Phylogenetic Relationships of Mastomys to Mouse and Rat Deduced from Satellite DNA Sequences

Hisashi HISATOMI, Ryuichi MIURA*, Kunio SHIOTA*, Tomoya OGAWA*,
Kazutoshi SAYAMA**, Shin TANAKA***, Akio MATSUZAWA***,
and Yasuhiko KANOH

Department of Animal Physiology, Faculty of Agriculture, Meiji University, 1-1-1 Higashi-mita,
Tama-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa 214, *Laboratory of Cellular Biochemistry, Veterinary
Medical Science/Animal Resource Science, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi,
Bunkyo-ku, Tokyo 113, **Department of Animal Science, Faculty of
Agriculture, Shizuoka University, 863 Ohya, Shizuoka-shi,
Shizuoka 422, and ***Laboratory Animal Research Center,
Institute of Medical Science, The University of
Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku,
Tokyo 108, Japan

(Received 14 December 1993/Accepted 12 April 1994)

Mastomys is a rodent with a intermediate size between mouse and rat, and classify as a subgenus of *Praomys coucha*. Our study determined the phylogenetic evolutionary relationships of mastomys to mouse and rat deduced from satellite DNA sequences. Genomic DNA was extracted from each liver and digested by restriction enzymes (*EcoRI* and *BglII*). After separation and purification, we obtained these *EcoRI/BglII*-0.5 Kbp repeated elements and determined the nucleotide sequences. The similarities and speed of evolution were 86.06% and 0.1578 between mastomys and mouse, 85.56% and 0.1671 between mastomys and rat, and 83.91% and 0.1863 between rat and mouse, indicating that mastomys was evolutionary classified between mouse and rat, and closely related with mouse. —KEY WORDS : mastomys, phylogenetic relationship, satellite DNA, sequence

サテライト DNA 配列から推定したマストミスのマウスおよびラットとの類縁関係

久富 寿・三浦 竜一*・塩田 邦郎*・小川 智也*・茶山 和敏**・
田中 慎***・松沢 昭雄***・加納 康彦

明治大学農学部動物生理学研究室

*東京大学農学部獣医学科獣医生化学研究室

**静岡大学農学部応用生物化学科

***東京大学医科学研究所実験動物施設

マストミス (*Praomys coucha*) はマウスとラットの中間大の大きさをもつネズミ科のブラオミス属に属するアフリカ原産の代表的なげっ歯類である [12,15]。マストミスの実験動物としての歴史は比較的浅く、

1950年代前半からベスト、ラッサウイルス、住血吸虫に高感受性の感性動物として利用されはじめた [6]。その後、胃、肝臓、副腎、胸腺、脳下垂体、前立腺、卵巣などの腫瘍が報告され、多くの臓器組織に各種の

腫瘍をかなり高率に自然発生する実験動物として重要な位置を占めることとなった。さらに一部の変異系の近交化の過程で、ヒトを除いて唯一、胃に腺癌が自然発生する哺乳類でもある [15]。

他のげっ歯類（ラット、マウス）と比較した場合、その解剖学的な特徴として以下のことが上げられる。マストミスはラットと同様胆嚢を欠き、雌にも前立腺が存在する。副腎皮質では三者にそれぞれ特異な付加層が確認され、マストミスの境界層は極めて特徴的な変化を示す [13,14]。また、妊娠期間はラットと同様23日であるが、産子数はマウスと同じ7匹前後で、乳腺数はマウスおよびラットが6対以下であるのに対し、マストミスは7対以上存在する。このような解剖学上の相違から、マストミスは分類学および系統発生学でマウスおよびラットのいずれに近縁か未だ明確な結論には至っていない。

従来、分類学上や系統発生学上での近縁関係を明らかにするための手がかりは、生物の形態学的な比較や解剖学的特徴の比較を中心とした研究によって扱われてきたが、近年の遺伝子工学の進歩に伴い、遺伝子の一次構造の比較を基にした系統樹の作成および類縁関係の決定がなされるようになった。遺伝子DNAは進化の過程で変異が起こりにくく、近縁の生物間においてそれほど大きな変異が見られないため、このような系統樹の作成および類縁関係の決定には、自然淘汰の影響を受けないで変異の蓄積したミトコンドリアDNAや非遺伝子DNAが用いられてきた。非遺伝子DNAの中でも、ゲノムDNAから様々な制限酵素による消化で作出されるサテライトDNAは多くの染色体上にまたがって数多く反復して存在し、親子鑑別のプローブやこうした一次構造の比較に用いられてきた。マウス [1-3,5,8] やラット [4,11] ではこれまで数多くのサテライトDNAの一次構造が決定されている。

本研究では、マストミスのマウスおよびラットとの分類学的および系統発生学的関係を解明するために、三者の類似性の高い *Bam*HI ファミリーのサテライトDNAの一次構造を決定し、それら一次構造の相同性探査を行った。

材料および方法

1) 使用動物：マストミスは米国立衛生研究所 (NIH) 由来で東北大学、東京大学医科学研究所で近

交化され [15]、1985年に明治大学動物生理学研究室に導入された F_{36} の個体を兄妹交配で維持し、 F_{56} に至った9週齢の個体（雄5匹、雌5匹）を用いた。マウスは日本クレアから購入した9週齢のBALB/cA Jcl（雄5匹、雌5匹）、ラットは三協ラボサービスから購入した9週齢のクローズドコロニーであるWistar/ST（雄5匹、雌5匹）、チャイニーズハムスターは三協ラボサービスから購入した9週齢の個体（雄5匹、雌5匹）を用いた。

2) ゲノムDNAの抽出：使用動物から肝臓1gを摘出し、ただちに5mlのホモジナイズ溶液（10mM Tris-Cl pH7.5, 0.1M NaCl, 1.5mM $MgCl_2$ ）を加え、4℃・3000rpm・2分間ホモジナイズした（Omega Electric Homogenizer, TypeSW-3）。得られたホモジネイトを4℃・3000rpm・10分間で遠心（Kubota KN-70）したのち沈殿物をSTE溶液（10mM Tris-Cl pH7.5, 0.1mM NaCl, 1mM EDTA）10mlに懸濁した。10% SDSを1ml加えて細胞成分を可溶化した。プロティナーゼK（10mg/ml）200 μ lを加え50℃・12時間インキュベートしてタンパク質成分を分解した。インキュベート後、等量のフェノール溶液（飽和フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール=25:24:1）を加え、10分間振とう後、4℃・3500rpm・10分間遠心し、2回繰り返した。上清をクロロホルム抽出を行い、-20℃の100%エタノールを3倍量加えDNAを沈殿させた。沈殿を70%エタノールで洗い、乾燥させた後、TE溶液（20mM Tris-Cl pH7.5, 1mM EDTA pH8.0）に溶解した。

3) サテライトDNAの単離：抽出したゲノムDNAを制限酵素 *Eco*RI（Takara 社製）にて消化した。その後、TAE（40mM Tris-acetate, 2mM EDTA pH8.0）に溶解した1%アガロースゲル電気泳動を行った。電気泳動によって分離したマストミス、マウスおよびラットの約1350bpのサテライトDNAをEASYTRAP（Takara 社製）で精製した。このDNA断片をさらに制限酵素 *Bgl*II（Takara 社製）で消化し、同様に電気泳動後、約500bpのサテライトDNA断片を精製した。

4) サテライトDNAの塩基配列決定：マストミス、マウスおよびラットに共通して見られた約500bpのサテライトDNA断片を制限酵素 *Bam*HI（Takara 社製）で切断したプラスミドベクター pUC119にDNA Ligation Kit（Takara 社製）を用いてLigationした。得られたpUC119組換えプラスミドを *E. coli* (X11-

Blue 株)のコンピテント細胞に形質転換した。さらに、形質転換された組換え体から、M13 Helper phage によって一本鎖 DNA を調整した [9]。調整した一本鎖 DNA を Auto Read Sequencing Kit (ファルマシア社製)と ALF DNA Sequencer (ファルマシア社製)を用いて、塩基配列の決定を行った。

5) マストミスの類縁関係の決定：得られた塩基配列からマストミス、マウスおよびラットの分岐年代の差異を推定するために Kimura の式 [7] を参照した。まず、マストミスとマウス、マストミスとラット、マウスとラットそれぞれの塩基配列の「違い」の数を求めた。そのうち、塩基の転位型の違いを P、塩基の転換型の違いを Q として以下の式から進化速度を求めた。 $K = -1/2 \log_e \{ (1 - 2P/\text{総塩基数} - Q/\text{総塩基数}) \sqrt{1 - 2Q/\text{総塩基数}} \}$ さらに、求められた K の値から系統樹を作成した。また、得られた塩基配列からマストミスとマウス、マストミスとラット、マウスとラットそれぞれの相同性を算出した。

成 績

マストミス、マウス、ラットおよびチャイニーズハムスターから抽出したゲノム DNA を制限酵素 *EcoRI* 消化後得られた DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で分離した (Fig. 1)。マストミス、マウスおよびラットにおいて 1350bp の DNA 断片が見られたのに対して、チャイニーズハムスターでは観察されなかった。この DNA 断片 (*EcoRI*-1.35Kbp repeated element) は、マウスでは *Bam*HI ファミリーあるいは L1Md ファミリー [4,5]、ラットでは Rat LINE [11] として既に報告されているサテライト DNA である。マウス、ラットと同様の 1.35Kbp の DNA 断片がマストミスに存在することから、この断片がマストミスのサテライト DNA (*EcoRI*-1.35Kbp repeated element) である可能性が考えられた。

さらにアガロースゲル電気泳動で検出されたマストミス、マウスおよびラットの *EcoRI*-1.35 Kbp repeated element を制限酵素 *Bgl*II でそれぞれ消化し、電気泳動を行った (Fig. 2)。*EcoRI*-1.35Kbp repeated element を *Bgl*II 消化で作出される約 500bp のサテライト DNA は、マウスおよびラットで特異的に見られることが知られている [4,11]。マストミスにも同様の DNA 断片 (*EcoRI/Bgl*II-0.5Kbp repeated element) の存在が明らかになった。

Fig. 1. *EcoRI*-1.35 kbp repeated elements from mastomys, mouse, rat and hamster in 1% agarose gel stained by ethidium bromide. Arrow shows 1.35 kbp of the DNA. M (Marker)

Fig. 2. *EcoRI/Bgl*II-0.5 kbp repeated elements from mastomys, mouse and rat in 1% agarose gel stained by ethidium bromide. Arrow shows 0.5 kbp of the DNA. M (Marker)

マストミス、マウスおよびラットの *EcoRI/Bgl*II-0.5 Kbp repeated element を詳細に比較するために、それぞれの DNA 断片の塩基配列を決定し (Fig. 3), それぞれの相同性を計算した (Table 1)。マストミスとマウスの *EcoRI/Bgl*II-0.5 Kbp repeated element の相同性は 86.05%, マストミスとラットでは 85.56% であることから、マストミスの *EcoRI*-1.35 Kbp

Mouse	1	G A A T T C A A G G	C C C A T A C C T A	A A C A T G A T A A
Mastomys	1		: t t t : g	: a g
Rat	1		: a	: a g
Mouse	31	A A G C A A T C T A	C A G C A A A C C A	G T A G C C A A C A
Mastomys	31	: a	: a	: :
Rat	31	: c . . a . .	: :	: . . t . . t
Mouse	61	T C A A A G T A A A	T G G T G A G A A G	C T G G A A G C A A
Mastomys	61	: a	: a a	: . . t :
Rat	61	: . . t c	: . . a a a	: . . t :
Mouse	91	T C C C A C T A A A	A T C A G G A A C T	A G A C A A G G C T
Mastomys	91	: :	: g	: c a :
Rat	91	: :	: g	: c :
Mouse	121	G C C C A C T C T C	T C C A T A C C T A	T T C A A C A T A G
Mastomys	121	: :	: c	: t . . t . .
Rat	121	: :	: c t . .	: t . c . .
Mouse	151	T A C T T G A A G T	C C T A G T C A G A	G C A A T T C G A C
Mastomys	151	: :	: c . . t . .	: a . g . .
Rat	151	: . . t :	: t c	: c a
Mouse	181	A A C A A A A G G A	G A T C A A G G G G	A T A C A A A T T G
Mastomys	181	: :	: a	: :
Rat	181	: . . t :	: :	: g t . c . .
Mouse	211	G A A A A G A T G A	A A T C A A A A T A	T C A C T T T T T G
Mastomys	211	: g . . a . .	: g g t	: a
Rat	211	: : . . a . .	: g g :	: . . t a
Mouse	241	C A G A T G A T A T	G A T A G T A T A T	A T A A G T G A C C
Mastomys	241	: :	: : c	: t :
Rat	241	: :	: :	: t :
Mouse	271	C T A A A A A T T C	C A C C A G A G A A	C T C C T A A A A C
Mastomys	266	: c :	: : g	: : c
Rat	271	: c g	: :	: . . a g . .
Mouse	301	T G A T A A A C A G	C T T C G G T G A A	A T A G C T G G A T
Mastomys	296	: : a	: a . c a g .	: g :
Rat	301	: : t	: . . a g a . c a . .	: g . g g . .
Mouse	331	A T A A A A T T A A	C T C A A A C A A G	T C A A T G G C C T
Mastomys	326	: :	: g . . . a	: . . . g a . . . t .
Rat	331	: : c . .	: t . . . a	: . . . g . t
Mouse	361	T T C T G T A C A C	A A A G G A T A A A	C A G G C T G A G A
Mastomys	356	: c a	: :	: a g
Rat	361	: c c . . t . .	: a . . g . .	: . . a c . . .
Mouse	391	A A G A A A T T A G	G G A A A C A A C A	C C C T G C T C A A
Mastomys	385	: :	: :	: t . a . . .
Rat	391	: :	: c . g . . .	: t . a t . .
Mouse	421	T A G T C A C A A A	T A A C A T A A A A	T A T C T T G G T G
Mastomys	415	: t	: t	: . . c . . c
Rat	421	: a . c . . t .	: t g	: . . c . . c
Mouse	451	T G A C T C T A G 	 G G A A G T A A	A A G A T C T 474
Mastomys	445	: : c g	: a a . c g	: : 471
Rat	451	: : t . . a a	: a a . c	: : 477

Fig. 3. Comparison of the nucleotide sequences of these *EcoRI/BglIII*-0.5 Kbp repeated elements. Dot shows the same nucleotide as that of mouse. Space box shows deleted nucleotide.

Table 1. Similarity and speed of evolution among mouse, mastomys and rat deduced from *EcoRI*/*Bgl* II-0.5 kbp repeated elements.

	Similarity	P	Q	K
mouse v.s. mastomys	86.05%	38	29	0.1578
mastomys v.s. rat	85.56%	39	32	0.1671
mouse v.s. rat	83.91%	47	31	0.1868

P : Number of transition O : Number of transversion
K : Speed of evolution.

Fig. 4. Schematic presentation of homology of sequence among mouse, mastomys and rat

repeated element および *EcoRI*/*Bgl* II-0.5 Kbp repeated element はサテライト DNA であることが明らかになった。さらに、マウスおよびラットには見られない欠失部位(マストミス242-248)、マウスには見られない挿入部位(マストミス454-456、ラット460-462)が存在していた。

マストミス、マウスおよびラットの *EcoRI*/*Bgl* II-0.5 Kbp repeated element の塩基配列から進化速度を算出した(Table 1)。マストミスとマウスの進化速度は0.1578、マストミスとラットの進化速度は0.1671、マウスとラットの進化速度は0.1868であることからマストミスは系統的にみてマウスとラットの中間に位置し(Fig. 4)、マウスに近い種であることが明らかになった。

考 察

本研究では、マストミスにおいてサテライト DNA *EcoRI*/*Bgl* II-0.5 Kbp repeated element を検索し、その塩基配列を決定した。その結果、マウスおよ

びラットにおける *EcoRI*/*Bgl* II-0.5 Kbp repeated element と高い相同性を示し、マストミスは系統的にマウスとラットの中間に位置し、マウスに近いことが進化速度の比較から明らかになった。

ゲノム DNA から制限酵素 *EcoRI* の消化によって作出されるサテライト DNA は1980年代から解析され、マウスおよびラットにおいては、既にその塩基配列が決定され、それぞれの種に普遍的な、約1350bp を1単位とする反復配列であることが知られている[1]。マストミスから作出された *EcoRI*-1.35Kbp repeated element の一部である *EcoRI*/*Bgl* II-0.5 Kbp repeated element もマウス、ラットのサテライト DNA との相同性を比較した結果から反復配列であると推測された。

マストミスがラットよりマウスにやや近縁であることはこれまで、腎臓 IV 型コラーゲンの免疫学的特性から報告されていた[10]が、今回のサテライト DNA 分子の進化速度の比較から、より明確な系統発生的分類を行うことができ、マストミスはマウスおよびラットと共通の祖先を持つことが明確になった。

本研究で用いたマストミスのみをもってして、マストミス (*Praomys coucha*) の全ての種において、*EcoRI*/*Bgl* II-0.5 Kbp repeated element が普遍的とは言いは難く、特定の系統に特異的である可能性も危惧される。しかし、マウスおよびラットの *EcoRI*-1.35 Kbp repeated element がそれぞれの種において普遍的であることを考慮に入れると、マストミスにおいても系統間で差異が確認される可能性は極めて低く、*EcoRI*/*Bgl* II-0.5 Kbp repeated element の普遍性は高いものと考えられる。

要 約

マストミス (*Praomys coucha*) はマウスとラットの中間大の大きさをもつネズミ科のプラオミス属に属するげっ歯類である。本研究では、サテライト DNA を用いてマストミスのマウスおよびラットとの系統的近縁関係を調べた。それぞれの肝臓から抽出した遺伝子を制限酵素 (*EcoRI*・*Bgl* II) で処理し、*EcoRI*/*Bgl* II-0.5 Kbp repeated element を精製し、それらの塩基配列を決定した。それらの塩基配列を相互に比較した時の相同性と進化速度は、マストミスとマウスでは86.06%・0.1578、マストミスとラットでは85.56%・0.1671、マウスとラットでは83.91%・0.1863を示した。このこと

から、マストミスは系統的にマウスとラットの中間に位置し、マウスにより近縁であることが明らかになった。

文 献

- [1] Brown, A. and Ru Chih C. Huang (1982). Mouse *EcoRI* satellite DNA contains A sequence homologous to the long terminal repeat of the intracisternal a particle gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6123-6127.
- [2] Brown, S. D. M. and Dover, G. (1981). Organization and evolutionary progress of a dispersed repetitive family of sequence in widely separated rodent genomes. *J. Mol. Biol.*, **150**, 441-466.
- [3] Brown, S. D. M. and Piechaczyk, M. (1983). Insertion sequences and tandem repetitions as sources of variation in a dispersed-repeat family. *J. Mol. Biol.*, **165**, 249-256.
- [4] D'ambrosio, E., Waitzkin, S. D., Witney, F. R., Salemme, A., and Furano, A. V. (1986). Structure of highly repeated, long interspersed DNA family (LINE1 or L1Rn) of the rat. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 411-424.
- [5] Gebhard, W., Meitinger, T., Hochtl, J., and Zachau, H. G. (1972). A new family of interspersed repetitive DNA sequences in the mouse genome. *J. Mol. Biol.*, **157**, 453-471.
- [6] 細田 峻・熊沢平次 (1987). マストミス (Y15突然変異系) - 自然発生胃癌の動物モデル. *実験医学*, **5**, 103-105.
- [7] 木村資生 (1984). DNA レベルでの進化距離と速度の推定. *分子進化学入門*, pp. 16-23, 培風館, 東京.
- [8] Kominami, R., Urano, Y., Mishima, Y., and Muramatsu, M. (1983). Novel repetitive sequence families showing size and frequency polymorphism in the genomes of mice. *J. Mol. Biol.*, **165**, 209-228.
- [9] Messing, J. and Vieira, J. (1982). A new pair of M13 vectors for selection either strand of a double digest restriction fragment. *Gene*, **19**, 269-276.
- [10] Sayama, K., Hashimoto, H., Sasaki, A., Oikawa, T., Tanaka, S., and Matsuzawa, A. (1991). Phylogenetic relationships among laboratory animals deduced from basement membrane type IV collagen antigens. *Zool. Sci.*, **8**, 359-369.
- [11] Soares, M. B., Schon, E., and Efstratiadis, A. (1985). Rat LINE1: The origin and evolution of a family of long interspersed middle repetitive DNA elements. *J. Mol. Evol.*, **22**, 117-133.
- [12] Solleveil, H. A. (1987). The multimammate mouse. *In* The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals, 6 th edition, pp. 346-359. Pool, T., (eds), Longman Scientific & Technical, Both Press, Avon, Great Britain.
- [13] Tanaka, S., Nozaki, M., Fujioka, T., and Matsuzawa, A. (1990). Adrenocortical zonation of inbred wild-coloured mastomys, *Praomys coucha*: a new border zone in the cortex of females. *Lab. Anim.*, **24**, 5-13.
- [14] Tanaka, S., Nozaki, M., Fujioka, T., and Matsuzawa, A. (1991). Effects of lactation on the border zone formation in the female mastomys (*Praomys coucha*) adrenal cortex. *Acta Anat.*, **141**, 269-273.
- [15] Tanaka, S., Nozaki, M., Maruyamauchi, T., Kaneko, T., Yamanouchi, K., Okugi, M., and Matsuzawa, A. (1988). Laboratory strain of hamster, gerbil and mastomys maintained at the Institute of Medical Science, University of Tokyo. *Jpn. J. Exp. Med.*, **58**, 273-278.