

烏骨鶏選抜集団第5世代における8番染色体上のDNAマーカーと 生産形質との関連性

西山由紀¹・MD ミザヌル ラハマン^{1,2}・阿南加治男³・山中賢一^{1,2}・和田康彦^{1,2}

¹ 佐賀大学農学部, 佐賀市本庄町 840-8502

² 鹿児島大学連合農学研究科, 鹿児島市郡元 890-8580

³ 大分県農林水産研究指導センター畜産研究部豚・鶏チーム, 豊後大野市三重町赤嶺 879-7111

烏骨鶏は絹糸状の羽毛, 黒い皮膚などの特徴をもつ鶏品種で, 古くから人間の健康に結びつくとして肉と卵が高値で取引されてきた。しかし, 他の鶏品種と比較して小型で産卵率が低いために生産効率が悪いことが問題となっている。著者らはこれまでに産卵率や発育の改良を目的として大分県で選抜されている烏骨鶏選抜集団の第5世代を供試して, 他の採卵鶏で産卵率に関連するQTLが報告されている2番染色体およびZ染色体上のDNAマーカーと産卵率などの生産形質との関連性について検討してきた。本研究では, さらに関連するQTLが報告されている8番染色体上のDNAマーカーと生産形質との関連性について検討した。8番染色体上のIn/Delマーカー(AAMm77)と3つのPCR-RFLPマーカー(RZ-M75, RZ-M76, RZ-M77)を用いて, 烏骨鶏選抜集団第5世代の雌195羽と雄58羽のジェノタイプングを行った。DNAマーカーのハーディーワインベルグ平衡に対する χ^2 値を求めたところ, 雄雌ともにRZ-M77とAAMm77において平衡条件から有意に異なることが明らかとなった。タイプング結果と150~300日齢での産卵率, 294~300日齢の平均卵重, 294~300日齢の平均卵殻強度, および50日齢(雌のみ), 100日齢, 150日齢, 300日齢, 450日齢の体重との関連性について, 統計言語Rを用いて分散分析を行った。雌ではAAMm77と卵重との間に有意な関連性が認められた($p < 0.05$)。雄ではAAMm77と450日齢の体重との間に有意な関連性が認められた($p < 0.05$)。これらの結果を踏まえて, 卵重や雄の発育との関連性が認められたAAMm77の周辺に新たなマーカーを開発して検討を進める必要があると考えられた。

キーワード: 烏骨鶏, 8番染色体, 産卵率, 卵殻強度, 発育

緒 言

烏骨鶏 (*Gallus gallus var domesticus*) は, ニワトリの1品種であり, 全身が絹糸状の羽毛で覆われており, 皮膚, 骨, 肉, 内臓にメラニン色素が沈着し暗紫色を呈しており, 古来から薬用や愛玩用に用いられてきた。烏骨鶏の原産地については諸説存在し明確にはなっていないが, 分布は東南アジア地域の広範囲に及んでいる。日本には17世紀(江戸時代初期)に渡来したと言われており, 1943年に天然記念物に指定された。平均体重は約1.2kgとやや小ぶりだが, 肉は締まっていて, 脂肪は少ない。烏骨鶏には就巢性と呼ばれる産んだ卵を抱いて温める行動があるために, 産卵数は年間に50から200個程度で他の産卵鶏品種と比べて生産効率が極めて低い(野口ら, 2001)。近年, 烏骨鶏の産卵率を改良する選抜試験が大分県, 東京都, 栃木県, 和歌山県などで行われて

きたが, ある程度の改良はできるものの産卵率は50%程度で頭打ちになっている(野口ら, 2001; 和田ら, 2008a)。一方, 大分県で11の鶏系統の能力調査と交配試験を経て作出された「おおい冠地どり」の雄系には食味性の改善の観点から烏骨鶏を交配して作出されており, 今後も烏骨鶏が新たな地鶏作出の基礎品種として利用されていくと思われる(阿南と津田, 2008)。

和田ら(2008a, b)は, 日本における53羽の烏骨鶏, および大分県の烏骨鶏選抜集団第4世代311羽(雄69羽, 雌242羽)について, 2番染色体上のプロラクチン(PRL)遺伝子のプロモーター領域に位置する24bpの挿入の有無(Jiang *et al.*, 2005)について遺伝子型判定を行った。その結果, Jiang *et al.* (2005)が用いた烏骨鶏集団では, In型対立遺伝子がほとんど見られなかったが, In型対立遺伝子はヘテロ個体として確認された。また, この選抜集団第4世代において生産形質とこのIn/Del座位との間に有意な関連性は認められなかったものの, Del/Del型のピーク産卵率が50~55%であったのに対してIn/Del型のピークは60~65%であり, In/Del型のピークが約10%程度高い産卵率を示した。また, 岳ら(2011)はPRL遺伝子周辺に烏骨鶏と白色レグホン間に連鎖不平衡ブロックが存在していることを示した。

ローシャンら(2012)は, 就巢性の除去による産卵率の向上な

2015年10月27日受付, 2016年5月25日受理

連絡者: 和田康彦

〒840-8502 佐賀県本庄町1番地

Tel: 0952-28-8787

Fax: 0952-28-8787

E-mail: ywada@cc.saga-u.ac.jp

ど、烏骨鶏の生産性の向上を目指して、2 番染色体上の候補遺伝子である *PRL* 遺伝子プロモーター領域の 24bp の挿入の有無と、プロラクチンの分泌に関与しているといわれる vasoactive intestinal peptide 受容体 1 (*VIPRI*) 遺伝子領域の 1 塩基置換 (Xu *et al.*, 2011) および視床下部における摂食刺激に対する反応に関与しているとされる neuropeptide Y (*NPY*) 遺伝子領域の 1 塩基置換 (Xu *et al.*, 2011) に関して、烏骨鶏選抜集団第 5 世代の遺伝子型判定を行い、産卵率などの生産形質との関係性を検討した。その結果、50 日齢体重、100 日齢体重、150 日齢体重、300 日齢体重、450 日齢体重、産卵率、卵殻強度のすべての形質で父鶏の効果との有意な関連性を明らかにした。

Rahman *et al.* (2014a) は、烏骨鶏選抜集団第 4 世代で *PRL* 遺伝子プロモーター領域の 24bp の挿入をヘテロでもつ個体 (In/Del 型) どうしで交配させ、In/In 型の烏骨鶏個体を生産した。そして In/Del×In/Del 集団において 3 つの候補遺伝子 (*PRL* 遺伝子、*VIPRI* 遺伝子、*NPY* 遺伝子) の DNA マーカーと生産形質との関連性を検討し、卵殻強度と *NPY* 遺伝子、雄の 50 日齢体重と *PRL* 遺伝子、*VIPRI* 遺伝子で有意な関連性を明らかにした。

Tuiskula-Haavisto *et al.* (2002) は 2 つの採卵鶏系統の交雑家系を用いて生産形質との QTL 解析を実施し、4 番染色体、8 番染色体および Z 染色体上に産卵数に関与する QTL を検出している。Rahman *et al.* (2014b) は、烏骨鶏選抜集団第 5 世代においてプロラクチン受容体や成長ホルモン受容体が座乗している Z 染色体上の 5 つの DNA マーカーについて PCR-RFLP で遺伝子型判定を行い、一部の DNA マーカーにおいて、産卵率、卵重、雌の 150 日齢体重、雄の 150、300 日齢体重との間に有意な関連性が存在することを明らかにした。しかし、これら 2 番染色体や Z 染色体などの DNA マーカーによって示されたゲノム領域だけでは遺伝分散の一部しか説明できていないと考えられるため、これらの領域以外にも、烏骨鶏選抜集団において生産形質に関与するゲノム領域が存在することが示唆された。

Tuiskula-Haavisto *et al.* (2002) は採卵鶏の 2 系統を交雑して得られた F2 家系について QTL 解析を実施し、14 箇所のゲノムワイドでの有意な QTL を検出した。その中で 18~40 週の産卵数については Z 染色体のほかに 8 番染色体にも QTL を検出している。そこで本研究では烏骨鶏選抜集団第 5 世代において 8 番染色

体上の 4 つの DNA マーカーについて遺伝子型判定を行い、産卵率などの生産形質との関連性について検討した。

材料と方法

1. 供試鶏

大分県農林水産研究指導センターにおいて、宮崎、青森、東京、佐賀、大分の各都県畜産試験場などから導入した烏骨鶏を用いて基礎集団を作成し、雌は産卵率で雄は発育と体型で選抜した烏骨鶏選抜集団を構築している。本研究では第 5 世代の雌 195 羽、雄 58 羽を使用した。

2. 飼育方法と表現型の測定

鶏は 3 つの異なる期間に孵化し、異なる鶏舎において飼育された。全期間にわたって、市販の配合飼料を自由に与えた。雛は 40 日齢までバタリーケージで飼育され、80 日齢までは中雛用ケージ、120 日齢までは大雛用ケージ、450 日齢までは成鶏用シングルケージ (226×393×455 mm) で飼育された。生産形質として雌では、50、100、150、300、450 日齢での体重、150~300 日齢での産卵率、294~300 日齢での平均卵重と平均卵殻強度を測定し、雄では、100、150、300、450 日齢での体重を測定した。卵殻強度の測定には卵殻強度計 II (富士平工業、東京) を使用した。

3. DNA 抽出と遺伝子型判定

尺骨静脈からへパリン入り採血管を用いて採血を行い、-20℃で保存し、Pure Gene キット (フナコシ、東京) を使用して DNA を抽出した。DNA マーカーとしては Riztyan *et al.* (2011) および Maw *et al.* (2012) の情報をもとに 8 番染色体の In/Del マーカー (*AAMm77*) と 3 つの PCR-RFLP マーカー (*RZ-M75*, *RZ-M76*, *RZ-M77*) を用いた。抽出したゲノム DNA をテンプレートとして、PCR によって各 DNA マーカー用のプライマー (表 1) を使用して DNA の増幅を行った。PCR 酵素には Takara ExTaq Hot start version (タカラバイオ、滋賀) を使用した。PCR 条件は 95 分で 5 分間の前加熱を行い、95℃ 30 秒間の熱変性、表 1 に示すアニーリング温度で 30 秒間のアニーリング、72℃ 1 分間の伸長反応を 40 サイクル行った後、72℃ 10 分間の伸長反応を行った。In/Del マーカーについては 1.2% アガロースゲル電気泳動により遺伝子型判定を行い、PCR-RFLP マーカーについては PCR 産物を制限酵素 *Pst*I で 37℃ 3 時間処理後、3.0% アガロースゲル電気泳動により遺伝子型判定を行った。

表 1. DNA マーカーとプライマー情報

DNA マーカー	染色体上の位置	プライマーの配列	アニーリング温度	PCR 産物長 (bp)	制限酵素
<i>RZ-M75</i>	5897948	CAT ATT TCA TCA TCG TAC GGT TCA CA GAC CAG CAT GGA AGA GTT GAG	60.0	1010	<i>Pst</i> I
<i>RZ-M76</i>	14459355	AAG TAC CTC TCA ATT AAC ATT TAC CAT AAG TAG AAG GTT CAA CAA CAT ATC AG	61.0	937	<i>Pst</i> I
<i>RZ-M77</i>	22507694	GTG CTA ACC AAG CAG CGA AC ATT CGG CTG CCA CGA GAC	61.0	883	<i>Pst</i> I
<i>AAMm77</i>	27438242	CAT TTG GGG CAG CAG TAT TC CAC CTC CCA AAC TTG CAT CT	62.5	363/339	—

4. 統計解析

遺伝子型頻度がハーディー・ワインベルグ平衡に達しているかどうかを確認するため POPGEN version1.32 (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/>) を用いて χ^2 検定を実施した。また、遺伝子型と産卵率などの生産形質との関連性について、遺伝子型と飼養管理グループを主効果とする二元配置分散分析により統計処理言語 R (Ihaka and Gentleman, 1996) を用いて判定した。雌は 50, 100, 150, 300, 450 日齢体重、産卵率、卵重、卵殻強度との関連性を分析し、雄は 100, 150, 300, 450 日齢体重との関連性を分析した。

表 2. 各 DNA マーカーにおける遺伝子型別の羽数

性別	DNA マーカー	遺伝子型	羽数
雌	RZ-M75	AA	168
		AG	27
	RZ-M76	TT	155
		TG	36
		GG	4
	RZ-M77	T/T	26
		T/C	55
		C/C	114
	AAMm77	In/In	54
		In/Del	79
		Del/Del	62
	雄	RZ-M75	AA
AG			12
RZ-M76		TT	42
		TG	14
		GG	2
RZ-M77		T/T	10
		T/C	19
		C/C	29
AAMm77		In/In	15
		In/Del	38
		Del/Del	5

分散分析の結果から、DNA マーカーと生産形質との間に有意な関連性が認められたものについてチューキーの多重範囲検定を実施した。

結 果

DNA マーカーごとの遺伝子型判定の結果を表 2 に、ヘテロ接合体頻度とハーディー・ワインベルグ平衡に対する χ^2 値を表 3 に示した。観測されたヘテロ接合体頻度は RZ-M75 の雌で 0.14, 雄で 0.21 と低く、AAMm77 では雌で 0.41, 雄で 0.66 と高かった。期待されたヘテロ接合体頻度は、RZ-M75 で雄雌ともに 0.2 未満と低く RZ-M77, AAMm77 では雄雌ともに 0.40 以上と高かった。 χ^2 検定の結果、RZ-M77 と AAMm77 のハーディー・ワインベルグ平衡に対する χ^2 値が雄雌ともに 5% 水準で有意であり、ハーディー・ワインベルグ平衡に達していないことが示された。

雌について DNA マーカーと 50, 100, 150, 300, 450 日齢体重、産卵率、卵重、卵殻強度との関連性を分析した結果 (表 4), その結果、AAMm77 と卵重との間に 5% 水準の有意な関連性が認められた。体重では、すべての日齢で DNA マーカーと有意な関連性は認められなかった。

雄について DNA マーカーと 100, 150, 300, 450 日齢体重との有意な関連性を分析した結果 (表 5), AAMm77 と 450 日齢体重との間に 5% 水準で有意な関連性が認められた。

分散分析の結果から DNA マーカーと生産形質との間に有意な関連性が認められたものについてチューキーの多重範囲検定を実施した結果を表 6 に示した。その結果、AAMm77 では Del/Del 型で有意に卵重が重いことが示された ($p < 0.05$)。雄の 450 日齢体重では、AAMm77 の Del/Del 型が有意に重いことが示された ($p < 0.05$)。

考 察

烏骨鶏の肉と卵は古来より漢方薬の原料や健康食品として高価で取引されているが、産卵率が他の鶏品種と比べて著しく低いために生産効率が悪いことが問題となっている。そこで本研究では烏骨鶏の産卵率を改良することを目的として、産卵率を中心に選抜されている烏骨鶏選抜集団を用いて DNA マーカーと生産形質との関連性を検討した。

表 3. ヘテロ接合体頻度とハーディー・ワインベルグ平衡に対する χ^2 値

性別	DNA マーカー	観測されたヘテロ接合体頻度	期待されたヘテロ接合体頻度	ハーディー・ワインベルグ平衡に対する χ^2 値
雌	RZ-M75	0.14	0.13	1.04
	RZ-M76	0.18	0.20	1.28
	RZ-M77	0.28	0.40	16.92**
	AAMm77	0.41	0.50	7.11**
雄	RZ-M75	0.21	0.19	0.70
	RZ-M76	0.24	0.26	0.46
	RZ-M77	0.33	0.45	4.40*
	AAMm77	0.66	0.49	6.78**

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

表 4. 雌の生産形質に対する各 DNA マーカーの分散分析結果

DNA マーカー	50 日 齢体重	100 日 齢体重	150 日 齢体重	300 日 齢体重	450 日 齢体重	産卵率	卵重	卵殻 強度
<i>RZ-M75</i>	0.00	0.93	0.14	0.35	0.12	0.12	0.72	0.47
<i>RZ-M76</i>	0.65	0.91	0.79	1.59	0.67	0.01	0.34	0.38
<i>RZ-M77</i>	2.30	1.65	0.82	0.02	0.59	1.34	1.06	2.91
<i>AAMm77</i>	0.41	1.03	0.89	0.70	0.17	0.07	3.29*	1.20

数値 : F 値 ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$

産卵率は 150~300 日齢の産卵率、卵重は 294~300 日齢の平均卵重、
卵殻強度は 294~300 日齢の平均卵殻強度。

表 5. 雄の生産形質に対する各 DNA マーカーの分散分析結果

DNA マーカー	100 日 齢体重	150 日 齢体重	300 日 齢体重	450 日 齢体重
<i>RZ-M75</i>	0.09	0.24	0.26	0.13
<i>RZ-M76</i>	0.10	0.80	1.19	1.98
<i>RZ-M77</i>	0.31	0.21	1.30	1.79
<i>AAMm77</i>	0.76	2.56	2.27	3.22*

数値 : F 値 ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$

χ^2 検定の結果、*RZ-M77* と *AAMm77* とでハーディーワインベルグ平衡に対する χ^2 値が雄雌ともに 5% 水準で有意な値となったため、ハーディーワインベルグ平衡に達していないことが示された。このことより、このマーカー付近に対して、何らかの選抜圧が生じている可能性が考えられる。

分散分析の結果から *AAMm77* について卵重 ($p < 0.05$) と雄の 450 日齢体重 ($p < 0.05$) に有意な関連性が認められた。体重の増加とともに卵のサイズも増加すると考えられるため、二つの形質は同一の QTL に支配されている可能性が考えられる。近年、烏骨鶏を地鶏の食味性の改善に使用する動きもあり、烏骨鶏の発育の改良についても必要性が増してきている。そこで、卵重と雄の体重との関連性が認められた *AAMm77* について、周辺に新たな DNA マーカーを開発して、詳細な検討を進める必要がある。

日本では烏骨鶏卵の需要が高いわりには産卵率が低く、産卵率の遺伝的な改良が待たれている。大分県などによる烏骨鶏の選抜試験の結果を見ると、表現型による選抜だけでは現状以上の産卵率の改良は困難であると推察される (阿南ら, 2008)。一方、DNA マーカーによるマーカーアシスト選抜は有効と考えられるが、今回の分析では産卵率と有意な関連性を持つ DNA マーカーを発見できなかった。Tuiskula-Haavisto *et al.* (2002) は 8 番染色体に産卵率の QTL を発見しており、8 番染色体上の他の DNA マーカーをさらにタイピングしていくことによって、産卵率と関連性のある DNA マーカーを発見できる可能性がある。

引用文献

阿南加治男・津田 剛. 新大分地鶏の作出. 大分県畜産試験場試験成績報告, 37 : 69-77. 2008.

表 6. 遺伝子型別の最小自乗平均値

生産形質	DNA マーカー	遺伝子型	最小自乗 平均値
卵重 (g)	<i>AAMm77</i>	In/In	39.17 ^a
		In/Del	39.51 ^a
		Del/Del	40.42 ^b
雄の 450 日 齢体重 (g)	<i>AAMm77</i>	In/In	1505.88 ^a
		In/Del	1524.37 ^a
		Del/Del	1635.73 ^b

a, b ; 異なる肩文字間に有意差あり ($p < 0.05$)

卵重は 294~300 日齢の平均卵重

岳佳妮・松田莉朋・ローシャン ジャーハン・下桐 猛・穴井豊昭・和田康彦. 烏骨鶏と白色レグホーンにおけるプロラクチン遺伝子領域周辺の連鎖不平衡ブロックについて. 日本家禽学会誌, 48 : J63-J68. 2011.

Ihaka R and Gentleman R. R : A language for data analysis and graphics. Journal of Computational and Graphical Statistics, 5 : 299-314. 1996.

Jiang RS, Xu GY, Zhang XQ and Yang N. Association of polymorphisms for prolactin and prolactin receptor genes with broody traits in chickens. Poultry Science, 84 : 839-845. 2005.

Maw AA, Shimogiri T, Riztyan, Kawabe K, Kawamoto Y and Okamoto S. Genetic diversity of Myanmar and Indonesia native chickens together with two jungle fowl species by using 102 indels polymorphisms. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 25 : 927-934. 2012.

野口宗彦・田澤倫子・大久保彰夫・石松茂英. 高産卵性を目標とした烏骨鶏の改良. 栃木県畜産試験場研究報告, 17 : 20-27. 2001.

Rahman MM, Matsuda R, Matsuda T, Nishiyama Y, Jozaki K, Anann K and Wada Y. Relationship between the production traits and three candidate genes in the prolactin's In/Del \times In/Del population of silkie fowl. Journal of Poultry Science, 51 : 138-143. 2014a.

Rahman MM, Nishiyama Y, Yamanaka K, Anann K and Wada Y. Relationship between production traits and DNA markers on the Z chromosome in the 5th generation of selection program of silky fowl. Journal of Warm Regional Society of Animal Science, Japan, 57 : 115-122. 2014b.

Riztyan, Katano T, Shimogiri T, Kawabe K and Okamoto S.

- Genetic diversity and population structure of Indonesian native chickens based on single nucleotide polymorphism markers. *Poultry Science*, 90 : 2471-2478. 2011.
- ローシャン ジャーハン・松田智恵・松田莉朋・砂川知絵子・MD ミザヌラハマン・小原瑛子・阿南加治男・和田康彦. 産卵率にもとづいて選抜された烏骨鶏選抜第5世代における生産形質と2番染色体上の候補遺伝子との関連性について. *日本暖地畜産学会報*, 55 : 115-120. 2012.
- Tuiskula-Haavisto M, Honkatukia M, Vilkki J, de Koning DJ, Schulman NF and Mäki-Tanila A. Mapping of quantitative trait loci affecting quality and production traits in egg layers. *Poultry Science*, 81 : 919-927. 2002.
- 和田康彦・中牟田裕子・岳佳妮・松田莉朋・阿部正八朗・阿部加治男. 烏骨鶏選抜集団におけるプロラクチン遺伝子プロモーター領域の24-bpの挿入と生産形質との関連. *日本家畜学会誌*, 45 : J82-J86. 2008a.
- 和田康彦・戸谷温子・岳佳妮・ローシャン ジャーハン. 烏骨鶏と他の鶏品種におけるプロラクチン遺伝子のプロモーター領域における24-bp挿入の比較. *西日本畜産学会報*, 51 : 39-42. 2008b.
- Xu H, Zeng H, Luo C, Zhang D, Wang Q, Sun L, Yang L, Zhou M, Nie Q and Zhang X. Genetic effects of polymorphisms in candidate genes and the QTL region on chicken age at first egg. *BMC Genetics*, 12 : 33. 2011.

Relationship between Production Traits and DNA Markers on the 8th Chromosome in the 5th Generation of Selection Program of Japanese Silky Fowl

Yuki Nishiyama¹, MD, Mijanur Rahman^{1,2}, Kajio Anann³,
Ken-ichi Yamanaka^{1,2} and Yasuhiko Wada^{1,2}

¹ Faculty of Agriculture, Saga University, Saga, 840-8502

² The United Graduate School of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima, 890-5880

³ Livestock Research Institute, Oita Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Research Center, Bungo-Ohno, 879-7111

Silky fowl is a famous chicken breed which has a beautiful silky feather and black skin. The meat and egg of Silky fowl have been traded at a high price for human health. However, it becomes the problem in comparison with other chicken breeds in small size and that a production egg rate is low. The QTLs for egg production rate were reported on the 2nd and Z chromosome. Authors also studied the relationship between the DNA markers on these chromosomes and the production traits in the fifth generation of the selection program of Japanese Silky fowl. In this study, the relationship between five DNA markers on the 8th chromosome and the production traits in the fifth generation of the selection program of Japanese Silky fowl was examined. For the known an In/Del markers (*AAMm77*) and three PCR-RFLP markers (*RZ-M75*, *RZ-M76*, *RZ-M77*) on the 8th chromosome, 195 females and 58 males were genotyped. The results of χ^2 test for Hardy-Weinberg equilibrium showed the significant difference for *RZ-M77* and *AAMm77*. The ANOVA was performed using R language for the study of the association with production traits. The significant associations with average egg weight for *AAMm77* ($p < 0.05$) were showed in the female birds. In the male birds, the significant associations with body weight at 450 days of age for *AAMm77* ($p < 0.05$) were detected. These results suggested the needs of the new DNA markers around *AAMm77* for egg weight and male growth.

(*Japanese Journal of Poultry Science*, 53 : J45-J49, 2016)

Key words : egg strength, GGA8, growth, production egg rate, Silky fowl