

# 愛玩動物と有用脊椎動物における DNA および染色体分析 による遺伝的集団構造解析とその応用

*Population genetic structure, phylogenetic classification and individual identification in pet animals and useful vertebrate animals on the basis of DNA or chromosome analyses*

村上 賢<sup>1</sup>, 福岡秀雄<sup>2</sup>, 荒井克俊<sup>3</sup>

<sup>1</sup>麻布大学大学院獣医学研究科, <sup>2</sup>麻布大学獣医学部, <sup>3</sup>北海道大学大学院水産科学研究科

Masaru Murakami<sup>1</sup>, Hideo Fukuoka<sup>2</sup>, Katsutoshi Arai<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Veterinary Sciences, Azabu University, <sup>2</sup>School of Veterinary Medicine, Azabu University, <sup>3</sup>Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University

**Abstract.** Several independent studies were carried out: 1. Individual identification of cats and dogs using hair by mitochondrial D-loop analyses. 2. Genetic population structure of the smelt (*Spirinchus lanceolatus*), a useful fish indigenous to Japan, on the basis of mitochondrial D-loop sequence variations. 3. Phylogenetic relationships within the Khari breed of the goat in Nepal by partial mitochondrial D-loop sequencing. 4. Development of species-specific PCR techniques for the detection of carp and goldfish DNA.

1. Highly variable mitochondrial regions from hairs in cats and dogs were examined to ascertain the possibility of their use in forensic identification. In dogs, 26 haplotypes based on 714bp sequence were found from 149 samples representing 21 breeds. The haplotype diversity could not be partitioned according to breeds, whereas some haplotypes were characteristic to small-sized dogs. In cats, 442bp of the D-loop were sequenced for 135 individuals, yielding 47 haplotypes. Most of cat specimens showed high levels of length heteroplasmy. In addition, some individuals exhibited site heteroplasmy. The polymorphisms of the D-loop region examined especially in cats were considered to be highly useful for individual identification.

2. We analyzed the genetic variation in 924bp of mitochondrial D-loop among 108 specimens of the smelt collected from 4 rivers and sea in Hokkaido. Twenty-one haplotypes were detected. Genetic distances among these haplotypes were very low. No significant genetic differentiation was observed among 5 population samples, suggesting the high genetic similarities of the smelt populations.

3. In order to help elucidate the relationships within the useful Khari breed of the goat in Nepal, a region of 453bp of the mitochondrial D-loop was analyzed. The sequencing of this segment from 27 specimens yielded 17 haplotypes at 58 polymorphic sites. These haplotypes were mainly divided into 3 clusters in the phylogenetic tree, suggesting the existence of at least 3 maternal lineages of the Khari breed. No significant geographic differentiation of the Khari breed was observed at six different localities in Nepal.

4. Each primer set for carp- and goldfish-specific repetitive DNA sequences was designed to differentiate from these species at DNA level. The PCR techniques using these primer sets successfully identified DNA sequences specific to carp and goldfish, respectively. These techniques were applied to identify the source of the sperm from a germ-line chimeric fish (carp-goldfish).

## 1. イヌとネコの毛からのミトコンドリア DNA (D-loop 領域) 分析による個体識別

### 1. 目的

獣毛などの微量組織からの異同識別は、犯罪捜査などの法医鑑識領域において重要である。特に動物種として、ペットとして広く飼育されているイヌとネコはその対象となると考えられる。一般に、微量組織からの個体識別にはミトコンドリア DNA (mtDNA) の多型性が有効であるが、ネコのそれについての詳細な報告はあまりない。そこで、本研究では、数多くのイヌとネコの毛から mtDNA の塩基配列を分析し、その多型性を調べるとともに個体識別や品種識別の可能性を探った。

### 2. 方法

血縁関係の認められない 21 品種、149 頭のイヌ及び 31 品種、135 個体のネコの被毛 (数 cm 以下/個体) から、DNA 抽出キット ISOHAIR (ニッポンジーン) 又は DNA エキストラクター FM キット (和光純薬) を用いてマニュアルに従って DNA を抽出した。あらかじめ決定した D-loop 領域の塩基配列情報に基づいて、イヌ<sup>1)</sup> 及びネコに特異的なプライマーを設定し、D-loop の変異領域の一部を PCR で増幅した。増幅反応は、初期熱変性 95℃、3 分、次に熱変性 95℃、30 秒、アニーリング 50～60℃、30 秒、伸長 72℃、1 分のサイクルを 33 回繰り返し、最終伸長反応 72℃、5 分の条件で行った。目的のサイズの断片が増幅されていることをアガロースゲル電気泳動で確認した後、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing キット (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンシング反応を行い、塩基配列を決定した。

### 3. 結果と考察

イヌの D-loop 超可変領域を中心とした 714 bp の領域の塩基配列を決定、比較した。その結果、使用した 21 犬種 149 頭は、塩基配列変異から 26 個のハプロタイプに分類できたが、品種特異的なハプロタイプは確認できなかった。しかし、全体的に最も多く見られた Cf1 が小型犬では少ないことや、Cf3 および Cf4 が小型犬で多いこと、Cf7 が主に柴犬で、Cf13 が主にピアデッドコリーで見られたことなど、いくつかの特徴が見られた。また、26 個のハプロタイプから系統樹を作成したところ、大きく 3 つのグループ

に分けられ、グループ 2 では小型犬のみが認められた。

ネコの場合、D-loop 領域の PCR において、ほとんどの個体で複数のサイズをもつ増幅産物が見られた。これは、D-loop 領域内に存在する RS2 領域と呼ばれる縦列反復配列配列の領域<sup>2)</sup> での約 80bp を反復単位とする配列の繰り返し回数が異なる length heteroplasmy<sup>3)</sup> によると考えられた (反復単位の繰り返し回数は 3～7 回 (多くは 4 回))。増幅領域のうち、RS2 領域の 5' 側約 200 bp と 3' 側約 90 bp および RS2 領域の 5' 上流 (約 90 bp) と 3' 下流 (約 60 bp) の計 442 bp からなる高変異領域の塩基配列を決定し、比較した。その結果、442 bp の中に 56 ヶ所の多型部位 (52 ヶ所がトランジション) が認められ、その配列変異に基づいて 135 個体のネコは、47 の mtDNA ハプロタイプ (FC01～47 型) に分類された。これらのハプロタイプの塩基配列は DDBJ/GenBank/EMBL DNA データベースにおけるアクセッション番号 AB121148-AB121194 として登録された。FC42, 43, 44 と 47 の 4 つのハプロタイプでは点突然変異由来の site heteroplasmy も見られた。更に、各ハプロタイプにおける出現頻度を調べると、29 のハプロタイプは 1 個体ずつ (0.7%) しかみられない型で特徴的であった一方で、15% を越える高い出現頻度を示すハプロタイプも 2 つ (FC07 型と FC11 型) 見られた。

### 4. 要約

微量組織からの個体識別の可能性を探るため、被毛からの DNA を解析した。イヌでは mtDNA の D-loop 超可変領域を中心とした 714 bp の塩基配列変異に基づいて、21 犬種 149 頭を 26 のハプロタイプに分類できた。小型犬に特徴的なハプロタイプはみられたが、品種特異的な塩基配列は確認できなかった。ネコでは、mtDNA の D-loop 高変異領域の塩基配列 (442 bp) 変異に基づいて、135 個体のネコを 47 のハプロタイプに分類できた。heteroplasmy も見られ、本研究で解析したネコの mtDNA の D-loop 領域は、比較的多様性に富んでおり、ネコの個体識別をする上で有用であることが分かった。

### 5. 文献

- 1) Savolainen P., Zhang Y.P., Luo J., Lundeberg J., Leitner T., Science, 298, 1610-1613, 2002

- 2) Lopez J.V., Cevario S., O'Brien S.J., *Genomics*, 33, 229-246, 1996.
- 3) Eizirik E., Bonatto S.L., Johnson W.E., Crawshaw P.G. Jr, Vie J.C., Brousset D.M., O'Brien S.J., Salzano F.M., *J. Mol. Evol.*, 47, 613-624, 1998.

## 2. 有用魚種シシャモにおける mtDNA の D-loop 領域の塩基配列変異に基づく集団解析

### 1. 目的

シシャモ *Spirinchus lanceolatus* は、北海道太平洋岸にみに生息する本邦固有種であり、その干物は北海道の特産品として貴重である。本種の資源量は低水準で推移しており、その回復が望まれている。シシャモ資源の増殖をはかるためには、生理、生態学的知見に加えて、集団構造に関する遺伝学的及び資源生物学的知見の蓄積が必須と考えられる。これまでに、北海道各地での遡上親魚の形態学的相違による分類<sup>1)</sup>や、鵠川、沙流側、十勝川及び釧路川の4つの集団についてアロザイムをマーカーとした集団遺伝的解析<sup>2)</sup>、及び mtDNA の制限酵素切断多型分析<sup>3)</sup>が報告されてきたが、シシャモの遺伝的集団構造については結論が得られていない。又、厚岸や道南河川に遡上する集団についての解析は全く行われていない。そこで、本研究では、より詳細な遺伝学的検討を行うため、シシャモ mtDNA の一部について塩基配列を決定し、さらに高変異領域である D-loop 領域についてプライマーを設定した。そして、苫小牧沖や道南の遊楽部川を含む5地域から採集した標本について、集団構造の解析を行った。

### 2. 方法

シシャモ mtDNA の塩基配列情報はこれまでに知られていなかったため、イワシの mtDNA 全塩基配列決定の際に使用されたプライマーセット<sup>4)</sup>を用いて、PCR 増幅を行い、シシャモの mtDNA の D-loop 全長を含む ND6 から ND1 遺伝子の一部までの 5859 bp の配列情報を得た。その配列情報に基づいて、シシャモの D-loop 可変領域に新規のプライマーを設定した。苫小牧沖、遊楽部川、鵠川、十勝川、及び釧路川の5地域で採集された合計108個体(1地域当たり20尾以上)のシシャモの筋肉から DNA を抽出し、初期熱変性 95℃ 3分、熱変性 95℃ 30秒、55～60℃ アニーリング 30秒、伸長反応 72℃ 1分のセッ

トで30サイクル、最終伸長反応 72℃ 5分の条件で PCR 増幅を行った。サイクルシークエンシング反応により D-loop 領域を中心とした約 1 kbp の配列を決定し、遺伝情報処理ソフト GENETYX-MAC を用いて解析した。

### 3. 結果と考察

tRNA<sup>Phe</sup>の一部から D-loop の一部までの連続した 924bp の塩基配列変異を解析した結果、108 個体のシシャモは 21 個のハプロタイプに分けられた。924 bp のうち、トランジションが 11 か所、トランスバージョンが 6 か所、挿入(欠失)が 2 か所の計 19 か所に多型部位が認められた。各ハプロタイプ間の塩基置換率は 0.87% 以下と小さかった。ハプロタイプ SD02 は、いずれの川及び海においても占める割合がもっとも高かった(33.3%～59.1%)。又、各河川及び海に固有のハプロタイプも認められたが、いずれも出現頻度は低かった。モンテカルロシミュレーション<sup>5)</sup>を用いて各地域間でのハプロタイプの出現頻度を比較したところ、有意差は認められなかった。これらの結果からシシャモは mtDNA 変異がほとんどなく、遺伝的に分化が小さい均一な集団であると推測された。今後、各集団の分析個体数をさらに増やし、統計学的解析を行った上で、シシャモの集団的変位の程度について結論を出す必要がある。なお、本研究で得られた配列情報は、DNA データベースのアクセッション番号 AB094410, AB095420, AB095998 及び AB113318-113339 として登録した。

### 4. 要約

本邦固有種で、有用資源であるシシャモの遺伝的集団構造を調べた。シシャモ mtDNA の一部について塩基配列を決定し(5859 bp)、D-loop 可変領域に新規のプライマーを設定した。この領域の塩基配列(約 1 kbp)変異に基づき、遊楽部川、鵠川、十勝川、釧路川、北海道太平洋沿岸苫小牧沖の5地域由来のシシャモ 108 個体を 21 の HT に分類した。各集団間のハプロタイプの出現頻度に有意差は認められず、遺伝的距離も極めて小さかった。これらのことから、北海道のシシャモ集団が遺伝的に均一である可能性が示唆された。

### 5. 文献

- 1) 伊藤小四郎, 北海道立水産孵化場研報, 18, 27-40, 1963.

- 2) 大久保進一, 北海道立水産孵化場研報, 44, 63-68, 1989.
- 3) 鈴木研一, 小林敬典, 松石隆, 沼知健一, 日本水産学会誌, 66, 269-274, 2000.
- 4) Inoue J. G., Miya M., Tsukamoto K., Nishida M., Fisheries Sci., 66, 924-932, 2000.
- 5) Roff D. A., Bentzen P., Mol. Biol. Evol., 6, 539-545, 1989.

### 3. ミトコンドリア DNA の塩基配列変異に基づくネパール産ヤギ (Khari 種) の系統分類

#### 1. 目的

ネパールに生息するヤギ (*Capra hircus*) の中で, Khari 種は, 標高 300-1500 m の地域で良く見られる品種であり, その繁殖性はネパール国内で飼養されるヤギの中で最も高く, それゆえに食用肉の生産に利用される<sup>1)</sup>。ネパールはチベットとインドに囲まれており, 標高差が大きく気候条件も様々であるため, ネパールに生息する動物は一般に遺伝的多様性に富んでいる。ヒマラヤ高地等の厳しい環境に適応した在来家畜種も多い一方で, 外来種との交雑も進んでおり, 種の保存のためには調査が必要とされる。今回は, mtDNA D-loop<sup>2)</sup> (一部) の塩基配列変異を指標としてヤギの Khari 種の系統や生息地による違いについて調べた。

#### 2. 方法

ネパール国内 6ヶ所 (Surkee, Udaypur, Rampur, Jugedi, Kavre, Chitwan) から計 27 個体のヤギの血液を用いて DNA を抽出し, D-loop 領域の一部 (453 bp) を PCR 増幅し, 直接シーケンシング反応を行った。

#### 3. 結果と考察

調べた 27 個体から 17 種類のハプロタイプが得られた。453 bp のうち, 多型部位は 58 カ所 (57ヶ所がトランジション) あった。HT6 と HT13 の 2 つのハプロタイプは異なる地域で共通して見られた。NJ 法<sup>3)</sup> により無根系統樹を作成したところ, 大きく 3 つのクラスターに分かれ, クラスター I には 10 種類のハプロタイプ (HT1, HT2, HT5, HT8, HT13, HT17) が属し, クラスター II には 6 種類のハプロタイプ (HT3, HT4, HT6, HT7, HT15, HT16) が, クラスター III には HT14 のみが属した。Khari 種には大きく 3 つの母系起源があることが推察された。クラスター

I は Surkee (HT1, HT2), Udaypur (HT8, HT9, HT10, HT11), Rampur (HT12, HT13), Jugedi (HT17) の全く異なる地域からのヤギで構成された。これらの地域には幹線道路が通っているために人の移住と共にヤギも移動し, 地域差がなくなったと考えられる。クラスター II には Kavre (HT3, HT4, HT6, HT7), Chitwan (HT6), IAAS farm (HT15), Jugedi (HT16) から構成され, Kavre の個体は一個体 (HT5) を除いた全てがこのクラスターに含まれた。Kavre は他の地域より標高が高く, その地理的条件から比較的独立した地域であるために, ここで一つの系統として定着した可能性が示唆される。しかし, クラスター II に属するその他のハプロタイプについては, Kavre に他の地域からヤギが持ち込まれて系統が固定したのか, 逆に Kavre から他の地域へ持ち出されたのかという点については分らなかった。クラスター III (Rampur の HT14) は独立した系統を構成していたが, 更に個体数を増やして調査を行う必要がある。

#### 4. 要約

ネパールに生息し, 食用肉の生産に適するヤギの Khari 種の系統関係を明らかにするため, ネパール国内 6 カ所からの計 27 個体について, D-loop の一部の塩基配列 (453 bp) を調べた。見つかった 17 種類の HT は, 系統樹から大きく 3 つのクラスターに分類され, Khari 種には大きく 3 つの母系起源があることが推察された。明確な地域特異性は得られなかった。

#### 5. 文献

- 1) Ghimire S.C., FAO animal production and health paper 105.
- 2) Pietro P., Maria, F., Gianfranco G., Giuseppe E., DNA sequence, 14, 199-203, 2003.
- 3) Saitou N., Nei M., Mol. Biol. Evol., 4, 406-425, 1987.

### 4. フナ属およびコイ属特異的 DNA 断片を増幅する PCR 法の開発

#### 1. 目的

コイ科魚類やドジョウ科魚類は, 観賞用・実験モデル用生物として広く利用されている。しかし, 分子レベルでの分類や識別法はあまり確立されていない。そこで, DNA 多型マーカーによる観賞・実験モデル用魚類の各種品種の特徴付けや異同識別を行う

一環として、フナ属とコイ属の反復DNA配列を利用した分子識別を試みた。

## 2. 方法

コイDNAゲノム中に存在する高頻度縦列反復配列の反復単位配列情報<sup>1)</sup>及び筆者らによって既に報告されたフナ(キンギョを含む)DNAゲノム中に存在する高頻度縦列反復配列の反復単位配列情報<sup>2)</sup>に基づいて、コイDNA特異的検出用プライマー及びキンギョDNA特異的検出用プライマーを各々設定した。ゲノムDNA100~150ngを鋳型として*rTaq*(宝酒造)を用いて、95℃3分で初期変性、95℃30秒、58℃30秒、72℃1分のサイクルを20回繰り返し、最後に72℃7分の予備伸長を行う反応条件で、PCRを行った。アガロースゲルで電気泳動を行い、バンドを検出した。

## 3. 結果と考察

今回設定したプライマーセットを用いたPCRで、コイでは約250塩基対の反復単位とその整数倍からなる大きさをもつ予想DNA断片が、キンギョでは約270塩基対反復単位とその整数倍からなる大きさをもつ予想DNA断片が増幅されることを確認した。又、

キンギョとコイのそれぞれ数個体からのDNAを用いて、キンギョDNAを鋳型としたコイDNA検出用プライマーによるPCRでは、増幅バンドが検出されないこと、またその逆のコイDNAを鋳型としたキンギョDNA検出用プライマーによるPCRでは、増幅バンドが検出されないことも確認した。この技術を、始原生殖細胞を含む胚移植によるコイとキンギョの生殖系列キメラ個体<sup>3)</sup>の分子識別に利用した。

## 4. 要約

キンギョを含むフナ属特異的およびコイ特異的DNAを増幅するPCR法を開発した。この技術をコイとキンギョの生殖キメラ個体のDNAによる識別に応用した。

## 5. 文献

- 1) Datta U., Dutta P., Mandal R.K., *Gene*, 62, 331-336, 1988.
- 2) Murakami M., Fujitani H., *Zool. Sci.*, 14, 763-769, 1997.
- 3) Yamaha E., Murakami M., Hada K., Otani S., Fujimoto T., Tanaka M., Sakao S., Kinura S., Sato S., Arai K., *Genetica*, 119, 121-131, 2003.