

(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2017-85991

(P2017-85991A)

(43) 公開日 平成29年5月25日(2017.5.25)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68	Z N A A 2 G O 4 5
G01N 33/50 (2006.01)	G01N 33/50	P 4 B O 2 4
C12N 15/00 (2006.01)	C12N 15/00	A 4 B O 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2015-221325 (P2015-221325)	(71) 出願人	591282205
(22) 出願日	平成27年11月11日 (2015.11.11)		島根県
			島根県松江市殿町1番地
		(71) 出願人	595038556
			公益社団法人畜産技術協会
			東京都文京区湯島三丁目20番9号 緬羊
			会館
		(74) 代理人	110000176
			一色国際特許業務法人
		(72) 発明者	杉本 喜憲
			福島県西白河郡西郷村大字小田倉字小田倉
			原1-83 公益社団法人 畜産技術協会
			附属動物遺伝研究所内
		Fターム(参考)	2G045 AA25 DA13 DA14
			4B024 AA10 AA11 CA01 HA12
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさを判定する方法及びウシの胎膜水腫のキャリアを特定する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさを判定する判定方法、及びウシの胎膜水腫のキャリアを特定する特定方法の提供。

【解決手段】 前記ウシ胎子から単離された核酸において、SLC12A1遺伝子の変異の有無を検出する工程、前記ウシ胎子の両親のウシから単離された核酸において、SLC12A1遺伝子の変異の有無を検出する工程、または前記ウシ胎子の両親のウシから単離された核酸において、SLC12A1遺伝子の発現レベルを調べる工程を含み、前記ウシから単離された核酸において、SLC12A1遺伝子の変異の有無を検出する工程を含む、方法。

【選択図】 なし

上記方法。

【請求項 4】

前記ウシ胎子の両親のウシから単離された核酸において、

前記両親の両方が変異を有し、

前記両親の両方がホモ接合の場合、

前記ウシ胎子は胎膜水腫を発症しやすい、または発症しており、

前記両親の一方がホモ接合で、もう一方がヘテロ接合の場合、及び

前記両親の両方がヘテロ接合の場合、

この順に前記ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさが減少し、

前記ウシの少なくとも一方が変異を有さない場合は、

前記ウシ胎子は胎膜水腫を発症しにくい、または発症しない、
と判定する、請求項 3 に記載の方法。

10

【請求項 5】

ウシの胎膜水腫のキャリアを特定する方法であって、

前記ウシから単離された核酸において、SLC12A1 遺伝子の変異の有無を検出する工程を含み、

前記変異は、配列番号 1 の第 1 6 4 番塩基において、グアニン (G) がアデニン (A) に置換される変異である、

上記方法。

【請求項 6】

前記ウシから単離された核酸において、

前記変異がヘテロ接合のとき、前記ウシがキャリアであると判定する、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記核酸が DNA または RNA である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさを判定するためのキットであって、

SLC12A1 遺伝子の、配列番号 1 の第 1 6 4 番塩基においてグアニン (G) がアデニン (A) に置換される変異を含む DNA 断片を増幅するためのプライマーセットと、

前記ウシ胎子の胎膜水腫を判定するための指示が記録された媒体と、
を含むキット。

30

【請求項 9】

ウシの胎膜水腫のキャリアを特定するキットであって、

SLC12A1 遺伝子の、配列番号 1 の第 1 6 4 番塩基においてグアニン (G) がアデニン (A) に置換される変異を含む DNA 断片を増幅するためのプライマーセットと、

前記ウシ胎子の胎膜水腫を判定するための指示が記録された媒体と、
を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさを判定する方法及びウシの胎膜水腫のキャリアを特定する方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

胎膜水腫は、胎膜腔内に大量の胎水が貯留する症状を有する疾患である。胎膜水腫には、羊膜腔内に羊水が貯留する羊膜水腫と、尿膜腔内に尿膜水が貯留する尿膜水腫があり、単独で発症すること、同時に発症することもある。胎膜水腫が妊娠した母ウシで生じると、流産や早産を起こし、胎子は死亡することもある。重症例では母ウシも死亡する場合があり、農家の損失は大きい。

【0003】

50

羊膜水腫は、異常胎子に伴って先天的または遺伝的に生じることが報告されている（例えば、非特許文献1参照）。具体的には、乳用牛エアシャー種で常染色体劣性の遺伝様式で発症する胎子の浮腫（水腫胎）を伴う羊膜水腫が報告されている（例えば、非特許文献2参照）。また、尿膜水腫は、乳用牛エアシャー種、乳用牛ガーンジ種、乳用牛ジャージー種、乳用牛レッドデニッシュ種、乳用牛ホルスタイン種、肉用牛黒毛和種で発生の報告がある（例えば、非特許文献3～5参照）。しかしながら、現在、羊膜水腫発症の遺伝的原因は解明されていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

10

【非特許文献1】Roberts S.J.獣医産科・繁殖学—その診断と治療。（翻訳：白井和哉 & 河田啓一郎）.p149-164 学窓社。（1978年発行）

【非特許文献2】Donald HP, Deas DW, Wilson AL: Genetical analysis of the incidence of dropsical calves in herds of Ayrshire cattle. Brit Vet Jour,108:227-245.（1952年発行）

【非特許文献3】Neal P.A. Bovine Hydramnios and Hydrallantois. Vet Rec 68, 89-97.（1956年発行）

【非特許文献4】Skydsgaard J.M. The pathogenesis of hydrallantois bovis. I. The concentrations of sodium,potassium, chloride and creatinine in the foetal fluids in cases of hydrallantois and during normal pregnancy. Acta Vet Scand 6, 193-207.（1965年発行）

20

【非特許文献5】島根県農畜産振興課：牛の妊娠期後期の疾患（胎膜水腫）事例調査の結果について。URL: http://www.pref.shimane.lg.jp/industry/norin/seisan/shimane_wagyu/index.data/taimakusuishu-kekka.pdf.（2014年発行）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさを判定する新規方法及びウシの胎膜水腫のキャリアを特定する新規方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

30

【0006】

ウシ胎子の胎膜水腫の原因となる遺伝子を明らかにし、その変異を検出する遺伝子診断法を確立すれば、胎膜水腫の原因変異を保因する個体を迅速に検出できるようになる。本発明者らは、鋭意研究の結果、胎膜水腫の原因遺伝子としてsolute carrier family 12, member 1 (SLC12A1, NM_001192058)をコードするSLC12A1遺伝子を同定することに成功し、本発明を完成した。

【0007】

すなわち、本発明の一実施態様は、ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさを判定する方法であって、前記ウシ胎子から単離された核酸において、SLC12A1遺伝子の変異の有無を検出する工程を含む方法である。ここで、前記ウシ胎子から単離された核酸において、前記変異があつて、前記変異がホモ接合のとき、前記ウシ胎子は胎膜水腫を発症しやすい、または発症していると判定し、前記変異がヘテロ接合の場合、及び前記変異が無い場合、前記ウシ胎子は胎膜水腫を発症しにくい、または発症しないと判定する工程をさらに含んでもよい。

40

【0008】

また、本発明の他の一実施態様は、ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさを判定する方法であって、前記ウシ胎子の両親のウシから単離された核酸において、SLC12A1遺伝子の変異の有無を検出する工程を含む方法である。ここで、前記ウシ胎子の両親のウシから単離された核酸において、前記両親の両方が変異を有し、前記両親の両方がホモ接合の場合、前記ウシ胎子は胎膜水腫を発症しやすい、または発症しており、前記両親の一方がホモ接

50

合で、もう一方がヘテロ接合の場合、及び前記両親の両方がヘテロ接合の場合、この順に前記ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさが減少し、前記ウシの一方が変異を有さない場合は、前記ウシ胎子は胎膜水腫を発症しにくい、または発症しない、と判定する工程をさらに含んでもよい

【0009】

また、本発明のさらなる一実施態様は、ウシの胎膜水腫のキャリアを特定する方法であって、前記ウシから単離された核酸において、SLC12A1遺伝子の変異の有無を検出する工程を含む方法である。前記変異がヘテロ接合のとき、前記ウシがキャリアであると判定する工程を含んでもよい。

【0010】

上記いずれの方法においても、前記変異が、SLC12A1遺伝子の発現または陽イオン/C1⁻共輸送機能を低下させる変異であってもよい。また、前記変異が配列番号1における第164番塩基における変異であってもよい。

【0011】

また、本発明のさらなる一実施態様は、ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさを判定する方法であって、前記ウシ胎子から単離された核酸において、SLC12A1遺伝子の発現レベルを調べる工程を含む方法である。前記核酸において前記発現が無い場合、前記ウシ胎子は胎膜水腫を発症しやすい、または発症していると判定し、前記発現がある場合、前記ウシは胎膜水腫を発症しにくい、または発症しないと判定する工程をさらに含んでもよい。

【0012】

また、本発明のさらなる一実施態様は、ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさを判定する方法であって、前記ウシ胎子の両親のウシから単離された核酸において、SLC12A1遺伝子の発現レベルを調べる工程を含む方法である。ここで、前記ウシ胎子の両親のウシから単離された核酸において、前記両親の両方でSLC12A1遺伝子の発現が無い場合、前記ウシ胎子は胎膜水腫を発症しやすい、または発症しており、前記両親の一方でSLC12A1遺伝子の発現が低下し、もう一方でSLC12A1遺伝子の発現が無い場合、及び前記両親の両方でSLC12A1遺伝子の発現が低下している場合、この順に前記ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさが減少する、と判定する工程をさらに含んでもよい。

【0013】

上記いずれの方法においても、前記核酸がDNAまたはRNAであってもよい。

【0014】

また、本発明のさらなる一実施態様は、ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさを判定するためのキットであって、SLC12A1遺伝子の変異を含むDNA断片を増幅するためのプライマーセットと、前記ウシ胎子の胎膜水腫を判定するための指示が記録された媒体と、を含むキットである。また、本発明のさらなる一実施態様は、ウシの胎膜水腫のキャリアを特定するキットであって、SLC12A1遺伝子の変異を含むDNA断片を増幅するためのプライマーセットと、前記ウシの胎膜水腫を判定するための指示が記録された媒体と、を含むキットである。いずれのキットにおいても、前記変異が配列番号1における第164番塩基における変異であってもよい。

【発明の効果】

【0015】

本発明により、ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさを判定する新規方法及びウシの胎膜水腫のキャリアを特定する新規方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】実施例で同定されたSLC12A1遺伝子の変異部分を示す図である。矢印は、変異部分を検出するためのPCRプライマーSLC12A1-F及びSLC12A1-Rの該当する位置、矢印の方向はプライマーの5'から3'への方向を示す。図1に示したPCR増幅断片の第164番塩基は、正常型ではグアニン（G）であり、胎膜水腫型ではアデニン（A）である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下、本発明の実施の形態を、実施例を挙げながら詳細に説明する。

【0018】

実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R.

E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Ltd.などの標準的なプロトコル集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いている場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコルを用いる。

【0019】

本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的に実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

【0020】

== SLC12A1遺伝子の変異を検出する方法 ==

本明細書において、「SLC12A1遺伝子」とは、SLC12A1タンパク質をコードするコーディング領域及び3'-及び5'-UTR（非翻訳領域）を含むエクソンと、イントロンと、遺伝子発現制御に関わるプロモーター及びエンハンサーとを含むDNAをいう。

【0021】

本明細書において、「SLC12A1遺伝子の変異」とは、SLC12A1遺伝子において、UMD3.1ゲノムアセンブリ上の基準となる塩基配列と比較して相違することをいう。その基準となる塩基配列は、配列表の配列番号1に示す塩基配列を例示できる。なお、本明細書において、SLC12A1遺伝子内の特定の塩基に言及する場合、配列番号1に示す基準の配列における位置で表すものとする。

【0022】

SLC12A1遺伝子は、ナトリウムイオン及びカルシウムイオンと、塩素イオンとを共輸送する陽イオン/C1⁻共輸送体であるSLC12A1タンパク質をコードする。SLC12A1タンパク質は、腎臓の尿細管のヘンレのワナ上行部における塩化ナトリウム（NaCl）の再吸収を行うことで、腎臓における対向流増幅機構を形成し、水の再吸収を行う。SLC12A1遺伝子に、SLC12A1遺伝子発現が低下するか、あるいはSLC12A1タンパク質自体の活性が低下するような変異が生じると、ウシ胎子でのSLC12A1タンパク質の機能、特に陽イオン/C1⁻共輸送機能が低下する。その結果、ウシ胎子が胎膜水腫を発症する。

【0023】

従って、本発明で検出する対象となる変異は、SLC12A1遺伝子の発現を低下させたり、SLC12A1タンパク質自体の活性を低下させたりすることによって、ウシ胎子の胎膜水腫を発症させることができる変異であれば限定されず、挿入変異、欠失変異、置換変異のいずれであってもよいが、配列番号1における第164番塩基における変異であることが好ましい。基準となる第164番塩基はグアニン（正常型塩基とも呼ぶ）であって、アデニン（胎膜水腫型塩基ともよぶ）、チミン、シトシンへのいずれの変異であってもよい。

【0024】

変異を検出するための核酸は特に限定されず、ゲノムDNA、RNA（全RNAまたはmRNA）、又はcDNAを用いることができる。cDNAは、ウシからRNAを単離し、これを鋳型とした逆転写反応により調製することができる。作業工程の簡便さから、ゲノムDNAを用いることが好ましい。

【0025】

10

20

30

40

50

単離した核酸中のSLC12A1遺伝子の変異を調べる具体的な方法は特に限定されず、例えば、常法によって核酸の塩基配列を決定し、変異の有無を調べる方法が挙げられる。変異により正常型塩基を含む配列と胎膜水腫型塩基を含む配列との間で制限酵素の認識部位に相違が生じる場合には、PCR-RFLP法により変異の有無を調べることができるが、一般には、塩基配列を決定して変異の有無を調べる方法が汎用的である。

【0026】

例えば、配列番号1の配列における第164番塩基を調べる場合、その塩基を含むDNA断片を核酸増幅法により増幅し、増幅断片の塩基配列を決定し、第164番塩基に変異があるか否かを確認すればよい。具体的な例としては、配列番号2及び3に示すプライマーセットを用いてPCRを行えば、SLC12A1遺伝子のうちで図1に示した領域（配列番号1）が増幅されるので、この増幅断片における164番目の塩基について、グアニンか、それ以外の塩基であるかを調べればよい。

【0027】

== SLC12A1遺伝子の発現を調べる方法 ==

SLC12A1遺伝子の発現を調べる組織は、正常のウシにおいてSLC12A1遺伝子が発現している組織であれば特に限定されないが、腎臓などが好ましい。それらの組織から、周知の方法で、SLC12A1遺伝子の発現を調べるための核酸を抽出することができる。

【0028】

SLC12A1遺伝子の発現を調べるために用いる核酸は、RNA（全RNAまたはmRNA）又はcDNAを用いることができる。核酸の種類により、周知の発現検出方法を適宜選択することができる。たとえば、RNAを用いる場合、ノーザン・ブロットやドット・ブロットなどによって、またcDNAを用いる場合、PCRなどによって発現を検出することができる。

【0029】

== ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさを判定する方法 I ==

本発明のウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさを判定する方法の一実施形態は、ウシ胎子から単離された核酸において、SLC12A1遺伝子の変異の有無を検出する工程を含む。なお、本明細書において、母ウシが胎子を妊娠しているときに胎膜水腫が生じた場合、その原因となった胎子が胎膜水腫を「発症した」といい、母ウシで胎膜水腫が「生じた」というものとする。

【0030】

上述のようにして、SLC12A1遺伝子の変異を調べた結果、SLC12A1遺伝子の変異の性質によって、当業者が容易に胎膜水腫の発症しやすさの判定方法を決めることができる。例えば、SLC12A1遺伝子の変異が劣性変異の場合、常染色体劣性遺伝様式をとるので、ホモ接合であるウシ胎子は胎膜水腫を発症しやすい、または発症していると判定し、ヘテロ接合であるウシ胎子及び野生型ウシ胎子は胎膜水腫を発症しにくい、または発症しないと判定する。また、SLC12A1遺伝子の変異が優性変異の場合、ホモ接合及びヘテロ接合であるウシ胎子は胎膜水腫を発症しやすい、または発症していると判定し、野生型ウシ胎子は胎膜水腫を発症しにくい、または発症しないと判定する。これ以外に、優性や劣性の中間的な性質を呈する場合であっても、当業者は容易に判定方法を決めることができる。

【0031】

また、本明細書で、90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは99%以上の確率で胎膜水腫を発症する場合、「胎膜水腫を発症しやすい」という。そして、10%以下、好ましくは5%以下、より好ましくは1%以下の確率で胎膜水腫を発症する場合、「胎膜水腫を発症しにくい」という。

【0032】

例えば、第164番塩基の場合、これは劣性変異であるため、グアニン以外の塩基をホモ接合で有する場合、当該ウシ胎子は胎膜水腫を発症しやすい、または発症していると判定し、グアニン以外の塩基とグアニンとをヘテロ接合で有する場合及びグアニンをホモ接合で有する場合、当該ウシ胎子は胎膜水腫を発症しにくい、または発症しないと判定する

【0033】

また、上述したように、SLC12A1遺伝子内に、SLC12A1遺伝子の発現を低下させたり、SLC12A1タンパク質自体の活性を低下させたりする変異をウシ胎子が有することによって、ウシ胎子が胎膜水腫を発症し得る。従って、ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさを判定するために、ウシ胎子から単離された核酸を用いて、SLC12A1遺伝子の発現レベルを調べてもよい。

【0034】

ここで、ウシ胎子においてSLC12A1遺伝子の発現が無い場合、ウシ胎子は胎膜水腫を発症しやすい、または発症していると判定し、SLC12A1遺伝子の発現がある場合、ウシ胎子は胎膜水腫を発症しにくい、または発症しないと判定する。

【0035】

このようにして、ウシ胎子から単離した核酸を用いて、その胎子の胎膜水腫の発症しやすさを調べることができる。

【0036】

==ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさを判定する方法 I I ==

ウシ胎子の有するSLC12A1遺伝子は、両親から受け継がれたものである。従って、ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさは、両親のウシのSLC12A1遺伝子の変異または発現を調べることによって、判定することができる。

【0037】

まず、上述のようにして両親のウシのSLC12A1遺伝子の変異を調べた結果、その変異の性質によって、ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさの判定方法を当業者が容易に決めることができる。例えば、変異が劣性変異の場合、両親ともホモ接合、一方がホモ接合で他方がヘテロ接合、両親ともヘテロ接合、の順で、ウシ胎子の胎膜水腫の発症の確率が下がる、すなわち発症しにくくなる。具体的には、両親ともホモ接合の場合は100%の割合で、一方がホモ接合で他方がヘテロ接合の場合は約50%の割合で、両親ともヘテロ接合の場合は約25%の割合でウシ胎子が胎膜水腫を発症することが期待される。また、少なくとも一方が野生型である場合、ウシ胎子は胎膜水腫を発症しにくい、または発症しないと判定する。

【0038】

また、上述のようにして両親のウシのSLC12A1遺伝子の発現を調べた結果、その発現レベルによって、ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさの判定方法を当業者が容易に決めることができる。例えば、両親ともSLC12A1遺伝子の発現が無い場合、一方で発現が無く他方で発現が正常ウシと比べ低下している場合、両親とも発現が正常ウシと比べ低下している場合、の順で、ウシ胎子の胎膜水腫の発症の確率が下がる、すなわち発症しにくくなる。具体的には、両親ともSLC12A1遺伝子の発現が無い場合は100%の割合で、一方で発現が無く他方で発現が正常ウシと比べ低下している場合は約50%の割合で、両親とも発現が正常ウシと比べ低下している場合は約25%の割合でウシ胎子が胎膜水腫を発症することが期待される。また、少なくとも一方で発現が正常である場合、ウシ胎子は胎膜水腫を発症しにくい、または発症しないと判定する。

【0039】

==ウシの胎膜水腫のキャリアを特定する方法==

本発明のウシの胎膜水腫のキャリアを特定する方法は、ウシから単離された核酸において、SLC12A1遺伝子の変異の有無を検出する工程を含む。ここで、上述のようにして、SLC12A1遺伝子の変異を調べた結果、SLC12A1遺伝子の変異がヘテロ接合の場合に、そのウシを胎膜水腫のキャリアと特定する。

【0040】

なお、本明細書で「胎膜水腫のキャリア」とは、胎膜水腫の原因遺伝子が劣勢変異である場合のヘテロ接合体であって、当該個体は胎膜水腫を発症しないが、その原因遺伝子をホモ接合で有する個体は胎膜水腫を発症しうる場合のヘテロ接合体をいうものとする。

【0041】

この方法を用いて、ウシ集団内で胎膜水腫を発症しにくくすることができる。すなわち、キャリア同士を交配すると、4分の1の確率で子孫はホモ接合で変異を有する。また、キャリアと、変異型遺伝子を有さない野生型ウシを交配しても、2分の1の確率でキャリアが生じ、変異型遺伝子は集団から無くならず、子孫に受け継がれる。一方、変異型遺伝子を有さない野生型ウシ同士を交配すると、子孫は胎膜水腫を発症せず、変異型遺伝子は集団から排除されるようになる。

【0042】

従って、本発明による胎膜水腫の判定方法を用い、野生型ウシ同士を交配することにより、胎膜水腫をへらすことができるだけでなく、ウシ集団から、胎膜水腫のリスク要因を減らすことが可能になり、ウシ集団内で胎膜水腫を発症しにくくすることができる。

【0043】

==プライマーセット及びキット==

SLC12A1遺伝子の発現を低下させたり、SLC12A1タンパク質自体の活性を低下させたりすることによって、ウシ胎子の胎膜水腫を発症させることができる変異は、ウシ胎子の胎膜水腫の指標となるので、変異部位を含むDNAを増幅するためのプライマーセットは、ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさの判定試薬（以下、判定試薬と呼ぶ）及びウシの胎膜水腫のキャリアの特定試薬（以下、特定試薬と呼ぶ）として用いることができる。なお、このプライマーセットは、変異を有しない野生型配列のウシ由来の核酸を増幅した場合、変異部位に変異のないDNAの増幅断片が得られる。

【0044】

SLC12A1遺伝子領域内の変異部位を含む領域を増幅するプライマーセットは、例えば、配列番号1における164番目の塩基を含むウシゲノム上の領域を増幅するプライマーセットであってもよい。プライマーの配列は、当業者の技術常識から容易に設計可能である。一例として、そのようなプライマーセットは、配列番号1の第1番～第20番塩基の領域内の部分領域に対するフォワード側プライマーと、配列番号1の第226番～第245番塩基の領域内の部分領域に対するリバーズ側プライマーとのセットであってもよい。なお、「フォワード側プライマー」とは、配列表に実際に示されている塩基配列を有し、その相補鎖であるDNA鎖にハイブリダイズするプライマーであり、「リバーズ側プライマー」とは、配列表に実際に示されている塩基配列に相補的な配列を有し、配列表にある配列を有するDNA鎖にハイブリダイズするプライマーである。

【0045】

下記実施例で用いられている、配列番号2に示す塩基配列からなるプライマーと配列番号3に示す塩基配列からなるプライマーとのセットは、実施例で同定されたSLC12A1遺伝子領域における一塩基置換変異を検出するための好ましいプライマーセットの一例であるが、判定試薬や特定試薬に使用可能なSLC12A1遺伝子領域を増幅するプライマーセットはこれに限定されない。

【0046】

これら判定試薬や特定試薬は、SLC12A1遺伝子の変異を含むDNAを増幅するためのプライマーセットを含めばよく、その形状は限定されない。例えば、プライマーを緩衝液等に溶解させた溶液状であってもよく、また、乾燥させたプライマーであってもよい。さらに、該試薬は、プライマーの分解防止等に有用な添加剤等を含んでいてもよい。

【0047】

これら判定試薬や特定試薬は、他の試薬類と組み合わせて、ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさを判定するための判定キット及びウシの胎膜水腫のキャリアを特定するための特定キットとして提供することができる。例えば、判定キット及び特定キットには、PCR等の核酸増幅法に必要なプライマー以外の周知の試薬を含んでもよく、反応液を調製するための緩衝液、dNTP、耐熱性ポリメラーゼ等を含んでもよい。

【0048】

さらに、判定キット及び特定キットには、それぞれウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさ

を判定するための指示や方法及びウシの胎膜水腫のキャリアを特定するための指示や方法が具体的に記録された媒体が含まれていてもよい。媒体の形状は特に限定されず、紙であっても電子媒体であってもよい。

【0049】

例えば、ウシ胎子の胎膜水腫の発症しやすさを判定するための指示や方法として、上述したように、変異や発現を調べた結果に対し、それぞれの判定方法が記載されている。例えば、配列番号1における164番目の塩基を調べる場合、グアニン以外の塩基をホモ接合で有する場合、当該ウシは胎膜水腫を発症しやすい、または発症していると判定し、ヘテロ接合、またはグアニンをホモ接合で有する場合、当該ウシは胎膜水腫を発症しにくい、または発症しないと判定するように指示した判定方法が記載されている。

10

【0050】

また、ウシの胎膜水腫のキャリアを特定するための指示や方法として、上述したように、変異や発現を調べた結果に対し、それぞれの特定方法が記載されている。例えば、配列番号1における164番目の塩基を調べる場合、グアニンとグアニン以外の塩基をヘテロ接合で有する場合、そのウシを胎膜水腫のキャリアであると特定するように指示した特定方法が記載されている。

【実施例】

【0051】

(1) ウシSLC12A1遺伝子の胎膜水腫特異的変異

胎膜水腫を発症した胎子9頭のゲノムDNAを抽出し、SLC12A1遺伝子内の配列番号1における第164番塩基の遺伝子型を調べたところ、9頭とも、Aのホモ接合体であった。

20

【0052】

次に、LC12A1遺伝子内の配列番号1における第164番塩基がG/Aの雄牛の産子で、表現型が正常な73頭のゲノムDNAを抽出し、配列番号1における第164番塩基の遺伝子型を調べた結果、G/Gのホモ接合体が36頭、G/Aのヘテロ接合体が37頭、A/Aのホモ接合体が0頭であった。Aのアレル頻度が0.285であることからA/Aのホモ接合体の期待頭数は約5頭と計算され、観測値が0頭である統計学的確率は有意に小さかった($P < 0.01$)。

【0053】

本実施例で調べた集団において、配列番号1における第164番塩基がA/Aのホモ接合体は胎膜水腫を発症し、また、A/Aのホモ接合体の正常個体が存在しなかった。このように、配列番号1における第164番塩基Gの変異は、胎膜水腫の原因である。なお、胎膜水腫発症個体は、Robertsらの手法(Roberts S.J.獣医産科・繁殖学—その診断と治療、(翻訳: 白井和哉 & 河田啓一郎), p149-164 学窓社, (1978年発行))に従い診断した。また、配列番号1における第164番塩基の遺伝子型は、GGP_SuperLDv2-0(GeneSeek社製)を用いて調べた。

30

【0054】

(2) 配列番号1における第164番塩基の変異

SLC12A1遺伝子内にある配列番号1における第164番塩基がグアニン(G)からアデニン(A)に置換する変異は、SLC12A1タンパク質の372番目のプロリンをロイシンに置換する。この変異は、SLC12A1の機能を損なうことが、アミノ酸変異の影響を調べるソフトウェアであるPolyPhen-2 (Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L. et al. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods 7,24 8-9.)、SIFT (Sim N.L., Kumar P., Hu J. et al. (2012) SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. Nucleic Acids Res 40 W452-7.)によって推定された。

40

【0055】

(3) ウシゲノムDNAの配列番号1における第164番塩基の決定

ウシの血液(抗凝固剤としてEDTA、ヘパリンを含む)より、自動核酸分離装置NA-1000

50

(クラボウ社製)を用いてゲノムDNAを調製した。これらのゲノムDNAを鋳型とし、プライマーSLC12A1-F(配列番号2)及びSLC12A1-R(配列番号3)を用いたPCR(98℃で20秒、60℃で30秒、72℃で1分間からなる工程を1サイクルとした35サイクル反応)を行い、3730蛍光DNAシーケンサー(アプライドバイオシステムズ社製)を用いてPCR生成物の塩基配列を決定した。胎膜水腫を発症したウシのSLC12A1遺伝子を鋳型にPCRで増幅させたDNA断片(配列番号1)では、配列番号164番目の塩基が常にグアニン(G)であったが、正常型由来の増幅断片ではアデニン(A)であった。

【0056】

このように、SLC12A1遺伝子は胎膜水腫の発生の原因遺伝子であり、SLC12A1遺伝子における変異の有無を判定する本発明の診断法によって、確実にウシの胎膜水腫を判別可能である。

【図1】

正常型

1 CTCCCTGTCTACCCAACTGcaccactgcttcttgattacaaagcagaggaataacatccctccasctcccgagat
164
tggcaccgcaaggtccagtgctgctggaaaaatggcagaacagagagccttcaccttttgagcttGgcccaaat
tttgcacatattgctgcacacaataatgagaataattattatgAATTCTTCACTGGCGGAA 245

胎膜水腫型

1 CTCCCTGTCTACCCAACTGcaccactgcttcttgattacaaagcagaggaataacatccctccasctcccgagat
164
tggcaccgcaaggtccagtgctgctggaaaaatggcagaacagagagccttcaccttttgagcttGgcccaaat
tttgcacatattgctgcacacaataatgagaataattattatgAATTCTTCACTGGCGGAA 245

【配列表】

0006586684000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 長谷川 清寿

島根県出雲市古志町 3 7 7 5 島根県畜産技術センター内

(72)発明者 東 智子

島根県出雲市神西沖町 9 1 8 - 4 島根県畜産課家畜病性鑑定室内

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献 特表 2 0 0 1 - 5 0 8 2 9 1 (J P , A)

「和牛ブランド危機 「隆娘」精液供給休止」, しまねkey, YOMIURI ONLINE [online], 2014年
10月18日 [検索日 2018年11月5日], インターネット <URL: [https://www.yomiuri.co.jp/local/
shimane/feature/C0004252/20141017-OYTAT50032.html](https://www.yomiuri.co.jp/local/shimane/feature/C0004252/20141017-OYTAT50032.html)>

日獣会誌 (1978) Vol.31, pp.660-663

日児腎誌 (2009) Vol.22, No.1, pp.24-28

Endocrine Journal (2007) Vol.54, No.6, pp.1003-1007

Biology of Reproduction (2006) Vol.75, No.1, pp.122-130

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)

M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q