

万年委員提供資料

ウシの品種の鑑別方法

国内産牛肉に対する品種鑑定の技術開発

万年英之

神戸大学大学院自然科学研究科 神戸市灘区六甲台町 657-8501

(東海畜産学会報総説、15:8-11、2005 改編)

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説明する¹⁾。

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 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約 90% 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。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。

3. 黒毛和種とホルスタイン種の歴史的背景

黒毛和種とホルスタイン種は、両品種共にヨーロッパ系牛 (*Bos taurus*) に属するが、その成立起源はそれぞれ日本とヨーロッパである。黒毛和種の祖先となる在来牛は、縄文時代後期から弥生時代初期に朝鮮半島より日本に渡来した。明治時代に入りいくつかのヨーロッパ品種との交雑による改良が試みられたが、この輸入戦略は失敗に終わり、純粋品種を再構築するために集団から交雑種を排除したとされている。

一方、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²⁾。このようにこれら両品種では、他品種の遺伝子がお互いに残存している可能性があり、これが我国における両品種あるいは F1 との識別を困難にしている原因にもなっている。

3. 交雑牛の偽装販売

近年我々が取り組んだ DNA 鑑定法の開発は、F1 (黒毛和種×ホルスタイン種) と黒毛和種の判定についてである。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間位置する。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 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。

牛肉偽装は枝肉から小売までの間で行われるので、実際は小売における精肉を識別しなければならない。よって、外貌比較は適用できない。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違いを見つけ出すことが重要なる。これら両品種の違いは、体毛色や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る。

4 AFLP ゲノムスクニング

このような背景から、我々は AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法³⁾という方法を用いてゲノムスクニングを行い、両品種間の識別可能な遺伝子領域を探るべく、研究を続けてきた。

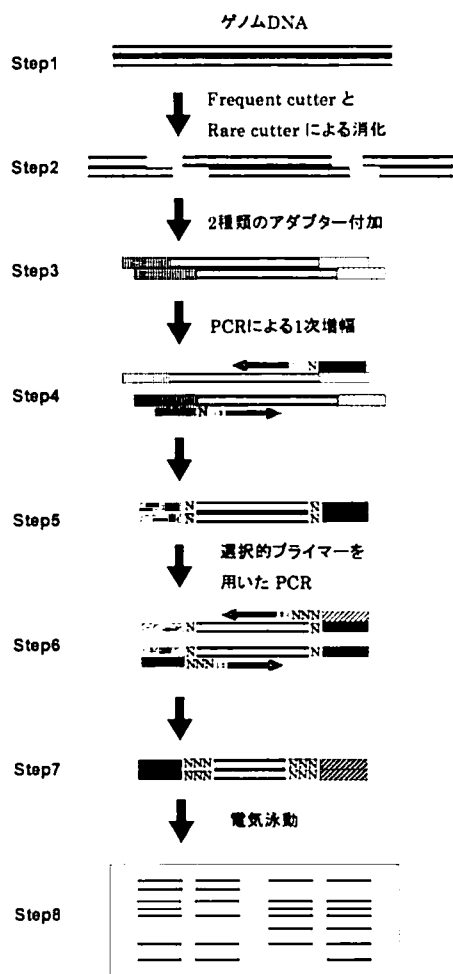


図1 AFLP法の概要図

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6塩基認識、Rare cutterには4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)。

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Rare 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合には、同種のアダ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(ゲノムスクニング)、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2500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。

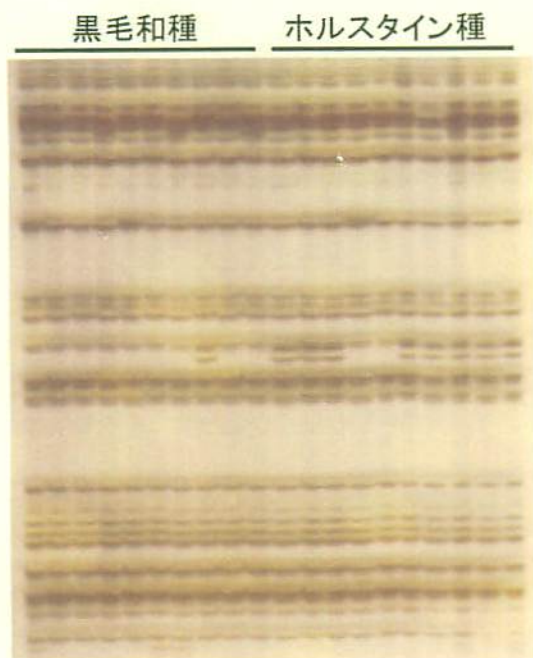


図2 AFLP法による電気泳動例
矢印は黒毛和種とホルスタイン種で遺伝子頻度が異なるバンドを示している

5 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法は技術が必要とする方法の上、精肉に対する識別には不適である。精肉は熟成されるので取り出されるDNAはかなり分解が進んでおり、高品質のDNAを必要とするAFLP法では識別が困難なためである。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法を開発する(図3)。これ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方法となる。

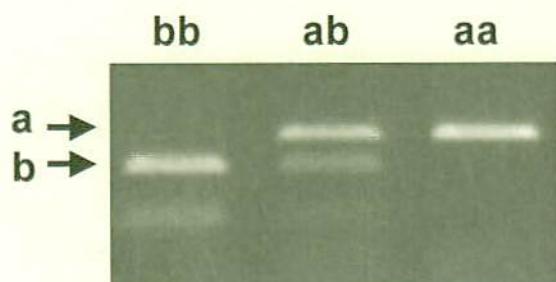


図3 簡易法によるDNAマーカーの検出例
aは黒毛和種特異的アレル、bはホルスタイン種特異的アレル

6 鑑定マーカーを用いた識別精度

このような手法を用いて、黒毛和種とF1を識別する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見つかってない。

最終的に下記の表1に示す11のマーカーがこの品種鑑定に有効であると考えられた(BIMA1-11)。これらを用いて鑑定を行うためには、有効バンド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。

表1 識別マーカーの各品種における遺伝子頻度

マーカー名	黒毛和種	ホルスタイン種	F1
BIMA1	0.0017	0.575	0.215
BIMA2	0.0431	0.470	0.205
BIMA3	0.0450	0.435	0.214
BIMA4	0.0550	0.525	0.288
BIMA5	0.0448	0.620	0.283
BIMA6	0.0034	0.365	0.163
BIMA7	0.0000	0.400	0.181
BIMA8	0.0000	0.275	0.140
BIMA9	0.0052	0.370	0.137
BIMA10	0.0155	0.380	0.170
BIMA11	0.0016	0.550	0.214

鑑定精度はマーカーの組合せや判定基準となるマーカーにより変化する。鑑定精度は検出率と誤判別率の2つで判断される。ここでこの検出率とは、識別するF1の何パーセントがこの方法によって「F1である」と判定される割合のことであり、誤判別率とは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」と判定される可能性があるためである。

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。

このマーカーは黒毛和種とホルスタイン種を識別

する場合にも利用でき、2つのマーカー（BIMA7.8）を用いた場合、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。どちらの品種共に地域の偏りを避け、全国より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、黒毛和種の中にほんのわずかであっても、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、はっきりした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ので、記憶に残っている方もおられるかもしれない。いずれにせよ、科学的な実証に基づいた鑑定方法が開発され、それが世間に認知されることにより、偽証販売の抑制につながるであろうことが最も大切な結果であったと考えている。

7 あとがき

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。このような技術開発を通じて、消費者や生産者の安心や信頼が得られることになれば、「家畜の遺伝学」に身をゆだねたものとしては至極幸いである。

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。

文献

- 1) Sasazaki, S., Honda, T., Fukushima, M., Oyama, K., Mannen, H., Mukai, F. and Tsuji, S. Genealogical relationship between pedigree and microsatellite information, and analysis of genetic structure of a highly inbred Japanese Black cattle strain. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 17:1355-1359. 2004.
- 2) Tsuji, S., H. Mannen, F. Mukai, M. Shojo, K. Oyama, T. Kojima, C. Kano, Y. Kinoshita and E. Yamaguchi. Trace of native cattle in Japanese Holstein assessed by mitochondrial DNA sequence polymorphism. *Journal of Dairy Science*. 87:3071-3075. 2004.
- 3) Vos P, Hogers R, Bleeker M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research*. 21:4407-4414. 1995.