

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 ニワトリの羽性鑑別法の活用性向上を目指した遅羽遺伝子の構造
および羽性形質の品種網羅的解析

広島大学大学院生物圏科学研究科
生物資源科学 専攻
学生番号 D145871
氏 名 竹之内 惇

養鶏産業において、初生雛の性鑑別法は、経営に直結する重要な技法である。性鑑別法の中でも、初生時の主翼羽と覆主翼羽の長さの差異に着目する羽性鑑別法は世界各地の養鶏現場で多く利用されている。羽性鑑別には、伴性優性の遅羽遺伝子 (K)が利用されているが、遅羽遺伝子の構造や遅羽形質の発現メカニズムには未解明な点が多く存在するため、羽性鑑別は簡便かつ有用な手法でありながら、その利用が妨げられている。本研究では、羽性鑑別の利用性を向上させることを目的として、羽性形質ならびに羽性遺伝子の構造に関する研究を遂行した。

第2章では、52の品種および商用鶏3グループ、ならびにセキショクヤケイの総計1,994個体を用いて、羽性遺伝子の構造と羽性形質との関係を明らかにした。遅羽遺伝子 K は速羽遺伝子 k^+ に対し、prolactin receptor ($PRLR$)および sperm flagellar protein 2 ($SPEF2$)遺伝子の不完全かつ変則的な重複構造をもつ。すなわち、 $PRLR$ および $SPEF2$ に加え、*duplication SPEF2* ($dSPEF2$)と *duplication PRLR* ($dPRLR$)の結合遺伝子をもつ。尚、本論文では、 $dSPEF2$ と $dPRLR$ の結合部位を Junction Site (JS)と呼称する。さらに、ニワトリ白血病ウイルス由来の内存在性遺伝子である $ev21$ も K 遺伝子座には存在する。ほぼ全ての遅羽品種は JS および $ev21$ を保有し、ほぼ全ての速羽品種は JS および $ev21$ の両者ともに保有しなかったが、インギー鶏では、全個体が遅羽形質を示したものの、それらは JS のみをもち $ev21$ はもたなかった。一方、白色プリマスロックの1系統には、速羽形質を示すものの $ev21$ をもつ個体 (JSはもたない)が存在した。これらの事実から、遅羽形質を発現させる要因は、 $ev21$ ではなく JS、すなわち $dSPEF2dPRLR$ 結合遺伝子であると考えられた。 $ev21$ をもたず遅羽形質を示す品種の発見は世界初の事例である。

第3章では、JS および $ev21$ の有無と羽性形質の関係をより詳細に明らかにすることを目的として、第2章で得た結果に基づき、インギー鶏雄と速羽性土佐九斤雌の F_1 雄を土佐九斤の雌に戻し交配して得た N_2 世代 (インギー鶏が遅羽固定群であったため)、白色プリマスロック、および白色レグホーンの3つの群を用いて、各群の速羽個体と遅羽個体の羽毛 (主翼羽、覆主翼羽、副翼羽、覆副翼羽および尾羽) の長さの測定を1~5週齢に行った。尚、 N_2 群は、速羽個体[JS (-); $ev21$ (-)]、遅羽個体[JS (+); $ev21$ (-)]であり、白色プリマスロック群は、速羽個体[JS (-); $ev21$ (+)]、遅羽個体[JS (+); $ev21$ (+)]であり、白色レグホーン群は、速羽個体[JS (-); $ev21$ (-)]、遅羽個体[JS (+); $ev21$ (+)]である。

$ev21$ をもつ速羽個体は、 $ev21$ をもたない速羽個体と同様な形質を示し、 $ev21$ をもたない遅羽個体も $ev21$ をもつ遅羽個体と共通の部位に羽毛の伸長遅延を示した。ただし、 N_2 群の遅羽形質には、他の群に比べ顕著な伸長遅延がみられた。この結果および第2章の結果から、遅羽形質の

DNA マーカーとしては、*ev21*ではなく *JS* を用いることが適切であると結論された。

上記のどの群においても、遅羽個体の主翼羽、副翼羽および尾羽では伸長遅延がみられたのに対し、覆主翼羽および覆副翼羽では伸長促進がみられた。この事実から、遅羽形質は全ての部位の羽毛に共通して一定の伸長遅延効果を示すのではなく、羽域毎に羽毛の伸長が制御されている可能性が考えられた。遅羽形質発現における部位間差の発見は世界初の発見であり、今後の遅羽形質発現メカニズムの解明に寄与する発見であると考えられる。

第4章では、インギー鶏の羽性の特徴をより詳細に調査した。第3章の研究結果より、インギー鶏は、*K* 遺伝子に加え、羽毛の伸長遅延を促進する他の遺伝子をもつ可能性が考えられたためである。速羽の雄鶏（黒柏鶏）の同一個体を、インギー鶏を含む4品種の遅羽性雌鶏と交配し、その初生雛の羽性を確認した。インギー鶏の雌から得られた初生雛の遅羽個体は、他の3品種の雌から得られた遅羽個体とは明らかに異なり、主翼羽や覆主翼羽の羽軸が存在しないほど極度の遅羽形質（超遅羽形質）を示した。次いで、インギー鶏雄と白色レグホーン雌の F₁ 世代 (IW-F₁)、インギー鶏雄と土佐九斤雌の F₁ 世代 (IT-F₁) およびインギー鶏の雌初生雛の羽毛の長さを第3章と同様に測定し、第3章で述べた白色レグホーンおよび白色プリマスロック雌雛における通常の遅羽形質と比較したところ、これらの F₁ およびインギー鶏は共に超遅羽形質を示した。さらに、第3章の研究に用いたインギー鶏と土佐九斤由来の N₂ 世代における遅羽性雌鶏 (n = 31) の羽毛長に対し、階層的クラスター分析を行ったところ、遅羽形質と超遅羽形質が 17 : 14 に分離した (1 : 1, 二項検定, *P* = 0.12)。一方、N₂ 世代の速羽性雌鶏にはそのような羽性形質の分離は認められなかった。

以上の結果から、超遅羽形質を発現する遺伝子は、遅羽遺伝子 *K* と相互作用する、常染色体性優性遺伝子であり、かつ、それ単独では形質発現を行わない遺伝子であると推測された。インギー鶏がもつ超遅羽形質を利用することで、羽性鑑別の精度を向上させることができると考えられる。

第5章では、ニワトリ 34 品種 (39 系統) およびセキショクヤケイの総計 610 個体を用い、雄鶏における遅羽遺伝子のホモ・ヘテロ型の DNA 鑑別法の 1 つである、既存の unoccupied region (UR) 鑑別法に関し、この手法が全ての品種において利用可能であるか否かの調査を行った。

羽性鑑別を正確に行うためには、遅羽形質に固定した種鶏群が必要である。しかし、遅羽の雄鶏のホモ型 (*KK*) とヘテロ型 (*Kk*) を表現型情報だけで判別することは困難であり、遺伝子検査による判別が必要である。遅羽遺伝子と速羽遺伝子では遺伝子構造が一部異なるが、UR は遅羽遺伝子と速羽遺伝子の双方が共通してもつ領域である。この UR の配列の差異を利用し、PCR-RFLP 法 (制限酵素 Hae III および Mbo I を利用) により、遅羽性雄鶏のホモ型とヘテロ型を判別する手法が白色レグホーンや名古屋など一部の品種において用いられている。

上記材料を用いて、UR の塩基配列を決定した結果、UR 内に既報の Hae III および Mbo I 切断サイト以外に遅羽遺伝子と速羽遺伝子を判別可能な塩基配列は存在しなかった。そのため、次いで、2 つの制限酵素 Hae III および Mbo I 切断サイトの有無 (+, -) について調査を行ったところ、両者の組み合わせ (Hae III/Mbo I) には 3 つの型 (A: -/-, B: +/+, C: +/-) が存在した。この型が速羽遺伝子と遅羽遺伝子の間で異なれば、2 つの酵素いずれかを利用することでホモ型・ヘテロ型の DNA 鑑別が可能である。しかし、本章での品種網羅的解析の結果、遅羽個体と速羽個体に同じ制限酵素切断型が観察され、UR に着目した DNA 鑑別法は、ニワトリの品種 (集団) によっては必ずしも有効ではないことが明らかになった。よって、さらに効率の良い DNA 鑑別法を開発する必要があると考えられた。

第6章では、第5章の研究結果を受けて、遅羽を示す雄鶏のホモ型とヘテロ型を正確に判別するための新規 DNA 鑑別法の開発を目的として研究を行った。

UR の場合と同様に、速羽遺伝子および遅羽遺伝子の双方に共通して存在する領域として、*SPEF2* 遺伝子の約 1,100 bp 上流に位置する領域に着目した。遅羽遺伝子の場合 *dSPEF2* の上流

側にも相同領域が存在するため、速羽遺伝子上には1つ、遅羽遺伝子上には2つの相同領域が存在する。この領域を *up-stream region of the dSPEF2/dSPEF2 gene* (UPS) と名付けた。この UPS にはポリチミン配列が存在することを明らかにした上で、品種網羅的解析 (ニワトリ 34 品種 39 系統およびセキショクヤケイの総計 578 個体を使用) を行って、UPS の PCR 産物長を同定し、その利用性を検討した。その結果、品種 (個体) により、速羽遺伝子は産物長の異なる 6 種の型 (a, b, c, d, e, f 型) を、遅羽遺伝子は 5 種の組み合わせの型 (aa, ab, ac, ae, ce 型) をもつことを明らかにし、速羽遺伝子と遅羽遺伝子の UPS が異なる型 (例: 速羽 b 型、遅羽 ae 型) を示す場合には、遅羽性雄個体のホモ型・ヘテロ型の DNA 鑑別が可能であることを明らかにした。速羽遺伝子では多くが b 型あるいは c 型を、遅羽遺伝子では多くが ae 型を示すものの、両遺伝子の UPS が同じ型を示す場合も存在したため、本法もすべての品種に適用できるとは限らなかったが、前章で扱った UR を用いた DNA 鑑別法よりも、本法の汎用性が高いことを明らかにした。さらに、本法は、所要時間、必要コストおよび簡便性においても優れている。

以上述べた本研究の成果は、我が国を始め世界の養鶏産業の現場における、初生雛の羽性鑑別法の活用性向上に大きく貢献し得ると考えられる。