

《研究ノート》

## 遅羽性遺伝子と連鎖する一塩基多型を利用した 比内地鶏初生ヒナの羽性鑑別の検証

力丸宗弘<sup>1</sup>・大竹 剛<sup>2</sup>・佐藤慎一<sup>2</sup>・福田 栞<sup>1</sup>・鹿野亜海<sup>1</sup>・田澤 謙<sup>1</sup>・菅原二千字<sup>1</sup>・小島孝敏<sup>2</sup>

<sup>1</sup>秋田県畜産試験場, 秋田県大仙市字神宮寺字海草沼谷地 13-3 019-1701

<sup>2</sup>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

家畜改良センター岡崎牧場のロードアイランドレッド(岡崎 RIR)では羽性遺伝子と連鎖する *sperm flagellar protein 2* 遺伝子 (*SPEF2*) の一塩基多型 (SNP) c.684C > T により羽性を遺伝子レベルで分離できることが報告されている。比内地鶏は比内鶏の雄とロードアイランドレッドの雌との交配による一代交雑種であるが, 比内地鶏を生産するために利用しているロードアイランドレッドの系統(秋田 RIR)には岡崎 RIR が交配されており, 遅羽性の個体が存在する。そこで本研究では, 比内地鶏初生ヒナの羽性鑑別を可能にすることを目的として, 当該 SNP 情報を用いて速羽性の比内鶏の雄と遅羽性の秋田 RIR の雌を交配し, 比内地鶏初生ヒナの羽性鑑別を試みた。

*SPEF2* c.684C > T の遺伝子型はリアルタイム PCR による SNP アッセイにより判定した。*SPEF2* c.684C > T の遺伝子型から速羽性の比内鶏の雄と遅羽性の秋田 RIR の雌を交配して比内地鶏をふ化し, 羽性鑑別の精度を調査した。*SPEF2* c.684C > T の遺伝子型を調査した結果, 遅羽性の秋田 RIR の雌はすべて T/− を示し, 速羽性の比内鶏の雄はすべて C/C, 雌はすべて C/− を示した。速羽性の比内鶏の雄と遅羽性の秋田 RIR の雌を交配した結果, 速羽性と遅羽性のヒナが得られ, 雌は C/−, 雄は T/C を示した。羽性鑑別の精度は雄で 99.3%, 雌で 97.7%, 全体で 98.6% であった。実際の比内地鶏の生産現場に合わせ, 比内地鶏を再度ふ化し, 羽性鑑別の精度を調査した結果, 雌の適合率は 97.7% であった。

以上の結果から, *SPEF2* c.684C > T の遺伝子情報を用いて速羽性の比内鶏の雄と遅羽性の秋田 RIR の雌を交配することにより, 比内地鶏の羽性鑑別が可能となることが確認された。

キーワード: 比内地鶏, 雌雄鑑別, SNP, *SPEF2*, 遅羽性遺伝子, 羽性

### 緒 言

比内地鶏は肉のうま味が強く, 独特の風味ときめ細かな黄色い脂肪球が特徴であり, 秋田県の郷土料理であるきりたんぼ鍋には欠かせない食材である。鶏肉は一般的に雌雄とも飼育されて食鳥処理されているが, 比内地鶏は雄と雌では脂ののりが異なる等 (Rikimaru *et al.*, 2009) の理由から飼育されるほとんどが雌である。そのため, 比内地鶏のヒナのふ化場では, 初生ヒナの段階で雌雄判別が必要となり, 鑑別師が総排泄腔の生殖突起の有無によって性判別する肛門鑑別により雌雄判別を行っている。しかし, 東北地域においては鑑別師の高齢化による後継者不足や誤鑑別の増加が懸念されており, 生産現場から肛門鑑別の代わりとなり得る鑑別手法の確立が望まれている。

ニワトリ初生ヒナの肛門鑑別に変わる手法として, 羽性(遅羽性, 速羽性)や羽色(銀色, 金色)の違いを利用した方法が利用

されている (Etches, 1996; Kaleta and Redmann, 2008; 都築と後藤, 2009)。羽性や羽色を利用した雌雄鑑別の大きな利点は, 肛門鑑別と比較して 2~3 倍の速さで雌雄鑑別できること, 初生ヒナ鑑別師の資格がなくても容易に性判別ができることなどである。羽性鑑別は 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, 産まれるヒナは雄が遅羽性 ( $K/k^+$ ), 雌が速羽性 ( $k^+/−$ ) となり, 簡易に初生ヒナの雌雄鑑別が可能となる (Warren, 1925)。現在, この交配様式を用いて, 卵用鶏や肉用鶏の実用鶏の作出に利用されている (Etches, 1996; 島田, 2002)。地鶏では名古屋種において遅羽性系統の造成が行われている (野田ら, 2006a)。

羽性による雌雄鑑別を行うためには, 雄種鶏を速羽性 ( $k^+/k^+$ ) に, 雌種鶏を遅羽性 ( $K/−$ ) に完全に固定することが必要となるが, 雌系統を遅羽性に固定する際, 遅羽性遺伝子がホモ接合体 ( $K/K$ ) とヘテロ接合体 ( $K/k^+$ ) の雄はいずれも初生ヒナの翼羽形態が遅羽性を示すため, 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, 遅羽性の雄が性成熟した後に速羽性の雌と交配させ, 産まれたヒナの羽性を判別する後代検定が必要となる。しかし, 後代検定には莫大な時間や労力を要することから, これに代わる手法として羽装の形態的差異に着目した遅羽

2023 年 1 月 26 日受付, 2023 年 6 月 16 日受理

連絡者: 力丸宗弘

〒019-1701 秋田県大仙市神宮寺字海草沼谷地 13-3

Tel: 0187-72-3813

Fax: 0187-72-2807

E-mail: Rikimaru-Kazuhiro@pref.akita.lg.jp

性の遺伝子型を判定する方法が試みられている (Siegel *et al.*, 1957; 野田ら, 2006b; 中村ら, 2010a)。

一方, 分子生物学的手法の進歩により, DNA レベルでの遅羽性遺伝子の研究も進んでいる。Bacon *et al.*, (1988) はニワトリ白血ウイルス由来の内在性ウイルス遺伝子 *ev-21* と *K* 遺伝子が関連していることを確認し, Levin and Smith (1990) は *K* 遺伝子は *ev-21* が挿入された領域と *ev-21* が挿入されていない領域の重複配列からなることを報告した。Smith and Fadly (1994) は *ev-21* が *K* 遺伝子を検出するための DNA マーカーとなり得ることを示し, *ev-21* の挿入を調べることで白色レグホーンや名古屋種において遅羽性と速羽性の判別が可能となっている (Iraqi and Smith 1994; 中村ら, 2002)。また, *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) を比較すると, それらの塩基配列には差異があることから, 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* 遺伝子の遺伝子型を判定することも可能となっている (Smith and Levin, 1991; Iraqi and Smith 1994; 野田ら, 2006b; 中村ら, 2009)。

*K* 遺伝子には 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) が存在し (Elferink *et al.*, 2008), 遅羽性には *dPRLR*, *dSPEF2*, それらの結合部位である JS が関与していることが報告されている (Bu *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2016; Takenouchi *et al.*, 2018)。最近, 佐藤ら (2022) 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 (岡崎 RIR) において, 不完全重複領域の外側に位置する *SPEF2* のエクソン配列を調査した結果, JS と完全に連鎖する一塩基多型 (SNP) (*SPEF2* c.684 C > T) を検出し, 羽性や遅羽性の遺伝子型を分離できることを見出した。

比内地鶏は比内鶏の雄とロードアイランドレッドの雌との交配による一代交雑種であるが, 比内地鶏を生産するために利用しているロードアイランドレッドの系統 (秋田 RIR) には岡崎 RIR が交配されており, 遅羽性の個体が存在する。また, 比内鶏は羽性の表現型が速羽性である。これらのことから, 比内地鶏を生産する両品種において, 遅羽性に固定した秋田 RIR の雌と速羽性の比内鶏の雄を交配すれば, 比内地鶏の初生雌ヒナは速羽性に, 初生雄ヒナは遅羽性となり, 羽性鑑別が可能となる。そこで, 本研究では表現型が速羽性の比内鶏と遅羽性の秋田 RIR において *SPEF2* c.684 C > T が利用可能かを確認し, 比内鶏の雄と秋田 RIR の雌を交配することによって, 比内地鶏初生ヒナの羽性鑑別が可能か, 検証することを目的とした。

## 材料と方法

### 1. 試験 1 (秋田 RIR と比内鶏における *SPEF2* c.684 C > T の遺伝子型判定)

#### (1) 供試鶏

秋田県畜産試験場で飼養する秋田 RIR (2021 年度生) および比内鶏 (2020 年度生) を供試した。秋田 RIR はふ化場で比内地

鶏を生産する際に利用されている系統 (雄系統と雌系統との交配による組み合わせ) で表現型が遅羽性である雌 64 羽, 速羽性の比内鶏は種鶏として維持している雄 22 羽, 雌 436 羽について調査した。

#### (2) *SPEF2* c.684 C > T の遺伝子型判定

ゲノム DNA は QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて血液から抽出した。羽性遺伝子型の判定は, 羽性遺伝子と連鎖する *SPEF2* の SNP (c.684 C > T) (佐藤ら, 2022) を標的とした蛍光プローブ (TaqMan MGB プローブ, Product number: 4332077, Assay Name: c\_SPEF2ex5, Assay ID: ANZTPJV, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いた SNP ジェノタイプングアッセイにより行った。TaqMan SNP assay は Takara Premix EX Taq™ (Probe qPCR) (タカラバイオ, 滋賀, 日本) を利用し, 反応はゲノム DNA 20ng を 1  $\mu$ l, PCR マスターミックス EX Taq を 6.25  $\mu$ l, プローブ 0.1 pmol, プライマー 11.25 pmol を 0.313  $\mu$ l, ROX を 0.25  $\mu$ l, SIGMA Water (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を 4.69  $\mu$ l, 合計 12.5  $\mu$ l で行った。反応は 95°C 1 秒間の熱変性, 60°C 20 秒のアニーリング, 60°C 20 秒の伸長反応を 40 サイクル行う条件とした。ポジティブコントロールには岡崎 RIR の遅羽性個体 (ホモ接合体, ヘミ接合体, ヘテロ接合体) および速羽性個体を, ネガティブコントロールには SIGMA Water (Merck KGaA) を用いた。*SPEF2* c.684 C > T の遺伝子型判定は Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用い, C/C あるいは C/ーが検出された場合は速羽性, C/T が検出された場合は遅羽性のヘテロ接合体, T/T あるいは T/ーが検出された場合は遅羽性のホモ接合体あるいはヘミ接合体として遺伝子型の判定を行った。

### 2. 試験 2 (比内地鶏初生ヒナの羽性鑑別の検証)

#### (1) 供試鶏

*SPEF2* c.684 C > T の遺伝子型判定後, 速羽性の比内鶏の雄と遅羽性の秋田 RIR の雌を交配して得られた比内地鶏 282 羽 (2022 年 4 月 13 日ふ化) について羽性鑑別の精度を調査した。

#### (2) 羽性鑑別による比内地鶏初生ヒナの表現型

ふ化時に畜産試験場職員が羽性を確認後, 翼帯を脚に巻き, 4 週齢までバタリー育雛器で飼育した。

#### (3) 性別別マーカーによる性別別

性別別は市川ら (2006) の性別別マーカー (フォワードプライマー: 5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3'; リバースプライマー: 3'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-5') を用いて行った。ゲノム DNA は前述した方法で抽出した。PCR は KOD FX (東洋紡, 大阪, 日本) を利用し, PCR 反応はゲノム DNA を 20ng, 各プライマーを 6.25 pmol, dNTP を 0.4 mM, 1×PCR バッファー, KOD FX DNA Polymerase を 0.25 U, 合計 15  $\mu$ l で行った。PCR の条件は 94°C 2 分間の後, 98°C 10 秒の熱変性, 55°C 30 秒のアニーリング, 68°C 30 秒の伸長反応を 35 サイクル行う条件で増幅した。PCR 産物はエチジウムプロマイド入りの 2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い, 性を判別した。

#### (4) *SPEF2* c.684 C > T の遺伝子型判定

比内地鶏における *SPEF2* c.684 C > T の遺伝子型判定は前述

した方法で行った。

(5) 羽性鑑別の精度

比内地鶏の羽性鑑別の誤判定は性別別マーカーの性別別結果および *SPEF2* c.684C > T の遺伝子型判定結果によって判定し、羽性鑑別の適合率を求めた。

3. 試験3 (比内地鶏初生雌ヒナにおける羽性鑑別の精度)

(1) 供試鶏

次に実際の比内地鶏の生産現場に合わせ、比内鶏の雄と遅羽性の秋田 RIR の雌を交配して再度比内地鶏 573 羽をふ化し (2022 年 6 月 1 日ふ化)、比内地鶏初生雌ヒナにおける羽性鑑別の精度を調査した。

(2) 比内地鶏初生雌ヒナの羽性鑑別および性別別

ふ化時における羽性の確認は前述した方法で行った。その後、羽性鑑別で雌と判定された個体について、外見で雌雄を確認できるまで飼育し、羽性鑑別の適合率を求めた。

4. 動物実験の倫理的承認

本研究は秋田県畜産試験場の動物実験委員会の承認 (2022 年

度 受付番号 3) を受けて実施した。

結 果

1. 試験1 (秋田 RIR および比内鶏における *SPEF2* c.684C > T の遺伝子型判定)

*SPEF2* c.684C > T の遺伝子型を調査した結果、表現型が遅羽性である秋田 RIR の雌 64 羽はすべて T/- を示し、速羽性の比内鶏の雄 22 羽はすべて C/C、雌 436 羽はすべて C/- を示した (表 1, 図 1)。

2. 試験2 (比内地鶏初生ヒナの羽性鑑別の検証)

(1) 羽性鑑別による比内地鶏初生ヒナの表現型

速羽性の比内鶏の雄と遅羽性の秋田 RIR の雌を交配した結果、速羽性と遅羽性の初生ヒナが得られた (図 2)。羽性鑑別による比内地鶏初生ヒナの表現型を表 2 に示した。比内地鶏 282 羽について羽性を確認した結果、速羽性が 132 羽、遅羽性が 150 羽であった。

表 1. ロードアイランドレッドおよび比内鶏における *SPEF2* c.684C > T の遺伝子型判定結果

品種	表現型	性	羽数	遺伝子型*		
				T/T T/-	T/C	C/C C/-
ロードアイランドレッド	遅羽性	雌	64	64	0	0
比内鶏	速羽性	雄	22	0	0	22
		雌	436	0	0	436

\*雄：T/T, T/C, C/C, 雌：T/-, C/-

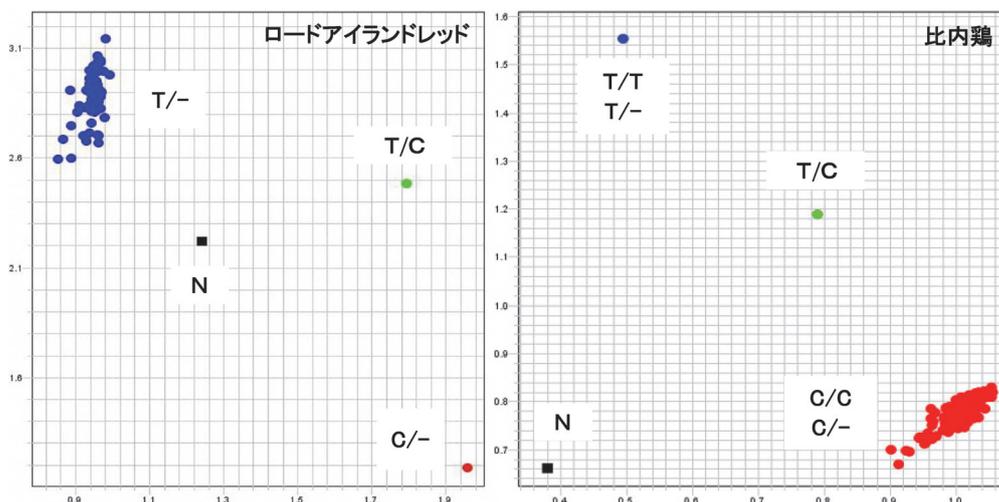


図 1. ロードアイランドレッドおよび比内鶏における *SPEF2* c.684C > T の遺伝子型判定の例  
 ロードアイランドレッドは表現型が遅羽性の雌  
 比内鶏は表現型が速羽性の雌雄  
 T/T, T/- : 遅羽性 (ホモ接合体, ヘミ接合体), T/C : 遅羽性 (ヘテロ接合体), C/C, C/- : 速羽性,  
 N : ネガティブコントロール  
 雄 : T/T, T/C, C/C, 雌 : T/-, C/-  
 ポジティブコントロールには岡崎 RIR の遅羽性個体 (ホモ接合体, ヘミ接合体, ヘテロ接合体) および速羽性個体を、ネガティブコントロールには SIGMA Water を用いた。

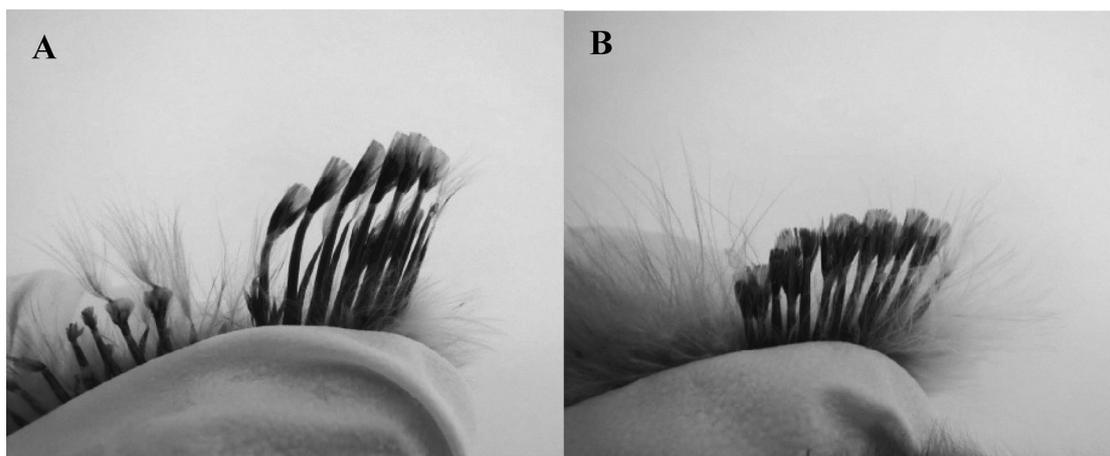


図 2. 比内地鶏初生ヒナの翼羽の形状  
A: 速羽性, B: 遅羽性

表 2. 羽性鑑別による比内地鶏初生ヒナの表現型

鑑別羽数*	表現型	
	遅羽性	速羽性
282	150	132

\* 鑑別羽数: 職員による羽性鑑別

(2) 性判別マーカーによる性判別, *SPEF2* c.684C > T の遺伝子型判定および羽性鑑別の精度

比内地鶏における性判別マーカーの性判別結果, *SPEF2* c.684C > T の遺伝子型判定結果および羽性鑑別の精度を表 3 に示した。性判別マーカーを用いて雌雄を確認した結果, 雌は 130 羽, 雄は 152 羽であった。次にリアルタイム PCR を用いて *SPEF2* c.684C > T の遺伝子型を確認した結果, 152 羽が T/C (雄), 130 羽が C/- (雌) を示し, 雌雄は性判別マーカーの結果とすべて一致していた (図 3)。性判別マーカーの性判別結果および *SPEF2* c.684C > T の遺伝子型判定結果から羽性鑑別の誤判定を調査した結果, 雄 150 羽中 1 羽が雌, 雌 132 羽中 3 羽が雄であった。羽性鑑別の適合率は雄で 99.3%, 雌で 97.7%, 全体で 98.6% であった。

### 3. 試験 3 (比内地鶏初生雌ヒナにおける羽性鑑別の精度)

比内地鶏初生雌ヒナの羽性鑑別の精度を表 4 に示した。比内地鶏の雌雄を外見で判断できるまで飼育して調査した結果, 雌と鑑別した 303 羽中 7 羽が実際には雄であり, 羽性鑑別の適合率は 97.7% であった。

## 考 察

本研究では, 性判別の手法として従来の肛門鑑別の代替となりうる比内地鶏初生ヒナの羽性鑑別の可能性について検証した。初めに表現型が遅羽性の秋田 RIR において *SPEF2* c.684C > T の遺伝子型を確認し, 次に速羽性の比内地鶏の雄と遅羽性の秋田 RIR の雌を交配して得られた比内地鶏初生ヒナの羽性鑑別の精度を調査した。

佐藤ら (2022) は岡崎 RIR において, *PRLR* と *SPEF2* の不完全重複内の部分的断片における JS と完全に連鎖する *SPEF2* の SNP (c.684C > T) を検出し, 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/- を示し, 岡崎 RIR の羽性を遺伝子レベルで分離できることを見出した。当場で比内地鶏を生産するために利用している秋田 RIR の系統には岡崎 RIR が交配されており, 遅羽性の個体が存在する。また, 比内地鶏は羽性の表現型が速羽性である。これらのことから, 比内地鶏を生産するために利用する秋田 RIR を *SPEF2* c.684C > T で遅羽性に固定し, 遅羽性の秋田 RIR の雌と速羽性の比内地鶏の雄を交配することで比内地鶏の羽性鑑別の可能性が考えられた。そこで, 表現型が遅羽性である秋田 RIR の雌について *SPEF2* c.684C > T の遺伝子型を調査した。その結果, すべての雌が T/- を示し, 岡崎 RIR の遺伝子型と一致していた。これらの結果から, 岡崎 RIR の血が導入された系統においても遅羽性である雌は *SPEF2* c.684C > T の遺伝子型が T/- を示すことが確認された。比内地鶏については表現型が速羽性であり, 雄は C/C, 雌は C/- とすべての個体が速羽性の遺伝子型を示したが, 遅羽性の個体が存在しないため, 羽性と *SPEF2* c.684C > T との関連性を確認することはできなかった。過去の研究において, 表現型が同じ羽性でも, 品種や系統間で羽性判別に利用可能な UR の塩基配列が異なる (Smith and Levin, 1991; 中村ら, 2009; Kansaku *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2018) ことが報告されている。そのため, 当該 SNP の利用に当たっては速羽性と遅羽性の個体が存在する品種や系統において, 羽性との関連性を確認する必要がある。

*SPEF2* c.684C > T の遺伝子型判定後, 速羽性の比内地鶏の雄と遅羽性の秋田 RIR の雌を交配することにより, 速羽性と遅羽性の比内地鶏の初生ヒナが得られた。表現型および性判別マーカーを用いて雌雄を確認後, リアルタイム PCR による SNP ジェノタイピングアッセイを行った結果, 速羽性の初生雌ヒナと遅羽性の初生雄ヒナの *SPEF2* c.684C > T の遺伝子型はそれぞれ C/-, T/C を示し, 性判別マーカーの結果と一致していた。この結果は比内地鶏の雌は比内地鶏から C アリルを受け継ぎ, 比内地

表 3. 比内地鶏における性判別マーカーの性判別結果, *SPEF2* c.684C > T の遺伝子型判定結果および羽性鑑別の精度

性判別マーカー*		c.684C > T**			羽性鑑別	誤判定数	適合率 (%)	
		T/T T/-	T/C	C/C C/-			雌雄別	合計
雄	152	0	152	0	150	1	99.3	98.6
雌	130	0	0	130	132	3	97.7	

\* 性判別マーカー：市川ら（2006）の性判別マーカーを用いた。

\*\* 雄：T/T, T/C, C/C, 雌：T/-, C/-

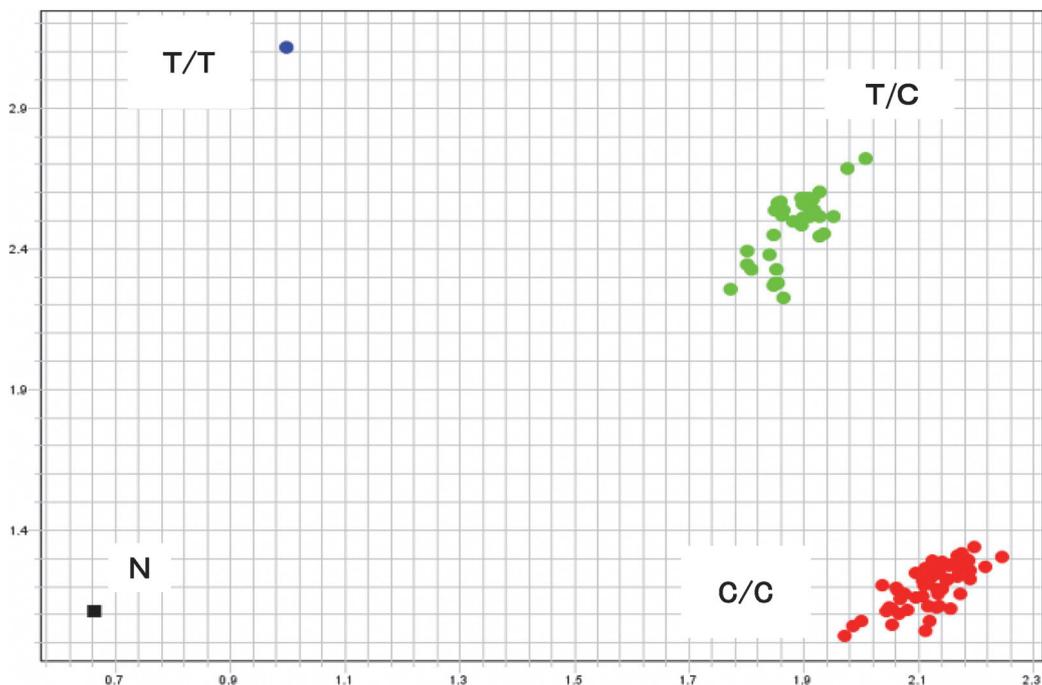


図 3. 比内地鶏における *SPEF2* c.684C > T の遺伝子型判定の例

比内地鶏は速羽性の比内鶏雄と遅羽性のロードアイランドレッド雌を交配して作出

T/T, T/-：遅羽性（ホモ接合体，ヘミ接合体），T/C：遅羽性（ヘテロ接合体），C/C, C/-：速羽性，N：ネガティブコントロール

雄：T/T, T/C, C/C, 雌：T/-, C/-

ポジティブコントロールには岡崎 RIR の遅羽性個体（ホモ接合体，ヘミ接合体，ヘテロ接合体）および速羽性個体を，ネガティブコントロールには SIGMA Water を用いた。

表 4. 比内地鶏初生雌ヒナの羽性鑑別の精度

鑑別羽数*	鑑別結果 雌	誤判定数	雌の適合率 (%)
573	303	7	97.7

\* 鑑別羽数：職員による羽性鑑別

鶏の雄は比内鶏から C アリルを秋田 RIR から T アリルを受け継いでいることを示しており，当該 SNP が比内地鶏初生ヒナの羽性鑑別に有効な SNP になり得ることが示された。白色レグホーンや名古屋種における分子生物学的手法を用いた羽性判別では，UR における塩基配列の差異を PCR-RFLP 法でアガロースゲル

を用いて電気泳動を行い，異なるバンドパターンによって羽性あるいは遅羽性の遺伝子型を判定する手法が報告されているが (Smith and Levin 1991 ; Iraqi and Smith, 1994 ; 野田ら, 2006b ; 中村ら, 2009), アガロースゲルによる電気泳動の場合はバンドの有無が確認しづらいこともあり，羽性や遅羽性の遺伝子型を正確に判定できない可能性もある。一方，リアルタイム PCR による SNP ジェノタイピングアッセイでは，アガロースゲルを作製する手間もなく，容易にかつ確実に羽性や遅羽性の遺伝子型を判定することが可能であることから本手法は羽性および遅羽性の遺伝子型を判定するための有効な手法になると考えられる。

性判別および *SPEF2* c.684C > T の遺伝子型から比内地鶏初生ヒナの羽性鑑別の精度を調査した結果，羽性鑑別の全体の適合

率は 98.6% であり、雌だけの場合は 97.7% であった。次に実際の比内地鶏の生産現場に合わせ、比内地鶏の初生雌ヒナについて羽性鑑別の精度を調査した結果、雌の適合率は 97.7% であった。比内地鶏の生産現場における初生雌ヒナの誤鑑別率は 2% 前後である (未公表)。羽性鑑別では雌の誤鑑別率が 2 回とも 2.3% であり、一般的な比内地鶏の誤鑑別率と同等であったことから、本技術は生産現場において利用可能と考えられる。しかしながら、羽性鑑別は初生雛鑑別師の資格がない人でも容易に性判別ができる利点がある反面、正しい鑑別方法で実施しなければ、その精度は著しく低下し、初心者と熟練者では羽性鑑別の精度が異なることが確認されている (中村ら, 2010b)。中村ら (2010b) は名古屋種の初生ヒナについて羽性鑑別で誤判定したヒナの翼部の形態を観察し、羽性の判定基準を変更することによって、羽性鑑別の精度を改善できることを報告している。今回の試験では、誤判定したヒナの翼部の形態まで確認できなかったが、今後、比内地鶏の生産現場において本技術を利用するためには、比内地鶏独自の羽性の判定基準を策定し、ふ化場の職員でも羽性鑑別が可能となるように精度を高めていく必要がある。

以上の結果から、*SPEF2* の c.684C > T の遺伝子情報を用いて遅羽性の秋田 RIR と速羽性の比内地鶏の雄を交配することにより比内地鶏の羽性鑑別が可能となることが確認された。今後は、*SPEF2* c.684C > T の遺伝子情報を用いて当場の秋田 RIR の雄系統を遅羽性に固定していく予定である。

## 謝 辞

供試鶏の飼育管理を担当していただいた秋田県畜産試験場比内地鶏エリアの皆様へ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.

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. *MBC Genomics*, 9 : 391. 2008.

Etches RJ. Growth and sexual maturation. In : *Reproduction in poultry*. pp. 74-105. CAB International. Wallingford. 1996.

市川あゆみ・市村卓也・中村明弘・野田賢治・加藤泰之. 遺伝子診断による文鳥の性別判別技術. 愛知県農業総合試験場研究報告, 38 : 175-180. 2006.

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.

Kaleta EF and Redmann T. Approaches to determine the sex prior to and after incubation of chicken eggs and of day-old chicks. *World's Poultry Science Journal*, 64 : 391-399. 2008.

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 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.

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雄の遅羽性遺伝子型判定. 日本家禽学会誌, 46 : J9-J15. 2009.

中村明弘・神作宜男・近藤 一・野田賢治. 羽性遺伝子型の違いによる名古屋種雄の羽性形質の特徴. 日本家禽学会誌, 47 : J78-J84. 2010a.

中村明弘・長尾健二・恒川豊芳・木野勝敏・野田賢治・近藤 一. 名古屋種初生ヒナの羽性鑑別の精度. 愛知県農業総合試験場研究報告, 42 : 107-112. 2010b.

野田賢治・伊藤裕和・恒川豊芳・木野勝敏・箕浦正人・市川あゆみ・中村明弘・加藤泰之. 愛知県における名古屋種の育種改良と飼育管理技術の開発. 日本家禽学会誌, 43 : J110-J118. 2006a.

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. 2006b.

Rikimaru K, Ogawa H, Komatsu and Ishizuka J. Effect of caponization on meat quality of Hinai-jidori chicken. *The Journal of Poultry Science*, 46 : 345-350. 2009.

佐藤慎一・大竹 剛・稲生 哲・小島孝敏. 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. 日本家禽学会誌, 59 : J29-J34. 2022.

Siegel PB, Mueller CD and Craig JV. Some phenotypic differences among homozygous, heterozygous, and hemizygous late feathering chicks. *Poultry Science*, 36 : 232-239. 1957.

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. 日本家禽学会誌, 39 : J172-J176. 2002.

Smith EJ and Fadly AM. Male-mediated venereal transmission of endogenous avian leukosis virus. *Poultry Science*, 73 : 488-494. 1994.

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.

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.

都築政起・後藤直樹. ニワトリおよびウズラにおける遺伝育種学的研究の 100 年. 日本家禽学会誌, 46 : J23-J29. 2009.

Warren DC. 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.

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.

## Verification of Feather Sexing in Newly Hatched Hinai-jidori Chicks using a Polymorphism Linked to Late-Feathering Gene

Kazuhiro Rikimaru<sup>1</sup>, Tsuyoshi Ohtake<sup>2</sup>, Shin-ichi Sato<sup>2</sup>, Shiori Fukuda<sup>1</sup>, Ami Shikano<sup>1</sup>, Ken Tazawa<sup>1</sup>, Nichika Sugawara<sup>1</sup> and Takatoshi Kojima<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Akita Prefectural Livestock Experiment Station, Daisen, Akita, 019-1701, Japan

<sup>2</sup>National Livestock Breeding Center, Nishigo, Fukushima 961-8511, Japan

Recently, it was revealed that the feathering phenotype can be segregated by a single nucleotide polymorphism (SNP) of *sperm flagellar protein 2 (SPEF2)* c. 684 C > T linked to the feathering gene in Rhode Island Red of National Livestock Breeding Center Okazaki Station. Hinai-jidori is a cross between Hinai-dori sire and Rhode Island Red dam. When crossing one Rhode Island Red line of Akita Livestock Experiment Station with Rhode Island Red of Okazaki Station, National Livestock Breeding Center, some birds showed late-feathering. In this study, we attempted to differentiate the feathering phenotype of newly hatched Hinai-jidori chicks by crossing Hinai-dori males with late-feathering Rhode Island Red females using the SNP information. The genotype of *SPEF2* c. 684 C > T was confirmed using SNP assay with real-time PCR. The accuracy of feathering sexing was investigated by hatching Hinai-jidori chicks through crossing Hinai-dori males and late-feathering Rhode Island Red females from *SPEF2* c. 684 C > T genotypes. Genotyping of *SPEF2* c. 684 C > T confirmed that all late-feathering Rhode Island Red females showed T/- and late-feathering. All males and females of Hinai-dori were C/C and C/-, respectively, and we confirmed that they had early-feathering. Early- and late-feathering newly hatched Hinai-jidori chicks were obtained by crossing early-feathering Hinai-dori males with late-feathering Rhode Island Red females, showing C/- in females and T/C in males. The accuracy rates of sex determination were 99.3% for male chicks, 97.7% for female chicks, and 98.6% overall. We produced newly hatched Hinai-jidori chicks again according to the situation of poultry industry of Hinai-jidori and investigated the accuracy rate of sex determination in the Hinai-jidori female chicks; this was 97.7%. These results confirm that the genetic information of *SPEF2* c. 684 C > T can be used to differentiate the feathering phenotype of newly hatched Hinai-jidori chicks by crossing early-feathering Hinai-dori males and late-feathering Rhode Island Red females.

(*Japanese Journal of Poultry Science*, **60** : J67-J73, 2023)

**Key words** : Hinai-jidori, sexing, SNP, *SPEF2*, late-feathering gene, feathering phenotype