

博士論文

ミトコンドリアゲノムによる
キジ目の分子系統学的研究

平成 15 年 7 月

西堀正英

目次

第一章．緒論	1
第二章．ミトコンドリアゲノム全塩基配列の決定法の確立	
緒論	1 5
材料と方法	1 8
結果	2 0
考察	2 2
要約	2 5
図表	2 6
第三章．キジ科のミトコンドリア全塩基配列決定とその分子系統学的解析	
緒論	3 0
材料と方法	3 3
結果	3 4
考察	3 5
要約	3 8
図表	3 9
第四章．ホロホロチョウ科のミトコンドリア全塩基配列決定とその分子系統学的解析	
緒論	4 5
材料と方法	4 6
結果	4 9
考察	5 0

要約	5 2
図表	5 3
第五章. ヤケイおよびニワトリの分子系統学的解析	
緒論	5 9
材料と方法	6 1
結果	6 4
考察	6 7
要約	6 9
図表	7 0
第六章. 東南アジア在来鶏の分子系統、分子生態学的解析	
緒論	8 4
材料と方法	8 5
結果	8 8
考察	8 9
要約	9 1
図表	9 2
第七章. 総合考察	
総括	1 0 1
謝辞	1 0 4
引用文献	1 0 5
付表	1 1 6

第一章．緒論

家禽および家畜の遺伝資源は、これまで12,000年以上もの間、人類の食料を中心とした農産物として貢献してきた。特に食肉、乳製品、卵類、繊維、作物への肥料、燃料用の堆肥、役力を提供してきた (Hammond and Leitch, 1995; FAO, 1998a; FAO, 1998b)。家禽および家畜からの人類に対する食料供給割合は、少なくとも30%を占めている。家禽および家畜は40種の野生動物種が家畜化され、4,500~5,000の家禽および家畜の品種が作られてきた。その遺伝的多様性は家禽および家畜において非常に効率的に利用されている。この品種の数は全家禽・家畜の遺伝的多様性に関する非常によい指標となっている。FAOでは動物遺伝資源のデータバンク (DAD-IS: Domestic Animal Diversity Information System) を開発した (FAO, 1996a)。これらのデータから、家禽および家畜は一ヶ月間で6品種の割合で滅び、現在では現存の品種のうち30%が絶滅の危機に瀕している (FAO, 1998a)。家禽および家畜の遺伝資源は真に世界的財産で、世界のどの地域においても価値を持つものであるため今後とも保存していく必要がある。

動物遺伝資源に見られる多様性は人間の生存と幸福に対していろいろな形で貢献している。今日の先進国において元来の役畜の仕事であったものをトラクターや自動車によって変わってきたが、発展途上国ではいままなお役畜はその重要な役割を担っている。さらに重要なことには、人類にとってタンパク質の重要な供給源である家禽および家畜の役割はいままなお変わってはいない (FAO, 1998a)。現在、世界の人口は約61億人で大変な速さで増加の途を辿っている。その中で、人類にとって不可欠な資源は食料資源である。ある地域に偏った人口の増加と食料生産増加の不均衡、干魃等の異常気象、政治不安等による食料配分体制の不備による飢え、これらのことから今もなお世界の6人に1人の割合で飢餓にさらされている (FAO, 1998a)。発展途上国における急激な人口の増加とそれに伴う動物タンパク質の需要の増加は、家畜・家禽に対する需要の急激な増加を煽っている。今後さらに増えつつある世界の人口をいかに養うかは容易ならざる課題である。

人類が利用できる動物遺伝資源の全ての多様性および多様な生産物が作られている結果、人間は暑く湿潤な熱帯から乾燥した砂漠地帯、非常に寒冷な極地あるいは山岳地帯に至る広範な環境のもとで生存していくことが可能になっている。家禽・家畜において遺伝的多様性があることで、家禽・家畜が疾病、寄生虫、飼料と水の得やすさおよびその他の広範な環境変動に適応することができる。過去数十年の間に重要な家禽・家畜種において、管理された条件下で生産に関する形質が改良された新品種を作出することに成功してきた。これらの好条件下で作出された品種は、種々の環境条件に対しても適応が速く、コスト効率が良いと期待され、世界中に輸出されてきた。しかし、実際には新品種を維持し、高い生産性をあげるために、生産者は従来品種よりも多くの飼料を給与せねばならないこと、他の資材投与を劇的に増やさねばならないことを経験している。したがって、輸入された新品種は現地に適応している在来家畜・家禽品種のように飼育することやこれらより高い生産性を上げることは難しく、期待はずれの結果となっている。以上のことから、世界各地の環境に適した家禽および家畜の新品種を作出するためにも、その生物多様性を維持しながら、また遺伝資源あるいは遺伝子資源として保存していく必要がある。

FAO (1996b) は、生物多様性の保存と持続的な利用をするための努力は農業にとって極めて重要であることから最優先されるべきであることを示した。このため、家禽・家畜における生物多様性を維持するためには、まず家禽および家畜およびそれらの近縁種におけ

る系統関係および遺伝的類縁関係を明らかにしておくことが必要不可欠であり重要である。しかしながら、家禽・家畜を中心とした系統関係の解析は現在進行中の課題であり、まだ明らかにされていないのが現状である。

家禽種の多くは鳥綱キジ目に分類されている。現在の分類体系において、鳥類（鳥綱；Aves）は、ダチョウ目（Struthioniformes）、シギダチョウ目（Tiramiformes）、キジ目（Galliformes）、カモ目（Anseriformes）、スズメ目（Passeriformes）、キツツキ目（Piciformes）、ペンギン目（Sphennisciformes）、タカ目（Falconiformes）、コウノトリ目（Ciconiiformes）、アビ目（Gaviiformes）、ペリカン目（Pelecanisciformes）、ツル目（Gruiformes）、チドリ目（Charadiiformes）、オウム目（Psiitaciformes）、フクロウ目（Strigiformes）、ハト目（Columbiformes）およびカイツブリ目（Podiaipediformes）の17目に分類されている（Sibley and Ahlquist, 1990; 図 1-1）。キジ目は、生態・地理学および生理・形態学的特徴からツカツクリ科（Megapodidae）、ハウカンチョウ科（Cracidae）、ホロホロチョウ科（Numididae）、ハウズラ科（Odontophoridae）およびキジ科（Phasianidae）の5科75属283種（Sibley and Monroe, 1990; Sibley and Ahlquist, 1990; 表 1-1）に分類されている。一方、Johnsgard (1973, 1986, 1999) は、キジ目における科（family）はキジ科のみでその中にホロホロチョウ亜科、ハウズラ亜科およびキジ亜科があり、キジ亜科をキジ族（tribe Phasianini）とシャコ族（tribe Perdicipini）に分類した（図 1-2、図 1-3）。また、ツカツクリ科とハウカンチョウ科を別目に分類した。形態学的な基準に基づいた表系分類では、複数の分類様式があり現在も論議されている。近年の鳥類系統学の急速な発展にもかかわらず、目（order）の系統はまだ解明されていない部分も多い。最近になって、DNA 配列を用いて現存する鳥類の目の関係を解析した研究成果が発表されてきた（Cracraft, 1988; Sibley and Ahlquist, 1990; Casper et al., 1997; Mindell et al., 1997, 1999; Harlid et al., 1998; Groth and Barrowclough, 1999; Garcia-Moreno and Mindell, 2000; van Tuinen et al., 2000）。形態と DNA 配列を用いた系統解析の結果から、（1）現存している鳥類は大きく古口顎類（Paleograthae）と新口顎類（Neograthae）に分類されること（Cracraft, 1981; Olson, 1985; Cracraft and Mindell, 1989; Sibley and Ahlquist, 1990; Caspers et al., 1997; Groth and Barrowclough, 1999; Garcia-Moreno and Mindell, 2000; van Tuinen et al., 2000）、（2）キジ目とカモ目は、系統樹上で1つの枝が分岐してでき最近の祖先を共有するグループであるとされる姉妹関係にあり、キジ目とカモ目で1つのクレイド（clade）を構成すること（Cracraft, 1981; Cracraft and Mindell, 1989; Caspers et al., 1997; Groth and Barrowclough, 1999; Garcia-Moreno and Mindell, 2000; van Tuinen et al., 2000）、（3）古口顎類、キジ目とカモ目のクレイド、および残りのグループを含むクレイドの関係は強く支持されること（Cracraft, 1981; van Tuinen et al., 2000）、（4）ミズナギドリ目と一部のペンギン目が近縁関係にあること（Cracraft, 1981; Sibley and Ahlquist, 1990）、（5）アビ目とペンギン目が姉妹関係にあること（Cracraft, 1981; Groth and Barrowclough, 1999）が両者の系統樹間で一致する点として報告されているが、その他の関係はいまだに論議され（由利, 2002）、特にコウノトリ目、ツル目、タカ目、ペリカン目およびカッコウ目の単系統性については、盛んに議論されている（Cracraft, 1981, 1982; Olson, 1985; Sibley and Ahlquist, 1990; Sheldon and Bledsoe, 1993; Griffiths, 1994; Hedges and Sibley, 1994; Sibley, 1994; Hackett et al., 1995; Hedges et al., 1995; Houde, 1997; Mindell et al., 1997; Siegel-Causey, 1997; Hughes and Baker, 1999; Feduccia, 1999）。

キジ目は、世界中に劇的な適応放散し進化してきた。現在、キジ目には 283 種が分類さ

れ、それらは世界 5 大陸に広く分布している (Sibley and Monroe, 1990)。キジ目には、高地高山に生息するライチョウ、長さ 1.5m にもなる尾羽を持つインドクジャク、大きな塚を作りその塚の発酵熱で卵を孵化させるツカツクリなど生態学的、形態学および行動学的に非常に多様な種が存在している。このような生物多様性は、これまで自然科学、生態学および進化生物学分野の研究者における研究対象の的となってきた。Hammond and Leitch (1995) によると、鳥類における家禽遺伝資源はニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ホロホロチョウ、バリケン、シャコ、ウズラ、キジ、ハト、ダチョウなどとされ、その大部分がキジ目およびカモ目に分類されている鳥種である。その中でニワトリおよびシチメンチョウに代表されるキジ目家禽は、産肉性、産卵性および呈味性に優れた産業動物として家禽化されてきた。またこれらの家禽化された鳥類は、疾患モデルなどの実験モデル動物あるいはその卵を利用したワクチンの生産など医療へも貢献している。一方、キジ目に属す種は、「Game birds」とも称され、狩猟を楽しむために飼育され、放鳥されてきた。キジ目は 5 大陸全てに分布している。しかしながら、キジ目の分類には複数の説があり (Johnsgard, 1999)、その系統関係は明確ではない。このことは、従来分類や生物系統において現生生物や化石などの形態、形質を比較すること、行動様式、あるいは生息地域を区分することにより生物を分類してきたことに起因する。生物分類では、まず分類体上で同定するステップを踏む。ところがこの同定作業には研究者あるいは分類学者に主観的な判断が入る余地が多く、どのような基準あるいは形態的な特徴を重んじるかという研究者の立場によって分類の結論が食い違うことが多い。このため研究者間での論争が生じ、複数の分類が存在することになった。近年の分子生物学の発展に伴い、DNA あるいはタンパク質解析が進み、DNA 塩基配列およびタンパク質のアミノ酸配列データが急速に蓄積してきた。これらの分子データ情報は、生物の系統的な位置を評価するための客観的基準を与えるものとして、形態データとは独立して用いられるようになってきた。この分子データ情報をもとにした生物系統進化解析を研究するのが分子系統学 (Molecular Phylogeny; 長谷川・岸野, 1996; 長谷部, 1996) である。

分子系統による系統解析

地球上の多様な生物は、すべて基本的な機構が共通であり、しかも共通の遺伝子をもつことから共通祖先から進化してきたことは明らかであり、1つの大きな系統樹の中に位置付けることができる。この遺伝子系統樹を用いて生物進化の筋道を逆に辿る(復元する)ことにより、生物の系統関係を解明することができる。鳥類において、各分類群の正確な系統関係を解明し、把握することは、このこと自体が1つの学問的興味の対象ともなっているが、単にそれだけではなく鳥類の多様性と進化に関するすべての研究の基礎ともなっている。鳥類の行動(轉りや求愛など)、生態(環境適応や食物連鎖など)あるいは形態(羽装や羽色など)などあらゆる形質の進化に関する考察を行うためには、ある一種の鳥だけについての観察および考察は不可能であり、分類群間の比較(種間比較)が不可欠になる(粕谷, 1995)。この比較の対象となる種および分類群について系統を無視した選択を行い、実験・研究をした場合、誤った結論を導いてしまうことが多い。正確な分類群間比較を行うには正確な系統推定を行い、それらの系統関係を知ることが大前提となり、不可欠な要因である。また、家禽遺伝資源の持続的な利用および家禽近縁野生種を含めた生物多様性を維持するためには、家禽種およびその近縁野生種の系統関係を明らかにしておくことも必要不可欠な要因である。

一般に、分子系統樹作成法には距離行列法 (Distance matrix method) と形質状態法 (Character state method) がある。距離行列法は、比較するすべての OTU (Operational Taxonomic Unit) のペアで推定した距離行列を用いるもので、 n 個の OTU の場合には $n(n-1)/2$ 個の距離が得られる。距離には、塩基置換数、アミノ酸置換数、集団間の遺伝距離、DNA 交雑法による塩基差異の割合など様々な進化距離が用いられている。この距離データをもとにして、UPGMA 法 (Unweighted Paired Group Method with Arithmetic Average : 非加重結合法, Socal and Michener, 1958)、NJ 法 (Neighbor Joining Method : 近隣結合法, Saito and Nei, 1987) のほか最小二乗法、距離節約法などを用いて系統樹を作成する。これらの方法は、系統樹の樹形を各段階で、ある基準をもとに部分的に決定してゆき、何回かの段階を経ることによって最終的にすべての樹形を決定することになる。これらの方法では、与えられたデータが系統関係を持つという前提があり、段階的探索法 (stepwise clustering method) に分類される。

一方、形質状態法は、塩基やアミノ酸などの形質の状態が長く連なったもの (配列) あるいは制限酵素地図における制限サイトの有無配列を用いて系統樹を作成する方法であり、MP 法 (Maximum Parsimony : 最大節約法, Felsenstein, 1978; Futuyma, 1998)、ML 法 (Maximum Likelihood : 最尤法, Adachi and Hasegawa, 1996) のほか最大相互適合法などがある。これらの方法は、すべて可能な樹形をある基準のもとに片っ端から調べて、最適な樹形を選ぶ方法であり、網羅的探索法 (exhaustive search method) に分類される。樹形ごとに与えられたデータをもとに、MP の場合には最小必要変化数を、ML の場合には尤度などの尺度を計算し、データに最も合う樹形を選び出す。理想的にはこれらの樹形を網羅的に調べ、その中でデータが最も合う樹形を選び出すこととなる。

現在、分子系統学で広く用いられている解析方法は、NJ、MP および ML 法の 3 つである。NJ 法は、距離行列データから簡単なアルゴリズムを用いて段階的に近隣を見出し、最終的に 1 個の無限系統樹を得る方法である。この方法は計算が比較的容易であるため、他の方法に比べて遥かに短い計算時間で系統樹を得ることができる。そのために最もよく利用されている。また、「進化速度一定」を仮定していないために、系統によっては進化速度に違いがあり分子時計が成り立たなくとも、比較的正しい真の系統樹を復元することが可能である (DeBry, 1992)。MP 法は、系統樹上の進化的変化数、たとえば塩基置換やアミノ酸置換などの合計を最大に節約することによって最小化するという最大節約の原理のもとに系統推定を行う方法である。分子時計が成り立たない場合や多重置換の効果が大きい場合にはデータがいくら増えても間違った系統樹が選択されることがある (Felsenstein, 1978; Hasegawa et al., 1991)。ML 法は、データの生じてくる背景について仮説を立て、そのもとで構造を統計的に推定し、一方で仮説の妥当性を検証していく方法である。仮説を表す統計モデルはデータの生じる尤度 (確率) を未知のパラメータの関数として表現した尤度関数で表され、この尤度関数を最大にするように未知のパラメータから推定する。ML では分子時計が成り立たなくとも効率よく真の系統樹を推定することができる (Hasegawa et al., 1991)。また塩基置換およびアミノ酸置換のモデルが明示的に仮定されているため、そのモデルが現実の過程をうまく近似していないことが明らかになればモデルを改良して現実的なものに近づけることが可能である。ただし、ML の欠点は、計算量が多いために、計算に時間がかかることである。

現在、分子系統学的解析に DNA 塩基配列およびアミノ酸配列を用いることが最も有効

である。DNA 塩基配列およびアミノ酸配列データは、以下の 4 項目にあげられるように系統推定に最も適した特徴を持っている。(1) 形態形質に比べ、非常に多くの形質情報が容易に得られる。例えば、500 アミノ酸 (1,500 塩基対) の配列データを系統解析に使用した場合、各サイトを 1 つの形質として取り扱うために 500 形質 (塩基配列では 1,500 形質に相当) を集めて解析したことになる。形態形質やアイソザイムを 500 集めることは非常に困難であり、形態形質やアイソザイムと比較すると塩基配列やアミノ酸配列は非常に大量の形質を集めて解析することができる。(2) 形質の収集・解析において、種や個体群の知識を特に必要としない。したがって、形質の収集時に研究者の主観が入り込む余地が少ない。(3) 塩基配列やアミノ酸配列は定量化しやすく、統計的解析が容易である。(4) 塩基配列やアミノ酸配列は、異なる分類群でも同じ尺度を用いて比較することができる。(5) 分子時計を設定することができる。塩基配列データは形質データあるいはアイソザイムに比べて比較的中立で、時間に比例して変異を蓄積している。すなわち、分子時計を仮定することができる。したがって変異の程度を比較すれば分類群同士がどのくらい前に分化したのか推定できる場合が多い。このことから化石の記録が乏しい種および分類群の分岐年代を推定することが可能となる。また、伝統的に利用されてきた形態形質と比較すると、塩基配列およびアミノ酸配列データには研究者の主観が入り込む余地がなく、収斂進化をより簡単に排除できるという特徴を有する。さらに塩基配列およびアミノ酸配列データはデータベース化が進み、実際に DDBJ/EMBL/GenBank などのデータベースから他の研究者が登録したデータを簡単に取り出すことが可能である (高木・金久, 1996)。これによって、塩基配列およびアミノ酸配列データを使った分子系統学的研究は格段に進展した。

脊椎動物において、生体内における DNA は、核ゲノム DNA と細胞質にあるミトコンドリア DNA とに大別できる。これまで分子系統学的解析には、ミトコンドリア DNA の一部あるいは全部を用いられることが多かった。これは分子系統学的解析に適したミトコンドリア DNA の特徴によるものであり、このため種々の動物種においてミトコンドリア DNA の塩基配列が決定され、DNA データバンクに数多く登録されてきた。この登録された塩基配列を利用することは分子系統学的解析に非常に有効となってきた。

ミトコンドリア DNA

ミトコンドリアはほとんどの真核生物にある細胞内小器官であり、内部に組み込まれた電子伝達系は酸化的リン酸化反応と共役して生命活動に必要なエネルギーの大部分を供給している。DNA は、核だけではなくこのミトコンドリアというエネルギー産生や呼吸代謝の役目をもつ特殊な小器官の中にも存在し、特にミトコンドリア DNA (mtDNA) と呼ばれる。この mtDNA にはわずか 37 種類の遺伝子および領域しかない。Anderson et al. (1981) は Sanger 法を用いてヒト mtDNA の全塩基配列を決定し、その長さが 16,569 塩基対 (bp) であり、12S と 16S の 2 つのリボソーム RNA (rRNA) と、アミノ酸を運ぶ 22 個の転移 RNA (tRNA) および電子伝達系構成サブユニットのうち 13 個のタンパク質をコードする遺伝子があることを報告した。13 個の遺伝子がコードするサブユニットは、複合体 I (NADH-ユビキノン酸化還元酵素) が 7 個 (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5 および ND6)、複合体 III (ユビキノール-シトクローム c 酸化還元酵素) が 1 個 (Cytb)、複合体 IV (シトクローム c 酸化酵素) が 3 個 (COI, COII および COIII)、複合体 V (ATP 合成酵素) が 2 個 (ATPase6 および ATPase8) である。これらの遺伝子産物はすべて酸化的リン酸化反

応に参与している。ヒトのほか、マウス、ウシ、ブタなどの哺乳類でも mtDNA の全塩基配列が決定され、これらのすべての種で遺伝子構成とその構造的配置が同じであり、遺伝暗号や tRNA の特徴を共有していることが明らかになった。ヒトでは 16,569bp の配列の中に 13 個の遺伝子、22 個の tRNA および 2 個の rRNA があり、約 1,100bp の制御領域（コントロール領域：D-loop）とよばれる領域を除くと、これらは mtDNA 上にほとんど隙間なく並んでいる。D-loop には遺伝子はないが、H 鎖の複製開始点 (OH)、H 鎖と L 鎖の転写開始点 (OL) が存在している (Clayton, 1991)。また遺伝子の中には介在配列（イントロン）はまったく存在せず、rRNA および遺伝子の両端は tRNA で区切られている。隣り合った tRNA 間では 1bp あるいは数 bp を共有するところもある。*ATPase8* と *ATPase6* とは 46bp を、*ND4L* と *ND4* とは 7bp を読み枠として共有している。タンパク質をコードする遺伝子のうち *ND1*、*ND2*、*ND3*、*ND4*、*COIII*、*ATPase6* および *Cytb* は 3' 末端に完全な終止コドンを持たず、T あるいは TA で終わっている (Anderson et al., 1981)。これらの遺伝子では転写後ポリ A 付加によってはじめて終止コドン UAA を持つ。tRNA において、アミノ酸を受容する 3' 末端に共通して存在する配列 CAA は、mtDNA 上の遺伝子の配列には存在しておらず、これも転写後に付加されると考えられている (Anderson et al., 1981)。一方、 3×10^9 塩基あるヒトの核ゲノムではミトコンドリアゲノムとは異なり、その約 95% 程度が機能を持たない配列（主にイントロンである）と報告されている (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001)。以上のように、mtDNA の遺伝子構成はきわめてコンパクトでむだな部分が少ない。鳥類では、ニワトリ mtDNA の全塩基配列がもっとも早くに決定され、その長さが 16,775bp であり、*Cytb* と *ND6* との位置が哺乳類とは逆になっていることが報告されている (Desjardins and Morais, 1990)。ニワトリの mtDNA では、その 92.7% が遺伝子等の機能がわかっている領域であり、機能の知られていない配列 (D-loop) はわずか 7.3% (1,231bp) しかない。このことは核 DNA との大きな違い（ヒトの核 DNA では約 95% 程度が機能を持たない配列）である (Desjardins and Morais, 1990)。

mtDNA は、系統進化の研究をするのに有効な 5 つの特徴をもっている。(1) mtDNA は、核の染色体 DNA のようにヒストンで保護されたクロマチン構造ではなく、裸の環状二本鎖 DNA である。(2) mtDNA は突然変異を起こしやすく、DNA の修復も不完全である。そのため核 DNA に比べて塩基置換の起こる速度（進化速度）が 5~10 倍速い (Brown et al., 1979)。ヒトに最も近縁なチンパンジーとヒトとの相同遺伝子の塩基配列を比較すると、塩基の異なる割合は核 DNA では 1% 前後であるが、mtDNA では 10% 近くになる (Horai et al., 1987; Horai et al., 1992)。これら 2 種は共通の祖先種から分岐して進化してきたと考えられるが、これら 2 種に蓄積した塩基置換の量は mtDNA の方が核 DNA より 10 倍くらい多いことを示している。このことは生物進化を研究する上で強力な武器となる。この mtDNA 塩基置換速度が速いという特徴により、比較的短い進化時間の中で生じた DNA の変異を効率よく測ることができる。(3) 遺伝様式は、母性遺伝である (Hutchison et al., 1974; Giles et al., 1980)。母親の mtDNA のみが子供に伝わり、父親の mtDNA は次世代にはまったく関与せず、核 DNA とは異なった遺伝様式をとる。この特殊な遺伝様式の機構は、受精の際、卵子が精子よりも遥かに多量の細胞質を提供するため、精子の mtDNA は増殖せずに消失するためと考えられてきた。しかし、Kaneda et al. (1995) は受精の際に卵子に入った精子の mtDNA が発生の初期の段階で特異的に除去されることを明らかにした。このことは父系、母系の入りまじった核 DNA と異なり、系統関係を復元するのに mtDNA がきわめ

て適していることを示している。(4) mtDNA では遺伝子重複がないために常にオーソローガスな比較ができ、パラローガスな比較をしてしまう危険がないために分子系統学的な目的には良い材料である。(5) 1 個の細胞にミトコンドリアは数百個含まれ、ミトコンドリア 1 個に対して mtDNA が 5、6 個あるため、1 細胞当たりのミトコンドリアは 1,000 個以上も存在することとなる。また通常ヒトの個体内では、すべての mtDNA が同じ塩基配列より成り立っていることが報告されている (Potter et al., 1975)。このため、極めて少量の血液や組織から解析に必要な mtDNA を得ることができ、分析しやすいという利点がある。したがって分子系統学的な解析には格好の材料とされている。

mtDNA を用いた分子系統学的解析

mtDNA を用いた鳥類の分子系統学的解析を行う場合、どの領域あるいは遺伝子を解析に用いるかをまず決めなければならない。以前は入手可能な PCR プライマーに限りがあったが、現在では mtDNA 塩基配列解析のための特異的 PCR primer についての情報 (Sorenson et al., 1999) が報告されている。種および属の分類では、D-loop が最も多く利用されている。これは塩基置換速度がミトコンドリアの 13 遺伝子、rRNA および tRNA よりも速いこと、鳥類で広く利用できる D-loop 領域の塩基配列情報がデータベースに数多く蓄積されていることが原因である。続いて、*Cytb*、*12SrRNA* の順に用いられているが、これらは系統解析の対象により使い分けられている。(1) D-loop は、ニワトリで 1,231bp (DDBJ/EMBL/GenBank accession number X52392 ; Desjardins and Morais, 1990) の長さの制御領域である。*Cytb* や *12SrRNA* に比べるとその進化速度は速い。これは D-loop がタンパク質などの遺伝情報をコードしないため、突然変異による塩基置換を容易に固定しているためであるとされている。D-loop は、進化速度が速いため、主に種、亜種あるいは個体群レベルの研究に適し、利用されている。(2) *Cytb* は、ニワトリで 1,143bp (DDBJ/EMBL/GenBank accession number X52392 ; Desjardins and Morais, 1990) の長さであり、ミトコンドリア電子伝達系の反応に関与する酵素タンパク質の一種である *Cytb* の遺伝情報をコードしている。この進化速度は、*12SrRNA* よりも速く、D-loop 領域よりも遅い。進化速度から属あるいは種レベル、ときには亜種レベルの解析に利用されており (Kimball et al., 1999)、D-loop とともに数多くの配列が DNA データバンクに登録されてきている (Moore and DeFilippis, 1997)。(3) *12SrRNA* は、973bp (DDBJ/EMBL/GenBank accession number X52392 ; Desjardins and Morais, 1990) の長さであり、タンパク質合成に関与する細胞の小器官であるリボソームの一部を構成する RNA の遺伝情報をコードしている。進化速度は、*Cytb* や D-loop よりも遅いため種よりも上の階級である属や科の系統解析に利用されることが多い (Dimcheff et al., 2000, 2002)。(4) これら以外に鳥類の系統解析に使われている mtDNA の遺伝子あるいは領域として、*ND2* (Zink and Blackwell, 1998; Kimball et al., 1999)、*ND5* (Shen et al., 2001)、*ND6* (Moum and Johnsen, 1992; Wood and Krajewski, 1996; Jones and Gibbs, 1997; Zink et al., 1997)、*COI* (Miranda et al., 1997)、*COII* および *ATPase8* (Greenberg et al., 1998) などの遺伝子と、tRNA (Krajewski and Wood, 1995; Wood and Krajewski, 1996; Greenberg et al., 1998) がある。これらの遺伝子あるいは領域は、*Cytb* と同様に種レベルあるいは種よりも上の階級である属や科の系統解析に用いられている。

これまでの分子系統学的解析は、主に 1 つの遺伝子の DNA 配列を用いて行われてきた。近縁種の系統関係を推定する場合には、祖先から引き継がれた多型性、遺伝子の水平転移

や交雑が原因で遺伝子系統樹が種系統樹と異なることがある (Tajima, 1983; Takahata and Nei, 1985; Pamilo and Nei, 1988; Wu, 1991; Hey and Kliman, 1993)。また、用いた1つの遺伝子が収斂進化を起こしている場合には、それとは知らずに間違った系統樹を結論づけてしまうこともある。Cao et al. (1994a,b) は、哺乳類のミトコンドリア 12 遺伝子 (*ND6* を除く) のアミノ酸配列を用いた最尤法による系統樹では、それらの遺伝子ごとに系統樹を作成したものと、12 遺伝子全てを concatenate した後に系統樹を作成したものとを比較すると、12 遺伝子を concatenate した系統樹とそれぞれ *COI*, *ND1* あるいは *ATPase 6* 遺伝子のみの系統樹とではその樹形が異なることを報告した。これは各々の遺伝子において塩基置換の特徴が異なるか、あるいはそれぞれ独立して進化していることによるものである。このため、分子系統学的解析を行うためには必ず複数の遺伝子を用いることが必要である (Cao et al., 1994a,b; Hasegawa and Adachi, 1996)。

ミトコンドリアのタンパク質をコードする遺伝子のデータを用いた分子系統学的解析では、アミノ酸の3つのコドンが異なった置換速度を持つため、コドンの座位毎に解析を行う必要があると主張されている (Hasegawa and Adachi, 1996)。トリプレット第3コドンの座位は置換してもアミノ酸を変えないことが多い (少なくともトランジション型の置換ではアミノ酸は変わらない) ために、第1コドンや第2コドンの座位よりも置換速度が高くなる。これによって、コドンの座位により塩基置換速度と進化様式が異なっている。このため、第1および第2コドンと第3コドンの座位における α/β (トランジションとトランスバージョンの比) は異なることとなる。つまり、第3コドンの座位ではトランジションはすべて同義置換であるために α/β 比が第1・第2コドンの座位よりも高くなる。ところがコドンの座位を考慮せずに α/β 比を算出すると、 α/β 比は3つのコドン座位よりも低くなり、非現実的な系統樹を推定することになることが報告されている (Hasegawa and Adachi, 1996)。したがって、分子系統学的解析を行う場合、すべての座位において塩基置換過程が一様であると仮定することは現実的ではなく、塩基配列データをさらに分割して、それぞれの重み付け (バイアス) 行列を推定することが必要である。

形態分類から分子系統学的解析に

哺乳類において、表形形態および化石形態に基づいた系統仮説ではクジラ目 (Cetacea) は哺乳類の中でもウシ、ブタ、カバなどの偶蹄目との共通祖先から分岐したとされ、偶蹄目が単系統であるとされてきた。ところが Graur and Higgins (1994) は、クジラ目、ウシ、ブタ、ラクダなどの偶蹄目および外群 (アウトグループ) にマウス (齧歯目) とアザラシ (食肉目) を用いて、ミトコンドリアのタンパク質をコードしている遺伝子のデータによる分子系統学的解析を行った結果、現存のクジラはウシなどの反芻亜目に最も近いと主張した。その後、クジラ目と偶蹄目との系統関係の解析が、ミトコンドリアの13遺伝子やtRNAを用いて NJ 法、ML 法、MP 法などの分子系統樹作成法を用いて行われ、クジラ目と偶蹄目とが単系統を形成することが報告された (Irwin and Arnason, 1994; Arnason and Gullberg, 1996; Montgelard et al., 1997; Ursing and Arnason, 1998; Arnason et al., 2000; Ursing et al., 2000; Eizirik et al., 2001; Gatesy and O'Leary, 2001; Waddell et al., 2001; Lin et al., 2001; Arnason et al., 2002)。反芻亜目の種をウシ、ヒツジ、キリン、シカおよびマメジカと増やすこと、またクジラとカバに共通の散在性反復配列 (SINE) が存在することが判明したこと (Shimomura et al., 1996; Nomura et al., 1998)、以上のことからクジラとカバは共通の祖

先から進化したことが明らかとなった(Nikaido et al., 1999)。さらに、偶蹄目およびクジラ目の祖先からまずラクダの仲間が分岐し、次にブタや イノシシ、さらにウシ、キリンなどの反芻亜目、そしてカバ、クジラの順に分岐していったことが明確に示された(Nikaido et al., 1999)。したがって、系統において従来の表形分類は目単位で誤っていたことが判明し、分子生物学の進歩に伴ない分子系統法が導入されてきたことで生物の系統推定がより正確になった。

キジ目の分子系統学的研究

キジ目における mtDNA を用いた分子系統学的研究は、秋篠宮殿下らのグループによる mtDNA D-loop によるヤケイからニワトリへの家禽化、キジ目キジ族とシャコ族との分子系統について解析された報告(Fumihito et al., 1994, 1995, 1996) から本格化してきた。この研究の中で、Fumihito et al. (1996) はニワトリがヤケイ属 4 種のうちセキショクヤケイの一亜種のみを起源として家禽化されたと主張した。また、馬場ら(1999) および Baba et al.

(2001) はエゾライチョウ(Hazel Grouse; *Bonasa bonasia*) およびライチョウ(Japanese Rock Ptarmigan; *Lagopus mutus japonicus*) の mtDNA D-loop の塩基配列情報を用いて、それらの遺伝的多様性について報告した。以上のように大部分の研究は mtDNA D-loop の塩基配列データから NJ 法により分子系統樹を作成し、それぞれの OTU 間の関係を考察したものであった。

Kimball のグループは、キジ目 39 種の mtDNA D-loop および *Cytb* の塩基配列を用いて、キジ目の広範な分子系統学的解析を行った(Kimball et al., 1999)。その結果、これまでの形態および生態学的分類とは矛盾する結果を得た。また、アフリカに生息する大型のキジ目はコンゴクジャク(Congo Peafowl; *Afropavo congensis*) とホロホロチョウ(Helmeted Guineafowl; *Numida meleagris*) のみであるが、この両者の遺伝的関係はコンゴクジャクとインドに生息するインドクジャク(Indian Peafowl; *Pavo cristatus*) との関係よりも遠いことが *Cytb* を用いた解析で明らかにされた(Kimball et al., 1997)。しかしながらこれらの解析は、1 つの遺伝子の塩基配列による解析であり、それから推定した系統樹は遺伝子系統樹であって、それを種系統樹として用いることには問題がある。また、これらの研究ではコドンの座位における塩基置換速度は考慮されていない。Dimcheff et al. (2000, 2002) は、*12SrRNA* と *ND2* の 2 つの塩基配列を用い、*ND2* では塩基配列をコドン毎に分けてキジ目の系統関係を解析した。しかしながら遺伝子は *ND2* 遺伝子 1 つのみであり、遺伝子系統樹の問題から脱却していない。したがって本論文における系統解析では、ミトコンドリアの複数の遺伝子を用い、それぞれの遺伝子についてはコドン座位に分けて系統樹を作成し、キジ目の系統推定を行った。

本論文では、分子系統学的手法を用いて、家禽を含むキジ目の系統関係を明らかにすることを目的とした。特に、キジ目のミトコンドリアゲノム塩基配列情報をもとにして、最尤法(ML 法)を主に用いて分子系統樹を作成し、キジ目の系統関係の解析を行った。まず第二章では、キジ目の分子系統学的解析を行うためにミトコンドリアゲノム全塩基配列を正確かつ効率よく決定する方法を確立することを目的として、まず(1)核ゲノムとミトコンドリアゲノムとを分離する方法の確立、(2)効率の良い塩基配列の決定方法の確立を行った。(1) および(2)を行うために、ニホンウズラ(Japanese Quail; *Coturnix japonica*) およびヒメウズラ(Blue-breasted Quail; *Coturnix chinensis*) のミトコンドリアゲノム全塩基配列を決定した。第三章では、キジ目キジ科における系統関係を明らかにする

ことを目的とし、第二章で決定した mtDNA の全塩基配列からタンパク質をコードする二遺伝子について、塩基配列をコドン座位に分けて ML 法により第 1、第 2 コドンの塩基配列および第 3 コドンの塩基配列で系統樹を作成し、加えてアミノ酸配列からも系統樹を作成した。これらの系統樹をもとにキジ目キジ科の分子系統学的解析を行った。第四章ではキジ目内におけるホロホロチョウ科ホロホロチョウの遺伝学的位置を分子系統学的に解明することを目的とし、第二章で開発した mtDNA 決定法を改良してホロホロチョウの mtDNA の全塩基配列を決定し、その塩基配列データに基づき MOLPHY Package (version 2.3b3; Adachi and Hasegawa, 1996a) を用いた最尤 (ML) 法により分子系統学的解析を行った。なお系統樹は、塩基配列をコドン座位に分けて第 1、第 2 コドンの塩基配列および第 3 コドンの塩基配列で系統樹を作成し、加えてアミノ酸配列からも系統樹を作成して議論した。第五章ではヤケイ属におけるニワトリの成立を分子系統学的に解析することを目的として、ヤケイおよびニワトリの mtDNA 全領域の塩基配列を決定し、その塩基およびアミノ酸配列データに基づいた分子系統樹を作成し、ヤケイおよびニワトリの系統関係を明らかにした。第六章ではヤケイおよび東南アジア在来鶏の類縁関係を分子生態学的なアプローチから解明することを目的とし、mtDNA で塩基置換速度が最も速い D-loop の全塩基配列を解析し、その情報より分子系統学的解析を行い、それぞれの類縁関係を推定し、考察した。

Table 1-1. Order Galliformes : キジ目の分類 (genus 属数/species 種数)

family Megapodidae (6/19) : ツカツクリ科
megapodes, scrubfowl, brush-turkeys
family Cracidae (11/50) : ホウカンチヨウ科
guans, chachalacas, curassows
family Phasianidae (45/177) : キジ科
pheasants, grouse, old world quail (Japanese quail), etc.
family Numididae (4/6) : ホロホロチヨウ科
guineafowl
family Odontophoridae (9/31) : ハウスラ科
new world quail (California quail) etc.

(Sibley and Monroe, 1990)

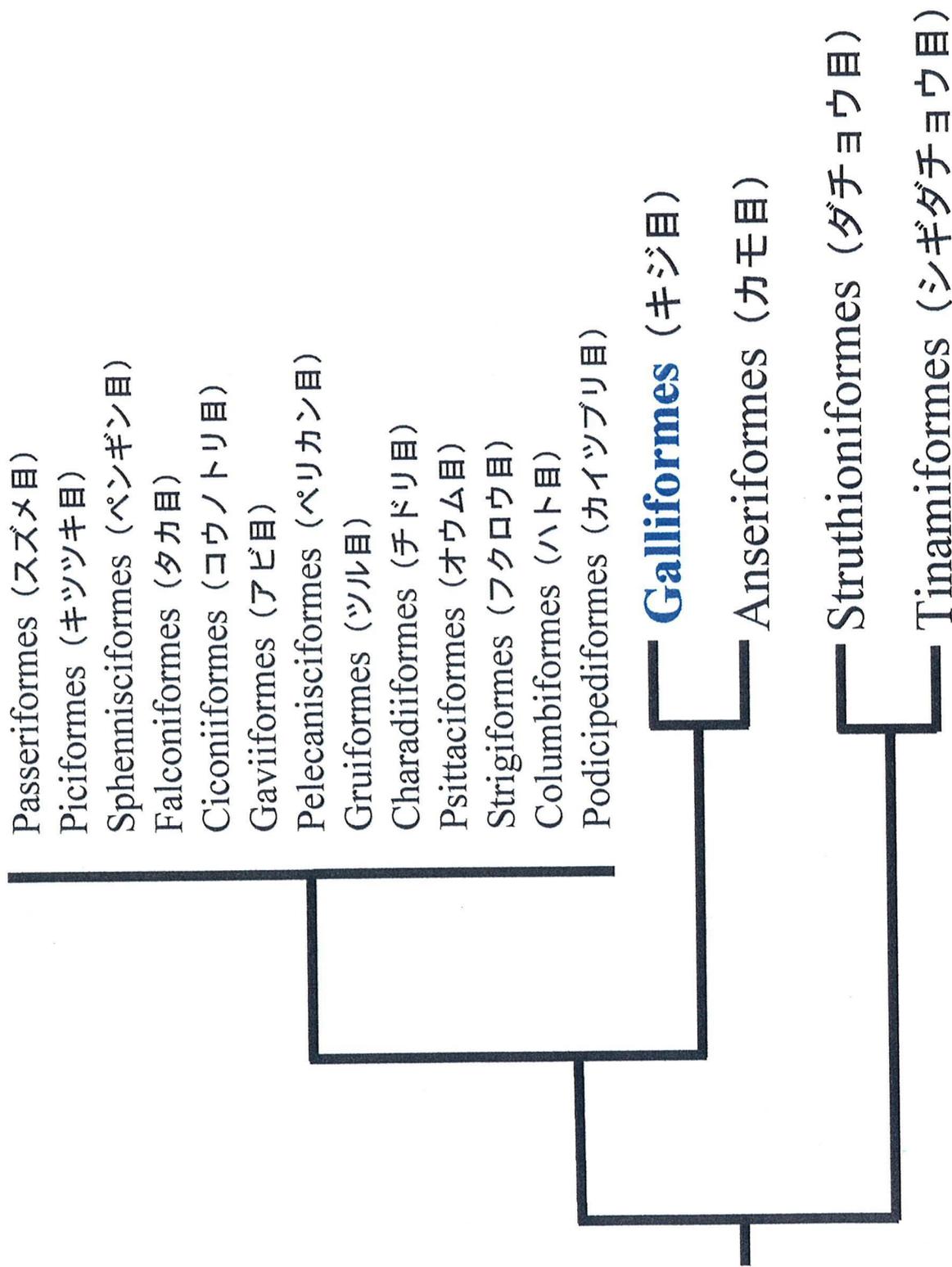


Figure 1-1. classification of class Aves (鳥綱の分類)
 (Sibley & Ahlquist (1990))

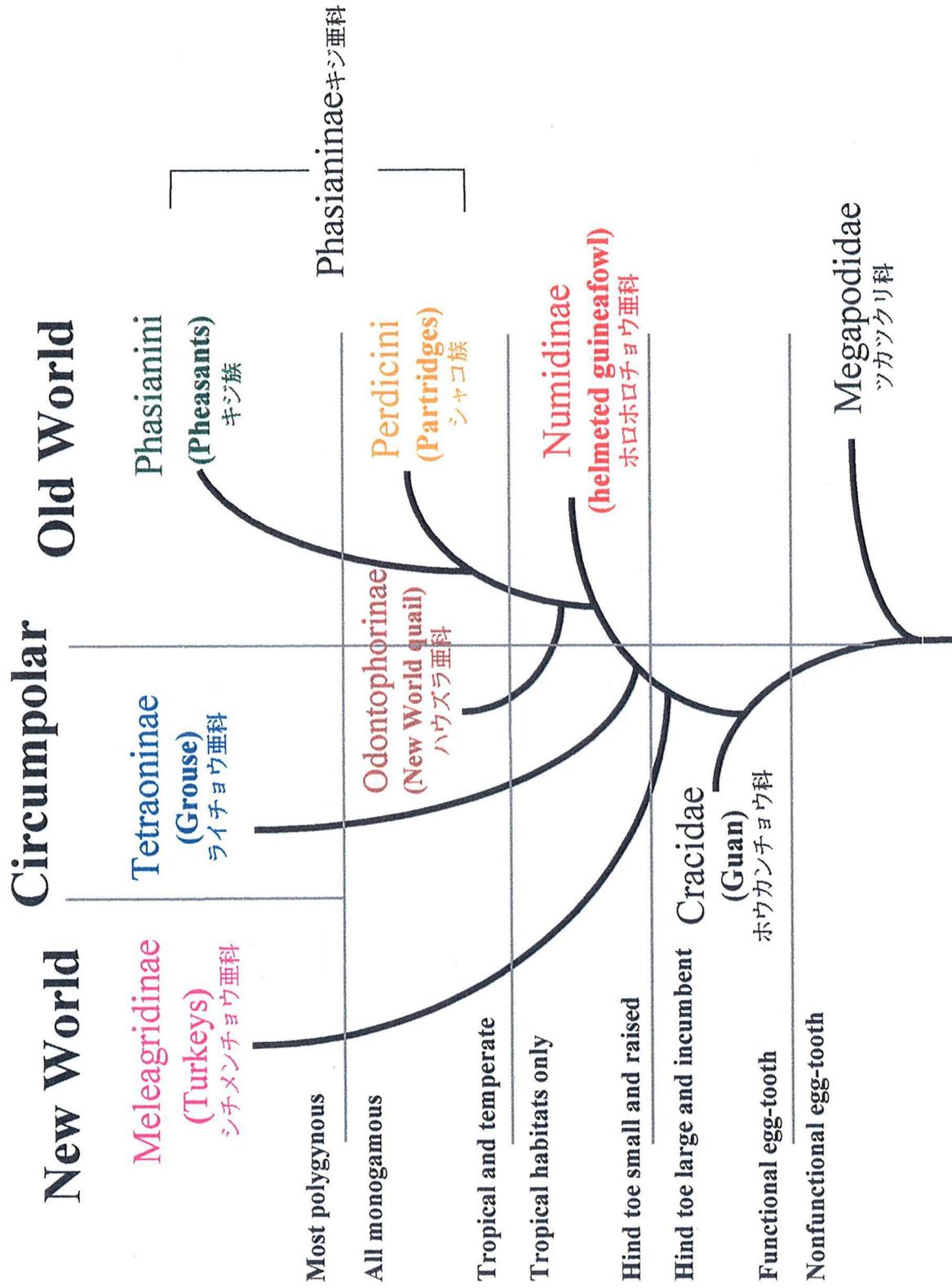


Figure 1-2. Dendrogram of postulated general relationships among the Galliformes (Johnsgard, The Pheasants of the World, 1999)

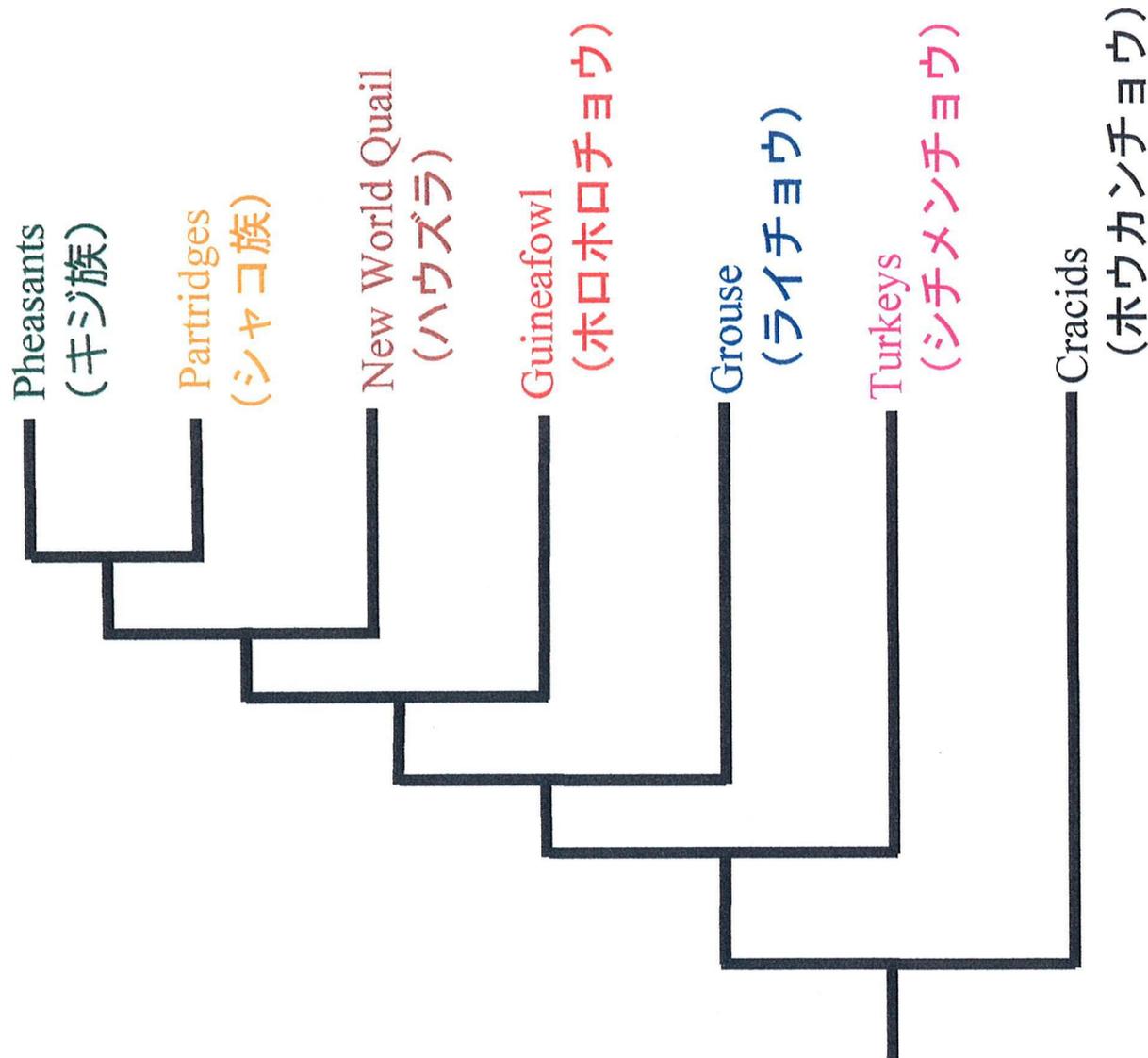


Figure 1-3. Johnsgard's (1986) hypothesized relationships among order Galliformes

第二章. ミトコンドリアゲノム全塩基配列決定法の確立

【緒論】

ヒト (*Homo sapiens*) のミトコンドリア DNA (mtDNA) の全塩基配列は、1981 年 Sanger のグループによって、脊椎動物では世界ではじめて決定された。その mtDNA 全長は 16,569 塩基対 (bp) であった (Anderson et al., 1981)。彼らは胎盤から環状 mtDNA を分離し、制限酵素で約 1kbp の大きさに切断したのち、プラスミド pBR322 にクローニングした。この single-strand DNA を exonuclease III で処理し、M13 バクテリオファージ DNA にクローニングした。この DNA クローンの塩基配列をサンガー法 (Sanger et al., 1977; Sanger and Coulson, 1978) で決定し、各 DNA クローンの塩基配列をアライメントして mtDNA 全長の塩基配列を決定した。鳥類では、ニワトリ mtDNA の全塩基配列が 1990 年に Desjardins and Morais によって最も早く報告された。彼らは塩化セシウム-エチジウムプロマイド (CsCl/EtBr) 密度勾配法でまず mtDNA の全長を分離した後、8 種の制限酵素により切断し、プラスミド pBR322 および pUC18 にクローニングした。これをサンガー法で塩基配列の決定を行った。その結果、ニワトリの mtDNA の全長は 16,775bp であると報告した。ニワトリ mtDNA は、すでに mtDNA の構造が決定されているヒトやウシなどの脊椎動物と同様であり、13 遺伝子、2 ribosomal RNA (rRNA)、22 transfer RNA (tRNA) および 1 つの制御領域 (D-loop) で構成されている。しかし、脊椎動物において D-loop に近接した位置では、NADH dehydrogenase subunit 5 (*ND5*)、*ND6*、tRNA-Glu、cytochrome-b (*Cytb*)、tRNA-Thr、tRNA-Pro および D-loop の順に遺伝子がなっているが、ニワトリでは tRNA-Glu と *ND6* が D-loop に近接して位置し、*ND5*、*Cytb*、tRNA-Thr、tRNA-Pro、*ND6*、tRNA-Glu および D-loop の順となり、この 2 つが入れ替わった構造となっていた (Desjardins and Morais, 1990; Quinn, 1997; Yamamoto et al., 2000)。その後、PCR 法が普及するに伴って多く動物種で mtDNA の塩基配列決定が試みられた。ところが、PCR で容易に増幅できる産物の大きさ、および容易に塩基配列を決定できる大きさが 700~1,000bp 以下のサイズであったことから、700~1,000bp 以下の mtDNA 部分配列が次々に決定され、DNA データバンクに登録された。このためこのサイズの部分配列が分子系統学的解析に使われるようになった。とくに、mtDNA の D-loop における超可変領域 (Hyper-variable region) (Fumihito et al., 1995) あるいは mtDNA *Cytb* 遺伝子の一部の領域などが主として用いられるようになった。

分子系統学的解析には、1 つの遺伝子のみの塩基配列を決定し、その塩基配列だけから推定した系統樹 (遺伝子系統樹) を、系統解析する真の系統樹 (種系統樹) とすることは危険である (Pamilo and Nei, 1988; Wu, 1991; Hey and Kliman, 1993)。分子系統樹を作る際には、常に複数の遺伝子を解析し、その複数の遺伝子の情報を統合し、総合的に系統樹を作って評価する必要がある (Cao et al., 1994; Cummings et al., 1995; Hasegawa and Adachi, 1996)。

ヒトゲノム解析が進むにつれて、核ゲノムに mtDNA の一部が挿入されていることが報告され、これは「numt (integrated mitochondrial DNA in nuclear genome)」と称されている (Lopez et al., 1994; Sorenson and Quinn, 1998)。ヒトにおける numtDNA は、106~14,654bp の大きさが報告されている (Mourier et al., 2001)。mtDNA を PCR で遺伝子あるいは領域

特異的に増幅する場合、血液あるいは組織から抽出した全ゲノム DNA を鋳型にすると、ミトコンドリアにある mtDNA と核ゲノムにある numtDNA がともに PCR によって増幅することがある (Sorenson and Quinn, 1998)。mtDNA 塩基置換様式と numtDNA の塩基置換様式とは異なる (Arctander, 1995)。リュウキュウガモ属 (genus *Dendrocygna*) の 7 種で mtDNA *COI* 遺伝子のアミノ酸配列に、リュウキュウガモ属オオリュウキュウガモ (Wandering Whistling-Duck ; *Dendrocygna arcuata*) の mtDNA および numtDNA の *COI* のアミノ酸配列を加えて分子系統樹を作成すると、オオリュウキュウガモの mtDNA と numtDNA とは別のクラスターに位置する (Sorenson and Quinn, 1998)。このことから mtDNA による分子系統学的解析に numtDNA を誤って用いると正しい系統を推定することができない。したがって、分子系統学的解析をする場合には、まず核ゲノムとミトコンドリアゲノムとを分離した上で、ミトコンドリアゲノムのみを鋳型にした PCR を行う必要である。

mtDNA の全塩基配列の決定は、当初、CsCl/Ethidium Bromide を用いた超遠心法や phenol/chloroform 法 (Arnason et al., 1991; Hiendleder et al., 1998; Kumazawa et al., 1998; Zardoya and Meyer, 1998 ; Saito et al., 2000) で mtDNA だけを分離した後に、mtDNA を制限酵素で切断してクローニングし、多数のクローンの塩基配列を決定したものをコンピュータで編集する方法で行われていた (Anderson et al., 1981; Desjardins and Morais, 1990; Arnason et al., 1996; Harlid et al., 1997; Janke and Arnason, 1997; Bjorn and Arnason, 1998)。これらの方法は、多くの量の mtDNA が必要であり、作業も煩雑である。Zardoya and Meyer (1997) は、シーラカンスについて核およびミトコンドリアの全 DNA をまず抽出し、mtDNA において脊椎動物で保存されている領域に 24 セットの PCR プライマーを設計して PCR を行い、その後平均 800bp の増幅産物をアセンブルして mtDNA 全塩基配列を決定した。しかしながらこの方法では、上述したように核に挿入された numtDNA も PCR 増幅され解析されている可能性が大いに考えられる。その後、LA-PCR (Long and Accurate PCR) 法が開発され (Cheng et al., 1994)、一般に用いられるようになると、血液あるいは培養細胞から分離した全 DNA (核およびミトコンドリアゲノム DNA) を鋳型にして 2.0-16kbp の DNA 断片が増幅され、これを超音波でランダムに切断した後に塩基配列を決定する方法 (ショットガンシークエンス法) で mtDNA 全塩基配列が決定された (Yamamoto et al., 2000)。この方法で mtDNA の塩基配列を決定するには、mtDNA が約 17kbp であると仮定するとその約 6 倍に当たる 100 クローン程度の塩基配列を読む必要がある。さらに読み終えた塩基配列を整列化し、編集することは非常に煩雑となる。また別の方法として、LA-PCR 産物をまずクローニングし、そのベクターの上にある塩基配列を利用した PCR プライマーで可能な限り塩基配列を読み、その決定した塩基配列上に新たに PCR プライマーを作成して読み進む方法 (プライマーウォーキング法) がある。この方法を用いて mtDNA の全塩基配列を行った報告もある (Kumazawa et al., 1999)。この方法は、編集作業は非常に容易であるが、塩基配列を読むごとにプライマーを設計しなければならず、時間とコストがかかってしまう。

本章では、キジ目の分子系統学的解析を行うためにミトコンドリアゲノム全塩基配列を正確かつ効率よく決定する方法を確立することを目的として、まず (1) 核ゲノムとミトコンドリアゲノムとを分離する方法の確立、(2) 効率の良い塩基配列の決定方法の確立を行った。(1) および (2) を行うために、ニホンウズラ (Japanese Quail; *Coturnix japonica*) およびヒメウズラ (Blue-breasted Quail; *Coturnix chinensis*) のミトコンドリアゲノムから

mtDNA の全塩基配列の決定を試みた。

【材料と方法】

ニホンウズラおよびヒメウズラの全ゲノム DNA は、広島大学で飼育しているオス個体の肝臓を 100mg 採取し、Protenase K および Phenol・chlroform 法で抽出した (Sambrook and Russel, 2000)。

numtDNA の混入をさけるため、抽出したゲノム DNA を鋳型にして、まず TaKaRa LA Taq™ DNA Polymerase (TaKaRa-BIO)を用い、LA-PCR 法で mtDNA の約 16,000bp を増幅した。すでに DNA バンクに登録されているニワトリ (chicken: *Gallus gallus* var. *domesticus*; DDBJ/EMBL/Genbank accession number : X52392)、アメリカホジハジロ (Redhead: *Aythya americana*; AF090337) およびコウノトリ (White stork: *Ciconia boyciana*; AB026193) の mtDNA 全塩基配列を CLUSTAL X Ver.1.8 (Thompson et al. 1997) を用いてアライメントし、よく保存されていた 16S ribosomal RNA (*16SrRNA*) および Cytochrome b (*Cytb*) 遺伝子の 2 カ所に LA-PCR のプライマーを設計した (図 2-1)。設計した 4 種のプライマーはそれぞれ 35bp であった。

LA16SF (forward primer) : 5'- CCT ACG TGA TCT GAG TTC AGA CCG GAG CAA TCC AG
LA16SR (reverse primer) : 5'- TGC ACC ATT AGG TTG TCC TGA TCC AAC ATC GAG GT
LACytbF (forward primer) : 5'-TAC ACG AAT CAG GCT CAA ACA ACC CCC TAG GCA TC
LACytbR (reverse primer) : 5'-AGA TAC AGA TGA AGA AGA ATG AGG CGC CGT TTG CG

LA-PCR 反応液は、TaKaRa LA Taq™ DNA Polymerase に添付されている 10×LA PCR Buffer II with Mg²⁺ free を 5.0 μl、MgCl₂ (25mM) を 5.0 μl、dNTPs (各 2.5mM) を 8.0 μl、20pmol/μl に希釈調製したプライマーをそれぞれ 0.75 μl、200~800 μg/ml の濃度に調整した DNA 溶液を 2.0 μl、TaKaRa LA Taq™ DNA Polymerase (5U/μl) を 0.5 μl を加え、滅菌蒸留水で全量 50 μl にした。LA-PCR には GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)を用い、二本鎖の鋳型 DNA を 94℃ で 1 分熱変成した後に、94℃ で 30 秒と 68℃ で 16 分を 30 回交互に繰り返して行った。LA-PCR 反応液から未反応のプライマーおよび mtDNA などの夾雑物を除くために、約 16kb の LA-PCR 産物を 0.6%アガロースゲル電気泳動で分離し、ゲルから切り出した後に、LA-PCR 産物を磁気ビーズ法 (MagExtractor MFX-6000, TOYOBO) で精製した。

LA-PCR プライマー設計と同様の方法を用い、比較的保存された領域に 37 セットのプライマーを設計した。PCR プライマーセットの塩基配列情報を表 2-1 に示した。これらの PCR プライマーの設計条件は、以下の 4 項目に準じて設定した。(1) 鳥類においてすでに mtDNA の全塩基配列が解析されているニワトリ (chicken ; キジ目キジ科ヤケイ属)、アメリカホシハジロ (Redhead ; カモ目カモ科スズガモ属)およびコウノトリ (White storck ; コウノトリ目コウノトリ科コウノトリ属) の mtDNA の塩基配列をアライメントした配列から比較的保存された領域および塩基配列が各種で変異の少ない tRNA 領域を、主として PCR プライマーの部位として選んだ。(2) PCR 産物の大きさが 500~1,200bp になるように設計した。(3) 塩基配列を決定した後に、配列の編集を簡便にするため、mtDNA における各 PCR 産物が最低 100bp オーバーラップするように設計した。(4) 各 PCR のアニーリング温度を全てのプライマーセットにおいて 58℃となるように設計した。この PCR プ

プライマーを用い、精製した LA-PCR 産物を鋳型にして PCR を行った。PCR の反応液量を全量 20 μ l とし、DNA 合成酵素には Ampli-Taq GOLD DNA polymerase (Applied Biosystems) を用いた。PCR 反応液は、Ampli-Taq GOLD DNA polymerase に添付されている GeneAmp^R10 \times PCR Buffer II & MgCl₂ Solution を 2.0 μ l、同様に添付される dNTPs (各 400 μ M) を 2.0 μ l、20pmol/ μ l に希釈調整したプライマーをそれぞれ 0.4 μ l ずつ、200~800 μ g/ml の濃度に調整した LA-PCR 産物を 0.5 μ l、Ampli-Taq GOLD DNA polymerase (2.5U) を 0.1 μ l を加え、滅菌蒸留水で全量 20 μ l にした。PCR には GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用い、95 $^{\circ}$ C で 9 分間 DNA polymerase を活性化させた後に、95 $^{\circ}$ C で 1 分、58 $^{\circ}$ C で 30 秒および 72 $^{\circ}$ C で 1 分を 40 回繰り返し DNA を増幅した。

Exonuclease I および Shrimp Alkaline Phosphatase (Exo-SAP-IT; Reagent pack for use with Sequence PCR Product Sequence Kit, Amersham Pharmacia biotech) を用いて PCR 増幅産物を精製したのち、Sequencing の鋳型とした。Sequencing 反応には 1 反応で PCR と同様のプライマーの一方のみを用い、Dye Deoxy-terminator 法 (ABI PRISMTM BigDye Terminator Cycle Sequencing kit Ver. 1.0 あるいは Ver. 3.0, Applied Biosystems) でターゲット配列を蛍光標識した。蛍光標識にもちいた Pre-Mix sequence 反応液は、メーカー製品マニュアルの 8 倍に希釈して調製した。このため Pre-Mix sequence 反応液と別に作成した Sequence 反応バッファー (2.5 \times sequence buffer; 200mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, pH9.0) とを 1 : 7 の割合に混合して Sequence 反応を行った。Sequence 反応液は、各反応チューブあたり Pre-Mix sequence 反応液を 1.0 μ l、2.5 \times sequence buffer を 7.0 μ l、20pmol/ μ l の primer を 0.23 μ l、精製した PCR 産物を 3.0 μ l、これらに滅菌蒸留水を加えて全量を 20.0 μ l とした。Sequence 反応には、GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) を用い、95 $^{\circ}$ C で保温したアルミブロックにサンプルチューブを乗せ、95 $^{\circ}$ C で 10 秒、50 $^{\circ}$ C で 30 秒および 60 $^{\circ}$ C で 4 分を 25 回繰り返し鋳型の DNA を標識した。Sequence 反応の後、蛍光標識した Sequence 反応後の DNA を SephadexTM G-50 Superfine (Amersham Pharmacia Biotech AB) カラムに通して、未反応蛍光色素および未反応プライマーを除去し、標識した DNA を精製した。この精製産物を濃縮乾燥システム (VC96N; タイテック社) で乾燥し、Formamide と Bluedextran を 5 : 1 で混合した Loading Dye を各サンプル 4 μ l ずつ加えてサンプルを溶解した。この溶液に 95 $^{\circ}$ C、2 分の熱処理を施した後、氷上で急冷し、DNA を一本鎖の状態を保った。この溶液から、1.7 μ l を ABI377 Sequencer で電気泳動した。電気泳動は 48 サンプルずつ行い、ABI377 Sequencer のマニュアルにしたがって解析を行った。決定した塩基配列は AutoAssembler Ver.2.1 (Applied Biosystems) を用い、ニワトリ mtDNA (Desjardins and Morais, 1990) の塩基配列情報をもとにつなぎ合わせて編集し、GENETYX program package (Ver.10.3; Software development Inc.) を用いて解析した。以上の操作を 1 つのサンプルで 2 回行い、解析の再現性を確認した。

【結果】

ニホンウズラおよびヒメウズラ mtDNA の全塩基配列の決定

ニホンウズラおよびヒメウズラの全 DNA を鋳型にした mtDNA 特異的 LA-PCR において、LAcytb および LA16S のプライマーセットにより、ともに想定される大きさの LA-PCR 産物が電気泳動によって明瞭に確認された。この LA-PCR 産物のみを分離し、精製したものを PCR の鋳型に使った。本研究で設計した 37 セットの PCR プライマーを用いてニホンウズラおよびヒメウズラ mtDNA の全塩基配列を決定した（付表 2-1 および付表 2-2）。

本研究で決定したニホンウズラおよびヒメウズラ mtDNA の全塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank に登録し、その登録番号はそれぞれ AP003195 および AB073301 であり、それぞれの登録時にアノテーションを作成して添付した（付表 2-1 および付表 2-2）。

ニホンウズラ mtDNA の大きさは 16,697bp とニワトリよりも 78bp 小さかった（表 2-2）。ニホンウズラ mtDNA は、ニワトリ mtDNA の遺伝子セット（Desjardins and Morais, 1990）と同様であった（表 2-2）。ニホンウズラとニワトリとの mtDNA 13 遺伝子および 2 rRNA においてその相同性を比較すると、78.0～89.9%であった。その中で ATPase subunit 8（*ATPase8*）では 78.0%と低く、NADH dehydrogenase subunit 4 light-chain（*ND4L*）では最も高く、89.9%であった（表 2-2）。各遺伝子の塩基組成は、ニホンウズラとニワトリとの間に差異は認められなかった。ニホンウズラの D-loop、*12SrRNA* および *16SrRNA* は、ニワトリに比べてそれぞれ 72bp、2bp および 6bp 短かった。また、ウズラの cytochrome oxidase subunit I（*COI*）、*ATPase8* および *ND5* は、ニワトリよりもそれぞれ 1 アミノ酸（3bp）だけ長かった。その他の遺伝子および tRNA の大きさは同じであった。

ヒメウズラの全 mtDNA の塩基配列は 16,687bp であった。ヒメウズラの 13 遺伝子、*12SrRNA*、*16SrRNA* および 22 tRNA の大きさは、ニワトリ mtDNA（Desjardin and Morais, 1990）および本研究で決定したニホンウズラ mtDNA と比較しながら表 2-3 に示した。ヒメウズラ mtDNA は、ニワトリよりも 88bp 小さく、ニホンウズラよりも 10bp 小さいものであった。ヒメウズラでは、とくに D-loop および *16SrRNA* がニワトリおよびニホンウズラよりも小さく、*ND5* がニホンウズラよりも 3bp（1 アミノ酸）小さかった。またヒメウズラの *ATPase8* はニワトリよりも 3bp（1 アミノ酸）大きかった。その他の遺伝子および tRNA の大きさはニワトリおよびニホンウズラと同じ大きさであった。ヒメウズラ mtDNA とニワトリ mtDNA およびニホンウズラ mtDNA との相同性は、*12SrRNA*、*16SrRNA* および 13 遺伝子間で比較すると鳥種間および遺伝子間で異なっていた（表 2-3）。ヒメウズラとニワトリとの相同性は、*ATPase8* が 78.0%と最も低く、*12SrRNA* が 89.6%と最も高く、その平均相同性は 85.2%であった。またヒメウズラとニホンウズラとの相同性は、*ATPase8* が 84.5%と最も低く、*ND4* が 93.5%と最も高かった。その平均相同性は 88.7%であった。

ニホンウズラおよびヒメウズラ mtDNA はともに、哺乳類で見られる *ND6-Cytb-D-loop* の構造とは異なり、*Cytb*、tRNA-Thr、tRNA-Pro、*ND6*、tRNA-Glu および D-loop となっていた（付表 2-1 および付表 2-2）。その他の遺伝子および tRNA のセットおよびその構造は哺乳類の mtDNA と同様であった。

ニホンウズラおよびヒメウズラ mtDNA の *ND3* 遺伝子において 1 bp の extra one base（シトシン：C）が見られた。*COI* 遺伝子における開始コドンは、ATG（Met）ではなく、GTG

(Val)であった。その他の遺伝子は ATG であった。また、*COIII* および *ND4* における終止コドンは、完全なトリプレットとして mtDNA 塩基配列上には見いだされず、ともに T のみであった。

本解析はニホンウズラおよびヒメウズラでそれぞれ 2 回行ったが、その 2 回の解析で差は見られなかった。

【考察】

mtDNA の全塩基配列決定法の確立

本章では、numtDNA (Lopez et al., 1994; Sorenson and Quinn, 1998) を除くためにまず LA-PCR 法を用いて、mtDNA のほぼ全長である 16kbp を増幅して解析に用いた。この LA-PCR 産物を鋳型に 37 セットの PCR プライマーを用いて解析したことで、ショットガンシーケンス法を用いるよりも少ないシーケンス回数で mtDNA 全塩基配列を決定でき、さらに 2 週間以内でほぼ 16kbp の塩基配列を決定できた。この塩基配列の解析は 2 回行い、2 回の結果を比較すると、塩基配列解析テクニックによる差異は認められなかった。このことにより、numtDNA を排除することができたと考えられた。また決定した塩基配列を編集すると環状構造となることで mtDNA の中に核 DNA が確認できなかったことから、LA-PCR に LA-Taq を用いることで PCR による間違っただ塩基の取り込みはなかったものと判断された。LA-Taq は間違っただ塩基の取り込みが 10,000bp に 1bp 以下であり、Taq DNA polymerase に比べ、その取り込みミスは 13 分の 1 以下になると報告されている (Barns, 1994)。本法は、1) numtDNA を完全に除去できること、2) LA-Taq を用いることで PCR の際の間違っただ塩基の取り込みを低く抑えることができることから、mtDNA の全塩基配列の決定に非常に有用であると結論付けられた。

本章で確立した mtDNA 全塩基配列の決定方法では、37 セットのプライマーセットによる PCR 産物の塩基配列を決定し、その結果をアセンブルすることでニホンウズラおよびヒメウズラ mtDNA の全塩基配列をこれまで報告された方法に比べて、PCR 操作およびシーケンスは 37 サンプルと少なく効率よく決定できた。Miya et al. (2003) は、LA-PCR について 7 つのプライマーを設計し、PCR プライマーを 180 個用意して、硬骨魚類の mtDNA 全塩基配列を決定した。Miya et al. の方法は、本研究で用いた方法に比べ、プライマーの設計に関わるコストおよび塩基配列を決定する作業量から判断すると効率的ではない。これは硬骨魚類における多様性が、本研究の対象であるキジ目よりも大きいため、PCR 増幅の成功率が低いことによるものと思われる。ニホンウズラおよびヒメウズラの mtDNA の大きさがそれぞれ約 16,697 および 16,687bp であったことから、37PCR プライマーセットでは 1 プライマーあたり約 450bp 読み進んだことになり、各 PCR 産物間のオーバーラップを平均約 150bp とすると 1 プライマーあたり約 600bp の解析をしたことになる。現在では、1 プライマーセットあたり 800~1,000bp は解読できるため、PCR プライマーを再設計し、さらに効率よく塩基配列の決定を行うことも可能であると考えられる。

ニホンウズラおよびヒメウズラ mtDNA の全塩基配列

ニホンウズラおよびヒメウズラの mtDNA 全塩基配列を決定し、その大きさがそれぞれ約 16,697 および 16,687bp であった。ニホンウズラおよびヒメウズラの mtDNA の遺伝子配置は、哺乳類および爬虫類で見られる *ND5*、*ND6*、*tRNA-Glu*、*Cytb*、*tRNA-Thr*、*tRNA-Pro*、*D-loop* の構造 [ヒト (*Homo sapiens*) :Anderson et al., 1981; ウシ (*Bos taurus*) :Anderson et al., 1982; ヒツジ (*Ovis aries*) :Hiendleder et al., 1998; プタ (*Sus scrofa*) :Ursing and Arnason, 1998; クジラ (*Balaenoptera physalus*) :Arnason et al., 1991; ワニ (*Alligator mississippiensis*) :Janke and Arnason, 1997; ヘビ (*Dinodon semicarinatus*) :Kumazawa et al., 1998; カメ (*Pelomedusa subreifa*) :Zardoya and Meyer, 1998; トカゲ (*Eumeces egregius*

lividus) :Kumazawa and Nishida, 1999] とは異なり *ND5*, *Cytb*, *tRNA-Thr*, *tRNA-Pro*, *ND6*, *tRNA-Glu* および *D-loop* の順であった。(付表 2-1 および付表 2-2)。その他の遺伝子および *tRNA* のセットおよびその構造は同様であった。ニホンウズラおよびヒメウズラの *mtDNA* はこれまで報告されている鳥類(ニワトリ (*Gallus gallus* var. *domesticus*) :Desjardins and Morais, 1990; アメリカホシハジロ (*Aythya americana*) :Johnson and Sorenson, 1998; コウノトリ (*Ciconia boyciana*) :Yamamoto et al., 2000; ダチョウ (*Struthio camelus*) :Harlid et al., 1997; レア (*Rhea americana*) :Harlid et al., 1998) の遺伝子セットおよび遺伝子配置と同じであった。この遺伝子配置は鳥類のみに特有の配置であることが報告されており (Quinn, 1997)、本研究の結果もこれと一致するものであった。

ニホンウズラおよびウズラ *mtDNA* の塩基構成は、それぞれ A が 5200、C が 5219、G が 2197、T が 4081 および A が 5175、C が 5199、G が 2248、T が 4065 であり、グアニン (G: guanine) の割合が低かった(付表 2-1 および付表 2-2)。この結果は、ニワトリ (Desjardins and Morais, 1990) をはじめとする鳥類における塩基組成と同じ傾向であった。このグアニンの割合が少ないことは、1) 鳥類特有であり塩基組成上のバイアスが生じたため、2) 塩基の飽和効果 (saturation effect) であると説明されており (Kocher et al., 1989)、本研究の結果もこれと一致した。

ニホンウズラ *mtDNA* の部分配列(4,958bp)はすでに報告され(Desjardins and Morais, 1991; DDBJ/EMBL/GenBank accession numbers X57245 と X57246)、本章で決定したニホンウズラの *mtDNA* との相同性は、99%以上であった。本章で決定したニホンウズラ *mtDNA* と 4,958bp とを比較すると、33bp で塩基の違いがあった。そのうち 27bp が *D-loop* 領域であり、*12SrRNA* で 3bp、*ND6* で 4bp および *tRNA-Glu* で 1bp の違いがあった。*D-loop* における変異は、*D-loop* 全体の 2.16%であった。パンダおよびニワトリにおける *D-loop* 領域の種内変異は、それぞれ 3%および 5%と報告されている (Su et al., 2001; Fumihito et al., 1996) ことから、本章で決定したニホンウズラと X57245 および X57246 とは種内変異レベル以下の変異であったものと推察された。

ニホンウズラおよびウズラ *mtDNA ND3* に C (シトシン) 1 塩基の挿入を見いだした(ニホンウズラでは第 10,866 番塩基、ヒメウズラでは第 10,859 番塩基; 付表 2-1 および付表 2-2)。これは鳥類において *ND3* 遺伝子の塩基配列がすでに登録されている Redhead (*Aythya americana* : AF090337; Johnson and Sorenson, 1998) および Peregrine falcon (*Falco peregrinus* : AF090338 ; Mindell et al., 1999) でも観察されている。この extra base はアミノ酸翻訳の過程ではスキップし、*ND3* 遺伝子の frame を維持していると考えられている (Mindell et al. 1998)。ニワトリ (Desjardins and Morais, 1990) およびコウノトリ (Yamamoto et al., 2000) には extra one base の報告はないが、第 5 章で決定した数品種のニワトリ (*Gallus gallus* var. *domesticus*) および 4 種のヤケイ (*Gallus gallus*, *Gallus sonneratii*, *Gallus lafayetii* および *Gallus varius*) の *ND3* 遺伝子においては 1 塩基の extra base が見られた。キジ目およびその近縁の鳥類において、*ND3* 遺伝子の構造解析が行われれば、この extra one base の挿入がいつ起こったのかが解明され、鳥類における系統進化マーカーの 1 つになるものと思われる。

両ウズラにおいて *COI* 遺伝子における開始コドンのみが、ATG (Met) ではなく、GTG (Val) であった。これはダチョウ (Harlid et al., 1997)、レア (Harlid et al., 1998)、ニワトリ (Desjardins and Morais, 1990) およびコウノトリ (Yamamoto et al., 2000) においても

同様であったが、ダチョウ (Harlid et al., 1997)、レア (Harlid et al., 1998) およびコウノトリ (Yamamoto et al., 2000) では *COII* 遺伝子においても GTG が開始コドンであったが、ニホンウズラおよびヒメウズラにおいては *COI* 以外の遺伝子における開始コドンは全て ATG であった。

COIII および *ND4* における終止コドンは、完全なトリプレットとして mtDNA 塩基配列上には見いだされず、ともに T のみであった。T のすぐ次には、tRNA-Gly および tRNA-His が続いた。これは、mtDNA からの転写後 A の付加が起こり、TAA の終止コドンとして翻訳を終了させることが示唆されている (Ojala et al., 1981)。

以上のことから、本研究で開発した mtDNA 全塩基配列の決定法を用い、ニホンウズラおよびヒメウズラの mtDNA 全塩基配列を決定し、本法は mtDNA の全塩基配列の決定には有用であることが示唆された。

【要約】

キジ目の分子系統学的解析を行うためにミトコンドリアゲノム全塩基配列を正確かつ効率よく決定する方法を確立することを目的として、(1) 核ゲノムとミトコンドリアゲノムとを分離する方法の確立、(2) 効率の良い塩基配列の決定方法を確立をした。この方法を用いて、ニホンウズラ (Japanese Quail; *Coturnix japonica*) およびヒメウズラ (Blue-breasted Quail; *Coturnix chinensis*) のミトコンドリアゲノム全塩基配列を決定した。LA-PCR 法を用いて、全ゲノム DNA から mtDNA のほぼ全長である約 16kbp をまず増幅して解析に用いた。解析は 2 回行い、この 2 回において塩基配列解析テクニックによる差異がみられなかった。さらに 37 プライマーセットによる PCR 産物の塩基配列を直接決定し、その結果をアセンブルすることでニホンウズラおよびヒメウズラ mtDNA の全塩基配列を決定した。これまでの方法に比べて正確かつ効率よく決定できた。よって本法は mtDNA の全塩基配列の決定に非常に有用であると結論付けられた。

決定したニホンウズラおよびヒメウズラ mtDNA はともに、鳥類型である *Cytb*、tRNA-Thr、tRNA-Pro、*ND6*、tRNA-Glu および D-loop であった。ニホンウズラおよびヒメウズラ mtDNA の大きさは、それぞれ 16,697bp および 16,687bp であった。ヒメウズラ mtDNA は、ニワトリよりも 88bp 小さく、ニホンウズラよりも 10bp 小さいものであった。ヒメウズラでは、とくに D-loop および *16SrRNA* がニワトリおよびニホンウズラよりも小さく、*ND5* がニホンウズラよりも 3bp (1 アミノ酸) 小さかった。またヒメウズラの *ATPase8* がニワトリよりも 3bp 大きかった。その他の遺伝子および tRNA の大きさはニワトリおよびニホンウズラと同じ大きさであった。ヒメウズラ mtDNA とニワトリ mtDNA およびニホンウズラ mtDNA との相同性は、*12SrRNA* および *16SrRNA* を含む 13 遺伝子間で比較すると鳥種間および遺伝子間で異なっていた。ヒメウズラとニワトリとの相同性は、*ATPase8* が 78.0% と最も低く、*12SrRNA* が 89.6% と最も高く、その平均相同性は 85.2% であった。またヒメウズラとニホンウズラとの相同性は、*ATPase8* が 84.5% と最も低く、*ND4* が 93.5% と最も高かった。その平均相同性は 88.7% であった。ニホンウズラおよびヒメウズラ mtDNA の *ND3* 遺伝子において 1 bp の extra one base (シトシン: C) が見られた。*COI* 遺伝子における開始コドンが、ATG (Met) ではなく、GTG (Val) であった。その他の遺伝子は ATG であった。また、*COIII* および *ND4* における終止コドンは、完全なトリプレットとして mtDNA 塩基配列上には見いだされず、ともに T のみであった。

以上のように、本研究で開発した mtDNA 全塩基配列の決定法を用い、ニホンウズラおよびヒメウズラの mtDNA 全塩基配列を決定した結果、本法は mtDNA の全塩基配列の決定には非常に有用であることが示唆された。

Table 2-1 thirty-seven sets of PCR primers

primer name	Forward primer	size 5' position 1)	3' position 1)	primer name	Reverse primer	size 5' position 1)	3' position 1)
AV1F2	AGG ACT ACG GCT TGA AAA GC	20	16732	AV1R2	CAT CTT GGC ATC TTC AGT GCC	21	1276
f1-3m	TGG TTC CTC GGT CAG GCA CAT CC	23	523	r2-3m	TGC TTA AGG TTA ATT ACT GCT G	22	1491
AV(JQ)2-3m	GGG GTA TCT GCC CCT CTT CAG T	22	591	AV2R	TCT TGG CAT CTT CAG TGC CA	20	1401
AV3F	ATA TAC ATG CAA GTA TCC GC	20	1339	AV3R	TTA GAA AAT GTA GCC CAT TTC T	22	2045
AV4F	AAG ACA GGT CAA GGT ATA GC	20	1992	AV4R	CTC TTT TGC AAC AGA GAC GG	20	2673
AV5F	GCA TCA TGA TTT AGC AAG AAC	21	2555	AV5R1	GTT AGG ATA CCG CGG CCG TT	20	3293
AV6F	CAA GTA TTG AAG GTG ATG CC	20	3233	AV6R	CAT AGA TAG AAA CCG ACC TG	20	3832
AV7F	TAA GGG TTC GTT TGT TCA AC	20	3751	AV7R	GCT AGG GAG AGG ATT TGA AC	20	4040
f7-8m	ACT CCT CCT AGT ACG AAA GGA	21	3835	f7-8m	TTT TCG TTC TAC AAG TGT TAA	21	4148
AV8F	AAA TGC AAA AGG CTT AAG CC	20	3989	AV8R	GTA TAA TGT TGG CGT ATT CG	20	4768
AV9F	GCC CCA TTT GAC CTA ACA GA	20	4657	AV9R	AAC CAT CAT TTT CCG GGT AT	20	5224
AV10F1	TCA CTA TGA TAA AGT GAA CAT AGA	24	5051	AV10R	GGA TGA GAA GGC TAG GAT TTT	21	5791
f10-11m	CCC ATT CCA CTT CTG ATT CCC	21	5567	r10-11m	GAG ATG AGT ATT GTT GAC AGT	21	5938
AV11F	CTA AAC CAA ACA CAA ACA CGA	21	5750	AV11R	GGG TTA GGC TGT AGT CCT TT	20	6623
AV12F2	GTT AAA CTC TCT TAG TTT CTG	21	6337	AV12R	GAG GAG TCA GAA GCT TAT GTT	21	6964
f12-13m	TCG TCA TAA TCT TCT TTA TAG	21	6835	f12-13m	GTG ATA AAG TTG ATG GCT CTT	21	7141
AV13F	ATA GCA TTC CCC CGC ATA AA	20	6923	AV13R	ATA GTG GAA GTG GGC GAC TA	20	7784
AV14F2	AAATGA GAC CCC CCT ATG CTA	21	7642	AV14R	CTA TGT AAT TGG TTT ACT AAC	21	8288
AV15F2	GTT AGT AAA CCA ATT ACA TAG	21	8268	AV15R2	TGC ATA GCT TCT TAA TGG TTA	21	9034
f15-17l	TTC ATC ACC ACT CGA CCA GGA GTG	24	8877	f15-17l	ACT ATG TGG TAG GAG TGT GCT TGG	24	9954
AV16F	CAC AGC TAC ATA CCC ATT GT	20	8939	AV16R	ACT ATG TGG TAG GAG TGT GC	20	9956
AV17F	ATA ATC CAA GCC TAC GTC TTC	21	9866	AV17R	TGT TCA TTG CTC TTC TCT GGG	21	10784
f17-19l	CAC TTC GTA GAC ATC ATC TGA	21	10649	f17-19l	TAT GCC TGT TCA GAG GGT TAG	21	11659
AV18F	GCT CTT CTA GTA TAC TCA TTA CA	23	10709	AV18R	AGG CTG TAT ATT GTG GTG TTA	21	11582
f18-20l	CAA TGC TAA AGA TCA TCC TAC CAA	24	11484	f18-20l	AGG GAG GAT GTT AGT CCA TGG GAG	24	12459
AV19F	CAC AAC CTA AAC CTT CTA CAA	21	11468	AV19R	TGG GAG ATT ATG AGG ATT ATT G	22	12444
f19-21l	CCT CAC CCT AGC CCT ATG AGG	21	12268	r19-21l	CAT TAC TTT TAC TTG GAT TTG	21	13076
AV20F	CAA ACA GAC CTA AAA TCC CTC	21	12322	AV20R	TAC TTT TAC TTG GAT TTG CAC C	22	13073
AV21F	TGC ATC TGA GCT TTA AAC CTC	21	12971	AV21R2	GCA ACT ACT ATT GTG CTG GA	20	13836
f21-22m	CTA AGC ATA GCA TGA CTA GCC	21	13623	f21-22m	ATG AGG CCT AGT TGG CTT GA	20	14008
AV22F	CAG CAA TAG AAG GCC CAA CC	20	13776	AV22R	AGT TCT AGG GCT AGG ATA ATT	21	14583
f22-23m	GAA AAC CTA AAC ACC TCA TAC	21	14259	f22-23m	TAG GGG GTT AAA GTA GCC TA	20	14666
AV23F	TCA CAA AAA CTG CTG CCA TC	20	14526	AV23R	CCT GTG TTT CAG GTT TCC TT	20	15244
f23-25l	ACA ATA CCG CTG ACT CAT CCG GAA	24	15114	f23-25l	AGT AGT TTA TTT GAA AAT ACC AGC	24	16172
AV24F1	GCC TCA TTC TTC ATC TG	20	15156	AV24R	AAT ACC AGC TTT GGG AGC TG	20	16156
AV25F	CAT TG TCT TGT AAA CCA AAA AC	23	16062	AV25R	CCT AAC CCG TAG TCC TT	20	16751
f25-1m	ACC CCA TAA TAC GGC GAA GGA TTA G	25	16620	f25-1m	ATG TCC TGT AAC CAT TCA TAG T	22	347
			16644				326

1): 5' and 3' positions in X52392, DDB/EMBL/GenBank accession number of chicken complete mitochondrial DNA sequence (Desjardins and Morais, 1990).

Table 2-2. *Coturnix japonica* (Japanese quail) mtDNA features and comparison with *Gallus gallus* var. *domesticus* (chicken) and *Coturnix chinensis* (Blue-breasted quail) mtDNAs

Genes and features	Location	Size (bp)	Codon/Initial	Codon/Terminal	chicken 1) size (bp)	% identity 1) with Japanese quail	Blue-breasted quail 2) size (bp)	% identity 2) with Japanese quail	% identity 3) with Japanese quail	% identity 4) with Japanese quail
Control region (<i>D-loop</i>)	1-1155	1155			1227	76.3	1150	76.3	76.3	87.4
tRNA-Phe	1156-1222	67			69	85.5	67	85.5	85.5	95.5
12S rRNA	1223-2196	974			976	89.4	973	89.4	89.4	91.2
tRNA-Val	2197-2267	71			73	86.5	72	86.5	86.5	80.6
16S rRNA	2268-3882	1615			1621	86.1	1607	86.1	86.1	88.7
tRNA-Leu	3883-3956	74			74	97.5	74	97.5	97.5	95.9
NADH dehydrogenase subunit 1 (<i>ND1</i>)	3956-4939	975	ATG	TAA	975	84.4	975	84.4	84.4	87.4
tRNA-Ile	4940-5010	71			72	90.3	71	90.3	90.3	95.8
tRNA-Gln*	5016-5086*	71			71	91.4	72	91.4	91.4	94.4
tRNA-Met	5086-5154	69			69	91.3	69	91.3	91.3	98.6
NADH dehydrogenase subunit 2 (<i>ND2</i>)	5155-6195	1041	ATG	TAG	1041	84.7	1041	84.7	84.7	85.4
tRNA-Trp	6194-6269	76			76	89.5	76	89.5	89.5	94.7
tRNA-Ala*	6275-6343*	69			69	88.4	69	88.4	88.4	94.2
tRNA-Asn*	6346-6418*	73			73	86.3	73	86.3	86.3	90.4
tRNA-Cys*	6419-6484*	66			66	81.8	66	81.8	81.8	90.9
tRNA-Tyr*	6484-6554*	71			71	94.4	71	94.4	94.4	98.6
Cytochrome oxidase subunit 1 (<i>CO1</i>)	6556-8106	1551	GTG	AGG	1548	96.0	1551	96.0	96.0	88.8
tRNA-Ser*	8098-8172*	75			75	96.0	75	96.0	96.0	100.0
tRNA-Asp	8175-8243	69			69	94.2	70	94.2	94.2	95.7
Cytochrome oxidase subunit 2 (<i>CO2</i>)	8245-8928	684	ATG	TAA	684	86.8	684	86.8	86.8	89.6
tRNA-Lys	8930-8997	68			68	94.1	68	94.1	94.1	95.6
ATPase subunit 8 (<i>ATPase8</i>)	8999-9166	168	ATG	TAA	165	78.0	168	78.0	78.0	84.5
ATPase subunit 6 (<i>ATPase6</i>)	9157-9840	684	ATG	TAA	684	84.6	684	84.6	84.6	87.6
Cytochrome oxidase subunit 3 (<i>CO3</i>)	9840-10625	786	ATG	T	786	87.0	786	87.0	87.0	89.8
tRNA-Gly	10625-10692	68			68	94.1	68	94.1	94.1	94.1
NADH dehydrogenase subunit 3 (<i>ND3</i>) †	10693-11044	352	ATG	TAA	351	84.9	352	84.9	84.9	89.5
tRNA-Arg	11046-11114	69			68	94.1	69	94.1	94.1	97.1
NADH dehydrogenase subunit 4 light-chain (<i>ND4L</i>)	11115-11411	297	ATG	TAA	297	89.9	297	89.9	89.9	89.2
NADH dehydrogenase subunit 4 (<i>ND4</i>)	11405-12784	1380	ATG	T	1380	84.5	1380	84.5	84.5	93.5
tRNA-His	12783-12851	69			65	94.2	69	94.2	94.2	95.7
tRNA-Ser	12853-12921	69			69	84.1	68	84.1	84.1	92.8
tRNA-Leu	12923-12993	71			71	93.0	71	93.0	93.0	95.8
NADH dehydrogenase subunit 5 (<i>ND5</i>)	12994-14814	1821	ATG	TAA	1818	83.5	1818	83.5	83.5	89.5
Cytochrome b (<i>Cytb</i>)	14814-15956	1143	ATG	TAA	1143	86.6	1143	86.6	86.6	88.5
tRNA-Thr	15960-16029	70			69	92.9	70	92.9	92.9	97.1
tRNA-Pro*	16032-16101*	70			70	84.3	70	84.3	84.3	92.9
NADH dehydrogenase subunit 6 (<i>ND6</i>)*	16107-16628*	522	ATG	AGG	522	85.4	522	85.4	85.4	88.5
tRNA-Glu	16630-16697*	68			68	97.1	68	97.1	97.1	98.5
mitochondrial genome		16,697			16,775		16,687			

*: coded on the complementary (L) strand, †: insertion of one extra base,

1) Desjardins and Morais, 1990; DDBJ/EMBL/GenBank accession number X52392

2) similarity (%) of the sequences between chicken and Japanese quail

3) Table 2-3, DDBJ/EMBL/GenBank accession number X52392

4) similarity (%) of the sequences between blue-breasted quail and Japanese quail

Table 2-3. *Coturnix chinensis* (blue-breasted quail) mtDNA features and comparison with *Coturnix japonica* (Japanese quail) and *Gallus gallus domesticus* (chicken) mtDNAs

Genes and features	Location	Size (bp)	Codon/Initial	Codon/Terminal	Japanese quail 1) size (bp)	% identity 2) with blue-breasted quail	chicken 3) size (bp)	% identity 4) with blue-breasted quail
Control region (<i>D-loop</i>)	1-1150	1150			1155	87.4	1227	76.2
tRNA-Phe	1151-1217	67			67	95.5	69	84.1
12S rRNA	1218-2190	973			974	91.2	976	89.6
tRNA-Val	2191-2262	72			71	80.6	73	73.7
16S rRNA	2263-3869	1607			1615	88.7	1621	86.1
tRNA-Leu	3870-3943	74			74	95.9	74	95.9
NADH dehydrogenase subunit 1 (<i>ND1</i>)	3953-4927	975	ATG	TAA	975	87.4	975	84.0
tRNA-Ile	4928-4998	71			71	95.8	72	91.7
tRNA-Gln*	5004-5075*	72			71	94.4	71	95.8
tRNA-Met	5075-5143	69			69	98.6	69	92.8
NADH dehydrogenase subunit 2 (<i>ND2</i>)	5144-6184	1041	ATG	TAG	1041	85.4	1041	82.3
tRNA-Trp	6183-6258	76			76	94.7	76	89.5
tRNA-Ala*	6265-6333*	69			69	94.2	69	91.3
tRNA-Asp*	6336-6408*	73			73	90.4	73	90.4
tRNA-Cys*	6411-6476*	66			66	90.9	66	84.8
tRNA-Tyr*	6476-6546*	71			71	98.6	71	94.4
Cytochrome oxidase subunit 1 (<i>CO1</i>)	6548-8098	1551	GTT	AGG	1551	88.8	1548	88.6
tRNA-Ser*	8090-8164*	75			75	100	75	96.0
tRNA-Asp	8167-8236	70			69	95.7	69	91.4
Cytochrome oxidase subunit 2 (<i>CO2</i>)	8238-8921	684	ATG	TAA	684	89.6	684	87.6
tRNA-Lys	8923-8990	68			68	95.6	68	92.6
ATPase subunit 8 (<i>ATPase8</i>)	8992-9159	168	ATG	TAA	168	84.5	165	78.0
ATPase subunit 6 (<i>ATPase6</i>)	9150-9833	684	ATG	TAA	684	87.6	684	83.3
Cytochrome oxidase subunit 3 (<i>CO3</i>)	9833-10618	786	ATG	T	786	89.8	786	87.3
tRNA-Gly	10618-10685	68			68	94.1	68	95.6
NADH dehydrogenase subunit 3 (<i>ND3</i>) †	10686-11037	352	ATG	TAA	352	89.5	351	84.9
tRNA-Arg	11039-11107	69			69	97.1	68	94.2
NADH dehydrogenase subunit 4 light-chain (<i>ND4L</i>)	11108-11404	297	ATG	TAA	297	89.2	297	88.2
NADH dehydrogenase subunit 4 (<i>ND4</i>)	11398-12777	1380	ATG	T	1380	93.5	1380	84.4
tRNA-His	12776-12844	69			69	95.7	69	92.8
tRNA-Ser	12846-12913	68			69	92.8	65	88.2
tRNA-Leu	12916-12986	71			71	95.8	71	94.4
NADH dehydrogenase subunit 5 (<i>ND5</i>)	12987-14804	1818	ATG	TAA	1821	89.5	1818	82.5
Cytochrome b (<i>Cyb</i>)	14804-15946	1143	ATG	TAA	1143	88.5	1143	86.0
tRNA-Thr	15950-16019	70			70	97.1	69	94.3
tRNA-Pro*	16022-16091*	70			70	92.9	70	85.7
NADH dehydrogenase subunit 6 (<i>ND6</i>) *	16097-16618*	522	ATG	AGG	522	88.5	522	85.4
tRNA-Glu	16620-16687*	68			68	98.5	68	98.5
mitochondrial genome		16,687			16,697		16,775	

*: coded on the complementary (C.) strand, †: insertion of one extra base,

1) Table 2-2, DDBJ/EMBL/GenBank accession number AP003195

2) similarity (%) of the sequences between Japanese quail and blue-breasted quail

3) Desjardins and Morais, 1990; DDBJ/EMBL/GenBank accession number X52392

4) similarity (%) of the sequences between chicken and blue-breasted quail

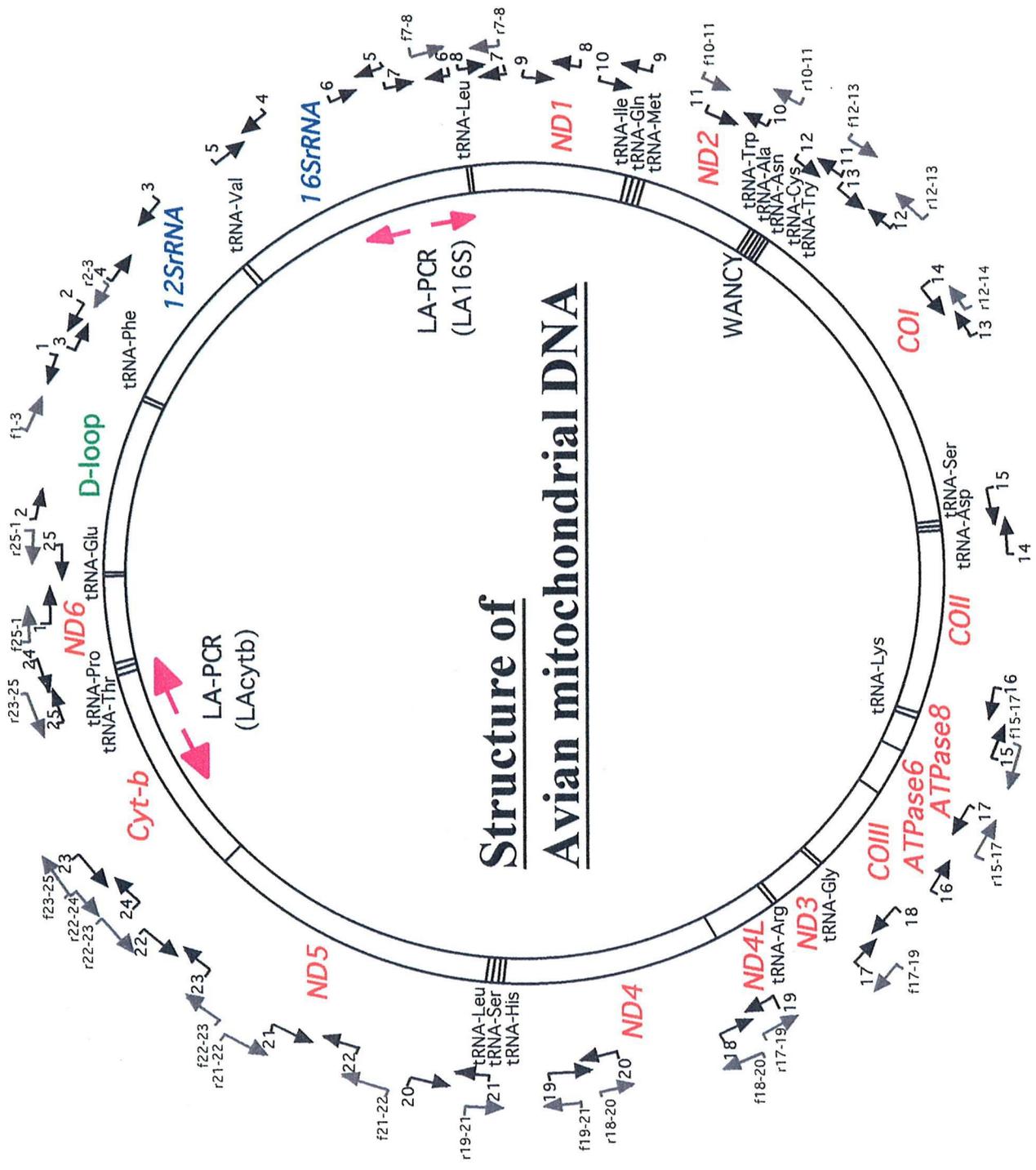


Figure 2-1. Avian mitochondrial DNA having 22 tRNAs, 2 rRNAs, and 13 genes with protein-coding region. **D-loop:** displacement loop, **rRNA:** ribosomal RNA, **CO:** cytochrome *c* oxidase subunit, **ND:** NADH dehydrogenase subunit, **Cyt-b:** cytochrome *b*, tRNA: transfer RNA, **LA-PCR:** long-accurate PCR primer sets inside of the mtDNA circle. →: 37 PCR primer sets outside of the mtDNA circle.

第三章. ミトコンドリア DNA によるキジ科における分子系統学的解析

【緒論】

キジ目キジ科には 45 属 177 種が分類されている (Sibley and Monroe 1990)。さらにキジ科の分類では、キジ科の下位にキジ亜科を設け (Peters, 1934 ; Mayr and Amadon, 1951 ; Johnsgard, 1973)、さらにキジ亜科を形態形質によりシャコ族とキジ族に分類している (Johnsgard, 1973, 1986, 1999)。シャコ族 (Perdicini; Old World quails, partridges, and francolins) は、尾羽が翼よりも短く、尾羽が平らで円形をし、羽色には光沢がなく雌雄差が見られない鳥とされている。また目の周りの広い範囲で皮膚が露出している (Johnsgard, 1999)。一般に小型でウズラ (*Coturnix japonica* や *Coturnix chinensis*) やコジュケイ (*Bambusicola thoracica*) などが含まれる (黒田・小宮, 1987)。一方、キジ族 (Phasianini; pheasants, junglefowl, and peafowl) は、尾羽が翼よりも長く、尾羽が丸く順に折り重なる鳥とされている。また雄の羽色は変化に富んだ光沢色で雌とは異なり、目の周辺部分にのみ露出した皮膚をもつ (Johnsgard, 1999)。一般に、大型でヤケイ (*Gallus gallus*) やキジ (*Phasianus colchicus*) などが含まれる (黒田・小宮, 1987)。以上のように、キジ科における族 (tribe) の分類は形態による表形分類 (Phenetic classification) である。しかしながら、族の分類がすべての分類モデルに採用されているとは限らない。このことは形態による表形分類の問題点である。

哺乳類において、表形形態および化石形態に基づいた系統仮説ではクジラ目 (Cetacea) は哺乳類の中でもウシ、ブタ、カバなどの偶蹄目との共通祖先から分岐したとされ、偶蹄目が単系統であるとされてきた。Graur and Higgins(1994)は、クジラ目、ウシ、ブタ、ラクダなどの偶蹄目および外群 (アウトグループ) にマウスとアザラシを用いて、ミトコンドリアのタンパク質をコードしている遺伝子のデータによる分子系統学的解析を行った結果、現存のクジラはウシなどの反芻亜目に最も近いと主張した。その後、反芻亜目の種をウシ、ヒツジ、キリン、シカおよびマメジカと増やすことにより、さらにクジラとカバに共通の散在性反復配列 (SINE) が存在することが判明したことで (Shimomura et al., 1996; Nomura et al., 1998)、クジラとカバは共通の祖先から進化したことが明らかとなった。さらに、偶蹄目およびクジラ目の祖先からまずラクダの仲間が分岐し、次にブタや イノシシ、さらにウシ・キリンなどの反芻亜目、そしてカバ、クジラの順に分岐していったことが明確に示された。したがって、系統において従来の表形分類は目単位で誤っていたことが判明し、分子生物学の進歩に伴い分子系統法が導入されてきたことで生物の系統推定がより正確になった。そこで本章では、キジ科におけるこれまでの表形分類を、分子系統学的解析で再検討することを目的として、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 配列による系統樹を作成し、考察する。本章では、特にキジ目キジ科キジ族およびシャコ族における系統関係の解析を中心に行った。

キジ目には「ウズラ (quail)」と命名されている鳥が 38 種いる。このうちキジ科 (Phasianidae) には 5 属 14 種が属し、その他の 24 種はキジ目ハウズラ科 (Odontophoridae) で 7 属に分類されている。また、ツル目ミフウズラ科にミフウズラ (Barred Buttonquail: *Turnix suscitator*) がいる。族 (tribe) による分類では、キジ科の「ウズラ (quail)」は、すべてシャコ族 (Perdicini) に属している (Johnsgard, 1973; 1999)。ウズラは、ヨーロッ

パ、アフリカ、アジア、オーストラリアおよびアメリカ大陸に広く分布している。ニホンウズラ (*Coturnix japonica*) は、当初ウズラ (*Coturnix coturnix*) の1亜種であるとされていたが、現在では1種として分類され (Sibley and Monroe, 1990; 日本鳥学会, 2000)、日本、韓国、中国、モンゴルを中心とした東アジアに生息し、冬季には東南アジアにも渡るとされている (Sibley and Monroe, 1990)。

家禽学および家禽産業の見地からウズラの代表的なものとして、ニホンウズラ、ヒメウズラがある。ニホンウズラは、日本に生息する4種のキジ目キジ科の1種であり、日本国内で肉用および卵用として家禽化された唯一の鳥である (日本鳥学会, 2000)。ニホンウズラは飼育が容易で成熟も早く、ニワトリに比べて体が小さいことが特徴で、ニワトリと同じ染色体数 ($2n=78$) を有し、多くの突然変異をもつことから実験動物としても改良されてきた (Padgett and Ivey, 1959; Reese and Reese, 1962; Lansdown et al., 1970; Cheng and Kimura, 1990)。

ヒメウズラ (Blue-breasted quail; *Coturnix chinensis*, also known as *Excalfactoria chinensis*) は、キジ科最小の種で、インドから中国南西部、インドネシア、フィリピン、グアムなどの島嶼部からオーストラリア南部まで分布している (Sibley and Monroe, 1990)。ヒメウズラは体重がニホンウズラの約半分と小型であり、強健で、世代交代が早く、産卵率が高い。体形がニホンウズラよりも小さいために取り扱いが容易で、ニワトリやウズラに比べて飼育面積が小さくてすみ、飼育経費の削減、高い精度の研究を少ない経費で数多く行うことが可能となり、ニワトリやニホンウズラの優れたパイロットアニマルとなりうる (Tsuchizuki, 1994)。また、ニホンウズラに比べ、羽毛色による雌雄の区別が容易であり、羽毛色のミュータントも報告されている (Tsuchizuki, 1995a,b)。実験動物として確立するためには、遺伝的統御および微生物を含む環境的統御が必要である。ヒメウズラを実験モデル動物とするためには、生物学的および系統遺伝学的基礎データが必要であるが、ほとんどないのが現状である。

第二章で決定したニホンウズラおよびヒメウズラの mtDNA の塩基配列を中心に、DDBJ/EMBL/GenBank に登録されている塩基配列データを用いて分子系統学的解析を行った。mtDNA を用いた分子系統学的解析の大部分は、主に1つの遺伝子あるいはD-loop領域が用いられている。第一章でも述べたように、1つの遺伝子ではその遺伝子の変異あるいは進化の方向に依存した系統樹、つまり遺伝子系統樹が作られることになり、その遺伝子系統樹では正しい系統解析を行ったことにはならず問題が生じる。あるいは解析に用いたその1つの遺伝子がたまたま収斂進化を起こしていた場合に、それと気づかずに間違った系統解析の結論を得ることがある。このため複数の遺伝子による分子系統学的解析が必要となる (Cao et al., 1994; Haswagawa and Adachi, 1996)。さらにタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列は全ての座位が同じような確率で置換が起こることはない。第3コドンの座位で置換が起こったとしてもランジッジョン型の置換であることからアミノ酸は変わらない。このため、第3コドンの座位では第1および第2コドンの座位に比べて塩基置換が起こりやすく、このために第3コドンの座位では置換速度が速くなっている。Graur and Higgins (1994) は、コドンを考慮せずに遺伝子全ての座位が同じような確率法則で置換しているものと仮定して系統解析を行った。この解析に対して、Hasegawa and Adachi (1996) は、コドンを考慮せずに遺伝子全ての座位が同じような確率法則で置換しているものと仮定するような非現実的なモデルが解析に与える影響を検討するために、コドンの

3つの座位について別々に解析を行い、その結果を用いて Graur and Higguns の説を修正して報告した。さらに Hasegawa and Adachi (1996) は系統樹を作成する際に、コドンの各座位のように進化の様式と進化速度の大きく異なる座位を一緒にして取り扱うことはその結果を偏らせ、大変危険であると述べた。

分子系統学的解析では、これまで UPGMA (非加重結合法) ならびに NJ (近隣結合法) などの距離行列法が用いらてきた。これらの距離行列法では、進化速度がコドンの座位間で不均質であり、多重置換の効果を正確に評価することが難しく、系統樹推定に偏りが生ずることが考えられている (Hasegawa and Fujiwara, 1993 ; Adachi and Hasegawa, 1995a)。また形質状態法による系統樹の1つである MP (最節約法) は優れた系統樹推定法ではあるが、これは系統間に進化速度の差があり、しかも多重置換の効果が効いてくるような状況では偏った推定が行われることが知られている (Felsenstein, 1987)。一方、ML (最尤法) は、とくにミトコンドリア遺伝子を用いた系統樹の推定に対して最適なモデルが提唱されており (Adachi and Hasegawa, 1996)、特に脊椎動物の系統解析に有効であるとされている。

本章では、キジ目キジ科キジ族およびシャコ族における系統関係を明らかにするために、第二章で決定したニホンウズラおよびヒメウズラの mtDNA の全塩基配列からタンパク質をコードする2遺伝子 (cytochrome b (*Cytb*) 遺伝子 (1,143bp) および NADH dehydrogenase subunit 2 (*ND2*) 遺伝子 (1,041bp)) について、塩基配列をコドン座位に分けて ML 法により第1、第2コドンの塩基配列および第3コドンの塩基配列で系統樹を作成し、加えてアミノ酸配列からも系統樹を作成した。これらの系統樹をもとにキジ目キジ科の分子系統学的解析を行った。

【材料と方法】

分子系統学的な解析には、ニホンウズラおよびヒメウズラを含む 10 種のキジ目キジ科を用い、外群（アウトグループ）には、カモ目カモ科アメリカホシハジロ (Redhead: *Aythya americana*) の塩基配列を用いた (表 3-1)。用いた鳥の分類は、「Distribution and Taxonomy of Birds of the World」(Sibley and Monroe, 1990) によった。また用いた鳥の和名は、「日本鳥類目録改訂第 6 版」(2000) を用いた。キジ目キジ科では、ソウゲンライチョウ属ホソオライチョウ (Sharped-tailed grouse: *Tympanuchus phasianellus*)、ヤマウズラ属ヨーロッパヤマウズラ (Grey Partridge: *Perdix perdix*)、キジ属コウライキジ (Ring-neck pheasant: *Phasianus colchicus*)、クジャク属インドクジャク (Indian peafowl: *Pavo cristatus*)、コジュケイ属コジュケイ (Chinese Bamboo Partridge: *Bambusicola thoracica*)、ヤケイ属ニワトリ (chicken: *Gallus gallus* var. *domesticus*) およびアオエリヤケイ (Green junglefowl: *Gallus varius*)、第二章で mtDNA 全塩基配列を決定したウズラ属ニホンウズラ (Japanese quail: *Coturnix japonica*) およびヒメウズラ (Blue-breasted quail: *Coturnix chinensis*) の塩基配列を用いた。キジ目キジ科において mtDNA 13 遺伝子のうち DNA データバンク (DDBJ/EMBL/GenBank) に最も多くの種において登録されている cytochrome b (*Cytb*) 遺伝子 (1,143bp) およびその次に多い NADH dehydrogenase subunit 2 (*ND2*) 遺伝子 (1,041bp) を解析に用いた (表 3-1)。解析には、塩基配列データとその塩基配列をアミノ酸配列に翻訳した配列を用いた。塩基配列データは、解析の前に *ND2* および *Cytb* の終止コドン (それぞれ TAG と TAA) を塩基配列から除いた。塩基配列のデータは、MOLPHY program package version 2.3 (Adachi and Hasegawa, 1996; <ftp://ftp.ism.ac.jp/pub/ISMLIB/MOLPHY/>) に含まれている molcodon ソフトウエアを用い、アミノ酸をコードするそれぞれのトリプレットをまず第 1、第 2 および第 3 コドンに分けた。系統解析には、第 1 コドンおよび第 2 コドンを concatenate したもの、および第 3 コドンのみの情報の 2 とおりで行った。それぞれコドンの座位毎に配列を集め、第 1 と第 2 コドン (1,456bp)、第 3 コドン (726bp) の配列に編集した。それぞれ編集した第 1 および第 2 コドン、第 3 コドン、およびアミノ酸配列をそれぞれの種ごとに CLUSTAL X (Ver. 1.81; Thompson et al., 1997; <ftp://iubio.bio.indiana.edu/molbio/align/clustal>) でマルチプルアライメントを行った。アライメントした塩基配列およびアミノ酸配列から、NJ 法および ML 法で系統樹を作成した。ML 系統樹は、MOLPHY program package を用いて構築した。塩基配列を用いた系統樹の作成には、NucML で HKY85F モデル (Hasegawa et al., 1985) を用い、アミノ酸配列を用いた系統樹の作成には ProtML で mtREV24-F モデル (Adachi and Hasegawa, 1996) を用いて行った。作成した系統樹は、TREE-VIEW (Ver1.6.2: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) を用いて作図した。ML 系統樹の局所的ブートストラップ確率は、Resampling of estimated Log-likelihood of sites (RELL) (Kishino et al., 1990; Hasegawa and Kishino, 1994) を 1,000 回の試行を繰り返して行って計算した。

【結果】

ニホンウズラ (*Cjap*)、ヒメウズラ (*Cchi*) およびキジ目に属する7種 [ホソオライチョウ (*Tpha*)、ヨーロッパヤマウズラ (*Pper*)、コウライキジ (*Pcol*)、インドクジャク (*Pcri*)、コジュケイ (*Btho*)、ニワトリ (*Ggal*) およびアオエリヤケイ (*Gvar*)] とアメリカホシハジロ (*Aame*) おいて DNA データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) に登録されている *ND2* および *Cytb* 遺伝子の 2,184bp を第1・第2コドンおよび第3コドンの2つに分けた塩基配列 (それぞれ 1,456bp と 726bp) およびアミノ酸に翻訳した配列により ML 法を用いてそれぞれ3種の分子系統樹を作成した (図 3-1)。第1・第2コドンの塩基配列およびアミノ酸配列データから作成した ML 法による分子系統樹 (図 3-1a と図 3-1c) は、(((*Cjap*,*Cchi*),((((*Ggal*,*Gvar*),*Btho*),*Pcri*),((*Pcol*,*Pper*),*Tpha*))),*Aame*) と両者でトポロジーが同じになった。カモ目アメリカホシハジロをアウトグループに設定すると、これらの分子系統樹からニホンウズラおよびヒメウズラなどのウズラ属が本章で用いたキジ目の中でも早い時期の分岐となった。ニワトリ、アオエリヤケイ、コジュケイおよびインドクジャクが単系統となり、またコウライキジ、ヨーロッパヤマウズラおよびホソオライチョウが単系統を作った。

一方、第3コドンの塩基配列より作成した ML 法による分子系統樹 (図 3.1b) では、((((((*Cjap*,*Cchi*),(((*Ggal*,*Gvar*),*Btho*),*Pcri*)),*Pcol*),*Pper*),*Tpha*),*Aame*) となり、第1・第2コドンの塩基配列およびアミノ酸配列より作成した系統樹とトポロジーが異なった。ホソオライチョウの分岐が早く、またニワトリ、アオエリヤケイおよびコジュケイが局所ブートストラップ値 1,000 で単系統となった。コウライキジ、ヨーロッパヤマウズラは、ニワトリを含む単系統の側系統になった。

【考察】

第1・第2コドンの塩基配列、第3コドンの塩基配列およびアミノ酸配列の3つに分けて系統樹を作成した。第1・第2コドンの塩基配列およびアミノ酸配列は同じトポロジーとなった(図 3-1a と図 3-1c) が、第3コドンの塩基配列を用いた場合にはそのトポロジーが異なった(図 3-1b)。NJ 法でも同様に3種類の系統樹を作成したところ、それぞれ系統樹のトポロジーは同じであった(data not shown)。したがって、このトポロジーの違いは系統樹作成法によるものではないと考えられた。本章では、系統樹のアウトグループにカモ目アメリカホシハジロを用いて系統樹を作成したが、これをキジ目ホロホロチョウ科のホロホロチョウ(Helmeted guineafowl: *Numida meleagria*; DDBJ/EMBL/GenBank accession number: AF397613 [ND2] and L08383 [Cytb]) に変えて系統樹を作成してもそのトポロジーは変わらなかった。したがって、アウトグループに選ぶ外群種の影響でもないものと考えられた。

第1・第2コドンの塩基配列およびアミノ酸配列データから作成した ML 法による分子系統樹(図 3-1a および図 3-1c) は、(((Cjap,Cchi),(((Ggal,Gvar),Btho),Pcri),((Pcol,Pper),Tpha))),Aame)となった。これは、Cytb のアミノ酸配列をもとに ML 法で作成した系統樹および Cytb の塩基配列をもとに最尤法(MP: Maximum Parsimony)で作成した系統樹のトポロジーと同様であり、大きく3つのクラスターを形成した(Kimball et al., 1999; Dimcheff et al., 2000)。

用いた10種のND2およびCytbについて、第1・第2コドンの塩基配列、第3コドンの塩基配列およびアミノ酸配列の3つに分けて、それぞれ種間の相同性を算出した(表 3-2)。第1・第2コドンおよびアミノ酸は、それぞれ89.2~97.9%および82.5~96.7%であったが、第3コドンでは57.3~88.7%とその相同性は低いものであった。このことから第3コドンの塩基配列では、変異の飽和(mutational saturation)が生じたため系統樹が不安定になり、一つの局所ブートストラップ値も50%以下(44.8%)と低くなったものと考えられた。このため、キジ目内の系統解析には第3コドンの塩基配列による系統樹の信頼性は、アミノ酸配列あるいは第1・第2コドンの塩基配列を用いた系統樹よりも低いものと考えられた。第1・第2コドンの塩基配列およびアミノ酸配列の分子系統樹から、ニホンウズラおよびヒメウズラなどのウズラ属は、キジ目の中でも早い時期に分化したものであろうと推定された(図 3-1a と図 3-1c)。これはこれまでの結果と一致するものであった(Kimball et al., 1999; Dimcheff et al., 2000)。また、これまでの解析は本章の解析とは異なり Cytb 遺伝子1つのみの解析であるにもかかわらず安定した系統樹が得られているのは、コドンを座位に分けずにそのまま系統解析を行っているためで、こうして作られた系統樹は第1および第2コドンに依存して第3コドンの不安定さを見えなくしているためにいかにも正しく見える系統樹を作っているものと考えられる。したがって、安定で、かつ正確に過去を復元する系統樹を作成するためには、コドンの座位毎に分けることに加えて、より精度の高い系統樹を作るためにはさらに多くの遺伝子の情報を加えて解析する必要があることが示唆された。

クジラ(Blue whale: *Balaenoptera musculus*)とウシ(bovine: *Bos taurus*)との類縁関係について Short interspersed repetitive elements (SINEs)を用いた分子系統学的解析の結果、両者が近縁であることが報告された(Nikaido et al. 1999; Nomura and Yasue, 1999)。

mtDNA 全塩基配列から作成した分子系統樹においても、クジラとウシとの関係は SINEs の挿入解析の結果と矛盾しないことが明らかにされた (Yasue et al., In preparation)。この中で第3コドンの塩基配列をもとに系統樹を作成した際のクジラとウシとの相同性は、58.5%であったが、mtDNA の第3コドンの分子系統樹と SINEs の挿入解析の結果が一致したことから、第3コドンの塩基置換が飽和に達していないものと推察される。このことから、本研究では第3コドンの塩基配列におけるそれぞれの相同性は、62.9%以上あり、クジラとウシとの相同性よりも高いために、本研究における第3コドンの塩基配列については塩基置換が飽和には達していないものと考えられる。よって第3コドンの塩基配列より作成した系統樹は信頼性が高いものと判断された。その上で、第1・第2コドンの塩基配列およびアミノ酸配列をもとに作成した系統樹が、第3コドンの塩基配列による系統樹と異なったことは、系統解析に用いる情報を持つサイト（塩基配列）の数が少なかったものと考えられる。このため、キジ目内の系統関係を明らかとするためには、さらに多くの塩基配列あるいはアミノ酸配列情報が必要である (Cao et al., 1994) ことが示唆された。

ウズラ属であるニホンウズラとヒメウズラは3つの系統樹において単系統をつくり、局所ブートストラップの値も高く（それぞれ 1,000、1,000 および 991）、遺伝的に近縁であることが明らかとなった（図 3-1）。この結果は、形態による表形分類および DNA-DNA hybridization を基にした分子系統の結果 (Sibley and Ahlquist, 1990) とも一致するものであった。Fumihito et al. (1995)は、mtDNA D-loop 領域の超可変領域 400bp の塩基配列をキジ目各種で決定し、分子系統樹を作成して系統解析を行った。とくに彼らのグループは、まずキジ族とシャコ族に種を分けて系統解析を行い、シャコ族の系統樹ではウズラとコジュケイが単系統となり、その側系統にヒメウズラが位置し、本章の結果と異なるものであった。目レベル内の系統関係の解析に mtDNA D-loop 領域が適するか否かの検討を行う必要があると思われる。

ミトコンドリアにおいて安定して変異する 12 遺伝子 (*ND6* を除く) について、それらの変異率からキジ目 (Galliformes) とカモ目 (Anseriformes) との分岐が約 9,000 万年 ($8,980 \pm 697$ 万年) と推定された (Tuinen and Hedges, 2001)。本章では、この分岐は外群のアメリカホシハジロと内群のキジ目の 9 種との分岐にあたるが、各目で用いた種の数が少ないために、その値を用いてキジ目内の各種間の分岐年代を算出することは困難である。化石データからニワトリとウズラとの分岐は、3,300 万年前と推定されている (Olson, 1985)。また、ニワトリとウズラとの分岐について、mtDNA の 12S ribosomal RNA (*12SrRNA*)、transfer RNA- Valine (tRNA-Val) および *16SrRNA* の変異から推定した分岐時期が $3,610 \pm 750$ 万年 (Tuinen et al., 2000; Tuinen and Hedge, 2001)、DNA-DNA Hybridization からは 4,040 万年と推定され (Sibley and Ahlquist, 1990)、トランスフェリンのアイソザイム変異からは 3,980 万年と推定された (Ho et al., 1976; Prager and Wilson, 1976; Prager et al., 1976)。これらの推定された分岐年代を総合して、ニワトリとウズラとの分岐は $3,880 \pm 130$ 万年と評価され、化石データと比較した推定精度は 85.1%と高く (Tuinen and Hedge, 2001)、その信頼性は高いものであると推定される。本章で算出した塩基置換率およびアミノ酸置換率を、表 3-3 に示した。塩基置換率は HKY85-F model (Hasegawa et al., 1985) から算出し、アミノ酸置換率は mtREV24-F model (Adachi and Hasegawa, 1996b) を用いて算出した。第3コドンの塩基配列は不安定であろうと推察されたため、第1、第2コドンの塩基配列およびアミノ酸配列の置換率からそれぞれの分岐年代を算出すると、それぞれ 1 置換あたり 336 万年前お

よび 195 万年前となり、例えばニワトリとアオエリヤケイとの分岐は、第 1、第 2 コドンの塩基配列では 324 万年前、アミノ酸配列では 321 万年前とほぼ同じ年代であると算出された。

分類体系における族 (tribe) の分類では、その形態形質でキジ族 (tribe Phasianini) とシャコ族 (tribe Perdicini) に分けられている。本章の第 1・第 2 コドンの塩基配列およびアミノ酸配列では、ニワトリとコジュケイが単系統となり、またコウライキジとヨーロッパヤマウズラが単系統となった。これらはともにキジ族とシャコ族とがともに単系統となっていることから、「族」の分類とは矛盾する結果であった。Kimball et al. (1999) が主張するキジ族、シャコ族それぞれの単系統を否定する説と一致するものであった。このようにキジ族とシャコ族に分類されている種がともに混在したクラスターを形成することが明らかとなり、従来の形態形質による分類体系の問題点が示唆された。

本章の結果から、キジ目内の系統関係を解析するためには 2 つの遺伝子を用い、さらに塩基配列をコドンの座位ごとに分けて、あるいはアミノ酸配列を用いて系統樹を作成することは非常に有効であった。またウズラ属はキジ目内で早い時期に分岐したことが明らかとなった。キジ科について形態によりキジ族およびシャコ族に分類されているが、これら両者は単系統にはならないことが明らかとなり、「族」の分類における問題点が指摘された。各系統の分岐におけるブートストラップ値の低いポジションがあり、これを解決するためには mtDNA の 13 遺伝子全てを用いた解析が必要であると思われる。

【要約】

キジ目キジ科における系統関係を明らかにするために、第二章で決定したニホンウズラおよびヒメウズラ mtDNA の全塩基配列からタンパク質をコードする 2 遺伝子について ML 法により分子系統樹を作成し、キジ目キジ科の分子系統学的解析を行った。

ニホンウズラ (*Cjap*)、ヒメウズラ (*Cchi*) およびキジ目に属する 7 種 [ホソオライチョウ (*Tpha*)、ヨーロッパヤマウズラ (*Pper*)、コウライキジ (*Pcol*)、インドクジャク (*Pcri*)、コジュケイ (*Btho*)、ニワトリ (*Ggal*) およびアオエリヤケイ (*Gvar*)] とアメリカホシハジロ (*Aame*) おいて DNA データベース (DDBJ/EMBL/GenBank) に登録されている *ND2* および *Cytb* 遺伝子の 2,184bp を第 1・第 2 コドンおよび第 3 コドンの 2 つに分けた塩基配列 (それぞれ 1,456bp と 726bp) およびアミノ酸に翻訳した配列により ML 法を用いてそれぞれ 3 種の分子系統樹を作成した。第 1・第 2 コドンの塩基配列およびアミノ酸配列データから作成した ML 法による分子系統樹は、(((*Cjap*,*Cchi*),((((*Ggal*,*Gvar*),*Btho*),*Pcri*),((*Pcol*,*Pper*),*Tpha*))),*Aame*) と両者でトポロジーが同じになった。カモ目アメリカホシハジロをアウトグループに設定すると、これらの分子系統樹からニホンウズラおよびヒメウズラなどのウズラ属がキジ目の中でも早い時期の分岐となった。ニワトリ、アオエリヤケイ、コジュケイおよびインドクジャクが単系統となり、またコウライキジ、ヨーロッパヤマウズラおよびホソオライチョウが単系統を作った。一方、第 3 コドンの塩基配列より作成した ML 法による分子系統樹では、(((((((*Cjap*,*Cchi*),(((*Ggal*,*Gvar*),*Btho*),*Pcri*)),*Pcol*),*Pper*),*Tpha*),*Aame*) となり、第 1・第 2 コドンの塩基配列およびアミノ酸配列より作成した系統樹とトポロジーが異なった。ホソオライチョウの分岐が早く、またニワトリ、アオエリヤケイおよびコジュケイが局所ブートストラップ値 1,000 で単系統となった。コウライキジ、ヨーロッパヤマウズラは、ニワトリを含む単系統の側系統になった。

分類体系における族 (tribe) の分類では、その形態形質でキジ族 (tribe Phasianini) とシャコ族 (tribe Perdicini) に分けられている。本章の第 1・第 2 コドンの塩基配列およびアミノ酸配列では、ニワトリとコジュケイが単系統となり、またコウライキジとヨーロッパヤマウズラが単系統となった。これらはともにキジ族とシャコ族とがともに単系統となっていることから、「族」の分類とは矛盾する結果であった。

本章の結果から、キジ目内の系統関係を解析するためには 2 つの遺伝子を用い、さらに塩基配列をコドンの座位ごとに分けて、あるいはアミノ酸配列をもちいて系統樹を作成することは非常に有効であった。またウズラ属はキジ目内で早い時期に分岐したことが明らかとなった。キジ科について形態によりキジ族およびシャコ族に分類されているが、分子系統ではこれら両者は単系統とはならないことが明らかとなり、「族」の分類は系統学的には正しくないものと判断された。

Table 3-1. Sequence data for ND2 and Cytb

Group	Species	Common name (abbreviation) 和名	DDB/EMBL/GenBank accession number		Reference
			ND2	Cytb	
Duck	<i>Aythya americana</i>	Redhead (<i>Aame</i>) アメリカカホシハジロ	AF090337	AF090337	Mindell <i>et al.</i> (1999)
Grouse	<i>Tympanuchus phasianellus</i>	Sharp-tailed grouse (<i>Tpha</i>) ホンオライチヨウ	AF222569	AF068191	Kimball <i>et al.</i> (1999) and Dimcheff <i>et al.</i> (2000)
Pheasants	<i>Phasianus colchicus</i>	Ring-neck pheasant (<i>Pcol</i>) コウライキジ	AF222561	AF028798	Kimball <i>et al.</i> (1999) and Dimcheff <i>et al.</i> (2000)
	<i>Pavo cristatus</i>	Indian peafowl (<i>Peri</i>) インドクジャク	AF394612	L08379	Birks <i>et al.</i> (unpublished) and Kronegay <i>et al.</i> (1993)
	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Chicken (<i>Ggal</i>) ニワトリ	X52392	X52392	Desjardins & Morais (1990)
	<i>Gallus varius</i>	Green junglefowl (<i>Gvar</i>) アオエリヤケイ	AF222551	AB044988	Kimball <i>et al.</i> (1999) and Dimcheff <i>et al.</i> (2000)
Partridges	<i>Perdix perdix</i>	Grey partridge (<i>Pper</i>) ヨーロッパヤマウズラ	AF222560	AF028791	Kimball <i>et al.</i> (1999) and Dimcheff <i>et al.</i> (2000)
	<i>Bambusicola thoracica</i>	Chinese bamboo partridge (<i>Btho</i>) コジュケイ	AF222538	AF028790	Kimball <i>et al.</i> (1999) and Dimcheff <i>et al.</i> (2000)
	<i>Coturnix japonica</i>	Japanese quail (<i>Cjap</i>) ニホンウズラ	AP003195	AP003195	in this chapter
	<i>Coturnix chinensis</i>	Blue-breasted quail (<i>Cchi</i>) ヒメウズラ	AB073301	AB073301	in this chapter

Table 3-2. Similarity (%) of nucleotide and amino-acid sequences between species

	ホソオライチヨウ	ヨーロッパヤマウズラ	コウライキジ	ニホンウズラ	ヒメウズラ	インドクジャク	コジュケイ	ニワトリ	アオエリヤケイ
1st and 2nd bases of codons	sharp-tailed grouse	grey partridge	ring-neck pheasant	Japanese quail	blue-breasted quail	Indian peafowl	Chinese bamboo partridge	chicken	grey junglefowl
<i>Aythya americana</i> (redhead)	90.3	89.6	89.9	90.1	89.2	90.4	90.3	90.8	91.0
<i>Tympanuchus phasianellus</i> (sharp-tailed grouse)		92.9	94.8	93.5	93.4	94.9	93.7	94.8	94.5
<i>Perdix perdix</i> (grey partridge)			93.9	93.2	91.9	93.5	93.2	93.8	93.3
<i>Phasianus colchicus</i> (ring-neck pheasant)				93.7	92.8	94.1	94.1	94.8	94.7
<i>Coturnix japonica</i> (Japanese quail)					95.6	94.0	94.4	95.1	94.3
<i>Coturnix chinensis</i> (blue-breasted quail)						94.0	93.7	94.0	93.4
<i>Pavo cristatus</i> (Indian peafowl)							95.3	95.1	95.1
<i>Bambusicola thoracica</i> (Chinese bamboo partridge)								96.5	96.3
<i>Gallus gallus domesticus</i> (chicken)									97.9
<i>Gallus varius</i> (green junglefowl)									
3rd base of codons	sharp-tailed grouse	grey partridge	ring-neck pheasant	Japanese quail	blue-breasted quail	Indian peafowl	Chinese bamboo partridge	chicken	grey junglefowl
<i>Aythya americana</i> (redhead)	57.4	58.1	57.5	57.3	58.8	58.0	58.6	58.7	59.5
<i>Tympanuchus phasianellus</i> (sharp-tailed grouse)		65.6	66.0	62.9	64.2	66.6	64.3	63.8	64.6
<i>Perdix perdix</i> (grey partridge)			66.4	63.1	63.8	64.2	64.2	64.8	64.0
<i>Phasianus colchicus</i> (ring-neck pheasant)				66.6	66.9	67.7	66.7	64.9	66.5
<i>Coturnix japonica</i> (Japanese quail)					70.1	68.5	66.6	67.5	68.3
<i>Coturnix chinensis</i> (blue-breasted quail)						69.6	66.8	65.5	65.3
<i>Pavo cristatus</i> (Indian peafowl)							70.8	71.4	71.2
<i>Bambusicola thoracica</i> (Chinese bamboo partridge)								75.2	74.4
<i>Gallus gallus domesticus</i> (chicken)									88.7
<i>Gallus varius</i> (green junglefowl)									
amino-acid	sharp-tailed grouse	grey partridge	ring-neck pheasant	Japanese quail	blue-breasted quail	Indian peafowl	Chinese bamboo partridge	chicken	grey junglefowl
<i>Aythya americana</i> (redhead)	84.6	82.5	83.0	84.6	83.9	84.0	84.1	85.1	84.9
<i>Tympanuchus phasianellus</i> (sharp-tailed grouse)		90.7	92.8	90.4	89.8	92.7	91.6	93.2	92.0
<i>Perdix perdix</i> (grey partridge)			91.2	88.8	87.9	90.5	89.0	90.6	89.7
<i>Phasianus colchicus</i> (ring-neck pheasant)				90.3	88.8	91.7	90.6	92.1	91.3
<i>Coturnix japonica</i> (Japanese quail)					94.5	91.6	91.6	92.8	91.6
<i>Coturnix chinensis</i> (blue-breasted quail)						91.7	91.0	91.9	90.6
<i>Pavo cristatus</i> (Indian peafowl)							94.1	94.1	93.7
<i>Bambusicola thoracica</i> (Chinese bamboo partridge)								94.8	94.6
<i>Gallus gallus domesticus</i> (chicken)									96.7
<i>Gallus varius</i> (green junglefowl)									

Table 3-3. Genetic distances between species (number of nucleotide and amino-acid substitutions per 100 sites)

	ホソオライチヨウ	ゴウライキジ	ニホンウスラ	ヒメウスラ	インドクジヤク	コジュケイ	ニワトリ	アオエリヤケイ
1st and 2nd bases of codons 1)	sharp-tailed grouse	ring-neck pheasant	Japanese quail	blue-breasted quail	Indian peafowl	Chinese bamboo partridge	chicken	grey junglefowl
<i>Aythya americana</i> (redhead)	12.77	13.02	11.55	12.49	11.54	11.58	11.54	12.05
<i>Tympanuchus phasianellus</i> (sharp-tailed grouse)	14.35	6.37	7.86	8.80	6.67	7.07	6.67	7.18
<i>Perdix perdix</i> (grey partridge)	7.70	6.47	9.44	10.38	8.25	8.49	8.25	8.76
<i>Phasianus colchicus</i> (ring-neck pheasant)			8.11	9.05	6.92	6.87	6.92	7.43
<i>Coturnix japonica</i> (Japanese quail)				4.58	6.63	6.59	6.63	7.14
<i>Coturnix chinensis</i> (blue-breasted quail)					7.57	7.74	7.57	8.08
<i>Pavo cristatus</i> (Indian peafowl)						5.63	4.96	5.47
<i>Bambusicola thoracica</i> (Chinese bamboo partridge)							3.67	4.18
<i>Gallus gallus domesticus</i> (chicken)								0.97
<i>Gallus varius</i> (green junglefowl)								
3rd base of codons 1)	sharp-tailed grouse	ring-neck pheasant	Japanese quail	blue-breasted quail	Indian peafowl	Chinese bamboo partridge	chicken	grey junglefowl
<i>Aythya americana</i> (redhead)	131.82	161.71	198.59	197.38	177.44	191.49	193.86	196.63
<i>Tympanuchus phasianellus</i> (sharp-tailed grouse)	166.95	61.89	98.77	97.56	77.62	91.67	94.04	96.81
<i>Perdix perdix</i> (grey partridge)	67.13	68.80	105.68	104.47	84.53	98.58	100.95	103.72
<i>Phasianus colchicus</i> (ring-neck pheasant)			88.92	87.71	67.77	81.82	84.19	86.96
<i>Coturnix japonica</i> (Japanese quail)				56.19	76.25	90.30	92.67	95.44
<i>Coturnix chinensis</i> (blue-breasted quail)					75.04	89.09	91.46	94.23
<i>Pavo cristatus</i> (Indian peafowl)						61.23	63.60	66.37
<i>Bambusicola thoracica</i> (Chinese bamboo partridge)							42.81	45.58
<i>Gallus gallus domesticus</i> (chicken)								8.95
<i>Gallus varius</i> (green junglefowl)								
amino-acid 2)	sharp-tailed grouse	ring-neck pheasant	Japanese quail	blue-breasted quail	Indian peafowl	Chinese bamboo partridge	chicken	grey junglefowl
<i>Aythya americana</i> (redhead)	23.12	24.54	19.85	21.29	20.69	21.53	19.91	20.50
<i>Tympanuchus phasianellus</i> (sharp-tailed grouse)	27.04	8.52	12.47	13.91	8.29	10.79	9.17	9.76
<i>Perdix perdix</i> (grey partridge)	11.02	9.86	16.39	17.83	12.21	14.71	13.09	13.68
<i>Phasianus colchicus</i> (ring-neck pheasant)			13.89	15.33	9.71	12.21	10.59	11.18
<i>Coturnix japonica</i> (Japanese quail)				5.90	10.04	10.88	9.26	9.85
<i>Coturnix chinensis</i> (blue-breasted quail)					11.48	12.32	10.70	11.29
<i>Pavo cristatus</i> (Indian peafowl)						8.36	6.74	7.33
<i>Bambusicola thoracica</i> (Chinese bamboo partridge)							5.50	6.09
<i>Gallus gallus domesticus</i> (chicken)								1.65
<i>Gallus varius</i> (green junglefowl)								

1) calculated with the HKY85-F model (Hasegawa et al., 1985)

2) calculated with the mtREV24-F model (Adachi and Hasegawa 1996b)

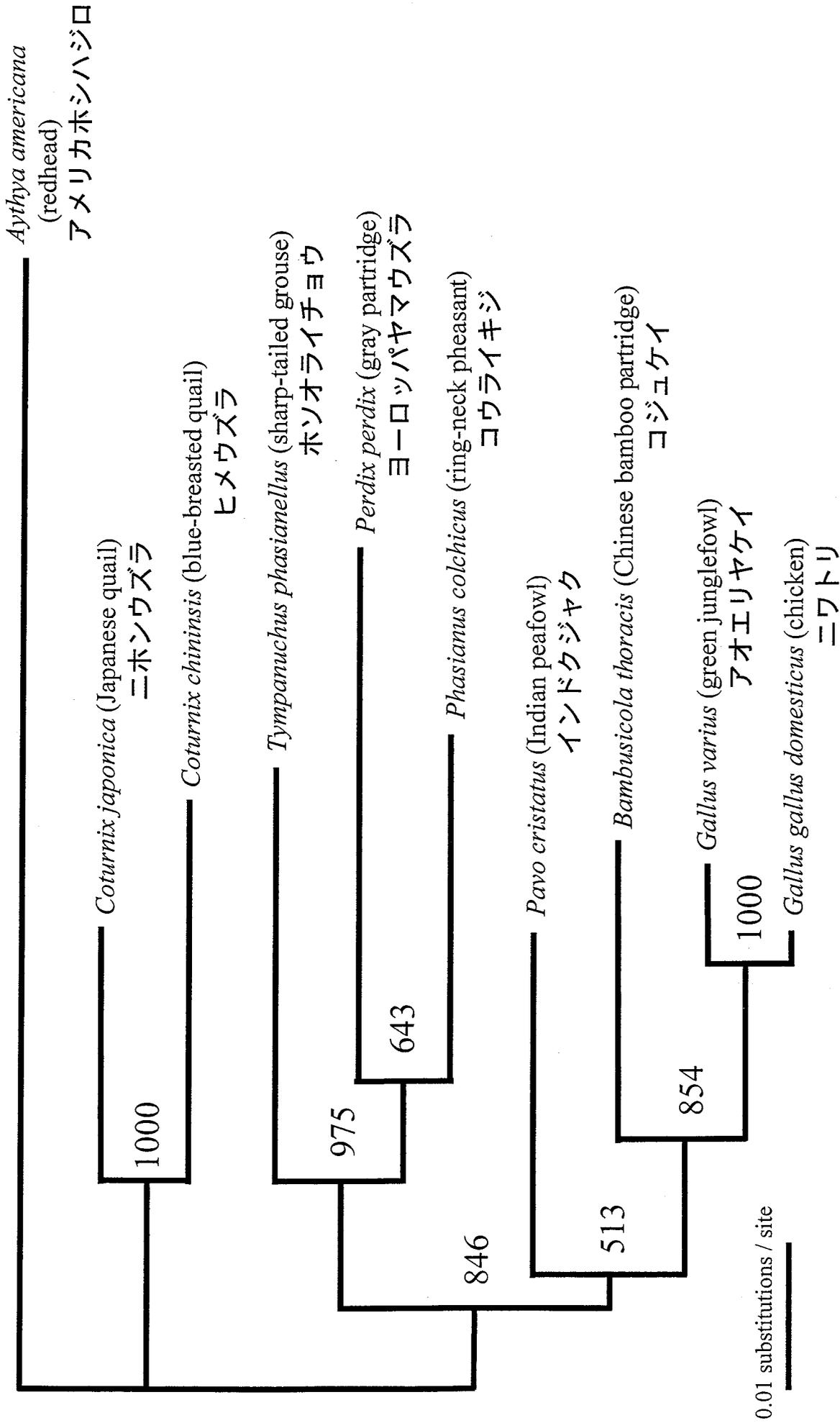


Figure 3-1a Phylogenetic trees of *Coturnix chinensis* (blue-breasted quail), *Coturnix japonica* (Japanese quail), *Bambusicola thoracis* (Chinese bamboo partridge), *Perdix perdix* (grey partridge), *Gallus gallus domesticus* (chicken), *Gallus varius* (green junglefowl), *Phasianus colchicus* (ring-neck pheasant), *Pavo cristatus* (Indian peafowl), and *Tympanuchus phasianellus* (sharp-tailed grouse) together with *Aythya americana* (redhead) as an outgroup, using nucleotide base and amino-acid sequences of mitochondrial *ND2* and *Cytb* genes. NucML was applied to the 1st and 2nd codons of each triplet of the concatenated genes of *ND2* and *Cytb*, using HKY85-F model ($a/b=4.54$) Number on each branch indicates the local bootstrap value estimated by the REML method with 1,000 replications. The horizontal scale bar indicates the number of substitutions / site.

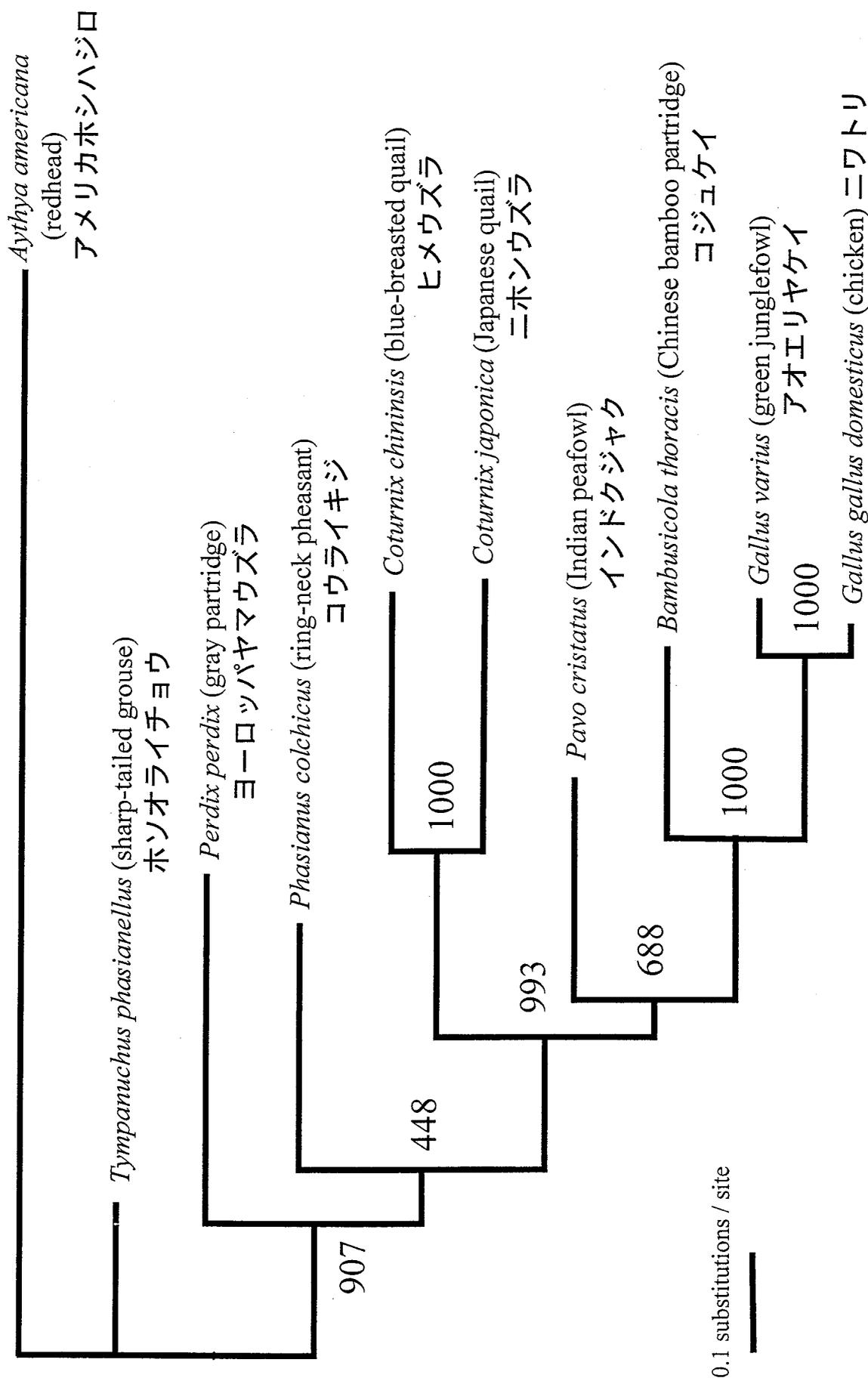


Figure 3-1b Phylogenetic trees of *Coturnix chinensis* (blue-breasted quail), *Coturnix japonica* (Japanese quail), *Bambusicola thoracis* (Chinese bamboo partridge), *Perdix perdix* (gray partridge), *Gallus gallus domesticus* (chicken), *Gallus varius* (green junglefowl), *Phasianus colchicus* (ring-neck pheasant), *Pavo cristatus* (Indian peafowl), and *Tympanuchus phasianellus* (sharp-tailed grouse) together with *Aythya americana* (redhead) as an outgroup, using nucleotide base and amino-acid sequences of mitochondrial ND2 and *Cytb* genes. NucML for 3rd codon, using HKY85-F model (a/b = 13.53). Number on each branch indicates the local bootstrap value estimated by the REL method with 1,000 replications. The horizontal scale bar indicates the number of substitutions / site.

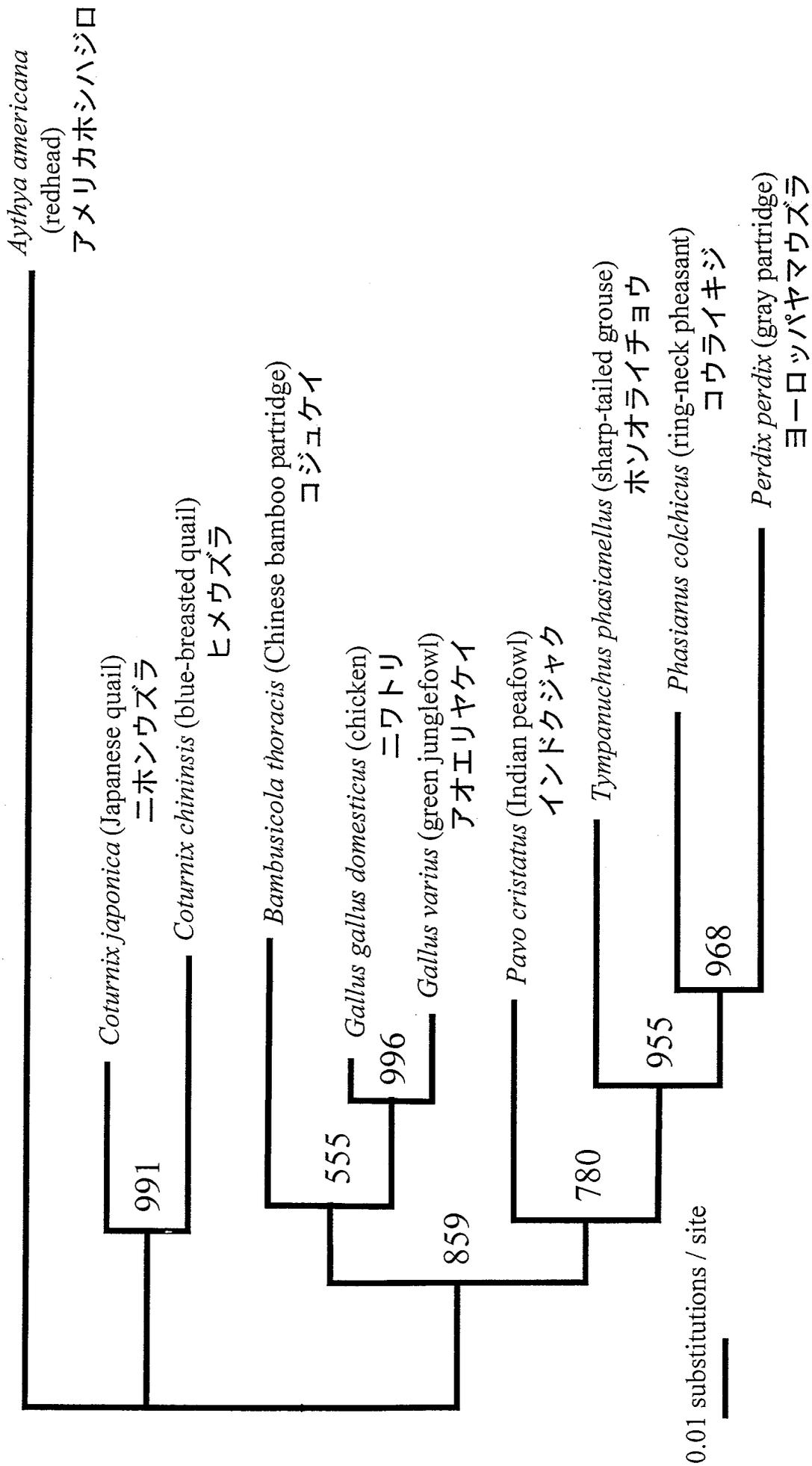


Figure 3-1c. Phylogenetic trees of *Coturnix chinensis* (blue-breasted quail), *Coturnix japonica* (Japanese quail), *Bambusicola thoracis* (Chinese bamboo partridge), *Perdix perdix* (grey partridge), *Gallus gallus domesticus* (chicken), *Gallus varius* (green junglefowl), *Phasianus colchicus* (ring-neck pheasant), *Pavo cristatus* (Indian peafowl), and *Tympanuchus phasianellus* (sharp-tailed grouse) together with *Aythya americana* (redhead) as an outgroup, using nucleotide base and amino-acid sequences of mitochondrial *ND2* and *Cytb* genes. ProtML was applied to the amino-acid sequence of the concatenated two genes, using mtREV24-F model. Number on each branch indicates the local bootstrap value estimated by the RELL method with 1,000 replications. The horizontal scale bar indicates the number of substitutions / site.

第四章. ホロホロチョウ科のミトコンドリア全塩基配列の決定と その分子系統学的解析

【緒論】

ホロホロチョウ (Guineafowl) は、紀元前 (BC) 2,400 年ごろの第 5 エジプト王朝時代の壁面に描かれた人の生活の中に描かれ、古くからスーダンや西アフリカを中心に家禽化されていた (Crawford, 1990)。ホロホロチョウは、アフリカ原産の種で、サハラ砂漠以南の東～西アフリカに広く分布している (Sibley and Monroe, 1990)。20 世紀中ごろ、ホロホロチョウとコンゴクジャク (Congo peafowl: *Afropavo congensis*) は解剖学のおよび免疫学的解析結果から遺伝的に近縁であると報告された (Verheyen, 1956; Mainardi, 1963)。その後、形態学のおよび DNA-DNA hybridization をもとにして、ホロホロチョウはキジ目ホロホロチョウ科に分類された (Sibley and Ahlquist, 1990; Sibley and Monroe, 1990)。ホロホロチョウ科は 4 属 6 種に分類されている (表 4-1, Sibley and Monroe, 1990)。Kimball et al. (1997) は、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の制御領域 (D-loop) あるいは cytochrome-b (*Cytb*) の塩基配列を使って、キジ科に分類されているコンゴクジャクを含む「クジャク (Peafowl)」3 種とホロホロチョウ科に分類されているホロホロチョウ (Helmeted Guineafowl; *Numida meleagris*) の遺伝学的位置を解析した。その結果、Sibley and Ahlquist (1990) および Sibley and Monroe (1990) の説を支持し、「クジャク」3 種は単系統となり、ホロホロチョウは「クジャク」の側系統となった。

ホロホロチョウの育種技術を確立するためには、生物学のおよび系統遺伝学的基础データが必要であるが、ほとんどないのが現状であるため、まずホロホロチョウの系統遺伝学的位置を明らかにする必要がある。ホロホロチョウにおいても mtDNA の塩基配列が決定され、その分子系統学的解析が行われているが、第三章で述べたように解析に用いる塩基配列数が少ないこと、解析に 1 つの遺伝子しか用いていないこと、mtDNA の塩基配列を決定する際、核に挿入された塩基配列 (numtDNA) を考慮していないことなどの問題点がある。

本章では、キジ目内におけるホロホロチョウの系統遺伝学的位置を分子系統学的に解明することを目的とし、第二章で開発した mtDNA 決定法を改良してホロホロチョウの mtDNA の全塩基配列を決定した。その塩基配列データに基づき MOLPHY Package (version 2.3b3; Adachi and Hasegawa, 1996a) を用いた最尤 (ML) 法により分子系統学的解析を行った。なお系統樹は、塩基配列をコドン座位に分けて第 1、第 2 コドンの塩基配列および第 3 コドンの塩基配列で系統樹を作成し、加えてアミノ酸配列からも系統樹を作成して議論した。

【材料と方法】

ホロホロチョウの全ゲノム DNA は、旭川市立旭山動物園で飼育されているオス個体の血液から分離し、Protenase K および Phenol・chloroform 法 (Sambrook and Russel, 2000) を改良した SepaGene キット (三光純薬) で抽出した。抽出したゲノム DNA を鋳型にして、まず、LA-PCR Kit (TaKaRa LA-PCR kit, TaKaRa-BIO)を用い、LA-PCR 法で mtDNA の約 16,000bp を増幅した。第二章と同様に、16S ribosomal RNA (*16SrRNA*) および *Cytb* 領域の 2 カ所に、それぞれ LA16S および LACytb プライマーセットを設計した。

LA16SF : 5'- CCT ACG TGA TCT GAG TTC AGA CCG GAG CAA TCC AG (35 塩基対 [bp])

LA16SR : 5'- TGC ACC ATT AGG TTG TCC TGA TCC AAC ATC GAG GT (35bp)

LACytbF : 5'-TAC ACG AAT CAG GCT CAA ACA ACC CCC TAG GCA TC (35bp)

LACytbR : 5'-AGA TAC AGA TGA AGA AGA ATG AGG CGC CGT TTG CG (35bp)

LA-PCR 反応液は、TaKaRa LA Taq™ DNA Polymerase に添付されている 10×LA PCR Buffer II with Mg²⁺ free を 5.0 μl、MgCl₂ (25mM) を 5.0 μl、dNTPs (各 2.5mM) を 8.0 μl、20pmol/μl に希釈調整したプライマーをそれぞれ 0.75 μl、200~800 μg/ml の濃度に調整した DNA 溶液を 2.0 μl、TaKaRa LA Taq™ DNA Polymerase (5U/μl) を 0.5 μl を加え、滅菌蒸留水で全量 50 μl にした。LA-PCR には GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)を用い、二本鎖の鋳型 DNA を 94℃で 1 分間熱変成した後に、94℃で 30 秒と 68℃で 16 分を 30 回交互に繰り返して行った。約 16kb の LA-PCR 産物を 0.6% 低融点アガロースゲル (Agarose L; Nippon-Gene) 電気泳動で分離し、ゲルから切り出した。ゲルから切り出したアガロースは、β-agarase I (Nippon Gene) を用い、製品マニュアルに従って消化して精製した。鳥類 mtDNA をアライメントした配列を基にして比較的保存された領域で作成した 37 セットのプライマー (第二章表 2-1) の塩基配列情報をもとに再設計した 24 セットプライマーを本章での PCR プライマーとして用いた (表 4-2)。精製した LA-PCR 産物を鋳型にして PCR を行った。PCR の反応液量を全量 20 μl とし、DNA 合成酵素には Ampli-Taq GOLD DNA polymerase (Applied Biosystems) を用いた。PCR 反応液は、Ampli-Taq GOLD DNA polymerase に添付されている GeneAmp^R10×PCR Buffer II & MgCl₂ Solution を 2.0 μl、同様に添付される dNTPs (各 400 μM) を 2.0 μl、20pmol/μl に希釈調整したプライマーをそれぞれ 0.4 μl ずつ、200~800 μg/ml の濃度に調整した LA-PCR 産物を 0.5 μl、Ampli-Taq GOLD DNA polymerase (2.5U) を 0.1 μl を加え、滅菌蒸留水で全量 20 μl にした。PCR には GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) を用い、95℃で 9 分間 DNA polymerase を活性化させた後に、95℃で 1 分、58℃で 30 秒および 72℃で 1 分間を 1 サイクルとし 40 サイクル繰り返し DNA を増幅した。PCR 増幅産物を Exo-SAP-IT (Amersham Biosciences) を用いて未反応の蛍光物質およびプライマーを除いて精製したのち、Sequencing の鋳型とした。Sequencing 反応には 1 反応で PCR と同様のプライマーの一方のみを用い、Dye Deoxy-terminator 法 (ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing kit Ver. 3.0, Applied Biosystems; DYEnamicET Terminator Cycle Sequence Kit, Amersham Biosciences) でターゲット配列を蛍光標識した。ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequence Kit (ABI PRISM KIT) を用いた場合には

以下の方法で行った。蛍光標識にもちいた Pre-Mix sequence 反応液は、メーカー製品マニュアルの 8 倍に希釈して調整した。このため Pre-Mix sequence 反応液と別に作成した Sequence 反応バッファー (2.5×sequence buffer; 200mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, pH9.0) とを 1 : 7 の割合に混合して Sequence 反応を行った。Sequence 反応液は、各反応チューブあたり Pre-Mix sequence 反応液を 1.0 μl、2.5×sequence buffer を 7.0 μl、20pmol/μl の primer を 0.23 μl、精製した PCR 産物を 3.0 μl、これらに滅菌蒸留水を加えて全量を 20.0 μl とした。DYEnamicET Terminator Cycle Sequence Kit (DYEnamicET KIT) を用いた場合には以下の方法で行った。蛍光標識にもちいた Pre-Mix sequence 反応液は、メーカー製品マニュアルの 2 倍に希釈して調整した。このため Pre-Mix sequence 反応液と Dilution buffer (DYEnamic ET Terminator Dilution Buffer, US84002, Amersham Biosciences) とを 1 : 1 の割合に混合して Sequence 反応を行った。Sequence 反応液は、各反応チューブあたり Pre-Mix sequence 反応液を 4.0 μl、Dilution buffer を 4.0 μl、20pmol/μl の primer を 0.5 μl、精製した PCR 産物を 3.0 μl、これらに滅菌蒸留水を加えて全量を 20.0 μl とした。Sequence 反応の後、Sephadex™ G-50 Superfine (Amersham Pharmacia Biotech AB) カラムに標識した反応液を通して、未反応蛍光色素および未反応プライマーを除去し、精製した。この精製産物を濃縮乾燥システム (VC96N; タイテック社) で乾燥し、Formamide と Bluedextran を 5 : 1 で混合した Loading Dye を各サンプル 4 μl ずつ加えてサンプルを解かした。この溶液に 95℃2 分間の熱処理を施した後、氷上で急冷し、DNA を 1 本鎖の状態に保った。この溶液から、1.7 μl を ABI377 Sequencer にアプライした。電気泳動は一回のランで 48 サンプルずつ行い、ABI377 Sequencer のマニュアルに従って解析を行った。決定した塩基配列は AutoAssembler ver.2.1 (Applied Biosystems) を用い、ニワトリ mtDNA (Desjardins and Morais 1990) の塩基配列情報をもとにつなぎ合わせて編集し、GENETYX program package (Ver.10.3; Software development Inc.) を用いて解析した。

分子系統学的な解析には、ホロホロチョウを含む 10 種のキジ目キジ科の鳥を用い、外群 (アウトグループ) には、カモ目カモ科アメリカホシハジロ (Redhead: *Aythya americana*) の塩基配列を用いた (表 4-2)。用いた鳥の分類は、「*Distribution and Taxonomy of Birds of the World*」 (Sibley and Monroe, 1990) によった。また用いた鳥の和名は、「日本鳥類目録改訂第 6 版」 (2000) を用いた。キジ目キジ科では、ソウゲンライチョウ属ホソオライチョウ (Sharped-tailed grouse: *Tympanuchus phasianellus*)、ヤマウズラ属ヨーロッパヤマウズラ (Grey Partridge: *Perdix perdix*)、キジ属コウライキジ (Ring-neck pheasant: *Phasianus colchicus*)、クジャク属インドクジャク (Indian peafowl: *Pavo cristatus*)、コジュケイ属コジュケイ (Chinese Bamboo Partridge: *Bambusicola thoracica*)、ヤケイ属ニワトリ (chicken: *Gallus gallus* var. *domesticus*) およびアオエリヤケイ (Green junglefowl: *Gallus varius*)、ウズラ属ニホンウズラ (Japanese quail: *Coturnix japonica*) およびヒメウズラ (Blue-breasted quail: *Coturnix chinensis*) の塩基配列を用いた。キジ目キジ科において mtDNA 13 遺伝子のうち DNA データバンク (DDBJ/EMBL/GenBank) に最も多く登録されている *Cytb* 遺伝子 (1,143bp) およびその次に多い NADH dehydrogenase subunit 2 (*ND2*) 遺伝子 (1,041bp) を解析に用いた (表 4-3)。解析には、塩基配列データとその塩基配列をアミノ酸配列に翻訳した配列を用いた。塩基配列データは、解析の前に *ND2* および *Cytb* の終止コドン (それぞれ TAG と TAA) を塩基配列から除いた。塩基配列のデータは、MOLPHY program package version 2.3 (Adachi and Hasegawa, 1996; ftp://ftp.ism.ac.jp/pub/ISMLIB/MOLPHY/) に含まれて

いる molcodon ソフトウェアを用い、アミノ酸をコードするそれぞれのトリプレットをまず第1、第2および第3コドンの塩基配列に分けた、系統解析には、第1コドンおよび第2コドンの塩基配列を concatenate したものと、および第3コドンの塩基配列のみの情報の2とおりで行った。それぞれコドンの座位毎に配列を集め、第1と第2コドン(1,456bp)の塩基配列、第3コドン(726bp)の塩基配列に編集した。それぞれ編集した第1および第2コドンの塩基配列、第3コドンの塩基配列、およびアミノ酸配列をそれぞれの種ごとに CLUSTAL X (Ver. 1.81; Thompson et al., 1997; <ftp://iubio.bio.indiana.edu/molbio/align/clustal>) でマルチプルアライメントを行った。アライメントした塩基配列およびアミノ酸配列から、NJ法およびML法で系統樹を作成した。ML系統樹は、MOLPHY program package を用いて構築した。塩基配列を用いた系統樹の作成には、NucML で HKY85F モデル (Hasegawa et al, 1985) を用い、アミノ酸配列を用いた系統樹の作成には ProtML で mtREV24-F モデル (Adachi and Hasegawa, 1996) を用いて行った。作成した系統樹は、TREE-VIEW (Ver1.6.2: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) を用いて作図した。ML系統樹の局所的ブートストラップ確率は、Resampling of estimated Log-likelihood of sites (RELL) (Kishino et al. 1990; Hasegawa and Kishino, 1994) を1,000回の試行を繰り返して行って計算した。

【結果】

ホロホロチョウの全 mtDNA の塩基配列を決定し、DNA database (DDBJ/EMBL/GenBank) に登録した。その登録番号は、AP005595 であり、それぞれの登録にはアノテーションを作成して添付した(付表 4-1)。ホロホロチョウ mtDNA の遺伝子および tRNA のセットおよびその構造はこれまで鳥類で報告されている mtDNA の遺伝子および tRNA のセットと同様であった。ホロホロチョウ 13 遺伝子、*12SrRNA* および *16SrRNA* および 22 transfer RNA (tRNA) の大きさは、mtDNA の全塩基配列が明らかにされているニワトリ (Desjardins and Morais, 1990) およびニホンウズラ (第二章) の結果と比較して表 4-4 に示した。ホロホロチョウの mtDNA は、16,726bp であり、ニワトリ (16,775bp) よりも 49bp、ニホンウズラ (16,697bp) よりも 29bp 小さいものであった。これらの大きさの差異は、主に D-loop および *ND1* の大きさに起因した。ホロホロチョウとニワトリおよびニホンウズラとの相同性は、*12SrRNA* および *16SrRNA* を含む 13 遺伝子毎に比較すると鳥種間および遺伝子間で異なっていた。ホロホロチョウとニワトリとの間の相同性は、ATPase subunit 8 (*ATPase8*) が 77.0% と最も低く、*12SrRNA* が 88.6% と最も高く、その平均相同性は 85.7% であった。またホロホロチョウとニホンウズラとの間の相同性は、*ATPase8* が 76.2% と最も低く、*12SrRNA* が 88.4% と最も高かった。その平均相同性は 84.7% であった。

ホロホロチョウ mtDNA の *ND3* 遺伝子において 1 bp の extra one base が見られた。Cytochrome oxidase subunit I (*COI*) 遺伝子における開始コドンが、ATG (Met) ではなく、GTG (Val) であった。その他の遺伝子は ATG であった。また、*COIII* および *ND4* における終止コドンは、完全なトリプレットとして mtDNA 塩基配列上には見いだされず、ともに T のみであった。

本章で決定したホロホロチョウ (*Nmel*) とその他キジ目に属する 9 種(コジュケイ [*Btho*]、ヒメウズラ [*Cchi*]、ニホンウズラ [*Cjap*]、ニワトリ [*Ggal*]、アオエリヤケイ [*Gvar*]、インドクジャク [*Pcri*]、ヨーロッパヤマウズラ [*Pper*]、コウライキジ [*Pcol*]、ホソオライチョウ [*Tpha*]) およびアウトグループにはアメリカホシハジロ (*Aame*) について、DDBJ/EMBL/GenBank に登録されている *ND2* および *Cytb* 遺伝子の 2,178bp (終止コドンを除く) およびそれらをアミノ酸に翻訳した配列をもとに最尤法を用いて分子系統樹を作成した。第 1・第 2 コドンの塩基配列から作成した系統樹は、((*Cjap,Cchi*),(((*Pcol,Pper*),*Tpha*),(((*Ggal,Gvar*),*Btho*),*Pcri*)),(*Nmel,Aame*)) となった (図 4-1a)。第 3 コドンの塩基配列およびアミノ酸配列から作成した系統樹は、それぞれ((((*Cjap,Cchi*),((*Tpha,Pper*),*Pcol*),*Pcri*),((*Ggal,Gvar*),*Btho*)),(*Nmel,Aame*)) および ((*Cjap,Cchi*),(((*Pcol,Pper*),*Tpha*),*Pcri*),((*Ggal,Gvar*),*Btho*))),*Nmel,Aame*) となった (図 4-1b および図 4-1c)。アメリカホシハジロをアウトグループに置くと、ホロホロチョウ (*Nmer*) は 3 つの系統樹すべてにおいてキジ目の側系統となった。これらの系統樹において、ニホンウズラとヒメウズラ (*Cjap/Cchi*)、コウライキジ、ヨーロッパヤマウズラとホソオライチョウ (*Pcol/Pper/Tpha*) およびニワトリ、アオエリヤケイとコジュケイ (*Ggal/Gvar/Btho*) の 3 つのクラスターを作った。しかしながら、ニホンウズラとヒメウズラの間での分岐位置はそれぞれの系統樹で異なり、第 3 コドンの塩基配列で系統樹の深い位置になった。また、インドクジャク (*Pcri*) の分岐位置はそれぞれの系統樹で一致しなかった。

【考察】

ホロホロチョウ mtDNA の部分配列は、*ND2* (Dimcheff et al., 2000)、*Cytb* (Kornegay et al., 1993) および D-loop (DNA bank には登録されているが論文はない) についてすでに DNA database (DDBJ /EMBL/GenBank)に登録されている。DNA bank に登録されている *ND2* (DDBJ /EMBL/GenBank accession number: AF222557 and AF394613) と本章で決定した mtDNA の塩基配列とは完全に一致した。また DNA bank に登録されている *Cytb* (L08383) と本章で決定した mtDNA の塩基配列とは 1bp の塩基置換が見られたが、アミノ酸配列は完全に一致した。一方、D-loop については複数の塩基配列が登録されている。412bp の塩基配列が登録されている AF245272 と本章で決定した塩基配列は完全に一致した。498bp の塩基配列が登録されている AF013765 と 392bp の塩基配列が登録されている AF245273 とは完全に一致していたが、本章で決定した塩基配列とは 6bp 異なっていた。本章で決定した塩基配列とすでに DNA バンクに登録されている塩基配列の相同性は 99.47%~100% と非常に高く、これからホロホロチョウの遺伝変異性が低い可能性が示唆された。

ホロホロチョウ mtDNA の *ND3* 遺伝子において extra one base (1 bp) の挿入、*COI* 遺伝子における開始コドンの GTG (Val) への変異、*COIII* および *ND4* における終止コドンの不完全性 (表 4-2) は、ニホンウズラおよびヒメウズラ mtDNA で観察された変異と同様であった。これらの変異がいつ起こったのか解明されれば、鳥類における系統進化学マーカーの 1 つになりうるものと思われる。

第 1・第 2 コドンの塩基配列、第 3 コドンの塩基配列およびアミノ酸配列の 3 つに分けて系統樹を作成した。第 1・第 2 コドンの塩基配列、第 3 コドンの塩基配列およびアミノ酸配列から作成した系統樹のトポロジーはそれぞれ異なった (図 4-1)。NJ 法 (Saitou and Nei, 1987) でも同様に 3 種類の系統樹を作成したところ、それぞれ系統樹のトポロジーは ML 系統樹と同じであった (data not shown)。したがって、このトポロジーの違いは系統樹作成法によるものではないと考えられる。それぞれトポロジーは異なったが、ニホンウズラとヒメウズラ (*Cjap/Cchi*)、コウライキジ、ヨーロッパヤマウズラとホソオライチョウ (*Pcoll/Pper/Tpha*) およびニワトリ、アオエリヤケイとコジュケイ (*Ggal/Gvar/Btho*) の 3 つの単系統を形成した。トポロジーの違いは、この 3 つの単系統の分岐パターンの違いによるもの、およびインドクジャク (*Pcri*) の分岐位置の違いに起因する (図 4-1)。とくに、第 3 コドンの塩基配列の系統樹では、これまでの報告 (Kimball et al., 1999; Dimcheff et al., 2000) とは異なり、ニホンウズラおよびヒメウズラに分岐が深い位置になった (図 4-1b)。このことから第 3 コドンの塩基配列では、変異の飽和 (mutational saturation) が生じたため系統樹が不安定になったものと考えられる。第 1・第 2 コドンの塩基配列およびアミノ酸配列の分子系統樹から、ニホンウズラおよびヒメウズラなどのウズラ属は、ホロホロチョウについてキジ目の中でも早い時期に分化したものであろうと推定された (図 4-1a と図 4-1c)。これはこれまでの結果と一致するものであった (Kimball et al., 1999; Dimcheff et al., 2000)。

分類体系における族 (tribe) の分類では、その形態形質でキジ族 (tribe Phasianini) とシャコ族 (tribe Perdicini) に分けられている。本章で作った 3 つの系統樹すべてにおいてコウライキジ、ヨーロッパヤマウズラとホソオライチョウ (*Pcoll/Pper/Tpha*) およびニワトリ、アオエリヤケイとコジュケイ (*Ggal/Gvar/Btho*) がそれぞれ単系統になった (図 4-

1)。これらはともにキジ族とシャコ族が単系統となっていることから、第三章と同様に「族」の分類とは明らかに矛盾する。Kimball et al., (1999) が主張するキジ族、シャコ族それぞれの単系統を否定する説と一致するものであった。このようにキジ族とシャコ族に分類されている種がともに混在したクラスターを形成することが明らかとなり、従来の形態形質による分類体系の問題点が示唆された。

第1、第2コドンの塩基配列、第3コドンの塩基配列およびアミノ酸配列の3つの系統樹では、ホロホロチョウとインドクジャクは別のクラスターとなった。現在ではホロホロチョウ科 (Numididae) のホロホロチョウとキジ科 (Phasianidae) のコンゴクジャクは別の科に分類されている (Sibley and Monroe, 1990)。さらに D-loop と *Cytb* の塩基配列 (Kimball et al., 1997) および Ovomuroid Intron G の塩基配列 (Armstrong et al., 2001) を用いた分子系統学的解析により、インドクジャクとコンゴクジャクは近縁であり、インドクジャクおよびコンゴクジャクの「クジャク」とホロホロチョウとは系統遺伝学的にも区別される。本章の結果もこれら結果を支持する。しかしながら、アフリカ大陸にはニワトリより大きなキジ目がホロホロチョウとコンゴクジャクの2種しか生息していないことの原因は明らかにされてはいない。さらにホロホロチョウとコンゴクジャクとの系統関係を詳細に解析するためには、ホロホロチョウ科および「クジャク」における複数の種について解析する必要がある。

以上の結果から、ホロホロチョウはキジ科のクラスターとは別の遺伝学的位置となり、またキジ科の成立分化よりもより古くに分岐したことが明らかとなった。

【要約】

ホロホロチョウ (Helmeted Guineafowl ; *Numida meleagris*) はアフリカ原産のキジ目ホロホロチョウ科に属する鳥であり、地中海沿岸地域で家禽化され、現在家禽として用いられているが、その系統遺伝学的な位置は明確ではない。キジ目におけるホロホロチョウの系統遺伝学的な位置を明らかにするために、ホロホロチョウのミトコンドリアゲノム (mtDNA) の全塩基配列を決定し、系統解析を行った。ホロホロチョウの mtDNA の大きさは 16,726bp であり、キジ目内で mtDNA の全塩基配列が明らかとなっているニワトリ (16,775bp) およびニホンウズラ (16,697bp) より小さく、これは D-loop の大きさと対応していた。一方、ホロホロチョウの *12SrRNA* および *16SrRNA* の大きさ (それぞれ 980bp、1624bp) は、ニワトリおよびニホンウズラよりも大きかった。ホロホロチョウとニワトリおよびニホンウズラとの相同性は、*12SrRNA* および *16SrRNA* と 13 遺伝子毎に比較するとその相同性は異なっていたがそれぞれ 77.0~88.6% および 76.2~88.4% で、その平均相同性は 85.2% および 84.7% であった。ホロホロチョウとその他のキジ目に属する 9 種 (コジュケイ [*Btho*]、ヒメウズラ [*Cchi*]、ニホンウズラ [*Cjap*]、ニワトリ [*Ggal*]、アオエリヤケイ [*Gvar*]、インドクジャク [*Pcri*]、ヨーロッパヤマウズラ [*Pper*]、コウライキジ [*Pcol*]、ホソオライチョウ [*Tpha*]) およびアウトグループとしてアメリカホシハジロについて、DDBJ /EMBL/GenBank に登録されている *ND2* および *Cytb* 遺伝子の 2,178bp (終止コドンを除く) およびそれらをアミノ酸に翻訳した配列をもとに最尤法を用いて分子系統樹を作成した。アメリカホシハジロをアウトグループに置くと、ホロホロチョウは 3 つの系統樹すべてにおいてキジ目の側系統となった。これらの系統樹において、ニホンウズラとヒメウズラ (*Cjap/Cchi*)、コウライキジ、ヨーロッパヤマウズラとホソオライチョウ (*Pcol/Pper/Tpha*) およびニワトリ、アオエリヤケイとコジュケイ (*Ggal/Gvar/Btho*) の 3 つのクラスターを作った。しかしながら、ニホンウズラとヒメウズラの分岐位置はそれぞれの系統樹で異なり、第 3 コドンの塩基配列では系統樹の深い位置になった。また、インドクジャクに分岐位置はそれぞれの系統樹で一定しなかった。以上の結果から、ホロホロチョウはキジ科のクラスターとは別の系統遺伝学的な位置となり、キジ科が分化する以前、より早くに分岐したことが明らかとなった。

Table 4-1. Classification of the family Numididae

Genus	Scientific name	Common name
genus <i>Agelastes</i>		
	<i>Agelastes niger</i>	Black Guinea fowl
	<i>Agelastes meleagrides</i>	White-breasted Guinea fowl
genus <i>Numida</i>		
	<i>Numida meleagris</i>	Helmeted Guinea fowl
genus <i>Guttera</i>		
	<i>Guttera plumifera</i>	Plumed Guinea fowl
	<i>Guttera edouardi</i>	Crested Guinea fowl
genus <i>Acryllium</i>		
	<i>Acryllium vulturinum</i>	Vultrine Guinea fowl

Table 4-2. Localization of genes, features and length of each gene (base pair) in the mitochondrial genome of *Numida meleagris* (Helmeted Guineafowl)

Genes and features	Location	Size (bp)	<i>Gallus gallus domesticus</i> Size (bp) 1	Identity vs. <i>G.g.domesticus</i> (%)	<i>Coturnix japonica</i> Size (bp) 2	Identity vs. <i>C.japonica</i> (%)	Codon/Initial	Codon/Terminal
Control region (D-loop)	1-1169	1169	1227	73.4	1155	79.7		
tRNA-Phe	1170-1238	69	69	85.5	67	91.3		
12S rRNA	1239-2218	980	976	88.6	974	88.4		
tRNA-Val	2219-2291	73	73	82.4	71	80.8		
16S rRNA	2292-3915	1624	1621	86.7	1615	83.8		
tRNA-Leu	3916-3990	75	74	94.7	74	94.7		
NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1)	3999-4961	963	975	83.9	975	82.6	ATG	TAA
tRNA-Ile	4962-5032	71	72	91.7	71	85.9		
tRNA-Gln*	5038-5108*	71	71	88.6	71	94.4		
tRNA-Met	5108-5176	69	69	95.7	69	89.9		
NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2)	5177-6217	1041	1041	83.6	1041	81.9	ATG	TAG
tRNA-Trp	6216-6293	78	76	93.6	76	89.7		
tRNA-Ala*	6302-6370*	69	69	89.7	69	86.8		
tRNA-Asn*	6374-6446*	73	73	89.0	73	87.7		
tRNA-Cys*	6448-6515*	68	66	83.1	66	84.8		
tRNA-Tyr*	6515-6585*	71	71	94.3	71	95.7		
Cytochrome oxidase subunit 1 (CO1)	6587-8137	1551	1548	88.1	1551	87.0	GTT	AGG
tRNA-Ser*	8129-8203*	75	75	97.3	75	97.4		
tRNA-Asp	8206-8274	69	69	94.2	69	89.9		
Cytochrome oxidase subunit 2 (CO2)	8276-8959	684	684	86.4	684	86.8	ATG	TAA
tRNA-Lys	8961-9031	71	68	90.1	68	85.9		
ATPase subunit 8 (ATPase8)	9033-9197	165	165	77.0	168	76.2	ATG	TAA
ATPase subunit 6 (ATPase6)	9188-9871	684	684	83.5	684	81.0	ATG	TAA
Cytochrome oxidase subunit 3 (CO3)	9871-10654	784	784	88.4	784	86.2	ATG	T
tRNA-Gly	10656-10723	68	68	94.1	68	98.5		
NADH dehydrogenase subunit 3 (ND3) †	10724-11075	352	351	82.1	352	84.9	ATG	TAA
tRNA-Arg	11077-11145	69	68	95.6	69	98.6		
NADH dehydrogenase subunit 4 light-chain (ND4L)	11146-11442	297	297	87.5	297	83.5	ATG	TAA
NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4)	11436-12813	1378	1378	84.6	1378	83.2	ATG	T
tRNA-His	12814-12882	69	69	91.3	69	94.2		
tRNA-Ser	12884-12948	65	65	89.1	69	85.5		
tRNA-Leu	12950-13020	71	71	88.7	71	95.8		
NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5)	13021-14835	1815	1818	82.1	1821	81.7	ATG	TAA
Cytochrome b (Cytb)	14841-15983	1143	1143	86.9	1143	86.5	ATG	TAA
tRNA-Thr	15986-16054	69	69	98.6	70	94.3		
tRNA-Pro*	16058-16127*	70	70	87.1	70	80.0		
NADH dehydrogenase subunit 6 (ND6)*	16136-16657*	522	522	84.5	522	83.8	ATG	TAG
tRNA-Glu	16659-16726*	68	68	98.5	68	97.1		
mitochondrial genome		16726	16775	85.2	16697	84.7		

*: coded on the complementary (L) strand, †: insertion of one extra base in *Numida meleagris*

1) Desjardins and Morais 1990: DDBJ/EMBL/GenBank accession number X52392, 2) Chapter 2: DDBJ/EMBL/GenBank accession number AP003195

Table 4-3 Species examined and accession number of sequence data for *ND2* and *Cytb* available from DDBJ/EMBL/GenBank.

Group Species	DDBJ/EMBL/GenBank accession number			References
	Common name 和名	<i>ND2</i>	<i>Cytb</i>	
Duck				
<i>Aythya americana</i>	Redhead アメリカカホシハジロ	AF090337	AF090337	Mindell et al. (1999)
Guineafowl				
<i>Numida meleagris</i>	Helmeted Guineafowl ホロホロチヨウ	AP005595	AP005595	in this Chapter
Grouse				
<i>Tympanuchus phasianellus</i>	Sharp-tailed Grouse ホンオライチヨウ	AF222569	AF068191	Kimball et al. (1999) and Dimcheff et al. (2000)
Pheasants				
<i>Gallus gallus domesticus</i>	Chicken ニワトリ	X52392	X52392	Desjardins and Morais (1990)
<i>Gallus varius</i>	Green Junglefowl アオエリヤケイ	AF222551	AB044988	Kimball et al. (1999) and Dimcheff et al. (2000)
<i>Pavo cristatus</i>	Indian Peafowl インドクジャク	AF394612	L08379	Birks et al. (unpublished) and Kronegay et al. (1993)
<i>Phasianus colchicus</i>	Ring-neck Pheasant コウライキジ	AF222561	AF028798	Kimball et al. (1999) and Dimcheff et al. (2000)
Partridges				
<i>Bambusicola thoracica</i>	Chinese Bamboo Partridge コジュケイ	AF222538	AF028790	Kimball et al. (1999) and Dimcheff et al. (2000)
<i>Coturnix chinensis</i>	Blue-breasted Quail ヒメウズラ	AB073301	AB073301	in Chapter 2
<i>Coturnix japonica</i>	Japanese Quail ニホンウズラ	AP003195	AP003195	in Chapter 2
<i>Perdix perdix</i>	Grey Partridge ヨーロッパヤマウズラ	AF222560	AF028791	Kimball et al. (1999) and Dimcheff et al. (2000)

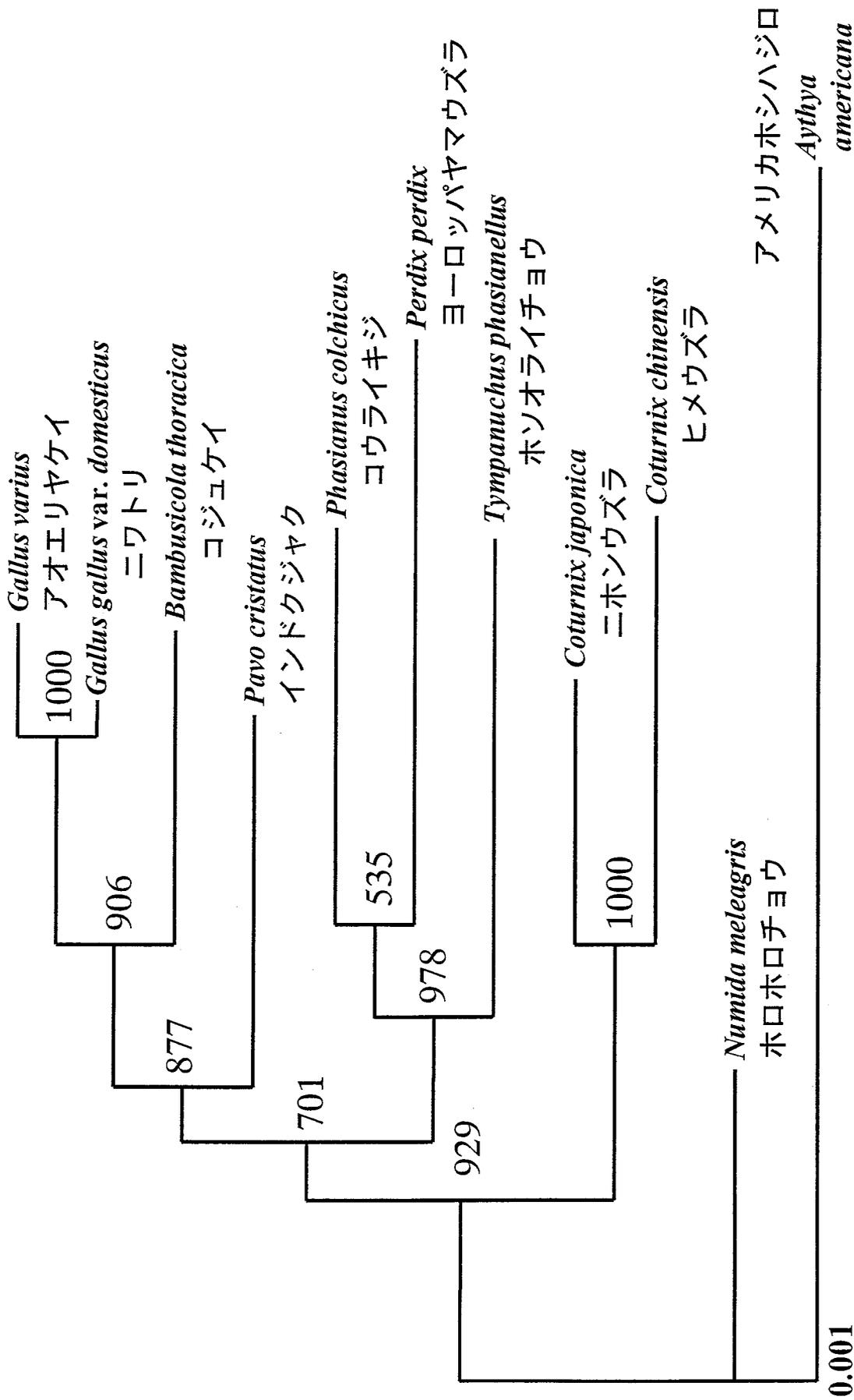


Figure 4-1a. Phylogenetic tree of black-billed capercailiie (*Tympanuchus phasianellus*), ring-neck pheasant (*Phasianus colchicus*), chicken (*Gallus gallus var. domesticus*), green junglefowl (*Gallus varius*), grey partridge (*Perdix perdix*), chinese bamboo partridge (*Bambusicola thoracica*), Japanese quail (*Coturnix japonica*), and blue-breasted quail (*Coturnix chinensis*) using amino-acid sequences of mitochondria *ND2* and *Cytb* genes. ProtML was applied to the amino-acid sequence of the concatenated two genes, using mtREM24-F model. Number on each branch indicates the local bootstrap value estimated by the REL method with 1,000 replications. The vertical scale bar indicates substitution rate / site.

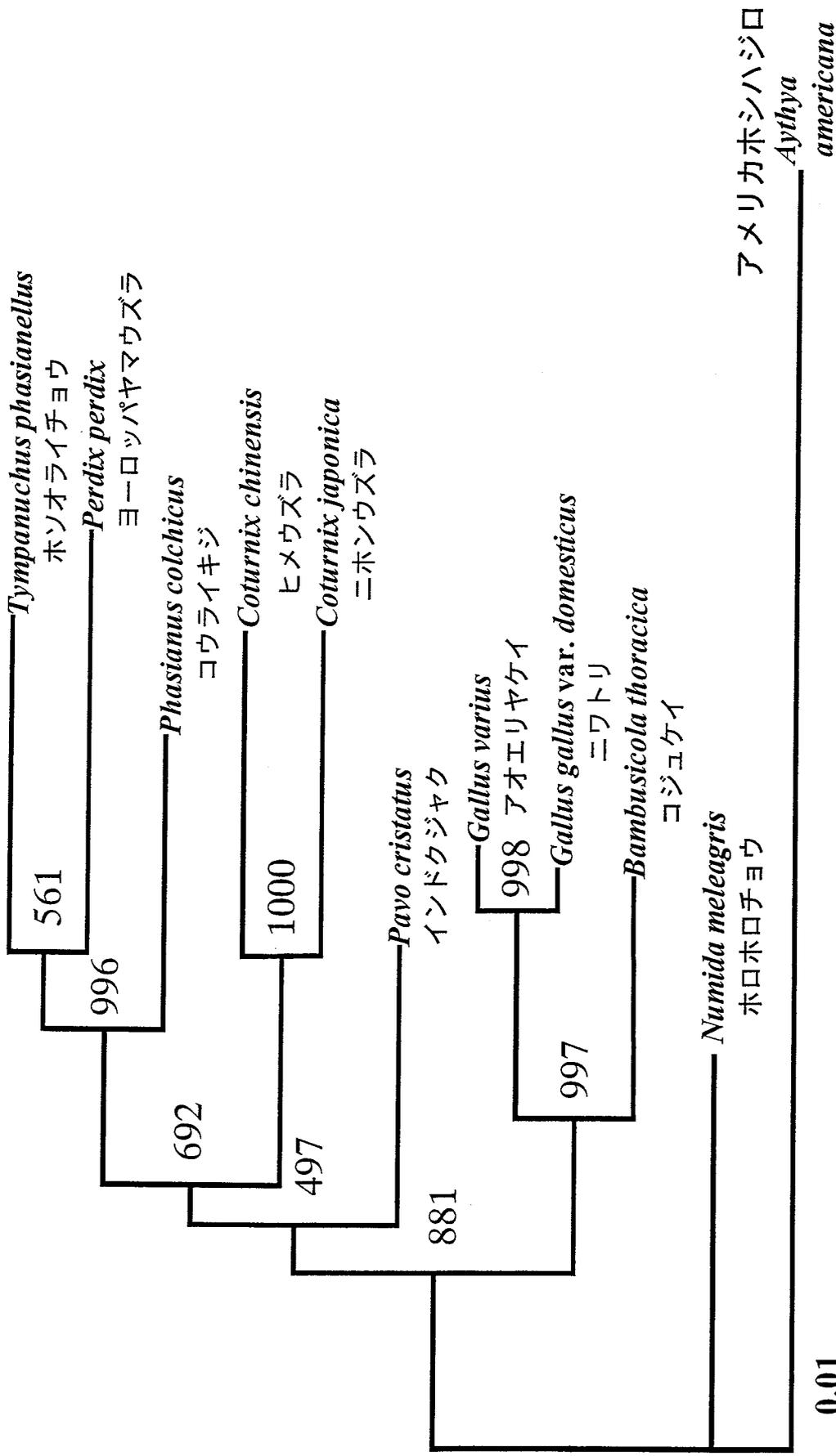


Figure 4-1b. Phylogenetic tree of black-billed capercaillie (*Tympanuchus phasianellus*), ring-neck pheasant (*Phasianus colchicus*), chicken (*Gallus gallus var. domesticus*), green junglefowl (*Gallus varius*), grey partridge (*Perdix perdix*), chinese bamboo partridge (*Bambusicola thoracica*), Japanese quail (*Coturnix japonica*), and blue-breasted quail (*Coturnix chinensis*) using nucleotide base sequences of mitochondria *ND2* and *Cytb* genes. NucML was applied to the 1st and 2nd codons of each triplet of the concatenated genes, using HKY85-F model (a/b= 4.54). Number on each branch indicates the local bootstrap value estimated by the REL method with 1,000 replications. The vertical scale bar indicates substitution rate / site.

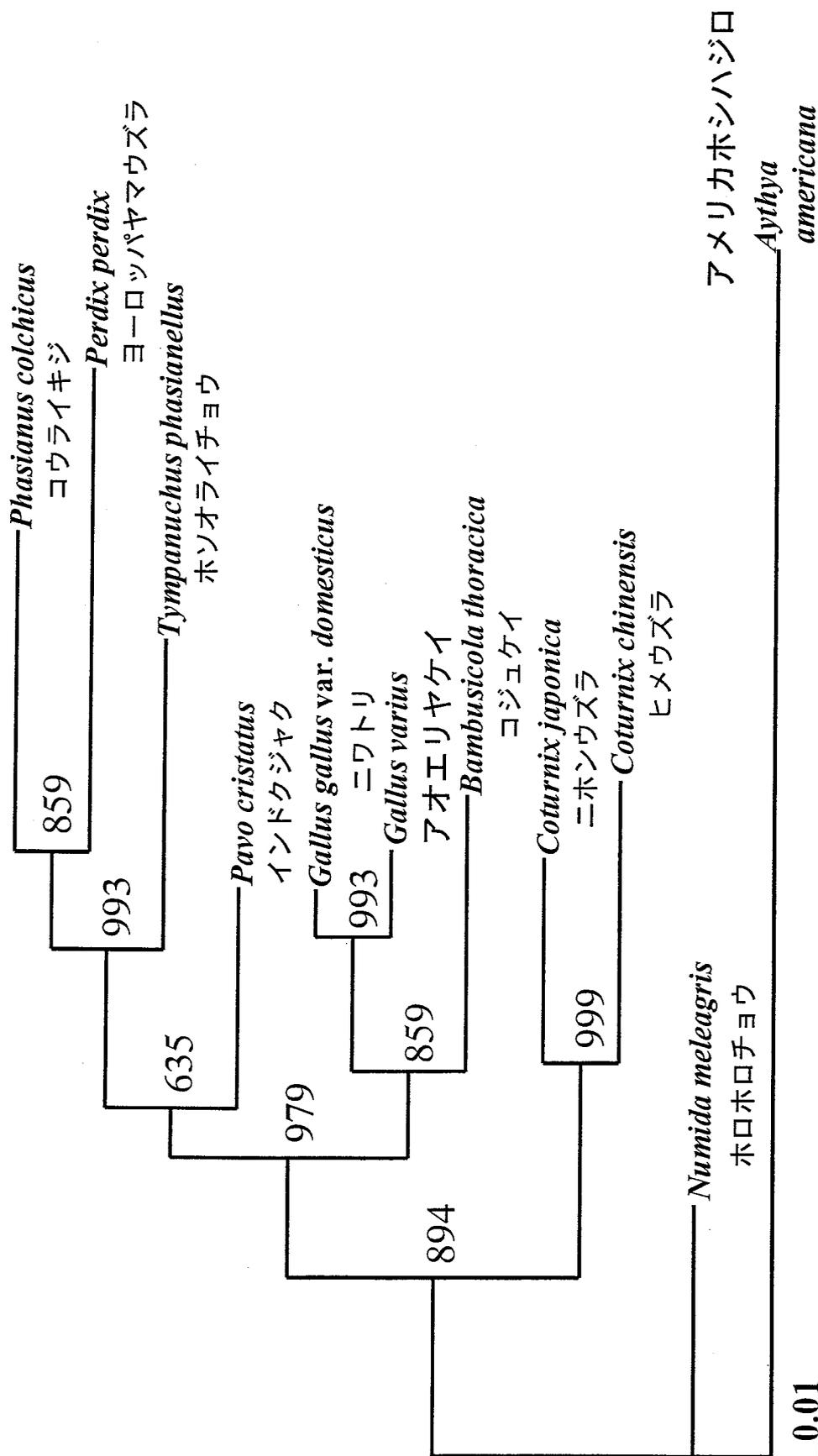


Figure 4-1c. Phylogenetic tree of black-billed capercallinies (*Tympanuchus phasianellus*), ring-neck pheasant (*Phasianus colchicus*), chicken (*Gallus gallus var. domesticus*), green junglefowl (*Gallus varius*), grey partridge (*Perdix perdix*), chinese bamboo partridge (*Bambusicola thoracica*), Japanese quail (*Coturnix japonica*), and blue-breasted quail (*Coturnix chinensis*) using nucleotide base sequences of mitochondria *ND2* and *Cytb* genes. NucML for 3rd codon, using HKY85-F model (a/b= 13.53). Number on each branch indicates the local bootstrap value estimated by the RELL method with 1,000 replications. The vertical scale bar indicates substitution rate / site.

第五章. ヤケイおよびニワトリの分子系統学的解析

【緒論】

ニワトリ (*Gallus gallus* var. *domesticus*) は、形態学的特徴および DNA-DNA ハイブリダイゼーションによりキジ目キジ科ヤケイ属 (order Galliformes, family Phasianidae, genus *Gallus*) に分類されている (Sibley and Monroe, 1990; Johnsgard, 1999)。ヤケイ属は、セキショクヤケイ (Red Junglefowl: RJF; *Gallus gallus*)、ハイイロヤケイ (Grey Junglefowl: GyJF; *Gallus sonnerati*)、セイロンヤケイ (Ceylon Junglefowl: CJF; *Gallus lafayetii*) およびアオエリヤケイ (Green Junglefowl: GJF; *Gallus varius*) の4種に分類されている (Sibley and Monroe, 1990; Johnsgard, 1999)。セキショクヤケイは、パキスタン北部のヒマラヤ山脈の麓、インド北部から西部、南アジア東部から南部、東南アジアからインドシナ半島、およびインドネシア Sumatra 島から Java, Bali および Salawesi 島およびフィリピンにいたる広範な地域に分布している (Sibley and Monroe, 1990; Johnsgard, 1999)。さらにセキショクヤケイは地理的かつ形態学的に *Gallus gallus gallus*; RJFgal, *G. g. jabouillei*; RJFjab, *G. g. spadicius*; RJFspa, *G. g. bankiva*; RJFban および *G. g. murgi*; RJFmur の5つの亜種に分類されている (Johnsgard, 1999)。ハイイロヤケイは、インド半島部、南 Rajasthan の北部、Gujarat, Madhya Pradesh, Andhra Pradesh および Polarvaram にかけて生息している (Delacour, 1977; Johnsgard, 1999)。アオエリヤケイは、ジャワ島およびその近隣島嶼 (Madura, Kangean, Bawean, Bali, Lombok, Sumbawa, Flores, および Alor) に生息しているが、セイロンヤケイはスリランカ (セイロン島) のみに生息している。ハイイロヤケイ、アオエリヤケイおよびセイロンヤケイには亜種の報告はない (Sibley and Monroe, 1990)。

紀元前 6,000 年の中国河北 (Huber)・河南 (Henna) 省の遺跡からニワトリの遺物が出土したものが最も古く、紀元前 2,500 年にパキスタンの Mohenjo-Daro 遺跡からニワトリを表した印章や粘土像や骨が発掘されている (West and Zhou, 1988; West and Zhou, 1989)。両遺跡から発掘された骨は現存のニワトリと解剖学的構造が似ており、東南アジアから南アジアを中心として生息していた鳥が東南アジアから中国にかけての広範な地域で家禽化されたものと推定されている。このことは、現在ヤケイの生息域が東南アジアから南アジアにかけての地域であることと矛盾しない。

Darwin (1896) は、世界で最初にニワトリの起源について推察し、ヤケイ属の種間交雑および形態学的比較を基にしてセキショクヤケイがニワトリの直接の祖先であると述べた。一方、例えばコーチン (Cochin) やブラーマ (Brahma) などのアジア肉用品種に対するレグホーン (Leghorn) などの欧米の卵用品種のように、ニワトリ品種間における形態は千差万別であり、大後頭孔の形状がアジア肉用品種とセキショクヤケイで異なること、セキショクヤケイ以外のヤケイとニワトリとの交雑で繁殖可能な雑種が出来ることなどを理由に、Hutt (1949) はニワトリの家禽化がセキショクヤケイを含む複数の系統から生じたと提唱した。現在では、ニワトリがセキショクヤケイから作り出されてきたという説が優勢であるがまだ決着には至っていない。家禽化されたニワトリは、卵生産および肉生産を目的に選抜が繰り返され、世界中に約500品種が確立され、約70億羽飼育されている (Robin, 1990)。

このように家禽化に関する一世紀に及ぶ論争に終止符を打とうと、ヤケイ属の類縁関係

についてタンパク質多型を用いた UPGMA 法 (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average Methods) により系統学的解析が行われ、ニワトリとセキショクヤケイが、その他 3 種のヤケイよりも遺伝的に近縁であるという結果が報告されている (Hashiguchi et al., 1981; Okada et al., 1984)。一方、分子系統学的な解析からもニワトリとセキショクヤケイが、その他 3 種のヤケイよりも遺伝的に近縁であるという結果が血液タンパク質のアイソザイム、血液型、DNA fingerprinting、mtDNA D-loop の塩基配列を用いて示された (Hashiguchi et al., 1981; Ohta et al., 2000; Okada et al., 1984; Yamashita et al., 1994; Fumihito et al., 1996)。これらの結果は Darwin の結論を強く支持するものであった。分子生物学的手法の出現・進展により、近隣結合法 (Neighbor joining; NJ; Saito and Nei, 1986)、最大節約法 (Maximum Parsimony; MP) および最尤法 (Maximum Likelihood; ML) など DNA 塩基配列を基にした 3 種の分子系統学的な解析が、数理統計学的方法を駆使して構築されてきた (Dayhoff et al. 1978; Felsenstein 1981; Saitou and Nei 1987; Kishino & Hasegawa 1989; Nei and Kumar, 2000)。これらの手法を用いて正しい系統解析を行うためには、1 つの遺伝子だけから推定された系統樹を用いるのではなく、多くの遺伝子について解析を行いその結果を総合的に評価する必要がある (Kishino and Hasegawa, 1989; Cao et al, 1994a, 1994b)。Mindell et al. (1999) は、鳥類および爬虫類の系統関係を正確に解析するために mtDNA 全塩基配列を決定し、系統樹を作成している。そこで本章では、ヤケイ属におけるニワトリの成立を分子系統学的に解析する目的で、ヤケイおよびニワトリの mtDNA 全領域の塩基配列を決定し、その塩基およびアミノ酸配列データに基づいた分子系統樹を作成し、ヤケイおよびニワトリの系統関係を明らかにした。

【材料と方法】

本研究には、ヤケイ属としてセキショクヤケイ (*Gallus gallus gallus*: RJFgal, *G. g. spadicius*: RJFspa, *G. g. bankiva*: RJFban,) 3 亜種、アオエリヤケイ (GJF)、セイロンヤケイ (CJF)、ハイイロヤケイ (GyJF) を用いた (表 5-1)。ニワトリには、ラオス在来鶏 (ラオス中央部 (Vientiane Province) で採取; NLAO; Yamamoto et al., 2000)、広島大学にて維持しているホワイトレグホーン CB 近交系統 (WLCB; Hala, 1986; Nishibori et al., 2000)、広島大学で血液中 IgG 量で高低二方向選抜を重ねたホワイトプリマスロック IgG-H 選抜系統 (WR; Nishibori et al., 2000)、および埼玉医科大学神吉博士より分与いただいたホワイトレグホーンコーネル近交系統 (Cornell-P: WLP; Briles et al., 1982) を用いた。とりわけ、ハイイロヤケイは採取地域の異なる 2 個体を用い、WLCB は同じ集団内から 2 個体を用いた。さらに広島大学で飼育しているキジ科ウズラ属ニホンウズラ (Japanese quail: JQ; *Coturnix japonica*) を解析に加えた (第二章)。キジ目における多くの種はオスが大変美しく、メスは地味な羽色をし、オスの方がその羽色から種を正確に同定することが可能である。したがって本章では、解析には全てオスのみを用いた。

各個体の血液 100 μ l あるいは肝臓を約 100mg 採取し、Protenase K および Phenol \cdot chloroform 法でゲノム DNA を抽出した (Sambrook and Russell, 2000)。抽出したゲノム DNA を鋳型にして、まず Takara LA-TaqTM DNA Polymerase (TaKaRa-BIO) を用い、LA-PCR 法でミトコンドリア DNA の約 16,000 塩基対 (bp) を増幅した。すでに DNA バンクに登録されているニワトリ (DDBJ/EMBL/Genbank accession number : X52392)、アメリカホジハジロ (AF090337) およびコウノトリ (AB026193) の mtDNA 全塩基配列を CLUSTAL X Ver.1.8 (Thompson et al. 1997) を用いてアライメントし、比較的保存されていた 16S ribosomal RNA (16S rRNA) および Cytochrome b (*Cytb*) 遺伝子の 2 カ所に LA-PCR プライマーを設計した (図 2-1)。設計した 4 種のプライマーはそれぞれ 35 塩基対 (bp) であった。

LA16SF (forward primer) : 5'-CCT ACG TGA TCT GAG TTC AGA CCG GAG CAA TCC AG
LA16SR (reverse primer) : 5'-TGC ACC ATT AGG TTG TCC TGA TCC AAC ATC GAG GT
LACytbF (forward primer) : 5'-TAC ACG AAT CAG GCT CAA ACA ACC CCC TAG GCA TC
LACytbR (reverse primer) : 5'-AGA TAC AGA TGA AGA AGA ATG AGG CGC CGT TTG CG

LA-PCR 反応液は、TaKaRa LA TaqTM DNA Polymerase に添付されている 10 \times LA PCR Buffer II with Mg²⁺ free を 5.0 μ l、MgCl₂ (25mM) を 5.0 μ l、dNTPs (各 2.5mM) を 8.0 μ l、20pmol/ μ l に希釈調整したプライマーをそれぞれ 0.75 μ l、200~800 μ g/ml の濃度に調整した DNA 溶液を 2.0 μ l、TaKaRa LA TaqTM DNA Polymerase (5U/ μ l) を 0.5 μ l を加え、滅菌蒸留水で全量 50 μ l にした。LA-PCR には GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) を用い、二本鎖の鋳型 DNA を 94 $^{\circ}$ C で 1 分間熱変成した後に、94 $^{\circ}$ C で 30 秒と 68 $^{\circ}$ C で 16 分を 30 回交互に繰り返して行った。約 16kb の LA-PCR 産物を 0.6% アガロースゲル電気泳動で分離し、ゲルから切り出した後に、LA-PCR 産物を磁気ビーズ法 (MagExtractor MFX-6000, TOYOBO) で精製した。

LA-PCR プライマー設計と同様の方法を用い、比較的保存された領域に 37 セットのプライマーを設計した。PCR プライマーセットの塩基配列情報を第二章表 2-1 に示した。PCR

の反応液量を全量 20 μ l とし、DNA 合成酵素には Ampli-Taq GOLD DNA polymerase (Applied Biosystems) を用いた。PCR 反応液は、Ampli-Taq GOLD DNA polymerase に添付されている GeneAmp^R10 \times PCR Buffer II & MgCl₂ Solution を 2.0 μ l、同様に添付される dNTPs (各 400 μ M) を 2.0 μ l、20pmol/ μ l に希釈調整したプライマーをそれぞれ 0.4 μ l ずつ、200~800 μ g/ml の濃度に調整した LA-PCR 産物を 0.5 μ l、Ampli-Taq GOLD DNA polymerase (2.5U) を 0.1 μ l を加え、滅菌蒸留水で全量 20 μ l にした。PCR には GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を使い、95 $^{\circ}$ C で 9 分間 DNA polymerase を活性化させた後に、95 $^{\circ}$ C で 1 分、58 $^{\circ}$ C で 30 秒および 72 $^{\circ}$ C で 1 分間を 40 回繰り返し DNA を増幅した。

PCR 産物を Exonuclease I および Shrimp Alkaline Phosphatase (Exo-SAP-IT; Reagent pack for use with Sequence PCR Product Sequence Kit, Amersham Pharmacia biotech) を用いて PCR 増幅産物を精製したのち、Sequencing の鋳型とした。Sequencing 反応には 1 反応で PCR と同様のプライマーの一方のみを用い、Dye Deoxy-terminator 法 (ABI PRISMTM BigDye Terminator Cycle Sequencing kit Ver. 1.0 あるいは 3.0, Applied Biosystems) でターゲット配列を蛍光標識した。蛍光標識にもちいた Pre-Mix sequence 反応液は、メーカー製品マニュアルの 8 倍に希釈して調整した。このため Pre-Mix sequence 反応液と別に作成した Sequence 反応バッファー (2.5 \times sequence buffer; 200mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, pH9.0) とを 1 : 7 の割合に混合して Sequence 反応を行った。Sequence 反応液は、各反応チューブあたり Pre-Mix sequence 反応液を 1.0 μ l、2.5 \times Sequence buffer を 7.0 μ l、20pmol/ μ l の Primer を 0.23 μ l、精製した PCR 産物を 3.0 μ l、これらに滅菌蒸留水を加えて全量を 20.0 μ l とした。Sequence 反応には、GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) を使い、95 $^{\circ}$ C で保温したアルミブロックにサンプルチューブを乗せ、95 $^{\circ}$ C で 10 秒、50 $^{\circ}$ C で 30 秒および 60 $^{\circ}$ C で 4 分間を 25 回繰り返し鋳型の DNA を標識した。Sequence 反応の後、SephadexTM G-50 Superfine (Amersham Pharmacia Biotech AB) カラムに標識した反応液を通して、未反応蛍光色素および未反応プライマーを除去し、精製した。この精製産物を濃縮乾燥システム (VC96N; タイテック社) で乾燥し、Formamide と Bluedextran を 5 : 1 で混合した Loading Dye を各サンプル 4 μ l ずつ加えてサンプルを解かした。この溶液に 95 $^{\circ}$ C、2 分間の熱処理を施した後、氷上で急冷し、DNA を 1 本鎖の状態に保った。この溶液から、1.7 μ l を ABI377 Sequencer にアプライした。電気泳動は一回のランで 48 サンプルずつ行い、ABI377 Sequencer のマニュアルに従って解析を行った。決定した塩基配列は AutoAssembler ver.2.1 (Applied Biosystems) を使い、ニワトリ mtDNA (Desjardins and Morais, 1990) の塩基配列情報をもとにつなぎ合わせて編集し、GENETYX program package (Ver.10.3; Software development Inc.) を用いて解析した。

解析には、mtDNA のタンパク質をコードする 13 遺伝子について塩基配列およびアミノ酸に翻訳した配列をそれぞれ concatenate したものをを用いた。なお、アミノ酸配列では NADH dehydrogenase subunit 6 (ND6) 遺伝子のみが L-strand (L 鎖) を読むために ND6 を除いた 12 遺伝子を用いた。concatenate した遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を CLUSTAL X を用いてアライメントし、挿入・欠失がある場合には挿入・欠失箇所を除いて編集した。編集した塩基配列のデータは、まず MOLPHY package に含まれている molcodon ソフトウェアを用い、アミノ酸をコードするそれぞれのトリプレットをまず第 1、第 2 および第 3 コドンの 3 つの座位にに分けた。系統解析には、第 1 コドンおよび第 2 コドンの塩基配

列を concatenate したもの、および第3コドンの塩基配列を concatenate したものの2とおりで行った。編集した塩基配列およびアミノ酸配列から近隣結合法 (NJ)、最大節約法 (MP) および 最尤法 (ML) により分子系統樹を作成した。NJ 法は、CLUSTAL X package (version 1.81; Thompson et al. 1997) にある "BOOTSTRAP N-J TREE" を用いて行った。MP 法は、PHYLIP package (version 3.57c; Felsenstein, 1995) を用い、上述の concatenate した塩基配列およびアミノ酸配列を使って、塩基配列は DNAPARS を、アミノ酸は PROTPARS program を用いて解析を行った。ML 法は、MOLPHY package (version 2.3b3; Adachi and Hasegawa, 1996) を用いて系統樹を構築した。塩基配列を用いた系統樹の作成には、NucML で HKY85F モデル (Hasegawa et al., 1985) を用い、アミノ酸配列を用いた系統樹の作成には ProtML で mtREV24-F モデル (Adachi and Hasegawa, 1996a) を用いて行った。ML 系統樹の局所的ブートストラップ確率は、Resampling of estimated Log-likelihood of sites (RELL) (Kishino et al. 1990, Hasegawa and Kishino, 1994) を1,000回の試行を繰り返して行って計算した。ML 法により尤度が高かった上位10位までのトポロジーに対して、PAML package (version 3.0; Yang, 2000) を用いて gamma-parameter を補正し、再度トポロジーの信頼性を高めた。

【結果】

mtDNA の構造

ヤケイ 4 種およびニワトリ mtDNA の全塩基配列を決定した。決定した mtDNA の全塩基配列の登録番号 (DDBJ/EMBL/GenBank) を、表 5-2 に示した。ハイイロヤケイおよびアオエリヤケイが 16,783bp で最も小さく、セイロンヤケイが 16,841bp で最も大きかった。ニワトリ (WLCB, WR およびラオス在来鶏) は 16,784~16,788bp、セキシヨクヤケイ 3 亜種は総て 16,785bp であった。ニワトリとセイロンヤケイおよびニホンウズラ (16,697bp; 第二章表 2-3) 間の塩基数の差異は主に D-loop の大きさであり、セイロンヤケイは WLCB より 61 bp 長く、ニホンウズラは 76 bp 短かった。ニワトリとヤケイの大きさの差異で特徴がみられたのは、16SrRNA の NADH dehydrogenase subunit 1 (*ND1*) 側の末端近傍に poly-C が見られ、ハイイロヤケイは C が 4 個、セキシヨクヤケイおよびラオス在来鶏は 5 個、WR は 6 個、WL は 8 個であった。4 種のヤケイおよびニワトリ内の mtDNA の相同性は 94% 以上であり、ニワトリとウズラとは 85% の相同性であった。解析した WLCB2 個体の mtDNA の塩基配列は、100%一致した。WLCB、WLP、WR およびラオス在来鶏 mtDNA のそれぞれの相同性は、99.96%以上であった。多摩動物公園で飼育され、1980 年に採血されたハイイロヤケイと、インドからマレーシアの動物園を経由しラオス動物園にて飼育されていた個体を 1999 年に採血したハイイロヤケイは、地理的に隔たった地域で、かつ採取時期も大きく異なっている個体にもかかわらず両者の mtDNA は 100%一致した。WLCB の mtDNA の塩基配列は、ハイイロヤケイの mtDNA の塩基配列と D-loop 領域を除くすべての遺伝子および領域で一致したが、その他のヤケイの mtDNA 塩基配列とは一致しなかった。このことは、ハイイロヤケイが WLCB と遺伝的に近いことを示している。

ヤケイ 4 種およびニワトリ (WLCB、WLP、WR およびラオス在来鶏) におけるすべての *ND3* 遺伝子において 1 bp の extra one base を見いだした。cytochrome oxidase subunit I (*COI*) 遺伝子における開始コドンが、ATG (Met) ではなく、GTG (Val) であった。その他の遺伝子は ATG であった。また、*COIII* および *ND4* における終止コドンは、完全なトリプレットとして mtDNA 塩基配列上には見いだされず、ともに T のみであった (表 5-2)。

分子系統樹の作成

ND6 遺伝子を除く 12 遺伝子および 13 遺伝子を concatenate してアライメントし、GAP (挿入・欠失箇所) を取り除いて編集した結果、WLCB とハイイロヤケイにおいてその配列は完全に一致した。塩基配列を第 1・第 2 コドンの塩基配列と第 3 コドンの塩基配列にわけてアライメントを行うと、第 1・第 2 コドンの塩基配列およびアミノ酸配列ではハイイロヤケイ、WLCB およびラオス在来鶏では完全に一致した。決定した全 mtDNA の 12 遺伝子 (*ND6* 遺伝子を除く) のアミノ酸配列、13 遺伝子の第 1・第 2 コドンの塩基配列、第 3 コドンの塩基配列データから分子系統樹を作成した。ニホンウズラをアウトグループ (外群) として NJ、MP および ML の系統樹を作成した。

NJ 法において、第 1・第 2 コドンの塩基配列では、((((GyJF,NLAO,WLCB,WLP),WR),((RJFban,RJFgal),RJFspa),CJF),GJF),JQ) (図 5-1a)。第 1・第 2 コドンの塩基配列はハイイロヤケイ、WLCB およびラオス在来鶏で同じであり、同じ

クラスターとなった。これらの分岐における局所ブートストラップ値は 1,000 であった。ハイイロヤケイ、WLCB、WLP およびラオス在来鶏は WR と近縁であり、その次にはセキショクヤケイのある亜種が位置した。第 3 コドンの塩基配列では、

(((((((GyJF,WLCB),NLAO),WLP),WR),((RJFban,RJFgal),RJFspa),GJF),CJF),JQ) (図 5-1b)。

ニホンウズラ、アオエリヤケイとセイロンヤケイのグループ、セキショクヤケイのグループ、ハイイロヤケイおよびニワトリの大きく 4 つのグループに分けられた。その中で、ハイイロヤケイ、ラオス在来鶏、WR および WLCB で単系統 (1 つのクラスター) を作った。アオエリヤケイの分岐および RJFspa の分岐における bootstrap の値は、その他の bootstrap の値よりも低い傾向にあった。第 3 コドンの塩基配列から作成した系統樹 (図 5-1b) は、第 1・第 2 コドンの塩基配列から作った系統樹とはトポロジーが異なった (図 5-1a)。アオエリヤケイは、ハイイロヤケイ、WLCB、WLP、ラオス在来鶏、WR および RJFspa からなるクラスターにリンクした。12 遺伝子を concatenate して作成したアミノ酸配列では、ハイイロヤケイ、WLCB、WLP、ラオス在来鶏、WR および RJFspa を除くセキショクヤケイの系統学的位置は、第 1・第 2 コドンの塩基配列から作成した系統樹と同じであった。第 1・第 2 コドンの塩基配列、第 3 コドンの塩基配列およびアミノ酸配列による系統樹において、ハイイロヤケイ、WLCB、WLP、ラオス在来鶏、WR およびセキショクヤケイのクラスターは信頼性が高い。RJFspa の位置はそれぞれの系統樹間で不安定であったが、ハイイロヤケイが遺伝学的にニワトリに近いことが高い信頼性を持って示された。セイロンヤケイおよびアオエリヤケイの位置は、系統樹間で異なったが (図 5-1abc)、それぞれニワトリ、ハイイロヤケイおよびセキショクヤケイの側系統となった。

NJ 法による結果の信頼性を高めるために、ML 法を用いて系統樹を作成した。第 1・第 2 コドンの塩基配列により NucML 解析では、セイロンヤケイおよびアオエリヤケイの位置を除いては NJ 系統樹と同じトポロジーであった (図 5-2a)。セイロンヤケイとアオエリヤケイのクラスターは、NJ 法を用いたアミノ酸配列による系統樹のトポロジーと同じであった。ハイイロヤケイ、ラオス在来鶏、WLCB、WLP および WR 間の分岐、およびハイイロヤケイ、ラオス在来鶏、WLCB、WLP、WR および RJFspa 間の分岐における局所ブートストラップの値は、NJ 法と同様にきわめて高かった。さらに NJ 法と同様に RJFspa の分岐におけるブートストラップ値はその他の値より低いものであった。第 3 コドンの塩基配列による NucML 系統樹では、ラオス在来鶏、ハイイロヤケイ、WLCB、WLP および WR の分岐順序は異なるが NJ 系統樹と同じトポロジーとなった (図 5-2b)。高い尤度を持つ NucML 候補系統樹に、NJ 系統樹と同じトポロジーのものが含まれた。NJ および ML 系統樹においてラオス在来鶏、ハイイロヤケイ、WLCB、WLP および WR の分岐位置の順序はそれぞれ異なったが、それらの分岐におけるブートストラップ値は有意に高かった。アミノ酸配列による ProtML では、RJFspa の分岐位置を除いて NJ 系統樹と同じであった (図 5-2c)。

PAML によって Γ (gamma ; ガンマ) 補正を加えた ML 系統樹を、塩基配列では baseml、アミノ酸では codeml 法で作成した (図 5-3abc)。第 1・第 2 コドンの塩基配列の系統樹は、((((GyJF,NLAO,WLP,WLCB),WR),(RJFban,RJFgal),RJFspa),(GJF,CJF)),JQ)となり、RJFspa の分岐位置を除いて NJ および ML 系統樹のトポロジーと同じになった (図 5-3a)。第 3 コドンの塩基配列では、((((WR,NLAO),WLP),(GyJF,WLCB)),((RJFban,RJFgal),RJFspa),GJF),CJF),JQ)となり、ラオ

ス在来鶏、ハイイロヤケイ、WLCB、WLP および WR の分岐順序は異なるものの NucML 系統樹と同じトポロジーとなった (図 5-3b)。アミノ酸配列では、((((GyJF,NLAO,WLCB,WLP),WR),(RJFban,RJFgal),RJFspa),(CJF,GJF),JQ)となり、NJ 系統樹と同じトポロジーであった (図 5-3c)。

さらに MP 系統樹を第 1・第 2 コドン、第 3 コドンの塩基配列およびアミノ酸配列についてそれぞれ作成した (図 5-4abc)。第 1・第 2 コドンの塩基配列では、((((GyJF,NLAO,WLCB,WLP),WR),(RJFban,RJFgal),RJFspa),CJF),GJF),JQ)となり、NJ 系統樹におけるアオエリヤケイの分岐位置を除いてはそのトポロジーは同じであった (図 5-4a)。第 3 コドンの塩基配列では、(((((((GyJF,WLCB),WR),WLP),NLAO),(RJFban,RJFgal),RJFspa),GJF),CJF),JQ)となり、ハイ

イロヤケイ、WLCB、WLP、NLAO および WR の分岐順序および CJF の分岐位置を除けば Γ 補正した ML 系統樹および Γ 補正をしない系統樹のトポロジーと一致した (図 5-4b)。アミノ酸配列では、

((((((GyJF,NLAO,WLP,WLCB),WR),(RJFban,RJFgal),RJFspa),CJF),GJF),JQ)となり、RJFspa および CJF の分岐位置を除けばそれらのトポロジーは同様となった (図 5-4c)。

本章の結果をまとめると以下のようになった。1)ハイイロヤケイ、ラオス在来鶏、WLCB、WLP および WR は遺伝的に 1 つのクラスター (単系統) となる。2) RJFban と RJFgal は 1 つのクラスターを作った。3) セキショクヤケイは、ハイイロヤケイ、ラオス在来鶏、WLCB、WLP および WR のクラスターと最も近縁であり、アオエリヤケイおよびセイロヤケイは遺伝的に遠くなった。4) ニホンウズラはヤケイの外側 (側系統) となった。

【考察】

1896年に Darwin が、ニワトリはヤケイ属のセキショクヤケイが起源であると述べた (Darwin, 1896)。その後、ニワトリの祖先について様々な議論がなされてきた。1949年に Hutt は、ニワトリには品種の多様性が豊富であることから、ニワトリはセキショクヤケイだけではなく、その他のヤケイを加えて改良され、成立したと述べた。近年、D-loopの塩基配列を用いて分子系統学的解析を行い、Darwin の説を支持する成果が報告されている (Fimihito et al., 1996)。クジラ目と偶蹄目との関係を解析するためにはミトコンドリアでは複数の遺伝子でかつ約 3,000bp 以上の配列データが必要であると統計学的視点から述べられている (Hasegawa and Adachi, 1986)。それゆえに本章では、ヤケイ属におけるニワトリの遺伝学的位置を明らかにするために、ヤケイ 4 種および 4 品種のニワトリ (WLCB、WLP、WR およびラオス在来鶏) の mtDNA 全塩基配列を決定し、NJ 法、ML 法および MP 法で系統樹を作成した結果、ハイイロヤケイがニワトリと遺伝的に最も近い位置となった。このことから、ニワトリが現在生息するハイイロヤケイの祖先種に由来するのか、あるいは現在生息するハイイロヤケイそのものを起源とするのか、という疑問が生じてくる。

本章では、ニワトリとして WLCB、WLP、WR およびラオス在来鶏について解析した。WLCB の個体群 (集団) から 2 羽を選び、両者ともに mtDNA の全塩基配列を決定した結果、決定した 16,788bp で塩基置換が全く観察されなかった。ハイイロヤケイについても、多摩動物公園で飼育されていた個体から 1982 年にサンプルを採取し保存しておいたものと 1999 年にラオス動物園で飼育されていた個体からサンプルを採取した 2 つのサンプルについて mtDNA の全塩基配列を解析した。両者はサンプル採取場所およびサンプル採取年代が大きく異なるものであるにもかかわらず、これらには塩基置換が全く観察されなかった。このことからハイイロヤケイの集団の遺伝的変異はほとんどないか、あるいは非常に小さい可能性が示唆された。しかしながら、このことをより正確に評価するためには、ハイイロヤケイの個体数をさらに増やして検討した方が良いと考えられる。

Cyt-b と *ND6* 遺伝子との間に位置する transfer RNA-Proline (tRNA-Pro) において、ヤケイおよびニワトリの間で 1 bp の変異が見られた。WLCB、WR およびハイイロヤケイでは G であったが、セキショクヤケイ 3 亜種、ラオス在来鶏、アオエリヤケイおよびセイロンヤケイでは A であった。tRNA は多型性が比較的低いことから、ハイイロヤケイの 1 bp の多型はニワトリの成立にハイイロヤケイが深く関与したことを示唆する。

本章では、NJ 法、ML 法および MP 法を用いて分子系統学的解析を行い、上述した仮説の検討を行ったが、セイロンヤケイ、アオエリヤケイ、RjFspa およびハイイロヤケイを含むニワトリの分岐位置がそれぞれの系統樹で一致しなかった。これらの系統樹の精度を向上させるために、D-loop、*12SrRNA*、*16SrRNA* および 22 個ある tRNA をアライメントし、本章で用いた系統樹と統合して評価する必要があるものと考えられる。セイロンヤケイにおいて、D-loop に 61bp の塩基挿入がみられたが、これはセイロンヤケイにのみ見られ、その他のヤケイおよびニワトリ、ニホンウズラには観察されなかった。このことは、NJ 法 (図 5-1)、ML 法 (図 5-2、図 5-4) および MP 法 (図 5-3) の第 3 コドンの塩基配列による系統樹において、セイロンヤケイが遺伝的にニワトリから最も離れた位置にあることと一致した。本章では、セキショクヤケイ 5 亜種のうち 3 亜種について解析し (RjFgal, RjFban および RjFspa)、その他の 2 亜種 (RjFjab と RjFmur) については解析しなかった。

これはセキショクヤケイの亜種の形態分類が不明瞭であるために解析には用いなかったが、これら2亜種についてmtDNAを解析を行うとセキショクヤケイのクラスターに入るものと考えている。

本章の結果から、ニワトリが現在生息するハイイロヤケイの祖先種に由来する、あるいは現在生息するハイイロヤケイそのものを起源とする、という仮説が提起できる。この仮説を明らかにすることによって、これまで血液タンパク質のアイソザイム (Hashiguchi et al., 1981) や mtDNA D-loop (Fumihito et al., 1996) を基にした系統解析による報告、つまりセキショクヤケイのみがニワトリの起源であるという仮説が否定されるものと思われる。

Tuinen and Hedge (2001) は、ニワトリとニホンウズラの分岐が、mtDNA から 3,610 万年前、核 DNA から 3,980 万年前および化石の記録から 3,330 万年前と推測した。このことから、ニワトリ (WLCB) とニホンウズラ (JQ) との分岐が 3,610 万年前と仮定し、mtDNA の 13 遺伝子第 3 コドンの塩基配列から進化時間を加味した系統樹を PHYLIP

(Felsenstein, 1995) の DNAMLK を用いて作成すると、ハイイロヤケイとラオス在来鶏との分岐は約 14,000 年前と推定できる。また NJ 法で第 3 コドンの塩基配列を用いた場合には、DNAML の解析結果とほぼ同じ 13,000 年前に分岐したものと推定され、これらの推定値はほぼ妥当な値であると評価できる。

本章の結果から、ハイイロヤケイはニワトリと近縁であることが示された。このことは、1) ニワトリの骨が、紀元前 2,500 年ごろのパキスタン Mohenjo-Daro 遺跡から発見されたこと、2) ハイイロヤケイが Mohenjo-Daro に近接している地域に生息していること、3) ハイイロヤケイとニワトリとの F1 世代は妊性を持っていること (Danforth, 1958) と矛盾しない。セキショクヤケイとハイイロヤケイとは別種に分類されるが、両者の間には完全に妊性があると報告されている。一方、アオエリヤケイおよびセイロンヤケイとの間には人工授精で F1 はとれるがその F1 には生殖能力がないと報告されている (Danforth, 1958; Johnsgard, 1999)。セキショクヤケイとニワトリとは自然状態においても交配していることが観察されている (Johnsgard, 1999)。これらの報告は、ニワトリのドメスティケーションに対してセキショクヤケイおよびハイイロヤケイが関与した可能性を示唆しており、ハイイロヤケイがニワトリの成立に関わっていることに全く矛盾はないと考えられる。

以上のことから、当初ハイイロヤケイが Mohenjo-Daro 周辺地域でニワトリの成立に関わった可能性があるものと考えられる。紀元前 6,000 年の中国河北 (Huber)・河南 (Henna) 省の遺跡からニワトリの遺物が出土しているものが最も古いことから、紀元前 6,000 年以前に Mohenjo-Daro 周辺地域ですでにニワトリが成立しており、そのニワトリがアジア諸国に持ち込まれて広まっていったとも考えられる。このことは本研究で推定されたハイイロヤケイとニワトリとの分岐年代には矛盾しない。一方、Crawford (1990) は、現在生息する 4 種のヤケイ以外にすでに絶滅した別種の存在を述べており、その絶滅した種がニワトリの成立に関わっていた可能性もある。しかしながら、現在ではその証拠はなく、またその絶滅した種の化石あるいは遺物を発見しない限り系統学的な解析は不可能である。

ニワトリの持続的な育種および新しい品種の作成には、遺伝的多様性の点からニワトリの品種の遺伝的な位置付けを明らかにし、各品種集団に対して遺伝的背景の違った集団を導入することが今後重要になると考えられる。このため、セキショクヤケイをはじめとする 4 種のヤケイおよびラオス在来鶏をはじめとするアジアの在来鶏は、ニワトリの育種に対して重要な遺伝子資源の候補となりうるものと考えられる。

【要約】

ニワトリ (*Gallus gallus* var. *domesticus*) は、ヤケイが家禽化されたものとされている。キジ目キジ科ヤケイ属には、セキショクヤケイ、ハイイロヤケイ、アオエリヤケイ、セイロンヤケイの4種が属し、ニワトリの祖先はセキショクヤケイのみの単一祖先であるという説とセキショクヤケイ以外のヤケイも家禽化に寄与したとする説があり、現在でもその結論には至っていない。ニワトリの起源を明らかにすることは、ニワトリの有用遺伝資源の保全にとって重要であるため、本章ではヤケイ属における全ミトコンドリア DNA の塩基配列を決定し、ニワトリの起源を分子系統学的に解析、推定した。セキショクヤケイ (*Gallus gallus*)、ハイイロヤケイ (*Gallus sonnerati*)、アオエリヤケイ (*Gallus varius*)、セイロンヤケイ (*Gallus lafayetii*) のヤケイ4種およびニワトリ (*Gallus gallus* var. *domesticus*: ホワイトレグホーン、ホワイトプリマスロック、ラオス在来鶏) さらにキジ科ウズラ属のニホンウズラ (*Corturnix japonica*) のミトコンドリアゲノム全領域の塩基配列 (16,697~16,841bp) を決定した。それぞれの遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列から最尤法、近隣結合法および最大節約法で分子系統樹を作成し、*Gallus* 属の系統関係を推定した。それらの系統樹において、ニホンウズラ、アオエリヤケイとセイロンヤケイのクラスター、セキショクヤケイのクラスター、ハイイロヤケイおよびニワトリの大きく4つのクラスターに分けられた。その中で、ハイイロヤケイ、ラオス在来鶏、ホワイトレグホーンおよびホワイトプリマスロックで単系統 (1つのクラスター) を作った。ニワトリの成立は、セキショクヤケイとハイイロヤケイのグループが母系起源となったものと考えられる。ニワトリは、セキショクヤケイとともにハイイロヤケイとも近縁であることが明らかとなり、その成立は比較的新しいものであると推定された。

Table 5-1. List of breeds and species surveyed

Breeds or Species	Abbreviation of name	No. of birds	Sex	Place and year of sampling
Red Junglefowl				
(<i>Gallus gallus gallus</i>)	RJFgal	1	♂	Manila, Philippine (1998)
(<i>Gallus gallus spadiceus</i>)	RJFspa	1	♂	Vientiane, Lao P.D.R. (1998)
(<i>Gallus gallus bankiva</i>)	RJFban	1	♂	Bali, Indonesia (1990)
Green Junglefowl	GJF	1	♂	Bali, Indonesia (1990)
(<i>Gallus varius</i>)				
Grey Junglefowl	GyJF	2	♂	Lao Zoological Park, Vientiane, Lao P.D.R. (1998)
(<i>Gallus sonnerati</i>)			♂	Tama Zoological Park, Tokyo, Japan (1982)
Ceylon Junglefowl	CJF	1	♂	Tama Zoological Park, Tokyo, Japan (1999)
(<i>Gallus lafayettei</i>)				
Domestic chicken;				
White Leghorn, CB line	WLCB	2	♂	Hiroshima University, Hiroshima, Japan (1997)
(<i>Gallus gallus</i> var. <i>domesticus</i>)				
White Leghorn, Cornell-P line	WLP	1	♂	Saitama Medical University, Saitama, Japan (1987)
(<i>Gallus gallus</i> var. <i>domesticus</i>)				
White Plymouth Rock, IgG-H line	WPR	1	♂	Hiroshima University, Hiroshima, Japan (2000)
(<i>Gallus gallus</i> var. <i>domesticus</i>)				
Laos native chicken	NLAO	1	♂	Vientiane province, Lao P.D.R. (1998)
(<i>Gallus gallus</i> var. <i>domesticus</i>)				

Table 5-2. Localization of genes, features and length of each gene (base pair) in the mitochondrial genome of genus *Gallus*

Genes and features	DDBJ/EMBL/GenBank accession number	WLCB	WLP	WR	NLAO	GyJF	RJFgdI	RJFspa	RJFbarr	GJF	CJF	Codon/Initial	Codon/Terminal
Control region (<i>D-loop</i>)	AC0003317	1231	1232	1231	←	←	1232	←	←	1228	1292	←	←
tRNA-Phe		69	←	←	←	←	←	←	←	68	67	←	←
12S rRNA		976	←	←	←	←	←	←	←	973	977	←	←
tRNA-Val		73	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
16S rRNA		1626	1625	1623	1622	1621	1622	←	←	←	1621	←	←
tRNA-Leu		74	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
NADH dehydrogenase subunit 1 (<i>ND1</i>)		975	←	←	←	←	←	←	←	←	←	ATG	TAA
tRNA-Ile		72	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
tRNA-Gln*		71	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
tRNA-Met		69	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
NADH dehydrogenase subunit 2 (<i>ND2</i>)		1041	←	←	←	←	←	←	←	←	←	ATG	TAG
tRNA-Trp		76	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
tRNA-Ala*		69	←	←	←	←	←	←	←	70	69	←	←
tRNA-Asn*		73	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
tRNA-Cys*		66	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
tRNA-Tyr*		71	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
Cytochrome oxidase subunit 1 (<i>CO1</i>)		1551	←	←	←	←	←	←	←	←	←	GTG	AGG
tRNA-Ser*		75	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
tRNA-Asp		69	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
Cytochrome oxidase subunit 2 (<i>CO2</i>)		684	←	←	←	←	←	←	←	←	←	ATG	TAA
tRNA-Lys		68	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
ATPase subunit 8 (<i>ATPase8</i>)		165	←	←	←	←	←	←	←	←	←	ATG	TAA
ATPase subunit 6 (<i>ATPase6</i>)		684	←	←	←	←	←	←	←	←	←	ATG	TAA
Cytochrome oxidase subunit 3 (<i>CO3</i>)		786	←	←	←	←	←	←	←	←	←	ATG	T
tRNA-Gly		68	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
NADH dehydrogenase subunit 3 (<i>ND3</i>) †		352	←	←	←	←	←	←	←	←	←	ATG	TAA (TAG in CJF)
tRNA-Arg		68	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
NADH dehydrogenase subunit 4 light-chain (<i>ND4L</i>)		297	←	←	←	←	←	←	←	←	←	ATG	TAA
NADH dehydrogenase subunit 4 (<i>ND4</i>)		1380	←	←	←	←	←	←	←	←	←	ATG	T
tRNA-His		69	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
tRNA-Ser		65	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
tRNA-Leu		71	←	←	←	←	←	←	←	66	65	←	←
NADH dehydrogenase subunit 5 (<i>ND5</i>)		1818	←	←	←	←	←	←	←	←	←	ATG	TAA
Cytochrome b (<i>Cytb</i>)		1143	←	←	←	←	←	←	←	←	←	ATG	TAA
tRNA-Thr		69	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
tRNA-Pro*		70	←	←	←	←	←	←	←	71	70	←	←
NADH dehydrogenase subunit 6 (<i>ND6</i>)*		522	←	←	←	←	←	←	←	←	←	ATG	TAA
tRNA-Glu*		68	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←	←
mitochondrial genome		16,788	16,788	16,785	16,784	16,783	16,785	16,785	16,785	16,783	16,841	←	←

Avian names are described in Table 1.

* : coded on the complementary (L) strand, † : insertion of extra one base

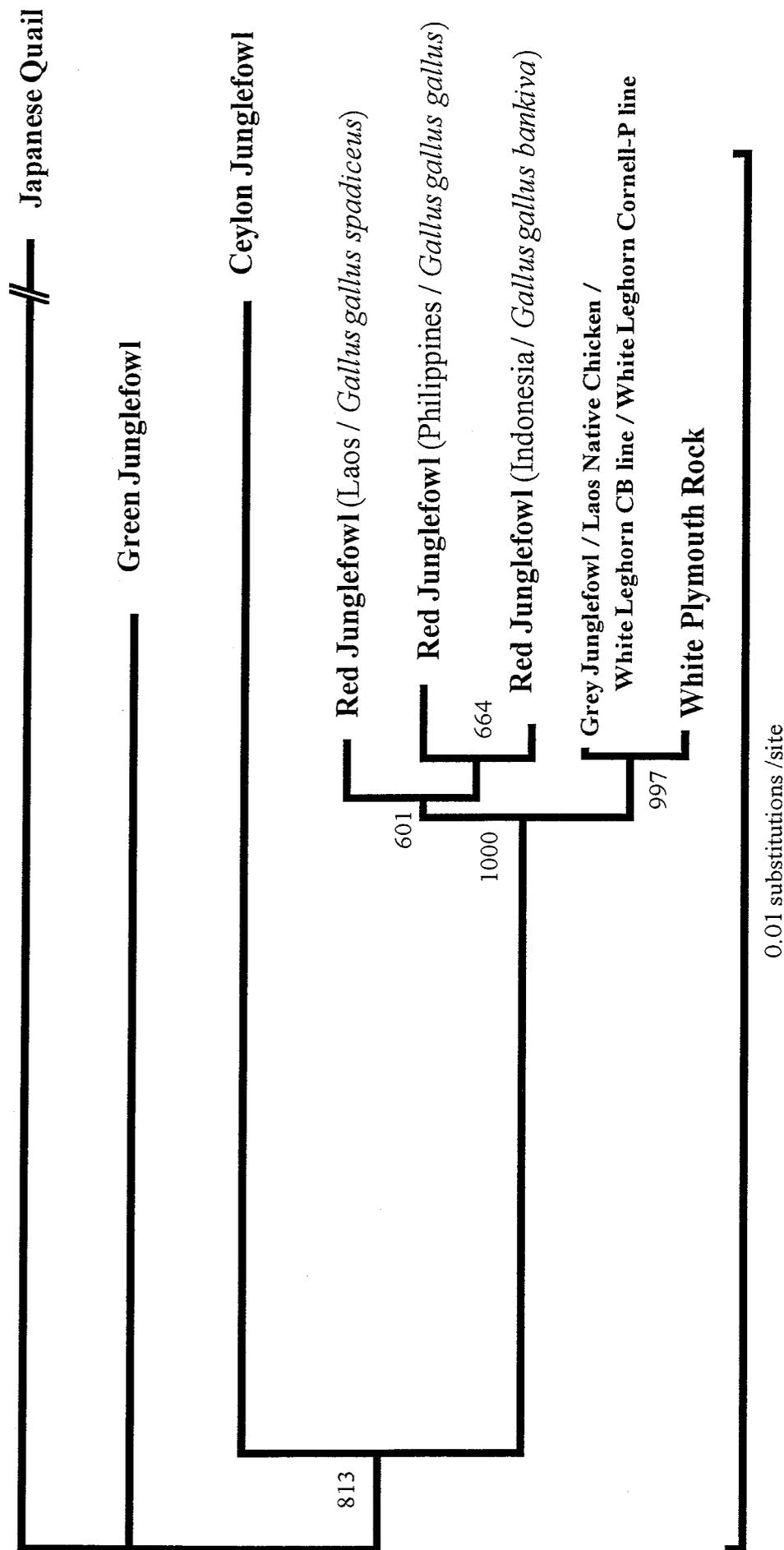


Figure 5-1a. Phylogenetic tree based on Neighbor Joining method with Clustal X of the 1st and 2nd codon of each triplet in concatenated mitochondrial 13 genes (*ND1*, *ND2*, *COI*, *COII*, *ATPase8*, *ATPase6*, *COIII*, *ND3*, *ND4L*, *ND4*, *ND5*, *Cyt-b* and *ND6*) showing relationships of four species of jungle fowls, domestic chicken and Japanese quail. Numbers on each branch indicate the bootstrap of 1,000 replications. The vertical scale bar indicates nucleotide substitution rate.

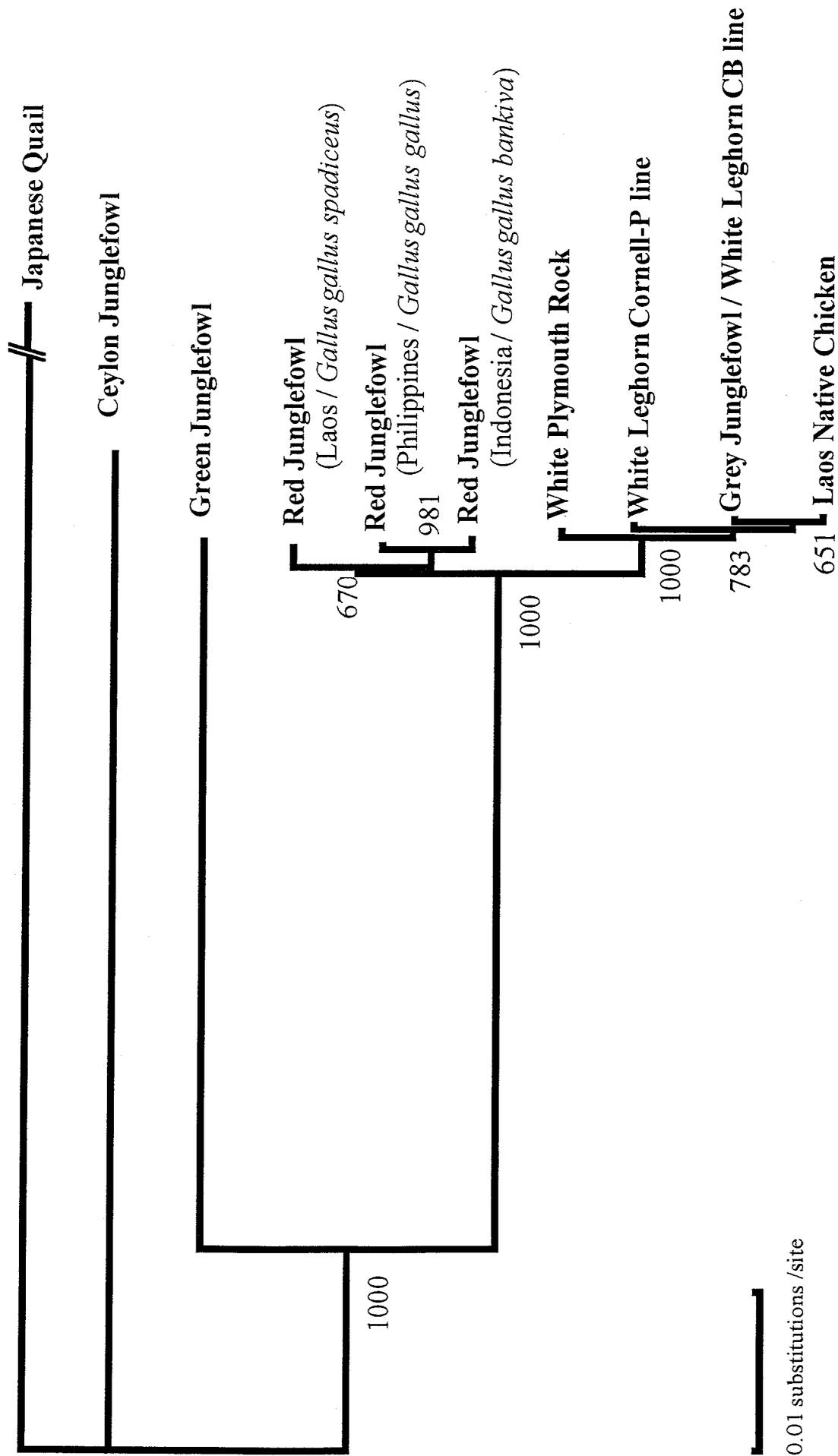


Figure 5-1b. Phylogenetic tree based on Neighbor Joining method with Clustal X of the 3rd codon of each triplet in concatenated mitochondrial 13 genes (*ND1*, *ND2*, *COI*, *COII*, *ATPase8*, *ATPase6*, *COIII*, *ND3*, *ND4L*, *ND4*, *ND5*, *Cyt-b* and *ND6*) showing relationships of four species of jungle fowls, domestic chicken and Japanese quail. Numbers on each branch indicate the bootstrap of 1,000 replications. The vertical scale bar indicates nucleotide substitution rate.

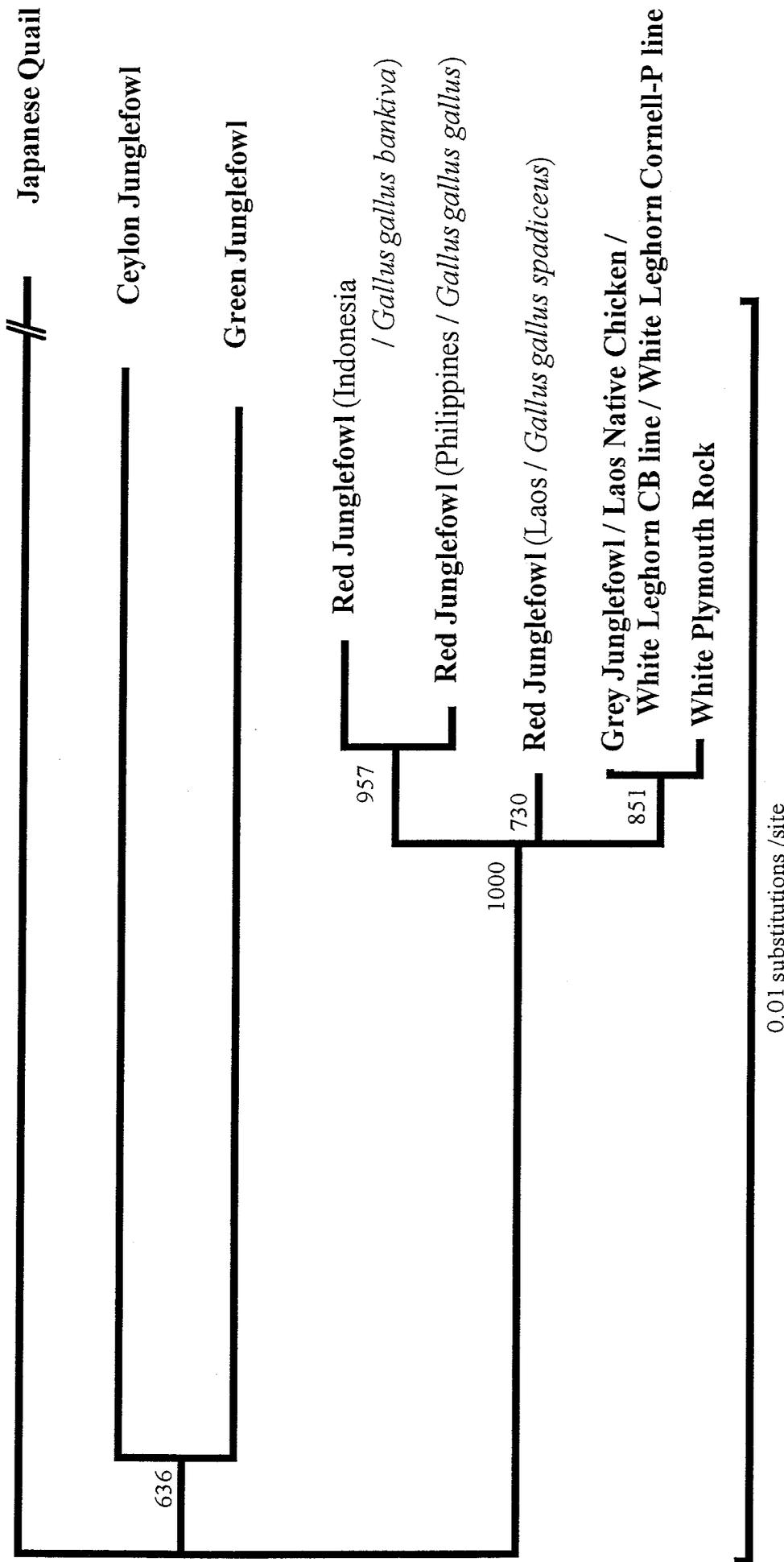


Figure 5-1c. Phylogenetic tree based on Neighbor Joining method with Clustal X of the amino acid in concatenated mitochondrial 12 genes (*ND1*, *ND2*, *COI*, *COII*, *ATPase8*, *ATPase6*, *COIII*, *ND3*, *ND4L*, *ND4*, *ND5* and *Cyt-b*) showing relationships of four species of jungle fowls, domestic chickens and Japanese quail. The *ND6* gene is excluded from the phylogenetic analysis because it is on the opposite strand and had considerably different base composition. Numbers on each branch indicate the bootstrap of 1,000 replications. The vertical scale bar indicates amino acid substitution rate.

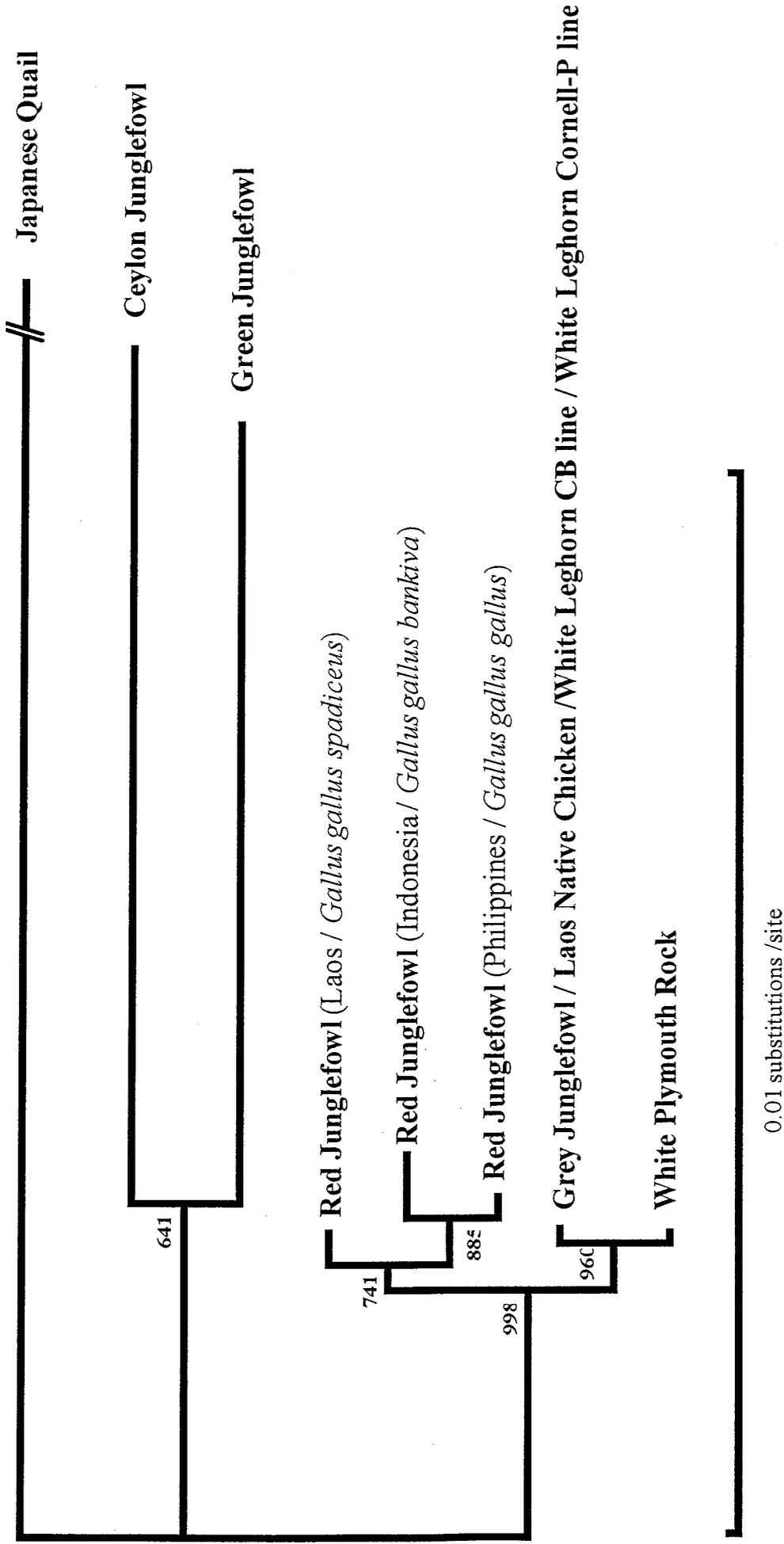
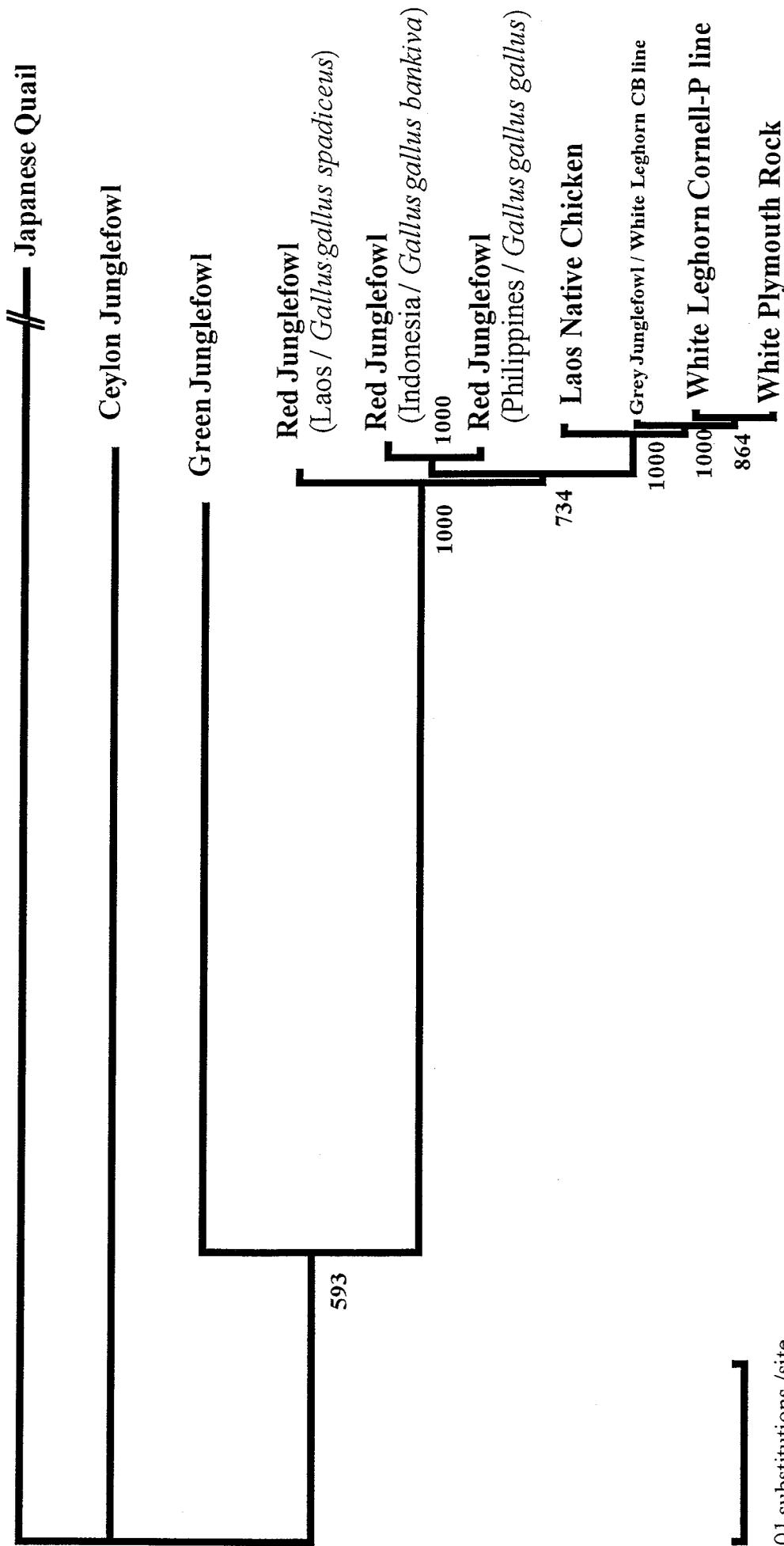
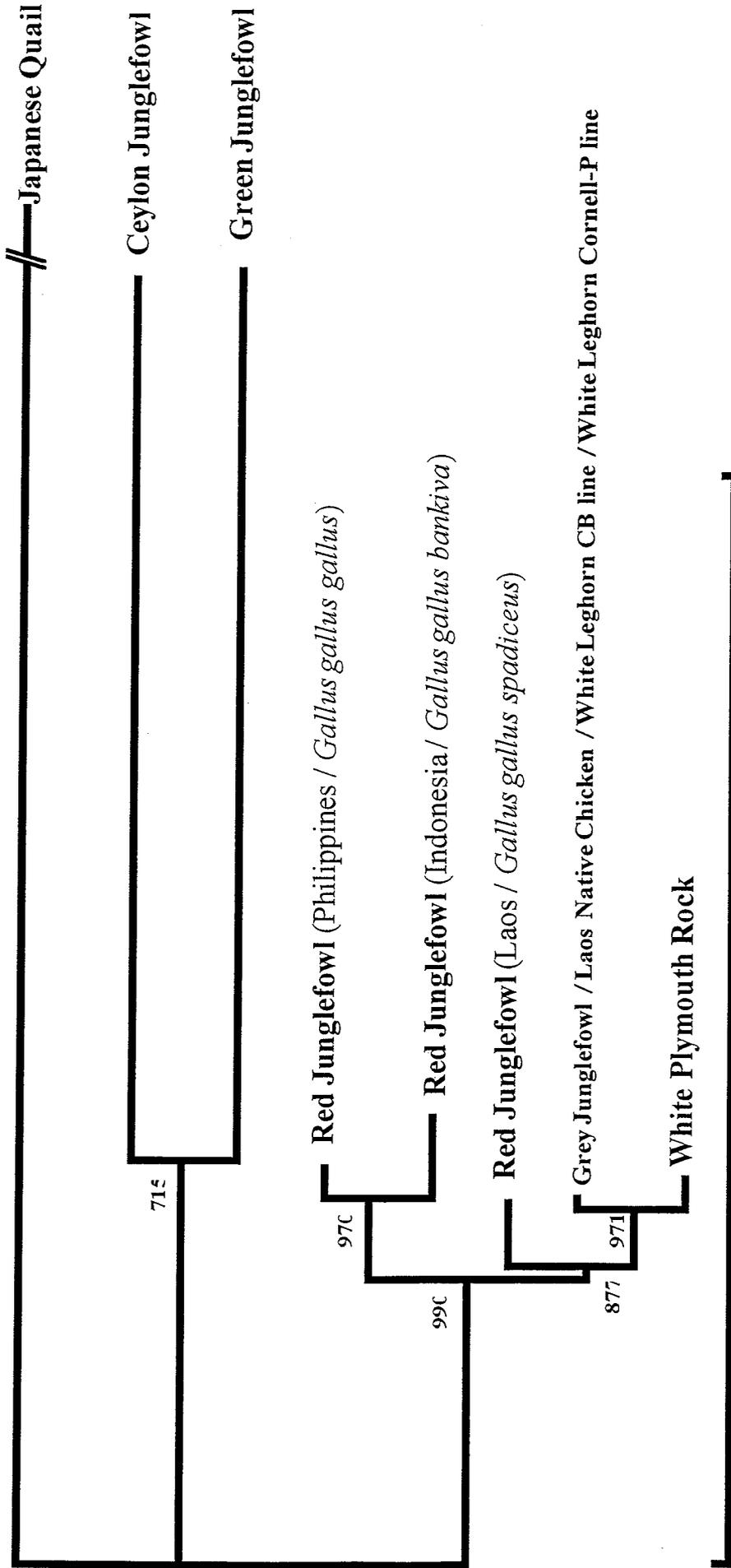


Figure 5-2a. Phylogenetic tree based on Maximum Likelihood method by NucML with HKY85F model (a/b = 6.6) of the 1st and 2nd codon of each triplet in concatenated mitochondrial 13 genes (*ND1*, *ND2*, *COI*, *COII*, *ATPase8*, *ATPase6*, *COIII*, *ND3*, *ND4L*, *ND4*, *ND5*, *Cyt-b* and *ND6*) showing relationships of four species of jungle fowls, domestic chicken and Japanese quail. Numbers on each branch indicate the local bootstrap of 1,000 replications. The vertical scale bar indicates nucleotide substitution rate.



0.01 substitutions /site

Figure 5-2b. Phylogenetic tree based on Maximum Likelihood method by NucML with HKY85F model ($a/b=12.23$) of the 3rd codon of each triplet in concatenated mitochondrial 13 genes (*ND1*, *ND2*, *COI*, *COII*, *ATPase8*, *ATPase6*, *COIII*, *ND3*, *ND4L*, *ND4*, *ND5*, *Cyt-b* and *ND6*) showing relationships of four species of jungle fowls, domestic chicken and Japanese quail. Numbers on each branch indicate the local bootstrap of 1,000 replications. The vertical scale bar indicates nucleotide substitution rate.



0.01 substitutions /site

Figure 5-2c. Phylogenetic tree based on Maximum Likelihood method by ProtML with mtREV24-F model of the amino acid in concatenated mitochondrial 12 genes (*ND1*, *ND2*, *COI*, *COII*, *ATPase8*, *ATPase6*, *COIII*, *ND3*, *ND4L*, *ND4*, *ND5* and *Cyt-b*) showing relationships of four species of jungle fowls, domestic chickens and Japanese quail. The *ND6* gene is excluded from the phylogenetic analysis because it is on the opposite strand and had considerably different base composition. Numbers on each branch indicate the local bootstrap of 1,000 replications. The vertical scale bar indicates amino acid substitution rate.

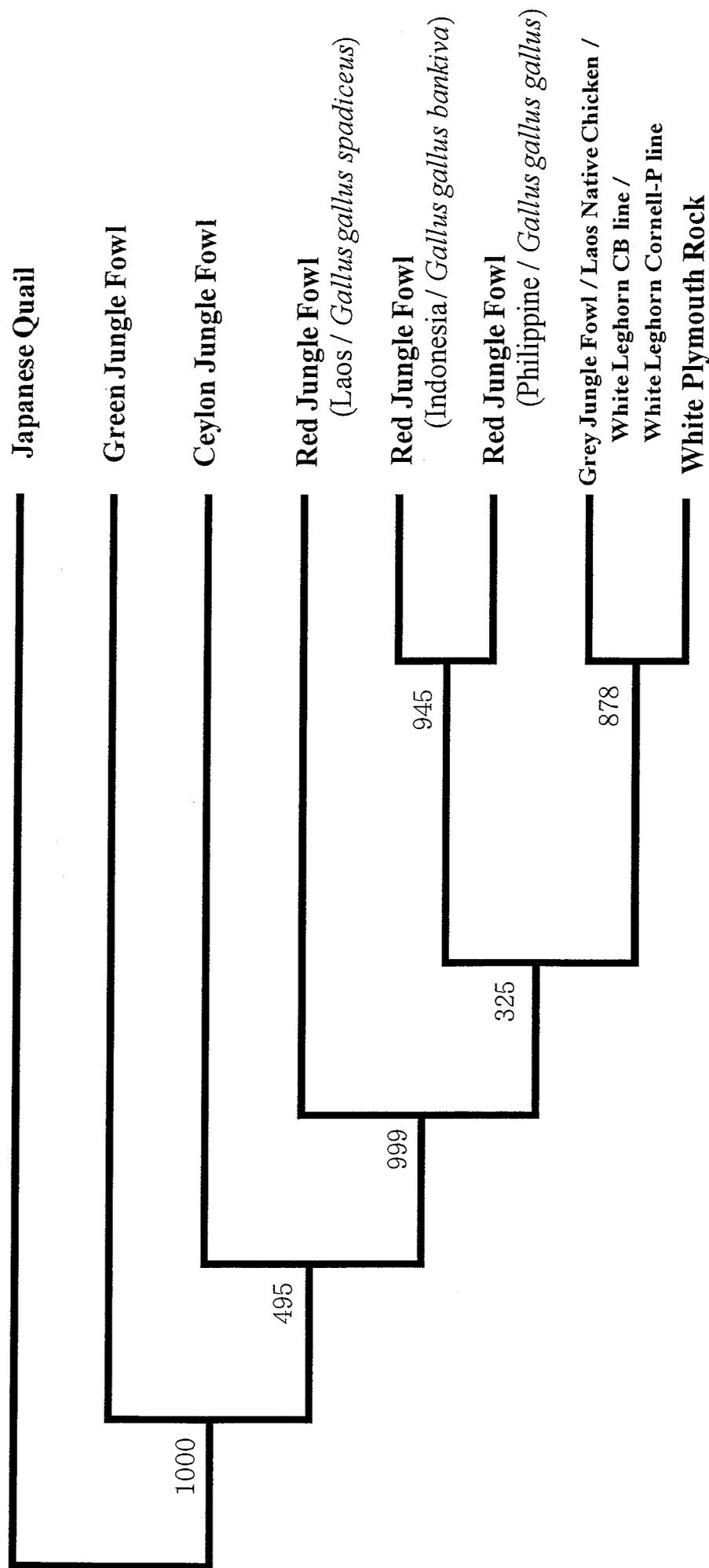


Figure 5-3a. Phylogenetic tree based on Maximum Parsimony method with PHYLIP program of the amino acid in concatenated mitochondrial 12 genes (*ND1*, *ND2*, *COI*, *COII*, *ATPase8*, *ATPase6*, *COIII*, *ND3*, *ND4L*, *ND4*, *ND5* and *Cyt-b*) showing relationships of four species of jungle fowls, domestic chickens and Japanese quail. The *ND6* gene is excluded from the phylogenetic analysis because it is on the opposite strand and had considerably different base composition.

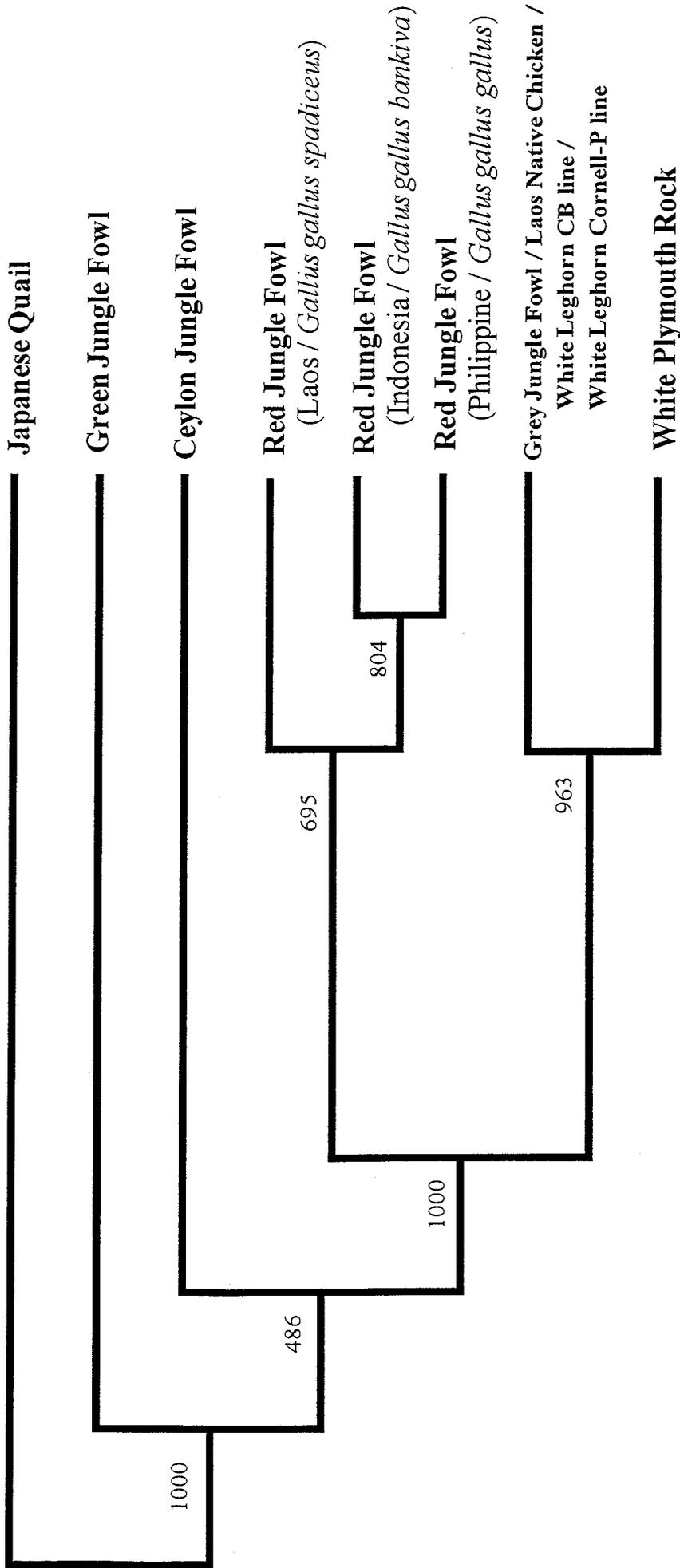


Figure 5-3b. Phylogenetic tree based on Maximum Parsimony method with PHYLIP program of the 1st and 2nd codon of each triplet in concatenated mitochondrial 13 genes (*ND1*, *ND2*, *COI*, *COII*, *ATPase8*, *ATPase6*, *COIII*, *ND3*, *ND4L*, *ND4*, *ND5*, *Cyt-b* and *ND6*) showing relationships of jungle fowls, domestic chicken and Japanese quail. Numbers on each branch indicate the bootstrap of 1,000 replications.

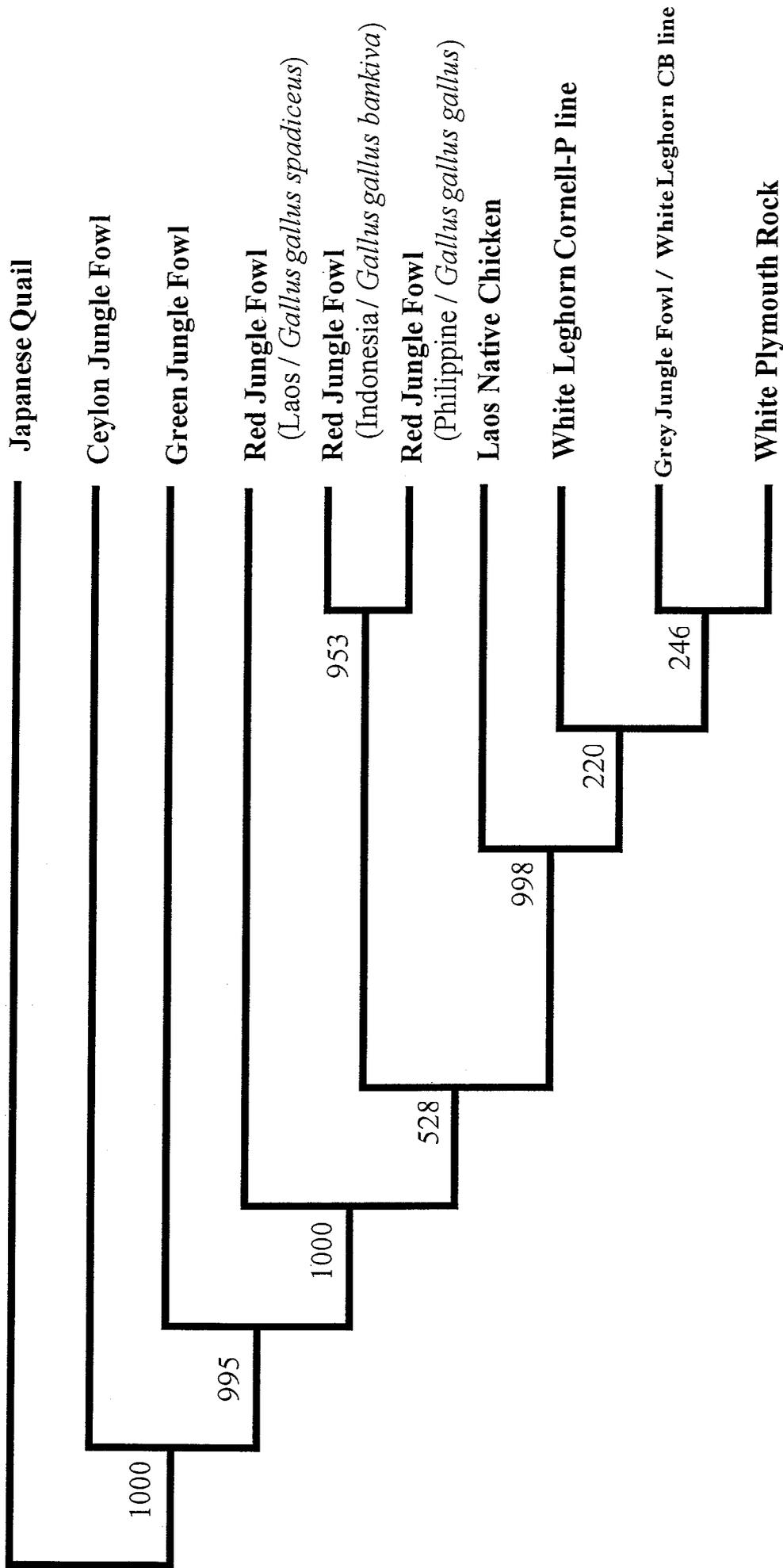
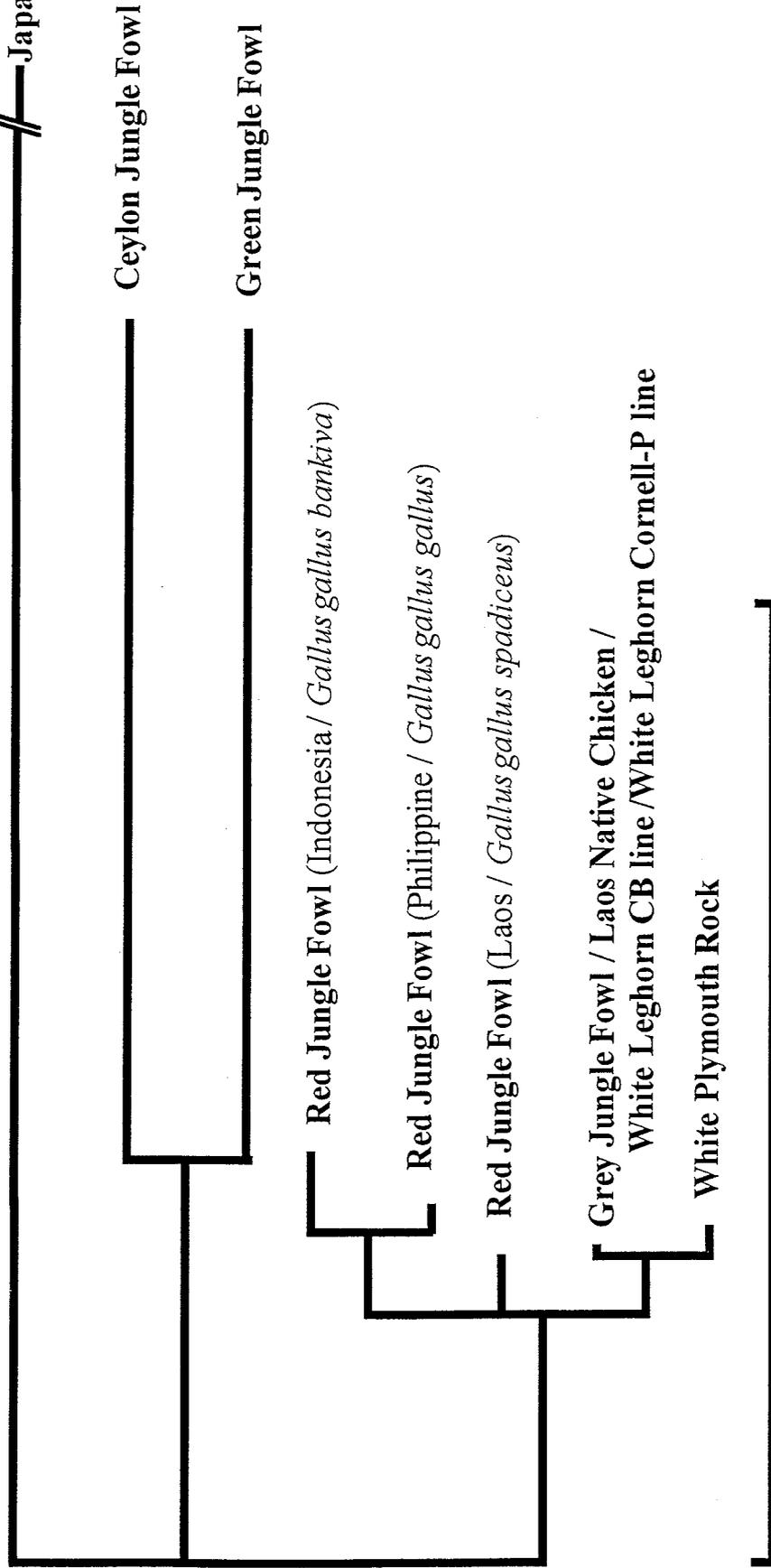


Figure 5-3c. Phylogenetic tree based on Maximum Parsimony method with PHYLIP program of the 3rd codon of each triplet in concatenated mitochondrial 13 genes (*ND1*, *ND2*, *COI*, *COII*, *ATPase8*, *ATPase6*, *COIII*, *ND3*, *ND4L*, *ND4*, *ND5*, *Cyt-b* and *ND6*) showing relationships of four species of jungle fowls, domestic chicken and Japanese quail. Numbers on each branch indicate the bootstrap of 1,000 replications.



0.01 substitutions /site

Figure 5-4a Phylogenetic tree based on Maximum Likelihood method by the codeml in PAML with mtREV24-F model and gamma-corrected rates of the amino acid in concatenated mitochondrial 12 genes (*ND1*, *ND2*, *COI*, *COII*, *ATPase8*, *ATPase6*, *COIII*, *ND3*, *ND4L*, *ND4*, *ND5* and *Cyt-b*) showing relationships of four species of jungle fowls, domestic chickens and Japanese quail. The *ND6* gene is excluded from the phylogenetic analysis because it is on the opposite strand and had considerably different base composition.

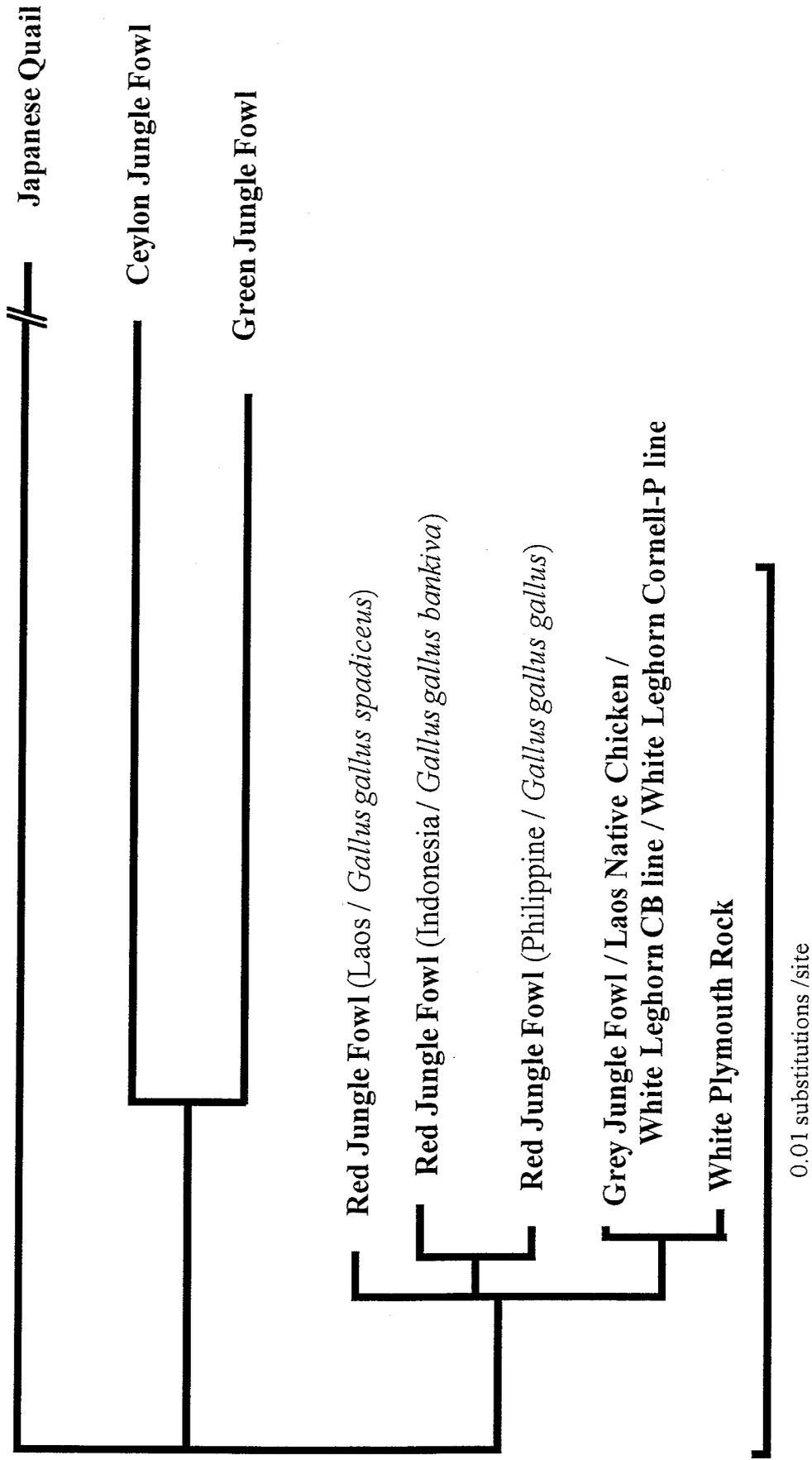


Figure 5-4b. Phylogenetic tree based on Maximum Likelihood method by baseML in PAML with HK Y85F model and gamma-corrected rates of the 1st and 2nd codon of each triplet in concatenated mitochondrial 13 genes (*ND1*, *ND2*, *COI*, *COII*, *ATPase8*, *ATPase6*, *COIII*, *ND3*, *ND4L*, *ND4*, *ND5*, *Cyt-b* and *ND6*) showing relationships of four species of jungle fowls, domestic chicken and Japanese quail.



Figure 5-4c. Phylogenetic tree based on Maximum Likelihood method by baseML in PAML with HKY85F model and gamma-corrected rates of the 3rd codon of each triplet in concatenated mitochondrial 13 genes (*ND1*, *ND2*, *COI*, *COII*, *ATPase8*, *ATPase6*, *COIII*, *ND3*, *ND4L*, *ND4*, *ND5*, *Cyt-b* and *ND6*) showing relationships of four species of jungle fowls, domestic chicken and Japanese quail.

第六章. 東南アジア在来鶏の分子系統、分子生態学的解析

【緒論】

ニワトリ (*Gallus gallus* var. *domesticus*) は、その肉および卵を人類の食用に供し、経済的に重要な家禽の1種であるとともに、人との関わりにおいて特異かつ多様な文化の形成にも貢献してきた。ニワトリは、東南アジアで約 5,000 年前にヤケイから家禽化されたものとされ、その野生原種であるヤケイが今なお生存している種である。Fumihito et al. (1994, 1996) は、タイ・ラオスおよびベトナムを中心とした東南アジア大陸部が家禽化の拠点であり、セキショクヤケイの1亜種から家禽化されたと報告した。現在では森林開発や環境悪化などにより東南アジア一帯でセキショクヤケイの数は減少し、中国ではセキショクヤケイヤケイの保護に乗り出しているのが現状である。本章では、分子系統学的手法を用い、東南アジアにおいて経済成長が比較的遅いラオス人民民主共和国における在来鶏について分子生態学的に解析した。

ラオスは外洋と隣接しない内陸国であり、その地理的条件からラオス国内あるいはその近隣諸国との交易が乏しく、社会交通的に隔離された地域を有している。このことはニワトリの成立を解析する上で、社会的に発展著しい近隣諸国に比べて、ラオスがユニークであり、かつ重要な国であると考えられる。しかし、ラオスにおけるニワトリおよびヤケイに関する遺伝学的な調査・研究はほとんど行われていない (Bouahom, 2000)。そこで本章では、ラオスおよびその近隣諸国の在来鶏およびヤケイの遺伝的類縁関係を検討した。一般に、鳥類におけるミトコンドリア DNA (mtDNA) を用いた分子系統学的解析において、属あるいは種レベルの解析には cytochrome b (*Cytb*) や 12S ribosomal RNA (*12SrRNA*) が利用されており (Kimball et al., 1999; Dimcheff et al., 2000)、種あるいは亜種以下のレベルには制御領域 (D-loop) が利用されている (Fumihito et al., 1995; 1996)。これは、それぞれの遺伝子あるいは遺伝領域の進化速度の違いによるものである。*Cytb* は 100 万年あたり 2.0% (2.0%/MY)、D-loop は 14.8%/MY と報告されており (西海, 2002)、D-loopの方が *Cytb* より約 7 倍進化速度が速いことになる。よって D-loopの方が遺伝的に近い集団を解析するには都合がよい。このため本章ではラオス在来鶏を中心としたニワトリとセキショクヤケイとの遺伝的かつ分子生態学的解析を行うことから、D-loopを用いて解析を行った。

【材料と方法】

調査地域および調査個体群

1997年8月、1997年12月から1998年1月、および1999年9月にラオス6県において在来鶏およびヤケイの血液を採取した(図6-1)。採取した地域と採血数および解析に用いたサンプル数を表6-1に示した。採取したサンプルの内訳は、ラオス在来鶏がラオス6県で162個体、セキショクヤケイがラオス2県で12個体、およびVientianeで飼養されているコマーシャル鶏が25個体であった。解析には、表1に示した各個体群から雄2羽を選んで行った。セキショクヤケイは雄1羽のみを解析に用いた(表6-1)。

DNAの抽出およびmtDNAの塩基配列の決定

採取した血液は、Yamamoto et al. (2000)が報告したように血漿分画と血球分画にわけて保存した。解析に供する個体の血球分画より第2章と同様の方法に従って、ゲノムDNAを抽出した(Sambrook and Russel, 2000)。抽出したゲノムDNAを鋳型にして、まず、LA-PCR Kit (TaKaRa LA-PCR kit, TaKaRa-BIO)を用い、LA-PCR法でミトコンドリアDNAの約16,000bpを増幅した。第2章と同様に、16S ribosomal RNA (*16SrRNA*) および cytochrome b (*Cytb*) 領域の2カ所に、それぞれLA16S および LAcytb プライマーセットを設計した(図2-1)。

LA16SF: 5'- CCT ACG TGA TCT GAG TTC AGA CCG GAG CAA TCC AG (35塩基対 [bp])
LA16SR: 5'- TGC ACC ATT AGG TTG TCC TGA TCC AAC ATC GAG GT (35bp)
LAcytbF: 5'-TAC ACG AAT CAG GCT CAA ACA ACC CCC TAG GCA TC (35bp)
LAcytbR: 5'-AGA TAC AGA TGA AGA AGA ATG AGG CGC CGT TTG CG (35bp)

LA-PCR 反応液は、TaKaRa LA TaqTM DNA Polymerase に添付されている 10×LA PCR Buffer II with Mg²⁺ free を 5.0 μl、MgCl₂ (25mM) を 5.0 μl、dNTPs (各 2.5mM) を 8.0 μl、20pmol/μl に希釈調整したプライマーをそれぞれ 0.75 μl、200~800 μg/ml の濃度に調整した DNA 溶液を 2.0 μl、TaKaRa LA TaqTM DNA Polymerase (5U/μl) を 0.5 μl を加え、滅菌蒸留水で全量 50 μl にした。LA-PCR には GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)を用い、二本鎖の鋳型 DNA を 94℃で 1 分間熱変成した後に、94℃で 30 秒間と 68℃で 16 分間を 30 回交互に繰り返して行った。約 16kb の LA-PCR 産物を 0.6% 低融点アガロースゲル (Agarose L; Nippon-Gene) 電気泳動で分離し、ゲルから切り出した。ゲルから切り出したアガロースは、β-agaraseI (Nippon Gene) を用い、製品マニュアルに従って消化して精製した。この精製した LA-PCR 産物を鋳型にして mtDNA D-loop の全長を PCR により増幅した。D-loop 領域の全長を増幅するために、D-loop を挟む PCR プライマーを表 4-1 より準備した。その塩基配列は、

Gal1F: 5'-AGG ACT ACG GCT TGA AAA GC-3' (20bp) および
Gal1R: 5'-CAT CTT GGC ATC TTC AGT GCC-3' (21bp)

である。PCR の反応液量を全量 20 μl とし、DNA 合成酵素には Ampli-Taq GOLD DNA

polymerase (Applied Biosystems) を用いた。PCR 反応液は、Ampli-Taq GOLD DNA polymerase に添付されている GeneAmpR10×PCR Buffer II & MgCl₂ Solution を 2.0 μl、同様に添付される dNTPs (各 400 μM) を 2.0 μl、20pmol/μl に希釈調整したプライマーをそれぞれ 0.4 μl ずつ、200~800 μg/ml の濃度に調整した LA-PCR 産物を 0.5 μl、Ampli-Taq GOLD DNA polymerase (2.5U) を 0.1 μl を加え、滅菌蒸留水で全量 20 μl にした。PCR には GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) を使い、95℃で 9 分間 DNA polymerase を活性化させた後に、95℃で 1 分、58℃で 30 秒および 72℃で 1 分間を 1 サイクルとし 40 サイクル繰り返し DNA を増幅した。PCR 産物を Exo-SAP-IT (Amersham Biosciences) を用いて未反応プライマーを取り除き、PCR 増幅産物を精製したのち、Sequencing の鋳型とした。Sequencing 反応には 1 反応で PCR と同様のプライマーおよび PCR 増幅産物内部にシーケンス専用のプライマーを設計して行った。その塩基配列は、

Gal1-2F: 5'-TGG TTC CTC GGT CAG GCA CAT CC-3' (23bp)

Gal1-3F: 5'-TGC TTA AGG TTA ATT ACT GCT G-3' (22bp)

である。

これら 4 つのプライマーを用い、Dye Deoxy-terminator 法 (ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing kit Ver. 3.0, Applied Biosystems) でターゲット配列を蛍光標識した。蛍光標識にもちいた Pre-Mix sequence 反応液は、メーカー製品マニュアルの 8 倍に希釈して調整した。このため Pre-Mix sequence 反応液と新たに作成した Sequence 反応バッファー (2.5×sequence buffer; 200mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, pH9.0) とを 1 : 7 の割合に混合して Sequence 反応を行った。Sequence 反応液は、各反応チューブあたり Pre-Mix sequence 反応液を 1.0 μl、2.5×Sequence buffer を 7.0 μl、20pmol/μl の Primer を 0.23 μl、精製した PCR 産物を 3.0 μl、これらに滅菌蒸留水を加えて全量を 20.0 μl とした。Sequence 反応の後、Sephadex™ G-50 Superfine (Amersham Pharmacia Biotech AB) カラムに標識した反応液を通して、未反応蛍光色素および未反応プライマーを除去し、精製した。この精製産物を濃縮乾燥システム (VC96N; タイテック社) で乾燥し、Formamide と Bluedextran を 5 : 1 で混合した Loading Dye を各サンプル 4 μl ずつ加えてサンプルを解かした。この溶液に 95℃ 2 分間の熱処理を施した後、氷上で急冷し、DNA を 1 本鎖の状態に保った。この溶液から、1.7 μl を ABI377 Sequencer にアプライした。その後は ABI377 Sequencer のマニュアルに従って解析を行った。決定した塩基配列は AutoAssembler ver.2.1 (Applied Biosystems) を用いて編集し、D-loop 領域の全長塩基配列を決定した。各サンプルにおいて、塩基配列の解読は複数回行った。解析は、GENETYX program package (Ver.10.3; Software development Inc.) を用いて行った。

分子系統学的解析

決定した mtDNA D-loop の全塩基配列データを、ClustalX (Thompson et al., 1997) を用いて多重整列 (アライメント) し、解析した各個体間の相同性を検索した。また、本研究で解析したサンプルと比較検討するために、DDBJ/GenBank/EMBL に登録されているヤケイおよびニワトリの mtDNA 塩基配列を用いた。ホワイトレグホーン CB 系統 (*Gallus gallus* var. *domesticus*; DDBL/GenBank/EMBL accession number AP003317, 1,231 bp、第五章)、セ

キショクヤケイ (インドネシア : *Gallus gallus bankiva* / AP003323, 1,232 bp, 第五章)、セキショクヤケイ (フィリピン : *Gallus gallus gallus* / AP003322, 1,232 bp, 第五章)、アオエリヤケイ (*Gallus varius* / AP003320, 1,228bp, 第五章)、タイ在来鶏 (AB009443, AB009441, とともに 630bp, Fumihito et al., 1996) およびベトナム在来鶏 (AB009449, 641bp, Miyake et al., unpublished) における D-loop の塩基配列を用いた。遺伝距離は、塩基置換数を推定し、Kimura-2 パラメーター法 (Kimura, 1980) を用いて距離行列を生成し、そこから近隣結合法 (Neighbor-joining : NJ) 法 (Saitou and Nei, 1987) により系統樹を作成した。得られた系統樹の統計的検定にはブートストラップ法を用い、1,000 回の反復を行い検定した。

【結果】

ラオス在来鶏雄 12 羽、ラオスコマーシャル鶏雄 2 羽およびラオス Vientiane で捕獲されたセキショクヤケイ雄 1 羽 (表 6-1, 図 6-1) の mtDNA D-loop 領域の全塩基配列を決定した。決定した D-loop の長さは、ホワイトレグホーン、ラオスコマーシャル鶏、Vientiane、LuangNamtha および Bolikhamxay の 1 羽で 1,231 塩基であり、また Bolikhamxay の 1 羽、Xiengkhouang、Champassak および Bokeo の在来鶏とセキショクヤケイで 1,232bp であった。これらの塩基配列を ClustalX 上でアライメントを行った。D-loop の長さの違いに起因する塩基の位置は、transfer RNA-Glutamine (tRNA-Glu) 側に隣接する D-loop の末端 (5'末端) から 859 番目であり、それは C の欠失/挿入であった (表 6-2)。852 番目から C の連続配列が見られ、D-loop の短いグループ (1,231bp) では C が 7 個連続し、D-loop の長いグループ (1,232bp) では C が 8 個連続していた。

セキショクヤケイ、ラオス在来鶏およびコマーシャル鶏における塩基置換とその位置を表 2 に示した。D-loop の 1,232bp 中 24bp で塩基置換および欠失/挿入が見られた。またこれらの塩基置換は、297 座位および 650 座位以外の 21bp は transition 変異であった。24 座位中 2 座位の Transversion 変異は、Champassak および Bokeo で採取した在来鶏のみで見られた。この 2 つの個体群は他のラオス在来鶏 4 集団と異なる塩基置換の傾向を示した (表 6-2)。Vientiane で捕獲されたセキショクヤケイの塩基配列では、Xiengkhouang の在来鶏と 1 bp、Bolikhamxay の在来鶏と 2bp のみの置換であった。

ラオス在来鶏の遺伝的類縁関係を検討するために、ラオス在来鶏、コマーシャル鶏およびセキショクヤケイの D-loop 全塩基配列をアライメントし、1 bp のギャップ (859 座位) を除いた 1,231bp から NJ 法で分子系統樹を作成した (図 6-2)。アオエリヤケイをアウトグループに設定すると、Xiengkhouang、Bolikhamxay、Vientiane の在来鶏およびラオスのセキショクヤケイが 1 つの大きなクラスターを作り、ラオスコマーシャル鶏、ホワイトレグホーン、インドネシアおよびフィリピンのセキショクヤケイが 1 つのクラスターを作り、その外側に Champassak および Bokeo の在来鶏が 1 つのクラスターを作った。しかし各枝のブートストラップ値が低い分岐が見られた。セキショクヤケイ 3 個体 (ラオス、インドネシアおよびフィリピン) 間の関係よりもラオスのセキショクヤケイとラオス在来鶏との方が近縁であった。Champassak および Bokeo の在来鶏がそれ以外の在来鶏 4 集団とは別クラスターを作り、Bokeo 在来鶏は両者に共通して別クラスターに属した。

ラオスコマーシャル鶏は、タモファン (Tam Huang) 品種と称される卵肉兼用種であり、ラオス国内に種卵が供給されている。この鶏は中国由来であり、ラオス在来鶏とは遺伝的に遠い位置となり、産業家禽化されたホワイトレグホーンと遺伝的に近い位置となった。

【考察】

ラオス在来鶏雄 12 羽、ラオスコマーシャル鶏雄 2 羽およびラオス Vientiane で捕獲されたセキショクヤケイ雄 1 羽 (表 6-1, 図 6-1) の mtDNA D-loop 領域の全塩基配列を決定した結果、1,231bp と 1,232bp の 2 種類の mtDNA D-loop を見いだした。決定した D-loop の長さは、ホワイトレグホーン、ラオスコマーシャル鶏、Vientiane、LuangNamtha および Bolikhamxay の 1 羽で 1,231bp であり、また Bolikhamxay の 1 羽、Xiengkhouang、Champassak および Bokeo の在来鶏とセキショクヤケイで 1,232bp であった。852 番目から C の連続配列が見られ、D-loop の短いグループ (1,231bp) では C が 7 個連続し、D-loop の長いグループ (1,232bp) では C が 8 個連続していた。短い D-loop は産業家禽化された個体およびラオスの都市部で採取した在来鶏に見られ、長い D-loop はラオス郊外および辺境部の在来鶏およびセキショクヤケイに見られ、このことから家禽化にともなって 1bp が欠失した可能性が示唆された。

セキショクヤケイ、ラオス在来鶏およびコマーシャル鶏において、D-loop の 1,232bp 中 24bp で塩基置換および欠失/挿入が見られた。ニワトリおよびウズラにおいて 5'末端から 550bp を Domain I と称し、ニワトリおよびウズラではこの領域に塩基置換が最も多く見られることが知られている (Baker and Marshall, 1997)。本研究においても塩基置換 24 座位中の 17 座位が Domain I に集中した。またこれらの塩基置換は、297 座位および 650 座位以外の 21bp は transition 変異であり、これまでの多くの報告と一致するものであった。Desjardins and Morais (1990) は、Domain III の 873 座位から 27bp の保存領域 (CSB-1 領域) があることを報告している。この CSB-1 領域は種々の鳥類にもみられ、良く保存されていることが知られている (Marshall and Baker, 1997)。解析した総ての個体においても同様にこの 27bp の領域には変異が全く見られず保存されていることが判明した。24 座位中 2 座位の Transversion 変異は、Champassak および Bokeo で採取した在来鶏のみで見られた。この 2 つの個体群は他のラオス在来鶏 4 集団と異なる塩基置換の傾向を示した (表 6-2)。Vientiane で捕獲されたセキショクヤケイの塩基配列では、Xiengkhouang の在来鶏と 1 bp、Bolikhamxay の在来鶏と 2bp のみの置換であった。

ラオス在来鶏、コマーシャル鶏およびセキショクヤケイの D-loop 全塩基配列をアライメントし、NJ 法で分子系統樹を作成した (図 6-2)。アオエリヤケイをアウトグループに設定すると、Xiengkhouang、Bolikhamxay、Vientiane の在来鶏およびラオスのセキショクヤケイが単系統となり、ラオスコマーシャル鶏、ホワイトレグホーン、インドネシアおよびフィリピンのセキショクヤケイが 1 つのクラスターを作り、その外側に Champassak および Bokeo の在来鶏が単系統となった。塩基置換数が 23 個と少ないこともあり、各枝のブートストラップ値が低い分岐が見られた。セキショクヤケイ 3 個体 (ラオス、インドネシアおよびフィリピン) 間の関係よりもラオスのセキショクヤケイとラオス在来鶏との方が近縁であった。このことから、1) セキショクヤケイが生息する地域に棲む在来鶏は、その生息域に棲むセキショクヤケイが飼い慣らされて (家禽化されて) 成立した。あるいは 2) 生息域を同じにするセキショクヤケイと在来鶏はともに交配して遺伝子交流がある。つまり在来鶏が飼われている庭先にセキショクヤケイが来て交配し山野に帰る、あるいは山野からセキショクヤケイの受精卵を農家に持ち帰り、孵化した後しばらく農家で放飼されるが、成長すると飛び立って山野に帰る。その間に在来鶏と交配して遺伝子交流をして

いるものと推察できる。

Yamamoto et al. (2000) は、ラオス在来鶏 6 集団およびセキショクヤケイの血液型およびタンパク質座位の遺伝子頻度から遺伝距離を算出し、遺伝的類縁関係を検討した。ラオス在来鶏は、Luang Namtha および Bokeo のラオス北西部 2 集団とそれ以外のラオス在来鶏 4 集団にクラスタリングされることを報告した。本研究では、Champassak および Bokeo の在来鶏がそれ以外の在来鶏 4 集団とは別クラスターを作り、Bokeo 在来鶏は両者に共通して別クラスターに属した。Bokeo の在来鶏はラオスにおいては特異な集団であろうと考えられ、近隣のミャンマーおよびタイにおける在来鶏を解析することによる詳細な検討が望まれる。また、ラオス南部の Champassak およびラオス西部の Luang Namtha については本研究と Yamamoto et al. (2000) とにおいて結果が異なっているために、さらに解析個体数を増やして検討する必要があると思われる。

ラオス在来鶏と近隣諸国の在来鶏との遺伝的類縁関係を検討するために、DDBJ/GenBank/EMBL に登録されているタイおよびベトナム在来鶏の塩基配列を含めて系統解析を行った。DDBJ/GenBank/EMBL の登録されている D-loop の塩基配列は主として D-loop の Domain I 領域を含む 630bp であったため、この 630bp についてアライメントを行い、NJ 法で分子系統樹を作成した (図 6-3)。この系統樹において、用いた塩基配列が短く変異が少なかったために、各枝の分岐におけるブートストラップ値は小さくなった。その分子系統樹は図 6-2 の分子系統樹にタイおよびベトナム在来鶏をラオス在来鶏およびセキショクヤケイとは別のクラスターにそれぞれそのまま加えたトポロジーとなり、ラオスのセキショクヤケイおよびラオス在来鶏を含む基本的なトポロジーは変わらなかった。図 6-3 では、図 6-2 と同様にアオエリヤケイをアウトグループに設定すると、Xiengkhouang、Bolikhamsai、Vientiane の在来鶏およびラオスのセキショクヤケイが大きな単系統となり、Champassak および Bokeo の在来鶏が 1 つのクラスターとなった。ラオスコマーシャル鶏、ホワイトレグホーン、インドネシアおよびフィリピンのセキショクヤケイで形成されるクラスターに、タイ在来鶏およびベトナム在来鶏が加わったクラスターとなった。ラオス在来鶏のクラスターはラオス由来の個体のみで構成されたことから、ラオス在来鶏への近隣諸国からの遺伝子移入がなく、遺伝的均一性に富むものと考えられる。

以上のことから、ラオス在来鶏は、系統遺伝学的にラオス都市部およびその郊外と辺境部との大きく 2 つの集団となり、それぞれが遺伝的に均一性が高い在来の集団であることが明らかとなった。

【要約】

ラオスおよびその近隣諸国の在来鶏およびヤケイの遺伝的類縁関係を検討する目的で、1997年8月、1997年12月から1998年1月、および1999年9月にラオス6地域(Vientiane, Xiengkhouang, Borikhamxay, Champassack, Luang Namtha および Bokeo provinces) でラオス 在来鶏、ラオスコマーシャル鶏およびセキショクヤケイの血液を採取した。血液より DNA を分離し、ミトコンドリア DNAD-loop の塩基配列を決定し、分子系統学的な解析を行った。解析には各集団から雄 2 羽を選んで行った。ラオスのセキショクヤケイは雄 1 羽のみを解析に用いた。mtDNA D-loop は 1,231bp と 1,232bp の個体が見られ、ラオスのセキショクヤケイおよびラオス辺境部 (Champassack と Bokeo) では長いグループとなった。分子系統樹を作成すると、ラオス在来鶏と近隣諸国の在来鶏とが別のクラスターに別れ、近隣諸国の在来鶏と近隣諸国のセキショクヤケイとが同じクラスターを作った。ラオス Bokeo および Champassak の在来鶏は、他の在来鶏 4 集団と別のクラスターを作った。これらラオス在来鶏 4 集団は、ラオスのセキショクヤケイと最も近縁であることが判明した。また、ラオス在来鶏のミトコンドリア DNA を指標として算出した遺伝的距離は小さいものと推察された。

Table 6-1. List of Lao native chicken, Laos commercial chicken and red junglefowls were surveyed in this project and used in this study.

population	sampling place	collection number of birds	analyzing number of samples
Lao commercial breed	Vientiane prov.	25	2
Lao native chicken	Vientiane prov.	65	2
Lao native chicken	Xiengkhouang prov.	15	2
Lao native chicken	Borikhamxay prov.	28	2
Lao native chicken	Champassack prov.	21	2
Lao native chicken	Luang Namtha prov.	12	2
Lao native chicken	Bokeo prov.	21	2
Red junglefowl	Vientiane prov.	10	1

Table 6-2. Sequence variation observed among chicken D-loop sequence of Laos native chickens and red junglefowls

samples	167	212	217	225	243	246	256	261	297	302	303	306	310	315	322	342	446	636	650	686	792	859	1214	1215
White Leghoen CB line	T	G	C	C	C	C	C	C	C	C	A	T	T	C	T	A	T	C	T	G	G	*	T	G
LAOS commercial strain																				A		*		
VIENTIANE prov.	C	T	T	T	T	T	T	T				C	C				C					*	C	
LUANG NAMTHA prov.	C	T	T	T	T	T	T	T				C	C				C					*	C	
BOLIKHAMSAI prov.1	C										C	C	C				C					*	C	
BOLIKHAMSAI prov.2	A	T	T	T	T	T	T	T				C	C	T		G	C				A	C	C	A
XIENG KHOUANG prov.	A	T	T	T	T	T	T	T				C	C	T			C	T				C	C	A
CHAMPASSAK prov.	A	T							A *	T	G			T	C							C		
BOKEO prov.	A	T							A *	T				T	C				G *			C		
Red junglefowl LAOS	A	T	T	T	T	T	T	T				C	C	T			C					C	C	A
Red junglefowl PHILIPPINES	T								T		C	C				G	C			A		C	C	
Red junglefowl INDONESIA	T										C	C				G	C					C	C	

The numbers upper column indicated the positions of nucleotide substitutions. The bold letter and * showed the nucleotide substitution with transversion. The asterisk marks (*) showed nucleotide deletions.

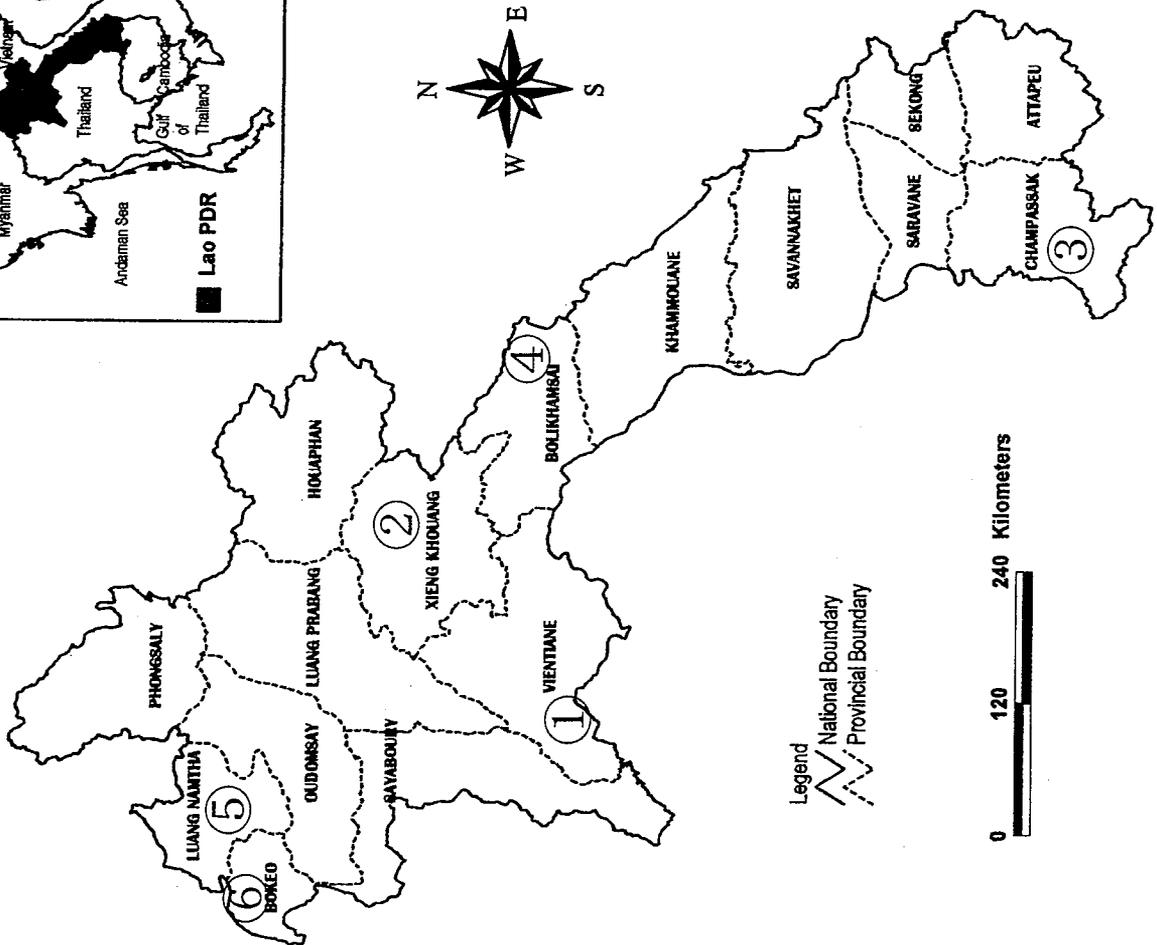
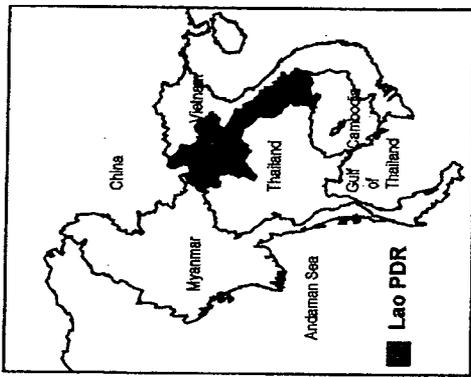


Figure 6-1. The map and samplig places in Lao PDR

1. Vientiane prov.
2. Xiengkhouang prov.
3. Champassak prov.
4. Bolikhamsai prov.
5. Luang Namtha prov.
6. Bokeo prov.

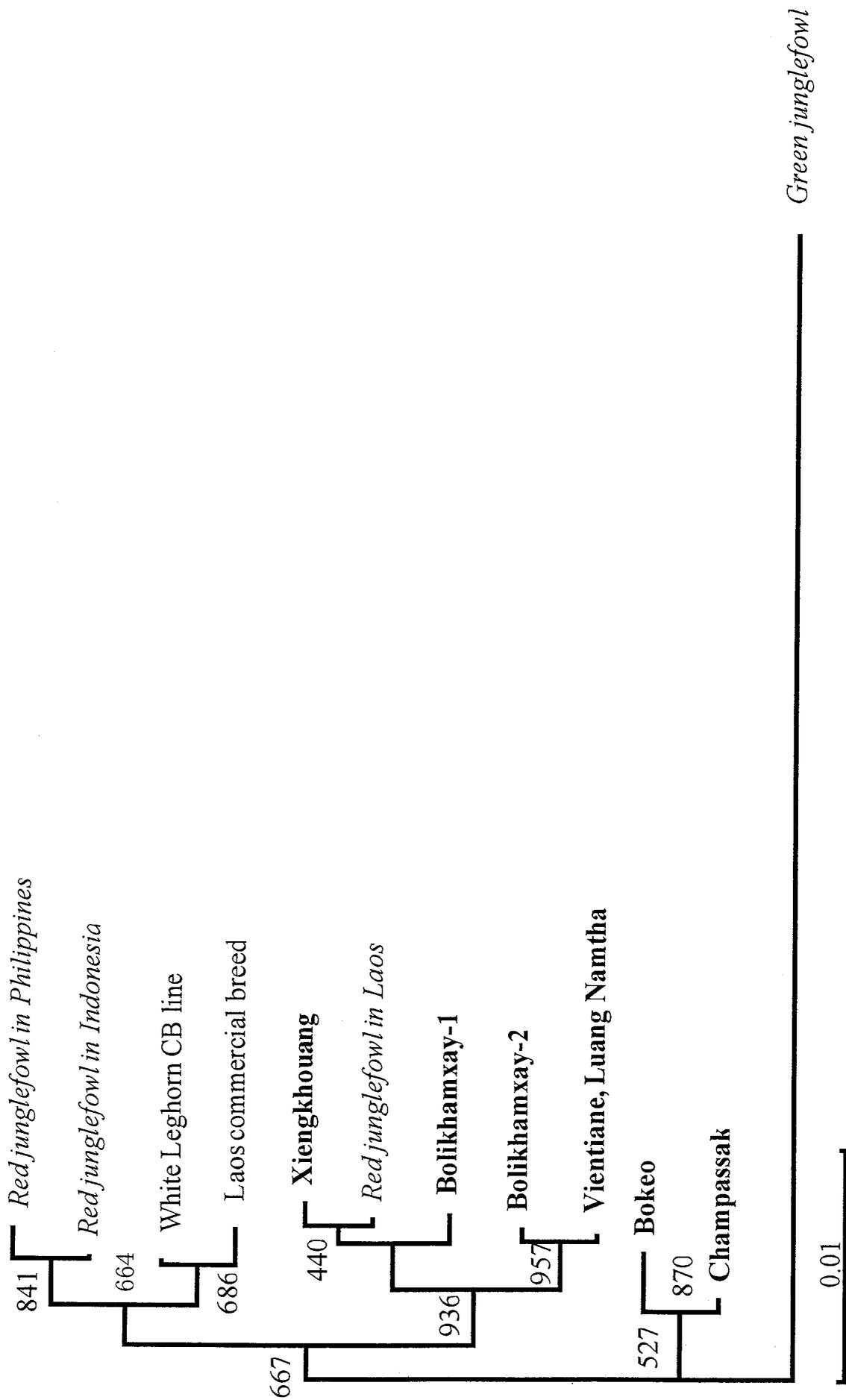


Figure 6-2. Phylogenetic tree of chicken mitochondrial D-loop (control) sequence data based on the neighbor joining methods (Saitou and Nei, 1987) using Clustal X software (1997). The bold and italic letters showed Laos native chicken and junglefowls, respectively. Numerals on each branch indicated the bootstrap value of 1,000 replications. Scale bar represent substitution rate.

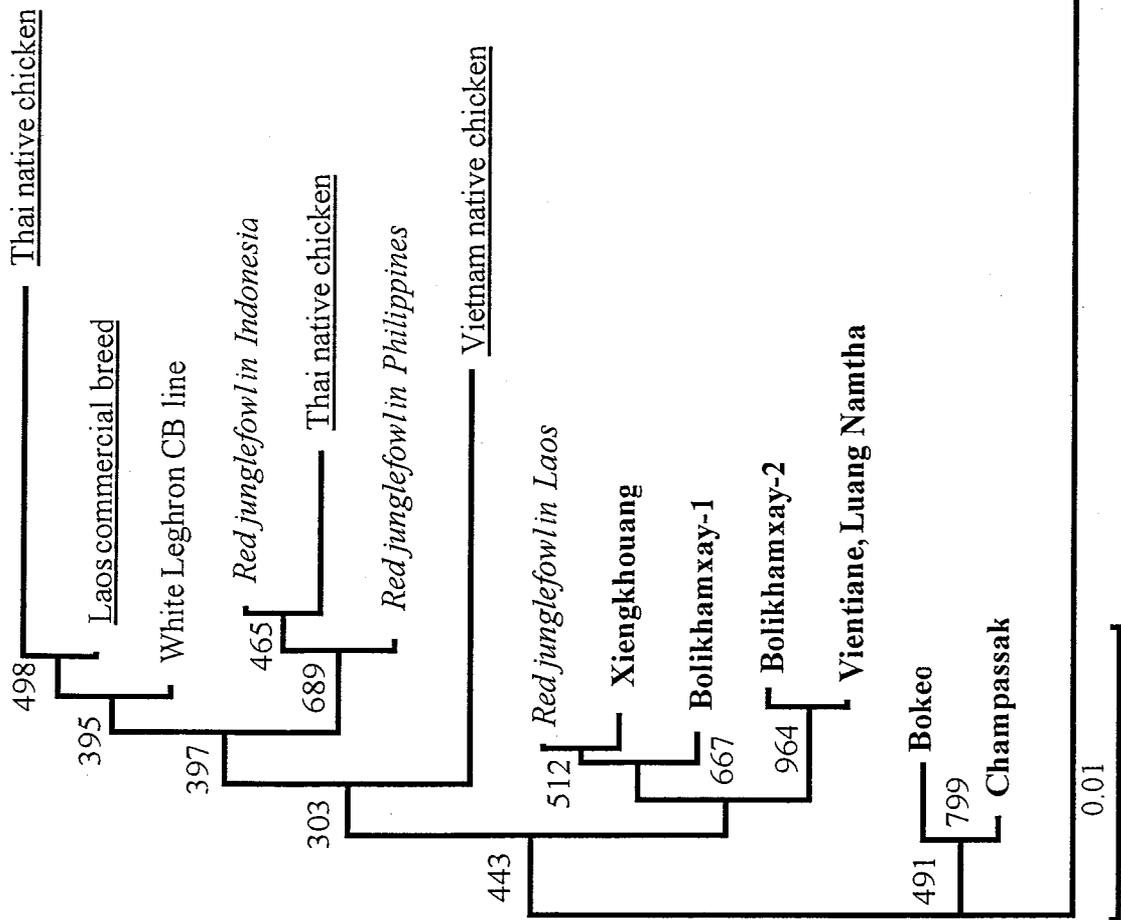


Figure 6-3. Phylogenetic tree of chicken mitochondrial D-loop (control) sequence data based on the neighbor joining methods (Saitou and Nei, 1987) using Clustal X software (1997). The bold and italic letters, and underlines showed Laos native chicken and junglefowls, and native chickens of Laos neighbor country, respectively. Numerals on each branch indicated the bootstrap value of 1,000 replications. Scale bar represent substitution rate.

第七章. 総合考察

現在、地球上には 200 万~1 億もの生物種が多様性を保ちながら生息していると考えられている。このうち約 140 万種の生物にのみ命名され (WCMC, 1994)、これらの種はすべてその生息環境に適応し、形態・生態的にもそれぞれに多様化している。様々な生物種や個体群の関係を正確に認識するため、人類は昔から生物分類を体系化しようと試みてきた。紀元前 300 年頃、アリストテレスは、生物を動物と植物の「二界」に分け、特に動物に関しては 500 以上の種を階層的に分類した。1758 年、リンネは著書「自然の体系」の中で「種」を基本単位とした分類法を発表した。リンネはまず学名の命名法に関して、属名+種小名という形式の二名法を提案した。また現在の分類階層である界、門、綱、目などもリンネが考案した。1866 年、ヘッケルは、生物が進化の結果として現在の様相を示すようになったのであれば過去を遡れば全生物の共通祖先に行きつくはずだという考えから、生物を大樹の枝分かれに準えて分類しようとした。現在の系統関係は「古典的な系統樹」と呼ばれている。こうして分類法は、それまで人間の主観に大きく依存し、分類の構築を目的とした人為的分類であったが、客観的データに基く系統関係を指標した系統分類へと変遷していった。近年、これまでの生物の形態に基いた系統分類に加え、DNA の配列に基いた分子系統学が確立され、生物における系統関係は真実に近い系統樹の推定へと変遷している。

キジ科における分類では、その形態形質からシャコ族 (tribe *Perdicini*) とキジ族 (tribe *Phasianini*) とに分けられている (Johnsgard, 1999)。シャコ族 (*Perdicini*; Old World quails, partridges, and francolins) は、尾羽が翼よりも短く、尾羽が平らで円形をし、羽色には光沢がなく雌雄差が見られない鳥とされている。また目の周りの広い範囲で皮膚が露出している。一般に小型でニホンウズラ (*Coturnix japonica*) やコジュケイ (*Bambusicola thoracica*) などが含まれる。一方、キジ族 (*Phasianini*; pheasants, junglefowl, and peafowl) は、尾羽が翼よりも長く、尾羽が丸く順に折り重なる鳥とされている。また雄の羽色は変化に富んだ光沢色で雌とは異なり、目の周辺部分にのみ露出した皮膚をもつ。一般に大型でニワトリ (*Gallus gallus* var. *domesticus*) やコウライキジ (*Phasianus colchicus*) などが含まれる (Johnsgard, 1999)。第三章において、第 1・第 2 コドンの塩基配列およびアミノ酸配列データから作成した ML 法による分子系統樹は、(((ニホンウズラ, ヒメウズラ),(((ニワトリ,アオエリヤケイ),コジュケイ),インドクジャク)),((コウライキジ,ヨーロッパヤマウズラ),ホソオライチョウ))),アメリカホシハジロ) であり (図 3-1a と図 3-1c)、第 3 コドンの塩基配列では、((((ニホンウズラ,ヒメウズラ),(((ニワトリ,アオエリヤケイ),コジュケイ),インドクジャク)),コウライキジ),ヨーロッパヤマウズラ),ホソオライチョウ),アメリカホシハジロ) となり、第 1・第 2 コドンの塩基配列およびアミノ酸配列より作成した系統樹とトポロジーが異なっていた (図 3.1b)。しかしながら、ニワトリとコジュケイが単系統となり、またコウライキジとヨーロッパヤマウズラが単系統となった。さらに第四章においてホロホロチョウを加えた分子系統樹においても同様な結果となった (図 4-1)。本研究の結果はともにキジ族とシャコ族とが 1 つの同じ単系統の中に含まれていることから、形態形質による「族」の分類とは矛盾する結果であった。本研究の結果は、Kimball et al., (1999) がキジ族およびシャコ族はそれぞれ単系統ではないとする説と一致するものであった。これらのことから、キジ族とシャコ族とはそれぞれの独立した祖先種を持つのではなく、キジ族およびシャコ族に分類されている種についての共通祖先種からまず複数の単系統に分岐し、それぞれの単系統内でキジ族およびシャコ族に分類されている種が成立したのと考えられる。それぞれの単系統内にキジ族とシャコ族とが出現したこと

は、形態分類学上の収斂進化であろうと考えられる。東アフリカの大地溝帯に位置する三大湖、タンガニカ湖、マラウィ湖、ヴィクトリア湖にはシクリッドと称されるカワスズメ科魚類が息している。これら3つの湖の成立はそれぞれ1,500万年前、200万年前および12,000年前とされている。それぞれの湖には、お互いに形態学的によく似たカワスズメ科魚類のペアが見られる (Kocher et al., 1993; Takahashi et al., 2001; Terai et al., 2002; Verheyen et al., 2003)。またこのよく似たペアは遺伝学的かつ系統学的に近縁であろうと考えられていた。ところが、分子系統学的な解析の結果、マラウィ湖の多種多様なカワスズメ科魚類は単系統であることが明らかとなった (Kocher et al., 1993, 1995)。Kocher et al. (1995) は、マラウィ湖とタンガニカ湖のカワスズメ科魚類の NADH dehydrogenase subunit 2 遺伝子の系統樹から、マラウィ湖の *Pseuditropheus* と *Rhamphochromis* は、形態的にはそれぞれタンガニカ湖の *Tropheus* と *Bathybatens* に似てゐるが、系統的に近いわけでもなく、形態的には似ていないマラウィ湖の魚同士がむしろ近縁であったと報告している。この2つの湖で見られる形態的な類似性は、形態レベルで自然淘汰が強く働いた収斂進化の結果であろうと考えられている。鳥類では、ツバメ (House (Barn) Swallow, *Hirundo rustica*) とイワツバメ (House Martin, *Delichon urbica*) はともに飛んでいる昆虫を飛びながら捕らえて食べるのに適し、そのために外見上非常によく似ている。しかし、ツバメはスズメ (Tree Sparrow, *Passer montanus*) などの鳴禽類に近く、イワツバメはハチドリ (Hummingbird, *Amazilia amabilis*) に近縁であるとされている (Sibley and Ahlquist, 1987)。以上のことから、形態からの分類による系統関係は、分子系統による系統関係の解析と異なることがあり、この原因はおもに収斂進化によるものである。したがって、キジ目における族 (tribe) の分類は、生物系統学的立場からは正しくはないものと判断された。

本研究の結果から、キジ目における系統関係 (遺伝的類縁関係) は、主に従来形態による分類学的な情報のみから推定することは難しく、分子系統学的手法による分析結果を取り入れた系統学による新たなキジ目の系統樹を提案した (図 7-1)。本研究で構築した分子系統樹から、1) キジ族とシャコ族はそれぞれ単系統ではない。2) ホソオライチョウ (shaped-tail grouse, *Tympanuchus phasianellus*) はライチョウ科に分類されているが分子系統ではキジ科の単系統に含まれる (図 3-1、図 4-1)。3) ホロホロチョウはキジ科が分化する以前に分岐した (図 4-1)。であることが明らかとなった。さらに、4) シチメンチョウ (turkey; *Meleagris gallopavo*) はキジ科の単系統に含まれる (Kimball et al., 1999; Nishibori et al., in preparation)。5) ツカツクリ科 (family Megapodiidae) およびホウカンチョウ科 (family Cracidae) は、キジ目の最も初期に分岐した (Kimball et al., 1999; Dimcheff et al., 2000)。6) 新大陸に生息するウズラ (New world quail; family Odontophoridae) はキジ科の分岐以前に分岐していた (Kimball et al., 1999; Dimcheff et al., 2000)。しかし、family Odontophoridae の分岐と family Numididae の分岐でどちらが初期に起こったかは、研究者によってその系統樹は異なっているために統一した見解はなされていない。以上のことをまとめて、キジ目の系統樹は、図 7-1 に記したトポロジーであると提案した。

キジ目における産業家禽の代表であるニワトリにおいて、その持続的な育種および新しい品種の作成には、遺伝的多様性の点からニワトリの品種の遺伝的な位置付けを明らかにし、各品種集団に対して遺伝的背景の違った集団を導入することも今後重要になると考えられる。第五章では、ニワトリとヤケイとの遺伝的類縁関係を分子系統学的手法で明らかにした。その結果、これまでニワトリはセキショクヤケイの1亜種を家禽化して作出されたとする説 (Fumihito et al., 1996) とは異なり、セキショクヤケイおよびハイイロヤケイも関わっているという結果を得た。このために、ニワトリの多様性が維持されているということに矛盾はない。ただし、セキショクヤケイ

およびハイロヤケイに関しては可能な限りサンプルを入手し、さらに解析を加えていく必要があると思われる。また第六章では、インドシナ半島、とくにラオスにおける在来鶏とセキシヨクヤケイとの類縁関係をミトコンドリア D-loop の全塩基配列を用いて解析した。その結果、ラオスの在来鶏はラオスのセキシヨクヤケイと同じクラスターを作り、他の国のセキシヨクヤケイ（フィリピンおよびインドネシア）からは遠くに位置した（図 6-3）。このことから、地理的分布域が同じであるセキシヨクヤケイと在来鶏は遺伝的に近縁であるといえる。したがって、1) セキシヨクヤケイが生息する地域に棲む在来鶏は、その生息域に棲むセキシヨクヤケイが飼い慣らされて（家禽化されて）成立した。2) 生息域を同じにするセキシヨクヤケイと在来鶏はともに交配して遺伝子交流がある。つまり在来鶏が飼われている庭先にセキシヨクヤケイが来て交配し山野に帰る、あるいは山野からセキシヨクヤケイの受精卵を農家に持ち帰り、孵化した後しばらく農家で放飼されるが、成長すると飛び立って山野に帰る。その間に在来鶏と交配して遺伝子交流される。以上の 1)、2) のどちらが事実かを分子系統学的解析では難しい。この問題を解決するために、分子系統学的アプローチだけではなく、遺伝、形態、行動、生活史および文化人類学などの分野の知識が必要となるものと思われる。

ニワトリが家禽化されて 6,000 年から 8,000 年と歴史が浅いが、1) ニワトリの選抜育種の影響のために人為的に進化速度が加速していること、2) 現在生息しているヤケイの他にも別のヤケイが存在して可能性があること（Crawford, 1990）、3) ヤケイおよびニワトリ間の妊性が高く、それぞれ複雑に交配し選抜を繰り返してニワトリが作られてきた。このようなことから、コマーシャル鶏などのニワトリにおける類縁関係の解析には、野生動物を対象とした一義的な解析だけでは正確に過去を復元できず、ネットワーク系統樹（Miretti et al., 2002; Nyakaana et al., 2002）などを使った解析が必要となる。以上のような問題を考慮した上で、ヤケイ及びニワトリの系統関係の解析を行い、それぞれの類縁関係を明らかにすることによって、セキシヨクヤケイ、ハイロヤケイをはじめとするヤケイおよびラオス在来鶏をはじめとするアジアの在来鶏がニワトリの育種に対して重要な遺伝子資源の候補となりうるものと考えられる。

キジ目において、レッドデータブック「日本の絶滅のおそれのある野生動物 2 鳥類」（環境省, 2002）には絶滅危惧 II 類（VU）にライチョウ（*Lagopus mutus japonicus*）、準絶滅危惧（NT）にコシジロヤマドリ（*Phasianus soemmerringii ijimae*）、その他、エゾライチョウ（*Tetrastes bonasia vicinitas*）およびニホンウズラ（*Coturnix japonica*）が掲載されている。近年、国内において野生絶滅に瀕した「トキ（*Nipponia nippon*）」をはじめ、地球上の遺伝子資源が徐々に失われつつある。遺伝子資源および生物多様性の保全を行うための基礎研究として、キジ目あるいは鳥類の分子系統学的手法による類縁関係の解析はますます重要になってくると考えられる。今後、我々は、分子系統学的分類に関する情報を提供することで、遺伝子資源・種の多様性に関する研究の一翼を担えるものと期待している。

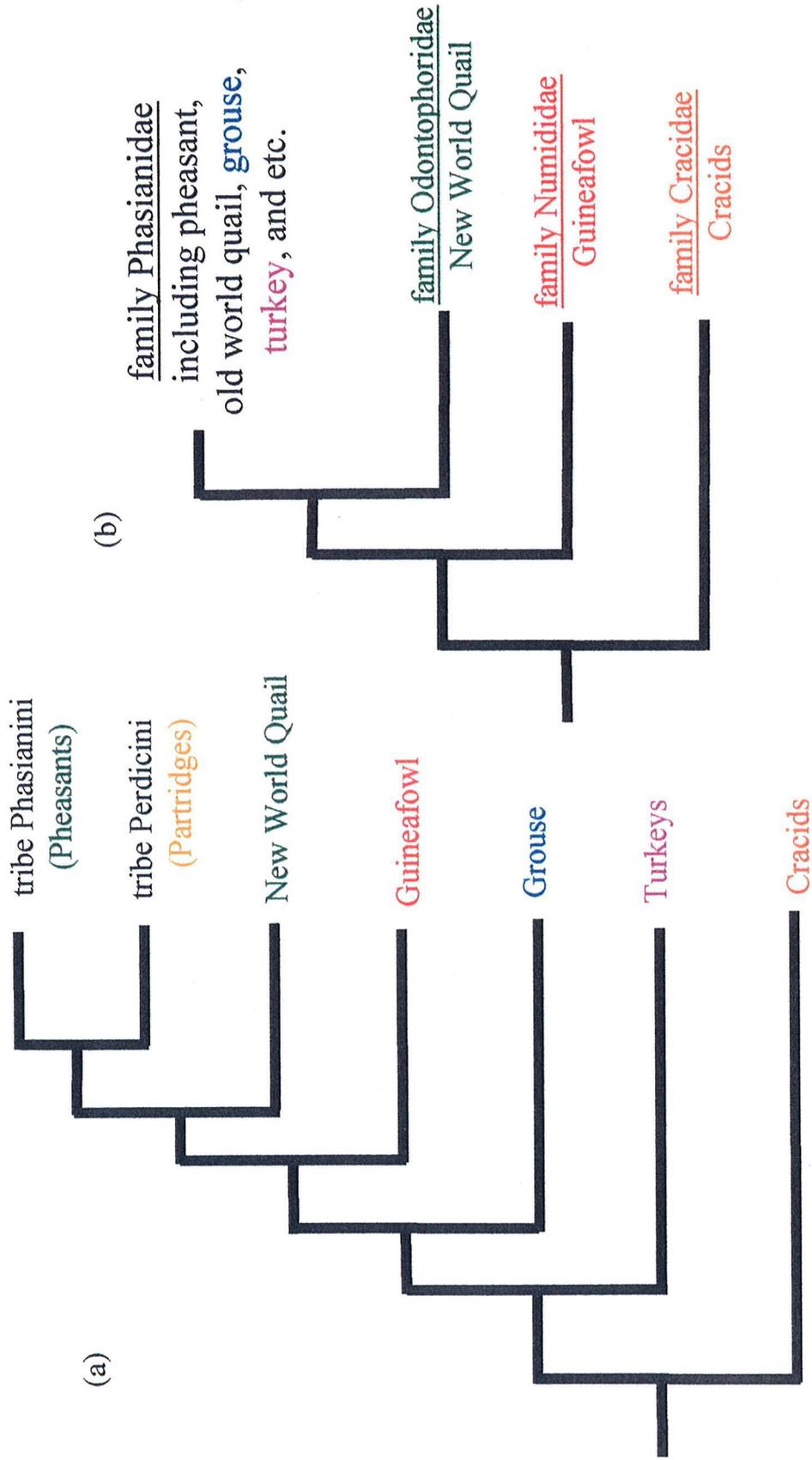


Figure 7-1. Johnsgard's (1986; a) and this paper (b) hypothesized relationships in order Galliformes

総括

家禽および家畜において、その生物多様性の維持、動物遺伝資源の保存と保全のための基礎的研究として、家禽および家畜とその近縁種における系統関係および遺伝的類縁関係を明らかにすることは重要であり、必要不可欠な情報源でもある。本論文では、多くの家禽種が分類されているキジ目において分子系統学的手法を用いて系統関係を明らかにすることを目的とした。このためキジ目のミトコンドリアゲノム全塩基配列を決定し、その塩基配列情報をもとにして、最尤法 (ML 法) を主に用いて分子系統樹を作成し、キジ目の系統関係の解析を行った。まず第二章では、ミトコンドリアゲノムの全塩基配列を効率よく決定する方法を確立し、その手法を用いて、第三章および第四章では第二章で決定した複数のミトコンドリア遺伝子の塩基配列をコドン座位ごとに分け、とくに第三章ではキジ科について、第四章ではホロホロチョウを中心にしてその分子系統学的解析を行い、それらの系統関係を推定し、考察した。さらに第五章ではこれらの成果を応用し、ニワトリにおける家禽化の分子系統学的な解析をミトコンドリア 13 遺伝子を用いて行った。第六章ではヤケイおよび東南アジア在来鶏との類縁関係を分子生態学的なアプローチから、D-loop の全塩基配列より分子系統学的解析を行い、それぞれの類縁関係を推定し、考察した。

第二章では、キジ目の分子系統学的解析を行うためにミトコンドリアゲノム全塩基配列を正確かつ効率よく決定する方法を確立することを目的として、核ゲノムとミトコンドリアゲノムとを分離する方法の確立、および効率の良い塩基配列の決定方法の確立を行った。この方法を用いて、ニホンウズラ (Japanese Quail; *Coturnix japonica*) およびヒメウズラ (Blue-breasted Quail; *Coturnix chinensis*) のミトコンドリアゲノム全塩基配列を決定した。LA-PCR 法を用いて、全ゲノム DNA から mtDNA のほぼ全長である約 16kbp をまず増幅し、さらに 37 プライマーセットによる PCR 産物の塩基配列を直接決定した。その結果をアセンブルすることでニホンウズラおよびヒメウズラ mtDNA の全塩基配列を決定した。これまでの方法に比べて正確かつ効率よく決定することが可能となった。

ニホンウズラおよびヒメウズラ mtDNA の大きさは、それぞれ 16,697bp および 16,687bp であった。ヒメウズラ mtDNA は、ニワトリよりも 88bp 小さく、ニホンウズラよりも 10bp 小さいものであった。ヒメウズラとニワトリとの平均相同性は 85.2% であった。またヒメウズラとニホンウズラとの平均相同性は 88.7% であった。ニホンウズラおよびヒメウズラ mtDNA の *ND3* 遺伝子において 1 bp の extra one base (シトシン: C) が見られた。以上のように、本研究で開発した mtDNA 全塩基配列の決定法を用いることにより、ニホンウズラおよびヒメウズラの mtDNA 全塩基配列を決定することができた。したがって、本法は mtDNA の全塩基配列の決定には非常に有用であることが示された。

第三章では、キジ目キジ科における系統関係を明らかにするために、第二章で決定したニホンウズラおよびヒメウズラ mtDNA の全塩基配列から ML 法により分子系統樹を作成し、キジ目キジ科の分子系統学的解析を行った。ニホンウズラ、ヒメウズラおよびキジ目に属する 7 種 (ホソオライチョウ、ヨーロッパヤマウズラ、コウライキジ、インドクジャク、コジュケイ、ニワトリおよびアオエリヤケイ) とアメリカホシハジロにおいて DNA データベースに登録されている *ND2* および *Cytb* 遺伝子の 2,184bp を第 1・第 2 コドンおよび第 3 コドンの 2 つに分けた塩基配列 (それぞれ 1,456bp と 726bp) およびアミノ酸に翻訳した配列により ML 法を用いてそれぞれ 3 種の分子系統樹を作成した。第 1・第 2 コドンの塩基配列およびアミノ酸配列データから作成した ML 法による分子系統樹は、両者でトポロジーが同じになった。カモ目アメリカホシハジロをアウトグループに設定すると、これらの分子系統樹からニホンウズラおよびヒメウズラなどのウズラ属がキジ目の中でも早い時期の分岐となった。ニワトリ、アオエリヤケイ、コジュケイおよびインドクジャクが単系統となり、またコウライキジ、ヨーロッパヤマ

ウズラおよびホソオライチョウが単系統を作った。一方、第3コドンの塩基配列より作成した ML 法による分子系統樹では、第1・第2コドンの塩基配列およびアミノ酸配列より作成した系統樹とトポロジーが異なった。ホソオライチョウの分岐が早く、またニワトリ、アオエリヤケイおよびコジュケイが単系統となった。コウライキジ、ヨーロッパヤマウズラは、ニワトリを含む単系統の側系統になった。分類体系における族 (tribe) の分類では、その形態形質でキジ族 (tribe *Phasianini*) とシャコ族 (tribe *Perdicini*) に分けられている。本章の第1・第2コドンの塩基配列およびアミノ酸配列では、ニワトリとコジュケイが単系統となり、またコウライキジとヨーロッパヤマウズラが単系統となった。これらはともにキジ族とシャコ族とがともに単系統となっていることから、「族」の分類とは矛盾する結果であった。本章の結果から、キジ目内の系統関係を解析するためには2つの遺伝子を用い、さらに塩基配列をコドンの座位ごとに分けて、あるいはアミノ酸配列をもちいて系統樹を作成することは非常に有効であることが示された。またウズラ属はキジ目内で早い時期に分岐したことが明らかとなった。キジ科について形態によりキジ族およびシャコ族に分類されているが、分子系統ではこれら両者は単系統はならないことが明らかとなり、「族」の分類は系統学的には正しくないものと判断された。

第四章では、キジ目におけるホロホロチョウの遺伝系統学的な位置を明らかにするために、ホロホロチョウのミトコンドリアゲノム (mtDNA) の全塩基配列を決定し、系統解析を行った。ホロホロチョウの mtDNA の大きさは16,726bpであった。ホロホロチョウとニワトリおよびニホンウズラとの相同性は、77.0~88.6%および76.2~88.4%で、その平均相同性は85.2%および84.7%であった。ホロホロチョウとその他キジ目に属する9種から最尤法を用いて分子系統樹を作成した。アメリカホシハジロをアウトグループに置くと、ホロホロチョウはキジ目に対して側系統となった。これらの系統樹において、ニホンウズラとヒメウズラ (*Cjap/Cchi*)、コウライキジ、ヨーロッパヤマウズラとホソオライチョウ (*Pcoll/Pper/Tpha*) およびニワトリ、アオエリヤケイとコジュケイ (*Ggall/Gvar/Btho*) の3つのクラスターを作った。以上の結果から、ホロホロチョウはキジ科のクラスターとは別の系統学的な位置となり、またキジ科が分化する以前、より早くに分岐したことが明らかとなった。

第五章では、ニワトリの起源を明らかにすることを目的として、ヤケイ属における全ミトコンドリア DNA の塩基配列を決定し、ニワトリの起源を分子系統学的に解析、推定した。セキショクヤケイ (*Gallus gallus*)、ハイイロヤケイ (*Gallus sonneratii*)、アオエリヤケイ (*Gallus varius*)、セイロンヤケイ (*Gallus lafayetii*) のヤケイ4種およびニワトリ (*Gallus gallus* var. *domesticus* : ハクショクレグホーン、ハクショクプリマスロック、ラオス在来鶏) さらにキジ科ウズラ属の日本ウズラ (*Corturnix japonica*) のミトコンドリアゲノム全領域の塩基配列 (16,697~16,841bp) を決定した。それぞれの遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列から最尤法、近隣結合法および最節約法で分子系統樹を作成し、*Gallus* 属の系統関係を推定した。それらの系統樹において、ニホンウズラ、アオエリヤケイとセイロンヤケイのクラスター、セキショクヤケイのクラスター、ハイイロヤケイおよびニワトリの大きく4つのクラスターに分けられた。その中で、ハイイロヤケイ、ラオス在来鶏、WR および WLCB で単系統を作った。ニワトリの成立は、セキショクヤケイとハイイロヤケイのグループが母系起源となったものと考えられる。ニワトリは、セキショクヤケイとともにハイイロヤケイとも近縁であることが明らかとなり、その成立は比較的新しいものであると推定された。

第六章では、ラオスおよびその近隣諸国の在来鶏およびヤケイの遺伝的類縁関係を検討する目的で、ラオス6地域 (Vientiane, Xiengkhouang, Borikhamxay, Champassack, Luang Namtha および Bokeo provinces) でラオス在来鶏、ラオスコマーシャル鶏およびセキショクヤケイについてミトコンドリア DNA D-loop の塩基配列を決定し、分子系統学的な解析を行った。mtDNA D-loop は1,231bp と1,232bp の個体が見られ、ラオスのセキショクヤケイおよびラオス辺境部 (Champassack と Bokeo) では長いタイプとなった。分

子系統樹を作成すると、ラオス在来鶏と近隣諸国の在来鶏とは別のクラスターに別れ、近隣諸国の在来鶏と近隣諸国のセキショクヤケイとは同じクラスターを作った。ラオス BokeoおよびChampassakの在来鶏は、他の在来鶏4集団と別のクラスターを作った。これらラオス在来鶏4集団は、ラオスのセキショクヤケイと最も近縁であることが判明した。

キジ目における系統関係（遺伝的類縁関係）は、主に従来形態による分類学的な情報のみから推定することは難しく、分子系統学的手法による分析結果を取り入れた系統学による新たなキジ目の系統樹が必要である。そこで本研究の結果からキジ目の新たな系統樹を構築した。本研究で構築した分子系統樹から、1) キジ族とシャコ族はそれぞれが単系統ではない。2) ライチョウはキジ科の単系統に含まれる。3) ホロホロチョウはキジ科が分化する以前に分岐した、ことが明らかとなった。

本研究ではセキショクヤケイおよびハイイロヤケイがニワトリの成立に関わっているという結果を得た。今後、家禽遺伝資源としてセキショクヤケイ、ハイイロヤケイをはじめとするヤケイ、およびラオス在来鶏をはじめとするアジアの在来鶏がニワトリの育種に対して重要な遺伝子資源の候補となりうるものと考えらる。さらに絶滅のおそれのある野生動物などの遺伝子資源および生物多様性の保全を行うための基礎研究として、キジ目あるいは鳥類の分子系統学的手法による類縁関係の解析はますます重要になってくると考えられる。また新たに分子系統学的分類に関する情報を提供することで、遺伝子資源・種の多様性に関する研究の一翼を担えるものと期待している。

謝 辞

本論文のとりまとめに際して、ご指導を賜った広島大学大学院生物圏科学研究科教授 山本義雄 博士、および論文のとりまとめに際し、有益なご助言を賜った同研究科教授 吉村幸則 博士、堀貫治 博士、伊藤敏男 博士、藤田正範 博士、同研究科助教授 都築政起 博士、独立行政法人農業生物資源研究所上席研究官 安江博 博士に謹んで感謝申し上げます。

財団法人山階鳥類研究所総裁 秋篠宮文仁 博士には、ニワトリの家禽化（ドメスティケーション）およびニワトリに対する文化人類学的な知見を直接ご教授、ご議論させていただき、甚大なる感謝申し上げます。国立民俗学博物館・総合研究大学院大学教授 秋道智彌 博士、大阪外国語大学学長 赤木攻 博士、湧永製菓株式会社副社長 不破亨 博士には、アジアにおけるヤケイおよびニワトリの生物学および文化人類学的な情報を提供して頂いたことに感謝を表します。

本研究において、ホロホロチョウのサンプルは旭川市立旭山動物園園長 小菅正夫氏に提供していただきました。ラオス在来鶏およびセキショクヤケイのサンプルは在来家畜研究会会長・名古屋大学大学院生命農学研究科教授 並河鷹夫 博士、ラオス国立農林研究所所長 Bounthong Bouahom 博士、京都大学霊長類研究所名誉教授 野澤謙 博士、前沢町立牛の博物館学芸員 黒澤弥悦 博士、神戸大学農学部助教授 万年英之 博士、名古屋大学大学院生命農学研究科助手 山縣高宏 博士を中心とするラオス在来家畜遺伝資源調査グループの皆さんの協力により得られたものであります。系統樹作成は、独立行政法人農業生物資源研究所主任研究官 林武司 博士、独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所 大原一郎 博士、独立行政法人東北区水産研究所 斉藤憲治 博士、北里大学水産学部 林崎健一 博士にご指導して頂きました。独立行政法人農業生物資源研究所主任研究官 美川智 博士、同研究員 上西博英 博士、木内幸子 博士をはじめとする安江上席研究官研究室の皆さんには、分子生物学的実験、その他実験補助など多数協力していただきました。広島大学名誉教授 岡田育穂 博士、山本禎紀 博士、同大学院生物圏科学研究科助手 島田昌之 博士には、科学者としての哲学について常に有益な示唆を頂き、本論文をまとめる上で大いに刺激を与えていただきました。本研究を遂行し、完結するうえで多くのご協力を頂いた上述の皆様、厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行時、論文作成の日々において、常に議論と激励、内面および健康面共に支えてくれた妻 奈穂子博士にこの場を借りて感謝の意を表します。

引用文献

- Adachi, J., and Hasegawa, M. (1996a.) Computer Science Monographs, No. 28, MOLPHY version 2.3: *Programs for Molecular Phylogenetics, Based on Maximum Likelihood*, Institute of Statistical Mathematics, Tokyo.
- Adachi, J., and Hasegawa, M. (1996b) Model of amino acid substitution in proteins encoded by mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* **42**: 459-68.
- Adachi, J., and Hasegawa, M. (1995) Improved dating of the human-chimpanzee separation in the mitochondrial DNA tree: heterogeneity among amino acid sites. *Journal of Molecular Evolution* **40**: 622-628.
- Anderson, S., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Eperon, I.C., Sanger, F., and Young, I.G. (1982) Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *Journal of Molecular Biology* **156**: 683-717.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. **290**: 457-465.
- Arctander, P. (1995) Comparison of a mitochondrial gene and a corresponding nuclear pseudogene. *Proceedings of the Royal Society of London -B - Biological Sciences* **262**:13-19.
- Armstrong, M.H., Braun, E.L., and Kimball, R.T. (2001) Phylogenetic utility of avian ovomucoid intron G: a comparison of nuclear and mitochondrial phylogenies in Galliformes. *AUK* **118**:799-804.
- Amason, U., Adegoke, J.A., Bodin, K., Born, E.W., Esa, Y.B., Gullberg, A., Nilsson, M., Short, R.V., Xu, X., and Janke, A. (2002) Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **99**: 8151-8156.
- Amason, U., Gullberg, A., Gretarsdottir, S., Ursing, B., and Janke, A. (2000) The mitochondrial genome of the sperm whale and a new molecular reference for estimating eutherian divergence dates. *Journal of Molecular Evolution* **50**: 569-578.
- Amason, U., Gullberg, A., Janke, A., and Xu, X. (1996) Pattern and timing of evolutionary divergences among hominoids based on analyses of complete mtDNAs. *Journal of Molecular Evolution* **43**: 650-661.
- Amason, U., and Gullberg, A. (1994) Cytochrome b nucleotide sequences and the identification of five primary lineages of extant cetaceans. *Molecular Biology and Evolution* **13**: 407-417.
- Amason, U., Gullberg, A., and Widegren, B. (1991) The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the Fin Whale, *Balaenoptera physalus*. *Journal of Molecular Evolution* **33**: 556-568.
- Baba, Y., Fujimaki, Y., Yoshii, R., and Koike, H. (2001) Genetic variability in the mitochondrial control region of the Japanese Rock Ptarmigan *Lagopus mutus japonicus*. *Japanese Journal of Ornithology* **50**: 53-62.
- 馬場芳之・藤巻裕蔵・小池裕子 (1999) 日本産エゾライチョウ *Bonasa bonasia* の遺伝的多様性と遺伝子流動. *日本鳥学会誌* **48**: 47-60.
- Baker, A.J. and Marshall, H.D. (1997) Mitochondrial control-region sequences as tools for understanding the evolution of avian taxa. in *Avian molecular systematics and evolution* (Mindell, D.P., ed.), pp49-80. Academic Press, New York, USA.
- Barnes, W.M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from bacteriophage templates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **91**: 2216-2220.
- Bouahom, B. (2000) Animal genetic resources in the Lao PDR: current status and production systems. *Report of Society for Researchers on Native Livestock* **18**: 11-16.

- Brown, W.M., George, M. Jr, and Wilson, A.C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **76**: 1967-1971.
- Briles, W.E., Bumstead, N., Ewert, D.L., Gilmour, D.G., Gogusev, J., Hála, K., Koch, C., Longenecker, B.M., Nordskog, A.W., Pink, J.R.L., Schierman, L.M., Simonsen, M., Toivanen, A., Toivanen, P., Vainio, O., and Wick, G. (1982) Nomenclature for chicken major histocompatibility (*B*) complex. *Immunogenetics* **15**: 144-147.
- Cao, Y., Adachi, J., Janke, A., Paabo, S., and Hasegawa, M. (1994a) Phylogenetic relationships among Eutherian ordered from inferred sequences of Mitochondrial proteins: instability of a tree based on a single gene. *Journal of Molecular Evolution* **39**:225-241.
- Cao, Y., Adachi, J., and Hasegawa, M (1994b) Eutherian phylogeny as inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Japanese Journal of Genetics* **69**:455-472.
- Caspers, G.J., Uit de Weerd, D., Wattel, J., and de Jong, W.W. (1997) Alpha-crystallin sequences support a galliform/anseriform clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **7**:185-188.
- Cheng, K.M., and Kimura, M. (1990) Mutations and major variations in Japanese quail. in *Poultry Breeding and Genetics* (Crawford, R.D. ed.), pp. 333-362. Elsevier, Amsterdam.
- Cheng, S., Chang, S.-Y., Gravitt, P., and Respass, R. (1994) Long PCR. *Nature*. **369**: 684-685.
- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W.M., and Higuchi, R. (1994) Effective Amplification of Long Targets from Cloned Inserts and Human Genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **91**: 5695-5699.
- Cracraft, J. (1988) *The Phylogeny and Classification of the Tetrapods*. (Benton, M.J. ed.) , pp.335-355. Systematics association special Vol. 35A, Clarendon Press, Oxford, UK.
- Cracraft, J. (1982) Phylogenetic relationships and monophyly of loons, grebes, and hesperornithiform birds, with comments on the early history of birds. *System Zoology*. **31**:35-56.
- Cracraft, J. (1981) Toward a phylogenetic classification of the recent birds of the world (Class Aves). *AUK*. **98**:681-714.
- Cracraft, J. and Mindell, DP. (1989) *The hierarchy of Life* (Fernholm, B. et al., eds.), pp.389-403. Proceedings of Nobel Symposia, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Crawford, R.D. (1990) *Poultry Breeding and Genetics*, (Crawford, R. D. ed.), pp. 1-41. Elsevier, Amsterdam.
- Cummings, MP., Otto, SP., and Wakeley, J. (1995) Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* **12**: 814-822.
- Danforth, C.H. (1958) *Gallus sonnerati* and the domestic fowl. *Journal of Hereit*. **49**: 167-169.
- Darwin, C. (1896) *The Variation of Animals and Plants under Domestication*. 2nd ed., Vol. 1 D. Appleton and Company, New York.
- Dayhoff, m.o., Schwartz, R.M., and Orcutt, B.C. (1978) A model of evolutionary change in proteins. In *Atlas of protein sequence and structure* (Dayhoff, M.O. ed.) pp.345-352. National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, MD.
- DeBry, R.W. (1992) The consistency of several phylogeny-inference methods under varying evolutionary rates. *Molecular Biology and Evolution* **9**: 537-551.
- Delacour, J. (1977) *The Pheasants of the World*, 2nd ed. World Pheasant Association and Spur Publications, Hindhead, U.K.
- Desjardins P, Frost E, Morais R. (1985) Ethidium bromide-induced loss of mitochondrial DNA from primary chicken embryo fibroblasts. *Molecular Cellular and Biology* **5**:1163-1169.

- Desjardins, P., and Morais, R. (1991) Nucleotide sequence and evolution of coding and noncoding regions of a quail mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution* **32**: 153-61.
- Desjardins, P., and Morais, R. (1990) Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *Journal of Molecular Biology* **212**: 599-634.
- Dimcheff, D.E., Drovetski, S.V., and Mindell, D.P. (2002) Phylogeny of Tetraoninae and other galliform birds using mitochondrial 12S and ND2 genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **24**:203-215.
- Dimcheff, D.E., Drovetski, S.V., Krishnan, M., and Mindell, D.P. (2000) Cospeciation and horizontal transmission of avian sarcoma and Leukosis virus gag genes in Galliform birds. *Journal of Virology* **74**:3984-3995.
- Eizirik, E., Murphy, W.J., and O'Brien, S.J. (2001) Molecular dating and biogeography of the early placental mammal radiation. *Journal of Heredity* **92**:212-219.
- FAO (1998a) *Primary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans*. FAO, Rome, Italy.
- FAO (1998b) Commission on genetic Resources for Food and Agriculture: Intergovernmental technical working group on animal genetic resources for food and agriculture. FAO, Rome Italy.
- FAO (1996a) *Domestic animal diversity information system* at URL <http://www.fao.org/dad-is/>
- FAO (1996b) *Farm animal genetic resources. A call to action*. CD-ROM, FAO, Rome.
- FAO. 1995. *World watch list for domestic animal diversity*. 2nd ed. Edited by B. Scherf. Rome, FAO and the United Nations Environment Programme (UNEP).
- Feduccia, A. (1999) *The origin and evolution of Birds*. Yale University Press, New Haven.
- Felsenstein, J. (1995) *PHYLIP: Phylogeny inference package, ver.3.572*. University of Washington, Seattle, WA.
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368-376.
- Felsenstein, J. (1978) Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *System Zoology* **27**: 401-410.
- Fumihito, A., Miyake, T., Takeda, M., Shingu, R., EnDo, T., Gojobori, T., Kondo, N. and Ohno, S. (1996) Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **93**: 6792-6795.
- Fumihito A., Miyake T., Takada M., Ohno S. & Kondo N. (1995) The genetic link between the Chinese bamboo partridge (*Bambusicola thoracica*) and the chicken and junglefowls of the genus *Gallus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **92**: 11053-56.
- Fumihito, A., Miyake, T., Sumi, S., Takeda, M., Ohno, S. and Kondo, N. (1994) One subspecies of the red junglefowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **91**: 12505-12509.
- Futuyma, D.J. (1998) *Evolutionary Biology* (3rd ed.). Sinauer, Sunderland.
- Garcia-Moreno, J., and Mindell, D.P. (2000) Rooting a Phylogeny with Homologous Genes on Opposite Sex Chromosomes (Gametologs): A Case Study Using Avian CHD. *Molecular Biology and Evolution*. **17**: 1826-1832.
- Gatesy, J., Leary, O., and Maureen, A. (2001) Deciphering whale origins with molecules and fossils. *Trends in Ecology and Evolution* **16**: 562-570.
- Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M., and Wallace, D.C. (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **77**: 6715-6719.

- Graur, D., and Higgins, D.G. (1994) Molecular evidence for the inclusion of Cetaceans within the order Artiodactyla. *Molecular Biology and Evolution* 11:357-364.
- Griffiths, C.S. (1994) Monophyly of the Falconiformes based on syringeal morphology. *AUK* 111:787-805.
- Greenberg, R., Cordero, P.J., Droege, S., and Fleischer, R.C. (1998) Morphological adaptation with no mitochondrial DNA differentiation in the coastal plain Swamp Sparrow. *AUK* 115:706-72.
- Groth, J.G., and Barrowclough, B.F. (1999) Basal Divergences in birds and the phylogenetic utility of the nuclear RAG-1 gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12:115-123.
- Hackett, S.J., Griffiths, C.S., Bates, J.M., and Klein, N.K. (1995) A commentary on the use of sequence data for phylogeny reconstruction. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4:350-356.
- Hammond, K. and Leitch, H.W. (1995) Towards better management of animal genetic resources. *World Animal review* 84/85: 43-53.
- Hára, K. (1987) *Avian Immunology; Basis and Practice, Volume II*. (Toivanen, A., & Toivanen, P. eds.) CRC Press, Boca Raton.
- Harlid, A., Janke A., and Arnason, U. (1998) The complete mitochondrial genome of *Rhea americana* and early avian divergences. *Journal of Molecular Evolution* 46: 669-679.
- Harlid, A., Janke, A., and Arnason, U. (1997) The mtDNA sequence of the Ostrich and the Divergence between Paleognathous and Neognathous birds. *Molecular Biology and Evolution* 14: 754-761.
- Hasegawa, M., and Adachi, J. (1996) Phylogenetic position of cetaceans relative to artiodactyls: Reanalysis of mitochondrial and nuclear sequences. *Molecular Biology and Evolution* 13: 710-717.
- Hasegawa, M., and Kishino, H. (1994) Accuracies of the simple methods for estimating the bootstrap probability of a maximum likelihood tree. *Journal of Molecular Evolution* 11:142-145.
- Hasegawa, M., and Fujiwara, M. (1993) Relative efficiencies of the maximum likelihood, maximum parsimony, and neighbor-joining methods for estimating protein phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2: 1-5.
- Hasegawa, M., Kishino, H., and Saitou, N. (1991) On the maximum likelihood method in molecular phylogenetics. *Journal of Molecular Evolution* 32: 443-445.
- Hasegawa, M., Kishino, H., and Yano, T. (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22:160-174.
- 長谷川政美・岸野洋久 (1996) 分子系統学. 岩波書店. 東京.
- 長谷部光泰 (1996) 分子系統学のすすめ. 岩槻邦男・馬渡峻輔 (編) pp.88-101. 生物の種多様性. 裳華房. 東京.
- Hashiguchi, T., Tsuneyoshi, M., Nishida, T., Higashiawatoko, H., and Hiraoka, E. (1981) Phylogenetic relationships determined by the blood protein types of fowls. *Japanese Journal Zootechnical Science* 52: 713-729.
- Hedges, S.B., Simmons, M.D., van Dijk, M.A.M., Caspers, G.-J., de Jong, W.W., and Sibley, C.G. (1995) Phylogenetic relationships of the hoatzin, an enigmatic South American bird. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 11662-11665.
- Hedges, S.B., and Sibley, C.G. (1994) Molecule vs. Morphology in Avian Evolution: The Case of the "Pelecaniform" Birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91:9861-9865.
- Hey, J., and Kliman, R.M. (1993) Population genetics and phylogenetics of DNA sequence variation at multiple loci within the *Drosophila melanogaster* species complex. *Molecular Biology and Evolution* 10:804-822.
- Hiendleder, S., Lewalski, H., Wassmuth, R., and Janke, A. (1998) The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *Journal of Molecular*

- Evolution* 47: 441-448.
- Ho, C. Y.-K., Prager, E., Wilson, A. C., Osuga, D. T., and Feeney, R. E. (1976) Penguin evolution: comparisons demonstrate phylogenetic relationship to flying aquatic birds. *Journal of Molecular Evolution* 8: 271-282.
- Horai, S., Satta, Y., Hayasaka, K., Kondo, R., Inoue, T., Ishida, T., Hayashi, S., and Takahata, N. (1992) Man's place in Hominoidea revealed by mitochondrial DNA genealogy. *Journal of Molecular Evolution* 35: 32-43.
- Horai, S., Gojobori, T., and Matsunaga, E. (1987) *Human Genetics*, Proceedings of the 7th International Congress (Vogel, F., Sperling, K. eds.), pp.177-181. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Houde, P., Cooper, A., Leslie, E., Strand, A., and Montano, A. (1997) Phylogeny and Evolution of 12SrDNA in Gruiformes (Aves). in *Avian Molecular Evolution and Systematics* (Mindell, D.P. ed.) pp121-158. Academic Press, New York, USA.
- Hughes, M., and Baker, A.J. (1999) Phylogenetic relationships of the enigmatic hoatzin (*Opisthocomus hoazin*) resolved using mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1300-1307.
- Hutchison, C.A. 3rd, Newbold, J.E., Potter, S.S., and Edgell, M.H. (1974) Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* 251: 536-538.
- Hutt, F. B. (1949) *Genetics of the Fowl*. McGraw Hill Book Company Inc., New York.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- Irwin, D.M., and Amason, U. (1994) Cytochrome *b* gene of marine mammals: phylogeny and evolution. *Journal of mammal Evolution* 2: 37-55.
- Janke, A., and Amason, U. (1997) The complete mitochondrial genome of *Alligator mississippiensis* and the separation between recent Archosauria (Birds and Crocodiles). *Molecular Biology and Evolution* 14:1266-1272.
- Johnsgard, P.A. (1973) *Grouse and quails of North America*. Lincoln: University of Nebraska Press.
- Johnsgard, P.A. (1986) *The Pheasants of the World*: Oxford Univ. Press, Oxford, UK.
- Johnsgard P.A. (1999) *The Pheasants of the World: Biology and Natural History, 2nd ed.* Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- Johnson, K.P., and Sorenson, M.D. (1998) Comparing molecular evolution in two mitochondrial protein coding genes (cytochrome *b* and ND2) in the dabbling ducks (Tribe: Anatini). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10: 82-94.
- Jones, D.A., and Gibbs, H.L. (1997) Intra- and interspecific sequence variation in a portion of the mitochondrial ND6 gene in Cuckoos. *Condor* 99: 815-818.
- Kaneda, H., Hayashi, J., Takahama, S., Taya, C., Lindahl, K.F., and Yonekawa, H. (1995) Elimination of Paternal Mitochondrial DNA in Intraspecific Crosses During Early Mouse Embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 92: 4542-4546.
- 環境省 (2002) 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物-レッドデータブック-2鳥類 環境省自然環境局野生動物課編集 財団法人自然環境研究センター 東京.
- 粕谷英一 (1995) 最近の比較生態学の方法の発展-種間比較には系統関係が必要である-. 日本生態学会誌. 45:227-288.
- Kimball, R.T., Braun, E.L., Zwartjes, P.W., Crowe, T.M., and Ligon, J.D. (1999) A molecular phylogeny of the pheasants and partridges suggests that these lineages are not monophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11: 38-54.

- Kimball, R.T., Braun, E.L., and Ligon, J.D. (1997) Resolution of the phylogenetic position of the Congo reafowl, *Afropavo congensis*: a biogeographic and evolutionary enigma. *Proceedings of Royal Society of London, Series B* **254**:1517-1523.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111-120.
- Kishino, H., Miyata, T., and Hasegawa, M. (1990) Maximum likelihood inference of protein phylogeny, and the origin of chloroplasts. *Journal of Molecular Evolution* **31**:151-160.
- Kishino, H., and Hasegawa, M. (1989) Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topology from DNA sequence data, and the branching order in Hominoidea. *Journal of Molecular Biology* **29**:170-179.
- Kocher, T.D., Conroy, J.A., McKare, K.R., Stauffer, J.R., and Lockwood, S.F. (1995) Evolution of NADH dehydrogenase subunit 2 in East Africa cichlid fish. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **4**: 420-432.
- Kocher, T.D., Conroy, J.A., McKare, K.R., and Stauffer, J.R. (1993) Similar morphologies of cichlid fish in Lakes Tanganyika and Malawi are due to convergence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2**: 158-165.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X., and Wilson, A.C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **86**: 6196-6200.
- Kornegay, J.R., Kocher, T.D., Williams, L.A., and Wilson, A.C. (1993) Pathways of lysozyme evolution inferred from the sequences of cytochrome b in birds. *Journal of Molecular Evolution* **37**: 367-379.
- Krajewski, C., and Wood, T.C. (1995) Mitochondrial DNA relationships within the Sarus Crane species group (Gruiformes: Gruidae). *Emu* **95**:99-105.
- Kumazawa, Y., and Nishida, M. (1999) Complete mitochondrial DNA sequences of the green turtle and blue-tailed mole skink: static evidence for archosaurian affinity of turtles. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 784-792.
- Kumazawa, Y., Ota, H., Nishida, M., and Ozawa, T. (1998) The complete nucleotide sequence of a Snake (*Dinodon semicarinatus*) mitochondrial genome with two identical control regions. *Genetics* **150**: 313-329.
- 黒田長久・小宮輝之 (1987) キジ科の分類 世界の動物・分類と飼育 (10) I・キジ目. 財団法人東京動物園協会 株式会社どうぶつ社 東京.
- Lansdown, A.B.G., Crees, S.J., and Wilder, R.G. (1970) The Japanese quail: its suitability for embryonic and reproductive investigations. *Journal of the Institute of Animal Technicians* **21**: 71-77.
- Lin, Z., Nomura, O., Hayashi, T., Wada, Y., and Yasue, H. (2001) Characterization of a SINE species from vicuna and its distribution in animal species including the family Camelidae. *Mammalian Genome* **12**:305-308.
- Lopez, J.V., Yuhki, N., Masuda, R., Modi, W., and O'Brien, S.J. (1994) *Numt*, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *Journal of Molecular Evolution* **39**:174-190.
- Mainardi, D. (1963) Immunological distances and phylogenetic relationships in birds. in *Proceedings of the 13th International Ornithological congress*. (Sibley, C.G. ed.), pp.103-114. American Ornithologist' Union and Allen Press, Lawrence, Kansas.
- Marshall, H.D. and Baker, A.J. (1997) Structural conservation and variation in the mitochondrial control region of Fringilline Finches (*Fringilla* spp.) and the Greenfinch (*Carduelis chloris*). *Molecular Biology and Evolution* **14**: 173-184.
- Mayr, E., and Amadon, D. (1951) A classification of recent birds. *American Museum Novit* **1496**: 1-42.

- Mindell, D.P., Sorenson, M.D., Dimcheff, D.E., Hasegawa, M., Ast, J.C. and Yuri, T. (1999) Interordinal relationships of birds and birds and other reptiles based on whole mitochondrial genomes. *Systematic Biology* **48**: 138-152.
- Mindell, D.P., Sorenson, M.D., and Dimcheff, D.E. (1998) An extra nucleotide is not translated in mitochondrial ND3 of some birds and turtles. *Molecular Biology and Evolution* **15**: 1568-1571.
- Mindell, D.P., Sorenson, M.D., Huddleson, C.J., Miranda, Jr. H.C., Knight, A., Sawchuk, S.J., and Yuri, T. (1997) Phylogenetic relationships among and within select avian orders based on mitochondrial DNA. in *Avian Molecular Evolution and Systematics*. (Mindell, D.P. ed.), pp217-247. Academic Press, New York, USA.
- Miranda, H.C. Jr., Kennedy, R.S., and Mindell, D.P. (1997) Phylogenetic placement of *Mimizuku gurneyi* (Aves: Strigidae) inferred from mitochondrial DNA. *AUK* **114**: 315-323.
- Miretti, M.M., Pereira, H.A., Poli, M.A., Contel, E.P.B., and Ferro, J.A. (2002) African-derived mitochondrial in South American native cattle breeds (*Bos taurus*): evidence of new taurine mitochondrial lineage. *Journal of Heredity* **93**: 323-330.
- Miya, M., Takeshima, H., Endo, H., Ishiguro, N.B., Inoue, J.G., Mukai, T., Satoh, T.P., Yamaguchi, M., Kawaguchi, A., Mabuchi, K., Shrai, S.M., and Nishida, M. (2003) Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **26**: 121-138.
- Montgelard, C., Catzeflis, F.M., and Douzery, E. (1997) Phylogenetic relationships of artiodactyls and cetaceans as deduced from the comparison of cytochrome b and 12S rRNA mitochondrial sequences. *Molecular Biology Evolution* **14**: 550-559
- Moore, W.S., and DeFilippis, V.R. (1997) The window of taxonomic resolution for avian phylogenies based on mitochondrial cytochrome b DNA sequences. In *Avian Molecular Evolution and Systematics* Mindell, D.P., ed.), pp.83-119. Academic Press, San Diego .
- Moum, T., and Johansen, S. (1992) The mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 6 (ND6) gene in Murres: relevance to phylogenetic and population studies among birds. *Genome* **35**: 903-906.
- Mourier, T., Hansen, A.J., Willerslev, E., and Arctander, P. (2001) The human genome project reveals a countinuous transfer of large mitochondrial fragments to the nucleus. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 1833-1837.
- Nei M, and Kumar S. (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford, New York: Oxford University Press.
- 日本鳥学会 (2000) 日本鳥類目録改訂第6版. (日本鳥類目録編集委員会編) 帯広. 北海道.
- Nikaido, M., Rooney, A. P., and Okada, N. (1999) Phylogenetic relationships among cetartiodactyls based on insertions of short and long interspersed elements: Hippopotamuses are the closest extant relatives of whales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **96**:10261-10266.
- Nishibori, M., Nakaki, S., Tsudzuki, M., and Yamamoto, Y. (2000) Utility of three restriction fragment length polymorphism probes for genotyping of the chicken major histocompatibility complex class IV region. *Poultry Science* **79** : 305-311.
- 西海功 (2002) 鳥類学における分子手法の適用. 山岸哲・樋口広芳 (共編) pp.287-319. *これからの鳥類学*. 裳華房. 東京
- Nomura, O., and Yasue, H. (1999) Genetic relationships among hippopotamus, whales, and bovine based on SINE insertion analysis. *Mammalian Genome* **10**:526-527.
- Nyakaana, S., Arctander, P., and Siegismund, H.R. (2002) Population structure of the African savannah elephant inferred from mitochondrial control region sequences and nuclear microsatellite loci. *Heredity* **89**: 90-98.
- Ohta, N. Kajita, M., Kusuhara, S., and Kakizawa, R. (2000) Genetic Differentiation and Phylogenetic Relationships among Species of *Gallus* (Jungle Fowl) and the Chicken. *Japanese Poultry Science* **37**: 33-39.

- Ojala, D., Montoya, J., and Attard, G. (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* **290**: 471-474.
- Okada, I., Yamamoto, Y., Hashiguchi, T., and Ito, S. (1984) Phylogenetic studies on the Japanese native breeds of chickens. *Japanese Poultry Science* **21**: 318-329.
- Olson, S. (1985) The fossil record of birds. in *Avian Biology Vol.8* (Farner, D.S., King, J.R., and Parkers, K.C. eds.) pp.80-238. Academic Press, London.
- Padgett, C.A., and Ivey, W.D. (1959) Coturnix quail as a laboratory research animal. *Science* **129**: 267-268.
- Pamilo, P., and Nei, M. (1988) Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution* **5**: 568-583.
- Peters, J.L. (1934) *Check-list of birds of the world. Vol.2*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Potter, S.S., Newbold, J.E., Hutchison, C.A. 3rd, Edgell, M.H. (1975) Specific cleavage analysis of mammalian mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **72**: 4496-500.
- Prager, E.M. and Wilson, A.C. (1976) Congruency of phylogenies derived from different proteins: a molecular analysis of the phylogenetic position of cracid birds. *Journal of Molecular Evolution* **9**: 45-57.
- Prager, E.M., Wilson, A.C., Osuga, D.T., and Feeney, R.E. (1976) Evolution of flightless land birds on southern continents: transferrin comparison shows monophyletic origin of ratites. *Journal of Molecular Evolution* **8**: 283-294.
- Quinn, T.W. (1997) Molecular evolution of the mitochondrial genome. In: *Avian Molecular Evolution and Systematics* (Mindell, D.P. ed.), pp3-28. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Reese, E.P., and Reese, T.W. (1962) The quail, *Coturnix coturnix*, as a laboratory animal. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior* **5**:265-270.
- Robin, K. (1990) Pet and farm animals, 1st ed. Facts on file, Inc., New York.
- Saitoh, K., Hayashizaki, K., Yokoyama, Y., Asahida, T., Toyohara, H., and Tamashita, Y. (2000) Complete nucleotide sequence of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) mitochondrial genome: structural properties and cue for resolving teleostean relationships. *Journal of Heredity* **91**: 271-278.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2000) *Molecular cloning - A laboratory manual, 3rd ed*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York
- Sanger, F., and Coulson, A.R. (1978) The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Letter* **87**:107-110.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **74**:5463-5467.
- Sheldon, F.H., and Bledson, A.H. (1993) Avian molecular systematics, 1970s and 1990s. *Annual Review of Ecological Systematics* **24**: 243-278.
- Shen, X. (2001) Primer Design and Sequence Information for Complete Mitochondrial ND5 Gene in the Black and White Lines of Silky Fowl (*Gallus gallus*). *Animal Science, Journal* **72**: 257-259.
- Shimamura, M., Abe, H., Nikaido, M., Ohshima, K., and Okada, N. (1999) Genealogy of families of SINEs in cetaceans and artiodactyls: the presence of a huge superfamily of tRNA(Glu)-derived families of SINEs. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 1046-1060.

- Sibley, C.G. (1994) On the phylogeny and classification of living birds. *Journal of Avian Biology* **25**: 87-92.
- Sibley, C.G., and Ahlquist, J.E. (1990) Phylogeny and classification of birds: a study in molecular evolution. New Heaven & London: Yale University Press.
- Sibley, C.G., and Monroe, B.L. Jr. (1990) Distribution and taxonomy of birds of the world (Sibley, C.G. and Monroe, B.L. Jr, eds), London: Yale University Press.
- Sibley, C.G., and Ahlquist, J.E. (1987) Avian phylogeny reconstructed from comparisons of genetic material, DNA. in *Molecules and Morphology in Evolution: Conflict or Compromise?* (Patterson, C. ed.), pp.95-121. Cambridge University Press, Cambridge.
- Siegel-Causey, D. (1997) Phylogeny of the Pelecaniformes: Molecular Systematics of a Private Group. in *Avian Molecular Evolution and Systematics* (Mindell, D.P. ed.) pp159-171. Academic Press, New York, USA.
- Sokal, R.R., and Michener, C.D. (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin* **38**: 1409-1438.
- Sorenson, M.D., Ast, J.C., Dimcheff, D.E., Yuri, T., and Mindell, D.P. (1999) Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **12**:105-114.
- Sorenson, M.D., and Quinn, T.W. (1998) Numts: a challenge for avian systematics and population biology. *AUK* **115**: 214-221.
- Su, B., Fu, Y., Wang, Y., Jin, L., and Chakraborty, R. (2001) Genetic diversity and population history of the Red Panda (*Ailurus fulgens*) as inferred from mitochondrial DNA sequence variations. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 1070-1076.
- Tajima, F. (1993) Unbiased estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution* **10**: 677-688.
- 高木利久・金久實 (1996) ゲノムネットのデータベース利用法. 共立出版. 東京.
- Takahashi, K., Terai, Y., Nishida, M., and Okada, N. (2001) Phylogenetic relationships and ancient incomplete lineage sorting among cichlid fishes in Lake Tanganyika as revealed by analysis of the insertion of retroposons. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 2057-2066.
- Takahashi Y, and Mizuma Y (1981) Studies on the chicken-quail hybrids. *Japanese Poultry Science* **18**:267-272.
- Takahata, N., and Nei, M. (1985) Gene genealogy and variance of interpopulational nucleotide differences. *Genetics* **110**: 325-344.
- Terai, Y., Mayer, W.E., Klein, J., Tichy, H., and Okada, N. (2002) The effect of selection on a long wavelength-sensitive (LWS) opsin gene of Lake Victoria cichlid fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **99**: 15501-15506.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**: 4876-4882.
- Tsudzuki, M. (1995a) Light gray: A plumage color mutation of Chinese painted quail (*Excalfactoria chinensis*). *Journal of Heredity* **86**:68-70.
- Tsudzuki, M. (1995b) Brown: A plumage color mutation in Chinese painted quail (*Excalfactoria chinensis*) *Journal of Heredity* **86**:307-309.
- Tsudzuki, M. (1994) Excalfactoria quail as a new laboratory research animal. *Poultry Science* **73**:763-768.
- Uchida S, and Shimasaki S. (1987) Scientific names of the birds: dictionary of genetic and specific names, with

- English and Japanese names and distributions. Tokyo: University of Tokyo Press.
- Ursing, B.M., Slack, K. E., and Amason, U. (2000) Subordinal artiodactyl relationships in the light of phylogenetic analysis of 12 mitochondrial protein-coding genes. *Zoologica Scripta* **29**:83-88.
- Ursing, B.M., and Amason, U. (1998) The complete mitochondrial DNA sequence of the Pig (*Sus scrofa*). *Journal of Molecular Evolution* **47**:302-306.
- Ursing, B.M., and Amason, U. (1997) Analyses of mitochondrial genomes strongly support a hippopotamus-whale clade. *Proceedings of the Royal Society of London -B - Biological Sciences* **265**: 2251-2256.
- van Tuinen, M., and Hedges, S.B. (2001) Calibration of avian molecular clocks. *Molecular Biology and Evolution* **18**: 206-213.
- van Tuinen, M., Sibley, C.G., and Hedges, S.B. (2000) The early history of modern birds inferred from DNA sequences of nuclear and mitochondrial ribosomal genes. *Molecular Biology and Evolution*. **17**: 451-457.
- Verheyen, E., Salzburger, W., Snoeks, J., and Meyer, A. (2003) Origin of the superflock of Cichlid fishes from lake Victoria, East Africa. *Science* **300**:325-329.
- Verheyen, R. (1956) Contribution de l'anatomie et a la systematique des Galliformes. *Bulletin de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique* **32**:1-24.
- Waddell, P.J., Kishino, H., and Ota, R. (2001) A phylogenetic foundation for comparative mammalian genomics. *Genome Inform Ser Workshop Genome Information* **12**:141-54.
- WCMC (1994) *Biodiversity data sourcebook, WCMC Biodiversity Series No1*, World Conservation Monitoring Centre, (Groombridge, B. ed.), World Conservation Press, Cambridge, UK.
- West, B., & Zhou, B-X. (1989) Did chickens go north? New evidence for domestication. *World's Poultry Science Journal* **45**: 205-218.
- West, B., & Zhou, B-X. (1988) Did chickens go north? New evidence for domestication. *Journal of Archaeological Science* **15**: 515-533.
- Wood, T.C., and Krajewski, C. (1996) Mitochondrial DNA sequence variation among the subspecies of Sarus Crane (*Grus antigone*). *AUK* **113**: 655-663.
- Wu, C.I. (1991) Inferences of Species Phylogeny in Relation to Segregation of Ancient Polymorphisms. *Genetics* **127**: 429-435.
- Yamamoto, Y., Afraz, F., Nishibori, M., Namikawa, T., Kurasawa, Y., Mannen, H., Yamagata, T., Keonouchanh, S., Khounsavath, K., Seng Dera, B., Phouthavongs, K., Vannasouk, T., and Bouahom, B. (2000) Gene constitution of the blood groups and blood protein polymorphisms in the native chickens and red jungle fowls of Laos. *Report of Society for Researchers on Native Livestock* **18**:159-169.
- Yamamoto, Y., Murata, K., Matsuda, H., Hosoda, T., Tamura, K., and Furuyama, J. (2000) Determination of the complete nucleotide sequence and haplotypes in the D-loop region of the mitochondrial genome in the Oriental white stork, *Ciconia boyciana*. *Genes and Genetic Systems* **75**: 25-32.
- Yasue, H., Nishibori, N., Nishibori, M., Yamamoto, Y., Homma, D., and Hayashi, T. (2003) Phylogenetic positions of *Lama glama*, *Camelus bactrianus*, *Capricornis crispus*, *Giraffa camelopardalis angolensis*, and *Tayassu tajacu* in Cetartiodactyla estimated using mitochondrial genes. (in preparation).
- Yang, Z. (2000) *Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood (PAML), Version 3.0*. University College London, London.
- Yamashita, H., Okamoto, S., Maeda, Y., and Hashiguchi, T. (1994) Genetic relationships among domestic and jungle fowls revealed by DNA fingerprinting analysis. *Japanese Poultry Science* **31**: 335-344.

由利たまき (2002) 鳥類と系統学 in これからの鳥類学 (山岸哲・樋口広芳共編) pp.322-356.裳華房. 東京

Zardoya, R., and Meyer, A. (1998) Complete mitochondrial genome suggests diapsid affinities of tuetles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **95**:14226-14231.

Zardoya, R., and Meyer, A. (1997) The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of a "Living Fossil", the Coelacanth (*Latimeria chalumnae*). *Genetics*. **146**: 995-1010.

Zink, R.M., and Blackwell, R.C. (1998) Molecular systematics of the Scaled Quail complex (Genus *Callipepla*). *AUK* **115**: 394-403.

Zink, R.M., Blackwell, R.C., Rojas-Sato, O. (1997) Species limits in the Le Conte's Thrasher. *Condor* **99**: 132-138.

Appendix

Appendix 1-1. Abbreviations

Appendix 2-1. *Coturnicx japonica* (Japanese quail) complete mtDNA annotations and sequences

Appendix 2-2. *Coturnicx chinensis* (Blue-breasted quail) complete mtDNA annotations and sequences

Appendix 4-1. *Numida meleagris* (Helmeted guineafowl) complete mtDNA annotations and sequences

Appendix 5-1. *Gallus gallus* var. *domesticus* (White Leghorn CB line) complete mtDNA annotations and sequences

Appendix 5-2. *Gallus gallus* var. *domesticus* (White Leghorn Cornell-P line) complete mtDNA annotations and sequences

Appendix 5-3. *Gallus gallus* var. *domesticus* (White Plymouth Rock) complete mtDNA annotations and sequences

Appendix 5-4. *Gallus gallus* var. *domesticus* (Laos native chicken) complete mtDNA annotations and sequences

Appendix 5-5. *Gallus sonnerati* (Grey junglefowl) complete mtDNA annotations and sequences

Appendix 5-6. *Gallus gallus spadicius* (Red junglefowl in Laos) complete mtDNA annotations and sequences

Appendix 5-7. *Gallus gallus gallus* (Red junglefowl in Philippines) complete mtDNA annotations and sequences

Appendix 5-8. *Gallus gallus bankiva* (Red junglefowl in Indonesia) complete mtDNA annotations and sequences

Appendix 5-9. *Gallus varius* (Green junglefowl) complete mtDNA annotations and sequences

Appendix 5-10. *Gallus lafayetii* (Ceylon junglefowl) complete mtDNA annotations and sequences

Appendix 1-1, abbreviations

ATPase 6, ATPase8: ATPase subunit 6, ATPase subunit 8 (ATP 合成酵素)
bp: base pairs (塩基対)
COI, COII, COIII: cytochrome c oxidase subunit 1~3 (シトクローム c 酸化酵素)
CsCl: cesium chloride (塩化セシウム)
Cytb: cytochrome b (シトクローム b)
DDBJ: the DNA database of Japan (日本 DNA バンク)
D-loop: displacement loop (制御領域)
DNA: deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
EMBL: European molecular biology laboratory; UK outstation, European Biotechnology institute
EtBr: ethidium bromide (エチジウムブロマイド)
GenBank: National center for Biotechnology information, USA
LA-PCR: long and accurate- PCR
ML: Maximum likelihood (最尤法)
MP: Maximum parsimony (最大節約法)
mtDNA: mitochondrial DNA (ミトコンドリア DNA)
ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6: NADH dehydrogenase subunit 1 ~ 6 (NADH 還元酵素)
NJ: Neighbor joining method (近隣結合法)
NucML: ML for nucleotide sequence
numtDNA: integrated mitochondrial DNA in nuclear genome
OTU: operational taxonomic unit (操作分類単位)
PCR: polymerase chain reaction (PCR 増幅反応)
ProtML: ML for amino-acid sequence
RELL: resampling of estimated log-likelihood of sites
rRNA: ribosomal RNA (リボソーム RNA)
Exo-SAP: exonuclease I-shrimp alkaline phosphatase
SINE: short interspersed repeated sequences (短い散在反復配列: サイン)
tRNA: transfer RNA (運搬 RNA)
UPGMA: unweighted paired group method with arithmetic average (非加重結合法)

Appendix 2-1. complete mtDNA annotations and sequence of *Coturnix japonica* (Japanese quail)

LOCUS AP003195 16697 bp DNA circular VRT 26-JUL-2002
DEFINITION Coturnix japonica mitochondrial DNA, complete genome.
ACCESSION AP003195
VERSION AP003195.2 GI:18693240
KEYWORDS .
SOURCE mitochondrion Coturnix japonica (Japanese quail)
ORGANISM Coturnix japonica
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Archosauria; Aves; Neognathae; Galliformes; Phasianidae;
Phasianinae; Coturnix.
REFERENCE 1
AUTHORS Nishibori,M., Hayashi,T., Tsudzuki,M., Yamamoto,Y. and Yasue,H.
TITLE Complete sequence of the Japanese quail (*Coturnix japonica*)
mitochondrial genome and its genetic relationship with related
species
JOURNAL Anim. Genet. 32 (6), 380-385 (2001)
MEDLINE 21599056
PUBMED 11736810
REFERENCE 2 (bases 1 to 16697)
AUTHORS Nishibori,M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (15-FEB-2001) Masahide Nishibori, Hiroshima University,
Fac.of Applied Biological Science; Kagamiyama 1-4-4,
Higashi-hiroshima, Hiroshima 739-8528, Japan
(E-mail:nishibo@hiroshima-u.ac.jp, Tel:81-824-24-7992,
Fax:81-824-22-7067)
COMMENT On Feb 15, 2002 this sequence version replaced gi:15208270.
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..16697
/organism="Coturnix japonica"
/organelle="mitochondrion"
/db_xref="taxon:93934"
/tissue_type="whole blood"
/dev_stage="adult"
D-loop 1..1555
/note="control region"
tRNA 1156..1222
/product="tRNA-Phe"
rRNA 1223..2196
/product="12S ribosomal RNA"
tRNA 2197..2267

```

                /product="tRNA-Val"
rRNA          2268..3882
                /product="16S ribosomal RNA"
tRNA          3883..3956
                /product="tRNA-Leu"
gene          3965..4939
                /gene="ND1"
CDS           3965..4939
                /gene="ND1"
                /codon_start=1
                /transl_table=2
                /product="NADH dehydrogenase subunit 1"
                /protein_id="BAB62915.1"
                /db_xref="GI:15208271"
                /translation="MTLSTLTSLMIMTSLYMIPIILIAVAFLLTVERKILSYMQARKGP
NIVGPFGLLQPIADGVKLFIKEPIRPSTSSPFLFILTPILALLLALTIWTPPLPFPFPM
TDLNLGLLFLAMSSLTVYSLWGSWASNSKYALIGALRAVAQTISYEVTLAIILLST
IMLSGNYTLSTLSITQEPMYLIFSSWPLTMMWYISTLAETNRAPFDLTEGESELVSGF
NVEYAAGPFALFFLAEYANIMLNTLTITLFLNPSFLSPPSELFSITLATKVVLLSSS
FLWIRASYPRFRYDQLMHLWKNFLPLTLAMCLWHTSMPISYAGLPPA"
tRNA          4940..5010
                /product="tRNA-Ile"
tRNA          complement(5016..5086)
                /product="tRNA-Gln"
tRNA          5086..5154
                /product="tRNA-Met"
gene          5155..6195
                /gene="ND2"
CDS           5155..6195
                /gene="ND2"
                /codon_start=1
                /transl_table=2
                /product="NADH dehydrogenase subunit 2"
                /protein_id="BAB62916.1"
                /db_xref="GI:15208272"
                /translation="MNPFAKLISIMSLALGTSITISSNHWILAWTGLEINTLAIIPLI
SKSHHPRAIEAAIKYFLTQSTASALILFSSMNNAWSTGQWDITQLNHPTSCLILTMAI
AIKLGVPFHFVPEVLQGSSLITALLLSTLMKLPMTLLLMTSQSLNPALLTLLAVS
SALVGGWMLNQTQTRKILAFSSISHLGMMIVIIIYNPKLTILTFIIYSLMTSTVFLS
LSQIKVLKLSLMLISWTKTPMLNSTIMVTLLSLAGLPPLTGFMPKWLIIQELTKQEMT
PVATTIAMLSLLGLFFYLRLAYHSTITLPPNSSNHMKLWRINTTPNTPTAILTVLSIS
LLPLSPLITTLV"
tRNA          6194..6269

```

/product="tRNA-Trp"
 tRNA complement(6275..6343)
 /product="tRNA-Ala"
 tRNA complement(6346..6418)
 /product="tRNA-Asn"
 tRNA complement(6419..6484)
 /product="tRNA-Cys"
 tRNA complement(6484..6554)
 /product="tRNA-Tyr"
 gene 6556..8106
 /gene="COI"
 CDS 6556..8106
 /gene="COI"
 /note="AGG stop codon"
 /codon_start=1
 /transl_table=2
 /product="cytochrome oxidase subunit I"
 /protein_id="BAB62917.1"
 /db_xref="GI:15208273"
 /translation="MTFINRWLFSTNHKDIGTLYLIFGTWAGMAGTALLLIRAELGQ
 PGTLLGDDQIYNVIVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMIGAPDMAFPRMNMS
 FWLLPPSFLLLLASSTVEAGAGTGWTVYPPLAGNLAHAGASVDLAI FSLHLAGVSSIL
 GAINFITTIINMKPPALSQYQTPLFVWSVLITAILLLL LSLPVLAAGITMLLTDRNLNT
 TFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHPEVYILILPGFGIISHVVAYYAGKKEPFGYMGMW
 AMLSIGFLGFIVWAHHMFTVGMDDVDTRAYFTSATMIIA IPTGIKVFSWLATLHGGTIK
 WDP PMLWALGFIFLFTIGGLTGIVLANSSLDIALHDTYYVAHFHYVLSMGAVFAILA
 GFTHWFPLFTGFTLHPTWTKAHFGVMFTGVNLTFFPQHFLGLAGMPRRYSYDPDAYTL
 WNTLSSIGSLISMTAVIMLMFIVWEAFSAKRKVLQPELTATNIEWIHGCPPPYHTFEE
 PAFVQVQE"
 tRNA complement(8096..8172)
 /product="tRNA-Ser"
 tRNA 8175..8243
 /product="tRNA-Asp"
 gene 8245..8928
 /gene="COII"
 CDS 8245..8928
 /gene="COII"
 /codon_start=1
 /transl_table=2
 /product="cytochrome oxidase subunit II"
 /protein_id="BAB62918.1"
 /db_xref="GI:15208274"
 /translation="MANHSQLGFQDASSPIMEELVEFHDHALMVALAICSLVLYLLTL

MLTQKLSSENTVDAQEVELIWTILPAIVLVLLALPSLQILYMMDEIEEPDLTLKAIGHQ
WYWSYEYTDKDLSDSYMPTTDLDPQGHFRLLLEVDRHIVIPMESPIRIIITADDVLH
SWAVPTLVKTKDAIPGRLNQTFSFITTRPGVFYGCSEICGANHSYMPIVVESTPLKHF
ETWSSLLSS"

tRNA 8930..8997
/product="tRNA-Lys"

gene 8999..9166
/gene="ATPase8"

CDS 8999..9166
/gene="ATPase8"
/codon_start=1
/transl_table=2
/product="ATPase subunit 8"
/protein_id="BAB62919.1"
/db_xref="GI:15208275"
/translation="MPQLNPAPWFMIMLMTWFTYSLLIQPKLLSFTSMNTPSNKTTST
TKPTPWTWPWT"

gene 9157..9840
/gene="ATPase 6"

CDS 9157..9840
/gene="ATPase 6"
/codon_start=1
/transl_table=2
/product="ATPase subunit 6"
/protein_id="BAB62920.1"
/db_xref="GI:15208276"
/translation="MNLFFDQFSSPYLMGMPLILPSLLLPTLLFPTPGRRWISNRLS
TLQLWVINLITKQMLTNKTGHKWALLLTSLLLLLSINLMGLLPYFTPTTQLSMN
MALAFPLWLATLLIGLRNQPSASLAHLLPEGTPTPLIPIIMIIETTSLLIRPLALGVR
LTANLTAGHLLIQLISTATIALLPMPISITLTALILLLLITILEVAVAMIQAYVFLL
LSLYLQENI"

gene 9840..10625
/gene="COIII"

CDS 9840..10625
/gene="COIII"
/note="Protein sequence is in conflict with the conceptual
translation; TGC stop codon"
/codon_start=1
/transl_table=2
/product="cytochrome oxidase subunit III"
/protein_id="BAB62921.1"
/db_xref="GI:15208277"
/translation="MAHQAHSYHMVDPSPWPIFGAITALLTTSGLIMWFHYSIALLT

AGLLSMLLVMIQWRDVVRESTFQGHHTPTVQKGLRYGMILFITSEAFFFLGFFWAF
 HSSLAPTPELGGQWPPTGIKPLNPLEVPLLNNTAILLASGVTVTWAHHSITEGNRKQAI
 HALTLTILGFYFTALQAMEYHEASFSIADSVYGSTFFVATGFHGLHVIIGSSFLTIC
 LLRLIKFHFTSNHHFGFEAAAWYWHFVDIWLFLYMSMYWWGS"

tRNA 10625..10692
 /product="tRNA-Gly"

gene join(10693..10865,10867..11044)
 /gene="ND3"

CDS join(10693..10865,10867..11044)
 /gene="ND3"
 /note="extra one base at position 10866:reading frame
 presumably maintained by translational frameshift or RNA
 editing"
 /codon_start=1
 /transl_table=2
 /product="NADH dehydrogenase subunit 3"
 /protein_id="BAB62922.1"
 /db_xref="GI:15208278"
 /translation="MNTLTFMLSASLILSTLLTTVNFWLAQMPDTEKLSPEYCGFDP
 LGSARLPFSIRFFLVAILFLLFDLEIALLLPLPWAIQLQSPMTTLTWATTILTLTLG
 LIYEWTQGGLEWAE"

tRNA 11046..11114
 /product="tRNA-Arg"

gene 11115..11411
 /gene="ND4L"

CDS 11115..11411
 /gene="ND4L"
 /codon_start=1
 /transl_table=2
 /product="NADH dehydrogenase subunit 4 L"
 /protein_id="BAB62923.1"
 /db_xref="GI:15208279"
 /translation="MSPLHFSFYSAFTFSSLGLAFHRTHLISALLCLEMMLSMFIPL
 SIWSVENQTPSFTIVPILMLAFSACEAGTGLAMLVASTRTHGSDHLHNLNLLQC"

gene 11405..12784
 /gene="ND4"

CDS 11405..12784
 /gene="ND4"
 /note="Protein sequence is in conflict with the conceptual
 translation; TGC stop codon"
 /codon_start=1
 /transl_table=2
 /product="NADH dehydrogenase subunit 4"

```

/protein_id="BAB62924.2"
/db_xref="GI:18693241"
/translation="MLKIILPTIMLLPTLLSPTKSMWTNTTTHSLLIAMISLHWLAP
SYYPLKNLTLWTGNDQISTPLLVLSCWFLPLMIMASQGHLLQHEPHVRKQMFITLIII
QPFIIILAFSTTEILILFYISFEATLIPTLILITRWGNQPERLSAGIYLMFYTLISSLPL
LVTMLFLHSKTGLHLPILKLSYNSPSTSWTLLSSLALLAFMVKAPLYGLHLWLPK
AHVEAPIAGSMLLAALLKLGYGIMRVTLMLNMPNSLYYPFLTLALWGALMTSSIC
LRQTDLKSLLIAYSSVSHMGLVIAASMIQTQWSFSGAMILMISHGLTSSLLFCLANTNY
ERTHSRILILTRGLQPLLPLMSLWLLANLTNMLPPTTNLMAELTIMIALFNWSSPT
IILTGIATLLTASYTYMLLSTQRGTLPSHITTTMNSNTREHLLMVLHIIPMLALILK
PELISGTPL"
tRNA      12783..12851
          /product="tRNA-His"
tRNA      12853..12921
          /product="tRNA-Ser"
tRNA      12923..12993
          /product="tRNA-Leu"
gene      12994..14814
          /gene="ND5"
CDS       12994..14814
          /gene="ND5"
          /codon_start=1
          /transl_table=2
          /product="NADH dehydrogenase subunit 5"
/protein_id="BAB62925.2"
/db_xref="GI:18693242"
/translation="MEMTLLLNTLPTLTLVILLTPIILPPLLKLNPSLISKTVKTA
FMTSLIQTTTFIYSGTDSIITYWEWQFIPNFKIPLTLKMDLYSMFFPIALFVTSIL
EFATWYMASDPFITKFFTHLLTFLIAMLTLTIANNMFLLFVWGEVGVGIMSFLIGWWQ
GRAEANTAALQAMIYNRIGDIGLILSLAWLASTLNTWEIQQTIIHPHQPTPLPLGLIL
AATGKSAQFGLHPWLPAAAMEGPTPVSAALLHSSTMVAGIFLLIRTHPLLASNNTALTA
CLCLGALSTLFAAICALTQNDIKKIIAFSTSSQLGLMMVTIGLDLPQLAFLHISTHAF
FKAMFLCSGLIIHSLNGEQDIRKMGCLQKTLPMTTSCLTIGNLALMGTPFLAGFYSK
DLIENLNTSYINTWALLLLTLLATSFTATYSIRMTTLVQTGHNRSPTITPINENTPLA
ILPIIRLAFGSIAAGLLISSLILPTKTPPMTMPLITKTTAIIITAMGIILALELSTAT
HTMTPPKQNPLMNFSSSLGYFNPLAHRISPTISLYTGQKIASLLIDMTWYKMGPEGL
ANLHLIMTKLTTTHTGLIKSYLGSFALTILATILLIQNK"
gene      14814..15956
          /gene="Cytb"
CDS       14814..15956
          /gene="Cytb"
          /codon_start=1
          /transl_table=2

```

/product="cytochrome b"
 /protein_id="BAB62926.1"
 /db_xref="GI:15208282"
 /translation="MAPNIRKSHPLLKMINNSLIDLTPPNISAWWNFGSLLAMCLIT
 QILTGLLAMHYTADTSLAFSSVAHTCRNVQYGWLIRNLHANGASFFIFICIFLHIGRG
 LYYGSYLYKETWNTGVILLLLTMATAFVGYPVLPWQMSFWGATVITNLFSAVPYIGQT
 LVEWAWGGFSDNPTLTRFFALHFLLPFLIAGITIIHLTFLHESGSNNPLGISSDSK
 IPFHPYYSIKDILGLTLMLTPFLTALFSPNFLGDPENFTPANPLVTPPHIKPEWYFL
 FAYAILRSISNKLGGVLALAASVLIILLIPFLPKSKQRTMTFRPLSQLFWLLVANLL
 ILTWIGSQPVEHPFIIIGQMASLSYFTILLILFPMIGMLENKMLNH"

tRNA 15960..16029

/product="tRNA-Thr"

tRNA complement(16032..16101)

/product="tRNA-Pro"

gene complement(16107..16628)

/gene="ND6"

CDS complement(16107..16628)

/gene="ND6"

/codon_start=1

/transl_table=2

/product="NADH dehydrogenase subunit 6"

/protein_id="BAB62927.1"

/db_xref="GI:15208283"

/translation="MTYFVIFLGVCFMLGTLAVASNPSPYYGVVGLVLASVVGCGWLW
 NLGVSFVSLVLFMIYLGGMVVVYVSVSLAADPYPEAWGSRVVMGYGLGFVLVCMGM
 GLGGFVDFWKIGVTTVDSGGMSFVRLDFGGVAAFYSYGVGLFLVAGWLLLLLVFVVLE
 LVRGLSRGAIRAV"

tRNA complement(16630..16697)

/product="tRNA-Glu"

BASE COUNT 5200 a 5219 c 2197 g 4081 t

ORIGIN

1 aacacttttt ttaacctaac tcccctactt agtgtacccc ccctttcccc cccagggggg
 61 gtatactatg cataatcgtg catacattta tattccacat atactatggt accggttaata
 121 tatattatat acgtactaaa cccattatat gtatacgggc attacatatt gtccccattt
 181 ctccccatgt acattagtgc atgctccaag acataaacca tacgttcacc tagtaataga
 241 ctttccacta acaggacacc ataactatga atgggtgcag gacataaget tactaaatac
 301 ttagctcccc atttggttat gctagacgta ccagatggat ttattgatcg tacacctcac
 361 gagagatcac caaccctgt ctgtaatgct attccgtgac tagcttcagg cccattcttt
 421 cccctacac ccctcgcccc tcttgcctt ttgcgctct ggctcctcgg tcaggacat
 481 cccccgata actcctgaac tttcttactt tttacgaagt catctgtgcg gtatctgccc
 541 ctcttcagtc cgtgatcgcg gcatttcctt tcttctctgc tgttggttct tcttctcttt
 601 ggggcttctt cacaggttgc ccttcacagt gccgtcgcca gagtctact caagtgaagc
 661 ctggactact cctgcgttgc gtcctatcct agacctctag tgtccctcga tgatacggtt

721 tgcgtgtatt gggatcatt ttgacactga tgcactttgg atcgcattgg gttatggctc
781 ttccaccccc cccgataatg gtgctatata gggaatgctt gccggacata tttttaccaa
841 ttttcacttc ctctatTTTT ctaacaaaac tagggagttt tcccaaattt tttttgttgg
901 tttggttaat ttttttttg ttttttaaaa acatttttta aaaaactaaa ttacatacaa
961 actcaccgca caaataccct caaaccacaa aaacgtttta cgtttagtat atatacattg
1021 ttacgtttat ataattatta gagaaactcc actaccgaaa caaacataaa aacaaacaaa
1081 actattccgc ataaacttcc acaaacatat attatttata ttgttaatta caatcaattt
1141 ttattcccct agaaagccca catagcttaa cacaaagcat ggcactgaag atgccaaagc
1201 ggtacacaga ttacctgtgg acaaaagact cagtcctaac cttactattg gtttttgcta
1261 gacatataca tgcaagtatc cgcatcccag tgagaatgcc ccacaaacct ttatcttcca
1321 aagcaaaagg agcaggatc aggcgcactt taatagttag cccaaaacgc cttgttcaag
1381 ccacaccccc acgggtattc agcagtaatt qacattaagc aataagtgtg aacttgactt
1441 agccatagca agaccacagg gttggtaa at cttgtgccag ccaccgcggt cacacaagaa
1501 gccc aaatca atagccatcc ggcgtaaaga gtggccacat gttatcttca ttaactaaga
1561 tcaaaatgga accaagctgt cataagccca ggatccacct aagcccaaca taaaaacct
1621 cttagccaca tgatcaattt caatccacga aagccagggc acaaactggg attagatacc
1681 ccactatgcc tagccctaaa tctagatacc cacatactta tgtatccgcc tgagaactac
1741 gagcacaaac gcttaaaact ctaaggactt ggcggtgccc caaaccacc tagaggagcc
1801 tgttctataa ccgataatcc acgatctacc caaccacccc ttgccaacac agcctacata
1861 ccgccgtcgc cagcccacct taatgaaaga acaacagtga gctcaatagc cgccactaat
1921 aagacaggtc aaggtatagc ctatgggatg gaagaaatgg gctacattt ctaaaataga
1981 acaaacgaaa aaggacatga aacctggtcc ttggaaggag gatttagcag taaaatggga
2041 tcactttgcc cactttaaga tggccctgag gcacgtacat accgccgctc accctcttca
2101 aaagctacta ataccgataa ataacacca accattaagc caaagacgag gtaagtcgta
2161 acaaggtaag tgtaccgga ggtgcactta gaccaccaag gcgtagctat aagctccaaa
2221 gcattcagct tacacctgaa agatgcccc aataagggtc gccttgattt gccctacctc
2281 tagcccaacc acaaatctt caaaaaatcc aaaatcacct cacacagttt aattaaaaca
2341 tttaatctta tcctagtata ggcgatagaa ccgacccgag gcgcaataga gaccaaccgt
2401 accgtaaggg aaagatgaaa taacaatgaa aaacacaagc aaaaagcagt aaagacaac
2461 ccttgtaact cttgcatcat gatttagcaa gaacaacca gcaaagcgga ctaaagcttg
2521 ccttcccgaa acccaagcga gctacttgcg agcagctaaa attgagcgaa cccgtctctg
2581 tcgcaaaaga gtgggatgac tcgctagtag aggtgaaaag ccaaccgagc tgggtgatag
2641 ctggttacct gccaaacgaa tctaagttcc cccttaatct ctccctaaag gataccacaa
2701 tttaaccccc ttatgtaaag attaagaaca attcgacgga ggtacagctc catcgaaaaa
2761 gaatacaacc tccccagcg gataaactaa cactacctc cctctctccg tgggccttca
2821 agcagccatc acaaaaagag tgcgtcaaag ctctctact aaaaatccag atactaattt
2881 gattccctca tccaaagcag gtcaacctat gacaatagaa gaatcaatgc taaaatgagt
2941 aacttggaac ctctctctac acagcgtaga cttacatcaa cacattatta acagacctaa
3001 cttatactca caccacaaca agaactcata tgtctatgat ctgttagccc aactcaggaa
3061 cgcccacaag atgattaana tccgaaaag gaattcggca aaccaagac ccgactgttt
3121 cccaaaaaca tagcctttag caatcaaca gtattgaagg tgacgcctgc ccagtgacct
3181 gcaacgttca acggccgagg tctcctaacc gtgcaaagg agcgcfaatca attgtcccat
3241 aaatcgagac ttgtatgaat ggctaaacga ggtcttaact gtctcctgca gataatcagt

3301 gaaattagta tcctcgtgca aaaacgagaa tgtgaccata agacgagaag accctgtgga
3361 actttaaanaat cacgaccacc cttataatta cattcacccc accgggcaca tccacactaa
3421 cacccttggc cgacatTTTT cggttggggc gaccttggag aaaaacaaaa cctccaaaat
3481 tacagaccac acctcttaac caagatccac ccatcaaagt cctaacagta actagaccca
3541 atataattga ttaatggacc aagctacccc agggataaca gcgcaatctc ctccaagagc
3601 ccctatcgac aaggagggtt acgacctcga tgttggatca ggacaaccta atggtgtagc
3661 cgctattaag ggttcgttt ttcaacgatt aacagtccta cgtgatctga gttcagaccg
3721 gagtaatcca ggtcggtttc tatctatgaa cacactcctc ctagtacgaa aggaccggag
3781 aagtagggtc aataccacaa gcacacccta accttccaag caatgaactc aacttaattg
3841 ccaagaagct caccatccac ttacactcct agaaaaggaa cagctagcgt ggagagcgtt
3901 ggtaaatgca aaaggcttaa gccctttatc cagaggttca aatcctctcc ctagctcccc
3961 aaacatgacc ctatcaacc taacaagtct cataatcata accctatcct atataattcc
4021 aatccttatt gccgtggcct ttttaacact tgtagaacga aaaatcctaa gctacatata
4081 ggcccgaaag ggcccaata ttgtgggcc ttttggctca ctccaaccca ttgcagaccg
4141 ggtaaaactc tttatcaaa aaccatccg cccatctacc tcatccccgt ttctatttat
4201 cctaaccaca atcctagcct tactactagc cctcaccatc tgaaccctc tcccactacc
4261 tttcccata acagacctaa acctaggact actattctta ctagctatat ccagcctaac
4321 cgtctactcc ctctctgat cagggtgagc ttcaaaactc aaatacggcc taatcgggtc
4381 cctacgagct gtcgctcaaa caatctcata tgaagtcacc ctagccatca tcctattatc
4441 tacaatcata ttaagcggaa actatactct aagcacccta tccatcacc aagaaccaat
4501 ataccttacc ttctctcat gacccttac aataatgtga tacatctcca ctctcgccga
4561 aaccaaccgt gcccttttg atctactga aggagaatcg gagcttgttt caggttttaa
4621 cgtagaatac gctgccggac catcgcctc attttttcta gctgaatacg ccaacattat
4681 gtaataaat aactaaacca tcacctatt cctaaaccca agcttctga gccccctc
4741 agaactattc tetattacac tcgccactaa agtctactt ctctcatctt cattcttatg
4801 aatccgagct tcataccac gattccgcta tgatcaacta atacatctc tatgaaaaa
4861 tttcctacc ctaaccctag ccatatgtct ctgacatacc agcataccta tcagctatgc
4921 cggccttccc ccagcttaag gaagcgtgcc tgaacaaaag ggccactatg ataaagtggg
4981 catagaggta aaacaacct ctgcctcct aaaccttaga aaagtaggaa ttgaacctac
5041 acgaaagaga tcaaaactct tcatacttcc cttatattat tttctagtaa ggtcagctaa
5101 tcaagctatc ggcccatc cccgaaaatg atggtttaaa tccttccctc actaatgaat
5161 ccccatgcaa aactaatctc tatcataagc ctagccctag ggaccagtat cacaatctct
5221 agcaaccatt gaatcttagc ctgaacaggc ctagaatca ataccctagc catcatccca
5281 ctaatctcaa aatcacacca cctcggagca atcgaagcag caatcaata ctctcctaac
5341 caatcaaccg catccgcct aatcctctc tcaagcataa acaacgcctg atctactggc
5401 caatgagaca ttacacaact taaccacccc acatcctgcc taatcctaac aatagccatt
5461 gcaatcaaac taggtctagt tccattccac ttctgattcc ctgaagtcct tcaaggctcc
5521 tccctaatac cagccctct actctctacc ctaataaac tcccccaat aaccttctc
5581 ctcataacat cccaatcct taacctgcc ctctcactc tactagcagt ttctccgca
5641 ttagttggag gctgaatagg cctaaaccaa acacaaacac gaaaaatcct agccttctca
5701 tccatctccc acctaggatg aataatcgtg attattattt acaacccaaa actcaccatc
5761 ctaaccttca tcatctactc attaataaca tccactgtat tcctatctct ctgcaaatc
5821 aaagtcctaa aactgtcaac aatactcatc tcctgaacaa aaacccaat actaaattca

5881 accattatag ttaccctcct ctccctagca ggccctccac cactaaccgg tttcatgcca
5941 aatgactca ttatccaaga acttactaaa caagaaataa ccccagtagc tacaaccatt
6001 gcaatattat cattacttgg ctattcttc tatctcggcc ttgcatacca ttcaacaate
6061 acacttccac ctaactcatc taacatata aaactctgac gcatcaacac aacaccaaac
6121 acccccaccg ctatcctaac cgtcctatca atctctttac tccccctctc tcccctaate
6181 actactttag tttagaaact taggattaat tgcacttaaa ccaaaggcct tcaagcctt
6241 aaataagagt tgaacctct tagtttctgc taattaagat ctacagggca ctaacctgta
6301 tctttctgaat gcaaacaga cactttaatt aagctaagac ctcccctaga cagatgggct
6361 tcgatcccat atcattctag ttaacagcta gacgccataa cccattagct tctgtctaag
6421 accccggcat gctttaacat acatcaatga gcttgcaact caccatgaac ttaccacag
6481 ggccgataag aagaggaatt gaacctctgt aaaaaggact acagcctaac gccttgacac
6541 tcggccatct tacctgtgac ctcatcaac cgatgactat tttcaactaa ccacaaagac
6601 attggcactc tttatcttat ttttggtaca tgagcaggca tagccggtag agcacttagc
6661 ttgttaatcc gcgcagaact aggacaacca ggcaccctcc taggagatga ccaaatttac
6721 aatgtaattg tcacagcaca tgccttcgtc ataatcttct ttatagtcac accaattata
6781 attggaggct tcggaattg actcgtcca cttataatcg gagccccaga catagcattc
6841 ccacgtatga ataacataag cttctgactc ctcccacct cttcctgct gctactagct
6901 tcttccaccg ttgaagctgg tgccgtaca ggatgaactg tctaccgcc cctagccggc
6961 aacctcgccc acgcccggac atcagtagat ctagccatct tctccctaca tttagcagg
7021 gtatcatcaa tcctaggagc catcaacttt atcaccacta ttatcaatat aaaacccct
7081 gcactgtcac aataccaaac acccctattt gttgatcag tcctcatcac cgctatctta
7141 ctctactct cctcccagt cctagctgct ggcattacta tacttctaac tgatcgaac
7201 ctcaacta cttctttga ccctgcagga ggaggagacc ccatcctgta tcaactta
7261 ttttgattct ttggacacc agaagtctac atcctcatcc tcccaggctt cggatcact
7321 tcccacgtag tagcctacta cgcagggaaa aaagaacct tcggctatat aggaatagtg
7381 tgagcaatat tatcaatcgg attcctagga ttcacgtat gagcccacca tatattcaca
7441 gtaggaatag acgtagatac acgagcctac ttacatcag ctacaataat cattgccatc
7501 ccaaccggt tcaaagttt cagctgacta gcaaccctac acggaggaac aatcaaatga
7561 gatccgccc tactatgagc cctcggattc atcttctat tcaccatcgg aggactaaca
7621 gggatcgttc ttgccaattc atcacttgac atcgccctcc atgacaccta ttacgtagtc
7681 gccacttcc actacgtcct atccatagga gcagtctttg ctattttagc aggattcacc
7741 cactgattcc cactattcac aggcttcacc cttcatccta catgaactaa ggcacacttt
7801 ggagtaatgt tcacaggagt caacctaac ttcttccac agcacttctt aggcctagct
7861 ggtatacccc gacgatactc agactaccca gatgcctaca cactttgaaa cacactatcc
7921 tcaatcggct ccttaatctc aataacagcc gtaatcatac taatgtttat tgtatgagaa
7981 gccttctcag caaacgtaa agttcttcag ccagaattaa ctgctaccaa catcgaatga
8041 atccacggct gccaccccc ataccacacc ttgaagaac ctgccttctt ccaagtacaa
8101 gaaaggaagg aattgaacct tcacatgctg gtttcaagcc aaccgatca aaccatttaa
8161 tgcttcttct ttatgagagc tttagtaaac aattacatag acctgtcaag actaatcac
8221 aggtaaaact cctgtacatc tcatatggca aaccactccc aactaggatt ccaagatgcc
8281 tcactcctca tcatagaaga actttagtaa tttcatgacc atgccctaat agtagcacta
8341 gcaatctgca gcctagtact ctacctgcta accctcatac ttaccacaaa actctcatca
8401 aacaccgtag atgccaaga agtagaacta atctgaacaa tctcccagc tctcgtccta

8461 gtcctactcg cctcccatc actccaaatc ctctatataa tagacgaat tgaagagcca
8521 gaccttacc taaaagccat tggacatcaa tgatattgat cctacgagta cactgacttc
8581 aaagatctat catttgactc ctatataact ccaacaacgg atctaccaca aggccattht
8641 cgcctactag aagtagacca cgcattgta attccaatag aatcccccat ccgaattatc
8701 atcaccgccc atgacgtcct tcaactctga gctgtaccaa ccttaggggt aaaaacagac
8761 gccattccag gacgactaaa ccaaacctcc ttcacacca ctcgaccagg agtattctac
8821 gggcagtget cagaaatctg cggagctaac cacagctaca tacctattgt agtagaatcc
8881 acccctetta aacacttcca aactgatcc tccctctat catcttaacc gtaagaage
8941 tatgaaccag cactagcctt ttaagctaga gagaggggat gccctcccc ttaatgatat
9001 gccacaacta aaccagcac catgattcat aattatacta ataacctgat ttacctactc
9061 actactcatt caacctaaac tactatcatt caattccata aacacccctc cgaacaaaa
9121 aacatcaaca acaaaccta cccatgaac ctgaccatga acctaagctt ctttgatcaa
9181 ttctccagcc cctacctcat aggaatacca ctaatcctcc cctccctcct actccctact
9241 ctctctttc caacaccagg acgccgatga attagcaatc gcctctcaac cctccaactc
9301 tgggtcatta atctaattac aaaacaacta ataaccccc taaacaaaac aggccacaaa
9361 tgagccctac tactaacctc cctcactctg ctgttactgt ccattaacct aataggcctt
9421 ctccatata cctcaccctc tactacccaa ctatcaatga acatagcctt agccttcccg
9481 ctatgattag ccaccctact aatcggccta cgaaaccaac catccgcctc cctagctcac
9541 ctctcccag aaggaacccc cacaccacta atcccaatct taatcataat tgaacaaccc
9601 agtctactta tccgaccatt agccctagga gtccgcctaa cagcaaacct aacagctggc
9661 cacctactca ttcaacttat ctccacagct acaatcgccc tattaccaac aataccatcc
9721 atctccacc ttacagcact catcctactc ctactacca tcctagaagt agcagtagcc
9781 ataatccaag cctatgtatt cgtccttctt ttaagcctat acttacaaga aacatctaa
9841 tggcacacca agcacactcc taccacatag tcgatccaag cccatgacca attttcggcg
9901 caattacagc cctacttact acctccggcc taattatgtg attccactat aactctattg
9961 ccttactgac agcaggccta cttccatac tcctagtaat aattcaatga tgacgcgacg
10021 tagtccgaga aagcaccttc caaggacacc acaccccaac cgtgcaaaaa ggactgcat
10081 acggaataat cttttttatt acatcagaag cttcttctt cttaggcttc ttctgagcat
10141 tcttccactc aagcctagcc ccaacacctg aactcggagg acaatgacc ccaacaggaa
10201 tcaaacactt aatccccctc gaagtacccc tactaaacac tgcaatccta ctagcctcag
10261 gcgttaccgt aacatgagct caccatagta ttacagaagg aaaccgaaaa caagccatc
10321 acgcaactaa ccttaccatc cttctaggat tctacttca tgccctcaa gcaatagaat
10381 accacgaagc ttcatctca atcgccgata gtgtttacgg ctccactttc tttgtcgcca
10441 caggattcca cgtctacac gtaatcattg ggtcctcctt tctaacaatc tgcttactac
10501 gactaatcaa attccacttt acatccaacc atcaactcgg attcgaagca gcagcttgat
10561 actggcactt cgtagacatc atctgactct tcctttatat atccatgtac tgatgaggat
10621 cttgctcttc tagtatatta attacaactg acttccaatc tttaaaatct ggtaataacc
10681 cagagaagag caatgaacac acttacattt atgttatccg catcccttat tctaagcacc
10741 ctctaacaa ctgtaaacct ctgacttgc caaataaccc cagacacaga aaaaactatca
10801 ccatacgaat gcggatttga tccactagga tcagcccagc ttccattctc aatccgatcc
10861 ttctcagta gccatcctat tcctctatt cgacctagaa atcgccctac tactccctt
10921 accatgagcc atccaactcc aatcccccat gacaacccct acctgagcca ccacaactct
10981 taccctcctc acgctaggcc tcatttacga atgaaccaa ggcggcctag aatgagcaga

11041 ataacagaaa gttagtctaa ctaagacagc tggtttcggc ccagcaaatt atagccaaca
11101 cctataactt tctcatgtct cccctacact tcagcttcta ctcagcattc acattcagca
11161 gcttaggatt agcattccac cgtacacatc tcattctcgc cctactctgc ctagaagca
11221 taatactate catattcacc cccctttcaa tttgatcagt agaaaaccaa actccatcct
11281 tcaccatcgt acctatccta atactagcct tctctgcatg cgaagccggc acaggcctag
11341 caatactagt agcctccaca cgaacacacg gctccgacca tctacataac ctcaacctgt
11401 tacaatgcta aaaattatth taccacaat cataacta ccaacaacce tctatctcc
11461 cacaaaatcc atatgaacta acaccacaac ccatagtctc ctaatcgcca taatcagcct
11521 acactgacta gccccatcct actaccccct aaaaaaccta accctctgaa caggaaacga
11581 ccaaatctca actccactac tagtcccttc ctgctggttt ctcccactca taatcatggc
11641 cagccaaggc caccttcaac acgaaccca tgtacgaaa caaatattta tcacaacctc
11701 aattatcatt caaccattta tcactctagc attctcaaca acagaactca tcttattcta
11761 catctcattt gaagcaacce tcactccaac tctaactccta atcacacgat gaggaaacca
11821 accagaacga ttaagcgcag gcatttacct aatattttat accctaatta gctcactccc
11881 cctgctagta accatactct tccttcactc aaaaaccgga acccttcatc taccatcct
11941 aaaactctct tactccaacc cctcaacttc atgaacaacc ctactatcca gcctggccct
12001 cctcctagca tttatagtea aagcaccact atatggccta cacctatgat taccaaaagc
12061 ccatgtagaa gcaccatcgc ccggctcaat actactagcc gccctacttc ttaaactagg
12121 aggctatggc attatagcag ttacttact aataaacca ataccaaatt cactttacta
12181 cccattcctc accctagcct tatgagggtc tttataaact agctccatct gcttacgcca
12241 aacagaccta aatccctca ttgcctactc atctgtaagc cacataggcc tagtaattgc
12301 tgccagcata atccaaacce aatgatcatt ctcaggggca ataattctta taatctccca
12361 tggacttacc tcctccctcc tattctgttt agcaaacaca aactacgaac gaacacatag
12421 ccgtatctc atcctcacac gaggcctaca accactccta cccctaatat ccctatgatg
12481 actcctagcc aacctaacta acatagcctc tcccccaaca accaacttaa tagcagaatt
12541 aacaattata atcgcctctc tcaactgatc ctccccaca attatcctaa ccggaattgc
12601 cacactctta accgcctcct acaccctata catactccta tccacceaac gaggcacctc
12661 accatcccaac atcacaacaa ccataaactc aaacacacga gaacacctcc tcatggctct
12721 ccatatcatt ccataactcg ccctaactcct aaagccagaa ctaatctcag gaactccttt
12781 atgcaagcat agtttaacce aaacattaga ttgtgattct aaaaatagga gtttaaatct
12841 ccttgcctgc cgagggggagg gcaacccaaa ccagcaagaa ctgctaattc atgcatccga
12901 gcctaaaacc tcggccccct taacttttaa aggataaaag taatccattg gtcttaggaa
12961 ccaactatct tggtgcaaat ccaagtaaaa gtaatggaga taacactact cctaaatacc
13021 ctacacacat taacacttgt tatcctcctt acccccatta tccttcccc cctacttaaa
13081 ctaaaaaact ccccatcact aatctccaaa accgttaaaa ccgccttcat aactagtctc
13141 atccaaacaa ccaccttcat ttactcaggc acagacagca tcattaccta ctgagaatga
13201 caattcattc caaacttcaa aatcccacta accctcaaaa tagacttata ttccataata
13261 tttttcccaa tcgcattatt tgtaacatga tcaatcctag aatttgcaac atgatacata
13321 gcctctgacc cattcatcac gaaattcttt acccaacctc tcaccttct catcgcata
13381 ctaaacacta caattgcaaa caacatattc ctctattctg taggctgaga aggagtagga
13441 attatatcat tcctcctcat tggctgatga caaggacgag ccgaagccaa cacagccgcc
13501 cttcaagcca taatctataa ccgaattgga gacatcggtc tgatcctaag cctagcatga
13561 ctagecctca cattaaacac atgagaatc caacaaacta ttcacccca ccaaacacca

13621 actcttcccc tccttggcct aatcctagcc gccacaggaa aatcagccca atttggcctg
13681 cacccttgac tccccgcagc aatagaaggc ccaactccag tatccgcctt actccactca
13741 agcacaatag tagtagctgg aatcttctc ctcacccgaa cccacccctt actagcctca
13801 aacaataccg ccctaaccgc atgcctatgc ttaggagcac tatcaaccct tttcgccgct
13861 atctgtgcac tcaccdaaaa cgacatcaaa aaaatcatcg ctttctccac ttcaagtcag
13921 ctaggcctca tgatagtccac catcggactt gaccttccac aattagcatt cctccacatc
13981 tccaccatg ctttctttaa agcaatacta ttcctatgct ccggactaat cattcacagc
14041 ctaaatggcg aacaggacat tcgaaaaata ggatgcctac aaaaaaccct cccaataacc
14101 acctcctgcc taaccatcgg taacctcggc ctaataggca cacccttctt agcaggcttt
14161 tactcaaaag acctcatcat tgaaaactta aacacctcat acatcaacac ctgagcccta
14221 ctactgacac tcctcggcac atcttttacc gcaacctaca gtatccgcat aaccaccctc
14281 gtccaaacag gacacaaccg ctccccaaca atcactccaa tcaacgaaaa caccctcta
14341 gccattctcc caattatccg actagcattc ggcagcatcg cagcgggctt actaatctca
14401 tcccttatcc tcctacaaa aacaccccca ataactatac cacttatcac aaaaaccacc
14461 gccatcatta tcacagccat aggaatcatt ctgcacctag aactctcaac cgcaaccac
14521 accataacc caccataaca aaacccctc ataaacttct cctcctcatt aggctacttt
14581 aacccctag cccatcgaat cagcccccaca atctcactct acaccggaca aaaaatcgcc
14641 tcacttctaa tcgacataac atggtacaaa aaaataggcc cagaaggact cgctaacct
14701 cacctcatca taaccaaaac ctaactaca acccatacag gcttaataca atcataccta
14761 ggatcctttg cctcacaat cctagcaaca atcctactaa tccagaacaa ataatggcac
14821 ccaacattcg caagtcacat cccttactaa aaataatcaa taactcacta atcgacctt
14881 ccaactcccc aaacatctcc gcctgatgaa acttcggctc cctactagca atatgcctca
14941 tcacccaaat cctcaccggc cttctactag ccatacacta caccgcagac acctccctag
15001 ccttctcttc cgtagccac acatgctgaa acgtacagta cggctgactc attcgcaatc
15061 tccatgcaaa cggcgcacatc ttcttctca tctgcatctt cctccacatc ggacgaggcc
15121 tatattacgg ctctacctt tacaagaaa cctgaaacac aggagtaate ctgcttctca
15181 cactaatagc cactgcttcc gtaggatac gtttaccatg aggccaaata tccttctgag
15241 gtgctaccgt catcacaaac ctattctcag ctgtacccta catcggccaa acctagtag
15301 aatgagcctg aggaggcttt tcagttgaca atcctaccct aaccgatte ttcgccctcc
15361 acttctctct cccattctta atcgcaggaa tcaactatcat ccacctcaca ttcctacagc
15421 aatcaggctc aaataaccca ttaggaatct catctgactc tgataaaatc ccattccacc
15481 catactactc tatcaagat atcctaggac taacactgat acttacccca ttcctcacc
15541 tagccctatt ttcccaaac tttttagggtg acccagaaaa ctttactcca gccaaccccc
15601 tagtaacccc tccacacatt aaacccgaat ggtacttcct atttgettac gccatcctac
15661 gctcaatttc aaataagcta ggagcgctac ttgcccttgc agcctcagta cttatcctcc
15721 ttetaatccc ctctctcccc aaatetaaac aacgaacct aacattccgc caacttctcc
15781 aaacctatt ctgacttcta gtagcaaac tactaatcct aacctgaatc ggaagccaac
15841 cagtagaaca cccattcacc atcctcggcc aatagcacc cctctcctac ttcactatcc
15901 tactcactct cttccccata attggaatc tagaaaacaa aataactaat cactaaaata
15961 ctetaatagt ttaacacaaa acattggtct tgtaaaccac aaactgaaga cttcgccctt
16021 cttagagtaa ctcagaaga ggggatttaa accccatcc ccagctcca aagctggtat
16081 ttttaataa actaccttct gaaacccta actgcccga tgcaccccg agataaccg
16141 cgcacaagct ccaacacaac aaacaaaacc aacaacaaac cccaccagc taccaaaaac

16201 aaccgccccc catatgaata aaacgctgct accccaccaa aatccaaccg aacaaaagac
16261 atccccccac tatcaactgt agtcacacca atctttcaaa aatcaacaaa cccccctaaa
16321 cccattceca tacaactac caaaacaaaa cctaaccat accccatcac cegtcaactt
16381 cccaagcct ctgggtacgg atccgcagct aaagaaacag aatacacaaa aaccaccaac
16441 atcccccta aataatcat aaacaacacc aaagaacaa aagaacccc taaattcacc
16501 aaccaccac accctaccac agacgctaac accaacccca ccaccata atacggcgaa
16561 ggattagacg ctacagccaa agtcccaac atgaacaaa ctctaaaaa aatcacaaa
16621 taagtcatat attccgctt ggatagacc caaggactac ggcttgaaaa gccattgtg
16681 ttatcaacta cggaac

//

Appendix 2-2. complete mtDNA annotations and sequence of *Coturnix chinensis* (blue-breasted quail)

LOCUS AB073301 16687 bp DNA circular VRT 25-FEB-2003
DEFINITION *Coturnix chinensis* mitochondrial DNA, complete genome.
ACCESSION AB073301
VERSION AB073301.1 GI:28556848
KEYWORDS .
SOURCE mitochondrion *Coturnix chinensis*
ORGANISM *Coturnix chinensis*
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Archosauria; Aves; Neognathae; Galliformes; Phasianidae;
Phasianinae; *Coturnix*.
REFERENCE 1
AUTHORS Nishibori,M., Tsudzuki,M., Hayashi,T., Yamamoto,Y. and Yasue,H.
TITLE blue-breasted quail complete mitochondrial genome
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 16687)
AUTHORS Nishibori,M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (18-OCT-2001) Masahide Nishibori, Hiroshima University,
Fac.of Applied Biological Science; Kagamiyama 1-4-4,,
Higashi-hiroshima, Hiroshima 739-8528, Japan
(E-mail:nishibo@hiroshima-u.ac.jp,
URL:http://homepage2.nifty.com/nishibo/index.html,
Tel:81-824-24-7992, Fax:81-824-22-7067)
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..16687
/organism="Coturnix chinensis"
/organelle="mitochondrion"
/db_xref="taxon:46218"
/tissue_type="liver"
/dev_stage="adult"
/note="synonym:Excalfactoria chinensis"
D-loop 1..1150
/note="control region"
tRNA 1151..1217
/product="tRNA-Phe"
rRNA 1218..2190
/product="12S ribosomal RNA"
tRNA 2191..2262
/product="tRNA-Val"
rRNA 2263..3869

/product="16S ribosomal RNA"
 tRNA 3870..3943
 /product="tRNA-Leu"
 gene 3953..4927
 /gene="ND1"
 CDS 3953..4927
 /gene="ND1"
 /codon_start=1
 /transl_table=2
 /product="NADH dehydrogenase subunit 1"
 /protein_id="BAC57500.1"
 /db_xref="GI:28556849"
 /translation="MTPLTLMNLMIMTLSYIIPILIAVAFLLVERKILSYMQRKGP
 NIVGPFGLLQPIADGVKLFIKEPIRSTSSPFLFIMTPILALLLALTIWIPLPLPFPM
 ADLNLGLLFLAMSSLTVYSLWGSWASNSKYALIGALRAVAQTISYEVTLAIILLST
 IMLSGNYTLSTLSITQEPYILIFSSWPLAMMWYISTLAETNRAPFDLTEGESELVSGF
 NVEYAAGPFALFFLAEYANIMLNTLTITLFLNPSFLNLPSELSITLTKVLLSSS
 FLWVRASYPRFRYDQLMHLLWKNFLPLTLALCLWHTSMPISYAGLPPA"
 tRNA 4928..4998
 /product="tRNA-Ile"
 tRNA complement(5004..5075)
 /product="tRNA-Gln"
 tRNA 5075..5143
 /product="tRNA-Met"
 gene 5144..6184
 /gene="ND2"
 CDS 5144..6184
 /gene="ND2"
 /codon_start=1
 /transl_table=2
 /product="NADH dehydrogenase subunit 2"
 /protein_id="BAC57501.1"
 /db_xref="GI:28556850"
 /translation="MNPHAKLISAMSLTIGTSITISSNHVLAWTGLEINTLAIPLI
 SKSHHPRAIEAAIKYFLTQSTASALILFSSMNNSWFTGQWDITQLNHPTSCLILTMAI
 AIKLGVPFHFVPEVLQGSLLTALLLSTLLKLPMTLLIMTSQSLNPTLLTLLAIL
 SALVGGWMLNQTQTRKILAFSSISHLGWMIAIISYNPKLTILTFIIYTLMTSTVFLS
 LSQTKVLKLSMLISWTKPMLNSTIMLTL LSLAGLPPLTGFMKWLIIQELTKQELT
 PMATIIAMLSLLGLFFYLRLAYHSTITLPPNSSNHMKLWRTYSPPTSTAILTVLSTS
 LLPLSPLIITMI"
 tRNA 6183..6258
 /product="tRNA-Trp"
 tRNA complement(6265..6333)

```

        /product="tRNA-Ala"
tRNA      complement(6336..6408)
        /product="tRNA-Asn"
tRNA      complement(6411..6476)
        /product="tRNA-Cys"
tRNA      complement(6476..6549)
        /product="tRNA-Tyr"
gene      6548..8098
        /gene="COI"
CDS       6548..8098
        /gene="COI"
        /codon_start=1
        /transl_table=2
        /product="cytochrome oxidase subunit I"
        /protein_id="BAC57502.1"
        /db_xref="GI:28556851"
        /translation="MTLINRWLFSTNHKDIGTLYLIFGTWAGMAGTALSLLIRAELGQ
PGTLLGDDQIYNVIVTAHAFVMIFFMVMPIIMIGGFGNWLVPLMIGAPDMAFPRMNMS
FWLLPPSFLLLASSTVEAGAGTGWTVYPPLAGNLAHAGASVDLAI FSLHLAGVSSIL
GAINFITTIINMKPPALSQYQTPLFVWSVLITAILLLL SLPVLAAGITMLLTDRLNLT
TFFDPAGGGDPVLYQHLFWFFGHPEVYILILPGFGIISHVVAYYAGKKEPFGYMGMVW
AMLSIGFLGFIVWAHMFVGMVDVTRAYFTSATMIIAIP TGIKVFSWLATLHGGTIK
WDPMLWALGFIFLFTIGLGTGIVLANSSLDIALHDTYVVAHFHYVLSMGAVFAILA
GFTHWFLFTGFTLHPTWTKAHFGVMFTGVNLTFFPQHFLGLAGMPRRYSYDPDAYTL
WNTLSSIGSLISMTAVIMLMFIVWEAFSAKRKVLQPELTATNIEWIHGCPPPYHTFEE
PAFVQVQE"
tRNA      complement(8090..8164)
        /product="tRNA-Ser"
tRNA      8167..8236
        /product="tRNA-Asp"
gene      8238..8921
        /gene="COII"
CDS       8238..8921
        /gene="COII"
        /codon_start=1
        /transl_table=2
        /product="cytochrome oxidase subunit II"
        /protein_id="BAC57503.1"
        /db_xref="GI:28556852"
        /translation="MANHSQLGFQDASSPIMEELVEFHDHALMVALAICSLVLYLLTL
MLTQKLSNSTVDAQEVELIWTILPAIVLVLLALPSLQILYMMDEIEEPDLTLKAIGHQ
WYWSYEYDFKDLSDFSYMTPTDLPQGHFRLLLEVDRVVPIMESPIRMIITADDVLH
SWAVPALGVKTD AIPGRLNQTAFITTRPGVFYGCSEICGANHSYMPIVVESTPLEHF

```

EAWSSLLSS"
 tRNA 8923..8990
 /product="tRNA-Lys"
 gene 8992..9159
 /gene="ATPase 8"
 CDS 8992..9159
 /gene="ATPase 8"
 /codon_start=1
 /transl_table=2
 /product="ATPase subunit 8"
 /protein_id="BAC57504.1"
 /db_xref="GI:28556853"
 /translation="MPQLNPAPWFTIMLMTWLTFSLLIQKLLSFISTNNPSNKTTAT
 TKPTPWTWPWI"
 gene 9150..9833
 /gene="ATPase 6"
 CDS 9150..9833
 /gene="ATPase 6"
 /codon_start=1
 /transl_table=2
 /product="ATPase subunit 6"
 /protein_id="BAC57505.1"
 /db_xref="GI:28556854"
 /translation="MNLSFFDQFSSPYLMGIPLILPSLLLPTLLFPTPGRRWLTNRLS
 TLQLWMINLVTKQLMAPLNKAGHKWALLTSLILMLLSINLMGLLPYFTPTTQLSMN
 MALAFPLWLATLLIGLRNQPSASLAHLLPEGTPTPLIPIILIMIETTSLLIRPLALGVR
 LTANLTAGHLLIQLISTATIALMPMPSISTLTALILLLLITILEVAVAMIQAYVFVLL
 LSLYLQENI"
 gene 9833..10617
 /gene="COIII"
 CDS 9833..10617
 /gene="COIII"
 /note="TAA stop codon is completed by the addition of 3' A
 residues to the mRNA"
 /codon_start=1
 /transl_except=(pos:10616..10617,aa:TERM)
 /transl_table=2
 /product="cytochrome oxidase subunit III"
 /protein_id="BAC57506.1"
 /db_xref="GI:28556855"
 /translation="MAHQAHSYHMVDPSWPWIFGAIALLTTSGLVMWFHYNSTLLL
 TGLLSMILVMLQWWRDVVRESTFQGHHTPTVQKGLRYGMILFITSEAFFLGFVFAFF
 HSSLAPPELGGQWPPTGIKPLNPLEVPLLNNTAILLASGVTVTWAHHSITEGNRKQAT

```

                                HALTLTILLGFYFTALQAMEYHEASFSIADSVYGSTFFVATGFHGLHVIIGSSFLTVC
                                LLRLIKFHFTSNHHFGFEAAAWYWHFVDIWLFLYMSMYWWS"
tRNA      10618..10685
          /product="tRNA-Gly"
gene      join(10686..10858,10860..11037)
          /gene="ND3"
CDS       join(10686..10858,10860..11037)
          /gene="ND3"
          /note="extra one base at position 10859:reading frame
          presumably maintained by translational frameshift or RNA
          editing"
          /codon_start=1
          /transl_table=2
          /product="NADH dehydrogenase subunit 3"
          /protein_id="BAC57507.1"
          /db_xref="GI:28556856"
          /translation="MNTLTFMLSVSFVLSTLLTTINFWLAQMAPDTEKLSPYECGFDP
          LGSARLPFSIRFFLVAILFLLFDLEIALLLPLPWAIQLQSPMTTLTWATTILTLTLG
          LIYEWTQGGLEWAE"
tRNA      11039..11107
          /product="tRNA-Arg"
gene      11108..11404
          /gene="ND4L"
CDS       11108..11404
          /gene="ND4L"
          /codon_start=1
          /transl_table=2
          /product="NADH dehydrogenase subunit 4 L"
          /protein_id="BAC57508.1"
          /db_xref="GI:28556857"
          /translation="MSPLHFSFYSAFTFSSLGLAFHRTHLISALLCLESMMLSMFIPL
          SMWPVQNQTPTSFTITPILMLAFSACEAGTGLAMLVASTRTHGSDHLHNLNLLQC"
gene      11398..12775
          /gene="ND4"
CDS       11398..12775
          /gene="ND4"
          /note="TAA stop codon is completed by the addition of 3' A
          residues to the mRNA"
          /codon_start=1
          /transl_except=(pos:12775,aa:TERM)
          /transl_table=2
          /product="NADH dehydrogenase subunit 4"
          /protein_id="BAC57509.1"

```

```

/db_xref="GI:28556858"
/translation="MLKIILPTMMLLPTLLSPTKFMWNTTTTHSLLIAMISLHWTLP
SYYPLKNLTPWTGNDQISTPLLVLSWFLPLMIMASQGHQLQHEPHVRKQMFITTLIVI
QPFIIAFAFSAATELTLFYISFEATLIPTLILITRWGNQPERLSAGIYLMFYTLISSLPL
LVSMYLHSKTGTLHLPILKLSHPNLTTSWTTLMSSLALLMAFMVKAPLYGLHLWLPK
AHVEAPIAGSMLLAALLLKLGGYGIMRVTLMLQPVSNLLHYPFLTALWALMTSSIC
LRQTDLKSLIAYSSVSHMGLVIAASMIQTQWSFSGAMILMISHGLTSSLLFCLANTNY
ERTHSRILMLTRGLQPLPLMSVWLLANLNTMALPPTTNLMAELSIMIALFNWSSPT
IILTGVATLLTASYTYMLLSTQRGILPTHITATTNSSTREHLLMTLHIPLLLTLILK
PELISGTPL"
tRNA 12776..12844
      /product="tRNA-His"
tRNA 12846..12913
      /product="tRNA-Ser"
tRNA 12916..12986
      /product="tRNA-Leu"
gene 12987..14804
      /gene="ND5"
CDS 12987..14804
      /gene="ND5"
      /codon_start=1
      /transl_table=2
      /product="NADH dehydrogenase subunit 5"
      /protein_id="BAC57510.1"
      /db_xref="GI:28556859"
      /translation="MEMALLLNTLTPLTLIILLTPILLPLLFLKLNKSPILLISKTVKTA
FMISLMQTTAFIYSGTDSIIAYWEWQFIPNFKIPLTLKMDLYSVMFFPIALFVTWSIL
EFATWYMASDPFITKFFTYLLTFLIAMLTLTIANNMFLFVWGVEGVMGMSFLLIGWWQ
GRAEANTAALQAMIYNRIGDIGLILSLAWLASTLNTWEIQQTIHPHQTPTLPLGLLIL
AATGKSAQFGLHPWLPAAAMEGPTPVSALLHSSTMVAGIFLLIRTHPLLSSNKALTT
CLCLGALSTLFAATCALQNDIKKIIAFSTSSQLGLMMVTIGLDLPQLAFLHISTHAF
FKAMFLCGLIIHSLNGEQDIRKMGTLQKTLPMTTSCLTIGNLALMGTPFLAGFYSK
DLIENLNTSYINTWALLLTLATSFTATYSLRMTILVQAGYNRTPITIPINENAPLA
ILPIMRLAFGSITAGLLISSLILRKTTPMTPRITKAAIIVVTLGIILALELSNSA
HTTQPKQNPLMNFSSSLGYFNPLAHRINPTLLLHTGQKIASLLIDMTWYKKMGPEGLA
NLHLIMTKLTTHHTGLIKSYLGSFALTILTMILLTLNK"
gene 14804..15946
      /gene="Cytb"
CDS 14804..15946
      /gene="Cytb"
      /codon_start=1
      /transl_table=2
      /product="cytochrome b"

```

```

/protein_id="BAC57511.1"
/db_xref="GI:28556860"
/translation="MAPNIRKSHPLLKMINNSLIDLPTPPNISAWWNFGSLLAMCLAT
QILTGLLLAMHYTADTSLAFSSVAHTCRNVQYGWLIRNLHANGASFFFCIFLHIGRG
LYYGSYLYKETWNTGVILLLLTMATAFVGYYLVPWGQMSFWGATVITNLFSAVPYIGQT
LVEWAWGGFSVDNPTLTRFFALHFLLPFLIAGITIIHLTFLHESGSNNPLGISSDPDK
IPFHPYYSIKDILGLTLM LTPFLTLALFSPNFLGDPENFTPANPLTTPPHIKPEWYFL
FAYAILRSIPNKLGGVLALAASVLILLIPFLHKSQR TLTFRPLSQALFWLLVANLL
ILTWIGSQPVEHPFIIIGQMASLSYFSILLILFPMTAMLENKMLNH"
tRNA      15950..16019
          /product="tRNA-Thr"
tRNA      complement(16022..16091)
          /product="tRNA-Pro"
gene      complement(16097..16618)
          /gene="ND6"
CDS       complement(16097..16618)
          /gene="ND6"
          /codon_start=1
          /transl_table=2
          /product="NADH dehydrogenase subunit 6"
/protein_id="BAC57512.1"
/db_xref="GI:28556861"
/translation="MTYFVIFLGVCFMLGTLAVASNPSPYYGVVGLVLASVVGCGWL
NLGVSFISLVLFMIYLGMLVVFVYSVSLAADPYPEAWGSRVVVYGLGFVLVVCVGV
VLGGFVDFWKVGVVTVDSGGVSFVRFDGSGVAVFYSCGVGLFLVAGWGLLLVLFVVLE
LVRGLSRGAIRAV"
tRNA      complement(16620..16687)
          /product="tRNA-Glu"

```

BASE COUNT 5175 a 5199 c 2248 g 4065 t

ORIGIN

```

   1 aacacttttt ttaacctaac tcccctactt agtgtacccc ccctttcccc cccagggggg
  61 gtatactatg tataatcgtg catacattta tattccacat atattatggt accggaata
 121 gatattatat acgtactaaa cccattatat gtatacggac attaaagatt tgccccattt
 181 ctcccaatgt acattaatgc atgctcctag acattaaact ctctctacca gcccacgatt
 241 ctaaccctaa caaggcacca tagacatgaa tggttacagg acatacctct aatacatact
 301 gtcattccac atttggttat gctcgtcgta tcagatggat ttattgatcg tacacctcac
 361 gagagatcag caaccctgc tcgtaatggt tatcatgact agcttcaggc ccattctttc
 421 cccctacacc cctcgccct cttgctcttt tgcgcctctg gttcctcggg caggcacatc
 481 aactcataa ctctgatatt cctcactttt cacgaagtca tctgtcgtt atcctacccc
 541 tatttagtcc gtgatcgcgg catttccttt cttctctgct gttggttctt cttctctttg
 601 gggcttcttc acagggtgcc cttcacagtg ccgtcgccag agtcctactc aagtgaagcc
 661 tggactactc ctgcgttgcg tcctattcta gacctctagt gtccctcaat gatacggttt
 721 gcgtgatgag ggaatcattt tgacactgat gcactttgga tcgcatttgg ttatggttct

```

781 tccaccccc cggtaaatg gggctatatg gtgaatgctt gtcggacata tttttactaa
841 tttccacttc ctctatTTTT ctaacaaaac taggcgattt accacatttt ttttcgttcg
901 tttgtttaat tttttttgt tttttaaaaa ctttttttaa aaaacaaatt aaacacaaac
961 tcaccacaca aaaaccctca gaccataaaa acgtttatgc ttggtatata tatattgtat
1021 taaacaaaat tattagagaa actccactac cgaaactaaa cacaaaaaca aacaaacaag
1081 acagcataaa tgcccacaaa catgttttat ttatatgttt aattaacata aatttatatt
1141 ccgctataaa gcccatatag cttaacacaa agcatggcac tgaagatgcc aagacggtac
1201 acaaactacc tgtggacaaa agactcagtc ctaaccttac tattggtttt tgctaaacat
1261 atacatgcaa gtatccgcac tccagtgaga atgcccctaa aacttttaca acaaaagcaa
1321 aaggagcagg taccaggcac actaaacagt tgcccaaac gccttgctac aagccacacc
1381 cccacgggta ttcagcagta attaacatta agcaataagt gtaaacctga cttagctata
1441 gcaagactag ggttggtaaa tcttgtgcc a gccaccgagg tcatacaaga aaccggaatc
1501 aatagacacc cggcgtaaag agtggctata cgttatcttc acactaagat taaaatggaa
1561 ctaagctgtc ataagcccaa gatcccctta aacctaaact aaacctctt agttaaacga
1621 tcaatttcaa cccacgaaag ccaggacaca aactgggatt agatacccca ctatgcctag
1681 ccctaaatct agataccac aacttactt acgtattcgc ccgagaacta cgagcacaaa
1741 cgcttaaac tctaaggact tggcggtgcc ccaaacccac cttagaggagc ctgttctata
1801 atcgataatc cacgatctac ccaaccacc cttgccaata cagctacat accgcccgcg
1861 ccagcccacc tttaatgaaa gaataacagt gagctcaata gccccgcta acaagacagg
1921 tcaaggtata gcccatggag tggagaat gggctacatt ctctaaaata gagcaaacga
1981 aaaaggacat gaaaccggtc cttggaagga ggatttagca gtaaagtggg atcacccaa
2041 cagcccactt taagacggcc ctgaggcacg tacataccgc ccgtcaccct cttcaaaagc
2101 tatcaacacc aataaataaa cccaccaca aagccaaaga cgaggtaagt cgtaacaagg
2161 taagtgtacc ggaaggtgca cttagacaac caagacgtag cttattcaat ctaaagcatt
2221 cagcttacac ctgaaagatg ccctttaaat ggaccgctt gatttgcccc cctctagccc
2281 aaccaactaa ccccaaca aactaaaac ccccgcacac caccacaaca aaacatttta
2341 atccgtccca gtataggcga tagaaaagaa gacttaaggc gcaatagagg tcaactgtac
2401 cgtaagggaa agatgaaata ataatgaaac acacaagcaa aaagcagtaa agaccaacc
2461 ttgtacctct tgcacatga tttagcaaga acaaccaagc aaagcgtact aaagcttgcc
2521 ttcccgaac ccaagcagc tacttgcgag cagctaaac tgagcgaacc cgtctctgtc
2581 gcaaaagagt gggatgactt gctagtagag gtgaaaagcc aatcgagctg ggtgatagct
2641 ggttacctgc taaacgaatc ttagttcctc cttaatctct cctcaaagga tgcctacta
2701 gaccctctca tgtcaggatt aagagtaatt cgacggaggc acagctccat cgaaaagaa
2761 tacaacctct cccagcggat aataaccttt tttccctacc gtgggccttc aagcagccat
2821 caacaaaaga gtgcgtcaaa gctctccctc taaaaatcca aacacgaatc tgactccctc
2881 accctaaaga ggtcaacctc tgacaataga agcatcaatg ctaaatgag taactgggg
2941 caccctcta cacagcgtaa acttacatcg acccattgtt aacagactca tacttatacg
3001 cacaccacaa caagaacttg tattcaacca atctgttaaa ccaaccagg aacgcccaca
3061 agacgattaa aatctgcaaa aggaactcgg caaaccaag acccgactgt tccccaaaa
3121 catagccttc agcaaccaac aagtattgaa ggtgatgcct gccagtgac caacgttcaa
3181 cggcccggtt atcctaaccg tgcaaaagga gcgcaatcaa ttgtcccata aattgagact
3241 tgtatgaatg gctaaacgag gtcttgactg tctcctgcag ataatcagtg aaattagtat
3301 cctcgtgcaa aaacgagaat gtgaccataa gacgagaaga ccctgtggaa cttaaaaatc

3361 acgaccacct tcccaccaac accaccccac cgggccccacc cgtacaaaac ctttggtcga
3421 catttttcgg ttggggcgac cttggagtaa aacaaccctt ccaaattctat agaccacaac
3481 tcttaaccaa gatctactca tcaaagtcct aatagtaacc agaccacaata caattgatca
3541 atggactaag ctaccccagg gataacagcg caatctcctc caagagcccc tatcgacaag
3601 gaggtttacg acctcgatgt tggatcagga caacctaatt gtgtagccgc tattaagggg
3661 tcgtttggtc aacgattaac agtcctacgt gatctgagtt cagaccggag caatccaggg
3721 cggtttctat ctatgtatgc actcctccta gtacgaaagg accggagaag taggggtcaat
3781 accacaagca caccctaacc ttctaagcaa tgaacccaac tcaattgcc aagaagcccac
3841 caccaccctt cactcctaga aaaggaacag ctagcgtggc agagcttggc aatgcaaaa
3901 ggcttaagcc ctttactcag aggttcaaat cctctcccta gcccatcaaa acatgacccc
3961 attaacctta ataaacctta taatcataac cctatcttac atcatccta tccttattgc
4021 cgtggccttt ttaacacttg tagaacgaaa aatcctaagc tacatacagg cccgaaaggg
4081 cccaaatatt gtgggccctt ttggtctact tcagcccatt gcagacgggg taaaactcct
4141 cattaaagag cccattcgcc catccacatc ctccccattc ctgtttatca taacccaat
4201 cctagccctg cttctagccc ttaccatctg aatccccctc ccaactaccg tccctatggc
4261 agacttaaac ctaggattac tattcctact agccatatcc agtctcaccg tttactccct
4321 gctctgatca gggtgagctt caaactcaaa atacgcttta atcggcgccc tccgagctgt
4381 cgcccaaaca atctcatatg aagtcaccct agccatcctc ctactctcca caattatact
4441 cagtggaaat tacaccctaa gcaccctatc catcaccaa gaaccaatth acctcattht
4501 ttctcatgg cctcttgcaa taatatggta tatctccacc cttgccgaaa ccaatcgtgc
4561 cccctttgac cttaccgaag gggagtcaga acttgctctc gggtttaacg tagaatatgc
4621 tgctggacca ttgctttgt tcttcttagc tgaatagcc aacatcatat taataaatac
4681 actaaccatc accctattcc tcaacccaag cttcctaact ctaccctcag aactattctc
4741 catcacactt gctaccaag tctacttct ctcgctcctc ttctatgag tccgagcctc
4801 ataccacga tttcgttacg atcaactaat acacctctta tgaaaaaact tctaccctt
4861 aaccttagcc ctatgcctct gacacaccag catgcctatc agctatgccg gtctccctcc
4921 agcttaagga agcgtgctg aacataaagg accactatga taaagtggac atagaggtaa
4981 acaaccctct cgctcctaa gccttagaaa agtaggaatc gaacctacac gaaagagatc
5041 aaaactctc atactccctc ctatattatt ttctagtaag gtcagctaat caagctatcg
5101 ggcccatacc ccgaaaatga tggtttaaac ccttccctca ctaatgaacc cacatgcaaa
5161 actaatctca gccataagtc taaccattgg aactagcctc acaatctcta gtaaccattg
5221 agttctagct tgaacaggcc tagagatcaa caccctagcc attatcccac taatctctaa
5281 atcccatcac ccccgagcaa tcgaggctgc catcaaatat ttccttacc aatcaaccgc
5341 atctgcctta attctattct caagcatgaa caattcttga tttacaggac aatgagacat
5401 cacacaactc aaccaccca catcctgcct aatcctaaca atagcaattg caatcaaac
5461 aggactagta ccattccact tctgatttcc tgaagtcctc caaggctcat cctaaccac
5521 tgccctccta ctctccacc tattaact tcccccaata accctgctta tcataacatc
5581 acaatccctt aaccacacac tacttacact cctagctatt ctatctgcac tggctggagg
5641 atgaatagtc ttaaaccaaa cacaaacacg aaaaatccta gccttttcat ctatctctca
5701 cctaggatga ataatcgaac tcattagcta caacccaaa ctcaccatcc ttacctttat
5761 tatttacaca ctaataacat ccaactgtatt cctatcccta tcacaaacca aagtcctaaa
5821 actatcgaca atactcatct cctgaacaaa aacaccata ttaaacctca ccatcatact
5881 tacactccta tccttagcag gtctccacc attaaccggg ttcattgcaa aatgacttat

5941 cattcaagaa ctactaaac aagaactaac accaatagcc acaatcattg caatactatc
6001 actacttggg ctattcttct acctcgtct agcatatcac tcaacaatca ctctccctcc
6061 aaactcatcc aaccacataa aactctgacg cacctaccca tcaccaacca cctccactgc
6121 catcctaacc gtcctatcca cctctctact cccctctcc cccttaatta tcaccataat
6181 ctagaactt aggattaatc acaccxaaac caaaggcctt caaagcctta aataagagtt
6241 gaacctctt agtttctgcc aaattaaggt caacaggaca ttaacctgta tcttctgaat
6301 gcaaacaga cactttaatt aagctaagac ctcatctaga cagatgggct tcgatcccat
6361 ataattctag ttaacagcta gacgccagca cctattggct cctgcctaaa agaccccgcc
6421 acgcctaac atgcatcaac gagcttcaa ctcatcatga acttactac agggccgata
6481 agaagaggaa ttgaacctt gtaaaagga ctacagccta acgcctcac actcggccat
6541 cttacctgtg accctcatca accgatgatt atttcaact aaccacaaag acattggcac
6601 tctttactta attttcggca catgagcagg catagccggc acagccctca gcctattaat
6661 ccgtgcagaa ctaggtcagc caggtaccct ccttggagat gaccagattt acaacgtaat
6721 tgtcacagcc catgccttcg ttataatctt cttcatagtc ataccatca taatcggagg
6781 cttcggaaat tgactcgtcc cacttataat cggggcccc gacatagcat tcccacgcat
6841 aaacaacata agcttctgac tctcccacc ctcttccctt cttctactag catcttccac
6901 tgtagaagct ggcgccggca cagggtgaac tgtctacccc ctttagctg gtaacctagc
6961 ccatgccgga gcatcagtag atctagccat ctttccctt cacttggcag gtgtctcatc
7021 aatcctagga gctatcaact ttatcaccac cattatcaac ataaaacccc ccgactatc
7081 acaatatcaa actcccctat tcgtatgatc agtctcatt actgccattc tattattact
7141 ctccctccc gtcctagccg ccggcattac aatactgctc accgaccgaa atcttaacac
7201 cacattctt gacctgcag gaggaggaga ccctgtccta tacciaacacc tgttctgatt
7261 cttcggtcac ccagaagtct acatcctcat cctcccaggc ttcggaatta tctcccagct
7321 agtagcctac tacgcaggaa aaaaagaacc attcggctac ataggaatag tatgagcaat
7381 actatcaatt gggttcctag ggtttattgt atgagcccat cacatattca cagtaggcat
7441 ggacgtagat acccgagcct actttacatc agctacaata atcattgcca ttcccaccgg
7501 catcaaagt tttagctgac tagcaaccct gcacggagga acaattaaat gagaccacc
7561 tatactatgg gcctaggat ttatcttctt ctttaccatc ggaggactca cgggaattgt
7621 cctcgcacac tcatcacttg acattgcact ccacgacacc tattatgtag ttgccactt
7681 ccatatgtc ctctccatgg gggcagttt tgccattcta gcaggcttca ctactgatt
7741 cccctattc acaggcttca ccctacacc tacatgaacc aaagcacatt tcgggtaat
7801 attcacagga gttaacctaa cttcttccc acagcacttc ctaggattag ctggaatacc
7861 ccgacgatac tcagactacc cagatgccta cacgcttga aatacactat cctcaatcgg
7921 ctccctaate tcaatgacag ctgtaatcat attaatatc atcgtatgag aagcttctc
7981 agcaaacgt aaagtcctcc aacctgaatt aaccgccacc aacatcgaat gaattcatgg
8041 ctgcccacc ccataccaca ctttcgaaga acctgcctc gtccaagtac aagaaaggaa
8101 ggaattgaa cctcacatgc tggttcaag ccaaccgat caaacattt aatgcttctt
8161 tcttatgaga cgttagtaaa ccaattacat agacttgta aggctaaatc acaggtaaca
8221 actcctgtac atctcatatg gcaaacct ctcaactagg attccaagat gcctcatccc
8281 ccatcataga agaacttgta gaattccatg accatgctt aatagtagcc ctagcaatct
8341 gcagcctagt actctactg ctaaccctaa tactactca aaaactatca tcaaacaccg
8401 tagatgctca agaagtagaa ctaattttaa caatcctccc agcaatcgtc ctagtctac
8461 ttgactccc ctactacaa atcctctaca taatagacga aattgaagaa cccgacctca

8521 ccctaaaagc cattgggtcac caatgatact ggtcctatga atacacagac ttcaaagacc
8581 tatcgtttga ctcatatata accectacaa cagacctccc acaagggtcac ttccgcctac
8641 tagaagtaga ccaccgcgtt gttatcccaa tagaatcgcc cattcgaata atcattaccg
8701 ctgatgatgt cctccactcc tgagctgtgc cggccctagg ggtaaaaaca gacgctatcc
8761 caggacggct gaaccaaacc gccttcatca ccaactcgacc aggagtgttt tacggacaat
8821 gctcagaaat ttgcggagcc aaccacagct acatacctat tgtagtagaa tccaccccc
8881 ttgaacactt tgaagcctga tcttccctct tatcatctta accgttaaga agctatgaac
8941 cagcactagc cttttaaget agagaaaggg gatatactcc cccttaatga catgccacaa
9001 ttaaaccctg caccatgatt cacgatcatg cttataacct gactcacttt ctactcctt
9061 atccaacctt aactactctc atttatctcc acgaacaatc catcgaacaa aacaacagca
9121 acaacaaaac ccaccccatg aacctgacca tgaatctaag tttctttgat caattctcaa
9181 gcccttacct cataggtatc ccaactaatc tcccctccct attactcccc accctcctct
9241 ttccaacacc aggcgcgcca tgacttacca accgcctctc caccttacia ctctggataa
9301 tcaacctagt taaaaacaa ttgatggccc ccctaaacia agcaggccac aatgagccc
9361 ttctattaac ctcccttatt cttatactac tttccattaa tctaattggga ctctcccat
9421 acacctttac cctactacc cagctatcaa taaacatggc cctcgccttc ccaactatgac
9481 tcgctaccct actaattgga ttacgaaacc aacctcgcg tctctagct cacctacttc
9541 cagaaggtag tcccacccca ctaatcccta tcttaatcat aattgaaaca accagcctac
9601 tcatccgacc attagcccta ggggtccgcc taacagcaaa cctaacagcc ggccacctac
9661 ttattcaact catctcaaca gccacaatcg ccctaatacc aataatacca tccatttcaa
9721 ccctaacagc acttatecta cttctactta ccatcctaga agtcgcagta gccataatcc
9781 aagcctacgt attcgtctc ctactaagcc tgtacttaca agaaaacatc taatggcaca
9841 ccaagcacac tctaccata tagttgacce aagcccatga ccaattttcg gtgcaatcgc
9901 agcattactt actacctctg gcctagtcac atgattccac tacaattcta ctaccttact
9961 gttaacaggc ctactttcta taattttagt tatactacia tgatgacgtg atgtagtccg
10021 agaaagcacc ttccaaggac accacacccc taccgtccaa aaaggactac gatacggaat
10081 aattctcttc attacatcag aagccttctt cttcttaggt ttcttctgag ctttttcaa
10141 ctctagccta gccccaacac cagaacttgg aggacaatga cctccaacag gtattaaacc
10201 attaaacctt cttgaagttc ccctcctaaa caccgcaatc ctctagctt caggcgtcac
10261 cgttacatgg gccaccaca gcattacaga aggaaaccca aaacaagcta ctacgcact
10321 aacccttacc atccttctag gcttctactt cactgccctc caagcaatag aataccagca
10381 agcctcattc tcaatcgtg acagtgttta cggctccact ttctttgtcg ccacaggatt
10441 ccacggccta cacgtaatca ttggatcacc tttccttaca gtttgcttgc tacgactaat
10501 caaattccat ttacatcca accaccactt tggatttgaa gcagcagctt gatactgaca
10561 cttcgtagat atcatctgac tcttcttcta tatgtccatg tactgatgag gatcctgctc
10621 ttctagtata ctaaatacia ctgacttcca atctttaaaa tctggtataa acccagagaa
10681 gagcaatgaa tacactcaca tttatattat ctgtgtcctt cgtactaagc accctactaa
10741 caactatcaa tttctgactt gcccaaatag ccccagacac agaaaaacta tcaccatag
10801 aatgcggctt tgaccctta ggatcagccc gacttccatt ctcaatccga ttcttctca
10861 gtagccatct tttctctctt attcgacctg gaaatcgctt tacttctacc ctttcatga
10921 gccatccaac tacaatcccc tatgacgacc ctacactgag ccaccactat cctcactctc
10981 ctaccctag gcctcatcta cgaatgaacc caaggaggac tagaatgagc agaataacag
11041 aagtttagtc taaccaagac agctggtttc gaccagcaa attatagcca acacctataa

11101 ctttcttatg tctcccttac acttcagett ctactcagca tttacattca gcagcctagg
11161 attagcattt catcgaccc acctaatect cgccctacta tgtctagaga gcataatact
11221 atctatattt atccccctct caatatggcc agtacaaaac caaaccccat cattcacaat
11281 cacacctatc ctaatactag ctttctccgc atgcaagct ggcaccggcc tagcaatact
11341 ggtagcctcc acacgaacac atggctccga ccacctacac aacctcaacc tattacaatg
11401 ctaaaaatca tcttaccac aataatactc ctaccaacaa cccttctatc cccacaaaa
11461 ttcatatgaa ccaacaccac aactcatagc ctcctaateg ccataattag cctacactga
11521 ctaaccccat catactaccc actaaaaaac cttaccctt gaacagggaa tgatcaaatc
11581 tcaaccccat tattagtcct ctctgctgg ttctctccac ttataatcat agctagccaa
11641 ggcatctcc aacatgaacc tcatgtacga aaacaaat tcatcacaac ttaattgtc
11701 attcaacat tcatcactct ggcattctca gctacagaac ttacactatt ctacattca
11761 ttcgaagcaa ccctaatecc aaccctaatt ctaatcacac gatgaggtaa ccaacctgaa
11821 cgactaagcg caggcattta cctcatattt tacacctga tcagctcact cccctacta
11881 gtatcaatgc tctacttaca ctcaaaaacc ggaacctcc acctaccat cctaaaactc
11941 tctcaccaca accttacaac ctcatgaaca accctaatat ccagcctagc cctccttata
12001 gcattcatag ttaaagcacc attatatgga cttcacctat gattaccaa agcccagta
12061 gaagcaccca ttgccggctc aataactacta gccgccttac ttctaaaact aggtggatg
12121 ggtatcatac gagttactc actgatataa cccgtatcaa acctattaca ctaccattc
12181 ttaactctgg ccttatgagg cgtctataa accagctcta tctgtttag ccaaacagat
12241 ctaaaatccc tcattgccta ctcatccgta agccacatag gactagtaat cgccgaagc
12301 ataattcaaa ccaatgatc attctcagga gcaataatec tcataatec ccacggactc
12361 acctctccc tcttttctg ctagcaaac acaactacg aacgaacaca cagccgcatc
12421 ctactactca cagaggcct gcaacctt ttaccattaa tatcagtatg atgactcta
12481 gtaacctaa ccaatatagc tctccctca acaaccaatt taatagcaga actatcaatt
12541 ataategcc tttcaactg atctctccc acaatcatct taaccggagt cgcaacactc
12601 ttaaccgct cctacacct ttacatactt ttatcaacc aacgaggcat cctaccaacc
12661 cacatcacag caaccacaaa ctcaagcaca cgagaacacc tcctaataac cttcacatt
12721 atccctctat taactctat ccttaagcca gaactaatct caggaacccc tctatgcaag
12781 tatagtttaa cccaacatt agattgtgat tctaaaata ggagtttaa cctccttact
12841 cgccaagggg aggaaccca aaccagcaag aactgctaat teatgaccc gagctttaa
12901 cctcggctcc cttacactt taaaggataa aagtaatecg ttggctctag gaaccaccca
12961 tcttggtgca actccaagta aaagtaatgg agatagcact actcctaat acccttacac
13021 cattaacact catcactctc cttacccca tctctctccc actcttattt aaactaaaa
13081 actctccact actaatctcc aagaccgta aaactgcctt cataatcagc ctaatgcaga
13141 caactgctt catttactca ggcacagaca gcacatcgc ctattgagaa tgacaattca
13201 tcccaaacct taaaatccca ttaaccctaa aaatagacct atactccgta atattcttc
13261 caattgcatt attcgtaacc tgatcaatcc tagaattcgc aacatgatac atagcctccg
13321 acccatttat cacaaaatc ttacactacc tactcacctt cctcctcgc atactcacac
13381 ttacaattgc aaacaacata ttctctctat ttgtagggtg agaaggagta ggaattatat
13441 cgttctctct cattggctga tggcaaggac gagctgaagc caacacagca gccctccagg
13501 ccataatcta taaccgaatt ggagacatcg gcctaatec aagcctagcg tgactagcct
13561 ctacattaaa cacctgagaa atccaacaaa ccctccacc ccaaccaaca cccacctcc
13621 ctctccttgg cttaatccta gcagccacag gaaaatcagc ccaattcggc ttacacctat

13681 gactcccagc agcaatggaa ggcccaccc cagtatccgc cctactccat tcaagcacia
13741 tagtagtcgc cgggatcttc ctacttatcc gaactcacc cctactaagc tccaacaaga
13801 ccgccctaac cacatgccta tgcctagggg ccctatcaac cctcttcgct gctacctgtg
13861 ccctcaccca aaacgatatt aaaaaaatca tcgccttctc cacctcaagc caactagggc
13921 tcatgatagt taccattgga cttgacctcc cacaactagc attccttcac atctccacac
13981 acgccttctt caaagccata ctatttctat gctcaggact aatcattcac agcctaaacg
14041 gagaacaaga tatccgaaaa ataggaaccc tacaaaaaac tctcccaata accacctctt
14101 gtctcaccat cggtaacctc gccctaatag gaacgccctt cttagcgggc ttctattcaa
14161 aagacctcat tattgaaaac ctaaacacct catacatcaa cacctgagcc ctactactca
14221 ccctcctcgc cacatccttc accgcaacct acagccttcg cataaccatt ctagtccaag
14281 caggatacaa ccgcacccca acaatcacc caatcaacga aaatgcgcca ttagccatcc
14341 tcccaatcat acgtctagct ttcggaagca tcacagcagg attactaatt tcatccctca
14401 ttctgcgtac aaaaacaccc ccaataacca tacgcggtat cacaaaaacc gctgccatca
14461 ttgtcacaac cctaggaatt atcctagccc tagaactttc aaactccgca cacacaaccc
14521 aaccçaaaca gaacctctc ataaacttct cctcctcatt aggatacttc aaccçcttag
14581 cccaccgaat caacctaca cttctccttc acaccggaca aaaaatcgcc tcaactcctaa
14641 tcgacataac atggtacaaa aagataggcc ccgaaggact cgccaacctg cacçtaatca
14701 taaccaaaac cttaacçaca acacacacag gactaatcaa atcatattta ggatcattcg
14761 ccçttacaat cçtaacaata atcctactca ccçtaaaaaa ataatggcacc ccaacatccg
14821 taaatcacac ccçtactaa aaataatcaa caactcçtta attgatctcc ccacçccccc
14881 aaacatctcc gcçtgatgaa actttggctc cçtactagca atatgtctcg ccacçcaaat
14941 cçtcactgga ctçtçtçtag ccatacacta tacagctgac acçtctçtag cçttctçctc
15001 cgtcgcçccac acatgcçgaa atgtacagta cggctgactc atccgtaacc tacatgçaaa
15061 cggcgcçctc ttçttcttca tctgcatctt cçtccacatc ggacgaggcc tatactacgg
15121 ctçttacçtg tacaagaçaa cçtgaatac agggagtaatc ctgctcçtca cactaatagc
15181 tactgcçttc gtaggçtatg tçttaccatg aggçcaaaata tcattttgag gcgçcaccgt
15241 catcacaac ctattctcag cagtcçcçta catcggçcaa acçttagtag aatgagcçtg
15301 agggggattc tcagttgaca atccaacct taccçgattc ttcgçcçtac actttctçt
15361 cccattcçta atcgcaggaa ttaccatcat tcacçttaca ttçttacag aatcaggçtc
15421 aaacaacçca ctaggaattt catcagacçc agacaçaaatt cçattcçatc catactactc
15481 catcaagaac atcçtaggçc taacactaat acttacacça ttççtaacçc tagçcçtatt
15541 ctçcccaaac ttçttagggg accçagaçaaa ttçcactçca gçcaacçccç taacaacçcc
15601 accçcçatc aaacçagaat gatacttçt attcgçctac gçcçtçtçac gttcaatçcc
15661 aaacaacçta ggaggçgtac ttgççttagc cgcçtçagta ctçatçctçc tactaatçcc
15721 ctttctçcçc aaatçcaaac aacgaacçct aacattçcga cçactatçcc aagçcçtatt
15781 ttgactççta gtagçtaacç ttçtaattct gacttgaatc ggaagçcaac cagtggaaca
15841 cccattcçat atcatcggac aaatagçctc cçtçtçtçac ttçagçattc tacttatçct
15901 cttçcçtata actgcaatgc tagaaaacça gatactçaac cactaaaata ctçtaatagt
15961 ttaacaçaaa acattggtct tgtaacçcaa aaactgaaga cttcaccçtt cttagagtaa
16021 ctçagaaggg ggggactçga accçccatçc ccagçtçcca aagçtgggçt ttçtaataa
16081 actacçttct gaaacçcçta accgçccgaa tcgcaacçcçg agacaacçca cgcacaagçt
16141 ccaacacacac gaacaaaaca agcaacaaac ccçacçcagc taccaaaac aaacçaacac
16201 cacacgaata aaacacçgçc accçcactaa aatçaaacçg aacaaaagat accçtçcçc

16261 tatcaacagt aaccacacc acctttcaaa aatcaacaaa cccacccaaa accacccca
16321 cacaaaccac taaaacaaaa cctaaccat acaccaccac cgcaccaata cctcaagcct
16381 caggatacgg atccgcagcc aaagatacag aatacacaaa aaccaccaac atcccccta
16441 aataaatcat aaacaacacc aaagaataa aagaactcc taaatttact aatcatcgc
16501 accctactac agacgccaac actaaccta ctaccata atacggagaa gggtagacg
16561 ctacagccaa agtcccaac ataaaacaaa ctcccagaaa aattacaaa tatgtcatat
16621 attcccgtt ggatagacc caaggactac ggcttgaaa gccattgtg ttctcaacta
16681 cggaac

//

Appendix 4-1. Complete mtDNA annotations and sequence of *Numida meleagris* (Helmeted guineafowl)

COMMON SUBMITTER contact Masahide Nishibori
author Masahide Nishibori
year 2002
email nishibo@hiroshima-u.ac.jp
url http://homepage2.nifty.com/nishibo/index.html

phone 81-824-24-7992
fax 81-824-22-7067
institute Hiroshima University
department Graduate school of Biosphere Sciences

country Japan
state Hiroshima
city Higashi-hiroshima
street Kagamiyama 1-4-4,
zip 739-8528

REFERENCE title Helmeted guineafowl complete mitochondrial genome
author M Nishibori
author T Hayashi
author M Tsudzuki
author H Yasue
year 2002
status In Preparation

hgf.mt source 1..16726 organelle mitochondrion
ff_definition Numida meleagris mitochondrial DNA, complete genome
organism Numida meleagris
dev_stage adult
sequenced_mol DNA
tissue_type whole blood

D-loop 1..1169 note control region
tRNA 1170..1238 product tRNA-Phe
rRNA 1239..2218 product 12S ribosomal RNA
tRNA 2219..2291 product tRNA-Val
rRNA 2292..3915 product 16S ribosomal RNA
tRNA 3916..3990 product tRNA-Leu
CDS 3999..4961 gene ND1
codon_start 1
product NADH dehydrogenase subunit 1

```

                                transl_table 2
tRNA 4962..5032      product tRNA-Ile
tRNA complement(5038..5108) product tRNA-Gln
tRNA 5108..5176      product tRNA-Met
CDS 5177..6217      gene ND2
                                codon_start 1
                                product NADH dehydrogenase subunit 2
                                transl_table 2
tRNA 6216..6293      product tRNA-Trp
tRNA complement(6302..6370) product tRNA-Ala
tRNA complement(6374..6446) product tRNA-Asn
tRNA complement(6448..6515) product tRNA-Cys
tRNA complement(6515..6585) product tRNA-Tyr
CDS 6587..8137      gene COI
                                codon_start 1
                                product cytochrome oxidase subunit I
                                transl_table 2
tRNA complement(8129..8203) product tRNA-Ser
tRNA 8206..8274      product tRNA-Asp
CDS 8276..8959      gene COII
                                codon_start 1
                                product cytochrome oxidase subunit II
                                transl_table 2
tRNA 8961..9031      product tRNA-Lys
CDS 9033..9197      gene ATPase8
                                codon_start 1
                                product ATPase subunit 8
                                transl_table 2
CDS 9188..9871      gene ATPase 6
                                codon_start 1
                                product ATPase subunit 6
                                transl_table 2
CDS 9871..10654     gene COIII
                                codon_start 1
                                product cytochrome oxidase subunit III
                                note TAA stop codon is completed by the addition of 3' A
                                residues to the mRNA
                                transl_table 2
                                transl_except (pos:10653..10654,aa:TERM)
tRNA 10656..10723     product tRNA-Gly
CDS join(10724..10896,10898..11075) gene ND3
                                note extra one base at position 10897:reading frame
                                presumably maintained by translational frameshift or RNA

```

```

codon_start      1
product  NADH dehydrogenase subunit 3
transl_table     2
tRNA  11077..11145  product  tRNA-Arg
CDS   11146..11442  gene    ND4L
codon_start      1
product  NADH dehydrogenase subunit 4 L
transl_table     2
CDS   11436..12813  gene    ND4
codon_start      1
product  NADH dehydrogenase subunit 4
note    TAA stop codon is completed by the addition of 3' A
        residues to the mRNA
transl_table     2
transl_except    (pos:12812..12813,aa:TERM)
tRNA  12814..12882  product  tRNA-His
tRNA  12884..12948  product  tRNA-Ser
tRNA  12950..13020  product  tRNA-Leu
CDS   13021..14835  gene    ND5
codon_start      1
product  NADH dehydrogenase subunit 5
transl_table     2
CDS   14841..15983  gene    Cytb
codon_start      1
product  cytochrome b
transl_table     2
tRNA  15986..16054  product  tRNA-Thr
tRNA  complement(16058..16127) product  tRNA-Pro
CDS   complement(16136..16657) gene    ND6
codon_start      1
product  NADH dehydrogenase subunit 6
transl_table     2
tRNA  complement(16659..16726) product  tRNA-Glu

```

ORIGIN

```

aacctatttt ttaacctaac tcccctactg agtgtacccc ccctttcccc cccagggggg
gtatactatg tataactgtg catacattta tataccacat acattatggg accggtacta
tatattatat atgtactaaa cccatatata tgtaaacgga cataaatacc tccaccccat
tcctcccaaa tgtactagaa cgtgtaatgc ttccggacat aaattataac ccaccatcat
at ttgtcccc aacttcaag tcaccatgac catgaatggg tacaggacat acccttaac
tatatgttct tcctcatttg gttatgctag acgtaccaga tggatttatt gatcgtacac
ctcacgagag atcagcaacc cctgcctgta atgtcctata tgactagctt caggceccatt
ctttcccctt aaaccctcg cccctcttgc tcttttgcgc ctctggttcc tcggtcaggg

```

ccatcaccg ctttactcct gatttctca cttttcacga agtcatctgt gaactatfff
ccctcttca gtcctgatc gcggcatctt ctttcttcat ttgctgttgg ttcctttttt
ctctggggct tcttcacagg ttgcccttca cagtgccgtc gccagagtcc tactcaagtg
aagcctggac tacacctgcg ttgcgtccta ttctagtcct ctcgtgtccc tcaatgatac
ggtttgcgtg tatggggaat cttttgaca ctgatgact ttggatcgca tttggttatg
gctcttcac cctccccggc agcatggtgc tatatagtga atgcttgcg gacatgtttt
tactcatfff cacttctct attttcttca caaaaccaga aaatttccca caatfffat
ttcgtttttt tttcatttta taaaacgfff tttaaaaaaa aaattattac aaacaaatca
acaccttaac atccacaac cataattaaa cgtttgata atatatatat acatcattac
tttagcccaa attattagag aaacccact accacaacat acatcaaaaa atgaataaac
ataacctca tataaacccc ccaaaccaat cacaaactaa catcatttat atcatcaaca
aacaacagc tcaattcacc taccaccagg cccacatagc ttaaccatca aagcatggca
ctgaagatgc caagacggta ctcatattac ctgggggcaa aagacttagt cctaacctta
ttattggctc ttgctagaca tatacatgca agtatccgca ccccagtga aatgcccctg
aatcttctca cctctcaga gaaaaaggag caggcatcag gcacacccgc cagttagccca
agacgccttg ctaagccaca cccccaggg tattcagcag taattaacat taagcaataa
gtgtaaactt gacttagcca tagcaacaac cccagggttg gtaaatcttg tgccagccac
cgcggtcata caagaaaccc aagtcaataa tccatccggc gtaaagagtg gctacatggt
atcaaaccaa ctaagatcaa aatgtaacta agctgtcata agcctaagat tcacctaaac
ccaacctcaa aacaatctta gccaccacga ccaatttcaa cccacgaaag ccagggcaca
aactgggatt agatacccca ctatgcctag ccctaaatct agatacttca atacctagt
atccgcctga gaactacgag cacaaacgt taaaactcta aggacttggc ggtgccccaa
accacctag aggagcctgt tctataaccg ataatccacg atccaccaa ccacctctg
ccaacacagc ctacataaccg ccgtcgcag cccacctaca tgaagcgca acagtgagct
caacagtccc cactaacaag acaggtaag gtatagccca tggagggtgga agaaatgggc
tacatfffct agcatagaac actcacgaaa aagagcatga aacctgccct tagaaggagg
atthagcagt aaaatgggac catacatctt aagcccattt taagccggct ctggggcacg
tacataaccg ccgtcacct cttcacaagc cacctccacc gataactaac acctccccg
gcaaagacg aggtaagtcg taacaaggta agtgtaccgg aagggtgact tagaccacca
agacgtaget ataaactcca aagcattcag cttacacctg aaagatattt ccacaaatga
aatcgtcttg atctgcccc tctagcccaa ccaactcccc cacatgaaca tcaacaaacc
taettctca accaaccaaa acattataac tatatcctag tataggatgat agaaaagaca
ctccggcgca atagaggta accgtaccgt aagggaaagg tgaataaca gtgaaaacca
aaagcaatag acagtaaaaga ccaaccttg tacctcttgc atcatgattt agcaagaaca
accaagcaaa gcgtactaaa gtttgctcc ccgaaacca agcgagctac ttgcgagcag
ctaaacattg agcgaacccg tctctgtcgc aaaagagtgg gatgactcgc tagtagaggt
gaaaagccta ccgagctggg tgatagctgg ttacctgcca aaagaatcta agttctcct
cagccccctc tactaggaca tctactctaa ccgatcaact gcaagatagg gctaagagct
atcgaaggg ggtacagctc cctcgaaaaa gaacacaacc tcccctagcg gataatacaa
actcctctg ctccgtgggc tttaaagcag ccatcaaaa aagagtgcgt caaagctcat
tcccattaaa aatctaaaac ccccttgac tcccttacct ctagcaggtt aacctatgac
cataggagaa ttaatgctaa aataagtaac ttgggacccc acccctcta cggcggaac
ttacattggt acactattaa caaaccaac taataccgt actaagacaa gaacatgtat

tcaacctaac ttgttacgcc aactcaggag cccccgaag aagatcaaaa tctgtaaaag
gaactcggca aacccaatag acccgactgt ttcccaaaaa catagccttc agcaacaac
aagtattgaa ggtgatgcct gcccagtgac tacaacgttc aacggccgcg gtatcctaac
cgtgcgaagg tagcgcaatc aattgtctca taaatcgaga cttgtatgaa tggetaaacg
aggtcttaac tgtctctac agatgatcag tgaattagt attcccgtgc aaaaacgaga
atgggaccat aagacgagaa gaccctgtgg aacttcaaaa tcacgaccac cttgacacca
acccaatcc accggacca cccacacaaa acacctggtc gacatcttc ggttggggcg
accttgaga aaaataaatc ctccaaacca cagaccacia ctcttcaccg agaccaacc
ctctaagtac taacagtaac cagacccaat ataattgatc aatggactaa gctaccccag
ggataacagc gcaatctcct ccaagagccc atatcgacia ggaggtttac gacctgatg
ttggatcagg acaacctaot ggtgcagccg ctattaaggg ttcgtttggt caacgattaa
cagtcctacg tgatctgagt tcagaccgga gcaatccagg tcggtttcta tctatgaata
cactcctcct agtacgaaag gaccggagaa gtgggggtcaa tactacaagc acaccccc
cttcaagca atgacctcaa ctcaactgct aagaagacc ccataccca cccaacaatt
cctagaaaag gacaagctag cgtggcagag ctcggtaat gaaaaggct taaaccctt
acccagagg ttcaaatcct ctccctagct tcccagtat gacatgacat aacctaatta
tatccctatc ctatgtactc ctatacctaa tcgccgtggc ctctcaacc ctctagagc
gaaaaattct cagctacatg caggcccga agggcccaaa catcgtgggc ccttttggc
ttctcaacc tatcgagac ggagttaaac tattcatcaa agaactatc cggcgtcca
catcctccc ctctctctc accataacc caatcctggc cctactacta gctctacca
tctgaatccc cctccacta ccattcccgc tagctgacct caacctaggc ctctattcc
tactagccat gtcaagctc accgtctact ctctctctg atcaggatga gttcaaac
caaaatgct cttaatcgga gcaactagag ccgttgctca gacaattca tatgaagtca
ccctagccat tatectcta gccacaatca tacttagcgg caactacacc ctaactacc
tagccgtcac ccaagaacc atatacctaa tcttctctc atggccctt gcaataata
gatacatctc taccctcgc gagaccaacc gtgcccatt cgatctaaca gaaggggaat
ccgaactcgt ctcagggtt aatgttgagt atgctgcggg gccatttgcc ctattttcc
tagccgata cgccaacatc atactcataa acacattaac caccatctta tctcttaacc
caagctgctt aagcctatcg tcagagctat acccaattgc tcttgctact aaagtctcc
tcctctcacc cacattcctg tgaatccgag cctcataccc acgattccgc tacgaccaac
taatgacct cctatgaaaa aacttcttc ccctgacact agccctatgc ctctgacaca
ctagcatgcc aatcagctac gccggctac ctcccaccta aggaaatgtg cctgaactaa
aggatcacta tgataaagt aacatagagg tacaacaacc ctctcatttc ctaaatctta
gaaaagcagg aattgaaact acacaagaga gatcaaaact ctccatactt cccttatatt
atctctagt agggctagct aattaagcta tcgggccat accccgaaa cgatgggtta
acccctccc ctactaatga acccccagc aaaactaatc accacctaa gcctaactgc
agggacaagc atcacaatct ccagcaacca ctgaatcata gcatgaactg gcctagaat
caacacccta gctatcatcc ccctaatctc caaacccac ccccccgag caattgaagc
agccatcaaa tacttctta cccaatcaac tgcacagcc ttaatcctt tctcaagcat
aataaacgce tgacacacag gccaatgaga catcacacia ctaaacacc caacacctg
ccttgattg actatagcaa ttgcaatcaa actaggactg gtccattcc acttctgatt
cccagaagta ctcaaggat catccctaac cactgccctg ctactctcaa ccctgataa
actccccca atcactctc tctaatgac atcacaatca cttaatccca ccctactca

ctccctagca atcagctcaa cccttatcgg aggttgaatg ggcttaaacc aaacacagac
acgaaaaate ctageccttct catccatttc tcacctaggc tgaataatcg caatcattat
ctacagcccc aaactaacc tccttacatt cctcctctac actetaataa caacagctat
cttcctatcc ctaaaccaaa tcaaagtcct aaaactatca acaatactca tctcatgaac
aaaaaccccg atacttaacg caaccttgat actcaacttc ctctccctag caggcctacc
accactaacc ggcttcatgc ccaaatgact catcattcaa gagctcacta aacaagaat
aacaccaaca gccacaatca tcaactatgct ttcctacta ggectgttct tttacctcg
ccttgctac cactcaacaa ttactctcc cctaactcc tccaaccaca taaaactatg
acacactaac aatcatcaa aactaccac cgctatccta atcgccctgt caacatcctt
actccccctc tctcctctaa tactcaccat agcctagaaa cttaggatta agcagctacc
caaaccaag gccttcaag ccttaaataa gagttaaact ctcttagttt ctgccataca
ctaaggctaa caggacatta acctgtatct tctgaatgca aaccagacac tttcattaag
ctaaagcctt aacctaggca gatgggcctc gatcccataa aattctagtt aacagctaga
tgccataacc acttgcttc tgectacaaa accctgacac atctttaatg tgcataatg
agcttgcaac tcacctgaa cttcactaca gggctgataa gaagaggat cgaacctctg
taaaaaggac tacagcctaa cgcctagaca ctacagcctc ttacctgtga cttcatcaa
ccgatgatta ttctcaacca atcacaaga cattggcact ctttacctaa tctttggcac
atgagcaggc atagtcggca cagcactcag cctgttaatc cgcgcagaac taggacaacc
agggaccctt ttaggggacg accaaattta taatgtaatc gtcacagccc atgccttctg
cataattttc ttcatagtta taccaatcat gatcgcgccg ttcggaaact gactagtacc
actaataatc ggtgccccgg acatagcatt cccacgaata aacaacataa gcttctgact
cctcccccc tcttctctc ttctactagc atcctctact gtagaagctg gagctggcac
aggatgaact gtctaccac ccctagccag caaccttgc catgctggcg cctccgtaga
cttagctatc ttctccctc acctagcagg tgtctcatcc atcttaggtg ctatcaactt
cattaccacc atcatcaaca taaaaccccc tgcattaaca caataccaaa cacccttatt
cgtatgatca gtctcatca cgcctctct tctcctccta tccctaccgg tctcgcgcg
tggcattaca atactcctca ctgatcgaac cctcaacacc acattcttcg acccagctgg
aggcggagac ccagtactat accagcacct attctgatc ttcggccacc ctgaagtcta
catctcacc ctcccaggat tcggaattat ctcacacgta gtagcactact acgcaggaa
aaaagaacca ttcggctaca taggaatagt ctgagccatg atatccatcg gattcctagg
cttcacgta tgagcccacc acatattcac agtcgggatg gacgtagaca cccgagctta
cttcacatct gccaccataa tcatcgccat cccaaccggc atcaaagtct tcagctgact
agccaccctg cacggaggaa caatcaaatg agaccctccc attctatgag cctgggatt
catcttctc ttactatcg gaggcctaac aggaatcgtc cttgctaact catccctaga
cattgcctc cacgatacct actatgttg tgcccacttc cactatgtcc tctcaatggg
ggcagttttt gctattctag caggatttac ccactgatc cccctattca caggtttcc
cctcaccctc tcatgaacca aagcacactt tggagtata ttcacaggag ttaacctaac
cttcttccca cagcactttt taggcctagc tggcatgcc cgacgatact cggactacc
agacgctac acactatgaa acaccctatc ttcaatcggc tcattaatct caataacagc
cgtaattatg ctaatattca tegtctgaga agcattctca gctaagcga aagtcctcca
accagaacta accgccacca acattgaatg aatccacggc tgcccgcctc catatcacac
ctttgaagaa ccagcctttg tccaagtaca agaaaggaag gaatcgaacc ctcacatgct
ggtttcaagc caaccgcatc aaaccaatta atgcttcttt cttatgagac gttagtaaac

caattacata gccttgtcaa gactaaatca caggtgcaag ccccgtaacat ctcacatggc
aaaccactcc caactaggat tccaagacgc ctcatecccc attatagaag aacttgtcga
attccacgac catgccctaa tagtagcact agcaatctgc agcctagtac tgtaccttct
aacccctaata ctactcgaaa aactatcatt aataccgta gacgcccag aagtcgaact
aatttgaaca attctccccg ccactcgtct aatcctgctt gccctccctt cctcccaat
tttatatata atagacgaaa ttgatgagcc cgaccttacc ctaaaagcca tcggacacca
atgatattga tcctacgagt atacagactt caaagatctc tcatttgact cctacatggg
cccaacaact gacctcccca aaggccactt ccgacttcta gaggtcgatc atcgaattgt
gatccccata gaattctcca tccgaataat catcaccgcc gacgatgtcc tccattcttg
agccgtcccc accctgggag ttaaaacaga cgcaatccca ggacgactta accaaacctc
cttcattacc acccgcccag gagtgttcta cgggcagtgc tcagaaatct gtggggctaa
ccatagctac ataccaatcg tagtagaatc aaccctcta aaaccttcg aagcttgatc
ttcactgcta tcatcttaac cattaagaag ctatggacgc agcactagcc ttttaagcta
gagaaagagg acacactccc ctccttaatg acatgcctca actaaacca aaccctgat
ttaccattct actccttaca tgattctctt tctccttact catccaacct aaattactaa
ctttcaccac cacaaacccc cactaataa aaaccaacc aaccdaacca acccctgaa
cctgaccatg aacctaagct tcttcgacca atttcaagc ccatacctcc tagggatccc
actcatccca ttatccctcc tattcccaac ctactactg ccataccca acaaccgttg
agtaaccaac cgctctcaa ccctacaact ctgactcgcc aacctaatca ccaacaact
tatgactcct ctaaacaaag ccggtcacia atgggcccct ttactaacct cactatact
cttctcctc tccattaacc tgttaggcct actcccgtac accttacc ccaaccacca
gctatcgata aacatagccc tagccgtccc actctgactc gccacactcc taacaggctt
acgaaaccaa cctcgcct ctctcggta cctactccc gaaggaaacc ctacaccact
catccagcc ctgatcatga tcgaaacaac cagtctactc atccgaccgc tagccctagg
cgtacgcta acagcaaac tcacagctgg ccactactc atccaactca tctccacagc
taccgtcacc ctctaccta taataccatc aatctcagcc ctaacagcac ttatcctatt
cctactgact atcttagagg tagcagtgc cataattcaa gctacgtat tcgtactcct
cctaagctta tacttacaag agaacatcta atggcacacc aagcacactc ctaccacata
gttgaccaa gcccatgacc aatcttcggc gcagctgcc ccctactaac cacctcagge
ctaatcatat gattccactt taactctcc ctcttactag caacaggcct ctttcaata
cttctagtca taatccaatg gtgacgagac gtgggccgag agagcacctt tcaaggccac
cacaccccaa ctgtccaaaa aggcctacga tatggaataa ttctttttat cacgtcagaa
gccttctctt ttcttggatt cttctgagcc ttcttccact caagcctggc cccaacacca
gaattaggtg gacaatgacc ccctacagga atcaaacccc taaaccccct agaagtccc
ctactcaata cagccatcct cctggcatca ggcgtcaccg taacatgagc ccaccatagc
atcacagaag gtaaccgtaa acaagccatt cacgactaa ccttaaccat tctcctcggg
ttctacttca cagccctcca agcaatagaa taccatgaag cctcattctc aatcgtgac
agcgtttacg gctccacttt cttegtcgcc acaggattcc atggactcca cgtaatcatt
ggatccacct tccttacagt ctgccttca cgactaatca aattccattt cacatcagac
caccacttcg gattcgaagc agcagcctga tactgacact ttgtagacgt catctgactc
ttcctctaca tgtcaatata ctgatgagga tcctgctctt ctagtatatt aattacaact
gacttccaat ctttaaaatc tggtaactaac ccagagaaga gcaatgaaca cctcacatt
cacaatatec ctctcccttg tcttaagcac agcactagcc accctaaact tctgactggc

tcaaataact ccagactcag aaaagctatc accatcacgaa tgtggttttg atccccctagg
ttcagctcga cttccattct caatccgatt cttcctcagt agccatccta ttctctctat
tcgacctaga aatcgctta ctctccccc tcccatgagc cattcaactc cagtccccc
taacaacctt cacctgaacc actaccatca tctccttgct aacacttggg ctcactctag
aatgaactca gggcggccta gaatgagcag aataacagaa agttagtcta actaagacag
ctggtttcga cccagcaaat tatagccaac acctataact ttctcatgtc acccctacac
tttagcttct actccgcatt tacatttagc agcctaggac tagcattcca ccgaaccac
ctaactcag ccctctatg cctagaaagc ataatactct ccatgtttat tccactatca
atctgaccga tcgaaaacca aaccccatca tttacccttg tccccatcct aatattagcg
ttctcagcgt gcgaagctag taccggccta gctatactag tagcctccac acgaacacat
ggctcagacc acctacacaa cctaaacctc ctacaatgtt aaaaattatc ctcccaacaa
ccatactcct cccagtagcc ctctgtcac caccctaat tttatggacc aacaccacag
catacagcct cctaattgct ttaatcagcc tacaatgact taccctatca tactaccac
taaaaacctt aacccctga atatgcaccg accaaatctc atcccccta ctagtcttat
cctgctgatt cttaccctc ataatactag caagccaagg ccacctcaa cacgaacccc
aaacacgaaa acgcatatc atttcaacc taatcatcat ccaaccgttc atcatcctag
cattctcagc tacagaactc atactattct acatttcatt cgaagcaacc ctaatcccca
ccctgatcct cattacacga tgagggaaacc aacctgaacg actcagcgtt ggcatttacc
tcctattcta taccctaate agctccctac cctactaat ctcaatctc tactccact
caaaaaccgg aaccctacat cttccagttc tcaactaac ccacccagc ctaccaacct
catgaaccac actactagca accctagccc tactagtagc atttatagtc aaagcacccc
tatacggcct ccacctctga ctaccaagg cccatgtaga agcacctatc gcaggctcaa
tactactcgc cgtctactg ctaaaactag ggggatatgg tatcatcga ataaccttat
taataggatc cacatccaat ttctacact acccgttcct taccctagcc ttatgaggag
ccctaataac tagctctatc tgctacgcc aaacagacct aaaaaccctt atcgcctact
cctccgtaag ccacatgggc ctagtaatcg ctgcaggtat gatccaaacc cactgatcat
tctcaggggc aataatcctt ataatctccc acggattcac ctctcatta ctattctgcc
tagetaaac aaactatgag cgaacacata gccgcatcct cgtcctcaca cgaggcctac
aacccctcct acctctcata ggactatgat gactactagc aaacctaac aacatagccc
taccaccaac aaccaacctc atagcagaat taacaattat aattgccctt ttcaactgat
cttctccaac aattatctta accggaacag caacactact aacagccacc tacaccctct
acatactcct atcaacccaa cgaggtagc taccatccca cattacatca acctgaact
caaacacagc agaacatctc ctcataatcc tccacatcat ccctatacta gcccttatcc
taaaaccaga cctgatctca ggaactcctc tatgcaagca tagtttaate caaacattag
attgtgattc taaaaatagg agttcaaac tccttactcg ccgaggggtg gtcgaaccca
gcaagaactg ctaattcctg catccgagct ttaaacctcg gccccctcaa cttttaaagg
ataaaagtaa tccactggtc ttaggagcca ctcatcttgg tgcaactcca agtaaaagta
atggaacacg ccctactcct caacacctta acatcactta ccctaattat cctcctaacc
ccaatcatc taccctctat cctgaaattt aaaaacaccc cctcatccat ctccaagacc
gttaaagccg cttcctaac cagcctagca ccaataacca ttttctcata ttcaggagta
gaaagcatca ccactactg agaatgacaa ttcacccaaa acttcaaat cccctaacc
ctaaaaatag acctgtactc catattatc ttccccatcg cactattcgt aacatgatec
atcctagaat ttgcctcatg gtacataaac tcagaaccgt acattacaaa attcttcacc

ttccttctta tcttcctaatt tgccatactt acgctaacca tcgccaacaa catacttctc
ctattcgtag ggtgggaagg agtaggaatt atatcattcc tcctcatcgg ctgatgacaa
ggacgagccg aagccaacac agctgcatta caagctataa tttataaccg gattggagac
atcggcctca tcctgagcat agcatgacta gcctcaacac taaacacctg agaaatccaa
caaacacccc acccacaat tectattctt ccccttctag gcttaatcct agccgctaca
ggaaagttag cccaatttgg actccaccgg tgactgcccg cagcaataga aggccccacc
ccagtctccg cctactcca ctccagcaca atagtctgtag ccggaatfff cctactaatc
cgactcacc ccttactctc ctctaacaaa acagccctaa cactatgtct atgcctaggc
gcactatcaa cactcttcgc cgctacatgc gccctcacc aaaacgatat caaaaaatc
attgccttct ctacctcaag ccaactaggc ctcataatag tcacgatcgg cctagacctt
ccacaactag ccttcttca catctccacc cagccttct tcaaagccat gctattcctc
tgctcaggcc ttatcatcca cagcctaacc ggagaacagg acatccgaaa aataggatgc
ttacaaaaaa tccttccatc aaccacctcc tgcttgacca tcggtaacct tgccctaata
ggtacccccct tcctagcagg cttctactct aaagacatta tcategaaaa tttaaacacc
tcttacatca acacctgggc cctactactg acgctactcg ctacatcatt tactgcaacc
tacagtctcc gcataaccat cctagtcca acaggataca cccgactcc accaatcaca
ccaattgatg aaaacacacc ctacgccatc ctaccatca cagctctagc ccttggtagt
atcatagcag gactactaat ctctccctt atcctacca cgaaaacccc cccaataacc
atacctaccc ttacaaaaac cgccgctatc atcgtcacag cctcggact catcctcgc
ctagaacttt cgcacgcaac ccacacctc accaccctca aacaaaactc cctcataaac
ttctcatcct cactaggcta cttcaaccca ctaatacacc gatccagccc aataatcctc
ctactcaag gacaaaaaat tgctccacc ctaatcgaca tggcgtggta caaaaaata
ggcctgag gctcgcaga cctacaccta acaataagca aaatttccac atcactccac
acaggctcga tcaaagccta cctaggatct ttcgccctca caatcctaac aatcacctta
ctaccccaaa tataaaccca atggcccca acattcgaaa atctcaccct ctattgaaaa
taattaacaa ctccctaate gaccttcta cccatcaaa catctctgcc tgatggaact
tcggatccct cctagcagtc tgctcatga cccaaattat caccggccta ctactagcta
tacctacac tgcagatacc tccctagcct tctcatccgt agccccacaca tgcgaaatg
tccaatacgg atgactaatc cgaacctac atgcaaacgg agcctcatc ttcttcatc
gcatctacct ccacattggc cgaggcctat actacggctc ctacctatat aaagaacct
gaaacacagg agtaattctc ctctcacac taatagcaac cgctttcgta ggctacgttc
ttcatgagg ccaaatatca ttctgagggg ctactgtcat tactaateta ttctcagcta
tcccctacat tggacaaact ctagttaggt gggcgtgggg agggttttca gtcgacaacc
ccacctcac tcgattttc gccctacact tccttctccc cttcgtcatc gcaggaatca
caattatcca cctcacatc cttcacgaat cgggctcaaa caaccctca ggcatttcat
ccaactcaga caaaatccca ttccacctc actactccat caaagacatc ctaggcctaa
cactatact caccacctc ctaaccctag cctattctc cccaaacctc ctaggtgacc
ccgaaaactt taccagcc aaccactag taacaccccc acacatcaaa ccagaatgat
acttctatt tgcatacgc atctctcgt caattccaaa caaacttggg ggcgtactag
cactagcagc ctccgtactt atctctctc taatccatt cctccacaaa tccaacaac
gaaccataac attccgcca ttctcccaac ttctattctg actcctagta gccaaccttc
tcatttcaac ctgagtgggc agccaacctg tagaacaccc cttcatcacc atcggacaac
tagcatcact ctctacttc actacctcc taatctctt cccataatt ggaacctag

aaaacaaat acttaaccac taaatactct aatagtttat gaaaaacatt ggtcttgtaa
accaaaaact gaagacttca cccttcttag agtaaaactca gaaaaaaagg acttaaacct
ttctctccag ctcccaaagc tggcattttc aaataaacta ttctctgta aaccctaaa
ctgcccgaat tgcccccgca gacagcccac gcacaagetc taacacaaca aacagaacca
acaataaacc ccaccccgcc accaaaaata agcctacacc ccacgagtaa aacactgcaa
ccccactaaa atccaaccgc ataaaagata ttccccacc atcaacagta acagcccca
cctttcagaa ctcaacaagc cccctaaaa ctaccccgcc acaaactacc aacacaaaac
ccaaccata cccactacc cggcagctcc cccatgctc aggataagga tcagcagcca
aagacactga ataaacaaaa accaccaaca tccccccaa ataatcata aacaacgcca
aagaaataaa agaaaccct agactcatca accaccaca cccaaccaca gacgctaata
ctaateccac cacccataa taaggagaag gattagatgc cacagctaaa gtcccagta
taaagctaac cccaagaaaa atcataaat aagtcataa ttcccgttg gctagacccc
aaggactacg gcttgaagc ccattgttgt tctcaactac gggaac

//

Appendix 5-1. complete mtDNA annotations of *Gallus gallus* var. *domesticus*

(White Leghorn CB line)

```

whiteleghorn.mt  source  1..16788  organelle mitochondrion
                  organism Gallus gallus
                  sub_species      domesticus
                  dev_stage adult
                  tissue_type     whole blood
                  strain    White Leghorn
                  line      CB inbred line
                  note      common: chicken

D-loop  1..1231  note      control region
tRNA    1232..1300  product  tRNA-Phe
rRNA    1301..2276  product  12S ribosomal RNA
tRNA    2277..2349  product  tRNA-Val
rRNA    2350..3975  product  16S ribosomal RNA
tRNA    3976..4049  product  tRNA-Leu
CDS     4059..5033  gene     ND1
                  codon_start    1
                  product  NADH dehydrogenase subunit 1
                  transl_table    2

tRNA    5034..5105  product  tRNA-Ile
tRNA    complement(5111..5181)  product  tRNA-Gln
tRNA    5181..5249  product  tRNA-Met
CDS     5250..6290  gene     ND2
                  codon_start    1
                  product  NADH dehydrogenase subunit 2
                  transl_table    2

tRNA    6289..6364  product  tRNA-Trp
tRNA    complement(6371..6439)  product  tRNA-Ala
tRNA    complement(6443..6515)  product  tRNA-Asn
tRNA    complement(6517..6582)  product  tRNA-Cys
tRNA    complement(6582..6652)  product  tRNA-Tyr
CDS     6654..8204  gene     COI
                  note      GTG start codon
                  product  cytochrome oxidase subunit I
                  transl_table    2

tRNA    complement(8196..8270)  product  tRNA-Ser
tRNA    8273..8341  product  tRNA-Asp
CDS     8343..9026  gene     COII
                  codon_start    1
                  product  cytochrome oxidase subunit II
                  transl_table    2

tRNA    9028..9095  product  tRNA-Lys
CDS     9097..9261  gene     ATPase8
                  codon_start    1
                  product  ATPase subunit 8
                  transl_table    2

CDS     9252..9935  gene     ATPase 6
                  codon_start    1

```

product ATPase subunit 6
 transl_table 2
 CDS 9935..10720 gene COIII
 codon_start 1
 product cytochrome oxidase subunit III
 transl_table 2
 note TGC stop codon
 tRNA 10720..10787 product tRNA-Gly
 CDS join(10788..10960,10962..11139) gene ND3
 note extra one base at position 10961:reading frame presumably
 maintained by translational frameshift or RNA
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 3
 transl_table 2
 tRNA 11141..11208 product tRNA-Arg
 CDS 11209..11505 gene ND4L
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 4 L
 transl_table 2
 CDS 11499..12878 gene ND4
 note TGC stop codon
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 4
 transl_table 2
 tRNA 12877..12945 product tRNA-His
 tRNA 12947..13011 product tRNA-Ser
 tRNA 13013..13083 product tRNA-Leu
 CDS 13084..14901 gene ND5
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 5
 transl_table 2
 CDS 14906..16048 gene Cytb
 codon_start 1
 product cytochrome b
 transl_table 2
 tRNA 16052..16120 product tRNA-Thr
 tRNA complement(16121..16190) product tRNA-Pro
 CDS complement(16197..16718) gene ND6
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 6
 transl_table 2
 tRNA complement(16721..16788) product tRNA-Glu

Appendix 5-2. complete mtDNA annotations of *Gallus gallus* var. *domesticus*

(White Leghorn Cornell-P line)

```

whiteleghornP.mt  source  1..16788  organelle mitochondrion
                  organism Gallus gallus
                  sub_species      domesticus
                  dev_stage adult
                  tissue_type     whole blood
                  strain   White Leghorn
                  line     Cornell-P inbred line
                  note     common: chicken

D-loop  1..1232  note  control region
tRNA    1233..1301  product  tRNA-Phe
rRNA    1302..2277  product  12S ribosomal RNA
tRNA    2278..2350  product  tRNA-Val
rRNA    2351..3975  product  16S ribosomal RNA
tRNA    3976..4049  product  tRNA-Leu
CDS     4059..5033  gene    ND1
                  codon_start  1
                  product  NADH dehydrogenase subunit 1
                  transl_table  2
tRNA    5034..5105  product  tRNA-Ile
tRNA    complement(5111..5181)  product  tRNA-Gln
tRNA    5181..5249  product  tRNA-Met
CDS     5250..6290  gene    ND2
                  codon_start  1
                  product  NADH dehydrogenase subunit 2
                  transl_table  2
tRNA    6289..6364  product  tRNA-Trp
tRNA    complement(6371..6439)  product  tRNA-Ala
tRNA    complement(6443..6515)  product  tRNA-Asn
tRNA    complement(6517..6582)  product  tRNA-Cys
tRNA    complement(6582..6652)  product  tRNA-Tyr
CDS     6654..8204  gene    COI
                  note     GTG start codon
                  product  cytochrome oxidase subunit I
                  transl_table  2
tRNA    complement(8196..8270)  product  tRNA-Ser
tRNA    8273..8341  product  tRNA-Asp
CDS     8343..9026  gene    COII
                  codon_start  1
                  product  cytochrome oxidase subunit II
                  transl_table  2
tRNA    9028..9095  product  tRNA-Lys
CDS     9097..9261  gene    ATPase8
                  codon_start  1
                  product  ATPase subunit 8
                  transl_table  2
CDS     9252..9935  gene    ATPase 6
                  codon_start  1

```

product ATPase subunit 6
 transl_table 2
 CDS 9935..10720 gene COIII
 codon_start 1
 product cytochrome oxidase subunit III
 transl_table 2
 note TGC stop codon
 tRNA 10720..10787 product tRNA-Gly
 CDS join(10788..10960,10962..11139) gene ND3
 note extra one base at position 10961:reading frame presumably
 maintained by translational frameshift or RNA
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 3
 transl_table 2
 tRNA 11141..11208 product tRNA-Arg
 CDS 11209..11505 gene ND4L
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 4 L
 transl_table 2
 CDS 11499..12878 gene ND4
 note TGC stop codon
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 4
 transl_table 2
 tRNA 12877..12945 product tRNA-His
 tRNA 12947..13011 product tRNA-Ser
 tRNA 13013..13083 product tRNA-Leu
 CDS 13084..14901 gene ND5
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 5
 transl_table 2
 CDS 14906..16048 gene Cytb
 codon_start 1
 product cytochrome b
 transl_table 2
 tRNA 16052..16120 product tRNA-Thr
 tRNA complement(16121..16190) product tRNA-Pro
 CDS complement(16197..16718) gene ND6
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 6
 transl_table 2
 tRNA complement(16721..16788) product tRNA-Glu

Appendix 5-3. complete mtDNA annotations of *Gallus gallus* var. *domesticus*

(White Plymouth Rock)

```

whiterock.mt      source  1..16785  organelle mitochondrion
                  organism Gallus gallus
                  sub_species    domesticus
                  dev_stage adult
                  tissue_type  whole blood
                  strain     White Plymouth Rock
                  line       IgG-H selected line
                  note       common: chicken

D-loop  1..1231  note    control region
tRNA    1232..1300  product tRNA-Phe
rRNA    1301..2276  product 12S ribosomal RNA
tRNA    2277..2349  product tRNA-Val
rRNA    2350..3972  product 16S ribosomal RNA
tRNA    3973..4046  product tRNA-Leu
CDS     4056..5030  gene    ND1
                  codon_start  1
                  product    NADH dehydrogenase subunit 1
                  transl_table 2

tRNA    5031..5102  product tRNA-Ile
tRNA    complement(5108..5178)  product tRNA-Gln
tRNA    5178..5246  product tRNA-Met
CDS     5247..6287  gene    ND2
                  codon_start  1
                  product    NADH dehydrogenase subunit 2
                  transl_table 2

tRNA    6286..6361  product tRNA-Trp
tRNA    complement(6368..6436)  product tRNA-Ala
tRNA    complement(6440..6512)  product tRNA-Asn
tRNA    complement(6514..6579)  product tRNA-Cys
tRNA    complement(6579..6649)  product tRNA-Tyr
CDS     6651..8201  gene    COI
                  note       GTG start codon
                  product    cytochrome oxidase subunit I
                  transl_table 2

tRNA    complement(8193..8267)  product tRNA-Ser
tRNA    8270..8338  product tRNA-Asp
CDS     8340..9023  gene    COII
                  codon_start  1
                  product    cytochrome oxidase subunit II
                  transl_table 2

tRNA    9025..9092  product tRNA-Lys
CDS     9094..9258  gene    ATPase8
                  codon_start  1
                  product    ATPase subunit 8
                  transl_table 2

CDS     9249..9932  gene    ATPase 6
                  codon_start  1

```

product ATPase subunit 6
 transl_table 2
 CDS 9932..10717 gene COIII
 codon_start 1
 product cytochrome oxidase subunit III
 transl_table 2
 note TGC stop codon
 tRNA 10717..10784 product tRNA-Gly
 CDS join(10785..10957,10959..11136) gene ND3
 note extra one base at position 10958:reading frame presumably
 maintained by translational frameshift or RNA
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 3
 transl_table 2
 tRNA 11138..11205 product tRNA-Arg
 CDS 11206..11502 gene ND4L
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 4 L
 transl_table 2
 CDS 11496..12875 gene ND4
 note TGC stop codon
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 4
 transl_table 2
 tRNA 12874..12942 product tRNA-His
 tRNA 12944..13008 product tRNA-Ser
 tRNA 13008..13080 product tRNA-Leu
 CDS 13081..14898 gene ND5
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 5
 transl_table 2
 CDS 14903..16045 gene Cytb
 codon_start 1
 product cytochrome b
 transl_table 2
 tRNA 16049..16117 product tRNA-Thr
 tRNA complement(16118..16187) product tRNA-Pro
 CDS complement(16194..16715) gene ND6
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 6
 transl_table 2
 tRNA complement(16718..16785) product tRNA-Glu

Appendix 5-4. complete mtDNA annotations of *Gallus gallus* var. *domesticus* (Laos native chicken)

```

native-chick.mt  source  1..16784  organelle mitochondrion
                organism Gallus gallus
                sub_species domesticus
                dev_stage adult
                tissue_type whole blood
                strain native chicken in Laos
                note common: chicken

D-loop  1..1231  note control region
tRNA  1232..1300  product tRNA-Phe
rRNA  1301..2276  product 12S ribosomal RNA
tRNA  2277..2349  product tRNA-Val
rRNA  2350..3971  product 16S ribosomal RNA
tRNA  3972..4045  product tRNA-Leu
CDS  4055..5029  gene ND1
                codon_start 1
                product NADH dehydrogenase subunit 1
                transl_table 2
tRNA  5030..5101  product tRNA-Ile
tRNA  complement(5107..5177)  product tRNA-Gln
tRNA  5177..5245  product tRNA-Met
CDS  5246..6286  gene ND2
                codon_start 1
                product NADH dehydrogenase subunit 2
                transl_table 2
tRNA  6285..6360  product tRNA-Trp
tRNA  complement(6367..6435)  product tRNA-Ala
tRNA  complement(6439..6511)  product tRNA-Asn
tRNA  complement(6513..6578)  product tRNA-Cys
tRNA  complement(6578..6648)  product tRNA-Tyr
CDS  6650..8200  gene COI
                note GTG start codon
                product cytochrome oxidase subunit I
                transl_table 2
tRNA  complement(8192..8266)  product tRNA-Ser
tRNA  8269..8337  product tRNA-Asp
CDS  8339..9022  gene COII
                codon_start 1
                product cytochrome oxidase subunit II
                transl_table 2
tRNA  9024..9091  product tRNA-Lys
CDS  9093..9257  gene ATPase8
                codon_start 1
                product ATPase subunit 8
                transl_table 2
CDS  9248..9931  gene ATPase 6
                codon_start 1
                product ATPase subunit 6
                transl_table 2

```

CDS 9931..10716 gene COIII
codon_start 1
product cytochrome oxidase subunit III
transl_table 2
note TGC stop codon
tRNA 10716..10783 product tRNA-Gly
CDS join(10784..10956,10958..11135) gene ND3
note extra one base at position 10957:reading frame presumably
maintained by translational frameshift or RNA
codon_start 1
product NADH dehydrogenase subunit 3
transl_table 2
tRNA 11137..11204 product tRNA-Arg
CDS 11205..11501 gene ND4L
codon_start 1
product NADH dehydrogenase subunit 4 L
transl_table 2
CDS 11495..12874 gene ND4
note TGC stop codon
codon_start 1
product NADH dehydrogenase subunit 4
transl_table 2
tRNA 12873..12941 product tRNA-His
tRNA 12943..13007 product tRNA-Ser
tRNA 13007..13079 product tRNA-Leu
CDS 13080..14897 gene ND5
codon_start 1
product NADH dehydrogenase subunit 5
transl_table 2
CDS 14902..16044 gene Cytb
codon_start 1
product cytochrome b
transl_table 2
tRNA 16048..16116 product tRNA-Thr
tRNA complement(16117..16186) product tRNA-Pro
CDS complement(16193..16714) gene ND6
codon_start 1
product NADH dehydrogenase subunit 6
transl_table 2
tRNA complement(16717..16784) product tRNA-Glu

Appendix 5-5. complete mtDNA annotations of *Gallus sonnerati* (Grey junglefowl)

```

gyjf.mt source 1..16783 organelle mitochondrion
                        organism Gallus sonnerati
                        dev_stage adult
                        tissue_type liver
                        note common: Grey Jungle Fowl
D-loop 1..1231 note control region
tRNA 1232..1300 product tRNA-Phe
rRNA 1301..2276 product 12S ribosomal RNA
tRNA 2277..2349 product tRNA-Val
rRNA 2350..3970 product 16S ribosomal RNA
tRNA 3971..4044 product tRNA-Leu
CDS 4054..5028 gene ND1
                        codon_start 1
                        product NADH dehydrogenase subunit 1
                        transl_table 2
tRNA 5029..5100 product tRNA-Ile
tRNA complement(5106..5176) product tRNA-Gln
tRNA 5176..5244 product tRNA-Met
CDS 5245..6285 gene ND2
                        codon_start 1
                        product NADH dehydrogenase subunit 2
                        transl_table 2
tRNA 6284..6359 product tRNA-Trp
tRNA complement(6366..6434) product tRNA-Ala
tRNA complement(6438..6510) product tRNA-Asn
tRNA complement(6512..6577) product tRNA-Cys
tRNA complement(6577..6647) product tRNA-Tyr
CDS 6649..8199 gene COI
                        note GTG start codon
                        product cytochrome oxidase subunit I
                        transl_table 2
tRNA complement(8191..8265) product tRNA-Ser
tRNA 8268..8336 product tRNA-Asp
CDS 8338..9021 gene COII
                        codon_start 1
                        product cytochrome oxidase subunit II
                        transl_table 2
tRNA 9023..9090 product tRNA-Lys
CDS 9092..9256 gene ATPase8
                        codon_start 1
                        product ATPase subunit 8
                        transl_table 2
CDS 9247..9930 gene ATPase 6
                        codon_start 1
                        product ATPase subunit 6
                        transl_table 2
CDS 9931..10715 gene COIII
                        codon_start 1

```

product cytochrome oxidase subunit III
 transl_table 2
 note TGC stop codon
 tRNA 10716..10783 product tRNA-Gly
 CDS join(10785..10955,10957..11134) gene ND3
 note extra one base at position 10956:reading frame presumably
 maintained by translational frameshift or RNA
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 3
 transl_table 2
 tRNA 11136..11203 product tRNA-Arg
 CDS 11204..11500 gene ND4L
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 4 L
 transl_table 2
 CDS 11494..12873 gene ND4
 note TGC stop codon
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 4
 transl_table 2
 tRNA 12872..12940 product tRNA-His
 tRNA 12942..13006 product tRNA-Ser
 tRNA 13008..13078 product tRNA-Leu
 CDS 13079..14896 gene ND5
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 5
 transl_table 2
 CDS 14901..16043 gene Cytb
 codon_start 1
 product cytochrome b
 transl_table 2
 tRNA 16047..16115 product tRNA-Thr
 tRNA complement(16116..16185) product tRNA-Pro
 CDS complement(16192..16713) gene ND6
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 6
 transl_table 2
 tRNA complement(16716..16783) product tRNA-Glu

Appendix 5-6. complete mtDNA annotations of *Gallus gallus spadiceus* (Red junglefowl in Laos)

```

rjfl.mt  source  1..16785  organelle mitochondrion
                                organism Gallus gallus
                                sub_species      spadiceus
                                dev_stage adult
                                tissue_type      whole blood
                                note      common: Red Jungle Fowl
D-loop  1..1232  note      control region
tRNA    1233..1301  product  tRNA-Phe
rRNA    1302..2277  product  12S ribosomal RNA
tRNA    2278..2350  product  tRNA-Val
rRNA    2351..3972  product  16S ribosomal RNA
tRNA    3973..4046  product  tRNA-Leu
CDS     4056..5030  gene     ND1
                                codon_start  1
                                product  NADH dehydrogenase subunit 1
                                transl_table  2
tRNA    5031..5102  product  tRNA-Ile
tRNA    complement(5108..5178)  product  tRNA-Gln
tRNA    5178..5246  product  tRNA-Met
CDS     5247..6287  gene     ND2
                                codon_start  1
                                product  NADH dehydrogenase subunit 2
                                transl_table  2
tRNA    6286..6361  product  tRNA-Trp
tRNA    complement(6368..6436)  product  tRNA-Ala
tRNA    complement(6440..6512)  product  tRNA-Asn
tRNA    complement(6514..6579)  product  tRNA-Cys
tRNA    complement(6579..6649)  product  tRNA-Tyr
CDS     6651..8201  gene     COI
                                note      GTG start codon
                                product  cytochrome oxidase subunit I
                                transl_table  2
tRNA    complement(8193..8267)  product  tRNA-Ser
tRNA    8270..8338  product  tRNA-Asp
CDS     8340..9023  gene     COII
                                codon_start  1
                                product  cytochrome oxidase subunit II
                                transl_table  2
tRNA    9025..9092  product  tRNA-Lys
CDS     9094..9258  gene     ATPase8
                                codon_start  1
                                product  ATPase subunit 8
                                transl_table  2
CDS     9249..9932  gene     ATPase 6
                                codon_start  1
                                product  ATPase subunit 6
                                transl_table  2
CDS     9932..10717  gene     COIII

```

```

codon_start      1
product  cytochrome oxidase subunit III
transl_table     2
note    TGC stop codon
tRNA  10717..10784    product  tRNA-Gly
CDS   join(10785..10957,10959..11136)    gene    ND3
note    extra one base at position 10958:reading frame presumably
        maintained by translational frameshift or RNA
codon_start      1
product  NADH dehydrogenase subunit 3
transl_table     2
tRNA  11138..11205    product  tRNA-Arg
CDS   11206..11502    gene    ND4L
codon_start      1
product  NADH dehydrogenase subunit 4 L
transl_table     2
CDS   11496..12875    gene    ND4
note    TGC stop codon
codon_start      1
product  NADH dehydrogenase subunit 4
transl_table     2
tRNA  12874..12942    product  tRNA-His
tRNA  12944..13008    product  tRNA-Ser
tRNA  13010..13080    product  tRNA-Leu
CDS   13081..14898    gene    ND5
codon_start      1
product  NADH dehydrogenase subunit 5
transl_table     2
CDS   14903..16045    gene    Cytb
codon_start      1
product  cytochrome b
transl_table     2
tRNA  16049..16117    product  tRNA-Thr
tRNA  complement(16118..16187)    product  tRNA-Pro
CDS   complement(16194..16715)    gene    ND6
codon_start      1
product  NADH dehydrogenase subunit 6
transl_table     2
tRNA  complement(16718..16785)    product  tRNA-Glu

```

Appendix 5-7. complete mtDNA annotations of *Gallus gallus gallus* (Red junglefowl in Philippines)

```

tjfp.mt source 1..16785 organelle mitochondrion
          organism Gallus gallus
          sub_species gallus
          dev_stage adult
          tissue_type whole blood
          note common: Red Jungle Fowl
D-loop 1..1232 note control region
tRNA 1233..1301 product tRNA-Phe
rRNA 1302..2277 product 12S ribosomal RNA
tRNA 2278..2350 product tRNA-Val
rRNA 2351..3972 product 16S ribosomal RNA
tRNA 3973..4046 product tRNA-Leu
CDS 4056..5030 gene ND1
          codon_start 1
          product NADH dehydrogenase subunit 1
          transl_table 2
tRNA 5031..5102 product tRNA-Ile
tRNA complement(5108..5178) product tRNA-Gln
tRNA 5178..5246 product tRNA-Met
CDS 5247..6287 gene ND2
          codon_start 1
          product NADH dehydrogenase subunit 2
          transl_table 2
tRNA 6286..6361 product tRNA-Trp
tRNA complement(6368..6436) product tRNA-Ala
tRNA complement(6440..6512) product tRNA-Asn
tRNA complement(6514..6579) product tRNA-Cys
tRNA complement(6579..6649) product tRNA-Tyr
CDS 6651..8201 gene COI
          note GTG start codon
          product cytochrome oxidase subunit I
          transl_table 2
tRNA complement(8193..8267) product tRNA-Ser
tRNA 8270..8338 product tRNA-Asp
CDS 8340..9023 gene COII
          codon_start 1
          product cytochrome oxidase subunit II
          transl_table 2
tRNA 9025..9092 product tRNA-Lys
CDS 9094..9258 gene ATPase8
          codon_start 1
          product ATPase subunit 8
          transl_table 2
CDS 9249..9932 gene ATPase 6
          codon_start 1
          product ATPase subunit 6
          transl_table 2
CDS 9932..10717 gene COIII

```

```

codon_start      1
product  cytochrome oxidase subunit III
transl_table     2
note    TGC stop codon
tRNA  10717..10784    product  tRNA-Gly
CDS   join(10785..10957,10959..11136)    gene    ND3
note    extra one base at position 10958:reading frame presumably
        maintained by translational frameshift or RNA
codon_start      1
product  NADH dehydrogenase subunit 3
transl_table     2
tRNA  11138..11205    product  tRNA-Arg
CDS   11206..11502    gene    ND4L
codon_start      1
product  NADH dehydrogenase subunit 4 L
transl_table     2
CDS   11496..12875    gene    ND4
note    TGC stop codon
codon_start      1
product  NADH dehydrogenase subunit 4
transl_table     2
tRNA  12874..12942    product  tRNA-His
tRNA  12944..13008    product  tRNA-Ser
tRNA  13010..13080    product  tRNA-Leu
CDS   13081..14898    gene    ND5
codon_start      1
product  NADH dehydrogenase subunit 5
transl_table     2
CDS   14903..16045    gene    Cytb
codon_start      1
product  cytochrome b
transl_table     2
tRNA  16049..16117    product  tRNA-Thr
tRNA  complement(16118..16187)    product  tRNA-Pro
CDS   complement(16194..16715)    gene    ND6
codon_start      1
product  NADH dehydrogenase subunit 6
transl_table     2
tRNA  complement(16718..16785)    product  tRNA-Glu

```

Appendix 5-8. complete mtDNA annotations of *Gallus gallus bankiva* (Red junglefowl in Indonesia)

```

rjfi.mt  source  1..16785  organelle mitochondrion
                                organism Gallus gallus
                                sub_species      bankiva
                                dev_stage adult
                                tissue_type      whole blood
                                note      common: Red Jungle Fowl
D-loop  1..1232  note      control region
tRNA    1233..1301  product   tRNA-Phe
rRNA    1302..2277  product   12S ribosomal RNA
tRNA    2278..2350  product   tRNA-Val
rRNA    2351..3972  product   16S ribosomal RNA
tRNA    3973..4046  product   tRNA-Leu
CDS     4056..5030  gene      ND1
                                codon_start  1
                                product   NADH dehydrogenase subunit 1
                                transl_table  2
tRNA    5031..5102  product   tRNA-Ile
tRNA    complement(5108..5178)  product   tRNA-Gln
tRNA    5178..5246  product   tRNA-Met
CDS     5247..6287  gene      ND2
                                codon_start  1
                                product   NADH dehydrogenase subunit 2
                                transl_table  2
tRNA    6286..6361  product   tRNA-Trp
tRNA    complement(6368..6436)  product   tRNA-Ala
tRNA    complement(6440..6512)  product   tRNA-Asn
tRNA    complement(6514..6579)  product   tRNA-Cys
tRNA    complement(6579..6649)  product   tRNA-Tyr
CDS     6651..8201  gene      COI
                                note      GTG start codon
                                product   cytochrome oxidase subunit I
                                transl_table  2
tRNA    complement(8193..8267)  product   tRNA-Ser
tRNA    8270..8338  product   tRNA-Asp
CDS     8340..9023  gene      COII
                                codon_start  1
                                product   cytochrome oxidase subunit II
                                transl_table  2
tRNA    9025..9092  product   tRNA-Lys
CDS     9094..9258  gene      ATPase8
                                codon_start  1
                                product   ATPase subunit 8
                                transl_table  2
CDS     9249..9932  gene      ATPase 6
                                codon_start  1
                                product   ATPase subunit 6
                                transl_table  2
CDS     9932..10717  gene      COIII

```

codon_start 1
 product cytochrome oxidase subunit III
 transl_table 2
 note TGC stop codon
 tRNA 10717..10784 product tRNA-Gly
 CDS join(10785..10957,10959..11136) gene ND3
 note extra one base at position 10958:reading frame presumably
 maintained by translational frameshift or RNA
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 3
 transl_table 2
 tRNA 11138..11205 product tRNA-Arg
 CDS 11206..11502 gene ND4L
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 4 L
 transl_table 2
 CDS 11496..12875 gene ND4
 note TGC stop codon
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 4
 transl_table 2
 tRNA 12874..12942 product tRNA-His
 tRNA 12944..13008 product tRNA-Ser
 tRNA 13010..13080 product tRNA-Leu
 CDS 13081..14898 gene ND5
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 5
 transl_table 2
 CDS 14903..16045 gene Cytb
 codon_start 1
 product cytochrome b
 transl_table 2
 tRNA 16049..16117 product tRNA-Thr
 tRNA complement(16118..16187) product tRNA-Pro
 CDS complement(16194..16715) gene ND6
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 6
 transl_table 2
 tRNA complement(16718..16785) product tRNA-Glu

Appendix 5-9. complete mtDNA annotations of *Gallus varius* (Green junglefowl)

```

gjf.mt  source  1..16783  organelle mitochondrion
                                organism Gallus varius
                                dev_stage adult
                                tissue_type whole blood
                                note common: Green Jungle Fowl
D-loop  1..1228  note control region
tRNA    1229..1296  product tRNA-Phe
rRNA    1297..2269  product 12S ribosomal RNA
tRNA    2270..2342  product tRNA-Val
rRNA    2343..3964  product 16S ribosomal RNA
tRNA    3965..4038  product tRNA-Leu
CDS     4049..5023  gene ND1
                                codon_start 1
                                product NADH dehydrogenase subunit 1
                                transl_table 2
tRNA    5024..5095  product tRNA-Ile
tRNA    complement(5101..5171)  product tRNA-Gln
tRNA    5171..5239  product tRNA-Met
CDS     5240..6280  gene ND2
                                codon_start 1
                                product NADH dehydrogenase subunit 2
                                transl_table 2
tRNA    6279..6354  product tRNA-Trp
tRNA    complement(6362..6431)  product tRNA-Ala
tRNA    complement(6435..6507)  product tRNA-Asn
tRNA    complement(6509..6574)  product tRNA-Cys
tRNA    complement(6574..6644)  product tRNA-Tyr
CDS     6646..8196  gene COI
                                note GTG start codon
                                product cytochrome oxidase subunit I
                                transl_table 2
tRNA    complement(8188..8262)  product tRNA-Ser
tRNA    8265..8333  product tRNA-Asp
CDS     8335..9018  gene COII
                                codon_start 1
                                product cytochrome oxidase subunit II
                                transl_table 2
tRNA    9020..9087  product tRNA-Lys
CDS     9089..9253  gene ATPase8
                                codon_start 1
                                product ATPase subunit 8
                                transl_table 2
CDS     9244..9927  gene ATPase 6
                                codon_start 1
                                product ATPase subunit 6
                                transl_table 2
CDS     9927..10712  gene COIII
                                codon_start 1

```

product cytochrome oxidase subunit III
 transl_table 2
 note TGC stop codon
 tRNA 10712..10779 product tRNA-Gly
 CDS join(10780..10952,10954..11131) gene ND3
 note extra one base at position 10953:reading frame presumably
 maintained by translational frameshift or RNA
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 3
 transl_table 2
 tRNA 11133..11200 product tRNA-Arg
 CDS 11201..11497 gene ND4L
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 4 L
 transl_table 2
 CDS 11491..12870 gene ND4
 note TGC stop codon
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 4
 transl_table 2
 tRNA 12869..12937 product tRNA-His
 tRNA 12939..13004 product tRNA-Ser
 tRNA 13006..13076 product tRNA-Leu
 CDS 13077..14894 gene ND5
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 5
 transl_table 2
 CDS 14899..16041 gene Cytb
 codon_start 1
 product cytochrome b
 transl_table 2
 tRNA 16045..16113 product tRNA-Thr
 tRNA complement(16116..16186) product tRNA-Pro
 CDS complement(16193..16714) gene ND6
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 6
 transl_table 2
 tRNA complement(16716..16783) product tRNA-Glu

Appendix 5-10. complete mtDNA annotations of *Gallus lafayetii* (Ceylon junglefowl)

```

cjf.mt  source  1..16841  organelle mitochondrion
                                organism Gallus lafayettei
                                dev_stage adult
                                tissue_type whole blood
                                note common: Ceylon Jungle Fowl
D-loop  1..1292  note control region
tRNA    1293..1359  product tRNA-Phe
rRNA    1360..2336  product 12S ribosomal RNA
tRNA    2337..2409  product tRNA-Val
rRNA    2410..4029  product 16S ribosomal RNA
tRNA    4030..4103  product tRNA-Leu
CDS     4113..5087  gene ND1
                                codon_start 1
                                product NADH dehydrogenase subunit 1
                                transl_table 2
tRNA    5088..5157  product tRNA-Ile
tRNA    complement(5163..5233)  product tRNA-Gln
tRNA    5233..5301  product tRNA-Met
CDS     5302..6342  gene ND2
                                codon_start 1
                                product NADH dehydrogenase subunit 2
                                transl_table 2
tRNA    6341..6416  product tRNA-Trp
tRNA    complement(6423..6491)  product tRNA-Ala
tRNA    complement(6495..6567)  product tRNA-Asn
tRNA    complement(6569..6634)  product tRNA-Cys
tRNA    complement(6634..6704)  product tRNA-Tyr
CDS     6706..8256  gene COI
                                note GTG start codon
                                product cytochrome oxidase subunit I
                                transl_table 2
tRNA    complement(8248..8322)  product tRNA-Ser
tRNA    8325..8393  product tRNA-Asp
CDS     8395..9078  gene COII
                                codon_start 1
                                product cytochrome oxidase subunit II
                                transl_table 2
tRNA    9080..9147  product tRNA-Lys
CDS     9149..9313  gene ATPase8
                                codon_start 1
                                product ATPase subunit 8
                                transl_table 2
CDS     9304..9987  gene ATPase 6
                                codon_start 1
                                product ATPase subunit 6
                                transl_table 2
CDS     9987..10772  gene COIII
                                codon_start 1

```

product cytochrome oxidase subunit III
 transl_table 2
 note TGC stop codon
 tRNA 10772..10839 product tRNA-Gly
 CDS join(10840..11012,11014..11191) gene ND3
 note extra one base at position 11013:reading frame presumably
 maintained by translational frameshift or RNA
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 3
 transl_table 2
 tRNA 11193..11260 product tRNA-Arg
 CDS 11261..11557 gene ND4L
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 4 L
 transl_table 2
 CDS 11551..12930 gene ND4
 note TGC stop codon
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 4
 transl_table 2
 tRNA 12929..12997 product tRNA-His
 tRNA 12999..13063 product tRNA-Ser
 tRNA 13065..13135 product tRNA-Leu
 CDS 13136..14953 gene ND5
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 5
 transl_table 2
 CDS 14958..16100 gene Cytb
 codon_start 1
 product cytochrome b
 transl_table 2
 tRNA 16104..16172 product tRNA-Thr
 tRNA complement(16175..16244) product tRNA-Pro
 CDS complement(16251..16772) gene ND6
 codon_start 1
 product NADH dehydrogenase subunit 6
 transl_table 2
 tRNA complement(16774..16841) product tRNA-Glu