

学 位 論 文 要 旨

氏 名

エーエーモー

題 目

インデルマーカーを用いた *Gallus* 属の多様性に関する分子遺伝学的研究
(Studies on genetic diversity of genus *Gallus* by using indels markers)

[目的] インデルとは1塩基以上の挿入または欠失のことである。ニワトリゲノム情報は2004年、12月に初めて発表され、約10億塩基対により構成されていることが判明した。そのゲノム上には計447,388個(2012年、10月)のインデルが報告されている。そこで、本研究では分子マーカーとしてのインデルの有効性を調べ、*Gallus*属のトリたちの遺伝的特徴を解明することを目的とした。

[材料および方法] 東南アジア4ヶ国から在来鶏20集団(ミャンマー3集団、タイ6集団、ラオス3集団、インドネシア8集団)、改良品種5集団、実用品種3集団、セキショクヤケイ4亜種(*G.g.spadiceus*, *G.g.jabouilei*, *G.g.gallus*, *G.g.bankiva*)およびアオエリヤケイ(*G.varius*)の血液サンプル計1092羽を用いた。ゲノムDNAはPhenol chloroform方法で抽出した。マーカーは、各染色体において10Mbp間隔で配置した。多型解析は各マーカーについてPCRによる増幅後、アガロースゲル電気泳動により行った。さらに各集団の対立遺伝子頻度を算出後、多型座位の割合(P_{poly})、ヘテロ接合体率(H_o , H_E)、遺伝的分化指数(G_{st})、および遺伝的距離(D_s)を算出し、MEGAソフトウェア4.1を使って系統樹の作成を行った。

[結果] 在来鶏、改良品種、実用品種、セキショクヤケイおよびアオエリヤケイの P_{poly} はそれぞれ0.713~0.989, 0.500~0.618, 0.716~0.814, 0.218~0.946および0.039であった。 H_o と H_E は在来鶏集団で0.197~0.268と0.229~0.392, 改良品種で0.147~0.203と0.175~0.212, 実用品種で0.237~0.257と0.225~0.247, セキショクヤケイで0.101~0.231と0.078~0.366, アオエリヤケイで0.003と0.012と推定された。全在来鶏集団での G_{st} は0.045に評価され、それぞれの集団は遺伝的に近い集団と考えられた。分子系統樹を作成すると、在来鶏は大きく1つのクラスターから構成されていた。また、在来鶏、改良品種、実用品種およびセキショクヤケイ3亜種は大きなクラスターをつくった。一方、アオエリヤケイと*G.g.bankiva*は他の集団から遺伝的に離れていることが伺われた。タイ在来鶏、交雑種(在来鶏X野鶏)およびセキショクヤケイについてSTRUCTURE解析を行ったところ、在来鶏、交雑種およびセキショクヤケイ2亜種において共通祖先の可能性が示された。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	AYE AYE MAW
題 目	Studies on genetic diversity of genus <i>Gallus</i> by using indels markers (インデルマーカを用いた <i>Gallus</i> 属の多様性に関する分子遺伝学的研究)

Objective: Indels, as defined as either an insertion or deletion of one or more nucleotide base pairs into a DNA sequence. The chicken genome was announced for the first time in 2004, December. The draft sequence of chicken genome composed of approximately 1.05 Gb and it was reported that chicken's genome includes 447,388 indel polymorphisms in 2012, October. The present study focused on the application of indels polymorphism as genetic marker. 102 indels markers was developed to analyze the genetic diversity and phylogenetic relation of various chicken populations.

Materials and Methods: Totally, 1092 blood samples of various populations including native chickens, improved chickens, commercial chickens and Jungle fowls were used. Native chicken populations are from four South East Asian countries: Myanmar (3 populations), Thai (6 populations), Laos (3 populations) and Indonesia (8 populations). Then improved chicken breed (5 populations), commercial chicken (3 populations), subspecies of Red Jungle fowl (4 populations) and Green Jungle fowl (1 populations) were used. The indels sequences of 20-30 bp along the every 10 Mb of chromosome length were selected for primer design. PCR amplification and agarose gel electrophoresis was performed to examine the genotype of indels polymorphism. These genotype data were used to estimate allele frequency, (P_{poly}), expected (H_E) and observed heterozygosity (H_O), coefficient of genetic differentiation (G_{st}) and genetic distance (D_s). To construct phylogenetic tree, MEGA software version 4.1 was used.

Results: The estimated P_{poly} were ranged from 0.713- 0.989 in 20 native chicken populations, 0.500-0.618 in improved chickens, 0.716-0.814 in commercial chickens, 0.218-0.946 in four sub species of Red Jungle fowl and 0.039 in Green Jungle fowl. The H_E and H_O in native chickens, improved chicken, commercial chickens., Red Jungle fowl and Green Jungle fowl were ranged from 0.197-0.268 and 0.229-0.392 , 0.147- 0. 203 and 0.175- 0.212, 0.237-0.257and 0.225 - 0.247, 0.101-0.231 and 0.078-0.366, 0.003 and 0.012, respectively. The G_{st} among native chicken populations was 0.045. That indicated that they are genetically similar populations. In phylogenetic analysis, they were the same clade to improved chickens, commercial chickens and three sub species of Red Jungle fowl (*G.g.spadiceus*, *G.g.jabouilei* and *G.g.gallus*). The Green Jungle fowl and *G.g.bankiva* were remote from all other populations and they are genetically different from domestic chickens and other Red Jungle fowl's subspecies. The present of common origin and genetic admixture was observed among Thai's native chicken, Thai's cross chicken (native chicken X Jungle fowl), *G.g.spadiceus* and *G.g.jabouilei* in STRUCTURE analysis.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	エーエーモ一
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 岡本 新
	副査 鹿児島 大学 教授 侯 徳興
	副査 琉 球 大学 教授 川本 康博
	副査 佐 賀 大学 教授 和田 康彦
	副査 鹿児島 大学 准教授 下桐 猛
審査協力者	
題 目	Studies on genetic diversity of genus <i>Gallus</i> by using indels markers (インデルマーカを用いた <i>Gallus</i> 属の多様性に関する分子遺伝学的研究)
<p>2004 年 12 月にニワトリの全塩基配列が決定されてから、その情報をもとに分子レベルからの解析が積極的に実施されている。ニワトリゲノムはおよそ 10 億塩基対より構成されており、そこには様々な変異が存在する。DNA 上に散在する様々な変異の中で、1 塩基以上の挿入(insertion)または欠失(deletion)であるインデルはゲノム上に計 447,388 個(2012 年 10 月)存在すると報告されている。一方、東南アジアで飼養されている在来鶏は貴重な動物遺伝資源の一つであり、それらの集団を維持・保護していくことは将来的に極めて重要である。</p> <p>本研究では 102 個のインデルマーカを作出し遺伝的マーカとしての有効性を検証するとともに、<i>Gallus</i> 属の異なる種の遺伝的特徴について、①集団の遺伝的変異性、②集団構造および③ニワトリの成立の観点から検討した。本研究によって得られた知見は以下のように要約できる。</p> <p>材料には、東南アジア4ヶ国から在来鶏20集団(ミャンマー3集団、タイ6集団、ラオス3集団、インドネシア8集団)、改良品種5集団、実用品種3集団、セキショクヤケイ4亜種(<i>G.g.spadiceus</i>, <i>G.g.jabouilei</i>, <i>G.g.gallus</i>, <i>G.g.bankiva</i>)およびアオエリヤケイ(<i>G.varius</i>)の血液サンプル計 1,092 羽を用いた。ゲノム DNA</p>	

は血液より定法に従い抽出した。これらのサンプルについて常染色体上に 10Mbp 間隔で配置した 102 個のインデル座位の遺伝子型を PCR 増幅することで決定した。さらに得られた遺伝子型より各集団について、多型座位の割合、平均ヘテロ接合体率、遺伝的分化指数および遺伝的距離を算出した。また、STRUCTURE プログラムを用いた集団的構造解析および系統樹の作成を行った。

今回開発した 102 個のインデルマーカを用いて、ミャンマー在来鶏 80 個体を解析したところ、93 マーカーにおいて多型が観察され、これらのインデルマーカが多型解析に適していると考えられた。

在来鶏、改良品種、実用品種、セキショクヤケイおよびアオエリヤケイの多型座位の割合は、94%、57%、77%、69%および 4%と推定された。また、平均ヘテロ接合体率はそれぞれ 0.253、0.171、0.246、0.176 および 0.02 と評価され、在来鶏が変異性に富む集団であることが明らかとなった。さらに集団の分化の程度を推定すると、在来鶏集団間が最も低い値 (0.045) を示し、これらの集団は多型性が高いものの分化の進行は遅いことが明らかとなった。一方、ヤケイ集団間が 0.417 と高い値を示し種間の違いを反映した結果が得られた。改良品種および実用品種は両者の中間の値を示した。

タイ在来鶏、交雑種 (在来鶏×セキショクヤケイ) およびセキショクヤケイ 4 亜種について集団的構造解析を行ったところ、在来鶏、交雑種およびセキショクヤケイのなかで *G.g.spadiceus* と *G.g.jabouilei* において共通の祖先の可能性が示唆された。

系統樹を作成してみると、在来鶏は 1 つのクラスターにまとまって描かれた。さらに在来鶏は改良品種、実用品種およびセキショクヤケイ 3 亜種と大きなクラスターを構成した。特に、セキショクヤケイの中で *G.g.spadiceus* は在来鶏集団のなかに取り込まれ、ニワトリの成立に多大な貢献をしていると考えられた。しかし、セキショクヤケイの 1 亜種である *G.g.bankiva* およびアオエリヤケイは、他の集団から離れたところに位置し遺伝的に離れていることが明らかとなった。これらは、従来の血液タンパク質ならびにミトコンドリア DNA 解析の結果を支持するとともにより詳細な情報を提供した。

以上の成果は、インデルマーカが家禽集団の遺伝的特徴を把握する上で有効であり、家禽の成立を考察する上で極めて重要な知見が得られることを実証した。今後、これらのインデルマーカが系統解析ならびに集団の遺伝的多様性解析を行う上で大いに寄与するものとする。

よって審査委員一同、本論文が博士 (農学) の学位論文として十分価値があるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	工一工一七一
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 岡本 新
	副査 鹿児島 大学 教授 侯 徳興
	副査 琉球 大学 教授 川本 康博
	副査 佐賀 大学 教授 和田 康彦
	副査 鹿児島 大学 准教授 下桐 猛
審査協力者	
実施年月日	平成25年 1月 12日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査および副査は、平成25年1月12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、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏名

エーエーモ一

[質問 1] 今回の結果は、これまで報告されている血液タンパク質多型あるいはミトコンドリア解析等の結果と違いはありますか。また、本研究結果だけにみられる特異的な点はありますか。

[回答 1] 集団の多様性、分化指数などほぼ同じような結果が得られました。他の解析で示された集団の遺伝的特徴が今回も確認することが可能でした。系統樹を作成してみると、クラスター構成はこれまでとほぼ同様な傾向を示しました。しかしながら、これまでセキショクヤケイ亜種間でどの亜種がニワトリの祖先として有力かという点についてはっきりとはしませんでした。今回の成果からは *G.g.spadiceus* が亜種の中でも最もニワトリの成立に貢献していることが示唆されました。

[質問 2] 本研究のマーカーは経済形質の情報収集に応用できますか。

[回答 2] 今回作出した 102 マーカーは、そのほとんどが遺伝子をコードしていない部分に座位しています。経済能力との関連は調べておりませんが、今後 QTL 解析等に使える可能性はあると思います。

[質問 3] 分子マーカーとしては、マイクロサテライトマーカーや SNP マーカー等がありますが、それらと比較して本マーカーが異なる点などはありますか。

[回答 3] インデルマーカーも分子マーカーの一つですが、遺伝子型判定および手法の簡便さという点で優れていると考えます。しかし、対立遺伝子の少なさにおいては劣っていると考えます。また、解析結果については他の分子マーカーとほぼ同様な多様性ならびに系統樹を得ることができました。さらに集団間の遺伝的関係をみた場合、ヤケイにおける亜種間の関係などこれまでに確認できなかった詳細な解析が可能でした。

[質問 4] 集団の類縁関係を解析する際に、銘柄鶏などの交雑集団を加えるのは適当ではないと思いますが、どのように考えますか。

[回答 4] ご指摘の通り家畜化あるいは品種の成立を考察するうえでは、そのような集団を同じ視点で解析するのは困難なのかもしれません。しかしながら、今回さつま地鶏集団を供試した理由は、系統分化を検証するという

ためではありません。近年、日本各地で作出されている銘柄鶏においてその偽装が問題視されています。この点についてインデルマーカが有効かどうかを確認するためでした。その結果さつま地鶏集団は他の集団と混在することはなく単独でグルーピングすることができました。したがって、本マーカが品種鑑別マーカとしても応用できるという可能性が得られました。

[質問 5] ラオスの在来鶏も供試されていますが、集団構造解析の結果には含まれていませんでした。この集団は解析されなかったのですか。

[回答 5] 本日のプレゼンでは報告しませんでした。ラオス在来鶏についても同様に分析しました。その集団構造は他の在来鶏とほぼ同じ結果でした。またラオス在来鶏の遺伝的分化指数は最も低い値を示し、在来鶏の中でも特に分化が進行していない集団であることが判明しました。

[質問 6] 解析したサンプルの中にヤケイとの交雑種が含まれていましたが、もう少し詳しく説明してください。

[回答 6] 用いた交雑種は、タイの色々なところで観察される集団です。現地での聞き取り調査では、ゴム農園などで飼育しているニワトリに付近のジャングルに生息しているセキショクヤケイが交雑してつくられた集団だそうです。管理された集団ではなく、自由に餌を求めて移動しているようです。今回供試した個体はある農園で餌づけされた集団のものでした。遺伝的な特徴をみると、ヤケイより在来種に近い関係が確認されました。これらの集団の存在は、現在でも野生種と家畜種の間で遺伝的交流が継続中であることを示していると考えます。

[質問 7] 東南アジアの在来鶏は改良品種に比べて多様性に富んでいるにもかかわらず分化は低いという結果ですが、これはどのように理解すればいいですか。

[回答 7] 東南アジア在来鶏の各集団の多様性は、多型座位の割合および平均ヘテロ接合体率の値が示すとおりです。一方、集団間の遺伝的分化指数が低いのは、各集団が保有している多様性が極めて類似しているためであり、飼養地域が異なっても独自の分化は進行していないことを示していると思います。結果的に系統樹を作成してみると、東南アジアの在来鶏集団は同じクラスターを構成しています。