

## AFLP を用いた口之島野生化牛の遺伝的変異性

下桐 猛<sup>1\*</sup>・奥村史彦<sup>1</sup>・龍野巳代<sup>2</sup>・花田博之<sup>2</sup>・伊村嘉美<sup>2</sup>・河邊弘太郎<sup>3</sup>

岡本 新<sup>1</sup>・前田芳實<sup>1</sup>

<sup>1</sup>鹿児島大学農学部家畜育種学研究室 890-0065 鹿児島市郡元

<sup>2</sup>鹿児島大学農学部附属農場入来牧場 895-1402 薩摩川内市入来町

<sup>3</sup>鹿児島大学フロンティアサイエンス研究推進センター 890-0065 鹿児島市郡元

### Genetic variability of Kuchinoshima feral cattle as indicated by amplified fragment length polymorphism (AFLP)

Takeshi Shimogiri<sup>1</sup>, Fumihiko Okumura<sup>1</sup>, Miyo Ryuno<sup>2</sup>, Hiroyuki Hanada<sup>2</sup>, Yoshimi Imura<sup>2</sup>,  
Kotaro Kawabe<sup>3</sup>, Shin Okamoto<sup>1</sup> and Yoshizane Maeda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima 890-0065

<sup>2</sup>Iriki Livestock Farm, Experimental Farm, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Iriki, Satumasendai 895-1402

<sup>3</sup>Fronotier Science Center, Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima 890-0065

#### Summary

Kuchinoshima feral cattle are a native cattle population of Kagoshima. In this study, we applied amplified fragment length polymorphism (AFLP) analyses of five primer sets to 82 animals of Kuchinoshima feral cattle and four Japanese cattle breeds and assessed the genetic variability of Kuchinoshima feral cattle. Five AFLP analyses produced 110 polymorphic markers among the five cattle populations. Values of the genetic variability within cattle populations, expressed as the values of the proportion of polymorphic loci ( $P$ ) and the average heterozygosity ( $H$ ), ranged from  $P=0.845$  and  $H=0.323$  (Japanese Black) to  $P=0.400$  and  $H=0.133$  (Kuchinoshima feral cattle). The  $H$  value of Kuchinoshima feral cattle was significantly lower than those of other populations. Especially low values of genetic variability in Kuchinoshima feral cattle might result from their small breeding population. A dendrogram drawn from the standard genetic distances among populations showed that Kuchinoshima feral cattle were most distant from other populations.

**Key Words:** AFLP, genetic variability, Kuchinoshima feral cattle

**キーワード:** AFLP, 遺伝的変異性, 口之島野生化牛

#### 緒 言

現在、我が国には、在来牛として山口県の見島牛と鹿児島県の口之島野生化牛の2集団が維持されている。見島牛は、山口県萩市の見島で維持されている純粋かつ均一な日本在来牛集団であり、1928年に国の文化財として天然記念物に指定された。野澤 (1967) は、1964年までの見島牛集団の近交係数を少なくとも0.3, 多くて0.7程度であると推定しており、元来見島牛が保有していた遺伝的変異が失われていることを示唆している<sup>1)</sup>。さらにNamikawa (1972) は血液タンパク質の多型解析から見島牛集団は他の和牛より遺伝的変異が少ないことを報告

している<sup>2)</sup>。

口之島野生化牛は、鹿児島県のトカラ列島に生息する在来牛集団で、現在、総頭数が約80頭と推定されている。本集団は、大正7年頃に同じトカラ列島に属する諏訪之瀬島から導入された数頭の牛の子孫であると考えられている。また、現在までほとんど改良の手が加わらず、内地の和牛と隔離されたままになっているので、現在の和牛が既に失ってしまった遺伝子を保有している可能性がある。例えば毛色において古来の和牛の特徴を未だに有している。彼らの毛色は、黒色が主だが褐色、白斑のものが観察される。この白斑は昔の絵画などで見られるが、現在では口之島野生化牛にのみ残存している特徴である。このように口之島野生化牛は、我が国の遺伝資源として重要な存在であると考えられる。

AFLPは1995年にVosらによって開発されたゲノムワイドに多型を分析できるDNAフィンガープリント(指紋)法である<sup>11)</sup>。本法は、ゲノムDNAを2種類の制限酵素で断片化し、その中から特定の塩基配列を持つものだけを選択的にプライマーでPCR増幅し、検出することを基本とする方法である。本法は、1) 従来のDNA多型解析法に比べ多数のマーカーを一度に検出できる、2) プライマーの種類を変えることにより無数の多型マーカーが得られる、3) 再現性が高く信頼性がある、4) 既知のゲノム情報が必要なく基本的にどんな生物種にも適用できるといった特徴がある。本法は当初、植物ゲノムで主に適用されてきたが<sup>12)10)</sup>、以上のような特徴から、最近では動物ゲノムでも適用されており、連鎖解析等における優れたDNAマーカーとしてその有用性が確認されている。家畜ではニワトリに対して適用されて連鎖解析を行う上での優れたDNAマーカー作出する方法である事が報告されている<sup>3)</sup>。また本法は、集団遺伝学の分野でも利用されており、肉用牛5品種を用いてそれらの品種や系統間遺伝的類縁関係を推定している<sup>9)</sup>。

そこで本研究では、口之島野生化牛集団の遺伝的特性に関する基礎的知見を得ることを目的として、口之島野生化牛集団および4種和牛(黒毛和種・褐色和種・無角和種・日本短角種)にAFLPを適用し、これら5集団間の遺伝的類縁関係を調査した。

## 材料および方法

### 1. 供試動物

今回供試したウシ集団は、鹿児島大学学内農場及び附属入来牧場で採取した黒毛和種16頭、口之島野生化牛16頭、山口県畜産試験場から頂いた無角和種16頭、岩手県畜産試験場の日本短角種18頭、熊本県畜産試験場で飼育されている褐色和種16頭の全血もしくは凍結精液より抽出、精製した計82個体のゲノムDNAを用いた。

### 2. AFLP解析

朴ら(2003)の手法を参考にAFLP解析を行った<sup>8)</sup>。本研究で用いたアダプターとプライマーの塩基配列をTable 1に示した。また、得られたPCR産物を6%変性ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動し、SILVER SEQUENCE™ DNA Staining Reagents (Promega)により検出した。

### 3. 遺伝的変異性の評価法

AFLPによる品種内および品種間の遺伝的類似性は、NeiとKumar(2000)<sup>6)</sup>に従って評価した。AFLPで得られた多型は、ある遺伝子座でのバンドの有無で決定される。したがって、得られた多型は、2対立遺伝子からなる優性のマーカーとして扱い、平方根法から対立遺伝子頻度を推定した。また、品種内の遺伝的変異の大きさを多型遺伝子座の割合( $P$ )と平均ヘテロ接合体率( $H$ )から推定した。さらに、これら5集団の遺伝的類縁関係を推定するためにデンドログラムを作成した。その遺伝的距離の推定は、Neiの標準遺伝距離( $D_s$ )<sup>5)</sup>を、デ

ンドログラムの作成は平均距離法(UPGMA)を用いた。なお、 $H$ と $D_s$ をDISPANプログラム(<http://mep.bio.psu.edu/databases.html#POPULATION%20TREES%20FROM%20GENETIC%20MARKERS>)により算出し、デンドログラムを、Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) ver. 2.1<sup>2)</sup>により描いた。

## 結果および考察

Table 1に示した5種類のプライマーセットを用いてAFLP解析を行った。その結果、合計110本の増幅DNA断片において個体間に増幅の有無、すなわち多型マーカーが観察された。各プライマーセットで検出された多型マーカー数はEcoRI-AAC・TaqI-AAAで31、EcoRI-AAG・TaqI-AAAで22、EcoRI-AAA・TaqI-AAAで18、EcoRI-AAC・TaqI-AAGで27、EcoRI-AAG・TaqI-AAGで12であった。

Table 1. Adapters and primers used in AFLP analysis.

Adapters	EcoRI adapter	5' ctc gta gac tgc gta cc cat ctg acg cat ggt taa 5'
	Taq I adapter	5' gac gat gag tcc tga c ta ctc agg act ggc 5'
Primers	EcoRI-A	5' gac tgc gta cca att ca
	EcoRI-AAC	5' gac tgc gta cca att caa c
	EcoRI-AAG	5' gac tgc gta cca att caa g
	EcoRI-AAA	5' gac tgc gta cca att caa a
	Taq I-A	5' gat gag tcc tga ccg aa
	Taq I-AAG	5' gat gag tcc tga ccg aaa g
	Taq I-AAA	5' gat gag tcc tga ccg aaa a

これら多型マーカーから本研究で用いた5集団の遺伝的変異性を評価するために多型遺伝子座の割合( $P$ )および平均ヘテロ接合体率( $H$ )を示した(Table 2)。集団内の多型遺伝子座の割合は、黒毛和種の $P=0.845$ が最も高く、他方、口之島野生化牛のそれは $P=0.400$ で最低であった。同様に、平均ヘテロ接合体率( $H$ )も、黒毛和種において $H=0.323$ と最も高値を示し、口之島野生化牛において $H=0.133$ と最も低い値を示した。さらに、 $t$ 検定を行なったところ、口之島野生化牛の $H$ は他のものより1%レベルで有意に低かった(Table 2)。このように口之島野生化牛の遺伝的変異性が極端に低い値を示していたのは、1) 口之島で隔離された状態で繁殖保存されてきたこと、2) 附属牧場で飼養されている閉鎖集団を用いており、近交が進んでいることが考えられる。

Table 2. The proportion of polymorphic loci ( $P$ ) and the average heterozygosity ( $H$ ) at 110 AFLP markers in five cattle populations.

Population	No.	$P$	$H$
Kuchinoshima feral	16	0.400	0.133 ± 0.018**
Japanese Black	16	0.845	0.323 ± 0.018
Japanese Brown	16	0.682	0.239 ± 0.019
Japanese Shorthorn	18	0.773	0.293 ± 0.020
Japanese Polled	16	0.764	0.274 ± 0.019

\*\* Significant difference at 1% level.

次に110本の多型マーカーにおける各集団の遺伝子頻度から Nei の標準遺伝距離  $D_s$  を算出した (Table 3), その結果, 口之島野生化牛と日本短角種との間の0.181から日本短角種と無角和種との間の0.026まで及んだ。求められた遺伝距離から平均距離法 (UPGMA) を用いてデンドログラムを作成した (Fig. 1)。その結果, 口之島野生化牛がもっとも外側に位置づけられた。これは, 以前のタンパク質多型による分類結果と一致した<sup>4)</sup>。このような結果も口之島野生化牛が他の品種などの遺伝的影響を受けずに, 小集団で維持されてきたことが影響していると考えられる。

Table 3. Genetic distances ( $D_s$ ) between five cattle populations.

	Kuchinoshima	J. Black	J. Brown	J. Shorthorn
J. Black	0.126			
J. Brown	0.167	0.077		
J. Shorthorn	0.181	0.064	0.111	
J. Polled	0.144	0.062	0.094	0.026

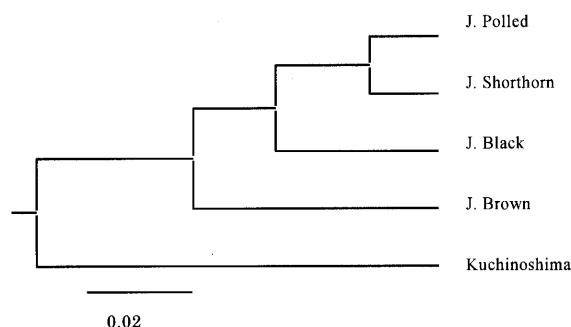


Fig. 1. Genetic relationship among Kuchinoshima feral cattle and four Japanese cattle breeds based on the genetic distances shown in Table 3.

口之島野生化牛は, 大正7年頃に同じトカラ列島に属する諏訪之瀬島から導入された数頭の牛が起源であると考えられており, それ以降, 他品種と交雑されることなく純粋に維持され, 今日に至っている。そのような結果として遺伝子頻度の機会的変動および機会的固定がおり, 現在のような遺伝子構成をもたらしたと考えられる。

### 摘 要

口之島野生化牛は, わが県で維持されている日本在来牛である。本研究は, 口之島野生化牛の遺伝的変異性を調査するために, 5組のプライマーセットによる AFLP 解析を口之島野生化牛および4種和牛の合計82頭で行なった。5回の AFLP 解析の結果, 5集団間で110個の多型マーカーが得られた。遺伝的変異性の評価のために求められた5集団の多型遺伝子座の割合 ( $P$ ) および平均ヘテロ接合体率 ( $H$ ) は, 黒毛和種の  $P=0.845$ ,  $H=0.323$  から口之島野生化牛の  $P=0.400$ ,  $H=0.133$  に及んだ。また, 口之島野生化牛の平均ヘテロ接合体率は他の集団と比べて有意に低かった。このように口之島野生化牛の遺

伝的変異性が極端に低い結果は本集団が小集団で維持されているためと考えられた。また, 標準遺伝距離からデンドログラムを描いた結果, 口之島野生化牛が4種和牛の外側に位置づけられた。

謝 辞: 本研究を遂行するにあたり, 貴重な血液サンプルや DNA サンプルをご提供いただきました岩手県畜産試験場, 山口県畜産試験場, 熊本県畜産試験場の関係諸氏に深く感謝いたします。

### 引用文献

- 1) Becker, J., Vos, P., Kuiper, M., Salamini, F. and Heun, M.: Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol. Gen. Genet.*, 249, 65-73 (1995)
- 2) Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. and Nei, M.: MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 17, 1244-1245 (2001)
- 3) Lee, E.J., Yoshizawa, K., Mannen, H., Kikuchi, H., Kikuchi, T., Mizutani, M. and Tsuji, S.: Localization of the muscular dystrophy AM locus using a chicken linkage map constructed with the Kobe University resource family. *Anim. Genet.*, 33, 42-48 (2002)
- 4) Namikawa, T.: Genetic similarities among seven cattle populations of eastern Asia and Holstein breed. *SABRAO newsletter*, 4, 17-25 (1972)
- 5) 根井正利: 分子進化遺伝学. P.190-191 培風館. 東京 (1990)
- 6) Nei, M. and Kumar, S.: *Molecular evolution and phylogenetics*. P. 244-285 Oxford University press. New York (2000)
- 7) 野澤 謙: 見島牛集団の近交度と遺伝子型頻度. 日本在来家畜調査団報告, 2, 73-85 (1967)
- 8) 朴 君・下桐 猛・前田芳實・岡本 悟: AFLP 法による日本ウズラ選抜系統の遺伝的特性の分析. 日本家禽学会誌, 40, J13-J20 (2003)
- 9) 笹崎晋史・李 恩俊・万年英之・国枝哲夫・櫻井孝志・山内健治・呂 政秀・辻 莊一: AFLP マーカーを用いた肉用牛5品種の系統分析. 日本畜産学会報, 72, J1-J5 (2001)
- 10) Thomas, C.M., Vos, P., Zabeau, M., Jones, D.A., Norcott, K.A., Chadwick, B.P. and Jones, J.D.: Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Plant J.*, 8, 785-794 (1995)
- 11) Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23, 4407-4414 (1995)