黒毛和種集団におけるミトコンドリア DNA の多様性

万年英之・川崎純一・石田孝史¹・向井文雄・辻 荘一

神戸大学農学部, 神戸市灘区 657-8501

¹ 宮崎大学農学部, 宮崎市 889-2192

(2000. 5. 8 受付, 2000. 7. 11 受理)

要 約 これまでの研究で黒毛和種集団の mtDNA タイプは大きく, ヨーロッパ品種に極めて高頻度で分布するタイプ (ヨーロッパタイプ) と黒毛和種にのみ観察されるタイプが存在することが明らかにされている. 本研究では黒毛和種生産の主要 3 地域における繁殖集団の mtDNA D-loop 領域について多型解析を行い, mtDNA タイプの遺伝子頻度を調査した. また, 分析には PCR-SSCP 法を適用し, その有用性についても検討した. 3 生産地域の繁殖集団の分析からヨーロッパタイプの mtDNA を持つ個体の頻度が地域間で大きく異なっていることが示された. この理由として, 繁殖集団の成立過程や創始者効果, 瓶首効果, 明治時代以降に実施された外来種との交配などが影響している可能性が示唆された. また, mtDNA D-loop 領域に対する PCR-SSCP 法の適用は, 多くのハプロタイプを簡便に識別することが可能であり, 有用な方法であることが示された.

日本畜産学会報, 71 (10) : J470-J474, 2000

黒毛和種は日本を代表する肉用種であり, その肉質の高さは国内外から高い評価を受けている. 和牛の祖先は約 2 千年前, 弥生時代に朝鮮半島を経て日本に渡来したとされている^{6,7)}. また, 明治時代には外来品種が再輸入され, 和牛と交配されたという事実もある. しかしながら, DNA 多型から見た和牛の集団遺伝構造は良く知られておらず, どの程度外来種の遺伝的影響が残っているのかも明らかではない. 正確な和牛の集団遺伝構造を明らかにすることは, 系統進化の見地のみならず, 和牛の遺伝的改良を行う際の重要な情報となり得る.

近年になって, 品種や系統の分析にミトコンドリア DNA (mtDNA) がよく用いられるようになった. この理由としては, ゲノム DNA と比べて変異に富むこと, DNA 間の相同組換えを起こさず母性遺伝すること, このためその進化過程がシンプルであること, 1 細胞あたりの DNA コピー数が多いため分析が容易であることなどがあげられる. ウシにおいても mtDNA, とくにその中でも変異に富むことが知られている displacement loop (D-loop) 領域を用いた分析がいくつか報告されている²⁻⁵⁾.

われわれは以前の研究で, 黒毛和種と世界のウシとの遺伝的類縁関係³⁾, また黒毛和種の産肉形質との関係を調べる目的⁴⁾で, 数多くの黒毛和種個体の mtDNA

D-loop 領域の全塩基配列を決定した. その結果, 黒毛和種は非常に変異に富む mtDNA ハプロタイプを有する集団であることが明らかとなった. しかしながら, これらのサンプルは全国からランダムに集められたものであり, 地域ごとにおける集団の特色を示すものではなかった. そこで本研究では, 日本の 3 地域における黒毛和種繁殖集団に対して mtDNA の多型分析を行いその遺伝的構造を調査した. また分析を簡便化するため, Single-strand conformation polymorphism (SSCP) 法を適用し, その有用性についても検討した.

材料および方法

1. 供試動物

岩手県, 兵庫県, 宮崎県において飼育されている繁殖雌牛の尾部より採毛を行った. その頭数は岩手県で 174 頭, 兵庫県で 123 頭および宮崎県で 206 頭である. 兵庫県と宮崎県ではランダムサンプリングを行ったが, 岩手県では血統的に鳥取母系の影響が濃い地域を選択し, サンプリングを行った.

2. PCR-SSCP 分析

PCR-SSCP 分析のプライマーには, ウシ mtDNA D-loop 領域の 15,916 bp から 16,160 bp の最も変異の高い部位 (245 bp) を対象とした. これら番号は Anderson

連絡者: 万年英之 (fax : 078-803-5803, e-mail : mannen@kobe-u.ac.jp)

らによって決定されたウシ mtDNA の塩基配列番号に基づいた¹⁾。そのプライマーの塩基配列は 5' AACACG-CCCATACACAGACCA3' および 5' AGCTCGTGAT-CTAATGGTAAGGA3' である。これら両プライマーは γ -[³²P] ATP (6000 Ci/mmol) を用いて 5' 末端標識した。採取した体毛は根端部より約 0.5 cm の長さに切り取り、0.5 ml のチューブに入れた。市販の電子レンジを用い、5 分間マイクロ波を照射した後、2.7 μ l の滅菌水を加えた。プライマーは各 5 pmol, 10 $\times$ PCR buffer を 0.5 μ l, dNTP Mixture (2.5 mM each) を 0.4 μ l, Taq DNA polymerase (5 unit/ μ l, Boehringer Mannheim) を 0.1 μ l 加え、合計 5 μ l とした。PCR 反応は、94 $^{\circ}$ C で 1 分間の熱変性後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、66 $^{\circ}$ C で 30 秒間、72 $^{\circ}$ C で 1 分間の条件で 22 サイクル実施した後、72 $^{\circ}$ C で 4 分間の伸長反応を行った。この反応液にホルムアミド色素溶液 (95% formamide 10 ml, 10 mM EDTA, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol) を 245 μ l 加えて 94 $^{\circ}$ C で 5 分間熱変成し、電気泳動に用いた。電気泳動には、非変性ポリアクリルアミドゲルを用い、恒温式電気泳動装置ジェノケンサー SSCP (ATTO AE-6160 型) を使用し、15 $^{\circ}$ C、40 W で 4 時間電気泳動した。

3. 塩基配列の決定

また、PCR-SSCP 法で識別できなかったハプロタイプを有するサンプルについては、Mannen ら⁵⁾の方法に従い塩基配列を決定した。

4. 統計処理

mtDNA タイプの遺伝子頻度に対する全国平均と各集団間の有意差検定には χ^2 検定を適用した。

結果および考察

以前の研究で、約 200 頭の黒毛和種について D-loop 領域の変異を調べたところ、25 カ所の突然変異を認め、これらの変異から 26 のハプロタイプの存在が示された⁴⁾。これらの塩基配列に基づき系統樹を作成したところ、これらのハプロタイプは大きく 5 つのタイプに区分できた。この分類に影響している D-loop の塩基配列は、16,042~16,122 bp の領域であった⁴⁾。したがって、ここではこの範囲をカバーする 15,916~16,160 bp の領域を増幅するように PCR プライマーを設計した。この領域ではこれまでに、14 カ所の突然変異に基づく 18 ハプロタイプが観察されている。この突然変異の箇所を表 1 に示し、これに基づくハプロタイプと以前の研究で分類された mtDNA タイプを表 2 に示す。

まず、D-loop 領域の塩基配列が既知であるサンプルを用い、上記 18 ハプロタイプに対する PCR-SSCP 法の検

Table 1. Sites and types of variants detected in D-loop region of Japanese Black cattle

Location of variant and polymorphic event ¹	Notation of polymorphism	Location of variant and polymorphic event	Notation of polymorphism
G16022A ²	a	G16086A ²	j
T16042C	b	A16088G	k
C16050T	c	G16093A	l
C16052T	d	C16104T	m
T16055C	e	T16112C	n
G16057C	f	T16116C	o
C16058T	g	T16119C	p
A16073G ²	h	G16121A ²	q
C16084T	i	T16122C	r

¹ Sites are numbered according to Anderson *et al.* (1982)¹⁾. T16019C indicates T $\rightarrow$ C transition mutation on bp 16019. A = adenine; C = cytosine; G = guanine; T = thymine.

² These are new variants found in this study.

Table 2. Definition of mitochondria displacement loop haplotypes and mitochondrial DNA types classified

Haplotype ¹	mtDNA Type ²	Haplotype	mtDNA Type
abl ³	type 1	gp ³	type 4
bcl ³	type 1	ip	type 4
bgl ³	type 1	mp	type 4
bfl	type 1	p	type 4
bl	type 1	br	type 5
blo	type 1	c	type 5
blr	type 1	df	type 5
lm	type 2	f	type 5
l	type 2	hr ³	type 5
eg	type 3	jq ³	type 5
egk	type 3	r	type 5
enr	type 3	No variantion	type 5

¹ Haplotypes are shown by notations defined in Table 1.

² mtDNA types are defined by Mannen *et al.* (1998)⁴⁾.

³ These are new haplotypes found in this study.

討を行った。図 1 はその PCR-SSCP 電気泳動図である。18 ハプロタイプの内、12 ハプロタイプは特異的な電気泳動像を示し、その区分がそれぞれ可能であった。No. 4 の r 型と No. 5 の突然変異を持たない型、No. 6 の mp 型と No. 7 の p 型、No. 8 の lm 型と No. 9 の l 型は同一

Fig. 1. PCR-SSCP analysis of mitochondrial DNA D-loop region in Japanese Black cattle. 1 : eg, 2 : enr, 3 : egk, 4 : r, 5 : No variation, 6 : mp, 7 : p, 8 : lm, 9 : l, 10 : ip, 11 : f, 12 : br, 13 : c, 14 : df, 15 : bfl, 16 : blr, 17 : bl, 18 : blo. These notations for mtDNA haplotypes are defined in Table 2.

のバンドパターンを示すため識別できなかった。しかし同一の泳動パターンを示すハプロタイプは塩基配列が類似し、同じ mtDNA タイプに属するためタイプの分類に関して問題はなかった（表 1）。これらの結果は、本研究で開発した PCR-SSCP 分析法が mtDNA D-loop 領域のタイピングに有効であることを示している。

次にこの PCR-SSCP 法を用いて、3 県から収集された合計 503 頭の黒毛和種の毛根試料を分析した。このうち 497 個体では表 2 に基づく mtDNA タイプの識別が可能であったが、残り 6 個体では新しいバンドパターンが観察された。そこでこの 6 サンプルについては、塩基配列の決定を行った。その結果、既知の突然変異に基づく新しいハプロタイプや新しい突然変異が認められた。この新しい突然変異およびハプロタイプはそれぞれ表 1 と表 2 に表記し、その塩基配列は DNA データバンク DDBJ に登録した（Accession number : AB04487-AB044592）。このうち、abl 型、bcl 型および bfl 型のハプロタイプは mtDNA タイプの Type 1 に、gp 型は Type 4 に、hr 型と jq 型は Type 5 に分類した。この分類の判断は以前の報告に基づき⁴⁾、Type 1 は突然変異 b と 1（bp 16,042, bp 16,093）を持ち、Type 2 は 1（bp 16,093）、Type 3 は e（bp

16,055）、Type 4 は p（bp 16, 119）、Type 5 はそれ以外の突然変異を持つことから判断した（表 2）。したがって本研究では合計 18 の突然変異に基づく、24 のハプロタイプが区分されたことになる。

合計 503 頭の黒毛和種における mtDNA タイプの分析結果を表 3 に示した。また、すでに報告した全国よりランダムに試料収集した合計 211 頭から得た結果についても示した⁴⁾。この結果はおおよそ全国における遺伝子頻度の平均値を示していると考えられる。表 3 に示す 5 つの mtDNA タイプのうち、Type 1 は現在のところ黒毛和種でのみ観察されるタイプ（黒毛和種タイプ）、Type 3～5 はヨーロッパ品種に極めて高頻度で観察されるものに類似したタイプ（ヨーロッパタイプ）、Type 2 は遺伝的にその中間に位置するタイプである^{4,5)}。これら mtDNA タイプの頻度について検討してみると、Type 1～3 の頻度はいずれの県間においても大差はない。しかし、Type 4 と 5 ではその頻度に大きな差が認められた。全国平均の結果と比較すると、宮崎県では同様の頻度を示したのに対し、岩手県と兵庫県ではその頻度が逆転していた。ただし、いずれの県においても Type 4 と 5 の合計頻度は類似していた。とくに兵庫県では Type 4 が

Table 3. Frequencies of mtDNA types of three Japanese Black cattle populations and random sampling in Japan

mtDNA Type ¹	Populations			
	Iwate	Hyogo	Miyazaki	JB Sample ²
1	63.2	61.8	64.4	61.6
2	2.9	4.1	2.9	3.8
3	0.6	0.8	1.0	1.9
4	18.4*	23.6**	10.7	12.8
5	14.9	9.8*	20.9	19.9

¹ mtDNA types are defined by Mannen *et al.* (1998)⁴⁾.

² JB Sample : These samples were collected from all over Japan. Details are described in previous study⁴⁾.

* and ** indicate statistically significant differences (* : $P < 0.05$ and ** : $P < 0.01$) between JB sample and each population.

23.6%と全国平均の約2倍の頻度を示した ($P < 0.01$). これらの結果, 黒毛和種の mtDNA タイプの頻度は, Type 4 と 5 で地域差が存在することが明らかとなった. この原因としてはいくつかの理由が考えられる.

第1に県単位の繁殖集団の成立過程の影響である. 例えば宮崎県の mtDNA の頻度分布は全国平均に近い (表3). これは宮崎県の繁殖集団は日本の様々な地域から繁殖雌牛が導入されており, これが mtDNA タイプの頻度を平均化している原因であろう. 一方, 兵庫県では繁殖雌牛の導入はほとんど行われておらず, したがって兵庫県の mtDNA 頻度は最近に至るまで大きく変化していないと推測される. その結果, 兵庫県の mtDNA 頻度は地域の遺伝的特色が強く現れていると考えられる. 岩手県のサンプルは血統的に鳥取母系の影響が濃い地域から採取され, したがってこの結果は鳥取母系を反映した結果といえる. その mtDNA 頻度は兵庫県と同じ傾向を示したが, 兵庫県と比べるとより全国平均に近い値を示している. このように, 最近形成された繁殖集団に対しては繁殖雌牛の導入は直接その母系遺伝構造に影響を与え, その成立過程が mtDNA 頻度に反映しているものと思われる. しかし, この仮説では近年形成された繁殖集団の遺伝構造は明確に説明できるが, もともと存在する mtDNA 頻度の地域差を説明することはできない.

第2に創始者効果 (founder effect) や瓶首効果 (bottleneck effect) による影響の可能性である. われわれは mtDNA の塩基配列に基づくこれまでの研究で, 黒毛和種が有するヨーロッパタイプの mtDNA (Type 3~5) の存在について2つの仮説を立てた³⁾. これは, このタイ

プの mtDNA が日本在来牛の祖先が弥生時代に渡来したときにはすでに存在していたとする説と, 明治時代に外来種を導入して品種改良を行った影響が残っているとする説である. 創始者効果や瓶首効果の影響が考えられるのは前者の仮説に基づく場合である. しかし本研究では, Type 1 の頻度が3集団と全国平均で一定であること, Type 4 と 5 の頻度に差が認められるがこの2つの合計頻度は一定であることが示されている. 創始者効果や瓶首効果が働く場合には, Type 4 と Type 5 の頻度と同様 Type 1 の頻度にも影響を及ぼす可能性が高いと思われる. この結果からはこれら2つの効果が Type 4 と 5 の頻度差に大きく影響を及ぼしたとは考えにくい, その可能性は否定できない.

第3としては黒毛和種の品種成立過程に起因している可能性がある. 前述したように黒毛和種は明治時代に外来種を導入して品種改良を行った経緯が知られている. 黒毛和種の品種成立過程では, シンメンタル種, ホルスタイン種, エアシャー種, ブラウンスイス種など多くの品種が各地で交配されたと言われている. この際に交配した外来種の品種の違いや供用頻度が, 現在の mtDNA の頻度に影響を与えた可能性が考えられる. しかしながら, ヨーロッパ品種の mtDNA タイプがすべてこの時期に導入されたとは結論付けられない. なぜなら, 黒毛和種ではヨーロッパタイプの mtDNA が少なくとも30%検出されているが (表2), これほど遺伝子頻度に影響を与えるほどの外来種雌牛が明治時代に導入・交配された事実は残っていない. おそらく, 弥生時代あるいはその後には渡来した祖先牛は既にヨーロッパタイプの mtDNA を有しており, それに加え明治時代の外来種交配がその遺伝子頻度に影響を与えたことが推測される.

mtDNA 頻度の地域差を説明するには, より多くの他県における調査や東北アジア大陸における在来牛の mtDNA タイプを分析することが必要であると考えられる. これら mtDNA 頻度の詳細な調査は黒毛和種の品種成立過程や集団構造を考える上で重要となるであろう. 以上, 本研究の結果より mtDNA から見た黒毛和種の集団の遺伝構造は地域差が存在することが示され, その原因として2, 3の仮説を提唱した. また, PCR-SSCP 法は多くの mtDNA ハプロタイプを識別する簡便で有効な方法であることが示唆された.

謝 辞

本研究の一部は, 文部省科学研究費補助金 (No. 10556064) および平成9, 10年度 (社)畜産技術協会委託

研究費, (社)全国和牛登録協会研究助成金, 平成9年度
(財)伊藤記念財団研究助成金, 和牛登録協会宮崎県支部
研究助成金を受けて行われた。ここに謝意を表します。

サンプル採取にご協力頂いた(社)全国和牛登録協会
岩手県支部, 兵庫県支部, 宮崎県支部関係者および黒毛
和種繁殖雌牛飼育農家の皆様に謝意を表します。

文 献

- 1) Anderson S, deBruijn MHL, Coulson AR, Eperon IC, Sanger F, Young IG. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology*, 156 : 683-717. 1982.
- 2) Bradley DG, MacHugh DE, Cunningham P, Loftus RT. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proceeding National Academy of Science USA*, 93 : 5131-5135. 1996.
- 3) Loftus RT, MacHugh DE, Bradley DG, Sharp PM, Cunningham P. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceeding National Academy of Science USA*, 91 : 2757-2761. 1994.
- 4) Mannen H, Kojima T, Oyama K, Mukai F, Ishida T, Tsuji S. Effect of mitochondrial DNA variation on carcass traits of Japanese Black Cattle. *Journal of Animal Science*, 76 : 36-41. 1998.
- 5) Mannen H, Tsuji S, Loftus RT, Bradley DG. Mitochondrial DNA variation and evolution of Japanese Black Cattle (*Bos taurus*). *Genetics*, 150 : 1169-1175. 1998.
- 6) 大木 卓. 和牛起源年代考. 日本大学農獣医学誌, 8 : 18-31. 1960.
- 7) 芝田清吾. 日本古代家畜史の研究. 学術出版会. 東京. 1969.

Mitochondrial DNA Diversity of Japanese Black Cattle

Hideyuki MANNEN, Junichi KAWASAKI, Takafumi ISHIDA¹,
Fumio MUKAI and Soichi TSUJI

Faculty of Agriculture, Kobe University, Nada-ku, Kobe-shi 657-8501, Japan

¹ Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki-shi 889-2192, Japan

Corresponding : Hideyuki MANNEN (fax : +81 (0) 78-803-5803, e-mail : mannen@kobe-u.ac.jp)

In our previous study, two major mtDNA types were observed in Japanese Black cattle ; one has been detected exclusively in Japanese samples (Japanese Black type), whereas the second is comprised of samples that show sequences and patterns of variability similar to those found in European samples (European type). This article describes mitochondrial DNA displacement loop polymorphisms and their frequencies in three representative Japanese Black cattle populations. PCR-SSCP method was applied to analyze the mtDNA polymorphisms. Differences of the genetic frequencies between populations were observed in European type mitochondrial DNA. The results suggested that the grading with European breeds in Meiji era retains genetic influence on modern Japanese Black cattle.

Animal Science Journal 71 (10) : J470-J474, 2000

Key words : Mitochondrial DNA, Polymorphisms, PCR-SSCP, Gene frequency, Japanese Black cattle