国内産牛肉を識別する DNA マーカーの開発

笹崎晋史・万年英之

神戸大学自然科学研究科

Development of breed discrimination markers in domestic beef

Shinji SASAZAKI and Hideyuki MANNEN

Graduate School of Science and Technology, Kobe University

1. はじめに

ここ数年、牛や鶏などの畜産物に関わる社会的問題が生じるようになってきた。その内の一つに牛肉の安全性の問題がある。2001年に国内で初めての牛海綿状脳症 (BSE; Bovine Spongiform Encephalopathy) 感染牛が確認され、社会を揺るがす大きな問題になった。現在のところ、BSE 感染牛は乳用牛として飼育されているホルスタイン種のみで確認され、焼却処分されている。しかし、この感染牛の発生は牛肉の安全性に対する消費者の不信を招き、牛肉の需要が激減した。次いで、国内の BSE 発生の後、その対策として食用牛買い取り制度が施行されたが、オーストラリア牛を国産牛と偽って業界団体に買い取らせようとした牛肉「偽装・詐欺」事件により、牛肉に対する消費者の信頼は地に落ちた。正しい表示に基づく牛肉の販売は、消費者や生産者の受益といった点で重要である。また、偽称販売は輸入牛肉のみならず、国産牛肉においても存在している形跡がある。これらの問題は食品の流通モラルの低下が原因であるが、品種を簡便に判別する手段がないこともその要因となっている。ここでは、国産牛肉の偽装販売や牛品種の遺伝的背景、さらに我々の研究室が取り組んできた DNA マーカーによる黒毛和種とホルスタイン種、およびその交雑種の鑑別技術の開発に関して概説する (Sasazaki ら 2004)。

2. 我国における肉牛と乳牛、その交雑種

現在、我国で飼育されている肉用牛は、黒毛和種、褐色和種、無角和種、日本短角種の和牛 4 品種と、若干のヘレフォード種、アンガス種などの外国種である。和牛は明治から昭和初期にかけて、体格の改善を目的としてデボン種、ブラウンスイス種、シンメンタール種、ショートホーン種などの品種と交配し、日本の気候、風土に合うように改良が試みられた。その後、耕

運機の導入など農作業の機械化で役牛としての役割は消失し、肉専用種として改良が加えられ、今日に至っている。和牛 4 品種の中でも特に黒毛和種の供用頭数は多く、その繁殖雌牛は我国の肉用種繁殖雌牛総頭数において 90 % 以上を占めている。この黒毛和種の優れた肉質は市場における評価も高く、高級牛肉の主な供給源となっている。

他方、我国で飼育されている乳用牛は、そのほぼ全てがホルスタイン種で、この他に若干のジャージー種が存在する。日本のホルスタイン種はヨーロッパあるいは北米と同じく、それら由来の完全な純粋種とされている。しかし、この品種は明治時代に種雄牛が外国から輸入され、在来の雌牛に累進交配されて、乳用牛の増頭が図られた経緯がある。我々の研究では、国内ホルスタイン種の 20 % 程度が和牛の mtDNA を有しているというデータも得ており、国内ホルスタイン種は欧米と違った遺伝的構成を有していることを示唆している (Tsuiji ら 2004)。今日まで、ホルスタイン種の雄子牛は肥育用素牛として出荷されていた。この肉質は黒毛和種に劣るが、安価で大衆肉として好まれてきた。ところが牛肉の輸入自由化に伴い、ホルスタイン種牛肉と競合する外国産の安価な牛肉が市場に出回るようになった。このため、ホルスタイン種の枝肉の需要が激減し、価格の値崩れを起こした。その後、外国産の安価な牛肉に対抗するために、ホルスタイン種雌牛に黒毛和種種雄牛を交配した雑種第一代 (F1) の牛肉生産が盛んとなった。

連絡先: 笹崎晋史、神戸大学大学院 自然科学研究科 動物遺伝育種学研究室 〒657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1
(e-mail: sasazaki@kobe-u.ac.jp)

3. 交雑牛の偽装販売

F1の毛色は黒毛和種と見分けが付きにくく、肉質も黒毛和種とホルスタイン種の中間に位置する。また、増体は黒毛和種よりもよく、平均価格は黒毛和種よりも安価である。このような理由から、F1牛肉が高級黒毛和種牛肉に偽称販売され易いようである。現在このような観点から、農林水産省は農作物の流れをトレースできるシステム（トレーサビリティ）の構築に努めており、食肉の品質や安全性を保証する重要な要素になると期待されている。しかし、すべての牛肉に対してこの方法を適用するには膨大な費用がかかる上、品種の違いを簡単に指摘できない点がある。したがって、トレーサビリティを補完する意味で、黒毛和種とF1（黒毛和種×ホルスタイン種）とを判定する簡便な技術、さらには多くの牛品種を正しく鑑別する技術の確立が必要である。

4. 品種特異的 DNA マーカーの開発

1) AFLP ゲノムスキャンニング

ホルスタイン種の遺伝子を有するF1と黒毛和種の違いを見つけようとするとき、黒毛和種とホルスタイン種との遺伝子レベルにおける違いを見つけ出すことが重要となる。これら両品種間における形質の違いには、体毛色、肉質および泌乳量などがあげられるが、これら形質をコントロールしている遺伝子は現在のところ不明であり、特定の遺伝子に焦点を充てるのは難しい状況である。

このような背景から、我々はAFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法 (Vosら1995) という方法を用いてウシゲノム全体のスキャンニングを行い、両品種間の識別可能な遺伝子領域を検出するべく、探索を続けてきた。

図1にAFLP法の概要図を示す。まずゲノムDNAをFrequent cutterとRare cutterの2種類の制限酵素で切断する。Frequent cutterには4塩基認識、Rare cutterには6塩基認識の制限酵素がよく使われる (Step1,2)。この切断されたゲノムDNAにそれぞれの制限酵素に対応したアダプターを付加する (Step3)。アダプターは同じ制限酵素による再切断を防ぐように設計されている。次にアダプターに対応するプライマーを用いてゲノムDNAを増幅する (Step4,5)。このプライマーの3'末端には任意の1塩基を付加しており、それに対応するDNA断片しか増幅されない。そのためこの操作を1塩基選択的増幅と呼ぶ。次に3'末端に任意の3塩基を付加したプライマーを用いて増幅する (Step6,7)。

図1. AFLP法の概要図

選択的プライマーを用いる理由は、膨大な数のDNA断片の中から検出できるDNA断片の数を減らす目的がある。この方法の利点としては、この選択的塩基の組み合わせを変えることにより違ったDNA断片を容易に検出できることになるため、多くの多型を検出できる点である。またこの方法では、Frequent cutterとFrequent cutter、またRare cutterとRare cutterで両端が切断されたDNA断片は増幅され難いシステムとなっている。これは両端が同じ制限酵素で切断された場

図2. AFLP法による電気泳動例
矢印は黒毛和種とホルスタイン種で遺伝子頻度が異なるバンドを示している

合には、同種のアプターが付加するため、inverted repeat を有することになり、PCR 反応の際に自己ループ構造を形成して増幅プライマーの結合を妨げることになる。

最後にこれら増幅産物をポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、DNA 断片を検出する。その他の技術に比べ AFLP 法は、1) ゲノム情報が乏しい種に対しても容易に分析可能、2) ゲノム全体の多型を包括的に調べることが可能(ゲノムスキニング)、3) 再現性に優れている点があげられる。本研究のように、品種間の差異を示す遺伝子領域がどこ存在するのかが不明の場合、その箇所を探っていくのに適した方法である。

図2は AFLP 法の泳動例を示している。本研究では黒毛和種と F1 の判別を行うため、黒毛和種とホルスタイン種間で特異的な頻度を示すバンドの検索を行った。F1 の識別を行うには、特にホルスタイン種に特異的なバンドが有効となる。図中の矢印は両品種間で差異を示す DNA バンドの例で、ここでは両品種とも 10 頭中、黒毛和種では 1 頭のみ、ホルスタイン種では 8 頭の高頻度で検出されている。このような分析を約 2,500 プライマーセット行った結果、全体で約 100 万本の DNA バンドを検索した。その結果、両品種間で差を示す候補バンドを得ることができ、これらを利用

して品種鑑別法の確立を目指した。

2) 検出方法の簡便化

候補バンドに対しては原因となる突然変異の同定を行い、検出法の簡便化をはかる。AFLP 法は簡便に多くの DNA 多型を検出する方法として非常に有効である。しかしながら、遺伝子型判定 (Genotyping) を行う際には、(1) 精製度の高いゲノム DNA が必要である、(2) 遺伝子型 (ホモとヘテロ) の区別ができない、(3) PCR-RFLP 法などと比較して、操作が煩雑である、などの欠点を持つ。すなわち本法は、精肉サンプルに対する識別には不適である。精肉は熟成が進んでいるため取り出される DNA はかなり分解が進行しており、高品質の DNA を必要とする AFLP 法では識別が困難である。したがって、AFLP バンドに対応する DNA 領域の解析を行い、多型の原因となっている領域に対する DNA マーカーを開発する。一般的にはその突然変異に基づいた PCR-RFLP 法を適用する (図3)。

具体的には、ホルスタイン種特異的 DNA 断片をゲルから切り出し、塩基配列の決定を行う。次に、断片のフランキングサイトの決定を行うため、ウシドラフトゲノムシーケンス (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/cow/>) や PCR Walking 法 (Negi ら 2000) を用いる。その配列を基に突然変異箇所を増幅可能なプライマーを作成する。最後に、AFLP 多型の原因となっている変異を同定し、それに応じた RFLP 法を開発する。この方法では、精肉サンプルに対する判定が可能となるばかりでなく、識別個体の遺伝子型がホモやヘテロも判断可能なために識別精度が上昇する。

3) 鑑定マーカーを用いた識別精度

我々はこのような手法を用いて、黒毛和種と F1 を

図3. PCR-RFLP 法による DNA マーカーの検出例
a は黒毛和種特異的アレル、b はホルスタイン種特異的アレル

識別する DNA マーカーの開発に成功した。これまで開発したマーカーは、ホルスタイン種に特異的なマーカーであるが、これは両品種間の遺伝子頻度の差を示すものである。例えば、図 3 のようなマーカーにおいて黒毛和種で aa 型が 100 %、ホルスタイン種で bb 型が 100 % のようなマーカーが見つければ、1 つのマーカーで F1 の識別が 100 % の確率で可能となるが、そのようなマーカーは検出されなかった。

最終的に表 1 に示す 11 のマーカー (BIMA1-11) がこの品種鑑定に有効であると考えられた。各品種における遺伝子頻度の算出には、開発した PCR-RFLP 法を用い、黒毛和種 300 頭、ホルスタイン種 100 頭程度を用いて遺伝子型判定を行った。表において、a は AFLP 法を行った際に検出される対立遺伝子、b は検出されない対立遺伝子を示す。すなわち a の対立遺伝子がホルスタイン種特異的であり、本研究では黒毛和種と F1 の鑑別を目的としているため、この頻度が黒毛和種で低く、ホルスタイン種で高いことが重要となる。黒毛和種 300 頭レベルで分析を行った SNPs マーカーのうち、黒毛和種で全く検出されなかった断片は 2 種類 (BIMA7,8)、遺伝子頻度が 1 % 未満であったものが 4 種類 (BIMA1,6,9,11) であった。その他はすべて 1 % 以上であり、最も高いもので 5.5 % (BIMA4) であった。また、ホルスタイン種での頻度は最も高いもので 62 % (BIMA5)、最も低いもので 27.5 % (BIMA8) であった。

ここで各マーカーにおける鑑定精度の指標として検出率と誤判別率という二つの値を算出した。ここでの検出率とは、ホルスタイン種における a の対立遺伝子頻度から求められ、識別するサンプル中に含まれる F1 の何パーセントがこのマーカーによって「F1 である」と鑑定されるかの割合である。また誤判別率とは、黒毛和種における a の対立遺伝子頻度から求められ、識別するサンプル中に含まれる黒毛和種の何パーセントが「F1 である」と誤判別をしてしまうかの確率のことである。ここで重要なのは誤判別率の方である。なぜなら実際に判定したものが黒毛和種であるのに「F1 である」と誤判定される可能性があるためである。すなわち、この値は DNA 判定そのものの信頼性を表す値である。よって黒毛和種における遺伝子頻度の算出にはホルスタイン種 (100 頭) より多くの個体 (300 頭) を用いて行っている。

これらを用いて鑑定を行うためには、有効マーカーをいくつか組み合わせて識別を行う。どのマーカーにおいてもホルスタイン種と比較して黒毛和種で遺伝子頻度がかなり低くなっている。この中でも BIMA1, 6-9, 11 は黒毛和種における遺伝子頻度が極めて低いために特に有効であった。マーカーを組み合わせた場合の検出率 P_i の算出方法は、

$$P_{i+2} = 1 - (1 - P_{i1})(1 - P_{i2}) = P_{i1} + P_{i2} - P_{i1}P_{i2}$$

となる。ここで、 P_{i1} および P_{i2} はマーカー 1 と 2 にお

表 1. 識別マーカーの各品種における遺伝子頻度と鑑定確率

マーカー名	黒毛和種				ホルスタイン種				検出率 (P_i)	誤判別率 (P_m^*)
	遺伝子型			対立遺伝子頻度	遺伝子型			対立遺伝子頻度		
	aa	ab	bb		a	aa	ab			
BIMA 1	0	1	294	0.0017	37	41	22	0.575	0.575	0.0034
BIMA 2	0	25	265	0.0431	19	56	25	0.470	0.470	0.0843
BIMA 3	0	9	91	0.045	14	59	27	0.435	0.435	0.0880
BIMA 4	0	11	89	0.055	30	47	23	0.525	0.525	0.1070
BIMA 5	0	26	264	0.0448	40	44	16	0.620	0.620	0.0876
BIMA 6	0	2	288	0.0034	14	45	41	0.365	0.365	0.0068
BIMA 7	0	0	292	0.0000	13	54	33	0.400	0.400	0.0000
BIMA 8	0	0	297	0.0000	5	45	50	0.275	0.275	0.0000
BIMA 9	0	3	287	0.0052	15	44	41	0.370	0.370	0.0104
BIMA 10	0	9	282	0.0155	15	46	39	0.380	0.380	0.0308
BIMA 11	0	1	310	0.0016	31	48	21	0.550	0.550	0.0032

* 誤判別率とは、識別するサンプル中に含まれる黒毛和種の何パーセントが「F1 である」と誤判別をしてしまうかの確率を表す。

ける検出率をそれぞれ表す。

黒毛和種と F1 を判定する場合、6 つのマーカーのうち BIMA7,8 の 2 つを用いた場合では、検出率が 56.50 %、誤判別率 0 % であり、4 つのマーカー (BIMA1,7,8,11) を用いた場合は検出率が 91.68 %、誤判別率 0.66 %、6 つすべてのマーカー (BIMA1,6,7,8,9,11) を用いた場合では検出率が 96.67 %、誤判別率 2.36 % となる。

さらに、これらのマーカーはホルスタイン種が黒毛和種に偽装されている場合には、より効果大きい。2 つのマーカー (BIMA7,8) を用いた場合でも、検出率が 81.08 %、誤判別率は 0 %、4 つのマーカー (BIMA1,7,8,11) を用いた場合では、検出率が 99.31 %、誤判別率 0.66 % となる。

ここで注意されたいのが、この鑑定精度は開発に用いた黒毛和種約 300 頭とホルスタイン種約 100 頭から得られた結果であり、日本全国の牛を調べたわけではないということである。両品種共に地域の偏りを避け、全国からランダムサンプリングにより得た結果であるが、逆に地域によっては遺伝子頻度に偏りがある場合があるかもしれない。また誤判別率が 0 % となっているマーカーの組合せがあるが、これも用いた黒毛和種 300 頭に、ホルスタイン種で見られた突然変異が観察されなかった理由によるものであり、黒毛和種の中にはほんのわずかでであっても、この突然変異が認められたときには誤判別率が 0 % ではなくなる。

これを回避するためには、品種を 100 % 鑑定できるマーカーが必要となるが、現状ではかなり困難である。しかしながら、我々が開発した方法によって疑わしいと判断された商品については、トレーサビリティによる個体識別を適用し、マイクロサテライトマーカーによる親子鑑定等の明確な識別を行うことも可能であるため、スクリーニング検査といった意味ではこの程度の精度があれば十分ではないかと考えている。

2004 年 2 月には、これらのマーカー検査を含めた農林水産省による抜き打ち検査が実施され、マスコミ等で取り上げられた。マスコミ等による方法の開発や検査実施の周知は、偽装表示の抑止力として大きな効果をもたらすものとして期待できる。

5. おわりに

国内における品種鑑定法の開発は完了した。現在、BSE 問題に絡んで注目を浴びているアメリカ産やオーストラリア産の輸入牛肉に対して、識別できるマーカーの開発を進めている。これに対してもいくつか良い

結果を得ているので、近い将来にその結果を公表できるだろうと考えている。

このような識別法は、実際に「不当表示」をするものがいなければ、無用の技術である。しかしながら、これまでの我国の表示制度や消費者が持つ不安を考えた場合、このような科学技術に基づいた抑止力は必要であろう。

謝 辞

本研究は、文部科学省科学研究費補助金 (No.13460126)、(社)畜産技術協会と(株)ビー・エム・エルとの共同研究費、農水省技術会議事務局による「食品の安全性及び機能性に関する総合研究 (食品総合プロジェクト)」など多くの助成と共同研究によってなされた。ここに深謝いたします。

参考文献

- Negi MS, Devic M, Delseny M, Lakshmikumaran M. 2000. Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in *Brassia Juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 146–152.
- Sasazaki S, Itoh K, Arimitsu S, Imada T, Takasuga A, Nagaishi H, Takano S, Mannen H, Tsuji S. 2004. Development of breed identification markers derived from AFLP in beef cattle. *Meat Science*, 67: 275–280.
- Tsuji S, Mannen H, Mukai F, Shojo M, Oyama K, Kojima T, Kano C, Kinoshita Y, Yamaguchi E. 2004. Trace of native cattle in Japanese Holstein assessed by mitochondrial DNA sequence polymorphism. *Journal of Dairy Science*, 87: 3071–3075.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research*, 21: 4407–4414.