

秋田比内地鶏のDNA識別手法の確立(1)

誌名	秋田県農林水産技術センター畜産試験場研究報告
ISSN	18826466
著者名	力丸,宗弘 石塚,条次 小松,恵 高橋,秀彰
発行元	秋田県農林水産技術センター畜産試験場
巻/号	22号
掲載ページ	p. 56-60
発行年月	2008年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



秋田比内地鶏のDNA識別手法の確立（第1報）

力丸 宗弘・石塚 条次・小松 恵・高橋 秀彰*

(* (独)農業生物資源研究所、現(独)農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所)

要 約

秋田比内地鶏のDNA識別手法を確立するため、マイクロサテライトマーカーを用いて秋田比内地鶏の父親となる比内鶏の遺伝的特性について調査を行った。

秋田県農林水産技術センター畜産試験場で維持している比内鶏160検体について調査した結果、5つの常染色体マーカー(ABR13、ABR277、ABR500、MCW298、MCW327)、5つのZ染色体マーカー(ABR89、ABR241、ABR311、ABR633、ADL250)において、それぞれ一つの対立遺伝子に固定していた。すなわち、比内鶏とのF1個体では、比内鶏で固定している10個のマーカーの対立遺伝子が必ずセットで検出されなければならないことがわかった。

固定した遺伝子型を示した単型性マーカーの割合を常染色体、Z染色体別に比較すると、常染色体マーカーでは92個中5個(5.4%)、Z染色体マーカーでは22個中5個(22.7%)であり、常染色体よりZ染色体において、比内鶏に特徴的なマーカーが存在することが示唆された。

これらのことから単型性マーカーの割合や生産形態を考慮すると、秋田比内地鶏のDNA識別には、Z染色体マーカーの方が常染色体マーカーよりも有効であることが示唆された。

緒 言

近年、消費者の畜産物に対する安全・安心・高品質への関心が高まり、国内の銘柄鶏や地鶏と呼ばれる地域特産鶏の需要が高まっている。県の特産品である比内地鶏も年々出荷羽数が増加し、県内だけでなく、関東圏を主に需要が増加しており、平成17年の出荷羽数は662千羽に達している。しかし、一方で比内地鶏を始めとするブランド鶏では、その供給量の増加につれて、流通過程でのブランド鶏以外の混入や偽りが懸念され、消費者のみならず生産者からも科学的根拠に基づいた識別手法の開発が求められてきている。日本在来あるいは地域特産の畜産物としては、黒毛和種(Sasazakiら2004)、鹿児島黒豚(奥村ら2000)のDNA識別技術が確立されている。また、鶏ではNakamuraら(2006)によって、名古屋コーチンの識別技術が開発されている。そこで、本報では、当試験場の種鶏から生産される秋田比内地鶏と他の鶏を識別する技術を開発するため、まず初めに秋田比内地鶏の父親となる比内鶏の遺伝的特性について調査を行った。

材料及び方法

- 1 供試材料
供試材料には、畜産試験場で維持している比内鶏160検体を用いた。
- 2 ニワトリゲノムDNAの調製
ニワトリのゲノムDNAは、翼下静脈から採取した血液から、DNA抽出キット(セバジーン：三光純薬)を用いて抽出した。ゲノムDNAは、分光光度計(GeneQuantTM：アマシャムバイオサイエンス)を用いて、DNA濃度を測定後、10ng/ μ lに調製した。
- 3 マイクロサテライトDNA多型の検出
114個のマイクロサテライトマーカーを実験に用いた(表1)。114個は、座乗する染色体によって、92個の常染色体マーカー、22個のZ染色体マーカーに分けられる。

表 1. 使用したプライマー

マーカー名	フォワードプライマー (5' → 3')	リバースプライマー (5' → 3')	染色体番号	参考文献	DDBJ Accession Number
ABR0113	CGACATCGTGTATACCTT	GTCCTCCTTGTCTTGTG	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186551
ABR0117	CCTGGGATATGCTGAGATTAC	GCTAGTAGAAGCTTTCTTTGG	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186553
ABR0139	AAAAGCCTTGAGCTTCCACT	ACTTGTCTCAGCCTGCCTAC	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186558
ABR0169	CTGGACAAAGTCCCAATTA	CCAGAGCCATAGGCTAAGTG	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186564
ABR0185	GTCTGGCTGAGTATGCTGG	CTGGCTGAGTAAAGGTAA	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186567
ABR0247	CAAGTGGTTGGTTATTTGCT	ATTACTGCTGCTTTGTTGG	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186584
ABR0258	GCATGACAGAAATGCCAATA	GATCAGAACTTACCTCCCT	chr1	高橋ら, (2006)	
ABR0280	CAGAGGTGCTGACAGAGTGA	CTGGCTGTAAATTCAGGTGT	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186595
ABR0284	TGTTAACTAGCATTTTGT	TATTTGAGGAGGACAGCAGC	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186597
ABR0287	CCAGATTTCATTAGTGTCT	CAAATGTACTCTTTCACAGTCG	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186598
ABR0424	CTTCAGCCTCAAGCACTCAG	ACCTAACAAAATCGGCAAAA	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186653
ABR0542	GTGCCACCTTTCATTCTG	CTCCCTCTGCACTATTCTTTG	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186686
ABR0594	CTGGACCAAGCAGTATTTC	CAATACCTCAGGGAACAGAA	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186707
ABR0609	TACGGAGTATGAAAGATTG	CTTTATTCCTCAAGACAGAT	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186714
ABR0649	CCTCAGTGGCAAGTGAATA	TTAGTGGGAAATACGTTGG	chr1	Takahashi et al. (2005)	AB186728
LE10146	TCAMGCCACCAAGTCTTGG	GATCAGCTGCTCATAGCAGT	chr1	Wardle et al. (1999)	X3254
MCW0327	GTCTTGGCATTGTATGACTG	CAGCAGTAAAGTCTGACATC	chr1	Crooijmans et al. (1997)	G32082
ABR0189	TTAAGATTAAAGGCGCATCT	ATTTGACTCTCCAAAACACT	chr2	Takahashi et al. (2005)	AB186569
ABR0493	CTCTCCCACTCAGCTGTG	TTGGAAGATTGTATGAAACC	chr2	Takahashi et al. (2005)	AB186662
ABR0500	CATCCCATAGGTTATTCAT	CCAGAATATCAGTAGTCC	chr2	Takahashi et al. (2005)	AB186664
ABR0532	ACAAAGCCACCACTTTAA	ACAATATCTGGAGGCAGTA	chr2	Takahashi et al. (2005)	AB186682
ABR0569	GCAGAAAGGATAAGATGAC	AAACAACACCCACCAAGAT	chr2	Takahashi et al. (2005)	AB186696
ABR0579	TAATCTAAAAGTCTCCTT	AGCTGTATGCTCTTGTAGT	chr2	Takahashi et al. (2005)	AB186699
ABR0584	CGAGTCAATCAGGTAAGTT	TGTTAGGATTGCTGGTTTC	chr2	Takahashi et al. (2005)	AB186702
ABR0645	TATTTCTCTCAATTACAT	CACGCACTTACACTTAGA	chr2	高橋ら, (2006)	
ABR0185	GATCTACTGTCATTTAGTGT	TGAATAGATTTCAGTGAAGT	chr2	Crooijmans et al. (1997)	G31976
MCW0298	AACACTGACACGATAAGGCC	GATCCAGCCTGCTCAAAATCC	chr2	Crooijmans et al. (1997)	G32055
ABR0161	AGCACCTGAGACTGAGAAGA	CTCGCAAATATGGAAGTGA	chr3	Takahashi et al. (2005)	AB186563
ABR0225	GAAATGAGCAGGAGGAATA	AGACAGGCACTTGTACTGGA	chr3	Takahashi et al. (2005)	AB186577
ABR0232	AAAAAGCTATGGCAGAAAGA	ATACAGTGGGTGCAACAAGC	chr3	Takahashi et al. (2005)	AB186579
ABR0245	GATTTCTTCTATGGCTGTTG	TTCTTCACTTGCACCTTC	chr3	Takahashi et al. (2005)	AB186583
ABR0297	ATGTTCTTCAATTCAGAG	GGTATCCATAGCAAGTTAGT	chr3	高橋ら, (2006)	
ABR0318	ACCAGTTTGGCCTTAAACAT	TATTTCCACGGTCTGATACA	chr3	Takahashi et al. (2005)	AB186608
ABR0353	GCCCTCATACAATTTCACT	TTACTCTCTTTGTAATCTG	chr3	Takahashi et al. (2005)	AB186620
ABR0472	AACAGCCACCAATTTACTTA	CCCTGACTGCTCATTATG	chr3	Takahashi et al. (2005)	AB186659
ABR0664	CTGGAATACAGTAGGAGAC	TGAAGTACGGTAAGTAAGA	chr3	高橋ら, (2006)	
ADL0306	GTTACTGATCTTGGCTCAT	TCAGTTGACTTTCTTCAT	chr3	Hu et al. (2001)	G01721
MCW0103	AACTCGTTGAGAGTGAATGC	TTTCTAACTGGATGCTCTG	chr3	Crooijmans et al. (1997)	G31956
ABR0045	CAGCTTTGGGTGATCTTCACT	CTTTCTACATACATCTTCTTG	chr4	Takahashi et al. (2005)	AB186533
ABR0075	CATGAAGACCAACAGCAAGG	CAGAAGTCAACAATTCAGAG	chr4	高橋ら, (2006)	
ABR0315	TAAACAAAACCACTGAA	GGCACTTACCTTCTCTCTC	chr4	Takahashi et al. (2005)	AB186607
ABR0544	CACATAAGAAATGGGCGAAG	GGTGCAGAGTTCACTATTCA	chr4	Takahashi et al. (2005)	AB186688
LE10094	GATCTACCAAGTATGAGTGC	TCTCAGCTTAACACAGTGC	chr4	Gibbs et al. (1997)	X3246
ABR0046	GTGGTCCCGCTTGTCTCT	GCCGTGGGAAACCGAAGCA	chr5	Groenen et al. (2000)	AB186534
ABR0277	AACCAAGCCAGAGGATAAAT	CAAAGCAGAAACAAGATGAT	chr5	Takahashi et al. (2005)	AB186594
LE10145	CTGTTCACTCTTCTCTCAGTC	GATCTTGAATATAGACCTTGG	chr5	Crooijmans et al. (1997)	X3252
ABR0028	GTGGCAGGGCTTGGATGTTG	TGTCCTTGGCTGCTGCTGG	chr6	Takahashi et al. (2005)	AB186528
ABR0605	AGGGCAGTCTTTACTGAGGC	GTGAAATTCAGCTGGCACA	chr6	Takahashi et al. (2005)	AB186712
MCW0118	ATGATGAAGCATTATGCTAAG	CAATTTACTCAGAGATCAGTG	chr6	Crooijmans et al. (1996)	L43642
ABR0041	CCCTTCCCATACCACTCT	CTGTTGAACCTGCTATTAGG	chr7	Takahashi et al. (2005)	AB186531
ABR0195	AACGAAATGCCAAGGGTTA	CTGCAATTTATTGCTGTTGA	chr7	Takahashi et al. (2005)	AB186571
ABR0274	AAGAGTCAACAGAGCAGAG	TCGTAGTTTGAACCAATA	chr7	Takahashi et al. (2005)	AB186593
ABR0326	TGTGCCCTTCTCCCTTCC	TTCTTTCTTATGGTCTGTGC	chr7	高橋ら, (2006)	
ABR0419	TTAACTGGAGAAATATTAACAGC	TGCTTATTTCACTCACCAA	chr7	Takahashi et al. (2005)	AB186651
ABR0636	TCAGCGAGTCTGCAAGTGT	GTGAAGGATTAAGGGTAAA	chr7	Takahashi et al. (2005)	AB186724
ADL0279	CATGCTGTGCTTTACATA	GTGAACCCCAATGCTCTCTG	chr7	Hu et al. (2001)	G01699
LE10158	ATTGTTATCTCCAGAGAGGAC	GTCTTGTGATTTGGTTAGC	chr7	Crooijmans et al. (1997)	X8520
ABR0228	TGTGCAATCGGAGAAAGACTCG	CCCTCTTTGTTATCCCTCTG	chr8	Takahashi et al. (2005)	AB186578
ABR0604	ATTACAATCTACAGTITTC	CACTAACACCTGTTATGGG	chr8	Takahashi et al. (2005)	AB186711
ADL0258	TCATTTCACTCAATTTA	TTTTGAGGTTGCTGGTTGC	chr8	Cheng et al. (1995)	G01678
ABR0377	TTGATCATGCAAAATCTGGT	GGCAGTCTGATAGTGGGT	chr9	Takahashi et al. (2005)	AB186632

PCRは、384ウェルプレートの1ウェルあたり6 μ lとし、表2に示す組成の反応液を作成して、サーマルサイクラー (GeneAmp™ PCR System9700 : ア

プライドバイオシステムズあるいはiCyclerサーマルサイクラー : バイオ・ラッド) を用いて行った。

表 2. PCR 反応液の組成

	使用量	最終濃度
鋳型DNA溶液 (10ng/ μ l)	3.0 μ l	5.0ng/ μ l
10×PCRバッファー	0.6 μ l	[1×]
2 mM dNTPミックス	0.6 μ l	200 μ M
25 mM MgSO ₄	0.288 μ l	1.2mM
プライマー-F (200 μ M)	0.0125 μ l	0.4167 μ M
プライマー-R (200 μ M)	0.0125 μ l	0.4167 μ M
KOD DNA ポリメラーゼ (1U/ μ l)	0.125 μ l	0.029U/ μ l
滅菌蒸留水	1.362 μ l	
全 量	6.0 μ l	

KOD DNA ポリメラーゼ : KOD-Plus- (東洋紡)

各マーカーのフォワードプライマーは、PCR増幅産物をDNAシーケンサーを用いて検出するため、表2に示した3種の色素(NED、6-FAM、HEX)のいずれかで蛍光標識した。PCRサイクルは、94℃、75秒間の熱変性後、熱変性(94℃、15秒)、アニーリング(60℃、30秒)、伸長反応(68℃、60秒)のサイクルを10回、アニーリング温度を55℃としたサイクルを10回、アニーリング温度を50℃としたサイクルを30回行い、最後に68℃で9分間伸長反応を行った(図1)。

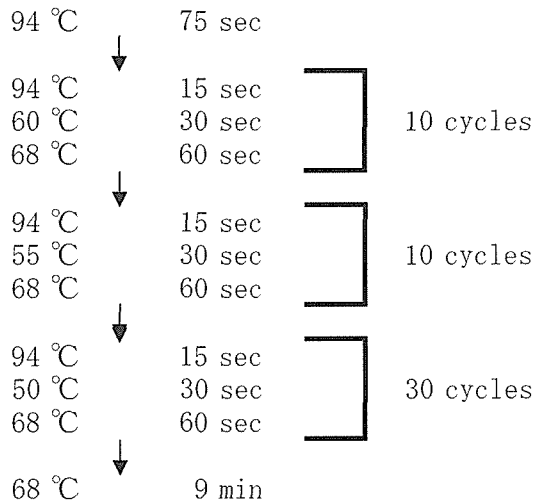


図1. PCRの温度条件

PCR産物をホルムアミドで約1,000倍に希釈して、サイズスタンダード(GENESCAN400HD [ROX]:アプライドバイオシステムズ)と共に、DNAシーケンサー(モデル3100:アプライドバイオシステムズ)を用いて電気泳動した。

- 4 各マイクロサテライトDNA座位の対立遺伝子頻度コンピューターソフトウェア(GeneMapper ver.2.0:アプライドバイオシステムズ)を用いて、PCR増幅産物の断片長の解析を行った。PCR増幅産物のサイズを基に、各個体、各マーカーの遺伝子型を判定した。

結果及び考察

常染色体では、5つのマーカー(*ABR13*、*ABR*

277、*ABR500*、*MCW298*、*MCW327*)において、それぞれ一つの対立遺伝子に固定していた。また、Z染色体についても5つのマーカー(*ABR89*、*ABR241*、*ABR311*、*ABR633*、*ADL250*)において、それぞれ一つの対立遺伝子に固定していた(表3)。

表3. 比内鶏に固定されたマイクロサテライトマーカー

マーカー名 (常染色体)	DNA断片長
<i>ABR0013</i>	137
<i>ABR0277</i>	247
<i>ABR0500</i>	160
<i>MCW0298</i>	133
<i>MCW327</i>	189

固定した遺伝子型を示した単型性マーカーの割合を常染色体、Z染色体別に比較すると、常染色体マーカーでは92個中5個(5.4%)、Z染色体マーカーでは22個中5個(22.7%)であり、常染色体よりもZ染色体において比内鶏に特徴的なマーカーが存在することが示唆された。

地鶏肉に関する日本農林規格において、「地鶏」は「在来種由来血液百分率が50%以上のもの」と定義されており、地鶏生産の多くは日本農林規格の許容範囲内において、外国鶏種との交雑が行われている。また、日本農林規格は「在来種」を「明治時代までに国内で成立し、又は導入され定着した、別表に掲げる鶏の品種」と定義しており、別表品種には横斑プリマスロック、ロードアイランドレッドといった外国鶏種が含まれている(表4)。

表4. 地鶏肉の日本農林規格における在来種

会津地鶏、伊勢地鶏、岩手地鶏、インギー鶏、烏骨鶏、鶉矮鶏、ウタイチャーン
 エーコク、黄斑プリマスロック、沖縄髯地鶏、尾長鶏、河内奴鶏、雁鶏、
 岐阜地鶏、熊本種、久連子鶏、黒柏鶏、コーチン、声良鶏、薩摩鶏、佐渡髯地鶏
 地頭鶏、芝鶏、軍鶏、小国鶏、矮鶏、東天紅鶏、蜀鶏、土佐九斤、土佐地鶏、
 対馬地鶏、名古屋種、比内鶏、三河種、蓑曳矮鶏、蓑曳鶏、宮地鶏、
 ロードアイランドレッド（38品種）

農林水産省告示第844号（平成11年6月21日）

これらの事柄が示すように、「地鶏」のほとんどは、外国鶏種との交雑によって生産されていることから、地鶏肉のDNA識別は非常に困難である。名古屋コーチンでは、すでにNakamuraら（2006）によってDNAによる識別法が確立されているが、名古屋コーチンの場合には同一品種内の系統間交配によるコマーシャル鶏である。一方、秋田比内地鶏のように、特定の地鶏品種と外国鶏種との交雑によってコマーシャル鶏が生産されている場合には、コマーシャル鶏は地鶏品種と外国鶏種の遺伝情報を合わせ持つため、交配が多くなれば多くなるほどDNA識別は困難となる。当場の種鶏から生産される秋田比内地鶏も比内鶏とロードアイランドレッド種の一代雑種である。しかしながら、本研究の結果から比内鶏では10個のマーカにおいてそれぞれ一つの対立遺伝子に固定していることが判明した。すなわち、比内鶏とのF1個体では、比内鶏で固定している10個のマーカの対立遺伝子が必ずセットで検出されなければならないことがわかった。

秋田比内地鶏のDNA識別手法の確立に向けては、常染色体およびZ染色体マーカの単型性マーカの割合に注目できる。本研究において、比内鶏で固定した遺伝子型を示した単型性マーカは、常染色体マーカでは92個中5個（5.4%）、Z染色体マーカでは22個中5個（22.7%）であり、常染色体よりもZ染色体において、比内鶏に特徴的なマーカが存在することが示唆された。また、秋田比内地鶏の生産形態にも注目できる。当場の種鶏から生産される秋田比内地鶏は、比内鶏の雄とロードアイランドレッド種の雌との一代雑種であり、市

場に流通している鶏のほとんどは雌である。したがって、秋田比内地鶏の雌の性染色体（ZW）のうちZ染色体は、間違いなく比内鶏のZ染色体である。このように単型性マーカの割合や生産形態を考慮すると、秋田比内地鶏のDNA識別には、Z染色体マーカの方が常染色体マーカよりも有効であることが示唆された。今後は、Z染色体マーカの調査に重点を移して、秋田比内地鶏のDNA識別手法の確立に向けた研究を推進する。

参考文献

- Cheng HH, Levin I, Vallejo RL, Khatib H, Dodgson JB, Crittenden LB and Hillel J. 1995. Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility. *Poultry Science*, 74 : 1855 - 1874.
- Crooijmans RPMA, van Oers PAM, Strijk JA, van der Poel JJ and Groenen MAM. 1996. Preliminary linkage of the chicken (*Gallus domesticus*) genome based on microsatellite markers : 77 new markers mapped. *Poultry Science*, 75 : 746 - 754.
- Crooijmans RPMA, Dijkhof RJM, van der Poel JJ and Groenen MAM. 1997. New microsatellite markers in chicken optimized for automated fluorescent genotyping. *Animal Genetics*, 28 : 427 - 437.
- Gibbs M, Dawson DA, McCamley C, Wardle AF, Armour JAL and Burke T. 1997. Chicken microsatellite markers isolated from libraries enriched for simple tandem repeats. *Animal Genetics*, 28 : 401 - 417.
- Groenen MAM, Cheng HH, Bumstead N, Bemkel BF, El-

- wood Briles W, Burke T, Burt DW, Crittenden LB, Dodgson J, Hillel J, Lamont S, Ponce de Leon A, Soller M, Takahashi H and Vignal A. 2000. A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome Research*, 10 : 137 - 147.
- Hu J, Mungall C, Law A, Papworth R, Nelson JP, Brown A, Simpson I, Leckie S, Burt DW, Hillyard A and Archibald A.L. 2001. The ARKdb - genome databases for farmed and other animals. *Nucleic Acids Research*, 29 : 106 - 110.
- Nakamura A, Kino K, Minesawa M, Noda M and Takahashi H. 2006. A Method for Discriminating a Japanese Chicken, the Nagoya Breed, Using Microsatellite Markers. *Poultry Science*, 85 : 2124 - 2129.
- 奥村直彦・小林栄治・鈴木秀昭・両角岳哉・濱島紀之・三橋忠由. 2000. ブタ品種間に認められるMC1R遺伝子及びKIT遺伝子の多型. *日本畜産学会報*, 71 : J 222 - J 234.
- Sasazaki S, Itoh K, Arimitsu S, Imada T, Takasuga A, Nagaiishi H, Takano S, Mannen H and Tsuji S. 2004. Development of breed identification markers derived from AFLP in beef cattle. *Meat Science*, 67 : 275 - 280.
- Takahashi H, Tsudzuki M, Sasaki O, Niikura J, Inoue-Murayama M and Minezawa M. 2005. A chicken linkage map based on microsatellite markers in an intercross of Japanese Large Game and White Leghorn. *Animal Genetics*, 36 : 463 - 467.
- 高橋秀彰・中村明弘・力丸宗弘. 2006. 平成17年度食肉に関する助成研究調査報告書. 財団法人伊藤記念財団 Vol. 24 : 207 - 213.
- Wardle A, Dawson D, Gibbs M, Parham A and Burke T. 1999. Further development of chicken microsatellite loci: 21 makers mapped. *Animal Genetics*, 30 : 238 - 241.
- ムとの共同研究であり、財団法人伊藤記念財団「平成17年度食肉に関する研究」の助成によるものです。

謝 辞

本研究は(独)農業生物資源研究所 動物資源研究チー