

木曾馬における保全生物学に関する研究

2023 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科
(岐阜大学)

中 村 琴 乃

木曾馬における保全生物学に関する研究

中 村 琴 乃

要約

木曾馬は木曾地域に起源をもつ日本の在来馬の一種であり、長年、農耕馬として、この地域の人々の生活に深く関わってきた。しかし戦後間もなく、農業の近代化や人々の生活圏・生活様式の変化により農耕馬としての役割を失い、急激にその頭数を減らしていった。一時、約 30 頭まで頭数を減らした木曾馬は、木曾馬を保存したいと考える人々の努力により現在約 150 頭まで回復した。しかしながら、この頭数は依然として絶滅の危機的状況であり、飼養者の高齢化や後継者不足により、将来における木曾馬の存続を楽観視することはできない。また、急激な集団サイズの減少は遺伝的ボトルネックを引き起こし、小規模な集団内での人為的な交配は近交退化を招く恐れがある。そこで、本研究では、将来的な木曾馬の保存を目指し、適切な保全計画を立てるために必要な知見を得ることを目的とした。

第 1 章では、急激に減少した木曾馬の遺伝的多様性を明らかにするため、1980 から 2017 年に産まれた木曾馬 163 頭を、産まれた年によって経年的にグループ 1 (1980～1998 年)、グループ 2 (1999～2007 年) およびグループ 3 (2008～2017 年) の 3 つのグループに分け、それぞれの個体において 31 個のマイクロサテライトの多型について解析した。グループ 1, 2 および 3 を解析した結果、平均対立遺伝子数 (N_a) は 6.2 ± 1.2 , 5.7 ± 1.3 , 5.1 ± 1.5 , ヘテロ接合体観測値 (H_o) は 0.692 ± 0.158 , 0.650 ± 0.152 , 0.644 ± 0.141 , ヘテロ接合体頻度 (H_e) は 0.668 ± 0.142 , 0.642 ± 0.141 , 0.606 ± 0.171 と、それぞれ減少していることが明らかとなった。木曾馬集団の遺伝的多様性は時間の経過と共に低下していることから、マイクロサテライト解析で集団の遺伝的多様性をリアルタイムにモニタリングしながら、繁殖馬が偏らないよう調整する必要があると考えられた。

第 2 章では、2009 年から 2015 年にかけて 149 頭の木曾馬を対象とした SNPs 解析を実施し、木曾馬の毛色を制御する遺伝子の多型について調査した。1940 年台後半、木曾馬には、鹿毛、青毛、栗毛、黒鹿毛、栃栗毛、河原毛、月毛が存在していたが、現在では毛色のバリエーションは鹿毛、栗毛、河原毛の 3 色のみで、90 %以上が鹿毛

である。本研究において、*E* 遺伝子座の *MC1R*, *A* 遺伝子座の *ASIP*, および *C* 遺伝子座の *MATP* (*SLC45A2*) を対象とし、SNP の有無を調べた。対立遺伝子 *E*, *e*, *A*, *a*, *C* および *Cr* の頻度はそれぞれ 0.80, 0.26, 0.86, 0.16, 0.98, および 0.02 であることが明らかとなった。この結果と、表現型のほとんどが鹿毛であることから、木曽馬の *E* および *A* 遺伝子座は *E/E* および *A/A* に固定されつつあることが考えられた。しかしながら、対立遺伝子 *e* および *a*, さらには *Cr* も残存しているため、将来的に 3 種以外の毛色の馬を生産できる可能が示唆された。今後は、遺伝的多様性と市場価値とのバランスに配慮しながら、毛色選別の必要性が考えられた。

日本の在来馬は全体的に、サラブレッドと比較して小柄で、かつ穏やかで扱いやすいと考えられている。第 3 章では、木曽馬 58 頭に加え、北海道和種 84 頭、野間 48 頭、御崎 72 頭、トカラ 123 頭および与那国 97 頭について、筋肉に関する *MSTN*, 体格に関する *LCORL*, 歩様に関する *DMRT3*, 扱いやすさに関する *HTR1A* を対象として、多型の有無および、ミオスタチン(*MSTN*) 遺伝子 Indel 変異 (*MSTN_Del/In*) を調べた。*MSTN* の T/C 変異について、*C* 頻度は木曽馬で 0.42, 北海道和種, 与那国馬, トカラ馬では 0.03 - 0.12, その他の品種では *C* 頻度は 0 であった。一方, *MSTN_Del/In* は木曽馬のみが変異 (*Del* : 0.69, *In* : 0.31) を示した。また, *HTR1A* において, トカラ馬以外では G>A 置換は多くなく (すなわち *A* 頻度は低い) 扱いやすい性格の傾向がみとめられた。本研究では他品種で同定された SNP を解析したため, 日本の在来馬における原因遺伝子とは限らないため, 日本の在来馬遺伝子型-表現型間の関連に関するより詳細な解析が必要と考えられる。

最後に, 第 4 章では, 個体数の減少した木曽馬集団における防疫体制の構築を目的とし, 馬伝染性子宮炎 (CEM) の感染状況について調査した。CEM は, *Taylorella equigenitalis* (TE) によってもたらされる性感染症である。CEM は日本のサラブレッドにおいては清浄化が宣言されているが, 在来馬について調査した報告はない。本研究では, 繁殖に用いられている木曽馬の牡馬 5 頭および牝馬 37 頭の生殖器から得られた計 42 検体のスワブから抽出された DNA を対象に, TE 特異的プライマーを用いて, 2 ステップ PCR を実施した。調査対象個体に臨床症状を示すものではなく, TE 陽

性となる個体は認められなかった。遺伝的多様性が低下した集団内では、伝染病の流行が品種の絶滅に直結する可能性が高まる。そのため、重大な疾病に関しては定期的なスクリーニング検査、ワクチン接種などを実施しながら、モニタリングを継続する必要がある。

今回得られた結果は、木曽馬の保全に向けた繁殖管理および防疫体制を構築する必要性を示した。2017年当時、繁殖にもちいられている種牡馬は3頭しかおらず、この傾向が続けば、いずれ木曽馬は絶滅の危機に瀕してしまう可能性が高い。そのため、木曽馬の新たな活用方法を模索し、飼養者の輪を広げることで繁殖に用いられる馬が偏らないよう調整していくなどの対策も合わせて必要であると考えられる。

目次

要約	3
序論	8
木曽馬とは	8
絶滅の危機にある木曽馬	9
保全生物学	9
木曽馬の保存に関する研究	10
木曽馬の近親度	10
木曽馬の特徴	11
木曽馬保全遺伝学	12
木曽馬保全のための獣医学	13
10年後の木曽馬の多様性	13
本研究の目的	14
第1章 マイクロサテライト解析による木曽馬の遺伝的多様性	16
背景と目的	16
材料と方法	16
血液サンプル	16
遺伝子型判定	17
結果	23
考察	25
第1章のまとめ	26
第2章 木曽馬の毛色の多様性： SNaPshot™遺伝子型解析による MC1R, ASIP および MATP 遺伝子の変異	27
背景と目的	27
材料と方法	28

血液サンプルの採取と DNA の抽出	28
遺伝子型判定	28
結果	30
考察	33
第 2 章のまとめ	34
第 3 章 木曽馬の性質にかかる遺伝子多型の解析	35
背景と目的	35
材料と方法	35
結果	38
考察	40
第 3 章のまとめ	41
第 4 章 木曽馬の防疫体制構築 伝染性子宮炎をモデルとして	43
背景と目的	43
材料と方法	44
サンプリング	44
PCR 解析	44
結果	45
考察	46
第 4 章のまとめ	46
結論	48
参考文献	49
謝辞	57

序論

木曾馬とは

現在、日本馬事協会が認定している日本の在来馬は、北海道和種（北海道）、木曾馬（長野県）、御崎馬（宮崎県）、野間馬（愛媛県）、対州馬（長崎県）、トカラ馬（鹿児島県）、宮古馬（沖縄県）、与那国馬（沖縄県）の8種類である。これらは、明治以降の近代的な育種の影響を受けていない馬であり、長く地域の人々に育まれてきた存在である。



図1 木曾地域と木曾馬。木曾馬は旧中山道木曾路を中心とした木曾地域（黒枠）で飼育されてきた在来馬である。ピンは木曾馬の保存基幹地となっている開田高原を指す。

木曾馬は長野県南部から岐阜県東部にかけての中山間地域である木曾地域に起源をもつ日本の在来馬の一種であり、この地域の文化に重要な役割を果たしてきた[6, 11]。歴史的に見ると、これらの馬は重要な農業機能を持ち、地域の住民にとって欠かすことのできない存在であった。中央アルプスの険しい山岳地帯では交通手段となり、また馬の排泄物は農地改良のための堆肥として利用され、子馬には相応の現金収入があった。

黒田（『信州 木曾馬ものがたり』1977. 信濃路）は、「馬をどこまで大切に飼育するかによって、その家の盛衰が左右したことから、馬のおかげで生活できるので、『馬様だ』、『馬明神だ』という観念が木曾谷農家の人を支配していた」と述べている。また、元開田村村長・初代木曾馬保存会会長の伊藤正起氏（ずんね空間 HP <http://www.zoone.com/zunne/home1.html>）は、「昔は、百姓は馬のおかげで生きていたようなもので、人間が馬に生かされていたようなもので、嫁が亭主より馬を大事にしたというのも、まるっきり作り話ではないんです。」と語ったとされている。これらを裏付けるように、木曾には、馬籠、駒ヶ岳など、馬にちなんだ地名が多く存在する。また開田高原末川の丸山馬頭観音、大桑村の伊奈川観音、旧日義村の渡沢観音など、多くの馬頭観音がみとめられる。

絶滅の危機にある木曾馬

しかしながら、他の日本の在来馬と同様に、昭和30年以降、地方から都市への人口移動、市民の生活様式の変化、また農業の近代化に伴って、木曾馬は労働馬としての役割を失った。1965年の調査では510頭の木曾馬が確認されたが、1975年には32頭まで減少した[4, 5]。

頭数減少を懸念した地元住民は、1969年に木曾馬保存会を設立した。木曾馬保存会の努力により、最終的には約150頭まで回復した[4, 5]。しかし、この数は依然として危機的な状況であり、馬と共に伝統的な生活を営んでいる所有者の高齢化、さらには後継者の欠如により、この品種の将来の存続を楽観視することはできない[8, 9]。

現在、木曾馬はこの地域の貴重な観光資源となっており、生物多様性の観点からも木曾馬の頭数保護は重要である。頭数を増加させる取り組みのなかで、伝統的な特徴をもつ木曾馬を得るために戻し交配が行われ、時間の経過とともに木曾馬らしい個体の生産が可能となってきた。しかし、木曾馬らしさ、すなわち形質の固定は、同時にその遺伝的多様性の減少を意味し、持続可能な集団維持を困難にさせる近交退化を引き起こす可能性を増大させる[2]。

保全生物学

保全生物学の父と呼ばれる Soulé は、保全生物学を遺伝学、自然資源（畑、林業、漁業、野生動物管理、公共政策）、社会科学、環境哲学、環境モニタリング、獣医学、危機性評価、歴史生物地理学、島の生物地理学、生理学、集団生物学（集団遺伝学、生態学、社会生物学）を包括する危機管理学であるとした。Soulé が指摘する通り、この領域は、自然科学だけでなく、人文・社会学を統合したものではあるが、自然物を対象としていることから、自然科学的知見が強くなる側面を持つ。特に自然科学の持つ現状分析ならびにその結果から推測される予測が力を発揮する。

木曽馬の保存に関する研究

何らかの問題を解決するとき、対象の現状理解がその第一歩となる。保全生物学において、個体群を適切に理解するためには、人口統計と保全遺伝学が大きな役割を果たす。

Takasu ら [8] は、木曽馬の生物学的な現状を理解するために、2008 年から 2009 年にかけて、群馬県から福岡県までの 47 か所に赴き、木曽馬保存会に登録されている 125 頭（牡 13 頭，せん 16 頭，牝 96 頭）の体格ならびに身体的特徴を明らかにした（図 2）。

当時、木曽馬は長野県 {24 か所で 76 頭 (60.8%)} と岐阜県 {13 か所で 13 頭 (24.8%)} を中心とした中部山岳地域において飼育されていた。当時、ほとんどのオーナーが 1 頭（23 人, 48.9%）ないし、2 頭（17 人, 36.2%）の木曽馬を飼育していた。その後、高齢だったオーナーは木曽馬を手放していったことから、2010 年代の半ば以降、木曽馬は木曽馬の里をはじめとした限られた施設で飼育されるようになった。

Takasu らによると、当時においても木曽馬の人口構成はすでに日本など、少子化が認められる国々と同じ釣鐘型であった。これに加えて、毎年生まれる子馬の数は 5 頭前後であったことから、木曽馬は将来的に減少し、その遺伝的多様性も近々に減少することが予測された。

木曽馬の近親度

Takasu らは血統書を基に、木曽馬の近交係数を算出した（図 3）。木曽馬の近交係数は、平均で 0.11 ± 0.07 （ $0.00 \sim 0.32$ ）であった [8]。祖父と孫娘との交配により生まれた子が 0.125 であることを考えると、非常に高い値である。

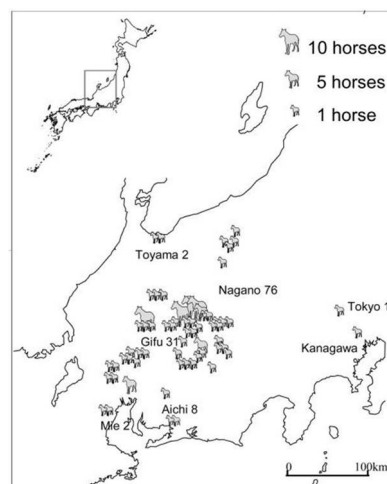


図 2 木曽馬の分布。調査では群馬県から福岡県までの 47 か所を調査した。Takasu, M., et al., J. Equine Sci., 2011 より。

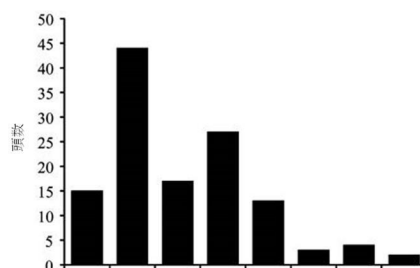


図 3 木曽馬における近交係数のヒストグラム。[出典: Takasu, M., et al., J. Equine Sci., 2011]

木曽馬の数は少なく、絶滅の危機にあると言われた。このような状況から、どれくらいの集団サイズならば絶滅を回避できるのか、つまり、近交退化を避けられるかということが着目された。通常、集団遺伝学では、集団の持続性を議論するとき、実際の数ではなく、集団の維持に有効なサイズ（有効集団サイズ effective number of population: N_e ）が用いられる。たとえば、家畜の育種から経験的に導き出された数字ではあるが、5 から 10 世代程度の短期間、近交退化を避けるために必要な有効集団サイズは 50 以上といわれている。また、100 年間 90% の多様性を担保するだけの有効集団サイズ（Required N_e ）は、世代間隔（ L ）から $\text{Required } N_e = 475/L$ で算出される[8]。

有効集団サイズの計算方法は使用する指標ごとに様々ではあるものの、繁殖可能な牝牝の比から有効集団サイズは $N_e = 4(N_m \cdot N_f) / (N_m + N_f)$ で算出できる[8]。この指標から算出された木曽馬の有効集団サイズは 45.8 であり、近交退化を避けるための値（50<）より若干低い値であった。また、木曽馬の Required N_e は 47.9 であった。これら木曽馬の人口構成を指標とすれば、木曽馬を保存するためには、少なくとも現存数を維持することが重要であると言及された。

木曽馬の特徴

1970 年代、いったん 32 頭まで減少した木曽馬を復元させるために、戻し交配による品種の再構築が行われた。Takasu ら[8]は、木曽馬の品種再構築がどこまで進んでいるのかを明らかにするために、木曽馬の表現型の解明を試みた。



図 4 木曽馬の特徴。背中に黒い線（鰻線）ならびに X 脚（矢印）がみとめられる。[出典: Takasu, M., et al., J. Equine Sci., 2011]

2008-2009 年に調査した木曽馬の体高は、牝で 133.0 ± 5.1 cm（122.9 ~ 143.2 cm）、牝で 131.6 ± 4.2 cm（123.2 ~ 140.1 cm）で

あり、牝牝間での差は存在しなかった。木曽馬の体格に関して、「昔よりも木曽馬が小さくなった」、「近親交配をしすぎたので、その弊害として木曽馬が小さくなっている」

という言葉がよく聞かれた。しかし、木曾馬の体高は、昭和 28 年（1953 年）に岡部が調査した木曾馬のサイズ（132.6 cm～133.5 cm）と差はなかった[1]。したがって、木曾馬が小型化しているという言葉は事実ではなく、外国種の影響を受けた牡馬が多かった時代を知る人々の記憶に由来すると考えられた。

次に、木曾馬の毛色の多様性が明らかにされた。昭和 28 年（1953 年）には様々な毛色、すなわち、鹿毛（43.2%）、黒鹿毛（16.0%）、栗毛（17.2%）、栃栗毛（5.0%）、青毛（4.5%）、河原毛（2.5%）、月毛（1.2%）、葦毛（0.2%）が認められている[1]。しかし、Takasu ら[8]の調査では、木曾馬の毛色は鹿毛（84.0%）、黒鹿毛（8.8%）、栗毛（4.0%）、河原毛（3.2%）の 4 色しか存在しなかった。その中でも、鹿毛が 92.8%を占め、毛色の固定化が進んでいた。しかも、主な種牡馬がすべて鹿毛であることから、今後この傾向は加速されると考えられた。

加えて、木曾馬の 66.4%には、在来家畜に多く認められる鰻線が認められた。また、山間部を歩くために発達したと言われる後肢の X脚が 72.0%の馬に認められた(図 4)。

以上をまとめると木曾馬では外見は固定化されてきていると考えられる。木曾馬は 1950 年代から 70 年代に急速に減少し、最終的には 31 頭の牝馬と第三春山 1 頭となった。このため、これら祖先の遺伝的特徴が現在の木曾馬に反映され、毛色などの固定化に影響を与えていることは間違いない。しかし、それ以上に、木曾馬を復元するために行われてきた戻し交配が木曾馬の外見の固定化に大きな影響を与えた。この品種の確立と近交化はコインの裏表である。近交化は「木曾馬の復元」を目指した飼育者らの意志によって進められてきたことであり、一概に否定されることではない。しかし、近交化は集団の維持にとって不利な状況を生み出すことも知られているため、両者のバランスの上に、今後、木曾馬をどのように残していくのかを考えていかなければならなかった。

木曾馬保全遺伝学

人口統計学的調査に加え、Takasu ら[8]は当時、現存していた木曾馬の 83%に当たる 125 頭のマイクロサテライトの多型を明らかにし、それらに基づく遺伝的多様性ならびに遺伝子構造を明らかにした。

マイクロサテライトは遺伝情報を持たない短い配列遺伝子であり、個体ごとに異なるタイプが存在している。したがって、複数のマイクロサテライトのタイプを決定することで、厳格な個体識別が可能になる。また、このタイピングによって、遺伝情報に基づく木曽馬の個体管理ならびに血統管理が可能となった。

加えて、マイクロサテライトに基づく、木曽馬の遺伝的多様性が評価された。木曽馬の平均アレル数（平均 6.3）、ヘテロ接合率の観察値（0.674）、ヘテロ接合率の期待値（0.662）は世界中の馬品種と比較しても平均的な値であった。また、マイクロサテライト情報に基づく木曽馬の近交系数（ $FIS = -0.017$ ）は高くはなかった。

興味深いことに、マイクロサテライトのデータからは、当時の木曽馬は深刻な近親度を有しているとは言えなかった。これは、昭和 50 年代から木曽馬を再構築したこと、つまり、昭和 50 年代から様々な場所から集められた木曽馬のファウンダー集団は遺伝的に多様であり、その多様な集団から 2 ないし 3 世代しか経っていない現在の集団における遺伝的多様性は比較的保たれていることを示唆していた[7]。

木曽馬保全のための獣医学

臨床獣医学的知見もまた、種の保存に貢献する。木曽馬における臨床獣医学的知見は十分とはいえないまでも、これまでに木曽馬の血液ならびに血液生化学検査基準、繁殖学的知見などが報告されている。同じ馬と言っても、木曽馬の赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン値はサラブレッドと比較して低いことが知られている[10]。また、これらの性質が品種固有なものなのか、後天的な要因によるものかはまだ不明であるが、少なくとも木曽馬の臨床において有用な情報であることから、今後も木曽馬の保全に貢献すべく獣医学的知見の蓄積は重要であると考えられる。

10 年後の木曽馬の多様性

Takasu ら[8, 9]の初期の研究から、すでに 10 年以上が立つ。2000 年代後半から 2010 年代の前半にかけて、これまで木曽馬の保存に貢献してきた飼育者たちの高齢化が進み、それまで個人で木曽馬を飼育してきた飼育者たちが馬を手放していった。その結果、木

曾馬は木曾馬の里を中心とした公的機関での飼育が主となり、広く個人で飼育されてきたからこそ保たれていた多様性も失われていった。限られた場所では、限られた種牡馬や繁殖牡馬が使用されるからである。このため、木曾馬個体群の多様性や群構造は、Takasuら[8, 9]が調査を開始した当時から大きく変化している可能性も考えられた。

本研究の目的

本研究は、SDGs が叫ばれる近年、ますます重要となる生物多様性の一翼を担い、かつ地域の遺伝子資源としても重要である木曾馬の持続可能な保存に貢献するために、木曾馬個体群の状況、またその多様性がどのように変化したかを保全生物学的な視野から明らかにすることを目的としている。

まず第1章において、時代を経て木曾馬の遺伝的多様性がどのように変化したかをマイクロサテライトの多型から明らかにした。ここでは、マイクロサテライトの多型データから、遺伝的多様性の指標となる平均アレル数 (Number of Alleles : N_a)、ヘテロ接合体観察値 (observed heterozygosity : H_o)、ヘテロ接合体頻度 (expected heterozygosity : H_e) を求め、2008年のデータと比較した。

つづいて第2章において、木曾馬の表現型の代表として毛色の遺伝的多様性がどのように残されているのか、また将来、新たに復活する毛色が遺伝的に残されているのかを明らかにした。毛色は分かりやすい表現型であり、最も飼育者らの嗜好バイアスが強く影響するものであるからである。

さらに第3章では、木曾馬の性格や特性に影響を与える遺伝子の多様性を明らかにした。ここでは、外見を除く木曾馬の特性を選抜するにおいて、どのように飼育者の嗜好バイアスがかっているかを明らかにした。

加えて、第4章では木曾馬の防疫体制モデルを構築することを目的に、馬伝染性子宮炎 contagious equine metritis CEM の保有の有無を明らかにした。なぜならば、2018年に全国で40万頭近い豚の殺処分をもたらした豚熱 Classical Swine Fever: CSF, 2020年から世界的な蔓延を見せた COVID-19 が認められたとおり、グローバル化に伴うヒトとモノの動きに伴う感染症はより身近なものになり、その防疫は近々の課題であると

考えられたからである。

最後に結論として、1章から4章で得られた結果から木曽馬の現状を考察し、今後、木曽馬を持続可能な方法で保存していくための方策を議論した。

第1章 マイクロサテライト解析による木曽馬の遺伝的多様性

背景と目的

家畜として木曽山脈地域の人々の生活を支えていた木曽馬は、1965年の調査で510頭が確認されたが、1975年には32頭まで減少した[3, 4]。頭数の激減によりボトルネック効果が起き、木曽馬の遺伝的多様性は減少した。現在、木曽馬保存会（KHCA: The Kiso Horse Conservation Association）の努力により木曽馬の頭数は約150頭まで回復したが、頭数ピラミッドは定常もしくは縮小傾向にあり、近い将来、減少することが示唆された。また、木曽馬は近交係数が高い[12]。このような状況からの回復には、科学的根拠に基づいた高度な戦略が必要である。そこで、2007年から保全プロジェクトを立ち上げ、さまざまな保全活動を実施している[13, 14]。しかし、この10年間、木曽馬の個体数は依然として少なく、現在の保全戦略では、木曽馬の個体数の増加や遺伝的多様性の確保に効果が表れなかった。

この保全プロジェクトの一環として、我々は毎年、生まれたばかりの仔馬を調査し、個体識別や親子関係の解析のためにマイクロサテライトの遺伝子型判定を行ってきた。

マイクロサテライトは、短い非コード反復DNA配列で、変異率が高く、多型性がある。これらの特徴から、集団の遺伝的背景を評価するのに適している[1, 2]。一般的に、マイクロサテライトを用いた遺伝的多様性の評価では、平均対立遺伝子数とヘテロ接合度を指標としている。そこで、本研究では、マイクロサテライト由来のマーカーを用いて、年代とともに木曽馬の遺伝的多様性がどのように変化したかを明らかにすることを目的とした。

材料と方法

血液サンプル

2007年～2017年の間に、1980年～2017年（1980及び2017年を含む）に生まれた木曽馬163頭（牡馬32頭、騊馬17頭、牝馬114頭）の頸静脈から血液を採取し、抗

凝固剤に EDTA をもちいて血漿を得た。馬は出生年により、グループ 1：1980～1998 年（牡馬 5 頭，騾馬 6 頭，牝馬 49 頭），グループ 2：1999～2007 年（牡馬 8 頭，騾馬 11 頭，牝馬 42 頭），グループ 3：2008～2017 年（牡馬 19 頭，牝馬 23 頭）の 3 つのグループに分けられた。既発表のデータ[13]と新たに取得した 38 頭の仔馬の遺伝子型データを統合し，対立遺伝子数とヘテロ接合度を用いて，木曾馬の遺伝的多様性の経年変化を再分析した。

サンプリング手順は，岐阜大学動物実験規程に則り，同大学の動物実験福祉委員会の承認を得て実施された（#15137）。

遺伝子型判定

頸静脈から採取した血液から，メーカーのプロトコル（DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN K.K. Japan, 東京）に従って，ゲノム DNA が抽出された。マイクロサテライト DNA は表 1 のとおり 6 つの群にわけられた。ルーチンマーカーとしての表 2 の 17 個のマイクロサテライト DNA (AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG10, LEX3, LEX33, TKY19, TKY28, TKY321, VHL20), および補体親子鑑定マーカーの 14 個のマイクロサテライト DNA (TKY279, TKY287, TKY294, TKY297, TKY301, TKY312, TKY325, TKY333, TKY337, TKY341, TKY343, TKY344, TKY374, TKY394) の合計 31 個を遺伝的多様性評価のためのマーカーとした[5, 15]。

DNA 2 μ L, 17 個のマイクロサテライト DNA に対応するフォワードプライマー 2–8 pmol と等量のリバースプライマー，あるいは 14 個のマイクロサテライト DNA に対応するフォワードプライマー 3–6 pmol と等量のリバースプライマー，5mM MgCl₂ 1.5 μ L, 2mM dNTP 2.5 μ L, 10 \times 反応バッファー 1.5 μ L, AmpliTaq Gold polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, 米国) 0.1U を混合して合計 15 μ L に調製し（表 3），GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) を用いて，表 4 の条件で反応させた。

マルチプレックス PCR による各増幅産物 2 μ L を Hi-Di Formamide (Thermo Fisher

Scientific) 20 μ L および GeneScan-500 [ROX] Internal Lane Size standard (Thermo Fisher Scientific) 0.25 μ L と混合し, 95°Cで5分間熱変性させた後, 36cm キャピラリーアレイ (Thermo Fisher Scientific) を備えた 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) で電気泳動に供した。ジェノタイピングは, GeneMapper (バージョン 6 ; Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。

表1 マイクロサテライト座位のグループ分け

群	マイクロサテライト						
1	VHL20	HTG4	AHT4	HMS3	HMS7	TKY19	
2	HMS6	TKY28	ASB17	ASB23	TKY321	LEX3	AHT5
3	HTG10	ASB2	CA425	LEX33			
TKY-1	TKY344	TKY279	TKY343	TKY287			
TKY-2	TKY312	TKY301	TKY337	TKY374	TKY297		
TKY-3	TKY333	TKY341	TKY325	TKY294	TKY394		

表 2 17 親子鑑定マイクロサテライトのプライマー配列

マイクロサテライト座位		プライマー配列
VHL20	forward	5'-CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG-3'
	reverse	5'-AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG-3'
HTG4	forward	5'-CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC-3'
	reverse	5'-CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC-3'
AHT4	forward	5'-AACCGCCTGAGCAAGGAAGT-3'
	reverse	5'-GCTCCCAGAGAGTTTACCCT-3'
HMS7	forward	5'-CAGGAAACTCATGTTGATAACCATC-3'
	reverse	5'-TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT-3'
LEX3	forward	5'-ACATCTAACCAGTGCTGAGACT-3'
	reverse	5'-AAGAACTAGAACCTACAACCTAGG-3'
CA425	forward	5'-AGCTGCCTCGTTAATTCA-3'
	reverse	5'-CTCATGTCCGCTTGTCTC-3'
TKY28	forward	5'-TTCAGCAGGGTCTCATGCCAC-3'
	reverse	5'-TTCGGCTCTGGTTCAAGAGG-3'
ASB17	forward	5'-GAGGGCGGTACCTTTGTACC-3'
	reverse	5'-ACCAGTCAGGATCTCCACCG-3'
ASB23	forward	5'-CTGGTGGGTTAGATGAGAAGTC-3'
	reverse	5'-GCAAGGATGAAGAGGGCAGC-3'
HMS6	forward	5'-GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG-3'
	reverse	5'-CTCCATCTTGTGAAGTGTAACCTCA-3'
LEX33	forward	5'-TTTAATCAAAGGATTCAGTTG-3'
	reverse	5'-GGGACACTTTCTTTACTTTC-3'
ASB2	forward	5'-CCACTAAGTGTCGTTTCAGAAGG-3'
	reverse	5'-CACAACCTGAGTTCTCTGATAGG-3'
HTG10	forward	5'-CAATTCCCGCCCCACCCCGGCA-3'
	reverse	5'-TTTTTATTCTGATCTGTCACATTT-3'
AHT5	forward	5'-ACGGACACATCCCTGCCTGC-3'
	reverse	5'-GCAGGCTAAGGAGGCTCAGC-3'
HMS3	forward	5'-CCAACCTTTGTCACATAACAAGA-3'
	reverse	5'-CCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT-3'
TKY19	forward	5'-TATGCCGCTGTCACTGTTGT-3'
	reverse	5'-ATCTCCTTAAATGGAACAAA-3'
TKY321	forward	5'-TGTGACTTCAAGAACAGACG-3'
	reverse	5'-ACAGTGCAAGTCTGTGAAAC-3'

表3 各PCR増幅に用いた混合液の組成

1 群混合液		2 群混合液		3 群混合液	
VHL20プライマー*	0.20µl	HMS6プライマー*	0.20µl	HTG10プライマー*	0.16µl
HTG4プライマー*	0.10µl	TKY28プライマー*	0.20µl	ASB2プライマー*	0.20µl
AHT4プライマー*	0.08µl	ASB17プライマー*	0.20µl	CA425プライマー*	0.10µl
HMS3プライマー*	0.30µl	ASB23プライマー*	0.08µl	LEX33プライマー*	0.32µl
HMS7プライマー*	0.20µl	TKY321プライマー*	0.30µl		
TKY19プライマー*	0.20µl	LEX3プライマー*	0.20µl		
		AHT5プライマー*	0.24µl		
10×バッファー	1.50µl	10×バッファー	1.50µl	10×バッファー	1.50µl
2 mM dNTPs	2.50µl	2 mM dNTPs	2.50µl	2 mM dNTPs	2.50µl
25 mM MgCl ₂	1.50µl	25 mM MgCl ₂	1.25µl	25 mM MgCl ₂	1.50µl
超純水	6.32µl	超純水	6.03µl	超純水	6.62µl
5 U Taqポリメラーゼ**	0.10µl	5 U Taqポリメラーゼ**	0.30µl	5 U Taqポリメラーゼ**	0.10µl
各鋳型DNA***	2.00µl	各鋳型DNA***	2.00µl	各鋳型DNA***	2.00µl

TKY-1混合液		TKY-2混合液		TKY-3混合液	
TKY344プライマー*	0.24µl	TKY312プライマー*	0.12µl	TKY333プライマー*	0.24µl
TKY279プライマー*	0.24µl	TKY301プライマー*	0.12µl	TKY341プライマー*	0.12µl
TKY343プライマー*	0.24µl	TKY337プライマー*	0.12µl	TKY325プライマー*	0.12µl
TKY287プライマー*	0.24µl	TKY374プライマー*	0.16µl	TKY294プライマー*	0.20µl
		TKY297プライマー*	0.24µl	TKY394プライマー*	0.20µl
10×バッファー	1.50µl	10×バッファー	1.50µl	10×バッファー	1.50µl
2 mM dNTPs	2.50µl	2 mM dNTPs	2.50µl	2 mM dNTPs	2.50µl
25 mM MgCl ₂	1.50µl	25 mM MgCl ₂	1.50µl	25 mM MgCl ₂	1.50µl
超純水	6.44µl	超純水	6.64µl	超純水	6.52µl
5 U Taqポリメラーゼ**	0.10µl	5 U Taqポリメラーゼ**	0.10µl	5 U Taqポリメラーゼ**	0.10µl
各鋳型DNA***	2.00µl	各鋳型DNA***	2.00µl	各鋳型DNA***	2.00µl

* 各プライマー濃度はすべて50 pmol/ml

** AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems, CA, U.S.A.)

*** 各鋳型DNA濃度はすべて20 ng/ml

表4 各群のPCR条件

1群		2群		3群	
94°C	10分	95°C	10分	95°C	10分
94°C	30秒	95°C	30秒	95°C	30秒
55°C	1分	60°C	30秒	55°C	30秒
72°C	30秒	72°C	1分	72°C	1分
72°C	10分	72°C	10分	72°C	10分
		33サイクル	35サイクル		35サイクル

TYK1群		TKY2群		TKY3群	
95°C	10分	95°C	10分	95°C	10分
95°C	30秒	95°C	30秒	95°C	30秒
55°C	30秒	55°C	30秒	55°C	30秒
72°C	1分	72°C	1分	72°C	1分
72°C	10分	72°C	10分	72°C	10分
		30サイクル	30サイクル		30サイクル

結果

選択されたマイクロサテライトはすべて増幅され、163頭の木曽馬すべてについて遺伝子型を判定できた。Na, Ho, He はいずれも時間の経過とともに減少していた（図5）。グループ1～3では、Naはそれぞれ 6.2 ± 1.2 （範囲：4～9）、 5.7 ± 1.3 （範囲：3～8）、 5.1 ± 1.5 （範囲：2～8）であった。Hoは 0.692 ± 0.158 （範囲：0.267-0.900）、 0.650 ± 0.152 （範囲：0.279-0.836）、 0.644 ± 0.141 （範囲：0.167-0.905）であった。Heは 0.668 ± 0.142 （範囲：0.272-0.816）、 0.642 ± 0.141 （範囲：0.258-0.823）、 0.606 ± 0.171 （範囲：0.156-0.796）であった。また、対象期間中の木曽馬の平均有効集団サイズも時間の経過とともに減少していた（図6）。

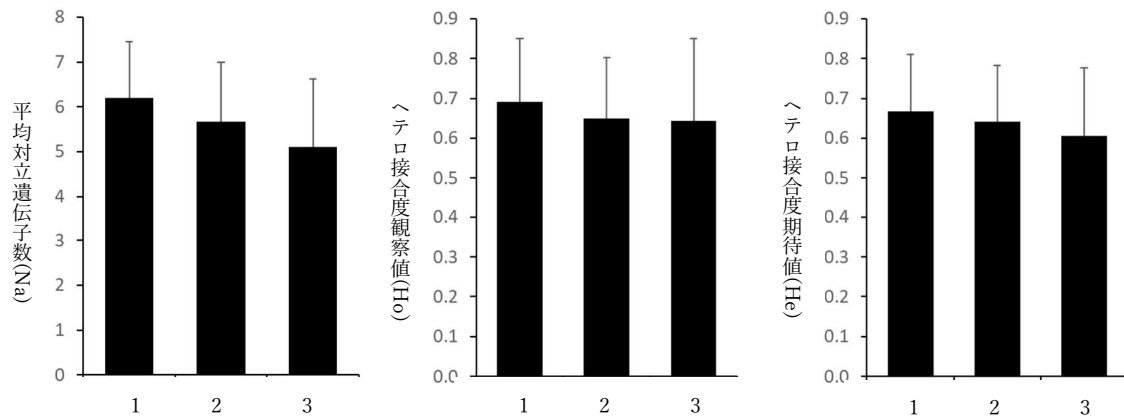


図5 木曽馬の Na, Ho, He の減少量
 3群間の平均 Na はそれぞれ 6.2 ± 1.2 , 5.7 ± 1.3 , 5.1 ± 1.5 , 平均 Ho は 0.692 ± 0.158 , 0.650 ± 0.152 , 0.644 ± 0.141 , 平均 He は 0.668 ± 0.142 , 0.642 ± 0.141 , 0.606 ± 0.171 であることがわかった。

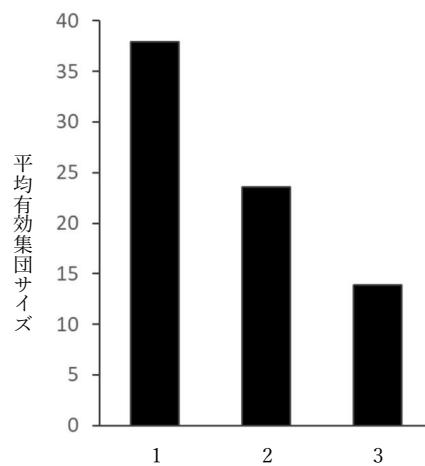


図6 平均有効集団サイズの減少
 グループ1：37.9頭，グループ2：23.6頭，グループ3：13.9頭であった。

考察

本研究により、マイクロサテライトを用いて木曽馬の遺伝的多様性の変動を明らかにできた。時代を経るとともに Na, Ho, He が減少していることから (図 5), 遺伝的多様性は時間とともに減少していることが明らかになった。

遺伝的多様性の低下は、1~2 頭の馬を飼育し、コンスタントに仔馬を生産していた個人馬主の減少に起因していると考えられる。高齢化した個人馬主が馬を手放したため、仔馬の生産は、限られた種牡馬ならびに繁殖牡馬しかもたない木曽馬の里 (第三セクター、公的機関による木曽馬の保存施設) に限られるようになった[4]。

木曽馬の里のスペース、スタッフなどが律速となり、毎年、交配できる雌は 10 頭以下、生まれる仔馬は年間 5 頭以下である[12]。さらに、繁殖センターでは種牡馬の確保が難しく、調査当時の 2017 年には 3 頭の種牡馬 (最近の仔馬の産駒) がいたのみである。このような木曽馬の飼育形態の変化によって、その遺伝的多様性が低下していることが考えられた。

木曽馬はこのままでは、頭数減少に伴い近親交配係数が上昇し、遺伝的多様性がさらに低下するという「絶滅の渦 extinction vortex」に巻き込まれることになる。本研究データは、木曽馬の遺伝的多様性が減少していることの科学的な裏付けとなり、木曽馬保存会と関連行政機関が、今後の木曽馬の保全活動を促すきっかけとなり得ると考えられた。

木曽馬の遺伝的多様性の減少の原因となる「木曽馬の里におけるリミット」をはずすことで木曽馬の多様性を回復できる可能性はある。例えば、繁殖センターの管理負担を軽減するために、一部の馬を保存会会員に委託して飼養することが考えられる。また、年間を通しての放牧は、馬の世話にかかる人手が比較的少なくて済むことから、林間放牧もその案の 1 つであると考えられる。しかし、最も重要なポイントは、社会学的な側面である。言い換えれば、木曽馬の新たな利活用の用途を開発することである。

本研究ではマイクロサテライト多型による平均対立遺伝子数とヘテロ接合度より、遺伝的多様性を評価した。遺伝的多様性は多面的に評価しなければ、その本当の姿を理解できないことから、さらなる指標を用いて木曽馬の遺伝的多様性を評価する必要がある。

毎年、マイクロサテライトを用いて親子判定を行っていることから、そのタイピングデータを用いることで木曽馬の遺伝的多様性をタイムリーに評価できる。実際、Takasuら[6, 9,10,11]のマイクロサテライトによる遺伝的多様性評価は、他の日本在来馬にも広がっている。今後も、木曽馬におけるマイクロサテライトタイピングを継続し、経時的にその遺伝的多様性をモニタリングすることは、その保存において重要であると考えられた。

第1章のまとめ

第1章では、マイクロサテライトデータを用いて、木曽馬の遺伝的多様性が年代を経るとともに、どのように変化しているかを明らかにした。ここでは、危惧されていた通り、木曽馬の遺伝的多様性が低下していることが明らかになった。

第2章 木曽馬の毛色の多様性：SNaPshot™遺伝子型解析による

MC1R, ASIP および MATP 遺伝子の変異

背景と目的

木曽馬の頭数を増加させる取り組みのなかで、伝統的な特徴をもつ木曽馬を得るために戻し交配が行われてきた。1章でも明らかになったとおり、木曽馬の集団サイズの小ささとこの人為的な介入によって、木曽馬の遺伝的多様性は減少している。

現在、木曽馬は中型で、鬃甲部の高さおよび胸囲はそれぞれおよそ 130 cm, 176 cm である。また伝統的な外貌として、66%の馬は背部の縞模様をもち、72%の馬は山間部農耕馬の特徴と考えられている外反膝（X脚）がみられる。さらに、2011年に調査対象となった馬の約92.8%は鹿毛であることが明らかになった [7, 9]。

毛色のバリエーションは野生動物ではあまり観察されないが、家畜では一般的である [2]。馬では、鹿毛、黒鹿毛、栗毛、芦毛、白毛など様々な毛色が記録されており、飼育者や地域の文化的背景を反映した毛色を持つ馬が各地に存在する。言い換えれば、毛色は動物の価値に影響する重要な要素であり、時には馬の用途や需要を直接決定することもある。日本では、珍しい毛色の馬は神馬として選ばれ、神事や祭礼に使用するため神社に奉納される。

1940年台後半、木曽馬には、鹿毛 43.2%、青毛 14.5%、栗毛 17.2%、黒鹿毛 16.0%、栃栗毛 5.0%、河原毛 2.5%、月毛 1.2%が存在していた [4]。現在では毛色のバリエーションは減少し、鹿毛、栗毛、河原毛の3色のみが残っている [9]。

馬において、これらの毛色は *Extension (E)*, *Agouti (A)*, および *Cream dilution (C)* 遺伝子座の *MC1R*, *ASIP*, および *MATP (SLC45A2)* 遺伝子によって制御されており、SNP解析によりこれら遺伝子型判定が可能である [6]。現存する木曽馬の毛色は、鹿毛、栗毛、河原毛と限られていることから、SNP解析によってそれら遺伝子の多型を明らかにするとともに、どのような掛け合わせをすることで青毛を生産できるか、またどの種牡馬を選択すれば栗毛の遺伝子を残せるかなどを明らかにできる。

そこで、本研究では木曽馬の SNP 解析を実施し、木曽馬におけるこれらの遺伝子の

バリエーションを評価した。加えて、木曽馬の将来的な毛色のバリエーションに関して考察した。

材料と方法

血液サンプルの採取と DNA の抽出

本研究では、2009 年から 2015 年にかけて合計 149 頭の木曽馬（牡馬 38 頭，牝馬 111 頭）を対象とした。これらの馬の毛色を含む表現形質を確認し，頸静脈から血液を採取した。採取された血液は可能な限り早く実験室へ運び解析され，MFX-2000 MagExtractor System（東洋紡）を用いて，製造元のプロトコルに従い DNA が抽出された。

遺伝子型判定

遺伝子座 *E*, *A*, 及び *C*, の遺伝子型は Kakoi et al. (2009) [5] の方法に従って，SNaPshot Multiplex kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.)を用いて分析された。MC1R, ASIP, and MATP のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) プライマーを表 5 に示すように設計し，マルチプレックス PCR は，DNA 20 ng, 各プライマー 0.33 μ M, MgCl₂ 2.5 μ M, dNTPs 0.33 μ M, 10 \times 反応バッファー，AmpliTaq Gold 0.5 U (Thermo Fisher Scientific) を混合して 15 μ L に調整し，95 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベーションした後，95 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒，60 秒 \cdot 1 分，72 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒の 3 ステップを 30 サイクル行い，最後に 72 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベーションして反応させた。PCR 産物は ExoSAP-IT[®] (Affymetrix-USB products, Cleveland, OH, U.S.A.)を用いて精製した。変異を検出するために，表 5 に示すように，プライマー 0.02 \sim 0.1 μ M を用いて SNaPshot Multiplex kit (Applied Biosystems)により遺伝子型解析を行った。遺伝子型は自動シーケンサー (Applied Biosystems 3130xl genetic analyzer; Thermo Fisher Scientific)を用いて決定した。

表5 PCR用プライマーおよびMCIR, ASIP, MATP遺伝子の変異を検出するSNaPshot用プライマー

プライマー	配列	検出可能な変異
MCIR-F	5' -CCTACCTCGGGCTGACCACCAA-3'	
MCIR-R	5' -GAGAGGACACTAACCCACCCAGATG-3'	
ASIP-F; TestADEx2-F	5' -CTTTTGTCTCTCTTTGAAGCATTG-3'	
ASIP-R	5' -GCTAGCTAGTACAGAAAAGAT-3'	
MATP-F	5' -TTGCTGACCCGAAAGAAAG-3'	
MATP-R	5' -GAAATGCACTGGGAGACTGA-3'	
E/e (C/T) primer	5' -GACTATCTGTGCCTGGCCGTGT-3'	C901T on MCIR
e/e (C/T) primer	5' -(GACT) 4TGCTCACCAGCAGGT-3'	G903A on MCIR
A/a (T/G) primer	5' -(GACT) 5GAAGATCTCTTCTCTTTCTGTCT-3'	exon 2 of ASIP
C/Cr (G/A) primer	5' -(GACT) 7CACCATGATAGGTGTGGTTCTCTTT-3'	G72A on exon 2 of MATP

結果

調査対象となった木曾馬の毛色は、表 6 に示すように、鹿毛が 140 頭で全体の 94 %、栗毛が 3 頭で 2.0 %、川原毛が 6 頭で 4.0 %であった。全ての調査対象馬について遺伝子型判定が実施でき、対立遺伝子 E , e , A , a , C および Cr の頻度はそれぞれ 0.80, 0.26, 0.86, 0.16, 0.98, および 0.02 であった (表 7)。毛色の表現型は遺伝子型と一致していた (表 8)。3 頭の種馬は全て鹿毛で、そのうち 2 頭は E/E , A/A , C/C で、残る 1 頭は E/e , A/A , C/C であった。

表6 木曾馬における毛色の種類と割合

毛色	頭数	%
鹿毛	140	94
栗毛	3	2
河原毛	6	4

表7 木曾馬のE, A, およびC 遺伝子座における対立遺伝子頻度

	MC1R		ASIP		MATP	
	E	e	A	a	C	Cr
対立遺伝子数	237	61	257	41	292	6
対立遺伝子頻度	0.80	0.20	0.86	0.14	0.98	0.02

調査対象頭数は149頭であった。

表 8 調査対象馬の遺伝子型と毛色の表現型

Sample	MCIR	ASIP	MATP	LWO	Sabinol	毛色	Sample	MCIR	ASIP	MATP	LWO	Sabinol	毛色
1	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	76	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
2	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	77	E E	A A	Cr	o o	sb1 sb1	バックスキン (河原毛)
3	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	78	E e	A A	Cr	o o	sb1 sb1	バックスキン (河原毛)
4	E e	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	79	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
5	E e	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	80	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
6	E e	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	81	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
8	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	82	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
9	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	83	e e	A A	C C	o o	sb1 sb1	栗毛
10	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	84	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
11	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	85	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
12	E e	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	86	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
13	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	87	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
14	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	88	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
15	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	89	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
16	E e	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	90	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
17	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	91	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
18	E E	A a	Cr	o o	sb1 sb1	バックスキン (河原毛)	92	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
20	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	93	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
21	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	94	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
22	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	95	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
23	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	96	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
24	E e	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	97	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
25	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	98	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
26	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	99	E e	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
27	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	100	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
28	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	101	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
29	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	102	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
30	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	103	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
31	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	104	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
32	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	105	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
33	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	106	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
34	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	107	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
35	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	108	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
36	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	109	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
37	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	110	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
38	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	111	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
39	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	112	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
40	E e	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	113	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
41	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	114	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
42	E e	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	115	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
43	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	116	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
44	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	117	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
45	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	118	e e	A a	C C	o o	sb1 sb1	栗毛
46	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	119	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
47	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	120	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
48	e e	A A	C C	o o	sb1 sb1	栗毛	121	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
50	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	122	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
51	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	123	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
52	E E	A a	Cr	o o	sb1 sb1	バックスキン (河原毛)	124	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
53	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	125	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
54	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	126	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
55	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	127	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
56	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	128	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
57	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	129	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
58	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	130	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
59	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	131	E e	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
60	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	132	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
61	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	133	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
62	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	134	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
63	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	135	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
64	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	136	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
65	e e	A A	C C	o o	sb1 sb1	栗毛	137	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
66	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	138	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
67	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	139	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
68	E E	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	140	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
69	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	141	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
70	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	142	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
71	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	143	E e	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
72	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	144	E e	A a	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
73	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	145	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
74	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	146	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
75	E e	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛	147	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
							148	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛
							149	E E	A A	C C	o o	sb1 sb1	鹿毛

考察

SNP解析によって、木曽馬の *MC1R*, *ASIP*, および *MATP* の遺伝子型を解析し、毛色を決定する遺伝子頻度を評価できた。これにより、木曽馬における毛色決定遺伝子のバリエーションを明らかにし、望まれる毛色を持つ木曽馬の生産が可能となると考えられた。

94%の木曽馬は鹿毛であった。その対立遺伝子 *E* および *A* の頻度はそれぞれ 0.80 と 0.86 であった。このことから、木曽馬の遺伝子座 *E* および *A* が *E/E* と *A/A* に固定されつつあると考えられた。さらに、使用されている 3 頭全ての種牡馬は鹿毛であった。その内、1 頭だけが *E/e*, *A/A* であったが、残り 2 頭は *E/E*, *A/A* であった。*A* と *E* を両方有する個体は鹿毛となる。つまり、木曽馬では鹿毛の均一化が進んでおり、*e* 遺伝子を持つ種牡馬が使われなければ、将来、木曽馬はすべて鹿毛となると予想される。確かに木曽馬の均一化は進んでいるといえる。しかし、それは望ましい形質を持つ木曽馬を得るために集団の純化を行ってきた関係者の努力を部分的に反映しているともいえる。

木曽馬の集団には劣性対立遺伝子 *e* と *a* が残されている (表 7)。対立遺伝子 *e* をもつ血統が存在するため、対立遺伝子 *e* を持つ栗毛馬 (*e/e*, *A/-*) の個体数が増加する可能性がある。劣性対立遺伝子 *a* の頻度は限られているが、木曽馬の集団に黒毛馬 (*E/-*, *a/-*) が復活する可能性はある。また、少ないながらも *Cr* 遺伝子が残されているため、将来的には月毛・パロミノ (*e/e*, *C/Cr*) や佐目毛・ダブルダイリュート (*Cr/Cr*) が出現する可能性は残されている。

家畜において、特定の表現型の固定は、集団の遺伝的多様性の低下を直接示唆するとは限らない。木曽馬の毛色多様性は減少しているが、マイクロサテライトとミトコンドリア DNA のデータから、木曽馬の遺伝的多様性は相対的に保護されていると考えられている [10, 11]。したがって、本研究データは、家畜における表現型遺伝子は飼育者の嗜好性に大きく左右されることが示唆される。ここは、生物多様性を考えるうえで、野生動物と家畜で大きく異なるところであると考えられる。

本研究において、我々は木曽馬の毛色を決定する遺伝子のバリエーションを明らかに

できた。これにより、目的にあった毛色を持つ木曽馬の生産が可能となった。また、木曽馬の毛色が固定化されつつあることが明らかになったとともに、家畜の毛色多様性は飼養者の嗜好性に大きく左右されることを再確認できた。

第2章のまとめ

第2章では、SNP解析によって、木曽馬の毛色を決定する遺伝子のバリエーションを明らかにすることができた。結果、飼育者の嗜好性により木曽馬における毛色の純化は進んでいるものの、将来的には排除された毛色が復活する可能性も残されていることがわかった。

第3章 木曾馬の性質にかかる遺伝子多型の解析

背景と目的

日本在来馬は明治以降の近代的育種の影響を受けていない。在来馬は、温厚で忍耐強いといわれ、地域の人々の生活に合わせて改良されてきたことから、走ることに特化したサラブレッドとは異なる特性を持つ。

馬ゲノムプロジェクトが完了したことで、ウマの参照ゲノム配列が公開され、いくつかの形質関連遺伝子の多型が明らかにされた[23]。ミオスタチン (MSTN) 遺伝子のプロモーター領域における short interspersed nuclear element (SINE) の挿入は筋肉量や筋線維の種類と関連していること[22], リガンド依存性核内受容体コアプレッシャー様 (LCORL) 遺伝子のシスエレメントにおける一塩基変異 (SNV) は馬の体高と体重に影響を与えること[10], doublesex and mab-3 related transcription factor 3 (DMRT3) 遺伝子のコード領域における SNV は馬の歩行に関連していること[3], 5-ヒドロキシトリプタミン受容体 1A (HTR1A) 遺伝子の SNV はサラブレッドの扱いやすさと関連していること[6]が明らかになった。

第3章では、木曾馬における上記4つの遺伝子頻度を明らかにした。これらの遺伝子頻度を、他の日本在来馬5品種（北海道和種, 野間, 御崎, トカラ, 与那国）と比較し、日本在来馬における木曾馬の特徴を明らかにした。

材料と方法

本研究では、木曾馬 58 頭に加え、北海道和種 84 頭, 野間 48 頭, 御崎 72 頭, トカラ 123 頭, 与那国 97 頭のゲノムサンプルを使用した。野間を除く全品種のゲノム DNA は、これまでの研究[2,7,14,16,18]で収集されたものを使用した。野間馬のサンプルに加え、他の5品種の一部においては、競走馬理化学研究所で親子鑑定用に提供された血液サンプルが使用された。

メーカーのプロトコールに従い、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いてゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノムサンプルにおけるそれぞれ

れの配列を以下の方法で決定した。

4つの遺伝子におけるジェノタイピングを TaqMan Genotyping Assay で実施した。プライマーならびにプローブは、過去の研究で報告された配列、もしくは Primer Express Software (v3.0; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて設計されたものが用いられた (表 9)。ジェノタイピングは、QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific), TaqMan GTXpress Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。得られた結果から、各遺伝子型における対立遺伝子頻度を算出した。

表9 4つの遺伝子および5つの変異型に対応するプロローブならびにプライマー配列

Variant name	Gene	Reference number, location, and description	Probe and primer sequences
MSTN_T/C	<i>MSTN</i>	rs397152648	MGB probe VIC: AATGCACCAAGTAATTT MGB probe FAM: ATGCACCAATAATTT
		chr18: 66608679 (EquCab3.0)	Forward: CCAGGACTATTTGATAGCAGAGTCA Reverse: GACACAACAGTTTCAAAA TATTGTTCTCCTT
		SNV of intron 1	MGB probe VIC: ATAAAAAGCCACTTGGAAATACAGTA MGB probe FAM: CCCC GTGGCCGAGT
MSTN_De/In	<i>MSTN</i>	deletion/insertion of SINE (227 bp) in promotor	Forward: CAATCATAGATCCTGACGACACTTGT Reverse: ACAACTTGCCACACCAGTGAAT
			MGB probe VIC: CATTCCAGCTTATTTCTGTA MGB probe FAM: CATTCCAGTTTATTTCTGTAC
LCORL_T/C	<i>LCORL</i>	rs68603064	Forward: CCAAATTTGCCCTGGCTAGAGA Reverse: TGTTCCTGTGATTCGCTTT
		chr3: 107374136 (EquCab3.0)	MGB probe VIC: CTGCCGAAAGTTCCG MGB probe FAM: CTCTCCAGCCGCTCCT
		60 kb upstream from LCORL	Reverse: TCAAAAGATGTGCCCGTTGGA MGB probe VIC: CCGCTCCCTTCTTC
DMRT3_C/A	<i>DMRT3</i>	rs1150690013	MGB probe FAM: TCCGCTCTCTCTTC Forward: CCGCAAGACAGTCAAAGAAGGT
		chr23: 22391254 (EquCab3.0)	Reverse: CGCCATTTGGCCTCTTCTT
		Ser301STOP	
HTR1A_G/A	<i>HTR1A</i>	rs1148692440	
		chr21: 10175848 (EquCab3.0)	
		Gly237Arg	

Minor Groove Binder (MGB)プロローブは、VIC または FAM で標識した。

結果

木曾馬においては、MSTN_T/CのCアレルが高頻度(0.42)で認められ、北海道和種、与那国馬、トカラ馬では、Cアレルが低頻度(0.03-0.12)であった。一方、野間馬ならびに御崎馬では多型が検出されなかった(表10)。また、MSTN_Del/Inについては、木曾のみが変異(Del:0.69, In:0.31)を示した(表10)。他の品種はすべて変異を示さなかった(Del:1.00)。

LCORL_T/Cについての多型は北海道和種馬と野間馬においてのみ認められ、Cアレルの頻度は北海道和種馬、野間馬、それぞれ0.02, 0.05であった(表10)。その他の品種において多型は認められなかった。

DMRT3_C/AについてAアレルの頻度は北海道和種馬において0.77であったが、その他の品種では多型は認められなかった(表10)。

HTR1A_G/AについてAアレルの頻度は、木曾馬、与那国馬、トカラ馬でそれぞれ0.01, 0.05, 0.73であった(表10)が、その他の品種においては多型が認められなかった。

表10 各馬種におけるMSTN, DMRT3, LCORL, HTR1A遺伝子のバリエーション

MSTN_T/C	T/T	T/C	C/C	T頻度	C頻度
北海道和種	69	14	1	0.90	0.10
木曾馬	17	33	8	0.58	0.42
野間馬	48	0	0	1	0
御崎馬	72	0	0	1	0
トカラ馬	117	5	1	0.97	0.03
与那国馬	73	24	0	0.88	0.12

MSTN_Del/In	Del/Del	Del/In	In/In	Del頻度	In頻度
北海道和種	84	0	0	1	0
木曾馬	24	32	2	0.69	0.31
野間馬	48	0	0	1	0
御崎馬	72	0	0	1	0
トカラ馬	123	0	0	1	0
与那国馬	97	0	0	1	0

LCORL_T/C	T/T	T/C	C/C	T頻度	C頻度
北海道和種	81	3	0	0.98	0.02
木曾馬	58	0	0	1	0
野間馬	43	5	0	0.95	0.05
御崎馬	72	0	0	1	0
トカラ馬	123	0	0	1	0
与那国馬	97	0	0	1	0

DMRT3_C/A	C/C	C/A	A/A	C頻度	A頻度
北海道和種	7	24	53	0.23	0.77
木曾馬	58	0	0	1	0
野間馬	48	0	0	1	0
御崎馬	72	0	0	1	0
トカラ馬	123	0	0	1	0
与那国馬	97	0	0	1	0

HTR1A_G/A	G/G	G/A	A/A	G頻度	A頻度
北海道和種	84	0	0	1	0
木曾馬	57	1	0	0.99	0.01
野間馬	48	0	0	1	0
御崎馬	72	0	0	1	0
トカラ馬	10	47	66	0.27	0.73
与那国馬	88	9	0	0.95	0.05

考察

本研究では、木曽馬の形質や表現型に関連する Del/In ならびに MSTN, LCORL, DMRT3, HTR1A の 4 つの SNV を明らかにした。また、これらを 5 つの日本在来馬と比較し、木曽馬の特徴を明らかにした。

サラブレッドにおいて、MSTN_Del/In ならびに MSTN_T/C は完全連鎖不平衡 (Del-T, In-C) の関係にある [20]。In-C ハプロタイプをホモ型で持つ個体は速筋線維の比率が多いこと、体重体高比が高いこと、すなわち筋肉質であることから、短距離に対しての適性が認められる [3,4]。いっぽう、Del-T ハプロタイプをホモ型で持つ個体は、遅筋線維比率が多いことから、長距離に適性がある傾向が認められる [4,5]。

MSTN_Del/In の多型が木曽馬のみに確認された。MSTN_Del/In の対立遺伝子は主にサラブレッドやクォーターホースのみに見られる対立遺伝子である。したがって、同遺伝子が木曽馬において低い頻度で認められたことは、戦前に国策として海外の品種と木曽馬との交配がすすめられた痕跡が残されていると考えられた。木曽馬は、第 3 春山を中心とした純系とされる木曽系とアングロアラブ第 4 カズランなどを祖に持つ木曽系に分けられる。一般に、外国の馬との交配により誕生したとされる木曽系は体格も大きく、力強い体格をしているといわれていたことから、木曽系馬には MSTN_In-allele を持つ個体が未だ存在している可能性が考えられた。

LCORL は馬の体高と体重に関連している。この遺伝子の約 60kb 上流の転写因子結合部位に位置する SNV rs68603064 はその遺伝子発現に影響を与える [10]。日本のサラブレッドでは、T/T, T/C, C/C の頻度分布はそれぞれ 0.83, 0.16, 0.01 である [19]。C/C や C/T などの C-allele を持つ馬は、T/T を持つ馬よりも体高が高く、体重が重い [20]。木曽馬において、体高や体重などのばらつきは存在することから、明確に LCORL によってその体格が規定されていると断言することは難しい。したがって、木曽馬の体高や体重に影響する他の候補遺伝子、例えば NCAPG, HMGA2, ZFAT などの多型を解析することで、木曽馬の体格決定に影響を与えている遺伝子が明らかになる可能性が考えられた [9,17]。

歩行は馬の重要な形質であり表現型である。DMRT3 における 301 番目の Ser3 がス

トップコドンに置き換わり、174 アミノ酸残基が欠落する Stop/Stop となる個体では側対歩が認められる [3]。実際、側対歩を示すといわれる北海道和種馬において、多型が認められた[13]。木曽馬においても、側対歩を示す個体がいるといわれている。しかし、木曽馬における側対歩は、すくなくとも DMRT3 の変異によるものではなく、他の遺伝子の影響によるもの、もしくは木曽馬独特の歩様が側対歩のように見える誤認である可能性が考えられた。

HTR1A はセロトニンの受容体であり、ウマではこの多型によって扱いやすさが変わる。ウマの HTR1A には c.709G>A, c.771G>C の 2 種類の SNP があるが、このうち c.709G>A の作用によって 709 番目の遺伝子が G から A に置換されることで HTR1A 蛋白質の 237 位のグリシンがアルギニンに変化する[5]。このアミノ酸はセロトニン受容体蛋白質の第 3 細胞内ループに位置することから、変異によって G 蛋白質との作用に影響し、セロトニンの作用を低下させることで扱いにくい馬となると考えられている。本研究では、トカラ馬以外、A アレルの頻度が高くはなかった。もちろん、性格は様々なファクターによって決まることから、1 つの遺伝子多型だけで言及することはできないが、この結果は「日本在来馬は比較的温和な性格である」可能性を示唆するものである。

在来家畜の集団において、特定の形質に関わる遺伝子をどのように扱うかは、一義的に決まるものではなく、形質や集団によって異なるとともに、その集団が置かれている社会的環境によっても変化する。したがって、各在来馬はそれぞれの文脈に沿った遺伝子型を有していると考えられる。木曽馬は小型で扱いやすい馬であり、かつ忍耐強く、よく働くといわれている。このように木曽馬の体格や性質を改良してきたのは、木曽の人々が木曽馬と共に歩んできた歴史である。本研究で得られた結果は、木曽馬が歩んできた歴史を証明する 1 つとなり得るものであると考えられた。

第 3 章のまとめ

第 3 章では、ウマの性質に関連する遺伝子について、木曽馬とその他の日本の在来馬における多型の有無を明らかにした。木曽馬のもつ特徴的な性質が、今回明らかになっ

た遺伝子の多型のみによって決定されているわけではないが, 現在までに受け継がれてきた性質の一端を担うものであると考えられた。

第4章 木曽馬の防疫体制構築 伝染性子宮炎をモデルとして

背景と目的

1章から3章までは木曽馬保全遺伝学的な側面をたどってきた。そこでは、木曽馬の遺伝的多様性の低下が進んできたこと、毛色を代表する外見を中心とした品種の再構築が進んできたこと、人々との生活とともに木曽馬が変化してきた可能性があることが確認できた。

2018年、本邦において26年ぶりに豚熱が発生した。豚熱の発生した岐阜県ではブランドブタの種雄を含む7万頭が殺処分となった。豚熱が野生のイノシシに感染したことから全国に広がり、現時点でも40万頭近いブタが殺処分されている。

2019年になると、武漢でCOVID-19が発生し、瞬く間に世界中に拡散された。2023年現在、ようやくその鎮静化が認められてきたが、日本だけでなく各国において、COVID-19による様々な被害が認められている。

感染症に対する感受性は、主要組織適合抗原などに左右される。したがって、遺伝的多様性のない集団においては、感染症に対する感受性が固定されており、いったん集団内に感染症が蔓延すると瞬く間に集団を絶滅させる状況を引き起こす可能性が言及されている。これまで述べてきた通り、木曽馬は個体数が少なく、遺伝的多様性は低い。したがって、特定の感染症が集団内に入ってしまうと、瞬く間に絶滅に至る可能性は否めない。

木曽馬保存会のデータをみると、木曽馬の受胎率（受胎数/交配数×100）は2018年で平均 $37.5 \pm 0.0\%$ 、2020年で $31.7 \pm 9.7\%$ と決して高い値とは言えない。ただでさえ高いと言えない受胎率を示す木曽馬において、いったん不妊症の原因となる感染症が侵入すると馬の生産量が大幅に減少すると考えられる。このため木曽馬においては、受胎率を低下させる原因となる感染症の制御と監視システムを早急に確立する必要がある。

第4章では、受胎率を低下させる原因となる微生物のうち、農林水産省の「家畜伝染病予防法」で届出伝染病とされている馬伝染性子宮炎（CEM）をモデルに、木曽馬の防疫体制の確立にかかる研究スキームを確立することを目的とした。

伝染性子宮炎は, *Taylorella equigenitalis* によってもたらされる性感染症である。1977年に英国で初めて報告された後, 世界各国で報告されている[1]。感染した雌馬は, 子宮内膜と子宮頸部の炎症に起因する粘液性の腔分泌物を示し, 一時的に不妊症となる。ほとんどの雌馬は問題なく回復するが, 一部の雌馬は *Taylorella equigenitalis* のキャリアとなり, 何ヶ月も経過することがある。このような雌での状況や, 感染した種馬が無症状キャリアとなっていることが CEM を蔓延させる要因である [1]。

Anzai[2]は本邦のサラブレッドにおいて CEM が根絶されたことを報告している。しかし, 在来馬の CEM についての情報は存在しない。

在来馬における CEM の監視は 2 つの理由から重要である。1つは本邦において CEM が根絶したことを宣言するため, もう一つは不妊の原因となる CEM を制御して馬の効率的な保存を図るためである。

第 4 章では, 木曾馬の CEM を調査し, 木曾馬が CEM フリーの集団であることを宣言するとともに, CEM を例とし, 木曾馬の保存における防疫体制の構築を試みた。

材料と方法

サンプリング

雌馬の陰核洞ならびに陰核窩, 牡馬の尿道口, 尿道洞, 包皮からスワブを採取した。対象とした全ての馬において, CEM を疑う臨床症状は認められなかった。牡馬 5 頭, 牝馬 37 頭の計 42 個のスワブサンプルをスワビングキット (BD BBL culture swabTM plus, Becton, Dickinson and Company Japan, Tokyo) で採取し, 4°C で速やかに実験室へ持ち帰った。

PCR 解析

スワブサンプルは蒸留水 100 μ l に懸濁し, 10 分間 100°C で加温して DNA を抽出した。抽出した DNA を 15,000g, 10 分間遠心分離し, 一次 PCR のテンプレートとした。センスプライマーに P1 (5'-CCATTAGAGGCTGTTATCAATCGGGAAACC-3')を, ア

ンチセンスプライマーに N2 (5'-GTGTCATTAAGGTGTGTATTTGGTCTGGTG-3') を, ポリメラーゼに 1.25 U の Z-Taq (タカラバイオ, 滋賀) を用いた。GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) を用いて, 95°C で 3 分間, 98°C で 1 秒, 68°C で 5 秒 30 サイクル, 72°C で 3 分間のシャトル法で PCR を実施した。

二次 PCR は, 1 回目の PCR 産物をテンプレートとし, センスプライマーに P2 (5'-CCATACCGAACCCAATACCAAGCACAAG-3') を, アンチセンスプライマーに N2 を用いて行った。

増副産物は *T. equigenitalis* 株からの組換えプラスミドで構築したコントロールとともに, 2% アガロースゲル電気泳動で分析した[3]。

結果

今回検査した 5 頭の牡馬と 37 頭の繁殖用牝馬に CEM 陽性の馬は認められなかった (図 7)。

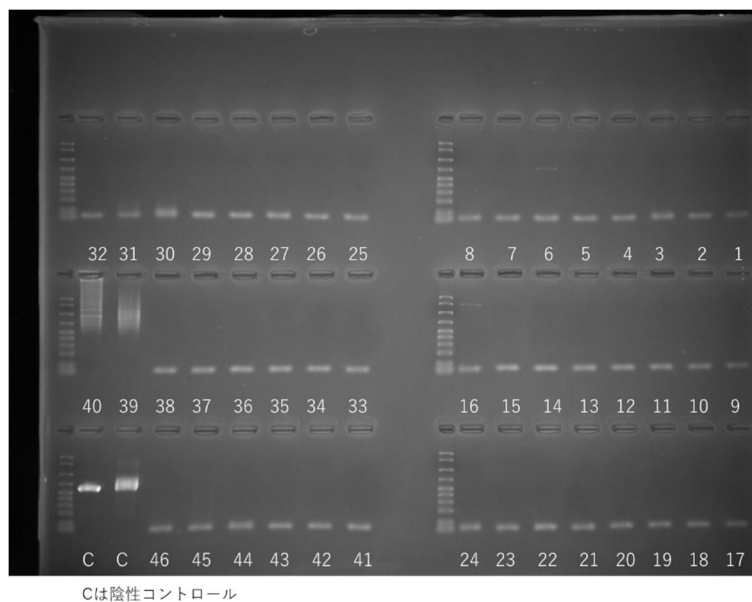


図 7 電気泳動後のアガロースゲル撮影像
今回サンプルを採取した 42 頭の木曾馬において, 陽性と判断される個体は存在しなかった。

考察

現在種牡馬として使用されている3頭の牡馬において CEM は認められなかった。また、繁殖に用いられている牝馬においても CEM は認められなかった。現在、木曽馬保存会に登録されている木曽馬は他の馬との交配はない。したがって、現時点では木曽馬は CEM フリーの集団であると考えられる。

今回、主要な木曽馬から CEM をスクリーニングした。ここで木曽馬は CEM フリーな集団である可能性が考えられた。したがって、今後、繁殖期直前の牡馬ならびに交配前の牝馬で CEM 検査を実施し、疾病の予防に努めることで木曽馬の CEM に対する対策は万全となると考えられる。また、今回、日本在来馬の8品種のうちの一つである木曽馬が CEM に罹患していないことが明らかになり、日本馬の CEM 撲滅に一步近づいたとも言及できる。

CEM に限らず、絶滅危惧種の感染症対策を確立することはグローバル化する世界において重要である。2019年発生した COVID-19 は急速に世界中に拡散した。これは病原体にとって国境はないことを意味し、グローバル化した世界では感染症に対する対策の重要性が益々高まっていることを実感させる。

本研究によって、木曽馬における CEM の防疫体制を確立できた。防疫体制の確立には、まず該当する病原体が集団内に存在しないことを確認することが肝要である。その後、該当する病原体が流入する可能性のあるポイントにおいてスクリーニング検査をすることで集団を病原体から守ることが可能となる。今後、家畜伝染病にリスト化されている疾患を中心に、木曽馬コロニーにおけるスクリーニングを行い、ワクチン接種などの対策をしつつ、定期的なモニタリングを進めることで、木曽馬を絶滅の脅威にさらす疾患から守ることができると考えられる。

第4章のまとめ

第4章では、木曽馬の管理における防疫体制を確立する目的で、届出伝染病である CEM のスクリーニング検査を実施した。その結果、現在の木曽馬集団では CEM は清浄化されていると考えられた。本研究は、今後、各感染症を制御していく上で重要な足

がかりになると考えられた。

結論

木曽馬は、その飼育に関わる人々と共に生きる家畜としての側面がある一方で、絶滅の危機に瀕する野生動物としての性格も併せ持っている。そのため、木曽馬の保全は可能な限り飼養者の意向を汲んだものである必要がある。そこで木曽馬の辿ってきた歴史を詳にし、現在置かれている状況を明らかにすることは、木曽馬保全学において重要な基礎となることであると考えた。

本研究では、これまでの木曽馬について振り返った上で、新たな知見として、主に木曽馬の遺伝的多様性について調査した。その結果、木曽馬の遺伝的多様性は減少傾向にあるものの、未だ一定の水準で維持されており、毛色については飼養者が望むのであればさらに純化を進めることも、以前存在していた毛色を復活させることも可能であるということが明らかとなった。また他の在来馬との比較によって、木曽馬の性格を特徴づけるような遺伝子をもつことも明らかとなった。最後には、種の保全において重要な防疫の観点から CEM の感染状況を調査し、木曽馬集団における CEM の清浄化を宣言することができた。

以上のことから、本研究は木曽馬の保全に役立つ情報を提供できるものと結論づけた。我々には、今後も継続的な調査を実施し、飼養者の希望と木曽馬の将来とのバランスをとりながら保全を進めていくことが期待されていると考えられる。

参考文献

序論

1. 岡部利雄, 松本久喜, 三村一, 1953. 『日本在来馬に関する研究: 特に北海道和種, 木曾馬及び岬馬について』 文部科学省科学試験研究報告, 日本学術振興会.
2. Frankham R. Genetics and extinction: *Biol. Conserv.* 2005: 126 131–140.
3. Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. 2010. Introduction to conservation genetics, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
4. Ito M. 1996. Life with Kiso Horses. Kaida Village and Kiso Horse Conservation Association, Kaida, Nagano, Japan (in Japanese).
5. Japan Equine Affairs Association. 1984. The Kiso horse. pp. 51–62. *In: Japanese Native Horses—Their Preservation and Utilization*, Japan Equine Affairs Association, Tokyo (in Japanese).
6. Kakoi, H., Tozaki, T. and Gawahara, H. 2007. Molecular analysis using mitochondrial DNA and microsatellites to infer the formation process of Japanese native horse populations. *Biochem. Genet.* 45: 375–395.
7. Senju, N., Tozaki, T., Kakoi, Maeda, M., Matsuyama, R., Almunia, J. and Takasu, M. 2017. Genetic characterization of the Miyako horse based on polymorphisms of microsatellites and mitochondrial DNA. *J. Vet. Med. Sci.* 79: 218–223.
8. Takasu, M., Hiramatsu, N., Tozaki, T., Kakoi, H., Hasegawa, T., Maeda, M., Kusuda, S., Doi, O., Murase, T., Mukoyama H., Huricha 2011. Population statistics and biological traits of endangered kiso horse. *J. Equine Sci.* 22: 67–72.
9. Takasu, M., Hiramatsu, N., Tozaki, T., Kakoi, H., Nakagawa, T., Hasegawa, T., Huricha., Maeda, M., Murase, T. and Mukoyama, H. 2012. Genetic characterization of the endangered Kiso horse using 31 microsatellite DNAs. *J. Vet. Med. Sci.* 74: 161–166.
10. Takasu, M., Nagatani, N., Tozaki, T., Kakoi, H., Maeda, M., Murase, T. and Mukoyama, H. 2013. Hematological and biochemical reference values for Endangered Kiso Horse. *J. Equine Sci.* 24: 75–78.

11. Tozaki, T., Takezaki, N., Hasegawa, T., Ishida, N., Kurosawa, M., Tomita, M., Saitou, N. and Mukoyama, H. 2003. Microsatellite Variation in Japanese and Asian Horses and Their Phylogenetic Relationship Using a European Horse Outgroup. *J. Hered.* 94: 374–380.

第 1 章

1. Frankham, R., Ballou, J. D. and Briscoe, D. A. 2009. Genetic diversity. pp. 41-65. *In: Introduction to Conservation Genetics*, 2nd ed. (Frankham, R., Ballou, J. D. and Briscoe, D. A. eds.), Cambridge University Press, Cambridge.
2. Fernández, J., Villanueva, B., Pong-Wong, R. and Toro, M. Á. 2005. Efficiency of the use of pedigree and molecular marker information in conservation programs. *Genetics*. 170: 1313-1321.
3. Ito, M. 1996. Life with Kiso Horses. Kaida Village and Kiso Horse Conservation Association, Kaida (in Japanese).
4. Japan Equine Affairs Association. 2008. The Kiso Horse. pp. 133-161. *In: Japanese Native Horses -Their Preservation and Utilization*, Japan Equine Affairs Association, Tokyo (in Japanese).
5. Kakoi, H., Nagata, S. and Kurosawa, M. 2001. DNA typing with 17 microsatellites for parentage verification of racehorses in Japan. *Anim. Sci. J.* 72: 453-460.
6. Kobayashi, I., Akita, M., Takasu, M., Tozaki, T., Kakoi, H., Nakamura, K., Senju, N., Matsuyama, R. and Horii, Y. 2019. Genetic characteristics of feral Misaki horses based on polymorphisms of microsatellites and mitochondrial DNA. *J. Vet. Med. Sci.* 81: 707-711.
7. Raymond, M. and Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.
8. Scherf, B. D. 2000. Farm animal genetic resources. pp. 37-646. *In: World Watch List of Domestic Animal Diversity*, 3rd ed., Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
9. Senju, N., Tozaki, T., Kakoi, H., Almunia, J., Maeda, M., Matsuyama, R. and Takasu M.

2017. Genetic characterization of the Miyako horse based on polymorphisms of microsatellites and mitochondrial DNA. *J. Vet. Med. Sci.* 79: 218-223.
10. Senju, N., Tozaki, T., Kakoi, H., Shinjo, A., Matsuyama, R., Almunia, J. and Takasu, M. 2017. Genetic diversity of the Yonaguni horse based on polymorphisms in microsatellites and mitochondrial DNA. *J. Vet. Med. Sci.* 79: 425-431.
11. Senokuchi, A., Ishikawa, S., Tozaki, T., Takasu, M., Kakoi, H., Misumi, K. and Hobo, S. 2018. Genetic analyses for conservation of the traditional Tokara horse using 31 microsatellite markers. *J. Equine Sci.* 29: 97-104.
12. Takasu, M., Hiramatsu, N., Tozaki, T., Kakoi, H., Hasegawa, T., Maeda, M., Huricha, Kusuda, S., Doi, O., Murase, T. and Mukoyama, H. 2011. Population statistics and biological traits of endangered Kiso horse. *J. Equine Sci.* 22: 67-72.
13. Takasu, M., Hiramatsu, N., Tozaki, T., Kakoi, H., Nakagawa, T., Hasegawa, T., Huricha, Maeda, M., Murase, T. and Mukoyama, H. 2012. Genetic characterization of endangered Kiso horse using 31 microsatellite DNAs. *J. Vet. Med. Sci.* 74: 161-166.
14. Takasu, M., Ishihara, N., Tozaki, T., Kakoi, H., Maeda, M. and Mukoyama, H. 2014. Genetic diversity of maternal lineage in the endangered Kiso horse based on polymorphism of the mitochondrial DNA D-loop region. *J. Vet. Med. Sci.* 76: 1451-1456.
15. Tozaki, T., Kakoi, H., Mashima, S., Hirota, K., Hasegawa, T., Ishida, N., Miura, N., Choi-Miura, N. H. and Tomita, M. 2001. Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 1191-1197.

第 2 章

1. Bowling, A. T. *Genetics of colour variation*. In: *The Genetics of the Horses*. Bowling, A. T. and Ruvinsky, A. (eds.). CAB International, Wallingford. 2000. pp. 53-70.
2. Ito M. 1996. *Life with Kiso Horses*. Kaida Village and Kiso Horse Conservation Association, Kaida, Nagano, Japan (in Japanese).
3. Japan Equine Affairs Association. 1984. *The Kiso Horse*. pp. 51–62. In: *Japanese Native*

- Horses - Their Preservation and Utilization, Japan Equine Affairs Association, Tokyo (in Japanese).
4. Kakoi, H., Tozaki, T. and Gawahara, H. Molecular analysis using mitochondrial DNA and microsatellites to infer the formation process of Japanese native horse populations. *Biochem. Genet.* 2007. 45: 375-395.
 5. Kakoi, H., Tozaki, T., Nagata, S., Gawahara, H. and Kijima-Suda, I. Development of a method for simultaneously genotyping multiple horse coat colour loci and genetic investigation of basic colour variation in Thoroughbred and Misaki horses in Japan. *J. Anim. Breed. Genet.* 2009 126: 425-431.
 6. Mukoyama H., Furuta H., Yoshida T., Tomogane H., Yoshimura I. Application of a coat color gene polymorphism to evaluation of the bay monotonous phenomenon in Japanese native horse: Kiso pony. *DNA Polymorph.* 2007. 15: 42–50. (in Japanese)
 7. Rieder S., Taourit S., Mariat D., Langlois B., Guérin G. Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mamm. Genome* 2001. 12: 450–455.
 8. Takasu, M., Hiramatsu, N., Tozaki, T., Kakoi, H., Hasegawa, T., Maeda, M.; Huricha, Kusuda, S., Doi, O., Murase, T. and Mukoyama, H. Population statistics and biological traits of endangered kiso horse. *J. Equine Sci.* 2011. 22: 67-72.
 9. Takasu, M., Hiramatsu, N., Tozaki, T., Kakoi, H., Nakagawa, T., Hasegawa, T., Huricha, Maeda, M., Murase, T. and Mukoyama, H. Genetic characterization of the endangered Kiso horse using 31 microsatellite DNAs. *J. Vet. Med. Sci.* 2012. 74:161-166.
 10. Takasu, M., Ishihara, N., Tozaki, T., Kakoi, H., Maeda, M. and Mukoyama, H. Genetic diversity of maternal lineage in the endangered Kiso horse based on polymorphism of the mitochondrial DNA D-loop region. *J. Vet. Med. Sci.* 2014 76: 1451-1456.
 11. Tozaki, T., Takezaki, N., Hasegawa, T., Ishida, N., Kurosawa, M., Tomita, M., Saitou, N. and Mukoyama, H. Microsatellite variation in Japanese and Asian horses and their phylogenetic relationship using a European horse outgroup. *J. Hered.* 2003. 94: 374-380.

12. Wagner, H.J. and Reissmann, M. New polymorphism detected in the horse MC1R gene. *Anim. Genet.* 2000. 31: 289-290.

第3章

1. Ali, M., Masood, A.F., Ali, E.K., Mohammadreza, M., Olena I.B., and Nataliia, I.K. 2019. Effect of LCORL gene polymorphism on body size traits in horse populations. *Acta Sci., Anim. Sci.* 42.
2. Amano, T., Tozaki, T., Takasu, M., Onogi, A., Yamada, F., Kawai, M., and Ueda, J. 2021. Changes of sires in a breeding farm enables maintenance of DNA-level genetic variation in a produced herd of Hokkaido native horses. *Anim. Sci. J.* 92: e13633.
3. Andersson, L.S., Larhammar, M., Memic, F., Wootz, H., Schwochow, D., Rubin, C. J., Patra, K., Arnason, T., Wellbring, L., Hjälm, G., Imsland, F., Petersen, J.L., McCue, M.E., Mickelson, J.R., Cothran, G., Ahituv, N., Roepstorff, L., Mikko, S., Vallstedt, A., Lindgren, G., Andersson, L., and Kullander, K. 2012. Mutations in DMRT3 affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice. *Nature.* 488: 642–646
4. Hill, E.W., Gu, J., Eivers, S.S., Fonseca, R.G., McGivney, B.A., Govindarajan, P., Orr, N., Katz, L.M., and MacHugh, D.E. 2010. A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in thoroughbred horses. *PLoS ONE.* 5: e8645.
5. Hill, E.W., McGivney, B.A., Gu, J., Whiston, R., and Machugh, D.E. 2010. A genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g.66493737C>T) in the equine myostatin (MSTN) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for Thoroughbred racehorses. *BMC Genomics.* 11: 552
6. Hori, Y., Tozaki, T., Nambo, Y., Sato, F., Ishimaru, M., Inoue-Murayama, M., and Fujita, K. 2015. Evidence for the effect of serotonin receptor 1A gene (HTR1A) polymorphism on tractability in Thoroughbred horses. *Anim. Genet.* 47: 62–67.
7. Kobayashi, I., Akita, M., Takasu, M., Tozaki, T., Kakoi, H., Nakamura, K., Senju, N., Matsuyama, R., and Horii, Y. 2019. Genetic characteristics of feral Misaki horses based on

- polymorphisms of microsatellites and mitochondrial DNA. *J. Vet. Med. Sci.* 81: 707–711.
8. Kutara, K., Ono, T., Hisaeda, K., Inoue, Y., Henmi, C., Sho, K., Ohnishi, A., Ohzawa, E., Une, Y., Iwata, E., Shibano, K., Asanuma, T., and Kitagawa, H. 2022. An anatomical study of the skull, the dorsal and ventral nasal conchal bullae and paranasal sinuses in normal Noma horses: Computed tomographic anatomical and morphometric findings. *Anat. Histol. Embryol.* 51: 624–632.
 9. Makvandi-Nejad, S., Hoffman, G.E., Allen, J.J., Chu, E., Gu, E., and Chandler, A.M. 2012. Four loci explain 83% of size variation in the horse. *PLoS ONE.* 7(7):e39929.
 10. Metzger, J., Schrimpf, R., Philipp, U., and Distl, O. 2013. Expression levels of LCORL are associated with body size in horses. *PLoS ONE.* 8: e56497.
 11. Nishinakagawa, H., Honda, M., and Matsumoto, M. 1991. A study on the time and the route of the introduction of cattle and horses into Japan, as examined from skeletal remains of archaeological sites (Nishinakagawa, H. ed.), Kagoshima Univ. (In Japanese).
 12. Paul, C.R., Nguyen, B.T., Okuda, Y., Le, N.A.T., Tabuyaqona, J.M.D., Konishi, Y., Kawamoto, Y., Nozawa, K., and Kunieda, T. 2020. Distribution of the mutant allele of the DMRT3 gene associated with ambling gaits in Japanese native horse populations. *Anim. Sci. J.* 91: e13431
 13. Promerova, M., Andersson, L.S., Juras, R., Penedo, M.C.T., Reissmann, M., Tozaki, T., Bellone, R., Dunner, S., Horin, P., Imsland, F., Imsland, P., Mikko, S., Modry, D., Roed, K.H., Schwochow, D., VegaPla, J.L., Mehrabani-Yeganeh, H., Yousefi-Mashouf, N., Cothran, E.G., Lindgren, G., and Andersson, L. 2014. Worldwide frequency distribution of the ‘Gait keeper’ mutation in the DMRT3 gene. *Anim. Genet.* 45: 274–282.
 14. Senju, N., Tozaki, T., Kakoi, H., Almunia, J., Maeda, M., Matsuyama, R. and Takasu, M. (2017a) Genetic characterization of the Miyako horse based on polymorphisms of microsatellites and mitochondrial DNA. *J. Vet. Med. Sci.* 79: 218–23
 15. Senju, N., Tozaki, T., Kakoi, H., Shinjo, A., Matsuyama, R., Almunia, J., and Takasu, M. (2017b) Genetic diversity of the Yonaguni horse based on polymorphisms in microsatellites

- and mitochondrial DNA. *J. Vet. Med. Sci.* 79: 425–31.
16. Senokuchi, A., Ishikawa, S., Tozaki, T., Takasu, M., Kakoi, H., Misumi, K., and Hobo, S. (2018) Genetic analyses for conservation of the traditional Tokara horse using 31 microsatellite markers. *J. Equine Sci.* 29: 97–104.
 17. Shuqin, L., Shunyan, J., Xiang, G. D., Ran, C., Yao, L., and Chunjiang, Z. 2020. Novel variants in the HMGA2 gene are associated with withers height in Debao pony. *J. Equine Sci.* 88: 102948.
 18. Takasu, M., Hiramatsu, N., Tozaki, T., Kakoi, H., Nakagawa, T., Hasegawa, T., Huricha, Maeda, M., Murase, T., and Mukoyama, H. 2012. Genetic characterization of the endangered Kiso horse using 31 microsatellite DNAs. *J. Vet. Med. Sci.* 74: 161–166.
 19. Tozaki, T., Sato, F., Ishimaru, M., Kikuchi, M., Kakoi, H., Hirota K., and Nagata, S. 2016. Sequence variants of BIEC2-808543 near LCORL are associated with body composition in Thoroughbreds under training. *J. Equine Sci.* 27: 107–114
 20. Tozaki, T., Kikuchi, M., Kakoi, H., Hirota, K., and Nagata, S. 2017. A genome-wide association study for body weight in Japanese Thoroughbred racehorses clarifies candidate regions on chromosomes 3, 9, 15, and 18. *J. Equine Sci.* 28: 127–134.
 21. Tozaki, T., Takezaki, N., Hasegawa, T., Ishida, N., Kurosawa, M., Tomita, M., Saitou, N., and Mukoyama, H. 2003. Microsatellite variation in Japanese and Asian horses and their phylogenetic relationship using a European horse outgroup. *J. Hered.* 94: 374–380
 22. van den Hoven, R., Gür, E., Schlamanig, M., Hofer, M., Onmaz, A.C., and Steinborn, R. 2015. Putative regulation mechanism for the MSTN gene by a CpG island generated by the SINE marker Ins227bp. *BMC Vet. Res.* 11: 138
 23. Wade, C.M., Giulotto, E., Sigurdsson, S., Zoli, M., Gnerre, S., Imsland, F., Lear, T.L., Adelson, D.L., Bailey, E., Bellone, R.R., Blöcker, H., Distl, O., Edgar, R.C., Garber, M., Leeb, T., Mauceli, E., MacLeod, J.N., Penedo, M.C.T., Raison, J.M., Sharpe, T., Vogel, J., Andersson, L., Antczak, D.F., Biagi, T., Binns, M.M., Chowdhary, B.P., Coleman, S.J., Valle, D.G., Fryc, S., Guérin, G., Hasegawa, T., Hill, E.W., Jurka, J., Kiialainen, A., Lindgren, G.,

Liu, J., Magnani, E., Mickelson, J.R., Murray, J., Nergadze, S.G., Onofrio, R., Pedroni, S., Piras, M.F., Raudsepp, T., Rocchi, M., Røed, K.H., Ryder, O.A., Searle, S., Skow, L., Swinburne, J.E., Syvänen, A.C., Tozaki, T., Valberg, S.J., Vaudin, M., White, J.R., and Zody M.C. 2009. Genome sequence, comparative analysis and population genetics of the domestic horse (*Equus caballus*). *Science*. 326: 865–867.

第 4 章

1. 江口 正志, 馬伝染性子宮炎. 1986. 日本獣医師会雑誌. 39: 679–686
2. Anzai, T., Kamada, M., Niwa, H., Eguchi, M. and Nishi, H. 2012. Contagious Equine Metritis Eradicated from Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 74: 519–522
3. Wakeley, P.R., Errington, J., Hannon, S., Roest, H.I.J., Carson, T., Hunt, B., Sawyer, J. and Heath, P. 2006. Development of a real time PCR for the detection of *Taylorella equigenitalis* directly from genital swabs and discrimination from *Taylorella asinigenitalis*. *Vet. Microbiol.* 118: 247–254

謝辞

本稿を終えるにあたり、指導教員として多大なご指導を賜りました、岐阜大学高等研究院 高須正規准教授に深く感謝いたします。

本稿作成において、ご指導、ご助言をいただきました、岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科臨床繁殖学教室 村瀬哲磨教授、帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター 南保泰雄教授、岩手大学農学部共同獣医学科 高橋透教授、東京農工大学農学部共同獣医学科 田中知己教授に深く感謝申し上げます。

学位論文審査にあたりご指導いただきました、岐阜大学大学院連合獣医学研究科 浅井鉄夫教授に深く感謝申し上げます。

本研究遂行にあたり、ご指導、ご鞭撻いただきました競走馬理化学研究所 梶裕永博士、戸崎晃明博士、日本中央競馬会 大和田さつき先生に感謝いたします。