

# 血液蛋白質多型からみた木曾馬の遺伝的特性

辻井弘忠・赤羽明子

信州大学農学部 生物資源開発学講座

## Genetical Characteristics of Kiso Horse Observed in Its Blood Protein Type

**Hirotsada TSUJII and Akiko AKAHANE**

Department of Agriculture Biotechnology  
Faculty of Agriculture, Shinshu University

### Summary

There are eight kinds of native variety in the Japanese horse. Recent reports on them indicate that numbers of most of them are rapidly decreasing and incidences of still birth and deformities rise in such breeds, perhaps due to the increase of the inbreeding. Careful planning of breeding is required to keep the size of genetic variation in populations of the Japanese native horse and, for this purpose, characteristics of gene constitution of individual dams and sires used for the breeding should be grasped.

With the object in view, the blood protein polymorphism in various breeds of the horse, with special reference to that in Kisouma, was analyzed in this study. Blood samples were collected from Hokkaidowashu, Kisouma, Taishuba and Tokarauma as the Japanese natives and Thoroughbred, Breton and Percheron as the foreign breeds. Three types of electrophoresis were used for the analysis of blood protein polymorphism; Horizontal polyacrylamide gel electrophoresis for transferrin (Tf), esterase (Es), albumin glycoprotein (A1B) and vitamin D binding protein or group specific component (Gc) in serum, polyacrylamide isoelectronic focusing for hemoglobin (Hb) and carbonicanhydrase (CA) in erythrocytes, and starch gel electrophoresis for serum albumin (Al) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD) in erythrocytes.

There were considerable differences in the gene frequency among horse breeds, especially eminent in that of Tf, Es and Hb alleles. Of the Tf alleles, Tf<sup>F</sup>, Tf<sup>H1</sup> and Tf<sup>F1</sup> were found only in Kisouma, Hokkaidowashu, and Thoroughbred, respectively. In the esterase regulating alleles, Es<sup>H</sup> was found only in Kisouma and Hokkaidowashu and Es<sup>O</sup> was only in Kisouma. Similarly, of the hemoglobin type, Hb<sup>A</sup> was found in

Kisouma, Hokkaidowashu and Taishuba, but not in Tokarauma and foreign breeds in which only Hb<sup>B1</sup> and Hb<sup>B2</sup> types were detected. By comparing the present results with those of previous workers, we have to conclude that two types of Tf alleles, Tf<sup>M</sup> and Tf<sup>C</sup>, have disappeared from the Kisouma population, perhaps owing to the rapid decrease in the population size of the breed in recent years.

(Jour. Fac. Agric. Shinshu Univ. 31 : 125—138, 1994)

**Key words** : Japanese native horse, Kisouma, horse, blood protein polymorphism

## 緒 論

現在、日本において8種類の在来馬種が飼育され、その生存数は、1993年現在で北海道和種2561頭、木曾馬90頭、御崎馬84頭、対州馬89頭、トカラ馬118頭、宮古馬19頭、与那国馬112頭、野間馬35頭である。この数字が示すように、北海道和種を除く7馬種は、絶滅の危機に瀕しているといえる。このため、各在来馬ともその数の増加をはかる努力がなされているが、集団内での近親交配が進んでいるために、死産および流産の増加、産子の性の偏りや機会的遺伝的浮動による遺伝子構成の変動、遺伝子の損失による集団内の遺伝的多様性の減少等の起こっていることが確認されている<sup>1,2)</sup>。貴重な遺伝資源である日本在来馬が、その集団として本来有する遺伝形質を変化させることなく保存されるためには、まずそれらのもつ遺伝的特性を解析し、得られた情報を交配等に当たって十分活用することが重要である。

赤血球抗原型および血液蛋白質型は、多型性を示す遺伝形質で、免疫学的抗原抗体反応や電気泳動を用いて検出した表現型から、各対立遺伝子の遺伝子頻度を容易に計算することができる。このような理由から、赤血球抗原型および血液蛋白質型は、他の遺伝形質よりも遺伝標識としての有用性が高いと考えられている。

日本在来馬の遺伝標識として、血液蛋白質型を取り上げた研究はすでにあるが<sup>3-8)</sup>、近年のように各馬種とも母集団頭数が急減しつつある状況を考えると、集団の遺伝子構成の変化の意味でもさらに研究を進めていく必要がある。

本研究においては、木曾馬の遺伝形質の特徴を明らかにするために、血液蛋白質の変異型を、水平式ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (HPAGE 法)、ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法 (PAGIEF 法)、澱粉ゲル電気泳動法 (SGE 法) の3種類の電気泳動法を用いて分類し、結果から血液蛋白質型の各対立遺伝子についての遺伝子頻度を算出した。さらに得られた結果を先人の業績と比較することにより、最近20数年間に木曾馬集団の遺伝子構成に起こった変化を明らかにし、その原因を考察する。

## 材料および方法

本実験に使用した木曾馬の血液試料は、岐阜県高根村の名鉄牧場、長野県開田村開田牧場、長野県南箕輪村内において飼育されている計24頭から各々採血した。その他、北海道和種5頭、トカラ馬3頭、対州馬4頭、サラブレッド12頭、ブルトン2頭、ペルシュロン2頭の計53頭からの血液試料も用いた。このうちサラブレッド5頭については血清のみ、残りの馬に

については血清および血球の両方を実験に使用した。採血はシリコン処理した真空採血管と19 G採血針を用いて、被検馬の頸静脈より行った。1個体当たりの採血量は原則として5～10 mlとした。採血した血液は室温で1時間程放置した後、遠心分離機で6,000rpm, 15分間遠心分離した。上清の血清は、1.5mlのマイクロチューブに分注し、 $-40^{\circ}\text{C}$ で実験時まで保存した。残りの血餅を生理食塩水で数回洗浄して、赤血球を分離し、得られた血球を $-40^{\circ}\text{C}$ で実験時まで保存した。実験に当たっては、凍結血球を融解、さらにHPAGE法およびSGE法による分析は、硫酸第2鉄アンモニウム液を添加し完全に溶解したもの、他の方法では2%赤血球溶血液を用いた。

### I: HPAGE 法による血清蛋白質型の分類

阿部ら<sup>9)</sup>および横法ら<sup>10)</sup>に従い、水平式ポリアクリルアミド電気泳動法 (HPAGE 法) を用いた。トリスアミノメタン 8 g, ホウ酸 2 g および BPB 2ml を蒸留水に溶かし 1000ml ( $\text{pH}9.0$ ) とした電極溶解液を用い、55mA, 120V で 5 時間泳動後、コマシーブリリアントブルー-G で染色を行った。被検馬血清の泳動像とコントロールとして使用した Es (エステラーゼ), Gc (ビタミンD結合蛋白質), A1B (A1B グルコプロテイン) および Tf (トランスフェリン) の各遺伝子座についての標準型既知血清の泳動像を比較して被検馬血清におけるこれら血清蛋白質の型を同定した。各座位について泳動バンドの移動度の大きい順に、Es については F, H, I および S, Gc については F および S, A1B については F, K および S, Tf については D, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, O および R とし、それらバンドの出現の有無により各個体、各座位における表現型を判定した。なお Es については上記 4 バンドの出現を基本としたが、バンドの染色が明らかに薄い場合には同遺伝子と Es<sup>0</sup> とのヘテロ型、Es バンドが欠失の場合は Es<sup>0</sup>/Es<sup>0</sup> のホモ型と判定した。

### II: SGE 法による血清および血球蛋白質型の分析

澱粉ゲル電気泳動法による血液蛋白質の分離は、競争馬理化学研究所において、軽種馬の血液鑑定に用いられている方法<sup>11)</sup>に従い、以下の分析を行った。1) 血清を 6 mA/cm で 5 時間泳動後、アミドブラック B で染色した。2) 赤血球溶血液を 2～3 mA/cm で 4 時間泳動後、発色用寒天で発色させた。これらの方法により、それぞれ 1) 被検馬血清中 Alb (アルブミン)、2) 血球蛋白中 PGD (6-ホスホグルコン酸脱水素酵素) についての蛋白質多型分析を行った。

蛋白型の分類は、1) 被検馬血清の泳動像と Alb についての標準型既知血清の泳動像とを比較して移動度の大きいバンドを A、小さいバンドを B とし、それらバンドの組合せにより、Alb 型を判定した。同様に 2) 赤血球溶血液の泳動像と PGD に対する標準既知赤血球溶血液の泳動像を比較して移動度の大きいバンドを F、小さいものを S として PGD 型を判定した。

### III: PAGIEF 法による血球蛋白質型の分析

横浜ら<sup>12)</sup>によって報告された、ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法 (PAGIEF 法) を用い、被検馬赤血球溶血液について Hb- $\alpha$  (ヘモグロビン- $\alpha$ ) 多型の分析を行った。120 V, 4 時間の電気泳動後、コマシーブリリアントブルー (CBB)・R で染色した。

Hb- $\alpha$  については被検馬赤血球溶血液の泳動像とウマ Hb- $\alpha$  についての標準既知赤血球溶血液の泳動像を比較して移動度の早いバンドから順に A, B<sub>1</sub> および B<sub>2</sub> とし、それらの組み合わせにより Hb- $\alpha$  型を判定した。

Table 1. List of gene loci, alleles and phenotypes of blood protein polymorphism examined.

Locus	Allele	Phenotype	Locus	Allele	Phenotype
Al	A	A	Tf	D	D
	B	AB		F <sub>1</sub>	DF <sub>1</sub>
		B		F <sub>2</sub>	DF <sub>2</sub>
Es	F	F		F'	DF'
	H	FH		H <sub>1</sub>	DH <sub>1</sub>
	I	FI		H <sub>2</sub>	DH <sub>2</sub>
	S	FS		H <sub>2</sub>	DO
	O	H		O	DR
		HI		R	F <sub>1</sub>
		HS			F <sub>1</sub> F <sub>2</sub>
		I			F <sub>1</sub> F'
		IS			F <sub>1</sub> H <sub>1</sub>
		S			F <sub>1</sub> H <sub>2</sub>
					F <sub>1</sub> O
					F <sub>1</sub> R
Gc	F	F		F <sub>2</sub>	F <sub>2</sub>
	S	FS		F <sub>2</sub> F'	F <sub>2</sub> F'
		S		F <sub>2</sub> H <sub>1</sub>	F <sub>2</sub> H <sub>1</sub>
AlB	F	F		F <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	F <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
	K	FK		F <sub>2</sub> O	F <sub>2</sub> O
	S	FS		F <sub>2</sub> R	F <sub>2</sub> R
		K		F'	F'
		KS		F' H <sub>1</sub>	F' H <sub>1</sub>
		S		F' H <sub>2</sub>	F' H <sub>2</sub>
				F' O	F' O
Hb	A	A		F' R	F' R
	B <sub>1</sub>	AB <sub>1</sub>		H <sub>1</sub>	H <sub>1</sub>
	B <sub>2</sub>	AB <sub>2</sub>		H <sub>1</sub> H <sub>2</sub>	H <sub>1</sub> H <sub>2</sub>
		B <sub>1</sub>		H <sub>1</sub> O	H <sub>1</sub> O
		B <sub>1</sub> B <sub>2</sub>		H <sub>1</sub> R	H <sub>1</sub> R
		B <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	
PGD	F	F	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	
	S	FS	H <sub>2</sub> R	H <sub>2</sub> R	
		S	O	O	
			OR	OR	
			R	R	

以上、3種類の電気泳動法を用いて分類できた7種類の血液蛋白質 (Al, Tf, Es, Gc, AlB, Hb- $\alpha$  および PGD) の各座位における対立遺伝子とそれらの組合せによる表現型を表1にまとめて示した。

遺伝子頻度は各座位における表現型の出現頻度より Wright の式に基づく Nozawa ら<sup>5)</sup>の方法を用いて算出した。

Table 2. Incidence of blood protein phenotypes in various breed of horses examined: serum albumin (Al) and transferrin (Tf).

Locus	Phenotype	Kisouma	Hokkaido washu	Taishuba	Tokarauma	Thoroughbred	Heavy draft horse
Al	A	2	2	2			1
	AB	11		2		2	1
	B	11	3		3	10	2
	Total*	24	5	4	3	12	4
Tf	DF <sub>1</sub>					2	
	DF'	1					
	DF <sub>2</sub>		2			2	
	DH <sub>2</sub>	1				2	
	DR	9	1		1	2	
	F <sub>1</sub> F <sub>2</sub>					3	
	F <sub>1</sub> R					1	
	F' F <sub>2</sub>	1					
	F <sub>2</sub>	2		1			2
	F <sub>2</sub> H <sub>1</sub>		1				
	F <sub>2</sub> O						1
	F <sub>2</sub> R	10	1	3	1		1
	R				1		
Total*	24	5	4	3	12	4	

\*: Number of heads

## 結 果

ブルトンおよびベルシュロンより得られた結果は、それぞれ例数が少ないこともあり、西欧系重種馬として一括し、日本在来場各種およびサラブレッドと比較した。

### 1. 血清蛋白質型の判定

HPAGE 法による Gc, Es, A1B, Tf, および SGE 法による Al の泳動像から判定した各血清蛋白質の表現型と各馬種におけるそれらの出現頻度を表 2 および 3 に示した。

#### 1) アルブミン (Al) 型 (表 2)

Al<sup>A</sup>, Al<sup>A</sup>/Al<sup>B</sup>, Al<sup>B</sup> 3 者の割合は馬種によってかなり異なったが、特にサラブレッドにおいて Al<sup>B</sup> の割合が目立って高かった。

#### 2) トランスフェリン (Tf) 型 (表 2)

サラブレッドには D, F<sub>1</sub> および F<sub>2</sub> バンドの出現が多く、F' および H<sub>1</sub> バンドは検出されなかった。重種馬には F<sub>2</sub> バンドの出現が多く見られた。一方、日本在来馬には F<sub>2</sub> および R バンドが多く見られた。サラブレッドで多く見られた F<sub>1</sub> バンドは検出されなかった。また、同種において見られなかった F' および H<sub>1</sub> が、木曾馬および北海道和種においては検

Table 3. Incidence of blood protein phenotypes in various breed of horses examined :  
esterase (Es), vitamin D binding protein (Gc) and A1B glucoprotein (A1B)

Locus	Phenotype	Kisouma	Hokkaido washu	Taishuba	Tokarauma	Thoroughbred	Heavy draft horse
Es	F	1		2	2		1
	FH	1					
	FI	9	1	2	1	1	3
	HI		1				
	I	5	3			8	
	IO	1					
	IS	6				3	
	S	1					
	Total*	24	5	4	3	12	4
Gc	F	22	5	3	3	12	1
	FS	2		1			3
	Total*	24	5	4	3	12	4
A1B	FK	1					
	K	23	5	3	3	12	4
	KS			1			
	Total*	24	5	4	3	12	4

\* : Number of heads

Table 4. Incidence of blood protein phenotypen in various breed of horses examined :  
6-phosphogluconic acid dehydrogenase (PGD) and hemoglobin (Hb)

Locus	Phenotype	Kisouma	Hokkaido washu	Taishuba	Tokarauma	Thoroughbred	Heavy draft horse
PGD	F	21	5	4	3	2	4
	FS	3				2	
	S					1	
	Total*	24	5	4	3	5	4
Hb	AB <sub>1</sub>	12	1	2			
	B <sub>1</sub>	9					1
	B <sub>1</sub> B <sub>2</sub>	2	2	2	2	3	3
	B <sub>2</sub>	1	2		1	2	
	Total*	24	5	4	3	5	4

\* : Number of heads

Table 5. The frequency of alleles for albumin (Al) and transferrin (Tf) types in blood protein in various breeds of horses examined.

Locus	Allele	Kisouma	Hokkaido washu	Taishuba	Tokarauma	Thoroughbred	Heavy draft horse
Al	Al <sup>A</sup>	0.312	0.400	0.625	0	0.042	0.375
	Al <sup>B</sup>	0.688	0.600	0.375	1.000	0.958	0.625
Tf	Tf <sup>D</sup>	0.229	0.200	0	0.167	0.333	0
	Tf <sup>F1</sup>	0	0	0	0	0.250	0
	Tf <sup>F2</sup>	0.313	0.400	0.635	0.167	0.208	0.750
	Tf <sup>F3</sup>	0.042	0	0	0	0	0
	Tf <sup>H1</sup>	0	0.100	0	0	0	0
	Tf <sup>H2</sup>	0.021	0	0	0	0.083	0
	Tf <sup>O</sup>	0	0	0	0	0	0.125
	Tf <sup>R</sup>	0.396	0.300	0.375	0.667	0.125	0.125
Total No. of heads		24	5	4	3	12	4

出された。日本在来馬のうち北海道和種では、被検個体数が少ない割には多くの変異型が見られた。木曾馬は Tf<sup>R</sup> を含む変異型が多く DR 型と F<sub>2</sub>R 型で約80%を占めていた。対州馬においては、全ての変異型に Tf<sup>F2</sup> が含まれており、またトカラ馬では全ての変異型に Tf<sup>R</sup> が含まれていた。サラブレッドにおいては、Tf<sup>D</sup>、Tf<sup>R</sup> および Tf<sup>F2</sup> を含む変異型が多かった。

### 3) エステラーゼ (Es) 型 (表3)

木曾馬においては、F, FH, FI, I, IS, S, さらに IO の多種類の変異型が検出されたが、とくに FI 型の多いのが目立った。一方、サラブレッドにおいては I 型が多かった。木曾馬以外の在来馬と重種馬においては S 対立遺伝子を含む変異型は検出されなかった。O 遺伝子を含む型は木曾馬で見られた IO ヘテロ 1 例であった。

### 4) ビタミンD結合蛋白質 (Gc) 型 (表3)

在来馬では、木曾馬で 2 例、対州馬で 1 例に FS 型が検出された以外は、全て F 型であった。また、サラブレッドにおいては、全て F 型であった。しかし、重種馬においては逆に FS 型の方が多かった。

### 5) A1B グリコプロテイン (A1B) 型 (表3)

サラブレッドおよび重種馬では K 型にのみで多型はみられなかったが、在来馬では木曾馬に K 型の他に FK 型が、また対州馬に FK 型が各 1 例みられた。

## 2. 赤血球蛋白質型の判定

SGE 法による血球 PGD および、PAGIFE 法による Hb- $\alpha$  の泳動像から判定した各赤血球蛋白質の表現型と馬種ごとの出現頻度を表 4 に示した。

### 1) 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 (PGD) 型

在来馬においては、木曾馬に FS 型が 3 例みられた他は、全て F 型であった。サラブレッドにおいては、F, FS, S 型が同程度の割合でみられた。また、重種馬においては、F 型しか

Table 6. The frequency of alleles for esterase (Es), vitamin D binding protein (Gc) and A1B glucoprotein(A1B) types in blood protein in various breeds of horses examined.

Locus	Allele	Kisouma	Hokkaido washu	Taishuba	Tokarauma	Thoroughbred	Heavy draft horse
Es	Es <sup>F</sup>	0.250	0.100	0.750	0.833	0.042	0.625
	Es <sup>H</sup>	0.021	0.100	0	0	0	0
	Es <sup>I</sup>	0.542	0.800	0.250	0.167	0.833	0.375
	Es <sup>S</sup>	0.167	0	0	0	0.125	0
	Es <sup>O</sup>	0.021	0	0	0	0	0
Gc	Gc <sup>F</sup>	1.000	1.000	0.875	1.000	1.000	0.750
	Gc <sup>S</sup>	0	0	0.125	0	0	0.250
A1B	A1B <sup>F</sup>	0.021	0	0	0	0	0
	A1B <sup>K</sup>	0.979	1.000	0.875	1.000	1.000	1.000
	A1B <sup>S</sup>	0	0	0.125	0	0	0
Total No. of heads		24	5	4	3	12	4

検出されなかった。

## 2) ヘモグロビン- $\alpha$ (Hb- $\alpha$ ) 型

全被検個体を通しA型とみられるものは1例もなくAとB<sub>1</sub>のヘテロであるAB<sub>1</sub>型がトカラ馬を除く在来馬においてみられ、特に木曾馬で非常に多かったが、サラブレッド、重種馬の外国馬ではA遺伝子を含む変異は検出されなかった。本実験で用いた泳動条件ではAのバンドとB<sub>1</sub>のバンドが非常に近接していたためAB<sub>1</sub>型とB<sub>1</sub>型の判明がややしくかったが、上下2本のバンドのうち上のバンドが明らかに濃いものをAB<sub>1</sub>、2本が同じ濃さのものをB<sub>1</sub>として判定した。外国馬においてはB<sub>2</sub>を含む変異型が多かったが、在来馬では逆にB<sub>1</sub>を含む変異型が多かった。

## 3. 遺伝子頻度

各馬種について血液蛋白質表現型から算定した各座位の座位遺伝子の遺伝子頻度を表5、6および7に示した。

### 1) アルブミン (Al) 座位遺伝子頻度 (表5)

Al<sup>A</sup>は、トカラ馬を除く他種全ての馬で存在したが、その頻度は対州馬以外のものではAl<sup>B</sup>の頻度より低かった。特に、サラブレッドでは0.042であり、他よりもAl<sup>A</sup>頻度が大幅に低かった。Al<sup>B</sup>は、トカラ馬では1.000、サラブレッドでは0.958と非常に高頻度で検出されたが、対州馬では0.375と頻度が低かった。

### 2) トランスフェリン (Tf) 座位遺伝子頻度 (表5)

Tf<sup>D</sup>は、対州馬と重種馬以外の全ての馬種で検出され、とくにサラブレッドにおいてはその頻度が0.333と高かった。Tf<sup>F1</sup>は、サラブレッドのみに検出され、在来馬および重種馬にはみられなかった。また、Tf<sup>F'</sup>は、0.042の低頻度で木曾馬のみに検出された。Tf<sup>F2</sup>は、全ての馬種で検出され、その遺伝子頻度は、対州馬で0.625、または重種馬で0.750と特に高か



Table 7. The frequency of alleles for 6-phosphogluconic acid dehydrogenase (PGD) and hemoglobin (Hb) types in blood protein in various breeds of horses examined.

Locus	Allele	Kisouma	Hokkaido washu	Taishuba	Tokarauma	Thoroughbred	Heavy draft horse
PGD	PGD <sup>F</sup>	0.938	1.000	1.000	1.000	0.600	1.000
	PGD <sup>S</sup>	0.062	0	0	0	0.400	0
Hb - $\alpha$	Hb <sup>A</sup>	0.250	0.100	0.250	0	0	0
	Hb <sup>B1</sup>	0.667	0.500	0.500	0.167	0.300	0.625
	Hb <sup>B2</sup>	0.083	0.400	0.250	0.833	0.700	0.375
Total No. of heads		24	5	4	3	5	4

った。Tf<sup>H1</sup>は北海道和種のみで0.100の頻度で検出された。Tf<sup>H2</sup>は、木曾馬およびサラブレッドにおいて検出されたが、その遺伝子頻度は0.021、0.083と低かった。Tf<sup>0</sup>は、重種馬のみで検出されたが、これも遺伝子頻度は0.125と低かった。Tf<sup>K</sup>は、全ての馬種に検出されたが、在来馬において外国種よりも高頻度で存在し、特にトカラ馬では頻度が0.667と高かった。

### 3) エステラーゼ (Es) 座位遺伝子頻度 (表6)

Es<sup>F</sup>は、全ての品種で検出されたが、その頻度には馬種間で大きな差があった。トカラ馬および対州馬においては、同遺伝子頻度はそれぞれ0.833、0.750であり、非常に高く、一方、サラブレッドおよび北海道和種においては0.042、0.100と低かった。Es<sup>H</sup>は、木曾馬および北海道和種にのみ検出された。Es<sup>I</sup>は全ての馬種において見られたが、その頻度はEs<sup>F</sup>と逆に北海道和種、サラブレッドで特に高く、トカラ馬、対州馬で低かった。Es<sup>S</sup>は、木曾馬およびサラブレッドのみに、それぞれ0.167、0.125の頻度で存在した。また、Es<sup>0</sup>は、木曾馬のみで存在が検出されたものの、その頻度は0.021と低かった。

### 4) ビタミンD結合蛋白質 (Gc) 座位遺伝子頻度 (表6)

Gc<sup>F</sup>は、全ての馬種において高頻度で存在し、特に、木曾馬、北海道和種、トカラ馬およびサラブレッドにおいてはその遺伝子頻度は1.000であり、多型は検出されなかった。Gc<sup>S</sup>は対州馬および重種馬に、それぞれ0.125、0.250の頻度で存在した。

### 5) A1B グリコプロテイン (A1B) 座位遺伝子頻度 (表6)

A1B<sup>F</sup>は、木曾馬のみに0.021の低頻度でみられた。A1B<sup>K</sup>は、全ての馬種において、最も高い頻度で検出された。特に、北海道和種、トカラ馬、サラブレッドおよび重種馬においては、A1B型の表現型はK型のみであったため、A1B<sup>K</sup>の頻度は1.000であった。A1B<sup>S</sup>は対州馬のみに0.125の頻度で検出された。

### 6) 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 (PGD) 座位遺伝子頻度 (表7)

日本在来馬および重種馬ではPGD<sup>F</sup>の頻度が高く、木曾馬を除いて頻度は1.000であり、PGD型に多型は検出されなかった。木曾馬でもPGD<sup>F</sup>頻度は0.932と極めて高かった。一方、サラブレッドにおいては、PGD<sup>F</sup>頻度は0.600であり、他に比べて低かった。PGD<sup>S</sup>は、木曾馬で0.062、またサラブレッドは0.400の頻度で存在した。

### 7) ヘモグロビン- $\alpha$ (Hb- $\alpha$ ) 座位遺伝子頻度 (表7)

Hb<sup>A</sup> は、トカラ馬を除く在来馬においてのみ検出され、木曾馬では0.250、北海道和種では0.100、対州馬では0.250の頻度であった。Hb<sup>B1</sup> は、全ての馬種においてみられたが、その頻度はサラブレッドとトカラ馬では低く、重種馬では逆に高い傾向にあった。Hb<sup>B2</sup> も全ての馬種において検出されたが、木曾馬では0.083と頻度が低く、逆にトカラ馬では0.833の高頻度で検出された。またサラブレッドにおいては、Hb<sup>B1</sup> はHb<sup>B2</sup> よりも高い頻度で検出され、重種馬では逆の傾向がみられた。

## 考 察

### (1) AI 型

日本在来馬における血清アルブミンの多型については、茂木<sup>13)</sup>、野沢ら<sup>5,6)</sup>の報告があるが、このうち木曾馬におけるAI<sup>A</sup>の遺伝子頻度は、茂木によれば0.482、野沢らによれば、0.3060であり、本実験の結果は野沢らの結果に近かった。木曾馬の産駒数は、1899年の1,515頭を最高として、以後年々減少し、1980年には15頭にまで激減した。その後、1984年には60頭と増加し、やや回復の兆しがみられるようになったが、依然集団サイズが小さいまま現在に至っている。茂木<sup>14)</sup>の報告によれば、木曾馬のAI<sup>A</sup>は0.25であり、本実験結果よりも低かった。このように木曾馬の集団サイズが急激に縮小する前と後ではAI型の対立遺伝子の構成に異なりが見られた<sup>14)</sup>。

### (2) Tf 型

日本在来馬のTf型について、茂木<sup>13)</sup>はSGE法によって分類を行い、木曾馬のTf型は、Tf<sup>A</sup> (現在のTf<sup>D</sup>)、Tf<sup>B</sup> (同Tf<sup>F</sup>)、Tf<sup>C</sup> (同Tf<sup>H</sup>)、Tf<sup>D</sup> (同Tf<sup>E</sup>)、Tf<sup>E</sup> (同Tf<sup>R</sup>) およびTf<sup>F</sup> (同Tf<sup>M</sup>)の6種類の対立遺伝子によって支配されていると報告し、各々の対立遺伝子の頻度は、Tf<sup>B</sup>、Tf<sup>A</sup>、Tf<sup>E</sup>、Tf<sup>D</sup>、Tf<sup>C</sup> およびTf<sup>F</sup>の順で低かった。これらの結果を本実験結果と比較すると、本実験では、木曾馬にTf<sup>M</sup> およびTf<sup>E</sup>は検出されず、また対立遺伝子の順もTf<sup>R</sup>、Tf<sup>F</sup>、Tf<sup>D</sup> およびTf<sup>H</sup>であった等、幾つかの差異が確認された。一方、野沢ら<sup>4-7)</sup>による、日本在来馬およびいくつかのサラブレッドの血液型の報告によると、日本在来馬のTf型に、上述の6種類の対立遺伝子を確認し、Tf<sup>B-</sup>は木曾馬のみ検出したと報告した<sup>6)</sup>。このことは、本実験におけるTf<sup>F</sup>の結果と一致した。茂木<sup>14)</sup>の報告によれば、日本在来馬にはTf<sup>A</sup> (現在のTf<sup>D</sup>)、Tf<sup>B</sup> (同Tf<sup>F</sup>)、Tf<sup>C</sup> (同Tf<sup>H</sup>)、Tf<sup>D</sup> (同Tf<sup>E</sup>)、Tf<sup>E</sup> (同Tf<sup>R</sup>) およびTf<sup>X</sup>の6種類の対立遺伝子が検出された。このうち木曾馬にはTf<sup>X</sup>を除く5種類の対立遺伝子が確認された。Tf<sup>D</sup>は北海道和種、木曾馬、御崎馬および野間馬に検出されたと報告している。この結果と本実験の結果と異なる点は、木曾馬および北海道和種にTf<sup>D</sup>が検出された点であった。さらに、HPAGE法およびIEF法を用いてTf型の分類を行った。横浜ら<sup>10)</sup>の報告によれば、日本在来馬のTf型はTf<sup>D</sup>、Tf<sup>D</sup>、Tf<sup>F1</sup>、Tf<sup>F2</sup>、Tf<sup>F3</sup>、Tf<sup>H1</sup>、Tf<sup>H2</sup>、Tf<sup>H3</sup>、Tf<sup>O</sup>、Tf<sup>R</sup>、Tf<sup>X</sup> およびTf<sup>-</sup>の12種類の対立遺伝子に支配されていた。また、木曾馬には、このうちTf<sup>D</sup>、Tf<sup>D</sup>、Tf<sup>F1</sup>、Tf<sup>F2</sup>、Tf<sup>F3</sup>、Tf<sup>H2</sup> およびTf<sup>R</sup>の7種類の対立遺伝子が検出された。また、Tf<sup>X</sup>は北海道和種および野間馬のみに、若干検出されたと報告している。横浜ら<sup>10)</sup>がHPAGE法とIEF法を併用することによって、Tf<sup>D</sup>とTf<sup>D</sup>、またはTf<sup>H1</sup>とTf<sup>F2</sup>およびTf<sup>H3</sup>の細分化を行った結果と本実験結果と比較した場合、木曾馬にTf<sup>O</sup> およびTf<sup>F1</sup>が検出されなかった点

は類似していた。しかし、Tf<sup>F</sup>が木曾馬の他、北海道和種および御崎馬にも見られた点と、Tf<sup>H2</sup>が北海道和種のみならず、木曾馬および対州馬にも見られた点は異なっていたが、他の点については類似していた。

また、木曾馬について報告されているTf型と本実験の結果から、Tf型の経時的な変動を確認することができた。これは、A1型と同様に集団サイズが急激に減少する前と後では、対立遺伝子の構成が異なる点であった。全生存数が1,000頭前後であった1962～1963年の調査において確認されたTf<sup>M</sup>は、その後全生存数が急激に減少してからは検出されていない<sup>14)</sup>。また、Tf<sup>0</sup>も1984年の報告以後、木曾馬には検出されず、さらに、他のTf型の対立遺伝子頻度にも変動がみられた<sup>15)</sup>。遺伝子構成のこれらの変動は、木曾馬の集団サイズの急激な変動に伴う機会的遺伝浮動の影響と考えられた。また、その結果として、Tf<sup>M</sup>およびTf<sup>0</sup>が消失し、木曾馬のTf型の多様性が減少したと判断した。

### (3) Es型

野沢ら<sup>5,6)</sup>による、SGE法を用いた日本在来馬および外国馬種の研究結果によれば、Es型はEs<sup>F</sup>、Es<sup>I</sup>、Es<sup>S</sup>およびEs<sup>0</sup>の4種類の対立遺伝子によって支配されていた。日本在来馬のうち北海道和種においては、これらの全ての対立遺伝子が検出されたが、木曾馬においては、これらの全ての対立遺伝子がEs<sup>F</sup>、Es<sup>I</sup>およびEs<sup>S</sup>の3種類が検出された。Es<sup>I</sup>は全ての馬種で検出されたが、日本在来馬では木曾馬において高い頻度で検出されたと報告している。野沢ら<sup>5,6)</sup>によると、Es<sup>S</sup>は、サラブレッド、北海道和種および木曾馬のみに、また、Es<sup>0</sup>は北海道和種とサラブレッドに見られたと報告しているが、この点は本実験結果と異なった。また、横法ら<sup>16)</sup>の報告によれば、日本在来馬のEs型には、Es<sup>F</sup>、Es<sup>I</sup>およびEs<sup>S</sup>の3種類の対立遺伝子が存在し、Es<sup>I</sup>の頻度が最も高かった。茂木<sup>14)</sup>による、SGE法を用いた日本在来馬の血液型についての研究によれば、Es<sup>F</sup>およびEs<sup>I</sup>は全ての馬種にみられたが、Es<sup>S</sup>は木曾馬のみに検出されており、本実験結果と類似していた。さらに、横浜ら<sup>17)</sup>はHPAGE法およびIEF法を併用して、日本在来馬のEs型の分類を行った。その結果、Es型の対立遺伝子は、Es<sup>0</sup>、Es<sup>F</sup>、Es<sup>G</sup>、Es<sup>H</sup>、Es<sup>I</sup>、Es<sup>S</sup>およびEs<sup>0</sup>の7種類に細分化している。

これらの報告におけるEs型<sup>5,6,14,16,17)</sup>と本実験における結果の比較を行った結果、A1およびTf型に確認されたような対立遺伝子の経時的な変動は認められなかった。つまりEs型に関しては、集団サイズの縮小による機会的遺伝子浮動の影響は現れなかったと考えられた。

### (4) Hb型

日本在来馬およびサラブレッドの血液蛋白質に関する野沢ら<sup>6)</sup>の報告によれば、Hb- $\alpha$  (dup)は、Hb- $\alpha^1$  (現在のHb<sup>B1</sup>+Hb<sup>B2</sup>)およびHb- $\alpha^0$  (現在のHb<sup>A</sup>+Hb<sup>A2</sup>)に支配された1/1および1/0型の2種類の型に分類された。Hb- $\alpha^1$  (Hb<sup>B1</sup>+Hb<sup>B2</sup>)は全ての品種において見られたが、Hb- $\alpha^0$  (Hb<sup>A</sup>+Hb<sup>A2</sup>)は日本在来馬では北海道和種、対州馬、トカラ馬および粟国馬のみに検出されたただけであった。また、Hb- $\alpha^0$ はトカラ馬、対州馬および粟国馬においては比較的高頻度でみられたと報告している。これらの報告と本実験結果とを比較すると、Hb<sup>A</sup> (Hb- $\alpha^0$ )が木曾馬に見られなかった点と、逆にHb<sup>A</sup>がトカラ馬に見られなかった点が異なっていたが、他の馬種に関しては類似していた。横浜ら<sup>18)</sup>の結果によれば、日本在来馬のHb<sup>A</sup> (本実験におけるHb<sup>B2</sup>)の頻度は低い傾向にあり、特に木曾馬および北海道和種では低かった。また、Hb<sup>B</sup> (同Hb<sup>B1</sup>およびHb<sup>A</sup>)については、Hb<sup>A</sup> (同Hb<sup>B2</sup>)と

は逆に木曾馬および北海道和種で特に高く、サラブレッドでは低かったと報告している。これらの結果は、本実験結果と類似していた。

#### (5) A1B 型

日本在来馬の A1B 型に関する報告は、桑島ら<sup>19)</sup>の報告のみである。それによると、日本在来馬では木曾馬および北海道和種、また軽種馬 (サラブレッドおよびアングロ・アラブ) および他の馬種を用いて分類を行い、Pa<sup>D</sup> (現在の A1B<sup>F</sup>)、Pa<sup>F</sup> (同 A1B<sup>K</sup>) および Pa<sup>S</sup> (同 A1B<sup>S</sup>) の 3 種類の対立遺伝子を検出した。その結果、木曾馬の結果については類似していた。

#### (6) Gc 型

日本在来馬の Gc 型に関する桑島ら<sup>19)</sup>の HPAGE 法を用いた報告と本実験の木曾馬の結果は一致した。

#### (7) PGD 型

野沢ら<sup>6)</sup>によれば、PGD<sup>A</sup> (現在の PGD<sup>F</sup>) は全ての馬種に検出されるが PGD<sup>B</sup> (同 PGD<sup>S</sup>) は日本在来馬においては、北海道和種、宮古馬、与那国馬および粟国馬のみ見られた。また PGD<sup>S</sup> は、西欧系馬種においては比較的多く検出されたと報告している。ところが、本実験においては、PGD<sup>S</sup> は木曾馬にも検出され、逆に北海道和種には検出されなかった。

本研究における木曾馬の結果と既に報告されている結果<sup>6)</sup>との比較により対立遺伝子の経時的な変動から、集団サイズの縮小による機会的遺伝浮動の影響を推測することができた。一般に、集団サイズが急激に縮小したり、産児数が減少した場合、遺伝子の抽出誤差により、特定の座位遺伝子が急に増加したり、消失する減少が起りやすいといわれる<sup>20)</sup>。特に非常に小さい集団においては、全ての遺伝子座が同質対立遺伝子性 (ホモ) に向かう傾向があり、異形接合体性が減少して変異が消失する確率が高い日本在来馬のうちトカラ馬に遺伝的変異があまり認められず、また他の日本在来馬の遺伝子構成と大きく異なっているのは、ボトルネック効果と呼ばれる集団サイズの一時的な縮小により機会的遺伝浮動が起こった影響と言われている<sup>21)</sup>。さらに、集団サイズが小さいと遺伝資源の枯渇により近親交配を余儀なくされるため、集団内にヘテロの状態でかくされている劣性有害遺伝子がホモ接合となって表現されるようになる。その結果として、適応力の劣る個体が生じる確率が増し、死産や奇形の例数が増加すると考えられる。阿部ら<sup>22)</sup>は、牛において近交率の高い群と低い群とを比較した場合、前者の方がヘテロ接合率が低いと報告した。今後、木曾馬においても、全遺伝子座のモニターとして血液型の分析を行い、近交率の増加と対立遺伝子のヘテロ接合率の相関を調査することによって、近親交配が遺伝構成に与えた影響を明らかにできるものと思われた。

## 要 約

本実験では、日本在来馬のうち木曾馬を中心に電気泳動法を用いて血液蛋白質型を分析し、遺伝形質としての特徴を解析することを試みた。供試馬は、木曾馬24頭の他に、北海道和種、対州馬、トカラ馬、サラブレッド、ブルトンおよびペルシュロンを用いた。血液蛋白質型の分析に用いた電気泳動法は、水平式ポリアクリルアミドグラジェンゲル電気泳動法 (HPAGE 法)、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGIEF 法)、澱粉ゲル電気泳動法

の3種を用いた。各血液蛋白質型の対立遺伝子頻度を算出した結果、遺伝子構成には馬種間の差異があることが判った。特に、Tf (トランスフェリン) 型, Es (エステラーゼ) 型およびHb (ヘモグロビン) 型においては、馬種間の差異のみならず、日本在来馬とサラブレッドおよび重種馬の遺伝子構成の違いを認識することができた。つまり、Tf型に関しては、Tf<sup>F</sup>は木曾馬のみに、Tf<sup>M</sup>は北海道和種のみに、Tf<sup>F1</sup>はサラブレッドのみにみられた。Es型に関しては、Es<sup>H</sup>は木曾馬および北海道和種に、Es<sup>O</sup>は木曾馬のみにみられた。また、Hb型に関しては、Hb<sup>A</sup>はトカラ馬を除く日本在来馬のみに見られた。また、木曾馬において従来報告されたものと比較して、頭数の急激な減数が始まる前と後では遺伝子構成に変動がみられた。特にTf型では、消失したと思われる対立遺伝子を2種類確認できた。これは集団サイズの急激な縮小による機会的遺伝浮動の影響であると考えられた。

キーワード：木曾馬，遺伝形質，電気泳動，日本在来馬，血液蛋白質型

## 謝 辞

各電気泳動の実施に際して、懇切なる御指導を賜り、その他、種々の便宜を与えて下さった競争馬理化学研究血液部、茂木一重氏、井上正春氏他、血液型検査課の各位に対し、厚く御礼申し上げる。

被検馬の血液採取に関して、山本静二獣医師、貴重な材料を提供して下さいました名鉄木曾牧場および家畜改良センター十勝牧場の各位に対し、深く感謝の意を表する。

## 引 用 文 献

- 1) 日本馬事協会. (1984). 日本在来馬—その保存と活用. 日本馬事協会. 東京. pp.27-243.
- 2) 農林水産技術会議事務局. (1988). 農林水産業. 動物遺伝資源の長期保存法マニュアル
- 3) 野沢 謙, 江崎孝三郎, 若林 昇, 林田重幸. (1965). 日本在来馬に関する遺伝学的研究. 日畜会報. 36 : 233-242.
- 4) Nozawa, K., Shotake, T. and Ohkura, Y. (1975). Gene constitution and phylogenetic interrelationships among native livestock in Japan and its adjacent area, with special reference to native horses and cattle. In: JIBP Synthesis. 5 : 130-137.
- 5) Nozawa, Ken., Shotake, T. and Ohkura, Y. (1976). Blood protein variations within and between the east Asian and European horse populations. Z. Tierzuchtg. Zuchtgsbiol. 93 : 60-74.
- 6) 野沢 謙, 庄武孝義, 峰沢 満, 新城明久, 橋口 勉, 並河鷹夫. (1980). 東亜在来馬といくつかの西欧系馬種における血液蛋白質変異. 家畜家禽の蛋白質多型による品種の相互関係と系統に関する研究 (文部省科研費 総合A. 報告書). pp.45-61.
- 7) 沢崎 担, 野沢 謙. (1981). 日本在来馬の類型化について. 日本馬事協会. pp.35-72.
- 8) 野沢 謙. (1992). 東亜と日本在来馬の起源と系統. Japanese Journal of Equine Science. 3 : 1-18.
- 9) 阿部恒夫, 小松正憲. (1978). 水平式 Polyacrylamide Gradient Gel 電気泳動法. 免疫実験操

作法, VII: 2013-2020, 日本免疫学会編.

- 10) 横浜道成, 渡辺泰子, 側原 仁, 小林悦子. (1987). 馬血清蛋白質型用水平式 Polyacrylamide Gradient Gel 電気泳動法. ABRI, 15: 22-27.
- 11) 競争馬理化学研究所. (1991). 馬の血液型検査の方法および判定基準. 競争馬理化学研究所.
- 12) 横浜道成, 渡辺泰子, 茂木一重. (1985). 日本在来馬の Hemoglobin 型について. 日畜会報. 56: 624-627.
- 13) 茂木一重. (1970). 馬の血液蛋白の多型に関する研究. 日畜会報, 41: 400-406.
- 14) 茂木一重. (1986). 野間馬に関する学術調査報告書, 4. 野間馬の血液型. 日本馬事協会. 東京.
- 15) Yokohama Mitinari, Watanabe Yasuko and Mogi Kazushige. (1985). A new equine transferrin phenotype detected by Isoelectric Focusing. Jpn. Zootech. Sci., 56: 116-121.
- 16) 横浜道成, 三浦信義, 茂木一重, 富田 武, 加藤勝久. (1979). 3. 集団における木曾馬の血液型多型. ABRI. 7: 42-45.
- 17) 横浜道成, 茂木一重, 小林悦子, 庄武孝義, 野沢 謙, 茂木一重. (1989). 馬の transferrin 型および esterase 型の分類. 日畜会報. 60: 115-120.
- 18) 横浜道成, 茂木一重. (1983). 等電点電気泳動法による馬 hemoglobin の多型. 日畜会報. 54: 794-797.
- 19) 桑島正夫, 阿部恒夫, 茂木一重, 細田達夫. (1981). 馬血清中の Gc 蛋白および Pa 蛋白の分類と遺伝並びにそれらの親子判定における有効性に関する研究. 日畜会報. 52: 17-21.
- 20) 野沢 謙 (1961). 家畜の集団における近親交配. 日畜会報 32: 65-73.
- 21) 野沢 謙, 庄武孝義 (1981). 日本在来馬の類型化について. p 57-65. 日本馬事協会.
- 22) 阿部恒夫 (1980). 血液型および蛋白質型から見た黒毛和種 2 集団の遺伝的変異性. 日畜会報 51: 311-368.