

2. サイエニティストからの提言

馬ゲノム研究の現状と展望

日本中央競馬会 競走馬総合研究所 生命科学研究室 主任研究役 **長谷川 晃久**

1. はじめに

最近、「ゲノム」(genome)という言葉をよく目にするようになりました。ゲノムとは生物が生まれ、育ち、生活するために必要な情報の集まりという意味で、「遺伝子」を意味する「gene」と「集まり」を意味する接尾語「-ome」から作られた造語です。「ゲノム」は人や馬、さらには植物や細菌などを含むあらゆる地球上の生物が、その細胞ひとつひとつの中に DNA という物質の形で持っているものです。「ゲノム」の DNA とは何をするものかという、たとえば馬の姿かたち、毛色など、親から子に遺伝するもの(遺伝形質)を伝える「情報の担い手」なのです。400年もの長い間、レースという実戦によって選抜を繰り返してきたサラブレッドが、優れた形質として先祖から受け継いだ能力は、もちろんこのゲノム DNA の中に秘められているといっても過言ではありません。

一方、世の中を眺めてみると、医学のみならずあらゆる生物学的分野において「ゲノム」の研究は必須のものとなっています。獣医畜産の領域でも、鶏、牛に続いて豚のゲノム解読が進められ、犬の全ゲノム解読も終了しています。ところが馬は、というと、これらの動物に比べると、やや遅れをとった感が否めません。それでも、国際協力のもとで馬の遺伝子地図を作製しようという、最初の会合がケンタッキー大学で開催されてから約 10 年が経ちました。そこでこの機会に、これまでの経過を振り返るとともに、最近の進捗状況についてご紹介しようと思います。

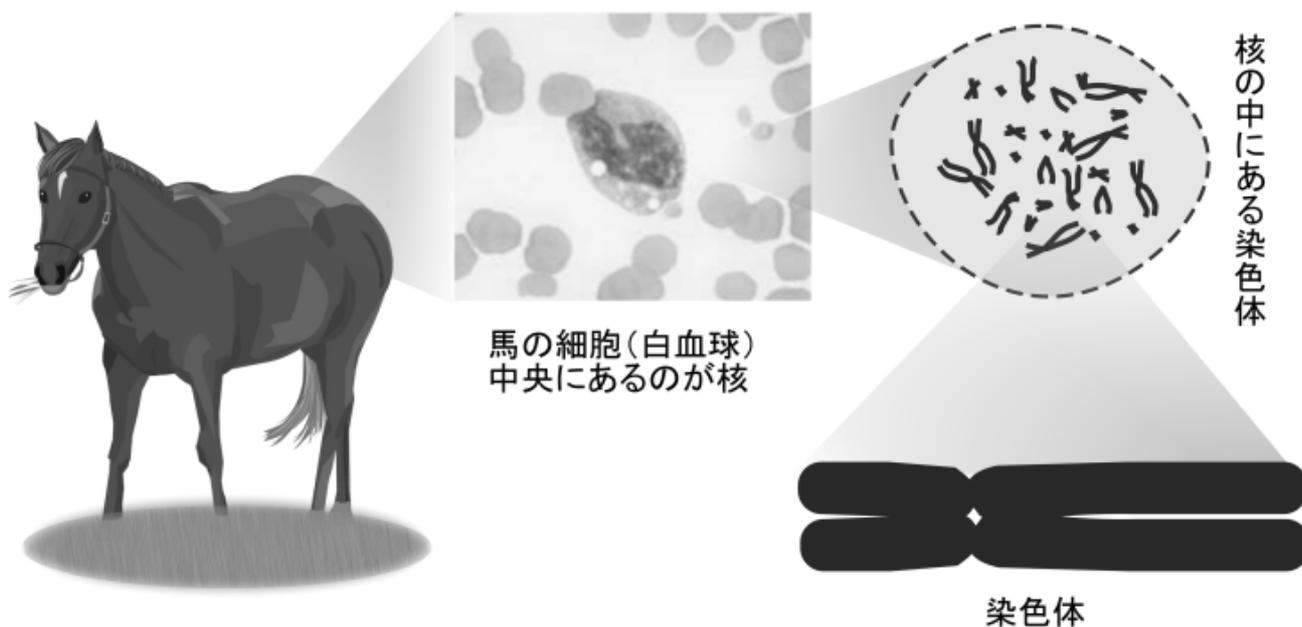


図1 核にある馬の遺伝子(DNA)は64本の染色体に分かれている。

2. きっかけは親子判定

馬をはじめとする動物の遺伝子を、普通の研究室で扱えるようになったのは、ここ 20 年ほどのことです。最初は、生理学や臨床、それに繁殖学などの専門家が、自分たちの分野で重要と思われる生理活性物質について、その合成や活性にかかわる酵素や蛋白質の遺伝子を研究したのが始まりです。しかし、ゲノム研究のように、生物の持つ遺伝子情報のすべてを同時に扱うような研究が始まったのは、人ゲノム解読のプロジェクトが始まったことと関係があります。特に馬の分野で、そうした取り組みを始めることになったのは、サラブレッドの血統登録制度と、それに伴い要求される親子判定に関係がありました。

サラブレッドの親子判定は従来、血液型、すなわち血球抗原型や血球蛋白質、血清蛋白質型をもとに行っていました。理論的にはおよそ三兆もの組み合わせがある血液型検査ですが、多型性の乏しいサラブレッドの世界では、父権否定率(無関係な馬をランダムに検査したときに誤った判定をしない理論上の確率)を 97%以上に向上させることができませんでした。また、血液型検査をするには、検査に必要な試薬として、例えば血球抗原に対する均質な抗体(血清)が必要ですが、これを将来にわたって大量かつ安定して確保ことは大変難しいとみられていました。

そこで、血統書統括機関であるサラブレッド国際血統書委員会 (ISBC) は 1990 年、血統登録に必要な親子判定法を血液型判定から DNA 型判定に変更することによって、判定精度の向上や経費の節減、将来に向けての安定した判定の実施が可能になることを期待し、その方法について国際動物遺伝学会 (ISAG) のサラブレッド比較同定常設委員会に対して科学的な助言を求めました。これを受けて各国の血液型検査機関と研究機関は馬の DNA 型判定法の開発に着手したのです。

3. DNA による親子判定

ゲノム DNA には、生死に関わるような形質を決める遺伝子の部分以外に、少々変異しても生存に影響しない部分や、遺伝情報を担っていないと考えられる、いわゆるジャンク DNA と呼ばれる部分がたくさんあります。このような場所には、A, C, G, T の 4 文字からなる DNA の暗号(塩基配列)に変異が蓄積し、いろいろな「型」を生じる、つまり「多型」となりやすいのです。というのも、形質を決める遺伝子に変異が生じると、病気になりやすかったりしますが、ジャンクの部分ならどの型でも生存力に影響しないからです。もうひとつ大切なことは、これら DNA の多型は長い間に蓄積した結果なので、親から子へ伝わる間に変異する可能性はほとんどありません。子馬の持っている DNA は、すべて父か母、いずれかのゲノムから伝えられたものですから、子馬が両親の持つ DNA 型以外を持っていた場合は、真の親子ではないと判定されるのです。

DNA の多型にはいろいろなものがありますが、最終的に選ばれたのが、2 塩基から 6 塩基程度の単純な塩基配列が繰り返す、マイクロサテライトと呼ばれる多型性マーカーです。マイクロサテライトは特殊な方法を使って、多型を小さな DNA の長さの違いとして検出することができます(図 2)。このマイクロサテライトを親子判定用のマーカーとして各国は競って開発しましたが、64 本ある馬の染色体の、どの染色体のどこにあるのか(座位)が不明なマーカーがほとんどでした。それまで、マーカー DNA を蛍光ラベルして染色体標本上で位置を決める FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) 法によって座位を決めることができたのは、日本のマーカーなど、ごく一部に過ぎませんでした。座位が不明なマーカーで親子判定を行うことは、親子判定法に必要な学問的裏付けが不十分だという考え方もあり、各国の研究機関はマーカーの座位を決定する必要を感じ始めました。

GAGAAGATGTGGTGCACACACACACACACACAATGGAATACTACT
GAGAAGATGTGGTGCACACACACACACACACAATGGAATACTACT
GAGAAGATGTGGTGCACACACACACACACAATGGAATACTACT
GAGAAGATGTGGTGCACACACACACACAATGGAATACTACT
GAGAAGATGTGGTGCACACACACAATGGAATACTACT

図2 マイクロサテライトDNAの多型

マイクロサテライトDNAは2から6塩基の繰り返し配列。

前後の配列は共通だが、繰り返し部分の繰り返し回数に違いがあり、いくつかの型に分けられる（多型性）。

4. 共同研究の始まり

1995年10月、アーネスト・ベイリー教授（ケンタッキー大）の呼びかけで、20カ国、25研究機関から約70名の研究者が集まって、馬ゲノム地図作製の共同研究について最初の会合が開かれました（図3）。この会議には、日本からはJRAの向山明孝先生（現日本獣医生命科学大学）と、国内で軽種馬の親子判定を行っている財団法人競走馬理化学研究所の三浦信義先生の2名が参加しました。

会議では、各国からそれぞれ異なった品種の馬家系試料を持ち寄り、全試料を分担してDNA型判定し、300個のマーカーが、31組の常染色体のどこにあるのか、また、なるべく均等に行き渡った平均間隔10cMの連鎖地図を作製することを最初の目標と決めました。その後、国際標準家系（ワークショップ家系）として、14頭の種雄馬から生まれた子馬と母馬の一部、全部で約500頭が採血され、DNAに精製して各研究機関に配布されたほか、従来法である血液型の解析も行われました。当初、1000個のマーカーを解析すれば、300個程度のマーカーがマップできると予測しましたが、実際、最初の3年間にマップできたマーカーの総数が300個弱でした。

共同研究では参加機関相互の情報交換を行うために、大部分のメンバーが参加するISAG大会（隔年開催）のほか、ISAGの開催がない年には米国のハヴェマイヤー財団（the Dorothy Russel Havemeyer Foundation）が資金を提供し、ワークショップを開催しています。



図3 第1回馬ゲノムワークショップ（1995年、レキシントン）

5. 染色体番号の統一

共同研究が始まった当時は、馬の染色体番号のつけ方は研究室により異なっており、染色体の呼び方を統一するためのイデオグラムを作る必要がありました。イデオグラムとは染色体の形と色素で染められたときに見える縞模様(バンドパターン)を模式的に表したものです。馬の染色体数は 64 本(31 対 + 性染色体)あり、ブタの 38 本やヒトの 46 本と比べてかなり多い上、よく似た染色体が何組かあって区別がつきにくいという特徴があります。そこで馬のイデオグラムを作るため、1995 年から 1997 年にかけて染色体の研究者が標本を持ち寄って討議を繰り返し、世界共通のイデオグラムを完成させました(図 4)。

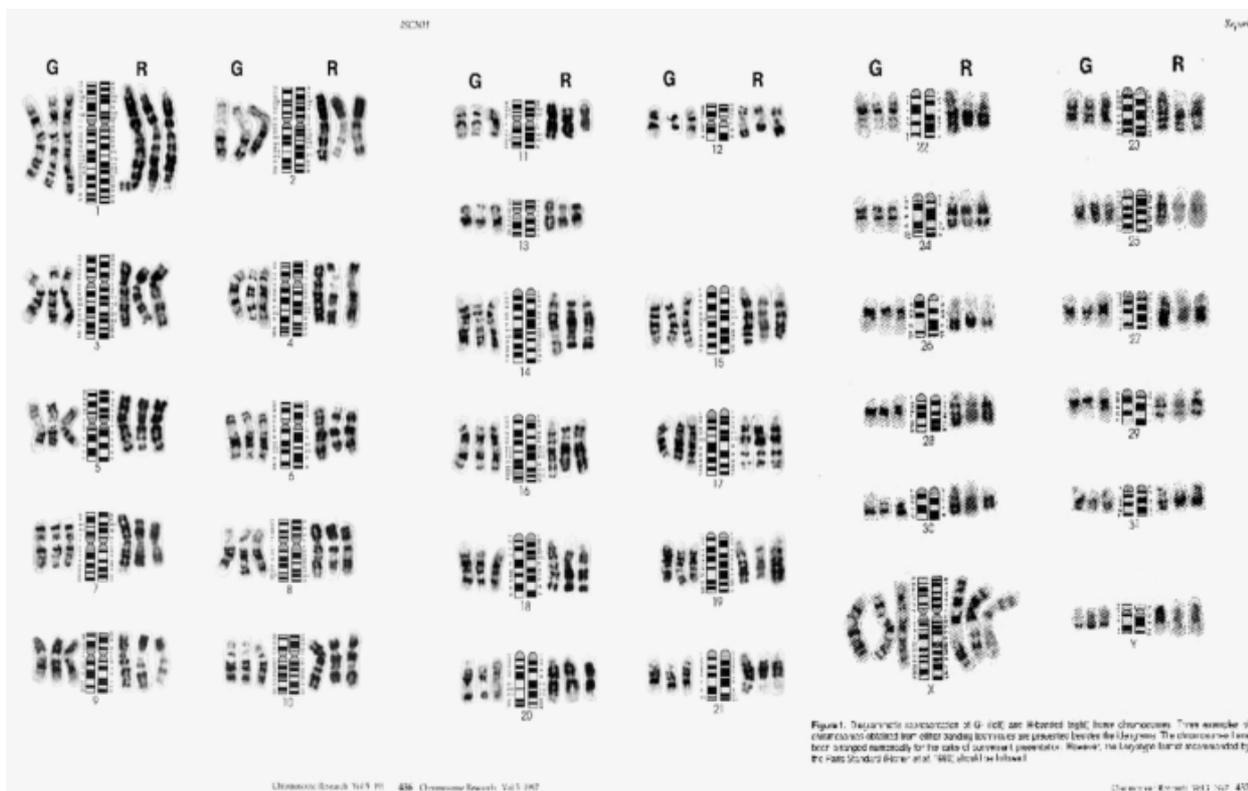


図 4 馬染色体イデオグラム Bowling ら (1997) から改変

6. その他の馬遺伝子地図

連鎖地図では、国際標準家系を使った父方半きょうだい家系連鎖地図のほかに、胚操作技術を使って得られた 84 個体からなるニューマーケット家系を用いた全きょうだい家系連鎖地図が加わり、さらに物理地図としてネズミの培養細胞と馬の細胞を融合させて、ネズミ細胞の中に残った馬染色体を調べる Somatic Cell Hybrid や、ハムスター細胞との融合に使う馬の細胞にあらかじめ放射線を照射しておく(こうすることで、馬の染色体がより小さな断片になる)RH 地図も作られました。特に RH 地図は詳細な地図作りに有効で、テキサス A&M 大学が中心になり、世界中の研究者が同じ DNA 試料を使った解析をしています。

7. 馬遺伝子地図の充実と活用

1998 年にスウェーデンのグループが最初の連鎖地図を報告して以来、マーカー数は年を追って増加し、平均距離も縮まっています。連鎖地図のマーカー数は、公表ベースでは 800 マーカー未満ですが、未公表のものを含めると 1000 マーカーを突破しました(表 1)。一方、RH 地図は多型性に頼る必要がないため、現在、約 3000 個のマーカーが載っています。

表 1 連鎖地図の充実

連鎖地図	連鎖群	染色体	マーカー数	合計距離 (cm)	平均距離 (cm)
Lindgren ら (1998)	25	18	100	679	12.6
Guerin ら (1999)	29	26	95	936	14.2
Swinburne ら* (2000)	42	32	334	1780	10.5
Guerin ら (2003)	34	31	310	2262	10.1
Penedo ら (2005)	31	31	766	3740	6.3
Swinburne ら* (2006)	32	32	745	2774	3.7

*印を付した連鎖地図は全きょうだい家系なので、X 染色体を含む

こうして充実しつつある地図を視覚化して表す方法としてカリフォルニア大学のグループがホームマップビューワーというツールを開発し、インターネットから利用できるようになりました。検索キーワードを入力するか、各染色体の絵をクリックすると目的の染色体が表示され、さらに表示する地図を初期の RH 地図、最新の RH 地図、2000 年頃の連鎖地図、最新の連鎖地図、そして FISH 地図などと指定して表示させることができます。

現在のところマーカーの密度が不足しており、連鎖解析で遺伝子まで辿りつくことは困難です。一般に連鎖地図として必要なマーカー数は 3000 から 5000 個と言われますが、マーカーすべてをあわせてもまだ 1000 個程度なので、まだまだ少なすぎます。2005 年のワークショップでは日本から 2400 個の新しいマーカーを報告しましたが、これを解析して、あと 2、3 年のうちにはなんとか 3000 マーカーの連鎖地図を手に入れたいと思っています。

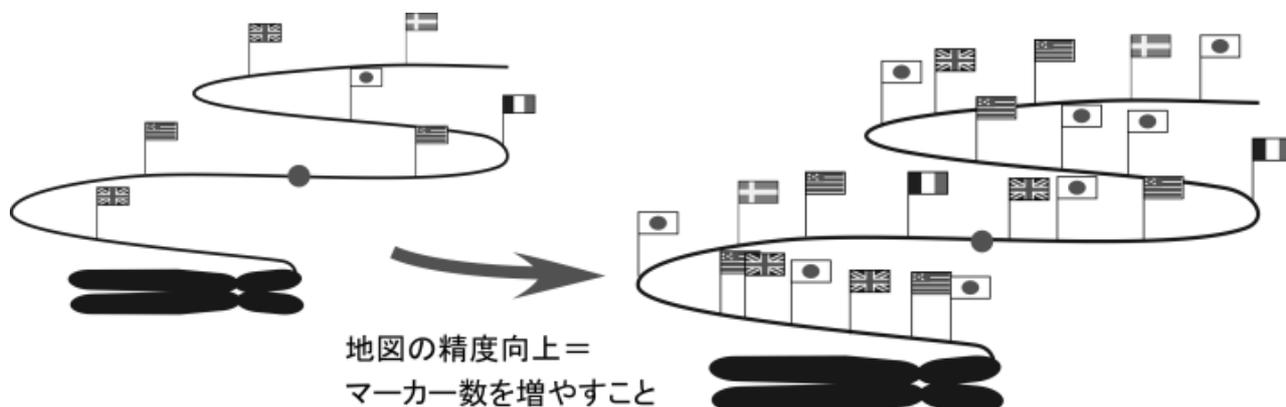


図 5 染色体上の位置を確認してマーカー配置する。

マーカーが多くなるほど精密な地図になり、細かい位置関係が詳しくわかるようになる。点()の所に病気の原因があることが左の粗い地図ではわからないとしても、右の地図ならみつける可能性が向上する。

8 . 今後の展開

これまでに、連鎖解析によって、毛色遺伝子のいくつかと疾病関連の遺伝子が同定され、クォーターホースなどでは遺伝子検査法として確立しているものもあります。アラブの免疫不全症や温血種の皮膚

疾患などについても、積極的に研究されているところです。現在、特に臨床研究者から遺伝子地図を使いたいというニーズが多く寄せられる一方、全ゲノム解読に向けた動きが活発になってきました。人や稲と同じように、ゲノム DNA の配列をすべて解読してしまおうというわけで、全ゲノムの塩基配列データは究極の物理地図と言うこともできます。また、馬の全ゲノム塩基配列データがあれば、馬専用のマイクロアレイを作製することができます。マイクロアレイは少量の試料で多数の遺伝子について同時に発現状況を調べる方法で、現在、臨床研究の基礎に欠かせない遺伝子発現解析法として、人や実験動物で多用されています。

2005 年のワークショップでも、馬の全ゲノム解読が議題の中心となり、予算措置に向けた白書を USDA と NIH に提出していますし、いくつかの準備作業を既に開始しています。また、コンソーシアムを設置し、10 名の運営委員の合議で今後の方針を決めることになりました。さらにこの原稿を書いている時点で、犬の全ゲノム解読を行ったアメリカのブロード研究所というところが、馬の全ゲノム解読を開始し、この夏までにはラフな解読作業を終了するという情報も入ってきました。事実だとすれば、今年から来年にかけては、大きな進歩が期待できるとともに、馬のゲノム研究が一大転換期を迎えるといっても過言ではないでしょう。

しかし、全ゲノム解読が終わっても、解読した塩基配列の意味や機能をすべて明らかにするには、さらに時間がかかります。人のゲノムデータでも、遺伝子としての体裁を持っていながら、それがどこで発現し、どのような機能を持っているのかわからないものが数多く残っているのです。また、人医学の世界でも全ゲノム解読後に改めて、生活習慣病や神経疾患などの連鎖解析に取り組んでいるところですし、前述のマイクロアレイを使って、様々な組織で遺伝子発現の網羅的な解析が進められています。応用研究、特に臨床応用に向けた研究ニーズに応えるためには、馬の能力や病気などの形質と遺伝子との関係を調べる必要があります、まだまだ連鎖解析をやめるわけにはいきません。今後さらに臨床データなどの集積を進め、遺伝子のデータと関係を調べていく必要があるのです。

参考文献

Bowling, A.T., *et al.* (1997) ISCNH. International system for cytogenetic nomenclature of the domestic horse. *Chromosome Res.* 5:443-453.

Shiue, Y-L., *et al.* (1999) A synteny map of the horse genome comprised of 240 microsatellite and RAPD markers. *Anim. Genet.* 30:1-10.

Kiguwa, S.L., *et al.* (2000) A horse whole-genome-radiation hybrid panel: Chromosome 1 and 10 preliminary maps. *Mammal. Genome* 11:803-805.

Penedo, M.C.T., *et al.* (2005) International equine gene mapping workshop report: a comprehensive linkage map constructed with data from new markers and by merging four mapping resources. *Cytogenet. Genome Res.* 111:5-15.

Swinburne, J.E., *et al.* (2006) Single linkage group per chromosome genetic linkage map for the horse, based on two three-generation, full-sibling, crossbred horse reference families. *Genomics* 87:1-29.

参考URL

<http://www.uky.edu/Ag/Horsemap/> 馬ゲノムプロジェクト

<http://www.vgl.ucdavis.edu/equine/caballus/> ホースマップビューワー