

エゾシカ (*Cervus nippon yesoensis*) の ミトコンドリア DNA 塩基配列の解析

—12SrRNA 遺伝子, COX II 遺伝子および D-loop 領域—

和田健太*・早川千里**・横濱道成**

(平成 14 年 8 月 5 日受付/平成 15 年 1 月 29 日受理)

要約: エゾシカ (*Cervus nippon yesoensis*) を有効に活用・保存するためには、基礎的な遺伝的情報を蓄積する必要がある。我々は北海道産エゾシカのミトコンドリア DNA (mtDNA) の 12SrRNA 遺伝子 (957 bp), COX II 遺伝子 (687 bp) および D-loop 領域 (1,110 bp) の DNA 配列を解析し、他のシカ科 (サンバー, *Cervus unicolor*; アカシカ, *Cervus elaphus*; タイワンキョン, *Muntiacus reevesi*; オジロジカ, *Odocoileus virginianus*; オグロジカ, *Odocoileus hemionus* 他) 動物との比較を行った。12SrRNA 遺伝子について解析したところ、調べた *Cervus* 属 3 種はクラスターを形成し、エゾシカはサンバーおよびアカシカに対してそれぞれ 2.9 および 3.5% の塩基置換度を示した。系統樹では、エゾシカとサンバーが最も近く、次いでアカシカが結合した。その *Cervus* 属に *Muntiacus* 属が結合し、*Odocoileus* 属よりも近い関係にあった。COX II 遺伝子の解析から、エゾシカとサンバーとの塩基置換度は 4.2% であり、またエゾシカとオジロジカとは 11.8% であった。系統樹では、12SrRNA 遺伝子と同様にエゾシカとサンバーが最も近く、次いでオジロジカが結合した。D-loop 領域の解析から、エゾシカと岩手県産のホンシュウジカ (*C.n. centralis*) との塩基置換度は 5.2% と低い値を示した。しかし、山口県産ホンシュウジカおよびツシマジカ (*C.n. pulchellus* 対馬列島産) における塩基置換度は岩手県産のホンシュウジカに比べて高かった (16.6~16.8%)。系統樹では、本邦における二ホンジカが南北の両グループに分かれ、アジアの二ホンジカ、アカシカおよびサンバーは、南グループの二ホンジカに近い関係にあった。

キーワード: エゾシカ, 12SrRNA 遺伝子, COX II 遺伝子, D-loop 領域, ミトコンドリア DNA

我が国には野生の二ホンジカ (*Cervus nippon*) が 6 亜種生息しており、その中でもエゾシカ (*C.n. yesoensis*) は最も体型が大きく、有用な動物資源であると考えられる¹⁾。それを有効に活用・保存する上で遺伝的情報のさらなる蓄積が望まれる。

動物の系統分類学的解析には、血液タンパク質型およびアイソザイムなどの遺伝子頻度を指標とした集団系統樹が用いられており、二ホンジカにおいてはタンパク質多型やアイソザイムを対象とした生化学的遺伝標識因子の検索が進められてきた (横濱ら 1995, 福井ら 1996)。その結果、血清 Tf 型および PTF 型に多型が認められているが、変異は極めて小さいものであった。

一方、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の解析では、シカ亜科は *Axis*, *Dama* および *Cervus* の 3 つのグループから構成されており、二ホンジカ、ワピチ (*Cervus elaphus sibiricus-nelsoni*) およびアカシカ (*Cervus elaphus*) は、それぞれ独立して進化したことが示されている⁴⁾。ワピチはアカシカの亜種ではなく、独立した種であることが示唆されている⁵⁾。

また二ホンジカにおいては、12SrRNA およびチトクロム *b* (*Cyt b*) 遺伝子の部分配列から、エゾシカとホンシュウジカでは遺伝的差異が認められず、ツシマジカは前 2 種とは少し離れていることが示されている⁶⁾。*Cyt b* 遺伝子の解析では、本邦における二ホンジカは南北の 2 つのグループに分けられることが明らかにされている^{7,8)}。さらに D-loop 領域の解析においても同様の結果が得られている⁹⁾。

このように、多くのシカ科動物において mtDNA の塩基配列を用いた系統分類学的解析が行われている。しかし、これまでシカ科動物の mtDNA についてはタイワンキョン (*Muntiacus reevesi*) で全塩基配列が決定されているものの、他のシカ科動物については D-loop 領域^{4,5,9)}、*Cyt b* 遺伝子^{6,7,8)}、COX II 遺伝子¹⁰⁾ およびリボソーム RNA 遺伝子¹¹⁾ が決定されているに過ぎない。

一方、mtDNA は細胞のエネルギー代謝やタンパク質合成に参与する遺伝子群を備えていることから、mtDNA の塩基配列置換により様々な疾患が生じることが報告されている¹²⁾。mtDNA の遺伝情報の違いによってエネルギー

* 東京農業大学生物産業学研究科生物産業学専攻

** 東京農業大学生物産業学部生物生産学科

礎代謝に差があるならば、発育や飼料効率などの経済形質にも影響を及ぼすこととなる。

そこで我々は、エゾシカを家畜化していく上で必要となる基礎的な遺伝的情報の蓄積を目的として、エゾシカの mtDNA 全塩基配列の解析を進めている。今回は *12SrRNA* 遺伝子、*COX II* 遺伝子および D-loop 領域の塩基配列を解析し、既に解析が完了しているシカ科およびウシ科動物との比較を試みた。

材料および方法

供試材料：

実験材料としては、北海道網走管内で捕獲されたエゾシカの肝臓および血液を用いた。

方法：

1. ゲノム DNA の抽出

ゲノム DNA は、肝臓および血液からフェノール抽出およびエタノール沈殿法により抽出した。

2. PCR 法による各遺伝子領域の増幅

12SrRNA、*COX II* 遺伝子、D-loop 領域および *Cyt b* 遺伝子の PCR 増幅には、各遺伝子領域に特異的な 4 対のプライマーを用いた (表 1)。

PCR 反応は、QUICK THERMO PERSONAL (NIPPON GENETICS) および PCR Sprint (HYBAID) を用いて、*12SrRNA* は 94°C で 1.5 分熱変性を行った後、55°C 1 分、

72°C 2 分、94°C 1 分を 35 サイクル繰り返し、55°C 1 分、72°C 10 分を 1 サイクル行った。*COX II* 遺伝子は、94°C 1.5 分を 1 サイクル、47°C 1 分、72°C 2 分、94°C 1 分を 35 サイクル繰り返し、47°C 1 分、72°C 10 分を 1 サイクル行った。D-loop 領域は、93°C 2 分を 1 サイクル、62°C 30 秒、72°C 2 分、93°C 1 分を 40 サイクル繰り返し、最後に 62°C 30 秒、72°C 1 分を 1 サイクル行った。*Cyt b* 遺伝子は、93°C で 2 分を 1 サイクル、60°C 1 分、72°C 1 分、94°C 1 分を 40 サイクル繰り返し、60°C 1 分、72°C 1 分を行った。

3. PCR 産物の精製

PCR 産物を 1-2% アガロースゲル (和光純薬工業株式会社) を用いたサブマリン式電気泳動法により 100 V 30~40 分で分離し、ゲルはエチジウムブロマイドにより染色後、透過型紫外線ランプで観察し、目的の増幅断片を切り出した。その増幅断片から JETsorb Gel Extraction Kit (VERITAS) および GenElute MINUS EtBr SPIN COLUMN (SIGMA) を用いて目的の遺伝子領域を精製した。

4. DNA シークエンシング

12SrRNA、*COX II* 遺伝子、D-loop 領域および *Cyt b* 遺伝子の PCR 産物を上記の方法により精製し、CEQ2000 (BECKMAN) を用いた Dye-terminator 法により塩基配列を決定した。

5. mtDNA におけるエゾシカと他のシカ科およびウシ科動物との遺伝的関連性

mtDNA からみたエゾシカと他のシカ科およびウシ科動物数種との遺伝的関連性については、DDBJ (日本 DNA データバンク) の SRS (Sequence Retrieval System) により検索した DNA 配列と我々が解析した DNA 配列とを GENETYX-MAC/malign version 1.0.2, DNASIS-Mac version 3.7 および Clustal W 1.74 を用いて分析した。

それらの DNA 配列から Clustal W 1.74 を用いて近隣結合法により系統樹を作成した。また塩基配列の差異は、MICHAELE *et al.* (1990) の方法に準じて算出した (表 2, 3, 4)。

結果および考察

エゾシカの *12SrRNA* (957 bp)、*COX II* 遺伝子 (687 bp) および D-loop 領域 (1,110 bp) の塩基配列を解析し、他のシカ科およびウシ科動物との比較を行った。

1) *12SrRNA* 遺伝子

エゾシカの *12SrRNA* 遺伝子の全長は 957 bp であった

Table 1 Primers for amplification of genes for the *12SrRNA*, *COX II*, D-loop region and *cytochrome b* sequencing in the *Cervus nippon yesoensis*

Primer name	Sequence (5'→3')
12SrRNA-SW	CTTGACTCAGCTATGGCCGTC
12SrRNA-ASW	CGTCCCTGCGGTAATTTCTC
12SrRNA-S1	CCCCAGTGAAAATGCCCTCC
12SrRNA-S2 ^{※1}	AAAAAGCTTCAAAGTGGATTAGATACCCCACTAT
COX2-SW	GAATCGAACCCCTACTATTGG
COX2-ASW	GCGCATGTCACCAAGGAGAGTAT
D-loop-S ^{※2}	CCATTTTCAGCGCCTTGCTTTGGGTTAAGC
D-loop-AS ^{※2}	AGTCTCACCACTCAACCCCAAGCTGAAG
cyt-b-S ^{※3}	CAATCCTCACAGGCCTATTCCTAGC
cyt-b-AS ^{※3}	TAGGCGAATAGGAATATCATTCGGGTTTGAT

※1:Kocher *et al.* 1989.¹³⁾

※2:Harumi *et al.* 1993.¹⁴⁾

※3:Chikuni *et al.* 1993.¹⁵⁾

Table 2 Pairwise comparisons of the *12SrRNA* gene sequences in Cervidae and Bovidae

Species compared	BP	Base Substitutions		TS/TV	Gaps	% Divergence
		TS	TV			
<i>C.n.yesoensis/Cervus unicolor</i>	955	17	5	3.40	6	2.9
<i>C.n.yesoensis/Cervus elaphus</i>	955	22	7	3.14	5	3.5
<i>C.n.yesoensis/Odocoileus virginianus</i>	953	54	14	3.86	6	7.7
<i>C.n.yesoensis/Odocoileus hemionus</i>	955	59	14	4.21	6	8.2
<i>C.n.yesoensis/Hydroptes inermis</i>	957	54	20	2.70	6	8.3
<i>C.n.yesoensis/Muntiacus reevesi</i>	957	47	7	6.71	10	6.6
<i>C.n.yesoensis/Bos taurus</i>	955	85	20	4.25	8	11.7
<i>C.n.yesoensis/Ovis aries</i>	958	86	17	5.06	13	11.9

BP:base positions shared by both sequences. TS:transitions. TV:transversions. Gaps:insertions and deletions.

※The percent sequence divergence was calculated as {(TS+TV+Gaps)/(BP+Gaps)} × 100%¹¹⁾

Table 3 Pairwise comparisons of the *COX II* gene sequences in Cervidae and Bovidae

Species compared	BP	Base Substitutions		TS/TV	Gaps	% Divergence
		TS	TV			
<i>C.n.yesoensis/Cervus unicolor</i>	684	26	0	0	3	4.2
<i>C.n.yesoensis/Muntiacus reevesi</i>	684	71	7	10.14	3	11.8
<i>C.n.yesoensis/Odocoileus virginianus</i>	684	71	7	10.14	3	11.8
<i>C.n.yesoensis/Bos taurus</i>	684	83	12	6.92	3	14.3
<i>C.n.yesoensis/Ovis aries</i>	684	83	20	4.15	5	15.7

BP:base positions shared by both sequences. TS:transitions. TV:transversions. Gaps:insertions and deletions.

※The percent sequence divergence was calculated as $\{(TS+TV+Gaps)/(BP+Gaps)\} \times 100\%$ ¹⁾

Table 4 Pairwise comparisons of the D-loop region sequences in *Cervus nippon yesoensis* and other Cervidae

Species compared	BP	Base Substitutions		TS/TV	Gaps	% Divergence
		TS	TV			
<i>C.n.yesoensis/Hka(Hokkaido)</i>	825	0	0	0	2	0.2
<i>C.n.yesoensis/ Gyol(Iwate)</i>	825	4	0	0	41	5.2
<i>C.n.yesoensis/ Tmal(Tushima Island)</i>	828	35	3	11.67	121	16.8
<i>C.n.yesoensis/ Ymal(Yamaguchi)</i>	828	34	3	11.33	121	16.6
<i>C.n.yesoensis/ Myal(Miyazaki)</i>	799	32	2	16.00	83	13.3
<i>C.n.yesoensis/ Ykul(Yakushima)</i>	814	38	3	12.67	120	17.2
<i>C.n.yesoensis/ Kral(Kerama Island)</i>	817	31	1	0	85	13.0
<i>C.n.yesoensis/C.n.kopschi</i>	814	33	1	0	122	16.7
<i>C.n.yesoensis/C.n.taiouanus</i>	1102	38	4	9.50	146	15.1
<i>C.n.yesoensis/C.n.pseudaxis</i>	1104	50	4	12.50	123	14.4
<i>C.n.yesoensis/C.n.dybowskii</i>	1102	43	4	10.75	123	13.9
<i>C.n.yesoensis/Cervus elaphus</i>	1038	75	95	0.79	23	18.2
<i>C.n.yesoensis/Cervus unicolor</i>	1034	51	13	3.92	125	16.3
<i>C.n.yesoensis/Dama dama</i>	903	80	69	1.16	15	17.9
<i>C.n.yesoensis/Axis porcinus</i>	923	64	43	1.49	54	16.5

BP:base positions shared by both sequences. TS:transitions. TV:transversions. Gaps:insertions and deletions.

※The percent sequence divergence was calculated as $\{(TS+TV+Gaps)/(BP+Gaps)\} \times 100\%$ ¹⁾

(図1, 表2)。エゾシカと他のシカ科 (Cervidae) およびウシ科 (Bovidae) 動物との間で比較した結果, アカシカおよびサンバーとの間の塩基置換度はそれぞれ 2.9 および 3.5% であった。Odocoileus 属 (オジロジカおよびオグロジカ) との間では, 7.7~8.2% の塩基置換度であった。キバノロジカ (*Hydroptes inermis*) およびタイワンキョン (*Muntiacus reevesi*) との間での塩基置換度は, それぞれ 8.3 および 6.6% であり, Odocoileus および *Hydroptes* 属よりも *Muntiacus* 属の方がエゾシカに近い関係であった。これは, MICHAEL *et al.* (1990) によって報告されているサンバーとタイワンキョンとの関連性と同様の結果であり, Odocoileus および *Hydroptes* 属よりも *Muntiacus* 属が *Cervus* 属に近縁的であることが, 本研究からも明らかになった。また, *Cervus* 属内の塩基置換度が 2.9~3.5% であることから, この *12SrRNA* 遺伝子領域は *Cervus* 属内において保存性の高い遺伝子領域であることが明らかにされた。一方, ウシおよびヒツジとの塩基置換度はそれぞれ 11.7 および 11.9% であった。

また系統樹では, エゾシカ, サンバーおよびアカシカの *Cervus* 属がクラスターを形成し, 次いでタイワンキョン

がこのクラスターに結合した (図2)。Odocoileus 属およびキバノロジカはこのグループとは別のグループを形成した。

2) *COX II* 遺伝子

エゾシカの *COX II* 遺伝子の全長は 687 bp であった。エゾシカとサンバーとの塩基置換度が 4.2% と最も低く, それに次いでオジロジカとは 11.8% であった (表3, 図3)。ウシおよびヒツジとの塩基置換度はそれぞれ 14.3 および 15.7% であった。このことから, *COX II* 遺伝子は *12SrRNA* 遺伝子よりも変異性に富む遺伝子領域であった。また, *12SrRNA* および *COX II* 遺伝子がほぼ同様の系統関係を示したことから, この両遺伝子領域は, シカ科の系統進化を知る上で, 有効な遺伝的マーカーであると考えられた。

一方, *COX II* 遺伝子はアミノ酸 228 残基により構成されており, 他の動物との差異は約 1~3% と非常に相同性が高い遺伝子であった。また今回調査したシカ科およびウシ科動物の中では, エゾシカに特有の変異が確認され, 71 残基目のイソロイシン (Ile) がバリン (Val) に, 99 残基目のスレオニン (Thr) がアラニン (Ala) に置換していた。

3) D-loop 領域

エゾシカの D-loop 領域は 1,110 bp の塩基長であり、他のニホンジカ亜種およびシカ科動物との比較を行った結果、我々が解析したエゾシカとデータベース上のエゾシカ/Hka との塩基置換度は 0.2% であった。また、本研究において 130 bp から 408 bp までの間に認められたタンデムリピートは、エゾシカ/Hka と同一のタイプであった (表 4, 図 5)。

エゾシカとホンシュウジカ/Gyo1 との塩基置換度は 5.2% と低い値を示した。一方、ホンシュウジカ (ツシマジカ) /Tma1, ホンシュウジカ/Yma1, ケラマジカ/Kra1 およびキュウシュウジカ/Mya1 との間では、それぞれ 13.0~16.8% と高い塩基置換度を示した。エゾシカとカナンジカ (*C.n. kopschi*), タイワンジカ (*C.n. taiouanus*), ベトナムジカ (*C.n. pseudaxis*) およびヒガシチュウゴクジカ (*C.n. dybowskii*) との塩基置換度は 13.9~16.7% であった。アカシカおよびサンバーとの間ではそれぞれ 18.2 および 16.3% であり、ツシマジカ/Tma1 およびホンシュウジカ/Yma1 と同等かそれ以上の塩基置換度を示した。ダマシカ (*Dama dama*) およびアクシズジカ (*Axis porcinus*) との間では 17.9 および 16.5% と高い塩基置換度を示した。

近隣結合法により系統樹を作成した結果、ニホンジカにおいては NAGATA *et al.* (1999) の報告と同様の結果が得られた (図 6)^{7,8)}。さらに本系統樹ではアジアのグループを加え解析した結果、それは ETTORE *et al.* (2001) の報告と同様に本邦におけるニホンジカ南グループに近く位置していた⁵⁾。また、アカシカおよびサンバーも南グループの近くに位置し、アクシズジカおよびダマシカはこれらのグループとは大きく離れていた。エゾシカを含むニホンジカ北グループは他の日本およびアジアの地域個体群とは異なり、独自の系統群を形成することが今回の解析からも確認することができた。

なお、*Cyt b* 遺伝子の部分配列 (644 bp) を解析し (未発表), ニホンジカ 6 亜種間で比較を行ったところ, KUWAYAMA and OZAWA (2000) と同様の結果が得られた⁷⁾。

文 献

- 1) 横濱道成, 1996. エゾシカ, 畜産の研究, 50 (1), 139-144.
- 2) 横濱道成・石島芳郎, 1995. エゾシカ (*Cervus nippon yesoensis*) およびトナカイ (*Rangifer tarandus tarandus*) のアルブミン型およびトランスフェリン型, *J. Anim. Genet.*, 23 (2), 49-50.
- 3) 福井えみ子・小嶋身江子・吉澤 緑・村松 晋・吉川 堯・丹治藤治, 1996. ニホンジカにおける血清タンパク質型および赤血球酵素型の多様性, 日畜会報, 67 (6), 574-578.
- 4) ETTORE, R., NADIA, M., FRANCOIS, E.C.H., AMELIE, B. and EMMANUEL, J.P.D., 2001. A mitochondrial DNA control region phylogeny of the Cervinae: speciation in *Cervus* and implications for conservation. *Animl Conservation*, 4, 1-11.
- 5) POLZIOHN, R.O. and STOROBEC, C., 1998. Phylogeny of Wapiti, Red Deer, Sika Deer, and other North American Cervids as determined from mitochondrial DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 10 (2), 249-258.
- 6) NAGATA, J., MASUDA, R. and YOSHIDA, M.C., 1995. Nucleotide sequences of the *cytochrome b* and the *12SrRNA* genes in the Japanese Sika Deer *Cervus nippon*. *J. Mamm. Soc.*, 20 (1), 1-8.
- 7) TAMATE, B.H., SHIROW, T., SUDA, K., IZAWA, M., DOI, T., SUNAGAWA, K., MIYASHITA, F. and TADO, H., 1998. Mitochondrial DNA variations in local populations of the Japanese Sika Deer, *Cervus nippon*. *J. Mammal.*, 79 (4), 1396-1403.
- 8) KUWAYAMA, R. and OZAWA, T., 2000. Phylogenetic relationships among european red deer, wapiti, and sika deer inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 15, 115-123.
- 9) NAGATA, J., MASUDA, R., TAMATE, B.H., HAMASAKI, S., OCHIAI, K., ASADA, M., TATUZAWA, S., SUDA, K., TADO, H. and YOSHIDA, C.M., 1999. Two genetically distinct lineages of Sika Deer, *Cervus nippon* in Japanese Islands: Comparison of mitochondrial D-loop region sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 13 (3), 511-519.
- 10) RODENY, L.H.M., MICHAEL, A.N., RONALD, M.A. and LAURA, L.J., 1995. Mammalian mitochondrial DNA evolution: A comparison of the *Cytochrome b* and *Cytochrome c oxidase II* genes. *J. Mol. Evol.*, 40, 260-272.
- 11) MICHAEL, M., MIYAMOTO, FRED, K. and OLIVER, A.R., 1990. Phylogeny and evolution of antlered deer determined from mitochondrial DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 6127-6131.
- 12) 埜中征哉・後藤雄一, 1997. ミトコンドリア病. 医学書院, 東京.
- 13) KOCHER, T.D., THOMAS, W.K., MEYER, A., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86, 6196-6200.
- 14) 春海 隆・古川 力・栗田 崇・熊谷光洋・安江 博, 1993. PCR-SSCP 法によるウシミトコンドリア D ループ領域の多型解析, 日畜会報, 65 (2), 149-151.
- 15) 千国幸一・田畑利幸・斉藤昌義・門間美千子, 1993. シトクロム *b* 遺伝子の塩基配列の違いによる肉種鑑別. 日畜会報, 65 (6) 571-579.

<i>Cervus nippon yesoensis</i>	1 :	CACAGTTTGGTCCAGCCTTCCTATTGACCCCTTAAATAGACCTTACACATGCAAGCATCCACCCAGGAAAT-GCCC-TCCAAATTAAGACTA
<i>C.unicolor</i> (M35875)*	1 :	T.....A.....G.....C.T.G.....
<i>C.elaphus</i> (AF091707)	1 :	T.....A.....G.....A.....G.....
<i>O.virginianus</i> (M35874)	1 :	.G.....A.T.C.-.GC.....T..T..T.....G.C.....A.....
<i>O.hemionus</i> (AF091708)	1 :	.G.....A.T.C.-.GC.....T..T..T.....G.C.....A.....
<i>H.inermis</i> (M35876)	1 :	.A.....T.....G..T.....G.....
<i>M.reevesi</i> (M35877)	1 :	T.T.....A.....T.....T.....T.G.....
<i>Bos taurus</i> (V00654 J01394)	1 :	.T.....G.-.A.TC.T...A.....T.....G.....T.GG...T...A.....
<i>Ovis aries</i> (AF010406)	1 :	T.T.....G.-.A.T.C.....T.....GT.AC...T..G..TCAC.C.G.....
<i>C.n.yesoensis</i>	101 :	AGAGGCTGGTATCAAGCACACA-TCC-GTAGCTCAGCACCTTGCCATAGCCACCCCGGAGCAGCATGATAAAAAATTAAGCCATAACGA
<i>C.unicolor</i>	101 :C.....
<i>C.elaphus</i>	101 :C.....
<i>O.virginianus</i>	101 :	T.....C.....T..G.....TC.....T.....T.....
<i>O.hemionus</i>	101 :	T.....C.....T..G.....TC.....T.....T.....
<i>H.inermis</i>	101 :C.....T.....T.....T.....T.....G.....
<i>M.reevesi</i>	101 :C.....T.....T.....T.....C.....
<i>B.taurus</i>	101 :C.....T.....T.....A.....C.....
<i>O.aries</i>	101 :	.A.....A.....C..TT.....A..G.....T..A.....A.C.....
<i>C.n.yesoensis</i>	201 :	AAG-TTGACTAAGCCATTAATCAGGGTGGTAAATTTCTGTCAGCCGCGCGGTCATAGCATTAAACCCGATTAAAGCAGCACGGCGTAAAGCGTG
<i>C.unicolor</i>	201 :	..T.....T.....A.....A.....
<i>C.elaphus</i>	201 :	..T.....T.....T.....A.....A.....T.....T.....
<i>O.virginianus</i>	201 :	..T.....T..GC..T.....T.....A.....A.....
<i>O.hemionus</i>	201 :	..T.....T..GC..T.....T.....A.....A.....
<i>H.inermis</i>	201 :	..T.....T.....T.....A.....A.....T.....
<i>M.reevesi</i>	201 :	..T.....T.....T.....A.....A.....T.....
<i>B.taurus</i>	201 :	..T.....TT.....T.....C.....A..C..C..AGT.....A.....
<i>O.aries</i>	201 :	..T.....T.....G.C.....T.....C.....G...A..C..C..AGT.....
<i>C.n.yesoensis</i>	301 :	TT-AAGCACTAT-ACTAATAAAGTTAA-TCCAAATTAAGCTGTAAAGGCATAA-TTGCACAAAAAATTAACAACGAAAGTAACTTTACGCCCGC
<i>C.unicolor</i>	301 :	.A.....-TTC.....C.....-T.....A.....
<i>C.elaphus</i>	301 :	.A.....T.....T.....-G.....T.....T.....A.....
<i>O.virginianus</i>	301 :	..T.....-G.C.....G.....C.....-CAAG..G..A..T.....A.....
<i>O.hemionus</i>	301 :	..T.....-G.C.....C.....-CAAG..G..A..T.....A.....
<i>H.inermis</i>	301 :	.A.....AC..ATAA.....G.....C..TT.....T..ATT...G.....T.....-AT...
<i>M.reevesi</i>	301 :	.A.....TT.C.....C.....T.T.....T.G.....-GTT.....
<i>B.taurus</i>	301 :	.A.....C.....C..GG.....T.T..C.....G.T..AA..T.....TG.....G.CC.....ATA...
<i>O.aries</i>	301 :	.A.....TC.....G.....T..TT.....A.....T..AT.....TG.....CC.....ATA...

Fig. 1-1 Variation in the sequences of the mitochondrial *12S rRNA* gene (957 bp) in *Cervus nippon yesoensis*, other Cervidae and Bovidae

<i>C.n.yesoensis</i>	401 :	TGAACAGCAGTAGCAGCCAAACTGGGATTAGATACCCCACTAGCCTTAACACAAATAGTT-ATGTAACAAAACATTTCGCCAGGTA
<i>C.unicolor</i>	401 :-G.....
<i>C.elaphus</i>	401 :C.....
<i>O.virginianus</i>	401 :A.T.....T.....C.....T.....-..A.....
<i>O.hemionus</i>	401 :A.T.....T.....C.....T.....-..A.....
<i>H.inermis</i>	401 :T.....A.....T.....C.....A-AAT.....G.....
<i>M.reevesi</i>	401 :TCCAC.....
<i>B.taurus</i>	401 :	...CG...T...A...T...C...G...A...-CA.....
<i>O.aries</i>	401 :	...T...C...A...T...C...C...A...-..AA.....T.....
<i>C.n.yesoensis</i>	501 :	CTACCGCAATAGCTTAAACTCAAGGACTTGGCGTCTTATACCTCTAGAGAGCCTGTTCTATATCGATAAACCCCGATAAACCTCACCATT
<i>C.unicolor</i>	501 :C.....
<i>C.elaphus</i>	501 :
<i>O.virginianus</i>	501 :G...T...CC
<i>O.hemionus</i>	501 :G...T...CC
<i>H.inermis</i>	501 :T.....T.....CC
<i>M.reevesi</i>	501 :G.....
<i>B.taurus</i>	501 :	...TA...C...T.....
<i>O.aries</i>	501 :	...-C...C...CCG.....
<i>C.n.yesoensis</i>	601 :	CCTTGCTACTAGCTATATACGCCATCTTCAGCAACCTT-AAAAAGTCAAAAAGTAGCACAATCATATAATAAAAACGTTAGGTCAAGGTGT
<i>C.unicolor</i>	601 :A.....
<i>C.elaphus</i>	601 :A.....G.....-..AT.....G.....
<i>O.virginianus</i>	601 :A.....-..A.....T.....
<i>O.hemionus</i>	601 :A.....-..A.....CT.....
<i>H.inermis</i>	601 :A.G.....-..AG.....T.....
<i>M.reevesi</i>	601 :	...C...A...T...A...T...G.....
<i>B.taurus</i>	601 :	T...A...A...-..A...A...GT...T...G.....
<i>O.aries</i>	601 :A.....A.....G.....T...A...C.....G.....
<i>C.n.yesoensis</i>	701 :	AACCTATGAACGGAAGAAATGGCTACATTTCTAATCTAAGAA-AAATCC-AAACGAAAGTTATTATGAACTAATAACCCAAAGGAGGATTTAGCA
<i>C.unicolor</i>	701 :T.....
<i>C.elaphus</i>	701 :GT.....T.....
<i>O.virginianus</i>	701 :GT.....CT.-TTT.....C.....T...G.....
<i>O.hemionus</i>	701 :GT.....CT.-TTT.....C.....T...G...-..
<i>H.inermis</i>	701 :GT...G.....T...A.C.T-A-.T.....T.....
<i>M.reevesi</i>	701 :G.T.G.....CT.....T...AT.T.....
<i>B.taurus</i>	701 :A.T.G.....C...CA.C...-G...AA-G.....C...-A.....
<i>O.aries</i>	701 :GT...G.....C.-C...-A...TTA-.T.....CC.....T...-G.....

Fig. 1-2 Variation in the sequences of the mitochondrial *12S_rrRNA* gene (957 bp) in *Cervus nippon yesoensis*, other Cervidae and Bovidae

<i>C.n.yesoensis</i>	801 : GTAAACTAAGAATAGAGTGCTTAGTTGAATTAGGCCATGAAGCACGCACACCGCCGTCACCCCTCCTCAAGTAGGCAC-AATACACTCAAACCTATTT
<i>C.unicolor</i>	801 :
<i>C.elaphus</i>	801 :C.....A...-G.....T.....
<i>O.virginianus</i>	801 :T...A...-.....T...T...A..
<i>O.hemionus</i>	801 :C.....T...A.....T...T...A..
<i>H.inermis</i>	801 :C...A.....A..A...-.....G..T...T...A
<i>M.reevesi</i>	801 :A.T...-G...TG.....
<i>B.taurus</i>	801 :A...ATT.AGTGCAT.-T..C.C.....
<i>O.aries</i>	801 :C.....AAT.-TG...T...T...C.....
<i>C.n.yesoensis</i>	901 : ACACGTATTAAATCAT-ATGAGAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGATAAAT
<i>C.unicolor</i>	901 :
<i>C.elaphus</i>	901 :
<i>O.virginianus</i>	901 : .T.....A...T.....T-
<i>O.hemionus</i>	901 : .T.....A...T.....
<i>H.inermis</i>	901 : GT.T...A..CTG.-.....
<i>M.reevesi</i>	901 : ...TA.....C...-T.....
<i>B.taurus</i>	901 : -.ACGCACT.G.TAC.....
<i>O.aries</i>	901 : ...TA...C-.A.CAC.C.....C

Fig. 1-3 Variation in the sequences of the mitochondrial COX II gene (687 bp) in *Cervus nippon yesoensis*, other Cervidae and Bovidae
 ※ (DDBJ Accession No.)

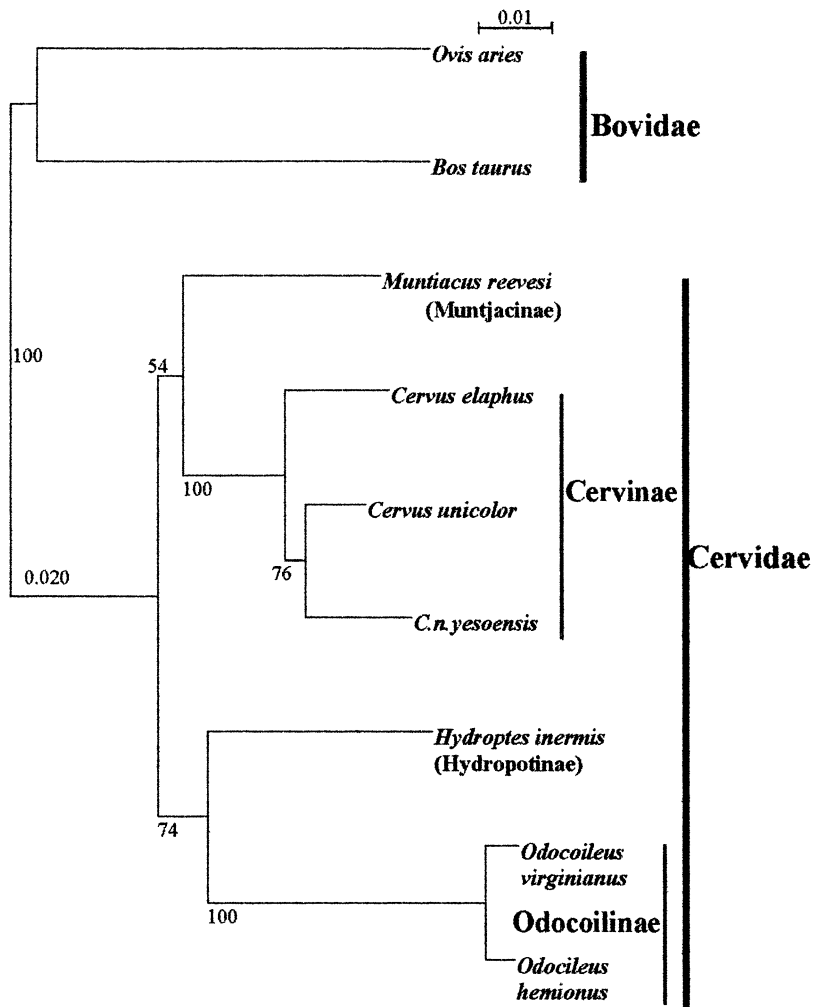


Fig. 2 Neighbor-joining tree of 12S rRNA gene in *Cervus nippon*, other Cervidae and Bovidae.
 The bootstrap value (percent occurrence of nodes in 1,000 bootstrap replicates) is indicated as a number at each node if the value is >50%

<i>Cervus nippon yesoensis</i>	1 :	ATGGCTTATCCTATACAATTAGGTTTTCAAGATGCAACATCACCTATTATAGAAGAATTGCTACATTTTCATGATCATACTAATAATTGTTTTCTAA
<i>Cervus unicolor</i> (U62570)*	1 :C.....GC.....C.....C.....
<i>Odocoileus virginianus</i> (U18816)	1 :C..C.....C..C.....C..A.....C.....C.....
<i>Muntiacus reevesi</i> (AF527537)	1 :C..C.....C..C.....T.....AT.....C.....
<i>Bos taurus</i> (V00654 J01394)	1 :A.....C.....C.....A.....C.....C..A..T..C.....C..C..GC.....C..CT...
<i>Ovis aries</i> (AF010406)	1 :A.....C.....C.....C.....C.....C..G.....C..A.....C.....C.....C.....C.....C.....
<i>Cervus nippon yesoensis</i>	101 :	TCAGCTCACTAGTACTTTATGTCATTTTCATTAATGCTAACGACAAAATTAACACACTAGCACAATAGACGCTCAAGAGGTAGAGACAATCTGAACAAT
<i>Cervus unicolor</i> (U62570)*	101 :C.....A.....A.....A.....
<i>Odocoileus virginianus</i> (U18816)	101 :	.T.....T.....G..C..A.....A.....C.....T.....T.....T.....C.....A.....G..A.....C.....
<i>Muntiacus reevesi</i> (AF527537)	101 :	.T.....GT.....A.....T..C.....T.....A.....T.....T.....T.....C.....A.....G.....T.....
<i>Bos taurus</i> (V00654 J01394)	101 :	.T.....T.....CA..T.....C.....A.....GC..G..C..T..A.....G.....T..A.....A.....C.....
<i>Ovis aries</i> (AF010406)	101 :T.....A..T.....C.....A.....A.....C..T..C..T..C.....G.....A.....A.....C.....
<i>Cervus nippon yesoensis</i>	201 :	CCTACCGGCTGTATCCTAATTTAATGCTCTTCATCTTTGCGAATTTTATATATGATAGATGAAATTAACAATCCATCTCTCAGTAAAAGCTATA
<i>Cervus unicolor</i> (U62570)*	201 :A..A.....C.....C.....C.....
<i>Odocoileus virginianus</i> (U18816)	201 :	T.....A..CA.....T.....C.....C.....T.....A.....A.....C.....
<i>Muntiacus reevesi</i> (AF527537)	201 :	T.....A.....A.....T..G..CC.....C..C..C.....C..G..C..A.....C..G.....T.....A..C.....
<i>Bos taurus</i> (V00654 J01394)	201 :	T..G..C..CA..C..T.....C.....T.....A.....C.....C..A.....C..T..C.....T.....A..C.....
<i>Ovis aries</i> (AF010406)	201 :	T.....A..CA.....T.....A..G.....C.....CC.....C..A.....C.....C.....GA..C.....
<i>Cervus nippon yesoensis</i>	301 :	GGACATCAATGATATTGAAGCTACGAGTATACAGATTATGAGGACCTAAGCTTCGACTCCTATATAATTCACAATCAGAAATTAACAGGAGATTAC
<i>Cervus unicolor</i> (U62570)*	301 :A..T.....C.....C.....
<i>Odocoileus virginianus</i> (U18816)	301 :C.....T..T..A.....C.....A..TT.....T..T.....G.....C.....
<i>Muntiacus reevesi</i> (AF527537)	301 :T..A.....C.....A.....G.....T.....C.....
<i>Bos taurus</i> (V00654 J01394)	301 :G.....C.....T.....T.....C.....G.....G..GC.....
<i>Ovis aries</i> (AF010406)	301 :	..G.....C.....T..A.....A.....T.....C.....C.....C.....C..G.....
<i>Cervus nippon yesoensis</i>	401 :	GACTACTAGAGGTAGATAACCGGGTGTCTACCAATAGAAAACAACATCCGAATATTAGTCTCCTCTGAAGACGACTGCACTCTTGAGCCGTACCCCTC
<i>Cervus unicolor</i> (U62570)*	401 :T.....C.....G.....
<i>Odocoileus virginianus</i> (U18816)	401 :T.....A..G.....A.....G.....C.....T.....T.....T..A.....C.....T.....
<i>Muntiacus reevesi</i> (AF527537)	401 :A.....A.....T.....T.....A.....C.....G.....G.....
<i>Bos taurus</i> (V00654 J01394)	401 :T.....A..C.....T..A.....A.....G.....T..A.....A.....T..G.....
<i>Ovis aries</i> (AF010406)	401 :	.TT.....A.....C.....A.....AT.....G.....G.....C..A.....T..C.....T..C..A..C.....A.....A..C.....T.....
<i>Cervus nippon yesoensis</i>	501 :	TCTAGGACTAAAAACGGACGCAATCCAGCCGCCTAAACCAAACTCTTATATCATCAACTCGACCAGTCTATATTACGGACAATGCTCTGAAATC
<i>Cervus unicolor</i> (U62570)*	501 :G.....G.....C.....
<i>Odocoileus virginianus</i> (U18816)	501 :GT.....A.....G.....A..T.....C.....T.....C.....C.....
<i>Muntiacus reevesi</i> (AF527537)	501 :T.....G..A..T.....T.....C.....C.....T.....C.....G.....
<i>Bos taurus</i> (V00654 J01394)	501 :A.....T.....T.....C.....GT..C..T.....CT.....T.....A.....T.....
<i>Ovis aries</i> (AF010406)	501 :A.....T.....T..TT.....T.....C.....G.....T.....C.....TC.....T.....A.....T.....
<i>Cervus nippon yesoensis</i>	601 :	TGCGGATCAAATCACAGCTTCATACCTATCGTTCTTGAAGTCTCCATTAATTTCTCGAAATGATCTGCATCAATACTATAA
<i>Cervus unicolor</i> (U62570)*	601 :T.....C.....T.....
<i>Odocoileus virginianus</i> (U18816)	601 :	..T.....T.....G.....T.....C.....C..T.....G..T.....
<i>Muntiacus reevesi</i> (AF527537)	601 :C..T..C.....T.....C.....AC..T..T.....T.....
<i>Bos taurus</i> (V00654 J01394)	601 :G.....C.....T.....C..T..C.....GT.....C.....G.....T.....G.....T.....
<i>Ovis aries</i> (AF010406)	601 :T..T..G..A..T.....C.....A.....T.....C.....

Fig. 3 Variation in the sequences of the mitochondrial *COX II* gene (687 bp) in *Cervus nippon yesoensis*, other Cervidae and Bovidae
 ※ (DDBJ Accession No.)

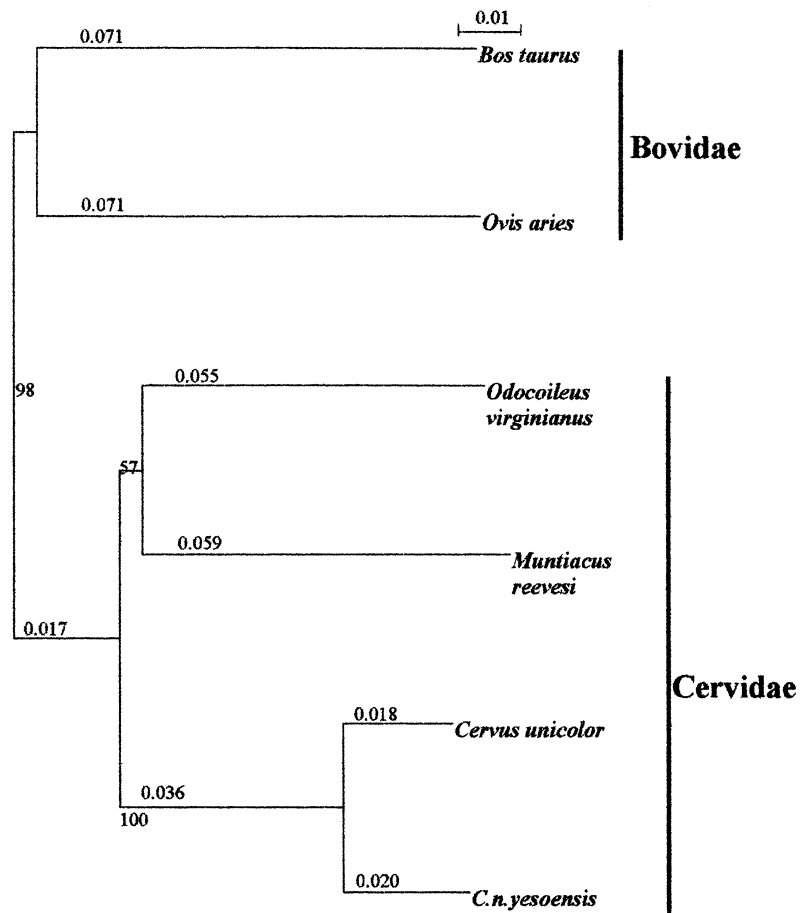


Fig. 4 Neighbor-joining tree of *COX II* gene in *Cervus nippon*, other Cervidae and Bovidae. The bootstrap value (percent occurrence of nodes in 1,000 bootstrap replicates) is indicated as a number at each node if the value is >50%

<i>C. nippon yesoensis</i>	1 :	GACGCTTATAATATAGTCCATAAAAAACAAGAAGCTTTATCAGTATTAAATTTCCAAAAA-TT-TTAATATTTAATACAGT-TTTCTACTCAACACCC
<i>C. n. yesoensis/Hka</i> (AB012365)*	1 :-.....-.....-.....
<i>C. n. centralis/Gyo1</i> (AB012371)	1 :-.....-.....-.....
<i>C. n. centralis/Ymal</i> (AB012379)	1 :C.....A.....-.....C.....
<i>C. n. centralis/tmal</i> (AB012378)	1 :C.....A.....-.....C.....
<i>C. n. nippon/Myal</i> (AB012378)	1 :C.....-.....-.....CC.....
<i>C. n. yakushimae/Yku</i> (AB012384)	1 :A.....-.....C.....
<i>C. n. keramae/Kral</i> (AB012377)	1 :C.....A.....-.....C.....
<i>C. n. kopschi</i> (AB012382)	1 :-.....-.....-.....C.....T.....
<i>C. n. taiouanus</i> (AF291879)	1 :-.....-.....-.....C.....C.....T.....
<i>C. n. pseudaxis</i> (AF291881)	1 :A.....-.....C.....T.....
<i>C. n. dybowskii</i> (AF291880)	1 :-.....-.....-.....C.....T.....
<i>C. unicolor</i> (AF291884)	1 :	-T.....C.....-A.....C.....C.....C.....T.....
<i>C. elaphus</i> (AF016972)	1 :T.C.-GG...TG.A...CAGA
<i>Dama dama</i> (AF291895)	1 :	
<i>Axis porcinus</i> (AF291897)	1 :	

		Tandem repeats
<i>C. n. yesoensis</i>	101 :	AATTTACATT-T-A-TGTCTACTAATTACACAACAAAACAGTGTATATAACCTTATGCACCTGTAGCACATAAAATTAATGCGTTAAGACATACCATGT
<i>C. n. yesoensis/Hka</i>	101 :-.....-.....-.....
<i>C. n. centralis/Gyo1</i>	101 :-.....-.....-.....
<i>C. n. centralis/Ymal</i>	101 :C.....T.....G.....C.....TG.....T.....A.....C.....T.....
<i>C. n. centralis/tmal</i>	101 :C.....T.....G.....C.....TG.....T.....A.....C.....T.....
<i>C. n. nippon/Myal</i>	101 :C.....T.....C.....G.....C.....TG.....C.....T.....A.....A.....C.....T.....
<i>C. n. yakushimae/Yku</i>	101 :C.....TC.....G.....C.....TG.....T.....A.....C.....T.....
<i>C. n. keramae/Kral</i>	101 :C.....T.....G.....C.....C.....TG.....T.....A.....C.....T.....
<i>C. n. kopschi</i>	101 :C.....G.....ATGT.....T.....G.A.A.....C.....
<i>C. n. taiouanus</i>	101 :T.....T.....G.....G.....TGT.....T.....A.....G.....C.....
<i>C. n. pseudaxis</i>	101 :T.....T.....G.....G.....C.TGT.....C.....T.....G.....A.....C.....
<i>C. n. dybowskii</i>	101 :T.....T.....G.....G.....ATGT.....T.....C.....G.....A.....C.....
<i>C. unicolor</i>	101 :T.-CA.....C.....CA.....G.....T.....G.....AAC.....T.....
<i>C. elaphus</i>	101 :	..AGG.G.GC-A-.C.AA...C.CT-...G.T...GGA.GAA.CC...G...C-...ATC.A...CC...GC.G.A.TTC...TTT-.A..T..TC
<i>D. dama</i>	101 :	
<i>A. porcinus</i>	101 :TG.T..TT.A-..

<i>C. n. yesoensis</i>	201 :	ACAACAGCACAT-AA-ACC--GGTGCCTAAGATACATTAT--GTATGATAGTAC---ATAAATT--A-ATGTGTTAGGACATATTATGTATAAT-AGTAC
<i>C. n. yesoensis/Hka</i>	201 :-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
<i>C. n. centralis/Gyo1</i>	201 :-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
<i>C. n. centralis/Ymal</i>	201 :	..G.G.T...-G...A--C-----
<i>C. n. centralis/tmal</i>	201 :	..G.G.T...-G...A--C-----
<i>C. n. nippon/Myal</i>	201 :	..G...T...G...-----
<i>C. n. yakushimae/Yku</i>	201 :	..GG...T...-G...A--C-----
<i>C. n. keramae/Kral</i>	201 :	..G.G.T...G...-----
<i>C. n. kopschi</i>	201 :-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
<i>C. n. taiouanus</i>	201 :-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
<i>C. n. pseudaxis</i>	201 :-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
<i>C. n. dybowskii</i>	201 :-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
<i>C. unicolor</i>	201 :	..G-----..A.....
<i>C. elaphus</i>	201 :	C.TGAT...TT...T...TATA.T.C.A...A.AT...AG.A--C.T.ATC...T---TA...T...CC--AAA...TTA.T...T.C.A-...C.GC-TT.C
<i>D. dama</i>	201 :	---.GCTTAT...T.TA--.C.C.A...A.AT...AG.A--C.T.ATC...T---TA...T...-TT.AAAA...TCT.ATA...TAA...C.GC-TT.C
<i>A. porcinus</i>	201 :	.T.GTTC..T.A-...T-----..T...TA...T.A.T.T.CAA.A.....-..AAT.C.AT...GC...-...C...C.C.AC..

Fig. 5-1 Variation in the sequences of the mitochondrial D-loop region (1110 bp) in *Cervus nippon yesoensis* and other Cervidae

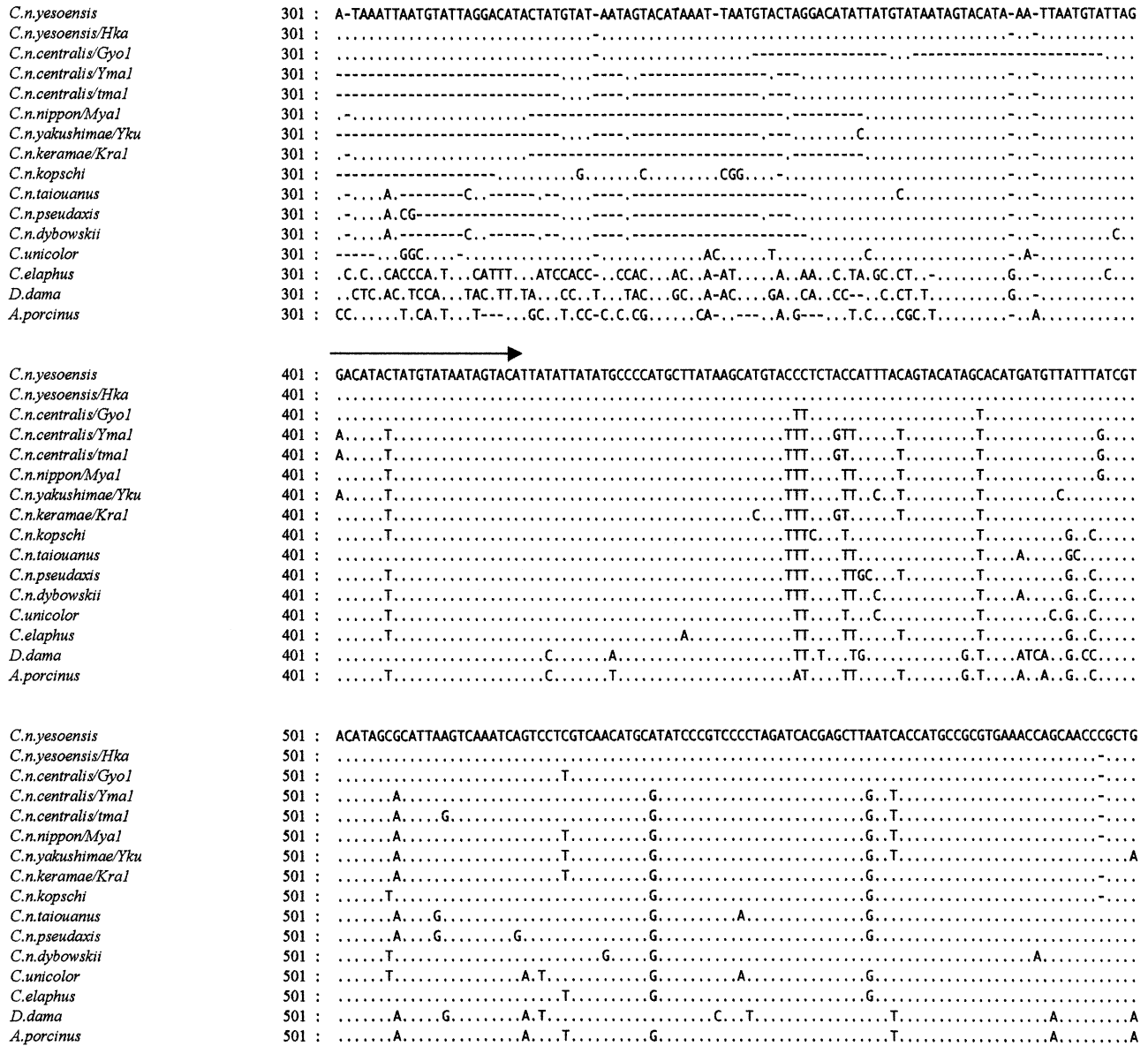


Fig. 5-2 Variation in the sequences of the mitochondrial D-loop region (1110 bp) in *Cervus nippon yesoensis* and other Cervidae

<i>C.n.yesoensis</i>	601 :	GGCAGGGATCCCTCTTCGCTCCGGGCCATGAACCGTGGGGTAGCTATTTAATGAATTTTATCAGACATCTGGTTCTTTTTTCAGGGCCATCTCACC
<i>C.n.yesoensis/Hka</i>	601 :
<i>C.n.centralis/Gyo1</i>	601 :
<i>C.n.centralis/Ymal</i>	601 :T.....C.....
<i>C.n.centralis/tma1</i>	601 :T.....C.....
<i>C.n.nippon/Mya1</i>	601 :T.....
<i>C.n.yakushimae/Yku</i>	601 :T.....C.....
<i>C.n.keramae/Kra1</i>	601 :T.....
<i>C.n.kopschi</i>	601 :T.....C.....
<i>C.n.taiouanus</i>	601 :TT.....C.....
<i>C.n.pseudaxis</i>	601 :T.....C.....
<i>C.n.dybowski</i>	601 :T.....C.....
<i>C.unicolor</i>	601 :A,CT.....C.....
<i>C.elaphus</i>	601 :A.....C.....
<i>D.dama</i>	601 :	.A.A.....AG.T.....C.....C.....
<i>A.porcinus</i>	601 :C.T.....C.....C.....T.....
<i>C.n.yesoensis</i>	701 :	TAAAAATCGCCACCCTTG---TAAT-ATAAGACATCTCGATGGACTAATGACTAATCAGCCCATGCTCACATAACTGGTGTGCATACATTTGGTAT
<i>C.n.yesoensis/Hka</i>	701 :
<i>C.n.centralis/Gyo1</i>	701 :
<i>C.n.centralis/Ymal</i>	701 :TC....C--...T.....
<i>C.n.centralis/tma1</i>	701 :TC....C--...T.C.....
<i>C.n.nippon/Mya1</i>	701 :TC....C--...T.....
<i>C.n.yakushimae/Yku</i>	701 :TC....C--...T.C.....
<i>C.n.keramae/Kra1</i>	701 :TC....C--...T.....
<i>C.n.kopschi</i>	701 :TC....C--...T.....
<i>C.n.taiouanus</i>	701 :TC....---
<i>C.n.pseudaxis</i>	701 :TC....C--...
<i>C.n.dybowski</i>	701 :TC....C--...
<i>C.unicolor</i>	701 :TC....C--...
<i>C.elaphus</i>	701 :C....C--...
<i>D.dama</i>	701 :TCT .CCCC. T. A.....
<i>A.porcinus</i>	701 :TCT .CCCC. T. A.....
<i>C.n.yesoensis</i>	801 :	TTTTAATTTTTGGGGGATGCTTGGACTCAGCAATGGCCGTCTGA-GGCCCGTCCCGGAGCATAAATTGTAGCTGGACTTAACTGCATCTTGAGCATCC
<i>C.n.yesoensis/Hka</i>	801 :
<i>C.n.centralis/Gyo1</i>	801 :
<i>C.n.centralis/Ymal</i>	801 :
<i>C.n.centralis/tma1</i>	801 :
<i>C.n.nippon/Mya1</i>	801 :
<i>C.n.yakushimae/Yku</i>	801 :
<i>C.n.keramae/Kra1</i>	801 :
<i>C.n.kopschi</i>	801 :
<i>C.n.taiouanus</i>	801 :G.....
<i>C.n.pseudaxis</i>	801 :T.....G.....
<i>C.n.dybowski</i>	801 :
<i>C.unicolor</i>	801 :AA.....
<i>C.elaphus</i>	801 :A.....GC.T.....G.....
<i>D.dama</i>	801 :T.....A.....A.....A.....G.....
<i>A.porcinus</i>	801 :T.....A.....

Fig. 5-3 Variation in the sequences of the mitochondrial D-loop region (1110 bp) in *Cervus nippon yesoensis* and other Cervidae

<i>C.n.yesoensis</i>	901 ;	CCATAATGGTAGGCATAGGGCATTGCAGTCAATGGTCACAGGACATAATTATTATTTTCATGAATCAACCCTA--AG-ATCTATTT-----
<i>C.n.yesoensis/Hka</i>	901 ;	
<i>C.n.centralis/Gyo1</i>	901 ;	
<i>C.n.centralis/Ymal</i>	901 ;	
<i>C.n.centralis/tmal</i>	901 ;	
<i>C.n.nippon/Myal</i>	901 ;	
<i>C.n.yakushimae/Yku</i>	901 ;	
<i>C.n.keramae/Kral</i>	901 ;	
<i>C.n.kopschi</i>	901 ;	
<i>C.n.taiouanus</i>	901 ;GC.....G.....-----
<i>C.n.pseudaxsis</i>	901 ;GC.....A.....G.....-----
<i>C.n.dybowskii</i>	901 ;GC.....A.....G.....C.....TC-----
<i>C.unicolor</i>	901 ;C.....G.....A.....A.....TTCC-----
<i>C.elaphus</i>	901 ;G.....C.....G.....TC-----
<i>D.dama</i>	901 ;C-A.....CAT.A.T.....C-.....C.....CA.....T.T.....-----
<i>A.porcinus</i>	901 ;G.....G.....T.....T.....T.....TTCCCCCCCCATTA
<i>C.n.yesoensis</i>	1001 ;	-----CCCCCC-TTCTTAT-TTTT--CCCCCTATATAGTTATCATCATTTTTAACACACTTCCCTAGATATTATTTAAATTATCACATTTTCA
<i>C.n.yesoensis/Hka</i>	1001 ;	
<i>C.n.centralis/Gyo1</i>	1001 ;	
<i>C.n.centralis/Ymal</i>	1001 ;	
<i>C.n.centralis/tmal</i>	1001 ;	
<i>C.n.nippon/Myal</i>	1001 ;	
<i>C.n.yakushimae/Yku</i>	1001 ;	
<i>C.n.keramae/Kral</i>	1001 ;	
<i>C.n.kopschi</i>	1001 ;	
<i>C.n.taiouanus</i>	1001 ;	-----.....C.....T-.....C.T.....T.....C..
<i>C.n.pseudaxsis</i>	1001 ;	-----.....C.....TT.....C.T.....T.....C.....C..
<i>C.n.dybowskii</i>	1001 ;	-----.....C.....T.....C.T.....T.....C.....C..
<i>C.unicolor</i>	1001 ;	-----.....A.TA.....C.....CT.....C..
<i>C.elaphus</i>	1001 ;	-----.....G.A.....T.....C.....T.....C..
<i>D.dama</i>	1001 ;	-----.....CAT.A.....CT.CT.....T.....T.....C..
<i>A.porcinus</i>	1001 ;	TTTTCC.....T.....T.....C.....CT.....C.....C..
<i>C.n.yesoensis</i>	1101 ;	ATACTCAAATTAGCACTCCAGAGGGGTAAGTATATAAACGCCAATTTTTCCCTAA
<i>C.n.yesoensis/Hka</i>	1101 ;	
<i>C.n.centralis/Gyo1</i>	1101 ;	
<i>C.n.centralis/Ymal</i>	1101 ;	
<i>C.n.centralis/tmal</i>	1101 ;	
<i>C.n.nippon/Myal</i>	1101 ;	
<i>C.n.yakushimae/Yku</i>	1101 ;	
<i>C.n.keramae/Kral</i>	1101 ;	
<i>C.n.kopschi</i>	1101 ;	
<i>C.n.taiouanus</i>	1101 ;
<i>C.n.pseudaxsis</i>	1101 ;
<i>C.n.dybowskii</i>	1101 ;G.....
<i>C.unicolor</i>	1101 ;G.....G.....T.....
<i>C.elaphus</i>	1101 ;C.....G.....T.....C.....
<i>D.dama</i>	1101 ;T.....T.....A.....C.....G.....T.....
<i>A.porcinus</i>	1101 ;-.....A.A.....G.....T.....

Fig. 5-4 Variation in the sequences of the mitochondrial D-loop region (1110 bp) in *Cervus nippon yesoensis* and other Cervidae
 ※ (DDBJ Accession No.)

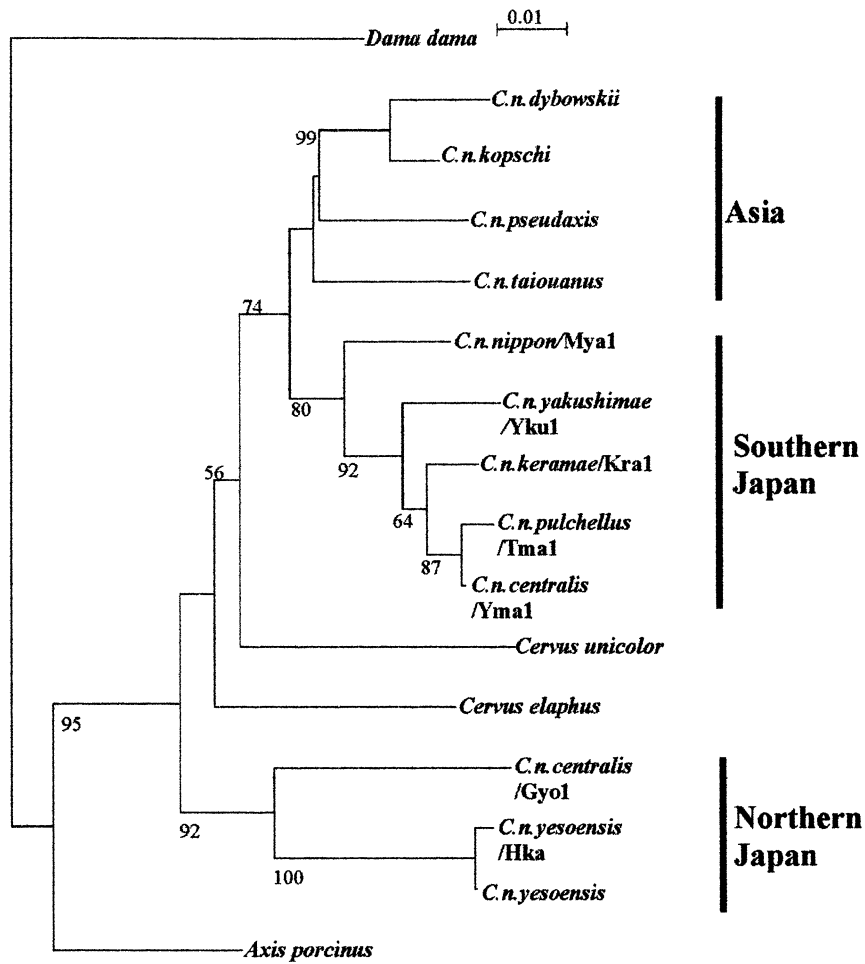


Fig. 6 Neighbor-joining tree D-loop region in *Cervus nippon* and other Cervidae. The bootstrap value (percent occurrence of nodes in 1,000 bootstrap replicates) is indicated as a number at each node if the value is >50%

Determination of the mitochondrial DNA sequences
in the Yeso Sika deer (*Cervus nippon yesoensis*)
—*12SrRNA* gene, *COX II* gene and D-loop region—

By

Kenta WADA*, Chisato HAYAKAWA** and Michinari YOKOHAMA**

(Received August 5, 2002/Accepted January 29, 2003)

Summary : Accumulation of genetic information is important in order to efficiently utilize and preserve the Yeso Sika deer (*Cervus nippon yesoensis*). We analyzed DNA sequences of the *12SrRNA* gene, *Cytochrome c Oxidase II (COX II)* gene and the D-loop region of the mitochondrial DNA in the Yeso Sika deer. The sequence divergence of mtDNA was compared in pairs between other Cervidae (*Cervus unicolor*, *Cervus elaphus*, *Muntiacus reevesi*, *Odocoileus virginianus*, *Odocoileus hemionus*, etc.). Moreover, phylogenetic analysis was also done between them. The complete sequence of the *12SrRNA* gene of the Yeso Sika deer was 957 bp, and the sequence divergence between the Yeso Sika deer and *Cervus unicolor* (Samber) or *Cervus elaphus* (Red deer) was low in value at 2.9 and 3.5%, respectively. In the phylogenetic tree, the Yeso Sika deer and the Samber were joined first, and following the Red deer was connected to them. Finally, *Muntiacus reevesi* (Reeves'muntjac) was connected to the genus *Cervus*. As a result of the phylogenetic analysis, we see that the Reeves'muntjac had a closer relationship to the genus *Cervus* than the genus *Odocoileus*. The complete sequence of the *COX II* gene in the Yeso Sika deer was 687 bp, and the sequence divergence between the Yeso Sika deer and the Samber or *Odocoileus virginianus* (White-tailed deer) was 4.2 and 11.8%, respectively. In the phylogenetic tree of the *COX II* gene, the Yeso Sika deer and the Samber were most closely related as well as the *12SrRNA* gene. The next closest relationship was of the White-tailed deer and the genus *Cervus*. The D-loop region of the Yeso Sika deer was 1110 bp, and the sequence divergence between the Yeso Sika deer and the *Cervus nippon centralis*/Gyo1 (from Iwate Prefecture-Honsyu Sika deer) showed the lowest value (5.2%). Furthermore, the sequence divergence of the Honsyu Sika deer/Ymal (from Yamaguchi Prefecture) and the *C.n. pulchellus* (Tushima Sika deer) was high in value (16.6–16.8%). In the phylogenetic tree, the Sika deer in Japan was classified into two groups of North and South. In addition, the Sika deer of Asia, the Red deer and the Samber were close in relationship to the South group of the Japanese Sika deer.

Key Words : Yeso Sika deer, *12SrRNA* gene, *COX II* gene, D-loop region, mitochondrial DNA

* Department of Bio-Industry Graduate School of Bio-Industry, Tokyo University of Agriculture

** Department of Bioproduction, Faculty of Bio-Industry, Tokyo University of Agriculture