

## トカラ馬血液の蛋白質多型現象について

小山田 巽・橋口 勉\*・前田芳実\*  
武富萬治郎\*

(学内農場・\*家畜育種学研究室)

昭和53年9月9日 受理

### On the Blood Protein Polymorphism in Tokara Horses

Tatsumi OYAMADA, Tsutomu HASHIGUCHI\*, Yoshizane MAEDA\* and Manjiro TAKETOMI\*  
(Campus Farm, \*Laboratory of Animal Breeding)

#### 緒 言

トカラ馬の形態的特徴に関する研究は、これまで毛色<sup>20)</sup>、馬体各部の体尺測定<sup>21)</sup> および解剖学的観察<sup>10)</sup>がなされている。また生化学的特徴については血液型<sup>20)</sup> (Pf<sub>2</sub>, Pf<sub>3</sub>, U<sub>1</sub>, U<sub>2</sub> および U<sub>3</sub> 各抗原の有無) に関する分析が行われている。他方、日本在来馬の系統および来歴を知るための研究の一環としてトカラ馬について、東亜あるいはヨーロッパ諸地域馬と対比しながら行った系統発生的研究<sup>11,12,21)</sup>もある。

本研究では、トカラ馬の遺伝生化学的特徴を明らか

にするために、まず血漿や赤血球に含まれる酵素蛋白質の多型現象を明らかにし、さらに集団における遺伝子構成を推定する目的で、酵素蛋白質型を支配する遺伝子を標識として表現型分布や遺伝子頻度について分析を行った。またトカラ馬の集団における遺伝的変異性の量を推定するために、多型遺伝子座の割合、個体当りのヘテロ接合体となる期待確率および座位当り対立遺伝子の有効数を定量した。

#### 材料および方法

本研究に供試したトカラ馬は、血液の採取が可能な

Table 1. List of blood proteins examined

Abbreviation	Name of blood protein	Cited from
PA	Plasma prealbumin	Gahne <sup>7)</sup>
Alb	Plasma albumin	Mogi et al. <sup>19)</sup>
Tf	Plasma transferrin	Mogi et al. <sup>19)</sup>
Hp	Plasma haptoglobin	Ishimoto. <sup>16)</sup>
$\alpha_2$	Plasma slow- $\alpha_2$ -macroglobulin	Mogi et al. <sup>19)</sup>
Cp	Plasma ceruloplasmin	Imlah <sup>15)</sup>
Es	Plasma non-specific esterase	Gahne <sup>7)</sup>
Ch	Plasma cholinesterase	Gahne <sup>7)</sup>
LAP	Plasma leucine aminopeptidase	Scandalios <sup>23)</sup>
Hb- $\alpha$	$\alpha$ -hemoglobin	Chernoff and Pettit <sup>6)</sup>
Hb- $\beta$	$\beta$ -hemoglobin	Chernoff and Pettit <sup>6)</sup>
PHI	Erythrocyte phosphohexose isomerase	Detter et al. <sup>6)</sup>
PGD	Erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase	Bengtsson and Sandberg <sup>3)</sup>
PGM	Erythrocyte phosphoglucomutase	Bengtsson and Sandberg <sup>2)</sup>
Dia	Erythrocyte NADH-diaphorase	Hopkinson et al. <sup>13)</sup>
Acp	Erythrocyte acid phosphatase	Karp and Sutton <sup>17)</sup>
MDH	Erythrocyte malate dehydrogenase	Shotake and Nozawa <sup>27)</sup>
LDH-A	Erythrocyte lactate dehydrogenase A	Shotake <sup>26)</sup>
LDH-B	Erythrocyte lactate dehydrogenase B	Shotake <sup>26)</sup>
Cell Es	Erythrocyte esterase	Shaw and Prasad <sup>25)</sup>
TO	Erythrocyte tetrazolium oxidase	Baur and Schorr <sup>1)</sup>
AK	Erythrocyte adenylate kinase	Bowman and Ronaghy <sup>4)</sup>
Es D	Erythrocyte esterase D	Hopkinson et al. <sup>14)</sup>

本学附属入来牧場で飼養中のトカラ馬10頭を用いた。採血した血液は通常の方法にしたがって血漿と赤血球とに分離し、これらを材料として電気泳動法を用いて酵素蛋白質型の分析を行った。標識として用いた酵素蛋白質の種類は Table 1 に示したとおりである。電気泳動法については、Table 1 に引用されている諸文献に記載されている方法に従って行った。

遺伝的変異性の量の推定は Nozawa et al.<sup>21)</sup>の方法に従ったが、その方法はつぎのとおりである。

1) 多型遺伝子座の割合

$$Ppoly \pm S.E.$$

この場合、1 座位において最高頻度をもつ対立遺伝子の頻度が0.99を越えない場合、その座位は多型的であると定義する。

2) 個体当りヘテロ接合体となる期待確率

$$\bar{H} = 1 - \sum q_i^2$$

$q_i$ : ある遺伝子座における第  $i$  対立遺伝子の頻度を示す。

3) 座位当り対立遺伝子の有効数

$$Nc = 1 / \sum q_i^2$$

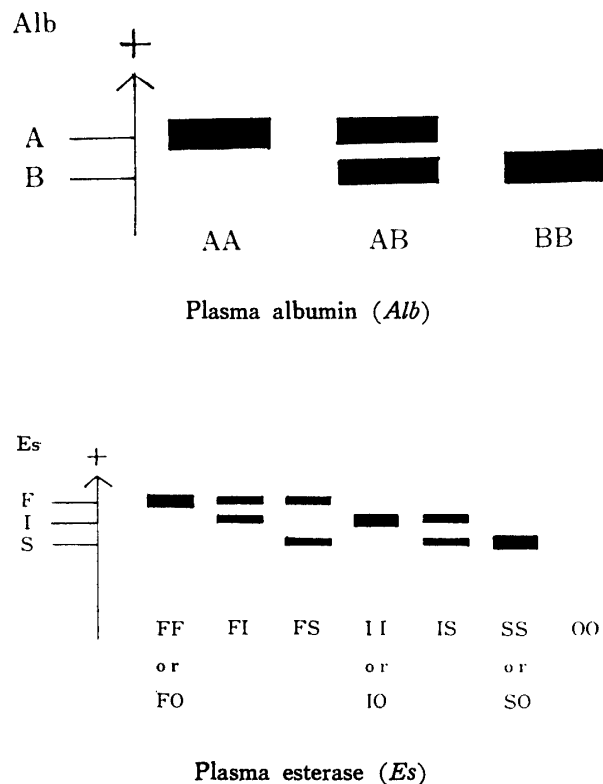


Fig. 1. Electrophoretic patterns of plasma albumin and esterase isozyme in Tokara horses.

結果ならびに考察

トカラ馬の赤血球および血漿に含まれる23種の酵素蛋白質について、電気泳動法により分析を行った結果、血漿アルブミン (*Alb*)、血漿エステラーゼ (*Es*)、赤血球ホスグルコムターゼ (*PGM*) およびヘモグロビン- $\alpha$  (*Hb-2*) について多型が検出された。しかし他の酵素蛋白質においては多型は認められず、すべて monomorphic であった。多型が検出された酵素蛋白質の表現型は、Fig. 1 および Fig. 2 に示したとおりである。

つぎに赤血球および血漿に含まれる酵素蛋白質の23座位について、表現型分布と遺伝子頻度を推定した。その結果は Table 2 および Table 3 のとおりである。

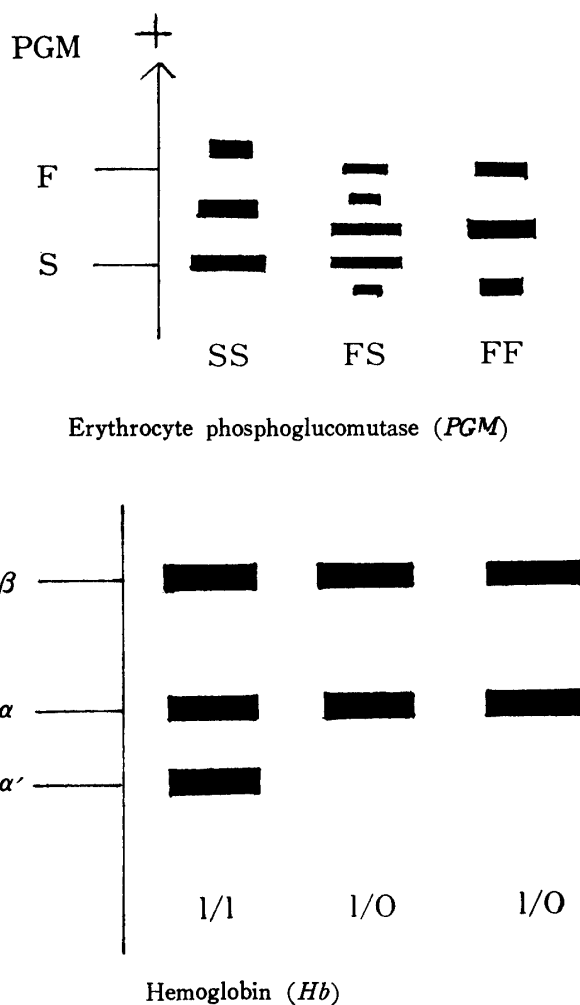


Fig. 2. Electrophoretic patterns of erythrocyte phosphoglucumutase isozyme and hemoglobin in Tokara horses.

Table 2-A. Phenotypic distribution and gene frequencies of plasma albumin and esterase loci of Tokara horses in Iriki Livestock Farm, Kagoshima University

No. of horses	Albumin				Esterase										
	Phenotypes			Gene frequencies		Phenotypes					Gene frequencies				
	AA	AB	BB	Alb <sup>A</sup>	Alb <sup>B</sup>	FF	FI	FS	II	SS	OO	Es <sup>F</sup>	Es <sup>I</sup>	Es <sup>S</sup>	Es <sup>O</sup>
10	3	7		0.15	0.85	5	4		1			0.70	0.30		

Table 2-B. Phenotypic distribution and gene frequencies of the various plasma protein loci of Tokara horses in Iriki Livestock Farm

No. of horses	Transferrin		Leucine aminopeptidase		Ceruloplasmin		Slow- $\alpha_2$ -macroglobulin		Cholinesterase		Prealbumin		Haptoglobin	
	EE	Tf <sup>F</sup>	AA	LAP <sup>A</sup>	AA	Cp <sup>A</sup>	AA	$\alpha_2$	AA	Ch <sup>A</sup>	2-2	PA <sup>2</sup>	AA	Hp <sup>A</sup>
10	10	1.00	10	1.00	10	1.00	10	1.00	10	1.00	10	1.00	10	1.00

Table 3-A. Phenotypic distribution and gene frequencies of the various erythrocyte protein loci of Tokara horses in Iriki Livestock Farm

No. of horses	Phosphoglucumutase				Hemoglobin				Acid phosphatase		Phosphohexose isomerase		Lactate dehydrogenase A		
	Phenotypes			Gene frequencies	Gene frequencies										
	FF	FS	SS	PGM <sup>F</sup>	PGM <sup>S</sup>	1/1	1/0	Hb- $\alpha^1$	Hb- $\alpha^0$	AA	Acp <sup>A</sup>	1-1	PHI <sup>1</sup>	1-1	LDH-A <sup>1</sup>
10	1	5	4	0.35	0.65	7	3	0.45	0.55	10	1.00	10	1.00	10	1.00

Table 3-B. Phenotypic distribution and gene frequencies of the various erythrocyte protein loci of Tokara horses in Iriki Livestock Farm

No. of horses	Lactate dehydrogenase B		NADH-diaphorase		Malate dehydrogenase		Adenylate kinase		Erythrocyte esterase		6-phosphogluconate dehydrogenase		Tetrazolium oxidase		Esterase D	
	1-1	LDH-B <sup>1</sup>	AA	Dia <sup>A</sup>	1-1	MDH <sup>1</sup>	1-1	AK <sup>1</sup>	1-1	Cell Es	AA	PGD <sup>A</sup>	1-1	TO <sup>1</sup>	1-1	Es-D <sup>1</sup>
10	10	1.00	10	1.00	10	1.00	10	1.00	10	1.00	10	1.00	10	1.00	10	1.00

すなわち, *Alb* 型に関しては *Alb<sup>B</sup>* の頻度 (0.85) が *Alb<sup>A</sup>* の頻度 (0.15) よりも高かった。つぎに, 血漿エステラーゼアイソザイム (*Es*) では, *Es<sup>F</sup>* の頻度 (0.70) が *Es<sup>I</sup>* の頻度 (0.30) に比して高かったが, 本研究に供試した本学附属入来牧場のトカラ馬においては, *Es<sup>S</sup>* および *Es<sup>O</sup>* の存在は認められなかった。ホスホグルコムターゼアイソザイム (*PGM*) では, *PGM<sup>S</sup>* の頻度 (0.65) が *PGM<sup>F</sup>* (0.35) よりも高く, さらにヘモグロビン型 (*Alb- $\alpha$* ) では *Hb- $\alpha^0$*  の頻度 (0.55) が *Hb- $\alpha^1$*  (0.45) よりも高いことが明らかとなった。しかし, はかの19座位の酵素蛋白質型はすべて monomorphic で遺伝子頻度は, それぞれ1.00を示した。

以上述べた電気泳動法によってとらえられる蛋白質の1次構造の変異を, トカラ馬全遺伝子プールからの無作為標本とみなして, 本学附属入来牧場で飼養されているトカラ馬集団での遺伝的変異性を定量した。尺度として多型遺伝子座の割合 (Ppoly), 個体当りのヘテロ接合体となる期待確率 ( $\bar{H}$ ) および座位当り対立遺伝子の有効数 (*Nc*) の3つを使用した。その結果は, つぎのとおりである。

$$P_{poly} = 0.1739 \pm 0.0790$$

$$\bar{H} = 0.0706$$

$$Nc = 1.076$$

遺伝的変異性は一般に無脊椎動物では高く, 脊椎動物では低い傾向がみられるが, 野生動物の地域集団で

は、Ppoly の値は 0.20~0.40,  $\bar{H}$  の値は 0.05~0.15 程度となり、これらの値はその種の分類学的位置にかかわらず、特殊の生態的条件下に生息するもの以外は、大体一定の値をとることが知られている (Selander et al.<sup>20</sup>)。また Nozawa et al.<sup>21</sup> はトカラ馬を含めた東アジアの在来馬と西欧系の競争馬について同じ方法で分析した結果、トカラ馬では他の馬種に比して低い値 (Ppoly=0.1428±0.0763;  $\bar{H}$ =0.0349; Nc=1.05) を示した。しかしトカラ馬以外の馬種では、Ppoly=0.33~0.48,  $\bar{H}$ =0.10~0.17 および Nc=1.22~1.33 の値が得られたが、これらの統計量は野生動物で得られている値と同じレベルか、あるいはそれよりやや高いレベルの値を示したことを報告している。さらに種々の動物について蛋白質レベルから遺伝的変異性を定量した報告<sup>18)</sup>では、ヒト (71 遺伝子座) : Ppoly=0.28; ハツカネズミ *Mus musculus musculus* (41 遺伝子座) : Ppoly=0.29; イエネズミ *Mus musculus domesticus* (41 遺伝子座) : Ppoly=0.20; キイロシヨウジヨウバエ *Drosophila melanogaster* (19 遺伝子座) : Ppoly=0.42; ウスグロシヨウジヨウバエ *Drosophila pseudo-obscura* (24 遺伝子座) : Ppoly=0.43; カブトガニ *Limulus polyphemus* (25 遺伝子座) : Ppoly=0.25 で結局ヒトやネズミのような脊椎動物では、Ppoly=0.20~0.29 を示し、またシヨウジヨウバエのような無脊椎動物では Ppoly=0.42~0.43 と脊椎動物より高い値を示すことが報告されている。

本研究で得られたトカラ馬の遺伝的変異性の量は、Nozawa et al. の報告したトカラ馬の値とほぼ同じ値を示したが、Selander et al. や Lewontin による種々の動物や Nozawa et al. の東アジアおよび西欧系の競争馬の値より低い値が得られた。このようにトカラ馬における遺伝的変異性の量が、他の種々の動物とくに他馬種に比して低いことの理由としては、第 1 にトカラ馬が他の品種と交雑されることなく、宝島などの離島で隔離された状態で同系交配により繁殖保存されてきたこと、第 2 にこのような閉鎖集団での繁殖が近交係数の上昇をもたらし、その結果として遺伝的変異性の値が低くなったものと考えられよう。

元来トカラ馬は、1897年 (明治30年) 頃に、まだ産馬改良のなされていなかった喜界島から宝島に10数頭導入されたものが起源となり、それ以後外来種を混ざることなく、また移出をすることもなく、離島故に閉鎖された状態で世代を重ねてきたものである。宝島に飼養されていたトカラ馬の頭数の最も多かった1943年 (昭和18年) 頃でも100頭内外に過ぎなかったといわれ

(林田・山内<sup>22</sup>)。現在鹿児島県下におけるトカラ馬の総飼養頭数は、鹿児島郡十島村の中之島、揖宿郡開聞町の開聞山麓自然公園、本学学内農場および本学附属入来牧場で飼養されている分を合わせて65頭 (1978年8月現在) であるが、これらのトカラ馬の起源はすべて宝島で飼養されていたものであることが判明している<sup>22</sup>。

トカラ馬が、かつて宝島で隔離された状態で飼養され、以後鹿児島県内の各地で飼養されるようになったとはいえ、これまで他品種と交雑されることなく純粋に維持されてきた結果として、遺伝子頻度の機会的変動、機会的固定、すなわち遺伝的浮動 (genetic drift) が起こり、それが現在みられるような遺伝子構成をもたらしたものと考えられる。

現在の本学附属入来牧場におけるトカラ馬の集団は、1頭の優占雄にともなわれた成雌4頭、仔雄3頭、仔雌1頭の第1グループと、成雌2頭、成駒1頭の第2グループおよび成雄1頭のみを計3つのグループから成立っているが、繁殖は現在第1のグループによって行われている。一般に閉鎖集団における近交係数 (F) は、次式によって高められることが知られている (Wright<sup>23</sup>)。

$$F = \frac{1}{8S} + \frac{1}{8D}$$

ただし S: 種雄畜数

D: 種雌畜数

上述した本学附属入来牧場におけるような、毎世代1頭の種雄馬のみを使用する閉鎖集団においては、1世代当り12.5%以上の近交係数の上昇が予想され、この結果が遺伝的変異性の値を低くする主因とみなすことができよう。

## 摘 要

本研究は、本学附属入来牧場で飼養中のトカラ馬について、血漿および赤血球に含まれる酵素蛋白質型を標識として表現型分布と遺伝子頻度を推定した。さらに集団における遺伝的変異性の量を推定するために、多型遺伝子金の割合 (Ppoly)、個体当りのヘテロ接合体となる期待確率 ( $\bar{H}$ )、および座位当り対立遺伝子の有効数 (Nc) を定量した。

1) 23座位の酵素蛋白質型について電気泳動法を用いて分析を行った結果、血漿アルブミン (Alb)、血漿エステラーゼ (Es)、赤血球ホスホグルコムターゼ (PGM) およびヘモグロビン (Hb- $\alpha$ ) の4座位について多型が検出された。しかしながら、他の19座位では

多型は認められず、すべて monomorphic であった。

2) 遺伝子頻度を推定した結果,  $Alb^A$  0.15,  $Alb^B$  0.85;  $Es^F$  0.70,  $Es^I$  0.30;  $PGM^F$  0.35,  $PGM^S$  0.65および  $Hb-\alpha^{11}$  0.45,  $Hb-\alpha^0$  0.55 であった。

3) 以上の結果をもとに、トカラ馬の集団における遺伝的変異性を定量した結果、下記のような値が得られた。

$$Ppoly=0.1739 \pm 0.0790$$

$$\bar{H}=0.0706$$

$$Nc=1.076$$

本研究の電気泳動法による血液酵素蛋白質の分析についてご便宜をいただいた京都大学霊長類研究所野澤 謙教授、およびご援助をいただいたトカラ馬保存会に深く感謝の意を表す。

## 文 献

- 1) Baur, E.W. and Schorr, R.T.: Genetic polymorphism of tetrazolium oxidase in dogs. *Science*, **166**, 1524-1525 (1969)
- 2) Bengtsson, S. and Sandberg, K.: Phosphoglucomutase polymorphism in Swedish horses. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.*, **3**, 115-119 (1972)
- 3) Bengtsson, S. and Sandberg, K.: A method for simultaneous electrophoresis of four horse red cell enzyme system. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.*, **4**, 83-87 (1973)
- 4) Bowman, J.E. and Ronaghy, H.: Hemoglobin, glucose-6-phosphate dehydrogenase, phosphogluconate dehydrogenase and adenylate kinase polymorphism in Moslems in Iran. *J. Phys. Anthropol.*, **27**, 119-123 (1967)
- 5) Chernoff, A.I. and Pettit, N.M.: The amino acid composition of hemoglobin. III. A qualitative method for identifying abnormalities of the polypeptide chains of hemoglobin. *Blood*, **24**, 750-756 (1964)
- 6) Detter, J.C., Ways, P.O., Giblett, E.R., Baughan, M.A., Hopkinson, D.A., Povey, S. and Harris, H.: Inherited variations in human phosphohexose isomerase. *Ann. Hum. Genet.*, **31**, 329-338 (1968)
- 7) Gahne, B.: Studies on the inheritance of electrophoretic forms of transferrins, albumins, prealbumins and plasma esterase of horses. *Genetics*, **53**, 681-694 (1966)
- 8) 林田重幸・山内忠平:九州在来馬の研究. I. トカラ馬について. 日畜会報, **26**, 231-236 (1955)
- 9) Hayashida, S. and Yamauchi, C.: Studies on the Tokara pony. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **2**, 7-15 (1956)
- 10) 林田重幸・山内忠平:トカラ馬の解剖学的観察特にアラブとの比較において. 鹿大農学術報告, **No.5**, 75-84 (1956)
- 11) 林田重幸・山内忠平:九州在来馬の研究. III. トカラ馬と東亞諸地域馬との比較. 日畜会報, **27**: 183-189 (1956)
- 12) 林田重幸:本邦家畜の起源と系統. 日本民族と南方文化. 375-402 (1968)
- 13) Hopkinson, D.A., Corney, G., Cook, P.J.L., Robson, E.B. and Harris, H.: Genetically determined electrophoretic variants of human red cell NADH diaphorase. *Ann. Hum. Genet.*, **34**, 1-10 (1970)
- 14) Hopkinson, D.A., Mestriner, M.A., Cortner, J. and Harris, H.: Esterase D: a new human polymorphism. *Ann. Hum. Genet.*, **37**, 119-137 (1973)
- 15) Imlah, P.: Inherited variants in serum ceruloplasmin of the pig. *Nature*, **203**, 658-659 (1964)
- 16) Ishimoto, G.: Blood protein variations in Asian macaques. 1. Serum proteins and hemoglobin. *J. Anthropol. Soc. Nippon*, **80**, 250-274 (1972)
- 17) Karp, G.W. and Sutton, H.E.: Some new phenotypes of human red cell acid phosphatase. *Amer. J. Hum. Genet.*, **19**, 54-62 (1967)
- 18) Lewontin, R.C.: *The genetic basis of evolutionary change*. p. 95-157, Columbia University Press, New York and London (1974)
- 19) Mogi, K., Abe, T. and Hosoda, T.: Studies on serum protein types in horses. 1. Classification and inheritance of serum transferrin and serum albumin types, and efficacy of their typing in determining of doubtful parentage. *Jap. J. Zootech. Sci.*, **41**, 400-406 (1970)
- 20) 野澤 謙・江崎孝三郎・若杉 昇・林田重幸:日本在来家畜に関する遺伝学的研究. I. 島嶼型在来馬の遺伝子構成. 日畜会報, **36**, 233-242 (1965)
- 21) Nozawa, K., Shotake, T. and Ohkura, Y.: Blood protein variations within and between the east Asian and European horse populations. *Z. Tierzüchtg. Züchtgsbiol.*, **93**, 60-74 (1976)
- 22) 小山田 巽・橋口 勉・柳田宏一・武富萬治郎:トカラ馬の飼養概要および体尺測定. 鹿大農学術報告, **No. 29**, 9-106 (1979)
- 23) Scandalios, G.: Tissue specific isozyme variations in maize. *J. Hered.*, **55**, 281-285 (1964)
- 24) Selander, R.K., Yang, S.Y., Lewontin, R.C. and Johnson, W.E.: Genetic variation in the horseshoe crab (*Limulus polyphemus*), a phylogenetic "relic". *Evolution*, **24**, 402-414 (1970)
- 25) Shaw, C.R. and Prasad, R.: Starch gel electrophoresis of enzymes-A compilation of recipes. *Biochem. Genet.*, **4**, 297-320 (1970)
- 26) Shotake, T.: Genetic polymorphisms in blood proteins in troops of Japanese macaques, *Macaca fuscata*. II. Erythrocyte lactate dehydrogenase polymorphism in *Macaca fuscata*. *Primates*, **15**, 297-303 (1974)
- 27) Shotake, T. and Nozawa, K.: Genetic polymorphisms in blood proteins in troops of Japanese macaques, *Macaca fuscata*. 1. Cytoplasmic malate dehydrogenase polymorphism in *Macaca fuscata* and other non-human primates. *Primates*, **15**, 219-226 (1974)
- 28) Wright, S.: Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, **16**, 97-159 (1931)

### Summary

Phenotype distribution and gene frequencies of Tokara horses maintained in Kagoshima University were assumed, using protein polymorphism in plasma and erythrocyte as markers. Furthermore, proportion of polymorphic loci ( $P_{poly}$ ), expected proportion of heterozygosis per individual ( $\bar{H}$ ) and effective number of alleles per locus ( $N_c$ ) were assayed, to estimate genetic variabilities in population.

Of 23 loci analysed by electrophoresis, polymorphism was detected on 4 loci; plasma albumin (Alb), plasma esterase (Es), erythrocyte phosphoglucomutase (PGM) and hemoglobin (Hb- $\alpha$ ). Other 19 loci were monomorphic and no polymorphism was seen.

PGM locus in erythrocytes appeared with three phenotypes; FF, FS and SS. The gene frequencies were  $PGM^F$  as 0.35 and  $PGM^S$  as 0.65. Hb- $\alpha$  locus showed two phenotypes: 1/1 and 1/o. The gene frequencies were Hb- $\alpha^A$  as 0.45 and Hb- $\alpha^O$  as 0.55. Es locus showed three phenotypes, FF, EI and II, with the following gene frequencies:  $Es^F$  as 0.70 and  $Es^I$  as 0.30. Alb locus was represented by two phenotypes AB and BB with the following gene frequencies:  $Alb^A$  as 0.15 and  $Alb^B$  as 0.85.

From these results, genetic variabilities in the population of Tokara horses in Kagoshima University were assumed, as follows;

$$P_{poly}=0.1739\pm 0.0790, \bar{H}=0.0706, \text{ and } N_c=1.076.$$