見島牛母系のミトコンドリア DNA の D-loop 多型解析による遺伝的多様性

師 嘉・細井栄嗣・原田佳典¹・三宅俊三²・
阪田昭次³・篠田稔彦⁴・小澤 忍

山口大学農学部, 山口市 753-8515

¹ 全国農業組合連合会, 山口県小郡町 754-0002

² 山口県農林部, 山口市 752-8501

³ 山口県中部農林事務所, 山口市 754-0897

⁴ 山口県畜産試験場, 美祢市 759-2221

(2001. 11. 28 受付, 2002. 1. 21 受理)

要 約 1995 年, 見島に飼育されていた雌牛頭数は 89 頭で, これらは 6 つの母系に分類された. 6 系統のうち 5 系統から各 2 頭ずつ選び, ミトコンドリア DNA の D-loop 領域における塩基配列を調べた結果, その変異から見島牛母系は 2 つのハプロタイプに分類された. すなわち, よしまき系, かめきち系, たかただ系の 3 系統は M1 に, みまつ系, しらうめ系の 2 系統は M2 に分類された. このように見島牛母系 5 系統は 2 つの遺伝子型に集約され, 遺伝的多様性はきわめて小さいことが明らかになった. M2 に分類された母系の遺伝子頻度は, 見島牛雌牛全体の 14.6% を占めるに過ぎず, 早急の保護対策が必要であると思われる.

日本畜産学会報, 73 (2) : 261-264, 2002

見島牛は山口県萩市沖見島で飼養されており, 明治時代に外国種との交雑を免れ, 純粋和種の遺伝子が保存されているとして 1928 年に天然記念物に指定された. 見島牛は外貌, 体型とも未改良品種の特徴を有し, 最近の調査 (原田ら 1998) では, 見島牛成雌牛の平均体重は 266 kg, 体高は 109.8 cm で, かつての調査 (本橋 1930, (財)名古屋畜産研究所編 1964) に比べさらに小格化していた. また, 見島牛の平均分娩間隔も 18 ヶ月と長く, 繁殖成績は著しく低下していた. さらに, 現有繁殖雌牛の月齢も 94 ヶ月齢と老齢化も進んでいた. 一方, 表 1 に示すように見島牛の飼育頭数および飼育農家数も減少の一途をたどり, 試料を収集した 1995 年には, 見島には子牛を含む雄雌合わせて約 104 頭の見島牛が飼育されていただけであった. 表 2 に見島牛母系の概要と現在飼養されている雌牛の頭数, および飼育農家数を示した. 母系は 6 系統を残すのみであり, そのうち 4 系統は 10 頭以下に減少しており, 1 母系についてはわずか 1 頭だけ残されているに過ぎない. このように, 見島牛の保存とくに残り少ない母系の保存が急務となっている. そのために

は, 見島牛母系の遺伝子の多様性と母系間の遺伝子構造を明らかにし, これに基づいた計画交配を進めることが必要である. また, 純粋和種である見島牛母系の遺伝子解明は, 現今の和牛に起源を明らかにする上で, 貴重な資料になるものと期待される.

本研究は, ミトコンドリア DNA (mtDNA) のなかでもとくに変異の多い Displacement loop (D-loop) 領域の塩基配列を分析することにより, 見島牛母系の遺伝的多様性を明らかにして, 今後の見島牛の遺伝子保存対策に資するために行った.

材料および方法

供試動物と DNA の調整:

表 2 に示した母系 6 系統のうち, みたろう系を除く 5 系統から 2 頭ずつ計 10 頭を供試した. 供試牛の頸静脈から血液を採取し, 白血球を分離した後 Lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 100 ug/ml proteinase K) で溶解し, フェノールおよびクロホルム抽出した後, エタノール沈殿法を用いて

連絡者: 小澤 忍 (fax : 083-933-5820, e-mail : ozawa@agr.yamaguchi-u.ac.jp)

DNA を精製した (Lindberg ら 1992, 浅野ら 1999)。

PCR (Polymerase chain reaction) 法による DNA の増幅と塩基配列の決定:

PCR 法による増幅は, ウシの mtDNA の D-loop 領域の 15,770 から 373 の全領域 (Anderson ら 1982) を対象とした。プライマーは既報の論文にあるもののうち, 3 種類を選出し, 便宜上以下のように名付けて使用した。

BovL1 (5'-AGTCTCACCATCAACCCCCAAAGCTGAAG-3') (春海ら 1994)

BovL2 (5'-CCATGCATATAAGCAAGTACATGAC-3') (武田ら 1997)

Table 1. Number of all the Mishima cattle including bulls and calves and their rearing farmers

Year	Number of animals	Number of rearing farmers
1955	559	No data available
1960	315	214
1965	164	155
1970	59	56
1975	31	25
1980	36	17
1985	45	14
1990	71	13
1995	104	7
2000	100	7

BovH1 (5'-GCATTTTCAGTGCCTTGCTTTGGG-TTAAGC-3') (Ron ら 1993)

PCR は反応液を 50 μ l として行い, テンプレート (試料 DNA) 225 ng, プライマー各 25 pmol, dNTP mix 200 μ M, 1 $\times$ PCR buffer, AmpliTaq Gold 1 ユニットとした。反応は, Gene Amp PCR System 2400 ((株)アプライドバイオシステムズジャパン, 東京 (以下 AB 社)) を用い, 以下のプログラムで行った。すなわち 93 $^{\circ}$ C で 2 分, 62 $^{\circ}$ C で 30 秒, 72 $^{\circ}$ C で 2 分を 1 サイクルとして 40 回繰り返した後, 72 $^{\circ}$ C で 2 分間最終の伸長反応をさせた。PCR 終了後, 2% アガロースゲル電気泳動で PCR 産物の有無およびその大きさを確認した後, ((株)アマシャムバイオサイエンス, 東京) の Micio Spin S-400HR Columns を用いて, PCR 産物を精製した。この PCR 産物をシーケンス用テンプレートとして用いた。シーケンス用のプライマーには PCR と同じものを用いた。シーケンス反応は Bigdye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (AB 社) により行い, DNA 蛍光式自動シーケンサー 377 (AB 社) で塩基配列を決定した。

結果および考察

結果の概要を表 3 に示した。供試牛から得られた D-loop 領域の塩基配列を, Anderson ら (1982) によるヨーロッパ牛の塩基配列を基準にして比較した結果, 6 カ所の変異が認められたが, ハプロタイプとしてはわずか 2 タイプしか存在しないことが明らかになった。同じ母系統の 2 頭間には変異が見られなかった。これら 2 つのハプロタイプを母系ごとに分類すると, よしまき系統, か

Table 2. Maternal lines of Mishima cattle, number of cows in 1995 and 2000, and their rearing farmers

Maternal line	Number of cows in 1995	Number of cows in 2000	Name of Rearing farmers and number of cows they owned in 2000 ^a
Yoshimaki	50	49	Hironaka (10), Kochi (9), Sebata (15), Tada (11), Yamada (1), Yamane (3)
Kamekichi	21	14	Hikiji (12), Sebata (1), Yamane (1)
Mimatsu	8	4	Tada (1), Yamada (3)
Shiraume	5	4	Yamane (4)
Takatada	4	3	Tada (3)
Mitarou ^b	1	1	Yamada (1)
Total	89	75	

^a Number of cows in parentheses.

^b No analysis was made in the present study.

Table 3. Substitution sites and polymorphic events detected in the D-loop region of Mishima cattle

Substitution sites in D-loop ^a	Haplotype	
	M1	M2
16042 (T)	C	T
16050 (C)	C	T
16093 (G)	A	G
16255 (T)	T	C
16302 (G)	A	G
169 (A)	G	G
Maternal line	Yoshimaki Kamekichi Takatada	Mimatsu Shiraume
Frequency (%) ^b	84.3	14.6

^a Sites are numbered according to the nucleotide sequence in Anderson *et al.* (1982). 16042 (T) indicates that the sequence in Anderson *et al.* (1982) had T on bp 16,042.

^b Calculated based on the number of cows in 1995 in Table 2.

めきち系統およびたかただ系統は M1 に、みまつ系統としらうめ系統は M2 に分類された。このことから、見島牛母系の遺伝子多様性は非常に小さいことが示された。

これらのハプロタイプは現在の黒毛和種にも見られ、Mannen ら (1998) との比較によれば、M1 は 211 頭の黒毛和種の内、49.14% を占めた BIUY と、M2 は 3.45% を占めた CRY と、それぞれ同じハプロタイプであることが明らかになった。すでに Mannen ら (1998) によって、黒毛和種の mtDNA は非常に変異に富むことが明らかにされている。本研究では、さらに純粋和種である見島牛の mtDNA の D-loop 領域におけるハプロタイプが示され、和牛の起源を解明する上で重要な知見になるものと思われる。

見島牛の母系の系譜を、牛籍台帳に基づき 5 代祖以上さかのぼって整理されたのはごく最近のことである (原田ら 1998)。したがって、現有のよしまき系統、かめきち系統、たかただ系統は、さらに系譜をさかのぼれば、同じ母系 (M1) に由来するものと推察された。同様にみまつ系統としらうめ系統も同じ母系 (M2) であった可能性がある。とくに、M2 は現存牛の 14.6% を占めるにすぎず、今後この系統を重点的に保存する必要がある。

見島牛の遺伝的多様性が非常に小さかった理由の第一は、明治時代の半ばに出雲地方から種雄牛が導入された

歴史的な経緯はある (岸 1981) もの、雌牛に関しては島外からの母牛を導入した形跡がなく、昔から小さな閉鎖集団で飼育されてきた (芝田 1969) ことがあげられる。第二の理由は、表 1 に示すように、過去における見島牛の頭数の激減にあると考えられる。見島牛は天然記念物に指定された当時は 422 頭飼養されており、1955 年には 559 頭に達した。しかし、1960 年代に入り耕耘機や化学肥料の急速な普及によって、見島牛の農耕用、厩肥生産用としての役割は終わったため頭数が急減し、1973 年から 1977 年にかけて 31 頭にまで減少し、一時絶滅の危機を迎えた。この間に見島牛の多くの母系が消滅したことが考えられる。第三の理由には、飼養農家数の減少があげられよう。現在、見島牛飼育農家は 7 戸だけであるが、かつては 200 戸以上の農家で飼われていた。見島牛の母系は、現在でも飼育農家により大きな偏りを示しており (表 2)、かつても農家により特有の母系が維持されてきたものと考えられる。このように、見島牛の飼育農家が減少したことが母系の消滅につながった大きな要因であったと考えられる。

見島牛集団において、移入時には母系が二系統だけ存在し、それが後世代で新たな母系として分派したのか、あるいは当初から多くの母系が移入されたのかは不明である。しかし、表 1 に示すように、見島牛の飼育状況の変遷を考慮すれば、かつては多くの母系が存在したと考えるのが妥当であろう。今後見島牛の遺伝的多様性を維持していくためには、見島牛を活用した産業振興を図ることにより頭数を確保しながら、計画交配を進める必要がある。

謝 辞

本研究を実施するに当たり、供試材料を提供していただいた見島牛保存会の多田健介会長をはじめ会員の皆様に厚く感謝致します。

文 献

- Anderson S, deBruijn MHL, Coulson AR, Eperon IC, Sanger F, Yong IG. 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology*, 156 : 683-717.
- 浅野由美・上北尚正・河西恭子・遠藤秀紀・山田 格・佐分作久良・山内啓太郎・東条英昭・名取正彦・館 隣. 1999. 哺乳類の毛皮標本から DNA 抽出並びに機能遺伝子の回収に関する研究. *Animal Science Journal*, 70 : J351-J362.
- 原田佳典・小澤 忍・細井栄嗣・福倉一宏・石川 豊・坂田昭次・秋友一郎・篠田稔彦. 1998. 見島牛の性能調査 (1). 山口県畜産試験場研究報告, 14 : 43-58.
- 春海 隆・古川 力・栗田 崇・熊田光洋・安江 博. 1994.

- PCR-SSCP 法による牛ミトコンドリア D ループ領域の多型解析. 日本畜産学会報, 65 : 149-151.
- 岸 浩. 1981. 天然記念物見島牛の起源に関する研究 (III). 獣医畜産新報, 725 : 731-743.
- Lindberg GL, Koehler CM, Mayfield JE, Myers AM, Beitz DC. 1992. Recovery of mitochondrial DNA from blood leukocytes using detergent lysis. *Biochemical Genetics*, 30 : 27-33.
- Mannen H, Kojima T, Oyama K, Mukai F, Ishida T, Tsuji S. 1998. Effect of mitochondrial DNA variation on carcass traits of Japanese Black Cattle. *Journal of Animal Science*, 76 : 36-41.
- 本橋平一郎. 1930. 純粋和牛見島種二関する研究. 第一報 見島ノ産牛. 鳥取農学会報, 2-1 : 83-122.
- (財)名古屋畜産研究所編. 1964. 日本在来家畜調査団報告書. II 見島牛の調査. 60-78.
- Ron M, Yoffe O, Weller JL. 1993. Sequence variation in D-loop mtDNA of cow lineages selected for high and low maternal effects on milk production. *Animal Genetics*, 24 : 183-186.
- 芝田清吾. 1969. 日本古代家畜史の研究. 276-283. 学術書出版会. 東京.
- 武田久美子・大西 彰・高橋清也・小島敏也・花田博文. 1997. 黒毛和種・褐毛和種・ホルスタイン種における牛ミトコンドリア DNA・D-loop 領域内変異. 日本畜産学会報, 68 : 1161-1165.

Genetic Variants of Mishima Cattle Based on Analysis of Mitochondrial DNA D-loop Region

Jia SHI, Eiji HOSOI, Yoshinori HARADA¹, Shunzoh MIYAKE², Shoji SAKATA³,
Toshihiko SHINODA⁴ and Shinobu OZAWA

Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi-shi, 753-8515, Japan

¹ Zenkoku Nougyoukumiai Renngoukai, Yamaguchi-ken, Ogori-machi 754-0002, Japan

² Yamaguchi Prefectural Agriculture and Forestry Department, Yamaguchi-shi 753-8501, Japan

³ Yamaguchi Central Agriculture and Forestry Office, Yamaguchi-shi 754-0897, Japan

⁴ Yamaguchi Prefectural Livestock Research Institute, Mine-shi 759-2221, Japan

Corresponding : Shinobu OZAWA (Fax : +81 (0) 83-933-5820, e-mail : ozawa@agr.yamaguchi-u.ac.jp)

Eighty-nine females of Mishima cattle reared in Mishima Island in 1995 were divided into 6 groups according to maternal lines. In the present study, 2 animals each from 5 lines out of 6 were selected for analysis of the D-loop region of mitochondrial DNA. According to the variants obtained from the analysis, Mishima cattle was assigned into 2 maternal lineages. Maternal lines Takatada, Kamekichi and Yoshimaki were classified as haplotype M1, and Mimatsu and Shiraume were classified as haplotype M2. Thus, 5 maternal lines of Mishima cattle were categorized into 2 lineages, which means that the genetic diversity of Mishima cattle is quite low. The frequency of M2 was only 14.6% of all the Mishima cattle in Mishima Island in 1995. It is particularly necessary to take measures to conserve haplotype M2 immediately.

Nihon Chikusan Gakkaiho, 73 (2) : 261-264, 2002

Key words : Mitochondrial DNA, D-loop region, Mishima cattle