ヨーロッパおよびアジアヒツジにおけるミトコンドリア DNA ハプロタイプの分布状況

角田健司・Heramba B. RAJBHANDARY*・佐藤啓造

昭和大学医学部, 東京都品川区 142-8555

* ネパール農業省, カトマンズ, ネパール

(2003 年 10 月 2 日受理)

緒 言

ミトコンドリア DNA (mtDNA) の多型分析は生物の集団間の類縁関係やその起源を解明する手段として重要であり, 家畜の分野では系統解析^{1,2)}や経済形質との関連性^{3,4)}から注目されている。特に家畜の系統関係の究明においてその起源や集団間での遺伝子の流れを把握することは家畜そのものの歴史の解明と同時にヒトの歴史的な交流や移動を論じる上でも極めて重要であり, その傍証としての価値が認められている。ヒツジもそのような価値内容を持つ重要な家畜の 1 つであるが, その解析に必要な mtDNA の多型研究はウシやヤギほど進展していない。

ヒツジの mtDNA 多型研究として WOOD と PHUA⁵⁾ は, ニュージーランド産ヒツジの mtDNA ゲノムの D-loop 領域をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法で増幅させ, その塩基配列を解析した結果, 個体別に 2 種類の異なった配列パターンのあることを明らかにした。HIENDLEDER ら⁶⁾ もヨーロッパ, アジアおよびアフリカ産ヒツジの mtDNA ゲノムの制限断片長多型 (RFLP) 分析により 20 種類のハプロタイプを検出し, 系統遺伝学的解析からヒツジは 2 つの主要な系統に分類できることを報告している。すなわち, ヒツジの mtDNA ゲノムには少なくとも 2 つの系統を示すハプロタイプがあり, その 1 つは「アジア系」と

して中央アジアや一部のヨーロッパのヒツジに検出されるもので, もう 1 つは「ヨーロッパ系」としてヨーロッパのヒツジの大部分に検出されるもので, これは野生ヒツジのムフロン (*Ovis musimon*) のハプロタイプとも類似するとされている⁶⁾。前者をハプロタイプ A, 後者をハプロタイプ B と称されている。これらの 2 つの主要な mtDNA ハプロタイプはヒツジの母系ルートの解明に重要なマーカーであり, 世界中で飼養されているヒツジの系統関係を論じるには, このハプロタイプの分布調査が必要とされている。しかしながら, その報告は極めて僅少である。

最近, このハプロタイプの判定に有用な, 迅速かつ経済的な方法が HIENDLEDER ら⁷⁾ によって開発された。PCR による mtDNA の COI 遺伝子領域の増幅断片を *Hinf* I 処理することで可能であるとされている。そこで, われわれはこの HIENDLEDER の簡易検出法に従い, ヨーロッパヒツジとアジアヒツジの系統遺伝学的研究の予報として, イギリス原産の Suffolk 種と Cheviot 種, ニュージーランド原産の Corriedale 種, フィンランド原産の Finnish Landrace 種, それにネパール原産の Kagi 種, Lampuchhre 種, Bhyanglung 種および Baruwal 種における mtDNA ゲノムの *Hinf* I RFLP ハプロタイプについて, その分布や拡散状況を調査検討した。

Jpn. J. Sheep Sci., 40 : 7-11. 2003

Distribution of mitochondrial DNA haplotypes in European and Asian sheep

Kenji TSUNODA, Heramba B. RAJBHANDARY* and Keizo SATO

Showa University School of Medicine, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555

* Ministry of Agriculture, Kathmandu, Nepal

材料および方法

血液試料：ヨーロッパヒツジとして岩手鉱業共働組合種山が原牧場，小岩井農場および登別ハッピー牧場飼養の Suffolk 種 41 頭，Corriedale 種 84 頭，Cheviot 種 21 頭および Finnish Landrace 種 18 頭から採取したヘパリン血を用いた。アジアヒツジとしてネパール中央部のカトマンズおよびチットラン産のインド系の Kagi 種 41 頭，同南部のナラヤングス，ソムナス，パラシ，バガットおよびルンビニー産の Lampuchhre 種 26 頭，それにネパール中部カリガンダキ河上流山岳地産のチベット系の Bhyanglung 種 40 頭および同東部ソル，中部コダリ，カリガンダキ河上流高地産の Baruwat 種 42 頭の血液を分析に供した。

DNA 抽出：血液から分離した血球泥ないし buffy coat を proteinkinase K (Wako 製) でタンパク分解反応させた後，ヨウ化ナトリウム法⁸⁾で DNA を抽出した。ここでは核 DNA と mtDNA の両方を含む total DNA として用いた。

PCR 条件：PCR 反応は 1 μ M の各プライマー，200 μ M のデオキシヌクレオシド三リン酸 (dNTPs) および 0.5 U Taq ポリメラーゼ (Nippon Gene 製) を含む 1 $\times$ ユニバーサル緩衝液 20 μ l に 20-50 ng の genomic DNA を混和して行った。dNTPs とユニバーサル緩衝液は Taq ポリメラーゼ製品に添付されたものを使用した。プライマーは HIENDLEDER ら⁷⁾によって下記のようにデザインされた塩基配列の合成品を用いた。

COIF (5'GCAGAGTTTGAAGCTGCT 3')

COIR (5'AGCTGACGTGAAGTAAGC 3')

PCR は最初の変性を 94°C 2 分，次いで変性 94°C 30 秒，アニーリング 53°C 30 秒，伸長反応 72°C 30 秒のステップの順に 32 サイクル，そして最後に伸長反応 72°C 7 分を行った。

DNA 多型検出：増幅された PCR 産物を *Hinf* I (Felmentas 製) 処理を施し，トリス-酢酸-EDTA 緩衝液による 2% アガロースゲル (エンチジウムブロマイド入，Bio Rad 製) で電気泳動を行い，UV 透過でハプロタイプを判定した。

結果および考察

ヒツジの mtDNA ハプロタイプの電気泳動パ

ターンは Fig. 1 に示す通りである。PCR 産物を *Hinf* I で処理したもので，DNA 分子量マーカ-との相対易動度の比較から HIENDLEDER ら⁷⁾が指摘するように 5 本の DNA 断片 (73-836 bp) が検出された。ハプロタイプ A では 836 bp 断片が 1 本，ハプロタイプ B では 477 bp と 359 bp 断片が 2 本示された。他に両タイプには 73 bp と 144 bp 断片がみられた。しかし，ハプロタイプ B において，この両断片に代わってみられる 217 bp 断片⁷⁾はここでは検出されなかった。

今回調査したヨーロッパおよびアジアヒツジの品種集団におけるハプロタイプの頻度は Table 1 に示すような結果であった。ヨーロッパヒツジにおいて Suffolk 種の大部分が B タイプであり，Cheviot 種はすべてが B タイプであった。この頻度構成は HIENDLEDER ら⁶⁾が指摘するようにヨーロッパ系として特徴的であるように思われる。しかしながら，Corriedale 種や Finnish Landrace 種では B タイプに加え，A タイプが 40% 前後を占めており，アジア系の影響がかなり高い可能性が考えられた。Corriedale 種⁹⁾は古代メソポタミアのウールヒツジの系統を引く Merino 種雌とイ

Fig. 1. Fragment patterns of *Hinf*I digested PCR products amplified from ovine mtDNA haplotypes A and B. Haplotype A: lanes 4, 5, 6, 7, 9, 10; Haplotype B: lanes 1, 3, 8; Molecular weight marker: lane 2, ϕ X174-*Hae*III digest consisting of 1353, 1078, 872, 603, 310, 281+271, 234, 194, 118, and 72 bp fragments.

Table 1. The incidence of mtDNA haplotypes in European and Asian sheep

Breed	Number tested	Haplotype	
		A	B
Suffolk	41	5 (12)	36 (88)
Cheviot	21		21 (100)
Corriedale	84	36 (43)	48 (57)
Finnish Landrace	18	7 (39)	11 (61)
Total	164	48 (29)	116 (71)
Kagi	41	39 (95)	2 (5)
Lampuchhre	26	25 (96)	1 (4)
Baruwal	42	38 (90)	4 (10)
Bhyanglung	40	24 (60)	16 (40)
Total	149	126 (85)	23 (15)

(%)

ギリス長毛種雄の交配種であり、この A タイプは Merino 種の影響によるようにも推測された。また Finnish Landrace 種は北方短尾種系⁹⁾とされ、その由来は不明であるが、アジア系の混入がここにおいて初めて認められた。

これらの結果からヨーロッパ原産のヒツジには既にアジア系のヒツジが拡散混入されている状況が伺えた。これは Wood と PHUA⁵⁾ によって報告されたニュージーランド産品種の mtDNA 多型分析からも類推される。

一方、アジアヒツジではインド系の Kagi と Lampuchhre の両種とも A タイプの頻度が圧倒的に高く、その割合は 90% 以上を示した。インド系ヒツジには A タイプが優位で典型的なアジア系の特徴を保有している可能性が示唆された。さらにチベット系の Baruwal 種は 90% が A タイプであり、これもアジア系の特徴を示していた。だが、Bhyanglung 種においては A タイプを基礎に B タイプが Baruwal 種の 4 倍もの高い頻度で認められた。この典型的なチベット原産のヒツジは純度の高いアジア系と推測されていたが、今回の調査から以外にもヨーロッパ系の血筋の混入が初めて確認された。このようにアジア原産のヒツジにおいてもヨーロッパ系が明らかに拡散混入されている状況が伺えた。

したがって、これらのヒツジ品種におけるハプロタイプの分布状況は、Hiendleder ら⁶⁾が指摘した A タイプがアジア原産、B タイプがヨーロッパ

原産のヒツジに多く検出された結果と一致し、前者がアジア系、後者がヨーロッパ系として区別できることを支持するものであった。

この単一のハプロタイプのデータから品種集団間において遺伝的類縁関係の評価を求めることは困難であった。同じヨーロッパヒツジでも Corriedale 種と Finnish Landrace 種、またはアジアヒツジでも Kagi 種と Baruwal 種などにおいてハプロタイプに類似な頻度構成がみられ、その集団間における類縁関係を単純に肯定するには、これらの集団が血液蛋白多型データの解析^{10,11)}から互いに異なったクラスターに属することの説明を必要とした。これに関しては別に多くの制限酵素を用いた RFLP 解析による総合的な検討が必要である。

このような mtDNA ハプロタイプによる品種レベルでの系統関係の評価は問題であり、ヨーロッパ原産およびアジア原産のグループとして全体的なレベルでみた場合、両グループのハプロタイプの頻度構成は著しく異なり、その意味合いは高いと考えられる。すなわち、ヨーロッパヒツジ全体としては、B タイプが平均して約 70% の高頻度であり、それに対してアジアヒツジ全体では、A タイプの方がかなり高く、平均 85% であった。これだけでも両者は全く異なる系統に属することを意味していた。しかしながら、必ずしも一方のハプロタイプだけで構成されているのではなく、ヨーロッパヒツジには A タイプ、アジアヒツジには B タイプの系統が影響していた。その影響

の度合はアジアヒツジよりもヨーロッパヒツジの方が強いように推察される。

したがって、ヨーロッパヒツジとアジアヒツジではそれぞれ基本的には異なった母系先祖から由来した個体で構成され、それと同時に両者の系統が互いに伝播拡散し入り混ざった状態で集団構成されている様相がmtDNA ハプロタイプの分布状況から示唆される。

今回調査したヨーロッパおよびアジアヒツジは少数の限られた品種集団であり、充分な確証を得るまでには至らなかった。今後、アフリカを含めヨーロッパやアジア地域の様々な集団の調査が必要なことは言うまでもない。それによりヒツジの系統関係がより一層明確になることが期待される。

要 約

ヨーロッパヒツジ4品種とアジア在来ヒツジ4種における2つの主要なmtDNA ハプロタイプA, Bの分布拡散状況を確認する目的でそのゲノムのHinf I RFLPをPCR法によって分析した。ヨーロッパヒツジのグループではSuffolk種とCheviot種はBタイプの頻度が著しく高く(88および100%), Corriedale種やFinnish Landrace種では共にBタイプの高頻度に加え、Aタイプが約40%の比較的高い頻度を有した。一方、アジアヒツジのグループではインド系のKagiとLampuchhreの両種が共にAタイプが圧倒的に高く(95および96%), チベット系ではBaruwal種にAタイプが90%みられた。だが、Bhyanglung種はAタイプが60%, Bタイプが40%と他のアジア種とは異なった。このように品種によってハプロタイプの頻度構成は異なったが、遺伝的關係を評価することは困難であった。しかしながら、ヨーロッパヒツジとアジアヒツジのような全体的なレベルからみると、前者はBタイプが平均71%, 逆に後者はAタイプが平均85%の高頻度であり、両者の間には著しい違いがみられた。したがって、ヨーロッパヒツジとアジアヒツジはそれぞれ基本的に異なった母系先祖から由来した個体で主に構成されていることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、貴重な血液の提供を頂きました岩手鮎業株式会社種山ガ原共働組合紺野朋夫氏をはじめ小岩井農場黒澤昭栄および浜戸祥平の両氏、北海道登別ハッピー牧場吉川周平氏並びに関係各位に謹んで感謝申し上げます。さらに分析実験に終始御協力を頂きました昭和大学医学部西村茂子氏に深謝申し上げます。

文 献

- 1) LOFTUS, R.T., D.E. MACHUGY, L.O. NGERE, D.S. BALAIN, A.M. BADI, D.G. BRADLEY and E.P. CUNNINGHAM, Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. *Anim. Genet.*, **25** : 265-271, 1994.
- 2) LUIKART, G., L. GIELLY, L. EXCOFFIER, J. VIGNE, J. BOUVET and P. TABERLET, Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98** : 5927-5932, 2001.
- 3) SCHUTZ, M.M., A.E. FREEMAN, G.L. LINDBERG, C. M. KOEHLER and D.C. BEITZ, The effect of mitochondrial DNA on milk production and health of dairy cattle. *Livestock Production Sci.*, **37** : 283-295, 1994.
- 4) MANNEN, H., T. KOJIMA, K. OJIMA, F. MUKAI, T. ISHIDA and S. TUJI, Effect of mitochondrial DNA variation on carcass traits of Japanese Black cattle. *J. Anim. Sci.*, **76** : 36-41, 1998.
- 5) WOOD, N.J. and S.H. PHUA, Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. *Anim. Genet.*, **27** : 25-33, 1996.
- 6) HIENDLEDER, S., K. MAINZ, Y. PLANTE and H. LEWALSKI, Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: No evidence for contributions from urial and argali sheep. *J. Heredity*, **89** : 113-120, 1998.
- 7) HIENDLEDER, S., S.H. PHUA and W. HECHT, A diagnostic assay discriminating between two major *Ovis aries* mitochondrial DNA haplogroups. *Anim. Genet.*, **30** : 211-213, 1999.
- 8) WANG L., K. HIRAYASU, M. ISIZAWA and Y.

- KOBAYASHI. Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucleic Acids Res.*, **22** : 1774-1775, 1994.
- 9) 森 彰, 羊の品種. 初版. 138, 153-154, 361-364 養賢堂. 東京. 1970.
- 10) TSUNODA, K., T. AMANO, K. NOZAWA and M.A. HASNATH. Genetic characteristics of Bangladeshi sheep as based on biochemical variations. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **61** : 54-66, 1990.
- 11) TSUNODA, K., K. DOGE, Y. YAMAMOTO, T. NAMIKAWA, T. AMANO, Y. KUROSAWA, T. SHOTAKE, T. NISHIDA and H.B. RAJBHANDARY. Biochemical polymorphisms of Nepalese native sheep breeds. *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)*, **64** : 1051-1059, 1993.

Summary

In order to ascertain the extent and distribution of two major mitochondrial DNA (mtDNA) haplotypes, A and B, in four European sheep breeds and four local Asian sheep breeds, the *Hinf*I restriction fragment length polymorphism of mtDNA genomes was assayed using PCR techniques. In the European sheep group, Suffolk and Cheviot sheep had a conspicuously high frequency of type B (88 and 100%, respectively). However, in both of Corriedale and Finnish Landrace sheep, type A was seen at comparatively high frequency of about 40%, accompanied by a high frequency of type B. On the other hand, in the Asian sheep group, the frequency of type A was considerably high in Kagi and Lampuchhre sheep belonging to the Indian sheep group (95% and 96%, respectively). As for the Tibetan sheep group, Baruwal sheep had type A haplotypes at the frequency of 90%. However, 60% of Bhyanglung sheep were type A and 40% were type B, the frequency being different from those of the other local Asian breeds tested. The frequency constitution of the haplotypes varied among breeds. It was difficult to estimate their genetic relationships. However, from the level of global sheep groups such as European and Asian sheep, the average frequency of type B in the former was 71%, while the average frequency of type A in the latter was 85%. A marked difference between both sheep groups was seen. This finding, therefore, suggests that European and Asian sheep respectively consist chiefly of animals derived from different ancestral maternal lineages.