

食と農の総合研究所研究プロジェクト 研究成果報告書

研究課題	RAD-seq を用いた、遺伝的浸透のある種の持続可能な遺伝的復帰方法の確立		
研究種別	<input checked="" type="checkbox"/> 共同 <input type="checkbox"/> 個人		
研究組織	永野 惇（農学部・講師）研究代表者 手塚 あゆみ（食と農の総合研究所・博士研究員）		
研究期間	<input type="checkbox"/> 1 年研究 <input checked="" type="checkbox"/> 2 年研究		
キーワード	(1) 遺伝子浸透 (4)	(2) RAD-seq (5)	(3) 遺伝的多様性 (6)

1. 研究計画(簡潔にまとめて記入してください。)

① 対州馬,日本在来馬,アングロアラブ種のサンプル採集

対州馬は長崎県対馬市の日本在来馬で、アングロアラブ種との交配（交雑）記録がある、遺伝子浸透した品種である。現在日本在来馬の中で最も個体数が少なく、遺伝子浸透の評価と復帰計画の実行が急務である。本研究では、対州馬保全会が維持している全 38 個体とアングロアラブ種 5 個体、他の日本在来馬の血液から DNA を抽出する。

② RAD-seq による遺伝的多型の検出

対州馬と他の日本在来馬、アングロアラブの RAD-seq 解析を行い、多型検出を行う。

③ 遺伝子浸透座位の特定と対州馬全個体の遺伝子浸透の評価

得られた対州馬の多型を 3 つに分類し、対州馬全個体の遺伝浸透の程度を評価する。
 固有変異：対州馬のみが多型を持つ座位。対州馬において優先的に保存する。浸透変異：対州馬とアングロアラブ種が共通の変異を持つが、日本在来馬は持たない変異がある座位。アングロアラブから対州馬に浸透が起きた領域にあるとみなし、減少を目指す。中立変異：対州馬、他の在来馬、アングロアラブの全てが持つ多型座位。日本在来馬とアングロアラブ種の祖先においてすでに存在していた多型とみなし、できるだけ多型を保持する。

④ 効率的な復帰交配計画の推定と評価

全個体のアレル情報を元に、交配計画をシミュレーションし、数十世代までの間に、どのような交配計画が浸透アレルを減少させ、遺伝的多様性を維持できるのかを推定する。また、既知の家系図情報をもとに RAD-seq による遺伝子多型検出の正確さ、シナリオ推定の正しさを評価する。以上の結果から、対州馬の持続可能な遺伝的復帰計画を提案する。

2. 研究成果の概要(4 ページ程度)

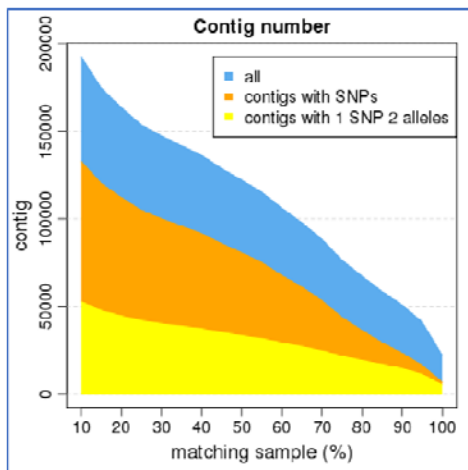
① 対州馬,日本在来馬,アングロアラブ種のサンプル採集

対州馬は長崎県対馬市の日本在来馬で、戦時下に外来のアングロアラブ種との交配(交雑)記録がある、遺伝子浸透した品種である。本研究では、対州馬保全会が維持している全38個体に加え、浸透したとされる外来品種アングロアラブ種5個体、日本在来馬の宮古馬5個体、木曾馬5個体、与那国馬5個体、北海道和種5個体の血液の入手に成功し、全個体のDNA抽出を行った。



② RAD-seq 法による多型座位検出の結果

それらのDNAを用いてRAD-seqを行った結果、136万の遺伝子座、30万をこえる多型座位を検出することに成功した。そのうち、75%以上の個体で共有し、かつ各座位につき1変異のみ、染色体上にマッピングされた9609座を用いて解析を進めた。

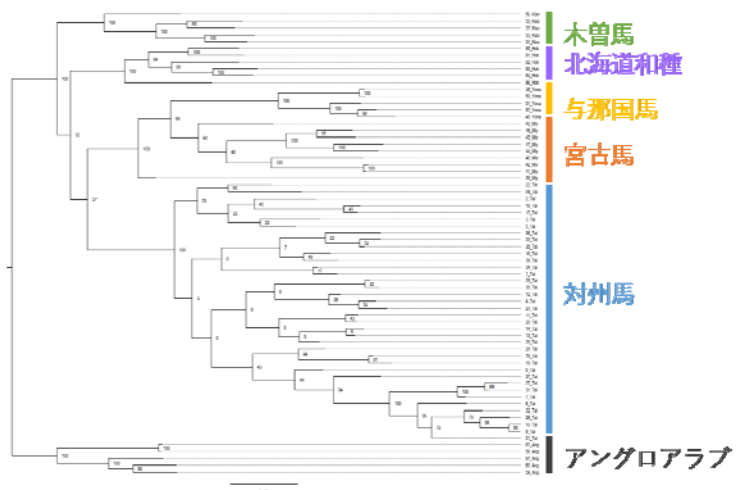


Contigs	all	1 SNP 2 alleles	with SNPs
All	1363411	159165	308712
Matching sample > 50 %	120509	33105	79342
Matching sample > 70 %	86029	24226	51499
Matching sample > 90 %	49273	14216	22166
Matching sample = 100 %	22205	5283	6921

③ 遺伝子浸透座位の特定と対州馬全個体の遺伝子浸透の評価 ゲノム全体に対する遺伝子浸透の検出

対州馬とアングロアラブとの交雑により、対州馬に遺伝子浸透が起きている場合、系統関係が品種によって分らないことが予測される。そのため、上記の多型情報をもとに最尤系統樹を作製した。

その結果、対州馬を含め、すべての品種が品種ごとにクラスターを形成した。対州馬は全個体がアングロアラブとは異なるクラスターに分けられていた。つまり、ゲノム全体にわたる遺伝子浸透の影響は、現存する対州馬には見られないことが分かった。



部分的な遺伝子浸透の検出

ゲノム全体にわたる遺伝子浸透ではなく、部分的な遺伝子浸透が起きている場合、ゲノムワイドな多型データを用いた系統樹では検出できなかった可能性があるため、部分的な遺伝子浸透の検出を試みた。

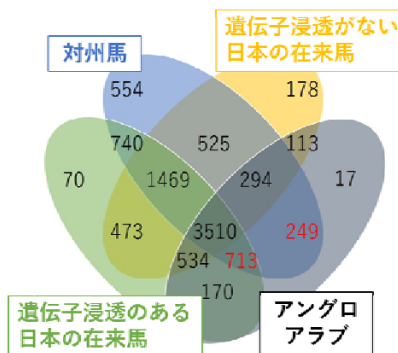


与那国馬 宮古馬 木曾馬 北海道和種 対州馬 アングロアラブ
 遺伝子浸透なし 遺伝子浸透あり 浸透種

浸透のある品種と外来馬で共有する『浸透変異』 → 除く

対州馬だけが持つ『固有変異』 → 残す

全品種の共通祖先に由来する『中立変異』 → 残す



対州馬の遺伝的変異は全部で
8504 SNPs

『固有変異』の定義に当てはまる
554 SNPs

『中立変異』の定義に当てはまる
6988 SNPs

『浸透変異』の定義に当てはまる
961 SNPs

↓ 高い連鎖不平衡を伴うか
などのフィルタリング

『浸透変異』の可能性が高い
38 SNPs

対州馬において、遺伝子浸透している個体、していない個体が不明のため、どの変異が対州馬本来の変異か判定ができない。そのため、他の日本在来馬の多型と照らし合わせ、品種間でどのように共有しているか、得られた対州馬の変異を3つに分類した。

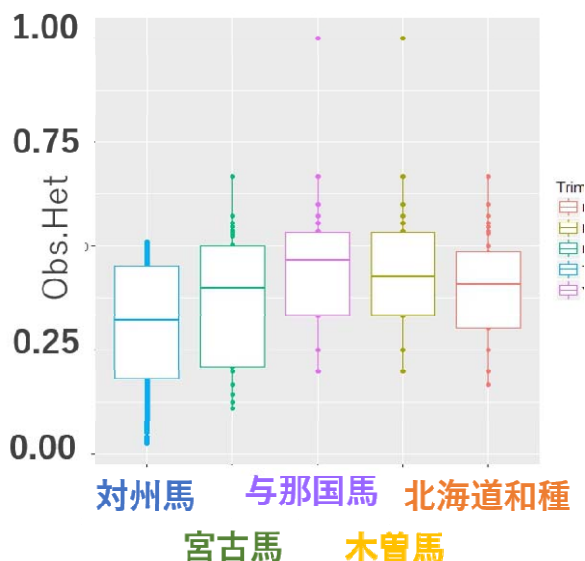
対州馬だけの『固有変異』を持つ座位が554座位、全品種の祖先に由来すると考えられる品種間共有の（遺伝子浸透とは関係のない）中立変異をもつ座位が6988座位、遺伝子浸透が起きた日本在来馬品種とアングロアラブの間でのみ共通している『浸透変異』を持つ座位が961座位存在していることがわかった。

単純な多型共有の組み合わせからでは、調べた個体の数が足りていない場合、擬陽性が多く含まれると考えられるため、遺伝子浸透に伴う他の基準でフィルタリングを行った。対州馬とアングロアラブの遺伝子浸透は進化的なスケールでは極めて近年のイベントであるため、浸透した染色体領域の組み換えが進んでいないことが予想され、浸透座位は広い領域にわたる高い連鎖不平衡を伴うと考えられる。そこで、高い連鎖不平衡を示す領域上にある浸透座位を調べたところ、38座位（0.4%）のみであった。

このことから、現在の対州馬個体には、アングロアラブとの交雑による遺伝子浸透はほとんど残っていないと考えられる。この割合は、アングロアラブとの交配以後、対州馬との戻し交配が繰り返されていたとしても、4-6世代程度の戻し交配から推測される値（12.5%-3%）よりも少ない。当時の文献記録には、交雑により大きくなった個体が好まれず排除され、より小さい個体を残したこと、個体数が維持できず残す形態的な特徴から残す個体を選抜したことが記載されており、アングロアラブとの交雑個体が積極的に排除されていたことなどが影響しているのかもしれない。

遺伝的多様性の状態に関して

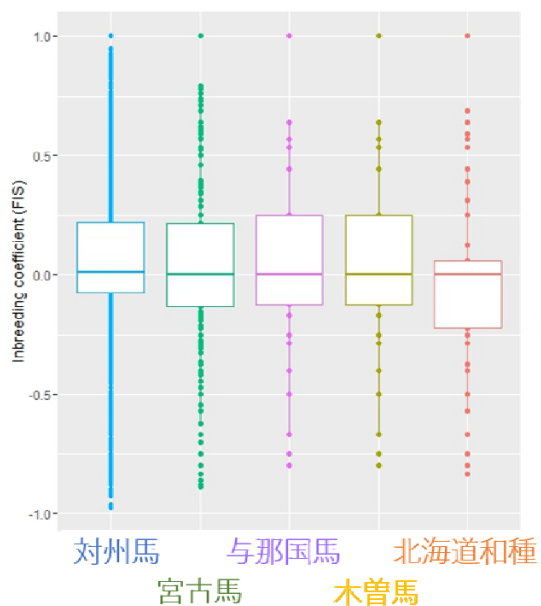
ヘテロ接合度の観測値 (Observed Heterozygosity) の比較



対州馬は急激に個体数が減少しているため、遺伝的な多様性が低くなっている恐れがあった。遺伝的多様性の指標として一般的である、ヘテロ接合度を計算し、他の日本在来馬品種と比較した。遺伝子浸透記録の有無にかかわらず、対州馬は他のすべての日本在来馬品種と比べ、平均ヘテロ接合度が最も低いことが明らかになった。

交雑が起こった場合、ヘテロ接合度は高くなるはずだが、対州馬では極めて低くなっており、遺伝子浸透が進んでいないとする先述の結果とも一致している。

近交係数 (F_{IS} : inbreed coefficient) の比較



ヘテロ接合度が低くなる可能性として、単純な遺伝的多様性の減少によるものではなく、交配組み合わせが近親交配を引き起こしている可能性も考えられる。そのため、近交係数 (F_{IS}) についても調べたが、対州馬で特に高くなることは見受けられなかった。つまり、ヘテロ接合度の低さは、交配の偏りの結果ではなく、近年の個体数減少による遺伝的多様性の減少によるものと考えられる。

これまで、対州馬は遺伝子浸透が起きていることが問題視されていたが、本研究の結果により、遺伝子浸透の影響はほとんどなく、むしろ、個体数減少による遺伝的多様性の減少が深刻であることが本研究の結果明らかになった。

④ 効率的な復帰交配計画の推定と評価

本研究の結果により、当初の推測と異なり、遺伝子浸透はほとんど起こっておらず、遺伝的多様性の減少が大きな問題であることがわかった。遺伝的多様性の維持のために、各繁殖牝馬に対する種牡馬の遺伝的距離を保存委員会に報告し、2017年の交配相手の選択の資料を提供した。

また、遺伝的多様性の減少が問題であることを対馬市と対州馬保存会に報告し「対州馬の天然記念物指定に向けた専門部会」が設立され、手塚がメンバーとなった。

3. 収支報告

(非公開)

4. 研究発表等(研究代表者及び研究分担者)

学会発表・発表論文・著書・学外資金獲得状況 等

○記載項目例

発表論文：著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）

学外資金獲得状況：獲得年、研究費名、代表 or 分担、研究課題名、獲得金額

<学会発表>

手塚あゆみ、高須正規、戸崎晃明、永野惇「RAD-seq 法による対州馬の遺伝的状态の検証」
第 65 回日本生態学会全国大会 2018.3.14-3.18

手塚あゆみ、高須正規、戸崎晃明、永野惇 「RAD-seq によるゲノムワイド SNP を利用した対州馬の遺伝的多様性と遺伝浸透状態の評価」日本ウマ科学会第 30 回学術集会、東京、
2017.11.27-11.28 **最優秀発表賞**

手塚あゆみ、高須正規、戸崎晃明、永野惇「RAD-seq を用いた対州馬の遺伝的多様性と遺伝浸透の検証 -在来家畜保全における RAD-seq の有用性-」日本動物遺伝育種学会第 18 回大会 2017.11.11-12

手塚あゆみ、高須正規、戸崎晃明、永野惇「RAD-seq を用いた遺伝的多様性の検証と遺伝子浸透の検出」 NGS 現場の会 第 5 回研究会 2017.5.22-5.24

ワークショップ「NGS データの多彩な活用」主催 龍谷大学瀬田キャンパス 1 号館 107 講義室 2018.11.17

招待講演 手塚あゆみ 「在来家畜保全を目的としたゲノムワイドな DNA 解析」 公益財団法人東京動物園協会 保全セミナー「DNA 解析を知ろう、活かそう」2018.2.9