

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-193826

(P2011-193826A)

(43) 公開日 平成23年10月6日(2011.10.6)

| | | |
|--------------------------------|-----------------------|-------------|
| (51) Int.Cl. | F 1 | テーマコード (参考) |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 4 B O 2 4 |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 A | 4 B O 6 3 |

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2010-65453 (P2010-65453)
 (22) 出願日 平成22年3月23日 (2010. 3. 23)

(出願人による申告) 農林水産省「平成21年度新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業委託事業」(豚肉の肉量および脂肪形質改良のための椎骨数遺伝診断を利用した生産技術の開発)、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 501167644
 独立行政法人農業生物資源研究所
 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
 (71) 出願人 000201641
 全国農業協同組合連合会
 東京都千代田区大手町一丁目3番1号
 (71) 出願人 593027587
 社団法人農林水産先端技術産業振興センター
 東京都港区赤坂1丁目9番13号
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ブタの椎骨数遺伝子診断キット

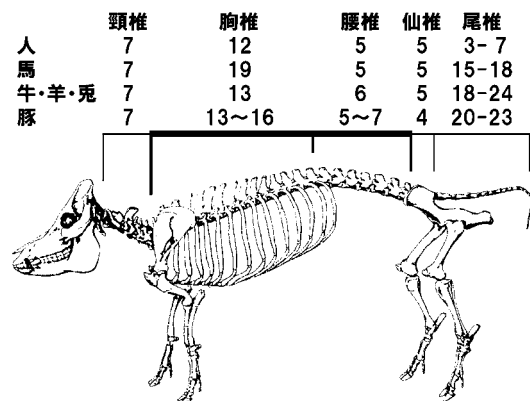
(57) 【要約】

【課題】 本発明は、椎骨数増大型遺伝形質を有するブタを効率的に判定可能な試薬を提供することにある。より詳しくは、本発明は、ブタの第7染色体上のVertnin(VRTN)遺伝子上、またはその近傍の多型を用いた遺伝子診断用の試薬の提供を課題とする。

【解決手段】

ブタの第7染色体上に、ブタの椎骨数増大と関連する新規なVertnin遺伝子を同定し、さらに、該遺伝子上もしくはその近傍に存在し、ブタの椎骨数増大型遺伝形質と関連する多型を同定した。該多型を用いることにより、ブタの椎骨数増大型遺伝形質の有無の判定方法を実施することが可能である。本発明は、該判定方法のためのPCRプライマー等の試薬を提供する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ブタの第 7 染色体上に存在する配列番号：1～7のいずれかに記載の塩基配列もしくはその相補鎖にストリンジェント条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、該塩基配列中に存在する下記(1)～(7)のいずれかの多型部位を含む領域を増幅するための PCR プライマー用ポリヌクレオチド。

- (1) 配列番号：1 に記載の塩基配列の 6 8 位
- (2) 配列番号：2 に記載の塩基配列の 1 4 1 位
- (3) 配列番号：3 に記載の塩基配列の 3 5 5 位
- (4) 配列番号：4 に記載の塩基配列の 2 0 7 位
- (5) 配列番号：5 に記載の塩基配列の 1 5 2 位
- (6) 配列番号：6 に記載の塩基配列の 1 5 5 ～ 4 4 5 位
- (7) 配列番号：7 に記載の塩基配列の 3 2 0 ～ 3 2 2 位

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを有効成分とする、ブタ椎骨数遺伝子診断薬。

【請求項 3】

下記(1)～(7)のいずれかのプライマーセットを有効成分として含む、ブタ椎骨数遺伝子診断薬。

- (1) 配列番号：8 に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：9 に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット
- (2) 配列番号：10 に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：11 に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット
- (3) 配列番号：12 に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：13 に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット
- (4) 配列番号：14 に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：15 に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット
- (5) 配列番号：16 に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：17 に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット
- (6) 配列番号：18 に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：19 または 20 に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット
- (7) 配列番号：21 に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：22 に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット

20

30

【請求項 4】

配列番号：8～22 に記載の全てのポリヌクレオチドを含有する、ブタ椎骨数遺伝子診断薬。

【請求項 5】

ブタの第 7 染色体上の塩基配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、以下の(1)～(7)のいずれかに記載された(A)と(B)のそれぞれの多型変異を区別可能なプローブ用ポリヌクレオチドを有効成分として含む、ブタ椎骨数遺伝子診断薬。

40

- (1) 配列番号：1 に記載の塩基配列において、(A) 6 8 位の塩基種が A、(B) 6 8 位の塩基種が G
- (2) 配列番号：2 に記載の塩基配列において、(A) 1 4 1 位の塩基種が T、(B) 1 4 1 位の塩基種が A
- (3) 配列番号：3 に記載の塩基配列において、(A) の 3 5 5 位の塩基種が T、(B) 3 5 5 位の塩基種が C
- (4) 配列番号：4 に記載の塩基配列において、(A) の 2 0 7 位の塩基種が A、(B) 2 0 7 位の塩基種が T
- (5) 配列番号：5 に記載の塩基配列において、(A) の 1 5 2 位の塩基種が C、(B) 1 5 2 位の塩基種が A

50

(6) 配列番号：6に記載の塩基配列において、(A)155～445位の塩基配列を有する挿入変異、(B)155～445位の塩基配列を有さない欠失変異

(7) 配列番号：7に記載の塩基配列において、(A)320～322位の塩基配列がA A A、(B)320～322位の塩基配列がA A A A A

【請求項6】

請求項2～5のいずれかに記載のブタ椎骨数遺伝子診断薬を含む診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ブタの第7染色体上のVertnin遺伝子上もしくはその近傍に存在する多型マーカーを指標とするブタの椎骨数増大型遺伝形質の有無の判定方法のための試薬およびキットに関する。

10

【背景技術】

【0002】

ブタはイノシシを祖先とし、ユーラシア大陸の複数地域で家畜化されたと言われている。19世紀中頃からヨーロッパにおいて、成長・体格などの良い豚を選抜して育種することが行われるようになり、それらがもとになり現在の商用品種が形成されている。

【0003】

本発明者らはブタの改良を目的に経済形質に関与する遺伝子座の単離を進めてきた。肉質・成長といった経済形質の多くは量的形質でありそれを支配する遺伝子座は量的形質遺伝子座(quantitative trait locus; QTL)と呼ばれる。量的形質は複数の遺伝子座に支配され、また環境要因によっても大きく影響を受けるため、QTLの正確なマッピングは難しく、その責任遺伝子を同定すること、また多様性の原因となる多型を同定することは非常に困難である。ブタにおいて遺伝子レベルで解明されたQTLでは肉質(グリコーゲン量)に関与するPRKAG3遺伝子(非特許文献1)、肉量に関与するIGF2遺伝子(非特許文献2)がある。

20

【0004】

本発明者らは複数のF2実験家系を作製し、成長性、産肉性、肉質などの各種経済形質に関するQTL解析を行った(非特許文献3～10)。その結果、様々なQTLが検出されたが、その中で胸椎数と腰椎数の和で示される椎骨数(図1)に関与するQTLが複数の家系を通じて2ヶ所のゲノム領域(第1染色体q腕末端、第7染色体q腕中央)に検出された(表1(F2実験家系と椎骨数QTL)、図2)。

30

【0005】

【表1】

| 生産場所／家系名 | 親世代に用いた品種* | QTLの対立遺伝子 | |
|--------------------------|-----------------|-----------|-------|
| | | 第1染色体 | 第7染色体 |
| 畜産試験場／MG家系 | ♂ゲッチンゲンミニ豚 | wt/Q | wt/wt |
| | ♀梅山豚 (1, 2) | wt/wt | wt/wt |
| 群馬県／LWb家系 | ♀ランドレース (1, 2) | Q/Q | Q/wt |
| | ♂日本イノシシ | wt/wt | wt/wt |
| 北海道／ML家系 | ♂ランドレース | Q/Q | Q/Q |
| | ♀梅山豚 (1, 2) | wt/wt | wt/wt |
| 北海道／MW家系 | ♂大ヨークシャー | Q/Q | Q/Q |
| | ♀梅山豚 | wt/wt | wt/wt |
| 静岡県／JW家系 | ♂大ヨークシャー | Q/Q | Q/wt |
| | ♀金華豚 | wt/wt | wt/wt |
| 鹿児島県／BC家系 | ♀パークシャー | Q/Q | Q/Q |
| | ♂クラウンミニ豚 | wt/wt | wt/wt |
| 宮城県／LM家系 | ♀ランドレース | Q/Q | Q/wt |
| | ♂梅山豚 | wt/wt | wt/wt |
| 徳島県／WWb家系 | ♀大ヨークシャー (1, 3) | Q/Q | Q/wt |
| | ♀大ヨークシャー (2) | Q/Q | wt/wt |
| | ♂日本イノシシ | wt/wt | wt/wt |
| 三県合同／JD家系 (千葉、神奈川、静岡) | ♂デュロック | Q/Q | Q/Q |
| | ♀金華豚 (1~5) | wt/wt | wt/wt |

* 複数個体を用いた場合は括弧内に示した。

【0006】

上記表1において、第1染色体では増大型対立遺伝子Qに約+0.5本の椎骨数増大効果があり、第7染色体では増大型対立遺伝子Qに約+0.6本の椎骨数増大効果があった。

【0007】

ブタの頸椎は他の哺乳類と同じく7個であるが、胸椎、腰椎の数には多様性があり、胸椎は13個から16個、腰椎は5個から7個とばらついている（非特許文献11）。これらを合計した数（椎骨数）はブタの祖先であるイノシシでは19個であるが、現在の肉用品種では20個から23個であり、このような種内での大きな多様性は、哺乳類ではブタでのみ見られる（図1）。ブタは肉量増大、繁殖性向上のために体が大きくなるように選抜され、その過程で椎骨数が増大したと考えられ、実際、一つの椎骨数の増大により、体長は平均約1.5 cm伸びることが示されている（非特許文献12）。

【0008】

2つの椎骨数QTLにはそれぞれ椎骨数を増大させる対立遺伝子（以下、増大型対立遺伝子）があり、その効果はほぼ等しく、各家系の結果を平均すると対立遺伝子あたり約0.5から0.6個の椎骨数を増大させた。また2つのQTLは互いに独立に働き、すべての対立遺伝子が増大型になると平均で約2.3本の椎骨数が増大した（表2（ブタの椎骨数に関する2つのQTLの効果））。

【0009】

【表 2】

| 第1染色体 | 第7染色体 | F2の個体数 | | | | | 平均 |
|-------|-------|--------|-----|-----|-----|-----|-------|
| | | 19個 | 20個 | 21個 | 22個 | 総計 | |
| Q/Q | Q/Q | | 1 | 8 | 14 | 23 | 21.57 |
| Q/Q | Q/wt | | 5 | 59 | 4 | 68 | 20.99 |
| Q/Q | wt/wt | 1 | 23 | 7 | 1 | 32 | 20.25 |
| Q/wt | Q/Q | | 3 | 68 | 5 | 76 | 21.03 |
| Q/wt | Q/wt | | 66 | 55 | 4 | 125 | 20.50 |
| Q/wt | wt/wt | 5 | 49 | 3 | | 57 | 19.97 |
| wt/wt | Q/Q | | 26 | 10 | 2 | 38 | 20.37 |
| wt/wt | Q/wt | 4 | 50 | 6 | | 60 | 20.03 |
| wt/wt | wt/wt | 39 | 10 | 1 | | 50 | 19.24 |
| 総計 | | 49 | 233 | 217 | 30 | 529 | 20.43 |

10

20

30

【0010】

40

上記表 2 においては、JD家系を用い、マイクロサテライトマーカーによりQTL型を推定した。

【0011】

これまでのF2実験家系の解析において、第1染色体q腕末端領域の椎骨数QTLでは、梅山豚、金華豚などのアジア在来種、および日本イノシシの対立遺伝子に椎骨数増大効果は認められず野生型であり、ランドレース、大ヨークシャー、デュロック、パークシャーといった西洋品種の対立遺伝子のすべてに椎骨数増大効果が認められた(表1、表3(椎骨数QTLの遺伝子型))。第1染色体上の椎骨数QTLについては、椎骨数が増大した西洋品種で固定された約300 kbの領域を発見し、そこに位置する責任遺伝子NR6A1を同定した(特許文献1、非特許文献13)。

50

【 0 0 1 2 】

【表 3】

| | 第1染色体 | 第7染色体 |
|-------------------|-------|------------|
| イノシシ、アジア在来種 (19個) | 野生型wt | 野生型wt |
| 西洋品種 (20~23個) | 増大型Q | 野生型wt、増大型Q |
| 責任遺伝子 | NR6A1 | VRTN |

【 0 0 1 3 】

第7染色体q腕中央部の椎骨数QTLでは、F2実験家系に用いた西洋品種に由来する一部の対立遺伝子に椎骨数を増大させる効果が認められた(表1、表3)、(非特許文献14)。また徳島県の大ヨークシャー種系統豚を用い、その種豚について第7染色体の椎骨数QTLについて半きょうだい解析を行うことにより、QTLがヘテロ型である個体を検出した(図3)(非特許文献14)。つまりこの第7染色体q腕中央部の椎骨数QTLが、現在豚肉生産に用いられている品種での椎骨数の多様性の原因であり、原因遺伝子の単離およびその遺伝子診断技術の開発は、産肉性、繁殖性、また筋肉内脂肪含量などの肉質の改良に大きく貢献することができる。

【 0 0 1 4 】

なお、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 1 5 】

【特許文献1】特開2006-101871

【非特許文献】

【 0 0 1 6 】

【非特許文献1】Milan D., Jeon JT., Looft C., Amarger V., Robic A. et al., 2000 A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science*. 288: 1248-1251.

【非特許文献2】Van Laere AS., Nguyen M., Braunschweig M., Nezer C., Collette C. et al., 2003 A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature*. 425: 832-836.

【非特許文献3】Wada, Y., T. Akita, T. Awata, T. Furukawa, N. Sugai et al., 2000 Quantitative trait loci (QTL) analysis in a Meishan x Gottingen cross population. *Anim. Genet*. 31: 376-384.

【非特許文献4】松原英二、湊和之、稲毛優子、楠本宏司、美川智、和田康彦、小林栄治、峰澤満、安江博「イノブタ実験家系における経済形質とマイクロサテライトマーカーとの連鎖解析」日本養豚学会誌、第36巻4号、P189、平成11年11月

【非特許文献5】内藤学、山田渥、内田陽子、稲毛優子、三宅正志、美川智、和田康彦、小林栄治、峰澤満、栗田崇、安江博「梅山豚 x 大ヨークシャー種実験家系におけるDNAマーカーと経済形質との連鎖解析」日本養豚学会誌、第37巻4号、P182、平成12年10月

【非特許文献6】室伏淳一、河原崎達雄、堀内篤、久松紀子、楠本宏司、美川智、和田康彦、峰澤満、安江博「金華豚・大ヨークシャー種交雑実験家系における産肉性、肉質とDNAマーカーとの連鎖解析」日本養豚学会誌、第35巻2号、P66、平成10年6月

【非特許文献7】加治佐修、犬童政昭、三宅正志、小林栄治、和田康彦、美川智、峰澤満、安江博「パークシャー種とクラウンミニブタ交雑家系のDNAマーカーを用いた連鎖解析」日本養豚学会誌、第35巻2号、P66、平成10年6月

【非特許文献8】新居雅宏、谷史雄、仁木明人、林武司、上西博英、美川智、小林栄治、内田陽子、栗田崇、安江博「日本イノシシと大ヨークシャー種交雑家系におけるQTL解析」第98回日本畜産学会大会講演要旨集、P19、平成13年3月

【非特許文献9】山口倫子、江森格、大澤浩司、内藤昌男、神山佳三、金谷奈保恵、内田

陽子、堀内篤、仲沢慶紀、林武司、栗田崇「金華豚・デュロック種交雑家系における経済形質のQTL解析と筋肉内脂肪含量を対象としたマーカー利用選抜」日本養豚学会誌、第40巻4号、P212、平成15年10月

【非特許文献10】堀内篤、知久幹夫、井手華子、金谷奈保恵、内田陽子、山口倫子、仲沢慶紀、林武司、栗田崇「金華豚とデュロック種の交雑家系における肉質に関するQTLの解析」日本養豚学会誌、第40巻4号、P213、平成15年10月

【非特許文献11】King, J. W. B., and R. C. Roberts, 1960 Carcass length in the bacon pig: its association with vertebrae numbers and prediction from radiographs of the young pig. Anim. Prod. 2: 59-65

【非特許文献12】Berge, S., 1948 Genetical researches on the number of vertebrae in the pigs. J. Anim. Sci. 7: 233-238 10

【非特許文献13】Mikawa S., Morozumi T., Shimanuki S., Hayashi T., Uenishi H., Domukai M., Okumura N., Awata T. 2007 Fine mapping of a swine quantitative trait locus for number of vertebrae and analysis of an orphan nuclear receptor, germ cell nuclear factor (NR6A1). Genome Research 17:586-593

【非特許文献14】Mikawa S., Hayashi T., Nii M., Shimanuki S., Morozumi T., Awata T., 2005 Two quantitative trait loci on Sus scrofa chromosomes 1 and 7 affecting the number of vertebrae. J Anim Sci. 83:2247-2254.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】 20

【0017】

本発明は、上記状況に鑑みてなされたものであり、その目的は椎骨数増大型遺伝形質を有するブタを効率的に判定する試薬を提供することにある。より詳しくは、本発明は、ブタの第7染色体上のVertnin(VRTN)遺伝子上、またはその近傍の多型を用いた遺伝子診断用の試薬の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0018】

椎骨数増大と関連する遺伝子の単離については、まずQTL領域に詳細に配置したマイクロサテライトマーカーを用い、そのハプロタイプ解析を行うことにより、そのQTL領域を45 kbの領域にまで絞り込んだ。またこの領域にはVertnin (VRTN) 遺伝子が位置することを解明した。ハプロタイプ解析に用いた大ヨークシャー種系統豚においては、増大型と野生型では42個の多型部位があり(図4)、増大型と野生型のそれぞれに対応するハプロタイプを形成した(表4(大ヨークシャー種系統豚でのVRTN遺伝子近傍の多型部位によるハプロタイプ))。 30

【0019】

【表 4】

| 多型 | 増大型 Q | 野生型 wt | |
|---------|-------------------|-------------------|----|
| NV004 | T | C | |
| NV007 | C | G | |
| NV083 | A | G | |
| NV015-1 | A | C | |
| NV015-2 | G | A | |
| NV149 | T | A | |
| NV090 | T | C | 10 |
| NV024 | A | T | |
| NV025 | G | A | |
| NV027-1 | C | A | |
| NV027-2 | C | T | |
| NV028 | A | G | |
| NV123 | ins (PRE1 291 bp) | del (PRE1 291 bp) | |
| NV104 | G | A | |
| NV030-1 | A | G | |
| NV030-2 | T | G | 20 |
| NV030-3 | C | T | |
| NV030-4 | T | C | |
| NV035 | C | G | |
| NV040-1 | del | ins (A) | |
| NV040-2 | A | G | |
| NV040-3 | A | T | |
| NV040-4 | G | A | |
| NV040-5 | G | A | |
| NV040-6 | C | T | 30 |
| NV040-7 | T | C | |
| NV048 | A | G | |
| NV049-1 | T | C | |
| NV049-2 | C | T | |
| NV107 | AAA | AAAAA | |
| NV055-1 | T | C | |
| NV055-2 | ins (GA) | del | |
| NV058-1 | T | C | |
| NV058-2 | T | C | 40 |
| NV058-3 | G | A | |
| NV058-4 | G | C | |
| NV062-1 | C | T | |
| NV062-2 | G | A | |
| NV064 | G | A | |
| NV065 | C | T | |
| NV067 | del | ins (C) | |
| NV071 | C | A | |

上記表4において、delとは欠失変異(deletion)、insとは挿入変異(insertion)を表す。

【0021】

現在、日本国内の豚肉生産には大ヨークシャー種他に、ランドレース種、デュロック種が多く用いられている。またパークシャー種も黒豚として生産されている。その他には少数ではあるがハンプシャー種、中ヨークシャー種がある。また海外ではチェスターホワイト種、スポット種、ピエトレン種も用いられており、海外系企業ではこれら品種からハイブリッド豚を作出しているところもある。

【0022】

国内で生産されている肉豚について(ランドレース種と大ヨークシャー種のF1雌とデュロック種雄から生産)多型情報を収集するために、と場からの肉豚のサンプリングを行い、プロモーター領域に位置するSNP(NV027-1)と、椎骨数との関係を表5(と場サンプルにおけるプロモーター領域のSNP(NV027-1)と椎骨数の関連性)に示したが、Cアレルに0.53個の椎骨数を増大させる効果が認められた。他の41個の多型部位もNV027-1と連鎖不平衡にあり、椎骨数と関連性が認められたが、多型解析の結果からは上記2種類以外のハプロタイプの存在も示唆された。

10

【0023】

【表5】

| | 個体数 | | | | 総計 | 平均 |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| | 20個 | 21個 | 22個 | 23個 | | |
| C/C | | 21 | 30 | 2 | 53 | 21.64 |
| C/A | 3 | 88 | 23 | 1 | 115 | 21.19 |
| A/A | 14 | 16 | 1 | | 31 | 20.58 |

20

【0024】

表4に示した2種以外のハプロタイプが存在するため、遺伝子診断のためには増大型の対立遺伝子と高度に関連する多型のみを選択して利用することが重要である。そのためには国内外から広くブタサンプルを収集し、それらの多型を詳細に解析する必要がある。

30

【0025】

またブタの出荷頭数(16,596千頭)はウシ(和牛:460千頭、その他:770千頭)に比べて多く、またその1頭あたりの枝肉価格は低い(豚:28千円、和牛:810千円)。よって遺伝子診断のコスト低減がその普及には必須である。

【0026】

ブタにおいて椎骨数は、産肉性、繁殖性に大きく関わり、また筋肉内脂肪含量などの肉質との関連性も指摘されている。よって椎骨数遺伝子に関する遺伝子診断の普及は、今日の豚肉生産の効率化に大きく貢献することができる。

【0027】

Vertnin(VRTN)遺伝子を含む45 kbの領域において、大ヨークシャー種系統豚では、QT L型と一致する42ヵ所の多型部位があり、これら多型から構成されるハプロタイプは2種であった。しかしながらと場サンプル(ランドレース種、大ヨークシャー種、およびデュロック種の交雑種)によるハプロタイプ解析においては、この2種のハプロタイプの他にマイナーなハプロタイプの存在が示唆された。正確な遺伝子診断のために、国内外から幅広く肉用に用いられる品種ブタを収集し、それらの多型情報集積し、椎骨数増大型に特徴的な多型を明らかにした。

40

【0028】

遺伝子診断において多型を判定する方法としては、その領域の増幅と塩基配列の解読、制限酵素を用いたRFLP(またはPCR-RFLP)、質量分析を用いた方法、多型部位に対するハ

50

イブリダイゼーションを利用したDNAチップなどがある。これらには簡便性、コスト性、大量解析に対する適性などに差がある。

【0029】

ブタに関する遺伝子診断を広く普及させるためには、コストが低く、また操作が容易であることが重要である。本発明においては、アレルト異的プライマーを用いたPCR-SSP(sequence specific primers)法を用いた。また診断の正確度を向上させるため、複数の多型部位を利用することとした。コスト低減と簡便性の向上を目的とし、複数の多型部位はマルチプレックスPCRにより解析した。

【0030】

具体的には、国内外より487頭の肉用品種ブタを収集し、それらの多型解析により、椎骨数増大型に高度に関連する多型部位を7ヶ所選定した。これら7ヶ所の多型部位について、アレルト異的な増幅が可能であること、アガロースゲル電気泳動により判別・区別できる増幅DNA断片長を持つこと、マルチプレックスPCRにより同時に増幅が可能であること、これらすべてを満たすPCRプライマーを検索し、またそれらの適正な混合比率を求めた。その結果、15種類のプライマーによって、7ヶ所の多型部位を判定する試薬を完成させた。

10

【0031】

即ち本発明は、椎骨数増大型遺伝形質を有するブタを効率的に判定可能な試薬に関し、より具体的には、

〔1〕 ブタの第7染色体上に存在する配列番号：1～7のいずれかに記載の塩基配列もしくはその相補鎖にストリンジェント条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、該塩基配列中に存在する下記(1)～(7)のいずれかの多型部位を含む領域を増幅するためのPCRプライマー用ポリヌクレオチド、

20

(1) 配列番号：1に記載の塩基配列の68位

(2) 配列番号：2に記載の塩基配列の141位

(3) 配列番号：3に記載の塩基配列の355位

(4) 配列番号：4に記載の塩基配列の207位

(5) 配列番号：5に記載の塩基配列の152位

(6) 配列番号：6に記載の塩基配列の155～445位

(7) 配列番号：7に記載の塩基配列の320～322位

30

〔2〕 〔1〕に記載のポリヌクレオチドを有効成分とする、ブタ椎骨数遺伝子診断薬、

〔3〕 下記(1)～(7)のいずれかのプライマーセットを有効成分として含む、ブタ椎骨数遺伝子診断薬、

(1) 配列番号：8に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：9に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット

(2) 配列番号：10に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：11に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット

(3) 配列番号：12に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：13に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット

(4) 配列番号：14に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：15に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット

40

(5) 配列番号：16に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：17に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット

(6) 配列番号：18に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：19または20に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット

(7) 配列番号：21に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：22に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット

〔4〕 配列番号：8～22に記載の全てのポリヌクレオチドを含有する、ブタ椎骨数遺伝子診断薬、

〔5〕 ブタの第7染色体上の塩基配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズする

50

ポリヌクレオチドであって、以下の(1)～(7)のいずれかに記載された(A)と(B)のそれぞれの多型変異を区別可能なプローブ用ポリヌクレオチドを有効成分として含む、ブタ椎骨数遺伝子診断薬、

(1) 配列番号：1に記載の塩基配列において、(A)68位の塩基種がA、(B)68位の塩基種がG

(2) 配列番号：2に記載の塩基配列において、(A)141位の塩基種がT、(B)141位の塩基種がA

(3) 配列番号：3に記載の塩基配列において、(A)の355位の塩基種がT、(B)355位の塩基種がC

(4) 配列番号：4に記載の塩基配列において、(A)の207位の塩基種がA、(B)207位の塩基種がT

(5) 配列番号：5に記載の塩基配列において、(A)の152位の塩基種がC、(B)152位の塩基種がA

(6) 配列番号：6に記載の塩基配列において、(A)155～445位の塩基配列を有する挿入変異、(B)155～445位の塩基配列を有さない欠失変異

(7) 配列番号：7に記載の塩基配列において、(A)320～322位の塩基配列がAAA、(B)320～322位の塩基配列がAAAA

〔6〕〔2〕～〔5〕のいずれかに記載のブタ椎骨数遺伝子診断薬を含む診断キット、を、提供する。

【発明の効果】

【0032】

簡便に椎骨数遺伝子型の判定ができる試薬の提供により、種豚の遺伝的能力が正確に判定され、ブタの産肉性、繁殖性、および肉質の効率的な改良が実現される。また基礎集団の遺伝的多様性を保持したまま遺伝子診断により必要な遺伝子型の個体を供給することができる。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】ブタの骨格とほ乳類の椎骨数を示す図である。椎骨数は、胸椎数と腰椎数の和である。ブタにおいては椎骨数に多様性がある。

【図2】椎骨数に関するQTL解析(JD家系)結果を示す図である。第1染色体q腕末端領域と第7染色体q腕中央部に2つの椎骨数に関するQTLが検出された。

【図3】徳島県大ヨークシャー種系統豚の種豚を用いた第7染色体上の椎骨数QTLの半きょうだい解析結果を示す図である。種豚の相同染色体上のQTL領域の子豚への伝達を、マイクロサテライトマーカーを用いて解析した。由来する種豚のQTL領域により2つの群に分け(任意に黒、白で示す。)、それぞれの椎骨数の平均値をプロットした。また子豚の頭数と標準誤差を示した。t検定において $P < 0.01$ (**)において種豚のQTLがヘテロ型であると判断した。Z検定は椎骨数増大効果を0.43としてNezerらの方法で行ない、 $Z < -2.0$ をホモ型とした。またホモ型種豚それぞれの子豚の椎骨数を、ヘテロ型種豚の椎骨数増大型アレルおよび野生型アレルが伝達した子豚(Q:371頭、q:383頭)の椎骨数と多重検定(Steel検定)し、椎骨数増大型または野生型を判定した。

【図4】椎骨数QTL近傍領域のゲノム構造解析結果を示す図である。VRTN遺伝子内および近傍の多型部位の内、大ヨークシャー種系統豚においてQTL型と一致する多型部位を示した。ボックスはエキソンを、斜線部は翻訳領域を示す。

【図5】椎骨数遺伝子診断の結果を示す写真である。野生型ホモ個体(wt/wt)では、297 bp、213 bp、202 bp、115 bpの4本のバンドが確認された。椎骨数増大型ホモ個体(Q/Q)では、242 bp、165 bp、146 bp、94 bpの4本のバンドが確認された。ヘテロ型においてそれを合わせた8本のバンドが確認された。Mは分子量マーカー(50 bpラダー)

【図6】VRTN遺伝子内および近傍の多型からなるハプロタイプを示す図である。ハプロタイプごとの多型パターンおよび検出された数を示した。NV123において、「i」は291 bpの挿入、「d」は291 bpの欠失、NV107において「3」はAAA、「5」はAAAAA、NV055-2およびN

10

20

30

40

50

V067において「d」は欠失型を示す。QTLの効果が判定されているQ(増大型)と、q1およびL1(ともに野生型)において分離している7ヶ所の多型部位について丸囲みで示した。M2およびJ1はアジア系ブタにおいて検出されたハプロタイプに含まれるものである。

【図7】NV123の判定方法を示す図である。斜線で示したPRE1配列の挿入・欠失変異を3種のプライマー(123f1、123r1、123r2)を用いて判定する。挿入型においては123f1と123r2による504塩基のDNA断片は増幅効率の低さから検出されず、123f1と123r1による242塩基のバンドのみが検出される。欠失型からは123f1と123r2による213塩基のバンドが検出される。ヘテロ型からは、504塩基のバンドは検出されず、242塩基と213塩基の2本のバンドが生じる。

【図8】NV123挿入型およびNV123欠失型の配列を示す図である。PRE1配列を二重下線、重複配列をボックス、境界配列(挿入型において特徴的な配列)をイタリックで示した。

【発明を実施するための形態】

【0034】

本発明は、ブタの第7染色体上のVertnin(VRTN)遺伝子上もしくはその近傍に存在する多型マーカーを指標とするブタの椎骨数増大型遺伝形質の有無の判定方法(本明細書において、「本発明の判定方法」と記載する場合あり)において、該方法に利用可能な試薬を提供する。

【0035】

該Vertnin遺伝子の塩基配列、および該遺伝子によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号：23、24へ記載する。

【0036】

本発明において「判定」とは、通常、被検ブタ(本発明の判定方法に供するブタ)が椎骨数野生型遺伝形質を有する、もしくは有しないと判定することを言う。また、椎骨数増大型遺伝形質を有するブタと、その他のブタとを判別すること等をいい、本発明における「判定」の用語は、例えば、「鑑定」、「鑑別」あるいは「判別」、「検査」等と表現してもよい。

【0037】

また、本発明の判定方法は、必ずしもブタ個体を対象として判定する方法に限定されず、例えば、食肉もしくは精肉加工品(例えば、ハム等)、あるいは、被検ブタに由来する生体試料等を対象として、椎骨数増大型遺伝形質の有無を判定する方法も含まれる。

【0038】

本発明において「多型」とは、例えば、一塩基多型(SNP)、欠失変異(deletion)、挿入変異(insertion)、マイクロサテライト等を指す。

【0039】

本発明の判定方法の好ましい態様としては、ブタゲノム中に存在する多型マーカーを用いることを特徴とする方法である。

本発明における多型マーカーとは、ブタの椎骨数増大型遺伝形質の有無を判定可能なDNA部位(多型部位)をいう。従って、本発明の方法において多型マーカーを用いるとは、通常、本発明の多型部位におけるDNA配列(塩基種)の違いに基づきブタの椎骨数増大型遺伝形質の有無の判定を行うことをいう。

【0040】

本発明において用いる多型マーカーとしては、具体的には、ブタ第7染色体上に存在する多型マーカーであって、以下の部位の多型マーカー(本明細書において「本発明の多型マーカー」と記載する場合あり)を示すことができる。

- (1) 配列番号：1に記載の塩基配列の68位
- (2) 配列番号：2に記載の塩基配列の141位
- (3) 配列番号：3に記載の塩基配列の355位
- (4) 配列番号：4に記載の塩基配列の207位
- (5) 配列番号：5に記載の塩基配列の152位
- (6) 配列番号：6に記載の塩基配列の155～445位

10

20

30

40

50

(7) 配列番号：7に記載の塩基配列の320～322位

【0041】

上記方法の好ましい態様としては、上記多型マーカーにおける多型部位を評価（例えば、多型部位における塩基種（DNA配列）の違いを評価）することにより、ブタの椎骨数増大型遺伝形質の有無を判定する方法である。

より具体的には、上記方法は、ブタゲノム中に存在する上記(1)～(7)のいずれかに記載の一もしくは複数の多型マーカーを用いて、上記のそれぞれの多型マーカーにおける塩基種（DNA配列）が記載された下記の判定表に基づき、ブタの椎骨数増大型遺伝形質の有無を判定する方法である。

【0042】

【表6】

| 多型 | 配列番号 | 多型部位の位置(位) | 増大型 Q | 野生型 wt |
|---------|------|------------|-------------------|-------------------|
| NV083 | 1 | 68 | A | G |
| NV149 | 2 | 141 | T | A |
| NV090 | 3 | 355 | T | C |
| NV024 | 4 | 207 | A | T |
| NV027-1 | 5 | 152 | C | A |
| NV123 | 6 | 155～445 | ins (PRE1 291 bp) | del (PRE1 291 bp) |
| NV107 | 7 | 320～322 | AAA | AAAAA |

10

20

【0043】

上記表6において、delとは欠失変異(deletion)、insとは挿入変異(insertion)を表す。

【0044】

また本発明の上記(1)～(7)の多型マーカーについて、以下の表7-1、7-2に示す。下記表7-1、7-2において、四角で囲った文字が多型部位を示す。下線はプライマーの位置を、配列番号8、13の斜体文字はミスマッチ塩基を示す。配列番号：5のtctggt(61..66)の挿入は、ランドレース種、パークシャー種、中ヨークシャー種の野生型対立遺伝子の一部に見られる。

30

【0045】

【表 7 - 1】

NV083

| | |
|--|-----------------------------------|
| tgtgcattgtaaacataaaaaactgaaaagaatgagagaaaatataaaaacacatagaggagttcctact gtggtgaaacgggactggcagcatctctggagcaccaggatgcaggttcgatccctaactggcacagtgg attaagatcctgtattgctgaagaagctgctgc (配列番号 : 1) | |
| 49. . 68 | aacacatagaggagttcgtgta (配列番号 : 8) |
| 123. . 142 | atccactgtgccagttagg (配列番号 : 9) |
| 68 | replace "g" |

10

NV149

| | |
|--|----------------------------------|
| acaaccaagatcaaggacaccaggcctgagattaagaacagaatgatagggaggccttgatttggcctt ggcttgcctcctctttacagacgaaagagagataacagaagaaacgtaatgaacttttggggaggacc tcaagcccttgaaacctcttctgaagcctagctgttccagtgggtacctgtgctgtttccttggggcg ggggaggcataaattatccacacgctttcttccc (配列番号 : 2) | |
| 15. 34 | ggacaccaggcctgagatta (配列番号 : 10) |
| 141. . 160 | aagagtttcaaggccttga (配列番号 : 11) |
| 141 | replace "a" |

20

NV090

| | |
|---|--------------------------------------|
| ggggaggaaactgagtgttggctttgtctacgttcccttagcttgaagtagaggagctgagaccatct caagttggttcagctccagagtcttgggtgctgtctgtttcggtcacaccagggactctggcagggtc ccaagtcctgggttgagtcctgggcaaagagaggcaaaagagaagagtgggggaggggggaaagaaga gagaaaggaacaaaggaacgaagccaggagattatgttatataattcaaactagcagccattggataaag agctgtggttaaacagggaacacagaagtgcttgttgttggatgaatgagaagccttttgagactcaa cccttagactctagaatcataggcatagacaggtccatagacagcactgggtcctctcagggctggcca ggacctggtccatattaggagctcaaatatccattgaatgaatgacagcgcagtgatgaatgtgtgagta aatgaaaaaaaaaccgaatacatgactgaatgaatgatgggctaatacgttaagttatttaaggcattgag tggtgacttaattgaatgacagatgaatgaaatctctccatcttcataggaggagaatgagaagggag acagtgaaatcggaca (配列番号 : 3) | |
| 264. . 283 | gcagccattggataaagagc (配列番号 : 12) |
| 355. . 378 | ctatgcctatgattctagagtatg (配列番号 : 13) |
| 355 | replace "c" |

30

NV024

| | |
|--|--------------------------------------|
| atgcattaagagtatttagtatgctaccattcgtgcgctagagaaaggacaaaagtgctgagagatttgc ttctttatacataacatatttctggaatgataccctagaaacgatattggcggcttctggaaagagaaaa ctgtggacaggaaacagggtgaaatttgaatattgaatgttttagcacattcctgaacaaaatgaca agcagtttgaatcatatacagtggtccagtggtcccctctcaccctggctccccaccccctttccaga cctctggcggatgcctgaaaccagtt (配列番号 : 4) | |
| 29. . 48 | attcgtgcgctagagaaagg (配列番号 : 14) |
| 207. . 230 | tgtatatgattcaaactgcttcta (配列番号 : 15) |
| 207 | replace "t" |

40

【表 7 - 2】

NV027-1

| | |
|---|----------------------------------|
| ccccaaactctttggaatctttcaactttctttcaagtttctctgggcagctcgggaatctgtttctg agctaggtcagggcgctttcacacccccagctgggtagagtggacgagacaatagctgctatcactttac cattggaagtgcccccgaatttgcactttctttcatctcgggacgcagcacttgagggtgggcgatttc ctgggggagtggttaagccgcttctccaccggccagttggctgtagacggtccat (配列番号 : 5) | |
| 1..20 | ccccaaactctttggaat (配列番号 : 16) |
| 152..171 | agaagtgcaaattcgggggg (配列番号 : 17) |
| 61..66 | replace |
| 152 | replace "a" |
| 185 | replace "t" |

10

NV123

| | |
|---|----------------------------------|
| gggcagatgaggagaatgcgggatccttggtgagctcgaatacagagccaggatgaggctggcagggaa gtgtttgttatagtcttatcagtgttggtgcagcagatctcaatttttcccttgccgtgccagagcct tggtcatcccttttaaagtcaagggacagggagttcccgctcgtggcgagtggttaaggaatccgact aggaaccatgaggttgcgggttcggtccctgcccctgctcagtggttgacgatccggcgttcccgtag ctgtggtgtaggttcagacgcggctcggatcctgctggtgctggtgtaggcccgggtggccacg gctcttattggacccttagcgtgggaccctccatagccgcaggagcggcccaagaaatagcaaaaggcc aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaataaaatgcaagggacagaggccagtcctgggctccaagacactat ctgcttgaagtaagaagactccaggaggaggaaggtgggtcttggtgaag (配列番号 : 6) | |
| 22..41 | gatccttggtgagctcgaat (配列番号 : 18) |
| 246..263 | tcgtcaaccactgagca (配列番号 : 19) |
| 506..525 | ccttcctcctcctggagtct (配列番号 : 20) |
| 155..445 | replace |

20

NV107

| | |
|---|-----------------------------------|
| tgtcctcatggatactagctgggttcattacctgctgagccacgacaggaactctgcatcaaggacattt ttgagcgatactagttttttgttcccagctgcggctacgtggtggtgaagaacacagtgattttctagtt tgattcatgccaagtactctagttttactcaaatgtaacacaatgaaaaggcaaatcctatcttagt gttgttgcccttagtattataatgagaacagtttaacttgaggccctctgaaagtctcaggaaacccaaa gtttcatggactgtatttttgagaatcactgttctaggaaagacctattttatttgatttcattttatt tatttttagggccgtaccacagcatatggagggtcccatgctag (配列番号 : 7) | |
| 43..62 | cgacaggaactctgcatcaa (配列番号 : 21) |
| 318..337 | caataaaataggtctttttcc (配列番号 : 22) |
| 320..322 | replace "aaaaa" |

30

【0047】

本発明の試薬の好ましい態様としては、上記方法に用いるための判定用検査薬（試薬）を提供する。

40

本発明の検査薬の好ましい態様としては、ブタの第7染色体上に存在する下記(1)~(7)に記載の一もしくは複数の多型部位（本明細書において「本発明の多型部位」と記載する場合あり）を含むDNA領域を増幅するためのPCRプライマー用ポリヌクレオチドが挙げられる。

【0048】

より具体的には、ブタの第7染色体上に存在する配列番号：1~7のいずれかに記載の塩基配列もしくはその相補鎖にストリンジェント条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、該塩基配列中に存在する下記(1)~(7)のいずれかの多型部位を含む領域を増幅するためのPCRプライマー用ポリヌクレオチドを例示できる。

(1) 配列番号：1に記載の塩基配列の68位

50

- (2) 配列番号：2に記載の塩基配列の141位
- (3) 配列番号：3に記載の塩基配列の355位
- (4) 配列番号：4に記載の塩基配列の207位
- (5) 配列番号：5に記載の塩基配列の152位
- (6) 配列番号：6に記載の塩基配列の155～445位
- (7) 配列番号：7に記載の塩基配列の320～322位

【0049】

上記ポリヌクレオチドは、ブタ椎骨数遺伝子診断薬として有用である。従って、本発明は、上記ポリヌクレオチドを有効成分とする、ブタ椎骨数遺伝子診断薬を提供する。

【0050】

本発明におけるブタの椎骨数増大型遺伝形質の有無の判定方法は、好ましくは、PCR-SSP(sequence specific primers)法を用いて実施することが可能である。PCR-SSP法は、特定の配列をもったDNA部位を選択的にPCRによって増幅する方法である。

例えば、本発明の多型マーカーにおける「増大型Q」の塩基種(DNA配列)を選択的に増幅し得るプライマーを設定し、PCRを行う。当該PCRの増幅産物の有無により、ブタの椎骨数増大型遺伝形質の有無の判定を行うことが可能である。例えば、当該PCRの増幅産物が検出された場合に、被検ブタは椎骨数増大型遺伝形質を有すると判定される。一方、当該PCRの増幅産物が検出されない場合に、被検ブタは椎骨数増大型遺伝形質を有しないと判定される。

【0051】

上記方法に利用可能なプライマーセットとしては、以下の(1)～(7)が挙げられる。即ち本発明は、下記(1)～(7)のいずれかのプライマーセットを有効成分として含む、ブタ椎骨数遺伝子診断薬を提供する。

- (1) 配列番号：8に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：9に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット
- (2) 配列番号：10に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：11に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット
- (3) 配列番号：12に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：13に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット
- (4) 配列番号：14に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：15に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット
- (5) 配列番号：16に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：17に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット
- (6) 配列番号：18に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：19または20に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット
- (7) 配列番号：21に記載されたポリヌクレオチドと、配列番号：22に記載されたポリヌクレオチドからなるプライマーセット

【0052】

本発明の試薬の好ましい態様としては、好ましくは、上記(1)～(7)のプライマーセットから少なくとも1セット、より好ましくは2セット、より好ましくは3もしくは4セット、さらに好ましくは5もしくは6セット、最も好ましくは全てのセット(7セット)を有効成分として含む試薬(診断薬)である。

【0053】

例えば本発明は、下記の表8(椎骨数遺伝子診断キットの詳細)に示した15種のプライマーを記載された濃度、または混合比率で含むものをブタの椎骨数遺伝子診断薬として提供する。

【0054】

10

20

30

40

【表 8】

| プライマー名 | 配列 | 濃度 (μ M) | 混合 比率 | PCR 増幅 サイズ (bp) | 増幅 される 対立 遺伝子 |
|---------|---------------------------------------|------------------|----------|--------------------------|------------------------|
| 107f | cgacaggaactctgcatcaa (配列番号：21) | 2.00 | 40 | 297 | wt |
| 107ra5 | caaataaaataggtctttttcc (配列番号：22) | 2.00 | 40 | | |
| 123f1 | gaccttggtgagctcgaat (配列番号：18) | 0.70 | 14 | 242 | Q |
| 123r1 | tcgtcaaccactgagca (配列番号：19) | 0.70 | 14 | 213 | wt |
| 123r2 | ccttcctcctcctggagtct (配列番号：20) | 0.70 | 14 | | |
| 024f | attcgtgcgctagagaaagg (配列番号：14) | 1.50 | 30 | 202 | wt |
| 024ra | tgtatatgattcaaactgcttgta (配列番号：15) | 1.50 | 30 | | |
| 027-1f | ccccaaactctttgaaat (配列番号：16) | 0.25 | 5 | 165 | Q |
| 027-1rg | agaagtgcaaattcgggggg (配列番号：17) | 0.25 | 5 | | |
| 149f | ggacaccaggcctgagatta (配列番号：10) | 0.75 | 15 | 146 | Q |
| 149ra | aagagtttcaagggttgta (配列番号：11) | 0.75 | 15 | | |
| 090f | gcagccattggataaagagc (配列番号：12) | 1.40 | 28 | 115 | wt |
| 090rg | ctatgcctatgattctagagtatg (配列番号：13) | 1.40 | 28 | | |
| 083fa | aacacatagaggagttcgta (配列番号：8) | 0.70 | 14 | 94 | Q |
| 083r | atccactgtgccagttaggg (配列番号：9) | 0.70 | 14 | | |

【0055】

本発明の好ましい態様としては、上記の15種のプライマーポリヌクレオチド（配列番号：8～22に記載のポリヌクレオチド）の全てを含むことを特徴とするブタ椎骨数遺伝子診断薬を提供する。上記の15種類のプライマーによって、7ヶ所の多型部位を同時に判定することが可能である。

【0056】

本発明の遺伝子診断薬は、好ましくは、混合プライマーとして提供され、通常のゲノム

10

20

30

40

50

DNAを鋳型としたPCRに加えて用いる。表8に記載された濃度のものであれば、通常は5倍希釈で、例えば15 µlのPCR反応液に3 µlを加える。反応液の組成は、上記混合プライマーの他、x1 PCR buffer (アプライドバイオシステムズ、1.5 mM MgCl₂を含む。)、0.2 mM dNTP、0.375units AmpliTaq Gold DNA polymerase (アプライドバイオシステムズ)、20~40 ng ゲノムDNAである。PCRサイクルは、[94 : 9分]、[94 : 30秒、55 : 30秒、72 : 30秒] x 40回、[72 : 5分] である。PCR産物は、高分解能を有するアガロースゲル、例えばAgarose 1000 (インビトロジェン)による3%アガロースゲルを用いて、TBEバッファもしくはTAEバッファ中で電気泳動を行う。

【0057】

アガロースゲル電気泳動の結果、297 bp、213 bp、202 bp、115 bpに相当する4本のバンドが確認された場合には、野生型のホモ型個体由来のサンプルと判定される。242 bp、165 bp、146 bp、94 bpに相当する4本のバンドが確認された場合には、増大型のホモ型個体由来のサンプルと判定される。297 bp、242 bp、213 bp、202 bp、165 bp、146 bp、115 bp、94 bpに相当する8本のバンドが確認された場合には、野生型と増大型のヘテロ型個体由来のサンプルと判定される(図5、表9(遺伝子診断の判定表))。

10

【0058】

上記以外のマイナーなバンドパターンとして、297 bp、213 bp、202 bp、146 bp、115 bpの5本のバンドが生じた際には、ランドレース種由来の野生型対立遺伝子(L3(図6))またはパークシャー種由来の野生型対立遺伝子(B1(図6))が含まれた野生型ホモ型個体である。242 bp、165 bp、146 bp、115 bp、94 bpの5本のバンドが生じた場合には、ハンブシャー種由来の増大型対立遺伝子(H1(図6))が含まれた増大型ホモ型個体と判定される(表9)。

20

【0059】

【表9】

| 多型部位 ／対立遺伝子 | バンドサイズ(bp) | 野生型 | 増大型 | ヘテロ型 |
|----------------|------------|-----|-----|------|
| NV107 wt | 297 | ○ | | ○ |
| NV123 Q | 242 | | ○ | ○ |
| NV123 wt | 213 | ○ | | ○ |
| NV024 wt | 202 | ○ | | ○ |
| NV027-1 Q | 165 | | ○ | ○ |
| NV149 Q | 146 | *1 | ○ | ○ |
| NV090 wt | 115 | ○ | *2 | ○ |
| NV083 Q | 94 | | ○ | ○ |

30

【0060】

上記表9において、*1は、ランドレース種由来野生型対立遺伝子(L3)またはパークシャー種由来野生型対立遺伝子(B1)が含まれる場合には増幅する、ことを示す。また*2は、ハンブシャー種由来の増大型対立遺伝子(H1)が含まれる場合に増幅する、ことを示す。

40

【0061】

また本発明は、ブタの第7染色体上の塩基配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、以下の(1)~(7)のいずれかに記載された(A)と(B)のそれぞれの多型変異を区別可能なプローブ用ポリヌクレオチドを有効成分として含む、ブタ椎骨数遺伝子診断薬(試薬)を提供する。なお、(A)は「増大型(Q)」、(B)は「野生型(wt)」を表す。

(1) 配列番号: 1に記載の塩基配列において、(A)68位の塩基種がA、(B)68位の塩基種がG

(2) 配列番号: 2に記載の塩基配列において、(A)141位の塩基種がT、(B)1

50

4 1位の塩基種がA

(3) 配列番号：3に記載の塩基配列において、(A)の355位の塩基種がT、(B)355位の塩基種がC

(4) 配列番号：4に記載の塩基配列において、(A)の207位の塩基種がA、(B)207位の塩基種がT

(5) 配列番号：5に記載の塩基配列において、(A)の152位の塩基種がC、(B)152位の塩基種がA

(6) 配列番号：6に記載の塩基配列において、(A)155～445位の塩基配列を有する挿入変異、(B)155～445位の塩基配列を有さない欠失変異

(7) 配列番号：7に記載の塩基配列において、(A)320～322位の塩基配列がA A A、(B)320～322位の塩基配列がA A A A

10

【0062】

上記試薬を用いて、例えば、(A)に記載された塩基種(または塩基配列、挿入変異)が検出された場合には、被検ブタは椎骨数の遺伝形質が「増大型」と判定される。一方、(B)に記載された塩基種(または塩基配列、欠失変異)が検出された場合には、被検ブタは椎骨数の遺伝形質が「野生型」と判定される。

【0063】

また、任意の多型変異を検出するためのプローブを作成することは、当該多型部位の周辺配列、および該多型変異に関するDNA情報が与えられれば当業者であれば特段の困難を伴うことなく実施することが可能である。従って、本願明細書に記載された多型に関する情報(多型部位の周辺配列、および該多型の変異の種類等)に基づいて、当業者は上記のプローブ用ポリヌクレオチドを容易に作成することができる。

20

【0064】

例えば、上記(1)においてプローブ用ポリヌクレオチドを作成する場合には、検出対象の多型を含むDNA領域からなる配列番号：1に記載の配列において、68位(検出対象の多型部位)の塩基種を含むDNA配列と特異的にハイブリダイズするDNA配列を、プローブ用ポリヌクレオチドとすることができる。当該ポリヌクレオチドは、通常、配列番号：1に記載の配列において68位(検出対象の多型部位)の塩基種を含むDNA配列断片、あるいは当該配列と相補的なDNA配列断片からなる。

【0065】

また、上記(6)の多型においては、図8で示すように「挿入型」(増大型)と「欠失型」(野生型)が存在する。当該多型変異の違いを区別可能なプローブとしては、以下のDNA配列からなるプローブを例示することができる。

30

【0066】

〔挿入型〕

挿入型において重複されたDNA配列部分(ボックスで示す箇所)とPRE1配列(二重下線)との境界配列(イタリック部分)が挿入型で特徴的な配列(以下「特徴配列」と記載する場合あり)である。従って、本発明のプローブとして、例えば、配列番号：6に記載されたDNA配列の部分配列であって、前記特徴配列(イタリック部分)を含むDNA配列が挙げられる。

40

【0067】

〔欠失型〕

欠失型を特異的に認識するプローブとしては、図8のボックス部分からその前後まで広げたDNA領域を認識する配列、例えば、配列番号：6に記載されたDNA配列の部分配列であって、前記ボックス部分の配列を含むDNA配列が挙げられる。

【0068】

本発明において「ハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下(例えば、サンプルックら, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 第2版1989に記載の条件)において、目的以外のDNAとクロスハイブリダイゼーションを有意に生じ

50

ないことを意味する。特異的なハイブリダイズが可能であれば、該ポリヌクレオチドは、検出する上記塩基配列に対し完全に相補的である必要はない。

【0069】

ハイブリダイゼーションの条件は、当業者であれば適宜選択することができる。ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば42、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ の条件であり、好ましくは50、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ の条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば65、 $5 \times \text{SSC}$ 及び $0.1\% \text{SDS}$ の条件である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAが効率的に得られることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

10

【0070】

該ポリヌクレオチドは、本発明の判定方法におけるプローブやプライマーとして利用することができる。該ポリヌクレオチドをプライマーとして用いる場合、その長さは、通常15 bp~100 bpであり、好ましくは17 bp~30 bpである。プライマーは、本発明の多型部位を含むDNAを増幅しうるものであれば、特に制限されない。該プライマーとしては、例えば、後述の表11に記載された配列からなるポリヌクレオチドが挙げられるが、このポリヌクレオチドに特に限定されるものではない。

20

【0071】

また、本発明のポリヌクレオチドをプローブとして使用する場合、該プローブは、本発明の多型マーカを含むDNA領域に特異的にハイブリダイズするものであれば、特に制限されない。該プローブは、合成ポリヌクレオチドであってもよく、通常少なくとも15 bp以上の鎖長を有する。

【0072】

本発明のポリヌクレオチドは、例えば市販のポリヌクレオチド合成機により作製することができる。プローブは、制限酵素処理等によって取得される二本鎖DNA断片として作製することもできる。

【0073】

本発明のポリヌクレオチドをプローブとして用いる場合は、適宜標識して用いることが好ましい。標識する方法としては、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、ポリヌクレオチドの5'端を ^{32}P でリン酸化することにより標識する方法、およびクレノウ酵素等のDNAポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーポリヌクレオチド等をプライマーとして ^{32}P 等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を取り込ませる方法(ランダムプライム法等)を例示することができる。

30

【0074】

本発明において、変異部位を含む領域を増幅するためのプライマーは、変異部位を含むDNAを鋳型として、変異部位に向かって相補鎖合成を開始することができるプライマーをいう。本発明のプライマーは、変異部位を含むDNAにおける、変異部位の3'側に複製開始点を与えるためのプライマーと表現することもできる。プライマーがハイブリダイズする領域と変異部位との間隔は、任意である。両者の間隔は、変異部位の塩基の解析手法に応じて、好適な塩基数を選択することができる。本発明のプライマーは、修飾することができる。たとえば、蛍光物質や、ビオチンまたはジゴキシンのような結合親和性物質で標識したプライマーも本発明に含まれる。

40

【0075】

一方本発明において、変異部位を含む領域にハイブリダイズするプローブとは、通常、変異部位を含む領域の塩基配列を有するポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができるプローブを言う。より具体的には、プローブの塩基配列中に変異部位を含むプローブは本発明のプローブとして好ましい。あるいは、変異部位における塩基の解析方法によ

50

ては、プローブの末端が多型部位に隣接する塩基に対応するように、デザインされる場合もある。したがって、プローブ自身の塩基配列には変異部位が含まれないが、変異部位に隣接する領域に相補的な塩基配列を含むプローブも、本発明における望ましいプローブとして示すことができる。

【0076】

本発明のプライマー、またはプローブとなるオリゴヌクレオチドの合成において、蛍光色素やビオチンなどで修飾されたヌクレオチド誘導体を利用して、オリゴヌクレオチドに任意の修飾を導入することもできる。あるいは、合成されたオリゴヌクレオチドに、蛍光色素などを結合する方法も公知である。

【0077】

上記の識別もしくは判定用試薬（本発明の検査薬）においては、有効成分であるポリヌクレオチド以外に、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、タンパク質安定剤（BSAやゼラチンなど）、保存剤等が必要に応じて混合されていてもよい。

【0078】

また、本発明の試薬（診断薬）を構成成分として含むブタの椎骨数増大型遺伝形質の有無の判定用キット（ブタ椎骨数遺伝子診断キット）もまた、本発明に含まれる。該キットには、本発明の試薬の他に、例えば、本発明の方法に用いるための反応液、酵素（ポリメラーゼ等）、対照標品、反応容器、操作器具、説明書等を含めることができる。

【0079】

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【実施例】

【0080】

以下本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0081】

〔実施例1〕遺伝子診断に用いる多型部位の選定

(1) 肉用に用いられる西洋品種ブタサンプルの収集

祖父母世代までに血縁の認められないことを条件に、ランドレース種48頭、大ヨークシャー種48頭、デュロック種48頭、パークシャー種48頭を収集した。またその他にハンブシャー種48頭、チェスターホワイト種13頭、中ヨークシャー種10頭、スポットテッド種3頭、ピエトレン種2頭、LWD三元交雑種1頭を収集した。また全農飼料畜産中央研究所において飼養されるデュロック種48頭、および肉豚として生産された170頭のLWD三元交雑豚のサンプルを収集した。合計487頭（染色体数は974本）である。

【0082】

(2) VRTN遺伝子内および近傍の42ヶ所の多型部位の解析

大ヨークシャー種系統豚において増大型と野生型において分離したVRTN遺伝子内および近傍の42ヶ所の多型部位（図4、表4）について、MALDI-TOF-MSを用いて、またはPCR増幅断片のダイレクトシーケンスにより、多型を判定した。

【0083】

MALDI-TOF-MSにより、3組のiPlexシステムにより35ヶ所の多型部位を解析した。

グループ1：14ヶ所（NV025、NV028、NV030-4、NV040-1、NV040-6、NV048、NV049-2、NV055-2、NV058-3、NV058-4、NV062-2、NV064、NV067、NV071）、

グループ2：14ヶ所（NV015-2、NV024、NV027-2、NV030-1、NV030-2、NV035、NV040-2、NV040-5、NV040-7、NV049-1、NV058-1、NV090、NV107、NV149）、

グループ3：7ヶ所（NV027-1、NV030-3、NV040-4、NV062-1、NV065、NV083、NV104）

ダイレクトシーケンスにより、7ヶ所（NV004、NV007、NV015-1、NV123、NV40-3、NV055-1、NV058-2）について多型を判定した。

【0084】

10

20

30

40

50

(3) ハプロタイプの再構成

42ヶ所の多型部位の判定結果を用いて、487個体のサンプル（974座位）におけるハプロタイプを再構成した。NV064から下流はハプロタイプブロックが保持されていないサンプルがあり、NV004からNV062までのハプロタイプにより判別を行った（図6）。

【0085】

これまでに大ヨークシャー種において確認されていた増大型の対立遺伝子に対応するハプロタイプをQ型、野生型対立遺伝子wtに対応するハプロタイプをq1型とすると、全農飼料畜産中央研究所で飼養されるデュロック種では、Q/Q：11頭、q1/q1：10頭、Q/q1：27頭の3種のみが検出された。

【0086】

全農飼料畜産中央研究所で生産されたLWD三元交雑種（170頭）では、Q/Q：59頭、q1/q1：7頭、Q/q1：47頭であり、新たにNV028のみが異なるハプロタイプq2を含むq1/q2：9頭、Q/q2：19頭が認められた。さらに他のハプロタイプも検出されQ/L1：20頭、q1/L1：9頭であった。

【0087】

他の西洋品種サンプルにおいては、Q/Q：74頭、Q/q1：63頭、q1/q1：41頭の他に、Q/q2：42頭、q1/q2：11頭、q2/q2：17頭であった。他のディプロタイプを示したものはランドレース種において5頭（Q/L1：3頭、q2/L2：1頭、Q/L3：1頭）、パークシャー種において5頭（Q/B1：1頭、q1/B2：4頭）、ハンブシャー種において8頭（H1/H1：1頭、Q/H1：1頭、q1/H1：2頭、q2/H1：3頭、q2/H2：1頭）、中ヨークシャー種において3頭（q1/Y1：3頭）であった。

【0088】

全体でハプロタイプはQ型、q1型、q2型、L1型、L2型、L3型、B1型、B2型、H1型、H2型、Y1型の11種であった（図6、表10（西洋品種ブタにおけるVRTN遺伝子内および近傍の多型部位によるハプロタイプの頻度））。系統的にはQ型、H1型、H2型は近く、またq1型とq2型は、NV028以外は同一である。またL1型とL2型は、NV025以外は同一である。L3型、B1型、B2型、Y1型は互いに系統的に近く、これらは日本イノシシ（J1型）や中国在来種（M2型）が持つハプロタイプとも同じ系統であった。

【0089】

系統的には、H1型、H2型は、Q型とともに増大型と判断される。増大型の対立遺伝子は、育種の過程において突然変異を選抜し、その後集団に広まったと考えられ、Q型、H1型、H2型が高度に保存されている。q2型はq1型とともに野生型、L3型、W2型、B1型、B2型、Y1型は、イノシシ由来J1型や中国種由来M2型とともに野生型と判断された。L1型、L2型については系統的には対立遺伝子型を判定することはできない。L1型およびL2型が含まれるグループにおいては、椎骨数増大能力の有無を検証する必要がある。

【0090】

10

20

30

【表 10】

| | 増大型 | | | 野生型 | | | | | | | | n |
|---------|-------|----|----|-------|-----|-------|----|--------------------|----|----|----|-----|
| | タイプ 1 | | | タイプ 2 | | タイプ 3 | | タイプ 4 (アジア系と共通) | | | | |
| | Q | H1 | H2 | q1 | q2 | L1 | L2 | L3 | B1 | B2 | Y1 | |
| ランドレース | 64 | | | 12 | 15 | 3 | 1 | 1 | | | | 96 |
| 大ヨークシャー | 54 | | | 14 | 28 | | | | | | | 96 |
| デュロック | 42 | | | 54 | | | | | | | | 96 |
| バークシャー | 44 | | | 41 | 6 | | | | 1 | 4 | | 96 |
| ハンプシャー | 32 | 8 | 1 | 24 | 31 | | | | | | | 96 |
| チェスター | 10 | | | 5 | 11 | | | | | | | 26 |
| 中ヨークシャー | 3 | | | 14 | | | | | | | 3 | 20 |
| スポッテッド | 4 | | | 1 | 1 | | | | | | | 6 |
| ピエトレン | 4 | | | | | | | | | | | 4 |
| LWD | 2 | | | | | | | | | | | 2 |
| 全農LWD肉豚 | 204 | | | 7 | 28 | 29 | | | | | | 340 |
| 全農デュロック | 49 | | | 47 | | | | | | | | 96 |
| 総計 | 512 | 8 | 1 | 291 | 120 | 32 | 1 | 1 | 1 | 4 | 3 | 974 |

10

20

【0091】

(4) ハプロタイプL1を示す対立遺伝子の椎骨数増大効果の有無

これまでに作製したF2家系の親世代ブタについて、ハプロタイプL1型を持つものを検索した結果、宮城県において雌ランドレースと雄梅山豚を用いて造成されたF2実験家系（LM家系）（表1）の、雌ランドレースの片側の染色体にハプロタイプL1型が認められた。他方はQ型であった。このF2家系の解析から、L1型が座位する染色体領域には椎骨数増大効果が無いことが示されており（Mikawa S. 2005 J Anim. Sci. 83: 2247）、L1型は野生型対立遺伝子に対応することが判明した。よってL1型およびL2型は野生型であると判断された。

30

【0092】

(5) 遺伝子診断に用いる多型部位の選定

増大型の98.3%（512/521）がQ型であり、野生型はq1型、q2型、L1型で97.8%（443/453）を占めることから、これらの中で分離する7ヶ所の多型部位（NV083、NV149、NV090、NV024、NV027-1、NV123、NV107）を遺伝子診断に利用することとした。NV083、NV024、NV027-1、NV123、NV107は100%遺伝子型と対応している。NV149は99.8%（972/974）、NV090は99.2%（966/974）が遺伝子型と一致している。

【0093】

〔実施例2〕 多型を判定するPCRプライマーの選定

(1) 多型部位を検出するためのPCRプライマーを検索した。条件は、アレル特異的な増幅が可能であること、アガロースゲル電気泳動により判別・区別できる増幅DNA断片長を持つこと、マルチプレックスPCRにより同時に増幅が可能であることである。またPCRはAmpliTaq Gold DNAポリメラーゼを用い、PCRサイクルは、[94℃：9分]、[94℃：30秒、55℃：30秒、72℃：30秒]×40回、[72℃：5分]である。完成した遺伝子診断キットに含まれるプライマーの特徴は以下の通りである。

40

【0094】

(2) NV123の多型を検出するPCRプライマー

NV123は291bpのPRE1配列の挿入・欠失型の多型である。多型部位の外側に設計したPCRプライマーでは、ヘテロ型サンプルにおいては増幅効率の差により、挿入型の増幅が検出されなかった。よって多型部位の外側に設計したPCRプライマーに加えて、挿入配列内に

50

リバースプライマーを設計した。この3種のプライマーを同時に用いることにより、挿入型、欠失型、ヘテロ型の判定を行った(図7)。利用プライマーは、上流:123f1、挿入配列:123r1、下流123r2であり(表11(多型判定用PCRプライマーと増幅DNA断片のサイズ))、挿入型(増大型)対立遺伝子から242 bp、欠失型(野生型)対立遺伝子から213 bpのDNA断片が増幅される。ヘテロ型の個体からは242 bpおよび213 bpのDNA断片が同時に増幅される。123f1と123r2による504 bpの増幅は、123f1と123r1による242 bpの増幅、および123f1と123r2による213 bpの増幅より効率が著しく低く検出されない(図7)。

【0095】

【表11】

| 多型部位 (野生型/ 増大型) | プライマー配列 | | 増幅サイズ(bp) | |
|---------------------------|-------------------------|---|-----------|-----|
| | | | 野生型 | 増大型 |
| NV107 (<u>a</u> 5/a3) | 107f 107ra5 | cgacaggaactctgcatcaa (配列番号: 21) caaataaaataggtc <u>ttttt</u> cc (配列番号: 22) | 297 | |
| NV123 (Del/In) | 123f1 123r1 123r2 | gatccttggtgagctcgaat (配列番号: 18) tcgtcaaccactgagca (配列番号: 19) ccttcctcctcctggagtct (配列番号: 20) | 213 | 242 |
| NV024 (<u>t</u> /a) | 024f 024ra | attcgtgcgctagagaaagg (配列番号: 14) tgtatatgattcaaactgcttgta (配列番号: 15) | 202 | |
| NV027-1 (a/ <u>c</u>) | 027-1f 027-1rg | ccccaaactctttgaaat (配列番号: 16) agaagtgcaaattcggggg (配列番号: 17) | | 165 |
| NV149 (a/ <u>t</u>) | 149f 149ra | ggacaccaggcctgagatta (配列番号: 10) aagaggtttcaagggcttga (配列番号: 11) | | 146 |
| NV090 (<u>c</u> /t) | 090f 090rag | gcagccattggataaagagc (配列番号: 12) ctatgcctatgattctagagt <u>atg</u> (配列番号: 13) | 115 | |
| NV083 (g/ <u>a</u>) | 083fga 083r | aacacatagaggagttc <u>gta</u> (配列番号: 8) atccactgtgccagttagg (配列番号: 9) | | 94 |

10

20

30

40

【0096】

上記表11において、下線を引いた塩基はアレル特異性を有するものである。斜字で示

50

した塩基はミスマッチ塩基である。

【 0 0 9 7 】

(3) NV024、NV027-1、およびNV149においては、多型部位（SNP）がリバースプライマーの3'末に位置している。NV024では野生型の塩基配列、NV027-1およびNV149では増大型の塩基配列を用いている。よってNV024では野生型の対立遺伝子から202 bpのDNA断片が、NV027-1では増大型の対立遺伝子から165 bpのDNA断片が、NV149では増大型の対立遺伝子から146 bpのDNA断片が増幅される（表 1 1）。

【 0 0 9 8 】

(4) NV107は塩基Aが3回（増大型）または5回（野生型）連続する多型部位である。判定用のプライマーは3'末から3~7塩基目にTTTTTが位置するリバースプライマーであり、5回型（野生型）を特異的に増幅する。増幅されるDNA断片の大きさは297 bpである（表 1 1）。

【 0 0 9 9 】

(5) NV090、NV083の多型判定用のプライマーは、3'末に多型部位（SNP）が位置している他に、1塩基のミスマッチ塩基を含んでいる。NV090は配列特異的プライマーをリバースプライマーとし、野生型の対立遺伝子から115 bpのDNA断片を増幅する。NV083は配列特異的プライマーをフォワードプライマーとし、増大型の対立遺伝子から94 bpのDNA断片を増幅する（表 1 1）。

【 0 1 0 0 】

〔実施例 3〕 マルチプレックスPCRを可能とするプライマーの混合比率

PCRを行う際のプライマー濃度は、0.05 μ Mから0.4 μ Mの間で設定した。詳細は表 1 2（遺伝子診断用PCRプライマーの混合比率）に示した。キットとして供給する際の例として5倍濃度の値を記載した。

【 0 1 0 1 】

【表 1 2】

| プライマー名 | 最終濃度 (μ M) | 混合比率 | キットでの濃度 (μ M) |
|---------|-----------------|------|--------------------|
| 107f | 0.40 | 40 | 2.00 |
| 107ra5 | 0.40 | 40 | 2.00 |
| 123f1 | 0.14 | 14 | 0.70 |
| 123r1 | 0.14 | 14 | 0.70 |
| 123r2 | 0.14 | 14 | 0.70 |
| 024f | 0.30 | 30 | 1.50 |
| 024ra | 0.30 | 30 | 1.50 |
| 027-1f | 0.05 | 5 | 0.25 |
| 027-1rg | 0.05 | 5 | 0.25 |
| 149f | 0.15 | 15 | 0.75 |
| 149ra | 0.15 | 15 | 0.75 |
| 090f | 0.28 | 28 | 1.40 |
| 090rg | 0.28 | 28 | 1.40 |
| 083fa | 0.14 | 14 | 0.70 |
| 083r | 0.14 | 14 | 0.70 |

【 0 1 0 2 】

〔実施例 4〕 遺伝子診断キットの利用方法

遺伝子診断キットは混合プライマーとして提供され、PCR反応に加えて用いる。表 1 2

に記載したものであれば、5倍希釈で、例えば15 μlのPCR反応液に3 μlを加える。反応液の組成は、x1 PCR buffer (アプライドバイオシステムズ、1.5 mM MgCl₂を含む。)、0.2 mM dNTP、0.375units AmpliTaq Gold DNA polymerase (アプライドバイオシステムズ)、20~40 ng ゲノムDNA、各種プライマー (表 1 2 に記載の最終濃度) である。PCRサイクルは、[94 : 9分]、[94 : 30秒、55 : 30秒、72 : 30秒] × 40回、[72 : 5分] である。PCR産物はアガロースゲル電気泳動を行う。高分解能を有するアガロースゲル、例えばAgarose 1000 (インビトロジェン)の3%ゲル等を用いて、TBEバッファーもしくはTA Eバッファー中で電気泳動を行う。

【 0 1 0 3 】

アガロースゲル電気泳動の結果、297 bp、213 bp、202 bp、115 bpに相当する4本のバンドが確認された場合には野生型のホモ型個体由来のサンプルと判定される。242 bp、165 bp、146 bp、94 bpに相当する4本のバンドが確認された場合には増大型のホモ型個体由来のサンプルと判定される。297 bp、242 bp、213 bp、202 bp、165 bp、146 bp、115 bp、94 bpに相当する8本のバンドが確認された場合には、野生型と増大型のヘテロ型個体由来のサンプルと判定される (図 5、表 9)。

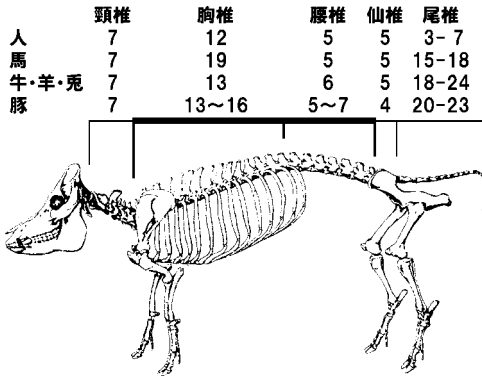
10

【 0 1 0 4 】

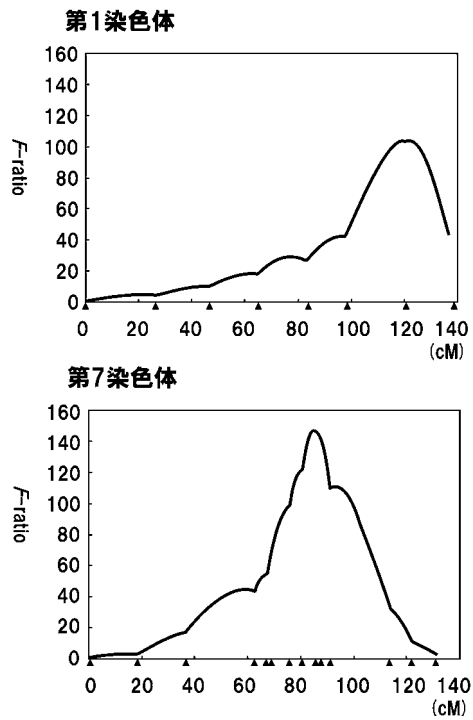
上記以外のマイナーなバンドパターンとして、297 bp、213 bp、202 bp、146 bp、115 bpの5本のバンドが生じた際には、ランドレース種由来の野生型対立遺伝子 (L3) またはパークシャー種由来の野生型対立遺伝子 (B1) が含まれた野生型ホモ型個体である。242 bp、165 bp、146 bp、115 bp、94 bpの5本のバンドが生じた場合には、ハンブシャー種由来の増大型対立遺伝子 (H1) が含まれた増大型ホモ型個体と判定される (表 9)。

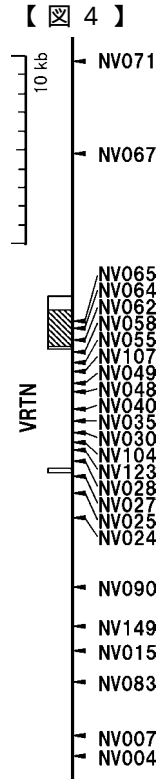
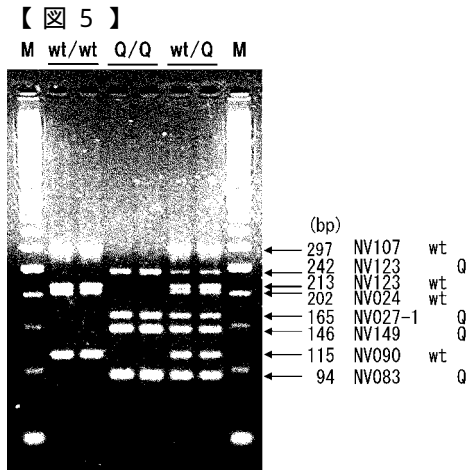
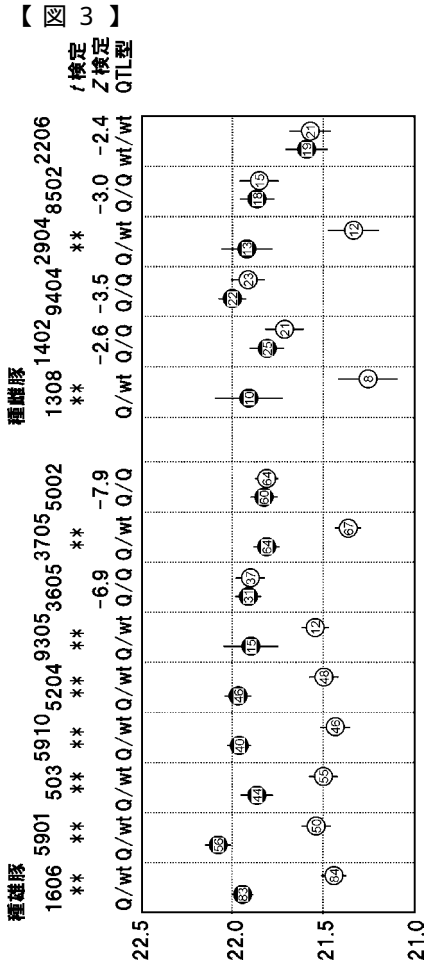
20

【 図 1 】



【 図 2 】

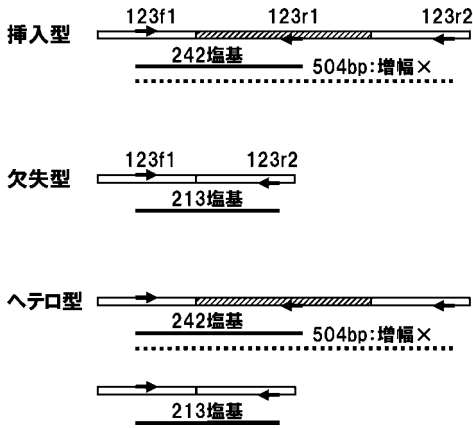




【 図 6 】

| 種別 | 品名 | 性別 | 年齢 | 検定 | Q/T 型 | 備考 |
|-----|------|----|----|----|-------|----|
| 種雄豚 | 1606 | ♂ | 1 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5901 | ♂ | 1 | + | wt | |
| 種雄豚 | 503 | ♂ | 1 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5910 | ♂ | 1 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5204 | ♂ | 1 | + | wt | |
| 種雄豚 | 9305 | ♂ | 1 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3605 | ♂ | 1 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3705 | ♂ | 1 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5002 | ♂ | 1 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1402 | ♀ | 1 | + | wt | |
| 種雌豚 | 9404 | ♀ | 1 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2904 | ♀ | 1 | + | wt | |
| 種雌豚 | 8502 | ♀ | 1 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2206 | ♀ | 1 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1308 | ♀ | 1 | + | wt | |
| 種雄豚 | 1606 | ♂ | 2 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5901 | ♂ | 2 | + | wt | |
| 種雄豚 | 503 | ♂ | 2 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5910 | ♂ | 2 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5204 | ♂ | 2 | + | wt | |
| 種雄豚 | 9305 | ♂ | 2 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3605 | ♂ | 2 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3705 | ♂ | 2 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5002 | ♂ | 2 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1402 | ♀ | 2 | + | wt | |
| 種雌豚 | 9404 | ♀ | 2 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2904 | ♀ | 2 | + | wt | |
| 種雌豚 | 8502 | ♀ | 2 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2206 | ♀ | 2 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1308 | ♀ | 2 | + | wt | |
| 種雄豚 | 1606 | ♂ | 3 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5901 | ♂ | 3 | + | wt | |
| 種雄豚 | 503 | ♂ | 3 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5910 | ♂ | 3 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5204 | ♂ | 3 | + | wt | |
| 種雄豚 | 9305 | ♂ | 3 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3605 | ♂ | 3 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3705 | ♂ | 3 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5002 | ♂ | 3 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1402 | ♀ | 3 | + | wt | |
| 種雌豚 | 9404 | ♀ | 3 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2904 | ♀ | 3 | + | wt | |
| 種雌豚 | 8502 | ♀ | 3 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2206 | ♀ | 3 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1308 | ♀ | 3 | + | wt | |
| 種雄豚 | 1606 | ♂ | 4 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5901 | ♂ | 4 | + | wt | |
| 種雄豚 | 503 | ♂ | 4 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5910 | ♂ | 4 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5204 | ♂ | 4 | + | wt | |
| 種雄豚 | 9305 | ♂ | 4 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3605 | ♂ | 4 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3705 | ♂ | 4 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5002 | ♂ | 4 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1402 | ♀ | 4 | + | wt | |
| 種雌豚 | 9404 | ♀ | 4 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2904 | ♀ | 4 | + | wt | |
| 種雌豚 | 8502 | ♀ | 4 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2206 | ♀ | 4 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1308 | ♀ | 4 | + | wt | |
| 種雄豚 | 1606 | ♂ | 5 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5901 | ♂ | 5 | + | wt | |
| 種雄豚 | 503 | ♂ | 5 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5910 | ♂ | 5 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5204 | ♂ | 5 | + | wt | |
| 種雄豚 | 9305 | ♂ | 5 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3605 | ♂ | 5 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3705 | ♂ | 5 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5002 | ♂ | 5 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1402 | ♀ | 5 | + | wt | |
| 種雌豚 | 9404 | ♀ | 5 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2904 | ♀ | 5 | + | wt | |
| 種雌豚 | 8502 | ♀ | 5 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2206 | ♀ | 5 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1308 | ♀ | 5 | + | wt | |
| 種雄豚 | 1606 | ♂ | 6 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5901 | ♂ | 6 | + | wt | |
| 種雄豚 | 503 | ♂ | 6 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5910 | ♂ | 6 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5204 | ♂ | 6 | + | wt | |
| 種雄豚 | 9305 | ♂ | 6 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3605 | ♂ | 6 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3705 | ♂ | 6 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5002 | ♂ | 6 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1402 | ♀ | 6 | + | wt | |
| 種雌豚 | 9404 | ♀ | 6 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2904 | ♀ | 6 | + | wt | |
| 種雌豚 | 8502 | ♀ | 6 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2206 | ♀ | 6 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1308 | ♀ | 6 | + | wt | |
| 種雄豚 | 1606 | ♂ | 7 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5901 | ♂ | 7 | + | wt | |
| 種雄豚 | 503 | ♂ | 7 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5910 | ♂ | 7 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5204 | ♂ | 7 | + | wt | |
| 種雄豚 | 9305 | ♂ | 7 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3605 | ♂ | 7 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3705 | ♂ | 7 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5002 | ♂ | 7 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1402 | ♀ | 7 | + | wt | |
| 種雌豚 | 9404 | ♀ | 7 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2904 | ♀ | 7 | + | wt | |
| 種雌豚 | 8502 | ♀ | 7 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2206 | ♀ | 7 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1308 | ♀ | 7 | + | wt | |
| 種雄豚 | 1606 | ♂ | 8 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5901 | ♂ | 8 | + | wt | |
| 種雄豚 | 503 | ♂ | 8 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5910 | ♂ | 8 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5204 | ♂ | 8 | + | wt | |
| 種雄豚 | 9305 | ♂ | 8 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3605 | ♂ | 8 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3705 | ♂ | 8 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5002 | ♂ | 8 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1402 | ♀ | 8 | + | wt | |
| 種雌豚 | 9404 | ♀ | 8 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2904 | ♀ | 8 | + | wt | |
| 種雌豚 | 8502 | ♀ | 8 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2206 | ♀ | 8 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1308 | ♀ | 8 | + | wt | |
| 種雄豚 | 1606 | ♂ | 9 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5901 | ♂ | 9 | + | wt | |
| 種雄豚 | 503 | ♂ | 9 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5910 | ♂ | 9 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5204 | ♂ | 9 | + | wt | |
| 種雄豚 | 9305 | ♂ | 9 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3605 | ♂ | 9 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3705 | ♂ | 9 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5002 | ♂ | 9 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1402 | ♀ | 9 | + | wt | |
| 種雌豚 | 9404 | ♀ | 9 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2904 | ♀ | 9 | + | wt | |
| 種雌豚 | 8502 | ♀ | 9 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2206 | ♀ | 9 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1308 | ♀ | 9 | + | wt | |
| 種雄豚 | 1606 | ♂ | 10 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5901 | ♂ | 10 | + | wt | |
| 種雄豚 | 503 | ♂ | 10 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5910 | ♂ | 10 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5204 | ♂ | 10 | + | wt | |
| 種雄豚 | 9305 | ♂ | 10 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3605 | ♂ | 10 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3705 | ♂ | 10 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5002 | ♂ | 10 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1402 | ♀ | 10 | + | wt | |
| 種雌豚 | 9404 | ♀ | 10 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2904 | ♀ | 10 | + | wt | |
| 種雌豚 | 8502 | ♀ | 10 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2206 | ♀ | 10 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1308 | ♀ | 10 | + | wt | |
| 種雄豚 | 1606 | ♂ | 11 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5901 | ♂ | 11 | + | wt | |
| 種雄豚 | 503 | ♂ | 11 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5910 | ♂ | 11 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5204 | ♂ | 11 | + | wt | |
| 種雄豚 | 9305 | ♂ | 11 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3605 | ♂ | 11 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3705 | ♂ | 11 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5002 | ♂ | 11 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1402 | ♀ | 11 | + | wt | |
| 種雌豚 | 9404 | ♀ | 11 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2904 | ♀ | 11 | + | wt | |
| 種雌豚 | 8502 | ♀ | 11 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2206 | ♀ | 11 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1308 | ♀ | 11 | + | wt | |
| 種雄豚 | 1606 | ♂ | 12 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5901 | ♂ | 12 | + | wt | |
| 種雄豚 | 503 | ♂ | 12 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5910 | ♂ | 12 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5204 | ♂ | 12 | + | wt | |
| 種雄豚 | 9305 | ♂ | 12 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3605 | ♂ | 12 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3705 | ♂ | 12 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5002 | ♂ | 12 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1402 | ♀ | 12 | + | wt | |
| 種雌豚 | 9404 | ♀ | 12 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2904 | ♀ | 12 | + | wt | |
| 種雌豚 | 8502 | ♀ | 12 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2206 | ♀ | 12 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1308 | ♀ | 12 | + | wt | |
| 種雄豚 | 1606 | ♂ | 13 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5901 | ♂ | 13 | + | wt | |
| 種雄豚 | 503 | ♂ | 13 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5910 | ♂ | 13 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5204 | ♂ | 13 | + | wt | |
| 種雄豚 | 9305 | ♂ | 13 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3605 | ♂ | 13 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3705 | ♂ | 13 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5002 | ♂ | 13 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1402 | ♀ | 13 | + | wt | |
| 種雌豚 | 9404 | ♀ | 13 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2904 | ♀ | 13 | + | wt | |
| 種雌豚 | 8502 | ♀ | 13 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2206 | ♀ | 13 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1308 | ♀ | 13 | + | wt | |
| 種雄豚 | 1606 | ♂ | 14 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5901 | ♂ | 14 | + | wt | |
| 種雄豚 | 503 | ♂ | 14 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5910 | ♂ | 14 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5204 | ♂ | 14 | + | wt | |
| 種雄豚 | 9305 | ♂ | 14 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3605 | ♂ | 14 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3705 | ♂ | 14 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5002 | ♂ | 14 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1402 | ♀ | 14 | + | wt | |
| 種雌豚 | 9404 | ♀ | 14 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2904 | ♀ | 14 | + | wt | |
| 種雌豚 | 8502 | ♀ | 14 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2206 | ♀ | 14 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1308 | ♀ | 14 | + | wt | |
| 種雄豚 | 1606 | ♂ | 15 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5901 | ♂ | 15 | + | wt | |
| 種雄豚 | 503 | ♂ | 15 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5910 | ♂ | 15 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5204 | ♂ | 15 | + | wt | |
| 種雄豚 | 9305 | ♂ | 15 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3605 | ♂ | 15 | + | wt | |
| 種雄豚 | 3705 | ♂ | 15 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5002 | ♂ | 15 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1402 | ♀ | 15 | + | wt | |
| 種雌豚 | 9404 | ♀ | 15 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2904 | ♀ | 15 | + | wt | |
| 種雌豚 | 8502 | ♀ | 15 | + | wt | |
| 種雌豚 | 2206 | ♀ | 15 | + | wt | |
| 種雌豚 | 1308 | ♀ | 15 | + | wt | |
| 種雄豚 | 1606 | ♂ | 16 | + | wt | |
| 種雄豚 | 5901 | ♂ | | | | |

【 図 7 】



【 図 8 】

```

NV123 挿入型
ggcaggggaaggtgtttgttatagtcttatcagtggtgtgtoagcagatctcaatTTTTCCCTT
gccgtgccagagccttggctcatcccttttaaaatgcaagggacagaggagttcccgctcgtggc
gcagtggttaaggaatccgactaggaaccatgaggttgcgggttcggtoctgcoccttgctcag
fgggtgacgatccggcgttcccgtagctgtggttaggtgcagaocggctcggatccctgc
gttctgtggctctggttagccgggtggccacggctcttattggacccttagcgtgggaccct
ccatagccgcaggagcggcccaagaaatagcaaaaggccaaaaaAAAAAAAAAAAAAAAAAAaa
ataaatgcaagggacagaggccagtc
1..20   ggcaggggaaggtgtttgtta
393..411 gactggcctctgtcccttg
95..385  replace   ""

NV123 欠失型
ggcaggggaaggtgtttgttatagtcttatcagtggtgtgtoagcagatctcaatTTTTCCCTT
gccgtgccagagccttggctcatcccttttaaaatgcaagggacagaggccagtc
1..20   ggcaggggaaggtgtttgtta
102..120 gactggcctctgtcccttg
95       insert   "291 bp of PRE1"

```

【 配列表 】

2011193826000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
- (74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 美川 智
茨城県つくば市観音台 2 - 1 - 2 独立行政法人農業生物資源研究所内
- (72)発明者 野口 剛
茨城県つくば市作谷 1 7 0 8 - 2 全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所内
- (72)発明者 千代 豊
茨城県つくば市作谷 1 7 0 8 - 2 全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所内
- (72)発明者 普川 一雄
北海道河東郡上士幌町字居辺 1 1 1 2 - 3 全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所種豚開発センター内
- (72)発明者 廣瀬 健右
北海道河東郡上士幌町字居辺 1 1 1 2 - 3 全国農業協同組合連合会飼料畜産中央研究所種豚開発センター内
- (72)発明者 奥村 直彦
茨城県つくば市上横場字一杯塚 4 4 6 - 1 社団法人農林水産先端技術産業振興センター農林水産先端技術研究所内

Fターム(参考) 4B024 AA10 AA11 CA01 CA09 DA02 HA14
4B063 QA08 QQ08 QQ42 QR32 QR55 QR77 QS34 QX01