

# DNA マーカーを利用した高品質阿波ポーク生産技術の開発

## (第1報)

### (イノシシの肉質調査)

新居 雅宏・谷 史雄・仁木 明人

#### 要 約

当場ではDNAマーカーを利用して良い肉質に連鎖するDNAマーカーを開発するためにイノシシを用いた家系の構築を図っている。そこで、5頭のイノシシの肉質の理化学的、組織化学的検査を行い、大ヨークシャー(W)とデュロック(D)、ハンプシャー(H)の交雑種等の在来種と比較した。

- 1 イノシシは肉のP.C.S, L値, a値がWとW, L, D, Hの交雑種WLD及びWLHDと比較して明らかに濃い赤色を呈した。
- 2 イノシシはR型, R型筋線維の割合が在来種に比べて、有意に高く、逆にW型筋線維が低かった。WとWLDを比較したときR型筋線維の割合がWで有意に低く、調査した中でW型筋線維の割合がWで最も高かった。
- 3 筋線維直径は種間においてほとんど差はなく、WLDにおいてR型がW型より、有意に小さかった( $P < 0.01$ )。
- 4 筋線維の構成割合と肉のP.C.S, L値, a値に有意な高い相関係数が認められた。

#### 目 的

徳島県では系統造成豚アワヨークを利用した高品質阿波ポークの生産を目指している。肉質の改善を目的とした育種は時間と費用を要するため、困難であった。しかし、近年、EU、アメリカ、日本(農水省)を中心としてゲノム解析研究が活発に行われている。ゲノム解析研究が進展し、形質を支配する遺伝子座が明らかになるとDNAマーカー等による育種選抜に応用されると期待される。当場では平成9年度より肉質に関与するゲノム領域を見つけ、DNAマーカーを利用した高品質阿波ポーク生産技術を開発する研究を開始した。ゲノム解析は家畜の場合、求めている形質が異なる系統の交配によるF1を作成し、F1の腹内交配、あるいは戻し交配により形質の分離を測定し、形質とDNAマーカーを照合し、求めている形質に関与するゲノム領域を絞り込んでいく方法が、一般に行われている<sup>1)</sup>。

ここで F2 での形質の分離を期待するには親世代で形質が大きく離れていることが必要とされる。そこで、現在の豚に交配可能で形質が最も離れていると考えられるイノシシを親世代に選定し、現在、家系の作成中である。しかし、イノシシの肉質を理化学的に検査した報告は少ない。そこでイノシシの肉質について基礎的知見を得るとともに、在来種と比較した。

#### 材料及び方法

##### 1) 試験期間及び調査豚の構成

試験供試豚の構成を表 1 に示した。肉質検査はイノシシについては平成 10 年 1 月 30 日～2 月 26 日、W、WLD、WLHD は平成 9 年 11 月 18 日と平成 10 年 2 月 4 日に行った。イノシシは放飼場のある 1 農家で飼育された個体を供試した。生後約 1 ヶ月で離乳し、1 ヶ月間豚のは乳後期飼料を与え、その後、サツマイモ、ニンジン、チンゲンサイ、大麦等で飼養された。その他の品種については、当场繋養の個体を用いた。W は全頭、系統造成豚アワヨークであり、また、WLD、WLHD の作成に用いた。イノシシは分娩日を記録していなかったため、正確な日齢が不明であったが平成 8 年 4～5 月に分娩した個体を平成 10 年 2 月前後に調査した。

表 1 供試豚の構成

品 種	イノシシ	W <sup>a)</sup>	WLD <sup>b)</sup>	WLHD <sup>c)</sup>
頭 数	5(雌5)	8(去勢8)	8(去勢3, 雌5)	7(去勢2, 雌5)
屠殺時体重(kg)	— <sup>d)</sup>	111± 5.3	112± 4.2	117± 5.0
日 齢(日)	550～ <sup>d)</sup>	197±21	187±19	181±10

a) アワヨーク、b)(アワヨーク\*ランドレース)\*デュロック

c) (アワヨーク\*ランドレース)\*(ハンプシャー\*デュロック)

d) 個体識別、正確な分娩日が不明

e) 屠殺前の体重測定を実施せず

##### 2) 材料肉採取方法

屠殺後、1 昼夜冷蔵した 4 - 5 胸椎間のロース肉を試験に用いた。肉の理化学及び組織化学検査はロース肉の胸最長筋 (M.longissimus thoracis) より、材料肉片を採取した。

##### 3) 理化学的検査方法

理化学的検査は当場の定法<sup>2)</sup>により行った。

##### 4) 組織化学的検査方法

理化学的検査と平行して胸最長筋の中心部分より、肉片を 1cm 各に整形し、O.C.T コンパウンドにより包埋後、ドライアイス - イソペンタンにより凍結し、薄切時まで - 30 の冷凍庫に保存した。次に凍結した肉片をクリオスタットを用いて約 10 μm の連続切片を作成し、30～60 分風乾したのち、各種酵素の検出を行った。

myosin ATPase 活性は酸性 (pH4.3～4.5) の前処理液に 5 分間、またはアルカリ性 (pH10.5) の前処理液に 30 分間浸漬した後に基質として ATP を含む浸漬液に前者は 45 分間、後者では 20 分

間の処理をして検出した。また，NADH - dehydrogenase (NADH - DH) 活性の検出も行った。

#### 5) 筋線維の計測

筋線維型の同定は 60 倍の顕微鏡写真を撮影して各々 250 ~ 450 個の筋線維によって求めた。筋線維の直径は 2 つのタイプについて 50 個の短径の最大直径をビデオマイクロメーター（オリンパス社 VM - 30）により計測した。

各型筋線維の構成割合は一元配置の分散分析の Fisher の方法により，95%信頼区間を設定して品種間で検定した。直径については t 検定により各型間で検定した。

#### 結果及び考察

##### 1) 理化学的検査結果

理化学的検査結果について，表 2 に示した。Pork Color Standard (P.C.S) においてイノシシが他の品種に比べて高い値となった。また，色差計により測定した L 値はイノシシが有意に低く，a 値は有意に高くなった ( $P < 0.01$ )。これらからイノシシが濃く，赤い肉色を呈していることが明らかになった。しかし 5 頭中 1 頭について豚肉の PSE 肉様の淡い肉色を呈する個体も見られた。この個体は P.C.S が 3，L 値 42.09 であり W と同程度であった。また，組織化学的検査でも明らかに他の個体と異なっていた（後述）。

保水性についてイノシシは W について低く，WLD と有意差も認められた。しかし，イノシシについては個体間差が大きく，先述の淡い肉色の個体の保水性は 70.8% で調査した全頭数の中で最も低かった。

脂肪の質について内層，外層ともに W の融点が他種に比べ有意に高く ( $P < 0.01$ ) だったが，これは季節，飼料の影響も考慮された。イノシシについては給与している飼料が配合飼料とは全く異なるため，イノシシの持っている性質かどうかは不明であった。

表2 イノシシ，アワヨーク及び3元4元交雑豚の理化学的肉质検査値

項目	イノシシ (n = 5)	W (n = 8)	WLD (n = 8)	WLHD (n = 8)
ロース (4-5胸椎間)				
P.C.S	5.20 ± 1.6 <sup>A</sup>	2.56 ± 0.6 <sup>B</sup>	2.69 ± 0.4 <sup>B</sup>	2.50 ± 0.6 <sup>B</sup>
L値	32.65 ± 7.3 <sup>A</sup>	43.69 ± 3.4 <sup>B</sup>	40.05 ± 2.6 <sup>B</sup>	40.16 ± 2.1 <sup>B</sup>
a値	13.47 ± 0.9 <sup>A</sup>	7.86 ± 0.7 <sup>B</sup>	8.56 ± 1.2 <sup>B</sup>	8.13 ± 1.0 <sup>B</sup>
b値	8.46 ± 1.8	8.44 ± 0.8	8.08 ± 0.7	7.83 ± 0.2
PH	5.59 ± 0.2	5.75 ± 0.2	5.48 ± 0.1	5.47 ± 0.2
水分(%)	73.42 ± 1.1	72.00 ± 3.1	73.05 ± 1.4	72.39 ± 4.0
保水性(%)	75.98 ± 4.8 <sup>a</sup>	75.11 ± 2.3 <sup>a</sup>	79.55 ± 2.4 <sup>ab</sup>	77.77 ± 1.9
伸展率(c m <sup>2</sup> /g)	23.48 ± 3.7	24.99 ± 2.4	26.09 ± 1.7 <sup>a</sup>	23.26 ± 1.4 <sup>b</sup>
脂肪(外層)				
P.F.C.S	2.10 ± 1.0 <sup>a</sup>	1.38 ± 0.5 <sup>b</sup>	1.56 ± 0.5	1.93 ± 0.5
L値	62.62 ± 4.6 <sup>A</sup>	66.70 ± 1.8 <sup>B</sup>	64.40 ± 2.3	64.59 ± 1.3
a値	2.31 ± 1.4 <sup>Aa</sup>	1.94 ± 0.7 <sup>c</sup>	1.03 ± 0.5 <sup>Bd</sup>	1.17 ± 0.7 <sup>b</sup>
b値	8.12 ± 1.1 <sup>A</sup>	8.29 ± 0.6 <sup>A</sup>	6.70 ± 0.4 <sup>B</sup>	6.67 ± 0.3 <sup>B</sup>
融点(°C)	36.95 ± 1.1 <sup>B</sup>	42.01 ± 1.7 <sup>A</sup>	38.29 ± 2.4 <sup>B</sup>	36.39 ± 1.4 <sup>B</sup>
脂肪(内層)				
P.F.C.S	1.70 ± 0.7 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.0 <sup>Ab</sup>	1.38 ± 0.4	1.71 ± 0.6 <sup>B</sup>
L値	64.64 ± 1.9 <sup>B</sup>	70.93 ± 1.6 <sup>A</sup>	64.06 ± 3.9 <sup>B</sup>	61.68 ± 3.1 <sup>B</sup>
a値	2.80 ± 1.1 <sup>Aa</sup>	1.99 ± 0.6	1.35 ± 0.9 <sup>B</sup>	1.65 ± 0.7 <sup>b</sup>
b値	8.41 ± 1.0 <sup>A</sup>	8.48 ± 0.6 <sup>A</sup>	6.89 ± 0.6 <sup>B</sup>	6.85 ± 0.4 <sup>B</sup>
融点(°C)	41.18 ± 1.4 <sup>B</sup>	45.04 ± 1.5 <sup>A</sup>	42.10 ± 2.2 <sup>B</sup>	40.66 ± 1.5 <sup>B</sup>

A - B = P < 0.01、a - b = < 0.05 (F - test)

## 2) 組織化学的検査結果

筋線維は Ashmore ら<sup>3)</sup>の方法に従い、アルカリ処理後の ATPase が活性を示し、酸処理後の ATPase が抑制される R 型とその逆の反応を示す W 型に区別された。R 型筋線維は NADH - DR 活性の高い R 型と低い W 型に区別された。また、pH4.4 の酸処理液で処理後の筋線維は 3 色に分離し、NADH - DR による型分けと一致したため、R 型と W 型の区別は両者を用いて行った。

結果を表 3 に示した。イノシシの R 型の構成は 25.32% で在来種に比べ 2 倍以上高かった。

R 型の構成も W に比べ 2.5 倍程度高く、交雑種に比べ 1.5 倍程度高かった。また、W は交雑種に比べ R 型の割合が有意に低い値となった。相反して W 型の構成はイノシシ、交雑種、大ヨークシャーの順に高くなった。

今回調査したイノシシは Solomon ら<sup>4)</sup>の報告した値よりも R 型が多く R 型が少なかった。また、理化学的検査のところで述べた肉色の淡い、保水性の劣る個体は酸処理、アルカリ処理後の ATPase が同じ筋線維で活性を持ち、筋線維の判定が不可能であった。W は Davies ら<sup>5)</sup>の報告した値よりも赤筋が少なく、白筋が多い値となった。筋線維の短径の直径については、アルカリ

処理後の ATPase 活性を判定したスライドガラスを顕微鏡下において測定したため 型と 型の 2 分類の測定しかできなかった。イノシシは生体重が明らかに小さいにも関わらず直径は在来種とほぼ同等の値を示した。これは運動によるためと推察された。 R 型と の直径の大きさは WLD において有意に R 型が小さい値となった。

組織化学的方法による myosinATPase 活性の差異は、それぞれの筋線維の収縮タンパク質であるミオシン分子の違いによって生じ、それは収縮速度の違いを表す。したがって、Ashmore ら<sup>3)</sup>の命名法による 型筋線維は fast - twitch - fiber であり、 R 型筋線維は slow - twitch - fiber である。さらに fast - twitch - fiber は解糖系が酸化系によってエネルギーを得ているかによって 2 種類に分類される。すなわち、 R 型は解糖系、酸化系の両方から、 W 型は解糖系のみからエネルギーを得ている。家畜の場合、R 型はミオグロビン含量の多い、赤色筋線維を、W 型は白色筋線維を意味すると考えられている。

表 3 イノシシ、アワヨーク及び 3 元 4 元交雑豚の組織科学的肉質検査値

項 目	イノシシ (n = 4)	W (n = 8)	WLD (n = 8)	WLHD (n = 7)
筋線維の割合(%)				
$\beta$ - R	25.32 $\pm$ 14.8 <sup>a</sup>	10.54 $\pm$ 4.5 <sup>b</sup>	10.64 $\pm$ 3.9 <sup>b</sup>	12.81 $\pm$ 4.5 <sup>b</sup>
$\alpha$ - R	26.14 $\pm$ 4.7 <sup>a</sup>	9.70 $\pm$ 5.0 <sup>bc</sup>	16.83 $\pm$ 4.9 <sup>bd</sup>	12.74 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>
$\alpha$ - W	47.02 $\pm$ 13.4 <sup>a</sup>	79.73 $\pm$ 6.2 <sup>ba</sup>	72.53 $\pm$ 4.2 <sup>ba</sup>	74.45 $\pm$ 3.1 <sup>b</sup>
筋線維の直径(um)				
$\beta$ - R	56.01 $\pm$ 5.5	52.13 $\pm$ 7.1	52.40 $\pm$ 6.5	56.26 $\pm$ 5.3
$\alpha$	58.65 $\pm$ 8.0	56.97 $\pm$ 4.1	61.61 $\pm$ 4.0 <sup>d</sup>	61.13 $\pm$ 5.8
A - B、C - D = P < 0.01 (F - test)			I - II = P < 0.01 (t - test)	

### 3) 理化学的検査値と組織化学的検査値の相関について

理化学的検査値と組織化学的検査値の相関係数を表 3 に示した。 R 型の筋線維の構成割合と P.C.S, a 値に有意な高い正の相関, L 値に負の相関があった。 R 型も同様に有意な相関が認められたが、相関係数は R 型が高かった。 W 型は先の 2 つの筋線維と逆の傾向を示した。すなわち、P.C.S, a 値に有意な負の相関, L 値に正の相関がみられ、また、相関係数はいずれも 0.8 を越える高い値となった。筋線維の直径においては R 型と L 値 (P < 0.05), b 値 (P < 0.01) に負の相関がみられ保水性に正の相関がみられた (P < 0.05)。理化学的検査項目では L 値, a 値, b 値と P.C.S で有意な相関がみられた。また、保水性と b 値において - 0.71 という高い負の相関がみられた。イノシシ以外の個体について日齢と各検査項目の相関を検定したが、有意な係数は認められなかった。

これらのことを要約すると R 型筋線維の構成割合が増えると肉色は濃い赤色になり、 W 型筋線維の構成割合が増えると肉色は淡く白くなるということが明らかになった。イノシシの肉が鮮明に赤いのは R 型、 R 型筋線維の割合が高く、相反して W 型筋線維の割合が低いと推

察された。また、W の純粹であるアワヨークは W 型筋線維の割合が D, H に比べ、高いことが示唆され、岩元ら<sup>6)</sup>の報告したパークシャーの構成割合に近い結果となった。

表 3\_肉質検査値の相関

	P.C.S	L 値	a 値	b 値	水分	保水性	伸展率	$\beta$ -R(%)	$\alpha$ -R(%)	$\alpha$ -W(%)	$\beta$ -R(dia)	W (dia)
P.C.S		-0.88 **	0.76 **	-0.38	0.09	0.19	0.14	0.62 **	0.54 **	-0.80 **	0.26	-0.01
L 値			-0.73 **	0.49 **	-0.20	-0.32	-0.14	-0.73 **	-0.46 *	0.82 **	-0.39 *	-0.09
a 値				0.18	0.26	-0.19	-0.21	0.67 **	0.57 **	-0.84 **	0.08	-0.07
b 値					0.06	-0.71 **	-0.46 *	-0.17	-0.04	0.17	-0.54 **	-0.31
水分						-0.28	0.02	0.16	0.13	-0.20	-0.23	-0.11
保水性							0.59 **	-0.07	0.10	-0.03	0.39 *	0.34
伸展率								0.10	-0.11	-0.03	0.21	0.15
$\beta$ -R(%)									0.14	-0.81 **	0.15	-0.22
$\alpha$ -R(%)										-0.69 **	0.20	0.04
$\alpha$ -W(%)											-0.25	0.09
$\beta$ -R(dia)												0.31
W (dia)												

\*\* : P < 0.01、\* : P < 0.05

### 【参考文献】

- 1) Andersson,L. et al. Science 263 : 1771 - 1774 ( 1994 )
- 2) 新居ら ; 徳島肉試研報 21 : 36 - 43 ( 1993 )
- 3) Ashmore,C.R. et al. Exp. Neurol. 30 : 431 - 446 ( 1971 )
- 4) Solomon,M.B. et al. Meat.Sci. 5 : 439 - 450 ( 1985 )
- 5) Davies,A.S. et al. J. Anat. 113 : 213 - 240 ( 1972 )
- 6) 岩元ら ; 日畜会報 60 : 261 - 272 ( 1989 )