

学 位 論 文 要 旨

氏 名	リズティアン
題 目	東南アジア在来鶏の多様性に関する分子遺伝学的研究 (Studies on genetic diversity of native chicken populations in South East Asia)
<p>[目的] 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1つであり、それらの集団を維持、保護していくことは極めて重要である。一方、2004年3月にニワトリの全塩基配列が決定されて以降、分子レベルからさかんに解析が実施されてきている。DNA上に散在する様々な変異の中で、一塩基置換 (Single Nucleotide Polymorphism : SNP) はニワトリゲノム中におよそ300万(2010年現在)確認され、網羅的に存在している。本研究では98個のSNPマーカーを作出し遺伝的マーカーとしてその有効性を検証し、東南アジア在来鶏の遺伝的多様性について、①集団の遺伝的変異性、②集団構造および地理的隔離の観点から検討した。</p> <p>[材料および方法] インドネシア在来鶏4集団、ミャンマー在来鶏3集団、タイ在来鶏3集団、コマーシャル鶏3集団およびヤケイ4亜種を供試し、血液より定法に従いDNAを抽出した。これらのサンプルについて常染色体上に10Mbp間隔で設定した98個のSNP座位の遺伝子型を決定した。得られた遺伝子型より各集団について、各座位の遺伝子頻度、多型座位の割合、平均ヘテロ接合体率、遺伝的距離およびペアワイズ F_{ST} 値を算出した。さらに Structure を用いて集団の遺伝的構造をまた距離による隔離(Isolation by Distance : IBD)テストにより集団間の地理的距離を解析した。</p> <p>[結果] ①在来鶏10集団、ヤケイ4亜種およびコマーシャル鶏3集団の多型座位の割合は、それぞれ79%、63%および60%と推定された。さらに平均ヘテロ接合体率は、在来鶏、ヤケイおよびコマーシャル鶏でそれぞれ 0.246 ± 0.045、0.225 ± 0.077 および 0.211 ± 0.037 と評価され、前2集団は後者と比較して遺伝的変異性が高かった。また、全17集団の系統樹を描いてみると在来鶏、ヤケイおよびコマーシャル鶏がそれぞれ異なるクラスターを構成し、SNPマーカーが遺伝的多様性解析に有効であることが示唆された。②Structureで遺伝的構造解析を実施したインドネシア在来鶏4集団は $K=3$、ミャンマーとタイ在来鶏およびコマーシャル鶏9集団は $K=6$ となり、それぞれ3および6つの集団を起源とする集団であることが推察された。インドシナ半島で飼養されているミャンマーおよびタイ在来鶏6集団についてIBDテストを行った結果、遺伝的距離が最も近かったミャンマーのヤンゴンとペグが地理的に最も近く、遺伝的距離が離れていたミャンマーのペグとタイの東南集団が遠く評価され、実際の地図上の距離を正確に反映していることが伺われた。</p> <p>以上、本研究の成果は、ニワトリの家畜化および系統解析に基礎的かつ重要な知見になるものと期待される。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名 Riztyan

題 目 Studies on genetic diversity of native chicken populations in South East Asia
(東南アジア在来鶏の多様性に関する分子遺伝学的研究)

[Background] Native chicken in South East Asia represents an important animal genetic resource and the conservation of its populations is an issue for the preservation of this resource. The first draft of chicken genome sequence has been deposited into free public database for use by researchers since March 1st, 2004. There are several types of DNA marker e.g. single nucleotide polymorphism (SNP), which have been used as tools for large number of applications such as phylogenetic analysis and mapping of quantitative trait loci. There are ca. three million SNP have been detected in the chicken genome (Ensembl v64.2 updated, 2010). Here, we developed 98 single nucleotide polymorphisms (SNP) to analyze the genetic diversity of native chicken population in South East Asia. We particularly observed: (1) the genetic variation in populations, (2) the population structure and phylogeographic analysis of the populations.

[Materials and Methods] DNA samples was extracted from the blood samples of the native chicken populations in Indonesia (n=4), Myanmar (n=3), Thailand (n=3), subspecies of red jungle fowl (n=4), and commercial lines (n=3). DNA samples were genotyped using 98 autosomal SNP markers, which developed at an average separation of 10 Mb. Genotype data was used to estimate the allele frequency, polymorphic loci (*Ppoly*), heterozygosity, and genetic distance (pairwise F_{ST}). Furthermore, STRUCTURE program and Isolation by Distance (IBD) test was performed to analyze the population structure and phylogeography of the native chicken populations.

[Results] (1) Polymorphic loci of the ten native chicken populations, four subspecies of red jungle fowls, and three commercial lines was estimated at 79%, 63%, and 60%, respectively. The greatest to the smallest average heterozygosity was estimated at 0.246 ± 0.045 , 0.225 ± 0.077 , and 0.211 ± 0.037 for native chicken populations, red jungle fowls, and commercial lines, respectively. The neighbor-joining tree of the 17 populations revealed a clear separation between native chicken populations, red jungle fowls, and commercial lines, which confirmed the usefulness of the SNP markers in this study. (2) The STRUCTURE analysis revealed that the native chicken populations in Indonesia might be derived from six genetic populations ($K=3$). For the native chicken populations in Myanmar and Thailand, and commercial lines, the STRUCTURE analysis revealed that the nine chicken populations might be derived from six genetic populations ($K=6$). The mantel test of Isolation by Distance for the native chicken populations in Myanmar and Thailand suggested that the closer geographic distance showed the smaller genetic distance between the populations in Yangon and Bago (Myanmar). In contrast, the further geographic distance showed the greater genetic distance between the populations in Bago (Myanmar) and South Eastern Thailand. The results of the study provided more evidence for the phylogenetics and domestication of chicken.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	Riztyan
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 岡本 新
	副査 鹿児島 大学 准教授 大久津 昌治
	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 三好 和睦
審査協力者	
題 目	Studies on genetic diversity of native chicken population in South East Asia (東南アジア在来鶏の多様性に関する分子遺伝学的研究)

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1つであり、それらの集団を維持、保護していくことは極めて重要である。一方、2004年3月にニワトリの全塩基配列が決定されて以降、分子レベルから盛んに解析が実施されている。DNA上に散在する様々な変異の中で、1塩基置換 (Single Nucleotide Polymorphism : SNP) はニワトリゲノム中におよそ300万(2010年現在)確認され、網羅的に存在している。

本研究では98個のSNPマーカーを作出し遺伝的マーカーとしてその有効性を検証し、東南アジア在来鶏の遺伝的多様性について、①集団の遺伝的変異性、②集団構造および地理的隔離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。

材料にはインドネシア在来鶏4集団、ミャンマー在来鶏3集団、タイ在来鶏3集団、コマーシャル鶏3集団およびヤケイ4亜種を供試し、血液より定法に従いDNAを抽出した。これらのサンプルについて常染色体上に10Mbp間隔で設定した98個のSNP座位の遺伝子型をPCR-RFLPによって決定した。さらに得られた

遺伝子型より各集団について、各座位の遺伝子頻度、多型座位の割合、平均ヘテロ接合体率、遺伝的距離およびペアワイズ F_{ST} 値を算出した。さらに Structure プログラムを用いた集団の遺伝的構造解析、また距離による隔離(Isolation by Distance : IBD)テストによる集団間の地理的距離と遺伝的距離との関係を検討した。

今回開発した 98 の SNP マーカーを用いて、インドネシア在来鶏 187 個体を解析したところ、87 マーカーにおいて多型が観察され本マーカーが多型解析に適していることが伺われた。

①在来鶏 10 集団、ヤケイ 4 亜種およびコマーシャル鶏 3 集団の多型座位の割合は、それぞれ 93%、63%および 60%と推定された。さらに平均ヘテロ接合体率は、在来鶏、ヤケイおよびコマーシャル鶏でそれぞれ 0.272、0.225 および 0.211 と評価され、前 2 集団は後者と比較して遺伝的変異性が高かった。全 17 集団の系統樹を描いてみると在来鶏、ヤケイおよびコマーシャル鶏がそれぞれ異なるクラスターを構成した。ヤケイのクラスターのなかでは、インドシナ半島に生息する 3 亜種とジャワ島に生息する 1 亜種が離れて描かれることが判明した。また、集団の分化の程度を F_{st} で推定すると、在来鶏集団間、ヤケイ亜種間およびコマーシャル鶏集団間は、それぞれ 0.078、0.077 および 0.289 となり、コマーシャル鶏において特に分化が進んでいることが推察された。②Structure で遺伝的構造解析を実施したインドネシア在来鶏 4 集団は $K=3$ 、ミャンマーとタイ在来鶏およびコマーシャル鶏 9 集団は $K=6$ となり、それぞれ 3 および 6 つの集団を起源とする集団であることが推察された。インドシナ半島で飼養されているミャンマーおよびタイ在来鶏 6 集団について IBD テストを行った結果、地理的距離が最も近かったミャンマーのヤンゴンとペグが遺伝的に最も近く、また地理的距離が離れていたミャンマーのペグとタイの東南集団が遠く評価され、実際の地図上の距離を正確に反映していることが伺われた。

以上の成果は、SNP マーカーが家畜の成立を考察する上で極めて重要な知見を提供することを実証し、今後、本マーカーが系統解析ならびに集団の遺伝的特性を把握する上で大いに寄与するものであると考えられ、審査員一同、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	Riztyan
審査委員	主査 鹿児島 大学 教授 岡本 新
	副査 鹿児島 大学 准教授 大久津 昌治
	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 三好 和睦
審査協力者	
実施年月日	平成 24 年 1 月 21 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査および副査は、平成24年1月21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	Riztyan
[質問 1]	従来ニワトリの分子マーカーとしては、マイクロサテライトマーカーがありますが、今回用いている SNP マーカーは、それと比較してどのような違いがあるのですか。
[回答 1]	マイクロサテライトは、対立遺伝子も多く多型解析には極めて有効なマーカーです。しかしながら解析には特別の機器が必要です。また、対立遺伝子が多いことは時としてその解釈が困難な場合もあります。一方、SNP マーカーは、対立遺伝子は 2 つと少なくマイクロサテライトに比較すると多型性は低いと思われます。しかしマーカーの開発は容易で、またゲノム状に網羅的に多数存在しているという特徴があります。さらに方法的にも短時間で検出が可能です。
[質問 2]	在来鶏、ヤケイおよびコマーシャル鶏の関係を教えてください。
[回答 2]	ヤケイは家畜化されたニワトリの野生種で、未改良の集団です。在来種は、家畜のグループですがやはり改良という点ではヤケイと同じでほとんど選抜を受けていません。一方、コマーシャル鶏はニワトリの市場における実戦部隊で、高度に改良された理想家畜です。
[質問 3]	今回、地理的距離と遺伝的距離の関係が高いことが確認されましたが、他でも同じような結果が得られていますか。
[回答 3]	ニワトリについてアフリカの在来鶏で同じように実際の地図上の距離が遺伝的評価と一致したという報告があります。しかし、家禽においてはまだ同じような解析が多くありませんので、今後いろいろな地域で確認する必要があると思います。
[質問 4]	多様性の確保は重要だと思いますが、どのように取り組むのが良いと考えますか。
[回答 4]	家畜を改良する上で多様性は必要です。改良品種が完成した段階で多様性を保持する集団が消えることは阻止する必要があります。将来的にすべての集団を維持するのは、物理的にも費用の面からも不可能だと思います。集団に適したあるいは動物種に適した保存を考えることが大切だと思います。

- [質問 5] Structure解析において、Kの値が大きくなると集団を構成するカラーも増えていきますが、その理由は何ですか。
- [回答 5] 確かに、グループの色がだんだん増えていきます。その理由としては、品種の数よりはサンプリングした地域の数が大きく影響しているように考えます
- [質問 6] 地理的隔離を検証する際に、インドシナ半島の2カ国で検討されていますが、なぜインドネシアの在来種を加えて解析しなかったのですか。
- [回答 6] インドシナ半島とインドネシアの島々の間には海が存在しています。陸地と海を同じように解析していいのかが不明でしたので、今回は除外して分析しました。今後の検討課題だと思います。
- [質問 7] SNPマーカーをニワトリのルーツに関する情報を集めるために利用されていますが、今後同マーカーを他の研究に利用する予定はありますか。
- [回答 7] 今回ニワトリの成立というテーマについてSNPマーカーが有効であるか検討しました。これからは作出したマーカーで品種鑑別などのトレーサビリティーに応用してみたいと考えています。
- [質問 8] はじめに設計したマーカーより実際に使えるマーカーの方が数が少なくなっていますが、なぜですか。
- [回答 8] はじめは112個のマーカーを設計しました。実際使えるマーカーは98個でした。少なくなった理由は、設計したとおりのPCR産物が得られなかった、あるいはRFLPで予想した断片が得られなかったからです。そのようなマーカーについては実験に利用しませんでした。
- [質問 9] 98個のマーカーはゲノムのどのような場所に存在していましたか。
- [回答 9] ほとんどのマーカーはコーディング領域ではないところに存在していました。98個のうち45個が遺伝子上にありましたが、43個はイントロンにあり、2個がエクソンにありました。従ってコーディング領域に存在していたのは2つだけです。
- [質問10] ヤケイ4亜種のなかで、バンキーバーだけが遺伝的に離れた関係になっていますが、なぜですか。
- [回答10] 4亜種の中で、バンキーバーだけ生息域が異なること、また供試数が少ないことが影響しているのではないかと考えています。