

令和5年2月24日

## 令和4年度 共同研究報告書

研究代表者： 高須 正規

1. 研究課題名	日本語表記：御崎馬の保全に関する研究 英語表記：Study on conservation of feral Misaki horses		
2. 研究期間	令和4年4月1日～令和5年3月31日		
3. 共同研究者	氏名	機関・所属部署名	職名
	戸崎晃明	競走馬理化学研究所 遺伝子分析部	上席調査役
	秋田 優	串間市 商工観光スポーツランド推進課 エコツーリズム推進室	主査
	加藤大輝	岐阜大学応用生物科学部	学生
	小林郁雄	宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター 畜産 研究・支援部門	准教授
4. 研究目的	<p>申請研究は、日本在来馬において唯一の「国の天然記念物」である御崎馬の持続可能な保存を最終的な目的とする。申請研究では、2019-2021年度に生まれた仔馬に続き、2022年度に生まれた御崎馬仔馬のマイクロサテライトタイピングならびにその解析を行った。これにより、科学的根拠に基づく御崎馬の血統管理体制の構築を一步進めた。また、御崎馬のマイクロサテライトを解析することで、その集団の遺伝的多様性（ヘテロ接合率や平均アレル数）評価ならびに集団の遺伝構成のモニタリングをすすめた。さらに、御崎馬のゲノムサンプルを保存し、将来、何らかの遺伝性疾患発生した場合の対策や御崎馬を特徴づけるターゲット遺伝子の解析のための遺伝子バンクとした。</p>		
5. 研究内容・成果	<p>10月に開催された馬迫に参加し、御崎馬(13頭の新生個体サンプル)から血液を採取した。翌日、リサーチセンターで採取した血液を遠心し、 Buffyコート を分離した。分離した Buffyコート を岐阜にてDNAを抽出し、解析サンプルとした。なお、さらなる御崎馬の保全遺伝学的な研究へ活用するために、このDNAサンプルを将来的な遺伝子バンクとして保存した。</p> <p>得られたDNAを共同研究者 戸崎博士の所属する競走馬理化学研究所で解析した。マイクロサテライトをタイピングした(添付資料)。データを使用し、血統登録を進めた。</p> <p>これまでのデータから、御崎馬の世代交代は4.56年であることが分かっている。申請研究を開始した2018年に生まれた個体の孫馬が生まれるのは2027年であることから、本研究の第一目標である「御崎馬における血統書作成」を達成するためには、あと5年程度、申請研究を継続する必要がある。</p> <p>また、御崎馬は世代交代が極めて速く、約5年間で約半数が入れ替わる。また御崎馬の数ならびに遺伝的多様性は都井岬が馬を飼養できる環境に依存しており、何らかの要因で飼養馬数と環境要因のバランスが崩れてしまうと、御崎馬の遺伝的多様性は急激に減少する。これらのことから、脆弱性のある御崎馬においては、その遺伝的構成の変化を継続してモニタリングすることが重要である(投稿準備中論文の内容)。</p> <p>申請者らが進めている本事業内容が日本馬事協会主催の全国在来馬会議で話題となった。各在来馬関係者から、地元の宮崎大学が御崎馬の保存に協力的であることに賞賛があった。</p>		

※ 必要に応じて、枠を広げて記載してください。

6. 成果となる論文・学会発表等

(※参考となる資料を添付してください。)

Ikuo Kobayashi, Ibuki Saito, Masaru Akita, Teruaki Tozaki, Masamichi Miyazaki, Kotonon Nakamura, Kazuki Hano, Masaki Takasu. Changes in population structure and genetic diversity of the Misaki horses between 2015 and 2020. JVMS 投稿予定 (英文校閲中論文を添付)

7. 産業動物防疫リサーチセンターへ訪問した回数

(例)	氏名	職名等	国籍	訪問回数・合計日数	訪問時期
		高須正規	准教授	日本	1回・3日
	加藤大輝	学生	日本	1回・2回	10月

8. 利用した設備・施設等 ※必要に応じ様式の追加・削除可。

施設

室名	動物種	飼育数	期間
BSL 3 施設			
獣医棟 P 2 動物実験室			
教育棟 P 2 動物実験室			

設備・機器類

(I) 獣医棟 3 階

部屋名	機器名	使用した延日数	
P 2 実験室	V301	フローサイトメーター (ライテクノロジー・ズジャパン)	
		マイクロプレートリーダー (BioRad)	
		マイクロプレート洗浄装置 (Thermo WellWash)	
		NanoDrop 分光光度計 (Thermo ND-1000)	
		冷却遠心機 (KUBOTA 7780)	
		冷却遠心機 (Thermo)	
		卓上型冷却遠心機 (HITACHI)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		ハイブリオープン (タイテック)	
		オートクレーブ (平山製作所 HG-50)	
		自動核酸抽出装置 (magLead 12gC)	
		V304	ヒートブロック (アステック)
	安全キャビネット (AIRTEC)		
	卓上遠心機 (HITACHI)		
	MALDI Biotyper (BRUKER)		
	V308	アイソレーター (マウス/ラット用) (Tokiwa T-BCC-Micro-M25)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		オートクレーブ (トミー精工、LSX-700)	
	V310	アイソレーター (マウス/ラット用) (Tokiwa T-BCC-Micro-M25)	
		オートクレーブ (HIRAYAMA HV-110)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
	V313	安全キャビネット (AIRTEC)	
	V314	デジタルカメラ付蛍光顕微鏡 (OLYMPUS DP74-SET-A)	
		CO <sub>2</sub> インキュベーター (ASTECS SCI-165D/APC)	
		倒立位相差顕微鏡 (OLYMPUS CKX41)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		オートクレーブ (平山製作所 HG-50)	
		卓上遠心機 (KUBOTA 5520)	
		卓上冷却遠心機 (Eppendorf 5415R)	
	V319	CO <sub>2</sub> インキュベーター (Thermo F370)	
		安全キャビネット (AIRTEC)	
		倒立蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-9000)	

			位相差顕微鏡 (OLYMPUS CK2)	
			超遠心機 (HITACHI CP80WX)	
	V323		安全キャビネット (AIRTEC)	1 日
			スイングローター付遠心機 (HIRASAWA TE-HER)	1 日
			インキュベーター (SANYO MIR-153)	
			卓上冷却遠心機 (eppendorf 5415R)	
			紫外・可視分光光度計 (GE Healthcare GeneQuant100)	
			ヒートブロック (アステック)	
遺伝子 実験室		V303		ゲル・メンブラン撮影装置 (BioRad)
			PCR 装置 (BioRad, Applied Biosystems)	
			多標識測定用プレートリーダー (ワラック社)	
			リアルタイム濁度測定装置 (テラメックス LoopampEXIA)	
			リアルタイム PCR 装置 (ABI, Quant Studio 3)	
			デジタル PCR (日本バイオラッド)	
	V306		卓上遠心機 (HITACHI CT6E)	
			卓上冷却遠心機 (HITACHI CT15RE)	
	V307		細菌検査用ホモジナイザー (オルガノ EXNIZER400)	
			シークエンサー (ABI3130, SeqStudio)	
試薬 調製室	V305		pH メーター (HORIBA)	
			デシケーター (ASONE)	
病理標本 作製室	V316		パラフィン包埋ブロック作製装置 (SAKURA)	
			手動回転式ミクロトーム (Leica MR2235)	
			密閉式自動固定包埋装置 (SAKURA)	
			卓上型ドラフト (明光メディカル)	
洗浄室	V318		超純水製造装置 (Milli-Q Advantage)	
			オートクレーブ (TOMY SX-500)	
			全自動洗浄機 (Miele PG858)	
滅菌室	V322		オートクレーブ (TOMY、平山製作所)	
			高純水製造装置 (Merck)	
			全自動血球計数器 (日本光電工業)	
微生物 保存室	V324		液体窒素保存容器 (太陽日酸株, アステック)	
			超低温槽 (Thermo REVC0 TSX400G)	

(II) 獣医寄生虫病学研究

部 屋 名	機 器 名	使用した延日数
獣医寄生虫病学研究室	H212 核酸抽出自動化装置 (QIAcubr)	

(III) 産業動物教育研究センター

部 屋 名	機 器 名	使用した延日数
大中動物検査実験室	大中動物検査実験室	
	全身麻酔装置	
	埋込式回転診療台	
中動物陽圧実験室	手術台、無影灯 (2 機)、麻酔装置、生体情報モニター、X 線投下装置 (C アーム) 一式	

MRI 室	3T MRI、MRI 用生体情報モニター、MRI 用麻酔装置一式	
	MRI オペレーター	
P2 検査実験室	アイソレーター	
	安全キャビネット	
	オートクレーブ	
器具・薬品庫	ウサギ飼育用ケージ	
滅菌リネン庫	高圧蒸気滅菌装置	
	カートリッジ式酸化エチレンガス滅菌器	
動物飼育	動物飼育費	
	飼育管理員	

その他の装置・データ等

分類	名称	使用した延日数