

ウシβグロビン遺伝子の構造解析

Genetic analysis of bovine hemoglobinβchain (Hbb) polymorphism.

田中和明, 滝沢達也, 岡林寿人

麻布大学獣医学部

Kazuaki Tanaka, Tatsuya Takizawa, Hisato Okabayashi

School of Veterinary Medicine Azabu University

Abstract. The presence of wild species of *Bos* is the feature of the genetic resources of cattle in Asia. The wild species of *Bos* consist of banteng (*B. banteng*), gaur (*B. gaurus*), yak (*B. mutus*), and kouprey (*B. sauveli*). There are some domesticated forms of these wild species, for example, domestic gaur (gayal or mithan) in hills of separate India, Bhutan, Myanmar and Bangladesh, domestic yak in Nepal to highland China, and domestic banteng (Bali cattle) in Indonesia. It is possible that domestic cattle in tropical and subtropical Asia have acquired some genes from such wild species, because they can interbreed with domestic cattle and, though mostly male offspring are sterility, female hybrid has breeding capability. However, it has been thought that the genetic influence from these wildness kinds is limitation-like, because the domestic forms of wild *Bos* species are distributed only over the area restricted extremely now. Thus, the native cattle in South and Southeast Asia was generally regarded as humped cattle (*Zebu, indicus*) or crossbred between humpless (*taurus*) and humped cattle in various rates. The hemoglobin β chain (*Hbb*) polymorphism is one of the most intensively investigated genetic characters in cattle. In Southeast Asia, most of the cattle populations were polymorphic with three electrophoretic bands: Hbb-A, -B, and -X with the three alleles, A, B, X at *Hbb* locus. The Hbb-X exists in the cattle of the Southeast Asia specifically, and is contained by 10 to 30 % of gene frequency. When analyzed by using isoelectrofocusing method, the Hbb-X band can be further divided into two polymorphic bands, we temporarily call them X₁ and X₂ from the higher pI. The X₁ band was confirmed to be identical with the Hbb of mithan, on the other hand, the X₂ band showed no difference in the pI from the previous X (XBali) band of Bali cattle. In the continental part of Southeast Asia, the X₁ is far common compared with X₂. In this paper, we analyzed the DNA sequence of the bovine β globin alleles and found some evidence that there were large gene flow between wild species and domestic cattle in Southeast Asia.

1. 目的

家畜牛は北方系牛（肩峰のない牛）と、インド系牛（肩峰のある牛）、および両者の中間型に大別されている。北方系牛は、紀元前8000年～6000年にかけて肥沃な三日月地帯を中心に原牛が家畜化されたとされている。これに対して、インド系牛はインダス川流域で別の原牛より家畜化されたとされたと考

えられており、前2600年頃のモヘンジョダロ遺跡出土の印章には、今と変わらぬ姿が見てとれる。北方系牛とインド系牛では、Y染色体が前者はサブメタ型であるのに対し、後者はアクロ型であり明確に区別出来る（Halanan and Watson, 1982）。ミトコンドリアDNA（mtDNA）を指標とした系統解析で求められる両者間の分岐時間が約50万年～80万年の範囲であることから、両者間には亜種レベルの分化

が生じていることは明らかである (Loftus et al., 1994)。東南アジア地域の在来牛は Phillips (1961) によって中間型に分類され、様々な割合での両者間の交雑が起源であると考えられてきた。また、アジアには、ウシ属の野生動物種が4種生息している。すなわち、チベット高原を中心に分布するヤク (*Bos mutus*)、インド以東からインドシナ半島にかけて分布するガウール (*B. gaurus*) とバンテン (*B. banteng*)、そしてインドシナに限定的に分布するクープレイ (*B. sauveli*) である。これら野生種のうちヤク、ガウール、バンテンには家畜型が存在し、牛との間での雑種が生産可能である。一般的に、これらの雑種の雌は妊性を有し、雄は繁殖能力を有さない。このうち、家畜ヤクは、中国西部からネパールおよび中央アジア諸国の高地で広く飼育されており、ウシとの間の雑種が積極的に利用されている。ガウールの家畜型であるミタン (ガヤール) は、ブータン、インドのアッサム州、バングラディッシュとミャンマー間のアラカン山脈地域で主に飼育されており、中国雲南省でも少数飼育されている。バンテンの家畜型であるバリ牛はインドネシアのバリ島を中心に飼育されている。

在来牛の遺伝的変異性と集団間の類縁関係を評価する方法として、電気泳動によって検出される各種血液タンパク質多型が、長年用いられている。その中で、ヘモグロビンβ鎖 (Hbb) 多型は重要な遺伝マーカーである。すなわち、ヨーロッパおよび東北

アジアの牛では HbbA に高頻度で固定されており、インド系牛では、HbbA と HbbB とが約3:2の遺伝子頻度で多型を保っている。これに対して、東南アジア地域の在来牛では、北方型牛にもインド系牛にも存在しない HbbX が10%内外の頻度で含まれる (Namikawa, 1981)。この変異型は、バリ牛で約80%の高頻度で認められる Hbb タイプと電気泳動による易動度に差が認められず、バリ牛もしくはバンテンから家畜牛への遺伝子流入を示唆する論拠とされている (図1)。その後、ガヤールも HbbX を持つことが判明し、東南アジア地域の家畜牛に対して、ガウールからの遺伝子流入の可能性も示唆された。さらに、等電点電気泳動法を用いるとバリ牛とガヤールの HbbX が分離可能な事が判明し、タイ・ベトナム・ラオスにおける在来牛の HbbX は、ガヤール型 (X1 型) とバリ牛型 (X2 型) の両方が存在するが、ガヤール型の方が高頻度であることが報告されている (天野ら 1998, Okada et al. 2000)。

このように、βグロビンのタンパク電気泳動多型は、東南アジア地域の在来牛の遺伝的背景を論ずるための鍵となる遺伝マーカーであるにもかかわらず、電気泳動型多型に対応する DNA レベルでの解析が行われていない。本研究では、家畜牛および近縁野生種に存在するβグロビン遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定し分子進化的解析を行うことで、ウシ属に存在するβグロビン多型の系統関係を明らかにし、東南アジア地域の家畜牛の遺伝的背景を明

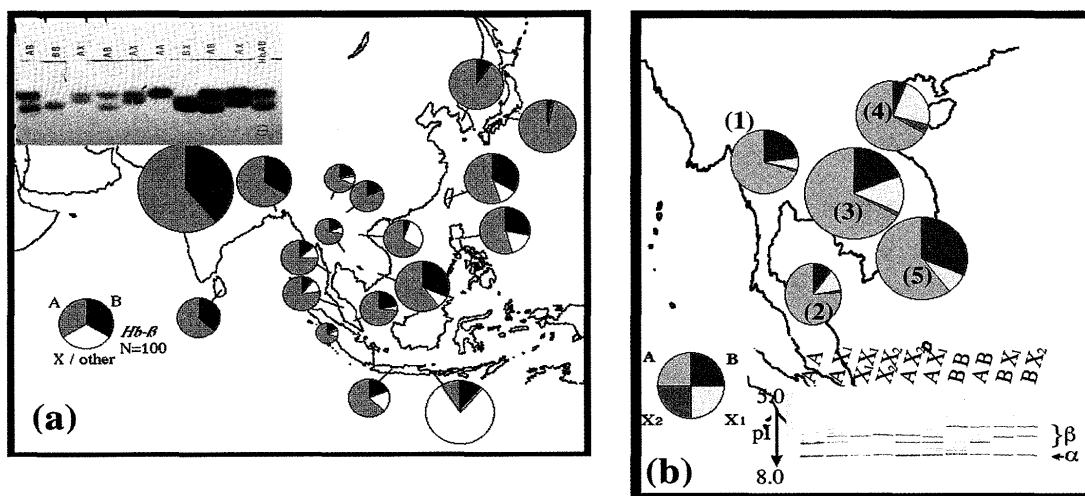


図1 アジア地域におけるウシヘモグロビンの電気泳動的対立遺伝子の分布

(a) 澱粉ゲル電気泳動による解析結果 (b) 薄層ポリアクリタミドゲルを用いた等電点電気泳動による分析結果
(1) タイ北部 (2) タイ南部 (3) ラオス (4) ベトナム北部 (5) ベトナム南部

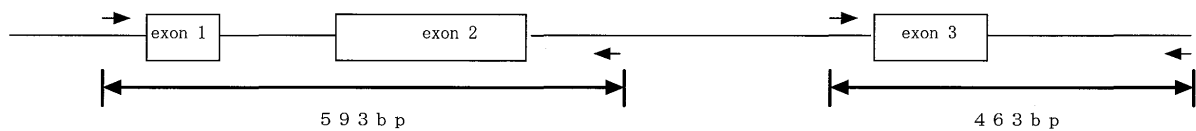


図2 β グロビン遺伝子の構造及び遺伝子増幅のためのプライマーの配置

らかにする。

2. 材料および方法

ベトナムおよびラオスの在来牛8個体、インドネシア産バリウシ5個体、ミャンマー産ミタン2個体、インドネシアのジャワ島産バンテン2個体、カンボジア産バンテン1個体、チベット産ヤク3個体、解析の外群として、フィリピン大学ロスバニオス校の水牛研究センターで飼育されている沼沢水牛2個体、および河川水牛2個体のDNA試料は、在来家畜研究会より分与をうけた。またアメリカンバイソン1個体のDNA試料は、群馬サファリパークより供与された。これらのDNA試料を用いて、3つのエクソンからなる β グロビン遺伝子の全領域約1.7 kbをPCR増幅し、プラスミドベクターにクローニングを行い、サイクルシーケンス法により塩基配列を決定した。DNA塩基配列データの編集はDNASIS (HITACHI SOFTWARE ENGINEERING) を使って分析した。分子進化学的分析はPHYLIP software (Version 3.57 c; Felsenstein 1995) を用い、進化学的距離をあらわすヌクレオチドあたりの置換の数は2パラメーター法 (Kimura 1980) を用いて計算した。得られた距離行列からNeighbor-joining (NJ) 法 (Saitou and Nei 1987) により系統樹を作成した。

3. 結果および考察

ウシ属の家畜および野生種21個体、アメリカンバイソン1個体、2タイプの家畜水牛各2個体について、 β グロビン遺伝子の完全長の塩基配列を決定した。現在学術論文作成中の為、個々の配列情報の詳細は本報告書での公開を控えるが、ウシ β グロビン遺伝子は、3つのエクソンからなり、第1エクソンは86塩基対、第2エクソンは223塩基対、第3エクソンは129塩基対であり、第1、第2エクソン間のイントロンは128塩基対、第2、第3エクソン間のイントロンは約900塩基対で構成されていた。ウシ亜科動物

の β グロビン遺伝子の解析に有効であったプライマー配置を図2に示した。クローニングベクター側に存在するM13ForwardとM13Reverseプライマーおよび図2中のプライマーセットを用いて塩基配列を決定し、得られた配列を連結することで、ウシ亜科動物の β グロビン遺伝子の完全長を効率よく決定する手法を確立した。

血中タンパク質の電気泳動型であるA型、B型、X1型およびX2型に対応する β グロビン対立遺伝子のDNA配列を決定した。家畜牛に存在するX1型対立遺伝子の塩基配列は、ガウールを家畜化したミタンが保有する配列と完全に一致していた。さらにDNA配列をアミノ酸配列に翻訳した結果、Lalthantluanga and Braunitzer (1984) が報告しているガヤールの β グロビンのアミノ酸配列と完全に一致した。以上のことから東南アジアの在来牛に存在するX1型 β グロビン遺伝子が、家畜ウシとは別種の野生牛であるガウールからもたらされてことを、遺伝子レベルで証明した。これに対して、ベトナム在来牛で得られたX2型 β グロビン対立遺伝子は、カンボジアで得られたバンテンのそれと完全に一致した。このことは、東南アジアの家畜牛に存在するX2型 β グロビン遺伝子は、野生種であるバンテンからの遺伝子流入によることが明らかになった。これらの結果を総合すると、東南アジア在来牛の成立には、野生種からの遺伝子流入が関与しており、世界の家畜牛集団の中で極めて特種な存在であることが明らかになった。

興味深いことに、インドネシアのジャワ島とカンボジアのバンテンが保有する β グロビン遺伝子の配列を比較すると、両者の間にいくつかの点突然変異が存在していた。本研究で得られた β グロビン遺伝子の分子系統樹 (図3) に示すように、インドネシア産バリウシのX型 β グロビン対立遺伝子の配列は、ジャワ島のバンテンのそれと同一のクラスターに含まれ、カンボジアのバンテンのそれとは離れた関係にあった。このことは、バリウシの家畜化がインド

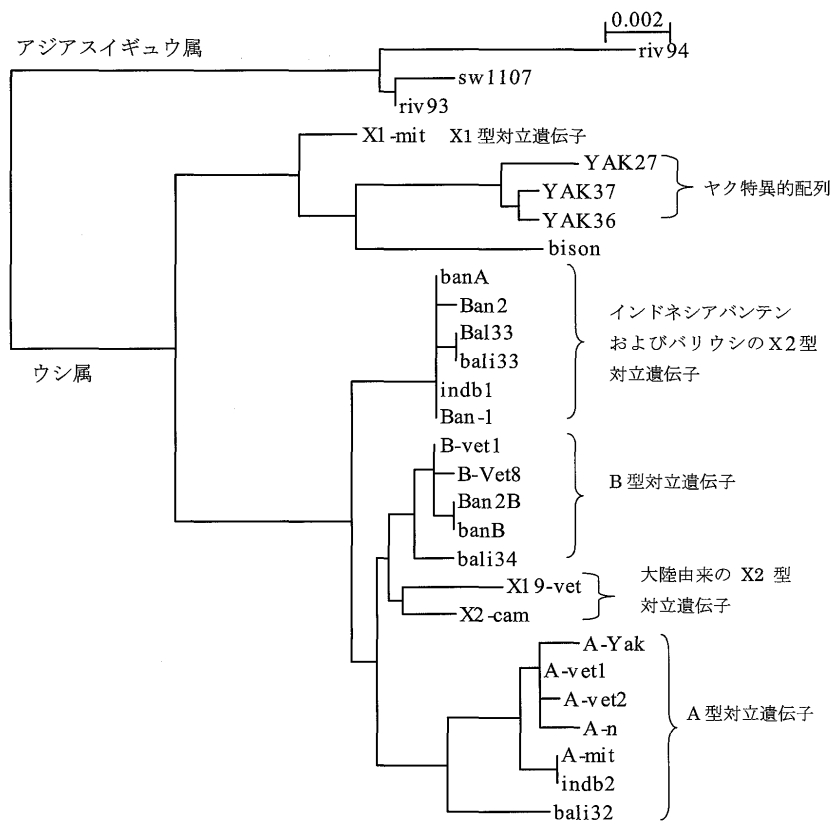


図3 βグロビン遺伝子 1716 bp に基づいた分子系統樹 (NJ法)
系統樹における各、配列名は個体情報を記号化したものである。

シナ半島など大陸アジアで生じたのではなく、ジャワ島を含む大スンダ列島においておきた事を強く示唆している。家畜ヤクの主要なβグロビン対立遺伝子は、アメリカンバイソンの配列に非常に近い関係にあることが明らかになった(図3)。これは、ミトコンドリアDNAの塩基配列に基づいた両者の系統関係(Verkaar et al., 2004)と一致しており、*Bison*属という*Bos*属と独立した属をウシ科の分類体系に置く必要性について再検討が必須であることを分子進化の側面から指摘する結果となった。

次に、バリウシを含むバンテン、ミタンおよびヤクより得られたβグロビン遺伝子について、比較すると、これらの集団の中から、家畜牛に高頻度で認められるA型およびB型対立遺伝子の存在が明らかになった。このことは、これら家畜牛とは別種であるウシ属に対して、家畜牛からの遺伝子流入が存在することを示唆している。実際、ネパールやチベットでは、家畜ヤクとウシとの交雑種であるゾーをシェルバ族に代表される移牧民が利用しており、ブータンではミタンと家畜牛との交雑種であるジャッサ

を利用する文化がある。これら交雑種のうち雌は繁殖性を持つことから、両者の間に遺伝子交流が現在でも存在する。ウシ属の野生種に対して家畜牛からの遺伝子流入が存在することは、家畜種と野生種の間で双方向の遺伝子交流が存在することに他ならず、ウシ属の野生種の保全を考える上で、種を超えた遺伝子交流の影響をどのように判断するべきかについて、新たな課題が明らかになった。

4. 要約

東南アジア在来牛8個体および、家畜牛とは種を異にするウシ属の野生種4個体およびその家畜型9個体についてβグロビン遺伝子の配列を決定し、ヘモグロビンβ鎖におけるタンパク質電気泳動多型に対応するDNA変異を明らかにした。その結果、東南アジアの在来牛に存在するβグロビンのX型変異は、野生種であるバンテンおよびガウルからの遺伝子流入の結果であることが明らかとなった。さらに、これら野生種やその家畜型において、家畜牛からの遺伝子流入が存在することが明らかになった。この

ことは、東南アジア地域では、家畜牛と近縁野生種の間で双方向の遺伝子交流が存在することを意味しており、同地域の家畜牛が、他地域と異なる遺伝的組成を保有し遺伝資源として重要な存在であることを示唆した。

文 献

- 天野卓ら (1998). ベトナム在来牛の血液蛋白質支配遺伝子構成とその系統遺伝学的研. 在来家畜研究会報告, 16: 49-62.
- Felsenstein J. (1995) PHYLIP, version 3.57c. Executables for PowerMac. university of Washington, Seattle.
- Halnan CRE and Watson JI. (1982). Y chromosome variants in cattle *Bos taurus* and *Bos indicus*. Ann. Genet. Sel. Anim. 14: 1-16.
- Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. Mol. Biol. Evol 16, 111-20.
- Lalthantluanga R and Braunitzer G. (1984). Amino-acid sequence of gayal hemoglobin (*Bos gaurus frontalis*, Bovidae). Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem. 365: 737-741.
- Loftus TR. et. al. (1994) Evidence for two independent domestications of cattle. Proc. Natnl. Acad. Sci. USA, 93: 2757-2761.
- Namikawa T. et. al. (1981) Geographic distribution of bovine hemoglobin-beta (Hbb) alleles and the phylogenetic analysis of the cattle in Eastern Asia. Z. Tierzucht. Zuchtgsbil. 98: 150-159.
- Namikawa T. et. al. (1984) Genetic relationships and phylogeny of East and Southeast Asian cattle: genetic distance and principal component analyses. Z. Tierzucht. Zuchtgsbil. 101: 17-32.
- Okada Y. et. al. (2000) Comparison of hemoglobin- β chain polymorphism of the native cattle from Laos, Thailand and Vietnam. Report of the Society for Researches on Native Livestock, 18: 75-82.
- Phillips RW. (1961) World distribution of the major types of cattle. J. Hered. 52: 207-213.
- Saitou N and Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol 4, 406-25.
- Verkaar LCE. et. al. (2004). Maternal and Paternal Lineage in Cross-Breeding Bovine Species. Has Wisent a Hybrid Origin? Mol. Biol. Evol. 21: 1165-1170.