日本家禽学会誌, 46: J9-J15, 2009



PCR-RFLP 法を用いた名古屋種雄の遅羽性遺伝子型判定

中村明弘¹·小林正直²·野田賢治¹·近藤 一¹·神作宜男²

¹愛知県農業総合試験場畜産研究部,愛知県愛知郡長久手町岩作 480-1193 ²麻布大学獣医学部,神奈川県相模原市淵野辺 229-8501

ニワトリ白血病ウイルス由来の内在性ウイルス遺伝子 ev-21 は Z 染色体上に存在する遅羽性(K) 遺伝子と連鎖している。速羽性の雄(k^+/k^+)を遅羽性の雌(K/-) に交配すると、雄雛では遅羽性(K/k^+) となり、雌雛では速羽性(k^+/e^-) となることから、K 遺伝子は初生雛の雌雄鑑別に広く利用されている。この羽毛鑑別を行うためには遅羽性と速羽性の2 種類の系統が必要であるが、遅羽性の雄にはK 遺伝子のホモ接合体(K/K) とヘテロ接合体(K/k^+)が存在し、それらは初生雛の表現型の違いによって区別できなかった。このことから、これまで遅羽性系統を作出するには多くの労力がかかる後代検定を行う必要があった。近年、白色レグホーンではK および k^+ 遺伝子近傍領域の制限酵素断片長多型(RFLP)によって、雄の遅羽性遺伝子型($K/K \ge K/k^+$)を効率的かつ正確に判定できることが報告されている。そこで、本研究では名古屋種についても同様に PCR 解析を利用して $K/K \ge K/k^+$ を判別できるか検討した。

名古屋種における K と k⁺ 遺伝子間の違いを調査するため, K および k⁺ 遺伝子近傍領域の 1456 bp について塩基配列を 決定した。その結果, K と k⁺ の塩基配列を比較すると, 7 ケ所で違いが見られた。Transition 型の置換は 213, 294 およ び 616 番目の位置で, Transversion 型の置換は 333, 694 および 794 番目の位置で見られた。さらに, K では 189–193 番 目の位置で欠失が見られた。k⁺ において 292–295 番目の位置に *Mbo* I の認識配列 (GATC) が存在したが, K には存在し ないことが明らかになり,名古屋種では K/K と K/k⁺ の判定に *Mbo* I を用いた制限酵素断片長多型が有効であることが 示された。

キーワード:名古屋種,羽毛鑑別,制限酵素断片長多型,PCR

緒言

ニワトリ初生雛の翼は主翼羽と覆翼羽の2層構造となってい て、上層が覆翼羽、下層が主翼羽となっている。孵化したばかり の初生雛の翼羽を観察すると、この主翼羽の伸長が遅い個体(遅 羽性)と速い個体(速羽性)が見られる。この形質はZ染色体上 に存在するK遺伝子によって支配され、遅羽性(K)は速羽性(k⁺)に対して優性であることが報告されている(Warren, 1925)。 速羽性の雄(k^+/k^+)を遅羽性の雌(K/-)に交配すると、生ま れてきた雛の遺伝子型は雄では K/k^+ となり、すべて遅羽性を示 し、雌では $k^+/-となり、すべて速羽性を示すことから、雌雄鑑$ 別が可能である。この鑑別の大きな利点として、総排泄腔部の生殖突起の有無によって性判別する肛門鑑別より 2~3 倍の速さで雌雄鑑別でき、判別自体に特別な技術を必要としないことなどが挙げられる。さらに、品種や系統による違いはあるが、その精度は 99% 程度あり、肛門鑑別に劣らないものである。そのため、現

2008 年 7 月 29 日受付,2008 年 10 月 7 日受理 連絡者:中村明弘 〒480-1193 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字三ヶ峯 1-1 愛知県農業総合試験場畜産研究部 Tel:0561-62-0085 Fax:0561-63-7856 E-mail:akihiro_1_nakamura@pref.aichi.lg.jp 在, この交配様式は世界中の多くの採卵鶏や肉用鶏に利用されている (Etches, 1996;島田, 2002)。

この羽性による雌雄鑑別を行うためには、雄種鶏を速羽性に、 雌種鶏を遅羽性に完全に固定することが不可欠である。これま で、これらの羽性系統を作出する際、初生雛の翼羽の形態で羽性 を判定して選抜を行ってきた。しかし、遅羽性 (K) 遺伝子のホモ 接合体 (K/K) とヘテロ接合体 (K/ k^+)の雄はいずれも初生雛の 翼羽の形態が遅羽性を示すために、初生時にこれらの遺伝子型を 判別することは困難である。そのため、これまで遅羽性遺伝子型 の判定は K/K あるいは K/ k^+ の雄が性成熟に達した時期に速羽 性の雌 (K/-) と交配させ、産まれてくる雛の表現型を観察して 判別するという後代検定によって行われてきた。しかしながら、 この手法は莫大な時間と労力がかかり、多額な費用を要すること や、多数の検体を同時に検定することが容易でないことなどの欠 点があり、遅羽性の固定には数世代が必要であった。そこで、後 代検定に代わる正確かつ簡易な遅羽性遺伝子型 (K/K と K/ k^+) 判定技術の開発が求められている。

これまでに、その解決法の一つに羽装の形態的差異に着目し、 雄の遅羽性遺伝子型を簡易に判定する方法が報告されている。 Siegel et al. (1957) はロードアイランドレッドにおいて、初生時 の第 2 副翼羽の長さ、12 日齢時の尾羽の形態、3 および 5 週齢時 の体羽の形態などの表現型から、80% 程度の精度でK/K と K/k⁺ を推定できることを報告した。また、野田ら(2006)は白色レグ ホーンにおいて、4週齢時の第2副翼羽の形態と2週齢時の尾羽 の長さおよび形態が $K/K \ge K/k^+$ の判定に有効な指標となること を示し、特に、尾羽の長さが雄の遅羽性遺伝子型 $(K/K \ge K/k^+)$ の判定に利用できる可能性を明らかにした。

一方,近年の分子生物学的手法の進歩から,DNA レベルでの 遅羽性(K)遺伝子の研究も数多く報告されている。現在までに K遺伝子本体のDNA 配列は未だ明らかにされていない。しか し,Bacon et al. (1988) はニワトリ白血病ウイルス由来の内在性 ウイルス遺伝子 ev-21 が K遺伝子と関連していることを確認し, さらに Smith and Fadly (1994) は K遺伝子と ev-21 の遺伝子間 の距離が 0.3cM 以内であることを推測し, ev-21 が K遺伝子を検 出するためのDNA マーカーとなりえることを示した。Iraqi and Smith (1994) は ev-21 末端の Long terminal repeat (LTR)上 にプライマーを設定した PCR 法で ev-21 の挿入を検出すること により,白色レグホーンの遅羽性と速羽性の判別が行えることを 明らかにした。

さらに、ev-21 近傍の DNA 配列には ev-21 の挿入により生じた 重複によって形成された反復配列, つまり ev-21 が挿入されている 領域 (OR : Occupied repeat) と ev-21 が挿入されていない領域 (UR : Unoccupied repeat) が存在することが報告された (Levin and Smith, 1990)。白色レグホーンにおいては, K 遺伝子に連鎖 した ev-21 が挿入されていない反復配列の領域 (URa) と k^+ 遺伝 子に連鎖し, URa と相同な領域 (URb) を比較すると, それらの塩 基配列に差異があることが報告された (Smith and Levin, 1991)。 さらに遅羽性の白色レグホーン雄において, ホモ接合体 (K/K) は URa だけを有し, ヘテロ接合体 (K/k⁺) は URa と URb を有 すること (Smith and Levin, 1991) から, Iraqi and Smith (1994) は URa と URb の間で見られる塩基配列の差異を利用した制限 酵素断片長多型 (RFLP) 法によって, 初生雛の翼羽の形態で判定 が困難であった雄の遅羽性遺伝子型 (K/K と K/k⁺) を迅速かつ 正確に判定できることを見い出した。

このように、白色レグホーンでは DNA でも羽性判定(遅羽性と 速羽性の判定)や遅羽性遺伝子型判定(K/KとK/k⁺の判定)が可 能である。一方、名古屋種の集団内にも遅羽性遺伝子と速羽性遺 伝子が存在していることが確認されている(中村・野田, 2001)。 名古屋種は白色レグホーンに比べて、雄雛と雌雛の生殖隆起の特 徴がはっきりと現れていないために肛門鑑別による雌雄鑑別が難 しい(増井, 1975)。このため、羽性による雌雄鑑別の導入は雌雄 鑑別の精度の向上と雛生産の拡大につながると期待されている。

そこで、名古屋種の羽性を正確に判定して、羽性系統を効率よ く作出するために、これまでに Iraqi and Smith (1994) が開発し た DNA 解析法が名古屋種に適用できるか検討してきた。その結 果、遅羽性の名古屋種にも ev-21 が存在することを明らかにし、 白色レグホーンにおいて開発された PCR 法により遅羽性と速羽 性の判別ができることを報告した(中村ら、2002)。しかしなが ら、PCR-RFLP 法については白色レグホーンと異なり、制限酵素 (Hae III) の切断パターンに違いがみられず、名古屋種雄の K/Kと K/k^+ を区別できないことが確認された(中村、2003)。

本研究は遅羽性の名古屋種雄において K/K と K/k⁺の遺伝子 型を迅速かつ正確に判別できるようにするため、まず名古屋種の 遅羽性遺伝子および速羽性遺伝子近傍の UR 領域について塩基 配列を明らかにし,次に得られた塩基配列の情報から Hae Ⅲによ る PCR-RFLP 法に代わる新たな DNA 解析法の開発について検 討した。

材料と方法

1. 供試鶏

愛知県農業総合試験場で系統造成している,遅羽性遺伝子保有 と速羽性遺伝子保有の白色レグホーンおよび名古屋種を供試した。

2. ゲノム DNA の抽出

供試鶏から採取した血液のゲノム DNA の抽出は Kansaku *et al.* (2005)の方法と同様に行った。

3. 塩基配列の解析

遅羽性と速羽性の白色レグホーン雌 (K/-と k⁺/-) および遅 羽性と速羽性の名古屋種雌 (K/-と k⁺/-) について各4羽ずつ から抽出したゲノム DNA を用いた。UR 領域の増幅には Iraqi and Smith (1994) の報告に従って、フォワードプライマーの GS-9 と リバースプライマーの GS-23 を用いた (図 1)。PCR 反応液 25 μ l は 50 ng ゲノム DNA, 1×PCR バッファー (タカラバイオ、大 津)、50 μ M 各 dNTP, 0.1 μ M の GS-9 と GS-23 プライマーおよび 0.625U TaKaRa Z-TaqTM (タカラバイオ)の組成で調製した。反 応条件は 98°C 1分に続いて 98°C 1秒・55°C 1分・72°C 1分を 40 サイクル行い、最後に 72°C 2分の伸張反応を行った。PCR 産 物は 1×TAE (40 mM Tris, 40 mM 酢酸、1 mM EDTA) に溶解 して作成した 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブ ロミド染色で確認した。確認後、ConcertTM Rapid PCR Purification System (Marligen Biosciences, Ijamsville, MD, USA)を 用いて, PCR 産物を精製した。

シーケンス反応はジデオキシ法 (Sanger *et al.*, 1977) を用いて 行った。配列上にポリ A/T 配列が含まれるため、図1に示した 複数のプライマーを用いて両鎖の解析を行った。反応液は



GS-9 :AATGGTACTACAGAGAAGGTAGGAATATC (1-29) GS-10:CCTAGAACACTGGACATGGTATGGTATGCTCAGCC (395-362) GS-23:GTAAGACTAACACAGTATTCTCGAGT (1456-1431) NGK1 :CTGAGATATCATACCATGTC (364-383) NGK2 :CTCACTACTACTGCATGAAG (691-672) NGK3 :CCAAACACTTTTGTATATGGG (160-140) NGK4 :GACAGGAATGCAGTGCAGAACAGT (1120-1143) NGK5 :TCAGATCCAAGTTTCTGGGC (980-961)

 図 1. シーケンス反応に用いたプライマーの設定部位 目的の配列上にポリA/T 配列が2ケ所含まれるため, Iraqi and Smith (1994)の報告したプライマーGS-9, GS-10およびGS-23に加えて,NGK 1-5の5つのプラ イマーを設定し、シーケンス反応を行った。括弧内は プライマーの設置された位置を示す。 BigDye[™] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) に従って調製し,反応条件 は 96℃ 1 分に続いて 96℃ 10 秒・50℃ 5 秒・60℃ 1 分 15 秒を 35 サイクル,最後に 60℃ 2 分で行った。シーケンス反応後,反応 生成物をエタノール沈殿により回収し, ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyzar (Applied Biosystems)を用いて塩基配列を解析 した。得られた配列は DNASIS-Pro(日立ソフトウェアエンジニ アリング,東京)を用いて解析した。

4. PCR-RFLP 法による雄の K 遺伝子型の判定

 $K/K, K/k^+, k^+/k^+$ の白色レグホーン雄および $K/K, K/k^+, k^+/k^+$ k^+ の名古屋種雄から抽出したゲノム DNA を用いて, Hae III およ び Mbo I 消化による PCR-RFLP 法で雄の K 遺伝子型を判定し た。PCR 反応液の組成および反応条件は UR 領域を増幅する条 件と同様に行った。ただし, プライマーセットは Hae III 消化の場 合は GS-9 と GS-23 を用い, Mbo I 消化の場合は GS-9 と GS-10 を用いた。得られた PCR 産物は制限酵素 (Hae III あるいは Mbo I) で消化した後, 2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い, 制限酵素の切断パターンを比較した。

K/K および K/k⁺ の名古屋種雄における遅羽性遺伝子型 判定法の検証

後代検定により K 遺伝子のホモ接合体と確認された名古屋種 雄 (K/K) 12 羽と遅羽性の名古屋種雌 (K/-) 12 羽を用いて, I 羽の雄に対して1 羽の雌を交配させ, 各交配で1 羽の雄雛 (K/ K) を得た。同様に, K 遺伝子のホモ接合体である名古屋種雄 (K/K) 13 羽と速羽性の名古屋種雌 ($k^+/-$) 13 羽を用いて, 1 羽 の雄に対して1 羽の雌を交配させ, 各交配で1 羽の雄雛 (K/k^+) を得た。得られた雄雛より採取した血液からゲノム DNA を抽出 し, *Mbo*I 消化による PCR-RFLP 法を用いて雄雛の遅羽性遺伝子 型を確認した。

結 果

1. UR 領域の塩基配列の比較

図2に遅羽性遺伝子保有および速羽性遺伝子保有の白色レグ ホーン雌と名古屋種雌について GS-9 と GS-23 で増幅された PCR 産物の塩基配列を示した。

速羽性の白色レグホーン雌(*k*⁺/-)と速羽性の名古屋種雌(*k*⁺/-)の塩基配列を比較したが,変異は検出されなかった。

一方, 遅羽性の名古屋種雌 (K/-)の塩基配列について遅羽性 の白色レグホーン雌 (K/-)の塩基配列と比較した結果,294番 目の塩基にCが挿入され,307番目の塩基がTからCに置換 (transition型),474番目の塩基がCからTに置換 (transition型),557 番目の塩基がCからAに置換 (transversion型),557 番目の塩基がGからTに置換 (transversion型),694番目の塩 基がTからGに置換 (transversion型),738番目の塩基がCか らTに置換 (transition型),754番目の塩基がAからTに置換 (transversion型),755-757番目の塩基にATTが挿入され,794 番目の塩基がCからAに置換 (transversion型),1064番目の塩 基がAからGに置換 (transition型),1065-1072番目の塩基 (GTTAGTTA)が欠失されていた。

さらに,遅羽性の名古屋種雌(K/-)の塩基配列について速羽

性の名古屋種雌 $(k^+/-)$ と比較した結果, 189-193 番目の5つの T が欠失され, 213 番目の塩基が C から T に置換 (transition 型), 294 番目の塩基が T から C に置換 (transition 型), 333 番 目の塩基が A から C に置換 (transversion 型), 616 番目の塩基 が G から A に置換 (transition 型), 694 番目の塩基が T から G に置換 (transversion 型), 794 番目の塩基が C から A に置換 (transversion 型) されていた。

2. Hae IIIを用いた PCR-RFLP 法による K 遺伝子型の判定

図3に Hae III 消化により白色レグホーン雄および名古屋種雄のK遺伝子型を判定した結果を示した。Hae III 消化により, K/K の白色レグホーンでは1,447 bp の位置だけに, K/k⁺ の白色レグホーンでは1,447, 1,065 および383 bp の位置に, k^+/k^+ の白色レグホーンでは1,065 と383 bp の位置にDNA 断片が検出され, それぞれの遺伝子型で異なるバンドパターンを示した。

これに対して、名古屋種では白色レグホーンとは異なり、K/K, K/k^+ 、 k^+/k^+ のすべてにおいて、2本の DNA 断片(約 1,065 bp と 383 bp)が検出された。

3. Mbo I を用いた PCR-RFLP 法による K 遺伝子型の判定

図4に *Mbo* I 消化により白色レグホーン雄および名古屋種雄 の K 遺伝子型を判定した結果を示した。*Mbo* I 消化により, *K/K* の白色レグホーンでは 347bp の位置に, *K/k*⁺の白色レグホーン では 347 と 293 bp の位置に, k^+/k^+ の白色レグホーンでは 293 bp の位置に DNA バンドが観察されたことから, それぞれの遺 伝子型で異なるバンドパターンを得ることができた。

一方, K/K, K/k^+ および k^+/k^+ の名古屋種においても白色レ グホーンと同様に,遺伝子型間で異なるバンドパターンが観察さ れた(名古屋種の場合, K/K は 348 bp, K/k^+ は 348 と 293 bp, k^+/k^+ は 293 bp)。

なお, K/k^+ の白色レグホーンおよび名古屋種にはこれらのバンドよりも高分子量の位置にあるバンドが出現したが、このバンドは PCR 産物のヘテロデュープレックスに起因するものと考えられた。

K/K および K/k⁺ の名古屋種雄における遅羽性遺伝子型 判定法の検証

初生時に K/K の雄雛 12 羽と K/k⁺の雄雛 13 羽について翼羽 の形態を観察した結果,すべて遅羽性であった。

それらの雄雛について、*Mbo* I 消化による PCR-RFLP 法で遅 羽性遺伝子型を判定した結果を表1に示した。K/Kの雄雛 12 羽 は 348 bp の位置に、一方、 K/k^+ の雄雛 13 羽は 348 と 293 bp の 位置に DNA バンドが観察され、*Mbo* I の切断パターンにより正 確に名古屋種の $K/K \ge K/k^+$ の遺伝子型を判別できることが確 認できた。

考 察

本研究では遅羽性の名古屋種雄において $K/K \geq K/k^+$ の遺伝 子型を迅速かつ正確に判定できるようにするため、まず名古屋種 の遅羽性遺伝子および速羽性遺伝子近傍の UR 領域について塩 基配列を明らかにし、次にその塩基配列の情報から Hae III による PCR-RFLP 法に代わる新たな手法の開発を行った。

本研究では愛知県農業総合試験場が保有する遅羽性と速羽性の

日本家禽学会誌 46 巻 J1 号 (2009)

| WL K WL k+ NG K NG k+ | 1 1 1 | AATGGTACTA AATGGTACTA AATGGTACTA AATGGTACTA | CAGAGAAGGT CAGAGAAGGT CAGAGAAGGT CAGAGAAGGT | AGGAATATCT AGGAATATCT AGGAATATCT AGGAATATCT | GGAGTTTGCT GGAGTTTGCT GGAGTTTGCT GGAGTTTGCT | GGGGAGCACT GGGGAGCACT GGGGAGCACT GGGGAGCACT | 50 50 50 50 | WL K WL k+ NG K NG k+ | 751 751 751 751 | AACATAC AACTATTTAC AACTATTTAC AACTATTTAC AACTATTTAC | TTGCCTTCCT TTGCCTTCCT TTGCCTTCCT TTGCCTTCCT | TTATTAAAGC TTATTAAAGC TTATTAAAGC TTATTAAAGC | AGTTCACAGC AGTTCACAGC AGTTCACAGC AGTTCACAGC | ATGCTGGTAG ATGCTGGTAG ATGATGGTAG ATGCTGGTAG | 800 800 800 800 |
|--------------------------------|--------------------------|--|--|--|--|---|--------------------------|--------------------------------|------------------------------|---|--|--|--|--|------------------------------|
| WL K WL k+ NG K NG k+ | 51 51 51 51 | GTTGGAAGTA GTTGGAAGTA GTTGGAAGTA GTTGGAAGTA | ATTGAAGTTA ATTGAAGTTA ATTGAAGTTA ATTGAAGTTA | ACATAGAAGT ACATAGAAGT ACATAGAAGT ACATAGAAGT | ATATCATATA ATATCATATA ATATCATATA ATATCATATA | AACTGACTTC AACTGACTTC AACTGACTTC AACTGACTTC | 100 100 100 100 | WL K WL k+ NG K NG k+ | 801 801 801 801 | AGGGTTAAGC AGGGTTAAGC AGGGTTAAGC AGGGTTAAGC | TGAGGCAAGA TGAGGCAAGA TGAGGCAAGA TGAGGCAAGA | AACTTTTGTA AACTTTTGTA AACTTTTGTA AACTTTTGTA | AGTGCTAGGC AGTGCTAGGC AGTGCTAGGC AGTGCTAGGC | TAAAAACAGT TAAAAACAGT TAAAAACAGT TAAAAACAGT | 850 850 850 850 |
| WL K WL k+ NG K NG k+ | 101 101 101 101 | ACTACTCAGC ACTACTCAGC ACTACTCAGC ACTACTCAGC | ATCACCAAAA ATCACCAAAA ATCACCAAAA ATCACCAAAA | AAAGATGAGA AAAGATGAGA AAAGATGAGA AAAGATGAGA | ATAAAACTAC ATAAAACTAC ATAAAACTAC ATAAAACTAC | CCATATACAA CCATATACAA CCATATACAA CCATATACAA | 150 150 150 150 | WL K WL k+ Ng K Ng k+ | 851 851 851 851 | TTGCTTGTGT TTGCTTGTGT TTGCTTGTGT TTGCTTGTGT | TTGATATGGT TTGATATGGT TTGATATGGT TTGATATGGT | ACTGGTGGAT ACTGGTGGAT ACTGGTGGAT ACTGGTGGAT | GAAAAACTGC GAAAAACTGC GAAAAACTGC GAAAAACTGC | TTCCAGTCTC TTCCAGTCTC TTCCAGTCTC TTCCAGTCTC | 900 900 900 900 |
| WL K WL k+ NG K NG k+ | 151 151 151 151 | AAGTGTTTGG AAGTGTTTGG AAGTGTTTGG AAGTGTTTGG | TTTTTTTGGT TTTTTTTTGGT TTTTTTTTGGT TTTTTT | GGATTTTTTT GGATTTTTTT GGATTTTTTT GGATTTTTTT | | GAACATT TTTGAACATT GAACATT TTTGAACATT | 200 200 200 200 | WL K WL k+ NG K NG k+ | 901 901 901 901 | CTTGGCTCGT CTTGGCTCGT CTTGGCTCGT CTTGGCTCGT | TGGTCCTAAT TGGTCCTAAT TGGTCCTAAT TGGTCCTAAT | TCCCCCCGAG TCCCCCCGAG TCCCCCCGAG TCCCCCCGAG | GGTATATCTC GGTATATCTC GGTATATCTC GGTATATCTC | CCATGCTTAG CCATGCTTAG CCATGCTTAG CCATGCTTAG | 950 950 950 950 |
| WL K WL k+ NG K NG k+ | 201 201 201 201 | GACAGCTGGC GACAGCTGGC GACAGCTGGC GACAGCTGGC | ATTTACAAGT ATCTACAAGT ATTTACAAGT ATCTACAAGT ATCTACAAGT | AGGTTGACAT AGGTTGACAT AGGTTGACAT AGGTTGACAT | TAAGGTTGAC TAAGGTTGAC TAAGGTTGAC TAAGGTTGAC | TCTTCTATAT TCTTCTATAT TCTTCTATAT TCTTCTATAT | 250 250 250 250 | WL K WL k+ NG K NG k+ | 951 951 951 951 | CTTGGTGTCT CTTGGTGTCT CTTGGTGTCT CTTGGTGTCT | GCCCAGAAAC GCCCAGAAAC GCCCAGAAAC GCCCAGAAAC | TTGGATCTGA TTGGATCTGA TTGGATCTGA TTGGATCTGA | ATGTCCTTGT ATGTCCTTGT ATGTCCTTGT ATGTCCTTGT | CCACATAATG CCACATAATG CCACATAATG CCACATAATG CCACATAATG | 1000 1000 1000 1000 |
| WL K WL k+ NG K NG k+ | 251 251 251 251 | ACAGAAATCT ACAGAAATCT ACAGAAATCT ACAGAAATCT | GTTTTGAAGT GTTTTGAAGT GTTTTGAAGT GTTTTGAAGT | TAGATGTCCT TAGATGTCCT TAGATGTCCT TAGATGTCCT | TTAAACATGC TTAAACATGC TTAAACATGC TTAAACATGC TTAAACATGC | TGA⊟CCCCCC TGATCCCCCCC TGACCCCCCCC TGATCCCCCCC | 300 300 300 300 | WL K WL k+ Ng K Ng k+ | 1001 1001 1001 1001 | AGTTGTTCAT AGTTGTTCAT AGTTGTTCAT AGTTGTTCAT | CAAGCAGTGC CAAGCAGTGC CAAGCAGTGC CAAGCAGTGC | AAAAAGTCTA AAAAAGTCTA AAAAAGTCTA AAAAAGTCTA | GCTCCCAAGT GCTCCCAAGT GCTCCCAAGT GCTCCCAAGT | AGCTCAAGTG AGCTCAAGTG AGCTCAAGTG AGCTCAAGTG | 1050 1050 1050 1050 |
| WL K WL k+ NG K NG k+ | 301 301 301 301 | CTTCCTTTTT CTTCCTCTTT CTTCCTCTTT CTTCCTCTTT CTTCCTCTTT | TACAATTTTA TACAATTTTA TACAATTTTA TACAATTTTA TACAATTTTA | CAATTTACAA CAATTTACAA CAATTTACAA CAATTTACAA | CTCTGCTTGT CTATGCTTGT CTCTGCTTGT CTCTGCTTGT CTATGCTTGT | TAAAATTTTA TAAAATTTTA TAAAATTTTA TAAAATTTTA | 350 350 350 350 | ₩L K ₩L k+ Ng K Ng k+ | 1051 1051 1051 1051 | TTAGTTACCT TTAGTTACCT TTAGTTACCT TTAGTTACCT | CTTAGTTAGT CTTG CTTG CTTG | TAGCCACTGT GCCACTGT GCCACTGT GCCACTGT | CCTAGCCCAA CCTAGCCCAA CCTAGCCCAA CCTAGCCCAA | AGCCTGCATA AGCCTGCATA AGCCTGCATA AGCCTGCATA | 1100 1100 1100 1100 |
| WL K WL k+ Ng K Ng k+ | 351 351 351 351 | TGATCTGTTT TGATCTGTTT TGATCTGTTT TGATCTGTTT | TGGCTGAGAT TGGCTGAGAT TGGCTGAGAT TGGCTGAGAT | ATCATACCAT ATCATACCAT ATCATACCAT ATCATACCAT | GTCCAGTGTT GTCCAGTGTT GTCCAGTGTT GTCCAGTGTT | CTAGGTATIT CTAGGTATIT CTAGGTATIT CTAGGTATIT | 400 400 400 400 | WL K WL k+ Ng K Ng k+ | 1101 1101 1101 1101 | AGCATTTCCC AGCATTTCCC AGCATTTCCC AGCATTTCCC | AGTGCTTAGG AGTGCTTAGG AGTGCTTAGG AGTGCTTAGG | ACAGGAATGC ACAGGAATGC ACAGGAATGC ACAGGAATGC | AGTGCAGAAC AGTGCAGAAC AGTGCAGAAC AGTGCAGAAC | AGTTAAAGTT AGTTAAAGTT AGTTAAAGTT AGTTAAAGTT | 1150 1150 1150 1150 |
| WL K WL k+ NG K NG k+ | 401 401 401 401 | TCCTCCATTC TCCTCCATTC TCCTCCATTC TCCTCCATTC | TAAGCCATAT TAAGCCATAT TAAGCCATAT TAAGCCATAT TAAGCCATAT | AAGTCATAAG AAGTCATAAG AAGTCATAAG AAGTCATAAG | CTAATATTAC CTAATATTAC CTAATATTAC CTAATATTAC | AGTGCATTTT AGTGCATTTT AGTGCATTTT AGTGCATTTT | 450 450 450 450 | WL K WL k+ NG K NG k+ | 1151 1151 1151 1151 | TGTCCTGCAG TGTCCTGCAG TGTCCTGCAG TGTCCTGCAG | CCTCTGTCAT CCTCTGTCAT CCTCTGTCAT CCTCTGTCAT | GGCAAACACA GGCAAACACA GGCAAACACA GGCAAACACA | GTGCGCCATG GTGCGCCATG GTGCGCCATG GTGCGCCATG | CATGCTCCAC CATGCTCCAC CATGCTCCAC CATGCTCCAC | 1200 1200 1200 1200 |
| WL K WL k+ NG K NG k+ | 451 451 451 451 | ATGTGTAAAC Atgtgtaaac Atgtgtaaac Atgtgtaaac Atgtgtaaac | CTTCAGACTG CTTCAGACTG CTTCAGACTG CTTCAGACTG | GTACAACAAG GTATAACAAG GTATAACAAG GTATAACAAG | AAAGATTGCC AAAGATTGCC AAAGATTGCC AAAGATTGCC | AGTCCCTTGC AGTCCCTTGC AGTCCCTTGC AGTCCCTTGC | 500 500 500 500 | WL K WL k+ NG K NG k+ | 1201 1201 1201 1201 | TTGCTGTTTC TTGCTGTTTC TTGCTGTTTC TTGCTGTTTC | ATTTCCTGTT ATTTCCTGTT ATTTCCTGTT ATTTCCTGTT | GCTTTTGTCC GCTTTTGTCC GCTTTTGTCC GCTTTTGTCC | CCAGCTGTGC CCAGCTGTGC CCAGCTGTGC CCAGCTGTGC | TGAAGAGATT TGAAGAGATT TGAAGAGATT TGAAGAGATT | 1250 1250 1250 1250 |
| WL.K WL k+ NG K NG k+ | 501 501 501 501 | TTGAAATGTG TTGAAATGTG TTGAAATGTG TTGAAATGTG | TAACATCCCA TAAAATCCCA TAAAATCCCA TAAAATCCCA TAAAATCCCA | TCAGTTTCCC TCAGTTTCCC TCAGTTTCCC TCAGTTTCCC | AACTAGTAAT AACTAGTAAT AACTAGTAAT AACTAGTAAT | CTCAGTCCTG CTCAGTCCTG CTCAGTCCTG CTCAGTCCTG | 550 550 550 550 | WL K WL k+ Ng K Ng k+ | 1251 1251 1251 1251 | TGGCTCAGGA TGGCTCAGGA TGGCTCAGGA TGGCTCAGGA | AGTCTGTCAT AGTCTGTCAT AGTCTGTCAT AGTCTGTCAT | ATTGTTCTTT ATTGTTCTTT ATTGTTCTTT ATTGTTCTTT | AGAGAACCTC AGAGAACCTC AGAGAACCTC AGAGAACCTC | AAATATAAAC AAATATAAAC AAATATAAAC AAATATAAAC | 1300 1300 1300 1300 |
| WL K WL k+ NG K NG k+ | 551 551 551 551 | TTGTACGGCA TTGTACTGCA TTGTACTGCA TTGTACTGCA | ACAACCAATC ACAACCAATC ACAACCAATC ACAACCAATC | ACCTAAGTCA ACCTAAGTCA ACCTAAGTCA ACCTAAGTCA | GCCTCTTGAA GCCTCTTGAA GCCTCTTGAA GCCTCTTGAA | TGTTCAACAG TGTTCAACAG TGTTCAACAG TGTTCAACAG | 600 600 600 600 | ₩L K ₩L k+ NG K NG k+ | 1301 1301 1301 1301 | ATTCTGGTGT ATTCTGGTGT ATTCTGGTGT ATTCTGGTGT | ACCGTATGGA ACCGTATGGA ACCGTATGGA ACCGTATGGA | GCAGATATAT GCAGATATAT GCAGATATAT GCAGATATAT | TGCTATATAA TGCTATATAA TGCTATATAA TGCTATATAA | AACATAAGCT AACATAAGCT AACATAAGCT AACATAAGCT | 1350 1350 1350 1350 |
| WL K WL k+ NG K NG k+ | 601 601 601 601 | TGTCCCATGA TGTCCCATGA TGTCCCATGA TGTCCCATGA | TGAGTÄGCAA TGAGTGGCAA TGAGTAGCAA TGAGTGGCAA | CTCTTTAACT CTCTTTAACT CTCTTTAACT CTCTTTAACT | CCCATGTAAA CCCATGTAAA CCCATGTAAA CCCATGTAAA | TTGTCCCTAG TTGTCCCTAG TTGTCCCTAG TTGTCCCTAG | 650 650 650 650 | WL K WL k+ NG K NG k+ | 1351 1351 1351 1351 | GAAATCAAAT GAAATCAAAT GAAATCAAAT GAAATCAAAT | GTACAAATTA GTACAAATTA GTACAAATTA GTACAAATTA | CATTACTTGC CATTACTTGC CATTACTTGC CATTACTTGC | ACTGAAGCTG ACTGAAGCTG ACTGAAGCTG ACTGAAGCTG | TCTTCCACTT TCTTCCACTT TCTTCCACTT TCTTCCACTT | 1400 1400 1400 1400 |
| WL K WL k+ NG K NG k+ | 651 651 651 651 | GGGGAAAATT GGGGAAAATT GGGGAAAATT GGGGAAAATT | AAAGAGATCA AAAGAGATCA AAAGAGATCA AAAGAGATCA | ACTTCATGCA ACTTCATGCA ACTTCATGCA ACTTCATGCA | GTAGTAGTGA GTAGTAGTGA GTAGTAGTGA GTAGTAGTGA | GTTTTTTTT GTTTTTTTT GTTGTTTTTTT GTTGTTTTTT | 700 700 700 700 | WL K WL k+ NG K NG k+ | 1401 1401 1401 1401 | TGCCTAAAAT TGCCTAAAAT TGCCTAAAAT TGCCTAAAAT | ATTCTGCTGA ATTCTGCTGA ATTCTGCTGA ATTCTGCTGA | AGTTAAAAAT AGTTAAAAAT AGTTAAAAAT AGTTAAAAAT | ACTCGAGAAT ACTCGAGAAT ACTCGAGAAT ACTCGAGAAT | ACTGTGTTAG ACTGTGTTAG ACTGTGTTAG ACTGTGTTAG | 1450 1450 1450 1450 |
| WLK WLk+ NGK NGk+ | 701 701 701 701 | TTTTTACTAT TTTTTACTAT TTTTTACTAT TTTTTACTAT | TTCTTCATTT TTCTTCATTT TTCTTCATTT TTCTTCATTT | TTAATTTCAG TTAATTTCAG TTAATTTCAG TTAATTTCAG | CTATGTACGA CTATGTATGA CTATGTATGA CTATGTATGA | ATAATAGTCA ATAATAGTCA ATAATAGTCA ATAATAGTCA | 750 750 750 750 | WL K WL k+ NG K NG k+ | 1451 1451 1451 1451 | TGTTAC TGTTAC TGTTAC TGTTAC | | | V | | 1456 1456 1456 1456 |

図 2. 白色レグホーンおよび名古屋種の GS-9 と GS-23 で増幅された PCR 産物の塩基配列
WL は白色レグホーン, NG は名古屋種を示し,四角で囲まれた文字は配列が異なる部分を示す。下線部の領域はプライマーの設定位置を示す。①:GS-9,②:NGK3,③:NGK1とGS-10,④:NGK2,⑤:NGK5,⑥:NGK4,⑦:GS-23

白色レグホーン雌 ($K/- \& k^+/-$) を解析したが, それらの UR 領域の塩基配列は Iraqi and Smith (1995) によって調査された 塩基配列 (1-173, 194-395 番目) と同じであった。さらに速羽性の 白色レグホーン雌 ($k^+/-$) については, UR 領域の 1-173 と 194-1456 番目の塩基配列が Levin and Smith (1991) によって解析さ れた k^+ 遺伝子近傍にある URb の塩基配列 (GenBank accession no. X54093) とも同じであった。したがって,本研究で対照 として用いた白色レグホーンは Iraqi and Smith (1994) の方法 を追試する供試鶏として適していることが確認できた。なお, 174 -193 番目に見られるポリ T の配列は個体により多型が見られる ことが報告されている (Iraqi and Smith, 1995)。本試験で解析し た結果では遅羽性の白色レグホーン雌および名古屋種雌 (K/-) で15回,速羽性の白色レグホーン雌および名古屋種雌 ($k^+/-$)で 20回のTが繰り返されていた。

次に、白色レグホーン雌と名古屋種雌における UR 領域の塩基 配列を比較すると、速羽性の白色レグホーン雌 ($k^+/-$) と速羽性 の名古屋種雌 ($k^+/-$) との間には塩基の違いは検出されず、品種 間の差は確認できなかった。一方、遅羽性の白色レグホーン雌 (K/-) と遅羽性の名古屋種雌 (K/-) の間では 12 ケ所で塩基の 違いが検出され、両品種間の塩基配列の相同性は 98.6% であっ



 図 3. Hae IIを用いた PCR-RFLP 法による K 遺伝子型の判定 M:サイズマーカー(φX174/Hinc II, ニッポンジーン, 東京), 1:白色レグホーン; K/K, 2:白色レグホーン; K/k⁺, 4:名古 屋種; K/K, 5:名古屋種; K/k⁺, 6:名古屋種; k⁺/k⁺

た。Smith and Levin (1991) はコマーシャル鶏(白色レグホー ンとブロイラー鶏)の10系統についてサザンブロット解析による 制限酵素断片長多型を調査した結果, Hae II 消化により遅羽性に は5種類,速羽性には3種類のDNA多型があることを報告した。 したがって,表現型は同じ羽性であっても、品種や系統によって 様々な多型が存在することが推測されることから,DNA解析に よる羽性判定(遅羽性と速羽性の判定)や遅羽性遺伝子型判定 ($K/K \ge K/k^+$ の判定)を行う場合には品種や系統毎に ev-21の 有無やUR 領域の塩基配列を確認することが必要である。

さらに、白色レグホーンおよび名古屋種における K 遺伝子近 傍の UR 領域の塩基配列を詳細に比較すると、名古屋種の K は 白色レグホーンの K と異なり、1065-1072 番目の配列に GTTA-GTTA が挿入されていないため、Hae II 認識配列(GGCC)の存 在が確認された(図 2)。したがって、図 3 に示したように、この 塩基配列の違いが Iraqi and Smith (1994)の開発した PCR-RFLP 法によって名古屋種雄の K/K と K/k⁺ を区別できない原因であ ることが明らかになった。そこで、本研究は得られた塩基配列の 情報を基にして、Hae III に代わる別の制限酵素の認識配列を検索 し、名古屋種雄の K/K と K/k⁺ の区別ができるかどうか検討した。

その結果, 292-295 番目の配列が名古屋種の k^+ では GATC で あるのに対し,名古屋種のKでは GACC であることから, k^+ だ けが制限酵素 Mbo I の認識配列を有していることが解明された。 292-295 番目以外にもMbo I の認識配列はK, k^+ ともに 352-355 番目の位置に存在しているが,本研究ではプライマーGS-9 と GS-10を用いて増幅した PCR 産物をMbo I 消化した結果, K/Kでは 348 と 42 bp, K/k^+ では 348, 293, 60 および 42 bp, k^+/k^+ で は 293, 60 および 42 bp の DNA 断片に切断され, DNA の泳動パ ターンの違いから名古屋種雄のK遺伝子型を判定できることが 明らかになった(図 4)。ただし、本研究で用いた 2% アガロース ゲル電気泳動では 60 と 42 bp の DNA バンドを明瞭に検出する

M 1 2 3 4 5 6



図 4. Mbo I を用いた PCR-RFLP 法による K 遺伝子型の判定
M:サイズマーカー(φX174/Hinc II, ニッポンジーン, 東京), 1:白色レグホーン; K/K, 2:白色レグホーン; K/k⁺, 3:白色レグホーン; k⁺/k⁺, 4:名古屋種; K/K, 5:名古屋種; K/k⁺, 6:名古屋種; k⁺/k⁺

表 1. *K*/*K* および *K*/*k*⁺の名古屋種雄における遅羽性 遺伝子型判定法の検証

| | | Mbo I を用いた PCR-RFLP 法で 判定された遺伝子型* | | | | | | |
|---------|-----|--------------------------------------|---------|-----------|--|--|--|--|
| 遺伝子型 | 検体数 | K/K | K/k^+ | k^+/k^+ | | | | |
| K/K | 12 | 12 | 0 | 0 | | | | |
| K/k^+ | 13 | 0 | 13 | 0 | | | | |

* K 遺伝子型は図4に示した DNA バンドパターンにより判定した。

ことはできなかったが、図4のように348と293 bpの違いだけ でも名古屋種雄のK 遺伝子型を十分に判定できることが示され た。さらに、K/Kの雄雛12羽と K/k^+ の雄雛13羽でこの手法を 検証した結果、迅速かつ正確に判定できることが確認された(表 1)。そのため、この遅羽性遺伝子型判定法は名古屋種の遅羽性系 統の造成や維持に十分に利用できることが証明された。

以上のことから、PCR-RFLP 法を用いた名古屋種雄の遅羽性 遺伝子ホモ接合体型 (K/K) と遅羽性遺伝子ヘテロ接合体型 (K/k^+) の判定方法を開発することができた。これにより、名古屋種 において羽性の固定が簡便化され、さらに羽性系統の維持も容易 となり、羽毛鑑別の早期導入が可能となる。

辞

謝

本研究を遂行するにあたり,ご協力頂きました愛知県農業総合 試験場畜産研究部家きんグループの方々に感謝の意を表します。

引用文献

- Bacon LD, Smith E, Crittenden LB and Havenstein GB. Association of the slow feathering (K) and an endogenous viral (ev21) gene on the Z chromosome of chickens. Poultry Science, 67 : 191-197. 1988.
- Etches RJ. Growth and sexual maturation. In : Reproduction in poultry. pp.74–105. CAB INTERNATIONAL. Wallingford. 1996.
- Iraqi F and Smith EJ. Determination of the zygosity of *ev21-K* in late-feathering male White Leghorns using the polymerase chain reaction. Poultry Science, 73 : 939–946. 1994.

- Iraqi F and Smith EJ. Organization of the sex-linked latefeathering haplotype in chickens. Animal Genetics, 26 : 141-146. 1995.
- Kansaku N, Ohkubo T, Okabayashi H, Guémené D, Kuhnlein U, Zadworny D and Shimada K. Cloning of duck PRL cDNA and genomic DNA. General and Comparative Endocrinology, 141 : 39–47. 2005.
- Levin I and Smith EJ. Molecular analysis of endogenous virus ev21-slow feathering complex of chickens. 1. Cloning of proviral-cell junction fragment and unoccupied integration site. Poultry Science, 69 : 2017-2026. 1990.
- Levin I and Smith EJ. Association of a chicken repetitive element with the endogenous virus-21 slow-feathering locus. Poultry Science, 70: 1948-1956, 1991.
- 中村明弘・野田賢治.愛知県における名古屋種の改良とその遺伝 的特性.動物遺伝資源探索調査報告,12:77-97,2001.
- 中村明弘・野田賢治・宮川博充・水野銈一郎・梅澤吉孝. 内在性 ウイルス遺伝子 ev-21 をマーカーに用いた PCR 法による名古 屋種の羽性判定. 愛知県農業総合試験場研究報告, 34:213-217. 2002.
- 中村明弘.名古屋種における羽性選抜技術の開発.第44回愛知県 畜産技術業績発表会集録. 110-115頁.愛知県農林水産部畜産 課. 2003.

- 野田賢治・中村明弘・大島啓太郎・梅澤吉孝. 白色レグホーン種 における優性伴性遅羽性遺伝子(K)保有ヒナの羽装の特徴. 日 本家禽学会誌,43:153-160.2006.
- 増井 清.初生雛雌雄鑑別.鶏の性と雌雄鑑別の研究.42-62頁. 日本中央競馬会弘済会.1975.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74 : 5463-5467. 1977.
- 島田清司. 種卵で雌雄を見分けることができるか:日本の伝統的 雌雄鑑別から近代技術まで、日本家禽会誌,39:172-176.2002.
- Siegel PB, Mueller CD and Craig JV. Some phenotypic differences among homozygous, heterozygous, and hemizygous late feathering chicks. Poultry Science, 36 : 232-239. 1957.
- Smith EJ and Levin I. Application of a locus-specific DNA hybridization probe in the analysis of the slow-feathering endogenous virus complex of chickens. Poultry Science, 70: 1957-1964. 1991.
- Smith EJ and Fadly AM. Male-mediated venereal transmission of endogenous avian leukosis virus. Poultry Science, 73 : 488-494. 1994.
- Warren DC. Inheritance of rate of feathering in poultry. The Journal of Heredity, 16 : 13-18. 1925.

Determination of Late Feathering Genotype in Nagoya Breed Males Using PCR-RFLP Method

Akihiro Nakamura¹, Masanao Kobayashi², Kenji Noda¹, Hajime Kondo¹ and Norio Kansaku²

¹ Animal Husbandry Research Division, Aichi-ken Agricultural Research Center, Yazako, Nagakute, Aichi 480-1193, Japan ² Laboratory of Animal Genetics and Breeding, Azabu University, Fuchinobe, Sagamihara 229-8501, Japan

The avian endogenous virus gene (ev-21) is closely associated on the dominant sex-linked late feathering (LF) gene, K, on the Z chromosome of chickens. The LF and early feathering (EF) phenotypes are widely used for sex identification ; when k^+/k^+ sires are mated with K/- hens, male chicks are LF and females are EF. To introduce the feather sexing, two lines (EF male line and LF female line) are necessary. However, homozygous (K/K) and heterozygous (K/k^+) late feathering genotypes exist in LF males and separating K/K and K/k^+ by phenotypic differences at hatch is not possible. Consequently, labor-intensive progeny testing has been required in order to establish LF female line. In White Leghorn, determination of the genotype can be conducted by using restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the K or k^+ gene flanking region segments amplified by the polymerase chain reaction (PCR). The present study was conducted to establish a specific PCR assay that distinguishes Nagoya breed K/K males from K/k^+ males.

To investigate the differences of DNA sequence between K and k^+ genes in Nagoya breed, a total of 1456bp of the flanking regions in K and k^+ was sequenced. Comparison between K and k^+ in Nagoya breed, indicated that differences were detected at 7 positions. Transition was detected at position 213, 294 and 616. Transversion was detected at position 333, 694 and 794. Deletion was detected at position 189–193 in K. At position 292–295, k^+ contains a *Mbo* I site (GATC), whereas K did not contain the recognition site. Thus, these results indicate that the *Mbo* I RFLP can be used in Nagoya breed to differentiate the K and k^+ alleles.

(Japanese Journal of Poultry Science, 46 : J9-J15, 2009) Key words : feather sexing, Nagoya breed, polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism