

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450389

研究課題名(和文) 日本鶏における闘争性と代謝調節関連の遺伝子多型との関連

研究課題名(英文) Association between aggressiveness and metabolic related genes in Japanese native chickens

研究代表者

豊後 貴嗣 (Bungo, Takashi)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：40325361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリの闘争性を闘争-逃走反応の観点から評価するとともに、その行動特性と気質/代謝関連遺伝子との関係性について調査した。モノアミン関連遺伝子(MAOおよびST)の遺伝子多型がストレス反応性と関連し、ストレス反応試験が闘争性の評価に有効であることが示唆された。一方、代謝関連遺伝子多型は一部行動特性への関与は認められるものの成長とともにその影響に変化のあることが示された。

研究成果の概要(英文)：The objective of the present study was to (1) estimate aggression, and (2) investigate the relationship between behavioral traits and temperament/metabolic related polymorphisms in chickens. It found that there was association between monoamine-related polymorphisms (monoamine oxidase A and serotonin transporter) and stress responses. It is suggested that, from the viewpoint to "fight or flight response", some stress response tests are effective to estimate aggression of chickens. On the other hand, metabolic related polymorphisms had partial relationships with some behavioral traits, but it seemed that the effects had changed with age.

研究分野：家畜管理学

キーワード：日本鶏 闘争性 遺伝子多型 アニマルウェルフェア

## 1. 研究開始当初の背景

家畜の気質研究の意義は、第一に、アニマルウェルフェアの向上という点においてである。我が国におけるアニマルウェルフェアの現状は、十分な理解および対応がなされているとは云えないが、自由貿易協定にみられるように、グローバル化の名の下に行なわれる包括的経済連携においては、アニマルウェルフェアの厳格化および法令化が付帯条件として要求され、アニマルウェルフェア概念の良否に関わらず、今後我が国においても益々その規制は激しくなることが予想される。したがって、我が国の研究者は先取をもってこれに備えなければならない。アニマルウェルフェアの向上にむけた指針としては、「ストレス（苦痛）からの開放」がキーワードのひとつとして挙げられる。そのために注意が払われるのは、主に、家畜の取り扱いや飼育環境であるが、もう一方ではストレス刺激に対して感受性の低い（抗ストレス性）家畜の選抜も試みられている。しかし、我が国においては、抗ストレス性を指標とした育種選抜について調査研究さえ行なわれるに至っていないのが現状である。研究意義の二つ目は、飼育者の作業性の向上である。古来より家畜化の条件として、取り扱い易さ、すなわち温和な動物であることが挙げられる。これは、家畜による攻撃が飼育者にとって脅威となるとともに作業の煩雑さを伴うためである。さらに、家畜同士の闘争の多くは、創傷などを伴い生産性のみならず管理上においても大きな問題となりうる（治療や隔離を要する）。ストレス刺激に対する行動的初期反応は闘争・逃走反応であり、ストレス反応およびそれに関わる性格（気質）の研究は動物の攻撃性をも明らかとするものである。したがって、本研究は作業効率の向上、さらには飼育者の福祉にも繋がる。

## 2. 研究の目的

日本鶏の長所を損なわずに、“温和なJAS地鶏”を作出するための礎として、①日本鶏の品種あるいは個体ごとの闘争性を多角的に評価するとともに、②その行動特性と気質関連遺伝子、なかでも代謝調節関連遺伝子の多型との関連性について調査する。また、その過程で③鶏の管理上問題となる「気質（闘争性）」の評価基準策定を行なうものである。

ニワトリの闘争性を多角的に評価するとともに、その行動特性と気質・代謝関連遺伝子の関係性について調査を行った。(1)行動反応試験を用い、各品種・系統の鶏の行動特性を調査、(2)気質・代謝関連遺伝子多型解析を行い、各品種・系統の特徴を調査、(3)行動特性と気質関連遺伝子多型の関連性について解析を行った。これによって、ニワトリの

闘争性を闘争-逃走反応の観点から評価するとともに、その行動特性と気質あるいは代謝関連遺伝子との関係性について明らかにし、ニワトリの気質-行動特性-代謝の関係を新たな視点で評価するための基礎的情報を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

<試験1>ニワトリヒナの行動反応における品種・系統間差：シャモ（831および833系統）、土佐九斤および卵用鶏の雄ヒナを用い、持続性不動（TI）および手動拘束（MR）の2つ行動試験を実施した。TI試験では、不動姿勢導入の試行回数と姿勢持続時間を、MR試験では、“もがき”の初動時間と総もがき回数を記録した。

<試験2>大軍鶏におけるモノアミン関連遺伝子多型と行動特性：愛好家由来の大軍鶏（上鶏および下鶏：15-16週齢）を用い、2つ行動試験（TIおよびMR）を実施するとともに、それぞれの血液からDNAを抽出して、ドーパミン受容体D2およびD4（DRD2、DRD4）、モノアミンオキシダーゼ（MAO）、セロトニントランスポーター（ST）に生じた多型を調査した。DRD2は、遺伝子上流の調節領域の一塩基多型（C/T）をRFLP法にて検出した。DRD4、MAOおよびSTについては、反復配列の多型を自動DNAシーケンサーで解析した（DRD4：エキソン、MAO：イントロン4と9（MA04、MA09）、ST：イントロン2と10（ST2、ST10））。

<試験3>日本鶏の行動とモノアミン関連遺伝子多型の特性比較：シャモ（831および833系統）、土佐九斤、卵用鶏、八木戸の雄を用いて、持続性不動（TI）および手動拘束（MR）の2つ行動試験を実施した。また、血液からDNAを抽出して、モノアミン関連遺伝子（DRD2、MAOおよびST）および成長ホルモン放出因子受容体（GHSR）多型解析を行った。

<試験4>日本鶏の気質関連遺伝子多型と12週齢時の行動反応：シャモ（831および833系統）および八木戸の雄12週齢を用いて、2つ行動試験を実施するとともにモノアミン関連遺伝子（DRD4、MAOおよびST）の多型解析を行った。

<試験5>大軍鶏ヒナ4系統の攻撃行動と遺伝子多型：シャモ（831および833系統、上鶏および下鶏）を用いて、TIおよびMR試験とともに、手突き攻撃反応試験（ヒトの手に対する反応を攻撃反応、姿勢、突き回数などから評価）を行った。また、対象鶏の血液からDNAを抽出してモノアミン関連遺伝子（DRD2、MAOおよびST）および成長ホルモン放出因子受容

体 (GHSR) 多型解析を行った。

<試験 6> シャモ及びプリマスロックの行動反応と気質関連遺伝子多型の比較：シャモ (831系統)、白色プリマスロック (WPR) 及びそのF1を対象として、MR試験を実施するとともに、各個体のDRD2、DRD4、MAO、セロトニントランスポーター (ST) 及びPMEL17の多型解析を行った。

<試験 7> 龍神地鶏および土佐地鶏の行動特性とモノアミン関連遺伝子多型：龍神地鶏および土佐地鶏の成鶏を用い、2つ行動試験を実施するとともにモノアミン関連遺伝子 (DRD4、MAOおよびST) の多型解析を行った。

<試験 8> 日本鶏の行動性ストレス反応における性差と代謝調節関連遺伝子多型：シャモ (831および833系統)、八木戸、土佐地鶏、ロードアイランドレッド (RIR) および白色プリマスロック (WPR) を用い、12週齢時に2つの行動試験を実施した。また、各個体のGHSRおよびPOMC (プロオピオメラノコルチン) の多型解析を行った。

<試験 9> 12週齢時の肉質の品種/系統間差：シャモ (831および833系統)、八木戸、土佐地鶏、ロードアイランドレッド (RIR) および白色プリマスロック (WPR) を用い、これらのモモ肉における遊離アミノ酸含量を比較した。

<試験 10> 異品種同居がニワトリの行動性ストレス反応に及ぼす影響：八木戸および卵用鶏を用いて、同種あるいは異種混合飼育を行なった。各ヒナは、2日齢より2週齢時までは8羽を、その後は4羽を一群とし、同種および異種群の羽数および構成が等しくなるよう設定した。2、4および7週齢時にTIおよびMR試験を実施し、品種、同居個体および週齢の効果について解析した。

#### 4. 研究成果

<試験 1> TI試験の試行回数は、品種・系統間に大きな違いは認められなかったが、姿勢持続時間は、卵用鶏において最も長いことが示されるとともに、シャモでも系統によって違いのあることが認められた。MR試験の初動時間では、品種・系統間の違いはなかったが、総もがき回数において土佐九斤が最も回数の少ないことが示された。

以上の結果から、TI試験の姿勢持続時間およびMR試験のもがき回数は、品種・系統間差の分類指標になるものと考えられた。

<試験 2> TI試行回数は、上鶏と下鶏に大きな違いは認められなかったが、姿勢持続時間

が、下鶏において短い傾向が示された。MRの初動時間は、系統間に大きな違いは認められなかったが、総もがき回数は、下鶏において多い傾向が示された。DRD2は上鶏の2個体を除き、Cアレルに固定されており、DRD4ではすべての個体で同じアレルが検出された。モノアミンオキシダーゼでは、MOA4で2つ、MOA9で4つのアレルが認められた。MOA9の4つのアレルのうち、2つは上鶏に、1つは下鶏に固有のアレルであった。セロトニントランスポーターでは、ST2で3つ、ST10で4つのアレルが認められた。ST10の1つのアレルは下鶏に固有のものであった。ST2およびST10の各アレルの組み合わせで集計したところ、7つの型に分類された。下鶏のみで認められた型と他の型の組み合わせ間で行動試験の各項目を比較したところ、下鶏のみで認められた型の姿勢持続時間が有意に短いことが認められた。

以上の結果から、大軍鶏において上鶏および下鶏間で行動反応に違いのあること、その違いとST2およびST10の遺伝子多型との間に関連性のあることが示唆された。

<試験 3> TI試行回数は、八木戸が最も多く、姿勢持続時間は八木戸が最も短く、卵用鶏が最も長かった。MRの初動時間は、卵用鶏が最も長く、八木戸が最も短かった。MAO4、MOA9においては共に5つのアレルが検出された。MAO4の5つのアレルのうち、1つは卵用鶏に固有のアレルであった。MAO9の5つのアレルのうち、1つは九斤に固有のアレルであった。ST2、ST10においても共に5つのアレルが検出された。ST2の5つのアレルのうち、一つは八木戸に固有のアレルであった。ST10の5つのアレルのうち、1つは八木戸に固有のアレルであった。GHSR遺伝子に認められた対立遺伝子型頻度は、TT型73.68%、TC型25.33%、CC型0.06%で、対立遺伝子頻度は、T対立遺伝子が0.863、C対立遺伝子が0.127であった。行動反応試験との関係では、姿勢持続時間においていずれも差が認められた。

以上の結果から、MAOおよびSTの遺伝子変異やGHSR遺伝子の対立遺伝子Cは相加的に姿勢持続時間を短くする効果のあることが示唆された。

<試験 4> DRD4では、すべての個体で同じアレルが検出されたが、MAOではMAO4および9とも4つ、STではST2および10とも5つのアレルが認められた。なお、両STの5つのアレルのうち、一つは八木戸に固有のアレルであった。行動反応については、いずれの行動試験においても、品種・系統間での著しい違いは認められなかったものの、ST10の各アレルの組み合わせで集計したところ、TIの項目において違いのあることが示された。

以上の結果から、日本鶏の行動反応とST10の遺伝子多型との間に関連性のあることが示唆された。

<試験5> TI試行回数は系統間に差は認められなかったが、姿勢持続時間は、上鶏>831系統>下鶏>833系統の順に長く、833系統が上・下鶏よりも短かった。手突き攻撃反応試験の攻撃反応および姿勢の評点は、いずれも下鶏>上鶏>833系統>831系統の順に高く、831系統のそれが上・下鶏よりも低かった。防御行動および突きについては、上・下鶏において多くの個体はその行動を示したのに対し、831および833系統ではほとんど観察されなかった。MRの初動時間については系統間に差は認められなかったが、初鳴時間において、上鶏>下鶏>831系統>833系統の順に遅く、833系統において上・下鶏よりも早いことが示された。総もがき回数は、下鶏において831および833系統よりも少ないことが示された。GHSR遺伝子に認められた対立遺伝子型頻度については、上鶏と831系統ではそのほとんどがTT型であった。DRD2遺伝子では、831系統においてのみCTおよびTT型が認められた。MAOについては、MOA4で3つ、MOA9で4つのアリルが認められ、MOA4の3つのアリルのうち1つは833系統に固有のアリルであった。また、MOA9の4つのアリルのうち、2つは上鶏と833系統に、1つは831系統に固有のアリルであった。STについては、ST2およびST10ともに5つのアリルが認められ、ST2では831系統に固有のアリルが1つあった。一方、ST10では上・下鶏に固有のアリルが2つ、831および833系統に固有のアリルが1つあった。しかし、各行動試験の結果を遺伝子型ごとに集計したところ、行動特性と遺伝子型との間に明確な違いは認められなかった。

以上のことから、シャモの系統間で行動反応に違いはあるものの、これらの違いにGHSR、DRD2、MAOおよびSTの遺伝子多型が関係している可能性は低いものと考えられた。

<試験6> MR試験の初動時間は、品種の効果及び交互作用が示されWPRの雄で最も短かった。もがき回数は、品種の効果のみが認められWPRにおいて多かった。DRD2の場合、WPRではC対立遺伝子頻度が1.00であったのに対し、SHMおよびF1はT対立遺伝子も検出された。PMEL17は、対立遺伝子頻度に大きな違いは見られなかった。DRD4、MAO4、MAO9、ST2、ST10においてそれぞれ2、2、5、3、4つのアリルが検出された。いずれの遺伝子においても、シャモあるいはWPR固有のアリルが確認された。

以上の結果から、行動反応および遺伝子型いずれにおいても、シャモとWPRとの間に違いのあることが明らかとなった。

<試験7> TIでは不動姿勢導入の試行回数において龍神地鶏のほうが多い傾向が認められた。MRでは雄が雌に比べて初動時間が長く、もがき回数が多い結果となった。また、MRの鳴き回数において品種と性の交互作用が認められた。土佐地鶏においては遺伝子型と行動との間に明確な関係は認められなかった。龍神地鶏において、ST2を除くすべての座位で多型が認められなかった。一方、龍神地鶏のTIおよびMRの結果にはばらつきが認められたため、今回調査した5座位の多型がTIおよびMRの結果に寄与する程度は低いものと考えられた。

<試験8> (品種×性) TIの試行回数において品種の効果が示されたが、性の効果および交互作用はなかった。持続時間については、いずれの効果も認められなかった。MR試験では、もがき回数および初動時間いずれにおいても品種の効果が認められたが、性の効果および交互作用はなかった。(POMC×性) 幼齢期ではTIの試行回数および持続時間ともにPOMCの効果がみられたが、MR試験では、初鳴時間においてのみPOMCの効果と交互作用が示された。12週齢時では、MR試験の総もがき回数においてのみPOMCの効果が認められた。(品種×GHSR) TIの試行回数においてのみ交互作用が示された。MR試験では、両項目とも品種の効果のみ認められた。

以上の結果から、行動性ストレス反応は、性による違いのないこと、また、代謝関連遺伝子多型と関連性は示唆されるものの、週齢によってその影響は変化することが考えられた。

<試験9> 測定した遊離アミノ酸については、雌雄間に大きな違いはなかったものの、八木戸および土佐地鶏が他の品種/系統とは大きく異なった。すなわち、この2品種の旨味に関与するアスパラギン酸とグルタミン酸、甘味に関係するセリンおよびアラニンの含量は、他のものより2-3倍も多いことが認められた。

<試験10> TIの試行回数は、八木戸が卵用鶏よりも有意に多かったが、同居あるいは週齢の効果は認められなかった。姿勢持続時間は、同居の効果はなかったが、卵用鶏の持続時間が八木戸よりも長いこと、週齢によって変化した。MRの初鳴時間は、八木戸の方が卵用鶏よりも短かったが、同居あるいは週齢の効果は認められなかった。初動時間は、成長とともに短くなったが、品種あるいは同居の効果は認められなかった。総もがき回数は、品種、同居あるいは週齢いずれの効果も認めら

れなかった。また、3つの項目いずれにおいても交互作用は認められなかった。

以上の結果から、八木戸と卵用鶏は、同居個体という環境要因によって気質に関わる行動特性が変化しないものと考えられた。

#### <総合考察>

幼齢期に行った行動試験では、品種・系統による違いを検出した。また、成長後の行動試験と幼齢期での行動試験については、いくつかの品種・系統において相関が認められた。このことから、行動実験により、品種/系統間の行動特性は検出できること、また、品種/系統によっては幼齢期の行動特性から成長後の反応が予測できる可能性が考えられた。遺伝子多型解析の結果では、品種・系統ごとに特徴的な遺伝的相違があること、行動特性がこれら遺伝子多型を背景としたものである可能性が考えられた。行動と遺伝子多型との関連性について、DRD4 遺伝子多型は新奇探求性と関連性があることが報告されているが、本試験では行動との関連性は低かったことから、DRD4 遺伝子多型を鶏の気質の基準とすることは難しいと考えられる。今回の結果からは、哺乳類において衝動的攻撃と関係している MAO 遺伝子多型と不安との関連が指摘されている ST 遺伝子多型が、ニワトリにおいてもその気質に関連性が大きく、特に 12 週齢時の MR では初動時間において特に短くて、総もがき回数が多かったことから、ST2 ロングフォームであるニワトリは抗ストレスが高いものと考えられた。

ST10 ショートフォームの個体は幼齢期 TI の持続時間、幼齢期 MR の初動時間、12 週齢時 MR の初動時間において有意に高い値を示し、12 週齢時 MR のもがき回数においては有意に低い値を示した。ST10 においてはショートフォームの個体は、抗ストレス性が低いことが考えられる。以上のことから、ストレス感受性について育種選抜を行う際には、MA04、MA09、ST2、ST10 は指標として有効である可能性が示された。

本研究の結果から、幼雛期での行動反応試験をもとに成長後のストレス感受性を評価できる品種/系統があるものの、反応が変化する品種もあったことから、今回用いた行動試験は、気質評価指標として利用する場合に品種/系統別に精査を要するものと考えられた。行動特性と遺伝子多型との関連性については、MAO、ST の遺伝子多型を指標とすることが有効であることが示唆された。

気質評価のための行動指標や遺伝子型が用いられることで、生産現場においてもこれまでより容易かつにニワトリの気質を評価することが可能になり、飼育管理の改善につなが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)

[発表論文] (計 2 件)

(1) Fukano, N., Wada, N., Oka, T. and Bungo, T. (2015) Evaluation of a modified manual restraint test for estimating fearfulness in laying hens. *International Journal of Poultry Science*, 14(11): 602-605. 査読有

(2) Oka, T. and Bungo, T. (2014) Comparison of response to restraint test in two breeds of Japanese native chicken. *International Journal of Poultry Science*, 13(9): 545-548. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

(1) 岡 孝夫・吉留晃一・深野夏暉・豊後貴嗣 (2017) 日本鶏の行動性ストレス反応における性差と GHSR 遺伝子多型. 日本家禽学会春季大会. (3/30: 神戸市、神戸大学).

(2) 吉留晃一・豊後貴嗣 (2017) 異品種同居がニワトリの行動性ストレス反応に及ぼす影響. 日本家禽学会春季大会. (3/30: 神戸市、神戸大学).

(3) 岡 孝夫・深野夏暉・豊後貴嗣 (2016) 龍神地鶏および土佐地鶏の行動特性とモノアミン関連遺伝子多型. 日本家禽学会秋季大会. (9/16: 静岡市、静岡県総合研修所もくせい会館).

(4) 岡 孝夫・深野夏暉・小牧功典・清水健介・中川明子・豊後貴嗣 (2016) 幼雛期シャモの闘争様行動と *PMEL17* 遺伝子多型. 日本家禽学会春季大会. (3/30: 武蔵野市、日本獣医生命科学大学).

(5) 岡 孝夫・深野夏暉・中川明子・清水健介・豊後貴嗣 (2016) シャモ及びブリマスロックの行動反応と気質関連遺伝子多型の比較. 日本畜産学会第 121 回大会. (3/28: 武蔵野市、日本獣医生命科学大学).

(6) 岡 孝夫・深野夏暉・豊後貴嗣 (2016) 日本鶏のストレス反応. ヒトと動物の関係学会第 22 回大会. (3/5-6: 東京都、東京大学農学部アネックスセイホクギャラリー).

(7) 岡 孝夫・深野夏暉・豊後貴嗣 (2015) 大軍鶏 4 系統の攻撃行動と遺伝子多型. 第 39 回日本鳥類内分泌研究会. (11/21: 豊岡市、兵庫県立大学豊岡ジオ・コウノトリキャンパス).

(8) 深野夏暉・岡 孝夫・中川明子・清水健介・小牧功典・豊後貴嗣 (2015) 日本鶏の気質関連遺伝子多型と 12 週齢時の行動反応. 日本家禽学会秋季大会. (9/10: 江別市、酪農学園大学).

(9) 深野夏暉・岡 孝夫・小牧功典・田崎翔太郎・豊後貴嗣 (2015) 日本鶏ヒナのストレス反応と遺伝子多型. 日本家畜管理学会・応用動物行動学会合同 2015 年度春季研究発表会. (3/30: 宇都宮市、宇都宮大学峰キャンパス).

(10) 深野夏暉・岡 孝夫・小牧功典・田崎翔太郎・豊後貴嗣 (2015) 日本鶏ヒナにおけ

る行動特性とモノアミン関連遺伝子多型. 日本家禽学会春季大会. (3/30: 宇都宮市、宇都宮大学峰キャンパス).

(11) 岡 孝夫・豊後貴嗣 (2015) 「大軍鶏」の闘争行動. ヒトと動物の関係学会第21回大会. (3/7-8: 東京都、東京大学農学部アネックスセイホクギャラリー).

(12) 岡 孝夫・豊後貴嗣 (2014) 大軍鶏におけるモノアミン関連遺伝子多型と行動特性. 第38回日本鳥類内分泌研究会. (12/13: 熱海市、紀州鉄道 熱海ホテル).

(13) 深野夏暉・岡 孝夫・小牧功典・田崎翔太郎・豊後貴嗣 (2014) ニワトリヒナの行動反応における品種・系統間差. 日本家禽学会秋季大会. (9/28: 鹿児島市、鹿児島大学農学部).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

豊後 貴嗣 (BUNGO TAKASHI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号: 40325361

### (2) 連携研究者

岡 孝夫 (OKA TAKAO)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・研究員

研究者番号: 10533367