

食と農の総合研究所研究プロジェクト 研究経過報告書

研究課題	次世代シーケンサーを用いた在来家畜（日本在来馬）の遺伝資源の探索
研究種別	<input checked="" type="checkbox"/> 共同 <input type="checkbox"/> 個人
研究組織	龍谷大学 農学部 准教授 永野惇 龍谷大学 食と農の総合研究所 客員研究員（アニコム先進医療研究所研究員）手塚あゆみ
キーワード	(1) 在来家畜 (2) 遺伝資源 (3) 人為選択 (4) 次世代シーケンサー (5) 在来馬 (6)

1. 2018 年度の研究計画（簡潔にまとめて記入してください。）

2018 年は対州馬の特徴を説明する遺伝的要因を探索するために、対馬市内で飼育されている対州馬のゲノムリシーケン及び集団遺伝学的解析を行った。

① シーケンスする対象について

本計画では、2016 年度 食と農の総合研究所 研究プロジェクト「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」の際に血液を採集・DNA 抽出済みである対州馬を用いた。

② NGS ライブラリ作製とシーケンス

まず、対州馬計 4 個体のリシーケンスを行い、原因遺伝子の探索を行った。その後、後述の解析結果でさらに個体数が必要であることが分かり、計 12 個体のリシーケンスを行った。

③ 原因遺伝要因（原因突然変異、コピー数変異）の探索

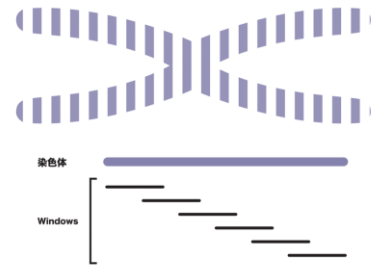
得られたシーケンスを公開されているサラブレッドゲノムにマッピングし、遺伝子多型（SNP）検出を行った。その後、対州馬全個体のアレル頻度を用いて、多型出現頻度の領域間の比較などから、対州馬特有の家畜化に伴う「近年」の選択の検出を試みた。

2. 研究成果の概要(1 ページ程度)

① 対州馬ゲノムリシーケンスによる選択の検出

得られた対州馬 4 個体のゲノムリシーケンス結果をもちいて、ゲノムを一定の領域ごとに分割し、集団遺伝学的統計量を計算する sliding window 解析を行った (図 1)。

本計画では、選択の指標となる Tajima's D を調べた。Tajima's D の値が他の領域よりも低くなる (多様性が低い) 領域は選択を受けていることが示唆される。全体の下位 5% 以下の Tajima's D を持つ領域 (図 2 赤点線) の遺伝子機能を Gene Ontology (GO) 解析したところ、嗅覚関連遺伝子、免疫関連遺伝子が頻出した (表 1)。



各Window事に計算を行い、局所的な選択を検出する

図 1 Sliding Window analysis

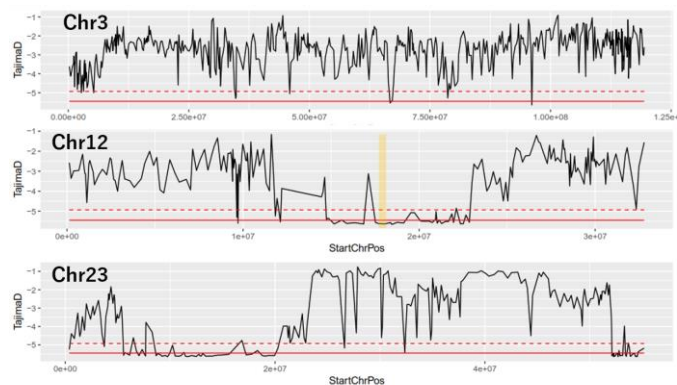


図 2 Tajima's D Sliding window analysis

表 1

GO-Slim Biological Process	REF	negative Tajima'sD(5%)	expected	Fold Enrichment	+/-	raw P value	FDR
sensory perception of smell	574	79	30.27	2.61+	3.69E-13	4.50E-11	
sensory perception of chemical stimulus	605	80	31.91	2.51+	1.62E-12	1.31E-10	
sensory perception	746	84	39.35	2.13+	9.54E-10	5.82E-08	
neurological system process	1224	96	64.56	1.49+	2.49E-04	8.67E-03	
system process	1318	101	69.52	1.45+	3.19E-04	9.73E-03	
G-protein coupled receptor signaling pathway	696	93	36.71	2.53+	1.19E-14	2.90E-12	
cell surface receptor signaling pathway	1330	114	70.15	1.63+	1.29E-06	6.27E-05	
developmental process	1391	38	73.37	0.52-	7.41E-06	3.01E-04	
immune response	289	4	15.24	0.26-	1.68E-03	4.55E-02	

他の日本在来馬との遺伝的分化の程度の比較

Tajima's D の結果から、嗅覚・免疫遺伝子に選択が働いている可能性が示された。しかし、どのタイミング(馬の家畜前、家畜化時、日本伝来時、対州馬確立時など)で起きたことなのかは不明である。そこで、選択を受けた時期を明らかにするため、前プロジェクトのシーケンスデータを用いて、他の日本在来馬との遺伝的距離を計算した。Tajima's D が低く、他の日本在来品種との遺伝的距離が高い場合、その領域は対州馬において選択が働いたことを意味する。

全体の下位 5% 以下の Tajima's D かつ全体の上位 5% 以上の F_{ST} (遺伝的分化の程度) を示す領域にある遺伝子機能を GO 解析により明らかにしたところ、再度、嗅覚関連遺伝子が頻出した (表 1 赤字)。具体的には 12 番染色体上の嗅覚受容体遺伝子が連続して配置されている領域 (図 2 黄色部分) がその領域に当たることがわかった。しかしながら、現時点ではシーケンスデータが十分でないため、この嗅覚遺伝子が本当に対州馬特有の進化に関わったかを結論するには十分でない。今後は、対州馬・他の在来馬の個体数を増やしたデータによる解析を予定している。

今回の結果が正しく嗅覚への選択が起こっているならば、対州馬の粗食に耐えるという特徴は、嗅覚への選択によって、島内の植物をより効率的に食べられるようになった、あるいは選ばずに食べるようになったことが起因しているのかもしれない。

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

<学会発表>

手塚あゆみ、高須正規、戸崎晃明、永野惇： 対州馬保全にむけた島外対州馬の遺伝的状態の把握 第19回動物遺伝育種学会、2018年9月、京都

<発表論文(査読有り)>

Ayumi TEZUKA, Masaki TAKASU, Teruaki TOZAKI, Atsushi J. NAGANO, Genetic analysis of Taishu horses on and off Tsushima Island: Implications for conservation, *Journal of Equine Science*, Volume 30, Issue 2, 33-40, 2019

<発表論文(査読無し)>

Tezuka, A., Takashu, M., Tozaki, T., and Nagano, A.J. 2018. The ability of ddRAD-Seq to estimate genetic diversity and genetic introgression in endangered native livestock. *bioRxiv* 454108. doi: 10.1101/454108 (査読付き論文誌に投稿中)