

食肉のミトコンドリア DNA 分析による動物種の鑑別

山口県衛生公害研究センター (所長: 宮村恵宣)

河村 章・数田行雄・森重徹洋

遠藤隆二・宮村恵宣

Discrimination of Animal Species of Meat by Mitochondrial DNA Polymorphism

Akira KAWAMURA, Ikuo KAZUTA, Tetsuhiro MORISHIGE

Ryuji ENDO, Shigenori MIYAMURA

Yamaguchi Prefectural Research Institute of Health (Director : Dr. Shigenori MIYAMURA)

はじめに

従来、食肉の動物種鑑別には、動物種に特異的な抗血清と筋肉抽出液との沈降反応を利用した免疫学的手法が広く用いられてきた¹⁾。近年では、種特異抗体を利用した酵素免疫測定法 (ELISA)、筋肉の可溶性タンパク質の電気泳動パターン²⁾の分析などによる鑑別法が報告されている^{3,4)}。

一方、生物のミトコンドリア内に存在する DNA (mtDNA) は、動物種により塩基配列が異なっていることが知られている。動物種による塩基配列の違いは、mtDNA の制限酵素による切断パターンを比較することによって、間接的、部分的ではあるが、明らかにすることができる⁵⁾。

今回、著者らは、食肉の動物種鑑別を行う目的で、各種食肉における mtDNA の制限酵素切断パターンを比較した。

材料及び方法

1 材料

山口県内のと畜場、食鳥処理場及び食肉販売店において、採取した種及び品種の明らかなウシ10検体 (ホルスタイン、ジャージー及び褐毛和種各3検体、見島牛1検体)、ブタ (ランドレース系) 1検体、ニワトリ (アーバーエーカ) 1検体の骨

格筋を用いた。

検査材料は、検査に供試するまで -80°C (一部 -20°C) で保存した。

2 mtDNA の抽出

骨格筋に含まれるミトコンドリアの単離は、分画メジウムに Chappell-Perry の液を用いる遠心分画法⁶⁾に準じて行った。得られたミトコンドリア分画は、以下に示す手順に従って mtDNA を抽出、精製した。

(1) ミトコンドリア分画を 0.25 M ショ糖-50mM MgSO_4 -10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH6.5) に分散し、DNase I 0.2mg/ml (最終濃度) を添加して 37°C 、30分間保温する。

(2) 冷却後、0.1M EDTA-0.15M NaCl-10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加え、15,000r.p.m.、5分間遠沈する。

(3) 沈査に T E S (0.1 M NaCl-10mM EDTA-10mM トリス-塩酸緩衝液 pH8.0, 0.6% SDS) を添加し 60°C 、10分間保温する。

(4) 冷却後、等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (50:48:2) を加え、室温で30分間ゆっくり振とうする。

(5) 15,000r.p.m.、5分間遠沈後、水層を回収し、RNase 50 $\mu\text{g/ml}$ (最終濃度) を添加し 37°C 、

30分間保温する。

(6) DNA 精製用キット GENE CLEAN II (フナコシ薬品株式会社) の使用方法に従って、溶液中の mtDNA を精製、回収する。

最終的に、1 g の骨格筋から回収した mtDNA を 2 μ l の TE (1mM EDTA-10mM トリス-塩酸緩衝液 pH8.0) に溶解し、mtDNA 溶液とした。

3 制限酵素処理及び電気泳動

mtDNA 溶液 1 μ l に対し、4 ユニットの制限酵素 *Hind* III を加え、37°C、2 時間保温し、mtDNA を完全に切断した。得られた mtDNA フラグメントは、5% ポリアクリルアミドゲル (0.75mm厚) で トリス-ホウ酸緩衝液 (pH8.3) を用い、7.5V/cm で 2 時間泳動後、Tegelström の銀染色法⁹⁾により染色した。

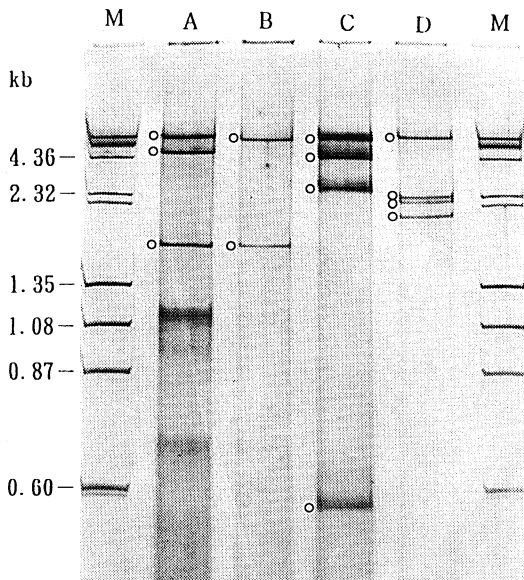


図1 mtDNA の制限酵素 *Hind* III による切断フラグメントの電気泳動パターン

A, B:ウシ C:ブタ D:ニワトリ

M:分子量マーカー

○:mtDNA の切断フラグメント

結果及び考察

mtDNA の制限酵素 *Hind* III による切断フラグメントの電気泳動パターンを図1に示す。ここでは、それぞれ異なる電気泳動パターンを便宜的に A~D パターンに区分した。ウシ 4 品種 10 検体では 2 種類のパターンが認められた。すなわち、ジャージー 3 検体のうち、1 検体とホルスタイン、褐毛和種及び見島牛のすべての検体が 3 本のフラグメント (○印) からなる A パターンを示し、ジャージー 3 検体中 2 検体が 2 本の B パターンを示した。この 2 種類のパターンには、1.7 キロ塩基対 (kb) 付近に共通のフラグメントが認められた。このフラグメントはウシ (A, B) にのみ特異的に存在した。また、ブタは C パターンをニワトリは D パターンを示し、C パターン及び D パターンには、それぞれ 4 本のフラグメントが認められた。動物種間の泳動パターンの比較では、それぞれの動物種に特異的なフラグメントが認められ、種の鑑別は可能であった。

制限酵素 *Hind* III による mtDNA の切断パターンは、ウシ^{7,8)}では 3 種類、ブタ⁹⁾及びニワトリ¹⁰⁾では、それぞれ 1 種類のみ報告されている。今回の実験で得られたウシ (A, B)、ブタ (C) 及びニワトリ (D) の切断パターンは、それぞれの動物種で報告されている切断パターンにはほぼ一致していた。

現在、食肉の動物種鑑別に広く用いられている免疫学的手法は、種特異抗体などの作成に多大の技術と労力を必要とする。また、電気泳動法によるタンパク質の分析には、同一個体内の組織特異性の問題がある。これに対し、mtDNA の分析による鑑別は、特別な装置や器具を必要とせず、鑑別までに要する時間も 10 時間程度と比較的短時間であり、また、同一個体の mtDNA の塩基配列は、組織を問わず全て同じという利点がある。

これらのことから、今回検討した方法は、食肉の動物種の鑑別に有効であると考えられた。

要 約

ウシ 4 品種 10 検体、ブタ 1 検体、ニワトリ 1 検

体の骨格筋から mtDNA を抽出し、制限酵素 *Hind* III による切斷パターンを比較した。ウシでは2種類のパターンが認められたが、両者には共通するフラグメントが存在した。動物種間の比較では、それぞれの動物種に特異的なフラグメントが認められ、種の鑑別は可能であった。

稿を終わるに当たり、検体採取に御協力いただいた山口県玖珂保健所並びに山口環境保健所の各位に深謝します。

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課：“食肉の動物種の鑑別方法” p. 2 (1967)
- 2) Patterson, R. L. S. et al : *Analyst* **115**, 501~506 (1990)
- 3) 安井 健：ぶんせき, 1月号, 43~48 (1991)
- 4) Potter, S. S. et al : *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 4496~4500 (1975)
- 5) 日本生化学会編：生化学実験講座12, エネルギー代謝と生体酸化 (上), 東京化学同人, 217 p. 1976.
- 6) Tegelström, H. : *Electrophoresis* **7**, 226~229 (1986)
- 7) Watanabe, T. et al : *Biochem. Genet.* **23**, 947~957 (1985)
- 8) Watanabe, T. et al : *Biochem. Genet.* **27**, 431~438 (1989)
- 9) Watanabe, T. et al : *Biochem. Genet.* **23**, 105~113 (1985)
- 10) Wakana, S. et al : *Anim. Genet.* **17**, 159~168 (1986)