

短報
Note

日本在来馬のミトコンドリア DNA 多型

川嶋 舟*・颯田葉子**

(平成 21 年 5 月 20 日受付/平成 21 年 9 月 15 日受理)

要約：日本在来馬 8 馬種（北海道和種馬，木曾馬，野間馬，対州馬，御崎馬，トカラ馬，宮古馬，与那国馬）のミトコンドリア DNA コントロール領域の多型解析を行なった。その結果，8 馬種で 14 ハプロタイプが認められた。系統樹解析の結果，14 ハプロタイプ間に明確な遺伝的差異は認められず，日本在来馬の単一起源説を支持するものであった。各馬種のハプロタイプ構成を比較した結果，遺伝的多様性が維持されている馬種や失いつつある馬種の存在が明らかとなった。また，8 馬種は互いに明確に異なるハプロタイプ構成を保有することが明らかとなった。これは，各飼養地域内で長期間維持されてきたため，各馬種で固有のハプロタイプ構成を持つに至ったと考えられた。

キーワード：日本在来馬，ミトコンドリア DNA，遺伝的多様性，遺伝資源，DNA 多型

1. はじめに

日本には在来馬として北海道和種馬（北海道），木曾馬（長野県），野間馬（愛媛県），対州馬（長崎県），御崎馬（宮崎県），トカラ馬（鹿児島県），宮古馬（沖縄県），与那国馬（沖縄県）の 8 馬種が存在する。これらの遺伝的類縁関係について形態学的研究（林田 1968）や血液タンパク型の研究（Nozawa *et al.* 1998）が行なわれてきた。しかしウマの DNA 多型については，ミトコンドリア DNA コントロール領域の多型などを用いた VILA *et al.* (2001) や KAVAR T. *et al.* (2002) および ISHIDA *et al.* (1994) の報告があるものの，報告例は少ない。そこで本研究では日本在来馬 8 馬種のミトコンドリア (mt) DNA コントロール領域の多型解析を行なった。

2. 材料および方法

8 馬種 345 個体（北海道和種馬 45，木曾馬 40，野間馬 72，対州馬 14，御崎馬 89，トカラ馬 21，宮古馬 13，与那国馬 51）を用いた。各在来馬の飼養現場で採血を行ない，Gen とるくん (TaKaRa) を用いて DNA を抽出した。コントロール領域の増幅はフォワード 5'-CCAAGGACTATCAA-GGAA GAAGCTCT-3' およびリバース 5'-TTTAAGGGG-AAAGAA TGGGCGAGGTT-3' プライマーを用い，94°C 5 分に続き，94°C 30 秒，55°C 30 秒，68°C 1 分を 25 サイクルの後，68°C 7 分の反応を行なった。塩基配列の決定には BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1 および ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた。得られた配列を元にロパの公表配列をアウトグループとして MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007) にて分子系統樹 (NJ 系統樹) を作成し，DnaSP 4.5 (Rozas & Rozas 1999) にてハプロタイプ多様度 (H) および塩基多様度 (π)

を算出した。

3. 結果および考察

8 馬種 345 個体の mtDNA コントロール領域前半 412bp の塩基配列を決定した。34 箇所の塩基置換により，14 ハプロタイプ (JN1~JN14) が認められた。また，認められた塩基置換はいずれもトランスポジション型置換であった。各ハプロタイプ間の遺伝的類縁関係を示す分子系統樹を図 1 に，各馬種のハプロタイプ構成および遺伝的多様性を示す H と π の値を表 1 に示した。

系統樹 (図 1) より，日本在来馬に認められた 14 ハプロタイプはアウトグループのロパとは高いブートストラップ確率 (100%) で明確に分かれた。しかしながら，14 ハプロタイプ間に明確な分岐は認められなかった (ブートストラップ値 < 63%)。日本在来馬の起源について，林田 (1968) は形態学的観点から小型馬と中型馬の 2 タイプが南方経由と北方経由の 2 経路で導入された複数起源としているのに対し，Nozawa *et al.* (1998) は血液タンパク型の分析から朝鮮半島経由の単一起源としている。本研究結果は日本在来馬に認められたハプロタイプが明確に分岐しない一群を形成したことから，Nozawa *et al.* (1998) の説を支持するものと考えられた。

表 1 より日本在来馬に認められた 14 のハプロタイプのうち JN1, JN2, JN8 は複数の馬種で共有されていた。地理的に離れた地域で飼養されている在来馬に共通のハプロタイプが存在することは，人為的要因による地域間の移出入があったことを示唆するものと考えられた。北海道和種馬と木曾馬は最大のハプロタイプ数 (5) を示したが，前者は 1 つのハプロタイプ (JN1) に偏り (83.0%) 遺伝的多様性は低い値を示し，後者は全てのハプロタイプの頻度に偏りが少なく遺伝的多様性は高い結果となった。北海道和種

* 東京農業大学農学部バイオセラピー学科

** 総合研究大学院大学先端科学研究科

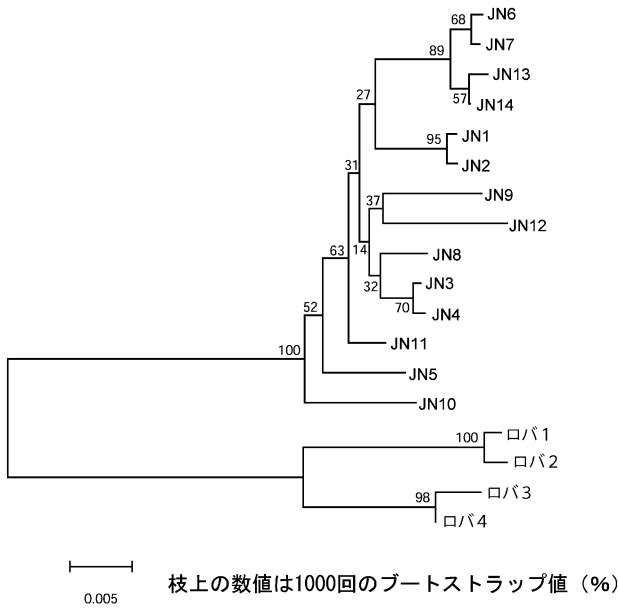


図 1 日本在来馬で認められた各ハプロタイプの遺伝的類縁関係を示す分子系統樹 (JN はハプロタイプ番号)

馬については、本州から持ち込まれた複数の馬種から成立したとする報告(近藤 1998)があるが、本研究結果からは、多様な起源を持ちながらも単一のハプロタイプに固定されつつある集団であることが示された。木曾馬についてはハプロタイプの頻度に偏りが少ないことから人為的な選択の下に交配が行われた可能性も考えられる。一方、野間馬とトカラ馬では 1 つのハプロタイプしか認められず、遺伝的多様性が低いことが判明した。特に野間馬は固有のハプロタイプ JN11 に固定されており、遺伝的特異性の高い馬種と考えられた。対州馬、宮古馬、与那国馬はいずれもハプロタイプ数が 2 であったが、対州馬と沖縄の 2 馬種間でハプロタイプ構成に差が認められた。また、沖縄の 2 馬種は共通のハプロタイプ JN1 と JN2 を保有していたが、その頻度に差異が認められた。

本研究結果より、日本在来馬 8 馬種は互いに明確に異なるハプロタイプ構成を示すことが明らかとなった。これは、もとは大陸から導入された一群に由来するものの、各飼養地域にとって重要な家畜で、各地域で独自に改良が行なわれ長期間にわたり維持されてきたため(川嶋 2009)、各馬種で固有のハプロタイプ構成を持つに至ったと考えられた。

謝辞：本論文の作成にあたり、御指導を賜りました東京農業大学客員教授 秋篠宮文仁親王殿下、東京大学大学院 林良博先生に御礼申し上げます。また、在来馬のサンプリングに御協力を賜りました各在来馬の保存会、振興会の関係者の皆様、馬事文化財団 馬の博物館、芝山カンントリーファーム、野間馬ハイランド、宮崎大学獣医内科学教室、

表 1 日本在来馬 8 馬種の遺伝的多様性

馬種	ハプロタイプ構成(%)	H	π (%)
北海道和種馬 (n = 45)	JN1 (83.0), JN2 (2.1), JN3 (4.3), JN4 (2.1), JN5 (8.5)	0.31	0.60
木曾馬 (n = 40)	JN6 (25.0), JN7 (10.0), JN8 (15.0), JN9 (10.0), JN10 (40.0)	0.75	2.02
野間馬 (n = 72)	JN11 (100.0)	0.00	0.00
対州馬 (n = 14)	JN8 (71.4), JN12 (28.6)	0.44	1.07
御崎馬 (n = 89)	JN1 (23.6), JN8 (10.1), JN13 (65.2), JN14 (1.1)	0.52	1.08
トカラ馬 (n = 21)	JN2 (100.0)	0.00	0.00
宮古馬 (n = 13)	JN1 (84.6), JN2 (15.4)	0.28	0.07
与那国馬 (n = 51)	JN1 (47.1), JN2 (52.9)	0.51	0.12
8馬種平均		0.35	0.62

H : ハプロタイプ多様度 π : 塩基多様度

開聞山麓自然公園、各関係者の皆様、サンプルの分析に御協力を賜りました日本中央競馬会競走馬総合研究所 沖博憲先生、石田信繁先生、総合研究大学院大学 高畑尚之先生、国立遺伝学研究所 五條堀孝先生、統計数理研究所 長谷川政美先生に御礼申し上げます。

引用文献

- 1) NOZAWA, K., SHOTAKE, T., ITO, S., KAWAMOTO, Y. (1998) Phylogenetic Relationships among Japanese Native and Alien Horses Estimated by Protein Polymorphisms. *Journal of Equine Science* 9 : 53-69.
- 2) VILA, C., LEONARD, J.A., GOTHERSTROM, A., MARKLUND, S., SANDBERG, K., LIDEN, K., WAYNE, R.K. and ELLEGREN (2001) H. Widespread origins of domestic horse lineages. *Science* 291 : 474-477.
- 3) KAVAR, T., BREM, G., HABE, F., SÖLKNER, J. and DOVC, P. (2002) History of Lipizzan horse maternal lines as revealed by mtDNA analysis. *Genet Sel Evol* 34 : 635-648.
- 4) ISHIDA, N., HASEGAWA, T., TAKEDA, K., SAKAGAMI, M., ONISHI, A., INUMARU, S., KOMATSU, M. and MUKOYAMA, H. (1994) Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA. *Animal Genetics* 25 : 215-221.
- 5) TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. and KUMAR, S. (2007) MEAG4 : molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software. Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24 : 1596-1599.
- 6) ROZAS, J. and ROZAS, R. (1999) DnaSP version 3 : an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15 : 174-175.
- 7) 林田重幸 (1968) 本邦家畜の起源と系統, 日本民族と南方文化. 平凡社, 東京.
- 8) 近藤誠司 (1998) 最近の馬生産に関する話題. 北海道畜産学会報 40 : 9-15.
- 9) 川嶋 舟 (2009) 日本在来馬の歴史と現状. *ピオストーリー* 11 : 92-105.

mtDNA Polymorphisms of Japanese Native Horse

By

Schu KAWASHIMA* and Yoko SATTA**

(Received May 20, 2009/Accepted September 15, 2009)

Summary : Control region of mtDNA polymorphisms of 345 animals in 8 Japanese native horse breeds, that is Hokkaido, Kiso, Noma, Taishu, Misaki, Tokara, Miyako and Yonaguni, were analyzed. Fourteen haplotypes were recognized. From the analyses of dendrogram (Fig. 1), the topology showed one cluster including 14 haplotypes, namely no clear genetic differences were found among these haplotypes. The results were considered to maintain that Japanese native horses have been originated from Korean peninsular rout reported by NOZAWA *et al*, not from 2 types and 2 routs reported by HAYASHIDA. From the constitution of haplotype analyses (Table 1), It was revealed that Kiso, Misaki and Taishu breeds are maintaining a high level of genetic diversity, on the other hand, Noma and Tokara breeds are losing diversity, and 8 breeds have clearly different haplotypes, respectively. For this reason, it can be estimated that each native breed has been kept within each feeding place for a long time.

Key words : Japanese native horse, Mitochondrial DNA, Genetic diversity, Genetic resource, DNA polymorphisms

* Department of Human and Animal-Plant Relationship, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture,

** School of Advanced Sciences, The Graduate University for Advanced Studies