DNA 診断で偽装表示と美味しい牛肉を見抜く

万 年　英 之
神戸大学大学院自然科学研究科

1. はじめに

近年、DNA 塩基配列の違い（多型）を利用することが可能となり、様々な分野で利用されるようになった。我々の研究室では、主に畜産動物へのDNA 多型の利用に取り組んできた。ここでは私が進めているプロジェクトの中でも２つの研究結果について紹介したいと思う。ひとつは最近騒がれるようになった牛肉の偽装表示を防ぐための牛の品種鑑定法である。もうひとつは牛肉の美味しさにかかわる遺伝子同定とその多型の利用についてである。

2. 牛肉の品種鑑定

2-1. 偽装表示の背景

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。さらに国内の 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失落した。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。偽称販売は輸入牛肉だけではなく、国産牛肉においても存在している。ここでは、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 et al., 2004; 万年, 2003, 2005a ）。

2-2. 我国における牛の品種

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、価格の下落を起こした。その後、外国産の安価な牛肉に対抗するために、酪農農家では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。

2-3. 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といわれている。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思われている。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（Tsuji et al., 2004）。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。

2-4. F1 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つきにくく、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やすい。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った。

2-5. AFLPゲノムスキャニング

このような背景から、我々はAFLP（Amplified Fragment Length Polymorphism）法（Vos et al., 1995）という方法を用いてゲノムスキャニングを行い、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。

AFLP法の利点としては、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（ゲノムスキャニング）、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1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頻度差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バンドの例である。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。

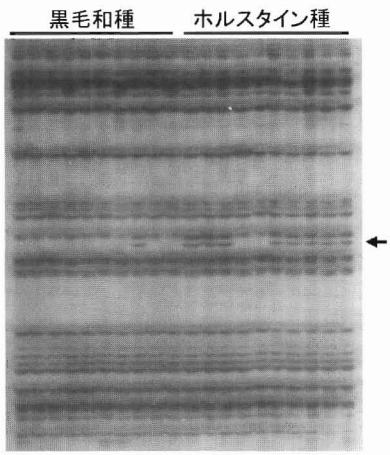

図1　AFLP法による電気泳動例
矢印は黒毛和種とホルスタイン種で頻度差を示すバンドをあらわす

2-6. 候補バンドのSNPs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法による解析は技術を要し、また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2）。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識別精度が上昇する。

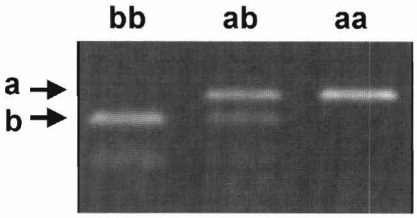

図2　簡易法によるDNAマーカーの検出例
aは黒毛和種特異的アリル、bはホルスタイン種特異的アリル

2-7. 鑑定マーカーを用いた識別精度

この手法を用い、黒毛和種とF1を識別するいくつかのDNAマーカーの開発に成功した。表1は特に有効である6つのSNPsマーカーを示している（BIMA1-11）。鑑定にはこれら複数のマーカーを利用し識別を行う。

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
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
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。検出率とは、識別するF1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が「F1である」と誤判別をしてしまう確率である。

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。

これらは低い確率ながらも誤判別が起こり得ることを示している。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、トレーサビリティーによる個体識別を適用することも可能であるため、スクリーニング検査に用いる方法といった意味ではこの程度の精度があれば十分であろう。実際にこの方法は、農林水産省による抜き打ち検査に利用されている。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。

また、判別の具体的な方法や判別確率の算出方法に興味がある方は関連論文などを参照されたい（万年, 2005; 万年・笹崎, 2006）。

2-8. 今後の研究

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。豪州産牛肉に対する識別法の開発は概ね終了している。今後は米国産牛肉についても検討していく予定である。

3. DNA 診断による牛肉品質の向上への取り組み

3-1. 脂肪酸組成と牛肉の美味しさ

食べ物の「おいしさ」とは個人差があり、その評価は難しい。牛肉においては一般的に、「柔らかさ」、「風味」、「多汁性」がおいしさの大きな要因を占めると言われている。日本固有の牛品種である黒毛和種は、品質の高さから世界的にも評価されている。この高品質の要因としては「脂肪交雑（さし）」が第一要因であり、これが「柔らかさ」や「多汁性」の向上にも影響している。一方、「風味」は最も評価が難しい形質であり、改良の対象としては取り上げられてこなかった。この「風味」に関係するものとしては脂肪酸の質が影響すると考えられている。

脂肪酸の中でも、不飽和脂肪酸が牛肉の熟成期間中に芳香物質となることが報告され、この不飽和脂肪酸の割合は「風味」に対する指標となることが推測される。また、飽和脂肪酸の過剰摂取は血中コレステロールの増加をまねくことから、不飽和脂肪酸含有量が多いことは健康にも良いとされている。この脂肪酸の質に影響する遺伝子が同定できれば、牛の遺伝的な改良や牛肉品質の指標として利用できると考えられる。

3-2. 脂肪酸組成に関わる遺伝子

我国固有の肉用種である黒毛和種は、多品種に比べ体脂肪の不飽和脂肪酸含有率が高く、体脂肪の融点が低いという物理的特性がある。ウシは反芻生理学的特性から、ルーメン内で脂肪酸に水素添加をするため、体脂肪における脂肪酸組成は、遺伝的要因による影響が大きいとも考えられる。

黒毛和種の不飽和脂肪酸含有量は、地域や血統間で違いが認められることから、我々は脂肪酸含有量に影響する遺伝子の同定に取り組んできた。着目したのは stearoyl-CoA desaturase (SCD) という酵素で、ステアリン酸、パルミチン酸から一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸やパルミトオレイン酸を生成するのにかかわる酵素である。我々はこの遺伝子そのものの遺伝変異、あるいはこの遺伝子の発現を調節する調節因子が不飽和脂肪酸含有量に影響していると考え、研究を進めてきた。

3-3. ウシ SCD 遺伝子の変異

ウシ SCD 遺伝子の cDNA 塩基配列を黒毛和種個体間で比較した所、翻訳領域内に 3 ヶ所、非翻訳領域内に 5 ヶ所、合計 8 箇所の塩基置換が認められた。そのうち、翻訳領域内の多型の一つは、バリンからアラニンへのアミノ酸置換を伴うものであった（Taniguchi et al., 2004a）。この遺伝変異

図 3　PCR-RFLP 法によるウシ SCD 遺伝子型判定法

を簡便に検出するために、PCR-RFLP 法を適用した。これにより、簡単にバリン（V）型、アラニン（A）型を区別することが出来る。その検出例を図 3 に示した。

3-4. SCD遺伝子変異と不飽和脂肪酸含有量との関係

このSCD遺伝変異と僧帽筋脂肪の不飽和脂肪酸含有量との関連を調査した。表2はSCD遺伝子型と脂肪

酸組成および脂肪融点との関係を示している。

表2　SCD遺伝子型と脂肪酸組成との関係

型	頭数	頻度	MUFA(%)	融点(℃)
A/A	74	0.18	59.4±0.2	24.9±0.4
A/V	295	0.74	58.3±0.1	26.3±0.2
V/V	31	0.08	57.0±0.4	27.5±0.5

MUFA:不飽和脂肪酸含有量

不飽和脂肪酸含有量は AA 型を有する個体が59.4%であり、AV型の58.3%、VV型の57.0%と比較して有意に高い値を示した。また、脂肪融点はそれに準じ、AA型をもつ個体は融点が有意に低いことが明らかになった。腎周囲脂肪についても調査を行ったが、同様の結果が得られた。

さらに、全国における地域とSCD遺伝子頻度について調査した結果が表3である。この表に示すように、SCD 遺伝子頻度は地域によって偏りがあり、Gの地域ではA型の遺伝子頻度が最大となっており、逆にE地域では最低を示した。その結果は系統間や種雄牛間の脂肪酸組成の違いとの関係を示唆するものであった。

表3　SCD遺伝子頻度の地域差

地域	頭数	遺伝子頻度	
		A	V
A	38	0.67	0.33
B	38	0.51	0.49
C	36	0.51	0.49
D	39	0.54	0.46
E	40	0.19	0.81
F	17	0.65	0.35
G	45	0.78	0.22

これらの結果は、SCD遺伝子内のAV型変異が脂肪酸組成に直接関係していることを強く示唆していた。おそらくアミノ酸変異に伴うタンパク質の構造変化がこの酵素の活性などに影響しているものと考えられる。

3-5. SCD遺伝子調節因子、SREBP

我々はこのSCD遺伝子の発現量がウシの品種や個体によって差を有するか調査した。その結果、黒毛和種ではホルスタイン種よりも数倍SCD遺伝子の発現量が高いことを認めた（Taniguchi et al., 2004b)。また、黒毛和種内においても個体差が大きく、調節因子の制御の差異を示唆していた。

SCD 遺伝子の転写調節領域には、SRE、C/EBPa、Sp1、NF-Y、NF-1 といった転写調節因子の結合部位が存在する。我々はSREに結合するSREBPという、転写調節に着目し分析を続けている。これまでの結果では、この因子の翻訳領域内には顕著な変異は認められなかったが、イントロン5において約80bpの挿入/欠失を発見している。

この変異と脂肪酸組成との関係を調べたものが表3である。SS型を有する個体はその他のものより、不飽和脂肪酸含有量が高い結果が得られた。その効果としてはSCDよりも小さいものの何らかの影響を及ぼしていることが示唆されている。ただし、この変異はイントロン中に存在するために、どのようにSCD発現に関係しているのかは現在の所不明である。この変異が直接脂肪酸組成に関係しているのか、それともその他領域に原因となる変異が存在し、間接的に関係しているのかは現在調査中である。

表3　SREBP遺伝子型と脂肪酸組成との関係

型	頭数	MUFA(%)	融点(℃)
LL	98	58.0±0.2	26.4±0.3
LS	437	58.4±0.1	26.1±0.2
SS	71	59.2±0.3	24.9±0.4

MUFA:不飽和脂肪酸含有量

我々は、このSCD遺伝子に着目し、SCD遺伝子やその調節因子SREBPが不飽和脂肪酸含有量に影響していることを突き止めた。この変異を用いることにより牛集団の改良や牛肉品質の一指標として利用できると考えている。しかし、脂肪酸組成に影響する遺伝子はこの他にも存在していることは明らかである。今後は、脂肪酸組成に関係するその他遺伝子を探索することが重要となるであろう。

参考文献

万年英之．牛肉の品種判別技術について．食肉の科学．44:175-179．2003.

万年英之．国内産牛肉に対する品種鑑定の技術開発．東海畜産学会報．15:8-11．2005a.

万年英之．生鮮食肉の品種鑑別．食品鑑定技術ハンドブック．pp. 87-94. Science Forum. 2005b.

万年英之・笹崎晋史．国内産牛肉のDNA品種鑑定法．新・食品分析法（Ⅱ）．(社)日本食品科学工学会編．2006（印刷中）.

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.

Taniguchi, M., T. Utsugi, H. Mannen, S. Tsuji. Genotypes of stearoyl-CoA desaturase affect on the difference of fatty acid composition of Japanese Black steers. Mammalian Genome. 14:142-148. 2004a.

Taniguchi, M., H. Mannen, K. Oyama, A. Oka, H. Watanabe, T. Kojima, M. Komatsu, G.S. Harper, S. Tsuji. Differences in Stearoyl-CoA Desaturase mRNA levels between Japanese Black and Holstein cattle. Livest. Prod. Sci. 87:215-220. 2004b.

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.

Vos P, Hogers R, Bleeker M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Research. 21:4407-4414. 1995.