

学 術

分子生物学の立場からみた秋田犬

小黒一岡野美枝子

ヤマザキ学園大学、秋田県立大学

要 約

本稿では、「秋田犬をよく知る」ことを目的に、「イヌのルーツ」、「日本犬のルーツ」、「秋田犬のルーツ」、「秋田犬における毛色の遺伝」、および「イヌの毛の長さの遺伝」について、分子生物学的立場から解説する。

はじめに

遺伝情報はA、T、G、Cから成る4種類の塩基、すなわち4文字で書かれている。それらA、T、G、Cの並び方が生命現象の設計図である。イヌ（イエイヌ；*Canis lupus familiaris*）の染色体は38対の常染色体と2本の性染色体からなる。Lindblad-Tohらにより、その全染色体上のDNA配列（ゲノム）が、Tasha（メスのボクサー犬）で解読された¹⁾。その全DNA配列情報がNational Center of Biotechnology Institute (NCBI) のゲノムサイト²⁾に公開されている。イヌの全ゲノムサイズは2410.98Mbである。タンパク質にコードできる遺伝子の推測数は、19,856である²⁾。

イヌの特徴は、多数の純化された犬種 (purebred dog) を有することである。犬種は世界では、およそ400といわれている¹⁾。2016年8月現在公開されているリストに登録された犬種の数、日本ケネルクラブ (JKC)³⁾では134、ケネルクラブ (KC)⁴⁾では316、アメリカンケネルクラブ (AKC)⁵⁾では189である。イヌの形態はケネルクラブや保存団体により、犬標準（スタンダード）に基づいて保存維持されてきた。イヌの形態は犬種間ではさまざまであり、ひとつの犬種内においても、多様な場合もある。

現在みられる多様な犬種は、イヌゲノムからみるとどのように考えられるのだろうか。Lindblad-Toh

ら¹⁾は、犬種が2回の遺伝的なボトルネックを経て形成される様子を明らかにした（図1）。ここで言う遺伝的ボトルネックとは、進化的なボトルネックであり、狭い瓶の口から少数のものを取り出す様子の例えに似て、生物の集団個体数が激減し、遺伝的浮動が進み、その子孫が増えて、遺伝的多様性の急激な減少が起こることである¹⁾。最初のボトルネックは、15,000～100,000年前にイヌがオオカミから家畜化されたときである。二回目のボトルネックは、200年から300年前にさまざまな近代的な犬種に分かれるプロセスで起こった（図1）。

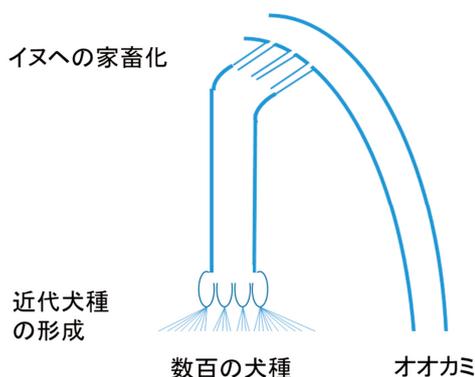


図1：2回のボトルネックを経た犬種形成のプロセスを示す模式図 Lindblad-Toh¹⁾の図を改変

本稿では、「秋田犬をよく知る」ことを目的に、「イヌのルーツ」、「日本犬のルーツ」、「秋田犬のルーツ」、「秋田犬における毛色の遺伝」、および

「イヌの毛の長さの遺伝」について、分子生物学的立場から解説する。その記載内容の一部分は、本年2月に秋田県において開催された日本獣医師会獣医学術学会年次大会市民公開講座で講演したものである。

イヌのルーツ

イヌの祖先(ルーツ)の研究は、図1の最初のボトルネック、すなわち犬がオオカミから家畜化されてきたプロセスを調べる研究である^{6,7)}。歴史的には、頭蓋骨などの骨の形や歯型などによる考古学的、形態学的研究⁶⁾が長らく行われてきた。形態のみからでは、小型オオカミとイヌとの判別が困難であった。また形態学的研究では、イヌのルーツはどの地域のオオカミに由来するかを同定するには困難であった。その後、遺伝子型、一塩基置換多型(SNPs)解析、最近では次世代シーケンサーの恩恵により全ゲノム解析による分子遺伝学や分子系統学的な研究も含めた分子生物学的研究⁸⁻¹⁷⁾が行われている。現在では、技術革新のおかげで、コストも低くなり、高い精度、再現性の十分なデータを得ることができる分子生物学的研究手法の利用による、イヌのルーツに関する研究が多くなってきた。

では、イヌのルーツは、どの地域のオオカミに由来しているか、これらの質問の答えについては、まだ諸説がある⁸⁻¹⁷⁾。国内研究者グループ、Tsudaら⁸⁾が3亜種のオオカミ(ヨーロッパ、インド、中国)と24犬種、34頭のミトコンドリア配列を調べ、分子系統樹解析を用いて、はじめてイヌのルーツは、東アジアのオオカミであること(東アジア説)を示唆した。ついで、Vilàら⁹⁾、Savolainenら¹⁰⁾国外の研究者も、オオカミやイヌのサンプル数を増やし、ミトコンドリア配列に基づき東アジア説を示した。ミトコンドリアDNAは母性遺伝であるが、その後、Parkerら¹¹⁾は、85犬種、414頭の純系のイヌを用いて、性別によらない、ゲノム上に存在する短い繰り返し配列であるマイクロサテライト遺伝子多型(96座位)に基づく分子系統樹解析により、東アジア説を示した。これらの詳細については、別の総説に記載している¹²⁾。

一方、Thalmannら¹³⁾は、古代イヌのサンプルを用いて、それらがヨーロッパ由来であることを示した。また、Shannonら¹⁴⁾は、今まで調べていなかった地域のオオカミや在来犬種を調べることにより、中央アジアに由来することを提唱した。これらの研究は、特定の一か所でオオカミが家畜化され、イヌが人とともに世界に移動したことを示唆している。本稿では、それぞれの内容の詳細な説明には触れない。

このように、家畜化の場所は特定の一か所であるという報告は複数ある。中でも、その場所は東アジア説が主流であった。しかし、Boykoら¹⁵⁾はアフリカ各地の在来犬の遺伝子多様性を調べることにより、東アジア説をさらに精査すべきであると提言している¹⁵⁾。もちろん、アフリカが家畜化のその場所であるとするには十分な立証はできていないので、アフリカを家畜化の場所と断言はしていない。

2010年に、vonHoldtら¹⁶⁾は、オオカミとさまざまな犬種から抽出したDNAのSNPsに基づく系統樹解析により、世界各地の複数の地域のオオカミから、同時期に家畜化されたとする同時多発的な家畜化ルーツ説を示した。続いて、2016年には、Frantzら¹⁷⁾も、同時多発的であることを示している。

特定のひとつの地域、なかでも東アジアが由来であること⁸⁻¹¹⁾が主流であり、ほかにヨーロッパ¹³⁾や中央アジア¹⁴⁾の由来も含め複数の論文が報告されてきた。最近では、同時多発的に複数の箇所でもオオカミが家畜化されてきたことが示されている。これらを考察すると、東アジアもヨーロッパも中央アジアの特定の一か所も、いずれも誤りではないだろう。なぜならば、今日では、実験で扱う犬種やオオカミのサンプル数は増加している。分子生物学的研究手法の技術革新により、対象とし比較するゲノム領域の範囲は、当初とは比較にならないほど広がり、大きなデータ量を扱い、解析処理ができる。したがって、ゲノムは単一オオカミに由来するより、複数のオオカミに由来すると推定することが妥当である¹⁾。たとえば、当初の研究で行われたミトコンドリアのDループ領域の配列やマイクロサテライト多型から比較し推論した東アジアの地域⁸⁻¹¹⁾は、ゲノム全体におけるSNPs解析やハプロタイプ型を比較し推論したvonHoltら¹⁶⁾が示した同時多発的に家畜化され

た地域に包含されている。

イヌのルーツは世界各地のオオカミであり、特定の一つの地域の祖先に絞れないことはゲノムから明らかになりつつあるが^{16, 17}、今後さらに研究が進み、同時多発的な家畜化説が有力になるだろう。

日本犬のルーツ

田名部の総説によれば、日本犬は人とともに日本列島に移入されてきたと言われている¹⁸。移入された日本犬には2系統がある。ひとつは、縄文人とともに南方、琉球から入り日本列島を北上して北海道に進んだ古い型の日本犬系統である¹⁸。もう一つは、弥生人とともに、古墳時代に朝鮮から日本列島に移入した新しい型の日本犬系統である。両系統が混血したといわれている¹⁸。日本犬もオオカミがルーツであることは、分子遺伝学的解析により明らかである^{8~11, 18}が、今後、ゲノムレベルでの包括的な研究が待たれる。

秋田犬のルーツ

秋田犬は、母性遺伝であるミトコンドリア配列^{8~10}や、性別に関係ないマイクロサテライトDNA多型を比べた研究¹¹で、オオカミに近縁の犬種のひとつであることが判明した。また面白いことに、Parkerら¹¹のマイクロサテライト多型解析では、秋田犬が、形態からは全く似てもつかない中国原産のチャウ・チャウとDNAレベルで非常に近いことがわかった¹¹。さらに、vonHoldtら¹⁶は、最近の最先端研究方法のひとつであるイヌのSNPs解析を行った結果¹⁶、従来からParkerら¹¹も示してきた犬の使役別に用いてきた4つの区分、すなわち、牧畜犬系、狩猟犬系、使役犬系、オオカミ系に、さらにスモールテリア、レトリバーなどを加えた区分に犬種を分けることができる。秋田犬は、これらの区分によるとオオカミ系に属し、オオカミに近縁な犬種のひとつである。このオオカミ系の区分を、vonHoltら¹⁶は古代およびスピッツ犬種 (Ancient & Spitz breeds) と呼んでいる。このオオカミ系の区分には、アジア、アフリカ、中近東にルーツをもつ犬種が含まれ、

チャウ・チャウも属している¹⁶。

秋田犬がどこの地域のオオカミがルーツで、どの地域から日本列島に移入して来たかは、いまだ明解に証明された定説はなく、謎を秘めたままである。

2016年にIshiguroらは¹⁹、古代のコレクションサンプルで下顎骨、頭蓋、指骨から抽出したミトコンドリアDNAより日本オオカミの特徴的配列を同定した。その特徴的な配列が秋田犬にも存在することを明らかにしている¹⁹。しかし1頭の秋田犬を調べたにすぎず、今後の研究が待たれる。

秋田犬の全ゲノムの解読解析が進行しているので、その研究成果が待たれる。

哺乳類の毛色の色素と色素スイッチングのしくみ

動物の毛色は外観から容易に判別できる形質であり、犬種の保存、維持では鍵となる。メラニン色素は毛包の色素細胞で産生され、毛幹への色素沈着がおこり外観から判別できる毛色を示す。

哺乳類の毛色は、2種類のメラニン色素、すなわち、ユーメラニンとフェオメラニンである。ユーメラニン色素は黒色、茶色を、フェオメラニン色素は赤色、黄色を示す²⁰。さまざまな毛色は、2種類のメラニン色素の含有量や分布の違い、毛周期に依存する遺伝子発現の違い、チロシナーゼ酵素活性の発現レベルの違いなどにより生じる²⁰。毛色の色素の詳細に関してはBarshの総説²⁰に詳しい。

ユーメラニンとフェオメラニンの合成の間における切り換えプロセスは、色素スイッチングとして知られている。一般にマウスなどの哺乳類において、色素スイッチングは、色素細胞の細胞膜にあるメラノコルチン1型受容体 (MC1R) とアグーチ (ASIP) が関与する²¹。MC1RはGタンパク質に共役する7回膜貫通型受容体であり、ASIPはそのリガンドである²¹。しかし、イヌの毛色の色素スイッチングには、その他に3つ目の因子として、 β -ディフェンシンが2007年にCandilleら²²により見いだされた。イヌの β -ディフェンシンは皮膚に多く発現²³し、自然免疫に関わる抗菌性を示すペプチドとして知られ、*CBD103* 遺伝子によりコードされている²²。

Candilleら²²はイヌの毛色の黄色、黒色素の生

成が3つの色素スイッチング遺伝子 (*MC1R*, *ASIP*, *CBD103*) によりコントロールされるしくみを、3つの犬種を例に挙げて示している。

黄色のグレート・デーンでは、3つの遺伝子 *MC1R*, *ASIP*, *CBD103* (k^r) が全て野生型アリルである。*MC1R*に*ASIP*が作用し、*MC1R*の働きを抑制し、フェオメラニン生合成系に働き、黄色の色素を産生する。

黄色のラブラドル・レトリバーでは、*MC1R* 遺伝子に変異が入り、受容体の機能を失い、*ASIP* や*CBD103* (K^b) の遺伝子型にかかわらず、フェオメラニン生合成の経路に入り、黄色の色素になる。

黒色のレトリバーの場合には、*MC1R*と*ASIP*遺伝子は野生型アリルを有し、*CBD103*が優性の黒色アリル (dominant black allele, K^b) である。変異型*CBD103*と*MC1R*が相互作用して、ユーメラニン生合成の経路に入り、黒色の色素を産生する。

受容体タンパク質である*MC1R*、および、リガンドである*CBD103*と*ASIP*をコードする各遺伝子は、2種類のメラニン色素を切り換える色素スイッチング遺伝子であり、西洋犬種で毛色と遺伝子多型が明らかとなった。しかしながら、日本犬においてはその関係性が少し異なるように思える。本稿では、とくに秋田犬の毛色と色素スイッチング遺伝子多型について解説する。

秋田犬の毛色

秋田犬の主な毛色は、赤 (アカ)、虎 (トラ)、白 (シロ)、胡麻 (ゴマ) である (図2)。著者らの研究²⁴⁾は、図2に示した典型的な4種類の毛色を対象にした。毛色は血統書に記載された毛色の表記に基づいた。同じ毛色であっても、色パターン (色素の濃淡や、色素がなす模様) や、抜毛1本ごとにみられる色パターンは多様である²⁵⁾。例えば、毛色アカやゴマの抜毛1本ずつは、色パターンが異なるが、アカの抜毛は毛の先端が必ず赤 (あるいは白) であった²⁵⁾。ゴマの場合にはアカの抜毛パターンに加えて、先端の黒いアグーチパターンや、先端から毛根まで均一な黒色の毛が混ざっていた²⁵⁾。本稿では取り上げないが、イヌの主毛、副毛の1本ず

つの抜毛の色パターンも遺伝子発現情報を知る興味あるソースである。

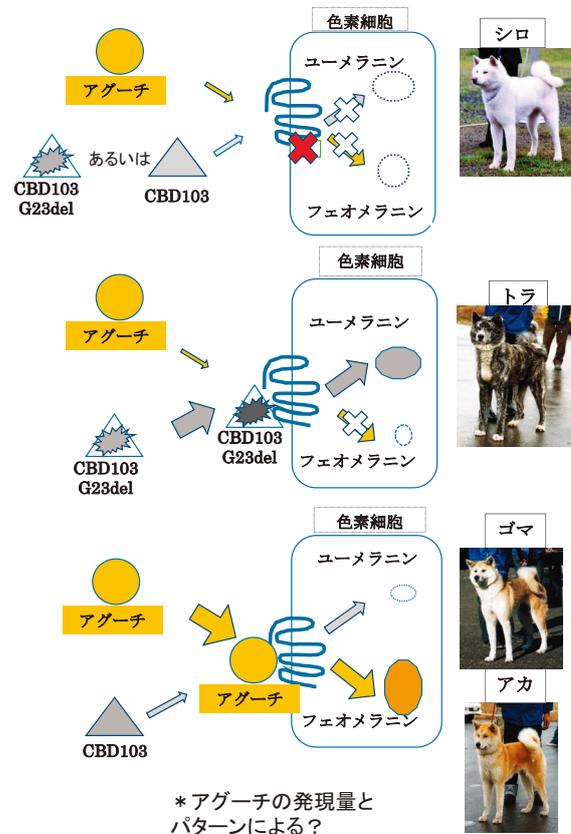


図2：秋田犬における4種類の毛色 (シロ、トラ、ゴマ、アカ) と色素スイッチング遺伝子多型の関係を示す模式図

M.Oguro-Okano「日本比較臨床医学会誌」Vol22, 2015より図を引用

秋田犬の毛色に関連する遺伝子多型を決める方法

秋田犬の口腔内細胞を採取し、その細胞からDNAを抽出した²⁴⁾。NCBIに公開されているボクサー犬のイヌゲノム配列解読情報から*MC1R*, *ASIP*, *CBD103*各遺伝子のプライマーをデザインし、抽出したゲノムDNAを用いて、それぞれの遺伝子をPCR増幅した²⁴⁾。そのDNA配列を決定解析し、遺伝子多型を同定した²⁴⁾。

秋田犬の4種類の毛色と*MC1R*遺伝子多型との関係

まず、著者らは、秋田犬の4種類の毛色、シロ、トラ、アカ、ゴマと*MC1R*遺伝子多型との関係を調べた²⁴⁾。Mountjoyら²⁶⁾や、Newtonら²⁷⁾の研究によれ

ば、イヌMC1R遺伝子は第5番染色体にあり、全長が952塩基 (bp) のOpen reading frame (ORF) からなり、コードするMC1Rタンパク質は、317個のアミノ酸残基からなる^{1,26,27)}。

著者ら²⁴⁾は、秋田犬の毛色シロにおいて、MC1R遺伝子のヌクレオチド916のCからTへの置換により、306番目の推定アミノ酸がアルギニン (R) から終止コドン (ter) に置換する (R306ter) ことを見出した。両親犬からMC1R遺伝子はこの短い欠失型を受け継ぎ、劣性ホモ型 (ter/ter) であること²⁴⁾が判明した (図2、表1)。Newtonらの西洋犬種におけるMC1Rに関する研究²⁷⁾から推論し、秋田犬の毛色シロにおいても、その短い欠失型遺伝子がコードする受容体MC1RはC末端の12個のアミノ酸が欠失した短い受容体となり、その機能を失うことが示唆される。

一方、毛が有色の秋田犬の場合 (トラ、アカ、ゴマ) には、親犬から受け継ぐ遺伝子多型は、MC1R遺伝子の完全型のホモ型 (R/R) か、あるいは、少なくともひとつのMC1R遺伝子は完全型でヘテロ型 (R/ter) である²⁴⁾。秋田犬では、MC1R遺伝子のR306ter変異が劣性ホモ型であれば毛色シロとなるため、R306を少なくともひとつもつ毛色アカ、ゴマ、トラの秋田犬と区別できる²⁴⁾ (図2、表1)。

表1：秋田犬の4種類の毛色におけるMC1R、CBD103、ASIP遺伝子多型

terはMC1R遺伝子のコドン306がストップコドン；delはCBD103遺伝子の23コドンが欠失；S, H, P, L, A, RはASIP遺伝子の82,83,87の各コドンに対応するアミノ酸を1文字表記で表す。ASIP遺伝子はコドン82、83で、A/A, R/Rは見出されなかった。毛色アカとゴマは3つの遺伝子多型では区別がつかない。

毛色	MC1R遺伝子 コドン306	CBD103遺伝子 コドン23	ASIP遺伝子 コドン82, 83, 87
シロ	ter/ter	G/del or G/G	S-H-P, S-H-L, A-R-P
トラ	R/R or R/ter	G/del	S-H-P, S-H-L, A-R-P
アカ	R/R or R/ter	G/G	S-H-P, S-H-L, A-R-P
ゴマ	R/R or R/ter	G/G	S-H-P, S-H-L, A-R-P

MC1R遺伝子においてヌクレオチド790がAからGに置換し、その結果、MC1Rの264番目のメチオニンのバリンへの置換 (M264V) が、メラニン色素をもつマスクがあるグレート・デーン、ボクサーなどの西洋犬種で、Schmutzら²⁸⁾により見出されている。その遺伝子多型はヘテロ型 (V/M)、ホモ型 (V/V)

がある²⁸⁾。しかし、著者らの研究²⁴⁾によれば、秋田犬においてはこのM264V変異は全くみられなかった。いずれの秋田犬でもマスクの表現型も見られなかったため、マスクの表現型とこの遺伝子型は一致していた²⁴⁾。いわゆるAmerica Akita⁵⁾にはマスクをもつイヌが多いが、秋田犬はこの遺伝子型 (M264V) の混入はない。

イヌの毛色に特徴的なβ-ディフェンシン103変異 (CBD103)

Candilleら²²⁾により、β-ディフェンシン103ペプチドのMC1R受容体への結合は、組換えタンパク質を用いた*in vitro*実験から、G23del変異をもつペプチドが変異を持たないペプチドに比べて、5倍高い親和性をもつことを実験的に証明している²²⁾。イヌの毛色の黒色に関係するとして見出されたこのG23del変異は、トランスジェニックマウスを用いた遺伝子過剰発現実験から、非トランスジェニックマウスより体の小さなサイズが生まれるという個体レベルの報告もある²²⁾。

Little²⁹⁾が60年前に既に、黒色の毛色のイヌには、他の動物と異なる遺伝様式で、優性 (dominant) 遺伝である犬種があると提唱していた。後に、Kernsら³⁰⁾がマイクロサテライトマーカーを使った連鎖解析により、イヌの毛色において優性の黒色の遺伝子座としてK座位を同定し、K^b (黒)、k^{tr} (トラ)、k^r (黄色) の3つのアレルの存在を明らかにした。同じ年に、Candilleら²²⁾が、K^bの原因遺伝子がCBD103遺伝子であることを明らかにした。

イヌの場合には、マウスやヒトとは異なり、CBD103ペプチドが色素スイッチングに関与することは驚きであり、イヌの毛色研究により見出された新しい発見であると発見者ら²²⁾も述べている。

秋田犬の毛色トラとCBD103遺伝子多型

著者らの研究によると、秋田犬の毛色トラを決定する遺伝子は、CBD103遺伝子である²⁴⁾。毛色トラの秋田犬の場合には、CBD103遺伝子の23番目のグリシンに相応する3bp (GGG) が欠失し (G23del)、

アミノ酸ひとつの欠損が起こるヘテロ型の遺伝子多型を持っていた²⁴⁾。ところが、アカとゴマはこの*CBD103* 遺伝子多型を全くもたない。しかも興味深いことに、Candilleら²²⁾の研究によれば、西洋犬の黒い毛色をもつグレート・デーンでは、*CBD103* 遺伝子のG23del変異は、ホモ型とヘテロ型があり、共に真っ黒い色になる²²⁾が、秋田犬ではヘテロ型のみで、毛色は白色と黒色が縞模様をなすトラとなる²⁴⁾。現在では真っ黒い秋田犬は見出すことができず、真っ黒い毛色の秋田犬サンプルを使って証明することはできない。

毛色トラの秋田犬で*CBD103* 遺伝子におけるG23delのヘテロ型変異を著者ら²⁴⁾が報告した後に、Ciampoliniら³¹⁾により、ボクサー犬やグレート・デーンのトラの毛色を示す西洋犬種において、秋田犬と同様に、この*CBD103* 遺伝子多型が見出され、秋田犬の毛色トラの場合と一致していることが判明した。しかし、黒色とトラの違いはなぜ起こるかについては、依然なぞである。この違いは*CBD103* 遺伝子における転写調節領域の配列部分の違い、*CBD103* 遺伝子以外のその他の遺伝子の関与、あるいは、DNA配列ではなく、エピジェネティックな影響による違いなどに起因するのかもしれない。今後の研究が待たれるところである。

秋田犬の毛色シロと*CBD103* 遺伝子多型

著者らの研究²⁴⁾によれば、秋田犬の毛色トラを決定する遺伝子、*CBD103* 遺伝子のG23delヘテロ型変異が、秋田犬の毛色シロの個体の中にもときどき見られる。このG23delヘテロ型変異をもつシロの秋田犬は、トラと同じ遺伝子型をもつが、形質は毛色シロを示す。筆者らは、この毛色シロの秋田犬を「隠れトラ」と呼んでいる。

なぜこの「隠れトラ」秋田犬はシロの毛色を示すか。この答えは、3つの色素スイッチング遺伝子の間にみられるエピスタシス (epistasis) な順位に起因する。毛色シロの秋田犬は必ず、*MC1R* 遺伝子がR306terのホモ型 (ter/ter) である。もし、秋田犬の中に、*CBD103* 遺伝子のG23delヘテロ型変異をもつ場合があったとしても、*MC1R* 遺伝子と*CBD103* 遺

伝子の間では、R306ter変異をもつ*MC1R* 遺伝子多型がG23del変異をもつ*CBD103* 遺伝子多型よりも遺伝子発現において上位にあり、エピスタシスな序列関係をもつためである²⁴⁾。例えて言えば、毛色シロの秋田犬で見られる、受容体*MC1R* 遺伝子多型、すなわち短い欠失型受容体、劣性ホモ型 (ter/ter) は、他の毛色決定遺伝子の全てを抑えて、自分の意見 (白くする) を通すようなワンマン社長のようである。

秋田犬の毛色と*ASIP* 遺伝子多型の関係

ASIP 遺伝子がコードするタンパク質*ASIP*は、受容体*MC1R*のリガンドであり²¹⁾、*MC1R*のその機能を抑制し、フェオメラニン合成経路に入る^{20,21)}。

ASIP 遺伝子は4つのエクソンからなる。NCBI ジーンバンクに公開されているボクサー犬の配列と秋田犬のその遺伝子配列を比較すると、エクソン1、2、3は同じであった。しかしエクソン4にはいずれの毛色においても2つの変異が見られた²⁴⁾。これらの変異は、ヌクレオチド244ではGからTへ置換され、アミノ酸では、82番目がAからSに置換 (A82S)、ヌクレオチド248ではGからAに置換され、83番目のアミノ酸がRからHに置換 (R83H) である²⁴⁾ (表1)。どの毛色の秋田犬でも、S82、H83の変異が必ずひとつのアレルに存在していた²⁴⁾ (表1)。*ASIP* 遺伝子のこれら2つの変異、A82S、およびR83Hは、セーブルのシェトランド・シープドッグや、フォーンの毛色のダックスフンドなどの西洋犬種に見られるように、フォーン (fawn、アカを示す毛色を表現)、やセーブル (sable、灰色黒) の毛色を示す³²⁾。この事実に基づけば、秋田犬の毛色アカやゴマで、ひとつのアレルに82S、83Hの組み合わせが存在するのは驚くことではないだろう。P87L変異が秋田犬で見られたが、特定の毛色とは関連はない²⁴⁾。このP87L変異は西洋犬種では見つかっていない。著者ら²⁴⁾は、秋田犬の毛色、アカとゴマを区別するために、*ASIP* 遺伝子多型を調べたが、その結果は、毛色と直接関連する遺伝子多型は見出せなかった。

Kernsら³³⁾は、真っ黒い毛色のジャーマン・シェパードでは、*ASIP* 遺伝子にR96C変異が見られ、ノ

ンアグーチ (*non-agouti*) 変異によるイヌの黒色毛色のひとつの遺伝様式であることを示した。*non-agouti*変異による黒い毛色はマウスでも古くから知られている²¹⁾。A82S, R83H, P87L, R96Cの変異は、*ASIP*遺伝子のコード領域の配列部分に見出された。Ciampolini³¹⁾らの最近の研究では、毛色の黒-タンを示すドーベルマンにおいて、*ASIP*遺伝子の5'転写制御領域の配列部分に毛色と関連する変異を見出している。

交配例から知る秋田犬の毛色遺伝の謎解き

秋田犬の毛色(シロ、トラ、アカ/ゴマ)の遺伝については、色素スイッチング遺伝子多型の解析結果に基づき、生まれてくる仔犬の毛色を予測説明できるようになった。例えば、以前に筆者が秋田犬の愛犬家から尋ねられた質問を挙げる。質問1は、「アカの毛色同士を交配して、なぜアカのみが生まれる場合とシロも生まれる場合があるのか」、質問2は、「シロとアカを交配して、なぜトラが生まれる場合があるのか。その確率がなぜ生まれる仔犬の50%であるのか。」である。*MC1R*遺伝子、および*CBD103*遺伝子多型に注目し、実際の家系図の一部分にみられる色素スイッチング遺伝子多型を示す(図3a、図3b、図4a、図4b)。質問1の答えには、アカの毛色の秋田犬であっても、*MC1R*遺伝子における変異R306terがホモ型同士の交配、あるいは

ホモ型とヘテロ型の交配(図3a)、ヘテロ型同士の交配(図3b)の3つの場合がある。R306terがホモ型同士の秋田犬の交配、あるいはホモ型とヘテロ型の秋田犬の交配(図3a)の2つの場合には、全てアカが生まれる。変異R306terがヘテロ型同士の秋田犬の交配では、アカが3/4、シロが1/4の確率で生まれる(図3b)。

質問2の答えには、シロが「隠れトラ」であることが鍵である。実際の交配の2例を見る(図4a、図4b)。*CBD103*遺伝子における変異G23del(G23/del)と*MC1R*遺伝子における変異R306terがホモ型(ter/ter)をもつシロの秋田犬(図4a; AK1)と、*CBD103*遺伝子には変異がなく(G/G)、*MC1R*遺伝子に変異がないホモ型(R/R)のアカの秋田犬(図4a; AK21)を交配すると、アカが1/2、トラが1/2の確率で生まれる(図4a)。同じ「隠れトラ」のシロ(図4b; AK1)を*MC1R*遺伝子に変異R306terがないゴマ(図4b; AK4)の秋田犬と交配すると、ゴマ1/4、アカが1/4、トラが1/2である。従って、これらの秋田犬の交配の場合から、生まれる仔犬の毛色トラは、生まれる仔犬全体の50%であることが判明した。

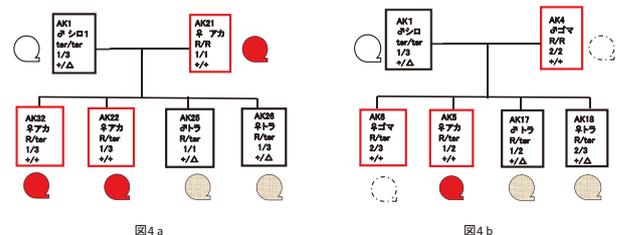
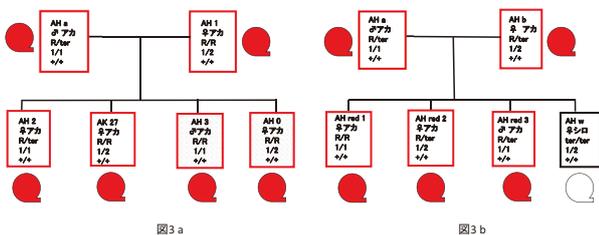


図4a, 図4b: 秋田犬の毛色シロと毛色アカ(4a)、あるいは毛色ゴマ(4b)と交配した場合に生まれる仔犬の毛色と遺伝子多型。

4aはシロ(隠れトラ)とアカの交配でアカとトラの仔犬が生まれる場合、4bはシロ(隠れトラ)とゴマの交配で、ゴマ、アカ、トラの仔犬が生まれる場合

四角の囲いの中を表記は、上から、秋田犬のサンプル番号、性別、毛色、*MC1R*遺伝子の306番目の変異の有無(R306はR、R306terはter)。*ASIP*遺伝子の82, 83, 87の各コドンの変異の組み合わせを、1はS82-H83-P87、2はS82-H83-L87、3はA82-R83-P87と表している。*CBD103*遺伝子の23番目の変異の有無(G23は+、G23delは△)。

図3a, 図3b: 秋田犬の毛色アカ同士を交配した場合に生まれる仔犬の毛色と遺伝子型

3aは毛色アカのみ生まれる場合、3bは、毛色アカとシロが生まれる場合

四角の囲いの中を表記は、上から、秋田犬のサンプル番号、性別、毛色、*MC1R*遺伝子の306番目の変異の有無(R306はR、R306terはter)。*ASIP*遺伝子の82, 83, 87の各コドンの変異の組み合わせを、1はS82-H83-P87、2はS82-H83-L87、3はA82-R83-P87と表している。*CBD103*遺伝子の23番目の変異の有無(G23は+、G23delは△)

秋田犬の毛色に関する今後の研究課題

秋田犬の毛色と3種類の色素スイッチング遺伝子 (*MC1R*, *CBD103*, *ASIP*) 多型との関係が明らかになった²⁴⁾。基本色であるシロ、トラ、アカ/ゴマの区別が遺伝子多型により可能となったが、まだ、アカとゴマの区別はできていない²⁴⁾。興味深いことは、1本ずつの被毛を観察すると、アカとゴマでは異なっている²⁵⁾。*ASIP*遺伝子において、毛周期にかかわる転写調節領域配列部分に変異があるのかもしれない。あるいは、*ASIP*遺伝子以外の遺伝子が関与するのかもしれない。

秋田犬では、同じ毛色アカであっても濃淡が見られる。筆者らは濃いアカや薄いアカの毛色の秋田犬からそのゲノムDNAを抽出し、3種類の色素スイッチング遺伝子多型解析を行ったが、濃淡による違いは見られなかった(データ未記載)。この淡色になる現象は希釈 (*dilute*) と呼ばれる。Drögemüllerら³⁴⁾は、イタリアン・グレーハウンドの希釈毛色が *Melanophilin (MLPH)* の多型と関連することを示しているが、フェオメラニン色素でない³⁴⁾。

西洋犬種による黒色、茶色のユーメラニン色素の希釈では、*B*遺伝子座 (*Brown*) があり、チロシナーゼ関連タンパク質1 (*TYRP1*) の多型との関連が Schmutzら³⁵⁾により報告されているが、フェオメラニン合成には影響はない。秋田犬の毛色アカの濃淡は、*TYRP1*の変異に起因すると考えることはできない。秋田犬のアカで、フェオメラニン色素の希釈を決定する遺伝子の解明が待たれる。

毛の長さを決める遺伝子多型

ゲノムワイド関連解析 (*genome-wide association study*; GWAS) やSNPs解析などの分子生物学的手法の技術開発の恩恵により、Housleyら³⁶⁾、Cadiueuら³⁷⁾、Dierksら³⁸⁾らの複数のグループが別々に、さまざまな犬種において、長毛と短毛を決める遺伝子多型を明らかにした。その結果、イヌの毛の長さを決める遺伝子は繊維芽細胞増殖因子5型 (*Fibroblast Growth Factor 5*; *FGF5*) 遺伝子であることが判明した^{36,37,38)}。

Housleyら³⁶⁾は、*FGF5* 遺伝子のエクソン1にある95番目のアミノ酸、システイン (C) がフェニルアラニン (F) へ変異 (C95F) に注目して、ウェルシュ・コーギ・ペンブロック、コリーやジャーマン・シェパードの長毛短毛の両方の毛の長さのイヌを用いて、遺伝子多型を調べた。その結果、これらの西洋犬種の長毛のイヌは、C95F変異のヘテロ型であることが明らかとなった³⁶⁾。その後、Cadiueuら³⁷⁾もイヌの毛質と関連遺伝子多型を調べて、多くの西洋犬種の長毛のイヌが、C95F変異多型を示すことを明らかにした。一方、Cadiueuら³⁷⁾は、GWASに基づいた研究から、イヌの32番染色体上にある*FGF5* 遺伝子座位以外の領域には、長毛の表現型と連鎖する遺伝子座位は見つからなかった³⁷⁾。

著者もこの*FGF5* 遺伝子多型を調べたが、調べた秋田犬ではC95F変異は見出されなかった(データ未発表)。秋田犬は短毛種であり、長毛の形質は淘汰されているから、このC95F変異が見出せないことは、短毛しか見られない形質と一致していると解釈した。その後、2013年にDierksら³⁸⁾が、ドイツのAkitaの長毛と短毛の個体について、毛色と連鎖する*FGF5* 遺伝子における新規の遺伝子多型を写真つき (Figure S5) で報告した。その研究によれば、長毛の個体は、*FGF5* 遺伝子における193番目のアミノ酸がアラニンからバリンに置換している遺伝子変異型 (A193V) で、遺伝様式は劣性ホモであった³⁸⁾。

秋田犬の繁殖において、短毛の両親から、長毛の仔犬が生まれることは大きな問題であるが、この遺伝子変異は劣性ホモである。したがって、短毛である秋田犬において、ある一定数の個体がヘテロでA193V変異を持つ可能性は否定できない。興味深いことにancient dogとされるシベリアン・ハスキーやサモエドの長毛の形質も、長毛西洋犬が一般的に持つC95F変異ではなく、A193V変異と連鎖する³⁸⁾。秋田犬は、ancient dogの区分に属する進化的に古い犬種である^{11,16)}。秋田犬の交配でときおり見られる毛の長い仔犬の原因遺伝子が、近代犬種 (modern dog) に見出された*FGF5* 遺伝子多型 (C95F) ではなく、ancient dogやルーツであるオオカミに起因するA193V変異型であるなら、犬の進化にまでさかのぼって考察する必要性を示唆し、今後の研究に興味

がもたれる。

おわりに

本稿では、イヌのルーツにはじまり、日本犬、秋田犬のルーツ、および、秋田犬の毛色に関連する色素スイッチング遺伝子多型、イヌの毛の長さを決める遺伝子多型について述べた。

著者らが研究してきた秋田犬において、肉眼で判別でき、体の表面、とくに背側にある被毛が示す毛色を対象に、その毛色と3つの色素スイッチング遺伝子 (*MC1R*, *CBD103*, *ASIP*) 多型との関係を主に解説した。

西洋犬種では、*MC1R*遺伝子の劣性ホモ型 (*ter/ter*) が、黄色の毛色のラブラドル・レトリバーやクリーム色の毛色のサモエドで見られている³⁷⁾。この*MC1R*遺伝子型は、秋田犬の場合にはシロの毛色で見られ、西洋犬種の場合とでは相違がある。秋田犬の毛色シロは、赤色が希釈したものではない。なぜならば、秋田犬の毛色アカでは、*MC1R*遺伝子型はR306*ter*変異をもたない (R/R) か、あるいは、R306*ter*変異がヘテロ型 (R/*ter*) であるから、秋田犬のシロが赤色の希釈による白色であるとは推測できない。

秋田犬のトラは、薄墨のトラの色パターンなどがあり、その色模様がどのように生まれるかは興味がある。そのほかに、毛色や色パターンが毛周期や加齢と関係するかどうかなど、未解決で興味ある問題もある。

イヌと、そのルーツであるオオカミの毛色とを比較し、イヌの毛色を決める遺伝子多型がオオカミではどのようなになっているのか、進化の上からも興味ある問題である。一例をあげれば、最近では、オオカミにおいても、イヌで発見された灰色、黒色と関連する*CBD103* 遺伝子多型が見出されている³⁹⁾。イヌとオオカミの間におけるG23*del*変異の移入が論じられ³⁹⁾、オオカミとイヌの進化を分子生物学的な考察に立ち、しかも毛色研究成果も有用な情報材料として生かされており、興味がつきない。

被毛は、毛色ばかりでなく、毛質からも多くの情報を得ることができる。本稿では、毛の長さのみを

言及したが、ワイア (*wire*)、カーリー (*curly*) と呼ばれる毛の硬さや毛の直毛や曲毛、口ひげの有無など毛質にもさまざまな形質があり、まだまだ研究の余地がある³⁷⁾。

毛色ばかりでなく、犬種がもつ複雑な毛質の組み合わせとその遺伝子多型の関係は、少しずつ明らかになってきている³⁷⁾。実際にこのような形質とその遺伝子多型との関係を明らかにし、その基礎的研究成果が応用利用できる時代となっている。獣医学、動物看護学分野ばかりでなく、在野の愛犬家にとっても、秋田犬において生まれてくる仔犬の毛色や毛質の予測が正確にでき、そのデータを活用する機会がすぐそこまで来ている。これらの研究が、秋田犬の健全な繁殖、飼育、保存維持に貢献できれば幸いである。

謝 辞

本稿を投稿する機会を与えていただいた秋田県立大学名誉教授 稲元民夫先生に感謝いたします。秋田犬の研究を始めるにあたり、聞き取り調査にご協力いただいた社団法人秋田犬保存会 故小笠原圭一氏、秋田犬サンプル収集などに多大なご尽力をいただいた(元)社団法人秋田犬協会 黒瀬敏之氏、多くの愛犬家の方々、並びに秋田県立大学 岡野桂樹教授はじめ共同研究者の皆様に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Lindblad-Toh K. C. M. Wade T. S. Mikkelsen *et al.* (2005) Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 438. 803-819.
- 2) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (2016)
- 3) <http://www.jkc.or.jp/modules/publicdata/> (2016)
- 4) <http://www.thekennelclub.org.uk/> (2016)
- 5) <http://www.akc.org/press-center/facts-starts> (2016)
- 6) Clutton-Brock J. (1995) Origins of the dog : Domestication and early history. In the domestic dog, its evolution, behaviour, and interactions with people (ed. J. Serpell) pp7-20 Cambridge University Press, Cambridge, UK
- 7) Ostrander E. A. and R. K. Wayne (2005) The canine genome. *Genome Res.*, 15. 1706-1716.
- 8) Tsuda K. Y. Kikkawa H. Yonekawa *et al.* (1997) Extensive interbreeding occurred among multiple matriarchal ancestors during the domestication of dogs: evidence from inter- and intraspecies polymorphisms in the D-loop region of mitochondrial DNA between dogs and wolves. *Genes Genet. Syst.*, 72. 229-238.

- 9) Vilà C. P. Savolainen J. E. Maldonado *et al.* (1997) Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*, 276. 1687-1689.
- 10) Savolainen P. Y. P. Zhang J. Luo *et al.* (2002) Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. *Science*, 298. 1610-1613.
- 11) Parker H. G. L. V. Kim N. B. Sutter *et al.* (2004) Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science*, 304. 1160-1164.
- 12) Oguro-Okano M. (2009) 分子生物学者からみた犬の歴史. ヤマザキ動物看護短期大学雑誌, 1. 13-25.
- 13) Thalmann O. B. Shapiro P. Cui *et al.* (2013) Complete mitochondrial genomes of ancient canids suggest a European origin of domestic dogs. *Science*, 342. 871-874.
- 14) Shannon L. M. R. H. Boyko M. Castelhan *et al.* (2015) Genetic structure in village dogs reveals a Central Asian domestication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112. 13639-13644.
- 15) Boyko A. R. R. H. Boyko C. M. Boyko *et al.* (2009) Complex population structure in African village dogs and its implications for inferring dog domestication history. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106. 13903-13908.
- 16) vonHoldt B. M. J. P. Pollinger K. E. Lohmueller *et al.* (2010) Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature*, 464. 898-902.
- 17) Frantz L. A. V. E. Mullin M. Pionnier-Capitan *et al.* (2016) Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs. *Science*, 352. 1228-1231.
- 18) 田名部雄一 (1996) 日本人の起源とその系統 日本獣医師会雑誌 49. 221-226.
- 19) Ishiguro N. Y. Inoshima, T. Yanai *et al.* (2016) Japanese wolves are genetically divided into two groups based on 8-nucleotide insertion/deletion within the mtDNA control region. *Zoolog Sci.*, 33. 44-49.
- 20) Barsh G. Gunn T. He L. *et al.* (2000) Biochemical and genetic studies of pigment-type switching. *Pigment Cell Res.*, 13. Suppl. 8. 48-53.
- 21) Barsh G. S. (2006) Regulation of pigment type switching by Agouti, Melanocortin signaling, Attractin, and Mahoganoid. pp. 395-409. In: *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*, 2nd ed. (Nordland H. J. Boissy R. E. Hearing *et al.* eds.), Massachusetts, Blackwell.
- 22) Candille S. I. C. B. Kaelin B. M. Cattana *et al.* (2007) A β -defensin mutation causes black coat color in domestic dogs. *Science*, 318. 1418-1423.
- 23) Leonard B. C. S. L. Marks C. A. Outerbridge *et al.* (2012) Activity, expression and genetic variation of canine β -defensin 103: a multifunctional antimicrobial peptide in the skin of domestic dogs. *J. Innate Immun.*, 4. 248-259.
- 24) Oguro-Okano M. M. Honda K. Yamazaki *et al.* (2011) Mutations in the melanocortin 1 receptor, β -defensin103 and agouti signaling protein genes, and their association with coat color phenotypes in Akita-Inu dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 73. 853-858.
- 25) Oguro-Okano M. M. Shirahata K. Yamazaki *et al.* (2014) 秋田犬における毛色と個々の被毛の色パターンとの関係: アカとゴマ. ヤマザキ学園大学雑誌, 4. 11-17.
- 26) Mountjoy K. G. L. S. Robbins M. T. Mortrud *et al.* (1992) The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science*, 257. 1248-1251.
- 27) Newton J. M. A. L. Wilkie L. He *et al.* (2000) Melanocortin 1 receptor variation in the domestic dog. *Mamm. Genome*, 11. 24-30.
- 28) Schmutz S. M. T. G. Berryere N. M. Ellinwood *et al.* (2003) MC1R studies in dogs with melanistic mask or brindle patterns. *J. Hered.*, 94. 69-73.
- 29) Little C. C. (1957) The inheritance of coat color in dogs. Comstock, Ithaca, N.Y.
- 30) Kerns J.A. E.J. Cargill L.A. Clark *et al.* (2007) Linkage and segregation analysis of black and brindle coat color in domestic dogs. *Genetics*, 176. 1679-1689.
- 31) Ciampolini R. F. Cecchi A. Spaterna *et al.* (2013). Characterization of different 5'-untranslated exons of the ASIP gene in black-and-tan Doberman Pinscher and brindle Boxer dogs. *Anim. Genet.*, 44. 114-117. doi: 10.1111/j.1365-2052.2012.02364.x.
- 32) Berryere T. G. J. A. Kerns G. S. Barsh *et al.* (2005) Association of an Agouti allele with fawn or sable coat color in domestic dogs. *Mamm. Genome*, 16. 262-272.
- 33) Kerns J. A. J. Newton T. G. Berryere *et al.* (2004) Characterization of the dog Agouti gene and a nonagouti mutation in German Shepherd Dogs. *Mamm. Genome*, 15. 798-808.
- 34) Drögemüller C. U. Philipp, B. Haase *et al.* (2007) A noncoding melanophilin gene (MLPH) SNP at the splice donor of exon 1 represents a candidate causal mutation for coat color dilution in dogs. *J. Hered.*, 98. 468-473.
- 35) Schmutz S. M. T. G. Berryere and A. D. Goldfinch (2002) TYRP1 and MC1R genotypes and their effects on coat color in dogs. *Mamm Genome*, 13. 380-387.
- 36) Housley D. J. and P. J. Venta (2006) The long and the short of it: evidence that FGF5 is a major determinant of canine 'hair' - itability. *Anim. Genet.*, 37. 309-315.
- 37) Cadieu E. M. W. Neff P. Quignon *et al.* (2009) Coat variation in the domestic dog is governed by variants in three genes. *Science*, 326. 150-153.
- 38) Dierks C. S. Momke U. Philipp *et al.* (2013) Allelic heterogeneity of FGF5 mutations causes the long-hair phenotype in dogs. *Anim. Genet.*, 44. 425-431.
- 39) Anderson T. M. B. M. vonHoldt S. I. Candille *et al.* (2009) Molecular and evolutionary history of melanism in North American gray wolves. *Science*, 323. 1339-1343.

プロフィール

小黒一岡野美枝子

ヤマザキ学園大学動物看護学部・動物看護学科。教授。秋田県立大学客員研究員。理学博士。

東京理科大学理学部I部化学科卒業。同大学院理学研究科化学専攻修了。東京大学医学部研究生などを経て日本大学医学部微生物学研究室助手。米国ミネソタ州 Mayo Clinic Neuroimmunology (神経免疫学 V. A. Lennon 研究室) Research Associate。科学技術振興財団事業団ERATO研究員。秋田県立大学客員研究員。平成16年ヤマザキ動物看護短期大学・動物看護学科開学時より閉学時迄、教授を経て、平成22年より現職。専門は生化学・分子生物学で、イヌからフジツボまでを研究。主なテーマは「日本犬、とくに秋田犬や川上犬における毛色の遺伝」、「フジツボ幼生の付着機構」。