

厚生労働科学研究費補助金

障害保健福祉総合研究事業

優良補助犬の効率的育成と普及に関する生殖工学的研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 鈴木 宏志

平成20(2008)年 4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

優良補助犬の効率的育成と普及に関する生殖工学的研究 -----	1
鈴木宏志	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	10
--------------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	11
------------------------	----

# 厚生労働科学研究費補助金（障害保健福祉総合研究事業）

## 総括研究報告書

### 優良補助犬の効率的育成と普及に関する生殖工学的研究

主任研究者 鈴木 宏志 帯広畜産大学教授

（研究要約）障害者の社会参加の促進に資するために、補助犬の人工繁殖技術の開発と実用化および補助犬適性の遺伝子レベルでの診断系の開発を果たし、優秀な補助犬の効率的育成とその啓蒙・普及を達成することを目的に、(I) イヌ精子の超急速凍結保存法の開発、(II) 盲導犬の人工授精法の普及に関する検討、(III) 盲導犬の卵巣移植法の開発、(IV) イヌ胚の凍結保存技術・胚移植技術の開発、および(V) 遺伝子多型の解析による盲導犬適性検査法の開発を行った。(I) スキムミルクとグルコースを基礎とする新規保存液を開発し、これを用いて凍結融解を行ったイヌ精子の人工授精によって6頭の産仔を得ることに成功した。(II) 人工授精を試行・実用化を図っている盲導犬事業所は、5施設に増加しており、人工繁殖技術の啓蒙、普及活動の効果が現われつつある。また、ブルセラ症の摘発のため、血清抗体法およびPCRによる検査系を確立し、全国の盲導犬協会8施設に対してサービスを提供した。(III) 凍結融解卵巣の移植後の卵胞数の減少を抑制するために、抗酸化剤およびRhoキナーゼ阻害剤の効果を検討した結果、両者ともに移植片の生着率を向上させる傾向が認められたが、卵胞の減少を抑制する証拠は得られなかった。(IV) ラブラドルリトリバーの初期胚の動態を初めて明らかにするとともに、胚の発生段階の違いによる凍結感受性の差異の存在を明らかにした。(V) 性格関連遺伝子の多型と盲導犬適性との間に関連性が存在することを示唆する成績を得た。また、ラブラドルリトリバーの進行性網膜萎縮症の遺伝子診断系を確立し、スクリーニングを実施した結果、盲導犬集団の数%に本疾患のキャリアーの存在を認めた。

#### A. 研究目的

障害者の社会参加の促進に資するため、補助犬の人工繁殖技術の開発と実用化および補助犬適性の遺伝子レベルでの診断系の開発を果たし、優秀な補助犬の効率的育成とその啓蒙・普及を達成する基礎・応用研究を計画する。

身体障害者補助犬の導入によって自立と社会参加を果たし得る障害者は数多く存在して

おり、その普及には法体系や社会的受け入れ体制の整備とともに、良質な補助犬の育成体制の整備が不可欠である。我が国の盲導犬は、約1,000頭が実働しているが、盲導犬希望者は約4,800人と推定されている。盲導犬の安定的・効率的繁殖育成は、最も重要な課題のひとつであるが、現在、全国の盲導犬訓練施設では、優れた雌雄の繁殖犬の確保が困難であること、盲導犬の合格率が低いなどの問題

を抱えている。事実、我が国の盲導犬普及率は、欧米先進諸国と比較して 1/2~1/10 程度と極めて低く、まったくの「盲導犬後進国」の状況にある。歴史の浅い他の補助犬の育成、利用に至っては、適切な犬種の選定、繁殖システムなどについて、手探りの状態が続いている。さらに、我が国に導入されているラブラドルリトリバーについては、補助犬としては不適格な股関節形成不全症や進行性の網膜萎縮症などの重篤な遺伝性疾患のキャリアーが高頻度で存在するといわれており、実態の把握を含めた緊急な対処を要する状況にある。

適切な資質を有する補助犬の安定的な提供は、我が国の身体障害者の経済社会への一層の進出、貢献を促すものである。本研究の成果は、盲導犬や介助犬などの補助犬、あるいは災害救助犬や麻薬探知犬などの資質向上にも寄与することから、国内の安心・安全で快適な社会の構築への寄与のみならず、大きな国際貢献をも果たす。

## B. 研究方法

(1) イヌ精子の超急速凍結保存法の開発に関する研究：これまでのイヌ精子の凍結保存は、煩雑な操作を要した。主任研究者らは、これまでに平衡時間を3時間から1時間に短縮することに成功しているが、既存の凍結保存法では、保存液にニワトリの卵黄を用いているため、トリインフルエンザの蔓延によって、凍結精子の輸出入に困難が生じており、化学的組成の明確な新規の凍結保存液の開発が急務となっている。そこで、卵黄の代替として LDL あるいは糖類等を用いた保存液を開

発し、遺伝子資源の促進に寄与する。

(2) 盲導犬の人工授精法の普及に関する研究：大型犬の人工授精においては、精子の子宮体部への注入が困難である。主任研究者らは、ヒト膀胱鏡を用いた経子宮頸管人工授精に成功していることから、全国の盲導犬協会への普及を目指すとともに、規模の小さな盲導犬協会については、人工授精サービスを提供するシステムを実現する。また、海外から導入した凍結精液を用いて盲導犬の改良を図る。

(3) 盲導犬の卵巣移植法の確立：すでにイヌ卵巣の凍結保存法の開発に成功しており、成獣をレシピエントとした場合においてもグラフト（凍結融解卵巣片）の拒絶が少ないことを明らかにしている。本研究においては、新生仔をレシピエントとすることで同種移植の成功率の向上を図るとともに、異種移植による卵胞発育の可能性を検討する。

(4) イヌ胚の凍結保存技術、胚移植技術の開発：これまでにイヌ桑実胚および胚盤胞の凍結保存に成功しているが、本研究においては、イヌ卵子・胚の超急速凍結保存法とヒト膀胱鏡を応用した胚の移植術を確立する。これらの成果によって、避妊手術（卵巣摘出術）に先立って人工授精を施し、胚を凍結保存する雌側からの育種が可能となる。

(5) 遺伝子多型の解析による盲導犬適性検査法の開発：盲導犬の合格率が30%程度で、しかも補助犬としては不適格な疾患遺伝子のキャリアーが多く存在する我が国のコロニーにおいては、盲導犬適性を遺伝子レベルで検査可能なシステムの開発は重要な課題である。そこで、本研究では、最終年度までに性格関

連遺伝子の多型解析対象遺伝子数を 20 までに拡大するとともに海外の盲導犬のサンプルも解析対象として比較検討し、盲導犬適性を左右する遺伝子多型を同定する。また、疾患関連遺伝子については、訓練時（若齢）時期には症状を示さないが盲導犬の実働年齢と発症時期が重なる疾患として問題となっている進行性網膜萎縮症の原因遺伝子のスクリーニング系を開発し、罹患個体あるいはキャリアーの摘発を可能とさせる。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究、遺伝子組換え実験には該当しない。動物実験に該当するので、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（文部科学省）、厚生労働省における動物実験等の実施に関する基本指針（厚生労働省）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（環境省）を遵守して動物愛護上の配慮を行う、また、実験に際しては、国立大学法人帯広畜産大学の動物実験指針に沿った実験計画を立案して、計画書を動物実験委員会に提出し、審査、承認を経て実施する。

### C. 研究結果

（1）イヌ精子の超急速凍結保存法の開発に関する研究：卵黄を含む凍結保存液に代わる新規のイヌ精子の凍結保存液を開発するため、スキムミルク（30 mg/ml）とグルコース（0.3M）を基礎とする溶液（SG 液）で凍結融解したイヌ精子の運動性および受精能について検討した。凍結融解後のイヌ精子の運動性については、SG 液と卵黄を基礎とする既存の凍結保存液との間に差を認めなかった。そこで、

グリセロール（7% v/v）を添加した SG 液で凍結融解したイヌ精子を用いて 2 頭の雌に人工授精を行った結果、合計 6 頭の産仔を得ることに成功した。

（2）盲導犬の人工授精法の普及に関する研究：人工授精に用いた 13 頭の繁殖雄犬由来の凍結融解精子について、前進活発運動を示す精子の割合は、運動性は 65～75% で種雄犬の違いによる差を認めなかった。しかしながら人工授精後の受胎率は、5 頭が 70% 以上（73～100%）を示したのに対し、6 頭が 20% 以下（0～14%）と雄の違いによる差が顕著で、全く受胎例が得られない雄も 5 頭観察された。これらの成績は、現在、汎用されている精子の凍結融解方法が、自然交配では十分な妊孕能を示す雄犬由来の精子のすべてに妥当性を有しているわけではないことを明確に示している。

凍結精子の保存ストロー数は、国内の雄由来が約 3,500 本、海外からの輸入が約 1,000 本にのぼり、人工授精普及の基盤が整ってきた。人工授精を試行・実用化を図っている盲導犬事業所は、平成 16 年度は 1 施設であったが、平成 19 年度には 5 施設に増加しており、人工繁殖技術の啓蒙、普及活動の効果が顕性化していると考えられる。

また、繁殖生産性の維持、向上のためには、ネオスポーラ症あるいはブルセラ症などの適切なコントロールが重要な課題であるが、ブルセラ症の迅速、的確な摘発のため、血清抗体法および PCR による検査系を確立し、全国の盲導犬協会 8 施設の繁殖犬、育成犬の診断を実施する体制を構築してサービスを提供した。

(3) 盲導犬の卵巣移植法の確立：ラブラドルリトリバー新生仔3例(6~9日齢)に対して凍結融解卵巣の同種移植を試み、現在、発情兆候の出現を観察中である。

卵巣移植術においては、移植後の移植片に対する酸化的ストレスあるいは虚血状態によって、移植後の卵巣組織の卵胞の多くが失われるといわれており、重要な検討課題のひとつとなっている。そこで、移植後の卵胞数の減少を抑制するために、抗酸化作用を有するプラチナコロイドおよび虚血・再環流による障害に対して有効といわれている Rho キナーゼ阻害剤の効果を検討した。凍結融解したイヌ卵巣組織片を止血用スポンジ(スポンゼル)に含ませた2 $\mu$ lの1mMプラチナコロイドあるいは15mg/mlの濃度の Rho キナーゼ阻害剤と一緒に、免疫不全を呈する NOD-SCID マウスの卵巣嚢内に移植し、移植後4週目に回収して、組織学的に観察した結果、移植片の生着率は対照(生理食塩水)の83%に対し、プラチナコロイド処理では93%、Rho キナーゼ阻害剤処理では96%と両実験区で対照と比較して高い傾向が認められた。原始卵胞の残存率は、対照では12%であったのに対し、プラチナコロイド処理では4%、Rho キナーゼ阻害剤処理では26%であった。また、初期一次卵胞の残存率は、対照区の13~18%に対し、プラチナコロイド処理では11%、Rho キナーゼ阻害剤処理では17%であった。一次卵胞の残存率は、対照区の13~23%に対し、プラチナコロイド処理では22%、Rho キナーゼ阻害剤処理では8%であった。以上のように、一部に薬物処理の効果を認めたが(原始卵胞の残存率における Rho キナーゼ処理)、すべての発育分化段階

に妥当性のある成績は得られなかった。

(4) イヌ胚の凍結保存技術、胚移植技術の開発：イヌの着床前の胚発生については、その理解が十分ではなく、胚移植などの人工繁殖技術開発の障害となっている。そこで、ラブラドルリトリバーに人工授精を施し、継時的に胚を回収することによって、LH サージと胚の発生段階および胚の生殖道内の局在を観察した。その結果、胚は LH サージ後11日目に卵管から子宮に移動を開始し、その移行には24時間を要すること、LH サージ後13日目までにすべての胚が子宮への移動を終了すること、さらには、LH サージ12~13日目までに桑実胚に、14日目までには胚盤胞に発生することが明らかとなった。

これまで、イヌ雄性生殖細胞(精子)の凍結保存については数多くの報告がなされ、保存法の改良が進められてきたが、雌性生殖細胞(卵母細胞および胚)についての報告は少なく、凍結保存法の確立には至っていない。そこで、イヌ卵母細胞および胚のガラス化保存法を検討するとともに、発生ステージにおける凍結感受性の差異を検討した。卵核胞(GV)期卵母細胞をDAP213(2M DMSO、1M アセトアミド、3M プロピレングリコール)法およびE30S(30%エチレングリコール、0.5M シュクロース)法でガラス化保存した結果、回収率は94~98%と両実験区間に差異は認められず、また、いずれの区においても形態的に正常な卵母細胞が多く観察されたが(DAP213区; 67%、E30S区; 66%)、PI染色により判定した正常卵の割合は、DAP213区で4%(2/49)、E30S区で21%(13/61)とE30S区が有意に高い成績であった( $P < 0.01$ )。また、

E30S 法によってガラス化保存した胚の正常性を PI 染色によって調べた結果、1~16 細胞期胚では正常割球が全割球の 75%以上を占める胚が多く観察されたのに対し、桑実胚および胚盤胞では障害を受けた細胞が大部分 (80%以上) を占めていた。また、DAP213 法でガラス化保存した桑実胚および胚盤胞についても、多くの細胞が障害を受けていた。

(5) 遺伝子多型の解析による盲導犬適性検査法の開発：盲導犬および非盲導犬 (不合格犬)、それぞれ、約 100 例の DNA サンプルを血液、口腔粘膜細胞あるいは爪から調整し、7 遺伝子の 15 多型について解析を行った。対象とした遺伝子は、ドーパミン D4 受容体 (DRD-4; exon I:  $p=0.259$ , exon II:  $p=0.979$ )、モノアミン代謝酵素 (MAOB; T199C:  $p=0.1182$ )、ドーパミン合成酵素 (TH; G180A:  $p=0.159$ , C264T:  $p=0.652$ )、ノルアドレナリン合成酵素、(DBH; C789A:  $p=0.678$ , A1819G: 両群とも全例がメジャーアリル)、カテコール-O-メチル基転移酵素 (COMT; G39A:  $p=0.328$ , G216A:  $p=0.006$ , G482A:  $p=0.034$ )、セロトニン受容体 1B (5-HTR1B; A157C:  $p=0.021$ , G246A:  $p=0.021$ , C660G:  $p=0.752$ , T955C:  $p=0.086$ )、グルタミン酸輸送体 (GLT-1; T471C:  $p=0.003$ ) であったが、これらのうち COMT (G216A, G482A)、5-HTR1B (A157C, G246A) および GLT-1 (T471C) に存在する合計 5 種類の一塩基多型について、盲導犬群と非盲導犬群の遺伝子頻度に統計学的に有意な差が認められた。さらに、これら 5 種類の遺伝子多型について、盲導犬群で有意に頻度の高い遺伝子型すべてを持つイヌの合格率は 80%であったが、頻度の高い遺伝子型を全く持たないイヌの合格率は 10%にすぎない

という解析結果であった。

ラブラドルリトリバーにおける進行性の網膜萎縮症 (PRA) は、遅発性の進行性桿体 - 錐体異形成 (prcd) タイプであることが明らかにされた (Zangerl *et al.*, 2006) ことから、イヌ染色体 9 番上の prcd 遺伝子を PCR 法によって増幅後、制限酵素 Rsa I および ApaI I を用いた制限酵素断片長多型解析によって、繁殖犬 62 頭、盲導犬 93 頭、リジェクト (不合格) 犬 35 頭を対象に遺伝子の変異の有無を検出した結果、繁殖犬 2 頭 (3%)、盲導犬 1 頭 (1%) およびリジェクト犬 5 頭 (14%) にキャリアーの存在が確認された。リジェクト犬でキャリアーの割合が高かったのは、解析サンプルが少なかつたことに加え、キャリアー個体 5 頭のうち 4 頭が同腹仔であったことに起因していると考えられた。

#### D. 考察

(1) イヌ精子の超急速凍結保存法の開発に関する研究：本研究によって開発された SG 液は、凍結融解後の運動性に関して、既存の卵黄を基礎とするイヌ精子保存液と同等かそれ以上の効果を示すこと、さらには、SG 液で凍結融解したイヌ精子の人工授精によって産仔を得ることに成功したことから、今後、盲導犬のみならず、種々の補助犬の人工授精、遺伝子資源の移動に有効に利用し得ると考えられる。また、それぞれの構成成分の構成比を改良することによって、すべての種雄犬精子の凍結保存に妥当性を有する凍結保存法の開発が期待される場所である。

(2) 盲導犬の人工授精法の普及に関する研究：凍結精子による人工授精成績からは、

雄犬の違いによる受胎率の差異が顕著であったことから、今後は、いずれの雄犬由来の精液にも妥当性のある凍結保存液、凍結保存法の開発、あるいはこの問題を補完する顕微授精などの新規技術の開発が望まれるところである。人工繁殖の有用性については、全国の盲導犬協会の理解が進み、その利用が増加することが期待されるが、今後、人工繁殖技術の積極的な利用と開発によって、年間 300 頭の盲導犬育成、1,500 頭の現役盲導犬を維持する体制を構築したいと考える。

また、ブルセラ症の診断については、繁殖雄犬については年間 2 回、繁殖雌犬については交配前の診断に対応可能な検査体制を構築した。今後は、ネオスポーラ症等についても同様なシステムを樹立して、盲導犬の安定かつ効率的な供給に寄与したい。

(3) 盲導犬の卵巣移植法の確立：すでに移植を施した 3 例については、発情兆候の出現を待って、プロゲステロン値の測定を行った後、適切な時期に自然交配あるいは人工授精により産仔を得る予定である。また、2 年を経過しても発情を認めない場合には、開腹して卵巣組織の検索を実施する。

抗酸化剤あるいは Rho キナーゼ阻害剤の局所投与による卵胞数減少抑制効果は認められなかったことから、今後は投与経路、用量あるいは両者の併用効果についての検討が必要と考えられた。

(4) イヌ胚の凍結保存技術、胚移植技術の開発：イヌ GV 期卵母細胞のガラス化保存では、E30S 法が有効であった。また、1~16 細胞期は、GV 期卵母細胞、桑実胚および胚盤胞に比べて、ガラス化保存後の胚の正常性が高く、

胚の発生段階の違いによる凍結感受性の差異が示唆された。これらの結果から、イヌ卵子のガラス化保存については、卵子、胚の発生段階を考慮することや発生段階別に適した方法を確立すること、さらには、ガラス化卵子の生存性は形態だけでなく細胞膜の正常性などを加味して判定することが必要であると考えられた。

胚移植については、人工授精と同様にヒト用の膀胱鏡を用いることで子宮体部への注入が可能であることが知られた。しかしながら、胚の非外科的な回収は困難を極めており、今後、適切な胚回収用カテーテルの開発が必須であると思われた。

(5) 遺伝子多型の解析による盲導犬適性検査法の開発：盲導犬群で有意に頻度の高い遺伝子多型すべてを持つイヌの合格率は 80%で、これら頻度の高い遺伝子多型を全く持たないイヌの合格率は 10%にすぎない結果であったことから、これらの成績は、性格関連遺伝子の遺伝子多型が、盲導犬適性の指標となり得ることを示していると思われるが、環境を異にする海外の盲導犬を含めた解析規模の拡大によって、より詳細な情報が提供されるものと考えられる。また、5-HTR1B の A157C および G246A における遺伝子型は、一般のラブラドルレトリバーでは、それぞれ、A/A および G/G の頻度が高いことが報告されているが (Matsuda *et al.*, 2004)、本研究における解析対象の盲導犬・非盲導犬群においては、それぞれ A/C および G/A の遺伝子頻度が高い傾向が認められたことから、これらの遺伝子型が何らかの表現型に反映しており、盲導犬候補犬を選ぶにあたって、積極的に選抜された



ものと推察される。また、GLT-1 においては、一塩基多型 T471C の遺伝子型は、一般のラブラドルレトリバーでは C/C の頻度が高いことが報告されている (Ogata et al., 2006)。しかし、盲導犬・非盲導犬群においては、T/T が優勢であることから、盲導犬コロニーにおいては何らかの選択圧によって T/T の遺伝子頻度が上昇したものと考えられる。

現在のところ、PRA の治療法は存在しないため、交配前の遺伝子診断が唯一の解決手段である。本研究で pred の変異の有無を解析した盲導犬集団 190 頭の約 4% にキャリアが存在することが明らかとなった。この割合は、これまで信じられていたキャリアの頻度から比較すると極めて低率であると考えられる。盲導犬事業においては、後代検定の成績からキャリアあるいは罹患犬を摘発、除去してきたものと考えられるが、本研究で開発したスクリーニング系を用いることによって、交配前に遺伝子変異の有無を検定可能となったことから、より効率的な交配計画が実現できるものと考えられる。

#### E. 結論

研究計画に沿った活動によって、新規のイヌ精子凍結保存液の開発を果たすとともに、人工繁殖技術の啓蒙・普及活動およびブルセラ症、進行性網膜萎縮症の診断・検査系を確立し、診断サービスを提供した。次年度以降の本研究の遂行によって、一層の優良補助犬の効率的育成と普及が図られるものとする。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 鈴木宏志, 植田佳子: 盲導犬を科学する—盲導犬適性を左右する遺伝子がわかってきた—  
遺伝 61: 4-6, 2007.
- 2) Lee JY, Uzuka Y, Tanabe S, Sarashina T, Suzuki H, Sato M: Cloning and characterization of canine thyroglobulin complementary DNA. *Domest. Anim. Endocrinol.* 32: 178-189, 2007.
- 3) Maeda K, Lee DS, Yanagimoto UY, Suzuki H: Expression of uterine sensitization-associated gene-1 (USAG-1) in the mouse uterus during the peri-implantation period. *J. Reprod. Dev.* 53: 931-936, 2007.
- 4) Kawase Y, Hani T, Kamada N, Jishage K, Suzuki H: Effect of pressure at primary drying of freeze-drying mouse sperm reproduction ability and preservation potential. *Reproduction* 133: 841-846, 2007.
- 5) Watarai M, Kim S, Yamamoto J, Miyahara K, Kazama M, Matsuoka S, Chimura S, Suzuki H: A rapid agglutination assay for canine brucellosis using antigen coated beads. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 477-480, 2007.
- 6) Kawase Y, Tachibe T, Jishage K, Suzuki H: Transportation of freeze-dried mouse spermatozoa under different preservation conditions. *J. Reprod. Dev.* 53: 1169-1174, 2007.
- 7) Hama K, Aoki J, Inoue A, Endo T, Amano T, Motoki R, Kanai M, Ye X, Chun J, Matsuki N, Suzuki H, Shibasaki M, Arai H: Embryo spacing and implantation timing are differentially regulated by LPA3-mediated lysophosphatidic

acid signaling in mice. *Biol. Reprod.* 77: 954-959, 2007.

8) Abe Y, Lee DS, Kim SK, Suzuki H: Vitrification of canine oocyte. *J. Mamm. Ova Res.* in press.

9) Abe Y, Suwa Y, Yanagimoto UY, Suzuki H: Preimplantation development of embryos in Labrador Retrievers. *J. Reprod. Dev.* in press.

## 2. 学会発表

1) 阿部靖之、諏訪義典、李 東洙、金 相根、鈴木宏志：イヌ GV 期卵母細胞および胚のガラス化保存の試み 第 143 回日本獣医学会学術集会 pp205, 2007.

2) 柳本（植田）佳子、李 晶淵、諏訪義典、鈴木宏志：盲導犬適性と性格関連遺伝子多型との関連性 第 143 回日本獣医学会学術集会 pp217, 2007.

3) 阿部靖之、諏訪義典、李 東洙、金 相根、鈴木宏志：イヌにおける着床前の胚発生および非外科的手法によるガラス化胚移植の試み 第 48 回日本哺乳動物卵子学会 24: S28, 2007.

5) 鈴木宏志、阿部靖之、諏訪義典：イヌのバイオバンク整備に向けての生殖工学技術の開発について 第 4 回北海道実験動物研究会学術集会 pp8, 2007.

6) 柳本（植田）佳子、李 晶淵、諏訪義典、鈴木宏志：盲導犬適性と性格関連遺伝子多型との関連性 第 4 回北海道実験動物研究会学術集会 pp9, 2007.

7) 阿部靖之、佐野 光、野田大地、古林与志安、鈴木宏志：イヌ精巢の凍結保存と異種移植 第 4 回北海道実験動物研究会学術集会 pp10, 2007.

8) Abe Y, Suwa Y, Lee DS, Kim SK, Suzuki H: Vitrification of canine oocytes and embryos, and pregnancy after non-surgical transfer of vitrified embryos. 40th Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction, pp107, 2007.

9) Suzuki H, Lee DS, Sano H, Akiyama K, Suwa Y, Abe Y: Cryopreservation of Canine Spermatozoa in a Simple Extender Composed of Skim Milk, Glucose and Glycerol. 40th Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction, pp237, 2007.

10) 鈴木宏志：盲導犬を科学する—性格関連遺伝子の探究— 第 16 回日本パーソナリティ心理学会 pp9, 2007.

11) 阿部靖之、李 東洙、佐野 光、秋山幸司、諏訪義典、鈴木宏志：スキムミルク希釈液を用いたイヌ精液の凍結保存 第 100 回日本繁殖生物学会大会 53: j119, 2007.

12) 鈴木宏志：盲導犬を科学する 第 100 回日本繁殖生物学会大会第 12 回日本生殖内分泌学会学術集会合同大会 53: j25, 2007.

阿部靖之、諏訪義典、李 東洙、鈴木宏志：13) イヌにおける胚のガラス化保存および非外科的手法による胚移植の試み 第 25 回日本受精着床学会総会・学術講演会 pp223, 2007.

14) 柳本（植田）佳子、李 晶淵、諏訪義典、鈴木宏志：盲導犬適性と性格関連遺伝子多型との関連性 第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会年会合同大会 pp356, 2007.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特願 2007-188779: イヌ精子の凍結保存剤および凍結保存方法 鈴木宏志、阿部靖之  
2. 実用新案登録

該当なし  
3. その他  
該当なし

研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
鈴木宏志、植田佳子	: 盲導犬を科学するー盲導犬適性を左右する遺伝子がわかってきたー	遺伝	61	4-6	2007
Lee JY, Uzuka Y, Tanabe S, Sarashina T, Suzuki H, Sato M	Cloning and characterization of canine thyroglobulin complementary DNA.	<i>Domest. Anim. Endocrinol.</i>	32	178-189	2007
Maeda K, Lee DS, Yanagimoto UY, Suzuki H	Expression of uterine sensitization-associated gene-1 (USAG-1) in the mouse uterus during the peri-implantation period.	<i>J. Reprod. Dev.</i>	53	931-936	2007
Kawase Y, Hani T, Kamada N, Jishage K, Suzuki H	Effect of pressure at primary drying of freeze-drying mouse sperm reproduction ability and preservation potential.	<i>Reproduction</i>	133	841-846	2007
Watarai M, Kim S, Yamamoto J, Miyahara K, Kazama M, Matsuoka S, Chimura S, Suzuki H	A rapid agglutination assay for canine brucellosis using antigen coated beads.	<i>J. Vet. Med. Sci.</i>	69	477-480	2007
Kawase Y, Tachibe T, Jishage K, Suzuki H	Transportation of freeze-dried mouse spermatozoa under different preservation conditions.	<i>J. Reprod. Dev.</i>	53.	1169-1174	2007
Hama K, Aoki J, Inoue A, Endo T, Amano T, Motoki R, Kanai M, Ye X, Chun J, Matsuki N, Suzuki H, Shibasaki M, Arai H	Embryo spacing and implantation timing are differentially regulated by LPA3-mediated lysophosphatidic acid signaling in mice.	<i>Biol. Reprod.</i>	77	954-959	2007
Abe Y, Lee DS, Kim SK, Suzuki H	Vitrification of canine oocyte.	<i>J. Mamm. Ova Res.</i>			in press
Abe Y, Suwa Y, Yanagimoto UY, Suzuki H	Preimplantation development of embryos in Labrador Retrievers.	<i>J. Reprod. Dev.</i>			in press

## 盲導犬を科学する —盲導犬適性を左右する遺伝子がわかってきた

★[Nature誌2007年3月8日掲載記事を読む]

盲導犬の起源は、紀元79年に火山の噴火で埋もれた都市、ポンペイの壁画に描かれていた視覚障害者らしい男性がイヌに導かれて歩いている姿にさかのぼるが、より正確な資料からは、1819年にウィーンの宣教師が盲導犬の訓練をしたのが最初とされている。その後、1916年にドイツのオルデンブルグに盲導犬学校が設立され、現在のような系統的な盲導犬の育成が始められた。当初は、第一次大戦で負傷した傷兵の援助が目的であったが、以来、盲導犬による視覚障害者全般に対する支援が、ヨーロッパを中心に拡大してきた(図1)。

現在、わが国では約950頭の盲導犬が視覚障害者のQOLの維持・向上に寄与すべく活動しているが、30万人を超える視覚障害者からの需要は4,800頭とも7,800頭ともいわれており、慢性的な盲導犬不足が続いている。全国9カ所の盲導犬訓練施設から年間120頭程度の盲導犬が育成され、視覚障害者に提供されているが、盲導犬候補犬が訓練後に卒業できる割合(合格率)は30%程度にとどまっていることから、盲導犬1頭当たりの育成コストは270万円に上っており、その成績の向上が望まれるところである。不合格の理由はさまざまであるが、警戒心の強さや不安を感じる度合いの強さが、訓練によっても除けなかったということが多いようである。人口10万人当たりの盲導犬数は、アメリカでは3.6頭、イギリスでは7.9頭、フィンランドでは4.1頭およびドイツでは2.4頭であるが、わが国では0.7頭と、欧米諸国との差はきわめて大きい(人口に対する視覚障害者の割合は、国、地域によって差がないといわれていることから、盲導犬の普及率は人口比で示されることが一般的である)。わが

国で盲導犬の普及が進んでこなかった要因には、さまざまな社会的・文化的な背景が関与していると思われ、その主因を特定することは困難であるが、育種・繁殖学的な側面からは、小規模の繁殖コロニーが散在していることと、特徴的な盲導犬の育成システムがあげられる。盲導犬候補犬は、例外なく雌雄ともに避妊・去勢術を受けるので、たとえ優秀な盲導犬に育成されたとしても、その子孫を残す術がない。すなわち、盲導犬事業においては、育種概念から逆行した育成システムがとられているので、比較的小さな規模のコロニーでは、その質の維持・向上は難しいものと考えられる。最近になって、家畜の育種・繁殖に一般的に利用されている凍結精子による人工授精技術の盲導犬事業への応用や、これまで廃棄の対象であった盲導犬候補犬の卵巣や精巣を凍結保存しておき、当該個体が優秀な盲導犬に育成されたときに、これらに存在する生殖細胞を利用しよ



(米国サンラファエルにて)

図1 盲導犬の路上訓練



表1 盲導犬と非盲導犬との性格関連遺伝子多型における遺伝子型頻度の違い

遺伝子名	ヒトにおける遺伝子多型と疾患等との関連	イヌの遺伝子多型	多型の種類	P値
COMT	統合失調症, 固執, 痛がり, 酵素活性	G39A	Silent SNP	0.328
		G216A	Silent SNP	0.006
		G482A	Missence SNP	0.034
5-HTR1B	攻撃性, アルコール依存症	A157C	Missence SNP	0.021
		G246A	Silent SNP	0.021
		C660G	Silent SNP	0.752
		T955C	Silent SNP	0.086
GLT-1	アルツハイマー病	T471C	Silent SNP	0.003
DRD4	新奇追求性	Exon I	24 bpの挿入/欠失	0.259
		Exon III	8種の可変長タンDEMリピート	0.979
MAOB	パーキンソン病	T199C	Missence SNP	0.182
TH	たばこ依存症	G180A	Silent SNP	0.159
		C264T	Silent SNP	0.652
DBH	酵素活性, パーキンソン病, 注意欠陥, 多動性障害	C789A	Missence SNP	0.678
		A1819G	Missence SNP	-

Silent SNP: アミノ酸置換を伴わない1塩基多型

Missence SNP: アミノ酸置換を伴う1塩基多型

うとする生殖工学的な技術開発の試みとともに、より盲導犬としての適性が高い候補犬を訓練の対象にすることが期待できる遺伝子診断システムの構築が進められている。

## 盲導犬の遺伝子多型解析

訓練前における盲導犬のより正確な適性把握が、その育成効率を改善すると考えられるが、盲導犬としての適性は性格によるところが大きく、遺伝的な要因も関与しているといわれている。そこで、性格形成に関与しているといわれている遺伝子の多型と盲導犬適性との関連性に関して、盲導犬および非盲導犬(不合格犬)それぞれ約100例のDNAサンプルを血液あるいは口腔粘膜細胞から調製し、7遺伝子の15多型について遺伝子型頻度の解析を行うことによって検討した。対象とした遺伝子は、ドーパミンD4受容体(DRD4)、モノアミン酸化酵素B(MAOB)、チロシン水酸化酵素(TH)、ドーパミンβ-水酸化酵素(DBH)、カテコール-O-メチル基転移酵素(COMT)、セロトニン受容体1B(5-HTR1B)、およびグルタミン酸輸送体(GLT-1)であったが、これらのうちCOMT、5-HTR1Bお

よびGLT-1に存在する合計5種類の1塩基多型\*について、盲導犬群と非盲導犬群との間の遺伝子型頻度に統計学的に有意な差が認められた(表1)。さらに興味深いことに、これら5種類の遺伝子多型\*について、盲導犬群で頻度の高い遺伝子型すべ

### 【1塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP)】

DNA配列のうちの1塩基が多型を示すこと。その場所によっては遺伝子から転写・翻訳されるアミノ酸、タンパク質に影響を及ぼす場合がある。繰り返し配列は遺伝子ではない部分に存在することが多いが、1塩基多型は遺伝子内にも存在し、遺伝子機能に違いをもたらすため、病気に対する感受性や抵抗性に関与する可能性もある。

### 【遺伝子多型 (genetic polymorphism)】

DNAの塩基配列に2通り以上の異なる配列が存在する場合、普通と異なる塩基配列の頻度が1%以上存在するものを多型と定義し、これより少ない場合には突然変異として区別される。多型には1塩基多型のほか、繰り返し配列の繰り返し回数の違いがあり、親子鑑定などのマーカーに利用される。

てを持つイヌの合格率は約80%であったが、頻度の高い遺伝子型をまったく持たないイヌの合格率は10%にすぎないという成績であった。これらの成績は、性格関連遺伝子の遺伝子多型が、盲導犬適性の指標となりうることを示していると思われるが、環境を異にする海外の盲導犬を含めた解析規模の拡大によって、より詳細な情報が提供されるものと考えられる。

5-HTR1Bの1塩基多型A157Cについて一般のラブラドルレトリバーではCアレルは存在しないこと、およびG246Aにおける遺伝子型については、一般のラブラドルレトリバーではG/Gの頻度が高いことが報告されているが<sup>1)</sup>、解析対象となった盲導犬・非盲導犬群においては、それぞれA/CおよびG/Aの遺伝子型頻度が高い傾向が認められたことから、これらの遺伝子型がなんらかの表現型に反映しており、盲導犬候補犬を選ぶにあたって、積極的に選択されたものと推察される。また、GLT-1においては、1塩基多型T471Cの遺伝子型は、一般のラブラドルレトリバーではC/Cの頻度が高いことが報告されている<sup>2)</sup>。しかし、盲導犬・非盲導犬群においては、T/Tが優勢であることから、盲導犬コロニーにおいてはなんらかの指標による選抜によってT/Tの遺伝子型頻度が上昇したものと考えられる。今後、性格に関する表現型と遺伝子多型との関連性についての解析の進展が待たれるところである。

## K9バイオバンク

バイオバンクとは、オーダーメイド医療の実現化に向けた研究を目的として、数十万人のDNAおよび血液試料を集めるプロジェクトのことで、集められた遺伝子情報を生活習慣病などの病気と遺伝子の個人差との関係の解明に利用しようとするものである。一方、盲導犬の効果的な育成に活用することを目的として、イヌについて同様な情報を統合管理するのがK9〔canine(イヌの意)〕バイオバンクである。K9バイオバンクは、世界に先駆けてわが国で企画されたものであり、個人情報データベースと遺伝子資源データベースとから構成され、上述の性

格関連遺伝子の多型やマイクロサテライトマーカーを含めた盲導犬の遺伝子情報、病歴、家系情報等とDNA、卵子、精子等の遺伝子資源を統合的に管理することによって、比較的零細な規模の盲導犬事業所が散在しているわが国の盲導犬育成のポテンシャルを最大限に発揮させることを意図している。一方、生物資源の維持管理の観点からみた盲導犬事業の大きな特徴は、イヌの個体・家系管理が厳重になされ、各世代にわたって、健康状態、病歴、繁殖歴等が記録・保管されていることにある。したがって、これらの情報をデータベース化するとともに、血液を含む体細胞、ゲノムDNAおよび生殖細胞を保存するイヌのバイオバンクを整備することによって、医学・薬学研究に活用できるきわめて貴重な生物資源バンクを実現させることができる。ヒトのバイオバンクとは異なり、生殖細胞の保存・利用が可能な動物のバイオバンクの最大の利点は、個体の作出を可能とさせることである。K9バイオバンクは盲導犬事業のみならず、広く学術利用されることによって、バイオサイエンスの発展にも寄与することが期待される。

### [引用文献]

- 1) Masuda, K., Hashizume, O., Ogata, N., Kikusui, T., Takeuchi Y. *et al. J. Vet. Med. Sci.*, **66**, 965-972 (2004).
- 2) Ogata, N., Hashizume, C., Momozawa, Y., Masuda, K., Kikusui, T. *et al. J. Vet. Med. Sci.*, **68**, 157-159 (2006).

### 鈴木 宏志 Hiroshi Suzuki

帯広畜産大学 原虫病研究センター ゲノム機能学分野 教授  
東京大学大学院 医学系研究科 発生・医療工学講座 客員教授

### 植田 佳子 Yoshiko Ueta

帯広畜産大学 原虫病研究センター ゲノム機能学分野 研究員





## Cloning and characterization of canine thyroglobulin complementary DNA<sup>☆</sup>

J.-Y. Lee<sup>a,\*</sup>,<sup>1</sup>, Y. Uzuka<sup>b</sup>, S. Tanabe<sup>a</sup>, T. Sarashina<sup>a</sup>,  
H. Suzuki<sup>c</sup>, M. Sato<sup>d</sup>

<sup>a</sup> *Laboratory of Veterinary Internal Medicine, Department of Clinical Veterinary Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan*

<sup>b</sup> *Department of Veterinary Clinical Radiology, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan*

<sup>c</sup> *Research Unit for Functional Genomics, National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan*

<sup>d</sup> *Department of Veterinary Clinical Radiology, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan*

Received 12 October 2005; received in revised form 21 February 2006; accepted 23 February 2006

### Abstract

Canine thyroglobulin (cTg) is one of the thyroid autoantigens associated with hypothyroidism caused by autoimmune thyroiditis in dog. To identify canine-specific areas in cTg, we cloned, by reverse transcriptase PCR, and sequenced the complete cDNA of cTg. It revealed an open reading frame of 8289 nucleotides, which encode a polypeptide of 2762 amino acids that is 78.9 and 78.1% identical to bovine and human thyroglobulin, respectively. This complete cTg sequence may be useful to promote the understanding of the primary structure of cTg and, it will be informative data in the

<sup>☆</sup> The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to DDBJ with the accession number AB231914.

\* Corresponding author. Tel.: +81 155 5806; fax: +81 155 5643.  
E-mail address: [s01060@st.obihiro.ac.jp](mailto:s01060@st.obihiro.ac.jp) (J.-Y. Lee).

<sup>1</sup> Current address: Research Unit for Functional Genomics, National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan.



further search about antigenic epitopes associated with autoimmune thyroiditis and pathogenesis of cTg-associated thyroid diseases in dog.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Keywords:* Autoimmune thyroid diseases; cDNA; Thyroglobulin; RT-PCR; Dog

## 1. Introduction

In dog, hypothyroidism is a common endocrine disease and at least half of patients have autoimmune thyroiditis (lymphocytic thyroiditis) [1,2], a condition analogous to Hashimoto's thyroiditis in human. In humans, autoantibodies to human thyroglobulin (hTgAA) are found in high titers in the sera of patients with autoimmune thyroid diseases, including Graves' and Hashimoto's diseases and other thyroid disorders such as thyroid carcinoma [3–5]. Canine thyroglobulin (cTg) is one of the autoantigens implicated in the pathogenesis of canine hypothyroidism caused by autoimmune thyroiditis. In conjunction with clinical signs and clinicopathological abnormalities suggestive of thyroiditis, detection of circulating autoantibodies to cTg (cTgAA) has been considered useful in supporting the diagnosis of hypothyroidism [6,7]. cTg is about 660 kDa glycoprotein composed of two identical subunits and secreted by thyrocytes and constitutes most of the follicular colloid as well as part of the cytosolic material. The biological function of cTg is known to provide a matrix for the iodination of its tyrosine and thus the synthesis of thyroid hormones [8]. Also, thyroglobulin (Tg) is known to contain many antigenic epitopes and capable of inducing thyroiditis in human and experimental animals [9–11]. In a previous study, to localize the disease-associated epitopes of cTg, after degradation of cTg with trypsin, the tryptic peptides of cTg were tested by Western immunoblotting for their immunoreactivity to serum thyroglobulin autoantibodies from patients with TgAA-positive hypothyroidism and normal individuals [12]. However, the search for unique cTg epitopes has been hampered by the lack of the complete primary structure of cTg [12]. Complete sequences of thyroglobulin gene have been reported for bovine, human, murine and rat Tg [13–16]. The purposes of this study were to obtain cDNA sequence and complete primary structure of cTg, and compare it with Tg sequences of human and other species.

## 2. Materials and methods

### 2.1. mRNA extraction and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

mRNA was prepared from thyroid glands of healthy dogs using the FastTrack 2.0 mRNA isolation kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using RNA LA PCR kit (TaKaRa, Shiga, Kyoto).

cDNA synthesis was carried out for 30 min at 50 °C in a 20 µl reaction solution containing 50 ng mRNA, 20 pmol downstream primer (Table 1) and 5 units AMV Reverse

Transcriptase XL. Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a 100 µl reaction solution containing 5 units TaKaRa LA Taq for 40 cycles using synthetic primers, which were designed using conserved regions in the coding sequence of the previously identified Tg sequences of four mammalian species, bovine, human, murine and rat, such that nine overlapping regions of approximately 1–2 kb in length were amplified (Table 1). The amplification of cDNA was performed for 40 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at the specific annealing temperature, and 2 min at 72 °C. The first cycle was preceded by a denaturation of 2 min at 94 °C and the last cycle was followed by a final extension of 5 min at 72 °C.

### 2.2. Circular first-strand cDNA-mediated RACE method of the 5' end of cTg mRNA

The 5' end of cTg mRNA was identified by the modified cRACE method using 5'-Full RACE core set (TaKaRa, Shiga, Kyoto). cDNA synthesis was performed as described above, with a phosphorylated downstream gene-specific primer (LA-PCR3, Table 1), located approximately 600 nucleotides from the putative transcription start. After hydrolysis of the template mRNA at 37 °C for 1 h, the cDNA was precipitated with ethanol and redissolved in 40 µl of RNA Ligation buffer containing 20% polyethylene glycol. After 40 units T4 RNA ligase was added, this ligation mixture was incubated at 15 °C for 16 h and an aliquot was directly used as a template for the amplification with gene-specific primers (LA-PCR4 and LA-PCR5, Table 1). The reaction was carried out for 40 cycles of 30 s denaturation at 94 °C, 30 s annealing at 58 °C and 1 min extension at 72 °C. The first cycle was preceded by a denaturation of 2 min at 94 °C and the last cycle was followed by a final extension of 5 min at 72 °C.

### 2.3. Cloning and sequencing

The PCR products were cloned into pT7Blue-2 plasmid vector (Novagen, Madison, WI) and pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector (Promega, Madison, WI), according to the manufacture's recommendations. The sequence of the plasmid inserts was determined by automated DNA

Table 1  
Sequence (5' → 3') of the primers used for PCR cloning of canine thyroglobulin

Clones	T <sub>ann</sub> (°C)	Upstream primer	Downstream primers
A	56	CTCACTAGGTGGTGAGGA	GTTTTCCCAGTCACGAC + T tail
B	58	GAGTTCCATATGCTGCCCC	GGATTTCTGATCTGATGAAG
C	60	GCAAACCTGTGGTGCCTTTC	GCAGCTGGCCCTTGGCTT
D	62	TACCGAGCCAGCCAGAAGGAC	TCTATCTTCCAGCACAACTTTC
E	55	GAGTGATCGTGTGTGAGC	CCATAGAAATCACAGGAGAC
F	52	GAAGATCATGAGCTACAGA	CGGGAGCAGGAGCTG
G	56	CTTCAGTCAGTTTTTCCAGC	GAGCGCTGAAGTCTGAGTA
H	56	GCAGCTACATTAACAGCA	CATCCTCGTAGTCTCCTTC
LA-PCR	56	GAGCGGCTACCTTAACA (LA5)	CATACACCTCCATCCCTTC (LA3) CTGCAGCTGACAGAATGACA (LA4)

Note: T<sub>ann</sub> is the annealing temperature used in PCR.



sequencing using a BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit and a 3700 DNA sequence analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

#### 2.4. Sequencing analysis

The determined DNA sequences data were analyzed using the program of GENETYX-Mac (Software Development, Sibuya, Tokyo) for sequence editing and analysis. The search for functional motifs of the predicted polypeptides was performed at the Sequence Motif Search website (<http://motif.genome.jp>).

### 3. Results

The nucleotide sequence of cTg mRNA was deduced by RT-PCR, cloning, and subsequent sequencing of nine overlapping plasmid cDNA clones. The nucleotide sequence revealed an open reading frame of 8289 nucleotides, preceded by a 41-nucleotide 5' end-untranslated region, and followed by a 128-nucleotide 3' end-untranslated region, containing the canonical polyadenylation signal (AAUAA). The cTg nucleotide sequence predicted a polypeptide of 2762 amino acids (Fig. 1). A leader peptide of 19 amino acids was followed by a 2743-amino-acid polypeptide, corresponding to the monomeric cTg. The amino acid composition indicated a rather high amount of leucine and serine residues (9.70 and 9.20%, respectively), and a small proportion of methionine (1.16%). Hydrophobic and charged amino-acid residues were homogeneously distributed on the polypeptide, whereas cysteine involved in the repetitive structures. The monomeric cTg polypeptide contained 66 tyrosine residues, representing 2.39% of total. The homology of cTg with the bovine, human, murine and rat Tg was 78.9, 78.1, 70.2, and 69.5%, respectively, at the amino acid level, and sequence databases searches confirmed that human acetylcholinesterase has the strongest match, with 31% identity with the cTg sequence. Analysis of the deduced amino acid sequence revealed the existence of the repeated domain, thyroglobulin type-1. This domain was exclusively present in the N-terminal portion of the molecule, and was repeated nine times. It was composed of approximately 65 amino acids, in which the position of cysteine, proline, and glycine residues were highly conserved. The proportion of cysteine and tyrosine in the type-1 domain was high, as compared to the entire protomer. With type-1 domain, the amino acid sequence of cTg contained many functional motifs, 16 potential *N*-glycosylation sites, three cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites, 1 carboxylesterases type-B signature 2, 1 amidation site, 35 protein kinase C phosphorylation sites, 3 tyrosine kinase phosphorylation sites, 49 *N*-myristoylation sites, 50 casein kinase II phosphorylation sites and 1 leucine zipper pattern (Fig. 2).

### 4. Discussion

The analysis of the amino acid sequence of cTg, as deduced from its mRNA, revealed the polypeptide of 2762 amino acids. Homology analysis showed that cTg is closely related

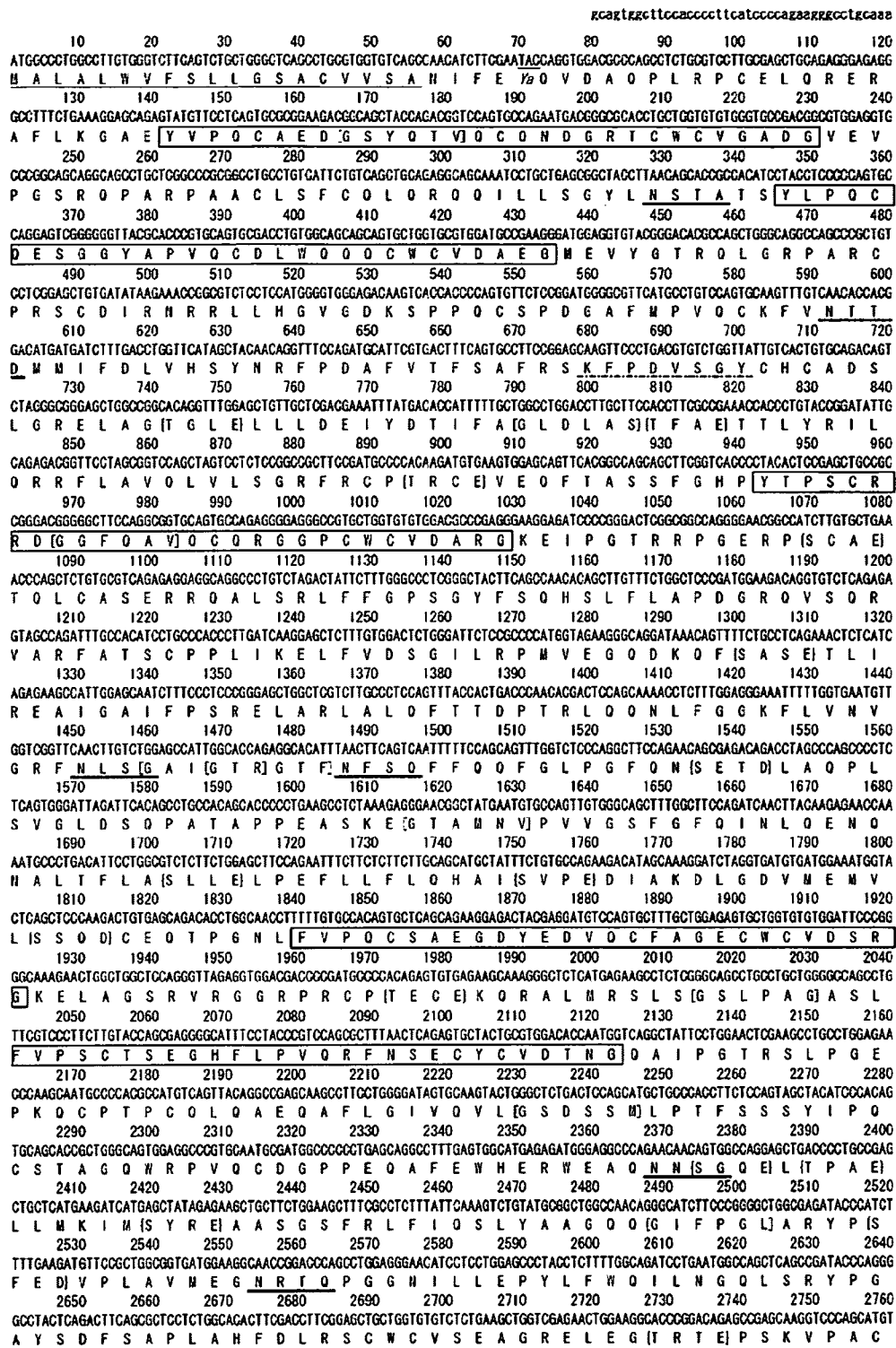


Fig. 1. Nucleotide sequence of canine thyroglobulin cDNA, and the deduced sequence of the protein. The last three sequences, TGA (\*) is stop codon: XXX, leader peptide; XXX, cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site; XXX, N-glycosylation site; XXX, carboxylesterase type-B signature 2; XXX, amidation site; XXX, protein kinase C phosphorylation site; XXX, tyrosine kinase phosphorylation site; [XXX], N-myristoylation site; {XXX}, casein kinase II phosphorylation site; [XXX], thyroglobulin type 1 repeat signature; Yx, tyrosine residues A–D.