

## DNA分析による豚肉の品種判別法の検討

中山 祐輔, 井口 潤

Yusuke Nakayama, Jun Iguchi

### 要 約

豚肉の品種判別について、公益社団法人農林水産・食品産業技術振興協会（JATAFF）で開発された2種類の毛色関連遺伝子の多型から代表的な商用品種を判別する技術を参考に、PCR 及び PCR-RFLP 法により黒豚（バークシャー）であるか否かを判別する検査法の検討を行った。

その結果、黒豚は全て「黒豚」と判別され、交雑種及びバークシャー以外の純粋種では一部を除き「黒豚以外の品種」と判別されたことから、FAMIC の表示監視業務に適した豚肉の品種判別が可能であることを確認した。また、一部を除く豚肉加工品についても判別が可能であった。

### 1. はじめに

我が国における食品の表示は、平成 25 年 6 月に制定された食品表示法及びこれに基づく食品表示基準（平成 27 年内閣府令第 10 号）において義務付けられており、一般用生鮮食品は、食品関連事業者が「名称」等を表示することとされている。豚肉は国内で年 91.7 万トン（部分肉ベース）が生産されている<sup>1)</sup>が、これだけでは国内消費量を満たすことができないため、アメリカ、カナダ、デンマーク等から 74.4 万トンを輸入している<sup>2)</sup>。ブタの品種は数百種あると言われているが、主に 6 品種（大ヨークシャー：W、中ヨークシャー：Y、ランドレース：L、デュロック：D、バークシャー：B、ハンプシャー：H）の交雑種が生産に寄与しており、特に三元交雑と呼ばれる雑種強勢を利用した交雑がほとんどである。三元交雑種は、繁殖能力に優れた大ヨークシャー（♂）とランドレース（♀）の交雑種を母豚に、産肉能力の優れたデュロックを止め雄に用いた交雑種（LWD）が主流であるが、生産者によっては産子数や肉質の向上を図るため、独自の品種改良や LWD 以外の品種の豚肉を生産している。

ブタの品種を強調して販売されている豚肉の一つに黒豚がある。黒豚の表示は、食肉小売品質基準（昭和 52 年 1 月 26 日農林水産省畜産局長通達）の中の豚肉小売品質基準において、バークシャー純粋種の豚肉のみを「黒豚」と表示できるものと規定されている。バークシャーは産子数が少なく、肥育に時間がかかるが、ヨークシャーやランドレース等の白色品種や交雑種よりも美味とされていることから、一般的に白色品種や交雑種の豚肉に比べ高値で取引されている。しかし、精肉や加工品の状態では、黒豚か否かを肉眼で判別することが困難であることから、白色品種とバークシャーの交雑により得られた品種や三

元交雑された品種が「黒豚」として販売されることが懸念されている。このため、黒豚のように強調して表示される品種とその他の品種を判別する方法が求められている。

公益社団法人農林水産・食品産業技術振興協会（JATAFF）では、ブタの毛色に関連する2つの遺伝子、色素細胞等の増殖に関わるとされる *KIT* 遺伝子及び *MC1R*（メラニン細胞刺激ホルモン受容体）遺伝子の多型から、ブタの代表的な商用品種を判別する技術を開発している<sup>3, 4)</sup>。JATAFFの方法では様々な品種に対応するため、5つのDNAマーカーにより判別をしているが、市場に流通する豚肉の9割以上が白色品種との交雑種であり、黒豚に偽装されるのもこのような交雑種である可能性が高いことから、JATAFFの報告を参考にDNAマーカーを3つに減らし、FAMICの表示監視業務に使用することを目的として、「黒豚」と表示された豚肉が真に黒豚であるかどうかを判別できるよう検討した。

## 2. 実験方法

### 2. 1 試料

プライマーを設計するために、主要なブタ純粋種（バークシャー29件、ランドレース10件、大ヨークシャー9件、中ヨークシャー10件、デュロック10件）の豚肉及びDNA抽出液を畜産業者等を通じて入手した。

判別法の評価のために、上記純粋種に加え、LWD、WLD、LDB、LWB、LYB、アグー豚、イベリコ豚、ハイブリッド（近年、育種会社で作出されたケンボロー、ハイポーなどの品種の総称）を含む、通常販売される交雑種の豚肉及びDNA抽出液計112件を畜産業者等を通じて入手した。

判別法の豚肉加工品等への適用可能性を確認するために、焼き豚2件、ハム1件、ソーセージ3件、とんかつ5件、ハンバーグ1件、角煮2件、缶詰2件、レトルト2件、内臓肉（レバー1件、ハツ1件）、ラード2件を小売店で購入し、試料として用いた。

DNAマーカーの特異性の確認のために、ブタ以外の生物種7種（ニワトリ、ウシ、アイガモ、ウサギ、ウマ、ヤギ、ヒツジ）について、FAMICの保有するDNA抽出液を用いた。

### 2. 2 DNA抽出

DNA抽出には、DNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN）又はMaxwell<sup>®</sup> 16 Tissue DNA Purification Kit（Promega）を用いた。

DNeasy Blood & Tissue Kitを用いる場合は、試料の筋肉組織を10～50 mg採取し、抽出操作は製品プロトコールに従って実施した。Maxwell<sup>®</sup> 16 Tissue DNA Purification Kitを用いる場合は、約25 mgを採取し、抽出操作は、核酸・タンパク自動精製システムMaxwell<sup>®</sup> 16（Promega）を用い、装置の動物・植物組織用のプログラムによりDNA抽出を行った。

### 2. 3 PCR

*KIT* 遺伝子の遺伝子重複境界領域（以下、「*KIT* DBP 領域」）、*KIT* 遺伝子配列上のイントロン17の最初の塩基を含む領域（以下、「*KIT* Hsp92II 領域」）、*MC1R* 遺伝子配列上の

褐色毛色の原因とされる変異が起こる塩基を含む領域（以下、「MC1R HhaI 領域」）を対象とし、KIT Hsp92II 領域及び MC1R HhaI 領域の増幅については、新たにプライマーを設計した。KIT DBP 領域の増幅は、既報<sup>3)</sup>のプライマーを用いた（表 1）。

表 1 本検討で使用したプライマー

マーカー名	プライマー名	向き	配列 (5'→3')	増幅長 (bp)
KIT DBP <sup>3)</sup>	KIT DBP-F	F	GGA AGA ACC TTA AAT ATG CAY TAC TAA GTG AAA	104, 148
	KIT DBP-R1	R	TTG AGG TCA GTC TCT TTT TCA AGC CA	
	KIT DBP-R2	R	TTT GCC TGT TTA TCC CTG GAA ACT ACT	
MC1R HhaI	MC1R HhaI-F	F	TCC AGC ACC CTC TTC ATC GCC TAC TAC	321
	MC1R HhaI-R	R	GTT GAC GTT CTT GAA GAC GCA GC	
KIT Hsp92II	KIT Hsp92II-F	F	GAT TTG TGA TTT TGG TCT AGC CAG AG	208
	KIT Hsp92II-R	R	TGC AAA AGT ACA CTT CAT CTG ACG GC	

PCR 反応液の組成は、0.5 Units/tube の DNA ポリメラーゼ *TaKaRa Ex Taq*<sup>®</sup> HS (タカラバイオ)、1× *Ex Taq* Buffer (20 mM Mg<sup>2+</sup> plus)、0.2 mmol/L dNTP Mixture、各プライマー 0.25 μmol/L を含む反応液系に 2.0 μL の DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を 20 μL とした。

PCR は、サーマルサイクラー GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) 又は PTC 220<sup>™</sup> (Bio-Rad Laboratories) を用いた。PCR の温度サイクルは、最初の熱変性として 94 °C で 5 分、次に (1) 熱変性として 94 °C で 30 秒、(2) アニーリングとして KIT DBP 領域を増幅する場合は 60 °C で 30 秒、KIT Hsp92II 領域及び MC1R HhaI 領域を増幅する場合は 64 °C で 30 秒、(3) 伸長反応として 72 °C で 30 秒、の (1)～(3) を 1 サイクルとして 35 サイクル、最後に伸長反応の延長として 72 °C で 5 分反応させた。

電気泳動は、エチジウムブロマイド (10 mg/mL) (和光純薬) をゲル 100mL あたり 5.0 μL 添加した 3.0 % (w/v) アガロースゲル (Agarose L03「TAKARA」(タカラバイオ) 又は Agarose S (ニッポンジーン)) に、PCR 後の PCR 反応液 2.5 μL を供し、電気泳動を行った。

## 2. 4 制限酵素処理及び制限酵素処理後の電気泳動

KIT Hsp92II 領域及び MC1R HhaI 領域については制限酵素処理を実施した。

奥村の方法<sup>3)</sup>では、KIT Hsp92II 領域の制限酵素処理には NlaIII を用いているが、本検討では NlaIII と認識配列が同じである Hsp92II (Promega) を使用した。2.5 Units/tube の Hsp92II、1× 制限酵素用緩衝液 (添付品)、0.1 μg/μL の BSA (添付品) を含む反応液に 7.5 μL の PCR 反応液を加え、滅菌水で全量を 15 μL とし、37 °C で 1 時間処理した。

MC1R HhaI 領域の制限酵素処理には HhaI (Thermo Fisher Scientific) を使用し、2.5 Units/tube の HhaI、1× 制限酵素用緩衝液 (添付品) を含む反応液に 7.5 μL の PCR 反応液を加え、滅菌水で全量を 15 μL とし、37 °C で 1 時間処理した。

制限酵素処理後のアガロースゲル電気泳動は 2. 3 と同様に実施し、制限酵素処理溶液 6 μL を電気泳動に供した。

### 3. 結果及び考察

#### 3. 1 プライマーの設計

奥村の方法<sup>3)</sup>では、制限酵素処理後の DNA 断片長はいずれも 100 bp 未満と短く、電気泳動をポリアクリルアミドゲルにより行っている。本検討にあたり、制限酵素処理後の DNA 断片長が 100 bp 以上になるように新たにプライマーを設計した (表 1)。これにより簡便なアガロースゲルでの電気泳動が可能となった。

#### 3. 2 PCR及びPCR-RFLPにより予想される各品種のバンドパターン

PCR 及び PCR-RFLP により予想される各マーカーのバンドパターンを表 2 に、主要なブタ品種におけるバンドパターンの組合せを表 3 にそれぞれ示す。

白色品種では *KIT* 遺伝子が重複していることが知られている。この遺伝子重複の境界領域を *KIT* DBP-F と *KIT* DBP-R1、*KIT* DBP-F と *KIT* DBP-R2 の 2 つのプライマーセットでそれぞれ増幅することで、白色品種及びその交配種では 148 bp と 104 bp の PCR 産物が検出される。一方、*KIT* 遺伝子に重複のないバークシャー及びデュロックでは、148 bp の PCR 産物のみが検出される (図 1 a)。

また、白色品種で重複した一方の *KIT* 遺伝子ではイントロン 17 の最初の塩基が G から A に変異しており、その転写産物はエキソン 17 を欠失することが分かっている。変異した配列は Hsp92II で切断されるため、白色品種及びその交配種では Hsp92II により切断されない 175 bp のバンドと切断された 108 bp と 67 bp のバンドが両方検出される。一方、変異のないバークシャー及びデュロックでは Hsp92II による切断が起らないため、175 bp のバンドのみが検出される (図 1 b)。

*MC1R* 遺伝子の第 2 膜貫通領域を含む領域には、デュロック種の褐色毛色の原因とされる塩基配列の多型があることが知られている。デュロック種では、褐色検出部の配列が HhaI で切断されないため、240 bp のバンドのみが検出される。一方、白色品種及びバークシャーでは PCR 産物が HhaI により切断され、115 bp と 125 bp のバンドが検出される。また、LWD のような白色品種とデュロックの交配種では、両方のバンドが検出される (図 1 c)。

これらの分析結果から総合的に判断し、国内に流通する豚肉について、黒豚か黒豚以外の品種かを判別した。すなわち、各領域を分析し、結果が全て A 型であれば「黒豚」と判定し、いずれか 1 つでも A 型以外のバンドパターンを示した場合は、「黒豚以外の品種」と判定した。

表2 各マーカーのバンドパターン

マーカー名	A 型	B 型	AB 型
KIT DBP	148 bp	104 bp	104, 148 bp
MC1R HhaI	(81)*, 115, 125 bp	(81), 240 bp	(81), 115, 125, 240 bp
KIT Hsp92II	175 bp	(67), 108 bp	(67), 108, 175 bp

\*100 bp 未満のバンドは確認できない場合もあるため、100 bp 以上のバンドにより判別を行う。

表3 各品種におけるバンドパターンの組合せ

品種	KIT DBP	MC1R HhaI	KIT Hsp92II
バークシャー (黒豚)	A 型	A 型	A 型
ランドレース			
大ヨークシャー	AB 型	A 型	AB 型
中ヨークシャー			
デュロック	A 型	B 型	A 型
LWD	AB 型	AB 型	AB 型
ハイブリッド	AB 型	A 型	AB 型

### 3. 3 試料の判別結果

PCR 又は PCR-RFLP 法により、試料の判別を行った結果を表 4 に示す。バークシャーでは 29 件全てが「黒豚」と判別された。通常販売される交雑種の豚肉及び DNA 抽出液 112 件を分析したところ、108 件が「黒豚以外の品種」と判別された。残りの 4 件で「黒豚」と判別された原因としては、独自に交配された銘柄豚の中に黒豚と同じ遺伝子型を持つものが存在している可能性が考えられる。ただし、品種自体がブランド化されており黒豚への偽装の恐れが少ないと考えられるアグー豚 4 件、イベリコ豚 1 件については、判別結果は「黒豚以外の品種」となったが、判別率の計算から除外した。

主要なブタ純粋種（ランドレース 10 件、大ヨークシャー 9 件、中ヨークシャー 10 件、デュロック 10 件）を分析したところ、白色品種では 29 件全てが予想されるバンドパターンと一致した。デュロックでは、10 件中 7 件は予想されるバンドパターンと一致したが、残りの 3 件で KIT Hsp92II 領域でいずれのバンドパターンとも異なる 96 bp と 79 bp に切断された。ただし、判別結果としてはいずれも「黒豚以外の品種」と判別された。デュロックの中には KIT 遺伝子において異なるハプロタイプのヘテロ接合体を持つものが存在することが示唆されており<sup>5)</sup>、優性白色でみられる変異とは異なる箇所での変異により、Hsp92II で切断される個体が生じたと考えられる。

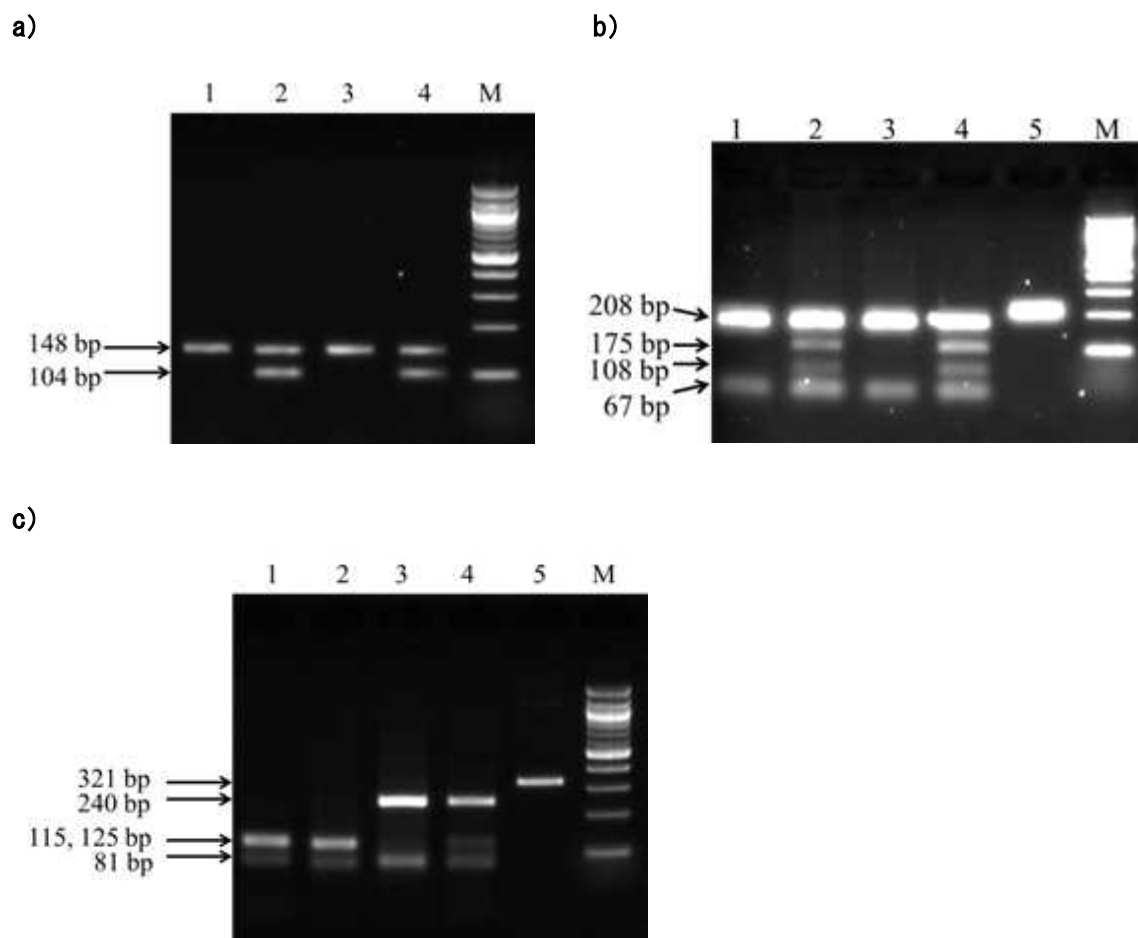


図1 各マーカーの電気泳動写真

a) KIT DBP マーカー、b) KIT Hsp92II マーカー、c) MC1R HhaI マーカー

1 : バークシャー 2 : ランドレース 3 : デュロック 4 : LWD 5 : 制限酵素未処理

M : 100bp Ladder Marker

左の数値は、PCR 産物長又は PCR-RFLP 後の DNA 断片長 (bp)

表4 試料の判別結果

品種	サンプル数	KIT DBP	MC1R HhaI	KIT Hsp92II	判別結果	
					黒豚	黒豚以外
パークシャー (黒豚)	29	A型 (29) *	A型 (29)	A型 (29)	29/29 (100%)	0/29 (0%)
通常販売される 交雑種**	107	A型 (13)	A型 (25)	A型 (26)	4/107 (3.7%)	103/107 (96.3%)
ランドレース	10	AB型 (94) AB型 (10)	AB型 (82) A型 (10)	AB型 (81) AB型 (10)	0/10 (0%)	10/10 (100%)
大ヨークシャー	9	AB型 (9)	A型 (9)	AB型 (9)	0/9 (0%)	9/9 (100%)
中ヨークシャー	10	AB型 (10)	A型 (10)	AB型 (10)	0/10 (0%)	10/10 (100%)
デュロック	10	A型 (10)	B型 (10)	A型 (7) いずれの型と も異なる (3)	0/10 (0%)	10/10 (100%)

\* ( ) 内はサンプル数

\*\*アグー豚4件、イベリコ豚1件を除く

また、判別法の適用可能性の確認のため、豚肉加工品等を分析した(表5)。レトルト、缶詰では電気泳動のバンドがやや薄かったものの、ラード以外は判別が可能であった。

豚以外の生物種7種を分析したところ、全てのDNAマーカーにおいて、PCR産物は検出されなかった。

表5 豚肉加工品等の判別結果

品目	判別可能数/試料数
焼き豚	2/2
ハム	1/1
ソーセージ	3/3
とんかつ	5/5
ハンバーグ	1/1
角煮	2/2
缶詰	2/2
レトルト	2/2
内臓肉	2/2
ラード	0/2

以上のことから、毛色関連遺伝子であるKIT遺伝子及びMC1R遺伝子中の3つの領域について、PCR及びPCR-RFLP法を用いて電気泳動パターンを検出することにより、FAMICの表示監視業務に適した豚肉の品種判別が可能であることを確認した。

#### 4. まとめ

ブタの毛色関連遺伝子である *KIT* 遺伝子及び *MC1R* 遺伝子について、JATAFF が開発した方法を参考に、一部新たにプライマーを設計し、3 種類の領域を PCR 及び PCR-RFLP 法により分析した。その結果、パークシャー（黒豚）を「黒豚」と判別した割合は 100 %、黒豚に偽装される可能性のある交雑種を「黒豚以外の品種」と判別する割合は 96.3 %であった。本手法により豚の品種判別が可能となった。また、一部を除く豚肉加工品等にも適用が可能であった。

なお、本検討を検査法として用いるにあたっては、特許<sup>4)</sup>の使用許諾を得る必要がある。

#### 5. 謝 辞

本研究を実施するにあたり、ご助言をいただきました、公益社団法人農林水産・食品産業技術振興協会農林水産先端技術研究所の奥村直彦様に深謝致します。

#### 6. 文 献

- 1) 農林水産省 平成 25 年畜産物流通統計
- 2) 財務省 平成 25 年日本貿易統計
- 3) 奥村直彦, ブタの品種, 「新・食品分析法Ⅱ」(倉田忠男編集) 株式会社光琳, 2006; 342 - 355.
- 4) DNA 配列多型による豚の品種鑑別法, 特許 3116049 号
- 5) 奥村直彦, 小林栄治, 鈴木秀昭, 両角岳哉, 濱島紀之, 三橋忠由: ブタ品種間に認められる *MC1R* 遺伝子および *KIT* 遺伝子の多型. Anim. Sci. J. 71 (8):2000; J222-J234