

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月24日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580319

研究課題名（和文） ニワトリの国際スタンダードSNPマーカー作製およびその解析システムを構築する

研究課題名（英文） Create international standard SNP markers for chicken, and their analysis systems

研究代表者

西堀 正英（NISHIBORI MASAhide）

広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：80237718

研究成果の概要（和文）：SNPsは遺伝病や経済的特性の原因遺伝子特定、遺伝的多様性解析に用いられている。本研究ではSNPs解析ツールのDigiTag2法で用いるニワトリSNPsマーカーを作製し、ヤケいとびニワトリの遺伝的類縁関係の解明のためにDigiTag2法によるSNPsの検出を試みた。遺伝的類縁関係解析で、14集団が各々のクラスターを作った。総合同値確率（ある個体と別の個体とを誤判定する確率）が $2.70 \times 10^{-20}$ となり、作出したSNPsマーカーを用いれば理論的に世界中全ての鶏（2011年の世界の鶏飼育羽数 $1.99 \times 10^{10}$ ）の個体識別を行うことが可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been used to identify genes responsible for economic traits, including genetic diseases in domestic animals, and to examine genetic diversity of populations. In this study, the aim is to create international standard SNP markers for chicken, and their analysis systems. I genotyped 239 chicken autosomal SNPs using DigiTag2 assay to understand the genetic structure of four species of Junglefowls, the Japanese native chicken breeds, and the relationship of these breeds. Phylogenetic analysis using the concatenated 74 autosomal SNP genotypes distinguished four Junglefowls, all chickens and formed clusters of chickens belonging to the respective breeds. Based on the allele frequency data, the estimated probability of identity (P) was calculated to be  $2.70 \times 10^{-20}$ . Since the FAOSTAT database published in 2011 showed that the total number of chickens raised worldwide was approximately  $1.99 \times 10^{10}$ , this SNP set would have the power to identify all chickens in the world. More importantly, this set would be particularly useful to monitor the genetic structure of populations for maintenance of the characteristics of the chicken breeds and junglefowls.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：ニワトリ, SNP, マーカー, DigiTag2, 国際スタンダード, 96組, 集団解析, 個体識別

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノム解析が完了している生物種では、その生物種における遺伝形質と関連する遺伝子を特定するためのゲノム解析が必要である。こうした解析を行うためには、同一の生物種の品種間で異なる配列であるとか、同一種内でも個体間で確認されるゲノムマーカー研究はまず 1980 年代に制限酵素断片長多型 (RFLP および PCR-RFLP) に始まり、塩基のシーケンス解析、マイクロサテライト配列反復多型で解析されてきたが、これらは莫大な時間と労力あるいは研究費がかかってしまう。

1990 年代に SNP (一塩基多型) 解析法が開発された。この解析法は、シーケンスの結果、そのインフォマティブサイトのみを抽出し、その変異のみを効率よく、大量・迅速に解析するもので、この方法の改良型が多型解析法の主流になった。

最近では SNP の解析は、PCR-Luminex 法あるいは DigiTag 法など再現性の高い方法が開発されてきた。さらに Multiplex-PCR 技術との複合化によって 1 回の反応で約 100 種類の遺伝子を検出することが可能となった。

申請者らは、PCR-Luminex 法を用いて家畜豚集団の SNP 解析を実施した。ブタ 998 頭に対して 47SNPs を解析した結果、その総合同値確率 (ある個体と別の個体とを誤判定する確率) が  $P=4.73 \times 10^{-17}$  となり、ニワトリにおいても同様の値が得られれば、現在世界中で飼育されているニワトリを一個体ずつ個体識別することが理論的に可能となる。

### 2. 研究の目的

ニワトリおよびヤケイの系統解析は、これまで特定遺伝子の塩基配列の違いあるいはマイクロサテライト DNA の多型を用いて行われてきたが、一塩基多型 (SNPs) を用いた報告はほとんどない。ニワトリゲノム解読の成果とともに SNPs 情報も集積・報告され、抗病性に関わる候補遺伝子領域の検出や品種鑑別・個体識別などでゲノムワイドかつ高精度な解析が可能となった。しかし、多数の個体で SNPs 検出を行うためには安価で信頼性の高い解析法が必要である。本研究では、ニワトリの遺伝的系統関係を解析するための SNPs 解析ツールである DigiTag2 法で用いるニワトリ SNPs マーカーを作製し、ヤケイおよびニワトリの遺伝的類縁関係の解明のために DigiTag2 法による SNPs の検出を行った。

### 3. 研究の方法

供試したニワトリは以下の図のとおり、土佐地鶏・小国・薩摩鶏・インギー・ロードアイランドレッド・ライトサセックス・ホワイトプリマスロック・アローカナ・ブロイラー (コブ)・レイヤー (エクセルリンク) の 10 集団であり、ヤケイはセキショクヤケイ・セイロンヤケイ・ハイロヤケイ・アオエリヤケイの 4 種であり、用いた全個体数は 239 羽であった。



本研究で作成できたニワトリ SNPs は、以下のとおり 96SNPs について作製した。そのうち SNPs のタイピングができたものは 79SNPs であった。

SNP No.	dbSNP ID	Chr	SNP position	SNP No.	dbSNP ID	Chr	SNP position
SNP01	rs15190368	1	5840219	SNP49	rs16267376	5	5503870
SNP02	rs15192185	1	18275221	SNP50	rs16706029	5	17663777
SNP03	rs15219669	1	30483641	SNP51	rs16728257	5	29545146
SNP04	rs15245305	1	42322973	SNP52	rs16496780	5	42418621
SNP05	rs16090699	1	53798113	SNP53	rs16511945	5	54444322
SNP06	rs15295408	1	66365107	SNP54	rs16532626	6	6316758
SNP07	rs16735514	1	78380448	SNP55	rs16549374	6	18973629
SNP08	rs15335728	1	90084367	SNP56	rs16563836	6	31480469
SNP09	rs15358380	1	102449807	SNP57	rs16579979	7	6674001
SNP10	rs15384180	1	114485643	SNP58	rs16592045	7	19355740
SNP11	rs15411726	1	126455494	SNP59	rs16607587	7	31964220
SNP12	rs15431859	1	138046864	SNP60	rs16621465	8	4816571
SNP13	rs15458009	1	150463828	SNP61	rs16631184	8	15351448
SNP14	rs15466863	1	162025942	SNP62	rs16643812	8	25498401
SNP15	rs15499955	1	174489438	SNP63	rs16663226	9	6037230
SNP16	rs15531419	1	186493205	SNP64	rs16674770	9	18947734
SNP17	rs15857736	1	198484571	SNP65	rs15567717	10	5953037
SNP18	rs15877507	2	6497393	SNP66	rs15586693	10	16759429
SNP19	rs15908381	2	18483711	SNP67	rs14959885	11	5268084
SNP20	rs15935351	2	30455653	SNP68	rs16062000	11	16867474
SNP21	rs15965721	2	42361517	SNP69	rs15639154	12	5498471
SNP22	rs15965700	2	42354661	SNP70	rs15663821	12	15406395
SNP23	rs15992467	2	54122042	SNP71	rs15668857	13	4284118
SNP24	rs16023472	2	66497760	SNP72	rs15713212	13	14490314
SNP25	rs16040665	2	78367361	SNP73	rs15725999	14	4403927
SNP26	rs16057651	2	90451426	SNP74	rs16062676	14	12449581
SNP27	rs16743123	2	113754602	SNP75	rs15768044	15	3990830
SNP28	rs16121133	2	126225804	SNP76	rs15788059	16	131611
SNP29	rs16138574	2	137669282	SNP77	rs16711522	17	2835890
SNP30	rs15162423	2	149966900	SNP78	rs13507058	18	3151755
SNP31	rs16219113	3	5546279	SNP79	rs14117360	19	2303927
SNP32	rs15747460	3	16647850	SNP80	rs16163376	20	3835177
SNP33	rs16242700	3	28362684	SNP81	rs16173192	20	10933006
SNP34	rs16255054	3	39367961	SNP82	rs13602946	21	2236947
SNP35	rs16272765	3	50440946	SNP83	rs14286447	22	830958
SNP36	rs16284912	3	61256784	SNP84	rs16188930	23	3194256
SNP37	rs16296696	3	71690934	SNP85	rs16194565	24	1949991
SNP38	rs16309780	3	83494417	SNP86	rs16346140	26	810037
SNP39	rs16321816	3	94416860	SNP87	rs13716503	27	1125385
SNP40	rs14405359	3	104524794	SNP88	rs16211202	28	1160825
SNP41	rs16355514	4	5868530	SNP89	rs16687428	2	6651662
SNP42	rs16370918	4	18216857	SNP90	rs16761111	Z	18519090
SNP43	rs16380594	4	30470532	SNP91	rs16769028	Z	30558351
SNP44	rs16395418	4	41749037	SNP92	rs16744356	Z	42218742
SNP45	rs16412125	4	54490451	SNP93	rs16772116	Z	53941908
SNP46	rs16425707	4	66447459	SNP94	rs16775422	Z	66018463
SNP47	rs16436181	4	77933017	SNP95	rs3137313	mt	240
SNP48	rs16450248	4	89826251	SNP96	rs16616403	7	38342002

DigiTag2 の方法は、Nishida ら (Analytical Biochemistry, 2007) にしたがった。得られた SNPs の遺伝子型のデータを近隣結合法 (NJ) に

よる系統樹解析、STRUCTURE2.3.1 (Pritchard et al. 2000)による集団構造解析、EIGENSTRAT (Price et al. 2006)による主成分分析で解析を行った。

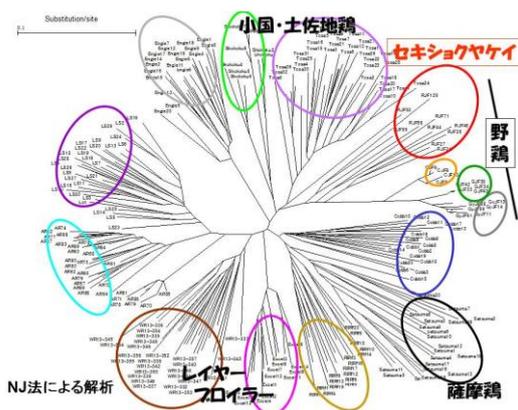
#### 4. 研究成果

解析を行った 96SNPs のうち、76SNPs で遺伝子型を決定でき、その遺伝子型から以下のことが明らかとなった。

76SNPs のうち 2SNPs で多型が見られなかった。したがって、本研究から 74SNPs が解析に有効な SNPs であり、今後の解析に用いられるセットとして活用できる。

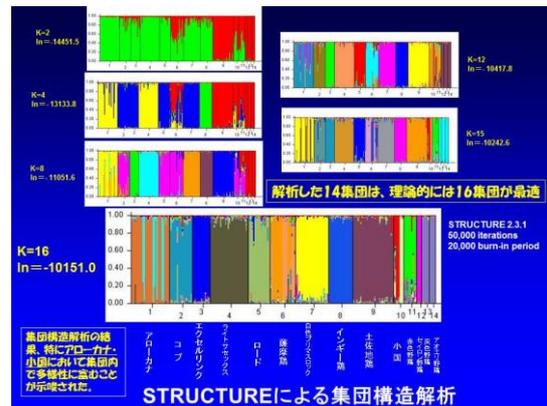
NJ 系統樹では、ヤケイ、日本鶏、外国鶏および商用鶏がそれぞれ独自のクラスターを作った。ニワトリとはセキショクヤケイが最も近縁であった。続いて、セイロンヤケイ、ハイロヤケイ、アオエリヤケイとこれら3種のヤケイが離れて位置した。この結果は、これまで報告されている報告と一致するものであった。一方、セキショクヤケイの種内変異は他のヤケイおよびニワトリ各集団に比べて大きく、つまりセキショクヤケイの分岐のみが多岐にわたっていた。このことはセキショクヤケイのみがヤケイの中で唯一亜種を5つ有することと一致するものであった。

本研究での解析では、セキショクヤケイと近縁であったのは日本鶏であり、その品種は土佐地鶏、小国であった。とくに、土佐地鶏が近縁であり、これはこれまでの一部の報告と一致した。ただし、日本鶏以外のアジア在来鶏が含まれていないために今後その成果が期待される。

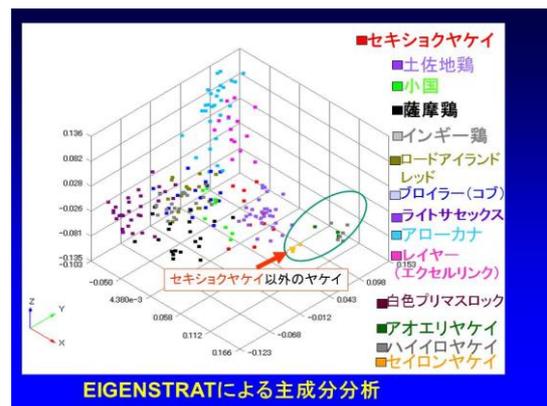


STRUCTURE による集団構造解析から、用いた 14 集団は 16 集団に分けることが最尤であり、アローカナおよび小国で集団内の多様性に富むことが示唆され、これら 2 集団でそれぞれ 2 つずつ集団が含まれていることが示唆された。この STRUCTURE の解析結果は NJ 系統樹におい

てその分岐が 2 つあることと一致した。その他の集団では比較的遺伝的に均一であることが観察できた。



主成分分析では上位主成分の寄与率は低かったが、三次元表では集団毎に比較的纏まっており、特にヤケイ4種ではセキショクヤケイがニワトリと最も近くに位置に、それ以外のヤケイはセキショクヤケイよりも離れて位置した。



総合同値確率（ある個体と別の個体とを誤判定する確率, Peelman et al. 1988）が  $2.70 \times 10^{-20}$  となり、作出した SNPs マーカーを用いれば理論的に世界中全ての鶏 (FAOSTAT, 2011 年によれば世界の鶏飼育羽数  $1.99 \times 10^{10}$  であった) の個体識別を行うことが可能であることが明らかとなった。つまり、本システムで世界中のニワトリの個体識別が理論的に十分可能であることが示唆された。

今回開発した DigiTag2 法によるニワトリ・ヤケイ SNPs 検出システムは品種鑑別や個体識別に有用であることが示唆された。

総合同値確率  
 $P = 2.70 \times 10^{-20}$   
 $P = \prod_{i=1}^n (\sum_{j=1}^m a_{ij} + 4 \sum_{k=1}^m \sum_{l=1}^m a_{ik} a_{lj})$  (Peehman et al. 1988)  
 よって、理論的には、少なくとも10<sup>19</sup>羽の  
 ニワトリの個体識別が可能  
 世界のニワトリ飼養羽数  
 1.99 × 10<sup>10</sup>羽 (FAOSTAT database, 2011)  
 したがって、  
 本システムで世界中のニワトリの個体識別が  
 (理論的に)可能である。  
 今回開発したDigiTag2法によるニワトリ・ヤケ  
 イのSNPs検出システムは品種鑑別や個体識  
 別に有用であることが示唆された。

この研究の成果を基に、イノシシおよびブタについての SNP マーカー作製について実施することも可能であると考えられ、本経験を生かして一部実施を始めた。

#### 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 4 件)

① Takeshi Shimogiri, Nao Nishida, Miyuki Kudo, Kousuke Niwa, Masahide Nishibori, Keiji Kinoshita, Shin Okamoto, Yoshizane Maeda, Katsushi Tokunaga, and Hiroshi Yasue. Genetic relationships between Japanese native and commercial breeds using 70 chicken autosomal SNP genotypes by the DigiTag2 assay. *Animal Genetics*, 43(1): 98-103. 2012. 査読あり

② Mohammed A. Islam, and Masahide Nishibori. Phylogenetic Analysis of Native Chicken from Bangladesh and Neighboring Asian Countries Based on Complete Sequence of Mitochondrial DNA D-loop Region. *Journal of Poultry Science*, 49(4): 237-243, 2012. 査読あり

③ Mohammad F. Ahmed, Masahide Nishibori, and Mohammed A. Islam. Production and price of indigenous naked neck and full feathered chicken reared under rural scavenging system in Bangladesh. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, 4(4): 92-97, 2012 査読あり

④ Jahan Rowshan, Miyuki Kumagae, Masahide Nishibori, Hiroshi Yasue and Yasuhiko Wada. Japanese Silkie fowls are widely distributed in the phylogenetic tree derived from mitochondrial complete D-loop nucleotide sequences. *Journal of Poultry Science*, 48(3): 176-180. 2011. 査読あり

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

西堀 正英 (NISHIBORI MASAhide)  
 広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授  
 研究者番号：80237718

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし