

家畜とその野生種との比較遺伝解析

Comparative genetic analysis between domestic animals and their wild origins

田中和明

麻布大学獣医学部

Kazuaki Tanaka

School of Veterinary Medicine Azabu University

Abstract: In this study, we analyzed DNA sequence of mitochondrial DNA (mtDNA) control regions on the 130 native domestic pigs and eight wild boars in the mainland South and Southeast Asian countries including Bhutan, Cambodia, Laos, Myanmar, and Vietnam. Forty-four haplotypes were found in the 138 individuals analyzed, 41 were in the domestic pigs and four haplotypes were in wild boars. One haplotype was shared by domestic and wild population in Bhutan. In other case, mtDNA of wild boars did not show close affinity to that of the domestic pigs in the same location, indicating that the native domestic pigs in these countries were not originated in the present habitat. Phylogenetic analyses of mtDNA haplotypes in the domestic pigs recapitulated several major mtDNA clusters identified in other studies, but 11 haplotypes were grouped in a new cluster we named MTSEA. In most case, more than one lineage groups were present in a sampling station, indicating that the present indigenous domestic pigs in this region may have multiple origins because of gene flow among the different maternal lineage. The MTSEA haplotypes were present relatively high frequency in domestic pigs in the mountainous area of mainland Southeast Asia (Cambodia and Laos), and a few found in Myanmar and Bhutan. The distribution of MTSEA haplotypes are in great conformity with the distribution of present-day Mon-Khmer language and indicated the existence of yet another independent domestication of pigs. The D2 haplotypes that distribute high frequency (almost 100 %) throughout the Chinese breeds were dominant in Bhutan, Myanmar, and Vietnam. These results suggest an existence of human-mediated dispersal of pigs from north to the southward during the historically expansion of Sino-Tibetan and Tai peoples from South China. The D3 haplotypes that previously reported in north India were found in domestic and wild populations in Bhutan. Presence of D3 haplotypes both in a sympatric domestic and wild population is an important proof of independent domestication event and/or great gene-flow between wild boar and domestic population in the foot of Himalaya.

1. 目的

家畜とは、人間が野生動物を捕らえて飼育し、人間の管理のもとで繁殖させ、その有用性を高める方向に選別することで、野生の状態のものと明らかに区別しうる遺伝的特徴を備えた動物である。人類が野生動物の家畜化を行った歴史はおよそ8000年から

1万年であるとされることから、家畜とその野生原種の間には存在する多くの形質の差異は、生物種の進化においては極めて短い時間で生じたことになる。家畜とその野生種の遺伝子を比較することで、動物の家畜化に伴って、どのような遺伝子が選択されたのかを知ることができる。また、野生動物の家畜化の起源と歴史を明らかにすることが可能である。し

かし、家畜の野生原種の多くが絶滅あるいは、個体数を大きく減少させていることは、集団遺伝学的手法を持って、野生集団と家畜を直接比較する上で大きな障害となっている。例えば、家畜ウシの主な野生種であるオーロックスは、すでに絶滅しているのので、遺伝学的な調査を行うには、出土する骨や化石を用いなければならない。当然、解析が煩雑になるうえ、解析できる標本数も制限される。また、馬の野生種の一つと考えられているモウコノウマ (*Equus przewalskii*) の現存する個体群は、20世紀中ごろにヨーロッパで飼育されていたわずか13頭(雌8頭雄5頭)を始祖として人の手で増殖されたものである。その上、13頭の中の1頭は、雌の家畜馬である(Hedric *et al.*, 1999)。現在、モウコノウマの個体数は1000頭以上に回復しているが、当然のこととして、近年の創始者効果や近親交配に伴う遺伝的浮動の影響を強く受けているため、正常な野集団とみなして家畜馬と比較するには細心の注意が必要である。これに対して、豚の主な野生種であるユーラシアイノシシ (*Sus scrofa*) は、北アフリカおよびヨーロッパから東アジアに至るまでユーラシア大陸のほぼ全域、および我が国を含むアジアの島嶼部にま広大な地域分布し、今なお豊富な個体群を維持している。これは、家畜とその野生集団とを直接比較する機会を提供することになる。

我々は、これまで報告の少ない、大陸部東南・南アジアにおける在来ブタとイノシシとのミトコンドリアDNA (mtDNA) の配列を比較解析し、この地域で伝統的に飼育されているブタとイノシシの系統関係および遺伝的多様性を評価した。なお、本報告は、研究代表者が公表した、「Mitochondrial diversity of native pigs in the mainland South and South-east Asian countries and its relationships between local wild boars」(Tanaka *et al.*, 2008, *Animal Science Journal* p417-434) の内容を要約したものである。

2. 方法

本研究では、ブータン、カンボジア、ラオス、ベトナムおよび、ミャンマーから得られた、ブタ130個体、イノシシ8個体を解析の対象とした。試料の採取地と個体数を、Fig. 1およびTable 1に示した。これらのDNA試料は在来家畜研究会より供与をうけた

ものである。mtDNAの中で最も変異性に富むコントロール領域を含む約1420 bpのDNA断片をOkumuraら(2001)に従ってPCR増幅した。用いたプライマーは、mitL44 (TCCACCATCAGCACCCAAAG) およびmitH45 (TTCAGTGCCTTGCTTTGATA) である。約1.4 kbのPCR産物を、Micron-PCR (Millipore, Bedford, MA, USA) を用いて限外濾過法により精製した。精製したPCR産物を鋳型として、mitL44プライマーを用いて、BigDye Terminator Cycle Sequencing v1.1 Ready Reaction Kit および、モデル3100 DNAシーケンサー(共にApplied Biosystems, Foster City, CA, USA)の使用説明書に従って、シーケンス反応および塩基配列の解読を行った。これにより、ブタおよびイノシシ138個体における約510 bpの配列を解読することが可能であった。決定した領域は、基準となるブタmtDNAの完全長配列(Ursing & Arnason 1998)における15433番地から15944番地に相当する。決定した138個体の配列はClustalW (Thompson *et al.* 1994)によってアライメントを行った。この結果、138個体の配列は44種類のハプロタイプに分類された。次に、各ハプロタイプ間の分子進化的関係を明らかにするため、プログラムパッケージMrBayes 3.1 (Huelsenbeck *et al.* 2001; Ronquist & Huelsenbeck 2003)を用いてMonte Carlo-Markov chain (MCMC)法による分子系統樹を構築した。

3. 結果と考察

138個体のブタおよびイノシシのmtDNAを解析した結果、44種類のハプロタイプを発見し、これらをH1(ハプロタイプ1)からH44(ハプロタイプ44)と命名した。これらの配列は、AB252783からAB252826までの登録番号でDDBJに登録した。44ハプロタイプのうち24種類は複数の個体から検出され、残りの20種類は、調査した138個体の中ではそれぞれ一度しか検出されなかった。また、ブタからは41種類のハプロタイプが検出され、イノシシからは4種類のハプロタイプが検出された。ブタとイノシシの間で共有されていたハプロタイプは1種類のみであった(Table 1)。

Fig. 2は、発見した44ハプロタイプに、データベースより取得したブタmtDNA配列を追加し、合計84ハプロタイプを用いて作成した分子系統樹であ

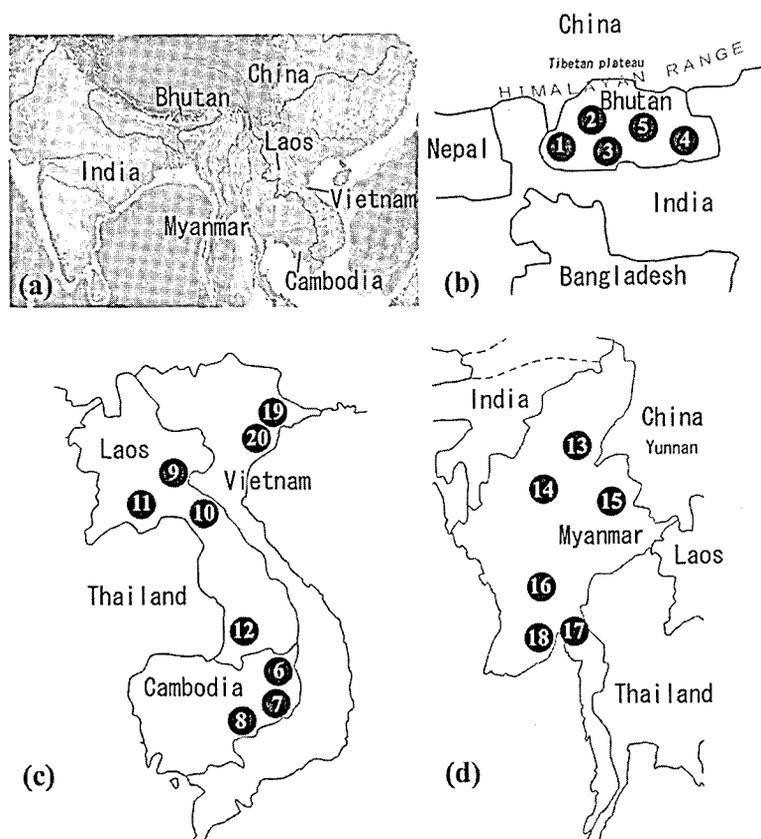


Figure 1 Localities of domestic pigs and wild boars analyzed in this study. (a) Map of mainland South and Southeast Asia. (b) Map of Bhutan; (1) Haa, (2) Punaka, (3) Tsiwang, (4) Mongar, (5) Bumthang districts. (c) Map of Indochina, Cambodia; (6) Ratanakiri, (7) Mondulkiri, (8) Kampong Cham provinces. Laos; (9) Xiangkhoang, (10) Borikamxai, (11) Vientiane, (12) Champasak provinces. Vietnam; (19) Quang Ninh (20) Na Nam provinces. (d) Map of Myanmar; (13) Kachin state, (14) Sagaing division (15) Shan state, (16) Bago division, (17) Kayin state, (18) Yangon division.

る。Fig. 2に示したように、今回検出した44種類のハプロタイプは全てアジアクレードに含まれ、欧米由来の改良品種に広く分布するヨーロッパ・クレードに含まれるものは存在しなかった。我々が発見した44のハプロタイプは、4つのクラスター（D2, MTSEA, D3, カンボジアイノシシ）に細分された。D2クラスターは、Larson *et al.* (2005) によって提唱されたグループで、中国の大多数のブタおよび、ニホンイノシシを含む極東アジアのイノシシでは、ほぼ100%頻度で分布する。また、歴史的に中国産のブタの影響を受けた欧米系改良品種にも一定の頻度で広く分布している (Okumura *et al.* 2001; Fang & Andersson, 2006)。今回の調査でも44ハプロタイプのうち28種類までが、D2に含まれた。さらに頭数においては、130頭のブタにおいて、74頭までがD2

クラスターに含まれる配列を保有していた。D2は、雲南省やチベットを含む中国のブタに、ほぼ100%の頻度で分布する (Fang & Andersson, 2006)。これは、東南・南アジアにおける在来ブタの起源が、過去に現在の中国地域から伝播したことを示すと考えられる。これに対して、MTSEAクラスターは、今回の解析では11種類のハプロタイプを含む大きなクラスターであるが、これに対応する系統群はこれまで中国から報告されていない。MTSEAは、ラオスおよびカンボジアの丘陵地帯でモン・クメール系の言語を利用する民族集団によって飼育されているブタから高い頻度で発見され、ミャンマーおよびブータンにも小数分布していた (Fig. 1, Table 1)。このことから、ブタにおけるMTSEA母系起源は、大陸部東南アジアで中国世界とは独立に野生イノシシの家

Table 1 Information on DNA samples of domestic pigs and wild boars used in this study and frequencies of the mtDNA haplotypes

| Countries | Locality ^(a) | | No. of samples | Haplotypes (No. of samples) | Classification of Haplotypes ^(b) | | | Frequency of mtDNA group (%) | | |
|----------------------|---------------------------|------|----------------|--|---|-------|----|------------------------------|-------|-------|
| | (Map positions on Fig. 1) | | | | D2 | MTSEA | D3 | D2 | MTSEA | D3 |
| Domestic pigs | | | | | | | | | | |
| Bhutan | Haa | (1) | 6 | H14, H15, H16, H44(3) | 3 | 0 | 3 | 50.0 | 0.0 | 50.0 |
| | Punaka | (2) | 4 | H12(2), H13(2) | 4 | 0 | 0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 |
| | Tsirang | (3) | 12 | H12(4), H43(7), H44 | 4 | 0 | 8 | 33.3 | 0.0 | 66.7 |
| | Mongar | (4) | 8 | H11, H12(5), H29(2) | 6 | 2 | 0 | 75.0 | 25.0 | 0.0 |
| | Total | | 30 | | 17 | 2 | 11 | 56.7 | 6.7 | 36.7 |
| Cambodia | Ratanakiri | (6) | 25 | H5, H17(2), H23, H30, H31(3), H34(5), H38(12) | 4 | 21 | 0 | 16.0 | 84.0 | 0.0 |
| | Mondulkiri | (7) | 24 | H8(5), H10(10), H24(3), H31(4), H32, H38 | 18 | 6 | 0 | 75.0 | 25.0 | 0.0 |
| | Total | | 49 | | 22 | 27 | 0 | 44.9 | 55.1 | 0.0 |
| Laos | Xiangkhoang | (9) | 5 | H20, H34, H36(2), H37 | 1 | 4 | 0 | 20.0 | 80.0 | 0.0 |
| | Borikamxai | (10) | 4 | H8, H24, H27, H36 | 3 | 1 | 0 | 75.0 | 25.0 | 0.0 |
| | Vientiane | (11) | 4 | H24, H35(2), H36 | 1 | 3 | 0 | 25.0 | 75.0 | 0.0 |
| | Champasak | (12) | 3 | H31(2), H38 | 0 | 3 | 0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 |
| | Total | | 16 | | 5 | 11 | 0 | 31.3 | 68.8 | 0.0 |
| Myanmar | Kachin | (13) | 12 | H1(4), H4, H8(2), H12, H18, H28(3) | 12 | 0 | 0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 |
| | Sagaing | (14) | 1 | H6 | 1 | 0 | 0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 |
| | Shan | (15) | 9 | H7(2), H22(3), H26(2), H35, H39 | 7 | 2 | 0 | 77.8 | 22.2 | 0.0 |
| | Bago | (16) | 4 | H3, H25, H33, H35 | 2 | 2 | 0 | 50.0 | 50.0 | 0.0 |
| | Kayin | (17) | 3 | H2, H21, H25 | 3 | 0 | 0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 |
| | Total | | 29 | | 25 | 4 | 0 | 86.2 | 13.8 | 0.0 |
| Vietnam | Quang Ninh | (19) | 5 | H9(3), H10, H19 | 5 | 0 | 0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 |
| | Na Nam | (20) | 1 | H23 | 1 | 0 | 0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 |
| | Total | | 6 | | 6 | 0 | 0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 |
| Wild boars | | | | | | | | | | |
| Bhutan | Bumthang | (5) | 3 | H43(3) | 0 | 0 | 3 | 0.0 | 0.0 | 100.0 |
| Cambodia | Kampong Cham | (8) | 2 | H42(2) | - | - | - | - | - | - |
| | Mondulkiri | (7) | 2 | H41(2) | - | - | - | - | - | - |
| Myanmar | Yangon | (18) | 1 | H40 | - | - | - | - | - | - |

(a) Localities were shown as districts (dzongdey) in Bhutan, provinces in Cambodia, Laos, and Vietnam. In Myanmar: Kachin, Shan, and Kayin are states; Sagaing, Bago, and Yangon are divisions. (b) See Figure 2 for Classification of Haplotypes.

畜化が行われたことを示す証拠であると考えられる。しかし、カンボジアで、家畜ブタの試料と同所的に得られたイノシシの mtDNA 配列は、MTSEA とは大きく異なっていた (Fig. 2)。これは、MTSEA 型 mtDNA を保有するイノシシの家畜化が、現在 MTSEA 型配列の頻度が高いインドシナ半島ではなく、どこか別の場所で行われたことを強く示唆している。家畜はヒトの移動とともに分布域を広げる特

徴があることから、MTSEA 型 mtDNA を保有する野生集団を発見することができれば、インドシナ半島に居住するモン・クメール語族の起源を明らかにできると期待される。カンボジアのイノシシの持つ mtDNA は、わが国のリュウキュウイノシシが保有する mtDNA と共通の起源をもっており、さらにハワイを含む太平洋の島々における先住民が飼育するブタから見つかる mtDNA クラスタ (D6) と大きな

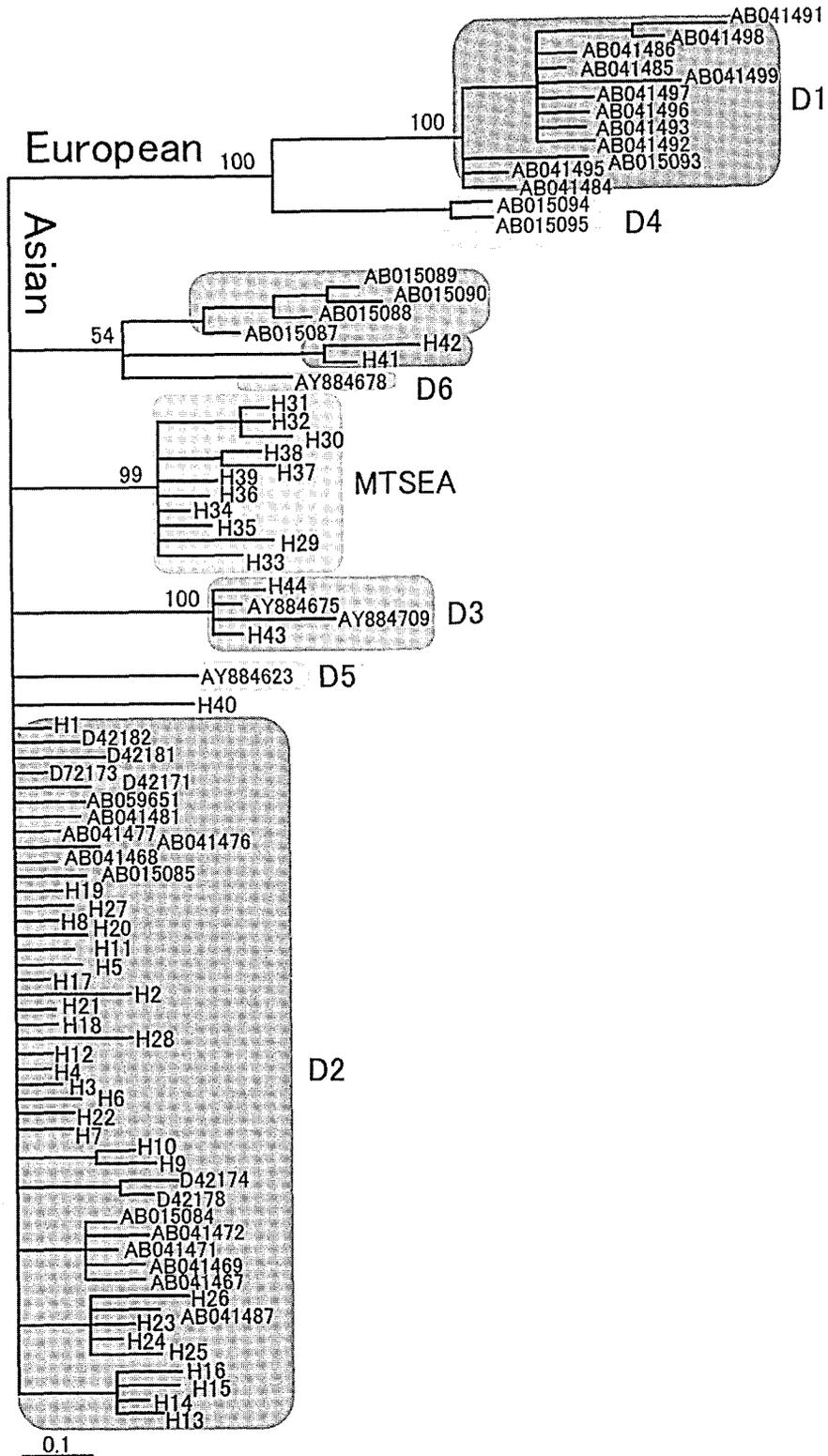


Figure 2. Bayesian (MCMC) consensus tree of 84 porcine mtDNA control region haplotypes. The H1 to H44 were haplotypes found in the 138 individuals we analyzed (Fig. 3), and the other 40 quoted sequences were shown with their GenBank accession numbers. The digits at the nodes are posterior probabilities (%) based on the 28,000,000 generations (discarded the first 25% samples). Length of the bar on the bottom of tree indicates 0.1 expected substitutions per site. The D1 to D6 are represented mtDNA clusters detected in domestic pig populations (Larson *et al.* 2005).

グループを形成した。これは、古代太平洋州に進出を果たした民族集団の起源がインドシナ半島から台湾にかけての地域に由来するという学説に一致し、家畜の起源を調べることで古代における人類の移動を明らかにできることを示している (Larson *et al.*, 2007)。ブータンで発見されたH43とH44は、Larson *et al.* (2005) によって報告されたインド北部のイノシシとブタからなるD3クラスターに含まれた。D3クラスターは、世界で飼育される商業用ブタ品種(ヨーロッパD1・中国D2)と母系起源を大きく異にしている。さらに、今回の調査によりブータンにおいて同所的に得られたブタとイノシシが同一のmtDNAハプロタイプH43を共有していたことから、ヒマラヤ山脈南麓において、独立した家畜化が存在したことが明らかになった。以上のことから、東南・南アジア地域の在来ブタは、ヨーロッパとも中国とも異なる遺伝的背景を持っており、ブタの遺伝資源として極めて重要であることが明らかになった。

4. 要 約

大陸部東南・南アジアにおける在来ブタの遺伝的組成を明らかにするため、ブータン、カンボジア、ラオス、ミャンマーおよび、ベトナムより得られた家畜ブタ130個体、野生イノシシ8個体を用いてミトコンドリアDNA (mtDNA) のコントロール領域の塩基配列の決定と多型解析を行った。138個体の解析から44種類のハプロタイプを検出した。このうち40ハプロタイプは、家畜ブタからのみ発見され、3つは野生イノシシに特異的であった。ブータンで発見された1つのハプロタイプ (H43) は、同所的に家畜ブタと野生イノシシに共通して存在し、野生集団と家畜集団間に母系を介した遺伝子流入が存在することが示唆された。本研究で検出した44ハプロタイプは全てアジアグループに含まれ、欧米系品種に高い頻度認められるヨーロッパグループに分類されるハプロタイプは存在しなかった。系統樹を構築した結果、家畜ブタに存在した41種のハプロタイプは、D2, D3, およびMTSEAの3つのクラスターに分類された。すなわち、東南・南アジア地域の在来ブタは、複数の異なる起源をもつことが明らかになった。D2は、中国全土においてほぼ100%の頻度で分布すると同時に、世界に広く導入されている欧米

系改良品種にも広く分布している。D3は、インド北部においてのみ報告されている。MTSEAクラスターはこれまで報告がなく、ブタmtDNAの新しいクラスターとして本論文において提唱する。MTSEAは、大陸部東南アジアの山地に多く分布し、この分布は、モン・クメール語族の話者の分布とよく一致していた。D2グループに含まれるハプロタイプが5カ国で多数存在したことは、民族の中国世界から南方への移動と関係すると考えられる。D3はブータンにおいてネパール系住民が居住する地域にのみ発見された。すなわち、東南・南アジアにおけるブタmtDNAの3つのグループの出現頻度は、飼養者の言語民俗学的構成とよく一致していた。

文 献

- Fang M, Andersson L. 2006. Mitochondrial diversity in European and Chinese pigs is consistent with population expansions that occurred prior to domestication. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 273: 1803-1810.
- Hedrick PW, Parker KM, Miller EL, Miller PS.(1999) Major histocompatibility complex variation in the endangered Przewalski's horse. *Genetics*. 152: 1701-1710.
- Huelsenbeck, J. P., F. Ronquist, R. Nielsen and J. P. Bollback. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-2314.
- Larson G, Cucchi T, Fujita M, Matisoo-Smith E, Robins J, Anderson A, Rolett B, Spriggs M, Dolman G, Kim TH, Thuy NT, Randi E, Doherty M, Due RA, Bollt R, Djubiantono T, Griffin B, Intoh M, Keane E, Kirch P, Li KT, Morwood M, Pedrina LM, Piper PJ, Rabett RJ, Shooter P, Van den Bergh G, West E, Wickler S, Yuan J, Cooper A, Dobney K.. 2007. Phylogeny and ancient DNA of *Sus* provides insights into neolithic expansion in Island Southeast Asia and Oceania. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 4834-4839.
- Larson G, Dobney K, Albarella U, Fang M, Matisoo-Smith E, Robins J, Lowden S, Finlayson H, Brand T, Willerslev E, Rowley-Conwy P, Andersson L, Cooper A. 2005. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science* 307: 1618-1621.
- Okumura N, Kurosawa Y, Kobayashi E, Watanabe T, Ishiguro N, Yasue H, Mitsuhashi T. 2001. Genetic

- relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in wild boars and several breeds of domesticated pigs. *Animal Genetics*, 32, 139-147
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Tanaka K, Iwaki Y, Takizawa T, Dorji T, Tshering G, Kurosawa Y, Maeda Y, Mannen H, Nomura K, DANG V-B, Chhum-Phith L, Bouahom B, Yamamoto Y, Daing T, Namikawa T. 2008. Mitochondrial diversity of native pigs in the mainland South and South-east Asian countries and its relationships between local wild boars. *Animal Science Journal*. 79: 417-434.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.
- Ursing BM, Arnason U. 1998. The complete mitochondrial DNA sequence of the pig (*Sus scrofa*). *Journal of molecular evolution* 47: 302-306.