

三浦ら：地鶏の遺伝子ホモ化に伴う不良形質発現抑制技術に関する研究
地鶏の遺伝子ホモ化に伴う不良形質発現抑制技術に関する研究

三浦成見・藤木美佐子¹⁾・須藤正巳²⁾・合原義人・関俊雄・井上雅美³⁾

1) 現：北海道空知家畜保健衛生所, 2) 現：茨城県鹿行農林事務所, 3) 退職

Study for avoidance of decreased performance on the economically important traits with genotypes of DNA markers in Japanese native chicken

Narumi MIURA, Misako FUJIKI, Masami SDOU, Yoshito AIHARA, Toshio SEKI, Masami INOUE

要 約

当センターで維持している原種鶏は20年以上閉鎖群で維持されていることから、近交度の上昇による不良形質発現の可能性が懸念されており、これらを防止あるいは遅延させる飼養管理方法を検討した。試験区は、群外の雄を交配に供した循環交配区（A区）、過去の凍結精液を利用し飼養羽数を増加させた凍結精液利用区（B区）および対照区（C区）を設け、繁殖能力の表現形質調査と遺伝的多様性調査により世代変化を比較した。表現形質調査では、産卵率のみC区で低下が認められたが、その他の項目について低下は認められなかった。遺伝的多様性調査の結果、平均ヘテロ接合度を含む遺伝的多様性の値は、いずれの世代においても、A区とB区はC区に比べ高く推移しており、A区とB区は近交度の上昇が抑制されていることが示唆された。このことから、循環交配および飼養羽数増加と凍結精液の利用は近交度の上昇を抑制することができ、不良形質発現を遅らせる可能性が示された。これらの手法は、当センターで維持している鶏群での近交度上昇対策の一つとして利用できることが期待される。

キーワード：不良形質発現 凍結精液 遺伝的多様性 マイクロサテライトマーカー 地鶏

緒 言

当センターでは茨城県の銘柄地鶏である「奥久慈しゃも」の原種鶏を維持している。20年以上閉鎖群で維持していることから、今後、繁殖能力の低下などの不良形質の発現の可能性が懸念されている。

近年、分子生物学の進歩により、DNAマーカー情報による遺伝子解析が可能となっている。なかでも、マイクロサテライトマーカーは、多型性に富み、検出される対立遺伝子数も多いことから、集団の遺伝的多様性を解析するツールとして有効であり、ブタ¹⁾やニワトリ^{2)~5)}においても使用されている。

そこで、集団の繁殖能力の表現形質とともにマイクロサテライトマーカーによる遺伝的多様性を調査し、不良形質の発現を防止あるいは遅延させる飼養管理技術を開発し、長期にわたる安定的な種鶏の供給を目的として本試験を実施した。

材料および方法

当センターで維持している奥久慈しゃも雄系種鶏

である軍鶏を3つの交配試験区に分割飼育し、一年一世代の交配を繰り返し、それぞれの試験区における表現形質と遺伝的多様性の世代変化を比較した。

1 交配試験（図1）

A区：群外の雄を交配に供した循環交配区

雄40羽、雌80羽を平飼い、自然交配により群外（B区）の雄を交配し種卵を採取した。

B区：飼養羽数増加、過去の凍結精液利用区

雄60羽、雌130羽をケージ飼い、群内の雄の精液を用いた人工授精により種卵を採取した。凍結精液は、農水省のジーンバンク事業により20年間保存したものおよび当センターで2から5年間保存のものを利用した。基礎世代（G0）は約20年間保存の精液を、第1世代（G1）は約5年間保存の精液を、第2世代（G2）は約3年間保存の精液を、第3世代（G3）は約2年間保存の凍結精液をそれぞれ利用した。

C区：対照区

雄40羽、雌80羽を平飼い、群内で自然交配により種卵を採取した。

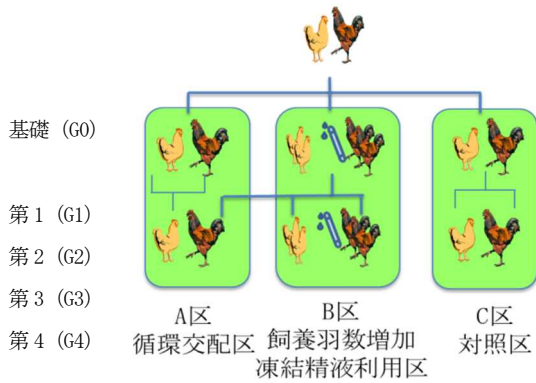


図1 交配イメージ

表2 PCR 反応組成および条件

PCR 組成		
Genome DNA (5ng/μl)		1 μl
2 μM each primer		2.5 μl
2×QIAGEN Multiplex PCR Master Mix		12.5 μl
Distilled Water		9 μl
PCR サイクル		
1 予備変性	98°C	15 分
2 変性	94°C	30 秒
アニーリング	X°C*	90 秒
伸長反応	72°C	60 秒
3 伸長反応	60°C	30 分

*アニーリング X°C : Multiplex 1, 2, 5, 6, 7=60°C,

Multiplex 3, 4=55°C

(3) データ解析

フラグメント解析により決定された遺伝子型をもとに、各マーカー座位の平均対立遺伝子数、実際に観察されたヘテロ接合体の割合 (Ho)、対立遺伝子の遺伝子頻度から期待される平均ヘテロ接合体度 (He) を算出し、集団の遺伝的多様性の指標とした。期待される平均ヘテロ接合体度は座位ごとに下記の式により算出し平均を算出した。

$$He = 1 - \sum Pi^2 \quad P: \text{各対立遺伝子の頻度}$$

また、DNA マーカーを用いた個体ごとの遺伝的多様性の指標として、各個体におけるホモ型を示すマーカーの割合を示すマーカー近交度を計算した⁶⁾。マーカー近交度は、各個体のそれぞれのマーカーにおいてヘテロ型を 0、ホモ型を 1 とし、全 DNA マーカーの総和をマーカー数で除して算出した⁷⁾。

結果

1 表現形質

受精率とふ化率は、A 区と C 区で 70% 以上を示し、世代による低下は認められなかった。B 区は、受精率では全世代をとおして 60% 以上を推移し、ふ化率も 80% 以上を推移した (表 3, 4)。

250 日齢から 300 日齢までの産卵率は、C 区では第 1 世代 (G1) で一旦上昇し、その後低下した。A 区は C 区に比べ、全世代をとおして高く推移した (p<0.05) (表 5)。平均卵重は、各区とも世代による低下は認められなかった (表 6)。精巣重量および雄体重

2 調査項目

1) 表現形質

すべての雌個体について受精率、ふ化率、250 日齢から 300 日齢のヘンハウス産卵率および平均卵重を調査した。また、雄個体は精巣重量および体重について各区 10 羽をランダム抽出し更新時 (380 日齢から 450 日齢) に測定した。

2) 遺伝的多様性調査

各区の鶏群のうちランダムに選択した鶏から血液を採取し、その全血を DNA 抽出の材料とした。検体数は表 1 に示した。

表 1 検体数

世代	A 区	B 区	C 区
基礎世代 (G0)	全区で 38		
第 1 世代 (G1)	40	40	40
第 2 世代 (G2)	43	93	43
第 3 世代 (G3)	40	115	40
第 4 世代 (G4)	40	115	40

(1) DNA 抽出

MAXWELL 16 Blood DNA Purification Kit (プロメガ社 AS1010) を用いて DNA 抽出を行った。

(2) マイクロサテライト DNA 多型の検出

ISAG/FAO 推奨のマイクロサテライトマーカー 30 座位を用いた。このうち、MCW0284 と LEI0192 の 2 マーカーは遺伝子型が得られた個体の割合が低かったため、以後の分析から除外した。PCR は、表 2 の反応組成および条件で Multiplex PCR を行った。PCR 産物を希釈し、ABI 3730 DNA sequencer を用いてフラグメント解析を行い、各座位の遺伝子型を決定した。

は、各区とも世代による低下は認められなかった(表7)。

表3 受精率の推移 (%)

世代	A区	B区	C区
G0	72.1	60.9	71.9
G1	80.8	64.4	80.7
G2	79.7	60.2	81.5
G3	91.6	64.6	86.2
G4	83.8	66.8	85.3

表4 ふ化率の推移 (%)

世代	A区	B区	C区
G0	76.6	75.8	80.7
G1	85.2	88.8	84.5
G2	74.1	86.2	74.1
G3	88.4	85.5	87.6
G4	78.2	81.6	86.0

表5 産卵率の推移 (%)

世代	A区	B区	C区
G0	49.5	49.1	44.8
G1	52.2	61.0	50.1
G2	49.4 a	54.9	43.5 b
G3	44.1 a	43.7	37.2 b
G4	47.4 a	57.1	27.6 b

※A区とC区：

G1~G4世代についてカイ二乗検定 (a, b<0.05)

表6 平均卵重の推移 (g)

世代	A区	B区	C区
G0	48.3	46.8	48.0
G1	48.7	48.4	48.8
G2	48.4	48.0	48.4
G3	49.5	47.7	48.8
G4	48.6	47.6	50.4

表7 更新時の雄体測結果

世代	精巣重量(g)			体重 (kg)		
	A区	B区	C区	A区	B区	C区
G0	NT	24.3	NT	NT	3.2	NT
G1	NT	20.0	NT	NT	3.0	NT
G2	27.9	25.5	26.7	3.4	3.2	3.3
G3	34.3	27.7	29.9	3.4	3.3	3.3
G4	30.3	31.1	33.4	3.4	3.5	3.3

NT：未実施

2 遺伝的多様性調査

基礎世代の総対立遺伝子数は51個、平均対立遺伝子数は1.82個と試験開始当初から低い値であった。

総対立遺伝子数と平均対立遺伝子数の世代変化は、B区は総対立遺伝子数は54個、平均対立遺伝子数は1.93個まで増加し推移した。C区は低下傾向を示した。また、第1世代B区では、C区で検出されていない対立遺伝子が新たに5個検出され、その後第2世代以降も検出された。同様に、A区においても第3世代以降検出された(表8)。

基礎世代の平均ヘテロ接合度は H_o が0.234、 H_e が0.258と試験開始当初から低い値であった。 H_o の値は、A区とB区は世代を経るに従い上昇傾向にあり、第4世代のA区とB区はC区に比べ高い値を示した。 H_e の値は、いずれの世代においても、A区とB区はC区に比べ第1世代以降高く推移した(表9)。また、調査した28座位中7座位で全区および全世代で多型が認められなかった。

マーカー近交度は、A区とB区では世代を経るに従い低下したが、C区は増加と低下を繰り返し、第4世代では基礎世代とほぼ同じであった(表10)。基礎世代と第4世代について、マーカー近交度のばらつきを示した(図2)。第4世代A区とB区は、基礎世代と第4世代C区に比べ、ばらつきが大きくなった。

表8 対立遺伝子数の推移

世代	総対立遺伝子数			平均対立遺伝子数		
	A区	B区	C区	A区	B区	C区
G0	51	51	51	1.82	1.82	1.82
G1	53	54	48	1.89	1.93	1.71
G2	53	54	50	1.89	1.93	1.79
G3	48	52	49	1.71	1.86	1.75
G4	51	54	49	1.82	1.93	1.75

表9 平均ヘテロ接合度の推移

世代	観察値(H_o)			期待値(H_e)		
	A区	B区	C区	A区	B区	C区
G0	0.234	0.234	0.234	0.258	0.258	0.258
G1	0.234	0.271	0.262	0.265	0.273	0.257
G2	0.248	0.261	0.249	0.264	0.285	0.260
G3	0.266	0.266	0.267	0.277	0.270	0.258
G4	0.280	0.270	0.249	0.266	0.261	0.239

表10 マーカー近交度の推移 (標準偏差)

世代	A区	B区	C区
G0	0.766(0.063)	0.766(0.063)	0.766(0.063)
G1	0.765(0.054)	0.729(0.076)	0.738(0.085)
G2	0.753(0.073)	0.743(0.084)	0.751(0.071)
G3	0.734(0.075)	0.734(0.066)	0.733(0.077)
G4	0.716(0.075)	0.730(0.068)	0.758(0.070)

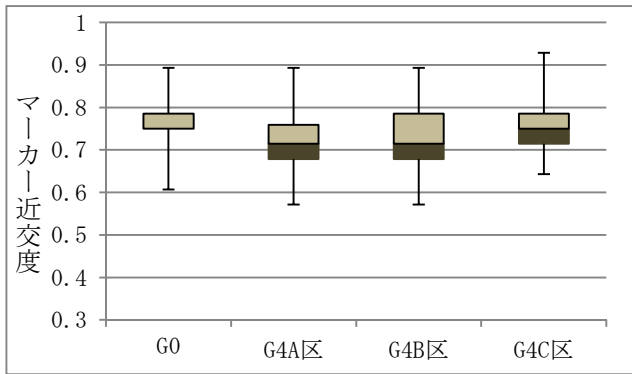


図2 基礎世代および第4世代のマーカー近交度

考 察

当センターで維持している原種鶏は20年以上閉鎖群で維持されていることから、近交度の上昇による不良形質の発現の可能性が懸念されており、これらを防止あるいは遅延させる飼養管理方法を検討した。

試験区は、群外の雄を交配に供した循環交配区 (A区)、過去の凍結精液を利用し飼養羽数を増加させた凍結精液利用区 (B区) および対照区 (C区) を設け、繁殖能力の表現形質調査と遺伝的多様性調査により世代変化を比較した。

表現形質調査では、産卵率のみC区で世代による低下が認められたが、受精率、ふ化率、平均卵重、精巣重量および体重において、各区とも世代による低下は認められなかった。近交度上昇により繁殖力などの種の存続に関わる適応力が低下するといわれている⁸⁾が、今回、産卵率の低下が近交度の上昇によるかは断定できないものの、少しずつ影響が出てきているかもしれない。

遺伝的多様性調査では、基礎世代における平均対立遺伝子数は1.82、平均ヘテロ接合度 (He) は0.258であった。当センターで維持している他鶏種での予備調査の結果から、名古屋種では平均対立遺伝子数2.61、平均ヘテロ接合度 (He) 0.347、ロードアイランドレッド種では平均対立遺伝子数2.25、平均ヘテロ接合度 (He) 0.316と今回試験を行った鶏群は他鶏種より明らかに低かった。また、岡ら⁴⁾が調査した軍鶏と比べても低く、試験当初から遺伝的多様性が低い傾向にあった。凍結精液の活用により、B区第1世代では、本鶏群の他個体で観察されない対立遺伝子が5個検出された。20年前の凍結精液に由来する対立遺伝子と考えられ、20年の間に失われた可能性が高い。これらの対立遺伝子は後代鶏でも維持されており、今回の試験(凍結精液の利用)により失

われた遺伝子を復活することができた。したがって、凍結精液を計画的に活用することにより遺伝的多様性の維持や復元が可能となると思われた。

平均ヘテロ接合度の世代変化は、C区に比べ、A区とB区でわずかではあるが高く推移した。また、個体毎のマーカー近交度においても、A区とB区はC区に比べて低く、近交度のばらつきは大きくなっており、ホモ化の進行が抑えられていることが示唆された。

これら結果から、循環交配、飼養羽数増加および凍結精液の活用は、近交度の上昇を抑制させることができ、不良形質発現を遅らせる可能性が示唆された。今回、試験期間が5年のため効果はわずかであったが、これら飼養管理技術が銘柄地鶏等閉鎖群で維持される集団の近交度上昇対策の一つとして利用できると思われた。しかしながら、どの手法が近交度上昇に効果があるか、どの程度の集団規模が必要かなど明らかにできなかったことから、今後、詳細を検討する必要があると思われる。岡ら^{4) 5)}が報告した福島県で維持されている会津地鶏においては、計画的な交配と集団サイズの拡大により遺伝的多様性を維持しているものの多様性の低下は避けられず、400~500羽規模の個体数の確保が必要としている。

以上のことから、当センターで維持する鶏群においても、集団規模を大きくし個体数を確保すること、凍結精液を有効に活用すること、および鶏群全体に対する計画的交配を工夫することなどの対応により近交度上昇対策になることが分かった。今後はこれら技術を当センターの近交度上昇対策に積極的に利用し、長期的に表現形質および遺伝的多様性の推移を確認しつつ、安定的な種鶏の供給につなげたい。

謝 辞

本研究を行うにあたり、遺伝的多様性調査データ解析のご指導をいただきました国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門 小林栄治先生に深く深謝いたします。

参考文献

- 1) 大城まどから, 2006, 琉球在来豚 (アグー) の近交退化を緩和するための育種技術の確立, 沖縄県畜産研究センター研究報告 第44号39-42
- 2) 力丸宗弘・高橋秀彰, 2007, 比内鶏の遺伝的な特徴 動物遺伝育種研究, 35(1), 00-00

- 3) 岡孝夫ら, 2010, マイクロサテライト DNA 多型情報にもとづく日本鶏, 特に軍鶏およびその近縁品種の遺伝的多様性と集団構造, 東京農大農学集報, 55(3), 211-218
- 4) 岡孝夫ら, 2008, 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
- 5) 岡孝夫ら, 2009, マイクロサテライト DNA 多型情報にもとづく龍神地鶏の遺伝的多様性, 東京農大農学集報, 53 (4) , 363-367
- 6) CHAKRABORTY, R. and N. RYMAN, Relationship of mean and variance of genotypic values with heterozygosity per individual in a natural population, Genetics, 103, 149-52
- 7) 小林栄治ら, 2014, 実験家系における DNA マーカーを用いた近交度のばらつき, 日豚会誌, 51(3)143-151
- 8) ファルコナーDS, 1993, 量的遺伝学入門 (原書第3版), 312, 蒼樹書房