

「アグーブランド豚」識別法の確立

(3) DNA チップを用いたアグーブランド豚識別手法の検討

當眞嗣平 島袋宏俊 知念司 我那覇紀子
渡部翔之 野中克治 奥村直彦*

I 要 約

琉球在来豚アグー（アグー）を活用したアグーブランド豚の識別技術を確立するためアグー、ランドレース種、大ヨークシャー種、ハンプシャー種、デュロック種および三元交雑種（LWD）、アグーブランド豚、合計 548 頭の一塩基多型（SNP）情報を用いて主成分分析を行った。その結果は以下のとおりであった。

1. アグーブランド豚と LWD などの西洋種は第 1 主成分で明瞭に区別でき、主成分分析はアグーブランド豚の識別に有効であった。
2. 主成分得点から各豚がそれぞれの品種に属する事後確率を求めた。事後確率が最も高い品種をその豚の属する品種として分類した結果、正答率は 95%以上であった。
3. LWA を DBA（アグーブランド豚）とした誤判別が 1.5%、アグーを DBA とした誤判別が 2.8%であったが、アグーブランド豚と LWD をはじめとする西洋種との識別結果は 100%であった。

II 緒 言

沖縄県ではアグーを活用したアグーブランド豚を作出して全国的に高い注目を集めている。アグーブランド豚は、沖縄県アグーブランド豚推進協議会（協議会）から認定を受けている琉球在来豚アグーの雄と西洋豚等の雌を交配し生産された交雑種が主流となっている。アグーブランド豚は肉質がよく、他の豚肉と比べ高値で取引されていることから、アグーブランド豚以外の豚肉が出回ることが懸念される。現在、アグーとそれ以外の品種の識別は、大城ら¹⁾が検討したマイクロサテライトマーカー（MS）と島袋ら²⁾が明らかにしたミトコンドリア（mtDNA）における d-loop の東洋型と西洋型のハプロタイプにより行なっている。しかし、アグーブランド豚であるアグー交雑種と他品種を識別できる MS は見つかっておらず³⁾、畜産物の偽装表示問題を契機に、消費者の食への安全性に対する関心が高まっている中、科学的なアグーブランド肉識別法を確立する必要がある。

SNP は遺伝子型の決定は分析器が自動的に迅速に行うため、判定するために労力を必要とせず、誰が行っても同じ結果が得られる。また、ブタの全染色体上に高密度に配置された DNA チップが開発されたことから、MS に比べ情報量が多く、全ゲノム DNA を網羅するため、DNA マーカーとして近年注目されており、アグーブランド豚の識別にも有効だと考えられる。そこで本研究では、SNP 情報を活用したアグーブランド豚の識別法を検討した。

III 材料および方法

1. 供試 DNA

供試豚は協議会で認定されたアグー71頭、県内外から収集したランドレース（L）種 48 頭、大ヨークシャー（W）種 47 頭、ハンプシャー（H）種 47 頭、デュロック（D）種 48 頭および三元交雑種（LWD）、さらに協議会指定生産農場で生産されたアグーブランド豚 238 頭の計 546 頭であった。アグーブランド豚は、LW 雌にアグー雄を交配した豚（LWA）201 頭、D 種とパークシャー（B）種を交配した雌および D 種雌にアグー雄を交配した豚（DBA、DA）36 頭を用いた。

2. DNA の抽出

DNA の抽出には-20℃で冷凍保存されている耳介組織および肉片組織を用いた。採材した組織は、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。

*（社）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（JATAFF 研）

3. SNP マーカーのジェノタイピング

Illumina 社の Porcine SNP60 Genotyping BeadChip を用いた SNP マーカー遺伝子型の決定を業者に委託した。62163 個の SNP マーカーから call rate が 95%未満の SNP を除外し、最終的に 54466 個の SNP を解析に用いた。

4. 統計解析

1) 系統解析

識別のための系統樹を、統計ソフト R を用いて、非加重結合法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, UPGMA 法)⁴⁾ により作成した。遺伝的類似度は Jaccard's 係数⁵⁾ を用いた。

2) 主成分分析

PLINK⁶⁾ により各 SNP についてマイナーアリルをカウントし、SNP の遺伝子型を 0, 1, 2 に変換後、主成分分析を行った。統計ソフトウェア JMP8 により第 1, 2 主成分の座標上に品種毎の 95%信頼楕円を描き、ベイズの定理により集団の構成比率を事前確率としマハラビス距離⁷⁾を基に、各豚が属する品種の事後確率⁸⁾を算出した。

IV 結果および考察

1. SNP マーカーを用いた系統解析

SNP マーカーに基づいて作成した系統樹を図 1 に示す。系統樹はアグーおよびアグーブランド豚 (LWA, DBA) と西洋種の大きく 2 つのクラスターに分かれた。しかし、アグーブランド豚である DA は西洋種のクラスターに含まれた。これまでマイクロサテライトマーカーによるアグーと他品種との識別は遺伝的類似度を尺度にした系統樹により行ってきた。しかし Jaccard's 係数を尺度にした系統解析では 54466 個の SNP マーカーを用いても、アグーブランド豚と他品種を識別することはできなかった。

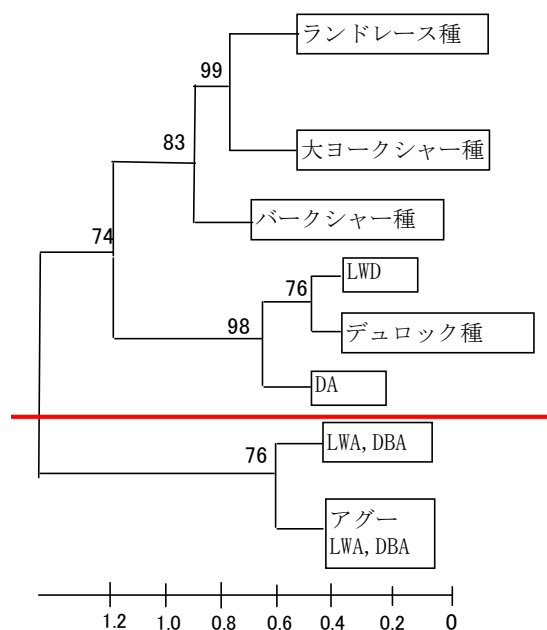


図 1 SNP マーカーによる系統樹

注) 枝上の数値は 500 反復のブートストラップ値を示し、500 反復中何%がその樹形図を支持したかを表す

2. 主成分分析

主成分分析は、個体が最もばらつく空間を見つけ、集団間の違いを最大限にする手法であることから遺伝的構造解析⁹⁾に利用されており、品種識別にも有効であると思われる。そこで各品種の遺伝的な違いを明らかにするため SNP 情報を用いた主成分分析を行った。その結果、第 1 主成分の寄与率は 20.9%で第 2

主成分は 9.52% であり、分析に用いたマーカー数の 54466 ある主成分の中において、これら 2 つで 30.4% の累積寄与率を占めた。第 3 主成分以降は 5% 以下の寄与率であった。図 2 に第 1 と第 2 主成分の散布図と 95% 信頼楕円を示した。

横軸の第 1 主成分で L 種、W 種、H 種、D 種および LWD 種などの西洋種がプラス、アグーはマイナスと完全に区別された。アグーブランド豚はアグーと西洋種の間位置したがアグーブランド豚と LWD などの西洋種は第 1 主成分で明瞭に区別することができた。縦軸の第 2 主成分では西洋種の中で D 種と他品種の分離が見られ、アグーブランド豚の中でも、LWA などの白色系と DBA などの有色系はやや離れて位置した。

95% 信頼楕円は、西洋種と比べアグーやアグーブランド豚は大きくなった。特にアグーの楕円は大きく、集団として遺伝的多様性は大きいことが示唆された。またアグーと DBA の楕円の一部分に重複が見られた。

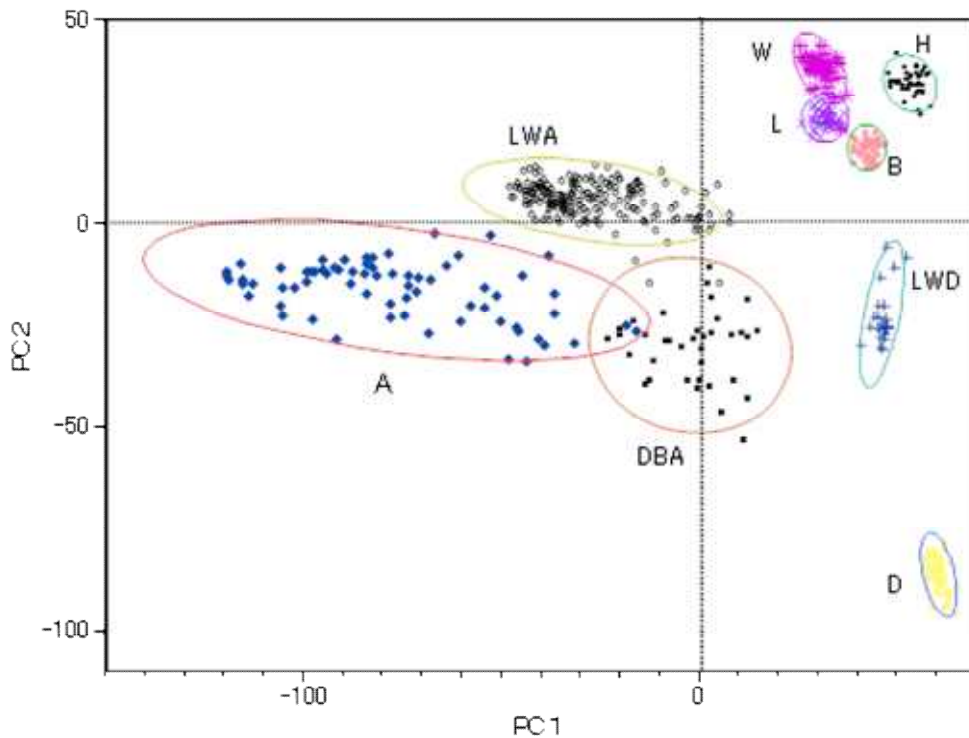


図 2 第 1, 第 2 主成分得点の散布図と 95% 信頼楕円

- 注 1) A: アグー, LWA: LW × アグー, DBA: DB × アグー, L: ランドレース種, W: 大ヨークシャー種, D: デュロック種, B: バークシャー種, H: ハンプシャー種, LWD: 三元交雑種
- 2) DA (D 種 × アグー) は DBA に含めて解析した。

3. 事後確率から予測した品種の識別

図 2 における散布図の各点から各品種の平均までの距離に分散と共分散を考慮に入れたマハラノビスの距離を算出し、各豚がすべての品種に属する事後確率を求めた。さらに事後確率が最も高い品種をその豚の属する品種として分類した。その結果を表 1 に示す。

正答率はすべての品種において 95% 以上であった。誤判別したのは LWA を DBA とした 3 頭、アグーを DBA とした 2 頭、W 種と L 種をそれぞれ誤判別した 4 頭であった。アグーブランド豚を他品種と判別したり、また逆に他品種をアグーブランド豚と判定することはなく、アグーブランド豚と西洋種との識別結果は 100% であった。

表1 事後確率から予測した品種の分類結果

品種	頭数	事後確率から予測した品種										正答率(%)	誤判別率(%)
		LWA	DBA	A	L	W	D	B	H	LWD			
LWA	201	198	3	0	0	0	0	0	0	0	0	98.5	1.5
DBA	36	0	36	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
A	71	0	2	69	0	0	0	0	0	0	0	97.2	2.8
L	48	0	0	0	46	2	0	0	0	0	0	95.8	0
W	47	0	0	0	2	45	0	0	0	0	0	95.7	4.3
D	48	0	0	0	0	0	48	0	0	0	0	100	0
B	48	0	0	0	0	0	0	48	0	0	0	100	0
H	47	0	0	0	0	0	0	0	47	0	0	100	0
LWD	22	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0	100	0

注) 数値は予測された頭数

これらの結果から、DNAチップのSNPマーカーを活用した主成分分析はアグーブランド豚の識別に大変有効な解析方法であることが明らかになった。大石ら¹⁰⁾は血液型および蛋白多型遺伝子頻度を用いて主成分分析を行い固有ベクトル値から12豚品種の分離に影響を与える対立遺伝子を明らかにしている。SNPマーカーにおいても品種の分類に寄与する固有ベクトルの大きいSNPを探索することでマーカーを絞り込むことも可能であると考えられる。

今回の識別結果は、供試豚546頭から得られたものであり、すべての豚を調べたわけではない。農場や血縁の偏りを避けて可能な限りランダムサンプリングを行ったが、今回推定された主成分得点のパラメーター（各品種の平均値や分散共分散）が真値とは限らない。また推定に用いたデータセットで識別精度の検証も行ったため誤判別率を過小評価している可能性もある。よって今後、アグーブランド豚の識別技術の確立に向けて、推定パラメーターの精度向上と検証用データセットを用いた識別精度の検討が必要である。

V 引用文献

- 1) 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), 沖縄畜研研報, **44**, 39-42
- 2) 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 (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 (3), 沖縄畜研研報, **46**, 43-50
- 3) 島袋宏俊・稲嶺修・仲村敏・宮城正男・佐藤正寛・石井和雄 (2009) 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 (4), 沖縄畜研研報, **47**, 29-36
- 4) 山田亮 (2007) 遺伝統計学の基礎, 96, オーム社
- 5) Sneath P. H., Sokal R. R. (1994) 数理分類学, 153, 内田老鶴圃
- 6) Purcell S, Benjamin N, Katho TB, Lori T, Manuel A. R. F, David B, Julian M, Pamela S, Paul I. W. de B, Mark J. D, Pak C. S (2007) PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses, *Am. J. Hum. Genet.*, **81**(5), 559-575
- 7) 足立堅一 (2005) 多変量解析入門, 250-251, 篠原出版新社
- 8) 金明哲 (2005) Rによるデータサイエンス, 179-181, 森北出版株式会社
- 9) Yamaguchi-Kabata, Y, Nakazono, K, Takahashi, A, Saito, S, Hosono, N, Kubo, M, Nakamura, Y, Kamatani N (2007) Japanese Population Structure, Based on SNP Genotypes from 7003 Individuals Compared to Ethnic Group Effects on Population-Based Association Studies, *Am. J. Hum. Genet.*, **83**(4), 445-456
- 10) 大石孝雄・天野卓・田中一栄 (1991) 血液型および蛋白多型遺伝子頻度に基づく主成分分析による12品種の遺伝的関係の考察, 日畜会報, **62**(8), 750-756