

トゲマウス Aco 系統の種の確定

Taxonomic status of Aco strain derived from spiny mice

持田 瞳、目加田和之

Hitomi Mochida, Kazuyuki Mekada

岡山理科大学 理学部 動物学科

Department of Zoology, Faculty of Science, Okayama University of Science

Summary

Spiny mice are useful in regenerative research and as a model for precocial animals. In the present study, we investigated the taxonomic status of the Aco strain, which is derived from spiny mice of an unidentified species. Although this Aco strain has been tentatively considered *A. cahirinus* species, it was distinguished from this species based on conventional and G-banding chromosomal patterns of this strain. Subsequently, we determined the nucleotide sequence of the mitochondrial gene cytochrome *b* (*Cyb*) and constructed a molecular phylogenetic tree. We found that the Aco strain belongs to the same clade as *A. dimidiatus*. Based on this molecular analysis, we concluded that the Aco strain of spiny mice should be considered *A. dimidiatus*.

はじめに

トゲマウス (*Acomys* 属) は、アフリカ地域や地中海の諸島から一部のアジアにかけて分布し、背部の棘状の硬い被毛を特徴とする齧歯類である (図 1) (Nowak 1999)。トゲマウスは既存の実験動物マウス・ラットにはない特徴をもち、その皮膚は薄く、裂けやすい上に再生能力が高いことが報告されている (Seifret *et al.* 2012)。また、生まれた時点で成長が進んでいる早成性の動物でもあり (Brunjes 1989; Brunjes 1990; Ratnayake *et al.* 2014)、再生研究や早熟性動物のモデルとして有用である (Haughton *et al.* 2016)。

Acomys 属の種 (species) の分類に際しては、2000 年代に入るまで、様々な見解があり、種の分類学的境界に関するコンセンサスは得られていなかった。その代表例が *Acomys cahirinus-dimidiatus* complex とよばれるグループであり、アフリカや西アジアの乾燥地帯に生息している *A. cahirinus* (カイロトゲマウス) や *A. dimidiatus* (アラビヤトゲマウス)、その他の関連種が含まれるグループをさす (Denys *et al.* 1994)。これらのグループは、外見や歯の咬合面の形態、染色体数が非常に類似しているため、*A. dimidiatus* が *A. cahirinus* の一亜種に分類されるなど、種の境目が明確ではなかった (Musser and Crleton 2005)。しかしながら、その後のミトコンドリア DNA の塩基配列の比較やバンド染色法を用いた詳細な染色体核型解析により、現在では、*A. cahirinus* と *A. dimidiatus* は別種と扱われるようになった (Kunze *et al.* 1999; Volobouev *et al.* 2007)。

岡山理科大学で維持しているトゲマウス Aco 系統は、1998 年に他の研究室から“*A. dimidiatus*”として譲渡されたものを基としているが、導入当時は、上述のように種の分類が曖昧な状態であったため、*A. dimidiatus* を *A. cahirinus* の種内変異であると解釈し、分子・細胞遺伝学的な解析による種の確認のないまま“*A. dimidiatus*”改め“*A. cahirinus*”の種の系統として維持してきた経緯をもつ。実験動物として扱う上で、その動物の分類学的な位置を明確にすることは重要であり、系統としての価値の向上につながる。そこで、本研究では、トゲマウス Aco 系統の種の確定を目的として、染色体核型解析ならびにミトコンドリア遺伝子チトクロム *b* (*Cytb*) の塩基配列の決定を行なった。



図 1 トゲマウス Aco 系統の外観

材料および方法

トゲマウス Aco 系統 4 個体から摘出した脾臓のリンパ球培養細胞から常法に従って染色体型標本作製した。ギムザ染色法により、染

色体数のカウントと形態の確認を行い、G 分染法 (ASG-GTG combination 法) による染色体バンドパターンにより個々の染色体を識別し、既知のデータとの比較を行なった。*Cytb* 遺伝子の塩基配列の解析には、上記 4 個体中の 2 個体から抽出したゲノム DNA を使用した。NCBI データベースより *A. cahirinus* と *A. dimidiatus* の *Cytb* 遺伝子および前後の塩基配列情報 (ND6:NC_020758.1, tRNA-Glu:NC_020758.1, CYTB: NC_02058.1 および Z96060.1、tRNA-Thr: NC_020758.1, D-loop: NC_020758.1 および FJ415545.1) を入手し、種間で保存性の高い領域を利用して *Cytb* 遺伝子全長をカバーするプライマー

Acb1-F: 5'-GCTAACCCCAAACAACCTGC-3'
 Acb1-R: 5'-TGCAGTTGCTATTACGGCGA-3'
 Acb2-F: 5'-TGCCGAGACGTAAACTACGG-3'
 Acb2-R: 5'-GGGGTGTTTAGGGGGTTAGC-3'
 Acb3-F: 5'-ACAGGGGTGAACCTCTGATGC-3'
 Acb3-R: 5'-TAGAATGCCAGCTTTGGGGG-3'

を設計し、Aco 系統のゲノム DNA に対して PCR を行なった。電気泳動により得られた PCR 産物を回収し、ダイレクトシーケンス法による塩基配列を決定した。得られた塩基配列情報を利用して MEGA7 により系統樹を作成した (Kumar *et al.* 2016)。系統樹に加えた *Acomys* 属種の塩基配列情報は、*A. airensis* (Z96053.1 および 96052.1)、*A. cahirinus* (Z96051.1、AJ233953.1、AJ012017.1)、*A. cilicicus* (AJ233957.1)、*A. dimidiatus* (Z96062.1、Z96061.1、Z96060.1、AJ010554.1、AJ010555.1、AJ233959.1、AJ233958.1)、*A. ignites* (Z96063.1、Z96064.1)、*A. nesiotetes* (AJ233952.1) および *A. spinosissimus* (Z96067.1、Z96068.1) とした。

結果

染色体核型解析

Aco 系統の染色体数は $2n=38$ 、腕の数は 70 (FN=70) であり、メタセントリック型染色体が 16 対、アクロセントリック型染色体が 2 対および性染色体で構成されていた (図 2)。G バンド処理では、各染色体はそれぞれ特有のバンドパターンを示しており、性染色体を含め全ての染色体が識別され、また、相同対も同定された (図 3)。解析した細胞を見る限り、細胞内および個体間での染色体数や形態、バンドパターンの違いは認められなかった。

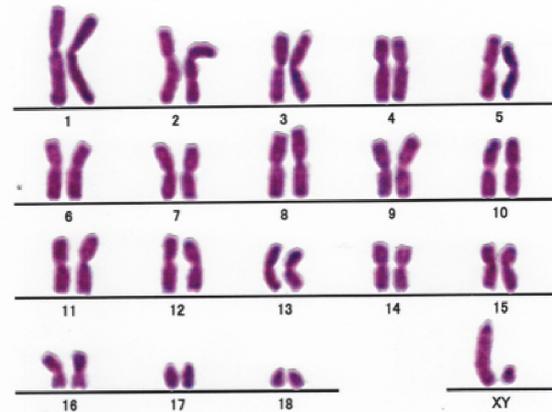


図 2 Aco 系統の通常染色体核型

1~16 番目までがメタセントリック型染色体、17 と 18 番目がアクロセントリック染色体、性染色体 X と Y に分けられる。

Cytb 遺伝子の塩基配列

Aco 系統のミトコンドリア DNA cytochrome *b* 遺伝子の塩基数は 1,141 bp であり (DNA Data Bank of Japan の登録番号は LC217315)、解析した 2 個体間の塩基配列は全く同じ配列であった (図 3)。得られた Aco 系統の塩基配列データと NCBI データベース上の *Acomys* 属 7 種 18 地域の配列データを用いて分子系統樹を作成した結果、Aco 系統は、*A. dimidiatus* のクレードに位置しており、特に、AJ010555.1 (Bethlehem 産) のものと 87% のブートストラップ値でクラスターを形成していた (図 4)。近隣接合法、最大節約法および最尤法のどれを使っても同様の系統樹であった。

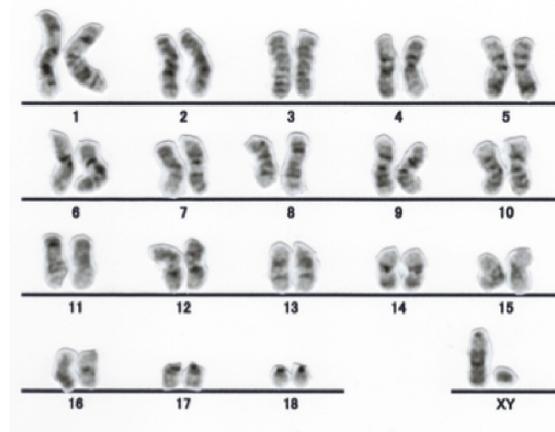


図 3 Aco 系統の G 分染パターン染色体核型

各染色体はそれぞれ特有のバンドパターンを示す。

ATGAAATCATAACGAAAACAACCCACTCCTAAAAATCATCAACCATGCATT CGT
CGACC TCCC TGCA CCT CCAA CATT TCAT CATGATGA AACT TCGGCTCT AT TAG
GAGTA TGCC TAGT AATA CAAA TCCT CACAGGCC TATT CTTAGCAA TACA CTAC ACC
TCAGA TACC ATAA CAGCAT TC TCAT CCGT AACCCACA TCTGCCGAGACGTAAA CTA
CGGCT GATT AATT CGAT ATCT CCAT GCAAACGGAGCC TCCATATT CTTCGTAT GCT
TGTTT ATAC ACGT AGGACGAG GCAT TTTAT TATGATC TTACACCT TTACAGAA ACA
TGAAA CCTC GGCG TTTAT TCTA TTGT TCGC CGTAATAG CAAC TGCA TTTA TAGGATA
TGTAC TTCC ATGA GGACA AATAT CCT TCT GAGGGGCT ACAGTCAT TACA AAC TAC
TATCA GCTA TTCC CTAT ATCGGCAT AAC CTAGTAGA ATGAATTT GAGGTGGG TTT
TCAGT AGACA AAGCCAC CCTC ACAC GCTT TTTCGCAT TCCACTT ATCC TCCC CTT
TATCA TTGC AGCC CTAGCCAT AGTAC ACC TTCT ATTC CTTACGA AACT GGCT CCA
ATAAC CCCA CAGGAGTGA ACT CTGATGCAGACAAAAT CCCATTCC ACCCTAC TAC
ACAAT TAAAGACC TTTT AGGT GTAT TCCT AATA CTAT TAAT TCTC CTCT TATT AGT
ATTAT TCTC CCCA GACC TATT AGGAGACC CAGACAAC TATACACC GGCT AAC CCC
TAAAC ACCC CTCC CCAC ATCAA ACC AGAA TGAT ACTT CCTA TTTCGATA CGCT ATC
CTACG CTCT ATCC CCAA CAAA CTTGGAGG CGTGCTAG CCCTAGTA CTAT CCAT CCT
AATCC TAAT TCTT ATAC CCCT CATC CACA CATCAAAA CAAC GAAGCTTA ATAT TCC
GCCAATTA GCCA GGCC ATAT TCTGAATC CTAACAGC TAACCTAC TCAT CCTA ACC
TGAAT CGGA GGGA ACC CGTA GAAC ACCC CTTT ATCA TCAT CGGG CAAC TAGG TTC
AATCA GCTA TTTC TCCA TTAT TTTAATTT TAATACCA ATCTCAGGACTAATTGAAA
ACAAAATACTAAAATTAACCT

図4 Aco系統のミトコンドリアDNA cytochrome b 遺伝子の塩基配列 (1,141 bp)

考察

Aco 系統の通常核型を文献 (Kunze *et al.* 1999; Volobouev 1996) と比較したところ、本系統は、染色体数 (2n) や染色体腕 (FN) の数は *A. dimidiatus* のもの (2n=38, FN=70) 同じであり、*A. cahirinus* のもの (2n=36, FN=68) とは異なっていた。さらに、染色体核型 G 分染パターンを文献 (Kunze *et al.* 1999; Volobouev *et al.* 2007) に掲載されている染色体核型写真と比較した結果、Aco 系統の G 分染パターンは *A. dimidiatus* のパターンのもと同様であった。したがって、染色体核型解析の結果から Aco 系統は *A. cahirinus* 種ではないことが判明した。一方、ミトコンドリア DNA の *Cytb* 遺伝子をもちいた塩基配列の解析では、Aco 系統の *Cytb* 遺伝子の塩基配列は *A. dimidiatus* のものもともとも高い相同性が認められ、分子系統樹 (近隣接合法) において *A. dimidiatus* と同じクレードに位置していたことから、Aco 系統は *A. dimidiatus* に属していることが明らかとなった。なお、Aco 系統はイスラエル・ベツレヘム産 (AJ010555.1) のものと 87% のブートストラップ値でクラスターを形成していたことから、*A. dimidiatus* の集団の中でもイスラエル産のものを由来としているのではないかと考えられた。

今回の分子細胞遺伝学的解析から、Aco 系統は *A. dimidiatus* 種 (アラビアトゲマウス) であることが確定できた。分類学的な位置が明らかとなったことで、今後、本トゲマウス系統の実験動物としての価値が向上するものと期待される。

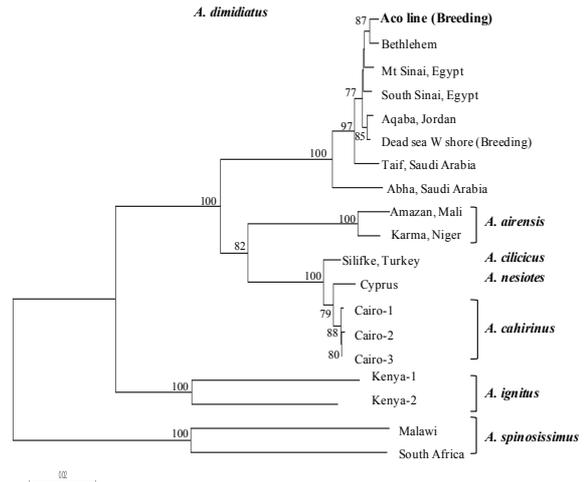


図5 *Cytb* 遺伝子の塩基配列情報をもちいた *Acomys* 属種の分子系統樹

近隣接合法により作成。系統樹上の数値はブートストラップ値を示す。

参考文献

- Brunjes, P.C. (1989). A comparative study of prenatal development in the olfactory bulb, neocortex, and hippocampal region of the precocial mouse *Acomys cahirinus* and rat. *Brain Res Dev Brain Res*, 49, 7-25.
- Brunjes, P.C. (1990). The precocial mouse, *Acomys cahirinus*. *Psychobiology*, 18, 339-350.
- Denys, C., Gautun, J.C., Tranier, M., Volobouev, V. (1994). Evolution of the genus *Acomys* (Rodentia, Muridae) from dental and chromosomal patterns. *Israel J Zool*, 40, 215-246.
- Houghton, C.L., Gawriluk, T.R., Seifert, A.W. (2016). The Biology and Husbandry of the African Spiny Mouse (*Acomys cahirinus*) and the Research Uses of a Laboratory Colony. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 55, 9-17.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol and Evol*, 33, 1870-1874.
- Kunze, B., Dieterlen, F., Traut, W., Winking, H. (1999). Karyotype relationship among four species of Spiny mice (*Acomys*, Rodentia). *Zeitschrift fur Saugetierkunde*, 64, 220-229.
- Musser, G.G., Carleton, M.D. (2005). Superfamily Muroidea. pp. 894-1531. In: Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. 3rd ed. Vol. 2. (Wilson D.E., Reeder, D.M. Eds.), The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Nowak, R.M. (1999). Walker's mammals of the work. John Hopkins University Press, Baltimore.
- Ratnayake, Quinn, T., Daruwalla, K., Dickinson,

- H., Walker, D.W. (2014). Understanding the behavioural phenotype of the precocial spiny mouse. *Behav Brain Res*, 15, 62-71.
- Seifert, A.W., Kiama, S.G., Seifert, M.G., Goheen, J.R., Palmer, T.M., Maden, M. (2012). Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). *Nature*, 489, 561-565.
- Volobuev, V., Auffray, J.C., Debat V., Denys, C., Gautun, J.C., Tranier, M. (2007). Species delimitation in the *Acomys cahirinus-dimidiatus* complex (Rodentia, Muridae) inferred from chromosomal and morphological analyses. *Biol J Linn Soc*, 91, 203-214.