

## 木曾馬におけるミトコンドリア DNA D-loop 領域の PCR-RFLP 解析

廣村恵子・石田信繁\*・坂上正行\*・向山明孝\*・辻井弘忠  
信州大学農学部 生物資源科学科 生物資源開発学講座

### PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA D-loop Region in Kiso Native Horses

Kei-ko HIROMURA, Nobushige ISHIDA, Masayuki SAKAGAMI\*,  
Harutaka MUKOYAMA\* and Hirotada TSUJII

Department of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shinshu University.

#### Summary

In this study, mitochondrial DNA (mtDNA) was isolated from peripheral bloods of thirteen Kiso native horses and the genetic variation in the length of restriction fragments, of mtDNA D-loop region was analyzed by the use of polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Three restriction enzymes, *Aci*I, *Cfr*13I and *Mse*I, were used and the PCR-RFLP was detected by the polyacrylamide gel electrophoresis.

In the *Aci*I and *Mse*I cleavage patterns, two variations were observed, respectively. Although no variation was found in the *Cfr*13I cleavage pattern. The frequencies of these variations were A=0.769 and C=0.231 in *Aci*I and B=0.692 and C=0.308 in *Mse*I, respectively.

These frequencies in Kiso native horses were considerably different from those in Thoroughbred horses previously reported. The occurrence of *Mse*I-C variation was characteristic to the Kiso native horse.

(Jour. Fac. Agric. Shinshu Univ. 31 : 139—144, 1994)

**Key words** : Kiso native horses, mtDNA, PCR-RFLP

#### 緒 言

木曾馬は日本在来馬の一品種として、現在116頭が登録されているが、明治時代より軍馬

---

\* 日本中央競馬会競走馬総合研究所生命科学研究グループ  
Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Equine Research  
Institute, Japan Racing Association  
1994年9月30日 受付

育成のため、アングロアラブ種をはじめとする西洋種と交配され、雑種化された経緯がある。戦後、軍馬ないし木材運搬等の役用馬としての目的を失ったため馬産が衰退し、集団サイズが急激に縮小した結果近親交配が余儀なくされ、同時に、産子の奇形、流産および死産などの弊害が目立ってきている。こうした状況を憂え、近年になり再び日本在来馬としての木曾馬の保護、育成が進められてきているが、そのためには現存する木曾馬のもつ遺伝形質、遺伝子構成を十分把握しておく必要がある。これまで木曾馬の遺伝子構成については、毛色、赤血球抗原型および血液蛋白型<sup>1)</sup>を指標とした報告があるが、その後品種としての集団縮小がさらに進化したにもかかわらず、ほとんど調査は行われていない。

一方、近年の分子生物学的手法の発展にともない、各種高等動物においてDNA多型に基づく遺伝子構成の解析や進化・系統解析が行われるようになってきた。木曾馬についてもDNA多型を指標とした研究を行うことにより、また新たな面から遺伝子構成についての情報が得られると考えられる。

そこで、今回我々は、ミトコンドリアDNA (mtDNA) のD-loop領域を対象とし、ポリメラーゼ連鎖反応—制限酵素断片長多型 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism: PCR-RFLP) 法により木曾馬におけるDNA多型を調べ、それらの結果について先に石田ら<sup>2)</sup>により報告されたサラブレッドおよび他の品種における結果と比較検討した。

## 材料および方法

### 1. テンプレートDNAの調整

PCRのテンプレートに用いたDNAは、木曾馬13頭よりヘパリン入り真空採血管を用いて採取した血液から、Fujinagaら<sup>3)</sup>の方法に従ってmtDNAを含む全ゲノムDNAを精製した。

### 2. PCR-RFLP法

PCR法<sup>4)</sup>により、ウマmtDNAのD-loop領域 (tRNA<sup>Pro</sup>とlarge-central-conserved-sequence blockの間<sup>5)</sup>) を含む232bpを増幅した。なお、使用したプライマーの設計は同領域の外側のセンス側24bp、およびアンチセンス側の25bpとした。PCR反応液は、テンプレートDNA (100ng)、各プライマー (1pmol/ $\mu$ l) (プライマーI: 5'-AGGACTATCAAAG-GAGAAGCTCTA-3', プライマーII: 5'-GTACATGCTTATTATTCATGGGGCA-3'), dNTP mix. (各1.25mM), reaction buffer (1mM Tris/HCl pH8.3, 5mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02% NP-40) (宝酒造), Taq DNA polymerase (2.5unit) (宝酒造) を含む50  $\mu$ lとした。PCR反応は、予備変性を96°Cにて2分間行った後、変性94°C・1分、アニーリング: 62°C・1分、伸長: 72°C・1分30秒の条件で30サイクルにて行い、PCR産物を得た<sup>2)</sup>。

得られたPCR産物を3種類の4塩基認識制限酵素、すなわち、*Aci*I (CCGCを認識) (New England Biolabs, Inc), *Cfr*13I (GGNCCを認識) (宝酒造), および *Mse*I (TTAAを認識) (New England Biolabs, Inc) で切断した。制限酵素切断パターンは、酵素処理後の試料を10%および12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離し、エチジウムブロマイ

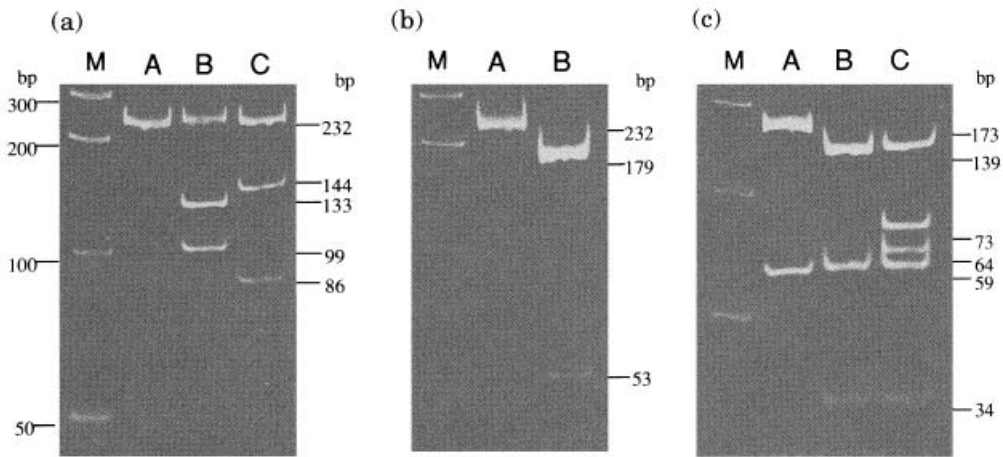


Fig. 1 RFLP patterns of horse mtDNA D-loop region using three restriction enzymes. (a) The *AcilI* RFLP patterns. (b) The *Cfr13I* RFLP patterns. (c) The *MseI* RFLP patterns.

A, B and C indicate different RFLP patterns.

M is size-maker. A, B and C in the *AcilI* patterns, and, A and B in the *Cfr13I* and *MseI* patterns reported previously in Thoroughbred and other breeds by Ishida et al.<sup>2)</sup>

C in the *MseI* RFLP patterns was newly found in the Kiso native horses in the present study.

ド染色後，透過型紫外線ランプを用いて観察した。

## 結 果

### 1. 木曽馬における mtDNA D-loop 領域の PCR-RFLP 解析

図1に，木曽馬ならびに石田ら<sup>2)</sup>によって報告されたサラブレッドおよびその他の品種における RFLP パターンを示した。表1には，木曽馬13個体の mtDNA D-loop の超可変領域における PCR-RFLP 解析の結果を，サラブレッドおよび他の品種の結果とともに示した。木曽馬においては *AcilI* および *MseI* で，それぞれ2種類の RFLP パターンが検出された。すなわち *AcilI* では，石田ら<sup>2)</sup>の報告しているA型およびC型，*MseI* ではB型と今回新たにC型が見出された。各 RFLP パターンの出現頻度は，*AcilI* : A = 76.9%，*AcilI* : C = 23.1%，*MseI* : B = 69.2% および *MseI* : C = 30.8% であった。なお，*Cfr13I* では調査した木曽馬全てがA型であった。

### 2. mtDNA D-loop の PCR-RFLP パターンの組み合わせによる木曽馬のタイピング

前述の3種類の制限酵素を用いて検出される木曽馬の mtDNA D-loop 領域 (232bp) の RFLP パターンの組み合わせに基づくタイプ分類を表2に示した。木曽馬集団内においては計3つのタイプの mtDNA が確認された。木曽馬においては，タイプ2 (*AcilI*=A, *Cfr13I*=A, *MseI*=B) が69.2%と最も出現頻度が高い。また，*MseI* において新しく検出

Table 1. Numbers and frequencies of RFLP patterns of mtDNA D-loop region.

enzyme	RFLP pattern	Kiso horse		Thoroughbred†		Other breeds†	
		n.	frequency (%)	n.	frequency (%)	n.	frequency (%)
<i>Aci</i> I	A	10	76.9	56	96.6	13	61.9
	B	0	0.0	1	1.7	0	0.0
	C	3	23.1	1	1.7	8	38.1
<i>Cfr</i> 13I	A	13	100.0	57	98.3	21	100.0
	B	0	0.0	1	1.7	0	0.0
<i>Mse</i> I	A	0	0.0	4	6.9	0	0.0
	B	9	69.2	54	93.1	21	100.0
	C	4	30.8	0	0.0	0	0.0
total		13	100	58	100	21	100

† Data from Ishida et al.<sup>2)</sup>

Table 2. Types of mtDNA D-loop region based on the RFLP patterns of three restriction endonucleases.

type	RFLP pattern			Kiso horse		Thoroughbred†		other breeds†	
	<i>Aci</i> I	<i>Cfr</i> 13I	<i>Mse</i> I	n.	frequency (%)	n.	frequency (%)	n.	frequency (%)
1	A	A	A	0	0.0	3	5.2	0	0.0
2	A	A	B	9	69.2	52	89.7	13	61.9
3	A	B	A	0	0.0	1	1.7	0	0.0
4	B	A	B	0	0.0	1	1.7	0	0.0
5	C	A	B	0	0.0	1	1.7	8	38.1
6	A	A	C	1	7.7	0	0.0	0	0.0
7	C	A	C	3	23.1	0	0.0	0	0.0
total				13	100	58	100	21	100

† Data from Ishida et al.<sup>2)</sup>

されたC型により、これまで他の品種において検出されていないタイプ（タイプ6、7と命名）が見出され、出現頻度はそれぞれ、7.7%、23.1%であった。

## 考 察

今回得られた、木曾馬13頭における mtDNA D-loop 領域の PCR-RFLP パターンを、石田ら<sup>2)</sup>の報告であるサラブレッド58頭およびその他の品種（日本在来種4頭、重種5頭、ポニー8頭、中半種4頭）21頭について集計したデータと比較した。

すなわち、表1に示したように、*Aci*Iおよび*Cfr*13IによるRFLPパターンは、サラブレッド種よりもむしろサラブレッド種を除く他の品種に近い結果であった。*Mse*Iにおいては、今回新たにC型が認められたため、サラブレッドおよび他の品種のいずれとも異なる結

果となった。このC型は、図1-(C)のB型の約140bpのフラグメント内に点突然変異が起り、新たな *MseI* 認識配列が生じ、B型に75および65bpの長さのフラグメントが加わってC型となる可能性が考えられる。つまり、C型はB型の約140bpのフラグメント内に *MseI* 認識配列のある mtDNA と、同じ部位に *MseI* 認識配列のない mtDNA が同時に存在するヘテロプラスミー<sup>6)</sup>であることが示唆された。また、このC型は木曾馬に特徴的な RFLP パターンである可能性が考えられた。

表2に示した mtDNA の RFLP パターンの組み合わせに基づくタイプについても、*MseI* のC型を含むタイプ6およびタイプ7の mtDNA は、それぞれタイプ2と5より点突然変異によって生じたものと推察された。また、上述のようにC型が木曾馬に特徴的な RFLP パターンであると考え、タイプ6、7は木曾馬に特異的なタイプである可能性がある。

家畜馬集団はタイプ2と5の2つの大きな集団に分けられる<sup>2)</sup>が木曾馬においても、もとはタイプ2、5の2つの集団があり、在来馬集団として維持されてきた間にタイプ6、7が生じたと推察される。

以上の結果から、mtDNA D-loop 領域の多型性を指標とし、木曾馬の遺伝子構成について調査したところ、木曾馬に特異的な mtDNA のタイプが確認され、日本在来馬の一品種としての品種特性保持の可能性が示唆された。しかし、今回指標とした mtDNA は、基本的には母性遺伝をするため、雄の遺伝的影響を考慮できないことや、比較検討を行った個体数が少ないことなどから、今後、他の DNA 領域やその他の品種についての調査やデータ解析を進めることにより木曾馬の特徴を明らかにすることができるとともに、家畜馬における各品種の系統関係を調査する上でも有効であると考えた。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、血液の採取に御協力いただいた名鉄木曾馬牧場の関係各位、および、終始御指導いただいた日本中央競馬会競走馬総合研究所の皆様に、深甚なる感謝の意を表します。

## 要 約

木曾馬13頭の血液よりミトコンドリア DNA (mtDNA) を精製し、D-loop 領域を PCR 増幅した後、制限酵素処理することにより多型性の検出を試みた (PCR-RFLP)。すなわち、3種類の制限酵素 *AciI*、*Cfr13I* および *MseI* による RFLP パターンをポリアクリルアミドゲル電気泳動により検出し、その出現頻度をサラブレッド種とその他の品種で報告されている結果と比較した。

*AciI* と *MseI* では、それぞれ2つのタイプの RFLP が見出され、このうち *MseI* におけるC型はこれまで他の品種では認められていない新しい RFLP パターンであった。*Cfr13I* においては多型は認められなかった。これらの RFLP パターンの出現頻度は、*AciI* でA型.0.769、C型.0.231、*MseI* でB型.0.692、C型.0.308であった。

木曾馬の mtDNA D-loop 領域の PCR-RFLP 解析の結果は、全体的にサラブレッドより

もそれ以外の品種における結果とより類似した傾向を示した。

キーワード：木曾馬, mtDNA, PCR-RFLP

## 引用文献

- 1) 野澤 謙・庄武孝義, 日本在来馬の類型化, 日本在来馬—その保存と活用—, pp155-195, 日本馬事協会, 1984.
- 2) 石田信繁・長谷川晃久・坂上正行・向山明孝・真島 傑・廣田桂一, PCR-RFLP法を用いたウマ mtDNA D-loop region における多型解析, DNA 多型, **2**, pp173-177, 1994.
- 3) Fujinaga K., Rankin A., Yamazaki H., Sekikawa K., Bragdon J. & Green M. RD114 virus: Analysis of viral gene sequences in feline and human cells by DNA-DNA reassociation kinetics and RNA-DNA hybridization. *Virology*, **56**, 484-495, 1973.
- 4) Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Schare S. J., Higuti R., Hoen G. T., Mullis K. B. & Erlich H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491, 1988.
- 5) Ishida N., Hasegawa T., Takeda K., Sakagami M., Onishi A., Inumaru S., Komatsu M. & Mukoyama H. Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA. *Animal Genetics*, **25**, 215-221, 1994.
- 6) Hoelzel A. R. Evolution by DNA turnover in the control region of vertebrate mitochondrial DNA. *Current Opinion in Genetics and Development*, **3**, 891-895, 1993.