

ミトコンドリア DNA 多型から見た黒毛和種と 本学ホルスタイン種集団の遺伝的多様性

清野孝二¹⁾・泉賢一²⁾・新名正勝³⁾・上田純治⁴⁾

Phylogenetic and polymorphic analyses for mtDNA of Holstein and Japanese Black cattle

Koji SEINO, Kenichi IZUMI, Masakatsu NIINA and Junji UEDA
(Accepted 24 July 2009)

序 文

世界の家畜牛は、形態学的な研究と分子生物学的な研究から肩峰の有する *Bos indicus* と肩峰の有しない *Bos taurus* に分類されている (Manwellら 1980; Loftusら 1994a, 1994b; MacHughら 1997; Payneら 1998)。 *Bos taurus* はミトコンドリア DNA (mtDNA) の多型解析によって、アフリカタイプ (T1), 近東アジアタイプ (T2), ヨーロッパタイプ (T3), 北東アジアタイプ (T4) の4つの主要なハプロタイプに大別され、それぞれのハプロタイプは地理的に異なる頻度分布をしていることが判明している (Andersonら 1982; Bradleyら 1996; Troyら 2001; Mannenら 2004)。特に、T1タイプ及びT4タイプは、東アジアとヨーロッパのウシではほとんど観察されないことから、アフリカと北東アジアで独自のウシの家畜化が行われていたのではないかとされている (Troyら 2001)。また、 *Bos indicus* は、中国の在来牛において、同様な mtDNA の多型解析から、2つのハプロタイプ、I1とI2が見出されている。I1は中国の *Bos indicus* の主要なハプロタイプと考えられ地理的にも広く分布し、I2は中国の南部と南東部のみで観察されている。このことから、I2はインド牛由来のハプロタイプではないかとされている (Laiら 2006)。さらに、既に絶滅したオーロックス (*Bos primigenius*: 原牛) の

mtDNA の塩基配列も、遺跡より発掘された骨の標本から D-loop 領域の一部の塩基配列が明らかになり (Troyら 2001)、この Pタイプが *Bos taurus* にも存在することからオーロックスも家畜化に寄与したものと考えられている (Achilliら 2008)。

これまで、日本における mtDNA 多型を用いたウシの系統解析の研究では、Tsujiら (2004) が日本のホルスタイン種と北アメリカのホルスタインフリージアン種について、D-loop 領域の塩基配列の多型を解析し、アメリカでは見られないハプロタイプのものであるが、日本では 18.3%存在したと報告している。Mannenら (2004) も黒毛和種の mtDNA タイプについて調べた結果、T1, T2, T3タイプのいずれも見られたが、T4タイプが最も多く存在していたことを報告している。しかし、その詳細な mtDNA 多型の遺伝的多様性については十分に調べられていない。

本研究では、本学に飼養されるホルスタイン種について、mtDNA 多型からその母方系統の遺伝的な特徴を明らかにすること、また、日本在来種である黒毛和種について mtDNA 多型を調べ、その遺伝的多様性の詳細を明らかにすることを目的とした。さらに、遺伝的な情報量が多いとされている D-loop 領域の塩基配列の多型とそれ以外の残りのコード領域との多型の程度を調べ、今後の研究に資するための比較検討も行った。

¹⁾ 2008年度酪農学園大学大学院酪農学研究科酪農学専攻修士課程修了生

Animal Breeding and Genetics, Graduate School of Dairy Science, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

²⁾ 酪農学園大学附属農場ルミノロジー研究室

Ruminology, Research Farm, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

³⁾ 酪農学園大学酪農学部実践酪農学研究室

Practical Dairy Production, Department of Dairy Science, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

⁴⁾ 酪農学園大学短期大学部酪農学科家畜遺伝学研究室

Animal Genetics, Department of Dairy Science, Rakuno Gakuen University Dairy Science Institute, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

材料と方法

供試動物

供試動物には本学附属農場で飼育されているホルスタイン種 68 頭, 家畜改良センター十勝牧場で飼育されている黒毛和種 2 頭及び日本短角種 1 頭, 屠場由来の血統の明らかな黒毛和種 21 頭を用いた。mtDNA D-loop (910 bp) の解析では, 比較対照として GenBank に登録されている各地方の品種, ヨーロッパ 13 頭, アフリカ系 8 頭, 近東系 5 頭, インド系 (*Bos indicus*) 3 頭, 中国 1 頭, モンゴル 28 頭, ブータン 3 頭, 韓国 1 頭, 日本の在来種 (黒毛和種) 38 頭の合計 100 頭と *Bos primigenius* 6 頭, また, アウトグループとして *Bison bison* 5 頭のデータを使用した (Table 1)。D-loop 以外のコード領域 (15,428 bp) の解析では, ホルスタイン種 16 頭, 黒毛和種 8 頭の他に比較対照として GenBank に登録されている各地方の品種, ヨーロッパ 1 頭, 日本 7 頭, 韓国 3 頭, アフリカ 6 頭, 近東 6 頭, *Bos indicus* 3 頭の在来種と *Bos primigenius* 1 頭, さらに, アウトグループとして, *Bison bison* 1 頭のデータを使用した (Table 2)。

mtDNA の調製と塩基配列の決定

本学附属農場のホルスタイン種の DNA は血液よ

り調製し得た。すなわち, 全血から白血球を分離後, 常法に従って, プロテナーゼ処理, フェノール・クロロホルム抽出法によって DNA を精製した。また, 黒毛和種では毛根から DNA 抽出 Kit「ISOHAIR」(NIPPONGENE, Tokyo) を用い製品マニュアルに従って DNA の抽出を行った。mtDNA の全長をシーケンスするため, 前半部分と後半部分の 2 つに分け PCR で増幅した。増幅プライマーは, GenBank に登録されているウシの mtDNA の全長 (DQ124418) の塩基配列を参考に, Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) を用いて以下のプライマーを設計した。すなわち, 全長 16338 bp の前半部 8814 bp (tRNA-Pro~COX2) の増幅には, B-mtDNA-F-15682 (5'-TGGTCTTGTAACCCAGAGAAGGA-3') と B-mtDNA-R-8157 (5'-CTCATGTTGACGTGTCTAGTTGC-3') を用いた。後半部 7769 bp (tRNA-Lys~tRNA-Thr) の増幅には, B-mtDNA-F2-7978 (5'-CAAACCACAGTTTCATACCCATT-3') と B-mtDNA-R2-15746 (5'-GACTGCAGTTTCTTCCTTGAGTC-3') を用いた。

PCR 反応は高い正確性を有する PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase (TAKARA, Tokyo) を使用し行った。前半部 mtDNA を増幅する PCR の条

Table 1 Accession number of GenBank used for analysis the D-loop sequence of mtDNA

| Area / Species | No. of sample | Accession Number. |
|-----------------------|---------------|--|
| Europe | 13 | V00654, L27712-3, L27716-9, L27724-7, L27734-5 |
| Near east | 5 | EU177856-60 |
| Africa | 8 | L27714-5, L27720-1, L27728-31 |
| Bhutan | 3 | AB268582-4 |
| Mongol | 28 | AB117060-87 |
| China | 1 | AY998840 |
| Korea | 1 | DQ124389 |
| Japan | 38 | U87633-50, U87893-905, AB074962-8 |
| <i>B. primigenius</i> | 6 | AF336745-8, DQ915524, DQ915537 |
| <i>B. indicus</i> | 3 | L27722, L27732-3 |
| <i>B. bison</i> | 5 | U12936, U12946-9 |

Table 2 Accession number of GenBank used for analysis the coding region of mtDNA

| Area / Species | No. of sample | Accession Number |
|-----------------------|---------------|------------------------------|
| Europe | 1 | V00654 |
| Near east | 1 | EU177852 |
| Africa | 6 | DQ124399, EU177841-5 |
| Korea | 3 | DQ124372, DQ124375, DQ124377 |
| Japan | 7 | AB074962-8 |
| <i>B. primigenius</i> | 1 | DQ124389 |
| <i>B. indicus</i> | 3 | AF492350, NC005971, AY124389 |
| <i>B. bison</i> | 1 | EU177851 |

件は、98°Cで1分30秒の熱変性を1サイクル行った後、熱変性を98°Cで10秒、アニーリングを58°Cで15秒、伸長反応を72°Cで9分行うサイクルを32回繰り返した。

後半部の mtDNA を増幅する PCR 条件は、98°Cで1分30秒の熱変性を1サイクル行い、次に、熱変性を98°Cで10秒、アニーリングを62°Cで5秒、伸長反応を72°Cで8分行うサイクルを32回繰り返す、目的の部位を増幅した。

PCR 終了後、アガロースゲル電気泳動法により増幅産物を分離し、目的のバンドをゲルから切り出してスピカラム法で精製した。この精製 DNA をシーケンスのテンプレートとして使用した。シーケンスは ABI PRISM 310 Genetic Analyzer により、前述の4個の増幅プライマーに加え、最終的に37個のウォーキング専用プライマーを設計し、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, WI) を用い、mtDNA の全長の塩基配列を決定した。

D-loop 領域の塩基配列による系統解析

D-loop の塩基配列データは、Kumar ら (2008) と Tamura ら (2007) によって作成された解析ソフト MEGA4 (<http://www.megasoftware.net/index.html>) を用いて解析した。D-loop の系統解析では、Bradley ら (1996) の方法に従い、塩基置換モデルは Tamura-Nei のモデル (Tamura ら 1993) を用いて、 Γ パラメータを 0.11 に設定し無根近隣結合系統樹 (Saitou ら 1987) を作成した。

D-loop を除くコード領域による系統解析

D-loop 以外のコード領域の塩基配列のデータについても、MEGA4 を用いて解析した。mtDNA 全長を用いた Achilli ら (2008) の方法に従い、コード領域の系統解析では最尤法を用いて、 Γ パラメータを 0.21 に、進化率を 2.043×10^{-8} に設定し無根近隣結合系統樹を作成した。

結 果

mtDNA D-loop の塩基配列による多型解析

酪農学園大学附属農場のホルスタイン種 68 頭の D-loop の塩基配列を調べた結果、合計 17 のハプロタイプが存在した (Table 3)。それぞれのハプロタイプを Troy ら (2001) によって定義されたタイプに分類すると、ホルスタイン種では 15 のハプロタイプの 53 頭がヨーロッパタイプの T3 タイプに、1 頭のハプロタイプが T4 タイプに分類できた。黒毛和種に

おいては、11 頭が T3 タイプに、10 頭が T4 タイプであった。今回の実験に用いたホルスタイン種と黒毛和種では、T1 タイプ及び T2 タイプは存在しなかった。また、*Bos primigenius* の D-loop の塩基配列断片と変異箇所が一致する P タイプはホルスタイン種で 14 頭、黒毛和種で 2 頭存在した (Table 4)。このタイプはこれまで本邦での報告例はなく、本研究で初めてその存在を確認した。

D-loop の塩基配列を用いた無根近隣結合系統樹

D-loop の塩基配列を用いた無根近隣結合系統樹は、*Bison bison* と *Bos indicus* 以外の GenBank に報告されている合計 97 頭の D-loop 塩基配列を加えて作成した。その結果、T1, T2, T4 タイプの分岐は一つに分岐点を中心に放射状に広がる構成になったが、T3 タイプの分岐は主に、3つの分岐点を基点として、それぞれ放射状に広がる構成になった (Figure 1)。*Bos primigenius* タイプ (P) は明らかに 4つの T タイプから離れた分岐をしていた。T4 タイプにはホルスタイン種 1 頭と黒毛和種 10 頭が含まれた。T3 タイプはさらに 3つのクラスターに分かれ、T3-1 にはホルスタイン種 22 頭と黒毛和種 5 頭が含まれた。T3-2 にはホルスタイン種 13 頭と黒毛和種 4 頭が含まれた。T3-3 にはホルスタイン種 18 頭と黒毛和種 2 頭が含まれた。

また、T3-1 の枝にはアバディーンアングス種 (L27713) が含まれ、T3-2 にはジャージ種 (L27727) 及びフリージャン種 (L27719) が、T3-3 の枝にはフリージャン種 (L27718) とシャロレー種 (L27717) が含まれることから、これらの枝に含まれるウシの品種は共通の母方祖先から由来していることが示された。

本研究で分析した P タイプの枝に含まれるホルスタイン種 14 頭と黒毛和種 2 頭は母方祖先に *Bos primigenius* を持つことが示された。

コード領域の塩基配列による多型解析

シーケンスを行った全 25 サンプル中には 103 箇所の一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) が存在した。D-loop の解析で T4 タイプに分類された個体でのコード領域の塩基配列は、12158 番目の塩基が T から C に、15510 番目の塩基が C から T にすべての個体で置換していた。この変異の内 12158 番目の T から C への置換は ND5 の 17 番目のアミノ酸 Met を Thr へ変異させる非同義置換であった (Table 5)。

D-loop 塩基配列の比較より *Bos primigenius* タ

SNPs の内 42 箇所の SNPs はタンパク質コード領域で観察され、10 箇所は非同義置換を生じる塩基置換であった。

特に ND5, ND4, Cyt b, 16 s rRNA の塩基配列部位で多く観察されたが、各遺伝子座内の 1 塩基あたりの変異割合は、tRNA-Thr と tRNA-Ser など各 tRNA コード領域で高い値を示すものの、全体では大きな差は認められなかった。

コード領域の塩基配列を用いた無根近隣結合系統樹
コード領域のみを用いた無根近隣結合系統樹は GenBank に報告されたサンプル (Table 2) から *Bison bison* と *Bos indicus* を除外した個体の D-loop を除くコード領域の塩基配列データを本実験でのデータに加えて作成した。その結果、T1~T4 タイプの分岐は主に一つの分岐点を中心に放射状に広がる構成になった (Figure 2)。また、*Bos primigenius* タイプ (P) には本研究でのホルスタイン種 4 頭と黒毛和種 2 頭が含まれ明らかに 4 つの T タイプから離れた位置になった。また、T1 タイプと T3 タイプは、D-loop 塩基配列を用いた解析結果ほど明らかな分岐を示さなかった。

考 察

多型解析

D-loop の塩基配列を用いた系統解析の結果、H1 のハプロタイプのホルスタイン種は GenBank の

データと比較するとアバディーンアンガス種と非常に似た塩基配列をしていた。アバディーンアンガス種は 1916 年にスコットランドから日本に輸入され、無角和種の改良に貢献している。このことから、H1 のハプロタイプの母方祖先は、アバディーンアンガス種と共通な母方祖先から由来すると推察され、本邦での累進交配による結果なのか、本邦に導入以前からホルスタイン種に存在していたのか興味深い。一方、H2 と H5 のハプロタイプはフリージアン種に多いとされていることから、フリージアン種を母系に持つ系統と考えられた。H6 のハプロタイプはシャロレー種の mtDNA と似たハプロタイプであった。わが国でシャロレー種は、1960 年に北海道の曾田牧場に輸入され、昭和 40 年代までに各地で交雑種が作られた。しかし、肉用種であるシャロレー種のメスとホルスタイン種のオスの交配が行われたとは考えにくい。このハプロタイプは相当過去に共通な母方祖先から由来していると考えた方が妥当である。H16 のハプロタイプは T4 タイプに分類されることから、このウシの母方祖先は北東アジア特有の *Bos taurus* 系から由来しているものと思われる (Namikawa, 1980)。

Tsuji ら (2004) は、日本と北アメリカのホルスタイン種 588 頭について mtDNA D-loop を調べたところ、日本のホルスタイン種の 18.3% が日本在来牛由来の mtDNA (T4) を持っていることを報告した。彼らの報告例と比較して、本研究でのホルスタイン種

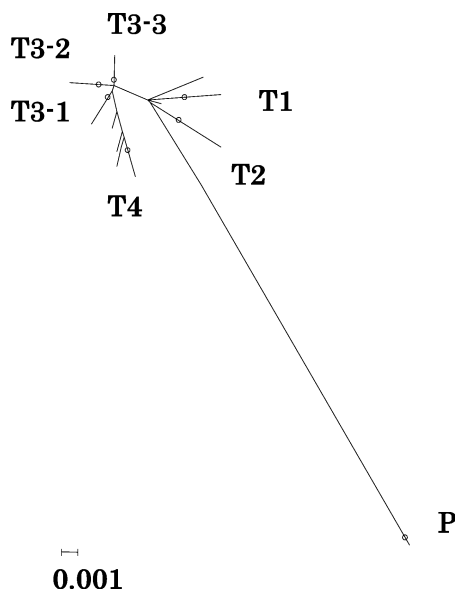


Figure 1 Unrooted neighbor-joining tree constructed from mtDNA D-loop sequences of Holstein and Japanese Black cattle.

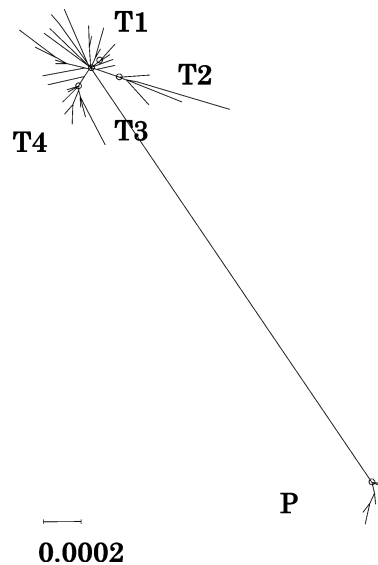


Figure 2 Unrooted neighbor-joining tree constructed from mtDNA coding sequences of Holstein and Japanese Black cattle.

68頭から T4 は 1 頭のみ観察されただけで、酪農学園大学附属農場のホルスタイン種の牛群は T3 タイプに偏っていることが明らかとなった。

本研究では、ホルスタイン種 14 頭、黒毛和種 2 頭の D-loop 塩基配列が *Bos primigenius* のものと一致していた (Table 4)。このように、今回調べたウシに見られた P タイプは同一母牛からの個体でないにも関わらず D-loop の塩基配列が全く同じ個体が見られた。P タイプに分類された 16 頭は世代数さかのぼることによって同一母牛に至る可能性がある。また、*Bos taurus* 集団への *Bos primigenius* の mtDNA の遺伝子侵入は、Achilli ら (2008) の研究において、イタリアの 2 サンプル (EU177866-7) 及び韓国の 1 サンプル (DQ124389) で報告されている。その他に GenBank に登録されているものでは、中国より一例 (AY998840) 報告されただけである。日本でもウシの mtDNA について研究が多数行われているが、今回、初めて日本の牛群に *Bos primigenius* タイプの mtDNA が確認された。本研究のサンプルは全国からランダムに集めたサンプルではないことから、本研究に使用したウシの中に *Bos primigenius* タイプの mtDNA を持った個体が偶然祖先にいた可能性もある。しかし、複数の品種においてこのタイプの mtDNA が存在すること、およびコード領域には数箇所の変異が存在することから、日本に現存するウシの祖先に *Bos primigenius* 由来の雌ウシがかなり存在していると考えられるのが妥当のようである。本研究で用いた酪農学園大学附属農場のホルスタイン種の雌牛の最初の導入経緯については不明であるが、現存する牛群についての分子生物学的解析から、本農場の牛群は特異な母方祖先を持つ系統に由来しているのかも知れない。

また、Mannen ら (1998, 2004) は黒毛和種の mtDNA についての塩基配列を調べた結果、61.6% が T4 に分類されると報告している。本研究で用いた黒毛和種 23 頭の内 T4 の割合は約 43.5% であったことから、このタイプに限ると、今回調べた黒毛和種は、日本在来牛の mtDNA タイプの割合と概ね一致していた。

無根近隣結合系統樹

4 つの T タイプの分岐において、D-loop の塩基配列を用いた無根近隣結合系統樹 (Figure 1) とコード領域の塩基配列を用いた無根近隣結合系統樹 (Figure 2) は、ほぼ同様の系統樹の形を示した。これは、*Bos taurus* 内の遺伝的変異が、コード領域では全長が長いにもかかわらず D-loop 領域の 8 分の

1 程度の変異しか存在しないことに起因していると考えられた。このことより、近い年代での分岐状態を調べるためにはコード領域よりも mtDNA D-loop の塩基配列を用いた方が、より明白に分岐した系統樹が得られるという他の動物での結果と一致していた (Taylor ら 2003; Torroni ら 2006)。

また、*Bos primigenius* (P 系統) と *Bos taurus* の分岐年代の推定では、Achilli ら (2008) は mtDNA D-loop の塩基配列を用いて 7.4 ± 0.9 万年前と推定しており、今回のコード領域の塩基配列を用いて推定したところ、8.3 万年前となった。しかし、本実験での D-loop の塩基配列を用いた分岐年代の推定は、12 万年前となり、彼らの推定値と約 4 万年の差が生じていた。さらに、本研究による T1, T2, T3, T4 タイプの分岐年代の推定では、D-loop の塩基配列を用いた分岐年代の推定値の方が、コード領域の塩基配列を用いた分岐年代の推定値より約 2 ~ 3 倍早く分岐していた。このように、D-loop の塩基配列を用いた推定値とコード領域の塩基配列を用いた推定値は異なる傾向になった。これは、D-loop の塩基配列はコード領域の塩基配列よりも遺伝的変異が蓄積されやすいことに起因していると考えられた。

要 約

本研究はミトコンドリア DNA (mtDNA) の多型解析から本学のホルスタイン種の母方系統の由来および黒毛和種における遺伝的多様性を明らかにすることを目的とした。また、遺伝的変異の多い D-loop 領域の塩基配列のみを用いた分析と遺伝的変異の少ない遺伝子コード領域のみを用いた分析から推定される遺伝的情報の相違についても考察を行った。酪農学園大学附属農場のホルスタイン種 68 頭において母系解析を行った結果、53 頭がヨーロッパタイプの T3 に、1 頭が北東アジアタイプの T4 に分類された。また、黒毛和種では、11 頭が T3 に、10 頭が T4 であった。アフリカタイプの T1 近東アジアタイプの T2 タイプは観察されなかった。しかし、残りのホルスタイン種 14 頭と黒毛和種 2 頭はこれまで日本では報告されていなかった *Bos primigenius* タイプの mtDNA を持ことが本邦で初めて発見された。コード領域全体の分析でも *Bos primigenius* タイプでは、46 箇所 SNPs が観察され、その内 10 箇所は非同義置換であった。これらの mtDNA の遺伝情報から推定された系統樹では、コード領域のみを用いた推定値の方が、D-loop のみを用いた推定値より分岐が隔たる傾向を示した。この相違は、D-loop 領域がコード領域よりも多型性に富んでいる

ことに起因していると考えられた。しかし、D-loop領域と遺伝子コード領域から推定される系統解析はほぼ同様の結果となった。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、ホルスタイン種の血液採取には酪農学園大学附属農場の川岸孝博氏のご協力を得た。また、黒毛和種の毛根サンプルの採取には北海道早来食肉衛生検査所の方々にお世話になった。記して深く感謝する。

引用文献

- Achilli, A., Olivieri, A., Pellecchia, M., Ubaldi, C., Colli, L., Al-Zahery, N., Accetturo, M., Pala, M., Kashani, B.H., Perego, U.A., Battaglia, V., Fornarino, S., Kalamati, J., Houshmand, M., Negrini, R., Semino, O., Richards, M., Macaulay, V., Ferretti, L., Bandelt, H. J., AjmoneMarsan, P., Torroni, A. 2008. Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle. *Curr. Biol.*, 18(4): 157-158.
- Anderson, S., De Bruijn, M. H. L. and Coulson, A. R. 1982. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.*, 156: 683-717.
- Bradley, D.G., MacHugh, D.E., Cunningham, P. and Loftus, R. T. 1996. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 5131-5135.
- Kikkawa, Y., Amano, T. and Suzuki, H. 1995. Analysis of genetic diversity of domestic cattle in East and Southeast Asia in terms of variations in restriction sites and sequences of mitochondrial DNA. *Biochem. Genet.*, 33(1-2): 51-60.
- Lai, S.J., Liu, Y.P., Liu, Y.X., Li, X.W., Yao, Y.G. 2006. Genetic diversity and origin of Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 38(1): 146-154.
- Loftus, R.T., MacHugh, D.E., Bradley, D.G., Sharp, P.M. and Cunningham, P. 1994a. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 2757-2761.
- Loftus, R.T., MacHugh, D.E., Ngere, L.O., Balain, D.S., Badi, A.M., Bradley, D.G. and Cunningham, E.P. 1994b. Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. *Anim. Genet.*, 25: 265-271.
- MacHugh, D.E., Shriver, M.D., Loftus, R. T., Cunningham, P., Bradley, D.G. 1997. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics*, 146(3): 1071-1086.
- Mannen, H., Tsuji, S., Loftus, R.T. and Bradley, D.G. 1998. Mitochondrial DNA variation and evolution of Japanese Black cattle (*Bos taurus*). *Genetics*, 150: 1169-1174.
- Mannen, H., Kohno, M., Nagata, Y., Tsuji, S., Bradley, D.G., Yeo, J.S., Nyamsamba, D., Zagdsuren, Y., Yokohama, M., Nomura, K. and Amano, T. 2004. Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32(2): 539-544.
- Manwell, C. and Baker, C. M. 1980. Chemical classification of cattle. 2. Phylogenetic tree and specific status of the Zebu. *Anim. Blood Groups. Biochem. Genet.*, 11(3): 151-162.
- Namikawa, T. 1980. Genetical aspect of domestication and phylogeny in the cattle. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 49: 817-827.
- Payne, W.J.A. and Hodges, J. 1997. *Tropical Cattle: Origins, Breeds and Breeding Policies*. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24(8): 1596-1599.
- Tamura, K. and Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, 10: 512-526.
- Taylor, R.W., Barron, M.J., Borthwick, G.M., Gospel, A., Chinnery, P.F., Samuels, D.C., Taylor, G.A., Plusa, S.M., Needham, S.J., Greaves, L.C., Kirkwood, T.B.L. and Turnbull, D.M. 2003. Mitochondrial DNA muta-

- tions in human colonic crypt stem cells. *J. Clin. Invest.*, 112 (9): 1351-1360
- Torrioni, A., Achilli, A., Macaulay, V., Richards, M. and Bandelt, H.J. 2006. Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. *Trends Genet*, 22: 339-345.
- Troy, C.S., MacHugh, D.E., Bailey, J.F., Magee, D.A., Loftus, R.T., Cunningham, P., Chamberlain, A.T., Sykes, B.C. and Bradley, D.G. 2001. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature*, 410: 1088-1091.
- Tsuji, S., Mannen, H., Mukai, F., Shojo, M., Oyama, K., Kojima, T., Kano, C., Kinoshita, Y. and Yamaguchi, E. 2004. Trace of native cattle in Japanese Holstein assessed by mitochondrial DNA sequence polymorphism. *J. Dairy Sci.*, 87(9): 3071-3075.

Summary

The aim of this study was to reveal the diversity of Japanese cattle (68 Holstein cows and 23 Japanese Black cattle) by the use of the mitochondrial DNA polymorphisms. In addition, the analyses were performed by combined with mtDNA sequences of *B. taurus*, *B. primigenius*, *B. indicus*, *B. bison* deposited in GenBank and phylogenetic tree were constructed to reveal the relationships between them.

The results of sequences for mtDNA D-loop type of 68 Holstein cows, 1 cattle was North East Asian type (T4) and 53 cattle were European type (T3). In Japanese black cattle, 10 cattle were T4 type and 11 cattle were T3 type. However, African type (T1) and Near East type (T2) were not observed in this study.

Unexpectedly, 17 cattle were correspond to *B. primigenius* type, which mtDNA D-loop type of *B. primigenius* has not yet been reported in Japan. Seven samples of *B. primigenius* type of them were additionally sequenced for coding region. The results showed that single nucleotide polymorphisms (SNPs) were observed on 56 polymorphic sites. The 46 of SNPs were observed to unique *B. primigenius* types. Furthermore, the 42 of SNPs were observed in protein coding region. The 10 of SNPs were non-synonymous substitution.

The phylogenetic trees were illustrated by use of analysis software "MEGA4". The estimate value from the coding region showed the same as the value from the D-loop region.