

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20780200

研究課題名（和文）：DNA鑑定による国産銘柄鶏、特にさつま地鶏の市場価値と食の安全・安心に関する研究

研究課題名（英文）：A study for valorization and food safety of a Japanese brand chicken, the Satsuma-jidori, using DNA tests

研究代表者

下桐 猛 (SHIMOGIRI TAKESHI)

鹿児島大学・農学部・助教

研究者番号：40315403

研究成果の概要（和文）：さつま地鶏は鹿児島県で飼養されている国産銘柄種であり、天然記念物である薩摩鶏にロードアイランドレッドを交雑して造成された集団である。本研究では、ニワトリSNPを用いた費用効率が高くかつハイスループットな解析システムの確立とさつま地鶏の品種鑑定を目的とし、以下の研究を行った。研究1) 安価で迅速なゲノムDNA抽出法の確立を目的として、植物で確立されたガラス繊維ろ紙を適用し、条件検討を行った。研究2) わが国でヒトゲノム解析用に開発され、96種類のSNPsによる遺伝子型を同時に判別できるDigiTag2法をニワトリSNP解析に応用し、ニワトリSNP検出システムの開発を行い、実際に薩摩鶏とロードアイランドレッドを含む5鶏集団89羽に利用した。

研究1) ニワトリ血球の希釈倍率50倍～200倍で1 μ g程度のゲノムDNAが得られ、LA-PCRによって約5kbの産物も確認できた。2. サンプル吸着後の保存は、室温で4週間までDNA抽出が可能であることを確認した。本法は、1サンプル当たりの費用が10円程度で、コスト面で優れ、16個体の血球からおおよそ1時間でゲノムDNAが抽出できた。

研究2) DigiTag2解析の結果、1) 供試した全89羽の個体識別ができた。2) 総合同値確率は 8.00×10^{-20} と計算され、 10^{19} 羽程度のニワトリの識別が可能であることが示唆された。全世界のニワトリの飼養羽数が 1.84×10^{10} 羽 (FAO, 2009) であることから、現在の解析で十分な識別能を有することが示唆された。3) NJ系統樹は5集団がそれぞれ独立したクラスターを構成し、分類することが出来た。以上、SNPを用いた品種識別技術への応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The Satsuma-jidori is a popular Japanese brand chicken, which crossbred Satsumadori and Rhode Island Red breeds. In this study, we developed a cost-effective and high-throughput chicken SNP genotyping system to discriminate the Satsuma-jidori from other chickens and conducted the following two studies. Study 1) To develop a cost-effective and rapid genomic DNA purification method in animals and birds, we examined the DNA purification method using glass fiber filter proven in plant genomics. Study 2) In order to identify the chicken breeds, we developed a cost-effective and

high-throughput chicken SNP genotyping system using the DigiTag2 assay and applied this system to 89 birds from the five breeds including Satsumadori and Rhode Island Red. These results were as follows: 1) One μg of genomic DNA was purified from the chicken blood cell samples diluted 50–200 times. It could be used for $\sim 5\text{kb}$ PCR amplification. 2) When the filter with the blood cells was stored for four weeks at room temperature, genomic DNA was purified. We purified the genomic DNAs using this method for 10 yen/sample and from 16 samples at 1 hour. 2) The DigiTag2 assay distinguished all 89 chickens examined here. The estimated probability of identity (P) was 8.00×10^{-20} . The P value is the probability that two individuals selected at random will have identical genotypes at all of the genotyped loci. Since the FAOSTAT database published in June 2009 showed that the total number of chickens raised worldwide in 2008 was approximately 1.84×10^{10} (<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>), this SNP set would have power to identify all chickens in the world. Phylogenetic analysis distinguished all chickens and formed clusters of chickens belonging to the respective breeds. These results suggested that this SNP system may discriminate the chicken breeds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度			
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：育種

1. 研究開始当初の背景

さつま地鶏は鹿児島県で飼養されている国産銘柄種であり、天然記念物である薩摩鶏にロードアイランドレッドを交雑して造成された集団である。さつま地鶏はブロイラーに比べて鶏肉中にイノシン酸などの旨味成分が多く含まれ、筋繊維が細く脂肪が少ない

ため、高品質の鶏肉を生産するのが特徴である。他方、発育が遅く生産量が少ないこと、安全で品質の高い鶏肉を求める消費者のニーズから、さつま地鶏の鶏肉はブロイラーの2倍以上で販売されている。

近年、様々な農畜水産物でDNAを用いた品種鑑定法が開発され、実用化されている。畜

産物では、黒毛和種、鹿児島黒豚などで DNA 鑑定技術が報告され、生産者の利益や生産物の市場価値を確保するものとして畜産振興の面だけでなく、消費者への畜産物の安全・安心を保障する面からも重要な技術となっている。鶏肉については、名古屋コーチンと比内地鶏で品種鑑定技術が実用化されており、2006 年 10 月に鶏肉の偽装表示事件が発覚したように、本技術は店頭に並べられた鶏肉から直接品種鑑定できるため、食の安全・安心の面で今後さらに重要になると思われる。

他方、わが国におけるニワトリ DNA を用いた国産銘柄鶏の品種鑑定技術は、名古屋コーチンと比内地鶏で開発・実用化されている

(Takahashi & Nakamura, 2007; 力丸と高橋、2007)。これらはいずれもマイクロサテライト DNA の反復回数の違いを用いた方法である。マイクロサテライトによる DNA 鑑定は、ウシの個体識別で実用化されているが、1 座位当たりの情報量が多いことが長所である反面、① 解析に特殊な機器が必要なこと、② 型判定に熟練が必要なことなどの短所がある。今回採用する SNP による DNA 鑑定は、黒毛和種の品種鑑定やブタの個体識別で実用化されており、1 座位当たりの情報量が少ないが、① 座位数が多い、② 型判定が容易で機械による自動化が可能であるといった長所がある。また、わが県で飼養されている国産銘柄鶏の 1 つであるさつま地鶏について、遺伝変異や多様性に関する研究はほとんどなされていない。そこで、国産銘柄鶏のさつま地鶏について DNA の遺伝変異を用いた品種鑑定技術を試みようとした。

2. 研究の目的

わが県は全国有数の畜産県であり、さつま地鶏など国産銘柄鶏が飼養されているが、まだ

銘柄を保障する鑑定技術はなかった。そこで、本研究は、食の安全・安心および国産銘柄鶏の銘柄保障に取り組む一助として、DNA の遺伝変異、特に一塩基多型 (SNP) を用いたさつま地鶏の品種判定技術の開発を目的とした。具体的には、以下の研究を行った。

研究 1) まず DNA 鑑定を行う上で、大量の個体からゲノム DNA を抽出する必要がある。本研究では、安価なゲノム DNA 抽出法として、ガラスろ紙法を検討した。ガラスろ紙法は、植物ゲノム DNA の抽出で実績があり、約 10 円/サンプルで行える。

研究 2) 我が国でヒトゲノム解析用に開発された DigiTag2 法をニワトリ SNPs 解析法として利用し、SNP 検出システムを構築した。

DigiTag2 法は、マルチプレックス PCR と DNA アレイを用いたシステムで、96 カ所の SNP を同時に検出できる。さらに、本システムを薩摩鶏、ロードアイランドレッドなどの 5 集団に応用し、品種識別能などを検討した。

3. 研究の方法

研究 1) 材料にはニワトリ血球の原液および生理食塩水で 10・50・100・150・200 倍に希釈したものを供試した。方法は、①抗酸化物質の亜硫酸 Na を含ませたガラス繊維ろ紙 (Glass Microfibre Filters GF/C; Whatman 社) を乾燥後、5 mm×5 mm に裁断した。②裁断したろ紙に血球を吸着させ (以降、サンプル吸着ろ紙という)、エッペンドルフチューブに移した。③カオトロピック塩を含む緩衝液による固定、④アルコールを含む高塩濃度の緩衝液による洗浄、⑤TE 緩衝液による溶出を行い、ゲノム DNA を得た。検討項目は 5 つ (①血球の希釈倍率、②亜硫酸 Na の濃度、③サンプル吸着ろ紙の乾燥処理、④抗酸化物質の種類、⑤サンプル吸着後の保存期間) とし、ゲノム DNA 抽出量と PCR 増幅の可否で判

定した。

研究 2) 供試材料は、薩摩鶏 20、インギー鶏 19、ロードアイランドレッド 19、ブロイラー (コブ) 17、レイヤー (デカルブエクセルリンク) 14 の計 5 集団 89 羽のゲノム DNA であった。これらのゲノム DNA は血球から通常のフェノール法で得た。96 種類のニワトリ SNPs 座位の情報は Entrez dbSNP

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>) から取得した。SNP 座位の配置は、ニワトリのゲノムサイズが 1,050 Mb であるので、 $1,050/96 \approx 11$ Mb 間隔とし、ゲノム全体をカバーするよう設計した。なお、これら SNPs はすべてイントロン上のものとした。DigiTag2 の方法は、Nishida ら (2007) にしたがった。判定された遺伝子型から 2 個体間の識別能力を表す総合同値確率を Peelman ら (1998) の式により計算した。さらに、近隣結合法 (NJ) による系統樹解析を行い、集団間の遺伝的類縁関係を評価した。

4. 研究成果

研究 1) ①血球の希釈倍率は、血球 50~200 倍希釈で 1- μ g 程度のゲノム DNA が得られ、1-kb の PCR 産物が確認できた。また、LA-PCR によって約 5-kb の産物も確認できた。他方、原液と 10 倍希釈ではゲノム DNA が抽出されたが、PCR 増幅できなかった。②亜硫酸 Na の濃度は、植物と同様 10% でよいことが確認できた。③サンプル吸着ろ紙を乾燥させると、乾燥せずすぐに抽出する場合に比べて DNA 抽出量が有意に増加した。④亜硫酸 Na をビタミン C に変更した結果、サンプル吸着ろ紙を乾燥した場合にゲノム DNA 抽出ができなかった。⑤サンプル吸着ろ紙の保存は、室温で 4 週間まで可能であった。本法は 1 サンプル当たり費用が約 10 円、時間が約 30 分でゲノム DNA が抽出できる。以上、ガラス繊維ろ紙法はニワトリゲノム DNA にも利用可能であるこ

とが示された。

研究 2) 解析した 96 SNP 座位のうち、84 座位で遺伝子型を決定でき、残り 12 座位で決定できなかった。84 座位のうち、本解析集団で多型が得られたのは 77 座位であり、その座乗する染色体と SNP 座位数は、常染色体 71 座位、Z 染色体 5 座位、ミトコンドリア 1 座位であった。以降の解析は解析を単純にするため、常染色体上で多型のあった 71 座位の遺伝子型で行い、以下のことを明らかにした。

1) 供試した 89 羽の個体識別ができた。2) 総合同値確率は 8.00×10^{-20} と計算され、 10^{19} 羽程度のニワトリの識別が可能であることが示唆された。全世界のニワトリの飼養羽数が 1.73×10^{10} 羽 (FAO, 2008) であることから、現在の解析で十分な識別能を有することが示唆された。3) NJ 系統樹は 5 集団がそれぞれ独立したクラスターを構成し、分類することが出来たので、SNP を用いた品種識別技術への応用の可能性が示唆された。また、ブロイラーとロードアイランドレッド、薩摩鶏が遺伝的に近く、インギーとレイヤーが離れて位置づけられた。

以上、ニワトリ SNPs 検出システムを確立し、鶏集団に利用できた。まだ供試数が少ない等の改良点があるものの、本システムを有効に利用すれば、鶏集団の遺伝構造の解析や遺伝的類縁関係、品種識別を効率的に行えるものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

① Shimogiri T., Msalya G., Myint S.L., Okamoto S., Kawabe K., Tanaka K., Mannen H., Minezawa M., Namikawa T., Amano T., Yamamoto Y. and Maeda Y. : Allele distributions and frequencies of the six

prion protein gene (*PRNP*) polymorphisms in Asian native cattle, Japanese breeds, and mythun (*Bos frontalis*). *Biochemical Genetics*, 印刷中, 2010

②工藤美雪, 河邊弘太郎, 大久津昌治, 岡本新, 山口浩, 安江博, 前田芳實, 下桐猛: 家畜・家禽のゲノム DNA 抽出におけるガラスろ紙法の検討. 鹿児島大学農学部附属農場研究報告, 32 : 13-17, 2010

③Msalya G., Shimogiri T., Okamoto S., Kawabe K., Minezawa M., Namikawa T., Maeda Y. : Gene and haplotypes polymorphisms of the prion gene (*PRNP*) in Japanese Brown, Japanese native and Holstein cattle. *Animal Science Journal*, 80(5) : 520-527, 2009

[学会発表] (計 17 件)

①安江博・下桐猛・工藤美雪・長坂直比路・西田奈央・岡本新・徳永勝士・西堀正英、DigiTag2 法を用いたヤケイ・ニワトリ集団の SNP 解析、日本動物遺伝育種学会第 10 回記念大会、群馬会館 (群馬県)、2009 年 11 月

②工藤美雪・下桐猛・西田奈央・丹羽孝介・西堀正英・木下圭司・岡本新・前田芳實・徳永勝士・安江博、DigiTag2 法による鹿児島県の在来鶏を含む 5 鶏品種の SNPs 解析、日本動物遺伝育種学会第 10 回記念大会、群馬会館 (群馬県)、2009 年 11 月

③下桐猛・西田奈央・丹羽孝介・西堀正英・工藤美雪・平岩秀樹・岡本新・前田芳實・徳永勝士・安江博、わが国で開発された DigiTag2 法によるニワトリ SNPs の同時検出、日本動物遺伝育種学会第 9 回大会、岡山大学 (岡山県)、2008 年 11 月

④工藤美雪・下桐猛・平岩秀樹・河邊弘太郎・岡本新・前田芳實・安江博、家畜・家禽のゲノム DNA 抽出におけるガラスろ紙法の検討、第 59 回西日本畜産学会、佐賀大学 (佐賀県)、2008 年 10 月

⑤T. SHIMOIRI, J. KAWAKAMI, A. MATSUMOTO, M. NISHIBORI, S. OKAMOTO, Y. MAEDA, H. YASUE.、Expression of the chicken δ 2-crystallin gene: Occurrence of sense and antisense RNAs in testis.、XXXI International Conference of the International Society for Animal Genetics (ISAG2008)、RAI Conference Center (Amsterdam)、2008 年 7 月

[その他]

[招待講演] (計 1 件)

①下桐猛、DigiTag2 法を用いたニワトリ SNP の解析について、第 15 回動物遺伝育種シンポジウム、群馬会館 (群馬県前橋市)、2009 年 11 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下桐 猛 (SHIMOIRI TAKESHI)
鹿児島大学・農学部・助教
研究者番号 : 40315403