

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	奥村 史彦
題 目	ニワトリカルパイン遺伝子のマッピングとその系統分化への応用 (Mapping and phylogeny of calpain genes in chicken)
<p>【目的】カルパインは細胞内カルシウムイオン依存性プロテアーゼで、成長と肉品質性に關与していると考えられている。家畜において、μ-カルパインは死後における肉質軟化反応の主要酵素である。近年、m-カルパイン遺伝子は、ウシの肉質軟化の原因遺伝子としても同定された。また、家禽において、2系統のウズラ（体重の大きさにより選抜された系統）を使用した筋肉タンパク質代謝回転速度とカルパイン活性が計測され、筋肉タンパク質代謝回転速度とカルパイン活性は体重大選抜ウズラと比較して体重小選抜ウズラが有意に高いことが報告されている。同様に、ニワトリを用いた研究により、m-カルパイン活性と筋肉タンパク質代謝回転速度はブロイラーと比較してレイヤーが有意に高いことが報告された。</p> <p>以上のように、カルパインは家畜・家禽において成長や肉品質にかかわるため非常に有用な形質であると考えられる。そこで本研究では、カルパイン遺伝子多型を用い、1) ニワトリ染色体上へのカルパイン遺伝子(<i>CAPN1</i>, <i>CAPN2</i>, <i>CAPN3</i>, および <i>CAPN1.5</i>)のマッピングを East Lansing Reference Population (EL)と Kobe University Resource Family (KU)の2つの家系を用いて行った、2) カルパイン遺伝子がニワトリ集団において、どのような遺伝子構成をもたしているのかを明らかにするため、東南アジア在来鶏（タイ、ラオス、ミャンマー、インドネシア）、商業鶏（ホワイトレグホーン、ブロイラー）、ヤケイ（セキショクヤケイ、アオエリヤケイ）を材料として集団遺伝学的解析を行った。</p> <p>【結果】1) <i>CAPN2</i> と <i>CAPN1.5</i> はおよそ 30cM 離れて GGA03 に、<i>CAPN3</i> は GGA5 に、それぞれマップされた。<i>CAPN1</i> はマイクロサテライトマーカーである <i>LEI0140</i> と新たに E66 と呼ばれる連鎖グループを形成したが、これは EL のみで観察された結果である。また、<i>CAPN2</i> と <i>CAPN1.5</i> がマップされた GGA03 は HSA01 と、<i>CAPN3</i> がマップされた GGA05 は HSA15 とシンテニーがあると報告されており、今回の結果もまたそれを示唆している。また、<i>CAPN2</i>、<i>CAPN3</i>、および <i>CAPN1.5</i> はニワトリ全ゲノムデータベースである UCSC Genome Browser on Chicken で検索できたが、<i>CAPN1</i> は特異的位置を断定することは出来なかった。</p> <p>2) \bar{H} は在来鶏、商業鶏、およびセキショクヤケイにおいて、0.316~0.465、アオエリヤケイにおいては 0.137 となりアオエリヤケイは遺伝的に固定されているグループであると考えられる。また、G_{ST} は在来鶏集団間では低く、在来鶏と野鶏間においてもっとも高くなった。今回解析した G_{ST}、Pairwise F_{ST} test、主成分分析およびデンドログラムから、在来鶏集団、改良鶏集団およびセキショクヤケイは遺伝的に近い関係にあり、アオエリヤケイは非常に離れた集団であることがわかった。</p>	

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Fumihiko Okumura
題 目	Mapping and phylogeny of calpain genes in chicken (ニワトリカルパイン遺伝子のマッピングとその系統分化への応用)
<p>【OBJECTS】 Calpains are intracellular Ca^{2+} dependent proteases and enzymes that contribute to growth and meat quality. In livestock, μ-calpain is the primary enzyme responsible for postmortem tenderization of meat. Recently, <i>CAPN1</i> was identified as a positional candidate gene for meat tenderness in cattle. In the poultry, it was measured muscle protein turnover rate and calpain activity in muscle of two quail lines divergently selected for body size. Muscle protein turnover rate and calpain activity were significantly higher in the small line compared to the large line. Similarly, it was reported higher m-calpain activity and muscle protein turnover rate in layer chickens than in broiler chickens. These results suggest that calpain activity correlates with turnover of muscle protein.</p> <p>As mentioned above, calpains are enzymes contributing to the important agronomic traits of growth rate and meat quality for the poultry and livestock industries. In this study, using of calpain genes polymorphisms, 1) we described the mapping of four calpain genes (<i>CAPN1</i>, <i>CAPN2</i>, <i>CAPN3</i>, and <i>CAPN1.5</i>) in chicken, and 2) we analyzed distribution of alleles for the four loci among native chicken in Southeast Asia, some commercial breed, and two species of jungle fowl. We also analyzed the genetic constitution, genetic variability, and relation among the chicken populations by using these loci.</p> <p>【RESULTS】 1) <i>CAPN2</i> and <i>CAPN1.5</i> mapped to two locations on chromosome 3 about 30 cM apart, while <i>CAPN3</i> mapped to chromosome 5. <i>CAPN1</i> was linked to a previously unlinked microsatellite marker <i>LEI0140</i> to form a new linkage group called E66. <i>CAPN2</i> and <i>CAPN3</i> extend the amount of conserved synteny between chicken chromosome 3 and human chromosome 1, and between chicken chromosome 5 and human chromosome 15, respectively. Although <i>CAPN2</i>, <i>CAPN3</i>, and <i>CAPN1.5</i> were found in UCSC Genome Browser on Chicken, but <i>CAPN1</i> and <i>LEI0140</i> were not in specific genomic position. 2) The P_{poly} and F_{ST} were respectively 1.00 and 0.316 ~ 0.465 in domestic chicken and red jungle fowl, and 0.33 and 0.137 in Green jungle fowl. G_{ST} values suggested that the degree of subdivision among native chicken except for Thailand was relatively low, while it was highest in Thailand. Pairwise F_{ST} test, dendrogram and principal component analysis from the results of calpain loci showed that the populations of the four Southeast Asian native and commercial chickens were close genetically.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	奥村 史彦
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 前田 芳實
	副査 鹿児島 大学 教授 岡本 新
	副査 琉 球 大学 教授 仲田 正
	副査 佐 賀 大学 教授 和田 康彦
	副査 鹿児島 大学 助教授 侯 徳興
審査協力者	
題 目	ニワトリカルパイン遺伝子のマッピングとその系統分化への応用 (Mapping and phylogeny of calpain genes in chicken)
<p>本研究は、家畜・家禽の成長や肉の品質に重要な関わりをもっていると考えられているニワトリのカルパイン遺伝子について、そのニワトリ染色体上の位置を明らかにすると共に、それらの遺伝子をマーカーとして、アジア在来鶏、改良鶏および野鶏について集団遺伝学的解析を行ったものである。</p> <p>遺伝子マッピングの材料には、East Lansing Reference Population (EL)と Kobe University Resource Family (KU)の2つの family のDNAサンプルを用いた。また、集団解析には、タイ、ラオス、ミャンマー、インドネシアの在来鶏、肉用鶏、卵用鶏、赤色野鶏および緑襟野鶏を用いた。</p> <p>ニワトリにおける4種類のカルパイン遺伝子 (CAPN1, CAPN2, CAPN3, および CAPN1.5) について多型を明らかにし、その多型情報を基に連鎖地図の作成を行なった。その結果、CAPN1は既知のマイクロサテライトマーカーLE10140と12cMの連鎖関係が見られ、これを新規の連鎖グループE66と結論付けた。CAPN1.5とCAPN2はニワトリ第3染色体(GGA3)上に座位し、BLAT searchの結果、CAPN1.5とCAPN2はそれぞれ、26,626,374~26,630,453bp および 14,023,525~14,031,384bp の位置に存在することが明らかとなった。しかし、CAPN2の配列はデータベースで見出されなかった。CAPN3は第5染色体の22,910,331~22,916,334bpの位置に存在していることが判明した。また、</p>	

カルパイン遺伝子の連鎖解析から、ニワトリ第3染色体とヒト第1染色体およびニワトリ第5染色体とヒト第15染色体とはシンテニーを有することが明らかとなった。

主成分分析により系統分化のマーカーとしてふさわしいと判断された3種類のカルパイン (*CAPN1*, *CAPN3*, および *CAPN1.5*) の頻度情報を基にして、平均ヘテロ接合体率 (\bar{H})、系統分化指数 (G_{ST}) および主成分分析を行い、さらにデンドログラムを作成した。 \bar{H} は在来鶏、改良鶏、および赤色野鶏において、0.316 ~ 0.465 を示し、ほぼ類似の多様性を示した。一方、緑襟野鶏の \bar{H} は 0.137 と評価され、緑襟野鶏の変異性は低いと考えられた。また、 G_{ST} は在来鶏集団間では低く、在来鶏と野鶏間においてもっとも高くなった。今回解析した G_{ST} 、Pairwise F_{ST} test、主成分分析およびデンドログラムから、在来鶏集団と赤色野鶏は比較的近い関係にあり、改良鶏はそれらから離れていた。また緑襟野鶏は遺伝的に遠い関係にあり、緑襟野鶏は非常に離れた集団であることが明らかとなった。

これらの研究成果は家禽の筋肉蛋白質の分解に重要なかかわりを持つカルパイン遺伝子の連鎖関係を明らかにし、さらにそれらの遺伝子の頻度情報から野鶏、在来鶏および改良鶏の系統関係を明らかにした点で家畜育種学上重要な知見であり、農学博士の学位を与えるに十分な価値を有するものである。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	奥村 史彦
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 前田 芳實
	副査 鹿児島 大学 教授 岡本 新
	副査 琉 球 大学 教授 仲田 正
	副査 佐 賀 大学 教授 和田 康彦
	副査 鹿児島 大学 助教授 侯 徳興
審査協力者	
実施年月日	平成 18 年 1 月 20 日
試験方法（該当のものを○で囲むこと。） (口答)・筆答	
<p>主査及び副査は、平成 18 年 1 月 20 日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は学位申請者が鹿児島大学大学院連合農学研究科博士課程修了者としての学力ならびに識見を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに十分な資質を有するものと判定した。</p>	

学位申請者 氏 名	奥村 史彦
質問01	カルパイン活性とカルパイン遺伝子の多型に関連はあるのか？
回答01	現状では、それはわからない。しかし、今回マッピングを行ったカルパイン遺伝子周辺には QTL が存在していると報告がある。そのため今後の研究対象として重要であると考えられる。
質問02	今回解析したのは増体などに係っているタンパク質分解酵素であったが、逆に合成では何かターゲットとするものはあるのか？
回答02	現状では、ターゲットとするような遺伝子は無いと考えられる。(筋肉タンパク質代謝回転において、常に一定量の合成は行われており、むしろ筋肉タンパク質量は分解において調節がされていると考えられているため)
質問03	今回 <i>CAPNI</i> が染色体上にマッピングされず、UCSC Genome Browser 上にもその存在が確認されなかったのは微小染色体に存在するためではないのか？
回答03	その可能性は、十分考えられる。また、UCSC Genome Browser はショットガン シークエンスなので現状では完全な全ゲノムシークエンスとはいえない。そのため、未だに明らかとなっていない領域に <i>CAPNI</i> が存在しているため今回は検索できなかったとも考えられる。
質問04	哺乳類では12種類のカルパインが存在しているのに、なぜニワトリでは4種類しかないのか？
回答04	現状では4種類の報告しかないが、ニワトリにおいても哺乳類と同じように多くのカルパインホモログが存在していると考えられる。

質問05 今回報告されたタイ在来鶏において、闘鶏の存在について論文中で論じているが実際のところ、その体型などにカルパインは関与しているのか？

回答05 本研究の結果からはそれは判断することは難しい。今後の研究対象として考えていく必要がある。

質問06 *CAPNI*においてのみ、なぜPCR-SSLP解析なのか？

回答06 実験開始当初は*CAPNI*もPCR-RFLP解析を行うために数 k bpのPCR増幅産物を得るためのプライマー設計を試みていたが、原因は不明であるが良好な増幅を得ることは出来なかった。そのため、増幅産物の全長を短くしていった結果、今回のようなSSLPを発見した。

質問07 RFLPに使用する制限酵素はどのように決めているのか？

回答07 実際のところ、単価の安い制限酵素をいろいろ試してみて、良好な多型パターンを検索している。

質問08 なぜ、East Lansing Reference Population (EL) と Kobe University Resource Family (KU)の間には、マーカーの数に差があるのか？

回答08 そもそもELは遺伝子をマッピングする目的で構築された家系であるが、KUは筋ジストロフィーの原因遺伝子を検索する目的で構築された家系であり、マッピングを目的とした家系ではないためマッピングされている遺伝子数は少ない。

質問09 ELとKUは、それぞれの家系において何個体解析するのか？

回答09 それぞれ、58、55個体でワンセットとなっている。(実際はKUにおいて、親世代2個体、F₁世代1個体、Backcross世代55体の合計58個体)

質問10 家畜育種学研究室では、過去血液型、卵白タンパク質型など中立なマーカーを用いて解析を行ってきたが、今回のような機能遺伝子を用いた場合の影響は？

回答10 確かに今回用いているカルパインは機能遺伝子ではあるが、鋳型としたものがゲノムDNAであるため、おそらく今回多型現象が確認された部位はイントロンであると仮定できる。イントロンは変異性に富んでいるため問題はないと考えられる。

質問11 タイ在来鶏集団において、 G_{ST} が高く評価され、また、各地域が他の国と比べて主成分分析においても広くプロットされたのはなぜか？

回答11 タイでは在来鶏とヤケイと在来鶏の交雑集団が存在するため、他の地域と比較して遺伝的な変異性に富んでいると考えられる。