

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15395

研究課題名(和文)ゲノムワイド多型解析による家禽ニホンウズラ集団の遺伝的差異と集団史の解明

研究課題名(英文) Population history of domestic Japanese quail inferred from genome-wide genetic diversity

研究代表者

布目 三夫 (Mitsuo, Nunome)

名古屋大学・生命農学研究科・研究員

研究者番号：40609715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Oxford Nanopore社のMinIONによる全ミトゲノムシーケンスを実施し、分子系統学的解析を行った。続いてGRAS-Di法による野生および家禽ウズラ16集団89個体のゲノムワイドSNP解析を行った。さらに10集団10個体を選抜し、全ゲノムリシーケンスを行った。ミトゲノムの解析の結果、家禽ニホンウズラは戦前集団と戦後集団の二つの系統に分かれることが示唆された。GRAS-DiによるゲノムワイドSNPを用いたクラスタリングの結果、商業(卵・肉)用ウズラと実験用ウズラが顕著に分かれ、全ゲノムリシーケンスデータにおいて、肉用ウズラ集団と他のウズラ集団で明瞭に分かれるゲノム領域も見つかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニホンウズラは、ニワトリに比べ飼育スペースが小さく、病気にも強いいため、特に後進国において広く利用されつつある。本研究では、最新の手法を用いて、全ゲノムレベルで遺伝的多様性を調査し、世界の家禽ニホンウズラ集団の多くは、戦後に少数個体を元に確立された集団の子孫であり、ニワトリほど遺伝的多様性が高いことを明らかにした。また、ミトコンドリアDNAやマイクロサテライトDNAを用いることで、農家間の個体導入の歴史をトレースできることも明らかにした。本研究で得られた成果は、今後のニホンウズラを対象とした農学的・生物学的研究において、対象集団の遺伝的背景を考慮する際に役立つものであると考えている。

研究成果の概要(英文)：A whole mitogenome sequencing was performed with MinION system of Oxford Nanopore to construct a mitochondrial-genome phylogenetic tree. Subsequently, genome-wide SNP analysis for 89 individuals from 16 populations of wild and domestic quail was conducted with the GRAS-Di method. Whole-genome resequencing was carried out on 10 individuals that were selected based on their high homozygosities. The mitochondrial genome sequences were divided into two lineage groups, pre-war and post-war quail populations. As a result of genetic clustering using genome-wide SNP by GRAS-Di, it was suggested that commercial quail for egg and meat quail were apparently separated from experimental quail groups. Besides, the whole genome resequencing revealed a genomic regions where showed clear differences between meat and egg quail.

研究分野：集団遺伝学

キーワード：ニホンウズラ ミトコンドリアゲノム ゲノムワイドSNP 集団遺伝学 MinION GRAS-Di 家禽・家畜動物

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

家禽ウズラは、1年あたりの産卵数はニワトリに及ばないものの、維持にかかるスペースや費用は小さく病気にも強いことから、近年では商業用（卵生産用および肉用）として後進国を中心に世界で広く飼育されている（Nasar et al., 2016; Santhi & Kalaikannan, 2017）。また20世紀中ごろからは鳥類ではニワトリに継ぐ実験用動物としても着目されるようになった。脊椎動物の生理学・発生学分野におけるモデル動物として用いられてきたことに加え、近年は進化生物学や動物行動学など幅広い分野で利用されつつある。本研究を実施した名古屋大学・鳥類バイオサイエンス研究センター（以下、ABRセンター）では、以前から様々な実験用ウズラ系統を用いて、ニワトリとの交雑種における雑種不稔・不妊に関する細胞遺伝学的・比較ゲノム学的研究や、ウズラ胚盤葉細胞を用いた発生工学的研究が進められていた。その過程で、ウズラ系統間に、孵化までの日数や生存率、さらには細胞の培養効率などに差があることが分かってきていた。このような「系統差」は実験動物で一般的に知られており、実験結果に及ぼす系統差の影響についても考慮する必要がある。その「系統差」を理解する上で欠かせない情報の一つが、系統間の遺伝的差異および類縁関係である。しかし家禽ウズラの遺伝的差異については木村・藤井（家禽学会誌、26:245-256、1989）や佐野ら（家禽学会誌、32:177-183、1995）のタンパク質多型に基づく研究以降、あまり調べられていなかった。ABRセンターが保有する実験用ウズラ9集団、欧米諸国（ハンガリー、フランス、ブラジル、エストニア、オランダ）から輸入され、実験用に系統化された肉用大型ウズラ6集団、および日本の卵用ウズラ2集団の計17集団の家禽ニホンウズラについて、遺伝的差異の調査を行った（Nunome et al. 2016）。ミトコンドリアDNAのD-loop領域の塩基配列278bpならびにマイクロサテライトDNAマーカー50個を用いた解析の結果、16集団は大きく二つのグループに分かれた。日本や欧米諸国の家禽ウズラ集団が全く同じD-loop配列（ハプロタイプ）を有し、かつマイクロサテライトマーカーによるクラスタリング結果においても、それらの集団が一つのグループに属した。

2. 研究の目的

家禽ウズラの育成の歴史に関する文献を調べたところ、家禽ウズラ集団が世界に広まった機会が戦前および戦後の2度あったことがわかった。ニホンウズラの家禽化は12世紀ごろの日本で始まったと考えられている。人々はウズラの鳴き声を好み、江戸時代以降は鳴き声を基に選抜された「鳴き鶉」の飼育が続いた。この「鳴き鶉」をもとにして、1900年代初頭に卵生産用（商業用）のウズラが開発され、世界各地に輸出された（戦前の集団）。しかし第2次世界大戦中、物資不足によって商業用ウズラ集団は絶滅に近い状況に陥った。戦後まもなく日本の農家の手により、生き残った数羽の商業用ウズラと野生のニホンウズラを基礎として商業用ウズラ集団は再興され（戦後の集団）、再び世界各地に輸出された。現在、世界で飼育されている家禽ウズラのほぼ全ては「戦後の集団」に由来するといわれている。先行研究において、日本と欧米諸国の家禽ウズラが同じD-loopのハプロタイプを有していたことは、これらのウズラ集団が「戦後の集団」から派生した歴史を反映したものと思われる。ミトコンドリアD-loop配列ならびにマイクロサテライトDNAマーカーに見られた2つのグループについて、全ゲノムレベルでの多型マーカー（SNP）を用いた解析を行い、2つのグループや各家禽集団（系統）間の遺伝的差異を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

材料は名古屋大学鳥類バイオサイエンス研究センターで維持されている家禽ニホンウズラと別科のコリンウズラ、山階鳥類研究所から頂いた野生ニホンウズラ2個体のゲノムを加え、総じて18集団96個体を用いた。

- 実験用ウズラ（8集団）：LWC系、Quv系、RWN系、WE系、AWE系、AMRP系、rb系、NIES-L系
- 欧米の肉用ウズラ由来の集団（5集団）：Estonia系（エストニア）、NIES-Fr系（フランス）、NIES-Hn系（ハンガリー）、NIES-Br系（ブラジル）、WJ系（オランダ）
- 日本の商業用ウズラ集団（2集団）：豊橋市農家由来のウズラ1集団、埼玉県ウズラ1集

団

- 野生ウズラの閉鎖集団 (1 集団): W 系 (1970 年頃に富士山麓で捕獲、農研機構畜草研で維持)
- 対馬の野生ニホンウズラ (2 個体)
- ナンベイウズラ科のコリンウズラ (5 個体)

ゲノム DNA の抽出には、ISOSPIN Blood & Plasma DNA (Nippon Gene 社) を用い、DNA の濃度測定は Qubit Fluorometer (Thermo Scientific 社) を用いて行った。

ミトコンドリア (mtDNA) ゲノム配列の解読と分子系統学的解析

ウズラのミトコンドリア全ゲノム (全長およそ 16 kbp) を、互いの両端が重なり合う 7 kbp 程度の 3 つの領域にわけ、KOD FX Neo ポリメラーゼを用いロング PCR によるミトコンドリアゲノムの増幅・精製を行った。第 4 世代の次世代シーケンシング技術である、Oxford Nanopore 社の MinION システムを用いて、mtDNA ゲノム配列の解読を行った。精製した 10 kbps の長さの mtDNA 断片を、NEB 社のキット: NEBNext FFPE Repair Mix (M6630S)、NEB Next End repair/dA-tailing Module (E7546)、NEBNext Ultra II End Repair/dA-tailing Module (E7546)、NEBNext Quick Ligation Module (E6056S) を用いてライブラリの調整を行った。ミトゲノム配列のシーケンスには、Oxford Nanopore のフローセル (FLO-MIN106 R9.4.1)、Native Barcoding Expansion 1-12 (EXP-NBD104)、Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109)、Flow Cell Priming Kit (EXP-FLP001) を用いた。EXP-NBD104 でバーコードを付与した 12 検体分のミトゲノムライブラリを MinION フローセルに添加し、シーケンシング反応を 2 時間行った。バーコードタグの選別は Oxford Nanopore 社のフリーソフト EPI2ME で行った。NCBI Genbank から取得したミトコンドリアゲノム配列 (NC_003408、Nishibori et al. 2001) をリファレンスとし、DNA 配列解析ソフトウェア Geneious Prime (Biomatters 社) を用いて得られたリードのマッピングを行った。分子系統樹は MEGA 7 (Kumar, Stecher, and Tamura 2015) を用いて作成した。

GRAS - Di 法によるゲノムワイド SNP 解読と全ゲノム理シーケンス

家禽ウズラと野生ウズラ、コリンウズラの 18 集団 96 個体について GRAS-Di 法によるゲノムワイド SNP の検出を行った。ライブラリ調整からバリエーションコールまでは Eurofins 社に委託した。TASSEL 5 (Bradbury et al. 2007) を用いて全個体で Base call されたサイトを抽出し、主成分分析によるクラスタリング解析を行った。クラスタリング解析の結果をもとに、10 集団から 1 個体ずつ、合計 10 個体を選抜し全ゲノム理シーケンスを実施した。ライブラリからバリエーションコールまでを Eurofins 社に委託した。

4. 研究成果

ミトコンドリア (mtDNA) ゲノムにおける 2 大系統

MinION を用いた 12 検体のマルチプレックスシーケンシングを行った結果、開始から約 14 時間で 4Gb のデータがえられたことを確認し、シーケンシングを停止させた。1 検体当たり、2 万~4 万個のリードが得られ、そのうち 8,000 以上ものリード (x8000 coverage) が、リファレンスに用いたニホンウズラミトコンドリアゲノム配列 (NC_003408) に 90% 以上の相同性を持ってマッピングされた。マッピングされたリードのうち 9 割は、7 kbp 以上のロングリードであった。2 度目のシーケンスでは 2 時間で Run を停止したところ、1 個体あたり 100~200 coverage のリードが得られた。全ミトコンドリアゲノム配列を用いた分子系統樹にも、D-loop 配列による樹形図にみられた二つのグループが形成された。しかし、D-loop 配列での系統樹で「戦前」のグループと予想された系統は、さらに二つの亜系統に分かれることが、ミトコンドリアゲノムの結果から示唆された (図 1)。

GRAS - Di 法によるゲノムワイド SNP から見られた家禽ウズラの 4 つの遺伝的集団

GRAS-Di 法によるゲノムワイド SNP の収集の結果、コリンウズラを含むウズラ 18 集団、合計 96 個体から、350 万 サイトの SNP が得られた。続いてコリンウズラを除くニホンウズラ 17 集団 91 個体の全てでジェノタイプングできたサイト、14 万サイトを抽出した。ウズラのゲノ

ムサイズが約 10 億塩基対として、1000 塩基あたり 1 ~ 2 個の SNP が得られたことになる。14 万サイトを用いたクラスタリング解析の結果、実験用ウズラの TKP 系、肉用・卵用の商業用ウズラと野生ウズラのグループ、WE 系など実験用ウズラのグループ、肉用ウズラのエストニア系・フランス系のグループ、の 4 グループに分かれた (図 2)。現在、各グループ間で明瞭な遺伝的分化をみせるゲノム領域について、全ゲノムリシーケンスの結果と統合しつつ解析を進めている。

先述したように、家禽ニホンウズラは後進国を中心に、ニワトリに次ぐ家禽として飼養されており、近年では農家集団レベルでの遺伝的特性の研究も徐々に行われつつある (Bai et al., 2016; Rifki et al., 2018; Shimma & Tadano, 2019)。2016 年には、NCBI と東京農業大学自然科学研究機構新分野創成センターそれぞれからニホンウズラのドラフトゲノムデータが公開された。今後、ニワトリ同様に、ニホンウズラにおいても生理学的、行動学的、発生学的研究がより盛んに行われると予想される。本研究によって得られるニホンウズラの育種の歴史や各系統の遺伝的差異の全ゲノムレベルでの情報は、それら多様な分野の研究に遺伝的な考察を付与する際に役立つものになると考えている。

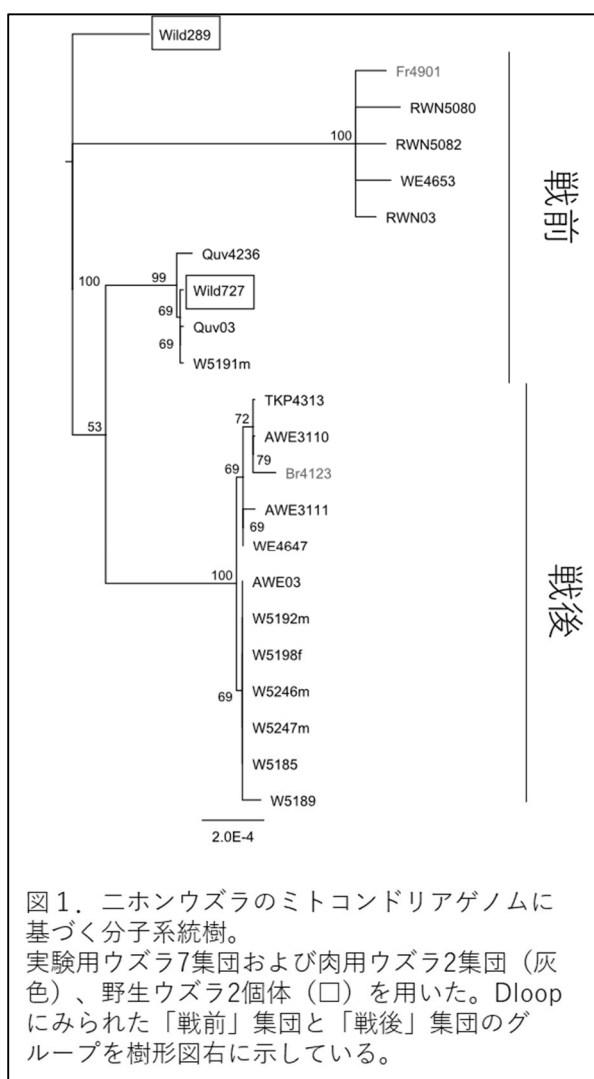


図 1. ニホンウズラのミトコンドリアゲノムに基づく分子系統樹。実験用ウズラ 7 集団および肉用ウズラ 2 集団 (灰色)、野生ウズラ 2 個体 (□) を用いた。Dloop にみられた「戦前」集団と「戦後」集団のグループを樹形図右に示している。

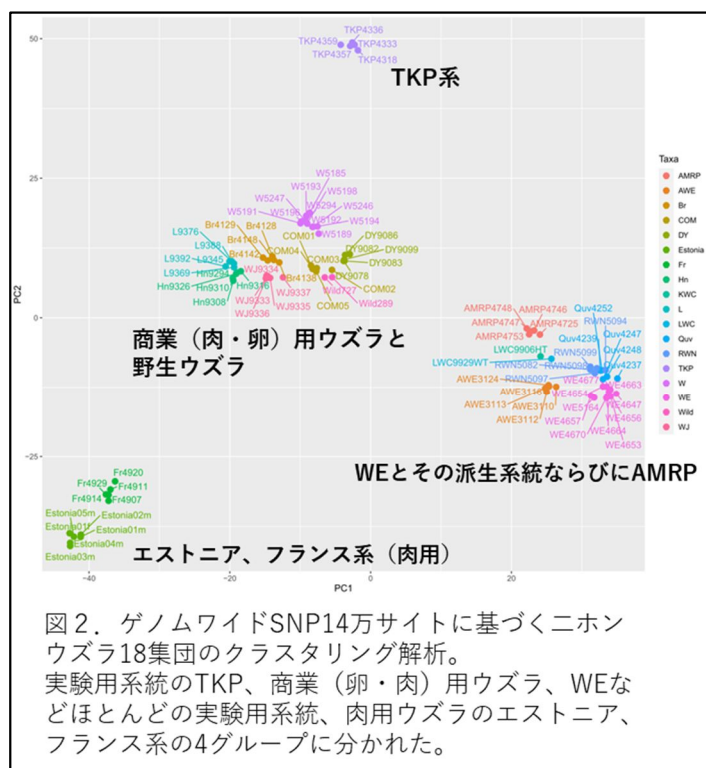


図 2. ゲノムワイドSNP14万サイトに基づくニホンウズラ18集団のクラスタリング解析。実験用系統のTKP、商業 (卵・肉) 用ウズラ、WEなどほとんどの実験用系統、肉用ウズラのエストニア、フランス系の4グループに分かれた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nunome Mitsuo, Kinoshita Keiji, Ishishita Satoshi, Ohmori Yasushige, Murai Atsushi, Matsuda Yoichi	4. 巻 68
2. 論文標題 Genetic diversity of 21 experimental chicken lines with diverse origins and genetic backgrounds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 177 ~ 193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.18-0139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nunome Mitsuo, Yoshioka Rie, Shinkai Takuro, Kino Katsutoshi, Matsuda Yoichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Assessment of genetic diversity and genetic relationships of farm and laboratory quail populations in Japan using microsatellite DNA markers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary Medicine and Science	6. 最初と最後の頁 1000 ~ 1008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/vms3.328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mitsuo Nunome, Ayano Hata, Yoichi Matsuda
2. 発表標題 Genetic divergence in domestic Japanese quail inferred from mitochondrial genome sequences and genome-wide SNP data
3. 学会等名 第40回タイ野生動物セミナー（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

National BioResource Project ニワトリ・ウズラ
<https://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~nbrp/about/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------