

黒毛豚の SLA-DRB1 遺伝子及び 18S rRNA 遺伝子の同定

竹下 温子, 竹野あいこ, 瀬戸口賀子

要 旨

豚の SLA-DRB1 遺伝子解析は、異種移植の影響からミニブタを中心として多くの研究者より報告がなされている^{1) 2) 3) 4)}。一方、黒毛豚の遺伝子解析報告は偽造問題の影響から増えつつあるが、その解析は非常に困難を極めている。1999 年に三橋らによる毛色の遺伝子解析が報告され⁵⁾、その方法は特許を得、畜産学会では一役かったが、六白黒毛の鹿児島黒豚と他の黒毛の豚を判別するには毛色遺伝子では難しい。

そこで我々は、市販されている鹿児島黒豚はもとより、それ以外の黒毛豚にも注目し、豚の主要組織適合性複合体遺伝子の一つである、SLA-DRB1 (SLA : Swine Leukocyte Antigen) 遺伝子および真核生物の同定に用いられる 18S rRNA 遺伝子を用いて遺伝子の同定を行った。その結果、SLA-DRB1 遺伝子において鹿児島黒豚改良協会と南九州畜産の鹿児島黒豚、スペインのイベリコ豚は、猪豚と約 98% の相同性を示した。また 18S rRNA 遺伝子の塩基配列についても鹿籠豚と南九州畜産の鹿児島黒豚において、猪豚と 99.73% の相同性を示した。猪豚は猪と中国の梅山豚との交配種で、梅山豚は鹿児島黒豚の系統の一つとして 2003 年に我々が報告している⁶⁾。今回解析したすべての黒毛豚について、イノシシと中国の梅山豚との掛け合わせであるイノ豚と近縁であることが判明した。このことより、黒毛で美味しいと呼ばれている遺伝子は中国の梅山豚に由来するのではなかろうかという考えに至った。また以上の結果より 18S rRNA 遺伝子でも鹿児島黒豚の源流を探ることができると考えられた。

キーワード：鹿児島黒豚, SLA-DRB1 遺伝子, 18S rRNA 遺伝子

はじめに

我が国で養豚が本格的に奨励されたのは明治 14 年のこと、鹿児島ではその何百年も前から在来の「島豚」と呼ばれる黒毛小型の豚が飼育されており、十八代藩主島津義久は琉球からも島豚（あぐーと呼ばれる黒毛島豚）を移入するほどであった。飼料には当時フィリピンから伝わった「さつまいも」を加え、飼育していたと伝えられており、これが現在の鹿児島の養豚飼料の原点となったとも考えられる。鹿児島は、このように古くから養豚が盛んに行われてきたが、現在の鹿児島黒豚と呼ばれる「六白」の黒毛豚は、明治 18 年に枕崎で獣医業を開業していた園田兵助が在来の島豚に英国のパークシャー種を掛け合わせ改良を重ねたのが始まりであった。黒豚の父と呼ばれる園田が伝承した枕崎産の黒豚は、その後、枕崎の人たちの手により改良を続け、昭和 24 年から生きたまま枕崎の鹿籠駅から東京へ出荷されるようになった。その肉質のうまさや全国的な市場や食肉業者の間でうわさとなり、黒豚の貨車に「鹿籠駅」の車票がついていたことから「鹿籠豚」と呼ばれ親しまれ、豚のブランドを確立していった。

しかしながら、高度経済成長期を境に安価で大量に消費するという考えが広がる中で鹿児島黒豚は絶滅の危機を経験した。現在では、消費者の食への関心も高まり、

再びブランドとしての価値を見出している鹿児島黒豚だが、ブランドの影を落とす食品偽造の問題に頭を悩ませる日々である。そこで我々は、鹿児島黒豚の遺伝子解析はもとより、その他の黒毛豚であるスペインのイベリコ豚や、十八代島津義久が移入したという琉球の島豚である「あぐー豚」、現在も鹿籠豚として販売を続けている山口牧場の鹿籠豚について、その遺伝子の同定を行い、源流を探ることを目的とした。

実験材料および方法

1. 実験材料

実験材料は市販されており、生産場所から直接卸されている鹿児島市の食肉店より鹿児島黒豚および、薩摩川内市の飲食店から分けて頂いたスペイン産のイベリコ豚 (*De Recebo*)、薩摩川内市のスーパーにて市販されていた、沖縄県産あぐー豚および鹿児島黒豚を用いた。

2. 豚肉からの DNA 抽出および精製

(以後の実験方法はすべて、滅菌された器具・試薬を用いた) 市販されている黒毛豚肉を試料として高分子 DNA の分離精製を行った。ここでは Blin らの方法である液体窒素粉末法⁷⁾および Benzyl Chloride 法⁸⁾の 2 法に従い、高分子 DNA を分離した。精製は前報⁹⁾に従った。

これら 2 法を比較することで豚肉から高分子 DNA を抽出するのに最適な方法を検討した。

Table 1 SLA-DRB1 genetic of PCR Primer

Set	Primer	Sequence	report
PDR2	Forward	5'-TAGGATCCCTCACAGCGCATTTCTT-3'	Shia YC et al. ²⁾
	Reverse	5'-GCGAATTCCGAGGTCCTGTAGTTGT-3'	Animal Genetics,1995

Table 2 18S rRNA genetic of PCR Primer

Set	Primer	Sequence	report
18SF	Forward	5'- AACCTGGTTCATYCTGCCAG-3'	Shia YC et al. ²⁾
18SR	Reverse	5'-TGATCCTTCYGCAGGTTACCTAC -3'	Animal Genetics,1995

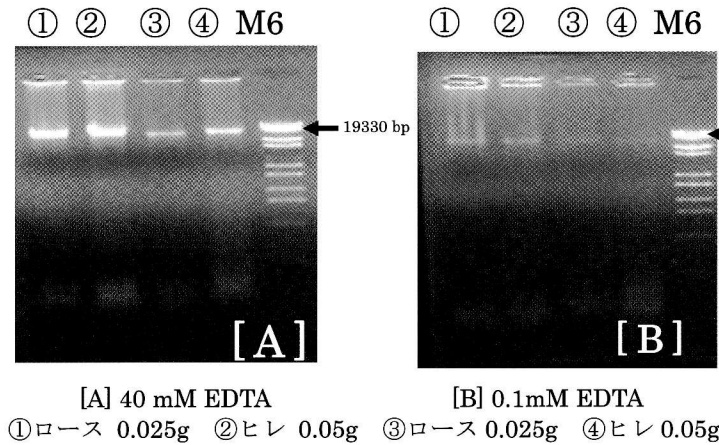


Fig.1 DNA 抽出 Buffer における EDTA 濃度および豚肉量の検討

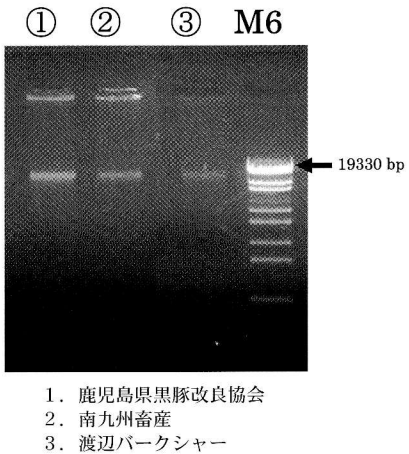


Fig.2 黒毛豚 DNA 電気泳動

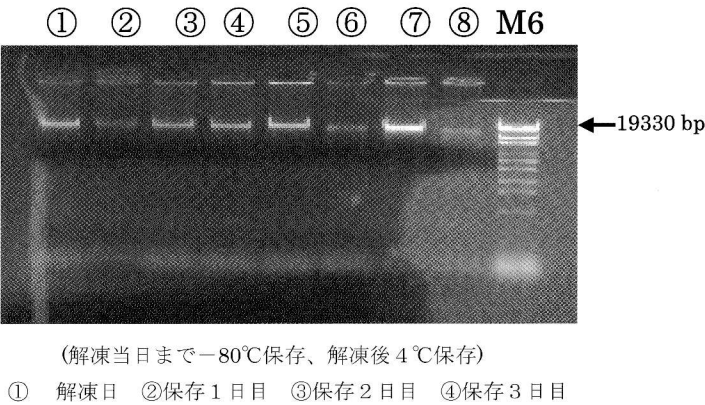


Fig.3 豚肉保存期間における DNA 電気泳動

3. 1.0% アガロースゲル電気泳動による高分子 DNA の確認

高分子 DNA の確認は前報⁹⁾の方法に従って行った。

4. SLA-DRB1 遺伝子の PCR(PCR:Polymerase-Chain-Reaction) 法¹⁰⁾

SLA-DRB1 遺伝子の PCR 増幅の Primer PDR2 は前報⁹⁾に従い、インビトロジェン株式会社に委託合成したものを使用し、反応は Takara Ex Taq (タカラバイオ株式会社)を用いて行った。PCR 反応は Bio RAD i cycler を用いて至適サイクルと至適温度条件は前報⁹⁾

に従って行った。Primer の塩基配列は Table 1 に示した。

5. 18S rRNA 遺伝子の PCR 法¹¹⁾

18S rRNA 遺伝子の PCR 増幅 Primer は 18SF, 18SR をインビトロジェン株式会社に委託合成し、反応試薬は Takara Ex Taq (タカラバイオ株式会社)を用いた。PCR 反応は Bio RAD i cycler を用い、至適サイクル・温度条件は知念ら¹²⁾に従った。Primer の塩基配列は Table2 に示した。

6. Sephaglas Band Preo Kit によるスミアバンドの除去
それぞれの遺伝子の PCR 増幅産物にはスミアバンド

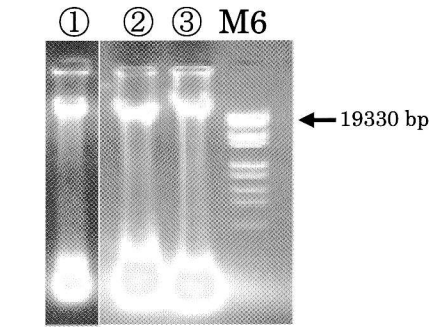


Fig.4 液体窒素粉末法による DNA 抽出

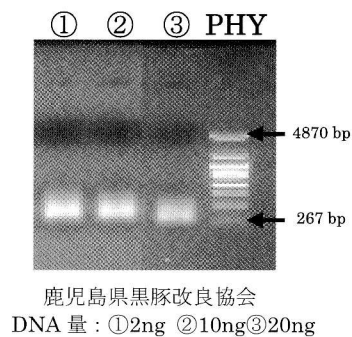
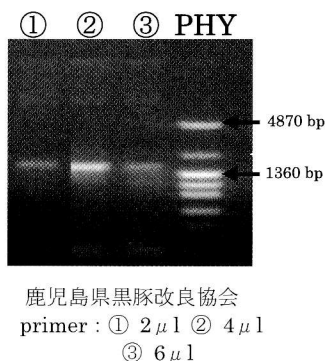
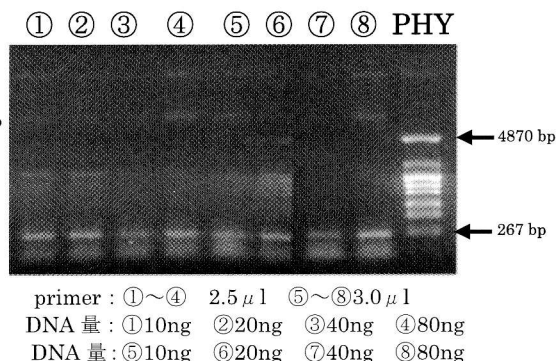
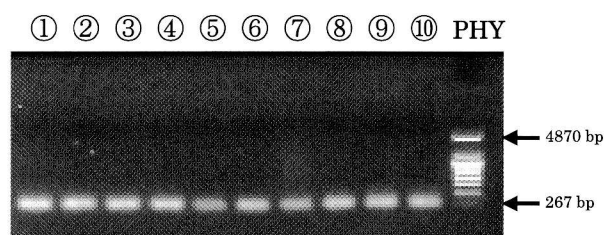
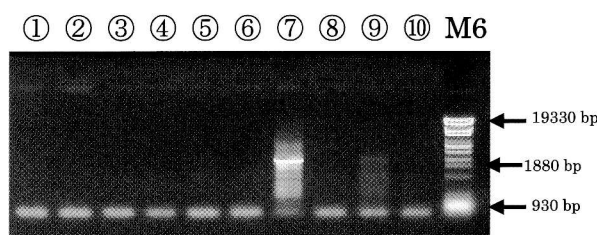
Fig.5 DNA 濃度変化による
SLA-DRB1 増幅産物Fig.6 Primer 濃度変化による
SLA-DRB1 増幅産物

Fig.7 条件変更による SLA-DRB1 増幅産物

Fig.8 18S r RNA 遺伝子の増幅産物
Annealing:62°CFig.9 18S r RNA 遺伝子の増幅産物
Annealing:50°C

も増幅されたため、Sephaglas Band Preo Kit によりスメアバンドの除去を行った。

7. 塩基配列の決定

目的の PCR 増幅産物が得られたかアガロースゲル電気泳動法で確認後、塩基配列の決定を行うため Sequence PCR を Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、反応は Bio RAD i cycler を用いて前報⁹⁾に従い至適サイクルと至適温度条件で行った。その後 DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の相同検索エンジン FASTA にて相同検索を行った。

結果および考察

1. Benzyle Chloride 法による高分子 DNA 抽出

1-1 EDTA 濃度および豚肉量の検討

Benzyle Chloride 法による高分子 DNA の抽出は菌検体から行ったことしかなく、豚肉から同様の方法で抽出できるかを検討するため、豚肉量および EDTA 濃度を変化させ、市販黒豚 2 検体を用いて抽出を行った。その結果、Fig.1 に示すように、EDTA 濃度は 40 mM、豚肉量は 0.025g が最も収量が高く、純粋な高分子の DNA を抽出できることがわかった。よって以後、Benzyl Chloride 法はこの組成にて高分子 DNA の抽出をおこなった (Fig.2)。

1-2 豚肉保存期間における高分子 DNA 抽出の検討

屠殺後急速冷凍された鹿児島黒豚改良協会の豚肉を購入し、-80°C にて保存していたものを、解凍後 4°C 保存にて、何日間高分子 DNA が抽出できるか検討を行った。抽出方法は Benzyl Chloride 法を用いて行った結果、Fig.3 に示すように、4°C 保存 9 日間という長期にわたっても高分子 DNA を抽出することができた。9 日以後は、豚肉の腐敗がはじまり、抽出を行うことができなかった。

2. 液体窒素粉末法による高分子 DNA の抽出

豚肉から従来の方法である液体窒素粉末法により高分子 DNA の抽出を行った結果、Fig.4 に示すとおり、非常に高収量の高分子 DNA が得られたが、RNA の存在も非常に多かった。また Benzyl chloride 法と同様に保存期間の検討も行ったが、数日後には DNA を目で確認することができなくなった。液体窒素粉末法は、最終的に、目で確認できる DNA を回収するため、それより細かいものについては、回収できない。このことより、液体窒素粉末法による高分子 DNA の抽出は保存されている豚肉の状態によって高分子の DNA の抽出に影響がでることがわかった。以上の 2 法の DNA 抽出法の結果より、より多くの高分子 DNA 量が必要な時には、液体窒素粉末法が適するが、近年の PCR の酵素は非常に少ない DNA から遺伝子の増幅を可能とするため、Benzyl Chloride 法がサンプル量も少なく、液体窒素粉末法より、抽出法が簡素化されているということからも、非常に適しているということが判った。

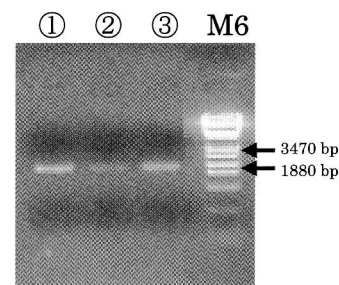


Fig.12 Sephaglas 处理

Annealing : 62°C

①鹿児島県黒豚改良協会 ②南九州畜産 ③イベリコ豚 ④渡辺パークシャー

				380	370	360
–				GCGCGCCTGCTGCCTTCCTTGATGTGGTA		
					
AY2653	CTACCTCCCCGGGTCGGGAGTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTTGATGTGGTA					
	1470	1480	1490	1500	1510	1520
	350	340	330	320	310	300
–	GCCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCTGATTCCCCGTCACCCGTGGTCACC					
					
AY2653	GCCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCTGATTCCCCGTCACCCGTGGTCACC					
	1530	1540	1550	1560	1570	1580
	290	280	270	260	250	240
–	ATGGTAGGCACGGCGACTACCATCGAAAGTTGATAGGGCAGACGTTCAATGGGTCGTCG					
					
AY2653	ATGGTAGGCACGGCGACTACCATCGAAAGTTGATAGGGCAGACGTTCAATGGGTCGTCG					
	1590	1600	1610	1620	1630	1640
	230	220	210	200	190	180
–	CCGCCACGGAGGGCGTGCGATCGGCCCAGGTTATCTAGAGTCACCAAAGCCGCCGGCGC					
					
AY2653	CCGCCACGGAGGGCGTGCGATCGGCCCAGGTTATCTAGAGTCACCAAAGCCGCCGGCGC					
	1650	1660	1670	1680	1690	1700
	170	160	150	140	130	120
–	CCACCCCCCGGCCGGGGCCGGGAGGAGGCTGACCGGGTTGGTTTTGATCTGATAAATGC					
					
AY2653	CCACCCCCCGGCCGGGGCCGGGAGGAGGCTGACCGGGTTGGTTTTGATCTGATAAATGC					
	1710	1720	1730	1740	1750	1760
	110	100	90	80	70	60
–	ACGCATCCCCCGCGAAGGGGGTCAGCGCCCGTCGGCATGTATTANCTCTAGAATTACC					
					
AY2653	ACGCATCCCCCGCGAAGGGGGTCAGCGCCCGTCGGCATGTATTAGCTCTAGAATTACC					
	1770	1780	1790	1800	1810	1820
	50	40	30	20	10	
–	ACAGTTATCCAAGTAGGAGAGGAGCGAGCGACCAAAGGAACCATAACTGA					
					
AY2653	ACAGTTATCCAAGTAGGAGAGGAGCGAGCGACCAAAGGAACCATAACTGATTTAATGAGC					
	1830	1840	1850	1860	1870	1880

得られたが、シャープなバンドを得ることができなかった (Fig.5)。そこで、Annealing 時の温度条件を色々と検討した。その結果 58℃では目的のバンドとそれ以外のスミアバンドが高濃度で増幅された (Fig.6)。よって、DNA 量、プライマー量、サイクル数など、考えられる条件をすべて変え行ってみたが多数のスミアバンドが

	18S rDNA	相同性(%)	SLA-DRB1 遺伝子	相同性(%)
鹿児島県黒豚改良協会	Not done		猪豚	98.0%
南九州畜産	猪豚	99.7%	猪豚	98.2%
鹿籠豚	猪豚	99.7%	Not done	
イベリコ豚	Not done		猪豚	98.2%
あぐー豚	Not done		Not done	

Fig.13 黒毛豚の相同性検索結果

増幅され、目的の 300bp 付近のみの濃いバンドを得ることができなかった (Fig.7)。SLA-DRB1 遺伝子の PCR 反応の温度条件は今後さらなる検討が必要と考えられた。

2-2 18S rRNA 遺伝子の PCR 増幅

上述したように SLA-DRB1 遺伝子の PCR 増幅には困難を極めたため、18S rRNA 遺伝子を増幅し、塩基配列の決定を行う事を試みた。まず Ex Taq 試薬の組成と反応条件に従い、Annealing 温度 62℃で PCR 反応を行ったが、Fig.8 に示すとおり、目的の 1750bp 付近にバンドを得ることができなかった。そこで我々は知念らの方法に従い¹²⁾ Annealing 温度を 50℃に設定し PCR 反応を行った (Fig.9) その結果、目的の 1750bp 付近にバンドが確認できたのは⑦検体のみであったが、スメアバンドの増幅も多数確認され、この温度条件では目的の 18S rRNA 遺伝子が単一で増幅しにくいことが判った。その後 SLA-DRB1 遺伝子の増幅時と同様に、DNA 量、プライマー量、サイクル数などの条件を変え、至適反応組成および至適温度条件を検討した。2000 年に我々が報告した時より、酵素が少量の DNA で目的産物の増幅を可能としているため、最初に DNA 量の検討を行った (Fig.10)。その結果、2000 年に我々が報告した反応組成の DNA 量より約 1/6 量である 80ng/μl では、目的のバンドが得られなかったが、最も高い濃度で目的の産物を得たのが 80ng/μl よりも少ない 4~10ng/μl であった。よってこの DNA 量でさらに増幅産物を増やすためにサイクル数を増やし、PCR を行った結果、Fig.11 に示すとおり、すべての検体において目的の増幅産物を得ることができた。しかしながら、スメアバンドも確認されたため、スメアバンドの除去を行うこととした。

4. SLA-DRB1 遺伝子増幅産物および 18S rRNA 遺伝子増幅産物のスメアバンドの除去

目的の増幅産物のみを得るために、Sephaglas Band Preo Kit を用い、スメアバンドを除去した結果の一部を Fig.12 に示した。このようにして目的のバンドのみを得ることができた。

5. 黒毛豚の塩基配列の決定

目的の PCR 増幅産物を鋳型とし、遺伝子配列の決定

を行った。南九州畜産の黒豚とイノ豚の 18S rRNA 遺伝子の相同性検索結果を Table3 に示した。このように、遺伝子増幅産物の得られたすべての遺伝子について相同性検索した結果、SLA-DRB1 遺伝子において鹿児島県黒豚改良協会と南九州畜産の鹿児島黒豚、スペインのイベリコ豚は、猪豚と約 98%の相同性を示し、18S rRNA 遺伝子の塩基配列について鹿籠豚と南九州畜産の鹿児島黒豚も、猪豚と 99.73%の相同性を示した (Fig.13)。猪豚は猪と中国の梅山豚との交配種で、梅山豚は鹿児島黒豚の系統の一つとして 2003 年に我々が報告している⁶⁾。今回解析したすべての黒毛豚について、イノシシと中国の梅山豚との掛け合わせであるイノ豚と近縁であることが判明した。このことより、黒毛で美味しいと呼ばれている遺伝子は中国の梅山豚に由来するのではなかろうかという考えに至った。現在はこれらの思想から科学研究費を得て、黒毛豚と美味しさの遺伝子について研究を進めている。

文 献

- 1) Vage D.I. et al. (1994) *Animal Genetics* 25 : 73-75
- 2) Shia Y.C. et al. (1995) *Animal Genetics* 26 : 91-100
- 3) Brunsberg U. et al. (1996) *Immunogenetics* 44 : 1-8
- 4) Tomoko Hosokawa Kanai. et al. (1999) *Immunogenetics* 50 : 295-300
- 5) 三橋忠由, 他 (1999) 毛色関連遺伝子を用いたブタの品種推定法 畜産学会 第 96 回
- 6) 竹下温子 (2003) 鹿児島黒豚の SLA-DRB1 遺伝子の同定及び系統解析 修士論文
- 7) Blin N. et al. (1976) *Nucleic Acids Res.* 3 : 2303
- 8) Zhu H. et al. (1993) : Isolation of genomic DNAs from plants fungi and bacteria using benzyl chloride. . 21 : 5279 - 5280
- 9) 竹下温子 (2001) 鹿児島黒豚の SLA-DRB1 遺伝子の分析地域・人間・科学 5 : 145-160
- 10) 知念秀明 (1999) 18S rDNA 遺伝子を用いたラファミド藻類の分子系統解析

Phylogenic analysis of the black hair pig (Kuroge-Buta) by homology sequencing of swine leukocyte antigen DRB1 and 18 s ribosomal RNA genes

Haruko Takeshita, Aiko Takeno and Yoshiko Setoguchi

Faculty of Nursing and Nutrition, Kagoshima Immaculate Heat University

Key words : Black hair pig, SLA-DRB1 gene, 18s ribosomal gene

Abstract

Genetic analysis of swine leukocyte antigen DRB1 gene (SLA-DRB1) has been made by many investigators who aim to explore xenotransplantation in human using live organ of miniature pigs. Genes of pig's hair color are genetic marker of pigs to define a specific strain of pig (Mitsuhashi et al. 1999) and used for certification of pork meats from a specific strain of pig. However, the molecular analysis of hair color genes is not always useful in determining specificity of Kagoshima Kurobuta whose hair color is black but distinct from other black hair pigs in 6 white spots that is a significant marker of pork meat taste.

In order to establish a better genetic marker of Kagoshima Kurobuta, we investigated two genetic markers, one is SLA-DRB1 gene that is one of the major histocompatibility genes to determine a specific stain of pig and the other is 18s ribosomal RNA gene that define pig's DNA. SLA-DRB1 gene study revealed that pork meats provided from Kagoshima Kurobuta Breeding Association and Southern Kyushu Stockbreeding Co., and Spanish Iberico pork meat showed 98% of DNA sequence homology with Inobuta. The 18s ribosomal RNA gene revealed that pork meats provided from Southern Kyushu Stockbreeding Co., and Kurobuta pork meats showed 99.7% homology with Inobuta.

We have previously documented that Inobuta was mix-bred between Inoshishi and Meishan pig of China, and the Meishan pig was one of the ancestry of Kagoshima Kurobuta (Takeshita H, 2003). The present study confirmed that black hair pig was come from Chinese Meishan pig and closely related to the Ino-butu. Thus we speculated that the good taste of Kagoshima Kurobuta may come from the Chinese Meishan pig. Further genetic information may be available from polymorphic analysis of 18s ribosomal RNA gene to trace back the origin of Kagoshima Kurobuta.
