

偶蹄目ウシ亜目における
分子進化に関する研究

1996.3

千 國 幸 一

①

偶蹄目ウシ亜目における
分子進化に関する研究

千国幸一

目次

緒論	1
第1章 シトクロム b 遺伝子の塩基配列	9
第1節 部分塩基配列の決定	11
1. 材料および方法	11
2. 結果と考察	17
第2節 部分塩基配列の特徴	25
第3節 全塩基配列の決定	32
1. 材料および方法	32
2. 結果と考察	33
第4節 第1章の要約	34
第2章 κ -カゼイン遺伝子の塩基配列	35
第1節 エキソン II, III, IV の塩基配列決定	37
1. 材料および方法	37
2. 結果と考察	43
第2節 塩基配列の特徴	53
第3節 第2章の要約	61
第3章 成長ホルモンプロモーター領域の塩基配列	62
第1節 塩基配列の決定	63
1. 材料および方法	63
2. 結果と考察	66
第2節 塩基配列の特徴	68
第3節 第3章の要約	70

第4章 分子系統樹の作成とその比較	7 1
第1節 シトクロム b 遺伝子の分子系統樹	7 5
1. 系統樹作成方法	7 5
2. 結果と考察	7 9
第2節 κ -カゼイン遺伝子の分子系統樹	8 5
1. 系統樹作成方法	8 5
2. 結果と考察	8 8
第3節 成長ホルモンプロモーター領域の分子系統樹	9 1
1. 系統樹作成方法	9 1
2. 結果と考察	9 3
第4節 塩基およびアミノ酸置換速度の比較	9 5
第5節 分子進化から推定される偶蹄目ウシ亜目の系統樹	9 8
第6節 第4章の要約	1 0 1
総括	1 0 2
資料： 塩基配列と推定アミノ酸配列	1 0 6
1. シトクロム b 遺伝子	1 0 6
2. κ -カゼイン遺伝子	1 2 6
要旨	1 4 1
謝辞	1 4 8
引用文献	1 4 9
論文目録	1 6 1
参考論文	1 6 3

緒 論

生物の進化とはどのような過程を経て起きてきたものなのか、生物の進化史と進化機構の解明は生物学最大の課題である。この問題について、1859年 Charles Darwin¹⁴⁾の進化論が発表された。この考えに対して、激しい論争が引き起こされたが、進化論も世の中に受け入れられるようになり、突然変異によって生じた変異が自然淘汰によって選択され、それによって生物が進化してきたとの考えは広く一般化している。

この考え方に基づけば、生物の形質は徐々に変化したものであり、多くの形質についてその特徴を細かく比較し、変化の順を追ってならべることにより、生物進化の歴史を解析することができるとの考えが成り立つ。現存している生物の分類はこの考えに基づき、主に形態の比較から分けられたものであり、化石種を含めた多くの系統樹が提案されてきている。

しかし、生物の形態に基づいた評価には主観的な要素が入りやすく、分類学者が重視した形質によって異なった結果を与えるため、真の進化史はどの経路を通ったか、どちらの分類が正しいのか、論争が絶えない。これには収束進化や平行進化の問題が絡んでおり、外観から判断する進化解析はこの問題を避けて通ることができない。

収束進化 (convergent evolution) は鳥の翼と昆虫の羽のように起源の異なる種から外見上類似した構造を生じる進化をいい、この他にもイルカ、魚類、魚竜でヒレの形が非常に類似しているなど数多くの例が存在する。平行進化 (parallel evolution) は独立した2種以上の発生系図で同じような傾向を生じることをいい、白亜期に絶

滅した恐竜類と現存する哺乳動物類がともに同じような形態で生態系に展開していることなどがあげられる。また、同じ哺乳類の中でも有袋類と有胎盤類で独立して同様な種を進化させていることが知られている。このような進化過程での傾向は生物が環境に適応する場合、その環境に最も適した形態に進化していった結果であると考えられる。

例にあげたこれらの種については分岐した年代が非常に古いため、器官の形態的相違から識別することが可能である。しかし、より近い年代に分かれたと考えられる種において判断に迷う例が多い。ジャイアントパンダは19世紀になってから世界に知られるようになった動物であり、発見当時からその分類学的位置について議論が続いている。その要旨^{27, 28, 44)}は、外観からはクマであり、骨と歯並びからはレッサーパンダやアライグマの仲間であるというものであった。近年になって分子進化的解析が行われ、ジャイアントパンダはクマに近い種であるとの結論に達している²⁸⁾。

分子進化はDNAの塩基配列や蛋白質のアミノ酸配列の比較から系統関係を推定するもので、形態の類似にまどわされないという利点がある。1960年代に蛋白質のアミノ酸配列データが集まりはじめ、それら配列間の比較が行われた。その結果、同種蛋白質間のアミノ酸置換数はそれらの種が分化してから経過した時間にほぼ比例するという「分子時計」といわれる現象が明かとなった。この「分子時計」は蛋白質の種類によって決まる一定の速度を持つこと、生物の種の違いに影響されないこと、などから生物の進化を解析する上で非常に有効な手法であることが示された^{43, 68)}。また、蛋白質のアミノ酸配列はだれが分析しても同じ結果を与え、それに基づく系統

解析は客観的なデータとして扱うことができるようになった。

その後、DNAの塩基配列データにおいても「分子時計」の成立することが明らかにされ、現在では系統解析のデータとしてDNA塩基配列が一般的に扱われるようになった。このようにDNAが主に扱われるようになった理由としては分析方法の容易さとデータの質の2つの面がある。1970年代までは塩基配列の決定が困難で、アミノ酸配列が用いられていた。しかし、最近のDNA解析技術の進歩により、DNAの塩基配列の決定がはるかに容易に行えるようになってきた。現在、分子進化の系統解析にアミノ酸配列と塩基配列の両者が用いられている。しかし、ここで用いられているアミノ酸配列は蛋白質から決定されたアミノ酸配列ではなく、cDNAの塩基配列から推定されたアミノ酸配列が大部分である。

第2の点はDNA塩基配列における情報量の多さである。蛋白質を構成するアミノ酸はDNAの3塩基からなるコドンで規定され、同じ領域でもDNAはアミノ酸配列に比べ3倍の情報量を持っている。生物のDNAで蛋白質に翻訳される部位はごく一部であり、哺乳類では全塩基配列の5%以下しか蛋白質に翻訳されていないと言われている。塩基配列の比較ではこの95%以上を占める翻訳されない領域を用いることも可能である。また、アミノ酸数に対しコドン数が多くなるため、1つのアミノ酸に対し複数のコドンが存在する。これは突然変異で塩基置換が生じててもアミノ酸の変化が起きない場合のあることを示しており、同義置換(synonymous substitution)といわれている。同義置換部位での進化速度はアミノ酸変化を引き起こす非同義置換(nonsynonymous substitution)の進化速度と異なっており、cDNAの塩基配列から質の異なる2種の情報を得るこ

とができる。

DNAの塩基配列やアミノ酸配列に「分子時計」が成立する理由は木村^{35, 37)}によって提唱された「分子進化の中立説」から説明される。木村は、進化的変化の大部分が正の淘汰ではなく、淘汰に中立またはほとんど中立な突然変異遺伝子の偶然的な浮動によって起こると主張している。生物界に存在する遺伝的な変異が正の淘汰によるものであるならば、それには何らかの優性的な理由が付随している。ダーウィンの考えを発展させたネオ・ダーウィニズムによれば、その変異が存在している理由はそれが何らかの優れた形質を持っているからであると考えられる。したがって、変異は機能に関与している重要な領域に多く、同義置換部位など機能に関与しない領域では少ないことになる。

一方、「中立説」によれば、存在するほとんどの変異は偶然的な浮動によるもので、中立的な変異が大部分を占める。機能に有害な遺伝的な変異は淘汰によって除去され、後に残る変異は機能に関与しない部分に多いことになる。「中立説」は発表当時ダーウィンの進化論を否定するものとして激しい批判を浴びたものの、その後多くの分子データが「中立説」を支持している。多くの遺伝子の塩基配列で同義置換部位は変化しやすく、非同義置換部位は変化が少ない。また、蛋白質のアミノ酸配列の比較においても、ヒストンなどの機能的に重要な蛋白質の変異速度は非常に遅く、フィブリノペプチドのように血液凝固時に切り出され、その後の機能のない蛋白質は変異速度が大きい。

「中立説」は木村自身が述べているように、全ての突然変異が厳密に中立であると主張しているのではなく、非常に多くの負の淘汰

といくらかの正の淘汰の存在も認めている。負の効果のある突然変異は淘汰によって速やかに集団中から排除されるので、観察される割合は少ない。また正の効果のある突然変異は頻度が少ないので同じく観察される割合は少ない。したがって、現在観察される変異は淘汰に中立な変異であると考えることができる。淘汰に中立な変異であれば、ある2つの種が分岐してからの変異は独立に起こり、2種間の変異数は分岐年代に比例して増加していく。逆に、ある2種の配列を比較すればその配列の相違の程度から分岐してからの経過年数を推定することが可能となる。実際には系統ごとに変異速度に違いがあり、単純に分岐年代を推定することは困難である。しかし、系統間の分岐パターンを推定することは可能であり、年代の明らかになっている化石データを考慮することにより、かなり正確に分岐パターンと分岐年代を決定し、系統樹を作成することができるようになった。

この分子進化による解析が効果をあげた例として霊長類の系統解析をあげることができる。人類の起原は化石の証拠から2000-3000万年前であるとされていた。しかし、Sarich and Wilson⁵⁹⁾によってヒトとチンパンジーが約500万年前に分岐したことが示されて以来、この分岐年代を支持する数々の分子生物学データが出されてきた。新しい分岐年代の推定はしだいに受け入れられ、当時、人類の古い化石と考えられていたものは他の霊長類の祖先の化石であるとされるようになってきている²⁷⁾。

有蹄類は爪のかわりに蹄を持つようになった動物全体を指し、地上を走り、植物性食物を取るよう進化したグループと考えられる。有蹄類は6000-6500万年前の暁新世のころ現れ、奇蹄目と偶蹄目に

分かれた後、温暖な気候のもとに急速な適応放散をしめした。初期には奇蹄目の分化が進み、偶蹄目はその後 3800-2600 万年前の漸新世の気候変動を境に適応放散をし、現在では奇蹄目よりも優勢なグループとして存在している^{29, 52)}。

偶蹄目は暁新世と始新世の境界付近の年代でイノシシ亜目が分化し、さらに残るグループがラクダ亜目とウシ亜目の2つのグループに分かれている。なかでもウシ亜目は現生の陸上大型哺乳類で最もめざましく、多様な発展をとげたグループで、熱帯から砂漠、山岳地帯まで広く分布している。ウシ亜目は約2600万年前以後、地球の草原化とともに急速に分化をとげたため、相互に分岐した年代が近く、現生する動物種間の分岐系統関係は明確となっていない。

ウシ、ヤギ、ヒツジなど現在、家畜として飼われている動物の大部分は偶蹄目ウシ亜目に属している。これらにおける系統関係を明確にすることは人間が利用している家畜の各種形質の進化を検討し、改良を加えていく上で重要なことである。

例えば、本研究で分子進化の解析に用いている κ -カゼインは乳蛋白質の主要成分であり、そのアミノ酸配列の違いによって乳の性質は異なってくる。ウシ、スイギュウ、ヤギ、ヒツジの乳から造られるチーズはそれぞれ異なった特徴を有し、それは乳構成成分の性質の違いに基づいている。ウシの乳の場合も κ -カゼインのアミノ酸配列多型でチーズの物性に違いが表れてくる。したがって、ウシの乳構成成分の遺伝子を改変し、新しい性質を付与することはバイオテクノロジーの利用として1つの方向を示すものと考えられる。しかし、ランダムな変異の導入は蛋白質の機能を阻害する可能性も持っており、遺伝子のどの部分に変異を導入するかは重要な問題で

ある。実際、酵素遺伝子はアミノ酸1個の置換によって全く機能を消失してしまうことが多くの研究で示されている。一方、生物における進化の歴史はランダムな突然変異と選択の結果であり、自然界での遺伝子組換え実験ともいえる。このなかで有害な遺伝子は除去され、生存に有利な遺伝子や中立な遺伝子が残っていると考えられる。動物の系統関係が明らかになれば、特定の蛋白質が機能を維持したまま、どのように変化してきたか明らかになり、また、それらの種が生育している環境と蛋白質機能の相互関係も明らかになると期待される。

ウシ亜目を含む偶蹄類の分子進化についてはいくつかの解析がなされている。しかし、その解析においてウシ科とシカ科の位置、およびそれらが単系統であるのか否かについて、結果が分かれている。

初期に行われた蛋白質のアミノ酸配列の比較で、フィブリノペプチド²⁵⁾とリボヌクレアーゼ⁷⁾のデータはウシ科とシカ科が単系統であることを示しており、これは化石データから得られる結果とも一致していた。一方、1991年にIrwinら³⁴⁾が発表したミトコンドリアDNAのシトクロムb遺伝子のデータはこれらの2科が系統樹の中で混在し、系統樹作成の誤差を考慮すると、単系統であるのか、複数の系統であるのか結論を出していない。また、Gatesyら²³⁾はミトコンドリアに存在する12Sおよび16S tRNA遺伝子の部分配列データからウシ科が単系統ではないことを示唆している。さらにこの領域付近についてAllardら⁴⁾が2.7kbの塩基配列を決定し、比較した結果、彼らはウシ科が単系統であると考えている。

塩基配列決定の困難さから、分子進化の解析は1種類の遺伝子について比較される場合が多い。これによって示される系統樹は遺伝

子の系統樹であって種の系統樹ではない。解析に用いた遺伝子の種類による塩基置換の片寄りも予想され、種の分岐系統樹を作成するためには多くの遺伝子について塩基配列を決定し、その結果から系統樹を作成することが望ましい。特に動物の系統解析に良く用いられているミトコンドリア遺伝子は進化速度が速いため近縁種間の比較ができる長所と古い分岐年代で変異が飽和に達する短所とが共存している。

本研究は家畜種の大部分をしめるウシ亜目の系統関係を明確にするため、シトクロム b, κ-カゼイン遺伝子および成長ホルモン遺伝子プロモーター領域の塩基配列決定と系統樹の作成を行った。これらの遺伝子は存在している部位、機能、進化速度の異なる遺伝子である。また、対象動物として形態分類から分岐年代が異なっていると思われるウシ、サイガ、ヤギ、シロイワヤギ、ニホンカモシカなど偶蹄目のウシ亜目ウシ科ヤギ亜科を中心に14種の動物を選び、遺伝子の変異速度と分子系統樹の解析精度、信頼性の関係を検討した。

第1章 シトクロム b 遺伝子の塩基配列

緒言

ミトコンドリアは細胞内に存在する小器官で、独自の遺伝子を保有し、真核生物の発生初期に共生関係となった特殊な原核細胞を起源に持つと考えられている²⁾。ミトコンドリアは比較的容易に細胞分画から分離することができ、その遺伝子の大きさも核遺伝子に比べて小さいため、分子生物学の研究初期から集中的に塩基配列の決定が行われてきた。哺乳動物においてもヒト⁵⁾、マウス⁸⁾、ウシ⁶⁾等の全塩基配列が決定されている。また、ミトコンドリアDNAの変異速度は非常に速く、近縁種間においても多くの塩基置換が見られる^{10, 27, 49)}。これらの理由からミトコンドリア遺伝子は分子進化の研究に最もよく用いられている遺伝子の1つである。

Polymerase Chain Reaction (PCR) 法^{5, 6)}の開発は分子生物学やその応用分野に画期的な進歩をもたらしたが、分子進化の研究もその例外ではない。分子進化のような研究においては、対象とする生物種で同じ領域の塩基配列が決定されているか否かが研究の成否を左右している。現在では、PCR法を用いて対象領域を増幅し、さらに増幅されたDNA断片の塩基配列を決定することは容易である。

分子進化研究の手法上で大きな進歩は1989年Kocherら³⁹⁾によって報告されたPCR共通プライマーの概念である。彼らは哺乳類、カエル、ハエのミトコンドリアDNAの塩基配列を比較して保存性の高い領域を選び出した。その領域で共通に保存されている塩基配列となるように作成したプライマーはPCR法で広範囲の動物種か

ら対象領域を増幅することが可能であった。それまでの考え方によれば、プライマー領域の塩基配列の情報はPCRを行う上で必須の条件であった。したがって、塩基配列の決定されていない遺伝子を増幅することはできなかった。しかし、共通プライマーを使用することにより、塩基配列が未決定の種からも目的領域を増幅し、塩基配列を決定できることが明かとなり、その後、多くの動物グループで塩基配列の決定と比較が行われている。そのなかでもシトクロム b 遺伝子は多くの動物種について塩基配列が決定された遺伝子で、本研究においても他種との比較上、シトクロム b 遺伝子の塩基配列を決定した。

Kocherら³⁹⁾が決定したシトクロム b 遺伝子の配列は307bp と短いものであったが、Irwinら³⁴⁾はミトコンドリアDNAシトクロム b 遺伝子の前後に存在するtRNA領域にプライマーを設定し、17種の哺乳類のシトクロム b 遺伝子の全塩基配列1140bpを決定した。

シトクロム b 遺伝子の全領域を決定するためには複数の組のプライマーと塩基配列の決定が必要である。そこで本研究では1組のプライマーと1回の塩基配列で決定できる646bpの領域を対象に14種の偶蹄目動物のミトコンドリアDNAについてPCR増幅を行い、塩基配列を決定した。また、比較に用いた塩基配列の長さによって分子進化解析が受ける影響を検討するため、ウシ、スイギュウ、ニホンカモシカ、ニホンジカ、ジャワマメジカのシトクロム b 遺伝子の全塩基配列を決定した。

第1節 部分塩基配列の決定

1. 材料および方法

1) 試験材料

塩基配列の決定を行った動物は *Sus scrofa* (ブタ, イノシシ科), *Tragulus javanicus* (ジャワマメジカ, マメジカ科), *Cervus nippon* (ニホンジカ, シカ科), *Bos taurus* (ウシ, ウシ科ウシ属), *Bubalus bubalis* (スイギュウ, ウシ科スイギュウ属), *Capra hircus* (ヤギ, ウシ科ヤギ属), *Ovis aries* (ヒツジ, ウシ科ヒツジ属), *Saiga tatarica* (サイガ, ウシ科サイガ属), *Rupicapra rupicapra* (シャモア, ウシ科シャモア属), *Oreamnos americanus* (シロイワヤギ, ウシ科シロイワヤギ属), *Nemorhaedus goral* (ゴール, ウシ科ゴール属), *Capricornis sumatrensis* (シーロー, ウシ科カモシカ属), *Capricornis swinhoei* (タイワンカモシカ, ウシ科カモシカ属), *Capricornis crispus* (ニホンカモシカ, ウシ科カモシカ属) の14種である (Fig. 1)。

ウシ, ヒツジ, ヤギ, ブタ, ニホンカモシカ, ニホンジカ, ジャワマメジカの試料は筋肉を採取し, DNAの抽出を行った。スイギュウは血液試料からDNAを抽出した。シャモア, シロイワヤギ, ゴール, シーロー, タイワンカモシカの5種は日本カモシカセンターで飼育している個体から採取した毛根を試料とした。またニホンカモシカについては毛根試料の分析も行った。

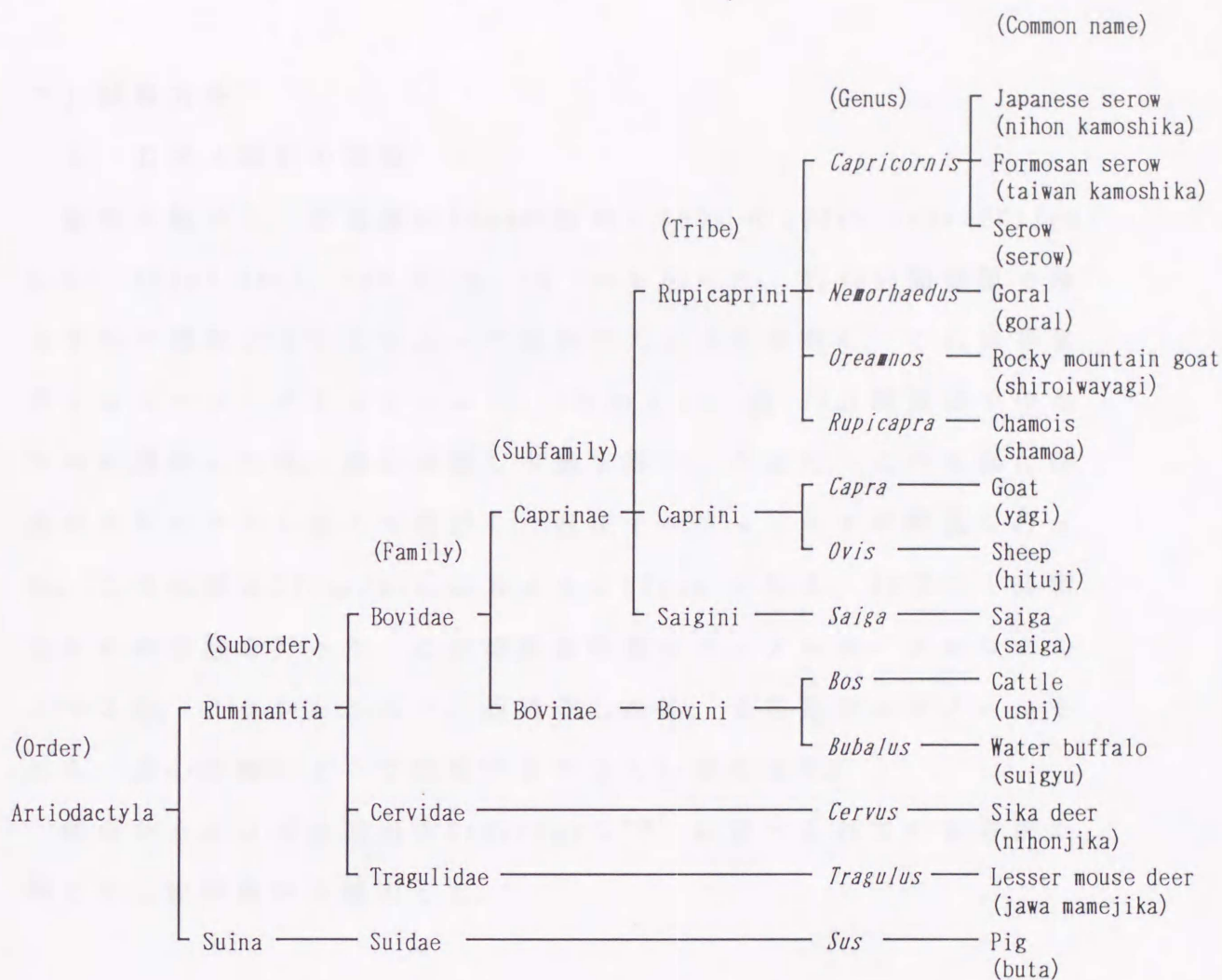


Fig.1 Taxa examined in the present study.

Common names in parenthesis are Japanese names.

Scientific names of the animals are *Capricornis crispus*(Japanese serow),

Capricornis swinhoei(Formosan serow), *Capricornis sumatrensis*(Serow),

Nemorhaedus goral(Goral), *Rupicapra rupicapra*(Chamois), *Oreaninos americanus*(Rocky mountain goat),

Capra hircus(Goat), *Ovis aries*(Sheep), *Saiga tatarica*(Saiga), *Bos taurus*(Cattle),

Bubalus bubalis(Water buffalo), *Cervus nippon*(Sika deer), *Tragulus javanicus*(Lesser mouse deer),

and *Sus scrofa*(Pig).

2) 試験方法

a. DNA試料の調製

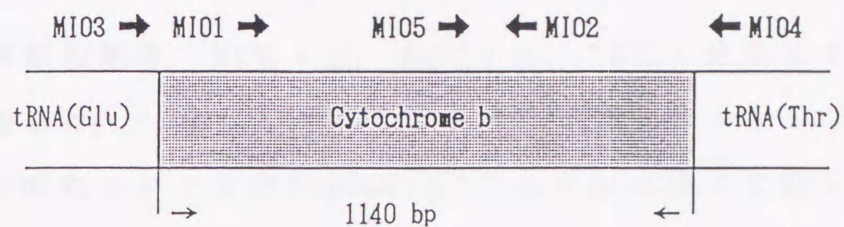
筋肉を細切し、湿重量約50mgの試料に800 μ lの100mM Tris-HCl(pH 9.0), 100mM NaCl, 5mM EDTA, 1% SDSを加えた。約30分間室温でゆるやかに攪拌することによって試料の大部分を溶解し、これに等量のフェノール・クロロホルム(1:1)を加えた。約10分間室温でゆるやかに攪拌した後、遠心分離し水層を得た。さらに、この水層に等量のクロロホルム加えて攪拌し、混在するフェノールの除去を行った。この水層に100 μ g/mlになるようにRNaseを加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間RNAの分解を行った。この溶液を等量のフェノール・クロロホルムで2回、クロロホルムで1回処理した後、2倍量のエタノールを加え、遠心分離によって沈澱するDNA分画を得た。

血液からのDNA抽出はSambrookら^{5,8)}に述べられている方法に準じて白血球層から抽出した。

b. PCR増幅

PCRのプライマーは、ヒト⁵⁾、ウシ⁶⁾、マウス⁸⁾、ニワトリ¹⁵⁾のミトコンドリアDNAの塩基配列を比較し、シトクロムb遺伝子で共通性の高い領域に設定した(Fig. 2)。フォワードプライマー(MI01)の配列は5'-CAAATCCTCACAGGCCTATTCCTAGC-3'、リバープライマー(MI02)の配列は5'-TAGGCGAATAGGAAATATCATTTCGGGTTTGAT-3'である。これらの位置はウシのミトコンドリアDNAでMI01がL14643-14668, MI02がH15315-15346の位置に相当する。

PCRは100 μ lの反応液で行い、10mM Tris-HCl(pH8.9), 1.5mM MgCl₂, 80mM KCl, 500 μ g/ml BSA, 0.1% コール酸ナトリウム, 0.1%



- MIO1: 5'-CAAATCCTCACAGGCCTATTCCTAGC-3' (L14643-14668)
 MIO2: 5'-TAGGCGAATAGGAAATATCATTCCGGTTTGAT-3' (H15315-15346)
 MIO3: 5'-GACTAATGATATGAAAAACCATCGTTG-3' (L14465-14491)
 MIO4: 5'-TTGTTCTTCATCTCTGGTTTACAAGAC-3' (H15683-15709)
 MIO5: 5'-TCCACGAAACAGGATCCAACAACCC-3' (L15112-15136)

Fig.2 Structure of the mammalian mitochondrial cytochrome b gene and the primers for amplification of the artiodactyl cytochrome b genes. Numbers in parentheses are the positions according to the bovine mtDNA sequence⁶⁾.

TritonX-100, プライマー 40 pmole, dNTP 200 μ M, Tth DNA ポリメラーゼ (TOYOBO) 2 ユニットとした。テンプレートは 500 ng の DNA を用いた。反応は, ZYMOREACTOR (ATTO, AB-1800) を用い, 93°C で 2 分の初期加熱後, 93°C 1 分, 60°C 1 分, 72°C 1 分のサイクルを 35 回繰り返した。

毛根試料の PCR は Higuchi ら³⁰⁾の方法に準じて行った。1 本ないしは 2 本の毛根部分を 10 μ l の水中で 95°C 10 分の加熱を行った。50°C に冷却後 protease K 溶液を加え, 50°C で 1 時間蛋白質を分解した。95°C 10 分の加熱で酵素を失活させた後プライマー, dNTP, Tth DNA ポリメラーゼを加え, DNA テンプレートと同様の反応液組成で PCR を行った。

c. 塩基配列の決定

塩基配列の決定は PCR 産物のダイレクトシーケンシングで行った。PCR 反応液約 90 μ l を Ultrafree C3-TK (MILLIPORE, 分画分子量 30000) で約 10 μ l に濃縮後, 4% NuSieveGTG (FMC) アガロースゲル電気泳動で分離した。目的の断片をゲルから切り出した後, 凍結し, 融解後 Ultrafree C3-VV (MILLIPORE, 0.1 μ m) で遠心することによってアガロースゲルから DNA フラグメントを含む水層を分離した。この水層を Ultrafree C3-TK に移し, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM EDTA 溶液 300 μ l と滅菌水 300 μ l で遠心・洗浄した。さらにこの液を 14 μ l に濃縮し, シーケンス反応のテンプレートとする精製 DNA を得た。シーケンス反応は ABI 社の Dye Terminator Cycle Sequencing Kit で行った。1 つの試料から得られた精製 DNA 溶液を 2 分し, それぞれ MI01, MI02 をプライマーとするサイクルシーケンス反応を行

った。反応液組成はABI社のプロトコールにしたがった。反応はZYM
OREACTOR (ATTO, AB-1800) を用い, 96°C 0.5分, 55°C 0.5分, 60°C
4分のサイクルで25回行った。

反応終了後Bio-Spin 30カラムで2500 rpm, 2分の遠心をかけ, 反応
液から未反応物質を除いた。この液に酢酸ナトリウム溶液とエタノ
ールを加え, -20°Cで30分放置後, 遠心分離によって反応産物を得た。
これを自動DNAシーケンサ (ABI373A) にかけて, 塩基配列を決定し
た。フラグメントの両端から決定した約 300-450bpをプログラムで
結合し, 646bpの塩基配列を決定した。

2. 結果と考察

プライマーMI01とMI02を用いるPCRで14種の偶蹄目全てから目的の領域を増幅することができた。これは新たに設計したプライマーMI01とMI02が共通プライマーとして偶蹄目動物のシトクロムb遺伝子増幅に使えることを示している。決定した塩基配列の比較をFig. 3に、アミノ酸配列の比較をFig. 4に、個々の動物についての塩基配列と翻訳アミノ酸配列をFig. S 1からFig. S 13に示す。塩基配列はアミノ酸配列との比較上、5'末端の1塩基を除いた645bpを示している。

ウシ⁶⁾、ヒツジ³⁴⁾、ヤギ³⁴⁾、ブタ³⁴⁾のシトクロムb遺伝子についてはすでに塩基配列が発表されている。本研究で決定した塩基配列と比較すると、ウシは完全に一致し、ヒツジで7ヶ所、ヤギで16ヶ所、ブタで2ヶ所の相違点があった。ミトコンドリア遺伝子は変異速度が速いため、同じ種内においても多型現象が認められる。ヒツジ、ヤギにおいて、相違箇所は決定した塩基配列の1.1%および2.5%に相当する。制限酵素切断型の違いから計算されたヒツジ、ヤギの多型割合は0.5-1.0%および2.0%であり、これと比べ高い値ではなかった。また、塩基置換のうちヒツジの全てとヤギの14ヶ所は同義置換でアミノ酸配列に変化を与えない。したがって、これら発表されている塩基配列との相違は分析に用いた個体または系統による多型であると考えられた。

ニホンカモシカは筋肉から抽出したDNA試料と毛根試料の両者について塩基配列を決定した。その結果、個体が異なるものの両者の塩基配列は完全に一致し、試料部位の違いによる多型はないものと考えられた。

Cattle	ATA	CAC	TAC	ACA	TCC	GAC	ACA	ACA	ACA	GCA	TTC	TCC	TCT	GTT	ACC	CAT	ATC	TGC	CGA	GAC	60
Water buffalo	
Sheep	<u>T</u>	...	<u>C</u> <u>T</u>	
Goat	<u>T</u>	<u>C</u>	
Japanese serow	<u>T</u>	<u>T</u>	
Formosan serow	<u>T</u>	<u>T</u>	
Serow	<u>T</u>	<u>GT</u>	<u>T</u>	
Goral	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	
Chamois	
Rocky mountain goat	
Saiga	<u>G</u> <u>T</u>	
Sika deer	<u>T</u>	...	<u>T</u>	
Lesser mouse deer	<u>A</u>	
Pig	...	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	...	<u>A</u>	...	<u>A</u>	...	<u>A</u>	

Cattle	GTG	AAC	TAC	GGC	TGA	ATC	ATC	CGA	TAC	ATA	CAC	GCA	AAC	GGA	GCT	TCA	ATG	TTT	TTT	ATC	120
Water buffalo	<u>T</u>	...	<u>A</u>	...	<u>T</u>	
Sheep	...	<u>A</u>	...	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	...	<u>A</u>	
Goat	...	<u>A</u>	<u>T</u>	
Japanese serow	...	<u>A</u>	...	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	...	<u>A</u>	...	
Formosan serow	...	<u>A</u>	...	<u>T</u>	<u>T</u>	
Serow	...	<u>A</u>	<u>T</u>	
Goral	...	<u>A</u>	...	<u>T</u>	<u>T</u>	...	<u>T</u>	
Chamois	...	<u>A</u>	<u>T</u>	...	<u>T</u>	...	<u>A</u>	...	
Rocky mountain goat	...	<u>A</u>	...	<u>T</u>	<u>T</u>	
Saiga	...	<u>C</u>	...	<u>T</u>	<u>T</u>	
Sika deer	...	<u>C</u>	...	<u>T</u>	<u>T</u>	...	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	...	<u>A</u>	
Lesser mouse deer	...	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	
Pig	...	<u>A</u>	<u>T</u>	...	<u>A</u>	...	<u>G</u> <u>T</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	...	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	...	

Cattle	TGC	TTA	TAT	ATG	CAC	GTA	GGA	CGA	GGC	TTA	TAT	TAC	GGG	TCT	TAC	ACT	TTT	CTA	GAA	ACA	180
Water buffalo	<u>A</u>	<u>A</u>	...	<u>C</u>	...	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	
Sheep	...	<u>C</u>	<u>T</u>	...	<u>T</u>	<u>C</u>	...	<u>T</u>	...	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	
Goat	...	<u>C</u>	<u>TC</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>A</u> <u>C</u>	<u>C</u>	...	<u>T</u>	...	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	
Japanese serow	...	<u>C</u>	<u>TC</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	...	<u>C</u>	...	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	
Formosan serow	...	<u>C</u>	<u>TC</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	...	<u>C</u>	...	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	...	<u>C</u>	<u>T</u>	
Serow	...	<u>C</u>	<u>TC</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	...	<u>C</u>	...	<u>A</u>	<u>G</u>	
Goral	...	<u>C</u>	<u>TC</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	...	<u>C</u>	...	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>TC</u>	
Chamois	...	<u>C</u>	<u>TC</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	
Rocky mountain goat	...	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	...	<u>T</u>	
Saiga	...	<u>C</u>	<u>TC</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>C</u>	
Sika deer	...	<u>C</u>	<u>TC</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	...	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	
Lesser mouse deer	...	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	...	<u>T</u>	<u>C</u>	...	<u>C</u>	...	<u>A</u>	<u>C</u>	...	<u>C</u>	<u>C</u>	
Pig	...	<u>C</u>	<u>TC</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	...	<u>T</u>	<u>C</u>	...	<u>C</u>	...	<u>A</u>	<u>C</u>	...	<u>T</u>	<u>A</u>	...	

Fig.3 Partial sequences of the cytochrome b genes from 14 species in the Artiodactyla. Dot indicate nucleotides that are identical to the bovine cytochrome b gene. The different nucleotides from the published sequences are underlined.

	TGA	AAT	ATT	GGA	GTA	ATC	CTT	CTG	CTC	ACA	GTA	ATA	GCC	ACA	GCA	TTT	ATA	GGA	TAC	GTC	240
CattleC	..CA	..A	T..	G..A	
Water buffaloC	..CC	..A	T..T	G..G	AC..CC	..T	..T	
SheepC	..CC	G..G	AC..	..GCC	..T	..T	
GoatC	..CC	..A	AC..CC	..T	..T	
Japanese serowC	..CC	..A	AC..CC	..T	...	
Formosan serowC	..CT	..C	..A	CG..CC	..T	...	
Serow	..G	..C	..C	..GT	..C	..A	CG..CC	..T	...	
GoralC	..C	..GA	AC..TC	..G	..T	
ChamoisC	..CC	..A	AC..GG	..C	
Rocky mountain goatCC	T..A	..T	...	AC..GCC	
SaigaCT	..TA	..T	G..	AC..CT	
Sika deerC	..CT	..C	..A	T..TTC	G..T	
Lesser mouse deerCG	..T	..C	..AGCG	..T	
PigC	G..	..A	..A	T..T	..C	..TAC	..CC	

	CTA	CCA	TGA	GGA	CAA	ATA	TCA	TTC	TGA	GGA	GCA	ACA	GTC	ATC	ACC	AAC	CTC	TTA	TCA	GCA	300
Cattle	..GG	...	ACA	GTC	ATC	ACC	AAC	CTC	TTA	TCA	GCA	
Water buffalo	T..T	..TT	C..C	
Sheep	T..TGT	..T	..T	..T	..T	C..T	
Goat	T..TGT	..T	..T	..T	..T	C..T	
Japanese serowGG	..TT	..T	..T	..T	..T	C..C	
Formosan serowGG	..GTT	..T	..T	..T	..T	..T	C..C	
SerowGG	..TT	..T	..T	..T	..T	..T	C..C	
GoralGGG	..CT	..T	..T	..T	..T	C..C	
ChamoisG	..T	..TGGT	..T	..T	..T	..T	..T	C..C	
Rocky mountain goat	T..T	..T	..T	..T	..T	C..T	
SaigaG	..T	..TGGT	..T	..T	..T	..T	..T	C..T	
Sika deerCG	..TCT	..T	..T	..T	..T	..T	C..C	
Lesser mouse deer	..G	..CT	..GA	..T	..A	..A	..A	..A	C..T	
Pig	..G	..CT	..GA	..T	..A	..A	..A	..A	C..T	

	ATC	CCA	TAC	ATC	GGC	ACA	AAT	TTA	GTC	GAA	TGA	ATC	TGA	GGC	GGA	TTC	TCA	GTA	GAC	AAA	360
Cattle	..TT	..T	..G	C..G	..T	..GTGA	
Water buffalo	..TT	..T	..C	C..A	
Sheep	..TT	..T	..C	C..G	
Goat	..TT	..T	..C	C..	..AAC	
Japanese serowT	..T	..T	..C	C..AC	
Formosan serowT	..T	..T	..C	C..AC	
SerowT	..T	..T	..C	C..AC	
Goral	..T	..G	..T	..T	..GC	C..ACGG	
Chamois	..T	..G	..T	..T	..G	C..A	..CGG	
Rocky mountain goat	..TT	..T	..G	C..CG	..GGT	..TT	
Saiga	..T	..T	..T	..T	..G	C..C	..AG	..T	..T	..T	..T	..T	..TT	
Sika deer	..T	..T	..T	..T	..C	C..GG	..C	..CT	..T	..T	..TT	
Lesser mouse deerT	..T	..T	..G	C..GT	..T	..T	..T	..T	..T	..T	
Pig	..T	..T	..T	..T	..A	..G	C..C	..AG	..C	..T	..C	..C	

Fig.3. Continued

	GCA	ACC	CTT	ACC	CGA	TTC	TTC	GCT	TTC	CAT	TTT	ATC	CTT	CCA	TTT	ATC	ATC	ATA	GCA	ATT	420
CattleCA	..T	..C	..CCC	..T	...	GC	...	C	...
Water buffalo	..TCTC	..T	..CT	..CC	GC	..C	C	..C
Sheep	..C	..T	..CCCCCC	..C	C	..C
Goat	..CCCCT	..CCC	..C	C	..C
Japanese serow	..CCTCCC	..T	..CCC	..C	C	..C
Formosan serow	..CCTCCC	..T	..CCC	..T	C	..C
Serow	..CCTCCC	..T	..CCC	..T	C	..C
Goral	..C	..T	..CCCC	..T	..CCC	..T	C	..C
Chamois	..CCTCCC	..T	..CC	...	GC	..C	T	..A
Rocky mountain goat	..TCTCCC	..T	..CC	...	GC	..C	C	..C
Saiga	..CCTCCC	..T	..CC	...	GC	..C	C	..C
Sika deerATCCT	..CC	GC	..C	C	..C
Lesser mouse deerATCCT	..CCC	..C	C	..A
PigC	..ACCGCT	..CC	..C	C	..C

	GCC	ATA	GTC	CAC	CTA	CTA	TTC	CTC	CAC	GAA	ACA	GCC	TCC	AAC	AAC	CCA	ACA	GGA	ATT	TCC	480
Cattle	..AT	..TACC	..A	...
Water buffaloTCACC	..A	...
SheepG	..CA	..GCC	..A	...
GoatG	..CA	..GCC	..A	...
Japanese serowG	..ATAT	..CC	..A	...
Formosan serowG	..ATAT	..CC	..A	...
SerowG	..ATAT	..CC	..A	...
Goral	..TTT	..GACT	..C	..A	..C	..A	...
Chamois	..CCA	..TCCC	..A	...
Rocky mountain goat	..TT	..T	..TA	..T	..TCC	..A	...
Saiga	..TT	..T	..TA	..T	..TCC	..A	...
Sika deer	..TA	..T	..C	..TGACC	..A	...
Lesser mouse deer	..T	..CT	..T	..TA	..T	..TCC	..C	...
Pig	..A	GCC	..A	..T	..CGC	..AT	..CC	..A	...

	TCA	GAC	GTA	GAC	AAA	ATC	CCA	TTC	CAC	CCC	TAC	TAT	ACC	ATT	AAG	GAC	ATC	TTA	GGG	GCC	540
Cattle	ACT	..CACCC
Water buffalo	..G	...	AC	..TT	..CT	..T	..CACC	..T	..T	...
Sheep	AC	..TT	..CT	..T	..CACC	..T	..T	...
Goat	AC	..TT	..CT	..T	..CACC	..T	..T	...
Japanese serow	ACT	..CC	..A	..C	..A	..T	..C	..A	..T	..C	..C	AT	...
Formosan serow	CGT	..CC	..A	..C	..A	..T	..C	..A	..T	..C	..T	..T	...
Serow	ACT	..CC	..A	..C	..A	..T	..C	..A	..T	..C	..C	..C	...
Goral	AT	..CC	..A	..C	..A	..T	..C	..A	..T	..C	..C	..T	...
ChamoisT	CGT	..CC	..A	..C	..A	..T	..C	..A	..T	..C	..G	..C	...
Rocky mountain goatCT	..T	..CC	..A	..C	..A	..T	..C	..A	..T	..C	..C	..C	...
SaigaT	TCT	..CC	..A	..C	..A	..T	..C	..A	..T	..C	..C	..C	...
Sika deer	..GCC	..T	..T	..C	..A	..T	..C	..A	..T	..C	..A	..T	..C	..C	AT	...
Lesser mouse deerCC	..T	..T	..C	..A	..T	..C	..A	..T	..C	..A	..T	..C	..C	..TT	...
Pig	AT	..T	..C	..A	..C	..T	..C	..A	..T	..C	..A	..T	..C	..C	..A

Fig.3. Continued

Cattle	CTC	TTA	CTA	ATT	CTA	GCT	CTA	ATA	CTA	CTA	GTA	CTA	TTC	GCA	CCC	GAC	CTC	CTC	GGA	GAC	600
Water buffalo	..A	C..	T..	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..T	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..G	..C	..C
Sheep	A..	C..	..C	..C	ATC	..C	..G	..C	..C	..C	..C	..C	..C	A..G	..T	..C	T..A	..C	..C	..C	..C
Goat	A..G	C..	..C	..T	..T	..C	..I	..C	..C	..C	..C	..C	..C	A..	..C	..C	..A	..C	..C	..C	..C
Japanese serow	G..G	C..	..C	..C	A..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..G	..C	A..	..C	..C	..A	..C	..C	..C	..C
Formosan serow	A..A	C..	T..	..C	A..C	..C	..T	..G	..C	..C	..G	..C	..G	AT..	..C	..C	..A	..C	..C	..C	..C
Serow	A..A	C..	T..	..C	A..C	..C	..G	..G	..C	..C	..G	..C	..G	A..	..C	..C	..A	..C	..C	..C	..C
Goral	A..A	C..	..C	..C	A..C	..T	..C	..G	..C	..C	..G	..C	T..	A..	..C	..C	T..A	..T	..C	..C	..C
Chamois	A..A	C..	..C	..C	A..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	A..	..T	..C	..A	..C	..C	..C	..C
Rocky mountain goat	A..A	C..	..C	..C	A..C	..T	..C	..C	..C	..C	..C	..C	T..	T..	..C	..C	T..A	..C	..C	..C	..C
Saiga	..A	C..	..T	..C	ATC	..C	..C	..T	..C	..C	..C	..T	T..	..A	..C	..C	..G	..T	..C	..C	..C
Sika deer	T..A	C..T	..C	G..A	..C	TTC	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..A	..C	..C	..G	..T	..C	..C	..C
Lesser mouse deer	..A	GCC	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	T..	..C	..C	..A	..T	..C	..C	..C
Pig	T..A	..T	A..	..A	..C	ATC	..C	A..C	..T	..C	..C	..C	..C	T..	..A	..C	..A	..A	..A	..A	..A

Cattle	CCA	GAT	AAC	TAC	ACC	CCA	GCC	AAT	CCA	CTC	AAC	ACA	CCC	CCT	CAC						645
Water buffalo	..C	..C	..C	..C	..C	..A	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..T	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C
Sheep	..C	..C	..C	..C	..C	..A	..C	..C	..C	..T	..C	..I	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C
Goat	..C	..C	..C	..T	..T	..A	..C	..C	..C	..C	..C	..I	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C
Japanese serow	..C	..C	..C	..T	..C	..A	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C
Formosan serow	..C	..C	..C	..C	..C	..A	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C
Serow	..C	..C	..C	..T	..C	..A	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C
Goral	..C	..C	..C	..T	..T	..A	..C	..C	..C	..C	..G	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C
Chamois	..C	..C	..C	..T	..C	..A	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C
Rocky mountain goat	..C	..C	..C	..T	..C	..A	..C	..G	..A	..T	..C	..C	..T	..C	..T	..C	..T	..C	..T	..C	..T
Saiga	..C	..C	..C	..A	..C	..A	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..T	..A	..T	..C	..T	..C	..C	..T
Sika deer	..C	..C	..C	..T	..C	..A	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C
Lesser mouse deer	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..C	..A	..C	..T	..C	..T	..C	..C	..T
Pig	..C	..C	..C	..C	..C	..A	..C	..C	..A	..C	..C	..C	..A	..C	..C	..T	..C	..T	..C	..C	..T

Fig.3. Continued

Cattle	MHYTSDTTTAFSSVTHICRDVNYGWIIRYMHANGASMFFICLYMHVGRGLYGYSTFLET	60
Water buffaloA.....M.....	
SheepP.....F.....	
GoatM.....F.....I.....	
Japanese serowF.....	
Formosan serowF.....H.....	
SerowC.....F.....	
GoralS.....F.....S.....	
ChamoisA.....F.....	
Rocky mountain goatF.....	
SaigaA.....A.....H.....F.....	
Sika deerM.....F.....	
Lesser mouse deerS.....	
PigV.....L.....FI.....M.....	

Cattle	WNIGVILLTYMATAFMGYVLPWQMSFWGATVITNLLSAIPYIGTNLVEWIWGGFSVDK	120
Water buffaloFA.....S.....	
SheepFAT.....	
GoatAT.....	
Japanese serowT.....	
Formosan serowA.....G.....	
SerowA.....	
GoralT.....S.....	
ChamoisT.....D.....	
Rocky mountain goatT.....D.....	
SaigaFAT.....D.....	
Sika deerF.....V.....	
Lesser mouse deerD.....	
PigV.....F.....D.....	

Fig. 4. Amino acid sequences deduced from the nucleotide sequences of cytochrome b genes.
Dots indicate amino acids that are identical to the bovine cytochrome b protein.

Cattle	ATLTRFFAFHFILPFIIMAIAMVHLLFLHETGSNNPTGISSDYDKIPFHPYYTIKDILGA	180
Water buffaloA.L.....T.....	
SheepF.....A.L.....P.T.....	
GoatT.L.....P.T.....	
Japanese serowT.L.....T.....I	
Formosan serowT.L.....P.A.....Q.....	
SerowL.....P.T.....	
GoralT.L.....P.M.....	
ChamoisA.L.L.....P.A.....	
Rocky mountain goatA.L.....L.A.....	
SaigaA.L.....Y.....P.S.....	
Sika deerA.L.....P.A.....I	
Lesser mouse deerT.L.V.L.....P.A.....V	
PigT.L.A.....M.....M.....	

Cattle	LLLILALMLLVLFAPDLLGDPDNYTPANPLNTPPH	215
Water buffalo	
Sheep	I.....I.....T.....	
Goat	M.....V.....T.....	
Japanese serow	V.....T.....T.....	
Formosan serow	M.....T.I.....M.....	
Serow	M.....T.....T.....	
Goral	M.....T.....T.....S.....	
Chamois	M.....T.....T.....	
Rocky mountain goat	M.....T.....S.....	
SaigaI.....S.....	
Sika deerV.F.....	
Lesser mouse deerA.F.....S.....	
PigFMM.I.LI.....S.....	

Fig.4. Continued

新規に決定した部分塩基配列は以下の accession number で DNA データベース (D D B J) に登録した。

タイワンカモシカ : D 3 2 1 9 4 (Fig. S 8)

シーロー : D 3 2 1 9 5 (Fig. S 9)

ゴーラル : D 3 2 1 9 6 (Fig. S 1 0)

シャモア : D 3 2 1 9 7 (Fig. S 1 1)

シロイワヤギ : D 3 2 1 9 8 (Fig. S 1 2)

サイガ : D 3 2 1 9 9 (Fig. S 1 3)

第 2 節 部分塩基配列の特徴

Fig. 3 の塩基配列より求めた塩基置換数を Table 1 から Table 4 に示す。コドン全部位の比較では古い時代に分岐し亜目の異なるブタと他のウシ亜目の種との違いが大きく、ヤギ亜科カモシカ属の 3 種、ニホンカモシカ、シーロー、タイワンカモシカの間の塩基置換数が最も少なかった。これは分岐した時期の違いを反映していると考えられ、シトクロム b 遺伝子で分子時計が成立していると考えられた。

コドンの部位別に塩基置換数を見ると、第 3 部位での置換が圧倒的に多く、平均すると全置換数の 79.1% がコドン第 3 部位に生じていた (Table 2, 3, 4, 5)。コドンは第 3 部位の塩基が変化してもアミノ酸の種類が変わらない同義置換が多く、他の遺伝子でも第 3 部位の変異割合は高い。しかし、今回の例でも分かるとおり、シトクロム b 遺伝子における第 3 部位の変異割合は核遺伝子と比べて非常に高く、何らかの原因によって片寄りが生じていることが考えられた。また、ミトコンドリア遺伝子では塩基置換速度が速いため同じ部位に何度も変異の起こる多重置換や、その結果としての塩基置換の飽和現象が指摘されている^{10, 27, 49)}。

アミノ酸配列の比較で見ると、置換数は塩基配列と比べて少なく、シトクロム b 遺伝子では非同義置換が少なく、同義置換の多いことを示していた (Table 6)。

Table 1. Numbers of nucleotide substitutions among the cytochrome b genes in Artiodactyla.
(All position; 645bp)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Pig	(1)	111	133	133	122	111	127	126	118	131	128	119	121	123
Lesser mouse deer	(2)		122	95	108	97	115	120	110	102	120	107	108	113
Sika deer	(3)			97	96	94	84	91	95	100	94	88	93	93
Cattle	(4)				75	100	101	94	94	90	100	91	91	99
Water buffalo	(5)					90	92	98	88	96	97	87	92	101
Saiga	(6)						88	93	82	88	96	86	91	96
Sheep	(7)							69	71	79	90	67	75	79
Goat	(8)								83	88	86	72	83	78
Rocky mountain goat	(9)									82	79	70	77	82
Chamois	(10)										78	69	72	73
Goral	(11)											62	61	68
Japanese serow	(12)												40	47
Serow	(13)													30
Formosan serow	(14)													

Table 2. Numbers of nucleotide substitutions among artiodactyl cytochrome b genes.
(First position; 215bp)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Pig	(1)	18	21	20	19	19	20	21	20	19	19	17	15	18
Lesser mouse deer	(2)		19	12	18	16	20	18	18	11	18	15	14	15
Sika deer	(3)			17	18	18	17	16	16	17	15	16	15	16
Cattle	(4)				14	20	20	16	19	15	18	13	14	15
Water buffalo	(5)					16	15	17	20	19	19	16	13	16
Saiga	(6)						11	14	15	11	16	15	14	16
Sheep	(7)							10	12	12	10	12	10	13
Goat	(8)								16	14	10	12	10	13
Rocky mountain goat	(9)									12	10	12	12	13
Chamois	(10)										12	10	10	11
Goral	(11)											8	6	9
Japanese serow	(12)												6	9
Serow	(13)													3
Formosan serow	(14)													

Table 3. Numbers of nucleotide substitutions among artiodactyl cytochrome b genes.
(Second position; 215bp)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Pig	(1)	8	5	5	6	5	4	6	6	5	7	6	7	7
Lesser mouse deer	(2)		5	5	4	7	6	8	6	5	9	4	7	7
Sika deer	(3)			6	5	4	3	3	5	4	8	3	6	6
Cattle	(4)				3	6	5	7	5	4	6	5	4	6
Water buffalo	(5)					5	4	6	4	3	5	4	5	5
Saiga	(6)						1	3	3	2	6	3	4	4
Sheep	(7)							2	2	1	5	2	3	3
Goat	(8)								4	3	7	4	5	5
Rocky mountain goat	(9)									1	5	2	3	3
Chamois	(10)										4	1	2	2
Goral	(11)											5	6	6
Japanese serow	(12)												3	3
Serow	(13)													4
Formosan serow	(14)													

Table 4. Numbers of nucleotide substitutions among artiodactyl cytochrome b genes.
(Third position; 215bp)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Pig	(1)	85	107	108	97	87	103	99	92	107	102	96	99	98
Lesser mouse deer	(2)		98	78	86	74	89	94	86	86	93	88	87	91
Sika deer	(3)			74	73	72	64	72	74	79	71	69	72	71
Cattle	(4)				58	74	76	71	70	71	76	73	73	78
Water buffalo	(5)					69	73	75	64	74	73	67	74	80
Saiga	(6)						76	76	64	75	74	68	73	76
Sheep	(7)							57	57	66	75	53	62	63
Goat	(8)								63	71	69	56	68	60
Rocky mountain goat	(9)									69	64	56	62	66
Chamois	(10)										62	58	60	60
Goral	(11)											49	49	53
Japanese serow	(12)												31	35
Serow	(13)													23
Formosan serow	(14)													

Table 5. Third/all positions ratios of substitution sites for the cytochrome b genes in Artiodactyla. (%)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Pig	(1)	76.6	80.5	81.2	79.5	78.4	81.1	78.6	78.0	81.7	79.7	80.7	81.8	79.7
Lesser mouse deer	(2)		80.3	82.1	79.6	76.3	77.4	78.3	78.2	84.3	77.5	82.2	80.6	80.5
Sika deer	(3)			76.3	76.0	76.6	76.2	79.1	77.9	79.0	75.5	78.4	77.4	76.3
Cattle	(4)				77.3	74.0	75.2	75.5	74.5	78.9	76.0	80.2	80.2	78.8
Water buffalo	(5)					76.7	79.3	76.5	72.7	77.1	75.3	77.0	80.4	79.2
Saiga	(6)						86.4	81.7	78.0	85.2	77.1	79.1	80.2	79.2
Sheep	(7)							82.6	80.3	83.5	83.3	79.1	82.7	79.7
Goat	(8)								75.9	80.7	80.2	77.8	77.3	76.9
Rocky mountain goat	(9)									84.1	81.0	80.0	80.5	80.5
Chamois	(10)										79.5	84.1	83.3	82.2
Goral	(11)											79.0	80.3	77.9
Japanese serow	(12)												77.5	74.5
Serow	(13)													76.7
Formosan serow	(14)													

Table 6. Numbers of amino acid substitutions among artiodactyl cytochrome b proteins.
(215aa)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Pig	(1)	20	21	20	21	21	22	23	19	21	22	20	22	23
Lesser mouse deer	(2)		13	12	15	16	18	15	12	11	16	14	15	16
Sika deer	(3)			11	12	13	12	12	11	11	15	11	12	14
Cattle	(4)				8	15	13	12	10	12	13	9	9	13
Water buffalo	(5)					13	11	13	12	14	15	12	13	17
Saiga	(6)						9	12	10	10	15	14	14	17
Sheep	(7)							8	10	10	12	9	9	14
Goat	(8)									9	8	9	7	11
Rocky mountain goat	(9)										4	8	7	9
Chamois	(10)											8	8	10
Goral	(11)												8	11
Japanese serow	(12)													6
Serow	(13)													
Formosan serow	(14)													

第3節 全塩基配列の決定

1. 材料および方法

1) 試験材料

Tragulus javanicus (ジャワマメジカ, マメジカ科), *Cervus nippon* (ニホンジカ, シカ科), *Bos taurus* (ウシ, ウシ科ウシ属), *Bubalus bubalis* (スイギュウ, ウシ科スイギュウ属), *Capricornis crispus* (ニホンカモシカ, ウシ科カモシカ属) の5種について, シトクロム b 遺伝子の全塩基配列の決定を行った。

2) 試験方法

PCRの反応条件, シーケンス反応, 塩基配列の決定方法は第1節の部分塩基配列の決定方法と同様である。プライマーはフォワードプライマーとしてMI03(5'-GACTAATGATATGAAAAACCATCGTTG-3'), MI01(5'-CAAATCCTCACAGGCCTATTCCTAGC-3'), MI05(5'-TCCACGAAACAGGATCCAACAACCC-3'), リバースプライマーとしてMI02(5'-TAGGCGAATAGGAAATATCATTTCGGGTTTGAT-3'), MI04(5'-TTGTTCTTCATCTCTGGTTTACAAGAC-3')を用いた (Fig. 2)。MI03はtRNA-Gluの領域に設計し, MI04はtRNA-Thrの領域に設計した。またMI05はMI01とMI02の間の領域に設計した。PCRはMI03/MI04, MI03/MI02, MI01/MI02, MI05/MI04の組み合わせで行った。

2. 結果と考察

シトクロム b 遺伝子の各部分配列を決定し、それらを連結することによって全塩基配列を決定した。決定したシトクロム b 遺伝子の長さはウシ, スイギュウ, ニホンカモシカ, ニホンジカ, ジャワマメジカとも 1140bpであった。

ウシについては全塩基配列^{2,3)}がすでに発表されており、本試験で決定した配列はこの配列と一致していた (Fig. S 1)。

新規に決定した塩基配列は以下の accession number で DNA データベース (D D B J) に登録した。

スイギュウ : D 3 2 1 9 3 (Fig. S 2)

ニホンカモシカ : D 3 2 1 9 1 (Fig. S 3)

ニホンジカ : D 3 2 1 9 2 (Fig. S 4)

ジャワマメジカ : D 3 2 4 8 9 (Fig. S 5)

第 4 節 第 1 章の要約

第 1 章において 14 種の偶蹄目動物，ブタ（イノシシ科），ジャワマメジカ（マメジカ科），ニホンジカ（シカ科），ウシ（ウシ科ウシ属），スイギュウ（ウシ科スイギュウ属），ヤギ（ウシ科ヤギ属），ヒツジ（ウシ科ヒツジ属），サイガ（ウシ科サイガ属），シャモア（ウシ科シャモア属），シロイワヤギ（ウシ科シロイワヤギ属），ゴールル（ウシ科ゴールル属），シーロー（ウシ科カモシカ属），タイワンカモシカ（ウシ科カモシカ属），ニホンカモシカ（ウシ科カモシカ属）を試験対象とした。

これらの組織より取り出した DNA をテンプレートとして PCR をおこない，ダイレクトシーケンシングの手法で PCR 産物の塩基配列を決定した。

ジャワマメジカ，ニホンジカ，ウシ，スイギュウ，ニホンカモシカの 5 種は全塩基配列 1140bp を決定し，その他の 9 種については部分塩基配列 646bp を決定した。

第2章 κ -カゼイン遺伝子の塩基配列

緒言

乳蛋白質のカゼインは α 、 β 、 κ -カゼインの3種が存在している。乳中では疎水性の α 、 β -カゼインを両親媒性の κ -カゼインが結合することによって水可溶性となり、リン酸カルシウムとともにカゼインミセルを構成している。

κ -カゼインの分子構造は大きく2つの部分に分けられる。キモシンによって分離されるC端側の水可溶性ペプチドをカゼインマクロペプチド、N端側をパラカゼインと称している。カゼインマクロペプチドは親水性であることが要求されるものの、その他の分子構造的な制約は少なく、比較的変異の多い領域であると考えられる⁴⁶⁾。ウシの κ -カゼインではA、B、C、Eの4種の遺伝的多型が知られており、その部位は全てカゼインマクロペプチドの領域に存在している^{45, 47, 60)}。また、 κ -カゼイン分子全体の構造も、動物の子供の栄養となる役割が最も大きく、酵素などの蛋白質と比べ分子構造の自由度は大きい。そのため、 κ -カゼインは比較的アミノ酸置換速度の速い蛋白質の部類にはいり、最も速いフィブリノペプチドの約1/3の速さでアミノ酸置換を起こしている⁴⁹⁾。

DNAの塩基配列または蛋白質のアミノ酸配列をもとに分子進化的解析を行う場合には、遺伝子の重複を考慮する必要がある。生物の遺伝子は初期の祖先遺伝子から様々な重複と組換えを経て成立したものであると考えられている⁶⁴⁾。重複をおこした遺伝子は機能的制約から解除され、変異速度は急激に上昇する。また、配列の同じ重複部分同士で組換えを起こす。そのため、系統関係を検討す

る動物グループ中で目的遺伝子の重複，組換えが起きると，まちがった解析結果を与える可能性がある。

カゼイン遺伝子は乳蛋白質の遺伝子であり，哺乳類の成立以後に機能するようになった遺伝子であることは明かである。アミノ酸配列の比較から κ -カゼイン遺伝子は他のカゼイン遺伝子とは起源が異なり，フィブリノーゲン遺伝子ファミリーに属するといわれている⁴⁸⁾。ウシの κ -カゼインはシングルジーンであることも明らかにされており³⁾，他の遺伝子と組換えを起こしている可能性は少ない。

このように，アミノ酸置換速度が速いこと，遺伝子がシングルジーンであること，は分子進化学的解析の対象として適した性質である。本研究では系統解析に用いる核遺伝子として κ -カゼイン遺伝子を選び，決定した塩基配列をデータとして用いた。

第1節 エキソンII, III, IVの塩基配列の決定

1. 材料および方法

1) 試験材料

塩基配列の決定は第1章のシトクロムb遺伝子の決定に用いた動物と同じ個体より採取した試料から行った。

動物は *Sus scrofa* (ブタ, イノシシ科), *Tragulus javanicus* (ジャワマメジカ, マメジカ科), *Cervus nippon* (ニホンジカ, シカ科), *Bos taurus* (ウシ, ウシ科ウシ属), *Bubalus bubalis* (スイギュウ, ウシ科スイギュウ属), *Capra hircus* (ヤギ, ウシ科ヤギ属), *Ovis aries* (ヒツジ, ウシ科ヒツジ属), *Saiga tatarica* (サイガ, ウシ科サイガ属), *Rupicapra rupicapra* (シャモア, ウシ科シャモア属), *Oreamnos americanus* (シロイワヤギ, ウシ科シロイワヤギ属), *Nemorhaedus goral* (ゴール, ウシ科ゴール属), *Capricornis sumatrensis* (シーロー, ウシ科カモシカ属), *Capricornis swinhoei* (タイワンカモシカ, ウシ科カモシカ属), *Capricornis crispus* (ニホンカモシカ, ウシ科カモシカ属) の14種である (Table 1)。

ウシ, ヒツジ, ヤギ, ブタ, ニホンカモシカ, ニホンジカ, ジャワマメジカの試料は筋肉を採取し, DNAの抽出を行った。スイギュウは血液試料からDNAを抽出した。シャモア, シロイワヤギ, ゴール, シーロー, タイワンカモシカの5種は日本カモシカセンターで飼育している個体から採取した毛根を試料とした。

2) 試験方法

a. DNA試料の調製

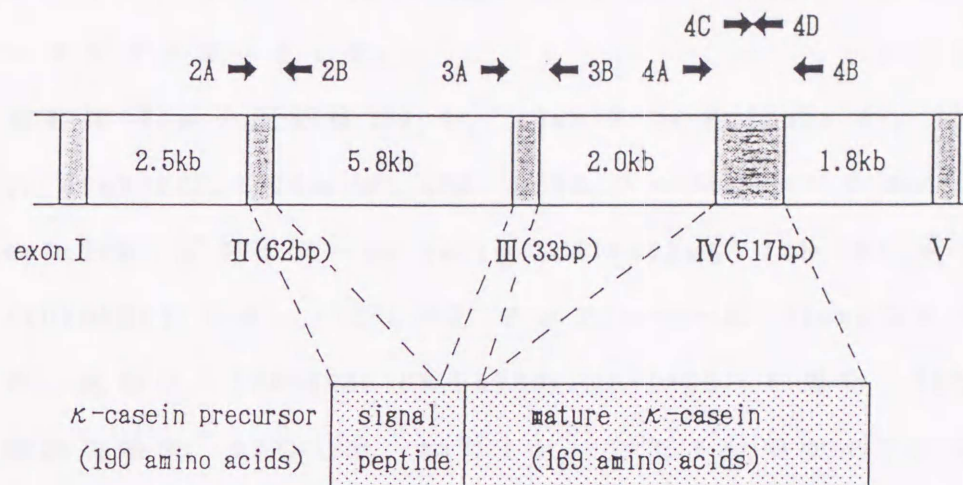
試料は第1章第1節「部分塩基配列の決定」で作成したDNAを用いた。毛根試料は第1章と同じ個体から同時期に採取した毛根を用いた。

b. プライマーの設計

κ -カゼインcDNAの塩基配列についてはラット⁴⁸⁾、マウス⁶⁵⁾、モルモット²⁶⁾、ウシ⁶¹⁾、ヒツジ²²⁾、ヤギ¹²⁾、ブタ⁴²⁾ですでに決定されている。しかし、cDNAから塩基配列を決定するには対象動物のmRNAを得る必要があり、本試験の対象動物全てのmRNAを得ることは新鮮組織を要求するmRNA抽出の手法から困難である。

一方、ゲノム遺伝子の塩基配列についてはウシ³⁾の配列だけが決定されているにすぎない。その配列によれば遺伝子は5つのエクソンからなり、全長は10kbを超える。この全ての領域をPCRで増幅することはできないため、各エクソンの外側の領域にプライマーを設計し、エクソン部分だけを増幅することとした (Fig. 5)。5つのエクソンのうち蛋白質をコードしているエクソンはII, III, IVであるので、この3つのエクソンの塩基配列を解析対象とした。

当該遺伝子の塩基配列はウシについてしかわかっていないため、プライマーは全てウシ κ -カゼイン遺伝子の配列を用いた。



2A : 5'-CTAATTGTTTAATTTAATTTAGGTGCA-3' (2578-2604)
 2B : 5'-CAAACTGATTAGATGAAATTAATC-3' (2664-2689)
 3A : 5'-TCTTGTCTGATTCTTTCTCTGAATCTC-3' (8451-8479)
 3B : 5'-GGATTCATATCTCTACTGAAACAACTTA-3' (8519-8548)
 4A : 5'-TAATACCATTCTGCATAATTTATTTTTTACAG-3' (10496-10528)
 4B : 5'-CTGCGTTGTCTTTCTTTGATGTCTC-3' (11022-11045)
 4C : 5'-CCCACATTTATCATTTATGGCCATTCC-3' (10801-10827)
 4D : 5'-GATTTCTGTTTTATCCTGATTTTTCTTTGG-3' (10829-10858)

Fig.5. Structure of the bovine κ -casein gene and the primers for amplification of the artiodactyl κ -casein genes. Numbers in parentheses are the positions according to the bovine κ -casein gene³⁾.

c. エキソン II の塩基配列決定

P C R のプライマーは 2A(5'-CTAATTGTTTAATTTAATTTAGGTGCA-3')をフォワードプライマー, 2B(5'-CAAAACTGATTAGATGAAATTAAGTC-3')をリバースプライマーとした。

P C R は 50 μ l の反応液で行い, 10mM Tris-HCl(pH8.9), 1.5mM MgCl₂, 80mM KCl, 500 μ g/ml BSA, 0.1% コール酸ナトリウム, 0.1% TritonX-100, プライマー 20 pmole, dNTP200 μ M, Tth DNA ポリメラーゼ(TOYOBO)1 ユニットとした。テンプレートは 250ng の DNA を用いた。反応は, ZYMOREACTOR (ATTO, AB-1800) を使い, 93 $^{\circ}$ C で 2 分の初期加熱後, 93 $^{\circ}$ C 1 分, 55 $^{\circ}$ C 1 分, 72 $^{\circ}$ C 1 分のサイクルを 35 回繰り返した。

毛根試料の P C R は Higuchi ら³⁶⁾の方法に準じ, 第 1 章のシトクロム b 遺伝子の決定時に行った処理と同様にして DNA を露出させ, その後の P C R は DNA テンプレートと同様に行った。ただし, 毛根試料は P C R 産物の量が少ないため, 4% NuSieveGTG(FMC)アガロースゲル電気泳動で分離, 精製を行った P C R 産物の一部をテンプレートとし, 同じ条件で再度 P C R を行った。

塩基配列は P C R 産物のダイレクトシーケンシングで決定した。P C R 反応液約 40 μ l を Ultrafree C3-GC (MILLIPORE, 分画分子量 10000) で約 10 μ l に濃縮後, 4% NuSieveGTG(FMC)アガロースゲル電気泳動で分離した。目的の断片をゲルから切り出した後, 凍結し, 融解後 Ultrafree C3-VV (MILLIPORE, 0.1 μ m) で遠心することによってアガロースゲルから DNA フラグメントを含む水層を分離した。この水層を Ultrafree C3-GC に移し, 10mM Tris-HCl(pH7.5), 0.1mM EDTA 溶液 300 μ l と滅菌水 300 μ l で遠心・洗浄した。さらにこの液を 14 μ l

に濃縮し、シーケンス反応のテンプレートとする精製DNAを得た。シーケンス反応はABI社の Dye Terminator Cycle Sequencing Kitで行った。1つの試料から得られた精製DNA溶液を2分し、それぞれ2A, 2Bをプライマーとするサイクルシーケンス反応を行った。反応液組成はABI社のプロトコールにしたがった。反応はZYMOREACTOR (ATTO, AB-1800) を用い、96°C 0.5分、50°C 0.5分、60°C 4分のサイクルで25回行った。

反応終了後Bio-Spin 30カラムで2500rpm, 2分の遠心をかけ、反応液から未反応物質を除いた。この液に酢酸ナトリウム溶液とエタノールを加え、-20°Cで30分放置後、遠心分離によって反応産物を得た。これを自動DNAシーケンサ(ABI373A)にかけ、塩基配列を決定した。

d. エキソンIIIの塩基配列決定

PCRのプライマーは3A(5'-TCTTGTTTCTGATTCTTTCTCTGAATCTC-3')をフォワードプライマー、3B(5'-GGATTCATATCTCTACTGGAAACAAACTTA-3')をリバースプライマーとした。

PCRおよびそれ以後の処理はプライマーの配列を除きエキソンIIと同様の方法で行った。

e. エキソンIVの塩基配列決定

エキソンIVの配列決定は2段階のPCRで行った。これはエキソンIVがウシの配列で517bpと長い領域をコードしており、両端からのシーケンシングでは中心部分の塩基配列が不正確となるためである。

P C R のプライマーは 4A(5'-TAATACCATTCTGCATAATTTATTTTTTTTACAG-3'), 4C(5'-CCCACATTTATCATTATGGCCATTCC-3')をフォワードプライマー, 4B(5'-CTGCGTTGTCTTCTTTGATGTCTC-3'), 4D(5'-GATTTCTGTTTATCCTGATTTTTCTTTGG-3')をリバースプライマーとした。

第1段階のP C Rは4A, 4Bをプライマーとし, 50 μ lの反応液で行った。反応液の濃度は10mM Tris-HCl(pH8.9), 1.5mM MgCl₂, 80mM KCl, 500 μ g/ml BSA, 0.1% コール酸ナトリウム, 0.1% TritonX-100, プライマー20 pmole, dNTP200 μ M, Tth DNA ポリメラーゼ(TOYOBO)1ユニットとした。テンプレートは250ngのDNAを用いた。反応は, ZYMOREACTOR(ATTO, AB-1800)を用い, 93 $^{\circ}$ Cで2分の初期加熱後, 93 $^{\circ}$ C 1分, 60 $^{\circ}$ C 1分, 72 $^{\circ}$ C 1分のサイクルを35回繰り返した。

第2段階のP C Rは第1段階のP C R産物を4% NuSieveGTG(FMC)アガロースゲル電気泳動で分離, 精製し, そのP C R産物の一部をテンプレートとしておこなった。プライマーは4A/4D, 4C/4Bの2組の組み合わせでP C Rを行った。反応条件はプライマーの配列を除き第1段階のP C Rと同様である。

毛根試料のP C RはHiguchiら³⁶⁾の方法に準じ, エキソンII, IIIと同様に行った。

塩基配列の決定もエキソンII, IIIと同様にしてダイレクトシーケンシングで行った。ただし, シーケンス反応はプライマーの違いから96 $^{\circ}$ C 0.5分, 55 $^{\circ}$ C 0.5分, 60 $^{\circ}$ C 4分のサイクルで25回とした。

2. 結果と考察

a. エキソン II の塩基配列

プライマー 2A と 2B を用いる PCR でブタとジャワマメジカを除く 12 種の試験動物から目的の領域を増幅することができた。増幅した DNA 断片の長さはプライマーを含め 12 種の動物とも 112bp であった。本試験に用いた 14 種の偶蹄目動物のなかでブタとジャワマメジカはプライマーに用いたウシから系統的に最も離れている 2 種の動物種であり、塩基配列の違いから、PCR 増幅ができなかったものと考えられた。

新規に決定したエキソン II の塩基配列は以下の accession number で DNA データベース (DDBJ) に登録した。

スイギュウ	: D 1 4 3 6 8 (Fig. S 1 6)
ヤギ	: D 1 4 3 7 1 (Fig. S 1 8)
ニホンカモシカ	: D 1 4 3 7 4 (Fig. S 1 9)
タイワンカモシカ	: D 3 2 1 7 1 (Fig. S 2 0)
シーロー	: D 3 2 1 7 4 (Fig. S 2 1)
ゴール	: D 3 2 1 7 7 (Fig. S 2 2)
シャモア	: D 3 2 1 8 0 (Fig. S 2 3)
シロイワヤギ	: D 3 2 1 8 3 (Fig. S 2 4)
サイガ	: D 3 2 1 8 6 (Fig. S 2 5)
ニホンジカ	: D 1 4 3 7 7 (Fig. S 2 6)

b. エキソンⅢの塩基配列

プライマー3Aと3Bを用いるPCRでブタを除く13種の試験動物から目的の領域を増幅することができた。増幅したDNA断片の長さはプライマーを含め13種の動物とも98bpであった。ブタのエキソンⅢが増幅できなかったことはプライマー領域塩基配列の不一致のためと考えられた。

新規に決定したエキソンⅢの塩基配列は以下のaccession numberでDNAデータベース(DDBJ)に登録した。

スイギュウ	: D 1 4 3 6 9 (Fig. S 1 6)
ヤギ	: D 1 4 3 7 2 (Fig. S 1 8)
ニホンカモシカ	: D 1 4 3 7 5 (Fig. S 1 9)
タイワンカモシカ	: D 3 2 1 7 2 (Fig. S 2 0)
シーロー	: D 3 2 1 7 5 (Fig. S 2 1)
ゴーラル	: D 3 2 1 7 8 (Fig. S 2 2)
ジャモア	: D 3 2 1 8 1 (Fig. S 2 3)
シロイワヤギ	: D 3 2 1 8 4 (Fig. S 2 4)
サイガ	: D 3 2 1 8 7 (Fig. S 2 5)
ニホンジカ	: D 1 4 3 7 8 (Fig. S 2 6)
ジャワマメジカ	: D 1 4 3 8 0 (Fig. S 2 7)

c. エキソン IV の塩基配列

プライマー 4A と 4B を用いる PCR で 14 種の試験動物全てから目的の領域を増幅することができた。また、4A/4D および 4C/4B のプライマーセットによる第 2 段階の PCR においても正常に増幅された。エキソン IV では PCR 増幅された DNA 断片の長さが動物の種類によって異なっていた。これはヒツジ、ヤギ、シャモア族で 6 塩基の挿入があること、サイガとブタでは別の個所に 36 および 18 塩基の挿入があることによっている。ブタではさらに 3 塩基の挿入、24 塩基の欠失、3 塩基の挿入が見られた (Fig. 6)。

ウシ⁶¹⁾、ヒツジ²²⁾、ヤギ¹²⁾、ブタ⁴²⁾ではすでに cDNA の塩基配列が決定されている。本研究で決定したエキソン IV の塩基配列と比較すると、ブタで 2 ヶ所の塩基置換が認められたが、ウシ、ヒツジ、ヤギの cDNA とエキソン IV の塩基配列は完全に一致していた。本試験ではウシの塩基配列から作成したプライマーを用いて PCR を行っている。他の動物ではプライマー領域の塩基配列が決定されていない。しかし、偶蹄目で最も遺伝的な距離が離れているブタでも正常にエキソン IV を増幅することができた。したがって、ブタよりはウシに対する遺伝的な距離の近い他の動物のエキソン IV も正常に増幅し、塩基配列が決定できたものと考えられた。

新規に決定したエキソンIVの塩基配列は以下の accession number
でDNAデータベース (DDBJ) に登録した。

スイギュウ	: D 1 4 3 7 0 (Fig. S 1 6)
ヤギ	: D 1 4 3 7 3 (Fig. S 1 8)
ニホンカモシカ	: D 1 4 3 7 6 (Fig. S 1 9)
タイワンカモシカ	: D 3 2 1 7 3 (Fig. S 2 0)
シーロー	: D 3 2 1 7 6 (Fig. S 2 1)
ゴールル	: D 3 2 1 7 9 (Fig. S 2 2)
シャモア	: D 3 2 1 8 2 (Fig. S 2 3)
シロイワヤギ	: D 3 2 1 8 5 (Fig. S 2 4)
サイガ	: D 3 2 1 8 8 (Fig. S 2 5)
ニホンジカ	: D 1 4 3 7 9 (Fig. S 2 6)
ジャワマメジカ	: D 1 4 3 8 1 (Fig. S 2 7)

	←	exon II																→ ←			
Cattle	ATG	ATG	AAG	AGT	TTT	TTC	CTA	GTT	GTG	ACT	ATC	CTG	GCA	TTA	ACC	CTG	CCA	TTT	TTG	GGT	60
Water buffalo	
Sheep	
Goat	
Japanese serow	<u>G</u>	
Formosan serow	<u>G</u>	
Serow	<u>G</u>	
Goral	<u>G</u>	
Chamois	
Rocky mountain goat	
Saiga	<u>A</u>	
Sika deer	<u>T</u>	
Lesser mouse deer	<u>T</u>	
Pig	

	exon III							→ ←	exon IV												
Cattle	GCC	CAG	GAG	CAA	AAC	CAA	GAA	CAA	CCA	ATA	CGC	TGT	GAG	AAA	GAT	GAA	AGA	TTC	TTC	AGT	120
Water buffalo	<u>G</u>	<u>A</u>	
Sheep	<u>G</u>	<u>G</u>	...	<u>T</u>	<u>GA</u>	
Goat	<u>G</u>	<u>R</u>	...	<u>G</u>	...	<u>T</u>	<u>GA</u>	
Japanese serow	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>GA</u>	
Formosan serow	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>GA</u>	
Serow	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>GA</u>	
Goral	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>Y</u>	
Chamois	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>GAG</u>	
Rocky mountain goat	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>GA</u>	
Saiga	<u>G</u>	...	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	
Sika deer	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	
Lesser mouse deer	...	<u>A</u>	<u>T</u>	...	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>TC</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	
Pig	<u>GT</u>	...	<u>A</u>	...	<u>G</u>	...	

Cattle	GAC	AAA	ATA	GCC	AAA	TAT	ATC	CCA	ATT	CAG	TAT	GTG	CTG	AGT	AGG	TAT	CCT	AGT	TAT	GGA	180
Water buffalo	
Sheep	
Goat	
Japanese serow	
Formosan serow	
Serow	
Goral	
Chamois	
Rocky mountain goat	
Saiga	...	<u>G</u>	<u>A</u>	
Sika deer	<u>T</u>	<u>C</u>	
Lesser mouse deer	<u>C</u>	ATT	CT	...	T	...	A	...	A	
Pig	...	A	G	...	A	...	T	T	...	C	A	...	A	...	T	

Fig.6. Nucleotide sequences for κ -casein precursor proteins from the 14 species in the Artiodactyla. Dots indicate nucleotides that are identical to the bovine A type gene. Nucleotides 1-57, 58-90, and 91-3' terminal are coded in exon 2, 3, and 4, respectively. Exon 2 of the lesser mouse deer and pig, and exon 3 of the pig have not be sequenced because these regions were not amplified by the PCR. Polymorphic sites and the different nucleotides from the published sequences are underlined. Polymorphisms; R,A/G; Y,C/T; M,A/C.

Cattle	CTC	AAT	TAC	TAC	CAA	CAG	AAA	CCA	GTT	GCA	CTA	ATT	AAT	AAT	CAA	TTT	CTG	CCA	TAC	CCA	240
Water buffalo	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Sheep	·	·	·	·	·	·	·G·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Goat	·	·	·	·T	·	·	·G·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Japanese serow	·	·	·	·	·	·	·G·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Formosan serow	·	·	·	·	·	·	·G·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Serow	·	·	·	·	·	·	·G·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Goral	·	·	·	·	·	·	·G·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Chamois	·	·	·	·	·	·	·G·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Rocky mountain goat	·	·	·	·	·	·	·G·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Saiga	·	·	·	·	·	·	·G·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Sika deer	·	·	·	·	·	·C	·G·	·	·	·	·	·	·	·	·G	·	·	·	·	·	
Lesser mouse deer	·	·	·	·	·G	·A	·GG	·	CC·	·	·	·	·	·C	·	·	·	·G	·T·	T·	
Pig	T·T	---	·T·	·	·	·T	·G·	T·	·C·	·T·	TC·	CC·	·	·GC	·	·	A·A	·T	·	·	

Cattle	TAT	TAT	GCA	AAG	CCA	GCT	GCA	GTT	AGG	TCA	CCT	GCC	CAA	ATT	CTT	CAA	TGG	CAA	GTT	TTG	300
Water buffalo	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Sheep	·	·	·G	·	·	·T	·	·	·	·	·	·	·	·C	·	·	·	·	·	·	
Goat	·	·	·	·	·	·T	·	·	·	·	·	·	·	·C	·	·	·	·	·	·	
Japanese serow	·	·	·	·	·	·T	·	·	·	·	·	·	·	·C	·	·	·	·	·	·	
Formosan serow	·	·	·	·	·	·T	·	·	·	·	·	·	·	·C	·	·	·	·	·	·	
Serow	·	·	·	·	·	·T	·	·	·	·	·	·	·	·C	·	·	·	·	·	·	
Goral	·	·	·	·	·	·T	·	·	·	·	·	·	·	·C	·	·	·	·	·	·	
Chamois	·	·	·	·	·	·T	·	·	·	·	·	·	·	·C	·	·G	·	·	·	·	
Rocky mountain goat	·	·	·	·	·	·T	·	·	·	·	·	·	·	·C	·	·G	·	·	·	·	
Saiga	·	·	·	·	·	·T	·	·	·	·	·	·	·	·C	·	·	·	·	·	·	
Sika deer	·	·	·T	·	·	·G	·	·	·	·	·	·	·	·	·C	·	·	·	·	·C	
Lesser mouse deer	·T	·	·	·	·	ATG	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·G	·	·	·C	CC·	
Pig	·	·	·	·G	·	·T	·T	·C	G·	C·	·A	·T	·	·AA	·C	·	·	·	·AC	CA·	

Cattle	TCA	AAT	ACT	GTG	CCT	GCC	AAG	TCC	TGC	CAA	GCC	CAG	CCA	ACT	ACC	ATG	GCA	CGT	CAC	CCA	360
Water buffalo	C·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	A·	·	·	·	
Sheep	C·	·	G·	·	·	·	·	·	·	·A	·	·	·	·	G·	·	·	·	·	·	
Goat	C·	·	·	·	·	·	·	·	·	·A	·	·	·	·	C·	·	·	·	·	·	
Japanese serow	C·	·	·	·	·	·	·	·	·	·A	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Formosan serow	C·	·	·	·C	·	·	·	·	·	·A	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Serow	C·	·	·	·C	·	·	·	·	·	·A	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Goral	C·	·	·	·CA	·	·	·	·	·	·A	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Chamois	C·	·	·	·CA	·	·	·	·	·	·A	·	·	·	·	·	·	·A	·	·	·	
Rocky mountain goat	C·	·	·	·C	·	·	·	·	·	·A	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Saiga	C·	·	·	·	·	·T	·	·	·	·A	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	
Sika deer	C·	·C	·C	·	·	·	·T	·	·	·	·	·	·Y	·	·	·	·	·	·	·	
Lesser mouse deer	CTG	·	G·	·	T·	·	·	C·	·	·	·	·	·C	·	·	T	·	·	·G	·	
Pig	C·	·	---	---	---	---	---	---	---	·T	·T·C	·	·	C·	·A	G·	·	·	·G	·	

Fig.6. Continued

	CTA	GAA	GAT	TCT	CCA	GAA	---	GTT	ATT	GAG	AGC	CCA	CCT	GAG	ATC	AAC	ACA	GTC	CAA	GTT	600
Cattle	·C·	·C·	T·	·M	---	·T·	GT·	·C·	·C·
Water buffalo	·C·	...	·C·	·C·	T·	...	---	TCG	...	·C·	·T·	G·	·C·	·C·
Sheep	·C·	...	·C·	·C·	T·	...	---	TCG	...	·C·	·T·	G·	T·	...	·C·	·C·
Goat	·C·	...	·C·	·C·	T·	...	---	TCG	...	·T·	·T·	G·	·C·	·C·
Japanese serow	·G·	...	·C·	·C·	T·	...	---	TC·	...	·T·	·T·	G·	·C·	·C·
Formosan serow	·C·	...	·C·	·C·	T·	...	---	TCG	...	·T·	·T·	G·	·C·	·C·
Serow	·C·	...	·C·	·C·	T·	...	---	TCG	...	·T·	·T·	G·	·C·	·C·
Goral	·C·	...	·C·	·C·	T·	...	---	TC·	...	·C·	·T·	G·	·C·	·C·
Chamois	·C·	...	·C·	·C·	T·	...	---	TCG	...	·CA·	·T·	G·	·C·	·C·
Rocky mountain goat	·C·	...	·C·	·C·	T·	...	---	TC·	...	·T·	·T·	G·	·C·	·C·
Saiga	·C·	...	·C·	·C·	T·	...	---	A·	...	·C·	·T·	GTG	·C·	·C·
Sika deer	·A·	...	·C·	·TC·	T·	...	---	·T·	G·	GC·	·A·	...	·A·
Lesser mouse deer	·C·	·C·	T·	...	---	TC·	·C·	·CC·	·T·	G·	·CT·	·C·
Pig	·C·	...	·C·	·C·	T·	...	---	TTC	·C·	·C·	·ACA·	...	G·	·C·	·C·	·T·	·C·

	ACT	TCA	ACT	GCA	GTC	TAA
Cattle	·C·	·TC·
Water buffalo	·C·	·AG·
Sheep	·C·	·AG·
Goat	·C·	·AG·
Japanese serow	·C·	·AG·
Formosan serow	·C·	·AG·
Serow	·C·	·AG·
Goral	·C·	·AG·
Chamois	·C·	·AG·
Rocky mountain goat	·C·	·AG·
Saiga	·A·
Sika deer	·C·	·TG·
Lesser mouse deer	G·	·AG·	·T·	...
Pig	C·C·	·TG·

Fig. 6. Continued

	← exon II →	exon III	← exon IV		
Cattle	MMKSFFLVVTLALTL	PFLGAQE	QNQEPIRCEKDERFF	SDKIAKYIPIQYVLSRYP	SYG 60
Water buffalo	E.....	N.....	
Sheep	R.C.....	D.....	D.....	
Goat	C.....	D.....	D.....	
Japanese serow	C.....	T.D.....	D.....	
Formosan serow	C.....	D.....	D.....	
Serow	C.....	D.....	D.....	
Goral	C.....	D.....	D.....	
Chamois	A.....	S.C.....	E.....	
Rocky mountain goat	C.....	D.....	
Saiga	D.....	R.....	C.....	N.R.....
Sika deer	A.....	V.....	I.....	TG.....
Lesser mouse deer	V.....	V.Y.....	LTG.....	N.....
Pig	S.K.L.....	NEEKV.....	Y.M.N.F.....

Cattle	LNYYQKQP-VALINN	QFLPYPYAKPAA	VRSPAQILQWQVLS	NTPAKSCQAQPTT	MARH 120
Water buffalo	P.....	T.....
Sheep	R.....	V.....	T.....	P.A.....
Goat	R.....	V.....	T.....	P.....
Japanese serow	R.....	V.....	T.....	P.....
Formosan serow	R.....	V.....	T.....	P.A.....
Serow	R.....	V.....	T.....	P.A.....
Goral	R.....	V.....	T.....	P.A.....
Chamois	R.....	V.....	T.....	P.A.....
Rocky mountain goat	R.....	V.....	T.....	P.A.....
Saiga	R.....	V.....	T.....	P.....
Sika deer	HR.....	V.....	G.....	P.....
Lesser mouse deer	R.....	P.....	FSF.....	M.....
Pig	F-F.....	HRS-AVSP.....	S.....	I.....	R.....

Fig.7. Amino acid sequences deduced from the nucleotide sequences of κ -casein genes. Dots indicate amino acids that are identical to the bovine κ -casein.

Cattle	PHPHLSFMAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGPT--STPTTEAVEST-----VA	180
Water buffaloV.V.....I.N.....	
SheepD.....A.....VH.....VNA-----D	
GoatD.....V.A.....VH.....IVN-----D	
Japanese serowD.....A.....VH.....IVN-----D	
Formosan serowD.....A.T.VH.....IVN-----D	
SerowD.....A.....VH.....IVN-----D	
GoralD.....A.....VH.....IVN-----D	
ChamoisD.....A.....VH.....IVN-----D	
Rocky mountain goatD.....A.....VH.....IVN-----D	
SaigaD.....V.A.A.....IVN.EAIVNTEAIVNT.D	
Sika deer	..R.....D..S.....TA.S---I.....IVD-----	
Lesser mouse deer	.R.....D.....DT.....VTV.....T.....SIVN-----	
Pig	.R.A.I.....A.A.S.TV.....IV.A.PIVNAEPIVNA-----V	

Cattle	TLEDSPE-VIESPPEINTVQVTSTAV
Water buffalo	...A.S-...V.T.A...V.
Sheep	NP.A.S-S.A.A.T.A...E.
Goat	NP.A.S-S.A.A.S.T.A...E.
Japanese serow	NP.A.S-S.V.A.T.A...E.
Formosan serow	NR.A.S-S.V.A.T.A...E.
Serow	NP.A.S-S.V.A.T.A...E.
Goral	NP.A.S-S.A.A.T.A...E.
Chamois	NP.A.S-S.A.A.T.A...E.
Rocky mountain goat	NP.A.S-S.V.A.T.A...E.
Saiga	NP.A.S-I.A.V.T.A...E.
Sika deer	.Q.AFS-...A.AK.D...V.
Lesser mouse deer	...A.S-S.A.A.TT...AE.
Pig	.P.A.S.FL.T.A.TT...PV.

Fig.7. Continued

第2節 塩基配列の特徴

κ -カゼインの前駆蛋白質は21アミノ酸からなるシグナルペプチドをつけた状態で翻訳される。乳中にはシグナルペプチドを切断した成熟 κ -カゼインが現れ、これがカゼインミセルを構成している。シグナルペプチドはエキソンIIの全コドンとエキソンIIIの前部6塩基にコードされている。シグナルペプチドは膜を通過するための特異的な配列を持っており、アミノ酸配列の保存性が高い。本試験で供試した動物においてもこの領域の塩基置換は少なく (Fig. 6), アミノ酸配列の変化も少ない (Fig. 7)。また、ジャワマメジカのエキソンIIの塩基配列を決定することができなかつたため、塩基置換数の比較は κ -カゼインの成熟蛋白質をコードしている領域について行った。ブタについてはエキソンIIIも決定できなかつたため、この領域は発表されているcDNAの塩基配列を用いた。

成熟 κ -カゼイン蛋白質をコードしている塩基置換数の比較をTable 7からTable 11に示した。また、アミノ酸置換数の比較をTable 12に示した。置換数は挿入または欠失で比較できない領域を除いた数値で示してある。

κ -カゼイン遺伝子においてもブタと他のウシ亜目の動物との塩基置換数が多く、3種のカモシカ属間の塩基置換数が少なかった。

これは種の分岐した時期の違いを反映しているものと思われ、シトクロムb遺伝子と同様に分子時計が成立していると考えられた。

コドンの部位別に塩基置換数を見ると、第3部位での置換は多いものの、第3部位での塩基置換数は全置換数の33.5%であり、全置換数の79.1%を占めるシトクロムb遺伝子とは別の傾向を示した (Table 7, 8, 9, 10)。

アミノ酸配列の比較でもブタと他の動物との間の置換数が多く、
シャモア族間の置換数は少なかった。したがってκ-カゼインのア
ミノ酸配列においても分子時計が成り立つものであると考えられた
(Table 12)。

Table 7. Numbers of nucleotide substitutions among the κ -casein genes in Artiodactyla.
(All position; 483,510,516bp)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Pig	(1)	99	98	105	98	105	94	97	95	95	93	95	94	96
Lesser mouse deer	(2)		78	80	72	77	73	74	67	71	69	70	70	70
Sika deer	(3)			45	36	48	45	44	38	46	39	39	39	38
Cattle	(4)				20	38	36	39	32	40	33	33	33	33
Water buffalo	(5)					30	29	30	23	31	24	24	24	24
Saiga	(6)						25	24	20	25	18	19	19	20
Sheep	(7)							13	13	16	11	10	10	13
Goat	(8)								12	15	10	9	9	12
Rocky mountain goat	(9)									9	4	5	3	4
Chamois	(10)										7	10	8	11
Goral	(11)											5	3	4
Japanese serow	(12)												2	5
Serow	(13)													3
Formosan serow	(14)													

Table 8. Numbers of nucleotide substitutions among the κ -casein genes in Artiodactyla.
(First position; 161,170,172bp)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Pig	(1)	32	33	34	30	33	30	32	31	32	31	31	31	32
Lesser mouse deer	(2)		18	20	16	16	17	18	14	15	14	14	14	15
Sika deer	(3)			10	6	9	12	11	8	9	8	8	8	8
Cattle	(4)				6	10	12	13	9	10	9	9	9	10
Water buffalo	(5)					6	10	9	5	6	5	5	5	6
Saiga	(6)						9	8	4	5	4	4	4	5
Sheep	(7)							7	5	6	5	5	5	6
Goat	(8)								4	5	4	4	4	5
Rocky mountain goat	(9)									1	0	0	0	1
Chamois	(10)										1	1	1	2
Goral	(11)											0	0	1
Japanese serow	(12)												0	1
Serow	(13)													1
Formosan serow	(14)													

Table 9. Numbers of nucleotide substitutions among the κ -casein genes in Artiodactyl.
(Second position; 161,170,172bp)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Pig	(1)	32	37	41	38	37	35	35	36	36	35	37	36	37
Lesser mouse deer	(2)		30	31	27	31	27	27	28	29	28	29	29	29
Sika deer	(3)			21	18	22	21	20	20	22	21	21	21	21
Cattle	(4)				9	19	18	17	17	19	18	18	18	18
Water buffalo	(5)					14	15	14	14	16	15	15	15	15
Saiga	(6)						5	4	7	6	5	6	6	7
Sheep	(7)							1	4	3	2	3	3	4
Goat	(8)								3	2	1	2	2	3
Rocky mountain goat	(9)									3	2	3	1	2
Chamois	(10)										1	4	2	3
Goral	(11)											3	1	2
Japanese serow	(12)												2	3
Serow	(13)													1
Formosan serow	(14)													

Table 10. Numbers of nucleotide substitutions among the κ -casein genes in Artiodactyla.
(Third position; 161,170,172bp)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Pig	(1)	36	29	30	30	35	29	30	28	27	27	27	27	27
Lesser mouse deer	(2)		30	29	29	30	29	29	25	27	27	27	27	26
Sika deer	(3)			14	12	17	12	13	10	15	10	10	10	9
Cattle	(4)				5	9	6	9	6	11	6	6	6	5
Water buffalo	(5)					10	4	7	4	9	4	4	4	3
Saiga	(6)						11	12	9	14	9	9	9	8
Sheep	(7)							5	4	7	4	2	2	3
Goat	(8)								5	8	5	3	3	4
Rocky mountain goat	(9)									5	2	2	2	1
Chamois	(10)										5	5	5	6
Goral	(11)											2	2	1
Japanese serow	(12)												0	1
Serow	(13)													1
Formosan serow	(14)													

Table 11. Third/all positions ratios of substitution sites for the κ -casein genes
in Artiodactyla. (%)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Pig	(1)	36.4	29.6	28.6	30.6	33.3	30.9	30.9	29.5	28.4	29.0	28.4	28.7	28.1
Lesser mouse deer	(2)		38.5	36.3	40.3	39.0	39.7	39.2	37.3	38.0	39.1	38.6	38.6	37.1
Sika deer	(3)			31.1	33.3	35.4	26.7	29.5	26.3	32.6	25.6	25.6	25.6	23.7
Cattle	(4)				25.0	23.7	16.7	23.1	18.8	27.5	18.2	18.2	18.2	15.2
Water buffalo	(5)					33.3	13.8	23.3	17.4	29.0	16.7	16.7	16.7	12.5
Saiga	(6)						44.0	50.0	45.0	56.0	50.0	47.4	47.4	40.0
Sheep	(7)							38.5	30.8	43.8	36.4	20.0	20.0	23.1
Goat	(8)								41.7	53.3	50.0	33.3	33.3	33.3
Rocky mountain goat	(9)									55.6	50.0	40.0	66.7	25.0
Chamois	(10)										71.4	50.0	62.5	54.5
Goral	(11)											40.0	66.7	20.0
Japanese serow	(12)												0.0	20.0
Serow	(13)													33.3
Formosan serow	(14)													

Table 12. Numbers of amino acid substitutions among artiodactyl κ -casein proteins.
(160, 169, 171aa)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Pig	(1)	63	64	72	66	67	64	65	64	65	64	65	64	66
Lesser mouse deer	(2)		43	47	41	45	43	43	41	42	41	42	42	43
Sika deer	(3)			32	28	34	35	33	30	33	31	31	31	31
Cattle	(4)				15	28	28	28	24	27	25	25	25	26
Water buffalo	(5)					21	25	23	19	22	20	20	20	21
Saiga	(6)						13	11	10	10	8	9	9	11
Sheep	(7)							8	9	9	7	8	8	10
Goat	(8)								7	8	5	6	6	8
Rocky mountain goat	(9)									5	2	3	1	3
Chamois	(10)										3	6	4	6
Goral	(11)											3	1	3
Japanese serow	(12)												2	4
Serow	(13)													2
Formosan serow	(14)													

第3節 第2章の要約

第2章においても、第1章のシトクロム b 遺伝子の解析に用いた14種の偶蹄目動物、ブタ（イノシシ科）、ジャワマメジカ（マメジカ科）、ニホンジカ（シカ科）、ウシ（ウシ科ウシ属）、スイギュウ（ウシ科スイギュウ属）、ヤギ（ウシ科ヤギ属）、ヒツジ（ウシ科ヒツジ属）、サイガ（ウシ科サイガ属）、シャモア（ウシ科シャモア属）、シロイワヤギ（ウシ科シロイワヤギ属）、ゴーラル（ウシ科ゴーラル属）、シーロー（ウシ科カモシカ属）、台湾ンカモシカ（ウシ科カモシカ属）、ニホンカモシカ（ウシ科カモシカ属）を試験対象とした。

これらの組織から取り出したDNAをテンプレートとし、エクソンII、エクソンIII、エクソンIVに分けてPCRをおこない、ダイレクトシーケンシングの手法でPCR産物の塩基配列を決定した。

ブタのエクソンIIとエクソンIII、ジャワマメジカのエクソンIIは決定できなかったものの、その他の種と領域の塩基配列を決定した。

第3章 成長ホルモンプロモーター領域の塩基配列

緒言

第1章では核外遺伝子のミトコンドリアDNAシトクロムb遺伝子の塩基配列を決定し、第2章では核内遺伝子のκ-カゼイン遺伝子の塩基配列を決定した。これらは蛋白質をコードしている領域の塩基配列である。

DNA上に存在する遺伝子がmRNAに転写され、蛋白質に翻訳されて発現するためには蛋白質に翻訳される領域以外の調節領域の塩基配列が関与している。その中でもアミノ酸コード領域の上流に存在するプロモーター領域は他の調節因子との相互作用により蛋白質の発現量や発現部位、発現時期を決定する重要な領域である。調節領域に生じた変異は生物の生理状態に重大な変化を引き起こし、調節領域の変異が生物の進化に大きく関与しているのではないかとの考えもある⁴⁹⁾。

動物の成長ホルモン遺伝子は細胞の分化、個体の成長に関与する重要な遺伝子の1つである。成長ホルモン遺伝子の発現には多くの転写調節因子が関与している^{33, 50, 51, 55, 64)}。これらの転写調節因子の結合領域に起こした塩基置換はCATアッセイで遺伝子産物の転写量を6~11倍に増加させた⁵⁵⁾。

動物の進化史で成長ホルモンのプロモーター領域に変異が生じた場合、その影響は非常に大きいものがあると考えられる。第3章では一部の動物について成長ホルモンのプロモーター領域の塩基配列を決定し、比較を行った。

第1節 塩基配列の決定

1. 材料および方法

1) 試験材料

動物は *Sus scrofa* (ブタ, イノシシ科), *Tragulus javanicus* (ジャワマメジカ, マメジカ科), *Cervus nippon* (ニホンジカ, シカ科), *Bos taurus* (ウシ, ウシ科ウシ属), *Bubalus bubalis* (スイギュウ, ウシ科スイギュウ属), *Capra hircus* (ヤギ, ウシ科ヤギ属), *Ovis aries* (ヒツジ, ウシ科ヒツジ属), *Capricornis crispus* (ニホンカモシカ, ウシ科カモシカ属) の8種である (Table 1)。

ウシ, ヒツジ, ヤギ, ブタ, ニホンカモシカ, ニホンジカ, ジャワマメジカの試料は筋肉を採取し, DNAの抽出を行った。スイギュウは血液試料からDNAを抽出した。

2) 試験方法

a. DNA試料の調製

試料は第1章第1節「部分塩基配列の決定」で作成したDNAを用いた。

b. PCR増幅

PCRのプライマーはウシ^{6,2)}の成長ホルモン遺伝子の塩基配列から作成した。フォワードプライマーはGHP1 (5'-TCTCAAGCTGAGACCCTGTGTGCACA-3'), リバースプライマーはGHP2 (5'-CGAATGGAGGGGATTTTACCGAGCTTAC-3')である。GHP1は転写開始部位から-245/-220の領域,

GHP2はイントロンIの5'末端に相当する。

PCRは50 μ lの反応液で行い、10mM Tris-HCl(pH8.9), 1.5mM MgCl₂, 80mM KCl, 500 μ g/ml BSA, 0.1% コール酸ナトリウム, 0.1% TritonX-100, プライマー40 pmole, dNTP200 μ M, Tth DNA ポリメラーゼ(TOYOBO)2ユニットとした。テンプレートは375ngのDNAを用いた。反応は、ZYMOREACTOR(ATTO, AB-1800)を用い、93 $^{\circ}$ Cで4分の初期加熱後、93 $^{\circ}$ C 1分, 60 $^{\circ}$ C 1分, 72 $^{\circ}$ C 1分のサイクルを35回繰り返した。

塩基配列の決定をダイプライマー法(ABI)で行ったため、ダイプライマー導入のための2段階目のPCRを行った。プライマーとしてさらにSGHP1(5'-TGTA AACGACGGCCAGTTCTCAAGCTGAGACCCTG-3')とSGHP2(5'-TGTA AACGACGGCCAGTGGATTTTAGCGAGCTTAC-3')を作成した。第1段階のPCR産物を4% NuSieveGTG(FMC)アガロースゲル電気泳動で分離、精製し、そのPCR産物の一部をテンプレートとした。PCRはSGHP1/GHP2とGHP1/SGHP2の2種類の組み合わせで行った。反応条件はプライマーの配列を除き第1段階のPCRと同様である。

c. 塩基配列の決定

塩基配列の決定はPCR産物のダイプライマーサイクルシーケンシングで行った。PCR反応液約40 μ lをUltrafree C3-TK(MILLIPORE, 分画分子量 30000)で約10 μ lに濃縮後、4% NuSieveGTG(FMC)アガロースゲル電気泳動で分離した。目的の断片をゲルから切りだし、凍結し、融解後UltrafreeC3-VV(MILLIPORE, 0.1 μ m)で遠心することによってアガロースゲルからDNAフラグメントを含む水層を分離した。この水層をUltrafree C3-TKに移し、10mM Tris-HCl

(pH7.5), 0.1mM EDTA溶液300 μ lと滅菌水300 μ l で遠心・洗浄した。
さらにこの液を濃縮し, シーケンス反応のテンプレートとした。
反応条件はTth DNA ポリメラーゼの使用と伸長反応の温度を76 $^{\circ}$ Cに
したことを除き, ABI社のプロトコールにしたがった。

シーケンス反応産物はエタノール沈澱によって精製し, 自動シー
ケンサ (ABI373A) で塩基配列を決定した。

2. 結果と考察

ウシ, ヒツジ, ヤギ, スイギュウ, ニホンカモシカ, ニホンジカの塩基配列を決定した (Fig. 8)。ブタ, ジャワマメジカはPCRで増幅せず, 塩基配列を決めることができなかった。ブタ成長ホルモン遺伝子は塩基配列が発表されており⁶⁶⁾, プロモーター領域の一部を比較することは可能である。GHP1の領域は決定された部位にないため比較することができないが, GHP2の領域でウシ塩基配列と一致していない。ジャワマメジカの成長ホルモン遺伝子は塩基配列が決定されていないため比較できないが, どちらかのプライマー領域で不一致があったものと考えられる。

ウシ, ヒツジ, ヤギの塩基配列はクローニングしたゲノムから決定された配列^{54, 67, 38)}と一致していた。

新規に決定した塩基配列は以下の accession number で DNA データベース (DDBJ) に登録した。

スイギュウ : D16297

ニホンカモシカ : D16298

ニホンジカ : D19299

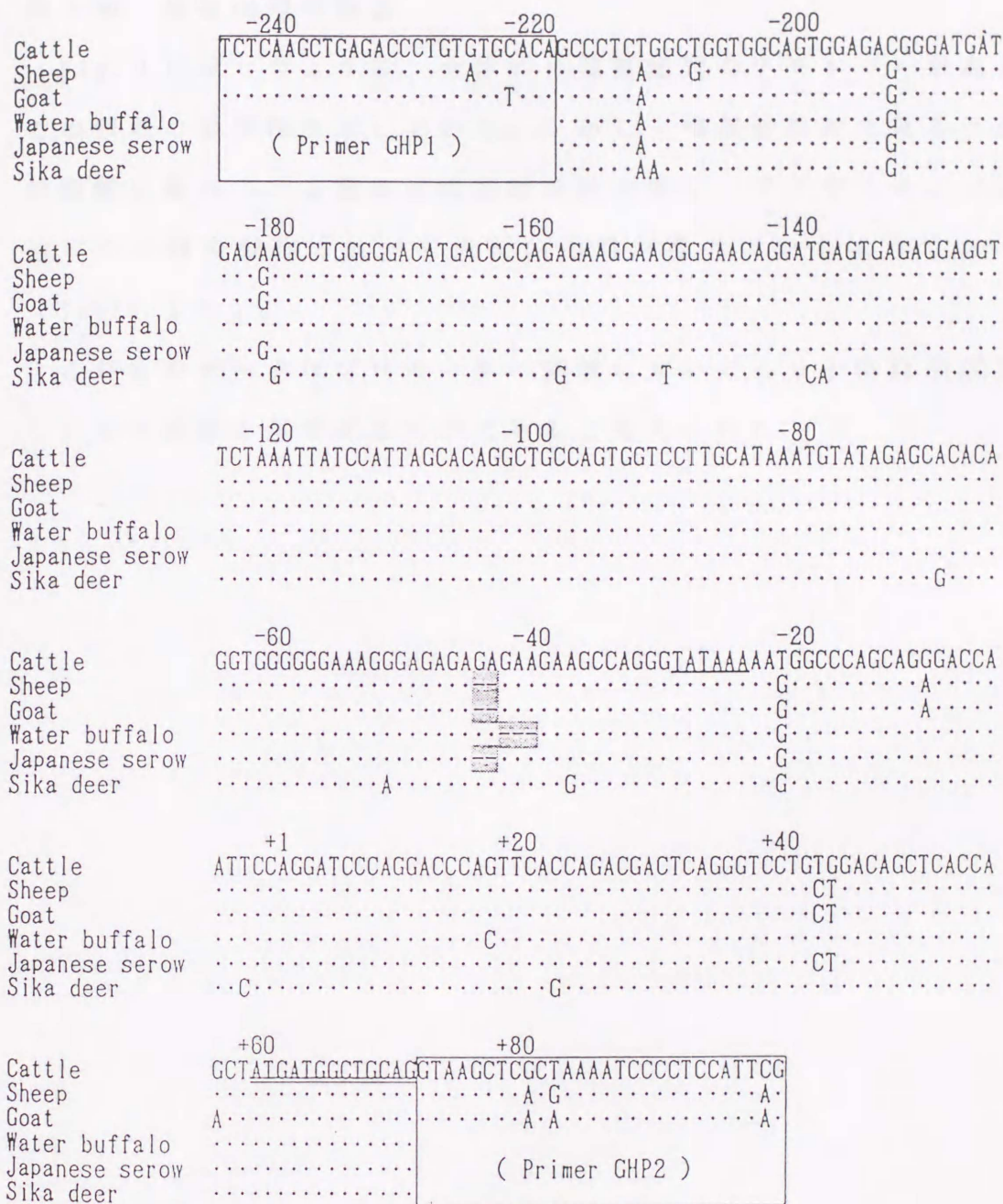


Fig. 8. Nucleotide sequences of the GH promoters of cattle, sheep, goat, water buffalo, Japanese serow, and sika deer. Dots indicate nucleotides that are identical to bovine nucleotides. Deletions are indicated by hatched boxes. Position +1 is the transcription startsite. The TATA box is underlined. Coding region is double-underlined. Primer regions, GHP1 and GHP2, are boxed.

第2節 塩基配列の特徴

Fig. 8 に示したように、全体的に塩基配列のホモロジーが高く、この領域の重要性を示していた。しかし、塩基置換数で見ると遺伝的距離の離れている種ほど塩基置換数が多く、ブタやニホンジカは他のウシ科の動物と比べて遺伝的距離が離れているようであった (Table 13)。

これらのデータはプロモーター領域においても分子時計が成立している可能性を示唆するものであると考えられた。

Table 13. Numbers of nucleotide substitutions among the growth hormone promoter regions of Artiodactyla. (287,288,290bp)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Pig	(1)	29*	23*	23*	26*	27*	24*
Sika deer	(2)		14	12	17	17	14
Cattle	(3)			4	9	9	6
Water buffalo	(4)				7	7	4
Sheep	(5)					2	3
Goat	(6)						3
Japanese serow	(7)						

* The length of pig sequence is 248bp.

第3節 第3章の要約

第3章では8種の偶蹄目動物、ブタ（イノシシ科）、ジャワマメジカ（マメジカ科）、ニホンジカ（シカ科）、ウシ（ウシ科ウシ属）、スイギュウ（ウシ科スイギュウ属）、ヤギ（ウシ科ヤギ属）、ヒツジ（ウシ科ヒツジ属）、ニホンカモシカ（ウシ科カモシカ属）を試験対象とした。

これらの組織より取り出したDNAをテンプレートとし、PCRで成長ホルモン遺伝子のプロモーター領域の増幅を試みた。PCRで増幅できなかったブタとジャワマメジカを除く5種の動物の塩基配列をダイプライマーサイクルシーケンス法で決定した。

第4章 分子系統樹の作成とその比較

緒言

生物の進化史を系統樹の形で示すことは生物の研究においてよく用いられている。通常この系統樹は生物発生時の仮想的祖先種を根元とし、現存している種を枝先とする形で表される。系統樹において重要な部分は枝の分岐パターンと枝長である。枝の分岐パターンは現存種や化石種がどの祖先種から分岐したかを示し、枝長は分岐してから経過した時間を示す。しかし、形態学的性質は一定速度で進化しておらず^{27, 49)}、系統樹は化石種の出現年代と現存種や化石種の形態の比較から決められている。これには収束進化の問題がつきまとい、これまでも特定の形質の解釈のしかたで系統樹に大きな違いのでてくる場合が見られた。

それに対し、分子系統樹は「分子進化の中立説」^{35, 37)}に基づく分子時計の考え方を取り入れることができる。分子系統樹はZucker kandle & Pauling^{68, 69)}らによるヘモグロビンのアミノ酸配列の比較研究と分子時計の発見後、1967年Fitch & Margoliash^{20, 21)}によって初めてチトクロムc分子系統樹の作成が行われた。これによって示された20種の生物の分子系統樹はそれまで化石などから推定されていた系統関係をよく反映しており、分子系統学の認知と発展に大きな影響を与えた⁶³⁾。

その後の研究から、アミノ酸や塩基の置換速度の一定性は近似的にしか成り立たず、生物の系統によっては同じ分子でも進化速度に違いのあることが明らかにされてきている⁴⁹⁾。それでも、化石データなどを考慮、補正を加えることによってかなり正確な分岐年代を

推定することが可能である。また各種の分子系統樹の作成方法が開発され、必ずしも置換速度の一定性を仮定しなくても分子系統樹を作成できるようになってきている^{49, 63)}。

分子系統樹の作成方法には大きく分けて2つのグループがある。1つは分子データの比較から生物間の遺伝的な距離を計算し、その距離をもとに系統樹を作成する方法である。この中には初期によく使われた平均距離法(UPGMA)があり、その他に最小進化法や近隣結合法がある。平均距離法⁶²⁾は最も簡単な方法で置換数を距離に換算し、クラスターを作成していくものである。分岐図が時間軸に対して示され、系統図が正しければ分岐時間を簡単に推定することができる。しかし、この方法は塩基置換速度の一定性を仮定しており、比較する生物種グループ内でこの仮定が成り立たない場合は分岐時期だけでなく分岐パターンの推定も誤ることがありうる。最小進化法¹¹⁾は、樹形のなかで全ての枝の進化的な変化の総和が最小となるような樹系を選ぶものであるが、現在ではほとんど使われていない。近隣結合法はSaitou & Nei⁵⁷⁾によって開発された計算方法で、比較的簡単に最小進化系統樹を得ることができる。

もう1つのグループは塩基配列またはアミノ酸配列データをそのまま解析に用いるものである。これには代表的なものとして最大節約法と最尤法がある。最大節約法^{16, 18, 19)}は現存種の塩基配列やアミノ酸配列から祖先種の配列を推定し、系統樹全体の進化的変化の数を最小にするように系統樹を作成するものである。最大節約法は現在でも最もよく用いられている方法の1つである。しかし、サイト当たりの置換数が多く多重置換や復帰置換がある場合には誤った結果を与えるとの批判がある⁴⁹⁾。最尤法は想定される全ての系

統樹についてそれが成立する確率を計算し、最良の樹系を選択するものである。コンピュータを用いたモデル計算からかなり良い再現性のあることが示されている。しかし、膨大な計算量が必要なため、現在においても少数の種からなる系統樹の計算にしか用いることができない。

偶蹄目の分子系統樹はAllardら⁴⁾の12Sと16S遺伝子によるものとIrwinら^{3,4)}によるシトクロム b 遺伝子系統樹が代表的なものである。Allardら⁴⁾は偶蹄目の種から約2.7kbのミトコンドリア塩基配列を決定し、すでに発表されている配列と共にこの分子系統樹を作成した。彼らは最節約法で分子系統樹を作成し、これら偶蹄目の動物が地質学的に非常に短い期間に分化したことを示した。彼らの系統樹によればウシ科とシカ科とのグループの分かれ方、すなわちこれらが単系統であるのか否かについて明確な結果はでなかった。また、Irwinら^{3,4)}もシトクロム b 遺伝子の結果から明確な結果を得ることができず、彼らの作成した最節約系統樹および近隣結合系統樹ともこれらの種が混在した系統樹を与えた。

この原因として2つの可能性が考えられる。1つの可能性は2科の動物がそれぞれの系統で単系統ではなく、系統樹の示すように入り組んでいること、もう1つの可能性は系統樹作成に用いた遺伝子の質の問題である。彼らの用いた遺伝子はともにミトコンドリア遺伝子であり変異の速さとともに変異の片寄りが認められる^{3,4)}。一方、系統樹作成方法に関しては最節約法も近隣結合法もIrwinら^{3,4)}の結果では大差が見られなかった。

通常、最節約法はミトコンドリア遺伝子のように変異速度が速く多重置換の起きている場合、より大きな誤差を与える可能性が高い

49)。本研究では変異速度の異なる3種の遺伝子から系統樹を作成し比較を行っているため、系統樹は全て近隣結合法を用いて作成した。

第1節 シトクロム b 遺伝子の分子系統樹

1. 系統樹作成方法

シトクロム b 遺伝子の系統樹は部分塩基配列 645bp および全塩基配列 1140bp の両者から作成した。部分塩基配列は本研究で決定した 14 種の偶蹄目動物の塩基配列 (Fig. S 1 ~ S 14) を用いた。全塩基配列は本研究で決定したウシ, スイギュウ, ニホンカモシカ, ニホンジカ, ジャワマメジカ (Fig. S 1 ~ S 5) と, すでに Irwin ら³⁴⁾ によって発表されているブタ, ヒツジ, ヤギ, オオマメジカ (

Tragulus napu), キリン (*Giraffa camelopardalis*), プロングホーン (*Antilocapra americana*), ダマジカ (*Dama dama*), ミュールジカ (*Odocoileus hemionus*) の合計 13 種の動物の塩基配列を用いた。また部分配列データの比較は推定アミノ酸配列についても行い, 近隣結合法⁵⁶⁾ による分子系統樹を作成した。

これらの配列データの解析および系統樹の作成には国立遺伝学研究所で開発した ODEN プログラム³²⁾ を用いた。サイト当たりの塩基置換数の推定には 6 パラメーター法²⁴⁾ を用い, アミノ酸置換数の推定には木村³⁷⁾ の方法を用いた。

近隣結合法は塩基置換数から遺伝的な距離を計算し, 遺伝距離の合計が最も少なくなるように種の間でクラスターを作成する。その遺伝距離は Table 14, 15 に示した種間の配列のホモロジーを反映した数値となる。

近隣結合法は計算から無根系統樹を与える方法である。しかし, 偶蹄目ではブタ亜目とウシ亜目の初期の分離が明らかにされており, ブタをアウトグループとしてウシ亜目の分子系統樹を作成した。作

成した系統樹の枝の形の統計的な有意性はブーツストラップ法¹⁷⁾で検討した。系統樹の枝に書いてある数字は100回のブーツストラップ試行でその枝の現れた回数を示している。

Table 14. Homology of nucleotide sequences among the cytochrome b genes in Artiodactyla.(%)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Pig	(1)	82.8	79.4	79.4	81.1	82.8	80.3	80.5	81.7	79.7	80.2	81.6	81.2	80.9
Lesser mouse deer	(2)		81.1	85.3	83.3	85.0	82.2	81.4	82.9	84.2	81.4	83.4	83.3	82.4
Sika deer	(3)			85.0	85.1	85.4	87.0	85.9	85.3	84.5	85.4	86.4	85.6	85.6
Cattle	(4)				88.4	84.5	84.3	85.4	85.4	86.0	84.5	85.9	85.9	84.7
Water buffalo	(5)					86.0	85.7	84.8	86.4	85.1	85.0	86.5	85.7	84.3
Saiga	(6)						86.4	85.6	87.3	86.4	85.1	86.7	85.9	85.1
Sheep	(7)							89.3	89.0	87.8	86.0	89.6	88.4	87.8
Goat	(8)								87.1	86.4	86.7	88.8	84.4	87.9
Rocky mountain goat	(9)									87.3	87.8	89.1	88.1	87.3
Chamois	(10)										87.9	89.3	88.8	88.7
Goral	(11)											90.4	90.5	89.5
Japanese serow	(12)												93.8	92.7
Serow	(13)													95.3
Formosan serow	(14)													

Table 15. Homology of amino acid sequences among the cytochrome b proteins in Artiodactyla.
(%)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Pig	(1)	90.7	90.2	90.2	90.2	90.2	89.8	89.3	91.2	90.2	89.8	90.7	89.8	89.3
Lesser mouse deer	(2)		94.0	94.4	93.0	92.6	91.6	93.0	94.4	94.9	92.6	93.5	93.0	92.6
Sika deer	(3)			94.9	94.4	94.0	94.4	94.4	94.9	94.9	93.0	94.9	94.4	93.5
Cattle	(4)				96.3	93.0	94.0	94.4	95.3	94.4	94.0	95.8	95.8	94.0
Water buffalo	(5)					94.0	94.9	94.0	94.4	93.5	93.0	94.4	94.0	92.1
Saiga	(6)						95.8	94.4	95.3	95.3	93.0	93.5	93.5	92.1
Sheep	(7)							96.3	95.3	95.3	94.4	95.8	95.8	93.5
Goat	(8)								95.9	96.3	95.8	96.7	96.7	94.9
Rocky mountain goat	(9)									98.1	96.3	96.7	96.7	95.8
Chamois	(10)										96.3	96.3	96.7	95.3
Goral	(11)											96.3	96.3	94.9
Japanese serow	(12)												97.2	95.3
Serow	(13)													96.3
Formosan serow	(14)													

2. 結果と考察

1) 全塩基配列

偶蹄目の分子系統樹における問題の1つはウシ科動物とシカ科動物の由来である。Irwinら^{3,4)}は確定的ではないもののウシ科動物とシカ科動物の起源が入り組んだ系統樹を作成した。彼らの使用した塩基配列はシトクロム b 遺伝子の全塩基配列1140bpであるので、本研究で主に分析した部分塩基配列645bpとは長さが異なっている。そのため、系統樹作成に使用した塩基配列の長さによる影響が現れる可能性が考えられた。ミトコンドリア16S リボソーム遺伝子の塩基配列を用いた報告^{2,3,4)}ではその結果に影響が現れ、解析に用いた塩基配列の長さの違いで、異なった形の系統樹が提示された。また、本研究で対象としたシカ科動物はニホンジカ1種であり、その他いくつかの種がIrwinら^{3,4)}の動物種と重ならない。ニホンジカは形態からシカ科の代表的な亜科であるシカ亜科(Cervinae)に分類されているものの、シカ科内の正確な系統関係は明かでない。そこでニホンジカ、ジャワマメジカ、スイギュウ、ニホンカモシカのシトクロム b 遺伝子全塩基配列を決定し、Irwinら^{3,4)}の決定した塩基配列とともに系統樹を作成した。

Fig. 9 にシトクロム b 遺伝子の全塩基配列から作成した近隣結合法系統樹を示した。この系統樹は本研究で使用した8種(ブタ, ジャワマメジカ, ニホンジカ, ウシ, スイギュウ, ヒツジ, ヤギ, ニホンカモシカ)とIrwinら^{3,4)}の研究で使用された5種(オオマメジカ, キリン, プロングホーン, ダマジカ, ミュールジカ)から成る系統樹である。ブタ, ウシ, ヒツジ, ヤギはIrwinら^{3,4)}の系統樹にも含まれている。

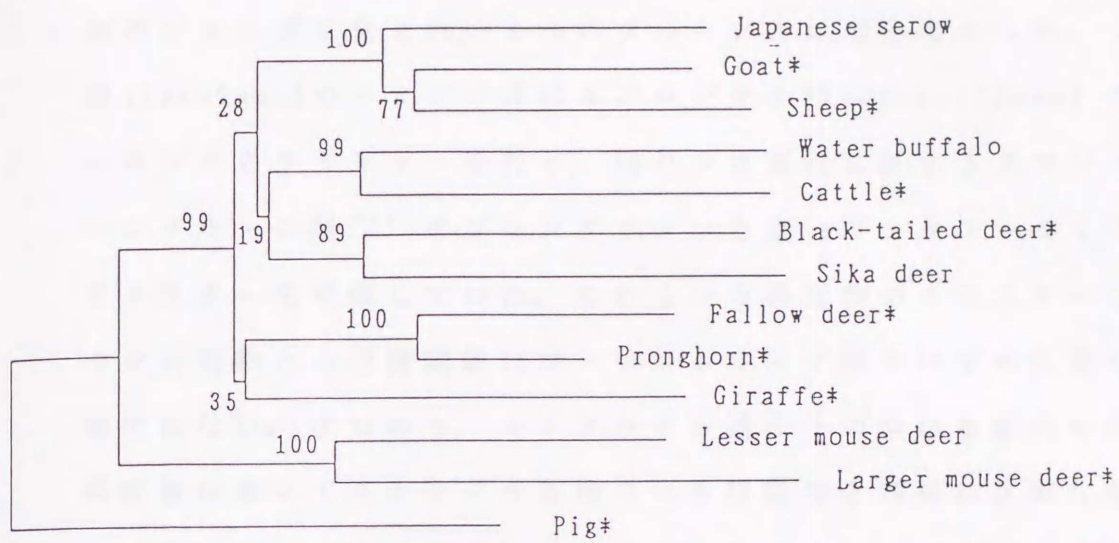


Fig. 9. A phylogenetic tree based on the cytochrome b genes(1140bp).

*, The sequences of cytochrome b genes were published^{3,4)}.

この結果から、マメジカ科(Tragulidae)の2種は高いブーツストラップ値で結合し、他のウシ亜目の動物とは初期に分離していることが明かとなった。一方、シカ科に属する動物の位置はウシ科の動物のグループに含まれ、1つのグループとはならなかった。シカ亜科(Cervinae)のニホンジカはオジロジカ亜科(Odocoilinae)のミューールジカとクラスターを作り、同じシカ亜科に属するダマジカはプロングホーン科³¹⁾のプロングホーンと高いブーツストラップ値でクラスターを形成していた。これらシカ科動物のクラスターと他のウシ科動物との位置関係はブーツストラップ値がいずれも低く、明確ではない。すなわち、シトクロム b 遺伝子の全塩基配列を用いた系統樹においてニホンジカは他のシカ科動物と同様に正確な位置付けが不明であった。この結果は後で示すシトクロム b 部分塩基配列からの結果と同様で、シトクロム b 遺伝子の塩基配列の長さの違いは系統樹の形に影響していないと考えられた。

2) 部分塩基配列

Fig. 10 にシトクロム b 遺伝子の部分塩基配列 645bp より作成した系統樹を示した。ブーツストラップ値から評価するとタイワンカモシカ、シーロー、ニホンカモシカのカモシカ属の3種の関係は明確である。タイワンカモシカは台湾だけに生息するニホンカモシカによく似た動物でニホンカモシカの亜種と考えられていた¹³⁾。しかし、分子系統樹はニホンカモシカが初期に分岐し、その後タイワンカモシカとシーローが分岐したことを示している。これは分子進化と形態進化の違いを端的に示しており、分子進化解析の効果を示す例である。また、ゴールル、シャモアとの関係も比較的高いブー

ツストラップ値で示されており、シャモア族のように分岐年代の近い動物間の系統関係を解析するにはシトクロム b 遺伝子が適していると考えられた。一方、シカ科のニホンジカはヤギ、ヒツジとクラスターを作り、ウシ科動物のクラスター内に含まれていた。しかし、これらクラスターの枝のブーストラップ値は低く、結果として明確な位置が不明であった。

3) アミノ酸配列

ミトコンドリア遺伝子のように塩基置換速度の速い遺伝子には塩基配列の系統樹よりもアミノ酸配列の系統樹が適しているとの考えがある¹⁾。そこでシトクロム b 遺伝子の部分塩基配列領域のアミノ酸配列から分子系統樹を作成した (Fig. 11)。しかし、各枝のブーストラップ値は低く、この系統樹から明確な関係を読みとることはできなかった。

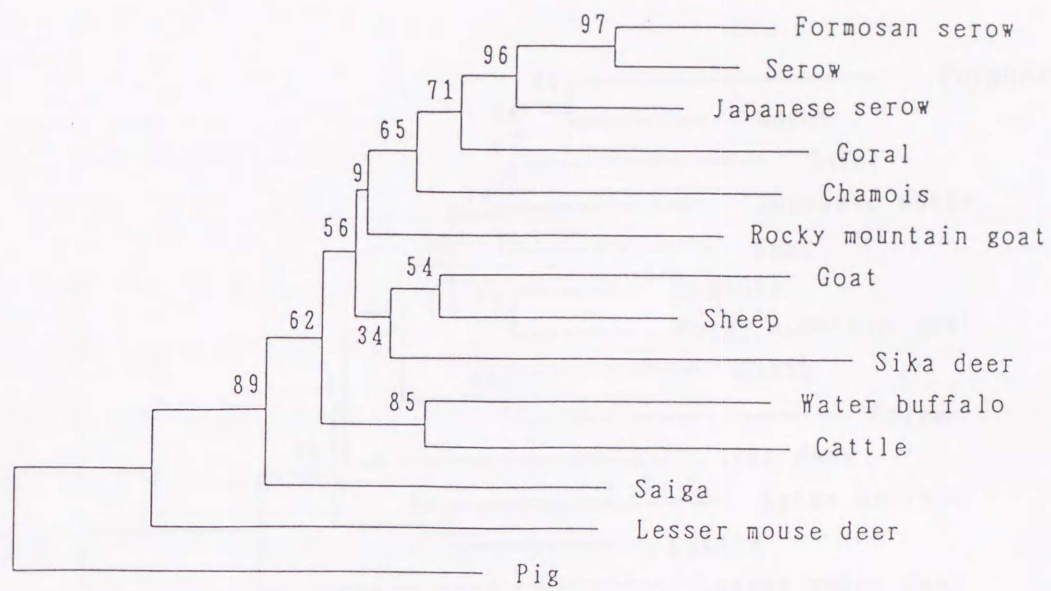


Fig. 10. A phylogenetic tree based on the cytochrome b genes(645bp).

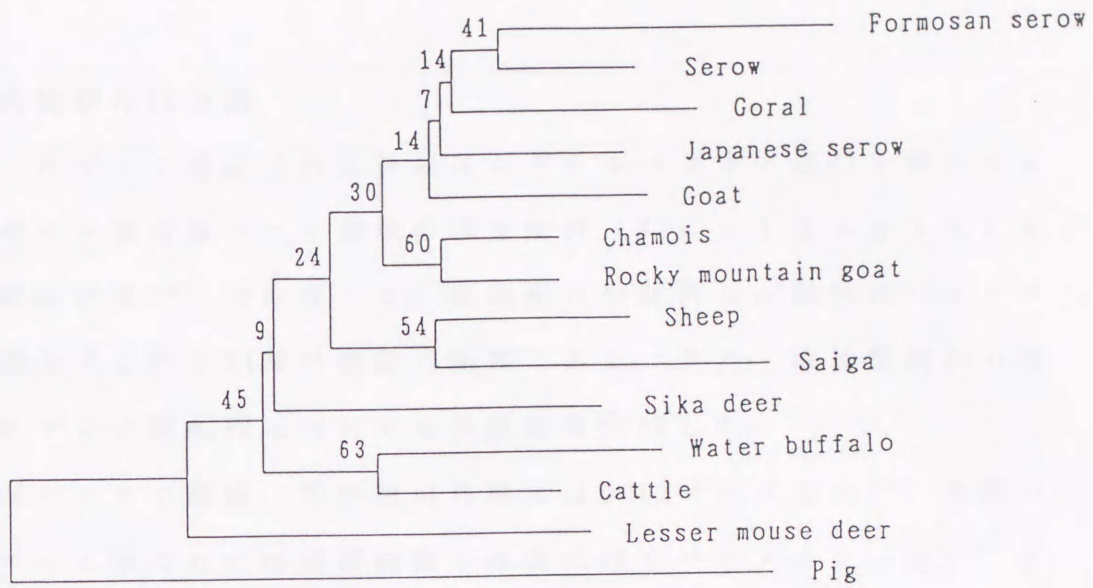


Fig. 11. A phylogenetic tree based on the cytochrome b proteins.

第2節 κ -カゼイン遺伝子の分子系統樹

1. 系統樹作成方法

κ -カゼイン遺伝子の系統樹はシグナルペプチド部分を除いた κ -カゼイン蛋白質コード領域の塩基配列 (Fig. S 15 ~ S 28) から近隣結合法⁵⁰⁾で作成した。塩基配列を解析した動物はシトクロム b 遺伝子と同じ14種の偶蹄目動物である。また、塩基配列から推定したアミノ酸配列についても系統樹を作成した。

配列データの解析、系統樹の作成にはODENプログラム³²⁾を用いた。サイト当たりの塩基置換数の推定には6パラメーター法²⁴⁾を用い、アミノ酸置換数の推定には木村³⁷⁾の方法を用いた。系統樹はブタをアウトグループとし、ブーツストラップ法¹⁷⁾で有意性を検討した。

遺伝的距離と関連する各配列間のホモロジーをTable 16, 17に示した。

Table 16. Homology of nucleotide sequences among the κ -casein genes in Artiodactyla.
(%)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Pig	(1)	79.5	79.7	78.3	79.7	78.3	80.5	79.9	80.3	80.3	80.7	80.3	80.5	80.1
Lesser mouse deer	(2)		84.7	84.3	85.9	84.9	85.7	85.5	86.9	86.1	86.5	86.3	86.3	86.3
Sika deer	(3)			91.2	92.9	90.6	91.2	91.4	92.5	91.0	92.4	92.4	92.4	92.5
Cattle	(4)				96.1	92.5	92.9	92.4	93.7	92.2	93.5	93.5	93.5	93.5
Water buffalo	(5)					94.1	94.3	94.1	95.5	93.9	95.3	95.3	95.3	95.3
Saiga	(6)						95.1	95.3	96.1	95.1	96.5	96.3	96.3	96.1
Sheep	(7)							97.5	97.5	96.9	97.9	98.1	98.1	97.5
Goat	(8)								97.7	97.1	98.1	98.3	98.3	97.7
Rocky mountain goat	(9)									98.3	99.2	99.0	99.3	99.2
Chamois	(10)										98.6	98.1	98.4	97.9
Goral	(11)											99.0	99.4	99.2
Japanese serow	(12)												99.6	99.0
Serow	(13)													99.4
Formosan serow	(14)													

Table 17. Homology of amino acid sequences among the κ -casein proteins in Artyodactyla.
(%)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)
Pig	(1)	60.6	60.0	55.0	58.8	58.1	60.0	59.4	60.0	59.4	60.0	59.4	60.0	58.8
Lesser mouse deer	(2)		74.6	72.2	75.7	73.4	74.6	74.6	75.7	75.1	75.7	75.1	75.1	74.6
Sika deer	(3)			81.1	83.4	79.9	79.3	80.5	82.2	80.5	81.7	81.7	81.7	81.7
Cattle	(4)				91.1	83.4	83.4	83.4	85.8	84.0	85.2	85.2	85.2	84.6
Water buffalo	(5)					87.6	85.2	86.4	88.8	87.0	88.2	88.2	88.2	87.6
Saiga	(6)						92.3	93.5	94.1	94.1	95.3	94.7	94.7	93.5
Sheep	(7)							95.3	94.7	94.7	95.9	95.3	95.3	94.2
Goat	(8)								95.9	95.3	97.1	96.5	96.5	95.3
Rocky mountain goat	(9)									97.1	99.1	98.2	99.5	98.2
Chamois	(10)										98.2	96.5	97.7	96.5
Goral	(11)											98.2	99.5	98.2
Japanese serow	(12)												99.1	97.7
Serow	(13)													99.1
Formosan serow	(14)													

2. 結果と考察

1) 塩基配列

Fig. 12 に κ -カゼイン遺伝子の塩基配列から作成した分子系統樹を示した。ブーツストラップ値の高い枝はジャワマメジカ以下のクラスターとウシ, スイギュウのクラスターで, 100 回のサンプリング中100 回ともこの枝が現れたことを示している。

形態分類^{29, 31)}においてマメジカ科はウシ亜目の中で最も初期に分岐したとされており, κ -カゼイン遺伝子の結果はこれを支持するものである。ウシ, スイギュウのクラスターも形態分類と一致するものである。

この系統樹ではニホンジカがブーツストラップ値75でウシ科のクラスターから分岐し, ウシ科とシカ科の混合した系統樹とならなかった。しかし, ヤギ亜科内の系統関係は初期に分岐したサイガを除き, 関係を明確することができなかった。

2) アミノ酸配列

Fig. 13 に κ -カゼイン蛋白質のアミノ酸配列から作成した分子系統樹を示した。この系統樹は塩基配列系統樹と同様の結果で, ジャワマメジカ, ニホンジカ, ウシ亜科, ヤギ亜科の系統関係が高いブーツストラップ値で示されている。一方, ヤギ亜科内の系統関係はブーツストラップ値が低く不明であった。

このように, κ -カゼイン系統樹はミトコンドリア遺伝子と比べ, 比較的古い年代の分岐解析に適しており, 近い年代の解析には適していないと考えられた。

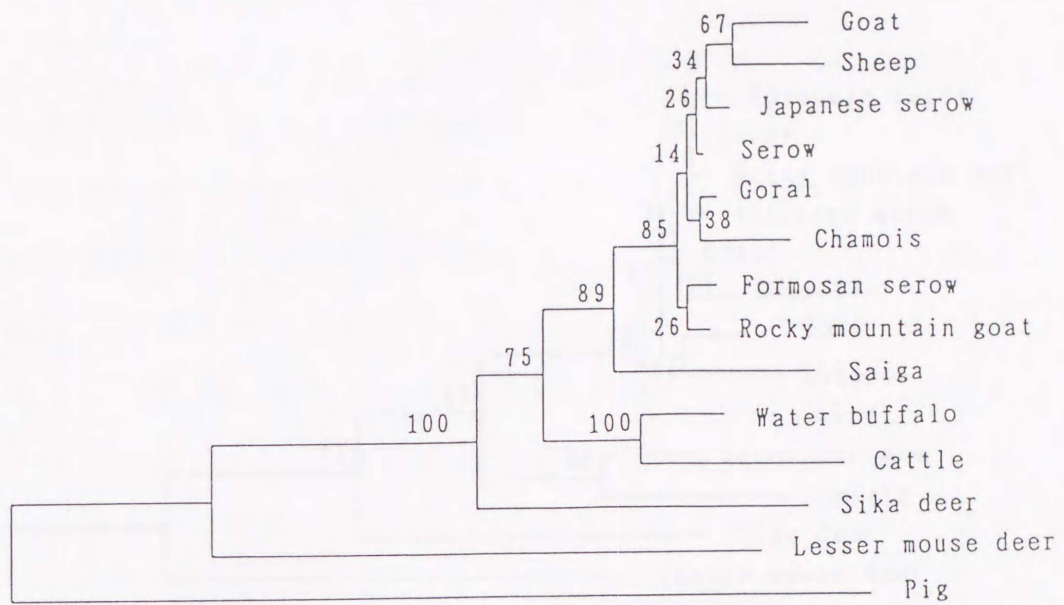


Fig. 12. A phylogenetic tree based on the κ -casein genes.

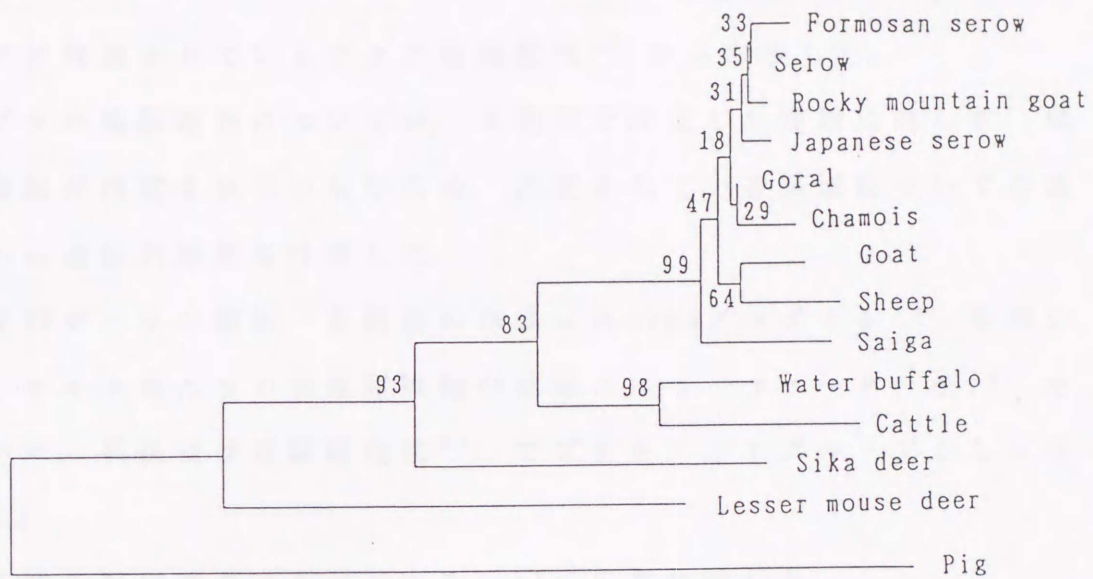


Fig. 13. A phylogenetic tree based on the κ -casein proteins.

第3節 成長ホルモンプロモーター領域の分子系統樹

1. 系統樹作成方法

成長ホルモンプロモーター領域の系統樹はウシ, ヒツジ, ヤギ, スイギュウ, ニホンカモシカ, ニホンジカの塩基配列 (Fig. 8.) とすでに発表されているブタの塩基配列^{6,6)}から作成した。

ブタの塩基配列については, 本研究で決定した領域に対し5'側34塩基が決定されていないため, 決定されている領域についての比較から遺伝的距離を計算した。

配列データの解析, 系統樹の作成にはODENプログラム^{3,2)}を用いた。サイト当たりの塩基置換数の推定には6パラメーター法^{2,4)}を用いた。系統樹は近隣結合法^{5,7)}でブタをアウトグループとして示した。

各塩基配列間のホモロジーをTable 18に示した。

Table 18. Homology of nucleotide sequences among the growth hormone promoter regions in Artiodactyla. (%)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Pig	(1)	88.3	90.7	90.7	89.5	89.1	90.3
Sika deer	(2)		95.2	95.8	94.1	94.1	95.2
Cattle	(3)			98.6	96.9	96.7	97.9
Water buffalo	(4)				97.6	97.6	98.6
Sheep	(5)					99.3	99.0
Goat	(6)						99.0
Japanese serow	(7)						

2. 結果と考察

Fig. 14 に成長ホルモンプロモーター領域の塩基配列から作成した分子系統樹を示した。アウトグループとしたブタの塩基配列が一部決定されておらず、また、他の種での塩基置換数が少なかつたため (Table 13), ブーツストラップ法による解析は行わなかつた。

Fig. 14 ではヤギとヒツジがクラスターを形成し、次にニホンカモシカが結合している。しかし、Table 13 と Fig. 8 に見られるように、これらの種間の塩基置換数は少なく、このデータから分岐関係を決定することはできない。ただ、Fig. 8 の塩基配列の比較を見ると、系統樹の作成には使用していない欠失部位が3種とも-44位置のGAとして共通し、塩基配列全体から見てヤギ、ヒツジ、ニホンカモシカは1つのグループと考えられた。

一方、ニホンジカはウシとスイギュウの間の枝として入っていた。これはアウトグループとしたブタとのホモロジーがニホンジカでは低く、ウシ、スイギュウの方が高かつたことが原因であると考えられた (Table 18)。しかし、枝の分岐位置は近接しており、意味のある分岐ではない。また、ブタに関しては比較した領域の長さが他の種と違っており、系統樹の作成方法として問題がある。

ブタの配列を除いてを比較すると、ニホンジカとウシ科動物の間のホモロジーは低い値であった。したがって、より長い領域にわたり、成長ホルモンプロモーターの塩基配列を決定し、比較することによって、プロモーター領域での進化の関係が明らかになると考えられた。

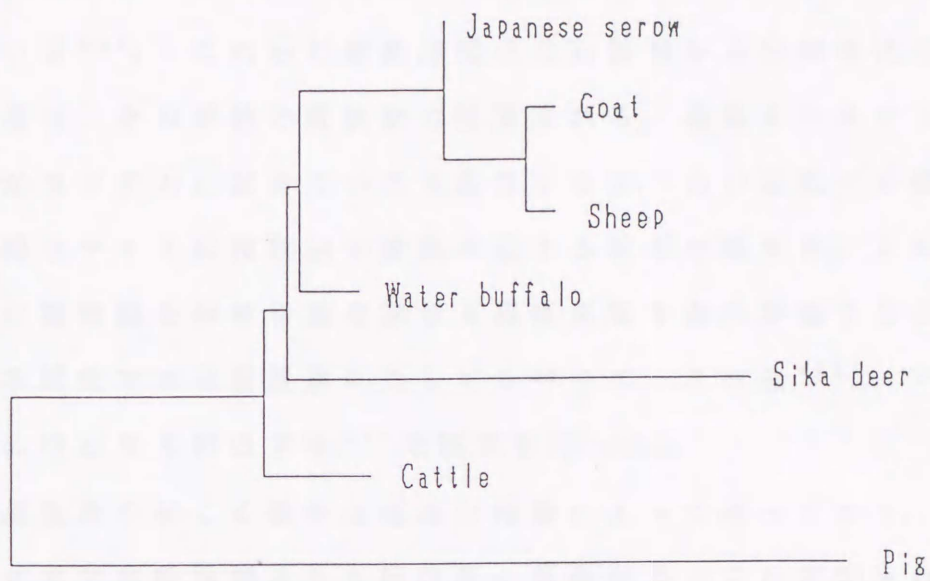


Fig. 14. A phylogenetic tree based on the growth hormone promoter regions.

第4節 塩基およびアミノ酸置換速度の比較

塩基およびアミノ酸配列の置換速度は遺伝子の種類によって異なっている⁵⁰⁾。これらの置換速度は化石資料から分岐年代の明かな種を選び、その年数と置換数で計算される。塩基またはアミノ酸の置換がランダムに起きていると仮定すると、古い年代に分岐した種では同じサイトに複数回の置換の起きる確率が高まる。このため、単純に置換数を分岐年数で割ると置換速度を過小評価することになる。本研究では塩基置換に対して6パラメーター法²⁴⁾、アミノ酸配列に対して木村の方法³⁷⁾で補正を行った。

塩基置換の起こる確率は塩基の種類によって違っており、ミトコンドリアでは転換型よりも転移型の置換が多いことが知られている。このため転移型と転換型で異なったパラメーターを与え、塩基置換数の補正が行われる³⁶⁾。6パラメーター法はこの方法を拡大したもので、さらに6つのパラメーターを用いて計算するものである。

アミノ酸配列に対してはあるサイトで置換の起こる確率がポアソン分布によって与えられることから計算する木村の方法³⁷⁾を用いている。

化石資料からの推定分岐年代は、ヤギとヒツジの500万年前、ウシ亜科とヤギ亜科の2000万年前、ウシ亜目とブタ亜目の6000万年前を用いている^{34, 52)}。

Table 19 にシトクロム b と κ -カゼインの塩基置換速度とアミノ酸置換速度の推定値を示した。 κ -カゼイン遺伝子の塩基置換速度は $1.9 - 2.6 \times 10^{-9}/\text{site}/\text{year}$ で比較的一定の値を示した。またアミノ酸配列においても $4.6 - 5.6 \times 10^{-9}/\text{site}/\text{year}$ と一定の値を示した。一方、シトクロム b 遺伝子についてヤギとヒツジの分岐年代か

ら推測された値は $11.3 \times 10^{-9} / \text{site/year}$ と κ -カゼイン遺伝子の4倍以上の速さを示したものの、より古い年代で急速に低下し、ウシ、ブタの分岐年代から推測された値は $1/9$ となっている。この傾向はアミノ酸配列においても同様で、値は $1/4$ に低下している。

塩基およびアミノ酸置換速度の変化は実際の変異速度が変化したのではなく、同じサイトに変異の起こる多重置換現象によるものである。本研究ではこの多重置換現象に対してそれぞれ6パラメータ法および木村の方法で補正を行っている。しかし、Table 19の結果はこの補正で足りないほど多重置換が起きていることを示している。

塩基置換の飽和現象のため、ミトコンドリア遺伝子を用いた分岐年代の推定は500-1000万年前を境に信頼度が急激に低下する^{9, 10)}。Adachiら¹¹⁾はアミノ酸配列を用いることによって飽和現象をある程度回避できるとしているが、本研究の結果はアミノ酸配列においても2000万年前の時点で影響が現れていることを示している。

Table 19. Rates of substitutions for mature κ -casein(κ -CN) and cytochrome b(Cyt.b)
 ($\times 10^{-9}$ /site/year)

	Divergence time(My ^r)*	Nucleotides		Amino acids	
		κ -CN	Cyt.b	κ -CN	Cyt.b
Cattle/Pig	60	2.0(1.7)	1.8(1.6)	5.6(3.8)	0.83(0.78)
Cattle/Sheep,Goat	20	1.9(1.8)	4.1(3.8)	4.6(4.1)	1.5 (1.5)
Sheep/Goat	5	2.6(2.5)	11.3(11.0)	4.9(4.7)	3.9 (3.8)

*, Most probable year from fossil records³⁴⁾

Date are corrected by the 6-parameter method²⁴⁾ for nucleotide substitution
 and Kimura's method³⁷⁾ for amino acid replacements.

Numbers in parenthes are the noncorrected rates.

第5節 分子進化から推定される偶蹄目ウシ亜目の系統樹

第1章の結果はシトクロム b 遺伝子が分岐年代の近い種の系統解析に適していることを示している。第2章の結果は κ -カゼイン遺伝子がより古い年代の系統解析に適していることを示している。これは第4節で述べた塩基置換速度の違いが原因として考えられる。Table 19の結果にみられるように、 κ -カゼイン遺伝子は6000万年前まで置換速度が大きく変化せず、ほぼ一定であると考えられる。そのため、ウシ亜目全体を通じた分岐年代の推定には κ -カゼイン遺伝子の系統図が適していると思われ、最終的な系統樹の全体的な枝の長さについては κ -カゼイン遺伝子のものを用いた (Fig. 15)。

ジャワマメジカは κ -カゼイン系統樹、シトクロム b 系統樹ともブタから最初に分岐し、その分岐は高いブーツストラップ値で支持されている。また形態からの分類もこの位置を支持している¹⁶⁾。

ニホンジカの位置について κ -カゼイン遺伝子とシトクロム b 遺伝子は見解が分かれている。しかし、シトクロム b 遺伝子の系統樹の枝のブーツストラップ値は低く、信頼度は高くない。また、ウシ亜目の分化は2300-2800万年以後⁴¹⁾急激に起こったと考えられ、この時期には始まっているミトコンドリア遺伝子の飽和現象の影響がニホンジカの位置の混乱を引き起こしているものと考えられた。成長ホルモンプロモーター領域の系統樹は明確な結果を示さなかったが、塩基配列はニホンジカの分離を示唆していた。そこで、ニホンジカについてはブーツストラップ値の高い κ -カゼイン系統樹の位置を採用し、ウシ科クラスターの外側とした。

ウシとスイギュウのクラスターは全ての系統樹で支持されている。サイガはヤギ亜科のなかで最も異質な種と言われており、塩基配

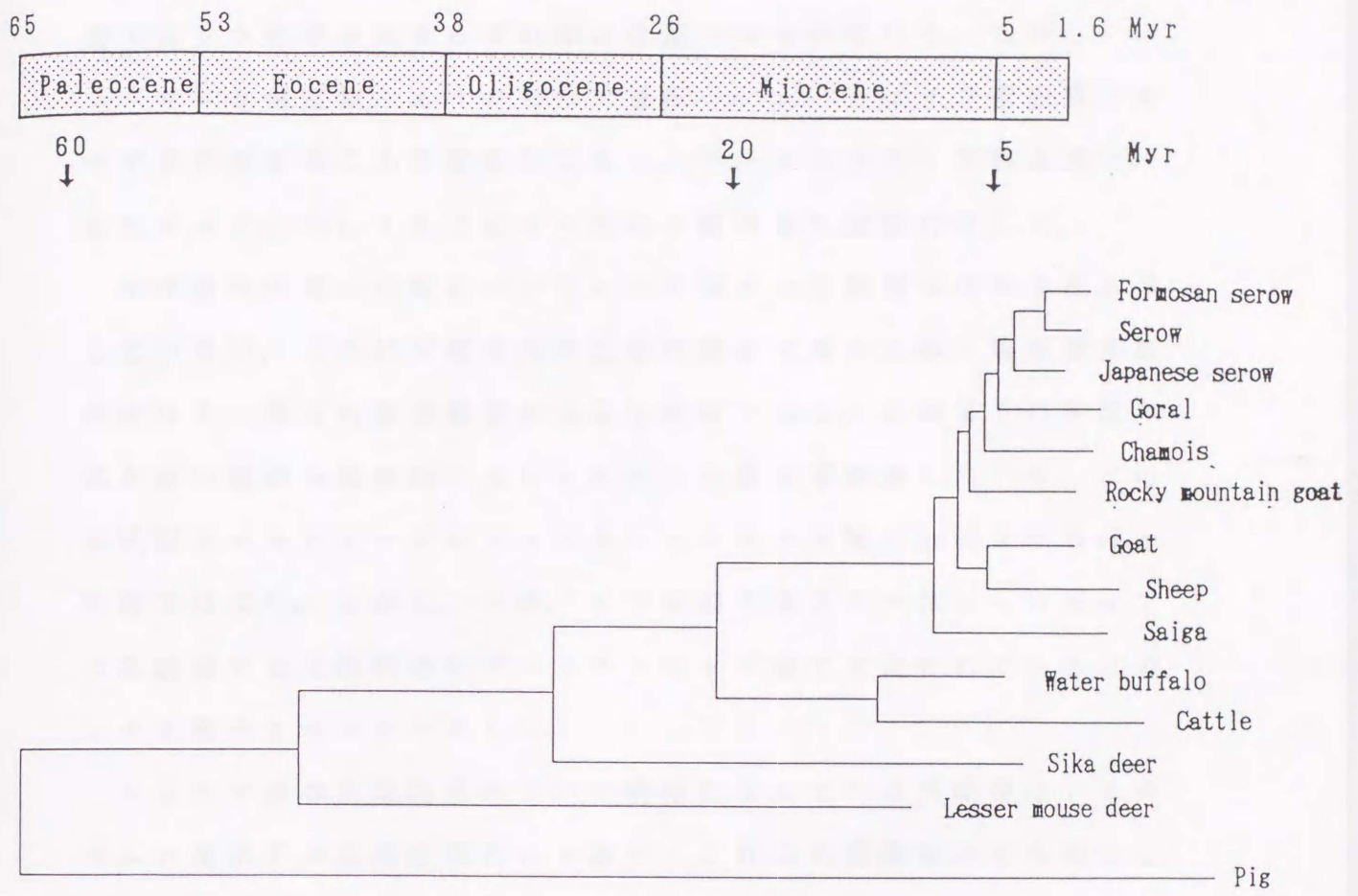


Fig. 15. A phylogenetic tree of the Ruminant inferred from the present study.

列データもそれを示している。シトクロム b 遺伝子の塩基配列系統樹ではウシ科クラスターの外部に位置づけられている。しかし、シトクロム b 蛋白質, κ -カゼイン遺伝子, κ -カゼイン蛋白質ともヤギ亜科とすることを支持しており, ブーツストラップ値も高い。したがって, Fig. 15 ではヤギ亜科の最外部に位置付けした。

ヤギ亜科内部の分岐について κ -カゼイン系統樹は何の情報も示していない。これは分岐年代が比較的最近であるため, 塩基置換数が少なく, 得られる情報量が少ないためである。このように分岐年代が近い種の系統解析にはシトクロム b 遺伝子が適している。この系統樹でヤギとヒツジのクラスターとシャモア族の分岐はそれほど明確ではない。しかし, ヤギ, ヒツジのクラスターは κ -カゼインの系統樹でも比較的高いブーツストラップ値で支持されているため, この 2 種をクラスターとした。

シャモア族の系統関係について明確に示している系統樹はシトクロム b 遺伝子の塩基配列だけであり, これらの系統を示すものとしてこの系統樹を採用した。この系統樹によればアメリカに生息するシロイワヤギが最初に分化し, 次にヨーロッパのシャモア, 次にアジア中南部のゴールと地理的關係とも一致している。3 種のカモシカ属は本研究に用いた種の中で最後に分化した種と考えられる。

これらを総合して作成した系統樹を Fig. 15 に示した。この系統樹は 3 種のカモシカ属の系統関係を除き, 形態からの分類とはほぼ一致していた。しかし, 分子進化の結果は 3 種のカモシカ属の關係について新たな系統関係を提示するものであり, その他のヤギ亜科の動物についても相互の分岐関係を明示することが可能となった。

第 6 節 第 4 章の要約

シトクロム b 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列, κ -カゼイン遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列, 成長ホルモン遺伝子プロモーター領域の塩基配列から, ODENプログラムを用いてそれぞれの近隣結合法系統樹を作成した。

ブーティストラップ法による分岐の評価と塩基およびアミノ酸置換速度の解析から, 分岐年代が最近の場合はシトクロム b 遺伝子, 分岐年代が古い場合は κ -カゼイン遺伝子が系統解析に適していることが明かとなった。

これらの系統樹から総合的に作成したウシ亜目の推定系統樹はカモシカ属内の 3 種の間を除いてほぼ形態分類と一致していた。

カモシカ属は形態から考えられていたようにタイワンカモシカとニホンカモシカが近縁なのではなく, タイワンカモシカはシーローにより近い種であることが明かとなった。

総 括

家畜として使用されている動物種の大部分は偶蹄目に属し、特にウシ、スイギュウ、ヤギ、ヒツジ等、ウシ亜目の動物が多い。ウシ亜目は反芻亜目とも呼ばれるように摂取した飼料を反芻し、その利用性を高めている。この食性はウシ亜目が草食動物として進化した結果を示しており、始新世以後における気候変動と草原の拡大による適応であると考えられる。この時期にウシ亜目の動物種は急激な分化を遂げており、現在の地球において最も発展した哺乳類グループの1つである。

これらの種は、進化時間から見て非常に短期間に分化、拡散してきているため、人間にとって重要な動物グループであるにも関わらず、相互の系統関係が明らかにされていない。このような系統関係を解析するために分子進化解析の手法は強力な手段となる。分子進化解析は「分子時計」の考えに立脚しており、相互の系統関係だけでなく、分岐年代を決定することも可能である。しかし、ミトコンドリアDNAの塩基配列から提出されたウシ亜目の分子系統樹は混乱しており、特にウシ科とシカ科の扱いで見解が分かれている。

この混乱は分子進化解析に用いられてきた遺伝子の種類がミトコンドリアに存在する遺伝子に片寄っており、核遺伝子の情報が少ないことに原因の1つがあると考えられた。本研究では分岐時期が異なると予想される14種の偶蹄目動物（ブタ、ジャワマメジカ、ニホンジカ、ウシ、スイギュウ、ヒツジ、ヤギ、サイガ、シロイワヤギ、シャモア、ゴールル、ニホンカモシカ、タイワンカモシカ、シーロー）を対象に、ミトコンドリア遺伝子としてシトクロムb遺伝子、

常染色体の存在する核遺伝子として κ -カゼイン遺伝子を選び、これらの塩基配列を決定し、系統樹を作成した。また一部の動物について成長ホルモン遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を決定し、比較を行った。

第1章ではシトクロム b 遺伝子の塩基配列の決定を行い、塩基配列の特徴を検討した。

シトクロム b 遺伝子は近縁種間でもかなりの塩基置換があり、塩基配列は明確に種の違いを示していた。また、遺伝的距離の離れていると思われる種の間で塩基置換数が多く、近縁種間では置換数が少なく、「分子時計」が成立しているものと考えられた。しかし、これらの塩基置換はコドンの第3部位に偏在しており、分子進化の解析に影響を与えていると思われた。

この章ではジャワマメジカ、ニホンジカ、スイギュウ、サイガ、シロイワヤギ、シャモア、ゴールル、ニホンカモシカ、タイワンカモシカ、シーローのシトクロム b 遺伝子を実験的に決定し、塩基配列をDNAデータベース (DDBJ) に登録した。

第2章では κ -カゼイン遺伝子の塩基配列の決定を行い、塩基配列の特徴を検討した。通常、蛋白質をコードしている遺伝子の塩基配列決定は mRNA から作成した cDNA について行われることが多い。またミトコンドリア遺伝子のようにイントロンを含まない遺伝子はPCR産物から決定することもできる。しかし、 κ -カゼイン遺伝子は5つのエクソンにコードされ、全遺伝子をPCR増幅することは不可能である。mRNA についても新鮮な組織を採取する必要がある。本研究で対象とした種から κ -カゼインの mRNA を取ることは困難である。そこで本研究では、蛋白質をコードしてい

るエキソン II, III, IV の 3 つのエキソンそれぞれについて PCR 増幅を行い, ダイレクトシーケンシングで塩基配列を決定した。

κ -カゼイン遺伝子の塩基配列においても「分子時計」が成り立ち, 形態分類から考えられている種の遺伝的距離と塩基置換数のあいだに相関関係が認められた。コドン部位別の特徴ではシトクロム b 遺伝子と異なり, 第 3 部位への片寄り認められなかった。

この章ではジャワマメジカ, ニホンジカ, スイギュウ, ヤギ, サイガ, シロイワヤギ, シャモア, ゴーラル, ニホンカモシカ, タイワンカモシカ, シーローの κ -カゼイン遺伝子を新規に決定し, 塩基配列を DNA データベース (DDBJ) に登録した。

第 3 章では成長ホルモン遺伝子プロモーター領域の塩基配列の決定を行った。新規に決定したニホンジカ, スイギュウ, ニホンカモシカの塩基配列は DNA データベース (DDBJ) に登録した。

第 4 章では 1, 2, 3 章で決定した塩基配列の分子系統樹を作成し, ブーツストラップ法でその系統樹の信頼性を検討した。シトクロム b 遺伝子の分子系統樹は分岐年代の新しい種間の系統解析に適しており, 3 種のカモシカ属の系統関係を明確に示すことができた。この系統樹によれば, ニホンカモシカの亜種と考えられていたタイワンカモシカは亜種ではなく, シーローの近縁種で, ニホンカモシカはこの 2 種よりも前の年代に分岐をしていた。しかし, シトクロム b 遺伝子系統樹の信頼度は古い分岐年代の解析で低く, ニホンジカの位置について明示することはできなかった。これはシトクロム b 遺伝子における塩基置換の飽和現象によるものであり, アミノ酸配列系統樹を用いても, 解決できなかった。

κ -カゼイン遺伝子は偶蹄目の進化史で塩基置換速度の変化を起

こさず、比較的古い年代の分岐を解析することに適していると考えられた。この系統樹によれば、ニホンジカはウシ科のグループの前に分化し、化石種の形態から推定されている結果と一致していた。しかし、塩基置換数が少ないため、 κ -カゼイン遺伝子系統樹はヤギ亜科以下の系統を明確に示すことができなかった。

これらの結果は、系統樹作成に用いる遺伝子の種類によって解析に適する年代に違いのあることを示している。そこで、各系統樹の枝をブーツストラップ値から総合的に検討し、研究に用いた14種の動物の推定系統樹を作成した。この系統樹は形態分類とはほぼ一致するものの、カモシカ属3種については形態分類とは別の系統関係を示すものであった。

本研究で行った κ -カゼイン遺伝子の塩基配列決定方法は、染色体上にエキソンとして散在する遺伝子の蛋白質翻訳領域をダイレクトに決定した最初の報告である。毛根試料から直接に核遺伝子の配列を決定することは多くの種からの配列決定を容易にし、分子進化の研究方法として今後さらに利用できるものと思われる。

資料： 塩基配列と推定アミノ酸配列

1. シトクロム b 遺伝子

本研究で決定したシトクロム b 遺伝子の塩基配列と推定アミノ酸配列を示す。

ATG ACT AAC ATT CGA AAG TCC CAC CCA CTA ATA AAA ATT GTA AAC AAT GCA TTC ATC GAC	60
M T N I R K S H P L M K I V N N A F I D	
CTT CCA GCC CCA TCA AAC ATT TCA TCA TGA TGA AAT TTC GGT TCC CTC CTG GGA ATC TGC	120
L P A P S N I S S W W N F G S L L G I C	
CTA ATC CTA CAA ATC CTC ACA GGC CTA TTC CTA GCA ATA CAC TAC ACA TCC GAC ACA ACA	180
L I L Q I L T G L F L A M H Y T S D T T	
ACA GCA TTC TCC TCT GTT ACC CAT ATC TGC CGA GAC GTG AAC TAC GGC TGA ATC ATC CGA	240
T A F S S V T H I C R D V N Y G W I I R	
TAC ATA CAC GCA AAC GGA GCT TCA ATG TTT TTT ATC TGC TTA TAT ATG CAC GTA GGA CGA	300
Y M H A N G A S M F F I C L Y M H V G R	
GGC TTA TAT TAC GGG TCT TAC ACT TTT CTA GAA ACA TGA AAT ATT GGA GTA ATC CTT CTG	360
G L Y Y G S Y T F L E T W N I G V I L L	
CTC ACA GTA ATA GCC ACA GCA TTT ATA GGA TAC GTC CTA CCA TGA GGA CAA ATA TCA TTC	420
L T V M A T A F M G Y V L P W G Q M S F	
TGA GGA GCA ACA GTC ATC ACC AAC CTC TTA TCA GCA ATC CCA TAC ATC GGC ACA AAT TTA	480
W G A T V I T N L L S A I P Y I G T N L	
GTC GAA TGA ATC TGA GGC GGA TTC TCA GTA GAC AAA GCA ACC CTT ACC CGA TTC TTC GCT	540
V E W I W G G F S V D K A T L T R F F A	
TTC CAT TTT ATC CTT CCA TTT ATC ATC ATA GCA ATT GCC ATA GTC CAC CTA CTA TTC CTC	600
F H F I L P F I I M A I A M V H L L F L	

Fig.S1. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of bovine cytochrome b gene (1140bp).

The nucleotide sequence is identical to the published sequence.

CAC GAA ACA GGC TCC AAC AAC CCA ACA GGA ATT TCC TCA GAC GTA GAC AAA ATC CCA TTC 660
H E T G S N N P T G I S S D V D K I P F

CAC CCC TAC TAT ACC ATT AAG GAC ATC TTA GGG GCC CTC TTA CTA ATT CTA GCT CTA ATA 720
H P Y Y T I K D I L G A L L L I L A L M

CTA CTA GTA CTA TTC GCA CCC GAC CTC CTC GGA GAC CCA GAT AAC TAC ACC CCA GCC AAT 780
L L V L F A P D L L G D P D N Y T P A N

CCA CTC AAC ACA CCC CCT CAC ATC AAA CCC GAG TGA TAC TTC TTA TTT GCA TAC GCA ATC 840
P L N T P P H I K P E W Y F L F A Y A I

TTA CGA TCA ATC CCC AAC AAA CTA GGA GGA GTA CTA GCC CTA GCC TTC TCT ATC CTA ATT 900
L R S I P N K L G G V L A L A F S I L I

CTT GCT CTA ATC CCC CTA CTA CAC ACC TCC AAA CAA CGA AGC ATA ATA TTC CGA CCA CTC 960
L A L I P L L H T S K Q R S M M F R P L

AGC CAA TGC CTA TTC TGA GCC CTA GTA GCA GAC CTA TTG ACA CTC ACA TGA ATT GGA GGA 1020
S Q C L F W A L V A D L L T L T W I G G

CAA CCA GTC GAA CAC CCA TAT ATC ACC ATC GGA CAA CTA GCA TCT GTC CTA TAC TTT CTC 1080
Q P V E H P Y I T I G Q L A S V L Y F L

CTC ATC CTA GTG CTA ATA CCA ACG GCC GGC ACA ATC GAA AAC AAA TTA CTA AAA TGA AGA 1140
L I L V L M P T A G T I E N K L L K W *

Fig.S1. Continued

ATG ACC AAC ATC CGA AAA TCC CAC CCA CTA ATA AAA ATT CTA AAC AAT GCA TTC ATT GAC 60
 M T N I R K S H P L M K I L N N A F I D

CTC CCT GCT CCA TCA AAC ATC TCA TCA TGA TGA AAC TTT GGC TCT CTC CTA GGC ATC TGA 120
 L P A P S N I S S W W N F G S L L G I W

CTA ATC CTG CAA ATC CTC ACC GGC CTA TTC CTA GCA ATA CAC TAC ACA TCC GAC ACA ACA 180
 L I L Q I L T G L F L A M H Y T S D T T

ACA GCA TTC TCC TCC GTC GCC CAC ATC TGC CGG GAC GTG AAC TAT GGA TGA ATT ATT CGA 240
 T A F S S V A H I C R D V N Y G W I I R

TAC ATA CAC GCA AAC GGA GCT TCA ATA TTT TTC ATC TGC TTA TAT ATA CAC GTA GGA CGA 300
 Y M H A N G A S M F F I C L Y M H V G R

GGC ATA TAC TAC GGA TCA TAT ACC TTT CTA GAA ACA TGA AAC ATC GGA GTA ATC CTA CTA 360
 G M Y Y G S Y T F L E T W N I G V I L L

TTC GCA GTA ATA GCC ACA GCA TTT ATA GGA TAC GTA CTG CCA TGA GGA CAA ATA TCA TTC 420
 F A V M A T A F M G Y V L P W G Q M S F

TGA GGG GCA ACA GTC ATC ACC AAC CTT CTC TCA GCA ATC CCA TAC ATT GGT ACA AGT CTG 480
 W G A T V I T N L L S A I P Y I G T S L

GTT GAG TGA ATT TGA GGG GGA TTC TCA GTA GAC AAA GCA ACC CTC ACC CGA TTC TTC GCA 540
 V E W I W G G F S V D K A T L T R F F A

TTT CAC TTC ATC CTC CCA TTC ATT ATC GCA GCA CTT GCA ATA GTC CAC CTA TTA TTT CTC 600
 F H F I L P F I I A A L A M V H L L F L

Fig.S2. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of water buffalo cytochrome b gene (1140bp).
 The nucleotide sequence has been submitted to the DDBJ with accession number D32193.

CAC GAA ACA GGA TCC AAC AAC CCA ACA GGA ATC TCA TCA GAC ACA GAC AAA ATC CCA TTC 660
H E T G S N N P T G I S S D T D K I P F

CAC CCC TAT TAC ACC ATT AAA GAC ATC CTA GGC GCC CTA CTA TTA ATC CTA GCC CTA ATA 720
H P Y Y T I K D I L G A L L L I L A L M

CTA TTA GTA CTA TTC GCA CCC GAC CTC CTC GGG GAC CCA GAC AAC TAC ACC CCA GCA AAC 780
L L V L F A P D L L G D P D N Y T P A N

CCA CTC AAC ACA CCT CCC CAC ATC AAG CCT GAA TGG TAC TTC CTA TTC GCA TAC GCA ATC 840
P L N T P P H I K P E W Y F L F A Y A I

TTA CGA TCA ATT CCT AAC AAA CTA GGA GGG GTT CTA GCC CTA GTT CTC TCT ATC CTA ATC 900
L R S I P N K L G G V L A L V L S I L I

CTC ATT CTC ATG CCC CTG CTA CAT ACA TCC AAA CAA CGA AGT ATG ATG TTC CGG CCA TTC 960
L I L M P L L H T S K Q R S M M F R P F

AGC CAA TGC CTA TTC TGA ATT CTA GTA GCA AAC CTG CTA ACA CTC ACA TGG ATT GGA GGA 1020
S Q C L F W I L V A N L L T L T W I G G

CAG CCA GTC GAA CAC CCA TAT ATT ATC ATT GGA CAA CTA GCA TCT ATC ACA TAC TTC CTC 1080
Q P V E H P Y I I I G Q L A S I T Y F L

CTC ATC CTA GTG CTA ATA CCA ACG GCC AGC ATA ATC GAA AAT AAT CTC TTA AAA TGA AGA 1140
L I L V L M P T A S M I E N N L L K W *

Fig.S2. Continued

ATG ATT AAC ATT CGA AAA ACT CAC CCA CTA ATA AAA ATT GTA AAT AAT GCA TTT ATT GAT 60
 M I N I R K T H P L M K I V N N A F I D

CTC CCA ACC CCA TCA AAC ATC TCA TCA TGA TGA AAC TTC GGC TCC CTC CTG GGC ATC TGC 120
 L P T P S N I S S W W N F G S L L G I C

CTA ATT CTA CAA ATC CTA ACA GGC CTA TTC CTA GCA ATA CAC TAT ACA TCC GAC ACA ACA 180
 L I L Q I L T G L F L A M H Y T S D T T

ACA GCA TTC TCT TCT GTA ACA CAC ATC TGC CGA GAT GTA AAC TAT GGC TGA ATT ATC CGA 240
 T A F S S V T H I C R D V N Y G W I I R

TAT ATA CAC GCA AAC GGG GCG TCG ATA TTC TTT ATC TGC CTA TTC ATA CAC GTA GGA CGA 300
 Y M H A N G A S M F F I C L F M H V G R

GGC CTA TAC TAT GGA TCA TAC ACT TTC TTA GAA ACA TGA AAC ATC GGA GTA ATC CTC CTA 360
 G L Y Y G S Y T F L E T W N I G V I L L

CTC ACA ACA ATA GCC ACA GCA TTC ATA GGC TAT GTC CTA CCA TGA GGA CAA ATA TCA TTC 420
 L T T M A T A F M G Y V L P W G Q M S F

TGA GGG GCT ACA GTC ATT ACT AAC CTC CTC TCA GCA ATC CCA TAT ATT GGC ACA AAC TTA 480
 W G A T V I T N L L S A I P Y I G T N L

GTA GAA TGA ATC TGA GGA GGA TTC TCC GTA GAC AAA GCC ACC CTC ACC CGA TTC TTT GCC 540
 V E W I W G G F S V D K A T L T R F F A

TTC CAT TTC ATT CTC CCA TTC ATC ATC ACA GCC CTC GCC ATA GTG CAC CTA CTT TTC CTC 600
 F H F I L P F I I T A L A M V H L L F L

Fig.S3. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of Japanese serow cytochrome b gene (1140bp).
 The nucleotide sequence has been submitted to the DDBJ with accession number D32191.

CAC GAA ACA GGA TCC AAC AAC CCC ACA GGA ATC TCA TCA GAC ACA GAC AAA ATC CCA TTQ 660
H E T G S N N P T G I S S D T D K I P F

CAC CCC TAC TAC ACA ATC AAA GAT ATC CTA GGC ATC GTG CTA CTA ATC CTC ACC CTC ATA 720
H P Y Y T I K D I L G I V L L I L T L M

CTA CTA GTA CTG TTC ACA CCC GAC CTA CTC GGA GAC CCA GAC AAC TAC ACT CCA GCA AAC 780
L L V L F T P D L L G D P D N Y T P A N

CCA CTC AAC ACA CCC CCT CAC ATC AAG CCC GAG TGA TAC TTC CTA TTT GCA TAC GCA ATC 840
P L N T P P H I K P E W Y F L F A Y A I

CTA CGA TCA ATC CCC AAC AAA CTA GGC GGA GTT TTA GCC CTA GTC CTC TCA ATT CTA ATC 900
L R S I P N K L G G V L A L V L S I L I

CTA GCA CTC GTA CCC TTC CTC CAC ACA TCC AAA CAA CGA AGC ATA ATA TTC CGA CCA ATC 960
L A L V P F L H T S K Q R S M M F R P I

AGC CAA TGT ATA TTC TGA ATC CTA GTA GCA GAT TTA CTT ACA CTC ACA TGA ATT GGA GGA 1020
S Q C M F W I L V A D L L T L T W I G G

CAG CCA GTC GAA CAC CCC TAC ATT ATT ATT GGA CAA CTA GCA TCC ATC ATA TAC TTC CTA 1080
Q P V E H P Y I I I G Q L A S I M Y F L

ATC ATC CTA GTA CTG ATG CCA GTA GCT AGT ACC ATC GAA AAC AAC CTC CTA AAA TGA AGA 1140
I I L V L M P V A S T I E N N L L K W *

Fig.S3. Continued

ATG ACT AAT ATC CGA AAA ACC CAC CCA TTA ATA AAA ATT GTA AAC AAC GCA TTC ATT GAC 60
 M T N I R K T H P L M K I V N N A F I D

CTC CCC GCC CCA TCA AAT ATT TCA TCC TGA TGA AAT TTC GGC TCC CTA CTA GGA ATT TGT 120
 L P A P S N I S S W W N F G S L L G I C

CTA ATC CTA CAA ATC CTT ACA GGC CTA TTC CTA GCA ATA CAC TAT ACA TCT GAC ACA ATA 180
 L I L Q I L T G L F L A M H Y T S D T M

ACA GCA TTT TCC TCT GTC ACC CAT ATC TGT CGA GAT GTC AAC TAT GGT TGA ATT ATC CGA 240
 T A F S S V T H I C R D V N Y G W I I R

TAC ATA CAC GCA AAC GGG GCA TCA ATA TTT TTC ATC TGC CTA TTC ATA CAT GTA GGA CGA 300
 Y M H A N G A S M F F I C L F M H V G R

GGC CTG TAC TAC GGA TCA TAT ACT TTT CTA GAG ACA TGA AAC ATC GGA GTA ATT CTC CTA 360
 G L Y Y G S Y T F L E T W N I G V I L L

TTT ACA GTT ATA GCC ACA GCA TTC GTA GGA TAT GTC CTA CCA TGA GGA CAA ATA TCA TTC 420
 F T V M A T A F V G Y V L P W G Q M S F

TGA GGA GCA ACA GTC ATT ACC AAC CTC CTC TCA GCA ATT CCA TAT ATT GGC ACA AAC CTA 480
 W G A T V I T N L L S A I P Y I G T N L

GTC GAA TGG ATC TGA GGG GGC TTC TCA GTA GAT AAA GCA ACC CTA ACC CGA TTT TTC GCT 540
 V E W I W G G F S V D K A T L T R F F A

TTC CAC TTT ATT CTT CCA TTT ATC ATC GCA GCA CTT GCT ATA GTA CAC TTA CTC TTC CTT 600
 F H F I L P F I I A A L A M V H L L F L

Fig.S4. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of sika deer cytochrome b gene (1140bp).
 The nucleotide sequence has been submitted to the DDBJ with accession number D32192.

CAC GAG ACA GGA TCC AAC AAC CCA ACA GGA ATC CCA TCG GAC GCA GAC AAA ATC CCC TTC 660
H E T G S N N P T G I P S D A D K I P F

CAT CCT TAC TAC ACC ATT AAA GAT ATC TTA GGC ATC TTA CTT CTA GTA CTC TTC CTA ATA 720
H P Y Y T I K D I L G I L L L V L F L M

TTA CTA GTA TTA TTC GCA CCA GAC CTG CTT GGA GAT CCA GAC AAC TAT ACC CCA GCA AAT 780
L L V L F A P D L L G D P D N Y T P A N

CCA CTC AAC ACA CCC CCT CAC ATC AAA CCT GAA TGA TAC TTC CTA TTT GCA TAC GCA ATC 840
P L N T P P H I K P E W Y F L F A Y A I

CTA CGA TCA ATT CCC AAC AAA CTA GGA GGA GTC TTA GCC CTA GTC TCA TCC ATC CTA ATC 900
L R S I P N K L G G V L A L V S S I L I

TTG ATT CTC ATG CCT CTT CTT CAC ACG TCC AAA CAA CGC AGC ATG ATA TTC CGA CCA TTC 960
L I L M P L L H T S K Q R S M M F R P F

AGC CAA TGC CTA TTC TGA ATC TTA GTA GCA GAC CTA CTA ACA CTC ACA TGA ATT GGA GGA 1020
S Q C L F W I L V A D L L T L T W I G G

CAA CCA GTT GAA TAT CCC TTT ATT ATT ATT GGA CAA CTA GCA TCT GTT CTA TAC TTT TTC 1080
Q P V E Y P F I I I G Q L A S V L Y F F

ATT ATC CTA GTC CTT ATA CCG ATT ACC AGC ACA ATC GAA AAT AAC CTC CTA AAA TGA AGA 1140
I I L V L M P I T S T I E N N L L K W *

Fig.S4. Continued

ATG ATC AAC ATA CGA AAA TCA CAC CCA CTA ATA AAA ATT GTC AAC AAC GCA TTC ATT GAT	60
M I N M R K S H P L M K I V N N A F I D	
CTC CCA GCC CCA TCA AAT ATC TCA TCA TGA TGA AAC TTC GGC TCT CTC TTA GGC ATC TGC	120
L P A P S N I S S W W N F G S L L G I C	
CTC CTC CTA CAA ATT CTA ACA GGC CTA TTC CTA GCA ATA CAC TAC ACA TCA GAC ACA TCA	180
L L L Q I L T G L F L A M H Y T S D T S	
ACA GCC TTC TCC TCA GTA ACC CAC ATC TGC CGA GAC GTA AAC TAC GGA TGA ATC ATT CGT	240
T A F S S V T H I C R D V N Y G W I I R	
TAT ATA CAC GCA AAC GGA GCC TCC ATA TTC TTT ATT TGC CTG TAC ATG CAT GTA GGA CGA	300
Y M H A N G A S M F F I C L Y M H V G R	
GGC CTA TAC TAC GGA TCC TAC ACC TTC CTA GAA ACC TGA AAC ATT GGA GTG ATT CTC CTA	360
G L Y Y G S Y T F L E T W N I G V I L L	
CTC ACA GTG ATA GCC ACA GCA TTC ATA GGG TAC GTT CTA CCC TGA GGA CAG ATA TCT TTC	420
L T V M A T A F M G Y V L P W G Q M S F	
TGA GGA GCC ACA GTC ATC ACC AAC CTC TTA TCA GCT ATC CCA TAC ATT GGC ACA GAC TTG	480
W G A T V I T N L L S A I P Y I G T D L	
GTC GAA TGA ATC TGA GGT GGT TTT TCA GTA GAC AAA GCA ACC CTT ACA CGA TTC TTT GCC	540
V E W I W G G F S V D K A T L T R F F A	
TTC CAC TTT ATC CTT CCA TTT ATC ATT ACA GCC CTA GTC CTA GTC CAC CTT TTA TTT CTC	600
F H F I L P F I I T A L V L V H L L F L	

Fig.S5. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of lesser mouse deer cytochrome b gene (1140bp).
The nucleotide sequence has been submitted to the DDBJ with accession number D32189.

CAC GAA ACA GGA TCT AAT AAC CCC ACA GGA ATC CCC TCA GAC GCA GAC AAA ATC CCC TTC 660
H E T G S N N P T G I P S D A D K I P F

CAC CCA TAC TAC ACT ATT AAA GAC ATT CTA GGG GTT CTA GCC CTA TTT CTA GCC CTA ATA 720
H P Y Y T I K D I L G V L A L F L A L M

CTA CTA GTC CTA TTC TCA CCC GAC CTA CTT GGA GAC CCA GAT AAC TAC ACC CCC GCC AAC 780
L L V L F S P D L L G D P D N Y T P A N

CCC CTT AAC ACA CCA CCC CAT ATC AAA CCC GAA TGA TAT TTC TTA TTT GCA TAC GCA ATT 840
P L N T P P H I K P E W Y F L F A Y A I

CTT CGG TCA ATC CCC AAT AAA CTA GGA GGA GTC CTA GCA CTC ATC GCA TCA ATT TTA ATC 900
L R S I P N K L G G V L A L I A S I L I

CTA CTA CTC ATG CCC CTT CTC CAC ACA TCT AAA CAA CGA AGC ATA ATA TTC CGA CCA ATC 960
L L L M P L L H T S K Q R S M M F R P I

AGC CAA TGC CTG TTC TGA CTG CTA GCA GCA GAC CTA TTA ACC CTT ACA TGA ATT GGA GGT 1020
S Q C L F W L L A A D L L T L T W I G G

CAA CCT GTA GAA CAC CCC TAT ATT GTA ATT GGA CAA CTC GCA TCA ATT TCA TAT TTC TCT 1080
Q P V E H P Y I V I G Q L A S I S Y F S

ATC ATC CTA GTA CTA ATG CCA GTA GCA GGA ATG ATC GAA AAC AAG CTT CTA AAA TGA AGA 1140
I I L V L M P V A G M I E N K L L K W *

Fig.S5. Continued

ATA CAC TAT ACA CCT GAC ACA ACA ACA GCA TTC TCC TCT GTA ACC CAC ATT TGC CGA GAC	60
M H Y T P D T T T A F S S V T H I C R D	
GTA AAC TAT GGC TGA ATT ATC CGA TAT ATA CAC GCA AAC GGG GCA TCA ATA TTT TTT ATC	120
V N Y G W I I R Y M H A N G A S M F F I	
TGC CTA TTT ATG CAT GTA GGA CGA GGC CTA TAT TAT GGA TCA TAT ACC TTC CTA GAA ACA	180
C L F M H V G R G L Y Y G S Y T F L E T	
TGA AAC ATC GGA GTA ATC CTC CTA TTT GCG ACA ATA GCC ACA GCA TTC ATA GGC TAT GTT	240
W N I G V I L L F A T M A T A F M G Y V	
TTA CCA TGA GGA CAA ATA TCA TTC TGA GGA GCA ACA GTT ATT ACC AAC CTC CTT TCA GCA	300
L P W G Q M S F W G A T V I T N L L S A	
ATT CCA TAT ATT GGC ACA AAC CTA GTC GAA TGA ATC TGA GGA GGA TTC TCA GTA GAC AAA	360
I P Y I G T N L V E W I W G G F S V D K	
GCT ACC CTC ACC CGA TTT TTC GCC TTT CAC TTT ATT TTC CCA TTC ATC ATC GCA GCC CTC	420
A T L T R F F A F H F I F P F I I A A L	
GCC ATA GTT CAC CTA CTC TTC CTC CAC GAA ACA GGA TCC AAC AAC CCC ACA GGA ATT CCA	480
A M V H L L F L H E T G S N N P T G I P	
TCG GAC ACA GAT AAA ATT CCC TTC CAC CCT TAT TAC ACC ATT AAA GAC ATC CTA GGT GCT	540
S D T D K I P F H P Y Y T I K D I L G A	
ATC CTA CTA ATC CTC ATC CTC ATG CTA CTA GTA CTA TTC ACG CCT GAC TTA CTC GGA GAC	600
I L L I L I L M L L V L F T P D L L G D	
CCA GAC AAC TAC ACC CCA GCA AAC CCA CTT AAC ACT CCC CCT CAC	645
P D N Y T P A N P L N T P P H	

Fig.S6. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of sheep cytochrome b gene (645bp).
Different nucleotides from the published sequence are underlined.

ATA CAC TAT ACA TCC GAC ACA ATA ACA GCA TTT CCC TCT GTA ACT CAC ATT TGT CGA GAT 60
 M H Y T S D T M T A F P S V T H I C R D

GTA AAT TAT GGC TGA ATC ATC CGA TAC ATA CAC GCA AAC GGA GCA TCA ATA TTC TTT ATC 120
 V N Y G W I I R Y M H A N G A S M F F I

TGC CTA TTC ATA CAT ATC GGA CGA GGT CTA TAT TAT GGA TCA TAT ACC TTT CTA GAA ACA 180
 C L F M H I G R G L Y Y G S Y T F L E T

TGA AAC ATT GGA GTA ATC CTC CTG CTC GCG ACA ATG GCC ACA GCA TTC ATA GGC TAT GTT 240
 W N I G V I L L L A T M A T A F M G Y V

TTA CCA TGA GGA CAA ATA TCA TTT TGA GGG GCA ACA GTC ATC ACT AAT CTT CTT TCA GCA 300
 L P W G Q M S F W G A T V I T N L L S A

ATC CCA TAT ATT GGC ACA AAC CTA GTC GAA TGA ATC TGA GGG GGA TTC TCA GTA GAC AAA 360
 I P Y I G T N L V E W I W G G F S V D K

GCC ACT CTC ACC CGA TTC TTC GCC TTC CAC TTT ATC CTC CCA TTC ATC ATC ACA GCC CTC 420
 A T L T R F F A F H F I L P F I I T A L

GCC ATA GTC CAC CTG CTC TTC CTC CAC GAA ACA GGA TCG AAC AAC CCC ACA GGA ATT CCA 480
 A M V H L L F L H E T G S N N P T G I P

TCA GAC ACA GAT AAA ATC CCA TTT CAC CCT TAC TAC ACC ATT AAA GAT ATC TTA GGC GCC 540
 S D T D K I P F H P Y Y T I K D I L G A

ATG CTA CTA ATT CTT GTT CTA ATA TTA CTA GTA CTA TTC ACA CCC GAC CTA CTC GGA GAC 600
 M L L I L V L M L L V L F T P D L L G D

CCA GAC AAC TAT ATC CCA GCA AAT CCA CTC AAT ACA CCC CCT CAC 645
 P D N Y I P A N P L N T P P H

Fig.S7. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of goat cytochrome b gene (645bp).
 Different nucleotides from the published sequence are underlined.

ATA CAC TAT ACA TCC GAC ACA ACG ACA GCA TTT TCT TCT GTA ACA CAC ATT TGC CGA GAT	60
M H Y T S D T T T A F S S V T H I C R D	
GTA AAC TAT GGC TGA ATT ATC CGA TAC ATA CAC GCA AAC GGA GCA TCA ATA TTT TTT ATC	120
V N Y G W I I R Y M H A N G A S M F F I	
TGC CTA TTC ATA CAC GTA GGA CGA GGC CTA TAC TAT GGA TCG CAC ACT TTC TTA GAA ACA	180
C L F M H V G R G L Y Y G S H T F L E T	
TGA AAC ATT GGA GTA ATT CTC CTA CTC ACA GCG ATA GCC ACA GCA TTC ATA GGC TAT GTC	240
W N I G V I L L L T A M A T A F M G Y V	
CTA CCG TGA GGA CAA ATA TCA TTC TGA GGG GGT ACA GTT ATT ACT AAC CTC CTC TCA GCA	300
L P W G Q M S F W G G T V I T N L L S A	
ATC CCA TAT ATT GGC ACA AAC CTA GTC GAA TGA ATC TGA GGA GGA TTC TCC GTA GAC AAA	360
I P Y I G T N L V E W I W G G F S V D K	
GCC ACC CTC ACC CGA TTT TTC GCC TTC CAC TTC ATC CTT CCA TTT ATC ATT ACA GCT CTC	420
A T L T R F F A F H F I L P F I I T A L	
GCC ATG GTA CAC CTA CTT TTC CTC CAC GAA ACA GGA TCC AAC AAT CCC ACA GGA ATC CCA	480
A M V H L L F L H E T G S N N P T G I P	
TCA GAC GCG GAC AAA ATC CCA TTT CAC CCC TAC TAC ACA ATC CAA GAT ATC CTA GGT GCC	540
S D A D K I P F H P Y Y T I Q D I L G A	
ATA CTA TTA ATT CTC ACC CTC ATT CTG CTA GTA CTG TTC ATA CCC GAC CTA CTC GGA GAC	600
M L L I L T L I L L V L F M P D L L G D	
CCA GAC AAC TAC ACC CCA GCA AAC CCA CTC AAT ACA CCC CCT CAC	645
P D N Y T P A N P L N T P P H	

Fig.S8. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of Formosan serow cytochrome b gene (645bp).

The nucleotide sequence has been submitted to the DDBJ with accession number D32194.

ATA CAC TAC ACA TCC GAT ACA ACG ACA GCA TGT TCT TCT GTA ACA CAC ATT TGC CGA GAC 60
 M H Y T S D T T T A C S S V T H I C R D

GTA AAC TAC GGC TGA ATT ATC CGA TAT ATA CAC GCA AAC GGA GCA TCA ATA TTC TTT ATC 120
 V N Y G W I I R Y M H A N G A S M F F I

TGC CTA TTC ATA CAC GTA GGA CGA GGC CTA TAC TAC GGA TCG TAC ACT TTC TTA GAA ACA 180
 C L F M H V G R G L Y Y G S Y T F L E T

TGG AAC ATC GGG GTA ATT CTC CTA CTC ACA GCG ATA GCC ACA GCA TTC ATA GGC TAT GTC 240
 W N I G V I L L L T A M A T A F M G Y V

CTA CCA TGA GGA CAA ATA TCA TTC TGA GGG GCT ACA GTT ATT ACC AAC CTC CTC TCA GCA 300
 L P W G Q M S F W G A T V I T N L L S A

ATC CCA TAC ATT GGC ACA AAC CTA GTC GAA TGA ATC TGA GGA GGA TTC TCC GTA GAC AAA 360
 I P Y I G T N L V E W I W G G F S V D K

GCC ACC CTC ACC CGA TTT TTC GCC TTC CAT TTC ATC CTT CCA TTT ATC ATC ATA GCT CTC 420
 A T L T R F F A F H F I L P F I I M A L

GCC ATA GTA CAC CTA CTT TTC CTC CAC GAA ACA GGA TCC AAC AAC CCC ACA GGA ATC CCA 480
 A M V H L L F L H E T G S N N P T G I P

TCA GAC ACA GAC AAA ATC CCA TTC CAC CCC TAC TAC ACA ATC AAA GAT ATC CTA GGC GCC 540
 S D T D K I P F H P Y Y T I K D I L G A

ATA CTA TTA ATC CTC ACC CTC ATG CTG CTA GTA CTG TTC ACA CCC GAC CTA CTC GGA GAC 600
 M L L I L T L M L L V L F T P D L L G D

CCA GAC AAC TAC ACT CCA GCA AAC CCA CTC AAT ACA CCC CCT CAC 645
 P D N Y T P A N P L N T P P H

Fig.S9 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of serow cytochrome b gene (645bp).

The nucleotide sequence has been submitted to the DDBJ with accession number D32195.

ATA CAC TAC TCA TCC GAC ACA ACA ACA GCA TTT TCT TCT GTA ACA CAC ATC TGC CGA GAC	60
M H Y S S D T T T A F S S V T H I C R D	
GTA AAC TAT GGT TGA ATT ATC CGA TAC ATA CAC GCA AAC GGA GCA TCA ATA TTT TTC ATC	120
V N Y G W I I R Y M H A N G A S M F F I	
TGC CTA TTC ATA CAC GTA GGA CGA GGC CTA TAC TAC GGA TCA TAC ACT TTC TCA GAG ACA	180
C L F M H V G R G L Y Y G S Y T F S E T	
TGA AAT ATT GGG GTA ATC CTT CTA CTC ACA ACA ATA GCT ACA GCA TTC ATG GGT TAC GTC	240
W N I G V I L L L T T M A T A F M G Y V	
CTA CCA TGA GGA CAA ATA TCA TTC TGA GGG GCC ACA GTC ATC ACC AAT CTC CTC TCA GCA	300
L P W G Q M S F W G A T V I T N L L S A	
ATT CCA TAT ATT GGC ACA AGC CTA GTC GAA TGA ATC TGA GGA GGA TTC TCC GTA GAC AAA	360
I P Y I G T S L V E W I W G G F S V D K	
GCC ACT CTC ACC CGA TTC TTC GCC TTC CAT TTC ATC CTC CCA TTT ATC ATT ACA GCT CTC	420
A T L T R F F A F H F I L P F I I T A L	
GCT ATA GTC CAC CTA CTT TTC CTC CAT GAG ACA GGA TCC AAC AAC CCC ACA GGT ATC CCA	480
A M V H L L F L H E T G S N N P T G I P	
TCA GAC ATA GAC AAA ATC CCA TTT CAC CCT TAT TAT ACA ATC AAA GAT ATT CTA GGC GCT	540
S D M D K I P F H P Y Y T I K D I L G A	
ATA CTA CTA ATC CTC ACC CTT ATA TTA CTG GTA TTA TTC ACA CCC GAC TTA CTT GGA GAC	600
M L L I L T L M L L V L F T P D L L G D	
CCA GAC AAC TAT ACT CCA GCA AAC CCA CTC AGC ACA CCC CCT CAC	645
P D N Y T P A N P L S T P P H	

Fig.S10. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of goral cytochrome b gene (645bp).

The nucleotide sequence has been submitted to the DDBJ with accession number D32196.

ATA CAC TAC ACA TCC GAT ACA GCA ACA GCA TTC TCC TCT GTA ACC CAC ATT TGC CGA GAT 60
 M H Y T S D T A T A F S S V T H I C R D

GTA AAC TAC GGC TGA ATC ATC CGA TAC ATA CAT GCA AAT GGA GCA TCA ATA TTT TTC ATC 120
 V N Y G W I I R Y M H A N G A S M F F I

TGC CTA TTC ATA CAT GTA GGA CGA GGC CTA TAT TAC GGA TCA TAC ACT TTT CTA GAA ACA 180
 C L F M H V G R G L Y Y G S Y T F L E T

TGA AAC ATC GGA GTA ATC CTC CTA CTC ACA ACA ATA GCC ACA GCG TTT ATG GGC TAC GTC 240
 W N I G V I L L L T T M A T A F M G Y V

CTA CCA TGA GGA CAG ATA TCA TTC TGG GGA GCA ACA GTT ATT ACC AAC CTC CTC TCA GCA 300
 L P W G Q M S F W G A T V I T N L L S A

ATC CCG TAT ATT GGC ACA GAC TTA GTC GAA TGA ATC TGA GGA GGC TTC TCG GTA GAC AAG 360
 I P Y I G T D L V E W I W G G F S V D K

GCC ACC CTC ACC CGA TTC TTT GCC TTC CAC TTC ATC CTC CCA TTT ATC ATT GCA GCC TTA 420
 A T L T R F F A F H F I L P F I I A A L

GCC CTA GTC CAC CTA CTC TTC CTC CAC GAA ACA GGA TCT AAC AAC CCC ACA GGA ATC CCA 480
 A L V H L L F L H E T G S N N P T G I P

TCA GAT GCG GAC AAA ATC CCA TTT CAC CCC TAT TAT ACC ATC AAA GAC ATT CTG GGC GCC 540
 S D A D K I P F H P Y Y T I K D I L G A

ATA CTA CTA ATC CTC ACC CTC ATA CTA CTA GTA CTA TTC ACA CCT GAC CTA CTC GGA GAC 600
 M L L I L T L M L L V L F T P D L L G D

CCA GAT AAT TAC ACC CCA GCG AAC CCA CTC AAC ACA CCC CCT CAC 645
 P D N Y T P A N P L N T P P H

Fig.S11. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of chamois cytochrome b gene (645bp).
 The nucleotide sequence has been submitted to the DDBJ with accession number D32197.

ATA CAC TAC ACA TCC GAC ACA ACA ACA GCA TTC TCC TCT GTA ACA CAC ATC TGT CGA GAC 60
 M H Y T S D T T T A F S S V T H I C R D

GTA AAC TAT GGC TGA ATT ATC CGA TAT ATA CAC GCA AAC GGA GCT TCC ATA TTT TTC ATC 120
 V N Y G W I I R Y M H A N G A S M F F I

TGC CTA TTT ATA CAC GTA GGA CGA GGC CTA TAT TAT GGA TCA TAT ACC TTT TTA GAA ACA 180
 C L F M H V G R G L Y Y G S Y T F L E T

TGA AAC ATT GGA GTA ATC CTC TTA CTT ACA ACA ATA GCC ACG GCA TTC ATA GGC TAC GTC 240
 W N I G V I L L L T T M A T A F M G Y Y

TTA CCA TGA GGA CAA ATA TCA TTC TGA GGA GCA ACA GTC ATT ACC AAT CTC CTT TCA GCA 300
 L P W G Q M S F W G A T V I T N L L S A

ATT CCA TAC ATC GGT ACA GAC CTA GTC GAA TGA ATC TGA GGG GGG TTC TCA GTA GAC AAA 360
 I P Y I G T D L V E W I W G G F S V D K

GCT ACC CTC ACC CGA TTT TTC GCC TTC CAC TTC ATT CTC CCA TTT ATC ATC GCA GCC CTC 420
 A T L T R F F A F H F I L P F I I A A L

GCC ATA GTC CAC TTA CTT TTC CTC CAC GAA ACA GGA TCT AAT AAC CCA ACA GGA ATT TTA 480
 A M V H L L F L H E T G S N N P T G I L

TCA GAC GCA GAC AAA ATT CCA TTT CAC CCC TAC TAT ACT ATT AAA GAT ATC CTA GGC GCC 540
 S D A D K I P F H P Y Y T I K D I L G A

ATA CTA CTC ATC CTC ACC CTT ATA CTA CTA GTA TTA TTC TCA CCC GAC TTA CTC GGA GAC 600
 M L L I L T L M L L V L F S P D L L G D

CCA GAC AAC TAC ACT CCA GCA AAC CCG CTA AAT ACA CCT CCC CAT 645
 P D N Y T P A N P L N T P P H

Fig. S12. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of rocky mountain goat cytochrome b gene (645bp).

The nucleotide sequence has been submitted to the DDBJ with accession number D32198.

ATA CAC TAC ACA GCT GAC ACA GCA ACA GCA TTC CAC TCT GTT ACC CAC ATC TGC CGA GAC	60
M H Y T A D T A T A F H S V T H I C R D	
GTC AAC TAT GGC TGA ATT ATC CGA TAC ATA CAT GCA AAC GGA GCA TCC ATA TTC TTT ATC	120
V N Y G W I I R Y M H A N G A S M F F I	
TGC CTA TTC ATA CAC GTA GGA CGA GGC CTC TAT TAC GGA TCC TAT ACA TTC CTA GAA ACA	180
C L F M H V G R G L Y Y G S Y T F L E T	
TGA AAC ATT GGA GTT ATT CTT CTA TTC GCA ACA ATA GCC ACA GCA TTC ATA GGA TAT GTC	240
W N I G V I L L F A T M A T A F M G Y V	
CTA CCA TGA GGA CAA ATA TCT TTC TGA GGA GCA ACA GTC ATC ACC AAT CTC CTT TCA GCA	300
L P W G Q M S F W G A T V I T N L L S A	
ATC CCA TAT ATC GGC ACA GAC CTA GTA GAA TGA ATC TGA GGG GGT TTT TCA GTA GAT AAA	360
I P Y I G T D L V E W I W G G F S V D K	
GCA ACC CTC ACC CGA TTC TTC GCC TTC CAC TTC ATC CTC CCA TTT ATT ATC GCA GCC CTC	420
A T L T R F F A F H F I L P F I I A A L	
GCT ATA GTC CAC CTA CTT TTT CTT CAC GAA ACA GGA TCT TAC AAC CCC ACA GGA ATC CCA	480
A M V H L L F L H E T G S Y N P T G I P	
TCA GAT TCA GAC AAA ATC CCA TTC CAC CCC TAC TAC ACC ATT AAA GAC ATT CTA GGC GCC	540
S D S D K I P F H P Y Y T I K D I L G A	
CTA CTA CTT ATT CTA ATC CTC ATA CTT CTA GTC CTA TTT TCA CCA GAC CTG CTT GGA GAC	600
L L L I L I L M L L V L F S P D L L G D	
CCA GAC AAC TAC ACA CCA GCA AAC CCA CTT AAC ACA CCT CCA CAT	645
P D N Y T P A N P L N T P P H	

Fig.S13. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of saiga cytochrome b gene (645bp).

The nucleotide sequence has been submitted to the DDBJ with accession number D32199.

ATA CAT TAC ACA TCA GAC ACA ACA ACA GCT TTC TCA TCA GTT ACA CAC ATT TGT CGA GAC 60
 M H Y T S D T T T A F S S V T H I C R D

GTA AAT TAC GGA TGA GTT ATT CGC TAT CTA CAT GCA AAC GGA GCA TCC ATA TTC TTC ATT 120
 V N Y G W V I R Y L H A N G A S M F F I

TGC CTA TTC ATC CAC GTA GGC CGA GGT CTA TAC TAC GGA TCC TAT ATA TTC CTA GAA ACA 180
 C L F I H V G R G L Y Y G S Y M F L E T

TGA AAC ATT GGA GTA GTC CTA CTA TTT ACC GTT ATA GCA ACA GCC TTC ATA GGC TAC GTC 240
 W N I G V V L L F T V M A T A F M G Y V

CTG CCC TGA GGA CAA ATA TCA TTC TGA GGA GCT ACG GTC ATC ACA AAT CTA CTA TCA GCT 300
 L P W G Q M S F W G A T V I T N L L S A

ATC CCT TAT ATC GGA ACA GAC CTC GTA GAA TGA ATC TGA GGG GGC TTT TCC GTC GAC AAA 360
 I P Y I G T D L V E W I W G G F S V D K

GCA ACC CTC ACA CGA TTC TTC GCC TTC CAC TTT ATC CTG CCA TTC ATC ATT ACC GCC CTC 420
 A T L T R F F A F H F I L P F I I T A L

GCA GCC GTA CAT CTC CTA TTC CTG CAC GAA ACC GGA TCC AAC AAC CCT ACC GGA ATC TCA 480
 A A V H L L F L H E T G S N N P T G I S

TCA GAC ATA GAC AAA ATT CCA TTT CAC CCA TAC TAC ACT ATT AAA GAC ATT CTA GGA GCC 540
 S D M D K I P F H P Y Y T I K D I L G A

TTA TTT ATA ATA CTA ATC CTA CTA ATC CTT GTA CTA TTC TCA CCA GAC CTA CTA GGA GAC 600
 L F M M L I L L I L V L F S P D L L G D

CCA GAC AAC TAC ACC CCA GCA AAC CCA CTA AAC ACC CCA CCC CAT 645
 P D N Y T P A N P L N T P P H

Fig.S14. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of pig cytochrome b gene (645bp).
 Different nucleotides from the published sequence are underlined.

2. κ -カゼイン遺伝子

本研究で決定した κ -カゼイン遺伝子の塩基配列と推定アミノ酸配列を示す。

ATG ATG AAG AGT TTT TTC CTA GTT GTG ACT ATC CTG GCA TTA ACC CTG CCA TTT TTG GGT	60
M M K S F F L V V T I L A L T L P F L G	
GCC CAG GAG CAA AAC CAA GAA CAA CCA ATA CGC TGT GAG AAA GAT GAA AGA TTC TTC AGT	120
A Q E Q N Q E Q P I R C E K D E R F F S	
GAC AAA ATA GCC AAA TAT ATC CCA ATT CAG TAT GTG CTG AGT AGG TAT CCT AGT TAT GGA	180
D K I A K Y I P I Q Y V L S R Y P S Y G	
CTC AAT TAC TAC CAA CAG AAA CCA GTT GCA CTA ATT AAT AAT CAA TTT CTG CCA TAC CCA	240
L N Y Y Q Q K P V A L I N N Q F L P Y P	
TAT TAT GCA AAG CCA GCT GCA GTT AGG TCA CCT GCC CAA ATT CTT CAA TGG CAA GTT TTG	300
Y Y A K P A A V R S P A Q I L Q W Q V L	
TCA AAT ACT GTG CCT GCC AAG TCC TGC CAA GCC CAG CCA ACT ACC ATG GCA CGT CAC CCA	360
S N T V P A K S C Q A Q P T T M A R H P	
CAC CCA CAT TTA TCA TTT ATG GCC ATT CCA CCA AAG AAA AAT CAG GAT AAA ACA GAA ATC	420
H P H L S F M A I P P K K N Q D K T E I	
CCT ACC ATC AAT ACC ATT GCT AGT GGT GAG CCT ACA AGT ACA CCT ACC ACC GAA GCA GTA	480
P T I N T I A S G E P T S T P T T E A V	
GAG AGC ACT GTA GCT ACT CTA GAA GAT TCT CCA GAA GTT ATT GAG TGC CCA CCT GAG ATC	540
E S T V A T L E D S P E V I E C P P E I	
AAC ACA GTC CAA GTT ACT TCA ACT GCA GTC TAA	573
N T V Q V T S T A V *	

Fig.S15. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of bovine κ -casein gene (573bp).
The nucleotide sequence is identical to the published sequence.

ATG ATG AAG AGT TTT TTC CTA GTT GTG ACT ATC CTG GCA TTA ACC CTG CCA TTT TTG GGT 60
 M M K S F F L V V T I L A L T L P F L G

GCC CAG GAG CAA AAC CAA GAA CAA CCA ATA CGC TGT GAG AAA GAG GAA AGA TTC TTC AAT 120
 A Q E Q N Q E Q P I R C E K E E R F F N

GAC AAA ATA GCC AAA TAT ATC CCA ATT CAG TAT GTG CTG AGT AGG TAT CCT AGT TAT GGA 180
 D K I A K Y I P I Q Y V L S R Y P S Y G

CTC AAT TAC TAC CAA CAG AAA CCA GTT GCA CTA ATT AAT AAT CAA TTT CTG CCA TAC CCA 240
 L N Y Y Q Q K P V A L I N N Q F L P Y P

TAT TAT GCA AAG CCA GCT GCA GTT AGG TCA CCT GCC CAA ATT CTT CAA TGG CAA GTT TTG 300
 Y Y A K P A A V R S P A Q I L Q W Q V L

CCA AAT ACT GTG CCT GCC AAG TCC TGC CAA GCC CAG CCA ACT ACC ATG ACA CGT CAC CCA 360
 P N T V P A K S C Q A Q P T T M T R H P

CAC CCA CAT TTA TCA TTT ATG GCC ATT CCA CCA AAG AAA AAT CAG GAT AAA ACA GAA ATC 420
 H P H L S F M A I P P K K N Q D K T E I

CCT ACC ATC AAT ACC ATT GTT AGT GTT GAG CCT ACA AGT ACA CCT ACC ACC GAA GCA ATA 480
 P T I N T I V S V E P T S T P T T E A I

GAG AAC ACT GTA GCT ACT CTA GAA GCT TCC TCA GAM GTT ATT GAG AGT GTA CCT GAG ACC 540
 E N T V A T L E A S S E/D V I E S V P E T

AAC ACA GCC CAA GTT ACT TCA ACC GTC GTC TAA 573
 N T A Q V T S T V V *

Fig.S16. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of water buffalo κ -casein gene (573bp).
 The nucleotide sequences have been submitted to the DDBJ with accession numbers D14368, 14369 and 14370.
 A polymorphic site is underlined.

ATG ATG AAG AGT TTT TTC CTA GTT GTG ACT ATC CTG GCA TTA ACC CTG CCA TTT TTG GGT 60
 M M K S F F L V V T I L A L T L P F L G

GCC CAG GAG CAA AAC CAG GAA CAA CGA ATA TGC TGT GAG AAA GAT GAA AGA TTC TTC GAT 120
 A Q E Q N Q E Q R I C C E K D E R F F D

GAC AAA ATA GCC AAA TAT ATC CCA ATT CAG TAT GTG CTG AGT AGG TAT CCT AGT TAT GGA 180
 D K I A K Y I P I Q Y V L S R Y P S Y G

CTC AAT TAC TAC CAA CAG AGA CCA GTT GCA CTA ATT AAT AAT CAA TTT CTG CCA TAC CCA 240
 L N Y Y Q Q R P V A L I N N Q F L P Y P

TAT TAT GCG AAG CCA GTT GCA GTT AGG TCA CCT GCC CAA ACT CTT CAA TGG CAA GTT TTG 300
 Y Y A K P V A V R S P A Q T L Q W Q V L

CCA AAT GCT GTG CCT GCC AAG TCC TGC CAA GAC CAG CCA ACT GCC ATG GCA CGT CAC CCA 360
 P N A V P A K S C Q D Q P T A M A R H P

CAC CCA CAT TTA TCA TTT ATG GCC ATT CCA CCA AAG AAA GAT CAG GAT AAA ACA GAA ATC 420
 H P H L S F M A I P P K K D Q D K T E I

CCT GCC ATC AAT ACC ATT GCT AGT GCT GAG CCT ACA GTA CAC AGT ACA CCT ACC ACC GAA 480
 P A I N T I A S A E P T V H S T P T T E

GCA GTA GTG AAC GCT GTA GAT AAT CCA GAA GCT TCC TCA GAA TCG ATT GCG AGT GCA CCT 540
 A V V N A V D N P E A S S E S I A S A P

GAG ACC AAC ACA GCC CAA GTT ACT TCA ACC GAG GTC TAA 579
 E T N T A Q V T S T E V *

Fig.S17. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of sheep κ -casein gene (579bp).
 Different nucleotides from the published sequence are underlined.

ATG ATG AAG AGT TTT TTC CTA GTT GTG ACT ATC CTG GCA TTA ACC CTG CCA TTT TTG GGT	60
M M K S F F L V V T I L A L T L P F L G	
GCC CAG GAG CAA AAC CAG GAA <u>CAR</u> CCG ATA TGC TGT GAG AAA GAT GAA AGA TTC TTC GAT	120
A Q E Q N Q E <u>Q</u> P I C C E K D E R F F D	
GAC AAA ATA GCC AAA TAT ATC CCA ATT CAG TAT GTG CTG AGT AGG TAT CCT AGT TAT GGA	180
D K I A K Y I P I Q Y V L S R Y P S Y G	
CTC AAT TAC TAT CAA CAG AGA CCA GTT GCA CTA ATT AAT AAT CAA TTT CTG CCA TAC CCA	240
L N Y Y Q Q R P V A L I N N Q F L P Y P	
TAT TAT GCA AAG CCA GTT GCA GTT AGG TCA CCT GCC CAA ACT CTT CAA TGG CAA GTT TTG	300
Y Y A K P V A V R S P A Q T L Q W Q V L	
CCA AAT ACT GTG CCT GCC AAG TCC TGC CAA GAC CAG CCA ACT ACC CTG GCA CGT CAC CCA	360
P N T V P A K S C Q D Q P T T L A R H P	
CAC CCA CAT TTA TCA TTT ATG GCC ATT CCA CCA AAG AAA GAT CAG GAT AAA ACA GAA GTC	420
H P H L S F M A I P P K K D Q D K T E V	
CCT GCC ATC AAT ACC ATT GCT AGT GCT GAG CCT ACA GTA CAC AGT ACA CCT ACC ACC GAA	480
P A I N T I A S A E P T V H S T P T T E	
GCA ATA GTG AAC ACT GTA GAT AAT CCA GAA GCT TCC TCA GAA TCG ATT GCG AGT GCA TCT	540
A I V N T V D N P E A S S E S I A S A S	
GAG ACC AAC ACA GCC CAA GTT ACT TCA ACC GAG GTC TAA	579
E T N T A Q V T S T E V *	

Fig.S18. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of goat κ -casein gene (579bp).

The nucleotide sequences have been submitted to the DDBJ with accession numbers D14371,14372 and 14373.

A polymorphic site is underlined.

ATG ATG AAG AGT TTT TTC CTA GTT GTG ACT ATC CTG GCA TTA ACC CTG CCG TTT TTG GGT 60
 M M K S F F L V V T I L A L T L P F L G

GCC CAG GAG CAA AAC CAG GAA CAA CCA ATA TGC TGT GAG AAA GAT GAA ACA TTC TTC GAT 120
 A Q E Q N Q E Q P I C C E K D E T F F D

GAC AAA ATA GCC AAA TAT ATC CCA ATT CAG TAT GTG CTG AGT AGG TAT CCT AGT TAT GGA 180
 D K I A K Y I P I Q Y V L S R Y P S Y G

CTC AAT TAC TAC CAA CAG AGA CCA GTT GCA CTA ATT AAT AAT CAA TTT CTG CCA TAC CCA 240
 L N Y Y Q Q R P V A L I N N Q F L P Y P

TAT TAT GCA AAG CCA GTT GCA GTT AGG TCA CCT GCC CAA ACT CTT CAA TGG CAA GTT TTG 300
 Y Y A K P V A V R S P A Q T L Q W Q V L

CCA AAT ACT GTG CCT GCC AAG TCC TGC CAA GAC CAG CCA ACT ACC ATG GCA CGT CAC CCA 360
 P N T V P A K S C Q D Q P T T M A R H P

CAC CCA CAT TTA TCA TTT ATG GCC ATT CCA CCA AAG AAA GAT CAG GAT AAA ACA GAA ATC 420
 H P H L S F M A I P P K K D Q D K T E I

CCT ACC ATC AAT ACC ATT GCT AGT GCT GAG CCT ACA GTA CAC AGT ACA CCT ACC ACC GAA 480
 P T I N T I A S A E P T V H S T P T T E

GCA ATA GTG AAC ACT GTA GAT AAT CCA GAA GCT TCC TCA GAA TCG ATT GTG AGT GCA CCT 540
 A I V N T V D N P E A S S E S I V S A P

GAG ACC AAC ACA GCC CAA GTT ACT TCA ACC GAG GTC TAA 579
 E T N T A Q V T S T E V *

Fig.S19. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of Japanese serow κ -casein gene (579bp).
 The nucleotide sequences have been submitted to the DDBJ with accession numbers D14374, 14375 and 14376.

ATG ATG AAG AGT TTT TTC CTA GTT GTG ACT ATC CTG GCA TTA ACC CTG CCG TTT TTG GGT 60
 M M K S F F L V V T I L A L T L P F L G

GCC CAG GAG CAA AAC CAG GAA CAA CCA ATA TGC TGT GAG AAA GAT GAA AGA TTC TTC GAT 120
 A Q E Q N Q E Q P I C C E K D E R F F D

GAC AAA ATA GCC AAA TAT ATC CCA ATT CAG TAT GTG CTG AGT AGG TAT CCT AGT TAT GGA 180
 D K I A K Y I P I Q Y V L S R Y P S Y G

CTC AAT TAC TAC CAA CAG AGA CCA GTT GCA CTA ATT AAT AAT CAA TTT CTG CCA TAC CCA 240
 L N Y Y Q Q R P V A L I N N Q F L P Y P

TAT TAT GCA AAG CCA GTT GCA GTT AGG TCA CCT GCC CAA ACT CTT CAA TGG CAA GTT TTG 300
 Y Y A K P V A V R S P A Q T L Q W Q V L

CCA AAT ACT GCG CCT GCC AAG TCC TGC CAA GAC CAG CCA ACT ACC ATG GCA CGT CAC CCA 360
 P N T A P A K S C Q D Q P T T M A R H P

CAC CCA CAT TTA TCA TTT ATG GCC ATT CCA CCA AAG AAA GAT CAG GAT AAA ACA GAA ATC 420
 H P H L S F M A I P P K K D Q D K T E I

CCT ACC ATC AAT ACC ATT GCT AGT GCT GAG ACT ACA GTA CAC AGT ACA CCT ACC ACC GAA 480
 P T I N T I A S A E T T V H S T P T T E

GCA ATA GTG AAC ACT GTA GAT AAT CGA GAA GCT TCC TCA GAA TCT ATT GTG AGT GCA CCT 540
 A I V N T V D N R E A S S E S I V S A P

GAG ACC AAC ACA GCC CAA GTT ACT TCA ACC GAG GTC TAA 579
 E T N T A Q V T S T E V *

Fig.S20. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of Formosan serow κ -casein gene (579bp).
 The nucleotide sequences have been submitted to the DDBJ with accession numbers D32171,32172 and 32173.

ATG ATG AAG AGT TTT TTC CTA GTT GTG ACT ATC CTG GCA TTA ACC CTG CCG TTT TTG GGT	60
M M K S F F L V V T I L A L T L P F L G	
GCC CAG GAG CAA AAC CAG GAA CAA CCA ATA TGC TGT GAG AAA GAT GAA AGA TTC TTC GAT	120
A Q E Q N Q E Q P I C C E K D E R F F D	
GAC AAA ATA GCC AAA TAT ATC CCA ATT CAG TAT GTG CTG AGT AGG TAT CCT AGT TAT GGA	180
D K I A K Y I P I Q Y V L S R Y P S Y G	
CTC AAT TAC TAC CAA CAG AGA CCA GTT GCA CTA ATT AAT AAT CAA TTT CTG CCA TAC CCA	240
L N Y Y Q Q R P V A L I N N Q F L P Y P	
TAT TAT GCA AAG CCA GTT GCA GTT AGG TCA CCT GCC CAA ACT CTT CAA TGG CAA GTT TTG	300
Y Y A K P V A V R S P A Q T L Q W Q V L	
CCA AAT ACT GCG CCT GCC AAG TCC TGC CAA GAC CAG CCA ACT ACC ATG GCA CGT CAC CCA	360
P N T A P A K S C Q D Q P T T M A R H P	
CAC CCA CAT TTA TCA TTT ATG GCC ATT CCA CCA AAG AAA GAT CAG GAT AAA ACA GAA ATC	420
H P H L S F M A I P P K K D Q D K T E I	
CCT ACC ATC AAT ACC ATT GCT AGT GCT GAG CCT ACA GTA CAC AGT ACA CCT ACC ACC GAA	480
P T I N T I A S A E P T V H S T P T T E	
GCA ATA GTG AAC ACT GTA GAT AAT CCA GAA GCT TCC TCA GAA TCG ATT GTG AGT GCA CCT	540
A I V N T V D N P E A S S E S I V S A P	
GAG ACC AAC ACA GCC CAA GTT ACT TCA ACC GAG GTC TAA	579
E T N T A Q V T S T E V *	

Fig.S21. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of serow κ -casein gene (579bp).
The nucleotide sequences have been submitted to the DDBJ with accession numbers D32174,32175 and 32176.

ATG ATG AAG AGT TTT TTC CTA GTT GTG ACT ATC CTG GCA TTA ACC CTG CCG TTT TTG GGT 60
 M M K S F F L V V T I L A L T L P F L G

GCC CAG GAG CAA AAC CAG GAA CAA CCA ATA TGC TGT GAG AAA GAT GAA AGA TTC TTY GAT 120
 A Q E Q N Q E Q P I C C E K D E R F ? D

GAC AAA ATA GCC AAA TAT ATC CCA ATT CAG TAT GTG CTG AGT AGG TAT CCT AGT TAT GGA 180
 D K I A K Y I P I Q Y V L S R Y P S Y G

CTC AAT TAC TAC CAA CAG AGA CCA GTT GCA CTA ATT AAT AAT CAA TTT CTG CCA TAC CCA 240
 L N Y Y Q Q R P V A L I N N Q F L P Y P

TAT TAT GCA AAG CCA GTT GCA GTT AGG TCA CCT GCC CAA ACT CTT CAA TGG CAA GTT TTG 300
 Y Y A K P V A V R S P A Q T L Q W Q V L

CCA AAT ACT GCA CCT GCC AAG TCC TGC CAA GAC CAG CCA ACT ACC ATG GCA CGT CAC CCA 360
 P N T A P A K S C Q D Q P T T M A R H P

CAC CCA CAT TTA TCA TTT ATG GCC ATT CCA CCA AAG AAA GAT CAG GAT AAA ACA GAA ATC 420
 H P H L S F M A I P P K K D Q D K T E I

CCT ACC ATC AAT ACC ATT GCT AGT GCT GAG CCT ACA GTA CAC AGT ACA CCT ACC ACC GAA 480
 P T I N T I A S A E P T V H S T P T T E

GCA ATA GTG AAC ACT GTA GAT AAT CCA GAA GCT TCC TCA GAA TCT ATT GCG AGT GCA CCT 540
 A I V N T V D N P E A S S E S I A S A P

GAG ACC AAC ACA GCC CAA GTT ACT TCA ACC GAG GTC TAA 579
 E T N T A Q V T S T E V *

Fig.S22. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of goral κ -casein gene (579bp).

The nucleotide sequences have been submitted to the DDBJ with accession numbers D32177, 32178 and 32179.

ATG ATG AAG AGT TTT TTC CTA GTT GCG ACT ATC CTG GCA TTA ACC CTG CCA TTT TTG GGT	60
M M K S F F L V A T I L A L T L P F L G	
GCC CAG GAG CAA AAC CAG GAA CAA TCA ATA TGC TGT GAG AAA GAT GAA AGA TTC TTC GAG	120
A Q E Q N Q E Q S I C C E K D E R F F E	
GAC AAA ATA GCC AAA TAT ATC CCA ATT CAG TAT GTG CTG AGT AGG TAT CCT AGT TAT GGA	180
D K I A K Y I P I Q Y V L S R Y P S Y G	
CTC AAT TAC TAC CAA CAG AGA CCA GTT GCA CTA ATT AAT AAT CAA TTT CTG CCA TAC CCA	240
L N Y Y Q Q R P V A L I N N Q F L P Y P	
TAT TAT GCA AAG CCA GTT GCA GTT AGG TCA CCT GCC CAA ACT CTT CAG TGG CAA GTT TTG	300
Y Y A K P V A V R S P A Q T L Q W Q V L	
CCA AAT ACT GCA CCT GCC AAG TCC TGC CAA GAC CAG CCA ACT ACC ATG GCA CAT CAC CCA	360
P N T A P A K S C Q D Q P T T M A H H P	
CAC CCA CAT TTA TCA TTT ATG GCC ATT CCA CCA AAG AAA GAT CAG GAT AAA ACA GAA ATC	420
H P H L S F M A I P P K K D Q D K T E I	
CCT ACC ATC AAT ACC ATT GCT AGT GCT GAG CCT ACA GTA CAC AGT ACA CCT ACC ACT GAA	480
P T I N T I A S A E P T V H S T P T T E	
GCA ATA GTG AAC ACT GTA GAT AAT CCA GAA GCT TCC TCA GAA TCG ATT GCA AGT GCA CCT	540
A I V N T V D N P E A S S E S I A S A P	
GAG ACC AAC ACA GCC CAA GTT ACT TCA ACC GAG GTC TAA	579
E T N T A Q V T S T E V *	

Fig.S23. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of chamois κ -casein gene (579bp).

The nucleotide sequences have been submitted to the DDBJ with accession numbers D32180,32181 and 32182.

ATG ATG AAG AGT TTT TTC CTA GTT GTG ACT ATC CTG GCA TTA ACC CTG CCA TTT TTG GGT 60
 M M K S F F L V V T I L A L T L P F L G

GCC CAG GAG CAA AAC CAG GAA CAA CCA ATA TGC TGT GAG AAA GAT GAA AGA TTC TTC GAT 120
 A Q E Q N Q E Q P I C C E K D E R F F D

GAC AAA ATA GCC AAA TAT ATC CCA ATT CAG TAT GTG CTG AGT AGG TAT CCT AGT TAT GGA 180
 D K I A K Y I P I Q Y V L S R Y P S Y G

CTC AAT TAC TAC CAA CAG AGA CCA GTT GCA CTA ATT AAT AAT CAA TTT CTG CCA TAC CCA 240
 L N Y Y Q Q R P V A L I N N Q F L P Y P

TAT TAT GCA AAG CCA GTT GCA GTT AGG TCA CCT GCC CAA ATT CTT CAG TGG CAA GTT TTG 300
 Y Y A K P V A V R S P A Q I L Q W Q V L

CCA AAT ACT GCG CCT GCC AAG TCC TGC CAA GAC CAG CCA ACT ACC ATG GCA CGT CAC CCA 360
 P N T A P A K S C Q D Q P T T M A R H P

CAC CCA CAT TTA TCA TTT ATG GCC ATT CCA CCA AAG AAA GAT CAG GAT AAA ACA GAA ATC 420
 H P H L S F M A I P P K K D Q D K T E I

CCT ACC ATC AAT ACC ATT GCT AGT GCT GAG CCT ACA GTA CAC AGT ACA CCT ACC ACC GAA 480
 P T I N T I A S A E P T V H S T P T T E

GCA ATA GTG AAC ACT GTA GAT AAT CCA GAA GCT TCC TCA GAA TCT ATT GTG AGT GCA CCT 540
 A I V N T V D N P E A S S E S I V S A P

GAG ACC AAC ACA GCC CAA GTT ACT TCA ACC GAG GTC TAA 579
 E T N T A Q V T S T E V *

Fig.S24. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of rocky mountain goat κ -casein gene (579bp).

The nucleotide sequences have been submitted to the DDBJ with accession numbers D32183,32184 and 32185.

ATG ATG AAG AGT TTT TTC CTA GTT GTG ACT ATC CTG GCA TTA ACC CTG CCA TTT TTG GAT	60
M M K S F F L V V T I L A L T L P F L D	
GCC CAG GAG CGA AAC CAG GAA CAA CCA ATA TGC TGT GAG AAA GAT GAA AGA TTC TTC AAT	120
A Q E R N Q E Q P I C C E K D E R F F N	
GAC AGA ATA GCC AAA TAT ATC CCA ATT CAG TAT GTG CTG AGT AGA TAT CCT AGT TAT GGA	180
D R I A K Y I P I Q Y V L S R Y P S Y G	
CTC AAT TAC TAC CAA CAG AGA CCA GTT GCA CTA ATT AAT AAT CAA TTT CTG CCA TAC CCA	240
L N Y Y Q Q R P V A L I N N Q F L P Y P	
TAT TAT GCA AAG CCA GTT GCA GTT AGG TCA CCT GCC CAA ACT CTT CAA TGG CAA GTT TTG	300
Y Y A K P V A V R S P A Q T L Q W Q V L	
CCA AAT ACT GTG CCT GCT AAG TCC TGC CAA GAC CAG CCA ACT ACC ATG GCA CGT CAC CCA	360
P N T V P A K S C Q D Q P T T M A R H P	
CAT CCA CAT TTA TCG TTT ATG GCC ATT CCA CCA AAG AAA GAT CAG GAT AAA ACA GAA ATC	420
H P H L S F M A I P P K K D Q D K T E I	
CCT ACC ATC AAT ACA GTT GCT AGT GCT GAG CCT GCA AGT ACA CCT ACC ACC GAA GCA ATA	480
P T I N T V A S A E P A S T P T T E A I	
GTG AAC ACT GAA GCA ATA GTG AAC ACC GAG GCA ATA GTG AAC ACT GTA GAT AAT CCA GAA	540
Y N T E A I V N T E A I V N T V D N P E	
GCT TCC TCA GAA ATT ATT GCG AGT GTG CCT GAG ACC AAC ACA GCC CAA GTT ACT TCA ACT	600
A S S E I I A S V P E T N T A Q V T S T	
GAA GTC TAA	609
E V *	

Fig.S25. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of saiga κ -casein gene (609bp).

The nucleotide sequences have been submitted to the DDBJ with accession numbers D32186,32187 and 32188.

ATG ATG AAG AGT TTT TTC CTA GCT GTG ACT ATC CTG GCA TTA ACC CTG CCA TTT TTG GTT 60
 M M K S F F L A V T I L A L T L P F L V

GCC CAG GAG CAA ATC CAG GAA CAA CCA ACA GGC TGT GAG AAA GAT GAA AGA TTC TTC AAT 120
 A Q E Q I Q E Q P T G C E K D E R F F N

GAC AAA ATA GTC AAA TAT ATC CCA ATT CAG TAT GCG CTG AGT AGG TAT CCT AGT TAT GCA 180
 D K I V K Y I P I Q Y A L S R Y P S Y G

CTC AAT TAC TAC CAA CAC AGA CCA GTT GCA CTA ATT AAT AAT CAG TTT CTG CCA TAC CCA 240
 L N Y Y Q H R P V A L I N N Q F L P Y P

TAT TAT GTA AAG CCA GGT GCA GTT AGG TCA CCT GCC CAA ATT CTC CAA TGG CAA GTC TTG 300
 Y Y V K P G A V R S P A Q I L Q W Q V L

CCA AAC ACC GTG CCT GCC AAG TTC TGC CAA GCC CAG YCA ACT ACC ATG GCA CGT CAC CCA 360
 P N T V P A K F C Q A Q P/S T T M A R H P

CAC CCA CGT TTA TCA TTT ATG GCC ATT CCG CCA AAG AAA AAT CAG GAT AAA ACA GAC ATC 420
 H P R L S F M A I P P K K N Q D K T D I

CCT TCC ATC AAT ACC ATT GCT ACT GCT GAG TCT ACA ATT ACA CCT ACC ACC GAA GCA ATA 480
 P S I N T I A T A E S T I T P T T E A I

GTG GAC ACT GTA GCT ACT CAA GAA GCT TTC TCA GAA GTT ATT GAG AGT GCA CCT GAG GCC 540
 V D T V A T Q E A F S E V I E S A P E A

AAA ACA GAC CAA GTT ACT TCA ACC GTG GTC TAA 573
 K T D Q V T S T V V *

Fig.S26. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of sika deer κ -casein gene (573bp).
 The nucleotide sequences have been submitted to the DDBJ with accession numbers D14377, 14378 and 14379.
 A poly morphic site is underlined.

GTT GCC CAA GTG CAA TAT CAG GAA CAA CTC ACA GGA TGT GAG AAT GAT GAA AGA TTC TTC 60
 V A Q V Q Y Q E Q L T G C E N D E R F F

AAT GAC AAA ACA ATT AAA TAT ATC CCA ATT CCT TAT TTG CTG AAT AGA TAT CCT AGT TAT 120
 N D K T I K Y I P I P Y L L N R Y P S Y

GGA CTC AAT TAC TAC CAG CAA AGG CCA CCT GCA CTA ATT AAT AAC CAA TTT CTG CCG TTC 180
 G L N Y Y Q Q R P P A L I N N Q F L P F

TCA TTT TAT GCA AAG CCA ATG GCA GTT AGG TCA CCT GCC CAA ATT CTT CAG TGG CAA GTC 240
 S F Y A K P M A V R S P A Q I L Q W Q V

CCG CTG AAT GCT GTG TCT GCC AAG CCC TGC CAA GCC CCG CCA ACT ACT ATG GCA CGT CGC 300
 P L N A V S A K P C Q A P P T T M A R R

CCA CGC CCA CAT TTA TCA TTT ATG GCC ATT CCA CCA AAG AAA GAT CAG GAT AAA ACA GAC 360
 P R P H L S F M A I P P K K D Q D K T D

ACC CCT ACC ATC AAT ACC ATT GTT ACT GTT GAG CCT ACA ACT ACA CCC ACC ACT GAA TCA 420
 T P T I N T I V T V E P T T T P T T E S

ATA GTG AAC ACT GTA GCT ACT CTA GAA GCT TCC TCA GAA TCT ATC GCC AGT GCA CCT GAG 480
 I V N T V A T L E A S S E S I A S A P E

ACT ACC ACA GTC CAA GTT ACT TCA GCT GAG GTT TAA 516
 T T T V Q V T S A E V *

Fig.S27. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of lesser mouse deer κ -casein gene (516bp).

The nucleotide sequences have been submitted to the DDBJ with accession numbers D14380 and 14381.

CGC TGT GAG AGT GAT AAA AGA TTG TTC AAT GAA GAA AAA GTC AAA TAT ATC CCA ATT TAT 60
R C E S D K R L F N E E K V K Y I P I Y

TAC ATG CTG AAT AGG TTT CCT AGT TAT GGA TTT TTC TAC CAA CAT AGA TCA GCT GTA TCA 120
Y M L N R F P S Y G F F Y Q H R S A V S

CCT AAT AGC CAA TTT ATA CCT TAC CCA TAT TAT GCA AGG CCA GTT GTA GCT GGG CCA CAT 180
P N S Q F I P Y P Y Y A R P V V A G P H

GCT CAA AAA CCT CAA TGG CAA GAC CAG CCA AAT GTC TAC CCA CCT ACA GTG GCA CGT CGC 240
A Q K P Q W Q D Q P N V Y P P T V A R R

CCA CGC CCA CAT GCA TCA TTT ATT GCC ATT CCC CCA AAG AAA AAT CAG GAT AAA ACG GCC 300
P R P H A S F I A I P P K K N Q D K T A

ATC CCT GCT ATC AAT TCC ATT GCT ACT GTT GAG CCT ACA ATT GTA CCT GCC ACT GAA CCA 360
I P A I N S I A T V E P T I V P A T E P

ATA GTG AAC GCT GAA CCA ATA GTG AAC GCT GTA GTA ACT CCA GAA GCT TCC TCA GAA TTC 420
I V N A E P I V N A V V T P E A S S E F

CTC ATC ACA AGC GCA CCT GAG ACC ACC ACT GTC CAA GTC ACT TCA CCC GTG GTC TAA 477
L I T S A P E T T T V Q V T S P V V *

Fig.S28. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of pig
κ-casein gene (477bp).
The nucleotide sequence is identical to the published sequence.

要 旨

緒 論

蛋白質のアミノ酸配列の比較からZuckerkandle & Pauling^{68, 69)}は「分子時計」が生物種の間で成立することを提唱した。すなわち、アミノ酸置換数はその種が分化してから経過した時間にはほぼ比例するというものである。これは生物の進化を考察するうえで画期的な発見であった。形態からの推定には収束進化や平行進化の問題があり、主観的な判断の違いから多くの系統樹が提出されている。しかし、「分子時計」は形態とは全く独立した性質に基づいており、客観的なデータから判断をくだすことができる。「分子時計」はDNAの塩基配列でも成立し、その原理は木村^{35, 37)}によってとなえられた「分子進化の中立説」から説明することができようになった。

ウシ、ヤギ、ヒツジなど現在、家畜として飼われている動物の大部分は偶蹄目ウシ亜目に属し、始新世以後の草原化に適応して急速に分化したと考えられている。比較的短期間で多くの種に分化したため、ウシ亜目に属する種の分岐系統は明確となっていない。また、最近の分子進化の結果でも系統解析の基礎となった遺伝子データの種類の違いによって、ウシ科とシカ科の位置関係について意見が分かれている。

本研究はウシ科ヤギ亜科の動物を中心に偶蹄目ウシ亜目における進化の道筋を明らかにするため、シトクロムbとκ-カゼイン遺伝子の塩基配列を決定し、ブタ（偶蹄目イノシシ亜目イノシシ科）をアウトグループとして系統樹の作成を行った。また、一部の動物については成長ホルモン遺伝子プロモーター領域の塩基配列について

も比較を行った。

シトクロム b と κ-カゼイン遺伝子について、塩基配列の決定と比較を行った動物はブタ（イノシシ科）、ジャワマメジカ（マメジカ科）、ニホンジカ（シカ科）、ウシ（ウシ科ウシ属）、スイギュウ（ウシ科スイギュウ属）、ヤギ（ウシ科ヤギ属）、ヒツジ（ウシ科ヒツジ属）、サイガ（ウシ科サイガ属）、シャモア（ウシ科シャモア属）、シロイワヤギ（ウシ科シロイワヤギ属）、ゴーラル（ウシ科ゴーラル属）、シーロー（ウシ科カモシカ属）、タイワンカモシカ（ウシ科カモシカ属）、ニホンカモシカ（ウシ科カモシカ属）の14種である。成長ホルモンプロモーター領域についてはニホンジカ、ウシ、スイギュウ、ヤギ、ヒツジ、ニホンカモシカの比較を行った。

第1章 シトクロム b 遺伝子の塩基配列

ミトコンドリアは原核生物が真核生物の祖先に共生したものであるといわれ、染色体遺伝子とは別に独自の遺伝子系を持っている。その全遺伝子は約 1.6kb と少ない塩基数から構成されているため、塩基配列がいくつかの種について決定されている。1989年 Kocher らがミトコンドリア遺伝子の保存領域に PCR のプライマーを設定し、多くの種について容易に塩基配列を決定できることを示した。その後、多くの研究者がミトコンドリアのシトクロム b 遺伝子の解析を行った結果、現在シトクロム b 遺伝子は最も多くの種について解析されている遺伝子の1つである。

本研究ではすでに発表されているウシ、ヒト、マウス、ニワトリのシトクロム b 遺伝子の塩基配列からプライマー MI01 (5'-CAAATCCT

CACAGGCCTATTCCTAGC-3')とMI02(5'-TAGGCGAATAGGAAATATCATTTCGGGTTTGAT-3')を設計し、シトクロム b 遺伝子の中央部分 646bp の塩基配列を決定した。PCR 増幅のテンプレートにはブタ、ジャワマメジカ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ニホンジカ、ニホンカモシカで筋肉から抽出したDNA、スイギュウで血液から抽出したDNA、サイガ、シャモア、シロイワヤギ、ゴールル、シーロー、タイワンカモシカで毛根を用いた。PCR によって増幅したフラグメントはアガロースゲル電気泳動と限外濾過フィルター遠心濾過ユニットを用いて精製し、サイクルシーケンス法で反応後、全自動シーケンサで塩基配列を決定した。

さらに、遺伝子領域による塩基置換の片寄りの有無を検討するため、ウシ、ジャワマメジカ、ニホンジカ、スイギュウ、ニホンカモシカについてはシトクロム b 遺伝子の全塩基配列 1140bp を決定した。塩基配列の決定にはプライマーMI01, MI02 の他にMI03(5'-GACTAATGATATGAAAAACCATCGTTG-3'), MI04(5'-TTGTTCTTCATCTCTGGTTTACAAGAC-3'), MI05(5'-TCCACGAAACAGGATCCAACAACCC-3')を用いてPCR増幅を行った。

その結果、ウシ、ジャワマメジカ、ニホンジカ、スイギュウ、ニホンカモシカのシトクロム b 遺伝子の全塩基配列を決定し、その他の動物は部分塩基配列 646bp を決定した。

第2章 κ -カゼイン遺伝子の塩基配列

乳中に存在するカゼインミセルは蛋白質として α 、 β 、 κ -カゼインをもち、これら分子の複合体として構成されている。 κ -カゼイン遺伝子はゲノム中にシングルジーンとして存在し、フィブリノ

ーゲン遺伝子属から進化した後、他の遺伝子との転移や交差はしていないものと考えられる。また、カゼインミセルの構造を保持する上である程度の制約があるものの、すでに決定されている哺乳類の κ -カゼイン遺伝子間でかなりの塩基配列の違いが見いだされている。このため κ -カゼイン遺伝子は常染色体に存在する「分子時計」のよい候補遺伝子と考えられる。

今までに発表されている κ -カゼイン遺伝子の塩基配列はmRNAから作成したcDNAの塩基配列で、ゲノムDNAの配列はウシについてしか決定されていない。cDNAはそれが発現している新鮮な組織からしか作成できないため、塩基配列を決定できる対象生物は限られている。そこで、本研究ではゲノムDNAから κ -カゼイン遺伝子の塩基配列を直接決定することを試みた。ゲノムDNAを対象にすれば雄からでも塩基配列を決定することができ、また毛根試料から決定することもできる。

ウシの κ -カゼイン遺伝子はエキソンIからエキソンVまでの5つのエキソンに分かれてコードされており、その全長は10kbを超えている。このため、ゲノム上の κ -カゼイン遺伝子の塩基配列全てを決定することは困難である。アミノ酸に翻訳される領域はシグナルペプチド領域を含め、エキソンのII, III, IVにコードされている。本研究ではアミノ酸翻訳領域だけを対象に塩基配列の決定を行い、その結果から κ -カゼインのアミノ酸配列を推定した。

具体的にはウシの κ -カゼイン遺伝子の塩基配列からアミノ酸翻訳領域の外側にプライマーを設計してPCR増幅を行い、各エキソン毎に塩基配列を決定した。エキソンIVについては2つの領域に分割し、配列を決定した。エキソンIIの増幅はプライマー2A(5'-CTAA

TTGTTTAATTTAATTTAGGTGCA-3'), 2B(5'-CAAAACTGATTAGATGAAATTAACCTC-3'), エキソン III はプライマー-3A(5'-TCTTGTTTCTGATTCTTTCTCTGAATCTC-3'), 3B(5'-GGATTCATATCTCTACTGGAAACAAACTTA-3'), エキソン IV はプライマー-4A(5'-TAATACCATTCTGCATAATTTATTTTTTTTACAG-3'), 4B(5'-CTGCGTTGTCTTCTTTGATGTCTC-3'), 4C(5'-CCCACATTTATCATTTATGGCCATTCC-3'), 4D(5'-GATTTCTGTTTTATCCTGATTTTTCTTTGG-3')を用いた。

その結果, ブタのエキソン II, III とジャワマメジカのエキソン II を除き, 試験対象とした動物全ての κ -カゼイン遺伝子のアミノ酸翻訳領域の塩基配列を決定することができた。この方法によって決定した塩基配列はすでに mRNA から決定されていたブタ, ウシ, ヤギ, ヒツジの塩基配列と多型と考えられる部分を除き一致していた。これは本研究に用いた方法で, 常染色体上に存在する遺伝子のアミノ酸翻訳領域の塩基配列を容易に決定できることを示しており, 複数のエキソンに散在する遺伝子をクローニングすることなしに直接決定した最初の例である。

第3章 成長ホルモンプロモーター領域の塩基配列

シカ科の分岐位置についてシトクロム b 遺伝子と κ -カゼイン遺伝子の系統図は異なった結果を示している。分子進化の推定は用いた遺伝子の種類による誤差を含んでいるため, 複数の遺伝子からの推定がより正確な結果を与える。また, 機能が異なり, 進化速度の違う遺伝子の比較がよい結果を与えると考えられる。

アミノ酸翻訳領域の上流部は RNA ポリメラーゼの結合部位をはじめ, 多くの転写調節領域を含んでいる。シカ科がウシ科の中に含まれるのか, 否かを検討するため, ニホンジカ, ウシ, スイギュウ,

ヤギ, ヒツジ, ニホンカモシカの成長ホルモンプロモーター領域290bpの塩基配列を決定した。PCRのプライマーはウシ成長ホルモンの塩基配列に基づくGHP1(5'-TCTCAAGCTGAGACCCTGTGTGCACA-3'), GHP2(5'-CGAATGGAGGGGATTTTAGCGAGCTTAC-3')を用いた。

PCR産物から決定された塩基配列はウシ, ヤギ, ヒツジですでに発表されている塩基配列と一致していた。塩基配列のホモロジーを比較すると, ウシに対しウシ科のスイギュウ, ヤギ, ヒツジ, ニホンカモシカはそれぞれ98.5, 97.1, 97.1, 97.8%のホモロジーを示し, 配列はよく保存されていた。一方, シカ科のニホンジカは94.9%のホモロジーで, これらよりもやや離れた種であることを示していた。

第4章 分子系統樹の作成とその比較

シトクロムb遺伝子とκ-カゼイン遺伝子について塩基配列, アミノ酸配列, 双方の分子系統樹を作成した。系統樹の作成は遺伝的な距離に基づく近隣結合法⁵⁷⁾を用いた。また, 系統樹の分岐パターンの検定にはFeisensteinの開発したブーツストラップ法¹⁷⁾を用いた。

シトクロムb遺伝子は塩基置換速度が速いため, 最近になって分岐した種の系統を比較するには適していた。このデータからカモシカ属のシーロー, タイワンカモシカ, ニホンカモシカの3種の系統関係が明らかになった。形態的な分類ではタイワンカモシカとニホンカモシカが亜種ではないかともいわれているが, シトクロムb遺伝子の配列はシーローとタイワンカモシカの近縁関係を示し, ニホンカモシカはそれ以前に分岐したことが明かとなった。しかし, ブーツストラップ値は低いもののニホンジカがウシ科の分岐に含まれ,

シトクロム b 遺伝子の系統樹はウシ科の単系統を支持しなかった。

逆にκ-カゼイン遺伝子の分子系統樹はヤギ亜科内部の分岐についてははっきりした結果を示せなかったものの、ウシ科の単系統については高いブーツストラップ値で支持していた。

これら2つの系統樹の違いは遺伝子の変異速度の違いに起因するものと考えられ、分岐500-1000万年前くらいまではシトクロム b 遺伝子、それ以前の分岐にはκ-カゼイン遺伝子が解析に適していると考えられた。

成長ホルモンプロモーター領域の系統樹はアウトグループとするブタの塩基配列が一部未決定なため不十分なものとなった。しかし、塩基置換数の比較はニホンジカが他のウシ科の動物のグループから離れていることを示しており、ウシ科の単系統説を支持すると考えられた。

これらの結果を総合すると、ウシ亜目において分子進化から推定される系統樹はほぼ現在の分類と一致していた。さらに、本研究によってカモシカ属3種の新しい系統関係とヤギ亜科動物のより詳しい系統関係が明かとなった。

謝 辞

本研究の遂行に当たりニホンカモシカ、タイワンカモシカ、シーロー、ゴーラル、シャモア、シロイワヤギ、サイガの試料は日本カモシカセンターの森豊氏、スイギュウの試料は筑波大学農林学類の本間秀弥博士、ニホンジカの試料は宮城県農業短期大学の石田光晴助教授、ジャワマメジカの試料は農林水産省家畜衛生試験場福田勝洋博士よりご提供頂きました。厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に当たりご支援を頂きました日本商事株式会社医薬開発センターの田畑利幸氏、農林水産省食品総合研究所の門間美千子博士、齋藤昌義博士に衷心より感謝いたします。

本研究をまとめるのに際し、ご指導とご高配を賜りました茨城大学農学部小杉山基昭教授と宇都宮大学農学部村松晉教授に謹んで感謝の意を表します。

引用文献

1) Adachi J., Cao Y., and Hasegawa M. (1993) Tempo and mode of mitochondrial DNA evolution in vertebrates at amino acid sequence level: Rapid evolution in warm-blooded vertebrates. *J. Mol. Evol.* 36:270-281.

2) Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D. (1983) *Molecular biology of the cell.* Garland Publishing, Inc. New York & London.

3) Alexander L.J., Stewart A.F., Mackinlay A.G., Kapelinskaya T.V., Tkach T.M., and Gorodetsky S.I. (1988) Isolation and characterization of the bovine κ -casein gene. *Eur. J. Biochem* 178:395-401.

4) Allard M.W., Miyamoto M.M., Jarecki L., Kraus F., and Tennant M.R. (1992) DNA systematics and evolution of the artiodactyl family Bovidae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3972-3976.

5) Anderson S., Bankier A.T., Barrell M.H., de Bruijn 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.

6) 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.

7) Beintema J.J., Fitch W.M., and Carsana A. (1986) Molecular evolution of pancreatic-type ribonucleases. *Mol. Biol. Evol.* 3:262-275.

8) 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.

9) Brown W.M., George M. Jr., Wilson A.C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:1967-1971.

10) 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.

11) Cavalli-Sforza L.L. and Edwards A.W.F. (1967) Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *Amer. J. Hum. Genet.* 19:233-257.

- 12) Coll A., Folch J.M., Sanchez A. (1993) Nucleotide sequence of the goat κ -casein cDNA. *J. Anim. Sci.* 71:2833-2833.
- 13) クラウス・ポーレ (1991) カモシカの仲間の世界分布. in: 大町山岳博物館編. カモシカ / 氷河期を生きた動物. 信濃毎日新聞社. 長野.
- 14) Darwin C. (1859) *On the origin of species.* Murray, London.
- 15) Desjardins P., and Morais R. (1990) Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genomes: A novel gene order in higher vertebrates. *J. Mol. Biol.* 212:599-634.
- 16) Eck R.V. and Dayhoff M.O. (1966) in: Dayhoff M.O. (ed) *Atlas of protein sequence and structure.* Natl. Biomed. Res. Found. Silver Springs, Md.
- 17) Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791
- 18) Fitch W.M. (1971) Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* 20:406-416.

19) Fitch W.M. (1977) On the problem of discovering the most parsimonious tree. Amer.Natur. 111:223-257.

20) Fitch W.M. & Margoliash E. (1967) Construction of phylogenetic trees. Science 155:279-284.

21) Fitch W.M. & Margoliash E. (1967) A method for estimating the number of invariant amino acid coding positions in a gene using cytochrome c as a model case. Biochem.Genet. 1:65-71.

22) Furet J.P., Mercier J.C., Soulier S., Gaye P., Huc-Delahaie D., and Vilotte J.L. (1990) Nucleotide sequence of ovine κ -casein cDNA. Nuc.Acids Res. 18:5286-5286.

23) Gatesy J., Yelon D., DeSalle R., and Vrba E.S. (1992) Phylogeny of the Bovidae (Artiodactyla, Mammalia), based on mitochondrial ribosomal DNA sequences. Mol.Biol.Evol. 9:433-446.

24) Gojobori T., Ishii K., and Nei M. (1982) Estimation of average number of nucleotide substitutions when the rate of substitution varies with nucleotide. J.Mol.Evol. 18:414-423.

- 25) Goodman M. (1981) Decoding the pattern of protein evolution. Prog. Biophys. Molec. Biol. 37:105-164.
- 26) Hall L. (1990) Nucleotide sequence of guinea-pig κ -casein cDNA. Nucleic Acids Res. 18:6129.
- 27) 長谷川政美. (1984) DNAからみた人類の起原と進化. 海鳴社. 東京.
- 28) Hashimoto T., Otaka E., Adachi J., Mizuta K., and Hasegawa M. (1993) The giant panda is closer to a bear, judged by α - and β -hemoglobin sequences. J. Mol. Evol. 36:282-289.
- 29) 平凡社監修 (1986) 動物大百科. 4 大草食獣. 平凡社. 東京.
- 30) Higuchi R., von Beroldingen C.H., Sensabaugh G.F., and Erlich H.A. (1988) DNA typing from single hairs. Nature 332: 543-546.
- 31) 今泉吉典 (1988) ウシ科の分類. in: 世界の動物 / 分類と飼育 7 偶蹄目 III. 東京動物園協会. 東京

32) Ina Y. (1992) ODN : Molecular evolutionary analysis system for DNA and amino acid sequences. Version 1.1.1. DDBJ. Mishima.

33) Ingraham H.A., Albert V.A., Chen R., Crenshaw III E.B., Elsholtz H.P., Kapiloff M.S., Mangalam H.J., Swanson L.W., Tracy M.N., and Rosenfeld M.G. (1990) A family of POU-domain and PIT-1 tissue specific transcription factors in pituitary and neuroendocrine development. Annu. Rev. Physiol., 52:773-791.

34) 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.

35) Kimura M. (1968) Evolutionary rate at the molecular level. Nature 217:624-626.

36) Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16:111-120.

37) Kimura M. (1983) The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge University Press, Cambridge

38) Kioka N., Manabe E., Abe M., Hashi H., Yato M., Okuno M., Yamano Y., Sakai H., Komano T., Utsumi K. and Iritani A. (1989) Cloning and sequencing of goat growth hormone gene. Agric. Biol. Chem., 53:1583-1587.

39) Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., P?bo S., Villablanca F.X., and Wilson A.C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in mammals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:6196-6200.

40) Kocher T.D., and White T.J. (1989) Evolutionary analysis via PCR. in: Erlich H.A. (ed) PCR technology. Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, New York, p137-147.

41) Kraus F., and Miyamoto M.M. (1991) Rapid cladogenesis among the pecoran ruminants: evidence from mitochondrial DNA sequences. Syst. Zool. 40:117-130.

42) Levine W.B., Alexander L.J., Hoganson G.E., and Beattie C.W. (1992) Cloning and sequencing of the porcine κ -casein cDNA. Anim. Genet. 23:361-363

43) Margoliash E. (1963) Primary structure and evolution of cytochrome c. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 50:672-679.

44) Mayer E. (1986) Uncertainty in science: is the giant panda a bear or a raccoon? Nature 323:769-771.

45) Mercier J.C., Brignon G., and Ribadeau-Dumas B. (1973) Structure primaire de la caseine κ - B bovine. Sequence complete. Eur. J. Biochem. 35: 222-235.

46) Mercier J.C., Chobert J.M., and F. Addeo. (1976) Comparative study of the amino acid sequences of the caseinomacropetides from seven species. FEBS Letters 72: 208-214.

47) Mercier J.C., Vilotte J.L., and Provot C. (1990) Structure and function of milk protein genes. in: Geldermann H., and Ellendorff F. (eds) Genome analysis in domestic animals. VCH, Weinheim, 233-258.

48) Nakhashi H.L., Grantham F.H., and Gullino P.M. (1984) Expression of κ -casein in normal and neoplastic rat mammary gland is under control of prolactin. J. Biol. Chem. 259:14894-14898

49) 根井正利.(1990) 分子進化遺伝学 (五條堀孝, 斎藤成也 訳).

57-95. 培風館. 東京.

50) Nelson C., Albert V.R., Elsholtz H.P., Lu L.I.-W., and Rosenfeld G.(1988) Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. *Science* 239:1400-1405.

51) Norman M.F., Lavin T.N., Baxter J.D., and West B.L.(1989) The rat growth hormone gene contains multiple thyroid response elements. *J.Biol.Chem.*, 264:12063-12073.

52) Novacek M.J.(1982) Information for molecular studies from anatomical and fossil evidence on higher eutherian phylogeny. in: Goodman M.(ed) *Macromolecular sequences in systematic and evolutionary biology*. Plenum Press, New York, p3-41.

53) Ohno S.(1970) *Evolution by gene duplication*. Springer-Verlag. Berlin.

54) Orian J.M., Omahony J.V., and Brandon M.R.(1988) Cloning and sequencing of the ovine growth hormone gene. *Nucleic Acids Res.* 16: 9041.

- 55) Pan W.T., Liu Q., and Bancroft C. (1990) Identification of a growth hormone gene promoter repressor element and its cognate double- and single-stranded DNA-binding proteins. *J. Biol. Chem.*, 265:7022-7028.
- 56) Saiki R., Scharf S., Faloona F., Mullis K., Horn G., Erlich H., and Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- 57) Saitou N., and Nei M. (1987) The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- 58) Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 9.16-9.19.
- 59) Sarich V.M. and Wilson A.C. (1967) Immunological time scale for hominid evolution. *Science* 158:1200-1203.
- 60) Schlieben S., Erhardt G., and Senft B. (1991) Genotyping of bovine κ -casein (κ -CNA, κ -CNB, κ -CNC, κ -CNE) following DNA sequence amplification and direct sequencing of κ -CNE PCR product. *Anim. Genet.* 22: 333-342.

61) Stewart A.F., Willson I.M., and Mackinlay A.G. (1984)
Nucleic sequences of bovine alpha s1- and kappa-casein cDNAs.
Nucleic Acids Res. 12:3895-3900.

62) Sokal R.R. and Michener C.D. (1958) A statistical method
for evaluating systematic relationships.
University of Kansas Sci. Bull. 28:1409-1438.

63) 館野義男 (1984) 分子系統樹の作り方とその評価.
in: 木村資生 編. 分子進化学入門. 164-184. 培風館. 東京.

64) Theill L.E., Castrillo J.-L., Wu D., and Karin M. (1989)
Dissection of functional domains of the pituitary-specific
transcription factor GHF-1. Nature 342:945-948.

65) Thompson M.D., Dave J.R., and Nakhasi H.L. (1985)
Molecular cloning of mouse mammary gland κ -casein:
Comparison with rat κ -casein and rat and human
 γ -fibrinogen. DNA 4:263-271.

66) Vize P.D., and Wells J.R.E. (1987) Isolation and
characterization of the porcine growth hormone. Gene 55:
339-344.

67) Woychik R.P., Camper S.A., Lyons R.H., Horowitz S.,
Goodwin E.C., and Rottman F.M. (1982) Cloning and nucleotide
sequencing of the bovine growth hormone gene.
Nucleic Acids Res. 10:7197-7210.

68) Zuckerkandl E. and Pauling L. (1962) Molecular disease,
evolution, and genetic heterogeneity. in: Kasha M. and
Pullman B. (eds). Horizons in biochemistry. 189-225.
Academic Press. New York.

69) Zuckerkandl E. and Pauling L. (1965) Evolutionary diverg
ence and convergence in proteins. in: Bryson V. and Vogel H.
J. (eds). Evolving genes and proteins. 97-166.
Academic Press. New York.

論文目録

- 1) Chikuni K., Tabata T., Monma M., and Saito M. (1994)
Direct sequencing of the promoter region of growth hormone gene from Artiodactyla.
Anim. Sci. Technol. (Jpn) 65, 120-124.
- 2) 千国幸一, 田畑利幸, 斎藤昌義, 門間美千子 (1994)
シトクロム b 遺伝子の塩基配列の違いによる肉種鑑別.
日畜会報, 65, 571-579.
- 3) Chikuni K., Tabata T., Saito M., and Monma M. (1994)
Direct sequencing of the water buffalo (*Bubalus bubalis*)
 κ -casein gene. Anim. Sci. Technol. (Jpn) 65, 652-655.
- 4) Chikuni K., Mori Y., Tabata T., Saito M., Monma M., and
Kosugiyama M. (1995) Molecular phylogeny based on the
 κ -casein and cytochrome b sequences in the mammalian
suborder Ruminantia. J. Mol. Evol. 41, 859-866.

口頭発表

- 1) 千国幸一, 田畑利幸, 門間美千子, 齋藤昌義 (1992)
成長ホルモン遺伝子プロモーター領域のダイレクトシーケンシング. 第85回日本畜産学会大会, 要旨集 p125.
- 2) 千国幸一, 田畑利幸, 門間美千子, 齋藤昌義 (1993)
ミトコンドリアDNAシトクロムb領域の塩基配列によるツグミ類の識別. 第87回日本畜産学会大会, 要旨集 p74.
- 3) 田畑利幸, 千国幸一, 森豊, 齋藤昌義, 門間美千子,
小杉山基昭 (1993) カモシカ類のミトコンドリアDNAシトクロムb塩基配列の比較. 第87回日本畜産学会大会, 要旨集 p74.
- 4) 千国幸一, 田畑利幸, 齋藤昌義, 門間美千子 (1994)
偶蹄目 κ -カゼイン遺伝子のPCR増幅とアミノ酸配列の比較.
第88回日本畜産学会大会, 要旨集 p219.

参考論文

- 1) 千国幸一, 神部昌行, 小沢忍, 小石川常吉, 吉武充, 矢野信礼
(1985) 豚の背脂肪の厚さ, 脂肪細胞の大きさと脂肪酸組成の
関係. 日豚研誌, 22, 181-187.
- 2) 千国幸一, 神部昌行, 小沢忍, 小石川常吉, 吉武充, 矢野信礼
(1985) 脂肪酸組成の品種間差と性差の成長に伴う変化.
日豚研誌, 22, 200-205.
- 3) 千国幸一, 神部昌行, 小沢忍, 小石川常吉, 吉武充, 矢野信礼
(1986) 背脂肪の厚さと脂肪細胞の大きさの品種間差と性差の
成長に伴う変化. 日豚研誌, 23, 9-13.
- 4) 千国幸一, 小沢忍, 三橋忠由, 三津本充, 小石川常吉,
加藤貞雄, 小堤恭平(1989) ノルアドレナリン注入が肥育牛の
血中遊離脂肪酸組成に与える変化. 日畜会報, 60, 29-34.
- 5) 千国幸一, 神部昌行, 小沢忍, 小石川常吉, 吉武充(1989)
血中遊離脂肪酸組成の成長に伴う変化. 日豚会誌, 26, 99-
103.
- 6) 千国幸一, 神部昌行, 田中博, 小石川常吉, 加藤貞雄,
小堤恭平(1989) ガスクロマトグラフィーを用いる脂肪酸不飽
和化酵素活性の測定法. 日畜会報, 60, 951-957.

- 7) Chikuni K., Ozutsumi K., Koishikawa T., and Kato S. (1990)
Species identification of cooked meats by DNA
hybridization assay. Meat Sci. 27, 119-128.
- 8) 千国幸一, 陰山聡一, 小石川常吉, 加藤貞雄, 小堤恭平 (1991)
P C R 法を用いた牛 κ -カゼイン遺伝子型の分析. 日畜会報,
62, 654-659.
- 9) 千国幸一, 寺田文典, 陰山聡一, 小石川常吉, 加藤貞雄,
小堤恭平 (1991) P C R 法を用いた牛成長ホルモン遺伝子
1 2 7 番アミノ酸部位塩基配列の多型検出. 日畜会報,
62, 660-666.
- 1 0) Chikuni K., Tabata T., Monma M. and Saito M. (1994)
Polymerase chain reaction assay for detection of sheep
and goat meats. Meat Sci. 37, 1-9.
- 1 1) 千国幸一, 長妻常人, 田畑利幸, 門間美千子, 斎藤昌義,
小沢忍, 小堤恭平 (1994) 和牛において見いだされた成長ホル
モン遺伝子の多型. 日畜会報, 65, 340-346.

