

マイクロサテライト DNA 多型による会津地鶏の遺伝的多様性と遺伝的位置

岡 孝夫¹・井野靖子¹・野村こう¹・花田博文¹・天野 卓¹・山内克彦²・
小林雄治²・泉田和子²・西堀正英³・山本義雄³・秋篠宮文仁⁴

¹ 東京農業大学農学部畜産学科 神奈川県厚木市船子 243-0034

² 福島県農業総合センター畜産研究所養鶏分場 福島県郡山市富田町満水田 963-8041

³ 広島大学大学院生物圏科学研究科 東広島市鏡山 739-8528

⁴ 総合研究大学院大学葉山高等研究センター 神奈川県三浦郡葉山町 240-0193

日本鶏の一部の品種は遺伝資源として保存が図られる一方、各地域の特産鶏肉の素材鶏としても保存が図られている。会津地鶏もそのような品種の一つである。本研究では2006年、2004年および1989年に採血された純系会津地鶏3集団および大型会津地鶏、肉用会津地鶏について、ISAG/FAO推奨の30のマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝的多様性の経時的な比較と他の日本鶏品種との遺伝的類縁関係を明らかにすることを目的とした。平均対立遺伝子数において、純系会津地鶏3集団間に差は認められなかったが、平均ヘテロ接合体率の観察値(H_0)および期待値(H_E)では経時的な減少傾向がみられた。1989年の純系会津地鶏集団は2004年および2006年集団に比べ H_0 が有意に高く、これは遺伝的に多様な個体を増やすために会津地鶏飼育集団間の人為的な交配があったものと推察された。一方、商用品種を交配して作出された大型会津地鶏および肉用会津地鶏の H_E はいずれも純系会津地鶏よりも高い値を示した。純系会津地鶏3集団の F_{ST} は0.052であり、同一品種でありながら1989年から2006年にかけてわずかながら遺伝的差異が生じたものと考えられた。 D_{AS} 遺伝距離にもとづくNJ系統樹においても1989年集団は純系会津地鶏集団内でサブクラスターを形成し、 F_{ST} の値を支持する結果となった。 D_A 遺伝距離にもとづくNJ系統樹では、会津地鶏は大型会津地鶏、肉用会津地鶏を含めて他の品種からやや離れて位置する結果となった。

キーワード: 会津地鶏, 遺伝資源, 遺伝的多様性, 集団構造

緒 言

日本鶏の一部の品種は遺伝資源として系統的に保存が図られる一方、各地域の特産鶏肉の素材鶏としても保存が図られている。福島県農業総合センター畜産研究所養鶏分場にて維持されている会津地鶏(図1)もそのような品種の一つである。およそ1200年前、源平の合戦に敗れた平家ゆかりの人々が会津地方に流れ着いた際、愛玩鶏を持ち込んだ。それが会津地鶏の起源となったと考えられている。会津地鶏は愛玩目的だけでなく、会津彼岸獅子の飾羽に用いられ、会津地方の文化と共に歴史を歩んできた(猪狩, 1999)。しかしながら戦後の高度経済成長にともなう人々の嗜好の変化により、生産性の低い会津地鶏はほぼ途絶えたものと考えられていた。昭和62年(1987年)、会津の民家で保存されていたものを当時の福島県養鶏試験場にて保護、繁殖し、現在では純系会津地鶏として維持されている。一方、純系会津地鶏と商用品種との交配を試み、肉用品種としての利用も図られている。すなわち、純系会津地鶏と白色プリマスロックとの交配により大型会津

地鶏を作出し、さらに大型会津地鶏にロードアイランドレッドを交配したものが肉用会津地鶏として流通している(会津地鶏振興会, 2001)。

純系の会津地鶏は他品種との交配を避け、小集団で維持されてきたと考えられている。血液タンパク型の解析からも他の日本鶏品種とは遺伝的に異なることが判明し、会津地方に固有の品種であるとされた(天野ら, 1990)。また、発見当初の個体数は数羽ときわめて少なく、その集団を母集団として成立した事実がある。本研究ではマイクロサテライト DNA 多型から会津地鶏の遺伝的多様性の経時的な比較と他の日本鶏品種との遺伝的類縁関係を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

1. 供試鶏

純系会津地鶏2006年採血集団(AIZ'06:32羽)、2004年採血集団(AIZ'04:20羽)、1989年採血集団(AIZ'89:45羽)および大型会津地鶏(AZL:27羽)、肉用会津地鶏(AZM:28羽)の5集団を用いた。供試サンプルは福島県農業総合センター畜産研究所養鶏分場(2004年以降、福島県養鶏試験場より改名)にて採血されたものを用いた。また、遺伝的類縁関係の解析のために岐阜地鶏(32羽)、土佐地鶏(14羽)、小国(15羽)を加えた。供試鶏の詳細は表1に示した。DNAは血液からフェノールクロロフォルム法(Sambrook and Russell, 2001)にて抽出し、以下の実験

2008年2月7日受付, 2008年3月4日受理

連絡者: 天野 卓

〒243-0034 神奈川県厚木市船子 1737

Tel: 046-270-6571

Fax: 046-270-6571

E-mail: amano@nodai.ac.jp

に供した。

2. マイクロサテライト DNA 多型解析

本研究では ISAG/FAO 推奨のマイクロサテライトマーカー 30 座位 (Hoffman *et al.*, 2004) を用いた。プライマーは Forward 鎖が蛍光色素 (6-FAM, HEX, NED) で標識された蛍光プライマー (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた。PCR は GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて Template DNA 20 ng, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 各 200 μM, プライマーペア各 0.05 μM, Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) 1 U, 1×Mg Free PCR Buffer (Promega, Madison, WI, USA), 合計 10 μl の反応系で行なった。予備変性 94°C 5 分の後, 94°C 30 秒, 60°C 1 分, 68°C 1 分を 30 サイクル, 次いで 72°C 10 分の伸長反応で行なった。目的領域の増幅後, オートキャピラリーシーケンサー ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いてフラグメント解析を行なった。

フラグメント解析により決定した遺伝子型をもとに, Microsatellite Toolkit 3.1 (Park, 2001) を用いて各集団の平均対立遺伝子数 (MNA), ヘテロ接合体率の観察値 (H_o) およびその期待値 (H_e) を算出した。集団間のペアワイズ F_{ST} の算出には FSTAT 2.9.3.2 ソフトウェア (Goudet, 2001), 遺伝距離 D_{AS} は

Microsatellite Toolkit 3.1, D_A は DISPAN ソフトウェア (Ohta, 1993) を用いてそれぞれ算出した。系統樹は得られた遺伝距離をもとに PHYLIP パッケージ 3.67 (Felsenstein, 1985) の Neighbor プログラムを用いて近隣結合 (NJ) 法にて作成した。

結果および考察

各集団の遺伝的多様性を比較するため MNA, H_o および H_e を算出し, 表 2 に示した。MNA は純系会津地鶏集団 (AIZ'89, AIZ'04, AIZ'06) においては 2.67 から 2.73 と各集団間で有意差は認められなかった ($P>0.05$)。白色プリマスロックを交配して作出された大型会津地鶏集団の MNA は 3.07, さらにロードアイランドレッドを交配して作出された肉用会津地鶏集団の MNA は 4.00 と純系会津地鶏集団よりも有意に高い値を示した (AZL : $P<0.05$, AZM : $P<0.01$)。純系会津地鶏集団の H_o と H_e は AIZ'89 集団がそれぞれ 0.532, 0.420 で最も高い値を示した。AIZ'04 集団の H_o と H_e はそれぞれ 0.383 と 0.415, AIZ'06 集団は 0.374 と 0.405 であった。純系会津地鶏集団においては H_o , H_e とともに経時的な減少傾向がみられた。特に H_o は AIZ'89 と AIZ'04 集団間の減少が有意に認められた ($P<0.01$)。これは, 会津地鶏が発見された当初 (1988 年), 数羽しか残っていなかった会津地鶏を維持するため, 遺伝的に多様な個体を増やすために会津地鶏飼育集団間の人為的な交配の結果であろうと推察された。MNA と同様に AZL, AZM 両集団は H_o , H_e とともに純系会津地鶏集団よりも高くなる傾向が認められた。

次に, 集団間の遺伝的分化の程度を推定するために各集団間のペアワイズ F_{ST} を算出した (表 3)。純系会津地鶏 3 集団全体の F_{ST} は 0.052, AIZ'89 と AIZ'04 集団間, AIZ'89 と AIZ'06 集団間の F_{ST} はそれぞれ 0.069, 0.083 であった。 F_{ST} が 0.05 から 0.15 では遺伝的分化の程度が中程度とされ (Balloux and Lugon-Moulin, 2002), 同じ品種ではあるが 1989 年から 2004 年, 2006 年にかけてわずかに遺伝的差異が生じたと考えられた。しかし AIZ'04 と AIZ'06 集団間では F_{ST} が 0.004 と遺伝的分化の程度は低かった。このことから, 純系会津地鶏集団間に認められた遺伝的分化は約 15 年にわたる集団の維持によって生じたものであると考えられた。商用品種の遺伝的影響を受けた AZL 集団, AZM 集団と純系会津地鶏集団間の F_{ST} は 0.220 から 0.282 と高い値を示した。



図 1. 福島県農業総合センター畜産研究所養鶏分場で飼育されている会津地鶏

表 1. 本研究に用いた会津地鶏 5 集団および日本鶏 3 集団

品種	略号	羽数	採取地
2006 年純系会津地鶏	AIZ'06	32	福島県農業総合センター畜産研究所養鶏分場 (旧福島県養鶏試験場)
2004 年純系会津地鶏	AIZ'04	20	福島県養鶏試験場
1989 年純系会津地鶏	AIZ'89	45	福島県養鶏試験場
大型会津地鶏	AZL	27	福島県農業総合センター畜産研究所養鶏分場
肉用会津地鶏	AZM	28	福島県農業総合センター畜産研究所養鶏分場
岐阜地鶏		32	東京農業大学
土佐地鶏		14	高知県畜産試験場
小国		15	東京農業大学・進化生物学研究所

岡ら：会津地鶏の遺伝的多様性

表 2. 会津地鶏各集団の平均対立遺伝子数および平均ヘテロ接合体率

集団	平均対立遺伝子数 ($M_N \pm S.D.$)	平均ヘテロ接合体率	
		観察値 ($H_O \pm S.D.$)	期待値 ($H_E \pm S.D.$)
AIZ'89	2.73 ± 1.08	0.532 ± 0.014	0.420 ± 0.044
AIZ'04	2.67 ± 1.12	0.383 ± 0.020	0.415 ± 0.038
AIZ'06	2.73 ± 1.05	0.374 ± 0.016	0.405 ± 0.039
AZL	3.07 ± 0.78	0.460 ± 0.018	0.473 ± 0.032
AZM	4.00 ± 1.46	0.673 ± 0.016	0.584 ± 0.021

集団の略名は表 1 を参照

表 3. 会津地鶏集団間のペアワイズ F_{ST}

	AIZ'89	AIZ'04	AIZ'06	AZL	AZM
AIZ'89	—				
AIZ'04	0.0691	—			
AIZ'06	0.0834	0.0043	—		
AZL	0.2719	0.2648	0.2824	—	
AZM	0.2318	0.2200	0.2449	0.1116	—

集団の略名は表 1 を参照

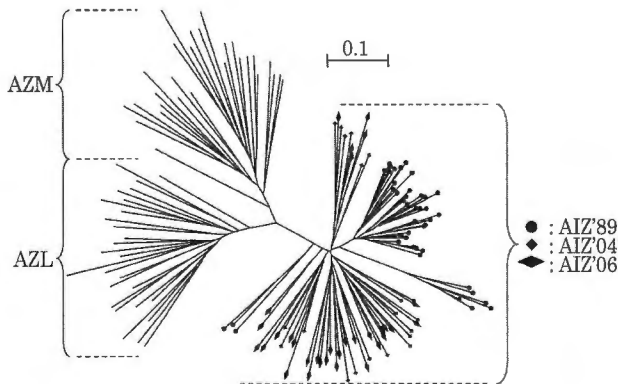


図 2. 会津地鶏 5 集団 全 152 個体間の遺伝距離 D_{AS} にもとづいて作成された NJ 系統樹
図中のスケールバーは D_{AS} 遺伝距離を示す。各集団の略名は表 1 を参照。

純系会津地鶏 3 集団, 大型会津地鶏, 肉用会津地鶏の遺伝的類縁関係を明らかにするため, 各個体間の遺伝距離 D_{AS} にもとづいて作成された NJ 系統樹を図 2 に示した。純系会津地鶏 AIZ'89, AIZ'04 および AIZ'06 集団は 1 つのクラスターを形成したものの, AIZ'89 集団のみ単独でサブクラスターを形成した。一方, 商用品種の遺伝的影響を受けた AZL 集団, AZM 集団は純系会津地鶏集団とは明確に分かれた。

次に日本鶏品種内における会津地鶏の遺伝的な位置を明確にするために, 岐阜地鶏, 土佐地鶏, 小国の解析結果を加えて遺伝距離 D_A を算出し, NJ 系統樹を作成した (図 3)。図 2 より AZL, AZM 両集団は純系会津地鶏集団とは明確に分かれたが, それら

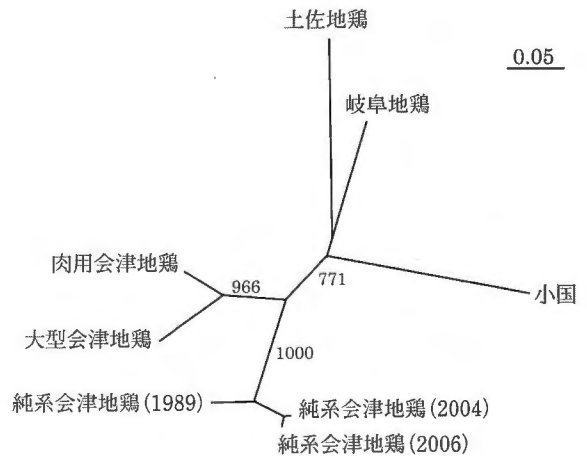


図 3. 会津地鶏 5 集団に岐阜地鶏, 土佐地鶏, 小国を加えて算出された遺伝距離 D_A にもとづいて作成された NJ 系統樹
図中のスケールバーは D_A 遺伝距離を, 図中の数字は分岐の信頼性を示すブートストラップ値。

と純系会津地鶏集団間の D_A 遺伝的距離は他の日本鶏品種間との距離よりも小さなものであった。すなわち会津地鶏は大型会津地鶏, 肉用会津地鶏も含めて他の品種とは遺伝的にやや離れて位置する結果となった。ミトコンドリア DNA D-loop 領域の解析から, 会津地鶏は岐阜地鶏や小国とともに中国, 朝鮮半島を起源とする地鶏, 小国系のグループに含まれることが明らかにされている (Oka *et al.*, 2007)。一方, マイクロサテライト DNA 多型の解析を行なった Takahashi *et al.* (1998) と Osman *et al.* (2006) の

報告において、会津地鶏は前者では岩手地鶏や佐渡髯地鶏など、他の地鶏系品種とは近縁とならず、後者では小国ともっとも近縁となっている。本研究結果では、会津地鶏各集団との間では岐阜地鶏がもっとも小さい D_A 遺伝距離を示したものの、明確なクラスターは認められず、いずれの集団とも遺伝的に異なる結果となった。このことから会津地鶏集団は大型、肉用会津地鶏集団を含めて他の日本鶏集団とは異なる、会津地方に固有の遺伝資源である可能性が示唆された。

謝 辞

比較に用いた日本鶏のサンプルを提供していただきました、東京農業大学農学部 桑山岳人教授、高知県畜産試験場大動物科山崎清人科長、(財)進化生物学研究所 白石幸司博士に厚く御礼申し上げます。本研究の一部は平成 16-18 年度東京農業大学農学研究プロジェクト研究費および科学研究費基盤研究 (A : No. 17200015, 2005-2007)、家禽資源研究会の補助を受けて実施されたものである。

引用文献

会津地鶏振興会. 手間をかけて育てたい—会津 400 年の系譜・会津地鶏. 養鶏の友, 468 : 11-13. 2001.
 天野 巨・大久保吾良・鈴木 章・稲福桂一郎・橋口 勉. 会津地鶏に関する遺伝学的研究. 福島県養鶏試験場研究報告, 21 : 85-88. 1990.
 Balloux F and Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11 : 155-165. 2002.
 Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39 : 783-791. 1985.
 Goudet J. FSTAT version 2.9.3, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Available at : <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. 2001.

Hoffman I, Marsan PA, Barker SF, Cothran EG, Hanotte O, Lenstra JA, Milan D, Weigend S and Simianer H. New MoDAD marker sets to be used in diversity studies for the major farm animal species: recommendations of a joint ISAG/FAO working group. In: *Proceedings of the 29th International Conference on Animal Genetics*, September 11-16th 2004, Meiji University, Tokyo, Japan. 2004.
 猪狩 勉. 400 年の伝統が究極の鶏肉として蘇る会津地鶏. 養鶏の友, 444 : 16-21. 1999.
 Ohta T. DISPAN : Genetic Distance and Phylogenetic Analysis. Available at : <http://www.bio.psu.edu/People/Faculty/Nei/Lab/dispans2.htm>. 1993.
 Oka T, Ino Y, Nomura K, Kuwayama T, Kawashima S, Hanada H, Amano T, Takada M, Takahata N, Hayashi Y and Akishinomiya F. Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. *Animal Genetics*, 38 : 287-293. 2007.
 Osman SAM, Sekino M, Nishihata A, Kobayashi Y, Takenaka W, Kinoshita K, Kuwayama T, Nishibori M, Yamamoto Y and Tsudzuki M. The genetic variability and relationships of Japanese and foreign chickens assessed by microsatellite DNA profiling. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 19 : 1369-1378. 2006.
 Park SDE. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. Ph.D. thesis, University of Dublin, Available at : <http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/> 2001.
 Sambrook J and Russell DW. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 2001.
 Takahashi H, Nirasawa K, Nagamine Y, Tsudzuki M and Yamamoto Y. Genetic Relationships Among Japanese Native Breeds of Chicken Based on Microsatellite DNA Polymorphisms. *Journal of Heredity*, 89 : 543-546. 1998.

Genetic Diversity and Phylogenetic Classification of Aizu-Jidori Based on Microsatellite DNA Polymorphisms

Takao Oka¹, Yasuko Ino¹, Koh Nomura¹, Hirofumi Hanada¹, Takashi Amano¹,
Katsuhiko Yamauchi², Yuuji Kobayashi², Kazuko Izumida², Masahide Nishibori³,
Yoshio Yamamoto³ and Akishinonomiya Fumihito⁴

¹ Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture,
Funako 1737, Atsugi-Shi, Kanagawa 243-0034

² Fukushima Agricultural Technology Centre, Mansuiden 2, Tomita-Cho, Koriyama-Shi, Fukushima 963-8041

³ Department of Bioresource and Technology, Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Kagamiyama 1-4-4, HigashiHiroshima-Shi, Hiroshima 739-8528

⁴ Hayama Center for Advanced Studies, The Graduate University for Advanced Studies,
Hayama-Cho, Miura-Gun, Kanagawa 240-0193

Some Japanese native chicken breeds are preserved as genetic resources and are used to establish new commercial meat-type chickens. Aizu-Jidori is one of these breeds. In this study, ISAG/FAO recommended 30 microsatellite markers were used to investigate temporal change in genetic diversity and explore phylogenetic relationships among Aizu-Jidori and other Japanese native chicken breeds. Aizu-Jidori samples were collected in 1989, 2004 and 2006, respectively. Large type and meat type Aizu-Jidori were also sampled. Significant difference in mean number of alleles was not observed among the three Aizu-Jidori populations. However, a temporal decrease over time in the observed and expected heterozygosity was observed. For instance, a high value of observed heterozygosity was observed in the 1989 Aizu-Jidori population. It is suggested that there was artificial crossing within Aizu-Jidori population instead of increase in population size. F_{ST} value across the 3 populations was 0.052 indicating a middle level of genetic differentiation. Therefore, in spite of these 3 populations being of the same breed, genetic differentiation was observed between 1989–2006. On the NJ-tree based on D_{AS} distance, Aizu-Jidori population collected in 1989 was grouped separately from those sampled in 2004 and 2006. On the NJ-tree based on D_A genetic distance, the five Aizu-Jidori populations include large and meat type Aizu-Jidori were separated from other breeds, Gifu-Jidori, Tosa-Jidori and Shokoku. Therefore, it is suggested that Aizu-Jidori is unique and valuable genetic resource for Fukushima prefecture.

(Japanese Journal of Poultry Science, 45 : J61–J65, 2008)

Key words : Aizu-Jidori, genetic diversity, genetic resource, population structure