

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

岡 孝夫*・高橋幸水**・野村こう**・花田博文**・天野 卓***・秋篠宮文仁****

(平成 22 年 5 月 20 日受付/平成 22 年 7 月 23 日受理)

要約：軍鶏は多くの日本鶏品種の作出に広く用いられてきたが，それら軍鶏およびその近縁品種間の遺伝的類縁関係や品種内に生じた遺伝的差異については現在でも不明な点が多い。そこで本研究はマイクロサテライト DNA 多型情報を用いて軍鶏およびその近縁品種につき分析を行なった。供試鶏として 6 品種 9 集団 122 羽を用い，マイクロサテライト 28 座位の分析を行なった。その結果，交雑により作出された品種であっても，選抜や品種を維持する過程で遺伝的多様性が低下したと考えられる品種も認められた。特に声良は 12 座位で多型が認められず，もっとも低い遺伝的多様性を示した。品種間の遺伝的類縁関係は書誌学的，形態学的研究にもとづく説をおおむね支持するものであった。品種間の遺伝的分化の程度は高かった一方，同一品種の別地域集団は系統樹においてクラスターを形成した。軍鶏，薩摩鶏，矮鶏において，品種内に生じた遺伝的差異の程度は異なるものであった。軍鶏は地域集団間で明確な遺伝的差異が認められた一方，矮鶏は地域集団間や内種間で明確な差異は認められなかった。薩摩鶏は地域集団間で差異が認められ，さらに内種によっても遺伝的差異が生じていた。本研究結果より，軍鶏およびその近縁品種間の遺伝的類縁関係は従来説をおおむね支持する一方，品種内に生じる遺伝的差異は品種の維持形態やそれを取り巻く人側の要因により，程度や分集団の単位が異なることが明らかとなった。

キーワード：遺伝資源，遺伝的多様性，軍鶏，日本鶏，マイクロサテライト DNA 多型

1. はじめに

日本鶏は現在，17 品種が天然記念物に指定されている我が国の貴重な遺伝資源である。書誌学的，形態学的研究から，現在の日本鶏の多くは地鶏，小国，軍鶏の 3 品種から成立したとされている¹⁾。しかしながら，それらの品種間の遺伝的類縁関係や品種内の遺伝的変異については現在でも不明な点が多い。軍鶏は闘鶏目的に改良されてきた品種であるが，肉用品種や観賞用品種の作出にも用いられ，現存する多くの日本鶏品種の成立に関与した。観賞用では軍鶏を小型に改良した小軍鶏が知られる。比内鶏は肉用品種で，秋田県北部の地鶏と軍鶏の交雑により作出された。薩摩鶏や声良の成立にも軍鶏が関与したとされている。軍鶏は豆冠を有し，直立型の独特の体型を示す。声良の体型は軍鶏に類似する一方，薩摩鶏は小国に類似した体型を示し，軍鶏の近縁品種にも多様な形態が認められる。軍鶏は江戸時代にタイおよびその周辺の東南アジア地域から渡来したとされてきた。しかしながら，ミトコンドリア (mt) DNA D-loop 領域の塩基配列の解析から中国東部在来鶏

と近縁になる軍鶏が存在することが示され²⁾，さらに沖縄の軍鶏に固有の D-loop 系統が認められている³⁾。このことから，軍鶏は従来説¹⁾よりも多元的な起源を有するものと考えられる。

日本鶏品種間の遺伝的類縁関係については血液蛋白・酵素型⁴⁾や mtDNA 多型^{2,3,5)}を用いた研究が行なわれている。KOMIYAMA *et al.*⁵⁾による mtDNA の解析から，軍鶏は多くの日本鶏品種と遺伝的背景を共有し，ほとんどの日本鶏は軍鶏に由来するとしている。しかし，この説は従来説¹⁾とは大きく異なる。近年では，品種間の詳細な遺伝的類縁関係を調べるため，多型性に富むマイクロサテライトマーカーを用いた研究⁶⁻¹²⁾が行なわれている。TAKAHASHI *et al.*⁶⁾は 8 座位，OSMAN *et al.*^{7,8)}は 20 座位，TADANO *et al.*^{9,10)}は 40 座位の多型解析を行ない，書誌学的，形態学的研究から得られた品種成立の説¹⁾と比較的類似した系統関係を示す結果が得られている。しかしながら，これらの研究は主に品種間の遺伝的類縁関係に言及するものがほとんどであり，品種内に生じた遺伝的差異については TADANO *et al.*^{11,12)}が名古屋種と尾長鶏で報告しているのみである。そこで本

* 元東京農業大学農学部バイオセラピー学科

** 東京農業大学農学部畜産学科

*** 東京農業大学名誉教授

**** 東京農業大学客員教授

研究では、軍鶏およびその近縁品種、矮鶏の地域集団を含めた分析を行なうことで、品種間の遺伝的類縁関係および品種内に生じた遺伝的差異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

軍鶏 2 集団 (福島県と青森県) 30 羽, 小軍鶏 12 羽, 比内鶏 10 羽, 声良 20 羽, 薩摩鶏 2 集団 (茨城県と東京農業大学, 以下東農大) 20 羽, 矮鶏 2 集団 (千葉県と大分県) 30 羽, 計 9 集団 122 羽を用いた。各採取地からの供試羽数が少ないため, 小軍鶏は 2 地域集団を, 薩摩鶏と矮鶏は各地域集団で複数の内種を同一集団として解析を行なった (表 1)。DNA 抽出は標準的なフェノール・クロロフォルム法⁽³⁾にて行なった。抽出後の DNA は分光光度計にて濃度測定を行ない, 20 ng/ μ l に調整して以下の実験に用いた。

(2) PCR 法による目的領域の増幅およびフラグメント解析

本研究では ISAG/FAO の推奨する 30 座位のマイクロサテライトマーカー⁽⁴⁾を用いた。これらは大型染色体 9 対のうち 1 番から 8 番染色体, 微小染色体のうち 6 対をカバーするように設計されたもので, 同一染色体上のマーカー間には十分な距離があり, マーカー間の連鎖は報告されていない⁽⁴⁾。反応には GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて 10 μ l の反応系 (鋳型 DNA 20 ng, dNTPs 各 200 μ M, プライマーペア各 50 mM, TaKaRa Taq ポリメラーゼ HS (TaKaRa Bio) 1 Unit および付属の PCR バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂) で 94°C 5 分の後, 94°C 30 秒, 60°C (MCW 0183, ADL0112 は 58°C) 1 分, 68°C 1 分を 30 サイクル, 次いで 72°C 10 分の反応を行なった。

表 1 本研究で用いた供試鶏

品種	略号	羽数	採取地(内訳および内種)
軍鶏	SHA ^F	20	福島県
軍鶏	SHA ^A	10	青森県
小軍鶏	KOS	12	茨城県(5)、愛媛県(7)
比内鶏	HIN	10	青森県
声良	KOE	20	青森県
薩摩鶏	SAT ^I	10	茨城県(2 内種* 各 5)
薩摩鶏	SAT ^T	10	東農大(2 内種* 各 5)
矮鶏	CHA ^C	14	千葉県(7 内種** 各 2)
矮鶏	CHA ^O	16	大分県(8 内種** 各 2)

福島県: 福島県農業総合センター畜産研究所, 青森県: 青森県産業技術センター畜産研究所, 茨城県: 茨城県畜産センター養鶏研究室, 愛媛県: 愛媛県農林水産研究所畜産研究センター養鶏研究所, 東農大: 東京農業大学富士農場, 千葉県・大分県: 個人愛好家, *薩摩鶏の内種内訳 茨城: 赤笹, 白笹, 東農大: 赤笹, 白笹, **矮鶏の内種内訳 千葉: 黒逆毛, 白, 基石, 桂, 銀鈴波, 猩々, 赤笹, 大分: 黒, 黒逆毛, 白笹, 赤笹, 猩々, 桂, 翁, 桜。

目的領域の増幅後, オートキャピラリーシーケンサー 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。フラグメント解析はサイズスタンダード (GS400HD, Applied Biosystems) を基準とし, 得られたデータをもとに解析用ソフトウェア GeneMapper 3.5 (Applied Biosystems) を用いて PCR 産物のフラグメントサイズ (遺伝子型) を決定した。得られたデータは Microsoft Excel に Microsatellite Toolkit⁽⁵⁾ のフォーマットで記録した。

(3) データ解析

得られた遺伝子型より, 各集団で総対立遺伝子数 (TNA), 平均対立遺伝子数 (MNA), 対立遺伝子数をサンプル数で補正した Allelic Richness (AR) を算出した。次に各集団の遺伝的多様性を評価するため, ヘテロ接合体率の観察値 (H_o) と期待値 (H_e) および近交係数 (F_{is}) を算出した。集団内および集団間の近親交配の程度は WEIR and COCKERHAM の F 統計量⁽⁶⁾にて求めた。TNA, MNA, H_o および H_e の算出には Microsatellite Toolkit⁽⁵⁾ を, AR, 近交係数および F 統計量の算出と 0 からの偏りの有意性の検定には FSTAT 2.9.3 プログラム⁽⁷⁾を用いた。

集団間の遺伝的分化の程度はペアワイズ F_{ST} , 集団間および個体間の遺伝距離はそれぞれ遺伝距離 D_A ⁽⁸⁾ と D_{AS} ⁽⁹⁾ を求めた。求めた遺伝距離をもとに, 近隣結合法 (Neighbor Joining : NJ 法⁽²⁰⁾) にて系統樹を作成した。ペアワイズ F_{ST} の算出には FSTAT 2.9.3 プログラム, 遺伝距離 D_A の算出には DISPAN プログラム⁽²¹⁾, 遺伝距離 D_{AS} の算出には Microsoft Toolkit, NJ 系統樹の作成には PHYLIP 3.5 パッケージ⁽²²⁾ の NEIGHBOR プログラムを用いた。

3. 結 果

(1) 日本鶏品種間の遺伝的多様性の比較

多くの個体で増幅が認められなかった MCW0284 座位と非特異的増幅が多く認められた LEI0192 座位を除く 28 座位のデータを用い, 解析を行なった。解析に用いた全 28 座位で多型が検出され, 165 個の対立遺伝子が認められた。各集団で算出した対立遺伝子レベルの遺伝的多様性の尺度を表 2 に示した。対立遺伝子数においては, TNA が 54 (KOE)~106 (CHA^O), MNA が 1.93 (KOE)~3.79 (CHA^O), AR が 1.79 (KOE)~3.50 (SHA^A) であり, いずれも声良が低く, 矮鶏 2 集団が高い値を示した。また, 声良は 28 座位中 12 座位で多型が認められなかった。薩摩鶏は SAT^I, SAT^T と類似した値を示した一方, 軍鶏では SHA^F が SHA^A より低い値を示した。SHA^A は矮鶏 2 集団と同程度の高い多様性を示した一方, SHA^F は小軍鶏, 比内鶏, 薩摩鶏と同程度の値を示し, 同一品種であっても集団により多様性の程度に差が認められた。

次に, 遺伝子頻度から算出した各集団の H_o , H_e および F_{is} を表 3 に示した。 H_o と H_e はそれぞれ 0.219 (KOE)~0.529 (SHA^A), 0.248 (KOE)~0.558 (CHA^C) であった。対立遺伝子レベルの多様性と同じく, 声良が低く, 軍鶏や矮鶏が高い値を示す結果となった。また, 小軍鶏や薩摩鶏,

表 2 9 集団における対立遺伝子レベルの遺伝的多様性

集団	TNA	MNA (S. D.)	AR (S. D.)
SHA ^A	98	3.50 (1.43)	3.50 (1.43)
SHA ^F	73	2.61 (0.82)	2.49 (0.73)
KOS	73	2.61 (1.05)	2.57 (1.00)
HIN	65	2.32 (0.80)	2.32 (0.80)
KOE	54	1.93 (0.92)	1.79 (0.74)
SAT ^I	70	2.50 (0.78)	2.50 (0.78)
SAT ^T	75	2.68 (0.85)	2.68 (0.85)
CHA ^C	101	3.61 (1.61)	3.42 (1.43)
CHA ^O	106	3.79 (1.88)	3.47 (1.55)

TNA: 絶対対立遺伝子数, MNA: 平均対立遺伝子数, AR: アレリックリッチネス ($n=10$ で補正), S. D.: 標準偏差

表 3 9 集団におけるヘテロ接合体率および近交係数

集団	H_O (S. D.)	H_E (S. D.)	F_{IS}
SHA ^A	0.529 (0.219)	0.526 (0.199)	-0.006 ^{ns}
SHA ^F	0.484 (0.210)	0.460 (0.180)	-0.054 ^{ns}
KOS	0.298 (0.197)	0.415 (0.232)	0.291 ^{**}
HIN	0.329 (0.210)	0.335 (0.205)	0.019 ^{ns}
KOE	0.219 (0.220)	0.248 (0.239)	0.121 [*]
SAT ^I	0.321 (0.190)	0.461 (0.157)	0.314 ^{**}
SAT ^T	0.429 (0.210)	0.506 (0.165)	0.161 ^{**}
CHA ^C	0.482 (0.192)	0.558 (0.181)	0.140 ^{**}
CHA ^O	0.403 (0.170)	0.555 (0.178)	0.281 ^{**}

H_O/H_E : 平均ヘテロ接合体率の観察値/期待値, S. D.: 標準偏差, F_{IS} : 近交係数 (^{ns}: $P \geq 0.05$, ^{*}: $P < 0.05$, ^{**}: $P < 0.01$)

表 4 9 集団間のペアワイズ F_{ST} (右上) および遺伝距離 D_A (左下)

集団	SHA ^A	SHA ^F	KOS	HIN	KOE	SAT ^I	SAT ^T	CHA ^C	CHA ^O
SHA ^A	—	0.178 ^{**}	0.185 ^{**}	0.338 ^{**}	0.441 ^{**}	0.297 ^{**}	0.254 ^{**}	0.209 ^{**}	0.207 ^{**}
SHA ^F	0.205	—	0.273 ^{**}	0.391 ^{**}	0.531 ^{**}	0.302 ^{**}	0.288 ^{**}	0.302 ^{**}	0.274 ^{**}
KOS	0.224	0.284	—	0.417 ^{**}	0.537 ^{**}	0.332 ^{**}	0.337 ^{**}	0.248 ^{**}	0.242 ^{**}
HIN	0.346	0.407	0.422	—	0.626 ^{**}	0.346 ^{**}	0.362 ^{**}	0.330 ^{**}	0.310 ^{**}
KOE	0.399	0.519	0.520	0.572	—	0.523 ^{**}	0.465 ^{**}	0.433 ^{**}	0.445 ^{**}
SAT ^I	0.339	0.319	0.362	0.337	0.476	—	0.184 ^{**}	0.169 ^{**}	0.178 ^{**}
SAT ^T	0.289	0.283	0.406	0.375	0.431	0.203	—	0.150 ^{**}	0.168 ^{**}
CHA ^C	0.257	0.349	0.291	0.315	0.423	0.239	0.243	—	0.001 ^{ns}
CHA ^O	0.275	0.332	0.313	0.309	0.459	0.253	0.257	0.047	—

^{ns}: $P \geq 0.05$, ^{*}: $P < 0.05$, ^{**}: $P < 0.01$

矮鶏は H_O と H_E の差が大きく, F_{IS} も有意な値を示した ($P < 0.01$)。WEIR and COCKERHAM の F 統計量は, 全集団における個体間の近交係数 F_{IT} が 0.426 ± 0.022 , 集団間の分化の程度を示す F_{ST} が 0.335 ± 0.021 , 分集団内における個体間の近交係数 F_{IS} が 0.137 ± 0.020 であり, いずれの値も有意に 0 から偏ったものであった ($P < 0.01$)。

(2) 日本鶏品種間の遺伝的類縁関係

各集団間の遺伝的分化の程度を示すペアワイズ F_{ST} および集団間の遺伝距離 D_A を算出し表 4 に示した。集団間のペアワイズ F_{ST} は 0.001 (CHA^C-CHA^O , $P \geq 0.05$) ~ 0.626 ($KOE-HIN$, $P < 0.01$) であった。本研究で用いた 6 品種すべての間で有意な値が認められた ($P < 0.01$)。同一品種の地域集団間では, SHA^A-SHA^F 間で 0.178, SAT^I-SAT^T 間で 0.184 であり, 矮鶏の地域集団間 (CHA^C-CHA^O) を除いていずれも有意な値であった ($P < 0.01$)。遺伝距離 D_A は 0.047 (CHA^C-CHA^O) ~ 0.572 ($KOE-HIN$) であり, ペアワイズ F_{ST} と同様の傾向が認められた。

集団間の遺伝的類縁関係を明らかにするため, 遺伝距離 D_A をもとに NJ 法にて無根系統樹を作成した (図 1)。 D_A -NJ 系統樹の樹形はペアワイズ F_{ST} の値を支持するものであった。軍鶏 2 集団と小軍鶏, 矮鶏 2 集団, 薩摩鶏 2

集団はそれぞれクラスターを形成した。軍鶏およびその近縁品種とは遺伝的背景が異なる矮鶏は 100% のブートストラップ値にて他から明確に区別された。また, 軍鶏 2 集団と小軍鶏, 薩摩鶏 2 集団もそれぞれ 67% のブートストラップ値で他とは区別された。一方, その他の分岐に対するブートストラップ値は 36~39% と低い値を示した。声良と薩摩鶏は両品種とも軍鶏と小国を基礎として成立した品種であるが, 系統樹においては明確に区別された。軍鶏と地鶏を基礎として成立した比内鶏も同様に, 他から明確に区別される結果となった。

本研究で用いた全 122 個体について, 28 座位の遺伝子型から遺伝距離 D_{AS} を算出し, NJ 法にて系統樹を作成した (図 2)。 D_{AS} -NJ 系統樹において, 同一品種では薩摩鶏を除いてクラスターを形成する結果となった。軍鶏 2 集団と小軍鶏はそれぞれサブクラスターを形成した。小軍鶏は茨城県 5 羽と愛媛県 7 羽がさらに分かれる傾向が認められた。一方, 矮鶏 2 集団は明確な差異が認められず, 1 つのクラスターに 2 集団由来の個体が混在する結果となった。また, 内種による差異も認められなかった。薩摩鶏は採取地および内種により大きく 4 つのサブクラスターが認められる結果となった。また, 東農大白笹集団 5 羽は他の 15 羽とは離れて位置していた。

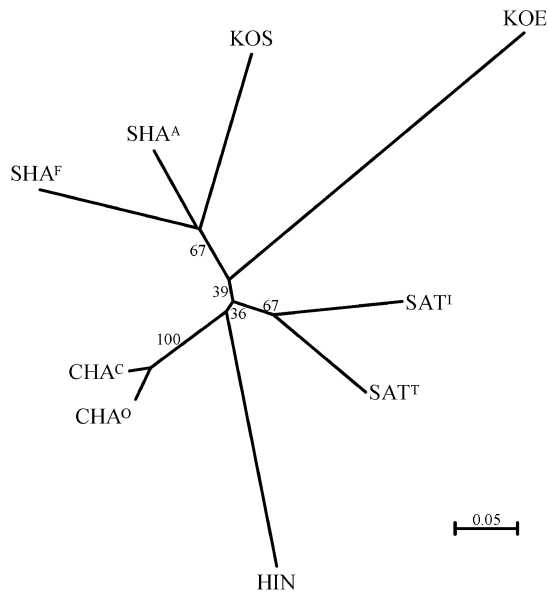


図 1 日本鶏 9 品種間の D_A 遺伝距離に基づく NJ 系統樹
枝上の数字はブートストラップ値 (%)

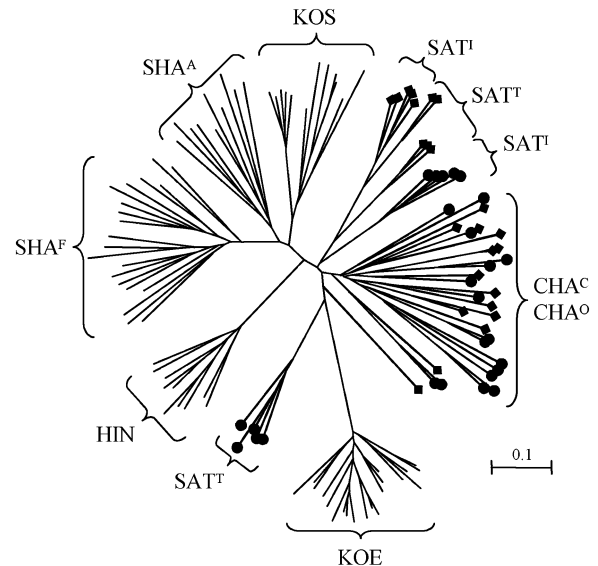


図 2 全 122 個体間の D_{AS} 遺伝距離にもとづく NJ 系統樹
薩摩鶏は赤笹◆, 白笹●, 矮鶏は千葉◆, 大分●で示した

4. 考 察

(1) 日本鶏品種間の遺伝的多様性の比較

本研究で分析した 6 品種 9 集団において、軍鶏 2 集団と矮鶏 2 集団が高い遺伝的多様性を示し、他の 4 品種 5 集団はそれに比べて低い値を示した。小軍鶏は軍鶏を矮小化した品種とされているが、mtDNA D-loop 領域の分析からその成立には他品種の関与が示唆されている²⁾。また、比内鶏は地鶏と軍鶏が、薩摩鶏と声良は小国と軍鶏が成立に関与したとされている¹⁾。一般的に、遺伝的に離れた集団の交雑により生じた集団の遺伝的多様性はもとの集団と比べて高くなるとされる。岡ら²³⁾はマイクロサテライト DNA 多型の解析から純系会津地鶏と純系に白色プリマスロックを交雑した大型会津地鶏、さらにロードアイランドレッドを交雑した肉用会津地鶏において、MNA, H_E , H_O は純系 < 大型 < 肉用としている。しかしながら本研究では交雑により作出されたとされる 4 品種 (KOS, KOE, HIN, SAT) は純系の軍鶏よりも低い値を示した。これらの品種は江戸時代に作出された後、品種の特徴を維持するために他の集団から隔離され、小集団で維持されてきたため、遺伝的多様性が低下したものと考えられた。声良は三大長鳴鶏 (声良, 唐丸, 東天紅) の一品種であり、より長く、良い声で鳴くように強い選抜、淘汰を受けたため、比内鶏は食用である比内地鶏の作出のための育種選抜が行われているため²⁴⁾、遺伝的多様性が低くなったと考えられた。特に声良は精液性状の悪化や孵化率の低下が報告されており²⁴⁾、本研究で示された遺伝的多様性の低下や近親交配の影響を裏付けるものと考えられた。逆に、軍鶏や矮鶏は日本のみならず東南アジアから東アジア地域を中心に世界中で広く飼育され、日本のものも多起源であると考えられている²⁾。そのため、現在でもその遺伝的多様性を維持しているものと考えられた。さらに小軍鶏、薩摩鶏、矮鶏は H_O と H_E の

差が大きく、有意な F_{IS} を示した。これらの 3 品種は複数の地域集団や内種を 1 つの集団として分析したものであり、この結果は各地域集団や内種により近親交配が生じていることを示すものと考えられた。

同じ軍鶏系品種について 20 座位の分析を行なった OSMAN *et al.*⁷⁾ では、軍鶏の MNA が 3.90~4.35, H_E が 0.619~0.622 となり、本研究よりも高い値を示した。OSMAN *et al.*⁷⁾ は愛好家所有の軍鶏 2 集団 (各 24 羽) を分析しており、試験場で維持されている集団を分析した本研究と異なる結果になったものと考えられた。小軍鶏、比内鶏、薩摩鶏、声良も同様であった。遺伝的多様性の値はいわゆる在来鶏 (放飼鶏)^{25, 26)} よりも低い値を示し、明確に品種化された商用品種²⁷⁾ に近いものであった。

(2) 日本鶏品種間の遺伝的類縁関係

D_A -NJ 系統樹 (図 1) より、軍鶏と小軍鶏は 1 つのクラスターを形成した。小軍鶏の成立には他品種の関与も示唆されているが²⁾、本結果からは成立に他品種が関係している薩摩鶏、声良、比内鶏よりも軍鶏の遺伝的寄与が大きいことが示された。声良、薩摩鶏、比内鶏は軍鶏とは明確に区別された。これはいずれも軍鶏を基礎として成立しているものの、声良と薩摩鶏には小国が、比内鶏には地鶏が関与しているとされ¹⁾、その遺伝的背景が異なることが原因と考えられた。また、軍鶏と小国から派生した薩摩鶏と声良も遺伝的に離れて位置した。両品種の体型を比較すると、薩摩鶏は尾羽が豊かな小国型の体型を示し、声良は直立した軍鶏型の体型を示す。このことから、成立に関与した各品種の遺伝的寄与の程度が異なることがこの原因と考えられた。

KOMIYAMA *et al.*⁵⁾ は mtDNA D-loop 領域の解析より、声良を含む長鳴鶏は日本鶏の古い系統の 1 つであるとし、多くの日本鶏の成立に関与したとしている。一方、本研究

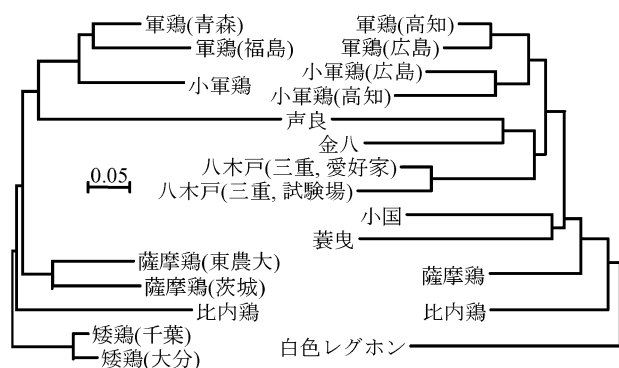


図3 本研究結果（左）および OSMAN *et al.*⁷⁾（右）における D_A -NJ 系統樹の樹形の比較
本研究結果は図1と同じデータを用いて矮鶏2集団をアウトグループとして示したもの。

や OSMAN *et al.*⁷⁾ など、マイクロサテライトマーカーを用いた研究結果（図3）では、声良は他の軍鶏の近縁品種とクラスターを形成する結果が得られた。mtDNA の塩基置換速度は、もっとも速い D-loop 領域でも 100 万年あたり 1 % 程度とされている²⁸⁾。そのため、塩基配列情報は長期的に見た渡来経路の推定²⁾には適しているが、日本鶏品種間の類縁関係の推定にはマイクロサテライト多型のような遺伝子頻度情報の方が適しているものと考えられた。

OSMAN *et al.*⁷⁾ は 20 座位を用いて軍鶏およびその近縁品種のマイクロサテライト DNA 多型解析を行なっている。OSMAN *et al.*⁷⁾ で用いた 20 マーカーは本研究で用いたマーカーと 5 つが共通しており、同様にゲノムを幅広くカバーできるように設計されたものである。そこで本研究結果と OSMAN *et al.*⁷⁾ にて得られた D_A -NJ 系統樹を比較した（図3）。その結果、軍鶏と小軍鶏がクラスターを形成し、次いで小国が成立に関与した品種（本研究では声良と薩摩鶏、OSMAN *et al.*⁷⁾ では声良、養曳、薩摩鶏）、地鶏が成立に関与した品種（比内鶏）が続くという共通の樹形を示した。また、OSMAN *et al.*⁷⁾ では声良は金八、八木戸などの軍鶏の小型品種とクラスターを形成した。このことから、声良の成立において軍鶏の遺伝的寄与は他の軍鶏系品種よりも高いものと考えられた。以上の結果、本研究で得られた品種間の遺伝的類縁関係は従来説およびマイクロサテライト DNA 多型情報にもとづくこれまでの研究結果を支持するものと考えられた。

(3) 日本鶏品種内の遺伝的差異

WEIR and COCKERHAM の F 統計量は F_{IT} が 0.426, F_{ST} が 0.335, F_{IS} が 0.137 であった（いずれも $P < 0.01$ ）。本研究と同じマーカーを用いてベトナム在来鶏およびジンバブエ在来鶏の多型解析を行なった CUC *et al.*²⁹⁾ と MUCHADEYI *et al.*³⁰⁾ では、 F_{IT} , F_{ST} , F_{IS} はそれぞれ 0.069 と 0.084, 0.026 と 0.008, 0.004 と 0.077（いずれも $P < 0.05$ ）であった。 F_{IT} は全集団に含まれる個体間に生じた遺伝的偏り、すなわち全集団内の分集団（品種や地域集団）の存在を示し、 F_{ST} は分集団間の遺伝的分化の程度を、 F_{IS} は分集団内で近親交配

などによる遺伝的偏りの程度を示すものである。日本鶏とベトナム、ジンバブエ在来鶏の比較より、いずれも 0 から有意に異なる F_{IT} の値が得られたことより、なんらかの遺伝的集団構造が存在することが示された。しかしながら、 F_{ST} の値よりその分集団間に生じた遺伝的分化の程度は日本鶏と在来鶏で差が認められた。すなわち、日本鶏は全体の遺伝的多様性の 33.5 % が集団間に偏在し、高い分化の程度を示したのに対し、両在来鶏の集団間には 2.6 % と 0.8 % しか偏在せず、多様性の大部分は集団内に偏在する分化の程度の低い集団であることを示すものであった。さらに $F_{ST} > 0.25$ で分化の程度が非常に高いとされている³¹⁾ ことから本研究で用いた軍鶏および近縁品種の遺伝的分化の程度は高いと考えられた。さらに、有意かつ正の F_{IS} の値から、日本鶏とベトナム、ジンバブエ在来鶏の分集団内に遺伝的な偏りが生じていることが示されたが、その程度は日本鶏の方が高いものであった。これらの結果はいずれも、本研究で用いた集団は明確な品種や地域集団や内種と認識され、集団間の遺伝的交流が少ない状態で遺伝的分化が急速に進んだことが原因と考えられた。

D_{AS} -NJ 系統樹（図2）より、地域集団を分析した 3 品種（軍鶏、薩摩鶏、矮鶏）において異なる樹形が得られた。軍鶏は各地域集団（福島県と青森県）由来の個体が異なるクラスターを形成した。この傾向は小軍鶏でも認められ、茨城県の 5 羽と愛媛県の 7 羽の間にわずかながら遺伝的差異が認められた。薩摩鶏は地域集団（茨城県と東農大）に加え、内種（赤笹と白笹）でも遺伝的差異が生じていた。一方、矮鶏は地域集団（千葉県と大分県）で明確な差異が認められず、また内種による差異も認められなかった。岡らは会津地鶏²³⁾ および龍神地鶏³²⁾ において、同一品種でも経時的に遺伝的差異が生じることを示している。また、マイクロサテライト DNA 多型の解析から、名古屋種において同一品種内で¹¹⁾、尾長鶏において内種間で¹²⁾ 遺伝的分化が生じていることが示された。本研究結果では、試験場にて小集団で維持されている軍鶏 2 集団間には明確な差異が認められた。この 2 集団間の遺伝的距離 D_A は愛好家により維持されている軍鶏 2 集団間から算出された値⁷⁾ よりも大きな値を示した。また、図2において、小軍鶏個体間の遺伝距離 D_{AS} は試験場で維持されている 5 個体間のほうが愛好家に維持されている 7 個体間よりも小さい値を示した。このことから、同一品種地域集団間に生じる遺伝的差異は飼育形態や飼育規模により左右されることが示された。一方、矮鶏は 2 地域集団間で明確な遺伝的分化が認められなかった。これらのサンプルはいずれも「全日本チャボ保存会」所属の愛好家由来のものであり、地域を越えて保存会所属会員間での遺伝的交流があったためと考えられた。

本研究結果より、軍鶏を中心とする日本鶏品種間の遺伝的類縁関係は従来説をおおむね支持することが示された。一方、品種内に生じる遺伝的分集団化には品種の維持形態やそれを取り巻く人的要因により、その程度や分集団化の単位が異なってくることが明らかとなった。

謝辞：貴重な日本鶏サンプルを提供していただきました福島県農業総合センター畜産研究所，青森県産業技術センター畜産研究所，茨城県畜産センター養鶏研究室，愛媛県農林水産研究所畜産研究センター養鶏研究所，全日本チャボ保存会に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 小穴 彪 (1951) 日本鶏の歴史. 日本鶏研究社, 東京.
- 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.
- KOMIYAMA, T., IKEO, K. and GOJOBORI, T. (2003) Where is the origin of the Japanese gamecocks? *Gene* **317**, 195–202.
- OKADA, I., YAMAMOTO, Y., HASHIGUCHI, T. and ITO, S. (1984) Phylogenetic studies on the Japanese native breeds of chickens. *Japanese Poultry Science* **21**, 318–329.
- KOMIYAMA, T., IKEO, K., TATENO, Y. and GOJOBORI, T. (2004) Japanese domesticated chickens have been derived from Shamo traditional fighting cocks. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **33**, 16–21.
- TAKAHASHI, H., NIRASAWA, K., NAGAMINE, Y., TSUDZUKI, M. and YAMAMOTO, Y. (1998) Genetic relationships among Japanese native breeds of chicken based on microsatellite DNA polymorphisms. *The Journal of Heredity* **89**, 543–546.
- OSMAN, S.A.M., SEKINO, M., NISHIBORI, M., KAWAMOTO, Y., KINOSHITA, K., YAMAMOTO, Y. and TSUDZUKI, M. (2004) Genetic variability and relationships of Japanese native chickens assessed by means of microsatellite profiling approach, focusing on the Oh-Shamo (Japanese large game) and its related breeds. *The Journal of Poultry Science* **41**, 94–109.
- OSMAN, S.A.M., SEKINO, M., NISHIHATA, A., TAKENAKA, W., KINOSHITA, K., KUWAYAMA, T., NISHIBORI, M., YAMAMOTO, Y. and TSUDZUKI, M. (2006) The genetic variability and relationships of Japanese and foreign chickens assessed by microsatellite DNA profiling. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* **19**, 1369–1378.
- TADANO, R., SEKINO, M., NISHIBORI, M. and TSUDZUKI, M. (2007) Microsatellite marker analysis for the genetic relationships among Japanese long-tailed chicken breeds. *Poultry Science* **86**, 460–469.
- TADANO, R., NISHIBORI, M., IMAMURA, Y., MATSUZAKI, M., KINOSHITA, K., MIZUTANI, M., NAMIKAWA, T. and TSUDZUKI, M. (2008) High genetic divergence in miniature breeds of Japanese native chickens compared to Red Junglefowl, as revealed by microsatellite analysis. *Animal Genetics* **39**, 71–78.
- TADANO, R., NISHIBORI, M. and TSUDZUKI, M. (2008) High accuracy of genetic discrimination among chicken lines obtained through an individual assignment test. *Animal Genetics* **39**, 567–571.
- TADANO, R., NISHIBORI, M. and TSUDZUKI, M. (2009) Genetic structure and differentiation of the Japanese extremely long-tailed chicken breed (Onagadori), associated with the plumage color variations: suggestions for its management and conservation. *Animal Genetics* **40**, 989–992.
- SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 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.
- PARK, S.D.E. (2004) Trypanotolerance in west African cattle and the population genetic effects of selection. Ph.D. Thesis, University of Dublin. Available at 'http://animal.genomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/2001'.
- WEIR, B.S. and Cockerham, C.C. (1984) Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358–1370.
- GOUDET, J. (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversity and fixation indices (ver. 2.9.3). Updated from GOUDET J. (1995) FSTAT (ver. 1.2): a computer program to calculate *F*-statistics. *The Journal of Heredity* **86**, 485–486.
- NEI, M., TAJIMA, F. and TATENO, Y. (1983) Accuracy of estimated phylogenetic tree from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution* **19**, 153–170.
- BOWCOCK, A.M., RUIZ-LINARES, A., TOMFOHRDE, J., MINCH, E., KIDD, J.R. and CAVALLI-SFORZA, L.L. (1994) High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* **368**, 455–457.
- SAITOU, N. and NEI, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biological Evolution* **4**, 406–425.
- OHTA, T. (1993) DISPAN: Genetic distance and phylogenetic analysis. Pennsylvania State University, University Park.
- FELSENSTEIN J. (1993) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. University of Washington, Seattle.
- 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 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**, 61–65.
- 野口純子, 荻澤圭二郎 (1998) 秋田県における家禽遺伝資源の探索と収集. 動物遺伝資源探索調査報告, **8**, 41–50.
- BERTHOULY, C., LEROY, G., NHU VAN T., HOANG THANH, H., BED'HOM, B., TRONG NGUYEN, B., VU CHI, C., MONICAT, F., TIXIER-BOICHARD, M., VERRIER, E., MAILLARD, J.C. and ROGNON X. (2009) Genetic analysis of local Vietnamese chickens provides evidence of gene flow from wild to domestic populations. *BMC Genetics* **10**, 1–8.
- PANDEY, A.K., TANTIA, M.S., KUMAR, D., MISHRA, B., CHAUDHARY, P. and VIJH, R.K. (2002) Microsatellite analysis of three poultry breeds of India. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* **11**, 1536–1542.
- TADANO, R., NISHIBORI, M., NAGASAKA, N. and TSUDZUKI M. (2007) Assessing Genetic Diversity and Population Structure for Commercial Chicken Lines Based on Forty Microsatellite Analyses. *Poultry Science* **86**, 2301–2308.
- BROWN, W.M., GEORGE, M. Jr. and WILSON, A.C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **76**, 1967–1971.
- CUC, N.T.K., MUCHADEYI, F.C., BAULAIN, U., EDING, H.,

- WEIGEND, S. and WOLLNY, C.B.A. (2006) An assessment of genetic diversity of Vietnamese H'mong chickens. *International Journal of Poultry Science* **5**, 912-920.
- 30) MUCHADEYI, F.C., EDING, H., WOLLNY, C.B.A., GROENEVELD, E., MAKUZA, S.M., SHAMSELDIN R., SIMIANER, H. and WEIGEND S. (2007) Absence of population substructuring in Zimbabwe chicken ecotypes inferred using microsatellite analysis. *Animal Genetics* **38**, 332-339.
- 31) BALLOUX, F. and LUGON-MOULIN, N. (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* **11**, 155-165.
- 32) 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 (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. 東京農業大学農学集報, 53, 363-367.

Genetic Diversity and Population Structure of Shamo and Its Related Breeds of Japanese Native Chicken based on Microsatellite DNA Polymorphisms

By

Takao OKA*, Yukimizu TAKAHASHI**, Koh NOMURA**, Hirofumi HANADA**,
Takashi AMANO*** and AKISHINONOMIYA Fumihito****

(Received May 20, 2010/Accepted July 23, 2010)

Summary : *Shamo* is a breed of Japanese native chicken that has been used to establish various modern Japanese native breeds. However, genetic relationships among the breeds derived from the *Shamo* and their genetic population structure is unclear. In this study, microsatellite DNA polymorphisms were used to analyze the genetic relationship among *Shamo* and its related breeds. A total of 122 individuals of six breeds (nine populations), *Shamo*, *Ko-Shamo*, *Hinai-dori*, *Koeyoshi*, *Satsuma-dori*, and *Chabo*, were used for the analyses of the 28 loci recommended by ISAG/FAO. In the results, low genetic diversity was observed even in the breeds established by crossbreeding, because of artificial selection and maintenance of these breeds. In particular, the *Koeyoshi*, which had 12 monomorphic loci, demonstrated the lowest diversity amongst the six breeds. Genetic relationships of these populations were supported by the established theories of their genetic histories. In the phylogenetic tree analysis, local populations of the same breeds were located in the same cluster. However, the star-like topology of the D_A tree showed a high and significant genetic differentiation in each population with the exception of two local populations of the *Chabo*. The degree of genetic differentiation was estimated from local populations of *Shamo*, *Satsuma-dori*, and *Chabo*. A high and significant genetic differentiation was observed in two local populations of the *Shamo*. In addition, in the *Chabo*, no genetic differentiation was observed, not only between local populations but also amongst plumage variations. In the *Satsuma-dori*, differentiations were observed among local populations and plumage variation. In conclusion, the results of this study showed that the degree of genetic differentiation and the unit of population segmentation were influenced by the manner in which the breeds are managed and human factors.

Key words : Genetic diversity, genetic resource, Japanese native chicken, microsatellite DNA polymorphisms, *Shamo* and its related breeds

* Former : Department of Human and Animal-Plant Relationships, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

*** Professor emeritus, Tokyo University of Agriculture

**** Visiting professor, Tokyo University of Agriculture