



DNAマーカーを用いた東アジア在来牛の遺伝的解析

林, 邦忠

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2010-03-25

(Date of Publication)

2011-07-26

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4945

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004945>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

DNA マーカーを用いた
東アジア在来牛の遺伝的解析

平成 22 年 1 月

神戸大学大学院農学研究科

林 邦忠

目次

第1章 序論	1
第2章 ミトコンドリア DNA を用いた <i>Bos indicus</i> 起源の推定	5
第1節 緒言	5
第2節 材料及び方法	7
第3節 結果	15
第4節 考察	23
第3章 ウシ成長ホルモンレセプター遺伝子における遺伝的多様性	31
第1節 緒言	31
第2節 材料及び方法	33
第3節 結果	37
第4節 考察	43
第4章 SNP マーカーを用いたウシの遺伝的多様性と遺伝的構造の解析	47
第1節 緒言	47
第2節 材料及び方法	49
第3節 結果	56
第4節 考察	66
第5章 総括	70
謝辞	73
引用文献	74

第 1 章 序論

生物の種の保存や品種改良に重要な遺伝資源は人類共通の財産であるという認識が社会的に広まり、種の遺伝的多様性の維持や遺伝資源の保存に対する認識が高まってきている。現在、経済的に最も重要である家畜のひとつであるウシは、19 世紀以降各地で品種改良が行われ、約 800 品種が存在している (Loftus ら、1993)。また、世界の家畜牛は大きく *Bos taurus* と *Bos indicus* に分類することができる。*Bos indicus* はインド、東南アジアそして東アフリカといった熱帯地域に分布しており、一方 *Bos taurus* はヨーロッパ、西アフリカそしてアジアではシベリア、モンゴル、中国西北部、朝鮮半島、日本などに広く分布している (Phillips、1961)。

長年にわたり生物集団は進化の過程で生じた突然変異・移入・交雑などにより遺伝変異を拡大し、選択・淘汰や遺伝浮動による変化を受け高い遺伝的多様性を保存してきた。しかし、品種改良やクローン技術、バイオテクノロジーの発達に伴った偏った遺伝情報の集団内への拡散、環境の著しい変化、疾病蔓延による様々な生物の絶滅などにより家畜における遺伝的多様性は大きく減少している。一方、近代品種の影響を受けていない発展途上国の在来牛は、抗病性や耐寒性、耐熱性などの優良な特性を備えている可能性が強い固有種と考えられるようになってきた。これらの遺伝資源を保存していく上で、詳細な遺伝的背景や遺伝的類縁関係あるいはその起源の解析は基礎情報として極めて重要となるが、その調査は緒についたばかりである。

近年になって分子遺伝学的手法が発達し、ミトコンドリア DNA、マイクロサテライトそして Y 染色体などを用い、これら *Bos indicus* と *Bos taurus* の起源や遺伝的多様性、遺伝的類縁関係について研究が行われるようになった。ミトコンドリア DNA は、同種内或は近縁種内の系統関係を明らかにするための優れたマーカーとして用いられてきており、様々な動物において種や系統分化に関する研究に用いられている。ミトコンドリアの特徴として、組み換えを起

こさずに母から子へ伝えられる母系遺伝があり、核内遺伝子とは異なる遺伝様式があげられる。また、その進化速度は核 DNA を比べ 10 倍以上も速く、これは生物進化を研究する上で強力な道具となっている。このミトコンドリア DNA の変化を追うことにより、どのように種が分岐していったか、分岐はいつ頃起こったのかを調べることが可能である。

ウシにおいても、ミトコンドリア DNA を用いて、その起源や系統など様々な研究が行われている。ミトコンドリア DNA・D-loop 領域の変異を用いた研究の結果より、*Bos taurus* と *Bos indicus* がおよそ 20 万年前から 100 万年前に分岐したことが推定された (Loftus ら、1994)。すなわち、これら 2 亜種が別々の家畜化の起源と祖先に由来していることが解明された。このようにミトコンドリア DNA は、家畜の品種や系統の分析に有効な手法である。しかしながら、ウシに対するミトコンドリア DNA・D-loop を用いた研究は、*Bos taurus* については多く研究されているが、*Bos indicus* に対する詳細な研究や、特にアジアにおける *Bos indicus* 亜種の遺伝的多様性を解析した研究はほとんどない。

また、熱帯地方を多く含む東アジアにおける在来牛の遺伝構造を知るためには *Bos taurus* 型と *Bos indicus* 型遺伝子座の含有率を調査することが肝要である。しかし、ミトコンドリア DNA とは異なり、*Bos taurus* 型と *Bos indicus* 型を明確に区分する常染色体上の DNA マーカーは現在のところ発見されていない。このような亜系間あるいは大きく分化した系統間の類縁関係を調査するためには、トランスポゾンのような大きな挿入・欠失による DNA 多型は有効であると考えられる。その理由としては、このような挿入欠失は非同祖的に起こりにくい、つまりそれら突然変異が生じる以前の系統に基づく DNA 領域なのか、それ以後の系統に基づく領域なのかを概ね正確に知ることができるためである。

機能遺伝子である GHR 遺伝子上には、約 1.2 kbp の LINE-1 配列の挿入の有無による 2 つの対立遺伝子の存在が知られている。これまでの研究から、ヨーロッパ品種ではその LINE 挿入型の頻度が極めて高く、インド系牛では欠失型の頻度が極めて高いという報告がされている。しかし、これまでの研究では、分析頭数が少なく、ヨーロッパ品種は 2 品種数頭程度、インド系牛でも 2 品種

合計 4 頭程度であった。このように、品種及び地域などが限定され、さらにサンプル数があまり多くないため、その詳細については明らかにされていない。しかしながら、この GHR LINE-1 多型は挿入・欠失による同祖性 DNA 多型と考えられ、亜種間などの遺伝的関係を調べるのに有効なマーカーであると期待される。

また、東アジア在来牛における包括的な遺伝構造および遺伝的類縁関係を調査するためには、*Bos indicus* 型特異的マーカーのみならず、常染色体由来のランダムな遺伝マーカーによる調査が必要であると考えられる。これまで、様々な地域の在来牛の遺伝的調査にはマイクロサテライトマーカーが主に利用されてきた。その理由としては、ゲノム中に数多く存在し、固有遺伝子座の調査が可能、また多型性が極めて高いなどの利点による。実際、FAO (国連食糧農業機関) においても 30 のマイクロサテライトマーカーが多様性の調査に推奨されている。しかしながら、このマーカーの欠点としては、1) 反復配列数の違いによる多型を検出するため、データ化しにくく調査研究室間などでの比較が難しい、2) 反復配列数が異なる突然変異が起こりやすいために、同じ遺伝子型を示す場合においてもその対立遺伝子が同祖的でない場合が多い、などがあげられる。その結果として、解析データは誤差を有する場合が多く明確な結果が出にくいといった傾向がある。

近年、一塩基多型 (SNP) が代替マーカーとして注目を浴びている。この SNP マーカーを利用すれば、マイクロサテライトマーカーが持つ欠点を補うばかりでなく、簡易・迅速・廉価化できる可能性も秘めており、遺伝的多様性解析や遺伝構造解析に極めて有用なマーカーシステムとなることが期待される。ウシゲノム配列の解読に伴い、大量の SNP マーカーが利用可能になりつつある。2007 年末には Illumina 社より 54,001 SNP が解析可能な BovineSNP50 BeadChip が利用可能となり、ゲノムワイドの集団遺伝的解析にも利用されるようになった (Tassell ら、2008)。しかし、このシステムによる解析は非常に高価であり、大量かつ永続的な分析が必須となる遺伝的多様性解析には、不適當である。よって、限られた適当数の SNP を分析する SNP システムが必要とな

るが、現在のところコンセンサスのとれたシステムは開発されていない。

以上の観点から、本研究では東アジアの在来牛に対し、ミトコンドリア DNA、常染色体上の機能遺伝子の多型、常染色体上の SNP システムの開発、そのシステムを用いた遺伝的多様性解析、集団の遺伝構造、および遺伝的類縁関係の調査を以下のとおり行った。

1) 西アジア、南アジア、東アジアの幅広い地域のウシのミトコンドリア DNA・D-loop 領域の塩基配列を決定した。得られた塩基配列に Genbank データベースによりアジア *Bos indicus* 在来牛のデータを加え、これら地域のウシのミトコンドリア DNA の変異、遺伝的多様性、遺伝構造を調査し、さらに *Bos indicus* ウシの起源の推定を行った。

2) 成長ホルモンレセプター (GHR) 遺伝子における多型に注目し、両亜種での検討を行った。即ち GHR 遺伝子の遺伝的多様性及び起源を調べるために、ヨーロッパおよび東アジア *Bos taurus* と *Bos indicus* 在来牛における GHR 遺伝子型の頻度を調査し、GHR LINE-1 配列の遺伝的多様性とその起源について考察した。

3) 常染色体由来のランダムな遺伝マーカーには数多くの SNP による解析が有効であると考えた。そこで、ウシ常染色体上の SNP 探索を染色体ごとにランダム行い SNP システムの開発を行った。さらに、このシステムを用いてアジア 6 集団の在来牛を含むユーラシア大陸に生存するウシ 9 集団に対して遺伝構造、遺伝的類縁関係及び遺伝的多様性を検討した。

第2章 ミトコンドリア DNA を用いた *Bos indicus* 起源の推定

第1節 緒言

世界の家畜牛は大きく *Bos taurus* と *Bos indicus* に分類することができる。*Bos indicus* はインド、東南アジアそして東アフリカといった熱帯地域に分布しており、一方 *Bos taurus* はヨーロッパ、西アフリカそしてアジアではシベリア、モンゴル、中国西北部、朝鮮半島、日本などに広く分布している (Phillips、1961)。また、ミトコンドリア DNA・D-loop 領域の変異を用いた研究の結果より、*Bos taurus* と *Bos indicus* がおよそ 20 万年前から 100 万年前に分岐したことが推定された (Loftus ら、1994)。実際、考古学のデータにより、*Bos taurus* の起源は 10,000 年前の近東または北アフリカであり、*Bos indicus* は 8,000 年前インド亜大陸に起源を有することが推定された (Zeuner、1963 ; Meadow、1996 ; Bokonyi、1997)。

さらに近年、ミトコンドリア DNA を用い、*Bos taurus* の起源や遺伝的多様性、遺伝的類縁関係について詳細な分析が行われた (Bradley ら、1996 ; Troy ら、2001 ; Mannen ら、1998, 2004)。これらの研究では、*Bos taurus* のミトコンドリア DNA は大きく T、T1~T4 の 5 つのハプログループに分かれ、各ハプログループは放射状のネットワークを形成し、その分布は地理的に分かれており、T1 はアフリカ、T2 は中・近東、T3 はヨーロッパ、T4 はアジアで主に観察されているハプロタイプである。これらの結果より、*Bos taurus* ウシの二次的移住、集団拡大及び家畜化年代の深さが示された (Magee ら、2002)。

一方、*Bos indicus* に対するミトコンドリア DNA の研究は中国、インドそして近東に限定されて行われた (Baig ら、2005 ; Lai ら、2006 ; Magee ら、2002)。これらの研究結果より、*Bos indicus* 型ミトコンドリア DNA は大きく 2 つのグループ、I1 と I2 に分類された。この 2 つハプログループはともに *Bos taurus* のハプログループと同様な放射状のネットワークが示された。しかし、これま

での研究では地域が限られていたため、I1、I2 ハプログループの地理的分布が明らかにされず、*Bos indicus* の起源および多様性についても不明である。

そこで本研究では、西アジア、南アジア、東アジアの 19 ヶ国により 30 ウシ集団のミトコンドリア DNA・D-loop 領域の塩基配列により、これら地域のウシのミトコンドリア DNA バリエーション、遺伝的多様性、遺伝構造そして *Bos indicus* ウシの起源の推定を行った。

第 2 節 材料及び方法

2-A) 供試動物

本研究では *Bos indicus* に属する、ユーラシア、南及び東アジアの 16 ヶ国の在来牛により、548 個体を実験に供した (表 2-1)。カンボジア、ミャンマー、ブータンにおいては、現地で採取された全血よりゲノム DNA を抽出した。それらのサンプルから、サンプリングの地域が偏らないように各 30 頭を選出した。ベトナム在来牛においては麻布大学の田中 和明博士より譲り受けた DNA サンプルのうち、北部地方より 14 個体、南部地方より 16 個体を選出し実験に用いた。その他のサンプルは、Beja-Pereir らとの共同研究の中でそれぞれの研究室においてサンプリングおよび分析を行った (Chen ら、in press)。これらの供試動物は血縁情報から血縁関係が認められないことを確認している。

2-B) ゲノム DNA の精製

約 10ml の全血を 3,000rpm で 10 分間遠心分離し、パスツールピペットを用いて白血球層を分取した。40ml の 0.2%NaCl 溶液を加えてよく混和して血球を溶血させ、3,000rpm で 10 分間遠心分離し上清を除いた。その後 0.5ml の 0.16M NaCl /1mM EDTA 溶液を加えてよく懸濁した後、20ml のザルコシル溶液を加え DNA を切断しないようにゆっくりと振とうし、DNA を溶出させた。そして ProteinaseK 溶液 (10mg/ml in water) 200 μ l を加え、37°C で一晩インキュベートした。当量の TE-フェノール (フェノールを 60°C で溶かし、0.1%になるように 8-hydroxyquinoline を加え、TE buffer (10m ミトコンドリアris-HCl ; pH8.0, 1mM EDTA) で水飽和したもの) を加え 10 分間ゆっくりと混和した。3,000rpm で 10 分間遠心分離し、水層とフェノール層の間にできるタンパク質を取らないように水層を分取した。この水層にフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール (25:24:1, 0.05%の 8-hydroxyquinoiine を含む) を加え、10 分間遠心分離し水層を分取した。この水層に当量のクロロフォ

表 2-1 サンプル情報、ハプログループ頻度及び多様性

Regional group	Geographic origin	Population	N	I1	I2	I1		I2	
				frequency	frequency	π	SD	π	SD
Northeast Indian subcontinent	Bhutan and Nepal	Bhutanese native & Dwarf Lulu	38	0.605	0.395	0.0072	0.0048	0.0075	0.0052
Northeast Indian subcontinent	Arunachal Pradesh, India	Arunachal Pradesh local	29	0.621	0.379	0.0051	0.0038	0.0061	0.0045
Ganges	Uttar Pradesh, India	Uttar Pradesh local	45	0.356	0.644	0.0116	0.0072	0.0006	0.0009
Ganges	Bangladesh	Red Chittagong	46	0.652	0.348	0.0079	0.0052	0.0072	0.0049
Ganges	Meghalaya, India	Meghalaya local	10	0.700	0.300	0.0071	0.0054	0.0111	0.0100
Ganges	Mizoram, India	Mizoram local	17	0.765	0.235	0.0043	0.0034	0.0083	0.0070
Ganges	West Bengal, India	West Bengal local	75	0.587	0.413	0.0043	0.0033	0.0028	0.0025
Indus Valley	Punjab, Indo-Pakistan border	Sahiwal & Haryana	31	0.613	0.387	0.0083	0.0055	0.0031	0.0028
Indus Valley	Rajasthan, India	Rajasthan local	71	0.577	0.423	0.0072	0.0048	0.0052	0.0038
Indus Valley	Thar region, India	Tharparker	27	0.704	0.296	0.0078	0.0052	0.0023	0.0024
Indus Valley	Baluchistan, Pakistan	Red Sindhi	20	0.350	0.650	0.0071	0.0054	0.0045	0.0035
South India	Andhra Pradesh, India	Ongole	17	0.706	0.294	0.0092	0.0061	0.0050	0.0044
South India	Maharashtra-Karnataka, India	Maharashtra local & Desi	33	0.333	0.667	0.0061	0.0045	0.0078	0.0052
South India	Tamil Nadu, India	Tamil Nadu local	30	0.700	0.300	0.0050	0.0037	0.0029	0.0028

East Asia	Central, East & North China	Multiple breeds	51	1.000	0.000	0.0006	0.0010	0.0000	0.0000
East Asia	South China	Hainan & Leizhou	16	1.000	0.000	0.0034	0.0029	0.0000	0.0000
East Asia	Southwest China	Local yellow cattle	80	0.912	0.088	0.0019	0.0019	0.0000	0.0000
East Asia	Mongolia	Mongolian	16	1.000	0.000	0.0021	0.0021	0.0000	0.0000
Central Asia	Kazakhstan	Kazakh	1	1.000	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Central Asia	Kyrgyzstan	Kyrgyzstan local	2	1.000	0.000	0.0042	0.0059	0.0000	0.0000
Central Asia	Turkmenistan	Turkmenistan local	8	0.750	0.250	0.0042	0.0037	0.0000	0.0000
Central Asia	Afghanistan	Afghanistan local	18	0.833	0.167	0.0011	0.0014	0.0000	0.0000
West Asia	Oman	Oman local	11	0.818	0.182	0.0022	0.0024	0.0000	0.0000
West Asia	Iraq	Iraqi & Kurdi	13	0.308	0.692	0.0021	0.0026	0.0016	0.0019
West Asia	Turkey	East Anatolian	1	0.000	1.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Southeast Asia	Myanmar	Myanmar native	30	0.933	0.067	0.0020	0.0020	0.0000	0.0000
Southeast Asia	Cambodia	Cambodia native	30	0.933	0.067	0.0034	0.0028	0.0000	0.0000
Southeast Asia	Laos	Laotian	30	0.967	0.033	0.0032	0.0027	0.0000	0.0000
Southeast Asia	Vietnam	Vietnam native	30	1.000	0.000	0.0017	0.0018	0.0000	0.0000
Southeast Asia	Philippines	Philippine native	18	1.000	0.000	0.0013	0.0016	0.0000	0.0000

π : シーケンス多様性 SD : 標準偏差

ルム・イソアミルアルコール (24:1) を加え 10 分間混和した後、3,000rpm で 5 分間遠心分離した。次に水層を分取し、当量のジエチルエーテルを加え、白色になった水層が透明になるまでやや強めに振とうした後 3,000rpm で数秒間遠心分離し、エーテルを通風除去した。

そして10分の1量の3M酢酸ナトリウム溶液 (酢酸でpH5.2に調整)を加え、冷却した100%エタノールを2倍量混合しDNAを沈殿させた。そのDNAは70%エタノールで洗浄し室温で乾燥させた後、2mlのTE bufferに溶解して4°Cで保存した。

2-C) DNA の定量

DNA の定量は 260nm の吸光測定で行った。O.D.260=1.00 は 2 本鎖の DNA が 50 μ g/ml の濃度に相当する。同時に 280nm の吸光度も測定した。O.D.260:O.D.280 比が 1.8 ± 0.1 であれば、タンパク質、界面活性剤、フェノールなどの不純物が混入していない純粋な DNA が回収されたとみなした。

2-D) ミトコンドリア DNA ・ D-loop 領域の塩基配列の決定

2-D-1) プライマーの作成

ウシのミトコンドリア DNA における D - loop 全領域を増幅するために、OligoTM ソフトウェアを用いて全ミトコンドリア DNA (GenBank Accession no.:AY526085) 領域内の cytochrome b 遺伝子における 15706bp から 15727bp の領域に Forward primer、12SrRNA 遺伝子における 971bp から 992bp の領域に Reverse primer を作成した。シーケンス用のプライマーも同様に 16233bp から 16255bp の領域に作成した。それらプライマーの塩基配列を以下に示す。

Forward primer:b-15706F: 5'-ACA ACT AAC CTC CCT AAG ACT C-3' (22mer) Reverse primer:b-971R: 5'- GAT TAT AGA ACA GGC TCC TCT A -3' (22mer) Sequencing primer:b-16233F: 5'-TTC ATT AAA TAG CGA CCC CCA C-3' (22mer)。カンボジア、ミャンマー、ブータン、ベトナムのサンプルに対して上記のプライマーを用いたが、それ以外のサンプルに対し、プライマー

AN2FOR 及び AN3REV (Troy ら、2001) を利用した。

2-D-2) PCR 反応

上記のプライマーを用いて D-loop 領域を増幅した。全血より精製したゲノム DNA は超純水で 10ng/μl に調整し鋳型とした。この鋳型 DNA 2μl に、超純水 12.3μl、Forward と Reverse のプライマー (10pmol/μl) 各 1μl、10×PCR buffer (100mM ミトコンドリア リス-HCl, 15mM MgCl₂, 500mM KCl, pH8.6) 2μl、dNTP Mixture (2.5mM each) 1.6μl、EX-Taq polymerase 5units/μl) 0.1μl を加えた溶液で PCR 反応を行った。以上の作業は氷上で行った。PCR 反応は GeneAmp9700 (Applied Biosystems) を使い、94°C・2分間で熱変性後 94°C・30秒間、55°C・30秒間、72°C・90秒間を 30 サイクル行い、最後に 72°C・4分間の伸長反応を行った。

2-D-3) キャピラリーシーケンサーを用いた塩基配列の決定

2-D-3-1) DNA 精製

精製には GENE CLEAN II KIT (Qbio gene) を用いた。まず PCR 産物 20μl を 1.5ml チューブに移し、3 倍量の NaI と 5μl の glass milk を加え懸濁し、室温で 5 分間インキュベートして DNA を吸着させた。次に 10,000rpm で 30 秒間遠心して glass milk を沈殿させ、溶液を除いた。氷冷した洗浄液 (New wash 14ml, water 280ml, 100% ethanol 310ml) 100μl を加えて 10,000rpm で 30 秒間遠心し、上清を除く操作を三回繰り返し、三回目で十分乾燥させた。最後に 100μl の滅菌超純水を加え懸濁して室温で 5 分間インキュベートした後 10,000rpm で 1 分間遠心して上清を別のチューブに移して保存した。

2-D-3-2) シーケンス反応

最初に Nano Drop ND-1000 (NanoDrop Technologies) を用いて上で精製した DNA 濃度を測定した。シーケンス反応は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequenceing Kit を用いて行った。鋳型 DNA を 5-10ng、Ready Reaction Premix を 1μl、BigDye Sequencing Buffer を 3.5μl、プライマー 1μl (3.2μM)、滅菌超純水で全量が 20μl になるよう混合して反応を行った。GeneAmp9700 (Applied

Biosystems) により、96°C・1min の熱変性後 96°C・10sec, 50°C・5sec, 60°C・4min で 25 サイクル行い、4°C で保存した。

2-D-3-3) Ethanol/EDTA 沈殿によるシーケンス産物の精製

次に反応させた産物からより正確なデータを読みとるため、未反応の蛍光ターミネーターを除去する Ethanol/EDTA 沈殿法を行った。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit のプロトコールに従い、まずシーケンス産物に 125mM EDTA を 5 μ l、100%エタノールを 60 μ l 加えて四回転倒混和し、室温で 15 分間インキュベートした。次に、室温で 14000rpm、25 分間遠心分離し、上清を除いた。さらに、70%エタノールを 60 μ l 加え再び室温で 14000rpm、5 分間遠心分離した後、上清を除いた。これを 15 分間室温で風乾させた。乾燥した状態では遮光するよう注意する。実験を中断する時はこの状態で遮光し 4°C 保存。次に沈殿にインジェクションバッファー (Hi-Di ホルムアミド) を加えて 3~5 分 vortex し沈殿を溶解させた。この溶液を 95°C、2 分間のボイルにかけ、すぐに氷上で 5 分間冷やす。これをキャピラリーシーケンサー用の 96 ウェルプレートに全量移しキャピラリーシーケンサーにセットした。

2-E) 分析

シーケンスのチェック及びアラインメントは DNASTAR 6.0 (DNASTAR Inc., Madison) を用いて行った。分析にはミトコンドリア DNA 超可変領域 16,023~16,262 間の 240bp を用い、今回塩基配列決定を行った 548 固体在来牛に、データベースより 296 個体のデータを加えた合計 844 個体で行った (Genbank Accession number: Bhutan: FJ492456~492464、AB268559~268581。 Nepal: AB065125~065126、065128、085921~085923。 Arunachal Pradesh India: FJ492465~492493。 Uttar Pradesh India: FJ492494~492538。 Bangladesh: DQ985396~985438。 Meghalaya India: FJ492539~492548。 Mizoram India: FJ492549~492565。 West Bengal India: FJ492566~492640。 Punjab Indo-Pakistan border: FJ492379~492399、L27732、27733、27722、27723、U51806~51811。 Rajasthan India: FJ492641~492700、

AY972130~972140。 Thar region India: FJ492333~492352、 L27736~27737、
 U51812~51815、 AY318137。 Baluchistan Pakistan: FJ492359~492378。
 Andhra Pradesh India: FJ492353~492358 、 AF336738~336744 、
 AY378133~378136 。 Maharashtra India: FJ492701~492708 、
 AY972149~972154。 Karnataka India: FJ492314~492332。 Tamil Nadu India:
 FJ492709~492730、AY972141~972148。 Neimenggu North China: DQ166055。
 Shanxi North China: DQ166073~166074、 166076~166077、 166084、 166089、
 AF521973、 AY119669、 119676。 Shandong East China: DQ166069~166070、
 166078、 166081~166082、 344930~344932、 344946~344947、 344949。 Anhui
 East China: AY521122、 521125、 902398~902399。 Jiangxi East China:
 DQ166117、 344933~344937。 Henan Central China: DQ166090~166091、
 166093、 166095、 166103~166105、 344957、 AY115527、 521133、 902405、
 902393。 Fujian East China: DQ166118、 166120~166122、 344953~344955。
 Hainan South China: DQ166130~166132、 344938~344939。 Guangdong
 South China: DQ166123~166129、 344965~344968。 Guizhou South China:
 AY491437、 491440、 515610~515625、 515627、 515632、 515634~515635、
 515637~515638、 515643、 515647、 515650、 515652、 515654~515655、 515658、
 515661~515663、 515667~515671、 515676、 515678、 DQ166115~166116。
 Sichuan South China: DQ166111、 166113、 344963、 AY521083、 521085、
 902385 、 902396 、 EF417970~417986 。 Yunnan South China:
 AY521127~521128、 902400~902403、 FJ492425~492426。 Xizang South China:
 AY378119。 Mongolia: FJ492414~492424、 AB117088~117092。 Kazakhstan:
 FJ492427~492729 。 Turkmenistan: FJ492430~492437 。 Afghanistan:
 FJ492438~492455。 Oman: FJ492731~492741。 Iraq: FJ492400~492412。
 Turkey: FJ492413 。 Myanmar: FJ492254~492283 。 Cambodia:
 FJ492224~492253。 Laos: FJ492284~492313。 Vietnam: FJ492194~492223。
 Philippines: AB079301~079307、 079310、 079312~079313、 079315~079317、
 079319~079323)。 Mean number of pairwise differences、 シーケンス多様性

(π), neutrality tests の Tajima's D、Fu's Fs 及びミスマッチ分布と raggedness index は Arlequin 3.1 (Excoffier ら、2005) を用いて計算を行った。ネットワークの作成には median-joining ネットワーク (Bandelt ら、1999) (NETWORK4.5; <http://www.fluxus-engineering.com/>) を用いた。各ハプログループの拡大年代の推定は demographic expansion パラメーター (mismatch distribution) を用いた。遺伝的多様性の推定にサンプルサイズの影響の分析はブートストラップ検定 Manly (1997) にしたがって行った。

第3節 結果

3-A) ミトコンドリア DNA・D-loop 領域の塩基配列決定

3-A-1) 塩基配列の結果及びハプログループ

ユーラシア、南及び東アジアの 16 ヶ国の在来牛により、548 個体におけるミトコンドリア DNA・D-loop 領域の塩基配列を決定した。得られた塩基配列に Genbank データベースによりアジア *Bos indicus* 在来牛のデータを加え、合計 844 個体のミトコンドリア DNA・D-loop 領域の 16,023~16,262 間の 240bp 超可変領域を参照のミトコンドリア DNA の塩基配列 (Genbank Accession no. V00654) と比較した。

その結果、合計 60 突然変異、94 ハプロタイプが観察された。これらのハプロタイプは大きく I1 と I2 グループに分類された。この I1 と I2 グループは後に解析を行ったネットワーク分析に基づいて分類された。この分析の詳細については後述する。検出された 94 ハプロタイプのうち、56 ハプロタイプ (607 個体) は I1 ハプログループに属し、38 ハプロタイプ (237 個体) は I2 ハプログループに属された。I1 グループの最も頻度の高いハプロタイプは 391 個体、I2 グループには最も頻度の高いハプロタイプは 118 個体が観察された。

3-A-2) シーケンス多様性

Bos indicus のミトコンドリア DNA・D-loop 多様性を評価するため、アジア全域を Indus (Pakistan, India)、Ganges (India, Bangladesh)、South India、Northeast Indian subcontinent (Bhutan, Nepal と India)、West Asia (Iraq, Oman と Turkey)、Central Asia (Kazakhstan, Kyrgyzstan, Turkmenistan と Afghanistan)、East Asia (China と Mongolia)、そして Southeast Asia (Myanmar, Cambodia, Laos, Vietnam と Philippines) 8 つの地域に分け、それぞれ地域内のウシ集団の I1 及び I2 ハプログループのシーケンス多様性を算出した (表 2-1)。表 2-1 から、Northeast India subcontinent、Ganges、Indus Valley

及び South India 地域におけるウシ集団は高い I1 及び I2 グループのシーケンス多様性が示されており、I1 ハプログループにおいては、最も高い多様性値は Ongole 集団の 0.0092 であり、I2 ハプログループにはその値は Maharashtra 集団の 0.0078 であった。また、全体として、I1 グループは高い割合を占めているが、I2 ハプログループの Mean number of pairwise differences (1.411 ± 0.867) は I1 ハプログループ (1.143 ± 0.742) より高い値を示した。

また、インド亜大陸及びそれ以外地域を 2 つの大きな地域グループとし、各グループの I1 や I2 グループのシーケンス多様性を算出し、表 2-2 に示した。表 2-2 から、インド亜大陸グループでの平均シーケンス多様性について、I1 ハプログループは 0.0070 であり、I2 ハプログループは 0.0053 であった。これに対し、それ以外地域グループでの I1、I2 平均シーケンス多様性はそれぞれ 0.0021 と 0.0001 となり、インド亜大陸とそれ以外地域において、両地域グループ間の I1 及び I2 グループシーケンス多様性の有意差が $P (P < 0.001)$ 値において観察された。

3-B) アジアにおける *Bos indicus* 在来牛の系統分析

3-B-1) アジア領域のミトコンドリア DNA ハプロタイプネットワーク

得られたユーラシア、南及び東アジアの 16 ヶ国の在来牛のミトコンドリア DNA・D-loop の塩基配列に Genbank データベースによりアジア *Bos indicus* 在来牛のデータを加え、NETWORK4.5 ソフトを用い、ネットワーク系統樹を作成した (図 2-1)。このネットワーク分析の結果、アジア在来牛の *Bos indicus* 型ミトコンドリア DNA は明らかに大きく 2 つのグループに分類された。この 2 つのハプロタイプグループは数箇所の置換によって分類される (16084、16232、16085、16141)。このネットワーク系統樹において、円で示されるハプロタイプの大きさはそのハプロタイプの遺伝子頻度を反映している。2 つのハプロタイプグループの地理的分布を示しており、I1 グループは、インド~東南アジアの各地で主として見られるミトコンドリア DNA グループであり、I2 グループは、インド北部、ブータン、ネパールなどで相対的に高い頻度で観察されたが、東南

表 2-2 インド亜大陸及び他の地域グループのシーケンス多様性

Haplogroup	Location	n	Mean π	s.d.	U	<i>P</i>
I1	Indian subcontinent	14	0.0070	0.0020	224	<0.001
	Other	16	0.0021	0.0013		
I2	Indian subcontinent	14	0.0053	0.0029	223	<0.001
	Other	16	0.0001	0.0004		

n は地理的地域の数。 π はシーケンス多様性、s.d.は標準偏差を示す。U は non parametric 検定 (Mann-Whitney (U) test)。P は有意差水準を示す。Other 地域は West Asia、Central Asia、East Asia 及び Southeast Asia を含む。

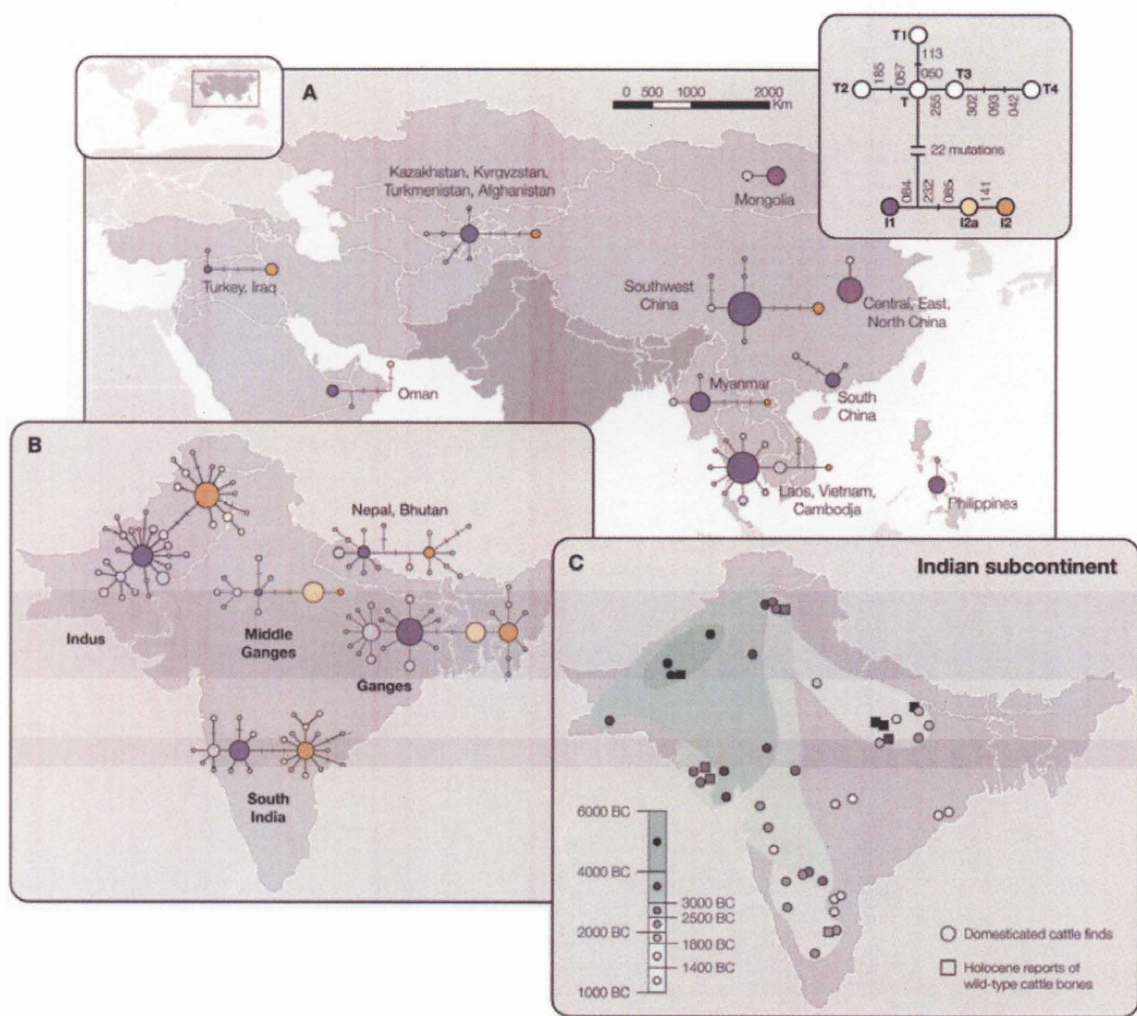


図 2-1 アジア *Bos indicus* ウシのミトコンドリア DNA ハプログループの地理的分布及びインド亜大陸においてのウシ考古学上の遺跡分布。(A) アジア領域にわたって *Bos indicus* ウシハプロタイプのネットワーク。(B) インド亜大陸において 3 つ候補家畜化センター (Indus、Ganges と South India) のウシハプロタイプのネットワーク。(C) 考古学上のデータによるインド亜大陸の異なる時期のウシ分布、そのデータの詳細は表 2-4 に示す。

アジア在来牛では極めて低い頻度であった。

I1 グループの中心を占める高頻度なハプロタイプはブータンを除くその他の国でいずれも高頻度を示すハプロタイプとなっている。I1 グループでは、この高頻度を示すハプロタイプを中心として放射状にその他低頻度なハプロタイプが散在していた。特に、高頻度なハプロタイプと 1・2 塩基のみが異なるハプロタイプが数多く観察された。このことは、この高頻度なハプロタイプが I1 ハプログループの中で最も祖先型を示すハプロタイプであることを示しており、家畜化初期において最も集団に遺伝的貢献をしたハプロタイプであることが推測される。

一方、I2 グループにおいても放射状のネットワークを形成していたが、I1 グループのように中心をなすハプロタイプはインドを除いて高頻度ではなかった。このことは I2 グループの祖先集団が、多様性を有する複数の集団から形成されているか、家畜化後に野生集団からの遺伝子移入が起こったことを示唆している。これは、I1 グループと比較して I2 グループを形成するハプロタイプが変異に富むものが多いことから示唆される。

3・B・2) インド亜大陸の Indus、Ganges 及び South India でのミトコンドリア DNA ハプロタイプのネットワーク

考古学データにより、インド亜大陸の Indus、Ganges 及び South India は *Bos indicus* 起源の有力な候補地域と考えられている。そこで、これらの地域において I1、I2 ハプロタイプのネットワークを構築し、図 2・2 に示した。図 2・2 から、3 つ地域とともに高頻度の I1、I2 ハプログループが観察された。I1 ハプログループに関しては、Indus において中心をなすハプロタイプは高頻度であり、完全な放射状のネットワークを形成した。Ganges には高頻度の I1 ハプロタイプが観察されたが、その放射状のネットワークは完全ではない。South India には相対的に低い頻度の I1 ハプログループが示された。また、I2 ハプログループについて、Ganges や South India とともに高頻度で観察された。

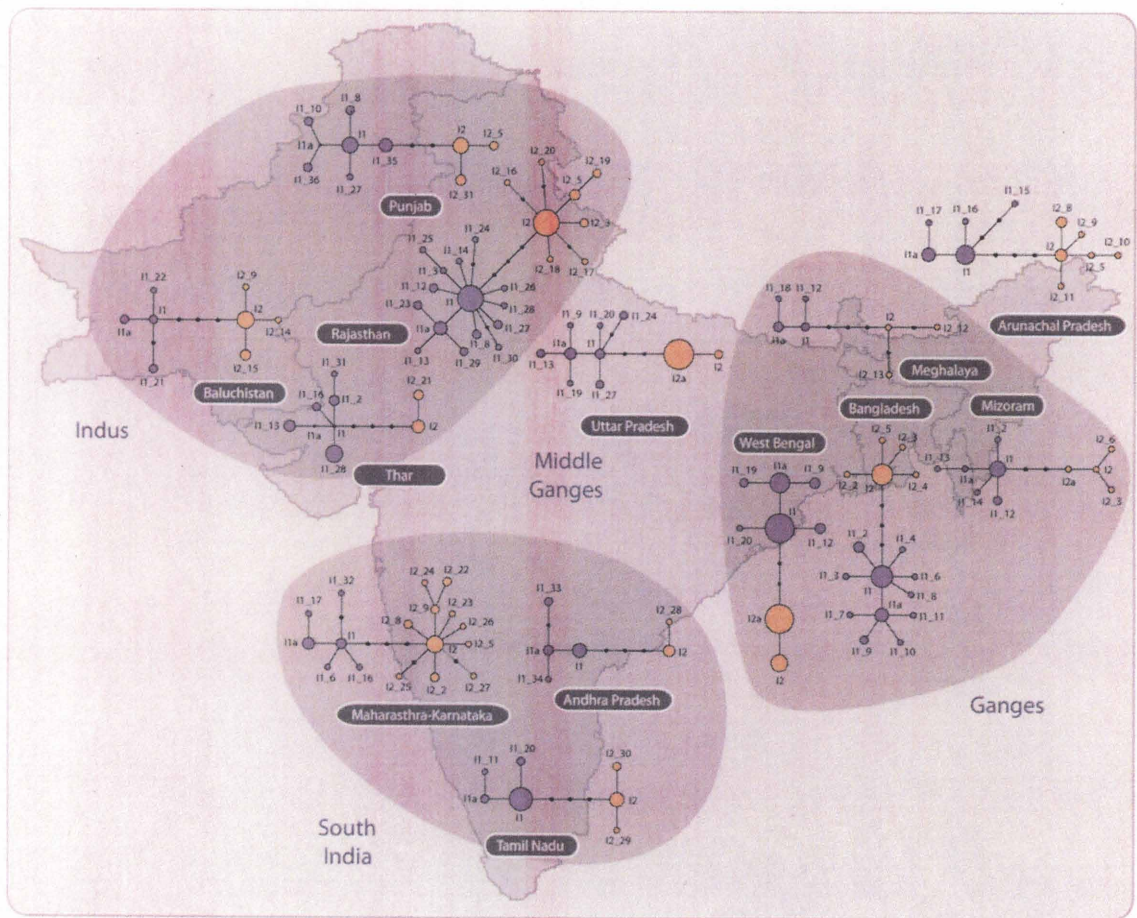


図 2-2 インド亜大陸の Indus、Ganges 及び South India において I1、I2 のミトコンドリア DNA ハプロタイプのネットワーク。

3-C) *Bos indicus* 起源の推定

前述したように起源の候補領域である Indus、Ganges 及び South India に対し、ミスマッチ分布及び Tajima's D、Fu's Fs と raggedness index の検定を行い、その結果は図 2-3 に示した。図 2-3 から、ミスマッチ分布の曲線より、Indus における I1 ハプログループのピーク (modal value=2) は Ganges や South India (2 つ地域共に modal value=1) より高く、そのピークの位置は分岐年代の深さを反映するため、Indus における I1 グループの分岐年代は Ganges や South India より昔であると考えられる。したがって、Indus は I1 ハプログループの起源である可能性が最も高いと推定できる。これに対し、I2 ハプログループ曲線のピーク位置は Indus や South India 共に観察され、Ganges での曲線は不明確であるため、I2 グループの起源に関する同定は困難であると考えられる。

また、Tajima's D、Fu's Fs の検定は中立的な進化から逸脱の程度を示す。図 2-3 の Ganges、Indus 及び South India において、それぞれの I1 の Tajima's D 値は -1.764 ($P < 0.05$)、-1.790 ($P < 0.05$)、-1.534 ($P < 0.05$)であり、I2 の Tajima's D 値は -1.691 ($P < 0.05$)、-2.024 ($P < 0.05$)、-2.098 ($P < 0.05$)であった。I1 のそれぞれの Fu's Fs の値は -13.096 ($P < 0.001$)、-25.167 ($P < 0.001$)、-6.638 ($P < 0.01$)であり、I2 の Fu's Fs の値は -7.359 ($P < 0.01$)、-9.119 ($P < 0.001$)、-9.801 ($P < 0.001$)であった。これらの数値はともに負の値であり、ミトコンドリア遺伝子全体に自然選択が働いたか、あるいは過去に集団が急激に拡大したことを示唆している。また、raggedness index の検定には 3 つ地域の 2 つハプログループ共に有意差が観察されず ($P > 0.05$)、集団の拡大が示された。

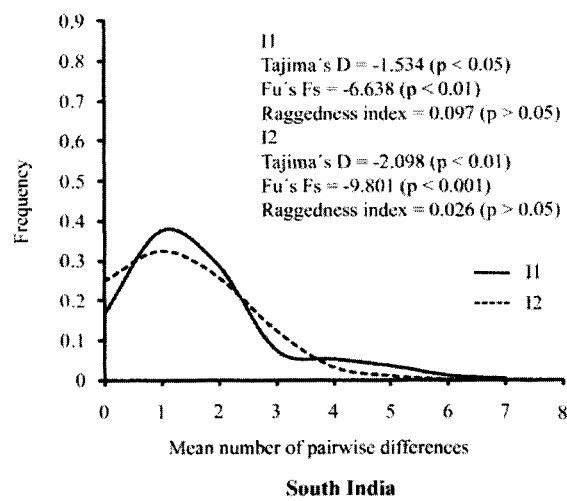
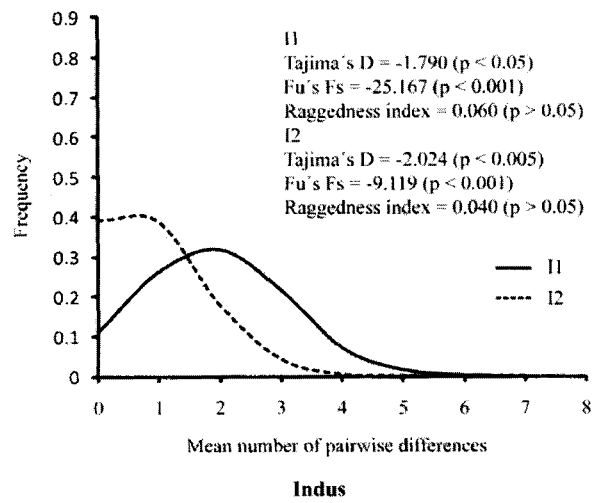
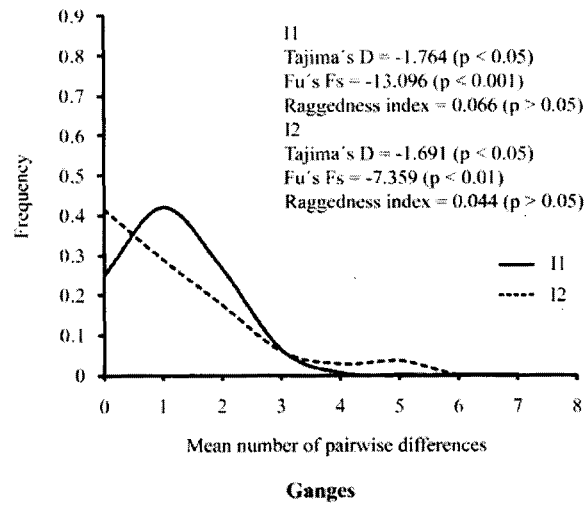


図 2-3 *Bos indicus* ウシの 3 つ起源である候補地域 (Ganges、Indus Valley 及び South India) に対してミスマッチ分布及び中立仮説検定。

第4節 考察

近年、分子遺伝学の急速な発展に伴い、DNA 塩基配列を用いた分析が様々な動物において簡便に行えるようになった。特に、ミトコンドリア DNA・D-loop の塩基配列を用いた分析は、種や系統分化に関する研究に対して幅広く行われている。ウシにおいてもミトコンドリア DNA・D-loop の塩基配列を用いた分析により、起源や遺伝的多様性、遺伝的類縁関係についての研究が世界中多くの在来牛において進んでいる。しかしながら、これらの研究は *Bos indicus* に属する在来牛においては緒に着いたばかりである。アジア在来牛に対する分析は、中国 (Lai ら、2006)、日本、韓国、モンゴル (Mannen ら、2004) の家畜牛において研究がなされてきた。しかし、*Bos indicus* 在来牛が多く生息している南、東南アジアなどの遺伝的な調査は行われておらず、これら発展途上国にあたる地域の分析は固有の在来牛を有していることから遺伝資源学上有益であると考えられる。

そこで本研究では、ユーラシア、南及び東アジアの 16 ヶ国の在来牛により、548 個体の在来牛におけるミトコンドリア DNA・D-loop 領域の塩基配列を決定し、さらに Genbank データベースから利用可能なアジア *Bos indicus* 在来牛のデータを加えて、アジア *Bos indicus* 在来牛に対する遺伝的構造及び多様性の解析を行った。ハプロタイプ分析の結果、94 ハプロタイプが得られた。これらのハプロタイプは大きく I1 と I2 グループに分類し、各地域においての 2 つグループの多様性を推定した。

地域グループ間の多様性を比較したところ、インド亜大陸地域では 2 つのミトコンドリアハプログループ共に著しく高いシーケンス多様性が観察された ($P < 0.001$) (図 2-1、表 2-2)。家畜化起源 (家畜化センター) におけるウシ集団は、野生集団に由来する突然変異を多く保有し、高い遺伝的多様性を有すると考えられる。また、家畜化センター以外の地域におけるウシ集団には、祖先の多様性も明らかに含まれているが、家畜化センターから離れれば離れるほど、そ

の多様性は減少していく傾向がある (Troy ら、2001 ; Beja-Pereira ら、2004)。したがって、ここで示されたインド亜大陸における I1 及び I2 グループの高いシーケンス多様性は、*Bos indicus* の起源がインド亜大陸であることを示唆している。また、遺伝的多様性の推定にサンプルサイズの影響をブートストラップ検定 (Manly、1997) により分析している。反復回数を 10,000 回とした各グループの 40、100、200 サンプルを分析に用いた結果、サンプルサイズの違いにより、遺伝的多様性の検定には影響を与えないことを明らかにした ($P>0.05$)。

Bos indicus の家畜化センターと考えられている 3 つ領域 Indus Valley、Ganges region 及び South India (Allchin、1963 ; Fuller、2008) の中で、I1 及び I2 グループの起源がどの地域であるかを同定するため、各ハプログループに対する多様性の詳細な分析を行った (図 2-3)。Indus における modal value は 2 であり、Ganges 及び South India の modal value (共に=1) より大きい数値を示した。その分析から、I1 ハプログループの最も有力な起源は Indus (Rajasthan と Pakistan を含む) であること示唆しており、これは考古学上の研究 (Meadow、1984 ; Meadow、1996) によっても支持されている。I1 ハプログループはインドのみならず、それ以外のアジア領域においても高い頻度で観察され、いくつかの地域にはこの I1 ハプログループのみが観察されている。次の 3 つの分析結果から、Indus 地域は *Bos indicus* の最有力家畜化センターであるといえる。(1) Indus ウシ集団の I1 ハプログループは完全な放射状ネットワークを示す。(2) ミトコンドリア DNA ミスマッチ分布の分析結果により、Indus における I1 ハプログループの modal value は Ganges 及び South Indian より高く、I1 ハプログループは Indus における集団拡大年代は Ganges 及び South Indian により昔であることが推定された。(3) Ganges 及び South Indian と比べ、Indus では I1 ハプログループのユニークなハプロタイプが多いことである。

一方、I2 ハプログループに対して同様な分析を行った結果、より複雑なパターンが観察された。I2 ハプログループの祖先ハプロタイプに由来したいくつかのハプロタイプが高頻度で観察されたが、その他の派生的なハプロタイプは

特定の場所のみで観察された。また、I1-I2 の中間ハプロタイプ I2a (I2 ハプログループに属すと考えられる) は I1 及び I2 中心ハプロタイプからそれぞれ 3 または 1 塩基置換によって分岐している。このハプロタイプは Uttar Pradesh (図 2-2) において高頻度 (93%) で示され、Ganges の中部平原において、Uttar Pradesh から離れるほど、I2a ハプロタイプの頻度が減少する傾向にあった。このパターンはおそらくウシ集団の拡大時期に、Ganges 及び中央インドの野生牛が家畜集団に導入されたことを示唆するものであろう。

また、Indus 及び South Indian の I2 ハプログループにおいて、類似的なネットワーク構造による同程度の多様性 (図 2-1、2-2)、同様のミトコンドリア DNA ミスマッチ分布 modal value (図 2-3)、そして同程度のユニークなハプロタイプ数 (表 2-3) が観察された。さらに、Ganges においては高頻度の I2a ハプログループ (図 2-2) が観察されることを鑑みると、I2 ハプログループの家畜化センターの明確な特定は困難であると考えられた。一方、考古学上の証拠により、Indus において *Bos indicus* 家畜牛が現れる時期 (約 8,000 年前) は、South India (約 5,000 年前) 及び中央 Ganges (約 4,000 年前) よりかなり昔である。さらに、これら地域の家畜牛と野生原牛の地理的分布も類似していることも示されている (図 2-1C, Chattopadhyaya 2002 ; Fuller 2006)。これらの結果から、I2 グループの起源は South India や中央 Ganges より、インド亜大陸の北部である可能性が高いことが指摘されている。

東南アジアや中国では高頻度の I1 ハプログループが観察され、またその遺伝的多様性から、これらの地域へは I1 ハプログループを持つ系統が India から導入された可能性が高いことを示している。考古学データから、家畜牛が South China や Southeast Asia に移動した時期はおそらく 3,000~3,500 年前であったと考えられる (Higham, 1996)。東南アジアでは、I2 ハプロタイプがほとんど観察されないため、I2 ハプログループは金石併用時代或いは鉄器時代の時代に家畜牛集団へ導入されたと考えられる。この時期、中国や東南アジアでの文化的な品種成立により I2 ハプログループの拡散が妨げられ、各地域に存在する I2 ハプロタイプはおそらく貿易による伝播の結果であったと示唆される。

表 2-3 インド亜大陸において 3 つ家畜化センター候補地域のハプロタイプ

Haplogroup	Region ¹	Number of sequences	Number of haplotypes	Number of unique haplotypes 2-step distant from main haplotype (I1, I2)
I1	Ganges	110	19 (5) ²	4
	Indus Valley	86	23 (11)	7
	South India	44	10 (4)	4
I2	Ganges	83	9 (5)	2
	Indus Valley	63	13 (9)	4
	South India	36	14 (10)	4

¹Ganges は Uttar Pradesh、Bangladesh、Meghalaya、West Bengal と Mizoram を含む。 Indus Valley は Punjab、Rajasthan、Thar region と Baluchistan を含む。 South India は Andhra Pradesh、Maharasthra-Karnataka と Tamil Nadu を含む。 ²0内の数字はユニークなハプロタイプ数を表す。

以上のことから、*Bos indicus* ウシの起源はインド亜大陸の北部であることが示唆された。さらに、考古学上の推定により、Indus は *Bos indicus* 亜種の家畜化センターの最有力候補であり、本研究の遺伝的データはその推測を支持している。また少なくとも、Uttar Pradesh 及び Ganges における I2 ハプログループの頻度と分布から、インド北部において雌野牛が *Bos indicus* 家畜牛集団に導入されたことが考えられるであろう。このように、約 8,000 年前 Indus での *Bos indicus* ウシの家畜化早期段階、I1 ハプログループを有する野生牛が家畜化されてから、Southeast Asia 及び Southern China まで伝播されたと考えられる (<4,000 年前)。

また、家畜牛の初期伝播に伴い、I2 ハプログループに属する南アジアの野生集団の家畜牛への遺伝子流入が考えられるが、これら野生牛集団は、現在ではもう絶滅しているため現時点での推測は容易ではない。考古学の証拠から、新石器時代における Ganges での野生原牛の存在が示され (図 2-1、Chattopadhyaya、2002 ; Fuller、2006)、家畜牛集団への野牛の導入が行われた可能性は十分に考えられる。また、South India では野生原牛の分布についてのデータが少ないが、更新世後期や完新世の時期に野生原牛が大陸で広く分布していたと考えられており (Grigson ら、1985 ; Van Vuure、2005)、South India においてもいくつかの野生原牛が新石器時代に生存していた可能性がある。例として、表 2-4 に示しているように、4,200 年前の野生原牛 (*B. primigenius/namadicus*) の遺物が Banahalli Kanataka において発見されている (Korisettar ら、2001 ; Chattopadhyaya、2002 ; Fuller、2006)。表 2-4 では、Greater Indus、Gujarat/Rajasthan、North Peninsula、East Maharashtra と South Peninsula などの南アジア地域において、考古学の証拠により他の家畜牛及び野生ウシの年代分布も示唆した。また、東南アジアにおいて他のウシ属 (例えば *B. gaurus* と *B. Javanicus*、約 3,500 年前) の家畜化も考えられるが、これらの家畜化に関するデータは現在のところ充分ではない。

以上、本研究ではミトコンドリア DNA の塩基配列情報を用い、アジア *Bos indicus* 在来牛の母系系統より遺伝的関係の研究を行った。これらの結果は考古

表 2-4 考古学の証拠による南アジアにおける家畜牛及び野牛の分布

DOMESTICATED CATTLE		PROBABLE WILD CATTLE	
Greater Indus			
Mehrgarh, Baluchistan	6000 BC	Mehrgarh, Baluchistan	6000 BC
Kili Ghul Mohammad	7000-5000 BC		
Sheri Khan Terakai, NW Frontier Province	4000 BC		
Harappa, Pakistani Punjab	3200 BC		
Miri Qalat, Makran	3000 BC		
Kanishpur, Kashmir	3000 BC		
Gufkral, Kashmir	2500 BC	Gufkral, Kashmir	2500 BC
Burzahom	2500 BC		
Gujarat/Rajasthan			
Loteshwar, Gujarat	3600 BC	Kuntasi, Gujarat	2500 BC
Balathal, Rajasthan	3000 BC		
Padri, Gujarat	3000 BC		
Kuntasi, Gujarat	2500 BC		
Shikarpur, Gujarat	2500 BC	Shikarpur, Gujarat	2500 BC
North Peninsula			
Kayatha, Madya Pradesh	2500-2300 BC		
Kaothe, Maharashtra	2000 BC		
Daimabad, Maharashtra	2000 BC		
Inamgaon, Maharashtra	1700 BC		
East Maharashtra			
Tuljapur Garhi	1500 BC		
Bhagimohari	1000 BC		
South Peninsula			
Kodekal, Karnataka	(?) 2800 BC		
Utnur, Karnataka	2800 BC		
Budihal, Karnataka	2300 BC		
Banahalli, Karnataka	2200 BC	Banahalli, Karnataka,	2200 BC
Terdal	2200-2000 BC		
Hallur, Karnataka	2000 BC		
T. Narsipur	2000 BC		
Rupanagudi, Andhra Pradesh	1700 BC		
Hanumantaraopeta, Andhra Pradesh	1600 BC		
Biljapalle, Andhra Pradesh	1600 BC		

South Peninsula				
Tamil Nadu	(?) ≤800 BC			
Middle Ganges		Ganges		
Lahuradewa II, Uttar Pradesh	2000 BC	Sarai-Nahar-Rai, Pradesh	Uttar	(?) ~5000 BC
Senuwar 1B, Uttar Pradesh	2000 BC	Damdama, Uttar Pradesh		4500-4000 BC
Lal Qila, Uttar Pradesh	1800 BC	Chopani-mando, Pradesh	Uttar	10,000-3000 BC
Chirand, Bihar	1800 BC			
Mahagara, Uttar Pradesh	1800 BC	Mahadaha, Uttar Pradesh		2500 BC
Khairadih, Uttar Pradesh	1400 BC	Koldihwa/ Mahagara, Pradesh	Uttar	1800 BC
East India (Orissa)				
Golbai Sassan, Orissa	1500 BC			
Gopalpur, Orissa	1500 BC			

学研究を補足するのみならず、いくつかの分岐系統の地理的起源及び伝播方向の解明に貢献するものである。また、伝播の歴史及び起源の解明は潜在的な遺伝多様性資源の把握及び将来の家畜改良や農業生産に役に立つと考えられる。

第3章 ウシ成長ホルモンレセプター遺伝子における遺伝的多様性

第1節 緒言

成長ホルモンは多くの動物種において、出産後成長などの重要な役割を担っている (Etherton & Bauman, 1998)。成長ホルモンレセプター (GHR) はサイトカインレセプターの1つタイプであり、組織レベルで GH の生物学的作用を仲介する。GHR の発現は様々な組織において広く分布され、肝臓において最も高く発現されている (Kelly ら、1991)。ウシにおいて、肝臓の GHR は IGF1 (insulin-like growth factor 1) のメッセンジャーRNA 発現と高度に関連していることが報告されている (Kobayashi ら、1999)。また、GHR 遺伝子はウシの成長、胴体、乳形質にとって重要な遺伝子と考えられている (Hale ら、2000 ; Curi ら、2005 ; Di Stasio ら、2005)。

ウシの成長ホルモンレセプター遺伝子は 20 番染色体に位置し、5'側に存在する 1A~1I までの 9 つの非コードエクソンは選択的にスプライシングされ、おのおののエクソンにはプロモーターが存在する。そのうちエクソン 1A の上流にはおよそ 1.2kbp のレトロポゾンファミリーのメンバーである LINE-1 が存在し、*Bos taurus* でのみこの LINE 配列が存在すると報告されている (Lucy ら、1998)。LINE-1 の挿入 (L タイプ) はヨーロッパ牛に特異であり、*Bos indicus* ウシにはこの LINE-1 が欠失している (S タイプ) と考えられてきた (Lucy ら、1998)。また、黒毛和種ではこの両方の型が混在しているという報告がある (Ohkubo ら、2006)。

このような挿入欠失は塩基置換とは異なり、非同祖的にはきわめて生じにくい。いいかえれば、通常の塩基置換は同一遺伝子座であったとしても異なった系統や時期に十分起こり得るが、大きな単位での全く同じ挿入欠失は、偶然に異なった系統間ではほとんど起こりえないといえる。したがって、このような DNA 多型は生物種間、亜種、系統あるいは品種間の遺伝的類縁関係を調べるた

めの、良いマーカーとなりえる。

そこで、本研究ではこの遺伝的多様性及び起源を調べるために、ヨーロッパおよび東アジア *Bos taurus* と *Bos indicus* 在来牛における GHR 遺伝子型の頻度を調査し、GHR LINE-1 配列の遺伝的多様性とその起源について考察した。

第2節 材料及び方法

2-A) 供試動物

肉用牛である黒毛和種 60 個体、アンガス種 30 個体、ヘレフォード種 55 個体と乳用牛であるホルスタイン種 30 個体、また韓牛 115 個体、モンゴル在来牛 47 個体、さらにベトナム、カンボジア、ラオスおよびミャンマーの在来牛各 30 個体を実験に供した。黒毛和種は 2002 年に開催された第 8 回全国和牛能力共進会出品牛のうち、同一県、同一種雄牛に偏らないように選んだ肝臓サンプル 60 頭分を用いた。ホルスタイン種は、岐阜県境川市の屠場より譲り受けた肝臓組織サンプル 30 頭分を用いた。アンガス種およびヘレフォード種はオーストラリアクイーンズランド大学の Hong Duong 博士より譲り受けたゲノム DNA を用いた。韓牛は嶺南大学の呂博士よりゲノム DNA サンプルを譲り受けた 55 頭分、韓国中南大学より 60 頭分を用いた。モンゴル在来牛はモンゴル北東部のドルノド県スンベル地方より 47 個体サンプルを得た。これは東京農業大学の天野 卓博士によって血液採取が行われ、サンプルを譲り受けたものである。ベトナム、カンボジア、ラオスおよびミャンマーの在来牛は現地より各 30 個体のサンプルを得た。これらの供試動物は血縁情報から血縁関係が認められないことを確認している。

2-B) ゲノム DNA の精製

ウシゲノム DNA は肝臓組織、リンパ節、血液および筋肉組織より抽出し、精製した。

2-B-1) 肝臓組織からの DNA 精製

組織からのゲノム DNA は以下のように抽出した。組織約 1.0g をホモジナイザーでホモジナイズし、TNE 溶液 (10mM Tris-HCl pH7.5, 0.1M NaCl, 1mM EDTA) 20ml を加えながらガーゼを用いて濾過し、3,000rpm で 10 分間遠心分離した。その後上清を除き、TNE 溶液を 15ml 加え良く混和して、再び 3,000rpm

で 10 分間遠心分離し上清を除いた。そして生理食塩水/EDTA (0.16M NaCl, 1mM EDTA) 1ml に良く混和し、ザルコシル溶液 (0.5% N-lauroylsarcosine sodium salt, 10mM Tris-HCl pH8.0 10mM EDTA) 15ml 加えて DNA を切断しないようにゆっくりと振とうして DNA を溶出させた。そして ProteinaseK 溶液 (10mg/ml in water) 200 μ l を加え、37°C で一晩インキュベートした。当量の TE-フェノール(フェノールを 60°C で溶かし、0.1%になるように 8-hydroxyquinoline を加え、TE buffer 10mM Tris-HCl; pH8.0, 1mM EDTA で水飽和したもの)を加え 10 分間ゆっくりと混和した。3,000rpm で 10 分間遠心分離し、水層とフェノール層の間にできるタンパク質を取らないように水層を分取した。この水層にフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール (25:24:1, 0.05%の 8-hydroxyquinoline を含む) を加え、10 分間遠心分離し水層を分取した。この水層に当量のクロロフォルム・イソアミルアルコール (24:1) を加え 10 分間混和した後、3,000rpm で 5 分間遠心分離した。次に水層を分取し、当量のジエチルエーテルを加え、白色になった水層が透明になるまでやや強めに振とうした後 3,000rpm で数秒間遠心分離し、エーテルを通風除去した。

そして 10 分の 1 量の 3M 酢酸ナトリウム溶液(酢酸で pH5.2 に調整)を加え、冷却した 100%エタノールを 2 倍量混合し DNA を沈殿させた。その DNA は 70%エタノールで洗浄し室温で乾燥させた後、2ml の TE buffer に溶解して 4°C で保存した。

2-B-2) リンパ節からの DNA 精製

リンパ節約 0.5g をテフロン・ペッスルとステンレスメッシュを用いて、生理食塩水/EDTA 中ですり潰しガーゼで濾過した後、3,000rpm で 10 分間遠心分離した。その後上清を除去して 20ml の生理食塩水/EDTA を加えよく混和し、再び 3,000rpm で 10 分間遠心分離した。そして上清を除き約 1ml の生理食塩水/EDTA によく混和し、20ml のザルコシル溶液を加えて DNA を溶出させた。その後の操作は肝臓組織からの DNA の精製と同様に行った。

2-B-3) 全血からの DNA 精製

ウシゲノム DNA は血液より抽出し、精製した。方法は第 2 章の 2-B) に従った。

2-B-4) 筋肉組織からの DNA 精製

組織約 0.1g をホモジナイザーでホモジナイズし、TNE 溶液 5ml、Proteinase K 溶液 (10mg/ml) 200 μ l を加えた後、DNA を切断しないようにゆっくりと振とうして 37°C で一晩インキュベートした。当量のフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコールを加え、3,000rpm で 10 分間遠心分離し水層を分取した。その際、タンパクなどの不純物が多く残っていると思われたものは再度フェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコールによりタンパク等をさらに除去した。次に水層を分取し、当量のジエチルエーテルを加え、白色になった水層が透明になるまでやや強めに振とうした後 3,000rpm で数秒間遠心分離し、エーテルを通風除去した。そして 100%エタノールを 2 倍量混合し DNA を沈殿させた。その DNA は 70%エタノールで洗浄し室温で乾燥させた後、2ml の TE buffer に溶解して 4°C で保存した。

2-C) DNA の定量

DNA の定量は 260nm の吸光測定で行った。O.D.260=1.00 は 2 本鎖の DNA が 50 μ g/ml の濃度に相当する。同時に 280nm の吸光度も測定した。O.D.260:O.D.280 比が 1.8 ± 0.1 であれば、タンパク質、界面活性剤、フェノールなどの不純物が混入していない純粋な DNA が回収されたとみなした。

2-D) 遺伝子型決定

2-D-1) PCR による遺伝子領域の増幅

プライマーセット：Forward プライマー：5'-TGC GTG CAC AGC AGC TCA ACC-3' と Reverse プライマー：5'-GGC AAA CAG TGC GGG GTT GGA-3' (Aggrey ら、1999) を用いて GHR 遺伝子領域を増幅した。精製したゲ

ノム DNA は超純水で 10ng/μl に調整し鋳型とした。この鋳型 DNA 2μl に、超純水 12.3μl、Forward と Reverse のプライマー (10pmol/μl) 各 1μl、10×PCR buffer (100mM Tris-HCl, 15mM MgCl₂, 500mM KCl, pH8.6) 2μl、dNTP Mixture (2.5mM each) 1.6μl、EX-Taq polymerase 5units/μl) 0.1μl を加えた溶液で PCR 反応を行った。以上の作業は氷上で行った。PCR 反応は GeneAmp9700 (Applied Biosystems) を使い、94°C・2 分間で熱変性後 94°C・30 秒間、55°C・30 秒間、72°C・90 秒間を 35 サイクル行い、最後に 72°C・4 分間の伸長反応を行った。

2-D-2) アガロース・ゲル電気泳動

実験には、75×108mm 及び 75×49mm の 1.2% アガロース・ゲル (ゲル厚は 4mm) を用いた。アガロース・ゲルは Agarose S (NIPPON GENE, Japan) を使い、TE バッファー (40mM Tris-acetate pH7.7, 1mM EDTA) 中で、電子レンジを用いて完全溶解した後、0.5mg/ml の ethidium bromide を加えた (目安: 20ml アガロース溶液に 5μl 該試薬)。水平な面でアガロース・ゲルを完全に固めた。PCR 産物 15μl には 40%グリセロール 5μl を加えて全量 20μl ずつアプライし、断片の大きさの指標としては 100bp DNA ladder を用いた。泳動後、紫外線照射してバンドを確認した。

2-E) 分析

各ウシ集団において GHR LINE-1 の遺伝子型分布及びアリル頻度を算出した。GHR 遺伝子の LINE-1 因子の有無により、3 つの遺伝子型:LL、LS、SS (L: long type、S: short type) が存在している。本研究に供した 10 ウシ集団において、この 3 つタイプの遺伝子型の分布及び L、S アリルの頻度の計算を行った。次に、遺伝子型判定から求めたアリル頻度に対し、Arelquin Version 3.1 (Excoffier ら、2005) ソフトウェアプログラムを用い、各ウシ集団においての Hardy-Weinberg 法則の検定を行った。

第3節 結果

3-A) 遺伝子型の分布及び頻度の算出

GHR 遺伝子では LINE-1 因子の挿入欠失の有無により、3 つの遺伝子型:LL、LS、SS (L type 約 2.0kb、S type 約 0.7kb) が存在する (図 3-1)。PCR 法によるそのタイピング結果の例を図 3-2 に示した。このタイピング結果にしたがい、*Bos taurus* と *Bos indicus* を含む 10 のウシ集団において、L アリル及び S アリルの頻度を算出した (表 3-1)。

Bos taurus 集団のホルスタイン、アングス、ヘレフォード、黒毛和種、韓牛及びモンゴル在来牛において、L アリルの頻度は 0.991 (ヘレフォード) ~0.417 (韓牛) であった。ヨーロッパ集団であるホルスタイン、アングス、ヘレフォードの L アリル頻度が 0.917~0.991 と非常に高い頻度を示した。一方、*Bos indicus* であるベトナム、カンボジア、ミャンマー、ラオス在来牛では、2%以下の非常に低いアリル L 頻度を示した。また、北東アジアの日本、韓国とモンゴルでの *Bos taurus* 集団では、3 集団共に中程度の頻度を示した (0.417~0.522)。韓牛においての 2 つ集団 (韓牛 A と韓牛 B) は共に低いヘテロ遺伝子型頻度を示した。

3-B) Hardy-Weinberg 法則の検定

表 3-2 は 10 のウシ集団における、GHR LINE-1 遺伝子のヘテロ接合度の実測値と推定値の結果である。ベトナムとカンボジア在来牛集団は L アリルが観察されなかったため、これら集団に対し、Hardy-Weinberg 法則の検定から排除した。表 3-2 で示されているように、北東アジアの黒毛和種、韓牛、モンゴル在来牛集団のヘテロ接合度推定値は 0.468~0.505 と高い値を示したが、他の集団は 0.018~0.155 と低い値を示した。ヘテロ接合度実測値と推定値間の有意差検定を行った結果、ホルスタイン、ヘレフォード、黒毛和種、ラオスとミャンマー在来牛集団においては、Hardy-Weinberg 法則にしたがっており不平衡が認められなかった ($P>0.05$)。一方、アングス、韓牛、モンゴル在来牛においては

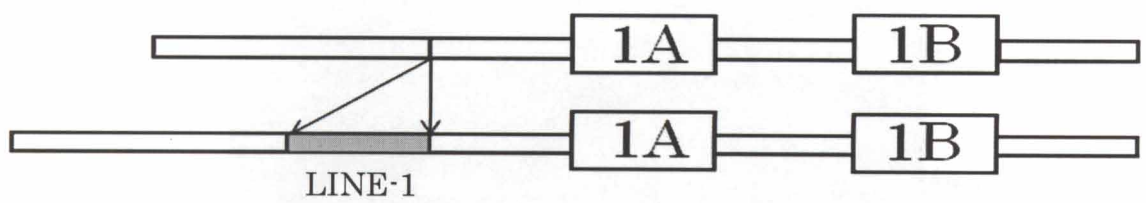


図 3-1 GHR 遺伝子の LINE-1 因子の挿入。ウシの GHR 遺伝子は 20 番染色体に位置し、約 1.2kbp の LINE-1 因子がこの遺伝子の exon1A の上流に存在している。

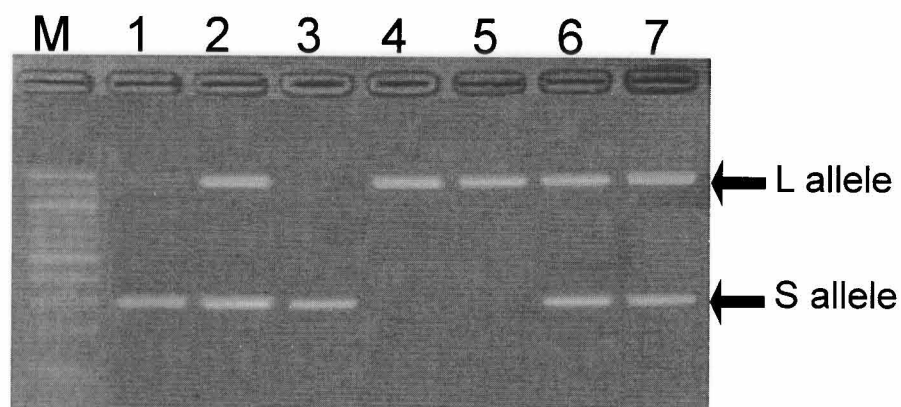


図 3・2 GHR 遺伝子の遺伝子型判定における電気泳動図。LINE-1 因子の有無による泳動パターンの違いを示し、レーン 4,5 は LL 遺伝子型、レーン 1,3 は SS 遺伝子型、レーン 2,6 と 7 は LS 遺伝子型である。電気泳動は 1.2% のアガロースで 100V 30 分間を行った。左端 M は 100bp DNA ladder である。

表 3-1 GHR LINE-1 の遺伝子型分布及びアリル頻度

集団	個体数	遺伝子型			アリル頻度	
		LL	LS	SS	L	S
ホルスタイン	30	29	1	0	0.983	0.017
アングス	30	27	1	2	0.917	0.083
ヘレフォード	55	54	1	0	0.991	0.009
黒毛和種	60	15	27	18	0.475	0.525
韓牛	115	43	10	62	0.417	0.583
韓牛A	55	22	8	25	0.473	0.527
韓牛B	60	21	2	37	0.367	0.663
モンゴル在来牛	47	18	13	16	0.522	0.478
ベトナム在来牛	30	0	0	30	0.000	1.000
カンボジア在来牛	30	0	0	30	0.000	1.000
ミャンマー在来牛	30	0	1	29	0.017	0.983
ラオス在来牛	30	0	1	29	0.017	0.983

表3-2 Hardy-Weinberg法則の検定

集団	個体数	Obs. Het ¹	Exp. Het ²	P-value	s.d. ³
ホルスタイン	30	0.03333	0.03333	1.00000	0.00000
アンガス	30	0.03333	0.15537	0.00436	0.00007
ヘレフォード	55	0.01818	0.01818	1.00000	0.00000
黒毛和種	60	0.45000	0.50294	0.44697	0.00049
韓牛	115				
韓牛A	55	0.14545	0.50309	0.00000	0.00000
韓牛B	60	0.03333	0.46835	0.00000	0.00000
モンゴル在来牛	47	0.27660	0.50446	0.00270	0.00005
ミャンマー在来牛	30	0.03333	0.03333	1.00000	0.00000
ラオス在来牛	30	0.03333	0.03333	1.00000	0.00000

¹ヘテロ接合度実測値、²ヘテロ接合度推定値、³P 値の標準偏差。

ヘテロ接合度の実測値と推定値に大きな隔たりがみられ、不平衡が認められた ($P<0.01$)。特に不平衡は韓牛で顕著であった ($P<0.001$)。

第4節 考察

ウシの GHR 遺伝子では、5'非翻訳領域に約 1.2Kbp の LINE-1 配列が存在していることがわかっている。これまでの研究から、ヨーロッパ品種ではその LINE 挿入型の頻度がきわめて高く、インド系牛では欠失型の頻度が極めて高いという報告がされている (Lucy ら、1998)。また、黒毛和種ではこの両方の型が混在していると報告されている (Ohkubo ら、2006)。一方、それらの研究では、アンガスが 100 頭程度分析されたが、その他ヨーロッパ品種は 2 品種数頭程度、インド系牛でも 2 品種合計 4 頭程度とそれらの遺伝子頻度は十分には分析されていなかった。このように、品種及び地域などが限定され、さらにサンプル数があまり多くないため、その詳細については不明であった。

このような挿入欠失は非同祖的にはきわめて生じにくく、またインド系牛では特異的な遺伝子頻度を示していることが考えられ、*Bos taurus* と *Bos indicus* の両亜種間等の遺伝的類縁関係を調査するために適した DNA マーカーといえる。そこで、本研究ではウシ GHR 遺伝子の LINE-1 配列に対する遺伝的多様性及び起源を調べるために、ヨーロッパ及び東アジア在来牛合計 10 集団における遺伝子頻度を調査した。タイピング結果により、*Bos taurus* 品種であるホルスタイン、アンガス及びヘレフォードでは LINE-1 挿入型 (L アリル) の対立遺伝子頻度はきわめて高く、一方 *Bos indicus* 品種に属すると考えられるベトナム、カンボジア、ラオス在来牛ではほとんど欠失型 (S アリル) であった。この結果は以前の研究と一致した (Lucy ら、1998)。また、北東アジアの黒毛和種、韓牛、モンゴル在来牛では 3 集団共に両対立遺伝子は中程度の頻度を示した。

Ohkubo ら (2006) は黒毛和種に対して L アリルと S アリルの頻度を調査したところ、この両型が混在していることを明らかにした。黒毛和種は純粋種として管理される前、一時期に日本在来牛は数種のヨーロッパ牛との交雑が行われた経緯がある。彼らによれば、日本在来牛の祖先集団は LINE-1 因子を持たず、L アリルは交雑が行われた時期にヨーロッパ牛から導入されたことを推測して

いる。しかし本研究においては、同程度の L アリル頻度が北東アジアの日本、モンゴル及び韓国牛集団において観察されている（表 3-1）。したがって、北東アジア牛の L アリルは近代ヨーロッパ牛から導入されたのではなく、東アジアにおける祖先のウシは古代より既に L アリルを有していたと考えられる。

LINE-1 因子は哺乳類トランスポゾンのうち最も豊富であり、このタイプのトランスポゾンは哺乳類において最近発生したトランスポゾン因子である（Han & Boeke, 2005）。レトロポゾンの性質から、LINE-1 因子は異なる分化系統のオーソログな箇所での挿入や欠失は滅多に起こらないと考えられている（Shimamura ら、1997；Han & Boeke, 2005）。このような特徴から、ウシの GHR 遺伝子内の LINE-1 因子はヨーロッパ牛とアジア牛において同起源であると考えられる。

Bos indicus 集団では、LINE-1 因子挿入型の対立遺伝子がきわめて低い頻度ながらも観察された。この理由としては、東南アジア在来牛集団に対する L アリルの近年の遺伝子流入が考えら得る。東南アジアでは、近代になって牛乳の利用が一般的になるにしたがい、牛乳の需要が高まりつつある。そのために、在来品種の育種改良を目的としたヨーロッパ牛の導入および交配が試みられている。したがって、*Bos indicus* 集団における LINE-1 因子の L アリルの存在は、これら近代に導入されたヨーロッパ品種に由来している可能性が考えられる。したがって、本来 *Bos indicus* 祖先集団においては LINE-1 因子を有する GHR L アリルは存在しなかったものと考えられる。

Bos indicus ウシでは L アリルが存在していなかったと仮定すると、この LINE-1 因子の挿入は *Bos taurus* ウシと *Bos indicus* ウシの分岐以降であると推測できる。ヨーロッパとアジア *Bos taurus* ウシでの頻度の違いから、LINE-1 因子の挿入は家畜化前後の *Bos taurus* 祖先集団において発生した可能性が高い。ヨーロッパ品種集団で観察された L アリルの高頻度は、伝播前の集団頻度の影響やその後の選抜などによる遺伝的浮動の結果が考えられる。また、北東アジア集団での LS 型の混在は、両型が混在している祖先集団に由来するか、後の伝播の影響による可能性も考えられる。一方、アジア集団の L 型の頻度が著しく

高いこと、またアジア集団間で同程度の頻度を示していることから、少なくとも、近代における欧米品種の影響は小さいと考えられる。さらに、ミトコンドリア DNA 研究により、ヨーロッパ牛では特異的なミトコンドリア系統が存在することが明らかになっており、またアジア牛では遺伝的多様性が高く、ヨーロッパ牛のミトコンドリア系統を含む多様なミトコンドリア系統が観察されている (Mannen ら、1998, 2004 ; Troy ら、2001)。これらの結果から、GHR 遺伝子での LINE-1 因子の挿入時期は近代より以前であることが支持された。

Hardy - Weinberg 検定の結果より、アンガス、韓牛、モンゴル在来牛においてはヘテロ接合度の実測値と推定値に大きな隔たりがみられ、不平衡が認められた ($P < 0.01$) (表 3-1)。特に韓牛にはヘテロ LS 遺伝子型の頻度が非常に低い値で観察され、Hardy - Weinberg 平衡から高度に逸脱している ($P < 0.001$)。韓牛に対して最初に 55 個体 (韓牛 A) を分析したところ、非常に低い LS 遺伝子型頻度が観察された ($LL:LS:SS=22:8:25$)。次に、異なる 60 個体韓牛 (韓牛 B) を解析したところ、同様の結果が観察された ($LL:LS:SS=21:2:37$)。その原因は不明であるが、実験に供した韓牛はいくつかの遠く離れた地域に由来したため、サンプルの偏りが原因である可能性が考えられる。モンゴル在来牛は数個の遠く離れた地域からサンプリングしたため、その Hardy-Weinberg 不平衡は韓牛のようにサンプルの偏りが原因であると考えられる。また、アンガス集団においては、その不平衡は近交或いは人工授精より生じた遺伝的多様性減少の結果であると考えられる。

Di Stasio ら (2005) は GHR 遺伝子のエクソン 10 にある多型と牛肉品質との関連を報告した。また、GHR プロモーターにある TG マイクロサテライト多型がウシの成長に影響するとの報告もなされている (Hale ら、2000 ; Curi ら、2005)。上述したように、LINE-1 因子は経済形質との関連という報告がされていないが、これまで GHR 遺伝子はウシの経済形質との関連が示唆されているため、LINE-1 多型に対して更なる研究は、とくに多型が認められるアジア集団においては、興味深いマーカーであると考えられる。

以上のように、本研究ではユーラシアのウシ集団における GHR LINE-1 因

子の遺伝的多様性と遺伝的起源の推定を行った。本研究の結果より、欧米 *Bos taurus* ウシとインド系牛では、それぞれの遺伝子型にほぼ固定し、アジア *Bos taurus* ウシでは L と S 型が混在し、その頻度は類似していた。さらに、アジア在来牛の LINE-1 配列の挿入が近代における遺伝的流入による結果ではないことを推測し、GHR LINE-1 配列の挿入は、北方系牛の祖先集団において発生したことを示唆した。

第 4 章 SNP マーカーを用いたウシの遺伝的多様性と遺伝的構造の解析

第 1 節 緒言

この 20 年の間、分子マーカーの利用は、家畜動物の遺伝的多様性及び遺伝構造の解析に重要な役割を担っている。ウシに関しては、様々な集団構造及び多様性の研究により、ウシの起源と進化への洞察がなされてきた。これまで、これらの研究は主にマイクロサテライトマーカーが利用されてきた (Goudarzi ら、1997 ; MacHugh ら、1998 ; Mukesh ら、2004)。マイクロサテライトマーカーは、1 つ遺伝子座に多数のアリルが存在し、大量の遺伝情報を有するため、最も広く利用されているマーカーである (Vignal ら、2002)。一方、特に多型性が高い代表的なマイクロサテライトマーカーが選抜・使用されているため、遺伝的多様性の解析やゲノムワイド相関解析には誤差がもたらされる可能性がある (Vali ら、2008)。

近年、一塩基多型 (SNP) が代替マーカーとして注目を浴びている。SNP マーカーはマイクロサテライトマーカーより遺伝情報量が少ないが、多くの SNP マーカーを利用することにより同程度の分析が行えることが報告されている。Mckay ら (2008) はウシ常染色体上の 2,641 個 SNP マーカーを用い、数集団のウシの系統関係と集団構造を解析した。Seldin ら (2006) はウシゲノム上の 5,700 SNP マーカーを利用し、様々な欧米ウシ集団の遺伝的構造の推定を行った。一方、適当な少数の SNP マーカーを利用することにより大規模な調査に対して実験コストの軽減が期待される。

これまでウシに対する遺伝的解析は、世界に広く分布しているヨーロッパ牛品種に対して主になされてきた。アジア在来牛に対しての遺伝的研究は、ミトコンドリア DNA、Y 染色体及びマイクロサテライトマーカーをもとに行われてきた (Mannen ら、2004 ; Mukesh ら、2004 ; Sodhi ら、2008)。アジア在来牛

は将来の品種改良や遺伝的多様性保持において重要な遺伝資源である。したがって、SNPs のような包括的なマーカーの分子情報は、アジア在来牛の遺伝的構造及び多様性の理解に寄与できると考えられる。

そこで本研究では、ウシ常染色体上の SNPs 探索を染色体ごとにランダム行い SNPs システムの開発を行った。さらに、このシステムを用い、アジア在来牛及びヨーロッパ牛を含む 9 ウシ集団においての集団構造と系統関係の推定を行った。

第 2 節 材料及び方法

2-A) 供試動物

肉用牛である黒毛和種、アングス種、ヘレフォード種と乳用牛であるホルスタイン種、また韓牛、モンゴル在来牛、さらにカンボジア、ラオスおよびミャンマーの在来牛各 30 個体を実験に供した。黒毛和種は 2002 年に開催された第 8 回全国和牛能力共進会出品牛のうち、同一県、同一種雄牛に偏らないように選んだ肝臓サンプル 30 頭分を用いた。ホルスタイン種は、岐阜県境川市の屠場より譲り受けた肝臓組織サンプル 30 頭分を用いた。アングス種およびヘレフォード種はオーストラリアクイーンズランド大学の Hong Duong 博士より譲り受けたゲノム DNA を用いた。韓牛は嶺南大学の呂博士よりゲノム DNA サンプルを譲り受けた 30 頭分を用いた。モンゴル在来牛はモンゴル北東部のドルノド県スンベル地方より 30 個体サンプルを得た。これは東京農業大学の天野 卓博士によって血液採取が行われ、サンプルを譲り受けたものである。カンボジア、ラオスおよびミャンマーの在来牛は現地より各 30 個体のサンプルを得た。これらの供試動物は血縁情報から血縁関係が認められないことを確認している。

2-B) ゲノム DNA の精製

ウシゲノム DNA は肝臓組織、リンパ節、血液および筋肉組織より抽出し、精製した。方法は第 2 章の 2-B) に従った。

2-C) DNA の定量

DNA の定量は 260nm の吸光測定で行った。方法は第 2 章の 2-C) に従った。

2-D) 遺伝子型決定

2-D-1) SNP マーカーの選抜

58 SNP マーカーは Mckay ら (2008) より決定された 2,641 SNP マーカー及び Illumina BovineSNP50 BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA) から選んだ。各常染色体よりランダムかつマーカー間隔は 30Mbp 以上である 2 個の SNP マーカーを選抜した。

2-D-2) PCR による遺伝子領域の増幅

プライマーセット (表 4-1) を用いて各 SNP マーカーを増幅した。精製したゲノム DNA は超純水で 10ng/ μ l に調整し鋳型とした。この鋳型 DNA 2 μ l に、超純水 12.3 μ l、Forward と Reverse のプライマー (10pmol/ μ l) 各 1 μ l、10 $\times$ PCR buffer (100mM Tris-HCl, 15mM MgCl₂, 500mM KCl, pH8.6) 2 μ l、dNTP Mixture (2.5mM each) 1.6 μ l、EX-Taq polymerase 5units/ μ l) 0.1 μ l を加えた溶液で PCR 反応を行った。以上の作業は氷上で行った。PCR 反応は GeneAmp9700 (Applied Biosystems) を使い、94°C・2 分間で熱変性後 94°C・30 秒間、60°C または 65°C・30 秒間、72°C・90 秒間を 35 サイクル行い、最後に 72°C・4 分間の伸長反応を行った。

2-D-3) 制限酵素による切断

PCR 産物 5.0 μ l、10 $\times$ 制限酵素 Buffer 1.5 μ l、制限酵素 (表 4-1) 0.25 μ l、滅菌超純水 8.25 μ l を加えて全量 15.0 μ l で行った。どの制限酵素もウォーターバスを用い、37°C または 65°C で 8 時間以上インキュベートした。

2-D-4) アガロース電気泳動

どのマーカーもアガロース電気泳動を行った。方法は第 2 章の 2-D-2) に従った。

2-E) 分析

2-E-1) 統計的計算及び遺伝的多様性の分析

遺伝子型分布およびアレル頻度を計算した。Microsatellites Tools for Excel (Park, 2001) により遺伝的多様性 (ヘテロ接合度の期待値を指標に) の計算を行った。*Bos taurus* と *Bos indicus* グループ間の遺伝的多様性の有意差検定に

表 4-1 SNP マーカー情報及び PCR 条件

Marker	BTA	Forward primer 5'-3' Reverse primer 5'-3'	T _A ¹ (°C)	Variation	RE
rs29016906	1	TGGAAACAGACACACAATCATCA GTTCTTTAGGAGTGAGCCAACTG	60	T/C	<i>RsaI</i>
rs29019581	1	AATGGACGGTTTGGAAGTAGACA CACTTTGAGAAATTGCTGGCATG	60	A/G	<i>TaqI</i>
AAFC02105141	2	GAGGGCACTCTTCTTCCAGTCA AAAATCCCACCCTCAAAAGCATC	60	C/T	<i>RsaI</i>
SCAFFOLD296064_2119	2	CAAAAGTGCTGGCTAGGGAATCA TTGAACCCGCACCTCCTGTGTCT	60	C/T	<i>RsaI</i>
SCAFFOLD120581_8167	3	TTAACGTCTCATAGAATGCATAA ATAGTAGAGGAAGGGGGAAGGAT	60	T/A	<i>RsaI</i>
NW_931151	3	GGTTAGTGTTTGCTGTGAGGGAT CGGGGGAGAGGATAATTTGAGTT	60	CT	<i>RsaI</i>
rs29011127	4	TTGCACACAGATATGGGGAAGGA ACAGCTCTTCGGGGAGACAGTTC	60	C/T	<i>RsaI</i>
ARS-BFGL-NGS-20771	4	GAGGGACAAGTGGGTTCGATACA GAGTGGGGTTCTGCTGGCTTTA	60	C/T	<i>MspI</i>
NW_931537	5	GCTGGCTCTGAATAGGTGTCTTTG TCTGAGGAAGGAGAAGAAGAGGTC	60	C/G	<i>TaqI</i>
rs29021807	5	CTATTGAGGACTTCGGGCAGGAT GGCTAGGTGGGTACATGATCAGA	60	C/A	<i>HhaI</i>
rs29011393	6	ATCACACTCCTGGCAACAAGAATGA TGTGGAAGATAAGAGTACAAACACC	60	G/A	<i>TaqI</i>
ARS-BFGL-NGS-100394	6	CGCTTACCTGCTTGGGGAGTCA GCTGGTGACGCTCTGCCTCTTA	60	A/G	<i>HhaI</i>
SCAFFOLD300151_9022	7	GCAAGTGTGTATTTCAGTCTGAGTCA ATCCATAACCGCAGGCAATATAGCA	60	T/C	<i>TaqI</i>
ARS-BFGL-NGS-100448	7	GGCTTCAGTGGTTGTGGTGTAT GATGGACATGCCTGAAGAGACT	60	T/C	<i>MspI</i>

rs29015318	8	GCAGAGAAATTCCAGTTGGCAGTAT	60	T/C	<i>RsaI</i>
ARS-BFGL-NGS-100986	8	TTTCACCATACTCGCCATCCAATCT TACACCCTCCCCTATCACTACA	60	A/C	<i>MspI</i>
rs29013606	9	CTAGACCTTTGCCCCACAGATGA CAGTGCCTTTGTACTTACACCTACT	60	C/A	<i>TaqI</i>
rs29026780	9	GTA CTGCGCCAAAGGATGTGTATAT ACTGTCTGTCCCATGTGACTTTA	60	G/T	<i>MspI</i>
rs29023741	10	GCTAACTGAAAGTGGGCTAATCA CAGTATCCTGCTTCCTTTGATGTAG	60	T/C	<i>RsaI</i>
ARS-BFGL-NGS-20486	10	ATCCTGACACACTGACTCCAGATAA TCTTTGGATGGACCTGAATGACTGG	60	A/G	<i>MspI</i>
rs29018818	11	TGTTCCCCCTCCCCCACTGCAA CTGGGGACAGGATCTGGGCTAA	60	A/G	<i>TaqI</i>
rs29017375	11	CTGGCTTGGAATCCTGGTCTCA CCTGCTGACCTAAACTTCTGACA	60	C/G	<i>MspI</i>
rs29013665	12	TTTAGTCACTCCCACCTCCAGTT AGAAGCCAGCACCTCAGCCAA	60	C/T	<i>RsaI</i>
ARS-BFGL-NGS-5229	12	CCTACCTGCCTTCTCTTCCACA AATAATGGGCAGGGGTCAGAGT	60	G/A	<i>MspI</i>
rs29026914	13	ACTACTCTTACCCTGCCCTCTA GCACCCACACACCATGAGCAGA	60	C/T	<i>RsaI</i>
rs29019327	13	TGCTGAAGTCAAACCGGGGTCA GTCCTCTCAGCAAACCTCCCAGAT	60	A/G	<i>HhaI</i>
SCAFFOLD140142_1793	14	AATGCGGGTCGTGAGGATGTGAT CAGGACTCTCTTCTTCTTGCCA	60	T/C	<i>TaiI</i>
4		TACAGCCCATTCTCACCAGACT			
rs29023700	14	CCTCAGTGACCCATTGAGAGCTA TGTGAAACCCAGTTGGCCCATCT	60	A/G	<i>HhaI</i>
SCAFFOLD150141_9327	15	CCATCTCAGCCCCAGTACTATG ACCATGCACACGGGCTTACCAA	60	C/T	<i>TaqI</i>
rs29012705	15	CCAAGCTCCATCCCCTAGAAGTA GGGTACTAGAGAAAGAGGCGGAA	60	A/C	<i>MspI</i>

AAFC02081606	16	CTTGGCCTGTCTGAGTCGTCTT	60	A/G	<i>RsaI</i>
ARS-BFGL-NGS-13451	16	AGTCACACTCTCTGCTCCTCTC	60	A/G	<i>HhaI</i>
SCAFFOLD136321_685	17	GGGTCCTCCATTGTCCTTCTGAA	60	A/G	<i>HhaI</i>
SCAFFOLD261036_2309	17	TCCCTGCCTGCTGTTATCTCTT	60	A/G	<i>HhaI</i>
SCAFFOLD251179_6898	18	GGAGGGAGGCGGATTTCTAATG	60	A/G	<i>MspI</i>
ARS-BFGL-NGS-85483	18	GAGCCAGCGGGTGAAGAATTAG	60	A/G	<i>MspI</i>
rs29025978	19	GTCTAGTTTTCTGAATGCCGCTT	60	A/G	<i>TaqI</i>
SCAFFOLD226442_2944	19	TAAAAGAACAGGCGTGGAGAACA	60	A/G	<i>TaqI</i>
rs29012338	20	ACACAAACCCACCCACAGGAA	60	G/A	<i>MspI</i>
ARS-BFGL-BAC-33065	20	GATCTGGGCAATCAACCTCCT	60	A/G	<i>TaqI</i>
rs29016768	21	GACCTGGGAACCGCTGCAACTA	60	A/G	<i>MspI</i>
ARS-BFGL-NGS-101514	21	GAGCCGACCCAGTGAGAATGA	60	G/T	<i>TaqI</i>
rs29014026	22	CATGTCCTGGTTTGCGCTCTGA	60	G/A	<i>HhaI</i>
rs29020896	22	TGAAAGAGCTGAGCACGGGAGA	60	G/C	<i>Eco72I</i>
AAFC02073768	23	TGGCAGGCGAAACTAAGACAGTA	60	C/T	<i>HhaI</i>
Hapmap24587-BTA-25254	23	GCCTGAACCAAGCTGCATTAGTA	60	T/C	<i>RsaI</i>
		AGAGGGAGGGGGGCATATATACA	60	T/G	<i>TaqI</i>
		GTTGCCAAACTTTGCCTCTGTC	60	C/T	<i>TaqI</i>
		TTGATGGAGGGGTGGTGAGAAT	60	C/T	<i>TaqI</i>
		TTCCCTGGCAGTCTAGTGGTTA	60	C/T	<i>TaqI</i>
		TCCCCATCTATTTGCCCTGAAGT	60	C/T	<i>TaqI</i>
		AACTTTCCCTGCTCCACACTCTA	60	C/T	<i>TaqI</i>
		GTGATGGGGTCCTGACGCCTTT	60	C/T	<i>TaqI</i>
		AGGGACAGGCAGGGGAGACTAA	60	C/T	<i>TaqI</i>
		TTCCACCTCACACAAGTGCAGAG	60	C/T	<i>TaqI</i>
		TTGGGTCACATGGCCGTGTCTAA	60	C/T	<i>TaqI</i>
		CTGCCCTCAATCTCAACCATCAT	60	C/T	<i>TaqI</i>
		GGACAACAGAGGATGAGATGGTT	60	C/T	<i>TaqI</i>
		GGATGACTTCACCACCATGACTT	60	C/T	<i>TaqI</i>
		CAAGGCTCCTCTGGTGATTCTTA	60	C/T	<i>TaqI</i>
		GCTGCCACAACCGGAAAACATAT	60	C/T	<i>TaqI</i>
		CTCCGTTTACCCCTTCCATGAT	60	C/T	<i>TaqI</i>

AF265221	24	CATTGACTCGGTGATCTGTAGCT	60	C/G	<i>TaiI</i>
ARS-BFGL-BAC-41574	24	CAAGACTGGGCACTGTTTCACAT	60	C/T	<i>TaqI</i>
ARS-BFGL-BAC-65447	25	CTATCTCCCTGTCCACCCATCA	65	A/G	<i>MspI</i>
ARS-BFGL-BAC-29419	25	CCAGGTAACAGCAGAAGCAAGT	60	A/G	<i>MspI</i>
AAFC02015915	26	GGAAGTAGGCCAGCAGAGAACA	60	C/G	<i>MspI</i>
ARS-BFGL-NGS-10954	26	GGTCCAACTCTCCCATCTGTAC	60	C/T	<i>MspI</i>
rs29013388	27	CCAATTCCTCTCCAGCCTTCT	60	A/G	<i>MspI</i>
rs29012090	27	CCACCCTCTGATCCTTAGCCAT	60	A/G	<i>MspI</i>
ARS-BFGL-NGS-103673	28	CGGTGCCATTGCCTACTGTTGAA	60	C/T	<i>MspI</i>
ARS-BFGL-NGS-107787	28	GAGGTGAATGAGGCTCCAGGAAA	65	A/G	<i>MspI</i>
AAFC02172006	29	AGAGGGAGGCTGTGGGAGGAAT	60	C/A	<i>DraI</i>
ARS-BFGL-NGS-106983	29	CAAGCAATGCCAGACGCCTCAA	60	A/G	<i>MspI</i>
		CTGGAAGTCTCTTGCTTTTTCTATG	60	A/G	<i>MspI</i>
		TGAATGGATGGAGAAGAGCAAAGTT	60	C/T	<i>MspI</i>
		CCAAATTCACGCCACTGAGTCAA	60	A/G	<i>MspI</i>
		CTCAAGTTCAGATCCGAGCTTCA	60	A/G	<i>MspI</i>
		GGGGTCGCTAGGAGTTGGATAT	60	A/G	<i>MspI</i>
		TGCCTGTCTCATCCCCCTCTTA	60	A/G	<i>MspI</i>
		CTCGTGTTTGTCTGCCTTATCT	60	A/G	<i>MspI</i>
		GAGAAGAACACCATATCCCAGA	60	A/G	<i>MspI</i>
		CTAGACCATCCGAGGAAGACATT	60	A/G	<i>MspI</i>
		AGTGTCCCTGGACCAATGTGTTT	60	A/G	<i>MspI</i>
		CTACAGTCCAAGGGGTCGTGAA	60	A/G	<i>MspI</i>
		TCACTCTACCCCCTCACCTTCA	60	A/G	<i>MspI</i>

¹ アニール温度

は FSTAT v2.9.3 (Goudet、2001) を用いた。

2-E-2) 集団間系統関係の推定

ARLEQUIN (Excoffier ら、2005) を用い、集団分化及び Hardy-Weinberg 法則の検定を行った。ウシ集団間の系統関係推定のため、アリル頻度をもとに Nei (1972) 遺伝距離を計算し、さらに PHYLIP 3.6 (Felsenstein、1989) ソフトウェアを用い、得た遺伝距離をもとに平均距離法 (UPGMA, Sneath & Sokal、1973) と近隣結合法 (Neighbor-joining method, Saitou & Nei、1987) にて 2 種類の系統樹を構築した。集団間の系統関係の信頼度を推定するため、PHYLIP 3.6 ソフトウェアに含んである SEQBOOT, GENDIST, NEIGHBOR, CONSENSE と RETREE を用い、系統樹の統計的検定にブートストラップの反復回数は 1000 回とし、解析を行った。MVSP 3.1 (Kovach、2005) ソフトウェアにより主成分分析を行い、各集団のアリル頻度を基づいた主成分を計算した。

2-E-3) 集団構造解析

STRUCTURE 2.2 (Pritchard ら、2000) を用い、集団構造及び集団間混合程度を推定した。STRUCTURE はマルチ遺伝子座の遺伝子型をもとに、祖先集団の数と各個体の混合割合の推定を行う。代表的な祖先集団数を得るため、9 ウシ集団にて 9 回の独立な計算を行った。ソフトウェアの設定は Falush ら (2007) が提案した 20,000 burn-in 及び 100,000 MARKOV CHAIN MONTE CARLO に従って行った。

第3節 結果

3-A) SNP マーカーシステムの開発

SNP マーカーは McKay ら (2008) より報告された 2,641 SNP マーカーおよび 54,001 SNP を含む Illumina BovineSNP50 BeadChip から選抜した。それぞれの SNP マーカーは、各常染色体よりランダムかつ 2 つのマーカー間隔が 30Mbp 以上である SNP マーカーを選抜した。PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism、制限酵素断片長多型) 法によるタイピングを行うため、マーカー選抜には、制限酵素認識部位のある突然変異を選び、この制限酵素部位を挟むように両端でプライマーを作成した。最終的に、58 SNP マーカーを開発し、それらの詳細を表 4-1 にまとめた。表 4-1 は左の列から、選抜したマーカーの名称 (2,641 SNP マーカーや Illumina BovineSNP50 BeadChip における名称)、これらマーカーが存在する染色体番号、プライマーセットの塩基配列、PCR におけるアニーリング温度、変異多型の塩基配列、PCR-RFLP に使用した制限酵素を示している。

3-B) 統計分析および遺伝的多様性

開発した 58 SNP マーカーからなる SNP システムを用い、9 ウシ集団においてのアリル頻度を計算した。この SNP マイナーアリル頻度 (MAFs) を表 4-2 に示す。各集団における $MAFs \leq 0.1$ の SNP マーカーの割合は、0.121 (黒毛和種) ~0.621 (ラオス在来牛) の範囲であった。*Bos indicus* のラオス、ミャンマーとカンボジア在来牛においては、半分以上の SNP マーカーが $MAFs \leq 0.1$ を示した。しかし、それ以外の *Bos taurus* の 6 集団においては、 $MAFs > 0.2$ を示す SNP マーカーが高い割合を示した (> 0.5)。

表 4-3 は各ウシ集団のヘテロ接合度の実測値と期待値を示す。*Bos taurus* 集団においては、ヘテロ接合度の実測値は 0.310 (アンガス) ~0.362 (韓牛) の範囲であったが、*Bos indicus* 集団においては相対的に低い値 0.185 (ミャンマー在

表 4-2 各集団のマイナアルル頻度分布

Population	HER	ANG	JH	MON	KOR	JB	LAO	MYA	CAM
MAF $\leq$ 0.1	0.172	0.207	0.121	0.155	0.172	0.190	0.621	0.603	0.517
0.1<MAF $\leq$ 0.2	0.241	0.172	0.155	0.138	0.103	0.224	0.103	0.103	0.207
0.2<MAF $\leq$ 0.3	0.155	0.190	0.328	0.293	0.345	0.276	0.069	0.103	0.034
0.3<MAF $\leq$ 0.4	0.224	0.224	0.241	0.207	0.190	0.121	0.103	0.103	0.138
0.4<MAF $\leq$ 0.5	0.207	0.207	0.155	0.207	0.190	0.190	0.103	0.086	0.103

HER: ヘレフォード、ANG:アングス、JH:日本ホルスタイン、MON:モンゴル在来牛、KOR:韓牛、JB:黒毛和種、LAO:ラオス在来牛、MYA:ミャンマー在来牛、CAM:カンボジア在来牛。

表 4-3 遺伝的多様性

Population	Samples no	Exp. Hz ¹	Obs. Hz ²
<i>Bos taurus</i>			
HER	30	0.346	0.333
ANG	30	0.351	0.310
JH	30	0.370	0.352
MON	30	0.364	0.350
KOR	30	0.362	0.362
JB	30	0.331	0.320
Overall	180	0.356	0.338
<i>Bos indicus</i>			
LAO	30	0.194	0.186
MYA	30	0.196	0.185
CAM	30	0.219	0.214
Overall	90	0.204	0.195

¹ヘテロ接合度推測値、²ヘテロ接合度実測値。
各牛集団の略称は表 4-2 に示す。

来牛) ~0.214 (ラオス在来牛) が観察された。*Bos taurus* と *Bos indicus* グループ全体に対し、それぞれのヘテロ接合度の期待値を求めた。*Bos taurus* グループでは 0.356、*Bos indicus* グループでは 0.204 であり、*Bos taurus* より *Bos indicus* 集団では有意に低い値を示していた (permutation test $P=0.010$)。全 9 ウシ集団に対して各集団の Hardy-Weinberg 法則の検定を行ったところ、ヘテロ接合度実測値と推定値間の有意差は認められなかった ($P>0.05$)。

3-C) 集団間の遺伝距離及び類縁関係

表 4-4 は各集団間の遺伝的距離及び遺伝的分化の値を示す。*Bos taurus* の集団間において、最も低い遺伝距離を示したのは韓牛とモンゴル在来牛間の 0.036 であり、黒毛和種とヘレフォード間では最も高い遺伝距離の値を示した (0.125)。*Bos indicus* 集団では非常に低い集団間の遺伝距離 (≤ 0.010) を観察した。*Bos taurus* と *Bos indicus* 集団間の遺伝距離は概して高い値であったが、比較的低い値 (0.149~0.152) がモンゴル在来牛と *Bos indicus* 集団間において観察された。*Bos taurus* と *Bos indicus* 集団間には高い F_{st} 値が求められたが、どの集団分化値間でも有意差が認められなかった。

集団間の系統関係を 2 つのタイプの系統樹、UPGMA (図 4-1A) と Neighbor-joining (図 4-1B) 系統樹にて推定した。これら系統樹の結果から、*Bos taurus* と *Bos indicus* 間の明確な分岐が観察された。図 4-1A においては、アジア *Bos taurus* の黒毛和種、韓牛及びモンゴル在来牛は近い系統関係を示し、ヨーロッパ集団のヘレフォードとアンガスは *Bos taurus* グループの外側に位置し、日本のホルスタインは黒毛和種とモンゴル在来牛の間に位置した。3 つの *Bos indicus* 集団は 1 つクラスターを形成し、緊密な系統関係を示唆した。図 4-1B の Neighbor-joining 系統樹による系統関係の解析は UPGMA 系統樹の結果とほぼ一致し、3 つの *Bos indicus* 集団は近い系統関係を示し、*Bos taurus* クラスターと大きく分類された。図 4-1B においてもヨーロッパ品種 (ヘレフォード、アンガス及び日本ホルスタイン) とアジア *Bos taurus* 種 (黒毛和種、韓牛及びモンゴル在来牛) が分岐していることが示され、モンゴル在来牛は *Bos taurus* ク

表 4-4 遺伝的距離（下対角）及び Fst 検定（上対角）

Population	HER	ANG	JH	MON	KOR	JB	LAO	MYA	CAM
HER	-	0.145	0.116	0.127	0.143	0.183	0.347	0.364	0.345
ANG	0.114	-	0.122	0.122	0.145	0.171	0.340	0.342	0.311
JH	0.080	0.094	-	0.071	0.075	0.131	0.330	0.334	0.306
MON	0.097	0.093	0.062	-	0.040	0.098	0.272	0.274	0.258
KOR	0.105	0.108	0.056	0.036	-	0.091	0.328	0.333	0.315
JB	0.125	0.122	0.091	0.079	0.062	-	0.331	0.339	0.308
LAO	0.227	0.203	0.224	0.149	0.214	0.206	-	0.023	0.017
MYA	0.233	0.209	0.230	0.152	0.212	0.216	0.010	-	0.018
CAM	0.225	0.189	0.213	0.149	0.215	0.201	0.009	0.009	-

各牛集団の略称は表 4-2 に示す。

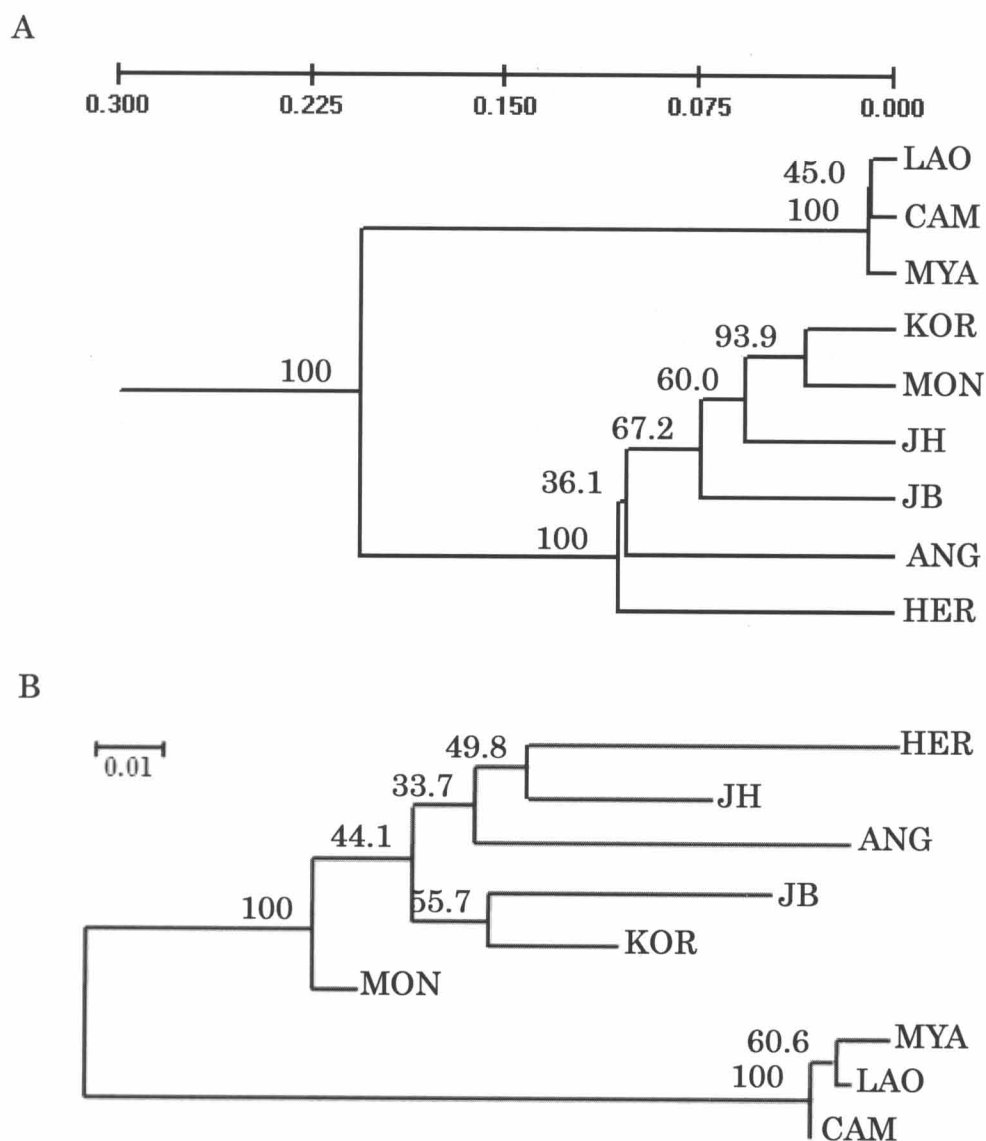


図 4-1 UPGMA 法 (A) 及び Neighbor-joining 法 (B) による系統樹
1000 回反復を基づいたブートストラップ値をそれぞれ表す。
各牛集団の略称は表 4-2 に示す。

ラスターの外側に位置していたことを示唆していた。また、2つの系統樹ともに *Bos taurus* または *Bos indicus* グループ内においてほとんどのクラスターのブートストラップ値は比較的低い値を示したが、*Bos taurus* 及び *Bos indicus* 間におけるクラスターは 100%の信頼度を示した。

3-D) 集団の主成分分析

9 集団に対して 58 SNP のマーカーアليل頻度を用い、集団ごとの主成分分析を行った (図 4-2)。第一主成分は 61.1%を占め、*Bos taurus* と *Bos indicus* 間の明らかな分岐を示した。第二主成分は 12.5%であり、概ねヨーロッパ品種とアジア在来牛を区分することが可能であった。この主成分分析の結果から、3つの *Bos indicus* 集団は図の左側に緊密な関係を有していることが示された。また、*Bos taurus* 集団には図の右側において、緩やかなクラスターを形成したが、どの集団間においても *Bos indicus* 集団のような緊密な遺伝的類縁関係を示すものは認められなかった。*Bos taurus* 集団ではヨーロッパとアジアグループ間の部分的な分岐が観察されたが、系統樹解析で遺伝的位置が不明瞭であった日本のホルスタインとモンゴル在来牛はその中間あたりに位置づけられた。

3-E) 集団構造及び混合度合いの推定

図 4-3 は 58 SNP の情報を用い、STRUCTURE プログラムにより解析されたウシ 9 集団の構造分析の結果を示す。この STRUCTURE 解析より集団の遺伝的構造と混合度合いの解明が行える。 $K=2$ の場合は、2 つ明確なクラスターが示され、*Bos taurus* と *Bos indicus* グループが大きく分類された。 $K=3$ の場合、*Bos taurus* グループにはヨーロッパ集団のヘレフォード、アンガスとアジア集団及び日本ホルスタイン集団間の異なる構造が観察された。一方、 $K=4$ の場合では日本ホルスタインとアンガスは同じクラスターを形成した。 $K=4$ 、5 と 6 の場合において、モンゴル在来牛集団ではアジア及びヨーロッパ祖先ウシの混合パターンが示唆された。 $K=7$ では *Bos taurus* の各集団は混合パターンがほとんど観察されず、それぞれのクラスターを形成した。また、*Bos indicus* 集団は

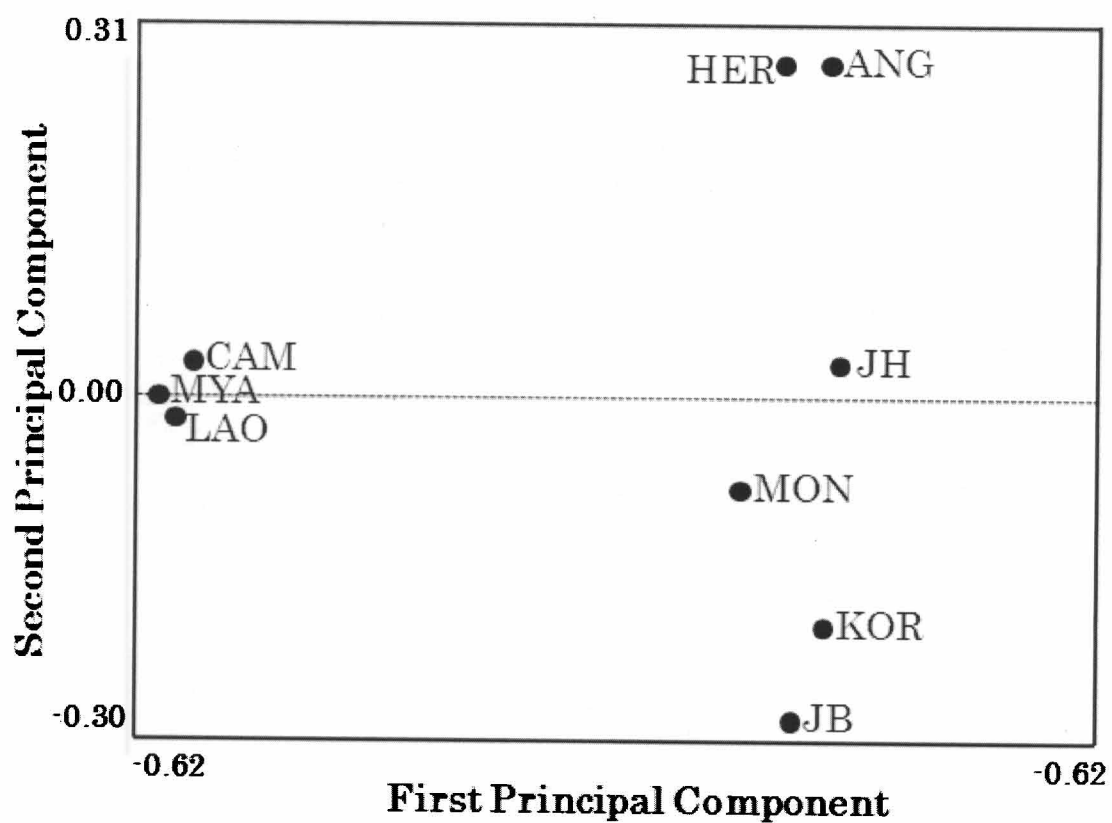


図 4-2 主成分分析。第一、第二主成分はそれぞれ 61.1%、12.5%を占め。各牛集団の略称は表 4-2 に示す。

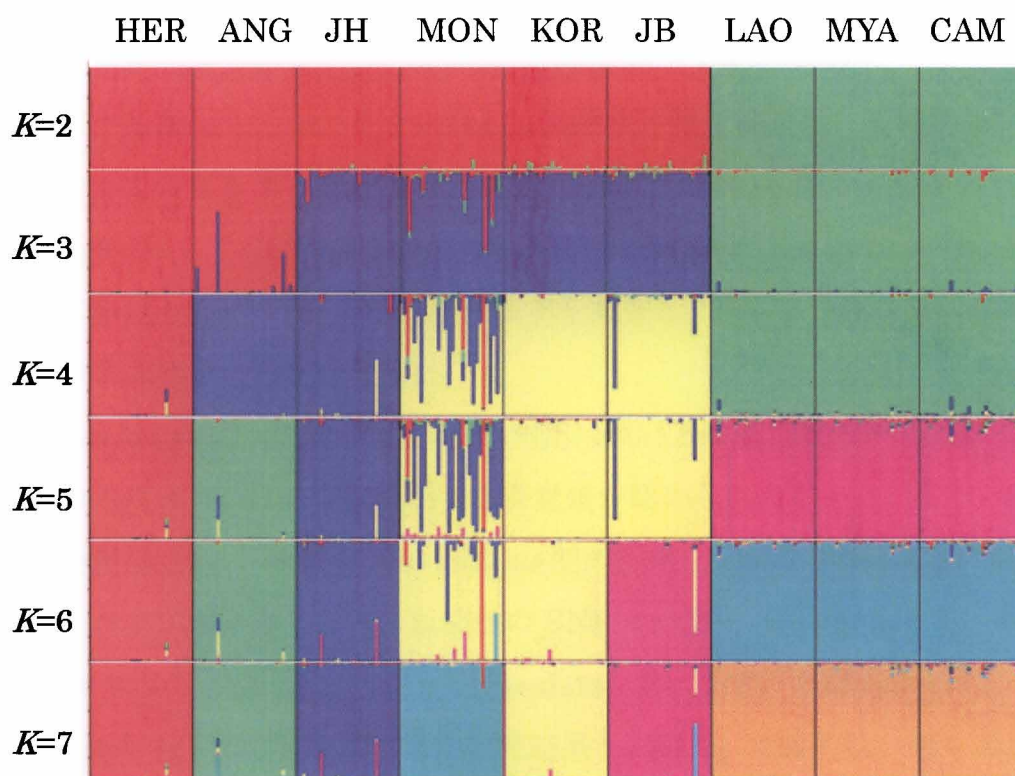


図4-3 STRUCTUREによる牛集団の遺伝的構造
各牛集団の略称は表 4-2 に示す

極めて近い遺伝的類縁関係が観察された ($K=2\sim7$)。

第4節 考察

本研究では、Mckay ら (2008) より報告された 2,641 SNP マーカーおよび 54,001 SNP を含む Illumina BovineSNP50 BeadChip により、各常染色体よりランダムかつ 2 つのマーカー間隔が 30Mbp 以上である SNP マーカーを選抜した。これら選出したマーカーに対して実験条件等を精査し、最終的に 58 SNP マーカーからなるマーカーシステムを開発した。構築した 58 SNP マーカーシステムを用い、アジア及びヨーロッパの *Bos taurus* と *Bos indicus* ウシ集団 270 個体における SNP マーカーアليل頻度を調査し、さらにこれら集団の遺伝的構造及び系統関係の推定を行った。

Bos taurus と *Bos indicus* ウシ集団は高い F_{st} 値 (0.258~0.364) により大きく分かれたが、どの F_{st} 値間でも有意差が認められなかった。また、2 つの系統樹分析は *Bos taurus* と *Bos indicus* 間の明確な分岐を示唆した。一方、ブートストラップ値に関しては、以前他の SNP マーカー (Ryynanen ら、2007) とマイクロサテライトマーカー (Goudarzi ら、1997 ; Maudet ら、2002 ; MacHugh ら、1997) を基づいた研究結果と同様に、比較的低い値を示した。この理由としては、お互いの遺伝的類縁関係が近い集団間には分岐程度が低いため、ブートストラップ値は高くないと考えられる。したがって、特に系統関係近い集団に対して構築された系統樹では、信頼性が低い遺伝的關係が示されることが多く、本研究で示されたようにホルスタインやモンゴル在来牛の遺伝的位置は系統樹間で若干違いがもたらされると考えられた。

一方、主成分分析及び STRUCTURE 解析には、集団間の分類、混合度合いと遺伝的類縁関係がよく示された。主成分分析の結果は概ね 2 つの系統樹の結果と一致していたが、部分的な相違が観察された。例としては、日本ホルスタインは図 4-1 と図 4-2 におけるそれぞれの分析ごとに異なる位置関係を示した。本研究における主成分分析は、第 1 と第 2 主成分を合わせて全体バリエーションの 73.6% を占め、高い分析能を示していると考えられる。さらに、この主成

分分析の結果は、STRUCTURE 解析結果とほとんど一致していた。これらの結果より、58 SNP マーカーはアジアやヨーロッパのウシ集団に対する遺伝的構造の推定に対し、十分な遺伝情報を含んでいると考えられる。

Mannen ら (2004) はミトコンドリア DNA を分析した結果により、モンゴル在来牛は 20%の *Bos indicus* ミトコンドリアハプロタイプを有していることを明らかにし、*Bos indicus* の母性系統からモンゴル在来牛への遺伝子移入を示唆した。本研究では、モンゴル在来牛と *Bos indicus* 集団間のより低い遺伝的距離が求められた。これと比較したところ、主成分分析と STRUCTURE 分析の結果から、*Bos indicus* 常染色体ゲノムはモンゴル在来牛への遺伝子移入はほとんど認められなかった。モンゴル在来牛は完全に *Bos taurus* 形態特徴を有し、モンゴルの寒冷な気候は耐暑性に選抜されてきた *Bos indicus* には適しないと思われる (Mannen ら、2004)。したがって、モンゴル在来牛には *Bos indicus* のミトコンドリア DNA が残っているものの、在来のモンゴル雄牛との累進交配が進められた結果、現存のモンゴル在来牛には *Bos indicus* の常染色体遺伝子がほとんど残っていないものと考えられる。

Bos taurus 集団間における日本ホルスタインの遺伝的位置関係は不安定であることが複数の分析から明らかとなった。どの分析においても、日本ホルスタインはアジアとヨーロッパ集団の概ね中間に位置していることが示されている (表 4-4、図 4-1 と 4-2)。一方、STRUCTURE 分析では、日本ホルスタインは $K=3$ の場合、アジア集団とクラスターを形成し、 $K=4$ の場合ではアンガスとクラスターを形成した (図 4-3)。一方、どちらの場合においても日本ホルスタイン集団において他集団との混合パターンはほとんど示されなかった。

ホルスタインは最初、1889 年にアメリカとオランダから日本に輸入されたとされている。Tsuji ら (2004) は日本ホルスタインは 15~57%の頻度で日本在来牛のミトコンドリア DNA を有していることを示唆した。したがって、日本ホルスタインは、おそらくある程度の日本在来牛常染色体遺伝子を有していたと考えられる。このように、日本ホルスタインは、アジア及びヨーロッパ牛の遺伝子が混在していると考えられる。しかし、長年にわたって日本ホルスタイン

に対する強い選抜の結果、現存集団では日本ホルスタインに特異的な遺伝子構造が形成されているため、他集団の遺伝子混在が認められない集団構造を示していると考えられる。

遺伝資源の重要性が益々重視されることに伴い、遺伝的多様性の研究が促進されている (Bovine HapMap Consortium ら、2009)。本研究では、ヘテロ接合度期待値に基づいた遺伝的多様性に関しては、*Bos indicus* 集団と比べ、*Bos taurus* 集団の多様性が高いことが示唆された。しかし、本研究で用いられたほとんどの SNP は、*Bos taurus* 集団において検出されたものである。そのため、これら SNP を用いた *Bos taurus* と *Bos indicus* 間の分析においては、SNP の選抜の影響に関する誤差が存在すると考えられる。本研究では、*Bos taurus* 集団においては同程度の遺伝的多様性 (0.331~0.370) が観察されたが、*Bos indicus* 集団では明らかに低い値 (0.194~0.219) が観察された。一方、マイクロサテライトマーカーを用いた研究により、*Bos taurus* 集団 (ホルスタイン: 0.686) と *Bos indicus* 集団 (Tharparkar: 0.716 ; Rathi: 0.694) においては、類似した遺伝的多様性が報告されている (Maudet ら、2002 ; Sodhi ら、2008)。このように、*Bos taurus* と *Bos indicus* 間の多様性の推定には、*Bos taurus* と *Bos indicus* の両方を用いて検出された新たな SNP の開発が必要であると考えられる。

以上より、本研究では 58 SNP からなる SNP システムを構築し、このシステムを用いた *Bos taurus* と *Bos indicus* を含むユーラシアウシ集団の遺伝的解析を行った。このシステムを 9 つのウシ集団に適用し、各集団の区分、遺伝的多様性及び集団間の類縁関係が明らかにした。この開発した SNP システムと最新構造分析法を用いた解析は、これまでのマイクロサテライトマーカーによる分析と比べると、これら集団のより詳細な位置付けと集団間の遺伝子混在の程度を明らかにすることが可能であった。したがって、この SNP システムは品種や集団の遺伝的類縁関係や多様性を知る上で極めて有用なマーカーパネルとなることを示唆した。また、今後は多くのウシ集団に対する総合的な遺伝的多様性などの分析の際、より多くの SNP マーカーを利用することにより、分析精度

を上げることが期待される。

第 5 章 総括

生物多様性の理解と維持は、人類の生存や発展にきわめて重要であり、これらの家畜遺伝資源は人と最も緊密に関連し、人類の現在及び将来の生存・発展に必須である。したがって、遺伝資源の保護や有効、合理かつ継続利用可能な国際戦略は人類の将来を見据える上で極めて重要である。現在、家畜の中でも経済的に重要であり品種改良が進んでいるウシは、19 世紀以降各地で品種改良が行われ、約 800 品種が存在している。しかし、極度の改良を受けた品種がその優位性から世界中に広まるに連れ、世界におけるウシの遺伝的多様性の減少が問題視されてきている。一度失われた遺伝的多様性は元に戻ることはない。その結果、多様性に富んだ遺伝資源は人類共通の財産であるという認識が高まり、遺伝資源を保存するために現在の遺伝的多様性がどのような状況にあるのかを把握しておく必要性が生じている。

以上の観点から、本研究では東アジアの在来牛に対し、ミトコンドリア DNA、常染色体上の機能遺伝子の多型、常染色体上の SNP マーカーシステムの開発、そのシステムを用いた遺伝的多様性解析、集団の遺伝構造、および遺伝的類縁関係の調査を行った。

まず第 2 章では、ミトコンドリア DNA・D-loop 領域の全塩基配列を決定し、これまで調査が行われてこなかったアジア在来牛に対し、その遺伝的類縁関係や遺伝的多様性を解析した。ミトコンドリア DNA・D-loop を用いたウシの起源や遺伝的多様性、遺伝的類縁関係についての研究が世界中多くの国において進んでいるが、これらの研究ではインド系牛はほとんど扱われていない。そこで本研究では、ミトコンドリア DNA の解析を行い、インド系牛の遺伝的多様性や遺伝的類縁関係および起源について研究を行った。その結果、インドや東南アジア在来牛のミトコンドリア DNA グループは大きく 2 つに分岐することを明らかにした (I1 及び I2 グループ)。I1 グループは、インドから東南アジアの各地で主として見られるミトコンドリア DNA グループであるが、その平均遺伝的多

様性は低かった。一方、I2 グループは、インド北部、ブータン、ネパールなどで相対的に高い頻度で観察される一方、東南アジア在来牛では極めて頻度が低かった。またその多様性は I1 グループと比較して高かった。さらに詳細な遺伝分析から、I1 グループはインダス川流域に起源を有し、I2 グループはガンジス川流域に起源を有することが示唆された。

第 3 章では、機能遺伝子であるウシの GHR 遺伝子の多型をもとに遺伝学的な解析を行った。アジアにおける在来牛の遺伝構造を知るためには *Bos taurus* 型と *Bos indicus* 型遺伝子座の含有率を調査することが肝要である。しかし、ミトコンドリア DNA とは異なり、*Bos taurus* 型と *Bos indicus* 型を明確に区分する常染色体上の DNA マーカーは現在のところ発見されていない。このような亜系間あるいは大きく分化した系統間の類縁関係を調査するためには、同祖性の大きな挿入・欠失による DNA 多型は有効であると考えられる。ウシの GHR 遺伝子上には、約 1.2 kbp の LINE-1 配列の挿入の有無による 2 つの対立遺伝子の存在が知られている。本研究では、ヨーロッパおよび東アジア在来牛における 10 品種・集団における GHR 遺伝子型の頻度を調査し、GHR LINE-1 配列の遺伝的多様性とその起源について考察した。その結果、欧米品種のホルスタイン、アングス、ヘレフォードでは、LINE-1 挿入遺伝子頻度が 0.917~0.991 と非常に高い頻度を示し、アジア品種・在来牛では 0.417~0.522 と中程度の頻度を示した。一方、インド系牛であるベトナム、カンボジア、ミャンマー、ラオス在来牛では、0.000~0.017 と非常に低い遺伝子頻度を示した。LINE-1 配列の特徴から、ヨーロッパ品種とアジア在来牛における GHR LINE-1 配列は同じ祖先に起因していると考えられ、アジア在来牛の LINE-1 配列の挿入が近代における遺伝的流入による結果ではないことが推測された。したがって、GHR LINE-1 配列の挿入は、北方系牛の祖先集団において発生したことが示唆された。

次に第 4 章では、SNP マーカーの開発とそれらのマーカーを用いたウシの遺伝的多様性の解析を行った。これまで蓄積したゲノム情報から、常染色体から各マーカーを選出し、合計 58 SNP からなる分析システムを構築した。このシステムをヨーロッパおよび東アジア在来牛における 9 品種・集団に適用し、

遺伝的類縁関係の分析を行った。系統樹解析では、大きく *Bos taurus* 型ウシと *Bos indicus* 型ウシに区分され、さらにアジア在来牛とヨーロッパ品種に分かれる傾向が認められたが、その信頼度は高くなかった。次いで、主成分分析でも同様の結果が得られたが、モンゴル在来牛や日本ホルスタイン種における遺伝的交雑も示唆された。また、最新の遺伝構造分析「STRUCTURE」を用いた結果、系統樹解析では区分が不可能であった各品種の分類も可能であり、その遺伝的構造を明らかにした。またこの結果から、開発した SNP マーカーおよび最新分析法の有効性が示された。

以上の研究から、mtDNA、機能遺伝子、SNP 多型に基づいた遺伝学的分析を実施し、ヨーロッパおよび東アジア在来牛における 9 品種・集団に対する遺伝的多様性の評価を行い、さらにその遺伝的構造や遺伝的類縁関係について明らかにした。また、これらの方法や開発した SNP システムは系統進化的調査に対して有効な方法となることが示された。

謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、終始御指導を賜りました神戸大学農学部 of 万年 英之教授、笹崎 晋史助教に謹んで感謝の意を表します。

また、東アジア在来牛の調査およびサンプリングに協力していただいた在来家畜研究会および現地での研究関係者の皆様、貴重なサンプルを提供していただいた麻布大学の田中和明博士に謹んで感謝の意を表します。

そして、種々の御協力を賜りました本研究室の諸先輩方、専攻諸氏の皆様に心から感謝の意を表します。

引用文献

- Aggrey SE, Yao J, Sabour MP, Lin CY, Zadworny D, Hayes JF, Kuhnlein U
1999. Markers within the regulatory region of the growth hormone
receptor gene and their association with milk-related traits in Holsteins.
Journal of Heredity 90, 148-151.
- Allchin, B. 1963. Neolithic cattle-keepers of South India. Cambridge
University Press, Cambridge.
- Allchin, F. R., and B. Allchin. 1973. Some new thoughts on Indian cattle. Pp.
71-77 in J. E. van Lohuizen-de Leeuw, and J. N. Ubaghs, eds. *South
Asian Archaeology 1973*. Brill, Leiden.
- Baig, M., A. Beja-Pereira, R. Mohammad, K. Kulkarni, S. Farah, and G.
Luikart. 2005. Phylogeography and origin of Indian domestic cattle.
Current Science 89, 38-40.
- Beja-Pereira, A., D. Caramelli, C. Lalueza-Fox, C. Vernesi, N. Ferrand, A.
Casoli, F. Goyache, L. J. Royo, S. Conti, M. Lari, A. Martini, L. Ouragh, A.
Magid, A. Atash, A. Zsolnai, P. Boscato, C. Triantaphylidis, K. Ploumi, L.
Sineo, F. Mallegni, P. Taberlet, G. Erhardt, L. Sampietro, J. Bertranpetit,
G. Barbujani, G. Luikart, and G. Bertorelle. 2006. The origin of
European cattle: Evidence from modern and ancient DNA. *Proceedings
of the National Academy of Sciences* 103, 8113-8118.
- Bandelt, H. J., P. Forster, and A. Rohl. 1999. Median-joining networks for
inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16,
37-48.
- Beja-Pereira, A., P. R. England, N. Ferrand, S. Jordan, A. O. Bakhiet, M. A.
Abdalla, M. Mashkour, J. Jordana, P. Taberlet, and G. Luikart. 2004.
African Origins of the Domestic Donkey. *Science* 304, 1781.
- Bokonyi, S., 1997. Zebus and Indian wild cattle. *Anthropozoologica* 25-26,
647-654.
- Bovine HapMap Consortium, Gibbs RA, Taylor JF, Van Tassell CP, Barendse

- W, Eversole KA, Gill CA, Green RD, Hamernik DL, Kappes SM, Lien S, Matukumalli LK, McEwan JC, Nazareth LV, Schnabel RD, Weinstock GM, Wheeler DA, Ajmone-Marsan P, Boettcher PJ, Caetano AR, Garcia JF, Hanotte O, Mariani P, Skow LC, Sonstegard TS, Williams JL, Diallo B, Hailemariam L, Martinez ML, Morris CA, Silva LO, Spelman RJ, Mulatu W, Zhao K, Abbey CA, Agaba M, Araujo FR, Bunch RJ, Burton J, Gorni C, Olivier H, Harrison BE, Luff B, Machado MA, Mwakaya J, Plastow G, Sim W, Smith T, Thomas MB, Valentini A, Williams P, Womack J, Woolliams JA, Liu Y, Qin X, Worley KC, Gao C, Jiang H, Moore SS, Ren Y, Song XZ, Bustamante CD, Hernandez RD, Muzny DM, Patil S, San Lucas A, Fu Q, Kent MP, Vega R, Matukumalli A, McWilliam S, Sclep G, Bryc K, Choi J, Gao H, Grefenstette JJ, Murdoch B, Stella A, Villa-Angulo R, Wright M, Aerts J, Jann O, Negrini R, Goddard ME, Hayes BJ, Bradley DG, Barbosa da Silva M, Lau LP, Liu GE, Lynn DJ, Panzitta F, Dodds KG. 2009. Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science* 324, 528-532.
- Bradley, D.G., MacHugh, D.E., Cunningham, P., Loftus, R.T., 1996. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93, 5131-5135.
- Chattopadhyaya, U. C. 2002. Researches in archaeozoology of the Holocene period (Including the Harappan tradition in India and Pakistan). Pp. 365–422 in S. Settar, and R. Korisettar, eds. *Indian archaeology in retrospect. Archaeology and interactive disciplines*. Manohar, New Delhi.
- Chen S, Lin B, Baig M, Lopes R, Santos A, Magee D, Azevedo M, Tarroso P, Sasazaki S, Ostrowski S, Mahgoub O, Chaudhuri T, Zhang Y, Costa V, Royo L, Goyache F, Luikart G, Boivin N, Fuller D, Mannen H, Bradley D, Beja-Pereira A. 2009. Zebu cattle are an exclusive legacy of the South Asia Neolithic. (in press) [Sep 21. Epub ahead of print].
- Curi RA, de Oliveira HN, Silveira AC, Lopes CR. 2005. Effects of polymorphic microsatellites in the regulatory region of IGF1 and GHR on

- growth and carcass traits in beef cattle. *Animal Genetics* 36, 58–62.
- Di Stasio L, Destefanis G, Brugiapaglia A, Albera A, Rolando A. 2005. Polymorphism of the GHR gene in cattle and relationship with meat production and quality. *Animal Genetics* 36, 138–140.
- Etherton TD, Bauman DE. 1998. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiological Reviews* 78, 745–761.
- Excoffier E, Laval G, Schneider S. 2006. Arelquin ver 3.1: A integrated software package for population genetics data analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), Institute of Zoology, University of Beme, Switzerland.
- Falush D, Stephens M, Pritchard J. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7, 574–8.
- Felsenstein J. 1989. PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5, 164–166.
- Fuller, D. Q. 2006. Agricultural origins and frontiers in South Asia: A working synthesis. *Journal of World Prehistory* 20, 1–86.
- Fuller, D. Q. 2008. Neolithic Cultures. Pp. 756–768 in D. M. Pearshall, ed. *Encyclopedia of archaeology*. Academic Press, New York.
- Goudarzi K, Laloe D, Furet J, Grosclaude F. 1997. Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Animal Genetics* 28, 338–345.
- Goudet J. 2001. Lausanne University, Lausanne, Switzerland. FSTAT, a program to estimate and test gene diversity and fixation indices (version 2.9.3). Available from URL: <http://www2.unit.ch/popgen/softwares/fstat.html>.
- Grigson, C. 1985. *Bos indicus* and *Bos namadicus* and the problem of autochthonous domestication in India. Pp. 425–428 in V. N. Misra, and P. Bellwood, eds. *Recent advances in Indo-Pacific prehistory*. Oxford and IBH, New Delhi.

- Hale CS, Herring WO, Shibuya H, Lucy MC, Lubahn DB, Keisler DH, Johnson GS. 2000. Decreased growth in Angus steers with a short TG microsatellite allele in the P1 promoter of the growth hormone receptor gene. *Journal of Animal Science* 78, 2099–2104.
- Han JS, Boeke JD. 2005. LINE-1 retrotransposons: modulators of quantity and quality of mammalian gene expression?. *Bioessays* 27, 775-784.
- Higham, C. 1996. *The Bronze Age of Southeast Asia*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jiang H, Lucy MC. 2001. Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptormRNA: isolation, expression and effects on translational efficiency. *Gene* 265, 45-33.
- Kelly PA, Djiane J, Banville D, Ali S, Edery M, Rozakis M. 1991. The growth hormone/ prolactin receptor gene family. *Oxford Surveys on Eukaryotic Genes* 7, 29-50.
- Kobayashi Y, Boyd CK, Bracken CJ, Lamberson WR, Keisler DH, Lucy MC. 1999. Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 40, 3947-3954.
- Korisettar, R., P. C. Venkatasubbaiah, and D. Q. Fuller. 2001. Brahmagiri and beyond: The archaeology of the Southern Neolithic. Pp. 151-237 in S. Settar, and R Korisettar, eds. *Indian archaeology in retrospect*. New Delhi, Manohar.
- Kovach W, 2005. *MVSP-A MultiVariate Statistical Package for Windows*, ver.3.1. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, U.K.
- Lai, S. J., Y. P. Liu, Y. X. Liu, X. W. Li, and Y. G. Yao. 2006. Genetic diversity and origin of Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38, 146-154.
- Loftus, R., D. MacHugh, D. Bradley, P. Sharp, and P. Cunningham. 1994. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences 91, 2757-2761.
- Loftus, R.T., and Scherf, B. 1993. World Watch List for Domestic Animal Diversity. FAO, Rome, 32-34.
- Lucy MC, Johnsson GS, Shibuya H, Boyd CK, Herring WO, Werin M. 1998. Rapid communication: Polymorphic (GT)_n microsatellite in the bovine somatotropine receptor gene promoter. *Journal of Animal Science* 76, 2209-2210.
- MacHugh D, Loftus R, Cunningham P, Bradley D. 1998. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Animal Genetics* 29, 333-340.
- MacHugh D, Shriver M, Loftus R, Cunningham P, Bradley D. 1997. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of Taurine and Zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* 146, 1071-1086.
- Magee, D. A., H. Mannen, and D. G. Bradley. 2007. Duality in *Bos indicus* mtDNA diversity: Support for geographical complexity in zebu domestication. Pp. 385-391 in M. D. Petraglia, and B. Allchin, eds. *The Evolution and History of Human Populations in South Asia: Inter-disciplinary Studies in Archaeology, Biological Anthropology, Linguistics and Genetics*. Springer, Dordrecht.
- Manly, B. F. J. 1997. Randomization, Bootstrap and Monte Carlo methods in biology. Chapman & Hall, London.
- Mannen H, Kohno M, Nagata Y, Tsuji S, Bradley DG, Yeo JS, Nyamsamba D, Zagdsuren Y, Yokohama M, Nomura K, Amano T. 2004. Independent Mitochondrial Origin and Historical Genetic Differentiation of North Eastern Asian Cattle. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32, 539-544.
- Mannen H, Tsuji S, Loftus RT, Bradley DG. 1998. Mitochondrial DNA variation and evolution of Japanese Black cattle (*Bos taurus*). *Genetics* 150, 1169-1175.

- Maudet C, Luikart G, Taberlet P. 2002. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *Journal of Animal Science* 80, 942-950.
- McKay S, Schnabel R, Murdoch B, Matukumalli L, Aerts J, Coppieters W, Crews D, Neto E, Gill C, Gao C, Mannen H, Wang Z, Tessell C, Williams J, Taylor J, Moore S. 2008. An assessment of population structure in eight breeds of cattle using a whole genome SNP panel. *BMC Genetics* 9, 37.
- Meadow, R. H. 1984. Notes on the faunal remains from Mehrgarh, with focus on cattle (*Bos*). Pp. 30-40 in B. Allchin, ed. *South Asia Archaeology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Meadow, R. H. 1993. Animal domestication in the Middle East: a revised view from the eastern margin. Pp. 295-320 in G. L. Possehl, ed. *Harappan Civilization. A Recent Perspective*. Oxford and IBH Publishing, Delhi.
- Meadow, R. H. 1996. The origins and spread of pastoralism in Northwestern South Asia. Pp. 390-412 in D. R. Harris, ed. *The origins and spread of agriculture and pastoralism in Euroasia*. University College London Press, London.
- Mukesh B, Sodhi M, Bhatia S, Mishra B. 2004. Genetic diversity of Indian native cattle breeds as analysed with 20 microsatellite loci. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 121, 416-424.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalists* 106, 283-92.
- Ohkubo T, Yano H, Takahashi S, Kimura N, Tanaka M. 2006. *Bos indicus* type of growth hormone receptor gene is retained in Japanese Black cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 123, 410-413.
- Park S. D. E. 2001. Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection [Ph.D. thesis]. University of Dublin.

- Phillips, R. W. 1961. World distribution of the major types of cattle. *Journal of Heredity*, 52, 207-213.
- Pritchard J, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-59.
- Ryynanen H, Tonteri A, Vasemagi A, Primmer C. 2007. A comparison of biallelic markers and microsatellites for the estimation of population and conservation genetic parameters in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Heredity* 98, 692-704.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-25.
- Seldin M, Shigeta R, Villoslada P, Selmi C, Tuomilehto J, Silva G, Belmont J, Klareskog L, Gregersen P. 2006. European population substructure: clustering of Northern and Southern populations. *PLoS Genetics* 2, 1339-51.
- Shimamura M, Yasue H, Ohshima K, Abe H, Kato H, Kishiro T, Goto M, Munechika I, Okada N (1997) Molecular evidence from retroposons that whales form a clade within even-toed ungulates. *Nature* 388, 666-670.
- Sneath P, Sokal R. 1973. *Numerical taxonomy*. San Francisco, CA: W. H. Freeman.
- Sodhi M, Mukesh M, Ahlawat S, Sobti R, Gahlot G, Mehta S, Prakash B, Mishra B. 2008. Genetic diversity and structure of two prominent Zebu cattle breeds adapted to the arid region of India inferred from microsatellite polymorphism. *Biochemical Genetics* 46, 124-136.
- Tassell C, Smith T, Matukumalli L, Taylor J, Schnabel R, Lawley C, Haudenschild C, Moore S, Warren W, Sonstegard T. 2008. SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries. *Nature Methods* 5, 247-52.
- Troy CS, Machugh D, Balley JF, Magee DA, Loftus RT, Cunningham P, Chamberlain AT, Sykes BC, Bradley DG 2001. Genetic evidence for

- Near-Eastern origins of European cattle. *Nature* 410, 1088-1091.
- Tsuji S, Mannen H, Mukai F, Shoji M, Oyama K, Kojima T, Kano C, Kinoshita Y, Yamaguchi E. 2004. Trace of native cattle in Japanese Holstein assessed by mitochondrial DNA sequence polymorphism. *Journal of dairy science* 87, 3071-5.
- Van Vuure, C. 2005. Retracing the aurochs: history, morphology and ecology of an extinct wild ox. Pensoft Publishers, Sofia-Moscow.
- Vali U, Einarsson A, Waits L, Ellegren H. 2008. To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations?. *Molecular Ecology* 17, 3808-3817.
- Vignal A, Milan D, Sancristobal M, Eggen A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics, Selection, Evolution: GSE*. 34, 275-305.
- Zeuner, F.E., 1963. The history of domestication in cattle. In: Mourant, A.E., Zeuner, F.E. (Eds.), *Man and cattle: Proceedings of a Symposium on Domestication*. Royal Anthropological Society of Great Britain and Ireland, Occasional Paper 18, 9-15.