

日本ウズラ長期選抜系統におけるマイクロサテライト多型解析

和田康彦, 田中雅生, 朴 君, 岡本 悟

(動物生産学分野)

平成15年10月31日 受理

Analysis of Microsatellite Polymorphism for Long Term Selected Lines in Japanese Quail Using Microsatellite Markers

Yasuhiko WADA, Msao TANAKA, Jun PIAO, Satoru OKAMOTO

(Laboratory of Animal Production)

Received October 31, 2003

Summary

Twenty five microsatellite markers were studied toward a QTL analysis for long term selected lines in Japanese quail. Two lines have been selected for small(SS line) and large(LL line) body weight for more than 80 generations and one line as a control (RR line). Genetic variations within three lines and genetic distances between each pair of these lines were estimated using microsatellite PCR method. Seven microsatellite markers, GUJ 0001, GUJ 0008, GUJ 0014, GUJ 0015, GUJ 0017, GUJ 0021, GUJ 0023 revealed polymorphism in the three lines. The heterozygote frequency of GUJ 0021 was 49.1% and those of other markers except for GUJ 0001 were around 30%. Average value of the heterozygote frequency for LL line was 26.4%, for RR line was 30.7% and for SS line was 33.8%. The Nei's minimum genetic distance between LL line and SS line was 0.150, between LL line and RR line was 0.154 and between SS line and RR line was 0.116.

Key words:

Japanese quail, polymorphism, long term selection, microsatellite marker

緒 言

日本ウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) は徳川時代に野生ウズラから鳴きウズラとしての家禽化が始められ, 明治中期から現在に至るまで卵用, 肉用として育種改良が進められてきた。また, 世代交代が早く, 小型で飼育が容易であることからニワトリのモデル動物や鳥類の実験動物としても利用されてきた。

佐賀大学農学部動物生産学研究室でもこれらの特徴を考慮して, 育種理論の検証と新しい育種手法の開発のための基礎実験として, 日本ウズラの体重大小2方向への長期選抜を35年以上にわたり実施してきた^{1, 2)}。その結果, LL系統がSS系統と比較して雌雄ともに体重が5倍程度大きく, 顕著な体重差が見られるようになり, 現在では体重大方向および体重小方向ともにほぼ選抜限界に達したと考えられる(岡本ら 未発表)。これらの系統は直接選抜反応として

の体重の変化のみならず、繁殖率や育成率、初産日齢などの形質も間接選抜反応を示している³⁾。また、これらの系統は生理的には、増体量や代謝回転速度および筋束の形状などにおいても顕著な系統間差を示すことが報告されている^{4,5)}。

このように長期選抜によって多くの表現型に大きな変化がもたらされたにもかかわらず、各系統の遺伝子構成がどのように変化したかについては必ずしも明らかではない。そこで、QTL解析などの手法を用いて体重に関与する遺伝子座を検索し、どのような遺伝子の変化が起きたのかを明らかにする必要がある。すでに、ブタなどでは異なる品種間で交配したF₂家系によるQTL解析が盛んに行われているが⁶⁾、その多くはヘテロ座位を特定できるマイクロサテライトマーカーを用いたものである。そこで本研究では当研究室で約80世代にわたって維持されている体重大小選抜系統およびコントロール系統の日本ウズラを用いて、日本ウズラにおける体重大小に関わるQTL解析の第一歩としてのマイクロサテライトマーカー検索を試みた。また、マイクロサテライトマーカーによるPCR法を用いた多型解析を実施し、3系統の遺伝的変異を明らかにするとともに、3系統間の遺伝的距離についての検討を行った。

材料および方法

1. 供試動物

本研究では佐賀大学農学部において約30年間にわたって維持してきたニホンウズラ (*Coturnix coturnic japonica*) の83世代の体重大方向選抜LL系統と体重小方向選抜のSS系統および84世代の無作為交配集団RR系統、各20個体の全血を用いた。本研究で使用した日本ウズラは、孵化した雛(200–250羽)を2週齢まで4段式の電熱式立体育雛機内で1段あたり約60羽程度収容して育雛した。その後、4週齢まで40羽を1群とする個体群ケージで、5週齢から100日齢まで個体ケージで飼育した。給与飼料として、孵化後100日齢までは市販のウズラ産卵用配合飼料(粗蛋白質24%、代謝エネルギー2,710kcal)に良質魚粉(粗蛋白質66%)を11%加えて粗蛋白質含量を28%に調整した飼料を用い、それ以降は市販のウズラ産卵用配合飼料(粗蛋白質24%)のみ自由摂取させた。また水は不断給水とした。飼育温度は、孵化時には約35℃、1週齢で約30℃、2週齢で約28℃、3週齢で約25℃、それ以降は20℃から30℃にヒーター及びエアコンで調節した鶏舎内で飼育した。

2. 血液からのゲノムDNA抽出

LL, RR, SS系統各20個体より採取した血液サンプルを使用し、三光純薬のセパジーンを用いてフェノール法でゲノムDNAを抽出し、TEバッファーにより250ng/μlに濃度調整した。

3. 最適アニーリング温度の決定

血液から抽出したゲノムDNAをテンプレートとして、既知のマイクロサテライトDNAマーカー用の25組のGUJプライマー⁷⁾(表1)を用いて最適なアニーリング温度の検討を行った。すなわちKayangら⁷⁾で示されたアニーリング温度を中心とする6度の範囲にほぼ等間隔に4点をとって、アニーリング温度を変化させたグラジエントPCRを行った。PCRにはTakara Ex-Taq Hot Start Version0.25μl, 10xExTaqバッファー5μl, 2.5mM dNTP 4μl, RR系統の1羽から抽出したゲノムDNA250ng, forwardプライマー, reverseプライマー各10μmolを含む50μlの系を用いた。PCRの条件は始めに96℃5分の熱変性を行い、次に96℃1分、上記のアニーリング温度で1分、72℃1分のサイクルを40回繰り返し、最後に72℃10分の伸長反応を行った。

Table 1. List of primer pairs

Locus name	Forward primer	Reverse primer	Annealing temperature	Polymorphism ^b
GUJ 0001	GAAGCGAAAGCCGAGCCA	CAGCACTTCGGAGCACAGGA	56.2	○
GUJ 0002	AGGTTGTGCTTTGCTGTAT	GAGCATGTTGCACATTTCTT	× ^a	—
GUJ 0003	AGGGAAGAAGCAACTGTTC	ATTCCAGAATCTGGACTGG	55.0	×
GUJ 0004	AGCTCTCCTATGGGGCAAC	CTGAGCACGAGGACTGGGAA	63.0	×
GUJ 0005	GCTCTGCTCTCACAGCAGT	TGGATCTGGAGCTGCAACGC	63.0	×
GUJ 0006	TGGGATGATAATGAGGTACGG	AGGATAGCATTTTCAGTACGG	56.7	×
GUJ 0007	TGACTGCTTTCCACACACA	CAGAAGGTAAGGACGGA	×	—
GUJ 0008	CATGGTTATCAACCTGCAGA	ACATGCCAGTCCTTACAAT	56.7	○
GUJ 0009	CACGCTTGCTTCTTGCTTCA	TATGTTTGGTGCCTGTAG	59.0	×
GUJ 0010	TTCCTTCTGGGTGCTGTCTA	CATAGACACATCCCTCCCTC	×	—
GUJ 0011	TACTTGATACACCAGCTGTC	CACCCTATACCAATGAAAGG	57.0	×
GUJ 0012	TTTATGTAAGTGTGGGCGC	CTTGACATAGAGTAAGCCA	54.7	×
GUJ 0013	ACCAAACCCGAGATCCGACA	AGCGTTCGCGTTCTCTTTC	58.7	×
GUJ 0014	TGCTGGGGTTGCTTTCTCCA	TCTCGGTGGTTTGTCTGAC	58.7	○
GUJ 0015	AGGTGGTCCCAATGCCTT	GGAAGCAGAGCATCGTTCCC	63.0	○
GUJ 0016	AATGAATGTCTGGGTGGTGC	CATGGAGTGTGGGTATTGC	59.0	×
GUJ 0017	AGAGAGATTAGAGGAGCTGC	GGCACTAAAACCATCGAGAG	59.0	○
GUJ 0018	ATCCGCGCCCTCTTGTT	CGGCACCACGAAGTACTCCA	59.0	×
GUJ 0019	GGGGGCTGTAGTCTGGATC	ATCGGGCACGCGAGGACCAT	61.2	×
GUJ 0020	AATGTCCTTGTGCAGCTCCA	CAGCATTGTGCAAAGCAGTG	59.0	×
GUJ 0021	GAGCATTCTAGTCTGTCTC	GATCAATACACAGGCTAAGG	57.0	○
GUJ 0022	AAACTTATTCTCGCTCCC	TAAGCAAGGAAGAGGTGGCA	63.0	×
GUJ 0023	GAGAGGTACAGCAACTTT	CGTTTCTTCTGGAGTGTCT	58.0	○
GUJ 0024	TCACACCTTCGGGCTGATCT	ATGCGACGGGTGCCTAAA	62.0	×
GUJ 0025	CCTGAGCGAATACACAAGT	AGTGTAGGTGAGGACTGCT	60.0	×

a: PCR products were not obtained.

b: O; Polymorphism was detected. X; not detected.

PCR産物を2.2%アガロース電気泳動して最もシャープなバンドを示した温度を最適アニーリング温度とした。

4. 多型チェック

LL, RR, SS 系統各20羽の血液から抽出したゲノムDNAの等量混合溶液より1μgをテンプレートとして、最適アニーリング温度下での同様のPCRを行い、集団内での多型の有無を確認した。PCR産物を2.2%アガロース電気泳動して複数のバンドが現れたマーカーを多型が存在するマーカーとして以後の分析に用いた。

5. マイクロサテライト多型のタイピング

LL, RR, SS 系統各20羽について、抽出したゲノムDNA250ngをテンプレートとして、個体別のPCRを行い、2.2%アガロース電気泳動によりバンド判定を行い、マイクロサテライト多型のタイピングを実施した。タイピング結果をもとに、各遺伝子の遺伝子頻度とマーカーごとのヘテロ接合体頻度を算出した。

6. 系統間の遺伝的距離の算出

タイピングの結果よりNeiの最小遺伝距離の算出法⁹⁾を用いて、LL対RR, LL対SS, RR対SS各系統間の遺伝距離を求めた。算出した遺伝距離をもとに、近隣結合法⁹⁾により分子系統樹を作成した。

結果および考察

表1にマイクロサテライトマーカーのプライマー配列, 本研究で得られた最適アニーリング温度, 3系統混合DNAをテンプレートとしたPCR判定による多型の有無を示した. GUJ0002, GUJ0007, GUJ0010の3マーカーではシャープなPCRバンドが認められなかった. GUJ0001, GUJ0008, GUJ0014, GUJ0015, GUJ0017, GUJ0021, GUJ0023の7マーカーに多型が確認された. Kayangら⁷⁾は50座位のマイクロサテライトマーカーのなかで多型が認められた割合が46%であることを報告している. 本研究ではこの割合は28%と少し低い値を示したが, 選抜開始時の集団の血液サンプルが存在しないので, 選抜開始時から多型マーカーが少なかったのか, 選抜によって多型マーカーが減少したのかを判断することはできなかった.

多型が確認された7マーカーについて3系統計60羽についてのPCRを行い, 個体別のタイピングを実施した. 全てのマーカーで2から3種の多型が得られ, これらを遺伝子型としてA,B,Cとした. タイピング結果より求めたマーカー別の遺伝子頻度を表2 (LL line), 表3 (RR line), 表4 (SS line) に示した. 各系統内で2つの遺伝子型が観察された場合, 頻度の高い遺伝子型が94.1-55.9% (LL line), 80.0-72.5% (RR line), 92.5-65.0% (SS line) と変動していた. LL系統とRR系統において少数のマーカーで3つめの遺伝子型が確認でき, その遺伝子頻度は5.0-15.0%であった. また, LL系統とRR系統においてそれぞれ2マーカーは1遺伝子型に固定されていた.

表5にタイピング結果より求めた, マーカー別ヘテロ接合体頻度及びその平均値を示した. 3系統全体のヘテロ接合体頻度はGUJ0021で49.1%と一番高く, その他のマ-

Table 2. Gene frequency of LL line

Marker	Gene frequency (%)		
	A	B	C
GUJ 0001	100.0	0.0	0.0
GUJ 0008	70.6	29.4	0.0
GUJ 0014	100.0	0.0	0.0
GUJ 0015	94.1	5.9	0.0
GUJ 0017	94.1	5.9	0.0
GUJ 0021	11.6	67.7	14.7
GUJ 0023	55.9	44.1	0.0

Table 3. Gene frequency of RR line

Marker	Gene frequency (%)		
	A	B	C
GUJ 0001	100.0	0.0	0.0
GUJ 0008	100.0	0.0	0.0
GUJ 0014	45.0	50.0	5.0
GUJ 0015	80.0	20.0	0.0
GUJ 0017	27.5	72.5	0.0
GUJ 0021	30.0	55.0	15.0
GUJ 0023	80.0	20.0	0.0

Table 4. Gene frequency of SS line

Marker	Gene frequency (%)		
	A	B	C
GUJ 0001	88.2	11.8	0.0
GUJ 0008	86.8	13.2	0.0
GUJ 0014	72.5	27.5	0.0
GUJ 0015	70.0	30.0	0.0
GUJ 0017	35.0	65.0	0.0
GUJ 0021	77.5	22.5	0.0
GUJ 0023	7.5	92.5	0.0

Table 5. Frequency of heterozygote (%)

Marker	Line			Average
	LL	RR	SS	
GUJ 0001	0.0	0.0	23.5	7.0
GUJ 0008	58.8	0.0	26.3	26.8
GUJ 0014	0.0	40.0	55.0	33.9
GUJ 0015	11.8	40.0	60.0	38.6
GUJ 0017	11.8	55.0	30.0	33.3
GUJ 0021	64.7	50.0	35.0	49.1
GUJ 0023	41.2	30.0	5.0	24.6
Average	26.4	30.7	33.8	30.3

カーでも GUJ001を除いて30%前後の高い値を示した. 系統別のヘテロ接合体頻度の平均値は LL 系統では26.4%, RR 系統では30.7%, SS 系統では33.8%であり, LL, SS 系統ともに高いヘテロ接合体頻度を示し, 特に SS 系統が RR 系統より高いという興味深い結果が得られた. 本研究では長期選抜を目指しているために, できるだけ近交に陥らない交配方法を実施している¹⁾. 本来, 選抜によりヘテロ接合体頻度は減少するはずであるが, このような交配方法を用いることによって, SS 系統では全体の遺伝変異を残したまま, 体重に関する遺伝子のみを変化させることができたのではないかと考えられた.

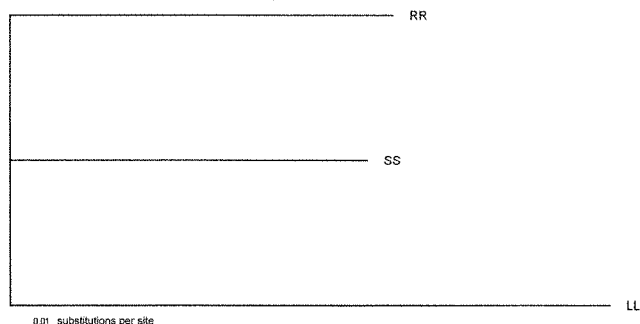
万年ら¹⁰⁾は, 以前に DNA フィンガープリント法を用いて LL, RR, SS の3系統を解析し, ヘテロ接合体頻度が LL 系統で38%, SS 系統で31%と高いことを報告している. 今回の結果では LL 系統ではかなりヘテロ接合体頻度が下がっているが SS 系統ではほとんど変化していない. LL 系統では受精率の低下に悩まされており, これがヘテロ接合体頻度の低下の原因になっている可能性があるが, RR 系統や SS 系統ではヘテロ接合体頻度はほぼ30%を維持している.

当研究室において選抜74世代目から逆選抜が行われた結果, LS, SL 系統が作出され, 両系統とも逆選抜に反応した結果が得られている¹¹⁾. このことは LL, SS 両系統ともに体重に関する遺伝の変異を保有していることを示している. しかしながら, 両系統ともに選抜には反応しない. これは, 大きすぎる体重や小さすぎる体重が生存に不利に働くため, 選抜に対して自然淘汰が拮抗しているためではないかと考えられる. たとえば, LL 系統においては体重が大きくなりすぎたために交配に不都合をきたしており, そのために受精率が低下している. LL 系統においては体重が小さい方が交配しやすいと考えられるため, 体重小方向への自然淘汰圧があるものと推察される. また, SS 系統においては孵化直後の死亡が多い. 3系統ともに孵化後すぐに孵卵器から育雛器に移されて集団飼育されているが, SS 系統はあまりにも体が小さいために環境の変化に弱く, また多くの個体の下敷きになって圧死するケースが多い. 体が大きいほどこれらの状況下でも生き残る可能性が大きくなるため, 体重大方向への自然淘汰圧があるのではないかと考えられる.

系統間の Nei の最小遺伝距離を求めた結果, LL-SS が0.150, LL-RR が0.154, SS-RR が0.116であった. これらの遺伝距離から RR 系統をアウトグループとして近隣結合法を用いた分子系統樹を作成した (図1). その結果, SS 系統と比較して LL 系統の枝長が若干長くなっていることが示された.

本研究で用いた長期選抜系統は, 選抜形質である体重で大きな選抜反応を得たにもかかわらず, 大きな遺伝変異を残しており, 家畜家禽の育種改良にとって理想的な例と言える. 今後, 日本ウズラのマイクロサテライトマーカーの開発を続けてマーカー数を増やし, QTL 解析等を用いて LL および SS 系統の遺伝子構成の変化について検討していきたい.

Fig.1. Neighbor-joining phylogenetic tree of three lines using Nei's minimum genetic distance.



摘 要

佐賀大学において約80世代にわたって維持されている体重大小選抜系統およびコントロール系統の日本ウズラを用いて、日本ウズラにおける体重大小に関わる QTL 解析の第一歩としてのマイクロサテライトマーカー検索を試みた。また、PCR 法を用いたマイクロサテライトマーカーによる多型解析を実施し、3系統の遺伝的変異を明らかにするとともに、3系統間の遺伝的距離についての検討を行った。その結果、日本ウズラ3系統において GUJ0001, GUJ0008, GUJ0014, GUJ0015, GUJ0017, GUJ0021, GUJ0023の7マーカーに多型が確認された。マーカー別ヘテロ接合体頻度は GUJ0021で49.1%と一番高く、その他のマーカーでも30%前後の高い値を示した。系統別のヘテロ接合体頻度の平均値は LL 系統では26.4%, RR 系統では30.7%, SS 系統では33.8%であり、LL, SS 系統ともに高いヘテロ接合体頻度を示した。2系統間の Nei の最小遺伝距離は、LL-SS が 0.150 , LL-RR が 0.154 , SS-RR が 0.116 であった。

引 用 文 献

1. 岡本 悟, 旗手祐二, 松尾昭雄 (1982). ウズラの体重大小系統の相反交雑におけるヘテロシス. 日畜会報53, 424-428.
2. Suda, Y., K. Imakawa and S. Okamoto (2002). Long term selection for small body weight in Japanese quail I: Direct selection response from 60 to 65th generation. *J. Poult. Sci.* 39, 274-284.
3. Suda, Y., K. Imakawa and S. Okamoto (2003). Long term selection for small body weight in Japanese quail II: Changes in reproductive traits from 60 to 65th generations. *J. Poult. Sci.* 40, 30-38.
4. Maeda, Y., K. Kawabe, S. Okamoto, S. Okamoto and T. Hashiguchi (1994). Comparison of energy metabolism during the growing period in quail lines selected for body weight. *British Poultry Science* 35, 135-144.
5. Iwamoto, H., S. Tabata, T. Gotoh and S. Okamoto (2000). Histochemical profile and ultrastructure of pectoralis myofibrin in Japanese quail bred for large body weight. *Proc. of the 9th AAAP Animal Sci. Cong.*, 1, 116-119.
6. Wada, Y., T. Akita, T. Awata, T. Furukawa, N. Sugai, Y. Inage, K. Ishi, Y. Ito, E. Kobayashi, H. Kusumoto, T. Matsumoto, S. Mikawa, M. Miyake, A. Murase, S. Shimanuki, T. Sugiyama, Y. Uchida, S. Yanai, H. Yasue (2000). Quantitative trait loci (QTL) analysis in a Meishan \times Gottingen cross population. *Animal Genetics* 31, 376-384.
7. Kayang, B.B., M. Inoue-Murayama, A. Nomura, K. Kimura, H. Takahashi, M. Mizutani and S. Ito (2000). Fifty Microsatellite Markers for Japanese Quail. *The Journal of Heredity* 91, 502-505.
8. Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *Amer. Natur.* 106, 283-292.
9. Saitou, N. and M. Nei (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Bio. Evol.* 4, 406-425.
10. 万年英之, 辻 莊一, 岡本 悟, 前田芳寛, 山下秀次, 向井文雄, 後藤信男 (1993). 体重選抜ウズラ系統における DNA フィンガープリント像による遺伝的構造の分析. 家禽会誌30, 66-71.
11. 朴 君, 岡本 悟, 小林 真, 和田康彦, 前田芳寛 (2002). 日本ウズラの生産形質に関するヘテロシス効果 1) 体重大系統と無作為交配集団の系統間交雑におけるヘテロシス効果. 家禽会誌39, J139-J146.