

遺伝子マーカーを利用した讃岐コーチンの改良

川江早矢香・三谷英嗣

Improvement of the Sanuki cochin fowl using a gene marker

Sayaka KAWAE, Hidetsugu MITANI

要 約

肉用讃岐コーチンにおいてコレシストキニン A 受容体遺伝子 (CCKAR) の一塩基多型 (SNP; AB604331, g. 420 C>A) と発育形質との関連性を検討した。肉用讃岐コーチン 153 羽を用い、3 週齢において遺伝子型を判定し、2 週間ごとに体重を測定、11 週齢時に屠畜した。CCKAR の遺伝子型解析の結果、A/A が 53 羽、A/C が 71 羽、C/C が 29 羽であった。期間中の体重、一日平均増体重、歩留まり率は遺伝子型間に有意な差はなく、SNP のハプロタイプの効果は認められなかった。以上のことから、肉用讃岐コーチンの 11 週齢までの発育形質に CCKAR g. 420 C>A SNP は影響を与えないことが示された。

結 言

「肉用讃岐コーチン」は「讃岐コーチン A4 系統」の雄と、「白色プリマスロック」の雌を交配させて作出されるコマーシャル鶏である。肉用讃岐コーチンは地鶏の中では比較的発育性が良いものの、夏季の暑熱下での出荷時体重の低下やばらつきなどが課題であり、発育形質の育種は検討課題である。

近年、Rikimaru ら⁵⁾は秋田県の比内鶏において、コレシストキニン A 型受容体遺伝子 (CCKAR) の 5'-非翻訳領域の一塩基多型 (g. 420 C>A SNP) と発育形質との間に有意な関連があり、2 つの SNP 型 (A または C) のうち発育形質に対する優良型は A であることを報告した。また宮崎県のみやざき地頭鶏²⁾や熊本県の天草大王¹⁰⁾においても CCKAR g. 420 C>A SNP が発育形質に関与することが報告されている。

本試験では、肉用讃岐コーチンにおいても、当該 SNP が発育形質を改善するマーカーとして利用できるか検討した。

材料及び方法

1. 試験期間

令和 2 年 7 月 22 日～10 月 6 日

2. 試験鶏と飼養方法

令和 2 年 7 月 22 日に同日発生した肉用讃岐コーチン雄 82 羽、雌 71 羽を供試した。孵化した雛は餌付けから 3 週齢時までバタリー育雛器 (850mm×2650mm) にて飼育した。CCKAR 遺伝子型判定後、3 週齢時に雌雄別に均等羽数に分けて育成ケージ (間口 875mm×奥行き 555mm) にて 11 週齢まで飼育した。

給与飼料は、餌付けから3週齢まで前期飼料(CP23%、ME3, 100kcal以上)、3-6週齢までは後期飼料(CP18.5%、ME3, 250kcal以上)、6-11週齢は仕上げ飼料(CP18%、ME3, 250kcal以上)をそれぞれ与え、試験期間中は自由摂食、自由飲水とした。

試験鶏の体重測定は、0、3、5、7、9、11週齢時に行った。一日平均増体重は、体重差を週齢間の日数で割って算出した。11週齢時に解体し、歩留り率を算出した。

3. CCKAR 遺伝子型判定

各個体の遺伝子型判定は3週齢時までに行った。血液を翼下静脈から採取し、Dneasy Blood and Tissue Kits(QIAGEN)を用いてゲノム DNA の抽出を行った。CCKAR の遺伝子型の判別は Rikimaru ら⁶⁾のプライマーを用いて、リアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR 反応には、Quant Studio(Thermo Fisher)を使用し、反応液の組成は、DNA サンプル 1 μ l、20 μ M のプライマーセット 0.4 μ l(最終濃度 0.2 μ M)、Power SYBR Green RNA-to-CT 1step kit (Applied Biosystems) 10 μ l、滅菌蒸留水 8.6 μ l で総量 20 μ l とした。PCR サイクルは熱変性 (98 $^{\circ}$ C 10 秒間)、アニーリング (65 $^{\circ}$ C、30 秒間)、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C、30 秒間) のサイクルを 30 回繰り返した。A アリルプライマーを用いた反応液のみで PCR 増幅が認められた場合は A/A 型、C アリルプライマーを用いた反応液のみで増幅が認められた場合は C/C 型、両方の反応系で増幅が認められた場合は A/C 型と判定した。

4. 統計解析

SNP のアリル頻度は、遺伝子型ごとの羽数より算出した。体重、一日平均増体重、歩留り率における遺伝子型および SNP の効果は R(R Core Team, 2016)を用いて解析した。

遺伝子型の効果は、遺伝子型、性を要因とした最小二乗法による分散分析を行った。

SNP の効果は、次の一般線形モデルで求めた。 $y = \mu + C_s s + C_a a + C_d d + e$
 y は各形質の表型値、 μ は全平均、性効果(s)、相加的効果(a)および優勢効果(d)は共変量で、 C_s は雄と雌でそれぞれ 0 と 1 の値をもつ指示変数、 C_a は遺伝子型 A/A、A/C、および C/C について 2、1、および 0 の値を持つ指示変数、 C_d は、遺伝子型 A/A、A/C、および C/C について、それぞれ 0、1、および 0 の値を持つ指示変数である。モデル式によって説明される全分散に占めるハプロタイプ効果の分散の割合は、Rikimaru ら⁵⁾によって示されているように、分散(%) = $100 \times (1 - Fvar / Rvar) Rvar$ の式で計算した。Fvar はモデル式より得られる残差分散、Rvar はハプロタイプ効果を除いたモデルでの残差分散を示す。

成 績

1. 遺伝子型判定結果

表 1 に CCKAR の遺伝子型の結果を示した。153 羽の試験鶏のうち A/A が 53 羽、A/C が 71 羽、C/C が 29 羽であり、遺伝子型頻度は A/A が 0.346、A/C が 0.464、C/C が 0.189 であった。集団における遺伝子型の分布は Hardy-Weinberg 平衡比率と矛盾しなかった。A および C アリル頻度はそれぞれ 0.578 と 0.422 であった。

表 1 コレシストキニン A 受容体遺伝子g.420C>A SNPの遺伝子型頻度と対立遺伝子頻度

遺伝子型頻度			対立遺伝子頻度	
A/A	A/C	C/C	A	C
0.346	0.464	0.189	0.578	0.422

2. 体重および一日平均増体重

表 2 に CCKAR の遺伝子型と発育形質の関連性を示した。3 週齢から 11 週齢までの体重および一日平均増体重について、遺伝子型間に有意差は認められなかった。

表 2 体重および一日平均増体重とコレシストキニン A 受容体g.420 C>A SNPとの関連性

	A/A型 (n=53)	A/C型 (n=71)	C/C型 (n=29)		性差	残差標準偏差
体重(g)						
0週齢	40.0 ± 0.4	39.4 ± 0.3	39.3 ± 0.5	n.s.	0.8	2.7
3週齢	560.7 ± 7.13	564.5 ± 5.9	557.5 ± 9.3	n.s.	44.8	48.9
5週齢	1177.9 ± 13.0	1179.8 ± 10.7	1171.6 ± 16.8	n.s.	191.3	88.8
7週齢	1881.8 ± 19.4	1909.4 ± 16.2	1880.6 ± 25.7	n.s.	427.3	133.3
9週齢	2722.7 ± 26.1	2753.4 ± 22.1	2742.8 ± 34.5	n.s.	716.8	179.2
11週齢	3394.2 ± 36.2	3445.5 ± 30.0	3484.7 ± 46.2	n.s.	1034.1	240.1
一日平均増体重(g/日)						
0-3週齢	24.8 ± 0.3	25.0 ± 0.3	24.7 ± 0.4	n.s.	2.1	2.3
3-5週齢	44.1 ± 0.7	44.0 ± 0.6	43.9 ± 0.9	n.s.	10.5	5.0
5-7週齢	50.3 ± 0.9	52.1 ± 0.8	51.0 ± 1.2	n.s.	17.0	6.4
7-9週齢	60.1 ± 1	60.4 ± 0.9	61.6 ± 1.4	n.s.	21.0	7.2
9-11週齢	47.4 ± 2.7	52.4 ± 2.2	53.1 ± 3.4	n.s.	18.5	17.6

体重、一日平均増体重は各群の最小自乗平均値 ± SE

n.s.:有意差なし

表 3 に発育形質における CCKAR の SNP の効果を示した。3 週齢から 11 週齢までの体重および一日平均増体重について、有意な効果は認められなかった。

表3 体重および一日平均増体重におけるコレシストキニンA受容体g.420 C>A SNPの効果

	全平均±SE	性の効果		相加的效果		優勢効果		Fvar	Rvar	分散(%)
		平均値±SE		平均値±SE		平均値±SE				
体重(g)										
0週齢	39.7 ± 0.5	-0.8 ± 0.4	n.s.	0.3 ± 0.3	n.s.	-0.2 ± 0.4	n.s.	984.6	992.6	0.8
3週齢	579.9 ± 10	-44.8 ± 8.2	***	1.6 ± 5.8	n.s.	5.4 ± 8.3	n.s.	334545	334722	0.1
5週齢	1267.2 ± 18.1	-191.3 ± 14.8	***	3.2 ± 10.6	n.s.	5.1 ± 15.1	n.s.	1104684	1105384	0.1
7週齢	2094.2 ± 27.8	-427.3 ± 22.4	***	0.6 ± 16.1	n.s.	28.2 ± 22.8	n.s.	2451564	2451586	0.001
9週齢	3101.3 ± 37.4	-716.8 ± 30.3	***	10.1 ± 21.6	n.s.	20.6 ± 30.9	n.s.	4366495	4373452	0.2
11週齢	3441.5 ± 21.9	-1034.1 ± 41.3	***	-45.3 ± 29.4	n.s.	6.1 ± 42	n.s.	7552416	7689540	1.8
一日平均増体重(g/日)										
0-3週齢	25.7 ± 0.5	-2.1 ± 0.4	***	0.1 ± 0.3	n.s.	0.3 ± 0.4	n.s.	746.1	746.3	0.03
3-5週齢	49.1 ± 1	-10.5 ± 0.8	***	0.1 ± 0.6	n.s.	-0.02 ± 0.8	n.s.	3444	3445	0.02
5-7週齢	59.4 ± 1.3	-17 ± 1.1	***	-0.3 ± 0.8	n.s.	1.5 ± 1.1	n.s.	5595	5603	0.1
7-9週齢	72.1 ± 1.5	-21 ± 1.2	***	-0.8 ± 0.9	n.s.	-0.4 ± 1.2	n.s.	6988	7028	0.6
9-11週齢	62.3 ± 3.7	-18.5 ± 3	***	-2.8 ± 2.2	n.s.	2.2 ± 3.1	n.s.	40631	41164	1.3

n.s.:有意差なし ***:p<0.001

3. 歩留り率

表4にCCKAR遺伝子型と歩留り率の関連性を示す。各部位において遺伝子型間に有意差は認められなかった。

表4 歩留り率とコレシストキニンA受容体g.420 C>A SNPとの関連性

歩留り率(%)	A/A型	A/C型	C/C型	性差	残差標準偏差
	(n=43)	(n=63)	(n=27)		
もも	19.0 ± 0.1	19.2 ± 0.1	19.0 ± 0.2	n.s.	1.6
むね	14.5 ± 0.2	14.7 ± 0.1	14.7 ± 0.2	n.s.	0.7
ささみ	3.4 ± 0.03	3.4 ± 0.03	3.4 ± 0.05	n.s.	0.2
合計	36.9 ± 0.3	37.3 ± 0.2	37.1 ± 0.3	n.s.	2.1

歩留り率は各群の最小自乗平均値±SE

n.s.:有意差なし

表5に歩留り率におけるCCKARのSNPの効果を示した。各部位の歩留り率において、有意な効果は認められなかった。

表5 歩留り率におけるコレシストキニンA受容体g.420 C>A SNPの効果

歩留り率(%)	全平均±SE	性の効果		相加的效果		優勢効果		Fvar	Rvar	分散(%)
		平均値±SE		平均値±SE		平均値±SE				
もも	19.8 ± 0.2	-1.6 ± 0.2	***	-0.01 ± 0.1	n.s.	0.2 ± 0.2	n.s.	117.5	117.5	0.001
胸	15 ± 0.2	-0.7 ± 0.2	***	-0.1 ± 0.1	n.s.	0.1 ± 0.2	n.s.	170	171	0.2
ささみ	3.3 ± 0.1	0.2 ± 0	***	0.005 ± 0.03	n.s.	-0.002 ± 0.004	n.s.	8	8	0.01
合計 (もも、胸、ささみ)	38.1 ± 0.3	-2.1 ± 0.3	***	-0.1 ± 0.2	n.s.	0.3 ± 0.3	n.s.	357	357	0.110

n.s.:有意差なし ***:p<0.001

考 察

コレシストキニン(CCK)は食欲の制御に関与する腸管ペプチドとして知られており¹⁾、その受容体はコレシストキニン A 受容体(CCKAR)⁹⁾とコレシストキニン B 受容体(CCKBR)³⁾が同定されている。CCKAR の 5' 非翻訳領域の特定部位における一塩基多型(SNP, g. 420 C>A)と発育形質との関連性は、Rikimaru ら⁵⁾によって初めて報告されており、A アリルは C アリルよりも発育形質に対する効果が優れており、比内地鶏における低成長系統と高成長系統の CCKAR の対立遺伝子頻度の有意差は長年にわたり増体重視で選抜されてきた結果であるということ⁶⁾、CCKAR の g. 420 C>A SNP によって比内地鶏の発育が実際に改善されることを報告している⁷⁾。さらに 2020 年の同著者の報告では、遺伝子型を A/A 型に固定化した種鶏から生産された改良型比内地鶏(比内地鶏雄×ロードアイランドレッド雌)は従来の比内地鶏と比べて 22 週齢時の体重が有意に増加し、また体重の変動係数が小さくなることが述べられている⁸⁾。そのほか熊本県の天草大王(原種天草大王雄×九州ロード雌)¹⁰⁾、宮崎県のみやざき地頭鶏((地頭鶏×劣性白色プリマスロック)雄×九州ロード雌)²⁾などコマーシャル地鶏においても CCKAR の g. 420 C>A SNP と発育形質との間の有意な関連性が確認されており、当該 SNP が地鶏の発育形質を改善するのに有効なマーカーであることが示唆されている。

しかしながら、本試験において肉用讃岐コーチンにおける CCKAR g. 420 C>A SNP と発育形質との関連性を検討した結果、体重、一日平均増体重、歩留り率に遺伝子型間に有意な差はなく、SNP の効果も認められなかった。本試験で SNP の効果が認められなかった理由是不明だが、要因のひとつとして鶏種の違いが考えられる。これまで g. 420 C>A SNP が発育形質に影響を与える週齢は鶏種・交配によって異なる可能性が示唆されており、一日平均増体重については、比内地鶏は飼育後半の 14 週齢以降において A アリルは C アリルよりも有意に優れた効果が認められたのに対し、天草大王¹⁰⁾では 5~6 週齢、みやざき地頭鶏²⁾では 0~1、1~2、3~4、5~7 週齢とより早い週齢において効果が認められている。肉用讃岐コーチンは雌系種鶏に白色プリマスロックを持ち、これまでに CCKAR の SNP について報告されている地鶏よりも 11 週齢までの発育はかなり良く、今回の 11 週齢までの調査では SNP の効果が認められなかったのかもしれない。

また本試験は試験期間中 8 月の最高気温の平均が 35℃の暑熱ストレス下での肥育試験であったことも、SNP の効果が認められなかった要因として考えられた。しかしながら、岐阜県の奥美濃古地鶏の試験においては冬期、夏季の両方において CCKAR の SNP 効果が認められたとの報告⁴⁾があり、単純に暑熱ストレスだけが SNP の効果が認められなかった原因とは考えにくいものと思われた。

結論として、肉用讃岐コーチンの 11 週齢までの発育形質においては、CCKAR g. 420 C>A SNP は影響を与えないことが示された。

参考文献

- 1) Gibbs J, Young RC and Smith GP. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 84: 488-495. 1973.
- 2) Horinouchi S, Nakayama H, and Takahashi H. Effect of a single nucleotide polymorphism in the cholecystokinin type A receptor gene on growth traits of the Miyazaki Jitokko chicken. *Journal of Poultry Science*, 56: 96-100. 2019.
- 3) Innis RB and Snyder SH. Distinct cholecystokinin receptors in brain and pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 77:6917-6921. 1980.
- 4) Ishikawa S, Asano M, Sakai K and Takahashi H. Verification of the effectiveness of an SNP marker in the cholecystokinin type A receptor gene for improving growth traits in 香川畜試報告 55 (2020)

- Okumino-kojidoru chickens. *Journal of Poultry Science*, 57: 107-113. 2020.
- 5) Rikimaru K, Komatsu M, Suzuki K, Uemoto Y, Takeda H and Takahashi H. Association between cholecystokinin type A receptor haplotypes and growth traits in Japanese Hinai-dori crossbred chickens. *Molecular Biology Reports*, 39: 4479-4484. 2012.
 - 6) Rikimaru K, Takeda H, Uemoto Y, Komatsu M, Takahashi D, Suzuki K and Takahashi H. Effect of a single-nucleotide polymorphism in the cholecystokinin type A receptor gene on growth traits in the Hinai-dori chicken breed. *Journal of Poultry Science*, 50:206-211. 2013.
 - 7) Rikimaru K, Takeda H, Ohkubo T, Takahashi D, Komatsu M and Takahashi H. The A allele of the cholecystokinin type A receptor g.420 C>A polymorphism improves the growth traits of the Hinai-dori breed. *Japanese Journal of Poultry Science*, 51:J43-J48. 2014. (in Japanese)
 - 8) Rikimaru K, Sato Y, Ito Y, Fukuda S, Sasaki S and Takahashi H. Is a single nucleotide Polymorphism marker in the cholecystokinin A receptor gene practically suitable for improving the growth traits of Hinai-jidori chickens? *Journal of Poultry Science*, 57(2);99-106. 2020.
 - 9) Sankaran H, Goldfine ID, Deveney CW, Wong KY and Williams JA. Binding of cholecystokinin to high affinity receptors on isolated rat pancreatic acini. *The Journal of Biological Chemistry*, 255: 1849-1853. 1980.
 - 10) Takahashi H, Katayama M, Michishita K and Yamashita H. The A allele of the cholecystokinin type A receptor g.420 C>A polymorphism improves the growth traits of the Amakusa Daioh cross chicken. *Journal of Poultry Science*, 56:91-95. 2019.