

黒色羽装の発現を制御する *MC1R* 遺伝子の品種間における多様性

奥村友美¹・大竹 剛¹・佐藤慎一²・新實竜也³・上本吉伸¹・小林栄治¹

¹ 家畜改良センター, 福島県西白河郡西郷村大字小田倉字小田倉原 1 961-8511

² 家畜改良センター兵庫牧場, 兵庫県たつの市揖西町土師 954-1 679-4017

³ 家畜改良センター岡崎牧場, 愛知県岡崎市大柳町字栗沢 1 444-3161

これまでニワトリの羽色に関係する遺伝子がいくつか報告されており, その中でもメラノコルチン 1 受容体 (melanocortin-1 receptor ; *MC1R*) 遺伝子がよく知られている。*MC1R* 遺伝子は, 黒色羽装の発現制御を司る黒色拡張遺伝子座 (extended black ; *E* 座位) に存在し, この遺伝子の変異がニワトリの羽色に関係している。この *MC1R* 遺伝子において, アミノ酸置換を伴う 12 カ所の変異と各対立遺伝子について, これまでの報告や DNA データベースに登録されている配列からハプロタイプを整理した。次に, 簡便かつ正確に遺伝子型を判定するために, 12 カ所のすべてにおいて PCR-RFLP 法の開発を試みた。すなわち, 各変異部位に対して, PCR 反応に用いるプライマーを設計し, 得られた PCR 産物について制限酵素反応を行い, 電気泳動パターンから型判定を行えるようにした。さらに, この判定法を用いて, 品種間および系統間で *MC1R* 遺伝子の多型について調査した。用いたニワトリの品種は白色レグホン, ロードアイランドレッド, 白色プリマスロック, 横斑プリマスロック, 軍鶏, 白色コーニッシュ, 赤色コーニッシュの 7 品種 12 系統であった。この結果, ロードアイランドレッドと軍鶏を除く品種で, 品種内および系統内で *MC1R* 遺伝子の多型が確認された。また, 白色レグホンおよび白色コーニッシュにおいて, 新たに *E^{R3}* ハプロタイプが検出された。これより, PCR-RFLP 法を用いて, *MC1R* 遺伝子の 12 カ所の変異を判定することが可能となり, この結果から *MC1R* 遺伝子のハプロタイプを推定することが可能となった。

キーワード: ニワトリ, *MC1R* 遺伝子, PCR-RFLP, 羽色, 多型

緒 言

ニワトリの羽色は, 白色レグホンやロードアイランドレッドのように品種内では同一でも, 品種間ではその違いが顕著であること, また, 軍鶏やアローカナでは品種内でも様々な羽色を示すことから, 多様性に富んでいる。日本においては古くから愛鶏家によって美しい羽色のニワトリが改良され, 飼育されてきた歴史がある。近年では地鶏などの銘柄鶏において, 羽色がそのニワトリのイメージを代表する大きな要素となること, また視覚的で判別が容易であることなどから重要視されている。現在, 羽色をコードする遺伝子がいくつか報告されており (若杉, 1996), その中の一つに第 11 番染色体に位置するメラノコルチン 1 受容体 (melanocortin-1 receptor ; *MC1R*) がある。これは, 黒色羽装の発現制御を司る黒色拡張遺伝子座 (extended black ; *E* 座位) に存在し (Takeuchi *et al.*, 1996a, 1996b), この遺伝子のいくつかの変異がニワトリの羽色に関係していることが報告されている

(Takeuchi *et al.*, 2003 ; Boswell *et al.*, 2005)。*E* 座位は, 8 個の対立遺伝子を持ち, 優劣の上位から順に extended black (*E*) > birchen (*E^R*) > dominant wheaten (*e^W*) > wild-type (*e⁺*) > partridge (*e^b*) > speckled (*e^s*) > buttercup (*e^{bc}*) > recessive wheaten (*e^v*) となっている (Smyth *et al.*, 1996)。これまで, この *MC1R* 遺伝子の変異について, 様々な品種を用いて各対立遺伝子と塩基配列との関連性が報告されている (Kerje *et al.*, 2003 ; Ling *et al.*, 2003)。また, 三輪ら (2006) は, 白色プリマスロックの雄とロードアイランドレッドの雌を交雑して得られた雌種鶏と, 岐阜地鶏改良種の雄種鶏の三元交雑から作出された岐阜県の肉用奥美濃古地鶏を用いた研究で, 雌種鶏の雛に黒色羽装と褐色羽装がそれぞれ 2 タイプ発生することを観察し, これが白色プリマスロックの *MC1R* 遺伝子に起因することを明らかにした。また, 黒色羽装を示す雛は, 白色プリマスロックから *E* または *E^R* を, 褐色羽装を持つ雛では *e^b* を受け継ぐとした。このように, *MC1R* 遺伝子は品種内においても多型が見られ, 羽色の発現が *MC1R* 遺伝子の変異により影響を受けることは, 品種内および品種間交雑を基本とするニワトリ生産においては重要な意味を持つ。

また, これまで *MC1R* 遺伝子の 12 カ所の変異でアミノ酸置換が起こることが分かっており, それぞれ対応するハプロタイプが報告されている (Kerje *et al.*, 2003 ; Ling *et al.*, 2003 ; 三輪ら, 2006)。これらの変異について塩基配列を決定する場合, 高価なシーケンサーが必要になるのに加え, サンプルが大量になると手

2011 年 11 月 28 日受付, 2012 年 10 月 9 日受理

連絡者: 奥村友美

〒961-8511 福島県西白河郡西郷村大字小田倉字小田倉原 1

独立行政法人家畜改良センター

Tel : 0248-25-2243

Fax : 0248-25-2243

E-mail : y0okumur@nlbc.go.jp

間と経費が膨大になる。近年、一塩基多型 (SNP) を検出する方法が数多く開発されてきている。その中の一つである制限酵素断片長多型 (RFLP) 法は、SNP により制限酵素認識部位の有無が生じる場合、制限酵素による切断の有無を断片長の違いによる電気泳動パターンの変化により、変異を検出することが出来る。多数の解析方法の中でも RFLP 法は、簡便で正確性も高く、かつ低コストで SNP が検出可能な手法である。MC1R 遺伝子では Takeuchi *et al.* (1996) がこの RFLP 法を用いて、*E* と *e*^x の判別を報告している。

そこで本研究では、MC1R 遺伝子の SNP について、アミノ酸置換を伴う 12 カ所の変異の遺伝子型判定を、PCR-RFLP 法で行えるような DNA マーカーの開発を試みた。また、この DNA マーカーを用いて、7 品種 12 系統について解析を行い、MC1R 遺伝子の多様性について検討した。

材料と方法

1. 供試鶏

本試験では、家畜改良センターで保有している白色レグホン (MK 系統: 32 羽), ロードアイランドレッド (YA 系統: 32 羽, 86 系統 30 羽), 白色プリマスロック (LA 系統: 32 羽, 16 系統: 30 羽, 13 系統: 24 羽, 30 系統: 22 羽), 横斑プリマスロック (XS 系統 30 羽, 88 系統: 28 羽), 軍鶏 (831 系統: 32 羽), 白色コーニッシュ (54 系統: 28 羽), 赤色コーニッシュ (56 系統: 30 羽)

を供試した。

2. PCR 反応と電気泳動

まず、これまで Kerje *et al.* (2003), Ling *et al.* (2003), 三輪ら (2006) によって報告されている配列および DNA データベースに登録されている配列のうち、対立遺伝子との対応が示されている配列を用いて、ハプロタイプを整理した (表 1)。これを基に、アミノ酸置換を伴う 12 カ所の判定を行うにあたり、PCR 反応に用いるプライマーを表 2 のとおり作成した。いくつかのアミノ酸変異箇所では、制限酵素切断部位が存在しなかったため、鶏の MC1R 遺伝子の塩基配列 (GenBank 登録番号 D78272.1) を参照し、登録されている塩基とは違う塩基 (ミスマッチ) を入れたプライマーを設計することで、ミスマッチ部位の周辺に制限酵素認識部位を作成した。このミスマッチプライマーを用いて得られた産物について制限酵素処理を行い、遺伝子型の判定を行った。表 3 に 12 カ所のアミノ酸置換部位と使用するプライマーセットおよび制限酵素を示した。

DNA は、フェノール・クロロホルム法により血液から抽出し、これを 20 ng/ μ l に調整した。PCR 反応は、フォワードおよびリバースプライマーをそれぞれ 6.25 pmol, dNTP を 0.2 mM, MgCl₂ を 2 mM, BIOTaqTM HS DNA Polymerase (Bioline, Taunton, MA, USA) を 0.375 U とし、合計 15 μ l で反応させた。また、PCR 反応条件は、熱変性を 94°C で 10 分、その後 95°C を 30 秒、アニーリングを 55°C で 30 秒、伸張反応を 72°C で 30 秒を 35 サイクル繰

表 1. MC1R 遺伝子

品種	ゲノム位置	c497g	a508g	t610c	g672a	t727c	g774a	t796a
		アミノ酸置換	Cys33Trp	Asp37Gly	Thr71Met	Lys92Glu	Ile110Thr	Val126Ile
白色レグホン	<i>E</i> ¹	c	a	t	a	t	a	t
ロックコーニッシュ	<i>E</i> ²	c	a	c	a	t	g	t
横斑プリマスロック	<i>E</i> ³	c	a	c	a	c	g	t
オーストラロープ, ロックコーニッシュ	<i>E</i> ⁴	c	a	c	a	t	g	t
烏骨鶏	<i>E</i> ⁵	c	a	c	a	t	g	t
ADOL line	<i>E</i> ^{R1}	c	a	t	a	t	g	t
白色プリマスロック	<i>E</i> ^{R2}	c	a	t	g	t	g	a
ファイオミ	<i>E</i> ^{Rfav}	c	a	t	g	t	g	a
白色レグホン, 白色コーニッシュ	<i>E</i> ^{R3}	c	a	t	g	t	g	a
ニューハンブシャー	<i>e</i> ^{Wh}	c	a	t	g	t	g	t
赤色野鶏	<i>e</i> ⁺¹	c	a	t	g	t	g	t
褐色レグホン	<i>e</i> ⁺²	c	a	t	g	t	g	t
赤色野鶏	<i>e</i> ⁺³	c	a	t	g	t	g	t
褐色レグホン	<i>e</i> ⁺⁴	c	a	t	g	t	g	t
Smyth Brown line	<i>e</i> ^b	c	a	c	a	t	g	t
Buttercup	<i>e</i> ^{bc}	c	a	c	a	t	g	t
ロードアイランドレッド	<i>e</i> ^{v1}	c	a	t	g	t	g	t
名古屋コーチン	<i>e</i> ^{v2}	g	g	t	g	t	g	t

*ゲノム位置は、MC1R 遺伝子 (DDBJ accession No. D78272) の転写開始点を 1 とした場合の位置を示す

り返し、最後に 72°C で 5 分間保持した。この際、増幅の困難であった系統は、アニーリング温度を 53°C とし、40 サイクル反応させた。得られた PCR 産物 3 μ l と制限酵素反応液 6 μ l の合計 9 μ l について、各制限酵素の最適反応温度下で 24 時間、制限酵素反応を行った。この産物について、ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動後、臭化エチジウムと UV 照射により DNA 断片を可視化し、遺伝子型判定を行った。

結 果

これまで報告のあった *MC1R* 遺伝子のハプロタイプについてまとめた結果 (表 1)、全部で 18 タイプとなった。また、同じ対立遺伝子の中で変異を持つハプロタイプ *E*, *E^R*, *e⁺* および *e^v* には、1 から番号をつけた。これより、*E* で 5 タイプ、*E^R* で 4 タイプ、*e⁺* で 4 タイプ、*e^v* で 2 タイプが存在した。このうち *E⁵* は DNA データベースに既に登録されている配列で、*E^{R3}* は本試験において、白色レグホンと白色コーニッシュで検出されたハプロタイプである。

今回供試した各個体について、それぞれのプライマーで PCR を行った結果、すべての組み合わせで目的のサイズの PCR 産物が得られた。また、ミスマッチをいれたプライマーの PCR 産物について塩基配列を確認したところ、各系統で目的の配列が得られていた。次に、各プライマーで増幅した産物をそれぞれの制限酵素で処理し、PCR-RFLP を行った電気泳動像を図 1, 2 に示し

た。これより、各アミノ酸置換部位において *MC1R* 遺伝子の変異を容易に分析することが可能となった。このようにして得られた 12 カ所の変異について、アレル頻度および遺伝子型頻度を品種・系統ごとにそれぞれ表 4 および表 5 に示した。この結果、ロードアイランドレッド 2 系統と軍鶏では、品種内でアレル頻度、遺伝子型頻度ともに特定の型に固定されていた。その他の品種においては、白色プリマスロック 13 系統、横斑プリマスロック XS 系統を除いて、系統内で多型が見られた。

12 カ所の変異の判定結果から、表 1 を参考にハプロタイプを推定し、表 6 にそれぞれの系統におけるハプロタイプの割合を示した。これより、白色レグホンでは *E¹*, *E^{R1}*, *E^{R3}* および *E^{Rfav}*, ロードアイランドレッドでは 2 系統ともに *e^{v1}* であった。また、白色プリマスロックでは、*e^{v1}* または *e^b* を中心に持つ LA および 13 系統と、*E* または *E^R* シリーズを多く持つ 16 および 30 系統の 2 グループに分かれ、同じ品種内においても系統間で黒色羽装を発現する *E*, *E^R* と、褐色羽装を発現する *e^b*, *e^v* を持つことが明らかとなった。横斑プリマスロックでは XS 系統は *E⁴* のみを持ち、88 系統は *E⁴*, *E^{R1}*, *E^{R2}*, *E^{Rfav}* および *e^b* を持つ個体が見られた。軍鶏は *e⁺¹* で固定されており、白色コーニッシュでは *E⁴*, *E⁵*, *E^{R1}*, *E^{R3}*, *E^{Rfav}*, *e⁺³* および *e^{v1}* と様々なタイプを持ち、赤色コーニッシュでは *e⁺³*, *e^{v1}* および *e^b* を持っていた。これらの結果から、ロードアイランドレッドと軍鶏を除く品種で、品種内および系統内において、*MC1R* 遺伝子のハプロタイプに多様性がある

のハプロタイプ

a825g	t1035c	a1042c	g1051c	t1129c	Reference	GenBank accession no.
Thr143Ala	Cys213Arg	His215Pro	Ser218Thr	Leu244Pro		
a	c	a	g	t	Kerje <i>et al.</i> 2003	AY220304
a	t	a	c	t	Kerje <i>et al.</i> 2003	
a	t	a	g	t	Kerje <i>et al.</i> 2003	
a	t	a	g	t	Ling <i>et al.</i> 2003, 三輪ら 2006	D78272
a	c	a	g	t		AB201631
a	c	a	g	t	Ling <i>et al.</i> 2003	
a	t	a	g	t	三輪ら 2006	
a	c	a	g	t	Ling <i>et al.</i> 2003	
g	c	a	g	t		AB710327,AB711121
g	c	a	g	t	Ling <i>et al.</i> 2003	
a	t	a	g	t	Kerje <i>et al.</i> 2003, Ling <i>et al.</i> 2003	AY220303,AB201628,AB201629
g	c	a	g	t	Kerje <i>et al.</i> 2003	
a	c	a	g	t	Ling <i>et al.</i> 2003	
a	t	a	g	t	三輪ら 2006	AB201630
a	t	c	g	t	Ling <i>et al.</i> 2003	
a	t	c	g	t	Kerje <i>et al.</i> 2003	AY220305
g	c	a	g	t	Ling <i>et al.</i> 2003, 三輪ら 2006	
g	c	a	g	c	Kerje <i>et al.</i> 2003	

表 2. プライマーの塩基配列

フォワードプライマー		リバースプライマー		プロダクト サイズ
名前	塩基配列 (5'→3')	名前	塩基配列 (5'→3')	(bp)
45F- <i>RsaI</i>	GCCTCGTGC ^g CGAGCCCTGGT <u>A</u>	110R- <i>SphI</i>	CAGGAAGAGCTCATTGGG <u>C</u> ATG	110
1F	GGCCGCCATCCTCAAGAACAG	398R- <i>DdeI</i>	CGGTCCACGGCGATGACC <u>CTC</u>	246
329F- <i>MboI</i>	GTGCTGGTGATCCGCGCCAG <u>G</u> A	427R- <i>BstUI</i>	TAGCGCAGCGCATAGAAGAT <u>C</u> G	143
2F	GCCATCCTGCTCTGCCTCATTG	637R- <i>HpyCH4V</i>	GAGATGCTGCGCACGTGGT <u>T</u> G <u>C</u>	107
2F	GCCATCCTGCTCTGCCTCATTG	R1192	GCCCCAGCAGATGATGAAGACTC	205

* プライマーの配列内にある塩基の下線部は、制限酵素サイトを作るため、変更した部位 (ミスマッチ部位) を示す

* 太字は制限酵素認識部位を示す

表 3. 各プライマーに対応する制限酵素

ゲノム位置	c497g	a508g	t610c	g672a	t727c	g774a	t796a	a825c	t1035c	a1042c	g1051c	t1129c
制限酵素	<i>PflMI</i>	<i>SphI</i>	<i>Hpy</i> CH4IV	<i>MscI</i>	<i>MboI</i>	<i>BccI</i>	<i>DdeI</i>	<i>BstUI</i>	<i>Hpy</i> CH4V	<i>PmII</i>	<i>ApeKI</i>	<i>MspI</i>
切断部位	+ : c - : g	+ : g - : a	+ : c - : t	+ : a - : g	+ : t - : c	+ : a - : g	+ : t - : a	+ : g - : a	+ : t - : c	+ : a - : c	+ : g - : c	+ : c - : t
45F- <i>RsaI</i> /110R- <i>SphI</i>	○	○										
1F/398R- <i>DdeI</i>			○	○		○	○					
329F- <i>MboI</i> /427R- <i>BstUI</i>					○			○				
2F/637R- <i>HpyCH4V</i>									○			
2F/R1192										○	○	○

* ゲノム位置は、*MCIR* 遺伝子 (DBJ accession No. D78272) の転写開始点を 1 とした場合の位置を示す

* 網掛けはミスマッチプライマーに対応した制限酵素

ることが確認された。

考 察

これまで報告のあった *MCIR* 遺伝子のハプロタイプを整理した結果 (表 1), e^{wh} , e^{+2} , e^{v1} ではアミノ酸置換を伴う 12 カ所の変異全てで各タイプにおいて同じ塩基配列であった。また, e^{+1} , e^{+4} の 2 タイプと, e^b と e^{bc} の 2 タイプも同様に, タイプ間で塩基配列が同一であったことから, 今回調べた 12 カ所の変異からは, これらのタイプを分類出来ないことが分かった。Kerje *et al.* (2003), Ling *et al.* (2003), 三輪ら (2006) はそれぞれ違った品種を用いて e^{wh} , e^+ , e^b , e^v タイプを報告しているため, 今回は彼らの報告に基づいてハプロタイプを整理した。また, 本試験において, 新たに白色レグホン, 白色コーニッシュでハプロタイプが見つかった。これは, 野生型の e^+ と比較して, 133 番目のアミノ酸がロイシンからグルタミンに置換 (Leu133Gln) しており, この置換は E^{R2} , E^{R6v} でのみ報告されている。Leu133Gln の置換により黒色素の沈着が増加することが報告されている (Ling *et al.*, 2003; 三輪ら, 2006) ことから, 新たに見つかったハプロタイプを E^R シリーズと判断し E^{R3} と分類した (表 1)。

Guo *et al.* (2010) は, 有色のハイラインブラウンおよびローマインブラウンと 3 種類の羽色 (black, grey plumage with black spots,

and yellow with black spots) を持つ中国在来鶏 (Hebei chickens) の *MCIR* 遺伝子についてシークエンスした結果, 中国在来鶏においてのみ, 新しいアミノ酸置換箇所 3 個を発見し, この 3 カ所を含む 11 カ所の変異を分析し, 28 種類のハプロタイプを報告している。Guo *et al.* (2010) が報告した 28 タイプのハプロタイプのうち中国在来鶏においてのみ見られた 3 カ所のアミノ酸置換部位を除いて, 我々が整理したハプロタイプ (表 1) と比較すると, 11 タイプが共通しており, 一致しなかったタイプは E^1 , E^5 , E^{R2} , e^{+1} , e^{+4} , e^b , e^{v2} であった。このうち, 白色羽装のニワトリで報告されている E^1 , E^5 , E^{R2} のタイプが彼らの報告で観察されなかったことから, 白色羽装のニワトリでは有色のニワトリが持たない *MCIR* 遺伝子型を有する可能性が考えられた。実際に本試験でも, 白色レグホンと白色コーニッシュにおいて, E^{R3} が新たに検出された。

また, 今回の結果から, 白色レグホンや白色プリマスロック, 白色コーニッシュで, *MCIR* 遺伝子型に多くの多型が見られた。これは 3 集団では全個体が白色羽装であることから, 羽色に関する選抜が行われず, *MCIR* 遺伝子型への影響がなかったためと考えられる。また, 白色羽装は, 優性白遺伝子 (*PMEL17*) および劣性白遺伝子 (*TYR*) によって支配されることが報告されており (Kerje *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2006), 優性白遺伝子は黒色を完

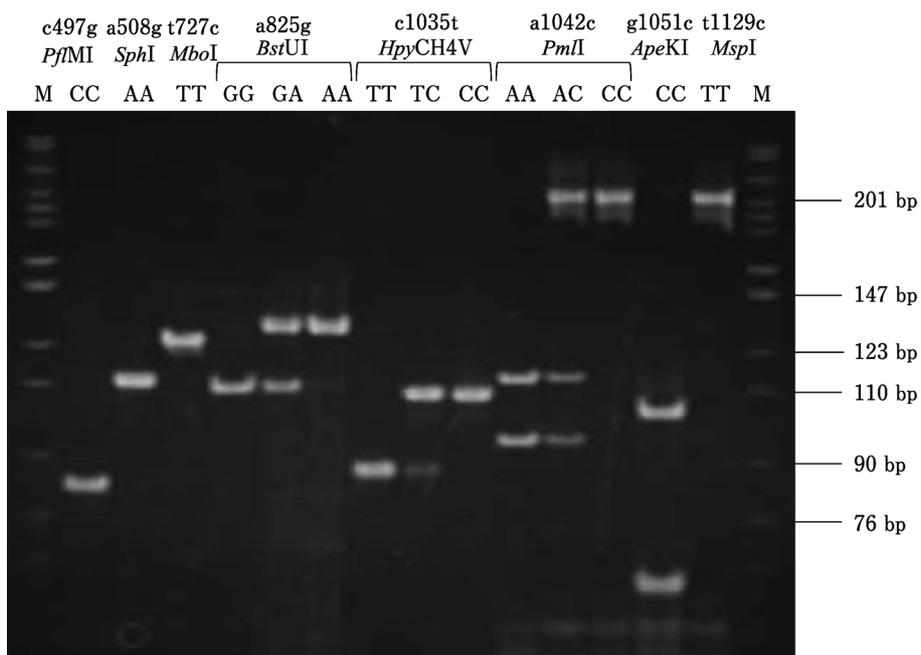


図 1. MCIR 遺伝子における c497g, a508g, t727c, a825g, c1035t, a1042c, g1051c, t1129c 部位の電気泳動像
M は DNA マーカーのサイズスタンダードを示す

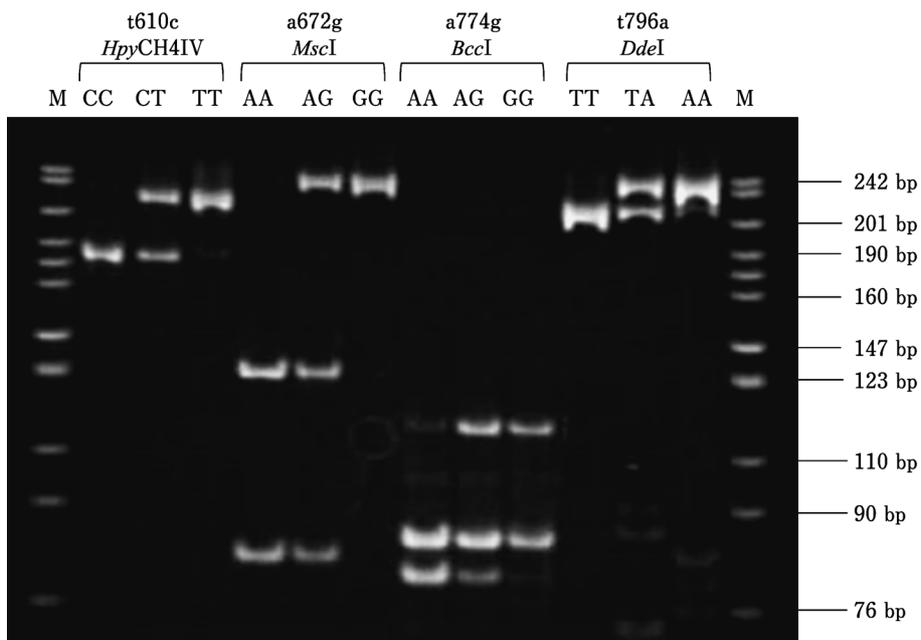


図 2. MCIR 遺伝子における t610c, a672g, a774g, t796a 部位の電気泳動像
M は DNA マーカーのサイズスタンダードを示す

全に抑制、褐色に対しては不完全優性であることが知られている。しかしながら、肉用鶏において、白色プリマスロックおよび白色コーニッシュは地鶏や銘柄鶏等の生産のために用いられる。この交配相手としてロードアイランドレッドや軍鶏といった有色

の鶏が多く利用され、白色の両品種が持つ MCIR 遺伝子型によりヒナの羽色に影響を与える可能性があることから (三輪ら, 2006), 求める羽色がある場合には、これら羽色の遺伝子型を確認する必要がある。

表 4. 各変異におけるアレル頻度

制限酵素	品種 ¹	WL	RIR	RIR	WPR	WPR	WPR	WPR	BPR	BPR	shamo	WC	RC
	系統	MK	YA	86	LA	16	13	30	XS	88	831	54	56
	羽数	32	32	30	32	30	24	22	30	28	32	28	30
<i>PflMI</i>	c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>SphI</i>	a	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	g	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>HpyCH4IV</i>	t	1	1	1	0.67	0.12	0	0.42	0	0.13	1	0.52	0.93
	c	0	0	0	0.33	0.88	1	0.58	1	0.88	0	0.48	0.07
<i>MscI</i>	g	0.25	1	1	0.67	0.08	0	0.35	0	0.09	1	0.35	0.93
	a	0.75	0	0	0.33	0.92	1	0.65	1	0.91	0	0.65	0.07
<i>MboI</i>	t	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>BccI</i>	g	0.81	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	a	0.19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>DdeI</i>	t	0.75	1	1	1	0.92	1	0.65	1	0.91	1	0.81	1.00
	a	0.25	0	0	0	0.08	0	0.35	0	0.09	0	0.19	0.00
<i>BstUI</i>	a	0.88	0	0	0.34	1	1	1	1	1	1	0.80	0.08
	g	0.13	1	1	0.66	0	0	0	0	0	0	0.20	0.92
<i>HpyCH4V</i>	t	0	0	0	0.33	0.88	1	0.60	1	0.89	1	0.43	0.08
	c	1	1	1	0.67	0.12	0	0.40	0	0.11	0	0.57	0.92
<i>PmlI</i>	a	1	1	1	0.67	1	0	0.96	1	0.91	1	1	0.92
	c	0	0	0	0.33	0	1	0.04	0	0.09	0	0	0.08
<i>ApeKI</i>	g	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MspI</i>	t	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

¹WL: 白色レグホン, RIR: ロードアイランドレッド, WPR: 白色プリマスロック, BPR: 横斑プリマスロック, shamo: 軍鶏, WC: 白色コーニッシュ, RC: 赤色コーニッシュ

これまで横斑プリマスロックとして報告されている E^3 タイプ (Kerje *et al.*, 2003) が, 当センターで保有している横斑プリマスロックには存在しない結果となった。また, 88 系統で e^b のヘテロが確認されたが, e^b をホモで持った場合, ヒナの羽装は暗い褐色になることが知られている (三輪ら, 2006)。純粋な横斑プリマスロックのヒナの羽装は黒色であり, 成鶏では特徴的な横斑模様を示すが, 88 系統でもこれまで長年にわたる生産において, ふ化時のヒナはすべて黒色羽装である。このことから, 今回調べた 12 カ所の変異以外にも $MCIR$ 遺伝子に変異が存在するか, 別な遺伝子が黒色羽装の発現に関係している可能性が考えられる。今後はさらに, $MCIR$ 遺伝子について, 今回報告した変異以外のアミノ酸置換を伴う変異箇所を探索する必要がある。

このように $MCIR$ 遺伝子には多くの変異が存在し, これら変異が羽色の発現に影響を与えることがこれまで報告されている。複数の品種・系統を用いた今回の結果においても, 多くの多様性が見られたことから, $MCIR$ 遺伝子型と表現型の更なる検討が必要であると考えられた。加えて, 白色品種で多くのハプロタイプが見られたこと, 横斑プリマスロックで e^b が観察されたことは, 鶏の羽色が $MCIR$ 遺伝子を初め, 多くの遺伝子によって相互に

作用し, これらの遺伝子が羽色の発現様式を複雑にしている可能性を示唆した。

これまで, $MCIR$ 遺伝子に関しては, 多くの変異やハプロタイプがあるにも関わらず, 体系だったまとめがなされなかった。本研究において PCR-RFLP 法を用いて 12 カ所の変異を判定し, 表 1 を参照することでハプロタイプを簡便に決定することが可能となったことは, $MCIR$ 遺伝子の解析に有用であると考えられる。以上のことから, E 遺伝子座の遺伝子型と $MCIR$ 遺伝子の SNP とを正確に関連付け, 各変異の遺伝子型およびハプロタイプと生産形質との関連性を検討する有効な手法が開発された。

謝 辞

本試験を遂行するにあたり, サンプルを提供して頂いた家畜改良センター岡崎牧場ならびに兵庫牧場の方々に感謝いたします。

表 5. 各変異における遺伝子型頻度

制限酵素	品種 ¹	WL	RIR	RIR	WPR	WPR	WPR	WPR	BPR	BPR	shamo	WC	RC
	系統	MK	YA	86	LA	16	13	30	XS	88	831	54	56
	羽数	32	32	30	32	30	24	22	30	28	32	28	30
<i>PflMI</i>	cc	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	cg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	gg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>SphI</i>	aa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	ag	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	gg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>HpyCH4IV</i>	tt	1	1	1	0.47	0	0	0.13	0	0	1	0.15	0.87
	tc	0	0	0	0.41	0.23	0	0.58	0	0.25	0	0.74	0.13
	cc	0	0	0	0.13	0.77	1	0.29	1	0.75	0	0.11	0
<i>MscI</i>	gg	0.09	1	1	0.47	0	0	0.08	0	0	1	0.15	0.87
	ga	0.31	0	0	0.41	0.17	0	0.54	0	0.18	0	0.41	0.13
	aa	0.59	0	0	0.13	0.83	1	0.38	1	0.82	0	0.44	0
<i>MboI</i>	tt	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	tc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	cc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>BccI</i>	gg	0.50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	ga	0.44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	aa	0.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>DdeI</i>	tt	0.59	1	1	1	0.83	1	0.38	1	0.82	1	0.70	1
	ta	0.31	0	0	0	0.17	0	0.54	0	0.18	0	0.22	0
	aa	0.09	0	0	0	0	0	0.08	0	0	0	0.07	0
<i>BstUI</i>	aa	0.75	0	0	0.13	1	1	1	1	1	1	0.67	0
	ag	0.25	0	0	0.44	0	0	0	0	0	0	0.26	0.17
	gg	0	1	1	0.44	0	0	0	0	0	0	0.07	0.83
<i>HpyCH4V</i>	tt	0	0	0	0.13	0.77	1	0.33	1	0.79	1	0.11	0
	tc	0	0	0	0.41	0.23	0	0.54	0	0.21	0	0.63	0.17
	cc	1	1	1	0.47	0	0	0.13	0	0	0	0.26	0.83
<i>PmlI</i>	aa	1	1	1	0.47	1	0	0.92	1	0.82	1	1	0.83
	ac	0	0	0	0.41	0	0	0.08	0	0.18	0	0	0.17
	cc	0	0	0	0.13	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>ApeKI</i>	gg	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	gc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	cc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>MspI</i>	tt	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	tc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	cc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

¹ WL : 白色レグホン, RIR : ロードアイランドレッド, WPR : 白色プリマスロック, BPR : 横斑プリマスロック, shamo : 軍鶏, WC : 白色コーニッシュ, RC : 赤色コーニッシュ

表 6. 各品種・系統におけるハプロタイプの割合

品種	系統	羽数	E^1	E^2	E^5	E^{R1}	E^{R2}	E^{R3}	E^{Rfay}	e^{+1}	e^{+3}	e^b	e^{y1}
白色レグホン	MK	32	0.17	0	0	0.58	0	0.13	0.13	0	0	0	0
ロードアイランドレッド	YA	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ロードアイランドレッド	86	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
白色プリマスロック	LA	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.33	0.67
白色プリマスロック	16	30	0	0.80	0.08	0.03	0.08	0	0	0	0	0	0
白色プリマスロック	13	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
白色プリマスロック	30	22	0	0.54	0	0.06	0	0	0.33	0	0	0.02	0
横斑プリマスロック	XS	30	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
横斑プリマスロック	88	30	0	0.78	0	0.03	0.02	0	0.07	0	0	0.03	0
軍鶏	831	32	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
白色コーニッシュ	54	26	0	0.38	0.05	0.15	0	0.10	0.07	0	0.05	0	0.10
赤色コーニッシュ	56	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0.32	0.07	0.62

引用文献

- Boswell T and Takeuchi S. Recent developments in our understanding of the avian melanocortin system : its involvement in the regulation of pigmentation and energy homeostasis. *Pep-tides*, 26 : 1733-1743. 2005.
- Chang C M, Coville J L, Coquerelle G, Gourichon D, Oulmouden A and Tixier-Boichard M. Complete association between a retroviral insertion in the tyrosinase gene and the recessive white mutation in chickens. *BMC genomics*, 7 : 19. 2006.
- Guo X L, Li X L, Gu Z I, Zheng C S, Wei Z H, Wang J S, Zhou R Y, Li L H and Zheng H Q. Genetic variation of chicken *MC1R* gene in different plumage colour populations. *British Poultry Science*, 51 : 734-739. 2010.
- Kerje S, Lind J, Schuts K, Jensen P and Andersson L. Melanocortin 1-receptor (*MC1R*) mutations are associated with plumage colour in chicken. *Animal Genetics*, 34 : 241-248. 2003.
- Kerje S, Sharma P, Gunnarsson U, Kim H, Bagchi S, Fredriksson R, Schutz K, Jensen P, von Heijne G, Okimoto R and Andersson L. The dominant white, dun and smoky color variants in chicken are associated with insertion/deletion polymorphisms in the *PMEL17* gene. *Genetics*, 168 : 1507-1518. 2004.
- Ling MK, Lagerström MC, Fredriksson R, Okimoto R, Mundy NI, Takeuchi S and Schiöth HB. Association of feather colour with constitutively active melanocortin 1 receptors in chicken. *European Journal of Biochemistry*, 270 : 1441-1449. 2003.
- 三輪 充・井上-村山美穂・加藤未来・早川 博・小川正幸・大谷 健・伊藤慎一. メラノコルチン 1-受容体遺伝子のアミノ酸置換を指標とした, 肉用奥美濃古地鶏の雌種鶏に出現する『黒色羽装』雛の除去. *日本畜産学会報* 77 : 207-214. 2006.
- Smyth JR. Genetics of plumage, skin and pigmentation in chickens. In : *Poultry Breeding and Genetics* (Crawford R. D. ed), pp. 109-167. Elsevier Science, New York. 1996.
- Takeuchi S, Suzuki H, Hirose S, Yabuuchi M, Sato C, Yamamoto H and Takahashi S. Molecular cloning and sequence analysis of the chick melanocortin 1-receptor gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1306, 122-126. 1996a.
- Takeuchi S, Suzuki H, Yabuuchi M and Takahashi S. A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1308, 164-168. 1996b.
- Takeuchi S, Takahashi S, Okimoto R, Schiöth HB and Boswell T. Avian melanocortin system : α -MSH may act as an autocrine/paracrine hormone. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 994 : 366-372. 2003.
- 若杉 昇. 遺伝と育種. 新編畜産大辞典 (田先威和夫監修). 第一版. 1066-1067. 株式会社養賢堂. 東京. 1996.

Genetic Variation of the *MC1R* Gene that Controls Black Plumage Color in Different Breeds

Yumi Okumura¹, Tsuyoshi Ohtake¹, Shin-ichi Sato², Tatsuya Niinomi³,
Yoshinobu Uemoto¹ and Eiji Kobayashi¹

¹National Livestock Breeding Center, Nishigo, Fukushima, Japan 961-8511

²National Livestock Breeding Center of Hyogo Station, Tatsuno, Hyogo, Japan 679-4017

³National Livestock Breeding Center of Okazaki Station, Okazaki, Aichi, Japan 444-3161

Several loci control the plumage color of chickens; one of the most studied such loci is the melanocortin-1 receptor (*MC1R*) gene. The *Extended black* (*E*) locus that controls the expression of black plumage color encodes the *MC1R*. *MC1R* polymorphisms are known to control plumage color. In this study, we determined the haplotype for 12 synonymous mutations using data of previous reports and DNA database. We attempted to develop a PCR-RFLP method for the easy and precise determination of the genotypes of the 12 synonymous mutations. Primers were designed for PCR-RFLP. Segments of the *MC1R* region were amplified by PCR using these primers; the PCR products were treated with restriction enzymes, and the resulting fragments were examined using polyacrylamide gel electrophoresis. In addition, we examined *MC1R* polymorphisms using PCR-RFLP in 7 breeds and 12 strains (White Leghorn, Rhode Island Red, White Plymouth Rock, Barred Plymouth Rock, Shamo, White Cornish, and Red Cornish) and 12 strains.

MC1R polymorphisms were observed in five breeds (except for Rhode Island Red and Shamo) and families. We detected a novel haplotype E^{R3} in the White Leghorn and White Cornish.

We identified 12 synonymous mutations of the *MC1R* gene using PCR-RFLP and analyzed the haplotypes.

(*Japanese Journal of Poultry Science*, **50** : J1-J9, 2013)

Key words : chicken, *MC1R* gene, PCR-RFLP, plumage, polymorphism