

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04636

研究課題名(和文)ヒマラヤ山系を中心としたアジア山岳地帯の小型在来馬に関する調査研究

研究課題名(英文)Study on local native horse in Asian mountainous area including Himalayan mountains

研究代表者

国枝 哲夫(Kunieda, Tetsuo)

岡山大学・環境生命科学研究所・教授

研究者番号：80178011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒマラヤ山系にて飼育されている小型在来馬の遺伝的特性を明らかにすることを目的として2017年から2019年にかけて、ネパールのムスタン地方、ジュムラ地方、イラム地方において調査およびDNAサンプルの収集を行った。得られたDNAサンプルを用いてY染色体、ミトコンドリアDNA、毛色関連遺伝子の遺伝的多様性について調べたところ、Y染色体についてはきわめて特徴的なハプロタイプを持つ個体が存在すること、ミトコンドリアDNAについては他の在来馬と同様に多様性に富んでいること、毛色関連遺伝子では、祖先型の毛色である薄墨毛に関わるTBX3遺伝子の対立遺伝子が一定の頻度で存在することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウマは歴史的に運輸、農耕、軍事等の人類の文明の発展に最も深く関わってきた重要な家畜である。歴史的に世界各地で飼育されてきた多様な在来馬の遺伝的特性を明らかにすることは、人類がどのようにウマを家畜化してそれを利用し、さらにそれら家畜化されたウマがどのように世界各地に伝わってきたかを解明する上で重要な課題である。本研究の成果はこの様な家畜ウマの由来と伝播経路を解明する上で重要であるだけでなく、近年の産業化の進展にともない個体数が減少する中で危惧されているウマの遺伝的多様性の減少を回避し、在来馬として固有の性質を持つウマの集団を維持し保存する上でも重要である。

研究成果の概要(英文)：To clarify the genetic characteristics of local native horses in the Himalayan mountains, we performed survey and collection of DNA samples in Mustang, Jumla and Ilam regions of Nepal from 2017 to 2019. Then, we investigated the genetic diversity of Y chromosome, mitochondrial DNA, and coat color-related genes using these horse DNA samples. The results revealed that Y chromosome haplotype of some Nepal native horses have very unique characteristics, mitochondrial DNA haplotypes showed high diversities as other Asian native horses, and there were a relatively high frequency of the allele of TBX3 gene, which is associated with the ancestral Dun coat color of horse.

研究分野：動物遺伝学

キーワード：ネパール 在来家畜 ウマ 遺伝的多様性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウマは歴史的に運輸、農耕、軍事等の人類の文明の発展に最も深く関わった重要な家畜であるが、近年の産業化に伴って飼育頭数は減少し、その遺伝的多様性の減少が危惧されている。特に、アジアの各地域に小集団として存在する在来馬は、西洋系品種とは隔離された固有な遺伝的特徴をもつ貴重な希少集団と考えられるが、その遺伝的特徴は必ずしも明らかとはなっていない。我々はこれまでのラオス、ベトナム、ミャンマー等の山岳地帯の在来馬の調査において、これら山岳地帯に居住する少数民族の集団においては、作物の運搬には利用は歴史的にウマが使われてきたが、これらのウマはきわめて小型であり形態的にも固有の特徴を持つこと、ミトコンドリア DNA 等を用いた遺伝学的解析においても固有の遺伝学的特徴を持つことを明らかにしてきた。このことは、アジア南部の山岳地帯において歴史的に飼育されてきた在来馬が現在世界各地で飼育されている家畜馬とは異なる由来を持つ集団である可能性を示しており、そのことを明らかにするためには、これらの地域と近接し、ウマの家畜化の起源地である中央アジアにも近接しており、また歴史的に他の地域とは比較的隔離されてきたヒマラヤ山系を中心とする南アジア山岳地帯における在来馬の遺伝学的特性を明らかにすることが必要と考えられた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、このようなアジア在来小型馬の特徴を強く残していることが期待されるネパールを中心とするヒマラヤ山系で歴史的に利用されてきた在来馬を対象として、現地における調査によるこれらの在来馬に関する各種情報を収集するとともに DNA サンプルの収集を行い、それらを用いてこれら小型在来馬の遺伝的特性と多様性、さらに他のウマの集団との類縁関係を明らかとすることを目的とする。また、本研究により収集された在来馬の DNA サンプルは、ウマの遺伝学的研究のため研究リソースとして整備、保存し、広く世界の研究者に利用可能とすることを旨とする。

3. 研究の方法

本研究では、科研費による研究開始前の予備調査を含めて計 4 回にわたってネパール各地の山岳地帯における在来馬の調査とサンプリングを実施した。予備調査は 2016 年 5 月に行われ、まず、ネパール側の受け入れ研究機関となるネパール農業研究機構の Lumre 試験場を訪問し、受け入れ研究者の Manoj Kumar Shah 氏と、現地での研究施設の現状、備品、薬品等の入手可能性等に検討した。その結果、停電の発生頻度が高いなどの研究環境面では一部問題はあるものの、日本から必要な機材を持ち込めば DNA 抽出等の最低限の実験は可能であることが確認された。また、ネパール北部の山岳地帯を中心に荷役に小型の在来馬が多く飼育されていることが確認され、特に飼育頭数が多いと思われる場所等の情報についても入手した。次に、実際に多くの小型在来馬が飼育されているネパール北部の Mustang 地方にて予備調査を実施した。Mustang 地方までの道路事情は悪く途中道路が崩落しているようなところも見られたが、2 日程度の日程で現地まで到達できることが確認され、現地では数は減少しているものの、依然として多くの小型馬が荷役に利用されており、またこれら小型馬の所有者から許可を得て採血することが可能であることも確認された。これらの予備調査の結果を受けて、第 1 回調査は 2017 年ネパールの北部のムスタン地方にて、第 2 回調査は、2018 年にネパールの西部のジュムラ地方にて、第 3 回調査は、2019 年にネパールの東部インド国境近くのイラムにおいて実施した。

上記の調査、サンプリングによりネパール各地より得られた DNA サンプル、および対象としてのこれまでにアジア各地で得られている DNA サンプルを用いて、Y 染色体特異的なマーカーおよびミトコンドリア DNA (mtDNA) のハプロタイプの解析を行った。Y 染色体については、これまでに Wallner ら (2103, 2017) により報告されているウマ Y 染色体上に存在する多数の一塩基多型 (SNPs) について、SNPs を簡便に検出する方法として開発された KASP Assay 法を用いてその遺伝子型を決定することで Y 染色体ハプロタイプを決定した。ミトコンドリア DNA については、変位速度がきわめて早く高多型であることが知られている D-loop 領域内の 247-bp の断片を PCR 法により増幅し、塩基配列を決定した。Genbank に登録されているウマ mtDNA 配列を参考配列としてハプロタイプを決定した。ウマの毛色に関わる遺伝子の遺伝子型についても決定した。具体的には、改良された西欧系品種ではほとんど見られないが、アジア各国の在来馬には比較的高い頻度で見られ、家畜ウマの由来する野生馬の毛色と考えられている薄墨毛の遺伝子である TBX3 遺伝子の変異について、上記のネパール在来馬および比較対照として他のアジア在来馬について調べた。TBX3 の野生型対立遺伝子であり薄墨毛の原因となる D、および非薄墨毛の原因となる d1、d2 対立遺伝子について TBX3 遺伝子周辺の特定の領域の塩基配列を解析することで、その対立遺伝子頻度について調べた。

4. 研究成果

(1) ネパール在来馬の調査、サンプリング

第 1 回調査は 2017 年 9 月から 10 月にかけて実施した。ネパールの農業研究機構 (NARC) をカウンスパートとして実験室等の施設の提供を受け、日本から遠心機、恒温水槽等いくつかの機材を搬入し、調達できるものについては現地で調達し、採血された血液からの DNA の抽出等の必要とされる操作、実験を行える実験室を立ち上げた。ここを拠点として、約 2 週間ネパールの北部のチベット国境に近い山岳地域であるムスタン地方において在来馬の調査を実施した。具体

的には Jomsom, Kagbeni, Muktinath 等の地域にて計 35 個体の血液を採取するとともに、飼育頭数、飼育形態、利用実態、由来、移動の聞き取り調査、体高等の体尺の測定、毛色等の外貌、年齢、性別、家系等の個体情報の記録を行った。次に、採取した血液より DNA を抽出し、ネパールにおける輸出許可、および日本における動物検疫所の手続きを経て日本に搬入した。第 2 回調査は、2018 年 9 月に、同様にネパール農業研究機構をカウンターパートとして実験室を立ち上げた上で、ネパールの西部の山岳地域であるジユラ地方において在来馬の調査を実施した。具体的には Nepalgunj, Jumla, Lumle 等の地域にて計 32 個体の血液を採取するとともに、飼育頭数、飼育形態、利用実態、由来、移動の聞き取り調査、体高等の体尺の測定、毛色等の外貌、年齢、性別、家系等の個体情報の記録を行った。なお、第 2 回調査では、当初は上記の地域に加えてネパール西部の山岳地域での調査を予定していたが、外務省注意喚起情報が公表されたため、予定を一部変更して上記の地域において調査を実施した。次に、採取した血液より DNA を抽出し同様に日本に搬入した。第 3 回調査は、2019 年 9 月に、同様にネパール農業研究機構をカウンターパートとして実験室を立ち上げた上で、ネパールの東部インド国境近くにおいて実施した。具体的にはイラム周辺の地域にて計 15 個体の血液を採取するとともに、飼育頭数、飼育形態、利用実態、由来、移動の聞き取り調査、体高等の体尺の測定、毛色等の外貌、年齢、性別、家系等の個体情報の記録を行った。次に、上記の採取した血液および、事前に農業研究機構の研究者により事前に採取された血液サンプルを用いて DNA を抽出し、同様に日本に搬入した。

(2) DNA サンプルの解析

3 回にわたる調査で、ネパールの東部、中部、西部の山岳地帯を網羅する形でのムスタン地方、ジユラ地方およびイラム地方の在来馬の DNA サンプルが収集されたため、これらネパール在来馬の DNA サンプル、および対象としてミャンマー、ラオス、カザフスタン等の他のアジア在来馬の血液サンプルを用いて、Y 染色体上の DNA マーカー、mtDNA の多様性および毛色関連遺伝子の対立遺伝子の分布について調べた。Y 染色体については計 49 の SNPs マーカーについて調べたところ、クラウングループと呼ばれるアラブ種、サラブレッド種を中心とする西欧系品種と同様のハプロタイプを持つ個体はきわめて少数であり、多くの個体はアジア在来馬に見られるクラウングループに属さないハプロタイプを持っていた。特にアジア在来馬でもシベリアのヤクートウマ等ごく一部にしか認められず、その塩基配列からウマの家畜化以前の約 5,500 年前に他の家畜ウマの Y ハプロタイプから分岐したと考えられている特徴的なハプロタイプの存在が明らかになった。ネパール在来馬にこの Y 染色体ハプロタイプが存在していることを見いだしたことは、本調査研究における大きな成果の一つである。以上のように、ネパール在来馬はアジア在来馬の中でも特徴的な Y 染色体のハプロタイプの構成を持っていることが明らかになった。mtDNA D-loop 領域の解析では、従来よりアジア在来馬の母系の遺伝的多様性は高いことが知られていたが、ネパール在来馬の集団でも他のアジア在来馬の集団と同様に多数のハプロタイプが検出され、それらの多くはこれまでにアジア在来馬の集団に報告されているハプログループのうちのいずれかのハプログループに分類された。これらのことからネパール在来馬の集団では、母系の遺伝的多様性は高く、他のアジア在来馬の集団と基本的には類似している遺伝的特徴を持つことが明らかとなった。

ネパール在来馬の毛色は他の在来馬の集団と同様に、鹿毛、栗毛、粕毛、河原毛、月毛、青毛等が認められたが、一部に薄墨毛と見られる個体も存在していた。薄墨毛は希釈色、背正中部の鰻線と呼ばれるストライプ、さらに四肢後部および肩甲部の縞模様を特徴とする毛色であり、改良された西欧系品種ではほとんど見られることがないが、アジア在来馬には比較的高い頻度で見られ、家畜ウマの由来する野生馬の毛色と考えられている。薄墨毛の原因となる遺伝子である TBX3 遺伝子の変異については、これまで野生型の薄墨毛となる D 対立遺伝子、非薄墨毛であるが鰻線を呈する d1 対立遺伝子、鰻線のない完全な非薄墨毛である d2 対立遺伝子の 3 対立遺伝子が報告されている。西欧系品種ではほとんどの個体が d2 対立遺伝子のホモであるが、アジア在来馬にはこれまでの我々の調査で d1 対立遺伝子が多く存在し、一部に D 対立遺伝子も存在することが明らかにされている。ネパール在来馬において、TBX3 周辺の特定の領域の塩基配列を解析することで、D、d1、d2 対立遺伝子対立遺伝子の頻度について調べたところ、ネパール在来馬の集団では 0.03、0.30、0.67 であり、比較的高い頻度で薄墨毛を引き起こす D 対立遺伝子が存在していることが明らかとなった。一方で鰻線を引き起こす d1 対立遺伝子の頻度は他のアジア在来馬の集団と比べると低い傾向が認められ、これは実際の毛色の観察と一致していた。

以上、本研究の成果はネパールを中心とするヒマラヤ山系に歴史的に飼育されてきた小型在来馬の遺伝的特徴を明らかにしたものであり、アジア在来馬の由来と伝播経路を解明する上で重要なデータであると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Paul CR, Ngyen BT, Okuda Y, Thu Nu Anh Le NAT, Tabuyaqona MDJ, Konishi Y, Kawamoto Y, Nozawa K, Kunieda T. | 4. 巻 91 |
| 2. 論文標題 Distribution of the mutant allele of the DMRT3 gene associated with ambling gaits in Japanese native horse populations. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Anim Sci J. | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Paul CR, Okuda Y, Nguyen BT, Le NAT, Ibi T, Kawamoto Y, Nozawa K, Kunieda T. | 4. 巻 47 |
| 2. 論文標題 Genotype distribution and allele frequencies of the genes associated with reproductive traits and hereditary disorders in Japanese native horses. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Anim Genet | 6. 最初と最後の頁 29-36 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Kunieda T, Ezoe 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, Nishibori M. | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 Coat color variation and allelic frequency of the genes associated with body composition and locomotion traits in Kazakhstan native horse. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Report of Society for Researches on Native Livestock | 6. 最初と最後の頁 53-63 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Tetsuo Kunieda, Yu Okuda, Misao Kanemaki, Hideyuki Mannen, Takeshi Shimogiri, Yoshio Yamamoto, Yuki Shimizu, Shuichi Hamada, Haruko Ezoe, Hla Hla Moe, Kyaw Kyaw Moe, Bounthavone Kounnavongsa. and Van Hai Vu | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Record for Coat Color Variation, Withers Heights Measurement and Blood Sample Collection of Native Horses in Myanmar, Laos and Vietnam | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Report of Society for Researches on Native Livestock | 6. 最初と最後の頁 55-62 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Yu Okuda, Hla Hla Moe, Kyaw Kyaw Moe, Yuki Shimizu, Kenji Nishioka, Takeshi Shimogiri, Hideyuki Mannen, Misao Kanemaki, and Tetsuo Kunieda | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Allele Frequencies of the Genetic Polymorphisms Associated with Physical Traits in Myanmar Native Horses | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Report of Society for Researches on Native Livestock | 6. 最初と最後の頁 63-71 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Paul, R.C., Okuda, Y., Kawamoto, Y., Nozawa, K. Kunieda, T. |
| 2. 発表標題 Genetic Characterization of Japanese Native Horses |
| 3. 学会等名 18th Asian Australasian Animal Production Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Nguyen, B.T., Le, N.A.T., Paul, R. C., Okuda, Y., Kushaliyev Kaissar, J., Akhmedenov Kazhmurat, M., Bibigul, S., Bakhtin, M., Kazymbet, P., Maratbek, S.Zh., Meldelokov, A., Nishibori, M. & Kunieda, T. |
| 2. 発表標題 Genetic Characterization of Kushum Horse by mtDNA and Genes Associated with Coat Color, Body Composition, and Physical Performance. |
| 3. 学会等名 18th Asian Australasian Animal Production Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Y. Okuda, H. Moe, K. Moe, B. Kounnavongsa, S. Keonouchanh, B. Bouahom, T. Shimogiri, H. Mannen, M. Kanemaki, Y. Yamamoto, T. Kunieda |
| 2. 発表標題 Genetic characterization of native horses in Myanmar and Laos using haplotypes of mitochondrial DNA and Y-chromosomal |
| 3. 学会等名 36th International Society for Animal Genetics Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 H. Ezoë, Y. Okuda, M. Nishibori, H. Mannen, Y. Takahashi, K. Nomura, T. Yamagata, Y. Yamamoto, K. Tsunoda, M. Bakhtin, P. Kazymbet, M. Alykhan, M. Suleimenov, O. Safronova, T. Kunieda1 |
| 2. 発表標題 Genetic characteristics of Kazakhstan native horses. |
| 3. 学会等名 36th International Society for Animal Genetics Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Paul Ripon Chandra・奥田 ゆう・川本 芳・野澤 謙・国枝 哲夫 |
| 2. 発表標題 Genetic Characterization of Japanese native horse |
| 3. 学会等名 日本畜産学会第124回大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Nguyen Ba Trung, Le Nu Anh Thu, Ripon C. Paul, Phuong T. K. Pham, Yu. Okuda, Kushaliye J. Kaissar, Akhmedenov Kazhmurat, Sarsenova Bibigul, Meirat Bakhtin, Polat Kazymbet, Suleimenov Zh Maratbek, Alykhan Meldelokov, Masahide Nishibori, Tetsuo Kunieda. |
| 2. 発表標題 Genetic characterization of Kazakhstan Kushum horse by mtDNA and y chromosome haplotypes and genes associated with coat color, body composition, and physical performance. |
| 3. 学会等名 日本動物遺伝育種学会第20回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--------------------------------|------------------------------|----|
| 研究協力者 | 万年 英之 (Mannen Hideyuki) | 神戸大学・農学研究科・教授 (14501) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|---|-------------------------------|----|
| 研究 協力者 | 熊谷 元 (Kumagai Hajime) | 京都大学・農学研究科・准教授 (14301) | |
| 研究 協力者 | サー マノジュ कुमार (Shah Manoj Kumar) | ネパール農業研究機構・研究員 | |