

# 琉球大学学術リポジトリ

## ヘモグロビンによるキジ亜科の系統的研究

メタデータ	言語: 出版者: 江口幸典 公開日: 2010-10-05 キーワード (Ja): ヘモグロビン, アミノ酸配列, 分子進化, 系統樹, キジ亜科, キジ科 キーワード (En): Hemoglobin, Amino Acid Sequence, Molecular Evolution, Phylogenetic Tree 作成者: 江口, 幸典, 嘉陽, 進, Eguchi, Yukinori, Kayo, Susumu メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/18189">http://hdl.handle.net/20.500.12000/18189</a>

# ヘモグロビンによるキジ亜科の系統的研究

課題番号：07804061

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金  
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成9年3月

研究代表者 江口 幸典  
(琉球大学医学部助教授)

## はしがき

キジ科に含まれる各亜科の系統的研究は、1960年代に始まる形態的研究をかわきりに、1970年代に行われた卵白リゾチームを指標とする分子進化的研究や、1980年代のDNAハイブリダイゼーションによる研究、さらに1990年代に入りミトコンドリアDNA塩基配列による研究が行われている。しかし、これらの研究により得られた系統樹は、それぞれ異なり、いまだこれら亜科間の系統関係ははっきりしていない。

そこで我々は、かねてより鳥類におけるヘモグロビンの分子進化の興味より各種鳥類のヘモグロビンの一次構造を解析し、ヘモグロビンによる鳥類の分子進化について検討してきた。今回、キジ亜科間の系統関係に興味を抱き、新たにホロホロチョウ及びカリフォルニアウズラのデータを加え検討すると共に、さらに希少種への応用を考え、抜け落ちた羽より効率よくDNAを抽出する方法を開発した。現在、PCR反応により各種のDNA断片を増幅する方法を確立し、この方法により、希少種への応用に利用できる可能性を示唆した。

## 研究組織

研究代表者：江口 幸典（琉球大学医学部助教授）  
研究分担者：嘉陽 進（琉球大学医学部助手）  
研究協力者：奥村 智春（行川アイランドパーク 獣医師）  
研究協力者：池原 強（琉球大学大学院医学研究科院生）  
研究協力者：江口 知子（琉球大学大学院医学研究科院生）

## 研究経費

平成7年度	1、700千円
平成8年度	500千円
計	2、200千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

- 江口 幸典 キジ亜科ヘモグロビンの分子進化について 生化学 67 1995 p724
- 池原 強 ハト $\alpha^D$ グロビン遺伝子のクローニング 生化学 68 1996 p1772
- 池原 強 ハト $\alpha^D$ グロビン遺伝子の構造解析 生化学 68 1996 p1090
- 江口 知子 エラブウミヘビのグロビン遺伝子構造の解析 生化学 68 1996 p1091
- 江口 幸典 シギダチョウヘモグロビンの一次構造について 生化学 68 1996 p627

### (2) 口頭発表

- 江口 幸典 キジ亜科ヘモグロビンの分子進化について  
第68回日本生化学会総会（仙台） 1995
- 池原 強 ハト $\alpha^D$ グロビン遺伝子のクローニング  
平成8年度日本生化学会九州支部例会 1996
- 池原 強 ハト $\alpha^D$ グロビン遺伝子の構造解析  
第69回日本生化学会総会（札幌） 1996
- 江口 知子 エラブウミヘビのグロビン遺伝子構造の解析  
第69回日本生化学会総会（札幌） 1996
- 江口 幸典 シギダチョウヘモグロビンの一次構造について  
第69回日本生化学会総会（札幌） 1996

### (2) 出版物

なし

## 研 究 成 果

## I. 本研究の背景

キジ科に含まれる各亜科の系統関係についての研究は、1960年代に行われた、Wetmore らによる形態的研究を始め、1970年代に行われた Jollesra らによる卵白リゾチームのアミノ酸配列を指標とする分子進化的研究や、1980年代の Sibley と Ahlquist による DNA ハイブリダイゼーションによる研究、さらに1990年代に入り Kornegay らによるミトコンドリア DNA 塩基配列による研究が行われている。しかし、これらの研究により得られた系統樹 (図-1) は、それぞれ異なり、いまだこれら亜科間の系統関係ははっきりしていない。そこで生命維持に不可欠なヘモグロビンの配列を決定し、先の結果と比較検討する事を試みた。

最初の計画では、血液の入手が困難であることも考慮し PCR を多用する予定であったが、幸いにも血液が入手できたので、今までのデータの蓄積等を考慮し (表-1 研究代表者 江口が関与しアミノ酸配列を決定したキジ科の種については下線を引いている。現在までに、キジ科における5つの亜科のうち、我々の関与した研究によりキジ亜科とシチメンチョウ亜科についてヘモグロビンの全アミノ酸配列を決定してきた。今回は新たにアメリカウズラ亜科1種とホロホロチョウ亜科1種を決定した。)、まずアミノ酸配列の決定を行い、キジ亜科間の系統関係を明らかにした。

また、これらの解析等と平行して、稀少種への対応の為に羽より PCR 反応ができないかについて検討を重ねてきた。これまでの抽出方法では、DNA の抽出効率が悪いためミトコンドリア DNA の様な多コピー性の領域は、比較的簡単に増幅することが可能であった。しかしミトコンドリア以外の領域を増幅する為には増幅が困難であるなど問題があったため、従来の DNA 抽出方法を改良し、より効率よく抽出し、PCR 反応に応用できるように試みた。最終的には、抜け落ちた羽により塩基配列の決定までを行えるようにするべく試みた。

## II. 研究の方法

### II-1 ヘモグロビンのアミノ酸配列の解析方法

#### II-1-1. ヘモグロビン溶液の調整

鳥類の採血は、翼下の静脈血管よりヘパリン存在下で採血し、直ちに生理食塩水で洗浄した。洗浄は常法に従い5倍量の生理食塩水を加え、2000 x g、10分間遠心を行い上清を除去し、さらに生理食塩水を加え同様の操作を4回繰り返し、赤血球を得た。得られた赤血球に、10倍量の蒸留水を加え溶血した。十分に溶血後、10000 x g、20分間遠心し上清を回収し、20mM リン酸緩衝液 pH6.85 で透析し、ヘモグロビン溶液とした。

#### II-1-2. ヘモグロビンの分離精製

ヘモグロビン溶液は、常法に従いイオン交換クロマトグラフィにより、主成分 HbA(HbII)と、少成分 HbD(HbI)とに分離精製した。分離には、MemSep CM を用いて、20mM リン酸緩衝液 pH6.85 と 1.0M 塩化ナトリウム含有の 20mM リン酸緩衝液 pH6.85 によるグラジエント (図-2上) により、流速 1.0ml/分で溶出し、検出は UV モニターを使用し、測定波長は 280nm で行った。

#### II-1-3. グロビン鎖の分離

精製ヘモグロビン溶液は、逆相カラムクロマトグラフィにてグロビン鎖の分離を行った。分離カラムは、 $\mu$  Boundsphere C4 を用いて、0.1% トリフルオロ酢酸と 0.1%トリフルオロ酢酸含有のアセトニトリルによるグラジエント (図-2中、下) により、流速 1.0 /分で溶出し、検出は UV モニターを使用し、測定波長は 280nm で行った。

#### II-1-4. 各グロビン鎖のアミノ酸配列の分析方法

分離精製された各グロビン鎖は、凍結乾燥し、プロテインシークエンサーで分析を行った。プロトコールの概略は図-4に示す各アミノ酸残基の化学的切断を行い各フラグメントを分析することで行われた。すなわち、N末端より 60~70残基を決定し、BrCN 分解産物と Asp-Pro 結合分解産物の断片をそれぞれ分析する事で全構造を解析した。

## Ⅱ－２．ヘモグロビンのアミノ酸配列に基づく、キジ亜科間の系統関係の分析

### Ⅱ－２－１．ヘモグロビンのアミノ酸配列のアライメント方法

得られた各グロビン鎖には、欠損等が見られなかったため、seqedit 等でアライメントを行った。

### Ⅱ－２－２．各グロビン鎖における分子系統樹の解析方法

得られた各グロビン鎖のデータに基づき、N J 法及び最尤法を用いて解析を行った。N J 法は、Phylip のパッケージで、最尤法は molphy-2.0 の protml により算出した。



## II-3. PCR反応による希少種への応用

### II-3-1. DNA抽出方法の改良

約0.3gの抜けた羽を滅菌生理食塩水でよく洗浄し、滅菌遠心チューブに移し、200mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0) 6ml とコラゲナーゼ 3mg を加え、37°Cで一晩良く振とうした。翌日懸濁液を別の滅菌遠心チューブに移し、3000 r.p.m.で5分間遠心し、上清を捨てた。沈殿物にTE緩衝液(10mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)、1mM EDTA)、及び終濃度0.1% SDS、0.5mg/ml プロテナーゼKと為るように3ml加え、37°Cで一晩静かにインキュベートした。その後常法に従い、フェノール・クロロホルム処理を行い、最後にエタノール沈殿を行い精製をした。その後DNA濃度が0.5 $\mu$ g/mlになるようTE緩衝液で溶解し以下の実験に使用した。

### II-3-2. PCR反応

PCR反応液は、鋳型DNA、2mM dNTP、50p moleの各プライマー、反应用緩衝液(終濃度40mM トリス塩酸緩衝液 pH8.5、47.5mM 塩化カリウム、50 $\mu$ g/ml 牛血清アルブミン)、Tthポリメラーゼ 2unitsを加え、最終用量を100 $\mu$ lとした。なお、反応するに当り蒸発を防ぐためにミネラルオイルを各30 $\mu$ lずつ加えた。PCR反応の条件は、Minicycler (MJ Research社製)を使用し、94°C 60秒、52°C 60秒、72°C 60秒、で30サイクル反応した。なお、用いたプライマーの配列はニワトリ $\alpha^A$ 遺伝子の塩基配列データを基に作製した。

### II-3-3. 電気泳動

PCR反応後の産物の分析は、サブマリン-アガロース電気泳動法により泳動し、UVイルミネータでバンドを確認し、ポラロイドカメラで記録を取った。アガロースゲルの濃度は0.6%と1.0%で緩衝液は、0.5倍のTBE緩衝液を使用した。

### Ⅲ. 本研究の結果及び考察

#### Ⅲ-1. ホロホロチョウのヘモグロビンの分離精製について

キジ科を含む多くの鳥類は、主成分と少成分のヘモグロビンを持ち、これらの構成成分の $\beta$ グロビン鎖が共通で、 $\alpha$ グロビン鎖が異なり、2成分となっていることが知られている。今回新たに分析をした、ホロホロチョウのヘモグロビンでも、イオン交換クロマトのパターンは、主成分及び少成分の存在を示す、図-2上の様になった。インジェクト後、約1分のピークは少成分のヘモグロビンでHbD(HbI)である。また7.3分付近のピークは、主成分のヘモグロビンであるHbA(HbII)である。また両者の比率は、約1:3で他のキジ科の鳥類と同様であった。

#### Ⅲ-2. ホロホロチョウのヘモグロビンのアミノ酸配列について

得られたホロホロチョウのヘモグロビンは、 $\mu$ -Bondasphere C4による逆相クロマトにより各グロビン鎖に分離した。得られた結果は、図-2中、下に示す通りである。8分付近の最初のピークは、ヘムで、10分付近のピークが $\alpha$ グロビン鎖で、最後の13分付近のピークが $\beta$ グロビン鎖である事がアミノ酸配列より、確認された。なお各グロビンのアミノ酸配列は、図-4、5、6に示す通りであった。

#### Ⅲ-3. カリフォルニアウズラのヘモグロビンの分離精製について

カリフォルニアウズラのヘモグロビンの分離精製についても、図は省略するが、ホロホロチョウのヘモグロビンと同様の分離条件で分離可能であった。また少成分と主成分の比率は、約1:3で他のキジ科の鳥類と同様であった

#### Ⅲ-4. カリフォルニアウズラのヘモグロビンのアミノ酸配列について

カリフォルニアウズラのヘモグロビンのアミノ酸配列についても、ホロホロチョウのヘモグロビンと同様の決定方法により全アミノ酸配列を決定できた。各グロビンのアミノ酸配列は、図-4、5、6に示す通りであった。

#### Ⅲ-5. アミノ酸配列と生理学的機能の関連について

今回得られたアミノ酸配列より、ヘモグロビンの生理学的に重要なアミノ酸残基は、よく保たれている事がわかった。この事よりホロホロチョウやカリフォルニアウズラのヘモグロビンの機能は、他のキジ科のヘモグロビンと同様の機能である事が推測された。

### Ⅲ-6. ヘモグロビンによるキジ亜科の分子系統樹について

最尤法による解析の結果は、図-7に示す通りである。また NJ 法による解析の結果は、図-9に示す通りであった。NJ 法ではニホンウズラの位置関係が、ホロホロチョウに非常に近い位置に来ていた。この点については、今後十分に吟味しないといけないが、仮に、このニホンウズラを例外と考えるならば、最尤法の結果とほぼ同じになる。そこで今回は最尤法で得られた結果について、検討を加えた。今までの各種の研究により図-7の1~3に示されるような、キジ亜科間の系統関係が考えられている。今回得られたヘモグロビンのアミノ酸配列のデータを基に、他のデータで示された系統樹との検討を行った。その結果を表-2に示している。内容は、各グロビン等のアミノ酸配列を基に図-7に示される系統樹に当てはめた場合の確率を示している。このデータによると70%以上の確率でヘモグロビンの示した4番の系統樹が支持されている。 $\beta$ グロビン鎖のデータでは、若干低値になっているが、NJ法でもわかる様に変化が小さいためであると考えられる。各種のデータを総合的に判断すると1番の形態学的な系統樹は否定できると考えられる。また現在発見されている化石のデータを重ね合わせた場合、キジ科が分岐したのは5000万年以上前で、ホロホロチョウがキジ亜科と分岐したのは4000年以上前で、キジ亜科の種の分化が始まったのが最大で3100万年とされている。またシチメンチョウの先祖の化石は、米国フロリダで1600~2000万年前のものが見つかっている。また600~800万年前の地層からも見つかっているため、キジ亜科とシチメンチョウ亜科が分岐したのは、最大でも2000万年前だと考えられる。これら化石のデータと今回ヘモグロビンのデータに基づく分子系統樹は、これらの年代関係とも問題無く一致する事が確認出来る。しかし問題は、アメリカウズラ亜科に関する化石等のデータが存在しない事である。事実、DNAハイブリダイゼーションとミトコンドリアの塩基配列データから解析された分子系統樹とヘモグロビンによる系統樹では、ホロホロチョウ亜科とアメリカウズラ亜科との関係が逆転するのみである。このような状況を考慮しても、キジ亜科間の系統関係は、図-7に示された系統樹2番と系統樹4番のいずれかであると確信する。

また、ヘモグロビンのデータに基づく系統樹4番である事を証明するためには、今回ヘモグロビンのデータで解析をしたアメリカウズラは一種のみである為、数種のアメリカウズラ亜科のデータを加えることにより、確実なデータを得られると考えている。

### Ⅲ-7. PCR反応の希少種への応用について

通常の DNA 抽出方法では、抽出効率が悪く、また抽出された DNA も短くなっておりミトコンドリア DNA の増幅等には問題なかったが、ヘモグロビンの領域の増幅を試みたところ、増幅出来なかった。これは抽出した DNA の質によるものと考え、DNA の抽出方法の改良を行った。抜け落ちた羽などでは、プロテナーゼKによる組織の分解の効率が非常に悪いのではないかと考え、まず、羽をコラゲナーゼ処理し、その後通常の DNA 抽出を試みた。その結果コラゲナーゼ処理をすることにより、DNA の抽出効率が飛躍的によくなり、かつ、DNA の質もよくなった。我々が、ニワトリ等で実際に行った例では、抽出効率が約 1000 倍、40 Kb 以上の DNA が抽出できた (図-9 パネルA)。この方法により希少種への応用が十分可能になるのではないかと期待している。

また、PCR 反応についても図-9 パネルBのような結果を得ることが出来た。この結果より、通常の組織から抽出した DNA と同じような各種の遺伝子解析が可能ではないかと考えている。

## IV. 本研究における今後の展開

### IV-1. ヘモグロビンによるキジ目の分子系統的研究について

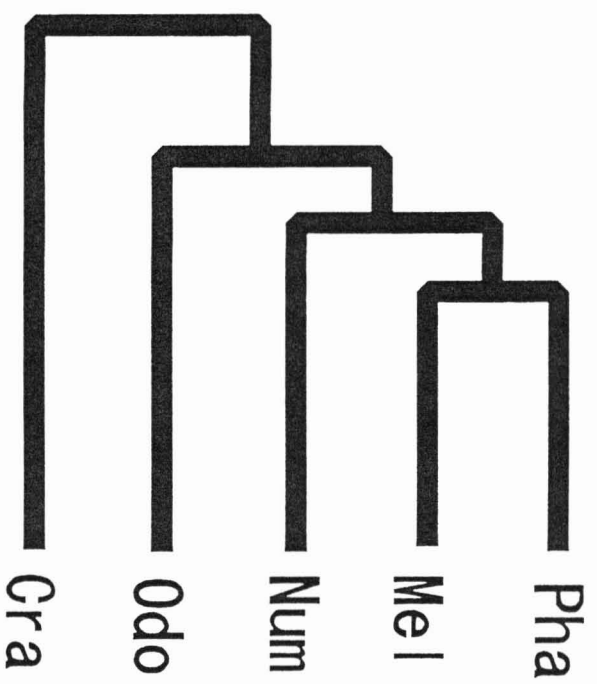
今回の研究により、ヘモグロビンによるキジ目の分子系統樹に関しては、ライチョウ亜科を除いてほぼ網羅できたことになる。しかし今回の最尤法での解析においても、日本ウズラは本来キジ亜科に分類されニワトリやコウライキジと同じ分岐を示すはずであるが、今回の位置関係はホロホロチョウに近い位置になっていた。このようなデータのばらつきを考慮するならば、特に問題に成っているホロホロチョウ亜科やアメリカウズラ亜科についての他の種を加えさらに検討する必要があると考えられる。またライチョウ亜科についての分子進化的研究は非常に少ないため貴重であると共に、高地での生息と言うヘモグロビンの機能と進化と言う点で、非常に興味ある対象である。今後もこれらを考慮し、本研究の更なる展開を推進したい。

### IV-2. ヘモグロビンによる鳥類の分子系統的研究について

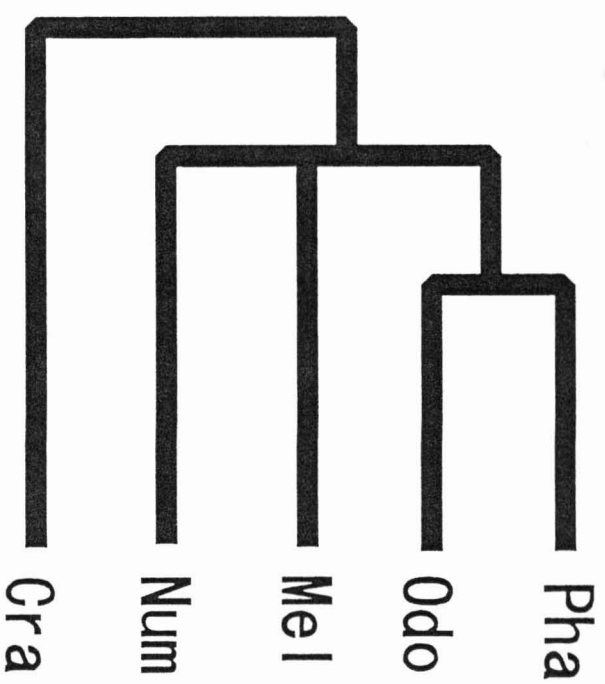
本研究により、抜け落ちた羽より DNA を効率よく抽出し、PCR反応により特定の領域を増幅できる方法を確立できた。今後はこの方法をより確実に実行できるように多少の改良を加えつつ、各種鳥類の分子系統的研究を推進できると期待される。特にこの方法を利用すると、生体に負担をかけることなくサンプリングできるため、今まで分析できなかった希少種や野生種等にも利用できることより、よりダイナミックに鳥類間の関係を明らかにできるのではないかと期待している。

## 図表の部

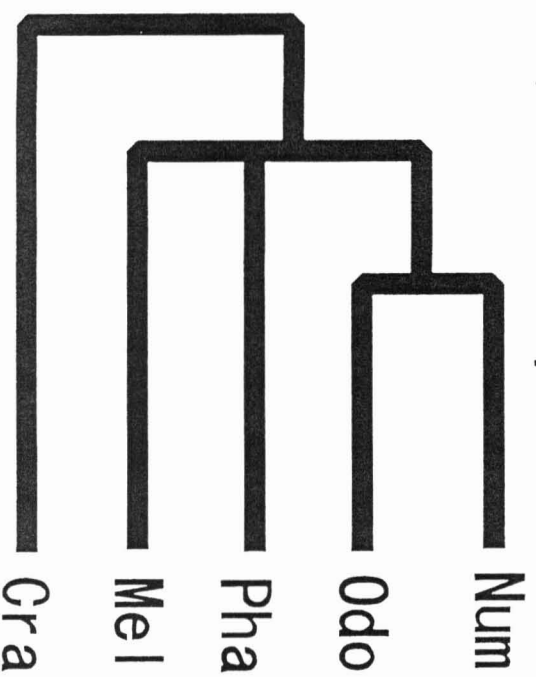
# DNA hybridization



# Morphological



# Lysozyme C seq.



Pha: キジ 亜科

Odo: アメリカカウス`ラ 亜科

Mel: シチミンチヨウ 亜科

Num: ホロホロチヨウ 亜科

Cra: ホウカンチヨウ 科

キジ科

キジ亜科

ニワトリ・ニホンウズラ

コウライキジ

アメリカカウズラ亜科

カシムリウズラ\*

シチメンチヨウ亜科

シチメンチヨウ

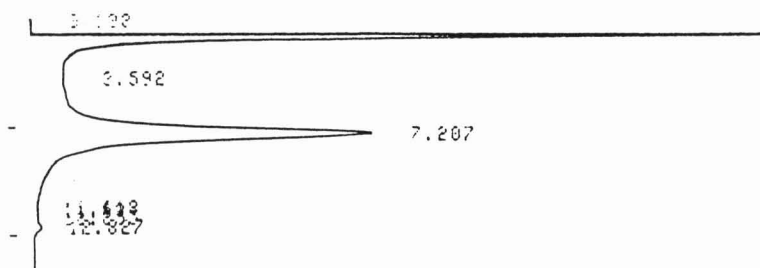
ホロホロチヨウ亜科

ホロホロチヨウ\*

ライチヨウ亜科



### Separation of Guinea fowl hemoglobin on MemSep CM



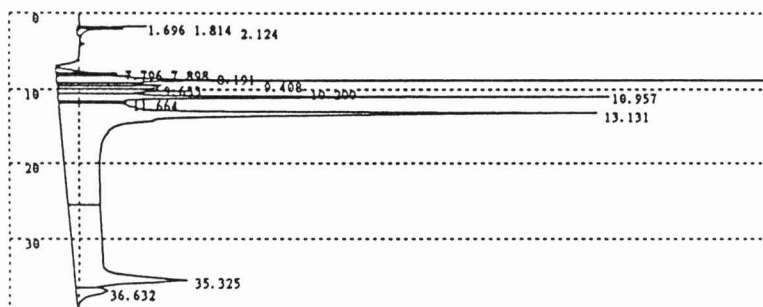
Sol. A: 20mM Phosphate buffer (pH=6.85)

Gradient: B conc 0→40%

Sol. B: 20mM Phosphate buffer(pH=6.85) + 1.0M NaCl

/ 30 min.

### Separation of Guinea fowl hemoglobin-I on $\mu$ -Bondasphere C4



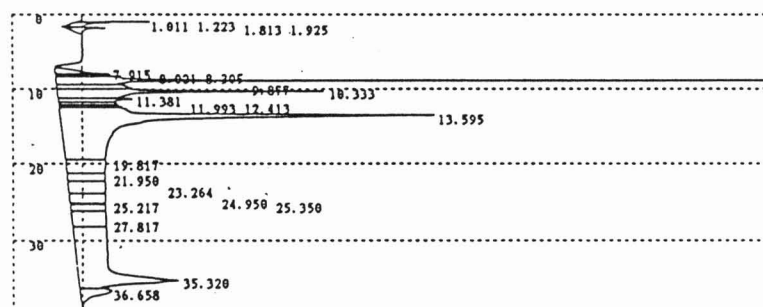
Sol. A: 0.1% TFA

Gradient: B conc 50→60%

Sol. B:  $\text{CH}_3\text{CN}$

/ 30 min.

### Separation of Guinea fowl hemoglobin-II on $\mu$ -Bondasphere C4



Sol. A: 0.1% TFA

Gradient: B conc 50→60%

Sol. B:  $\text{CH}_3\text{CN}$

/ 30 min.

Alpha-A globin

1 32 94 141

Val Met Asp-Pro

Alpha-D globin

1 32 63 80 94 141

Met Met Met Asp-Pro

Beta globin

1 59 99 146

Val Met Asp-Pro

Amino acid sequence of avian alpha-D globin

	1	11	21	31	41	51	61	
<u>C-Quail</u>	<u>MLTAEDKLL</u>	<u>QQTWEKAASH</u>	<u>QEDFGAEAL</u>	<u>RMFTTYPQIK</u>	<u>TYFPHFDISA</u>	<u>GHDQVRGHGK</u>	<u>KVMGALGNAY</u>	
<u>G.Fowl</u>	<u>MLTAEDKLL</u>	<u>QQWEKASSH</u>	<u>QEDFGAEAL</u>	<u>RMFTAYPQIK</u>	<u>TTFPHFDLSP</u>	<u>GSDQIRGHGK</u>	<u>KVLNALGNAY</u>	
Turkey	MLTAEDKLL	QQAWEKAAASH	QEEFGAEALT	RMFTTYPQIK	TYFPHFDLSP	GSDQVRGHGK	KVLGALGNAY	
Chicken	MLTAEDKLL	QQAWERAASH	QEEFGAEALT	RMFTTYPQIK	TYFPHFDLSP	GSDQVRGHGK	KVLGALGNAY	
Quail	MLTAEDKLL	QQAWEKASSH	QEDFGAEALL	RMFTAYPQIK	TYFPHFDLSP	GSDQIRGHGK	KVLAALGNAY	
Pheasant	MLNAEDKLL	QQAWEKAAASH	QEEFGAEALV	RMFTAYPQIK	TYFPHFDLSP	GSDQIRGHGK	KVLGALSNAY	
Goshawk	MLTAEDKLL	QAIWDKVGQH	QEDFGAEALQ	RMFITYPPTK	TYFPHFDISP	GSDQVRSHGK	KVYNALGNAY	
Duck	MLTAEDKLL	TQLWEKVAGH	QEEFGSEALQ	RMFLAYPQIK	TYFPHFDLHP	GSEQVRGHGK	KVAALGNAY	
	71	81	91	101	111	121	131	
	<u>KNVDNL</u>	<u>SELN</u>	<u>LHAYN</u>	<u>LRVDPVNF</u>	<u>KL</u>	<u>LSQCIQVLA</u>	<u>AHLGKDYTPE</u>	<u>VHAAF</u>
	<u>KNL</u>	<u>DNL</u>	<u>SOAL</u>	<u>SELSNTHAYN</u>	<u>LRVDPVNF</u>	<u>KL</u>	<u>LSQCIQVLA</u>	<u>AHMGKEYTPE</u>
	<u>KNVDNL</u>	<u>SOAM</u>	<u>SELSN</u>	<u>LHAYN</u>	<u>LRVDPVNF</u>	<u>KL</u>	<u>LSQCIQVLA</u>	<u>AHLGKDYTPE</u>
	<u>KNVDNL</u>	<u>SOAM</u>	<u>AELS</u>	<u>NLHAYN</u>	<u>LRVDPVNF</u>	<u>KL</u>	<u>LSQCIQVLA</u>	<u>VHMGKDYTPE</u>
	<u>KNVDNL</u>	<u>SOAM</u>	<u>AELS</u>	<u>NLHAFN</u>	<u>LRVDPVNF</u>	<u>KL</u>	<u>LSQCIQVLA</u>	<u>AHMGKDYSP</u>
	<u>KNVDNL</u>	<u>SOAM</u>	<u>SELS</u>	<u>NLHAYN</u>	<u>LRVDPVNF</u>	<u>KL</u>	<u>LSQCIQVLA</u>	<u>VHMGKDYTPE</u>
	<u>KSM</u>	<u>DNL</u>	<u>SOAL</u>	<u>SELSN</u>	<u>LHAYN</u>	<u>LRVDPVNF</u>	<u>KL</u>	<u>LSQCFQWLA</u>
	<u>KSL</u>	<u>DNL</u>	<u>SOAL</u>	<u>SELSN</u>	<u>LHAYN</u>	<u>LRVDPVNF</u>	<u>KL</u>	<u>LAQCFQWLA</u>
								<u>AHLGKDYSP</u>
								<u>MHAAF</u>
								<u>DKFMS</u>
								<u>AVAAV</u>
								<u>LAEKY</u>

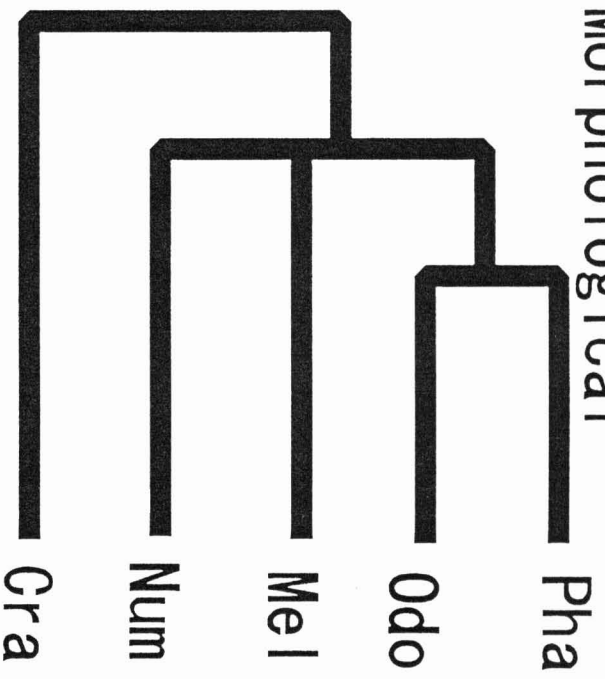
Amino acid sequence of avian alpha-A globin

	1	11	21	31	41	51	61
<i>C-Quail</i>	VLSAAEKTINV	KGIFTKISGH	AEEYGAEEALE	RMFITYPQTK	TYFRPHFDLSH	GSAQIKGHGK	KVVAALIEAA
<u><i>G-Fowl</i></u>	VLSAADKTINV	KGVFSKITG	ADEYGAEALD	RMFTTYPQTK	TYFRPHFDLSH	GSAQIKAHGK	KVAALVEAA
Turkey	VLSAADKNV	KGIFTKIAGH	AEEYGAETLE	RMFITTPPTK	TYFRPHFDLSH	GSAQIKGHGK	KVVAALIEAA
Chicken	VLSAADKNV	KGIFTKIAGH	AEEYGAETLE	RMFTTYPPTK	TYFRPHFDLSH	GSAQIKGHGK	KVVAALIEAA
J-Quail	VLSAADKTINV	KGIFAKIAGH	AEEYGAEALD	RMFTTYPQTK	TYFRPHFDVSH	GSAQIKGHGK	KVAALVEAA
Pheasant	VLSAADKNV	KGIFTKIAGH	AEEYGAEEALE	RMFITTPSTK	TYFRPHFDLSH	GSAQIKGHGK	KVVAALIEAV
Goshawk	VLSANDKTINV	KNVFTKIGGH	AEEYGAETLE	RMFTTYPPTK	TYFRPHFDLHH	GSAQIKAHGK	KVVGALIEAV
Duck	VLSAADKTINV	KGVFSKIGGH	AEEYGAETLE	RMFIAYPQTK	TYFRPHFDLSH	GSAQIKAHGK	KVAALVEAV
	71	81	91	101	111	121	131
	NHIDDIAGTL	SKLSDLHAHK	LRVDPVNFKL	LGQCFLWVA	IHPAALTPE	VHASLDFLC	AVGTVLTAKY R
	<u>NHIDDIAGTL</u>	<u>SKLSDLHAHK</u>	<u>LRVDPVNFKL</u>	<u>LGQCFLWVA</u>	<u>IHPAALTPE</u>	<u>VHASLDFLC</u>	<u>AVGTVLTAKY R</u>
	NHIDDIAGTL	SKLSDLHAHK	LRVDPVNFKL	LGQCFLWVA	IHPAALTPE	VHASLDFLC	AVGTVLTAKY R
	NHIDDIAGTL	SKLSDLHAHK	LRVDPVNFKL	LGQCFLWVA	IHPAALTPE	VHASLDFLC	AVGTVLTAKY R
	NHIDDIAGTL	SKLSDLHAQK	LRVDPVNFKL	LGQCFLWVA	IHPAALTPE	VHASLDFLC	AVGTVLTAKY R
	NHIDDIAGTL	SKLSDLHAHK	LRVDPVNFKL	LGQCFLWVA	IHPAALTPE	VHASLDFLC	AVGTVLTAKY R
	NHIDDIAGTL	SKLSDLHAQK	LRVDPVNFKL	LGQCFLWVA	IHPAALTPE	VHASLDFLC	AVGTVLTAKY R
	NHIDDIAGAL	SKLSDLHAQK	LRVDPVNFKL	LGQCFLWVA	IHPAALTPE	VHASLDFLC	AVGNVLTAKY R
	NHVDDIAGAL	SKLSDLHAQK	LRVDPVNFKF	LGHCFWVA	IHPAALTPE	VHASLDFKFMG	AVGAYLTAKY R

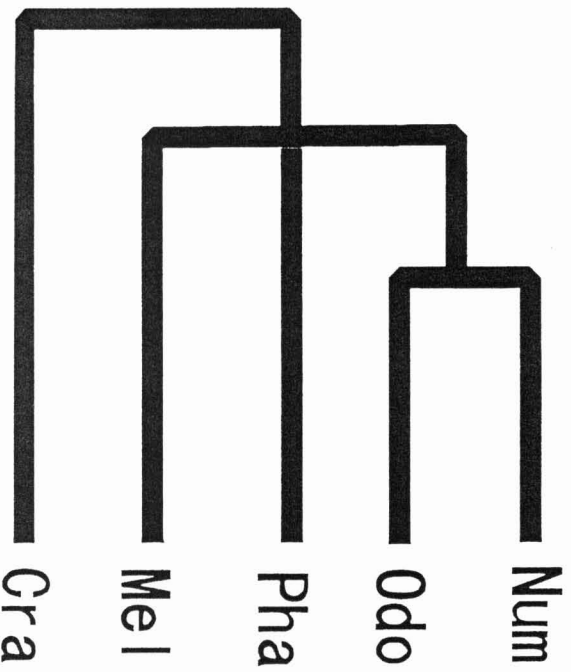
Amino acid sequence of avian beta globin

	1	11	21	31	41	51	61
<i>G-Quail</i>	VHWSAEEKQL	ITGLWGKVVV	AEGGAEALAR	LLIVYPWTQR	FFAIFGNLSS	PTAILGNPMV	RAHGKKVLTIS
<i>G-Fowl</i>	VHWTAEKKQL	ITNLWGKVVV	AESGAEALAR	LLIPYPWTQR	FFASFGNLFS	PTAILGNPMV	RAHGKKVLTIS
Turkey	VHWSAEEKQL	ITGLWGKVVV	ADCGAEALAR	LLIVYPWTQR	FFASFGNLSS	PTAILGNPMV	RAHGKKVLTIS
Chicken	VHWTAEKKQL	ITGLWGKVVV	AEGGAEALAR	LLIVYPWTQR	FFASFGNLSS	PTAILGNPMV	RAHGKKVLTIS
Quail	VHWSAEEKQL	ITGLWGKVVV	AEGGAEALAR	LLIVYPWTQR	FFASFGNLSS	PTAILGNPMV	RAHGKKVLTIS
Pheasant	VHWSAEEKQL	ITGLWGKVVV	ADCGAEALAR	LLIVYPWTQR	FFASFGNLSS	PTAILGNPMV	RAHGKKVLTIS
GOSHAWK	VQWAAEEKQL	ITGLWGKVVV	ADCGAEALAR	LLIVYPWTQR	FFASFGNLSS	ATAVLGNPMV	RAHGKKVLTIS
Duck	VHWTAEKKQL	ITGLWGKVVV	ADCGAEALAR	LLIVYPWTQR	FFASFGNLSS	PTAILGNPMV	RAHGKKVLTIS
71	81	91	101	111	121	131	141
<u>EGDAVKNLDN</u>	<u>IKNTFSQLSE</u>	<u>LHCDKLHVP</u>	<u>ENFRLLGDIL</u>	<u>IVLAHFQSK</u>	<u>DFTPEGQAAM</u>	<u>QKLVVVVANA</u>	<u>LARKYH</u>
<u>EGDAVKNLDN</u>	<u>IKNTFSQLSE</u>	<u>LHCDKLHVP</u>	<u>ENFRLLGDIL</u>	<u>IVLAHFQSK</u>	<u>DFTPEGQAAM</u>	<u>QKLVVVVANA</u>	<u>LARKYH</u>
FGDAVKNLDN	IKNTFSQLSE	LHCDKLHVP	ENFRLLGDIL	IVLAHFQSK	DFTPEGQAAM	EKLVRVANA	LARKYH
FGDAVKNLDN	IKNTFSQLSE	LHCDKLHVP	ENFRLLGDIL	IVLAHFQSK	DFTPEGQAAM	QKLVVVVANA	LARKYH
FGDAVKNLDN	IKNTFSQLSE	LHCDKLHVP	ENFRLLGDIL	IVLAHFQSK	DFTPEGQAAM	QKLVVVVANA	LARKYH
FGDAVKNLDN	IKNTFSQLSE	LHCDKLHVP	ENFRLLGDIL	IVLAHFQSK	DFTPEGQAAM	QKLVVVVANA	LARKYH
FGDAVKNLDN	IKNTFSQLSE	LHCDKLHVP	ENFRLLGDIL	IVLAHFQSK	DFTPEGQAAM	QKLVVVVANA	LARKYH
FGDAVKNLDN	IKNTFSQLSE	LHCDKLHVP	ENFRLLGDIL	IVLAHFQSK	DFTPEGQAAM	QKLVVVVANA	LARKYH
FGDAVKNLDN	IKNTFSQLSE	LHCDKLHVP	ENFRLLGDIL	IVLAHFQSK	DFTPEGQAAM	QKLVVVVANA	LARKYH

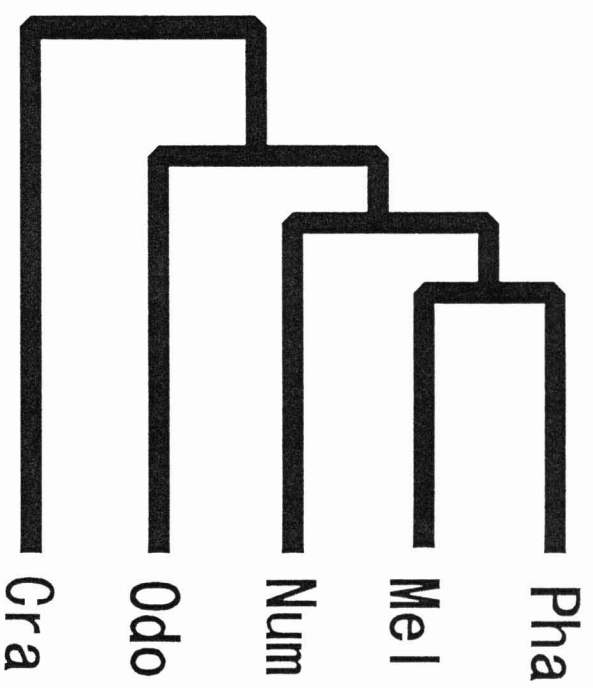
### 1. Morphological



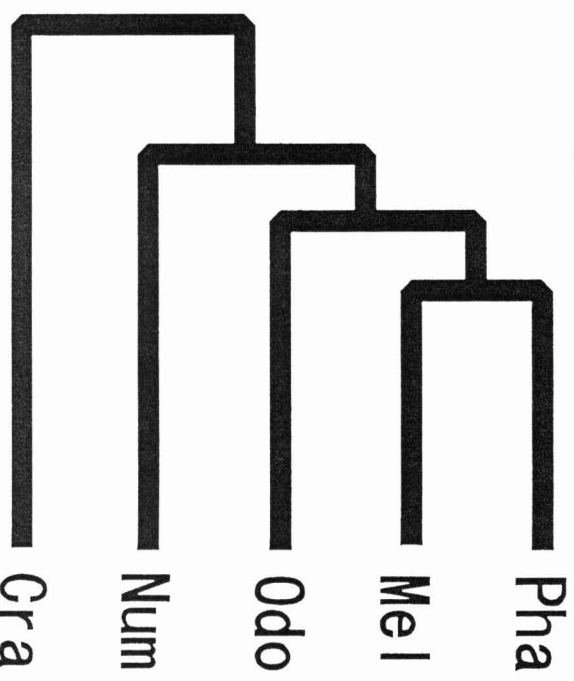
### 3. Lysozyme C seq.



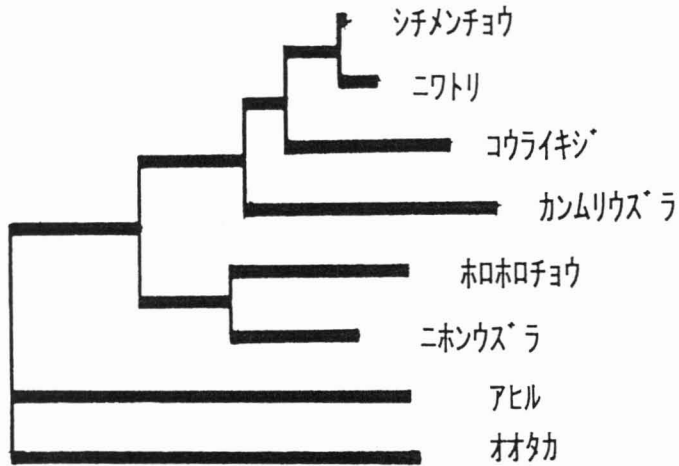
### 2. DNA hybridization



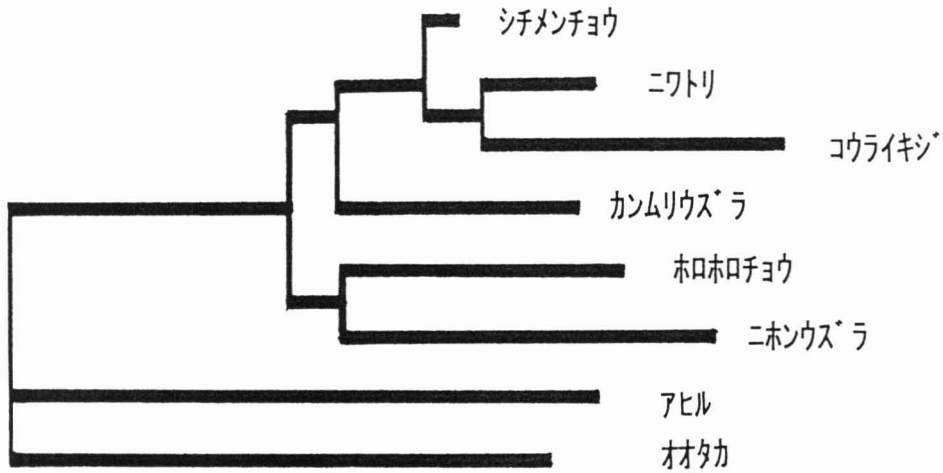
### 4. Hemoglobin



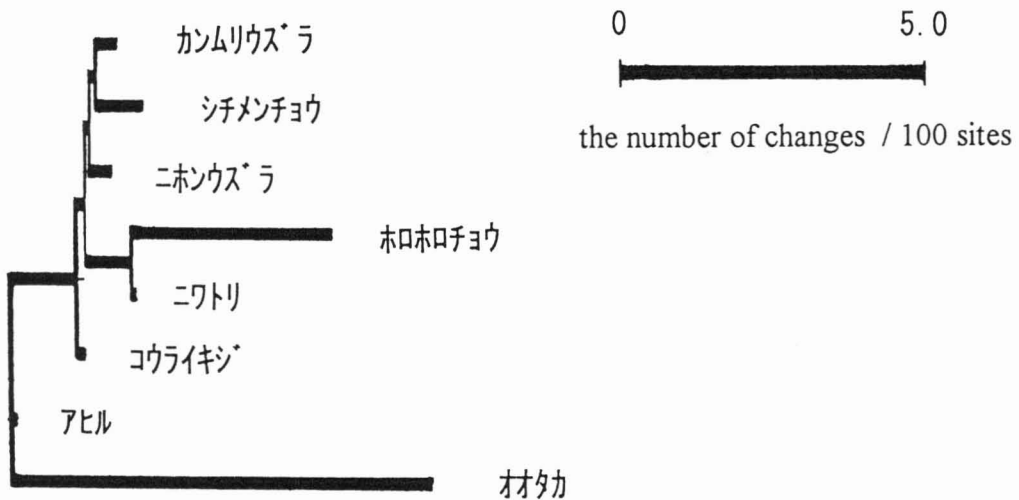
alpha-A globin



alpha-D globin



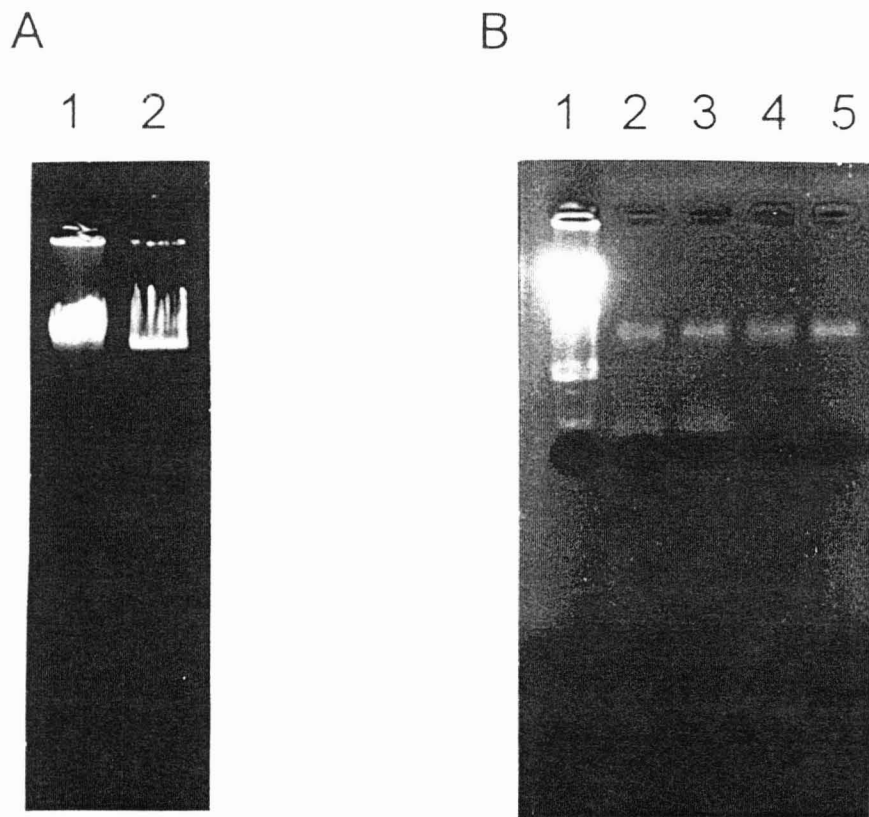
beta globin



Tree	In L	Diff	In L	S.E.	#Para	AIC	Diff AIC	Boot P
<u>alpha-A globin</u>								
1	-725.6	-9.0	5.7	13	1477.3	18.0	0.0000	
2	-721.5	-4.9	4.7	13	1469.0	9.8	0.0860	
3	-723.8	-7.2	7.0	13	1473.6	14.4	0.1270	
4	-716.6	0.0	<-best	13	1459.2	0.0	0.7870	
<u>alpha-D globin</u>								
1	-838.7	-12.2	7.7	13	1703.3	24.5	0.0160	
2	-829.2	-2.7	3.2	13	1684.4	5.5	0.1330	
3	-831.8	-5.4	5.1	13	1689.6	10.7	0.1120	
4	-826.4	0.0	<-best	13	1678.9	0.0	0.7390	
<u>beta globin</u>								
1	-581.4	-2.2	3.0	13	1188.7	4.4	0.2760	
2	-581.4	-2.2	3.0	13	1188.7	4.4	0.0000	
3	-581.4	-2.2	3.0	13	1188.7	4.4	0.0400	
4	-579.1	0.0	<-best	13	1184.3	0.0	0.6840	
<u>alpha-A + alpha-D globin</u>								
1	-725.6	-9.0	5.7	13	1477.3	18.0	0.0000	
2	-721.5	-4.9	4.7	13	1469.0	9.8	0.0860	
3	-723.8	-7.2	7.0	13	1473.6	14.4	0.1270	
4	-716.6	0.0	<-best	13	1459.2	0.0	0.7870	
<u>alpha-A + alpha-D + beta globin</u>								
1	-2169.7	-19.4	9.6	13	4365.4	38.8	0.0020	
2	-2159.3	-9.0	6.2	13	4344.5	18.0	0.0400	
3	-2163.2	-13.0	8.5	13	4352.5	25.9	0.0510	
4	-2150.3	0.0	<-best	13	4326.6	0.0	0.9070	

表-2





パネルA 羽より抽出したDNAの電気泳動パターン

レーン1 羽より抽出した DNA  
 レーン2  $\lambda$  DNA (サイズ 40Kb)

パネルB PCR産物 (ヘモグロビン遺伝子の領域) の電気泳動パターン

レーン1 サイズマーカ ( $\lambda$  DNA/HindIII cut)  
 レーン2、3 全血より抽出した DNA  
 レーン4、5 羽より抽出した DNA