

会津地鶏の五色羽装と *SLC45A2* 遺伝子上の変異との関係

大竹 剛¹・佐藤妙子²・國分洋一²・上本吉伸¹・佐藤周史¹・奥村友美¹・小林栄治¹

¹ 独立行政法人家畜改良センター, 福島県西白河郡西郷村大字小田倉 961-8511

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字満水田 963-8041

会津地鶏は、福島県の特産銘柄鶏の素材鶏として保存されており、五色羽装を有している。近年、*SLC45A2* 遺伝子が銀笹羽装に関与していることが報告されている。本研究では、*SLC45A2* 遺伝子上の銀笹羽装に影響を与える変異と大型会津地鶏（会津地鶏×白色プリマスロック）の五色羽装との関連性を調査した。用いた集団は、大型会津地鶏雄および赤笹羽装を示すロードアイランドレッド（RIR）雌を親世代とした F2 個体雌 204 羽である。*SLC45A2* 遺伝子上のアルビノ形質に影響を与えるフレームシフト変異（S36fs）および銀笹羽装に影響を与える 2 つの非同義置換を伴う SNP 変異（Y277C および L347M）について遺伝子型判定を行い、F2 個体の羽装との関連性を調査した。調査した親世代と F2 の集団では、S36fs について、アルビノ形質を示す遺伝子型は得られなかった。しかしながら、Y277C および L347M については、各アリルが完全に連鎖不平衡となっており、親世代である大型会津地鶏と RIR では銀笹羽装を示すハプロタイプ（Silver 型）および赤笹羽装を示すハプロタイプ（Wild 型）が完全に分離していた。F2 集団 204 羽の羽装は、五色羽装 100 羽、赤笹羽装 99 羽および白色羽装 5 羽と、アルビノ型を持たないにも関わらず白色羽装個体が存在した。そのため、劣性白色遺伝子である *Tyrosinase* 遺伝子について遺伝子型を調査したところ、白色羽装を示す個体はすべて *Tyrosinase* 遺伝子による影響であることが確認された。F2 集団で五色羽装を示す個体はすべて Silver 型であったが、赤笹羽装を示す個体の中にも Silver 型である個体が 5 羽認められた。本研究では、五色羽装を示すすべての個体が Silver 型を持っていることから、*SLC45A2* 遺伝子が大型会津地鶏の五色羽装に影響を及ぼしている可能性があることが示唆された。

キーワード：*SLC45A2* 遺伝子, 会津地鶏, アリル頻度, 五色羽装

緒 言

近年、鶏肉については差別化した鶏肉（高品質、差別化飼養形態、食味、機能性など）への要望が高まり、特産銘柄鶏として全国各地で生産されるようになってきた。この特産銘柄鶏は各県の畜産・養鶏研究機関において保存されている日本在来鶏を活用して生産されている（秋葉, 2007）。その理由の一つとして、日本在来鶏は肉質などの形質のほかに地域ごとに独特の羽装を有しているからである。この独特の羽装により、各地域固有の日本在来鶏をイメージさせるような外観を持った特産銘柄鶏の作出が可能となる。例えば、岐阜県が開発した肉用奥美濃古地鶏は、雄種鶏である岐阜地鶏改良品種と地鶏をイメージさせる赤笹羽装を有する雌種鶏（白色プリマスロック×ロードアイランドレッド）を交配させて生産されている。その雌種鶏の一部にはヒナの時に黒色羽装を示す個体がみられるが、羽装色が均一でないことから、それらは淘汰されており、種鶏業者にとって経済的に大きな損失と

なっている。そのためこの黒色羽装の除去に有効な DNA マーカーの開発が行われ、DNA レベルでの選抜が行われてきている（三輪ら, 2006）。

会津地鶏は、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おり、特産銘柄肉の素材鶏として保存されている。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ており、DNA レベルでも他の日本鶏品種とは遺伝的に異なる固有の遺伝資源であることが知られている（岡ら, 2008）。この会津地鶏の特徴の一つとして、五色羽装を主とした美しい羽装がある（猪狩, 1999）。五色羽装は、小国などにみられる全身黒色で頸毛および養毛がわずかに黄色を帯びた銀白色であり、また翼肩部では銀白色に淡い赤、褐、および黄色が交った羽装である（全国日本鶏保存会, 2004）。

鶏の羽装の一つである銀笹羽装は久連子鶏などにみられる羽装であり、全身黒色で頸毛および養毛のみ（雌は頸毛のみ）銀白色となり五色羽装とは異なる羽装である（全国日本鶏保存会, 1974）。この銀笹羽装は野生型の赤笹羽装に対し、伴性の優性遺伝子により支配されており（Sturtevant, 1912）、近年この伴性羽色遺伝子座 *Silver* は Z 染色体上に位置づけられた（Bitgood, 1999）。2007 年、鶏の伴性羽色遺伝子座として知られていた *Silver* とウズラのアルビノ遺伝子座が *SLC45A2* 遺伝子であることが報告された（Gunnarsson *et al.*, 2007）。鶏の場合、*SLC45A2* 遺伝子上にはアミノ酸配列が変化する 3 つの突然変異、1 bp 欠

2011 年 2 月 24 日受付, 2011 年 7 月 13 日受理

連絡者: 大竹 剛

〒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 : 0248-25-3990

E-mail : t0ohtake@nlbc.go.jp

損によるフレームシフト変異 (S36fs) および 2 つの非同義置換を伴う SNP 変異 (Y277C および L347M) が報告されている。S36fs はアルビノ形質に影響を与える変異であり、Y277C および L347M は共に銀笹羽装に影響を与える変異だと考えられている (Gunnarsson *et al.*, 2007)。

現在、会津地鶏と白色プリマスロックの交配により作出した大型会津地鶏とロードアイランドレッド (RIR) を交配させたものが福島県の特産銘柄鶏である「肉用会津地鶏」として流通している (会津地鶏振興会, 2001)。この「肉用会津地鶏」は羽装にばらつきが見られることから、DNA レベルでの五色羽装への均一化が必要とされている。本研究では福島県農業総合センター畜産研究所養鶏分場で保有している会津地鶏の五色羽装が銀笹羽装と同様に *SLC45A2* 遺伝子により影響を受けているのか調査するために、大型会津地鶏および RIR からなる F2 資源家系を用いて *SLC45A2* 遺伝子上の変異と羽装との関連性を調査した。

材料と方法

1. 供試鶏

本研究で供試した鶏群は、福島県農業総合センター畜産研究所養鶏分場で保有している大型会津地鶏 (会津地鶏×白色プリマスロック) および RIR であった。大型会津地鶏も会津地鶏と同様の羽装を示す。大型会津地鶏雄 3 羽および RIR 雌 9 羽を親世代とし、F1 個体 56 羽を作出した。この F1 個体を全きょうだい交配により F2 個体を作出した。本研究では、F2 個体について肛門鑑別による雌雄鑑別を行い、F2 個体のうち雌 204 羽を実験に用いた。F2 個体 204 羽について、羽装の評価を五色羽装、赤笹羽装および白色羽装の 3 種類で分類し、130 日齢以降の成鶏羽装を評価した。会津地鶏にみられる五色羽装については図 1 に示した。



図 1. 会津地鶏の五色羽装
会津地鶏の雌鶏 (左) および雄鶏 (右) を示す。雄鶏は、全身黒色で頸毛および叢毛がわずかに黄色を帯びた銀白色であり、翼肩部では銀白色に淡い赤、褐、および黄色が交った羽装を示す。一方、雌鶏は、頸毛が黒色の縦斑をもつ銀白色、翼肩部では濃褐色地に銀灰色の細点斑、胸部では淡い藍色、および尾部では暗石盤色となる羽装を示す。

2. PCR-RFLP 法

エキソン 1 の 1 bp 欠損変異 (S36fs)、およびエキソン 3 および 4 内の 2 つのアミノ酸置換を伴う SNP (それぞれ Y277C および L347M) の遺伝子型を判定するために、*SLC45A2* 遺伝子のゲノム配列 (Accession No. DQ900688) を基に、各エキソン内に新たにオリゴヌクレオチドプライマーを作成した。各変異検出用のプライマー配列については、表 1 に示した。Y277C については、制限酵素サイトが存在しないため、ミスマッチプライマーを設計することで、PCR-RFLP 法の適用を可能にした。

ゲノム DNA は、フェノール・クロロホルム法により血液から抽出し、20 ng/ μ l に調整した。PCR 反応は、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを各 6.25 pmol、dNTP を 0.2 mM、Tris-HCl (pH8.3) を 10 mM、KCl を 50 mM、MgCl₂ を 1.5 mM、KOD-FX DNA ポリメラーゼ (Toyobo, Osaka, Japan) を 0.375 U を用いておこなった。PCR 反応条件は、94°C で 2 分について、98°C を 10 秒、55°C を 30 秒、68°C を 30 秒で 35 サイクル反応を行った。得られたエキソン 1、3 および 4 の PCR 産物を、それぞれ *MnII*、*RsaI* および *NlaIII* の制限酵素により切断した。制限酵素反応は、PCR 産物 3 μ l に制限酵素 2U および制限酵素用バッファーを加え、37°C で一晩行った。引き続き、得られた反応産物を 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、UV 照射下で DNA 断片を可視化し、制限酵素の切断パターンにより、遺伝子型判定を行った。各遺伝子型の RFLP 断片は、S36fs では T アリル (149, 78, 71, 65, 41, 29, 22, 2 bp) および欠損型 (149, 105, 78, 71, 29, 22, 2 bp)、Y277C では A アリル (86, 17, 13 bp) および G アリル (82, 17, 13, 4 bp) および L347M では C アリル (66, 24, 15 bp) および A アリル (57, 24, 15, 9 bp) である。得られた遺伝子型をもとに、羽装ごとのアリル頻度を求めた。

本研究で用いた集団には、F2 個体の表現型が白色羽装である個体が存在していたため、第 1 番染色体上に存在する劣性白色遺伝子である *Tyrosinase* 遺伝子の遺伝子型判定についても同時に行った。*Tyrosinase* 遺伝子は、第 4 イントロン上のレトロウイルス配列の挿入による変異を持ち、挿入されることで白色羽装を示すことが報告されている (Chang *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2007)。PCR に用いたプライマー配列は、Sato *et al.* (2007) の方法で行い、PCR 反応条件については、上記と同様に行った。

結果および考察

本研究により非同義置換を伴う変異について、PCR-RFLP 法により容易に判定が可能になった。本研究では、*SLC45A2* 遺伝子の S36fs について、すべて T アリルであり、アルビノ形質を示す 1 bp 欠損は本集団では得られなかった。*SLC45A2* 遺伝子の Y277C および L347M については、本研究で用いた鶏群で各アリルが完全に連鎖不平衡となっており、特に親世代の大型会津地鶏と RIR では銀笹羽装を示すハプロタイプ (Silver 型) および赤笹羽装を示すハプロタイプ (Wild 型) に分離していた (表 2)。また親世代では大型会津地鶏がすべて Silver 型を示しており、RIR がすべて Wild 型を示した。

本集団では F2 集団 204 羽の羽装が、五色羽装 100 羽、赤笹羽

表 1. プライマー配列

プライマー名 ^{1,2}	プライマー配列 (5'→3')	プライマー 位置	増幅サイズ (bp)
S36fs_primer_F	cactgactgtccgagcact	Exon 1	457
S36fs_primer_R	cattgaggtacaaagccattcc	Exon 1	
Y277C_primer_F	tctgcttattgtacatctacg	Exon 3	116
Y277C_primer_R	ttcctctatggatctgtacgta	Exon 3	
L347M_primer_F	cactcttgaagactctttaagcat	Exon 4	105
L347M_primer_R	cgtgaagaagagcatgttgac	Exon 4	

¹F=フォワードプライマー, R=リバースプライマー。²GenBank accession no. DQ900688表 2. P 集団および F2 資源集団における *SLC45A2* 遺伝子のアリル頻度と羽装との関係

ハプロタイプ	各変異のアリル			P 集団 ¹		F2 集団 ¹			
	S36fs	Y277C	L347M	大型会津地鶏 ²	RIR ³	五色羽装	赤笹羽装	白色羽装	合計
Silver 型	T	A	A	100.0 (3)	0.0 (0)	92.6 (100)	4.6 (5)	2.8 (3)	100.0 (108)
Wild 型	T	G	C	0.0 (0)	100.0 (9)	0.0 (0)	97.9 (94)	2.1 (2)	100.0 (96)
アルビノ型	Del	A or G	A or C	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)

¹P 集団および F2 集団の上段は頻度 (%), 下段は個体数 (羽) を示す。²大型会津地鶏は, すべての個体で Silver 型をホモで持つ。³RIR=ロードアイランドレッド。

装 99 羽および白色羽装 5 羽であった (表 2)。本研究ではアルビノ型を持たないにも関わらず白色羽装個体が 5 羽存在した。そのため, すべての個体について *Tyrosinase* 遺伝子の遺伝子型判定を行ったところ, 白色羽装個体のすべてが劣性白色遺伝子のホモ個体であった。したがって本集団で見られる白色羽装はすべて *Tyrosinase* 遺伝子の変異に起因することが示された。一方, 本研究ではすべての五色羽装個体が Silver 型であったが, 赤笹羽装個体でも 5 羽の Silver 型が存在していた。

SLC45A2 遺伝子は 12 個の膜貫通領域を持つ膜タンパク質であり, チロシナーゼや PMEL17 などゴルジ装置からメラノソームに運搬する輸送タンパク質であると考えられている (Kushimoto *et al.*, 2003)。マウスでは毛色遺伝子 *underwhite* にコードされており, その劣性遺伝子型系統では, 毛のメラニン含量の顕著な低下が報告されている (Newton *et al.*, 2001; Du and Fisher, 2002)。また, ヒトにおいては皮膚, 毛および眼の異色とそれに伴う眼症状を発症させることから, *SLC45A2* 遺伝子は 4 型眼皮膚白皮症の原因遺伝子との関連が報告されている (Newton *et al.*, 2001; Sengupta *et al.*, 2007)。Gunnarsson *et al.* (2007) はこれらの結果を基に鶏 F2 資源家系を用いた連鎖解析により, ヒトやマウスの報告から *SLC45A2* 遺伝子を銀笹羽装に影響を与えるポジショナル候補遺伝子として報告している。

銀笹羽装を示す変異は Y277C および L347M があるが, 特に L347M が原因変異であると考えられている。Gunnarsson *et al.*

(2007) は銀笹羽装を示す個体は L347M により決まることを示しているが, 白色レグホンでは Y277C が銀笹羽装に関与している可能性があることを報告している。本研究では, Y277C および L347M は完全に連鎖不平衡となっていたため, どちらの SNP が大型会津地鶏の五色羽装に影響を及ぼすのか検討することができなかった。また, Gunnarsson *et al.* (2007) は銀笹羽装を示す個体の一部が矛盾した結果を報告している。彼らが用いた集団は孵化 1 日後に形質を測定している。この日齢では羽装の判断が困難な個体も存在することから, 間違った評価が矛盾を生じさせている可能性が考えられた。本研究においては 5 羽が Silver 型にも関わらず赤笹羽装となっていた。この集団は 130 日齢以降の成鶏羽装を測定しているため, 間違った評価については考えにくい。そのため *SLC45A2* 遺伝子上のその他の変異または *SLC45A2* 遺伝子以外の他の遺伝子の影響によって, その矛盾が生じている可能性が考えられた。五色羽装の遺伝様式に関する報告として, 岡野 (1980) は岐阜地鶏に出現した五色羽装の遺伝的要因を調査するために五色羽装および赤笹羽装を用いた交配実験を行った。その結果, この集団では五色羽装を決定する遺伝子は常染色体上に存在する劣性遺伝子であることを示している。本研究で用いた大型会津地鶏の表現型は, 岡野 (1980) の示した五色羽装の表現型とは異なる羽装であった。同じ五色羽装でも異なる羽装を示すことから, 「五色羽装」そのものの定義が曖昧であり, また類似な表現型が様々な遺伝子の変異によってつくられることが推察され

る。そのため、五色羽装の詳細な遺伝様式についてはその表現型の定義も含め今後さらなる調査が必要である。しかしながら、本研究において F2 個体について五色羽装を示す個体のすべては Silver 型を示すことから、*SLC45A2* 遺伝子は大型会津地鶏の五色羽装に大きく関与していることが示唆された。今回用いた集団は大型会津地鶏を親世代とする F2 集団である。そのため、大型会津地鶏の親個体である会津地鶏の五色羽装についても、*SLC45A2* 遺伝子が影響を及ぼすことが示唆される。これらの結果は、会津地鶏を用いた特産銘柄鶏を作出において、五色羽装を DNA レベルで均一化するための DNA マーカーとして利用できることが示唆される。

本研究では、会津地鶏の五色羽装が *SLC45A2* 遺伝子により影響を受けるのか調査した。五色羽装を示す大型会津地鶏個体のすべてが Silver 型を持っていることから、*SLC45A2* 遺伝子が会津地鶏の五色羽装に大きく影響を及ぼすことが示唆された。その一方で、Silver 型を持つにも関わらず赤笹羽装を示す個体もみられたことから、五色羽装の遺伝様式に関して今後さらなる調査が必要であることが示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、サンプルを提供して頂きました福島県農業総合センター畜産研究所養鶏分場の方々に感謝の意を表します。

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.
- 秋葉征夫. 食肉生産における家禽の役割と日本在来鶏種の利用, そして今後の課題. 東北畜産学会報, 56 : 1-8. 2007.
- Bitgood JJ. Linkage relationships of the Z-linked silver, slow feathering, and pop-eye loci. Poultry Science, 78 : 1100-1101. 1999.
- Chang CM, Coville JL, 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.
- Du J and Fisher DE. Identification of Aim-1 as the *underwhite* mouse mutant and its transcriptional regulation by MITF. The Journal of Biological Chemistry. 277 : 402-406. 2002.
- Gunnarsson U, Hellström AR, Tixier-Boichard M, Minvielle F, Bed'hom B, Ito S, Jensen P, Rattink A, Vereijken A and Andersson L. Mutations in *SLC45A2* cause plumage color variation in chicken and Japanese quail. Genetics, 175 : 867-877. 2007.
- 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.
- Kushimoto T, Valencia JC, Costin GE, Toyofuku K, Watabe H, Yasumoto K, Rouzaud F, Vieira WD and Hearing VJ. The Seiji memorial lecture : the melanosome : an ideal model to study cellular differentiation. Pigment Cell Research, 16 : 237-244. 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.
- Newton JM, Cohen-Barak O, Hagiwara N, Gardner JM, Davisson MT, King RA and Brilliant MH. Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (*uw*) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. American Journal of Human Genetics, 69 : 981-988. 2001.
- 岡 孝夫・井野靖子・野村こう・花田博文・天野 卓・山内克彦・小林雄治・泉田和子・西堀正英・山本義雄・秋篠宮文仁. 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. 日本家禽学会誌, 45 : J61-J65. 2008.
- 岡野 香. 岐阜地鶏に出現した五色羽装の遺伝. 日本畜産学会報, 51 : 408-410. 1980.
- Sato S, Otake T, Suzuki C, Saburi J and Kobayashi E. Mapping of the recessive white locus and analysis of the tyrosinase gene in chickens. Poultry Science, 86 : 2126-2133. 2007.
- Sengupta M, Chaki M, Arti N and Ray K. SLC45A2 variations in Indian oculocutaneous albinism patients. Molecular Vision, 13 : 1406-1411. 2007.
- Sturtevant AH. An experiment dealing with sex-linkage in fowls. Journal of Experimental Zoology, 12 : 499-518. 1912.
- 全国日本鶏保存会. 原色/日本鶏. 第 1 版. 73 項. ペットライフ社. 東京. 1974.
- 全国日本鶏保存会. カラー版日本鶏・外国鶏. 第 1 版. 181-188. 社団法人家の光協会. 東京. 2004.

The Effect of *SLC45A2* Gene Polymorphisms on Goshiki Plumage Color Trait in Aizu-Jidori Chickens

Tsuyoshi Ohtake¹, Taeko Sato², Youichi Kokubun², Yoshinobu Uemoto¹,
Shuji Sato¹, Yumi Okumura¹ and Eiji Kobayashi¹

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

² Fukushima Agricultural Technology Centre, Kooriyama, Fukushima, 963-8041

Aizu-Jidori is one of Japanese native chicken breeds and preserved as genetic resources for commercial branded chicken. Aizu-Jidori also has a characteristic Goshiki (five-colored) plumage. Recently, *SLC45A2* gene was reported as a candidate gene affecting silver plumage color in chickens. In the present study, we evaluated the effect of *SLC45A2* gene on Goshiki plumage color of large type Aizu-Jidori chickens (Aizu-Jidori × White Plymouth Rock). The F₂ resource population was obtained by crossing large type Aizu-Jidori males and Rhode Island Red (RIR) females, and a total of 204 F₂ females were then measured for plumage color. One frameshift mutation (S36fs) and two missense mutations (Y277C and L347M) in the *SLC45A2* gene were genotyped in parental and F₂ populations. In parental and F₂ populations, there was no chicken with albino alleles at S36fs mutation. A total of 2 haplotypes (the haplotype Silver derived from large type Aizu-Jidori males and the haplotype Wild derived from RIR females) were identified in parental population, and there was no recombination between Y277C and L347M. In this experiment, 100 chickens with Goshiki plumage, 99 chickens with wild type plumage, and 5 chickens with white plumage were obtained. Though there was no chicken with albino alleles at S36fs mutation, 5 chickens with white plumage were observed. A mutation of *tyrosinase* gene, which was an avian retroviral sequence insertion in the *tyrosinase* gene, was then genotyped in parental and F₂ populations, and was confirmed to be associated with white plumage. All Goshiki plumage chickens have the haplotype Silver, and wild type plumage chickens were 94 chickens with the haplotype Wild and 5 chickens with the haplotype Silver. These results suggested that the mutation of *SLC45A2* gene might affect the Goshiki plumage of large type Aizu-Jidori chickens.

(*Japanese Journal of Poultry Science*, 48 : J58-J62, 2011)

Key words : Aizu-Jidori chicken, Allele frequency, Goshiki plumage color, *SLC45A2* gene