

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660257

研究課題名(和文) カザフスタン在来馬を用いた家畜馬の起源に関する研究

研究課題名(英文) Studys on the origin of domestic horse using Kazakhstan native horse

研究代表者

国枝 哲夫 (KUNIEDA, TETSUO)

岡山大学・環境生命科学研究科・教授

研究者番号：80178011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：カザフスタン在来馬は、祖先としての野生馬の遺伝的影響を強く残している可能性が推測されている。そこで、本研究ではこの在来馬集団の遺伝的特徴を明らかにすることを試みた。106個体の在来馬について、ミトコンドリアDNAおよびY染色体マーカーのハプロタイプ、特定の形質に関わる遺伝子の遺伝子型を調べた。その結果、ミトコンドリアDNAのハプロタイプから、母系の遺伝的多様性は高く、固有の特徴をもつことが明らかとなった。一方、Y染色体ハプロタイプから、父系では西洋系品種との関連性が示唆された。歩様、運動特性、体高に関わる遺伝子の遺伝子型からは、これらの形質について強い選抜が行われていない可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Kazakhstan native horse has been expected to retain the genetic influences of ancestral wild horse. In the present study, therefore, we investigated the genetic characteristics of the native horse population of Kazakhstan. We determined haplotypes of mitochondrial DNA and Y chromosome, as well as genotypes of several functional genes associated with particular traits of horse in 106 Kazakhstan native horses. The results of mitochondrial DNA haplotypes indicated that the population retains high level genetic diversity and unique genetic features in maternal lineage. On the other hand, the results of Y chromosomal haplotypes indicated relation with the common European breeds in paternal lineage. The genotypes of genes associated with gait, physical performance, and withers height suggested that the population has not been under strong selective pressure on these traits.

研究分野：動物遺伝学

キーワード：在来家畜 遺伝的多様性 ミトコンドリアDNA Y染色体

1. 研究開始当初の背景

家畜としての馬は歴史的に軍事、運輸等に重要な役割を果たしてきた。近年ではその利用は大きく減少しているとはいえ、馬が人類にとって重要な家畜であることに変わりはなく、馬の遺伝的特性を解明し、その遺伝子資源を保存することが重要であることは言うまでもない。家畜馬は約 5,500 年前にカザフスタンを含む中央アジアで野生馬から家畜化され、その後全世界に広がったと考えられている。家畜馬の原種となる野生馬は中央アジアからロシアにかけ 19 世紀まで生息していたが、1909 年に絶滅している。

我々は、これまでの在来家畜の調査により、カザフスタンにおいて特徴的な在来馬の集団（以下、カザフスタン在来馬とよぶ）の DNA サンプルを採取している。これらの馬の中には、背中に縋線と呼ばれる黒帯が認められ、四肢上部には明瞭な縞模様が観察されるきわめて特徴的な毛色をもつ個体も含まれている。このような毛色はウマ科の野生種には特徴的にみられるものであるが、家畜馬にはきわめて希であることから、この在来馬の集団は、飼育下の馬でありながら家畜馬の原種の影響を強く残している可能性が推測された。

2. 研究の目的

本研究では、これらカザフスタン在来馬の集団より採取した DNA サンプルを用いて、各種の DNA 多型マーカーの解析を行うことで、これら集団の遺伝的特徴を解析し、他在来馬集団および既存品種の馬と比較することにより、本集団が他の家畜馬とは由来の異なる集団であるか否かを明らかとすることを目的とする。本研究の結果、このカザフスタン在来馬が他の家畜馬とは由来が異なることが確認されたなら、現存の家畜馬は全て約 5,500 年前に野生馬から家畜化された集団に由来するという、これまでの家畜馬の起源

に関する定説が大きく変更される可能性もある。

3. 研究の方法

カザフスタン国内の 6 地域で収集された合計 106 の DNA サンプルを用いた。収集地と収集数はそれぞれ North Kazakhstan で雄 11、雌 1、Kostanay で雄 20、雌 21、Almaty で雄 4、雌 9、South Kazakhstan で雄 17、雌 3、Aktobe で雄 1、雌 4、Mangystau で雄 5、雌 10 である。

ミトコンドリア DNA (mtDNA) の D-loop 領域内の 722-bp の断片を PCR 法により増幅させ、塩基配列を決定した。解析には MEGA7 を使用し、Genbank accession number X75654 のウマ mtDNA 配列を参考配列として 247-bp の領域を用いてハプロタイプを決定し、Neighbor-Joining Tree を作成した。

ウマの Y 染色体では 3 つの一塩基置換、1 つの塩基挿入および 966-bp の欠損が見つかり、これらの変異によって 8 種類の Y 染色体ハプロタイプに分類される。これらの変異を含む領域を PCR 法により増幅し、一部は制限酵素を用いた PCR-RFLP 法により、一部は PCR 断片の長さにより遺伝子型を決定し、残りは PCR 産物の塩基配列を決定することで遺伝子型を決定し、これらの遺伝子型から Y 染色体ハプロタイプを決定した。

ウマ 23 番染色体上の *DMRT3* 遺伝子において 301 番目のコドンでセリンから終止コドンに変化させる g.22999655C>A のナンセンス変異について制限酵素 *Dde* を用いた PCR-RFLP 法によって遺伝子型を判別した。18 番染色体上の *MSTN* 遺伝子の第一イントロンにおける g.66493737C>T の塩基置換について制限酵素 *Rsa* を用いた PCR-RFLP 法によって遺伝子型を判別した。3 番染色体上 *LCORL* 遺伝子の 5' 領域における BIEC2-808543 部位 T>C の塩基置換について制限酵素 *Alu* を用いた PCR-RFLP 法によって遺伝子型を判別した。

4. 研究成果

(1) mtDNA D-loop 領域の解析

家畜馬の mtDNA は品種内および品種間で非常に高い多様性をもつことが明らかにされており、非常に多数の母系系統が家畜馬の遺伝子プールに影響したことが提唱されている。

mtDNA D-loop 領域の解析の結果、カザフスタン在来馬全体で 25 種のハプロタイプが検出され、それらは 13 のハプログループに分類された。そのうち 5 ハプロタイプが他のウマの集団に見られない全く新規のハプロタイプであった。Neighbor-Joining Tree を作成したところカザフスタン在来馬の mtDNA 配列は系統樹の分岐の先には分布せず、根元付近に集中して分布している傾向にあった。これらのことからカザフスタン在来馬の集団では、母系の遺伝的多様性は高く、他のウマの集団とは異なる特徴を持つことが明らかになるとともに、比較的祖先型と思われる mtDNA ハプロタイプを持つ個体が多いことが明らかとなった。

(2) Y 染色体特異的マーカーの解析

Y 染色体には 8 種類のハプロタイプが存在する。HT1 が始祖型とされており、世界的に在来馬を含めた多くの集団に広く分布している。他の 7 ハプロタイプはウマが家畜化された後に起こった変異や遺伝子変換によって HT1 から派生したものであると考えられている。HT2、3 は西洋系品種特異的にみられ、HT2 がアラブ種に由来する西洋系品種を中心に広く分布している一方で、HT3 はサラブレッド種とその関連品種のみに特異的にみられる。また、HT4、5、6 は北欧系品種に特異的にみられるハプロタイプである。HT4 は Icelandic horse、HT5 は Norweigen Fjord、HT6 は Shetlandpony でそれぞれ特異的にみられる。HT7、8 は中国在来馬で報告されているハプロタイプである。カザフスタン在来

馬における Y 染色体特異的マーカーの解析の結果、8 種のハプロタイプのうち HT1、2、3 のみが検出された。HT2 が最も多く観察され、集団中の大部分を占めていた。次に HT3 が多く観察され、最も観察される頻度が少なかったのが HT1 であった。これらの結果から、カザフスタン在来馬の集団は父系においてアラブ種の影響を強く受けていること、一部には過去にサラブレッド種との交配が行われた可能性があることが明らかとなり、カザフスタン在来馬の集団は、母系に比べて父系においては固有の遺伝的特徴は少ないことが示唆された。

(3) 機能的遺伝子の解析

ウマの歩様は遺伝的影響を強く影響を受け、通常の斜体歩とは逆の歩様である側対歩は限られた系統でのみ可能である。近年、*DMRT3* 遺伝子における C から A へのナンセンス変異がウマの歩様に影響をもたらすことが報告されている。カザフスタン在来馬において、*DMRT3* の遺伝子型を調べた結果、CC、CA、AA 型の 3 種類の遺伝子型が観察され、側対歩を可能とする A 対立遺伝子の頻度は、14.4%であった。

MSTN 遺伝子は骨格筋の成長抑制に関与し、これまでに *MSTN* における変異がウシ、イヌ、マウスおよびヒトの筋肥大症に関わると報告されている。ウマにおけるこの遺伝子の T と C の多型は競走馬の距離適性と体格に強く関係することが報告されている。*MSTN* の遺伝子型を調べた結果、TT、TC、CC 型の 3 種類の遺伝子型が観察され、短距離特性と関連する C 対立遺伝子の頻度は 9.6%であった。

LCORL 遺伝子はヒトの身長およびウシの骨重量に関わる遺伝子として同定されている。ウマでも様々な品種のウマにおいて体高に強く関わり、本遺伝子の T と C の多型における C 対立遺伝子が体高を増加させる効果があることが報告されている。*LCORL* の遺

伝子型を調べた結果、TT, TC, CC 型の 3 種類の遺伝子型が検出され C 対立遺伝子の頻度は 16.2%であった。

以上のように、カザフスタン在来馬集団では、*DMRT3*、*MSTN*、*LCORL* のいずれの遺伝子についても変異対立遺伝子は検出されたものの、それらの頻度は低い傾向にあった。したがって、歩様、運動特性、体格等に関する強い選抜が、カザフスタン在来馬集団では行われられて来なかった可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Coat color variation and allelic frequency of the genes associated with body composition and locomotion traits in Kazakhstan native horse. Kunieda T, Ezo H, Okuda Y, Mannen H, Takahashi Y, Nomura K, Yamagata T, Yamamoto Y, Tsunoda, K, Bakhtin M, Kazymbet P, Alykhan M, Suleimenov MZ, Safronova O, and Nishibori M. Report of Society for Researches on Native Livestock, 28, 53-63. 2017 査読なし

Genetic characterization of Laotian native cattle using mtDNA haplotype and loci associated with economical traits, coat color, and a hereditary disorder. Okuda Y, Kanii T, Yamamoto Y, Kounnavongsa B, Keonouchanh S, Bouahom B, Kunieda T. J Anim. Genet. 45. 2017 掲載決定済み、査読有り

Genotype distribution and allele frequencies of the genes associated with body composition and locomotion traits in Myanmar native horse. Okuda Y, Moe HH, Moe KK, Shimizu Y, Nishioka

K, Shimogiri T, Mannen H, Kanemaki M, Kunieda T. Anim. Sci. J. doi:

10.1111/asj.12756. 2016 査読有り

Low mitochondrial DNA diversity of Japanese Polled and Kuchinoshima feral cattle. Mannen H, Yonesaka R, Noda A, Shimogiri T, Oshima I, Katahira K, Kanemaki M, Kunieda T, Inayoshi Y, Mukai F, Sasazaki S.

Anim. Sci. J. doi: 10.1111/asj. 2016 査読有り

〔学会発表〕(計 15 件)

カザフスタンにおける在来馬調査の概要 国枝哲夫、江副暖子、奥田ゆう、万年英之、高橋幸水、野村こう、山縣高宏、山本義雄、角田健司、Meirat Bakhtin, Polat Kazymbet, Meldelokov Alyan, Maratbek Zh Suleimenov, Olga Safronova, 西堀正英 日本畜産学会第121回大会 2017年3月29日 神戸

カザフスタン在来馬の遺伝学的解析 江副暖子、奥田ゆう、Polat Kazymbet, Meirat Bakhtin, Meldelokov Alyan, Maratbek Zh Suleimenov, 西堀正英、山本義雄、万年英之、山縣高宏、高橋幸水、野村こう、角田健司、国枝哲夫 日本動物遺伝育種学会第17回大会 2016年11月5日 名古屋

Myanmar, Laos およびVietnam 在来家畜の遺伝学的調査 国枝哲夫、奥田ゆう 日本動物遺伝育種学会・在来家畜研究会合同シンポジウム 2016年3月27日 東京

ミトコンドリアDNAおよびY染色体マーカーを用いたラオス在来馬の遺伝学的解析 奥田ゆう、濱田秀一、山本義雄、Bounthavone Kounnavongsa, Soukanh Keonouchanh, Bounthong Bouahom, 国枝哲夫 第16回日本動物遺伝育種学会大会.

2015年11月27日 神戸

ミャンマー在来馬の遺伝学的特徴の解析
奥田ゆう、青木実菜、Hla Hla Moe、Kyaw
Kyaw Moe、西岡謙二、清水佑起、戸崎晃
明、梶裕永、万年英之、下桐猛、印牧美
佐生、国枝哲夫 日本畜産学会第119回大
会 2015年3月28日 宇都宮

ミャンマー在来牛を用いた*Bos taurus*
由来DNAマーカーの遺伝子型判定.

Hla Hla Moe、奥田ゆう、Moe Lwin、
Kyaw Kyaw Moe、河邊弘太郎、岡本新、
印牧美佐生、万年英之、国枝哲夫、下桐
猛、第15回日本動物遺伝育種学会大会.

2014年10月31日 和光

〔図書〕（計2件）

祝前博明、国枝哲夫、野村哲朗、万年英
之編、朝倉書店、動物遺伝育種学、2017、
204

国枝哲夫、今川和彦、鈴木勝士編、朝倉
書店、獣医遺伝育種学、2014 160

〔産業財産権〕

該当無し

〔その他〕

該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

国枝 哲夫 (KUNIEDA, Tetsuo)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・教授
研究者番号：80178011

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

揖斐 隆之 (IBI, Takayuki)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・准教
授

研究者番号：70335305

(4)研究協力者

戸崎 晃明 (TOZAKI, Teruaki)

公益財団法人競走馬理化学研究所・専門役