

DNA分析を用いた牛肉の雌雄判別法の検討

浪越 充司¹、立野 みどり¹、服部 賢志²、澤田 桂子²、
井伊 悠介¹、足立 静香¹、木村 康晴¹

Atsushi NAMIKOSHI, Midori TATENO, Satoshi HATTORI, Keiko SAWADA,
Yusuke Ii, Shizuka ADACHI, Yasuhare KIMURA

要 約

牛肉の雌雄を判別するために Sasazaki らが開発した雄牛特異的マーカー(SRY マーカー)及びウシ共通の内在性マーカー(AMLX1 マーカー)を用いた PCR によって、牛肉の雌雄判別が可能かの検討を行った。オス 47 個体及びメス 49 個体で確認した結果、AMLX1 マーカーの PCR では、すべての試料で目的長の PCR 増幅産物が得られ、DNA 抽出に問題がないことが確認された。また、SRY マーカーの PCR では、すべてのオス試料から目的長の PCR 増幅産物が得られ、メス 2 個体でも PCR 増幅産物が得られた。ウシの染色体異常として外見上の性別と染色体に相違がある生殖巣発育不全症やフリーマーチン等の現象があり、ホルスタイン種でのフリーマーチンの発生率は 1～2%であるとの報告¹⁾がある。SRY マーカーで PCR 増幅産物が得られたメス 2 個体についてはフリーマーチン等の染色体異常の可能性が考えられる。このため、本法は 1～2%の誤判別が生じると考えられる。さらに、本法について 4 試験室において未知試料を用いて共同試験を実施したところ、配付したすべての試料について正しく雌雄を判別した。

1. はじめに

我が国における生鮮食品の品質に関する表示は、農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律(JAS 法)に基づき制定された生鮮食品品質表示基準によって名称及び原産地を記載することになっている。また、地名を冠した銘柄名(ブランド名)を表示する際、当該地名が主たる飼養地の地名と同一である場合は原産地名の記載を省略できることとなっている。

また、産地銘柄表示の基準は、(社)中央畜産会が「産地等表示食肉の生産・出荷等の適正化に関する指針」及び「食肉販売店等における食肉の産地等表示販売に関する指針」を策定しており、多くの産地銘柄牛肉は品種、生産地域の範囲、飼養管理方法及び品質(肉質)の範囲等が定められている。

銘柄牛肉は一般的に高級又は一定の品質を備えたものとのイメージがあり、高価であるため、食肉の産地銘柄について虚偽の表示が懸念される。一部の銘柄牛肉はブランド定義として雌雄のどちらかを飼養することが定められているため(表 1)、これらについては雌雄判別を行うことで

1 (独)農林水産消費安全技術センター 神戸センター

2 (独)農林水産消費安全技術センター 本部

表示の真正性を確認することが可能となる。

農林水産消費安全技術センター(以下、「FAMIC」という)は神戸大学の万年教授らと協力し、DNA分析による国産と外国産の牛肉の産地判別法の確立に取り組んでいるところであるが、Sasazakiらが開発した国産と外国産の牛肉の産地判別 DNA マーカーの一つに、雄性決定の Y 染色体に座乗している雄牛特異的マーカー(SRY マーカー)がある。牛の性染色体構成はオスでは X 及び Y で、メスでは X 及び X の 2 本の染色体をもっているため、この SRY マーカーを雌雄判別に転用することで、新たな、DNA 分析による雌雄判別法の確立が期待できる。

本調査研究は Sasazaki らが開発した SRY マーカーを用いた PCR^{1), 2)} 及び DNA 抽出に問題がないことを確認するために設計したウシ共通の内在性マーカー(AMLX1 マーカー)を用いた PCR によって牛肉の雌雄が判別可能かを検討した。さらに本法の複数試験室における再現性を確認するために、FAMIC で DNA 分析を担当している 4 試験室で未知試料の雌雄判別結果が一致するかの共同試験(以下、「共同試験」という)を実施して確認したので報告する。

表 1 雌雄が定められた産地銘柄牛肉(平成 22 年の銘柄牛肉検索システム(財)日本食肉消費総合センターからの情報による)

雌牛	釧路アップルビーフ、むさし牛、阿智黒毛和牛、特選和牛静岡そだち、松阪牛、伊賀牛、大和牛、石見和牛肉、いしづち牛
雄牛	美夢牛、こだわりの美深牛、野付牛、根釧牛、しほろ牛、庄内牛、暖か渥美の伊良湖常春ビーフ

2. 実験方法

2.1 試料

雌雄間で形態的な差異が現れる部位としてオスでは生殖器、メスでは乳房を対象試料とし、フナコシ株式会社よりオスの生殖器 26 個体及びメスの乳房 26 個体を入手した。また、検査対象部位となる筋肉組織試料は、市販の食肉に記載された個体識別番号から雌雄を判断し、オス 21 個体及びメス 23 個体を入手した。

2.2 プライマーの設計

ウシ共通の内在性マーカー(AMLX1 マーカー)としてアメロゲニン遺伝子配列(DDBJ/EMBL/GenBank : Accession No. L48608)を参考にし、AMLX1 フォワードプライマー(5'-TCAGTGATTTCAGTTAGCCCAAGTGTGT-3')及び AMLX1 リバースプライマー(5'-AATCACCTTTCCTTGAATAGCTCTGGC-3')を設計した。なお、AMLX1 マーカーで得られる PCR 増幅産物は 1,187 bp であった。

2.3 DNA 抽出、PCR、アガロース電気泳動

DNA 抽出は DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN 株式会社)を用いた。試料 25 ± 5 mg を採取し、

180 μL の Buffer ATL 及び 20 μL の Proteinase K を添加後、55 $^{\circ}\text{C}$ に保温し、試料が完全に溶解するまで 2 時間以上放置した。次に、RNase A (QIAGEN 株式会社 : 100 mg/mL) を 4.0 μL 添加し、室温で 2 分間静置した。200 μL の Buffer AL を添加し、70 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間加熱した。200 μL のエタノールを添加し、溶液全量を付属のカラムに負荷した。カラムを室温にて 6,000 $\times g$ で 1 分間遠心した。カラムに Buffer AW1 を 500 μL 加え、室温にて 6,000 $\times g$ で 1 分間遠心し、さらに、カラムに Buffer AW2 を 500 μL 加え、室温にて 12,000 $\times g$ で 3 分間遠心し、カラムを洗浄した。DNA の溶出には滅菌水を 100 μL 加え、室温で 1 分間静置後、室温にて 6,000 $\times g$ で 1 分間遠心し、もう 1 度滅菌水を 100 μL 加え、1 回目の溶出液と合わせて遠心操作を行い、溶出液を DNA 溶液とした。

PCR は AMLX1 マーカー及び SRY マーカーでそれぞれ行い、PCR 反応液の組成及び PCR 反応条件は同一とした。PCR 増幅は 25 μL の反応液で行い、PCR 反応液の組成は、0.5 units の *TaKaRa Ex Taq*[®] HS (タカラバイオ株式会社)、1 \times *EX Taq* buffer、0.2 mmol/L dNTP Mixture、0.2 $\mu\text{mol/L}$ の各 DNA マーカーのプライマーセットを含む反応液系に 5.0 μL の DNA 溶液を加え、滅菌水で全量を 25 μL とした。PCR 反応条件は最初の熱変性として 94 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分、次に 94 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒、65 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒、72 $^{\circ}\text{C}$ で 30 秒を 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 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分を GeneAmp[®] PCR System 9700 (Life Technologies 株式会社) を用いて行った。

アガロース電気泳動でのアガロースは Agarose LE (和光純薬工業株式会社) を用い、ゲルの濃度は 1 ~ 1.5 % (w/v) とし、電気泳動緩衝液は TAE を用いた。PCR 反応液 2.5 μL を電気泳動に供し、泳動結果はゲルイメージ解析装置を用いて画像データ又は写真で記録した。

2. 4 4 試験室における共同試験

試験手順及び条件を文書化し、共同試験を実施した。共同試験の対象試験室は FAMIC で DNA 分析による品種判別を業務として行っている 4 試験室 (さいたま市、横浜市、神戸市及び福岡市) で実施した。試料はオス 3 個体及びメス 2 個体の筋肉組織約 0.5 g を雌雄が分からないように 3 桁の乱数を付して各試験室に配付し、試験を行って雌雄を判別した。

3. 結果及び考察

設計した AMLX1 マーカーのプライマーセットで PCR 増幅産物が得られることを確認した (図 1)。また、SRY マーカーは既報の DNA 抽出、PCR 反応液の組成及び PCR 条件を変更し PCR を行うこととしたため、変更した条件下でも PCR 増幅産物が得られることを確認した (図 1)。

96 個体から DNA を抽出し、AMLX1 マーカーを用いた PCR を行ったところ、すべての試料で目的長の PCR 産物が得られ、生殖器、乳房及び筋肉組織からの DNA 抽出に問題がないことが確認された。また、上記の試料で SRY マーカーを用いた PCR を行ったところ、すべてのオス試料から目的長の PCR 増幅産物が得られ、メス 2 個体においても PCR 増幅産物が得られた。SRY マーカーで PCR 増幅産物が得られたメスの検査部位は乳房 1 個体及び筋肉組織 1 個体であった。

ウシの染色体異常に係る情報として、外見上は雌であるが、雄型の染色体構成 (XY) を示す生殖巣発育不全症 (XY female) や性染色体キメラ (XX / XY) を示すフリーマーチンなどの外見上の

性別と染色体に相違がある現象が報告されている³⁾。フリーマーチンの発生率はホルスタイン種においては約1～2%であり、品種によって差があるとの報告がある³⁾。このため、今回のメス2個体でSRYマーカーでPCR増幅産物が得られた結果はフリーマーチン等の染色体異常の可能性が考えられる。そのため、本法は染色体異常による誤判別が避けられず、1～2%の誤判別が生じると考えられる。

また、4試験室における共同試験の結果、すべての試験室において雌雄を正しく判別(表2)したことにより、複数試験室における再現性の確認をした。

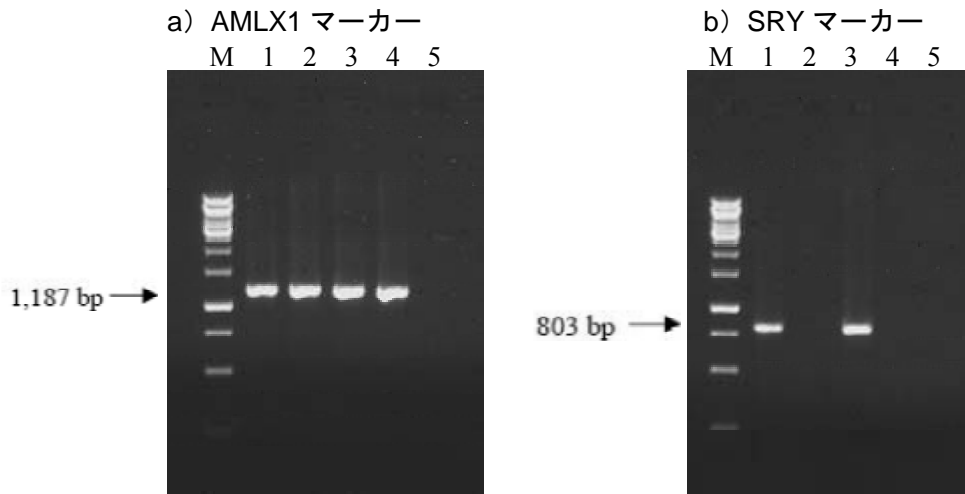


図1 各マーカー PCR 後の電気泳動写真

1: オス (生殖器)、2: メス (乳房)、3: オス (筋肉組織) 4: メス (筋肉組織)
 5: ネガティブコントロール、M: 1 kb DNA Ladder marker

表2 各試験室における雌雄判別結果

	試料1 (オス)	試料2 (オス)	試料3 (オス)	試料4 (メス)	試料5 (メス)
試験室A	オス	オス	オス	メス	メス
試験室B	オス	オス	オス	メス	メス
試験室C	オス	オス	オス	メス	メス
試験室D	オス	オス	オス	メス	メス

4. まとめ

オス47個体及びメス49個体について AMLX1 マーカー及び SRY マーカーを検討した結果、AMLX1 マーカーを用いた PCR は、すべての試料で目的長の PCR 増幅産物が得られ、DNA 抽出に問題がないこと確認された。また、雄牛を特異的に検出する SRY マーカーを用いた PCR では、すべてのオス試料から目的長の PCR 増幅産物が得られたが、メス2個体においても PCR 増幅産物が得られた。メス2個体でも PCR 増幅産物が得られたことについては、ウシの染色体異常であるフリーマーチン等の可能性が考えられる。本法は、染色体異常による誤判別が避けられず、1～2%の誤判別が生じると考えられる。なお、この判別法について4試験室による共同試験を

実施したところ、すべての試験室で配付したすべての試料について正しく雌雄を判別し、複数試験室における再現性を確認した。

5. 謝 辞

本研究を実施するにあたり、国立大学法人神戸大学大学院農学研究科資源生命科学専攻応用動物学講座の万年英之教授からは、技術指導を含め多大なるご支援をいただいたので感謝を申し上げます。

6. 文 献

- 1) Sasazaki, S., Mutoh, H., Tsurifune, K. and Mannen, H. Development of DNA markers for discrimination between domestic and imported beef. *Meat Science*, **77**, 161-166 (2007).
- 2) 特許公開 2008-48613 国産牛と豪州産輸入牛の鑑別方法
- 3) 山内 亮 最新家畜臨床繁殖学 朝倉書店