

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5667057号
(P5667057)

(45) 発行日 平成27年2月12日 (2015. 2. 12)

(24) 登録日 平成26年12月19日 (2014. 12. 19)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 15 (全 73 頁)

(21) 出願番号	特願2011-526627 (P2011-526627)	(73) 特許権者	501339171
(86) (22) 出願日	平成21年9月11日 (2009. 9. 11)		ユニバーシティ・カレッジ・ダブリン, ナ
(65) 公表番号	特表2012-501671 (P2012-501671A)		ショナル・ユニバーシティ・オブ・アイル
(43) 公表日	平成24年1月26日 (2012. 1. 26)		ランド, ダブリン
(86) 国際出願番号	PCT/IE2009/000062		アイルランド国ダブリン 4, ベルフィー
(87) 国際公開番号	W02010/029527		ルド
(87) 国際公開日	平成22年3月18日 (2010. 3. 18)	(74) 代理人	100140109
審査請求日	平成24年9月7日 (2012. 9. 7)		弁理士 小野 新次郎
(31) 優先権主張番号	61/136, 533	(74) 代理人	100075270
(32) 優先日	平成20年9月11日 (2008. 9. 11)		弁理士 小林 泰
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100080137
(31) 優先権主張番号	61/213, 125		弁理士 千葉 昭男
(32) 優先日	平成21年5月8日 (2009. 5. 8)	(74) 代理人	100096013
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 潜在的競技パフォーマンスを予測するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

M S T N__ 6 6 4 9 3 7 3 7 (T/C) 一塩基多型 (S N P) の存在に関して、サラブレッド競走馬に由来する生物学的標本をアッセイするステップを含む、サラブレッド競走馬の潜在的最適レース距離パフォーマンスを予測するための方法。

【請求項 2】

C アレルの存在が優れた潜在的全力疾走パフォーマンスを示す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ホモ接合 C C 遺伝子型の存在が優れた潜在的全力疾走パフォーマンスを示す、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

T アレルの存在が潜在的スタミナパフォーマンスを示す、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

ホモ接合 T T アレルの存在が潜在的スタミナパフォーマンスを示す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

対象の生物学的標本が、血液、唾液、骨格筋、体毛、精液、骨髓、軟部組織、内部臓器生検標本および皮膚を含む群から選択される、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方

10

20

法。

【請求項 7】

e x v i v o 生物学的標本から DNA を抽出するか、または遊離させるステップ；および

抽出または遊離された DNA における M S T N _ 6 6 4 9 3 7 3 7 (T / C) S N P の遺伝子型を同定するステップ

を含み、M S T N _ 6 6 4 9 3 7 3 7 (T / C) S N P における C アレルの存在が優れた潜在的全力疾走パフォーマンスを示し、M S T N _ 6 6 4 9 3 7 3 7 (T / C) S N P における T アレルの存在が潜在的スタミナパフォーマンスを示す、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 8】

抽出または遊離された DNA における M S T N _ 6 6 4 9 3 7 3 7 (T / C) S N P をコードする標的配列を増幅するステップを、M S T N _ 6 6 4 9 3 7 3 7 (T / C) S N P の遺伝子型を同定するステップの前に含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

DNA がゲノム DNA である、請求項 7 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

配列番号 31 の核酸配列からなる、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 11】

202 位のヌクレオチドが c である、請求項 10 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

20

【請求項 12】

サラブレッド競走馬の潜在的最適レース距離パフォーマンスを予測するための遺伝的マーカーとしての、配列番号 31 の核酸配列からなる単離されたポリヌクレオチドの使用。

【請求項 13】

C アレルの存在が優れた潜在的全力疾走パフォーマンスを示す、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】

T アレルの存在が潜在的スタミナパフォーマンスを示す、請求項 12 または 13 に記載の使用。

30

【請求項 15】

ホモ接合 C C 遺伝子型の存在が優れた潜在的全力疾走パフォーマンスを示し、ホモ接合 T T 遺伝子型の存在が潜在的スタミナパフォーマンスを示す、請求項 12 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は対象の競技パフォーマンスの潜在能力を予測するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

サラブレッド馬産業は、サラブレッド馬の繁殖、訓練および競走に関係する数十億ユーロの国際的な産業である。数百万ユーロの決断が、しばしば競争能力を有すると認められた個々の動物の購入に対して行われる。サラブレッドの競走および繁殖産業へのゲノミクス情報の統合は早期の“素質確認”に対する高い潜在性を有する。サラブレッドは伝統的に、血統情報および非常に多くの表現型の特徴に基づいて競走および繁殖に対して選択される。伝統的または新規な手段による遺伝的潜在性の早期の確認が成功に優先する。産業内では、常に新規な方法および技術を検討することに関わる人々は“有効性”を見出すための探索に迫られている。従って、ゲノミクス情報は、以前には入手し難かった情報を提供することによって、しばしば数百万ドルの決断を微調整するためにブリーダーやトレーナーを直接援助する潜在性を有する。

40

【0003】

50

酸素は筋肉機能の重要なレギュレーターであり、エネルギー産生、筋肉収縮、および副生成物の除去に影響を及ぼす。運動中のエネルギーに対する要求は、酸素の利用能によって非常に限定される。哺乳類の細胞は低い細胞内酸素環境に反応するための精巧な適応機序を進化させてきた (Taylor & Colgan 1999)。ヒト運動の研究において、訓練された骨格筋におけるそのような低酸素環境への適応が炭水化物の酸化増大に対して基質選択をシフトさせ、細胞を刺激して酸素輸送および利用の状態を改善する (Hoppele & Vogt 2001)。サラブレッド馬では、高強度での短時間の運動中に、心臓血管および呼吸系における酸素の運搬能力および送達を改善する数多くの構造的および機能的適応にもかかわらず、酸素輸送系は運動 - 誘発動脈低酸素血および炭酸過剰の日常的発生においてもたらされる末梢の要求にかなり遅れを取る (Dempsey & Wagner, 1999; Seaman, 1995)。サラブレッドの反応は、訓練されたヒトアスリートを含む他の動物種に比較して、エネルギーに対する筋肉系の非常に大きい要求を反映して月並みではない。驚くべきことに、限定された酸素供給に直面してさえ、サラブレッドは厳しい運動に適切に適応する優れたアスリートであり続ける。

10

【0004】

サラブレッド馬は短距離 (<1 マイル) および長距離 (>1 マイル) レースの両方において秀でている。これらの鍛錬 (discipline) に対する生理的要求は異なり、代謝経路の分配によって調節される。超最大強度 (105~125% VO_2max) における運動の初めの75秒間は、酸素供給が運動中の筋肉の要求に応えることができないため、ウマは酸素欠乏を経験する (Dempsey & Wagner, 1999; Seaman, 1995)。これにもかかわらず、短距離レース (<1000m) 中、全エネルギーのおよそ70%が好氣的に供給されることになる。より長い距離およびより長い期間 (>75秒) を競うウマは定常状態 VO_2 に到達し、従って酸素欠乏ではない。

20

【0005】

さまざまな研究が、サラブレッド競走馬における競技パフォーマンス表現型との測定可能な関連を検討するために行われてきており、それらは心臓の大きさ (Youngら 2005)、筋肉繊維の型 (Riveroら 2007)、筋骨格構造 (Loveら 2006)、最大心拍数におけるスピード (Gramkow & Evans 2006)、血液学的 (Revington 1983) および他の生理学的変数 (Harkinsら 1993) の評価を含む。

30

【0006】

WO2006003436は、パフォーマンスとミトコンドリアゲノムによってコード化された遺伝子変異体間の関連について記載する。しかし、ミトコンドリアDNA (mtDNA) ハプロタイプは、母親から厳密に受け継ぎ、従って表現型に対して雌性貢献にだけ関係する。サラブレッド集団におけるmtDNAハプロタイプの数に限定され ($n=17$)、10頭の雌だけが現在の母性血統の74%に貢献するため (Cunninghamら 2002)、パフォーマンスに対して目標を設定された選択が存在する集団において、これらのハプロタイプ変異体が、速やかに好ましいハプロタイプが“固定される”といったような意味のある効果を有する可能性はありそうもなく; さらに (mtDNA変異体の) 効果的な集団サイズは核内コード化変異体の1/3である (Ballard and Dean 2001, Blieerら 2001, Das 2006, Meiklejohnら 2007)。その上、mtDNAハプロタイプは血統情報から直接推測されうる。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】WO2006003436

【非特許文献】

【0008】

50

- 【非特許文献1】Taylor & Colgan 1999
【非特許文献2】Hoppeler & Vogt 2001
【非特許文献3】Dempsey & Wagner, 1999
【非特許文献4】Seaman, 1995
【非特許文献5】Youngら 2005
【非特許文献6】Riveroら 2007
【非特許文献7】Loveら 2006
【非特許文献8】Gramkow & Evans 2006
【非特許文献9】Revington 1983
【非特許文献10】Harkinsら 1993
【非特許文献11】Cunninghamら 2002
【非特許文献12】Ballard and Dean 2001
【非特許文献13】Blieら 2001
【非特許文献14】Das 2006
【非特許文献15】Meiklejohnら 2007

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、対象の潜在的競技パフォーマンスを予測するための、これらの問題のいくつかを克服する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

発明の陳述

本発明は核内コード化遺伝子における変異を検出するための、DNAを基にした検定を提供する。核内コード化遺伝子の変異はすべての可能性のある祖先に由来する好ましい遺伝子変異体の遺伝を反映するが、mtDNA検定は雌の祖先に制限されるため、この方法はミトコンドリアDNA (mtDNA) 検定よりも優れている。

【0011】

本明細書に記載の方法およびアッセイはex vivoで実施され、ex vivoまたはin vitroの方法およびアッセイであると見なされうる。

【0012】

たとえば血液、唾液、体毛、皮膚、骨髄、軟部組織、内部臓器、生検標本、精液、骨格筋組織などの遺伝物質を含むいずれか適切な生物学的標本が、本明細書に記載の方法の生物学的標本として使用されてもよい。血液および体毛標本はとりわけ生物学的標本として適している。

【0013】

本明細書で使用する“競技パフォーマンス”には、競争レースならびに、競走、障害飛越、総合馬術、調馬、耐久競技、乗馬、狩猟などの馬術スポーツのような競走が挙げられる。馬術スポーツは競技スポーツであってもよい。

【0014】

競争レース種には、ウマ科動物 (ウマ)、ラクダ、イヌ、ゾウ、ウサギ、カンガルー、ダチョウ、ハト、ヒトおよびタカまたはハヤブサのような猛禽が挙げられる。競争レース種はサラブレッド馬または障害飛越馬であってもよい。

【0015】

“プライマー”は、関心のある核酸配列に由来する約15から約40、たとえば約18から約25の連続したヌクレオチドを含む核酸配列を意味する。プライマーはフォワード (5'または3') もしくはリバース (3'から5') プライマー、または関心のある核酸配列に対する相補的核酸配列に基づいて設計されたプライマーであってもよい。本発明では、関心のある配列は競技パフォーマンスに関連した遺伝子、たとえば付録の中に挙げられた遺伝子、またはCOX4I1、COX4I2、PDK4、CKMまたはMSTN遺

10

20

30

40

50

伝子の中の1以上のゲノム配列である。一態様では、プライマーはSEQ ID No. 1、SEQ ID No. 2、SEQ ID No. 3、SEQ ID No. 31もしくはSEQ ID No. 32に由来する約15から約40、たとえば約18から約25の連続したヌクレオチド、またはSEQ ID No. 1、SEQ ID No. 2、SEQ ID No. 3、SEQ ID No. 31もしくはSEQ ID No. 32に対する相補的配列に由来する約15から約40、たとえば約18から約25の連続したヌクレオチドを含んでいてもよい。“相補的配列”は、慣例のワトソン-クリック塩基対形成：すなわち、アデニンがチミンに結合し、そしてシトシンがグアニンに結合する；を使用して関心のある配列に結合する配列を意味する。

【0016】

10

本発明は、優れた競技パフォーマンスに関連した一塩基多型（SNP）を提供する。本発明は対象の競技パフォーマンスを予測する方法を提供し、該方法は付録に列挙された1以上の遺伝子における一塩基多型（SNP）の存在に関して、対象に由来する生物学的標本をアッセイするステップを含み、ここではSNPが競技パフォーマンスと有意な関連を有する。

【0017】

本発明に従って、対象の潜在的競技パフォーマンスを予測する方法が提供され、該方法はMSTN遺伝子、COX4I2遺伝子、PDK4遺伝子、CKM遺伝子、またはCOX4I1遺伝子の中の1以上における一塩基多型（SNP）の存在に関して、対象に由来する生物学的標本をアッセイするステップを含む。

20

【0018】

SNPはMSTN_66493737（T/C）であってもよい。Cアレルの存在は優れた競技パフォーマンスを示す。ホモ接合CC遺伝子型の存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。優れた競技パフォーマンスは優れた全力疾走パフォーマンスであってもよい。

【0019】

SNPはCOX4I2_22684390（C/T）であってもよい。Tアレルの存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。ホモ接合TT遺伝子型の存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。

【0020】

30

SNPはPDK4_38973231（A/G）であってもよい。Aアレルの存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。ホモ接合AA遺伝子型の存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。

【0021】

SNPはCKM_15884567（G/A）であってもよい。Aアレルの存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。ホモ接合AA遺伝子型の存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。

【0022】

SNPはCOX4I1_32772871（T/C）であってもよい。Tアレルの存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。ホモ接合TT遺伝子型の存在が優れた競技パフォーマンスを示してもよい。

40

【0023】

対象の生物学的標本は：血液、唾液、骨格筋、皮膚、精液、生検標本、骨髄、軟部組織、内部臓器および体毛を含む群から選択されてもよい。

【0024】

対象は競争レース種に由来してもよい。対象はサラブレッド競走馬のようなウマ科動物であってもよい。

【0025】

本発明はさらに以下のステップを含む、対象の潜在的競技パフォーマンスを測定するためのアッセイ：

50

— 標本を得ること；
 — 標本からDNAを抽出するか、または遊離させること；および
 — 前記の抽出されるか、または遊離されたDNAにおける競技パフォーマンスに関連した遺伝子の標的配列の中の一塩基多型（SNP）を確認すること；
 を提供し、ここで対象の潜在的競技パフォーマンスはSNPに関連する。

【0026】

競技パフォーマンスに関連した遺伝子はMSTN、COX4I2、PDK4、CKMまたはCOX4I1の中の1以上から選択されてもよい。

【0027】

該アッセイは、以下のステップを、一塩基多型を確認するステップの前に含んでいてもよい：

— 前記の抽出されるか、または遊離されたDNAにおける競技パフォーマンスに関連した遺伝子の標的配列を増幅すること。

【0028】

DNAはゲノムDNAであってもよい。

【0029】

本発明はさらに、MSTN遺伝子、COX4I2遺伝子、PDK4遺伝子、CKM遺伝子、またはCOX4I1遺伝子の中の1以上における一塩基多型（SNP）の存在を検出するための手段を含む、対象の潜在的競技パフォーマンスの測定に使用されるアッセイを提供する。

【0030】

SNPはMSTN_66493737（T/C）であってもよい。Cアレルの存在は優れた競技パフォーマンスを示す。ホモ接合CC遺伝子型の存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。優れた競技パフォーマンスは優れた全力疾走パフォーマンスであってもよい。

【0031】

SNPはCOX4I2_22684390（C/T）であってもよい。Tアレルの存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。ホモ接合TT遺伝子型の存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。

【0032】

SNPはPDK4_38973231（A/G）であってもよい。Aアレルの存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。ホモ接合AA遺伝子型の存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。

【0033】

SNPはCKM_15884567（G/A）であってもよい。Aアレルの存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。ホモ接合AA遺伝子型の存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。

【0034】

SNPはCOX4I1_32772871（T/C）であってもよい。Tアレルの存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。ホモ接合TT遺伝子型の存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。

【0035】

本発明はさらに以下のステップ：

— 標本を得ること；
 — 標本からDNAを抽出するか、または遊離させること；および
 — 前記の抽出されるか、または遊離されたDNAにおけるMSTN_66493737（T/C）SNPの遺伝子型を確認すること
 を含む、対象の潜在的競技パフォーマンスを測定するためのアッセイを提供し、ここでMSTN_66493737（T/C）SNPにおけるCアレルの存在は優れた競技パフォーマンスを示す。

10

20

30

40

50

【0036】

該アッセイは、MSTN__66493737 (T/C) SNP 遺伝子型を確認するステップの前に、以下のステップを含んでもよい：

—前記の抽出されるか、または遊離されたDNAにおけるMSTN__66493737 (T/C) SNP をコードする標的配列を増幅すること。

【0037】

ホモ接合CC遺伝子型の存在は優れた競技パフォーマンスを示す。

【0038】

優れた競技パフォーマンスは優れた全力疾走パフォーマンスであり得る。

【0039】

DNAはゲノムDNAであってもよい。

【0040】

対象に由来する標本は：血液、唾液、骨格筋、皮膚、骨髄、生検標本、軟部組織、精液、内部臓器および体毛を含む群から選択されてもよい。

【0041】

対象は競争レース種に由来してもよい。対象はサラブレッド競走馬のようなウマ科動物であってもよい。

【0042】

本発明者らは、COX4I2 遺伝子 (EquCab2.0 22676361-C/T) 一塩基多型 (SNP) のTアレルのホモ接合キャリア：すなわち、COX4I2 遺伝子の両アレルにおいて多型を有するものは、SNP に対してヘテロ接合である対象：すなわちCOX4I2 遺伝子のアレルの一つにおいて多型を有する対象、またはCOX4I2 遺伝子のいずれのアレルもSNPを持たない対象に比較して、優れた全力疾走競走馬である可能性が統計的にいっそう高い。

【0043】

本発明者らは、COX4I2 遺伝子における一塩基多型 (SNP) の存在または非存在に関して対象に由来する生物学的標本をアッセイするステップを含む、対象の競技パフォーマンスを予測する方法を記載する。SNPはEquCab2.0 COX4I2-22676361-C/Tであってもよい。ホモ接合TT遺伝子型の存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。ホモ接合TT遺伝子型の存在は優れた酸素消費パフォーマンスを示してもよい。ホモ接合TT遺伝子型の存在は優れた全力疾走パフォーマンスを示してもよい。対象の生物学的標本は：血液、唾液、骨格筋、精液、生検標本、内部臓器、皮膚、骨髄（またはいずれか他の生物組織）および体毛を含む群から選択されてもよい。対象は競争レース種に由来してもよい。対象はウマ科動物であってもよい。対象はサラブレッド競走馬であってもよい。

【0044】

本発明者らはまた、COX4I2 遺伝子における一塩基多型 (SNP) の存在または非存在を検出するための手段を含む、対象の競技パフォーマンスを測定するための使用に関するアッセイを記載する。SNPはEquCab2.0 COX4I2-22676361-C/Tであってもよい。ホモ接合TT遺伝子型の存在は優れた競技パフォーマンスを示してもよい。対象の生物学的標本は：血液、唾液、骨格筋、精液、生検標本、内部臓器、皮膚、骨髄（またはいずれか他の生物組織）および体毛を含む群から選択されてもよい。対象は競争レース種に由来してもよい。対象はウマ科動物であってもよい。対象はサラブレッド競走馬であってもよい。

【0045】

本発明は、添付の図面を参照することによって、実施例だけによって示された以下のその態様の説明からいっそう明確に理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】図1はウマにおける運動中のエネルギー分配の概要である。

【図2】図2は、サラブレッド亜集団 (TBE__EN: > 8 fの距離で優れたパフォーマンスをするサラブレッド; TBE__SP: < 8 fの距離で優れたパフォーマンスをするサラブレッド; TBO: レースに参加してきたが、一度も勝利せず、< 70のハンディキャップレーティングを有するその他のサラブレッド) および非サラブレッド馬 (AH: Akhal-Teke; CON: Connemara Pony; TU: Tuvva) における COX4I2 22676361 (C/T) SNP 遺伝子型の分布を示す棒グラフである。< 8 fの距離で首尾よく競ってきたエリートサラブレッドは、他のサラブレッド亜集団および非サラブレッドより有意に高いTT遺伝子型頻度を有する。

【図3】図3は運動中にエネルギー産生に貢献する3つの主要な代謝経路間の関係を示す図であり、優れた競走パフォーマンスに関連した3種の遺伝子、CKM、COX4I2およびPDK4の機能が示される。

10

【図4-1】図4は、CKM 22684390 (C/T) SNP (A)、COX4I2 22684390 (C/T) SNP (B) およびPDK4 38973231 (A/G) SNP (C) に対するエリートサラブレッド (斜線バー) と非エリートサラブレッド間、およびMSTN 66493737 (T/C) SNP (D) に対するエリートのスプリンター (斜線バー) とエリートエンデュアランスサラブレッド間のアレル頻度分布を示すグラフである。

【図4-2】図4は、CKM 22684390 (C/T) SNP (A)、COX4I2 22684390 (C/T) SNP (B) およびPDK4 38973231 (A/G) SNP (C) に対するエリートサラブレッド (斜線バー) と非エリートサラブレッド間、およびMSTN 66493737 (T/C) SNP (D) に対するエリートのスプリンター (斜線バー) とエリートエンデュアランスサラブレッド間のアレル頻度分布を示すグラフである。

20

【図5-1】図5は、CKM 22684390 (C/T) SNP (A)、COX4I2 22684390 (C/T) SNP (B) およびPDK4 38973231 (A/G) SNP (C) に対するエリートサラブレッド (斜線バー) と非エリートサラブレッド間、およびMSTN 66493737 (T/C) SNP (D) に対するエリートのスプリンター (斜線バー) とエリートエンデュアランスサラブレッド間の遺伝子型頻度分布を示すグラフである。

【図5-2】図5は、CKM 22684390 (C/T) SNP (A)、COX4I2 22684390 (C/T) SNP (B) およびPDK4 38973231 (A/G) SNP (C) に対するエリートサラブレッド (斜線バー) と非エリートサラブレッド間、およびMSTN 66493737 (T/C) SNP (D) に対するエリートのスプリンター (斜線バー) とエリートエンデュアランスサラブレッド間の遺伝子型頻度分布を示すグラフである。

30

【図6-1】図6の(A)~(C)は、最適レース距離に関するMSTN 66493737 (T/C) SNPの遺伝子型頻度を示すグラフであり、(A)はC/C遺伝子型頻度を示し; (B)はC/T遺伝子型頻度を示し;

【図6-2】そして(C)はT/T遺伝子型頻度を示す。

【図7】図7は、MSTN 66493737 (T/C) SNPの最適レース距離の遺伝子型頻度を示すグラフであり、ここでは2歳馬としてのグループレースで勝利したウマの最適レース距離はそれらの3歳馬レースの平均距離に置き換えられた。

40

【図8】図8は、持続性運動パフォーマンスに関して公知のエジプト系アラビア馬の非サラブレッド集団とサラブレッド集団における、MSTN 66493737 (T/C) SNPの遺伝子型頻度を示すグラフである。

【図9】図9は、6~8 f、8~10 f、10~12 fのスタミナインデックスを持つ種馬 (stallion) のMSTN 66493737 (T/C) SNPの遺伝子型頻度を示すグラフである。

【図10】図10はMSTN 66493737 (T/C) SNPのC/C、C/TおよびT/T遺伝子型に関するMSTN遺伝子の相対発現を示すグラフである。

50

【発明を実施するための形態】

【0047】

サラブレッド馬 (*Equus caballus*) における優れた競走パフォーマンスに関する厳しい選択の結果、運動にとって適切な多数の適応性生理的表現型が生まれたが、これらの特徴を引き起こす基礎的な分子機序は十分に理解されていない。

【0048】

Eiversら (2009) は、8頭の無調教サラブレッド馬における標準化漸増ステップトレッドミル運動試験後のウマ骨格筋における運動-反応候補遺伝子群のmRNA発現の適応性変化を検討した。該研究では、生検標本は運動前 (T_0)、運動後すぐ (T_1) および運動後4時間 (T_2) の中臀筋から得られた。 T_2 では T_0 に比較して8遺伝子 (CKM、COX4I1、COX4I2、PDK4、PPARGC1A、PRKAA1、SLC2A1、およびSLC2A4) において有意な倍率の差 ($P < 0.05$) が検出された。最大心拍数 (VHR_{max}) におけるmRNAおよび速度と運動後のピーク血漿中乳酸塩濃度 ($[La]_{T_1}$) の関係を研究することによって、彼らは T_2 でのCOX4I1とPPARGC1A、および T_0 での $[La]_{T_1}$ とCOX4I1間の有意な ($P < 0.05$) 関連を証明した。後続の研究では、彼らは10か月調教後の第2コホートのウマにおける遺伝子発現変化を検討した。彼らは、静止標本では、COX4I1遺伝子が調教後に有意な量の増加を示し、そして調教されたコホートでは運動後に T_2 において有意な倍率の差がCOX4I2、PDK4およびPPARGC1Aで確認されることを示した。彼らはまたPPARGC1AおよびCOX4I1に関して VHR_{max} と $[La]_{T_1}$ の有意な関係を検出した。

【0049】

本発明は、サラブレッド競走馬において多数の運動反応遺伝子候補 (付録に列举される) における配列変異体 (たとえば、SNP) と、後向き競技パフォーマンス (競馬場成功、すなわち、グループ勝ち馬または非勝ち馬、グループ勝ち馬のハンディキャップレーティング (RPR) および最適レース距離として示される) 間の今まで未知の関係に関する。ある側面では、本発明はCOX4I1、COX4I2、PDK4、CKMおよびMSTN遺伝子におけるSNPに関する。

【0050】

COX4I1およびCOX4I2

シトクロムCオキシダーゼ (COX) は、ミトコンドリア呼吸において還元されたシトクロムCから酸素への電子伝達を触媒するマルチサブユニット酵素 (複合体IV) である。COXはダイマーであり、それぞれのモノマーは13サブユニットから構成され、そのうちの3つ (COX1、2および3) はミトコンドリアゲノムによってコード化される。核内コード化COX4はミトコンドリア内膜上のミトコンドリアコード化サブユニットの調節および会合に関与する (Fukudaら 2007)。ヒト骨格筋では、COX4 mRNAレベルはミトコンドリア容積、伸長および VO_{2max} と関連することが示されている。COX4は、COX4I1およびCOX4I2遺伝子によってコードされる2つのイソ型 (COX4-1およびCOX4-2) を含み、それらは正常酸素環境および低酸素環境において異なって調節される (Fukudaら 2007)。正常酸素環境では、COX4I1は優先的に転写される。限定された酸素環境では、HIF-1がCOX4I2およびミトコンドリアLON遺伝子の転写を活性化する。LONはCOX4I1の発現を阻害するため、これらの制御機序はCOX4I2の転写および蛋白質合成を増し、COX4-1の利用能を減少させる。この機序は限定された酸素環境において細胞呼吸の効率を最大にするための方策であると見なされている (Fukudaら 2007)。

【0051】

レース中の生理的要求はエネルギー需要に依存して異なり、最も効率的な様式でエネルギーを提供するための代謝経路の分配によって調節される。酸素供給は運動している筋肉の需要に応えることができないため、過最大強度 ($105 \sim 125\% VO_{2max}$) における運動の初めの75秒間にウマは酸素欠乏を経験する (Dempsey and Wa

10

20

30

40

50

gner 1999; Seamanら 1995)。より長い距離およびより長い期間 (>75秒)の間に、ウマは定常状態 VO_2 に到達し、主として好氣的代謝に頼る。レースの終了時には、ウマが“乳酸塩閾値”を通過するため、酸素消費需要は増大する。短距離レース(<1,000m)中に、筋肉収縮に必要なATPの形態における総エネルギーのおよそ70%は好氣的代謝経路によって生み出される(Eatonら 1995)。短距離を過最大強度で運動するサラブレッド馬では、この低酸素環境が、都合よく保存された代謝スイッチをCOX4-1からCOX4-2利用に切り換えてもよい(Fukudaら 2007)。この環境によるCOX4-2の調節が細胞の呼吸効率を増大させてもよい。COX4-2は従って、酸素が限定される場合、レースの初期段階において、およびレースの終了に向けるエネルギー供給の重要なレギュレーターである。図1からわかるように、運動の初期段階において、およびレースの終了に向けて末梢の生理的システム(すなわち、骨格筋)が限定された酸素環境で稼働している間、大量のエネルギーが要求される。COX4-2を介したエネルギーの生成がこれらの両方の段階の期間中重要であってもよい。

10

【0052】

ミトコンドリア生合成の調節がグルココルチコイドホルモンによって媒介されてもよいことは示唆されている(Webberら 2002)。COX4I2遺伝子はグルココルチコイド受容体エレメント(TGTT)を含み、それがCOX4-2発現を増大させ、従ってミトコンドリア容積を増すために標的とされてもよい。さらに、COX4I2遺伝子はp53腫瘍抑制因子結合部位(CATG)を含む。最近の研究はp53がミトコンドリア生合成およびCOXを介した好氣的代謝の調節において役割を果たしてもよいことを示唆している(Matobaら 2006; Saleemら 2009)。

20

【0053】

CKM

クレアチンキナーゼ(CK)はクレアチンホスホキナーゼ(CPK)またはホスホクレアチンキナーゼとしても知られ、種々の組織型によって発現される酵素(EC2.7.3.2)である。該酵素はクレアチンの変換を触媒し、アデノシン三リン酸(ATP)を消費してホスホクレアチンとアデノシン二リン酸(ADP)を作り出す。ATPを速やかに消費する組織、とりわけ骨格筋、さらに脳および平滑筋では、ホスホクレアチンは迅速なATP再生のための貯蔵所として役立つ。従ってクレアチンキナーゼはそのような組織における重要な酵素である。

30

【0054】

多くの細胞では、CK酵素は2つのサブユニットからなり、それはB(脳型)またはM(筋肉型)のいずれであってもよい。従って、3種の異なるアイソザイム:CK-MM、CK-BBおよびCK-MBが存在する。これらのサブユニットの遺伝子は異なるクロモソーム上に位置する。その上、ミトコンドリアクレアチンキナーゼにはユビキタス型とサルコメア型の2つの形態が存在する。異なる型のCKアイソザイムを表1に列挙する。

【0055】

表1-クレアチンキナーゼのアイソザイム

【0056】

40

【表 1】

遺伝子	蛋白質
CKB	クレアチンキナーゼ、脳
CKBE	クレアチンキナーゼ、異所性発現
CKM	クレアチンキナーゼ、筋肉
CKMT1A	クレアチンキナーゼ、ミトコンドリア 1A
CKMT1B	クレアチンキナーゼ、ミトコンドリア 1B
CKMT2	クレアチンキナーゼ、ミトコンドリア 2(サルコメア)

10

【0057】

アイソザイムパターンは組織型に依存して異なる。たとえば、CK-BBは主に脳に存在し、そのレベルは骨格筋ではめったに意味を持たない。骨格筋はCK-MM(98%)および低レベルのCK-MB(1%)を発現するが、対照的に心筋層(心臓の筋肉)はCK-MMを約70%そしてCK-MBを25~30%発現する。

【0058】

クレアチンリン酸をクレアチンに変換することによってADPからATPを生産するミトコンドリアクレアチンキナーゼ(CK_m)はミトコンドリア内膜腔に存在する。ミトコンドリア形態とは別にサイトソルには3種の形態が存在する—CK_a(緊急に必要な場合、クレアチンリン酸を犠牲にしてサイトソルでATPを生産する)、CK_c(リン酸化および脱リン酸化をそれぞれATPおよびADPとカップリングすることによりサイトソルにおけるクレアチンおよびクレアチンリン酸の必要な濃度を維持する)およびCK_g(クレアチンの直接リン酸化を解糖経路に連結する)。

20

【0059】

クレアチンキナーゼ、筋肉遺伝子(CKM)はもっぱら横紋筋に見出されるクレアチンキナーゼの筋肉型アイソザイムをコードする。コードされた蛋白質は細胞のエネルギー論に参与する。運動中に、CKM遺伝子ノックアウトマウスはバースト活動の欠如を示すが、正常な絶対筋力を維持する(van Deursenら 1993)。本発明者らはCKM遺伝子転写物がサラブレッド馬骨格筋トランスクリプトームにおいて最も豊富な転写物であることを見出して、ウマの運動適応においてCKM遺伝子が極めて重要な役割を果たすことを支持する。

30

【0060】

PDK4

グルコース利用の調節はグルコーストランスポーターによるグルコースの取り込み、解糖フラックスの速度およびピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体(PDC)の触媒機能を介したミトコンドリアにおけるピルビン酸塩からアセチルCoAへの変換によって厳密に制御されている。グルコースの酸化における重要な律速段階はピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ(PDK)によって制御されるPDC会合の調節である。PDKはPDCの形成を遮断し、脂肪酸をベーター酸化して、酸化了的リン酸化の基質としてのアセチルCoAを生じる。PDKイソ型をコードする4種の遺伝子の中の3種の遺伝子(PDK2、PDK3およびPDK4)は、サラブレッドにおいて正の選択をされた遺伝子領域に位置する(Guら 2009)。PDK4遺伝子プロモーターは、肝臓および脂肪組織におけるインスリンシグナリングの重要なレギュレーターであるFOXO1A転写因子の結合部位を含む。FOXO1Aにおける一塩基多型は、T2DM(2型糖尿病)発症およびヒトの関連した表現型に対して保護効果を有することが見出されている。FOXO1Aはまた、サラブレッドにおいて正選択された遺伝子領域の中に見出され、そのPDK4プロモーター結合部位配列はウマにおいて保存される。転写因子FOXO1およびSMADはまた、ミオスタチン(MSTN)遺伝子調節に参与し、それ故筋肉成長の制御において重要な役割を果たしていることが示されている。

40

50

【0061】

正選択に関するゲノムスキャンでは、Guら（2009）は2つの独立した統計的検定（ F_{ST} およびEwens-Watterson検定）において中立期待から極めて有意に逸脱した領域を検出した。この領域はPDK4遺伝子を含んでいた。PDK4遺伝子発現はERPa（エストロゲン-関連受容体 α ）結合を介して転写共役因子PGC-1 α によって調整される。PPARGC1A（ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマ、共役因子1アルファ）遺伝子によってコードされるPGC-1 α は、SLC2A4（溶質運搬体ファミリー2（促進拡散型グルコース輸送体）、メンバー4；；以前はGLUT4）を介してグルコース輸送をコントロールすることによってインスリン感受性を調節するエネルギー代謝の重要なレギュレーターであり、そして酸化的筋肉線維形成を行わせ、核内コード化ミトコンドリア蛋白質遺伝子とその相互作用を介してミトコンドリア生合成を調整する。

10

【0062】

MSTN

ミオスタチンは、成長／分化因子8前駆体（GDF-8）としても公知である。いくつかの哺乳動物種（ウシ、ヒツジおよびイヌを含む）では、筋肉肥大形質はミオスタチン（MSTN）遺伝子における突然変異によって引き起こされる。イヌでは、競走ウィペット（whippet）におけるMSTN遺伝子突然変異は“闘争的（bully）”表現型に関連付けられていて、ヘテロ接合の個体は、野生遺伝子型を持つ個体より有意に速い（Moshersら 2007）。MSTN遺伝子における突然変異が競技パワーに関連してもよい。

20

【0063】

本発明者らは競技パフォーマンスに関連した遺伝子における多数の一塩基多型（SNP）を分析していて、SNPに基づいて対象の潜在的競技パフォーマンスを予測する簡単なDNAを基礎にした方法を開発している。

【0064】

本発明は以下の実施例からいっそう明確に理解されるであろう。

【実施例】

【0065】

対象

サラブレッドとは、三大基礎種馬（stallion）の1種およびThe General Studbook, 1791（Weatherby and Sons 1791）に記載されたおよそ30の基礎雌馬にその血統をたどることができる登録された競走馬である。サラブレッドレースには2つの型があり：ナショナルハントレース（National Hunt race）はハードルを跳び越えるか、またはフェンスを飛び越して4.5マイル（7,200m）までの距離を走るが、フラットレース（Flat race）は障害物がなく、5ファールロング（5／8マイルまたは1,006m）から20ファールロング（4,024m）までの範囲の距離を走る。最も重要な標準となり、そして最も価値のあるえり抜きのフラットレースは、グループ（Group）レース（ヨーロッパおよびオーストラレーシア）またはステークス（Stakes）レース（北米）として知られる。これらのレースの中で最も一流なものには、ブリーダーズカップレース（The Breeders' Cup races（米国））、ケンタッキーダービー（The Kentucky Derby）（米国）、エプソムダービー（The Epsom Derby）（英国）などが挙げられる。

30

40

【0066】

ヨーロッパ（イギリス（Britain）、アイルランド（北アイルランドを含む）、フランス、ドイツ、イタリア）では、84のグループ1、93のグループ2、および173のグループ3レースを含む年間350のグループレースが行われる。イギリス（United Kingdom）およびアイルランドでは、年間196のグループレース（43のグループ1、50のグループ2および103のグループ3）が競われる。イギリス（B

50

Britain) はヨーロッパの中で1年に行われるグループレースの数(139)が最も多く、57%が ≤ 1 マイル(1609メートル)、そして43%が > 1 マイルの距離を走る。オーストラリアは全部でほぼ21,000のレースから、季節毎におよそ540~550のグループレースを行い、ニュージーランドは季節毎に78のグループレースを主催する。グループレースの後は、準重賞レースが次の最も高いグレードのレースである。

【0067】

≤ 1 マイルの距離を競う馬は“スプリンター”として知られ、 > 1 マイルの距離を競うウマは“ステイヤー”として知られる。1マイルレースを競うウマ(‘マイラー’および‘中距離馬’)はスプリンターまたはステイヤーのいずれと見なされてもよく、騎手によってレースが行われる様式は、しばしばトレーナーが認めたウマの能力(‘スプリンター’または‘ステイヤー’)を反映する。国際競馬統括機関連盟(The International Federation of Horseracing Authorities)は5つのレース距離カテゴリー:短距離(5~6.5f、 $\leq 1,300$ m)、マイル(6.51~9.49f、1,301~1,900m)、中距離(9.5~10.5f、1,901~2,112m)、長距離(10.51~13.5f、2,114~2,716m)および超長距離(> 13.51 f、 $> 2,717$ m);S-M-I-L-Eを認めている[注:1ファーロング=1/8マイル=201.2メートル]。

10

【0068】

障害物レースの混乱した効果を最小限にするために、フラットレースでパフォーマンスレコードを持つウマだけが研究のコホートに含まれると見なされた。すべてのケースにおいて、2世代内の血族関係を共有する標本を排除することにより遺伝的背景を制御するために血統情報を使用した。さらに、血統内の評判のよい種親(sire)の過剰提示は可能な場合回避された。

20

【0069】

1997~2006年の間に、アイルランド、イギリス(Britain)およびニュージーランドにおいて、サラブレッド馬に由来する標本は、競走、育種および販売体制からオーナーのインフォームドコンセントを得て集められた。すべてのウマは“エリートサラブレッド”(TBE)または“その他のサラブレッド”(TBO)としての後ろ向き競馬場パフォーマンスレコードに基づいて分類された。エリートサラブレッドは少なくとも1つのグループ(グループ1、グループ2またはグループ3)レースに勝利しているフラットレース馬であった。その他のサラブレッドは競馬場で競走したが、フラットレースに勝利しなかったか、または89未満のハンディキャップレーティング(レーシングポストレーティング(RPR))を有するウマであった。

30

【0070】

実施例1-COX4I2

短距離運動中は限定された酸素環境にもかかわらず、筋肉収縮に必要なATPの形態におけるエネルギーは好氣的代謝経路(70%好氣的、30%嫌氣的)によって主に生成される。本発明者らはこの相対的低酸素環境が、都合よく保存された代謝スイッチをCOX4-1からCOX4-2に切り換え、それによって細胞呼吸の効率を増大させることを示唆する。COX4-2は従って全力疾走中のエネルギー供給の重要なレギュレーターであるが、酸素需要が満たされる長距離競技では必ずしも必要ではない。このスイッチは、低酸素-依存的遺伝子発現の主要なレギュレーターとして十分に性状が解析されている細胞内転写因子HIF-1 α によって媒介される(Semenza 1998)。HIF-1 α はPDK1、LDHA、COX4-2およびLONをコードする遺伝子の転写を活性化し、COX4-1からCOX4-2へのスイッチを制御する。極めて激しい運動中に酸素が欠乏するサラブレッドの筋肉では、減少した酸素に対して亢進される反応および最も効率的なやり方でATPを生成する能力がその個体にとって有意義な利点を提供するであろう。

40

【0071】

さらに、増大したミトコンドリア容積はより高い好氣的生産能力に関連することが示さ

50

れている (Fluck 2006)。増大した量のグルココルチコイドホルモンが、ミトコンドリアゲノムを特に目標とするか、または未知の機序によるかのいずれかでミトコンドリア生合成を刺激することが示されている (Weberら 2002)。グルココルチコイド受容体エレメント (グルココルチコイド反応性および関連性エレメント) は認識配列 (TGTT) を含む。COX4I2 遺伝子はイントロン2にこれらのエレメントの1つを含む。従って、グルココルチコイド結合が遺伝子発現増大を刺激し、ミトコンドリア容積増大およびその結果の好氣的エネルギー生産能力を導いてもよい。

【0072】

ある側面では、本発明は優れた全力疾走パフォーマンスに有意 ($P < 0.01$) に関連する COX4I2 における一塩基多型 (SNP) に関する。優れた短距離レース勝ち馬における COX4I2 ホモ接合 TT 遺伝子型 (EquCab2.0 22676361-C/T) の有意な関連が、サラブレッド馬における優れた競技パフォーマンスの、DNA を基礎にした遺伝的潜在性検定において利用されてもよい。

【0073】

COX4I2 遺伝子 (EquCab2.0 22676361-C/T) 多型の正確な位置

COX4I2 多型の正確な位置は、www.broad.mit.edu/mammals/horse/ で調べることができるウマゲノム配列 (Equus caballus. 2.0 版) のウマ (Equus caballus) クロモソーム22上の22676361位である。COX4I2 多型は EquCab2.0 COX4I2_22676361 (C/T) SNP として同定され得る。

【0074】

ウマゲノム EquCab2 アセンブリは 6.79x における全ゲノムショットガン (Whole Genome Shotgun) (WGS) アセンブリであり、2007年9月に公開された。"Twilight" という名の雌サラブレッドがゲノム配列決定のための代表馬として選択された。プロジェクトの調整ならびにゲノム配列決定およびアセンブリは Broad Institute によって提供される。N50 サイズは、アセンブルしたゲノムの 50% が N50 サイズまたはそれより長いブロックで存在するような長さである。コンティグの N50 サイズは 112.38 kb であり、すべてのコンティグの全長は 2.43 Gb である。スカホールド (scaffold) におけるコンティグ間のギャップが含まれる場合、アセンブリの全長は 2.68 Gb である。ウマ EquCab2 は標準 Ensembl 哺乳動物パイプラインを使用してアノテーションされた。脊椎哺乳動物およびウマ蛋白質からの予測は、非脊椎哺乳動物に由来する予測に対して優先されている。予測のセットはヒトおよびマウスにおける 1:1 相同遺伝子に比較され、ウマアノテーションにおいて欠損したホモログは exonerate を使用して発見されている。ウマおよびヒト cDNA は蛋白質に基づいた予測に UTR を添加するために使用されている。最終遺伝子セットは 20,737 の蛋白質-コーディング遺伝子を含み、2,863 は偽遺伝子として確認され、1,580 はレトロトランスポゾン遺伝子として分類された。

【0075】

EquCab2.0 COX4I2-22676361-C/T 多型の遺伝子型判定
SNP の遺伝子型判定はエリート ($n=79$) および非エリート ($n=70$) パフォーマーを共に含むサラブレッド ($n=149$) の標本において実行された。エリートパフォーマー群は、優先的に短距離 (≤ 1 マイル; $n=34$) レースおよび長距離 (> 1 マイル; $n=36$) レースにおいて競走した動物のサブセット ($n=70$) を含んだ。

【0076】

ゲノム DNA は新鮮な全血または体毛標本のいずれかから抽出された。血液標本は 7 ml のバキュテナー (Vacutainer) K₃ EDTA 血液回収チューブ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) に集められた。明白な毛根を持つ体毛標本は、ラベル付きの気密ジップロック (zip-lock) 袋に集めら

10

20

30

40

50

れた。標本は、改変した標準フェノール／クロロホルム法（Sambrook and Russell 2001）を使用してDNAを抽出するまで4℃で保管された。すべての標本のDNA濃度はNanoDrop ND-1000 UV-可視分光光度計（NanoDrop Technologies, Wilmington, DE）を使用して推測された。

【0077】

フランキンギン配列およびSNP（角括弧で囲んだ太字）は以下の通りである；

（小文字で示された塩基は、配列読み取りがフランキンギン配列のこの領域に対して最適ではなかったことを示す）

```
c a a g a g t g g a g t g t g c t c c a a g a a c t g g a g g c t a g c a t g t
a g c a g a g g a g g c a g t a g c a g a g g a g a g g t t g a t g g g g
g a g c t g c a t t t g g a g a g t c t g g c a g g c a g g a c c t t g a a t g
c c a g g c t a a g g a g t t t A T T G G G A G G C A A G T G G G T G C T G A T
A A A G G C T C A A G G A T T C C A T C A G G C T G T T C C C A C A A A G A C C
[C/T] G G G C C A C C T C A G G G C A C C A T A T C C C C A T A T C C A G G
A G C C A G T T G T G T C C C A G A G A A A C A A G G G A C T G G A C C T T G
A G A C T T G G C C A G T G T C C T T C A C A T C C T A C C C T G T G C A C G C
C C C T G T T T G G C C T G T G G T G C A G A A G G C C C C T G G G A G A C C T
G A A G C A G A A G C T G C A G A C C A T T C C A G G T T A G T G T G G A G C C
C C A G A
```

（SEQ. ID No. 1）

COX4I2遺伝子の遺伝子型判定は、競合的アレル特異的PCR（KASPar）またはTaqman（Applied Biosystems）のいずれかを使用してKBiosciences（www.kbioscience.co.uk）によって実施された。KASParは企業内所有の均質な蛍光遺伝子型判定系である。

【0078】

全DNAの中の25μLは“v-底の”96ウェルマイクロタイタープレート中、15ng/μLの濃度でKBiosciencesに供給された。再現性をチェックするため、および標本取り扱いにおける誤差を制御するために、設定およびアッセイ検証（n=24）ならびにブランク（96ウェルプレート毎にn=1）用のいくつかの標本も含まれた。

【0079】

遺伝解析研究

遺伝子型判定後、先に記載の対象（n=149）に対して遺伝解析が実行された。

【0080】

それぞれのSNPに対して個々の二分化ロジスティック回帰モデルを適合させた。遺伝子型傾向効果は、一般的ホモ接合、ヘテロ接合、およびまれなホモ接合遺伝子型に関する効果の大きさにおける線形傾向に関連したリスクを推測することによってモデル化された。P値は、優度比検定統計値から決定され、自由度1を持つ漸近 χ^2 分布に従って近似された。有意に関連のあるSNPのための最適な遺伝モデルは、相加、劣性および超優性モデルのコーディング変数を持つ解析を反復することによって決定された。

【0081】

表2は対象間のEquCab2.0 COX4I2_22676361（C/T）SNP遺伝子型頻度を示す。

【0082】

【表 2】

エリートスプリンター(8 フェアロング未満)(n=39)対他のエリートレース勝ち馬(n=36)				
	Sp (<8f)対 En			
遺伝子型	OR	lower	upper	p-値
優性(CC 対 CT・TT)	1.77	0.55	5.76	3.37E-01
劣性(CC・CT 対 TT)	4.89	1.21	19.75	<u>1.56E-02*</u>
超優性(CC・TT 対 CT)	0.56	0.2	1.52	2.50E-01
エリートスプリンター (7 フェアロング未満) (n=28) 対他のエリートレース勝ち馬 (n=36)				
	Sp (<7f)対 En			
遺伝子型	OR	lower	upper	p-値
優性 (CC v CT・TT)	2.05	0.54	7.69	2.78E-01
劣性 (CC・CT v TT)	5.6	1.31	23.86	<u>1.25E-02*</u>
超優性 (CC・TT v CT)	0.53	0.18	1.57	2.53E-01

10

20

【0083】

表中：Sp = スプリンター

En = エンデュアランス (または 'ステイヤー')

OR = オッズ比

LOWER = 下限信頼区間

UPPER = 上限信頼区間

表2では、EquCab2.0 COX4I2_22676361 (C/T) SNPホモ接合TT遺伝子型は<8フェアロング(1マイル未満)の距離での優れた競走(全力疾走)パフォーマンスに有意に関連し(P<0.02)(図2)、この関連は<7fの距離ではいっそう顕著である(P<0.01)。

30

【0084】

COX4I2_22676361 (C/T) SNPのホモ接合Tアレルを持つサラブレッド馬は、ヘテロ接合Tアレル(TC)を持つサラブレッド馬、またはTアレル(CC)を持たないサラブレッド馬に比較して優れた全力疾走パフォーマンスを有する。従って、サラブレッド馬の全力疾走パフォーマンスはCOX4I2_22676361 (C/T) SNPのホモ接合Tアレルの存在または不在に関して生物学的標本を試験することによって予測することができる。

40

【0085】

実施例2—サラブレッド競走パフォーマンスに関連する遺伝子

本発明者らは以下の遺伝子：ACN9、ACSS1、ACTA1、ACTN2、ADHFE1、GGPS1、GSN、MC3R、MTFR1、NDUFA8、PDK4、PON1、PTGS1、PTPN1、TNC、TOMM20、UGCG CKM、COX4I2、COX4I1、HIF1A、MYEF2、およびPRKAA1における80のSNP間の関連を検討した(SNPの詳細はサラブレッド競走パフォーマンスに関する付録に示す)。

【0086】

本発明はACN9、ACSS1、ACTN2、ADHFE1、CKM、COX4I2、

50

G S N、M S T N、P O N 1、P T G S 1 および P T P N 1 を含むこれらの遺伝子セットにおける S N P と競技パフォーマンス表現型間の有意な関連を確認する（付録を参照されたい）。ウマ骨格筋における運動に対する公知の遺伝子発現反応（E i v e r s ら 2 0 0 9）およびイヌにおけるパフォーマンスとの関連の証拠（M o s h e r ら 2 0 0 8）および訓練に対する反応から、サラブレッド競走パフォーマンスと有意な関連を有する4種の遺伝子（C K M、C O X 4 I 2、P D K 4 および M S T N）が詳細に検討された。これらの遺伝子の中の3種（C K M、C O X 4 I 2 および P D K 4）における S N P は優れた競技パフォーマンス（グループレース勝利）に関連し、M S T N 遺伝子における S N P は優れた短距離レースパフォーマンスに関連する。

【0087】

この実施例では、以下の標本セットが使用された：

表3—それぞれの亜集団にふくまれる標本の詳細。

【0088】

【表3】

標本 サブ	n	種馬(sire) の数	Grレース勝 ち馬数	平均 RPR	RPR 範囲	レース総数	平均レース数	レース勝利 数	Grレース 勝利数	Grレース 勝利数	平均Grレース 勝利数
TB	148	136									
TBE	86	86	84	115	87~134	1170	13.8	425	215	91	2.5
TBO	62	62	0	59	21~89	537	8.7	15	0	0	0

【0089】

表中、T B はサラブレッドであり、T B E はエリートグループレース勝利サラブレッドであり；そしてT B O は非エリート（すなわち、その他の非勝利）サラブレッドである。T B E コホートはさらにT B E __スプリンター（n = 3 9）およびT B E __エンデュランスまたは‘ステイヤー’（n = 3 2）に細分化された。

【0090】

遺伝解析研究

S N P と競技パフォーマンスとの関連に関する検定は、P L I N K プログラム（<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/> P u r c e l l ら、2 0 0 7）を使用して実施された。

【0091】

標準ケース／コントロール関連解析

標準ケース／コントロール関連解析を実施するために、オプション：p l i n k - - f i l e m y d a t a - a s s o c が使用され、それが以下のフィールドを含むファイル p l i n k . a s s o c を生成する：

C H R クロモソーム

S N P S N P I D

B P 染色体上の位置（塩基対）

A 1 マイナーアレル名（全標本に基づく）

F _ A ケースにおけるこのアレルの頻度

F _ U コントロールにおけるこのアレルの頻度

A 2 メジャーアレル名

C H I S Q 基本アレル検定 χ^2 乗（1 d f）

P この検定に関する漸近 p - 値

O R 推定オッズ比（A 1 に関する）

関連解析

モデルオプション（m o d e l o p t i o n）を使用することによって、基本アレル検定（ケース対コントロールにおけるアレルの頻度を比較する）以外の疾患と変異体間の関連の検定を実施することが可能である。本明細書で提案された検定は（基本アレル検定

10

20

30

40

50

の他に)以下の通りである:

- ・コクラン-アーミテージ傾向検定 (Cochran-Armitage trend test)
- ・遺伝子型 (2df) 検定
- ・優性遺伝子アクション (1df) 検定
- ・劣性遺伝子アクション (1df) 検定

コクラン-アーミテージ検定の利点の一つは、アレルではなく個体が解析の単位であるため、ハーディ・ワインベルグ (Hardy-Weinberg) 平衡を仮定しないことである (しかし、基本アレル検定に由来する順列に基づいた経験的 p 値もこの特性を有する)。ハーディ・ワインベルグ平衡からの大きな逸脱を示す SNP はしばしば劣った SNP である可能性があるか、または標本における層化を反映するが、それゆえ多くのケースにおいておそらく最適に排除される。

【0092】

遺伝子型検定は疾患 x 遺伝子型の 2 x 3 表における一般的な関連検定を提供する。優性および劣性モデルはマイナーアレルに対する検定である (どれがマイナーアレルであるかは `--assoc` または `--freq` コマンドのいずれかの出力の中に見出すことができる。すなわち、D がマイナーアレルであり (そして d がメジャーアレルである) 場合、以下の通りである:

アレル (Allelic): D 対 d

優性 (Dominant): (DD, Dd) 対 dd

劣性 (Recessive): DD 対 (Dd, dd)

遺伝子型 (Genotypic): DD 対 Dd 対 dd

先に述べたように、これらの検定は、以下のフィールドを含むファイル `plink` モデルを生成するオプション `plink--file mydata--model` によって生成される:

CHR クロモソーム番号

SNP SNP 識別子

TEST 検定の型

AFF ケースにおける遺伝子型/アレル

UNAFF コントロールにおける遺伝子型/アレル

CHISQ カイ二乗統計量

DF 検定に関する自由度

P 漸近 P 値

それぞれの SNP は適用される 5 種の検定に対応する出力の 5 つの列上で見られる。行の TEST は、先に述べた異なる型の検定を表す ALLELIC、TREND、GENO、DOM または REC のいずれかを表す。遺伝子型またはアレルカウントはケースおよびコントロールに対して別個に示される。劣性および優性検定の場合、カウントは遺伝子型を表し、2 つのクラスはプールされる。

【0093】

これらの検定は二倍体遺伝子型だけを考慮する: すなわち、X クロモソームの場合、雄は ALLELIC 検定からさえ除外されることになる。このように、本明細書に提示された 5 種の検定に対して同じデータが使用される。対照的に、基本関連コマンド (`--assoc` および `--linear` など) は単一の雄 X クロモソームを含み、それゆえ結果が異なってもよいことに注意されたい。

【0094】

遺伝子型および優性/劣性検定は 2 x 3 の表において細胞毎の最少観察数である場合だけ実施され: デフォルトによって、少なくとも細胞の 1 つが 5 未満の頻度を有する場合、代わりの検定は省かれることになる (NA は結果ファイルの中に記載される)。コクラン-アーミテージおよびアレル検定はすべてのケースにおいて実施される。この閾値は `--cell option: plink--file mydata--model--c`

10

20

30

40

50

e l l 20によって変更されうる。

【0095】

関連検定の結果は付録にすべて提供される。4つの遺伝子PDK4、COX4I2、CKMおよびMSTNにおけるSNPの数が検討された。それぞれの遺伝子に対して、本発明者らはその後の検討のための形質に関して最も有意な関連（P値）（表4）を持つSNPを選択した。競技パフォーマンスに最も高い関連がある4つのSNPはPDK4__38973231-A/G、COX4I2__22684390-C/T、CKM__15884567-G/A、およびMSTN__66493737-T/Cであった。PDK4、CKMおよびCOX4I2におけるSNPはサラブレッド競走馬の優れた全力疾走パフォーマンスと関連した。最良適合遺伝子型モデルは以下の表5の結果に基づいて割り当てられた。

10

【0096】

表4－サラブレッド競走馬の優れた（グループ勝利）パフォーマンス（PDK4、CKMおよびCOX4I2）および優れた全力疾走パフォーマンス（MSTN）に関するSNP関連検定の結果。それぞれの遺伝子において最も有意な関連を持つSNPがここに示される。

【0097】

【表4】

CHR	SNP	BP	A1	A2	F_A(A1)	F_A(A2)	F_U(A1)	F_U(A2)	CHISQ	P	OR
4	PDK4_38973231	3924	A	G	0.464	0.536	0.282	0.718	9.874	0.001676	2.2
10	CKM_15884567	2716	G	A	0.074	0.926	0.164	0.836	5.355	0.02066	0.4089
22	COX4I2_22684390	1164	C	T	0.325	0.675	0.455	0.546	4.654	0.03098	0.5778
18	MSTN_66493737	212	T	C	0.282	0.718	0.641	0.359	18.31	1.88E-05	4.5

20

【0098】

表中A1：アレル1；A2：アレル2；F_A(A1)：エリートTB（PDK4、CKMおよびCOX4I2）およびエリートのスプリンター（MSTN）におけるアレル1の頻度；F_A(A2)：エリートTB（PDK4、CKMおよびCOX4I2）およびエリートのスプリンター（MSTN）におけるアレル2の頻度；F_U(A1)：非エリートTB（PDK4、CKMおよびCOX4I2）およびエリートエンデュアランス（MSTN）におけるアレル1の頻度；F_U(A2)：非エリートTB（PDK4、CKMおよびCOX4I2）およびエリートエンデュアランス（MSTN）におけるアレル2の頻度。

30

【0099】

付加的な検討のために選択されたSNPは以下のとおりであった：

PDK4__38973231（A/G）
COX4I2__22684390（C/T）
CKM__15884567（G/A）
MSTN__66493737（T/C）

40

表5－最良適合モデルのための関連検定の結果

【0100】

【表 5 A】

CHR	SNP	A1	A2	TEST	AFF	UNAFF	CHISQ	DF	P
4	PDK4_38973231	A	G	GENO	18/41/24	6/23/33	9.644	2	0.008049
4	PDK4_38973231	A	G	TREND	77/89	35/89	9.237	1	0.002372
4	PDK4_38973231	A	G	ALLELIC	77/89	35/89	9.874	1	0.001676
4	PDK4_38973231	A	G	DOM	59/24	29/33	8.791	1	0.003027
4	PDK4_38973231	A	G	REC	18/65	6/56	3.706	1	0.05422

10

【 0 1 0 1 】

【表 5 B】

22	COX4I2_22684390	C	T	GENO	4/44/32	10/30/15	6.979	2	0.03052
22	COX4I2_22684390	C	T	TREND	52/108	50/60	5.58	1	0.01817
22	COX4I2_22684390	C	T	ALLELIC	52/108	50/60	4.654	1	0.03098
22	COX4I2_22684390	C	T	DOM	48/32	40/15	2.326	1	0.1272
22	COX4I2_22684390	C	T	REC	4/76	10/45	6.093	1	0.01357
10	CKM_15884567	G	A	GENO	1/10/70	2/14/39	5.03	2	0.08087
10	CKM_15884567	G	A	TREND	12/150	18/92	4.865	1	0.02741
10	CKM_15884567	G	A	ALLELIC	12/150	18/92	5.355	1	0.02066
10	CKM_15884567	G	A	DOM	11/70	16/39	4.953	1	0.02605
10	CKM_15884567	G	A	REC	1/80	2/53	0.876	1	0.3493
18	MSTN_66493737	T	C	GENO	3/16/20	9/23/0	23.8	2	0.000006799
18	MSTN_66493737	T	C	TREND	22/56	41/23	20.64	1	0.000005545
18	MSTN_66493737	T	C	ALLELIC	22/56	41/23	18.31	1	0.00001875
18	MSTN_66493737	T	C	DOM	19/20	32/0	22.85	1	0.000001755
18	MSTN_66493737	T	C	REC	3/36	9/23	5.225	1	0.02226

20

30

40

【 0 1 0 2 】

50

最良適合遺伝子型モデルは表5の結果に基づいて割り当てられた。SNPと競技パフォーマンスの関連に関する最良モデルは以下の通りに結論された：

PDK4-*Allelic*→Aアレル、すなわちAAまたはAGが好ましい。

CKM-*Allelic*→Aアレル、すなわちAAまたはAGが好ましい。

COX4I2-*Recessive*→Tアレル、すなわちTTが好ましい。

MSTN-*Genotypic*→遺伝子型は距離カテゴリーを予測する（この実施例で使用されるコホートでは、CCである‘ステイヤー’は無いが、50%のスプリンターはCであった）

CKM、COX4I2およびPDK4に関するエリートおよび非エリートサラブレッドの中でのアレル頻度分布、ならびにMSTNに関するエリートスプリンターおよびエリートエンデュアランスの中でのアレル頻度分布は図4に示される。以下の表6はサラブレッド（TBEおよびTBO）における4種のSNPのアレル頻度を示す。

【0103】

表6－サラブレッドにおける4種のSNPのアレル頻度（TBEおよびTBO）

【0104】

【表6】

CHR	SNP	A1	A2	MAF	NCHROBS
4	PDK4_38973231	A	G	0.3862	290
10	CKM_15884567	G	A	0.1103	272
22	COX4I2_22684390	C	T	0.3778	270
18	MSTN_66493737	T	C	0.4353	278

【0105】

表中、MAFはマイナーアレル頻度であり、NCHROBSは解析されたクロモソーム数である。

【0106】

CKM、COX4I2およびPDK4におけるSNPに関するエリートおよび非エリートサラブレッドの遺伝子型頻度分布、ならびにMSTNにおけるSNPに関するエリートスプリンターおよびエリートエンデュアランスの遺伝子型頻度分布。

【0107】

この研究の結果は図5および以下の表7に示される。

【0108】

表7－PDK4（PDK4__38973231）；COX4I2（COX4I2__22684390）；CKM（CKM__15884567）のSNPに関するエリートおよび非エリートサラブレッド亜集団における遺伝子型頻度およびMSTN（MSTN__66493737）のSNPに関するエリートスプリンターおよびエリートエンデュアランスサラブレッドにおける遺伝子型頻度

【0109】

【表 7】

		AA	AG	GG		AA	AG	GG
	ALL	24	64	57	145	0.17	0.44	0.39
PDK4	TBE	18	41	24	83	0.22	0.49	0.29
	TBO	6	23	33	62	0.10	0.37	0.53
		CC	CT	TT		CC	CT	TT
	ALL	14	74	47	135	0.10	0.55	0.35
COX4I2	TBE	4	44	32	80	0.05	0.55	0.40
	TBO	10	30	15	55	0.18	0.55	0.27
		GG	GA	AA		GG	GA	AA
	ALL	3	24	109	136	0.02	0.18	0.80
CKM	TBE	1	10	70	80	0.01	0.13	0.88
	TBO	2	14	39	55	0.04	0.25	0.71
		TT	TC	CC		TT	TC	CC
	ALL	23	75	41	139	0.17	0.54	0.29
MSTN	TBE_SP	3	16	20	39	0.08	0.41	0.51
	TBE_EN	9	23	0	32	0.28	0.72	0.00

10

【0110】

予想される中立遺伝的浮動からの逸脱を測定するために、標本コホートにおける4種のSNPに関するハーディ-ワインベルク平衡(HWE)からの逸脱が検討された。HWEからの逸脱は選択の指標であってもよく、アレル頻度を示された集団における遺伝子型の予想される分布を変化させてもよい。この情報は、遺伝子型頻度を正しく割り当て、パフォーマンスの検定を可能にするために必要である。

20

【0111】

表8-ALL(TBすべて)；AFF(非エリートおよびエリートスプリンター)；UNAFF(非エリートおよびエリートエンデュアランス)におけるハーディ-ワインベルク平衡からの逸脱に関する検定

【0112】

【表 8】

CHR	SNP	TEST	A1	A2	GENO	O(HET)	E(HET)	P
4	PDK4_38973231	ALL	A	G	24/64/57	0.4414	0.4741	0.3872
4	PDK4_38973231	AFF	A	G	18/41/24	0.494	0.4974	1
4	PDK4_38973231	UNAFF	A	G	6/23/33	0.371	0.4052	0.5332
10	CKM_15884567	ALL	G	A	3/24/109	0.1765	0.1963	0.2033
10	CKM_15884567	AFF	G	A	1/10/70	0.1235	0.1372	0.3553
10	CKM_15884567	UNAFF	G	A	2/14/39	0.2545	0.2737	0.6188
22	COX4I2_22684390	ALL	C	T	14/74/47	0.5481	0.4701	0.06812
22	COX4I2_22684390	AFF	C	T	4/44/32	0.55	0.4388	0.03941
22	COX4I2_22684390	UNAFF	C	T	10/30/15	0.5455	0.4959	0.5891
18	MSTN_66493737	ALL	T	C	23/75/41	0.5396	0.4916	0.3022
18	MSTN_66493737	AFF	T	C	3/16/20	0.4103	0.405	1
18	MSTN_66493737	UNAFF	T	C	9/23/0	0.7188	0.4604	0.001815

【0113】

エリートサラブレッド亜集団のCOX4I2_22684390-C/Tにおいて、HWEからの逸脱が確認された。従って、エリートレース馬のTT遺伝子型の過剰提示を説明するための検定において遺伝子型頻度が調整されてもよい。また、HWEからの逸脱は、エリートエンデュアランスサラブレッドコホートのMSTN_66493737-T/Cにおいても確認された。従って、エリートエンデュアランスレース馬のCC遺伝子型の過小提示を説明するための検定において遺伝子型頻度が調整されてもよい。

【0114】

実施例3—サラブレッド馬におけるエリート（グループレース勝利）パフォーマンスに関する多遺伝子予測検定

本発明は1以上の運動反応遺伝子におけるSNPの存在または不在に基づいてサラブレッド競走馬の競技パフォーマンスを予測するための簡単なDNAを基礎にした方法（遺伝子型検定）を提供する。運動反応遺伝子は付録に列挙された遺伝子の中の1以上であってもよい。たとえば、遺伝子型検定はPDK4、CKM、COX4I2、COX4I1、MSTN、ACSS1、ACTN2またはPTGS1遺伝子の中の1以上におけるSNPに基づいていてもよい。サラブレッド馬の競技パフォーマンスを予測するために使用されてもよいいくつかのSNPの詳細は付録に示される。遺伝子型検定がいずれか1以上のこれらのSNPの組み合わせに基づいていてもよいことは理解されるであろう。

【0115】

図3では、運動中のエネルギー生産に貢献する3つの主要代謝経路、ならびに優れた競

走パフォーマンスに関連した3つの遺伝子(CKM、COX4I2およびPDK4)の経路における位置および機能が示される。この限定的でない実施例において、既知の機能の知識、運動に反応して骨格筋で遺伝子が発現されるという知識および先の実施例2の結果を使用して、本発明者らはPDK4、COX4I2およびCKM遺伝子におけるサラブレッド馬における優れたパフォーマンスをSNPに基づいて予測するための、簡単な、DNAを基礎にした遺伝子型検定を開発した。

【0116】

COX4I2 SNP (COX4I2__22684390 (C/T) SNP)

このSNPは、www.broad.mit.edu/mammals/horse/で調べることができるウマゲノム配列(Equus caballus 2.0版)のウマ(Equus caballus)のクロモソーム22上22,684,390bp位置フォワード鎖に位置する。

【0117】

ウマゲノムEquCab2アセンブリは6.79xにおける全ゲノムショットガン(WGS)アセンブリであり、2007年9月に公開された。'Twilight'という名の雌サラブレッドがゲノム配列決定のための代表的なウマとして選択された。プロジェクト調整およびゲノム配列決定およびアセンブリはBroad Instituteによって提供される。N50サイズは、アセンブルしたゲノムの50%がN50サイズまたはそれより長いブロックで存在するような長さである。コンティグのN50サイズは112.38kbであり、すべてのコンティグの全長は2.43Gbである。スカホールドのコンティグ間のギャップが含まれる場合、アセンブリの全長は2.68Gbである。ウマEquCab2は、標準Ensembl哺乳動物パイプラインを使用してアノテーションされた。脊椎哺乳動物およびウマ蛋白質に由来する予測は無脊椎哺乳動物に由来する予測に対して優先させている。予測のセットはヒトおよびマウスの1:1相同遺伝子に比較されて、ウマアノテーションにおいて欠損した相同遺伝子はexonerateを使用して発見されている。ウマおよびヒトcDNAは蛋白質に基づいた予測にUTRを添加するために使用されている。最終遺伝子セットは20,737蛋白質-コーディング遺伝子を含み、2,863は偽遺伝子として確認され、1,580はレトロトランスポゾン遺伝子として分類された。

【0118】

SNPの付加的な詳細は以下の通りである：

○SNP: COX4I2__22684390 (C/T) P=0.03098 OR=0.5778

○EquCab2.0 SNP_ID: BIEC2-617568

○SNPのゲノム位置: インترون2

○置換型: 転移

○SNPはグルコルチコイド反応要素(GRE)結合部位(C/TGTT)を崩壊させる。好ましいアレル(T)は部位(TGT)を保持し、従ってGRE結合を可能にし、遺伝子の発現を増大させる。好ましくないアレル(C)は部位(CGT)を崩壊させ、それゆえGRE結合を不可能にし、遺伝子の発現を増大させない。あるいは、SNPはp53腫瘍抑制剤結合部位(CAC/TG)を崩壊させる。好ましいアレル(T)は部位(CATG)を保持し、それゆえp53結合を可能にし、ミトコンドリア生合成に貢献する。好ましくないアレル(C)は部位(CACG)を崩壊させ、それゆえp53結合を不可能にし、ミトコンドリア生合成に貢献しない。

【0119】

隣接配列およびSNP(太字および角括弧)は以下の通りである：

GCTGGGCGATCCTGGGGACATAAAAGTGAATCACCTGGAT
GGTTCTTTGCCCTCAGGGTGCTCCAGTCCAGTGGGGGAAC
CAACACAAGCCAGATAACTGTAAATATAGGATATGTGGCG
AGGGTGAAGTGTGTTCAAGGGGCTGTGAGGACCCAAAGGA

G A G A G A G A T G A A A T C C T G G T G G G C C T T C C A G A G G A G G G C A
 [T/C] G T T C T A G T T G A C C T T G A A T G G T G A G G C T G A G G G T G
 C T G C C A G G T G G T G G G A A C A G C A T G G G T A A G G G T A T G G G A G
 C G G A A G A G C A T G G A G G G T C C T A G G C A T C A G T A A G T G C T G T
 A G G G G A A G G A A C A G A G A G A G G C G G T G A G G T G G C C A G G A A A
 G A A G G G G G C C T G A C C C T G G G G A G C A G G A G G G A T G T G T G A C
 T C C A A

(SEQ ID No. 2)

CKM SNP (CKM__15884567 (G/A) SNP)

このSNPは、www.broad.mit.edu/mammals/horse/で調べることができるウマゲノム配列 (Equus caballus 2.0版) のウマ (Equus caballus) のクロモソーム10上15,884,567bp位に位置する。

【0120】

ウマゲノム EquCab2 アセンブリは6.79xにおける全ゲノムショットガン (WGS) アセンブリであり、2007年9月に公開された。"Twilight"という名の雌サラブレッドがゲノム配列決定のための代表的なウマとして選択された。プロジェクト調整およびゲノム配列決定およびアセンブリはBroad Instituteによって提供される。N50サイズは、アセンブルしたゲノムの50%がN50サイズまたはそれより長いブロックで存在するような長さである。コンティグのN50サイズは112.38kbであり、すべてのコンティグの全長は2.43Gbである。スカホールドのコンティグ間のギャップが含まれる場合、アセンブリの全長は2.68Gbである。ウマ EquCab2 は、標準 Ensembl 哺乳動物パイプラインを使用してアノテーションされた。脊椎哺乳動物およびウマ蛋白質に由来する予測は非脊椎哺乳動物に由来する予測に対して優先されている。予測のセットはヒトおよびマウスの1:1相同遺伝子に比較されて、ウマアノテーションにおいて欠損した相同遺伝子はexonerateを使用して発見されている。ウマおよびヒトcDNAは蛋白質に基づいた予測にUTRを添加するために使用されている。最終遺伝子セットは20,737蛋白質-コーディング遺伝子を含み、2,863は偽遺伝子として確認され、1,580はレトロトランスポゾン遺伝子として分類された。

【0121】

SNPの付加的な詳細は以下の通りである：

○SNP：CKM__15884567 (G/A) P=0.02066 OR=0.4089

○EquCab2.0 SNP_ID：BIEC2-109575

○SNPのゲノム位置：イントロン4

○置換型：転移

○SNPはインターフェロン調節因子結合部位 (GCA/GA) を崩壊させる。Aアレルは部位 (CAA) を保持する。Gアレルは部位 (CGA) を崩壊させる。

【0122】

隣接配列およびSNP (太字および角括弧) は以下の通りである：

C T G T C C C T A A C A G A C C T G G A C C T T G G C C C C G T G G A G G T C C
 T A A A G G C R A C T A T A C G C G A T G T A A A C C C A A A T T C A T G A C A
 T C C C C T G A A G C A T G C T C T T C C C C T G T C T G C C C G G G T C C C C
 G G A A C A G C C A C C C C A A G T G C T C T C T C C C A A G T G G A C T C T C
 C C T T C A C A C C C T G C C C C T C G C A T C C A G T G C A C C G G C A A G C
 [A/G] A C A C T A T C C C G G T G C C C A C T C C A G A A A G T C A A T G T
 C T C A G G A A T C T G G G G A G C C A T C A G T C A A A A T T A C T A T C A T
 A C A G T A T A T A T A G G A T T C G C A T A T A T T C C T A T G C A T A A T A
 A T T A T A C G T T T T G T G G A T A A T A A A T A T A T G T A T A T A T G C A

T A A T A T T T T A C A T A A T A T A T A C A T A T T T A T A T A C A T T T T T A T
A C A T T

(SEQ ID No. 3)

PDK4 (PDK4_38973231 (A/G) SNP)

このSNPは、www.broad.mit.edu/mammals/horse/で調べることができるウマゲノム配列 (Equus caballus 2.0版) のウマ (Equus caballus) のクロモソーム4上38,973,231bp位に位置する。

【0123】

ウマゲノム EquCab2 アセンブリーは6.79xにおける全ゲノムショットガン (WGS) アセンブリーであり、2007年9月に公開された。'Twilight' という名の雌サラブレッドがゲノム配列決定のための代表的なウマとして選択された。プロジェクト調整およびゲノム配列決定およびアセンブリーはBroad Instituteによって提供される。N50サイズは、アセンブルしたゲノムの50%がN50サイズまたはそれより長いブロックで存在するような長さである。コンティグのN50サイズは112.38kbであり、すべてのコンティグの全長は2.43Gbである。スカホールドのコンティグ間のギャップが含まれる場合、アセンブリーの全長は2.68Gbである。ウマ EquCab2 は、標準 Ensembl 哺乳動物パイプラインを使用してアノテーションされた。脊椎哺乳動物およびウマ蛋白質に由来する予測は非脊椎哺乳動物に由来する予測に対して優先されている。予測のセットはヒトおよびマウスの1:1相同遺伝子に比較されて、ウマアノテーションにおいて欠損した相同遺伝子はexonerateを使用して発見されている。ウマおよびヒトcDNAは蛋白質に基づいた予測にUTRを添加するために使用されている。最終遺伝子セットは20,737蛋白質-コーディング遺伝子を含み、2,863は偽遺伝子として確認され、1,580はレトロトランスポゾン遺伝子として分類された。

【0124】

SNPの付加的な詳細は以下の通りである：

○SNP: PDK4_38973231 (A/G) P=0.001676 OR=2.2

○EquCab2.0 SNP_ID: BIEC2-903605

○SNPのゲノム位置: インترون2

○置換型: 転移

○SNPは、転写因子 (2ハンド亜鉛フィンガーホメオドメイン転写因子) 結合部位 (t_a/gtgtGTTTcaga) から4bp上流である。

【0125】

隣接配列およびSNP (太字および角括弧) は以下の通りである：

A C T T T T A A C C C T C A A C T T T C T A A C T T A A A A T T T T A T G T T T T A A
C T A T T T C C A G A G C A A T A T T C A G T T T T A T T T G G C A A A T G T T T
T C A T T T T T T T A T A G C A A A A G T A T T T A G A A A T T T T T A A G A A A
G A T T T T C A T A T T T C T T T C T A C T T C A T T C A T T C A T G T G T G G G
T A G A A G T C T C G A A A G C A G C A G T A A A G A C T A T G G A T T G A A T
[A/G] T G T G T T T C A G A T T G T C A T T G T T T A A T G G G T A T G G A
A T G C A T A T A T T T C T T G A A T C A A T G A A C A A A A C G C T G T A T A
G T C A G C A G A T T A G G G T G A G G C T C T G G T G C A T A T C T G C T G C
A G T G C A T A T C C T G G C T C T A T T C T C T G A A A A T C T G C T C T T G
T G G G T C A T C T A C C C T C T C T A A G C T T M A G C A C C C T T A T T T G
T T A A A

(SEQ ID No. 4)

リスク予測

複雑な形質に関する 'リスク' の予測は、相加遺伝分散が小さい場合、単一遺伝子SN

10

20

30

40

50

Pに頼るよりむしろ、形質に貢献する複数の遺伝子を検定することによって非常に高められる（Yangら 2003）。しかし、効果が大きい場合（すなわち高オッズ比）、単一SNPが使用されてもよい。（HWEにおけるSNPに対する）集団アレル頻度または（HWEから逸脱したSNPに対する）観察された遺伝子型頻度およびベイズの定理（Bayes Theorem）を使用した亜集団予測に基づいて、本発明者らはPDK4、CKMおよびCOX4I2遺伝子における配列変異体に対して、ある種の遺伝子型の組み合わせを与えられた1種または他の亜集団（エリートおよび非エリート）のメンバーである確率を検討した。結果は、2つの亜集団のそれぞれのメンバーである確率の百分率として、以下の表9に提供される。

【0126】

10

表9－遺伝子PDK4、CKMおよびCOX4I2におけるSNPを使用した優れた競走能力に関する予測検定（遺伝子型組み合わせは、レース能力に関して「最も好ましい」から「最も好ましくない」までランク付けされる）

【0127】

【表 9 A】

				TBE							TBO					
				集団1 : アレル、遺伝子型頻度							集団2 : アレル、遺伝子型頻度					
	AA	AB	BB	A	AA	AB	BB	P(G C)		A	AA	AB	BB	P(G C)		
遺伝子座																
PDK4	1			0.464	0.22	0.50	0.29	0.22		0.282	0.08	0.41	0.52	0.08		
COX4I2			1	0.325	0.05	0.55	0.40	0.40		0.455	0.21	0.50	0.30	0.30		
CKM			1	0.074	0.01	0.14	0.86	0.86		0.164	0.03	0.27	0.70	0.70		
					P(G C)			0.074							0.02	
PDK4	AA	AG	GG		P(C)			0.5							0.5	
COX4I2	CC	CT	TT		P(G C)P(C)			0.037							0.01	
CKM	GG	GA	AA													
					P(C G)			0.817							0.18	
					観察された集団遺伝子型頻度およびベイズの定理に基づいた遺伝子型からの亜集団予測											
	PDK4	COX4I2	CKM		TBE	TBO										
	AA	TT	AA		0.82	0.18										
	AA	CT	AA		0.79	0.21										
	AG	TT	AA		0.67	0.33										
	AA	TT	GA		0.65	0.35										
	AG	CT	AA		0.63	0.37										
	AA	CT	GA		0.60	0.40										
	GG	TT	AA		0.48	0.52										
	AG	TT	GA		0.45	0.55										
	AA	CC	AA		0.44	0.56										
	AA	TT	GG		0.44	0.56										
	GG	CT	AA		0.43	0.57										
	AG	CT	GA		0.40	0.60										
	AA	CT	GG		0.38	0.62										
	AG	CC	AA		0.27	0.73										
	GG	TT	GA		0.27	0.73										
	AA	CC	GA		0.25	0.75										
	AG	TT	GG		0.25	0.75										
	GG	CT	GA		0.23	0.77										
	AG	CT	GG		0.22	0.78										
	GG	CC	AA		0.14	0.86										
	AG	CC	GA		0.13	0.87										

【0128】

【表 9 B】

	GG	TT	GG			0.13	0.87									
	AA	CC	GG			0.11	0.89									
	GG	CT	GG			0.11	0.89									
	AG	CC	GG			0.06	0.94									
	GG	CC	GA			0.06	0.94									
	GG	CC	GG			0.03	0.97									

【0129】

表中、PDK4の場合、AAは遺伝子型AAを表し、ABは遺伝子型AGを表し、そし

10

20

30

40

50

てBBは遺伝子型GGを表す；COX4I2の場合：AAは遺伝子型CCを表し、ABは遺伝子型CTを表し、そしてBBは遺伝子型TTを表す；そしてCKMの場合：AAは遺伝子型GGを表し、ABは遺伝子型GAを表し、そしてBBは遺伝子型AAを表す。

【0130】

表9から、これらの3種の遺伝子における遺伝子型の最も好ましい組み合わせは、PDK4、COX4I2およびCKMそれぞれに対して、AA、TT、AAであることを理解することができ（エリートレース馬である82%の確率、非エリートである18%の確率）、そしてこれらの3種の遺伝子における遺伝子型の最も好ましくない組み合わせは、PDK、COX4I2およびCKM4それぞれに対して、GG、CC、GGである（エリート競走馬である3%の確率、非エリートである97%の確率）。

10

【0131】

リスク予測検定は付録に列挙された1以上のSNPを使用して実施されてもよい。

【0132】

実施例4－SNPとハンディキャップレーティング（RPR）との定量的関連

レーシングポストレーティング（Racing Post Ratings）（RPR）は、レースレベル、フィールドの特性、負担重量およびレースのタイムに関して、指定されたレースにおけるウマの全体的パフォーマンスによって決定されるハンディキャップレーティングである。RPRはスピードレーティングに直接匹敵せず、むしろレーティングは、ウマがハンディキャップで負担することを要求されることになる重量を表すことを意図する。たとえば、同じ年齢および性のウマに制限されるレースでは、レーシングポストレーティング120のウマは、ハンディキャップでは、117のレーティングのウマより3ポンド多く負担することになる。オープンレースでは、セックスアローワンスおよび馬齢重量アローワンスが計算に入れられる。従って、ハンディキャップでは120ポンドを負担するウマが一馬身差で128ポンドを負担するウマに勝つ場合、128ポンドを負担するウマは一般に、120ポンドを負担するウマより6または7ポンド高いレーシングポストレーティングを与えられることになる。異なる部門のレース勝ち馬に対して満足できるレーティングを決定することに役立つ指針値は以下の表10に示される。

20

【0133】

表10－勝ち馬に対するRPR指針

【0134】

30

【表10】

	2歳馬	3歳馬	4歳馬以上
グループ1	120	125	130
グループ2	115	117	120
グループ3	105	110	115
準重賞レース	95	105	110
未勝利馬	80	85	---

40

【0135】

本発明者らは、定量的関連検定解析において競技パフォーマンスと有意な関連を示しているSNPのいくつかとRPRとの間に有意な関係があるかどうかを調べた。

【0136】

表11－RPRと有意な関連を有するSNP

【0137】

【表 1 1】

CHR	SNP	STAT	EMP1	NP
4	PDK4_38973231	8.095	0.005052	4750
4	PDK4_38969307	6.825	0.009441	2541
3	COX4I1_32772871	6.748	0.009681	2478

【0 1 3 8】

以下の表 1 2 は、上記の表 1 1 に列挙された 3 つの有意に関連した S N P のそれぞれの遺伝子型に対する平均 R P R を示す。

10

【0 1 3 9】

表 1 2 - 表 1 1 に由来する S N P のそれぞれの遺伝子型に対する平均 R P R

【0 1 4 0】

【表 1 2】

CHR	SNP	値	G11	G12	G22
4	PDK4_38973231	遺伝子型	A/A	A/G	G/G
4	PDK4_38973231	計数	19	46	44
4	PDK4_38973231	頻度	0.1743	0.422	0.4037
4	PDK4_38973231	平均値	99.95	97.7	80.3
4	PDK4_38973231	標準偏差	33.78	28.9	28.85
4	PDK4_38969307	遺伝子型	A/A	A/C	C/C
4	PDK4_38969307	計数	16	42	42
4	PDK4_38969307	頻度	0.16	0.42	0.42
4	PDK4_38969307	平均値	97.19	99.21	79.9
4	PDK4_38969307	標準偏差	36.23	28.06	28.45
3	COX4I1_32772871	遺伝子型	T/T	T/C	C/C
3	COX4I1_32772871	計数	13	42	50
3	COX4I1_32772871	頻度	0.1238	0.4	0.4762
3	COX4I1_32772871	平均値	100.6	99.71	83.3
3	COX4I1_32772871	標準偏差	29.46	28.92	30.49

20

30

40

【0 1 4 1】

上記の表 1 2 では、P D K 4 _ 3 8 9 7 3 2 3 1 - (A / G) において、A A 遺伝子型は 9 9 . 9 5 の平均 R P R を有し、A G 遺伝子型は 9 7 . 7 の平均 R P R を有し、そして G G 遺伝子型は 8 0 . 3 の平均 R P R を有する。従って本発明者らは、A A および A G 遺伝子型はより高い R P R と相関する好ましい遺伝子型であると結論する。C O X 4 I 1 _ 3 2 7 7 2 8 7 1 - (C / T) において、T T 遺伝子型は 1 0 0 . 6 の平均 R P R を有し、C C 遺伝子型は 9 9 . 7 1 の平均 R P R を有し、そして C C 遺伝子型は 8 3 . 3 の平均

50

R P Rを有する。従って本発明者らは、T TおよびT C遺伝子型はより高いR P Rと関連する好ましい遺伝子型であると結論する。

【0142】

COX4I1 SNP (COX4I1_32772871 (C/T) SNP)

このSNPは、www.broad.mit.edu/mammals/horse/で調べることができるウマゲノム配列 (Equus caballus 2.0版) のウマ (Equus caballus) のクロモソーム3上32, 772, 871bp位に位置する。

【0143】

ウマゲノムEquCab2アセンブリーは6.79xにおける全ゲノムショットガン (WGS) アセンブリーであり、2007年9月に公開された。'Twilight'という名の雌サラブレッドがゲノム配列決定のための代表的なウマとして選択された。プロジェクト調整およびゲノム配列決定およびアセンブリーはBroad Instituteによって提供される。N50サイズは、アセンブルしたゲノムの50%がN50サイズまたはそれより長いブロックで存在するような長さである。コンティグのN50サイズは112.38kbであり、すべてのコンティグの全長は2.43Gbである。スカホールドのコンティグ間のギャップが含まれる場合、アセンブリーの全長は2.68Gbである。ウマEquCab2は、標準Ensembl哺乳動物パイプラインを使用してアノテーションされた。脊椎哺乳動物およびウマ蛋白質に由来する予測は非脊椎哺乳動物に由来する予測に対して優先されている。予測のセットはヒトおよびマウスの1:1相同遺伝子に比較されて、ウマアノテーションにおいて欠損した相同遺伝子はexonerateを使用して発見されている。ウマおよびヒトcDNAは蛋白質を基礎にした予測にUTRを添加するために使用されている。最終遺伝子セットは20, 737蛋白質-コーディング遺伝子を含み、2, 863は偽遺伝子として確認され、1, 580はレトロトランスポゾン遺伝子として分類された。

【0144】

SNPの付加的な詳細は以下の通りである：

○SNP：COX4I1_32772871 (C/T) EMP1=0.009681

○EquCab2.0 SNP_ID：BIEC2-816028

○SNPのゲノム位置：イントロン

○置換型：転移

隣接配列およびSNP (太字および角括弧) は以下の通りであり、ここでMはAまたはCである：

TCAGGTCTCAGTCCGACCCAGAGCTGGATGGAGCCAGCGCA
GCTCCATCTCTCAGTGGCTGGGAGTGGGCTGCAGGGTGGT
CCTCACACAAGATGGGCACCTCCCTCCTGGGCTCCATCCC
AGGACTGTTTCCAGGTTTGGGAAACTGGCTCGCATTAGC
CGAGTGGCGTGAGCCGGAATMTGATTTACTCACAGTGCGC
[T/C] GTGCTTGGTGGGGAACGACTTCCCTGCTTTGTACA
GCACCCCTGCGTTTCCAGTGGTGGTGGTCTGGTCACTAGT
CTTTTATCAAGAGATAGTATAGTGAAGGTTAGGTCAAGGA
AAAGGGAACCTCTGACTTGTCAAGAGGGCTGTTTGAACCTGTA
TGGGGACTGCATCTCGATAACCAAGGATTCTGGGTCTCCAG
ACCCA

(SEQ ID No. 32)

定量的関連検定解析において、このSNPはR P Rと有意に関連する。

【0145】

実施例5-サラブレッド馬における優れた短距離レースパフォーマンスの遺伝子予測検定

サラブレッド馬は短距離 (< 1, 500m) および長距離 (> 1, 800m) レースの

10

20

30

40

50

両方において秀でている。中距離レースで競走するウマ（‘マイラー’および‘中距離馬’）は、‘スプリンター’または‘ステイヤー’のいずれかであると見なされてもよく、騎手により遂行されるレースのやり方はしばしば調教師が認めたウマの全力疾走能力および持久力を反映する。産業内では、ウマはそれらの馬格（*conformation*）に基づいてスプリンターとして記載されてもよく、通常、肥りやすく、より筋肉質の体格を有し、より早く成熟する。それらは通常2歳馬として、そしてより短い距離を3歳馬としてレースを行う。長距離動物であると認められた個体は、成熟にいつその時間を必要とし、3歳馬として長距離を走る‘バックヤード（*backyard*）’と呼ばれてもよい。ある地域（たとえばオーストラリア）では、ブリーダーはより速い‘短距離’型のウマだけを繁殖させることを企てる。

10

【0146】

ある側面では、本発明は1以上の運動反応遺伝子におけるSNPの存在または不在に基づいて、サラブレッド競走馬の優れた短距離レースパフォーマンスを予測するための、簡単なDNAを基礎にした方法（遺伝子型検定）を提供する。運動反応遺伝子は付録に列挙された1以上の遺伝子であってもよい。たとえば、遺伝子型検定はMSTN、ACN9、PTPN1、PON1、ADHFE1、またはGSN遺伝子の中の1以上におけるSNPに基づいていてもよい。サラブレッド競走馬の優れたレースパフォーマンスを予測するために使用されてもよいいくつかのSNPの詳細は付録に示される。遺伝子型検定がこれらのSNPのいずれか1以上の組み合わせに基づいていてもよいことは理解されるであろう。

20

【0147】

この限定的でない実施例では、本発明者らはMSTN遺伝子を研究した。

【0148】

方法

関連標本

国際競馬統括機関連盟（*International Federation of Horseracing Authorities*）は5つの距離カテゴリーを認めている：短距離（5～6.5 f、 $\leq 1,300$ m）、マイル（6.51～9.49 f、1,301～1,900 m）、中距離（9.5～10.5 f、901～2,112 m）、長距離（10.51～13.5 f、2,114～2,716 m）および超長距離（ > 13.51 f、 $> 2,717$ m）レース（*International Federation of Horseracing Authorities Classification*, www.horseracingintfed.com）[注：1ファールング＝1/8マイル＝201.2メートル]。ケースコントロール調査の場合、本発明者らは2つのコホートを比較した：標本は短距離（ ≤ 8 fおよび ≤ 7 f）および長距離（ > 8 f）レースコホートに細分化された。動物の過度な血縁関係（2世代以内）および血統内の評判のよい種馬（*sire*）の過剰提示を回避するために、1998～2008年の間に、アイルランドおよびニュージーランドにおいてサラブレッド訓練、繁殖および販売機関から、オーナーのインフォームドコンセントを得て収集された大規模なDNA標本リポジトリ（ $n > 1,000$ ）から、サラブレッドDNA標本セット（ $n = 148$ ）が選択された。

30

40

【0149】

レプリケーション標本

パフォーマンスに対する非遺伝的影響を最少化するために、2004～2008年の間に、アイルランドにおいて同じトレーナーによって訓練されたウマに由来するDNA標本（ $n = 142$ ）のリポジトリから選択されたエリート（グループレースおよび準重賞レースに勝利）競走馬標本（ $n = 39$ ）の遺伝子型を判定することにより、結果が実証された。このリポジトリのサブセット（ $n = 142$ ）は、2歳の競走馬における競馬場成功のパラメータにより、遺伝子型傾向を評価された。レースレコードは3つの供給源：ヨーロッパレースレコード、レーシングポストオンラインデータベース（*Racing Post*

50

online database) (www.racingpost.co.uk) ; オーストラレーシアおよび東南アジアレースレコード、Arion Pedigrees (www.arion.co.nz) ; ならびに北米レースレコード、Pedigree Online Thoroughbred データベース (www.pedigreequery.com) に由来した。レプリケーション標本には、解析で明らかにされた血縁関係の一部共有があった。

【0150】

DNA抽出、リシークエンシングおよび遺伝子型判定

ゲノムDNAは、標準フェノール／クロロホルム法の改変版 (Sambrook & Russell 2001) を使用して、新鮮な全血または体毛標本のいずれかから抽出された。webを基礎にしたプライマー設計ツールPrimer3に対するPCR suiteエクステンション (Rozen & Skaletsky 2000; van Baren & Heutink 2004) を使用して、13対の重複するPCRプライマーを設計し、全MSTNゲノム配列をカバーした (表13)。サラブレッド特異的配列変異体を確認するために、リシークエンシングパネルには24の関連のないサラブレッドDNA標本が含まれた。そのようなものとして本研究はサラブレッド集団においてMAF>0.05のSNPの95%を検出するように強化された (Kruglyak & Nickerson 2001)。PCR産物の2方向DNA配列決定はMacrogen Inc. (Seoul, Korea) に海外委託し、AB 3730x1シークエンサーを使用して実行された (Applied Biosystems, Foster City, CA)。配列変異体はConsed 19.0版 (090206) [Gordon ら 1998] を使用したアラインメント後に配列の目視検査によって検出された。遺伝子型判定は、San Diego, USA (関連標本) およびHamburg, ドイツ (レプリケーション標本) において、Sequenom社のSequenom (San Diego, USA) iPLEX技術を使用して実行された。

【0151】

統計解析

関連の検定を含むすべての統計解析は、PLINK 1.05版 (Purcell ら 2007) を使用して実施された。品質管理分析は標本アレル頻度、欠損遺伝子型の割合 (百分率) およびHardy-Weinberg平衡からの逸脱の計算を包含した。一連のケースコントロール関連検定は2つの遺伝子座 (g. 66493737C>Tおよびg. 66494218A>C) に対して実施された。統計的有意性は、傾向に関するコクランアーミテージ検定および無条件 (unconditioned) 遺伝子型モデルを使用して評価された。オッズ比および95% CIは2つの最も有意な関連に関して計算された。線形回帰モデルを使用して、表現型：最適レース距離およびkg/cm比を使用した遺伝子座g. 66493737C>Tにおける定量的形質関連を評価した。

【0152】

結果

ウマ、とりわけサラブレッドは、他の哺乳動物種 (30~40%) に比較して、体重に対する非常に高い筋肉量比 (55%) を有する (Gunn 1987)。ミオスタチン遺伝子 (MSTN) 変異体は以前に筋肉肥大に貢献することが示されている; 従って、クロモソーム18上に3つのエキソンと全長6, 172bpを含むウマMSTN遺伝子 (リバース鎖nt 66489608-66495780、EquCab2.0) の配列変異が検討された。現在まで、サラブレッド馬のゲノムMSTN配列において配列変異体は報告がなく、EquCab2.0 SNPデータベースにおいてMSTN SNPは実証されていない。3つのエキソンすべておよび5' 上流領域の288bpにわたる14の重複プライマー対 (表13) を使用して14頭の非関連サラブレッド馬におけるウマMSTN遺伝子をリシークエンシングすることにより、新規な配列変異体を確認された。エキソン配列変異体は検出されなかったが、MSTNのイントロン1 [nt 66492979-66494807] において6つのSNPが検出された (表14)。

【0153】

集団遺伝多様性解析は、MSTN遺伝子を含む領域の選択がサラブレッド集団において効果的であることを示唆する。関連のないサラブレッド ($n=106$) の3つの集団、Akhal-Teke ($n=18$)、Connemara ($n=17$) およびTuva ($n=17$) 馬において、ウマクロモソーム18にまたがる13のマイクロサテライト遺伝子座の遺伝子型判定が行われた。サラブレッドでは、連鎖不平衡の評価はMSTN遺伝子に最も近い2つの遺伝子座、TKY101 ($nt. 63528459$) およびTKY016 ($nt. 66838920$) を包含する保存されたハプロタイプを示した。集団の中で、 F_{ST} によってランク付けられた場合、ゲノムワイド遺伝子座のトップ10%の中にあるTKY101 ($F_{ST}=0.23$) において分化 (F_{ST}) が高かった。興味深いことに、ミオスタチンの重要なシグナリング分子であるアクチビンA受容体、IIA型をコードするACVR2Aに最も近いTKY303 ($nt. 31.1Mb$; $F_{ST}=0.31$) の F_{ST} スコアが、クロモソーム18上で最も高い F_{ST} スコアであった。MSTNから350bpに位置するTKY016の高い F_{ST} は、サラブレッドおよび非サラブレッド集団間の多岐にわたるアレル頻度分布に起因し、そして距離コホート ($TBE \leq 8f$; $n=25$ および $TBE > 8f$; $n=22$) へのサラブレッド標本の再分布は、アレル144頻度 ($TBE \leq 8f = 70\%$; $TBE > 8f = 45\%$) における有意な差 (ピアソンのカイ二乗検定; $\chi^2 = 5.809$; $df = 1$; $P = 0.0159$) を確認した。

10

【0154】

MSTN配列変異体と競走表現型間の関連を検討するために、本発明者らは $n=148$ のサラブレッド馬の遺伝子型を判定した。サラブレッドでは、6つのMSTN配列多型の中の4つが $MAF < 0.05$ を提示し (表15)、関連解析から排除された。後ろ向き競馬場パフォーマンスに基づいて、関係のない動物を含む別個のコホートにサラブレッドを分類することによって、集団を基礎にした一連のケースコントロール調査が実施された (表16)。解析に使用される2つのSNP ($g. 66493737C > T$ および $g. 66494218A > C$) における個々の遺伝子型は、一度もレースに勝ったことがないサラブレッド (Thoroughbred-other、TBO) より、エリートグループレース勝利サラブレッド (Thoroughbred-elite、TBE) ではいっそう共通でない (表17)。さらに、後ろ向き競走能力を反映するハンディキャップレーティングが定量的表現型として評価される場合、関連は検出されなかった。しかし、短距離および長距離競走に対する筋力パワーの相対的貢献を検討する場合、エリートグループレース勝利動物は $\leq 8f$ ($n=51$) の距離のそれらの最適レースに勝利したものと、 $> 8f$ ($n=35$) の距離のそれらの最適レースに勝利しているものに細分化され、極めて有意な差が見出された。[注: 1ファールロング = $1/8$ マイル = 201.2メートル]。イギリス (Britain) では、1年につき139のグループレースの中で、57%が ≤ 1 マイルの距離を走り、そして43%が > 1 マイルの距離を走る。エリートパフォーマンスコホートには、短距離 ($\leq 8f$, $n=39$) レースおよび長距離 ($> 8f$, $n=32$) レースを優先的に競う動物のサブセット ($n=71$) が含まれた。

20

30

【0155】

すべての解析に対して、関連の有意性は $g. 66494218A > C$ より、 $g. 66493737C > T$ に対して高く、これらのSNP間の連鎖不平衡は相対的に高い ($r^2 = 0.50$)。ロジスティック回帰モデルを使用するそれぞれのSNPに対するコンディショニングは、 $g. 66494218A > C$ に対する $g. 66493737C > T$ の独立した効果 ($P = 0.0108$) を確認したが、 $g. 66493737C > T$ に対する $g. 66494218A > C$ の効果は確認できず ($P = 0.7388$)、従って $g. 66493737C > T$ の結果だけがさらに検討された。2つの距離コホートの中で、本発明者らは $g. 66493737C > T$ との極めて有意な ($P = 3.70 \times 10^{-5}$) 関連を見出し、短距離コホートが $\leq 7f$ のそれらの最適レースに勝利している動物 ($n=43$) にさらに細分化される場合、この関連はわずかに、より強くなった ($P = 1.88 \times 10^{-5}$) (表17a)。

40

50

【0156】

Cアレルは4.54のオッズ比(95%CI: 2.23~9.23)に対応して、長距離(>8 f)コホートより短距離(≤ 7 f)コホートにおいて、2倍頻度が高かった(それぞれ0.72および0.36)。すべてのサラブレッドが一緒に検討される場合、遺伝子座は予測されたHardy-Weinberg比率に従った(表18)。しかし、長距離コホートでは、おそらくこの遺伝子座での選択に起因してHWEからの有意な($P=0.0018$)逸脱があった。逆に、C/C遺伝子型はスプリンター(≤ 7 f、 $> 51\%$)の中では最も一般的な遺伝子型であった。遺伝子型傾向効果は、傾向モデルに関するコクラン-アーミテージ検定を使用して、一般的なホモ接合、ヘテロ接合、およびまれなホモ接合遺伝子型に関する効果の大きさにおける線形傾向に関連したリスクを推測することによってモデル化された。最も簡潔なモデルは、遺伝子型が競走距離の予測に役立つことを示す遺伝子型モデル($P=1.18 \times 10^{-6}$)であった(表17b)。

10

【0157】

表13: ウマミオスタチン(MSTN)遺伝子におけるSNP発見に関するPCRプライマーの詳細

【0158】

【表 1 3 A】

アンプリコン	プライマー配列 (5')	プライマー配列(3')	PCR 産物 サ イ ズ (bp)	Chr 位 置 (EquCab2.0)	確認された SNPの数
MSTN_1	ATAAATGCAATTG TCTCAAAGTC (SEQ ID NO. 5)	CCATATGCAAGT TTCCATTCC (SEQ ID NO. 6)	399	chr18:664893 20+66489718	-
MSTN_2	TCAGCCATTGAGC CTATTTG (SEQ ID NO. 7)	ACGGTTGGCATT TAACCATC (SEQ ID NO. 8)	422	chr18:664896 29+66490050	-
MSTN_3	GGAGACTTGCTTT CATTTACCTG (SEQ ID NO. 9)	GAAGCTTTTGGG TGGGATTG (SEQ ID NO. 10)	552	chr18:664899 14+66490465	-
MSTN_4	CTCTGGGGTTTGC TTGGTG (SEQ ID NO. 11)	ACCTAGGGAATG GAGGATGG (SEQ ID NO. 12)	695	chr18:664903 36+66491030	-
MSTN_5	GAAGAGGAGGGA GGGAAGAG (SEQ ID NO. 13)	TTCACTCTTCAT GTGGTCTTGG (SEQ ID NO. 14)	762	chr18:664909 08+66491669	-
MSTN_7	AAGGTATTGTCAT CTGCTTGG (SEQ ID NO. 15)	CCAAGACCAGGA GAAGATGG (SEQ ID NO. 16)	783	chr18:664918 46+66492628	-
MSTN_8	GCTTGTTAGCATA GGAAACTGG (SEQ ID NO. 17)	CTGAGACCCGTC AAGACTCC (SEQ ID NO. 18)	376	chr18:664924 99+66492874	-
MSTN_9	CGTCTTTCATGGG TTTGATG (SEQ ID NO. 19)	ATGTTCTCTCCAC GGTGTCTC (SEQ ID NO. 20)	530	chr18:664928 05+66493334	1 (Indel)
MSTN_10	TGAAGGAATGAAC TGTGGATG (SEQ ID NO. 21)	GTCTGCGATCCT GCTTTACC (SEQ ID NO. 22)	580	chr18:664932 61+66493840	5
MSTN_11	TTTTGAAACTGTT GTGTCCTG (SEQ ID NO. 23)	TCATAATTGCGTT TGGTTGC (SEQ ID NO. 24)	674	chr18:664937 79+66494452	1
MSTN_12	GCAAATGCTCAAA TGACCTAAAC (SEQ ID NO. 25)	TGTGCTGATTCT TGCTGGTC (SEQ ID NO. 26)	799	chr18:664943 44+66495142	-

【 0 1 5 9 】

【表 1 3 B】

MSTN_13	TGAAGATTAGTG TTTTGTCTCC (SEQ ID NO. 27)	CGAGATTCATTG TGGAGCAG (SEQ ID NO. 28)	382	chr18:664950 28+66495409	-
MSTN_14	GAGACAACTTGCC ACACCAG (SEQ ID NO. 29)	TGCCCTGGTAAT AACAATGAAG (SEQ ID NO. 30)	786	chr18:664952 87+66496072	-

【 0 1 6 0 】

表 1 4 : 2 4 の関係の無いサラブレッド馬のパネルにおけるリシークエンシング後にウ

10

20

30

40

50

マミオスタチン遺伝子において発見されたSNPの詳細。これらのSNPはEquCab2.0 SNPマップ中のSNPの中には見られず、一般に利用可能などのような文献においても今まで報告されていない。

【0161】

【表14】

SNP ID	chr	EquCab2.0 SNP 位置	アレル1	アレル2	遺伝子 構造	アンプリ コン	置換型
MSTN_9_383-386	chr18	66493222- 66493225	delACTT		イントロン1	MSTN_9	
MSTN_10_227	chr18	66493525	T	G	イントロン1	MSTN_10	転換 (Transversion)
MSTN_10_284	chr18	66493582	T	G	イントロン1	MSTN_10	転換 (Transversion)
MSTN_10_439	chr18	66493737	T	C	イントロン1	MSTN_10	転移 (Transition)
MSTN_10_447	chr18	66493745	A	G	イントロン1	MSTN_10	転移 (Transition)
MSTN_10_477	chr18	66493775	A	G	イントロン1	MSTN_10	転移 (Transition)
MSTN_11_404	chr18	66494218	A	C	イントロン1	MSTN_11	転換 (Transversion)

【0162】

表15：MSTN SNPに関する遺伝子型判定の結果

【0163】

【表 1 5】

アッセイ(SNP_ID)	適用範囲	NA.	総数	アレ ル数	COMMON	HET	RARE	p	q	F_p	F_q (MAF)	n
MSTN_ 66493525 (SEQ ID No. 33)	96.67%	5	145	2	138	5	2	281	9	0.969	0.031	290
MSTN_ 66493582 (SEQ ID No. 34)	92%	12	138	2	135	3	0	273	3	0.989	0.011	276
MSTN_ 66493737 (SEQ ID No. 31)	93.33%	10	140	2	42	75	23	159	121	0.568	0.432	280
MSTN_ 66493745 (SEQ ID No. 35)	97.33%	4	146	2	139	6	1	284	8	0.973	0.027	292
MSTN_ 66493775 (SEQ ID No. 36)	96.67%	5	145	2	139	5	1	283	7	0.976	0.024	290
MSTN_ 66494218 (SEQ ID No. 37)	91.33%	13	137	2	59	67	11	185	89	0.675	0.325	274

【0164】

表16：それぞれのコホートに対する後ろ向き競馬場成功の詳細を含む、集団の概要

【0165】

10

20

30

40

【表 16】

	n	種馬 (sire) の数	雄の数	雌の数	平均RPR	RPR 範囲	全レ ース 数	平均 レー ス数	レー ス勝 利数	Gr レー ス勝利数	Gr1 レー ス勝利数	平均Gr レース勝 利数
TBE	86	86	37	49	115	87-134	1170	13.8	425	215	91	2.5
TBE>8f	35	35	12	23	119	107- 134	-	-	-	89	42	-
TBE≤8f	51	51	25	26	114	87-129	-	-	-	129	49	-
TBE≤7f	43	43	20	23	113	87-129	-	-	-	76	23	-
TBO	62	62	22	40	59	21-89	537	8.7	15	0	0	0

10

【0166】

表17：a. g. 66493737C>Tに関する一連のコホート比較のケースコントロール関連検定の結果。TBE：エリートグループレース勝利サラブレッド；TBO：その他の非勝利サラブレッド；TBE>8f、TBE≤8fおよびTBE≤7f：>8f、≤8fおよび≤7fの距離で最適（最も価値があるか、または最高の等級の）レースに勝利した、優れたグループレース勝利サラブレッド。それぞれのケースにおいてg. 66493737-Tアレルの頻度が示される。オッズ比は2つの最も有意な結果に対して計算された。b. ≤7fの距離の優れたグループレース勝利パフォーマンスとg. 66493737C>Tとの関連の最良適合モデルの結果。

20

【0167】

【表 17】

a.	集団1対集団2	頻度 T_集団1	頻度 T_集団2	CHISQ	P	OR
	TBE 対 TBO	0.443	0.425	0.09	0.764	-
	TBE>8f 対 TBE≤8f	0.641	0.309	17.02	3.70E-05	3.996
	TBE>8f 対 TBE≤7f	0.641	0.282	18.31	1.88E-05	4.538
	TBE>8f 対 TBO	0.641	0.425	7.76	0.005	-
	TBE≤8f 対 TBO	0.309	0.425	3.06	0.080	-
	TBE≤7f 対 TBO	0.282	0.425	4.15	0.042	-
b.		TBE>8f	TBE≤7f	P		
	遺伝子型(C/C,C/T,T/T)	0/23/9	21/23/3	1.18E-06		
	傾向(C, T)	23/41	65/29	5.23E-06		

30

【0168】

表18. 遺伝子座 g. 66493737C>T に対する Hardy-Weinberg 平衡検定の結果。

【0169】

【表 18】

検定	A1	A2	GENO	O(HET)	E(HET)	P
全体	T	C	23/75/41	0.5396	0.4916	0.3022
TBE<7f	T	C	3/16/20	0.4103	0.4050	1
TBE>8f	T	C	9/23/0	0.7188	0.4604	0.0018

40

【0170】

MSTN SNP (MSTN_66493737 (T/C) SNP)

このSNPは、www.broad.mit.edu/mammals/horse/で調べることができるウマゲノム配列 (Equus caballus 2.0版) のウマ (Equus caballus) のクロモソーム18上66,490,208-66,495,180位リバース鎖に位置する。

【0171】

50

ウマゲノム E q u C a b 2 アセンブリーは 6. 7 9 x における全ゲノムショットガン (WGS) アセンブリーであり、2007 年 9 月に公開された。'Twilight' という名の雌サラブレッドがゲノム配列決定のための代表的なウマとして選択された。プロジェクト調整およびゲノム配列決定およびアセンブリーは Broad Institute によって提供される。N50 サイズは、アセンブルしたゲノムの 50% が N50 サイズまたはそれより長いブロックで存在するような長さである。コンティグの N50 サイズは 112. 38 kb であり、すべてのコンティグの全長は 2. 43 Gb である。スカホールドのコンティグ間のギャップが含まれる場合、アセンブリーの全長は 2. 68 Gb である。ウマ E q u C a b 2 は、標準 E n s e m b l 哺乳動物パイプラインを使用してアノテーションされた。脊椎哺乳動物およびウマ蛋白質に由来する予測は非脊椎哺乳動物に由来する予測に対して優先されている。予測のセットはヒトおよびマウスの 1:1 相同遺伝子に比較され、ウマアノテーションにおいて欠損した相同遺伝子は exonerate を使用して発見されている。ウマおよびヒト cDNA は蛋白質を基礎にした予測に UTR を添加するために使用されている。最終遺伝子セットは 20, 737 蛋白質-コーディング遺伝子を含み、2, 863 は偽遺伝子として確認され、1, 580 はレトロトランスポゾン遺伝子として分類された。

【0172】

SNP の付加的な詳細は以下の通りである：

○ SNP : M S T N _ 6 6 4 9 3 7 3 7 (T / C) P = 1 . 8 8 E - 0 5 O R = 4 . 5 4

○ E q u C a b 2 . 0 S N P _ I D : E q u C a b 2 . 0 データベースでは検出されなかった。オンラインバイオインフォマティクスリソースにおける SNP の報告はない。

【0173】

○ インハウス SNP _ I D : M S T N - 1 0 _ 4 3 9

○ SNP のゲノム位置：イントロン 1

○ 置換型：転移

隣接配列および SNP (太字および角括弧) は以下の通りである：

A G C T A A G C A A G T A A T T A G C A C A A A A A T T T G A A T G T T A T A T
T C A G G C T A T C T C A A A A G T T A G A A A A T A C T G T C T T T A G A G C
C A G G C T G T C A T T G T G A G C A A A A T C A C T A G C A A T T T C T T T T
A T T T T G G T T C C C C A A G A T T G T T T A T A A A T A A G G T A A A T C T
A C T C C A G G A C T A T T T G A T A G C A G A G T C A T A A A G G A A A A T T
A [T / C] T T G G T G C A T T A T A A C C T G A T T A C T T A A T A A G G A G
A A C A A T A T T T T G A A A C T G T T G T G T C C T G T T T A A A G T A G A T
A A A G C A C T G G G T A A A G C A G G A T C G C A G A C A C A T G G C A C A G
A A T C T T T C C G T G T C A T G C C T T C T C T G T G A A G G T G T C T G T C T
C C C T T T C C T T G A G T G T A G T T A T G A A C T G A C T G C A A A A A G A
A T A T A T G

(S E Q I D N o . 3 1)

定量的形質としての最適レース距離 (BRD) を検討することにより、本発明者らは表現型として最も高い等級または最も価値のあるグループレース勝利の距離 (ファールング) を使用して、エリートコホートのデータ (n=79) を分析した。BRD は g. 66493737C>T SNP と極めて有意 (P=4. 85 x 10⁻⁸) に関連した (表 19) 。この結果は、同じトレーナーによって生み出された 37 頭のエリート競走馬 (n=27

グループレース勝ち馬および n=10 準重賞レース勝ち馬) において独立して実証された (P=0. 0047) 。それぞれの遺伝子型に対して、本発明者らは平均 BRD を測定した (表 20) : C/C 平均値=6. 2 ± 0. 8 f ; C/T 平均値=9. 1 ± 2. 4 f ; および T/T 平均値=10. 5 ± 2. 7 f 。2 ファールング増加の遺伝子型分布は図 6A から 6 に示される。アイルランドおよびイギリス (United Kingdom) で

は2歳馬のグループレースは $\leq 8 f$ に限定されるため、これらの距離に対してバイアスが導入されてもよい（ヨーロッパでは $> 8 f$ の2歳馬のグループレースは3つしかない）。従って、本発明者らは2歳馬としてただ1つのグループレースに勝利しているウマのBRDを、それらの3歳馬レースの平均距離と置き換え（ $n = 73$ ）、そのことが3つの遺伝子型の平均値におけるわずかな増大（C/C平均値 $= 6.4 \pm 1.0 f$ ；C/T平均値 $= 9.7 \pm 2.0 f$ ；およびT/T平均値 $= 10.9 \pm 2.4 f$ ）および関連の有意性における増大（ $P = 5.45 \times 10^{-9}$ ）に帰着した（図7）。

【0174】

8つのナショナルハント（障害レース、距離16～36f）競走馬はまた、 $g. 66493737C > T$ SNPに対して遺伝子型判定が行われ、結果はTアレルとスタミナとの関連を支持する（T/T、 $n = 7$ ；およびC/T、 $n = 1$ ）。さらに、持続運動能力で知られる非サラブレッド集団（ $n = 31$ 、エジプト系アラビア馬）間の遺伝子型頻度はサラブレッド集団とかなり異なった（図8）。これらの発見は一致して、C/C遺伝子型が短距離競走にとりわけ適することを示す。

【0175】

サラブレッド繁殖では、子孫の予測される最適レース距離における種馬（sire）の貢献が非常に重要であると考えられている。繁殖用種馬（stallion）にとって、‘スタミナインデックス’（S. I.）はすべての競走子孫の平均勝利距離として見積もられる。従って、本発明者らは、本発明者らの標本においてS. I.を持つ $n = 19$ の関係のない繁殖用種馬（stallion）の遺伝子型の分布を検討した（図9）。S. I. $= 6 \sim 8 f$ のすべて（100%）の種馬（stallion）はC/C遺伝子型を有し；それぞれS. I. $= 9 \sim 10 f$ および $10 \sim 12 f$ を持つ83.3%および75%の種馬（stallion）はC/Tであり；そしてS. I. $= 10 \sim 12 f$ を持つ25%の種馬（stallion）はT/Tであった。標本サイズは小さいが、 $g. 66493737C > T$ 遺伝子型が繁殖用種馬（stallion）におけるS. I.の予測に役立つという明確な徴候が見られる（図9）。

【0176】

これらのデータは、この遺伝子座における遺伝子型情報がサラブレッド馬の競走および繁殖産業において実用的な用途を有してもよいことを示す。このことをさらに評価するために、2007年と2008年（ $n = 63$ 、2007； $n = 79$ 、2008）において、同じトレーナーによる内部訓練中の $n = 142$ のウマの2歳の競走フォームが検討された。首尾一貫して、競走成功のそれぞれのパラメータに対して、C/CおよびC/T遺伝子型はT/T動物よりいっそう成功している2歳競走馬であった（表20a）。収益の点から、C/CまたはC/Tである動物に対しては訓練への投資に対する報酬が最も高く；平均でこれらのウマはT/Tのウマより5.5倍稼いだ。 $>$ スターリング（Sterling）£100,000（US\$165,000）を稼いだ個体が除外された場合でさえ、平均でC/Cの個体はT/Tの個体より1.6倍多く稼いだ。飼育および訓練費用の大半は賞金で戻らない（少なくとも1レースで走ったウマの場合、アイルランドで72%、イギリス（United Kingdom）で78%）[International Federation of Horseracing Authorities, www.horseracingintfed.com]；従って、2歳馬としてC/CおよびC/Tの個体だけを訓練し、競走させる方策を利用することが有益であってもよい。

【0177】

共有された種馬（sire）の潜在的に混乱する効果を取り除くために、同じトレーナーによって2歳馬として訓練された41頭の異母兄弟（単一種馬（sire）の子孫）[C/T、 $n = 22$ ；T/T=19]（表20c）の競走勝利が検討された。遺伝子型と競走パフォーマンスとの有意な関連（ピアソン（Pearson）の χ^2 乗検定： $\chi^2 = 7.235$ ； $df = 1$ ； $P = 0.0071$ ）が確認され；子孫の中の5頭が2歳馬グループレース勝ち馬であり、すべてがC/T遺伝子型を提示した。

【0178】

多くの場合、ブリーダーのゴールはダービー（Derby）勝ち馬を繁殖させることである。ダービー距離（12f）は、個体がg. 66493737C>Tにおいて少なくとも1コピーのTアレルを持たなければならないことを予測する。本発明者らの標本では、n=7：C/T n=6；およびT/T n=1がダービー勝ち馬であった。さらに、エプソンダービー（Epson Derby）およびアイルランドダービー（Irish Derby）の両方で勝利した、成功している繁殖業者の種馬（stallion）に由来するn=51の子孫は、遺伝子型が判定され、S. I. = 11. 3fであった。子孫の中では、たった2つの遺伝子型（n=29、C/T；およびn=22、T/T）が確認され、この個体（ここでは遺伝子型判定がされていないが）がT/Tであることを示唆した。（種馬（sire）と雌親（dam）の両方は遺伝子型判定され：種馬（sire）：T/T；雌親（dam）：C/Tであった）。本発明者らは、グループレースで勝利している種馬（stallion）のn=9の子孫の遺伝子型の平均BRDを推測し、g. 66493737C>T遺伝子型傾向（C/T：n=6；平均BRD=8f；T/T：n=3、平均BRD=10. 7f）をいっそう説得力のあるものにした。

【0179】

それらのヒト対応物と同様に、短距離競走サラブレッドは一般に長距離レースに適したウマより引き締まり、筋骨たくましい。従って、MSTN遺伝子型が体質量、き甲（withers）の重さ（mass）（kg）および高さ（cm）に影響を与えるかどうかを検討するために、2回の2歳馬競走シーズン中に同じトレーナーによる内部訓練中のn=97のウマ（n=37 雄、n=60 雌）に対して行われた測定が使用された。重さ対高さ比は、g. 66493737C>T遺伝子型との有意（P=0. 0147）な関係（2. 94kg/cm、C/C；2. 88kg/cm、C/T；および2. 83kg/cm、T/T）を提示した。雄（P=0. 0025）が雌（P=0. 2272）から独立していると見なされる場合、この関連はより強くなった（表21）。平均で、C/Cの雄はT/Tの雄よりcmあたりの重さが6. 7%（すなわち、3. 033kg/cm対2. 843kg/cm）大きかった。

【0180】

表19：定量的形質関連検定および最適レース距離（BRD）平均値：a. 関連検定標本；b. （≤8fの最適レースに勝利した2歳馬の場合）表現型として3歳馬の平均距離を使用した関連検定標本；およびc. レプリケーション標本。

【0181】

【表19】

		定量的関連検定の結果					最適レース距離平均値			
	n	BETA	SE	R2	T	P	遺伝子型	C/C	C/T	T/T
a.	79	2.308	0.381	0.322	6.052	4.85E-08	計数	21	46	12
							頻度	0.266	0.582	0.152
							平均値	6.167	9.087	10.540
							標準偏差	0.827	2.365	2.742
b.	73	2.390	0.360	0.383	6.635	5.46E-09	計数	19	42	12
							頻度	0.260	0.575	0.164
							平均値	6.421	9.682	10.930
							標準偏差	1.022	2.081	2.441
c.	37	-1.500	0.497	0.207	-3.021	0.005	計数	7	23	7
							頻度	0.189	0.622	0.189
							平均値	6.714	8.217	9.714
							標準偏差	1.704	1.930	1.890

【0182】

表20：2007年および2008年に同じトレーナーによる内部訓練中のn=142のウマに関する2歳馬競走（アイルランドおよびイギリス（United Kingdom）

m)) 成功のパラメータ。a. 2007年&2008年の内部訓練中の2歳馬；b. C／CおよびC／T対T／T遺伝子型を比較した2007年&2008年に内部訓練中の2歳馬；c：単一の種馬（s i r e）を共有する、内部訓練中の異母兄弟の2歳馬。

【0183】

【表20】

	a.	n	競走馬数	勝ち馬数	全レース数	全レース勝利数	競走馬の割合%	競走馬に 対する勝ち馬の割合%	競走馬に 対する勝利の割合%	全体に 対する勝ち馬の割合%	競争に 対する勝利の割合%	競走馬 毎の平均 レース数	総収益 (£)	平均収益 (£)	>£100kを 稼ぐ馬を除いた 平均収益	>£100kを 稼いだ馬の 数
	CC	40	21	11	87	17	52.5	52.4	81.0	27.5	19.5	4.1	511114	20440	8203	1
	CT	67	32	18	115	26	47.8	56.3	81.3	26.9	22.6	3.6	180110	36968	4925	5
	TT	35	13	6	40	6	37.1	46.2	46.2	17.1	15.0	3.1	87461	5175	5175	0
b.	CC/	10											231221			
	CT	7	53	29	202	43	49.5	54.7	81.1	27.1	21.3	3.8	7	28704	6564	6
	TT	35	13	6	40	6	37.1	46.2	46.2	17.1	15.0	3.1	87461	5175	5175	0
c.																
	CT	22	12	9	46	18	54.5	75.0	150.0	40.9	39.1	3.8	162008	73640	-	6
	TT	19	9	5	23	5	47.4	55.6	55.6	26.3	21.7	2.6	67864	3572	-	0

【0184】

10

20

30

40

50

表 2 1. 表現型としての k g / c m 比に関する g . 6 6 4 9 3 7 3 7 C > T の定量的関連検定の結果

【 0 1 8 5 】

【表 2 1】

	n	定量的関連検定の結果				P	Kg/cm 平均値			
		BETA	SE	R2	T		遺伝子型	C/C	T/C	TT
内部訓練中の 2歳馬	97	-0.05671	0.02382	0.06104	-2.485	0.015	計数	29	47	21
							頻度	0.299	0.485	0.217
							平均値	2.939	2.875	2.826
雄のみ	37	-0.09575	0.02941	0.2325	-3.256	0.003	標準偏差	0.155	0.162	0.168
							計数	10	18	9
							頻度	0.270	0.487	0.243
雌のみ	60	-0.03773	0.03091	0.02505	-1.221	0.227	平均値	3.033	2.918	2.843
							標準偏差	0.169	0.101	0.134
							計数	19	29	12
							頻度	0.317	0.483	0.200
							平均値	2.889	2.848	2.814
							標準偏差	0.124	0.187	0.194

【 0 1 8 6 】

リスク予測

集団で観察された遺伝子型頻度およびベイズの定理を使用した亜集団予測に基づいて、M S T N 遺伝子において、ある種の遺伝子型を与えられた 1 つの亜集団、または他の亜集団（エリートスプリンターまたはエリートエンデュアランスもしくは‘ステイヤー’）のメンバーである確率が検討された。結果は表 2 2 に示され、2 つの亜集団のそれぞれのメンバーである可能性の百分率として提供される。

【 0 1 8 7 】

表 2 2－優れた短距離競走能力の予測検定
 【0188】
 【表 2 2】

				TBE SP						TBE EN					
				集団1：アレル、遺伝子型頻度						集団2：アレル、遺伝子型頻度					
	AA	AB	BB	A		AA	AB	BB	P(G C)	A		AA	AB	BB	P(G C)
遺伝子座															
MSTN		1		0.28		0.08	0.41	0.51	0.41	0.64		0.28	0.72	0	0.72
MSTN	TT	TC	C			P(G C)			0.41						0.72
						P(C)			0.5						0.5
						P(G C)P(C)			0.21						0.36
						P(C G)			0.36						0.64
					TBE_SP	TBE_EN									
	1	TT			0.22	0.78									
	2	TC			0.36	0.64									
		C													
	3	C			1.00	0.00									

10

20

【0189】

表中、AAは遺伝子型TTを表し、ABは遺伝子型CTを表し、そしてBBは遺伝子型CCを表す。

【0190】

表 2 2 から、MSTN_66493737 (T/C) SNPにおいて遺伝子型CCを持つ対象は、それらがエリートサラブレッドであるならば、スプリンターである最も高い可能性を有すると見なすことができる。

30

【0191】

MSTN遺伝子発現

2つの独立したリアルタイムqRT-PCRアッセイにおけるMSTN mRNA発現(表 2 3)は、n=60の訓練されていない明け2歳馬 (yearling) (C/C、n=15; C/T、n=28; T/T、n=17) に関して集められた生検標本に由来する静止骨格筋 (gluteus medius) において検討されている。

【0192】

表 2 3：MSTN遺伝子発現およびTTN参照遺伝子発現に関するqRT-PCRアッセイのプライマー配列

40

【0193】

【表 2 3】

プライマー名	標的遺伝子	位置	配列
TTN_FOR	チン(TTN)	エクソン 357	gcatgacacaactggaaagc (SEQ ID No. 38)
TTN_REV	チン (TTN)	エクソン 357	aactttgccctcatcaatgc (SEQ ID No. 39)
MSTN1-2_FOR	シスチン(MSTN)	エクソン 1	tgacagcagtgatggctctt (SEQ ID No. 40)
MSTN1-2_REV	シスチン(MSTN)	エクソン 2	ttgggttttcttccacttg (SEQ ID No. 41)
MSTN2-3_FOR	シスチン(MSTN)	エクソン 2	ttccaagaccaggagaaga (SEQ ID No. 42)
MSTN2-3_REV	シスチン(MSTN)	エクソン 3	cagcatcgagattctgtgga (SEQ ID No. 43)

10

【0194】

本発明者らはMSTN 66493737 (T/C) SNPに関して遺伝子型との有意 (P=0.003559) な関連を見出した。C/C遺伝子型コホートはC/Tコホート (405.7±234.1; 368.6±213.6) およびT/Tコホート (350.1±185.5; 348.1±167.2) のいずれよりも高いMSTN mRNAレベル (654.3±354.3; 613.7±327.0) を有した (図10)。

【0195】

また、MSTN遺伝子発現は訓練期間後に有意にダウンレギュレーションされることが見出された (-4.2倍、P=0.0043)。サラブレッド馬骨格筋トランスクリプトームにおいて、MSTN遺伝子発現は訓練期間後の遺伝子発現が最も大きく減少する。

20

【0196】

最適レース距離との定量的関連

グループレースで勝利している個体 (すなわちTBE n=86) のサブセットを使用して、定量的関連検定解析において、調べられた遺伝子のSNPと最適レース距離間に有意な関係 (すなわち、最も優れた特性の距離/最も価値のあるグループレース勝利) があるかどうか調べられた。以下の表24は、SNPが最適レース距離と有意に関連したことを示す。

【0197】

表24—最適レース距離と関連するSNP

【0198】

30

【表 2 4】

CHR	SNP	STAT	EMP1	NP
18	MSTN_66493737	36.63	1.00E-06	1000000
18	MSTN_66494218	15.97	0.0001744	137586
22	COX4I2_22684844	6.495	0.01146	2094
22	COX4I2_22684390	5.783	0.02526	949
22	PTPN1_38585796	4.963	0.0377	609
4	PON1_38697145	4.596	0.03938	583
22	PTPN1_38597033	4.64	0.04406	521
22	COX4I2_22684676	4.51	0.04742	484

40

【0199】

以下の表25は、上記の表24に由来する4つのSNPに関するそれぞれの遺伝子型の平均最適レース距離を示す。

【0200】

表25—それぞれの遺伝子型の平均最適レース距離

【0201】

【表 2 5】

CHR	SNP	値	G11	G12	G22
18	MSTN_66493737	遺伝子型	T/T	T/C	C/C
18	MSTN_66493737	計数	12	46	21
18	MSTN_66493737	頻度	0.1519	0.5823	0.2658
18	MSTN_66493737	平均値	10.54	9.087	6.167
18	MSTN_66493737	標準偏差	2.742	2.365	0.8266
18	MSTN_66494218	遺伝子型	C/C	C/A	A/A
18	MSTN_66494218	計数	8	39	31
18	MSTN_66494218	頻度	0.1026	0.5	0.3974
18	MSTN_66494218	平均値	10.56	9.179	7.403
18	MSTN_66494218	標準偏差	2.872	2.48	2.043
22	COX4I2_22684844	遺伝子型	C/C	C/T	T/T
22	COX4I2_22684844	計数	4	39	40
22	COX4I2_22684844	頻度	0.04819	0.4699	0.4819
22	COX4I2_22684844	平均値	11.12	8.91	7.975
22	COX4I2_22684844	標準偏差	2.097	2.762	2.247
22	COX4I2_22684390	遺伝子型	C/C	C/T	T/T
22	COX4I2_22684390	計数	4	44	32
22	COX4I2_22684390	頻度	0.05	0.55	0.4
22	COX4I2_22684390	平均値	10.62	8.943	7.875
22	COX4I2_22684390	標準偏差	2.056	2.783	2.254

【0202】

表中、MSTN_66493737-(T/C)では、TT遺伝子型は10.54フェーロング(f)の平均最適レース距離を有し、TC遺伝子型は9.087fの最適レース距離を有し、そしてCC遺伝子型は6.167fの最適レース距離を有する。全体の最適レース距離は8.55fであった。

【0203】

MSTN遺伝子型に基づいた遺伝子型検定に関する多くの実用的な適用が存在する。これらには、以下のものが挙げられる：

1. 若馬(young stock)(当歳(0歳)および明け2歳(1歳))情報に基づいた選択および販売が以下のために行われうる：

- ・スプリンターを確認する
- ・中距離馬／スピードのある潜在的ダービー勝ち馬を確認する
- ・スタミナの強い個体を確認する；

2. 内部訓練中の馬(Horses-in-training)

運営コストを低減することが可能であり、競走方策を以下により微調整することができる；

- ・最も発達の早い2歳馬を確認すること
- ・ウマは最適レース距離に対して訓練し、競走させることが可能である

3. 繁殖牝馬(Broodmare)

繁殖の結果は以下により最適化することができる：

- ・最適繁殖用雄馬に注意を集中すること
- ・適合した種馬(stallion)を選択すること

4. 種馬(stallion)

10

20

30

40

50

種馬の潜在能力は以下により促進されうる：

- ・若い種馬のスタミナインデックスを予測すること（5歳アドバンテージ（*advantage*））
- ・種馬（*stallion*）のプロファイルを高めるために、適合する雌馬を誘致する
たとえば、当歳馬、若馬および内部訓練中の馬のMSTN-66493737 TIC SNPの場合、個体の選択は2歳馬として最も好ましいパフォーマンスをする可能性が高い個体（C/CおよびC/T）に対して行われ、そして3歳になるまでレースを待つことが有益であってもよい“バックワード（*backward*）”個体（身体的に発達の遅い若いサラブレッドに対する産業専門用語）（T/T）を除いて行われてもよい。繁殖の目標は、短距離競走に対してC/C個体、中距離競走に対してC/T個体、そしてより強いスタミナが必要な競走に対してT/T個体を選択することによっていっそう自信を持って達成されてもよい。種馬（*stallion*）オーナーの場合、種馬（*Stud*）キャリアの初めにおける種馬（*stallion*）の遺伝的スタミナインデックスの予測（後ろ向き3歳子孫競走パフォーマンスからS. I. を推測するためには5年が必要である）は、ただちに若い種馬（*stallion*）のプロファイルを高め、それらの遺伝的潜在性を雌馬オーナーに対して売り込むことになる。このことが今度は、雌馬オーナーが、目的をもった繁殖方策により、特定の繁殖目標を達成するために種馬（*stallion*）をいっそう都合よく選択することを可能にするであろう。交配の成り行き（種馬（*sire*）と母馬（*dam*）が共にホモ接合体である場合を除いて）から不確実性を排除するために、当歳馬の遺伝子型判定をすることが、目的を持った繁殖の成果にふさわしい個体の選択を可能にするために必要であろう。

10

20

【0204】

実施例6-SNPの検出

SNPは、たとえば以下の限定的でない方法を含む、任意のSNP遺伝子型判定法により決定されてもよい。

【0205】

Sequenom Inc

マルチプレックスPCRとそれに続く単一塩基プライマー伸長反応に基づいたiPLEX（登録商標）Goldアッセイ。PCRの後、残存するヌクレオチドはSAP処理により脱活性化される。単一塩基プライマー伸長ステップが実施され、プライマー伸長産物はMALDI TOF MSを使用して分析される。

30

【0206】

KBiosciences

KBiosciencesは、遺伝子型判定に本発明者らの競合的アレルト異的PCRシステムの新規形態（KASPar）およびTaqman（商標）化学の両方を使用する。KASParアッセイは以前使用されたAmplifluorシステムに取って代わるために開発された自社独自の社内システムである。

【0207】

Taqmanアッセイ

TaqMan（登録商標）遺伝子型判定アッセイは、TaqMan（登録商標）試薬を基にした精密な化学でSNP遺伝子型判定を実施することを容易にする。TaqMan（登録商標）アッセイはSNP検出能力を提供する。その上、TaqMan（登録商標）Sample-to-SNP（登録商標）キットは単一のキットにより、任意の標本からTaqMan化学に基づいた遺伝子型判定解析を実施するための簡潔なプロトコルを提供する。該キットは：DNA抽出物全溶解試薬（DNA Extract All Lysis Reagents）とTaqMan（登録商標）GTExpress（登録商標）Master Mixの2つの部分からなる。DNA抽出物全溶解試薬はリアルタイムPCR一用のDNA遊離のための時間のかかる手順を5分間プロトコルに短縮させる。それらは血液から頬スワブまでの範囲の多様な標本を調製できる。TaqMan GTExpress Master Mixは50分未満でロバストなPCR増幅を可能にする。

40

50

【0208】

産業上の利用可能性

本明細書に記載の予測検定は、競走成功に関する高い、または低い遺伝的潜在性を有する個体を選択するために適用されてもよい。これらの検定はライフサイクルのいずれの段階、たとえば生後1日目（出生時）、販売前（すなわち、明け2歳、2歳など）、競走キャリア中（すなわち、2歳から）、繁殖中（すなわち、およそ25歳まで）においても個体に実施されうる。その上、母馬と種馬（stallion）の遺伝的素質に基づいて交配のための適切な種馬（stallion）－母馬の縁組みを選択するために、該検定が適用されてもよい。

【0209】

10

本発明は、添付の図面と関連した先に記載の態様に限定されず、構成および詳細が変更されてもよい。

【0210】

参考文献

Ballard J.W. & Dean M.D. (2001) The mitochondrial genome: mutation, selection and recombination. *Curr Opin Genet Dev* 11, 667-72.

Blier P.U., Dufresne F. & Burton R.S. (2001) Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. *Trends Genet* 17, 400-6.

Bray MS, Hagberg JM, Perusse L, Rankinen T, Roth SM, Wolfarth B, Bouchard C. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2006-2007 update. *Med Sci Sports Exerc.* 2009 Jan;41(1):35-73.

20

Cunningham EP, Dooley JJ, Splan RK, Bradley DG. Microsatellite diversity, pedigree relatedness and the contributions of founder lineages to Thoroughbred horses. *Anim Genet.* 2001 Dec;32(6):360-4.

Das J. (2006) The role of mitochondrial respiration in physiological and evolutionary adaptation. *Bioessays* 28, 890-901.

Dempsey and Wagner 1999 Exercise-induced arterial hypoxemia. *J Appl Physiol.* 1999 Dec;87(6):1997-2006. Review. PMID: 10601141

Suzanne S. Eivers, Beatrice A. McGivney, Rita G. Fonseca, David E. MacHugh, Katie Menon, Stephen D. Park, Jose-Luis L. Rivero, Cormac T. Taylor, Lisa M. Katz and Emmeline W. Hill* Exercise-induced skeletal muscle gene expression in unconditioned and conditioned Thoroughbred horses and associations with physiological variables. *Physiological Genomics*, In Preparation (2009)

30

Martin Fluck 2006 Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *The Journal of Experimental Biology* 209, 2239-2248

Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*. 2007 Apr 6;129(1):111-22.

40

Gordon D, Abajian C, Green P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* 1998 Mar;8(3):195-202.

Gramkow and Evans 2006 Gramkow HL, Evans DL. Correlation of race earnings with velocity at maximal heart rate during a field exercise test in Thoroughbred racehorses. *Equine Vet J Suppl.* 2006 Aug;(36):118-22. PMID: 17402405

Gu J, Orr N, Park SD, Katz LM, Sulimova G, MacHugh DE, Hill EW. A genome scan for positive selection in thoroughbred horses. *PLoS One.* 2009 Jun 2;4(6):e5767.

Gunn HM. Muscle, bone and fat proportions and muscle distribution of thoroughbreds and quarter horses. In: Gillespie JR, Robinson NE eds. *Equine exercise physiology* 2. Davis, CA: ICEEP; 1987:253-264.

50

- Harkins et al., 1993 Harkins JD, Hackett RP, Ducharme NG. Effect of furosemide on physiologic variables in exercising horses. *Am J Vet Res.* 1993 Dec;54(12):2104-9. PMID: 8116946
- Hoppeler and Vogt, 2001 Muscle tissue adaptations to hypoxia. *J Exp Biol.* 2001 Sep;204(Pt 18):3133-9. Review. PMID: 11581327
- Love S, Wyse CA, Stirk AJ, Stear MJ, Calver P, Voute LC, Mellor DJ. Prevalence, heritability and significance of musculoskeletal conformational traits in Thoroughbred yearlings. *Equine Vet J.* 2006 Nov;38(7):597-603. PMID: 17228572
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science.* 2006 Jun 16;312(5780):1650-3. Epub 2006 May 25. 10
- Meiklejohn C.D., Montooth K.L. & Rand D.M. (2007) Positive and negative selection on the mitochondrial genome. *Trends Genet* 23, 259-63.
- Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, Ostrander EA.
- A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet.* 2007 May 25;3(5):e79. Epub 2007 Apr 30
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ & Sham PC (2007) PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *American Journal of Human Genetics*, 81. 20
- Revington M. Haematology of the racing Thoroughbred in Australia 2: haematological values compared to performance. *Equine Vet J.* 1983 Apr;15(2):145-8. PMID: 6873047
- Rivero JL, Ruz A, Marti-Korff S, Estepa JC, Aguilera-Tejero E, Werkman J, Sobotta M, Lindner A. Effects of intensity and duration of exercise on muscular responses to training of Thoroughbred racehorses. *J Appl Physiol.* 2007 May;102(5):1871-82. Epub 2007 Jan 25. PMID: 17255370
- Saleem A, Adhihetty PJ, Hood DA. Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle. *Physiol Genomics.* 2009 Mar 3;37(1):58-66. Epub 2008 Dec 23. Links 30
- Sambrook, J. and D. Russell (2001). *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Seaman J, Erickson BK, Kubo K, Hiraga A, Kai M, Yamaya Y, Wagner PD. Exercise induced ventilation/perfusion inequality in the horse. *Equine Vet J.* 1995 Mar;27(2):104-9. PMID: 7607141
- Taylor CT, Colgan SP. Therapeutic targets for hypoxia-elicited pathways. *Pharm Res.* 1999 Oct;16(10):1498-505. Review. PMID: 10554089
- van Deursen et al. 1993 Skeletal muscles of mice deficient in muscle creatine kinase lack burst activity *Cell* 74: 621-631 40
- Weber K, Bruck P, Mikes Z, Kupper JH, Klingenspor M, Wiesner RJ. Glucocorticoid hormone stimulates mitochondrial biogenesis specifically in skeletal muscle. *Endocrinology.* 2002 Jan;143(1):177-84.
- Yang Q, Khoury MJ, Botto L, Friedman JM, Flanders WD. Improving the prediction of complex diseases by testing for multiple disease-susceptibility genes. *Am J Hum Genet.* 2003 Mar;72(3):636-49. Epub 2003 Feb 14.
- Young LE, Rogers K, Wood JL. Left ventricular size and systolic function in Thoroughbred racehorses and their relationships to race performance. *J Appl Physiol.* 2005 Oct;99(4):1278-85. Epub 2005 May 26. PMID: 15920096
- 付録 I : T B E (エリート) 対 T B O (勝ち馬でない) 関連検定。S N P は P 値によっ 50

て並べられた。

【 0 2 1 1 】

【表 2 6 - 1 】

CHR	SNP	BP	A1	F A	F U	A2	CHISQ	P	OR
4	PDK4_38973231	3924	A	0.4639	0.2823	G	9.874	0.001676	2.2
4	PDK4_38968139	0	T	0.4146	0.582	C	7.842	0.005106	0.5088
4	PDK4_38969307	1168	A	0.4304	0.2712	C	7.409	0.006488	2.031
10	CKM_15884567	2716	G	0.07407	0.1636	A	5.355	0.02066	0.4089
18	MSTN_66493525	0	G	0.01205	0.05833	T	4.896	0.02692	0.1969
22	COX4I2_22684390	1164	C	0.325	0.4545	T	4.654	0.03098	0.5778
22	COX4I2_22684676	286	C	0.3415	0.4655	T	4.384	0.03628	0.5953
22	COX4I2_22683226	6865	T	0.3636	0.4828	G	3.868	0.04922	0.6122
22	ACSS1_759076	0	G	0.2317	0.1379	C	3.838	0.05009	1.885
3	COX4I1_32772871	0	T	0.3642	0.2586	C	3.462	0.0628	1.642
9	ADHFE1_18802749	66	A	0.03659	0.08197	T	2.728	0.0986	0.4253
18	MSTN_66493775	30	G	0.01205	0.04167	A	2.559	0.1097	0.2805
25	PTGS1_26007699	2168	C	0.1325	0.2016	T	2.494	0.1143	0.605
25	PTGS1_25991437	1489	C	0.1098	0.175	T	2.49	0.1146	0.5812
22	ACSS1_780613	12338	C	0.2625	0.3475	T	2.341	0.126	0.6685
1	ACTN2_74842283	0	G	0.08537	0.1417	A	2.259	0.1329	0.5655
25	GSN_25024464	0	T	0.09259	0.15	A	2.199	0.1381	0.5782
25	GSN_25028755	4291	A	0.0875	0.1441	G	2.193	0.1386	0.5697
10	CKM_15887661	3094	C	0.3025	0.386	T	2.088	0.1485	0.6899
1	GGPS1_76001872	0	A	0.439	0.3559	C	1.967	0.1607	1.416

【 0 2 1 2 】

【表 2 6 - 2】

22	PTPN1_38591965	1580	G	0.3025	0.3814	A	1.905	0.1675	0.7034
4	ACN9_40285196	5470	G	0.3861	0.3083	T	1.806	0.179	1.411
1	TOMM20_76186624	1936	C	0.2062	0.2727	T	1.61	0.2044	0.6929
4	ACN9_40267593	0	A	0.02907	0.008065	T	1.601	0.2058	3.683
18	MSTN_66493745	8	G	0.01765	0.04237	A	1.577	0.2092	0.406
21	PRKAA1_25374247	9959	A	0.04321	0.01667	G	1.572	0.2099	2.665
22	COX4I2-5900_22676361	0	C	0.4259	0.5	T	1.495	0.2215	0.7419
9	ADHFE1_18793538	5477	C	0.142	0.1949	T	1.394	0.2378	0.6835
9	ADHFE1_18802683	9145	G	0.05696	0.09322	A	1.321	0.2504	0.5876
1	GGPS1_76002021	149	C	0.4304	0.3644	A	1.223	0.2688	1.318
10	CKM_15881851	0	A	0.06329	0.0339	G	1.212	0.2709	1.926
18	MSTN_66494218	443	C	0.3526	0.2895	A	1.193	0.2747	1.337
1	ACTN2_74900867	19039	T	0.0625	0.09821	A	1.179	0.2775	0.6121
25	TNC_19737599	6101	C	0.4145	0.4815	G	1.149	0.2837	0.7623
22	PTPN1_38585796	0	G	0.1975	0.25	C	1.106	0.2929	0.7385
1	MYEF2_141647593	20636	T	0.1456	0.1034	C	1.065	0.302	1.477
9	MTFR1_19456942	17072	A	0.04819	0.07627	T	0.9663	0.3256	0.6132
1	MYEF2_141651362	394	G	0.141	0.1017	A	0.9562	0.3282	1.45

【 0 2 1 3 】

【表 2 6 - 3】

9	MTFR1_19472498	15556	A	0.05422	0.08333	G	0.9521	0.3292	0.6306
24	HIF1A_8984849	4922	G	0.1582	0.2034	A	0.9436	0.3314	0.7362
25	GSN_25033440	4685	G	0.3916	0.3361	A	0.9313	0.3345	1.271
1	ACTN2_74853540	11257	T	0.2785	0.2288	G	0.8721	0.3504	1.301
1	ACTN2_74872377	18837	G	0.09494	0.1293	T	0.8106	0.3679	0.7063
25	TNC_19737816	217	A	0.425	0.475	G	0.6937	0.4049	0.8169
9	ADHFE1_18787798	2714	G	0.03205	0.05172	A	0.6635	0.4153	0.6071
22	MC3R-530_43059660	0	C	0.2692	0.3148	T	0.6469	0.4212	0.8019
1	MYEF2_141626957	0	C	0.1386	0.1083	T	0.5781	0.447	1.324
1	TOMM20_76184688	0	T	0.3253	0.2833	A	0.5759	0.4479	1.22
25	PTGS1_25989948	0	C	0.1392	0.1724	T	0.5672	0.4514	0.7765
25	TNC_19741797	3981	C	0.3036	0.2564	G	0.5027	0.4783	1.264
25	TNC_19716930	0	G	0.09375	0.1167	A	0.3879	0.5334	0.7833
1	MYEF2_141650968	3375	C	0.1341	0.1102	T	0.3629	0.5469	1.251
4	PON1_38681590	784	T	0.08537	0.06667	C	0.3391	0.5604	1.307
25	NDUFA8_25799774	680	T	0.5064	0.4712	C	0.3103	0.5775	1.152
21	PRKAA1_25364288	0	A	0.03659	0.025	G	0.3031	0.5819	1.481
4	PON1_38680806	0	A	0.1098	0.09016	G	0.2947	0.5872	1.244
25	NDUFA8_25799094	3431	G	0.4661	0.5	T	0.2544	0.614	0.873
9	MTFR1_19439870	129	G	0.3072	0.2807	A	0.228	0.633	1.136

【 0 2 1 4】

【表 2 6 - 4】

1	ACTN2_74881828	9451	C	0.275	0.25	T	0.2204	0.6387	1.138
4	PON1 38693816	12226	A	0.1084	0.09167	G	0.2149	0.643	1.205
25	UGCG_16689693	0	T	0.3494	0.375	C	0.1981	0.6562	0.8951
24	HIF1A_8973233	0	C	0.3293	0.3534	A	0.1772	0.6738	0.898
1	ACTA1+50243_68459659	50311	C	0.4634	0.4407	T	0.1431	0.7052	1.096
25	NDUFA8_25801538	1764	C	0.4872	0.5086	T	0.1223	0.7265	0.9178
25	NDUFA8_25795663	0	A	0.4873	0.5085	G	0.1207	0.7283	0.9189
25	PTGS1_26005531	14094	T	0.4444	0.4237	C	0.1192	0.7299	1.088
4	PON1 38697145	3329	T	0.07738	0.06667	C	0.1189	0.7303	1.174
22	PTPN1_38590385	4589	A	0.3063	0.325	C	0.1119	0.738	0.9168
9	ADHFE1_18788061	263	C	0.04938	0.05833	T	0.1097	0.7405	0.8386
24	HIF1A_8979927	6694	G	0.175	0.1897	A	0.09736	0.755	0.9063
1	TOMM20_76191732	5108	T	0.4337	0.4153	C	0.09633	0.7563	1.079
18	MSTN_66493737	212	T	0.443	0.425	C	0.09028	0.7638	1.076
22	ACSS1_762559	120	A	0.4767	0.4597	T	0.08426	0.7716	1.071
1	ACTA1_68409348	0	C	0.1524	0.1404	T	0.07816	0.7798	1.102
9	MTFR1_19439741	0	A	0.3086	0.2931	G	0.0774	0.7808	1.077
25	UGCG_16710063	178	G	0.08537	0.07627	C	0.07577	0.7831	1.13
4	ACN9_40305424	20228	T	0.2831	0.2966	G	0.06101	0.8049	0.9366
4	ACN9_40279726	12133	C	0.3291	0.3421	T	0.0502	0.8227	0.9434

【 0 2 1 5 】

【表 2 6 - 5】

22	PTPN1_38597033	5068	T	0.2615	0.2745	C	0.04911	0.8246	0.936
1	MYEF2_141653617	2255	T	0.4177	0.4068	G	0.03336	0.8551	1.046
25	UGCG_16709885	20192	G	0.3812	0.3917	A	0.0314	0.8593	0.957
22	ACSS1_762439	0	G	0.4753	0.4831	A	0.0164	0.8981	0.9695
22	COX4I2_22684844	168	C	0.2831	0.2881	T	0.008468	0.9267	0.9758
9	ADHFE1_18785084	0	T	0.05921	0.06122	C	0.004285	0.9478	0.965
22	ACSS1_768275	5716	T	0.07407	0.075	G	0.000858	0.9766	0.9867
25	TNC_19731498	14568	G	0.3214	0	T	7.193	0.007319	NA

10

【0 2 1 6】

20

付録 I I : T B E _ S P (エリートスプリンター) 対 T B E _ E N (エリートステイヤー) 関連検定。S N P は P 値によって並べられた。

【0 2 1 7】

【表 27-1】

CHR	SNP	BP	A1	F A	F U	A2	CHISQ	P	OR
18	MSTN_66493737	212	T	0.2821	0.6406	C	18.31	1.88E-05	0.2204
18	MSTN_66494218	443	C	0.2368	0.4844	A	9.357	0.002221	0.3304
4	ACN9_40279726	12133	C	0.4079	0.25	T	4.026	0.0448	2.067
22	PTPN1_38585796	0	G	0.225	0.1029	C	3.901	0.04826	2.53
22	COX4I2_22684844	168	C	0.2195	0.3529	T	3.283	0.07001	0.5156
22	PTPN1_38597033	5068	T	0.2931	0.1552	C	3.173	0.07488	2.257
4	PON1_38697145	3329	T	0.04878	0.1286	C	3.074	0.07955	0.3476
22	COX4I2-5900_22676361	0	C	0.359	0.5	T	2.957	0.0855	0.56
22	COX4I2_22684390	1164	C	0.2692	0.3971	T	2.69	0.101	0.5595
4	ACN9_40305424	20228	T	0.3415	0.2206	G	2.656	0.1032	1.832
1	MYEF2_141650968	3375	C	0.0875	0.1765	T	2.6	0.1068	0.4475
18	MSTN_66493525	0	G	0	0.02941	T	2.444	0.1179	0
18	MSTN_66493775	30	G	0	0.02941	A	2.444	0.1179	0
25	UGCG_16710063	178	G	0.05	0.1176	C	2.258	0.133	0.3947
9	ADHFE1_18787798	2714	G	0.01351	0.06061	A	2.246	0.1339	0.2123
10	CKM_15884567	2716	G	0.05128	0.1176	A	2.121	0.1453	0.4054
4	PON1_38681590	784	T	0.0625	0.1324	C	2.094	0.1479	0.437

【0218】

10

20

30

【表 27-2】

1	MYEF2_141626957	0	C	0.09756	0.1765	T	2.003	0.157	0.5045
25	GSN 25028755	4291	A	0.05263	0.1176	G	1.986	0.1588	0.4167
22	COX4I2_22683226	6865	T	0.3108	0.4242	G	1.938	0.1639	0.612
1	MYEF2_141651362	394	G	0.09722	0.1765	A	1.872	0.1712	0.5026
25	GSN 25024464	0	T	0.05263	0.1143	A	1.836	0.1754	0.4306
24	HIF1A 8984849	4922	G	0.1053	0.1818	A	1.711	0.1909	0.5294
4	ACN9 40267593	0	A	0.01163	0.04286	T	1.506	0.2197	0.2627
22	PTPN1_38590385	4589	A	0.2692	0.3636	C	1.483	0.2233	0.6447
1	MYEF2_141653617	2255	T	0.3553	0.4545	G	1.449	0.2287	0.6612
4	PON1 38693816	12226	A	0.08537	0.1471	G	1.408	0.2354	0.5413
22	COX4I2_22684676	286	C	0.3049	0.3971	T	1.395	0.2376	0.666
1	MYEF2_141647593	20636	T	0.1081	0.1765	C	1.369	0.2421	0.5657
4	PON1 38680806	0	A	0.0875	0.1471	G	1.282	0.2574	0.5562
25	TNC 19737599	6101	C	0.4583	0.3636	G	1.274	0.2591	1.481
10	CKM 15887661	3094	C	0.2692	0.3529	T	1.194	0.2745	0.6754
1	ACTA1+50243_68459659	50311	C	0.425	0.5147	T	1.189	0.2756	0.6969
9	ADHFE1_18802749	66	A	0.025	0.05882	T	1.081	0.2985	0.4103
9	MTFR1_19456942	17072	A	0.03659	0.07353	T	1.005	0.3161	0.4785
24	HIF1A 8979927	6694	G	0.1316	0.1912	A	0.9498	0.3298	0.641

10

20

30

40

【表 27-3】

1	ACTN2_74900867	19039	T	0.03846	0.07576	A	0.9478	0.3303	0.488
25	TNC 19737816	217	A	0.4605	0.3824	G	0.8982	0.3433	1.379
22	PTPN1_38591965	1580	G	0.3125	0.2424	A	0.8793	0.3484	1.42
9	ADHFE1_18802683	9145	G	0.08108	0.04412	A	0.8156	0.3665	1.912
25	PTGS1_25991437	1489	C	0.0875	0.1324	T	0.7669	0.3812	0.6286
21	PRKAA1_25364288	0	A	0.0375	0.01471	G	0.7262	0.3941	2.61
21	PRKAA1_25374247	9959	A	0.0375	0.01515	G	0.6779	0.4103	2.532
9	ADHFE1_18793538	5477	C	0.1282	0.1765	T	0.6613	0.4161	0.6863
1	GGPS1_76001872	0	A	0.4756	0.4091	C	0.6549	0.4184	1.31
18	MSTN_66493745	8	G	0.01163	0.02941	A	0.6288	0.4278	0.3882
1	TOMM20_76186624	1936	C	0.175	0.2273	T	0.6208	0.4307	0.7212
25	GSN 25033440	4685	G	0.378	0.4412	A	0.614	0.4333	0.7699
4	PDK4 38969307	1168	A	0.3919	0.4559	C	0.5947	0.4406	0.7692
9	MTFR1_19439741	0	A	0.3375	0.2794	G	0.579	0.4467	1.314
9	ADHFE1_18785084	0	T	0.07895	0.04839	C	0.5231	0.4695	1.686
22	ACSS1_780613	12338	C	0.3026	0.25	T	0.4955	0.4815	1.302
22	ACSS1_762559	120	A	0.5116	0.4571	T	0.4585	0.4983	1.244
9	MTFR1_19472498	15556	A	0.04878	0.07353	G	0.4037	0.5252	0.6462
25	PTGS1	2168	C	0.122	0.1571	T	0.3928	0.5308	0.7449

【0220】

【表 27-4】

	26007699								
1	GGPS1_76002021	149	C	0.4605	0.4091	A	0.3799	0.5376	1.233
1	ACTN2_74853540	11257	T	0.3026	0.2576	G	0.3544	0.5516	1.251
25	UGCG_16709885	20192	G	0.4189	0.3714	A	0.3392	0.5603	1.22
3	COX4II_32772871	0	T	0.3846	0.3382	C	0.338	0.561	1.223
9	MTFR1_19439870	129	G	0.2805	0.3235	A	0.3279	0.5669	0.8151
25	UGCG_16689693	0	T	0.3659	0.3235	C	0.294	0.5877	1.206
25	TNC_19741797	3981	C	0.2778	0.3261	G	0.2761	0.5993	0.7949
1	ACTA1_68409348	0	C	0.1625	0.1324	T	0.264	0.6074	1.272
25	TNC_19731498	14568	G	0.35	0.25	T	0.262	0.6088	1.615
1	ACTN2_74881828	9451	C	0.2875	0.2576	T	0.1628	0.6866	1.163
4	PDK4_38973231	3924	A	0.439	0.4706	G	0.1494	0.6991	0.8804
22	MC3R-530_43059660	0	C	0.2692	0.2424	T	0.1346	0.7138	1.151
22	ACSS1_762439	0	G	0.5	0.4697	A	0.1329	0.7154	1.129
24	HIF1A_8973233	0	C	0.3125	0.3382	A	0.1111	0.7389	0.8893
4	PDK4_38968139	0	T	0.4375	0.4118	C	0.09958	0.7523	1.111
4	ACN9_40285196	5470	G	0.3684	0.3939	T	0.09761	0.7547	0.8974
1	TOMM20_76191732	5108	T	0.4512	0.4265	C	0.09241	0.7611	1.106
25	TNC_19716930	0	G	0.07692	0.09091	A	0.09154	0.7622	0.8333

【0221】

【表 27-5】

1	ACTN2_74842283	0	G	0.075	0.08824	A	0.08642	0.7688	0.8378
22	ACSS1_759076	0	G	0.2375	0.2206	C	0.05941	0.8074	1.101
25	PTGS1_25989948	0	C	0.1351	0.1471	T	0.04164	0.8383	0.9062
9	ADHFE1_18788061	263	C	0.05128	0.05882	T	0.03989	0.8417	0.8649
25	NDUFA8_25799094	3431	G	0.4833	0.5	T	0.02746	0.8684	0.9355
25	NDUFA8_25801538	1764	C	0.5135	0.5	T	0.02549	0.8732	1.056
25	NDUFA8_25795663	0	A	0.5132	0.5	G	0.02486	0.8747	1.054
22	ACSS1_768275	5716	T	0.07895	0.08571	G	0.02212	0.8818	0.9143
10	CKM_15881851	0	A	0.06757	0.07353	G	0.01924	0.8897	0.913
1	ACTN2_74872377	18837	G	0.09459	0.08824	T	0.01723	0.8956	1.08
1	TOMM20_76184688	0	T	0.3333	0.3235	A	0.01636	0.8982	1.045
25	PTGS1_26005531	14094	T	0.4625	0.4559	C	0.006481	0.9358	1.027
25	NDUFA8_25799774	680	T	0.4865	0.4853	C	0.000202	0.9887	1.005

【0222】

付録 I I I : S N P と表現型の有意な関連

T B E - エリート (グループレース勝利) サラブレッド

T B O - その他 (非勝利) のサラブレッド

T B E _ S P 8 - < 8 f の距離の最適レースに勝利したエリート (グループレース勝利) サラブレッド

T B E _ S P 7 - < 7 f の距離の最適レースに勝利したエリート (グループレース勝利) サラブレッド

T B E _ E N - > 8 f の距離の最適レースに勝利したエリート (グループレース勝利) サラブレッド

S N P は遺伝子記号 _ クロモソーム位置 (b p) によって示される。

【0223】

【表 2 8】

TBE V TBO	P	OR
PDK4 38973231	0.001676	2.2
CKM 15884567	0.02066	0.4089
COX4I2 22684390	0.03098	0.5778
TBE SP8 V TBE EN	P	OR
PON1 38697145	0.03584	0.2884
PTPN1 38585796	0.01011	3.157
MSTN 66493737	3.70E-05	0.2503
TBE SP7 V TBE EN	P	OR
ACN9 40279726	0.0448	2.067
PTPN1 38585796	0.04826	2.53
MSTN 66493737	1.88E-05	0.2204
TBE EN V TBO	P	OR
PDK4 38973231	0.008833	2.26
PTPN1 38585796	0.01482	0.3443
MSTN 66493737	0.005334	2.412
TBE SP8 V TBO	P	OR
ADHFE1 18802749	0.04945	0.2383
PDK4 38973231	0.006401	2.159
CKM 15884567	0.00545	0.2272
COX4I2 22684390	0.007404	0.4478
P - TBE SP7 V TBO	P	OR
GSN 25024464	0.03537	0.3148
PDK4 38973231	0.02048	1.99
MSTN 66493737	0.04163	0.5315
CKM 15884567	0.01821	0.2763
COX4I2 22684390	0.009814	0.4421
P TBE V TBO males	P	OR
ACTN2 74842283	0.04372	0.308
PDK4 38973231	0.003429	3.4
PTGS1 26007699	0.005124	0.2174
PTPN1 38590385	0.03461	0.3966
COX4I1 32772871	0.04415	2.229

10

20

30

【 0 2 2 4 】

付録 I V : ケースーコントロール関連検定および有意に関連する S N P の最良適合モデル

T B E 対 T B O (ケースーコントロール関連検定) $P < 0 . 0 5$

【 0 2 2 5 】

【表 2 9】

TBE V TBO (Case - control association test) P < 0.05

CHR	SNP	BP	A1	F A	F U	A2	CHISQ	P	OR
4	PDK4_38973231	3924	A	0.4639	0.2823	G	9.874	0.001676	2.2
4	PDK4_38968139	0	T	0.4146	0.582	C	7.842	0.005106	0.5088
4	PDK4_38969307	1168	A	0.4304	0.2712	C	7.409	0.006488	2.031
10	CKM_15884567	2716	G	0.07407	0.1636	A	5.355	0.02066	0.4089
18	MSTN_66493525	0	G	0.01205	0.05833	T	4.896	0.02692	0.1969
22	COX4I2_22684390	1164	C	0.325	0.4545	T	4.654	0.03098	0.5778
22	COX4I2_22684676	286	C	0.3415	0.4655	T	4.384	0.03628	0.5953
22	COX4I2_22683226	6865	T	0.3636	0.4828	G	3.868	0.04922	0.6122
22	ACSS1_759076	0	G	0.2317	0.1379	C	3.838	0.05009	1.885

10

20

【0 2 2 6】

T B E 対 T B O 有意に関連する S N P に関する最良適合モデル

【0 2 2 7】

【表 3 0 - 1】

TBE V TBO Best-fit Model for significantly associated SNPs

CHR	SNP	A1	A2	TEST	AFF	UNAFF	CHISQ	DF	P
4	PDK4_38973231	A	G	ALLELIC	77/89	35/89	9.874	1	0.001676
4	PDK4_38973231	A	G	TREND	77/89	35/89	9.237	1	0.002372
4	PDK4_38973231	A	G	DOM	59/24	29/33	8.791	1	0.003027
4	PDK4_38973231	A	G	GENO	18/41/24	6/23/33	9.644	2	0.008049
4	PDK4_38973231	A	G	REC	18/65	6/56	3.706	1	0.05422
4	PDK4_38968139	T	C	ALLELIC	68/96	71/51	7.842	1	0.005106
4	PDK4_38968139	T	C	TREND	68/96	71/51	6.841	1	0.008907
4	PDK4_38968139	T	C	REC	16/66	23/38	5.837	1	0.01569
4	PDK4_38968139	T	C	GENO	16/36/30	23/25/13	7.029	2	0.02977
4	PDK4_38968139	T	C	DOM	52/30	48/13	3.881	1	0.04884

30

40

【0 2 2 8】

【表 30-2】

4	PDK4_38969307	A	C	DOM	54/25	26/33	8.177	1	0.004243
4	PDK4_38969307	A	C	ALLELIC	68/90	32/86	7.409	1	0.006488
4	PDK4_38969307	A	C	TREND	68/90	32/86	6.996	1	0.008169
4	PDK4_38969307	A	C	GENO	14/40/25	6/20/33	8.245	2	0.01621
4	PDK4_38969307	A	C	REC	14/65	19511	1.554	1	0.2125
10	CKM_15884567	G	A	ALLELIC	12/150	18/92	5.355	1	0.02066
10	CKM_15884567	G	A	DOM	11/70	16/39	4.953	1	0.02605
10	CKM_15884567	G	A	TREND	12/150	18/92	4.865	1	0.02741
10	CKM_15884567	G	A	GENO	1/10/70	2/14/39	5.03	2	0.08087
10	CKM_15884567	G	A	REC	1/80	2/53	0.876	1	0.3493
18	MSTN_66493525	G	T	ALLELIC	2/164	7/113	4.896	1	0.02692
18	MSTN_66493525	G	T	TREND	2/164	7/113	3.432	1	0.06394
18	MSTN_66493525	G	T	REC	0/83	21217	2.806	1	0.09392
18	MSTN_66493525	G	T	DOM	29618	20210	2.625	1	0.1052
18	MSTN_66493525	G	T	GENO	0/2/81	20150	3.563	2	0.1683
22	COX4I2_22684390	C	T	REC	4/76	10/45	6.093	1	0.01357
22	COX4I2_22684390	C	T	TREND	52/108	50/60	5.58	1	0.01817
22	COX4I2_22684390	C	T	GENO	4/44/32	10/30/15	6.979	2	0.03052
22	COX4I2_22684390	C	T	ALLELIC	52/108	50/60	4.654	1	0.03098
22	COX4I2_22684390	C	T	DOM	48/32	40/15	2.326	1	0.1272
22	COX4I2_22684676	C	T	REC	28246	17472	5.557	1	0.01841
22	COX4I2_22684676	C	T	TREND	56/108	54/62	5.268	1	0.02172
22	COX4I2_22684676	C	T	ALLELIC	56/108	54/62	4.384	1	0.03628
22	COX4I2_22684676	C	T	GENO	5/46/31	11/32/15	6.402	2	0.04072

【0229】

【表 3 0 - 3】

22	COX4I2_22684676	C	T	DOM	51/31	43/15	2.196	1	0.1383
22	COX4I2_22683226	T	G	REC	26420	17137	6.057	1	0.01385
22	COX4I2_22683226	T	G	TREND	56/98	56/60	4.776	1	0.02887
22	COX4I2_22683226	T	G	GENO	5/46/26	12/32/14	6.449	2	0.03978
22	COX4I2_22683226	T	G	ALLELIC	56/98	56/60	3.868	1	0.04922
22	COX4I2_22683226	T	G	DOM	51/26	44/14	1.471	1	0.2252
22	ACSS1_759076	G	C	DOM	35/47	15/43	4.187	1	0.04075
22	ACSS1_759076	G	C	TREND	38/126	16/100	4.063	1	0.04382
22	ACSS1_759076	G	C	ALLELIC	38/126	16/100	3.838	1	0.05009
22	ACSS1_759076	G	C	GENO	3/32/47	1/14/43	4.231	2	0.1206
22	ACSS1_759076	G	C	REC	28915	20821	0.458	1	0.4986

【 0 2 3 0】

T B E _ S P 7 対 T B E _ E N (ケース - コントロール 関連 検定) $P < 0.05$

【 0 2 3 1】

【表 3 1】

TBE SP7 V TBE EN (Case - control association test) $P < 0.05$

CHR	SNP	BP	A1	F A	F U	A2	CHISQ	P	OR
18	MSTN_66493737	212	T	0.2821	0.6406	C	18.31	1.88E-05	0.22044.54
18	MSTN_66494218	443	C	0.2368	0.4844	A	9.357	0.002221	0.3304
4	ACN9_40279726	12133	C	0.4079	0.25	T	4.026	0.0448	2.067
22	PTPN1_38585796	0	G	0.225	0.1029	C	3.901	0.04826	2.53

【 0 2 3 2】

T B E _ S P 7 対 T B _ E N 有意に 関連 する S N P に関する 最良 適合 モデル

【 0 2 3 3】

【表 3 2 - 1】

TBE SP7 V TB EN Best-fit Model for significantly associated SNPs

CHR	SNP	A1	A2	TEST	AFF	UNAFF	CHISQ	DF	P
18	MSTN_66493737	T	C	GENO	3/16/20	9/23/0	23.8	2	6.80E-06
18	MSTN_66493737	T	C	TREND	22/56	41/23	20.64	1	5.55E-06
18	MSTN_66493737	T	C	ALLELIC	22/56	41/23	18.31	1	1.88E-05
18	MSTN_66493737	T	C	DOM	19/20	32/0	22.85	1	1.76E-06
18	MSTN_66493737	T	C	REC	3/36	9/23	5.225	1	0.02226
18	MSTN_66494218	C	A	GENO	2/14/22	6/19/7	10.08	2	0.006487
18	MSTN_66494218	C	A	TREND	18/58	31/33	9.708	1	0.001835
18	MSTN_66494218	C	A	ALLELIC	18/58	31/33	9.357	1	0.002221
18	MSTN_66494218	C	A	DOM	16/22	40/19	9.288	1	0.002306

10

【 0 2 3 4】

【表 3 2 - 2】

18	MSTN_66494218	C	A	REC	13181	46174	3.122	1	0.07726
4	ACN9_40279726	C	T	GENO	6/19/13	2/13/19	4.04	2	0.1326
4	ACN9_40279726	C	T	TREND	31/45	17/51	4.026	1	0.0448
4	ACN9_40279726	C	T	ALLELIC	31/45	17/51	4.026	1	0.0448
4	ACN9_40279726	C	T	DOM	25/13	15/19	3.413	1	0.06467
4	ACN9_40279726	C	T	REC	11841	11720	1.783	1	0.1817
22	PTPN1_38585796	G	C	GENO	0/18/22	0/7/27	NA	NA	NA
22	PTPN1_38585796	G	C	TREND	18/62	7/61	4.896	1	0.02692
22	PTPN1_38585796	G	C	ALLELIC	18/62	7/61	3.901	1	0.04826
22	PTPN1_38585796	G	C	DOM	18/22	7/27	4.896	1	0.02692
22	PTPN1_38585796	G	C	REC	0/40	0/34	NA	NA	NA

20

【 0 2 3 5】

T B E 最適レース距離定量的形質関連

30

【 0 2 3 6】

【表 3 3】

TBE Best Race Distance Quantitative Trait Association

CHR	SNP	STAT	EMP1	NP
18	MSTN_66493737	36.63	1.00E-06	1000000
18	MSTN_66494218	15.97	0.000174	137586
22	COX4I2_22684844	6.495	0.01146	2094
22	COX4I2_22684390	5.783	0.02526	949
22	PTPN1_38585796	4.963	0.0377	609
4	PON1_38697145	4.596	0.03938	583
22	PTPN1_38597033	4.64	0.04406	521
22	COX4I2_22684676	4.51	0.04742	484
22	COX4I2_22683226	4.248	0.05263	436
4	ACN9_40279726	3.628	0.0545	421

10

20

【0 2 3 7】

T B E 有意に関連する S N P に関する最適レース距離平均値（距離はファーロングである）

【0 2 3 8】

【表 3 4 - 1】

TBE Best Race Distance Means (where distances are furlongs) for significantly associated SNPs

CHR	SNP	VALUE	G11	G12	G22
18	MSTN_66493737	GENO	T/T	T/C	C/C
18	MSTN_66493737	COUNTS	12	46	21
18	MSTN_66493737	FREQ	0.1519	0.5823	0.2658

30

【0 2 3 9】

【表 3 4 - 2】

18	MSTN_66493737	MEAN	10.54	9.087	6.167
18	MSTN_66493737	SD	2.742	2.365	0.8266
18	MSTN_66494218	GENO	C/C	C/A	A/A
18	MSTN_66494218	COUNTS	8	39	31
18	MSTN_66494218	FREQ	0.1026	0.5	0.3974
18	MSTN_66494218	MEAN	10.56	9.179	7.403
18	MSTN_66494218	SD	2.872	2.48	2.043
22	COX4I2_22684844	GENO	C/C	C/T	T/T
22	COX4I2_22684844	COUNTS	4	39	40
22	COX4I2_22684844	FREQ	0.04819	0.4699	0.4819
22	COX4I2_22684844	MEAN	11.12	8.91	7.975
22	COX4I2_22684844	SD	2.097	2.762	2.247
22	COX4I2_22684390	GENO	C/C	C/T	T/T
22	COX4I2_22684390	COUNTS	4	44	32
22	COX4I2_22684390	FREQ	0.05	0.55	0.4
22	COX4I2_22684390	MEAN	10.62	8.943	7.875
22	COX4I2_22684390	SD	2.056	2.783	2.254
22	PTPN1_38585796	GENO	G/G	G/C	C/C
22	PTPN1_38585796	COUNTS	1	30	50
22	PTPN1_38585796	FREQ	0.01235	0.3704	0.6173
22	PTPN1_38585796	MEAN	8	7.75	9.09
22	PTPN1_38585796	SD	0	2.176	2.736
4	PON1_38697145	GENO	T/T	T/C	C/C
4	PON1_38697145	COUNTS	1	11	72
4	PON1_38697145	FREQ	0.0119	0.131	0.8571
4	PON1_38697145	MEAN	6	10.82	8.278
4	PON1_38697145	SD	0	2.892	2.359
22	PTPN1_38597033	GENO	T/T	T/C	C/C
22	PTPN1_38597033	COUNTS	2	30	33
22	PTPN1_38597033	FREQ	0.03077	0.4615	0.5077
22	PTPN1_38597033	MEAN	9.5	7.917	9.5
22	PTPN1_38597033	SD	2.121	2.275	2.339
22	COX4I2_22684676	GENO	C/C	C/T	T/T
22	COX4I2_22684676	COUNTS	5	46	31
22	COX4I2_22684676	FREQ	0.06098	0.561	0.378
22	COX4I2_22684676	MEAN	10.1	8.859	7.903
22	COX4I2_22684676	SD	2.133	2.75	2.286

【 0 2 4 0 】

【表 3 4 - 3】

22	COX4I2 22683226	GENO	T/T	T/G	G/G
22	COX4I2 22683226	COUNTS	5	46	26
22	COX4I2 22683226	FREQ	0.06494	0.5974	0.3377
22	COX4I2 22683226	MEAN	10.9	8.641	8.077
22	COX4I2 22683226	SD	1.884	2.491	2.331
4	ACN9 40279726	GENO	C/C	C/T	T/T
4	ACN9 40279726	COUNTS	8	36	35
4	ACN9 40279726	FREQ	0.1013	0.4557	0.443
4	ACN9 40279726	MEAN	7.875	8.264	9.3
4	ACN9 40279726	SD	2.1	2.628	2.544

10

【 0 2 4 1】

レーシングポストハンディキャップレーティング（最適 R P R）定量的形質関連

【 0 2 4 2】

【表 3 5】

Racing Post Handicap Rating (Best RPR) Quantitative Trait Association

20

CHR	SNP	STAT	EMP1	NP
4	PDK4 38973231	8.095	0.005052	4750
4	PDK4 38969307	6.825	0.009441	2541
3	COX4I1 32772871	6.748	0.009681	2478

【 0 2 4 3】

有意に関連する S N P に関するレーシングポストハンディキャップレーティング（最適 R P R）平均値

【 0 2 4 4】

30

【表 3 6】

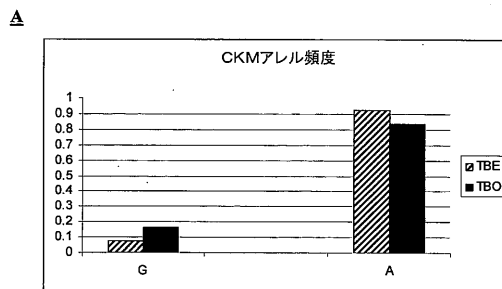
Racing Post Handicap Rating (Best RPR) Means for significantly associated SNPs

CHR	SNP	STAT	EMP1	NP	
4	PDK4 38973231	GENO	A/A	A/G	G/G
4	PDK4 38973231	COUNTS	19	46	44
4	PDK4 38973231	FREQ	0.1743	0.422	0.4037
4	PDK4 38973231	MEAN	99.95	97.7	80.3
4	PDK4 38973231	SD	33.78	28.9	28.85
4	PDK4 38969307	GENO	A/A	A/C	C/C
4	PDK4 38969307	COUNTS	16	42	42
4	PDK4 38969307	FREQ	0.16	0.42	0.42
4	PDK4 38969307	MEAN	97.19	99.21	79.9
4	PDK4 38969307	SD	36.23	28.06	28.45
3	COX4I1 32772871	GENO	T/T	T/C	C/C
3	COX4I1 32772871	COUNTS	13	42	50
3	COX4I1 32772871	FREQ	0.1238	0.4	0.4762
3	COX4I1 32772871	MEAN	100.6	99.71	83.3
3	COX4I1 32772871	SD	29.46	28.92	30.49

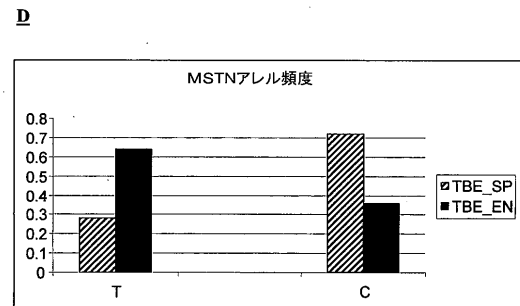
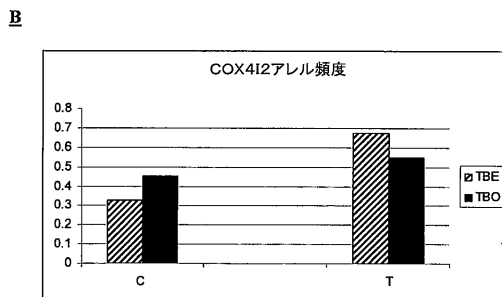
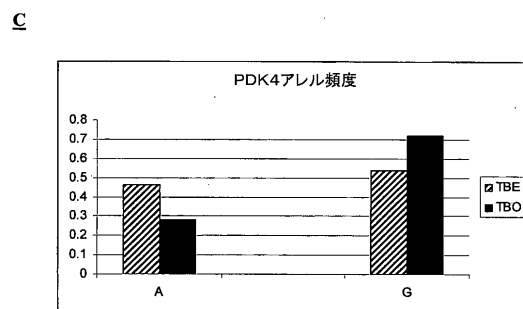
10

20

【図 4 - 1】

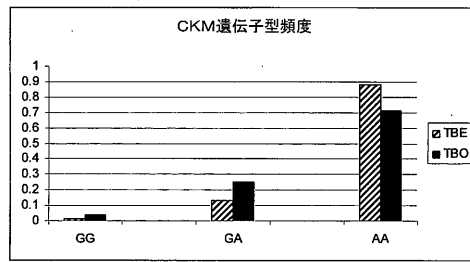


【図 4 - 2】

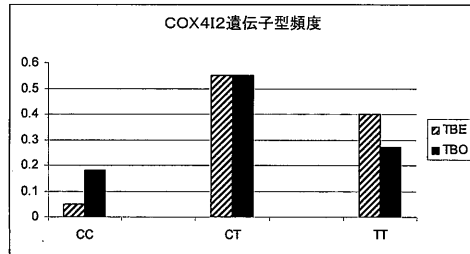


【図 5 - 1】

A

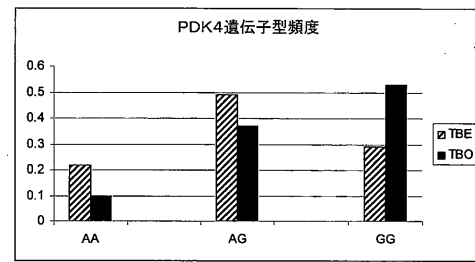


B

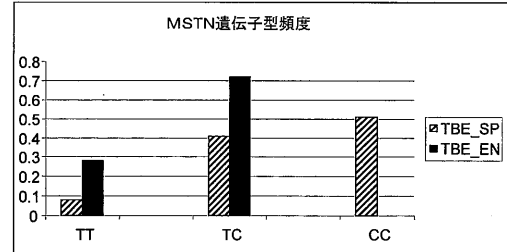


【図 5 - 2】

C

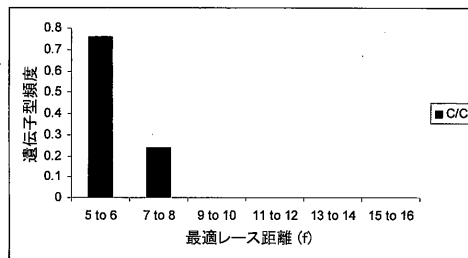


D



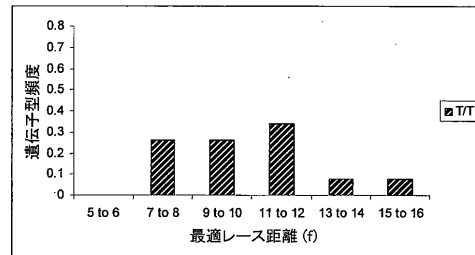
【図 6 - 1】

A



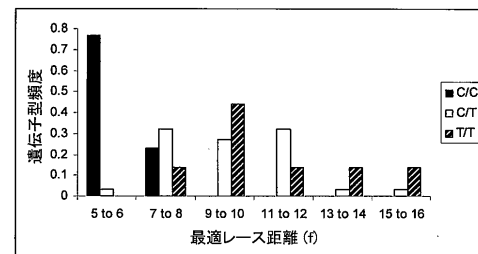
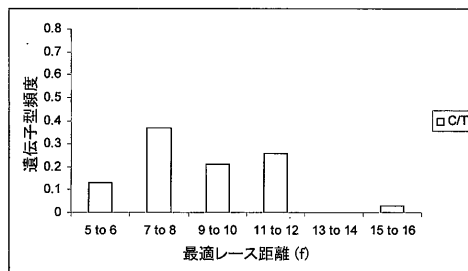
【図 6 - 2】

C

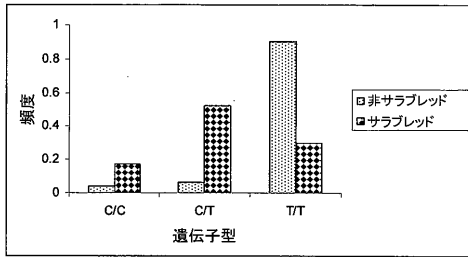


【図 7】

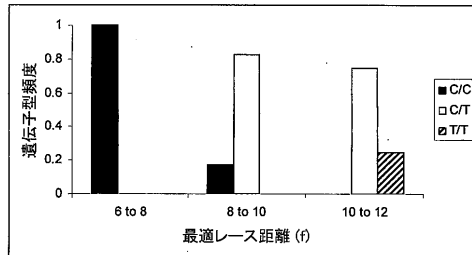
B



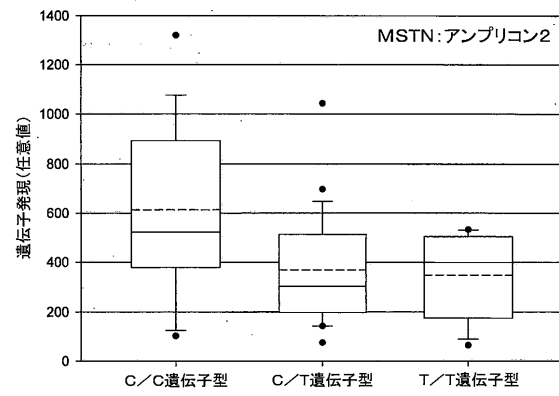
【図 8】



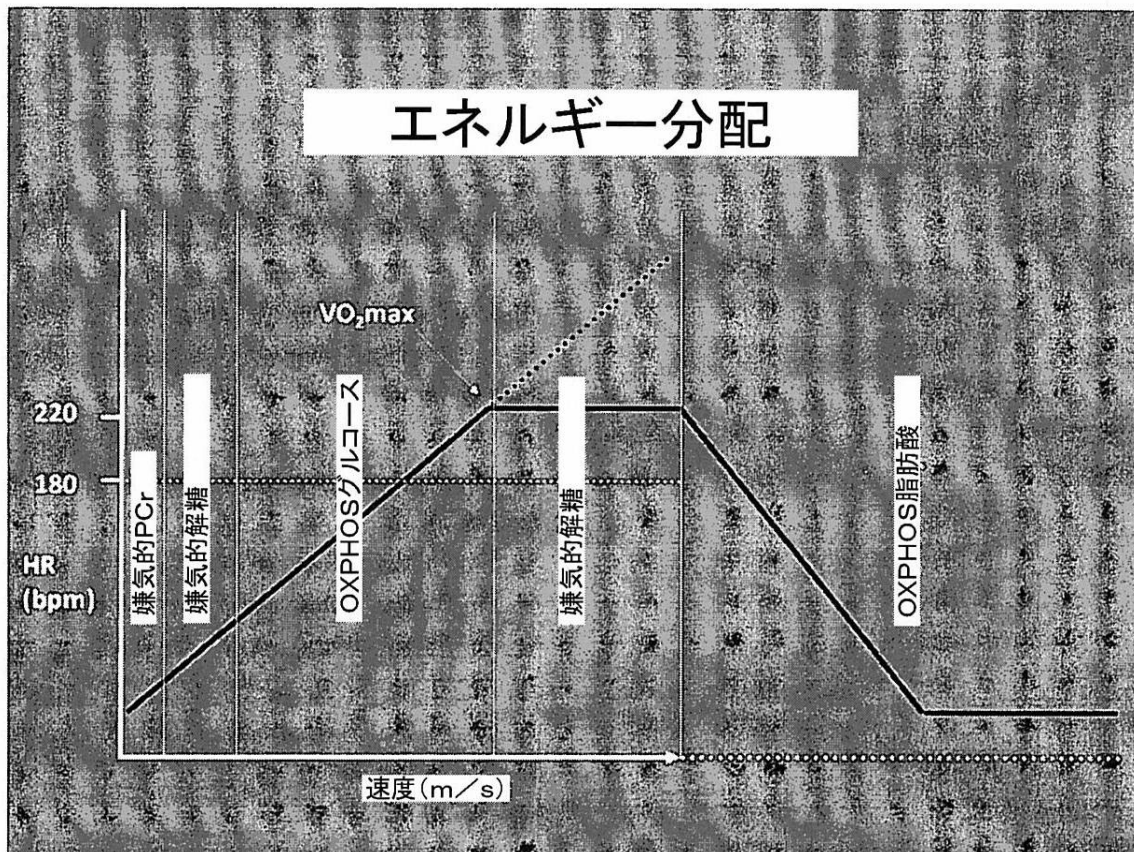
【図 9】



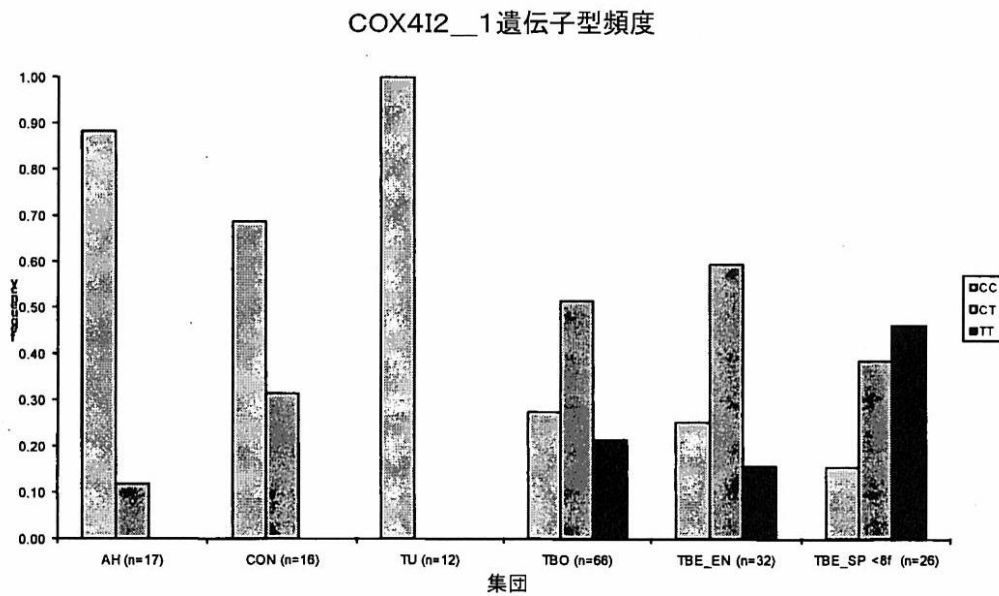
【図 10】



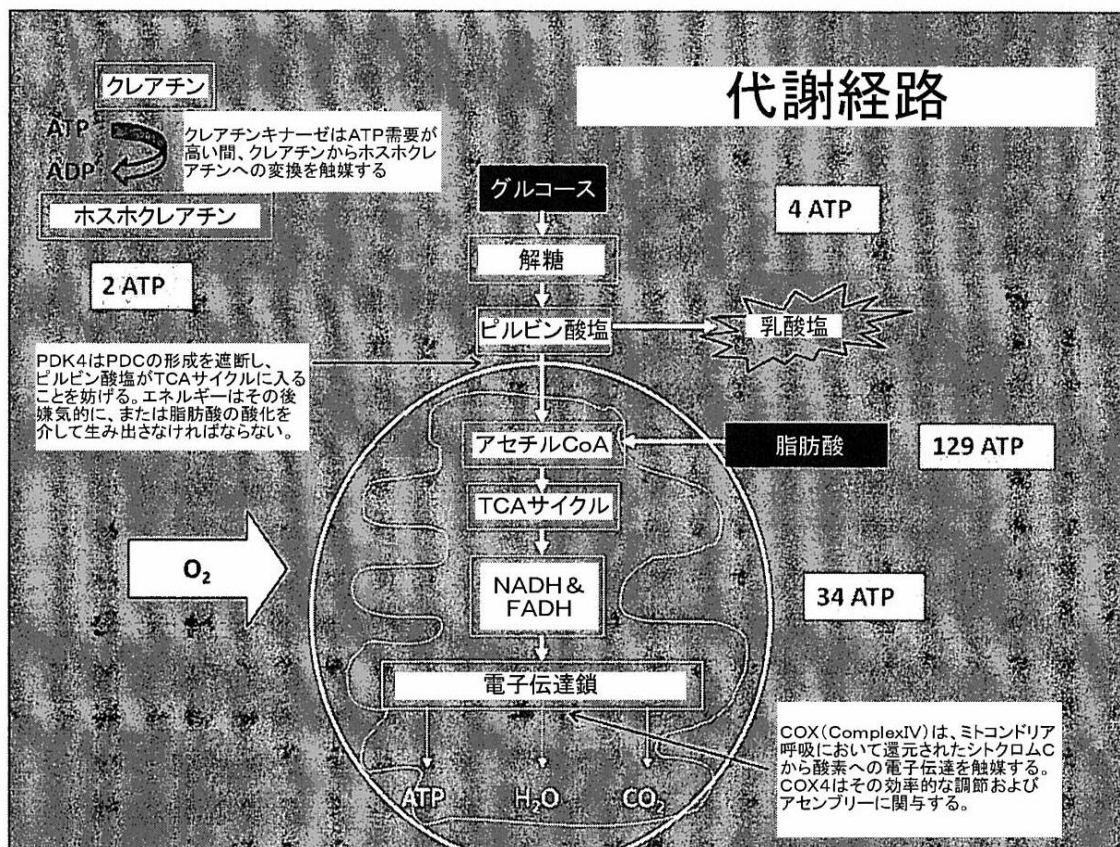
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【配列表】

0005667057000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100135415

弁理士 中濱 明子

(72)発明者 ヒル, エメリン

アイルランド国ダブリン 4, ベルフィールド, ナショナル・ユニバーシティ・オブ・アイルランド・ダブリンーユニバーシティ・カレッジ・ダブリン

(72)発明者 マックヒュー, デーヴィッド

アイルランド国ダブリン 4, ベルフィールド, ナショナル・ユニバーシティ・オブ・アイルランド・ダブリンーユニバーシティ・カレッジ・ダブリン

(72)発明者 オール, ニック

アイルランド国ダブリン 4, ベルフィールド, ナショナル・ユニバーシティ・オブ・アイルランド・ダブリンーユニバーシティ・カレッジ・ダブリン

(72)発明者 グウ, ジンジン

アイルランド国ダブリン 4, ベルフィールド, ナショナル・ユニバーシティ・オブ・アイルランド・ダブリンーユニバーシティ・カレッジ・ダブリン

(72)発明者 カッツ, リサ

アイルランド国ダブリン 4, ベルフィールド, ナショナル・ユニバーシティ・オブ・アイルランド・ダブリンーユニバーシティ・カレッジ・ダブリン

審査官 森井 文緒

(56)参考文献 Database GenBank [online], Accessin No. AY840554, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AY840554>> 2005-Mar-31 uploaded, Tang, H., et al., Definition: Equus caballus MSTN gene, complete cds

Chromosome Res. (Mar 2008) vol.16, no.1, p.109-127

N. Engl. J. Med. (2004) vol.350, no.26, p.2682-2688

PLoS Genet. (2007) vol.3, no.5, e79

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C12Q 1/68

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

PubMed

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

Thomson Innovation