

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-212121  
(P2016-212121A)

(43) 公開日 平成28年12月15日(2016.12.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	4 B O 2 9
<b>GO 1 N 33/573 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/573 A	4 B O 6 3
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	4 H O 4 5
<b>C 1 2 M 1/00 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 M	
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 M 1/00 Z N A A	

審査請求 有 請求項の数 27 O L (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-174275 (P2016-174275)  
 (22) 出願日 平成28年9月7日(2016.9.7)  
 (62) 分割の表示 特願2015-49937 (P2015-49937) の分割  
 原出願日 平成27年3月12日(2015.3.12)  
 (31) 優先権主張番号 10-2014-0169854  
 (32) 優先日 平成26年12月1日(2014.12.1)  
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

特許法第30条第2項適用申請有り 2014年9月12日に公開された Korean Society of Developmental Biology (33th Annual Meeting), Dev. Reprod Vol. 18 (suppl 1)、28~31頁

(71) 出願人 512291064  
 チュンアン ユニバーシティー インダストリー アカデミック コアポレイション ファウンデーション  
 大韓民国 ソウル 156-756 ドンジャクグ、84 フクソンノ、チュンアン ユニバーシティー  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74) 代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

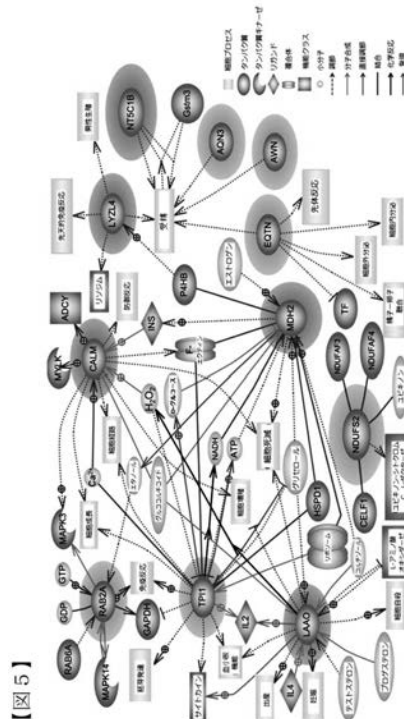
(54) 【発明の名称】 受胎能力に関連するタンパク質マーカーを用いた動物の産仔数予測方法、並びにクロルテトラサイクリン染色法を用いた動物の精液品質および産仔数予測方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、受胎能力に関連するタンパク質マーカーを用いた動物の産仔数予測方法、並びにクロルテトラサイクリン染色法を用いた動物の精液品質および産仔数予測方法に関する

【解決手段】本発明は、受胎能力に関連するタンパク質マーカーを用いた動物の産仔数予測方法に関し、より詳細には、動物の産仔数生産能力に応じて異なって発現される精子のマーカーを見出し、前記マーカーに特異的に結合する抗体を含む産仔数予測用マーカー組成物、およびそれを用いて動物の産仔数を予測する方法に関する。また、本発明は、クロルテトラサイクリン染色法を用いた動物の精液品質および産仔数予測方法に関し、より詳細には、精子の運動性、運動学または受精能獲得 (capacitance) 状態を測定して動物の産仔数を予測する方法に関する。

【選択図】 図5



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

精液で発現が増加することを特徴とする CALM (Calmodulin)、ブタ (porcine) の産仔数予測用マーカー。

## 【請求項2】

CALM (Calmodulin) マーカーに特異的に結合する抗体を含む、ブタ (porcine) の産仔数予測用組成物。

## 【請求項3】

L アミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase, LAAO)、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2, NAD)、細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5' nucleotidase 1B, NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4, LYZL4)、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin Aqn 3)、および NDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) からなる群から選択される1つ以上のマーカーに特異的に結合する抗体をさらに含む、請求項2に記載の ブタ (porcine) の産仔数予測用組成物。

10

20

## 【請求項4】

前記抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であることを特徴とする、請求項2に記載の ブタ (porcine) の産仔数予測用組成物。

## 【請求項5】

請求項2に記載の組成物を含む、ブタ (porcine) の産仔数予測用キット。

## 【請求項6】

基質との反応により発色する標識体が接合された2次抗体接合体と、前記標識体と発色反応する発色基質溶液と、洗浄液と、

酵素反応停止液と、をさらに含むことを特徴とする、請求項5に記載の ブタ (porcine) の産仔数予測用キット。

30

## 【請求項7】

前記標識体は、HRP (horseradish peroxidase)、アルカリ性リン酸分解酵素 (alkaline phosphatase)、コロイドゴールド (colloid gold)、蛍光物質 (fluorescein)、および 色素 (dye) からなる群から選択されることを特徴とする、請求項6に記載の ブタ (porcine) の産仔数予測用キット。

## 【請求項8】

前記発色基質は、TMB (3, 3', 5, 5' tetramethyl bezidine)、ABTS [2, 2' azinobis (3 ethylbenzothiazoline 6 sulfonic acid)]、および OPD (o phenylenediamine) からなる群から選択されることを特徴とする、請求項6に記載の ブタ (porcine) の産仔数予測用キット。

40

## 【請求項9】

(a) 抗 CALM (Calmodulin) 抗体 でコーティングした固定体に対象試料を加えて、抗原抗体反応させる段階と、

(b) 前記 (a) 段階により生成された抗原抗体反応物を、標識体が接合された2次抗体接合体および発色基質溶液を用いて検出する段階と、

(c) 前記検出された CALM (Calmodulin) タンパク質 のレベルを対照群と比較して、産仔数予測のための情報を提供する段階と、を含む、ブタ (porcine)

50

の産仔数予測用マーカー検出方法。

【請求項10】

(a') 抗 L アミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、LAAO)、抗 MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、抗 細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5' nucleotidase 1B、NT5C1B)、抗 リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、抗 EQTN (Equatorin)、抗 スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、抗 TPI (Triosephosphate isomerase)、抗 RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、抗 スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、および抗 NDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) 抗体からなる群から選択される1つ以上の抗体でさらにコーティングした固定体に対象試料を加えて、抗原 抗体反応させる段階と、

(b') 前記(a')段階により生成された抗原 抗体反応物を、標識体が接合された2次抗体接合体および発色基質溶液を用いて検出する段階と、

(c') 前記検出されたL アミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5' nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、またはNDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) タンパク質のレベルを対照群とさらに比較して、産仔数予測のための情報を提供する段階と、を含む、請求項9に記載のブタ (porcine) の産仔数予測用マーカー検出方法。

【請求項11】

前記固定体は、ニトロセルロース膜、PVDF膜、ポリビニル (polyvinyl) またはポリスチレン (polystyrene) 樹脂で合成されたウェルプレート、およびガラスからなるスライドガラスで構成される群から選択されることを特徴とする、請求項9または10に記載のブタ (porcine) の産仔数予測用マーカー検出方法。

【請求項12】

前記抗原 抗体結合反応が、酵素免疫測定法 (enzyme linked immunosorbent assay、ELISA)、放射免疫測定法 (radioimmunoassay、RIA)、サンドイッチ測定法 (sandwich assay)、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、免疫組織化学染色法 (immunohistochemical staining)、蛍光免疫法、酵素基質発色法、抗原 抗体凝集法からなる群から選択されることを特徴とする、請求項9または10に記載のブタ (porcine) の産仔数予測用マーカー検出方法。

【請求項13】

前記標識体は、HRP (horseradish peroxidase)、アルカリ性リン酸分解酵素 (alkaline phosphatase)、コロイドゴールド (colloid gold)、蛍光物質 (fluorescein)、および色素 (dye) からなる群から選択されることを特徴とする、請求項9または10に記載のブタ (porcine) の産仔数予測用マーカー検出方法。

【請求項14】

前記発色基質は、TMB (3,3',5,5' tetramethyl bezidi

10

20

30

40

50

ne)、ABTS [2, 2'-azino bis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid)]、およびOPD (o-phenylenediamine) からなる群から選択されることを特徴とする、請求項9または10に記載のブタ (porcine) の産仔数予測用マーカー検出方法。

【請求項15】

CALM (Calmodulin) マーカーを暗号化する遺伝子または前記遺伝子のmRNAに特異的に結合するプライマーまたはプローブを含む、ブタ (porcine) の産仔数予測用組成物。

【請求項16】

L アミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase, LAAO)、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2, NAD)、細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5' nucleotidase 1B, NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4, LYZL4)、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin AWN)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、およびNDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) からなる群から選択される1つ以上のマーカーを暗号化する遺伝子または前記遺伝子のmRNAに特異的に結合するプライマーまたはプローブをさらに含む、請求項15に記載のブタ (porcine) の産仔数予測用組成物。

【請求項17】

前記プローブは、前記遺伝子または前記遺伝子のmRNAと厳しい条件下でハイブリダイズすることができるプローブであることを特徴とする、請求項15に記載のブタ (porcine) の産仔数予測用組成物。

【請求項18】

請求項15に記載の組成物を含む、ブタ (porcine) の産仔数予測用キット。

【請求項19】

前記キットは、PCRキット、RT-PCRキット、またはDNAチップであることを特徴とする、請求項18に記載のブタ (porcine) の産仔数予測用キット。

【請求項20】

(a) 対象試料で、CALM (Calmodulin) のmRNAまたはタンパク質レベルを測定する段階と、

(b) 前記mRNAまたはタンパク質の発現量の増加または減少を分析する段階と、を含む、ブタ (porcine) の産仔数予測方法。

【請求項21】

前記(a)段階のタンパク質レベルを測定する段階は、抗 CALM (Calmodulin) 抗体を用いることを特徴とする、請求項20に記載のブタ (porcine) の産仔数予測方法。

【請求項22】

(a') 対象試料で、L アミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase, LAAO)、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2, NAD)、細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5' nucleotidase 1B, NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4, LYZL4)、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin AWN)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、およびNDUFS2 (NADH dehyd

10

20

30

40

50

rogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) からなる群から選択される1つ以上の動物の産仔数予測用マーカーのmRNAまたはタンパク質レベルをさらに測定する段階と、

(b') 前記mRNAまたはタンパク質の発現量の増加または減少を分析する段階と、を含む、請求項20または21に記載のブタ(porcine)の産仔数予測方法。

【請求項23】

前記(a')段階のタンパク質レベルを測定する段階は、抗 L アミノ酸オキシダーゼ(L amino acid oxidase、LAAO)、抗 MDH2(Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、抗細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B(Cytosolic 5' nucleotidase 1B、NT5C1B)、抗リゾチーム様タンパク質4(Lysozyme like protein 4、LYZL4)、抗EQTN(Equatorin)、抗スペルマドヘシンAWN(Spermadhesin Awn)、抗TPI(Triosephosphate isomerase)、抗RAB2A(Ras related protein Rab 2A)、抗スペルマドヘシンAQN 3(Spermadhesin AQN 3)、および抗NDUFS2(NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)抗体からなる群から選択される1つ以上を用いることを特徴とする、請求項22に記載のブタ(porcine)の産仔数予測方法。

10

【請求項24】

前記試料で、L アミノ酸オキシダーゼ(L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2(Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B(Cytosolic 5' nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4(Lysozyme like protein 4、LYZL4)、およびCALM(Calmodulin)からなる群から選択される1つ以上の動物の産仔数予測用マーカーのmRNAまたはタンパク質の発現量が増加すると、動物の産仔数が高いと予測する段階をさらに含むことを特徴とする、請求項20~23のいずれか1項に記載のブタ(porcine)の産仔数予測方法。

20

【請求項25】

抗 L アミノ酸オキシダーゼ(L amino acid oxidase、LAAO)、抗 MDH2(Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、抗細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B(Cytosolic 5' nucleotidase 1B、NT5C1B)、抗リゾチーム様タンパク質4(Lysozyme like protein 4、LYZL4)、または抗CALM(Calmodulin)抗体を用いた時に、L アミノ酸オキシダーゼ(L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2(Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B(Cytosolic 5' nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4(Lysozyme like protein 4、LYZL4)、またはCALM(Calmodulin)のタンパク質の発現量が増加すると、動物の産仔数が高いと予測することを特徴とする、請求項24に記載のブタ(porcine)の産仔数予測方法。

30

40

【請求項26】

前記試料で、EQTN(Equatorin)、スペルマドヘシンAWN(Spermadhesin Awn)、TPI(Triosephosphate isomerase)、RAB2A(Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3(Spermadhesin AQN 3)、およびNDUFS2(NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)からなる群から選択される1つ以上の動物の産仔数予測

50

用マーカーの mRNA またはタンパク質の発現量が増加すると、動物の産仔数が低いと予測する段階をさらに含むことを特徴とする、請求項 22 または 23 に記載の ブタ (porcine) の産仔数予測方法。

【請求項 27】

抗 EQTN (Equatorin)、抗 スペルマドヘシン AWN (Spermadhesin AWN)、抗 TPI (Triosephosphate isomerase)、抗 RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、抗 スペルマドヘシン AQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、または抗 NDUF52 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) 抗体を用いた時に、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシン AWN (Spermadhesin AWN)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシン AQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、または NDUF52 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) のタンパク質の発現量が増加すると、動物の産仔数が低いと予測することを特徴とする、請求項 26 に記載の ブタ (porcine) の産仔数予測方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、受胎能力に関連するタンパク質マーカーを用いた動物の産仔数予測方法に関し、より詳細には、動物の産仔数生産能力に応じて異なって発現される精子のマーカーを見出し、前記マーカーに特異的に結合する抗体を含む産仔数予測用マーカー組成物、およびそれを用いて動物の産仔数を予測する方法に関する。また、本発明は、クロルテトラサイクリン染色法を用いた動物の精液品質および産仔数予測方法に関し、より詳細には、精子の運動性、運動学または受精能獲得状態を測定して動物の産仔数を予測する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

30

動物を対象とする雄動物の受胎能の予測および診断は、当業者の主な関心事である。人の受胎能に関連する問題の約 50% は、男性因子 (male factor) に由来する。また、50% に該当する種雄 (Sire、例えば、父獣、種馬、種豚など) を用いた繁殖システムの失敗は、動物産業に大きい経済的損失を与え得る (非特許文献 1)。したがって、雄動物の受胎能を正確に予測および診断するために、新しい方法が開発されるべきである。

全世界的に、人工授精 (Artificial insemination、AI) が動物産業で幅広く行われている。最近のデータによれば、ここ 30 年間、ヨーロッパや米国で雌ブタの 90% が AI により繁殖された (非特許文献 2)。また、豚産業で、遺伝的なアップ グラデーション (up gradation) のために AI が広範囲に行われている (非特許文献 3)。

40

【0003】

一方、高品質の精液を選択するために用いられる方法は、精子の形態、運動性、および卵母細胞の浸透力アッセイなどの既存の分析方式に依存している (非特許文献 4 ; 非特許文献 5 ; 非特許文献 6)。このような検査は、可妊 / 不妊 (fertility / infertility) の雄因子を測定する際に多く用いられているが、臨床的な価値は正確に立証されていない (非特許文献 7 ; 非特許文献 8)。

【0004】

したがって、従来 of 精液検査の欠点を補完するために、ヒトと経済的重要性を有する動物の種を対象として精子の機能および受胎能を測定できる新しい方法が開発されなければな

50

らない。これとともに、増大された産仔数生産効率を有する優れた種雄 (sire) を選択する方法が提供された時に、シード (seed) の生産を最適化するための方法も開発されるべきである。

【0005】

最近報告されたいくつかの研究によれば、効果的なツールとしてプロテオミクス (proteomics) を用いると、精子の分子生物学的現象を理解するにおいて役に立つと報告されており、実際に、精子のプロテオミクスについての蓄積された知識は、新たな分子マーカーを見出すことを可能とした。(非特許文献9; 非特許文献10)。このような点で、包括的なプロテオミクスツールを用いて優れた種雄 (sire) 由来タンパク質バイオマーカーを見出すことは、動物の生殖に関連する分野の新しい地平を開くであろう。

10

【0006】

哺乳動物の射精された精子は、女性生殖管 (female genital tract) に長時間存在しながら、受精能獲得などの必要な生理学的な変形過程を経る(非特許文献11; 非特許文献12; 非特許文献13; 非特許文献14, 非特許文献15; 非特許文献16)。精子は、卵子と受精するために受精能獲得過程を経なければならないため、精子の受胎能力を考慮すると、受精能獲得過程前、後の変化は非常に重要である。しかしながら、現在までは、産仔数にかかわらず受精能獲得前、後のタンパク質発現挙動の差のみを比較した研究が多かった。

そこで、本発明者らは、新しい産仔数予測方法を開発するために鋭意検討した結果、精子の受精能獲得 (capacitance) 前後のタンパク質マーカーの発現変化による産仔数の予測方法と、クロルテトラサイクリン染色法を用いた受精能獲得状態による動物の精液品質および産仔数の予測方法を用いると、個体の産仔数生産能力が効果的に予測できることを確認し、本発明をなすに至った。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Sharlip ID et al., Fertility Steril, 77(5): 873-882, 2002

【非特許文献2】Gerrits RJ et al., Theriogenology, 63(2): 283-299, 2005

30

【非特許文献3】Gadea J, Theriogenology, 63(2): 431-444, 2005

【非特許文献4】Bonde JP, Lancet, 352(9135): 1172-1177, 1998

【非特許文献5】Budworth PR et al., J Androl, 9(1): 41-54, 1998

【非特許文献6】Oh SA et al., Anim Reprod Sci, 121(1-2): 131-138, 2010

【非特許文献7】Lewis SE, Reproduction, 134(1): 31-40, 2007

40

【非特許文献8】Braundmeier AG, Journal of Dairy Science, 84: 1915-1925, 2001

【非特許文献9】Corner JS et al., In The Sperm Cell, pp49-71, 2006

【非特許文献10】de Mateo S et al., Proteomics, 7(23): 4264-4277, 2007

【非特許文献11】Zaneveld LJ et al., Human Reproduction, 6: 1265-1274, 1991

【非特許文献12】Fraser LR et al., Journal of Reproduction and Fertility, 96: 363-377, 2001

50

【非特許文献13】Kirichok Y et al., Nature, 439:737-740, 2006

【非特許文献14】Visconti PE, PNAS, 106:667-668, 2009

【非特許文献15】Kwon WS et al., Fertil Steril, 99:354-61, 2013

【非特許文献16】Kwon WS et al., PLoS One, 8:e54192, 2013

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0008】

本発明の目的は、動物の産仔数予測用バイオマーカー、産仔数予測用マーカー組成物、および前記マーカーを用いて動物の産仔数を予測する方法を提供することにある。

【0009】

本発明の他の目的は、精子の受精能獲得 (capacitance) 有無に応じて動物の精液品質を予測する方法および動物の産仔数を予測する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、例えば、以下を提供する：

20

(項目1)

L アミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5' nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、CALM (Calmodulin)、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin AWN)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、およびNDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) からなる群から選択される動物の精液で発現が増加することを特徴とする、動物の産仔数予測用マーカー。

30

(項目2)

前記動物は、ウシ (bovine)、ウマ (equine)、ブタ (porcine)、ヒツジ (ovine)、エルク (elk)、およびバイソン (bison) からなる群から選択される何れか1つであることを特徴とする、上記項目に記載の動物の産仔数予測用マーカー。

(項目3)

L アミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5' nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、CALM (Calmodulin)、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin AWN)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、およびNDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) からなる群から選択される1つ以上のマーカーに特異的に結合する抗体を含む、動物の産仔数予測用組成物。

40

50

(項目4)

前記抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であることを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測用組成物。

(項目5)

上記項目のいずれかに記載の組成物を含む、動物の産仔数予測用キット。

(項目6)

基質との反応により発色する標識体が接合された2次抗体接合体と、

前記標識体と発色反応する発色基質溶液と、

洗浄液と、

酵素反応停止液と、をさらに含むことを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測用キット。

10

(項目7)

前記標識体は、HRP (horseradish peroxidase)、アルカリ性リン酸分解酵素 (alkaline phosphatase)、コロイドゴールド (colloid gold)、蛍光物質 (fluorescein)、および色素 (dye) からなる群から選択されることを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測用キット。

(項目8)

前記発色基質は、TMB (3, 3', 5, 5' tetramethyl bezidine)、ABTS [2, 2' azinobis (3 ethylbenzothiazoline 6 sulfonic acid)]、およびOPD (o phenylene diamine) からなる群から選択されることを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測用キット。

20

(項目9)

(a) 抗 L アミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、L AAO)、抗 MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、抗 細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5' nucleotidase 1B、NT5C1B)、抗 リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、抗 CALM (Calmodulin)、抗 EQTN (Equatorin)、抗 スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、抗 TPI (Triosephosphate isomerase)、抗 RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、抗 スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、および抗 NDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) 抗体からなる群から選択される1つ以上の抗体でコーティングした固定体に対象試料を加えて、抗原抗体反応させる段階と、

30

(b) 前記(a)段階により生成された抗原抗体反応物を、標識体が接合された2次抗体接合体および発色基質溶液を用いて検出する段階と、

(c) 前記検出されたLアミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、L AAO)、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5' nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、CALM (Calmodulin)、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、またはNDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) タンパク質のレベルを対照群と比較して、

40

50

産仔数予測のための情報を提供する段階と、を含む、動物の産仔数予測用マーカー検出方法。

(項目10)

前記固定体は、ニトロセルロース膜、PVDf膜、ポリビニル(polyvinyl)またはポリスチレン(polystyrene)樹脂で合成されたウェルプレート、およびガラスからなるスライドガラスで構成される群から選択されることを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測用マーカー検出方法。

(項目11)

前記抗原 抗体結合反応が、酵素免疫測定法(enzyme linked immunosorbent assay、ELISA)、放射免疫測定法(radioimmunoassay、RIA)、サンドイッチ測定法(sandwich assay)、ウェスタンブロットティング法、免疫沈降法、免疫組織化学染色法(immunohistochemical staining)、蛍光免疫法、酵素基質発色法、抗原 抗体凝集法からなる群から選択されることを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測用マーカー検出方法。

10

(項目12)

前記標識体は、HRP(horseradish peroxidase)、アルカリ性リン酸分解酵素(alkaline phosphatase)、コロイドゴールド(colloid gold)、蛍光物質(fluorescein)、および色素(dye)からなる群から選択されることを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測用マーカー検出方法。

20

(項目13)

前記発色基質は、TMB(3,3',5,5'-tetramethyl bezidine)、ABTS[2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid)]、およびOPD(ophenylenediamine)からなる群から選択されることを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測用マーカー検出方法。

(項目14)

L アミノ酸オキシダーゼ(L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2(Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B(Cytosolic 5' nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4(Lysozyme like protein 4、LYZL4)、CALM(Calmodulin)、EQTN(Equatorin)、スペルマドヘシンAWN(Spermadhesin Awn)、TPI(Triosephosphate isomerase)、RAB2A(Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3(Spermadhesin AQN 3)、およびNDUFS2(NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)からなる群から選択される1つ以上のマーカーを暗号化する遺伝子または前記遺伝子のmRNAに特異的に結合するプライマーまたはプローブを含む、動物の産仔数予測用組成物。

30

40

(項目15)

前記プローブは、前記遺伝子または前記遺伝子のmRNAと厳しい条件下でハイブリダイズすることができるプローブであることを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測用組成物。

(項目16)

上記項目のいずれかに記載の組成物を含む、動物の産仔数予測用キット。

(項目17)

前記キットは、PCRキット、RT-PCRキット、またはDNAチップであることを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測用キット。

50

## (項目18)

(a) 対象試料で、L アミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5′ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5′ nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、CALM (Calmodulin)、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、およびNDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) からなる群から選択される1つ以上の動物の産仔数予測用マーカーのmRNAまたはタンパク質レベルを測定する段階と、

(b) 前記mRNAまたはタンパク質の発現量の増加または減少を分析する段階と、を含む、動物の産仔数予測方法。

## (項目19)

前記(a)段階のタンパク質レベルを測定する段階は、抗Lアミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、LAAO)、抗MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、抗細胞質5′ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5′ nucleotidase 1B、NT5C1B)、抗リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、抗CALM (Calmodulin)、抗EQTN (Equatorin)、抗スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、抗TPI (Triosephosphate isomerase)、抗RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、抗スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、および抗NDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) 抗体からなる群から選択される1つ以上を用いることを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測方法。

## (項目20)

前記試料で、Lアミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5′ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5′ nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、およびCALM (Calmodulin) からなる群から選択される1つ以上の動物の産仔数予測用マーカーのmRNAまたはタンパク質の発現量が増加すると、動物の産仔数が高いと予測する段階をさらに含むことを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測方法。

## (項目21)

抗Lアミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、LAAO)、抗MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、抗細胞質5′ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5′ nucleotidase 1B、NT5C1B)、抗リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、または抗CALM (Calmodulin) 抗体を用いた時に、Lアミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5′ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5′ nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、またはCALM (Calmodulin) のタンパク質の発現量が増加

10

20

30

40

50

すると、動物の産仔数が高いと予測することを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測方法。

(項目22)

前記試料で、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、およびNDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) からなる群から選択される1つ以上の動物の産仔数予測用マーカーのmRNAまたはタンパク質の発現量が増加すると、動物の産仔数が低いと予測する段階をさらに含むことを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測方法。

10

(項目23)

抗EQTN (Equatorin)、抗スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、抗TPI (Triosephosphate isomerase)、抗RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、抗スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、または抗NDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) 抗体を用いた時に、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、またはNDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) のタンパク質の発現量が増加すると、動物の産仔数が低いと予測することを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測方法。

20

(項目24)

次の段階を含む動物の精液品質予測方法：

(a) 動物から採取した精子を準備する段階と、

(b) 前記(a)段階で準備した精子の運動性または受精能獲得 (capacitance) の変化を測定する段階と、

(c) 前記(b)段階の精子の運動性または受精能獲得 (capacitance) の測定値を対照群精子の測定値と比較して精液の品質を評価する段階。

30

(項目25)

前記(a)段階の精子は、受精能獲得前の精子またはヘパリン処理して受精能獲得が誘導された精子であることを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の精液品質予測方法。

(項目26)

前記精子の運動性を測定する方法として、CASA (computer assisted sperm analysis) を用いることを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の精液品質予測方法。

40

(項目27)

前記受精能獲得の変化を測定する方法として、CTC (chlortetracycline) およびHoechst 33258染色法を用いることを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の精液品質予測方法。

(項目28)

前記対照群精子は、高産仔数または低産仔数を有する動物由来のものであることを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の精液品質予測方法。

(項目29)

次の段階を含む動物の産仔数予測方法：

50

(a) 動物から採取した精子を準備する段階と、  
 (b) 前記(a)段階で準備した精子の受精能獲得(capacitance)または先体反応の変化を測定する段階と、  
 (c) 前記(b)段階の受精能獲得(capacitance)または先体反応における精子の精子膜パターンを、AR、B、またはFパターンに分類した後、それぞれのパターンの割合を対照群精子の精子膜パターンの割合と比較して、受精能が得られた精子のARパターンの割合が17.5%より大きいか等しく、受精能獲得前後のARパターンの割合の差が18.97%より大きいか等しいと、12匹以上の産仔数を有する受胎能を予測し、受精能獲得前後のBパターンの割合の差が0.68%より小さいか等しいと、12匹以上の産仔数を有する受胎能を予測することを特徴とする動物の産仔数を予測する段階。

10

(項目30)

前記(a)段階の精子は、受精能獲得前の精子またはヘパリン処理して受精能獲得が誘導された精子であることを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測方法。

(項目31)

前記(b)段階の受精能獲得の変化を測定する方法として、CTC(chlorotetracycline)およびHoechst33258染色法を用いることを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測方法。

20

(項目32)

前記(c)段階の対照群精子は、高産仔数または低産仔数を有する動物由来のものであることを特徴とする、上記項目のいずれかに記載の動物の産仔数予測方法。

摘要

本発明は、受胎能力に関連するタンパク質マーカーを用いた動物の産仔数予測方法、並びにクロルテトラサイクリン染色法を用いた動物の精液品質および産仔数予測方法に関する。

本発明は、受胎能力に関連するタンパク質マーカーを用いた動物の産仔数予測方法に関し、より詳細には、動物の産仔数生産能力に応じて異なって発現される精子のマーカーを見出し、前記マーカーに特異的に結合する抗体を含む産仔数予測用マーカー組成物、およびそれを用いて動物の産仔数を予測する方法に関する。また、本発明は、クロルテトラサイクリン染色法を用いた動物の精液品質および産仔数予測方法に関し、より詳細には、精子の運動性、運動学または受精能獲得(capacitance)状態を測定して動物の産仔数を予測する方法に関する。本発明によれば、動物の精子由来タンパク質マーカーを用いて、産仔数生産能力に応じて異なって発現されるタンパク質を分析することで、個体の産仔数生産能力を予測することができる。また、クロルテトラサイクリン染色法を用いた動物の精液品質および産仔数の予測方法により、精子の受精能力および個体の産仔数生産能力を予測することができる。したがって、本発明は、上記方法で提供される情報に基づいて、高い精子の受精能力および高い産仔数生産能力を有する優れた種を選別して、動物の安定的な生産を図るにおいて非常に有用に用いることができる。

30

【0011】

本発明は、L アミノ酸オキシダーゼ(L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2(Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B(Cytosolic 5' nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4(Lysozyme like protein 4、LYZL4)、CALM(Calmodulin)、EQTN(Equatorin)、スペルマドヘシンAWN(Sperm adhesin Awn)、TPI(Triosephosphate isomerase)、RAB2A(Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3(Sperm adhesin Aqn 3)、およびNDUFS2(NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron s

40

50

ulfur protein 2) からなる群から選択される動物の精液で発現が増加することを特徴とする動物の産仔数予測用マーカーを提供する。

【0012】

また、本発明は、L アミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5' nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、CALM (Calmodulin)、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、およびNDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) からなる群から選択される1つ以上のマーカーに特異的に結合する抗体を含む動物の産仔数予測用組成物、および前記組成物を含む動物の産仔数予測用キットを提供する。

10

【0013】

また、本発明は、(a) 抗 L アミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、LAAO)、抗 MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、抗細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5' nucleotidase 1B、NT5C1B)、抗リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、抗 CALM (Calmodulin)、抗 EQTN (Equatorin)、抗スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、抗 TPI (Triosephosphate isomerase)、抗 RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、抗スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、および抗 NDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) 抗体からなる群から選択される1つ以上の抗体でコーティングした固定体に対象試料を加えて、抗原抗体反応させる段階と、(b) 前記(a)段階により生成された抗原抗体反応物を、標識体が接合された2次抗体接合体および発色基質溶液を用いて検出する段階と、(c) 前記検出されたL アミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5' nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、CALM (Calmodulin)、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、またはNDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) タンパク質のレベルを対照群と比較して、産仔数予測のための情報を提供する段階と、を含む動物の産仔数予測用マーカー検出方法を提供する。

20

30

40

【0014】

また、本発明は、L アミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5' nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、CALM (Ca

50

lmodulin)、EQTN(Equatorin)、スペルマドヘシンAWN(SpermadhesinAWN)、TPI(Triosephosphate isomerase)、RAB2A(Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3(Spermadhesin AQN 3)、およびNDUFS2(NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)からなる群から選択される1つ以上のマーカーを暗号化する遺伝子または前記遺伝子のmRNAに特異的に結合するプライマーまたはプローブを含む動物の産仔数予測用組成物、および前記産仔数予測用組成物を含む動物の産仔数予測用キットを提供する。

【0015】

また、本発明は、(a)対象試料で、Lアミノ酸オキシダーゼ(L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2(Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B(Cytosolic 5' nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4(Lysozyme like protein 4、LYZL4)、CALM(Calmodulin)、EQTN(Equatorin)、スペルマドヘシンAWN(SpermadhesinAWN)、TPI(Triosephosphate isomerase)、RAB2A(Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3(Spermadhesin AQN 3)、およびNDUFS2(NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)からなる群から選択される1つ以上の動物の産仔数予測用マーカーのmRNAまたはタンパク質レベルを測定する段階と、(b)前記mRNAまたはタンパク質の発現量の増加または減少を分析する段階と、を含む動物の産仔数予測方法を提供する。

【0016】

また、本発明は、(a)動物から採取した精子を準備する段階と、(b)前記(a)段階で準備した精子の運動性または受精能獲得(capacitance)の変化を測定する段階と、(c)前記(b)段階の精子の運動性または受精能獲得(capacitance)の測定値を対照群精子の測定値と比較して、精液の品質を評価する段階と、を含む動物の精液品質を予測する方法を提供する。

【0017】

また、本発明は、(a)動物から採取した精子を準備する段階と、(b)前記(a)段階で準備した精子の受精能獲得(capacitance)または先体反応の変化を測定する段階と、(c)前記(b)段階の受精能獲得(capacitance)または先体反応における精子の精子膜パターンを、AR、B、またはFパターンに分類した後、それぞれのパターンの割合を対照群精子の精子膜パターンの割合と比較して、受精能が得られた精子のARパターンの割合が17.5%より大きいか等しく、受精能獲得前後のARパターンの割合の差が18.97%より大きいか等しいと、12匹以上の産仔数を有する受胎能を予測し、受精能獲得前後のBパターンの割合の差が0.68%より小さいか等しいと、12匹以上の産仔数を有する受胎能を予測することを特徴とする動物の産仔数を予測する段階と、を含む、動物の産仔数予測方法を提供する。

【発明の効果】

【0018】

本発明によれば、動物の精子由来タンパク質マーカーを用いて、産仔数生産能力に応じて異なって発現されるタンパク質を分析することで、個体の産仔数生産能力を予測することができる。また、クオルテトラサイクリン染色法を用いた動物の精液品質および産仔数の予測方法により、精子の受精能力および個体の産仔数生産能力を予測することができる。したがって、本発明は、上記方法で提供される情報に基づいて、高い精子の受精能力および高い産仔数生産能力を有する優れた種を選別して、動物の安定的な生産を図るにおいて非常に有用に用いることができる。

10

20

30

40

50

## 【図面の簡単な説明】

## 【0019】

【図1】動物精子のタンパク質を2次元タンパク質電気泳動(2-DE)で分離した結果を示したものであって、2-DEゲルを硝酸銀で染色し、PDQuest SWで分析して、(A)高産仔数個体のタンパク質スポットおよび(B)低産仔数個体のタンパク質スポットを示したものである。

【図2】高産仔数および低産仔数を有する個体のタンパク質を比較したものであって、高産仔数および低産仔数で異なって発現される(>3倍)タンパク質を示しており( $P < 0.05$ )、(A)は低産仔数精子で著しく多量発現される6種のタンパク質を示し、(B)は高産仔数精子で著しく多量発現される5種のタンパク質を示したものである。前記データは、平均 $\pm$ SEM、 $n = 3$ を示したものである。

【図3】高産仔数および低産仔数を有する個体のMDH2(Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、CALM(Calmodulin)、TPI(Triosephosphate isomerase)、RAB2A(Ras related protein Rab 2A)、およびNDUFS2(NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)の発現挙動を示したものであって、(A)は、高産仔数精子と低産仔数精子でのMDH2、CALM、TPI、RAB2A、およびNDUFS2タンパク質の割合(%)を示したものであり(光学密度(OD $\times$ mm)/tubulin(OD $\times$ mm))、(B)は、前記(A)のタンパク質に対して、抗MDH2、抗CALM、抗TPI、抗RAB2A、および抗NDUFS2抗体でプローブしたものを示したものである。

【図4】MDH2(Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、CALM(Calmodulin)、TPI(Triosephosphate isomerase)、RAB2A(Ras related protein Rab 2A)、およびNDUFS2(NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)の発現レベルを用いて平均産仔数を示したものであって、(A)はRAB2Aの発現レベルの割合(%)による平均産仔数を示したものであり、(B)はTPIの発現レベルの割合(%)による平均産仔数を示したものであり、(C)はNDUFS2の発現レベルの割合(%)による平均産仔数を示したものであり、(D)はCALMの発現レベルの割合(%)による平均産仔数を示したものであり、(E)はMDH2の発現レベルの割合(%)による平均産仔数を示したものである。

【図5】雄ブタの産仔数に関連してシグナル経路を示したものであって、赤色で強調されたタンパク質は高産仔数で多量発現し、青色で強調されたタンパク質は低産仔数で多量発現することを示したものである。

【図6】AR、ARおよびBパターンの差( )を用いて平均産仔数を予測することを示したものであって、(A)は、受精能獲得後のARパターンの割合による平均産仔数を示したものであり、(B)は、受精能獲得前後のARパターンの差による平均産仔数を示したものであり、(C)は、受精能獲得前後のBパターンの差による平均産仔数を示したものである。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0020】

本発明の一実施例で、雄ブタを産仔数の高いグループ(高産仔数)と低いグループ(低産仔数)とに分け、それぞれのグループから精子を採取して2-DEを行った後、ESI MS/MSを用いて高産仔数および低産仔数を比較することで、産仔数生産能力に応じたタンパク質の発現挙動を分析した。その結果、高産仔数と低産仔数との間にタンパク質の発現量において差があることを確認した(図1および図2)。発現量の差がある前記タンパク質は、表2に示したように、L-アミノ酸オキシダーゼ(L-amino acid oxidase、LAO)、MDH2(Mitochondrial malate

dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5′ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5′ nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、CALM (Calmodulin)、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin AWN)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、およびNDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)であることが確認された。特に、EQTN、AWN、TPI、RAB2A、AQN 3またはNDUFS2は、高産仔数精子に比べ低産仔数精子で有意に過量発現され(>3倍; P<0.05; 図2A)、LAAO、MDH2、NT5C1B、LYZL4またはCALMは、低産仔数精子に比べ高産仔数精子で有意に過量発現されることが確認された(>3倍; P<0.05; 図2A)。

#### 【0021】

したがって、本発明は、一観点で、Lアミノ酸オキシダーゼ(L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5′ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5′ nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、CALM (Calmodulin)、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin AWN)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、およびNDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)からなる群から選択される動物の精液で発現が増加することを特徴とする動物の産仔数予測用マーカーに関する。

#### 【0022】

本発明において、前記動物は、ウシ(bovine)、ウマ(equine)、ブタ(porcine)、ヒツジ(ovine)、エルク(elk)、およびバイソン(bison)からなる群から選択される何れか1つであることを特徴とする。

#### 【0023】

前記マーカーおよび本発明で用いられたマーカーのNCBI gi No. は下記のとおりである(表2参照)。

#### 【0024】

MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)のNCBI gi No. : 164541

CALM (Calmodulin)のNCBI gi No. : 2654179

TPI (Triosephosphate isomerase)のNCBI gi No. : 80971510

RAB2A (Ras related protein Rab 2A)のNCBI gi No. : 31125379

NDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)のNCBI gi No. : 54582230

Lアミノ酸オキシダーゼ(L amino acid oxidase、LAAO)のNCBI gi No. : 54583217

細胞質5′ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5′ nucleotidase 1B、NT5C1B)のNCBI gi No. : 33528584

リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)のNCBI gi No. : 31126871

EQTN (Equatorin) の NCBI gi No. : 31124567  
 スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin AWN) の NCBI gi No. : 248304

スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3) の NCBI gi No. : 114083

【0025】

EQTN (38 48 KDa) タンパク質は、動物種の赤道部分 (equatorial segment) および先体に位置して保存している途中、AR (acrosome reaction) 時に露出されて精子 卵子相互作用および受精プロセスに関与すると知られている (Toshimori K et al., Biol Reprod, 59 (1) : 229, 1998; Yoshinaga K et al., Reproduction, 122 (4) : 649-55, 2001; Hao J et al., BBRC, 444 (4) : 537-542, 2014; Manandhar G et al., Biol Reprod, 65 (5) : 1425-1436, 2011)。最近の研究結果によれば、Eqtn KOマウス (Eqtn / ) の精子は、ARおよび受精の欠乏があるが、正常な運動性および形態を示すと報告されている (Hao J et al., BBRC, 444 (4) : 537-542, 2014)。

10

【0026】

RAB2Aタンパク質は、RAB族のサブグループであって、小胞輸送 (vesicular transport) および膜融合を調節すると報告されており、精子の先体膜に位置すると知られていて、先体の構造的変形を起こすのに関与し、精子の受精能獲得後にARを誘導することができると報告されている (Rahman MS et al., Int J Endocrinol, 360986, 2013; Wu L et al., ACS Chem Bio, 9 (2) : 468-475, 2014)。

20

【0027】

AQN 3およびAWNタンパク質は、低分子量でブタの精子で確認されており (Sanz L et al., FEBS Lett, 291 (1) : 33-36, 1991; Sanz L et al., FEBS Lett, 300 (3) : 213-218, 1992)、ZP結合タンパク質として109 133アミノ酸および2つのジスルフィド結合 (disulphide bond) を有する構造を有し (Calvete JJ et al., Eur J Biochem, 218 (2) : 719-725, 1993)、射精時に多量のAQN 3およびAWNが精子の表面にコーティングされていて受精能獲得状態になると放出されると知られている。また、AQN 3とAWNは、受精能獲得および生殖細胞 (gametes) の認識において重要な役割をすると報告されている (Dostalova et al., Biochim Biophys Acta, 1200 (1) : 48-54, 1994)。

30

【0028】

NDUFS2タンパク質は、NADH ubiquinone oxidoreductase 40KDaのサブユニット (subunit) であると知られており (Fearnley IM et al., Biochem J, 278 (Pt 3) : 821-829, 1991; Procaccio V et al., Mamm Genome, 9 (6) : 482-484, 1998)、NADHデヒドロゲナーゼ (dehydrogenase) は、ミトコンドリア電子伝達系 (mitochondrial electron transport chain) のコントリビューテッドサイト1 (contributed site 1) である。NADHデヒドロゲナーゼは、精子でチロシン (tyrosine) リン酸化および精子の運動性に関与すると報告されている (Ruiz-Pesini E et al., Clin Chem, 44 (8 Pt 1) : 1616-1620, 1998; Arcelay E et al., Int J Dev Biol, 52 (5-6) : 463-472, 2008; Loza Huerta et al., Biochim Biophys Acta, 1830 (11) : 5305

40

50

5315, 2013)。

【0029】

TPIタンパク質は、精子の受精能獲得およびARに必要なブドウ糖代謝に関与する必須酵素であるが(Fraser LR et al., J Reprod Fertil, 61(1):25-35, 1981)、多量発現する場合には、精子の運動性を弱体化させ(asthenozoospermia)、精子の冷凍保存性が低下すると報告されている(Siva AB et al., Mol Hum Reprod, 16(7):452-462, 2010; Vilagran I et al., Theriogenology, 80(5):443-450, 2013)。

【0030】

LAAOタンパク質は、ウシの場合は精子の尾に位置すると知られており、精子の老化または死滅時に活性化すると知られている(Shannon P et al., J Reprod Fertil, 64(2):469-473, 1982; Shannon P et al., J Reprod Fertil, 64(2):463-467, 1982)。

【0031】

MDHタンパク質は、細胞呼吸において重要な役割をすると知られており、哺乳類(雄ヒツジ、雄ブタ、および雄ウシ)の精子の中間部分(mid piece)に位置し、受精能獲得およびARに寄与すると報告されている(Kohsaka T et al., J Reprod Fertil, 95(1):201-209, 1992; Cordoba M et al., Andrologia, 37(1):40-46, 2005)。

【0032】

LYZL4タンパク質は、精子の先体に位置し、運動性およびARを調節して受精において重要な機能をすると報告されている(Sun R et al., Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai), 43(5):346-53, 2011; Narmadha G et al., PLoS ONE, 6(11):e27659, 2011)。

【0033】

CALMタンパク質は、精子の先体および鞭毛に位置し、運動性およびARにおいて重要な役割をすると報告されている(Bendahmane M et al., Arch Biochem Biophys, 390(1):1-8, 2001; Colas C et al., Theriogenology, 71(5):789-800, 2009; Lasko J et al., Anim Reprod Sci, 132(3-4):169-177, 2012)。

【0034】

本発明において、「産仔数予測用マーカー」とは、動物の産仔数生産能力に応じて異なって発現される有機生体分子を意味し、前記有機生体分子としては、これに限定されないが、例えば、ポリペプチド、タンパク質、核酸(例えば、mRNA、DNAなど)、脂質、糖脂質、糖タンパク質、糖(例えば、単糖類、二糖類、オリゴ糖類など)などが挙げられる。

【0035】

本発明は、他の観点で、L-アミノ酸オキシダーゼ(L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2(Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5'-ヌクレオチダーゼ1B(Cytosolic 5'-nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4(Lysozyme like protein 4、LYZL4)、CALM(Calmodulin)、EQTN(Equatorin)、スペルマドヘシンAWN(Spermadhesin Awn)、TPI(Triosephosphate isomerase)、RAB2A(Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN-3(Spermadhesin AQN-3)、およ

10

20

30

40

50

びNDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) からなる群から選択されるマーカーに特異的に結合する抗体を含む動物の産仔数予測用組成物に関する。

【0036】

本発明において、前記動物は、ウシ (bovine)、ウマ (equine)、ブタ (porcine)、ヒツジ (ovine)、エルク (elk)、およびバイソン (bison) からなる群から選択される何れか1つであることを特徴とする。

【0037】

本発明において、前記抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であることを特徴とする。

10

【0038】

本発明において、「抗体」とは、抗原性部位に対して向けられて特異的に結合するタンパク質分子を意味する。抗体は、当業界で通常的に実施される方法、例えば、融合方法 (Kohler et al., European Journal of Immunology, 6:511-519, 1976)、組換えDNA方法 (米国特許第4,816,56号)、またはファージ抗体ライブラリ方法 (Clackson et al., Nature, 352:624-628, 1991) などにより製造されることができる。本発明に用いられる抗体は、モノクローン抗体またはポリクローン抗体、免疫学的に活性である断片 (例えば、Fabまたは(Fab)<sub>2</sub>断片)、抗体重鎖、ヒト化抗体、抗体軽鎖、遺伝子操作された単一鎖F<sub>1</sub>分子、キメラ抗体などであることができる。

20

【0039】

本発明において、前記産仔数予測用マーカーまたは産仔数予測用組成物は、男性避妊薬に適用可能な用途を有することができる。

【0040】

本発明は、さらに他の観点で、前記産仔数予測用組成物を含む動物の産仔数予測用キットに関する。

【0041】

本発明において、前記動物の産仔数予測用キットは、基質との反応により発色する標識体が接合された2次抗体接合体と、前記標識体と発色反応する発色基質溶液と、洗浄液と、酵素反応停止液と、をさらに含むことを特徴とし、前記標識体は、HRP (horseradish peroxidase)、アルカリ性リン酸分解酵素 (alkaline phosphatase)、コロイドゴールド (colloid gold)、蛍光物質 (fluorescein)、および色素 (dye) からなる群から選択されることを特徴とし、前記発色基質は、TMB (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine)、ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid)]、およびOPD (o-phenylenediamine) からなる群から選択されることを特徴とする。

30

【0042】

また、本発明は、さらに他の観点で、(a) 抗 L アミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase, LAO)、抗 MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2, NAD)、抗 細胞質5'ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5' nucleotidase 1B, NT5C1B)、抗 リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4, LYZL4)、抗 CALM (Calmodulin)、抗 EQTN (Equatorin)、抗 スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、抗 TPI (Triosephosphate isomerase)、抗 RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、抗 スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、および抗 NDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) 抗体からなる群から選択される1つ以上の抗体でコーティン

40

50

グした固定体に対象試料を加えて、抗原 抗体反応させる段階と、(b)前記(a)段階により生成された抗原 抗体反応物を、標識体が接合された2次抗体接合体および発色基質溶液を用いて検出する段階と、(c)前記検出されたL アミノ酸オキシダーゼ(L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2(Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5´ヌクレオチダーゼ1B(Cytosolic 5´ nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4(Lysozyme like protein 4、LYZL4)、CALM(Calmodulin)、EQTN(Equatorin)、スペルマドヘシンAWN(Spermadhesin AWN)、TPI(Triosephosphate isomerase)、RAB2A(Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3(Spermadhesin AQN 3)、またはNDUFS2(NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)タンパク質のレベルを対照群と比較して、産仔数予測のための情報を提供する段階と、を含む動物の産仔数予測用マーカー検出方法に関する。

10

## 【0043】

本発明において、前記動物は、ウシ(bovine)、ウマ(equine)、ブタ(porcine)、ヒツジ(ovine)、エルク( elk)、およびバイソン(bison)からなる群から選択される何れか1つであることを特徴とする。

20

## 【0044】

本発明において、前記固定体は、ニトロセルロース膜、PVDf膜、ポリビニル(polyvinyl)またはポリスチレン(polystyrene)樹脂で合成されたウェルプレート、およびガラスからなるスライドガラスで構成される群から選択されることを特徴とし、前記抗原 抗体結合反応は、酵素免疫測定法(enzyme linked immunosorbent assay、ELISA)、放射免疫測定法(radioimmunoassay、RIA)、サンドイッチ測定法(sandwich assay)、ウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、免疫組織化学染色法(immunohistochemical staining)、蛍光免疫法、酵素基質発色法、抗原 抗体凝集法からなる群から選択されることを特徴とする。

30

## 【0045】

本発明において、前記標識体は、HRP(horseradish peroxidase)、アルカリ性リン酸分解酵素(alkaline phosphatase)、コロイドゴールド(colloid gold)、蛍光物質(fluorescein)、および色素(dye)からなる群から選択されることを特徴とし、前記発色基質は、TMB(3,3´,5,5´ tetramethyl bezidine)、ABTS[2,2´ azinobis(3 ethylbenzothiazoline 6 sulfonic acid)]、およびOPD(ophenylenediamine)からなる群から選択されることを特徴とする。

## 【0046】

また、本発明は、さらに他の観点で、L アミノ酸オキシダーゼ(L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2(Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5´ヌクレオチダーゼ1B(Cytosolic 5´ nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4(Lysozyme like protein 4、LYZL4)、CALM(Calmodulin)、EQTN(Equatorin)、スペルマドヘシンAWN(Spermadhesin AWN)、TPI(Triosephosphate isomerase)、RAB2A(Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3(Spermadhesin AQN 3)、およびNDUFS2(NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)からなる群から選択される

40

50

1つ以上のマーカーを暗号化する遺伝子または前記遺伝子のmRNAに特異的に結合するプライマーまたはプローブを含む動物の産仔数予測用組成物に関する。

【0047】

本発明において、前記動物は、ウシ(bovine)、ウマ(equine)、ブタ(porcine)、ヒツジ(ovine)、エルク(elk)、およびバイソン(bison)からなる群から選択される何れか1つであることを特徴とする。

【0048】

本発明において、前記プローブは、前記遺伝子または前記遺伝子のmRNAと厳しい条件下でハイブリダイズできるプローブであることを特徴とする。

【0049】

本発明において「プライマー」とは、短い自由水酸基を有する核酸配列であって相補的な鋳型と塩基対を形成することができ、鋳型鎖の複写のための開始地点として機能する、短い核酸配列を意味する。「非特異的増幅」とは、標的配列以外の核酸配列にプライマーがハイブリッドされ、プライマー伸長の基質として作用することで起こる、標的配列以外の核酸増幅のことである。

【0050】

本発明において「プローブ」とは、mRNAと特異的結合を成すことができる、短くは数塩基、長くは数百塩基に相当するRNAまたはDNAなどの核酸断片を意味し、標識付けされているため、特定mRNAの存在有無を確認することができる。プローブは、オリゴヌクレオチド(oligonucleotide)プローブ、単鎖DNA(single stranded DNA)プローブ、二重鎖DNA(double stranded DNA)プローブ、RNAプローブなどの形態に製作されることができる。

【0051】

また、本発明は、さらに他の観点で、前記産仔数予測用組成物を含む動物の産仔数予測用キットに関する。

【0052】

本発明において、前記キットは、PCRキット、RT-PCRキット、またはDNAチップであることを特徴とする。

【0053】

また、本発明は、さらに他の観点で、(a)対象試料で、L-アミノ酸オキシダーゼ(L-amino acid oxidase、LAAO)、MDH2(Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5'-ヌクレオチダーゼ1B(Cytosolic 5'-nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4(Lysozyme like protein 4、LYZL4)、CALM(Calmodulin)、EQTN(Equatorin)、スペルマドヘシンAWN(Spermadhesin Awn)、TPI(Triosephosphate isomerase)、RAB2A(Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN3(Spermadhesin AQN 3)、およびNDUFS2(NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)からなる群から選択される1つ以上の動物の産仔数予測用マーカーのmRNAまたはタンパク質レベルを測定する段階と、(b)前記mRNAまたはタンパク質の発現量の増加または減少を分析する段階と、を含む動物の産仔数予測方法に関する。

【0054】

本発明において、前記動物は、ウシ(bovine)、ウマ(equine)、ブタ(porcine)、ヒツジ(ovine)、エルク(elk)、およびバイソン(bison)からなる群から選択される何れか1つであることを特徴とする。

【0055】

本発明において、前記(a)段階のタンパク質レベルを測定する段階は、抗-L-アミノ酸オキシダーゼ(L-amino acid oxidase、LAAO)、抗-MDH

10

20

30

40

50

2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、抗細胞質5′ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5′ nucleotidase 1B、NT5C1B)、抗リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、抗CALM (Calmodulin)、抗EQTN (Equatorin)、抗スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、抗TPI (Triosephosphate isomerase)、抗RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、抗スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、および抗NDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)抗体からなる群から選択される一つ以上を用いることを特徴とする。

10

**【0056】**

本発明は、前記試料で、Lアミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5′ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5′ nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、およびCALM (Calmodulin) からなる群から選択される1つ以上の動物の産仔数予測用マーカーのmRNAまたはタンパク質の発現量が増加すると、動物の産仔数が高いと予測する段階をさらに含むことを特徴とする。

20

**【0057】**

本発明は、前記抗Lアミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、LAAO)、抗MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、抗細胞質5′ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5′ nucleotidase 1B、NT5C1B)、抗リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、または抗CALM (Calmodulin)抗体を用いた時に、Lアミノ酸オキシダーゼ (L amino acid oxidase、LAAO)、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、細胞質5′ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5′ nucleotidase 1B、NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4、LYZL4)、またはCALM (Calmodulin)のタンパク質の発現量が増加すると、動物の産仔数が高いと予測することができることを特徴とする。

30

**【0058】**

本発明は、前記試料で、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、およびNDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) からなる群から選択される1つ以上の動物の産仔数予測用マーカーのmRNAまたはタンパク質の発現量が増加すると、動物の産仔数が低いと予測する段階をさらに含むことを特徴とする。

40

**【0059】**

本発明は、前記抗EQTN (Equatorin)、抗スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、抗TPI (Triosephosphate isomerase)、抗RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、抗スペルマドヘシンAQN 3 (Spermadhesin AQN 3)、または抗NDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)抗体を用いた時に、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)

50

N)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN3 (Spermadhesin AQN 3)、またはNDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)のタンパク質の発現量が増加すると、動物の産仔数が低いと予測することができることを特徴とする。

【0060】

本発明において、前記mRNAの発現量を測定するための分析方法としては、当業界に公知の方法を用いることができ、例えば、重合酵素連鎖反応(PCR)、逆転写重合酵素連鎖反応(RT-PCR)、競合逆転写重合酵素連鎖反応(Competitive RT-PCR)、リアルタイム逆転写重合酵素連鎖反応(Real time RT-PCR)、リボヌクレアーゼプロテクションアッセイ(RPA; RNase protection assay)、ノーザンブロット法(Northern blotting)、DNAチップなどが挙げられるが、これに限定されない。

10

【0061】

本発明において、前記タンパク質の発現量を測定するための分析方法としては、当業界に公知の方法を用いることができ、例えば、ウェスタンブロッティング法、酵素免疫測定法(enzyme linked immunosorbent assay、ELISA)、放射免疫測定法(RIA: radioimmunoassay)、放射免疫拡散法(radioimmunodiffusion)、オクタロニー(Ouchterlony)免疫拡散法、ロケット(rocket)免疫電気泳動、組織免疫染色、免疫沈殿分析法(Immunoprecipitation Assay)、補体結合分析法(Complement Fixation Assay)、蛍光標示式細胞分取(Fluorescence Activated Cell Sorter、FACS)、タンパク質チップ(protein chip)などが挙げられるが、これに限定されない。

20

【0062】

本発明は、一実施例で、精子の受精能獲得前後の状態および前記受精能獲得前後の変化による精子の運動性、運動学および受精能獲得状態と産仔数との相関度を検討した結果、表5に示したように、運動性および運動学は、受精能獲得前後および受精能獲得状態下の変化は産仔数と著しい相関関係を示さなかった。また、受精能獲得前の受精能獲得状態は、産仔数と著しい相関関係を示さなかった。しかし、表6に示したように、受精能獲得後のARは、産仔数と陽性の相関関係を示した( $r = 0.375$ ;  $P < 0.05$ )。また、受精能獲得前後のARおよびBパターンの差( )は著しい相関関係を示した。表6に示したように、受精能獲得前後のARパターンの差( )は、産仔数と陽性の相関関係を示し( $r = 0.333$ ;  $P < 0.05$ )、受精能獲得前後のBパターンの差( )は、産仔数と陰性の相関関係を示した( $r = -1.960.477$ ;  $P < 0.05$ )。

30

【0063】

したがって、本発明は、さらに他の観点で、(a)動物から採取した精子を準備する段階と、(b)前記(a)段階で準備した精子の運動性または受精能獲得(capacitance)の変化を測定する段階と、(c)前記(b)段階の精子の運動性または受精能獲得(capacitance)の測定値を対照群精子の測定値と比較して、精液の品質を評価する段階と、を含む動物の精液品質予測方法に関する。

40

【0064】

本発明において、前記動物は、ウシ(bovine)、ウマ(equine)、ブタ(porcine)、ヒツジ(ovine)、エルク( elk)、およびバイソン(bison)からなる群から選択される何れか1つであることを特徴とするが、これに限定されるものではない。

【0065】

本発明において、前記(a)段階の精子は、受精能獲得前の精子またはヘパリン処理して受精能獲得が誘導された精子であることを特徴とする。

50

## 【0066】

本発明において、前記精子の運動性を測定する方法として、CASA (computer assisted sperm analysis) を用いることを特徴とする。

## 【0067】

本発明において、前記受精能獲得の変化を測定する方法として、CTC (chlorotetracycline) およびHoechst 33258染色法を用いることを特徴とする。

## 【0068】

本発明において、前記対照群精子は、高産仔数または低産仔数を有する動物来由のものであることを特徴とする。

10

## 【0069】

また、本発明は、さらに他の観点で、(a)動物から採取した精子を準備する段階と、(b)前記(a)段階で準備した精子の受精能獲得(capacitance)または先体反応の変化を測定する段階と、(c)前記(b)段階の受精能獲得(capacitance)または先体反応における精子の精子膜パターンを、AR、B、またはFパターンに分類した後、それぞれのパターンの割合を対照群精子の精子膜パターンの割合と比較して、受精能が得られた精子のARパターンの割合が17.5%より大きいか等しく、受精能獲得前後のARパターンの割合の差が18.97%より大きいか等しいと、12匹以上の産仔数を有する受胎能を予測し、受精能獲得前後のBパターンの割合の差が0.68%より小さいか等しいと、12匹以上の産仔数を有する受胎能を予測することを特徴とする動物の産仔数を予測する段階と、を含む、動物の産仔数予測方法に関する。

20

## 【0070】

本発明において、前記動物は、ウシ(bovine)、ウマ(equine)、ブタ(porcine)、ヒツジ(ovine)、エルク( elk)、およびバイソン(bison)からなる群から選択される何れか1つであることを特徴とする。

## 【0071】

本発明において、前記(a)段階の精子は、受精能獲得前の精子またはヘパリン処理して受精能獲得が誘導された精子であることを特徴とし、前記(b)段階の受精能獲得の変化を測定する方法として、CTC (chlorotetracycline) およびHoechst 33258染色法を用いることを特徴とし、前記(c)段階の対照群精子は、高産仔数または低産仔数を有する動物来由のものであることを特徴とする。

30

## 【0072】

以下、実施例を挙げて本発明をより詳細に説明する。これらの実施例は、単に本発明を例示するためのものであって、本発明の範囲がこれら実施例によって制限されないことは、当業界において通常の知識を有する者にとって自明なことである。したがって、本発明の実質的な範囲は、添付された特許請求の範囲とそれらの等価物によって定義されるべきである。

## 【実施例】

## 【0073】

I. 受胎能力に関連するタンパク質マーカーを用いた動物の産仔数予測方法

40

実施例 I 1: 材料準備

ランドレース(Landrace)種ブタの精液サンプルは、SUNJIN社(Danyang, Korea)から提供されたものを使用した。各雄の受胎能フィールドデータは農場から入手した(総仔ブタ数/総繁殖数)。パリティ後の受胎能偏差を取り除くために、受胎能におけるペロティ1は除き、ペロティ2-8受胎能データのみが含まれた。9匹の高産仔数精液(12.3±0.07)および9匹の低産仔数精液(10.2±0.09)サンプルを収集した。繰り返し実験(n=3)のために、精液サンプルをそれぞれ無作為に3グループの高産仔数および低産仔数に分けた。個別的な差を排除するために、各グループを混合した。混合されたサンプルを、500xgで20分間、不連続的なPercoll density gradient (70% [v/v] および35% [v/v]

50

) (Sigma, USA) で洗浄して、精液血漿および死んだ精子を除去した。ELISAの受胎能フィールドデータに基づいた無作為に選択された20個の雄ブタサンプルも、上記の方法で洗浄した。全ての動物は、実験動物の使用、処置および管理に対する指針による、中央大学動物実験倫理委員会により承認されたプロトコル下で飼育された。

【0074】

実施例 I 2 : CASA (computer-assisted sperm analysis)

精子の運動性 (%) および運動学 (motion kinematics) は、精子分析器 (CASA system; computer assisted sperm analysis) (SAIS plus version 10.1, Medical Supply, Seoul, Korea) を用いて測定した。具体的には、前記実施例1で準備した各処理群の精子10 $\mu$ LをMaklerチャンパー (Makler, Israel) に入れ、満たされたチャンパーを37 $^{\circ}$ C加熱段階に置いた。位相差モードで10X対物レンズを用いて、画像をSAISでリレーし、デジタル化して分析した。各試料に対して、少なくとも250個の精子細胞の動きをランダムフィールドから記録した (>5)。運動性設定パラメーターにおいて、対象のVCL (curvilinear velocity) が10 $\mu$ m/s以上である場合に、運動性があることとした。運動性 (%) および4つの運動学パラメーター (すなわち、VCL、VSL (straight line velocity)、VAP (average path velocity)、平均ALH (amplitude of head lateral displacement)) を分析した。

【0075】

実施例 I 3 : 受精能獲得状態のHoechst 33258 / クロルテトラサイクリン (chlortetracycline) 蛍光性の評価

受精能獲得状態を確認するために、二重染色法を用いた (Kwon WS et al., Fertil Steril, 99:354-61, 2013; Kwon WS et al., PLoS One, 8:e54192, 2013, Mohamed el SA et al., Theriogenology, 75(6):1161-1169, 2011)。すなわち、135 $\mu$ Lの処理された精子にHoechst 33258 溶液15 $\mu$ L (10 $\mu$ g H33258/mL DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)) を添加して、常温で2分間処理した。前記混合物を、DPBSで2% (w/v) のポリビニルピロリドン (polyvinyl pyrrolidone) 250 $\mu$ L上に積み重ね、超過染色液を除去した。500xgで5分間遠心分離して上層液を除去し、沈殿物 (pellet) をDPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) 100 $\mu$ Lおよびクロルテトラサイクリン溶液 (5 $\mu$ L緩衝液中、CTC 750mM: Tris 20mM、NaCl 130mM、およびシステイン 5mM、pH 7.4) に再浮遊させた。H33258およびCTCによる受精能獲得状態を、エピ蛍光 (epifluorescence) 照明下でそれぞれUV BP 340-380/LP 425およびBP 450-490/LP 515励起/放射フィルター (excitation/emission filters) を用いて、Nikon microphot FXA顕微鏡 (Tokyo, Japan) で観察した。精子を、生きている非受精能獲得 (live non-capacitated; Fパターン、赤道部分に強い蛍光線があるかない、精子の頭部全体に一律に分散された明るい緑色蛍光)、生きている受精能獲得 (live capacitated; Bパターン、先体領域および暗い先体後部に緑色蛍光)、および生きている先体反応 (live acrosome reacted; ARパターン、先体領域で緑色蛍光、先体後部領域でのみ緑色蛍光、または頭部に蛍光なし) に分類した (Kwon WS et al., Fertil Steril, 99:354-61, 2013; Kwon WS et al., PLoS One, e54192, 2013, Mohamed el SA et al., Theriogenology, 75(6):1

161 1169, 2011)。各スライドに少なくとも400個の精子を有する2つのスライドでサンプルを評価した。

【0076】

実施例1 2および実施例1 3の方法で、精子の運動性及び受精能獲得の状態を高産仔数対低産仔数で比較するために、CASAおよびH33258/CTC染色を行った。その結果、精子の運動性、運動学および受精能獲得状態は、(1)低産仔数の場合、MOTILITY (MOT) =  $88.94 \pm 1.30\%$ 、VCL =  $152.92 \pm 10.40 \mu\text{m/s}$ 、VSL =  $76.64 \pm 7.61 \mu\text{m/s}$ 、VAP =  $88.71 \pm 6.11 \mu\text{m/s}$ 、ALH =  $6.93 \pm 0.40 \mu\text{m}$ 、AR =  $1.12 \pm 0.41\%$ 、F =  $91.55 \pm 3.92\%$ 、およびB =  $7.33 \pm 3.72\%$ と示され、(2)高産仔数の場合、MOT =  $91.43 \pm 2.55\%$ 、VCL =  $159.10 \pm 9.89 \mu\text{m/s}$ 、VSL =  $74.80 \pm 5.80 \mu\text{m/s}$ 、VAP =  $87.53 \pm 10.47 \mu\text{m/s}$ 、ALH =  $7.11 \pm 0.43 \mu\text{m}$ 、AR =  $2.10 \pm 1.13\%$ 、F =  $87.14 \pm 0.63\%$ 、およびB =  $10.75 \pm 0.97\%$  (表1)と示された。すなわち、精子の運動性および受精能獲得状態の程度は、産仔数の大きさとは関係ないということが分かった。

10

【0077】

下記表1は、低産仔数および高産仔数を有する精子の運動性、運動学および受精能獲得状態を示したものである。

【0078】

【表1】

20

精子の運動性、運動学及び受精能獲得状態 (Sperm motility, motion kinematics, and capacitation status)	高産仔数精子 (High-litter size spermatozoa)	低産仔数精子 (Low-litter size spermatozoa)
MOT (%)	$91.43 \pm 2.55$	$88.94 \pm 1.30$
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	$159.10 \pm 9.89$	$152.92 \pm 10.40$
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	$74.80 \pm 5.80$	$76.64 \pm 7.61$
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	$87.53 \pm 10.47$	$88.71 \pm 6.11$
ALH ( $\mu\text{m}$ )	$7.11 \pm 0.43$	$6.93 \pm 0.40$
AR (%)	$2.10 \pm 1.13$	$1.12 \pm 0.41$
F (%)	$87.14 \pm 0.63$	$91.55 \pm 3.92$
B (%)	$10.75 \pm 0.97$	$7.33 \pm 3.72$

Sperm motility, motion kinematics and capacitation status are presented as mean  $\pm$  SEM, n = 3. MOT = motility (%); VCL = curvilinear velocity ( $\mu\text{m/s}$ ); VSL = straight-line velocity ( $\mu\text{m/s}$ ); VAP = average path velocity ( $\mu\text{m/s}$ ); ALH = mean amplitude of head lateral displacement ( $\mu\text{m}$ ); AR = Live acrosome reacted pattern (%); F = Live non-capacitated pattern (%); B = Live capacitated pattern (%).

30

【0079】

実施例 I 4 : 2 DEおよびゲルイメージの分析

精子中のタンパク質を抽出するために、精子サンプル  $50 \times 10^6 / \text{mL}$  を尿素 (urea) (Sigma) 7 M、チオ尿素 (thiourea) (Sigma) 2 M、CHAPS 4% (w/v)、Triton X 100 (Sigma) 0.05% (v/v)、オクチル ジ グルコピロサイド (octyl D glucopyroside) 1% (w/v)、フェニルメチルスルホニルフルオリド (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)  $24 \mu\text{M}$ 、DTT 1% (w/v)、IPG緩衝液 0.5% (v/v)、およびBPB (bromophenol blue) 0.002% (w/v) を含む再水和緩衝液に、1時間4 で可溶されるようにした。

40

【0080】

次に、精子由来タンパク質の部分標本  $250 \mu\text{g}$  を、長さ  $24 \text{ cm}$  のNL Immobiline Dry Strips (pH 3-11; Amersham) 再水和トレー内の再水和緩衝液  $450 \mu\text{L}$  に、4 で12時間放置した。

【0081】

1次元電気泳動を行うにあたり、IPGphor isoelectric focusing apparatusを用いて、ストリップ (strip) を  $100 \text{ V}$  (1時間)

50

、200V(1時間)、500V(1時間)、1000V(1時間)、5000V(1.5時間)、8000V(1.5時間)、および8000 90000Vhrに焦点化(focusing)した。焦点化終了後、ストリップ(strip)を、15分間常温で、尿素(urea)6M、Tris HCl(pH8.8)75mM、グリセロール(glycerol)30%(v/v)、SDS(Sodium dodecyl sulfate)2%(w/v)、BPB(bromophenol blue)0.002%(w/v)、およびDTT2%(w/v)が含まれた平衡緩衝液Aで平衡状態となるようにした。次に、ストリップを、常温で15分間、平衡緩衝液B(DTTがなく、ヨードアセトアミド(iodoacetamide; Sigma)2.5%(w/v))を含む平衡緩衝液A)で、2回目の平衡状態となるようにした。

10

#### 【0082】

2次元電気泳動を、SDS PAGEゲル12.5%(w/v)を用いて、BPB(bromophenol blue)がゲルの低い端側に移動し始めるまで100V 1hおよび500Vで行った。イメージ分析のために、ゲルをシルバー染色した。次に、前記ゲルをGS 800(Bio rad)の高い解像度でスキャンした。それぞれのゲルのタンパク質スポット(spot)をPDQuest 8.0ソフトウェア(Bio rad)を用いてマッチングさせながら、高産仔数および低産仔数を有する精子ゲルを比較分析した。低産仔数を有する精子ゲルを対照群として用いた。最後に、高産仔数ゲル/低産仔数ゲルの割合でスポットの密度を計算した。

20

#### 【0083】

実施例 I 5 : タンパク質同定

4 1 : タンパク質をゲル内トリプシン消化(in gel trypsin digestion)した。切除されたゲルスポットを5分間シェーキングしながら100μLの脱染溶液(destaining solution; フェリシアン化カリウム30mMおよびチオ硫酸塩100mM)で脱染させた。前記脱染溶液を除去した後、ゲルスポットを炭化水素アンモニウム200mMで20分間処理した。ゲル片を100μLのアセトニトリルで脱水させ、真空遠心分離器内で乾燥させた。前記過程を3回繰り返した。乾燥されたゲル片を、変形されたトリプシン(Promega)0.2μgを含む50mMの炭化水素アンモニウム20μLで氷上で45分間再水和させた。前記溶液を除去した後、50mMの炭化水素アンモニウム30μLを添加した。消化は37℃で一晩行われた。前記ペプチド溶液をC18ナノカラム(nano column)を用いて脱染させた。

30

#### 【0084】

4 2 : 注文製作したクロマトグラフィーカラムを、質量分析前にペプチド混合液を脱染して濃縮させるために用いた。100 300nLのPoros reverse phase R2 materialで構成されたカラム(ビーズ径20 30μm、PerSeptive Biosystems)を構築されたGELoader tip(Eppendorf)内に満たした。弱い気圧で液体をカラムに通過させるために、10mLのシリンジを用いた。30μLの消化上澄液来由のペプチド混合液を5%のギ酸30μLで希釈させ、カラムに載せた後、5%のギ酸30μLで洗浄した。MS/MS分析のために、ペプチドをプレコートされたホウケイ酸塩ナノ電気噴霧針(pre coated borosilicate nano electrospray needle; EconoTipTM)に直接1.5μLの50%メタノール/49%水/1%ギ酸で溶出した。

40

#### 【0085】

4 3 : EIS MS/MS分析

ゲル内消化により生成されたペプチドのMS/MSを、Q TOF2質量分析計におけるナノESIを用いて行った(AB Sciex Instruments)。ソース温度は室温であった。イオンソース内のプレコートされたホウケイ酸塩ナノ電気噴霧針に安定的な10 30nL/minの流速を作るために、0 5psi窒素背圧とともに、1kVポテンシャルを適用した。コーン電圧(cone voltage)は40Vであ

50

った。ヘキサポール衝突細胞内分裂に対する前駆体イオンを選択するために、四重極分析器を用いた。衝突ガスは $6.7 \times 10^{-5}$  mbar 圧力のアルゴンであり、衝突エネルギーは25-40 Vであった。生成物イオンは、マイクロチャンネルプレート検出器である反射装置に適した直交TOP分析器および時間デジタル変換器 (time to digital converter) を用いて分析した。ペプチド配列システムを用いてデータを処理した。

【0086】

4.4: データベース検索

MASCOTソフトウェア (Matrix Science) 内のイオン検索オプションとしてMS/MSイオン検索を指定した。ESI-MS/MSによるESI-MS内のペプチドピークからペプチド断片ファイルを得た。潜在的に損失された分節部位を有する酵素としてトリプシンを選択した。ツールタイプとしてESI-QTIFを選択した。ペプチド断片ファイルを、MASCOT検索エンジンを用いたデータベースに基づいて検索し、Sus-scrofa分類によって限定した。酸化されたメチオニンを可変的変形とし、カルバミドメチル化システイン (carbamidomethylated cysteine) を固定的変形とした。質量許容差 (mass tolerance) は、ペプチドは $\pm 1$  Da、断片は $\pm 0.6$  Daとした。高数値ペプチドは、MASCOT内のデフォルト有効臨界レベル (default significance threshold) 以上のものと一致した ( $p < 0.05$ 、ペプチド数値  $> 35$ )。

10

【0087】

受胎能に関連するタンパク質を探すために、高産仔数および低算数を有するブタ来由の精子のタンパク質を2-DEおよびシルバー染色した後、イメージ分析した結果、図1および図2に示したように、高/低産仔数による差が3倍以上 ( $P < 0.05$ ) 大きく示された11個のスポットが確認された。前記確認されたスポットのタンパク質をMASCOT-SWを用いてMS/MSイオン検索した結果、表2に示したように、L-アミノ酸オキシダーゼ (L-amino acid oxidase, LAO)、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2, NAD)、細胞質5'-ヌクレオチダーゼ1B (Cytosolic 5'-nucleotidase 1B, NT5C1B)、リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme like protein 4, LYZL4)、CALM (Calmodulin)、EQTN (Equatorin)、スペルマドヘシンAWN (Spermadhesin Awn)、TPI (Triosephosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、スペルマドヘシンAQN3 (Spermadhesin AQN3)、およびNDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2) であることが確認された。特に、EQTN、AWN、TPI、RAB2A、AQN3、またはNDUFS2は、高産仔数精子に比べ低産仔数精子で有意に過量発現され ( $> 3$  倍;  $P < 0.05$ ; 図2A)、LAO、MDH2、NT5C1B、LYZL4、またはCALMは、低産仔数精子に比べ高産仔数精子で有意に過量発現されることが確認された ( $> 3$  倍;  $P < 0.05$ ; 図2A)。

20

30

40

【0088】

下記表2は、特異的に発現 (3倍以上発現差) されるタンパク質をESI-MS/MSで確認した結果を示したものである。

【0089】

【表 2】

NCBI gi No.	記号 (Symbol)	タンパク質情報 (Protein description)	ペプチド配列 (Peptide sequence)	マススコット スコア (Mascot Score <sup>*)</sup>
2654179	CALM	CALM(Calmodulin)	G.NGYISAAELR.H	61
31124567	EQTN	EQTN(Equatorin)	R.ATTDLNFSLR.N	60
33528584	NT5C1B	細胞質5'ヌクレオチダーゼ 1B(Cytosolic 5'-nucleotidase 1B)	R.LINSVNHYGLIDR.F R.VAFDGDACLFSDES DHVTKE	59
31125379	RAB2A	RAB2A(Ras-related protein Rab-2A)	K.LQIWDTAGQESFR.S	55
54582230	NDUFS2	NDUFS2(NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2)	K.LLNIQPPRA.A R.LVMELSGEMVR.K R.IDELEEMLTNNR.I K.GEFGVYLVSDGSSRPYR.C K.LYTEGYQVPPGATYTAIEAPK.G	139
80971510	TPI	TPI(Triosephosphate isomerase)	K.DLGATWVVLGHSER.R K.VVLAIEPVWAIGTGKT	88
248304	AWN	スベルマドヘシン(Spermadhesin) AWN	K.ICGGISLVFR.S K.EYVELLDGPPGSEIIGK.I	90
31126871	LYZL4	リゾチーム様タンパク質4 (Lysozyme-like protein 4)	K.FNPTAVYDNLG.G R.GDYTYGYLGFQIR.N	73
114083	AQN-3	スベルマドヘシン(Spermadhesin) AQN-3	F.VYQSSHNVATVK.Y	56
54583217	LAAO	L-アミノ酸オキシダーゼ (L-amino-acid oxidase)	R.ITFTPPLTR.R R.LALNDVAALHGPIVYRL K.ALTADAVLLTVSGPALQRI R.IYFAGEHTAFPHGWVETAVK.S	217
164541	MDH2	MDH2(Mitochondrial malate dehydrogenase 2, NAD)	K.VDFPQDQLSTLTGRI	59

\*MASCOT score is  $-10 \log(P)$ , where  $P$  is the probability that the observed match is a random event. Individual scores  $> 50$  indicate identity or extensive homology ( $P < 0.05$ ).

## 【 0 0 9 0 】

## 実施例 I 6 : ウェスタンブロットニング

2 DE 結果を確認するために、抗 RAB2A、抗 TPI、抗 NDUFS2、抗 CALM、および抗 MDH2 抗体で視覚化したウェスタンブロットニングバンドを、高産仔数と低産仔数の3つの個別的な雄ブタ精子から数量化した。ウェスタンブロットニング法は、既存の方法を僅かに変形して行った (Kwon WS et al., Fertil Steril, 99:35461, 2013; Kwon WS et al., PLoS One, 8:e54192, 2013)。前記精子サンプルを DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) で2回濯いだ後、 $10,000 \times g$  で5分間遠心分離した。その後、ペレットを再浮遊させ、5%の2メルカプトエタノールを含むサンプル緩衝液で室温で10分間処理した。次に、不溶性断片を10分間  $10,000 \times g$  で遠心分離して分離した。前記処理されたサンプルを、12%のミニゲルシステム (Amersham) を用いて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、分離されたタンパク質を PVDF 膜 (polyvinylidene fluoride membranes; Amersham) に移動させた。前記膜を3%のブロッキング試薬 (Amersham) で室温で1時間ブロッキングした。高産仔数および低産仔数精子由来の RAB2A、TPI、NDUFS2、CALM、または MDH2 を室温で2時間ブロッキング溶液で希釈 (1:1,000) した抗 RAB2A マウスモノクローナル (モノクローン) 抗体、抗 TPI ウサギポリクローナル (ポリクロー

10

20

30

40

50

ン)抗体、抗NDUFS2ヤギポリクローナル抗体、抗CALMマウスモノクローナル抗体、および抗MDH2ウサギポリクローナル抗体(Amersham)を用いて免疫検出した。次に、ブロッキング溶液で希釈された(1:3,000)ホースラディッシュペルオキシダーゼ(horse radish peroxidase;HRP)に接合された抗マウスIgG、抗ウサギIgG、および抗ヤギIgG(Abcam)で前記膜を室温で2時間処理した。tubulinは、室温で2時間ブロッキング溶液で希釈された(1:10,000)モノクローナル抗tubulinマウス抗体(Abcam)で処理して検出した。また、室温で1時間ブロッキング溶液で希釈された(1:10,000)HRPに接合されたヤギ抗マウスIgG(Abcam)で膜を処理した。前記膜をPBSTで3回洗浄した。前記膜に付着されたタンパク質を、ECL(enhanced chemiluminescence)試薬を用いてECLテクニックで検出した。全てのバンドは、GS 800 calibrated imaging densitometer(Bio Rad)でスキャンしてQuantity One(Bio Rad)で分析した。最後に、RAB2A、TPI、NDUFS2、CALM、およびMDH2 / tubulinバンドの信号強度の割合を計算した。

10

#### 【0091】

高/低産仔数精子来由のタンパク質の正体を検証するために、ウェスタンブロットおよび抗体を用いて実験を行った結果、RAB2A、TPI、NDUFS2、CALM、およびMDH2は、それぞれ24、27、49、17、および33kDa位置で確認され、これは図3の結果と類似する。特に、TPI、RAB2AまたはNDUFS2は、高産仔数精子に比べ低産仔数精子で有意に過量発現され( $P < 0.05$ )、MDH2またはCALMは、低産仔数精子に比べ高産仔数精子で有意に過量発現されることが確認された( $P < 0.05$ )。

20

#### 【0092】

実施例 I 7:ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay)

雄ブタのRAB2A、TPI、NDUFS2、CALM、およびMDH2と産仔数との相関関係を確認するために、20匹の雄ブタ来由の精子に対してELISAを行った。精子からタンパク質を抽出するために、精子サンプル $50 \times 10^6$ /mLを、尿素(urea)(Sigma)7M、チオ尿素(thiourea)(Sigma)2M、CHAPS 4%(w/v)、Triton X 100(Sigma)0.05%(v/v)、オクチルジグルコピロサイド(octyl D glucopyroside)1%(w/v)、フェニルメチルスルホニルフルオリド(phenylmethylsulfonyl fluoride、PMSF)24 $\mu$ M、DTT1%(w/v)、IPG緩衝液0.5%(v/v)、BPB(bromophenol blue)0.002%(w/v)を含む再水和緩衝液に、1時間4 で可溶されるようにした。

30

#### 【0093】

精製されたタンパク質(50 $\mu$ g/ウェル)をimmuno96ウェルプレートにコーティングし、4 で一晩処理した。次に、前記プレートを、ブロッキング溶液(5% [w/v] BSAを含むPBST(0.5% Tween 20を含むDPBS))で37 で90分間ブロッキングした。ブロッキング後、37 で90分間ブロッキング溶液で希釈(1:5,000)した抗RAB2Aマウスモノクローナル抗体、抗TPIウサギポリクローナル抗体、抗NDUFS2ヤギポリクローナル抗体、抗CALMマウスモノクローナル抗体、および抗MDH2ウサギポリクローナル抗体(Amersham)を用いてプレートを処理した。次に、37 で90分間ブロッキング溶液で希釈した(1:5,000)HRPに接合された抗マウス、抗ウサギ、または抗ヤギIgG(Abcam)で膜を処理した。前記HRPを活性化するために、プレートをTMB溶液(Sigma)で室温で15分間処理し、反応を終了させるために1N硫酸を処理した。最後に、マイクロプレート分析器(Gemini Em, Molecular Devices Corporation)を用いて450nmで信号を測定した。

40

50

## 【0094】

RAB2A、TPI、NDUFS2、CALM、およびMDH2と産仔数との相関関係を確認するために、20匹の雄ブタの精子からタンパク質を抽出し、発現レベルをピアソン相関係数(Pearson correlation coefficient)を計算して確認した。その結果、表3に示したように、RAB2A、TPI、およびNDUFS2は、産仔数の大きさと陰性の相関関係を有し( $r = -0.624$ 、 $-0.797$ 、および $-0.655$ ;  $P < 0.01$ )、CALMおよびMDH2は、産仔数の大きさと陽性の相関関係を有することが確認された( $r = 0.665$ および $0.638$ ;  $P < 0.01$ )。

## 【0095】

下記表3は、雄ブタの精子のMDH2(Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、CALM(Calmodulin)、TPI(Triosephosphate isomerase)、RAB2A(Ras related protein Rab 2A)、およびNDUFS2(NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)の発現レベルと産仔数との相関関係を示したものである(\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ )。

## 【0096】

## 【表3】

	産仔数 (Litter Size)	RAB2A	TPI	NDUFS2	CALM	MDH2
産仔数 (Litter Size)	1	-0.624**	-0.797**	-0.655**	0.665**	0.638**
RAB2A			0.468*	0.615**	-0.286	-0.360
TPI				0.465*	-0.422	-0.587**
NDUFS2					-0.488*	-0.256
CALM						0.623**
MDH2						1

## 【0097】

実施例 I 8: パラメータの品質評価(Quality assessment) 4つの主要パラメータである敏感度(sensitivity)、特異度(specificity)、陽性予測値(positive predictive value)、および陰性予測値(negative predictive value)を用いてスクリーニングテストを行った(Oh SA et al., Anim Reprod Sci., 121(12):131-138, 2010; Oh SA et al., Int J Androl, 33(4):604-612, 2010; Park YJ et al., J Reprod Dev, 58(4):461-466, 2012)。敏感度は、テストにより産仔数が正確に確認された雄の割合(パーセント)を決定するものである。特異度は、テストにより実際に陰性と確認された雄の割合を決定するものである。陽性予測値は、実際は産仔数が1匹であるかそれより大きい場合または小さい場合でも、テストにより陽性と確認された雄の割合を決定するものである。陰性予測値は、実際は産仔数が1匹であるかそれより大きい場合または小さい場合でも、テストにより陰性と確認された雄の割合を決定するものである。

## 【0098】

パラメータの品質評価を行った結果は、次のとおりである。まず、産仔数の大きさのcut off 数値を決定するために、ROC 曲線を用いた。前記曲線によれば、RAB2A(0.118)、TPI(1.115)、NDUFS2(0.93)、CALM(0.275)、およびMDH2(0.925)のcut off 数値は、最大化された敏感度および特異度と対応する。したがって、表4に示したように、前記数値を低い制限値(lower limit)と決定した。前記タンパク質の敏感度、特異度、陰性予測値、および陽性予測値をそれぞれみれば、

10

20

30

40

50

## 【0099】

(1) RAB2A タンパク質の感度、特異度、陰性予測値、および陽性予測値は、それぞれ90.9、44.4、80、および66.7%である。11匹の産仔数を有する予測の総合精度は70%であった(表4)。図4Aに示したように、0.118以上のRAB2A発現レベルを有する場合、低産仔数は10.54匹であるが、0.118またはそれ以下のRAB2A発現レベルを有する場合、平均産仔数は11.31匹であった。

## 【0100】

(2) TPI タンパク質の感度、特異度、陰性予測値、および陽性予測値は、それぞれ72.7、44.4、57.1、および61.5%である。11匹またはそれ以上の産仔数を有する予測の総合精度は60%であった(表4)。図4Bに示したように、1.115以上のTPI発現レベルを有する場合、平均産仔数は10.7匹であるが、1.115またはそれ以下のTPI発現レベルを有する場合、平均産仔数は11.4匹であった( $P < 0.05$ )。

10

## 【0101】

(3) NDUFS2 タンパク質の感度、特異度、陰性予測値、および陽性予測値は、それぞれ90.9、44.4、80、および66.7%である。11匹またはそれ以上の産仔数を有する予測の総合精度は70%であった(表4)。図4Cに示したように、0.93以上のNDUFS2発現レベルを有する場合、平均産仔数は10.54匹であるが、0.93またはそれ以下のNDUFS2発現レベルを有する場合、平均産仔数は11.31匹であった( $P < 0.05$ )。

20

## 【0102】

(4) CALM タンパク質の感度、特異度、陰性予測値、および陽性予測値は、それぞれ81.8、88.9、80、および90%である。11匹またはそれ以上の産仔数を有する予測の総合精度は85%であった(表4)。図4Dに示したように、0.275以下のCALM発現レベルを有する場合、平均産仔数は10.8匹であるが、0.275またはそれ以上のCALM発現レベルを有する場合、平均産仔数は11.5匹であった( $P < 0.05$ )。

## 【0103】

(5) MDH2 タンパク質の感度、特異度、陰性予測値、および陽性予測値は、それぞれ90.9、66.7、85.7、および76.9%である。11匹またはそれ以上の産仔数を有する予測の総合精度は80%であった(表4)。図4Eに示したように、0.925以下のMDH2発現レベルを有する場合、平均産仔数は10.64匹であるが、0.925またはそれ以上のMDH2発現レベルを有する場合、平均産仔数は11.37匹であった( $P < 0.05$ )。

30

## 【0104】

下記表4は、MDH2 (Mitochondrial malate dehydrogenase 2、NAD)、CALM (Calmodulin)、TPI (Triose phosphate isomerase)、RAB2A (Ras related protein Rab 2A)、およびNDUFS2 (NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron sulfur protein 2)の発現レベルと産仔数との相関関係を示したものである。

40

## 【0105】

【表 4】

	敏感度 (Sensitivity (%))	特異度 (Specificity (%))	陰性子測値 (Negative predictive value (%))	陽性子測値 (Positive predictive value (%))	総合精度 (Overall accuracy (%))
RAB2A	90.9	44.4	80	66.7	70
TPI	72.7	44.4	57.1	61.5	60
NDUFS2	90.9	44.4	80	66.7	70
CALM	81.8	88.9	80	90	85
MDH2	90.9	66.7	85.7	76.9	80

10

## 【0106】

実施例 I 9 : シグナル経路 ( signaling pathway )  
産仔数に応じて異なって発現されるタンパク質の生物学的機能およびシグナル経路を視覚化するために、Pathway Studio ( v 9 . 0 、 Aridane Genomics ) を用いた。

## 【0107】

Pathway Studio で分析した結果、確認された精子のマーカータンパク質である L アミノ酸オキシダーゼ ( L amino acid oxidase 、 L A A O ) 、 M D H 2 ( Mitochondrial malate dehydrogenase 2 、 N A D ) 、 細胞質 5 ´ ヌクレオチダーゼ 1 B ( Cytosolic 5 ´ nucleotidase 1 B 、 N T 5 C 1 B ) 、 リゾチーム様タンパク質 4 ( Lysozyme like protein 4 、 L Y Z L 4 ) 、 C A L M ( Calmodulin ) 、 E Q T N ( Equatorin ) 、 スペルマドヘシン A W N ( Spermadhesin A W N ) 、 T P I ( Triosephosphate isomerase ) 、 R A B 2 A ( Ras related protein Rab 2 A ) 、 スペルマドヘシン A Q N 3 ( Spermadhesin A Q N 3 ) 、 および N D U F S 2 ( N A D H dehydrogenase [ ubiquinone ] iron sulfur protein 2 ) は、図 5 に示したように、マーカータンパク質間に相互作用をし、特定細胞プロセス、タンパク質キナーゼ、リガンド、コンプレックス、機能的クラス、および小分子に関連することが確認された。

20

30

## 【0108】

実施例 I 10 : 統計学的分析

統計分析は、統計ソフトウェアプログラム S P S S ( バージョン 1 8 . 0 ) ( U S A ) を用いて行った。RAB2A、TPI、NDUFS2、CALM、およびMDH2と産仔数との相関関係を決定するためにピアソン相関係数 ( Pearson correlation coefficient ) を計算した。

## 【0109】

R O C s ( Receiver operating curves ) を用いて、平均産仔数を基準として産仔数が 1 1 匹より大きいかわりに小さいかを判断するために、それぞれ分析されたパラメーターの能力を評価した。R O C s で cut off 数値を計算した。前記 cut off 数値は、最大化された特異度と感度をなす地点に関連して決定された ( Oh S A et al . , Anim Reprod Sci . , 1 2 1 ( 1 2 ) : 1 3 1 1 3 8 , 2 0 1 0 ; Oh S A et al . , Int J Androl , 3 3 ( 4 ) : 6 0 4 6 1 2 , 2 0 1 0 ; Park Y J et al . , J , Reprod Dev , 5 8 ( 4 ) : 4 6 1 4 6 6 , 2 0 1 2 ) 。

40

## 【0110】

Student ' s two tailed t test を用いて、タンパク質発現レベルと予測された産仔数を R O C s で比較した。P 値が 0 . 0 5 以下である場合、有効な差であるとみなした。全てのデータは、平均 ( Mean ) ± 測定標準誤差 ( S E M ) で示

50

した。

【0111】

II. クロルテトラサイクリン染色法を用いた動物の精液品質および産仔数の予測方法

【0112】

実施例 II 1: 精液ソースおよび人工受精

雄ランドレース種から精液サンプルを任意に収集した (SUNJIN社のGGP農場、Danyang、Korea)。受胎データ (総仔ブタ数/総繁殖数) は農場から入手した。前記データに基づいて、平均産仔数が  $11.47 \pm 1.19$  である27匹の雄ブタから17サンプルを採取した。前記採取された精液は、人工受精のために  $30 \times 10^6$  精子/mLの濃度でエキステンダー (Beltsville thawing solution) 100 mLに希釈した後、17に保存した。

10

【0113】

前記保存された精液は、射精後3日以内のものを用いて、雌ブタの発情24時間以内に1回目の人工受精をし、2回目の人工受精は、1回目の人工受精後24時間経過時に再度人工受精して終了した。上記の方法により人工受精された27匹の雄ブタの受胎能力に関連するデータを収集した。

【0114】

精液分析のために、2時間以内に収集されたエキステンダーに保存中の精液を用いた。前記精液は、DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) で  $1,500 \times g$  で10分間洗浄した後、受精能獲得前と後の用途に使用できるように2つに分けた。受精能獲得実験のために、上記の2つのうち1つをFBS (fetal bovine serum (v/v)、ピルビン酸ナトリウム (sodium pyruvate) 0.91 mM、D-グルコース (D-glucose) 3.05 mM、乳酸カルシウム (calcium lactate) 2.92 mM、およびヘパリン (heparin) 10  $\mu g/mL$  を含むmTCM (modified tissue culture media) 199培地で、空気中で5% CO<sub>2</sub>存在下で、37で培養した (Oh SA et al., Animal Reproduction Science, 121:131-138, 2010)。

20

【0115】

全ての動物は、実験動物の使用、処置、および管理に対する指針による、中央大学動物実験倫理委員会により承認されたプロトコル下で飼育された。

30

【0116】

実施例 II 2: CASA (Computer assisted sperm analysis)

精子の運動性 (%) および運動学 (motion kinematics) は、精子分析器 (CASA system; computer assisted sperm analysis) (SAIS plus version 10.1, Medical Supply, Seoul, Korea) を用いて測定した。具体的には、前記実施例1で準備した各処理群の精子10  $\mu L$  を、加熱段階のMaklerチャンバー (Makler, Israel) に置いた。位相差モードで10X対物レンズを用いて、画像をSAISでリレーし、デジタル化して分析した。各試料に対して、少なくとも250個の精子細胞の動きを少なくとも5ランダムフィールドから記録した。ユーザー定義設定プログラムは次のとおりである: フレーム獲得、20; フレーム割合、30 Hz; 最小差 (contrast)、7; 最小サイズ、5; 低い/高いサイズ gates、0.4-1.5; 低い/高い彩度 gates、0.4-1.5; 非自動性頭部大きさ、16; 非自動性明るさ、14。運動性設定パラメーターにおいて、対象のVCL (curvilinear velocity) が10  $\mu m/s$  以上である場合に、運動性があることとした。運動性 (%) および5つの運動学パラメーター (すなわち、VCL、VSL (straight line velocity)、VAP (average path velocity)、LIN (linearity)、および平均ALH (amplitude of hea

40

50

d lateral displacement))を分析した。

【0117】

実験結果、精子の受精能獲得前後の状態および前記受精能獲得前後の変化による精子の運動性および運動学と産仔数との相関関係を検討した結果、表5に示したように、運動性および運動学は、受精能獲得前後および受精能獲得状態下の変化に関連して産仔数と著しい相関関係を示さなかった。ここで、表5は、雄ブタ精子の受精能獲得前後による精子の運動性、運動学、およびその差( )と産仔数との相関関係を示したものである。

【0118】

【表5】

産仔数 (Litter Size)	受精能獲得前 (Before-capacitation(BC))						受精能獲得後 (After-capacitation(AC))						受精能獲得前後の差 (Differences(Δ) before and after capacitation)						
	MOT	VCL	VSL	VAP	LIN	ALH	MOT	VCL	VSL	VAP	LIN	ALH	MOT	VCL	VSL	VAP	LIN	ALH	
Litter Size	-0.120	-0.182	-0.321	-0.314	-0.071	-0.222	0.030	0.040	-0.243	-0.174	-0.274	-0.036	0.177	0.187	-0.067	0.091	-0.272	0.167	
MOT (BC)		-0.037	0.532 <sup>**</sup>	0.237	0.280	0.219	0.611 <sup>**</sup>	0.282	-0.130	0.008	-0.290	0.203	-0.398 <sup>**</sup>	0.178	-0.354 <sup>**</sup>	-0.101	-0.495 <sup>**</sup>	-0.051	
VCL (BC)			0.365 <sup>**</sup>	0.519 <sup>**</sup>	-0.548 <sup>**</sup>	0.634 <sup>**</sup>	-0.023	0.080	-0.215	-0.197	-0.289	-0.089	0.014	-0.858 <sup>**</sup>	-0.349 <sup>**</sup>	-0.514 <sup>**</sup>	-0.022	-0.502 <sup>**</sup>	
VSL (BC)				0.855 <sup>**</sup>	-0.016	0.700 <sup>**</sup>	0.424 <sup>**</sup>	0.307	-0.034	0.077	-0.245	0.237	-0.097	-0.159	-0.482 <sup>**</sup>	-0.544 <sup>**</sup>	-0.270	-0.519 <sup>**</sup>	
VAP (BC)					-0.310	0.899 <sup>**</sup>	0.203	0.317	-0.025	0.059	-0.263	0.248	-0.027	-0.301	-0.409 <sup>**</sup>	-0.860 <sup>**</sup>	-0.126	-0.806 <sup>**</sup>	
LIN (BC)						-0.580 <sup>**</sup>	0.148	-0.142	0.343 <sup>**</sup>	0.262	0.480 <sup>**</sup>	0.062	-0.139	0.417 <sup>**</sup>	0.308	0.416 <sup>**</sup>	-0.014	0.550 <sup>**</sup>	
ALH (BC)							0.223	0.327 <sup>**</sup>	-0.193	-0.088	-0.449 <sup>**</sup>	0.170	0.015	-0.399 <sup>**</sup>	-0.527 <sup>**</sup>	-0.884 <sup>**</sup>	-0.181	-0.745 <sup>**</sup>	
MOT (AC)								0.612 <sup>**</sup>	0.056	0.295	-0.327 <sup>**</sup>	0.536 <sup>**</sup>	0.483 <sup>**</sup>	0.335 <sup>**</sup>	-0.143	0.080	-0.455 <sup>**</sup>	0.171	
VCL (AC)									0.281	0.573 <sup>**</sup>	-0.375 <sup>**</sup>	0.918 <sup>**</sup>	0.397 <sup>**</sup>	0.453 <sup>**</sup>	0.108	0.208	-0.348 <sup>**</sup>	0.339 <sup>**</sup>	
VSL (AC)										0.940 <sup>**</sup>	0.776 <sup>**</sup>	0.624 <sup>**</sup>	0.208	0.337 <sup>**</sup>	0.892 <sup>**</sup>	0.725 <sup>**</sup>	0.062 <sup>**</sup>	0.589 <sup>**</sup>	
VAP (AC)											0.528 <sup>**</sup>	0.840 <sup>**</sup>	0.334 <sup>**</sup>	0.471 <sup>**</sup>	0.789 <sup>**</sup>	0.711 <sup>**</sup>	0.454 <sup>**</sup>	0.627 <sup>**</sup>	
LIN (AC)												0.008	-0.051	0.095	0.791 <sup>**</sup>	0.582 <sup>**</sup>	0.870 <sup>**</sup>	0.382 <sup>**</sup>	
ALH (AC)													0.396 <sup>**</sup>	0.533 <sup>**</sup>	0.440 <sup>**</sup>	0.459 <sup>**</sup>	-0.025	0.531 <sup>**</sup>	
MOT (Δ)															0.192	0.228	0.271	0.020	0.255
VCL (Δ)																0.306 <sup>**</sup>	0.900 <sup>**</sup>	-0.100	0.704 <sup>**</sup>
VSL (Δ)																	0.882 <sup>**</sup>	0.720 <sup>**</sup>	0.751 <sup>**</sup>
VAP (Δ)																		0.430 <sup>**</sup>	0.899 <sup>**</sup>
LIN (Δ)																			0.138

MOT = motility (%); VCL = curvilinear velocity (μm/s); VSL = straight-line velocity (μm/s); VAP = average path velocity (μm/s); LIN = linearity; ALH = mean amplitude of head lateral displacement (μm). \* P < 0.05. \*\* P < 0.01.

【0119】

実施例 I I 3 : 受精能獲得状態の Hoechst 33258 / クロルテトラサイクリン (chlortetracycline) 蛍光性の評価

受精能獲得状態を確認するために、既存の二重 (Dual) 染色法を僅かに変形して用いた (Kwon WS et al., Fertil Steril, 99:354-61, 2013; Kwon WS et al., PLoS One, e54192, 2013)。すなわち、135 μL の非受精能獲得精子または受精能獲得精子に、Hoechst 33258 溶液 (150 μM の H33258 を含む DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)) 15 μL を添加し、常温で 10 分間処理した。前記混合物を、DPBS で 2% (w/v) のポリビニルピロリドン (polyvinylpyrrolidone) 250 μL 上に積み重ね、超過染色液を除去した。400 x g で 10 分間遠心分離して上層液を除去し、沈殿物 (pellet) を DPBS 500 μL およびクロルテトラサイクリン溶液 (5 μL の緩衝液中、CTC 750 mM: Tris 20 mM、NaCl 130 mM、およびシステイン 5 mM、pH 7.4) に再浮遊させた。H33258 および CTC による受精能獲得状態を、エビ蛍光 (epifluorescence) 照明下でそれぞれ UV BP 340 380 / LP 425 および BP 450 490 / LP 515 励起 / 放射フィルター (excitation/emission filters) を用いて、Nikon microphot FXA 顕微鏡 (Tokyo, Japan) で観察した。精子を、生きている非受精能獲得 (live non capacitated; F パターン、赤道部分に強い蛍光線があるかない、精子の頭部全体に一律に分散された明るい緑色蛍光)、生きている受精能獲得 (live capacitated; B パターン、先体領域および暗い先体後部に緑色蛍光)、および生きている先体反応 (live acrosome reacted; AR パターン、先体領域で緑色蛍光、先体後部領域でのみ緑色蛍光、または頭部に蛍光なし) に分類した (Kwon WS et al., Fertil Steril, 99:354-61, 2013; Kwon WS et al., PLoS One, e5

10

20

30

40

50

4192, 2013)。各スライドに少なくとも400個の精子を有する2つのスライドでサンプルを評価した。

【0120】

実験結果、精子の受精能獲得前後の状態および前記受精能獲得前後の変化による精子の受精能獲得状態と産仔数との相関関係を検討した結果、表6に示したように、受精能獲得後のARは産仔数と陽性の相関関係を示した(r = 0.375; P < 0.05)。また、受精能獲得前後のARおよびBパターンの差( )は、著しい相関関係を示した。表6に示したように、受精能獲得前後のARパターンの差( )は、産仔数と陽性の相関関係を示し(r = 0.333; P < 0.05)、受精能獲得前後のBパターンの差( )は、産仔数と陰性の相関関係を示した(r = -1960.477; P < 0.05)。ここで、表6は、雄ブタの精子の受精能獲得前後による受精能獲得およびその差( )と産仔数との相関関係を示したものである。

10

【0121】

【表6】

産仔数 (Litter Size)	受精能獲得前 (Before-capacitation)(BC)			受精能獲得後 (After-capacitation)(AC)			受精能獲得前後の差 (Differences(Δ) before and after capacitation)		
	AR	B	F	AR	B	F	AR	B	F
産仔数 (Litter Size)	0.298	0.230	-0.311	0.375*	-0.156	-0.276	0.333*	-0.447**	-0.002
AR (BC)		0.072	-0.398*	0.544**	-0.118	-0.492**	0.310	-0.221	-0.152
B (BC)			-0.943**	-0.144	0.627**	-0.398*	-0.151	-0.409*	0.473**
F (BC)				-0.076	-0.538**	0.529**	0.036	0.449**	-0.384*
AR (AC)					-0.481**	-0.685**	0.966**	-0.433*	-0.672**
B (AC)						-0.310	-0.509**	0.454**	0.179
F (AC)							-0.625**	0.093	0.580**
AR (Δ)								-0.423*	-0.715**
B (Δ)									-0.331*

20

F = non-capacitated sperm; B = capacitated sperm; AR = acrosome-reacted sperm. \* P < 0.05. \*\* P < 0.01.

【0122】

実施例 I I 4 : パラメーターの品質評価 (Quality assessment) 4つの主要パラメーターである感度 (sensitivity)、特異度 (specificity)、陽性予測値 (positive predictive value)、および陰性予測値 (negative predictive value)を用いてスクリーニングテストを行った (Evans MI et al., Clinical Obstetrics and Gynecology, 45:657-660, 2002)。感度は、テストにより産仔数が正確に確認された雄の割合(パーセント)を決定するものである。特異度は、テストにより実際に陰性と確認された雄の割合を決定するものである。陽性予測値は、実際は産仔数が12匹であるかそれより大きい場合または小さい場合でも、テストにより陽性と確認された雄の割合を決定するものである。陰性予測値は、実際は産仔数が12匹であるかそれより大きい場合または小さい場合でも、テストにより陰性と確認された雄の割合を決定するものである。

30

40

【0123】

受精能獲得状態を確認するために、実施例 I I 3の方法で、Hoechst 33258 / クロルテトラサイクリンで精子を染色し、受精能獲得有無に応じて精子状態を分類した後、実施例 I I 4のように受精能獲得状態のパラメーター品質を評価した。12匹の産仔数に対する cut off 数値を決定するために、受精能獲得後のARパターン(17.5%)とともに、受精能獲得前後のARパターンの差( = 18.97%)およびBパターンの差( = 0.68%)を、低い制限値 (lower limit)と決定した(表7、8および9)。

【0124】

50

ここで、表 7 は、雄ブタの精子の受精能獲得後の A R パターンの割合 (%) と産仔数との相関関係を示したものであり、表 8 は、雄ブタの精子の受精能獲得前後による A R パターンの差 ( ) の割合 (%) と産仔数との相関関係を示したものであり、表 9 は、雄ブタの精子の受精能獲得前後による B パターンの差 ( ) の割合 (%) と産仔数との相関関係を示したものである。

【 0 1 2 5 】

【表 7】

	産仔数 (Litter Size) $\geq 12$	産仔数 (Litter Size) $< 12$
AR (AC) $\geq 17.5\%$ (n = 12)	6 <sup>A</sup>	6 <sup>B</sup>
AR (AC) $< 17.5\%$ (n = 15)	2 <sup>C</sup>	13 <sup>D</sup>
敏感度 (Sensitivity)	75	
特異度 (Specificity)	68.4	
陰性子測値 (Negative predictive value)	86.7	
陽性子測値 (Positive predictive value)	50	
総合精度 (Overall accuracy)	70	
Sensitivity = $[A/(A + C)] \times 100$ ; Specificity = $[D/(B + D)] \times 100$ ; Positive predictive value = $[A/(A + B)] \times 100$ ; Negative predictive value = $[C/(C + D)] \times 100$ ; and overall accuracy = $[(A + D)/(A + B + C + D)] \times 100$ .		

10

20

【 0 1 2 6 】

【表 8】

	産仔数 (Litter Size) $\geq 12$	産仔数 (Litter Size) $< 12$
AR ( $\Delta$ ) $\geq 18.97\%$ (n = 11)	5 <sup>A</sup>	6 <sup>B</sup>
AR ( $\Delta$ ) $< 18.97\%$ (n = 16)	3 <sup>C</sup>	13 <sup>D</sup>
敏感度 (Sensitivity)	62.5	
特異度 (Specificity)	68.4	
陰性子測値 (Negative predictive value)	81.3	
陽性子測値 (Positive predictive value)	45.5	
総合精度 (Overall accuracy)	70	
Sensitivity = $[A/(A + C)] \times 100$ ; Specificity = $[D/(B + D)] \times 100$ ; Positive predictive value = $[A/(A + B)] \times 100$ ; negative predictive value = $[C/(C + D)] \times 100$ ; and overall accuracy = $[(A + D)/(A + B + C + D)] \times 100$ .		

30

40

【 0 1 2 7 】

【表 9】

	産仔数 (Litter Size) $\geq 12$	産仔数 (Litter Size) $< 12$
B ( $\Delta$ ) $\leq 0.68\%$ (n = 11)	6 <sup>A</sup>	4 <sup>B</sup>
B ( $\Delta$ ) $> 0.68\%$ (n = 16)	2 <sup>C</sup>	15 <sup>D</sup>
敏感度 (Sensitivity)	75	
特異度 (Specificity)	79	
陰性予測値 (Negative predictive value)	88.2	
陽性予測値 (Positive predictive value)	60	
総合精度 (Overall accuracy)	70	

Sensitivity =  $[A/(A + C)] \times 100$ ; Specificity =  $[D/(B + D)] \times 100$ ; Positive predictive value =  $[A/(A + B)] \times 100$ ; Negative predictive value =  $[C/(C + D)] \times 100$ ; and overall accuracy =  $[(A + D)/(A + B + C + D)] \times 100$ .

## 【0128】

受精能獲得後のARパターンにおいて、6雄ブタは17.5%のARパターンを示し、12匹の子ブタを生産したが、6雄ブタは12匹以下の子ブタを生産した。一方、2雄ブタは、17.5%以下のARパターンを示し、12匹の子ブタを生産し、残り13雄ブタは、12匹以下の子ブタを生産した。敏感度、特異度、陰性予測値、および陽性予測値は、それぞれ75、68.4、86.7、および50%であった。表7に示したように、12匹の産仔数を有する予測の総合精度は70%であった。図6Aに示したように、雄ブタの受精能獲得後のARパターンが17.5%以下である場合、平均産仔数は11.1匹であったが、雄ブタの受精能獲得後のARパターンが17.5%である場合、平均産仔数は11.98匹であった ( $P < 0.05$ )。

## 【0129】

受精能獲得前後のARパターンの差( )が18.97%である5雄ブタは、12匹を有する一方、残りの6雄ブタは12匹以下の子ブタを生産した。受精能獲得前後のARパターンの差( )が18.97%以下である3雄ブタは、12匹の子ブタを生産した(13雄ブタは12匹以下の子ブタを生産)。敏感度、特異度、陰性予測値、および陽性予測値は、それぞれ62.5、68.4、81.3、および45.5%であった。表8に示したように、12匹の産仔数を有する予測の総合精度は70%であった。図6Bに示したように、受精能獲得前後のARパターンの差( )が18.97%以下である場合には11.18匹の子ブタを有するが、受精能獲得前後のARパターンの差( )が18.97%である場合には平均産仔数が11.88匹であった ( $P < 0.05$ )。

## 【0130】

6雄ブタは、受精能獲得前後のBパターンの差( )が0.68%である場合、12匹以上の子ブタを生産したが、4雄ブタは12匹以下の子ブタを生産した。一方、2雄ブタは、受精能獲得前後のBパターンの差( )が0.68%以上である場合、12匹の子ブタを生産し、15雄ブタは12匹以下の子ブタを生産した。敏感度、特異度、陰性予測値、および陽性予測値は、それぞれ75、79、88.2、および60%であった。表9に示したように、12匹の産仔数を有する予測の総合精度は70%であった。図6Cに示したように、受精能獲得前後のBパターンの差( )が0.68%以上である場合には11.19匹の子ブタを有するが、受精能獲得前後のBパターンの差( )が0.68%である場合には11.94匹の子ブタを生産した ( $P < 0.05$ )。

## 【0131】

実施例II 5：統計学的分析

統計分析は、統計ソフトウェアプログラムSPSS(バージョン18.0)(USA)を

10

20

30

40

50

用いて行った。受精能獲得/非受精能獲得精子または受精能獲得状態の変化による精子の運動性、運動学、受精能獲得状態と産仔数との相関関係を決定するために、ピアソン相関係数 (Pearson correlation coefficient) を計算した。

【0132】

ROC s (Receiver operating curves) を用いて、平均産仔数を基準として産仔数が12匹より大きいか等しいか、または12匹より小さかを確認するために個別分析されたパラメーターの能力を評価した。ROC s で cut off 数値を計算した。前記 cut off 数値は、最大化された特異度と感度をなす地点に関連して決定された (Oh SA et al., Anim Reprod Sci., 121 (1-2): 131-138, 2010; Oh SA et al., Int J Androl, 33 (4): 604-612, 2010; Park YJ et al., J, Reprod Dev, 58 (4): 461-466, 2012)。

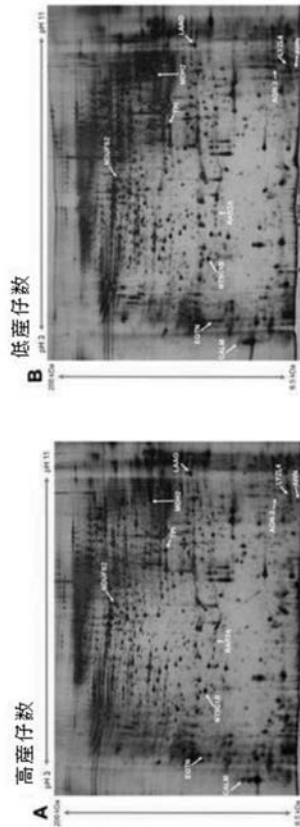
【0133】

Student's two tailed t test を用いて、予測された産仔数をROC s で比較した。P 値が0.05以下である場合、有効な差であるとみなした。全てのデータは平均 (Mean) ± 測定標準誤差 (SEM) で示した。

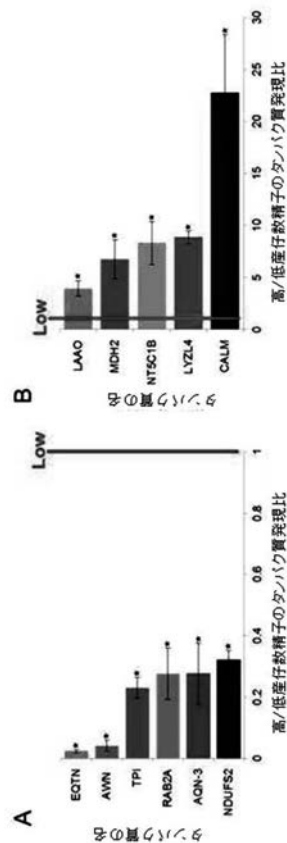
【0134】

以上、本発明の内容の特定部分を詳細に説明したが、当業界の通常の知識を有する者には、このような具体的説明が好ましい実施様態にすぎず、これにより本発明の範囲が制限されるものではないということが理解できる。したがって、本発明の実質的な範囲は、添付の特許請求の範囲とそれらの等価物により定義されるべきである。

【図1】



【図2】



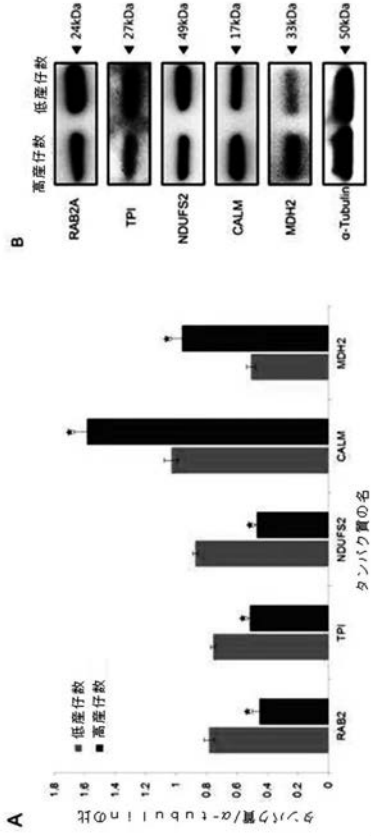
【図1】

【図2】

10

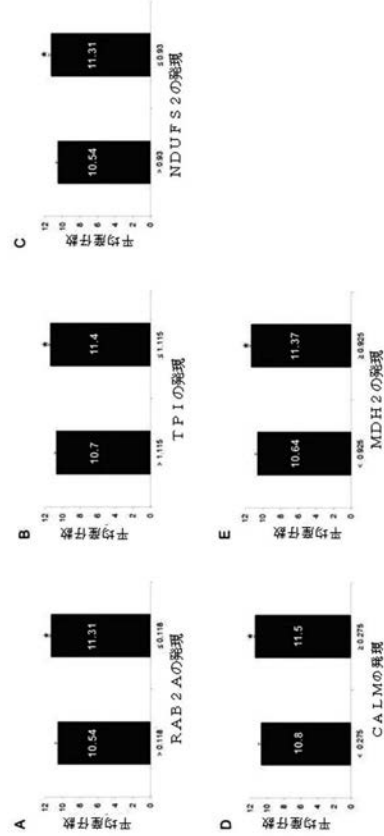
20

【図3】

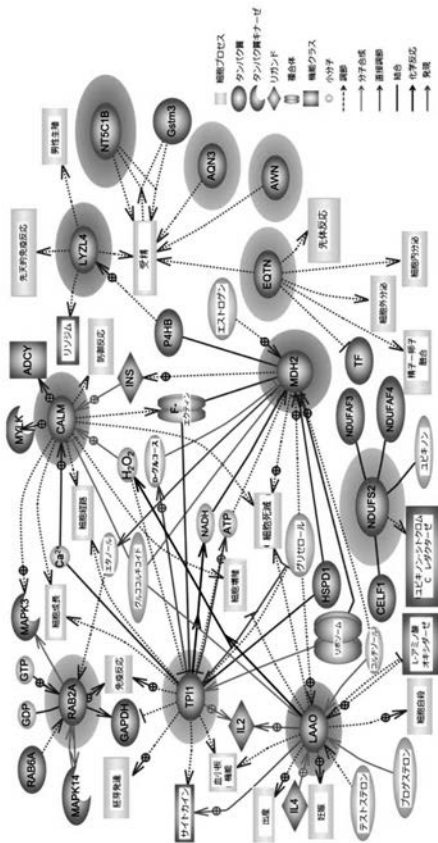


【図3】

【図4】

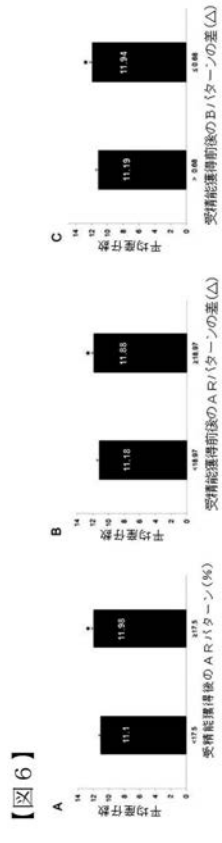


【図5】



【図5】

【図6】



【図6】

【配列表】

2016212121000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード(参考)
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/68	A
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	F
C 0 7 K	16/40	(2006.01)	C 0 7 K	16/18	
			C 0 7 K	16/40	

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 パン ミュン - ジョル

大韓民国 1 5 8 - 7 5 1 ソウル, ヤンチョン - グ, モクドンセオ - ロ, 3 8, 1 2 0  
- 9 0 2

(72)発明者 クウォン ウー スン

大韓民国 1 3 6 - 8 3 6 ソウル, セオンバク - グ, ジャングウィ - ロ 6 ギル, 1 0

F ターム(参考) 4B029 AA27 BB16 BB17 FA15

4B063 QA01 QQ03 QQ53 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34 QS39 QX02

4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 DA76 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	使用与育性相关的蛋白质标记物预测动物产仔数的方法和使用氯四环素染色法预测动物的精液质量和产仔数的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016212121A</a>	公开(公告)日	2016-12-15
申请号	JP2016174275	申请日	2016-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	安妮春工业大学学术核心蒲雷化基金会		
申请(专利权)人(译)	中央大学产业学术核心蒲雷化基金会		
[标]发明人	パンミュンジョル クウォンウースン		
发明人	パン ミュン-ジョル クウォン ウースン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/573 G01N33/543 C12M1/00 C12Q1/68 C12N15/09 C07K16/18 C07K16/40		
CPC分类号	G01N33/689 G01N33/56966		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/573.A G01N33/543.545.A G01N33/53.M C12M1/00.ZNA.A C12Q1/68.A C12N15/00.F C07K16/18 C07K16/40 C12M1/00.AZN.A C12N15/09.200 C12Q1/68		
F-TERM分类号	4B029/AA27 4B029/BB16 4B029/BB17 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QQ03 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	1020140169854 2014-12-01 KR		
其他公开文献	JP6461059B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开的是动物与生育有关，以及与金霉素染色动物精液质量和同窝仔规模的预测方法的蛋白质标志物的产仔数预测方法 本发明涉及动物的同窝仔规模的预测方法的蛋白质标志物被用于相关的生育力，和更具体地，精子的标志物是差异响应于动物同窝仔规模生产能力表示用于预测包含特异性结合标记物的抗体的垫料的标记物组合物，和使用该标记物组合物预测动物后代数量的方法。此外，本发明涉及一种精液质量和动物金霉素染色的产仔数预测方法，并且更具体地，精子活力，运动学或获能（容量）状态测量的动物预测后代的数量。 点域5

