[総 説]

マイクロサテライト DNA 多型に基づく
日本鶏の遺伝的類縁関係の解析

高 橋 秀 彰

農林水産省農業生物資源研究所遺伝資源第一部動物探索研究チーム
つくば市観音台 2-1-2, 〒305Genetic Relationships between Japanese chicken breeds
based on microsatellite DNA polymorphisms

Hideaki Takahashi

Laboratory of Animal Genetic Diversity, Department of Genetic
Resources, National Institute of Agrobiological Resources,
Kannondai 2-1-2, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

1. は じ め に

日本では、鶏は古くから報農用、食用あるいは観賞用に飼育されてきた。特に江戸時代は観賞用としての鶏の品種作出がさかんに行われ、その結果、明治以前に確立されたいわゆる在来家畜の中では、鶏の種類がもっとも多い。日本鶏には、明治期以前に品種の確立した在来品種と、それ以外に明治期以後外国種との交雑から作出された交雑種の一部が含まれており、特に在来品種のうち、17 品種は天然記念物に指定されている。

日本鶏の成立については、小穴（1951）の成書があり、また筆者は日本鶏を飼育した経験がないので、ここでは簡単に触れる程度とする。小穴（1951）によれば、ほとんどの日本鶏の成立には、3 種類の品種が関わっている。すなわち、弥生時代から日本にいたとされる地鶏、平安時代に中国から導入された小国、および江戸時代初期にシャムから導入された軍鶏である。このほかに大唐丸（蜀鶏）、チャボ、ウコッケイなども江戸時代に導

入された。現存する日本鶏は、①古い形態性質を保持しているもの（地鶏、小国など）、②特定の品種に起こった突然変異を固定したもの（尾長鶏など）、③各品種の交雑種（薩摩、比内など）に分けることができる。

日本鶏の類縁関係については、血液蛋白質型および血液型に基づいて、田名部ら（田名部と水谷、1980；田名部ら、1991）、岡田ら（岡田ら、1980；Okada ら、1984）、橋口ら（1981）によって報告され、すでに研究し尽くされた感がある。本研究を始めるにあたっては、既報を参考にしたが、これらを読んで筆者が気付いた点をいくつかあげたい。

① 結果が報告によって異なる。

各報告とも、調査した品種が異なるので単純に比較はできないが、各報告に共通する品種を抽出して見ても、結果が必ずしも一致しない。

② 日本鶏各品種成立の歴史と、結果が一致しない。

③ 血液蛋白質型をマーカーとした場合、

③-1 多型を示す遺伝子座位数が限られている。

③-2 一遺伝子座位あたりの対立遺伝子数が限られている。

④ 血液型をマーカーとした場合、

④-1 一遺伝子座位あたりの対立遺伝子数が多い (多すぎる)。

④-2 そのため、型判定に熟練を要する (ように思われる)。

④-3 従来の血液型以外の型が検出された場合、「その他」と評価せざるを得ない。

筆者らの研究グループは、多型を示す遺伝子座位数、一遺伝子座位あたりの対立遺伝子数が多く、型判定 (タイピング) が容易なマーカーを用いれば、結果的に①と②の問題は解決されるのではないかと考えた。そこで、このような条件を満たすマーカーの候補として、マイクロサテライト DNA の着目し、研究を開始した。

2. マイクロサテライト DNA とは？

マイクロサテライト DNA は、2～数ヌクレオチドから構成される単純繰り返し配列である。代表的なマイクロサテライト DNA としては、CA/TG リピートがある。この反復数が個体によって異なっていることから生じる多型を、マイクロサテライト多型 (microsatellite polymorphism)

または STR 多型 (Short Tandem Repeat polymorphism) と呼ぶ。

最近、マイクロサテライト DNA をマーカーに用いた遺伝連鎖解析が、哺乳動物において盛んに行われている。ニワトリでは既知のマイクロサテライト DNA マーカーの数が少なく、それを用いた遺伝解析の報告も少ない (Cheng ら, 1995)。また、ニワトリのマイクロサテライト DNA のハプロイドゲノムあたりのコピー数は少ないため、哺乳動物を材料として開発されたマイクロサテライト DNA の効率的な単離法 (Ostrander ら, 1992) をニワトリへ応用しても、マイクロサテライト DNA 単離の効率は低い (Cheng と Crittenden, 1994)。そこで筆者らは、Ostrander ら (1992) の方法を改変し、ニワトリのマイクロサテライト DNA の効率的な単離法を開発した (Takahashi ら, 1996)。

3. マイクロサテライト DNA 多型の検出および遺伝距離の推定

まず、ニワトリのマイクロサテライト DNA (CA リピート) ライブラリー (Takahashi ら, 1996) から、マイクロサテライト DNA を含むクローンをランダムに選択した。その塩基配列を決定した後、マイクロサテライト DNA 多型検出のための、PCR (Polymerase Chain Reaction) の

表 1 解析に用いたマイクロサテライト DNA

Clone	Gen Bank ¹	Repeat	Forward Primer	Reverse Primer	Alleles	Range ²
1	U 60782	(CA) ₁₂	5'TTTCACACGCAGCCTTTCTCCCG 3'	5'GTCATTCCTGCCTCCCCTTGAC 3'	6	120-130
2	U 60783	(CA) ₉	5'GTGCAGCTCAGTTGGACACACGC 3'	5'CAGCGGGTAACGGCGGGGACA 3'	10	72-100
3	U 60786	(CA) ₁₁	5'CAACTTCACTGCCTTCCCATTTG 3'	5'AACAGAGGAGAAATGGGAATAGTG 3'	5	114-126
4	U 60787	(CA) ₈	5'GATGCCCTCAGCCACGACCCCT 3'	5'CACCCAGCAACAGGAGCCAC 3'	2	144-146
5	U 60791	(CA) ₉	5'TTAGCAAGGATAGGGTGGAACA 3'	5'AACAGAGAACAACACTACGAGCCT 3'	6	93-103
6	U 60792	(CA) ₁₂	5'GTCCTTTCTCTGTCTTCCACT 3'	5'GTCTTGCTTCTAGGAGTCAGGCT 3'	7	144-158
7	U 60793	(CA) ₈	5'AGAGGTGGGAGGTGGGCATGAC 3'	5'CAGCATCCTTAATAGCAGTTTCC 3'	4	174-180
8	AF 012928	(CA) ₁₁	5'GTTGTGGTGGGCTCGTTTGTCTG 3'	5'GTGGAAACCGAAAGCACCG 3'	5	110-120

¹ Gene Bank の accession number.

² PCR 増副産物の範囲 (base pairs : bp)

プライマーを設計した (表 1)。それらを PCR に用いて、各マイクロサテライト DNA を増幅し、増幅断片の長さ (CA リピートの反復単位数) の多型を DNA シーケンサー (ALF II, ファルマシア) を用いて検出した。検出されたバンドのピークが 1 本ならばホモ, 2 本ならばヘテロと判断し、各対立遺伝子を直接数えることによって、各マイクロサテライト座位における対立遺伝子頻度を求めた。この数字を基に、遺伝距離の推定を行った。今回の研究では、以下の 4 つの遺伝距離の推定式を使用した。

① Nei (1972) の標準距離 (D_S) の式

$$D_S = -\log_e I$$

$$I = J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}$$

x_i , y_i を対立遺伝子 i の集団 X と Y における遺伝子頻度としたとき, J_{xy} , J_x , J_y は調べられたすべての遺伝子座の j_{xy} , j_x , j_y の平均を示す。

$$j_{xy} = \sum x_i y_i, j_x = \sum x_i^2, j_y = \sum y_i^2 \text{ とする。}$$

② Rogers (1972, D_R) の式

$$D_R = \sum_{k=1}^r \left(\frac{1}{2} \cdot \sum_{i=1}^{m_k} (x_{ik} - y_{ik})^2 \right)^{1/2} / r$$

ここで, m_k は遺伝子座 k における対立遺伝子数, x_{ik} , y_{ik} を対立遺伝子 ik の集団 X, Y における

遺伝子頻度, r は調べられた遺伝子座数を示す。

③ Nei (1983, D_A) の式

$$D_A = \sum_{k=1}^r \left(1 - \sum_{i=1}^{m_k} (x_{ik} y_{ik}) \right)^{1/2} / r$$

ここで, m_k は遺伝子座 k における対立遺伝子数, x_{ik} , y_{ik} を対立遺伝子 ik の集団 X, Y における遺伝子頻度, r は調べられた遺伝子座数を示す。

④ Cavalli-Sforza と Edwards (1967, D_C) の式

$$D_C = (2/\pi r) \sum_{j=1}^r \left(2 \left(1 - \sum_{i=1}^{m_j} (x_{ij} y_{ij}) \right)^{1/2} \right)^{1/2}$$

ここで, m_j は遺伝子座 j における対立遺伝子数, x_{ij} , y_{ij} を対立遺伝子 ij の集団 X, Y における遺伝子頻度, r は調べられた遺伝子座数を示す。

各遺伝距離 (D_R , D_A および D_C) に基づいて、UPGMA 法 (非加重結合法, Sneath と Sokal, 1958), FM 法 (Fitch-Margoliash 法, Fitch と Margoliash, 1967) および NJ 法 (近接結合法, Saitou と Nei, 1987) を用いて、デンドログラムを作成した。

4. 日本鶏の類縁関係

これまでに、表 1 に示した 10 品種 11 集団の日本鶏および白色レグホン 2 集団を調査した。その

表 2 解析したサンプルとその平均ヘテロ接合性

材	料	由	来	個体数	平均ヘテロ接合性
岩手地鶏		岩手県畜産試験場		19	0.388
会津地鶏		福島県畜産試験場		20	0.348
比内		秋田県畜産試験場		15	0.316
金八		秋田県畜産試験場		22	0.293
声良		秋田県畜産試験場		24	0.334
芝鶏		新潟県西蒲原郡		16	0.470
佐渡髭地鶏		新潟県佐渡郡・西蒲原郡・中蒲原郡		22	0.466
越後南京		新潟県西蒲原郡		12	0.362
蜀鶏		新潟県畜産試験場		15	0.243
尾長鶏		福島県三春町		15	0.422
		高知県南国市・土佐山田市・鏡村		22	0.429
白色レグホン	卵殻強系	農林水産省畜産試験場		24	0.247
(韮沢ら, 1995)	卵殻弱系	農林水産省畜産試験場		24	0.235

平均ヘテロ接合性 (H) を Nei (1978) の式によって求めた (表 2). 今回解析したサンプルの多くは、公立場所から採取したものであり、それらの H の値が愛好家から採取したサンプルよりも低い結果となった。公立場所では閉鎖群的に品種を維持しているので、この結果はリーズナブルである。しかしながら、新潟県畜産試験場で採取した蜀鶏の H の値は、白色レグホンの卵殻強度選抜鶏のそれに匹敵し、遺伝的多様性をすでに失っているように思われた。このことから、公立場所には遺伝的多様性を保持する方向での品種の維持をお願いしたい。

本研究で用いた 8 個のマイクロサテライト DNA はすべて多型が認められた。また、検出された対立遺伝子数は、合計 45 個、一座位あたりの対立遺伝子数は 5.6 個であった (表 2)。多型遺伝子座の割合 (P_{poly}) は 100%, 8 マーカーしか使用していないにもかかわらず、検出された対立遺伝子の合計は蛋白質型に基づく報告 (田名部と水谷, 1980; 田名部ら, 1991) の 2 倍以上であり、マイクロサテライト DNA は非常に優れたマーカーといえる。

4 つの遺伝距離の推定式 (D_R , D_S , D_A および D_C) を、マイクロサテライト DNA の各対立遺伝子頻度に応用してみると、各遺伝距離の推定式に長、短所があることがわかった。

① D_S の式では、対立遺伝子 i の集団 X, Y における遺伝子頻度 x_i と y_i を乗じた $x_i y_i$ が算出の基礎となっている。集団間の対立遺伝子が重複しない遺伝子座においては、集団間の遺伝距離は大きくなるべきだが、 D_S の式を用いると $x_i y_i$ は 0, $x_i y_i$ の総和である j_{xy} は 0 となり、最終的にその遺伝子座の遺伝距離は 0 となる。マイクロサテライト DNA では、遺伝子座あたりの対立遺伝子数が多く、集団間の対立遺伝子がまったく重複しない場合や、一部分しか重複していない場合があり、 D_S の式では、対立遺伝子頻度の情報を生かすことができない。

② D_R の式 (Rogers, 1972) では、集団間の対

立遺伝子頻度の差を二乗した値 ($(x_{ik} - y_{ik})^2$) が算出の基礎となるので、対立遺伝子頻度の情報をすべて活用することになる。しかしながら、2 つの集団が全く異なる複数の対立遺伝子をもっている場合には、その遺伝子座の遺伝距離は 1 より低い値になり、過小評価する欠点がある。マイクロサテライト DNA マーカーでは、一座位あたりの対立遺伝子数が多いため、実際にこのようなことが起こっていた。

③ D_A の式では、 D_S の式と同様に対立遺伝子頻度を乗じた $x_{ik} y_{ik}$ が算出の基礎となるが、1 から $x_{ik} y_{ik}$ の平方根の総和を引くので、対立遺伝子が一部分しか重複しない場合には、対立遺伝子の情報の一部しか算出に貢献しないが、重複する対立遺伝子数が多い場合、および重複する対立遺伝子頻度が高い場合には、結果的に D_A は小さい値となり、 D_S の式よりも、対立遺伝子頻度の情報を反映しているように思われた。

④ D_C の式は、 D_A と同様に、1 から $x_{ij} y_{ij}$ の平方根の総和を引くので、やはり集団間の対立遺伝子が重複しない遺伝子座の遺伝距離は最大 (0.9) となる。

このようなことから、検討した 4 つの推定式の中では、 D_A および D_C の式が優れていると思われる。また、血液蛋白質型に基づく報告で多用されている D_R および D_S の式は、マイクロサテライト DNA をマーカーに用いる場合には適さず、特に D_S は、対立遺伝子頻度の情報を生かすことができないので全く適さないといえる。

次に、デンドログラムの描き方について検討した。結論から先にいえば、日本鶏に最適なデンドログラムの描き方は存在しない。なぜなら、これまでに報告されているデンドログラムの描き方は何万年単位の種の進化を想定しており、同一種 (ニワトリ) 内の品種の成立過程は想定していない。また多くの日本鶏種は、日本に導入された品種 (地鶏, 小国, 軍鶏など) の交雑種である。その場合、作出された品種と交雑元の品種の遺伝距離が近くなるのは当然の結果であり、デンドログ

ラム上の位置付けは、結局「どちらの血が色濃いか」によって変わってくることになる。しかしながら他に手段がない以上、従来のデンドログラムの描き方 (UPGMA 法, FM 法および NJ 法) を, D_R , D_A および D_C によって求められた各集団の遺伝距離に応用してみた。図 1, 2 および 3 には, 9 つのデンドログラムが示されているが, どれが '真の' デンドログラムに近いのか, 意見が分かれると思われる。筆者は, D_R の式は前述のような問

題があるので, それに基づくデンドログラムは疑わしいと考える。また, UPGMA 法によるデンドログラムも他の 2 つに比べて疑わしいと考える。UPGMA 法は遺伝距離の期待値が進化速度に比例する場合に使える方法である。日本鶏成立の歴史は数百年であり, 進化速度では議論できない。実際, 一つの種 (品種) が多数の種 (品種) に分かれたわけではなく, あくまでも日本に導入された複数の鶏種 (地鶏, 小国, 軍鶏など) から, 日

図 1 UPGMA 法によるデンドログラム

図 2 FM 法によるデンドログラム

図 3 NJ 法によるデンドログラム

本人が品種を‘作出’したのだから進化したのではない。また、UPGMA 法を行ったことのある研究者ならば、一度は経験することではあるが、OTU (operational taxonomic unit) の結合を繰り返していくと、客観的に判断して‘群外’の品種も、結合せざるを得ない場面に出会す（もちろん研究者が群外と判断して計算し直すことは可能だが）。例えば本研究において、白色レグホンは群外の品種であるが、OTU の結合を繰り返すうちに日本鶏のグループに取り込まれてしまった（図 1 の D_C）。一方、無根のデンドログラムを表す FM 法や NJ 法は、UPGMA 法に比べれば、OTU 間の距離を比較的正確に反映するといえよう。そこで D_A および D_C の式によって求められた遺伝距離を基に、FM 法および NJ 法で描かれた 4 つのデンドログラムについて議論する。

4 つのデンドログラムは、ほぼ同じ結果を示していた。日本鶏種と白色レグホンは、遺伝的に離れていた。調査した日本鶏種は、①芝鶏、佐渡髯地鶏および比内、②尾長鶏と岩手地鶏、③金八、越後南京および声良、の 3 グループに分けられ、蜀鶏と会津地鶏は、3 グループに属さなかった。外貌的特徴から、3 グループは順に、地鶏系統、小国系統および軍鶏系統に対応しており、各品種成

立の歴史とほぼ一致した。岩手地鶏は地鶏の内種として天然記念物指定されているが、尾長鶏と遺伝的に近く、小国の内種あるいは小国と他の品種の交雑種の可能性が示された。現存する蜀鶏は、中国から導入された大唐丸に小国系統の鶏種が交雑し成立したと信じられているが、小国に対応するグループには属さなかった。また会津地鶏は 3 グループに属さず、その由来ははっきりしなかった。これらのデンドログラムに、地鶏、小国および軍鶏の純系の品種（岐阜地鶏、小国、大軍鶏など）を加え、さらにマーカーの数を増やすことによって今回の結果の正当性が明確になるので、近いうちにその結果を公表したい。

5. お わ り に

マイクロサテライト DNA は、多型性に富んでおり、検出される対立遺伝子数も多い。また、各動物種のゲノムが持つマイクロサテライト DNA のコピー数を上限として（ニワトリの場合 7500 コピー）、調査するマイクロサテライト DNA の遺伝子座位数を増やすことができる点、ゲノムのランダムな位置にマーカーを設定できる点において、血液蛋白質型および血液型をマーカーにするよりも優れていると考えられた。

マイクロサテライト DNA マーカーを用いる場合、本研究で検討したように 2 つの問題点が残っている。一つは、どの遺伝距離の推定式が最良の方法なのか確立されていない。もう一つは、マイクロサテライト DNA マーカーに適しているデンドログラムの描き方が明らかではない。これらの問題点については、今後検討する必要があるだろう。

謝 辞

本稿は、Takahashi ら (1997) の論文の一部である。本研究は、農業生物資源研究所長嶺慶隆動物探索研究チーム長、葦澤圭二郎主任研究官、広島大学山本義雄教授、都築政起助教授と共同で行われた。

文 献

- Cavalli-Sforza, L.L. & A.W. Edwards, 1967. Phylogenetic analysis : Models and estimation procedures. *Amer. J. Hum. Genet.*, 19 : 233-257.
- Fitch, W.M. & E. Margoliash, 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science*, 155 : 279-284.
- 橋口 勉・恒吉 満・西田隆雄・東上床久司・平岡英一, 1981. 血液蛋白質型からみた鶏の遺伝子構成, *日畜会報*, 52 : 717-729.
- 小穴 彪, 1951. 日本鶏の歴史, 日本鶏研究社, 東京
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Natur.*, 106 : 283-291.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89 : 583-590.
- Nei, M. 1983. Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution. In *Evolution of Genes and Proteins*, pp. 165-190. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- 葦澤圭二郎・内藤 充・大石孝雄・小宮山鐵朗, 1995. 非破壊変形を指標とした卵殻強度の強弱 2 方向選抜, *家禽会誌*, 32 : 128-136.
- 岡田育穂・豊川好司・高安一郎, 1980. 北奥羽在来日本鶏の類縁関係, *家禽会誌*, 17 : 337-343.
- Okada, I., Y. Yamamoto, T. Hashiguchi, & S. Ito, 1984. Phylogenetic studies on the Japanese native breeds of chickens. *Jpn. Poult. Sci.*, 21 : 318-329.
- Rogers, J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. In : *Studies in Genetics VII*, pp. 145-153. University of Texas Publication, Austin, Tex.
- Takahashi, H., K. Nirasawa, & T. Furukawa, 1996. An efficient method to clone chicken micro-satellite repeat sequences. *Jpn. Poult. Sci.*, 33 : 292-299.
- Takahashi, H., K. Nirasawa, Y. Nagamine, M. Tsudzuki, & Y. Yamamoto, 1997. An analysis of genetic relationships between Japanese native breeds of chicken based on micro-satellite DNA polymorphisms. *J. Here.*, submitted.
- 田名部雄一・水谷正俊, 1980. 日本鶏の蛋白質型による品種の相互関係と系統に関する研究. 3. 16 座位から求めた品種間の遺伝的距離と系統樹. *家禽会誌*, 17 : 116-121.

(平成 9 年 8 月 31 日 受理)