

ウマのミトコンドリアDNAのDループ領域における
多型解析とその応用に関する研究

1995.3

石田 信 繁

①

ウマのミトコンドリアDNAのDループ領域における

多型解析とその応用に関する研究

1995. 3

石田 信 繁

目 次

第 1 章 緒論	5
第 2 章 ウマのmtDNA D ループ領域の全塩基配列の解読	
1. 緒言	11
2. 実験材料と方法	14
3. 実験結果および考察	
1) ブタmtDNA プローブを用いた RFLP 法による ウマmtDNA の解析	19
2) 多型性に富むウマmtDNA D ループ領域の クローニングと塩基配列の決定	21
3) ウマmtDNA D ループ内塩基配列の特徴	25
4. 小括	29
第 3 章 ウマのmtDNA D ループ領域の多型解析	
1. 緒言	46
2. 実験材料と方法	50
3. 実験結果および考察	
1) PCR-SSCP法による D ループ領域 299bp の解析	54
2) PCR-RFLP法による D ループ領域 232bp の解析	56
3) PCR-ダイレクトシーケンス法による D ループ 超可変領域を利用した多型解析	57
4. 小括	60

第4章	家畜馬(<u>Equus caballus</u>)におけるDループ領域の 多型解析	
1.	緒言	74
2.	実験材料と方法	
1)	mtDNA Dループ多型解析法	76
2)	家畜馬(<u>Equus caballus</u>)における品種識別法	76
3)	サラブレッド集団, 北海道和種馬集団および モンゴル在来馬集団の解析法	76
4)	mtDNA Dループ領域の塩基置換多型を利用した 家系解析法	77
5)	mtDNA 多型を利用した母子判定法	78
3.	実験結果および考察	
1)	mtDNA Dループ多型を指標とした家畜馬における 品種間識別の検討	79
2)	サラブレッド集団, 北海道和種馬集団および モンゴル在来馬集団に対する解析	80
3)	家系解析への応用	84
4)	母子判定例	85
4.	小括	86
第5章	ウマmtDNA Dループ多型を指標とした ウマ科 <u>Equus</u> 属の進化解析	
1.	緒言	116
2.	実験材料と方法	118

3. 実験結果	119
4. 考察	121
5. 小括	124
第6章 総括	134
英文抄録	140
謝辞	143
引用文献	144

第1章 緒論

ウマ科に属する動物は、すでにその多くが絶滅しているが、現存するウマ科の動物は、体型や毛色などの発現形質に差異は見られるけれども、すべて単一の Equus 属に含まれる。この Equus 属の分類については種々の考え方が出されているが、Simpson (1951)は、

Equus 属を以下の 6種、すなわち家畜馬 Equus caballus とそれに近縁のモウコノウマ Equus przewalskii を合わせて 1種とし、ロバ Equus asinus、オナガー Equus onager、ヤマシマウマ Equus zebra、グレヴィシマウマ Equus grevyi、シマウマ Equus burchelli を加えて、計 6種としている。

一方では、化石による考古学的研究からのウマの起源分類、進化の問題の研究が進められており、鮮新世末期（約 500万年前～約 300万年前）にかけて北アメリカに出現したのが Equus 属であり（Simpson, 1953; Lindsay et al., 1980）、更新世の初期（200万年前）に陸続きの他の大陸へも移動し、家畜馬の他にも、シマウマやノロバ、ノウマとしてアフリカやアジアで今日もその生命は受け継がれているものと考えられている。この他に、血液蛋白などの多型を用いた生化学的研究（Clegg et al., 1974; Ryder et al., 1979; Kaminskii, 1979）、核型を用いた染色体学的研究（Ryder et al., 1978）等により Equus 属の分類と進化系統解析が行われてきている。現在、家畜馬には競馬でスピードを競うサラブレッド種・アラブ種、繋駕競技のアメリカントロッター種、鞍馬・シャイヤー種・ペルシユロン種などの重種、ポニーなどの小型種など多くの品種が存在す

る。日本には日本固有の在来品種として 8品種ほどの日本在来馬が生息している。この日本在来馬の品種間の比較，類型化（品種識別）が試みられており，その遺伝標識としては，体尺測定値・毛色・血液型・血液蛋白質型が用いられているが，単一の遺伝子座を反映する優れた遺伝標識は血液蛋白質型のみと言われている（野沢ら，1984）。また核型分析による細胞遺伝学的研究では，木曾馬，北海道和種，トカラ馬，御崎馬などの日本在来馬 8品種の染色体数は，すべて $2n=64$ と報告されている（村松ら，1984，1990）。このような *Equus* 属の分類に関する研究の流れの中で，最近ウマのミトコンドリアDNA（mtDNA）の多型を利用した新しい分類法が検討されてきている。一般に，ウマを含む動物の mtDNAは，全ての真核細胞中に存在する大きさ 1~2 μm の細胞小器官であるミトコンドリア中に含まれている。哺乳動物の mtDNAは植物のものに比較してはるかに小さく，その大きさは約16.5Kbの環状二本鎖DNAで，核ゲノムの10万分の1以下であることが知られている。mtDNAはNass et al. (1966)によって，鶏の肝臓から初めて精製され，その後，その構造と機能に関する研究が急速に進展した。すなわち mtDNAの環状二本鎖は比重の差より，heavy strand（H鎖）とlight strand（L鎖）に分けられ，mtDNA遺伝子の多くはH鎖にコードされているが，L鎖にコードされているトランスファーRNA（tRNA）や蛋白質も知られている（Anderson et al. 1981）。全塩基配列が決定されているヒトの mtDNAでは，そのゲノムの90%以上が遺伝子をコードしている領域で，13の蛋白質，2つのリボソームRNA，22のtRNAの遺伝子を含んでいることが明らかになっている（Anderson et al. 1981）。また，遺伝子を含んでいない領域は，H鎖の複製開始

点, 両方の鎖の転写開始点, Dループを含むmajor noncoding region, そして遺伝子の中に散在する数bpから数十bpの短い配列とに分けられている。また, H鎖, L鎖ともに複製開始点があり, 複製はH鎖から始まることが明らかにされている。そしてL鎖を鋳型にしたH鎖の複製がL鎖複製の開始点まで到達すると, 反対方向へのH鎖を鋳型にしたL鎖の複製が始まることが解明されている(Kasamatsu et al., 1971; Robberson et al., 1972; Upholt et al., 1974; Goddard et al., 1975; Crews et al., 1979)。このような独自の機能を有する mtDNAは, 細胞小器官であるミトコンドリアの構造と機能の影響を強く受けている。ミトコンドリアは, 細胞核に比べてはるかに小さいが, 細胞内の数が多いため体積比としては細胞中で大きな割合を占めており, 外膜と内膜の二重膜から構成されている。その内膜には酸化的リン酸化に必要な電子伝達系やATP合成酵素があり, 物質の酸化によるエネルギーを用いてATPを合成する酸化的リン酸化を主要な役割としており, 核とは異なる独自のDNAおよびタンパク質合成系をもっており, このことがミトコンドリアの起源が好気性細菌の寄生によるもので, mtDNAが外来遺伝子であることの根拠となっている(Schwartz et al. 1992)。その蛋白質の生合成は, 核遺伝子との二重支配を受けている。ミトコンドリアを構成する蛋白質の極く一部は mtDNAにコードされ, ミトコンドリア内のリボソームで合成されるが, 大部分の蛋白質は核DNAにコードされ, 細胞質のリボソームで合成された後にミトコンドリア内に運びこまれる。真核細胞では, 双方の遺伝子は密接な関連を保ち, 共役してそれぞれミトコンドリアを構築する作業にあっているが, そこで働く制御機構については不明の点が多い(Fox

et al., 1986; Tzagoloff et al., 1986; Attardi et al., 1988)。

一方、哺乳類の mtDNA は核蛋白質のヒストン等で保護されておらず、DNA 修復機構をもたないので、核 DNA に比べて塩基置換速度が極めて速く、その発生率は核 DNA に比べて 5~10 倍高いことが知られている (Brown et al., 1979)。この mtDNA の塩基置換速度は動物の種内における mtDNA 配列の変異性の大きさを反映するもので、それは種の進化を示唆するであろうとする仮説に繋がり、ヒトについては全 mtDNA の制限酵素切断パターンの変異に関する多型現象 (RFLPs) が研究されてきた (Brown, 1980; Denaro et al., 1981)。その後 mtDNA の RFLPs は人類学、集団遺伝学の立場から広く研究がなされ、各動物種については mtDNA の遺伝子型の分化と集団間の系統的な関係などについての考察が進められてきている (Johnson et al., 1983; Horai et al., 1986; Cann et al., 1987; Harihara et al., 1989)。

さらに、ヒトなどでは RFLPs による解析に加えて、特定領域の塩基配列を決定して比較する mtDNA の変異解析もさかんに行われるようになってきた (Aquadro et al., 1983; Greenberg et al., 1983; Harihara et al., 1984; Monnat et al., 1985; Horai et al., 1989; Horai et al., 1990; Ward et al., 1991)。しかし、RFLPs の検出では、変異の検出に限界があるため、塩基配列を決定することにより多くの情報を得られることを期待してその方向の研究が進められてきた。それには分子クローニング技術の進歩や全自動シーケンサーの開発による塩基配列解読技術が進歩してきたという背景も係わってきたものと考えられる。

全 mtDNA の塩基配列の中で tRNA^{Phe} と tRNA^{Pro} の遺伝子の間に位

置するDループの領域は、転写のpromoter sequenceの近くにいくつかの conserved sequence blocksが保有されていることが明らかになり (Walberg & Clayton, 1981), そこは mtDNAの残りの部位 (Dループ領域以外) に比べて、塩基置換速度が 2.8~5 倍速い領域であることが報告されている (Cann et al., 1984; Aquadro and Greenberg, 1983)。また、ウシのDループ領域の塩基配列では、全 mtDNAのRFLPs に比べて10倍塩基置換が速いことが報告されている (Ron et al., 1993)。従って、塩基配列がほとんど決定されていないウマの mtDNAについては、変異性の高いDループ領域が、配列を決定した上で進化解析等に利用する領域として、最も適しているものと考えられる。

ウマ mtDNAに関する研究は非常に限られており、1974年にウマとロバの交雑により mtDNAが母性遺伝することが確かめられたのが最初である (Hutchinson et al., 1974)。また、ウマの mtDNA配列の変異については全 mtDNAのRFLP分析による Equus属の進化解析に関する報告があるが (George and Ryder, 1986), 種内変異に関する報告はみられない。さらにHiguchi et al. (1984) は、絶滅したクアッガ Equus quagga の剥製標本の一部から抽出したDNAライブラリーよりスクリーニングして、ウマmtDNA では初めて蛋白質コード領域のCytochrome oxidase Iの遺伝子とNADH dehydrogenase Iの遺伝子の部分的配列 (約 200塩基) を決定している。

そこで本研究は、未だ決定されていないウマの mtDNAの中で最も変異が速いのではないかと考えられるDループ領域を対象として、

PCR法を用いてこの領域を分子クローニングして、その全塩基配列を解読し、変異の最も多い超可変領域(hypervariable region)を決

定するとともに、他の哺乳類とDNAアライメントを比較して、ウマ mtDNAの特徴を明らかにすることを目的として行った。さらに、その塩基配列多型を利用して品種識別を行うために、家畜馬 E. caballusの品種間における解析を試み、さらにサラブレッド・北海道和種・モンゴル在来馬の3品種における品種内解析、サラブレッドの一家系における家系解析、重種馬の母子判定およびウマ科 Equus属の分子進化遺伝学的解析を行った。

第2章 ウマのmtDNA Dループ領域の全塩基配列の解読

1. 緒言

一般にマウスやラットなどの哺乳類の mtDNAは、核DNA に比べて塩基置換の発生率が極めて高いことが知られており(Brown et al., 1979), この塩基置換速度を指標として、各動物種の進化解析が行われてきた(Cann et al., 1987; Kocher et al., 1989; Meyer et al., 1990)。この mtDNAの塩基置換速度や多型性を検討する場合、2つの領域を対象として行われている。すなわち、第一は、全 mtDNA 内の塩基配列置換をRFLP解析によって分析するもので、ヒトの mtDNAの多型性に関する研究では初期から利用されているものである。第二は、mtDNA のうち、tRNA^{Phe} とtRNA^{Pro} の遺伝子の間に位置するDループ領域の塩基置換による多型性を利用して分析を進めるものである。ヒトの mtDNAのDループ領域の塩基置換発生率は、mtDNA の他の部位に比べてさらに 2.8~5 倍高いと報告されている(Aquadro and Greenberg, 1983; Cann et al., 1984)。このDループ領域の転写に係わる promoter sequence の近くにはいくつかの conserved sequence blocks が保有されているが(Walberg and Clayton, 1981), 前述のように残りのDループ以外の部位に比べて塩基置換の高い領域であると報告されている(Aquadro and Greenberg, 1983; Cann et al., 1984)。ウシでは全 mtDNAのRFLP分析に対して、Dループの nucleotide diversityが、10倍高いことが報告されている(Ron et al., 1993)。これらの知見を基にして、

近年この領域の塩基置換配列を多型マーカーとした進化解析や系統解析に関する研究が発展して、多くの成果が得られている(Cann et al., 1987; Ward et al., 1991; Ron et al., 1993)。また、ヒトの mtDNAの多型性解析においては、全 mtDNAを用いたRFLP解析(Horai et al., 1984, 1986)とDループの塩基配列多型を利用した解析(Horai et al., 1990)の両者が利用されるようになってきている。

この塩基置換の変異を利用して品種識別や進化解析を行う上で最も基本となるのは mtDNAの全塩基配列の決定である。ウマの mtDNAの塩基配列については、わずかにHiguchi et al. (1987)による約200塩基の報告があるのみである。また、過去にウマの mtDNAに関する報告の中で、George et al. (1986)は、全 mtDNAのRFLP分析により Equus属の7種のウマの進化解析を行っている。Higuchi et al., (1984, 1987)は、cytochrome oxidase I遺伝子およびNADH dehydrogenase I 遺伝子の塩基置換を利用してクァッガE. quagga, シマウマE. burchelli, ヤマシマウマE. zebra, 家畜馬E. caballus間の進化解析を試みている。しかし、ウマの mtDNAの塩基配列は、ほとんど決定されておらず、またウマの mtDNAのDループの塩基配列に関する報告も見あたらない。

そこで、ウマの mtDNAにおける塩基置換とその多型性について解析を進めるため、著者ら(1992)がブタ mtDNA解析のためクローニングした mtDNA断片をプローブとして利用し、白血球より回収した全DNA(mtDNAを含む)を用いてサザンハイブリダイゼーション法によるRFLP解析を行い、ウマを含むブタ以外の動物種の mtDNAのDNA型の検出を試みた。また、非血縁馬5頭(サラブレッド種)にお

ける全DNA（核DNAとmtDNAの両方を含む）を用いたRFLP法による多型解析を行って本方法によるウマmtDNA多型検出の有効性についても検討した。次に、3頭の非血縁馬（サラブレッド種）についてmtDNAのDループ領域のPCR増幅とクローニングを行った後、それらのmtDNAのDループ全域の塩基配列を決定した。さらに、これら3頭の塩基配列を比較して変異の多い、いわゆるhypervariable regionを明らかにした。

2. 実験材料と方法

1)ウマおよび他の動物種の白血球からの全DNA抽出

非血縁馬 5頭 (サラブレッド種) の他, ブタ (ランドレース種), ウシ (ホルスタイン種), ヤギ (ザーネン種), ヒツジ (サフォーク種), ニワトリ (白色レグホン種・白河系), ウサギ (ニュージーランドホワイト種) の各 1個体, および 3名のヒト (日本人) のヘパリン加血約20mlから遠心(60g, 10分間)によりbuffey coat を収集し, 2ml の0.15M NaCl液に浮遊させた。これに 6mlの滅菌蒸留水を加え約60秒間ゆっくり混合して, 赤血球を溶血させた後, 2ml の0.6M NaCl を加え, NaCl濃度を 0.15Mとした。この溶液を遠心(200g, 10分間)し上澄を除去して白血球を集め, これに10mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA, 0.6% SDS, RNase A (100 μ g/ml) を 5ml加えて37°C, 1 時間インキュベートし RNAを分解した。さらに Proteinase K (500 μ g/ml) を加えて37°C, 16時間インキュベートし蛋白質を分解後, 全DNAをフェノール・クロロホルム法により抽出した。この後, 1/10量の 3M 酢酸ナトリウムを加え, 2 倍量のエタノールを添加, 混和してDNA沈殿を得たのち, 70% エタノールにて洗浄し, 乾燥させた。この抽出・精製したDNAをTE buffer(10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) 2ml に溶解させ, 4 °Cに保存し以下の実験に供したが, これらの操作で血液20mlより全DNA 500~1,500 μ g を得た。

2)ウマ肝臓からの mtDNA精製

ウマの mtDNAのみの精製は, 解剖時に非血縁の 3頭のサラブレッド種から得た新鮮な肝臓 10gよりPowell & Zúñiga(1983) および三

上ら(1988)の方法に準じて行った。すなわち、摘出した肝臓を直ちに鉋で細切し、ポッター型ホモジナイザーを用いてホモジナイズした後、700g、10分間遠心し、上澄を0.35Mのショ糖溶液を用いて重層した。引き続き、9,000gで10分間遠心し、ミトコンドリア分画を分離後、Lysis buffer (0.5M酢酸Na, 10mM Tris-HCl, pH 8.0)でミトコンドリアの二重膜を溶解した。さらにDNase free RNase (1mg/ml)を添加し、37°Cの恒温槽で15分処理し、フェノール・クロロホルム法により mtDNAを精製した。これらの操作で新鮮な肝臓 10gより約50 μ g の mtDNAを得た。

3)全DNAの制限酵素消化

精製した各動物種の白血球由来の全DNAのうち、ウマ・ウシ・ヤギ・ヒツジ・ウサギ・ヒトについてはEco RI, ブタについてはBgl II, ニワトリについてはKpn I で消化し、切断した。またウマの mtDNAのRFLP解析を検討するためには、サラブレッド種の非血縁馬 5頭の全DNA 20 μ g を 8種類の制限酵素(Bgl II, Bam HI, AccI, Bst EII, Eco RI, Kpn I, Sac I)を用いて消化し、切断した。

4)プローブの調製とRI標識

Eco RIで切断した豚の mtDNA断片をクローニングして得たpLmt-8.5, pLmt5, pLmt3 の 3種のプラスミドクローンを大量培養後、超遠心法により精製した。この 3種のプラスミドクローンが概ね同じ分子数 (全量 2.9 μ g)になるように混合し、クローニング部位を認識する 6塩基認識制限酵素Eco RIで切断後、これらのDNA断片に対してランダムプライマー法により [α -³²P]dATP 標識して、プローブとした。

5)サザンハイブリダイゼーション

制限酵素処理したDNA断片は、0.8%アガロースゲル電気泳動(80V, 3時間30分)をした後、ナイロンメンブレン(ハイボンドN, アマシャム社)に転写し、ミニハイブリダイゼーションオープン(HB-MOV1, HYBAID社)を用いてハイブリダイゼーションを行った。すなわち、転写したメンブレンはプレハイブリダイゼーション溶液20ml(組成: H₂O 11.3ml, 20% SDS 500 μl, 50×Denhardt's 2ml, 10mg/ml サケ精子DNA 200 μl, 20×SSC 6ml)を用いて68°C, 2時間処理した後、³²P標識プローブを90ng/mlの濃度になるように添加し、68°C, 16時間ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンの洗浄の順序は①室温, 5分(2×SSC, 0.5% SDS), ②室温, 15分(2×SSC, 0.1% SDS), ③37°C, 60分(0.1×SSC, 0.5% SDS), ④37°C, 60分(0.1×SSC, 0.5% SDS), ⑤室温, 10秒(0.1×SSC)で行った。オートラジオグラフィは、Kodak社製の高感度X線フィルムを用い、-80°Cにて1日または2日間の暴露時間で実施した。以上の過程を図2-1に示した。

なお、ブタ mtDNAプローブとウマを含む各動物種の白血球由来全DNA(20 μg)との相対的なバンドの濃淡を客観的に評価するため、オートラジオグラムによって得られたバンドを、デンシトメーター(ULTRASCAN XL, Pharmacia社製, 波長633 nm)を用いて測定した。

6) Dループ領域のPCR増幅

ウマのDループ領域のPCR増幅に用いるオリゴ・ヌクレオチドプライマーの配列は、図2-2に示すようにセンス側およびアンチセンス側いずれも20merであり、多くの動物種のmtDNAで共通するhighly conserved regionのスレオニンおよびフェニルアラニンのtRNA領域に設計した。すなわち、ヒト(Anderson et al., 1981),

マウス(Bibb et al., 1981), ウシ(Anderson et al., 1982)の間で 3' 末端が特によく保存されている部位を参考にしてこれらのプライマーを設計した。また, PCR 反応液は, ウマ肝臓から精製した mtDNAをテンプレート(20ng)として, プライマー (1pmol/ μ l), dNTP mix.(1.25mM), Buffer (1mM Tris/HCl pH8.3, 5mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.02% NP-40), Taq polymerase(2.5unit, Cetus)をそれぞれ加えて, total volumeを50 μ l とした。PCR反応は, PCR 反応専用装置 (プログラムテンプコントローラー, アステック社)を用いて, 予備変性94°C 2分で行い, 次に変性94°C 1分, アニーリング55°C 1分, 伸長72°C 1分を30回行った。また最後の伸長は72°C10分で行った。

7) PCR産物のクローニング

ウマmtDNA Dループの PCR産物のクローニングの過程を図 2-3に示した。すなわち, 1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動によって, PCR産物を泳動分離後, ゲルより切り出し, DNA吸着ガラスパウダー(Takara, EASYTRAP)を用いて回収した(Vogelstein et al., 1979)。回収したDNAをインサート用DNAとし, T4 DNAリガーゼを用いてTベクター (プラスミドベクター; Invitrogen, 3932bp) (Holton et al., 1990) に連結し, コンピテントセルEscherichia coli (INV α F)に対して形質転換を行った。組換え体プラスミドを形質転換させた大腸菌を, LB/Amp/X-gal/IPTG 培地で16時間培養し, β -galactosidaseの発現を指標にコロニーの色で識別し, L-Brothで培養後, アルカリ-SDS法で組換え体プラスミドを単離, 精製した(Maniatis et al., 1982)。

8) シークエンスとデータ解析

クローニングによって得たプラスミドDNAは、図 2-4に示すようにインサートとシーケンス用プライマーの間を制限酵素 Kpn I (Takara) および Spe I (Takara) で消化し、Exonuclease III (Takara) の作用時間を変化させて各種の長さのディリーション(deletion)をかけた。その後、Mung bean nuclease (Takara) で一本鎖の部分のみを特異的に消化した。さらにKlenow fragment (Takara) により断片を正確に平滑化した。この断片をセルフライゲーションさせて環状プラスミドとした後、大腸菌を形質転換して、目的の長さまでのディリーションのかかったインサートをもつプラスミドが入ったコロニーを選別して、培養した。この培養増殖した大腸菌よりプラスミドを精製してシーケンス用とした。シーケンス反応はTth polymerase (Pharmacia) , およびFITCラベルした M13 reversal primerを用いてジデオキシ法によるサイクルシーケンス法で行った (Sanger et al., 1977)。またシーケンス分析のための電気泳動は尿素を含む6%ポリアクリルアミドゲルを用いて ALF全自動シーケンサー (Pharmacia社製) によって、塩基配列を決定した。またウマ mtDNAのDループ領域が正しく増幅されたか否かをDNASIS-Macソフト (Hitachi Software Engineering) を使って、PCR 増幅された両端のtRNA領域について、ウシの配列とのホモロジーから確認すると共に、3 頭間の塩基配列の違いについて検索し、超可変領域を決定した。

3. 実験結果および考察

1) ブタ mtDNA プローブを用いたウマ mtDNA の解析

mtDNA の配列が各動物種間で極めて相同性が高いことに注目し、ウマの mtDNA の塩基配列置換をもとにした多型性を検索する手段の一つとして、すでに全 mtDNA の塩基配列が解読されているヒトや他の動物種の mtDNA の全部または一部をプローブとして、ウマ mtDNA との間でサザンハイブリダイゼーションを行い、両者間の相同性や多型性の有無を調べることにした。そこで、クローン化したブタ mtDNA をプローブとしてウマを含む各動物種の mtDNA とのハイブリダイゼーションを行い、その結果を図 2-5 に示した。ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジにおいてはいずれも mtDNA のハイブリダイゼーションバンドは比較的明瞭に確認することができた。しかし、ウサギ、ニワトリ、およびヒトの mtDNA に対してはハイブリダイゼーションバンドが不明瞭であった。また、各動物種の mtDNA に対するブタ mtDNA プローブの接合度の程度を定量的に分析するため、デンストメーターを用いてオートラジオグラフィ上でのバンドの相対濃度を測定した。その結果、ブタ mtDNA に対する濃度（吸光度値）を 100% とした時のハイブリダイゼーションの程度は、ウシ(28%)、ヤギ(15%)、ウマ(10%)、およびヒツジ mtDNA(7%)ではその数値が比較的高かったが、ニワトリ、ウサギ、およびヒト mtDNA では 2% 以下と低い結果であった。これらの結果の中で、ブタ mtDNA をプローブとした場合、ウマ mtDNA に対するハイブリダイゼーションの相対比が 10% 近くあることから、これらのプローブはウマ mtDNA の多型性検索の

ための指標として利用できる可能性があるものと考えられる。

そこで、これらの mtDNAプローブを利用して、ウマ mtDNAを特定の制限酵素を用いて消化し、種内変異の有無を調べるために、電気泳動してサザンハイブリダイゼーション法により、mtDNAの断片長によって現れるバンドパターンの多型分析 (RFLP解析) を行った。非血縁馬の 5頭 (サラブレッド種) の全 DNA について 3種類の制限酵素 (Eco RI, Bam HI, Bgl II) を用いた切断パターンを図 2-6に示したが、多型性は観察されなかった。同様に、他の 5種類の制限酵素の切断パターンにも多型性は観察されなかった。このように 8種類の制限酵素による mtDNAのRFLP分析では多型性の検出はできなかったが、それはサラブレッドが遺伝的に類似性の高いホモロガスな動物集団であるためであろうと考えられる。従って、全 mtDNAを用いたRFLP分析は、サラブレッドについては適当な方法とは言えないことを示唆しているものと考えられる。柴田ら(1990)は、肝臓、脾臓、腎臓より抽出した mtDNAを用いたRFLP法による多型解析を報告しているが、軽種馬 (サラブレッド種等) 9頭および、重種馬16頭の計25頭について、8種類の 6塩基認識の制限酵素による検出を試みた結果、わずかにBam HIに多型性が認められたと報告している。しかし、これも 2つのモルフ、すなわち切断パターンしか存在が認められず、RFLPによる品種特異的な多型現象の検出は不可能であったとしている。

また、今回用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法によるウマ mtDNAのRFLP分析では 1回当たりの検査に DNA量が多量に必要であり、サラブレッド種などの競走馬や動物園で飼育されている Equus属の種類では、臓器からの mtDNAの抽出が不可能であり、

有効な方法ではないと思われる。他方で mtDNAの抽出は実験操作も煩雑であるため、多数のサンプルを扱う実験には実用的な分析法とは言えないであろう。ヒトおよびその他の動物種において多型解析に応用されているmtDNA Dループ領域が、核DNAに比べて変異も多いので、ウマ mtDNAについても全塩基配列を決定したのち、その配列を利用してプライマーを作製し、目的の領域をPCR増幅して多型解析を行うことが有効な分析法と考えられる。

2)ウマ mtDNAのDループ領域のクローニングと全塩基配列の決定

前述の結果から、相同性の高いブタなどの他の動物種の mtDNAプローブを用いた RFLPs分析やそれらのプローブをウマ mtDNAの塩基配列解読のために利用することは困難であることが明らかとなったので、ウマ mtDNAの塩基配列を解読し、ウマ由来のプローブやプライマーを用いた多型解析が必要となったので、その目的に沿った研究を行った。

(1) ウマmtDNA Dループ領域の特異的 PCR増幅

ウマmtDNA Dループの塩基配列を解読するために基本となるプライマー設計は、多くの動物種の mtDNAの配列のうち、ウシ、ヒト、およびマウス mtDNA塩基配列のhighly conserved region のスレオニンおよびフェニルアラニンのtRNA領域に設計した。これらの設計に基づいて合成したプライマーを用いて 3頭のウマ mtDNA各20ngをテンプレートDNAとしてPCR増幅を行ったところ、約 1 μ g のベクターへのインサート用増幅DNAを得ることができた。このPCR

産物を1.5%アガロースゲル電気泳動によって確認したところ、約1300bpに位置する鮮明なシングルバンドが認められた。このPCR産物の大きさはウシのmtDNA Dループの塩基数に比較してやや大きいですが、両端にtRNAの一部を含むDループ領域に適合する大きさであるものと考えられる。

(2) PCR産物の分子クローニング

アガロースゲル電気泳動によって分子サイズを確認された3頭のウマのPCR産物を、電気泳動のゲルよりそれぞれ切り出して回収した後、これらのDNAをT4 DNAリガーゼを用いてTベクターに連結して、大腸菌を形質転換し、培養後分離精製した各プラスミドDNAについて、クローニングの是非を検討した。その結果、クローニングした各プラスミド(pEDL1, 2, 3と命名)を制限酵素Eco RIで切断して得られたDNAは、ベクター及びインサートとして用いたDNA断片を対照とした電気泳動分析によって、それぞれの断片の大きさが一致することから、いずれも分子クローニングされていることが明らかとなった。図2-7に示した電気泳動像から、pEDL1の分子サイズを確認することができた。ウマのmtDNAのDループ領域断片のPCR増幅およびクローニングが良好に行えたが、その理由としてはプライマー設計に際して3'末端がウシ、ヒト、マウスで種をこえて特によく保存された部位、すなわち、tRNA^{Thr}とtRNA^{Phe}のアンチコドンを含み3'末端の11~12塩基が一致する部位を選択したことによるものと考えられる。さらに、この断片のクローニングにおいてはTベクターを用いたので、プライマー設計の際に5'末端側に制限酵素サイトを付加したり(Scharf et al., 1986)、PCR

産物の両末端を平滑化する等の必要がなく，ライゲーションの効率もよくてクローニングが比較的容易であった。

(3)ウマmtDNA Dループ領域のシーケンスデータとコンピュータ解析による相同性の検討

次に，PCR増幅とクローニングで得られた3頭のウマmtDNA Dループ領域のDNA断片についてジデオキシ法によりそれらの塩基配列の解読を試みた。その結果，3個体とも2クローンずつの塩基配列の解読がなされたが，いずれも同一個体内での塩基配列は完全に一致していることからウマmtDNA Dループ領域の塩基配列解読に成功したことが明らかであった。3頭のウマmtDNAのDループ領域のDNA画分のうち，プライマー接合部を除く両端の配列は図2-8に示すように3頭とも完全に一致していることが明らかにされた(L-strandの配列を5' → 3'の方向に示した)。すなわち，プライマーに続くL-strandの5'側99bp (tRNA^{Thr}の一部とtRNA^{Pro})のシーケンスは，maximum matching法でウシの同部位と80%のホモロジーを示していた(図2-9)。また，L-strandの3'側30bp (tRNA^{Phe}の一部)もウシの同部位と76%の高いホモロジーが認められた。この結果より，本研究でクローニングされたDNA断片は，tRNAコード領域で高いホモロジーが認められたことから，確実にDループ領域を増幅できたものと考えられる。

また，解読できたウマmtDNAのDループ領域の全長はそれぞれ1114，1115，1146bpであり，配列数に若干の個体による差異が認められた。すなわち，それぞれの全長の差はpEDL2は，pEDL1に対して1塩基の挿入が認められ，pEDL3はpEDL1に対してTGTGCACCの8

bpの4回(計32bp)の挿入が認められた。また、pEDL2はpEDL1と比べて、18か所の塩基置換部位が認められ、pEDL3では1か所の塩基置換が認められた。Dループ領域全体の塩基構成はA;314-321(28.0-28.5%), C;339-351(30.4-30.6%), G;163-171(14.6-14.9%), T;294-303(26.4-26.6%)であった。また、特徴的な配列として、TGTGCACCの8bpのtandem repeats(図2-10)が認められ、pEDL1とpEDL2では18回、pEDL3では22回の繰り返しが認められた。基本単位である8bpの塩基構成は、A;12.5%, C;37.5%, G;25%, T;25%であった。

ヒトとウシのmtDNAの蛋白コード領域でのホモロジーは63~79%(Anderson et al., 1982)であり、塩基置換の多いDループ領域でのホモロジーは55%であることが明らかになっている。一方、本研究で得られたウマ(pEDL1)とすでにAnderson et al. (1981, 1982)により報告されているヒトまたはウシとのDループ領域でのホモロジーは各々56%であった。この結果から、他の哺乳類と同様に

Equus属においてもDループは塩基置換の多い領域であることが類推できた。また、3頭のアライメントの比較よりtRNA^{Phe}とlarge conserved-sequence blockとの間における18の塩基置換の中に、11個の塩基置換が集中しており、この領域が最も変異の多いhyper-variable regionであろうと推察された。Horai et al. (1990)は、この領域がヒトのmtDNAの中で最も変異の多い領域であると報告している。本研究で観察された変異の種類は、全てトランジション型変異(プリン塩基→プリン塩基, ピリミジン塩基→ピリミジン塩基)で、これはトランスバージョン型変異(プリン塩基→ピリミジン塩基, ピリミジン塩基→プリン塩基)に比べて起こりやすく、分析し

た3頭がいずれも同一品種（サラブレッド種）であったためであろうと考えられる。また，Dループ両端のtRNA領域には，3頭の間に変異が観察されなかった。Dループ（L鎖）の塩基構成は，他の哺乳類と同様にウマにおいてもA/T richであった（表2-1参照）が，その中でもCの割合が最も高かった。これはヒトの塩基構成（A;30%, C;33.2%, G;13.7%, T;23.1%）と類似していることが判った。

3)ウマmtDNA Dループ内塩基配列の特徴

前節の研究において，ウマ mtDNAのDループ領域の塩基配列が解読できたので，それらのDループ内塩基配列構成上の特徴について，ヒトや他の動物種のmtDNA Dループの塩基配列との比較検討を試みた。図2-11にウマ，ヒト，ウシおよびウサギの4種のDループ配列を示した。これらの塩基配列の比較より，哺乳類のmtDNAのDループの幾つかの特徴は，ウマのDループ領域においても観察されたものと同一であった。これは，ウマにおいても他の哺乳類のmtDNAと同様に，large central-conserved-sequence block (No.708-975bp)と，3つのlittle conserved-sequence blocks (CSB1, CSB2, CSB3)が検出されたことを示すものである。

一方，既に観察してきたようにウマのmtDNA Dループの塩基配列内には8bpを1単位とするtandem repeatsが認められたが，この反復配列の存在は，すでにウサギ (Mignotte et al., 1990), グリーンモンキー (Karawya et al., 1987), およびブタ (Ghivizzani et al., 1993)においても見い出されている。ウサギの反復配列では，20bpが10回と153bpが4回存在し，グリーンモンキーでは108bpが

3回、ブタでは10bpが14~29回繰り返して配列していると報告されている。本研究においては検出されたウマの反復配列の位置は、conserved sequence blockの1と2の間に存在し、ウサギのshort tandem repeats (20bp×10回: GCAC GTAC ACCC GTAC GCAC) およびブタのshort tandem repeats (10bp×14~29回: CGTGCGTACA) と類似していることが明らかにされた。また、その塩基構成は(A. 12.5%; C. 37.5%; G. 25%; T. 25%)であり、ウサギの塩基構成(A. 25%; C. 45%; G. 20%; T. 10%),ブタの塩基構成(A. 20%; C. 30%; G. 30%; T. 20%)と比較してG/C richという点で類似した傾向を示していることも認められた。また、ウマとウサギには、GCACの配列が含まれており、ウマの8bpのうち中央の4bpはTGCAでパリンδροミックであり、ピリミジン塩基とプリン塩基が交互に配置していることも判った。ウマの3個体における反復回数は、それぞれ18回、18回、22回で、個体間での差異が認められた。

この個体間の反復回数の差異を調べる目的で、図2-12に示した反復配列を含む領域を増幅するためのプライマーを作製した。PCR反応液には、テンプレートDNA (400ng), プライマー (1pmol/ μ l), dNTPmix. (1.25mM), Buffer (1mM Tris/HCl pH8.3, 5mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.02% NP-40), Taq polymerase (2.5unit, Cetus)をそれぞれ加えて、total volumeを50 μ l としたものをを用いた。PCR反応は、予備変性を96°Cで2分間行い、次に変性94°C 1分、アニーリング68°C 1分、伸長72°C 1分を30回行い、最後の伸長は、72°C 10分で行った。このような条件下で、サラブレッド種 5頭、中半血種 1頭、ポニー 1頭、ブルトン 1頭、日本在来馬 2頭の計10頭から精製した mtDNAをそれぞれ PCR増幅して、アガロースゲル電気泳動を

行い、移動度の差から反復回数の違いを調査したが、2つ以上の反復回数の違いを検出することができた(図2-13参照)。

この反復配列に関しては、ウサギ(Mignotte et al., 1990)およびブタ(Ghivizzani et al., 1993)では個体内および個体間でのheteroplasmy(ヘテロプラスミー)が存在することが既に報告されており、チョウザメでは地域差によるヘテロプラスミーの違いが報告されている。また、Madsen et al. (1993)は、ヘテロプラスミーの起こるメカニズムは、DNA複製の際のslippageとmispairingが原因であると報告している。Hoelzel et al. (1993)は、DNA複製の際のslippageとcrossingoverが原因であると報告している。脊椎動物のmtDNA Dループ内に観察された反復配列に関する総説もあるが(Hoelzel, 1993)が、特に Equus属における種差や在来馬のような生息地域の差にもとづくウマの品種差と反復回数の違い、およびヘテロプラスミーとの関連については未だ解明されておらず、今後の問題として大変興味を持たれるところである。

また、ヒトやマウスではtRNA^{Phe}とlarge central blockの間の領域には3つのshort conserved block(Walberg and Clayton, 1981)が認められているが、mtDNAのH鎖の複製開始点O_Hならびに両鎖の転写開始点は主にこの領域より見つかっている(Clayton 1984, Attardi 1985)。ウマにおいても、同様の配列がこの領域に存在しているものと推察される。また、ウマとウシでlarge central blockのホモロジーは82%であり、この領域はmtDNAの中で最も良く保存されている領域の一つと考えられる。既に図2-11に示したように、哺乳類でconserved block 3とtRNA^{Phe}の間の領域の長さがそれぞれ異なっており、数十bpから数百bpまでの差異が見

られる。ウサギでは、特に長く 153bp×4 回の long repeats も含めて約 670bp である (Mignotte et al., 1990)。さらに、tRNA^{P^{ro}} と large central block の間もその長さや塩基構成が異なっている。これらの事実を併せて考えていくと、ウマをはじめとする哺乳類では D ループの長さに違いが生じており、それは主に D ループの両末端での長さの違いに起因しているためではないかと考えられる。

4. 小括

1)核DNAに比較して塩基置換発生率が高いとされているウマmtDNAの多型性を検出するために、既にクローニングされているブタmtDNAをプローブとしてサザンハイブリダイゼーション法を行い、ウマmtDNAに対する相同性について検討した。その結果、ブタmtDNAプローブは、ウマのmtDNA型に対してハイブリダイズする相対濃度が高く、ウマmtDNAの多型性を検討する上で有効であるものと考えられた。そこで、ブタmtDNAプローブを用いて、サザンハイブリダイゼーション法によるRFLP解析を行ったが、8種類の制限酵素によって切断した非血縁馬（サラブレッド種）の全DNAのRFLP解析からは、いずれの場合も多型性は観察されなかった。従って、全mtDNAを用いたRFLP分析は、ホモロガスな集団であるサラブレッド種等の多型解析には適当な方法とは言えないのではないかと考えられた。

2) mtDNAの中で、特に多型性に富むと考えられるウマmtDNAのDループ領域の全塩基配列を解読するため、PCR法および遺伝子クローニング法を利用してmtDNAの分子クローニングを行った。サラブレッド種の肝臓から分離抽出したmtDNAをテンプレートDNAとして、mtDNA Dループの両端のtRNA領域に設計したプライマーを用いて、PCR増幅産物をTベクターにクローニング後、Dループ全域の塩基配列を解読した。初めてこの研究から、ウマmtDNA Dループ領域の塩基配列を決定することができた。Dループの全塩基数は、1114, 1115, 1146bpであり、その塩基構成は、A; 約28%, C; 約30%, G; 約15%, T; 約27%で、他の哺乳類と同様にA/T richであることが明

らかにされた。

3)ウマのmtDNA Dループ配列の特徴として、ヒト、ウシ、ウサギ等の哺乳類の mtDNAと同様に、large central-conserved-sequence block と、3つのlittle conserved-sequence block (CSB1, CSB2, CSB3) が検出された。また、tRNA^{Phe} とlarge central block の間の領域には 3つのshort conserved block があり、この領域にH鎖の複製開始点O_H ならびに両鎖の転写開始点が存在しているものと推察された。また、ウマとウシにおけるmtDNA Dループ領域でのlarge central block のホモロジーは 82%であり、この領域は mtDNA の中で最も保存された領域の一つと考えられた。ウマと他の哺乳類でDループの長さに差異が認められているのは、主にDループの両末端での長さの違いに起因しているためと考えられた。また、ウマの mtDNAのDループ内の塩基配列の特異的配列として、conserved sequence block 1と 2との間にTGTGCACCの 8bpの tandem repeats が見い出された。その塩基構成は、A. 12.5%; C. 37.5%; G. 25%; T. 25%であった。また、ウマの反復配列中にはGCACの配列が含まれ、かつ中央の 4bpはTGCAでパリンδροミックであり、ピリミジン塩基とプリン塩基が交互に配置していた。反復回数は個体によって18回、18回、22回と違いが検出され、同時にヘテロプラスミーの存在も示唆された。

さらに、3頭のウマの塩基配列の比較より、Dループ全体では18の塩基置換と1つの挿入が認められ、そのうち11の塩基置換が tRNA^{Phe} とlarge central-conserved-sequence blockの間の領域で観察された。従って、この領域がウマ mtDNAのDループにおける hypervariable regionで、ウマ mtDNA多型解析を行う上から、利用

価値の高い領域であることが示唆された。

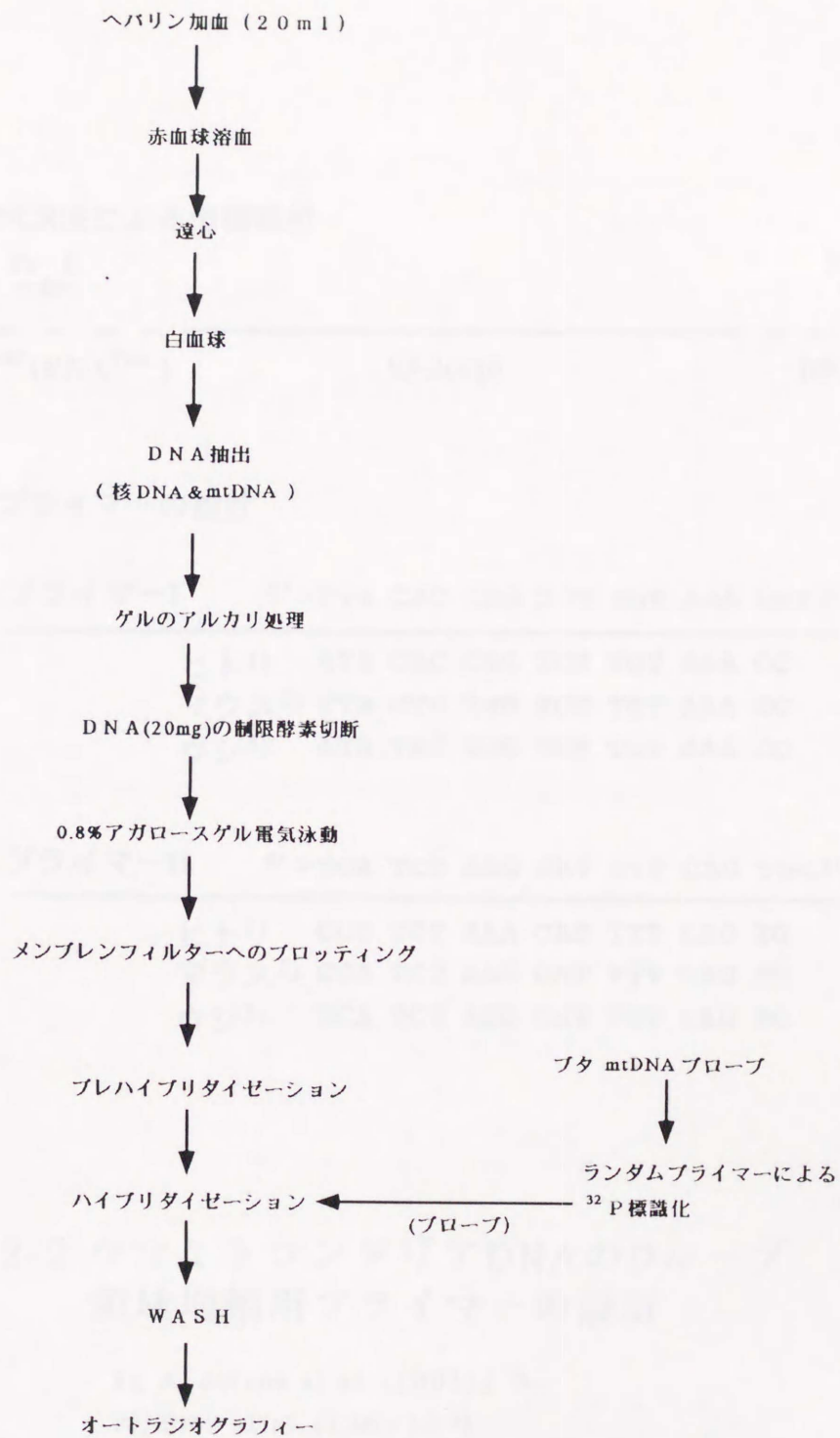


図2-1 サザンハイブリダイゼーション法によるmtDNAの制限酵素切断型の検出

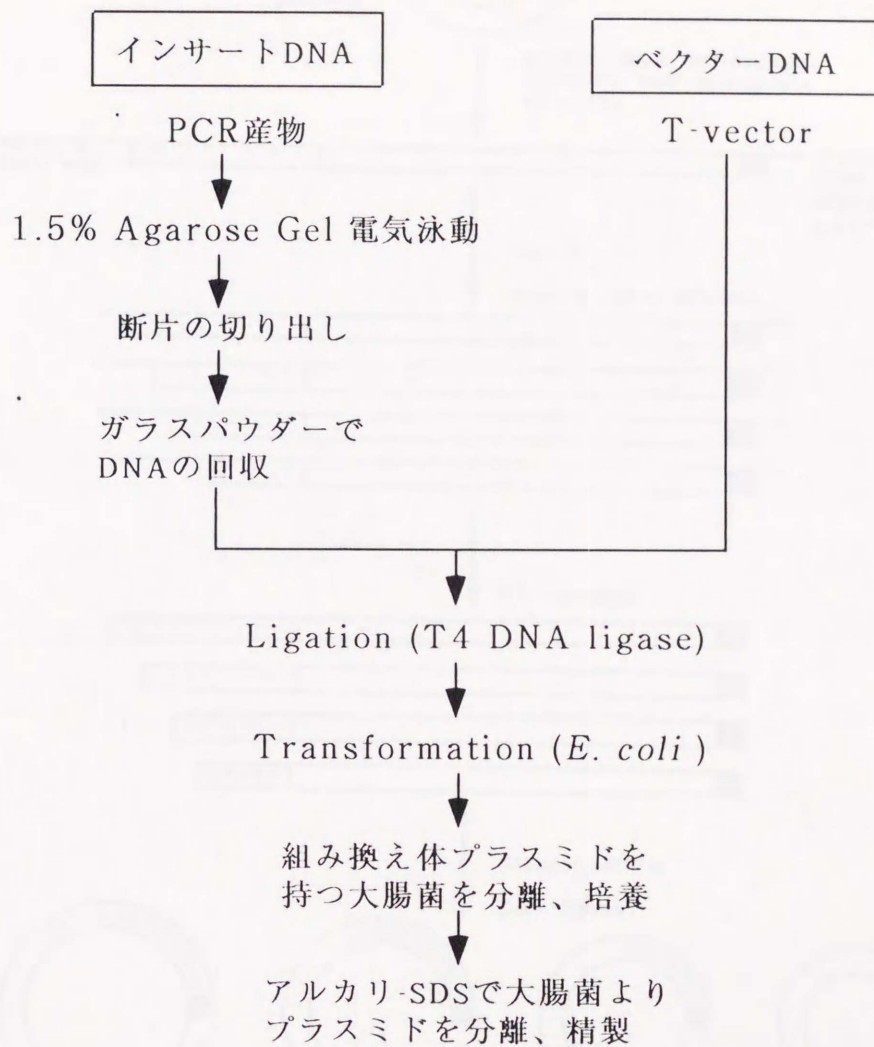


図2-3 ウマmtDNA・Dループ領域の
クローニング

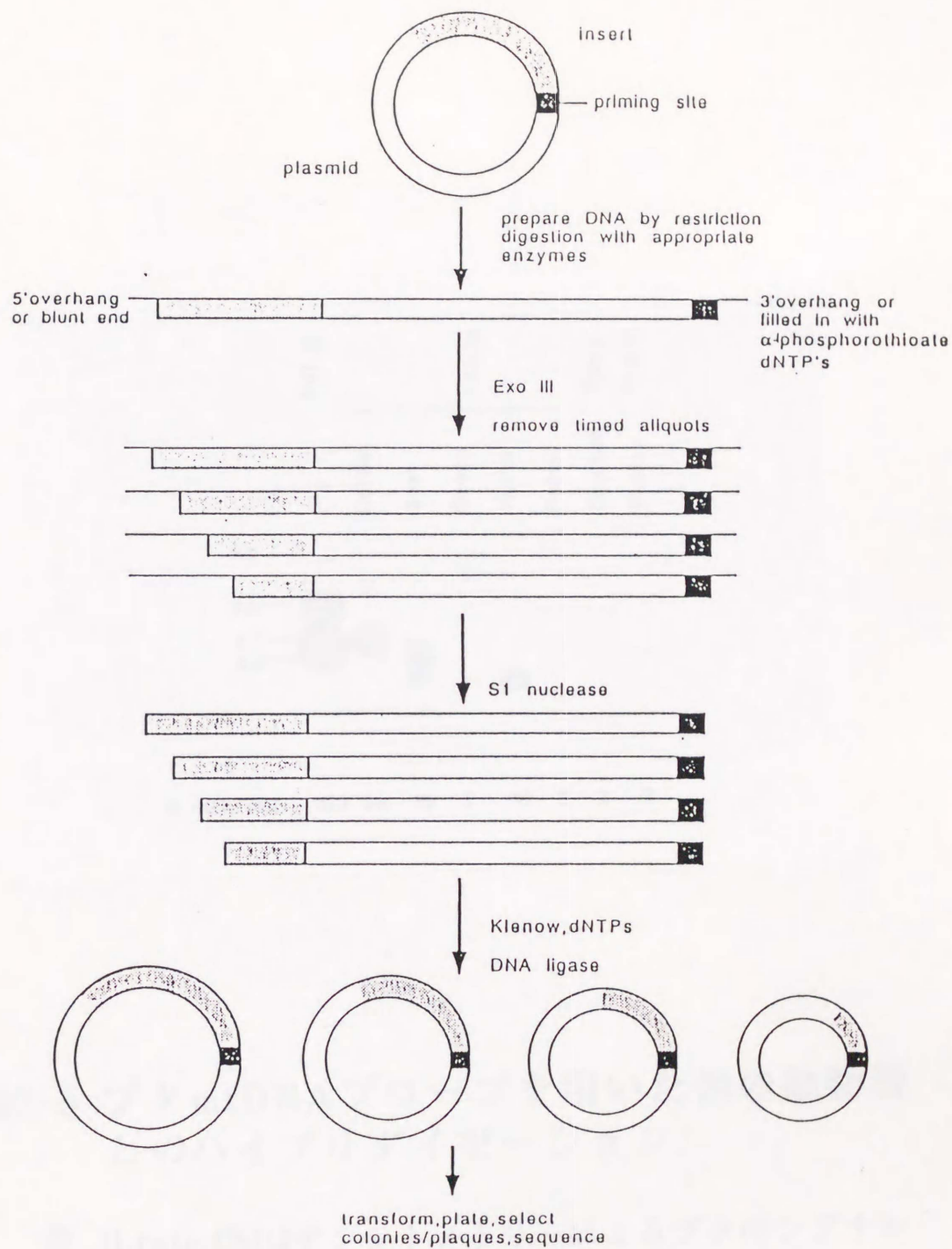


図2-4 デリーションクローンの作製原理

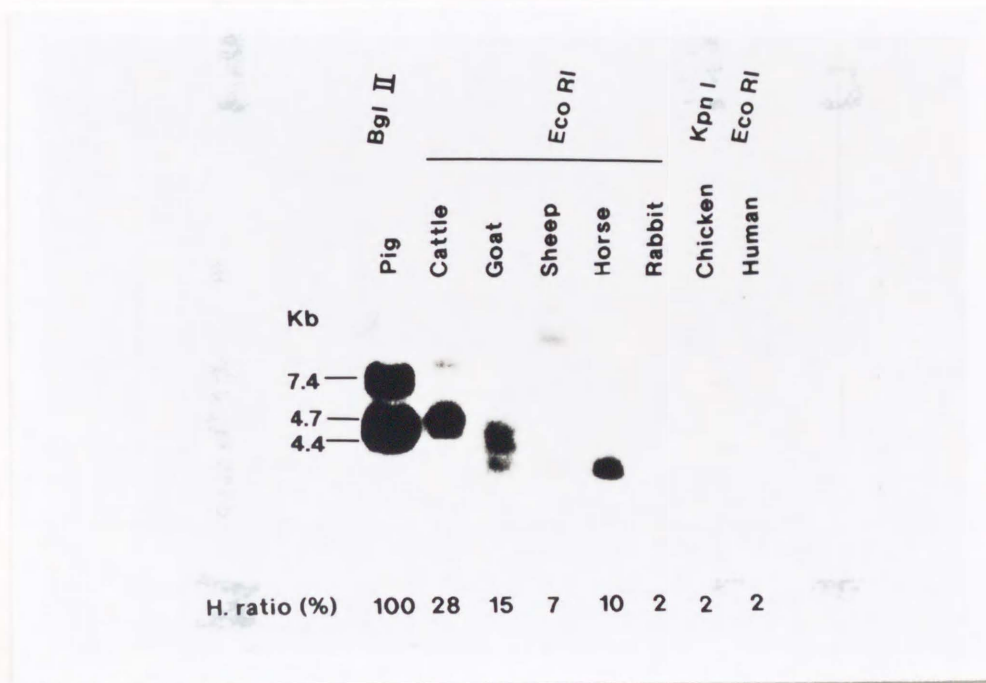


図2-5 ブタ mtDNA プローブを用いた他の動物種とのハイブリダイゼーション

注 H.ratio(%)はデンシトメトリーによるブタのシグナルを100%とした時の相対的濃度を示す。

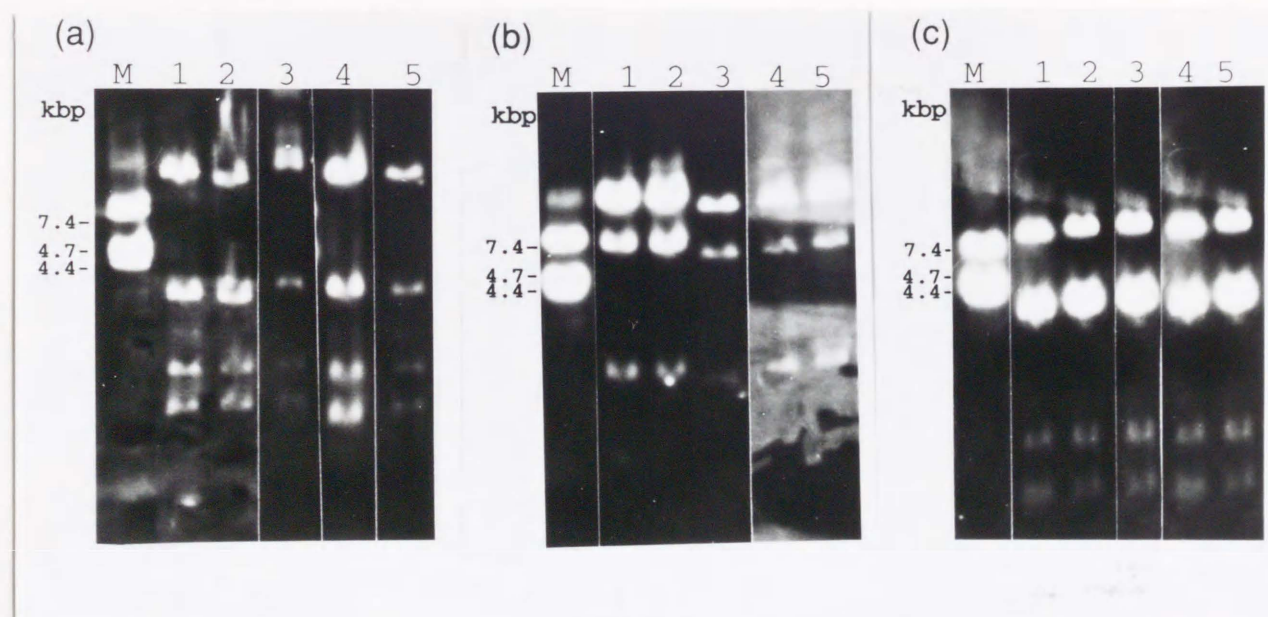


図2-6 非血縁馬5頭(サラブレッド種)のmtDNA制限酵素切断パターン

(a): *Bam* HI (b): *Bgl* II (c): *Eco* RI

M: マーカー(ブタ mtDNAの*Bgl* II切断)

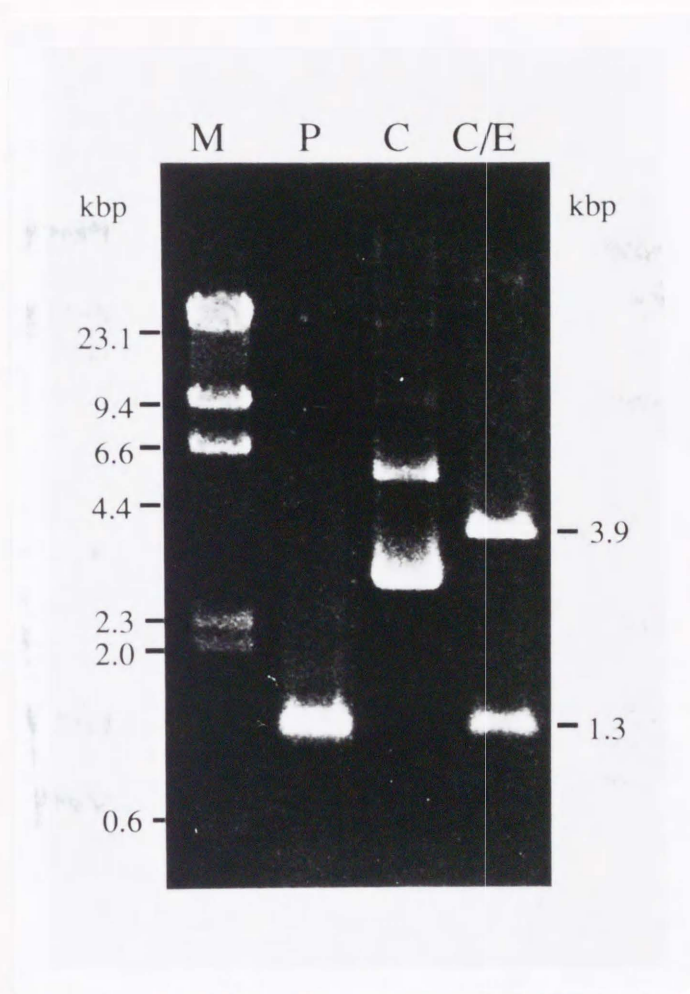


図2-7 PCR産物とそのクローン, および

クローンの*Eco* RI 切断片の比較

P : PCR産物 C : クローン (pEDL 1)

C / E : クローン (pEDL 1) の *Eco* RI 切断片

M : DNA分子量マーカー

tRNA^{Thr} →
 pEDL1: AGAAAAGGGGAAAACGTTCCCTCCCAAGGACTATCAAAGGAGAAGCTCTAGCTCCACCATCAACACCCAAAGCTG 75
 pEDL2:
 pEDL3:
 → tRNA^{Pro}
 pEDL1: AAATTCTACTTAAACTATTCCTTGATTTCCTCCCTAAACGACAACAATCACCCCTCATGTGCTATGTGCTAGTATC 150
 pEDL2:C·G·
 pEDL3:
 pEDL1: AAATTATACCCCCACATAACCACATACCACCTGACATGCAATATCTTATGAATGGCCCATGTACGTCGTG^EAATT 225
 pEDL2: ·G· ·T· ·T· ·A·
 pEDL3:T·
 pEDL1: AGATTGTTTGCCCCATGAATAAAGCATGTACATAATATCATTTATCTTACATAAGTACATTATATTATGATC 300
 pEDL2: ·A· ·CA· ·G·
 pEDL3:
 pEDL1: GTGCATACCCCATCCAAGTCAAATCATTTCCAGTCAACACGCATATCACAACCCATGTTCCACGAGCCTAATCAC 375
 pEDL2:T·
 pEDL3:
 large CSB →
 pEDL1: CAAGCCGCGGGAAATCAGCAACCCCTTCCAACACGTCGCCAATCCTCGCTCCGGGCCATCCAAGCGTTGGGGG 450
 pEDL2:
 pEDL3:
 pEDL1: TTTCTACAATGAAACTATACCTGGCATCTGGTTCTTTCTTCAGGGCCATTCTCACCCAAACCTCGCCCATTTCTTC 525
 pEDL2:T·
 pEDL3:
 → large CSB
 pEDL1: CCCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGCTCACATAACTGTGATTTCATGCATTT 600
 pEDL2:G·
 pEDL3:
 pEDL1: GGTATCTTTTATATTTGGGGATGCTATGACTCAGCTATGGCCGTCAAAGGCCTCGACGCAGTCAATTTAAATTG 675
 pEDL2:T·
 pEDL3:
 CSB1
 pEDL1: AAGCTGGACTTAAATTGAACGTTATTCCTCCGCATCAGCAACCAAGGTGTTATTCAGTCCATGGTAACAGGAC 750
 pEDL2:T·
 pEDL3:
 R1 R2 R3 R4 R5 R6 R7
 pEDL1: ATAGGAAACAAGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCT 825
 pEDL2:
 pEDL3:
 R8 R9 R10 R11 R12 R13 R14 R15 R16 R17
 pEDL1: GTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTG 900
 pEDL2:
 pEDL3:
 R18
 pEDL1: CACCTGTGCACC-----TACCCGCGCAGCAAGCAAGTAATATAGCTTT 975
 pEDL2:
 pEDL3:TGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACC·
 CSB2 CSB3
 pEDL1: CTTAATCAAAACCCCTACCCCATTAACCTCCACATATGTACATTCAACACAATCTTGCCAAACCCCAAAA 1050
 pEDL2:
 pEDL3:
 pEDL1: CAAGACTAAACAATGCACAATACCTCATGAAGCTTAACCTCGCATGCCAACATAAATACTCAACACACCTAAC 1125
 pEDL2:
 pEDL3:
 pEDL1: AATCTTAACAGAACTTCCCCCGCC-ATTAATACCAACATGCTACTTTAATCAATAAAAATTCCATAGACAGGC 1200
 pEDL2:C· ·C·
 pEDL3:
 tRNA^{Phe} →
 pEDL1: ATCCCCCTAGATCTAATTTTCTAAATCTGTCAACCCCTTCTCCCCCGTTAATGTAGCTTAATAATATAAAGCAAG 1275
 pEDL2:G·
 pEDL3:
 pEDL1: G
 pEDL2: ·
 pEDL3: ·

図2-8 3頭のウマmtDNA・Dループ領域の塩基配列

- (注1) tRNA(Thr, Pro, Phe)の配列も併せて示した。
 (注2) 保存領域(CSB1, CSB2, CSB3), 大きな保存領域
 (large CSB: position 374-611), および反復配列を
 を塩基配列の上を示した。
 (注3) ハイフンは塩基の欠失を, ドットはpEDL1と同じ配列を示す。

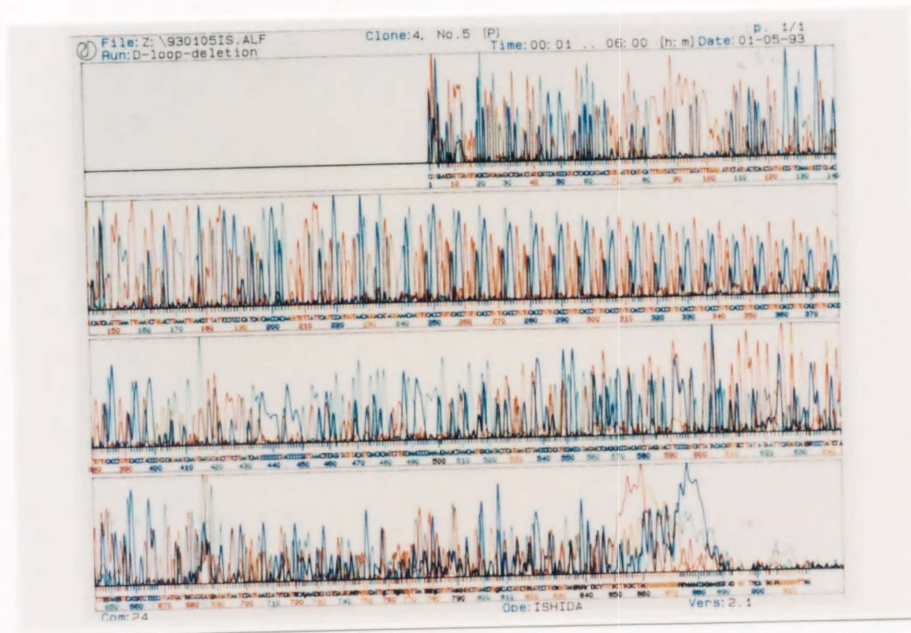


図2-10 Dループ内にみられたウマ特異的の反復配列

(注) TGTGCACCの8塩基が18回繰り返している。

Primer I
TGTTATTCAGTCCATGGTAACAGGACATAGGAAACAAGTGACACCTGTGCA 50
CCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACC 100
TGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTG 150
TGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTGTGCACCTACCCGCGCAGC 200
AAGCAAGTAATATAGCTTTCTTAATCAAACCCCCCTACCCCCATTAAA 250
Primer II
CTCCACATATGTACATTCAACACAATCTTGCCAAACCCCAAAAACAAGAC 300
TAA

図2-12 反復回数の違いを検出するためのPCR増幅部位

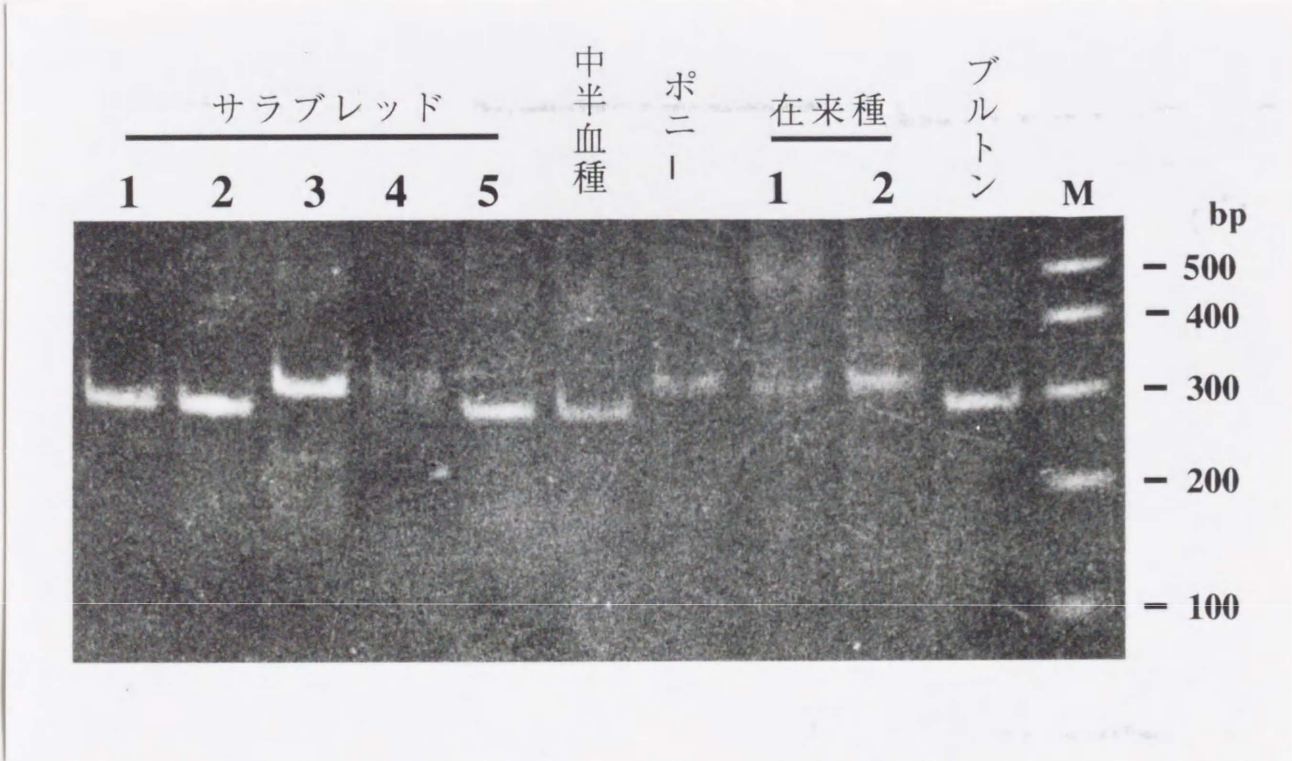


図2-13 家畜馬10頭における, ウマ特異的反复配列のPCR増幅

表2-1 哺乳類のmtDNA・Dループにおける塩基構成の比較

	A	C	G	T
ウマ	314-321 (28.0-28.5%)	339-351 (30.4-30.6%)	163-171 (14.6-14.9%)	294-303 (26.4-26.6%)
ヒト	337 (30.0%)	373 (33.2%)	154 (13.7%)	259 (23.1%)
ウシ	229 (32.9%)	222 (24.4%)	125 (13.7%)	264 (29.0%)
マウス	299 (34.0%)	218 (24.8%)	104 (11.8%)	258 (29.4%)
ウサギ	583 (31.7%)	530 (28.9%)	234 (12.7%)	491 (26.7%)

(注) () 内は, 割合 (%) を示す.

第3章 ウマmtDNA Dループ領域のDNA多型解析法の検討

1. 緒言

ウマ mtDNAにおける多型解析を進めていくために、前章で述べたとおり、ウマmtDNA Dループ領域の全塩基配列を解読し、その塩基配列の構造解析を行ったところ、Dループ全体で18の塩基置換と1つの挿入を認め、そのうち11の塩基置換がtRNA^{P_ro}と large central-conserved-sequence blockとの間の領域で観察された。従って、この領域がウマ mtDNAのDループにおけるhypervariable regionであることが明らかとなり、特にウマmtDNA 多型解析を行う上で、利用価値の高い領域であることが示唆された。そこで、これらの塩基配列が決定されたウマmtDNA のDループを利用して多型解析を行うために、有用な手法を確立するために最近開発されてきた3つの代表的な多型分析法を検討し、ウマの mtDNA多型検出のための実用化を試みた。

まず第一に、polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphisms (PCR-SSCP) 法について検討した。PCR-SSCP法は、Orita et al. (1989) によって開発された技術であり、ゲノムDNAに存在する任意の部位における塩基置換を電気泳動によるバンドの移動度の違いとして検出する方法である。本法は、異なる塩基配列を持つ一本鎖DNAのとり高次構造が、それぞれの塩基配列特異的なものであるために、電気泳動移動度が異なってくることを利用したものである。また、実験操作が簡単なために、変

異の種類が判明しているガンや遺伝病のDNA診断および研究にも応用されている(Groden et al., 1991; Dworniczak et al., 1991)。従来, 点突然変異に由来する多型性を検出するためには, サザンブロットハイブリダイゼーション法によって分析するか, 目的のDNA領域を分子クローニングした後, 塩基配列の解読等を行う必要があり, 煩雑な技術と多くの時間を必要としている。そこで簡便にDNAの多型性を検出するために有効な本法をウマ mtDNAのDループ領域 299bpの分析に用いて, バンドの検出に大きな影響を与えると考えられるポリアクリルアミドゲルの濃度, 電気泳動温度およびゲルに含まれるグリセロール濃度を検討し, 電気泳動の最適条件の決定を試みた。さらに, ウマ mtDNA多型検出に際して, 本方法の有効性についても検討を加えた。

第二の方法として, PCR-RFLP法を検討した。Saiki et al. (1988)により開発された PCR法を利用して, オリゴヌクレオチドプローブとドットハイブリダイゼーションを組み合わせたPCR-SSO (sequence specific oligonucleotide)法によって, ヒトの HLA-DNAのタイピングが可能となった。しかし, 多数の対立遺伝子が存在する HLA遺伝子の場合には, 多数の SSOプローブとフィルターを準備する必要があり, ハイブリダイゼーションフィルターの洗浄の条件も各プローブごとに設定する煩雑な操作が必要であり, 1塩基ミスマッチの判別が困難な場合もあり, 非特異的なハイブリダイゼーションが避けられない場合もあるなどの欠点も知られている。これらの欠点を補う方法として, Uryu et al. (1990)は, HLAアロ抗原タイプを決定するPCR-RFLP法を開発した。この方法は, PCR で遺伝子を増幅後, 標的遺伝子が対立遺伝子の特異的に切断する制限酵素に

より切断されるか否かを電気泳動を用いて判定する方法である。この方法は、PCR-SSO 法に比較して煩雑な操作がなく簡便であること、再現性に優れていること、時間を短縮でき、多数のフィルターや SSO プローブを用意する必要がないこと、また放射性同位元素を用いずに結果の判定が容易なことなど多くの利点が知られている。こうした研究状況下のもとに、前章の研究で明らかとなった D ループの塩基配列のうち、 $\text{tRNA}^{\text{P}^{\text{ro}}}$ と large central-conserved-sequence block との間の最も変異が蓄積した部位を増幅するようなプライマーを設計するとともに、塩基置換部位を認識する制限酵素を使ったウマ mtDNA の D ループ領域の PCR-RFLP による多型解析を試みた。

第三の方法としては、ダイレクトシーケンス法について検討した。ダイレクトシーケンス法は、PCR 産物そのものを鋳型として PCR 産物の塩基配列を決定する方法である。従来の方法では、PCR 産物中の特定の 1 つの DNA 分子をクローニングして、その塩基配列を決定していくのに対して、ダイレクトシーケンス法はクローニングの過程を経ずに、PCR で増幅された複数の DNA 分子の塩基配列を同時に決定する特徴を持っている。PCR の過程で誤って導入された変異も、平均化されてしまい、実際の塩基配列の結果には現れてこない。従って、正確かつ迅速に塩基配列を決定することができる。ダイレクトシーケンス法の決めては、いかに効率よく PCR 産物から一本鎖 DNA を生成できるかにあり、今までにさまざまな方法が工夫されてきている。例えば① PCR 産物を熱変性後急冷して一本鎖 DNA を得るもの (Wong et al., 1987), ② 2 種類のプライマーのモル比を変えて PCR を行い、少量の二本鎖 DNA と多量の本鎖 DNA を生成する非対称 PCR 法 (asymmetric PCR) (

Gyllenstern et al., 1988; 宝来ら, 1991), ③ PCR産物の一方のプライマーのみを加えて 2回目の PCRを行い, 一本鎖DNAだけを増幅する方法 (宝来ら, 1991; Murray et al., 1989), ④ PCR産物の二本鎖の一方の鎖のみを λ エキソヌクレアーゼで消化して一本鎖DNAを得る方法 (Higuchi et al., 1989), ⑤一方のプライマーをビオチン標識して PCRを行い, ストレプトアビジンの結合したマグネットビーズを使い, ビオチンとストレプトアビジンの結合を利用して一本鎖DNAを得る方法 (固相化シーケンス法) (Hopegood et al., 1992) などがある。本研究では, ⑤の方法である FITC 標識されたシーケンスプライマーと全自動シーケンサーを用いて容易に解析ができ, ヒトの mtDNA 研究で実際に利用され, 良好な結果が報告されている固相化シーケンス法 (Hopegood et al., 1992) を利用した。そしてウマ mtDNA の D ループの tRNA^{Phe} と the large central-conserved-sequence block の間の領域を PCR 増幅して, 直接塩基配列を決定し, ウマ mtDNA の多型解析を行うためにこの方法を利用することの有用性について検討した。

2. 実験材料と方法

1) PCR-SSCP分析法

(1) ウマ全DNAの調製

非血縁のサラブレッド種 5頭より採血した全血10mlより, 前章で述べた方法により全DNAを調製し研究に用いた。

(2) PCR増幅

SSCPの検出感度を高く保つためには, PCR 増幅断片は300bp 以下とすることが望ましいので(村上ら, 1992), 図 3-1に示すように, ウマ mtDNAのDループ領域 299bpを増幅するようなプライマーを調製した。PCR 反応液は, テンプレートDNA (全DNA 400ng), プライマー (1pmol/ μ l, each), dNTP mix. (1.25mM, each), Buffer(1mM Tris-HCl pH8.3, 5mM KCl, 1.3mM MgCl₂, 0.02% NP-40), Taq DNA polymerase(2.5unit, Cetus) をそれぞれ加えて, total volumeを50 μ l としたものをを用いた。PCR反応は, 予備変性を96°Cで 2分行い, 次に変性94°C 1分, アニール53°C 1分, 伸長72°C 2分を30回行った。また, 最後の伸長は72°C 10分で行った。

(3) PCR-SSCP 分析

a. 電気泳動用サンプルの調製

泳動用サンプルは, (2)において増幅した PCR産物にホルムアミド色素液 (95% ホルムアミド, 0.5% EDTA, 0.05% BPB, 0.05% Xylene Cyanol)を 7倍量加え, 100°C, 10分間熱変性した後, 氷中で急冷して一本鎖DNAとしたものをを用いた。

b. 電気泳動条件

ポリアクリルアミドゲルは架橋度を低く抑えるために, アクリル

アミドとビスアクリルアミドの割合を49:1に調整し、泳動バッファーには $0.5 \times$ TBE 緩衝液を使用した。ゲル濃度は、5%、7%および10%、泳動温度は 4°C 、 10°C および 15°C として比較検討した。また、通電量はいずれも1W/7.5cmとした。さらに、ゲルに対するグリセロール添加の有無の影響についても検討した。泳動装置は、市販の循環恒温槽付ミニスラブ電気泳動装置（アトー株：レゾルマックス）を用いた。

c. 染色方法

電気泳動後のゲルの染色は、銀染色法によって行った。すなわち、50% 冷エタノールにてゲルを固定した後、アルカリ液(0.075% NaOH)に30分間浸した。さらに、銀染色液(0.075% NaOH, 0.25% アンモニアおよび0.36% AgNO_3)にて22分間処理した後、現像液(0.005% クエン酸, 0.02% ホルマリン)にて発色させた。反応停止液には3% 酢酸を用いた。

2)PCR-RFLP分析法

(1) テンプレートDNAの調製

PCR用テンプレートに用いたDNAは、非血縁のサラブレッド3頭（日本中央競馬会美浦トレーニングセンターで繋養）、馬事公苑で繋養の中半血種1頭およびポニー1頭の全血20mlより抽出、精製して用いた。

(2)PCR増幅

サラブレッド種3頭のmtDNA Dループ領域の塩基置換部位を検索し、図3-2に示すように、センス側の7か所の塩基置換を含む領域(232bp)を増幅するプライマーを設計した。また、PCR反応液は、

テンプレートDNA (全DNA 200~400 μ g), プライマー(1pmol / μ l, each), dNTP mix. (1.25 mM, each), Buffer(1mM Tris/HCl pH8.3, 5mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.02% NP-40), Taq DNA Polymerase(2.5unit, Cetus)をそれぞれ加えて, total volumeを50 μ l とした。PCR反応は, 予備変成96°C 1分で行い, 次に変成94°C 1分, アニーリング62°C 1分, 伸長72°C 1分30秒を30回行った。また最後の伸長は72°C 10分で行った。さらに, PCR産物(232bp, 図3-2参照)に対して, 3か所の塩基置換部位を認識するAci I(CCGCを認識, New England Biolabs), Cfr 13I (GGNCCを認識, Takara), Mse I(TTAAを認識, New England Biolabs)の3種類の4塩基認識制限酵素を用いて, PCR-RFLP分析を試みた。制限酵素処理は, PCR産物7 μ lを3種類の制限酵素4~8 unitsを用いて, 37°C 2~3時間感作して行った。制限酵素切断片は, 5%ポリアクリルアミドゲル(70V, 80 min)で電気泳動し, ethidium bromide染色後, UV励起光下で観察した。サイズマーカーとしては, Bio-Marker Low (フナコシ株)を用いた。

3)PCR-ダイレクトシーケンス分析法

(1)ウマ全DNAの調製

非血縁の5頭のサラブレッド種より採血した全血20mlより, 全DNAを調製した。

(2)PCR増幅

PCR用のプライマーは, 図3-3に示すように, 超可変領域を増幅できるように, サラブレッドのDループの塩基配列 (Ishida et al., 1994)のうち, tRNA^{Phe}とlarge conserved-sequence blockの部位に設計した。プライマーの配列は, 5' -GCTGAAATTCTACTTAACTA

TTCCT- 3' および 5' (Biotin labeled)-AGTTGGAAGGGTTGCTGATT- 3' である。PCR反応液は、テンプレートDNA (全DNA 600ng), プライマー(1pmol / μ l, each), dNTP mix. (1.25mM, each), Buffer (1mM Tris/HCl pH8.3, 5mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.02% NP-40), Taq DNA Polymerase (4unit, Cetus) をそれぞれ加えて, total volume を75 μ l としたものをを用いた。PCR反応は, 予備変性を96°Cで 2分 行い, 次に変性94°C 1分, アニール58°C 1分, 伸長72°C 1分を 35回行った。また, 最後の伸長は72°C10分で行った。これらの PCR 産物の一部は, 2%アガロースゲル電気泳動で正しく増幅されている ことを確認した。

(3)ダイレクトシーケンス法

PCR産物は, マイクロスピカラム(Pharmacia社)により精製し, アルカリ変性による一本鎖DNAをマグネットビーズ (Dynabeads; Dynal)を用いて回収した (図 3-4参照)。シーケンス反応は, T7 polymerase (Pharmacia), FITCラベルをしたプライマー 5' (FITC labeled)-GCTGAAATTCTACTTAAA- 3' を用いて, ジデオキシ法 (Sanger et al., 1977)で行った。電気泳動は ALF全自動シーケンサー (Pharmacia) を用いて, 超可変領域の塩基配列を決定した。また, 塩基配列のホモロジー検索はDNASIS-Mac(Hitachi Software Engineering)を用いて行った。

3. 実験結果および考察

1) PCR-SSCP法によるDループ領域 299bpの解析

(1) PCR-SSCP分析のための各種の条件検討

ウマ mtDNAのDループ領域における多型性をPCR-SSCP分析法によって検出する場合，それらの塩基置換に基づく一本鎖DNAの高次構造の差を電気泳動によるバンドの移動度の違いとしてとらえる必要がある。しかし，泳動分析像は，ゲル濃度，泳動温度およびゲルに含まれるグリセロールの濃度などによって影響を受け易い。そこで，まずtRNA^{Phe}に隣接し，塩基置換が認められたウマmtDNA Dループ領域 299bpを特異的にPCR増幅し，単一のバンドとして観察されたPCR産物をサンプルとして，多型性を正確に分析するために各過程の条件について順次検討した。なお mtDNAは環状二本鎖DNAであり，母性遺伝することから，PCR産物をSSCP分析した場合2本のバンドとして観察されることが期待できる。ただし，ヘテロプラスミーの場合には4本以上のバンドが検出される可能性も考えられる。

a)ゲル濃度とサンプル量の検討について

ミニスラブ電気泳動によってウマmtDNA Dループの塩基置換をSSCP分析する場合，アクリルアミドゲルの濃度，すなわちゲルのポアサイズが大きく影響すると考えられるので，泳動用ゲル濃度を5%，7%および10%の3段階に設定して，電気泳動分析を行い，その結果を図3-5に示した。なお，それぞれのゲルは，10%グリセロールを含ませ，また，サンプルの量は50ng，25ngおよび10ngで検討した。

この結果、5%ゲルでは塩基置換の高次構造の違いによるバンドの分離能が低く、10%では非特異的なバンドの出現が多く見られたのに対し、7% [図 5の(b)]の場合は多型性が認められる比較的鮮明なバンドパターンが得られた。

b)電気泳動温度の検討について

前述のゲル濃度条件検討より、良好な結果が得られた7%ポリアクリルアミドゲルを用いて、泳動温度を検討した。この結果、4℃ではバンドの間隔が広すぎ、10℃では非特異的なバンドが出現するためにバンドが3本に見えるケースが多かった。一方、15℃ [図 3-6の(c)]では、各バンドが明瞭に検出され、またバンド間隔も良くこの条件が最適であると判断された。

c)グリセロールの影響について

前述の条件検討に基づき、7%ポリアクリルアミドゲルを用いて、15℃で泳動を行い、ゲル中にグリセロールを含む場合と含まない場合の検討を行った。この結果、図 3-7の(a)に示すようにグリセロールを10%含むゲルでは、多型性を示す各バンドの分離が良好であったが、グリセロールを含まないゲルでは多型性が検出されず、非特異的なバンドが検出された。

これらの結果から、ウマの mtDNAのDループ領域 299bpを指標として多型性を検出する場合には、10%グリセロールを含む7%ポリアクリルアミドゲルを用いて、泳動温度15℃でPCR-SSCP分析を行うのが有効であると判断された。また、これらの分析条件によって分析した非血縁の5頭のサラブレッド種において、3つのSSCPバンドパターンを検出することができ、この方法は、ウマmtDNA Dループ領域の多型解析を行う上で有用な方法であることが示唆された。

なお、PCRによりDループ領域の単一DNA断片が増幅されるにもかかわらず、このPCR産物についてSSCP解析を行うと一本鎖DNAが同じ移動度を示さず、ウマ mtDNAの場合3本以上、ときにはスメア状になったが、これは一本鎖DNA断片が複数の安定な高次構造をとること、あるいはゲルの表層と深層の間の微妙な温度条件の相違などにより、異なる高次構造をとることなどが考えられた。

2)PCR-RFLP法によるDループ領域 232bpの解析

次に、塩基置換部位を認識するDNA制限酵素を使ったウマ mtDNAのDループ領域のPCR-RFLPによる多型解析を行った。すなわち、mtDNAのtRNA^{Phe}とlarge central-conserved-sequence blockとの間の7か所の塩基置換を含む領域(232bp)について、PCR増幅を行い、精製されたPCR産物を3種類の制限酵素で消化した後、5%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法によって制限酵素切断パターンを解析した。ウマ mtDNAのDループ領域をPCR増幅した結果、5頭のサラブレッドのサンプルはすべて単一のバンドとして特異的に増幅することができた。また、PCR時のテンプレート量は、全DNAとして200~400 μ gで十分であることも判った。各PCR産物の大きさは等しく、欠失や挿入は観察されなかった。そこで、これらのPCR産物を3種類の制限酵素を用いて消化し、電気泳動によって得られた制限酵素切断パターンを図3-8、3-9 および3-10に示した。Aci I消化では、図3-8に示すように、3つの切断パターンが認められた。サラブレッド個体2、3 および中半血種には、制限酵素サイトはみられず、フラグメントの大きさは232bpであった。サ

ラブレット個体 1 のフラグメントは、133 bp と 99bp であり、またポニーは、152bp と 80bp であった。なお、サラブレット個体 1 およびポニーの Aci I 消化のパターン B には、2 つの切断片の他に、232 bp の断片も認められた。それは、ヘテロプラスミーのためであろうと考えられた。また、ポニーでは、図 3-2 の 3 頭について DNA アライメントの比較から、さらに他の部位に変異が生じているものと考えられる。

Cfr 13I 消化では、図 3-9 に示すように、2 つの切断パターンが認められた。すなわち、サラブレット個体 1, 3, 中半血種、ポニーには、制限酵素サイトが認められず、フラグメントの大きさは 232bp であった。サラブレット個体 2 は、179bp と 53bp であった。

Mse I 消化では、図 3-10 に示すように、2 つの切断パターンが認められた。サラブレット個体 2, 3 のフラグメントの大きさは、173 bp と 59bp であった。サラブレット個体 1, 中半血種、ポニーでは、139 bp, 59bp と 34bp であった。これらの 3 種類の制限酵素による切断パターンを組み合わせた DNA タイピングの結果を表 3-1 に示したが、5 頭のウマでそれぞれ 1~5 型の 5 つの型に分類された。今回 3 つの制限酵素でそれぞれ 3 種、2 種および 2 種類のパターンを認めたので、最高で $3 \times 2 \times 2 = 12$ のタイプが存在するものと推察された。以上の結果から、PCR-RFLP 法は、ウマの mtDNA D ループの多型解析法として有効な方法であると考えられた。

3) PCR-ダイレクトシーケンス法による D ループ超可変領域を利用した多型解析

ウマmtDNA Dループにおける塩基置換を指標とした多型分析の第3番目の方法として、PCR-ダイレクトシーケンス法について検討した。この方法を行うために、前述のPCR-RFLP法で用いたDループ領域と同じtRNA^{Phe}とlarge central-conserved-sequence blockの間をPCR増幅し、この領域について固相化シーケンス法を用いて塩基配列解読を行った。その結果、PCR反応で多型性を示す領域を含む336bpのDNA領域のみが特異的に増幅されており、シングルバンドとして観察された。なお、1頭のサンプルにおいてはPCR増幅がやや不良であったが、このPCR産物の1/10量をテンプレートDNAとして、再度PCRを実施したところ、増幅は良好に進行し、必要とするPCR産物量が得られた。また、前述のPCR産物に関するシーケンス反応においては、プライマーピークによる影響のため、プライマー接合部位の直後の約20塩基の配列を判読できない場合が多かったが、概ね良好にシーケンス反応と塩基配列解読を行うことができた。

5頭のサラブレッド種で塩基配列の判読が可能であった271塩基すべてを図3-11示した。コントロールとしてpEDL1(Ishida et al., 1994)の配列を併記し、比較した。この結果、表3-2に示すように、ウマmtDNAのDループの271塩基のうち、21か所の塩基置換と2か所の欠失が認められた。これらの全塩基置換数のうち96%がトランジション型塩基置換であり、トランスバージョン型塩基置換はわずかに4%であった。以上の結果より、遺伝学的に類似性が高く、ホモログな集団と言われているサラブレッド種においては、PCR-ダイレクトシーケンス法によりmtDNAのDループで多くの変異を認めることができ、また本方法では、簡便に変異に関して多くの情報を

得ることができたので、品種内の変異解析、品種識別、進化解析等に利用可能な有用な研究方法であると考えられた。

4. 小括

塩基配列が決定されたウマ mtDNAのDループ領域の塩基配列を利用して以下の3つの方法によって多型解析を行い、結果を検討した。

PCR-SSCP法では、Dループ領域299bpの解析法を検討し、10%グリセロールを含む7%ポリアクリルアミドゲルを用いて、15°Cで電気泳動を行うのが、最適条件であることが示された。また、5頭の非血縁馬で、3種類のバンドパターンを認めることができた。

PCR-RFLP法では、Dループのhypervariable region 232bpをPCR増幅して、3か所の塩基置換部位を認識する4塩基認識の制限酵素 Aci I, Cfr 13I, Mse I を用いて検討した。また、サラブレッド種3頭、中半血種1頭、ポニー1頭を用いてRFLP解析を行い、Aci I, Cfr 13I, Mse Iの3つの制限酵素で、それぞれ3種、2種および2種の切断パターンを識別することができた。また、3つの制限酵素による切断パターンの組み合わせにより、5頭のウマが5型のお互いに異なるタイプに分かれた。

PCR-ダイレクトシーケンス法では、マグネットビーズを用いた固相化シーケンス法を検討した。5頭の非血縁のサラブレッド種を用いて、Dループのhypervariable region 336bpをPCR増幅して、塩基配列を直接決定した。既に塩基配列の決定しているサラブレッドの1頭とその配列を比較したところ、271塩基の中21の塩基置換と、2か所の欠失を検出することができた。本方法では、簡便に変異に関して多くの情報を得ることができるので、多型解析に最適な方法であると考えられた。

以上の3方法は、有用な多型解析法であることが示された。

Primer I
CCCCATTAAACTCCACATATGTACATTCAACACAATCTTGCCAAACCCCA 50
AAAACAAGACTAAACAATGCACAATACTTCATGAAGCTTAACCCTCGCAT 100
GCCAACCATAATAACTCAACACACCTAACAATCTTAACAGAACTTTCCCC 150
CCGCCATTAATACCAACATGCTACTTTAATCAATAAAAATTTCCATAGACA 200
GGCATCCCCCTAGATCTAATTTTCTAAATCTGTCAACCCTTCTTCCCCCG 250
Primer II
TTAATGTAGCTTAATAATATAAAGCAAGGCAACTGAAAATGCCTAGATGA 300

図3-1 PCR-SSCP解析のためのウマmtDNAのDループ領域299bp

(注) ナンバー250-299: tRNA^{Phe}の領域

Primer I

pEDL1: AGGACTATCAAAGGAGAAGCTCTAGCTCCACCATCAACACCCCAAAGCTGA 50
pEDL2:
pEDL3:

MseI AciI

pEDL1: AATTCTACTTAAACTATTCCTTGATTTCTTCCCCTAAACGACAACAATTC 100
pEDL2:C
pEDL3:

pEDL1: ACCCTCATGTGCTATGTCAGTATCAAATTATACCCCCACATAACACCATA 150
pEDL2: G.....G.....T.....
pEDL3:

Cfr13I MseI

pEDL1: CCCACCTGACATGCAATATCTTATGAATGGCCCATGTACGTCGTGCATTA 200
pEDL2:T.....A.....
pEDL3:T.....

Primer II

pEDL1: GATTGTTTGCCCCATGAATAATAAGCATGTAC
pEDL2: A.....
pEDL3:

図3-2 PCR-RFLP分析のためのDループ増幅部位232bp
(注1) *Aci* I, *Cfr* 13 I, *Mse* Iは, 3か所の塩基置換部位を認識する.
(注2) PCR-RFLP分析のためのプライマー部位を併せて示した.

Primer I

pEDL1: GCTGAAATTCTACTTAAACTATTCCTTGATTTCTTCCCCTAAACGACAACAATTCACCCT 60
 pEDL2:C·G·
 pEDL3:

pEDL1: CATGTGCTATGTCAGTATCAAATTATACCCCCACATAACACCATACCCACCTGACATGCA 120
 pEDL2:G·.....T·
 pEDL3:

pEDL1: ATATCTTATGAATGGCCCATGTACGTCGTGCATTAGATTGTTTGCCCCATGAATAATAAG 180
 pEDL2:T·.....A·.....A·.....CA·
 pEDL3:T·.....

pEDL1: CATGTACATAATATCATTTATCTTACATAAGTACATTATATTATTGATCGTGCATACCCC 240
 pEDL2:G·
 pEDL3:

pEDL1: ATCCAAGTCAAATCATTTCAGTCAACACGCATATCACAACCCATGTTCCACGAGCCTAA 300
 pEDL2:T·
 pEDL3:

Primer II

pEDL1: TCACCAAGCCGCGGGAAATCAGCAACCCTTCCAACT
 pEDL2:
 pEDL3:

図3-3 PCR-ダイレクトシーケンスのためのDループ増幅部位

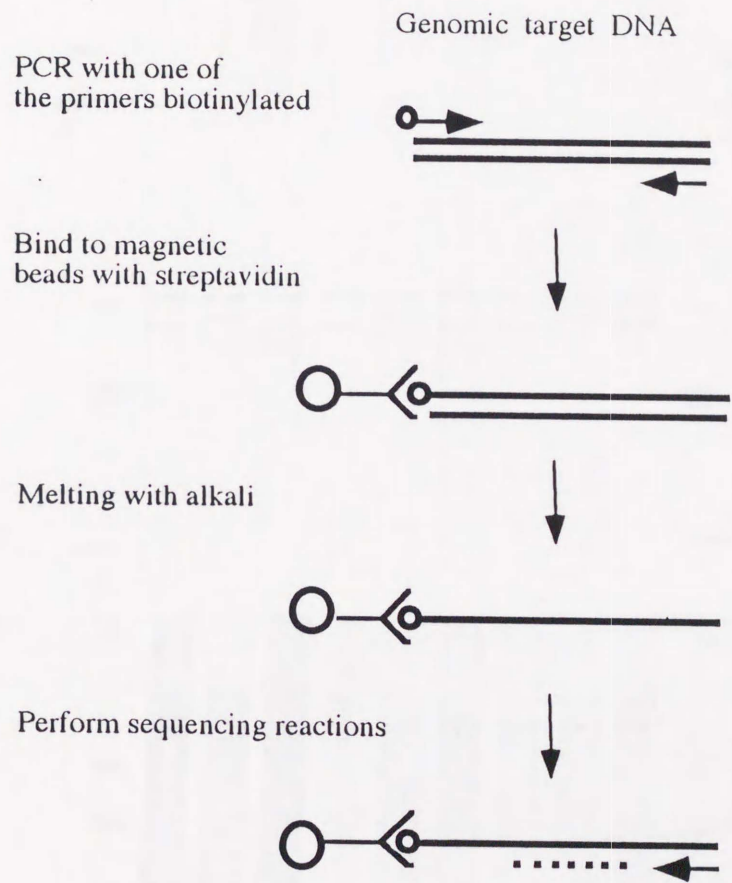


図3-4 固相化シーケンス法の原理

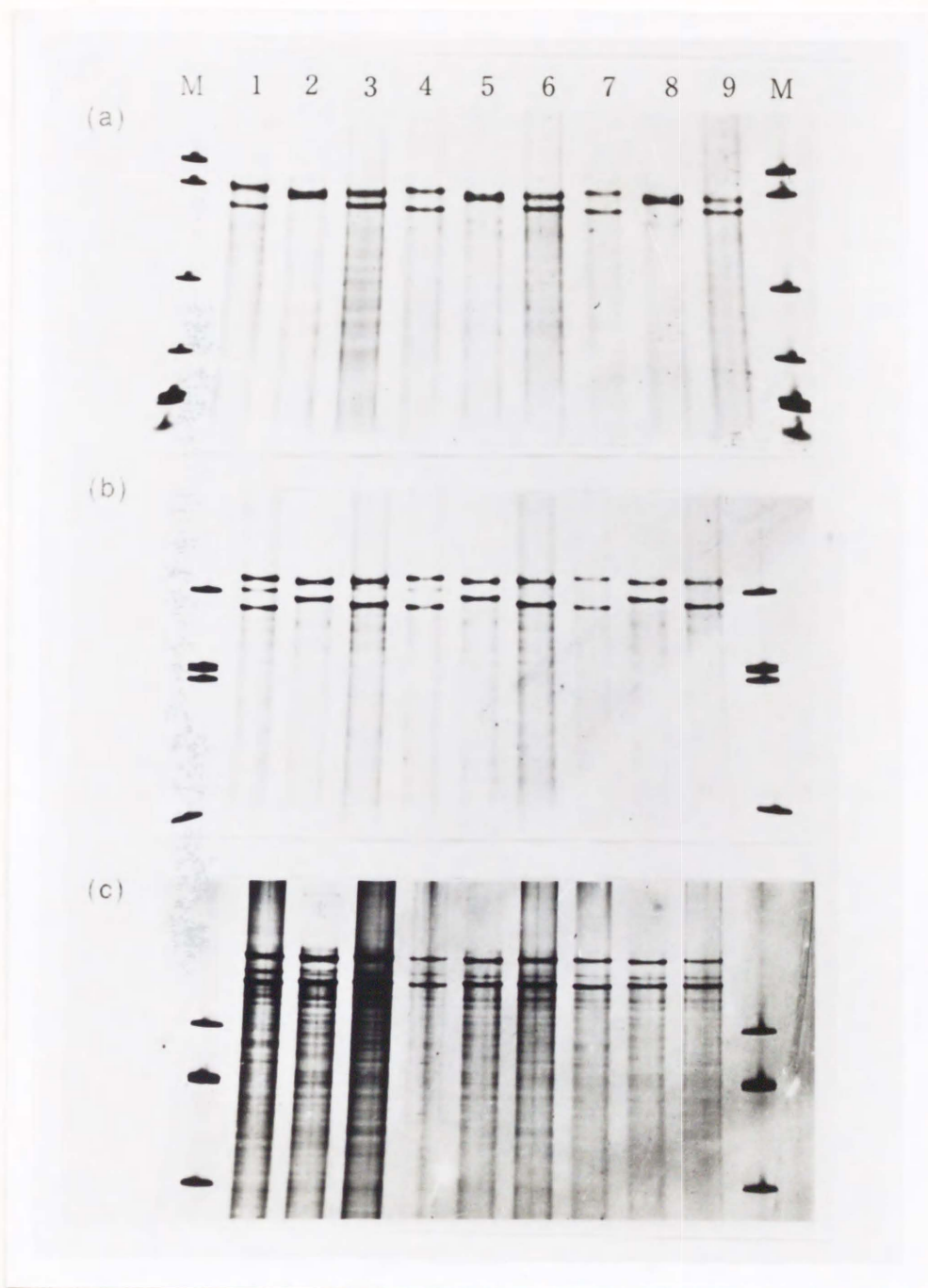


図3-5 ウマmtDNAのDループ領域を用いたPCR-SSCP解析のゲル濃度およびサンプル量の検討

3個体のサラブレッドDNAより得たPCR産物を用いた。

(a), (b), (c)はそれぞれ5%, 7%および10%ポリアクリルアミドゲル。

M: ϕ X174/*Hinc* II レーン1-3: 50ng

レーン4-6: 25ng レーン7-9: 10ng

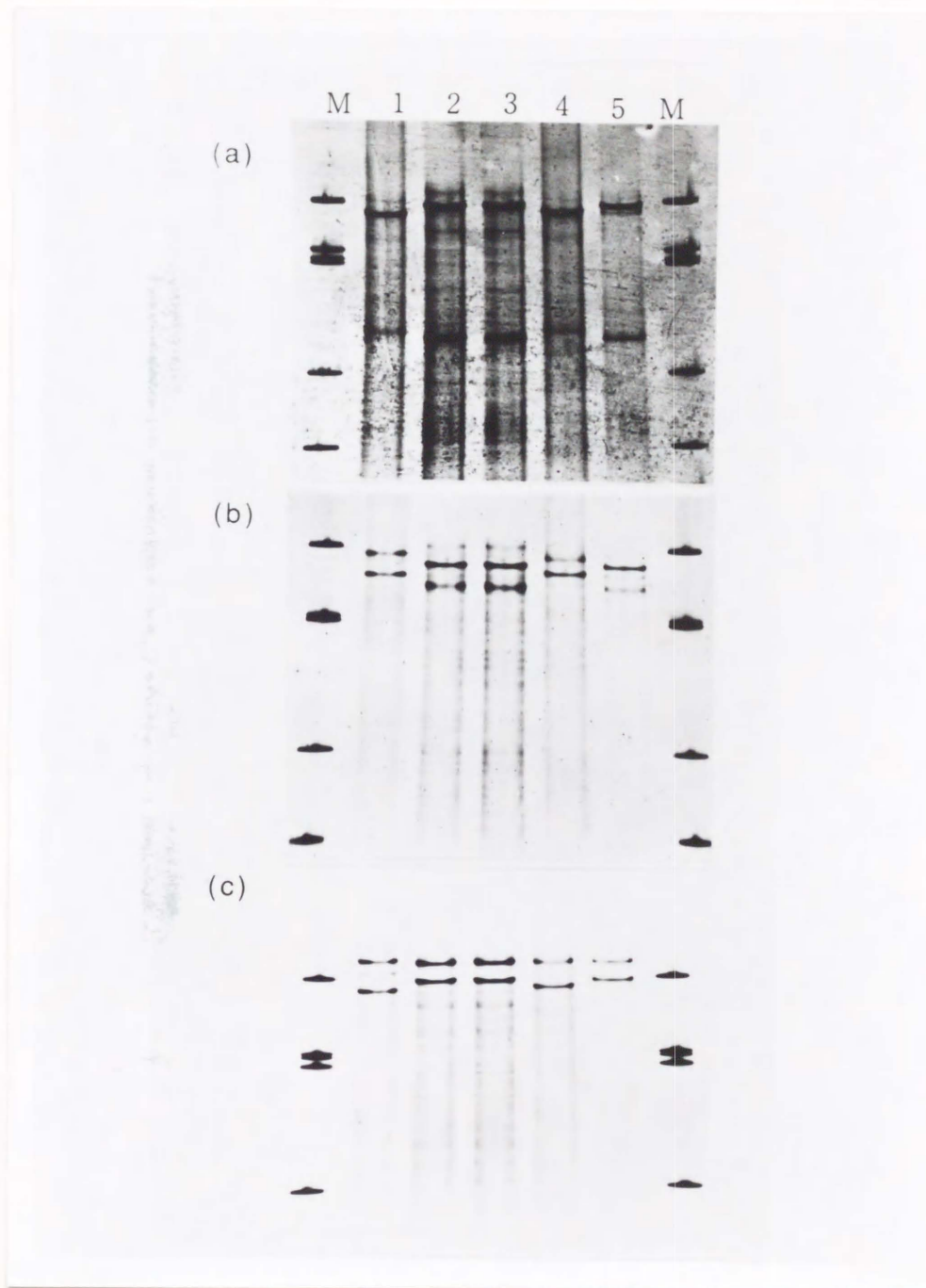


図3-6 ウマのmtDNAのDループ領域を用いたPCR-SSCP解析の泳動温度の検討

(a), (b), (c)はそれぞれ4°C, 10°Cおよび15°C.

M: ϕ X174/Hinc II.

レーン1-5: サラブレッド5個体のゲノミックDNAを
テンプレートとしたPCR産物.



図3-7 ウマのmtDNAのDループ領域を用いた
PCR-SSCP解析のゲルに含むグリセロール
濃度の検討

(a): 10%グリセロール添加, (b): グリセロール無添加,
M: ϕ X174/*Hinc* II, レーン1-5: サラブレッド5個体の
ゲノミックDNAをテンプレートとしたPCR産物.

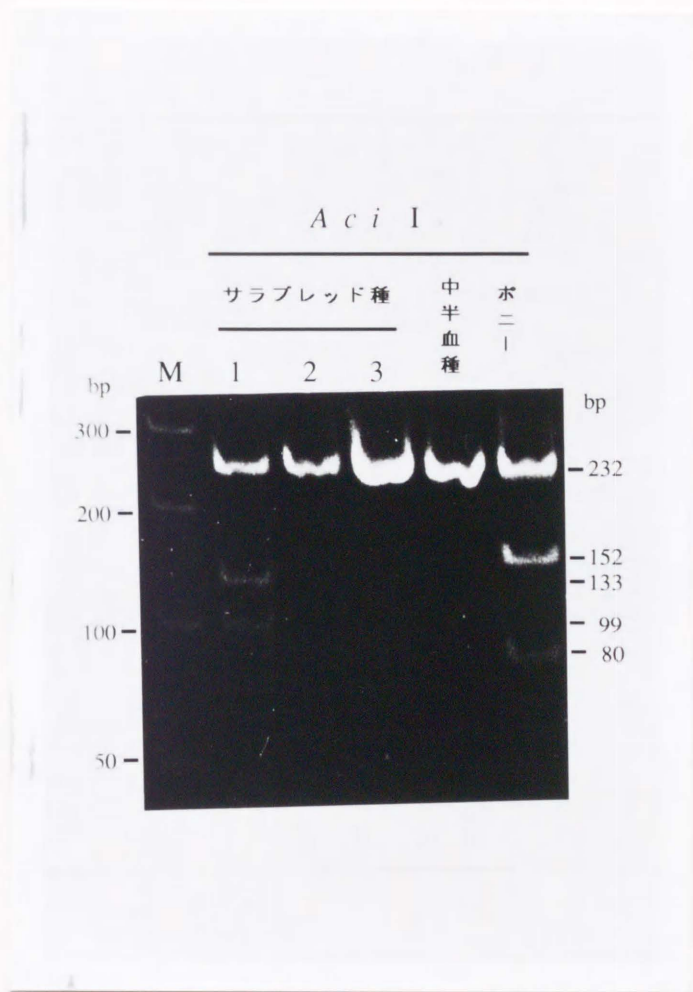


図3-8 非血縁馬5頭のPCR産物の制限酵素*Aci I*切断パターン

M:サイズマーカー

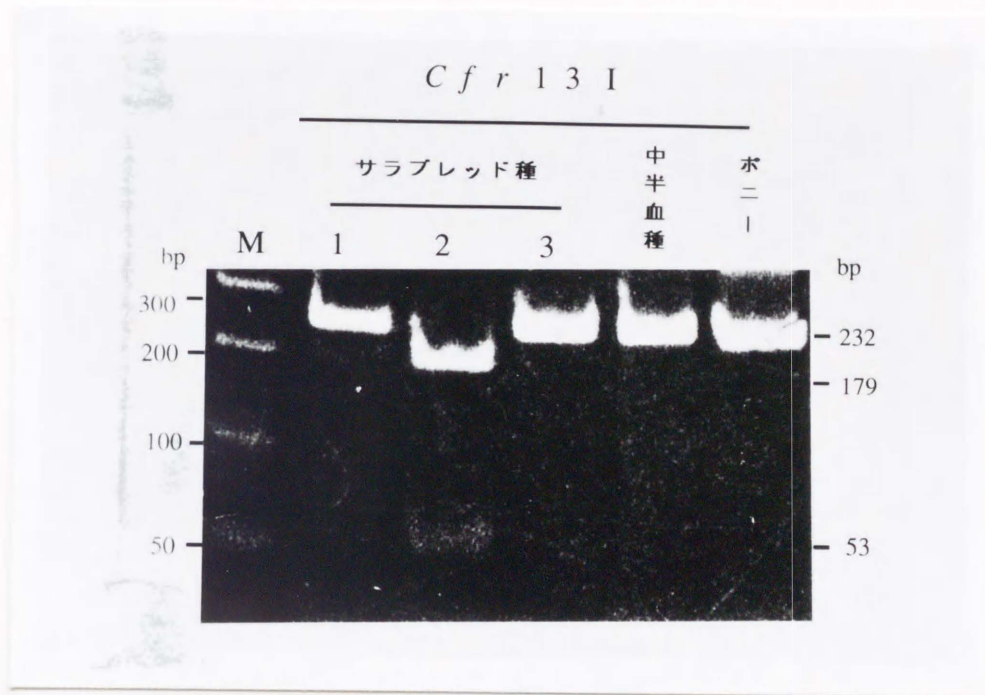


図3-9 非血縁馬5頭のPCR産物の
制限酵素*Cfr* 13I切断パターン
M:サイズマーカー

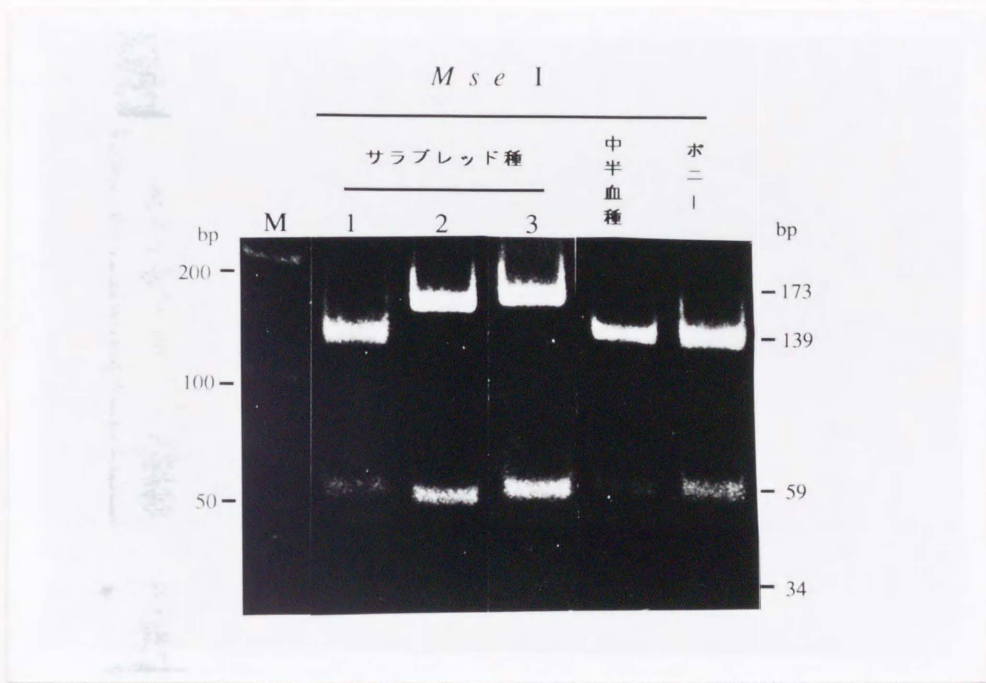


図3-10 非血縁馬5頭のPCR産物の制限酵素Mse I切断パターン

M:サイズマーカー

pEDL1	ACAACAATTCACCTCATGTGCTATGTCAGTATCAAATTATACCCCCACA	50
Thoroughbred1T·T.....C.....T·	
Thoroughbred2G.....	
Thoroughbred3C·G.....G.....T·	
Thoroughbred4G.....G.....T·	
Thoroughbred5G.....C.....	
pEDL1	TAACACCATACCCACCTGACATGCAATATCTTATGAATGGCCCATGTACG	100
Thoroughbred1C.....T.....	
Thoroughbred2T.....	
Thoroughbred3T.....A	
Thoroughbred4T.....A	
Thoroughbred5G.....T.....A	
pEDL1	TCGTGCATTAGATTGTTTGCCCATGAATAATAAGCATGTACATAATATC	150
Thoroughbred1A.....A.....C.....	
Thoroughbred2A.....	
Thoroughbred3A.....CA.....	
Thoroughbred4A.....CA.....	
Thoroughbred5A.....	
pEDL1	ATTTATCTTACATAAGTACATTATATTATTGATCGTGCATACCCCATCCA	200
Thoroughbred1T.....	
Thoroughbred2A.....	
Thoroughbred3G.....	
Thoroughbred4G.....	
Thoroughbred5	
pEDL1	AGTCAAATCATTTCAGTCAACACGCATATCACAACCCATGTTCCACGAG	250
Thoroughbred1C.....	
Thoroughbred2	
Thoroughbred3	
Thoroughbred4	
Thoroughbred5	
pEDL1	CCTAATCACCAAGCCGCGGGA	
Thoroughbred1	·T·G·	
Thoroughbred2	·T·	
Thoroughbred3	·T·	
Thoroughbred4	·T·	
Thoroughbred5	

図3-11 6頭のサラブレッドのmtDNA・Dループ271bpの塩基配列の比較

表3-1 PCR-RFLPによるタイピング

	<i>Aci</i> I (C!CGC)	<i>Cfr</i> 13 I (G!GNCC)	<i>Mse</i> I (T!TAA)	TYPE
サラブレッド I	B	A	B	1
サラブレッド II	A	B	A	2
サラブレッド III	A	A	A	3
中半血種	A	A	B	4
ポニー	C	A	B	5

(注) 1. *Aci* I cleavaged pattern

A: 232bp B: 133+99bp C: 152+80bp

2. *Cfr* 13 I cleavaged pattern

A: 232bp B: 179+53bp

3. *Mse* I cleavaged pattern

A: 173+59bp B: 139+59+34bp

表3-2 サラブレッド6頭のmtDNA・Dループ領域
における塩基置換, 欠失の分析

Type of Mutation	No. Observed	
	Entirety of Data	Each Position
Substitution :		
Transition :		
T → C	7	5
C → T	14	5
A → G	10	5
G → A	12	4
Total	43 (96)^{a)}	19 (90)^{a)}
Transversion :		
A → C	1	1
G → T	1	1
Total	2	2
Deletion :		
C → -	4	1
G → -	1	1

a) %は塩基置換のうちTransition型の占める割合

第4章 ウマmtDNA Dループ領域の多型解析

1. 緒言

第2章で、ウマのmtDNA Dループ領域が多型検出に適していることを明らかにし、また第3章においてそれらの多型解析のために、PCR-SSCP, PCR-RFLP, PCR-ダイレクトシーケンスの3つの方法が有効であることを明らかにした。本研究では、これらの方法を利用した家畜馬における品種識別および品種内集団における多型性の推移および母性遺伝など、いくつかの解析への応用を試みた。

まず、家畜馬における各品種の識別のためにmtDNA Dループ多型の応用を試みた。現在競馬産業における利用性の大きい品種として、家畜馬 *Equus caballus* の中でサラブレッド種が最も多く繁殖され、その他に乗馬用としてポニー種などが飼育されているが、各国に生息する野生馬や在来馬等については各品種とも極めて生息数は減少しており、全地球的ウマ資源保護の観点から、それらの品種を維持していくことが肝要である。現在競走馬として利用されているサラブレッド種やアラブ種、また北海道和種や木曾馬などの日本在来馬については、いずれも品種としての血統管理がなされており、特に体高や毛色などの外貌や血液蛋白質型などの発現形質を利用して、品種を規定している。しかし、家畜馬に対する遺伝子解析などDNAレベルでの客観的な品種識別マーカーはまだ見つかっていない。そこで、本研究においては、前章の研究で決定したウマ mtDNAのDループ領域の塩基配列多型を利用した品種の類型化（品種識別）に

について検討した。

次に、現在家畜馬 Equus caballus の品種としてその育成状況が異なる 3 集団（サラブレッド種，北海道和種，モンゴル在来馬）について，mtDNA 多型を指標として，それぞれの集団内における D ループ内の塩基配列の変異の程度を調べた。これらの 3 集団は，家畜馬においてはそれぞれに関係のない別個の集団であり，3 集団はそれぞれ遺伝的に類似性が高いと考えられているので，同一集団内の解析に利用可能な，優良な遺伝的指標が要望されていた。

また，品種内集団における母系性の遺伝力を調べるため，サラブレッドの 1 家系について 3 世代わたる mtDNA 多型の母性遺伝様式を調べるとともに，実際的な応用例として母子関係が疑われている一組の母子について，その関係の有無を PCR-ダイレクトシーケンス法で調べた。

2. 実験材料と方法

1) mtDNA Dループ多型解析法

ウマ mtDNAの多型解析は、前章で検討した 3つの方法を用いて行った。

2) 家畜馬における品種識別法

PCR-ダイレクトシーケンス法により、家畜馬に属する 5品種 7頭（サラブレッド種 2頭，ポニー 2頭，トカラ馬 1頭，北海道和種 1頭，御崎馬 1頭）の mtDNAのhypervariable region内の 271bpの塩基配列を決定し，すでにこれらの塩基配列が決定されている 3頭のサラブレッド種の塩基配列（Ishida et al., 1994）と比較検討した。

3) サラブレッド集団，北海道和種馬集団，およびモンゴル在来馬集団の解析法

(1) サラブレッド集団の解析法

競走馬として登録されている非血縁のサラブレッド20頭を用いてPCR-SSCP法で解析し，アリーの種類とその頻度を調べた。これをサラブレッド以外の品種で調べた結果と比較した。

また，非血縁のサラブレッド58頭を用いて，PCR-RFLP法により解析し，塩基置換による構造変異に基づく泳動パターン（アリー）の種類とその頻度を調べた。

さらに，PCR-ダイレクトシーケンス法により，非血縁のサラブレッド17頭の 271bpの塩基配列を決定し，すでに報告されている 3

頭のサラブレッド種の塩基配列 (Ishida et al, 1994) と比較検討した。

(2) 北海道和種馬集団の解析法

北海道帯広市の 3地区で飼育され、血統の明らかな北海道和種24頭を用いて、PCR-RFLP法により解析し、アリーの種類とその頻度を調べた。

また、PCR-ダイレクトシーケンス法により、20頭の北海道和種馬についてmtDNA Dループの 271bpの塩基配列を決定し、その中の1頭をコントロールとして、塩基配列の相違を比較解析した。

(3) モンゴル在来馬集団の解析法

モンゴル国は、図 4-1に示すように総面積約 150万km² の広大な牧畜国であり、約 200万頭のウマが生息している。これらのウマは、モンゴル在来馬 (Mongolian native horses) と呼ばれ、図 4-1において区分されているように、5 地域に 4品種が放牧されている。本研究では、これらの 4品種のうちの 3品種、すなわちTuv 種14頭、Galshir 種16頭、Tes 種11頭、計41頭を用いてPCR-RFLP法により解析した。

また、PCR-ダイレクトシーケンス法により、Tuv 種 8頭、Galshir 種10頭、Tes 種 2頭の合わせて20頭のmtDNA Dループ領域における 271bpの塩基配列を決定し、その中の 1頭をコントロールとして、塩基配列の相違を比較解析した。

4) mtDNA Dループ領域の塩基置換多型を利用した家系解析法

青森県の S牧場の協力によってサラブレッド種の 3世代にわたる家系から採血を行い、ウマmtDNA Dループ領域をPCR-SSCP, PCR-

RFLP, PCR-ダイレクトシーケンス法の 3つの方法を用いて mtDNA D ループ領域の多型解析を行い, 遺伝様式を検討した。

5) mtDNA 多型を利用した母子判定法

重種馬において母子関係に疑問が出されている一組の母子馬に関して, PCR-ダイレクトシーケンス法により, 271bp の塩基配列を決定し, その親子関係の有無を調べた。

3. 実験結果および考察

1) mtDNA Dループ多型を指標とした家畜馬における品種識別の検討

mtDNA Dループ内超可変領域の塩基置換による多型性を利用して家畜馬における品種識別を試みた。サラブレッドをはじめとする家畜馬の5品種7頭についてこの超可変領域の271bpの塩基配列を決定し、既に配列の決定している3頭のサラブレッド種の塩基配列 (Ishida et al., 1994) と共に比較した。その結果、それらの全塩基配列の中で変異が観察された部位を表4-1に示したが、この271bpのうち、32か所に変異部位が認められた。このうち、31か所は塩基置換であり、欠失は1か所であった (表4-2参照)。また、塩基置換の種類は、全体の82%がトランジション型塩基置換であった。このうち、表4-3に示すように5か所の塩基配列の組み合わせを比較したところ、サラブレッド種では、117番目がAとGに分かれ、タイプM1とM2に分けることができた。また、トカラ馬はタイプM3に、北海道和種はタイプM4に、御崎馬はタイプM5に、2頭のポニーはタイプM6にそれぞれ分類することができた。このようにmtDNA Dループ内の塩基配列の変異を指標とした解析によって、明らかに家畜馬の品種間における差を認めることができた。従って家畜馬内における品種類型化 (識別) 用遺伝標識としてmtDNA Dループの塩基置換部位の有効性が示唆された。

2) サラブレッド集団，北海道和種馬集団およびモンゴル在来馬集団 に対する解析

次に特定のウマ集団におけるmtDNA Dループの塩基置換多型の分布について調べた。

(1) サラブレッド集団の解析

まず，PCR-SSCP解析によるサラブレッド集団内の塩基置換の大きさとその高次構造による変異について調べた。その結果，表 4-4に示すように，サラブレッド集団内における各個体のDNA変異バンドパターンの中に，3種類の変異が認められた。これを便宜上バンドの間隔が狭い順にタイプ A，B，Cと命名したが，このうちタイプ Aが最も多いことが明らかになった。また，タイプ Bと Cもそれぞれ35および 20%の出現頻度が認められた。しかし，出現頻度の分布はサラブレッドと他の品種間で明瞭な差異は見られなかった。

次に，3種類の制限酵素を用いてのPCR-RFLP法による解析を行い，その結果を表 4-5および表 4-6に示した。サラブレッド集団では，そのほとんどが，制限酵素切断パターン(A, A, B)というタイプであったから，他の品種では，(A, A, B)タイプと(C, A, B)タイプがみられ，その割合は 2:1に分かれた。これは，主に3種の制限酵素のうちAci Iの切断パターンを反映しているものと考えられる。これらの成績について，サラブレッドと他の品種を1つにした家畜馬 *Equus caballus* という集団で考えると，(A, A, B)タイプと(C, A, B)タイプの2種類で大部分が占められることから，サラブレッドは主に(A, A, B)タイプの小さな集団から選抜，育種されてきたものではないかと推察された。

次に、PCR-ダイレクトシーケンス法によるサラブレッド集団の解析を行った。サラブレッド20頭におけるmtDNA Dループの超可変領域 271bpの中で、変異のみられた29部位を表 4-7に示した。また、これらの変異の形態について分析した結果を表 4-8に示したが、超可変領域 271bpの塩基中で、塩基置換27か所および欠失 2か所が認められた。塩基置換については、その 94%がトランジション型であり、トランジションの 4つの組み合わせ(T→C, C→T, A→G, G→A)が、ほぼ同じ割合で観察された。

サラブレッド種は競走馬として人為的に血統管理がなされてきた動物種であるため、Family Table (Studbook) をたどれば、全ての母系をたどることが可能である(Shirai, 1990)。また、mtDNA は前述のように母性遺伝することが明らかになっているので、Family Numberを利用すれば、逆に mtDNAの変異の程度を調べていくことができる。そこで、20頭のサラブレッド種の中でFamily Number 5 に属する 4頭の mtDNAについて調べた。図 4-3には、これら 4頭の血縁関係を示したが、サラブレッド 1(Th-1)の 2代前とサラブレッド 4 (Th-4)の 3代前は共通祖先であり、いずれもオンワードフリー (1964年生) に到達する。さらに15代逆上ると、サラブレッド20 (Th-20)との共通であるShepherdess(1809年生) に到達する。そこから15代逆上ると、サラブレッド15(Th-15) との共通祖先であるEbony(1728年生) に到達し、さらに 2代逆上ると、Family Number 5の根幹牝馬であるThe Massey Mare(生年不詳) にたどりつくことができる。次に、サラブレッド 4頭におけるmtDNA Dループ超可変領域の変異の数を図 4-4に示した。Th-1とTh-4は、25年前が共通祖先であるが、変異は 1か所に見られた。Th-1とTh-20 およびTh-4とTh-20

は、約 180年前が共通祖先であり、変異は前者に 1か所、後者に 0か所であった。Th-1とTh-15, Th-4 とTh-15 およびTh-20 とTh-15は、それぞれ約 260年前が共通祖先であり、それぞれ 4か所、5か所および 5か所に変異が見られた。このような変異については、ウシの場合に同じ家系で数代を経る間に塩基置換が見られたという報告がある(Olivo et al., 1983)。しかし、サラブレッド種では、血統書が完備しているので、前述のように検査した個体から約 300年前まで血統をさかのぼることが可能である。本研究に用いたサラブレッドの個体は、最大で30代前まで逆上ることができ、また、Family Number 5 の家系における mtDNAの変異の程度についても明らかにすることができた。

(2) 北海道和種馬集団の解析

北海道和種馬集団について、PCR-RFLP法による解析を行った。その結果を表 4-9に示した。Aci I, Cfr 13Iの 2種類の制限酵素では、すべてバンドパターン Aを示したが、Mse I では22頭がパターン Bを、2頭は A+B のパターンを示した(図 4-5参照)。これら 3種類の制限酵素切断パターンを組み合わせると、北海道和種馬24頭の中22頭が同じパターンを示しているという結果となった。従って、この集団は、遺伝的類似性の極めて高い集団であると考えられる。次に、PCR-ダイレクトシーケンス法による北海道和種馬の解析結果を表4-10に示した。20頭の中の 1頭をコントロールとして、そのアライメントを比較した(表4-11参照)。その結果、271塩基で13の塩基置換が認められたが、そのすべてがトランジション型であった。また、塩基置換部位は、サラブレッドと比較して少なく、

すべてがトランジション型の変異であり、遺伝的に非常に近親な集団であると考えられる。この北海道和種の集団は、Mukoyama et al. (1994)のTG繰返し配列によるマイクロサテライトDNA多型解析でも、アリーの分布に顕著な偏りが報告されている。

(3) モンゴル在来馬集団の解析

モンゴル在来馬についてPCR-RFLP法によるmtDNA Dループの多型解析を行い、その結果を表4-12に示した。Aci Iでは、切断パターン Aが22頭(53.7%)、切断パターン Bが1頭(2.4%)および切断パターン Cが15頭(36.6%)であった。さらにこの他に切断パターン B+Cが3頭(7.3%)認められた。これらの切断パターンについてさらに詳細な検討を加えたところ、図4-6に示したように、切断パターン B+Cは、パターン Bとパターン Cを合わせた切断パターンを示していることが判った。Cfr 13I切断では、41頭すべてが切断パターン Aであった。Mse I切断では、切断パターン Aは認められず、切断パターン Bが20頭(48.8%)、切断パターン Cが21頭(51.2%)認められた。図4-7に見られるように、サラブレッド等では観察されない切断パターン Cが、モンゴル在来馬のみに認められた新しい切断パターンであった。次に、Aci I切断パターンと Mse I切断パターンを組み合わせた mtDNA型とモンゴル在来馬3品種の関係を表4-13にまとめて示した。しかし、これら3種の間ではmtDNA Dループによる明確な品種差は認められなかった。

一方、2種類の制限酵素切断でモンゴル在来馬においては、日本の馬では観察されなかった2つの切断パターンが認められたことは極めて興味深く、モンゴル在来馬は日本在来馬の北海道和種やサラ

ブレッドの集団と比べて遺伝的に多様性に富むことが示唆された。

次にPCR-ダイレクトシーケンスによる解析を行った。すなわち、モンゴル在来馬のmtDNA Dループの超可変領域における塩基配列の相違の結果を表4-14に示した。また、この変異のアライメント解析の結果を表4-15に示したが、271塩基の中、35か所の塩基置換、1か所の欠失が認められた。トランジション型の塩基置換は、81%であり、サラブレッド種や北海道和種に比較してトランスバージョンの割合が、かなり高くなっていることが判った。このことは、モンゴル在来馬が遺伝的にかなり多様性に富む集団であることを示唆するものと考えられる。しかし、モンゴル在来馬3品種の間には、明らかな差異が認められなかった。また、Tuv(35頭)、Galshir(90頭)の両地区の品種を合わせた125頭についてTGリピートの反復回数の差を検討した。その結果を図4-8に示したが、アリアルサイズが141bpというTG繰返し配列においてサラブレッドでは見られなかった新しいアリアルが検出された。このアリアルは、日本在来馬にも見られないものであるが、フィンランドの在来馬で確認されている(Mukoyama et al., 1994)。これらの事実は、モンゴル在来馬の成立には、ヨーロッパからの遺伝子流入があったと言うZeuner(1963)の説を間接的に裏付けていると考えられる。また、モンゴル在来馬は、日本の在来馬の北海道和種と比べると、遺伝子構成の上で、品種特異性が少ないものと考えられる。

3) 家系解析への応用

次に、PCR-SSCP、PCR-RFLP、PCR-ダイレクトシーケンス法の3つの方法を用いて、ウマmtDNA Dループについての母性遺伝の関係

を調べた。これらの結果は図 4-9～図4-11に示した。図 4-9に示した結果は、PCR-SSCP法による解析結果であるが、祖母、母、子のモルフはいずれも Bタイプで、父は Aタイプであった。図4-10は、制限酵素Mse I および Aci Iを用いたPCR-RFLP法による解析結果であり、祖母、母、子のモルフは同一であったが、父は異なったモルフを示していた。図4-11は、PCR-ダイレクトシーケンス法による解析結果で、祖母、母、子のDループ内における 271塩基はすべて一致が見られたが、父は 9か所で異なっていた。以上の 3つの方法で mtDNA Dループ配列の遺伝関係を検討したところ、すべてのシーケンスがいずれも正確に母性遺伝していることを確認することができた。

4) 母子判定例

重種馬において母子関係が疑われた一組の母子について、PCR-ダイレクトシーケンス法を利用して母子判定を行った。その結果を、図4-12に示したが、mtDNA Dループの超可変領域の 271塩基中、6か所にわたって塩基配列が異なっており、母子の関係を否定するデータとなった。また、この判定にはTGリピートの反復回数の違いを利用した STR解析（図4-13参照）およびウマの血統登録に利用されている血液型検査を併せて行ったが、両者とも母子関係が否定された。これまでmtDNA Dループの塩基置換を利用した母子判定例はヒトにおいて行われているが、第3章で述べたように、mtDNA を母子判定に利用する場合、生後に生じる変異やヘテロプラスミーの問題もあるので、その結果の取扱いには慎重さが要求される。

4. 小括

1)家畜馬 5品種計10頭 (サラブレッド 5頭, ポニー 2頭, トカラ馬 1頭, 北海道和種 1頭, 御崎馬 1頭) のmtDNA Dループの超可変領域 271bpの塩基配列をPCR-ダイレクトシーケンス法で決定したところ, 32か所に変異が認められた。このうち塩基置換は31か所であったが, その 82%がトランジション型塩基置換であった。このうち, 5か所の塩基置換部位を組み合わせて検討したが, サラブレッド, 日本在来馬, ポニーの間に明らかな差異を認めることができ, 今後品種の類型化 (品種識別) を行う上でこの手法は指標となり得ることが, 明らかとなった。

2)家畜馬集団内におけるDループ内の塩基配列の変異状況を知るため, 3品種の集団について解析を行った。その結果, サラブレッド集団の解析では, PCR-SSCPおよびPCR-RFLPによる分析では, 多型性に関して多くの情報は得られず, サラブレッドは遺伝的に類似性の高い集団であることが示唆された。一方, PCR-ダイレクトシーケンス法では, 多くの情報を得ることができ, 271塩基中, 27か所の塩基置換および2か所の欠失を見い出すことができた。これらの塩基置換の94%はトランジション型であった。また, 母系祖先を明確にできるFamily Tableを利用して, Family Number 5に属する4頭のサラブレッドの塩基配列を比較したところ, 約260年前の共通の母にたどり着くそれぞれの2頭の間では, 4~5か所の塩基置換がみられた。これらの結果から, mtDNAは母性遺伝をし, 変異は確実に起きていることを間接的に証明することができた。

3)次に北海道和種馬集団の解析を, PCR-RFLP, PCR-ダイレクトシー

クエンスの 2つの方法で行った。その結果、この集団では塩基置換が 271bpの中で、13か所しかみられず、そのすべてがトランジション型であり、サラブレッドと比較しても変異は少なく、サラブレッド種よりさらに遺伝的類似性の高い集団であると考えられた。

4)モンゴル在来馬集団の解析は、PCR-RFLPおよびPCR-ダイレクトシーケンスの 2つの方法で行ったが、両者の解析結果からこの集団は、サラブレッドや日本在来馬の北海道和種の集団に比較して、非常に多型性に富むことが示された。すなわち、RFLP解析では他の品種ではみられなかった切断パターンが見い出されたり、塩基配列の比較では変異のサイト数が多かったり、トランジションの割合が相対的に低いものであった。これらの事実は、モンゴル在来馬の成立の過程で、ヨーロッパからの遺伝子流入があったことを間接的に裏づけていることを示すものと考えられた。また、モンゴル在来馬内の 3品種間には明らかな差（品種の特徴）が認められなかった。

5) 3世代にわたるサラブレッド種の一家系について、PCR-SSCP、PCR-RFLP、PCR-ダイレクトシーケンス法を用いて解析したが、3方法とも 3世代にわたる mtDNAの母性遺伝を確認することができた。

6)母子関係の疑われた一組の母子馬に関して、PCR-ダイレクトシーケンス法による判定を行った。271塩基中、6か所もの塩基配列が異なっており、母子関係は否定された。

以上、6つの方向から、ウマ mtDNAのDループ領域を用いた多型解析を行ったが、これらの方法はウマの品種間識別の上で非常に優れた方法であり、かつ種々の研究への応用も可能なので、今後ウマの遺伝学的研究を行う上で、貴重な遺伝的指標になることが示された。



Breeds	No. of PCR-RFLP Analysis	No. of PCR-direct-sequencing Analysis
1. Tuv	14	8
2. Galshir	16	10
3. Tes	11	2
4. Darkhad	0	0
total	41	20

図4-1 モンゴル在来馬4品種の分布と解析に用いた頭数



図4-2 Dループの塩基配列多型による
家畜馬6品種とmtDNAタイプ

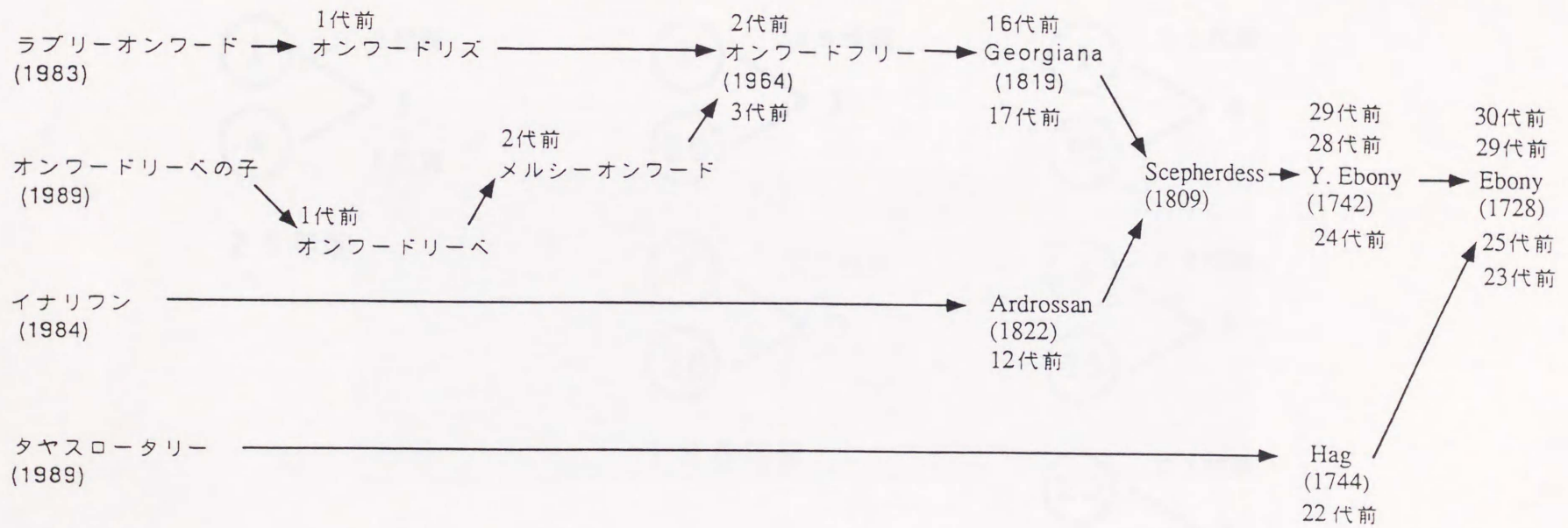
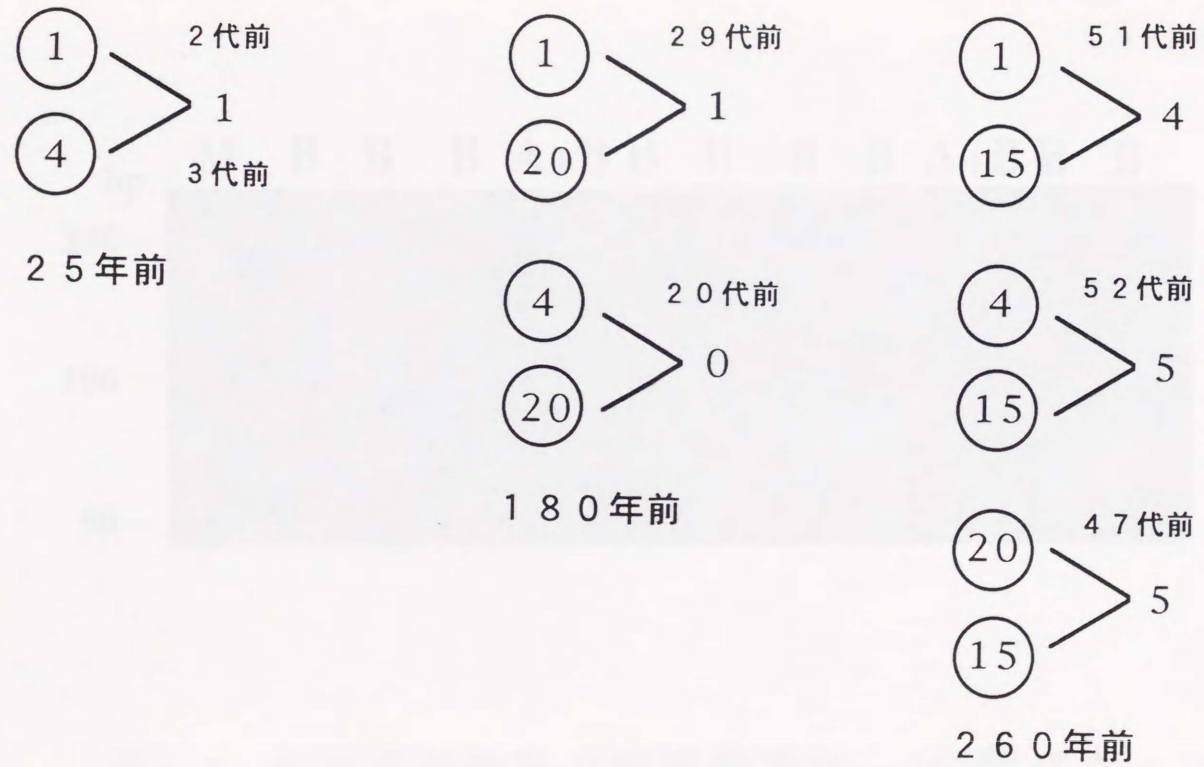


図4-3 Family Number 5 に属する4頭のサラブレッドの系統図

(注1) ()内は、生年を示す。

(注2) Family Table (Shirai. 1990)により作製した。



① : ラブリーオンワード ④ : オンワードリーベの子 ②⑩ : イナリワン ⑮ : タヤスロータリー

図4-4 Family Number 5に属する4頭のサラブレッド相互間に見られた変異の数

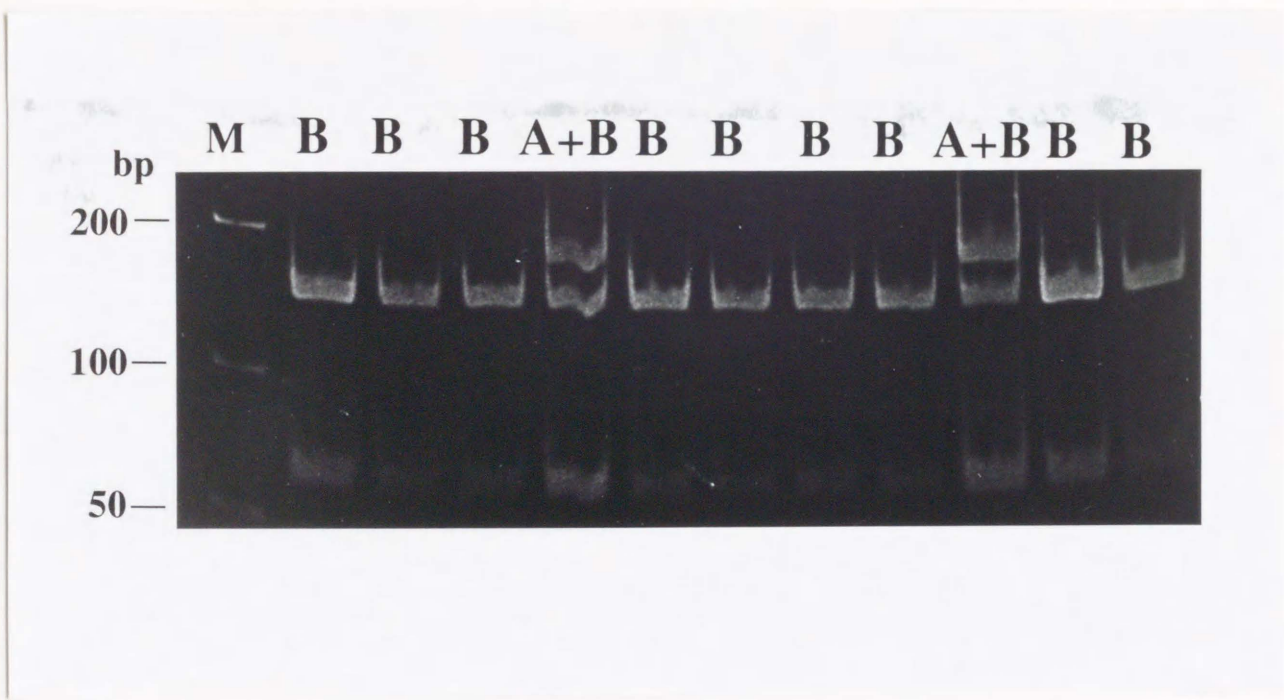


図4-5 北海道和種馬の制限酵素Mse I切断パターン

(注1) 切断パターンはレーンの上を示した.

(注2) M: サイズマーカー.

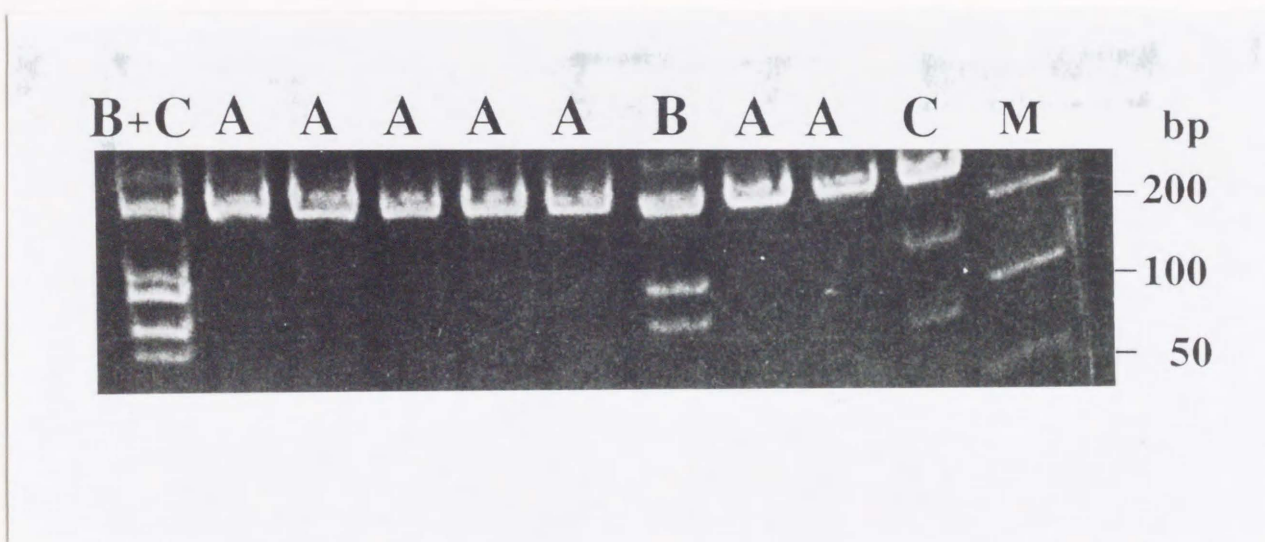


図4-6 モンゴル在来馬の制限酵素 *Aci* I 切断パターン

(注1) 切断パターンはレーンの上を示した.

(注2) M: サイズマーカー.

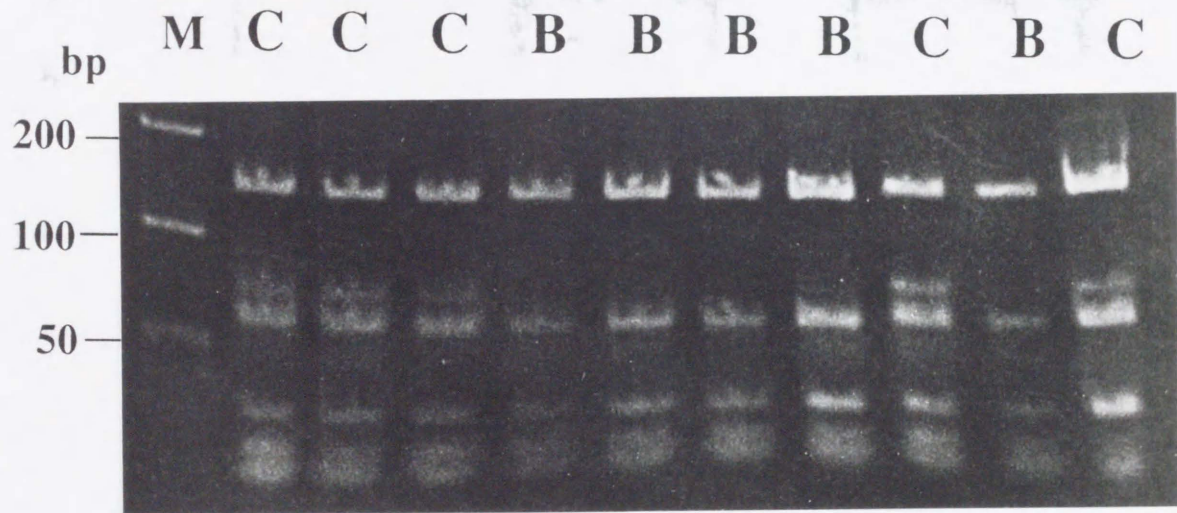


図4-7 モンゴル在来馬の制限酵素Mse I切断パターン

- (注1) 切断パターンはレーンの上を示した.
- (注2) M: サイズマーカー.

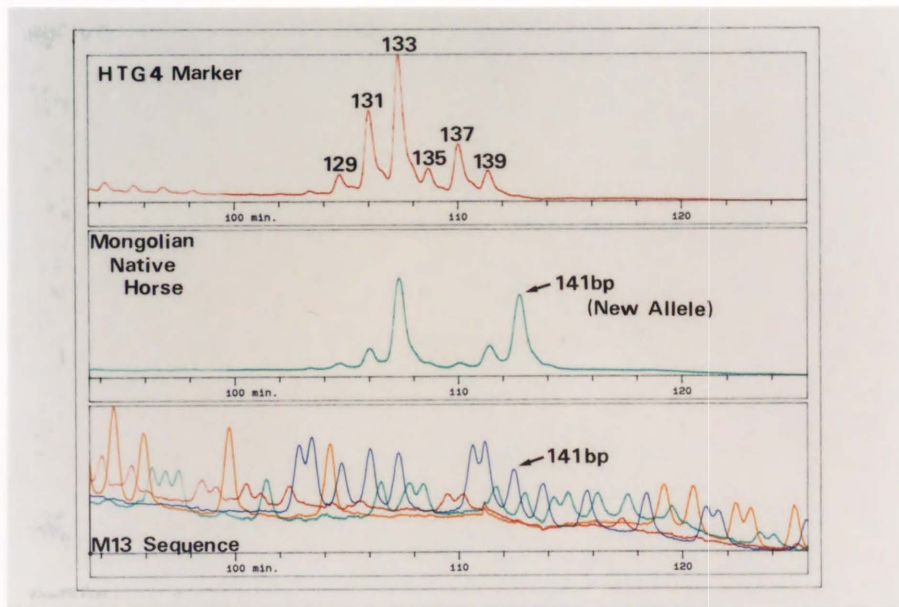


図4-8 Mongolian native horse に観察された、
マイクロサテライトDNA HTG4の
新しい141bpのアリール

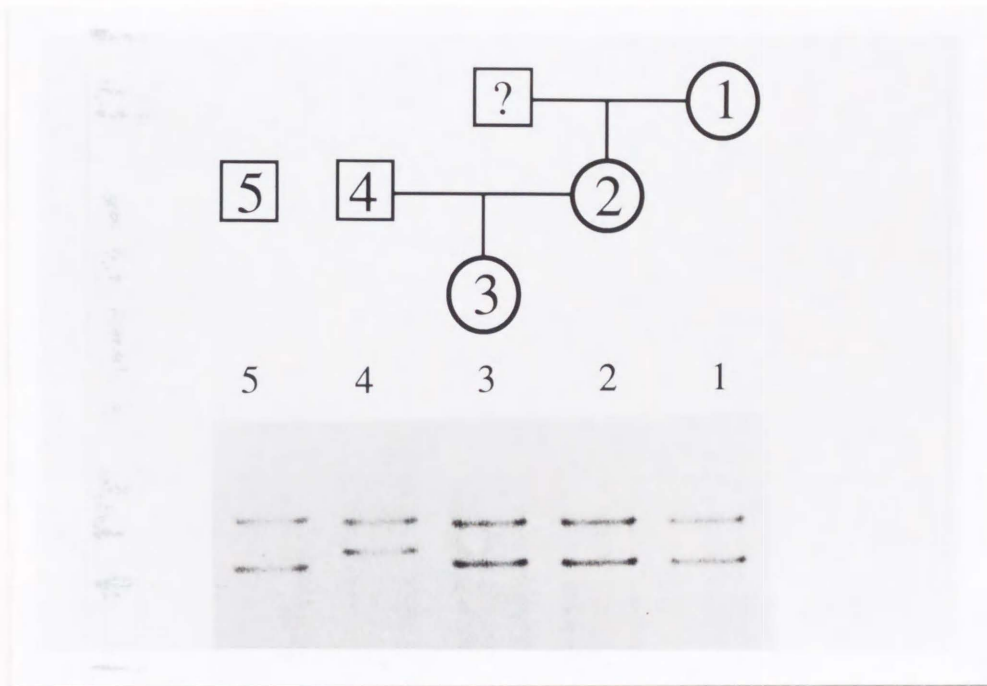


図4-9 3世代にわたるミトコンドリアDNAのDループ領域の母性遺伝 (PCR-SSCP法)

- 1 : granddam (祖母) 2 : dam (母)
 3 : offspring (子) 4 : sire (父)
 5 : unrelated (非血縁)

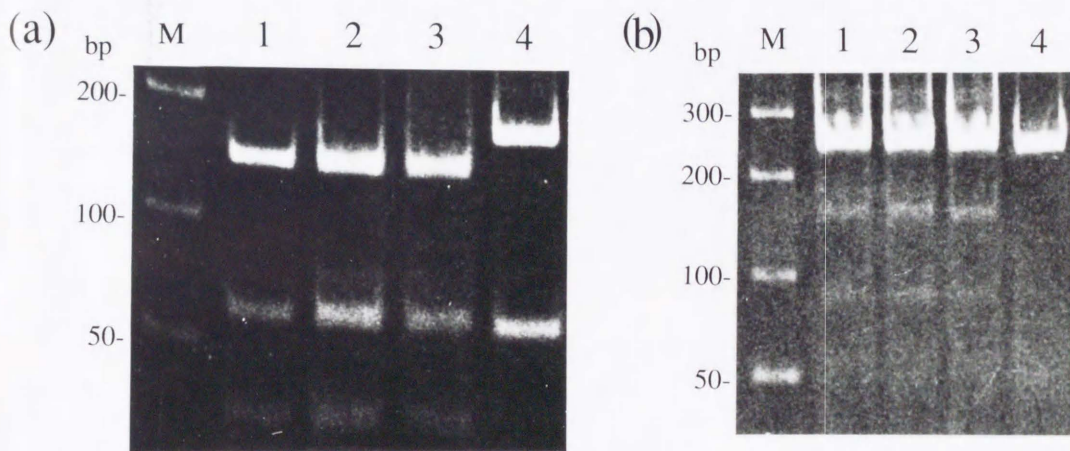
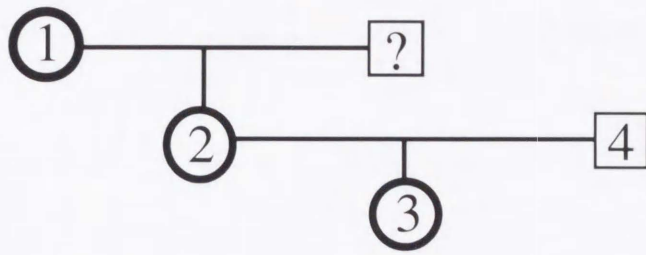


図4-10 3世代にわたるミトコンドリアDNAのDループ領域の母性遺伝(PCR-RFLP)

(a) : 制限酵素 *Mse* I 切断パターン
 (b) : 制限酵素 *Aci* I 切断パターン

1 : granddam (祖母) 2 : dam (母)
 3 : offspring (子) 4 : sire (父)

```

1.granddam  ATTCTTCCCCTAAACGACAACAATCCACCCTCATGTGCTATGTGTCAGTATCAGATTATACCCC-ACATAACACCAT
2.dam      .....
3.offspring .....
4.sire     .....T.....A.....C.....

1.granddam  ACCCACCTGACATGCAATACCTTATGAATG-CCCTATGTACATCGTGCATTAAATTGTTGCCCCATGAATAATAA
2.dam      .....
3.offspring .....
4.sire     .....T.....G.....G.....G.....T.....

1.granddam  GCATGTACATAAATATCATTATCTTACATAAGTACATTATATATATGATCGTGCATACCCCATCCAAGTCAAATCA
2.dam      .....
3.offspring .....
4.sire     .....

1.granddam  TTCCAGTCAACACGCATATCACAACCCATGTTCCACGAGCTTAATCACCAAGCCGCGGGA
2.dam      .....
3.offspring .....
4.sire     .....C.....

```

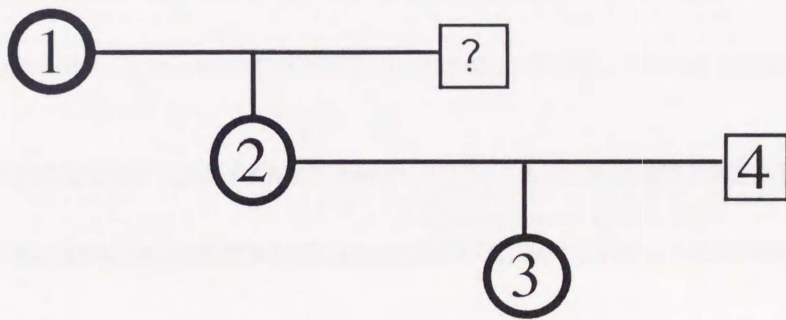


図4-11 3世代にわたるミトコンドリアDNAのDループ領域の母性遺伝

1:granddam(祖母) 2:dam(母)
3:offspring(子) 4:sire(父)

(注) ドット (・) は1と同じ塩基配列を示す.
ハイフン (-) は欠失を示す.

1. dam	ATTTCTTCCCCTAAACGTCAACAATT CACCCT CATGTGCTATGTCAGTAT	50
2. offspring	ATTTCTTCCCCTAAACGACAACAATT TATCCT CATGTGCTATGTCAGTAT	50
1. dam	CAGATTATACCCCCACATAACACCATACCCACCTGACATGCAAT GAACTT	100
2. offspring	CAGATTATACCCCCACATAACACCATACCCACCTGACATGCAAT- ACCTT	100
1. dam	ATGAATGGCCTATGTACGTCGTGCATTAAATTGTTT GCCCC CATGAATAAT	150
2. offspring	ATGAATGCCCTATGTACGTCGTGCATTAAATTGTTT ACCCC CATGAATAAT	150
1. dam	AAGCATGTACATAAATATCATT TATCTT ACATAAGTACATTATAT TATGA	200
2. offspring	AAGCATGTACATAAATATCATT TATCTT ACATAAGTACATTATAT TATGA	200
1. dam	TCGTGCATACCCCCATCCAAGTCAAATCATT TCCAGT CAACACGCATATCA	250
2. offspring	TCGTGCATACCCCCATCCAAGTCAAATCATT TCCAGT CAACACGCATATCA	250
1. dam	CAACCCATGTTCCACGAGCTTAATC ACCAAGCCGCGGGA	300
2. offspring	CAACCCATGTTCCACGAGCTTAATC ACCAAGCCGCGGGA	300

図4-12 Dループ289bpを利用した母子判定例

1: dam (母) 2: offspring (子)

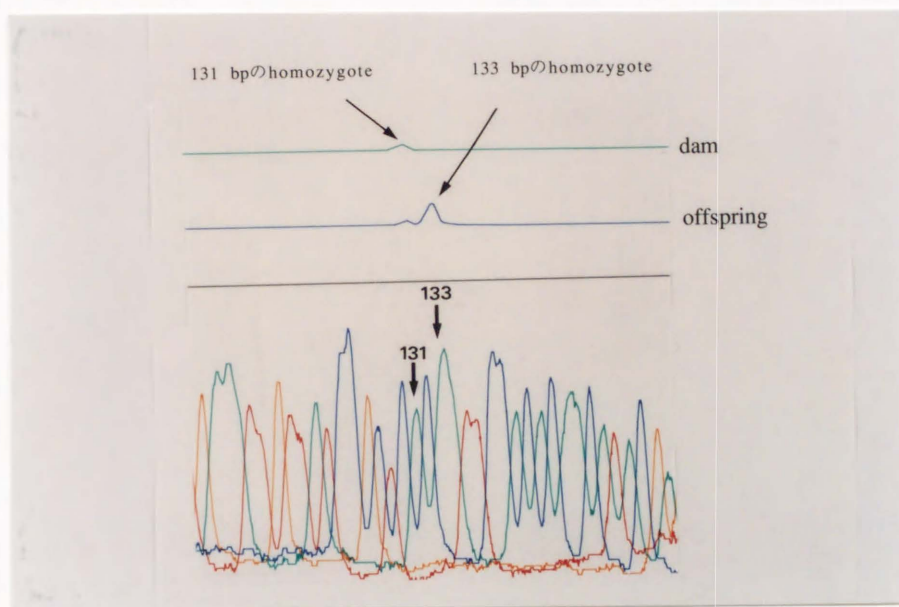


図4-13 マイクロサテライトDNA(HTG4)を利用した母子判定

(注) M13 sequenceを併せて示した.

表4-1 Dループ内超可変領域における5品種10頭の塩基配列の比較

	(a) 26	27	28	29	53	58	64	66	70	74	78	96	104	107	110	116	117	128	129	135	136	150	167	181	182	204	235	269	271	272	
サラ1	T	C	A	C	A	T	C	C	A	C	C	T	A	G	C	C	G	G	A	T	G	A	C	A	A	G	T	C	A	A	
サラ2	C	G	G		T							T	A	A	C	A					G									T	
サラ3												T									A										
サラ4				G			G			T	T	T	A	A											G						
サラ5		T	T	C	-	T				C	-	T		A							A	C									
トカラ馬				G						T		T	A	A									A								
北海道和種				G						T		T		-	G							T							T		
御崎馬				G								T	C	-	G	A											C	T	G		
ポニー1												T	C	A																	
ポニー2		T	T	C	-	T				C	-	T	C	A							A	C					T	C	T	G	

(a) : Dループ内のNo.を示す.

(注1) mtDNAウマのDループの超可変領域271bpの中で, 変異の見られた31か所の配列を示す.

(注2) ハイフンは, 欠失を示す.

表4-2 5品種10頭のmtDNA・Dループ領域
における塩基置換, 欠失の分析

Type of Mutation	No. Observed	
	Entirety of Data	Each Position
Substitution :		
Transition :		
T → C	12	5
C → T	30	10
A → G	16	7
G → A	16	3
Total	74 (83)^{a)}	25 (78)^{a)}
Transversion :		
C → A	1	1
A → C	3	1
A → T	2	2
G → C	6	2
G → T	3	1
Total	15	7
Deletion :		
C → -	3	1

a) %は塩基置換のうちTransition型の占める割合

表4-3 家畜馬(*Equus caballus*)における
5か所の典型的な塩基配列の比較

mtDNA タイプ	(a) 塩基番号					品種	頭数
	74	78	117	129	167		
M1	C	C	A	A	C	サラブレッド	2
M2	C	C	G	A	C	〃	3
M3	C	T	A	A	A	トカラ馬	1
M4	T	C	G	G	T	北海道和種	1
M5	C	C	C	G	C	御崎馬	1
M6	C	C	C	A	C	ポニー	2

(a) Dループ内のNo.を示す.

表4-4 mtDNAのDループ領域299bpの
SSCPアリアルとその出現頻度

Type	No. Frequency (%) (Thoroughbred)		No. Frequency (%) (in other breeds)	
A	9	45	10	50
B	7	35	7	35
C	4	20	3	15

表4-5 サラブレッドにおけるmtDNA・D-loopの
制限酵素切断パターンの数と頻度

Enzymes	Morphs	No.	Frequency (%)
AciI	A	56	96.6
	B	1	1.7
	C	1	1.7
Cfr13I	A	57	98.3
	B	1	1.7
MseI	A	4	6.9
	B	54	93.1

表4-6 3種の制限酵素切断型の組み合わせによる
サラブレッドのmtDNA・Dループのタイピング

Types	Enzymes Morphs			Thoroughbred		in other breeds(*)	
	Aci I	Cfr 13I	Mse I	No.	Frequency (%)	No.	Frequency (%)
1	A	A	A	3	5.2	0	0.0
2	A	A	B	52	89.7	13	61.9
3	A	B	A	1	1.7	0	0.0
4	B	A	B	1	1.7	0	0.0
5	C	A	B	1	1.7	8	38.1
Total				58	100.0	21	100.0

(*) サラブレッド以外の他の品種を示す。

表4-7 サラブレッド種20頭のDループ271塩基の比較

(a)	26	27	28	29	53	58	64	66	70	72	96	104	107	110	116	117	128	134	135	136	150	181	182	198	204	235	269	271	272
サラ1	T	C	A	C	A	T	C	C	A	A	T	A	G	C	C	G	G	T	T	G	A	A	A	G	G	T	C	A	A
サラ2	C	G	G				T							T		A	A		C	A		G						T	
サラ3														T															
サラ4														T															
サラ5		T	T		C	-	T			C	-	T				A			A	C				T	C	T		G	
サラ6		T	T		C	-	T			C	-	T				A			A	C				T	C	T		G	
サラ7		T	T		C	-	T			C	-	T				A			A					T	C	T		G	
サラ8					G									T		A							A			T			
サラ9	C	G	G		-	T								T		A	A		C	A		G					T		
サラ10		G	G		-	T								T		A	A		C	A		G					T		
サラ11					G	C	-			G				T		A	A												
サラ12		G	G		-	T								T		A	A		C	A		G							
サラ13					G				G			T		T	T	A	A						G				T		
サラ14					G									T		A													
サラ15					G												A	C									T		
サラ16		T	T		C	-	T			C	-	T				A			A					T	C	T		G	
サラ17		T	T		C	-	T			C	-	T				A			A	C				T	C	T		G	
サラ18	C				G	-				C	-	T				A	A		C								T		
サラ19	C				G	-				C	-	T				A	A		C								T		
サラ20														T															

(a): D ループ内のNo.を示す.

(注1) mtDNAウマのDループの超可変領域271bpの中で、変異の見られた31か所の配列を示す.

(注2) ハイフンは欠失を示す.

表4-8 サラブレッド20頭のmtDNA・Dループ領域における塩基置換, 欠失の分析

Type of Mutation	No. Observed	
	Entirety of Data	Each Position
Substitution :		
Transition :		
T → C	29	7
C → T	49	5
A → G	27	7
G → A	34	4
Total	139 (94)^{a)}	23 (85)^{a)}
Transversion :		
A → C	3	1
A → T	1	2
G → T	5	1
Total	9	4
Deletion :		
C → -	11	1
G → -	7	1

a) %は塩基置換のうちTransition型の占める割合

表4-9 北海道和種におけるmtDNA・ループの
制限酵素切断パターンの数と頻度

Enzymes	Morphs	No.	Frequency (%)
AciI	A	24	100
Cfr13I	A	24	100
MseI	A	0	0
	B	22	92
	A+B	2	8

表4-10 北海道和種馬20頭のDループ271塩基の比較

	(a)	53	74	80	128	129	134	167	182	198	235	252	255	269
H1		G	T	C	A	G	T	T	G	A	C	A	C	T
H2									A	G	T			
H3			C			A	C	C	A	G	T	G	T	
H4														
H5		A	C		G	A		C	A	G	T			C
H6														
H7														
H8		A	C		G	A		C	A	G	T			
H9			C			A		C		G	T	G		
H10														
H11				T										
H12														
H13														
H14														
H15														
H16														
H17														
H18														
H19														
H20														

(a): Dループ内のNo.を示す.

(注) ウマmtDNA・Dループの超可変領域271bpの中で、
変異の見られた36か所の配列を示す.

表4-11 北海道和種20頭のmtDNA・Dループ領域
における塩基置換の分析

Type of Mutation	No. Observed	
	Entirety of Data	Each Position
Substitution :		
Transition :		
T → C	10	4
C → T	7	3
A → G	9	3
G → A	10	3
Total	36 (100)^{a)}	13 (100)^{a)}
Transversion :		
Total	0	0

a) %は塩基置換のうちTransition型の占める割合

表4-12 モンゴル在来馬におけるmtDNA・Dループの制限酵素切断パターンの数と頻度

Enzymes	Morphs	No.	Frequency (%)
AciI	A	22	53.7
	B	1	2.4
	C	15	36.6
	B+C	3	7.3
Cfr13I	A	41	100
MseI	A	-	-
	B	20	48.8
	C	21	51.2

表4-13 3種の制限酵素切断型の組み合わせによる
モンゴル在来馬3品種のmtDNA・Dループのタイピング

Types	Enzymes Morphs			Tuv*		Galshir*		Tes*	
	Acil	Cfr13	MseI	No.	Frequency (%)	No.	Frequency (%)	No.	Frequency (%)
1	A	A	B	6	42.9	6	35.3	3	30.0
2	A	A	C	2	14.3	5	29.4	0	0
3	B	A	C	0	0	1	5.9	0	0
4	C	A	B	2	14.3	0	0	3	30.0
5	C	A	C	3	21.4	3	17.6	4	40.0
6	B+C	A	C	1	7.1	2	11.8	0	0
Total				14	100.0	17	100.0	10	100.0

(*) モンゴル在来馬の3つの品種名

表4-14 蒙古在来馬20頭のDループ271塩基の比較

	(a) 26	27	28	29	53	58	60	64	66	70	74	79	90	99	107	117	127	128	129	135	136	147	148	150	167	181	182	191	198	199	204	235	241	252	260	271	
M1	T	C	A	C	G	T	C	C	C	A	C	C	T	A	G	G	A	A	A	T	G	A	A	A	C	A	G	T	G	A	G	T	C	A	T	A	
M2													T					G																			
M3													T	T						A						A					C					G	
M4				A				T					T	A	G		C	A							G	A									C		
M5	C	G											T		G				A							A					C					G	
M6											T		T					G						T			A										
M7											T				A			G						T								C					
M8													T					G		A						A		G		C							
M9													T					G								A		G		C							
M10	C	G						T					T	A					C							A											
M11	C	G					T	T					T							C						A											
M12													T					G																			
M13													T	A						A						A				C					G		
M14																																			G		
M15								G					T							A											T						
M16											A		T		G					A						A				C						G	
M17	C	G				T	T						T							C					G	A										G	
M18		T	T	A	C		-	T					C	T	C					A			C			A			T	C						G	
M19	C	G	A				-	T					C	T	C											A										G	
M20													T									G	G			A	C									G	

(a):D ループ内のNo.を示す。

(注1) mtDNAウマのDループの超可変領域271bpの中で、変異の見られた36か所の配を示した。

(注2) ハイフンは欠失を示す。

表4-15 モンゴル在来馬頭のmtDNA・Dループ領域
における塩基置換, 欠失の分析

Type of Mutation	No. Observed	
	Entirety of Data	Each Position
Substitution :		
Transition :		
T → C	22	7
C → T	15	7
A → G	30	10
G → A	29	5
Total	96 (81)^{a)}	29 (83)^{a)}
Transversion :		
C → A	1	1
A → C	1	1
A → T	17	1
G → C	2	1
G → T	2	2
Total	23	6
Deletion :		
C → -	2	1

a) %は塩基置換のうちTransition型の占める割合

第5章 ウマmtDNA Dループ多型を指標としたウマ科Equus 属の 進化解析

1. 緒言

mtDNAを用いた家畜をはじめとする哺乳動物の系統，進化に関する研究は，従来全 mtDNAを用いたRFLP法で行われてきた(Brown et al., 1980; Denaro et al., 1981; Horai et al., 1984; Cann et al., 1987)。Anderson et al. (1981)が，ヒト mtDNAの全塩基配列を解読し，発表して以来，最近ではダイレクトシーケンス法による解析も行われている(Horai et al., 1990)。特に，ヒトにおける進化解析研究は最も進んでおり，アフリカ人，ヨーロッパ人，モンゴロイドの世界 3大人種の解析が行われてきたが，その研究が進展した理由の 1つには，mtDNA多型検出法の発達があげられる。

ウマにおいては，George and Ryder (1986)が，ウマの全 mtDNA領域を指標とした制限酵素地図によってEquus 属各種間の系統解析を行い，モウコノウマEquus przewalskii が家畜馬の祖先であると考察している。また，ウマのヘモグロビンのアミノ酸配列を指標とした研究(Clegg, 1974)，血清タンパク質多型を指標とした研究(Ryder et al., 1979; Kaminskii, 1979)，および核型分析に関する研究(Ryder et al., 1978)，さらには間接的ではあるが，Higuchi et al. (1987)の mtDNAのコード領域の多型に関する研究等によって，モウコノウマが，家畜馬に最も近い関係であることが示されている。本研究において，進化解析のために用いたEquus 属の種の染

色体数は、家畜馬 E. caballus: $2n=64$, モウコノウマ E. przewalskii): $2n=66$, ロバ E. asinus: $2n=62$, グレヴィシマウマ E. grevyi: $2n=46$, ヤマシマウマ E. zebra: $2n=32$ であることを共同研究者である広田(1994)が確認しており(図 5-2), これらの現存するウマ科 Equus 属の 7種(図 5-1)の染色体数は異なっている。一方, モウコノウマの染色体像(図 5-2)では, acrocentric な常染色体のうちの 2対が家畜馬においては Robertson型転座をおこして, submetacentric な常染色体の 1対になっているものと考えられており(Benirschke et al., 1965; Ryder et al., 1978), 2種の有効腕数(NF)は, 同じであると報告されている(Benirschke et al., 1966)。また, モウコノウマと家畜馬の雑種は, 稔性を有すと報告されている(Ryder et al., 1978; Trommerhausen-Smith et al., 1979)。

そこで本研究においては, 新たに決定されたサラブレッド種の mtDNA の D ループの塩基配列 (Ishida et al., 1994) のうち, $tRNA^{Phe}$ と large sequence block との間の領域を PCR 増幅し, mtDNA のうちで最も塩基置換の速い領域である D ループ内の hyper-variable region の約 270塩基の塩基配列を利用して, その塩基置換を指標としたウマ科 Equus 属の 5種 9頭についての進化系統解析を行った。

2. 実験材料と方法

1) 精製DNAをテンプレートとしたPCR産物

ウマ科 Equus 属に属する家畜馬，モウコノウマ，ロバ，グレビーシマウマ，ヤマシマウマのDNAは，それぞれ日本中央競馬会馬事公苑や動物園等で採取したヘパリン加血20mlより調製した。これらの各DNAをテンプレートとしてPCR増幅して得られた産物についてのPCR-ダイレクトシーケンスの方法は，第3章の多型解析法の項で記述した手法を用いて行った。

2) mtDNA配列のホモロジー検索

ウマ mtDNAの塩基配列のホモロジー検索は，DNASIS-Mac(Hitachi software Engineering)を用いて行った。

3) 系統樹の作製

系統樹の作成は近隣結合法(Saitou and Nei, 1987)と最大節約法(Swofford, 1993)を用いて行った。それぞれの系統樹は，ブーツストラップ法(Felsenstein, 1985)を用いて信頼性を評価した。

3. 結果

mtDNA多型によるウマの進化解析を行うために、先ずヤマシマウマ、グレビシマウマ、ロバ、モウコノウマおよび家畜馬（日本在来馬、モンゴル在来馬）の mtDNAの非コード領域である 271bpの塩基配列をPCR-ダイレクトシーケンス法で決定した。図 5-3には、今回調べたウマ科ウマ属 5種 6頭の全ての塩基配列を、Ishida et al. (1994)の報告している 3頭のサラブレッド種の mtDNA配列と並べて示し、比較検討した。その結果、271塩基の中に、計68か所の変異部位が検出された。それらの塩基置換は、tRNA^{P_ro}に近い 5'側で多く見つかっている。また、5頭の家畜馬（サラブレッド種 3頭、モンゴル在来馬 1頭、および日本在来馬 1頭）内における配列の変異は、ほとんどトランジション型変異で、挿入、欠失は見い出されなかった。さらにモウコノウマと家畜馬との間には、塩基の挿入を 1ないし 2か所認めただけであった。モウコノウマと、ヤマシマウマ、グレビシマウマ、ロバとの比較では、2か所以上の塩基の挿入または欠失、および数か所のトランスバージョン型変異が認められた。このように解析した結果を総合すると、mtDNA Dループの 271塩基の中で、塩基置換47、欠失11、挿入13か所の計68か所の配列部位に変異が認められた。表 5-1に示すように、3つの配列部位で塩基置換及び欠失の両方が認められた。4か所の基置換部位では、トランジションとトランスバージョンの両タイプの変異が見られ、一方、5種 9頭の個体相互間の塩基配列の差異を、表 5-2に示した。2つの種の塩基配列を相互に比較した場合、塩基置換の数が多く、またトランジション型塩基置換よりはトランスバージョン型

塩基置換が多く見られる方が2種間の系統分岐は進んでいるものと考えられる。また、欠失や挿入が多く見られる場合も分岐は進んでいることになるであろう。モウコノウマと家畜馬は近い関係にあり、家畜馬と、ヤマシマウマ、グレヴィシマウマ、ロバとは遠い関係にあることを表5-2より読み取ることができる。図5-3に示したように、多重整列にもとづいて、系統樹を作成した(図5-4, 5-5, 5-6を参照)。図5-4は、9頭のウマ mtDNAD ループの塩基配列を用いて、近隣結合法により作成された系統樹を示している。1塩基あたりの塩基置換数の評価は、Kimura(1968)の方法を用いて算出し、ブーツストラップ法により統計的検定を行った。図5-5は、PAUPの分岐限定法オプションを用いて得られた10個の同時に最大節約な系統樹を示したものである。これらの10個の系統樹は、すべて68個の塩基変化を必要としている。特に、系統樹の根は、caballus-przewalskii クラスタとzebra-grevyi-asinus クラスタの間にあると仮定して作成した。各枝の上を示した数字は、それぞれの枝における塩基変化数をPAUPのACCTRAN オプションを用いて推定したものである。系統樹3は図5-4の近隣結合法を用いて作成した系統樹と同一の樹形であり、またcaballus-przewalskiiクラスタ内の樹形だけを考えると、系統樹3, 5, 9は、近隣結合系統樹と同一の樹形である。一方、図5-6には、PAUPを用いて Equus の塩基配列9本から作成した系統樹を示した。すなわち、ブーツストラップ法を用いて、多数決規則による合意系統樹を作成した。この系統樹の中で、6個の枝に示した数字は、100個のブーツストラップ系統樹で観察された各枝の出現確立を%で表したものである。この系統樹は、図5-4の近隣結合法による系統樹と同一の樹形であった。

4. 考察

本研究においてウマ科 Equus 属の 5 種の mtDNA の非コード領域である D ループの 271 塩基の配列を決定した。サラブレッド種 3 頭を含む 5 種 9 頭の塩基配列についてそれぞれ比較検討したところ、271bp の領域で、68 か所の塩基置換による変異部位が検出された。一方、絶滅種であるクァッガ E. quagga とヤマシマウマ、シマウマ、家畜馬の 229bp のコード領域で、Higuchi et al. (1987) は 21 か所の変異サイトを検出している。従って、本研究から求められた変異率は、Higuchi らの値の 2 倍以上であった。また、Higuchi らの報告では、欠失や挿入は観察されなかったが、本研究の D ループ内では欠失や挿入が相当数見られた。本研究で指標とした tRNA^{Phe} と large conserved-sequence block の間の領域でも、特に tRNA^{Phe} に近い程変異が多いことが明らかとなった。この現象については、Horai et al. (1990) がヒトの研究でも同様の報告をしている。表 5-1 に示したように、家畜馬とシマウマやロバのように divergence が広がるほど、塩基配列の違いは明瞭となっている。家畜馬の 5 頭間の比較では欠失や挿入は観察されなかった。また、モウコノウマと家畜馬を比較すると、サラブレッドにおいては 2 か所の挿入が認められ、モンゴル在来馬や日本在来馬では 1 か所の挿入が認められた。また、家畜馬とシマウマやロバとではトランジション型塩基置換の他にトランスバージョン型の置換も数か所認められ、挿入や欠失も増えている。トランジション型塩基置換は、一般にトランスバージョン型変異に比べて起こりやすいことが知られている。また、図 5-4 に示した近隣結合法による系統樹からも、モウコノウマは家

畜馬に最も近いことが示された。さらに家畜馬の中でもサラブレッドよりは、モンゴル在来馬や日本在来馬の方がモウコノウマに近いことが示されている。これは、モンゴル在来馬は、モウコノウマと生息地域が重複していること(Mohr et al., 1970), 日本の在来馬の起源にはモンゴル在来馬の寄与があると考えられていること(野沢ら, 1992), 日本在来馬はトカラ馬, 御崎馬, 北海道和種などの各品種が形成され遺伝的に維持されてきたことなどからも理解できる。

ウマの化石や mtDNAの研究から、ウマ属の分化は 300~500 万年前と推定されている(Lindsay et al., 1980; George and Ryder, 1986; Higuchi et al., 1987)。mtDNAは、トランスバージョンよりはトランジションの方向へバイアスがかかって進化することが知られている(Brown et al. 1982; Aquadro and Greenberg 1982)。本研究で分析した Equus属 5種 9頭の mtDNAには、延べ83のトランジション, および12のトランスバージョンが観察されたことから、Equus属の進化でも同様のバイアスが存在することが明らかになった。本研究で用いた mtDNAでこれらの領域から推察された塩基置換速度(% sequence divergence)は、2.3~4.6% / Myrであり、Higuchi et al. (1987)の報告による 1.5~3.5% / Myrよりもやや高い値を示した。ヒトにおいてもHorai et al. (1990)が制限酵素切断型多型分析による値(0.4%)の約 4倍(1.5%)であったことを報告している。これらのことは、本研究で用いたこの領域が、他の哺乳類においてだけでなく、Equus属においても集団内変異を同定するために極めて有効な領域であることを示唆している。また、mtDNA を用いたPCR-ダイレクトシーケンス法は簡便な手法であり、

DNA多型解析や動物の進化解析等に便利で有用な方法であると考
えられた。

5. 小括

mtDNAのDループ内のtRNA^{Phe}とlarge conserved-sequence block との間の領域は、哺乳類の mtDNAにおける超可変領域であるが、日本在来馬およびモンゴル在来馬を含むウマ科 Equus属の 5種（ヤマシマウマ，グレヴィシマウマ，ロバ，モウコノウマ，家畜馬）を用いて、この領域の塩基配列を決定した。これらの塩基配列を既に知られている 3頭のサラブレッド種の塩基配列と比較検討したところ、サラブレッドの 1頭を標準として比較した場合、271bpのうち68か所の変異部位を認めた。その変異の割合は Equus属のコード領域でみられた値(229塩基のうち21か所)の 2倍以上であった。また、本研究により推察された塩基置換速度は、2.3~4.6% / Myrであり、これは従来の2% / Myrよりやや高く、この領域が mtDNAの中でも変異の多い部位であるためと考えられた。

さらに、Dループ 271塩基における塩基置換を利用して近隣結合法で系統樹を作成したところ、従来考えられていたように、モウコノウマが家畜馬に最も近いことが示された。また、家畜馬の中でも、モンゴル在来馬や日本在来馬が、サラブレッドよりモウコノウマに近い関係にあることも示された。

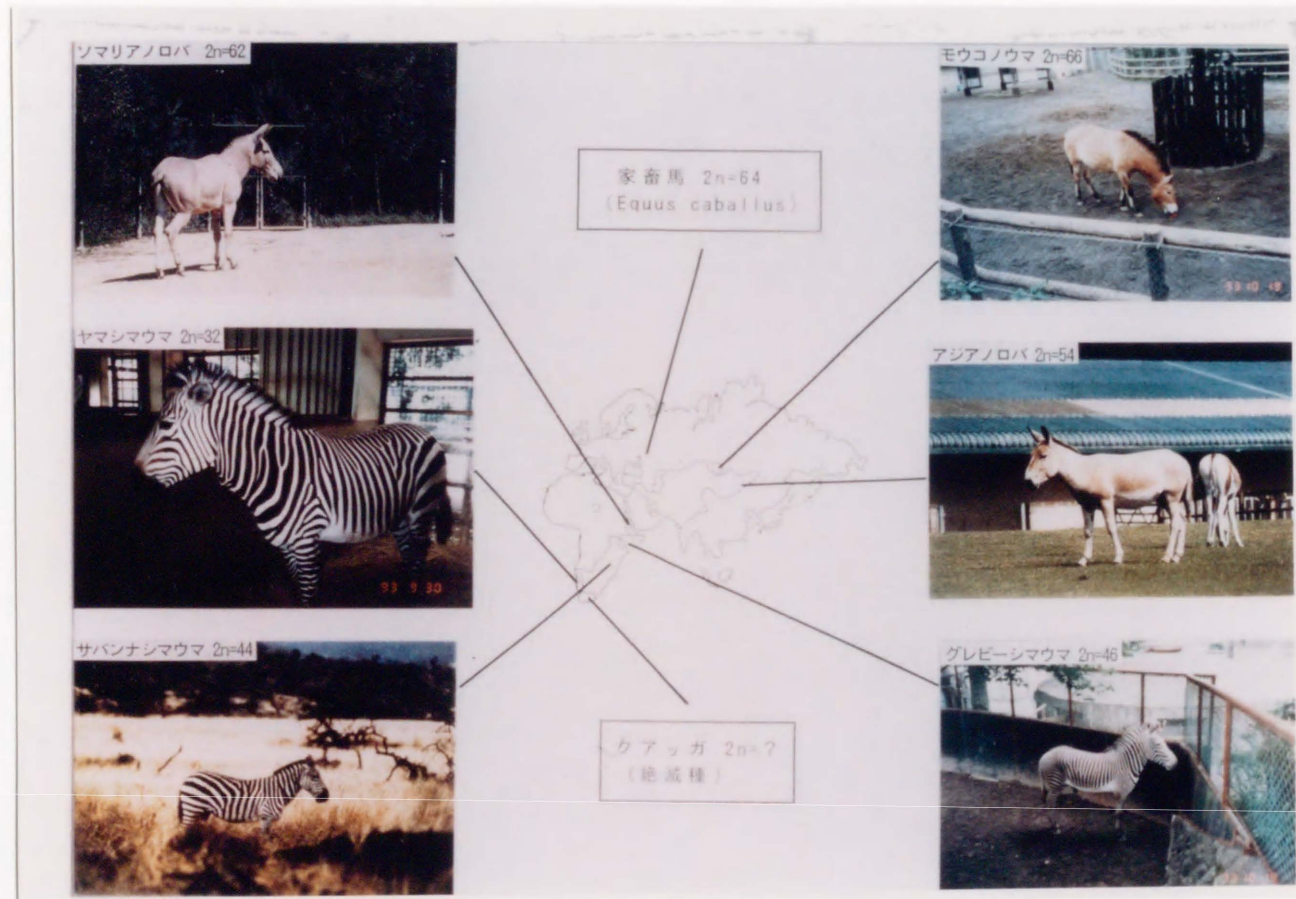


図5-1 現存するウマ科 *Equus* 属の7種
とその染色体数

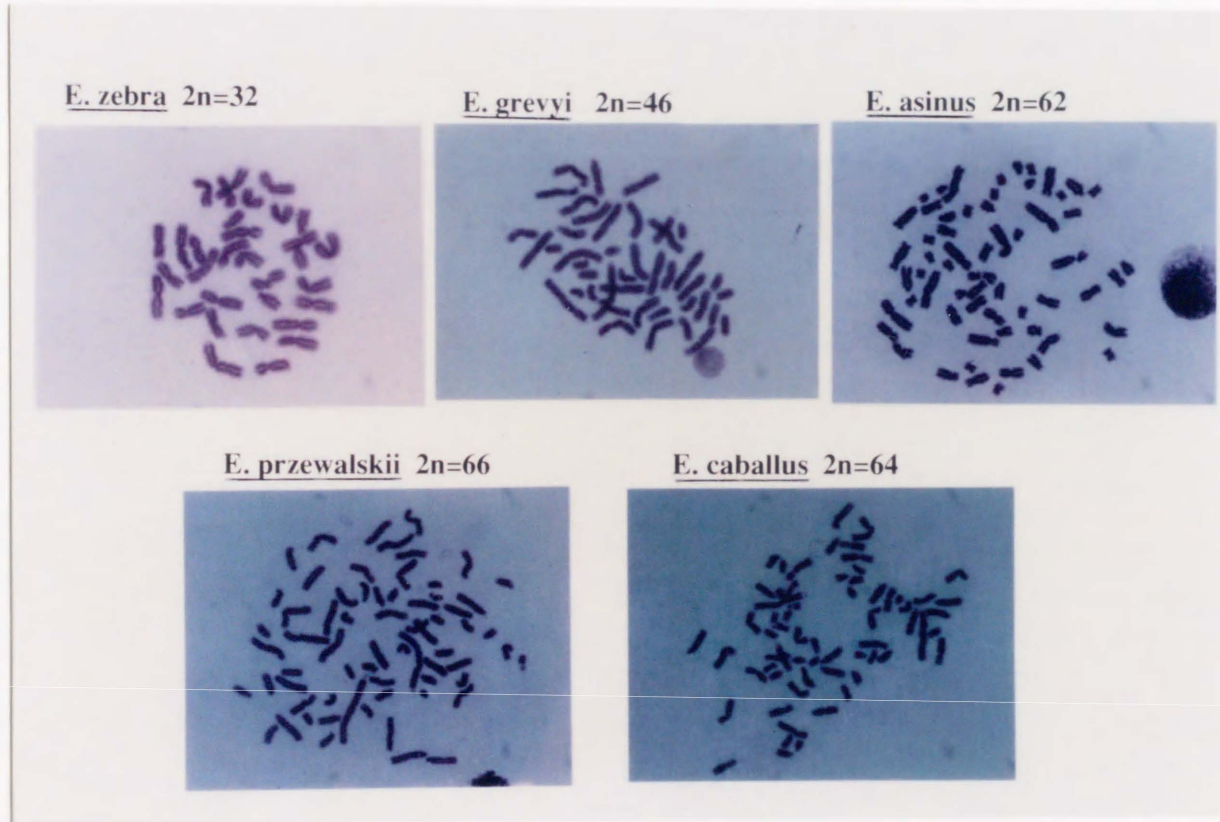


図5-2 ウマ科 *Equus* 属 5 種の染色体展開図

		50
E. caballus 1	ACAACAATTCACCCCTCATGTGCTATGTTCAGTATCAAAT--TATACCCC-C	
E. caballus 2C.G.....G.....	
E. caballus 3G.....	
E. przewalskiiG.....	
E. c. MongolianG.....	
E. c. JapaneseG.....	
E. zebraCC.....C.....T.....GG.G.....A..	
E. asinusT.T.....C.....T.....A---C.....	
E. grevyiC.T.....A.....T.....A---T.....	
		100
E. caballus 1	ACA-TAACACC--AT-ACC-CACCT-GA-CATGCAATA-TCTTATG-AAT	
E. caballus 2	•T-----	
E. caballus 3	-----	
E. przewalskii	-----T-----	
E. c. Mongolian	-----T-----	
E. c. Japanese	-----T-----	
E. zebra	-----G.....GC.....T.T-----CA.....G.....C.....	
E. asinus	G.....C.....T-----T-----G.....C.....A.....A.....C.....TT.....	
E. grevyiG.....T.....T-----T.G.T-----A.....C.....C.....	
		150
E. caballus 1	GGCCCATGTACG-TCGTGCATTAGATTGTTGCCCCATGAATAATAAGCA	
E. caballus 2T.....A.....A.....CA.....	
E. caballus 3T.....	
E. przewalskiiT.....C.....GA.....	
E. c. MongolianT.....A.....AG.....	
E. c. JapaneseT.....AG.....	
E. zebra	•C•T.....A.....A.....	
E. asinus	•C•T.....A.....	
E. grevyi	•C•T.....T.....A.....	
		200
E. caballus 1	TGTACATAATATCATTTATCTTACATAAGTACATTATATTATTGATCGTG	
E. caballus 2G.....	
E. caballus 3A.....	
E. przewalskiiG.....A.....	
E. c. MongolianT.....G.....A.....	
E. c. JapaneseA.....	
E. zebraC.....T.....T.....G.....G.....	
E. asinusG.....A.....G.....A.....	
E. grevyiT.....G.....A.....	
		250
E. caballus 1	CATACCCCATCCAAGTCAAATCATTTCAGTCAACACGCATATCACAACC	
E. caballus 2	
E. caballus 3	
E. przewalskii	
E. c. MongolianC.....	
E. c. Japanese	
E. zebra	
E. asinus	
E. grevyi	
E. caballus 1	CATGTTCCACGAGCCTAATCACCAAGCCGCGGGA	
E. caballus 2T.....	
E. caballus 3	
E. przewalskiiT.....	
E. c. MongolianT.....	
E. c. JapaneseT.....	
E. zebraT.....	
E. asinusA.....T.....	
E. grevyiT.....	

図5-3 9頭のウマmtDNAの塩基配列の比較

E. przewalskii, Mongolian native horse, Japanese native horse, *E. zebra*, *E. asinus*, *E. grevyi* と3頭のサラブレッドのDループ271塩基を比較した。

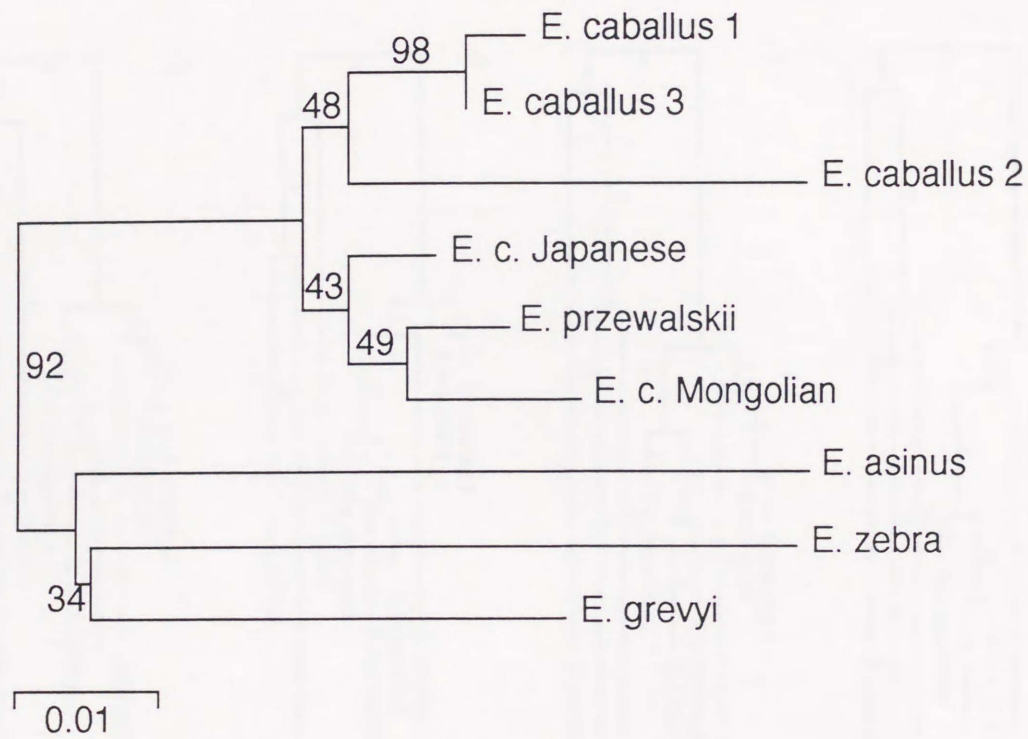


図5-4 9頭のウマmtDNA・Dループの塩基配列を用いて作成された近隣結合系統樹

(注1) 塩基あたりの塩基置換数の評価は, Kimuraの方法を用いた.

(注2) ブーツストラップ法により統計的検定を行った.

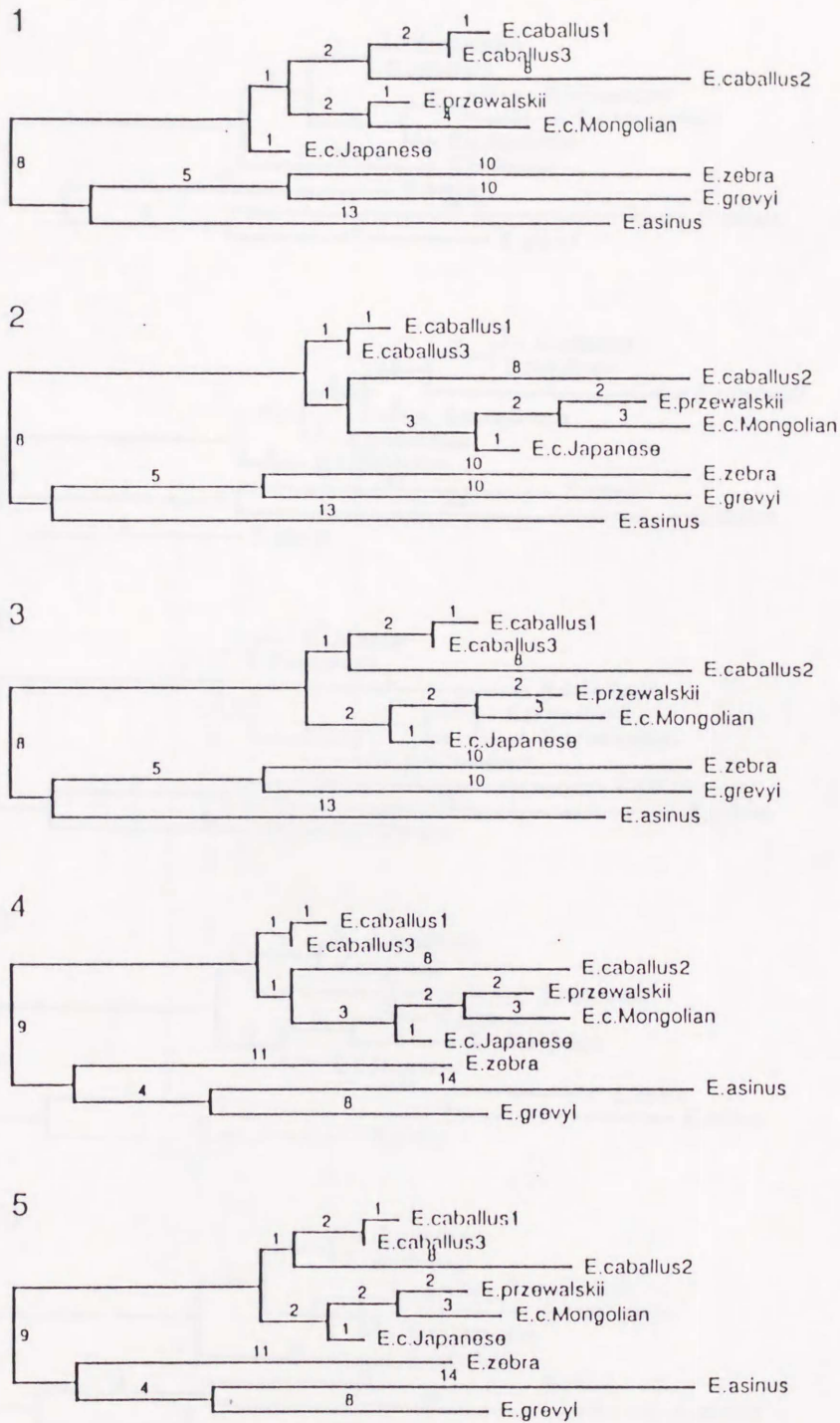


図5-5 PAUPの分岐限定法オプションを用いて得られた10個の同等に最大節約な系統樹 (その1)

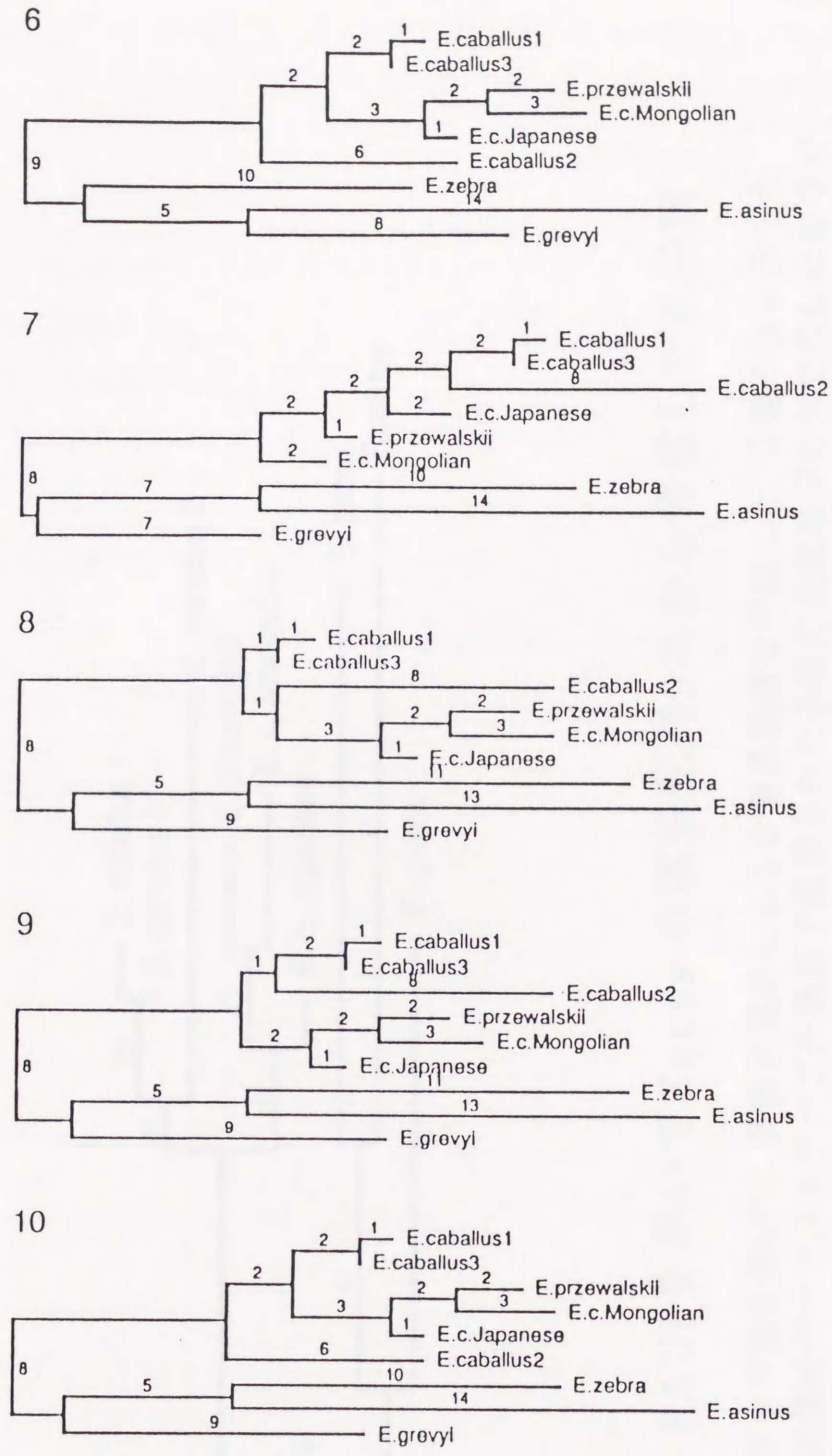


図5-5 PAUPの分岐限定法オプションを用いて得られた10個の同等に最大節約な系統樹 (その2)

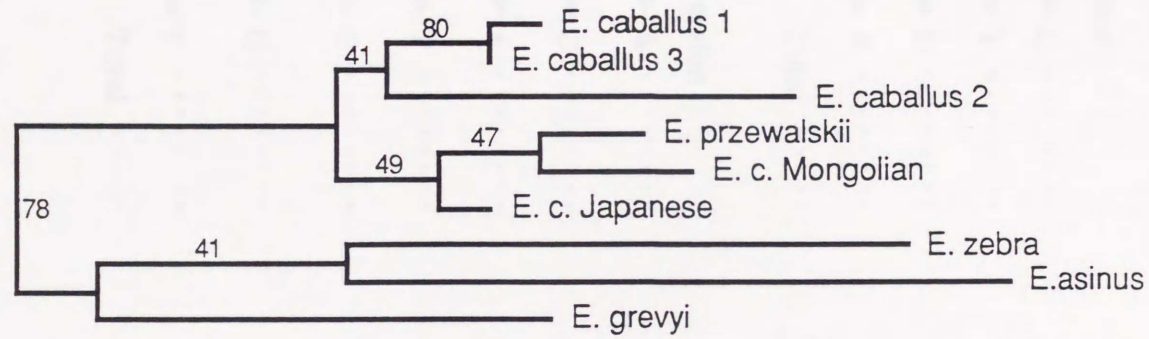


図5-6 PAUPを用いて *Equus* の塩基配列9本から作成した系統樹

ブーツストラップ法を用いて、多数決規則による合意系統樹を作成した。6個の枝に示した数字は、1000個のブーツストラップ系統樹で観察された各枝の出現確率を%で表したものである。この系統樹は、図5-4の近隣結合法による系統樹と同一の樹形であった。

表5-1 ウマ科 *Equus* 属5種9頭のmtDNA・Dループ領域
 における塩基置換, 挿入, 欠失の分析

Type of Mutation	No. Observed	
	Entirety of Data	Each Position
Substitution :		
Transition :		
T → C	13	9
C → T	30	11
A → G	20	11
G → A	20	7
Total	83 (87)^{a)}	38 (81)^{a)}
Transversion :		
C → A	1	1
A → C	1	1
T → A	2	1
A → T	2	2
G → C	4	2
C → G	1	1
G → T	1	1
Total	12	9
Deletion :	14	11
Insertion:	14	13

a) %は塩基置換のうちTransition型の占める割合

表5-2 個体相互間の塩基配列の違い

mtDNA compared	C1	C2	C3	P	M	J	Z	A	G
Caballus 1 (C1)	-	10/1	1/0	8/0	11/0	6/1	18/2	16/5	12/6
Caballus 2 (C2)	0/0	-	9/1	11/1	13/1	10/2	18/3	22/6	15/7
Caballus 3 (C3)	0/0	0/0	-	7/0	10/0	5/1	18/3	15/5	11/6
Przewalskii (P)	1/0	1/0	1/0	-	5/0	4/1	21/3	19/5	9/6
Mongolian (M)	0/0	0/0	0/0	0/1	-	4/1	20/3	20/5	9/6
Japanese (J)	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	-	18/4	16/4	9/7
Zebra (Z)	5/7	6/7	5/6	5/7	5/6	5/6	-	14/6	13/5
Asinus (A)	4/2	4/2	4/2	4/3	4/2	4/2	11/8	-	17/2
Grevyi (G)	4/6	4/7	4/7	4/8	3/7	4/7	7/9	1/6	-

(注1) 右上半分は塩基置換 (Transition/Transversion) を示す.

(注2) 左下半分は (挿入/欠失) を示す.

第6章 総括

ウマ科に属する動物は、現存する家畜馬、ロバ、シマウマなどの Equus 属に属するものを除き、すでにそのほとんどが絶滅している。また、野生馬や在来馬などの急激な生存頭数の減少や競走馬や乗馬として育種改良された家畜馬などは近交係数の高まりなど、家畜馬の種の保存や遺伝育種上の問題点が生じている。これらの現存するウマ科動物を保護し、遺伝子資源として活用を図るために、考古学、生化学および細胞遺伝学による解析に加えて、新たに mtDNA を指標とした分子遺伝学的分析法を用いてこれらのウマ科に属する動物の品種識別や進化解析を行う必要がある。mtDNA は母性遺伝をし、その塩基置換速度が核 DNA よりも極めて速い特徴がある。この現象は、近縁種間で mtDNA の配列を比較することにより、多くの塩基置換が蓄積していることを、容易に観察でき、また種内変異 (DNA 多型) としてもよく観察されることにも反映している。そこで、本研究ではウマの mtDNA 多型を遺伝的指標として応用し、ウマの品種識別や進化解析を行った。

まず、ブタの mtDNA プローブを用いて、ウマの全 mtDNA の RFLPs 分析を行った。非血縁のサラブレッド 5 頭と 8 種類の制限酵素を用いて分析を行ったが、多型は検出されず、ホモロガスな集団であるサラブレッド等の解析にはこの方法は適していないことが示唆された。

そこで、ウマの品種識別や進化解析に利用できるウマの mtDNA における変異 (多型性) を効率的に検出するため、mtDNA の中でも最

も変異が蓄積していると考えられるDループ領域の全塩基配列の解読を行った。ヒトのmtDNA Dループの塩基配列を基にしてプライマーを作製し、このプライマーを用いて非血縁の3頭のサラブレッドのmtDNA Dループ領域をPCR増幅したのち、クローニングして、その全塩基配列を解読した。これらの解読したmtDNA Dループの塩基配列とすでに配列のわかっている他の動物種の配列とを比較したところ、ウマにおいても各動物において共通するlarge conserved-sequence block) および conserved sequence block 1, 2, 3の存在を認めることができた。また、ウマ特異的な配列として、conserved sequence block 1と2の間に、TGTGCACCの8塩基の反復配列が認められ、この反復回数は、ウマの3個体間で比較したところ、異なっていた。3頭の塩基配列の比較から、tRNA^{Phe}とlarge conserved-sequence blockの間が最も変異の多い、超可変領域(hypervariable region)であることがわかった。

次に、塩基配列の決定されたウマ mtDNAのDループ領域の塩基配列を利用して多型解析を行うため、PCR-SSCP法、PCR-RFLP法、PCR-ダイレクトシーケンス法の3つの方法を検討した。

PCR-SSCP法でDループ領域299bpの解析法を検討したところ、10%グリセロールを含む7%ポリアクリルアミドゲルを用いて、15°Cで電気泳動を行うのが、最適条件であることが示された。また、このPCR-SSCP法を用いて5頭の非血縁馬を分析した結果、3種類のバンドパターンが認められた。

PCR-RFLP法では、Dループのhypervariable region 232bpをPCR増幅し、3か所の塩基置換部位を認識する4塩基認識の制限酵素

Aci I, Cfr 13I, Mse Iを用いて検討を試みた。サラブレッド種 3

頭，中半血種 1頭，ポニー 1頭を用いて解析を行い，Aci I，Cfr 13I，Mse Iの 3つの制限酵素で，それぞれ 3種，2種および 2種の切断パターンが認められた。また，3種類の制限酵素による切断パターンの組み合わせにより，5頭のウマが 5つのお互いに異なるタイプに分類された。

PCR-ダイレクトシーケンス法では，Dループの超可変領域を PCR増幅し，マグネットビーズを用いた固相化ダイレクト・シーケンス法によって検討した。本法によって 6頭の非血縁馬（サラブレッド種）の mtDNA Dループ超可変領域の 271塩基を決定したが，このうち 21か所は塩基置換であり，欠失も 2か所認められた。ウマにおいて遺伝学的にホモログな集団と考えられるサラブレッド種で多くの変異を認めており，本法は，特に同一集団内での遺伝組成を知る上で有効な方法であると考えられた。

次に，前述の 3つの方法を実際にウマ mtDNAの多型解析に応用した。まず，家畜馬における品種識別への応用について検討した。すなわち，家畜馬 5品種 10頭（サラブレッド 5頭，ポニー 2頭，トカラ馬 1頭，北海道和種 1頭，御崎馬 1頭）の Dループ超可変領域 271bp の塩基配列を決定したところ，32か所の変異がみられた。このうち，塩基置換は 31か所であったが，その 82%がトランジション型塩基置換であった。また，5か所の塩基置換部位の組み合わせを検討したところ，サラブレッド，日本在来馬，ポニーで明らかな差を認めることができ，今後家畜馬の品種の類型化（品種識別）の指標としての有効性が示唆された。

家畜馬 3集団の解析への応用を試み，サラブレッド集団での解析は，PCR-SSCP，PCR-RFLP，PCR-ダイレクトシーケンスの 3つの方

法で行った。PCR-SSCPおよびPCR-RFLPでは、mtDNA Dループの多型性に関して多くの情報は得られず、サラブレッドは遺伝的に類似性の高い集団であることが示唆された。一方、PCR-ダイレクトシーケンス法は、mtDNA Dループにおける塩基置換に関して多くの情報を得ることができ、271塩基の中27か所の塩基置換 および 2か所の欠失を見出した。また、塩基置換の94%はトランジション型であった。さらに、母系が一頭の牝馬にたどりつくFamily Tableを使って、Family Number 5 に属する 4頭の塩基配列を比較したところ、約 260年前の共通の母にたどり着くそれぞれの 2頭の間には 4~5 か所の塩基置換が認められた。このように mtDNAは母性遺伝をするが、それらの塩基配列内では変異は確実に起きていることを間接的に証明することができた。

北海道和種馬集団の解析は、PCR-RFLP、PCR-ダイレクトシーケンスの 2つの方法で行った。両者の解析によって、この集団では近交化が進んでいることを示す結果を得た。また、塩基置換も 271bpの中で13か所しかみられず、そのすべてがトランジション型であり、サラブレッドと比較しても変異は少なく、サラブレッド種よりさらに遺伝的類似性の高い集団であると考えられた。

また、モンゴル在来馬集団の解析は、PCR-RFLP、PCR-ダイレクトシーケンスの 2つの方法で行った。両者による解析結果とも、この集団では、サラブレッドや日本在来馬の集団と比べて、非常に多型性に富むことが示された。つまり、RFLP解析では他の品種ではみられなかった切断パターンが見られ、塩基配列の比較では変異の部位が多く、トランジションの割合が相対的に低かった。こうした事実は、モンゴル在来馬の成立に、西方（ヨーロッパ）からの遺伝子

流入があったことを間接的に裏づけているものと考えられた。また、モンゴル在来馬内の3品種間には明らかな差（品種間差）は認められず、ウマの移動にもとづく交雑があったであろうと推察された。さらに、mtDNA Dループの塩基置換多型を基にしたウマの家系解析への応用について検討した。3世代にわたるサラブレッド種の一家系について、PCR-SSCP、PCR-RFLPおよびPCR-ダイレクトシーケンス法を用いて解析したが、3方法ともに、3世代にわたるウマのmtDNAの母性遺伝を確認することができた。

また、母子判定への応用については、実際例を用いて検討した。すなわち、母子関係の疑われた一組の母子馬に関して、PCR-ダイレクトシーケンス法によって母子判定を行った。mtDNA Dループ超可変領域の271塩基中、6か所にわたって塩基配列が異なっており、母子関係は否定された。mtDNAの場合、生後に生じる変異やヘテロプラスミーの問題もあり、mtDNAを用いた母子判定では、その結果の運用にあたっては慎重さが要求されると考えられた。

次に、日本在来馬およびモンゴル在来馬を含むウマ科 Equus 属の5種（ヤマシマウマ E. zebra、グレヴィシマウマ E. grevyi、ロバ E. asinus、モウコノウマ E. przewalskii、家畜馬 E. caballus）を用いて、Dループ内超可変領域 271bpの塩基配列を決定した。この配列を塩基配列が既に知られている3頭のサラブレッド種の塩基配列と比較検討した。すなわち、サラブレッドの1頭を標準塩基配列として比較すると、271bpのうち68か所の変異部位を認めた。変異の割合は、ウマ属のコード領域で報告されている値（229塩基のうち21か所）の2倍以上であった。この研究より推察された塩基置換速度は、2.3-4.6 % / Myr（100万年）であり、これは従来の2% / Myr

よりやや高いが、この値は、mtDNAの中でも変異の最も多いDループ領域の超可変部位であることに起因しているものと考えられた。さらに、近隣結合法で系統樹を作製したところ、従来考えられていたように、モウコノウマが家畜馬に最も近いことが示された。また、家畜馬の中でも、モンゴル在来馬や日本在来馬が、サラブレッドよりモウコノウマに近い関係にあることも示唆された。また、日本の在来馬は、モンゴル在来馬に近く、その起源はモンゴル在来馬であるという説に矛盾しない結果を得た。

以上、ウマ mtDNAのDループ領域の全塩基配列を決定し、その特徴を明らかにし、またその配列を利用したウマの品種識別、ならびにウマ科 Equus属の進化解析へ応用することができた。今後さらにウマの遺伝学的研究を進める上で、Dループ内塩基配列多型が貴重な遺伝的指標になることが示唆された。

Polymorphic sequence of D-loop region in equine mitochondrial DNA
and its applications for breed verification
and molecular evolution of the genus *Equus*

Nobushige Ishida
Equine Research Institute
Japan Racing Association
27-7, Tsurumaki 5-chome Setagaya-ku, Tokyo 154 Japan

It is widely known that mammalian mitochondrial DNA (mtDNA) is inherited by maternal inheritance and has a frequency of nucleotide substitution 5-10 times as high as nuclear DNA. Using the rate of nucleotide substitutions as genetic markers, analyses of evolution in various animal species have been carried out. In this study the sequence of equine D-loop region in mtDNA was determined and it was utilized as a genetic marker for breed verification and evolution analysis of the genus *Equus*.

RFLPs analysis of whole mtDNA of five unrelated thoroughbred horses, digested with 8 restriction endonucleases, was done using pig mtDNA clone as a probe. No variation was detected from the results of the experiment. It was suggested that this method was not suitable to detect the small variations in homogeneous thoroughbred population.

In order to detect the variation of equine mtDNA easily, the equine D-loop region were cloned with PCR and these nucleotide sequences were determined. Comparing DNA sequences among horse, human, cattle and rabbit, a large central-conserved-sequence block and three small-conserved-sequence blocks (CSB1, CSB2 and CSB3) were detected. There were tandem repeats of the 8 bp sequence TGTGCACC between CSB1 and CSB2. The numbers of tandem repeats varied among three horses. It was determined that the region between tRNA^{Pro} and the large central-conserved-sequence block was the hypervariable region in comparison of the three thoroughbred sequences.

The three methods of PCR-SSCP, PCR-RFLP and PCR-direct-sequencing were investigated to characterize polymorphism within equine D-loop region. The D-loop region of 299 bp was amplified by PCR and analyzed by SSCP. The best ideal condition of electrophoresis was on a 7% polyacrylamide gel containing 10% glycerol at 15°C. Three SSCP band patterns were found from the analysis of 5 unrelated horses by the above condition. The D-loop region of 232 bp was amplified by PCR and analyzed by RFLPs. Total DNA of 3 thoroughbreds, a cross-bred and 2 ponies was amplified and digested using 3 restriction endonucleases *Aci* I, *Cfr* 13I and *Mse* I. The three *Aci* I patterns, two *Cfr* 13I patterns and two *Mse* I patterns were detected. By combination of three RFLPs, 5 unrelated horses were classified into 5 types. The 271 bp hypervariable regions of the 6 unrelated thoroughbreds were amplified with the biotinylated primer to determine the sequence directly with solid phase sequencing method. Comparing the 6 sequences, 21 substitution sites and 2

deletion sites were detected. Many mutations were detected in the homologous population of thoroughbreds. So, it was suggested that PCR-direct-sequencing method was very useful to carry out genetic analysis of some breed population. These three methods were used for some different polymorphic analyses of equine mtDNA D-loop region.

For breed verification, 10 hypervariable region sequences of 5 thoroughbreds, 2 ponies, a Tokara native horse, a Hokkaido native horse and a Misaki native horse were determined. Comparing 10 sequences, 31 substitution sites and a deletion site were revealed. Eighty-two percent of substitutions were transition types. When we arbitrarily chose 5 sites which were highly polymorphic among the thoroughbreds, the Japanese native horses (the Tokara native horse, the Hokkaido native horse and the Misaki native horse) and the ponies, all could be classified into the 6 combinations of nucleotides. It was suggested that the hypervariable region sequence was useful for breed verification.

Polymorphic analysis of a thoroughbred population was estimated by PCR-direct-sequencing method. A few polymorphic sites were detected by PCR-RFLP and PCR-SSCP method. This suggested that the thoroughbred population should be highly homogeneous. Contrary to this, many substitutions within D-loop region were detected by PCR-direct-sequencing from the same one. Within 271 bp region, there were 27 substitution sites and 2 deletion sites, 94 % of which were transitions. Two thoroughbred horses belonging to Family Number 5 were suggested to have the common dam ancestor 260 years ago. Close observation of their sequences revealed 4 or 5 substitutions, which showed that some mtDNA mutations occurred during the 260 years.

Polymorphic analysis of a Hokkaido native horse population was done by PCR-RFLP and PCR-direct-sequencing method. A few polymorphic sites were detected by these methods. It was suggested that this population should be more homologous than thoroughbred population.

Polymorphic analysis of a Mongolian native horse population was done by PCR-RFLP and PCR-direct-sequencing method. It was suggested that this population had extensive polymorphism. In RFLP analysis we identified new alleles of RFLPs which had not been found in any other populations. By PCR-direct-sequencing analysis many substitutions were found, and transversions in the Mongolian native horse population were more frequently observed than in other breed populations. So, it was suggested that European horses should have contributed to the establishment of the Mongolian native horses. No differences among the three Mongolian native horse breeds (Tuv, Galshir and Tes) were found.

The pedigree analysis in one thoroughbred horse family was done by PCR-SSCP, PCR-RFLP and PCR-direct-sequencing. The expected maternal inheritance of mtDNA was confirmed by these three methods.

In one pair of dam and offspring the maternal testing was done by PCR-direct-sequencing, which revealed 6 substitutions. It was indicated that the genetic relationship of dam and offspring was negative.

The hypervariable region of five species of *Equus*, including Mongolian and Japanese native horses, were sequenced. These data were compared with already known thoroughbred horse mtDNA sequences. Within 271 bp of D-loop region, there were a total of 68 substitution sites. This ratio is more than two times higher of that which previously reported by Higuchi et al. The mean rate of the divergence becomes between 2.3% and 4.6% per Million year (Myr). It was a little higher than the value (2%/Myr) obtained in previous studies on the genus *Equus* and some other vertebrates. The phylogenetic trees were constructed by using the neighbor-joining method and the maximum parsimony method. These phylogenetic trees show the Mongolian wild horse (*Equus przewalskii*) and domestic horse (*Equus caballus*) to be genetically most closely related. It was also indicated that *E. przewalskii* is genetically closer to the Mongolian or Japanese native horse than to the thoroughbred horses. By these results, the hypothesis was also supported that the Japanese native horses had been derived from the Mongolian native horses.

As we mentioned above, the equine D-loop nucleotide sequences were completely determined and its characteristic features were well clarified here. The equine D-loop sequence was found to be an effective genetic marker for breed verification and studying on the evolution of the genus *Equus*.

謝辞

本論文を作成するに当たり、終始懇切なる御指導を賜った宇都宮大学農学部動物生産学講座 村松晋教授，茨城大学農学部生物工学講座 小杉山基昭教授，東京農工大学農学部蚕学講座 黄色俊一教授，東京農工大学農学部一般教育部生物学教室 小原嘉明教授，宇都宮大学農学部動物生産学講座 吉澤緑助教授に衷心より感謝致します。また，本研究を遂行するにあたって終始御協力，御助言を賜った日本中央競馬会競走馬総合研究所 向山明孝博士をはじめ馬学研究室生命科学研究グループ関係各位，国立遺伝学研究所進化遺伝研究部門 齋藤成也助教授，農林水産省畜産試験場育種部 小松正憲博士，農林水産省家畜衛生試験場製剤部 犬丸茂樹博士，モンゴル科学アカデミー生物工学研究所 オーユンスーレン博士に深甚なる感謝の意を表します。さらに，本研究を実施する機会を与えていただいた日本中央競馬会理事 上田八尋博士および日本中央競馬会馬事部 田中義朗部長，日本中央競馬会競走馬総合研究所 山岡貞雄所長，血液の採取に御協力いただいた帯広畜産大学農学部馬学講座 小栗紀彦教授，東京都多摩動物公園・川崎市夢見ヶ崎動物公園・青森県諏訪牧場・美浦トレーニングセンター・馬事公苑の関係各位に深謝致します。

引用文献

Anderson S., Bankier A.T., Baarrell B.G., de Bruijin M. H. L., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J. H., Staden R. and Young I. G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290, 457-465.

Anderson S., de Bruijn M. H. L., Coulson A. R., Eperon I. C., Sanger F. and Young I. G. (1982) Complete sequence of bovine mitochondrial DNA, conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 156, 683-717.

Aquadro C. F. and Greenberg B. D. (1983) Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*. 103, 287-312.

Attardi G. (1985) Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. *International Review of Cytology*. 93, 93-145.

Attardi G. and Schatz G. (1988) Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 289-333.

Benirschke K., Malouf. N., Low R. J. and Heck H. (1965) Chromosome complement differences between *Equus caballus* and *Equus przewalskii*, Poliakoff. *Science*. 148, 382-383.

Benirschke K. (1966) Sterility and fertility of interspecific mammalian hybrids. In comparative aspects of reproductive failure. Springer-Verlag, New York.

- Bibb M. J., Van Etten R. A., Wright C. T., Walberg M. W. and Clayton D. A.
(1981) Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*. 26, 167-180.
- Bokonyi S. (1974) *Evolution of Domesticated animals*. Longman, London and New York.
- Brown W. M., George M. Jr. and Wilson A. C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79, 1967-1971.
- Brown W. M. (1980) Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77, 3605-3609.
- Brown W. M., Prager E. M., Wang A. and Wilson A. C. (1982) Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18, 225-239.
- Cann R. L., Brown W. M. and Wilson A. C. (1984) Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics*. 106, 479-499.
- Cann R. L., Stoneking and Wilson A. C. (1987) Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*. 325, 31-36.
- Chang D. D. and Clayton D. A. (1985) Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82, 351-355.
- Clayton D. A. (1984) Transcription of the mammalian mitochondrial genome.

Annual Reviews Biochem. 53, 573-594.

Clegg J. B. (1974) Horse hemoglobin polymorphism. Ann. NY Acad. Sci. 241, 61-69.

Crews S., Ojala D., Posakony J., Nishiguchi J. and Attardi G. (1979) Nucleotide sequence of a region of human mitochondrial DNA containing the precisely identified origin of replication. Nature. 277, 192-198.

Denaro M., Blanc H., Johnson M. J., Chen K. H., Wilmsen E., Cavalli-Sforza L. L. and Wallace D. C. (1981) Ethnic variation in Hpa I endonuclease cleavage patterns of human mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 5768-5772.

Dworniczak B., Dworniczak B., Brommelkamp L., Bulles J., Horst J. and Bocker W. W. (1991) Non-isotopic detection of single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) : a rapid and sensitive technique in diagnosis of phenylketonuria. Nucl. Acids. Res. 19, 2500.

Felsenstein J. (1985) Confidence limits on pylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39, 783-791.

Fox T. D. (1986) Nuclear gene products required for translation of specific mitochondrially coded mRNAs in yeast. Trends Genet. 2, 97-99.

George M. Jr. and Ryder O. A. (1986) Mitochondrial DNA evolution in the genus Equus. Mol. Biol. Evol. 3, 535-546.

Ghivizzani S. C., Mackay S. L. D., Madsen C. S., Laipis P. J. and Hauswirth W.

W. (1993) Transcribed heteroplasmic repeated sequences in the porcine mitochondrial DNA D-loop region. *J. Mol. Evol.* 37, 36-47.

Giles R. E., Blanc H., Cann H.M. and Wallace D. C. (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 6715-6719.

Ginther C., Issel-Tarver L. and King M. (1992) Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nature genetics.* 2, 135-138.

Goddard J. M. and Cummings D. J. (1975) Structure and replication of mitochondrial DNA from *Paramecium aurelia*. *J. Mol. Biol.* 97, 593-609.

Greenberg B. D., Newbold J. E. and Sugino A. (1983) Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene.* 21, 33-49.

Groden J., Thliveris A., Samowitz W., Carlson M., Gelbert L., Albertsen H., Joslyn G., Stevens J., Spirio L., Robertson M., Sargeant L., Krapcho K., Wolff E., Burt R., Hughes J. P., Warrington J., McPherson J., Wasmuth J., Le Paslier D., Abderrahim H., Cohen D., Leppert M. and White R. (1991) Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell.* 66, 589-600.

Gyllensten U. B. and Erlich H. A. (1988) Generation of single-strand DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 7652-7656.

Harihara S., Taira M., Yaginuma K., Kobayashi M., Omoto K. and Koike K. (1984) Cloning of human mtDNA and its sequence variation. *Jpn. J. Human Genet.* 29, 224 (Abstract).

Harihara S. and Saitou N. (1989) A phylogenetic analysis of human mitochondrial DNA data. *J. Anthrop. Soc. Nippon.* 97, 483-492.

Higuchi R., Bowman B., Freiberger M., Ryder O. A. and Wilson A. C. (1984) DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312, 282-284.

Higuchi R. G., Wrischnik L. A., Oakes E., George M., Tong B. and Wilson A. C. (1987) Mitochondrial DNA of the extinct quagga: relatedness and extent of postmortem change. *J. Mol. Evol.* 25, 283-287.

Higuchi R. G. and Ochman H. (1989) Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 17, 5865.

Hoelzel A. R., Hancock J. M. and Dover G. A. (1993) Generation of VNTRs and heteroplasmy by sequence Turnover in the mitochondrial control region of two elephant seal species. *J. Mol. Evol.* 37, 190-197.

Hoelzel A. R. (1993) Evolution by DNA turnover in the control region of vertebrate mitochondrial DNA. *Current Opinion in Genetics and Development.* 3, 891-895.

Holton T. A. and Graham M. W. (1990) A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Res.* 19, 1156.

Hopegood R., Sullivan K. M. and Gill P. (1992) Strategies for automated sequencing of Human mitochondrial DNA directly from PCR products. *BioTechniques.* 13, 82-92.

Horai S., Gojobori T. and Matsunaga E. (1984) Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese I. Analysis with restriction enzymes of six base pair recognition. *Hum. Genet.* 68, 324-332.

Horai S. and Matsunaga E. (1986) Mitochondrial DNA polymorphism in Japanese II. Analysis with restriction enzymes of four or five base pair recognition. *Hum. Genet.* 72, 105-117.

Horai S., Hayasaka K., Muratama K., Wata N., Koike H. and Nakai N. (1989) DNA amplification from ancient human skeletal remains and their sequence analysis. *Proc. Japan Acad.* 65, Ser B: 229-233.

Horai S. and Hayasaka K. (1990) Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet.* 46, 828-842.

宝来 聡・近藤るみ. (1991) PCR- 直接シーケンス法. *実験医学 (増刊)* . 9, 42.

Hutchinson C. A., Newbold J. E., Potter S. S and Edgell M. H. (1974) Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature.* 251, 536-538.

Irwin D. M., Kocher T. D. and Wilson A. C. (1991) Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32, 128-144.

石田信繁・犬丸茂樹・武田久美子・大西 彰・三上仁志・小松正憲 (1992) ブタmtDNA のクローニングと応用. *日畜会報.* 63, 1051-1058.

Ishida N., Hasegawa T., Takeda K., Sakagami M., Onishi A., Inumaru S., Komatsu M. and Mukoyama H. (1994) Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA. *Anim. Genet.* 25, 215-221.

Jones W. E. (1982) *Genetics and horse breeding.* 1st edn. Lea & Febiger, Philadelphia.

Johnson M J., Wallace D. C., Ferris S. D., Rattazzi M. C. and Cavalli-Sforza. (1983) Radiation of human mitochondrial DNA types analyzed by restriction endonuclease cleavage patterns. *J. Mol. Evol.* 19, 255-271.

Kaminskii M. (1979) The biochemical evolution of the horse. *Comp. Biochem. Physiol.* 63B, 175-178.

Karawya E. M. and Martin R. G. (1987) Monkey (CV-1) mitochondrial DNA contains a unique triplication of 108 bp in the origin region. *Biochim. Biophys. Acta.* 909, 30-34.

Kasamatsu H., Robberson D. L. and Vinograd J. (1971) A novel closed-circular mitochondrial DNA with properties of a replicating intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68, 2252-2257.

- Kimura M. (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217, 624-626.
- Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S. V., Paabo S., Villablanca F. X. and Wilson A. C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 6196-6120.
- Lindsay E. H., Opdyke N. D. and Johnson N. D. (1980) Pliocene dispersal of the horse *Equus* and late Cenozoic mammalian dispersal events. *Nature.* 287, 135-138.
- Madsen C. S., Ghivizzani S. C. and Hauswirth W. W. (1993) In vivo and in vitro evidence for slipped mispairing in mammalian mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* 90, 7671-7675.
- Maeda M., Murayama M. and Ishii H. (1989) A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele-specific restriction endonucleases. *Tissue Antigens* 34, 290-298.
- Maniatis T., Fritsch E. F. and Sambrook J. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Meyer A. and Wilson A.C. (1990) Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish. *J. Mol. Evol.* 31, 359-364.
- Mignotte F., Gueride M., Champagne A. M. and Mounolou J.C. (1990) Direct repeats in the non-coding region of rabbit mitochondrial DNA, Involvement in the

generation of intra- and inter-individual heterogeneity. *Eur. J. Biochem.* 194, 561-571.

三上仁志・大西 彰・小松正憲. (1988) 中国豚のミトコンドリア DNA制限酵素切断型. *日豚会誌* 25, 181-185.

Mohr E. (1970) *Das Urwildpferd*. A Zaisen Verlag, Wittenberg Lutherstadt (1970).

Monnat R. J. Jr. and Loeb L. A. (1985) Nucleotide sequence preservation of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 2895-2899.

Mukoyama H., Sakagami M., Hasegawa T., Ishida N., Mashima S. and Hirota K. (1994) STR fragment analysis by using PCR amplification with FITC-labelled primer and automated DNA sequencer for paternity testing of horse. *Proc. Internat. Forens. DNA Analys.* (in press)

村上義則. (1992) PCR-SSCP 法. *医学のあゆみ*. 162, 507-511.

村松晋, 田中一栄, 橋口勉, 加世田雄時朗, 茂木一重, 齋藤勝. (1984) 日本在来馬の細胞遺伝学的比較研究. 家畜化と品種分化に関する遺伝学的研究 (昭和57, 58 年度文部省科
研費研究成果報告書) 37-44.

村松晋, 橋口勉, 関川賢二, 田中一栄. (1990) 日本在来馬の細胞遺伝学研究. *畜産試験場報告* 50, 1-10.

Murray V. (1989) Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 17, 5865.

Nass M. M. K. and Nass S. (1963) Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *J. Cell Biol.* 19, 593-661.

野沢 謙, 庄武孝義 (1984) 日本在来馬の類型化. 日本の在来馬—その保存と活用—. 日本馬事協会, 155-194.

Nozawa K. (1992) Origin and ancestry of native horses in Eastern Asia and Japan. *Jpn. J. Equine Sci.* 3, 1-18.

Olivo P. D., Van de Walle M. J. Laipis P. J. and Hauswirth W. W. (1983) Nucleotide sequence evidence for rapid genotypic shifts in the bovine mitochondrial DNA D-loop. *Nature.* 306, 400-402.

Orita M., Iwahara H., Kanazawa H., Hayashi K. and Sekiya T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 2766-2770.

Powell J. R. and Zúñiga M. C. (1983) A simplified procedure for studying mtDNA polymorphisms. *Biochem. Genet.* 21, 1051-1055.

Robberson D. L., Kasamatsu H. and Vinograd J. (1972) Replication of mitochondrial DNA. Circular replicative intermediate in mouse L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69, 737-741.

Roe B. A., Ma D. P., Wilson R. K. and Wong J. F. H. (1985) The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *J. Biolo. Chem.* 260,

9759-9774.

Ron M., Yoffe J. and Weller J. I. (1993) Sequence variation in D-loop mtDNA of cow lineages selected for high and low maternal effects on milk production. *Anim. Genet.* 24, 183-186.

Ryder O. A., Epel N. C. and Benirschke K. (1978) Chromosome banding studies of the Equidae. *Cytogenet. Cell Genet.* 20, 323-350.

Ryder O. A., Starkes R. S., Starkes M. C. and Clegg J. B. (1979) Hemoglobin polymorphism in *Equus przewalskii* and *E. caballus* analyzed by isoelectric focusing. *Comp. Biochem. Physiol.* 62B, 305-308 (1979).

Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. and Erlich H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239, 487-491.

Saitou N. and Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.

Sanger F., Niklen S. and Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5463-5467.

Scharf S. J., Horn G. T. and Erlich H. A. (1986) Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science.* 233, 1076-1078.

Schwartz R. M. and Dayhoff M. O. (1978) Origins of prokaryotes, eukaryotes,

mitochondria, and chloroplasts. *Science*. 199, 395-403.

Shield G. F. and Wilson A. C. (1987) Calibration of mitochondrial DNA evolution in geese. *J. Mol. Evol.* 24, 212-217.

Simpson G. G. (1951) *Horses: The Story of the Horse Family in the Modern World and through Sixty Million Years of History*. Oxford University Press, New York.

柴田 猛・阿部恒夫. (1990) ウマのミトコンドリアDNA多型の検出. *ABRI* 18, 27-29.

Shirai T. (1990) *Family Tables of Racehorses Vol. III. Thoroughbred Pedigree Center LTD.*, Tokyo.

Tragoloff A. and Myers A. M. (1986) Genetics of mitochondrial biogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 249-285.

Trommerhausen-Smith A., Ryder O.A. and Suzuki Y. (1979) Bloodtyping studies of twelve przewalski's horses. *International Zoo Yearbook*. 19, 224-227.

Upholt B. U. and Borset P. (1974) Accumulation of replicative intermediates of mitochondrial DNA in *Tetrahymena pyriformis* grown in ethidium bromide. *J. Cell Biol.* 61, 383-397.

Uryu N., Maeda M., Ota M., Tsuji K. and Inoko H. (1990) A simple and rapid method for HLA-DRB and -DQB typing by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. *Tissue Antigens*. 35, 20-31.

Vogelstein B. and Gillespie D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 615-619.

Walberg M. W. and Clayton D. A. (1981) Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. Nucleic Acids Res. 9, 5411-5421.

Ward R. H., Frazier B. L., Dew-Jager K. and Paabo S. (1991) Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 8720-8724.

Wilson A. C., Cann R. L., Carr S. M., George M., Gyllensten U. B., Helm-Bychowski K. M., Higuchi R. G., Palumbi S. R., Prager E. M., Sage R. D. and Stoneking M. (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biol. J. Linn. Soc. 26, 375-400.

Wong C., Dowling C. E., Saiki R. K., Higuchi R. G., Erlich H. A. and Kazazian H. Jr. (1987) Characterization of β -thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. Nature. 330, 384.

Zeuner F. E. (1963) A history of Domesticated Animals. pp 299-337, Hutchinson, London.

