



日本中央競馬会特別
振興資金助成事業

動物遺伝研究所年報

第 10 号

(平成14年度)

Annual Report

Shirakawa Institute of
Animal Genetics

社団法人畜産技術協会附属
動物遺伝研究所

序 文

本年報は平成14年度における附属動物遺伝研究所の研究の概要などを中心に、研究所の諸活動についてとりまとめたものです。

昨年(2002年)は、イネゲノム、マウスゲノムの塩基配列が概略解読されたと宣言され、今春にはヒトゲノムが完全解読されたと公表されました。家畜でも、ウシ、ブタ、ニワトリで全塩基配列解読の計画が進みつつあり、中でも、ニワトリは来年にも解読宣言がなされるであろうという情勢です。これらの動きは、DNA・遺伝子に支配される生命の仕組みの解明、個人の遺伝的特性にあった医薬品の開発、生産性の高い家畜や農作物の育種を促進することは間違いありません。

動物遺伝研究所は主として黒毛和種を研究対象とし、これまでにいくつかの遺伝性疾患の原因遺伝子を同定し、これを基に当該遺伝子のキャリアのDNA診断法を開発しております。量的形質である経済形質では、対象形質を脂肪交雑と発育速度に絞り、これらの形質に関わるいくつかの遺伝領域を染色体上に位置づけ、一部の系統ではこの遺伝領域に所在するDNAマーカーを指標とした優良種畜のスクリーニングが行われております。DNAマーカーによる個体識別や親子鑑別はすでに実用技術であり、この手法は食肉のトレーサビリティを保証する重要な技術的根拠ともなっています。

平成4年9月に設立され、平成5年から研究活動をスタートした動物遺伝研究所は、農林水産省、日本中央競馬会、(財)全国競馬・畜産振興会などをはじめとする関係機関から多くのご支援をいただき、これまで順調に成果を挙げつつ発展して参りました。平成15年3月には動物遺伝研究所の10周年記念誌も刊行することができました。

今後、家畜におけるゲノム研究は国の内外でますます発展していくものと信じております。動物遺伝研究所としても、この趨勢に決して遅れることなく、研究活動を進めていく所存であります。

関係各位に置かれましても、研究所の今後の研究推進にいつそご支援をいただければ幸いに存じます。

平成15年7月

社団法人畜産技術協会

会長 山下喜弘

平成14年度 動物遺伝研究所年報

目 次

序 文

I 設立の経緯と沿革	1
II 平成14年度の動き	
1. 研究推進の状況	3
1) ウシDNAマーカー育種手法の開発	3
1) - 1 肉用牛経済形質のDNA育種手法の開発	3
1) - 2 ウシ遺伝性疾病のDNAマーカー育種手法の開発	6
1) - 3 ウシゲノム解析用ツールの開発	9
2) BSE感受性の遺伝的差異の診断技術の開発	11
2. 平成14年度研究発表	
1) 論文発表	12
2) 学会発表	12
3) 研究発表要旨	16
3. 委員会・会議等の開催	
1) 肉用牛ゲノム研究開発推進委員会	22
2) 肉用牛ゲノム研究・実用化技術推進委員会	22
3) 全国DNA育種推進会議	23
4) BSE生体診断技術緊急開発事業推進検討委員会及び研究打ち合わせ会	23
5) 研究会等の開催	24
4. 委託研究	26
5. 研修員の受け入れ	27
6. 職員の普及活動等	28
III 研究の解説	
1. 脂肪交雑を支配している責任遺伝子の同定を目指して	31

2. 軟骨異形成性矮小体軀症原因遺伝子 <i>LIMBIN</i> の同定と診断法の確立	42
--	----

IV 総務

1. 職員名簿	51
2. 職員の異動	52
3. 職員の海外出張	52
4. 施設・機器の整備	53
1) 施設	53
2) 平成14年度導入の主要機器	53
5. 購読雑誌一覧	55

V 資料

1. 論文再録	57
2. 海外出張報告	82

I 設立の経緯と沿革

1. 設立の経緯と沿革

家畜育種の基本は、個体の能力を正確に測定し、遺伝的能力に基づいた選抜を行い、選抜された個体間の交配から次世代を生産するという、一連の作業を反復することにより、望ましい遺伝子を個体内に集積することにある。

家畜の経済形質の大部分はいわゆる量的形質で、一つ一つは決定的な効果を持たない多数の遺伝子によって支配され、また、遺伝以外の環境などの多くの要因に支配されて形質は発現する。そのため、個々の遺伝子を解析することは難しく、遺伝子型そのものの解析ではなく、血統情報と表現型に基づいて統計遺伝学的手法により種畜の遺伝的能力を推定し選抜が行われてきた。

統計遺伝学的手法は、1940年代には理論的にほぼ集大成され、近年のコンピュータの発達ともあいまって、BLUPに代表されるような理論と計算手法の発展があり、近年家畜の能力は大きく向上した。とくに乳牛では、年あたりの遺伝的改良量は加速的に大きくなっている。

しかし、遺伝率が低く、あるいは表現型の測定に多大の時間と経費を要する形質、たとえば、繁殖性、抗病性等の形質については現行の育種法では改良が難しいことが指摘されている。さらに、多様化する育種目標に迅速、的確に対応するためには、育種に要する時間、費用等について効率化が強く求められている。

最近の分子遺伝学並びにその重要な領域であるゲノム研究の進展に伴い、家畜においても遺伝地図の作成が急速に進み、DNAマーカーと経済形質に關与する遺伝領域あるいは遺伝子座(QTL)との連鎖解析が可能になった。連鎖解析が進めば、DNAマーカーを指標として、育種目標に適合した遺伝子型を選抜する新しい育種法の開発が期待できる。また、DNAマーカーを指標とした遺伝性疾患原因遺伝子のキャリアのスクリーニングも可能になる。

我が国の畜産は、外国のそれに比して国土資源の制約、高水準の人件費などきわめて厳しい条件下で低コスト化・高品質化をはからなければならない状況にある。そのためには畜産技術の基本である優良家畜への育種を効率的に行うことが必須であり、上述の新しい育種技術の開発に早急に着手する必要がある。

このような状況から、農林水産省の指導のもとに、日本中央競馬会及び(財)全国競馬・畜産振興会のご理解を得て、日本中央競馬会の畜産振興資金の助成により、(社)畜産技術協会附属動物遺伝研究所が設立されることとなった。

研究の拠点となる建物は平成3年度に設計を開始し、平成4年9月着工、平成5年1月に竣工した。建物は鉄筋コンクリート造り一部2階建て延べ面積884m²(研究員室、実験室(2)、バイオハザード室、クリーンルーム、ドラフトチャンバー、会議室等)である。さらに、平成6年度にRI実験室、動物飼育室の2室(計116m²)を増築した。

研究プロジェクトの拡大に伴い、実験室が手狭になったことから、平成9年度に新たな実験棟を建設することとなった。平成9年9月着工、平成10年2月竣工で、建物は鉄筋コンクリート造り一部2階建て延べ面積1094m²(DNA解析室、コンピュータ室、大会議室、研究員室、図書保管室等)である。新たな実験棟の建設に伴い、これまでの実験棟を本館、新設棟を別館と呼称している。

研究プロジェクトは、平成4年度から「個体識別システムの開発」、平成6年度から「肉質等経済形質DNAマーカー育種手法開発事業」、平成9年度から「家畜疾病DNAマーカー育種手法開発事業」、平成10年度から「家畜遺伝子解析基盤技術緊急開発事業」及び「食肉品種鑑別技

術の確立」が開始されるなど順次拡大されてきた。このうち「個体識別システムの開発」は所期の目的を達成し、平成10年度をもって終了した。このプロジェクトによって数多くのDNAマーカーの開発、遺伝地図上への位置づけを行い、これらのマーカーを適宜選択することにより、個体識別や親子鑑定が実用上支障なくできることを明らかにした。個体識別の手法は、牛肉のトレーサビリティを保証する基本的な技術ともなっている。

また、これまでに脂肪交雑や枝肉重量に関与するとみられるいくつかの遺伝領域を染色体上に位置づけ、所在するQTLを同定すべく努力を続けている。遺伝領域が位置づけされたことに基づいて、DNAマーカーを指標にした種畜のスクリーニングが一部で試行されつつある。さらに、黒毛和種及び褐毛和種に見られた計4種の遺伝的疾患の遺伝子を特定してキャリアの診断法を開発した。

上記のプロジェクトは「食肉品種鑑別技術の確立」をのぞいては、平成12年度をもって予算上は一区切りとなった。平成13年度からは新たに「畜産新技術開発活用促進事業」として、ウシのゲノム地図などの基盤技術の開発や遺伝性疾患のキャリア診断技術の開発などを進め、「肉用牛遺伝資源活用体制整備事業」として経済形質QTLの特定とこれを活用した育種手法の開発を目標として研究を進めている。また平成12年度から引き続き「畜産新技術実用化対策事業」の一環としてDNA育種基盤整備事業を進め、この中で従来通り関係する道県との共同研究を推進している。平成14年度は、平成13年度をもって終了した「食肉品種鑑別技術の確立」をのぞく事業は継続されるとともに、新たに「BSE生体診断技術緊急開発事業」がスタートし、この中では、BSE感受性についての遺伝的な差異が我が国の牛にあるかどうかをプリオン遺伝子の多型との関係で調べている。

職員は平成4年度管理部門2名、研究員2名の計4名から発足し、研究の進展・拡大とともに順次増員し、平成14年度末には所長を含む管理部門4名、研究部門22名（研究員9名、研究補助員13名）となった。

Ⅱ 平成14年度の動き

1. 研究推進の状況

1) ウシDNAマーカー育種手法の開発

1) - 1 肉用牛経済形質のDNA育種手法の開発

(1) 研究年次：平成6年～平成15年

(2) 研究目的と期待される成果

ウシの経済形質の改良はこれまで主としてBLUP等に代表される統計遺伝学的手法によって行われており、大きな成果を挙げてきた。しかしこの方法では種畜評価に要する時間、コストが膨大なものになる欠点がある。一方、近年におけるゲノム解析研究の進展は、ゲノム連鎖地図を用いることにより、特定経済形質に関連する染色体上の遺伝領域、あるいは遺伝子を特定することを可能にしつつある。

平成6年度に開始された本課題は肉用牛（黒毛和種及び褐毛和種）を対象とし、発育速度、脂肪交雑を中心とする肉質等の経済形質についてDNAを指標とした改良手法の開発を目的とし、脂肪交雑などの主要な経済形質について連鎖する染色体領域を確実に特定してきた。平成12年度までに、一部の経済形質についてはマーカーアシスト選抜に適用しうる段階に至った。

ほとんどの経済形質は多数の遺伝子の関与する量的形質であるが、それらの責任遺伝子を同定することは、形質発現のメカニズムの解明につながる重要な成果となる。平成13年からは、経済形質、特に、脂肪交雑に影響する遺伝子を同定し、その遺伝子情報を応用することを目的としている。

(3) 研究開発の個別目標と成果

(3)-1 ウシ経済形質解析の前年度までの経緯

平成12年度までに21道県・家畜改良事業団との合計22機関と共同研究を実施し、15家系についてのDNAマーカーを用いた連鎖解析を行ってきた。平成13年度から18道県・家畜改良事業団・家畜改良センターの合計20機関と共同研究を実施している。道県・家畜改良事業団では特定種雄牛を父とする大規模な父方半兄弟家系を作成し、マイクロサテライトマーカーを用いたウシゲノム全体を対象とする解析を進め、経済形質のマッピングを行ってきた。いくつかの県において、枝肉重量や脂肪交雑等の経済形質に関する結果が得られており、これまでに脂肪交雑について4カ所、枝肉重量について4カ所の領域をマップしている。これらのうち特に重点的に解析しているものを表1に示す。これらはそのままマーカーアシスト選抜に応用されている。たとえば、表1に示す経済形質遺伝子座である「脂肪交雑1」の領域について、兵庫県では県内の集団で広くサーベイすることで、その優れたハプロタイプをホモで有する繁殖雌牛を確保することに成功した。このような個体を次世代の種雄牛作りに使うことができる。また、「枝肉重量1」について鹿児島県内の集団について調査し、優れたハプロタイプの頻度を知ることができた。これらの後継種雄牛について増体を保証した上で肉質の改良を行うことができるだろう。

表1. 主な黒毛和種経済形質のマッピングとハプロタイプ効果

種雄牛保有機関名	経済形質	連鎖の度合い	ハプロタイプ効果
兵庫県	脂肪交雑1	$p < 0.00001$	BMS, 1.0
宮崎県	脂肪交雑2	$p < 0.00005$	BMS, 1.0
鹿児島県	枝肉重量1	$p < 0.00001$	枝重, 36kg

(3)-2 経済形質解析のためのDNAサンプルの収集

黒毛和種の経済形質解析において、大規模な父方半兄弟家系の作成が重要である。そのため、18道県を中心に、枝肉共励会や枝肉共進会等において血統情報の明らかな肥育牛のDNAサンプルを収集し、自県所有種雄牛産子のDNAサンプルは自県で活用し、他道県や家畜改良事業団所有の種雄牛産子のDNAサンプルは該当機関に送付している。当研究所では、東京都食肉市場、および、大阪市食肉市場におけるサンプリングを実施し、全国の共同研究機関に収集したDNAサンプルを配布している。平成13-14年度のDNAサンプル収集状況は表2の通りである。

表2. 平成14年度までの黒毛和種DNAサンプル収集状況

	年 度	収 集 数	合 計
道 県	13	7,902	20,315
	14	12,413	
動物遺伝研究所	13	1,054	3,557
	14	2,503	
合 計			23,872

(3)-3 経済形質：脂肪交雑に影響する遺伝子のポジショナルクローニング

これまでにマッピングしてきた経済形質遺伝子座の内、表1に示す脂肪交雑1および脂肪交雑2について、ポジショナルクローニングによる責任遺伝子取りを始めた。

(3)-3-1. 「脂肪交雑1」の解析（兵庫県との共同研究）

前年度までに1,010頭の家系解析・ウシEST情報・ヒトとの比較地図作成・BAC整列地図作成の着手によるマーカーの開発を行い、3.5cMまで狭めていたが、今年度にはこの領域についてBAC整列地図を作成することに成功した。

整列地図はBACライブラリーから単離した126クローンの内60クローンで構成され、ヒトドラフト配列情報から、約6.2Mbと推測された。含まれるマイクロサテライトは65個、SNPは2個、既知および予想される遺伝子数は62個であった。今後、30kb間隔で多型性マイクロサテライトマーカーを揃え、一般の黒毛和種集団を対象とした相関解析を行い、責任遺伝子を同定していく予定である。

(3)-3-2. 「脂肪交雑2」の解析（宮崎県との共同研究）

種雄牛aの父方半兄弟家系解析により約20cMまで領域を狭めた。種雄牛aと同じ母を持つ半兄弟の種雄牛bの家系解析では該当部位でバラツキが認められなかったことから、兩種雄牛における母由来のハプロタイプを詳細に調べた。その結果、種雄牛aに遺伝しているが、種雄牛bに遺伝していない領域約1.9cMに責任遺伝子が存在している可能性が考えられた。

今年度は、該当領域に位置する既知のマイクロサテライトマーカー2個、ヒト相同遺伝子24種をアンカーとしてBACクローン合計152個をスクリーニングし、整列化を試み、ほぼ整列地図を完成させた。この領域の距離はヒトゲノム情報から7.1Mbと判明し、残されたギャップ1.1Mbを埋めているところである。含まれるマイクロサテライトは79個（内40個が多型性あり）、既知および予想される遺伝子数は148個であった。整列化が完成すれば、「脂肪交雑1」と同様に高密度の多型性マーカーを配置し、一般の黒毛和種集団を対象とした相関解析を行い、責任遺伝子を同定していく予定である。

(3)-4. 経済形質：枝肉重量に影響する遺伝子のポジショナルクローニング

これまでにマッピングしてきた枝肉重量遺伝子座の一つは、異なった血統の複数の家系で繰り返し検出されてきている。このことは、少なくとも黒毛和種の集団内で比較的大きな効果を示す遺伝子が存在することを予想させる。そこで、表1に示す枝肉重量1について、ポジショナルクローニングによる責任遺伝子取りを始めた。

(3)-4-1. 「枝肉重量1」の解析（鹿児島県・長崎県との共同研究）

前年度までに、7.5cMの領域にマッピングした。今年度は、該当領域のBACクローンによる整列化を始めている。既知のマイクロサテライト15個とウシEST1種をアンカーにBACクローンを合計41個得た。今後、BACクローンの部分的なショットガンシーケンシングを行って、対応するヒトゲノム上の位置を決めることで、アンカーにすべきヒト相同遺伝子を絞る。BACクローンの整列化がほぼできあがった段階から、100kbにつき1個のマイクロサテライト開発を行う。

(4) 国内および海外の状況

経済形質のような複数の遺伝子の関与する形質のゲノム解析の成果は、平成6年のスウェーデン農業大学のグループによるブタの肉質、および、平成7年のリェージュ大学（ベルギー）のグループによるホルスタインのミルク生産性について報告された。また、平成9年にもリェージュ大学などいくつかのグループによって豚尻形質（単一遺伝子が関与）について報告された。

リェージュ大学（ベルギー）のグループは、平成7年（1995年）にホルスタイン種のミルク生産性形質のマッピングを初めて報告しているが、その内の一つである染色体20番のQTLの解析を進め、平成14年1月にその責任遺伝子としてGHR(Growth Hormone Receptor)を報告した。経済形質QTLの責任遺伝子についての最初の報告と思われる。GHRの279番目のアミノ酸であるフェニルアラニンからチロシンにより乳脂肪率が増え、乳量も若干増えるそうである。

また、同じグループは、ホルスタインのミルク生産性について、平成11年に染色体14番のセントロメア領域の7cMに責任遺伝子が存在することを示していたが、平成14年2月に、問題の領域をさらに3cMまで狭め、乳脂肪含量に影響する遺伝子候補としてDGAT1(Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase)を同定したことを報告した。DGAT1の232位リジン/アラ

ニンの多型があり、リジンの場合ミルク生産量やタンパク質量を減らす、乳脂肪量を増やす効果がある。

これら2種類のQTL責任遺伝子の同定において連鎖不平衡（Linkage Disequilibrium; LD）が有効に使われた。これらの研究では、ホルスタイン種におけるハプロタイプブロックのサイズは1-2Mb程度と推定された。このサイズがLDマッピングの指標となるので、黒毛和種におけるQTL責任遺伝子同定の参考になると思われる。

肉牛については、米国から経済形質のマッピングについていくつか報告されているが、ゲノムワイズレベル1%以下、20cM以内にファインマッピングされている例はまだない。その大きな理由として、多型性のDNAマーカー数が少ないことが挙げられる。したがって、QTL検出の精度が低く、マッピングの位置が正確でなくなる。リェージュ大学のグループのように、領域特異的にDNAマーカーを開発するか、当研究所のように（後述）ゲノム全体に多数のDNAマーカーを開発しなければ進展は望めない。

(5) 今後の進め方

現状のマーカー数、遺伝子地図では、DNAを指標とした経済形質の選抜（マーカーアシスト選抜）が十分有効であるほどには染色体領域を狭く特定できないので、今後は1) -3で述べるようにゲノム解析用ツールの開発を進め、この成果をフィードバックしつつマーカーアシスト選抜が可能な高精度マーカー開発を急ぐ。また、上記以外の経済形質QTLについて、染色体領域の特定、ファインマッピング、BAC整列化を行う。高密度の多型性マーカーを配置し、一般の黒毛和種集団を対象とした相関解析を行い、責任遺伝子を同定していく。

1) -2 ウシ遺伝性疾患のDNAマーカー育種手法の開発

(1) 研究年次：平成9年～平成15年

(2) 研究目的と期待される成果

ウシの遺伝性疾患の多くは常染色体性単純劣性遺伝病である。遺伝性疾患の原因となる変異アリルはヘテロの状態では健常であるため、集団中に維持される。したがって、この変異アリルの遺伝子頻度を一定以下に下げることが従来の血統記録に頼る方法では容易ではない。一方、黒毛和種集団では近年における近交の高まりにつれて、遺伝性疾患が顕在化しつつあるとされる。このような風評の中で優良なウシがいたずらに淘汰されることは今後の育種改良基盤を狭めるおそれがある。そのため、遺伝性疾患のキャリア（当該遺伝子をヘテロに保有する個体）をDNA診断によってスクリーニングする方法の開発は従来にもまして重要となってきた。

また、小型ピロ、脂肪壊死症、乳房炎、トリパノゾーマ症等の疾患に対する感受性（抵抗性）は、単純劣性遺伝ではないものの、遺伝的変異のあることは明らかであり、これらの疾患に対する感受性（抵抗性）についてスクリーニングできれば経済的に重要な意義を持つこととなる。

本事業では、これらの疾患、あるいは疾患に対する感受性（抵抗性）について、DNAを指標としたスクリーニング（マーカーアシスト選抜）の手法を開発すると同時に、さらに進んで遺伝性疾患原因遺伝子の単離・特定を目的とする。このような目的が達成されれば、遺伝子の変異を検出するDNA診断によってキャリアのスクリーニングができるため、遺伝性疾患の発症を制御

しつつかリヤ牛の遺傳的能力を育種に生かすことができる。

(3)研究開発の個別目標と成果

(3)-1 ウシ遺傳性疾病解析の前年度までの経緯

本課題は平成9年度から開始されており、当研究所が疾病の原因遺伝子を同定し、DNA診断手法を開発し、家畜改良事業団が検査業務を行うことになっている。平成13年度までの成果を表3に示した。

表3. 遺傳性疾病の遺伝子解析のまとめ

劣性遺傳病名	品 種	原因遺伝子	変異の種類	遺伝子診断手法	特 許
クローディン-16 欠損症	黒毛	Claudin-16 (新規)	37kbの欠損	あり	受 理
モリブデン補酵 素欠損症	黒毛	Mcsu (新規)	3塩基欠損	あり	受 理
Chediak-Higashi 症候群	黒毛	CHS-1	1塩基置換	あり	受 理
クローディン-16 欠損症タイプ2	黒毛	Claudin-16	56kbの欠損	あり	受 理
軟骨異形成性矮 小体軀症	褐毛	LIMBIN	1塩基置換 1塩基の2 塩基置換	あり	申請中
横隔膜筋症	ホルス タイン種	HSP70	11kbの欠損	あり	申請中

黒毛和種では水頭腫、盲目等の遺傳性疾病に取り組んできた。さらに広く疾病の家系を収集するため、道県との共同研究を進めると共に、大学の家畜病院や共済組合などとの連携強化を進めてきた。

(3)-2 平成14年度の成果

(3)-2-1. 水頭症：一次スクリーニングおよび二次スクリーニングの結果、特定の染色体領域にマッピングすることができた。この領域に存在するヒト水頭症の原因遺伝子には本疾病と関連する変異は認められなかった。

(3)-2-2. 盲目：二次スクリーニングまで進み、約10cMの領域にマッピングできたが、発症牛サンプルの数が少ないため、これ以上は困難な状態である。

(3)-2-3. 発育不全：一次スクリーニングが進行中だが、表現型の識別に問題があり、マッピン

グが困難な状態である。

(3)-2-4. 腎無形成症：一次スクリーニングが進行中。サンプル数は多いので有望。

(3)-2-5. 腎機能不全症：サンプル収集中。

(3)-2-6. 乳頭欠損：一次スクリーニングを開始した。サンプル数は多いが、複数の遺伝子が関与している可能性もある。今後もサンプル数を増やす必要があるだろう。

(3)-2-7. 軟骨異形成性矮小体軀症：前年度の年報において本疾病の原因となる遺伝子LIMBINの特定と変異について述べたが、同一遺伝子に異なった変異が存在し、DNAマーカーがヘテロ型を示すにも関わらず、発症するという希有な例であった。

一つ目の変異は、1,356番目の塩基のシトシンがチミンへ変わったものである。この変異のため、スプライシング部位が生じ、停止コドンがその下流に現れることとなる。正常なLIMBINタンパク質は1,209個のアミノ酸で構成されるのに対し、変異型の遺伝子から作られるタンパク質は463個のアミノ酸から成ると予想される。

二つ目の変異は、2,054番目のシトシンとその隣の2,055番目のアデニンがグアニン1個に変わったものである。その結果、フレームがシフトし、停止コドンが現れるため、変異型の遺伝子から作られるタンパク質は705個のアミノ酸から成ると予想される。

LIMBIN遺伝子の隣にhead-to-headで1,869bpしか離れていないEVC遺伝子が存在する。この遺伝子は、ヒトの手足などの骨形成異常をもたらす遺伝病の原因遺伝子であるが、最近、ヒトEVCと診断された患者において、LIMBINに疾病の原因となる変異が報告された。LIMBINとEVCは想定されるタンパク質が互いに似ており、共に骨形成に重要な役割を担っていると思われるが、それらの働きはほとんど不明である。今後の研究に発展によって、骨形成の新しい側面が解明されていくだろう。

(3)-2-8. 横隔膜筋症：前年度の年報において本疾病の原因となる遺伝子の同定と遺伝子診断法の確立について述べた。ウシ23番染色体のほぼ中央のMHC領域内に存在する熱ショックタンパク質をコードするHSP70遺伝子に、本疾病の原因となる変異を同定した。HSP70遺伝子はタンデムに2個重複して並んでいる（HSPA1A, HSPA1B）。HSPA1AとHSPA1B遺伝子のアミノ酸配列は641個中で異なっているのは5番目のアミノ酸だけであり（メチオニン/スレオニン）、両者は9kb離れたイントロンも持たない遺伝子である。疾病の原因となる変異は、HSPA1Bの全体を含む11kbの欠損であるが、HSPA1Aは保持された状態にある。

HSP70遺伝子の発現を調べたところ、発症牛ではHSPA1Aの正常レベルの発現が見られたが、HSPA1Bの発現はなかった。HSPA1AがHSPA1B欠損を補っている可能性があるため、タンパク質の生成を調べたところ、発症牛ではHSP70タンパク質のレベルはきわめて低下していた。HSPA1AのmRNAが正常レベルで検出できるにもかかわらず、タンパク質ができない理由はわからないが、同様な現象はノックアウトマウスで報告されている。該当する遺伝子はマウスでもタンデムに並んでおり、その内の一つをノックアウトすると、片方のmRNAは発現しているが、HSP70タンパク質は検出されなくなる。

Hsp70のノックアウトマウスを農業生物資源研究所の関川生体防御研究グループ長よりいただ

き、このマウスの横隔膜筋肉を中心に病理学的な研究を行っている。

(4) 国内および海外の状況

ウシの疾病のゲノム解析では、リェージュ大学のグループによって、ブラウンスイスのウィーバー症候群、ベルジャンブルーの繁殖障害のマッピングが報告されている。

(5) 今後の進め方

共同研究機関との緊密な連携をとりつつ、現在解析中の遺伝病のさらなる家系の収集を行う。染色体の特定領域にマップできた遺伝病については、原因遺伝子を同定すべく、該当領域の整列地図作りなどを試みる。また、新たな遺伝病についても家系の収集を行い、原因遺伝子をマップする。抗病性についても研究を進める。

1) - 3 ウシゲノム解析用ツールの開発

(1) 研究年次：平成10年～平成15年

(2) 研究目的と期待される成果

ゲノム解析でマッピングした遺伝子座の遺伝子をクローニングするためにはウシの詳細な染色体地図が必要である。高密度ゲノム連鎖地図の作成、マッピングされたDNAマーカーによるRH地図のフレーム作成、ウシESTのRHパネルでのマッピングを行い、ヒトゲノム情報を有効に活用できるウシの詳細な染色体地図を作成する。

(3) 研究開発の個別目標と成果

(3)-1. マイクロサテライトの開発およびマッピング

平成9年に米国農務省肉畜研究センター(USDA-MARC)で作成されたウシゲノム連鎖地図が、現在パブリックドメインの地図として世界中で使われている。この連鎖地図には1,250種のマイクロサテライトがマッピングされている。ヒトゲノム情報を有効に活用できるウシの詳細な染色体地図を作成するためには約3,000種のマイクロサテライトがマッピングされたゲノム連鎖地図が不可欠である。我々は独自に多数のマイクロサテライトを開発し、ウシゲノム連鎖地図に載せていく。

これまでに開発した多型性マイクロサテライト数	2,505
その内、ゲノム連鎖地図に載せた数	マルチポイント：1,318 ツーポイント：336
ゲノム連鎖地図に載せた既知のマーカー数	マルチポイント：137 ツーポイント：75
本事業以前のゲノム連鎖地図のマーカー数	1,250
平成14年12月末現在のゲノム連鎖地図のマーカー数	2,892

これまでに2,892個のマイクロサテライトマーカーを載せた連鎖地図を作ることに成功した。

本事業以前のマーカー数1,250個と比べると、マーカー数は2.3倍に増えたことになる。当初の目的をほぼ達成したが、マッピングしていない多型性マーカーが約700個、および、ツーポイントでマップされた411個（若干のタイピングエラーが存在しているか、計算上の問題に由来）についてさらに検討を加えていく。

(3)-2. RH地図の作成

ヒトゲノム情報を有効に活用できるウシの詳細な染色体地図を作成するため、平成12年度までにRHパネルを作成した。ウシ遺伝子の物理的なマッピングをこのRHパネルを用いて行う。そのため、すでに判明している染色体上のマイクロサテライトの配置順の情報、すなわち、ゲノム連鎖地図の情報を利用して、RH地図のフレームワークをまず作成した。平成13年度には、ゲノム連鎖地図に載せられた約1,000種のマイクロサテライトでフレームを完成させ、4,000種のウシESTの内、すでにウシゲノムでの位置が報告されている約500種をマッピングした。ヒトゲノムとの比較により、これらのマッピング結果は妥当であることがわかった。

平成14年度は、このフレームを用いて、残りのウシESTのマッピングを継続して行った。

これまでにフレームワークに用いたマーカー数	1,079
ツーポイントでマップしたEST数	2,128
RHパネルの平均保持率	18%
ゲノムの全長	12,791cR

ゲノムの長さの単位であるcRは用いたRHパネルの性質に依存している。我々のRHパネルは、約7,000radの放射線を照射して作成したものである。DNA断片で整列化している染色体領域3箇所についてcRと対応するDNAの長さを平均したところ、230kbであった。今後、(3)-1で述べた連鎖地図情報を基に、フレームワークのマーカー数を3千個まで増やし、ESTデータベースからプライマー設計可能な約7,000種の遺伝子のマッピングを目標とする。

(4) 国内および海外の状況

本事業は米国のネバダ大学やUSDA-MARCとの共同研究である。ウシのゲノム解析のためのツールの開発は、1997年の春の段階で一応のレベルに達し、ゲノム解析ができるようになったため、各国の研究機関は一斉に経済形質や抗病性の家系を用いた解析に取り掛かっているが、ツールは十分ではない。ヒトゲノム情報を有効に活用するためにもツールの充実が急がれる。

平成12年1月より、USDA-MARCの主導でウシゲノム全体を対象とするBAC整列地図作りが開始された。米国・カナダ・英国・フランス・ニュージーランド等から出資を含む参加があり、ヒトゲノム解析での経験を有するTIGR (The Institute of Genomic Research)とブリティッシュコロンビア大学との共同で進められている。得られた結果はネット上に公開されている。USDA-MARCからも我が国の参加を求められているが、日本は参加するに至っていない。

当研究所のウシ染色体地図を中心に、各国の進めているRH地図のデータをすべて使って、ウシゲノム統合地図を作成する予定である。この仕事は米国農務省とフランスINRAの働きかけがきっかけとなった。

一方、ウシ全ゲノム配列の解読のための国際協力プロジェクトが進行中である。我が国はこのプロジェクトに入っていない。過去2年間でBACクローンフィンガープリンティングとBACク

ローン末端配列解読が行われた。40万クロンのフィンガープリンティングのデータ、および、26万6千クロンの末端配列の解読の終了が待たれる。

(5) 今後の進め方

新規マイクロサテライトの開発を進め、高密度ゲノム連鎖地図を作成すること、および、高精度物理地図を作成することでヒトやマウスとの精度の高い比較地図を完成させることが主要な目標である。

2) BSE感受性の遺伝的差異の診断技術の開発

(1) 研究年次：平成14年～平成16年

(2) 研究目的と期待される成果

平成13年9月のBSE発生の影響等により、国産牛肉の消費量が減少し、価格の低迷等により我が国の畜産経営は厳しい状況に置かれた。このため、DNA研究に関する知見を活用し、BSE感受性の遺伝的差異に関する生体診断技術の開発を行う。なお、この研究は「BSE生体診断技術緊急開発事業」として行われているものであり、この事業の一部は（株）ワイエスニューテクノロジー研究所及び（独）動物衛生研究所に委託されている。

(3) 研究開発の個別目標と成果

ヒト、マウス、ヒツジでは、プリオンタンパク質のC末端側に、感染型プリオンタンパク質に抵抗性や耐性を示すアミノ酸変異が存在することが報告されている。ウシにおいても、そのようなアミノ酸変異が存在すれば、BSE抵抗性の遺伝子診断やBSE抵抗性ウシの育種が可能になる。そこで、まず、ウシの各品種からDNAサンプルをできるだけランダムに集め、それらについてプリオン遺伝子の配列を広くサーベイし、アミノ酸変異を起こす遺伝子配列の変化があるかどうかを検索する。検出されたアミノ酸変異がBSE耐性に貢献するか否かを調べる。用いる手法は、ウシゲノムDNAよりプリオン遺伝子(PRNP)の調査該当部分をPCR増幅し、PCR産物のダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定するものである。

<結果>

1. 黒毛和種（63頭）、ホルスタイン種（79頭）について、プリオン遺伝子のタンパク質翻訳領域のDNA塩基配列を調査した。

その結果、3箇所1塩基多型（SNP）を見いだしたが、いずれもアミノ酸変異を伴うものではなかった。また、オクタペプチドリピートのくり返し数は、5回のもの、6回のもの、ヘテロのものなどがみられたが、それぞれの遺伝子頻度は出していない。

2. プリオンタンパク質のC末端側(122His以降)に相当する領域に絞って、幅広い品種（日本3品種、インドネシア4品種、アフリカ2品種）で、DNA塩基配列を調べた。

インドネシア由来の4品種においてのみ、アミノ酸変異を起こす遺伝子配列の変化が2箇所(154S→N, 185N→S)見いだされた。154S→Nの変異は、ヒツジの該当部位のアミノ酸配列と同じ

になることから、BSE耐性に貢献する可能性はないと考えられる。185Nは、他の生物種でも保存されているアミノ酸であるため、Sへの変異は、何らかの影響を持つかもしれない。他の生物種で、この部位にアミノ酸変異の報告はない。

アミノ酸変異を伴わないSNPについては、日本3品種で、1.で見いだされたのと同じ箇所にも1つ、また、インドネシア由来の4品種からは、日本由来のものとは異なる箇所に計4箇所が見いだされた。

3. プリオンタンパク質のC末端側（122His以降）領域について、黒毛和種、ホルスタイン種を1,000頭規模に拡大し、DNA塩基配列を調べることに着手した。両品種ともに、1家系内最大4頭（半兄弟4頭）として、調査を行った。

現在までに、黒毛和種455頭、ホルスタイン種515頭について解析を行ったが、新規SNPは見いだされていない。

黒毛和種、ホルスタイン種において、プリオンタンパク質のアミノ酸変異を起こすような遺伝子配列の変化は現時点では検出できていない。今後、検査頭数を2,000頭以上まで増やす予定である。

(4) 国内および海外の状況

ウシプリオン遺伝子領域において、51種のSNPが報告されているが、アミノ酸置換をもたらすSNPは知られていない。プリオンタンパク質のアミノ末端側に8アミノ酸、オクタペプチドの繰り返し数の多型が知られており、この多型はプリオンタンパク質の感染性に影響しない。

英国ロズリン研究所のWilliamsらは、ホルスタイン種の父方半兄弟家系を用い、BSE感染牛と正常牛の間でDNAマーカーのアリール頻度に有意な差があるかどうかを調べた。種雄牛4頭の産子のうち、それぞれBSE感染牛合計358頭（種雄牛あたり53～124頭）と正常牛合計172頭（種雄牛あたり28～56頭）をサンプルとした。マイクロサテライトマーカーを全ゲノムに約20cM間隔で選択し、種雄牛で多型性を示す166種の型判定を行ったところ、染色体5番、10番、20番のマーカーに連鎖が認められた。これらのマーカーの近傍のマーカーでも調べたところ、染色体5番では連鎖が確認できたが、10番と20番では多型性を示すマーカーが無かった。したがって、BSE抵抗性遺伝子座をさらに研究するためには、多数のマイクロサテライトが必要であることは明らかである。当研究所の進めている高密度連鎖地図作成は、この研究においても重要な貢献をすることが予想される。

2. 平成14年度研究発表

1) 論文発表

1. Takeda, H., Takami, M., Oguni, T., Tsuji, T., Yoneda, K., Sato, H., Ihara, N., Itoh, T., Kata, S. R., Mishina, Y., Womack, J. E., Moritomo, Y., Sugimoto, Y., and Kunieda, T.: Positional cloning of the gene LIMBIN responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 10549-54, 2002
2. Reed, K.M., Ihara, N., Mariani, P., Mendoza, K.M., Jensen, L.E., Bellavia, R., Ponde de Leon, F.A., Bennett, G.L., Sugimoto, Y. and Beattie, C.W.: High-resolution genetic map of bovine chromosome 29 through focused marker development. *Cytogenet Genome Research* 96:210-216 (2002)
3. Reed, K.M., N. Ihara, N., Ponde de Leon, F.A., Songstegard, T.S., Smith, T.P.L., Bennett, G.L., Sugimoto, Y. and Beattie, C.W.: Development of 47 new microsatellite markers from a BTA6 library. *Animal Biotechnology* 13:195-202, 2002
4. Fujisaki, S., Mizoguchi, Y., Takahashi, S., Chen YZ, Suzuki, K., Asakawa, S., Soeda, E., Shimizu, N., Sugimoto, Y. and Yasue, H.: Construction of a bovine bacterial artificial chromosome library from fibroblasts used for cloned cattle. *Animal Genetics* 33, 379-381, 2002
5. Kiuchi-Saishin, Y., Gotoh, S., Furuse, M., Takasuga, A., Tano, Y. and Tsukita, S.: Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13:875-886, 2002
6. 渡辺大作、伴 顕、高橋雅博、石川 弘、渡辺昭夫、山野辺 浩、角金俊一、藤森康一郎、三宅陽一、岡田幸助、大塚浩通、小黑雅史、川村清市、平野 貴、杉本喜憲、阿部省吾、斎藤博水： 東北地方における牛クローディング-16欠損症の遺伝学的調査と臨床病理学的特徴、*家畜臨床誌*、25：1-10、2002
7. 鈴木暁之、太田原健二、野口龍生、杉本喜憲、田中修一、小松繁樹、吉川恵郷：日本短角種におけるウシ筋肉肥大 (double muscling) 原因遺伝子の同定とその産肉性、*東北畜産学会報* 52：11-17、2002

2) 学会発表

1. Takeda, H., Takami, M., Oguni, T., Tsuji, T., Yoneda, K., Sato, S., Ihara, N., Itoh, T., Moritomo, Y., Sugimoto, Y. & Kunieda, T.: Positional cloning of a Novel Gene,

- Limbin, Responsible for a Bovine Chondrodysplastic Dwarfism. 28th Conference of the International Society of Animal Genetics ISAG, August, 2002. Gottingen, Germany.
2. Itoh, T., Watanabe, T., Ihara, N., Beattie, C. W. & Sugimoto, Y.: Construction of a framework map of the Shirakawa/University of Nevada Reno Bovine Radiation Hybrid (SUN-bRH7) panel. 28th Conference of the International Society of Animal Genetics ISAG, August, 2002. Gottingen, Germany.
 3. Ihara, N., Takasuga, A., Mizoshita, K., Takeda, H., Sugimoto, M., Mizoguchi, Y., Bennett, G. L., Reed, K. M., Beattie, C. W., Sugimoto, Y.: Mapping of over 1100 bovine polymorphic microsatellite markers to the USDA-MARC cattle linkage map. 28th Conference of the International Society of Animal Genetics ISAG, August, 2002. Gottingen, Germany.
 4. 小林直彦、平野 貴、栃本洋子、兼子栄美子、大谷 健、杉本喜憲：黒毛和種の父方半きょうだい家系におけるQTL解析、2002年 第3回日本動物遺伝育種学会、2002年10月、京都
 5. Takasuga, A., Ihara, N., Itoh, T., Mariani, P., Watanabe, T., Takeda, H., Mizoshita, K., Sugimoto, M., Mizoguchi, Y., Bennett, G. L., Reed, K. M., Beattie, C. W. and Sugimoto, Y. : Development of genomic tools, a bovine microsatellite-based linkage map and an EST-RH map. Plant & Animal Genome XI, San Diego, CA, USA, 2003
 6. 佐分淳一、阿部剛、中川哲夫、河村正、斉藤邦彦、熊谷周一郎、久保岳史、口田圭吾、林武司、杉本喜憲、小林栄治：黒毛和種とリムジン種のF2家系における画像解析を利用したと体形質のQTL解析、日本畜産学会第101回大会、2003年3月、つくば
 7. 佐藤周史、佐藤慎一、長谷部浩行、杉本喜憲、小林栄治：豚の粗脂肪含量QTL領域におけるBACコンテイング作製とSNP探索、日本畜産学会第101回大会、2003年3月、つくば
 8. 伊藤智仁、高須賀晶子、渡邊敏夫、井原尚也、杉本喜憲：ウシRHパネルを利用した全染色体ウシ・ヒト比較地図の作製、日本畜産学会第101回大会、2002年3月、つくば
 9. 小邦朋子、成田暁、井原尚也、松本道夫、杉本喜憲、佐々木義之：ハーフシブデザイン家系を用いたQTL解析における環境要因補正の効果、日本畜産学会第101回大会、2003年3月、つくば
 10. 溝口康、岩本英治、杉本喜憲：黒毛和種における脂肪交雑連鎖領域のBACコンテイングの作成、日本畜産学会第101回大会2003年3月、つくば
 11. 阿部 剛、高須賀晶子、杉本喜憲、小林栄治：ウシプリオン遺伝子のSNP検出、日本畜産学

会第101回大会、2003年3月、つくば

12. 谷口幸雄、高野 淳、杉本喜憲、山田宣永、佐々木義之：ウシADM12遺伝子のクローニング、日本畜産学会第101回大会、つくば
13. 小林直彦、平野 貴、杉本喜憲：黒毛和種エリート種雄牛の父方半きょうだい家系におけるQTL解析、日本畜産学会第101回大会、2003年3月、つくば

3) 研究発表要旨

1) Positional cloning of the gene *LIMBIN* responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism (ウシ軟骨異形成性矮小体軀症原因遺伝子*LIMBIN*のクローニング)

竹田晴子¹、高見まりか²、小邦朋子³、辻 岳人⁴、米田一祐²、佐藤敬明³、井原尚也¹、伊藤智仁¹、S.R. Kata⁵、三品祐司⁶、J.E. Womack⁵、森友靖生⁷、杉本喜憲¹、国枝哲夫²
(¹動物遺伝研、²岡山大自然、³熊本県畜産研、⁴岡山大医歯、⁵テキサスA&M大、⁶US-NIEHS、⁷九州東海大農)

褐毛和牛における軟骨異形成性矮小体軀症は、四肢長骨の短小、骨端の肥大、それに伴う歩行異常や発育不全を特徴とする劣性遺伝病である。経済効果の高い種雄牛の一部と、約1.6%の繁殖雌牛がキャリアであると推定されることから、当該疾病の原因遺伝子の究明とDNA診断法の確立が強く望まれていた。

そこで我々は、疾病牛約120頭のDNAを用いた連鎖解析法により、当該疾病の責任染色体領域をウシ6番染色体のマイクロサテライトマーカーBP7からBMS9257の約11cM領域に同定した。さらに、責任染色体領域のゲノムDNAを含むウシYACおよびBACクローンを単離し、磁気ビーズ単離法を用いたマイクロサテライトマーカーの開発や、高密度物理地図の作製および交差解析によって、当該疾病の責任染色体領域を約2cMにまで絞り込んだ。このウシ染色体領域はヒト4番染色体p16領域と相同であることが推定されたため、このヒト染色体領域のゲノム情報を利用して候補遺伝子を推定した。そして、新規遺伝子*LIMBIN*に2種類の変異を同定した。この遺伝子の長骨の発育に対する機能を調べるために、マウス組織における*LIMBIN*の発現を調べた。*LIMBIN*は発生初期から分娩前にかけて、長骨、頭蓋骨、腎臓、心臓などで発現していることを確かめた。四肢の肢芽形成期にも*LIMBIN*は発現しているなど、この遺伝子が長骨の形成に関わっていることを示すデータを得た。さらに、この遺伝子のキャリアのDNA診断法を確立した。(Proc.National Academy of Science,USA,99:10549-10554,2002)

2) High-resolution genetic map of bovine chromosome 29 through focused marker development

(マイクロディセクションによるウシ29番染色体特異的なマイクロサテライトの単離とそれを用いた高密度連鎖地図の作製)

K.M. Reed¹、井原尚也²、P. Mariani¹、K.M. Mendoza¹、L.E. Jensen¹、R. Bellavia¹、F.A. Ponde de Leon¹、G.L. Bennett³、杉本喜憲²、C.W. Beattie⁴
(¹ミネソタ大、²動物遺伝研、³USDA-MARC、⁴ネバダ大)

要旨

ウシ29番染色体は牛肉の柔らかさなどの形質に関与する遺伝子の存在が連鎖解析の結果から報告されている。そこでマイクロディセクション法を用いて29番染色体特異的なマイクロサテライトマーカーの開発を行った。プライマーが設計された90個のマイクロサテライトのうち、82個がPCRで適切に増幅した。体細胞雑種細胞パネル(SCHパネル)を用いた実験により82個の

うち65個（85%）が29番染色体上にマップされた。またUSDA-MARCのマッピング家系を用いた実験では、82個のうち75個（91%）がマッピング家系内において多型を示し、そのうち69個（84%）が連鎖解析により29番染色体へマップされた。従来の29番染色体連鎖地図上には32個のマイクロサテライトマーカーがマップされており、平均のマーカー間隔は約2センチモルガン程度であったが、今回開発されたマーカーが69個加わることにより、地図上のマーカー数は3倍以上の101個に増えたことになる。このような染色体特異的なマイクロサテライトの開発は連鎖解析でマップされている染色体領域から遺伝子を同定する上で非常に重要である。(Cytogenetic and Genome Research, 96:210-216, 2002)

3) Development of 47 new microsatellite markers from a BTA6 library (ウシ6番染色体から47個の新規マイクロサテライトマーカーの開発)

K.M. Reed¹, 井原尚也², F.A. Ponde de Leon¹, T.S. Songstegard³, T.P.L. Smith⁴, G.L. Bennett⁴, 杉本喜憲², C.W. Beattie⁵ (¹ミネソタ大、²動物遺伝研、³USDA-ARS、⁴USDA-MARC、⁵ネバダ大)

ウシ6番染色体は乳量や疾病などの形質に關与する遺伝子の存在が連鎖解析の結果から報告されている。マイクロディセクション法を用いて新たに121個マイクロサテライトが単離された。そのうち重複する19個を除き、残り102個のうち47個がPCRで適切に増幅された。USDA-MARCのマッピング家系を用いたマッピングでは、そのうち36個がマップされた。この36個のマイクロサテライトのマッピング家系内での平均のアレル数は6個で、最もアレル数が多かったBMS5009はアレル数が14個であった。6番染色体にはマーカーが粗な領域があるため、このような特定の染色体をターゲットにしたマイクロサテライトマーカーの開発は、解析の情報量を増やし連鎖解析でマップされている染色体領域から遺伝子を同定する上で非常に重要である。(Animal Biotechnology, 13:195-202, 2002)

4) Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. (タイトジャンクションを構成する膜タンパク質クローディンファミリーのマウスのネフロンセグメントにおける発現様式の違い)

西信(木内)裕美子^{1,2}, 後藤慎平¹, 古瀬幹夫¹, 高須賀晶子³, 田野保雄², 月田承一郎¹ (¹京都大医、²大阪大医、³動物遺伝研)

タイトジャンクションは、上皮系細胞の細胞間接着装置で、細胞間隙をシールして、細胞シートの上下間のバリアとして働く。クローディンは、タイトジャンクションの構成タンパク質のひとつで、これまでに20以上のサブタイプが知られている。ウシでは、クローディン-16欠損が慢性間質性腎炎の原因であることが以前に明らかにされている。

本研究では、マウスの腎臓で発現しているクローディンについて、ネフロンの各セグメントに

おける発現の分布を蛍光抗体法により調べた。各クローデインは、セグメント特異的な発現分布を示し、各セグメントによって、発現するクローデインタイプの組み合わせが異なることが明らかになった。この違いがネフロン各セグメントにおける物質輸送の特性に多様性をもたらしているのかもしれない。

(J. Am. Soc. Nephrol. 13:875-886, 2002)

5) Shirakawa/University of Nevada Reno bovine Radiation Hybrid (SUN-bRH7) パネルのフレームワーク構築

伊藤智仁¹、高須賀晶子¹、渡邊敏夫¹、井原尚也¹、C.W. Beattie²、杉本喜憲¹ (¹動物遺伝研究所、²ネバダ大)

Radiation Hybrid (RH)パネルは遺伝子や物理地図のアンカーの位置を決定するために広く利用されている。しかし、任意の遺伝子をマッピングするため、全染色体のフレームワークを完成させる必要がある。さらにESTをマッピングすることにより、ウシとヒトの比較地図が作製できる。比較地図により、ウシ染色体領域とヒト染色体領域の相同領域を判断することが可能になり、ヒト遺伝子の位置・配列・機能情報等を利用するために非常に有用である。我々は全染色体ウシフレームワーク構築及び、ウシ・ヒト比較地図を作製した。

RH地図のフレームワーク構築には、USDAウシ連鎖地図より約1600個のマイクロサテライトマーカーを利用した。RHマップ作成プログラムパッケージRHMAPのRH2PTより2 point analysisを行い、LOD>4による連鎖グループを作成した。2 point analysisの結果から、LOD>6による解析結果を用いて同パッケージのRHMAXLIKによるmultipoint analysisを行った。

ESTマーカーは、これまでに報告されているPrimerを利用した。RHMAP V3.0より2-pt LOD>3によるフレームワークマーカーとの連鎖グループを作成し、各染色体上の位置を同定した。

フレームワークはLOD > 4.0で約1100個のマイクロサテライトマーカーにより構築した。

比較地図作製では、EST約1600個のうち、約1400個をウシ全染色体にマッピングした。このうち、646個のヒト遺伝子と対応しているESTsを用いたウシ・ヒト比較地図を作製した。マップしたESTsは、最大がウシ第3番染色体で、114マーカーを同定した。フレームワークに利用しているマイクロサテライトマーカーとESTsにより、総計2475個のマーカーで構成されているRH地図を作製した。

(第28回国際動物遺伝学会および日本畜産学会第101回大会)

6) 1100個を超えるウシ多型マイクロサテライトマーカーのUSDA連鎖地図へのマッピング

井原尚也¹、高須賀晶子¹、溝下和則²、竹田晴子¹、杉本真由美³、溝口 康¹、G.L. Bennett⁴、K.M. Reed⁵、C.W. Beattie⁶、杉本喜憲¹ (¹動物遺伝研、²鹿児島県肉用牛改良研、³家畜改良センター、⁴USDA-MARC、⁵ミネソタ大、⁶ネバダ大)

連鎖地図上にマップされているマイクロサテライトマーカーは、遺伝性疾患の原因遺伝子や

経済形質などのQTLの責任遺伝子を同定する上で基本的かつ大変重要なツールといえる。1997年に米国農務省肉畜センター（USDA MARC）らのグループによって発表された第二世代ウシ連鎖地図は、1250個のDNAマーカーから構成されるが、精度の高いマッピングをするには、十分な数とは言えなかった。さらにマッピングされた染色体領域から遺伝子を同定するには、連鎖地図に基づいて作製された詳細な物理地図が必要となる。そこで我々は、USDA他いくつかの研究機関と共同で、多型なウシマイクロサテライトマーカーを開発し、それを用いた高密度なウシ連鎖地図の作製を試みた。現在までに新たにマップした1100個の多型マイクロサテライトマーカーを加えるとウシ連鎖地図上には少なくとも2300個のDNAマーカーが平均間隔1.3cMでマップされていることになる。（第28回国際動物遺伝学会）

7) Development of genomic tools, a bovine microsatellite-based linkage map and an EST-RH map

（ゲノム解析ツールの開発 — 連鎖地図及びRH地図）

高須賀晶子¹，井原尚也¹，伊藤智仁¹，P.Mariani²，渡邊敏夫¹，竹田晴子¹，溝下和則³，杉本真由美⁴，溝口 康¹，G.L. Bennett⁵，K.M. Reed²，C.W. Beattie⁶ and 杉本喜憲¹
（¹動物遺伝研，²ミネソタ大，³鹿児島県肉用牛改良研，⁴家畜改良センター，⁵USDA-MARC，⁶ネバダ大）

家畜の経済形質に関わる遺伝子を同定する上で、高密度マーカーから成る遺伝地図および物理地図は、必要不可欠な道具立てである。遺伝地図にマップされた多数のマイクロサテライトマーカーは、経済形質の責任領域をファインマッピングするのに役立つとともに、Radiation hybrid (RH) 地図のフレームワークマーカーとしても重要である。一方、多数のExpressed sequence tags (EST)がマップされたRH地図は、責任領域をヒトやマウスのゲノム配列と対照して、責任領域内に遺伝子マーカーを作成したり、候補遺伝子の検索を行うことを可能にする。動物遺伝研究所では、3000個のマイクロサテライトマーカーを持つ遺伝地図と、3000個のESTをマップした物理地図を作ることを目標に、仕事を進めてきた。現在までに、2000個以上の新規マイクロサテライトを単離し、うち1450個をアメリカ農務省肉畜研究センター(USDA-MARC)の連鎖地図にマッピングした。その結果、連鎖地図上のマイクロサテライトマーカー数は、2890個となった。また、約1000個のマイクロサテライトマーカーを用いて、RHのフレームワークを作成し、1820個のESTをマップした。

(Plant & Animal Genome XI, San Diego, 2003)

8) 黒毛和種エリート種雄牛の父方半きょうだい家系におけるQTL解析

小林直彦¹、平野 貴²、杉本喜憲² （¹岐阜県畜産研、²動物遺伝研）

（目的）脂肪交雑に関して、連鎖解析によって検出された2箇所のQTL候補領域について、これら2領域の保有の状態が、脂肪交雑に及ぼす効果について検討した。

(方法) 黒毛和種エリート種雄牛の産子である肥育牛190頭について、254個のマイクロサテライトマーカーを全常染色体に配置し、DNA型判定を行った。連鎖解析にはExplorer half-sibを用いた。解析の結果、脂肪交雑についてChromosome-wise 5%有意水準で検出された2領域に、さらに52個のマーカーを配置し、解析頭数を524頭に増やして2次スクリーニングを行った。

(結果) 2領域の父由来ハプロタイプが確定した個体(488頭)について、これら2領域のハプロタイプの種類とBMS No.について比較した。これら候補領域のA染色体と、B染色体の脂肪交雑に効果のあったハプロタイプを各々 Q_A 、 Q_B とし、効果のないハプロタイプを q_A 、 q_B とした。効果のあるハプロタイプを両方保有する個体($Q_A Q_B$)は113頭でそのBMS No. 平均値、標準偏差は 6.98 ± 2.21 、 $Q_A q_B$ が131頭で 6.68 ± 2.26 、 $q_A Q_B$ が92頭で 6.5 ± 2.03 、 $q_A q_B$ が152頭で 6.02 ± 2.02 であった。各タイプの平均値の差の検定をF検定で行った。 $Q_A Q_B$ と $q_A q_B$ に、 $Q_A Q_B$ と $q_A q_B$ に有意差($p < 0.01$)がみられた。以上のことより、2領域の脂肪交雑に効果のあるハプロタイプは、相加的効果を持つことが示唆された。

(日本畜産学会第101回大会)

9) 黒毛和種における脂肪交雑連鎖領域のBACコンティグの作成

溝口 康¹、岩本英治²、杉本喜憲¹ (¹動物遺伝研究所、²兵庫県畜産技術センター)

(目的) 現在までに我々は、父方半きょうだい家系を用いて連鎖解析を行い、脂肪交雑連鎖領域を同定している。当該領域を狭め、更にポジショナルクローニングを行うには、この領域の詳細な物理地図が不可欠である。そこで本研究では、当該領域のBAC(大腸菌人工染色体)クローンの整列化及びマイクロサテライトマーカーの開発を行うこととした。

(方法) 当該領域に存在する既知の14個のEST及び8個のマイクロサテライトマーカーを含むBACクローンをPCRスクリーニング法により単離した。BACクローンの末端配列を決定し、それを指標として新たにBACクローンの単離を行い整列化した。得られたBACクローンより、(CA/GT)_nをプローブとしてマイクロサテライトマーカーを単離した。

(結果) 当該領域からBACクローンを126個単離し整列化した。整列地図を構成するBACクローンは65個であった。この領域から新たに開発したマイクロサテライトマーカーは74個で、当該領域に80kbの平均間隔で配置された。この領域の連鎖地図の距離は3.5cMであったが、ヒトドラフト配列情報よりこの領域は約6.5Mbと推定され、既知の遺伝子は35個、遺伝子であると推定されるものは27個存在していた。今後は、本研究で開発した高密度マーカーを利用して連鎖不平衡解析を行い、更に領域を狭めていく予定である。(日本畜産学会第101回大会)

10) ウシプリオン遺伝子のSNP検出

阿部剛¹、高須賀晶子²、杉本喜憲²、小林栄治¹ (¹家畜改良センター、²動物遺伝研)

ウシ海綿状脳症(狂牛病、BSE)は、ヒツジのスクレイピーと同じく、感染性の異常型プリオンが脳内に蓄積することにより発症する、致死性の神経疾患である。ヒトの異型クロイツフェ

ルト・ヤコブ病は、BSEに汚染された牛肉を食したことにより発症したと考えられている。ヒツジでは、プリオンタンパク質に多型があり、スクレイピー発症率に関与する、136、154、171番目のアミノ酸をコードする遺伝子型を用いて選抜育種することにより、スクレイピー耐性のヒツジを供給することが提案されている。そこで、ウシにおいても、BSE耐性に関わるプリオンタンパク質の多型があるか否かを調査するために、黒毛和種とホルスタイン種について、家畜改良センターが保有する種雄牛凍結精液、家畜改良事業団から提供されたDNA、各県から提供された血液、と場で採取した腎周囲脂肪などについて、DNAを抽出し、プリオンタンパク質をコードする領域のゲノムDNA配列を調べた。プリオンタンパク質の576番目のアミノ酸に対応するコドン中にC/Tの同義置換が見られたものの、アミノ酸置換を起こす配列変化は見られなかった。(日本畜産学会第101回大会)

11) ウシADAM12遺伝子のクローニング

谷口幸雄¹、高野 淳²、杉本喜憲²、山田宣水¹、佐々木義之¹
(¹京都大、²動物遺伝研)

ADAM12 (Meltrin α) は細胞間相互作用に関わるADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) ファミリーに属する膜タンパク質の一種で、筋や骨の分化、筋管形成 (筋芽細胞の融合)、肺や腸の器官形成を制御することが知られている。また筋細胞でヒトADAM12を過剰発現するトランスジェニックマウスでは、筋肉内脂肪組織の形成が、一方でADAM12欠損マウスでは、褐色脂肪組織の減少なども報告されている。そこで、ADAM12の脂肪交雑および脂肪組織形成への関与を検討するために、ウシADAM12遺伝子のクローニングを試みた。

既に単離しているウシADAM12部分長cDNA (第3回日本動物遺伝育種学会で報告) をプローブとしてウシゲノム λ DASH IIライブラリーをスクリーニングした。さらに上流のゲノム領域を単離するために、得られたクローンの5'領域の塩基配列からプライマーを作製し、ウシBACライブラリーをスクリーニングした。これらの結果、最終的にエクソン2-16を含むクローンの単離に成功した。一方で、エクソン4上流へのウォーキングが困難であったことから、エクソン4下流のイントロンに比べ、イントロン1-3が非常に長いというADAM12遺伝子の構造上の特徴が考えられた。今後、エクソン1を含むBACクローンの単離および得られたBACクローンの解析を進める予定である。(日本畜産学会第101回大会)

3. 委員会・会議等の開催

1) 肉用牛ゲノム研究開発推進委員会

この委員会は、動物遺伝研究所が行う肉用牛のゲノム研究、開発事業のあるべき方向並びに研究開発成果の応用方向などについて審議し、必要な助言をいただくものとして開催されている。

平成14年度の委員会は平成15年1月21日東京で開催された。議事内容は次の通りであった。

①平成14年度動物遺伝研究所の活動と成果について

②今後の研究活動の方向について

これらの議事の中で、動物遺伝研究所の14年度の活動の概要が資料に基づいて紹介された。研究成果並びに活動方向については諒とされた。

なお、本年度のこの委員会では、上記の議事終了後、動物遺伝研究所の10周年記念座談会に移行することとしていたので、委員は座談会出席を主目的に選任した。そのため前年度とは大幅に変更となった。座談会内容は、平成15年3月刊行の動物遺伝研究所10周年記念誌に掲載しており、また、「畜産技術」誌平成15年11月号に掲載される。

肉用牛ゲノム研究・開発推進委員会委員

国枝哲夫	岡山大学農学部教授
佐々木義之	京都大学大学院農学研究科・農学部教授
菅野純夫	東京大学医科学研究所助教授
辻 莊一	神戸大学農学部教授
菱沼 毅	農畜産業振興事業団副理事長
藤山秋佐夫	国立情報学研究所学術研究情報系教授
三上仁志	農林漁業金融公庫技術参与
安江 博	農業生物資源研究所ゲノム研究グループ上席研究官

2) 肉用牛ゲノム研究・実用化技術推進委員会

動物遺伝研究所が行う研究開発について、研究手法など技術的側面から審議し、助言をいただくとともに、研究開発成果の学術的評価もいただくものとして平成13年度よりこの委員会は設置されている。平成14年度委員会は、平成15年1月23日動物遺伝研究所で開催された。議事は次の通りであった。

①動物遺伝研究所における研究の全体計画について

②平成14年度までの主要成果について

- a. ウシ高密度連鎖地図の作成
- b. RHパネルを用いたウシ染色体地図とウシーヒトゲノム比較地図の作成
- c. 所内データベースの構築とSAGEライブラリー解析
- d. ウシ脂肪交雑遺伝子の探索：脂肪交雑領域のBAC整列地図の作成

③平成15年度以降の研究計画について

④動物遺伝研究所の研究推進に対する評価及び助言

肉用牛ゲノム研究・開発技術推進委員会委員

猪子英俊	東海大学医学部分子生命学科教授
菅野純夫	東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター助教授
新山正隆	家畜改良センター理事
野村哲郎	京都産業大学工学部生物工学科教授
安江 博	生物資源研究所ゲノム研究グループ上席研究員

3) 全国DNA育種推進会議

この会議は畜産新技術実用化対策事業の一環である「DNA育種基盤の確立」にかかる全国推進会議である。平成13年度からは動物遺伝研究所と道県の研究機関との共同研究はこの事業の枠組みの中で実施されることになったもので、平成12年度までの連絡調整会議に相当する。共同研究参画機関は19の道県（北海道、岩手、宮城、秋田、山形、福島、山梨、岐阜、兵庫、鳥取、島根、岡山、広島、佐賀、長崎、熊本、大分、宮崎、鹿児島）であり、本事業の枠組み外で動物遺伝研究所と共同研究を行っている家畜改良センター、共同研究には参画していない茨城、和歌山の2県も本推進会議に参加した。

平成14年度推進会議は平成15年3月6日開催された。主要議題は、①「DNA育種基盤の確立」事業の概要、②各機関の平成14年度事業の実施状況、③平成15年度事業の実施計画、等であった。

4) BSE生体診断技術緊急開発事業推進検討委員会及び研究打ち合わせ会

推進検討委員会は平成14年度から開始された「BSE感受性の遺伝的差異の診断技術の開発」にかかる研究推進について、研究企画・実施への助言、研究成果の検討・評価を行うものとして設置された委員会であり、研究打ち合わせ会議は、研究計画の作成、研究実施状況の確認、研究情報の交換・協力を主たる目的として設置されている。なお、「BSE感受性の遺伝的差異の診断技術の開発」プロジェクトの予算上の事業名は「BSE生体診断技術緊急開発事業」であり、この事業の一部は（株）ワイエスニューテクノロジー研究所及び独立行政法人農業技術研究機構動物衛生研究所に委託し、実質的に共同研究として推進されている。

平成14年度は推進検討委員会を2回、研究打ち合わせ会議を3回開催した。第1回推進検討委員会は平成14年7月5日東京で開催している。議事は次の通りであった。

- 1) BSE生体診断技術緊急開発事業について
 - ①背景とこれまでの知見
 - ②BSE生体診断技術緊急開発事業の概要
- 2) BSE生体診断技術緊急開発事業の研究実施計画について
 - ①動物遺伝研究所
 - ②（株）ワイエスニューテクノロジー研究所

③動物衛生研究所

第2回推進検討委員会は平成15年2月27日東京で開催した。議事は次の通りである。

1) 平成14年度研究開発の実施報告

①動物遺伝研究所

②(株)ワイエスニューテクノロジー研究所

2) 平成15年度研究開発計画

①動物遺伝研究所

②(株)ワイエスニューテクノロジー研究所

③動物衛生研究所

④新たな委託課題について

研究打ち合わせ会議は、平成14年6月9日、10月10日、及び平成15年2月21日にいずれも東京で開催した。

BSE生体診断技術緊急開発事業推進検討委員会委員

小野寺節	東京大学大学院農学生命科学研究科教授
品川森一	帯広畜産大学畜産学部獣医学科教授 (その後、(独)動物衛生研究所プリオン病研究センター長)
関川賢二	(独)農業生物資源研究所生体防御研究グループ長
辻 莊一	神戸大学農学部教授
東條英昭	東京大学大学院農学生命科学研究科教授
毛利資郎	九州大学大学院医学研究院教授

BSE生体診断技術緊急開発事業研究打合せ会メンバー

金子清俊	国立精神神経センター神経研究所研究第7部長
八谷如美	国立精神神経センター神経研究所研究第7部研究員
高田益弘	(独)動物衛生研究所感染症研究部主任研究官 (その後、同プリオン病研究センター主任研究官)
上田正次	(株)ワイエスニューテクノロジー研究所長
塩田 明	(株)ワイエスニューテクノロジー研究所研究室長

5) 研究会等の開催

1. 生物系特定産業技術研究推進機構(生研機構)と共催でBRAINテクノフォーラム「動物ゲノム研究の成果と展開」を開催した。

開催日:平成14年10月4日

開催場所:虎ノ門パストラル

内容:1) 精子形成異常により無精子症を発症するラット自然突然変異遺伝子 as の解明
(野口純子、生物資源研究所遺伝資源研究グループ)

2) 褐毛和種牛における軟骨異形成生矮小体軀症の原因遺伝子同定とDNA診断法の確立

- (竹田晴子、畜産技術協会附属動物遺伝研究所)
- 3) ホルスタイン種における遺伝性横隔膜筋症の原因遺伝子の同定
(杉本真由美、家畜改良センター)
 - 4) Genetic Analysis of Ovine Reproductive Traits
(Susan Galloway, ニュージーランドAgResearch)
 - 5) Current Status and Future Perspective of USDA-ARS Livestock Genomics Research
(Steven Kappes, アメリカ農務省Meat Animal Research Center)

2. 動物遺伝育種シンポジウム組織委員会による「動物ゲノム解析と新たな育種戦略」を農林水産先端技術産業振興センター、家畜改良事業団、生物系特定産業技術推進機構と共催した。

開催日：平成14年11月10日

開催場所：キャンパスプラザ京都

内容：特別講演

Comparative genomics in the study of resistance to trypanosomiasis

(S.J. Kemp, イギリス リバプール大学)

1) 遺伝的多様性の評価と保全への利用

①家畜及び野生生物集団における遺伝的多様性の評価と保全

(野村哲朗、京都産業大学工学部)

②魚介類集団における遺伝的多様性の評価と保全—種苗生産と放流事業のあり方を巡って—

(谷口順彦、東北大学大学院農学研究科)

2) 動植物の育種改良への利用

①DNAマーカー選抜によるイネのイントログレッション育種

(吉村 淳、九州大学大学院農学研究院)

②家畜の品種内及び品種間におけるQTL探索

(長嶺慶隆、農業技術研究機構畜産草地研究所)

4. 委託研究

動物遺伝研究所の研究と深く関わりを持つテーマについて平成14年度は次の7課題を研究委託した。

- 1) 筋肉内脂肪細胞の分化制御と関連遺伝子の解明（平成13年度より継続）
 - ①委託先：東北大学大学院農学研究科
 - ②委託研究者：麻生 久

- 2) ウシ品種間において発現量を異にする筋組織遺伝子の解析（平成13年度より継続）
 - ①委託先：神戸大学農学部
 - ②委託研究者：万年英之

- 3) 大規模データに基づく黒毛和種牛における経済形質のゲノム解析（平成13年度より継続）
 - ①委託先：家畜改良技術研究所
 - ②委託研究者：森田光夫

- 4) 子牛の発育不全症に関わる遺伝的研究（平成14年度より継続）
 - ①委託先：山形農業共済組合連合会
 - ②委託研究者：斉藤博水

- 5) 量的形質遺伝領域のマッピングのための数理的解析手法の開発（平成13年度新規）
 - ①委託先：農業生物資源研究所
 - ②委託研究者：林 武

- 6) ウシゲノム解析のための効率的手法の開発（平成13年度新規）
 - ①委託先：農業生物資源研究所
 - ②委託研究者：安江 博

- 7) BSE感受性並びに抵抗性ウシ型プリオン遺伝子トランスジェニックマウスの作出に関する研究（平成13年度新規）
 - ①委託先：ワイエスニューテクノロジー研究所
 - ②委託研究者：上田正次

5. 研修員の受け入れ

所属機関名	氏名	受け入れ期間
佐賀県畜産試験場	片淵直人	平14.5.13～5.24 平14.8.12～8.23 平15.2.1～2.3 平15.2.17～2.28
島根県立畜産試験場	阿部亜津子	平14.5.20～5.24
山形県農業研究研修センター畜産研究部	斉藤真希	平14.6.1～8.31
兵庫県立農林水産技術総合センター畜産技術センター	岩本英治	平14.6.12～6.14
山梨県酪農試験場	菊島一人	平14.6.17～6.28 平15.2.17～2.21 平15.3.10～3.12
福島県畜産試験場	坂本秀樹 本多巖	平14.7.16～7.17 平14.12.11～12.13 平15.3.17～3.18 平14.7.16～7.17 平14.9.20 平14.12.11～12.13 平15.3.17～3.18
宮城県畜産試験場	千葉和義	平14.7.17～7.18 平15.2.3～2.7
兵庫県立農林水産技術総合センター畜産技術センター	龍田健	平14.12.18～12.20
岩手県農業研究センター畜産研究所	鈴木暁之	平14.12.25～12.28
岡山県総合畜産センター	古川恵	平15.1.8～1.22
広島県立畜産技術センター	今井佳積	平15.1.20～1.31
宮崎県畜産試験場	井上和也	平15.1.27～2.7 平15.3.7～3.9
岐阜県畜産研究所	小林直彦	平15.2.17～2.28
茨城県畜産センター肉用牛研究所	木村安之 津田和之	平15.2.24～2.28 平15.2.24～2.28 平15.3.3～3.14
北海道立畜産試験場	藤川朗	平15.3.24～3.26

6. 職員の普及活動等

1) 資料・解説等

1. 高須賀晶子：用語解説「フォワードジェネティクスとリバースジェネティクス」、畜産技術 2002年4月
2. 渡邊敏夫：用語解説「バイオインフォマティクス」、畜産技術2002年8月

2) 講演

1. 杉本喜憲：ウシゲノム研究の現状と今後の課題、北海道受精卵移植研究会、2002年7月、札幌
2. 竹田晴子、高見まりか、小邦朋子、辻 岳人、米田一裕、佐藤敬明、井原尚也、伊藤智仁、Srinivas R. Kata, 三品裕司、James E. Womack, 松本道夫、森友靖生、国枝哲夫、杉本喜憲：褐毛和腫における軟骨異形成性矮小体軀症の原因遺伝子をさぐる、九州東海大学セミナー、2002年7月、九州東海大学
3. 竹田晴子、高見まりか、小邦朋子、辻 岳人、米田一裕、佐藤敬明、井原尚也、伊藤智仁、Srinivas R. Kata, 三品裕司、James E. Womack, 松本道夫、森友靖生、国枝哲夫、杉本喜憲：褐毛和種牛における軟骨異形成性矮小体軀症の原因遺伝子の解析について、第139回 Bone Biology Seminar、2002年9月、東京医科歯科大学
4. 平野 貴：腎機能とparacellin-1/claudin-16、日本臨床電子顕微鏡学会シンポジウム、2002年9月、札幌
5. 杉本喜憲：Identification of genes responsible for genetic disease in Japanese Black population. 第7回開放融合研究公開シンポジウム「ゲノム機能から個体発生を探る」、2002年10月、東京
6. 溝口 康：黒毛和種DNA育種研究の現状と今後の展開方向、平成14年度近畿中国四国農業研究推進会議畜産草地推進部会問題別研究会 2002年10月 島根県粕淵町
7. 竹田晴子：褐毛和種牛における軟骨異形成性矮小体軀症の原因遺伝子同定とDNA診断法の確立について、BRAINテクノフォーラム、2002年10月、東京
8. Hirano, T.: QTL analysis for meat quality in Wagyu. International Symposium on Application Strategy of Genomic Information for Livestock Production. Oct., 2002, National Livestock Research Institute, Suwon, KOREA.

9. 平野 貴：和牛遺伝性疾病および経済形質のゲノム解析、平成14年度畜産技術研修会、2002年12月、宮崎
10. 杉本喜憲：動物ゲノム研究の現状と今後の展開と課題、客員研究員招聘事業講演会、2003年3月、高山
11. 平野 貴：DNA解析の先進事例：黒毛和種の経済形質QTLマッピングから、候補遺伝子クローニングに向けて、客員研究員招聘事業講演会、2003年3月、高山
12. 井原尚也：「家畜ゲノム解析の現状と課題」-ウシ遺伝性疾患の解析とウシ高密度連鎖地図の作製-、畜産新技術実用化対策事業（DNA育種基盤の確立）技術検討会に係る講演、2003年3月、鹿児島
13. 竹田晴子、他：褐毛和種牛の軟骨異形成矮小体軀症遺伝子のクローニング、アニマルゲノム研究会・家禽ゲノム研究会合同セミナー、2003年3月、つくば

Ⅲ 研究の解説

1 脂肪交雑を支配している責任遺伝子の同定を目指して

はじめに

家畜育種の主要テーマは、それぞれの時代のニーズに応じた家畜を作出するため、選抜、交配を繰り返し、家畜の遺伝的能力を目的に応じたものへと改良することである。我が国が原産国である和牛は、古来より役牛としてその能力を発揮していたが、戦後は肉牛としての改良が行われ現在に至っている。中でも、昭和19年に品種として正式に認定された黒毛和種は、脂肪交雑に優れた特徴を持つものとして世界的に評価が高い。

黒毛和種の育種目標として掲げられてきたのは、肉質（主として脂肪交雑）と増体能力である。これらの形質は、遺伝的には複数の遺伝子によって支配され、量的形質(quantitative trait)と呼ばれている。また、その遺伝子座を量的形質遺伝子座(quantitative trait loci : QTL)という。現在までに、表現型値と血縁情報を基に遺伝的能力を推定する統計遺伝学的アプローチによって、黒毛和種の遺伝的改良が行われ大きな成果を挙げてきた。しかしながら、この手法は多数の家畜と時間、費用を要するため、現代の多様なニーズに迅速に対応する新たな手法の開発が求められてきた。またこの手法はあくまでも表現型値からの統計学的な推定であるため、どのような遺伝子が関与しているかを明らかにすることは不可能である。

今から約15年前よりヒトや実験動物等で、DNA多型マーカーを利用した連鎖解析手法によって表現型値（特に劣性遺伝を示す形質）に影響を及ぼす染色体上の領域及びそこに存在する責任遺伝子の同定が精力的に行われてきた。ウシにおいても、クローディン16欠損症やモリブデン補酵素欠損症といった劣性遺伝病の原因遺伝子が当研究所で同定された。

DNA多型マーカーの中でも、最も多型に富み検出方法が容易なものがマイクロサテライトマーカーである。これはゲノムに散在的に存在するCAの繰り返し部分で、その繰り返し数の違いによって多型を検出する。家畜の分野においても、マイクロサテライトマーカーの多型と表現型値との関係を調べる連鎖解析手法を用いることにより、表現型値にばらつきをもたらしている領域が明らかとなり、その領域に存在するマイクロサテライトマーカーの多型を用いた育種への応用が可能になると考えられる。また、連鎖領域から責任遺伝子を同定し、機能解析等を行うことにより、量的形質に関わる遺伝子の作用機序を明らかにし、育種以外の家畜飼養や栄養等の分野にも貢献することが期待される。

現在までに筆者は、経済形質の中でも特に脂肪交雑に着目し、兵庫県との共同で父方半きょうだい家系を用いた連鎖解析及び責任遺伝子同定のアプローチであるポジショナルクローニングを実施してきた。本解説では現在までに行ってきた研究について紹介したい。全体の研究の流れを図1に示した。

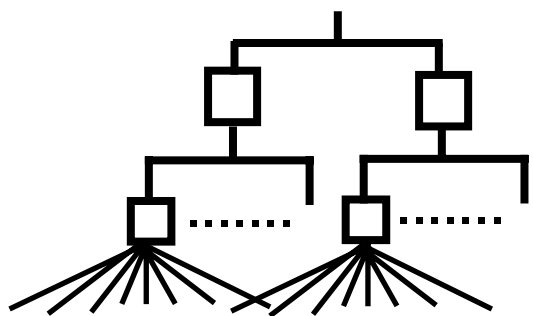
1) 連鎖解析

家系の構築

兵庫県内で多くの子牛を生産している一頭の種雄牛と、その産子（父方半きょうだい）のうち兵庫県内で開催される枝肉共励会、共進会等に出展された肥育牛を調査牛として家系を構築した。1次スクリーニングとして282頭を解析に用いた。

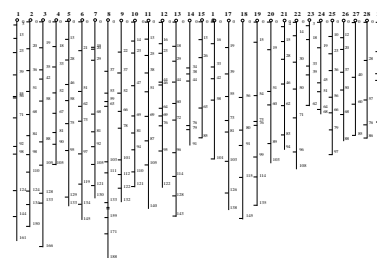
今回解析に用いた調査牛の特徴は、同一県内で繁殖肥育され、同一県内で出荷された肥育牛であること、出荷月齢が29から32ヶ月齢であり比較的一定であること、同県内の共励会、共進

家系の構築



- ・ DNAサンプル
- ・ 表現型データ
- ・ 血統情報

ウシ染色体



連鎖解析

DNAサンプル（脂肪、血液等より抽出）



DNA（マーカー）型判定

- ・ マーカー型の増幅（PCR）
- ・ 電気泳動（DNAシーケンサー）
- ・ DNA（マーカー）型の決定（ジェノタイパー）



親、子のハプロタイプ再構成（連鎖解析プログラム）



各ハプロタイプと表型値との相関解析
（連鎖解析プログラム）

1次スクリーニング

全染色体にマーカーを配置して連鎖解析→おおよその連鎖領域を推定

2次スクリーニング

1次で推定した連鎖領域にマーカーを増やし、
頭数を増やして連鎖解析→連鎖領域を狭める



優良ハプロタイプの推定
（QTL領域）

マーカーアシスト選抜
実証試験



ポジショナルクローニング

QTL遺伝子の同定

図1 QTL解析の手順

会に出展される肥育牛は年間約700頭と頭数が多く、データが集めやすいこと等が挙げられる。

表現型値

解析対象とした形質は、枝肉重量、脂肪交雑、ロース芯面積、バラの厚さ、皮下脂肪の厚さである。脂肪交雑の表現型値は、日本格付け協会の格付け員がbeef marbling standardに則って評価した1から12までのスコアを用いた。また、より正確な表現型値を得るため、各形質について出荷年度、枝肉市場、肥育農家などについて補正した値も用いた。

DNAマーカー型判定

サンプルDNAは、種雄牛の凍結精液及び肥育牛（その種雄牛の産子）のと体腎周囲脂肪組織より、定法に従い抽出した。利用するDNAマーカーは、マイクロサテライトマーカーで、アメリカ農務省が開発した連鎖地図にマップされているマーカーを用いた。この連鎖地図上には、現在までに約2400個のマーカーがマップされており、来年には当研究所との共同開発で3000個マップされる予定である。

父方半きょうだい家系を用いた連鎖解析において有効なマーカーとは、種雄牛のもつ対になっている相同染色体のうち、どちらのDNA領域を子供が受け継いだかの情報が得られるものである。そのため解析対象となる種雄牛でヘテロなマーカーでなければならない。今回解析に用いた種雄牛において全常染色体上に存在する約700個について、ヘテロかホモかの判定を行った。その中からヘテロなマーカーが平均15cM間隔になるように、207個のマーカーを選択配置した。選択したマーカーを用いて、産子282頭のマーカー型判定を行った。判定には、各マイクロサテライトマーカーをPCRで増幅後、ABI377シークエンサーで電気泳動し、解析ソフトGENESCAN, GENOTYPERを用いた。

連鎖解析

まず、上で述べたDNAマーカー型判定の結果を用いて親（種雄牛）と子供達（調査牛）の各染色体のハプロタイプの再構成を行う（図2）。目的は、親から子供達に染色体を受け渡す際に、どの子供ではどの位置で組み換えを起こしているかを明らかにすることである。このためには隣接する各マーカー間で、親から子が実際に受け継いでいる確率（尤度）を計算する。その尤度が最も高いものを採用し各個体のハプロタイプを再構成する。親と子のハプロタイプの再構成は、確率で決定するため子の数が多い程、より正確なハプロタイプの再構成を行うことが可能となる。

次に各染色体上の各ポイントにおいて、対になっている親の相同染色体のどちらを受け継いだかという、ヘテロなマーカーによって示される情報と、表現型値との間に関連性があるかどうかを統計学的に検定する。この方法を連鎖解析と言う。表現型値が、受け継いだ染色体によって違いがある場合には、その領域に当該形質の表現型値に差異を及ぼすQTLが存在すると推測するのである。統計学的検定には、パラメトリック検定とノンパラメトリック検定の2種類がある。前者は、正規分布を示す表現型値の解析に用いられ、後者は正規分布を示さない表現型値の解析に用いられる。統計学的検定の詳しい説明は省略する。本解説では、補正した値でパラメトリック検定を実施した解析結果について述べる（表1）。

今回、解析の対象とした形質の中でも、脂肪交雑は経済的にも価値があり、我々が最も興味を持つ形質である。そこで、脂肪交雑において最も連鎖の度合いが大きかった染色体に着目し

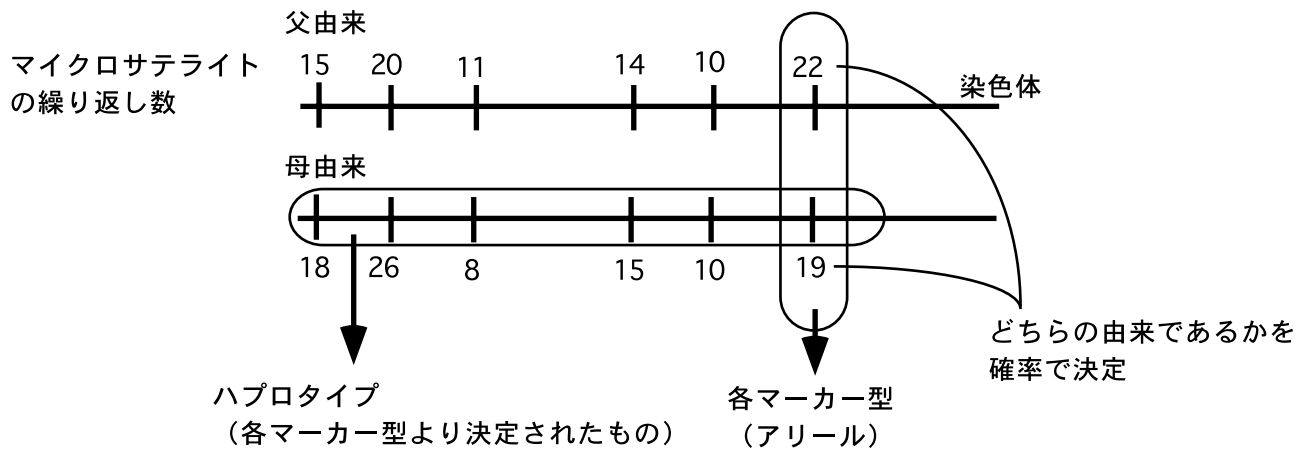


図2 ハプロタイプとは？

表1 連鎖解析結果（有意水準1%を超えた箇所）

解析頭数	282
解析形質	
枝肉重量	1
脂肪交雑	2
ロース芯面積	1
バラの厚さ	0
皮下脂肪の厚さ	1

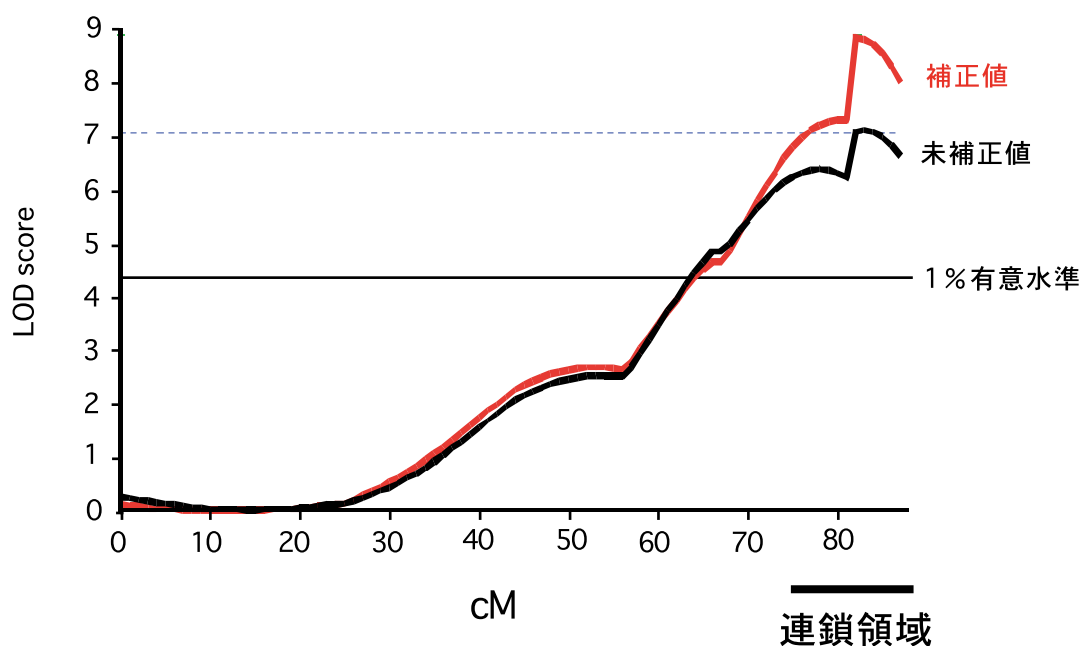


図3 脂肪交雑連鎖解析結果（282頭）

（図3）、その連鎖領域を更に狭め、責任遺伝子の同定を目指し研究を進めていくこととした。その概略を図4に示した。

2) ポジショナルクローニング

マイクロサテライトマーカーの開発とBACコンティグの作成

脂肪交雑連鎖領域を狭めるためには、次の2つのことが必要となる。一つは、解析に用いる頭数の増加である。頭数を増やす目的は、連鎖領域での組み換えを起こしている個体を増やすことにより、連鎖解析の精度を向上させることが狙いである。もう一つは、連鎖領域でのマーカー数を増やすことである。その目的は、組み換えを起こしている個体の組み換え位置をより正確にすることである。そのために更に多くのマイクロサテライトマーカーを開発する必要があり、連鎖領域にウシBACクローンを整列化（コンティグ化）した詳細な物理地図を作成しなければならない（図4）。ウシBAC（大腸菌人工染色体）クローンは、ウシゲノムDNAが約150kbの大きさに断片化されたものが、ベクターに組み込まれ大腸菌に導入されて増幅されたものである。

アプローチとして、まずこの連鎖領域がヒト染色体のどの領域と相同性があるかをヒト-ウシ比較地図により調べた（平成13年度年報参照）。結果、ある染色体のテロメア側と相同性（シンテニー）があった。このヒト染色体に存在する遺伝子情報より、ウシ遺伝子の相同検索を行い14個のウシESTを得た。ESTとは、Expressed Sequence Tagの略で遺伝子の部分塩基配列のことである。ヒト染色体に存在する遺伝子情報は、インターネットで公開されており手軽に入手できる。またウシ染色体のこの領域には、既知のマイクロサテライトマーカーが8個存在していた。

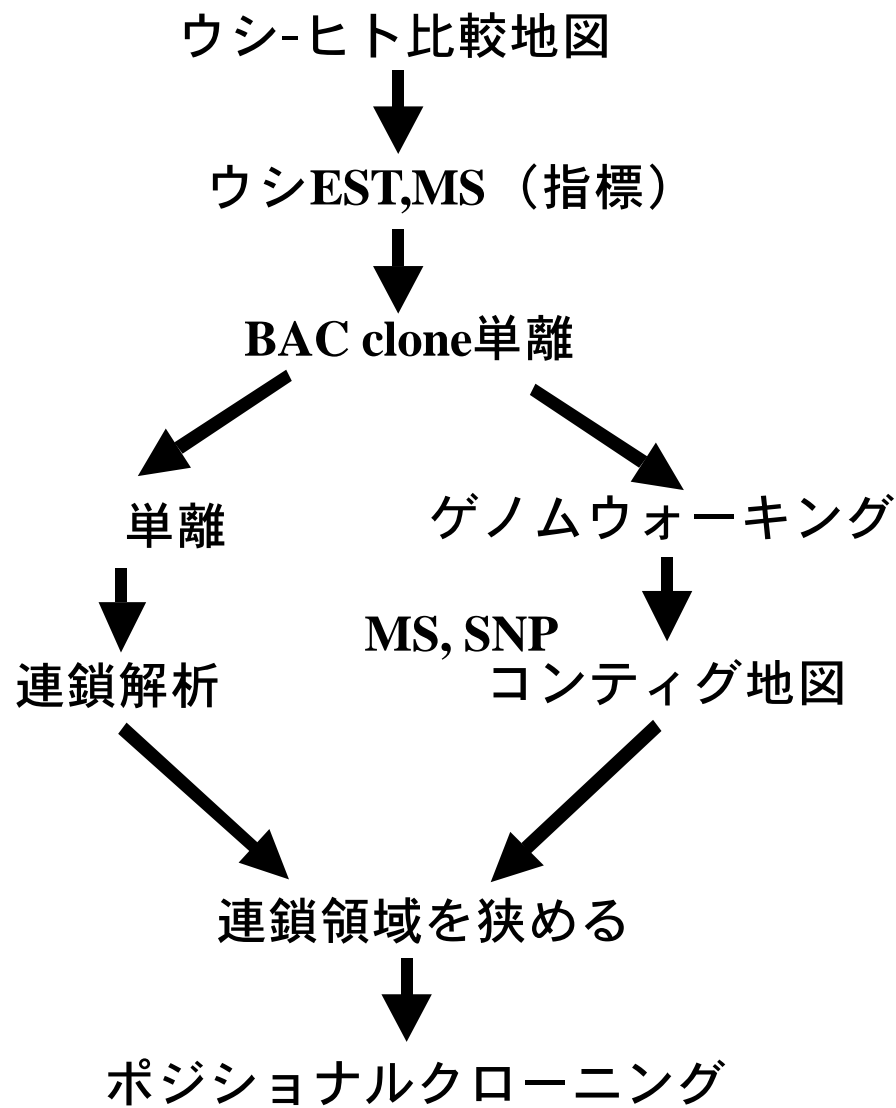


図4 ポジショナルクローニングの概略

連鎖領域をBACクローンでつなぎ合わせたもの

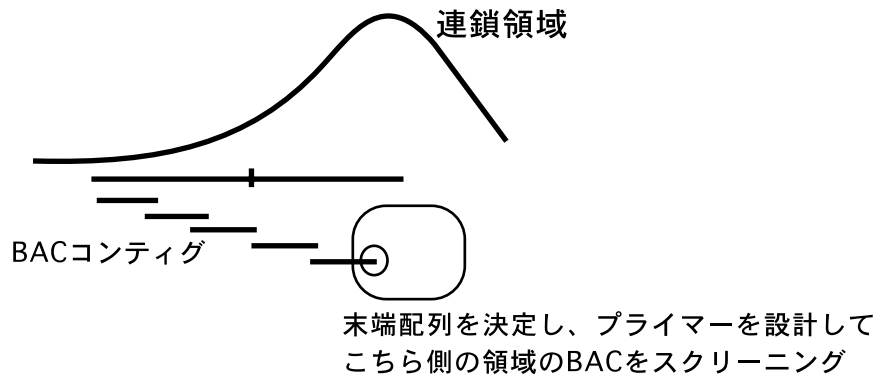


図5 BACコンティグとは？

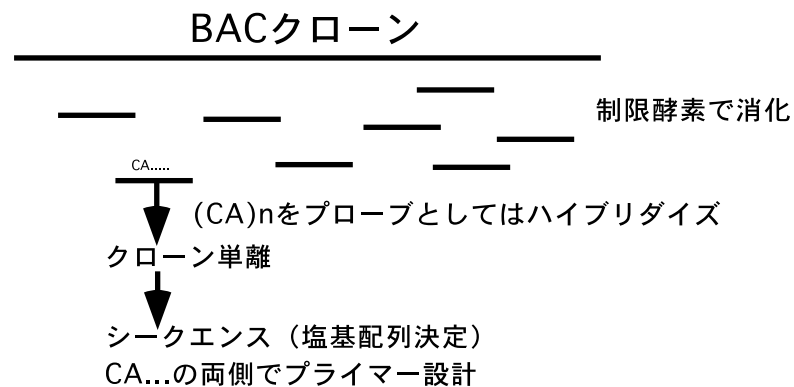


図6 BACクローンからマイクロサテライトの単離

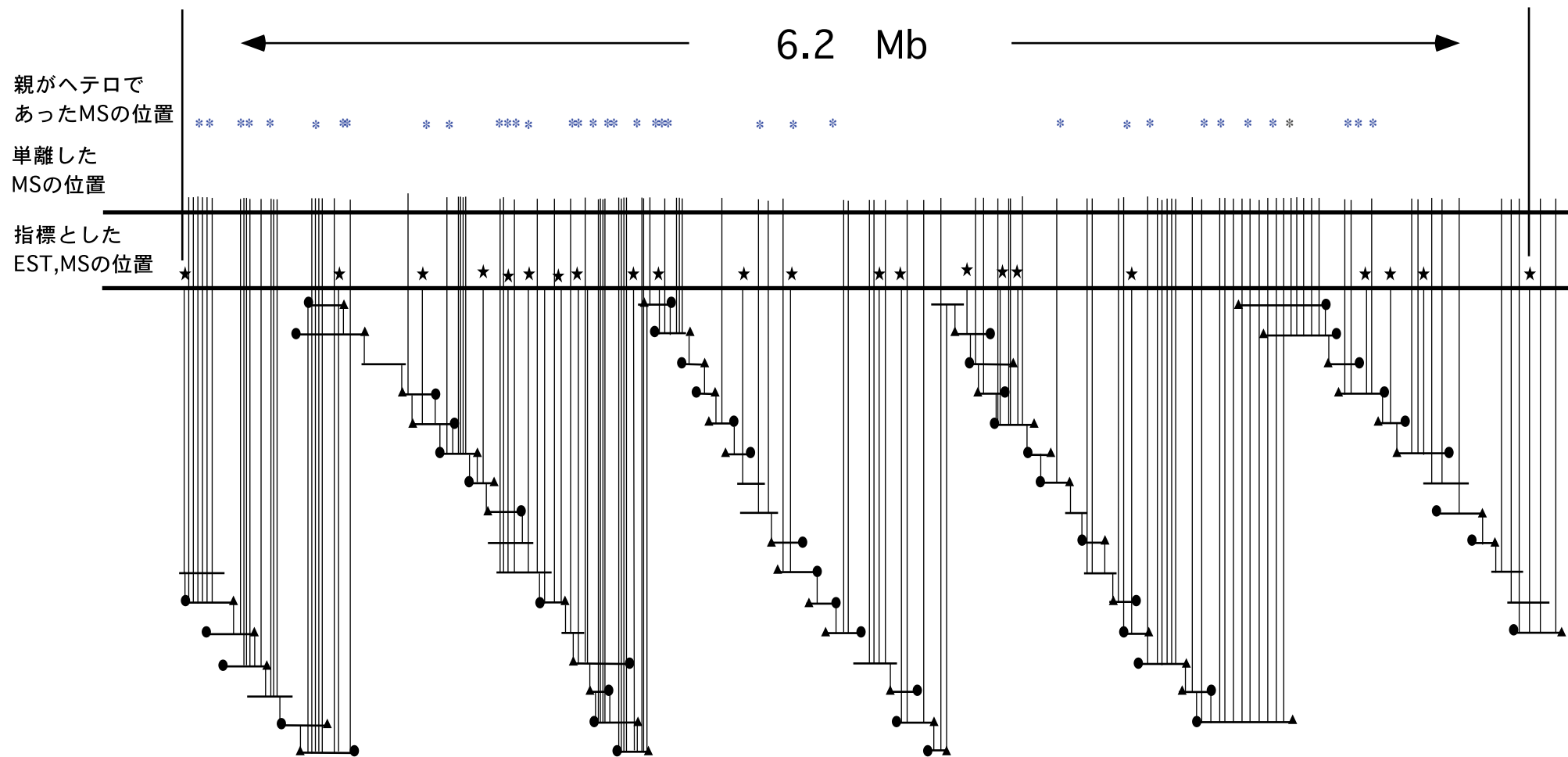


図7 BACコンティグの作成

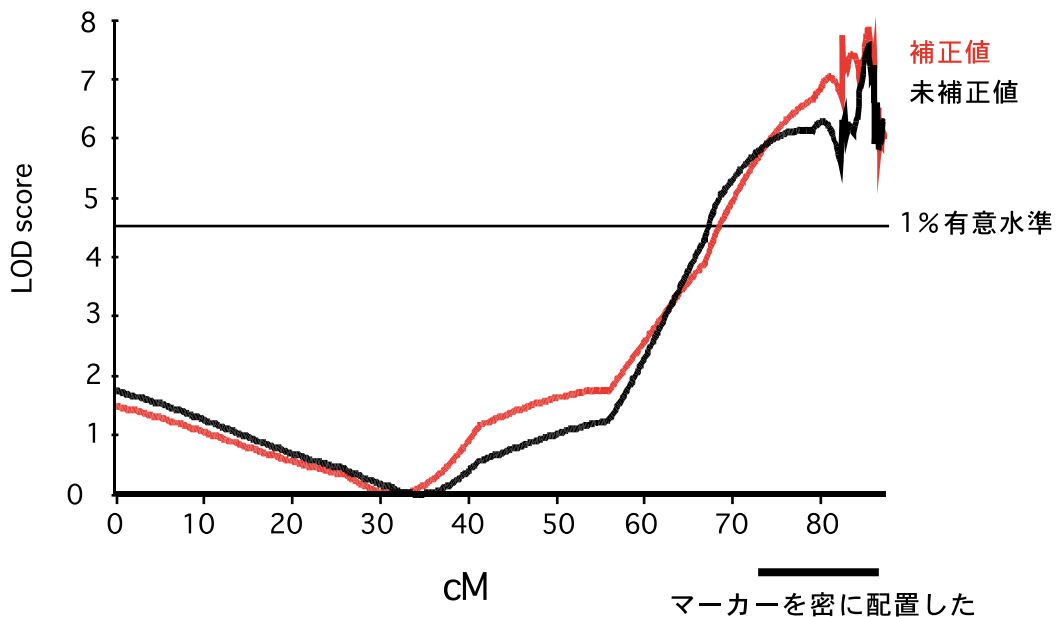


図8 脂肪交雑連鎖解析結果（872頭）

これらを指標として、ウシBACライブラリーをPCR法によりスクリーニングした。得られたBACクローンの末端配列をDNAシーケンサーによって決定後、その配列を基にプライマーを設計しコンティグを作成した。コンティグ作成と同時にマイクロサテライトマーカーの単離も行った。単離方法については、図6に示した。

脂肪交雑連鎖領域は、ヒトドラフトシーケンス情報より、6.2Mbであることが明らかとなった。作成したBACコンティグ地図を図7に示した。連鎖領域をカバーする66個のBACクローンで整列化した。単離したマイクロサテライトは108個で、既知のマーカー8個を含めると平均マーカー間隔は、約90kbであった。その中で、解析対象である種雄牛でヘテロであったマーカーは37個あり、平均約250kb間隔で存在していた。今回単離したマーカーを追加し、解析頭数を872頭に増やして連鎖解析を実施した。その結果を図8に示した。

ピークが図3と比べてシャープになった。このピーク近傍は、ヒトドラフトシーケンス情報より約2.8Mbと推定された。この領域にある既知及び予想される遺伝子数は22個であった。更に領域を狭めて行くには、この領域に組み換えを起こしている個体を増やさなければならない。しかしながら、今後この種雄牛の産子が市場に出てくる数には限りがあり、解析頭数を増加させることは期待ができない。そこで新たな戦略を考えなければならない。

相関解析

ヒトの多因子性疾患等のマッピングに用いられている相関解析のアプローチを採ることとした。この方法を用いて、ヒトでは数10Kbにまで領域を絞り込み責任遺伝子の同定に成功している例がある。黒毛和種の一般集団から血統に一切こだわらずにBMSの高い個体とBMSの低い個体をサンプリングし、2つのグループにおける各マーカーのアリル頻度の差を検定する（図9）。

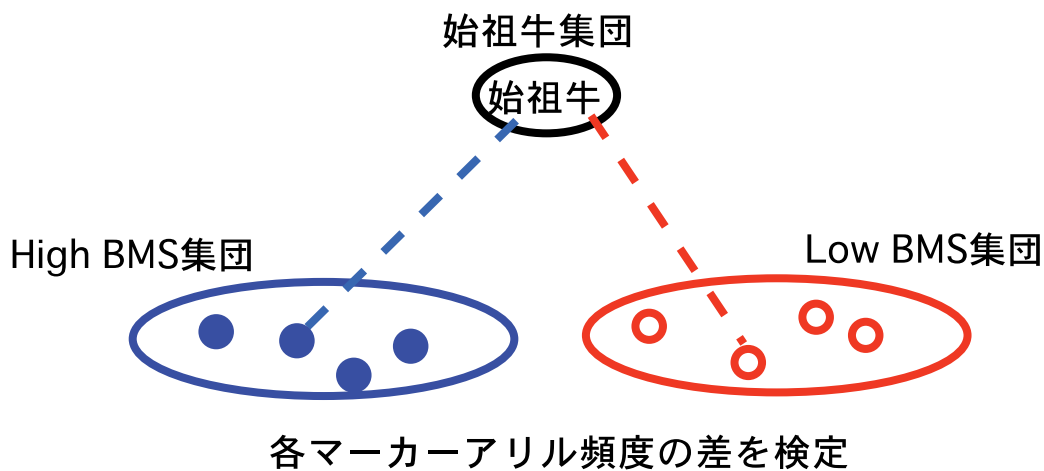


図9 黒毛和種一般集団を用いた相関解析

2つのグループ間で差の大きいマーカーを同定し、領域を狭めていくという手法である。この手法は、一般集団の連鎖不平衡を利用するため領域を狭めるのに有効であると考えた。この相関解析を実施するのに必要なことは、(1) 黒毛和種一般集団からのサンプリングと (2) 密な間隔での多型マーカーの配置である。

(1) 日本において大きな枝肉市場である東京芝浦と大阪南港及び北海道において開催される枝肉共励会、共進会に出展された肥育牛の脂肪サンプルを採材しており、現在までに合計約7000頭のサンプルを収集している。このサンプル群からBMSの高い個体100頭とBMSの低い個体100頭を抽出し、解析対象とする。

(2) 現在までに開発したマイクロサテライトマーカーは、前述したように約90Kb間隔で配置させている。しかし解析個体全てがホモでは、解析対象マーカーにはならない。そこで、黒毛和種の種雄牛82頭について調べたところ、全頭がホモであったのは、116個のマーカーの内20個であった。よって多型を示したマーカー間隔は約120Kbであった。この多型を示したマーカーを相関解析に用いることとした。

相関解析は、ヒトではリウマチや心筋梗塞等の疾患について全ゲノムを対象としたスクランが実施されている。今後ウシの全塩基配列が決定し、ヒトのように3万個のマイクロサテライトマーカーが開発されれば、様々な経済形質や繁殖関連形質についての全ゲノムを対象とした解析が可能となる。今回の場合、解析に用いたマーカー数が約100個と少ないため各個体でのタイピングが可能であるが、3万個となると膨大な時間と費用がかかる。そこで必要となってくるのがDNAのプーリングである。DNAプールとは、各グループの個体100頭分のDNAを一緒にすることである。このプールしたDNAを用いて、各マーカーのタイピングを行うというものである。この場合DNAの精製度、濃度、抽出方法等クリアしなければならない問題が多くある。現在、相関解析とDNAプール作成のための実験を行っている。数カ月後には結果が出るものと思われる。

結果が楽しみである。その後、そのデータを基に責任遺伝子単離まで持ち込んでいきたいと考えている。

おわりに

今までの研究経過を振り返ってみると、ようやくここまでたどり着いたという感じである。目標達成はもうすぐそこまできているように思えてならない。しかしながら、クリアしていかなければならない問題は山積みである。それをひとつひとつクリアして、近い将来、責任遺伝子が単離できたあかつきには、みんなでおいしいお酒を飲みたいものである。

(溝口 康)

2 軟骨異形成性矮小体軀症の原因遺伝子*LIMBIN*の同定と診断法の確立

1. はじめに

昭和20年代ごろから褐毛和種集団で問題となっている軟骨異形成性矮小体軀症は、四肢長骨の短小、骨端の肥大、それに伴う歩行異常や発育不全を特徴とする劣性遺伝病である(図1)(Moritomo et al., 1989, 1992)。四肢長骨の骨端における病理組織学的所見では、骨の成長点である骨端板の不均衡や消失、軟骨柱の不整、軟骨基質の分布異常などの軟骨内骨化障害像が認められるが(Moritomo et al., 1992)、その原因は不明であった。近年問題となった種雄牛Aは1988年より約100頭の疾患子牛を生産しており、その推定発症率は0.4%で、繁殖雌牛の約2%が当該疾病のキャリア(保因牛)であると推定された。このような遺伝性疾患の広がりには生産者に多大な経済的損失をもたらすことから、不良因子の拡散を防ぐためにキャリアと推定された種雄牛は淘汰される傾向にあった。しかし、種雄牛A、Bをはじめ、経済効果の高い種雄牛の一部がキャリアであることから、これらの種雄牛やその子孫をいたずらに淘汰することは褐毛和種集団の遺伝的ポテンシャルを低下させる可能性がある。そこで、当該疾病の原因遺伝子変異を同定し、DNA診断法を確立することによって、遺伝性疾患の発生を抑制しながら、集団の遺伝的能力や多様性の保全に配慮した育種を行うことが望ましい。

近年のゲノム研究の進展により、“ポジショナル候補遺伝子アプローチ”とよばれる方法を用いて、病因や生化学的な機能についての知見がない原因未知の遺伝性疾患においても、その原因遺伝子を染色体上の位置に関する情報を手がかりに同定することが可能になった。そこで、本研究では、ポジショナル候補遺伝子アプローチ法を用いて、軟骨異形成性矮小体軀症に対する原因遺伝子変異を同定し、これらの変異を検出するためのDNA診断法を確立することを試みた。

2. 軟骨異形成性矮小体軀症の責任染色体領域の同定

ポジショナル候補遺伝子アプローチ法では、まず、DNA多型マーカー(主にマイクロサテライトマーカー)を用いた連鎖解析法によって、疾病個体が親から必ず受け継ぐ責任染色体領域を同定する。次に、同定された染色体領域内にある候補遺伝子について詳しく調べ原因変異を同定する、というステップを踏む。

そこでまず我々は、全染色体領域から約300個のマイクロサテライトマーカーを選出し、種雄牛AおよびB(保因牛)とその疾患者牛約120頭のDNAを用いて連鎖解析を行い、疾患者牛が親(保因牛)から受け継ぐ責任染色体領域をウシ6番染色体のマイクロサテライトマーカーBP7からBMS9257の約11cM領域に同定した(Yoneda et al., 1999)。11cMはDNAで概算すると約100万塩基に相当し、その中には数多くの遺伝子が存在するため、この段階で候補遺伝子を推定することは難しい。したがって、この領域に新たなDNA多型マーカーを開発し、再度連鎖解析を行うことで、より正確な遺伝子座位を同定する必要がある。

そこで我々は、責任染色体領域のゲノムDNAを含むウシYACおよびBACクローンを単離し、磁気ビーズ単離法を用いたマイクロサテライトマーカーの開発や、高密度物理地図の作製および交差解析によって、疾患者牛が親から受け継ぐ責任染色体領域をウシ6番染色体のマイクロサテライトマーカーDIK1182からDIK1185の約2.4cMにまで絞り込んだ(Takeda et al., 2002, 2003)。さらに、作製したウシ高密度物理地図とインターネット上で公開されているヒト物理地図を比較し、この2.4cMの責任染色体領域に存在する遺伝子の並び順がウシとヒトで保存されているこ

A



B



図1. 軟骨異形成性矮小体躯症の表現型 (A) 罹患者 (B) 正常牛-左と罹患者-右の
大腿骨 (九州東海大学森友靖生先生より提供)

とを明らかにした (Takeda et al., 2003)。このことによって、豊富なヒトゲノム情報を基に、軟骨異形成性矮小体軀症の候補遺伝子を推定することが可能になった。

3. 軟骨異形成性矮小体軀症の候補遺伝子と原因変異の推定

褐毛和種における軟骨異形成性矮小体軀症の原因遺伝子は、四肢長骨の骨端における軟骨内骨化に何らかの機能を有するものと推定されている。そこで、ヒトゲノム情報を利用して、責任染色体領域に位置し、かつ疾患部位の長骨骨端で発現している遺伝子として、EVC遺伝子と新規の遺伝子（後にLIMBIN遺伝子と命名）を同定し、これらの遺伝子を軟骨異形成性矮小体軀症に対する候補とした。

まず、EVC遺伝子はヒト矮小体エリスファンクレベルト症候群（四肢の短小、肋骨の短小、多指、歯と爪の形成異常、心房中隔欠損を特徴とするヒトの劣性遺伝病）の原因遺伝子である (Ruiz-Perez et al., 2000)。褐毛和種における軟骨異形成性矮小体軀症では四肢短小以外の表現型は認められないが、動物種の違い、あるいは変異の違いによってその表現型が異なる可能性があるため、EVC遺伝子は有力な候補であった。しかし、正常個体と疾病個体のウシEVC遺伝子の塩基配列を比較を行ったところ、疾病と連鎖する多型（あるいは変異）は検出されなかった。

次に、ヒトEST配列およびヒトゲノムDNA配列を利用して、新規の遺伝子（後にLIMBIN遺伝子と命名）を同定し、正常個体と疾病個体の塩基配列を比較した。その結果、疾病個体のウシLIMBIN遺伝子内に2種類の変異が検出された (Takeda et al., 2002)。変異1型は、ウシLIMBIN遺伝子の1356番目のC塩基がT塩基に変異したもので、この変化（潜在的スプライス部位の活性化とフレームシフト）によって、通常1209アミノ酸からなるウシLIMBINタンパクが463アミノ酸までしか合成されず、何らかのタンパク機能を失うと考えられた。変異2型は、2054から2055番目のCA塩基がG塩基に変異したもので、この変化（フレームシフト）によって、705アミノ酸以降が欠落した不完全なタンパクが合成されることが考えられた。(図2) これらの変異によってどのような機能が失われるのかは、未だ明らかではない。

4. 軟骨異形成性矮小体軀症のDNA診断法の確立と原因変異の同定

ウシLIMBIN遺伝子の変異1型および2型を迅速かつ正確に同定することを目的として、対立遺伝子特異的PCR法とGenScan検出システムによるDNA診断法を確立した。血液や細胞から抽出したごく少量のDNAと対立遺伝子特異的プライマーセット（プライマーの先端に正常型あるいは変異型にみられる塩基配列を配置することで、正常型および変異型DNAをそれぞれ特異的に増幅することが可能）を用いてDNA増幅反応（PCR）を行い、DNAシーケンサーを用いて、正常型および変異型DNAが増幅されるかどうかを検出することができる (図3)。

この方法を用いて、軟骨異形成性矮小体軀症家系の種雄牛A、B、C（保因牛）とその疾病子牛121頭についてDNA診断を行った。その結果、種雄牛AとBは変異2型の、種雄牛Cは変異1型のキャリアであり、その疾病子牛は、変異1型あるいは変異2型のホモ接合体か、変異1型と2型のコンパウンドヘテロ接合体であることが判明した (表1)。次に、種雄牛A（保因牛）の子牛であるが正常な表現型を示す個体187頭についてDNA診断を行ったところ、少なくとも一方の相同染色体上に正常な遺伝子を有することが明らかとなった (表1)。次に、軟骨異形成性矮小体軀症の発生が確認されていない黒毛和種、およびホルスタイン種の正常個体201頭についてその遺伝子型を調べたところ、変異型はいずれにも検出されなかった (表1)。このことから、ウ

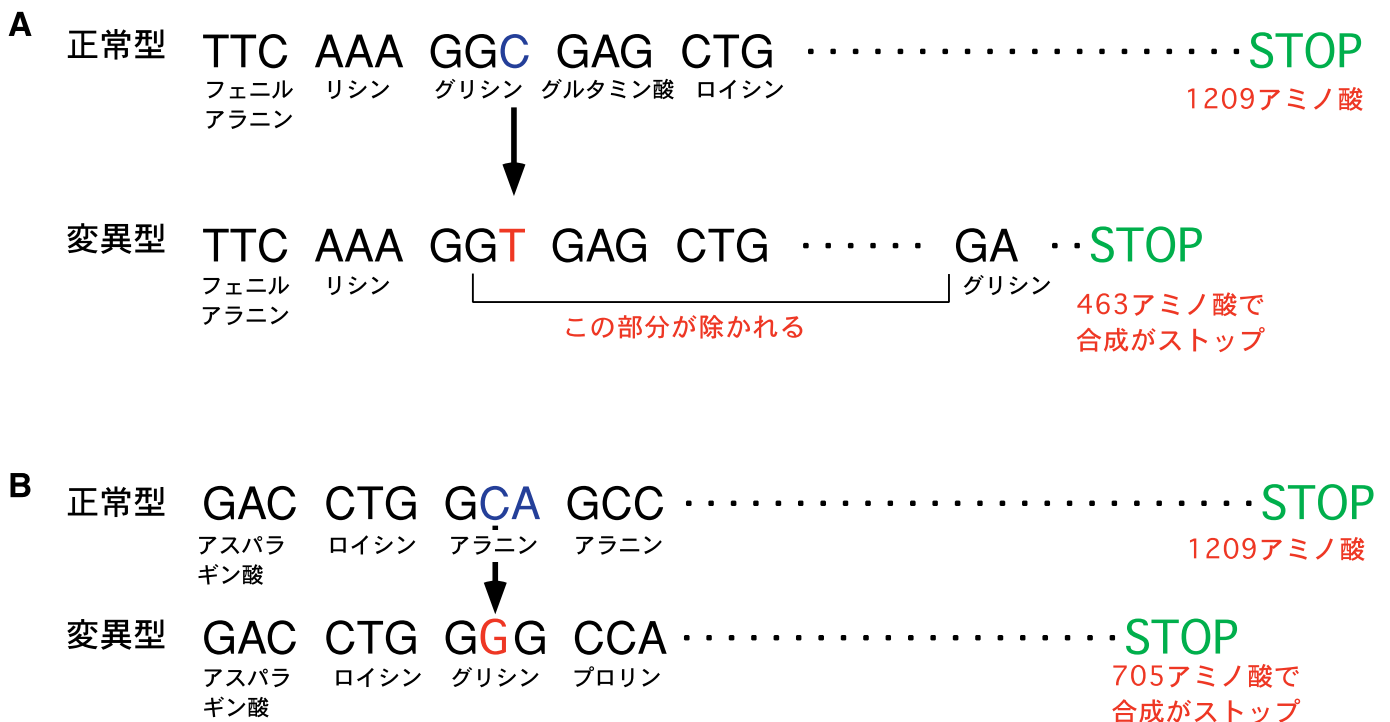


図2 リムビン遺伝子 (LIMBIN) に見付かった変異

リムビン遺伝子は通常1209アミノ酸からなるタンパク質をコードする遺伝子であるが、
 (A) 変異1型では、リムビン遺伝子の1356番目の塩基がCからTへ変異することによって、463アミノ酸からなる不完全なタンパクが合成されると考えられる。
 (B) 変異2型では、リムビン遺伝子の2054番目から2055番目の塩基がCAからGへ変異することによって、705アミノ酸からなる不完全なタンパクが合成されると考えられる。

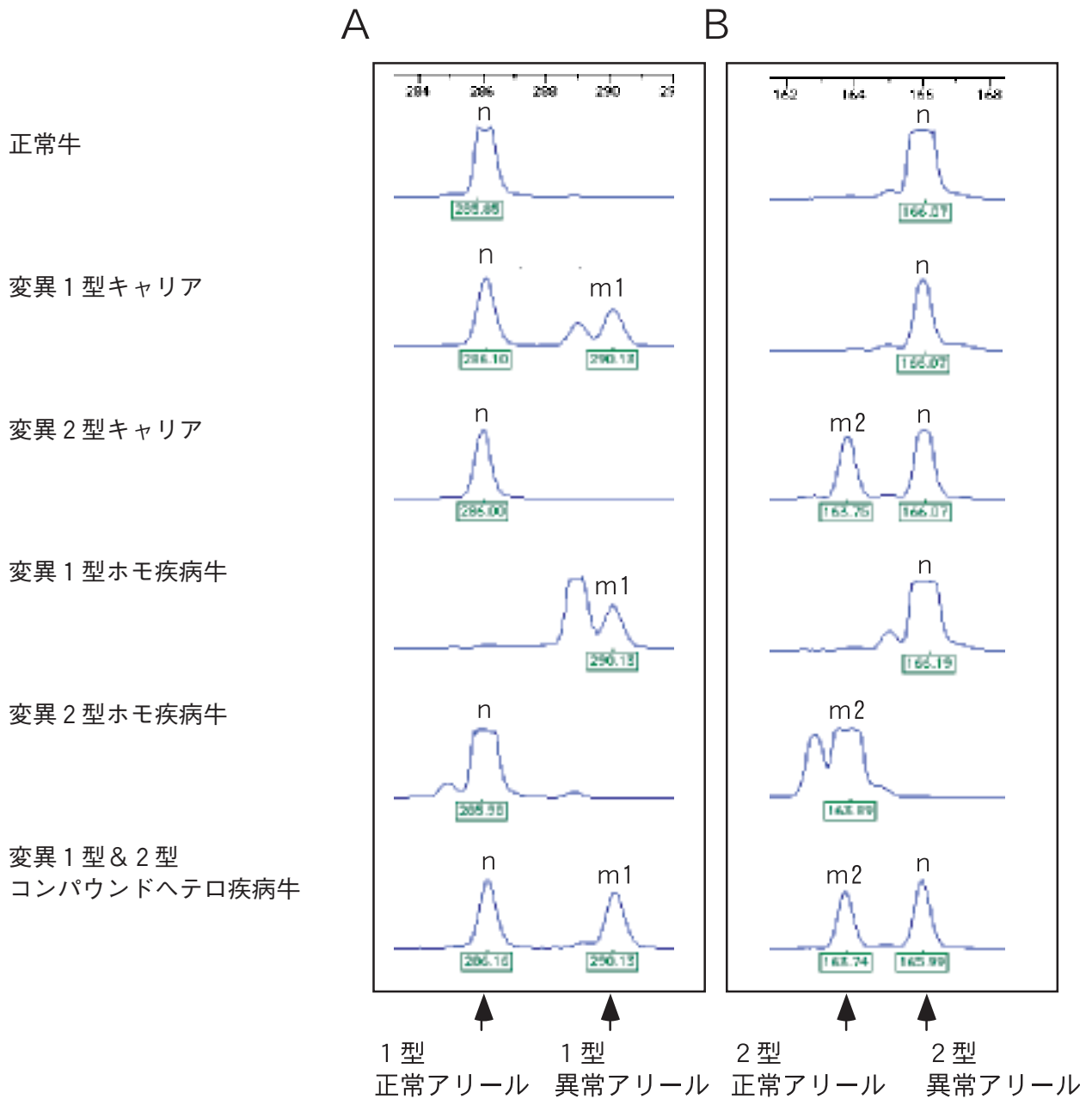


図 3. 対立遺伝子特異的PCR法とGenScan検出システムによるウシ*LIMBIN*遺伝子の変異 1 型 (A) および変異 2 型 (B) の DNA 診断結果。n, m1, および m2 はそれぞれ正常型、変異 1 型、および変異 2 型の遺伝子型を示す。

表 1. 疾病牛、半兄弟正常牛、コントロール牛におけるウシ*LIMBIN*遺伝子の遺伝子型の分布

	m1/m1	m2/m2	m1/m2	n/m1	n/m2	n/n
種雄牛A, B, Cの疾病子牛	2	8	111	0	0	0
種雄牛Aの正常子牛	0	0	0	6	90	91
黒毛和種、ホルスタイン牛	0	0	0	0	0	201

n, m1, およびm2 はそれぞれ正常型、変異 1 型、および変異 2 型の遺伝子型を示す。疾病子牛はすべて、変異 1 型あるいは変異 2 型のホモ接合体か、変異 1 型と 2 型のコンパウンドヘテロ接合体である。種雄牛A（保因牛）の子牛で正常な表現型を示す個体は、少なくとも 1 方の相同染色体上に正常な遺伝子型を有する。本疾病の発生が確認されていない黒毛和牛、およびホルスタイン牛には、変異型は検出されない。

シ*LIMBIN*遺伝子における変異 1 型および 2 型は一般的な多型ではないことが示唆された。

以上に示したように、2 種類の変異がウシ*LIMBIN*タンパクの62%および42%を欠損するような大きな変化をもたらすこと、2 種類の変異が疾病と完全に共分離すること、また2 種類の変異が一般的な多型ではないことから、ウシ*LIMBIN*遺伝子における変異 1 型および 2 型を軟骨異形成性矮小体軀症の原因変異と同定した (Takeda et al., 2002)。

5. DNA診断法の利用について

熊本県農業研究センターの小邦氏らによって、熊本県内の褐毛和種繁殖雌牛（育種集団）632 頭についてのDNA診断が実施された。その結果、変異 1 型のキャリアが76頭（12%）、変異2型のキャリアが28頭（4%）存在することが明らかとなった。また、過去に供用された種雄牛や繁殖雌牛の血統情報および遺伝子型を検討した結果、変異 1 型は 2 型と比較して、より後になって集団内に拡散した変異であることが確認された。今後、種雄牛候補のDNA診断を実施し、種雄牛側からの不良因子の拡散を防止することによって、集団全体から本疾患を引き起こす変異型遺伝子の頻度を減衰させる方針とのことである（小邦ら, 2002）。

このようなDNA診断法の利用によって、軟骨異形成性矮小体軀症に対する保因牛の早期発見と計画交配による発症の防除、および集団からの不良因子頻度の低減が可能となった。しかし、DNAの情報を利用した育種には留意しなければならない点が存在する。まず、生物の多様性を損なわないように注意しなければならない。劣性遺伝病の発生は、既に褐毛和種集団のホモ化が進んでいることを示唆している。変異型の遺伝子頻度を一定以下に抑えることは重要であるが、過度な選抜は集団のさらなるホモ化を進め、他の遺伝病の発生や集団の遺伝的ポテンシャルの低下を引き起こす。次に、変異型と他の経済形質との連鎖について検討しなければならない。今回の研究によって、褐毛和種という比較的小さな集団の同一の遺伝子に 2 種類の変異型が存在すること、また、経済的効果の高い種雄牛の一部がこれらの変異型を有することが明らかとなった。このことから、*LIMBIN*遺伝子の変異型の近傍に何らかの優良遺伝子が位置していたり、あるいはキャリア個体が何らかの好ましい形質を示すなどして、育種の過程で*LIMBIN*遺伝子の変異型を選抜してきた可能性がある。*LIMBIN*遺伝子の 2 種類の変異を集団から排除することは、

変異周辺の染色体領域も同時に集団から排除することに等しい。つまり、*LIMBIN*遺伝子の変異型と優良形質が連鎖している場合、優良形質に関わる遺伝子も集団から排除してしまうことになる。我々は、DNA技術を手に入れてまだ日が浅い。今は、DNA情報を利用して現在のニーズにあった家畜を生産しながらも、和牛集団のもつ遺伝的ポテンシャル、あるいはその多様性を後世に残す努力が必要である。

6. *LIMBIN*遺伝子について

*LIMBIN*遺伝子の機能はまだ明らかではないが、岡山大学の国枝博士と辻博士らの研究によって、マウス*Limbin*遺伝子が胎児期および成長期の四肢長骨の軟骨細胞、骨芽細胞および破骨細胞で発現し、また、マウス胎児を用いたwhole-mount *in situ* hybridizationでは、四肢の原基(手足の元となる隆起部位)で強く発現していることが明らかとなった(Takeda et al., 2002)。このことから、*Limbin*遺伝子は四肢長骨の成長だけでなく、発生初期における形態形成にも何らかの役割をもつ可能性が高い。また、この領域に位置する6つの遺伝子は、ヒトからフグに至るまで、その順番や転写方向が保存されており、脊椎動物にとって基本的かつ重要な遺伝子である可能性も高い。また、*LIMBIN*遺伝子の隣に位置する*EVC*遺伝子が原因とされていたヒト矮小体エリスファンクレベルト症候群において、*EVC*遺伝子ではなく*LIMBIN*遺伝子内に変異を持つ家系が複数存在することが近年報告されている(Galdzicka et al., 2002, Ruiz-Perez et al., 2003)。現在、*LIMBIN*遺伝子が軟骨異形成性矮小体軀症の真の原因であることを証明し、その病因を明らかにすることを目的として、アメリカ国立環境保健研究所の三品博士らとウシ軟骨異形成性矮小体軀症のモデルマウスを作成中である。予想外であったが、このマウスはヒト矮小体エリスファンクレベルト症候群のモデルにもなった。

このように牛に携わる研究機関(熊本県農業研究センター畜産研究所小邦氏ら、岡山大学大学院自然科学研究科国枝博士ら、九州東海大学農学部森友博士ら)との共同研究によって、牛だけでなく人、あるいは生物学全体に貢献するであろう遺伝子が見付かったことは大変喜ばしい。今後、ヒト矮小体エリスファンクレベルト症候群との比較や、*LIMBIN*遺伝子やそのタンパクの*in vivo*および*in vitro*での解析が進められることによって、治療法の開発や形態形成メカニズムの一端が解明されることを願う。(竹田晴子)

引用文献

- Galdzicka M, Patnala S, Hirshman MG, Cai JF, Nitowsky H, Egeland JA, Ginns EI. (2002). A new gene, *EVC2*, is mutated in Ellis-van Creveld syndrome. *Mol Genet Metab.*, 77(4), 291-295.
- Moritomo, Y., Ishibashi, T., Ashizawa, H., and Shibata, T. (1989) Chondrodysplastic dwarfism in Japanese brown cattle. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 42, 173-177.
- Moritomo, Y., Ishibashi, T., and Miyamoto, H. (1992) Morphological changes of epiphyseal plate in the long bone of chondrodysplastic dwarfism in Japanese brown cattle. *J. Vet. Med. Sci.*, 54, 453-9.
- 小邦朋子、竹田晴子、高見まりか、佐藤 敬明、森友 靖生、国枝哲夫、杉本喜憲、松本 道夫。(2002) 褐色和種における軟骨異形成性矮小体軀症の原因遺伝子の解析(4) : キャリア診断の確立及びその利用。第100回日本畜産学会大会。
- Takeda, H., Takami, M., Oguni, T., Tsuji, T., Yoneda, K., Sato, H., Ihara, N., Itoh,

- T., Kata, S. R., Mishina, Y., Womack, J. E., Moritomo, Y., Sugimoto, Y., and Kunieda, T. (2002) Positional cloning of the gene LIMBIN responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 10549-54.
- Takeda, H., and Y., Sugimoto, Y. (2003) Construction of YAC/BAC contig map for the BTA 6q21 region containing a locus for bovine chondrodysplastic dwarfism. *Anim Biotechnol.*, 14(1), 51-59.
- Ruiz-Perez VL, Ide SE, Strom TM, Lorenz B, Wilson D, Woods K, King L, Francomano C, Freisinger P, Spranger S, Marino B, Dallapiccola B, Wright M, Meitinger T, Polymeropoulos MH, Goodship J. (2000). Mutations in a new gene in Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acrodistal dysostosis. *Nat Genet.*, 24(3):283-286.
- Ruiz-Perez VL, Tompson SW, Blair HJ, Espinoza-Valdez C, Lapunzina P, Silva EO, Hamel B, Gibbs JL, Young ID, Wright MJ, Goodship JA. (2003). Mutations in two nonhomologous genes in a head-to-head configuration cause Ellis-van Creveld syndrome. *Am J Hum Genet.*, 72(3), 728-732.
- Yoneda, K., Moritomo, Y., Takami, M., Hirata, S., Kikukawa, Y., and Kunieda, T. (1999) Localization of a locus responsible for the bovine chondrodysplastic dwarfism (bcd) on chromosome 6. *Mamm. Genome*, 10, 597-600.

IV 総務

1. 職員名簿

(平成15年 3月31日現在)

所 属	職 名	氏 名
所 長 管 理 部 動物遺伝研究部	所 長	松 川 正
	部 長	高 田 耕 節
	補 助 員	浅 比 紀 子
	補 助 員	芳 賀 元 子
	部 長	杉 本 喜 憲
	主任研究員	高 須 賀 晶 子
	主任研究員	渡 邊 敏 夫
	研 究 員	溝 口 康
	研 究 員	竹 田 晴 子
	研 究 員	平 野 貴
	研 究 員	井 原 尚 也
	研 究 員	伊 藤 智 仁
	研 究 員	高 野 淳
	補 助 員	渡 辺 恵 美 子
	補 助 員	塚 沢 浩 子
	補 助 員	藤 田 郁 子
	補 助 員	伊 藤 千 代 子
	補 助 員	藤 井 友 子
	補 助 員	鳴 島 亜 希 子
	補 助 員	金 内 由 美 子
補 助 員	緑 川 淑 枝	
補 助 員	丸 山 久 美 子	
補 助 員	真 船 文 恵	
補 助 員	高 田 亜 紀	
補 助 員	星 優 美	
補 助 員	相 馬 千 裕	

2. 職員の異動

1) 職員の採用

採用年月日	氏名	所属	備考
平成14年4月1日	相馬千裕	動物遺伝研究部	
平成14年6月1日	高野淳	動物遺伝研究部	

3. 職員の海外出張

氏名	出張先	期間	用務
杉本喜憲 竹田晴子 井原尚也 伊藤智仁	ドイツ	14.8.10～14.8.19	ゲッチンゲンで開催された第28回国際動物遺伝学会に出席し、研究発表を行うとともに、関連情報を収集すること
松川正	ラオス	14.10.20～14.11.2	ラオスの畜産事情を調査し、我が国との技術協力のあり方を調査すること（畜産技術協会派遣調査団長）
平野貴	韓国	14.10.28～14.11.2	スウォンで開催された国際シンポジウム「畜産におけるゲノム情報の応用戦略」で講演を行うこと（招待講演）
高須賀晶子	アメリカ	15.1.10～15.1.17	サンディエゴで開催された第11回植物、動物、微生物ゲノム学会に出席し、講演するとともに、関連情報を収集すること

4. 施設・機器の整備

1) 施設

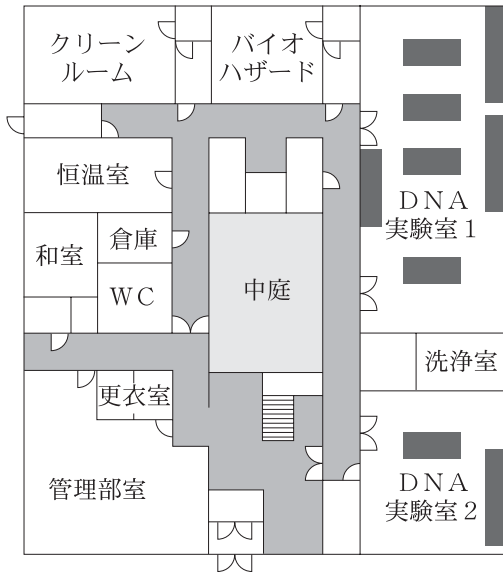
研究施設の平面図は52ページの通り。

2) 平成14年度購入の主要機器（単位百万円以上）

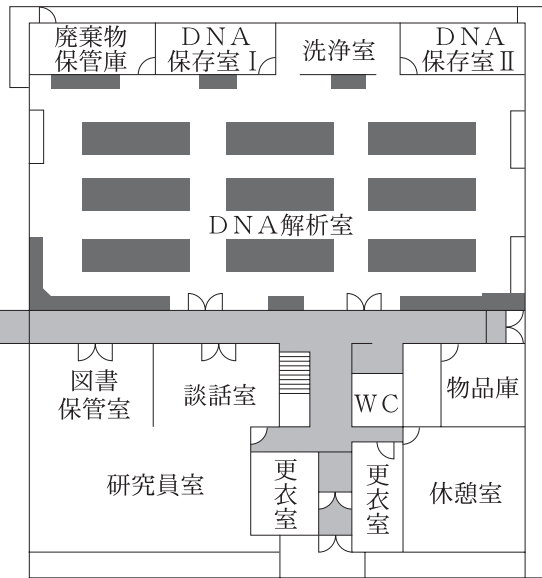
機 器 名	式 数
炭酸ガスインキュベーター（ヘラセル、ダブルチャンバー）	1
ゲル写真装置（東洋紡、FAS-Ⅲ）	1
スピードバッグ（サーモクエスト、SPD1010）	1
DNAシーケンサー（ABI 3730）	1
PCR増幅器（ABI ゴールド96）	2

研究施設平面図

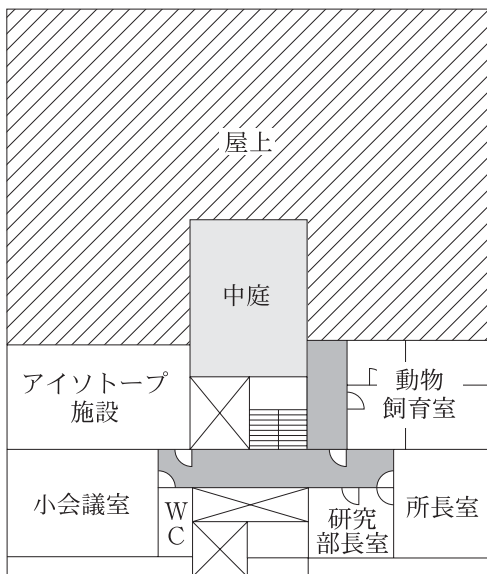
本館 1階 (742m²)



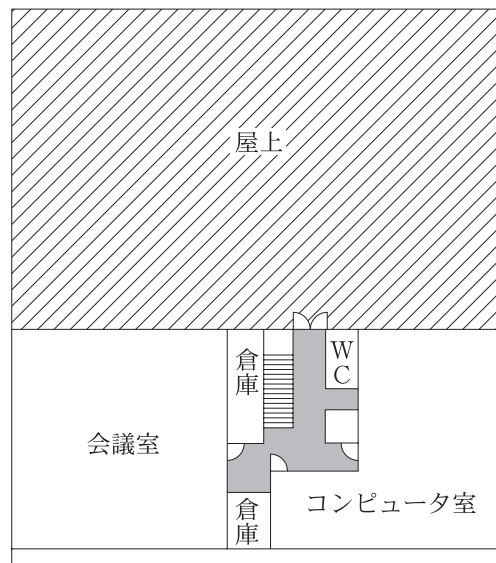
別館 1階 (788m²)



本館 2階 (258m²)



別館 2階 (306m²)



5. 購読雑誌一覧

- 1) American Journal of Human Genetics
- 2) Animal Biotechnology
- 3) Animal Genetics
- 4) Cell
- 5) Cytogenetic and Genome Research
- 6) Genes and Development
- 7) Genetics
- 8) Genome Research
- 9) Genomics
- 10) Journal of Biological Chemistry
- 11) Journal of Cell Biology
- 12) Mammalian Genome
- 13) Molecular Cell
- 14) Nature
- 15) Nature Biotechnology
- 16) Nature Genetics
- 17) Nature Medicine
- 18) Nature Reviews, Genetics
- 19) Proc. the National Academy of Sciences of the United States of America
- 20) Science
- 21) Trends in Genetics
- 22) 実験医学
- 23) 細胞工学
- 24) 畜産技術
- 25) 畜産の研究
- 26) 肉牛ジャーナル
- 27) 日経バイオビジネス
- 28) 日経バイオテク
- 29) 和牛

V 資 料

1. 論文再録

1. Takeda, H., Takami, M., Oguni, T., Tsuji, T., Yoneda, K., Sato, H., Ihara, N., Itoh, T., Kata, S. R., Mishina, Y., Womack, J. E., Moritomo, Y., Sugimoto, Y., and Kunieda, T.: Positional cloning of the gene LIMBIN responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 10549-54, 2002

2. Reed, K.M., Ihara, N., Mariani, P., Mendoza, K.M., Jensen, L.E., Bellavia, R., Ponde de Leon, F.A., Bennett, G.L., Sugimoto, Y. and Beattie, C.W.: High-resolution genetic map of bovine chromosome 29 through focused marker development. *Cytogenet Genome Research* 96:210-216, 2002

3. Reed, K.M., N. Ihara, N., Ponde de Leon, F.A., Songstegard, T.S., Smith, T.P.L., Bennett, G.L., Sugimoto, Y. and Beattie, C.W.: Development of 47 new microsatellite markers from a BTA6 library. *Animal Biotechnology* 13:195-202, 2002

4. Fujisaki, S., Mizoguchi, Y., Takahashi, S., Chen YZ, Suzuki, K., Asakawa, S., Soeda, E., Shimizu, N., Sugimoto, Y. and Yasue, H.: Construction of a bovine bacterial artificial chromosome library from fibroblasts used for cloned cattle. *Animal Genetics* 33, 379-381, 2002

Positional cloning of the gene *LIMBIN* responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism

Haruko Takeda*, Marika Takami†, Tomoko Oguni‡, Takehito Tsuji§, Kazuhiro Yoneda†, Hiroaki Sato‡, Naoya Ihara*, Tomohito Itoh*, Srinivas R. Kata¶, Yuji Mishina||, James E. Womack¶¶, Yasuo Moritomo**, Yoshikazu Sugimoto**††, and Tetsuo Kunieda†

*Shirakawa Institute of Animal Genetics, Nishi-shirakawa, Fukushima 961-8061, Japan; †Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan; ‡Animal Husbandry Research Institute, Kumamoto Prefectural Agricultural Research Center, Kikuchi-gun, Kumamoto 861-1113, Japan; §Department of Oral Morphology, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry, Shikata-cho, Okayama 700-8525, Japan; ¶Department of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station, TX 77843; ||National Institute of Environmental Health Science, Research Triangle Park, NC 27709; and **School of Agriculture, Kyusyu Tokai University, Aso, Kumamoto 869-1404, Japan

Contributed by James E. Womack, June 5, 2002

Chondrodysplastic dwarfism in Japanese brown cattle is an autosomal recessive disorder characterized by short limbs. Previously, we mapped the locus responsible for the disease on the distal end of bovine chromosome 6. Here, we narrowed the critical region to ≈2 cM by using linkage analysis, constructed a BAC and YAC contig covering this region, and identified a gene, *LIMBIN* (*LBN*), that possessed disease-specific mutations in the affected calves. One mutation was a single nucleotide substitution leading to an activation of a cryptic splicing donor site and the other was a one-base deletion resulting in a frameshift mutation. Strong expression of the *Lbn* gene was observed in limb buds of developing mouse embryos and in proliferating chondrocytes and bone-forming osteoblasts in long bones. These findings indicate that *LBN* is responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism and has a critical role in a skeletal development.

Longitudinal growth of long bones arises from continuous proliferation and differentiation of chondrocytes followed by endochondral ossification at the epiphyseal growth plates located at both ends of long bone. Mutations of genes involved in the process cause several types of dwarfism in human and mouse; these findings have provided valuable insight into our understanding of skeletal development, a process we know very little about (1–15).

Bovine chondrodysplastic dwarfism (BCD) in Japanese brown cattle is an autosomal recessive disorder with the phenotype of short limbs, joint abnormality, and ateliosis (16, 17). Long bones of the affected animals have insufficient endochondral ossification with irregularly arranged chondrocytes, abnormal formation of the cartilaginous matrix, and partial disappearance of the epiphyseal growth plates. The axial skeletal structures and craniofacial skeleton are not significantly affected. Disproportionate dwarfism also has been reported in other cattle breeds including Dexter, Holstein, Aberdeen-Angus, Hereford, and Shorthorn breeds (18, 19), but their clinical features, associated with vertebral and craniofacial abnormalities, are different from those of BCD.

In a previous study, we mapped the locus (*bcd*) responsible for this disease in an 11-cM region between microsatellite markers BP7 and BM9257 on the distal end of bovine chromosome (BTA) 6 and demonstrated that the region corresponded to human chromosome (HSA) 4p (20). Various genes responsible for human hereditary diseases with skeletal abnormalities have been localized to this region. For example, achondroplasia (7, 8), hypochondroplasia (11), and thanatophoric dysplasia (15), characterized by short-limb dwarfism, are caused by mutations in fibroblast growth factor receptor 3 (MIM no. 134934). An association between rare alleles of the *MSX1* locus and limb deficiency malformations has been suggested (MIM no. 142983; ref. 21). *EVC* was identified recently as the gene responsible for Ellis-van Creveld syndrome (MIM no. 225500), which is char-

acterized by short limbs, short ribs, postaxial polydactyly, and dysplastic nails and teeth (22).

In the present study, we narrowed the *bcd* locus to a 2.4-cM region, constructed yeast and bacterial artificial chromosome (YAC, BAC) contigs covering this region, sequenced candidate genes located in the region, and finally identified causative mutations in a gene that is expressed in the epiphyseal growth plates of long bone.

Materials and Methods

Construction of Physical Map. A bovine YAC library was screened by using a PCR-based method (23). A bovine BAC library (RPC1-42) was screened by colony hybridization with high-density filters purchased from Children's Hospital (Oakland, CA). YAC end sequences were obtained by the end rescue method using the vectorette method, (24) and the BAC end sequence was identified by direct sequencing of BAC DNA by using T7 and SP6 primers with BigDye chemistry (Applied Biosystems). Microsatellite loci were isolated by using biotinylated (CA)₁₂ probe, as described by Kijas *et al.* (25). The primer sequences and PCR conditions to amplify microsatellites are described in the GenBank database. Primer sequences of sequence-tagged site (STS) markers for bovine genes and ends of clones are described in the supporting information, which is published on the PNAS web site, www.pnas.org.

Pedigree Material and Haplotype Analysis. We used two paternal half-sib pedigrees derived from sire A and sire B in a commercial herd of Japanese brown cattle. Sire B is the offspring of sire A. The pedigree of sire A was composed of sire A, 91 dams, 91 affected offspring, and 187 unaffected offspring. The pedigree of sire B was composed of sire B, 28 dams, and 28 affected offspring. We used 95 Japanese black and 106 Holstein cattle as normal controls. The dwarf symptoms of the affected calves were diagnosed by visual examination and by histologic examination of growth plate cartilage after necropsy. Microsatellite genotyping was performed according to standard procedures (26). We determined the most likely haplotype configurations as described by Coppieters *et al.* (27).

Reverse Transcriptase (RT)-PCR. Total RNA of fetal calf long bone was extracted with Trizol (Invitrogen) and reverse-transcribed with SuperScript II Reverse Transcriptase using oligo-d(T)₁₂ and

Abbreviations: BCD, bovine chondrodysplastic dwarfism; YAC, yeast artificial chromosome; BAC, bacterial artificial chromosome; STS, sequence-tagged site; RT, reverse transcriptase; En, embryonic day *n*; Pn, postnatal day *n*; DIG, digoxigenin.

Data deposition: The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank database (accession nos. AB080343–AB080357 and AB083065–AB083067).

††To whom reprint requests should be addressed at: Shirakawa Institute of Animal Genetics, Odakura, Nishigo, Nishi-shirakawa, Fukushima 961-8061, Japan. E-mail: kazusugi@siag.or.jp.

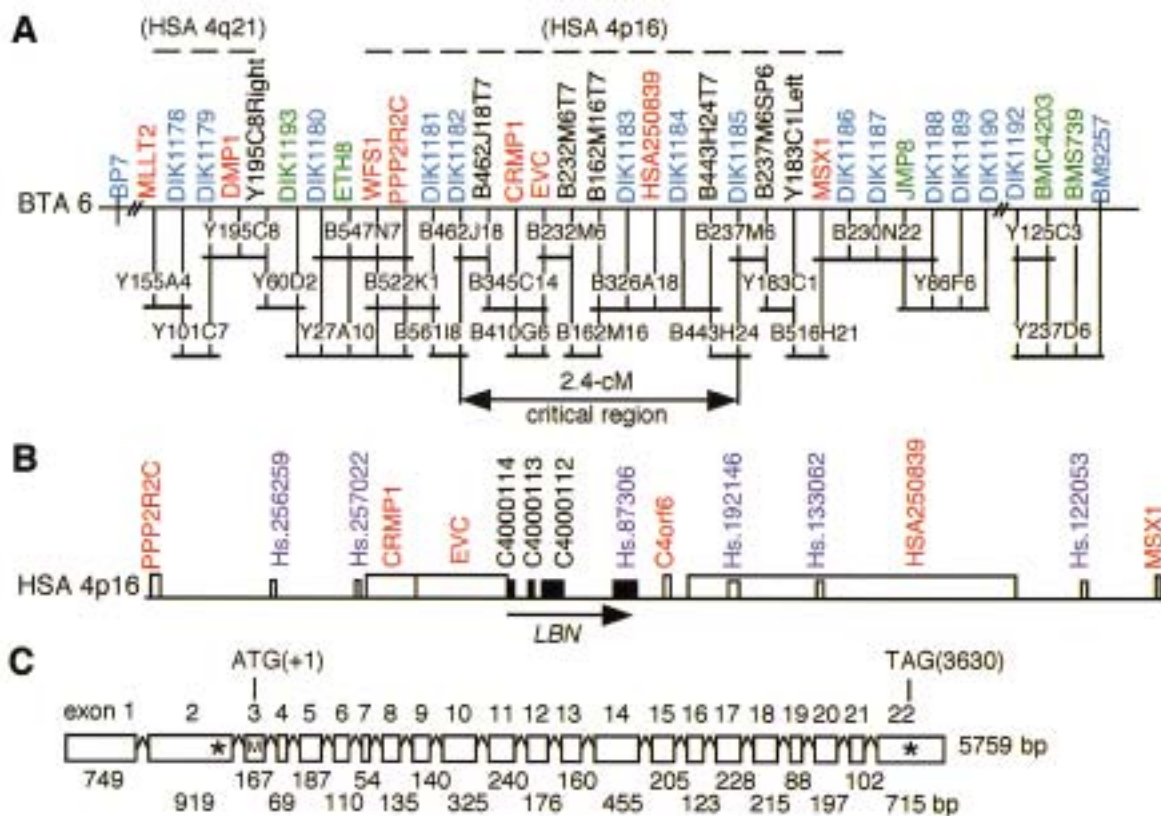


Fig. 1. Identification of bovine *LBN* gene. (A) Physical map consisting of YAC and BAC clones in the critical region on BTA 6. Informative and uninformative markers in our pedigree, STS markers for genes and ends of the clones are shown in blue, green, red, and black, respectively. Dotted lines show regions corresponding to HSA 4. (B) Transcription units on the human orthologous region on HSA 4p16. Genes and UniGene clusters localized by using the GRL database are shown in red and purple, respectively. C4000112, C4000113, and C4000114 are putative exons on the UCSC human genome database. The black boxes indicate a part of the human *LBN* gene. (C) Genomic structure of bovine *LBN*. M, translation initiation codon; *, stop codon.

random hexamers, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The cDNAs were amplified with an annealing temperature of 65°C using Avantage GC2 kit (CLONTECH), according to the manufacturer's instructions. To amplify bovine *EVC* and *geneX*, we used primer pairs as follows: *EVC*, 5'-GTCCACTCAGTGCATCTGC-3' and 5'-AGGCTCTGAGCAGTTGCCA-3'; and *geneX*, 5'-CTGGAGTCCACTGATGAACTGACC-3' and 5'-CAATGTGAGAACCGAGAGCCTTGC-3'.

Cloning of Bovine *LBN* cDNA. A fetal calf long bone cDNA library (28) was screened by using standard methods with the RT-PCR product of *LBN* as a probe amplified by a primer pair: bov1, 5'-GAGAGAGGGTGATATTCTCTGG-3' and 5'-GATAAAGAGCTTTTCACCCGTG-3'. In addition, RT-PCR using bovine fetal long bone total RNA was performed by using two sets of primer pairs as follows: bov2, 5'-GGCTTTTCAGGAAAGTCTTCTGC-3' and 5'-CTCCAGGAGCTTCTGACCCTTGC-3'; and bov3, 5'-GGAAGTATCTGGCCCATTTT-GCC-3' and 5'-CTCCAGCGAGGCTGTGTAGCTGAC-3'. The RT-PCR products were directly sequenced by using internal primers. Sequencer software (Gene Codes, Ann Arbor, MI) was used for the sequence assembly.

Human and Mouse Ortholog Cloning. The cDNA contig assembly of human *LBN* was produced by using the RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) methods (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions using human kidney total RNA (CLONTECH). The primers were designed based on human genome draft sequences. The cDNA contig

assembly of mouse *Lbn* was produced by using the mouse embryonic day (E)-11 limb buds λ -cDNA library (Stratagene) screening and 5' RACE method with mouse embryo E14.5 total RNA. We created multiple alignments of amino acid sequences of *LBN* using GENETYX-MAC software (Software Development, Tokyo). The protein sequences were analyzed by using the programs SMART (available at <http://smart.embl-heidelberg.de>; ref. 29) for transmembrane and coiled coil domain searches, and PSORTIII (available at <http://psort.nibb.ac.jp>; ref. 30) for protein localization prediction.

Mutation Analysis. RT-PCR amplifications of bovine *LBN* cDNA segments covering the entire coding region were performed by using long bone total RNA derived from a 3-week old affected and normal fetal calf with two sets of primer pairs as follows: bov4, 5'-GCAAGGGTCAGAAGCTCCTCGGAG-3' and 5'-CAATGTGAGAACCGAGAGCCTTGC-3'; and bov5, 5'-CGTCATTGTGCCTTTGGACTTTCAG-3' and 5'-GCAGCATCGTCAGCTTCGACAGG-3'. We used 38 PCR cycles with an annealing temperature of 65°C, and the RT-PCR products were sequenced by using internal primers. The genomic segments containing a region of C1356T and 2054–2055delCAinsG mutations were amplified with primer pairs as follows: bov6, 5'-TACAGCAGGAGGAGACCTTGC-3' and 5'-TTAGTTCACTGGAACCCAGCAC-3'; and bov7, 5'-GCCTGCAGAACTCAGGAATGAC-3' and 5'-CGTGAAGATCAAGTGCTCCCAGTG-3', respectively. We used 32 PCR cycles with an annealing temperature of 58°C, and the products were sequenced by using the same primers. For confirmation of the mutations, the PCR products also were cloned in a pGEM-T

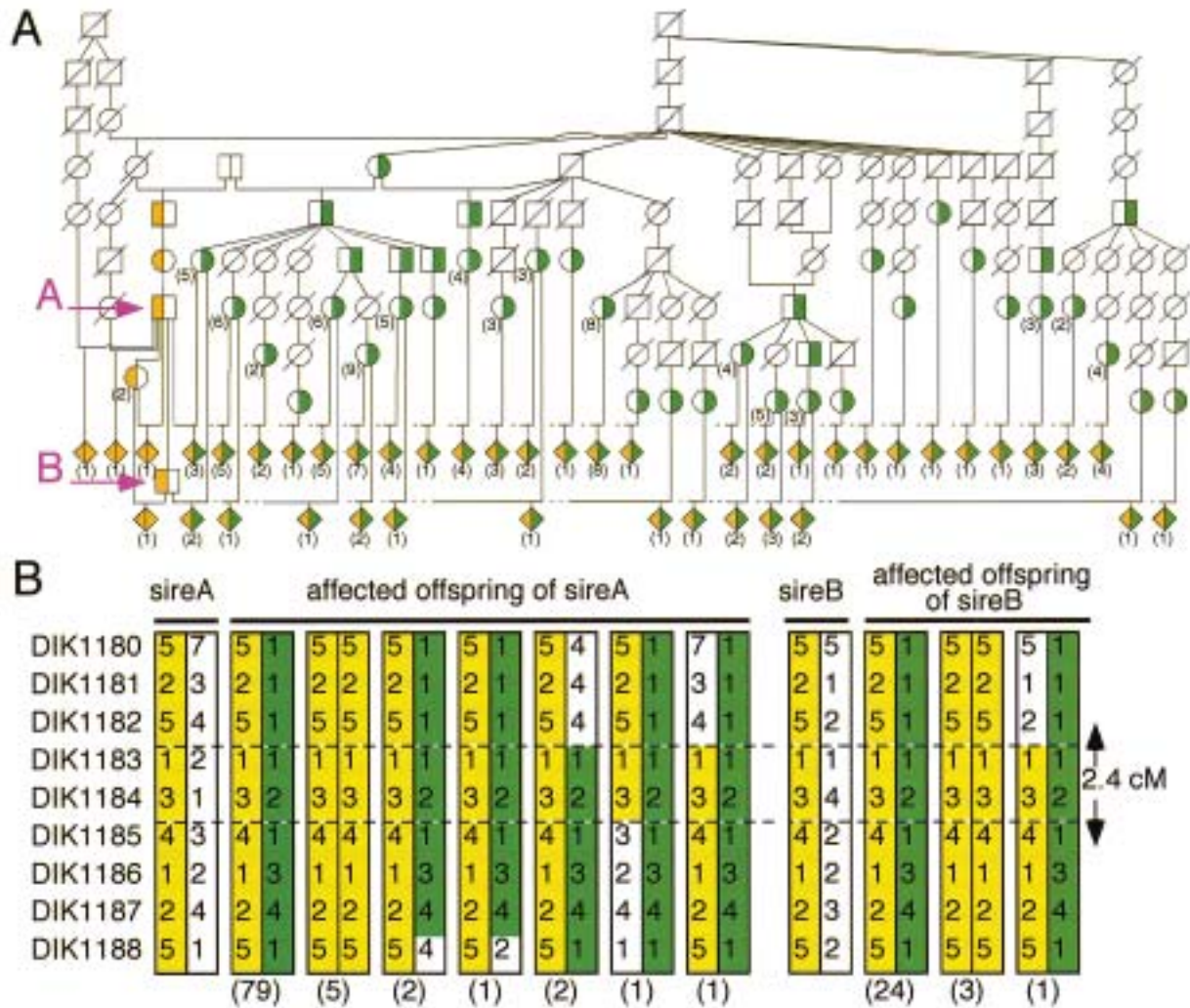


Fig. 2. Pedigrees with BCD and haplotypes consisting of nine markers in the critical region on BTA 6. Green, haplotype associated with a C1356T mutation; yellow, haplotype associated with a 2054–2055delCAinsG mutation. The number of animals is shown in parentheses. (A) This pedigree includes grandsire A and sire B, which were identified as carriers of the disease, 90 affected offspring, 90 dams of the affected offspring, and some ancestors. The shaded diamonds represent affected offspring. White with diagonal line denotes animals not genotyped. (B) Haplotypes of nine microsatellites (Left) for grandsire A, sire B, and the 119 affected offspring are shown.

Easy vector (Promega) according to the manufacturer's instructions and sequenced.

Expression Analysis. Northern blots contained 2 μ g of mouse poly(A)⁺ RNA from adult tissues (MNT filter, CLONTECH), long bone and cranial bone from postnatal day (P)-14 and whole embryos at various stages. A mouse *Lbn* cDNA fragment (nucleotides 266–2086) was used as a probe for hybridization. We probed the same set of filter with a *G3pdh* probe as a loading control. Whole-mount *in situ* hybridization was performed according to the protocol described by Conlon and Rossant (31). The digoxigenin (DIG)-labeled riboprobes corresponding to the 5' region of mouse *Lbn* cDNA (nucleotides 149–1558) was used. For *in situ* hybridization analysis, mouse tibias at E17 and P35 were fixed in 4% (vol/vol) paraformaldehyde in PBS overnight at 4°C and decalcified in 10% (wt/vol) EDTA for 1 day and 7 days, respectively. Specimens were embedded in paraffin and sectioned at 6 μ m. DIG-11-UTP-labeled riboprobes corresponding to the 3' region of mouse *Lbn* cDNA (nucleotides 2801–3044) were prepared by using a DIG RNA labeling kit (Roche

Molecular Biochemicals), according to the manufacturer's instruction. Hybridization was performed overnight at 48°C with washes at 50°C as described by Ikegame *et al.* (32). Cell nuclei were stained with 1% (wt/vol) methyl green.

Results

Fine Genetic and Physical Mapping. We constructed a bovine radiation hybrid (RH) map of BTA 6 by using a bovine-hamster whole-genome RH panel (33) and identified that the critical 11-cM region from BP7 to BM9257 corresponded to HSA 4p16 and 4q21 (M.T., unpublished data). To refine further the *bcd* locus, we constructed YAC and BAC clone contigs by using STS markers amplifying inserts of the clones as well as bovine orthologs of genes located in HSA 4p16 and 4q21 and developed 14 polymorphic microsatellite markers (DIK1178–DIK1190, and DIK1192) from the clones (Fig. 1A). We genotyped a paternal half-sibling pedigree of 119 affected calves using the markers to determine the precise localization of *bcd* and the disease-associated haplotypes. None of the affected calves had recombination with DIK1183 and DIK1184, narrowing the critical

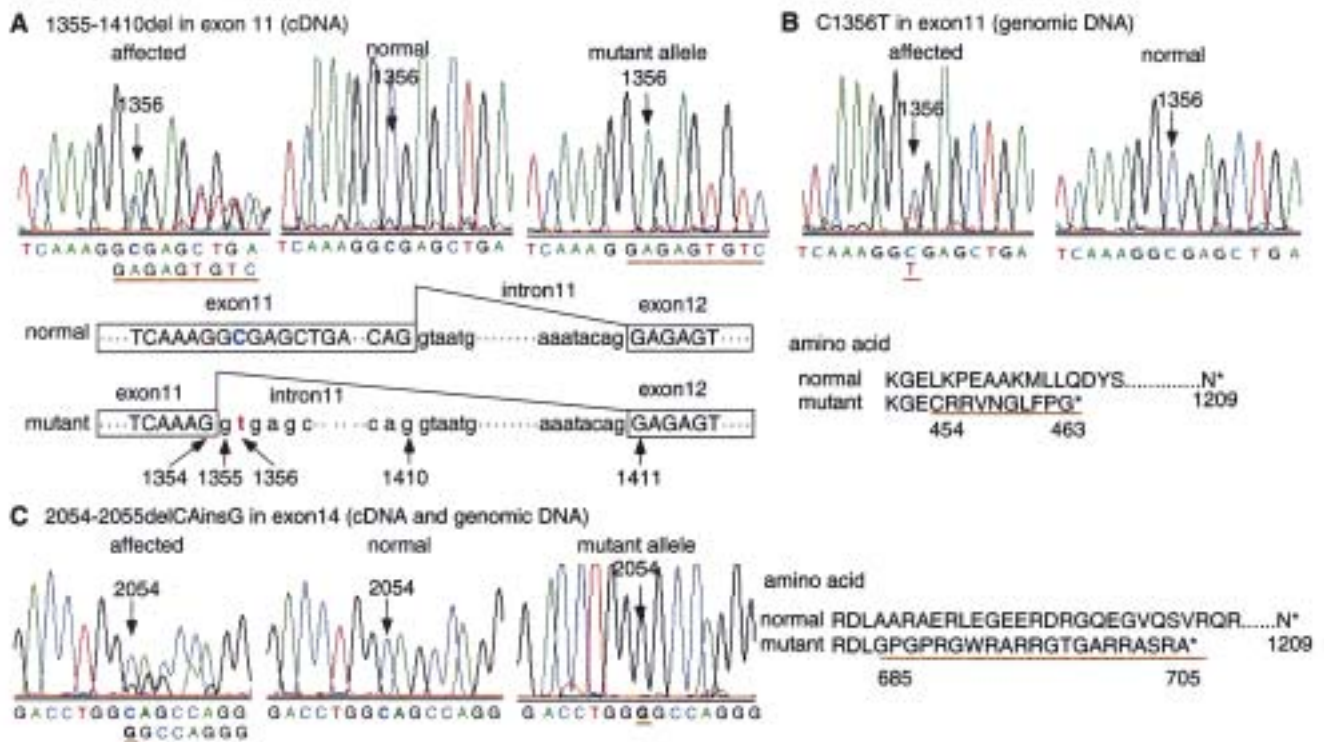


Fig. 3. Mutation analysis in bovine *LBN* gene. Sequence chromatograms of affected calves having heterozygous haplotypes (Left), normal calves (Center), and subcloned mutant alleles (Right). Amino acid sequence changes caused by mutations. (A) cDNA sequence in exon 11. A 56-bp deletion is observed at position 1355–1410 in the mutant allele, which is schematically illustrated. The deletion causes a frameshift, producing a premature termination at codon 464 with an extension of 10 aberrant amino acids. (B) Genomic sequence in exon 11. C to T substitution is observed at position 1356 in the affected calf (C1356T), which creates a cryptic splice donor site in exon 11 and leads to the improper splicing identified in the affected cDNA sequence. (C) cDNA and genomic sequences in exon 14. CA to G substitution is observed at positions 2054 and 2055 in the mutant allele (2054–2055delCAinsG), which causes a frameshift producing a premature termination at codon 706 with an extension of 21 aberrant amino acids.

region to 2.4 cM between DIK1182 and DIK1185 (Fig. 2B). Interestingly, the haplotypes of the most affected calves (111/119) were heterozygous for two specific haplotypes (Fig. 2), suggesting that both haplotypes were responsible for BCD and that two distinct mutations associated with these haplotypes might be present in the population of Japanese brown cattle.

Candidate Gene Identification. As shown in Fig. 1A and B, the gene order from *PPP2R2C* to *MSX1* covering the critical region is conserved between cattle and human. In this region, the human genome database GRL (<http://grl.gi.k.u-tokyo.ac.jp>; ref. 34) disclosed four genes (*CRMP1*, *EVC*, *C4orf6*, and *HSA250839*) and six human UniGene clusters (Hs.256259, Hs.257022, Hs.87306, Hs.192146, Hs.133062, and Hs.122053; Fig. 1B). We examined the expression of these possible candidate genes in long bones of fetal calves with RT-PCR and/or Northern hybridization. Among them, *EVC* and bovine expressed sequence tag AW345074 (designated *geneX*), an ortholog of Hs.87306, were expressed in long bones of fetal calves (data not shown), suggesting that these two genes were the most potent candidate genes for BCD. No causative mutation was found, however, in the bovine *EVC* gene by sequencing the entire coding region of the gene of affected animals (data not shown).

To characterize the complete coding sequence of *geneX*, we isolated two clones from a bovine fetal long bone cDNA library with AW345074 as a probe, covering a 1,775-bp region of *geneX* containing a poly(A)⁺ tail but not the 5' region of the coding sequence. As of April 1, 2001, the University of California Santa Cruz (UCSC) human genome database (<http://genome.ucsc.edu>) located three predicted exons C4000112, C4000113, and C4000114 upstream of Hs.87306, a human ortholog of *geneX*.

We confirmed that the three predicted exons were included in human *geneX* transcript with RT-PCR by using human kidney RNA (data not shown). Bovine sequences corresponding to C4000112, C4000113, and C4000114 were determined by shotgun sequencing of bovine BAC 162M16 and 232M6. Primers for amplifying the 5' region of the cDNA were designed from these sequences. The nucleotide sequences of the RT-PCR products using these primers allowed reconstruction of a 5,759-base transcript containing a putative 3630-base ORF (position 1686–5315). *geneX* encoded a protein consisting of 1209 amino acids (see Fig. 6, which is published as supporting information on the PNAS web site, www.pnas.org). To determine the genomic structure of the gene, we sequenced bovine BAC 232M6 and 162M16 using primers designed from the cDNA sequence and identified that the gene consists of 22 exons (Fig. 1C). The human and mouse orthologs also were isolated by a combination of cDNA cloning, RT-PCR, and RACE. The human and mouse *geneX* encode 1,228 amino acids with 78.7% homology, and 1,220 amino acids with 68.4% homology with bovine *geneX*, respectively (Fig. 6). The SMART (29) and PSORTII (30) program searches suggested that a putative transmembrane domain, two coiled-coil domains, and three nuclear localization signals were conserved between cattle, human, and mouse genes (Fig. 6).

Identification of Two Mutations in the Gene. We examined the expression of *geneX* in the long bones of normal and affected calves using RT-PCR; there was no qualitative difference observed (data not shown). Expression of *geneX* was not detected by Northern hybridization, probably because of the low level of expression (data not shown).

To determine whether mutations in *geneX* cause BCD, we

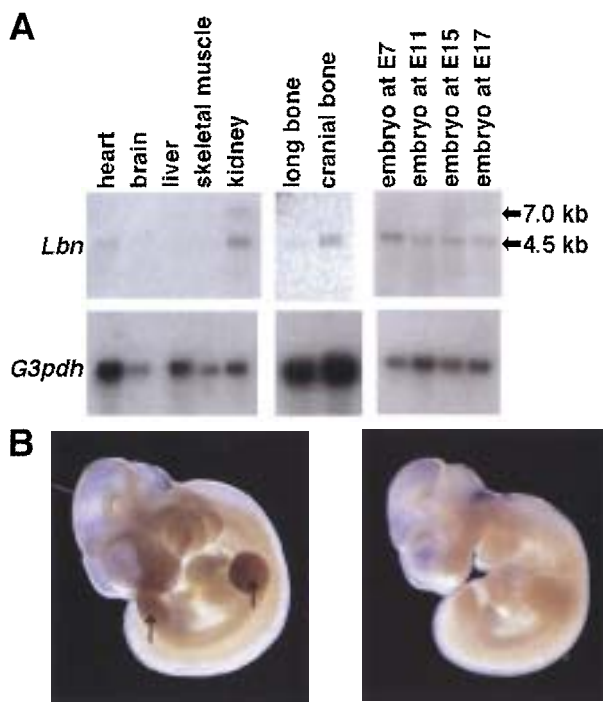


Fig. 4. *Lbn* expression in mouse tissues. (A) Northern blot analysis. An ≈ 4.5 -kb *Lbn* mRNA can be seen in heart and kidney in adult, long bone, and cranial bone at P14 and whole embryos at all stages tested. An additional ≈ 7.0 -kb band is faintly visible in kidney. (Lower) Loading controls with a *G3pdh* probe. (B) Whole-mount *in situ* hybridization with *Lbn* antisense probe (Left) and sense probe as a control (Right). A definite signal is observed in fore- and hindlimb buds (arrow), branchial arches, and facial primordia. The magnification is $\times 12.5$.

compared the nucleotide sequences of *geneX* between normal and affected calves, and identified two distinct mutations in the affected calves. One mutation was a 56-base deletion at position 1355–1410 in exon 11 (Fig. 3A). The deletion caused a frameshift and a premature termination at codon 464, resulting in a 62% shortened protein. Comparison of the genomic sequence of the region between the affected and normal calves revealed no differences in the nucleotide sequence except for a C to T transition at position 1356 (C1356T; Fig. 3B). Remarkably, the C1356T mutation created a cryptic splice donor site in exon 11 (AAGGT¹³⁵⁶GAGC) that substituted for the authentic splice donor site and led to improper splicing at position 1355, resulting in the 56-base RNA deletion between 1355 and 1410. The second mutation was a CA to G substitution at position 2054–2055 (2054–2055delCAinsG; Fig. 3C). The substitution also caused a frameshift and a premature termination at codon 706, resulting in a 42% shortened protein. We confirmed the CA to G substitution in the genomic DNA of the affected calves.

To confirm whether the mutations cosegregate with the phenotype and whether these two mutations are distinct alleles of the gene, we performed a direct sequencing analysis of all affected and unaffected animals of the pedigree as well as animals of unrelated populations (see Table 1, which is published as supporting information on the PNAS web site). All 119 affected calves were either homozygous for 2054–2055delCAinsG or compound heterozygous for C1356T and 2054–2055delCAinsG. The two sires of the affected offspring were carriers of 2054–2055delCAinsG, and the dams were carriers of either of the two mutations. The result was consistent with that of the haplotype analysis (Fig. 2). All 187 unaffected relatives

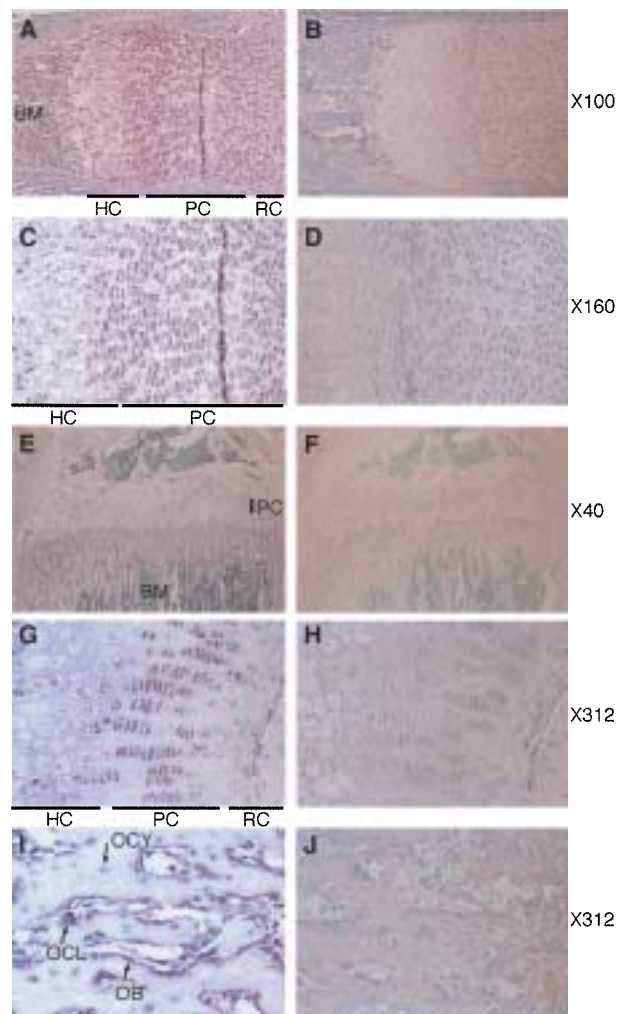


Fig. 5. *Lbn* expression in mouse long bones. *In situ* hybridization with *Lbn* antisense probe (Left) and sense probe as a control (Right). (A–D) Mouse tibia at E17. *Lbn* is expressed strongly in proliferating chondrocytes and weakly in other resting and hypertrophic chondrocytes in the epiphyseal growth plates. (E–J) Mouse tibia at P35. *Lbn* is expressed strongly in proliferating chondrocytes in the epiphyseal growth plates, osteoblasts, and osteoclasts and weakly in osteocytes in the metaphysis. RC, resting chondrocytes; PC, proliferating chondrocytes; HC, hypertrophic chondrocytes; OB, osteoblasts; OCL, osteoclasts; OCY, osteocytes; BM, bone marrow. The magnification is shown on the right.

had one or two chromosomes carrying the wild-type allele. Furthermore, no mutation was observed in 201 animals of the unrelated populations (106 calves of Holstein and 95 calves of Japanese black cattle), confirming that these mutations are specific to the disease. These data provide strong evidence that both mutations are distinct alleles of *geneX* and are responsible for BCD. We designated this gene *LIMBIN* (*LBN*), because the BCD disorder was characterized as the formation of short limbs.

Expression of Mouse *Lbn*. We examined the expression of the *Lbn* gene in mouse tissues to evaluate the potential roles of the gene in the development of long bone. Northern blot analysis revealed that *Lbn* was expressed as an ≈ 4.5 -kb mRNA in long bone, cranial bone, kidney, heart, and embryos at E7, E11, E15, and E17 (Fig. 4A). Whole-mount *in situ* hybridization showed that *Lbn* was expressed in fore- and hindlimb buds, branchial arches, and facial primordia at the limb bud formation stage, E11 (Fig. 4B), suggesting

that *Lbn* has a role in early embryonic morphogenesis as well. *In situ* hybridization analysis using mouse tibia at E17 revealed that mouse *Lbn* was strongly expressed in proliferating chondrocytes, and weakly in other resting and hypertrophic chondrocytes in the epiphyseal growth plates (Fig. 5 A and C). At P35, *Lbn* also was expressed in proliferating chondrocytes, but not in resting and hypertrophic chondrocytes (Fig. 5 E and G). In the metaphysis, the expression was observed strongly in osteoblasts and osteoclasts on the bone surface and weakly in osteocytes (Fig. 5I). These data implicate involvement of the *Lbn* gene in the formation and growth of long bones.

Discussion

In the present study, we identified the gene *LBN* as a causative gene for BCD. This conclusion is supported by the following evidence: (i) the position of the *LBN* gene on cattle chromosome, (ii) two frameshift mutations causing 62% and 42% deletion of the *LBN* protein, (iii) the perfect cosegregation of the mutations with the phenotype, and (iv) expression of *LBN* in the limb buds and growth plate chondrocytes. Although the function of *LBN* remains unknown, *LBN* should have essential roles for a skeletal development.

Mouse *Lbn* was strongly expressed in the proliferating chondrocytes in mouse tibia (Fig. 5 C and G). Several ligands and their receptors, including Indian hedgehog, PTH-related peptide, PTH/PTH-related peptide receptor, fibroblast growth factor receptor 3, and others are expressed in proliferating and/or prehypertrophic chondrocytes and regulate chondrocytic proliferation and differentiation that are critical to bone morphogenesis (35–38). In addition, extracellular matrix proteins such as proteoglycan and collagen have important roles in normal bone development (1–3, 39). As long bones of the affected animals show a disturbance in chondrocytic differentiation and abnormal formation of cartilaginous matrix (17), the loss of function of *LBN* might have a direct or indirect effect on proliferating chondrocytes through interactions with these factors and disturb a proper differentiation to hypertrophic chondrocytes to form a proper cartilaginous matrix. Moreover, the

expression of mouse *Lbn* was observed in cranial bone, osteoblasts, osteoclasts, osteocytes, and kidney (Figs. 4A and 5I), suggesting that *Lbn* has a role in osteogenesis and/or Ca^{2+} homeostasis as well.

LBN might have a positional relation to *EVC*. *LBN* and *EVC* genes are both responsible for short-limb disorder (22) and are arranged in a head-to-head configuration in cattle, human, and mouse, with transcription-start sites separated by 1,869 and 1,754-bp in human and mouse, respectively. In addition, *LBN* and *EVC* genes have similar expression patterns. Ruiz-Perez *et al.* (22) reported that *EVC* is expressed in human fetal tissues including developing bone, heart, kidney, and lung at Carnegie stages 19 and 21. We also demonstrated that mouse *Lbn* is expressed in developing bone and adult heart and kidney (Fig. 4A). Because of the contiguous genomic organization and similarity of expression patterns, both genes might be coexpressed and coregulated by common sequences within the intervening region. Kunte *et al.* (40) reported that *UFDIL* and *CDC45L* genes expressed in limb buds and pharyngeal arches are arranged in a head-to-head configuration, and an 884-bp intervening region could direct bidirectional transcription activation of both genes in a neural crest-derived cell line.

LBN is a gene involved in bone formation and shows no structural homology with any other known gene. Future studies of *LBN*, both *in vivo* and *in vitro*, and further pathological examination of BCD will provide new insight into the complex biological processes of mammalian skeletal development.

We thank the Kumamoto Federation of Agricultural Mutual Aid Association and the Japan Registry Association of Akaushi for collecting samples and pedigree data; H. Tsukazawa, K. Maruyama, and Y. Nishijima for technical assistance; S. Miura for assistance in whole-mount *in situ* hybridization; N. E. Cockett for *fgfr3* primers; and K. Hara, M. Agaba, A. Takasuga, T. Watanabe, and S. Hirotsune for insightful suggestions. This work was supported in part by grants from the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation (to Y.S.), the Agriculture and Livestock Industries Corporation (to Y.S.), the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (to T.K.), and the Livestock Improvement Association of Japan, Inc. (to T.K.).

- Lee, B., Vissing, H., Ramirez, F., Rogers, D. & Rimoin, D. (1989) *Science* **244**, 978–980.
- Vissing, H., D'Alessio, M., Lee, B., Ramirez, F., Godfrey, M. & Hollister, D. W. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 18265–18267.
- Warman, M. L., Abbott, M., Apte, S. S., Hefferon, T., McIntosh, I., Cohn, D. H., Hecht, J. T., Olsen, B. R. & Francomano, C. A. (1993) *Nat. Genet.* **5**, 79–82.
- Foster, J. W., Dominguez-Steglich, M. A., Guoli, S., Kowk, G., Weller, P. A., Stevanovic, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I. D., Goodfellow, P. N., *et al.* (1994) *Nature (London)* **372**, 525–530.
- Hastbacka, J., de la Chapelle, A., Mahtani, M. M., Clines, G., Reeve-Daly, M. P., Daly, M., Hamilton, B. A., Kusumi, K., Trivedi, B., Weaver, A., *et al.* (1994) *Cell* **78**, 1073–1087.
- Karaplis, A. C., Luz, A., Glowacki, J., Bronson, R. T., Tybulewicz, V. L., Kronenberg, H. M. & Mulligan, R. C. (1994) *Genes Dev.* **8**, 277–289.
- Rousseau, F., Bonaventure, J., Legeai-Mallet, L., Pelet, A., Rozet, J. M., Maroteaux, P., Le Merrer, M. & Munnich, A. (1994) *Nature (London)* **371**, 252–254.
- Shiang, R., Thompson, L. M., Zhu, Y. Z., Church, D. M., Fielder, T. J., Bocian, M., Winokur, S. T. & Wasmuth, J. J. (1994) *Cell* **78**, 335–342.
- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Bricarelli, F. D., Keutel, J., Hustert, E., *et al.* (1994) *Cell* **79**, 1111–1120.
- Watanabe, H., Kimata, K., Line, S., Strong, D., Gao, L. Y., Kozak, C. A. & Yamada, Y. (1994) *Nat. Genet.* **7**, 154–157.
- Bellus, G. A., McIntosh, I., Smith, E. A., Aylsworth, A. S., Kaitila, I., Horton, W. A., Greenhaw, G. A., Hecht, J. T. & Francomano, C. A. (1995) *Nat. Genet.* **10**, 357–359.
- Briggs, M. D., Hoffman, S. M., King, L. M., Olsen, A. S., Mohrenweiser, H., Leroy, J. G., Mortier, G. R., Rimoin, D. L., Lachman, R. S., Gaines, E. S., *et al.* (1995) *Nat. Genet.* **10**, 330–336.
- Hecht, J. T., Nelson, L. D., Crowder, E., Wang, Y., Elder, F. F., Harrison, W. R., Francomano, C. A., Prange, C. K., Lennon, G. G., Deere, M., *et al.* (1995) *Nat. Genet.* **10**, 325–329.
- Schipani, E., Kruse, K. & Juppner, H. (1995) *Science* **268**, 98–100.
- Tavormina, P. L., Shiang, R., Thompson, L. M., Zhu, Y. Z., Wilkin, D. J., Lachman, R. S., Wilcox, W. R., Rimoin, D. L., Cohn, D. H. & Wasmuth, J. J. (1995) *Nat. Genet.* **9**, 321–328.
- Moritomo, Y., Ishibashi, T., Ashizawa, H. & Shibata, T. (1989) *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* **42**, 173–177.
- Moritomo, Y., Ishibashi, T. & Miyamoto, H. (1992) *J. Vet. Med. Sci.* **54**, 453–459.
- Julian, L. M., Tyler, W. S. & Gregory, P. W. (1959) *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **135**, 104–109.
- Weaver, A. D. (1975) *Vet. Ann.* **15**, 7–9.
- Yoneda, K., Moritomo, Y., Takami, M., Hirata, S., Kikukawa, Y. & Kunieda, T. (1999) *Mamm. Genome* **10**, 597–600.
- Hwang, S. J., Beaty, T. H., McIntosh, I., Hefferon, T. & Panny, S. R. (1998) *Am. J. Med. Genet.* **75**, 419–423.
- Ruiz-Perez, V. L., Ide, S. E., Strom, T. M., Lorenz, B., Wilson, D., Woods, K., King, L., Francomano, C., Freisinger, P., Spranger, S., *et al.* (2000) *Nat. Genet.* **24**, 283–286.
- Takeda, H., Yamakuchi, H., Ihara, N., Hara, K., Watanabe, T., Sugimoto, Y., Oshiro, T., Kishine, H., Kano, Y. & Kohno, K. (1998) *Anim. Genet.* **29**, 216–219.
- Ogilvie, D. J. & James, L. A. (1995) in *YAC Protocols*, ed. Markie, D. (Humana, Totowa, NJ), pp. 131–138.
- Kijas, J. M., Fowler, J. C., Garbett, C. A. & Thomas, M. R. (1994) *Biotechniques* **16**, 656–662.
- Hirano, T., Nakane, S., Mizoshita, K., Yamakuchi, H., Inoue-Murayama, M., Watanabe, T., Barendse, W. & Sugimoto, Y. (1996) *Anim. Genet.* **27**, 365–368.
- Coppieters, W., Kvasz, A., Farnir, F., Arranz, J. J., Grisart, B., Mackinnon, M. & Georges, M. (1998) *Genetics* **149**, 1547–1555.
- Takasuga, A., Hirotsune, S., Itoh, R., Jitohzono, A., Suzuki, H., Aso, H. & Sugimoto, Y. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, E108.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. P. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5857–5864.
- Nakai, K. & Horton, P. (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 34–36.
- Conlon, R. A. & Rossant, J. (1992) *Development (Cambridge, UK)* **116**, 357–368.
- Ikegawa, M., Ishibashi, O., Yoshizawa, T., Shimomura, J., Komori, T., Ozawa, H. & Kawashima, H. (2001) *J. Bone Miner. Res.* **16**, 24–32.
- Womack, J. E., Johnson, J. S., Owens, E. K., Rexroad, C. E., 3rd, Schlapfer, J. & Yang, Y. P. (1997) *Mamm. Genome* **8**, 854–856.
- Honkura, T., Ogasawara, J., Yamada, T. & Morishita, S. (2002) *Nucleic Acids Res.* **30**, 221–225.
- Amizuka, N., Warshawsky, H., Henderson, J. E., Goltzman, D. & Karaplis, A. C. (1994) *J. Cell Biol.* **126**, 1611–1623.
- Deng, C., Wynshaw-Boris, A., Zhou, F., Kuo, A. & Leder, P. (1996) *Cell* **84**, 911–921.
- Lanske, B., Karaplis, A. C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L. H., Ho, C., Mulligan, R. C., *et al.* (1996) *Science* **273**, 663–666.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M. & Tabin, C. J. (1996) *Science* **273**, 613–622.
- Chintala, S. K., Miller, R. R. & McDevitt, C. A. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, 180–186.
- Kunte, A., Ivey, K., Yamagishi, C., Garg, V., Yamagishi, H. & Srivastava, D. (2001) *Mech. Dev.* **108**, 81–92.

High-resolution genetic map of bovine chromosome 29 through focused marker development

K.M. Reed,^a N. Ihara,^c P. Mariani,^a K.M. Mendoza,^a L.E. Jensen,^a R. Bellavia,^a F.A. Ponce de León,^b G.L. Bennett,^d Y. Sugimoto^c and C.W. Beattie^e

Departments of ^aVeterinary PathoBiology and ^bAnimal Science, University of Minnesota, St. Paul MN (USA);

^cShirakawa Institute of Animal Genetics Odakura, Nishigo, Nishi-shirakawa, Fukushima (Japan);

^dUSDA, ARS, U.S. Meat Animal Research Center, Clay Center NE; and

^eDepartment of Animal Biotechnology, University of Nevada, Reno NV (USA)

This article is dedicated to Professor Karl Fredga to commemorate his retirement and lifelong cytogenetic research activities.

Abstract. Chromosome-specific libraries aid in the development of genetic maps and focus marker development in areas of the genome with identified quantitative trait loci (QTL). A small-insert BTA29 library constructed by microdissection of a 1:29 Rb-fusion cell line, was screened for dinucleotide repeats (CA)₁₅ and/or (GA)₁₅ with the goal of generating new genetic markers for this, the smallest bovine autosome. A total of 90 primer pairs were designed and 82 of these successfully amplified bovine genomic DNA by PCR. In addition to these 82 loci, primer pairs were developed for nine putative genes identified from the sequenced clones by BLAST searches of GenBank. A somatic cell panel was used to test for synteny of the new loci

with two previously mapped BTA29 markers located on the MARC bovine linkage map. A total of 75 of the 82 microsatellite (ms) loci were integrated into the MARC bovine linkage map. Linkage analysis placed 69 ms markers on BTA29, five on BTAX and one on BTA1. Combined results of the somatic cell and linkage analyses place 79 new markers (ms and gene-related) on BTA29, six loci on BTAX and two loci on BTA1. The results of this effort significantly increase the marker density on BTA29, expanding the ability to fine map QTL associated with this chromosome.

Copyright © 2002 S. Karger AG, Basel

The identification and localization of genes that regulate important production traits (quantitative trait loci, QTL) are key objectives in livestock genomics. Identification of several economically important traits (QTLs) reduces whole-genome screening to the analysis of smaller regions of specific chromo-

somes through focused marker development (Alexander et al., 1997; Riquet et al., 1999) and fine mapping to identify possible candidate genes (Taylor et al., 1998). Once regions are fine mapped with genetic markers such as microsatellites (ms), contigs (continuous overlapping clones) of large genomic inserts (YAC, BAC, and/or P1 clones) can be constructed that cover the chromosome region where the trait has been assigned. This candidate clone set then provides the resource for fine mapping and gene isolation. This process can now be accelerated through comparative genomic approaches. For example, candidate genes can now be identified based on homology with the human genome sequence.

One means of focused marker development is to use chromosome or chromosome region-specific libraries. DNA libraries generated by chromosome flow sorting or microdissection provide a rich source of markers for specific chromosomes.

Supported by a grant from the USDA-NRIGP, the Japan Livestock Technology Association and the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

Received 5 November 2001; revision accepted 19 February 2002.

Request reprints from Dr. Kent M. Reed

Department of Veterinary PathoBiology, 295 ASVM, 1988 Fitch Ave
University of Minnesota, St Paul, MN 55108 (USA)
telephone: (612) 624-1287; fax: (612) 625-0204; e-mail: reedx054@tc.umn.edu

Request reprints from Dr. C.W. Beattie Department of Animal Biotechnology

University of Nevada, Reno NV 89557 (USA); telephone: (1+) 775-784-6135
e-mail: cbeattie@cabnr.unr.edu

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2002 S. Karger AG, Basel
0301-0171/02/0964-0210\$18.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/journals/cgr

Zhao et al. (1999) recently reported 22 new markers from a microdissected library of porcine chr 6 (SSC6) and Wang et al. (2000) isolated 31 markers from an SSC8 library. Recently, Ambady et al. (2001) isolated 17 new ms markers from a BTA11-specific library and Liu et al. (in press) obtained 34 new ms markers from a BTAY library. Here we report on the isolation and mapping of new markers from a bovine chromosome 29 (BTA29) library prepared by microdissection. Our goal was to substantially increase the number of linked markers on BTA29, the smallest bovine autosome.

Materials and methods

The bovine chromosome 29 library was constructed by microdissection of a 1:29 Rb-fusion cell line as described in Ambady et al. (1997, 2001). The λ -ZAP library was plated at ~5,000 pfu per 150-mm LB plate and grown overnight at 37 °C. The resulting plaques were transferred to nylon membranes, denatured, neutralized and UV-fixed for screening by hybridization to ³²P-labeled probes. Filters were prehybridized at 65 °C for 2 h in 10 ml of hybridization buffer and hybridized overnight at 65 °C in 5 ml of the same hybridization solution (minus blocking DNA) with 5 × 10⁶ cpm each of end-labeled (GA)₁₅ and (TG)₁₅. After hybridization, filters were washed in 2× SET, 0.5% SDS 2 × 15 min at 60 °C, rinsed briefly in room temperature 2× SSC and exposed to autoradiographic film. Agarose plugs containing positive phage clones were removed from the original plates and the associated phage eluted in 200 µl SM buffer. These primary clones were replated on 100-mm LB plates at a density of 50–100 plaques per plate. The resulting plaques were transferred to nylon membranes as described above and rescreened with the (GA)₁₅ and (TG)₁₅ probes. After hybridization, individual positive clones (2 per plate) were picked and eluted into 50 µl SM buffer.

The inserts of positive secondary clones were amplified from the phage/SM stock by PCR. Each reaction contained as template 5 µl of eluted phage, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 pmol each primer (T3 and T7 flanking primers), 100 µM dNTP, and 0.35 U Taq polymerase (Qiagen, Inc). Amplifications were performed under the following reaction conditions: 15 min at 94 °C; 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 58 °C, 30 s at 72 °C; and a final extension of 5 min at 72 °C. PCR products were resolved on 2% agarose gel. Sequencing templates were prepared from the PCR product with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Inc) and sequenced with an automated DNA sequencer (ABI 377) using vector-specific primers. DNA sequences were manually edited with Sequencher software (Gene Codes Corp.) and queried against GenBank by BLAST searching. All sequences were deposited in GenBank (Accession

numbers AF271898–AF271987). Oligonucleotide primers corresponding to sequences flanking the dinucleotide (dn) repeats were designed interactively with Primer v.3. Four sires of the MARC mapping family were screened for locus heterozygosity.

A bovine-hamster somatic cell-hybrid panel (provided by J.E. Womack) was used to test for synteny of the newly developed markers with mapped BTA29 loci. Thirty-one hybrid clones were scored for the presence or absence of two microsatellite loci assigned to BTA29 (BMC2228 and BMC3224, Kappes et al., 1997) and each of the new loci. Amplification patterns of the new markers were compared with those of the mapped loci and synteny was determined based on the correlation coefficient as described by Chevalet and Corpet (1986). Heterozygous markers were used to genotype the MARC mapping family at the Shirakawa Institute. Briefly, loci were amplified by means of PCR using fluorescent labeled primers, alleles were resolved by electrophoresis in polyacrylamide gels using an ABI PRISM 3700 DNA analyzer and genotype data were captured by means of GENESCAN and GENOTYPER software (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

The linkage map reported by Kappes et al. (1997) was used as a starting point for inserting new markers. Two-point lod scores (>3.0) were used to place markers on a linkage group. Multi-point linkage analysis (CRI-MAP v2.4; Green et al., 1990) was used to position markers linked to BTA29. The CHROMPIC option was used to identify unlikely double crossovers so that these genotypes could be checked for possible errors.

Results

A primary screen of 150,000 clones yielded 1200 isolates. Over half of these isolates were plated and secondarily screened to recover single isolated clones. DNA sequences were determined for 458 positive clones. From these, a total of 90 primer pairs were designed and 82 of these successfully amplified bovine genomic DNA by PCR (Table 1). Primer information for each of these loci is included in Table 2. Approximately 80% (65 of 82) of the loci were polymorphic in the four sires of the MARC mapping family. The number of alleles per locus ranged from one to five with an average of 2.5. Only seven of the 82 (8.5%) new ms loci were either not polymorphic in the four sires, or could not be mapped by linkage. In addition to the 82 microsatellite loci, primer pairs were developed for nine putative gene loci obtained from the library (Table 3).

Table 1. Summary of statistical analyses for synteny and linkage. For each locus, the results of SCP analysis (correlation coefficient for probability of synteny [ϕ , Chevalet and Corpet, 1986] with BTA29 markers BMC2228 and BMC3224) and linkage statistics are included. NS indicates loci that could not be scored (positive results for hamster and mouse samples) and E denotes loci where the values of ϕ were out of range of the test statistic (negative values)

Locus	SCP Analysis		Linkage Analysis						BTA assignment
	Φ_{2228}	Φ_{3224}	Inform. meioses	Phase known	Position cM	2pt LODs	2pt marker	2pt recomb	
MNB-93	0.8581	0.8673	256	125	24.1	52.05	RM179	0.02	29
MNB-94	0.7984	0.8578	87	53	3.7	16.78	BMS1857	0.03	29
MNB-95	0.6533	0.7964	333	126	56.7	76.67	BMC6004	0.01	29
MNB-96	0.7984	0.8578	208	135	27.5	42.83	BMS1600	0.01	29
MNB-97	0.6546	0.7399	246	170	17.6	54.71	BMS1787	0.01	29
MNB-98	0.7486	0.7285	3	0					29 ^a
MNB-99	0.7715	0.8086	177	49	29.9	33.97	BMS1600	0.02	29
MNB-100	0.7895	0.9304	209	143	8.0	46.33	BMS764	0.02	29
MNB-101	0.7678	0.8048	149	95	62.8	23.00	BMS1948	0.04	29
MNB-102	0.2624	0.2607	128	118		5.80	XB701	0.10	X ^b
MNB-103	0.8048	0.8757	285	208	29.2	59.58	BMS1600	0.01	29
MNB-104	0.7048	1	301	237	18.6	73.31	BMS1787	0.00	29
MNB-105	0.6589	0.8757	259	209	38.9	74.96	DIK094	0.00	29
MNB-106	0.8581	0.9304	260	178	3.8	59.61	BMS1244	0.02	29

Table 1 (continued)

Locus	SCP Analysis		Linkage Analysis						BTA assignment
	Φ_{2228}	Φ_{3224}	Inform. meioses	Phase known	Position cM	2pt LODs	2pt marker	2pt recomb	
MNB-107	0.8018	0.9337	227	106	20.3	50.63	BMS1787	0.03	29
MNB-108	0.7094	0.8701	173	119	27.5	28.19	RM044	0.05	29
MNB-109	0.6998	0.8000	271	182	35.8	56.59	BMS2149	0.00	29
MNB-110	0.7048	1	252	173	42.3	49.94	BL1100	0.03	29
MNB-111	0.6085	0.9365	163	80	21.1	39.33	RM044	0.01	29
MNB-112	0.3206	0.4110	224	214		25.49	XBM7	0.10	X ^b
MNB-113	0.6018	0.7285	223	50	33.4	33.21	BMS1600	0.06	29
MNB-114	0.8581	0.9304	335	201	26.5	76.11	BMS1600	0.01	29
MNB-115	0.7048	1	61	19	32.9	11.35	RM044	0.07	29
MNB-116	0.8604	0.8701	192	26	28.3	34.88	BMS1600	0.03	29
MNB-117	0.8048	0.8757	no data						29 ^a
MNB-121	0.6086	0.9365	302	241	20.3	62.12	RM179	0.02	29
MNB-122	0.7526	0.9365	239	128	46.2	55.40	BL1100	0.01	29
MNB-123	0.7048	1	228	176	38.5	39.02	RM040	0.07	29
MNB-124	0.7048	1	166	44	30.3	24.06	BMS1600	0.04	29
MNB-125	0.6086	0.9365	297	205	17.2	64.52	BMS1787	0.02	29
MNB-126	0.7526	0.9365	14	9	48.7	3.61	RM389	0.00	29
MNB-127	0.7526	0.9365	327	204	31.5	60.77	BMS1600	0.04	29
MNB-128	0.3671	0.7427	195	144	33.3	23.91	BMS1600	0.08	29
MNB-129	0.7048	1	no data						29 ^a
MNB-130	0.4062	0.5398	180	91	26.5	46.41	RM044	0.01	29
MNB-131	0.6193	0.8787	302	195	10.1	70.48	BMS764	0.01	29
MNB-132	0.7048	1	no data						29 ^a
MNB-133	0.1548	0.1158	142	131		7.70	XBM84	0.17	X ^b
MNB-134	0.1712	0.0262	300	217	48.7	61.43	BL1100	0.03	29 ^b
MNB-135	0.8604	0.8134	285	151	48.7	53.36	BL1100	0.04	29
MNB-136	0.7048	1	256	192	35.8	47.56	BMS2149	0.00	29
MNB-137	NS	NS	0	0					unknown
MNB-138	0.7048	1	306	130	50.5	57.69	URB011	0.04	29
MNB-139	0.7048	1	310	210	38.5	69.41	RM040	0.00	29
MNB-140	0.7048	1	256	107	36.4	49.16	RM040	0.03	29
MNB-141	0.7048	1	162	83	59.2	39.74	BMS1948	0.00	29
MNB-142	0.7048	1	282	205	6.7	58.38	BMS1244	0.04	29
MNB-143	0.7048	1	300	175	42.3	66.60	HH22	0.01	29
MNB-144	0.7048	1	332	268	13.9	66.41	MB107	0.03	29
MNB-145	0.7048	1	205	94	32.9	31.18	BMS1600	0.05	29
MNB-146	0.3258	0.5375	no data						unknown
MNB-147	0.7048	1	191	65	19.7	40.38	RM044	0.03	29
MNB-148	0.7048	1	246	181	29.2	37.90	BMC8012	0.08	29
MNB-149	0.7048	1	127	82	32.2	22.49	RM044	0.07	29
MNB-150	0.7048	1	148	75	27.2	33.59	BMS1600	0.01	29
MNB-151	0.7048	1	302	215	59.5	59.88	BMS1948	0.02	29
MNB-152	E	E	326	68		70.04	BMS4000	0.03	1
MNB-153	0.7048	1	40	0	5.2	8.29	ILSTS057	0.05	29
MNB-154	0.7048	1	211	30	27.3	50.57	BMS1600	0.00	29
MNB-155	0.7048	1	288	148	47.5	57.64	BL1100	0.02	29
MNB-156	E	E	no data						unknown
MNB-157	0.7048	1	289	206	10.1	65.69	BMS764	0.02	29
MNB-158	0.6086	0.9365	304	225	10.1	69.80	BMS764	0.01	29
MNB-159	0.7048	1	232	122	26.5	46.27	BMS1600	0.02	29
MNB-160	0.7048	1	200	104	21.1	43.96	RM044	0.02	29
MNB-161	0.7048	1	288	139	47.9	55.91	BL1100	0.04	29
MNB-162	0.6086	0.9365	275	192	29.2	56.04	BMS1600	0.01	29
MNB-163	0.7048	1	196	77	6.7	33.64	BMS1244	0.06	29
MNB-164	0.7048	1	272	88	27.2	64.51	BMS1600	0.01	29
MNB-165	0.3671	0.4765	270	212		39.92	BM4604	0.07	X ^b
MNB-166	0.7048	1	161	55	32.2	32.07	RM044	0.04	29
MNB-167	0.7048	1	350	223	54.0	95.46	URB011	0.00	29
MNB-168	0.5130	0.8757	327	204	31.5	62.18	BMS1600	0.04	29
MNB-169	0.6086	0.9365	262	92	24.1	50.65	RM179	0.02	29
MNB-170	0.7526	0.9365	69	45	42.3	11.74	DIK094	0.00	29
MNB-171	0.6086	0.9365	304	213	23.4	72.37	RM179	0.00	29
MNB-172	0.7526	0.9365	325	247	49.3	53.28	URB011	0.07	29
MNB-173	0.3311	0.4330	299	237		59.50	XBM16	0.04	X ^b
MNB-174	0.6606	0.9372	303	207	42.3	69.23	BL1100	0.02	29
MNB-204	0.7048	1	173	115	21.1	39.40	BMS1787	0.02	29
MNB-205	0.7048	1	109	55	32.9	17.92	RM044	0.07	29
MNB-206	0.7048	1	317	194	39.5	69.72	DIK094	0.00	29

^a Chromosome assignment based only on SCP analysis.

^b Chromosome assignment based only on linkage analysis.

Table 2. Locus information. The GenBank accession number, primer sequences, type and length of repeat, TM (PCR annealing temperature) of the primers, and observed product size (bp) are given for each locus

Locus	GenBank Accession no.	Forward primer	Reverse primer	Type/length	PCR TM	Product length (bp)
MNB-93	AF271898	GGTATAGGTTCTCTGAGTGC	TGGCAATAAAGTTGTGTATC	(CA) ₁₇ imperfect	55	149–177
MNB-94	AF271899	ACTTTCAGGCAAGAGTACTGG	CCCATTATGTTAGCCCTTGTG	(CA) ₁₃	55	154–156
MNB-95	AF271900	CTCTGAGTCAGGGCTAAGGATG	AAGTGGAAATGGGTAGGTTG	(CA) ₁₅	55	141–161
MNB-96	AF271901	CCCCTTCTGGAGGAAATGC	GCAGGGTTTTCAGCAGGTAG	(CA) ₁₃ + (CA) ₁₃	55	148–182
MNB-97	AF271902	GGAGGTAAAGAAGAGCTGGAG	CAAGCAGGACTGACAAGTATGC	(TG) ₂₈₊	55	144–162
MNB-98	AF271903	AGACCAAGCAGAAGACCATAACC	ATATACGCCCATTGCTGTCTAC	(CA) ₉	55	133–137
MNB-99	AF271904	TGACTCTCTTTCTTCTGATTC	TGTTGTTAACTGTACTAACCCTACCC	(CA) ₁₅	52	186–190
MNB-100	AF271905	ATGGGGTCGCAAGAGTCTGAG	ACACAAGGGTGGCATTCTAATC	(CA) ₁₅	55	97–119
MNB-101	AF271906	TTAAGAAGTATCTGCGTTTGG	AAGAATGAATGGTGCCAGAAAG	(CA) ₁₆	55	148–164
MNB-102	AF271907	ACAGGACCCGAGCAACTGAGTC	ACATGCCAGACATGGGTCTAAG	(CA) ₁₄	55	130–140
MNB-103	AF271908	GTTACCTTGGACCTTCATGC	GAGGTCAATTTAGCTAGGATGC	(CA) ₁₈	55	140–155
MNB-104	AF271909	GAGAACACAGTGGGTAGAAGC	CAAGGTGTGGGGGATTG	(CA) ₁₃	55	166–179
MNB-105	AF271910	AGGCTTCCAGAAGTGAAGAGG	CTGTGTGCTCCATGTACGAG	(TG) ₂₀	55	135–147
MNB-106	AF271911	GGAAACAGTTAGAACCAGACAGG	CAGACACAAGTGTAGTAACTGAGTG	(TG) ₁₉	55	162–180
MNB-107	AF271912	TAAGGAGTCGGACAGGACTCAG	GGAACTCTCTTAGCAAAATCAAC	(CA) ₁₄	55	149–159
MNB-108	AF271913	CGAGCTCCGGTAGGTATATGTG	TGGTCAGACACAGAAAAGAGAC	(TG) ₂₀	55	131–141
MNB-109	AF271914	GTAACGTGATTTAGGGAACCTGG	TGGAATTTAAGCTCTGACAGTTG	(TG) ₁₆	55	180–206
MNB-110	AF271915	ACCTCGGTGTGAATATCTTCTG	GAGCAACAATGAAGAACAATCA	(TG) ₁₂	55	142–154
MNB-111	AF271916	ATGGAATCTCAGAAAACCTTGC	AAGTGTAAAGCAAAGTATTCAAGC	(TA) ₅ + (GT) ₁₂	55	123–135
MNB-112	AF271917	ACACCTAATCATATGTGATTTGGAAG	CCACCAAGAAGGTATAGTAAAC	(GT) ₂₀	55	158–178
MNB-113	AF271918	GGACATGATTGAAGTAACTGAGC	GGATGTCTTTGTGTGCATGTAG	(CA) ₁₂	55	164–168
MNB-114	AF271919	GTCTCGGCATTCTCTAAACTTG	AGCAACTGAGCAAAATAAACAC	(TG) ₂₁	55	138–180
MNB-115	AF271920	ACTCCAGGTGGTTGCAAGG	AAGCAATTAATAATTAGTACTATC	(CA) ₁₂	55	100–106
MNB-116	AF271921	TGCTTGAGTAGGCTAGAGTTCAC	CGTCTCATTAGTCTCTTAACC	(CA) ₁₅	60	168–190
MNB-117	AF271922	AATTGAGCATAGTTCCTTGTGC	CTGAGAGGAACCTGACAGTCC	(TG) ₁₅	57	134–158
MNB-121	AF271923	GGAAACATCTTCAAATAAGTATGAAA	AGTCGGACACAACCTAAGCAACT	(TG) ₂₅	55	85–113
MNB-122	AF271924	GGATTCATGCTGCTGAGAAAAC	CAGACCAGAATTTACCAGTAACC	(CA) ₁₅	55	164–190
MNB-123	AF271925	AACTATAACCCGTTCTCTGCATC	AAAATGTTTCATACACATGAATAAGG	(TG) ₁₇	52	168–180
MNB-124	AF271926	TTGACATGACTCCTCTTTATTC	TGAAGAGTGGTGGTATAGTGG	(CA) ₂₄ imperfect	55	195–199
MNB-125	AF271927	AACTGAAGCAACTGGTATGCAC	TAAAGGCTGTGAAAACAGAGAAG	(CA) ₁₇ + (TA) ₉	55	92–120
MNB-126	AF271928	ACTAAGGGATTGAGCCCTGGTC	CATAGCAATTTCTGTGTTTGTGAAC	(TG) ₄ + (TA) ₁₁ + (CA) ₁₁	55	149–175
MNB-127	AF271929	GAGAATGTGGCTGGAGGTTTAC	GGGGATGTAAATGGACTGG	(CA) ₁₆	55	219–238
MNB-128	AF271930	AGTCCACGGAGTCACAAGAGTC	ATTTCAATTGGAGGACATTCTG	(CA) ₁₈	58	104–128
MNB-129	AF271931	GGCATCTCAGGATTTCTTATG	TAGCAATATTTCCAAATTTGGTG	(TG/TA) ₁₉	55	189
MNB-130	AF271932	ATGGCCAACTCCACAATC	TTGTTGGAGATAGGCTTTGGTAAAG	(TG) ₁₁	55	141–151
MNB-131	AF271933	CATCAACAAGGGATGATACTTGG	TGTCCTTACACATAGCCTGTGC	(CA) ₁₄	60	168–178
MNB-132	AF271934	CTGGTGATTGCCATGAACCTC	AGATGGCACATGGGTTGG	(CA) ₁₆	58	125–131
MNB-133	AF271935	GGCTCTGGACTTCAAGACTTC	AACCTACCTTTTGCCATCTG	(TG) ₁₆ + (TG) ₁₁	55	157–165
MNB-134	AF271936	GGATTAGCTTGCAGCCTTTG	AAGAGTATTGGAGGCTGACCTG	(TG) ₁₄	55	168–194
MNB-135	AF271937	TGTACAAAGAGGCAGACCACAC	ACAGCTCTGTTTGTCTGGAAC	(CA) ₁₈	52	167–185
MNB-136	AF271938	CTTACTCTCCAGCATCAGCAAG	GCTCCTTGTTAAAATGCAGACC	(CA) ₁₄	55	143–165
MNB-137	AF271939	TTCAGCTGACATTATTTCACTC	TGTTCTTGGCAGCACTGTTAC	(TG) ₁₃	58	145–165
MNB-138	AF271940	AGAAGGGGACCGAGACAATAC	GCTATTTCTGGCCCTGTATTCC	(CT) ₁₂ + (CA) ₁₅	55	125–139
MNB-139	AF271941	CACCCAAACTGGAAAGTGATTG	TGCCCTCTTTGTTAAGTAAATCC	(CA) ₁₃	55	277–295
MNB-140	AF271942	CTGAAACTAACACAACACTGTTC	GTTGCAAAGAGTTGGAGAAGAC	(TG) ₃₁	58	101–135
MNB-141	AF271943	AGCTTAGCACTCTGAGGATGTC	AACACAGGACTATGGAAACTG	(TG) ₁₂	55	141–153
MNB-142	AF271944	ATAAGGTTCGAAAGGCAGATAC	AAGGTGTTGGGCTGTAGTATG	(CA) ₁₆	55	129–161
MNB-143	AF271945	AAGGAGTTGTCGGCTCAAC	ACCTCTTCAATCAAGGCTCAC	(TG) ₁₈	55	93–125
MNB-144	AF271946	CCTCTACCACCCTAGTCAAAGC	AAGAGTTGGAAAACGACTGAGTG	(TG) ₂₃	60	148–178
MNB-145	AF271947	CTAGCTGACGTGCAGAATCAC	GAAGTCCTCCTCAGAGTCCAG	(TG) ₁₃	55	164–178
MNB-146	AF271948	GCACTGTTTACAGTAGCCAAGAC	TGCAGCTGACATTATTTCACTC	(CA) ₁₃	58	136–154
MNB-147	AF271949	TGCAGTGTGTATCTATTTTGC	CCTCAATGAAAAGATTCCTCTC	(CA) ₁₆	55	135–165
MNB-148	AF271950	CTTGAATTCAGCCTTGTCTTTC	ATTGTAACAGCTCACCTTTTG	(CA) ₁₃	60	148–160
MNB-149	AF271951	GGCTCTGCCTCCCTCTC	CCTGACGCTTATTTGTATGTG	(CA) ₁₀ + (CA) ₁₀	55	148–160
MNB-150	AF271952	TTACAAGAAGCTGGACATGACA	TCTCATTGGGAAAACATCACTC	(CA) ₁₂	55	152–158
MNB-151	AF271953	CTGCATGCTTTTGGATTATTTG	CACTGCAATTCAGAAGTAACC	(TG) ₃₂	55	133–168
MNB-152	AF271954	CATGAATGTCAAAATGGCAAG	CCTAAATGCCCATCAAGAGAAG	(TG) ₁₂	55	126–150
MNB-153	AF271955	CTGGACACAACCTAGCAACTAAC	AGCCTAAGCTGAAGTTTTCTG	(CA) ₇	55	106–112
MNB-154	AF271956	ATGGCTACCCTCCAGTATTC	TACCCTTGAACCTTTGGAGATG	(CA) ₁₁	60	180–213
MNB-155	AF271957	CAGCGTTTTAATGAGTTAGAAAATG	GTCTCTGACAGTTTCAGATGC	(CA) ₁₄	55	126–146
MNB-156	AF271958	GGGCTTTAAACCTTCTTTTG	TGACAGTATTACAGCCTTGAGAC	(TC) ₁₁ imperfect	55	79–79
MNB-157	AF271959	AACAGATGTGGGAATTTGATG	TGGACATGACATAGTGGCTAAAC	(CA) ₁₇	55	181–222
MNB-158	AF271960	TGGACATGACATAGTGGCTAAAC	AACAGATGTGGGAATTTGATG	(TG) ₁₇	55	178–217
MNB-159	AF271961	TCCATTAATTCCTAAAGTGGAG	TATAAGAAGCGGGTGGGAAG	(TG) ₁₁	55	149–155
MNB-160	AF271962	CAAACTGGGTGATGGCTAAAC	ACGCATGCAAAAAGAGTCAAAC	(TA) ₁₃	55	168–190
MNB-161	AF271963	ACACCAGTCCCTGTTCTTTC	GAAGTGAATGAGCCACCAG	(GT) ₁₄	55	144–150
MNB-162	AF271964	ATCACCTAAGTGCCATAAAC	CTCCATGGTGTGGCAAATG	(CA) ₁₆ imperfect	60	132–178
MNB-163	AF271965	ACTACATGGAGAGGGCAAAGG	CATAAGCCTGGAGCACTTCTTG	(CA) ₃₄ imperfect	55	219–225
MNB-164	AF271966	GTTTCTGCCATGAAGCACTC	AGCTAGCCTGTGTCTGTGAC	(TG) ₁₇	58	131–147
MNB-165	AF271967	CACGATTGAGAGACTAAGCACAG	ACTGCTTCAGGACATGTGTGA	(CA) ₃₂ imperfect	58	146–178

Table 2 (continued)

Locus	GenBank Accession no.	Forward primer	Reverse primer	Type/length	PCR TM	Product length (bp)
MNB-166	AF271968	CTGTGTGCTATCACTTCCATGC	TAAAGCTGGTGACTCTGTCTGG	(CA) ₁₅	55	143–163
MNB-167	AF271969	TAGAGCAGGAAGGGACTTTCAG	AGCCTTGACTGCATTGTCTG	(CA) ₂₀	55	140–152
MNB-168	AF271970	TGAGGTTCAAAGCCTGTATGC	GGGGATGAAATGGACTGG	(CA) ₁₆	55	161–179
MNB-169	AF271971	GCAAGTCAAGCTCTGCAGTTAG	TCCAGACTGTTTTGAAAAGTCAC	(CA) ₂₁ imperfect	55	206–220
MNB-170	AF271972	ATTCTTTGTTTCTGTGGATG	CCAGACTCAGCCTTGGAATC	(TG) ₁₇	55	186–190
MNB-171	AF271973	TCCCAGCAAGTCTGTATTTACC	AACATGAATAAATGGGAGAGACC	(TG) ₁₇	55	211–235
MNB-172	AF271974	ATAAAAGGGGAATCTTGTGCTG	TCGGAACACTCTAGAAGCTTGG	(TG) ₁₅ + (TG) ₁₄	58	157–258
MNB-173	AF271975	GAATGGCAATATGAGGAGTTGC	GATAATTTGCTCTGTGCCCTTAG	(CA) ₁₆	55	140–162
MNB-174	AF271976	TGTCAAGGCATATTGTCAAAAAG	GCCTATGAATACTTGCATGCTC	(CA) ₁₈	55	134–152
MNB-204	AF271977	ATGTTTTGGGATGGTTATCTGG	TCTCCATTGTTCTGTTCTGACTC	(TG) ₁₇	55	156–169
MNB-205	AF271978	ACTGTGCACGCTTGTCTG	TCCTCCGCTGTAGAATAAAGGAC	(TG) ₁₈	60	149–155
MNB-206	AF271979	CATAGAGCATCCCATGTTGTGT	CTCTCTCATCTCCCAGCATCTT	(CA) ₁₉ imperfect	55	169–181
MNB-211	AF271980	GGGCCTTCCACTAGATGTACC	TTCTTTTCTCTGGAGGCTGTC		56–58	122
MNB-212	AF271981	TACGGGAAATCGTTTTACACAG	GGTGCTAAAAGTCCCCAGTTC		56–58	145
MNB-213	AF271982	TATCATGTTGTGCGGTCAATAC	AGTTTGAGAACCAACCCTCAG	(CT) ₅	56–58	127
MNB-214	AF271983	ACAAGTACCCTTTCATTGAC	AGGAATTCAGTTCCACAGATG		56–58	196
MNB-215	AF271935	GAAGTACTGACCAATGGACTGAG	AGAGTTGCACCCCTTATGTGAC		56–58	150
MNB-216	AF271984	TCTGTCTTTGTTTGTCTCAGG	CACACACGTGTAGTCCCATAG	(GT) ₃	56–58	127
MNB-217	AF271985	TCCAGGATGCTACATTATGGTG	CAGCAAATATACGCCGTAAGC		56–58	168
MNB-218	AF271986	TCTGGTAGTTCCTGGAGACAG	TCCCCAGAAGTGTCTTTCTTTTC	(GA) ₃	58	167
MNB-219	AF271987	TGTACTATGCCCTTTGGGAAG	CAGAGTGCCTTAAGTCTATTGAATG		58	141

Table 3. Mapping results of gene-specific loci. Included for each locus are the putative sequence similarities based on BLAST search, probability level from BLAST search (*P*), correlation coefficients for probability of synteny (ϕ) with BTA29 markers BMC2228 and BMC3224 and chromosomal assignment. Position in the human genome based on BLAST search of the Human Genome sequence is indicated by HSA. NS indicates loci that could not be scored (positive results for hamster and mouse samples) and E denotes loci where the values of ϕ were out of range of the test statistic (negative values)

Locus	BLAST gene similarity	<i>P</i>	Φ_{2228}	Φ_{3224}	BTA	HSA
MNB-211	PGA exon 8	5e ⁻²⁶	0.7048	1	29	11
MNB-212	ZFP36L1	5e ⁻³²	NS	NS	unknown	14
MNB-213	PAG1B exon 8	9e ⁻⁸⁶	0.7048	1	29	unknown
MNB-214	PAG1B intron 2	1e ⁻⁴¹	0.7048	1	29	unknown
MNB-215	UREB1	3e ⁻³⁵	0.3206	0.5424	X ^a	X
MNB-216	HNT	1e ⁻⁵⁴	0.7048	1	29	11
MNB-217	Glucosyltransferase (putative)	2e ⁻³⁵	0.7048	1	29	11
MNB-218	PCCB	4e ⁻²⁸	E	E	1 ^b	3
MNB-219	Canine SRPR	1e ⁻²¹	0.7048	1	29	11

^a Based on comparison with X-linked loci, see Table 5.

^b Based on comparison with BTA1 loci, see Table 4.

Table 4. Correlation coefficients for probability of synteny with BTA1 markers (BMS4008, BMS4017, and BMS4030) for loci not statistically syntenic with the BTA29 markers based on SCP analysis. Comparisons which resulted in out of range statistical values (negative values) are denoted as E

Locus	Φ_{4008}	Φ_{4017}	Φ_{4030}
MNB-102	E	E	E
MNB-112	E	E	E
MNB-130	0.1164	0.0541	0.0854
MNB-133	0.0421	0.1287	0.0053
MNB-134	E	E	E
MNB-146	0.2753	E	0.0529
MNB-152	0.8051	0.9351	1
MNB-156	E	E	E
MNB-165	E	E	E
MNB-173	E	E	E
MNB-215	E	E	E
MNB-218	0.8051	0.8009	0.8675

Tests for synteny of the new microsatellite loci with two BTA29 markers on the MARC bovine linkage map (BMC2228 and BMC3224) found that 82% (65 of 82) of these loci are syntenic (average $\phi > 0.74$) with previously mapped BTA29 loci (Table 1). Non-significant synteny ($0.74 < \phi < 0.59$) was found for five of the remaining markers and nine ms were found to be not syntenic based on somatic cell panel (SCP) analysis. Because the initial library was from a 1:29 Rb-fusion cell line, each of these loci was subsequently compared with SCP scores for three loci from BTA1 (BMS4008, BMS4017, and BMS4030). One of the loci (MNB-152) mapped to BTA1 ($\phi > 0.74$; Table 4) and was confirmed by linkage analysis (Table 1). Of the remaining eight ms, five are part of a separate

syntenic group (MNB-102, MNB-112, MNB-133, MNB-165, MNB-173; Table 5). Each of these loci was subsequently mapped to the bovine X linkage group. Only two discrepancies between the SCP and linkage analyses were detected. Two ms (MNB-130 and MNB-134) not syntenic with BTA29 based on SCP analysis, were placed on BTA29 by linkage analysis.

Microsatellite markers that were heterozygous in at least one of the 28 MARC parent animals were used to genotype the 234 animals of the MARC reference families. Average heterozygosity among the 28 parents was 56.5% with the number of alleles ranging from two to twenty and including null alleles for MNB-123, MNB-128 and MNB-158. Linkage analysis placed 69 of the 90 new ms markers on BTA29, five on BTAX and one

Table 5. Summary of statistical analysis for probability of synteny (ϕ) among six new loci that formed a syntenic group based on SCP analysis. Three of these loci (MNB-102, MNB112 and MNB-133) were placed on BTAX by linkage analysis

Locus	MNB-112	MNB-133	MNB-165	MNB-173	MNB-215
MNB-102	0.6652	0.5839	0.7365	0.6298	0.7365
MNB-112		0.6309	0.9351	0.9303	0.8675
MNB-133			0.6757	0.4913	0.6309
MNB-165				0.8542	0.9351
MNB-173					0.7856

on BTA1. The new loci were distributed along the full length of BTA29 (Fig. 1). MNB-94 was the most proximal marker at 3.7 cM and MNB-101 the most distal at 62.8 cM. The greatest cluster of new markers (28 loci) occurred between 23 and 36 cM, OARVH110 and BMS2149, respectively.

Six of the nine putative gene loci mapped to BTA29 by SCP analysis (Table 3). Of the remaining three loci, MNB-218 was syntenic with the BTA1 ms loci (Table 4) and MNB-215 was part of the X syntenic group (Table 5). Each of these assignments is consistent with the position of this DNA sequence in the Human Genome sequence. MNB-218 showed highest similarity to a sequence on HSA3 (3q21 → q22; homologous to distal two-thirds of BTA1) and MNB-215 showed highest similarity to a sequence on HSAX. Additional support for the assignment of MNB-215 to the X chr is based on its physical linkage to the ms locus MNB-133. The closest linked marker to MNB-133 is XBM84 (Table 1) located on BTAXq. The remaining gene-specific locus (MNB-212) could not be mapped using the SCP because the primers co-amplified the locus in the hamster and mouse samples. However, BLAST search found significant similarity with ZFP36L1 (alias BRF1, butyrate response factor 1 [EGF-response factor 1]) that is located on HSA14q22 → q24 (Maclean et al., 1995). This gene is a putative zinc finger nuclear transcription factor and member of the Tis11 family of early-response proteins.

Discussion

Prior to this study, fine mapping studies of BTA29 were restricted by the limited density of genetic markers. Only 32 ms loci were placed on the MARC linkage map for BTA29, at an average density of one locus per 2.03 cM. The new markers reported in this study, increase marker density on BTA29 by 340% yielding a BTA29 map 62.8 cM in length with an average marker density of one marker per 0.561 cM. Sufficient genetic tools are now available to enhance the robustness of QTL scans and for further mapping of this bovine chromosome. For example, each of the new BTA29 loci are currently being used to characterize a new 7000-rad whole genome radiation panel (Mariani et al., 2000).

Investigation of BTA29, the smallest bovine chromosome, appears to hold promise for improved beef tenderness. Two groups have independently located a QTL for meat tenderness

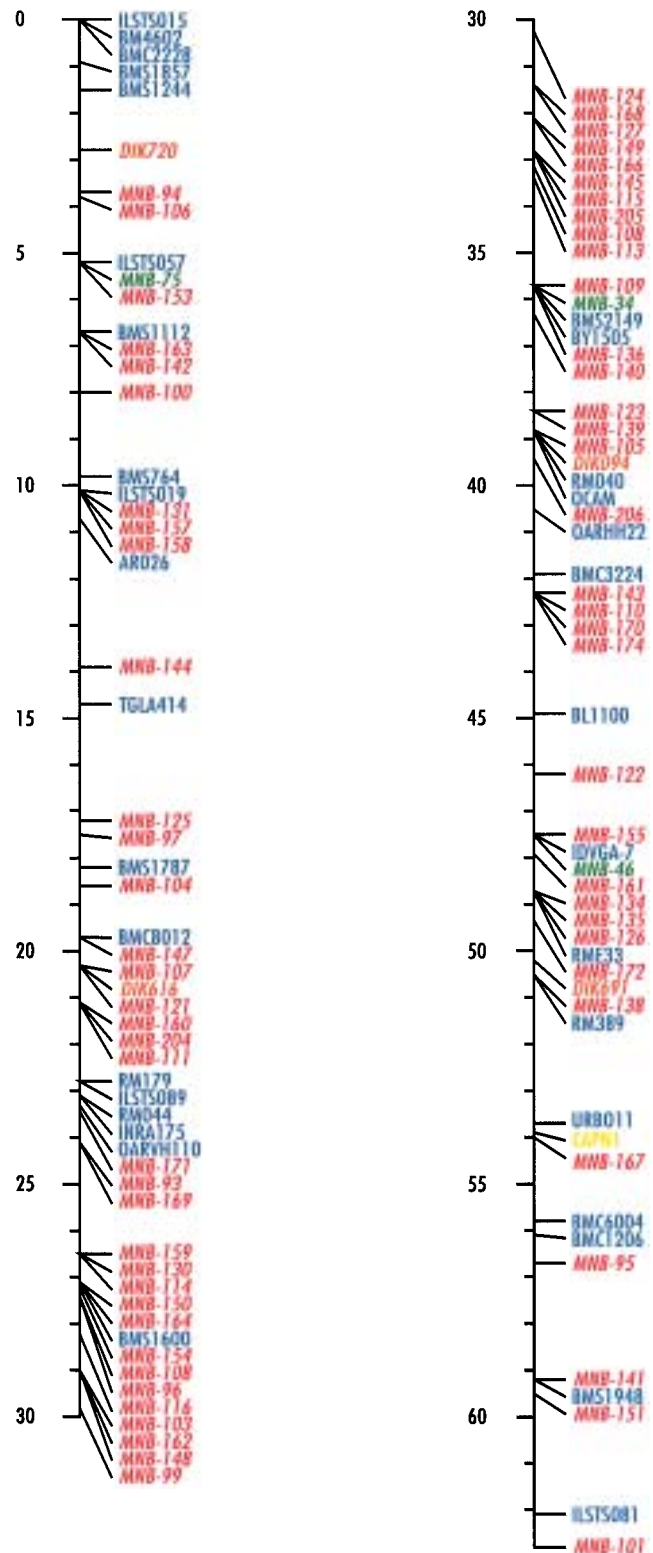


Fig. 1. Linkage map of BTA29. New markers developed as part of this study are indicated in RED, recently published markers developed as part of a separate study (Reed et al., 2001) are indicated in GREEN, and additional new markers developed at the Shirakawa Institute (Hirano et al., 1996; Ihara et al., in preparation) are indicated in ORANGE. Position of the micromolar calcium activated neural protease gene (CAPN1) at 53.9 cM is indicated in YELLOW.

on this chromosome and two candidates for this QTL, micro-molar calcium activated neural protease (CAPN1 at 53.9 cM; Smith et al., 2000) and collagenase (Schmutz et al., 2000) have been hypothesized. One new ms locus described in this study (MNB-167, 54.0 cM) is located just distal to CAPN1.

The results of this study add to the growing number of gene sequences mapped in cattle. In addition to CAPN1, several genes (TYR, CCND1, LDHA IGF2) have been physically mapped to BTA29 (Schmutz and Moker, 1999; Schmutz et al., 1999 and references therein; Schmitz et al., 2001). Our results place four additional genes on BTA29 and confirm the location of a fifth gene (PAG1, bovine placental-associated glycoprotein 1). PAG1B is a member of the aspartic proteinase family. The gene product is produced specifically in the invasive binucleate cells of the placenta and becomes detectable in maternal serum soon after implantation (Xie et al., 1995). PAG1B was just recently placed on BTA29 between anonymous markers RM40 and ILSTS081 using SINEVA (Sine variable poly(A)) markers (Martin-Burriel et al., 1998).

Loci with sequence similarity to PGA (Pepsinogen A), HNT (human neurotrimin), a putative glucosyltransferase, and SRPR (signal recognition particle receptor) are included in the new BTA29 assignments. PGA, the precursor of Pepsin, is the predominant endopeptidase in the gastric juice of vertebrates, maps to HSA11q13 (Nakai et al., 1986). HNT is a member of the immunoglobulin superfamily located on HSA11q25 and

may function as a GPI-anchored neural cell adhesion molecule (Struyk et al., 1995). SRPR, located in the human genome at 11q23 → q24 (NCBI BLAST of human genome sequence), is an essential component of the cellular machinery (docking protein) that mediates the translocation of nascent secretory and membrane proteins to the rough endoplasmic reticulum (Hortsch and Meyer, 1988).

In addition, to genes located on BTAX, SCP analysis placed PCCB (Propionyl Coenzyme A carboxylase) on BTA1 and a sequence with similarity to UREB1 (upstream regulatory element binding protein 1), on BTAX. PCCB acts to degrade branched-chain amino acids, whereas the exact function of UREB1 is not known. Studies with the rat homolog of UREB1 suggest that it may function as a DNA-binding transcriptional regulator (Huibregtse et al., 1995). In conclusion, our results provide a significant number of new ms markers for BTA29. The physical assignment of new gene-specific and ms loci on BTA29 will enhance our ability to fine-map loci putatively associated with meat tenderness.

Acknowledgements

The authors wish to thank J. Womack for providing access to the bovine somatic cell panel.

References

- Alexander LJ, Smith TP, Beattie CW, Broom MF: Construction and characterization of a large insert porcine YAC library. *Mammal Genome* 8:50–51 (1997).
- Ambady S, Ciufo S, Robl JM, Smyth JR, Ponce de León AF: Development of a chicken Z-chromosome-specific DNA library. *J Hered* 88:247–249 (1997).
- Ambady S, Kappes SM, Park C, Ma RZ, Beever JE, Lewin HA, Smith TPL, Beattie CW, Basur PK, Ponce de León AF: Development and mapping of microsatellites from a microdissected BTA 11-specific DNA library. *Animal Genet* 32:152–155 (2001).
- Chevalet C, Corpet F: Statistical decision rules concerning synteny or independence between markers. *Cytogenet Cell Genet* 43:132–139 (1986).
- Green P, Falls K, Crooks S: Documentation for CRIMAP, Version 2.4. Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, USA (1990).
- Hirano T, Nakane S, Mizoshita K, Yamakuchi H, Inoue-Murayama M, Watanabe T, Barendse W, Sugimoto Y: Characterization of 42 highly polymorphic bovine microsatellite markers. *Animal Genet* 27:365–368 (1996).
- Hortsch M, Meyer DI: The human docking protein does not associate with the membrane of the rough endoplasmic reticulum via a signal or insertion sequence-mediated mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 150:111–117 (1988).
- Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM: A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci, USA* 92:2563–2567 (1995).
- Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw RA, Sonstegard TS, Smith TP, Lopez-Corrales NL, Beattie CW: A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res* 7:235–249 (1997).
- Liu W, Mariani P, Beattie CW, Alexander LJ, Ponce de León FA: A radiation hybrid map for the bovine Y chromosome. *Mammal Genome* (in press).
- Maclelean KN, See CG, McKay IA, Bustin SA: The human immediate early gene BRF1 maps to chromosome 14q22 → q24. *Genomics* 30:89–90 (1995).
- Mariani P, Sugimoto Y, Beattie CW: A new whole-genome radiation hybrid (WG-RH) panel for cattle. Abstract B082, p 43. 27th International Conference on Animal Genetics (2000).
- Martin-Burriel I, Elduque C, Osta R, Laurent P, Barendse W, Zaragoza P: SINEVA polymorphism and mapping of the bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 gene. *Mammal Genome* 9:179–180 (1998).
- Nakai H, Byers MG, Shows TB, Taggart RT: Assignment of the pepsinogen gene complex (PGA) to human chromosome region 11q13 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 43:215–217 (1986).
- Reed KM, Mendoza KM, Beattie CW: Development of 90 new bovine microsatellite loci. *Animal Biotech* 12:69–76 (2001).
- Riquet J, Coppieters W, Cambisano N, Arranz JJ, Berzi P, Davis SK, Grisart B, Farnir F, Karim L, Mni M, Simon P, Taylor JF, Vanmanshoven P, Wagenaar D, Womack JE, Georges M: Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: application to milk production in dairy cattle. *Proc Natl Acad Sci, USA* 96:9252–9257 (1999).
- Schmitz BH, Buchanan FC, Plante Y, Schmutz SM: Linkage mapping of the tyrosinase gene to bovine chromosome 29. *Animal Genet* 32:105–121 (2001).
- Schmutz SM, Buchanan FC, Plante Y, Winkelman-Sim DC, Aalhus J, Boles JA, Moker JS: Mapping collagenase and a QTL to beef tenderness to cattle chromosome 29. Abstract no. 367, International Plant and Animal Genome Conference VIII (2000).
- Schmutz SM, Moker JS: In situ hybridization of TRY and CCND1 to cattle chromosome 29. *Animal Genet* 30:241–242 (1999).
- Struyk AF, Canoll PD, Wolfgang MJ, Rosen CL, D'Eustachio P, Salzer JL: Cloning of neurotrimin defines a new subfamily of differentially expressed neural cell adhesion molecules. *J Neurosci* 15:2141–2156 (1995).
- Smith TP, Casas E, Rexroad CE III, Kappes SM, Keele JW: Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *J Anim Sci* 78:2589–2594 (2000).
- Taylor JF, Coutinho LL, Herring KL, Gallagher DS Jr, Brenneman RA, Burney N, Sanders JO, Turner JW, Smith SB, Miller RK, Savell JW, Davis SK: Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. *Anim Genet* 29:194–201 (1998).
- Wang Z, Rohrer G, Stone R, Troyer D: Isolation of thirty-one new porcine microsatellites from a microsatellite enriched microdissected chromosome 8 library. *Anim Biotechnol* 11:33–43 (2000).
- Xie S, Green J, Beckers JF, Roberts RM: The gene encoding bovine pregnancy-associated glycoprotein-1, an inactive member of the aspartic proteinase family. *Gene* 159:193–197 (1995).
- Zhao F, Ambady S, Ponce de León FA, Miller LM, Lunney JK, Grimm DR, Schook LB, Louis CF: Microsatellite markers from a microdissected swine chromosome 6 genomic library. *Anim Genet* 30:251–255 (1999).

DEVELOPMENT OF 47 NEW MICROSATELLITE MARKERS FROM A BTA6 LIBRARY

K. M. Reed,¹ N. Ihara,³ F. A. Ponce de León,² T. S. Sonstegard,⁴
T. P. L. Smith,⁵ G. L. Bennett,⁵ Y. Sugimoto,³ and C. W. Beattie^{6,*}

¹Department of Veterinary Pathobiology and ²Department of Animal Science,
University of Minnesota, St. Paul, MN, USA

³Shirakawa Institute of Animal Genetics Odakura, Nishigo, Nishi-shirakawa,
Fukushima, 961-8061 Japan

⁴USDA, ARS, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, MD

⁵U.S. Meat Animal Research Center, Clay Center, NE, USA

⁶Department of Animal Biotechnology,
University of Nevada, Reno, NV, USA

ABSTRACT

Chromosome-specific libraries provide a means to isolate genetic markers from specific chromosomal regions. A small-insert BTA6 library, constructed by microdissection, was screened for dinucleotide repeats (CA)₁₅ and (GA)₁₅. A total of 47 new microsatellite loci were developed and tested for polymorphism and informativeness using the MARC bovine mapping family.

INTRODUCTION

Chromosomal flow sorting and microdissection are robust techniques for isolating chromosomes or chromosomal regions of interest. DNA libraries generated by these methods provide a rich source of markers for map construction and comparative studies. Several studies have recently reported on the use of these libraries for marker development in swine^[1,2] and cattle.^[3,4] Here we report on the isolation of new markers from a bovine chr 6 (BTA6) library prepared by microdissection.

*Corresponding author. E-mail: cbeattie@cabnr.unr.edu

METHODS

The bovine chromosome 6 (BTA6) library was constructed by microdissection of an Rb-fusion cell line as previously described.^[3,5] The λ -ZAP library was plated at ~5000 pfu per 150-mm LB plate and grown overnight at 37°C. The resulting plaques were screened by hybridization to ³²P end-labeled (GA)₁₅ and (TG)₁₅ probes. Agarose plugs (~2400) containing positive phage clones were removed from the original plates and the associated phage eluted in 200 μ L SM buffer. Approximately 300 of these primary clones were plated on 50 mm LB plates at a density of 50–100 plaques per plate. The resulting plaques were then screened with the (GA)₁₅ and (TG)₁₅ probes. After hybridization, individual positive clones (1–2 per plate) were picked and eluted into 50 μ L SM buffer.

The inserts of positive secondary clones were amplified from the phage/SM stock by PCR. Each reaction contained as template 5 μ L of eluted phage, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 pmol each primer (T3 and T7 flanking primers), 100 μ M dNTP, and 0.35 U *Taq* polymerase (Qiagen, Inc). Amplifications were performed under the following reaction conditions: 15 min at 94°C; 30 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 58°C, 30 sec at 72°C; and a final extension of 5 min at 72°C. PCR products were resolved on 2% agarose gel, prepared for sequencing with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Inc) and sequenced with an automated DNA sequencer using vector-specific primers. DNA sequences were manually edited with Sequencher software (Gene Codes Corp.) and queried against GenBank by BLAST searching. Oligonucleotide primers corresponding to sequences flanking the dinucleotide (dn) repeats were designed interactively with Primer v.3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

PCR Conditions

Oligonucleotide primer-pairs (Table 1) were optimized for PCR amplification of bovine genomic DNA by testing over a range of annealing temperatures (50 to 62°C). PCR reactions (12 μ L total volume) included 20–25 ng genomic DNA, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 pmol each primer, 100 μ M dNTP, and 0.35 U Hotstar *Taq* polymerase (Qiagen, CA). Amplifications were performed in a MJ Research thermal cycler under the following reaction conditions: 15 min at 94°C; 30 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at annealing temperature, 30 sec at 72°C; and a final extension of 5 min at 72°C. After optimization, fluorescently-labeled primers were used to generate marker genotypes from the USDA/MARC reference map population (415 potential meioses). Alleles were resolved by capillary electrophoresis using an ABI PRISM 3700 DNA analyzer. Genotypes were scored and merged with the genotypic data of the ~2000 markers in the MARC database (<http://www.marc.usda.gov/cattle>). Estimates of recombination and lod scores were calculated as described^[6] using Cri-Map V 2.4.^[7]

Table 1. Microsatellite Locus Information

Locus	Genbank Accession	Repeat Length	Forward Primer	Reverse Primer	Size-Range	PCR TM	# Alleles	BTA #
MNB-175	AF430215	(TG) ₁₈ imp	AGCATGGTCACCA-GAGTCAAG	GATATG-GAAGTCCCCCT-TAATGTTT	143-153	55	5	6
MNB-176	AF430216	(CA) ₁₅	GACTAAA-CACGTGGTG-GAAGTG	AGCAATGAGAGGG-TAACACCTG	116-130	55	6	6
MNB-177	AF430217	(TG) ₁₂	TGAAGTTCITGG-CATACAGCAC	GGTTGCAAAGAGT-CAGACATGC	151-157	66	3	6
MNB-178	AF430218	(CA) ₁₀	AACATAACGGT-CAAAAAGGCAAGTG	TGTCACTAA-GAAGGGATTTTGC	120-128	55	4	6
MNB-179	AF430219	(TG) ₁₇	CCAATAACTCTAC-CAAACCTGAGC	GGCAGGCAAG-GATTTCTTAAAC	165-181	55	9*	XY
MNB-180	AF430220	(CA) ₁₇	GGAACATAAATGT-GAACCTGGAC	CCATACACAGG-CAAGCTAACTG	226-248	55	10	6
MNB-181	AF430221	(CA) ₁₄	TAATCGTTTGT-GAAGGAAATGC	CCCTAATGGGTTT-GGAATTTG	165-189	54	8	6
MNB-182	AF430222	(CA) ₁₆	AGCTCTG-CAAAAACCTACA-GAGG	GACGTCAAAGG-GAAAATTGAGG	150-166	55	9	6
MNB-185	AF430223	(CA) ₁₈ imp	TAGCCTTTT-GAAAGCACTCAG	AGCTCCACAGA-GAAATGAAAAGC	146-152	55	4*	XY
MNB-186	AF430224	(TG) ₁₃ + (GA) ₁₃	GACAGCAGT-CAGTTTCCAAAG	TTTTTCAGTGTGGT-GTGGACAAG	143	56	nd	nm
MNB-187	AF430225	(CA) ₁₀	AAACTATGAGT-GAACA-GAATTTGTGG	GAGGTGGACCT-GACTTAGCAAC	141-153	55	6	2
MNB-188	AF430226	(CA) ₁₈	TGGACACGACT-GAATGACTAAAC	GATAGTGTTC-CAGGACTGTCC	187-207	55	8	6

(continued)

Table 1. Continued

Locus	Genbank Accession	Repeat Length	Forward Primer	Reverse Primer	Size-Range	PCR TM	# Alleles	BTA #
MNB-189	AF430227	(CA) ₁₂	ATGTCCAT- CAAAAAGCTGAAT- GA	TGTCACAAAATGG- CAAAATTTCA	121-125	60	3*	1
MNB-190	AF430228	(TG) ₁₇	TGAAAACATAA- GATGGGTTTCA- TAGG	ACACTCCT- GATTGTCCTTAGCC	184-198	60	5	6
MNB-191	AF430229	(CA) ₁₅	CCGCTGTCCAGG- TAACTAAAAC	CTGGGCTTGAACC- TTTAAACTG	145-159	55	7	6
MNB-192	AF430230	(CA) ₁₇	GGAGTCTGACTGC- TATTTTCATGT	CATCTGGAGAT- GAGATGTGA	111-139	55	8	6
MNB-194	AF430231	(TG) ₁₄	TTGATTGCTTTTCG- TGTGGAAG	TCCCTTCTCTA- CATCCTTGGAG	142-150	55	5	6
MNB-195	AF430232	(CA) ₃₃ imp	TTTTAAGTGA- CAACTGTCA- GATTCC	TGTCTAATTTCTC- TAAAGGTCCTTTC	151-157	55	3	6
MNB-196	AF430233	(CA) ₂₃	TGATG- GATTTCTCCTCAA- GATG	TAACCCGTGTG- CATATCCTG	172-186	55	6	6
MNB-197	AF430234	(CA) ₁₂	ATCTTTTCT- GAACCCCAAAAAGG	TGGGAAAAGAAAAGT- CACCTATGC	156-166	55	5*	6
MNB-198	AF430235	(TG) ₁₉	AATGTCCCAAGAC- CACTACCAC	AACTAAGACAA- CAGCAGCCATC	133-155	55	10	6
MNB-199	AF430236	(TG) ₁₄	TTGTTCTTTTAT- GGCTGAGTC	TGTACCCCAATGTT- CATAGCAG	140	58	1	nm
MNB-200	AF430237	(TG) ₁₂	GGGCATGGATT- TAATGTGAGAT	GCATGTCATGT- TATCTGTCAACC	146-154	55	4	6
MNB-201	AF430238	(CA) ₁₂	CCCTGGAGTAG- GAAATAGCAGT	CGTGTCAAAA- TACTGTGGTAGA	179	58	1	nm

MICROSATELLITE MARKERS

199

MNB-202	AF430239	(TG) ₁₃	CCCAAACCCAAA- CACCTTGTA	CAACATCCATC- CACTCAITTA	267-281	55	7*	6
MNB-203	AF430240	(TG) ₁₅	TCGTGGAAA- TAAGCACGTTGT	CTGGAGAAGG- CAAGGCAAT	195-207	55	3	6
MNB-207	AF430241	(TG) ₁₆	AAGAGGGCAC- CAAAGAAGAAG	TGTAACGTTGTCCT- TTCACCAC	136-156	55	6	6
MNB-208	AF430242	(TG) ₂₃	CCACACTCCAITC- TATGCTCTG	AITTTGTTCT- CAAAGCCACTCC	131-153	55	7	6
MNB-209	AF430243	(CA) ₂₀	GCACCTTGAAGAT- GAGAAITTTG	CTTCATGGGTCIT- GGGATTAAG	131-160	55	10	6
MNB-210	AF430244	(TG) ₂₀	CTAGCTGTAGG- CAGTGAGCAAAA	AGCTTC- CAAATTTGC- TAAAGTA	121-141	55	6	6
BMS5002	AF506914	(TG) ₁₆	CCACCCACGGCG- TATTTG	TGAATTTGG- CAGCTGGCTC	105-133	58	8	6
BMS5003	AF506915	(TG) ₂₆ imp	CTGGAGAAG- GAAAGGAAATGC	GTCCCACCTTCTGC- CTCTTTG	177-191	58	5	6
BMS5004	AF506916	(TG) ₂₂	CACACCTCCCTAAT- GAATTTCC	TTTTGGAGGACA- TAATTCACCC	76-104	58	11	6
BMS5006	AF506917	(CA) ₁₆	AGAACTGT- GAAGTTGCAIT- GATG	ATATCATAGGGGA- CAGTCGAGG	152-162	58	5	6
BMS5009	AF506919	(TG) ₁₄	GAACCCATGCC- CACTGAC	TGCCTCAITTTGGTIT- CCCC	169-205	58	14	6
BMS5010	AF506920	(CA) ₁₄	CAGGGTGATCC- TAAAGGCTGC	CAAATGA- GAAAAGC- GAAAGGCTA	121-147	58	6	6
BMS5015	AF506922	(TG) ₂₁ imp	GAGCACTG- TAACCCCTAAGCAGC	GTCACTCCCCCA- CACCAC	113-129	62	6	6
BMS5020	AF506925	(TG) ₁₈ imp	TCTGGA- TATGTGTGTTTG- CATG	CAGAAITGAGGA- GATTGTGCC	198-210	60	6*	6

(continued)

Table 1. Continued

Locus	Genbank Accession	Repeat Length	Forward Primer	Reverse Primer	Size-Range	PCR TM	# Alleles	BTA #
BMS5023	AF506926	(TG) ₁₂	CTGCAGAGGCAAAA-CAGGAG	GACTAAGCAACT-GAGCACATGC	184-188	58	3	1
BMS5025	AF506927	(CA) ₁₅	TGTCCAAGATGGA-TAAAGATGC	TTCACTCTTCTGTT-GCGTGC	77	56	nd	nm
BMS5028	AF506930	(CA) ₁₁	GGGTCACAAA-TAGCTGGCC	GAT-CAAACCCCTTGTT-CCTACG	162-170	58	4	6
BMS5029	AF506931	(TG) ₂₆ imp	TGTCAGTTGCCTA-CAATGTGC	GTCCCACTTCTGC-CTCTTTG	204-218	62	5	6
BMS5030	AF506932	(TG) ₁₃	CCTGAGTCTCTTCT-GTCTCCTG	AAGTCACCAGA-GAAGCCAATG	240	54	1	nm
BMS5031	AF506933	(TG) ₁₁	GAGCCTATAGT-GAAAATAATCTG	TCAAATGTACAGT-GAAGTGATTC	84	56	nd	nm
BMS5032	AF506934	(TG) ₁₉	GTCATGTC-CAACTCTGTACC	TCAAACACAAC-TGAGGCAAC	172-199	60	8	6
BMS5033	AF506935	(CA) ₁₁	ACAAACCGAAATA-TACCAITTTGTAC	TATGGTTGAGTAG-TATCCATTGTG	71-79	58	3	6
BMS5037	AF506937	(TG) ₂₃	GAGTGTCTGGG-GTGGC	GA-CAGCTTTGGTCTGT-CAAGC	148-168	58	6	6

The Genbank accession number, length of repeat, primer sequences, observed fragment size (bp), TM (PCR annealing temperature) of the primers, number of alleles and linkage group assignment (chromosome) are included for each locus. Where indicated the number of alleles could not be determined (nd), or a marker could not be mapped (nm). Asterisks denote loci with null alleles.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the present study are comparable to those obtained from a similar study of a BTA29 library^[4] where sequencing of 458 clones resulted in 90 new loci. From the BTA6 library, a total of 186 clones representing 121 unique sequences were obtained. Nineteen cases of redundancy involving from 2–12 clones (average 3.9) were observed. Primer pairs were developed for a total of 47 new loci determined to be unique based on queries of GenBank. All sequences were deposited in GenBank (Accession numbers AF430215–AF430244, AF506914–AF506937).

All new loci developed from the BTA6 library were tested for polymorphism using the USDA/MARC reference map population. Fragment sizes and number of alleles at each locus are given in Table 1. The number of alleles per locus ranged from 1 to 14 with an average of 6.0. Three loci (MNB-186, BMS5025, and BMS5031) proved difficult to score due to the presence of excess stutter bands. Of the remaining loci, all but three (MNB-199, MNB-201, and BMS5030) were polymorphic in the mapping family. Complete linkage data for the MNB markers is being generated by researchers at the Shirakawa Institute of Animal Genetics. Of the informative markers, 88% mapped to BTA6. The five informative markers that did not map to BTA6 (MNB-179, MNB-185, MNB-187, MNB-189, and BMS5023) mapped to the three largest bovine chromosomes (Table 1). This is consistent with our investigation of a similarly constructed library from BTA29,^[4] where 5 of 82 loci mapped on BTAX and one on BTA1.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from the USDA-NRICGP, the Japan Livestock Technology Association and the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

REFERENCES

1. Zhao, F.; Ambady, S.; Ponce de León, F.A.; Miller, L.M.; Lunney, J.K.; Grimm, D.R.; Schook, L.B.; Louis, C.F. Microsatellite Markers from a Microdissected Swine Chromosome 6 Genomic Library. *Anim. Genet.* **1999**, *30*, 251–255.
2. Wang, Z.; Rohrer, G.; Stone, R.; Troyer, D. Isolation of Thirty-One New Porcine Microsatellites from a Microsatellite Enriched Microdissected Chromosome 8 Library. *Anim. Biotechnol.* **2000**, *11*, 33–43.
3. Ambady, S.; Kappes, S.M.; Park, C.; Ma, R.Z.; Beever, J.E.; Lewin, H.A.; Smith, T.P.L.; Beattie, C.W.; Basrur, P.K.; Ponce de León, A.F. Development and Mapping of Microsatellites from a Microdissected BTA 11-Specific DNA library. *Animal Genet* **2001**, *32*, 152–155.
4. Reed, K.M.; Ihara, N.; Mariani, P.; Mendoza, K.M.; Jensen, L.E.; Bellavia, R.; Ponce de León, F.A.; Bennett, G.L.; Sugimoto, Y.; Beattie, C.W. High Resolution Genetic

- Map of Bovine Chromosome 29 Through Focused Marker Development. *Cytogenetic and Genome Res.* **2002**, *46*, 210–216.
5. Ambady, S.; Ciuffo, S.; Robl, J.M.; Smyth, J.R.; Ponce de León, A.F. Development of a Chicken Z-Chromosome-Specific DNA library. *J. Hered.* **1997**, *88*, 247–249.
 6. Kappes, S.M.; Keele, J.W.; Stone, R.T.; McGraw, R.A.; Sonstegard, T.S.; Smith, T.P.; Lopez-Corrales, N.L.; Beattie, C.W. A Second Generation Linkage Map of the Bovine Genome. *Genome Res.* **1997**, *7*, 235–249.
 7. Green, P.; Falls, K.; Crooks, S. *Documentation for CRIMAP*; Version 2.4.; Washington University School of Medicine: St. Louis, Missouri, 1990.

Construction of a bovine bacterial artificial chromosome library from fibroblasts used for cloned cattle

S. Fujisaki*, Y. Mizoguchi[†], S. Takahashi[‡],
Y. Z. Chen[¶], K. Suzuki^{**}, S. Asakawa[§], E. Soeda[¶],
N. Shimizu[§], Y. Sugimoto[†] and H. Yasue*

*Genome Research Department, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-0901, Japan. [†]Shirakawa Institute of Animal Genetics, Odakura Nishigo, Nishishirakawa, Fukushima 961-8061, Japan. [‡]Department of Animal Breeding and Reproduction, National Institute of Livestock and Grassland.

[§]Department of Molecular Biology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0016, Japan.

[¶]Advanced Genotechs Co., Tsukuba, Ibaraki 305-0074, Japan.

**Animal Genome Program Team, STAFF Institute, Tsukuba, Ibaraki 305-0854, Japan

Accepted for publication 28 May 2002

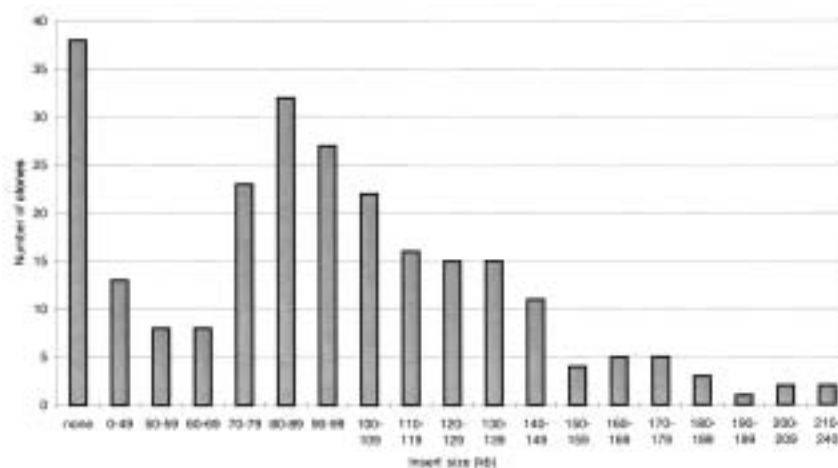


Figure 1 Size distribution of inserts in the bovine BAC genomic library. BAC DNA was extracted from 250 randomly selected clones and digested with *Not*I. The resulting samples were subjected to pulse-field agarose gel electrophoresis with λ -phage DNA ladder (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as the molecular size marker. Insert size was scored at 10 kb intervals.

Table 1 Sequences screened across the bovine BAC library.

STS	BTA	No. of clones	References	Sequence type	Product size	Forward primer	Reverse primer
DIK024	1	5	13	MS ¹	229-251		
DIK089	4	2	13	MS	82-98		
BM6026	5	3	13	MS	158-172		
ILSTS6	7	5	13	MS	283-297		
DIK106	8	1	13	MS	95-123		
DIK096	9	2	13	MS	246-256		
DIK020	10	6	13	MS	230-254		
DIK097	12	1	13	MS	192-212		
DIK102	15	4	13	MS	123-163		
DIK039	19	4	13	MS	194-220		
BM103	21	2	13	MS	147-157		
INRA130	22	6	13	MS	100-116		
CYP21A2 ³	23	2	13	MS	190-220		
DIK010	24	0	13	MS	185-201		
BM4505	26	4	13	MS	225-251		
CHGA ²	21	2	14	Gene	180		
SERPINA3 ^{2,3}	21	5	14	Gene	220		
ASB2	21	5	Bovine orthologue ASB2 (BF076091)	EST	124	GACCCCTGGCTCATCTTTG	TGGGTGTTCTCGTATTTCCAGG
FLJ21916	21	3	Bovine orthologue FLJ21916 (BE749521)	EST	110	AACATCGCCCTGCAGGTGGAGTA	GTGGGATGTTTTATAGACAGGTA
DDX24	21	2	Bovine orthologue DDX24 (AW463825)	EST	142	ACATCAAGCTCTGCCCGTATC	TGCCCTCATGCCAATCTTCT
SERPINA1 ^{2,3}	21	5	14	Gene	210		
BDKRB2 ^{2,4}	21	2	15	Gene	191	CGTACCCGCCTGCCGTCAAT	GCACCGTGGCCTTCTCAGTCT
EML1 ^{2,3}	21	3	15	Gene	500		
4-69(RNB6)	21	6	13	EST	249	ACAGGAAAGCTTAGCACACA	ACAGTCACGGTAGGGGGTG
DLK1 ^{2,3}	21	3	14	Gene	60		
WARS ²	21	5	14	Gene	105		

¹MS = microsatellite.²CHCA, chromogranin A; SERPINA3 (AACT), serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3; SERPINA1 (PI), serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1; BDKRB2, bradykinin receptor B2; EML1 (EMAPL), echinoderm microtubule associated protein like 1; DLK1 (DLK), delta-like 1 homolog; WARS, tryptophanyl-tRNA synthetase.³The original names of genes/sequences, SERPINA1, DLK1, CYP21A2, and EML1, are AACT, PI, DLK, CYP21, and EMAPL, respectively. The original names were in the papers cited.⁴The primer pair suggested by Fahrenkrug *et al.* (2000) did not amplify genomic DNA of Japanese Black cattle, so the primer sequences were modified.

Source/description: A bovine bacterial artificial chromosome (BAC) library was constructed from fibroblast cells (ABF2) of a 9-year-old Japanese black (*Bos taurus*) male. Fibroblasts from this cell line had been used previously to produce cloned animals by nuclear transfer¹. For the current experiment, cells were cultured in Dulbecco-modified MEM (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) supplemented with 10% foetal calf serum in an atmosphere of 5% CO₂. Because cultured cells with low passages are likely to maintain original genome organization, cells after 2–4 passages were suspended in Buffer L (100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 20 mM NaCl) at a final concentration of 3×10^7 cells/ml. The cell suspension was mixed with an equal volume of liquefied 1.2% agarose and processed for *in situ* isolation of DNA as described previously². High molecular weight DNA in the gel was partially digested with *Hind*III, and then subjected to pulse-field agarose gel electrophoresis to obtain fragments between 145 and 190 kb³. These fragments were ligated into the pBAC-Lac vector, and transformed into DH10B *E. coli*⁴. Using Q-Bot (Genetix, Hampshire, UK), individual white colonies were transferred to wells of 384-well microtitre plates containing LB medium with 7.5% glycerol, and grown overnight at 37 °C. A total of 86 400 clones were arrayed onto 225 microtitre plates and stored at –80 °C.

Characterization of the library: In order to estimate the average insert size, 250 clones were randomly selected and amplified. The BAC DNAs were then digested with *Not*I and separated by pulse-field electrophoresis, along with a λ -phage DNA ladder (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as the size marker. Of the 250 clones, 212 (84.8%) contained inserts with an average size of 103 kb, while the remaining clones (15.2%) apparently had no inserts (Fig. 1). Assuming that the bovine genome is 3×10^6 kb and excluding those clones without an insert, the present library was calculated to contain 2.5 genome equivalents [$(86\,400 \times 0.848 \times 103) / (3 \times 10^6) = 2.5$].

Library screening: For rapid isolation of clones, a two-round PCR-based screening system reported previously⁵ was employed. In the first round, 384-well microtitre plate DNA pools (prepared from individual microtitre plates) were screened for PCR amplification. In the second round, individual clones were identified based on PCR amplification of row and column pools (prepared in ditch plates) from microtitre plates selected in the first round. Using this system, the library was screened for 26 sequences (15 microsatellites, 7 genes and 4 ESTs) using primer pairs that were available in our laboratory (Table 1). Clones were identified for all the sequences except *DIK010*. The resulting amplified fragments were of expected sizes. In addi-

tion, sequence was obtained from one clone for each gene or EST; all the sequenced clones contained at least a part of the respective gene or EST (data not shown). The average number of clones per sequence was 3.4; thus, coverage of the library calculated by screening (3.4) was greater than that calculated by the average insert size (2.5).

Other comments: To date, bovine yeast artificial chromosome (YAC)^{6–9} and bacterial artificial chromosome (BAC)^{10–12} libraries have been constructed. However, all these libraries, except the BAC library constructed from a bovine foetal cell line¹², were constructed using peripheral blood cells. Libraries derived from blood cells may contain rearranged immunoglobulin and T-cell receptor genes, and therefore, may not be desirable for analysing these genes. Because this library was constructed from fibroblasts that contained a germ-line genome, as demonstrated by construction of cloned bulls¹, it will be useful for the analysis of immunoglobulin and T-cell receptor genes.

Acknowledgements: We thank T. Takeda, T. Itoh, N. Hayashi-Sugai, and H. Douguchi for their technical assistance. This research was supported in part by a grant from the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan.

References

- 1 Takahashi S. *et al.* (2000) *Clone Anim Placent*, pp. 30–5.
- 2 Suzuki K. *et al.* (2000) *Anim Genet* **31**, 8–12.
- 3 Asakawa S. *et al.* (1997) *Gene* **191**, 69–79.
- 4 Hanahan D. *et al.* (1991) *Methods Enzymol* **204**, 63–113.
- 5 Chen Y.Z. *et al.* (2001) *Genomics* **74**, 55–70.
- 6 Libert F. *et al.* (1993) *Genomics* **18**, 270–6.
- 7 Smith T.P. *et al.* (1996) *Mamm Genome* **7**, 155–6.
- 8 Takeda H. *et al.* (1998) *Anim Genet* **29**, 216–9.
- 9 Hills D. *et al.* (1999) *Mamm Genome* **10**, 837–8.
- 10 Cai L. *et al.* (1995) *Genomics* **29**, 413–25.
- 11 Buitkamp J. *et al.* (2000) *Anim Genet* **31**, 347–51.
- 12 Eggen A. *et al.* (2001) *Genet Sel Evol* **33**, 543–8.
- 13 Inoue-Murayama M. *et al.* (1997) *Anim Science Tech* **68**, 443–9.
- 14 Shay T.L. *et al.* (2001) *Mamm Genome* **12**, 141–9.
- 15 Fahrenkrug S.C. *et al.* (2000) *Mamm Genome* **11**, 871–6.

Correspondence: H Yasue (e-mail: hyasue@affrc.go.jp)

2. 海外出張報告

1. 第28回国際動物遺伝学会大会に参加して

竹田 晴子

2002年8月、学問の町として名高いドイツのゲッチンゲンで、第28回国際動物遺伝学会大会が開かれた。この大会には世界中の主な家畜ゲノム（DNA）関係者とその情報が集結する。そのため、世界の家畜ゲノムの情勢を知るよい機会となる。また、研究の成果を発表する好機を得た私にとっては、人生を変えるような思い出深い大会ともなった。本編では、私の視点からみたウシゲノム研究の現状についてご紹介したい。

これまで人類は、経験則や統計学を用いて家畜動物の育種選抜を行ってきた。そして現在、生命の設計図とも言われるDNA情報を利用して、より確実な育種をめざす研究が始まっている。DNA育種を行うためには、まず、経済形質に影響を与える遺伝子やDNAの多型（DNA配列の違い）を見付けなければならない。近年、ポジショナルクローニングとよばれる方法を用いて、遺伝形式が比較的単純な遺伝病などの原因遺伝子が同定されはじめている。一方、肉量や霜降りなどの量的形質は、複数の遺伝子が関わっていると考えられることや、環境要因が大きいこと、表現型値の計測条件にばらつきがある（例えば霜降り度合いは人の目で判定されている）などの理由から、原因遺伝子の同定は難しいとされている。しかし、DNA情報が今後多大な利益を生むと考えられていることから、農業先進国を中心として、ポジショナルクローニング法を利用した遺伝子探し競争が始まった。そして、ついに、本大会の半年ほど前に、ベルギー・リエージュ大学のGrisartらが世界で初めて家畜の量的形質（乳量と乳脂肪量）に影響を与える遺伝子多型を同定したとの発表を行った（Grisart B et al., *Genome Res* 2002 Feb;12(2):222-31）。よって、私の、あるいは参加者の多くの関心事は、量的形質に対するDNA解析が世界でどの程度進んでいるのかという事であったと思う。

本題に入る前に、少しポジショナルクローニングについての説明を加えたい。人や牛などの2倍体生物は、1つ1つの細胞に各染色体を2本ずつ有している。そして父からその半分が、母からもその半分が子供に伝わり、新しい生命となる。ポジショナルクローニング法では、まず、染色体上の位置の明らかなマイクロサテライトDNAマーカーを指標にして、子供が親から受け継ぐ染色体領域を推定する。そして、ある形質を示す子供達が、親から特定の染色体領域を受け継いでいないかを統計的処理によって探し出す（一次スクリーニング）。そして、解析頭数を増やす、マイクロサテライトDNAマーカーの数を増やす、あるいは解析方法を変えるなどして、責任染色体領域を狭めていく（二次スクリーニング）。十分狭まったところで、そこに位置する遺伝子（あるいはDNA）についてその配列などを調べて、形質と連鎖するDNA多型を同定する。よって本大会でも、一次、あるいは二次スクリーニングに関する結果がいくつか報告されていた。例えば、カナダ・アルバータ大学のJeniferらは、牛の体重や増体率に影響を与える染色体領域をウシ第14番染色体（マイクロサテライトマーカーBMC1207とBM1577の間）と第19番染色体（マイクロサテライトマーカーBMS2503とBMS2389の間）と報告している。ところが、これらの結果の有意水準は5%程度のもが多く、即時利用可能なデータとは言い難い。もっとよい結果を有している研究室もあると思うが、DNA多型が見付かるまでは、あるいは特許を申請するまでは、その発表を控えているのだらうという印象を受けた。

一方、遺伝子の多型が同定されたものに関してはその公開と利用が始まっている。オースト

ラリアのgenetic solutions社のHetzel博士はThyrogloblin遺伝子の転写調節領域にあるDNA多型が霜降りスコアに影響すると報告した（特定のDNA型をホモで有すると、アンガス種やショートホーン種では霜降りスコアが11%上昇する）。そして、これらの多型を検出するためのGeneSTAR marbling testを開発し、既に5000頭分のDNA診断を行ったと述べた。また、Hetzel博士は、オーストラリア連邦科学産業研究機構（CSIRO）/ Beef CRC 社で、年間5万6千頭の牛（ブラーマン種、ヘレフォード種、シャロレイ種、ショートホーン種）を用いた解析が計画されており、既に枝肉重量や霜降りスコアに影響を与える染色体領域が4か所同定されていると述べた。また、リムジン種とジャージー種との交雑種を用いた解析により、第14番染色体が成長率に関連しているとも述べた。Hetzel博士はもともとCSIRO（公的機関）の職員であった。現在はCSIROで得た結果を元にベンチャー企業を立ち上げている。オーストラリアでは、遺伝子探しなどのお金のかかる仕事は官で行い、結果を民に移して育種への利用と結果の実証を行っているようである。世界的な遺伝子開発競争に国全体として打ち勝つためには必要かつ効率的な方法であるように感じた。

また、先に書いたベルギー・リエージュ大学のGrisartらもポスターによる発表を行っていた。acylCoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) という脂肪代謝に関わる遺伝子の中のAAという遺伝子配列がGCに変わることによって、232番目のアミノ酸がリシンからアラニンに変わる(K232A)。この変化によって乳量と総タンパク量が増え、逆に総脂肪量、脂肪含有率とタンパク含有率が減少する。そして彼らは、K232A変異によってDGAT1の酵素活性が変化することを示し、K232A多型が「単なる連鎖ではないこと」を証明した。時に、ポジショナルクローニングによって同定されたDNA多型は、真の変異の近くに位置しているだけであって、実は偽物である可能性がある。よって、検出された多型が真の原因であるかどうかを何らかの方法で証明しなければならない。つまり、統計学的な裏付けの他に、DNA変異によって遺伝子の発現量が変化するか、タンパク質の性質が変わるとかいうことを、タンパク質工学や、細胞やモデル動物を用いた実験を通して実証しなければならない。それにしても、リエージュ大学のグループは圧巻である。ヒツジの話になってしまうが、彼らはキャリピージと呼ばれる形質（胴体と、骨盤から足にかけての筋肉量が増え、脂肪量が減少する。餌効率はよいものの肉質が悪くなるため、好まれない形質とされる）に対するDNA多型も同定した。この形質は、超優性と呼ばれる遺伝形式を示し、父から変異が伝わり、かつ子供がヘテロの場合のみキャリピージになる。同定された責任染色体領域には、DLK1, GTL2, PEG11, MEG8という4つの遺伝子が並んでいるが、DLK1とPEG11は父から伝わった遺伝子のみが発現し、逆にGTL2とMEG8は母から伝わった遺伝子のみが発現するという「遺伝子の刷り込み現象」が起こっている。そしてやっかいなことに、DNA多型はDLK1とGTL2遺伝子の間に見付かった。遺伝子内の変異ではないことや、4つの遺伝子が複雑な発現形態を示すことなどから、ヒツジの骨格筋細胞を用いた実験や遺伝子改変マウスを用いた検証が試みられていた。また、家畜におけるポジショナルクローニングの世界初の成功例として、彼らが1997年に同定したウシ筋肥大症の原因遺伝子のマイオスタチンに関する研究も進められている（Grobet L et al., Nat Genet 1997 Sep;17(1):71-4）。ウシ筋肥大症では筋肉量が20%増大し、かつ肉も軟らかくなることから、ベルギーでは好ましい形質とされている。しかし、この形質はホモでしか発現しないことから、ヘテロでも（片方の親から1つ変異が伝わりさえすれば）形質が現れるようにするために、マイオスタチン遺伝子に変異を加えた遺伝子改変マウスの作製が試みられており、その途中経過が報告されていた。本大会では、各ポスター部門から最優秀ポスターが1つずつ選出されるが、彼らは全6部門のうちの3部門を征した。彼らは、

集団遺伝学や情報処理能力に長けており、かつDNA工学以外の分野にも柔軟に対応している。今後、DNA多型を見付けること自体は徐々に容易になっていく。その時に必要なのは、解析家系をうまく集め利用する能力、情報処理能力、そしてDNA工学以外の技術にも取り組むことのできる幅広い知識と柔軟性であると感じた。

今「DNA多型を見付けること自体は徐々に容易になっていく」と書いたが、現在はまだまだ困難きわまりない状態である。そこで、それらの作業を容易にするためのウシゲノムツールの開発が進められている。例えば、動物遺伝研究所の井原らは、ウシ遺伝地図上に新たに約1100個のウシマイクロサテライトマーカーを追加した。また、同研究所の伊藤らは、約1000個のマイクロサテライトマーカーと1500個の遺伝子断片配列（EST）を用いて、ウシRH地図と呼ばれものを作製した。それらは、目的地に達するまでの道路地図や標識のようなものであり、これらの情報が十分かつ正確であれば、迅速なポジショナルクローニングが可能となる。また特記すべきは、アメリカを中心とした国際協力によって、ウシのDNA配列をすべて読もうとするウシゲノム計画が進んでいることである（なぜか日本は参加していない）。フランス農務省のEggenらは、DNA配列解読の元となる約11万個のウシBACクロンのフィンガープリンティング（1つ1つのBACクロンにはウシのDNA断片が入っており、その断片を整列化するための作業）を終えたと発表した。また、イリノイ大学のAnneleらは1625個のマイクロサテライトマーカーと351個の遺伝子を含むBACクロンを同定したとの報告をした。さらに、イリノイ大学のDenisらは2万6千個のBACクロンの末端DNA配列を読み終わり、そのうち6849個の配列はヒトゲノムとの対応づけが可能であったと報告した。また、ヒトゲノムの解読において大きな役割を果たしたアメリカ・セラ社の子会社のMMI Genomics社は、既に1倍量のウシゲノム配列を決定し、その解析から63万7千個の一塩基多型（DNAマーカーの一種）を同定し、そのうち17万8千個はヒトゲノムとの対応づけが可能であったと発表した。つまり、MMI Genomics社は既に1cM（遺伝学上の距離）に平均212個の一塩基多型情報を有しており、そのうちの59個はヒトゲノム配列に対応しているのだ。1千個だ、1万個だといわれても、ピンと来ない人の方が多いと思うが、これは並大抵の数字ではない。人的にも金銭的にも相当な投資が必要である。しかし、先にも述べたように、これらの研究はウシゲノム解析における道しるべであり、車であり、ガソリンである。彼らのたゆみない汗と涙と努力の上に、ウシゲノム解析がはじめて成り立つ。彼らとそれを支える人々に、ただただ感謝したい。

私は、熊本県農業研究センターの小邦ら、岡山大学の国枝博士ら、東海九州大学の森本博士らとの共同研究によって、褐毛和牛における軟骨異形成性矮小体躯の原因遺伝子とその変異を同定し、その発表をかねて本大会に参加していた。この研究は、ポジショナルクローニング法によって新規遺伝子を同定したという点で、家畜動物において世界で初めての成功例である。しかも、同定されたLIMBIN遺伝子は四肢の成長だけでなく、四肢の形成にも関わる重要な遺伝子である可能性も高い。この発表には、本大会のワークショップ（ウシ・ヒツジ・ヤギゲノム）での口頭発表のチャンスが与えられた。そして発表の後に、会場や廊下、そしてトイレにおいても、面識のない人々に次々に声をかけられるという生まれて初めての体験をした。ポスター「マーカーと形質の連鎖」部門の優秀賞も頂いた。もちろん最優秀賞は、乳量や乳脂率に影響を与える遺伝子多型を同定したGrisartらである。

次の国際動物遺伝学会大会は2004年9月、東京の明治大学で開催される。この大会では、量的形質に関するゲノム解析結果が数多く報告されるであろうし、DNA情報の育種への利用も始まっているだろう。新たなゲノム時代の幕開けに、その一員でいられるよう、日々の努力を重ねたい。

2. 第28回国際動物遺伝学会に参加して

伊藤 智仁

2002年8月11日から15日までの5日間ドイツのゲッチンゲンで第28回国際動物遺伝学会 (ISAG2002) が開催された。ここの気候はホテルには冷房が無いくらい夏でも涼しい。今回のポスター発表は415件で、開催されるごとに増えている。

ウシWhole-genome sequence

ウシゲノムで今回注目したのは、ウシ全ゲノムシーケンスがどこまで進んでいるのかである。さらにどのような計画になっているのか知りたかった。このプロジェクトは様々な国が協力し、ウシの全塩基配列を決定しようというプロジェクトである。方法であるが、彼らはまずBACと呼ばれるDNA断片を特定の位置で切断する制限酵素により消化する。各DNA断片は塩基配列の違いにより様々なパターンで切断される(フィンガープリント)。このパターンは隣り合ったDNA断片と同じようなパターンを示す。この情報を基にそれぞれのDNA断片をつなげていく。これをコンティグと呼ぶ。まずは、複数のコンティグを作成し、グループとする。この次に各BACをランダムに切断して塩基配列を読んでいく。ランダムに読まれた塩基配列はBACの情報とコンティグの並びにより塩基配列がどのような順番にならんでいるか整列することができる。まとめると、各コンティグをランダムシーケンスして全ゲノムが読めたことになる。この方法はマウスゲノムで成功を納めている。今回の学会の時点(2002年7月)では263,714個のBACをフィンガープリントし、10,573コンティグを作成した。さらに、BACのエンドシーケンスを26,690行ったという報告だった(ワークショップにおけるA. Eggenの報告より)。彼らの目標は280,000個のフィンガープリントなので、まだ目標値には遠いが1年以内にはランダムシーケンスにはいるのではないかと思われた。日本は残念ながら、このプロジェクトには参加していない。ちなみに、このフィンガープリントによるBACコンティグのデータはインターネットで情報をみることができる。専用のアプリケーションをダウンロードして見ることもできるが、以下のURLから確認することができる。

Bovine BAC contig<<http://www.livestockgenomics.csiro.au/WebFPC/bands.html>>

マーカー名やBACの名称を入れるとコンティグが確認できる。(専用ソフトを利用するよりも、こちらの方が情報量が多いような気がする。)

RH地図作製

私が今回RH地図作製についてポスター発表したためもあって、ゲノム解析ツールに目がつくということもあるが、今回の学会ではゲノム解析ツールの報告が多かったように思えた。連鎖解析などにより、ある程度の染色体領域までは絞り込むことはできるが、それ以上の解析のためには現在の情報では少ないという事の反映なのかもしれない。ブタRH地図の作製については、INRA、私のRH地図作製でお世話になっているネバダ大学、さらにイリノイ大、NIAS、コペンハーゲン大、USDAの共同研究により進められている成果が報告された。ブタでは染色体番号等の情報がウシよりもオープンになっているという状況もあるが、共同研究によりLODスコア8以下のマーカーを約4000個以上マップしたというのは正直に言って衝撃的であった。共同研究

により各研究機関のクオリティを維持するのは相当大変な事と思う。

当時我々がマップしていたマーカーは約1500個である。この時点でウシRH地図で先行しているテキサスA&Mのマーカー数を越えているつもりであったが、彼らも次世代RH地図について報告し、マーカー総数では我々とほぼ同じくらいのRH地図であった。(マーカー数とLODスコアは、地図の精度を反映する。)

最後に

Best Posterに竹田研究員のポスターが選ばれた(すばらしい)。今回の学会のポスター(受賞ポスター及びすべてのポスター)及び要旨はすべてインターネットを通じて誰でも見ることができる。以下がそのURLである。

ISAG2002<<http://www.gwdg.de/~uatz/isag/ISAG2002.html>>

ネットを通じて(無料で)閲覧できるというのは良いアイデアであると感じた。学会が終了しても情報の更新を行っている。次回の開催国は日本である。どこまでこのような気の利いた事が行えるのであろうか。個人的には各プレゼンテーションをインターネットを通じて公開するなんていう方法も良いかと思う。

ウシのゲノムシーケンスが完了したら、マイクロサテライトマーカーを探すのは非常に容易になるであろう。さらにSNPs等の情報も増えるので、これからの時代はいかに早く大量に多型を解析出来るかがポイントになってくると思う。よって、バイオインフォマティクス、さらにSNPsを高速に処理できるシステム(Pyrosequencing等)などの次の時代への準備が必要であると強く感じた。

3. International symposium - In post genome era, application strategy of genomic information for livestock production - に参加して

平野 貴

2002年10月29日に韓国のソウルから40kmほど離れたスーウォン市にある国立畜産研究所において開催された国際シンポジウムに演者として招待された。主催は韓国の国立畜産研究所である。演題は韓国、日本、中国の三カ国からのみであり、このシンポジウムの大きな目的として、アジアの国々でまとめ、欧米諸国に対抗したいという気持ちがあったようである。招待された演者は日本から2名、中国から2名であり、日本からのもう一名の演者は農業生物資源研究所の三橋忠由博士であった。

シンポジウムは、1) Bovine Genomics, 2) Swine & Poultry Genomics, 3) Animal Bioinformaticsの3つのセッションから構成されていた。筆者は、Bovine Genomicsのセッションにおいて、動物遺伝研究所で行われている和牛のQTL解析および遺伝病の解析によって得られた成果で、特に筆者が深く関係するクローニン-16欠損症および連鎖解析で脂肪交雑に有意な効果が見られる領域の解析の現状について紹介した。

三橋氏は、家畜改良センターで構築されたメイシヤン、デュロックを親世代とした実験家系を用いた成果、STAFF研究所で作成されたブタRHパネルおよびRHマップ、毛色に関する遺伝子の多型を利用したブタの品種鑑別、また、ニワトリのマイコプラズマ耐性の個体を用いて作成した実験家系を用いてAFLP解析を行い、これに連鎖するAFLPバンドを検出したことなどを報告した。

中国からの演題は、一つは抄録にはブタの脂肪組織由来ESTsの解析について掲載されていたが、実際の発表はニワトリの解析について行われた。彼らは、マグネティックビーズを用いて microsatellite enriched library を作成し新しいマーカーを開発していた。肉質形質、卵形質、他82形質に対し実験家系を構築し、functional analysis, candidate gene analysis, linkage analysisを行っている。その結果、体重、皮の色、脚の色に関する遺伝子座をChr. 2に、腹腔内脂肪に関する遺伝子座をChr. 4にマップし、Chr. 4に関しては、FABPs遺伝子を候補遺伝子として挙げていた。もう一演題は、何故かイネゲノムに関するものであった。

韓国からは、各セッションに一演題ずつ発表が行われた。ウシゲノムのセッションでは、一つの精子に由来するゲノムDNAをPEP法を用いて全ゲノムを増幅し、組み換え頻度を等を調べたものであった。ブタゲノムに関しては、ブタからヒトへの伝播が知られる porcine endogenous retroviruses (PERVs) の解析について紹介された。これらの解析からPERVsの約55%はそのコード領域に起きた変異のために本来の位置よりも前に終止コドンができてしまうためにその伝播性を失っていることを示した。しかし、伝播性をもつものは限られているが、伝播の際に組み換えを起こすことで、その能力を再び獲得する可能性があるということだった。また、彼らはPERVsの染色体上の位置を決定していた。

Bioinformaticsのセッションでは、NCBIのCOGs (Clusters of Orthologous Groups of Proteins) を利用して43種の微生物のゲノム配列を比較し、これらで保存されている遺伝子を調べた知見が発表された。その結果として、72個の遺伝子が保存されていることを示した。しかし、残念ながら家系など集団と多型マーカーを用いてのゲノム解析という報告はなかった。

韓牛 (Hanwoo種) と黒毛和種は遺伝的に近い関係にあり、やはり脂肪交雑が入りやすい品種だそうで、研究の対象となる形質も脂肪交雑だということであった。しかし、韓国では個体の

登録制度などが定められておらず、その親子関係などがはっきりしないため、我々動物遺伝研究所で行っているように市場からDNAサンプル、表現型データ、家系情報を得て大規模な父方半きょうだい家系を構築して解析に利用することは困難であると考えられた。現在は候補遺伝子アプローチで目的の表現型に関する遺伝子を探索していた。そのためか、筆者が解析に用いている家系について関心があるようであった。

懇親会の席などで、多くの年輩の方々は我々に対し流暢に日本語を話されるのに驚かされた。日本と韓国の歴史の一端を見たような気がした。

4. Plant, Animal & Microbe Genomes XI に参加して

高須賀晶子

この学会は、アメリカ西海岸のメキシコとの国境の町、サンディエゴで毎年開かれているもので、今回、私は、ウシ/ヒツジのワークショップで、動物遺伝研の作成した高密度マーカーから成る遺伝地図および物理地図の成果を発表するために参加した。

1400個以上の新規マイクロサテライトマーカーの遺伝地図へのマッピングと1800個以上の Expressed sequence tags (EST)のRadiation Hybrid (RH)地図へのマッピングという成果は、かなりインパクトがあったようで、このような発表の機会に恵まれ、大変光栄であった。発表の後、新規マイクロサテライトマーカーは、いつ公開されるかと、複数の人から聞かれたし、また、アメリカ農務省の女性研究者に、励ましの言葉も頂いた。

しかし、ゲノム研究は、国際協調と同時に国際競争であり、また、民間企業と公的研究機関の間の協力と競争の同時進行でもある。ウシにおいては、アメリカ農務省肉畜研究センターを中心として、一昨年開始されたウシBACコンティグマップがほぼ完成し、6月に発表されることが公表された。また、イリノイ大は彼らのRH地図を充実させ、第2世代RH地図を作成していた。彼らのマップしたESTマーカーの数は、私たちのRH地図とほぼ同数とみられることから、今後、私たちのRH地図の公表の時期やマッピングのマーカー数について、どのように戦略を立てるかが重要と思われた。

家畜ゲノムシーケンシングのワークショップでは、ニワトリ、ウシ、ブタの順に、ゲノムシーケンシングへの国際的な取り組みと進展状況が紹介された。ニワトリは、BACコンティグマップが春に完成予定で、ゲノムシーケンシングについても、すでに6割以上が読まれていた。ゲノム解析では家畜の中でも遅れをとっていたニワトリが、ゲノムサイズが小さいことから、一気に先頭に躍り出た感がある。ウシは、前述のように、BACコンティグマップが完成しつつあり、次期のゲノムシーケンシングの対象に、ぜひとも選ばれたい。ブタのゲノムシーケンシングは、ウシの後になると予想されることから、ブタについては、RH地図の充実やBACコンティグマップの作成が行われていた。

プレナリーレクチャーでは、民間企業のMMI Genomicsから、ウシのゲノムシーケンシングによる一塩基多型(SNP)の検索と高効率のSNPタイピング法の開発が紹介された。彼らによると、ある経済形質について、2万個のSNPをタイピングし、6000個の等間隔のSNPマーカーから成るゲノムSNP地図を、約1ヶ月で完成できるという。ベンチャー企業が、ヒトの疾患遺伝子のみならず、家畜の経済形質もターゲットとするようになってきたといえる。

家畜のゲノム解析はここ数年で大きく進展したが、あと2-3年後には、さらに劇的な変化が予想される。

一方、経済形質に関わる遺伝子の同定については、ベルギーのGeorgesより、IGF2 locusにマップされたブタの骨格筋量と脂肪含量に関する量的形質(QTL)が、転写調節領域のSNPによることが同定されたことが紹介された。経済形質が、転写調節領域のSNPに起因することが明らかにされた例としては、世界初であり、また、新規転写因子の存在が示唆されることから、今後の展開が期待される。

その他の経済形質についても、多くは、責任領域のBACコンティグが作成されており、遺伝子の同定は時間の問題のように思えた。動物遺伝研は、ぜひ、一歩先んじて、遺伝子の同定に到って欲しい。



動物遺伝研究所年報
第10号 (平成14年度)

平成15年7月31日発行

発行 (社)畜産技術協会

〒113-0034 東京都文京区湯島3-20-9 緬羊会館内

電話 03-3836-2301

F A X 03-3836-2302

編集及び連絡先 (社)畜産技術協会附属動物遺伝研究所

〒961-8061 福島県西白河郡西郷村大字小田倉字小田倉原1

電話 0248-25-5641

F A X 0248-25-5725

印刷 (有)ワタベ印刷所

〒961-0936 福島県白河市大工町18

電話 0248-22-3241