている mtDNA 配列を DDBJ データベース (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) より入手し

た。

#### (2) 阿波ポークおよび一般肉豚由来 mtDNA の決定

一般肉豚は県外産と県内産の豚肉を区別して採材した。県外産は 8 農場より集荷された 96 頭の肉豚について血液を採材した。尚、1 農場のサンプル数は 10～14 本であった。阿波ポークは本県で開催された肉豚共進会時に出品された 35 頭の肉および腎臓を採材した。また、同時に 135 頭の県内産一般肉豚の採材を実施した。

#### 2) mtDNA 非コード領域の塩基配列の決定

mtDNA 非コード領域の目的領域を含む PCR を実施後、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を用いたシーケンス反応後、ABI377 により塩基配列を決定した。用いたプライマーは表 1 のとおりである。

#### 3) mtDNA 非コード領域のハプロタイプの決定

決定した塩基配列のうち CGTGCGTACA という 10 塩基の繰り返し配列を除いた 1005bp および 652bp に存在する SNP を基にハプロタイプを特定した。ハプロタイプの比較および系統樹の作成は clustalx を用いたマルチプルアライメントおよび NJ 法 (Saitou & Nei ら 1987) により行った。

表1 mtDNA非コード領域の配列決定に用いたプライマー

プライマー名	塩基配列	塩基長	目的
Primer(1005)-F	5'-CGGCCAACTAGCCTCCATCTTAT-3'	23	PCR
Primer(1005)-R	5'-GCGCGGATACTTGCATGTGTAAT-3'	23	PCR
mitL44	5'-TCCACCATCAGCACCCAAAG-3'	20	Sequence
mitH45	5'-TTCAGTGCCTTGCTTTGATA-3'	20	Sequence
mitL11	5'-TACCATGCCGCGTGAAACCA-3'	20	Sequence
Primer(652)-F	5'-ACCCTGGTCTTGTAACC-3'	18	PCR
Primer(652)-R	5'-AAAGGCCAGGACCAAACC-3'	18	PCR
SQ652	5'-TTATGTCCCGTAACCATTGACTGAATA-3'	27	Sequence

**結果および考察**

1) アワヨークは 12 腹より生産された 29 頭の姉妹と 7 腹から生産された 7 頭 (1 腹 1 頭) の計 35 頭の雌と 9 頭の雄からなる第 6 世代時に系統造成豚として認定された (以降認定時の 19 腹の子孫を区別する目的ラインとする)。系統造成の基礎豚および造成途中世代の遺伝的趨勢を考慮しないとき、認定時の mtDNA のハプロタイプは 19 種類が存在することになる。今回の研究では既に維持世代において後継が残せなかった 1 ラインを除く 18 ラインのうち、15 ラインについて mtDNA 非コード領域 1005bp の配列に存在する SNP を基にハプロタイプを再構成した。その結果、

全部で 41 個の SNP が存在し、6 種類のハプロタイプに集約された (表 2)。シーケンス精度の向上と確認のため 35 頭の親子、姉妹、姪あるいは祖母一孫についてハプロタイプを比較した結果、同じラインでは同一のハプロタイプを保有していた。また、3 頭の実県系統造成豚 W はいずれもアワヨークと同じハプロタイプであった。6 種類のハプロタイプのうち、5 種類は既にデータベースに報告のある DNA 配列と全く同じであったが、1 種類 (ハプロタイプ 3) については新規のハプロタイプであることが示唆された。これらの配列を基に系統樹を作成すると大きくアジア系とヨーロッパ系の 2 種類に分類された (図 1)。

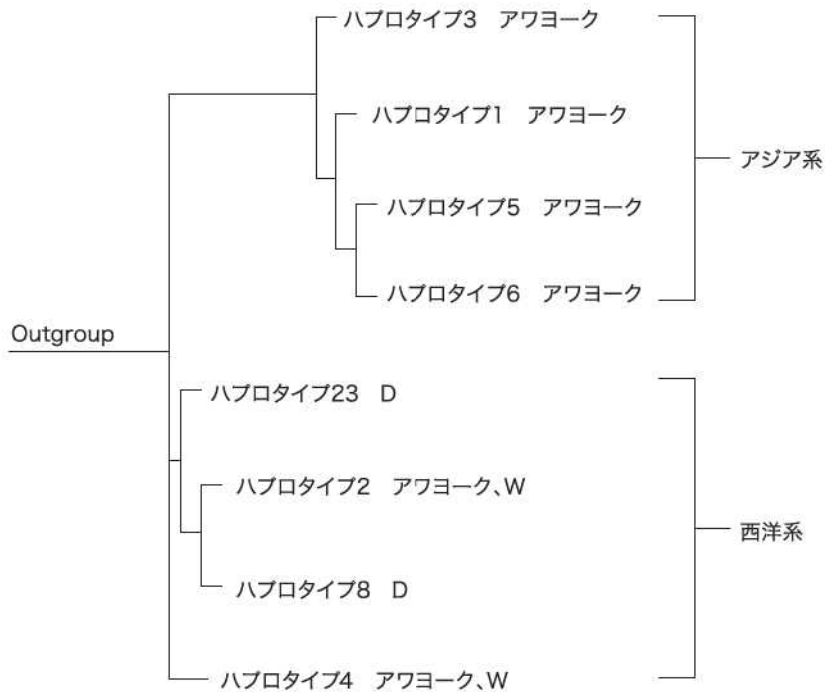


図1 mtDNA非コード領域1005bpの塩基配列に基づいた系統樹

表2 プラヨークおよび県外産市販肉豚から得られた mtDNA 非コード領域 1005bp における SNP

Table with columns for Accession No, SNP positions (124-978), and sequence data for various samples (AB041488-AB041499).

a) 塩基置換部位の番号は、mtDNA非コード領域の最初の塩基を1としたときの番号を示す。
b) 塩基置換部位の番号：mtDNA非コード領域の最初の塩基を1としたときの番号を示す。
c) へは参照基準である西洋種（登録番号AB041488）の塩基配列と一致していることを示す。
d) 塩基が欠損していることを示す。

2) 96 頭の県外産一般肉豚について試験 1 と同様に 1005bp の mtDNA 非コード領域を基にクラスタリングした結果、21 種類のハプロタイプに集約された(表 2)。このうち、アワヨークと同じハプロタイプ 1～6 を持つ個体はハプロタイプ 1 では 4 農場 14 頭、ハプロタイプ 2 では 1 頭、およびハプロタイプ 6 では 2 頭の計 21 頭であった。これらのことは 1005bp の mtDNA 非コード領域の情報では阿波ポークとそれ以外の豚肉を識別できない割合が 22%(21/96)であることを示す。ハプロタイプ 1 はアワヨークでは 1 番目に、96 頭中ではハプロタイプ 7 に次いで頻度が高かった。本試験におけるハプロタイプ 1 は DNA データバンクにおけるアクセション番号(以下 Acc#)AB041490 と相同であった。Acc#AB041490 は W 由来の配列として登録されており、W に広く浸透していることも推察された。また、ハプロ

タイプ 2(Acc#AB041492) および 6 (Acc#AB015091) も W とハンブシャー(H) およびバークシャー(B) について報告されている。

一方でそれ以外のハプロタイプについて両者に相同性はなく、各ハプロタイプ毎に度数分布をとるとハプロタイプ 1 以外では両者にほとんど重なりはみられない(図 2)。Okumura ら(2001)は 22 頭のランドレース(L)と 20 頭の W 間で相同性のあるハプロタイプは 1 種類とのデータを示した。そこで、県外産一般豚の中から既に DNA データベースに登録されている L 由来の配列と相同性のあるハプロタイプを抽出すると 42 頭(43.8%)であった。これらのことより、日本の肉豚生産において主要な交配様式である LWD と阿波ポークの生産様式である WLD ではハプロタイプの頻度に違いがあることも示唆され、今後更に例数を増やした解析が必要である。

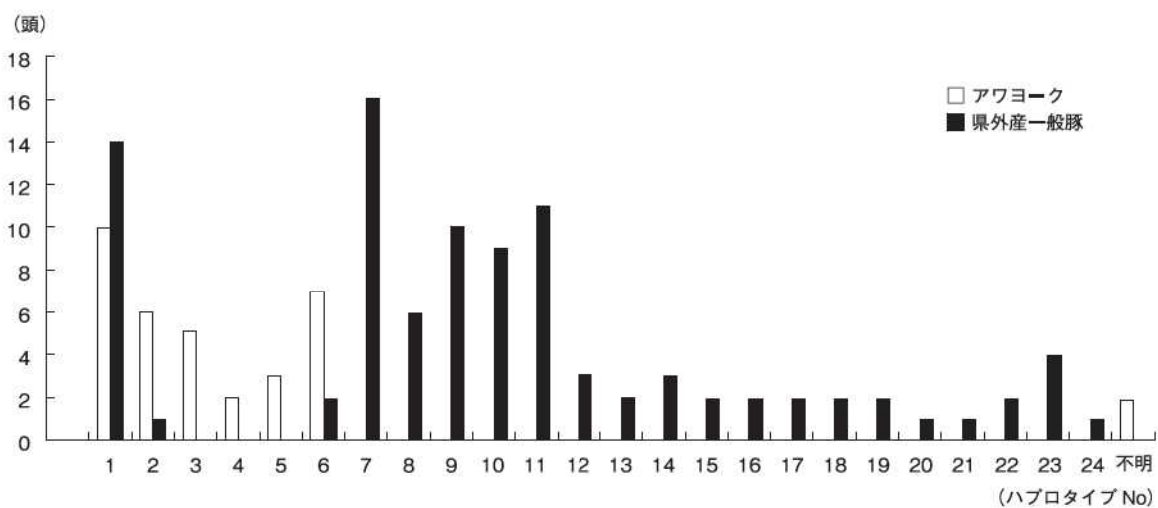


図2 アワヨークと県外産豚肉のmtDNA非コード領域1005bpハプロタイプの分布



## 謝辞

本研究の推進にあたり、多くの御指導御助言いただきました（社）農林水産先端技術産業振興センター奥村直彦博士に深謝いたします。

## 引用文献

- Brown et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 1967-1971(1979)
- Okumura et al., Animal. Genet. 32: 139-147(2001)
- Saitou & Nei, Molecular Biology and Evolution 4: 406-425(1977)
- Sasazaki et al., Meat Sci. 67:275- 280
- 奥村ら , 日本畜産学会報 : 71(8):J222-J234 (2000)