

学 位 論 文 要 旨

氏 名	シイ レイアン ミイ
題 目	卵白タンパク質多型とその抗菌活性に関する集団ならびに分子遺伝学的研究 (Population and molecular genetics on the egg white protein polymorphism and its antibacterial activity)

【目的】卵白タンパク質は、家禽の胚発生など様々な過程で必須の機能単位であるが、そのいくつかは電気泳動によって多型を観察することができる。本研究は、卵白タンパク質多型を用いた集団・分子遺伝学的研究として、1)日本在来鶏集団の遺伝的変異性と遺伝的類縁関係について卵白タンパク質多型から明らかにし、アジア在来鶏やコマーシャル鶏との関係も考察した。2) 抗菌作用を示す卵白リゾチームはニホンウズラで多型 (*S*と*F*型) が存在する。そこで、リゾチーム多型の原因変異を同定し、それらの酵素活性、抗菌活性および孵化率への影響を検討した。また、ニホンウズラ 27 集団でのリゾチーム対立遺伝子の保有状況も調査した。

【材料および方法】1)日本在来鶏 7 集団の卵白を供試し、卵白タンパク質 7 座位の多型を解析した。各集団の遺伝的変異性は、多型座位の割合 (P_{poly})、ヘテロ接合体率 (\bar{H}) および遺伝的分化指数 (G_{ST}) で評価した。また、集団間の遺伝的類縁関係は、標準遺伝距離から描いたデンドログラムで評価した。2) 原因変異は *S*型と *F*型を示したリゾチーム遺伝子の比較から同定した。*F*型と *S*型の卵白リゾチームを精製後、酵素活性、抗菌活性を測定した。孵化率は正逆交配 ($FF\sigma \times SS\varphi$ と $SS\sigma \times FF\varphi$) で得られた 2 群の種卵を用いた。

【結果】1) 日本在来鶏 7 集団の P_{poly} および \bar{H} はそれぞれ 0.286~0.429 および 0.085~0.158 であった。7 集団間の G_{ST} は 0.25 となり、アジア在来鶏集団間やコマーシャル鶏間の G_{ST} に比べて高かった。デンドログラムは、日本在来鶏 4 集団がアジア在来鶏の中に位置すること、その外側にコマーシャル鶏、さらに残りの 3 集団が位置することを明らかにし、日本在来鶏の多様性が示された。2) ニホンウズラのリゾチーム多型に関わる 1 か所の非同義的置換 (Q21K) を同定した。また、酵素活性で *F*が *S*より高いこと、抗菌活性で *F*が *S*よりも有意に高いこと ($P < 0.05$)、孵化率で $FF\sigma \times SS\varphi$ が $SS\sigma \times FF\varphi$ よりも有意に高いこと ($P < 0.05$)から、この多型が機能に影響することを示した。対立遺伝子頻度は、調査した全 27 集団で、*S*型が *F*型よりも高く、その頻度が 0.69~1.00 となった。*F*型が見られなかった集団はすべて小規模で維持されている集団であった。

以上、本研究の成果は、日本在来鶏の多様性やニホンウズラの生産性に貢献する基礎的かつ重要な知見になるものと期待される。

学 位 論 文 要 旨

氏 名

SILHYAM MYINT

題 目

Population and molecular genetics on the egg white protein polymorphism and its antibacterial activity

(卵白タンパク質多型とその抗菌活性に関する集団ならびに分子遺伝学的研究)

Objective: Egg white proteins are the functional units of biological processes, some of which show allozyme polymorphisms. These polymorphisms could be useful for understanding of genetic diversity and genetic relationships in populations. In addition, the polymorphism linked to better performance can improve egg productivity in poultry. The present study was conducted 1) to examine genetic diversity in Japanese native chickens as well as genetic relationships among Japanese native, Asian native and commercial chickens and 2) to investigate the effect of the lysozyme polymorphism (*F* and *S*) on muramidase activity, antibacterial activity and hatchability in Japanese quail. The allele frequency was also examined in 27 Japanese quail populations.

Materials and Methods: 1) I genotyped 606 birds from seven Japanese native populations for seven egg white protein polymorphisms. Genotype data were used to estimate the proportion of polymorphic loci (*Ppoly*), the average heterozygosity (*H*) and the coefficient of gene differentiation (*G_{ST}*). Dendrogram was drawn from standard genetic distances. 2) Causative polymorphism was identified by comparison of the lysozyme sequences between the two alleles. Purified lysozyme allozymes were used to analyze the muramidase activity and the antibacterial activity. Hatchability was estimated for reciprocal crosses of Japanese quail with the *FF* and *SS* genotypes.

Results: 1) The *Ppoly* and *H* ranged from 0.286 to 0.429 and from 0.085 to 0.158, respectively. The *G_{ST}* was 0.250 in the Japanese native populations, which was higher than those of Asian native chickens and of commercial chickens. Dendrogram showed that four Japanese native populations were grouped into Asian native chickens whereas the remaining three were far from the group, suggesting that the genetic differentiation of Japanese native chickens was high. 2) The two alleles of Japanese quail lysozyme were generated by a substitution at residue 21 of mature lysozyme (Q21K). Muramidase activity was *F* > *S* with no significant difference. Antibacterial activity was significantly higher for the *F* allozyme than the *S* allozyme ($P < 0.05$). Hatchability was *FF* male × *SS* female > *SS* male × *FF* female with a significant difference ($P < 0.05$). The *S* allele was a major allele with frequency from 0.69 to 1.00 in all 27 populations.

The results of the study provided more evidence for genetic diversity in Japanese native chickens and improvement of egg productivity in Japanese quail.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	SI LHYAM MYINT
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 中西 良孝
	副査 佐賀 大学 教授 和田 康彦
	副査 琉球 大学 教授 川本 康博
	副査 鹿児島 大学 教授 イブラヒム ヒッサムラドワン
審査協力者	
題目	<p>Population and molecular genetics on the egg white protein polymorphism and its antibacterial activity (卵白タンパク質多型とその抗菌活性に関する集団ならびに分子遺伝学的研究)</p>
<p>ニワトリ卵白は鶏卵の約63%を占め、必須アミノ酸、脂質およびミネラルを含む完全栄養食品である。また、卵白タンパク質は、家禽の胚発生など様々な過程で必須の機能単位であるが、そのいくつかは多型を確認することが可能である。一方、ウズラ卵白タンパク質についての情報は、ニワトリに比較して不足しているのが現状である。本研究は、卵白タンパク質多型を用いた集団・分子遺伝学的研究として、まず日本在来鶏集団の遺伝的変異性と遺伝的類縁関係について卵白タンパク質多型から明らかにし、アジア在来鶏やコマーシャル鶏との関係を考察した。次に抗菌作用を示すとされるウズラ卵白リゾチーム多型(SとF型)について、リゾチーム多型の原因変異を同定し、それらの酵素活性、抗菌活性および孵化率への影響を検討した。また、ニホンウズラ27集団でのリゾチーム対立遺伝子の保有状況についても分析を行った。</p> <p>日本在来鶏として比内鶏、名古屋種、対馬地鶏、天草大王、薩摩鶏、地頭鶏およびウタイチェーンの7集団を用い、得られた卵白を供試した。解析した卵タンパク質は、オボアルブミン(Ov)、オボグロブリン(G₃, G₂)、オボトランスフェリン</p>	

(Tf_{EW}), オボマクログロブリン(Omg), オボフラボプロテイン(Rd)およびリゾチーム(G₁)の7座位であった。各集団の遺伝的変異性は、多型座位の割合(P_{poly}), 平均ヘテロ接合体率(\bar{H})および遺伝的分化指数(G_{ST})により推定した。さらに集団間の類縁関係は遺伝的距離からデンドログラムを描いて評価した。ウズラのリゾチーム多型について、S型およびF型を示した個体より得られたリゾチーム遺伝子の比較により原因変異を同定した。さらにS型とF型の卵白リゾチームを精製後、それらの酵素活性を比較し、グラム陽性菌として黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)およびグラム陰性菌として大腸菌(*E. coli*)を用いて抗菌活性を測定した。リゾチーム多型が受精率および孵化率に及ぼす影響については、正逆交配($FF\delta \times SS\eta$ と $SS\delta \times FF\eta$)で得られた2群の種卵を用いて検討した。

(1)日本在来鶏7集団の P_{poly} および \bar{H} はそれぞれ 0.286~0.429 および 0.085~0.158 であった。7集団間の G_{ST} は 0.25 となり、アジア在来鶏集団間やコマーシャル鶏間の G_{ST} に比べて高かった。デンドログラムは、日本在来鶏4集団がアジア在来鶏の中に位置すること、その外側にコマーシャル鶏、さらに残りの3集団が位置することを明らかにし、日本在来鶏の多様性が示された。(2)ウズラのリゾチーム遺伝子は、4つのエクソンと3つのイントロンより構成されていた。翻訳領域は444bpで148個のアミノ酸をコードしていた。これらのなかでエクソン1およびエクソン2に一塩基多型(SNP)が確認された。特に、前者はグルタミンからリジンへのアミノ酸変異を伴う非同義的置換であることが判明した。このSNPをマーカーとしてS型およびF型の識別が分子レベルから可能となった。また、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性ではF型がS型よりも有意に高いこと($P < 0.05$), 孵化率で $FF\delta \times SS\eta$ が $SS\delta \times FF\eta$ よりも有意に高いこと($P < 0.05$)から、この多型が機能に影響することを示した。(3)ウズラリゾチームにおける対立遺伝子頻度は、調査した全27集団で、SがFよりも高く、その頻度が0.69~1.00となった。F型が見られなかった集団はすべて小規模で維持されている集団であった。

以上の成果は、家禽の卵タンパク質の遺伝的特性を明らかにしたものであり、特にウズラのリゾチームの変異と機能については本研究で初めて確認され、集団および分子遺伝学的研究において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	SI LHYAM MYINT
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 中西 良孝
	副査 佐賀大学 教授 和田 康彦
	副査 琉球大学 教授 川本 康博
	副査 鹿児島大学 教授 イブラヒム ヒッサムラドワン
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・ <input type="radio"/> 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	SI LHYAM MYINT
[質問 1]	日本在来鶏の G_{ST} がアジア在来鶏より高いことはどのようなことが考えられますか。
[回答 1]	日本在来鶏は様々な品種がありますが、そのほとんどが小集団です。またそれらの集団は閉鎖された状態で維持されています。結果的にその小集団が独自に分化していった可能性があります。したがって G_{ST} が高くなってしまったと考えられます。同じ品種でも飼養場所が異なると遺伝的にかなり違った特色を示すものがあるのはそれが原因ではないかと思われます。
[質問 2]	抗菌活性と孵化率との関係はどのように考えていますか。
[回答 2]	ウズラ卵白に含まれるリゾチームの抗菌活性には、リゾチーム F 型と S 型で比較しました。グラム陽性菌およびグラム陰性菌を用いて活性を比較したところ、両菌に対してともに F 型が高い活性を示しました。一方、孵化率については、S 型の卵白を持つ種卵の孵化率が高いことが判明しました。抗菌作用の高い卵白において孵化率が高いのではなく、抗菌作用の低い方が孵化率が高いという結果が得られました。現在のところ、抗菌活性と孵化率は別の事象と考えています。
[質問 3]	ニワトリにおいてもリゾチーム F 型の抗菌作用が高いのですか。
[回答 3]	ニワトリの卵白リゾチームもウズラと同様に抗菌作用はあります。しかし、ウズラのような多型は確認されていません。ニワトリにおけるリゾチームのタイプは、ウズラの S 型と同じタイプのものだけ観察されているのが現状です。
[質問 4]	F 型と S 型の卵白中のリゾチームの量は同じですか。また発現量は両者で違いますか。
[回答 4]	リゾチームの量は F 型と S 型で違いはありません。発現量については今回調べていません。
[質問 5]	ニワトリにおいてリゾチーム多型がないことはどう考えますか。
[回答 5]	今のところその点についてはわかりません。今後サンプル数を増やして検討したいと考えています。

- [質問 6] 今回、分子レベルから見いだした F 型と S 型の変異を抗菌活性あるいは孵化率等でどのような違いがあるかを検討されていますが、その他の形質についても応用される予定はありますか。
- [回答 6] 本研究成果を次に何に応用するかは具体的には考えていません。しかし、今回ウズラのリゾチーム遺伝子に初めて確認した変異は、これまで雌が生産する卵でしかタイピングできなかつた遺伝子型の情報を、雄の DNA を用いれば雄の遺伝子型も得られる点が極めて重要だと思います。今後、系統解析等に十分利用できるマーカーであると期待されます。
- [質問 7] リゾチームの変異はその構造においてどのような影響を及ぼしていますか。
- [回答 7] ウズラのリゾチームの 21 番目のアミノ酸に存在する変異は、グルタミンからリジンへの非同義的置換です。リゾチームの構造からみるとこの領域は抗菌活性に関与している部分です。おそらくその役割に変化をもたらしているのではないかと思います。
- [質問 8] 卵白タンパク質多型から描いたデンドログラムで対馬地鶏が離れたところに位置していますが、何故でしょうか。
- [回答 8] 対馬地鶏は、長崎県地方で維持されている集団です。一時期数を減らしたこともありますが、現在は絶滅の危機はないようです。また、外貌についてみると雄には髯がありかなり特徴的です。他の日本在来鶏と比べるとその成立において人為圧の影響が大きく結果的に離れて描かれたように考えます。
- [質問 9] ウズラ 27 集団において、リゾチームの遺伝子型はすべて S 型が高かったという結果ですが、何か考えられる理由はありますか。またウズラ全体に共通なことでしょうか。
- [回答 9] 抗菌作用の点からみると活性が低い S 型がなぜ多いかは不明です。ただ、孵化率の点からは S 型が高い孵化率を保持しているので自然と集団の中に広がっていく可能性があると思われます。他のウズラも同じような遺伝子構成であるかは分かりません。今後さらに供試数を増やして解析していく必要があると思います。