

# イヌ脳由来神経栄養因子 (*BDNF*) 遺伝子の 多型検索および一塩基多型 (-72G>A, 60C>A) と活動性—恐怖性スコアとの関連性

木島愛美\*・増田宏司\*\*・佐々木剛\*\*・土田あさみ\*\*・大石孝雄\*\*

(平成 23 年 11 月 16 日受付/平成 24 年 3 月 9 日受理)

**要約**：本研究ではイヌの行動特性関連候補遺伝子として *BDNF* 遺伝子に着目した。多型検索を行った結果、6箇所の一塩基多型 (SNPs; -2452G>C, -2439A>T, -2260T>C, -139C>T, -72G>A および 60C>A) が特定され、-2452G>C 多型と -2439A>T 多型、-72G>A 多型と 60C>A 多型の間でそれぞれ高率な連鎖が確認された。また、-72G>A および同義置換であることが推測された 60C>A については、活動性-恐怖性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, 行動特性, 連鎖, *BDNF*, SNPs

## 1. 緒 言

イヌ (*Canis lupus familiaris*) はヒトとの長い共存の歴史の中で、多様な利用目的に適合させるため、人為的な選抜育種が繰り返された。その結果、容姿だけでなく、変化に富んだ行動特性を示すさまざまな品種 (犬種) が作出された<sup>1)</sup>。現在の日本では多くのイヌが一般家庭で伴侶動物として飼育されており、牧羊犬や狩猟犬など、本来の目的で活躍している個体は非常に少ない。しかし、飼養の形態に関わらず、犬種特有の行動特性はある程度保存されることから<sup>2)</sup>、行動特性の差異は飼養形態のみならず、犬種の遺伝的背景にも強く関連して現れていることが推察される。

1999年、NIMIらによりゴールデンレトリバーとシバの2犬種におけるドーパミンD4受容体遺伝子 (*D4DR*) の遺伝的多様性<sup>3)</sup>が報告された。それ以降、ドーパミン受容体やセロトニン受容体などの神経伝達関連遺伝子群は、イヌの行動特性に関連する可能性をもつ遺伝子として盛んに調査されてきた。これまでにカテコール O-メチル基転移酵素遺伝子、セロトニン受容体 1B, 2A および 2C 遺伝子、*DRD4* 遺伝子、solute carrier family 1, member 2 (*SLC1A2*) 遺伝子、トリプトファンヒドロキシラーゼ 2 遺伝子、グルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子<sup>4-9)</sup> など、多くの神経伝達物質関連遺伝子における多型が報告され、多型性の犬種差が調べられている。イヌにおいて、行動特性と遺伝子の関係を初めて明らかにしたのは TAKEUCHI らで、シバを対象とした研究で種々の遺伝子多型と行動特性との関連を分子生物学的および統計学的に調査し、solute carrier family 1, member 2 (*SLC1A2*) 遺伝子の 471T>C と攻撃性が有意に関連して

いることを明らかにした<sup>10)</sup>。また、同年に発表されたラブラドルレトリバーを対象とした研究では、*SLC1A2* 遺伝子の 471T>C およびカテコール O-メチル基転移酵素遺伝子の 216G>A と活動性が有意に関連していることが明らかにされており<sup>11)</sup>、脳内における興奮性アミノ酸の細胞内取り込みを行うトランスポーター遺伝子である *SLC1A2* 遺伝子の多型が興奮性アミノ酸の伝達効率を変化させる可能性を示している。また、2010年にはイヌのメラノコルチン 2 受容体遺伝子における 600G>C と訓練能スコアとの関連性が示されている<sup>12)</sup>。

*BDNF* (brain derived neurotrophic factor) は、ニューロンの分化や神経機構に重要であるとされる脳由来神経栄養因子である。ヒトでは *BDNF* 遺伝子の多型が、健常な女性の外向性や報酬依存性に強く関連することが明らかにされている<sup>13)</sup>。また、うつ病<sup>14)</sup>との関わりについての報告もなされている。ヒト *BDNF* 遺伝子のプロモーター領域 -281C>A 多型において、A アレルを持つ個体は損害回避傾向が低くなること、さらに mRNA 発現にも関与していることが示されている<sup>15)</sup>。ヒト *BDNF* 遺伝子の 66Val>Met 多型において Val/Met あるいは Met/Met 型のヒトは Val/Val 型に比べて人格検査法である NEO-Personality Inventory forms における神経症スコアが有意に低いことが示されている<sup>16)</sup>。

イヌにおいて *BDNF* は脳神経機能改善に重要である<sup>17)</sup>とされている。イヌ *BDNF* 遺伝子は 21 番染色体上に位置し、コード領域の全長は 744-bp で、イントロンを持たない遺伝子である。イヌゲノムプロジェクトにより全配列が判明しているものの、遺伝子多型に関する報告はなされていない。また、イヌの *BDNF* 遺伝子におけるプロモーター

\* 東京農業大学農学研究科バイオセラピー学専攻

\*\* 東京農業大学農学部バイオセラピー学科

領域の特定は行われていない。そこで本研究では、イヌの *BDNF* 遺伝子における多型検索を行い、行動特性との関連性を見出すことを目的とした。

## 2. 材料および方法

### (1) ターゲット領域の設定およびプライマーデザイン

本研究における遺伝子多型検索のターゲット領域は、イヌの *BDNF* 遺伝子のコード領域とプロモーター領域とした。翻訳開始コドンより上流にある TATA 様配列をプロモーター領域と想定し、ターゲット領域（翻訳開始コドン上流域：-2750~-1754）に含めた。GENBANK に登録されているイヌの塩基配列（AAEX02028550, NC\_006603.2 および XM\_850457）を基に、ターゲット領域を A 領域（-2750~-1754:997 bp）、B 領域（-426~-570:996 bp）、C 領域（32~-685:580 bp）、D 領域（445~-1263:819 bp）の合計 4 領域に分割し、*BDNF* 遺伝子のターゲット領域全てを増幅できるようにプライマーを設計した。-1753~-427 の領域の付近には TATA 様配列が存在しなかったことから、本研究においてはターゲット領域に設定しなかった。

### (2) *BDNF* 遺伝子の多型検索

多型検索におけるサンプルは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から提供を受けたイヌゲノム DNA<sup>12,18)</sup> を使用した。多型検索には血縁関係の無い個体を領域毎にそれぞれ 10 検体以上供試した<sup>4,8)</sup>。サンプル数は A 領域 10 検体、B 領域 10 検体、C 領域 11 検体、D 領域 11 検体で検索を行った。各領域の検体のうち、6 検体は共通の個体のイヌゲノム DNA を使用したが、サンプル残量が足りなかったため、残りはそれぞれ異なる個体のイヌゲノム DNA で補填した。PCR に用いたプライマー一覧を表 1 に示す。なお、B 領域は、PCR 後の電気泳動でバンドが確認できない場合には、表 1 に示す B' のプライマーペアを用いて増幅した。PCR の酵素は ExTaq (タカラバイオ株式会社) を用い、テンプレート DNA 30 ng を含む全量 50  $\mu$ l (buffer, dNTP, primer を含む) に試薬を調整した。PCR の条件は 95°C、5 分間のプレ熱変性後、熱変性 (95°C、30 秒)、アニーリング (任意の温度および時間)、および伸長反応 (72°C、任意の時間) を 35 サイクル、ついで最終伸長反応 (72°C、5 分間) とした。なお、各領域のアニーリング反応の温度、時間および伸長反応の時間は、A 領域：54°C、60 秒および 90 秒、B 領域：60°C、50 秒および 30 秒、C 領域：56°C、30 秒および 90 秒、D 領域：56°C、50 秒および 90 秒とした。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。

表 1 本研究で用いたプライマーペア一覧

領域	Forward primer (5'to3')	Reverse primer (5'to3')
A	tgt gca gat gtc cag cct tga a	gcc acc tca atg tag gtc ga
B	tgc act tgc agt tgt tgc	acc cat ggg att gca ctt ggt
B'	tgc act tgc agt tgt tgc	cac tcg cta atg ctg tcg cac
C	ata ctt cgg ttg cat gaa gg	cca atg cct ttg gtc tat gc
D	aca gcg gca gac aaa aag a	gac aac agc acc ttg aca ttg

PCR 産物はシーケンシング (DNA 受託解析サービス；マクロジェンジャパン) により得た塩基配列を GenBank 登録配列 (AAEX02028550) とアライメントすることにより多型の有無を判定した。

### (3) 多型に基づくゲノムスクリーニング

多型検索において A 領域と B 領域にのみ多型を特定することができた。そのため、この 2 領域において行動特性との関連を調査することとした。材料となるイヌのゲノム DNA は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より提供を受けた。ゲノム DNA はゴールドレトリバー、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、シバの 5 犬種で構成されている。全てのゲノム DNA 提供個体 (イヌ) は、獣医師により、12 の行動特性 (臆病、よく吠える、活発、イヌに攻撃的、ヒトに攻撃的、過敏、おとなしい、好奇心旺盛、人なつっこい、神経質、従順、興奮しやすい) から複数選択方式での行動特性評価がなされている。それらの評価は数量化三類解析により算出された、3 種類の行動特性軸に関するサンプルスコアが得られているものである。3 種類の行動特性軸は、それぞれ、攻撃性—社会性 (統計学的に「ヒトに攻撃的」、「イヌに攻撃的」、「過敏」、「よく吠える」の 4 項目が正に突出し、「従順」、「おとなしい」の 2 項目が負に突出することで特徴づけられる行動特性)、活動性—恐怖性 (統計学的に「活発」、「好奇心旺盛」、「興奮しやすい」の 3 項目が正に突出し、「臆病」、「おとなしい」、「神経質」、「ヒトに攻撃的」の 4 項目が負に突出することで特徴づけられる行動特性)、大胆—過敏性 (統計学的に「イヌに攻撃的」、「よく吠える」の 2 項目が正に突出し、「ヒトに攻撃的」、「好奇心旺盛」、「過敏」の 3 項目が負に突出することで特徴づけられる行動特性) を弁別するものである<sup>18)</sup>。

本研究では、ヒトでの研究で、*BDNF* 遺伝子の多型と神経症スコアとの関連が報告されていること<sup>16)</sup> を参考として、獣医師によるアンケートにより、神経質と判断された個体と神経質と判断されなかった個体を基準にサンプル選択を行った。その際、5 犬種の個体数がほぼ同数になるよう配慮した。神経質と判断された個体を 27 検体、神経質と判断されなかった個体を 29 検体、すなわち共通した合計 56 検体を選抜して A 領域および B 領域について遺伝子型判別に用いた。遺伝子型の判別は、シーケンシングの波形のピークを元に判定した。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。

### (4) 多型とサンプルスコアの関連解析

本研究で使用したサンプルの行動特性スコアと 6 箇所の多型 (SNPs；-2452G>C, -2439A>T, -2260T>C, -139C>T, -72G>A および 60C>A) との関連性はエクセル統計 2008 (社会情報システム) を用い Kruskal-Wallis test および Mann-Whitney U test により検定した。

### 3. 結 果

#### (1) 多型検索の結果

多型検索の結果, A 領域 (-2750~-1754) では -2452G>C, -2439A>T, -2260T>C を, B 領域 (-426~570) では -139C>T, -72G>A, 60C>A の 6 箇所の SNP を特定した。C 領域, D 領域には多型は確認されなかった。

#### (2) ゲノムスクリーニングの結果

ゲノムスクリーニングにより得られた各多型における犬種別の遺伝子型, アレル頻度, ヘテロ接合度 (Heterozygosity) を表 2 に示した。B 領域の神経質と判断された 3 検体, 神経質と判断されなかった 3 検体については, 遺

表 2 イヌ BDNF 遺伝子の翻訳領域および上流域に認められた一塩基多型

-2452G>C (A領域)		遺伝子型			アレル頻度		ヘテロ接合度
犬種	n	G/G	G/C	C/C	G	C	
ゴールデンレトリバー	10	4(40.0)	3(30.0)	3(30.0)	11	9	0.495
ラブラドルレトリバー	13	3(23.0)	9(6.9)	1(7.7)	15	11	0.488
マルチーズ	11	1(9.1)	8(72.7)	2(18.2)	10	12	0.496
シバ	12	8(66.7)	4(33.3)	0(0)	20	4	0.278
ミニチュアシュナウザー	10	5(50.0)	3(30.0)	2(20.0)	13	7	0.455
総計	56	21(37.5)	27(48.2)	8(14.3)	69	43	0.473
-2439A>T (A領域)		遺伝子型			アレル頻度		ヘテロ接合度
犬種	n	A/A	A/T	T/T	A	T	
ゴールデンレトリバー	10	4(40.0)	3(30.0)	3(30.0)	11	9	0.495
ラブラドルレトリバー	13	3(23.0)	9(6.9)	1(7.7)	15	11	0.488
マルチーズ	11	1(9.1)	8(72.7)	2(18.2)	10	12	0.496
シバ	12	8(66.7)	4(33.3)	0(0)	20	4	0.278
ミニチュアシュナウザー	10	5(50.0)	3(30.0)	2(20.0)	13	7	0.455
総計	56	21(37.5)	27(48.2)	8(14.3)	69	43	0.473
-2260T>C (A領域)		遺伝子型			アレル頻度		ヘテロ接合度
犬種	n	T/T	T/C	C/C	T	C	
ゴールデンレトリバー	10	10(100)	0(0)	0(0)	20	0	0
ラブラドルレトリバー	13	13(100)	0(0)	0(0)	26	0	0
マルチーズ	11	10(90.9)	1(9.1)	0(0)	21	1	0.087
シバ	12	6(50.0)	6(50.0)	0(0)	18	6	0.375
ミニチュアシュナウザー	10	10(100)	0(0)	0(0)	20	0	0
総計	56	49(87.5)	7(12.5)	0(0)	105	7	0.366
-139C>T (B領域)		遺伝子型			アレル頻度		ヘテロ接合度
犬種	n	C/C	C/T	T/T	C	T	
ゴールデンレトリバー	10	10(100)	0(0)	0(0)	20	0	0
ラブラドルレトリバー	9	5(55.6)	4(44.4)	0(0)	14	4	0.346
マルチーズ	10	10(100)	0(0)	0(0)	20	0	0
シバ	11	11(100)	0(0)	0(0)	22	0	0
ミニチュアシュナウザー	10	10(100)	0(0)	0(0)	20	0	0
総計	50	46(92.0)	4(8.0)	0(0)	96	4	0.768
-72G>A (B領域)		遺伝子型			アレル頻度		ヘテロ接合度
犬種	n	G/G	G/A	A/A	G	A	
ゴールデンレトリバー	10	4(40.0)	3(30.0)	3(30.0)	11	9	0.495
ラブラドルレトリバー	9	2(22.2)	6(66.7)	1(11.1)	10	8	0.494
マルチーズ	10	10(100)	0(0)	0(0)	20	0	0
シバ	11	11(100)	0(0)	0(0)	22	0	0
ミニチュアシュナウザー	10	8(80.0)	2(20.0)	0(0)	18	2	0.180
総計	50	35(70.0)	11(22.0)	4(8.0)	81	19	0.295
60C>A (B領域)		遺伝子型			アレル頻度		ヘテロ接合度
犬種	n	C/C	C/A	A/A	C	A	
ゴールデンレトリバー	10	4(40.0)	3(30.0)	3(30.0)	11	9	0.495
ラブラドルレトリバー	9	3(33.3)	5(55.6)	1(11.1)	11	7	0.475
マルチーズ	10	10(100)	0(0)	0(0)	20	0	0
シバ	11	11(100)	0(0)	0(0)	22	0	0
ミニチュアシュナウザー	10	8(80.0)	2(20.0)	0(0)	18	2	0.180
総計	50	36(72.0)	10(20.0)	4(8.0)	82	18	0.295

( )内の数値は各遺伝子型の割合を示す。

伝子型を判別することができなかった。

A 領域の -2452G>C と -2439A>T の間に 100%の連鎖が認められた。すなわち, -2452G>C が G/G 型るとき -2439A>T が A/A 型, G/C 型るとき A/T 型, C/C 型るときには T/T 型が検出された。また, B 領域の -72G>A と 60C>A の間においても 98%の連鎖が認められた。すなわち, B 領域において -72G>A が G/G 型るとき 60C>A が C/C 型, G/A 型るとき C/A 型, A/A 型るとき A/A 型が高率に検出された。

多型頻度の犬種間検定については, サンプル数が十分でなかったため, 行わなかった。A 領域 -2452G>C と -2439A>T において, シバに C/C 型, T/T 型は認められなかった。また, -2260T>C において, C アレルがシバとマルチーズの 2 犬種のみ認められた。さらに, B 領域 -139C>T において, T アレルがラブラドルレトリバーにのみ認められた。また, -72G>A と 60C>A において, シバとマルチーズの 2 犬種で G/G 型, C/C 型のみが検出された。

#### (3) 本研究で同定された多型とサンプルスコアとの関連性

本研究において同定された 6 箇所の一塩基多型と 3 種類の行動特性軸に関するサンプルスコアとの関連性について検定を行った結果を表 3 に示した。6 箇所の一塩基多型のうち, -72G>A および 60C>A の遺伝子型と活動性-恐怖性スコアとの間に有意な関連が認められた (-72G>A : p = 0.0177, 60C>A : p = 0.0087, Kruskal Wallis test)。また, -72G>A および 60C>A のアレル間においても, 同様の有

表 3 遺伝子型およびアレルと行動特性との関連性検定結果

-2452G>C (A領域)		アレル間	
行動特性軸	遺伝子型	G+/G-	C+/C-
攻撃性-社会性	0.8149	0.5503	0.6845
活動性-恐怖性	0.1739	0.0626	0.6721
大胆-過敏性	0.5890	0.4465	0.3695
-2439A>T (A領域)		アレル間	
行動特性軸	遺伝子型	A+/A-	T+/T-
攻撃性-社会性	0.8149	0.5503	0.6845
活動性-恐怖性	0.1739	0.0626	0.6721
大胆-過敏性	0.5890	0.4465	0.3695
-2260T>C (A領域)		アレル間	
行動特性軸	遺伝子型	T+/T-	C+/C-
攻撃性-社会性	0.8720	-	0.8720
活動性-恐怖性	0.6289	-	0.6289
大胆-過敏性	0.1614	-	0.1614
-139C>T (B領域)		アレル間	
行動特性軸	遺伝子型	T+/T-	C+/C-
攻撃性-社会性	0.7072	0.7072	-
活動性-恐怖性	0.2598	0.2598	-
大胆-過敏性	0.7340	0.7340	-
-72G>A (B領域)		アレル間	
行動特性軸	遺伝子型	G+/G-	A+/A-
攻撃性-社会性	0.5966	0.4855	0.3300
活動性-恐怖性	0.0177	0.1685	0.0045
大胆-過敏性	0.1841	0.1474	0.7188
60C>A (B領域)		アレル間	
行動特性軸	遺伝子型	C+/C-	A+/A-
攻撃性-社会性	0.6473	0.4855	0.3814
活動性-恐怖性	0.0087	0.1685	0.0021
大胆-過敏性	0.1543	0.1474	0.6577

数値は統計解析結果のp値を示す。

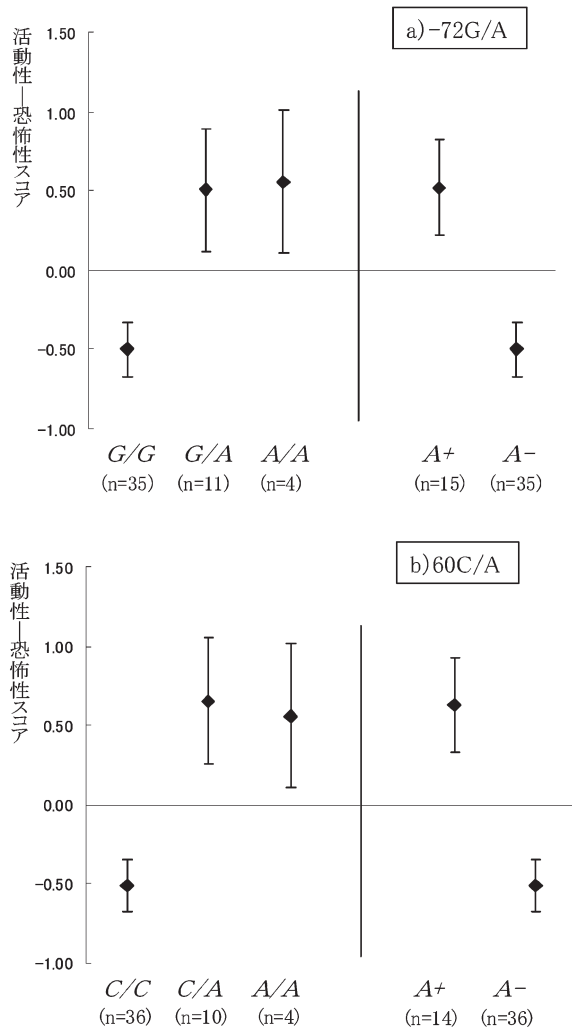


図1 イヌ *BDNF* 遺伝子の一塩基多型と活動性-恐怖性スコアの関連性。a)  $-72G>A$  と活動性-恐怖性スコア。 $G/G$ 型が  $G/A$  および  $A/A$ 型に比べて有意に低いスコアを示した ( $p \leq 0.05$ , post hoc test)。また、 $A$  アレルの有無でスコアに有意な差が認められた ( $p=0.0045$ , Mann-Whitney U test)。b)  $60C>A$  と活動性-恐怖性スコア。 $C/C$ 型が  $C/A$  および  $A/A$ 型に比べて有意に低いスコアを示した ( $p \leq 0.05$ , post hoc test)。また、 $A$  アレルの有無でスコアに有意な差が認められた ( $p=0.0021$ , Mann-Whitney U test)。エラーバーは標準誤差を示す。

意な関連性が認められた ( $-72G>A$ ;  $p=0.0045$ ,  $60C>A$ ;  $p=0.0021$ , Mann-Whitney U test)。それらの結果を図1に示した。また、 $-72G>A$  および  $60C>A$  との有意な関連が認められた活動性-恐怖性スコアに犬種差は認められなかった。(Kruskal-Wallis test,  $p>0.05$ )

#### 4. 考 察

##### (1) 本研究で明らかになった一塩基多型

本研究では *BDNF* 遺伝子のコード領域とともに、同遺伝子のプロモーター領域を視野に入れ、TATA 様配列の見られた5'側非コード領域を含む領域をターゲットとして設定した。イヌの *BDNF* 遺伝子におけるプロモーター領域は未だ特定されていないが、ヒト *BDNF* 遺伝子コー

ド領域に存在する一塩基多型とプロモーター領域の多型には損害回避傾向に対して相関関係があることが報告されている<sup>14)</sup>ことから、翻訳開始コドン上流の多型検索は有意義なものであると考えられた。本研究で明らかになった6箇所の一塩基多型のうち、5箇所 ( $-2452G>C$ ,  $-2439A>T$ ,  $-2260T>C$ ,  $-139C>T$  および  $-72G>A$ ) は翻訳開始コドンの上流域に位置しており、これらのSNPsが *BDNF* 遺伝子のプロモーター領域に位置する可能性は考えられるが、イヌの *BDNF* 遺伝子の発現系を解明するためにもプロモーター領域の特定は今後、必要不可欠になると考えられた。一方、コード領域で確認された  $60C>A$  は同義置換であると推測された。これら多型頻度の犬種差については統計学的に確認することができなかったが、本研究で明らかになった6箇所の一塩基多型全てにおいて、犬種間に差があるように思われた。今後はサンプル数を拡大してそれらの犬種差を検証する必要がある。また同時に、 $-2452G>C$  と  $-2439A>T$ , および  $-72G>A$  と  $60C>A$  について、犬種を越えて高率で連鎖しているか否かを確認しなければならない。

##### (2) $-72G>A$ および $60C>A$ と活動性-恐怖性スコア

6つの新規SNPsのうち、 $60C>A$ 多型はコード領域に位置しており、同義置換であると推察されたこれまで同義置換は遺伝子の発現機構に何ら影響を与えないものであるとされてきたが、近年、同義置換であってもドーパミン  $D2$  受容体 (*D2DR*) 遺伝子やカテコール-O-メチル基転移酵素遺伝子における mRNA の安定性に関与することが示唆された<sup>19,20)</sup>。すなわち、本研究で同定された  $60C>A$  は、同義置換であっても遺伝子発現に影響を及ぼす可能性が考えられた。今後はイヌ *BDNF* の  $60C>A$  が mRNA の安定性や発現量に及ぼす影響を、検討する必要がある。さらに、アミノ酸やタンパク質の発現量もまた検討していく必要があると考えられた。 $-72G>A$  についても  $60C>A$  との高率な連鎖を考慮に入れつつ、検討を行う必要がある。

活動性-恐怖性スコアは、サンプルスコアが高いと活動性が高く、逆に低いと恐怖性が高いと判断される<sup>18)</sup>。本研究の結果から、 $60C>A$ において  $A$  アレルを持つ個体 ( $A/A$  および  $C/A$ 型) は  $A$  アレルを持たない個体 ( $C/C$ 型) よりも活発であり、逆に  $A$  アレルを持たない個体 ( $C/C$ 型) は  $A$  アレルを持つ個体 ( $A/A$  および  $C/A$ 型) よりも怖がりであると判断された。さらに、 $-72G>A$  と  $60C>A$  におけるヘテロ型 ( $G/A$ 型,  $C/A$ 型) が高い活動性スコアを示していること、そして活動性-恐怖性スコアと  $A$  アレルの有無に有意な関連が認められ、 $G$  アレルおよび  $C$  アレルの有無で有意な関連が認められていないことから、 $-72G>A$  と  $60C>A$  において、それぞれ  $A$  アレル、 $C$  アレルに対して優性である可能性が考えられた。そのため、今後は親子関係など、血縁関係にある個体を用いて活動性-恐怖性スコアと *BDNF* 遺伝子  $-72G>A$  および  $60C>A$  との関連性を検討する必要があると考えられた。

本研究においてはイヌ *BDNF* 遺伝子に認められた多型

と行動特性との関連を確認できた。2009年に神経伝達に関連する *SLCIA2* 遺伝子と攻撃性との関連が示されている<sup>10)</sup> こと、2005年に行われたヒトの *BDNF* 遺伝子多型と気分障害との関連研究ではプロモーター領域の -281C>A 多型において A アレルを持つ個体は損害回避傾向が低くなること、さらに mRNA 発現にも関与していることが示されている<sup>15)</sup> ことから、アレルでのイヌの行動特性比較は有意義なものであり、本研究で得られた *BDNF* 遺伝子と活動性—恐怖性スコアとの関連も重要な結果の一つであると考えられた。さらに、本研究で用いたサンプルにおいて活動性—恐怖性スコアの犬種差は認められなかったが、さらにサンプル数を増やし、特定の犬種内で多型とスコアとの関連性を検討することで、本研究で認められた関連性が、犬種の枠を越えた遺伝的背景が行動特性に影響を及ぼしていることを、証明しようと考えられた。

## 5. 結論と展望

本研究ではイヌの行動特性関連候補遺伝子として *BDNF* 遺伝子に着目し、多型検索を行い、行動特性との関連性について検討した。遺伝的背景の異なる複数犬種をサンプルとして用いることは、犬種特異的な行動特性との関連を見出す際には、長所と短所が存在する。長所は、バリエーション豊かな行動特性の犬種差を、遺伝的特徴の差として見出すことができるという点である。一方、短所は、行動特性と多型分布の両方に犬種差が認められれば、注目した遺伝子多型が行動特性の差異に影響しているか否かを明確にできない点である。

今回は活動性—恐怖性スコアに犬種差が認められなかったため、今後はサンプル数を拡大することによりさらなる検討を行うとともに、活動性—恐怖性スコアとの関連が認められた 60C>A の機能解析を行い、行動特性の違いにどのように結びついているのかを検討する必要がある。

**謝辞:** 本研究を遂行するにあたり、貴重なイヌゲノム 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

- SERPELL J (1995) The domestic dog : its evolution, behaviour and interactions with people. Cambridge University Press, Cambridge.
- TAKEUCHI Y and MORI Y (2006) A comparison of the behavioral profiles of purebred dogs in Japan to profiles of those in the United States and the United Kingdom. *J. Vet. Med. Sci.* **68** : 789-796.
- NIMI 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** : 1281-1286.
- 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** : 183-187.
- 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** : 965-972.
- ITO H, NARA H, INOUE-MURAYAMA M, SHIMADA MK, KOSHIMURA A, UEDA Y, KITAGAWA H, 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** : 815-820.
- 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** : 157-159.
- KANEKO F, MASUDA K, TAKEUCHI Y and MORI Y (2008) Identifying novel polymorphisms in the canine tryptophan hydroxylase 2 gene. *J. Vet. Med. Sci.* **70** : 1117-1120.
- ARATA S, HASHIZUME C, KIKUSUI T, TAKEUCHI Y and MORI Y (2008) Sequences of canine glutamate decarboxylase (GAD) 1 and GAD2 genes, and variation of their genetic polymorphisms among five dog breeds. *J. Vet. Med. Sci.* **70** : 1107-1110.
- 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.
- TAKEUCHI Y, HASHIZUME C, ARATA S, INOUE-MURAYAMA M, MAKI T, HART BL and MORI Y (2009) An approach to canine behavioural genetics employing guide dogs for the blind. *Anim. Genet.* **40** : 217-224.
- 木村雄一, 増田宏司, 土田あさみ, 大石孝雄 (2011) 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. 東京農業大学農学集報 **55** : 270-274.
- ITOH K, HASHIMOTO K, KUMAKIRI C, SHIMIZU E and IYO M (2004) Association Between Brain-Derived Neurotrophic Factor 196G/A Polymorphism and Personality Traits in Healthy Subjects. *Am. J. Med. Genet. Part B (Neuropsychiatric Genet)* **124B** : 61-63.
- YULG B, OZAN E and KILIC E (2010) Brain-derived neurotrophic factor polymorphism as a genetic risk for depression? A short review of the literature. *J. Neuropsychiatry. Clin. Neurosci.* **22** : 123.E5-6.
- XUEYING J, KE X, JOELLE H, FENG, T, AIMEE J M, JUWARIA FW, CLAUDIA RH, ANN MM, MARY-ANNE E and ROBERT HL (2005) BDNF Variation and Mood Disorders : A Novel Functional Promoter Polymorphism and Val66Met are Associated with Anxiety but Have Opposing Effects. *Neuropsychopharmacology* **30** : 1353-1361.
- FRUSTACI A, POZZI G, GIANFAGNA F, MANZOLI L and BOCCA S (2008) Meta-analysis of the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) Val66Met polymorphism in anxiety disorders and anxiety-related personality traits. *Neuropsychobiology* **58** : 163-170.
- FAHNESTOCK M, MARCHESI M, HEAD E, POP V, MICHALSKI B, MILGRAM WN and COTMAN CW (2010) BDNF increases with behavioral enrichment and an antioxidant diet in the aged dog. *Neurobiol. Aging.* **33** : 546-544.
- 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)

- 
- 19) JUBAO D, MARK SW, JOSEP MC, NARUYA S, ALAN RS, JOEL G and PABLO VG (2002) Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum. Mol. Genet.* **12** : 205-216.
- 20) NACKLEY AG, SHABALINA SA, TCHIVILEVA IE, SATTERFIELD K, KORCHYNSKYI O, MAKAROV SS, MAIXNER W and DIATCHENKO L (2006) Human Catechol-O-Methyltransferase Haplotypes Modulate Protein Expression by Altering mRNA Secondary Structure. *Science* **314** : 1930-1933.

# The Polymorphism Screening and Association Study between Activeness-Fearfulness Discrimination Scores and Single Nucleotide Polymorphisms, -72G>A, 60C>A Identified in Canine Brain Derived Neurotrophic Factor (*BDNF*) Gene

By

Manami KIJIMA\*, Koji MASUDA\*\*, Takeshi SASAKI\*\*, Asami TSUCHIDA\*\*  
and Takao OISHI\*\*

(Received November 16, 2011/Accepted March 9, 2012)

**Summary** : The present study demonstrated polymorphism screening of canine brain derived neurotrophic factor gene as one of behavioral trait relatives. We identified six novel single nucleotide polymorphisms (SNPs ; -2452G>C, -2439A>T, -2260T>C, -139C>T, -72G>A and 60C>A), -2452G>C and -2439A>T were highly linked as well as -72G>A and 60C>A. The statistical analyses revealed that and the -72G>A and 60C>A (60C>A as synonymous mutation), were significantly associated with 'activeness-fearfulness discrimination scores'.

**Key words** : gene, behavioral traits, linkage, *BDNF*, SNPs

---

\* Department of Human and Animal-Plant Relationships, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

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