

《研究ノート》

ロードアイランドレッドにおいて遅羽性遺伝子と連鎖する一塩基多型

佐藤慎一¹・大竹 剛¹・稲生 哲²・小島孝敏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字小田倉原 1 961-8511

²独立行政法人家畜改良センター岡崎牧場, 愛知県岡崎市大柳町字栗沢 1-1 444-3161

本研究では, 家畜改良センター岡崎牧場のロードアイランドレッドの羽性を遅羽性 (K) に固定することを目的として, 羽性遺伝子と連鎖する一塩基多型 (SNP) の検出を試みた。

サンプルは遅羽性 (K) と速羽性 (k^+) が混在するロードアイランドレッド集団を利用した。近年, 遅羽性 (K) 遺伝子は Z 染色体上に存在するプロラクチン受容体遺伝子 (*prolactin receptor gene*: *PRLR*) と *sperm flagellar protein 2* 遺伝子 (*SPEF2*) の不完全重複内の部分的断片と関連することが明らかになっている。そこで, 本研究では部分的断片の結合部位 (ジャンクションサイト, JS) と羽性との関係を調査した。次に, 羽性遺伝子と連鎖する SNP を検出するために, 不完全重複の外側に位置する *SPEF2* のエクソン配列を調べた。さらに, 検出した SNP で遺伝子型を確認した雄と雌を交配して後代鶏を作出し, それらの羽性, JS の有無および検出した SNP の遺伝子型を確認した。

その結果, 表現型で遅羽性と判定した全羽で JS の存在を確認した。関連領域の多型探索の結果, *SPEF2* のエクソン 5 で JS と完全に連鎖する SNP (c.684C > T) を検出した。遅羽性の雄は T/T と T/C, 雌は T/-, 速羽性の雄は C/C, 雌は C/- であった。次に, T/C の雄と T/- および C/- の雌を交配して羽性を確認し, 遅羽性のすべての後代鶏で JS の存在を確認した。また, 後代鶏において, 遅羽性の雄は T/T および T/C, 雌は T/-, 速羽性の雄は C/C, 雌は C/- を示した。雄親から C アレルを受け継いだ後代鶏の雌が速羽性となったことから, T/C をもつ雄親は K 遺伝子のヘテロ接合体 (K/k^+) であることが明らかになった。以上のことから, 本研究で検出した c.684C > T は, ロードアイランドレッドの羽性を遺伝子レベルで分離することが可能であり, 雄では K 遺伝子のホモ接合体 (K/K) とヘテロ接合体 (K/k^+) を分離できるため, 遅羽性を効率よく選抜できる分子マーカーになり得ると考えられた。

キーワード: ロードアイランドレッド, 羽性, 雌雄鑑別, 遅羽性遺伝子, SNP

緒 言

ニワトリの雌雄を分離する方法として, Z 染色体上の遅羽性 (K) 遺伝子によって支配されている羽性を利用した鑑別手法がある。この特徴として, 遅羽性は速羽性に対して顕性であり, 雄を速羽性 (k^+/k^+), 雌を遅羽性 ($K/-$) にして交配すると, 産まれる雛は雄が遅羽性 (K/k^+), 雌が速羽性 ($k^+/-$) となり, 簡易に雌雄鑑別が可能となる (Warren, 1925)。現在では, この遺伝様式を用いて, 卵用鶏や肉用鶏の実用鶏種が作出されている。

これまで, 羽性を判別するために表現型だけでなく分子生物学的的手法との関連が調べられてきた。内在性のウイルス遺伝子 *ev-21* と K 遺伝子との関連が報告され (Bacon *et al.*, 1988), *ev-21* の挿入を調べることで遅羽性と速羽性の判別が可能になった (中村ら, 2002)。Levin and Smith (1990) は, K 遺伝子は

ev-21 が挿入された領域 (OR: Occupied repeat) と *ev-21* が挿入されていない領域 (UR: Unoccupied repeat) の重複配列からなることを報告した。 K 遺伝子に連鎖した領域 (URa) と k^+ 遺伝子に連鎖した領域のうち URa と相同な領域 (URb) では塩基配列が異なるため, その配列の違いをもとに遅羽性と速羽性を分けることが可能となり, さらに雄の K 遺伝子のホモ型とヘテロ型を分離することに成功している (Smith and Levin, 1991; Iraqi and Smith, 1994; 野田ら, 2006; 中村ら, 2009)。一方, 稀にはあるが, 遅羽性系統から速羽性の雌雛が出現する復帰突然変異, *ev-21* を含む速羽性のニワトリ, URb 配列を有する遅羽性のニワトリなど, これまでの研究結果と矛盾する個体が確認されている (Levin and Smith, 1990; Smith and Levin, 1991; Boulliou *et al.*, 1992; Tixier-Boichard *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2011)。つまり, *ev-21* の挿入および UR の塩基配列の差異で羽性を完全に分離できないことも報告されている。

分子生物学の進歩により, Z 染色体上の羽性遺伝子の詳細は明らかになりつつある。Elferink *et al.* (2008) は K 遺伝子において, プロラクチン受容体遺伝子 (*prolactin receptor gene*: *PRLR*) と *sperm flagellar protein 2* 遺伝子 (*SPEF2*) の不完全重複内に, *PRLR* の部分的重複 (*dPRLR*) と *SPEF2* の部分的重複 (*dSPEF2*) が結合したジャンクションサイト (JS) の存在を明

2022年4月6日受付, 2022年6月3日受理
連絡者: 佐藤慎一
〒961-8511 福島県西白河郡西郷村大字小田倉字小田倉原 1
Tel: 0248-25-2243
Fax: 0248-25-3990
E-mail: s1sato@nlbc.go.jp

らかにした。Bu *et al.* (2013) は *dPRLR* がプロラクチンに対する機能的な受容体として発現しており、遅羽性に関連する候補遺伝子である可能性を報告した。Okamura *et al.* (2019) は *K* 遺伝子が *dPRLR* を発現させることによって *PRLR* の機能を弱めて、胎仔期の羽の発育を阻害する可能性を示唆した。一方、Zhao *et al.* (2016) は遅羽性と速羽性の雛で *SPEF2* の発現量が有意に異なることから、*SPEF2* が羽性に対する候補遺伝子であり、*dPRLR* と *dSPEF2* の融合遺伝子 (*dPRLR* /*dSPEF2*) も遅羽性の雛における候補遺伝子であることを示した。Takenouchi *et al.* (2018) は *ev-21* をもたない遅羽性品種を確認し、調査した遅羽性の 13 品種はすべて JS を保有することを報告した。これらのことから、遅羽性には *dPRLR* と *dSPEF2* が関与しており、遅羽性を遺伝子レベルで調べる手段として JS を確認することが望ましいと考えられる。

家畜改良センター岡崎牧場で保有するロードアイランドレッド集団は遅羽性と速羽性を有することを確認している。本研究では、まず遅羽性のロードアイランドレッドにおける JS の有無を確認した。次にロードアイランドレッドでは先行研究において羽性を分離する変異の報告がないため、羽性遺伝子と連鎖する塩基多型 (SNP) を調べた。さらに、検出した SNP で *K* 遺伝子のホモ接合体 (*K* / *K*) とヘテロ接合体 (*K* / *k*⁺) を分離できるかを明らかにするために、家系情報をもとに羽性と遺伝子型との関係を調査した。

材料と方法

1. 供試鶏および羽性の確認

家畜改良センター岡崎牧場で飼養するロードアイランドレッド (2019 年鶏, 2020 年鶏) を供試した。2019 年鶏は後代採取に利用した育種群の雄 77 羽, 雌 391 羽とし、2020 年鶏は 2019 年鶏

の雌雄を交配して生まれた後代鶏のうち、家系情報をもとに選別した雄 11 羽, 雌 66 羽を調査した。供試鶏の羽性は 7 日齢に確認し、血液は 60~80 週齢時に採取した。本研究は家畜改良センターの動物実験委員会の承認を受けて実施した。

2. JS の確認

ゲノム DNA は Easy-DNA™ gDNA Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて血液から抽出した。供試鶏の *K* 遺伝子を確認するために、*dPRLR* と *dSPEF2* が結合した JS を増幅するためのプライマーを作成した (表 1)。PCR は BIOTAQ™ HS (Biolone, Taunton, MA, USA) を利用し、PCR 反応はゲノム DNA を 25 ng, 各プライマーを 6.25 pmol, MgCl₂ を 2 mM, dNTP を各 0.2 mM, 1×反応バッファー, BIOTAQ™ HS DNA Polymerase を 0.5 U, 合計 15 μl で行った。PCR の条件は 94℃ 10 分間ののち、95℃ 30 秒の熱変性、60℃ 30 秒のアニーリング、72℃ 30 秒の伸長反応を 35 サイクル行い、最後に 72℃ で 5 分とした。PCR 産物はエチジウムプロマイド入りの 2% アガロースゲルで電気泳動を行い、PCR 産物の有無で JS を確認した。

3. 羽性を分離する SNP の検出

羽性遺伝子と連鎖する SNP を検出するために、不完全重複の外側に位置するニワトリ *SPEF2* (Gene ID : 427435, Ensembl : ENSGALG00010014805) のうち、SNP 情報の公開されていた 5ヶ所のエクソン (5, 10, 12, 16, 24) を増幅するプライマーを作成した (図 1, 表 1)。供試サンプルは遅羽性と速羽性を確認した個体のゲノム DNA を抽出した。PCR は KOD FX (Toyobo, Osaka, Japan) を利用し、PCR 反応はゲノム DNA を 25 ng, 各プライマーを 6.25 pmol, dNTP を各 0.4 mM, 1×PCR バッファー, KOD FX DNA Polymerase を 0.25 U, 合計 15 μl で行った。PCR の条件は 94℃ 2 分間の熱変性、55℃ 30 秒のアニーリング、68℃ 30 秒の伸長反応を 35 サイクル行う条件で増幅した。PCR 産物は

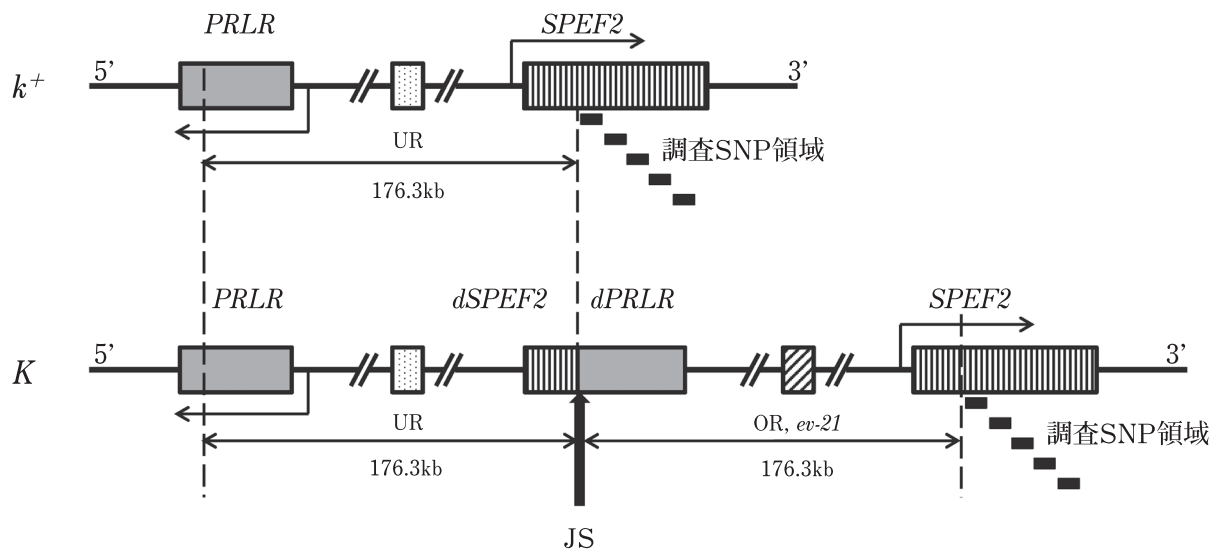


図 1. 羽性遺伝子の構造と JS および調査 SNP 領域の位置

k⁺: 速羽性遺伝子, *K*: 遅羽性遺伝子, *PRLR*: prolactin receptor gene, *SPEF2*: sperm flagellar protein 2 gene, JS: ジャンク ションサイト, UR: Unoccupied repeat, OR: Occupied repeat, *ev-21*: 内在性のウイルス遺伝子。 *K* 遺伝子では部分的に断片化した遺伝子 (*dSPEF2* と *dPRLR*) が結合した JS が存在する。調査 SNP 領域はプライマーを設計した 5 か所のエクソンを示す。

表 1. JS の確認および SNP 探索に利用したプライマー配列

Primer name	Primer sequence (5' -3')	Primer location	Product size (bp)
JS* amplification			
SPEF2-int4-f	TCAGACTAGGGCTAGCATTT	SPEF2 intron 4	200
PRLR-ex14-r3	AGCCTCCTATGTTTGCCTAT	PRLR exon 14	
SPEF2 exon amplification			
SPEF2-ex5-f	AAAATGAAGACAACAAGCCTCA	intron 4	390
SPEF2-ex5-r	AAAAACTAACCTTTTCCAAATTCA	intron 5	
SPEF2-ex10-f	TTTGGTTTCACTGTTCTCAGATG	intron 9	394
SPEF2-ex10-r	TGAAAAGAAAATGCATGTCAAA	intron 10	
SPEF2-ex12-f	TTCCTTCACATGTTGTAATGCTG	intron 11	398
SPEF2-ex12-r	TCACTTGAAGATGAACCTCGAA	intron 12	
SPEF2-ex16-f	CACTGTTTTGATCATGATGCTGT	intron 15	486
SPEF2-ex16-r	TCTTCATATTTGCCTCACATCAA	intron 16	
SPEF2-ex24-f	GCAAATAGCATTCTCATTCTCTTG	intron 23	372
SPEF2-ex24-r	CCTACATGCATCCTGAATGG	intron 24	

*JS：ジャンクションサイト

エチジウムブロマイド入りの2%アガロースゲルで電気泳動して確認した。これらのPCR産物は、3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) によって、BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を利用したダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定し、SNPを検出した。

4. 羽性判別 SNP における後代鶏の遺伝子型判定

上記で検出した羽性判別 SNP で遺伝子型を判定した2019年鶏のうち、 K 遺伝子のヘテロ接合体 (K/k^+) が予測された14羽を雄親として後代鶏を作出し、それらの羽性と遺伝子型を調査した。後代鶏のJSの有無および羽性判別 SNP の遺伝子型判定は前述した方法で行った。

結 果

1. JS の確認

2019年鶏のふ化後7日齢における羽性およびJSの判定結果を表2に示した。遅羽性と判定された雄76羽、雌372羽は、すべてJSが検出された。速羽性と判定された雄1羽と雌19羽はJSが検出されなかった。

2. 羽性を分離する SNP の検出

表2で羽性を判定した雄と雌で、不完全重複の外側に位置する *SPEF2* のエクソン5、エクソン10、エクソン12、エクソン16およびエクソン24の配列を確認した(図1)。その結果、エクソン5においてJSと完全に連鎖するSNP (c.684C > T) を検出した。この遺伝子型を確認した結果、遅羽性の雄62羽がT/T、14羽がT/C、雌372羽はすべてT/-を示し、速羽性の雄はC/C、雌はC/-を示した(表3)。

3. 羽性判別 SNP における後代鶏の遺伝子型判定

2019年鶏の雌雄を交配して作出した後代鶏の羽性、JSの有無およびc.684C > Tの遺伝子型判定結果を表4に示した。 K 遺伝

表 2. ロードアイランドレッドにおける羽性および JS の確認

表現型	性	羽数	JS*
遅羽性	雄	76	+
	雌	372	+
速羽性	雄	1	-
	雌	19	-

*JS：ジャンクションサイト、PCRで増幅あり：+、増幅なし：-

表 3. ロードアイランドレッドにおける c.684C > T の遺伝子型判定

表現型	性	羽数	遺伝子型*		
			T/T (T/-)	T/C	C/C (C/-)
遅羽性	雄	76	62	14	0
	雌	372	372		0
速羽性	雄	1	0	0	1
	雌	19	0		19

*雄：T/T, T/C, C/C, 雌：T/-, C/-

子のヘテロ接合体 (K/k^+) が予測されたT/Cの雄14羽はT/-の雌35羽およびC/-の雌6羽と交配し、77羽の後代鶏を得た。後代鶏の羽性は、遅羽性の雄が10羽、雌が38羽であり、速羽性の雄が1羽、雌が28羽であった。遅羽性の雄と雌はすべてJSが検出された。c.684C > Tにおいて、遅羽性の雄はT/TおよびT/C、雌はT/-を示し、速羽性の雄はC/C、雌はC/-を示した。雄親からCアレルを受け継いだ後代鶏の雌が速羽性となったことから、遺伝子型がT/Cの雄は、 K 遺伝子のヘテロ接合体

表 4. ロードアイランドレッドにおける羽性, JS の確認, c.684C > T の遺伝子型判定

世代	羽性	性	羽数	JS*	遺伝子型**		
					T/T (T/-)	T/C	C/C (C/-)
親		雄	14	+	0	14	0
		雌	41	+	35		0
後代	遅羽性	雄	10	+	5	5	0
		雌	38	+	38		0
	速羽性	雄	1	-	0	0	1
		雌	28	-	0		28

*JS: ジャンクションサイト, PCR で増幅あり: +, 増幅なし: -

**雄: T/T, T/C, C/C, 雌: T/-, C/-

(K/k^+) であることが明らかになった。

考 察

本研究では, ロードアイランドレッドを遺伝子レベルで遅羽性に固定するために, 羽性と不完全重複の結合部位 (JS) との関係性を確認し, 羽性遺伝子と連鎖する SNP の検出を試みた。

Elferink *et al.* (2008) が Z 染色体における *K* 遺伝子の構造を明らかにして以来, 遅羽性の発現には不完全重複を形成する *dPRLR* と *dSPEF2* の関与が報告されてきた (Bu *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2016; Okamura *et al.*, 2019)。Takenouchi *et al.* (2018) は遅羽性の発現に *ev-21* ではなく JS が必要であることを報告し, 遅羽性のニワトリを検出する分子マーカーとして JS の利用を推奨した。これらのことから, 本研究でも遅羽性を確認するために JS の有無を調べた。その結果, ふ化後 7 日齢に遅羽性と判定された個体はすべて JS を保有しており (表 2), ロードアイランドレッドは JS の有無で羽性を判別することが可能であった。

白色レグホーンや名古屋種では, UR における塩基配列の差異で羽性を判別する手法が報告されてきた (Smith and Levin, 1991; Iraqi and Smith, 1994; 野田ら, 2006; 中村ら, 2009)。しかし, これまでロードアイランドレッドの羽性を判別する変異は報告されていない。本研究では, 事前に遅羽性と速羽性のロードアイランドレッドにおける UR の塩基配列を比較したが, 羽性を判別する SNP を検出することができなかった (データ未発表)。そこで羽性遺伝子領域に存在する *PRLR* および *SPEF2* のエクソン配列比較を試みた。ただし, *K* 遺伝子の不完全重複内に存在する *PRLR* および *SPEF2* のエクソン配列を PCR で増幅する場合, UR に連鎖するエクソンと OR に連鎖するエクソンの両方の増幅が予測され (図 1), UR 側と OR 側の配列を判別することは難しいと考えられた。そのため, 本研究では不完全重複の外側に位置する *SPEF2* のエクソン配列を比較した (図 1)。本研究で検出した c.684C > T は, *SPEF2* のエクソン 5 に存在し, 遅羽性では T/T, T/C, T/- を示し, 速羽性では C/C, C/- を示した (表 3)。雌では羽性と遺伝子型が完全に一致しており, ロードア

일랜드レッドでは不完全重複配列の外側に存在する SNP で羽性を分離できると考えられた。

c.684C > T において, 遅羽性の雄の遺伝子型は, T/T と T/C を示した (表 3)。JS の存在を確認するだけでは, 遅羽性のホモ接合体 (K/K) とヘテロ接合体 (K/k^+) を分離することができないため, T/C を示した雄が K/k^+ であることを確認できれば, 遅羽性の雄の効率的な選抜につながる。そこで, 遺伝子型が T/C の雄と T/- および C/- の雌を交配して後代鶏を作出した。その結果, 後代鶏は遅羽性と速羽性を示した (表 4)。親世代から C アレルを受け継いだ後代鶏の雌 28 羽はすべて速羽性を示したことから, C アレルは k^+ 遺伝子と完全に連鎖しており, 遺伝子型が T/C の雄はヘテロ接合体 (K/k^+) であることが明らかになった。この事実から, c.684C > T はロードアイランドレッドの遅羽性個体を効率よく選抜するための有力な SNP になり得ると考えられた。

ロードアイランドレッドを雌系として利用した地鶏は数多く作出されている (全国地鶏・銘柄鶏ガイドブック, 2017)。また, 家畜改良センター岡崎牧場で育種改良されているロードアイランドレッドは, 卵肉兼用種である「岡崎おうはん」の雌系として利用される。これらの地鶏や卵肉兼用種において, 雄を速羽性 (k^+/k^+) の品種, 雌を遅羽性 ($K/-$) のロードアイランドレッドで交配した場合, 後代鶏の雄は遅羽性 (K/k^+), 雌は速羽性 ($k^+/-$) となり, 羽性による雌雄鑑別が可能となる。本研究の結果から, ロードアイランドレッドの羽性は c.684C > T で判別可能であるため, ロードアイランドレッドの利用を検討している関係者には有益な情報である。ただし, 地鶏や卵肉兼用種の交配に利用されるロードアイランドレッドは, 全国各地で独自に育種改良されているものもあり, 遺伝的多様性をもつことが予測される (全国地鶏・銘柄鶏ガイドブック, 2017)。また, これまでの研究において表現型は同じ羽性でも, 品種間, 系統間で羽性判別に利用可能な UR の塩基配列は異なることが報告されている (Smith and Levin, 1991; 中村ら, 2009; Kansaku *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2018)。そのため, DNA レベルで羽性判定や遅羽性遺伝子型を判定する際には, 品種, 系統ごとに羽性と関連する変

異を確認する必要がある。したがって、今後は c.684C > T がロードアイランドレッドの他の系統あるいは他の品種でも利用可能かを調べる必要があるだろう。

以上の結果から、本研究で検出した c.684C > T は羽性遺伝子と完全に連鎖しており、ロードアイランドレッドの羽性を遺伝子レベルで分離することが可能となった。さらに遅羽性の雄の K/K と K/k^+ を分離できることから、遅羽性を効率よく選抜できる分子マーカーになり得ると考えられる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、羽性判別、血液サンプルの収集に尽力頂きました家畜改良センター岡崎牧場の関係者に深く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.
- Boulliou A, Le Pennec JP, Hubert G, Donal R, Smiley M. The endogenous retroviral $ev21$ locus in commercial chicken lines and its relationship with the slow-feathering phenotype (K). *Poultry Science*, 71 : 38-46. 1992.
- Bu G, Huang G, Fu H, Li J, Huang S and Wang Y. Characterization of the novel duplicated $PRLR$ gene at the late-feathering K locus in Lohmann chickens. *Journal of Molecular Endocrinology*, 51 : 261-276. 2013.
- Elferink MG, Vallée AA, Jungerius AP, Crooijmans RP and Groenen MA. Partial duplication of the $PRLR$ and $SPEF2$ genes at the late feathering locus in chicken. *BMC Genomics*, 9 : 391-400. 2008.
- 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.
- Kansaku N, Guémené D, Nakamura A and Uchida M. Sequence Characterization of K -gene Linked Region in Various Chicken Breeds. *Journal of Poultry Science*, 48 : 181-186. 2011.
- Levin I, 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*, 11 : 2017-2026. 1990.
- Nakamura A, Ishikawa A, Nagao K, Watanabe H, Uchida M and Kansaku N. Characteristics of reversion to early feathering phenotype in the late feathering line of Nagoya breed chickens. *Journal of Poultry Science*, 48 : 155-161. 2011.
- 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・小林正直・野田賢治・近藤 一・神作宜男. PCR-RFLP 法を用いた名古屋種の遅羽性遺伝子型判定. 日本家禽学会誌, 46 : J9-J15. 2009.
- 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 : J153-J160. 2006.
- Okamura A, Masumoto A, Takenouchi A, Kudo T, Aizawa S, Ogoshi M, Takahashi S, Tsudzuki M and Takeuchi S. Changes in prolactin receptor homodimer availability may cause late feathering in chickens. *General and Comparative Endocrinology*, 272 : 109-116. 2019.
- Smith EJ, 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.
- Takenouchi A, Toshishige M, Ito N and Tsudzuki M. Endogenous viral gene $ev21$ is not responsible for the expression of late feathering in chickens. *Poultry Science*, 97 : 403-411. 2018.
- Tixier-Boichard MH, Benkel BF, Chambers JR and Gavora JS. Screening chickens for endogenous virus $ev21$ viral element by the polymerase chain reaction. *Poultry Science*, 73 : 1612-1616. 1994.
- Warren D. C. Inheritance of rate of feathering in poultry. *Journal of Heredity*, 16, 13-18. 1925.
- Zhang X, Wang H, Zhang L, Wang Q, Du X, Ge L, Zhou R, Li L and Li X. Analysis of a genetic factors contributing to feathering phenotype in chickens. *Poultry Science*, 97 : 3405-3413. 2018.
- 全国地鶏・銘柄鶏ガイドブック 2017. 一般社団法人日本食鳥協会. 2017.
- Zhao J, Yao J, Li F, Yang Z, Sun Z, Qu L, Wang K, Su Y, Zhang A, Montgomery SA, Geng T and Cui H. Identification of candidate genes for chicken early- and late-feathering. *Poultry Science*, 95 : 1498-1503. 2016.

A Single-Nucleotide Polymorphism Linked to the Late-Feathering Gene in Rhode Island Red Chickens

Shin-ichi Sato¹, Tsuyoshi Ohtake¹, Satoshi Inou² and Takatoshi Kojima¹

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

²National Livestock Breeding Center Okazaki Station, Okazaki, Aichi 444-3161, Japan

Late feathering (LF) and early feathering (EF) phenotypes are used to identify the sex at hatching. The LF gene *K* on the Z chromosome is closely linked to the junction site (JS) of fragments of the *prolactin receptor (PRLR)* and *sperm flagellar protein 2 (SPEF2)* genes, and JS has been used as a marker for identifying LF chickens. In this study, we investigated the effects of presence and absence of JS in Rhode Island Red chickens kept at the National Livestock Breeding Center Okazaki Station, and we assessed single-nucleotide polymorphisms (SNPs) linked to the *K* gene. JS was amplified through polymerase chain reaction (PCR), and PCR products were observed in all LF but not in EF Rhode Island Red chickens. *SPEF2* exons were investigated in LF and EF chickens, and sequence analysis revealed that a synonymous SNP (c.684C > T) in *SPEF2* was linked to the feathering phenotype and that LF corresponded to T/T and T/C genotypes in males and to the T/— genotype in females, whereas EF corresponded to the C/C genotype in males and to C/— in females. We thus confirmed that this polymorphism is a marker to distinguish *K/K* males from *K/k*⁺ males in LF Rhode Island Red chickens. Therefore, the c.684C > T polymorphism can be used for selecting feathering phenotypes in Rhode Island Red chickens.

(*Japanese Journal of Poultry Science*, 59 : J29-J34, 2022)

Key words : Rhode Island Red, feathering phenotype, sexing, late-feathering gene, SNP