

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 15 年度博士課程進学

氏 名：桃沢 幸秀

指導教員名：森 裕司

論文題目 ウマの気質に関する行動遺伝学的研究

動物が外的な環境変化に適応的な対応を行おうとする場合、全ての個体が常に同一の方法を選択するわけではなく、実際に取られる対応方法には個体により大きな差異が認められることが多い。それぞれの個体が示す対応方法には、異なる状況下で受ける刺激の種類が違っていたとしても通常一定の一貫性が観察され、こうした個体毎に特異的な反応様式の基盤となる心理的・生理的傾向は気質と称される。そして気質の個体差は遺伝的要因と環境的要因の相互的作用により形作られると考えられている。

本研究は、ウマを研究モデルとして、気質の個体差を形成する遺伝的要因について検討することを目的としたものである。元来、ウマは騎乗者との意思疎通が十分になされてはじめて能力を発揮できることから、身体的形質に加えて気質も育種選抜の過程において重要な形質とみなされてきた特殊な家畜であるといえよう。しかしながら、気質の多様性あるいはその変容の遺伝学的背景に関する研究はきわめて少ないのが現状である。ウマの子は早成性であり比較的成熟した状態で誕生し飼育環境も比較的均一であることなど気質形成に与える初生期環境の影響がそれほど大きくないことから、気質の遺伝的要因を探るための研究モデルとして有利な点をもつことが予想される。

本研究は、ウマの気質を客観的に評価するための方法について検討するとともに、その遺伝的要因について候補遺伝子解析、候補染色体領域解析、およびゲノムワイド解析

という 3 種類の方法を用いて解析したものである。本論文は以下のように 6 章から構成されている。

第 1 章は総合緒言であり、気質の定義および気質に及ぼす遺伝的要因に関する先行研究について解説し、本論文の目的を述べた。

第 2 章では、ウマにおける適切な気質評価法の開発を目的として、個々の被験馬をよく知る厩務員が気質に関する質問について回答するアンケート調査および被験馬を新奇環境に導入して行動的・生理的反応を調べる行動実験という 2 種類の方法を並行して行い、両者の関連性について検討した。

第 1 節では、この 2 種類の方法による評価の関連を検討するため、馬事公苑（日本中央競馬会）で飼養されている 86 頭を対象として、8 項目から構成される気質評価アンケート調査を厩務員に対して行い、同時に被験馬にとって新奇環境となる覆い馬場において風船を新奇刺激とした行動実験を実施した。気質評価アンケート結果について因子分析を行ったところ 3 因子が抽出された。これらの因子のうち「不安傾向」をあらわすと考えられる因子 1 と、新奇環境下における心拍数変化と排糞回数の 2 項目の間に正の相関が認められた。「不安傾向」の高い動物が示すこのような行動的・生理的反応は、齧歯類など他の動物種においても報告されており、ウマにおける気質評価の指標としての有効性が示唆された。

第 2 節では、第 1 節の結果をもとに項目数を 20 に増やした気質評価アンケートを作成して調査を行い、評価者間の一貫性、因子構造の保存性、行動実験における反応の予見性といった各観点からの解析を通じて、その信頼性および妥当性を検討した。2 ヶ年にわたって、日高育成牧場（日本中央競馬会）に所属する 2 歳齢のサラブレッド計 139 頭を用い気質評価アンケートを実施した。その結果、評価者間での一貫性が認められ、また気質評価の実施時期（2002 および 2003 年度）に応じて 2 群に分け因子分析を行ったところ、抽出された 5 因子のうち 4 因子については両群に共通で保存されており、3 因子については高い内的一貫性が認められた。「不安傾向」を表す因子得点が高い個体ほど、新奇環境において隔離された際に心拍数の上昇が著しいという関係が認められたが、この結果は第 1 節の結果とよく一致した。

以上のことから、気質評価のためのアンケート調査方法の信頼性と妥当性が確認されるとともに、次章以降の遺伝学的解析に用いるための対象集団として、品種・年齢・飼育環境・調教状態などが均一で気質の評価も済んだ 100 頭以上の個体から構成される理想的な実験群を得ることができた。

第 3 章では、気質関連候補遺伝子として、主にモノアミン系に関連する 11 遺伝子を選択し、それぞれ翻訳領域の配列・多型・染色体部位について解析した。このうち塩基

配列が報告されていない9遺伝子については、ヒトと高い相同性を示す翻訳領域の配列および22個の一塩基多型(SNP)を同定した。また、Radiation hybrid mapping法を用い、10遺伝子の染色体部位を同定した。次いで第2章で用いたサラブレッド実験群の各個体について、SNPと気質との関連を解析した。

その結果、*dopamine receptor D4 (DRD4)* 遺伝子上に存在し、アミノ酸置換を伴うと考えられるSNP(A>G)に関して、AA・AGを持つ個体に比べGGを持つ個体では「好奇心」スコアが高いという関連性が認められた。このSNPが「好奇心」スコアの分散全体に占める割合(寄与率)は6.77%であった。*DRD4* 遺伝子の多型とヒトの「新奇探求性」との関連や*DRD4* 遺伝子欠損マウスにおける探索行動の低下が報告されていることなどを勘案すると、*DRD4* 遺伝子の変異が「新奇探求性」に何らかの影響を与えることは、哺乳類の種を越えて広く観察される現象であろうと推察された。

第4章では、競走馬としても重要な気質とされる「不安傾向」と関連が予想される染色体領域の解析を行った。ゲノムワイド解析からヒトの染色体1番長腕と8番短腕において「不安傾向」との関連が繰り返し示唆されている。このうち染色体1番長腕については、マウスの相同染色体部位に存在する*regulator of G-protein signalling 2 (Rgs2)* 遺伝子に存在する多型と「不安傾向」との関連が近年指摘されたことから、まずウマ*RGS2* 遺伝子の翻訳領域について塩基配列を決定し多型を探索したところ、アミノ酸置換を伴わない1つのSNPが同定された。このSNPについて各個体の遺伝子型を決定して解析したところ、雌雄のいずれにおいても遺伝子型間に類似した関係が認められたものの、その寄与率は1.32%にとどまり、ウマの*RGS2* 遺伝子に存在する多型が「不安傾向」に与える影響は小さいものであった。

一方、染色体8番短腕については、「不安傾向」との関連が示唆されている*neuregulin 1* 遺伝子周辺の9配列を抽出し、9配列内の多型を探索するとともに、「不安傾向」スコアが極端に高いあるいは低い雌雄それぞれ4頭ずつ計16個体を用いて、両極端のスコアをもつグループ間において多型の遺伝子型頻度を比較した。その結果、*steroidogenic acute regulator (STAR)* 遺伝子のイントロンに存在するSNP(C>T)頻度には両群間で差が示された。残りの個体についても遺伝子型を調べた結果、雌雄いずれにおいてもCC・TTを持つ個体に比べ、CTを持つ個体の「不安傾向」は低いことが判明し、この多型の「不安傾向」への寄与率は7.72%であった。以上の結果より、「不安傾向」の個体差を構成する分散全体のうち、第2章で明らかにされた性差(9.47%)および本章で明らかにされた2遺伝子の多型(*Rgs2*:1.32%, *STAR*:7.72%)により約20%については説明が可能であることが明らかとなった。

第5章では、「不安傾向」に関わる遺伝的要因について、ゲノムワイドな方法を用いて解析を行った。ウマでは遺伝子マーカーが少ないため、遺伝子マーカーを使わずに解

析できる Amplified Fragment Length Polymorphism 法を用いた。第 4 章と同じ両極端な「不安傾向」スコアをもつ 16 個体のゲノムサンプルについて、3299 個のバンドを解析した。209 個の多型バンドの中から、「不安傾向」スコアが両極端のグループ間において差が明瞭な 9 多型バンドに着目し解析を進めたところ、2 個についてはその配列を決定することができた。そのうちひとつは、チミンの挿入・欠失および制限酵素 EcoRI の認識部位内にある T>G の SNP により生じることが明らかとなったが、それぞれの多型については両極端のグループ間では差は認められなかった。もうひとつは、ヒト染色体 10q21 上の配列と相同性が高く TG を繰り返し単位とするマイクロサテライト（14 回、15 回、17 回、18 回）により生ずると考えられ、その多型バンドに一致する 18 回繰り返しを持つ個体はそれ以外の個体に比べて「不安傾向」スコアが高い傾向が認められ、その寄与率は 1.79%となった。

第 6 章では、総合考察を行った。本研究から、(1) ウマの気質評価法として被験馬をよく知る厩務員が評価するアンケート調査方法の信頼性が示され、その評価を外的基準とした遺伝的解析の妥当性が確認された。また、(2) ウマの気質のうち「好奇心」の個体差の約 7%については *DRD4* 遺伝子におけるアミノ酸置換を伴う SNP、また「不安傾向」の約 8%については *STAR* 遺伝子のイントロンに存在する SNP により、それぞれ説明が可能であることが示唆された。本研究で得られた知見をもとに、アンケート調査と行動実験の 2 種類の方法を組み合わせながら改善していくことで、ウマの多様な気質項目についてより正確な評価を可能とする気質評価系が構築されていくことが期待される。また、本研究で気質との関連が示唆された *DRD4* 遺伝子及び *STAR* 遺伝子の多型が気質におよぼす影響のメカニズム解明とともに、他の遺伝的要因についても「不安傾向」に関わるものを中心に解析が進められていく必要があると考えられる。