

氏名(本(国)籍)	中 村 琴 乃 (愛知県)			
主指導教員氏名	岐阜大学 准教授 高 須 正 規			
学位の種類	博士(獣医学)			
学位記番号	獣医博甲第609号			
学位授与年月日	令和5年9月15日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻			
研究指導を受けた大学	岐阜大学			
学位論文題目	木曾馬における保全生物学に関する研究			
審査委員	主査	岐阜大学	教授	村 瀬 哲 磨
	副査	帯広畜産大学	教授	南 保 泰 雄
	副査	岩手大学	教授	高 橋 透
	副査	東京農工大学	教授	田 中 知 己
	副査	岐阜大学	准教授	高 須 正 規

### 学位論文の内容の要旨

日本には、現在、8つの在来馬が現存している。木曾馬は長野県木曾地域から岐阜県東濃地域を至る地域で飼育されてきた日本在来馬の1つである。木曾馬は、長年、農耕馬としてこの地域の人々になくてはならない存在であった。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ったことから、木曾馬の数は急激に減少した。

昭和50年には、木曾馬の数が約30頭まで減少した。これを危惧した人々が木曾馬保存会を設立し、木曾馬の保存に尽力した。その結果、木曾馬は約150頭まで回復したものの、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は楽観視できない状況である。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、木曾馬の遺伝的多様性の推移が明らかにされた。1980年から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つに分け、それぞれの個体におけるマイクロサテライトの多型から各グループの遺伝的多様性を推測した。グループ1, 2, 3を解析した結果、平均アレル数は、それぞれ $6.2 \pm 1.2$ ,  $5.7 \pm 1.3$ ,  $5.1 \pm 1.5$ 、ヘテロ接合度の観測値は、それぞれ $0.692 \pm 0.158$ ,  $0.650 \pm 0.152$ ,  $0.644 \pm 0.141$ 、ヘテロ接合度の期待値は、 $0.668 \pm 0.142$ ,  $0.642 \pm 0.141$ ,  $0.606 \pm 0.171$ であり、すべて減少していた。マイクロサテライトの多型を調べることで、集団の遺伝的多様性をリアルタイムにモニタリングできることから、今後も新たに生まれる木曾馬の遺伝子型を確定し、適切な交配計画を策定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頭の木曾馬における木曾馬の毛色を制御する遺伝子の多型を決定し、毛色の固定化がどこまで進んでいるかを明らかにした。ここで、馬の毛色をコントロールする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)のSingle Nucleotide Polymorphismの有無を調べたところ、対立遺伝子E、e、A、a、C、Crの頻度はそれぞれ0.80、0.26、0.86、0.16、0.98、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、木曾馬の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示唆された。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、遺伝的多様性と市場価値とのバランスに配慮しながら、毛色を選別していくことが重要であると考えられた。

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における多型の有無に加えて、ミオスタチン(MSTN)遺伝子Indel変異(MSTN\_Del/In)を調べた。MSTNのT/C変異におけるC頻度は木曾馬で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は木曾のみが変異(Del: 0.69, In: 0.31)を有していた。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)扱いやすい性格といえる傾向がみとめられた。

第4章では、木曾馬集団における防疫体制の構築を考える例として、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曾馬の牡馬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DNAを抽出し、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ことから、木曾馬の繁殖集団においてTEは存在しないと結論付けられた。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。このため、CEMのような種の保存において重大な疾病に関しては定期的なスクリーニング検査が必要であると考えられた。

本研究から、木曾馬の保全に向けた集団の遺伝的多様性に関する知見、繁殖管理および防疫体制の構築に関する知見を獲得できた。ここで得られた科学的な知見を活用し、保存計画を立案するとともに、木曾馬の新たな活用といった社会的な側面も勘案しつつ、統合的にその保存対策を進めていく必要があると考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、地域の遺伝子資源としてだけでなく、文化的な資源としても重要な木曾馬を保存していくために必要な科学的な知見の獲得を目的として実施された。木曾馬は長野県木曾地域で飼育されてきた日本在来馬の1つであり、この地域の人々の生活に深く関わっ

てきた。しかし、戦後、木曾馬は農耕馬として利用されなくなり、急激にその頭数を減らした。現在、その数は約 150 まで回復したが、この頭数は依然として少なく、危機的な状況にある。

絶滅の危機にある生物において、遺伝的多様性を保持することは重要である。そこで、第 1 章では、減少した木曾馬の遺伝的多様性がどのように推移してきたかを明らかにするため、1980 から 2017 年に産まれた木曾馬 163 頭を産まれた年ごとにグループ 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 つに分け、各個体における 31 個のマイクロサテライトの多型解析から各グループにおける遺伝的多様性を評価した。グループ 1, 2, 3 を解析した結果、平均アレル数は、それぞれ  $6.2 \pm 1.2$ ,  $5.7 \pm 1.3$ ,  $5.1 \pm 1.5$ , ヘテロ接合度の観測値は、それぞれ  $0.692 \pm 0.158$ ,  $0.650 \pm 0.152$ ,  $0.644 \pm 0.141$ , ヘテロ接合度の期待値 ( $H_e$ ) は、それぞれ  $0.668 \pm 0.142$ ,  $0.642 \pm 0.141$ ,  $0.606 \pm 0.171$  と、減少していた。これらの結果から、ひきつづき集団の遺伝的多様性をモニタリングしていくことが重要であると結論付けられた。

現在、木曾馬における毛色のバリエーションは鹿毛、栗毛、河原毛の 3 色のみで、しかも 90 %以上が鹿毛であることから、毛色の固定化が示唆されている。そこで第 2 章では、149 頭の木曾馬において、毛色をコントロールする *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*) における Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 解析を実施し、固定化の度合いを明らかにした。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 であり、木曾馬の *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 *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。これらの結果から、遺伝的多様性と市場価値とのバランスに配慮しながら、毛色を選別する必要があると結論付けられた。

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。これを遺伝子レベルで明らかにするために、第 3 章では木曾馬 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* の多型の有無に加えて、ミオスタチン (*MSTN*) 遺伝子 Indel 変異 (*MSTN*\_Del/In) を解析した。*MSTN* の T/C 変異において、木曾馬における C 頻度は 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 は木曾のみが変異 (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, 必ずしも日本在来馬の性格や体格を反映していない可能性もあるため, 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であると結論付けられた。

第 4 章では、個体数の減少した木曾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

る木曾馬の牡馬 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 DNA を抽出し、TE 特異的プライマーを用いた 2 ステップ PCR で CEM 罹患の有無を確認した。調査対象個体に臨床症状を示すものはなく、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。本章では、CEM を例に、重大な疾病における定期的なスクリーニング検査を行い、感染状況をモニタリングするプログラムの重要性が言及された。

最後に、まとめとして、在来家畜は地域の遺伝子資源としてだけでなく、文化的な資源でもあることから、木曾馬をはじめとした在来馬の保存においては科学的な知見に基づいた保存計画を立てることと同時に、馬の新たな活用方法を模索し、飼養者の輪を広げることといった社会的な要因の重要性が述べられた。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Variation in the *MC1R*, *ASIP*, and *MATP* genes responsible for coat color in Kiso horse as determined by SNaPshot™ genotyping  
著 者 名 : Nakamura, K., Tozaki, T., Kakoi, H., Owada, S. and Takasu, M.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 81 (1) : 100-102, 2019

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Response to estrus induction with abortion treatment in microminipigs on different days after insemination  
著 者 名 : Takasu, M., Maeda, M., Almunia, J., Nakamura, K., Nishii, N. and Takashima, S.  
学術雑誌名 : The Journal of Reproduction and Development  
巻・号・頁・発行年 : 64 (4) : 361-364, 2018
- 2) 題 目 : Genetic relationship between Miyako and Yonaguni horses native to Okinawa based on polymorphisms of microsatellites  
著 者 名 : Senju, N., Tozaki, T., Kakoi, T., Matsuyama, R., Nakamura, K. and Takasu, M.  
学術雑誌名 : Journal of Equine Science  
巻・号・頁・発行年 : 29 (4) : 87-97, 2018
- 3) 題 目 : X monosomy in the endangered Kiso horse breed detected by a parentage test using sex chromosome linked genes and microsatellites  
著 者 名 : Gamo, S., Tozaki, T., Kakoi, H., Hirota, K. I., Nakamura, K., Nishii, N., Almunia, J. and Takasu, M.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 81 (1) : 91-94, 2019

- 4) 題 目 : Sexual precocity in male microminipigs evaluated immunohistologically using spermatogonial stem cell markers  
著 者 名 : Almunia, J., Nakamura, K., Murakami, M., Takashima, S., Mori, T. and Takasu, M.  
学術雑誌名 : Theriogenology  
卷・号・頁・発行年 : 130 : 120-124, 2019
- 5) 題 目 : Genetic characteristics of feral Misaki horses based on polymorphisms of microsatellites and mitochondrial DNA  
著 者 名 : Kobayashi, I., Akita, M., Takasu, M., Tozaki, T., Kakoi, H., Nakamura, K., Senju, N., Matsuyama, R. and Horii, Y.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
卷・号・頁・発行年 : 81 (5) : 707-711, 2019
- 6) 題 目 : Decreased genetic diversity in Kiso horses revealed through annual microsatellite genotyping  
著 者 名 : Nakamura, M., Tozaki, T., Kakoi, H., Nakamura, K., Rajabi-Toustani, R., Ohba, Y., Matsubara, T. and Takasu, M.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
卷・号・頁・発行年 : 82 (4) : 503-505, 2020
- 7) 題 目 : Detection of non-targeted transgenes by whole-genome resequencing for gene-doping control  
著 者 名 : Tozaki, T., Ohnuma, A., Takasu, M., Nakamura, K., Kikuchi, M., Ishige, T., Kakoi, H., Hirota, K. I., Tamura, N., Kusano, K. and Nagata, S. I.  
学術雑誌名 : Gene Therapy  
卷・号・頁・発行年 : 28 (3-4) : 199-205, 2021
- 8) 題 目 : Physiological variation in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) housed in different outdoor cages evaluated using the metabolic profile test  
著 者 名 : Kaneko, A., Takasu, M., Miyabe-Nishiwaki, T., Nakamura, K. and Okamoto, M.  
学術雑誌名 : Primates  
卷・号・頁・発行年 : 62 (4) : 609-615, 2021
- 9) 題 目 : Sequence determination of phosphorothioated oligonucleotides using MALDI-TOF mass spectrometry for controlling gene doping in equestrian sports  
著 者 名 : Tozaki, T., Kwak, H. G., Nakamura, K., Takasu, M., Ishii, H., Ohnuma, A., Kikuchi, M., Ishige, T., Kakoi, H., Hirota, K. I., Kusano, K.,

Hirata, M., Nirasawa, T. and Nagata, S. I.

学術雑誌名 : Drug Testing and Analysis

巻・号・頁・発行年 : 14 (1) : 175-180, 2022

10) 題 目 : Detection of indiscriminate genetic manipulation in thoroughbred racehorses by targeted resequencing for gene - doping control

著 者 名 : Tozaki, T., Ohnuma, A., Nakamura, K., Hano, K., Takasu, M., Takahashi, Y., Tamura, N., Sato, F., Shimizu, K., Kikuchi, M., Ishige, T., Kakoi, H., Hirota, K. I., Hamilton, N. A. and Nagata, S. I.

学術雑誌名 : Genes

巻・号・頁・発行年 : 13 (9) : 1589, 2022