

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450399

研究課題名(和文)ニホンウズラリゾチーム多型の抗菌力の強さと生産形質への効果

研究課題名(英文)Effect of lysozyme polymorphism on antimicrobial activity and economic traits in Japanese quail

研究代表者

下桐 猛 (SHIMOGIRI, Takeshi)

鹿児島大学・農水産獣医学域 農学系・准教授

研究者番号：40315403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：家禽の抗菌タンパク質の変異が生産性に与える影響について検討した。抗菌能力や孵化率に関わるニホンウズラのリゾチーム遺伝子の変異が6週齢時体重、平均卵重、育成率には影響しないことを明らかにした。ニワトリのオボトランスフェリンの原因変異の特定を行い、B型とC型はAsp500Asnが原因変異であり、抗菌能力に差がないことを示した。以上、抗菌タンパク質の変異が家禽の生産性に関わる影響の一端を検討できた。

研究成果の概要(英文)：I investigated the effect of the variants of antimicrobial proteins on poultry production in this study. A polymorphism of the lysozyme gene, which was related to antimicrobial activity and hatchability, did not significantly affect the body weight at 6th weeks old, average egg weight and survival rate in Japanese quail. I tried to identify causal mutations of three variants of the chicken ovotransferrin gene. An Asp500Asn mutation was identified as a causal mutation between B and C variants. The B and C variants purified from egg white were not significantly different in antibacterial activity.

研究分野：動物遺伝学

キーワード：リゾチーム 家禽 抗菌タンパク質 生産形質 変異

1. 研究開始当初の背景

リゾチーム (EC 3.2.1.17) は、129 のアミノ酸で構成され、分子量が 14,500 と小さい酵素であり、黄色ブドウ球菌などのグラム陽性菌の細胞壁を溶解する働きを持つ。本酵素は、家禽の卵白タンパク質の約 3~4% を構成しており、胚発生の過程での細菌等の感染防御を担っているとされる。ただ、卵白以外でもあらゆる組織や体液にも存在し、生体の感染防御因子として機能するとされている。しかしながら、リゾチームの生体内における機能には未解明な点が多い。ニホンウズラの卵白リゾチームには電気泳動によりタンパク質多型 (S 型と F 型) が得られる。申請者らのグループは、これらの原因変異がリゾチーム遺伝子の 1 塩基多型 (SNP) による成熟体リゾチームの 21 番目のアミノ酸置換 (Q21K) であること、精製卵白リゾチームの黄色ブドウ球菌 (グラム陽性菌) に対する抗菌力で有意に F 型 > S 型であること、孵化率で卵白中の表現型で有意に S 型 > F 型であり、4~5% の差があることを初めて示した。つまり、本変異は卵白リゾチームの機能に影響し、生産能力にも影響する可能性を示唆する。

2. 研究の目的

遺伝的に異なる集団を使って正逆交雑家系を構築し、卵白リゾチーム多型と孵化率との関係を再検証する。

リゾチームの遺伝子型と生産能力 (育成率、成長に関わる能力、生産卵量など) との関係を調査する。

家禽の他の抗菌タンパク質の変異と抗菌活性との関係を調査する。

3. 研究の方法

大学で飼養していたニホンウズラ系統と豊橋養鶏農業共同組合から導入したニホンウズラ系統の系統間交雑種を用いた。リゾチームの遺伝子型は、ミスマッチ PCR-RFLP により判定し、雌 FF 型×雄 SS 型を 11 ペア、雌 SS 型×雄 FF 型 15 ペアから採卵した。10 日間の採卵後、立体孵化器で人工ふ化をさせた。孵化後に、孵化数の調査をし、また、孵化しなかった卵については、割卵し受精および発生の有無を調べた。上記の試験を 3 回繰り返し、その結果をコクラン・マンテル・ヘンツェル検定により統計解析した。

鹿児島市の養鶏業者から導入したニホンウズラを用いた。血液からゲノム DNA を抽出し、リゾチーム多型の遺伝子型判定を行った。供試した個体は市販の飼料を給餌させた。測定形質は、6 週齢時体重、6 週齢時までの育成率、10 週齢から 14 週齢までの平均卵重を用いた。

ニワトリのオボトランスフェリンの変異体 (A、B、C) を対象に調査した。B 型と C 型の変異体については、薩摩鶏の卵管 cDNA から原因変異の候補 SNPs を同定した後、得

られた候補部位について、薩摩鶏と台湾在来鶏の保有個体のゲノム DNA を使って、調査した。A 型と B 型についてはタイ在来鶏とセキシヨクヤケイの保有個体のゲノム DNA を使って、オボトランスフェリン遺伝子の塩基配列を決定し、卵白でのオボトランスフェリンの遺伝子型と一致する DNA 上の変異を調査した。また、B 型と C 型の変異体については、新鮮卵を使って、オボトランスフェリンタンパク質の精製を行い、抗菌活性を測定した。抗菌活性の測定法には、液体培地希釈法を使い、グラム陽性菌 (黄色ブドウ球菌)、陰性菌 (大腸菌) の両方で試験した。

4. 研究成果

正逆交配で得られた孵化率は、 $FF_{\text{♀}} \times SS_{\text{♂}}$ で 87.0% (83.3% ~ 91.4%)、 $SS_{\text{♀}} \times FF_{\text{♂}}$ で 92.2% (90.7% ~ 95.1%) で、統計的に有意ではなかったものの、約 5.2% の差があり、以前の研究と同様な傾向が認められた。

研究の結果、6 週齢時体重で SS 型 80.13±8.38g、SF 型 85.13±10.95g であり、育成率は SS 型 67.2%、SF 型 72.4% であり、平均卵重は SS 型 9.60±0.60g、SF 型 9.37±0.35g であった。これらを統計解析した結果、全ての形質で遺伝子型間に有意な差は確認できず ($P > 0.05$)、リゾチームの遺伝子型が孵化率以外の形質に影響を及ぼさない可能性が示唆された。

ニワトリのオボトランスフェリンの B 型と C 型については、卵管 cDNA を用いた研究から 3 か所のアミノ酸置換 (Ser52Ala、Ile96Val、Asp500Asn) が変異体の遺伝子型に対応した。その後、ゲノム DNA を用いた研究により、1 か所のアミノ酸変異 (Asp500Asn) が変異体の原因であることが特定された。他方、オボトランスフェリンの A 型と B 型については、変異体による遺伝子型に対応する DNA 多型が見つからず、原因変異を特定することができなかった。この結果から A 型と B 型の原因変異は、タンパク質の翻訳後修飾などの可能性が示唆された。次に、卵白から抽出したオボトランスフェリンの B 型と C 型の変異体を使って、抗菌活性を測定した結果、どちらもグラム陽性菌、陰性菌の両方に対して抗菌活性を示したが、お互いの間で有意な差を認めることができなかった。

以上、ニホンウズラのリゾチームを中心に家禽の抗菌タンパク質の変異とその生産性への影響を評価することができた。

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 9 件)

Kinoshita K, Myint SL, Shimogiri T, Ibrahim HR, Kawabe K, Okamoto S, Lee YP, Matsuda Y, Maeda Y. Chicken

ovotransferrin variants OTF^B and OTF^C harboring substitution of GAT (Asp) to AAT (Asn) in the codon 500 and their antimicrobial activity. Journal of Poultry Science, 査読有, accepted, 2016.

齊藤祐也・笹崎晋史・下桐猛・大島一郎・片平清美・印牧美佐生・国枝哲夫・万年英之. 高密度 SNP アレイを用いた口之島野生化牛の全常染色体及び各染色体に対する遺伝的多様性の評価. 日本畜産学会報, 査読有, 受理, 2016.

Nishi K, Shimogiri T, Kusano A, Sakamoto S, Shiromoto K, Kawabe K, Okamoto S, Honda T and Oyama K. Estimation of genetic parameters for carcass defects of Japanese Black cattle in Kagoshima. Animal Science Journal, 査読有, 87(5):655-660. 2016.

Maw AA, Kawabe K, Shimogiri T, Rerkamnuaychoke W, Kawamoto Y, Masuda S, Okamoto S. Genetic diversity and population structure in native chicken populations from Myanmar, Thailand and Laos by using 102 indels markers. Asian-Australasian Journal of Animal Science, 査読有, 28:14-19. 2015.

Riztyan, Kawabe K, Shimogiri T, Kawamoto Y, Rerkamnuaychoke W, Nishida T, Okamoto S. Genetic diversity and ancestral relationships of red junglefowls and domestic chickens in Southeast Asia. Journal of Poultry Science, 査読有, 51:369-374. 2014.

Elkhaat I, Kawabe K, Saleh K, Younis H, Nofal R, Masuda S, Shimogiri T, Okamoto S. Genetic diversity analysis of Egyptian native chickens using mtDNA D-loop region. Journal of Poultry Science, 査読有, 51:359-363. 2014.

Kawabe K, Worawut R, Taura S, Shimogiri T, Nishida T, Okamoto S. Genetic diversity of mtDNA d-loop polymorphisms in Laotian native fowl populations. Asian-Australasian Journal of Animal Science, 査読有, 27:19-23. 2014.

斯琴图雅, 西牧孝洋, 揖斐隆之, 辻岳人, 米田一裕, 大島一郎, 片平清美, 万年英之, 下桐猛, 印牧美佐生, 国枝哲夫. 口之島牛集団における経済形質、遺伝性疾患および毛色に関連する遺伝子の対立遺伝子頻度とその分布. 動物遺伝育種研究, 査読有, 42:11-19. 2014.

Maw AA, Shimogiri T, Yamamoto K, Kawabe K, Hamada K, Kawamoto Y, Okamoto S. The genetic diversity of eight chicken populations assessed by 102 indels markers. Journal of Poultry Science, 査読有, 50:99-103. 2013.

〔学会発表〕(計 1 2 件)

OYAMA H, NISHI K, IMAMURA K, SAKAMOTO S, KAWABE K, OKAMOTO S, HONDA T, OYAMA K, SHIMOGIRI T. Estimation of genetic parameters for stillbirth of Japanese Black cattle in Kagoshima, 17th AAAP ANIMAL SCIENCE CONGRESS, Fukuoka, 2016 年 8 月

松崎勇人・芝田晃一・河邊弘太郎・岡本新・下桐猛. ニワトリ精巢での一酸化窒素合成酵素 (NOS) の発現に関する研究, 日本家禽学会 2015 年度春季大会, 栃木, 2015 年 3 月

松崎勇人・芝田晃一・河邊弘太郎・岡本新・下桐猛. ニワトリ精巢での一酸化窒素合成酵素 (NOS) の発現に関する研究, 日本畜産学会第 119 回大会, 栃木, 2015 年 3 月

下桐猛・吉田彩華・笹崎晋史・片平清美・大島一郎・河邊弘太郎・岡本新・印牧美佐生・国枝哲夫・万年英之. 50K SNP チップを用いた口之島野生化牛の遺伝的多様性に関する研究, 日本動物遺伝育種学会第 15 回大会, 埼玉, 2014 年 11 月

Hla Hla Moe・奥田ゆう・Moe Lwin・Kyaw Kyaw Moe・河邊弘太郎・岡本新・印牧美佐生・万年英之・国枝哲夫・下桐猛. ミャンマー在来牛を用いた Bos taurus 由来 DNA マーカーの遺伝子型判定, 日本動物遺伝育種学会第 15 回大会, 埼玉, 2014 年 10 月

I. Elkhaat・河邊弘太郎・R. Worawut・K. Saleh・H. Younis・R. Nofal・下桐猛・田浦悟・岡本新. セキショクヤケイおよび在来鶏のプロラクチンプロモーター領域における挿入欠失変異の分布, 日本家禽学会 2014 年度秋季大会, 鹿児島, 2014 年 9 月

西和隆・下桐猛・草野昭徳・坂元信一・城元清巳・河邊弘太郎・岡本新・本多健・大山憲二. 鹿児島県産黒毛和種の枝肉における瑕疵間の遺伝相関の推定, 日本畜産学会第 118 回大会, 茨城, 2014 年 3 月

西和隆・下桐猛・草野昭徳・坂元信一・城元清巳・河邊弘太郎・岡本新・本多健・大山憲二. 鹿児島県産黒毛和種を用いた瑕疵と枝肉 6 形質の遺伝相関及び表型相関, 第 6 回日本暖地畜産学会鹿児島大会, 鹿児島, 2013 年 10 月

中島光海・西和隆・時任歩美・今村清人・坂元信一・河邊弘太郎・岡本新・下桐猛. 鹿児島県産黒毛和種で発生する流死産に関する研究, 第 6 回日本暖地畜産学会鹿児島大会, 鹿児島, 2013 年 10 月

下桐猛・林礼華・米坂陸・石井大介・片平清美・大島一郎・庭田悟・河邊弘太郎・岡本新・万年英之・向井文雄・安江博. 口之島野生化牛の遺伝的多様性に関する研究, 第 6 回日本暖地畜産学会鹿児島大会, 鹿児島, 2013 年 10 月

下桐猛・Si Lhyam Myint・木下圭司・Hisham R. Ibrahim・河邊弘太郎・前田芳實・

岡本 新、ニホンウズラの卵白リゾチームに関する遺伝学的研究、第 1 回ウズラ研究会、愛知、2013 年 12 月

松崎勇人、芝田晃一、河邊弘太郎、岡本新、安江博、下桐猛、ニワトリ精巢での一酸化窒素合成酵素(NOS)の発現に関する研究、日本動物遺伝育種学会第 14 回大会、東京、2013 年 10 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://ris.kuas.kagoshima-u.ac.jp/html/100005031_ja.html?k=%E4%B8%8B%E6%A1%90#item_kihon

<http://ace1.agri.kagoshima-u.ac.jp/agri0016/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

下桐 猛 (SHIMOGIRI, Takeshi)

所属・職：鹿児島大学・農水産獣医学域
農学系・准教授

研究者番号：40315403

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：