

平成 22 年 6 月 23 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：平成 19 年 ～ 平成 21 年
 課題番号：19700582
 研究課題名 (和文) 黒毛豚の遺伝子解析及び美味しさと遺伝子の関係
 研究課題名 (英文) Phylogenetic analysis of the black hair pig and the relationship between the good taste and gene
 研究代表者 竹下 温子
 (タケシタ ハルコ)
 研究者番号：10412850

研究成果の概要 (和文)

本研究は、黒毛豚の遺伝子解析および美味しさと遺伝子の関係について研究を行うことを大きな目的とした。その成果は、非常に困難を極め、特に遺伝子解析については、今まで我々が報告してきた、プライマー(PDR2)では目的の遺伝子を単一に増幅することができず、遺伝子解析については全てのサンプルで豚(学名: *Sus scrofa*)との相同性を示したが、それぞれの種について同定することができなかった。よってプライマーについては再度設計し直すことが今後の重要な課題となった。次に、遊離アミノ酸については、同じ種のサンプルについても、非常にばらつきがあった。唯一共通して言えることは、カルノシン含量は他の遊離アミノ酸より高い値を示していたことであった。カルノシンは近年アンチエイジングとしても非常に注目を浴びている食品である。このことから、黒毛豚肉は今後さらに価値が高まる食品になる可能性が高い。今回の期間では多くの成果を得ることができなかったが、今後の検討課題を多く得ることができた。最終的な目標は美味しさと遺伝子の関係を追求することであるため、今後もこの研究を続け、計画上行する予定であった解析の全てを明らかにし、さらなる発展に努めていきたいと考えている。

研究成果の概要 (英文) :

The study showed negative result, particularly about phylogenetic analysis, at primer we had reported, we couldn't get simple band and couldn't succeed in phylogenetic analysis. All pigs showed homology with *Sus scrofa*(pig) then we couldn't identify every species. We have an agenda hereafter of planning primer again. And then Free amino acid varied widely even among same kinds of species. The only common thing we can say is that Carnocine concentration showed higher value than that of other free amino acid. Carnocine is recently greatly noticed food as a potent anti-aging. The black hair pig could be more valuable food from now on by these facts. Although in this term our study can't bear fruit, we can get many agenda hereafter. Our final object is to research the relationship between the good taste and gene therefore we continue this study and reveal all things we were to research along the plan. Eventually we are going to contribute to more progress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,600,000 円	0 円	2,600,000 円
平成 20 年度	500,000 円	150,000 円	650,000 円
平成 21 年度	400,000 円	120,000 円	520,000 円
総計	3,500,000 円	270,000 円	3,770,000 円

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：食生活学

キーワード：遺伝子解析、遊離アミノ酸

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

国内・国外での豚の遺伝子系統解析報告は多く、異種移植の関係から SLA 遺伝子による解析報告もミニ豚を中心として多い。また国内においては豚の品種区別を目的として三橋忠由らが毛色関連の遺伝子を用いた豚品種推定を 1999 年に畜産学会で発表し、畜産大賞技術部門最優秀賞を獲得している。同年 6 月には DNA 配列多型によるブタの品種別法の特許を申請し、取得しているほどである。しかしながら鹿児島黒豚については、遺伝子解析報告が非常に少なく、SLA-DRB1 遺伝子の報告はなされていなかった。よって私はこの SLA-DRB1 遺伝子の多型で個体差を識別するのに有用である特徴に着目し、6 年前から鹿児島黒部あ SLA-DRB1 遺伝子の同定及び系統解析を行った。その結果、SLA-DRB1 遺伝子系で鹿児島黒豚は、鹿児島黒豚のみの純系（鹿児島固有のもの）、鹿児島黒豚と梅山豚（中国の梅山豚由来のもの）、および鹿児島黒豚と島豚（島豚由来のもの）の雑種系の 3 つの異なる系統に分類されることがわかった。現在は教育活動のかかわりの中で、卒業研究として豚の SLA-DRB1 遺伝子および 18S rRNA 遺伝子の解析を行っており、市販されている鹿児島黒豚および世界で高級豚肉として定評のあるイベリコ豚について解析を行った。その結果、鹿児島黒豚とスペイン産のイベリコ豚は猪豚と 99.7% の相同性を示した。猪豚とは、猪と梅山豚との抱え合わせであることが明らかであり、今回の結果より、黒毛の原点は中国の梅山豚に由来しているのではないだろうかと考えられた。またおいしさも梅山豚が由来になっているのではないかという着想に至った。

2. 研究の目的

前述した背景を踏まえたうえで、本研究では、美味しいと評判のあるイベリコ豚、梅山豚、鹿児島黒豚の遺伝子解析および、遊離アミノ酸、脂肪酸の定量を行い、違いがあるかないかを徹底して調べるとともに、黒毛豚以外でも、美味しいと定評のあるもち豚（白豚）についてその遺伝子解析及び遊離アミノ酸量、脂肪含有量を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

A. サンプル入手

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。また鹿児島畜産試験場の協力を

得て、現在飼育されている黒豚の血液サンプルを分けて頂いたものを用いた。

B. 遊離アミノ酸の抽出

以後の遊離アミノ酸の抽出・測定に用いるガラス器具はすべて、一昼夜 1% 硝酸につけ、蒸留水（HPLC 用）にて繰り返し洗浄し、乾燥させたものを用いた。また蒸留水はすべて HPLC 用の和光純薬を用いた。

鹿児島黒豚肉の旨味成分であるカルノシン及び遊離アミノ酸測定のため、それぞれの豚肉を試料として遊離アミノ酸の抽出を行った。抽出法は OPA プレカラム誘導体化法の前処理法¹⁾に従って行った。

C. 豚肉から DNA 抽出

（以後遺伝子に関する実験は全て、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室素粉末法²⁾に従い高分子 DNA を分離し、エタノール沈殿法の変法²⁾を用いて高分子 DNA の精製を行った。

D. 遊離アミノ酸の測定

試薬はすべて和光純薬製のものを用いた。

- HPLC 用 溶離液
溶離液 A（50mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.5））溶離液 B（メタノール/テトラヒドロフラン（90/10））
- Sample 標準液
アミノ酸標準液（10nM/ml）カルノシン標準液（10nM/ml）MIX 標準液（10nM/ml）
- Sample 調整用試薬
0.4M ホウ酸ナトリウム緩衝液（pH9.0）
0.1% HCL 溶液
- OPA プレラベル用試薬
OPA 反応液：0-フタルアルデヒド/メタノール/2-メルカプトエタノール/0.4M ホウ酸ナトリウム緩衝液（pH9.0）（用事調整）

4-2 装置

高速液体クロマトグラフ：Waters 510
蛍光検出器：Waters 470
分析カラム：CrestPak C18S

4-3 測定条件および方法

流速：1.0ml/min

注入量：10 μ l

溶離液 A を蛍光検出器が安定するまで流し、試料液をインジェクトした後は、溶離液 A と B を Table1 の条件で流した。

Time	溶離液 A	溶離液 B
0.0	80	20
9.0	70	30
9.1	55	45
17.0	55	45
17.1	45	55
25.0	45	55
28.0	0	100
38.0	0	100
38.1	80	20
50.0	80	20

Table1 移動相の濃度勾配

E. SLA-DRB1 遺伝子の PCR (PCR: Polymerase-Chain-Reaction)法²⁾

SLA-DRB1 遺伝子の PCR 増幅の Primer PDR2 は前報²⁾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、至適サイクルと至適温度条件は前報²⁾に従って行った。Primer は前報した PDR2 を用い、塩基配列は Table2 に示した。

Forward 5'-TAGGATCCCTCACAGCGCATTCTT-3'
Reverse 5'-GCGAATTCCGAGGTCCTGTAGTTGT-3'

Table2 SLA-DRB1 Primer PDR2

F. Sephaglas Band Preo Kit によるエキストラバンドの除去

それぞれの遺伝子の PCR 増幅産物の他にエキストラバンドが増幅されたため、Sephaglas Band Preo Kit によりエキストラバンドの除去を行った。

G. 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²⁾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 Blast にて同源性検索を行った。

4. 研究成果

(1) 白豚と黒豚(鹿児島黒豚)の蛋白質量および脂質量の比較

本研究では、前述してきたように、黒毛豚の遺伝子解析および美味しさと遺伝子の関係を大きな目的としているが、まず、黒豚と白豚の比較を行うために基礎的な測定である、蛋白および脂質の含有量を調べその違いを確認した。その結果を Fig1, Fig2 に示す。

Fig1 には豚肉 100 g あたりの脂質量を示した。その結果、脂質量は黒豚のロース、バラでは白豚のロース、バラに比べ 0.01%水準で有意に高く、うで、ヒレについては 0.01%水準で黒豚が有意に低かった。特にうでについては 4 倍以上の差があった。この結果から、黒豚肉は白豚肉にくらべ、ロースやバラのような比較的脂肪がたまりやすい部位では、脂肪をより溜めやすい性質であることが分かったが、本研究で用いた黒豚は放し飼いをするため、うでについては、非常に脂質量が少ないことがわかった。

(g/100g)

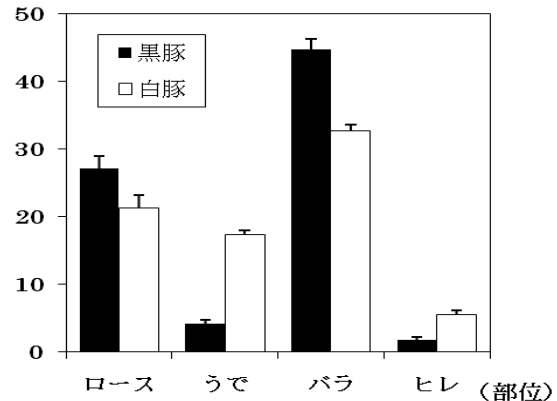


Fig1. 豚肉量100gあたりの脂質量

次に Fig2 には豚肉 100 g あたりの蛋白質量を示した。蛋白質量は、ヒレ以外の部位で 0.01%水準で有意な差が得られ、ヒレについては黒豚肉で少し高い値を示したが、有意な差はなかった。黒豚肉の蛋白質量が有意に高かったのは、「うで」であった。それ以外の部位については、0.01%水準で黒豚肉の方が有意に低いことがわかった。

(g/100g)

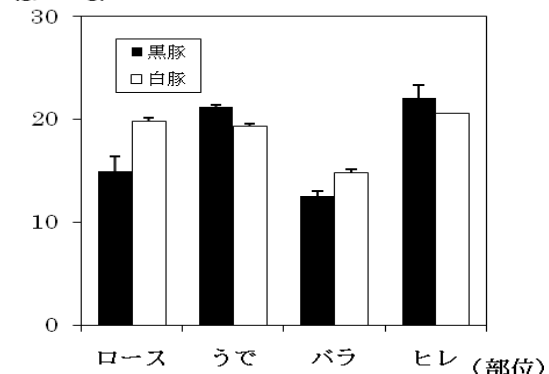


Fig2. 豚肉量100gあたりの蛋白質量

これらの結果より、黒豚肉と白豚肉では脂質の量に差があり、また肉質にもその違いを感じることもできた。黒豚肉が美味しいと言われる理由にも脂質の甘み等があげられる。よって、黒豚と白豚の脂質代謝、合成系を調べることで、おいしさとの関係を調べる上で重要と考えられた。

(2) 遊離アミノ酸の測定

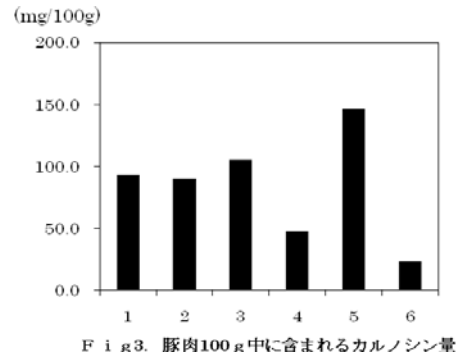
前述した方法に従い、1～6 { 1. あぐー (沖縄豚)、2. 鹿児島黒豚A、3. 鹿児島黒豚B、4. 梅山豚 (中国)、5. イベリコ豚 (モモ)、6. イベリコ豚 (肩) } のサンプルについてHPLC (高速液体クロマトグラフィー)にて測定した結果をTable3に示した。遊離アミノ酸量はそれぞれの豚肉によってばらつきがみられたが、カルノシンはどの豚肉にも多く含まれていることがわかった。しかしながら、中国の梅山豚は、他の黒毛豚肉に比べ遊離アミノ酸量が非常に低値であった。これは梅山豚は他の豚肉にくらべ肉に非常に「さし」が入っているため、どうしても脂肪が多く入ってしまう。このことが遊離アミノ酸量低値という問題に繋がった可能性も示唆されるため、このことを今後考慮していきたい。また、2, 3の鹿児島黒豚肉についても生産元の違いで、かなりアミノ酸量に違いが見られた。飼育・飼料の状態が値に大きく影響を与えることを示唆したため、今後この検討もしていきたいと考えられた。

遊離アミノ酸は味を決める重要な働きをしているが、美味しいと言われている豚肉には共通してカルノシンが他のアミノ酸より多く含まれていることが分かった。カルノシンは近年ではアンチエイジングの食品としても非常に注目が高い。よってこの結果は非常に興味深い結果となった。

	1	2	3	4	5	6
アスパラギン酸	1.6	19.3	3.9	0.0	8.7	8.6
グルタミン酸	8.2	17.0	6.0	0.0	11.5	4.4
アスパラギン	9.2	5.9	0.0	0.0	6.9	0.0
セリン	2.5	16.2	4.6	0.0	10.6	5.7
グルタミン	36.9	189.0	21.6	19.5	12.7	60.0
ヒスチジン	6.5	17.8	3.7	3.8	8.3	3.3
カルノシン	93.2	90.4	105.2	47.7	146.2	23.2
グリシン	8.4	10.1	11.0	2.6	17.9	3.6
スレオニン	5.1	8.0	3.3	3.1	4.3	3.3
アルギニン	29.1	5.2	2.5	10.9	5.4	1.4
アラニン	5.5	0.9	0.0	1.5	0.5	0.2
チロシン	1.8	0.0	0.0	0.0	1.4	0.3
メチオニン	3.7	3.6	2.4	0.0	3.9	1.0
バリン	0.7	7.6	3.3	0.4	5.6	3.0
イソロイシン	3.0	3.2	1.8	0.6	3.0	0.8
ロイシン	5.2	4.6	2.3	1.3	4.2	1.5
リジン	11.3	8.0	3.7	2.7	8.0	2.5
TOTAL	231.9	406.7	175.3	94.2	258.7	122.8

Table3. 黒毛豚肉 100 g 中に含まれる遊離アミノ酸量 (mg)

次に豚肉 100 g 中のカルノシン量をFig3に示す。5, 6については、同じイベリコ豚で部位違いであるが、この二つの結果から、部位により遊離アミノ酸量の分布に非常に大きな差があることが伺えた。このことより、部位による遊離アミノ酸の違いを検討することも今後必要になってくると考えられた。



(2) 高分子DNAの抽出

液体窒素粉末法により、それぞれの黒毛豚肉、白豚肉、および血液サンプルから、Fig4に示すように単一で高分子のDNAを抽出することができた。

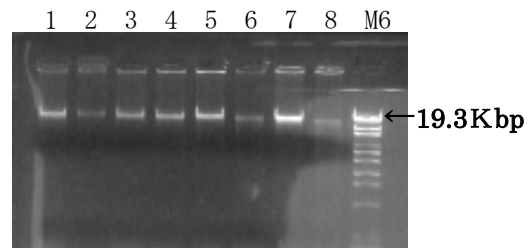
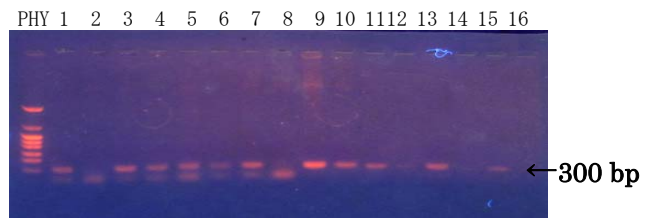


Fig4. 高分子DNAの電気泳動

(3) SLA-DRB1 遺伝子のPCR増幅

Table 2 に示した PCR プライマー (PDR2) を用いて SLA-DRB1 遺伝子の増幅を行った。Fig5に示す通り、目的の 300bp 付近以外のエクストラバンドが得られたサンプルもあったため、再度温度条件やサイクルを変更し目的のバンドを得た。さらにエクストラバンドが出たものについては Sephaglas Band Preo Kit にて除去を行い、目的の PCR 産物を得たが、2 のもち豚についてはいかなる反応条件であっても、プライマー PDR2 では PCR 増幅産物を得ることができなかった。



1. 白豚 2. もち豚 3. あぐー 4. 鹿児島黒豚A
5. 鹿児島黒豚B 6. 鹿児島黒豚C 7. イベリコ豚
8. 梅山豚 9～16 畜産試験場黒豚

Fig5 SLA-DRB1 遺伝子の PCR 増幅の電気泳動 (Annealing 55°C)

もち豚については、DNAに問題があるかもしれないと考え、18SrRNA 遺伝子についてPCRを行った結果、目的のバンドが得られたため、やはり PDR2 プライマーには反応しない遺伝子配列であることがわかった。白豚および黒毛豚に関してPDR2 プライマーで目的の遺伝子を増幅できなかったのはもち豚が初めてのことで、そのルーツを探ると、デュロック (Fig6) を母系にもち、このデュロックはアメリカの地方にいる島豚で赤毛の豚とパークシャーの掛け合わせであることから、PDR2 は赤毛の遺伝子は増幅できない可能性が示唆された。



Fig6. 赤毛のデュロック

(4) 塩基配列の決定

PCR で非常に困難を極めたが、最終的に遺伝子の増幅に成功したサンプルについて、Sequence PCR 後、鹿児島大学医学部の遺伝子施設に依頼し Sequence をおこなった。戻ってきた結果は、Fig7 のように、シャープで波長が長く、信頼できる部分の塩基配列のみを決定し、NCBI の相同性検索エンジン Blast を使ってその遺伝子を同定した。しかしながら、PCR 増幅産物の結果が上手くいかなかったこともあり、得られた塩基配列の長さが非常に短くなってしまった。(平均 120 b p) よって sequence した 16 サンプル全てにおいて、うち全く読むことができなかったのが 3 サンプルあったが、その他すべては、豚 (学名: *Sus scrofa*) と相同性があることのみは同定できた。(88~100%) その一つの相同性検索を示す (Fig8)

このことから、今回の遺伝子配列では、属が豚であることは証明できたが、それぞれの豚の種を同定することができなかったため、系統樹までに至ることができなかった。今後、これらの改善に努め、種の同定までおこなっていききたい。また PDR2 については赤毛の遺伝子を排除する可能性が示唆されたため、この点についても、もう一度検討していきたいと考えている。

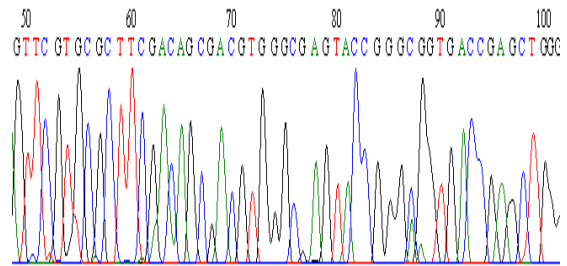


Fig7. Sequence 波形

```

Sequen          10          20          30
                TTGGAGAGCCAACTATAACGGAGAGGAG
                ::::::::::::::::::::::::::::::
EM_OH: TTCTTCAATGGACCGGACAGGTGAGGTTATTGGAGAGCCAACTATAACGGAGAGGAG
      7600  7610  7620  7630  7640  7650

Sequen          40          50          60          70          80          90
                TTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGCGGAGTACCGGCGGTGACCGAGCTGGGCGGCCA
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_OH: TTCGTGCGCTTCGACAGCGACGTGGGCGGAGTACCGGCGGTGACCGAGCTGGGCGGCCA
      7660  7670  7680  7690  7700  7710

Sequen          100         110         120         130         140         150
                GACGCCAAGAAGCTATAACAGCCAGAAAGGACCTCTGGAGCAGAGGCGGCGGAGGTGGAC
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
EM_OH: GACGCCAAGAAGCTATAACAGCCAGAAAGGACCTCTGGAGCAGAGGCGGCGGAGGTGGAC
      7720  7730  7740  7750  7760  7770

Sequen          160         170         180
                ACGTACTGCAGACACAACACTACAGGACCTCGGAATTCCG
                ::::::::::::::::::::::::::::::
EM_OH: ACGTACTGCAGACACAACACTACAGGACCTCGGATACATTCCTGGTGC CGGGCGGAGGTGAG
      7780  7790  7800  7810  7820  7830
  
```

Fig8 あぐ一豚と猪の相同性結果 (99%)

以上、全ての結果より、今回は多くの良い成果を得ることができなかったが、今後の課題を多く得ることができた。将来は何年かかるかわからないが美味しさと遺伝子の関係を明らかにできればと考えているため、これらの課題を一つ一つクリアしていきたいと考えている。

(5) 文献

- 1) 大沢利昭 (1989) 高速液体クロマトグラフィー 生化学実験 9 115-124
- 2) 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

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織 鹿児島純心女子大学

(1) 研究代表者 竹下 温子
(たけした はるこ)

研究者番号：10412850

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：