

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4839439号
(P4839439)

(45) 発行日 平成23年12月21日(2011.12.21)

(24) 登録日 平成23年10月14日(2011.10.14)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 Z N A A
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 4 (全 10 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2006-168259 (P2006-168259) (22) 出願日 平成18年6月19日 (2006. 6. 19) (65) 公開番号 特開2007-330207 (P2007-330207A) (43) 公開日 平成19年12月27日 (2007.12.27) 審査請求日 平成21年4月28日 (2009. 4. 28)</p>	<p>(73) 特許権者 504300088 国立大学法人帯広畜産大学 北海道帯広市稲田町西2線11番地 (74) 代理人 110000109 特許業務法人特許事務所サイクス (72) 発明者 鈴木 宏志 北海道帯広市稲田町西2線13番地 国立 大学法人帯広畜産大学 原虫病研究センタ ー内 審査官 上條 肇 (56) 参考文献 J Vet Med Sci., 2004年, 第66巻, 183- 187ページ</p>
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 盲導犬に適した犬を選別する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

盲導犬として有益な遺伝的資質を備えたイヌを選別するための犬の選別方法であって、被検査イヌの個体のカテコールO-メチル基転移酵素遺伝子の216番目の塩基および/または482番目の塩基に存在する一塩基多型を調べ、該遺伝子に存在する一塩基多型に基づいて盲導犬に適した犬を選別することを含む、犬の選別方法。

【請求項2】

前記216番目の塩基の遺伝子型がG/Gである被検査イヌの個体を盲導犬に適した犬であると判定する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記482番目の塩基の遺伝子型がG/Gである被検査イヌの個体を盲導犬に適した犬であると判定する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

被検査イヌの個体からゲノムDNAを抽出し、前記一塩基多型を含む塩基配列の外側に結合する特異的な配列を有する一対のPCRプライマーを用いてPCR反応を行い、得られたPCR産物を制限酵素処理し、制限酵素処理により得られたDNAの長さに基づいて前記対立遺伝子の遺伝子型を識別することを含む請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、盲導犬に適した犬を選別する方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、カテコール0-メチル基転移酵素遺伝子が有する特定の一塩基多型を調べることで盲導犬に適した犬を選別する方法に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

我が国の盲導犬の実働数は約1,000頭である。一方、盲導犬の需要は5,000~8,000頭と推定されており、慢性的な盲導犬不足が続いている。この慢性的不足の要因は多々存在するが、そのひとつに、きわめて低率な合格率が挙げられる。盲導犬候補犬の訓練後の合格率は約30%に過ぎない。そのため、訓練開始前の適当な予備選抜方法の開発が望まれていた。

10

【 0 0 0 3 】

これに対して、特開2004-201542号公報(特許文献1)には、ドーパミン受容体D4遺伝子のエクソン1の多型が有用犬の選抜に有効に利用し得ると記載されている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 4 】

しかるに、本発明者の検討によれば、ドーパミン受容体D4遺伝子のエクソン1の多型が有用犬の選抜に有効ではなかった(後述の比較例参照)。

20

【 0 0 0 5 】

そこで本発明の目的は、盲導犬の選抜に有効な方法を提供することにある。

【 0 0 0 6 】

本発明者は上記目的を達成するために鋭意検討した。その結果、犬のカテコール0-メチル基転移酵素(catechol 0-methyltransferase: COMT)をコードする遺伝子多型の内、特定の多型を検出することで、盲導犬に適した犬の選抜が可能であること見いだして本発明を完成させた。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

本発明は、以下のとおりである。

30

[1] 盲導犬として有益な遺伝的資質を備えたイヌを選別するための犬の選別方法であって、被検査イヌの個体のカテコール0-メチル基転移酵素遺伝子の216番目の塩基および/または482番目の塩基に存在する一塩基多型を調べ、該遺伝子に存在する一塩基多型に基づいて盲導犬に適した犬を選別することを含む、犬の選別方法。

[2] 前記216番目の塩基の遺伝子型がG/Gである被検査イヌの個体を盲導犬に適した犬であると判定する、[1]に記載の方法。

[3] 前記482番目の塩基の遺伝子型がG/Gである被検査イヌの個体を盲導犬に適した犬であると判定する、[1]または[2]に記載の方法。

[4] 被検査イヌの個体からゲノムDNAを抽出し、前記一塩基多型を含む塩基配列の外側に結合する特異的な配列を有する一対のPCRプライマーを用いてPCR反応を行い、得られたPCR産物を制限酵素処理し、制限酵素処理により得られたDNAの長さに基づいて前記対立遺伝子の遺伝子型を識別することを含む[1]~[3]のいずれかに記載の方法。

40

【発明の効果】

【 0 0 0 8 】

本発明の方法によれば、盲導犬に適した犬の選抜が可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 0 9 】

カテコール0-メチル基転移酵素(catechol 0-methyltransferase: COMT)はドーパミンやノルアドレナリンのようなカテコール系化合物を不活性化する酵素であり、ドーパミン

50

系の代謝には極めて重要な役割をもっている。ヒトにおいて、COMT遺伝子の第4エキソンに存在するSNP (G322A) はパリン (val) からメチオニン (met) へのアミノ酸置換を伴い、酵素の活性を変化させるとともに、「固執」や「統合失調症」といった性格や精神疾患との関連が示唆されている (Benjamin et al. Neuropsychobiology 2000; 41:48-53)。また、met/met homozygotes型のCOMT遺伝子を持つ人は、COMT活性が低下していて μ -opioid系の機能低下が生じ、痛みとなる (Zubieta et al. 21 February 2003 Vol 299 Science)。

【 0 0 1 0 】

イヌのCOMT遺伝子は、図1に示すように、663bp (配列番号1) であり、ヒトやラット、マウスのCOMT遺伝子と82%以上の相同性を有している (Masuda et al. J. Vet. Med. Sci. 66(2): 183-187, 2004)。翻訳領域39、216、482番目にSNP (G39A、G216A、G482A) が認められ、そのうちG482Aはアルギニンからグルタミンへのアミノ酸置換を伴うものである。さらに5犬種 (ゴールデン・レトリバー、ラブラドル・レトリバー、マルチーズ、ミニチュアシュナウザー、シバ) 間について各SNPの発現頻度を比較した報告では、遺伝子型、対立遺伝子頻度ともにG216AおよびG482Aについて有意な犬種差が認められ、イヌの性格特性の遺伝的背景を探る上で有用な手掛かりとなる可能性が示された。

【 0 0 1 1 】

しかし、上記文献 (Masuda et al. 2004) では、上記SNPと盲導犬に適した犬との関係については言及や示唆はなされていない。

【 0 0 1 2 】

本発明は、盲導犬として有益な遺伝的資質を備えたイヌを選別するための犬の選別方法であって、本発明の犬の選別方法は、被検査イヌの個体のカテコールO-メチル基転移酵素遺伝子の216番目の塩基および/または482番目の塩基に存在する一塩基多型を調べ、該遺伝子に存在する一塩基多型に基づいて盲導犬に適した犬を選別することを含む。

【 0 0 1 3 】

より具体的には、前記216番目の塩基の遺伝子型がG/Gである被検査イヌの個体を盲導犬に適した犬であると判定することができる。実施例で詳述するように、G/Gである被検査イヌの個体の訓練後の盲導犬合格率は約65%であるのに対して、G/AまたはA/Aである個体の訓練後の盲導犬合格率は約33~37%であった。

【 0 0 1 4 】

さらに、本発明の方法では、前記482番目の塩基の遺伝子型がG/Gである被検査イヌの個体を盲導犬に適した犬であると判定することができる。実施例で詳述するように、G/Gである被検査イヌの個体の訓練後の盲導犬合格率は約65%であるのに対して、G/AまたはA/Aである個体の訓練後の盲導犬合格率は約33~38%であった。

【 0 0 1 5 】

上記遺伝子における一塩基多型の検出は、検査イヌの個体から被検体を採取し、この被検体に含まれる上記遺伝子型を検査する。被検体は、例えば、検査イヌの個体から採取した血液であることができる。但し、被検体は、上記対立遺伝子を含む遺伝子を採取できる限り、血液以外の検査イヌの個体の組織等であってもよい。

【 0 0 1 6 】

上記遺伝子における一塩基多型の検出は、一塩基多型部分の塩基配列を決定することによって行うことができる。一塩基多型部分の塩基配列の決定には、例えば、TaqMan法、ダイレクトシーケンス法、PCR-制限酵素切断断片長多型による方法 (PCR-RFLP解析)、MALDI-TOF/MSによるSNPタイピング法、DNAチップを用いた方法などを挙げることができる。各方法に用いるプローブやプライマーはイヌのCOMT遺伝子 (配列番号1) に基づいて適宜調製できる。

【 0 0 1 7 】

上記遺伝子における一塩基多型の検出には、例えば、PCR-RFLP解析を用いることができる。具体的には、上記遺伝子における一塩基多型の検出は、例えば、被検査イヌの個体からゲノムDNAを抽出し、前記一塩基多型を含む塩基配列の外側に結合する特異的な配列

10

20

30

40

50

を有する一対のPCRプライマーを用いてPCR反応を行い、得られたPCR産物を制限酵素処理し、制限酵素処理により得られたDNAの長さに基づいて前記対立遺伝子の遺伝子型を識別することで行うことができる。

【0018】

G216AのPCRプライマーとしては、
 フォワード：5'-GCCAGATCTTGGATGCAG-3'(配列番号2)
 リバース：5'-CCTGTCCTGCAGGCCT-3'(配列番号3)
 を用いることができる。

また、G482AのPCRプライマーとしては、
 フォワード：5'-TCCACTTACTCATCCAGCTGG-3'(配列番号4)
 リバース：5'-TCGAGGCCATCCACTCTCTTG-3'(配列番号5)
 を用いることができる。

10

【実施例】

【0019】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

【0020】

盲導犬の適性検査方法(材料および方法)

材料

COMTおよびDRD4 exon I多型の解析には、合計100頭の盲導犬と68頭のリジェクト犬(非盲導犬)のゲノムDNAを用いて行った。また、DRD4 exon III多型の解析には、91頭の盲導犬と33頭の非盲導犬のゲノムDNAを用いた。盲導犬グループは、盲導犬テストに合格した犬、現役盲導犬、引退盲導犬を示し、非盲導犬グループは、盲導犬テストに不合格した犬を示す。2つのグループ共に犬種は、ラブラドル・レトリバー、ゴールデン・レトリバー、そしてそれら2種のF1である。

20

【0021】

比較例

DRD4 exon I とIII多型

DRD4 exon IとIIIの多型領域は、PCRによって増幅した。PCRに使用したイヌゲノムDNAは、PI-50 核酸自動分離装置(KURABO, Tokyo, Japan)を使用し、付属のマニュアルに従って血液より抽出したもの、あるいはFTAカード(Whatman Inc., Clifton, NJ)に血液あるいは口腔粘膜細胞をトランスファーしたものを使用した。20 μ lのPCR反応液中に5-50 ngのゲノムDNAを使用した。DRD4 exon I多型領域の増幅には、TaKaRa LA Taq with GC Buffer(TaKaRa Co. Ltd., Kyoto, Japan)を使用し、PCRの反応液組成は付属のプロトコールに従った(2X GC Buffer IIを使用)。プライマーは、0.2 μ Mの蛍光標識フォワードプライマー(5'-VIC-CGCCATGGGGAACCGCAG-3'(配列番号6))とリバースプライマー(5'-CGGC TCACCTCGGAGTAGA-3'(配列番号7))を用いた(Ito et al. 2004)。PCR反応条件は、95 $^{\circ}$ Cで5分間反応させた後、増幅ステップ(95 $^{\circ}$ C \cdot 30秒、60 $^{\circ}$ C \cdot 30秒、72 $^{\circ}$ C \cdot 30秒)を35-45サイクル行い、最後に72 $^{\circ}$ Cで7分間伸長反応を行った。

30

【0022】

DRD4 exon III多型領域の増幅に用いたPCRの反応液組成は、0.5 μ Mの蛍光標識フォワードプライマー(5'-FAM-TTCTTCTACCCTGCCCGCTCATG-3'(配列番号8))とリバースプライマー(5'-CCGCGGGGGCTCTGCAGGGTCG-3'(配列番号9))、250 μ MのdATPとdCTPとdTTP、125 μ MのdGTP、125 μ Mの7-deaza-dGTP(Boehringer-Mannheim, Germany)、5%のdimethyl sulfoxide、20mMのTris-HCl(pH 8.8)、10mMのKCl、2mMのMgSO₄、0.1%のTriton X-100、2 μ gのBSA、2UのPfu Turbo DNA Polymerase(STRATAGENE, U.S.A.)であった(Ito et al. 2004)。また、同じ長さの対立遺伝子(447aおよび447b)を区別するために、蛍光標識フォワードプライマー(5'-FAM-TTCTTCTACCCTGCCCGCTCATG-3'(配列番号10))とリバースプライマー(5'-TGGGCTGGGGTGCCGTCC-3'(配列番号11))を用いて増幅させた(Ito et al. 2004)。PCR反応条件は、98 $^{\circ}$ Cで3分間反応させた後、増幅ステップ(98 $^{\circ}$ C \cdot 1分、65 $^{\circ}$ C \cdot 1分、74 $^{\circ}$ C \cdot 1分)を30サイクル行い、最後に74 $^{\circ}$ Cで5分間伸長反応を行った。PCR産物のサイ

40

50

ズ測定には、ABI 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) を用いた。DRD4 exon I 多型では、short型を持つ場合には249bpに、long型を持つ場合には272bpにそれぞれ蛍光のピークが認められた。DRD4 exon III多型では、435を持つ場合には424bpに、447aを持つ場合には163bpに、447bを持つ場合には175bpにそれぞれ蛍光のピークが認められた。

【 0 0 2 3 】

実施例

COMT G39A、G216A、G482A SNPs

COMT G39A、G216A、G482A SNPsの遺伝子型判定には、RFLP解析を用いた。PCRに使用したイヌゲノムDNAは、PI-50 核酸自動分離装置を使用し、付属のマニュアルに従って血液より抽出したもの、あるいはFTAカードに血液あるいは口腔粘膜細胞をトランスファーしたものを使用した。20 μ lのPCR反応液中に5-50ngのゲノムDNAを使用した。各SNP領域の増幅には、TaKaRa LA Taq with GC Bufferを使用し、PCRの反応液組成は付属のプロトコールに従った(2 X GC Buffer Iを使用)。プライマーはそれぞれ、G39A(フォワード:5'-GCTGGAATGAGTTGGTCCTG-3'(配列番号12); リバース:5'-TTTCTTGTCACCCACGTTCA-3'(配列番号13))、G216A(フォワード:5'-GCCAGATCTTGGATGCAG-3'(配列番号2); リバース:5'-CCTGTCCTGCAGGCCT-3'(配列番号3))、G482A(フォワード:5'-TCCACTTACTCATCCAGCTGG-3'(配列番号4)); リバース:5'-TCGAGGCCATCCACTCTCTTG-3'(配列番号5))(Masuda et al. 2004)を用いた。

【 0 0 2 4 】

PCR反応条件は、G39Aは、95 で5分間反応させた後、増幅ステップ(95 \cdot 30秒、58 \cdot 30秒、72 \cdot 30秒)を40サイクル行い、最後に72 で5分間伸長反応を行った。G216Aは、95 で5分間反応させた後、増幅ステップ(95 \cdot 30秒、62 \cdot 30秒、72 \cdot 30秒)を40サイクル行い、最後に72 で5分間伸長反応を行った。G482Aは、95 で5分間反応させた後、増幅ステップ(95 \cdot 30秒、64 \cdot 30秒、72 \cdot 1分)を40サイクル行い、最後に72 で5分間伸長反応を行った。

【 0 0 2 5 】

G39A、G216A、G482A SNPsのPCR産物は、それぞれ20UのAfaI、30UのEagI、6UのSfcIで12時間制限酵素反応を行った後、G39A SNPは4%、G216A、G482A SNPは3%の低融点アガロースゲルで分離した。G39A SNPでは、G/G遺伝子型が179-bp、G/A遺伝子型が79-、100-、179-bp、A/A遺伝子型が79-、100-bpの断片に分離された。G216A SNPでは、G/G遺伝子型が38-、43-、113-bp、G/A遺伝子型が38-、43-、113-、156-bp、A/A遺伝子型が38-、156-bpの断片に分離された。G482A SNPでは、G/G遺伝子型が162-、332-bp、G/A遺伝子型が144-、162-、332-bp、A/A遺伝子型が144-、332-bpの断片に分離された。

【 0 0 2 6 】

統計解析

統計解析には、カイ二乗検定(StatView 5.0, SAS Institute Inc., USA)を用い、 $p < 0.05$ は有意な差を示すとみなした。

【 0 0 2 7 】

【表 1】

盲導犬および非盲導犬における COMT G216A 多型の遺伝子型および対立遺伝子頻度

	遺伝子型			対立遺伝子	
	G/G	G/A	A/A	G	A
盲導犬 (n=100)	88	11	1	187	13
非盲導犬 (n=68)	47	19	2	113	23

* Chi-square test, P=0.010

遺伝子型別の合格率(%)	
G/G	65.2
G/A	36.7
A/A	33.3

【 0 0 2 8 】

【表 2】

盲導犬および非盲導犬における COMT G482A 多型の遺伝子型および対立遺伝子頻度

	遺伝子型			対立遺伝子	
	G/G	G/A	A/A	G	A
盲導犬 (n=100)	88	11	1	187	13
非盲導犬 (n=68)	48	18	2	114	22

* Chi-square test, P=0.018

遺伝子型別の合格率(%)	
G/G	64.7
G/A	37.9
A/A	33.3

【 0 0 2 9 】

【表 3】

盲導犬および非盲導犬における COMT G39A 多型の遺伝子型および対立遺伝子頻度

	遺伝子型			対立遺伝子	
	G/G	G/A	A/A	G	A
盲導犬 (n=100)	34	44	22	112	88
非盲導犬 (n=68)	21	35	12	77	59

* Chi-square test, P=0.613

遺伝子型別の合格率(%)	
G/G	61.8
G/A	55.7
A/A	64.7

【 0 0 3 0 】

10

20

30

40

【表4】

盲導犬および非盲導犬における DRD4 exon III 多型の遺伝子型および対立遺伝子頻度

	対立遺伝子		
	435	447a	447b
盲導犬 (n=91)	48	119	15
非盲導犬 (n=33)	18	43	5

* Chi-square test, P=0.979

対立遺伝子別の合格率(%)	
435	72.3
447a	74.2
447b	75.0

【0031】

【表5】

盲導犬および非盲導犬における DRD4 exon I 多型の遺伝子型および対立遺伝子頻度

	遺伝子型			対立遺伝子	
	short / short	short / long	long / long	short	long
盲導犬 (n=100)	21	49	30	91	109
非盲導犬 (n=68)	10	42	16	62	74

* Chi-square test, P=0.259

遺伝子型別の合格率(%)	
short / short	67.7
short / long	53.8
long / long	65.2

【0032】

上記表1に示すように、COMT 216番目の塩基の遺伝子型がG/Gである被検査イヌの個体の訓練後の盲導犬合格率は約65%であるのに対して、G/AまたはA/Aである個体の訓練後の盲導犬合格率は約33~37%であった。この結果から、COMT 216番目の塩基の遺伝子型がG/Gである被検査イヌの個体を盲導犬に適した犬であると判定することができる。

【0033】

上記表2に示すように、COMT482番目の塩基の遺伝子型がG/Gである被検査イヌの個体の訓練後の盲導犬合格率は約65%であるのに対して、G/AまたはA/Aである個体の訓練後の盲導犬合格率は約33~38%であった。この結果から、COMTの482番目の塩基の遺伝子型がG/Gである被検査イヌの個体を盲導犬に適した犬であると判定することができる。

【0034】

上記表3に示すように、COMT39番目の塩基の遺伝子型については、G/Gである被検査イヌの個体、G/Aである被検査イヌの個体及びA/Aである被検査イヌの個体の間で、盲導犬合格率に有意な差はなかった。

【0035】

上記表4及び5に示すように、DRD4 exon III 多型対立遺伝子頻度及びDRD4 exon I多型遺伝子型、対立遺伝子頻度と盲導犬合格率との間に有意な差は見いだせなかった。

10

20

30

40

50

【産業上の利用可能性】

【0036】

本発明は盲導犬の育成に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】イヌのCOMT遺伝子を示す。

【 図 1 】

Canis familiaris catechol-*O*-methyltransferase (COMT) コード領域+終止コドン

```
atgggggacacgaaggagcagcgcacatcctgcgacatgtactccagcacgcggtggccgggga  
cccacaaagtgtgctggaggccattgatacctactgctcgcagaaggagtgggccatgaacg  
tgggtgacaagaaaggccagatcttggatgcagtgggtgcgggagcagcggccgtcggtgctg  
ctggagctgggagcctactgcggctactcggccgtgcgcacatggcccgcctgctggagcccgg  
ggcccgcctgatcaccatcgagctcaaccctgacttcgccgccatcaccagcagatgctgg  
acttcgcaggcctgcaggacagggtcaccattctgacoggggcatcccaggacaccatcccc  
gagctgaagaagaagcatgatgtggacacgctagacatgggtcttccttgaccactggaagga  
tcggtacctgcccgcacactcctcctagaggagtgtggcctgctacggaaagggacagtgc  
tgctggctgacaacgtcatctgccaggaaacaccagaattcctggcatacgtgcgtgggaac  
aacgcctttgagtgcacacacttcccctcgtacctggaatactccaagagagtggatggcct  
cgagaaggtggtctacaagggcccaggcagcccaacacagccgtga
```

コード領域の長さ : 663bp

gcac : エキソン領域

gcac : G39A SNP 検出用プライマー配列

gcac : G216A SNP 検出用プライマー配列

gcac : G482A SNP 検出用プライマー配列

atg : 開始コドン

tga : 終止コドン

【 配列表 】

0004839439000001.app

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/00 - 15/90

CA/REGISTRY(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

PubMed