

コレシストキニンA受容体遺伝子の一塩基多型が 青森シャモロック雌の発育性に及ぼす影響

河合宏美^{1,*}・佐藤典子¹・植田祐介²・高橋秀彰^{3,4}

¹ 地方独立行政法人青森県産業技術センター畜産研究所 青森県上北郡野辺地町枇杷野 51 〒039-3156

² 青森県上北地域県民局地域農林水産部 青森県十和田市西十二番町 20-12 〒034-0093

³ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門 茨城県つくば市池の台 2 〒305-0901

⁴ 現所属：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構本部企画戦略本部 茨城県つくば市観音台 3-1-1 〒305-8517

2021年4月27日受付, 2021年7月13日受理

要 約

これまでに、いくつかのブランド地鶏の発育性と、コレシストキニンA受容体遺伝子(CCKAR)の5'非翻訳領域に存在する一塩基多型(SNP)には有意な関連性が報告されている。本研究では、青森シャモロックにおいても、当該SNPと発育形質に有意な関連性があるか検証することを目的とした。同日発生した青森シャモロックの雌雛60羽を材料とした。同一鶏舎内で青森シャモロックの飼料給与体系に従い、0から118日齢まで肥育した。26, 35, 41, 48, 55, 62, 69, 76, 83, 90, 97, 104, 111, 118日齢に体重を測定し、各日齢間の体重差から平均日増体量(ADG)を算出した。119日齢と120日齢に屠殺・解体し、屠体形質を測定した。当該SNPの型判定にはミスマッチ増幅変異アッセイ法を用いた。SNPと各形質との関連性はSNPの相加的効果と優性効果を考慮した一般化線形モデルを用いて解析した。60羽の遺伝子型の内訳は、A/Aが22羽、A/Cが28羽、C/C型が10羽であった。体重は、97日齢を除いてA/Aが他の遺伝子型よりも有意に重く、97日齢でもA/AがC/Cよりも有意に重かった。ADGは、26-35, 35-41, 48-55, 76-83, 90-97日齢間で有意差が認められた。SNPと発育形質の関連性は相加的効果について有意差が認められ、全ての日齢時体重、26-35, 35-41, 48-55日齢間のADG、屠体重、モモ肉重量、正肉重量においてAアリルはCアリルよりも有意に重かった。以上の結果から、当該SNPと青森シャモロック雌の発育性には有意な関連性があることが示唆された。

キーワード：青森シャモロック, 一塩基多型, コレシストキニンA受容体遺伝子, 発育形質

東北畜産学会報 71(3) : 12 ~ 21 2022

緒 言

地鶏は地鶏肉の日本農林規格(以下、特定JAS; 日本農林規格, 1999)によって、1) 在来種由来血液百分率が50%以上、2) 飼育期間がふ化日から75日間以上、3)

28日齢以降平飼い飼育、4) 1㎡当たり10羽以下で飼育されているもの、等その定義が詳細に定められている。昭和50年代から平成にかけて、都道府県の公設研究所・試験場を中心に、特定JASに合致し、地域性と独自性を標榜したブランド地鶏の開発が盛んに行われた。青森県では、昭和62年から県独自のブランド地鶏開発の取り組みを開始した。青森県は古くから闘鶏が盛んな土地柄で、現在でも闘鶏用のシャモが愛好家によって県内各地で飼育されている。シャモは肉質の評価が高く、その肉は郷土料理の食材としても利用されてきた。こうした背景か

* 連絡者：河合宏美(かわい ひろみ)
(地方独立行政法人青森県産業技術センター畜産研究所)
〒039-3156 青森県上北郡野辺地町枇杷野 51
Tel: 0175-64-2231
E-mail: hiromi_kawai@aomori-itc.or.jp

ら、青森県畜産試験場（現：地方独立行政法人 青森県産業技術センター畜産研究所）では、青森県在来のシャモを活用したブランド地鶏の開発に取り組み、平成2年にブランド地鶏「青森シャモロック」の販売を開始した。

青森シャモロックは、横斑シャモ雄と速羽性横斑プリマスロック雌を交配して作出される一代交雑鶏である（西藤と吉田，1992）。横斑シャモは、青森県在来のシャモに、青森県畜産試験場で長年飼育されてきた横斑プリマスロックを交配した後、シャモの戻し交配を8世代繰り返して造成された合成品種である（在来種由来血液百分率100%）。品種成立過程で、シャモの闘争性を弱める選抜に努めると共に、羽色を横斑紋に固定した（西藤，2011）。速羽性横斑プリマスロックは、青森県畜産試験場で維持・改良してきた横斑プリマスロックに、民間導入の白色プリマスロックを交配した後、8世代にわたる閉鎖群育種を行うことによって造成された合成品種（在来種由来血液百分率50%）である。品種成立過程で横斑プリマスロックが保有していた遅羽性遺伝子を速羽性遺伝子へ置き換え、交雑種の発育、育成率、白血病に対する抗体生産能を抑制するとされる遅羽性遺伝子の欠点を補った（西藤，2011）。青森シャモロックは、在来種由来血液百分率が75%で、外見的に雌雄ともに三枚冠、横斑紋であり、外貌的特徴の斉一性の観点からも他のブランド地鶏との明確な差別化が図られている。青森シャモロックは令和2年度時点で、指定生産農場18戸から年間約52000羽が主に青森県内で生産されている。青森シャモロックの出荷目安は雄で100日齢（目安体重3.0kg）、雌で120日齢（目安体重2.5kg）である。飼育日数が長いことから、生産者からは発育性の改善による生産効率の改善と飼育期間の短縮が求められている。

農研機構と秋田県畜産試験場を中心とする研究グループから、秋田県の在来種である比内鶏を用いた、量的形質遺伝子座（quantitative trait loci, QTL）の解析結果、およびQTLに存在する候補遺伝子の一塩基多型（single nucleotide polymorphism, SNP）と発育性との関連性について一連の報告があった。すなわち、1）秋田県在来の比内鶏のF₂交雑家系を用いてQTL解析を行い、第4番染色体遠位端に発育性に関わるQTLが存在すること（Rikimaruら，2011）、2）当該QTLのピーク直下にコレシストキニンA受容体遺伝子（CCKAR）が存在し、CCKARのハプロタイプと発育形質との間に有意な関連性があること（Rikimaruら，2012）、および3）CCKARの5'非翻訳領域に存在するSNP（AB604331, g. 420C>A）と比内鶏の発育形質の関連性を調べた結果、AアリルはCアリルよりも発育性が有意に優れていることをそれぞれ報告した（Rikimaruら，2013）。

農研機構と秋田県畜産試験場を中心とする研究グループの報告を受けて、近年、CCKARの当該SNPと発育性の関連性について、品種交雑によって生産されるブランド地鶏を用いた報告が相次いでいる（天草大王, Takahashiら，2019；みやざき地頭鶏, Horinouchiら，2019；奥美濃古地鶏, Ishikawaら，2020；比内地鶏, Rikimaruら，2020）。これらは共通して、当該SNPの2つのアリルのうち、Aアリルの方がCアリルよりも発育性が優れると報告している。このことは、当該SNPのAアリル選抜による発育性改善効果が交雑鶏でも発揮されることを示唆している。そこで本研究では、CCKARのg. 420C>A SNPが青森シャモロックの発育性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

本研究におけるすべての動物実験は「地方独立行政法人青森県産業技術センターにおける動物実験等の実施に関する規程」に従って行った。

1. 供試鶏と飼育条件

青森県産業技術センター畜産研究所内で2018年2月14日にふ化した雌の青森シャモロック60羽を用い、供試鶏はすべて同一の開放鶏舎で飼育した。試験期間は0日齢から120日齢までとし、4段の育雛バッテリー（間口73cm×奥行139cm×高さ33cm）で27日齢まで飼育し、その後120日齢まで群飼ケージ（縦55.5cm×横90.5cm×奥行61.0cm）内に1ケージ5羽の密度で飼育した。給与飼料は青森シャモロックの標準飼料給与体系に従って、0-27日齢までは前期飼料（CP22%, ME3, 100kcal/kg, 北日本くみあい飼料株式会社, 仙台）を、28日齢-120日齢までは後期飼料（CP17%, ME2, 900kcal/kg, 北日本くみあい飼料株式会社, 仙台）を、屠殺前の2週間はガーリック粉末（富士産業株式会社, 青森）を0.3%（wt/wt）添加した後期飼料を給与した。屠殺・解体の前日まで自由採食・自由飲水とし、照明時間は自然日長とした。

2. 表型値の測定

26, 35, 41, 48, 55, 62, 69, 76, 83, 90, 97, 104, 111, 118日齢に体重測定を行った。各日齢間の平均日増体量（Average Daily Gain, ADG）は、日齢間の体重差を日数で割って算出した。解体は、119日齢に44羽、120日齢に16羽の2回に分けて行った。鶏を18時間絶食させた後、放血により屠殺した。食鳥処理機（株式会社ニッセイエンジニア, 静岡）を用いて脱羽した後、水

水に浸して3時間冷却した。屠体は重量を測定した後、解体し、モモ肉、ムネ肉、ササミを分離し、それらの各重量を測定した。モモ肉、ムネ肉、ササミ重量を合算し、正肉重量とした。なお、120日齢の鶏は、119日齢の鶏よりも1日分、各屠体形質の重量が重くなるため、120日齢の平均重量に119日齢平均重量/120日齢平均重量を乗じて補正した。

3. ゲノム DNA の抽出

6週齢時に翼下静脈から血液を採取した。血液1滴をFTAカード(WB120028, GEヘルスケア, イギリス)上に垂らし、室温で一晩風乾させた。SmithとBurgoyne(2004)に記載されているMethod#4に準じて、FTAカードからゲノムDNAを抽出した。すなわち、乾燥した血液部分からハリスマイクロパンチ(WB10005, GEヘルスケア)を用いて直径1.2mmのディスクを打ち抜き、96穴プレート(BRG-96S100, バイオリジェネレーションズ, 横浜)の各ウェルにディスクを移した。各ウェルに100 μ lのFTA精製試薬(WB120204, GEヘルスケア)を加えた後、室温で1時間静置した。上清を捨て、100 μ lのDNAzol BD溶液(10974-020, インビトロジェン, アメリカ)を加えた後、室温で30分静置し、上清を捨てた。その後、100 μ lの滅菌水を加え、上清を捨てる作業を3回繰り返して、ディスクを洗浄した。最後に100 μ lの滅菌水を入れ、サーマルサイクラー(GeneAmp System 9700: パーキンエルマーアプライドバイオシステムズ, アメリカ)を用いて90 $^{\circ}$ Cで10分間熱処理した後、室温以下に冷却した。回収された上清を、ゲノムDNA溶液として使用した。

4. CCKAR の遺伝子型判定

CCKARのg.420C>ASNPの遺伝子型判定には、ミスマッチ増幅変異アッセイ法(Chaら,1992)を用いた。共通のフォワードプライマー(5'-GAATGTGTGTCTGCGTGCTT-3')と2種類のリバースプライマー(Aアリルプライマー:5'-GGATCCACAGGTTAGCTGCGAT-3', およびCアリルプライマー:5'-GGATCCACAGGTTAGCTGCGAG-3')を組み合わせ、AアリルおよびCアリルがそれぞれ増幅するようにPCR反応液を調製した。96穴PCRプレート(BRG-96S100)の1枚あたりのPCR反応液は、396 μ lのミリQ水に100pmol/ μ lに調製されたPCRプライマー各2 μ lと2 \times PCRミックス(RR300A, EmeraldAmp, タカラバイオ, 大津)400 μ lを混合した後、電動ピペッターを用いて、1ウェルあたり8 μ lを分注した。1ウェルあたりFTAカードから抽出したゲノムDNA1 μ lを加えて混合した後、PCRを行った。PCRサイクルは、サーマ

ルサイクラー(GeneAmp System 9700: パーキンエルマーアプライドバイオシステムズ, アメリカ)を用いて、熱変性(98 $^{\circ}$ C, 10秒), アニーリング(68 $^{\circ}$ C, 60秒)の2ステップを30回とした。1 \times Tris-acetate-EDTA(TAE)バッファー(Sambrookら, 1989)を用いて作成した2.0%アガロースゲルに、AアリルとCアリル増幅用のPCR反応液が隣り合うように2 μ lずつ載せた後、電気泳動装置(BE-548B, バイオクラフト, 東京)を用いて、1 \times TAEバッファー中で、150Vで10分間、電気泳動を行った。泳動後のアガロースゲルを、常法(Sambrookら, 1989)に従って、エチジウムブロマイドで染色した後、UVトランスイルミネーター下で、PCR産物のバンドの検出を行った。SNPの遺伝子型はAアリル増幅反応液のレーンのみでバンドが検出された場合はA/A型、Cアリル増幅反応液のレーンのみでバンドが検出された場合はC/C型、A, C両方の増幅反応液のレーンでバンドが検出された場合はA/C型と判定した。

5. 統計解析

各日齢の体重、各日齢間のADG、および各屠体形質は、形質ごとに3つの遺伝子型(A/A, A/C, C/C)の群に分けた後、3群の差をTukey法にて検定した。

当該SNPと各形質との関連は以下に示す一般化線形モデルを用いて算出した。

$$y = \mu + C_a a + C_d d + e$$

ここで、 μ は全平均、 a は遺伝子型に占めるAアリルの個数(A/A, 2; A/C, 1; C/C, 0)、 d は遺伝子型がホモ(A/AおよびC/C)の場合0; ヘテロ(A/C)の場合1をとり、 C_a と C_d はそれぞれの回帰係数、 e は残差である。

モデル式によって説明される全分散に占めるSNPの相対効果の分散割合(%)は以下の式で求めた。

$$\text{Variance percentage} = 100 \times (1 - F_{\text{var}}/R_{\text{var}})$$

R_{var} はモデル式からSNPの効果を除いたモデルにおける残差分散、 F_{var} はモデル式から得られる残差分散である。

以上の統計解析は、Minitab統計解析ツール(構造計画研究所, 東京)を用いた。P値が0.05未満の場合、有意差ありと判定した。

結果

1. SNPの遺伝子型頻度およびアリル頻度

青森シャモロック雌集団60羽の遺伝子型を判定した結果、A/A, A/C, C/C型の羽数は、それぞれ、22羽, 28羽, 10羽であった。集団におけるA/A, A/C, C/Cの遺伝子型頻度は、それぞれ0.37, 0.47, 0.17と算出された。また、

A と C のアリル頻度は、それぞれ 0.60, 0.40 と算出された。

2. 発育形質

26, 35, 41, 48, 55, 62, 69, 76, 83, 90, 97, 104, 111, 118 日齢の体重データを図 1 に示した。26, 35, および 41 日齢の体重では、遺伝子型群間で有意な差が認め

られ、A/A, A/C, C/C 型の順に重かった。48 日齢以降の体重では、97 日齢の体重を除き、A/A 型個体が A/C および C/C 型個体に比べて有意に重かった。97 日齢の体重では A/A 型個体が C/C 型個体に比べ有意に重かった (図 1)。

ADG のうち、遺伝子型群間に有意差が認められた 26-

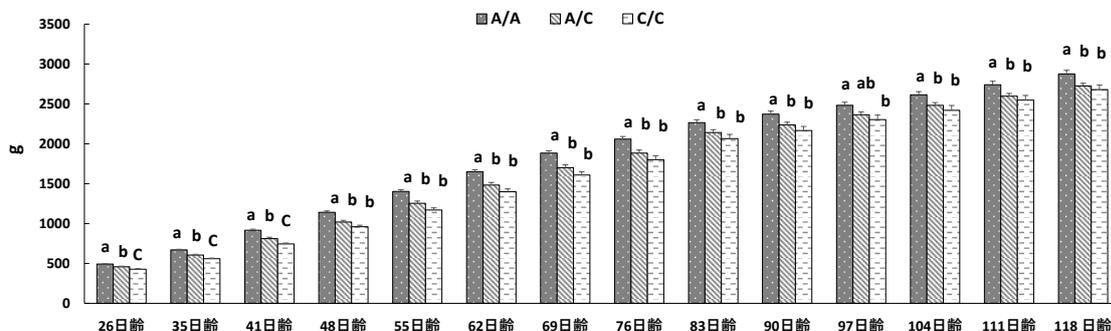


図 1. 各日齢時体重 (g) のコレシトキニン A 受容体遺伝子型ごとの比較
同一日で異符号間に有意差あり ($P < 0.05$), バーは平均 \pm SE

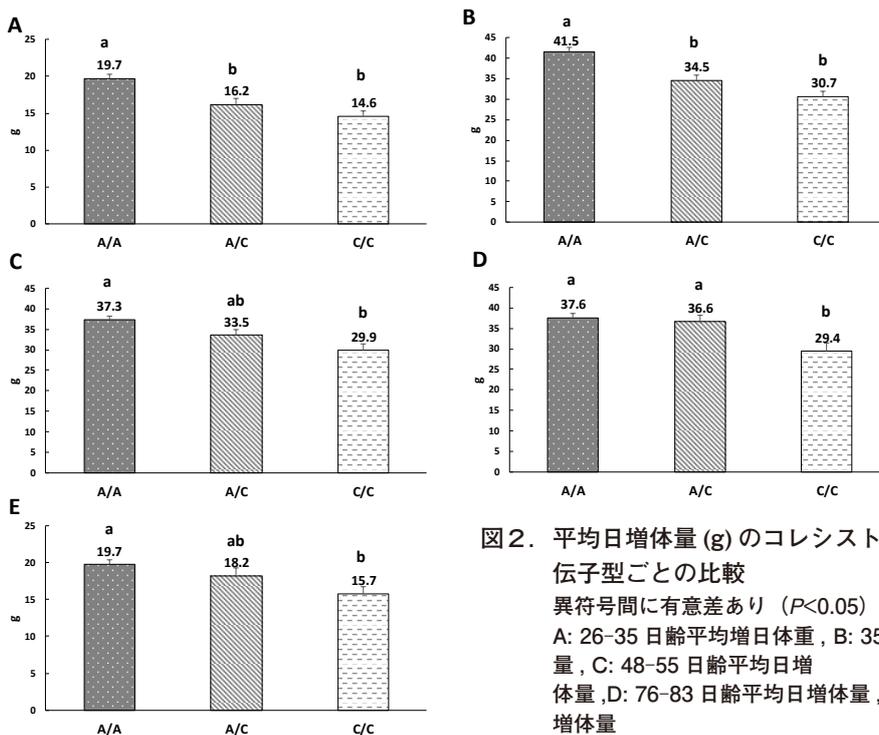


図 2. 平均日増体量 (g) のコレシトキニン A 受容体遺伝子型ごとの比較
異符号間に有意差あり ($P < 0.05$), バーは平均 \pm SE
A: 26-35 日齢平均日増体量, B: 35-41 日齢平均日増体量, C: 48-55 日齢平均日増体量, D: 76-83 日齢平均日増体量, E: 90-97 日齢平均日増体量

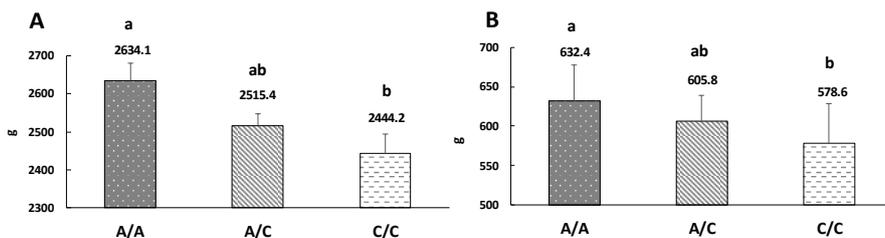


図 3. 各屠体形質 (g) のコレシトキニン A 受容体遺伝子型ごとの比較
異符号間に有意差あり ($P < 0.05$), バーは平均 \pm SE
A: 屠体重, B: モモ肉重量

35, 35-41, 48-55, 76-83, 90-97 日齢間のデータを図2に示した。26-35, 35-41 日齢間で A/A 型個体が他の遺伝子型個体に比べ有意に重かった。また, 48-55, 90-97 日齢間で A/A 型個体が C/C 型個体に比べ有意に重く, 76-83 日齢間では A/A および A/C 型個体が C/C 型個体に比べ有意に重かった。図に示していない他の日齢間では, 3つの遺伝子型群間に有意差は認められなかった。

屠体形質のうち, 遺伝子群間に有意差が認められた屠体重およびモモ肉重量のデータを図3に示した。A/A 型個体が C/C 型個体に比べ有意に重かった (図3)。なお, ムネ肉重量, ササミ重量および正肉重量に有意差は認め

られなかった (データは示していない)。

3. SNP と発育形質の関連性

g. 420 C>A SNP と 26 日齢から 118 日齢までの体重との関連性を表1に示した。相加的効果について, g. 420 C>A SNP と各日齢時体重との間に有意な関連性が認められ, A アリルは C アリルより有意に優れていた。優性効果については g. 420 C>A SNP と各日齢時体重との間に有意な関連性は認められなかった。

g. 420 C>A SNP と 26 日齢から 118 日齢までの 1 週間ごとの ADG との関連性を表2に示した。相加的効果をみ

表1. 各日齢時体重 (g) とコレシストキニン A 受容体遺伝子 g. 420C>A SNP との関連性

*P<0.05, **P<0.01

	全平均	相加的効果	優性効果	R _{var}	F _{var}	variance %
	推定値 ± 標準誤差	推定値 ± 標準誤差	推定値 ± 標準誤差			
26日齢	428.8 ± 9.7	31.7 ± 5.85**	-1.5 ± 8.23	81174	53556	34.0
35日齢	560.0 ± 15.1	55.0 ± 9.14**	-10.0 ± 12.8	208868	126900	39.2
41日齢	744.0 ± 23.1	86.0 ± 13.9**	-18.2 ± 19.6	506958	303783	40.1
48日齢	961.0 ± 29.4	90.9 ± 17.7**	-32.6 ± 25	720158	493112	31.5
55日齢	1170.0 ± 39.0	117.0 ± 23.5**	-33.1 ± 33.1	1244540	867800	30.3
62日齢	1400.0 ± 46.0	126.1 ± 27.7**	-42.6 ± 39	1642965	1205429	26.6
69日齢	1610.0 ± 51.0	137.0 ± 30.8**	-46.3 ± 43.3	2001408	1484918	25.8
76日齢	1802.0 ± 54.9	129.2 ± 33.1**	-46.6 ± 46.6	2175393	1716152	21.1
83日齢	2065.0 ± 56.5	100.7 ± 34.0**	-24.6 ± 47.9	2095190	1816427	13.3
90日齢	2167.0 ± 56.2	103.3 ± 33.9**	-32.8 ± 47.7	2092197	1798644	14.0
97日齢	2305.0 ± 58.0	89.3 ± 35.0*	-29.3 ± 49.2	2134447	1915059	10.3
104日齢	2421.0 ± 58.8	96.8 ± 35.4**	-33.8 ± 49.9	2225840	1968303	11.6
111日齢	2548.0 ± 61.0	96.5 ± 36.8*	-46.2 ± 51.8	2375598	2119753	10.8
118日齢	2680.0 ± 62.9	98.0 ± 37.9*	-53.0 ± 53.4	2518297	2254432	10.5

表2. 平均日増体量 (g) とコレシストキニン A 受容体遺伝子 g. 420C>A SNP との関連性

*P<0.05, **P<0.01

	全平均	相加的効果	優性効果	R _{var}	F _{var}	variance %
	推定値 ± 標準誤差	推定値 ± 標準誤差	推定値 ± 標準誤差			
26-35日齢間	14.6 ± 1.0	2.57 ± 0.63**	-0.93 ± 0.88	779	600	23.0
35-41日齢間	30.7 ± 2.0	5.24 ± 1.19**	-1.62 ± 1.66	2930	2134	27.2
41-48日齢間	31.0 ± 1.6	0.53 ± 0.99	-1.89 ± 1.39	1533	1525	0.5
48-55日齢間	29.9 ± 1.9	3.74 ± 1.12**	-0.08 ± 1.57	2341	1956	16.4
55-62日齢間	32.9 ± 2.0	1.30 ± 1.18	-1.35 ± 1.67	2247	2200	2.1
62-69日齢間	30.0 ± 1.5	1.56 ± 0.91	-0.54 ± 1.28	1363	1296	4.9
69-76日齢間	27.4 ± 1.5	-1.12 ± 0.88	-0.04 ± 1.24	1253	1219	2.7
76-83日齢間	37.6 ± 2.3	-4.08 ± 1.37**	3.14 ± 1.93	3396	2939	13.5
83-90日齢間	14.6 ± 1.6	0.38 ± 0.96	-1.17 ± 1.35	1441	1438	0.3
90-97日齢間	19.7 ± 1.4	-2.00 ± 0.81*	0.50 ± 1.14	1144	1034	9.6
97-104日齢間	16.6 ± 1.3	1.07 ± 0.76	-0.65 ± 1.08	947	916	3.3
104-111日齢間	18.1 ± 1.9	-0.05 ± 1.14	-1.77 ± 1.60	2033	2033	0.0
111-118日齢間	18.9 ± 1.4	0.21 ± 0.85	-0.96 ± 1.20	1134	1133	0.1
26-118日齢間	24.5 ± 0.6	0.72 ± 0.39	-0.56 ± 0.54	247	232	5.8

表 3. 各屠体形質 (g) とコレシストキニン A 受容体遺伝子 g. 420C>A SNP との関連性

* $P<0.05$, ** $P<0.01$

		全平均	相加的効果	優性効果	R_{var}	F_{var}	variance %
		推定値 ± 標準誤差	推定値 ± 標準誤差	推定値 ± 標準誤差			
屠体重	g	2444.2 ± 58.9	94.9 ± 35.5**	-23.8 ± 50.0	2223905.0	1976038.0	11.1
ムネ肉	g	378.3 ± 17.7	20.8 ± 10.7	2.1 ± 15.0	190813.0	178894.0	6.2
モモ肉	g	578.6 ± 17.6	26.9 ± 10.6*	0.3 ± 15.0	197344.0	177507.0	10.1
ササミ	g	98.3 ± 3.2	2.0 ± 2.0	1.2 ± 2.8	6092.2	5979.5	1.8
正肉	g	1055.2 ± 34.6	49.7 ± 20.9*	3.5 ± 29.4	750233.0	682305.0	9.1

ると, g. 420 C>A SNP と ADG (26-35, 35-41, 48-55 日齢間) との間に有意な関連性が認められ, A アリルは C アリルより有意に優れていた。一方, g. 420 C>A SNP と 76-83, 90-97 日齢間の AGD との間にも有意差が認められ, この期間では C アリルが A アリルより有意に優れていた。優性効果については g. 420 C>A SNP と ADG との間に有意な関連性は認められなかった。

g. 420 C>A SNP と各屠体形質との関連性について表 3 に示した。相加的効果について, g. 420 C>A SNP と屠体重, モモ肉重量, 正肉重量との間に有意な関連性が認められ, A アリルは C アリルより有意に優れていた。その他の屠体形質との間に有意な関連性は認められなかった。優性効果は g. 420 C>A SNP と各屠体形質との間に有意な関連性は認められなかった。

考 察

本研究の結果から, 青森シャモロックにおいて, CCKAR の g. 420C>A SNP と肥育前半 (26-35, 35-41, 48-55 日齢間) の ADG との間に有意な関連性があり, A アリルは C アリルに比べ, ADG を増加させることが示唆された。この結果は, 鶏種により ADG が向上する週齢が異なるものの, みやざき地頭鶏 (Horinouchi ら, 2019) や奥美濃古地鶏 (Ishikawa ら, 2020), 比内地鶏 (Rikimaru ら, 2020) における試験結果と一致する。また, 体重においても全日齢で有意な関連性が認められ, A アリルは C アリルに比べ各日齢時の体重を増加させることが示唆された。これは, A アリルにおける肥育前半の ADG の増加に伴う現象と考えられる。一方, 76-83 日齢間および 90-97 日齢間の ADG にそれぞれマイナスの相加的効果が算出された。この理由は不明であるが, それ以前の ADG ではほぼ一貫してプラスの相加的効果が算出されているため, 83 日齢体重や 97 日齢体重の相加的効果にほとんど影響していない。

全分散に占める SNP の相加的効果の分散割合は, ADG において肥育前半 (26-35, 35-41, 48-55 日齢間)

で 16.4-27.2%, 体重において 30.3-39.2% (26-55 日齢) と既報 (Takahashi ら, 2019; Horinouchi ら 2019; Ishikawa ら, 2020; Rikimaru ら, 2020) に比べ高い値となった。この理由については明らかではないが, シャモおよび横斑プリマスロックの系統では, 当該 SNP の効果が顕著に現れやすい可能性がある。また, Horinouchi ら (2019) は ADG に対する A アリルの効果は飼育期間の前半で大きいと報告しており, 本研究結果はこれを追認するものである。さらに本研究では, CCKAR の g. 420C>A SNP と屠体重および, モモ肉重量との間に有意な関連性が認められた。この現象は, 出荷体重の増加に伴うものと推察される。

本試験で供試した青森シャモロックの CCKAR のアリル頻度は A で 0.6, C で 0.4 であった。青森シャモロック集団の当該遺伝子型頻度の期待値は, AA が 0.36 (=0.6²), AC が 0.48 (=2×0.6×0.4), CC が 0.16 (=0.4²) と推測される。モデル式から, 118 日齢時の各遺伝子型 (A/A, A/C, C/C) の体重はそれぞれ, A/A が 2,876 g (=2,680+98.0×2), A/C が 2,725 g (=2,680+98.0×1-53.0×1), C/C が 2,680g と推定される。したがって, 青森シャモロック集団の 118 日齢時体重は, 2,772.2 g (=0.36×2,876 + 0.48×2,725+0.16×2,680) と推定される。仮に青森シャモロック集団を A アリルに固定した場合, A/A 個体の出現頻度は 100% となり, 従来型との体重差は 103.8 g (=2,876-2,772.2) になると推定される。すなわち, 出荷時期を変えなければ, 雌の体重 (=農家の出荷収入) は 3.74% 増加すると推定される。しかしながら, 実際の生産現場で想定通りの体重増加が認められるか, さらに検討する必要がある。また, 雄においても, 同様の肥育試験を実施する必要があるが, 他のブランド地鶏の報告をみる限り, 雄雌共同じ出荷週齢で比較した時, A アリル固定 (A/A 型) 鶏は, 従来鶏よりも大きく育っていることから, 青森シャモロック雄においても同様の発育性向上効果が見込まれる。

コレシストキニン (CCK) は, 哺乳類では食欲の制御に関連する腸管ペプチドとして知られており (Gibbs ら,

1973), その受容体としては, 2種類受容体 (コレシストキニン A 受容体 (CCKAR; Sankaran ら, 1980) とコレシストキニン B 受容体 (CCKBR; Innis と Snyder, 1980)) が同定されている。哺乳類において, CCKAR は主に末梢組織や中枢神経の一部に分布し, CCKBR は主に中枢神経に分布する (Wank, 1995)。鳥類においては, CCKAR, CCKBR 共に, 哺乳類と同様の体内分布を示すことが報告されている (Okubo ら, 2007)。一方, 鳥類では生理的・正常範囲の血液中濃度において, 哺乳類と同じように CCK が満腹シグナルとして働き, 摂食を抑制するのかわからない (Ishikawa ら, 2020)。CCK オクタペプチド硫酸塩 (CCK8) をニワトリの脳室内 (Denbow と Myers, 1982), 静脈内 (Savory と Gentle, 1980), および腹腔内 (Covasa と Forbes, 1994) に投与すると, 飼料摂取量が一時的に低下することが報告されている。これらの報告は生理学的な末梢血中 CCK の 1000 倍以上濃い CCK 8 が投与されており, 生理学的な末梢血中 CCK 濃度の範囲において CCK が満腹ホルモンとして機能している確証は今のところ得られていない (Ishikawa ら, 2020)。

CCKAR の SNP が, ニワトリの発育性と有意な関連性がある理由として, これまでに 2 つの仮説が提唱されている。1 つは, ロスリン研究所の研究グループ (Dunn ら, 2013) が提唱する「食欲学説」, もう 1 つは, 農研機構と秋田県畜産試験場の研究グループが提唱する「代謝効率学説」である。

Dunn ら (2013) は, ブロイラーと白色レグホーンの違いを交雑家系を分析した結果, CCKAR 多型と発育性に有意な相関があることを報告した。彼らは, 発育が早い遺伝子型をホモで保有する個体群, 発育が遅い遺伝子型をホモで保有する個体群および, 両者をヘテロで保有する個体群の 3 群の, 視床下部における摂食行動を促進するペプチドとして知られているアグーチ関連ペプチド (agouti-related peptide, AGRP) のメッセンジャー RNA (mRNA) 発現量を比較し, 分散分析で有意差があったと報告している (3 群のうち, 発育が早い遺伝子型をホモで保有する個体群の発現量が多い)。このことは, AGRP の発現量に応じて摂食行動が発現している可能性を示唆する。また, 膵臓, 十二指腸, および大腸における CCKAR の mRNA 発現量を, 上記 3 群で比較し, 分散分析で有意差があったと報告している (3 群のうち, 発育が遅い遺伝子型をホモで保有する個体群の発現量が多い)。このことは, CCKAR の mRNA 発現量に対応した満腹刺激が求心性内蔵神経経路を介して視床下部に伝達されている可能性を示唆する。さらに, CCK8 を腹腔投与した直後から 30 分間の摂食量の減少を, 上記 3 群で

比較し, 分散分析で有意差があったと報告している (3 群のうち, 発育が遅い遺伝子型をホモで保有する個体群の減少量が多い)。すなわち, Dunn ら (2013) らは, CCKAR 多型によってニワトリの発育性に差が生ずる理由として, 視床下部における AGRP 発現量や消化器官における CCKAR 発現量を反映した摂食行動がそれぞれ誘起されているという「食欲仮説」を提唱した。但し, 1) 上記の摂食試験における腹腔への CCK8 投与量は, Covasa と Forbes (1994) を参考に設定されており, 生理学的な正常範囲をはるかに上回る量が投与された結果であること, 2) 摂食行動に起因する仮説を提唱しているにもかかわらず, 通常飼育下の飼料摂取量や飼料効率のデータが提示されていないことが指摘される。

一方, 力丸ら (2014) は CCKAR の SNP 遺伝子型が異なる比内鶏の発育を比較した結果, 4-10 週齢間の飼料摂取量は遺伝子型間に有意な差はみられなかったが, 同期間の飼料要求率は A/A 型が C/C 型に比べ有意に低いことを報告し, SNP 多型が飼料摂取量そのものに影響するのではなく, 摂取した飼料を体重増加に変換する代謝効率に関与している可能性を示唆した。さらに, Rikimaru ら (2020) は, 秋田県特産のブランド地鶏である比内地鶏 (比内鶏雄とロードアイランドレッド雌を交配して作出される一代交雑鶏) を用いて, CCKAR の g. 420C>A SNP の遺伝子型ごとに飼料摂取量および飼料要求率を比較した。その結果, 給餌から 30 分以内の飼料摂取量は A/A 型および A/C 型が, C/C 型よりも有意に多いが, 1 日あたりの飼料摂取量に有意差はないことおよび, A/A 型は他の遺伝子型に比べて 4-23 週齢間の飼料要求率が最も低いことを報告している。これらのデータから, Rikimaru ら (2020) は飼料摂取量よりも代謝効率の違いの方が発育性の違いに及ぼす影響が大きいとする「代謝効率学説」を提唱した。以上のように, CCKAR 多型がニワトリの発育性に与える要因として, Dunn ら (2013) が提唱する「食欲学説」と, Rikimaru ら (2020) が提唱する「代謝効率学説」の 2 つが存在している。しかし, なぜ CCKAR 多型がニワトリの発育性に影響を与えるのかについて, さらなる研究が必要である。

我々は, CCKAR の g. 420C>A SNP と連鎖不平衡にある他の遺伝子多型が, 発育形質に影響した可能性を否定しない。CCKAR は第 4 番染色体の遠位端 73,203,371 ~ 73,210,227 bp (ENSGALG0000030801.3, Howe ら, 2021) に座乗している。この領域には, Rikimaru ら (2011, 2012, 2013) の他にも, 発育形質に関わる QTL, ハプロタイプ, および SNP が報告されている (Dunn ら, 2013; Lyu ら, 2017)。Dunn ら (2013) は, CCKAR の 5' 上流から 3' 下流までの約 4917bp の塩基配列を決定し,

3か所の挿入／欠失部位と 33か所の SNP を検出したが、これらの DNA 変異はわずか2つのハプロタイプに集約されると報告した。一方、Rikimaru ら (2012) は、比内鶏の F₂ 交雑家系の親世代個体の *CCKAR* 塩基配列を決定した結果、5つのハプロタイプを見出し、各ハプロタイプはメンデルの遺伝様式に従って後代に受け継がれていることを確認した。これらの結果は、*CCKAR* 領域は1つのハプロタイプブロックを形成していることを示唆している。ただし、Rikimaru ら (2012) のように、同一ブロック内に複数のハプロタイプを見出した場合、どの SNP が選抜指標として有効か、迷うところである。その中で、Rikimaru ら (2012, 2013) が着目したのは、5' 非翻訳領域の Yin Yang-1 結合部位に存在する g. 420C>A SNP である。一方、Lyu ら (2017) はニューハンプシャーと白色レグホーンの交雑家系を用いて、第4染色体遠位領域の発育に関与する QTL 内の9つの SNP と発育性の関連性を調査した。その結果、連鎖不平衡にある3つの SNP (rs14490774, rs314961352, および rs318175270) を見出し、3つの SNP から構成される領域 (74,863,019 ~ 76,439,757bp) と、発育形質および筋肉量には有意な関連性があることを報告した。この領域には、*CCKAR* は含まれない。Lyu ら (2017) が調査した SNP のうち、*CCKAR* に最も近い SNP は、rs313283321 (72,687,171 bp) であるが、rs313283321 上で、LOD score が 5% 有意水準を超える体重のデータとの関連性は認められなかった。すなわち、Rikimaru ら (2012) と Dunn ら (2013) は、*CCKAR* が座乗するハプロタイプブロックと発育形質の関連性を報告し、Lyu ら (2017) は *CCKAR* の近傍に存在する他のハプロタイプブロックと発育形質の関連性を報告していると区別できる。

以上の結果から、これまで報告のあったブランド地鶏と同様に *CCKAR* の g. 420C>A SNP 多型と青森シャモロックの発育性との間には有意な関連性があり、A アリルが優良型であることが示唆された。今後は、青森シャモロックの雄でも同様の肥育試験を行った後、父系種鶏(横斑シャモ)および母系統種鶏(速羽性横斑プリマスロック)を A アリルに固定する予定である。

引用文献

- Cha RS, Zarbl H, Keohavong P, Thilly WG. Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-ras gene. *PCR Methods Appl.*, 2:14–20, 1992.
- Covasa M, Forbes JM. Effects of the CCK receptor antagonist MK-329 on food intake in broiler chickens. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 48:479–486. 1994.
- Denbow DM, Myers RD. Eating, drinking and temperature responses to intracerebroventricular cholecystokinin in the chick. *Peptides*, 3:739–743. 1982.
- Dunn IC, Hocking PM, Meddle SL, Wilson PW, Wardle C, Law AS, Bishop V, Hindar C, Robertson GW, Burt DW, Ellison SJL, Morrice DM. Decreased expression of the satiety single receptor CCKAR is responsible for increased growth and body weight during the domestication of chickens. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 304: E909–E921, 2013.
- Gibbs J, Young RC, Smith GP. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 84:488–495. 1973.
- Horinouchi S, Nakayama H, Takahashi H. Effect of a single nucleotide polymorphism in the cholecystokinin type A receptor gene on growth traits of the Miyazaki Jitokko chicken. *J. Poult. Sci.*, 56:96–100. 2019.
- Innis RB, Snyder SH. Distinct cholecystokinin receptors in brain and pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77:6917–6921. 1980.
- Ishikawa S, Asano M, Sakai K, Takahashi H. Verification of the effectiveness of an SNP maker in the cholecystokinin type A receptor gene for improving growth traits in Okumino-kojidoru chickens. *J. Poult.-Sci.*, 57:107–113, 2020.
- Howe KL, Achuthan P, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amodio MR, Armean IM, Azov AG, Bennett R, Bhai J, Billis K, Boddu S, Charkhchi M, Cummins C, Fioretto LDR, Davidson C, Dodiya K, Houdaigui BE, Fatima R, Gall A, Giron CG, Grego T, Guijarro-Clarke C, Haggerty L, Hemrom A, Hourlier T, Izuogu OG, Juettemann T, Kaikala V, Kay M, Lavidas I, Le T, Lemos D, Martinez JG, Marugán JC, Maurel T, McMahon AC, Mohanan S, Moore B, Muffato M, Oheh DN, Paraschas D, Parker A, Parton A, Prosovetskaia I, Sakthivel MP, Salam AIA, Schmitt BM, Schuilenburg H, Sheppard D, Steed E, Szpak M, Szuba M, Taylor K, Thormann A, Threadgold G, Walts B,

- Winterbottom A, Chakiachvili M, Chaubal A, Silva ND, Flint B, Frankish A, Hunt SE, IIsley GR, Langridge N, Loveland JE, Martin FJ, Mudge JM, Morales J, Perry E, Ruffier M, Tate J, Thybert D, Trevanion SJ, Cunningham F, Yates AD, Zerbino DR, Flicek P. Ensembl 2021. *Nucl. Acids Res.*, 49 (D1): D884–D891, 2021.
- Lyu S, Arends D, Nassar MK, Brockmann GA. Fine mapping of a distal chromosome 4 QTL affecting growth and muscle mass in a chicken advanced intercross line. *Anim. Genet.*, 48:295–302. 2017.
- Ohkubo T, Shamoto K, Ogino T. Structure and tissue distribution of cholecystokinin-1 receptor in chicken. *J. Poult. Sci.* 44:98–104, 2007.
- Rikimaru K, Sasaki O, Koizumi N, Suzuki K and Takahashi H. Mapping of quantitative trait loci affecting growth traits in a Japanese native chicken cross. *Asian-australas J. Anim. Sci.*, 24: 1329–1334. 2011.
- Rikimaru K, Komatsu M, Suzuki K, Uemoto Y, Takeda H, Takahashi H. Association between cholecystokinin type A receptor haplotypes and growth traits in Japanese Hinai-dori crossbred chickens. *Mol. Biol. Rep.*, 39:4479–4484. 2012.
- Rikimaru K, Takeda H, Uemoto Y, Komatsu M, Takahashi D, Suzuki K, Takahashi H. Effect of a single-nucleotide polymorphism in the cholecystokinin type A receptor gene on growth traits in the Hinai-dori chicken breed. *J. Poult. Sci.*, 50:206–211. 2013.
- 力丸宗弘, 武田尚人, 大久保武, 高橋大希, 小松恵, 高橋秀彰. コレシストキニン A 受容体遺伝子 g. 420C>A 一塩基多型は比内鶏の発育を改善する. *家禽会誌*, 51 : J43–J48. 2014.
- Rikimaru K, Sato Y, Ito Y, Fukuda S, Sasaki S, 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? *J. Poult. Sci.*, 57:99–106. 2020.
- 西藤克己, 吉田昌二. 地域特産鶏肉・鶏卵の生産技術. 1. 青森シャモロックの週齢と肉質. *東北農業研究* 45:155–156. 1992.
- 西藤克己. 地方産業活性化のための卵用鶏と肉用鶏の作出. *家禽会誌*, 48 : J14–J23. 2011.
- Sambrook J, E. F. Fritsch, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.
- Sankaran H, Goldfine ID, Deveney CW, Wong KY, Williams JA. Binding of cholecystokinin to high affinity receptors on isolated rat pancreatic acini. *J. Biol. Chem.*, 255:1849–1853. 1980.
- Savory CJ, Gentle MJ. Intravenous injections of cholecystokinin and caerulein suppress food intake in domestic fowls. *Experientia*, 36:1191–1192. 1980.
- Smith LM, Burgoyne LA. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA[®] databasing paper. *BMC Ecol.*, 4:4, 2004.
- Takahashi H, katayama M, Michishita K, Yamashita H. The A allele of the cholecystokinin type A receptor gene g. 420C>A polymorphism improves the growth traits in Amakusa Daioh Cross chicken. *J. Poult. Sci.*, 56:91–95. 2019.
- Wank SA. Cholecystokinin receptors. *Am. J. Physiol-Gastr. L.*, 269: G628–G646. 1995.

Effect of a single nucleotide polymorphism in the cholecystokinin type A receptor gene on growth traits of the Aomori Shamo-rock hens

Hiromi Kawai¹, Noriko Sato¹, Yusuke Ueda², Hideaki Takahashi^{3,4}

¹Livestock Research Institute, Aomori Prefectural Technology Research Center, Noheji, Aomori 039-3156, Japan

²Kamikita District Administration Office, Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, Aomori Prefectural Government, Towada, Aomori 034-0093, Japan

³Institute of Livestock and Grassland Science, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Tsukuba, Ibaraki 305-0901, Japan

⁴Present address, Strategic Planning Headquarters, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Tsukuba, Ibaraki 305-8517, Japan

Corresponding: Hiromi KAWAI

(Tel; +81-175-64-2231, FAX; +81-175-64-2790, E-mail; hiromi-kawai@itc.aomori-or.jp)

A significant association was reported between a single nucleotide polymorphism (SNP; AB604331, g. 420 C>A) in the cholecystokinin type A receptor gene and growth traits in some Japanese slow-growing chickens. In the present study, associations between the SNP and growth traits in the Aomori Shamo-rock hens were investigated. A total of 60 Aomori Shamo-rock hens that hatched on the same day, raised in the same chicken house, and were fed the same diets ad libitum from 0 to 118 days of age. Body weight was recorded at weekly intervals and average daily gain of each weekly interval was calculated from body weight data. Birds were sacrificed at 118 and 119 days and carcass traits were recorded. SNP genotyping was performed with the mismatch amplification mutation assay. The association between SNP and growth characteristics was analyzed using a generalized linear model. The 60 hens consisted of 22 AA, 28 CA and 10 CC genotypes. Body weight except 97 days was higher in chickens with the AA than other genotypes, also body weight at 97 days was higher chickens with the AA than the CC. Concerning average daily gain, a significant difference among the groups was observed in the intervals 26-35 days, 35-41 days, 48-55 days, 76-83 days, 90-97 days. Carcass data showed that chickens with the AA heavier carcass weight and thigh weight than other genotypes. In the estimated effects of alleles, body weight from 26 to 118 days of age in chickens with the A allele was greater than that in chickens with the C allele. It was concluded that the g. 420 C>A SNP was a good selection marker that increases the growth performance of Aomori Shamo-rock hens.

Key words: Aomori Shamo-rock chicken, cholecystokinin A receptor gene, growth traits, single-nucleotide polymorphism.