

氏名(本籍)	外池 亜紀子(神奈川県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第 63 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学位論文題名	イヌの進化に関する研究 ～認知能力の犬種間比較と関連遺伝子の探索～
論文審査委員	(主査) 菊 水 健 史 (副査) 阪 口 雅 弘 田 中 和 明 茂 木 一 孝

論 文 内 容 の 要 旨

イヌの起源は 1 万 5 千年から 3 万 3 千年前と考えられており、祖先種の一部の集団がヒトの近くで生活するようになってイヌへ進化したと言われている。その後、およそ 1 万年前に農業の発達と共に小ささや従順さなどによる強い人為的選択が始まったとされている。さらに 200 年前に、犬種クラブや組織的な繁殖が始まり、多くの犬種が急激に作成された歴史がある。この進化と家畜化の過程において気質・行動や認知能力が選択圧に大きく寄与して、変化したと予測できる。例えばイヌはオオカミに比べて解決不可能な課題が提示された場合にヒトの方を早く振り返ることや、ヒトの指差しにしたがって指し示されたカップを選ぶ確率が高いことが報告されており、イヌはその進化・家畜化の過程で特異的な認知能力を獲得したと考えられる。しかし、その遺伝的背景は未だ明らかとなっていない。

現在、非公認犬種も含め世界には 700 から 800 もの犬種が確立されている。最近の遺伝子クラスター解析により、それらの犬種の中には祖先種に近いクラスター(以降原始的な犬グループと呼ぶ)が存在することが明らかとなり、原始的な犬グループには、柴犬や秋田犬等の日本固有の犬種が含まれていた。このことは柴犬や秋田犬等の日本犬が、その他の犬種よりも遺伝的にオオカミに近いことを意味している。

本研究では、イヌの選択圧の中心的役割と考えられる気質・行動や認知能力において、原始的な犬が一般的な犬種とオオカミの間に位置し、その行動は遺伝的に制御されていると仮説を立てた。さらにこの仮説に基づき、イヌの進化・家畜化の過程でオオカミから変化した行動に関与する遺伝子の探索を目指し、以下の第 1 章から第 4 章までの研究を行った。

第 1 章：原始的な犬グループのイヌの一般的な飼育下における行動特性

日本及び米国における一般の飼い主及びブリーダーを対象としたイヌの行動特性に関するアンケート

ト調査を、インターネット媒体を用いて実施した。イヌの行動解析システムは、C-barqを用いた。質問は、米国100問、日本78問から成り、様々な場面における犬の行動を5段階で評価する内容である。犬種を既に報告されていた遺伝分岐図を元に8つのグループに分類し、犬の行動特性の犬種グループ比較に用いた。質問項目について因子分析及び平行分析を行い、各因子の平均値を因子得点として分析に使用した。

アンケート結果を因子分析したところ、11の因子に分類された（訓練性、活発度、愛着、分離不安、侵入者に対する攻撃性、飼い主に対する攻撃性、見知らぬ人に対する攻撃性、見知らぬ犬に対する攻撃性、非社会的刺激に対する恐怖反応、見知らぬ人に対する恐怖反応、見知らぬ犬に対する恐怖反応）。そのうち、原始的な犬グループのイヌはどの犬種グループよりもヒトへの愛着が低いことが明らかとなった（ $p<0.05$ ）。原始的な犬の愛着はその他のどの犬種グループよりも低く、先行研究で知られている遺伝分岐図と一致した結果である。その他の犬種グループでは、ワーキンググループは、見知らぬ人に対する恐怖反応、見知らぬ犬に対する恐怖反応、非社会的刺激に対する恐怖反応、飼い主に対する攻撃性、活発度が低いことが明らかとなった。また、ハーディンググループは訓練性が高く、トイグループは飼い主に対する攻撃性、見知らぬ人に対する攻撃性、侵入者に対する攻撃性が高かった。

第2章：原始的な犬グループのイヌの社会的認知能力の特性

様々な犬種のイヌを用い、イヌの認知能力の犬種差を解決不可能課題及び指差し二者選択課題により評価した。解決不可能課題では、餌を容器で覆い容器を固定した状態で、イヌがヒトを見るまでの時間、ヒトを見ている時間、ヒトを見る回数、交互凝視の回数を測定した。指差し二者選択課題では、2つのカップのどちらかに餌を隠した上で、ヒントを出すことによりイヌが餌の入っている方のカップを選ぶ回数を測定した。ヒントとしては容器をとんとんとたたく（タッピング）、容器へ視線を向ける（視線）、容器を指差す（指差し）の3種類を組み合わせ用いた。

解決不可能課題では、原始的な犬は、最初にヒトを見るまでの時間がトイグループ、スパニエルグループ、ハーディンググループよりも長く、ヒトを見ている時間がスパニエルグループ、ハーディンググループ、レトリバーグループよりも短く、ヒトを見る回数がスパニエルグループ、ハーディンググループよりも少なく、交互凝視の回数がトイグループ、スパニエルグループ、ハーディンググループ、レトリバーグループよりも少なかった。また、原始的な犬と一般的な犬種とで2群比較を行ったところ、最初にヒトを見るまでの時間、ヒトを見ている時間、ヒトを見る回数、交互凝視の回数の全てにおいて、原始的な犬は一般的な犬種よりも有意にヒトを見ない結果が得られた（ $p<0.01$ ）。

指差し二者選択課題では、原始的な犬の成績は、視線+指差し+タッピング課題、視線+指差し課題、指差し課題の全てにおいてその他の犬種グループと同等であり、犬種グループによる有意な差は見られなかった。原始的な犬と一般的な犬種とで2群比較を行ったところ、視線+指差し+タッピング課題において、原始的な犬は一般的な犬種よりも正答数が有意に高かった（ $p<0.05$ ）。視線+指差し課題、指差し課題では、有意な差は見られなかった。

第3章：イヌの認知能力に関連する遺伝子の探索

コミュニケーション能力に関わるホルモンとして、オキシトシンとコルチゾールに着目し、メラノコルチン 2 受容体 (MC2R) とオキシトシン、オキシトシン受容体の遺伝子を選択した。さらにゲノムワイド解析によってイヌの進化に関わると報告されている候補遺伝子から WBSR17 を選抜し、これらに関連する遺伝子の多型を調べ、犬種差や行動実験の結果との関連性を調べた。

イヌの進化候補遺伝子である WBSR17 (ウィリアムズ症候群関連遺伝子) において、原始的な犬と一般的な犬種とで出現頻度の異なる一塩基多型 (C>T) が検出され、原始的な犬では一般的な犬種に比べ T を持つ頻度が高かった。またこの T 型の遺伝子型を持つ個体では、指差し二者選択課題の視線+指差し+タッピングの課題の正答数が高い結果となった ($p<0.05$)。MC2R (メラノコルチン 2 受容体遺伝子) において、原始的な犬と一般的な犬種とで出現頻度の異なる一塩基多型 (G>A) が検出され、原始的な犬では一般的な犬種に比べ A を持つ頻度が高かった。またこの A 型の遺伝子型を持つ個体を一般的な犬種内で比較した結果、指差し二者選択課題の視線+指差し+タッピング課題、視線+指差し課題、指差し課題の正答数が低い結果となった ($p<0.05$)。OT (オキシトシン遺伝子) において、原始的な犬と一般的な犬種とで出現頻度の異なる一塩基多型 (C>A) と反復数多型 (repGGGGCC) が検出され、原始的な犬では一般的な犬種に比べ一塩基多型では A を持つ頻度が高く、反復数多型では 25 塩基及び 37 塩基の長さの配列を持つ頻度が低かった。原始的な犬に多い A/A 型の一塩基多型を持つ個体では、A/C 型の遺伝子型を持つ個体よりも、解決不可能課題のヒトを見ている時間、ヒトを見る回数、交互凝視の回数においてヒトを見ない結果となった ($p<0.05$)。反復数多型では 25 塩基又は 37 塩基の長さの配列をヘテロで持つ個体において、挿入を持たない個体よりも解決不可能課題でヒトを見る回数が多い傾向が見られた ($p=0.078$)。OTR (オキシトシン受容体遺伝子) においては、原始的な犬と一般的な犬種とで出現頻度の異なる一塩基多型が検出されたものの、行動実験の結果とは関連性が見られなかった。

第4章：日本犬のβアミラーゼコピー数多型

オオカミ、秋田犬、柴犬、原始的な犬グループ以外のイヌ (ラブラドル、スタンダードプードル等の様々な犬種) のアミラーゼコピー数を調査した。柴犬は、一般的にペットとして飼われている柴犬と天然記念物柴犬保存会の厳しい管理の元で交配が行われている縄文柴を用いた。

オオカミのアミラーゼコピー数は先行研究で報告されているとおり、2 コピー程度であった。また、オオカミへの遺伝的近さから予想したとおり、秋田犬のコピー数はオオカミよりも多いが一般的な犬種より少なかった ($p<0.01$)。一方、秋田犬と同じく原始的な犬グループに含まれる柴犬のコピー数は、一般的な犬種と同程度であり、柴犬のオオカミへの遺伝的近さと反した結果となった。縄文柴のコピー数は、柴犬より少なく ($p<0.01$)、秋田犬より多かった ($p<0.05$)。

本研究によって、原始的な犬グループのイヌは一般的な犬種と比較してヒトへの愛着が低く、解決

不可能課題においてヒトを見ないことが明らかとなった。これは先行研究によって知られている遺伝分岐図の結果と一致する結果であり、イヌの進化・家畜化は気質・行動や認知能力によって選択されていることを示唆する内容である。一方で、指差し二者選択課題でヒトからの社会的な指示を読み取る能力では、原始的な犬グループのイヌは一般的な犬種と同程度又はより高いという結果が得られた。解決不可能課題と指差し二者選択課題では関連性が見られず、解決不可能課題においてヒトを見ることや指差し二者選択課題でヒトからの社会的な指示を読み取る能力は、イヌの進化・家畜化において別々に獲得されたものであることを示唆する結果といえた。イヌの認知能力に関連する遺伝子の探索では、WBSCR17 遺伝子、MC2R 遺伝子が第一の選択に関与し、OT 遺伝子が第二の選択に関わると考えられ、探索した遺伝子型の結果からも、イヌの進化・家畜化に二段階が存在する可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

イヌの起源は1万5千年から3万3千年前と考えられており、祖先種の一部の集団がヒトの近くで生活するようになってイヌへ進化したと言われている。その後、およそ1万年前に農業の発達と共に小ささや従順さなどによる強い人為的選択が始まったとされている。さらに200年前に、犬種クラブや組織的な繁殖が始まり、多くの犬種が急激に作成された歴史がある。この進化と家畜化の過程において気質・行動や認知能力が選択圧に大きく寄与して、変化したと予測できる。本研究では、イヌの選択圧の中心的役割と考えられる気質・行動や認知能力において、原始的な犬が一般的な犬種とオオカミの間に位置し、その行動は遺伝的に制御されていると仮説を立てた。さらにこの仮説に基づき、イヌの進化・家畜化の過程でオオカミから変化した行動に関与する遺伝子の探索を目指し、以下の第1章から第4章までの研究を行った。まず第1章では、日常生活における原始的な犬の行動特性を明らかにすることを目的とし、日米総計1万5千頭の犬の行動アンケートデータを解析した。第2章では、犬の遺伝分岐図に従って、犬に特徴的なヒトとのコミュニケーション能力が変化するかを行動実験で調べた。第3章では、第2章で調べた行動特性と関連する遺伝子候補を選出し、関連解析を実施した。第4章では、犬の進化家畜化における行動選択説と食物変化仮説が提唱されているが、食物変化仮説を支持するアミラーゼコピー数を調べ、犬の選択圧の可能性を調べた。

第1章では日本及び米国における一般の飼い主及びブリーダーを対象としたイヌの行動特性に関するアンケート調査を、インターネット媒体を用いて実施した。その結果、因子分析により11の因子に分類され、そのうち、原始的な犬グループのイヌはどの犬種グループよりもヒトへの愛着が低いことが明らかとなった。原始的な犬の愛着はその他のどの犬種グループよりも低く、先行研究で知られている遺伝分岐図と一致した結果となった。その他の犬種グループでは、ワーキンググループは、見知らぬ人に対する恐怖反応、見知らぬ犬に対する恐怖反応、非社会的刺激に対する恐怖反応、飼い主に対する攻撃性、活発度が低いことが明らかとなった。また、ハーディンググループは訓練性が高く、

トイグループは飼い主に対する攻撃性、見知らぬ人に対する攻撃性、侵入者に対する攻撃性が高かった。

第 2 章では様々な犬種のイヌを用い、イヌの認知能力の犬種差を解決不可能課題及び指差し二者選択課題により評価した。解決不可能課題では、原始的な犬は他の犬種グループと比較して、最初にヒトを見るまでの時間が長く、ヒトを見ている時間が短く、ヒトを見る回数が少なく、交互凝視の回数も少なかった。また、原始的な犬と一般的な犬種とで 2 群比較を行ったところ、最初にヒトを見るまでの時間、ヒトを見ている時間、ヒトを見る回数、交互凝視の回数の全てにおいて、原始的な犬は一般的な犬種よりも有意にヒトを見ない結果が得られた。

指差し二者選択課題では、原始的な犬の成績は、視線+指差し+タッピング課題、視線+指差し課題、指差し課題の全てにおいてその他の犬種グループと同等であり、犬種グループによる有意な差は見られなかった。原始的な犬と一般的な犬種とで 2 群比較を行ったところ、視線+指差し+タッピング課題において、原始的な犬は一般的な犬種よりも正答数が有意に高かった ($p<0.05$)。

第 3 章ではコミュニケーション能力に関わるホルモンとして、オキシトシンとコルチゾールに着目し、メラノコルチン 2 受容体 (MC2R) とオキシトシン、オキシトシン受容体の遺伝子を選択した。さらにゲノムワイド解析によってイヌの進化に関わると報告されている候補遺伝子から WBSR17 (ウィリアムズ症候群関連遺伝子) を選抜し、これらに関連する遺伝子の多型を調べ、犬種差や行動実験の結果との関連性を調べた。WBSR17 において、原始的な犬と一般的な犬種とで出現頻度の異なる一塩基多型 (C>T) が検出され、原始的な犬では一般的な犬種に比べ T を持つ頻度が高かった。またこの T 型の遺伝子型を持つ個体では、指差し二者選択課題の視線+指差し+タッピングの課題の正答数が高い結果となった。MC2R において、原始的な犬と一般的な犬種とで出現頻度の異なる一塩基多型 (G>A) が検出され、原始的な犬では一般的な犬種に比べ A を持つ頻度が高かった。またこの A 型の遺伝子型を持つ個体を一般的な犬種内で比較した結果、指差し二者選択課題の視線+指差し+タッピング課題、視線+指差し課題、指差し課題の正答数が低い結果となった。OT (オキシトシン遺伝子) において、原始的な犬と一般的な犬種とで出現頻度の異なる一塩基多型 (C>A) と反復数多型 (repGGGGCC) が検出され、原始的な犬では一般的な犬種に比べ一塩基多型では A を持つ頻度が高く、反復数多型では 25 塩基及び 37 塩基の長さの配列を持つ頻度が低かった。原始的な犬に多い A/A 型の一塩基多型を持つ個体では、A/C 型の遺伝子型を持つ個体よりも、解決不可能課題のヒトを見ている時間、ヒトを見る回数、交互凝視の回数においてヒトを見ない結果となった。反復数多型では 25 塩基又は 37 塩基の長さの配列をヘテロで持つ個体において、挿入を持たない個体よりも解決不可能課題でヒトを見る回数が多い傾向が見られた ($p=0.078$)。OTR (オキシトシン受容体遺伝子) においては、原始的な犬と一般的な犬種とで出現頻度の異なる一塩基多型が検出されたものの、行動実験の結果とは関連性が見られなかった。

第4章では、オオカミ、秋田犬、柴犬、原始的な犬グループ以外のイヌ（ラブラドル、スタンダードプードル等の様々な犬種）のアミラーゼコピー数を調査した。秋田犬のコピー数はオオカミよりも多いが一般的な犬種より少なかった。一方、秋田犬と同じく原始的な犬グループに含まれる柴犬のコピー数は、一般的な犬種と同程度であり、柴犬のオオカミへの遺伝的近さと反した結果となった。縄文柴のコピー数は、柴犬より少なく、秋田犬より多かった。

本研究では原始的な犬グループのイヌは一般的な犬種と比較してヒトへの愛着が低く、解決不可能課題においてヒトを見ないことが明らかとなった。これは先行研究によって知られている遺伝分岐図の結果と一致する結果であり、イヌの進化・家畜化は気質・行動や認知能力によって選択されていることを示唆する内容である。一方で、指差し二者選択課題でヒトからの社会的な指示を読み取る能力では、原始的な犬グループのイヌは一般的な犬種と同程度又はより高いという結果が得られた。解決不可能課題と指差し二者選択課題では関連性が見られず、解決不可能課題においてヒトを見ることや指差し二者選択課題でヒトからの社会的な指示を読み取る能力は、イヌの進化・家畜化において別々に獲得されたものであることを示唆する結果といえた。イヌの認知能力に関連する遺伝子の探索では、**WBSCR17** 遺伝子、**MC2R** 遺伝子が第一の選択に関与し、**OT** 遺伝子が第二の選択に関わると考えられ、探索した遺伝子型の結果からも、イヌの進化・家畜化に二段階が存在する可能性が示された。犬は最古の家畜であるものの、ヒトとの共生を生み出す機構とその遺伝的特性は明らかにされてこなかった。今回の結果より、犬の認知能力の変化には2段階が存在し、それぞれに応答した遺伝的多型の出現頻度が変化、さらに行動との関連性を見いだせた。このことは、よりヒトとの共生に適した遺伝的背景を同定できることを意味し、さらにヒトと犬の根源的な共生の歴史を明らかにする第一歩となった。

以上のことから、本研究は、博士（学術）の学位を授与するのにふさわしい業績と判断した。