

琉球在来豚（アグー）の近交退化を緩和するための 育種技術の確立

(3) ミトコンドリアDNA d-loop領域における母系解析

島袋宏俊 稲嶺修 仲村敏 大城まどか*
美川智** 佐藤正寛*** 石井和雄*** 与古田稔

I 要 約

本試験ではおきなわブランド豚推進協議会が登録認定したアグー90頭について、mtDNA d-loopの1049 bp領域におけるアグーの母系解析とMSマーカーを用いて核DNAの多型解析との関係について検討した結果、以下のとおりであった。

1. mtDNA d-loop領域1049bpの塩基配列について多型性を検討した結果、アグーのmtDNAハプロタイプはタイプ1からタイプ5までの5つのタイプに分類された。
2. mtDNA d-loop領域の塩基配列に基づき近隣結合法により系統的に分類したOkumuraらが報告したmtDNAハプロタイプと照合すると、タイプ1およびタイプ2は東洋系タイプで、タイプ3、タイプ4およびタイプ5は西洋系タイプであった。東洋系タイプの頭数は、供試豚全頭の85.6%を占め、タイプ1とタイプ2との間には2カ所において塩基置換部位が認められた。
3. 20個のMSマーカーを用いて非加重結合法により系統的に分類すると、アグーはグループIからグループVIIまでの7つのグループに分類される。
4. mtDNAハプロタイプとMSマーカーによるグループとの関係は、タイプ1はグループVIとグループVIIに属し、タイプ2は、グループII、グループIII、グループIV、グループVとグループVIIに属する。タイプ3はグループIとグループIIに属し、タイプ4またはタイプ5はそれぞれグループV、グループIに属する。

以上のことから、アグーにおいてmtDNA d-loop領域の母系解析をする技術は、塩基配列をもとに各個体のハプロタイプを決定するため、他の西洋系の品種とアグーとの識別を科学的に証明することが可能であり、登録体制を強化するための1つの手段として有効であることが示唆された。

II 緒 言

沖縄県では琉球在来豚アグー（アグー）を活用したおきなわブランド豚を作出して全国的に高い注目を集めている。2005年にはおきなわブランド豚推進協議会（協議会）が設立され、協議会ではアグーの個体登録認定を行っている。アグーの登録は表現型およびマイクロサテライト（MS）マーカーを用いて核DNAの多型性を調査したうえでを行っている。その登録調査において、登録認定されたアグーの表現型の特徴は稲嶺ら¹⁾によって明らかにされており、その表現型の特徴によってアグーとそれ以外の品種とを識別した後に、大城ら²⁾が検討したMSマーカー用いたDNA解析によりアグーとそれ以外の品種とを識別している。しかしながら、現在アグー識別で使用しているMSマーカーには比内地鶏³⁾あるいは名古屋コーチン⁴⁾の識別に利用されているような決定的なMSマーカーはみつかっていない。いっぽう、品種識別においてはMSマーカーを利用する以外に、ミトコンドリアDNA (mtDNA)・d-loop (displacement loop) 領域による母系解析による識別方法や毛色関連遺伝子を利用して各ブタ品種識別を判別する方法などさまざまな品種識別技術が開発されている。畜産物の偽装表示が社会的な問題となっている中、さまざまな遺伝学的観点からアグーの識別を科学的に証明し、いっそうアグー登録体制の強化を図り、沖縄固有のアグーブランド豚の確立を目指していく必要がある。

細胞が生存するうえで必要なエネルギー（ATP）を合成しているミトコンドリアは、核DNAとは別の遺伝情報を有しており、哺乳動物ではほぼ完全に母親由来のものだけが遺伝することが知られている。ま

* 現沖縄県畜産課 ** (独)農業生物資源研究所 *** (独)農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所

た、ミトコンドリアDNA (mtDNA) は核DNAより変異が起りやすいため品種の分化や類縁関係を調べるものとして有効である⁶⁾。井手ら⁶⁾はブタのmtDNA d-loop領域による母系解析によって系統豚の識別を行っている。アグーのmtDNA d-loop領域における母系解析では、Okumuraら⁷⁾ならびに高田ら⁸⁾が1種類のハプロタイプを報告しているが、その母系解析は協議会が登録認定しているアグーについて調べられていない。

そこで、本研究ではアグーの登録体制を強化するために、協議会によって登録されたアグーについてMSマーカーを用いた核DNAの多型解析に加え、mtDNA d-loop領域におけるアグーの母系解析について検討したので報告する。

III 材料および方法

1. 供試豚

供試豚は協議会によって登録認定されたアグー90頭を用いた。

2. DNAの抽出

DNAの抽出には耳の組織を用いた。採材した耳の組織は、プロテイナーゼK (10mg/ml:和光純薬工業株式会社製) を含んだDNA抽出バッファー (1.2%SDS, 12.0mM EDTA, 100mM Tris-HCl [pH8.5], 0.5%NP-40) で溶解後、フェノールクロロホルム処理にて精製し、エタノール沈殿により全ゲノムDNAを抽出した。

3. mtDNA d-loop領域のPCR

mtDNA d-loop領域のPCRには全ゲノムDNA50ngを用いた。プライマーには井手ら⁶⁾の報告にある725mtDNA (5' -CGGCCAACTAGCCTCCATCTTAT-3') および726mtDNA (5' -GCGCGGATACTTGCATGTGTAAT-3') 各10.0pmolを使用した。PCRは、サーマルサイクラー (GeneAmp™ PCR System9700:Applied Biosystems社製) を用い、反応条件は94℃30秒, 68℃1分を10サイクル, 94℃30秒, 60℃20秒, 72℃1分を40サイクルとした。

4. 塩基配列の決定

塩基配列はこのPCR増幅産物とBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems社製) を用いジデオキシ法により決定した。シーケンシング用のプライマーには、Okumuraら⁷⁾の報告にあるmitL44 (5' -CGGCCAACTAGCCTCCATCTTAT-3'), mitH45 (5' -TTCAAGTGCCTTGCTTTGATA-3') およびmitL11 (5' -TACCATGCCGCGTGAACCA-3') 各1.6pmolを使用した。

5. MSマーカーDNA多型の検出

MSマーカーは表1に示す20個を用いた。PCRの反応液は、AmpliAq Gold & 10×PCR Gold Buffer with dNTP (Applied Biosystems社製), ゲノムDNA16.0ng, フォワードおよびリバースプライマー各5.0pmolを使用した。PCRは、GeneAmp™ PCR System9700を用い、94℃9分の熱変成後、94℃30秒, 55℃30秒, 72℃30秒を40サイクルとした。PCR産物を希釈し、3130x1DNAアナライザー (Applied Biosystems社製) を用いて電気泳動した。

6. 調査項目

1) ハプロタイプの決定

得られたd-loopの1049bp領域の塩基配列について、Okumuraら⁷⁾の報告によるブタ品種ごとのハプロタイプと照合し、その異同と頭数を調べた。

2) 各遺伝子座ごとの対立遺伝子 (アレル) サイズ

GeneMapperソフトウェア (Applied Biosystems社製) を用いて、PCR産物の断片長のフラグメント解析を行った。DNAアナライザーによって検出された各マーカーのピークを1つのアレルとみなし、そのサイズを明らかにした。アレルごとのMSマーカーのバンドパターンをジェノタイピングし、アレルがある場合を1, ない場合を0で表記し、データセットを作成した。

3) 系統学的解析

MSマーカーのアレルサイズデータセットに基づき系統学的解析を行った。系統解析は、解析ソフト Diversity Database (Bio-Rad Laboratories社製) を用いて、非加重結合法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, UPGMA法)⁹⁾より作成した。類似度の算出はJaccard'sの係数¹⁰⁾を用いた。

表1 20個のマイクロサテライトマーカー

Marker	Chromosome	Forward primer(5'→3')	Reverse primer(5'→3')
SWR1133	17	TGGGATTTGTTACCACTGAGC	TCCATGGGTGAAAAAAGATG
SW813	16	AGTTGATTTAAAATGTTGTGCCA	AATATTTCAAAAAAGGAATGCG
SW1125	14	TAGATGTATATACTTCCATGTGTG	ATGTTGAGCTCTTAATTTTATACA
SW769	13	GGTATGACCAAAAGTCTGGG	TCTGCTATGTGGGAAGAATGC
SW1030	13	AACTGGGGAAGTAGAAGAGCG	TCATCTCATGCCCTGTGTCTAAA
SW1307	12	TCATCCTTCTTTTCTTTATTTCTT	TCTGGCTCGGATGCAATC
SW957	12	AGGAAGTGAGCTCAGAAAGTGC	ATGGACAAGCTTGGTTTTCC
SWR915	9	TTCATGTTTCCCTATTACAGCA	GCTATAGCTCCAATTCGACCC
SW827	9	AGCTGATTCTCCAGGC	TTATCTGAATTGGTGATGGC
SW853	8	CITTTCTTCTGTCTGGGTGTGG	GGGAAAATAGCCTCCACCTC
SW933	8	ACATATACTTCCGACAGCCCC	AAGAGCTTGGTGAATTGAGAGC
SW1067	6	TGCTGGCCAGTGACTCTG	CCGGGGGATTAACA AAAAAG
SW1353	6	TACTTGTTACCCCTGCC	AAGTACCGAGGTCACTGTGAG
SWR153	4	CCACGTTCTCCTTTTTGAGG	ATGAGTTGGTGTAGGTCGC
SW839	4	GGAAACCAGGATAACAGGAGG	TAACCCACTGTACCACCAAGG
SW969	4	AGCCTGGAACATTTTTGAGTG	TTTCAATTGGTTCCTGTGTCC
SW1443	3	CAAAAGTTGGCCATGAATTG	TTCTTCAGGAATCATTGTTACTTG
SWR1061	1	ATCTGCCTTGTGTCTGCATG	TGGCATTGCTGTGGCTATG
SW552	1	AAGAGCCAGATGGGGAGG	ACTGATAAGACATGCTGTGTGC
SW1693	3	GCGTAGGTTCCATCTGTATAG	TCAATATTACCCATTACTTGC

IV 結果および考察

1. ハプロタイプの決定

アグー90頭のハプロタイプとその頭数を表2に示した。アグーのハプロタイプは5種類に分類され、mtDNA d-loopの1049bp領域の塩基配列において26カ所に塩基置換部位が認められた。タイプ1およびタイプ2とタイプ3、タイプ4およびタイプ5との間には18カ所の塩基置換部位があり、それらの間には母系系統として大きな遺伝的違いが認められたことから2つのタイプに大別できることが示唆された。

また、タイプ1とタイプ2の間には242bpおよび693bpの2カ所の部位で塩基置換が認められ、タイプ3とタイプ4の間には280bp、406bp、862bpおよび1049bpの4カ所の部位で置換認められた。タイプ3とタイプ5の間には182bp、289bp、693bp、741bpおよび1049bpの5カ所の部位に置換が認められた。

タイプ別頭数についてはタイプ2が54頭と一番多く、次いでタイプ1の23頭であり、頭数の多い順にタイプ2>タイプ1>タイプ5>タイプ3>タイプ4であった。タイプ1とタイプ2の供試豚全体に占める割合は85.6%であった。

タイプ1はOkumuraら⁷⁾ならびに高田ら⁸⁾が報告するアグーのハプロタイプと一致したが、タイプ2~5の4種類については新たなタイプであることが判明した。

表2 アグーのmtDNA d-loop領域における塩基置換部位

ハプロタイプ	塩基置換部位(b)																										頭数
	108	124	131	137	146	154	159	182	242	280	289	295	307	324	391	406	576	693	705	707	741	862	971	978	1028	1049	
タイプ1	C	A	A	-	T	T	G	C	T	T	A	G	T	T	T	T	G	G	G	G	C	T	C	G	C	T	23
タイプ2	C	A	A	-	T	T	G	C	C	T	A	G	T	T	T	T	G	A	G	G	C	T	C	G	C	T	54
タイプ3	T	T	G	C	C	C	A	T	T	T	A	A	C	C	C	T	A	G	A	A	T	T	T	A	T	C	4
タイプ4	T	T	G	C	C	C	A	T	T	C	A	A	C	C	C	C	A	G	A	A	T	C	T	A	T	T	3
タイプ5	T	T	G	C	C	C	A	C	T	T	G	A	C	C	C	T	A	A	A	A	C	T	T	A	T	T	6

2. mtDNA d-loop領域のハプロタイプの系統樹

Okumuraら⁷⁾は東アジア系ブタ、ニホンイノシシ、リュウキュウイノシシ、欧米系ブタおよびヨーロッパイノシシなどのブタ品種ごとmtDNA d-loop領域の母系解析を行い、62ハプロタイプを決定した。アグーの5ハプロタイプをOkumuraら⁷⁾の62ハプロタイプに照合し、一致したものを表3に示し、Okumuraら⁷⁾の系統樹にプロットしたものを図1に示した。ハプロタイプ1, 2, 3, 4, 5は、Okumuraら⁷⁾のハプロタイプ36, 43, 56, 54, 47にそれぞれ一致した。

ブタ系統は東洋系ブタと西洋系ブタの2群に大別され、東洋系ブタはアジアイノシシから、西洋系ブタはヨーロッパイノシシから分枝し、家畜化されたものと考えられている¹¹⁾。図1に示すように、タイプ1およびタイプ2は、東アジア系ブタおよびアジアイノシシと同様の東洋系タイプであり、タイプ3, タイプ4およびタイプ5は、欧米系ブタおよびヨーロッパイノシシと同様の西洋系タイプであることが判明した。

表3のタイプ別に分類されたブタ品種について示したものは、Okumuraら⁷⁾が報告したものである。そのブタ品種とアグーのmtDNAハプロタイプとを照合すると、タイプ1はOkumuraら⁷⁾が材料に供した琉球在来豚アグー2頭中2頭、パークシャー種35頭中2頭の塩基配列と一致しており、タイプ2は大ヨークシャー種20頭中1頭の塩基配列と一致していた。Okumuraら⁷⁾の報告によると、パークシャー種35頭中31頭、大ヨークシャー種20頭中11頭が東洋系タイプであったとしており、アグーのmtDNAハプロタイプに相同したパークシャー種と大ヨークシャー種の塩基配列はともに東洋系タイプであった。

琉球在来豚は1385年に中国（当時の明）から導入され、その後1904年の明治時代に入り、パークシャー種あるいは大ヨークシャー種と交雑したものがアグーのが始まりと考えられている¹²⁾。mtDNA d-loop領域のハプロタイプ1および2に属するアグーは、歴史的な背景に沿った東洋系の母親に由来しているものと推察された。いっぽう、ハプロタイプ3, 4および5に属するアグーは、第二次世界大戦後に導入された西洋系の母親に由来しているものと推察された。

表3 アグーのmtDNAハプロタイプとブタ系統との関係

ハプロタイプ	タイプ別に分類されたブタ品種	タイプ別に分類された系統
タイプ1	在来豚アグー (2/2), パークシャー種 (2/35)	東アジア系ブタおよびアジアイノシシ
タイプ2	大ヨークシャー種 (1/20)	
タイプ3	大ヨークシャー種 (1/20)	欧米系ブタおよびヨーロッパイノシシ
タイプ4	大ヨークシャー種 (3/20), ハンプシャー種 (5/18)	
タイプ5	ランドレース種 (3/22)	

注) 表中のタイプ別に分類されたブタ品種と系統はOkumuraら⁷⁾の報告から引用したもので、カッコ内は頭数を示す（ハプロタイプ検出頭数/供試頭数）。

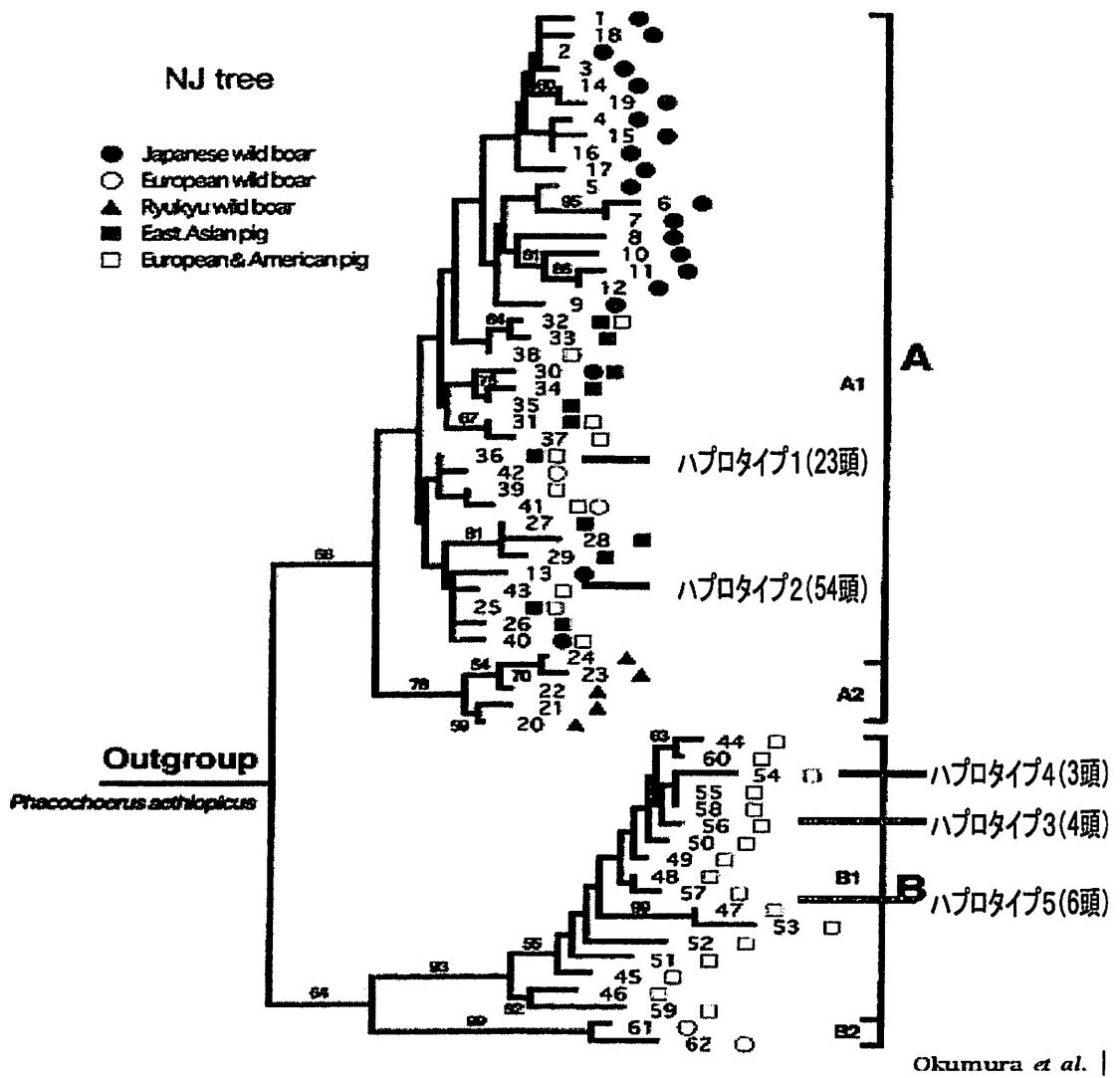


図1 mtDNA d-loop領域のハプロタイプの系統樹

- 注1) 図中の系統樹はOkumuraら(2001)⁷⁾の系統樹から引用したもの。
 2) Aは東アジア系ブタおよびアジアイノシシの群を示し、
 Bは欧米系ブタおよびヨーロッパイノシシの群を示す。
 3) A1はリュウキュウイノシシ以外のブタ品種群を示し、
 A2はリュウキュウイノシシの群を示す。
 4) B1は欧米系ブタの群を示し、B2はヨーロッパイノシシの群を示す。
 5) 分枝上にある数値はブートストラップ値(%)を示す。

3. MSマーカーのアリルサイズに基いた系統解析

20個のMSマーカーを用いて、UPGMA法により系統学的に分類した結果を図2に示した。アグーはグループIからグループVIIまでの7つのグループに分別された。系統的にはグループIとグループII～VIIとの間において分類され、類似度は0.39であった。また、グループIIとグループIII～VIIとの間、グループIII、IVおよびVとグループVIおよびVIIの間において分類され、類似度はそれぞれ0.42、0.47であった。グループVIとグループVIIの類似度は0.60であった。

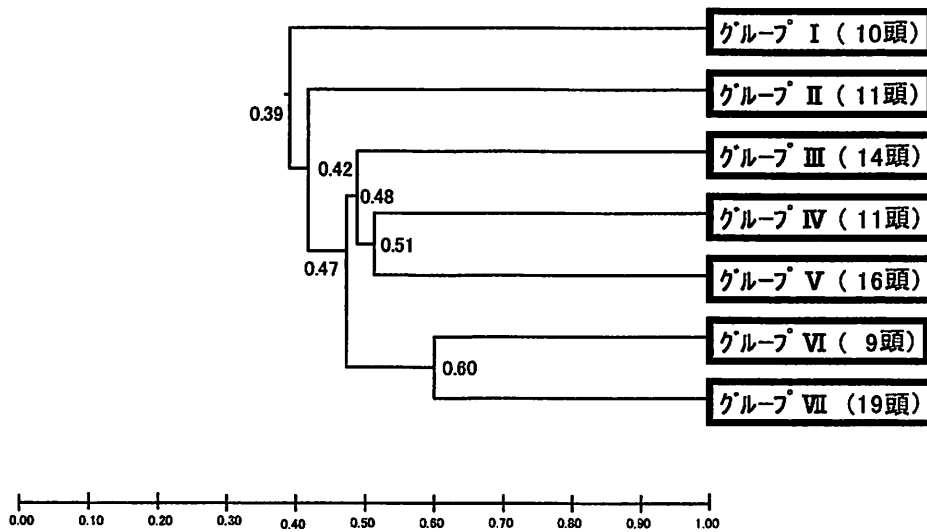


図2 20個のマイクロサテライトマーカーを用いて分類した系統樹

4. mtDNA d-loop領域のハプロタイプとMSマーカーのグループとの関係

mtDNA d-loop領域におけるハプロタイプとMSマーカーによるグループとの関係を表4に示した。タイプ1はグループVIとグループVIIに属し、タイプ2は、グループII、グループIII、グループIV、グループVとグループVIIに属する。タイプ3はグループIとグループIIに属し、タイプ4またはタイプ5はそれぞれグループV、グループIに属する。

東洋系ブタと西洋系ブタの群分けの観点からみると、グループII、グループIII、グループIV、グループV、グループVI及びグループVIIが東洋系ブタに属し、グループI、グループIIおよびグループVが西洋系ブタに属する。グループIII、グループIV、グループV、グループVI及びグループVIIはすべてが東洋系で、グループIはすべてが西洋系に属することが判明した。グループIIあるいはグループVは東洋系ブタと西洋系ブタの両方に属し、それぞれが西洋系ブタに属する割合は、グループIIが18% (11頭中2頭)、グループVが6% (16頭中1頭)であった。

表4 mtDNA d-loop領域のハプロタイプとマイクロサテライトマーカーのグループとの関係

ハプロタイプ	マイクロサテライトマーカー 系統樹グループ	頭数	タイプ別に分類された系統
タイプ1	グループVI	9	
	グループVII	14	
タイプ2	グループII	9	東アジア系ブタおよびアジアイノシシ
	グループIII	14	
	グループIV	11	
	グループV	15	
タイプ3	グループVII	5	
	グループI	4	
タイプ4	グループII	2	欧米系ブタおよびヨーロッパイノシシ
	グループV	1	
タイプ5	グループI	6	

以上のことから、アグーには、5つのハプロタイプがあり、東洋系タイプと西洋系タイプのものがあることが明らかになった。

アグーには西洋系タイプと東洋系タイプが認められた。しかし、沖縄在来種の歴史的・文化的背景からみたアグーを在来豚系統として位置づけた場合、協議会においては西洋系タイプを登録することが妥当か否か検討する必要があると思慮された。今後、登録申請のある西洋系タイプのアグー雌を登録認定から除外することになるならば、ハプロタイプから東洋系のアグーと西洋系ブタとの識別が完全に判定可能となる。

沖縄固有のアグーブランド豚の確立を目指していくためには、他の品種とアグーとの判定識別を科学的に証明できる登録体制とアグーブランド豚肉のトレーサビリティを見据えた体制を構築する必要があると思われる。今回、本研究で検討したmtDNA d-loop領域の母系解析をする技術は、塩基配列をもとに各個体のハプロタイプを決定するため、他の西洋系の品種とアグーとの識別を科学的に証明することが可能であり、登録体制を強化するための1つの手段として有効であることが示唆された。今後、アグーの個体登録認定を行う際には、現在実施されているMSマーカーを用いた核DNAの多型解析に加え、mtDNA d-loop領域における母系解析を行うことが必要であると思われた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、アグーのDNA採取等にご協力くださった（社）沖縄県家畜改良協会 永田存氏に深く感謝いたします。

VI 引 用 文 献

- 1) 稲嶺修・仲村敏・島袋宏俊・永田存・石井和雄（2008）琉球在来豚（アグー）の近交退化を緩和するための育種技術の確立（2）琉球在来豚アグーのフィールド調査による体型と特徴，沖縄畜研セ研報，46，31-41
- 2) 大城まどか・稲嶺修・仲村敏・佐藤正寛・石井和雄・蝦名真澄（2006）琉球在来豚（アグー）の近交退化を緩和するための育種技術の確立（1）23個のマイクロサテライトマーカーを用いたアグーのDNA多型解析，沖縄畜研セ研報，44，39-42
- 3) Rikimaru K, Tkahasi H (2007) A method for discriminating a Japanese brand of chicken, the Hin-aijidori, using microsatellite markers, *Poultry Science*, 86, 1881-1886
- 4) Takahashi H, Tsudzuki M, Sasaki O, Niikura J, Inoue-Murayama M, Minezawa M (2005) A chicken linkage map based on microsatellite markers genotyped on a Japanese Large Game and White Leghorn cross, *Animal Genetics*, 36, 463-467
- 5) 小松正憲・石黒直隆（2000）ミトコンドリアDNAの多型性を利用する，家畜ゲノム解析と新たな家畜育種戦略，動物遺伝育種シンポジウム編，245-253，（社）畜産技術協会
- 6) 井手華子・堀内篤・知久幹夫・寺田圭・奥村直彦（2005）ミトコンドリアDNA d-loop領域の多型による系統豚「フジョーク」の母系解析，日豚会誌，42(3)，130-138
- 7) Okumura N, Kurosawa Y, Kobayashi E, Watanobe T, Ishiguro N, Yasue H, Mitsuhashi (2001) Genetic relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in wild boars and several breeds of domesticated pigs, *Animal Genetics*, 32, 139-147
- 8) 高田勝・岡孝夫・高橋遼平・野村こう・花田博文・天野卓・秋篠宮文仁（2008）ミトコンドリアDNA情報にもとづく沖縄，奄美在来豚の系統遺伝学的研究，日豚会誌，45(4)，187-192
- 9) Sokal, R. R, Sneath, P. H. A (1963) Principles of numerical taxonomy. W. H. Freeman, San Francisco
- 10) Sneath P. H. A, Sokal R. R (1994) 数理分類学，153，内田老鶴圃
- 11) Watanobe T, Okumura N, Ishiguro N, Nakano M, Matsui A, Sahara M, Komatsu M (1999) Genetic relationship and distribution of the Japanese wild boar (*Sus scrofa riukiuanus*) analyzed by mitochondrial DNA, *Molecular Ecology*, 8, 1509-1512

12) 島袋正敏(1989) 沖縄の豚と山羊, ひるぎ社

研究補助: 又吉博樹, 赤嶺圭作