〔原著論文〕

日本ホルスタインにおいて観察された稀少な mtDNA ハプログループ P

野田 葵、川口 芙岐、笹崎 晋史、万年 英之

神戸大学大学院農学研究科, 神戸市灘区 657-8501

The rare mtDNA haplogroup P observed in Japanese Holstein cattle

Aoi NODA, Fuki KAWAGUCHI, Shinji SASAZAKI, Hideyuki MANNEN

Laboratory of Animal Breeding and Genetics, Graduate School of Agricultural Science, Kobe University,
Nada, Kobe, Japan, 657-8501

ABSTRACT

In previous study, we detected the rare mtDNA haplogroup P in Japanese Shorthorn cattle, suggesting that haplogroup P in Japanese Shorthorn may be derived from northern Japanese native cattle. In this study, we surveyed existence of the haplogroup P in other Japanese native cattle in northern area. We developed PCR-RFLP method for detecting haplogroup P, and analyzed a total of 388 individuals (Japanese Black and Japanese Holstein) in Hokkaido, Aomori and Iwate prefectures. As a result, we detected haplogroup P in two Holstein individuals in Hokkaido prefecture (2/105). These were same as previously detected haplotypes P (Japanese Shorthorn, Hanwoo, Chinese Holstein). Considering old historical documents in northern Japan and no report of haplogroup P in any modern European breeds so far, the Hokkaido Holstein would have received genetic influence from native cattle in northern Japan. Our finding suggests that native Japanese cattle in northern area would have different propagation root from northern Eurasian continent.

Key words: cattle, haplogroup P, Hokkaido prefecture, Japanese Holstein, mtDNA

要約

我々は先行研究において、日本短角種において稀少 mtDNA ハプログループ P を報告し、その起源は日本北部の在来牛に由来することを示唆した。本研究では、日本北部在来牛の影響を受けた可能性の高い品種について、ハプログループ P の調査を目的とした。そこで mtDNA ハプログループ P 個体検出を目的とした PCR-RFLP 法を開発し、日本北部のウシ品種 388 個体（黒毛和種、日本ホルスタイン）に対して調査を行った。その結果、遺伝子頻度は低いものの、北海道のホルスタイン集団 105 個体中 2 個体（0.019）でハプログループ P を検出した。この 2 個体が有する 2 つのハプロタイプは、日本短角種、韓牛、中国ホルスタインで報告されたハプログループ P 個体と同一のものであり、共通の母系起源に由来することが示された。また、欧米の純粋品種ではハプログループ P が報告されていないことや東北地方の歴史に関する記録を考慮すると、北海道のホルスタインで検出されたハプログループ P が日本北部の在来牛に由来すること、また、これら日本北部在来牛と他の在来牛は異なる遺伝的背景を持つことが示唆された。

キーワード: ウシ、ハプログループ P、北海道、日本ホルスタイン、mtDNA

連絡先：万年英之 神戸大学大学院農学研究科
神戸市灘区 657-8501
(e-mail: mannen@kobe-u.ac.jp)
2017 年 2 月 5 日受理

緒言

現代の家畜ウシは、ミトコンドリア DNA (mtDNA) を用いた母系統の解析から、起源や遺伝的多様性、遺伝的類縁関係などの詳細な調査が世界中で行われている。中でも、mtDNA・D-loop 領域は、塩基置換速度が速く変異に富むという利点から特によく用いられる。D-loop 領域の解析により、*Bos taurus* の mtDNA は T、T1~T4 の 5 つのサブハプログループに (Loftus ら、1994; Bradley ら、1996; Mannen ら、1998; Troy ら、2001; Sasazaki ら、2006)、*Bos indicus* においては I1 と I2 のサブハプログループに分類されることが明らかになった (Baig ら、2005; Lei ら、2006; Magee ら、2007)。また、近年 mtDNA 全塩基配列を用いた解析が行われ、*B. taurus* の 5 つのサブハプログループは大きくマクロハプログループ T にまとめられることが明らかとなった (Bonfiglio ら、2010; Olivieri ら、2015)。この解析から、マクロハプログループ T は T1'2'3' と T5 の大きく 2 つに分岐すること、サブハプログループ T4 は T3 から分岐したことなどが明らかとなった。さらに、mtDNA 全塩基配列を用いることで、より正確なハプログループ分岐年代の予測が可能となり、マクロハプログループ T と I の分岐年代は約 33 万年前と推定された (Achilli ら、2008)。

これら家畜ウシで代表的なハプログループ T や I の他にも、P、Q、R、C といった現代では稀少なハプログループも報告されている (Bailey ら、1996; Bollongino ら、2006; Edwards ら、2007, 2010; Achilli ら、2008, 2009; Stock ら、2009; Bonfiglio ら、2010; Olivieri ら 2015)。ハプログループ P は、家畜ウシの祖先種であるオーロックス (原牛、*Bos primigenius*) の遺骨で主に報告されている (Bailey ら、1996; Troy ら、2001; Edwards ら、2007)。一方、現代の家畜ウシでは、データベースに存在する数千個体の mtDNA 塩基配列のうち、ハプログループ P は韓国と中国の家畜ウシで 3 個体 (AY337527、DQ124389、AY998840) しか報告されておらず、極めて稀少なハプログループである。このことから、現代の家畜ウシで観察されるハプログループ P の起源は、西アジアで行われた家畜化の際に、ハプログループ P を持つオーロックスから遺伝子流入が起こったものであろうと説明されてきた (Achilli ら、2009)。

しかし、我々は先行研究において、日本短角種に対する調査を行ったところ 181 個体のうち 83 個体においてこの稀少なハプログループ P を検出した (Noda ら、2018)。日本短角種は和牛 4 品種のうちのひとつであり、日本の北海道・東北地方でのみ飼育されている肉用牛である。これまでの先行研究では、黒毛和種、褐毛和種、

無角和種などの日本のウシ品種の mtDNA は全てハプログループ T に属している (Mannen ら、1998, 2017; Troy ら、2001; Sasazaki ら、2006)。したがって、ハプログループ P を有する日本短角種は、他の日本のウシ品種とは異なる起源を持つことが示唆された。日本短角種は南部牛と呼ばれる日本北部で飼育されていた日本在来牛と外来品種であるショートホーンの交雑により造成された品種である。これまで、ショートホーンでハプログループ P は検出されていないことから、ハプログループ P の起源は南部牛を代表とする日本北部の在来牛に由来することが示唆された (Noda ら、2018)。

そこで本研究は、日本北部在来牛の影響を受けた可能性の高い他の品種について、ハプログループ P の調査を実施した。また、先行研究で報告されたハプログループ P 配列を用いた解析を行い、現在の日本のウシ品種で観察されるハプログループ P についての考察を行った。

材料および方法

供試動物

本研究では、北海道の黒毛和種 46 個体 (第 8,9 回全国和牛能力共進会出品牛、平成 15-26 年度現場後代検定牛)、岩手県の黒毛和種 123 個体 (第 8.9 回全国和牛能力共進会出品牛、平成 14-28 年度現場後代検定牛)、青森県の黒毛和種 8 個体 (第 8,9 回全国和牛能力共進会出品牛)、北海道のホルスタイン 105 個体 (家畜改良センター新冠牧場、1999 年試料収集雌個体)、岩手県のホルスタイン 106 個体 (家畜改良センター岩手牧場、2007 年試料収集雌個体) の計 388 個体の DNA サンプルを供試した。

ハプログループ P を検出する PCR-RFLP マーカーの開発

本研究では簡便にハプログループ P 個体を検出するために、PCR-RFLP 法の開発を行った。Achilli ら (2009) は、mtDNA・D-loop 領域 (410bp; bp15903-16313) に 13 のハプログループ P 特異的多型を報告している。この多型を対象とし、先行研究で行われた和牛 3 品種の D-loop 配列、黒毛和種 (Mannen ら、1998) (accession number: U87633-U87650)、褐毛和種 (Sasazaki ら、2006) (AB244486-AB244514)、無角和種 (Mannen ら、2017) (LC013966-LC013978)、日本短角種 (Noda ら、2018) (LC314237-LC314271)、および各 mtDNA ハプログループの代表配列; LC013968 (T1)、AB117049 (T2)、V00654 (T3)、LC013966 (T4)、AB268579 (I1)、AB268559 (I2)、DQ124389 (P)、HQ184036 (Q1)、HQ184030 (Q2)、

51

HQ184040 (R1)、HQ184045 (R2) を用いて比較を行い、ハプログループ T と P が明確に分かれる多型を探索した。図 1 では、代表的なハプロタイプに対する 13 変異箇所の多型を示した。

次にPCR増幅産物 5.0 μ l に、制限酵素 Nla III 0.25 μ l (5 units/ μ l) (Thermo Scientific, USA)、10 $\times$ buffer 1.5 μ l を加え合計 15 μ l の容量で制限酵素処理反応を行った (37 $^{\circ}$ C 3.5 時間)。その後、2% のアガロースゲル電気泳動を実施した (図 2)。

5'-ACAACCTAACCTCCCTAAGACTC-3' と 5'-GATTATAG AACAGGCTCCTCTA-3'である。得られた配列については、MEGA ソフトウェア 6.06 (Tamura ら、2013) を用い、ウシ mtDNA 代表配列 (V00654) と比較して変異箇所を決定した。

本研究で塩基配列決定を行ったハプログループ P を有する北海道のホルスタイン 2 個体、および現代の家畜ウシにおいてハプログループ P が報告されている 85 個体（日本短角種 83 個体；Noda ら、2018、韓牛 1 個体；DQ124389、中国ホルスタイン 1 個体；AY998840）を用いて、Median-joining (MJ) ネットワーク (NETWORK5.0; Bandelt ら、1999) を作成した。

本研究では、簡便にハプログループ P を検出する PCR-RFLP 法を開発した。データベース上の塩基配列を比較し、*Bos taurus* で観察されるハプログループ T、Q、R とハプログループ P の間で明確に分かれる変異箇所を 3 つ抽出した (bp15994、bp16049、bp16074)。この 3 変異のうち、プライマーの設計や制限酵素部位を考慮した結果、本研究では bp15994 多型を検出する PCR-RFLP マーカーを作成した。このマーカーを用いてタイピングを行った結果を図 2 に示す。

開発した PCR-RFLP 法を用い、北海道の黒毛和種 46

Figure 2 Agarose gel electrophoresis for mtDNA variation bp 15994 by PCR-RFLP. Numbers on the left column indicate the size of the DNA fragments (bp). T: haplotype T, P: haplotype P, M: Loading Quick 100bp DNA Ladder.

Figure 3 A reduced median network of 87 Bos samples with haplogroup P observed in Asian modern cattle. The network was constructed by complete D-loop sequences (bp 15792 – 363) of 87 Bos sample with haplogroup P observed in modern cattle (2 Japanese Holstein, 83 Japanese Shorthorn, 1 Hanwoo, 1 Chinese Holstein). Lines connecting sequence nodes denote substitutions. Numbers with grey color indicates substitution positions. Small grey circles represent hypothetical sequences, which have not been found in the sequencing exercise. Where the topology of the tree enforces the splitting of substitutions into separate events, these are denoted by a, b and c.

個体、岩手県の黒毛和種 123 個体、青森県の黒毛和種 8 個体、北海道のホルスタイン 105 個体、岩手県のホルスタイン 106 個体の計 388 個体に対して調査を行った結果、北海道のホルスタイン 105 個体中の 2 個体でハプログループ P が検出された。次いで、検出された 2 個体について、mtDNA・D-loop 領域 (910bp: bp15792-363) の全塩基配列決定を行った。各ハプログループを定義する多型 (Achilli ら、2009) および得られた配列を用いた NJ 系統樹 (結果は示さない) により検討したところ、この 2 個体がハプログループ P を持つことが確かめられた。これら 2 個体は異なるハプロタイプを持ち (JHS1、JHS2 とする)、それぞれ日本短角種でも報告されているハプロタイプであった (LC368257, LC368258)。

次に、現代の家畜ウシでハプログループ P として報告された配列 (北海道のホルスタイン 2 個体、日本短角種 83 個体、韓牛 1 個体、中国ホルスタイン 1 個体) を用いて MJ ネットワークを作成した (図 3)。この図から、現代の家畜ウシにおけるハプログループ P は最も高頻度 (0.425) で観察される JSH21 ハプロタイプを中心として、星状型に JSH22 ~ JSH35 の 14 個のハプロタイプが分岐する形をとることがわかる。本研究で検出した北海道のホルスタインは、この最も主要なハプロタイプである JSH21 に 1 個体、比較的高い頻度を持つ JSH23 に 1 個体が属した。また先行研究で、中国ホルスタインと韓牛で検出されたハプログループ P も、それぞれ JSH21、JSH23 に属した。

考察

日本短角種における mtDNA ハプログループ P

mtDNA ハプログループ P は、これまでヨーロッパのオーロックスの遺骨（イギリス、フランス、ドイツ、スロベニア、スロバキア、ハンガリー、ポーランド）で主に報告されてきたハプログループである（Bailey ら、1996; Troy ら、2001; Edwards ら、2007）。現代の家畜ウシにおいては非常に希少なハプログループであり、数千個体のデータベース上の塩基配列のうち、韓牛 2 個体、中国ホルスタイン 1 個体（AY337527、DQ124389、AY998840）のみで報告されている。しかし、我々は先行研究において、日本短角種でハプログループ P が高頻度で観察されることを報告した（Noda ら、2018）。

和牛 4 品種のうち日本短角種以外の 3 品種は西日本に成立起源を持ち、その後黒毛和種は全国に広がった。一方、日本短角種は東北地方北部に成立起源を持ち、現在も岩手県北部、秋田県鹿角地方、青森県東部、北海道渡島地方に分布に限られる（Takayasu、1983）。日本短角種は、明治時代初期、南部牛と呼ばれる日本北部の在来牛に対し、アメリカやヨーロッパから輸入したショートホーンを交配させて造成した経緯がある（Yamaguchi ら、2013）。これまでの mtDNA 解析では、ショートホーンではハプログループ P は検出されていないことから、日本短角種で観察されるハプログループ P は南部牛と呼ばれる日本北部在来牛に由来するものであると我々は考察した（Noda ら、2018）。

また、山田（1922）によれば、東北地方の歴史に関する文献である「南部氏旧記」には、享徳 3 年（1454）、田名部（現在の青森県むつ市）領主蛸崎蔵人が、南部氏への謀反のために韃靼、露西亞から軍馬とともに牛数百頭を輸入したとある。また、「東北太平記」では、康正年間（1455～1457）に南部氏が露西亞から牛千頭あまりを輸入したとの記録がある。山田（1922）はこれらの記録および藩政時代を通して中国・東海・北陸地方より牛を導入した史実が見られないこと、奥州和牛の体型が日本中国地方の牛と異なること、また牛をベコと称する奥州方言がロシア語の Bbikb から発しているとして、南部牛の起源を、露西亞・西利亞・蒙古・韃靼と関連があると考察している。

北海道のホルスタインにおける mtDNA ハプログループ P

これらの研究結果・記録から、我々は日本短角種で観察されたハプログループ P が南部牛に代表される日本北部在来牛に由来し、またこれら日本北部在来牛

が他の日本在来牛とは異なる遺伝的背景を有している」と推測した。したがって本研究では、日本北部における他の在来牛も mtDNA ハプログループ P を有する可能性を考え、日本北部で飼育されているウシ 388 個体（北海道のホルスタイン、岩手県のホルスタイン、北海道の黒毛和種、青森県の黒毛和種、岩手県の黒毛和種）を対象に、ハプログループ P 個体の存在を調査した。本研究では、ハプログループ P を特異的に検出する PCR-RFLP 法を開発しその調査に用いた。その結果、北海道のホルスタイン 105 個体のうち、2 個体でハプログループ P の存在を明らかにした。

これら 2 個体の塩基配列を決定したところ 2 つのハプロタイプが確認され（JHS1、JHS2）、MJ ネットワーク分析から JHS1 は JSH21、JHS2 は JSH23 とそれぞれ日本短角種で見られた主要ハプロタイプに属していた。またこれらのハプロタイプには、中国ホルスタインと韓牛個体のハプロタイプも属していた。異なる国の集団において同一のハプロタイプが観察されることは、これらが共通する母系統に由来していることを示唆している。したがって日本北部の在来牛は、山田（1922）が仮説立てているように露西亞・西利亞・蒙古・韃靼など北東アジアから伝播したウシの影響を受けていた可能性を示唆している。

また、Tsuji ら（2004）は、北海道、千葉県、兵庫県の日本ホルスタインにおいて、外国品種では観察されないアジアウシ品種に特有であるハプログループ T4 を高頻度（18.3%）で検出した。日本のホルスタインは、1889 年にアメリカとオランダから輸入されたホルスタインが最初の個体であり、その後も引き続いて輸入され育種改良がされている。現代の日本ホルスタインにおけるハプログループ T4 の存在は、輸入当初におけるホルスタインの希少さから、日本在来牛との交配が行われたことを示唆している。その後、雄牛を用いた累進交配によって育種改良が進められてきたことから、日本在来牛由来の mtDNA が現在まで残存していると考えられる。加えて、東北地方のホルスタインは南部牛との交雑がなされたとの記述も残っている（Takayasu、1983）。これらの報告と、ショートホーンやホルスタイン純粋系統ではハプログループ P が報告されていないことを考慮すると、北海道のホルスタインで検出されたハプログループ P は日本北部の在来牛に由来することが示唆される。

日本北部ウシ品種における mtDNA ハプログループ P

一方、本研究において北海道、青森県、岩手県の黒

黒毛和種ではハプログループPは観察されなかった。黒毛和種は、主に西日本で造成された品種である。そのため、東北地方の黒毛和種では、日本北部在来牛の影響が少なく、ハプログループPの個体が観察されなかったのかもしれない。一方、本研究では複数の県にまたがるホルスタインと黒毛和種の調査を実施したが、その調査個体は限定的である。したがって、今後は広範囲かつ個体数を増加した調査を行うことで、日本北部におけるウシ品種のハプログループPの存在頻度や日本北部在来牛の遺伝的影響について、より詳細な考察を進めることが出来ると考えられる。

本研究では、我国における家畜ウシにおいて世界的に稀少なmtDNAハプログループPを北海道のホルスタインで観察した。日本短角種に加えて北海道のホルスタインでもハプログループPが観察されたことは、このハプログループが日本北部の在来牛に由来することを示唆している。加えて、日本北部の在来牛は他地域とは異なる遺伝的背景を持ち、現在の日本北部のウシ品種にもその遺伝的影響が残っている可能性が示唆された。これらのmtDNAハプログループPを有する品種・集団は、大きく分岐しているハプログループP系統に由来する核ゲノムも有している可能性がある。このことは多様性に富むゲノム保持の観点から興味深い。今後は核ゲノムのSNP解析などによる分析が重要であると考えられる。

謝辞

本研究の血液・組織・DNA試料は、公益社団法人全国和牛登録協会および家畜改良センターから提供を頂きました。ここに深謝の意を表します。

引用文献

Achilli A, Olivieri A, Pellecchia M, Ubaldi C, Colli L, Al-Zahery N, Accetturo M, Pala M, Hooshar Kashani B, Perego UA, Battaglia V, Fornarino S, Kalamati J, Houshmand M, Negrini R, Semino O, Richards M, Macaulay V, Ferretti L, Bandelt HJ, Ajmone-Marsan P, Torroni A. 2008. Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle. *Current Biology*, 18: R157-158.

Achilli A, Bonfiglio S, Olivieri A, Malusà A, Pala M, Hooshar Kashani B, Perego UA, Ajmone Marsan P, Liotta L, Semino O, Bandelt HJ, Ferretti L, Torroni A. 2009. The multifaceted origin of taurine cattle reflected by the mitochondrial genome. *PLoS One*, 4: e5753.

Baig M, Beja Pereira A, Mohammad R, Kulkarni K, Farah S, Luikart G. 2005. Phylogeography and origin of Indian domestic cattle. *Current Science*, 89: 38-40.

Bailey JF, Richards MB, Macaulay VA, Colson IB, James IT, Bradley DG, Hedges RE, Sykes BC. 1996. Ancient DNA suggests a recent expansion of European cattle from a diverse wild progenitor species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 263: 1467-1473.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.

Bollongino R, Edwards CJ, Alt KW, Burger J, Bradley DG. 2006. Early history of European domestic cattle as revealed by ancient DNA. *Biology Letters*, 2: 155-159.

Bonfiglio S, Achilli A, Olivieri A, Negrini R, Colli L, Liotta L, Ajmone-Marsan P, Torroni A, Ferretti L. 2010. The enigmatic origin of bovine mtDNA haplogroup R: sporadic interbreeding or an independent event of *Bos primigenius* domestication in Italy? *PLoS One*, 5: e15760.

Bradley DG, MacHugh DE, Cunningham P, Loftus RT. 1996. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States America*, 93, 5131-5135.

Edwards CJ, Bollongino R, Scheu A, Chamberlain A, Tresset A, Vigne JD, Baird JF, Larson G, Ho SY, Heupink TH, Shapiro B, Freeman AR, Thomas MG, Arbogast RM, Arndt B, Bartosiewicz L, Benecke N, Budja M, Chaix L, Choyke AM, Coqueugniot E, Döhle HJ, Göldner H, Hartz S, Helmer D, Herzig B, Hongo H, Mashkour M, Ozdogan M, Pucher E, Roth G, Schade-Lindig S, Schmölcke U, Schulting RJ, Stephan E, Uerpmann HP, Vörös I, Voytek B, Bradley DG, Burger J. 2007. Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274: 1377-1385.

Edwards CJ, Magee DA, Park SD, McGettigan PA, Lohan AJ, Murphy A, Finlay EK, Shapiro B, Chamberlain AT, Richards MB, Bradley DG, Loftus BJ, MacHugh DE. 2010. A complete mitochondrial genome sequence from a mesolithic wild aurochs (*Bos primigenius*). *PLoS*

- One, 5: e9255.
- Lei CZ, Chen H, Zhang HC, Cai X, Liu RY, Luo LY, Wang CF, Zhang W, Ge QL, Zhang RF, Lan XY, Sun WB. 2006. Origin and phylogeographical structure of Chinese cattle. *Animal Genetics*, 37: 579-582.
- Lin BZ, Kato T, Kaneda M, Matsumoto H, Sasazaki S, Mannen H. 2013. Genetic diversity and structure in Asian native goat analyzed by newly developed SNP markers. *Animal Science Journal*. 84: 579-584.
- Loftus RT, MacHugh DE, Bradley DG, Sharp PM, Cunningham P. 1994. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America*, 91: 2757-2761.
- Magee DA, Mannen H, Bradley DG. 2007. Duality in *Bos indicus* mtDNA diversity: Support for geographical complexity in zebu domestication. In: *The Evolution and History of Human Populations in South Asia*. 385-391. Springer. The Netherlands.
- Mannen H, Tsuji S, Loftus RT, Bradley DG. 1998. Mitochondrial DNA variation and Evolution of Japanese Black cattle (*Bos taurus*). *Genetics*, 150: 1169-1174.
- Mannen H, Kohno M, Nagata Y, Tsuji S, Bradley DG, Yeo JS, Nyamsamba D, Zagdsuren Y, Yokohama M, Nomura K, Amano T. 2004. Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32: 539-544.
- Mannen H, Yonesaka R, Noda A, Shimogiri T, Oshima I, Katahira K, Kanemaki M, Kunieda T, Inayoshi Y, Mukai F, Sasazaki S. 2017. Low mitochondrial DNA diversity of Japanese Polled and Kuchinoshima feral cattle. *Animal Science Journal*, 88: 739-744.
- Noda A, Yonesaka R, Sasazaki S, Mannen H. 2018. The mtDNA haplogroup P of modern Asian cattle: A genetic legacy of Asian aurochs? *PLoS ONE*, 13: e0190937
- Olivieri A, Gandini F, Achilli A, Fichera A, Rizzi E, Bonfiglio S, Battaglia V, Brandini S, De Gaetano A, El-Beltagi A, Lancioni H, Agha S, Semino O, Ferretti L, Torroni A. 2015. Mitogenomes from Egyptian Cattle Breeds: New Clues on the Origin of Haplogroup Q and the Early Spread of *Bos taurus* from the Near East. *PLoS One*, 10: e0141170.
- Sasazaki S, Odahara S, Hirua C, Mannen H. 2006. Mitochondrial DNA variation and genetic relationship in Japanese and Korean cattle. *Asia-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19: 1394-1398.
- Stock F, Edwards CJ, Bollongino R, Finlay EK, Burger J, Bradley DG. 2009. Cytochrome b sequences of ancient cattle and wild ox support phylogenetic complexity in the ancient and modern bovine populations. *Animal Genetics*, 40: 694-700.
- Takayasu I. 1983. Study of establishment and improvement in Japanese Shorthorn. Report in Faculty of Agriculture, Hirosaki University, 40: 37-108
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: 2013. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Troy CS, Machugh D, Balley JF, Magee DA, Loftus RT, Cunningham P, Chamberlain AT, Sykes BC, Bradley DG. 2001. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature*, 410: 1088-1091.
- Tsuji S, Mannen H, Mukai F, Shoji M, Oyama K, Kojima T, Kano C, Kinoshita Y, Yamaguchi E. 2004. Trace of native cattle in Japanese Holstein assessed by mitochondrial DNA sequence polymorphism. *Journal of Dairy Science*, 87: 3071-3075.
- 山田嘉平. 1922. 岩手県の産牛, 岩手県内務部 1974 年復刻, 岩手県畜産会.
- Yamaguchi M, Ikeda K, Takenouchi N, Higashiyama M, Watanabe A. 2013. Maternal effects of Japanese Shorthorn cows on the Growth of Embryo-transferred Japanese Black Calves in a Cow-calf Grazing System. *Asian- Australasian Journal of Animal Science*, 26: 930-934.