

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 20 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850166

研究課題名(和文)ユニークな資源家系の造成と高多型性マーカー開発によるウズラ経済形質遺伝子座の解明

研究課題名(英文) Identification of quantitative trait loci in Japanese quail using unique resource family and highly polymorphic markers

研究代表者

只野 亮 (Tadano, Ryo)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：70614048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、ウズラの経済形質関連遺伝子座のマッピングにむけて、コマーシャル・ウズラの遺伝子プールの中から見出したユニークな系統による資源家系の造成、形質データの収集、マイクロサテライトマーカーの開発を実施した。家系の親世代とした2つの系統間で、体重と複数の卵関連形質に有意差が認められた。この資源家系を用いることにより、経済形質遺伝子座の特定を効率的に行うことができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：For future QTL analysis, I conducted preparation of resource family using a unique quail line found in commercial gene pool, measurement of economic traits, and development of polymorphic microsatellite markers. Body weight and some egg traits were significantly different between two quail lines used as a parental generation of the resource family. This resource family will be helpful for efficient QTL analysis.

研究分野：動物ゲノム多様性学

キーワード：ウズラ 系統 遺伝的分化 マイクロサテライトマーカー 経済形質

1. 研究開始当初の背景

ウズラ (*Coturnix japonica*) は、わが国で家禽化がなされた唯一の動物である。現在、卵肉生産において重要な家禽となっており、全国で約 700 万羽が飼育されている。

しかしながら、同じ家禽であるニワトリと比べ、ゲノム情報が整備されておらず、遺伝子マッピングに必要となる多型性の高い DNA マーカーは、十分に実用化されていない。

また、コマーシャル・ウズラを由来とする資源家系は、これまで造成されていない。そのため、ウズラ産業で実際に卵肉生産に使われている系統の経済形質関連遺伝子座のマッピングは実施されておらず、他の家畜・家禽よりも DNA レベルでの育種改良が大きく遅れている。

このような現状を踏まえ、申請者らは、既に公開されたウズラのドラフトゲノム配列^[1]から、遺伝子マッピングに有効と考えられるマイクロサテライトマーカーを新たに開発・実用化した^[2]。

ウズラの卵肉生産に関わる形質は、量的形質であり、複数の量的形質遺伝子座により支配されている。このような経済形質に関与している遺伝子の染色体上での位置を明らかにするためには、マーカーによる DNA 型の判定と形質データとの間で連鎖解析を行うことが必要である。

2. 研究の目的

本研究では、ウズラの経済形質関連遺伝子座の解明にむけて、以下の 3 つを目的に研究を進める。

(1) 申請者らが開発した多型性の高いマイクロサテライトマーカーを用い、国内のコマーシャル・ウズラの遺伝的背景を明らかにし、資源家系の造成に有用である系統を特定する。

(2) (1) の解析結果に基づき、遺伝的背景が異なる 2 つの系統を交配して、親世代、 F_1 および F_2 の 3 世代からなるマッピングのための資源家系の造成に着手する。

(3) 資源家系の個体を対象として、経済形質のデータ収集とマイクロサテライトマーカーによる DNA 型の判定を実施し、経済形質関連遺伝子座のマッピングにむけた基盤を整備する。

3. 研究の方法

(1) コマーシャル・ウズラ系統の遺伝的背景の解明

国内の生産農家で飼育されているコマーシャル・ウズラ 13 系統 (519 個体、1 系統あたり約 40 個体) のサンプルを収集し、解析対象とした。申請者らの先行研究^[2]で開発した常染色体に位置する 45 のマイクロサテライトマーカーでタイピングを行った。

マーカーのタイピング結果から、系統間の遺伝的分化の程度を示す指標である F_{ST} を算出した。また、遺伝距離 (D_A) に基づき系統

樹を作成して系統間の遺伝的な位置づけを明らかにした。さらに、個体レベルでのクラスタリング (STRUCTURE 解析) を行い各系統の遺伝的背景を推定した。

これらの解析結果に基づき、13 系統の中から遺伝的分化の程度が高い 2 つの系統 (A 系統と B 系統) を選び、資源家系の親世代の候補系統とした (遺伝子マッピングのための資源家系の造成には、遺伝的差異の大きい 2 つの系統を用いることが望ましいため)。

(2) マッピングのための資源家系の造成

(1) で特定した親世代候補系統である A 系統と B 系統を受精卵の形で導入し、孵化させ育成した。

(3) 経済形質のデータ収集とマイクロサテライトマーカーによる DNA 型の判定

親世代とした A 系統 (雄 20 個体・雌 16 個体) と B 系統 (雄 11 個体・雌 11 個体) について、経済形質のデータを収集し、2 つの系統間で有意な差があるか否かを検討した。具体的な形質として、週齢毎の体重の他に、初産日齢、卵重、卵黄重、卵黄高・卵白高等の卵関連形質についてもデータを収集した (図 -1)。

また、マイクロサテライトマーカーの候補領域 (CA リピート配列) の 120 箇所について、プライマーを設計し、PCR を行い増幅の有無を確認した。増幅されたものの中から、10 箇所を選び、蛍光標識を付加したプライマーにより PCR 増幅後、DNA シークエンサーで泳動し、多型の程度を詳細に確認した。

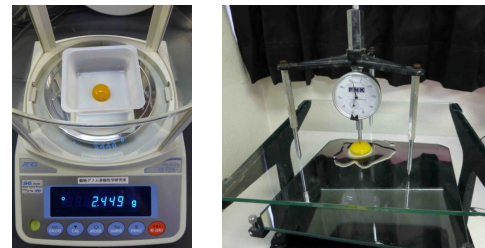


図-1. 卵関連形質の測定の例。卵黄重 (左) と卵黄高 (右)

4. 研究成果

(1) コマーシャル・ウズラ系統の遺伝的背景の解明

各系統間の遺伝的分化の程度を F_{ST} により評価したところ、B 系統を除いたその他 12 系統の間では、約 4 割のケースで有意な遺伝的分化は認められなかった。さらに、遺伝的分化がみられた場合でも、 F_{ST} は 0.003 から 0.021 の範囲の非常に低い値であった。一方で、B 系統とその他 12 系統の間では、 F_{ST} は 0.115 から 0.130 の範囲であり、比較的高い値が得られた。

次に、遺伝距離 (D_A) に基づき系統樹を作成したところ、B 系統以外では、遺伝的分化

の程度が小さいことが明らかとなった。これとは対照的に、B 系統はその他の系統から遺伝的に大きく離れて位置づけられた (図-2)。

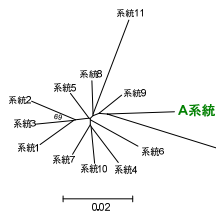


図-2. 遺伝距離 (D_A) に基づいたウズラ 13 系統の系統樹

さらに、STRUCTURE 解析においても B 系統は、それぞれの K (クラスター数) において、常に単独のクラスター (赤色) を形成し、他の系統とは異なる独自の遺伝的背景を持っていることが示唆された (図-3)。

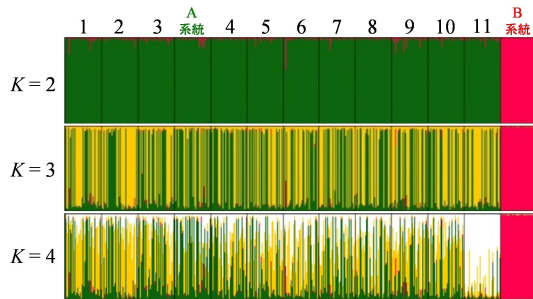


図-3. 45 のマイクロサテライトマーカーによるウズラ 13 系統の STRUCTURE 解析 (番号は、系統 1 から系統 11 に対応)

これらの結果から、B 系統は他の系統と遺伝的差異が大きく、そのマーカー型にも他系統との大きな違いが存在する可能性が示された。したがって、B 系統を用いて資源家系を造成することにより、経済形質関連遺伝子座のマッピングを効率的に行うことができると考えられる。本研究では、B 系統と A 系統を親世代として、資源家系を造成することとした。

(2) マッピングのための資源家系の造成

A 系統では 44 個、B 系統では 45 個の受精卵を生産農家より導入し、孵卵器を使用して孵卵した。入卵数に対する孵化率は、A 系統では 81.8%、B 系統で 51.1% であった。現在、A 系統と B 系統を交配し、 F_1 の生産を実施している。

(3) 経済形質のデータ収集とマイクロサテライトマーカーによる DNA 型の判定

A 系統と B 系統の体重は、週齢を経るごとにその差が大きくなり、8 週齢の雄の平均値は、A 系統で 105g、B 系統で 297g であり、B 系統が有意に高かった ($P < 0.001$)。また、8 週齢の雌の平均値は、A 系統で 132g、B 系統で 328g であり、雄の場合と同様に B 系統が高く、有意差が認められた ($P < 0.001$) (図

-4)。

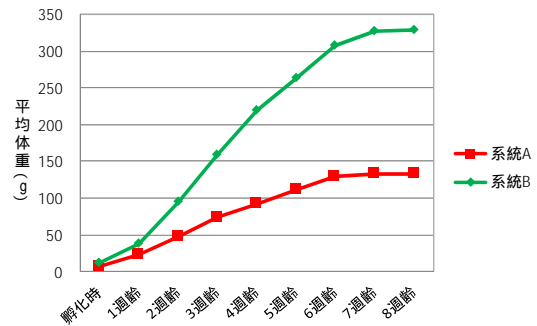


図-4. 孵化時から 8 週齢までの A 系統と B 系統の雌の体重の推移

A 系統と B 系統の卵関連形質についても大きな違いがみられた (図-5)。初産日齢は、A 系統では孵化後 39.5 日であったが、B 系統では 42.7 日であり遅い傾向にあった ($P < 0.05$)。初産時の卵重は、A 系統では 6.97g であるのに対し、B 系統では 10.40g であり有意に大きかった ($P < 0.001$)。初産時卵黄重は、A 系統で 1.80g、B 系統では 2.40g であり有意差が認められた ($P < 0.001$)。初産時の卵白高は、A 系統では 4.27mm であるのに対し、B 系統では 5.23mm であり高い傾向がみられた ($P < 0.05$)。卵黄高も同様の傾向を示し、A 系統の 9.69mm に対し、B 系統では 10.77mm と有意に高かった ($P < 0.05$)。

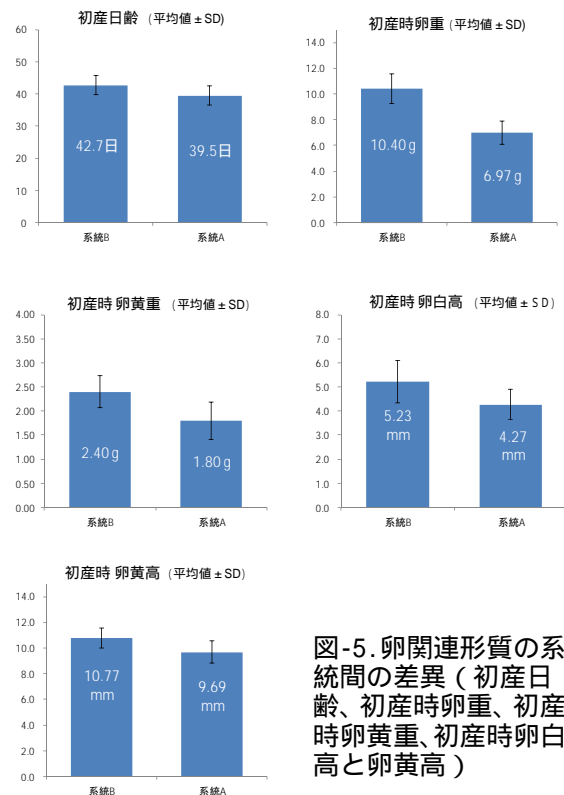


図-5. 卵関連形質の系統間の差異 (初産日齢、初産時卵重、初産時卵黄重、初産時卵白高と卵黄高)

これらの結果から、A 系統と B 系統の体重と卵関連形質にも、大きな差異が存在することが明らかとなった。したがって、これらの 2

系統を資源家系の親世代に用いることにより、効率的な経済形質関連遺伝子座のマッピングが期待できる。

新たなマイクロサテライトマーカーの作成に関しては、プライマーを設計した120箇所のCAリピート候補領域の内、64箇所で増幅が認められた。その中から、10箇所を選び、蛍光標識を付加したプライマーにより、A系統12個体とB系統11個体のDNAを鋳型とし、再度PCRを行った。増幅産物をDNAシーケンサーで泳動し多型を確認したところ、最大で1座位(マーカー)あたり9つのアリルを検出することができ、多型性の高いマーカーが得られた。これらのマーカーは、今後の遺伝子マッピングにおいて、有効なツールとして利用できると考えられる。

本研究により、ウズラの経済形質関連遺伝子座のマッピングにむけた基盤を整備することができた。今後は、F₁世代以降の資源家系の造成やそれらの形質データの収集等を行い、さらに研究を進めていく予定である。

<引用文献>

- [1] Kawahara-Miki R *et al.* Genomic sequence and analysis of Japanese quail by using the chicken genome sequence as a framework. *Genomics* 101: 345-353. 2013.
[2] Tadano R *et al.* Cost-effective development of highly polymorphic microsatellite in Japanese quail facilitated by next-generation sequencing. *Animal Genetics* 45: 881-884. 2014.

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)

[学会発表](計3件)

只野 亮、採肉用ウズラの遺伝的特性の解明、日本畜産学会第121回大会、2016年3月29日、日本獣医生命科学大学(東京都・武蔵野市)

新聞清仁・只野 亮、採卵用ウズラの遺伝的多様性ならびに系統相互の遺伝的分化、平成27年度東海畜産学会秋季大会、2015年12月11日、愛知県産業労働センター WINC あいち(愛知県・名古屋市)

只野 亮、ウズラのQTL解析にむけた資源家系造成のための有用系統の探索、日本動物遺伝育種学会第16回大会、2015年11月7日、神戸大学(兵庫県・神戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

只野 亮(Tadano, Ryo)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号: 70614048