

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850212

研究課題名(和文)セキショクヤケイの自然史から家畜化に至るまで～分子で探るニワトリの歴史～

研究課題名(英文)Evolutional history and domestication of red jungle fowl: in the case of molecular phylogenetic study

研究代表者

佐々木 剛 (Sasaki, Takeshi)

東京農業大学・農学部・教授

研究者番号：00581844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリ家畜化の起源はセキショクヤケイがタイ周辺で家畜化されたとする「単一起源説」と南・東南アジア一帯の複数の地域で同時多発的に起源を有するとする「多起源説」で議論されている。本研究はニワトリの起源を明らかにする目的でミトコンドリアゲノムを用いセキショクヤケイの分子系統解析を行った。その結果、ハプログループDとFはミャンマー付近、ハプログループEはインド周辺に生息する集団の地域性を示した。以上よりセキショクヤケイの家畜化が少なくともミャンマーとインドの2つの地域で起こった可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Currently, it is a controversial subject that an origin of chicken is either single origin occurred in the adjacent area of Thailand or multiple origin occurred in the multiple area of South and Southeast Asia. In this study, to elucidate the origin of chicken, we performed molecular phylogenetic analysis based on mitochondrial genome sequences. As a result, it was suggested that the chickens belonged to haplogroup D and F were derived from Myanmar and the chickens belonged to haplogroup E was derived from India. In conclusion, we suggested that the domestication of chickens occurred in at least two areas, namely Myanmar and India.

研究分野：進化生物学

キーワード：進化 分子系統 セキショクヤケイ 家畜化 ミトコンドリアDNA

1. 研究開始当初の背景

ニワトリは食用、観賞用、娯楽用(闘鶏)、宗教的儀式など幅広く利用され、人類にとって最も馴染みの深い家畜と言える。その起源である野生原種は東南アジアから南アジアの密林地帯に生息するセキショクヤケイ(*Gallus gallus*)とされており、およそ5400年前に家畜化されたと考えられている。セキショクヤケイは形態的特徴から5亜種(ビルマ亜種、トンキン亜種、コーチシナ亜種、インド亜種、ジャワ亜種)に分類されている。しかし、ジャワ亜種を除き残り4亜種は東南アジア地域で分布の境界を接しながら生息しており、その違いを示す形態的特徴(例えば耳朶の色)も個体変異によって同定が難しくなることから、亜種と認識される形態的差異が何を表すものであるのか、その実体は掴めていない。また、ミトコンドリアDNA(mtDNA)の分子系統解析によってニワトリの起源となったセキショクヤケイが単一の地域で家畜化されたとする説(単一起源説; 引用文献)と複数の地域で独立に家畜化されたとする説(多起源説; 引用文献)が存在する。しかしながら、これらの研究では解析に用いられた標本がごく限られた地域や多様なニワトリ品種を網羅したものではないことから、未だ一致した見解を得ていない。

我々はセキショクヤケイミトコンドリアDNAのD-loop領域の配列(411bp)を新たに40個体で決定し、Genbankに登録されているセキショクヤケイのD-loop領域配列87個とともに最尤法による分子系統解析を行なった(発表論文)。その結果、先行研究でも示されていたようにジャワ亜種は祖先的な系統で他の4亜種とも明確に系統を異にすることが示唆された(図1)。

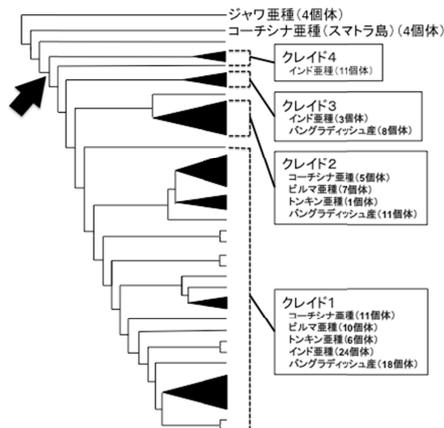


図1. セキショクヤケイ5亜種の系統樹

次に、インドネシアのスマトラ島に生息するコーチシナ亜種の一部は地域特異的な独立した系統群を形成した。残りのセキショクヤケイは大陸クレイドとして大きな単系統群(図1矢印)を形成したが、亜種間の系統関係を見るとインド亜種の一部(インド亜種クレイド3と4)を除き亜種は多系統となった(図1)。この結果から、次の2つのことを申請者らは新たに見出した。 コーチシナ亜

種はインドネシア、マレーシア南部、タイ東部、カンボジア、ラオス南部に掛けて分布する亜種であるが、分布最南端のスマトラ島の個体群は遺伝的に分化している。大陸に生息するセキショクヤケイは分布西側に生息するインド亜種の一部で遺伝的分化が認められるものの、その他の地域では亜種ごとの遺伝的分化はないこと。つまり、セキショクヤケイは形態的にある程度分化しているものの遺伝的には祖先集団から続く多型状態を残しており、種分化の途中段階にあると推測された。次に、系統地理学的な検証を行なうため、セキショクヤケイ集団の祖先集団サイズの歴史の変遷を評価した。その結果、インド亜種を除く4亜種の祖先集団はいずれもおよそ7万5千年前から集団サイズを拡大し、2万年前になると急速に縮小していることが示唆された。この集団サイズの変動は東南アジアにおける地史と深く関わっていると考えられた。7万5千年前から2万年前のウルム氷期には地球上では海退が進み、これによって東南アジアでは巨大な大陸スンダラン



図2. 東南アジア地域の最海退期(約2万年前)の陸地とセキショクヤケイの分布拡大図。スンダランドを灰色で示す。分布の拡大方向を白矢印で示す。

ドが形成された(図2)。恐らくセキショクヤケイの祖先集団は海退に伴う大陸の形成とともに生息地を広げ集団サイズを拡大させたと考えられる。そして、2万年前に氷期が終わり、海進が進むとセキショクヤケイの祖先集団は生息地を奪われ、集団サイズが減少するとともにその一部が島々へ隔離されたと考えられる。スマトラ島のコーチシナ亜種で見られた遺伝的分化はこれによるものと考えられる。さらにセキショクヤケイ標本にニワトリ品種および在来鶏219個体分のmtDNA D-loop配列を加えて分子系統解析を行なった。その結果、ニワトリ標本はセキショクヤケイで見出した4つのクレイドのうちクレイド1-3に散在し、それぞれのクレイドで単系統群を形成した。この結果は、ニワトリの家畜化がアジアの様々な地域で独立に起こったとする多起源説を指示している。その一方で、スマトラ島のコーチシナ亜種とクレイド4を形成したインド亜種の一部の系統はニワトリの家畜化に寄与していないことが示唆された。

2. 研究の目的

先行研究の豊富なサンプリングと D-loop 領域を用いた解析によって、セキショクヤケイの進化史がおぼろげながら見えてきた。恐らく 5 亜種は形態的に分化しており、それらの遺伝的多型状態は間違いないと考えられる。これまで mtDNA ゲノムを用いて行われた系統解析はセキショクヤケイ 14 個体、ニワトリ 43 個体のものが最大である(引用文献)。本研究はさらに多くのセキショクヤケイを用いる点で先行研究を越える成果をあげるとともに、中国在来鶏が中心であった先行研究とは異なり、日本と欧米鶏の 77 品種 200 個体とセキショクヤケイが家畜化された地域と考えられるタイおよびインドネシアの在来鶏を用い、より広範囲な標本サンプリングと大量のデータ解析によってニワトリ家畜化の起源と品種分化の歴史を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 供試個体

申請者は本研究に用いる予定のセキショクヤケイおよびニワトリ DNA 試料をすでに確保しているため供試個体を収集する必要はない。ニワトリ mtDNA ゲノムの決定は、未決定な日本鶏、欧米鶏の 77 品種を対象とする。同一品種であっても産地の違い(本研究の標本は日本、米国、英国、ハンガリーで収集した)や内種(毛色の違い)も考慮し、網羅的に配列決定対象とする。最終的にニワトリデータだけで 200 個体の配列決定を予定している。

(2) ロング PCR 法

Genbank に登録されているセキショクヤケイとニワトリ mtDNA ゲノムデータをアライメントし、保存性の高い領域にロング PCR (1st PCR) プライマーを設計する。1stPCR は mtDNA ゲノムを 2 つの断片に分けて増幅し、その増幅断片 2 つをそれぞれ 4 つの断片に分けて増幅する 2ndPCR にかける。この 2ndPCR で得られたフラグメントをダイレクトシーケンスする。プライマーウオーキング法で各フラグメントの全長配列を決定し、それを繋ぎ合わせてゲノム配列を決定する。

(3) マルチプレックス PCR 法

mtDNA を約 500bp 刻みの 46 断片または約 250bp 刻みの 116 断片にわけて増幅する。これらの断片は奇数番号と偶数番号の断片がオーバーラップするようにデザインされており、奇数番号同士または偶数番号同士はオーバーラップしない。これにより、一つの PCR 反応液で複数の断片を一度に増幅することができる(図 5A)。次に続くシンプレックス PCR では、マルチプレックス PCR 産物を鋳型に個々の断片に対応したインナープライマーを用いる(図 5B)ことで目的とする増幅断片を個々に得ることができる(図 5C)。以上の方法で DNA の限られた断片化した試料から効率的に mtDNA ゲノム配列を決定する。

(4) 分子系統解析

系統解析にはプログラムパッケージ MEGA6 を用いた。解析に使用したアライメントの長さは、D-loop 領域、ND6、開始と終始コドン、ATPase6 と ATPase8 の間、ND4 と ND4L の間で見られるオーバーラップ部分を除外した 9821bp である。系統解析を行う際、MEGA6 で最尤法における最適モデル選択をおこない、AIC 値が低い置換モデル“GTR+G+I”で系統解析した。系統樹の信頼性は 1000 回のブートストラップ法で評価した。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア DNA 配列決定

ロング PCR 法を用いたミトコンドリアゲノム配列決定によりラオス周辺地域で採集された 4 個体の配列を決定することに成功した。一方で、DNA 標本の断片化の進んでいた供試個体に関してはマルチプレックス PCR 法による増幅と配列決定が行われた。これによりバングラデシュ周辺地域の 7 個体分、タイの在来鶏 2 品種 4 個体とインドネシアの在来鶏 3 品種 3 個体のミトコンドリアゲノム配列が決定された。本研究で配列決定されたセキショクヤケイおよび在来鶏のミトコンドリアゲノムはいずれも約 16kbp であり、先行研究で得られているミトコンドリア全長配列と比べて長さ、遺伝子構成とも一致していた。

(2) セキショクヤケイの系統関係

本研究で決定したミトコンドリアゲノム配列に既知のデータを加えてセキショクヤケイ、在来鶏、およびニワトリ品種の最尤法による系統樹を作成した(図 3)。

先行研究(引用文献)は、インド、ミャンマー、ラオス、中国などの複数地域のセキショクヤケイとニワトリのミトコンドリア DNA を解析し、7 ハプログループ (A-G) と 6 系統 (H, I, W, X, Y, Z) を見出した。本研究の解析でもそれと同様の系統関係が確認された。本研究で塩基配列を決定したラオス北部のウドムサイのセキショクヤケイ 4 個体は、ハプログループ D に位置した。ハプログループ D において、セキショクヤケイとその地域の在来鶏に注目すると、インドネシアのバリのジャワ亜種 (AP003323)、フィリピンのマニラのコーチシナ亜種 (AP003322)、ラオスの在来鶏 (GU261682, GU261687)、インド北東部の在来鶏、バングラデシュ南東部のバンダーバンのセキショクヤケイ (RJF42, RJF44, RJF48) で構成され、ブートストラップ値 (BP 値) は 62% と低い値であった。その中でも先行研究のサブハプログループ D1 と D3 は高い BP 値を支持した。サブハプログループ D1 は、94% の BP 値で支持され、インドネシアのバリのジャワ亜種 (AP003323)、フィリピンのマニラのコーチシナ亜種 (AP003322)、ラオスの在来鶏 (GU261682, GU261687) で構成された。サブハプログループ D3 は、54% の BP 値で支持されたが、この系統から浙江省の在来鶏

(GU261677)を除くと、87%の高いBP値で支持された。浙江省の在来鶏を除いたサブハプログループ D3 は、南インドの在来鶏、インド北東部の在来鶏とバングラデシュ南東部のバンダーバンのセキショクヤケイ (RJF42,RJF44) とラオスのウドムサイのセキショクヤケイ (LAO4, LAO5, LAO19, LAO21, LAO22, LAO36) で構成された。

本研究で用いたラオス産セキショクヤケイ 6 個体は、先行研究で用いられたラオス産在来鶏 (GU261682, GU261687) および、バングラデシュ南東部のバンダーバンのセキショクヤケイ (RJF42, RJF44, RJF48) と共にハプログループ D に属した。この結果は、ハプログループ D がミャンマーを中心とした周辺地域と地理的に関係することを示唆している。これはミャンマー付近に生息するセキショクヤケイの地域集団が遺伝的に分化している可能性を示している。サブハプログループ D1 にはインドネシアのバリのジャワ亜種 (AP003323) とフィリピンのマニラのコーチシナ亜種 (AP003322) が属しているが、ハプログループ D に属している他の個体と地域的に離れていることに加え、先行研究 (引用文献) の結果で、ジャワ亜種がセキショクヤケイの単系統群の中で、最初に分岐した系統であったことから、これらの地域の標本はさらに検証する必要がある。

ハプログループ E は、98%の高いBP値で支持された。セキショクヤケイが生息する地域の在来鶏に注目すると、サブハプログループ E1 はインド北東部の在来鶏 (HQ857210)、インドのセキショクヤケイのインド亜種

(GU261709)、バンダーバンのセキショクヤケイ (RJF49) で構成された (95%BP)。一方、サブハプログループ E3 はインド北東部の在来鶏 (HQ857211, HQ857212) とインド亜種 (GU261708) で構成された (98%BP)。この結果は、ハプログループ E がインド北東部を中心とした周辺地域と地理的に関係することを示唆している。よってハプログループ E はインド付近に生息するセキショクヤケイの地域的な遺伝的分化を示す系統であると考えられる。このことはハプログループ E が多く見られる地域つまりインド北東部のベンガル地方のセキショクヤケイ (インド亜種) がニワトリ品種の多様化に大きく貢献した可能性を示している。また、ハプログループ E に属したラオス、中国の雲南省の在来鶏はおそらくインド北東部で家畜化した後にこれらの地域に持ち込まれた在来鶏の子孫ではないかと示唆された。

ハプログループ F は、90%の高いBP値で支持され、中国南部の雲南省の在来鶏 (GU261688, GU261717, GU261711, GU261689) とセキショクヤケイ (GU261702)、ミャンマーの在来鶏 (GU261691) とセキショクヤケイ (GU261703)、バングラデシュのセキショクヤケイ (RJF43, RJF50) で構成された。この結果は、ハプログループ F がミャンマー周辺地域と地理的に関係することを示唆している。よってハプログループ F は、地域的な関係性のある個体で構成されていることからミャンマー付近の地域的な遺伝的分化を示す系統であると考えられる。

以上のように本研究では、ハプログループ D と F はミャンマー周辺、ハプログループ E はインドといった地域性が示唆された。さらにハプログループ D と F は生息地域が重複していることから同一集団を構成している可能性が考えられた。先行研究 (引用文献) は A-G の 7 ハプログループそれぞれの系統にニワトリが含まれたことから多起源説を唱えたが、ここでは系統と地域集団の関係性が考慮されていなかった。本研究では、ハプログループ D と F はミャンマー付近、ハプログループ E はインド周辺で家畜化された可能性が示唆された。これらの結果はセキショクヤケイの家畜化が少なくともミャンマーとインドの 2 つの地域で起こったことを示している。本研究はセキショクヤケイの地理的な遺伝的分化を明らかにすることで先行研究で示唆された多起源説を支持した。しかし、ハプログループ D、E、F 以外の 4 つのハプログループ A、B、C、G および 6 つの系統 H、I、W、X、Y、Z の地域性が明らかになっていないため、これらの地域に棲息するセキショクヤケイの遺伝的多様性を明らかにすることが今後の課題であると考えられる。

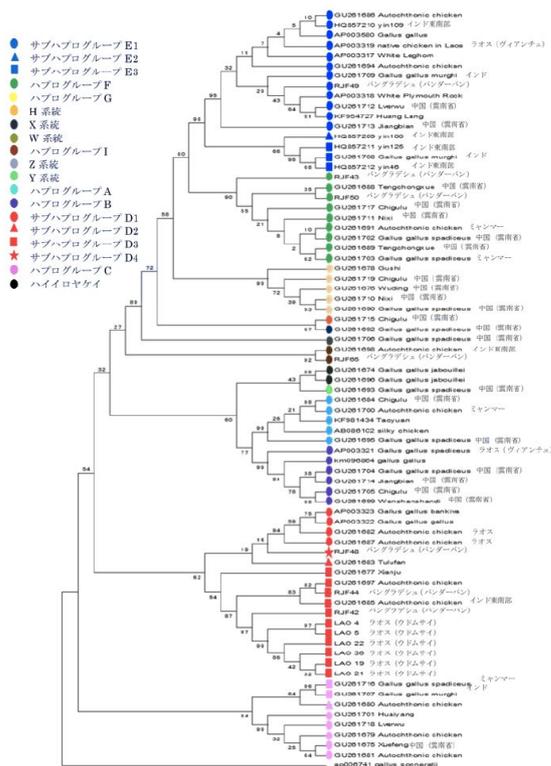


図 3. ミトコンドリア DNA 全長配列に基づく最尤系統樹。分岐状の数値はブートストラップ値を表す。ハプログループ・系統の違いを色分けでしめし、サブハプログループの違いを形で示した。

<引用文献>

Akishinonomiya F, Miyake T, Takada M, Shingu R, Endo T, Gojobori T, Kondo N and

Ohno S. 1996. Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls. *Evolution*. 93: 6792-6795.

Miao Y-W, Peng M-S, Wu G-S, Ouyang Y-N, Yang Z-Y, Yu N, Liang J-P, Pianchou, G, Beja-Pereira A, Mitra B, Palanichamy MG, Baig M, Chaudhuri TK, Shen Y-Y, Kong Q-P, Murphy RW, Yao Y-G, Zhang Y-P. 2013. Chicken domestication: an updated perspective based on mitochondrial genomes. *Heredity* 110: 277-282.

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2件)

Endo H, Tsunekawa N, Sonoe M, Sasaki T, Ogawa H, Amano T, Son NT, Phimpachanhvongsod V, Kudo K, Yonezawa T, Akishinomiya F. 2017. Geographical variation in the skeletal morphology of Red Jungle Fowl. *British Poultry Science* 印刷中
10.1080/00071668.2017.1311008.「査読有り」

Sasaki T, Yonezawa T and Wada K. 2014. Phylogeography and demography of the red junglefowl and its domestication process revealed by mitochondrial DNA sequences. *The Proceeding of Human-Chicken Multi-Relationships (HCMR) Symposium* p37-47. 「査読なし」

[学会発表](計1件)

中野敬太、和田香織、米澤隆弘、山本義雄、Lamont SJ、Tirawattanawanich C、佐々木剛 . 2015年6月28日. 遺伝子解析に基づくセキショクヤケイの家畜化の起源に関する研究. 生き物文化誌学会第13回学術大会 中央大学(東京・文京区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 剛 (SASAKI, Takeshi)

東京農業大学・農学部・教授

研究者番号: 00581844