

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

岡 孝夫*・井野靖子*・高橋幸水*・野村こう*・花田博文*・
天野 卓*・寒川 清**・秋篠宮文仁***

(平成 20 年 8 月 8 日受付/平成 20 年 12 月 12 日受理)

要約：龍神地鶏は和歌山県の旧龍神村（現在の田辺市）で少数が維持されている集団であり、同地で古くから飼養されているものである。1994 年には村内で 30 数羽が飼養されていたが、近年では個体数が減少し、遺伝的多様性の減少が懸念されている。そこで本研究では 1994 年および 2007 年に採血された龍神地鶏（1994 年 12 羽, 2007 年 2 集団各 18 羽, 7 羽）について、ISAG/FAO 推奨の 30 座位のマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝的多様性の経時的な比較と他の日本鶏品種との遺伝的類縁関係を明らかにすることを目的とした。龍神地鶏 3 集団において 30 座位中 12 座位で多型が認められず、5 座位で対立遺伝子の消失が認められた。さらに 6 座位においては遺伝子頻度 0.5 以上の主要な対立遺伝子が変化していた。その他の座位の対立遺伝子数は 2 から 3 の範囲であった。龍神地鶏各集団の平均対立遺伝子数およびヘテロ接合体率は既報の他の日本鶏品種よりも低い値を示した。次に、日本鶏品種内における龍神地鶏の遺伝的な位置を明確にするため、他品種の解析データを加えて D_A 遺伝距離にもとづく近隣結合系統樹を作成した。その結果、龍神地鶏は比較に用いたどの品種ともクラスターを形成せず、高いブートストラップ値で他の品種から分かれる結果となった。以上の結果より、龍神地鶏は地域に固有の品種である一方、小集団で長く維持されてきたため近交がすすみ、遺伝的多様性が低くなった集団であると考えられた。今後この品種を維持するためには、現在残されている 2 つの集団のみならず、県の試験場等を含めて十分な集団サイズを確保し、集団間の系統的維持が必要であると考えられた。

キーワード：龍神地鶏, マイクロサテライトマーカー, 遺伝的多様性, 遺伝資源

1. はじめに

龍神地鶏（写真 1）は和歌山県の旧龍神村（現在の田辺市）で少数が維持されている集団であり、同地で古くから飼養されているものである。雄は赤笹、雌は梨地という、典型的な地鶏の羽装を呈する。また、雌の羽の先端は黒色を呈し、覆輪になっているのが本品種の特徴である。龍神地鶏は近年、個体数が減少し、1990 年代に奈良県吉野郡に一部を移し、危険分散を図っている。かつては村内の各戸で飼育されていたとされるが、明治から昭和にかけて生産性の高い商用品種に押され、2007 年現在では旧龍神村と吉野郡で 2 名の愛好家および和歌山県農林水産総合技術センターにより維持されているのが現状である。1994 年は村内で 30 数羽が飼養されていたが、2007 年には龍神村に 18 羽、吉野郡に 7 羽が維持されているのみである。センターには雌雄各数羽が展示目的で飼育されているのみである。また、それぞれの集団の規模も小さいことから、遺伝的多様性の減少が懸念されている。そこで本研究では龍神地鶏の遺伝的多様性の経時的比較と日本鶏品種内における遺伝的

位置を明らかにすることを目的とした。

2. 材料および方法

(1) 供試鶏および DNA 抽出

供試鶏は龍神地鶏 3 集団、すなわち 1994 年に採血された集団 (RJN'94)、および 2007 年に採血された 2 集団 (RJN'07, RJN'07^N) である。詳細は表 1 に示した。表 1 にはまた、系統解析で比較に用いた日本鶏品種も示した。DNA は血液から標準的なフェノール-クロロフォルム法¹⁾にて抽出し、以下の実験に供した。

(2) PCR 法による目的領域の増幅とフラグメント解析

本研究では ISAG/FAO 推奨のマイクロサテライトマーカー 30 座位²⁾を用いた。PCR は GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて Template DNA 20 ng, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 各 200 μM, プライマーペア各 0.05 μM, Taq DNA Polymerase (Promega) 1 U, 1×Mg²⁺ Free PCR Buffer (Promega), 合計 10 μl の反応系で行なった。予備変性 94°C 5 分の後、94°C 30 秒, 60°C 1 分, 68°C 1 分を 30 サイ

* 東京農業大学農学部

** 田辺市立中山路小学校

*** 総合研究大学院大学

クル、次いで 72°C 10 分の伸長反応で行なった。目的領域の増幅後、オートキャピラリーシークエンサー ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてフラグメント解析を行なった。

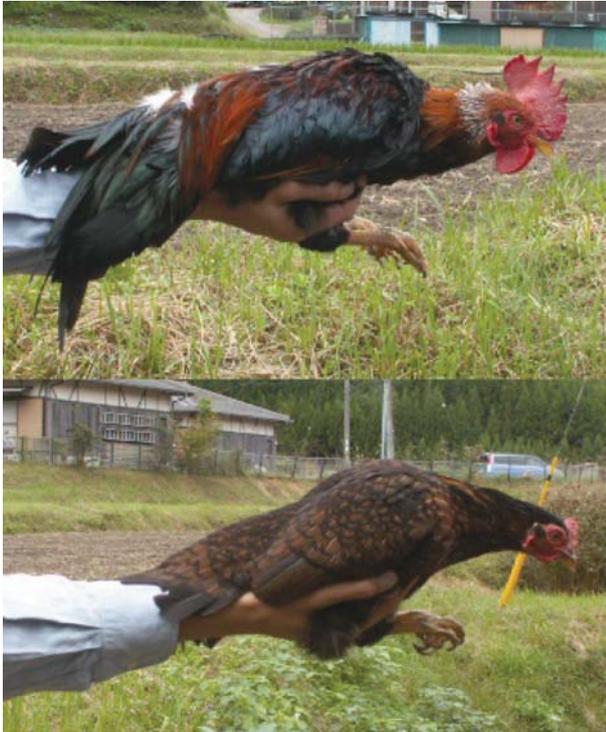


写真 1 龍神地鶏の雄(上)と雌(下)

(3) データ解析

フラグメント解析により決定した遺伝子型をもとに、Microsatellite Toolkit 3.1³⁾ を用いて各集団の平均対立遺伝子数 (MNA), ヘテロ接合体率の期待値 (H_E) を算出した。ヘテロ接合体の過剰/不足からボトルネックの有無を検出するために Bottleneck 1.2.02 プログラム⁴⁾ を用いた。遺伝距離 D_A は DISPAN プログラム⁵⁾ を用いてそれぞれ算出した。系統樹は得られた遺伝距離をもとに PHYLIP パッケージ 3.67⁶⁾ の Neighbor プログラムを用いて近隣結合 (NJ) 法にて作成した。

3. 結果および考察

龍神地鶏 3 集団で算出された 30 マーカーの対立遺伝子頻度を表 2 に示した。龍神地鶏 3 集団において 30 座位中 *ADL0268*, *MCW0206*, *MCW0295*, *MCW0081*, *ADL0278*, *MCW0104*, *MCW0248*, *LEI0234*, *MCW0222*, *MCW0098*, *MCW0078*, *ADL0112* の 12 座位で多型が認められなかった。さらに *MCW0067*, *MCW0123*, *MCW0069*, *MCW0111*, *MCW0037* の 5 座位で RJN'94 集団から RJN'07, RJN'07^N

表 1 本研究に用いた龍神地鶏集団 (RJN) および比較に用いた日本鶏品種

集団	採血年	採血場所	羽数
RJN'94	1994	和歌山県 龍神村	12
RJN'07	2007	和歌山県 龍神村	18
RJN'07 ^N	2007	奈良県 吉野郡	7
岐阜地鶏	2005	東京農業大学	30
土佐地鶏	2005	高知県畜産試験場	14
小国	2004	(財)進化生物学研究所	18
軍鶏	2004	福島県農業総合センター	20

表 2 龍神地鶏 3 集団の対立遺伝子頻度

マーカー	対立遺伝子 (bp)	RJN'94	RJN'07	RJN'07 ^N	マーカー	対立遺伝子 (bp)	RJN'94	RJN'07	RJN'07 ^N
ADL0268	110	1.00	1.00	1.00	MCW0020	176	0.29	0.69	0.71
MCW0206	232	1.00	1.00	1.00		182	0.71	0.31	0.29
LEI0166	344	0.46	0.67	0.86	MCW0034	231	0.37	0.18	0.22
	348	0.54	0.33	0.14		233	0.42	0.35	0.64
MCW0295	86	1.00	1.00	1.00		241	0.21	0.47	0.14
MCW0081	131	1.00	1.00	1.00	LEI0234	279	1.00	1.00	1.00
MCW0014	161		0.35		MCW0103	264	0.42	0.28	0.36
	167	1.00	0.65	1.00		268	0.58	0.72	0.64
MCW0183	299	0.46	0.47	0.36	MCW0222	217	1.00	1.00	1.00
	309	0.54	0.53	0.64	MCW0016	144	0.79	0.89	0.64
ADL0278	119	1.00	1.00	1.00		146	0.21	0.11	0.36
MCW0067	172	0.21	0.22	0.50	MCW0037	148	0.83	1.00	1.00
	174	0.63		0.29		152	0.17		
	178	0.16	0.78	0.21	MCW0098	255	1.00	1.00	1.00
MCW0104	204	1.00	1.00	1.00	LEI0094	248	0.50	0.84	0.92
MCW0123	89	0.21	0.69	1.00		264	0.50	0.16	0.08
	93	0.79	0.31		MCW0284	236	0.67	0.59	0.64
MCW0330	266	0.50	0.25	0.14		244	0.33	0.41	0.36
	286	0.50	0.75	0.86	MCW0078	142	1.00	1.00	1.00
MCW0165	114	0.21	0.14	0.86	LEI0192	272	0.58	0.81	0.58
	116	0.79	0.86	0.14		288	0.42	0.19	0.42
MCW0069	152	0.42		0.29	ADL0112	126	1.00	1.00	1.00
	166	0.58	1.00	0.71	MCW0216	140	0.71	0.33	0.21
MCW0111	96	0.79	0.83	1.00		141	0.29	0.67	0.79
	98	0.21	0.17		MCW0248	212	1.00	1.00	1.00

集団名の略号は表 1 と同じ

集団にかけて対立遺伝子の消失が認められた。RJN'07, RJN'07^N 集団は飼育されている全羽の採血を実施した。そのため、RJN'07, RJN'07^N 両集団で検出されなかった MCW0037 の対立遺伝子 152 (bp) は 13 年間の間に失われたものと考えられた。RJN'07 と RJN'07^N 集団のいずれかで認められた対立遺伝子は、今後の両集団の遺伝子型を考慮した系統的な維持により残すことができると考えられた。LEI0166, MCW0067, MCW0123, MCW0165, MCW0020, MCW0216 の 6 座位においては RJN'94 と RJN'07 集団間で遺伝子頻度 0.5 以上の主要な対立遺伝子が増加しており、さらに MCW0067 と MCW0165 は同じ年に採血を行なった RJN'07 と RJN'07^N 集団間でも主要な対立遺伝子が増加していた。その他の座位の対立遺伝子数は 2 から 3 の範囲であった。このことから、龍神地鶏は小集団で長く維持されてきたため、遺伝的浮動の影響が生じたものと考えられた。

多型の認められたすべての座位でヘテロ接合体の有意な過剰が認められた (Wilcoxon signed-test, IAM, SMM モデル下で $P < 0.001$)。また、3 集団とも対立遺伝子頻度の分布は 0.5 から 0.6 を中心に一峰性の分布を示した。これらの結果は龍神地鶏集団が集団サイズの減少にともなう強いボトルネックを受けたことを示すものであった。龍神地鶏と同じく遺伝的多様性の低下が懸念されている久連子鶏の分析⁷⁾ ではヘテロ接合体の過剰/不足は同程度であり、対立遺伝子頻度の分布は 0 から 0.1 を中心に L 字型の分布を示した。これらの結果から有意なボトルネックの影響は認められなかった。TADANO ら⁷⁾ は 8 つの愛好家維持集団から 48 個体をサンプリングし、1 集団として分析を行なった。比較のため、本研究で用いた RJN'07 集団と RJN'07^N 集団を合わせて 1 集団 (25 個体) として分析を行なったが、個別に分析した場合と同様にボトルネックが認められる結果となった (Wilcoxon signed-test, IAM, SMM モデル下で $P < 0.001$)。このことから、個体数および分集団数を増加させることで品種全体が遺伝的に均一になることを防ぎ、品種としての遺伝的多様性を維持できるのではないかと考えられた。

龍神地鶏 3 集団の平均対立遺伝子数 (MNA) および平均ヘテロ接合体率の期待値 (H_E) の値を表 3 に示した。龍神地鶏各集団の MNA は 1.53~1.63 であり、OSMAN ら⁸⁾ により報告されている他の日本鶏品種の MNA (1.75~4.70) よりも低い値を示した。 H_E はそれぞれ 0.198~0.261 の範囲であり、MNA と同様、OSMAN ら⁸⁾ の報告でもっとも低い値 (0.21 : 声良) と同程度の値を示した。MNA および H_E

より、小集団で維持されている龍神地鶏は近親交配がすすみ、遺伝的多様性が低くなった集団であると考えられた。300 年の歴史を持つと言われている龍神地鶏であるが、近年では 10 数年前と比べて体格が小さくなり、孵化率も低下してきている (寒川 私信)。このような事実もまた、近親交配により生じている可能性が考えられた。

著者ら⁹⁾ が以前に報告した福島県で維持されている会津地鶏においては、1989 年から 2006 年にかけて MNA には有意な変化は認められず、 H_E は 0.420 から 0.405 に有意に減少していた ($P < 0.01$)。龍神地鶏 (龍神村集団 RJN'94 および RJN'07) においても MNA では有意な差は認められなかった。 H_E は 1994 年から 2007 年にかけて 0.261 から 0.213 に有意に減少しており ($P < 0.01$)、会津地鶏集団と比べて短期間の比較ではあるが、 H_E の減少の程度は大きい傾向を示した。会津地鶏は 1988 年に再発見された後、1) 純系会津地鶏集団内の計画的な交配による集団サイズの拡大、2) 半きょうだい循環交雑による集団サイズと遺伝的多様性の維持というプロセスを経て、約 20 年にわたり遺伝的多様性を維持してきた。現在では福島県農業総合センターにて数羽の始祖集団から約 400 羽まで羽数を増やして維持されている。しかしながら、 H_E においては有意差はないものの減少傾向が見られる。このことから 400~500 羽規模の個体数を確保することが必要と考えられる。一方、現在龍神地鶏を維持しているのは高齢の愛好家 2 名で、後継者についても不安が残る。そのため、県の試験場等も含めて集団の維持を行なうのが最適と考えられる。また、繁殖適応度を維持できる最少の有効集団サイズは 50 とされている¹⁰⁾。したがって、有効集団サイズを $N_e = 4 N_m N_f / (N_m + N_f)$ で算出する場合、雄 : 雌 = 1 : 1 であれば各集団 50 羽が保全を考える上での最少羽数になるものと考えられる。

次に、日本鶏品種内における龍神地鶏の遺伝的な位置を明確にするために、岐阜地鶏、土佐地鶏、小国および軍鶏の解析データ (岡ら 未公表データ) を加えて遺伝距離 D_A を算出し、NJ 系統樹を作成した (図 1)。系統樹より、異なる時期に異なる場所から導入された岐阜地鶏、小国、軍鶏¹¹⁾ および mtDNA の解析から他の日本鶏品種とは異なる渡来経路が示されている土佐地鶏¹²⁾ は明確なクラスターを形成せず、大きな遺伝距離にて分かれる結果となった。龍神地鶏と他の品種間との遺伝的距離も同程度かそれ以上の値を示し、比較に用いたどの品種ともクラスターを形成せず、高いブートストラップ値 (100%) で他の品種から分かれる結果となった。このことから龍神地鶏はこの地域に固有の品種である可能性が示唆された。また、龍神地鶏のクラスターの中では 2007 年採血集団 (RJN'07 と RJN'07^N 集団) がサブクラスターを形成し、RJN'94 集団から分かれる結果となった。これは小集団で約 13 年間にわたり集団を維持してきた結果、わずかではあるが品種内で遺伝的差異が生じたものと考えられた。

以上の結果より、龍神地鶏は和歌山県旧龍神村 (現在の田辺市) 周辺の地域に固有の品種である一方、その遺伝的多様性が失われつつある集団であることが明らかとなった。今後この品種を維持するにあたり、現在残されている

表 3 龍神地鶏 3 集団の平均対立遺伝子数および平均ヘテロ接合体率

集団	MNA (S.D.)	H_E (S.D.)
RJN'94	1.63 (0.61)	0.261 (0.045)
RJN'07	1.57 (1.57)	0.213 (0.040)
RJN'07 ^N	1.53 (1.53)	0.198 (0.043)

MNA: 平均対立遺伝子数, H_E : 平均ヘテロ接合体率の期待値, S.D.: 標準偏差

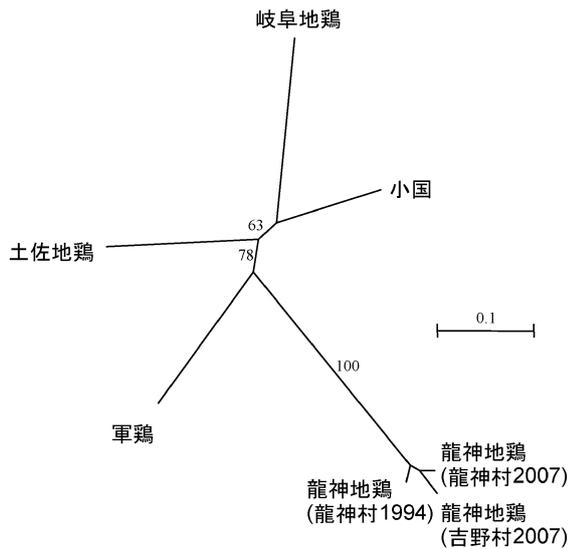


図1 龍神地鶏3集団に岐阜地鶏、土佐地鶏、小国および軍鶏を加えて算出された遺伝距離 D_A にもとづいて作成されたNJ系統樹。枝上の数字は分岐の信頼性を示すブートストラップ確率(%), スケールバーは D_A 遺伝距離を示す。

2つの集団のみならず、県の試験場等も含めて十分な集団サイズを確保すること、集団間のより系統的な維持が必要になるものと考えられた。

謝辞：龍神地鶏の調査、サンプリングに御尽力を賜りました松本修次氏、坂本利夫氏、比較に用いた日本鶏のサンプルを提供していただきました。高知県畜産試験場大動物科山崎清人科長、(財)進化生物学研究所 白石幸司博士に厚く御礼申し上げます。本研究の一部は平成16-18年度東京農業大学農学研究所プロジェクト研究費および科学研究費基盤研究(A: No. 17200015, 2005-2007)、家禽資源研究会の補助を受けて実施されたものである。

引用文献

- 1) SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 2) HOFFMAN, I., MARSAN, P.A., BARKER, S.F., COTHRAN, E.G.,

HANOTTE, O., LENSTRA, J.A., MILAN, D., WEIGEND, S. and SIMIANER, H. (2004) New MoDAD marker sets to be used in diversity studies for the major farm animal species: recommendations of a joint ISAG/FAO working group. In: Proceedings of the 29th International Conference on Animal Genetics, September 11-16th 2004, Meiji University, Tokyo, Japan.

- 3) PARK, S.D.E. (2001) Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. Ph.D. thesis, University of Dublin. Available at: <http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/>
- 4) CORNUET, J.M. and LUIKART, G. (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**: 2001-2014.
- 5) OHTA, T. (1993) DISPAN: Genetic Distance and Phylogenetic Analysis. Available at: <http://www.bio.psu.edu/People/Faculty/Nei/Lab/dispan2.htm>.
- 6) FELSENSTEIN, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**: 783-791.
- 7) TADANO, R., IMAMURA, Y., MATSUZAKI, M., NISHIBORI, M. and TSUDZUKI, M. (2008) Evaluation of a reduction in the effective population size for a rare Japanese native chicken breed, the Kurekodori. *Animal Genetics*, **39**: 457-458.
- 8) OSMAN, S.A.M., SEKINO, M., NISHIHATA, A., KOBAYASHI, Y., TAKENAKA, W., KINOSHITA, K., KUWAYAMA, T., NISHIBORI, M., YAMANO, Y. and TSUDZUKI, M. (2006) The genetic variability and relationships of Japanese and foreign chicken assessed by microsatellite DNA profiling. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, **19**: 1369-1378.
- 9) 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 (2008) マイクロサテライト DNA 情報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**: 61-65.
- 10) FRANKLIN, I.R. (1980) Evolutionary change in small populations. Pp. 135-150 in SOULE, M.E. and WILCOX, B.A. eds. *Conservation Biology: An Evolutionary-Ecological Perspective*. Sinauer, Sunderland, MA.
- 11) 小穴 彪 (1951) *日本鶏の歴史*. 日本鶏研究社, 東京.
- 12) OKA, T., INO, Y., NOMURA, K., KAWASHIMA, S., KUWAYAMA, T., HANADA, H., AMANO, H., TAKADA, M., TAKAHATA, N., HAYASHI, Y. and AKISHINONOMIYA, F. (2007) Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. *Animal Genetics*, **38**: 287-293.

Genetic Diversity of Ryujin-Jidori Based on Microsatellite DNA Polymorphisms

By

Takao OKA*, Yasuko INO*, Yukimizu TAKAHASHI*, Koh NOMURA*,
Hirofumi HANADA*, Takashi AMANO*, Kiyoshi SOGAWA**
and AKISHINONOMIYA Fumihito***

(Received August 8, 2008/Accepted December 12, 2008)

Summary : Ryujin-Jidori is one of the Japanese native chicken breeds kept in Ryujin village in Wakayama prefecture. Recently, a reduction in population size and in genetic diversity were detected in this breed. In this study, ISAG/FAO recommended 30 microsatellite markers be used to investigate temporal change in genetic diversity and phylogenetic relationships among Ryujin-Jidori and other Japanese native chicken breeds. The Ryujin-Jidori samples were collected in 1994 ($n=12$) and 2007 (two populations, $n=18, 7$), respectively. In this analysis, twelve monomorphic loci were observed. Allele loss at five loci and shift of major allele (allele frequency >0.5) at six loci were also observed. In other loci, number of alleles ranged from two to three. Mean number of alleles (MNA) and average expected heterozygosity (H_E) of Ryujin-Jidori populations were lower than previously reported in other Japanese native chicken breeds. No significant difference in MNA was observed between the two Ryujin-Jidori populations. However, a temporal decrease over time in H_E was observed. On the neighbor joining dendrogram based on D_A genetic distance, the Ryujin-Jidori populations were separated from all other breeds (Gifu-Jidori, Tosa-Jidori, Shokoku and Shamo) with robust bootstrap value. Therefore, it is suggested that Ryujin-Jidori is a unique and valuable genetic resource for Wakayama prefecture. However, to keep Ryujin-Jidori in small population could lead to an affect of genetic drift, intensify inbreeding and decrease genetic diversity.

Key words : Ryujin-Jidori, Microsatellite marker, Genetic diversity, Genetic resource

* Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Chuzanji elementary school, Tanabe City, Wakayama

*** The Graduate University for Advanced Studies