

イヌメラノコルチン2受容体遺伝子における一塩基多型の犬種間比較と「訓練能」との関連性について

木村雄一*・増田宏司**・土田あさみ**・大石孝雄**

(平成22年7月30日受付/平成22年10月22日受理)

要約：本研究ではイヌのメラノコルチン2受容体 (*MC2R*) 遺伝子に存在する一塩基多型 (SNPs ; 600 G>C, 858 G>A) と、「訓練能スコア」との関連性をゴールデンレトリバー、ラブラドルレトリバー、ミニチュアシュナウザー、マルチーズ、柴の5犬種、計77個体のゲノムDNAを用いて調査した。77個体のゲノムDNAについて遺伝子型判別を行った結果、ラブラドルレトリバー、マルチーズ、柴の3犬種において600 G>Cの遺伝子型およびアレル頻度に犬種差が認められた。また、600 G>C多型によって判別される遺伝子型と訓練能スコアとの間に有意な関連が認められた。

キーワード：遺伝子, 犬種差, 行動特性, *MC2R*, *SNPs*

はじめに

(1) 背景

日本におけるイヌの飼育頭数は1300万頭を超え、現在もなお増加傾向にある。近年のペットブームやペット可住宅の充実などの社会的現象がイヌの飼育頭数増加に拍車をかけていると考えられているが、イヌは盲導犬などの補助犬から生活に潤いを与えてくれる愛玩犬まで、人間の生活にはなくてはならない存在として広く社会に受け入れられている。動物福祉を含め、イヌとヒトとの関わりの重要性は以前よりも強く社会に認識されてきているが、一方でイヌにまつわるトラブルなどの解決すべき課題が山積しているのも事実である。

イヌとヒトの生活がより密接になれば、当然両者の生活に多少の問題点が顕在化するようになる。例えばイヌの鳴き声が近所迷惑になるなどの問題行動が挙げられるが、これらの問題点は飼い主があらかじめ、飼う犬種の行動特性やイヌの習性を学び、事前に予防策を講じることで防ぐことができる。しかし、イヌの行動特性や習性に基づいた飼育管理方法については多くのことが既に知られている反面、それらに強く影響する遺伝的背景についてはよく分かっていない。

(2) イヌの行動特性

ヒトで、性格は「氏も育ちも」といわれるように、性格形成において遺伝要因と環境要因は互いに欠くことができないものであるとされている。遺伝子と性格の関連性が初めて報告されたのは1996年で、ヒトのドーパミン受容体

D4型 (*DRD4*) 遺伝子のエクソン3領域に存在する反復配列の回数によって、遺伝的傾向の強い気質成分とされている新奇探求性スコアが変化することが明らかになっている^{1,2)}。

1999年にはイヌにおいても同遺伝子の同部位に反復配列が存在することが報告されている³⁾。その後今日までに様々な行動特性関連候補遺伝子の多型検索とその犬種特異性が検討されてきたが⁴⁻⁷⁾、イヌの行動特性と遺伝子多型との関連性についての報告は僅かである⁸⁾。

イヌを飼育管理する上で「飼いやすさ」というのは重要視される要因であるが、それは飼い主のライフスタイルに沿うものであり個々に異なる。すなわち、イヌの「飼いやすさ」を科学的に定義することは困難である。そこで本研究では、イヌの飼いやすさの中でも特に重要な、しつけのしやすさを左右するであろうイヌの訓練性能に注目した。

一概に訓練性能といっても、イヌに求める用途によって訓練性能の構成要因は変化するが、想定される種々要因の中でもイヌの「命令への反応」については訓練性能の中核をなす要因と考えても良いだろう。武内らの調査によると⁹⁾、飼い主へのアンケート調査によって得た回答を因子分析によって解析した結果、「報酬が見えている時の飼い主の命令に対する反応」の頻度と「報酬が見えていない時の飼い主の命令に対する反応」の頻度により構成される因子が抽出されており、この2成分による因子は「訓練能」と命名されている。両構成成分ともに、犬が飼い主の命令に従う頻度が高ければそれぞれのスコアが高くなり、結果として訓練能 (訓練能スコア) が高いと解釈される。

* 東京農業大学農学研究科畜産学専攻

** 東京農業大学農学部バイオセラピー学科

(3) メラノコルチン2受容体 (MC2R) 遺伝子

イヌ MC2R 遺伝子は1番染色体上に位置し、コード領域の全長が891-bpのイントロンを持たない遺伝子である。既にイヌ MC2R 遺伝子にはコード領域の600番目と858番目に2箇所の一塩基置換 (600 G>C; グアニンからシトシンへの置換, 858 G>A; グアニンからアデニンへの置換) が存在することが明らかになっている。ヒトではこのメラノコルチン受容体はGタンパク質共役型の副腎皮質刺激ホルモン受容体 (ACTH-R) であり、5種のサブタイプ (MC1R~5R) が知られている。このうち、2型受容体はACTHにのみ親和性を示し¹⁰⁾、ストレス反応系において重要であると考えられている。

本研究では、イヌのメラノコルチン2受容体遺伝子に存在する2箇所の遺伝子多型について、その多型頻度の犬種間比較と、イヌの訓練能との関連性を探ることを目的とした。

材料と方法

(1) DNA サンプル, プライマーデザイン, PCR

材料となるイヌのゲノムDNAは東京大学獣医動物行動学研究室より提供していただいた。これらのイヌには同時にイヌの飼い主により行動頻度の段階評価がなされており (科学研究費補助金, 基盤研究B, 課題番号03460131), 因子分析によって行動特性に関する8種類の因子 (攻撃性/反応性, 甘え, 探索性, 訓練能, 人見知りなど) と各因子における因子得点が得られている。本研究ではそれらの行動特性のうち、訓練能に着目したため、訓練能スコア (因子得点) 順にサンプルを並べ替え、スコアの上位41検体と下位36検体の合計77検体を実験に用いた。77検体の犬種の内訳はゴールデンレトリバー (n=4), ラブラドルレトリバー (n=20), ミニチュアシュナウザー (n=6), マルチーズ (n=20), 柴 (n=27) であった。PCRにはプライマー MC2R F; 5'-ttg tct taa cca cta gcc gg-3', MC2R R1; 5'-agc atg agc att tgt tgg tg-3', を用いた。電気泳動により目的鎖長 (988-bp) のバンドがうまく確認できなかった場合は、MC2R R1に代えてMC2R R2; 5'-aag gca atc tca gca aca gg-3'を使用した (鎖長は1246-bp)。

PCRの酵素はexTaq (タカラバイオ株式会社) を用いた。テンプレート30ngを含む全量50 μ l (buffer, dNTP, primerを含む) に試薬を調整し、95 $^{\circ}$ Cで5分間の予備変性後、95 $^{\circ}$ C 30秒, 56 $^{\circ}$ C 30秒, 72 $^{\circ}$ C 60秒の行程を35サイクル行い、最後に72 $^{\circ}$ Cで5分間の伸長反応を行った。その後1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、目的鎖長のバンドを確認した。

(2) 遺伝子型の同定

イヌ MC2R 遺伝子における2箇所のSNPs (600 G>C, 858 G>A) は、シーケンシングの波形から遺伝子型を判別した (DNA 受託解析サービス; マクロジェンジャパン)。その際、ヘテロ接合体についてはシーケンシング波形の蛍光ピーク強度が同等であることをもって判別した。また600 G>C多型については制限酵素認識部位 (Bsh1236I;

Fermentas社) が存在するため、制限酵素断片長多型判定法 (RFLP法) を用いて遺伝子型を確認した。RFLPでは制限酵素Bsh1236IとPCR産物を37 $^{\circ}$ Cで16時間反応させ、1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、その断片長によってG/G型, G/C型, C/C型の遺伝子型を判別した。また、いずれの電気泳動も、染色にはエチジウムブロマイドを用いた。

(3) 統計解析

全ての検定において有意水準は $p=0.05$ とした。遺伝子型頻度の犬種間比較 (ラブラドルレトリバー, マルチーズ, 柴) にはカイニ乗検定 (Chi-square test) を用いた。また、訓練能における因子得点と各遺伝子型との関連性はクラスカル・ウォリス検定 (Kruskal Wallis test) によって解析を行った。全てのデータ解析にはエクセル統計2008 (社会情報システム) を用いた。

結 果

犬種別遺伝子型頻度, アレル頻度, ヘテロ接合度 (Heterozygosity) は表1に示す。600 G>C多型において、ラブラドルレトリバー, マルチーズ, 柴については、遺伝子型頻度およびアレル頻度において有意な差が認められた (genotype; $df=4$, $\chi^2=43.881$, $p<0.0001$. allele frequency; $df=2$, $\chi^2=40.775$, $p<0.0001$. Chi-square test)。なお、ゴールデンレトリバーとミニチュアシュナウザーはサンプル数が少ないため、この解析から除外した。同様に858 G>A多型についてもゴールデンレトリバーとミニチュアシュナウザーを除いた3犬種で検定を行ったが、有意な差は認められなかった。また、両多型間に連鎖は認められなかった。

5犬種, 計77サンプルについて、遺伝子型と訓練能の関連性をクラスカル・ウォリス検定を用いて検討した結果を図1に示す。600 G>C多型と訓練能スコアに有意な関連が認められた (Kruskal Wallis test: $p=0.0252$)。また、scheffeの多重比較により、G/G型がC/C型に比べて有意に高い訓練能スコアを示した。858 G>A多型については、訓練能スコアとの関連性は認められなかった。

考 察

本研究では、イヌの行動特性関連候補遺伝子としてメラノコルチン2受容体遺伝子 (MC2R) に着目し、同遺伝子に認められる既知の一塩基多型 (600 G>Cおよび858 G>A) の犬種間比較およびイヌの行動特性の中でも特に訓練能との関連性について検討した。

遺伝子型判別を行った2箇所の一塩基多型のうち、600 G>Cには有意な犬種差が認められた。600 G>Cによって判別した遺伝子型について犬種別に見てみると、ラブラドルレトリバーの多くがG/G型であるのに対し、マルチーズはG/C型が最も多く、柴はC/C型が最も多い結果となった。また、G/G型を示す柴の個体は確認できなかった。これまでに検討されてきた一塩基多型の犬種間比較によって、様々な犬種特異性が報告されてきているが、

表 1 イヌ *MC2R* 遺伝子 600 G>C および 858 G>A の犬種差

600 G>C		遺伝子型頻度			アレル頻度		ヘテロ接合度
breed	n	G/G	G/C	C/C	G	C	
<i>Golden retriever</i>	4	1 (25.0)	2 (50.0)	1 (25.0)	4 (50.0)	4 (50.0)	0.500
<i>Labrador retriever</i>	20	15 (75.0)	4 (20.0)	1 (5.0)	34 (85.0)	6 (15.0)	0.255
<i>Maltese</i>	20	3 (15.0)	13 (65.0)	4 (20.0)	19 (46.0)	21 (54.0)	0.499
<i>Miniature schauzer</i>	6	5 (83.3)	1 (16.7)	0 (0.0)	11 (91.7)	1 (8.3)	0.153
<i>Shiba inu</i>	27	0 (0.0)	10 (37.0)	17 (63.0)	10 (18.5)	44 (81.5)	0.302
858 G>A		遺伝子型頻度			アレル頻度		ヘテロ接合度
breed	n	G/G	G/A	A/A	G	A	
<i>Golden retriever</i>	4	1 (25.0)	1 (25.0)	2 (50.0)	3 (37.5)	5 (62.5)	0.469
<i>Labrador retriever</i>	20	18 (90.0)	1 (5.0)	1 (5.0)	37 (92.5)	3 (7.5)	0.139
<i>Maltese</i>	20	14 (70.0)	2 (10.0)	4 (20.0)	30 (75.0)	10 (25.0)	0.375
<i>Miniature schauzer</i>	6	6 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (100.0)	0 (0.0)	0.000
<i>Shiba inu</i>	27	18 (66.7)	6 (22.2)	3 (11.1)	42 (77.8)	12 (22.2)	0.346

カッコ内の数値はパーセンテージを示す。

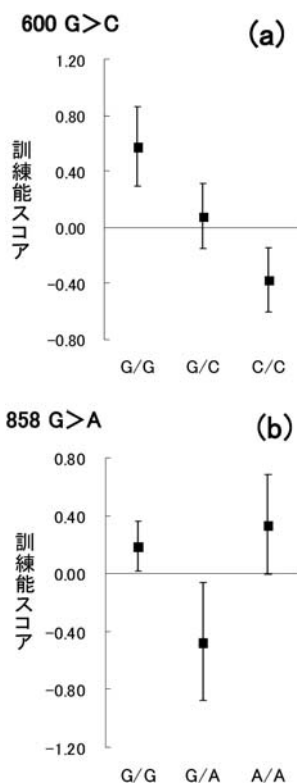


図 1 イヌ *MC2R* 遺伝子の一塩基多型と訓練能スコアの関連性。(a) 600 G>C と訓練能スコア。p<0.05 G/G型がC/C型に比べて有意に高い訓練能スコアを示した。(b) 858 G>A と訓練能スコア。p>0.05 (有意な関連なし)。エラーバーは標準誤差を示す。

特に日本在来犬種に関しては、洋犬とは大きく異なる遺伝子型分布を示すことが多いことが明らかになっている³⁻⁵⁾。本研究で明らかになった 600 G>C の犬種差、特に日本犬と洋犬の差はそれぞれの犬種が受けてきた選抜育種の違いを示すものであろうし、ひいては犬種による行動特性の差を説明する一つの要因である可能性があると考えられた。今後はさらにサンプル数を拡大し、ゴールデンレトリバーとミニチュアシュナウザーなど他の犬種も含めた解析を行い、600 G/C 多型の犬種多様性を確認し、この多

型の犬種差を越えた一般的な訓練能の差異を確認する必要があると考えられた。

現在まで、メラノコルチン受容体遺伝子に関しては、メラノコルチン 1 受容体 (*MC1R*) 遺伝子と麻薬探知犬の関係についての調査がなされている。メラノコルチン 1 受容体遺伝子はイヌの毛色決定遺伝子であり、一塩基置換によってもたらされる 3 種類の遺伝子型、すなわち R/R、R/ter (濃色) と ter/ter (淡色) によって毛色が決定することが知られているが、このうち同じ濃色内でも R/R が R/ter よりも麻薬探知犬の訓練合格率が高いことが判明している¹¹⁾。*MC2R* 遺伝子と行動特性の直接的な関連性についてはこれまで報告がなされていないため、本研究において *MC2R* 遺伝子の 600 G>C 多型と訓練能との関連性が明らかになったことは、メラノコルチン受容体遺伝子群と訓練性能との深い関係性を示唆するものであるのかもしれない。

本研究で訓練能との関連が認められた *MC2R* 600 G>C は同義置換 (synonymous mutation) である。すなわち 600 G>C によってアミノ酸配列は変化しないため、コードされるタンパクの表現型は変化しないと推測される。しかしながら、ヒトのドーパミン受容体 D2 型 (*DRD2*) 遺伝子に存在する数箇所の synonymous 変異のうち、957 T>C 多型において、その変異が mRNA の安定性や受容体タンパク質の 3 次元構造を変化させるという報告がなされるなど¹²⁾、同義置換であっても遺伝子発現系に影響を及ぼす可能性が考えられるため、今後は 600 G>C 多型について mRNA レベルでの検討を行うことが必要であると考えられた。

本研究ではイヌ *MC2R* 遺伝子の 600 G>C による遺伝子型頻度の犬種多様性を確認し、600 G>C と訓練能との有意な関連性を明らかにすることができた。遺伝子多型と行動特性の関連性について今後も研究が行われることで、イヌの訓練成功に関連する遺伝的諸要因を明らかにでき、ひいては盲導犬や麻薬探知犬などの使役犬候補個体の適性評価に貢献することが期待される。また、将来的にこれらの関連性が機能的に解明されれば、訓練によるイヌの学習成立過程の理解など、脳神経科学発展への貢献も期待できるため、意義が大きいと考えられた。また、これらの期待さ

れる成果はヒトとイヌのより良き共生関係を築くために重要であると考えられた。

謝辞：本研究を遂行するにあたり、貴重なイヌ DNA サンプルおよび行動特性データを提供していただいた東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医動物行動学研究室 武内ゆかり准教授に感謝いたします。

引用文献

- 1) BENJAMIN, J., LI, L., PATTERSON, C., GREENBERG, B.D., MURPHY, D.L. and HAMER, D.H. (1996.) Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of Novelty Seeking. *Nature Genet.*, **12**, 81-4.
- 2) EBSTEIN, R.P., NOVICK, O., UMANSKY, R., PRIEL, B., OSHER, Y., BLAINE, D., BENNETT, E.R., NEMANOV, L., KATZ, M. and BELMAKER, R.H. (1996.) Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. *Nature Genet.*, **12**, 78-80.
- 3) NIIMI, Y., INOUE-MURAYAMA, M., MURAYAMA, Y., ITO, S. and IWASAKI, T. (1999) Allelic variation of the D4 dopamine receptor polymorphic region in two dog breeds, Golden retriever and Shiba. *J. Vet. Med. Sci.*, **61**, 1281-6.
- 4) MASUDA, K., HASHIZUME, C., KIKUSUI, T., TAKEUCHI, Y. and MORI, Y. (2004.) Breed differences in genotype and allele frequency of catechol O-methyltransferase gene polymorphic regions in dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, **66**, 183-7.
- 5) MASUDA, K., HASHIZUME, C., OGATA, N., KIKUSUI, T., TAKEUCHI, Y. and MORI, Y. (2004.) Sequencing of canine 5-hydroxytryptamine receptor (5-HTR) 1B, 2A, 2C genes and identification of polymorphisms in the 5-HTR1B gene. *J. Vet. Med. Sci.*, **66**, 965-72.
- 6) OGATA, N., HASHIZUME, C., MOMOZAWA, Y., MASUDA, K., KIKUSUI, T., TAKEUCHI, Y. and MORI, Y. (2006.) Polymorphisms in the canine glutamate transporter-1 gene: identification and variation among five dog breeds. *J. Vet. Med. Sci.*, **68**, 157-9.
- 7) ITO, H., NARA, H., INOUE-MURAYAMA, M., SHIMADA, MK., KOSHIMURA, A., UEDA, Y., KITAGAWAH., TAKEUCHI, Y., MORI, Y., MURAYAMA, Y., MORITA, M., IWASAKI, T., OTA, K., TANABE, Y. and ITO, S (2004.) Allele frequency distribution of the canine dopamine receptor D4 gene exon III and I in 23 breeds. *J. Vet. Med. Sci.*, **66**, 815-20.
- 8) TAKEUCHI, Y., KANEKO, F., HASHIZUME, C., MASUDA, K., OGATA, N., MAKI, T., INOUE-MURAYAMA, M., HART, B.L. and MORI, Y. (2009.) Association analysis between canine behavioural traits and genetic polymorphisms in the Shiba Inu breed. *Anim. Genet.* **40**, 616-622.
- 9) 武内ゆかり (2004.) H13~H15 年度科学研究費補助金 基盤研究 (B) 研究成果報告書 (課題番号 03460131)
- 10) 日本比較内分泌学会編. (1997.) ストレスとホルモン, 学会出版センター, 81-97.
- 11) KISHI, H. and INOUE-MURAYAMA, M. (2010) The Genotypes of MC1R May Predict the Successful Training of Drug Detection Dog. *Ja. J. Hum. Anim. Relat.* **25**, 64
- 12) JUBAO, DUAN., MARK, S, WAINWRIGHT., JOSEP, M, COMERON., NARUYA, SAITOU., ALAN, R, SANDERS., JOEL, GELERNTER and PABLO, V, GEJMAN. (2002.) Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 205-216.

Association Analysis between Behavioral Trait 'Obedience' and SNPs in the *Canine MC2R* Gene Polymorphic Region

By

Yuichi KIMURA*, Koji MASUDA**, Asami TSUCHIDA** and Takao OISHI**

(Received July 30, 2010/Accepted October 22, 2010)

Summary : The relationships between behavioral trait data 'obedience score' and the genotype of two polymorphisms (600 G>C and 858 G>A) in the melanocortin 2 receptor gene (*MC2R*) were analyzed in 77 dogs of Golden retriever, Labrador retriever, Maltese, Miniature schnauzer and Shiba Inu breeds. From the genotyping of the polymorphism among the 77 dogs, we found inter-breed variations of genotype and of allelic frequency for 600G>C polymorphic region among Labrador retriever, Maltese, and Shiba Inu breeds. Furthermore, a statistical analysis revealed that genotype of 600G>C (G/G, G/C, C/C) was significantly associated with 'obedience score'.

Key words : gene, breed differences, behavioral traits, *MC2R*, *SNPs*

* Department of Animal Science, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Department of Human and Animal-Plant Relationships, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture