

原著論文

群馬県に生息するニホンイノシシのmtDNA D-loop領域 およびGPIP遺伝子の多型解析

高橋遼平¹・石黒直隆²・姉崎智子³・本郷一美¹

¹総合研究大学院大学 先導科学研究科 生命共生体進化学専攻：

〒240-0193神奈川県三浦郡葉山町（湘南国際村）

(takahashi_ryouhei@soken.ac.jp)

²岐阜大学 応用生物科学部 獣医学課程 食品・環境衛生学研究室：〒501-1193岐阜県岐阜市柳戸1-1

³群馬県立自然史博物館：〒370-2345群馬県富岡市上黒岩1674-1

要旨：群馬県に生息するニホンイノシシ (*Sus scrofa leucomystax*) 39個体から得られたDNA試料を用いて分子系統学的解析を行った。解析にはミトコンドリアDNA (mtDNA) D-loop領域及びGlucosephosphate isomerase-processed pseudogene (*GPIP* 遺伝子) の塩基配列を用いた。*GPIP* 遺伝子の解析でアジア型の遺伝子型のみが検出された一方、mtDNAの解析では群馬県に生息するニホンイノシシのうち3個体からヨーロッパ型ハプロタイプを検出した。これらの結果から、過去に群馬県に生息するニホンイノシシ集団に欧米家畜ブタ品種からの遺伝子流入が生じた可能性が示唆された。

キーワード：ニホンイノシシ, イノブタ, mtDNA, *GPIP* 遺伝子

Analysis of polymorphisms at mtDNA D-loop region and *GPIP* of the Japanese wild boar in Gunma prefecture.

TAKAHASHI Ryohei¹, ISHIGURO Naotaka²,

ANEZAKI Tomoko³ and HONGO Hitomi¹

¹ *Department of Evolutionary Studies of Biosystems, School of Advanced Sciences,
The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI) :*

Shonan Village, Hayama, Miura-gun, Kanagawa, 240-0193, Japan

² *Laboratory of Food and Environmental Hygiene, Veterinary Medicine,
Faculty of Applied Biological Science, Gifu University :*

1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan

³ *Gunma Museum of Natural History :*

1674-1 Kamikuroiwa, Tomioka, Gunma, 370-2345, Japan

Abstract : We extracted DNAs from 39 Japanese wild boars (*Sus scrofa leucomystax*) from Gunma prefecture and examined the phylogenetic relationship of these samples with other Japanese wild boar, Ryukyu wild boar (*S. s. riukiuanus*), and domestic pig breeds, using nucleotide sequences. Mitochondrial(mt)DNA D-loop region and Glucosephosphate isomerase-processed pseudogene (*GPIP*) nucleotide sequences were used in the analysis. A single European haplotype is detected from the analysis of mtDNA. But, an analysis of *GPIP* reveals that all samples have Asian types. From these results, we suggest that the gene flow could have taken place from Euro - American pigs to Japanese wild boars.

Key Words : Japanese wild boar, Inobuta, mtDNA, *GPIP*

はじめに

本研究では、群馬県に生息するニホンイノシシ39個体を分子系統学的に解析した。目的は野生のニホンイノシシに欧米家畜ブタ品種や、ニホンイノシシと欧米家畜ブタ品種との交配種であるイノブタの影響が生じているか否かを検討する事である。解析にはmtDNA D-loop領域とGPIP遺伝子のDNAマーカーを用いた。

mtDNAは細胞小器官であるミトコンドリアに存在するDNAであり、母性遺伝 (Hutchison *et al.*, 1974, Giles *et al.*, 1980) や塩基の変異の速さ (Brown *et al.*, 1979) から分子系統学的研究に活用されている。特にD-loop領域はタンパク質をコードしないために塩基の変異が蓄積しやすく、家畜動物の起源を探る研究に多用されている (Dobney and Larson, 2006)。これは家畜ブタやイノシシについても同様である。Okumura *et al.* (2001) は、世界の家畜ブタとイノシシが分子系統学的にアジア型 (A) とヨーロッパ型 (B) に大別される事をmtDNA D-loop領域を用いて示した (図1)。同様の結果を示す多数の先行研究から、現在ではユーラシア大陸の東部と西部の少なくとも2か所でイノシシの家畜化が生じた事が支持されている (e.g. Giuffra *et al.*, 2000)。さらに、近年ではより多くの地域でイノシシの家畜化が生じた可能性も指摘されている (Larson *et al.*, 2005)。本研究で対象とするニホンイノシシはアジア型に属すが、現在日本に流通する家畜ブタの多くは欧米家畜ブタ品種を利用した交雑ブタである。欧米家畜ブタ品種は、

東アジア家畜ブタ品種との交配の結果アジア型ハプロタイプを持つ個体も存在する (Fang and Andersson, 2006)。しかし基本的にはヨーロッパ型に属する事が知られている (図1)。これに加え1960年代後半から80年代にかけて盛んに飼育されたイノブタの作出は、欧米家畜ブタ品種のメスとニホンイノシシのオスを交配するのが一般的である (松岡ほか, 1987)。これらから、もし過去に欧米家畜ブタ品種やイノブタのメスが野生のニホンイノシシと交雑を起していれば、ニホンイノシシの集団内からヨーロッパ型のmtDNAハプロタイプを検出できる可能性がある。

また、mtDNAは母性遺伝であるため、オスからの遺伝子流入を検出する事が不可能である。この問題を解決するため、Ishiguro *et al.* (2002) は核遺伝子であるGPIPを用いた研究を行っている。GPIP遺伝子には数種類の対立遺伝子が存在するが、これらの塩基配列の特徴により、世界の家畜ブタとイノシシをアジア型とヨーロッパ型に大別できる事が報告されている (Giuffra *et al.*, 2000; Ishiguro *et al.*, 2002)。本研究ではこの配列特異性を利用し、本来アジア型であるべきニホンイノシシからヨーロッパ型の対立遺伝子が検出されるかどうか検討した。

試料と手法

使用したイノシシ試料

解析に使用したイノシシ試料の採取地及び性別は以下に続く遺伝子型の検出結果と併せ、表1に示した。

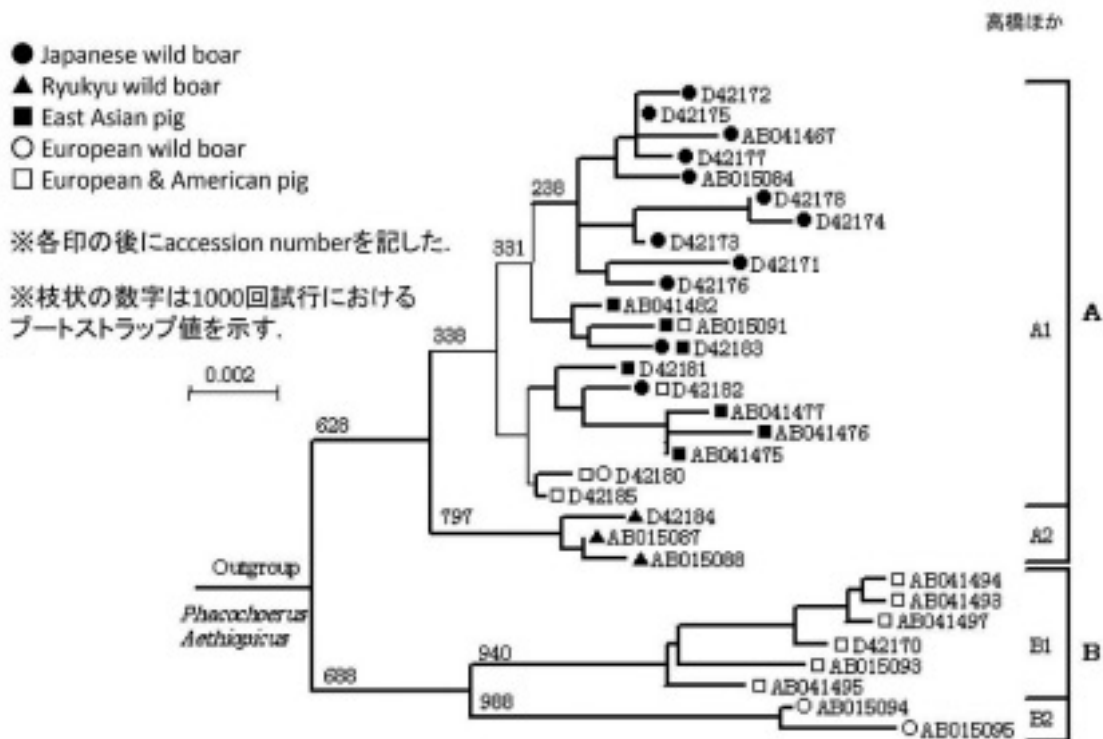


図1 世界の家畜ブタ、イノシシのmtDNA D-loop領域を用いたNJ系統樹。Okumura *et al.* (2001) を改変

DNAの抽出作業

0.5 g 前後のニホンイノシシの肉片を液体窒素で凍結し、乳鉢を用いて粉末状にした。20mM TrisHCl (pH7.5), 20mM EDTA, 0.5% SDSからなる細胞分離用Bufferを粉末サンプル100mgに対し1.2ml加えた。これに100 μ g/mlの濃度になるようにProteinase Kを加え、37 $^{\circ}$ Cで16時間振とうする事でタンパク質を分解した。タンパク質分解後の溶液に等量のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1) を加え転倒混和し、室温にて遠心分離を1700 \times gで10分間行った。フェノール層を除去した溶液に等量のクロロホルム・イソアミルアルコール (24:1) を加え同条件で遠心分離を行った。分離されたDNAを含む上清を採取し、その1/2量の3M酢酸ナトリウムを加えた。さらに溶液の2倍量の99.5%エタノールを加えて転倒混和後に遠心分離を行い、DNAを析出させた。70%エタノールにて塩を除去した後にエタノールを揮発させ、組織100mgあたり50 μ lのTEによってDNAを溶解した。

mtDNA D-loop領域の解析

抽出されたDNAよりpolymerase chain reaction (PCR) 法にてmtDNA D-loop領域を増幅した。プライマーにはmit112 (5'-GCGCACAAACATACAAATATGCG) とmit1214 (5'-ACGCACGTTATGTCCCGTA) を使用し、563-564bpを増幅した。PCR条件は、94 $^{\circ}$ Cで1分間の加熱後に、熱変性94 $^{\circ}$ C 30秒、アニーリング63 $^{\circ}$ C 30秒、伸長反応72 $^{\circ}$ C 30秒を30サイクル行い、最終伸長反応は72 $^{\circ}$ C 5分間とした。PCR産物中の過剰プライマーをExoSAP-IT (USB Corporation) により除去した後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 4を用いて近隣結合 (NJ) 法により解析を行った。解析にはデータベースに登録されている家畜ブタ、イノシシの塩基配列情報を加えた。また解析時に比較するサイトはpairwise deletionにより決定した。本研究で用いる領域内の塩基置換の程度は1%前後と小さいため、塩基置換の補正は行わずp-distanceを用いてNJ系統樹を作成した。さらに、統計学的有意性を検証するためにBootstrap法 (1000回繰り返し) を用いた。この際、外群にはイボイノシシ (AB046876) を用いた。

GPIP 遺伝子の解析

抽出されたDNAからPCR法にてGPIP遺伝子を増幅した。プライマーにはGiuffra *et al.* (2000) からGPIP1 (5'-TGCAGTTGAGAAGGACTTTACTT) とGPIP4 (5'-GTATCCCAGATGATGTCATGAAT) を使用し668bpを増幅した。PCRはアニーリング温度を58 $^{\circ}$ Cに変更した点を除き、前述のmtDNA D-loop領域と同条件で行った。ExoSAP-ITによるPCR産物の精製後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、それらの対立遺伝子をア

表1 解析に用いたニホンイノシシ試料の情報及び解析結果

試料番号 ^{※1} (受入No.)	雌雄	採取地域	mitDNA (Gunma -)	GPIP 遺伝子型
VM07-37-2	male	桐生	E	GPIP ⁺ ² /GPIP ⁺ ²
VM07-45	female	甘楽町	A	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM07-50	female	松井田	E	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM07-54	female	松井田	E	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM07-53	male	松井田	D	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-09	female	東吾妻	B	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ^{2a}
VM08-10	female	高山村	B	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-32	female	甘楽町	A	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-36	female	中之条	B	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-37	female	東吾妻	B	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-38	female	東吾妻	A	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-39	female	東吾妻	B	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-46	female	松井田	D	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ^{2a}
VM08-70	female	松井田	D	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ^{2a}
VM08-81	female	高山村	A	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-82	female	中之条	A	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-83	female	中之条	B	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-105	female	中之条	A	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ²
VM08-106	female	東吾妻	B	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-111	female	東吾妻	F	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ^{2a}
VM08-112	female	東吾妻	B	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-127	female	中之条	A	GPIP ⁺ ² /GPIP ⁺ ²
VM08-128	female	中之条	A	GPIP ⁺ ² /GPIP ⁺ ^{2a}
VM08-129	female	東吾妻	A	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ^{2a}
VM08-130	female	東吾妻	A	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-138	female	東吾妻	B	GPIP ⁺ ² /GPIP ⁺ ²
VM08-139	female	東吾妻	A	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-140	female	東吾妻	A	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ²
VM08-141	female	東吾妻	A	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-142	female	東吾妻	F	^{2a}
VM08-146	male	妙義	C	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-184	female	中之条	A	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-185	female	高山村	A	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-186	female	東吾妻	F ^{2a}	GPIP ⁺ ¹ /J ^{2a}
VM08-202	female	桐生	D	GPIP ⁺ ² /GPIP ⁺ ^{2a}
VM08-209	female	東吾妻	A	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-210	female	高山村	A	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ²
VM08-211	female	高山村	A	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹
VM08-212	female	高山村	A	GPIP ⁺ ¹ /GPIP ⁺ ¹

※1…群馬県立自然史博物館における試料番号を示した。

※2…他試料よりも分析配列長が短い。

※3…解析に必要な十分な配列長が得られなかった。

ジア型とヨーロッパ型に分類した。ただし、遺伝子型がヘテロ (異型接合体) であった個体については、TOPO[®]R TAクローニングキット (Life Technologies Japan Ltd.) を用いてそれぞれの対立遺伝子の配列を決定した。これと同時に、マルコフ連鎖モンテカルロ法 (MCMC) をアルゴリズムに使用し、集団の遺伝子型情報からヘテロ個体のハプロタイプを推定するソフトウェア「PHASE version2.1」 (Stephens *et al.*, 2001; Stephens and Donnelly, 2003) による解析も行った。なお、解析の際の初期値設定はソフトウェアのデフォルト設定に従った。

表2 本研究で使用した塩基配列データ上の変異

Population, breed	Haplotype strand	Accession No.	Nucleotide positions																												
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
Japanese wild boar	Gunma A		A	A	T	T	A	C	G	T	C	T	A	T	C	G	A	T	C	G	A	T	C	G	A	T	C	G	A	T	
	Gunma B		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
	Gunma C		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
	Gunma D(W99)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
	Gunma E(L10)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
	J1(O42173)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
	J3(AB05322)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
	J3(AB300293)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	J4(D42178)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
	J5(AB015095)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
J6(D42171)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
J7(AB015096)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
J8(AB300194)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
J8(D42176)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
J12(AB300281)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
J16(AB015064)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
J17(AB071706)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
J18(AB071707)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
J18(AB188576)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
J20(AB188577)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
J21(AB382179)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
J22(AB382180)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
J23(AB382181)		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Ryukyu wild boar		A	A	T	T	A	C	G	T	C	T	A	T	C	G	A	T	C	G	A	T	C	G	A	T	C	G	A	T	C	G
AB015087		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
AB015088		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
D42184		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Japan satsuma		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
China lixiu black		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Ocruwa native pig		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Taoyuan		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
S.s.taiwanensis		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
korean wild boar		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Thai indigeneous pig		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
FMQ44473		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Japanese wild boar		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Large white		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Duroc		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
spanish wild boar		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Wardshog		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
AB046375		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G

亜種名や品種等はデータベースに登録されているものを優先して記載した。「・」はGunma Aの塩基配列と同様である事を、「-」は塩基の挿入・欠損を示す。本表の1番塩基座位はOkumura *et al.* (2001) のFigure 1のNucleotide position No.131に相当する。

結 果

1. mtDNA D-loop領域の解析

塩基配列の決定を行った39個体のうち38個体の解析を行った。この他、VM08-186は他個体よりも決定された塩基配列が短かった (539bp)。このため、本試料については別のデータセットとして解析を行った。

1-1. 群馬県に生息するニホンイノシシについて

群馬県に生息するニホンイノシシ38個体から6つのハプロタイプが検出され、それぞれGunma A (18個体)、Gunma B (10個体)、Gunma C (1個体)、Gunma D (4個体)、Gunma E (3個体)、Gunma F (2個体)とした (表1)。検出された塩基の変異は、後述の解析結果と共に本論文末の表2に示した。また、VM08-186の解析領域は他個体よりも25bp短かったため、前述の38個体をこの配列長に合わせた後に再度解析を行った。この不足領域には少なくとも3塩基の変異が存在すると考えられるが、これを除いた多型パターンからVM08-186がGunma Fに含まれる可能性が示唆された (表2)。

1-2. データベース由来のニホンイノシシとの比較

ハプロタイプGunma A からGunma Fに、データベース由来で来歴が明らかであるニホンイノシシの塩基配列情報全て (102個体, 20ハプロタイプ) を加えて解析を行った。塩基配列情報の取得にはNational Center for Biotechnology Information (NCBI) を利用した。使用ハプロタイプと検出された塩基変異は表2に示した。解析の結果、Gunma Dはデータベースに登録されているニホンイノシシ (AB066101, M56) と、そしてGunma EはWatanobe *et al.* (2003) で示されるハプロタイプJ10と同一であった。その他は本解析で新たに検出したハプロタイプであった。

1-3. 世界の家畜ブタ、イノシシのmtDNA D-loop領域との塩基配列比較

これまでに用いた塩基配列情報に、データベース由来の世界各地の家畜ブタとイノシシの塩基配列情報を加えて解析を行った。検出された塩基変異は表2に示した。本解析により作成された系統樹を図2に示した。系統樹から、Gunma AからGunma Eは東・東南アジアの家畜ブタ品種・イノシシからなるクラスターに属する事が判明した。またGunma Fは欧米の家畜ブタ品種とヨーロッパイノシシからなるクラスターに属する事も同時に明らかとなった。

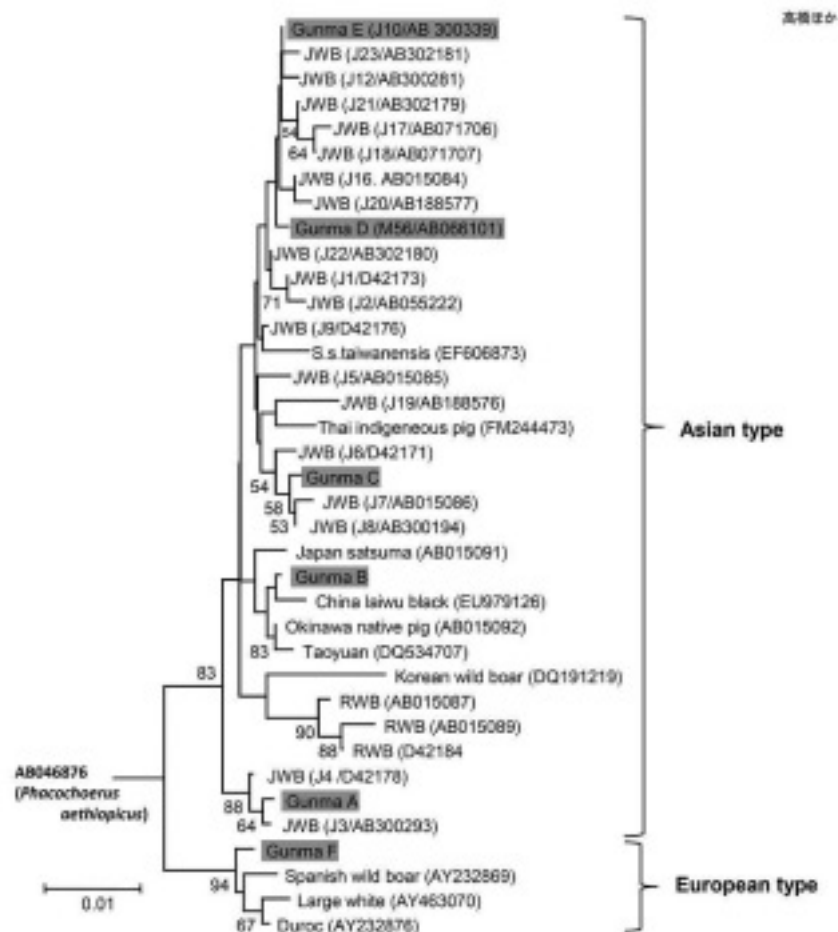


図2 群馬県に生息するニホンイノシシ及び世界のSus属のmtDNA塩基配列情報を用いたNJ系統樹

枝上の数字はブートストラップ値 (%) を示す (1000回繰り返す)。カッコ内にはハプロタイプ情報を示した (先行研究でのハプロタイプ名/ accession No.)。JWBはニホンイノシシを、RWBはりゅうきゅういノシシ (*S. s. riukiuanus*) を示す。

2. GPII 遺伝子の解析

39個体のうち37個体の解析が完了した。この他、VM08-142とVM08-186の2個体は本解析に必要な配列長を得る事ができなかった。

2-1. 対立遺伝子と遺伝子型の決定

Ishiguro *et al.* (2002) に従い、各対立遺伝子を分類した結果、群馬県に生息するニホンイノシシから検出された対立遺伝子はアジア型のみであり、ヨーロッパ型の対立遺伝子

(*GPII*4*, *GPII*4a*) は検出されなかった (表3)。なお、本研究で検出された各個体の遺伝子型は表1に示した。また、VM08-186は配列長が不十分ながらも *GPII*1* を保持している可能性が高い事が確認された。本研究ではヘテロ個体からの対立遺伝子の単離に大腸菌を用いたTAクローニング法を用いると同時に、ソフトウェア「PHASE version2.1」によっても解析を行った。この結果、どちらの手法でも同様の結果を得る事ができた。

表3 GPII 遺伝子における塩基置換及び本研究で検出した対立遺伝子情報

		Nucleotide positions ²²										Allele frequencies
		1	1	1	1	2	3	3	3	4		
Allele ²¹		0	1	4	5	4	1	1	3	6		
		5	2	9	7	0	2	3	9	8		
Asian type	<i>GPII*1</i>	G	G	G	C	A	G	A	C	C	0.76	
	<i>GPII*3</i>	A	T	T	.	.	0.15	
	<i>GPII*3a</i>	A	A	.	.	.	T	T	.	.	0.09	
European type	<i>GPII*4</i>	A	.	A	.	G	C	T	T	A	-	
	<i>GPII*4a</i>	A	.	A	T	G	C	T	T	.	-	

※1…対立遺伝子名 (Allele) はIshiguro *et al.* (2002) に準拠した。「 \cdot 」は *GPII*1* と塩基が同じであることを示す。

※2…本研究の105番塩基座位はIshiguro *et al.* (2002) のTable 2のNucleotide position No.181に相当する。なお468番塩基座位は先行研究で扱われておらず、*GPII*4a*における本塩基座位の確認ができなかったが、*GPII*4*についてはデータベース由来の参考配列 (AF181961) により確認する事ができた。

考 察

本研究では群馬県に生息するイノシシについてmtDNA D-loop領域及び *GPII* 遺伝子の解析を行った。解析の結果、東吾妻由来のニホンイノシシ3個体からヨーロッパ型のmtDNAハプロタイプを検出した (図3)。世界の家畜ブタ、イノシシのmtDNAの系統は大きくアジア型とヨーロッパ型に区別できるが、ニホンイノシシはアジア型のタイプを保持する事が知られている。この事からも、過去において群馬県に生息するニホンイノシシ集団に、欧米家畜ブタ品種を由来とする個体からの遺伝子流入が生じた可能性は否定できない。この要因の1つとして、1960年代後半から80年代にかけて盛んに飼育されたイノブタが挙げられる。飼育されたイノブタが逃走し再野生化した可能性はこれまでも指摘されている (朝日新聞, 1992, 読売新聞, 2008)。イノブタの作出は欧米家畜ブタ品種のメスとニホンイノシシのオス間での交配が一般的である。イノブタ作出に用いられた欧米家畜ブタ品種がヨーロッパ型のハプロタイプを有していた場合、イノブタのメスとニホンイノシシのオスが交雑すれば、次世代の個体にメス親由来のヨーロッパ型のmtDNAが受け継がれる。さらに、生まれた個体にメスが存在すればその子孫もこれを受け継ぐ事になる。また農家から逃走した家畜ブタのメスとニホンイノシシのオスの交雑が遺伝子流入の要因である可能性も存在する。 *GPII* 遺伝子の解析ではDNA増幅に成功した全個体がアジア型

の対立遺伝子を有していた (図4)。常染色体上に存在する核DNAは、次世代へオスとメスからその半分ずつが受け継がれる。mtDNAの解析でヨーロッパ型のハプロタイプが検出されたVM08-111は、交雑過程においてヨーロッパ型の対立遺伝子である *GPII*4* か *GPII*4a* が残らなかった個体であると推察された。

イノシシの移動に関しては、栃木県南西部の足利市に生息するイノシシが、隣接する群馬県から進入した、あるいは人為的に放逐された集団である可能性が指摘されている (永田ほか, 2006)。この根拠として、明治30年前後に発生した豚コレラにより栃木県南西部の多くのイノシシ集団が絶滅した事、mtDNAの解析により足利市のイノシシから栃木県内では検出されていないハプロタイプが検出された事が挙げられている。このハプロタイプはWatanobe *et al.* (2003) においてハプロタイプJ12 (以後J12と省略) と呼ばれており、隣接する群馬県では低頻度で確認されている (Watanobe *et al.*, 2003)。しかしながら、集団の移動の有無やその経路については慎重に判断する必要がある。永田ほか (2006) で解析された足利市のニホンイノシシは7個体に留まっており、足利市に生息するニホンイノシシ全体のハプロタイプ頻度を示しているとは断定できない。また、群馬県に低頻度 (1個体/37個体) で確認され、栃木県内では検出例のないハプロタイプJ12は地域特異的ではなく日本の広範囲に分布するハプロタイプである。これまでの研究で、J12は群馬県や栃木県以外に四国地方や五島列島、

静岡県でも確認されている (Watanobe *et al.*, 2003, 石黒, 2004). このため, 今後解析対象地域および試料数を増加させる事でJ12の自然分布状況を把握する必要がある. 同様の理由からJ12に関して放逐の可能性を検討する場合は, 人為的なニホンイノシシの移動について全国レベルで検討する必要がある.

また本研究ではGunma Eというハプロタイプを桐生市の個体から検出した. これはWatanobe *et al.* (2003) におけるハプロタイプJ10 (以後J10と省略) と同一であり, これまで群馬県では未確認であった. J10は関東平野東部において高頻度で検出されているが, 今回分析した群馬県東部の試料数は非常に少ないためその自然分布域については不

明である. これについては早急に追加分析を行っていく必要がある.

本研究では遺伝子型がヘテロであった個体のハプロタイプ決定に, TAクローニングとソフトウェア「PHASE version2.1」を用いた. どちらの手法でも同一の結果を得る事ができたため, 今後は「PHASE」のみを使用する事でTAクローニングの手間を省き, 作業の効率化を図る事が可能と考えられる. ただし, 「PHASE」により得られる結果の信頼性を上げるために, 組み換えのない領域の決定や, 低頻度で出現が推定されたハプロタイプの確認を, 追加試料による実験で検証していく必要がある.

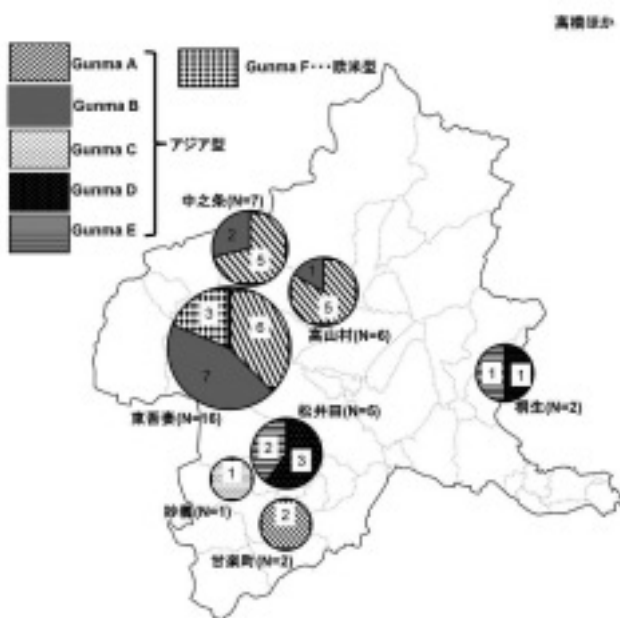


図3 mtDNA D-loop領域の解析結果

白地図は市町村変遷パラパラ地図 2009年4月1版を使用 (Copyright©エイチャ2004-).



図4 GPII遺伝子の解析結果

白地図は市町村変遷パラパラ地図 2009年4月1版を使用 (Copyright©エイチャ2004-).

謝 辞

本研究は「平成20年度新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」及び「平成19年度先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」の一環として行われたものである. 配列解析にあたっては, 颯田葉子教授 (総合研究大学院大学) に御助言いただいた. 記して深く御礼申し上げます.

引用文献

- 朝日新聞社 (1992): イノブタが野生化? 移植した植物掘り返す桐生の山間部. 朝日新聞, 9月23日.
- Brown, W.M., George, M. Jr., Wilson, A. C. (1979): Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76 (4): 1967-1971.

- Dobney, K. and Larson, G. (2006): Genetics and animal domestication: new windows on an elusive process. *Journal of Zoology*, 269 : 261-271.
- Fang, M., and Andersson, L. (2006): Mitochondrial diversity in European and Chinese pigs is consistent with population expansions that occurred prior to domestication. *Proceedings of the Royal Society B*, 273 : 1803-1810.
- Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M., Wallace, D., C. (1980): Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77 (11): 6715-6719.
- Giuffra, E., Kijas, J.M.H., Amarger, V., Carlborg, Ö., Jeon, J.-T., Andersson, L. (2000): The Origin of the Domestic Pig: Independent Domestication and Subsequent Introgression. *Genetics*, 154 : 1785-1791.
- Hutchison, C.A., Newbold, J.E., Potter, S.S., Hall Edgell, M. (1974): Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, 251 : 536-538.
- Ishiguro, N., Naya, Y., Horiuchi, M., Shinagawa, M. (2002): A Genetic

- Method to Distinguish Crossbred Inobuta from Japanese Wild Boars. *Zoological Science*, 19 : 1313-1319.
- 石黒直隆(2004)：四国4県に生息するイノシシのDNA解析. 四国4県連携施策イノシシ生息実態調査 DNA解析業務 調査報告書. 財団法人自然環境研究センター, p.3-18.
- Larson, G., Dobney, K., Albarella, U., Fang, M., Matisoo-Smith, E., Robins, J., Lowden, S., Finlayson, H., Brand, T., Willerslev, E., Rowley-Conwy, P., Andersson, L., Cooper, A. (2005): Worldwide Phylogeography of Wild Boar Reveals Multiple Centers of Pig Domestication. *Science*, 307 : 1618-1621.
- 松岡昭善・鈴木伸一・池田周平(1987)：イノブタの肉質に関する研究. 日本養豚学会誌, 24(1) : 7-12.
- 永田純子・丸山哲也・浅田正彦・落合啓二・山崎晃司・山田文雄・川路則友・安田雅俊(2006)：栃木県および近隣県におけるイノシシの遺伝学的特徴. 野生鳥獣研究紀要, 32 : 58-62.
- Okumura, N., Kurosawa, Y., Kobayashi, E., Watanobe, T., Ishiguro, N., Yasue, H., Mitsuhashi, T. (2001): Genetic relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in wild boars and several breeds of domesticated pigs. *Animal Genetics*, 32 : 139-147.
- Stephens, M., Smith, N.J., Donnelly, P. (2001): A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, 68 : 978-989.
- Stephens, M., Donnelly, P. (2003): A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction. *American Journal of Human Genetics*, 73 : 1162-1169.
- Watanobe, T., Ishiguro, N., Nakano M. (2003): Phylogeography and Population Structure of the Japanese Wild Boar *Sus scrofa leucomystax*: Mitochondrial DNA Variaton. *Zoological Science*, 20 : 1477-1489.
- 読売新聞社(2008)：イノブタ逃走中 前橋の農家から. 読売新聞, 6月28日.