

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：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2016

課題番号：25304046

研究課題名(和文) アジア南部山岳地帯における在来馬の遺伝的多様性に関する調査研究

研究課題名(英文) Research on genetic diversity of native horses in mountainy ranges of South Asia

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) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ミャンマー、ラオス、ベトナムの山岳地帯におい小型在来馬の調査とDNAサンプルの収集を行い、アジア在来馬集団の遺伝的多様性と集団間の類縁関係を明らかとすることを試みた。ミャンマーにて184個体、ラオスにて71個体、ベトナムにて167個体のDNAサンプルを収集し、それらのDNAを用いて、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、およびマイクロサテライトマーカーといくつかの機能的遺伝子の遺伝子型を調べた。その結果、いずれの集団も母系の遺伝的多様性は高く独自の遺伝的構成を持つこと、父系では一部に西洋系品種の遺伝的影響を受けていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： In the present study we investigate genetic diversity and relation of Asian native horse populations using DNA samples collected from mountainy ranges Myanmar, Laos, and Vietnam. We collected 184, 71, and 167 DNA samples of native horses in Myanmar, Laos, and Vietnam, respectively, and investigated haplotypes of mitochondrial DNA and Y chromosomal markers as well as genotypes of microsatellite markers and several functional genes. The results indicated that genetic diversities of maternal lineages are high in these populations and the have unique genetic compositions, while a part of these populations showed genetic influences of western breeds in paternal lineage.

研究分野：動物遺伝学

キーワード：在来馬 遺伝的多様性 東南アジア ミトコンドリアDNA Y染色体 マイクロサテライトマーカー

1. 研究開始当初の背景

ウマは歴史的に人類にとって最も重要な家畜の一つであったが、近年の産業化に伴って飼育頭数は世界的に大きく減少し、その遺伝的多様性の減少が危惧されている。したがって、将来に向けてウマのもつ遺伝子資源を保全し継承していくことが重要であることは言うまでもない。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なっていない。アジア在来馬は北方系の中型馬と、南方系小型馬に分類され、このうちの中型馬についてはモンゴル在来馬を中心にその特徴はある程度調べられているが、南方系小型馬についてはその遺伝的な特徴を体系的に解析したデータはほとんどない。一方でこれらの南アジア諸国では、近年の経済的発展はめざましく、それに伴いウマの飼育頭数は激減している。したがって、アジア在来馬の遺伝的多様性の保持と遺伝子資源として保存のために、これらの南アジアの小型馬を中心にアジア在来馬の遺伝学的特性を明らかとすることは、きわめて重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、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ミャンマー、ラオス、ベトナム等のアジア南部山岳地帯の在来馬を対象として、現地における調査と DNA サンプルの収集を行い、それらを用いてアジア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アジア在来馬の 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

ミャンマー、ラオス、ベトナムよりなるアジア南部山岳地帯を調査の対象として、まずカウンターパートとなる相手国の研究機関に基本的な実験が可能な実験室を立ち上げた。具体的には、ミャンマーでは国立獣医科学大学、ラオスでは国立農林研究所畜産試験所、ベトナムではフエ農林大学をカウンターパートとして、DNA の抽出と PCR 法による初歩的な遺伝子の解析が可能な実験環境を確立して。本調査に先立つ予備調査は、ミャンマーについてはすでに 2012 年に実施しているが、ラオスについては 2014 年 7 月、ベトナムについては 2015 年 6 月と 2015 年 12 月から 2016 年 1 月に実施し、各国において在来馬の特徴を残す地域集団を特定した。これらの予備調査により得られた情報を元に対象地域を特定し、本調査を実施して在来馬の血液サンプルを採取するとともに、飼育頭数、飼育形態、利用実態等の聞き取り調査、体尺の測定、毛色、年齢、家系等の個体情報を収集、記録した。本調査はミャンマーについては、2013 年 12 月から 2014 年 1 月に北東部の山岳地帯を中心に、ラオスについては 2014 年 12 月から 2015 年 1 月に北部山岳地帯を中心に、ベトナムについては、2016 年 6 月から 7 月に北部山岳地帯を中心に実施した。

その後、カウンターパートの研究施設に立ち上げた実験室にて、採取された血液サンプルより DNA を抽出した後に、PCR 法による初歩的な遺伝子の解析を行った。さらにこれらの DNA サンプルを相手国における正規の手続きを経て日本に持ち帰り、以下の遺伝学的解析を行った。

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 Y 染色体では 6 座位の変異の有無によって 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、PCR-RFLP 法および直接的な塩基配列の解析により遺伝子型を決定し、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。また、国際動物遺伝学会により推奨されているウマの個体識別、親子判定に用いられるウマのゲノムを広く網羅する 31 座位の高多型マイクロサテライトマーカーについて、PCR 法により増幅し、DNA シーケンサーを用いて遺伝子型を判別した。それらの結果をもとに、STRUCTURE 解析により、集団間の類縁関係を解析した。

ウマの歩様、運動特性、体高等に変わる遺伝子の遺伝子型についても決定した。具体的には *DMRT3* 遺伝子において 301 番目のコドン をセリンから終止コドンに変化させるナンセンス変異、*MSTN* 遺伝子の第一イントロンにおける塩基置換、*LCORL* 遺伝子の 5' 領域における塩基置換について、各種制限酵素を用いた PCR-RFLP 法によって遺伝子型を判別した。

4. 研究成果

(1) DNA サンプルの収集

ミャンマー、ラオス、ベトナムにおける調査、サンプリングにより、ミャンマーではシャン州、カチン州、バゴー地方域、ネピドー首都域にて、計 184 個体 (雄 96 個体、雌 88 個体)、ラオスではルアンパバーン県、ウドムサイ県、シエンクアーン県にて、計 71 個体 (雄 36 個体、雌 35 個体)、ベトナムにおいてはカオバン省、ハジャン省、ラオカイ省、ディエンビエン省にて、計 167 個体 (雄 54 個体、雌 113 個体) の在来馬より DNA サンプルを採取した。なお、ミャンマー在来馬はその利用目的によって、輓曳用、駄載用、儀式用に分類した。

(2) mtDNA ハプロタイプの解析

mtDNA D-loop 領域の解析の結果、ミャンマーおよびラオスの在来馬の集団でそれぞれ、48 種および 14 種のハプロタイプが検出され、それらはこれまでに報告されている 16 のハプログループのうち 9 および 7 のハプログループに分類された。さらに、それらのうちミャンマーの 4 およびラオス 4 ハプロタイプは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。また、これらのハプロタイプの構成は、東アジアを中心とした他のアジア在来馬のハプロタイプの構成と大きく異なっていた。これらのことからミャンマーおよびラオスの在来馬の集団では、母系の遺伝的多様性は高く、他のアジア在来馬の集団とは異なる遺伝的特徴を持つことが明らかとなった。

(3) 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 はアラブ種に由来する西洋系品種を中心に広く分布し、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。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。ミャンマー在来馬の集団における 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 が検出された。用途別集団でみると、儀式用の集団は全て HT3 であるのに対し、輓曳用、駄載用の集団では HT1、2、3 のいずれのハプロタイプも検出され、特に駄載用の集団では HT1 が半数以上を占めていた。これらの結果から、ミャンマー在来馬は西洋系品種の影響を部分的受けており、特に儀式用の集団は父系

においてサラブレッド種の影響を強く受け、過去にサラブレッド種との交配が行われていることが推測された。一方、ラオス在来馬の集団では 8 種のハプロタイプのうち HT1 のみが検出された。HT1 は最も始祖的はハプロタイプであり、各地の在来馬に広く認められることから、ラオス在来馬は西洋系品種の影響を受けておらず、アジア在来馬としての遺伝的特徴を強く残している可能性が示唆された。

(4) マイクロサテライトマーカーの解析

ミャンマーおよびラオス在来馬の DNA サンプルを用いて、ウマの染色体上に存在する 31 座位のマイクロサテライトマーカーのタイピングを行い、STRUCTURE 解析を行った。その結果、K=3 にて、ミャンマーの在来馬の集団とラオス在来馬の集団が、明確に分離し、さらにミャンマー在来馬の集団の中で、セレモニー用の集団が他の用途の集団と分離した。したがって、これらの在来馬は飼育地域や利用目的等によって分類される異なった集団間で異なった遺伝的構成を持つことが明らかとなった。

(5) 機能的遺伝子の解析

ウマでは、通常の斜体歩とは逆の歩様である側対歩が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与えることが報告されている。ミャンマー在来馬において、*DMRT3* の遺伝子型を調べた結果、CC、CA 型の 2 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、0.01 であった。

MSTN 遺伝子は骨格筋の成長に関わり、これまでに *MSTN* における変異が各種動物において筋肥大を引き起こすことが報告されている。ウマにおける *MSTN* 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。ミャンマー在来馬において、*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 0.09 であった。

LCORL 遺伝子はヒトの身長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。ミャンマー在来馬において、*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 0.13 であった。

以上、ミャンマー在来馬集団では、*DMRT3*、*MSTN*、*LCORL* の各遺伝子について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。これらの知見はミャンマー在来馬の遺伝的特性を考える上で、興味深い知見と考えられた。

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 9 件)

Coat color variation and allelic frequency of the genes associated with body composition and locomotion traits in Kazakhstan native horse. 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, 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
The assessment of genetic diversity within and among the eight subpopulations of Japanese Black cattle using 52 microsatellite markers. Nishimaki, T., Ibi, T., Tanabe, Y., Miyazaki, Y., Kobayashi, N., Matsuhashi, T., Akiyama, T., Yoshida, E., Imai, K., Matsui, M., Uemura, K., Watanabe, N., Fujita, T., Saito, Y., Komatsu, T., Yamada, T., Mannen, H., Sasazaki, S., Kunieda, T. Anim. Sci. J. 84(8):585-591. 2013 査読有り

〔学会発表〕(計16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
ラオスのセキショクヤケイにおける遺伝的多様性と類縁関係 山本義雄、奥田ゆう、Soukanh Keonouchanh、Bounthong Bouahom、国枝哲夫 日本畜産学会第120回大会 2016年3月29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6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

横山 智 (YOKOYAMA, Satoshi)

名古屋大学・環境学研究科・教授

研究者番号：30363518

万年 英之 (MANNEN, Hideyuki)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：20263395

(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