



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 11 号
(平成15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15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ある。

これまで研究所は、ウシゲノム解析ツールの開発を独自に担いつつ、黒毛和種を主たる研究対象として、DNA育種手法実用化を目的とした研究を進めてきた。その成果の一つとして、DNAマーカーとの遺伝的な連鎖関係からいくつかの遺伝性疾病の原因遺伝子を同定し、不良因子を見分けるDNA診断法を開発することで不良因子キャリアのコントロールを可能にしてきた。しかしながら、依然として複数の不良因子が、クローデイン-16欠損症ほどの影響力はないものの、黒毛和種集団に残存していることから、今後とも育種現場との連携を密にして対処していかなくてはならない。

また、ウシゲノムの解析のためツールの開発に伴い、経済形質責任遺伝子の研究も進んできた。本年報においてそれらの進展の様相が述べられているが、肉質や肉量に関わる責任遺伝子を同定することはもはや夢物語ではない段階まで到達することができたと思う。DNAマーカーによる連鎖地図の高密度化とDNAクローンという実体を持つ断片をつないだ詳細な物理地図の作成のおかげで、量的形質に関するメカニズムが分子レベルで解明されるのは近いかもしれない。今年度の年報は、これまでひたすら行ってきた長い地道な基盤作りから大きな飛躍が始まり、収穫期への転換の記念碑的なものになることを願ってやまない。

関係各位におかれましても、研究所の今後の研究推進に一層のご支援をいただければ幸いに存じます。

平成16年 7月

社団法人畜産技術協会

会長 山下 喜 弘

平成15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15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 ウシゲノム解析用ツールの開発	3
1) - 2 ウシ遺伝性疾病・抗病性のDNA育種手法の開発	8
1) - 3 肉用牛経済形質のDNA育種手法の開発	11
2) BSE感受性の遺伝的差異の診断技術の開発	21
3) 牛肉の品種鑑定技術の開発	24
2. 平成15年度研究発表	
1) 論文発表	26
2) 学会発表	27
3) 研究発表要旨	28
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	33
2) 肉用牛ゲノム研究・実用化技術推進委員会	33
3) 全国DNA育種推進会議	34
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	34
5) 牛肉の品質鑑定技術検討委員会	35
6) 研究会等の開催	36
4. 委託研究	38
5. 研修員の受け入れ	40
6. 職員の普及活動	41

Ⅲ 研究の解説	
1. ウシゲノム連鎖地図の現状	43
Ⅳ 総務	
1. 職員名簿	55
2. 職員の異動	56
3. 職員の海外出張	56
4. 施設・機器の整備	57
1) 施設	57
2) 平成14年度導入の主要機器	57
5. 購読雑誌一覧	59
Ⅴ 資料	
1. 論文再録	61
2. 海外出張報告	116

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関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った。

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1,094㎡（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。

これまでに脂肪交雑や枝肉重量に関与するとみられる60個所以上の染色体領域を有意水準1%以下のレベルで位置づけ、所在するQTLの遺伝子そのものを同定すべく努力を続けている。染色体領域が位置付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、褐毛和種、及び、ホルスタイン種に見られた計5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平成12年度をもって予算上一区切りとなった。平成13年度からは新たに、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「畜産新技術開発活用促進事業」として進め、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「肉用牛遺伝資源活用体制整備事業」として進めている。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年度からは新たに「BSE生体診断技術緊急開発事業」がスタートし、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。平成15年度からは、「牛肉の品種鑑別技術開発事業」がスタートした。

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15年度末には所長を含む管理部門4名、研究部門21名（研究員8名、研究補助員13名）となった。

Ⅱ 平成15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 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

ウシのほとんどの経済形質は量的形質 (quantitative trait) であり、遺伝的には量的形質遺伝子座 (quantitative trait loci, QTL) に支配されている。現在までに、表型値と血統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を用いた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。この手法では、種畜の保有する優良遺伝子型が後代集団へ遺伝する確率を推定できるが、特定の個体についての情報はない。そこで、近年の発展しているゲノム科学の成果を活用したDNA育種手法を開発し、個体毎のDNA情報から育種の精度を高めることが求められてきた。

1980年代後半よりヒトや実験動物等で、DNAマーカーを利用した連鎖解析手法によって表現型 (特に劣性遺伝を示す形質) に影響を及ぼす領域、および、そこに存在する責任遺伝子の同定が行われてきた。ウシにおいても、クローニン-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てきた。DNAマーカーの中でも、CAの繰り返し配列からなるマイクロサテライト (MS) マーカーは、最も多型に富みゲノム全体に分布している優れたマーカーである。畜産の分野において、MSマーカーの多型と表型値との相関性を調べるQTL解析手法を用いることにより、表型値にばらつきをもたらしている領域を明らかにし、その領域に存在するMS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、関連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、育種学以外の飼養学や栄養学等の分野にも貢献することが期待される。我々は、道県、および、(社)家畜改良事業団との共同で父方半きょうだい家系を用いた経済形質QTLマッピング (位置付け) を行ってきた。

ゲノム解析でマッピングしたQTL遺伝子座領域を狭めて信頼性の高い高精度マーカー情報を得、それらの責任遺伝子をクローニングするためには詳細なウシ染色体地図が必要である。ウシの育種選抜に利用可能なDNA情報の開発を加速化するため、高密度ゲノム連鎖地図の作成、マッピングされたDNAマーカーによる物理地図である放射線照射ウシ体細胞ハイブリッド地図 (Radiation Hybrid Map, RH地図) のフレーム作成、ウシ発現遺伝子座断片 (Expressed sequence tagged, EST) のマッピング、ヒトゲノム情報を有効に活用できるウシ-ヒトゲノム比較地図の作成などを行い、詳細なウシ染色体地図を作成する。

QTLをウシゲノム上にマッピングするには、ゲノム連鎖地図が不可欠であり、地図のマーカー密度が高いほど正確な領域が判明する。しかしながら、マーカーの位置は遺伝的組換えの頻度を計算して決められたものであるため、どこまで高密度化していてもマーカーはゲノム上の点に過ぎない。隣接するマーカーとの間から領域特異的にマーカーを開発することはできない。そこで、マーカーで高密度化した、いわゆる計算で作成した連鎖地図から、DNAクローンという物質的な実体で位置付けた物理地図に変換してやらなくてはならない。この役割を演じるのがBACクローンである。マーカーとマーカーの間を複数のBACクローンでつないだものをBAC整列地図、あるいは、BACコンティグ地図という。いったん整列化すると、任意の領域からマーカーを

開発することができ、ヒトゲノム情報から予測できるウシ相同遺伝子をコンテイング化した領域から分離できるようになる。なぜなら、整列化領域に存在するBACクローンのDNAからマーカーや遺伝子を開発できるからである。連鎖地図から物理地図への変換にはマーカーの高密度化が必要であり、物理地図を作成できれば、QTL領域の解析は飛躍的に進展する。

最も情報量の多い生物種はヒトであるため、ヒトゲノム情報を有効に活用することはQTL責任遺伝子のクローニングに大いに意義のあることである。ウシの染色体領域は、それぞれヒト染色体の特定の領域と類似している（シンテニーであるという）ので、ウシ遺伝子を貼り付けた物理地図を作成すれば、ウシ遺伝子とその隣の遺伝子の間に存在するであろう遺伝子の情報はヒトゲノムから得られる。しかしながら、遺伝子断片であるESTには多型がないため、連鎖地図にマッピングすることはできないが、RH地図にはマッピングできる。そこで、連鎖地図上に並べたDNAマーカーをフレームとしてRH地図を作り、遺伝子とその地図にマッピングすれば、詳細な物理地図が得られることになる。この段階まで進めば、もはやマーカーは点ではなく、マーカーとマーカーの間に存在する遺伝子が推測でき、その領域のBACクローンDNAを鋳型にPCRすれば、任意のウシ遺伝子の塩基配列の変異を調べることが可能になる。

したがって、高密度化したゲノム連鎖地図を作り、物理地図であるRH地図を作ることは、QTL責任遺伝子のクローニングに重要な準備であると言える。

(2) 研究の具体的な目標

(2)-1. マイクロサテライトの開発、および、高密度ゲノム連鎖地図の作成

1997年に公開された米国農務省肉畜研究センター（USDA-MARC）によるウシゲノム連鎖地図には約1,200種のマイクロサテライトがマッピングされている。我々は、USDA-MARCのウシリファレンスファミリー（標準家系）を用い、ゲノム連鎖地図を完成させる。このリファレンスファミリーで作成する地図の解離度限界は0.8cMなので、3,000個程度のマイクロサテライト（平均間隔：1 cM以下）を載せたゲノム連鎖地図を完成させる。

(2)-2. ウシ染色体地図の作成：放射線照射ウシ体細胞ハイブリッドパネル地図（RH地図）、および、ウシ-ヒトゲノム比較地図の作成

我々は、これまでに、ヒトゲノム情報を有効に活用できる詳細なウシ染色体地図を作成するための準備を進めてきた。まず、平成12年度までに米国ミネソタ大学と共同で、染色体物理地図の作成に有用なRHパネルの作成を完了した。また、大まかに遺伝子の染色体マッピングを行うために、ウシ体細胞ハイブリッドパネル（Somatic Cell Hybrid Panel, SCHパネル）を調製した。さらに、ウシ-ヒトゲノム比較地図の作成のため、ウシの各種組織で発現している遺伝子断片であるESTを約3万6千個開発し、GeneBankに登録した。これらのESTに含まれる約7,000配列からPCR増幅用のプライマーセット4,000種を作成した。これらの準備してきたツールと(2)-1で作成するウシゲノム連鎖地図を活用して詳細なウシ染色体地図を作成する。

- ・ゲノム連鎖地図に載せたマイクロサテライトでフレームワークマップを作る。
- ・4,000種のウシESTをマッピングし、ヒトゲノムへ位置づけ、比較地図とする（ウシEST数、419,416：平成16年4月30日現在）。
- ・最終的なウシのRH地図は、3,000個のマイクロサテライト、3,000個のESTを含む合計約6,000座とする。

(3) 研究開発の成果

今年度の成果であるウシゲノム連鎖地図とウシRH地図の概要は表1、2と表3にまとめて示し、詳しくは、第3節の1.ウシゲノム連鎖地図の現状、に述べている。

最新のウシゲノム連鎖地図のMS数は、3,802個となった。これらのMSのマッピング、および、MSの開発へ貢献してきた機関を表2にまとめた。当研究所によってマッピングされたMS数、および、開発されたMS数は共に過半数を越えており、最新ウシゲノム連鎖地図作成において当研究所が主導的な役割を果たしてきたことは明らかである。

表1. マイクロサテライト (Microsatellite, MS) 開発とマッピングのまとめ

1997年のUSDA-MARCウシゲノム連鎖地図のDNAマーカー数	1,236
ゲノム連鎖地図に新たに載せることのできたMS数 (内訳)	2,397
独自開発したMS数	2,183
他機関が開発したMS数	214
最新のウシゲノム連鎖地図のMS数	3,802

独自開発し、物理的に染色体上の位置を決めているが、連鎖解析でマッピングしていないMS、346個を除く。

表2. 最新ウシゲノム連鎖地図におけるマイクロサテライト等のマーカー開発の貢献度

機 関	国	マッピングした マーカー数	マーカー開発数
1 動物遺伝研究所	日本	2,397 (63.0%)	2,183 (55.2%)
2 USDA-MARC	米国	1,405 (37.0%)	781 (19.7%)
3 リュージュ大学	ベルギー	0	84 (2.3%)
4 ILRI	ケニア	0	79 (2.1%)
5 CSIRO	オーストラリア	0	57 (1.5%)
6 IDVGA	イタリア	0	42 (1.1%)
7 URB	米国	0	36 (1.0%)
その他		0	540 (18.8%)
合計		3,802 (=100%)	3,802 (=100%)

表3. RH地図のまとめ

フレームワークに用いたMS数	3,219
マッピングしたMS数	3,294
マッピングしたEST数	2,582
合計	5,876
RHパネルの平均保持率 ゲノムの全長	17.5% 25,088 cR (約120 kb/cR)

(4) 国内および海外の状況

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きたが、ツールは十分でなく、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ていた。

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。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・オーストラリア・ブラジル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米国の TIGR (The Institute of Genomic Research) とカナダのブリティッシュ・コロンビア大学を含む共同研究体制で進められている。

BACクロンの整列化とは、多数のBACクロンの中からお互いに一部重複するクロンのつながり具合を調べ、並べていくことの繰り返しでBACクロンをつないでいくことである。つながり方には2つの方法がある。1つはフィンガープリンティング法である。BACクロンを制限酵素(特定のDNA塩基配列の個所を切断する酵素)で切断してゲル電気泳動でDNA断片のサイズで分離すると、BACクロン特有の切断された断片のパターンが得られる。このパターンをフィンガープリントと言ひ、お互いに一部重複するクロン間では類似のパターンが見られる。このパターンの類似性からBACクロンをつないでいく方法である。もう一つの方法はBACクロンの末端配列解読法である。BACクロンの末端配列を解読してPCRで増幅できるプライマーを作成する。このプライマーでスクリーニングされるBACクロンはこの末端配列を共通に有する、すなわち、お互いにつながっていることがわかる。

この国際協力プロジェクトによる研究成果であるBACクロンのフィンガープリントと末端配列などの結果はネット上に公開されている。これまでの過去2年間で、40万クロンのフィンガープリンティングがなされ(平成16年3月中旬)、26万6千クロンの末端配列は4月に終了した(表4~6)。ウシBAC整列地図作成に関する論文が、国際協力プロジェクトから近々発表されることだろう。

表4. BAC フィンガープリンティング数

Library	Clones	Fingerprints	In contigs	Singles
CHORI-240	200,064	170,644	159,542	11,102
RPCI-42	94848	83,627	76,633	6,954
TAMBT	44,928	40,380	22,998	17,382
Total	339,840	294,651	259,173	35,478

表5. 解読したBACクロンの末端配列

Library	Clones	Paired	Single	Clones	Reads	Length
CHORI-240	200,064	119,091	26,067	145,164	264,261	605.4
TAMU	94848	9,686	5,299	14,985	24,671	501.5
INRA	44,928	11,174	544	11,718	22,892	722.8*
Total	339,840	139,957	31,910	171,867	311,824	605.8

表6. ヒトゲノムに占める作成したウシBAC整列化領域の割合

Human Chr *	Size (bp)	Covered by Bovine Ctgs	% Coverage
1	245,203,898	203,209,542	83
2	243,315,028	189,896,964	78
3	199,411,731	146,712,637	74
4	191,610,523	87,438,872	46
5	180,967,295	164,929,686	91
6	170,740,541	157,704,095	92
7	158,431,299	134,446,220	85
8	145,908,738	130,536,790	89
9	134,505,819	122,085,695	91
10	135,480,874	102,980,468	76
11	134,978,784	93,970,761	70
12	133,464,434	129,723,153	97
13	114,151,656	75,906,289	66
14	105,311,216	56,025,377	53
15	100,114,055	49,252,665	49
16	89,995,999	32,748,104	36
17	81,691,216	30,765,924	38
18	77,753,510	54,277,916	70
19	63,790,860	31,378,878	49
20	63,644,868	27,604,294	43
21	46,976,537	12,194,145	26
22	49,476,972	20,136,019	41
X	152,634,166	136,858,566	90
Y	50,961,097	-	-
Total	3,070,521,116	2,190,783,060	73

* UCSC hg15 masked sequences

(5) 今後の進め方

今年度までに進めてきた高密度ゲノム連鎖地図の作成、および、RH地図とウシ-ヒトゲノム比較地図の作成は現段階で完成とし、論文発表を行う。これらの情報は、経済形質の責任遺伝子だけでなく、遺伝性疾患の原因遺伝子のポジショナルクローニングに威力を発揮すると期待できる。

1) - 2 ウシ遺伝性疾病・抗病性のDNA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

ウシの遺伝性疾病の多くは常染色体性単純劣性遺伝病である。遺伝性疾病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、遺伝性疾病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、遺伝性疾病のキャリア（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。

感染症の防御対策において、飼養管理面の改善が重要なことは当然であり、これによってかなりの部分で目的を達成できると考えられるが、その上で、感染症に対する抵抗性、いわゆる抗病性育種を可能にすることが本事業の目的である。ここで云うウシの抗病性とは、細菌やウイルスなどの寄生生物によってもたらされるいわゆる感染症の発症を抑制するように働く遺伝的な形質を云う。抗病性に関わるDNA情報を明らかにし、選抜手法として確立し、感染症防御を容易にする。小型ピロ、乳房炎、トリパノゾーマ症等の疾病に対する感受性（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、これらの疾病に対する感受性（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。

また、黒毛和種に多発する脂肪壊死症を起こしにくいDNA情報を明らかにすることも経済的に意義を持つ。

本事業では、これらの疾病、あるいは疾病に対する感受性（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病原因遺伝子の単離・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、遺伝性疾病の発症を制御しつつキャリア牛の遺伝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. ウシ遺伝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14年度までの成果を表7に示した。

黒毛和種では水頭腫、盲目等の遺伝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. ウシ遺伝性疾病解析の今年度の成果

(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

表7. 遺伝性疾病の遺伝子解析のまとめ

劣性遺伝病名	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

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：特定の地域集団で散発する疾病であるが、ビタミンA欠乏などの栄養障害や感染症が原因とも考えられていた。一症例についての病理的な観察では、網膜神経細胞層の空胞形成と視神経繊維に疎な網状構造が見られたことから、遺伝的な異常の可能性も考えられた。しかしながら、ほとんどの発症牛で病理診断がなされていないため、これらの個体は同じ原因で発症したかどうか不明である。人間の場合は診断法が精緻なため、盲目をタイプ別に分類できるが、本ケースではそれを望むことはできない。発症牛の血統記録を総合すると、特定の個体（ファウンダー）に由来しているようであるが、そうでない症例も見られた。したがって、この疾病が遺伝的なものかどうか、劣性かどうかを含め、その本態を明らかにする現実的に最善の手段は、DNAマーカーを用いた連鎖解析で原因遺伝子座を特定の領域にマッピングできるかどうか調べることである。もし、劣性遺伝病であるなら、発症牛はホモ、その親はヘテロのマーカーが複数並ぶゲノム領域があるはずである。

発症個体数に性別による違いはなかったことから、常染色体を対象にDNAマーカーを選び、発症牛14頭を含む家系で連鎖解析を行った。その結果、染色体5番に最も強い連鎖を認めた（LODスコア＝3.9）。発症牛11頭はその領域でホモであったが、発症牛3頭はヘテロであった。そこで、発症牛3頭で連鎖解析を行ったところ、染色体18番にマッピングされた（LODスコア＝3.0）。2つの領域でそれぞれマーカーを増やすことで、ファウンダーには2つの異なる遺伝子座で変異をヘテロで持つことを証明した。5番と18番の変異はそれぞれが独立にホモになると発症するようである。このように、疾病に関する基礎的な情報がなくとも、ゲノム解析で遺伝性疾病かどうか判明する。2つの遺伝子座の同定は、ヒトゲノム情報を利用する候補遺伝子探しを進めている。

(3)－2－3. 上記以外の遺伝性疾患も解析の対象にしている。発育不全、腎無形成症、腎機能不全症、乳頭欠損などである。

(3)－3. ウシ抗病性育種

(3)－3－1. 小型ピロ抵抗性（北海道畜試との共同研究）：放牧時に小型ピロに感染し、貧血症状を示すことを特徴とするが、黒毛和種と比べホルスタイン種やヘレフォード種は感受性を示すことが知られている。黒毛和種とヘレフォード種の交配により、小型ピロ抵抗性のばらついた集団を作成し、抵抗性を支配する遺伝子座の特定を行っている。黒毛和種とヘレフォード種の交雑であるF1は、黒毛和種と同等の小型ピロ抵抗性を示したことから、F1雄とヘレフォード種雌間のバッククロス家系を作成した。この実験家系を用いたゲノム解析を進めている。

(3)－3－2. 乳房炎抵抗性（家畜改良センター、北海道畜試との共同研究）：乳房炎発症に及ぼす環境要因を最小にするため、特定地域より搾乳牛のDNAを集め、ゲノム解析の対象とした。対象とした搾乳牛は、初産時の体細胞スコアの得られており、共通の祖父牛を持つ。これらの搾乳牛集団の中から、体細胞スコア小（抵抗性）と体細胞スコア大（感受性）の集団を集め、マイクロサテライトマーカーで相関解析を行った。その結果、染色体21番（BTA 21）とBTA 22 に同程度の遺伝的効果を示す遺伝子座を特定した。BTA 22の遺伝子座についてBACクローンによる整列地図を作成し、この領域に存在する遺伝子を対象に抵抗性・感受性と相関する塩基置換を調べている。

(3)－3－3. トリパノゾーマ抵抗性（国際畜産研究所、英国リバプール大学との共同研究）：アフリカ赤道周辺に分布している原虫トリパノゾーマは外来肉用牛種である*Bos indicus*の貧血を引き起こすが、在来種である*Bos taurus*のN'Dama種はトリパノゾーマ抵抗性を示すことが知られている。そこで、国際畜産研究所では、15年かけて*Bos indicus*であるBolan種とN'Dama種を用いて受精卵移植技術を駆使したF2リソース家系を作成した。検出したQTL領域等の結果は5. 資料-1. 論文再録に掲載している Hanotte *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 7443-7448. の論文を参照されたい。これらQTL遺伝子座の解析は、平成15年から英国の財団ウェルカムトラストの出資により、国際畜産研究所・リバプール大学・英国ロズリン研究所の共同研究プロジェクトとして進められている。

(4) 国内および海外の状況

ウシの疾患のゲノム解析では、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。今年度には、無角形質に影響する遺伝子座として*scurs*座がBTA 19にマッピングされた (Asai *et al.* (2003) *Animal Genetics*, 35, 34-39)。

(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 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。しかしながら、ウシのほとんどの経済形質は量的形質であるため、責任遺伝子の特定は困難であることが容易に予想できる。責任遺伝子の特定という目的を達成するには明確な戦略に基づいた組織的・継続的な取り組みが欠かせない。

平成6年度に開始された本課題の第一期では、肉用牛（黒毛和種及び褐毛和種）の増体・肉質等の経済形質についてDNA情報を指標とした改良手法の開発を目的に、道県の畜産試験場・研究所や(社)家畜改良事業団家畜改良技術研究所との共同研究を開始した。平成12年度までに、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ており、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。平成13年からの第二期では、道県等との共同研究を継続して、肉用牛の増体・肉質等の経済形質領域をマッピングする（染色体上の位置を特定する、位置付ける）とともに、マッピングした経済形質、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. 経済形質解析のためのDNAサンプルの収集

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。特定種雄牛を父とする大規模な父方半きょうだい家系を作成することは、道県においては該当種雄牛の遺伝的能力の的確な把握と後継種雄牛の作成に重要であり、かつ、多種多様な解析用家系の作成は経済形質に影響する遺伝子（QTL）を同定するためにも有用である。そこで、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サンプルを収集する

表8. 平成15年度までのDNAサンプル収集状況

収集数	年 度	収 集 数	合 計
道県、LIAJ	13	7,902	
	14	12,413	
	15	17,658	37,973
動物遺伝研究所	13	1,054	
	14	2,503	
	15	5,387	8,944
合 計			46,917

ことを始めた。当研究所では、東京食肉市場、および、大阪市食肉市場におけるサンプリングを実施している。平成15年度までの収集の状況は表8の通りである。これらの収集したDNAサンプル数は約4万7千となった。これらのサンプルから17以上の父方半きょうだい家系が作成され、経済形質のマッピングに利用されている。

(3)–2. ウシ経済形質解析の前年度までの経緯、および、今年度の成果

これまでウシ、ブタ、ニワトリ等の家畜・家禽の量的形質である経済形質QTLマッピングには、遺伝的に離れ、表型値の異なる品種間の交雑家系が使われてきた。たとえば肉用牛では*Bos taurus*のアンガス種と*Bos indicus*のブラーマン種が解析用家系の親に使われている。このような場合、QTLを検出しやすいが、得られた結果を育種に応用することは比較的困難となる。一方、同一品種内での家系は、得られた結果はそのまま育種に応用できると予想されるが、効果の大きいQTLだけがマーカー型判定の多大な労力によって検出されるとシミュレートされている。本事業では、同一品種内の父方半きょうだい家系のデザインを黒毛和種に応用することを試みてきた。平成12年度までに、適度な型判定労力により、脂肪交雑QTLを4家系で4ヶ所、枝肉重量QTLを7家系で4ヶ所検出してきた(表9)。たとえば、表9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。

これまで我々がQTLマッピングに用いていた解析法Explorer/ Half-sibは、表型値が正規分布していない場合でも解析できる順位和検定に基づいているという長所があるが、点毎(1 cM毎, point-wise)に有意水準を検定しており、多重検定の補正がなされていなかったため、有意水準が高くでやすい欠点が判明した。そこで、解析法を染色体毎(染色体ワイズ, chromosome-wise)やゲノム毎(ゲノムワイズ, experiment-wiseまたはgenome-wise)に有意水準を検定し、多重検定を補正するインターバルマッピング法のQTL Express (Haleyら, 1994; 2002)に変更した。QTL Expressでは順位和検定をしていないが、ほとんどの表型値分布は正規分布であることを保証する尖度と歪度を示した。2種の解析法でそれぞれ得られた有意なQTLのアリアル効果に差はなかった。表9では2つの解析法の結果を比較している。脂肪交雑-1や枝肉重量-1などほとんどのQTLは有意であったが、枝肉重量-3と枝肉重量-4は有意ではなくなった。

そこで我々はQTL Expressで解析することにした。平成15年度までに全国で17家系についての経済形質のマッピングが得られた。それらの結果を表10と図1に示す。

QTL Expressを用いた解析で有意水準 $p < 0.001$ でマッピングされたQTLは、アリアル効果が大きいことが期待される。すなわち、平成15年度までに全国で20のQTLがマーカーアシスト選抜の対象になりうる段階まで至った。図1には、表10に示す $p < 0.01$ の各QTLの染色体領域を表している。興味深いことに、同種のQTLが同じ領域にマッピングされている。表9では、独立に4つの家系でマッピングされている枝肉重量-1は同一QTLと推測しているが、17家系のQTL解析の結果を見ると、2つの体重QTLと5つの枝肉重量QTLがいずれも有意水準 $p < 0.001$ で同じ領域にマッピングされている。我々は、(3)-3-3においてこの領域(黄土色で示している)を枝肉重量-1(CW-1)としてポジショナルクローニングのターゲットにして詳細に研究しており、現在までのところ互いに同祖的であるという結果を得ている。

もう2ヶ所の黄土色で示している領域のBTA 21番テロメア領域とBTA 7番セントロメア領域

表9. 黒毛和種経済形質マッピングとアリアル効果：Explorer/ Half-sibとQTL Expressの比較

経済形質	有意の度合い Explorer/Half-sib	有意の度合い*QTL Express	アリアル効果
脂肪交雑-1	$p < 0.00001$	$p < 0.001$	BMS, 1.0
脂肪交雑-2	$p < 0.00005$	$p < 0.001$	BMS, 1.0
脂肪交雑-3	$p < 0.00001$	$p < 0.001$	BMS, 1.0
脂肪交雑-4	$p < 0.0001$	$p < 0.01$	BMS, 1.5
枝肉重量-1	$p < 0.00001$	$p < 0.001$	枝重、36 kg
枝肉重量-1-2#	$p < 0.00001$	$p < 0.001$	枝重、32 kg
枝肉重量-1-3#	$p < 0.0001$	$p < 0.001$	枝重、28 kg
枝肉重量1-4#	$p < 0.00001$	$p < 0.001$	枝重、27kg/体重、40kg
枝肉重量-2	$p < 0.00001$	$p < 0.01$	枝重、22kg/体重、45kg
枝肉重量-3	$p < 0.0001$	ns	枝重、23 kg**
枝肉重量-4	$p < 0.0001$	ns	枝重、33 kg**

#同一のQTLと思われる。*染色体ワイズの有意水準。**QTL Expressでは有意でなかった。ns, 有意ではない。

表10. 平成15年度までのQTL Expressによる黒毛和種経済形質マッピングのまとめ

経済形質QTL*	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p < 0.001$
体重	12	6	5
枝肉重量	21	13	5
脂肪交雑	44	21	10
ロース芯面積	36	18	5
バラ厚	16	2	0
皮下脂肪厚	16	4	0
合計	145	64	25

*染色体ワイズの有意水準。

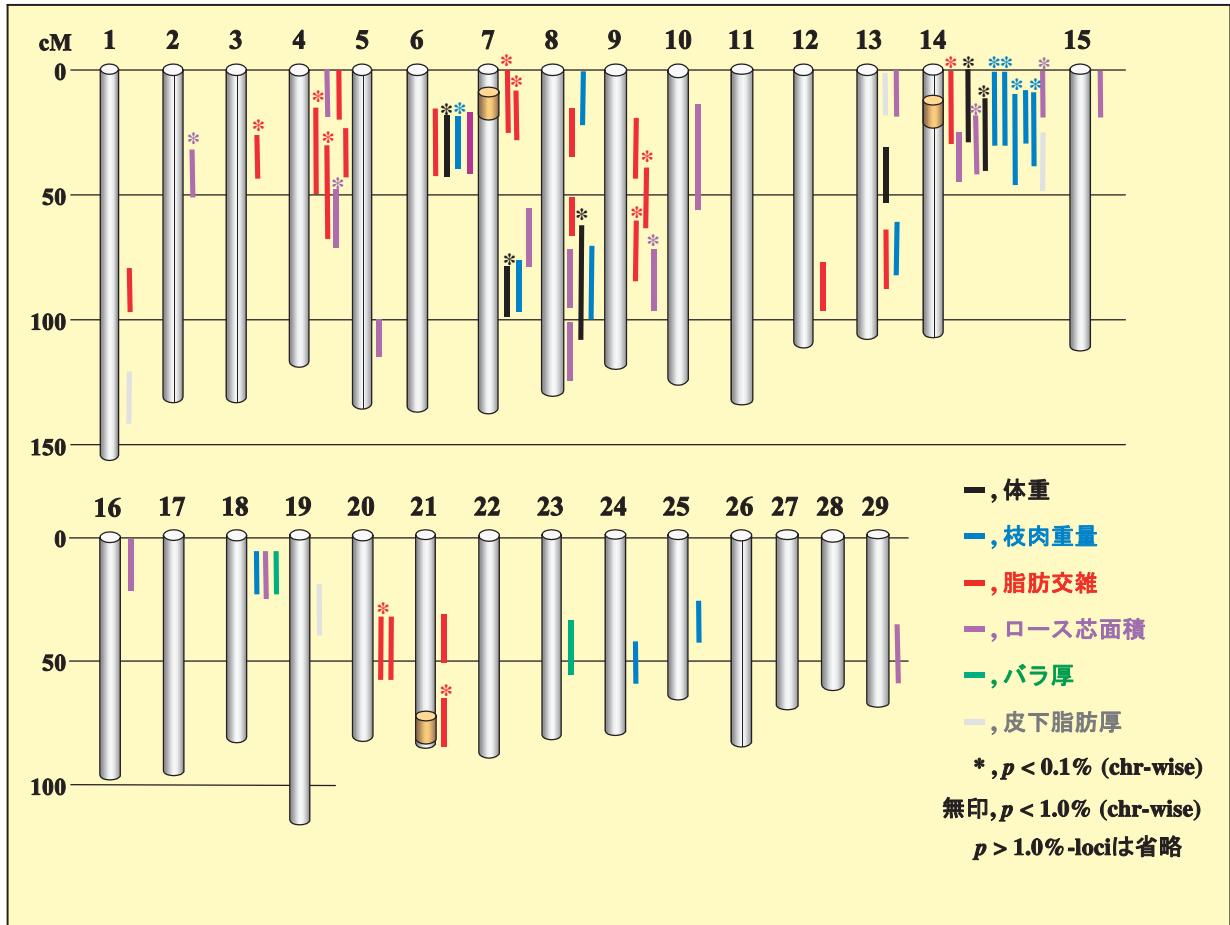
は、脂肪交雑-1 (Marbling-1) と脂肪交雑-2 (Marbling-2) として、それぞれ、(3)-3-1 と (3)-3-2 に述べるようにポジショナルクローニングのターゲットにして詳細に研究している。

肉牛の経済形質のような量的形質には、複数の遺伝子座の間の相互作用であるエピスタティック (非相加的) 効果が見られる場合がある。そこで、相互作用も検証するため、我々はQTL Express を改良したGlissardoを開発した。まだ本格的な解析が行われたケースはないが、今後、Glissardoを用いる予定である。

(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、図1の黄土色で示す領域である脂肪

図1 黒毛和種牛経済形質マッピングのまとめ



交雑-1・脂肪交雑-2・枝肉重量-1の3領域について、ポジショナルクローニングによる責任遺伝子取りを試みた。

(3)－3－1. *Marbling-1* (脂肪交雑-1) の解析 (兵庫県との共同研究)

中小家畜 (ブタ、ニワトリ) におけるQTL解析は、品種間の遺伝的差異に注目してF2家系やバッククロス家系といった資源家系を構築して行うことが多い。一方、大家畜 (ウシ) において資源家系を構築するには、多大な時間と費用を要する。そこで、枝肉成績、血統情報が公開される枝肉共励会・共進会からサンプリングし、父方半きょうだい家系を構築し、QTL解析に供することにした。黒毛和種家系のゲノム解析で得られる結果は品種内における表型値のバラツキを説明できると予想されるため、黒毛和種の育種への実用化が容易であると考えられる。

平成12年度までの家系解析でBTA21テロメア領域約20cMに脂肪交雑QTLをマッピングし、*Marbling-1*と名付けていた。平成13年度からの本事業で、ウシEST情報・ヒトとの比較地図作成・BAC整列地図作成・相関解析などで、BACクローン3個で構成される約50万塩基対領域まで狭めることができた。約2千万塩基対に相当する20cMの領域から、約50万塩基対領域までいかにして狭めたか、以下、詳述する。

(3)－3－1－1. QTL解析家系の構築

兵庫県内で開催された枝肉共例会及び共進会（1997年4月～2000年12月）に出展された肥育牛を調査牛としてサプリングし、家系の肥育産子1,010頭からなる父方半きょうだい家系を構築した。一次スクリーニングとして252頭の肥育産子を解析に用いた。

(3)－3－1－2．表型値としての枝肉検定成績

表型値としての枝肉検定成績は、日本格付協会によって測定された枝肉重量、脂肪交雑スコア、ロース芯面積、バラ厚、皮下脂肪厚の5形質を使用した。枝肉重量を除く形質の測定は第6-7肋間断面で行われ、脂肪交雑スコアは日本格付協会の標準規格（beef marbling standard）で示す1から12までのスコアに基づいている。QTL解析では、日本格付協会による枝肉検定成績について、性・年次・農家・出荷月齢を母数効果としてREML法で補正した。

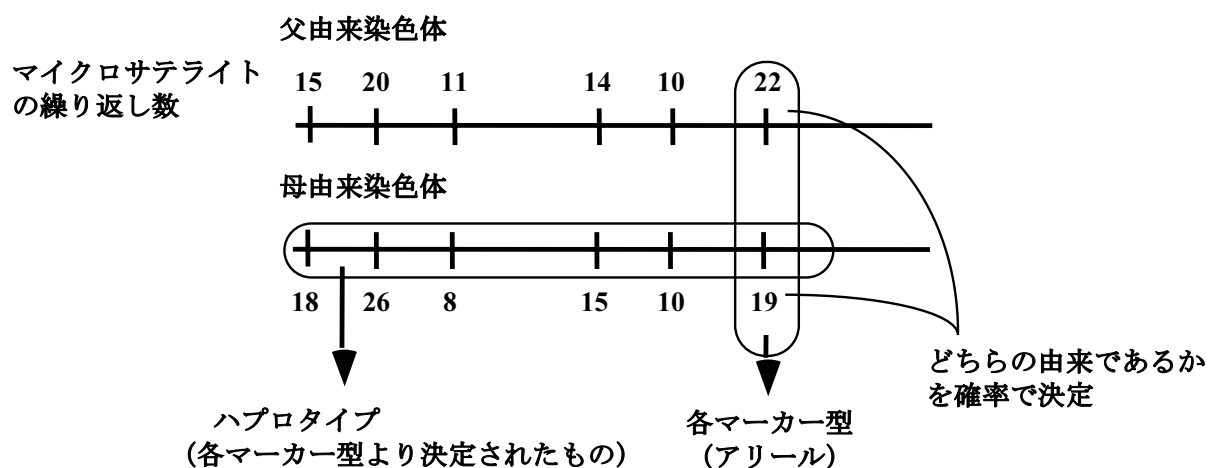
(3)－3－1－3．マイクロサテライトマーカーの型判定法

解析に用いたDNAは、種雄牛の凍結精液及び肥育牛の屠体腎周囲脂肪組織より、定法に従い抽出した。使用したマイクロサテライトマーカーは、アメリカ農務省の連鎖地図にマップされているマーカーから、解析用の家系の種雄牛で多型な207個のマーカーを選択した。マーカー間隔は平均15cMであった。選択したマーカーを用いて産子252頭のマーカー型判定を行った。判定には、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GENOSCAN、Genotyperを用いた。

(3)－3－1－4．統計検定

解析したマーカー型判定の結果は、Haleyらの開発したインターバルマッピング法プログラムであるQTL Expressを用いて以下のように解析した：親と子供達の各染色体のハプロタイプを再構成は、隣接する2マーカーの親におけるハプロタイプを再構成し、染色体上の任意のある点において、子がある一方のハプロタイプを親から受け継いでいる確率を計算した。ハプロタイプの概念図を示す（図2）。

図2 ハプロタイプとは？



次に、各子個体の各点の確率と表型値との相関性を線形回帰により検定した。QTLを検出するための統計量はF値を用い、多重検定効果を考慮するため染色体ワイズ、および、ゲノムワイズで計算した。それぞれの1%及び5%有意水準は、1万回の無作為化検定により決定した。

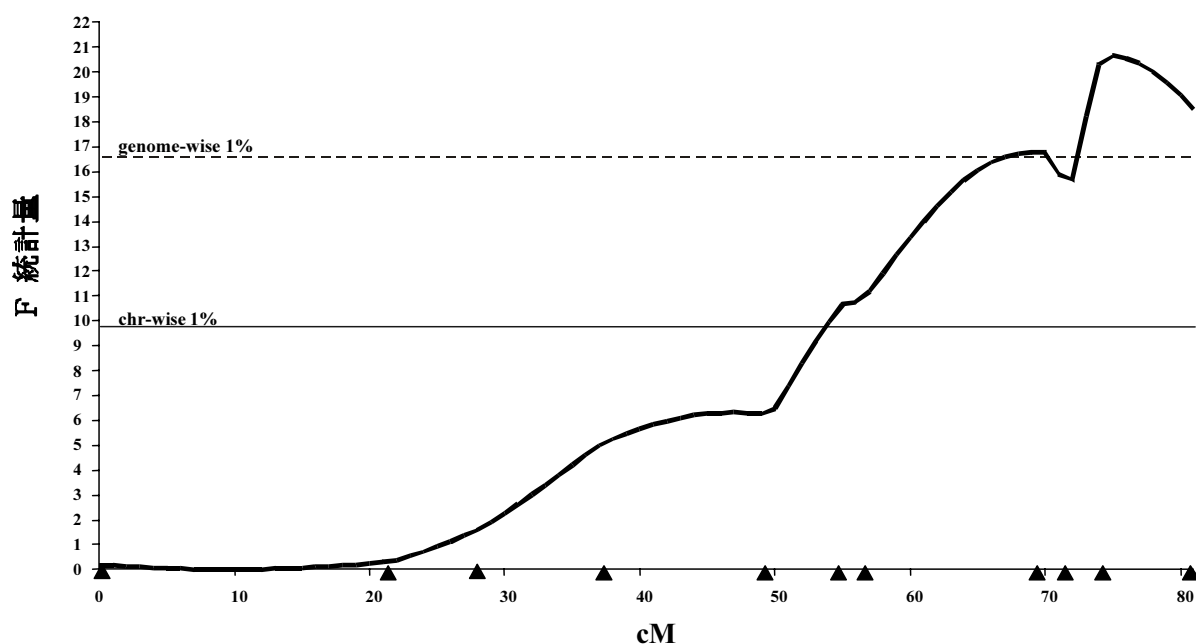
(3)–3–1–5. ゲノムスキャンの結果

解析対象とした5形質（枝肉重量、ロース芯面積、脂肪交雑、バラ厚、皮下脂肪厚）において、一次スクリーニングのゲノムスキャンで染色体ワイズ5%水準で有意であったQTL領域を19箇所検出した。21番染色体テロメア領域に見出した脂肪交雑QTL領域Marbling-1はゲノムワイズ1%水準で有意であった（図3）。852頭の去勢産子を用いた二次スクリーニングでMarbling-1の存在を確実にした。このMarbling-1 QTLのアリール効果（ $Q-q$; 相対的に優れた効果を示すアリールを Q 、劣っているアリールを q ）は、脂肪交雑スコア1.09であり、その遺伝分散は14.4%に達する大きな影響を示したことから、主動遺伝子座、メジャージーンと考えられる。 Q ハプロタイプは母方由来であり、集団内での Q アリール頻度は低かった。今後はこの Q アリールを保持する後代が繁殖に使われるようになるだろう。我々は、脂肪交雑に大きな効果を示す21番染色体の当該領域を狭め、責任遺伝子の同定を目指すこととした。

(3)–3–1–6. ポジショナルクローニング

父方半きょうだい家系で得た当該領域を更に狭めるためには、解析頭数を増加することにより、組み換え個体を増やす必要がある。しかしながら、解析対象の種雄牛の産子が市場に出てくる数には限りがあり、解析頭数を増加することに期待ができない。そこで、ヒトの多因子性疾患のマッピングなどで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。これは、黒毛和種集団より脂肪交雑スコアの高い群と低い群を構築し、各マーカーのアリール頻度の差を検定する手法である。そのためには、高密度なマーカーを配置する必要があった。そこで、ウ

図3 21番染色体への脂肪交雑QTLマッピング



シBACクローンを用いた整列地図を作成し、領域特異的なマイクロサテライトマーカーの開発を行った。

(3)–3–1–7．BAC整列地図の作成

ヒト–ウシ比較地図より、ウシ21番染色体テロメア領域は、ヒト14番染色体テロメア領域とシンテニーがあった。ヒト14番染色体テロメア側に存在する遺伝子の塩基配列情報を用いて相同検索を行い、14個のウシESTを得た。このESTと本領域に位置する既知MSマーカー11個をアンカーとして、2つのウシBACライブラリー（RPCI-42、WAGYU）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用いてゲノムウォーキングを行い、整列地図を作成した（図4）。整列地図は、単離した126クローンの内、66クローンで構成された。その距離は、ヒトドラフト配列情報より約6.2Mbと推定された。また、家系の肥育産子1,010頭を用いて遺伝的距離を推定したところ3.5cMであった。

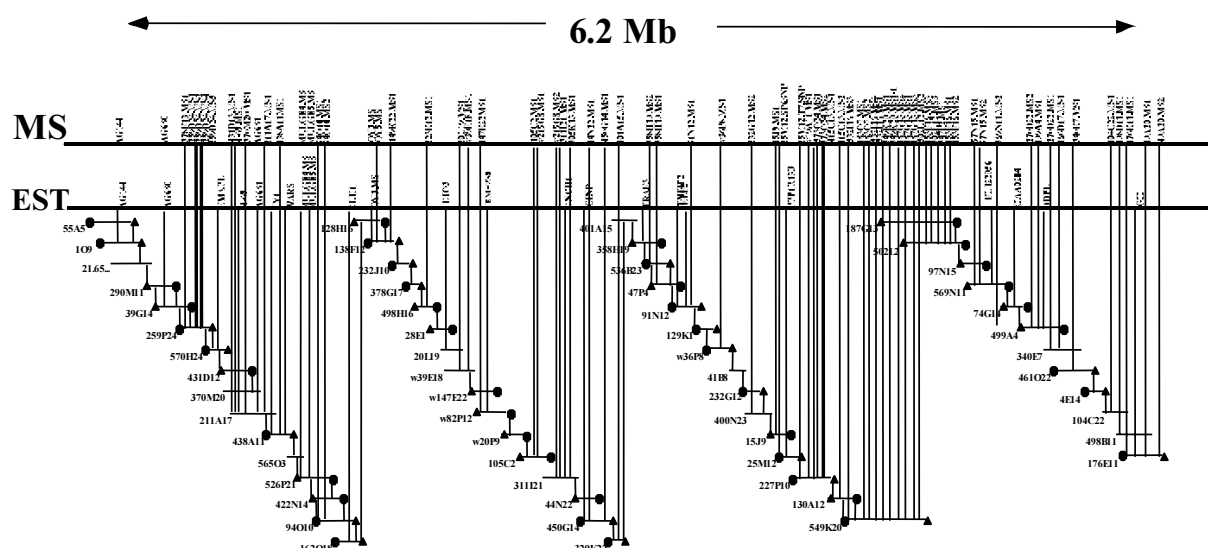
(3)–3–1–8．領域特異的なマイクロサテライトマーカーの開発

得られたBACクローンよりライブラリーを作成し、(CA/GT)_nをプローブとしてスクリーニングを行い、CA繰り返し数が8回以上のものを97個単離した。既知マーカー11個を含め合計108個のマーカーのうち、解析対象の種雄牛で多型だったのは37個であった。108個のマーカーのヘテロ接合率及びアリアル数を兵庫県種雄牛82頭で調べた。多型の全くなかったマーカーは24個あり、それらを除いた84個のマーカーの平均ヘテロ接合率は52%、平均アリアル数は3.5であった。それらの中から、PCR増幅が良好な47マーカーを選択し相関解析に用いた。平均マーカー間隔は約130kbに相当する。

(3)–3–1–9．相関解析

兵庫県内で開催された枝肉共例会及び共進会（1997年4月～2002年12月）に出展された肥育牛3,632頭の中から、解析対象の種雄牛以外の産子2,303頭を調査牛とした。脂肪交雑評点2～

図4 *Marbling-1*領域のBAC整列地図



4の430頭、脂肪交雑評点8～12の378頭をデータセットとし、母方アリアルを抽出し解析に用いた。相関解析調査牛のマーカーアリアルのうち、解析対象種雄牛の保有する Q/q と見かけ上同じアリアルは同祖的と仮定した。脂肪交雑スコア2～4群と脂肪交雑スコア8～12群における各マーカーのアリアル及びハプロタイプ頻度の有意差をFisher's正準検定により算出した。

Q アリアル、 q アリアル、 Q ハプロタイプ、 q ハプロタイプにおいて、有意水準1%を越えた領域を複数箇所に見いだした(図5)。中でも、 Q アリアル、 q アリアル、 q ハプロタイプにおいて、連続した3つのマーカーハプロタイプで有意水準1%を越えた領域(259D24MS1-438A17MS1)を候補領域とした。この領域は、3つのウシBACクローンで構成されており、ヒト塩基配列情報から490kbと推定され、既知及び予想される遺伝子は7個存在していた。

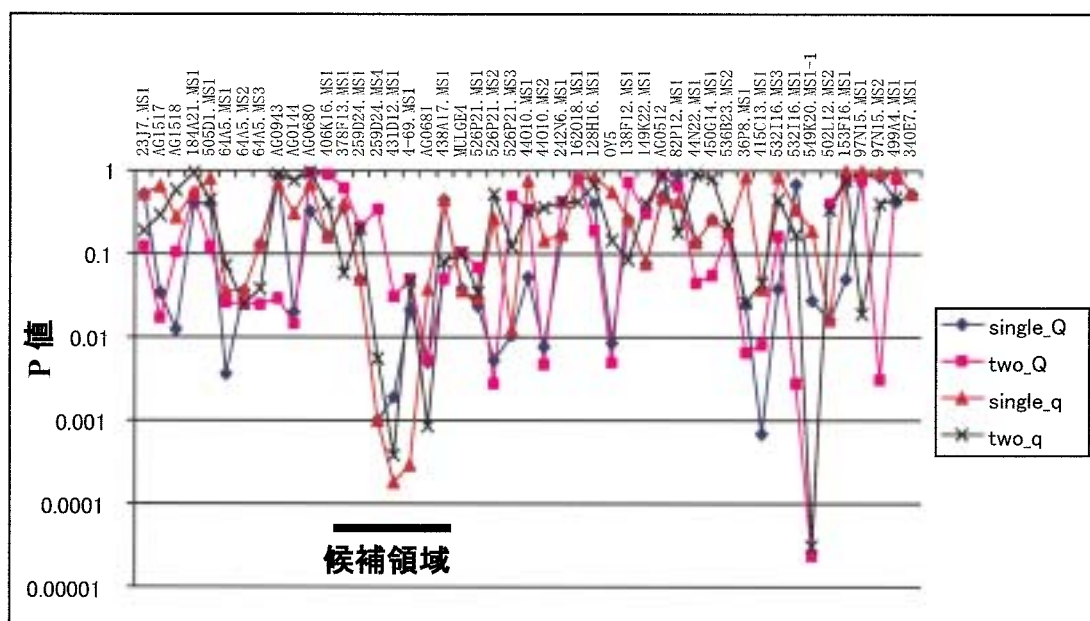
(3) - 3 - 1 - 10. 今後の展開

相関解析を用いることにより、脂肪交雑責任遺伝子領域を約490kbにまで絞り込むことに成功した。現在、以下の手法を用いて該当する領域の絞り込みを行っている。

1. 候補領域の塩基配列の決定
2. 一塩基多型 (SNP) の探索
 - a. 候補領域に存在する遺伝子のエキソンの多型の探索
 - b. 候補領域に存在する遺伝子のイントロンの多型の探索
 - c. 遺伝子間に存在する多型の探索
3. 2. で得られた一塩基多型を用いた相関解析
4. 候補領域に存在する遺伝子の発現パターンの解析

以上、*Marbling-1*の責任遺伝子取りの過程を詳述した。我々は、本事業においてもう2つの

図5. 相関解析結果



経済形質QTLの責任遺伝子取りを進めてきた。それらの過程は*Marbling-1*の場合と基本的に類似しているため、以下、概略について説明する。

(3)－3－2. *Marbling-2* (脂肪交雑-2) の解析 (宮崎県との共同研究)

平成12年度までに、種雄牛aの父方半兄弟家系解析によりBTA7セントロメア領域約20cMまで領域を狭めていた。

同じ母を持つ兄弟の種雄牛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、両種雄牛におけるハプロタイプを詳細に調べた。その結果、*Marbling-2*のQは種雄牛aに遺伝しているが、種雄牛bにはqが遺伝していることが考えられた。このQ/qの違いを根拠に*Marbling-2*領域を約6cMに狭めた。

この領域に位置する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ライブラリーをスクリーニングし、60個のクローンで整列化を完成した。この領域の距離はヒトゲノム情報から7.1Mbと判明し、含まれる多型性を示すマイクロサテライトは68個、既知および予想される遺伝子数は148個であった。2種の家系の解析と、45個のSNPのタイピングにより、*Marbling-2*領域をBACの1クローン以内まで(約50kb)狭めることに成功した。

今後は、この候補領域周辺に存在する遺伝子を探索し、検出された遺伝子の発現様式などを調べ、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2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. *CW-1* (枝肉重量-1) の解析 (鹿児島県・長崎県との共同研究)

平成12年度までに、父方半兄弟家系を解析し、BTA14の35-60cMの領域にマッピングした。*CW-1*のリアル効果は38kgを示した。別の父方半兄弟家系の解析により、同様な領域がマッピングされ、リアル効果は38kgを示した。マッピングされた両種雄牛のQハプロタイプを比較したところ、約10cMのIBD (Identical By Descent, 同祖的) 領域を見出したので、平成13年度から該当領域の多型性マイクロサテライトを開発し、ファインマッピングを開始した。

BTA14特異的DNAライブラリーからマイクロサテライトを33個開発し、その内25個がBTA14に存在することがわかった。また、ウシ-ヒトゲノム比較地図情報から該当領域に存在すると予想されるESTを2個開発した。これらのマイクロサテライトとESTをアンカーにしてBACクローンによる整列化を行った。整列地図は38個のBACクローンで構成され、ヒトドラフト配列情報から、約4.5Mbと推測された。各BACクローンからマイクロサテライトの開発を行い、45個のマイクロサテライトマーカーを用いた一般の黒毛和種集団等を対象とする相関解析を行った。該当領域のセントロメア側の約1.2cMに有意な相関が得られ、黒毛和種一般に共通なQハプロタイプを見出した。

今後、20個のBACクローンで整列化された*CW-1*領域(1.2cM, 2.3Mb)からマイクロサテライトを開発し、相関解析でさらに候補領域を狭め、SNP解析で候補遺伝子を絞っていく予定である。

(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年のリエージュ大学（ベルギー）のグループによるホルスタイン種のミルク生産性について報告された。また、平成9年にもリエ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。

平成11年にはリエージュ大学（ベルギー）のグループは、ホルスタイン種のミルク生産性について、BTA14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た。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ジアシルグリセロールアシル基転移酵素1（*DGAT1: acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1*）を同定したことを報告した。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。*DGAT1*タンパク質の232位にリジン/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。

肉牛については、米国などから経済形質のマッピングについてこれまでにいくつか報告されている。いずれの研究も *Bos Taurus*（アンガス種など）と *Bos indicus*（ブラーマン種）の交雑家系を解析に用いている。交雑家系の解析は、表型値が対照的なためQTLを検出しやすいと言われている。染色体ワイズレベル0.1%以下に増体や肉質関連のQTLが多数マッピングされている。しかしながら、特定の領域においてマーカー密度を高めて責任遺伝子のクローニングを試みている研究室はまだ無く、10cM以内のファインマッピングに成功した例もまだ無い。BTA29は最小サイズの染色体であり、かつ、USDA-MARCのCasasらによって肉の柔らかさ（tenderness）や脂肪交雑QTLがマッピングされている。我々はBTA29の高密度連鎖地図を作成した（Reed et al., 2002）ので、ポジショナルクローニングが行われるかもしれない。黒毛和種ではロース芯面積QTLがBTA29にマッピングされている（ $p < 0.01$ ）。

ブタにおいて、肉量・肉質に影響するQTLの責任遺伝子としてインスリン様成長因子II（*IGF-II*）がリエージュ大学と農業大学のグループにより同定された。第1イントロン内のSNPによって筋肉内の発現に差が認められたが、主要な臓器である肝臓での発現（筋肉の約10倍）にも、*IGF-II*タンパク質の血中レベルにも差は無かった。作用機作については今後明らかにされるだろう。

(5) まとめと今後の進め方

フィールドから黒毛和種肥育牛のDNAサンプル・血統記録・枝肉成績を収集する共同研究機関各位の努力の結果、経済形質解析に使える家系を多数作成することができ、マーカー型判定技術の習熟も相俟って145のQTL（ $p < 0.05$ ）を検出することができた。64のQTLは有意水準1%以下であり、25のQTLに至っては有意水準0.1%以下であった。今後、これらのQTLは同祖的なのか独立なのかを含め、それぞれの中味を検証していく必要がある。また、アリアル効果の大きいQTLは、責任遺伝子クローニングのターゲットになる可能性があると思われる。

我々がこれまで行ってきたゲノム解析用ツールの地道な開発により、マッピングしたQTL領域の詳細な染色体地図の作成が現実的なものとなった結果、*Marbling-1*、*Marbling-2*、*CW-1*の責任遺伝子の同定に向けて着々と進行している。平成16年度からの継続事業では、*Marbling-1*、*Marbling-2*、*CW-1*遺伝子を同定するため、SNPを使って候補遺伝子を絞り、それぞれの遺伝子機能の解明を培養細胞レベル・マウス個体レベルで進めると共に、バイオインフォマティック

スを活用することで責任遺伝子の同定を行う。

育種に有用と思われるDNA情報が得られてきたため、実用レベルでこれらの情報をどのように使うべきかが緊急の課題となってきた。黒毛和種集団の遺伝的な可能性を保持しつつ、重要な経済形質を向上させていくために広範なシミュレーションを実施し、本事業の生み出す成果を有効に活用するためのプロトコルを確立する必要がある。

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

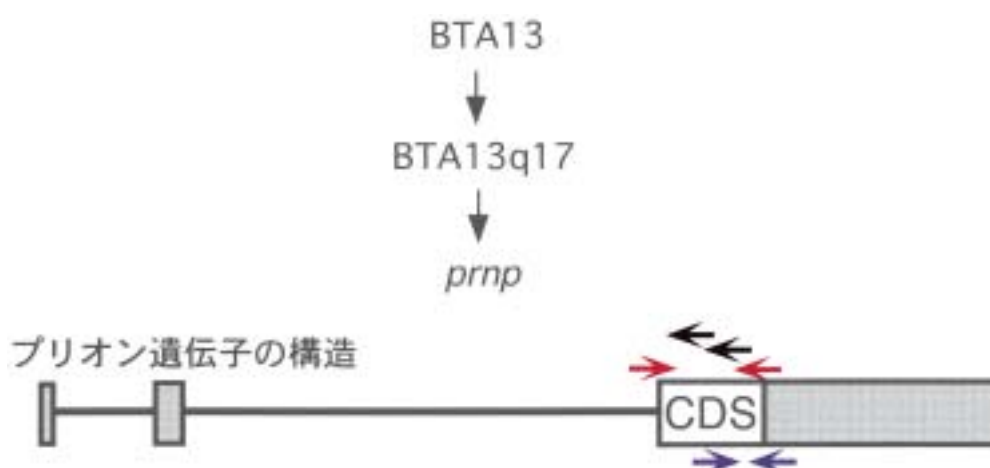
(2) 研究目的と期待される成果

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ている。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。

(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トランスジェニックマウスの作出で調べる。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

図6. ウシプリオン遺伝子の構造



赤い矢印はCDS全体をPCR増幅させるためのプライマーの位置を示し、黒の矢印は塩基配列解読のためのプライマーの位置を示している。青の矢印はC末端側をPCR増幅させるためのプライマーの位置を示している。この場合、青のプライマーで塩基配列を読んだ。

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。

図6にプリオン遺伝子の構造を示している。プリオン遺伝子はウシ染色体13番（BTA 13）に位置する。第3エクソンにプリオンタンパク質のコード領域であるCDSが存在し、プリオンタンパク質は約250のアミノ酸からなる。

(4) 研究開発の成果

(4)－1. プリオン遺伝子調査牛の品種と調査頭数について

これまでに、黒毛和種とホルスタイン種についてはそれぞれ約1000頭、褐毛和種および日本短角種についてはそれぞれ約30頭、そのほか、参考としてインドネシアおよびアフリカの在来牛についてプリオン遺伝子の塩基配列を調べた（表11）。黒毛和種およびホルスタイン種では、同一種雄牛の産子は4頭以内にするなど、サンプルが特定の血縁に偏らない配慮をした。その他の品種についてもサンプル牛が互いに血縁関係を極力持たないように配慮した。

(4)－2. プリオン遺伝子CDS塩基配列の多型について

(4)－2－1. 国内種のプリオン遺伝子の全CDS配列における変異

ホルスタイン種（79頭）、黒毛和種（63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。3箇所に1塩基多型（SNP）を見いだしたが、いずれもアミノ酸変

表11. プリオン遺伝子調査牛の品種と調査頭数

品種	CDS全体 ¹⁾	C末端側 ²⁾
ホルスタイン種	79	1,031
黒毛和種	63	957
褐毛和種		30
日本短角種		34
リムジン		6
リムジン x 黒毛和種		6
インドネシア在来牛		
オンゴール	8	41
バリ	8	42
ジャヴァ	8	39
マヅラ	8	42
アフリカ在来牛		
ンダマ		4
ボラン		4
合計頭数	174	2,236

1) CDS: プリオン遺伝子におけるアミノ酸コード領域（約250のアミノ酸をコード）

2) CDSの末端側：ヒト、マウス、ヒツジで感染型プリオンタンパク質への抵抗性を示すアミノ酸変異がある領域

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、6回、ヘテロのものがみられたが、BSE抵抗性に影響しないことがわかっているので、その遺伝子頻度は出していない。

(4)–2–2. プリオンタンパク質のC末端側 (122His 以降) の変異

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品種を含む) 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。

14箇所のアミノ酸変異を伴わないSNPのうち、新規SNPは、12箇所であった (SNP-5とSNP-10の2箇所は、Hill *et al.*により最近報告された: *Anim. Genet.*, 34, 183-190, 2003)。12箇所の内11箇所は、インドネシア由来の品種においてのみ検出された。日本3品種で、(4)–2–1で見いだされたのと同じ箇所に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。

(4)–2–3. 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2,000頭規模に拡大し、DNA塩基配列を調べた。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、黒毛和種約1,000頭、ホルスタイン種約1,000頭について解析を行ったが、新規SNPは見いだされなかった。

図7. プリオンタンパク質のアミノ酸配列とアミノ酸置換

bovine PRNP	1	AVKSHI	GSNI	VLFVAMWSDVGLCKKRPKPGG	NNTGGSRYPGQGSPPGNRYPPQGGGGG	60
human PRNP	1	VA--NL	GCNM	VLFVAITVSDL	GLCKKRPKPGG	57
mouse PRNP	1	--MANL	DYML	A	FVTHWTDVGLCKKRPKPGG	56
ovis PRNP	1	AVKSHI	GSNI	VLFVAMWSDVGLCKKRPKPGG	NNTGGSRYPGQGSPPGNRYPPQGGGGG	60
bovine PRNP	61	QPHGGG	WGQPHGGG	WGQPHGGG	WGQPHGGG	119
human PRNP	58	QPHGGG	WGQPHGGG	WGQPHGGG	WGQPHGGG	188
mouse PRNP	57	QPHGGG	WGQPHGGG	WGQPHGGG	WGQPHGGG	187
ovis PRNP	61	QPHGGG	WGQPHGGG	WGQPHGGG	WGQPHGGG	111
bovine PRNP	128	MKHVAGAAAAGAVVGG	GGYMLGSAMSRP	IHF	GS	179
human PRNP	109	MKHMAGAAAAGAVVGG	GGYMLGSAMSRP	IHF	GS	168
mouse PRNP	108	MKHVAGAAAAGAVVGG	GGYMLGSAMSRP	IHF	GS	167
ovis PRNP	112	MKHVAGAAAAGAVVGG	GGYMLGSAMSRP	IHF	GS	171
bovine PRNP	188	YSNQNNFVHDCVNI	TV	KE	HTVTTTTTKGENFTETDI	239
human PRNP	169	YSNQNNFVHDCVNI	TI	KQHTVTTTTTKGENFTETDV	KM	228
mouse PRNP	168	YSNQNNFVHDCVNI	TI	KQHTVTTTTTKGENFTETDV	KM	226
ovis PRNP	172	YSNQNNFVHDCVNI	TV	KQHTVTTTTTKGENFTETDI	KI	231
bovine PRNP	248	GA-SV-I-	FSSPPVILLISFLIFLI	LVIG		264
human PRNP	229	GS-SM-V-	FSSPPVILLISFLIFLI	LVIG		253
mouse PRNP	227	GRRSSSTV	FSSPPVILLISFLIFLI	LVIG		254
ovis PRNP	232	GA-SV-I-	FSSPPVILLISFLIFLI	LVIG		256

(5) 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頭それぞれBSE感染牛（53-124頭；合計358頭）と正常牛（28-56頭；合計172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、種雄牛に多型性を示す166種の型判定を行ったところ、BTA 5、BTA 10、BTA 20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、BTA 10とBTA 20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。当研究所の作成した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。

3) 牛肉の品種鑑定技術の開発

(1) 研究年次：平成15年～平成17年

(2) 研究目的と期待される成果

近年の食品偽装の発覚等を契機に消費者から食品の安全・安心が強く求められている中で、畜産物のトレーサビリティの導入など推進されているが、尚解決すべき技術的課題も多い。本事業において食肉表示の信頼性を確保するため、DNA解析手法を活用した品種鑑定技術を確立し、牛肉の安全・安心に資する。

(3) 研究開発の個別目標と成果

当研究所では牛肉品種鑑定のためランダム増幅したDNA断片を使った識別手法を作成しつつ、一塩基多型（SNP）による手法へと改善を図ってきたが、依然として識別精度100%までに至っていない。そのため、ゲノム上のSNP単独ではなく、隣接するSNPを含むゲノム領域を利用するハプロタイプブロック手法を開発する。牛の品種確立までにはある程度小さい集団内での交配がなされてきた経緯がある。したがって、これまでに品種内で蓄積されてきた遺伝的組換えの結果、品種に特有のハプロタイプブロックが保存されているはずである。すでに見出してきた品種特異的な傾向のあるSNPの中には、そのハプロタイプブロックの一部を構成している可能性がある。そこで、それらSNPを中心とする領域にDNAクローン（BACクローン）による整列地図を作成し、多数のSNPを開発し、ハプロタイプブロックを構成する。これによって鑑定率の改善を図る。

(4) 研究開発の成果

(4)－1. ウシのハプロタイプブロックの推定

ヒトでは平均10kb、純系マウスでは平均2,300kb（2.3Mb）と報告されている。純系マウスの世代交代速度は速いが、その歴史は高々100年程度なので、ウシの品種確立の時期と世代交代速

度から想定すると、ウシのハプロタイプブロックのサイズはヒトとマウスの間、1Mbと予想される。

そこで、ハプロタイプ推定の容易な父方半きょうだい家系の産子872頭を対象に、ウシ染色体21番のマイクロサテライトマーカー39個のタイピングを行い、ハプロタイプブロックについて調べた。その結果、当該条件でもハプロタイプブロックのサイズを推定することができたが、今後は対象にする領域を特定したやり方を行う必要がある。

(5) 国内および海外の状況

2つの遺伝子座位において観察されるハプロタイプの頻度が、期待される平均的な頻度（完全な連鎖平衡状態）からずれることを連鎖不平衡と云う。ヒトにおいて、高血圧などの生活習慣病や癌などの多因子遺伝性疾患の原因遺伝子座（感受性遺伝子座）のマッピングに連鎖不平衡が利用されている。ハプロタイプブロックは、連鎖不平衡距離であり、そのサイズは組換えの起こりやすい箇所（hot spot）、起こりにくい箇所（cold spot）、突然変異の頻度などに影響される。

ウシ品種鑑定技術の開発は、神戸大のグループなどで行われ、黒毛和種とホルスタイン種を識別する技術が最近開発され、実用化に至っている。

2. 平成15年度研究発表

1) 論文発表

1. Sugimoto, M., Furuoka, H. Sugimoto, Y. Deletion of one of the duplicated *Hsp70* genes causes hereditary myopathy of diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cattle. (2003) *Anim. Genet.*, **34**: 191-197.
2. Sugimoto, M., Ihara, N., Bennett, G. L., Sugimoto, Y. Eleven previously unreported dinucleotide microsatellite loci on bovine chromosome 19. (2003) *Anim. Genet.*, **34**: 236-237.
3. Hanotte, O., Ronin, Y., Agaba, M., Nilsson, P., Gelhaus, A., Horstmann, R., Sugimoto, Y., Kemp, S., Gibson, J., Korol, A., Soller, M., Teale, A. Mapping of Quantitative Trait Loci (QTL) controlling resistance to trypanosomosis in an experimental cross of trypanotolerant West African N'Dama cattle (*Bos taurus*) and trypanosusceptible East African Boran cattle (*Bos indicus*). (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**: 7443-7448.
4. Takeda, H., Sugimoto, Y. Construction of a physical map of an 8-cM region of bovine chromosome 6q21 with 83 loci including 46 new microsatellite markers. (2003) *Anim. Biotechnol.*, **14**: 51-59.
5. Itoh, T., Takasuga, A., Watanabe, T., Sugimoto, Y. Mapping of 1400 expressed sequence tags in the bovine genome using a somatic cell hybrid panel. (2003) *Anim. Genet.*, **34**: 362-370.
6. Takasuga, A., Abe, T., Itoh, T., Watanabe, T., Kamatani, N., Sugimoto, Y. Novel prion protein polymorphisms in cattle. (2003) *Anim. Genet.*, **34**: 396-397.
7. Sato, S., Oyamada, Y., Atsuji, K., Nade, T., Sato, S., Kobayashi, E., Mitsuhashi, T., Nirasawa, K., Komatsuda, A., Saito, Y., Terai, S., Hayashi, T., Sugimoto, Y. QTL analysis for growth and carcass traits in a Meishan X Duroc F2 resource population. (2003) *J. Anim. Sci.*, **81**, 2938-2949.
8. Ihara, N., Yamakuchi, H., Taniguchi, Y., Sasaki, Y., Bennett, G. L., Kappes, S., Sugimoto, Y. Mapping of bovine *CEBPD* gene to BTA14q15-17. (2003) *Anim. Genet.*, **34**, 470-471.
9. 渡辺大作、阿部正博、齋藤博水、阿部 榮、板垣昌志、阿部省吾、植松正巳、遠藤祥子、平野 貴、杉本喜憲： 山形県内の和牛枝肉共進会出品牛における枝肉成績と血清総コレス

テロール値の統計遺伝学的解析 (2003) 家畜臨床誌、26、2-8.

2) 学会発表

1. Malau-Aduli, A. E. O., Niibayashi, T., Kojima, T., Oshima, K., Mizoguchi, Y., Sugimoto, Y., Komatsu, M.: Genome scan of BTA1 for QTL affecting weaning weight, yealing weight and postweaning growth in Japanese Black Cattle, 2003 Joint Animal Meeting, June 2003, Phoenix, USA.
2. Malau-Aduli, A. E. O., Niibayashi, T., Kojima, T., Oshima, K., Mizoguchi, Y., Sugimoto, Y., Komatsu, M.: Microsatellite DNA marker mapping of bovine chromosome 1 for QTL affecting birth weight and preweaning growth in Japanese Black cattle (Wagyu), XIX International Congress of Genetics, July 2003, Melbourne, Australia.
3. 井原尚也、高須賀晶子、溝下和則、竹田晴子、杉本真由美、溝口 康、Bennett, G. L., Reed, K. M., Beattie, C. W., 杉本喜憲: ウシ高密度連鎖地図の作製、日本畜産学会第102回大会、2003年9月、岐阜。
4. 高野 淳、溝下和則、高須賀晶子、杉本喜憲: 黒毛和種の枝肉重量関連領域 (CW-1) におけるBACコンテイング作成、日本畜産学会第102回大会、2003年9月、岐阜。
5. 平野 貴、井上和也、原 好宏、杉本喜憲: 黒毛和種のMarbling-2領域特定のためのBACコンテイング作成、日本畜産学会第102回大会、2003年9月、岐阜。
6. 小林直彦、平野 貴、加藤誠二、傍島英雄、林 登、平尾一平、大谷 健、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、日本動物遺伝育種学会第4回大会、2003年11月、東京。
7. 伊藤智仁、高須賀晶子、井原尚也、渡邊敏夫、杉本喜憲: ウシ高密度RH地図作成、日本動物遺伝育種学会第4回大会、2003年11月、東京。
8. 阿部 剛、佐分淳一、中川哲夫、河村 正、斉藤邦彦、熊谷周一郎、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QTL解析 (I) 肥育期体格ならびにと場格付について、日本畜産学会第103回大会、2004年3月、東京。
9. 佐分淳一、阿部 剛、中川哲夫、斉藤邦彦、熊谷周一郎、撫 年浩、三角さつき、奥村寿章、田口圭吾、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QTL解析 (II) 理化学分析と画像解析について、日本畜産学会第103回大会、2004年3月、東京。
10. 横内 耕、渡邊敏夫、藤田達男、志賀一穂、杉本喜憲: 黒毛和種大規模半兄弟家系を用い

た高BMS責任領域同定の試み、日本畜産学会第103回大会、2004年3月、東京。

11. 小林直彦、平野 貴、加藤誠二、傍島英雄、林 登、平尾一平、大谷 健、杉本喜憲：黒毛和種大規模家系における枝肉形質のQTL解析と育種改良への応用、日本畜産学会第103回大会、2004年3月、東京。

3) 研究発表要旨

[学会発表の次の数字は、学会発表の番号に相当する]

学会発表 3.

題 目：ウシ高密度連鎖地図の作製

発表者：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、Gary L Bennett⁴、Kent M Reed⁵、Craig W Beattie⁶、杉本喜憲¹

所 属：¹畜技協・動物遺伝研、²鹿児島県肉改研、³家畜改良セ、⁴米国農務省肉畜セ、⁵ミネソタ大・病態生物、⁶ネバダ大・動物生物工

要 旨：【目的】1997年に米国農務省肉畜研究センター（USDA-MARC）グループが報告した1,250個のマーカーを含む第二世代ウシ連鎖地図は、遺伝病や経済形質のマッピングに世界中で活用されてきた。しかしながら、責任遺伝子の同定、RH物理地図やBAC整列地図の作製から全ゲノム配列の解読にはさらにマーカーを増やす必要があった。我々はUSDA-MARCの地図の高密度化を行ってきたが、当初の目的をほぼ達成したので今回報告する。

【方法・結果】マイクロサテライト（MS）濃縮ライブラリー等から多数開発した新規のMS3,181個、及び、これまでマッピングされていなかった既報のMS438個のUSDA-MARC連鎖地図へのマッピングを行った。その結果、2ポイント連鎖解析で新たに約2,500個がマッピングされ、マルチポイント解析によりその内2,100個の詳細な位置が明らかとなった。従来の1,250個と合わせ、本研究で作製されたウシ連鎖地図は約3,500個のマーカーを含み、平均のマーカー間隔は0.86 cM（ゲノムサイズ/マーカー数）と第二世代連鎖地図の2.8倍のマーカー密度となった。

（日本畜産学会第102回大会、2003年9月、岐阜）

学会発表 4.

題 目：黒毛和種の枝肉重量関連領域（CW-1）におけるBACコンテグ作成

発表者：高野 淳¹、溝下和則²、高須賀晶子¹、杉本喜憲¹

所 属：¹畜技協・動物遺伝研、²鹿児島県肉改研、

要 旨：【目的】現在までに我々は、父方半きょうだい家系を用いた連鎖解析によりCW-1を7.5 cMの領域にマップした（溝下ら、日本畜産学会第97回大会）。当該領域に存在する責任遺伝子を同定するためには高密度なMSマーカーの配置および詳細な物理地図の情報が必要とされる。今回、我々はCW-1のBACコンテグ作成と高密度な新規MSマーカーの開発を行ったので報告する。

【方法】本領域に位置する既知MSマーカー16個とヒト相同遺伝子2種をアンカーとして、BACライブラリーより当該領域の断片を含むクローンを単離した。クローンの末端配列を基にPCRを用いたBACスクリーニングを反復し、ゲノムウォーキングを行った。得られたBACクローンを基に

ライブラリーを作製し、(CA/GT)_nをプローブとしてMSを単離した。

【結果】我々は、116個のBACクローンをスクリーニングし、38個で構成される約4Mbのコンティグを作成することに成功した。また、各BACクローンから合計39個の新規MSを開発したことで、本領域のマーカー間隔は平均78kbとなった。当該領域における高密度マーカーの開発により、枝肉重量に関する相関解析が可能となった。今後、黒毛和種一般集団を対象に候補領域の絞り込みを進める予定である。

(日本畜産学会第102回大会、2003年9月、岐阜)

学会発表 5.

題 目：黒毛和種の*Marbling-2*領域特定のためのBACコンティグ作成

発表者：平野 貴¹、井上和也²、原 好宏²、杉本喜憲¹

所 属：¹畜技協・動物遺伝研、²宮崎県畜試

要 旨：【目的】我々は、種雄牛Aの半きょうだい家系の解析で、*Marbling-2*領域（約20cM）を見出したが、近縁種雄牛B、Cの家系では同領域の脂肪交雑への影響は見られなかった。産子のBMS値の比較から、A特有のハプロタイプ中に*Marbling-2*遺伝子が存在すると仮定し、約6cMまで狭めた（第100回大会）。今回、A特有のハプロタイプを塩基配列レベルで明らかにするため、BACコンティグ作成とMS・SNP開発を行った。

【方法】コンティグは、2個のMSと24個の既知遺伝子をアンカーとして得たBACクローンの末端配列をゲノムウォーキングに用いて作成した。MSはBACクローンから(CA/GT)_nをプローブとして単離し、SNPは目的のBACクローンのショットガンシーケンスで得た配列からプライマーを設計した。

【結果】作成したBACコンティグは48個のクローンで構成され、ヒトゲノム情報から既知遺伝子が148個存在すると推定された。多型性MSを59個、SNPを26個単離し、ハプロタイプを再構成したところ、1個のBACクローン内にB、Cハプロタイプと区別する組換え点を見出した。今後、ショットガンシーケンスやSNPの情報を基にA特有のハプロタイプを明らかにし、責任遺伝子を探索したい。

(日本畜産学会第102回大会、2003年9月、岐阜)

学会発表 6.

題 目：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

発表者：小林直彦¹、平野 貴²、加藤誠二¹、傍島英雄¹、林 登¹、平尾一平¹、大谷 健¹、杉本喜憲²

所 属：¹岐阜県畜産研、²畜技協・動物遺伝研

要 旨：【目的】我々は、黒毛和種の経済形質を支配するQTL領域を明らかにするために、岐阜県保有のエリート種雄牛産子で父方半きょうだい家系を構築し、連鎖解析を行っている。エリート種雄牛家系の1次スクリーニングで、脂肪交雑に関して2箇所のQTL候補領域が検出された。これら2箇所の候補領域について、さらに詳細な2次スクリーニングを実施した。

【方法】エリート種雄牛の産子である肥育牛190頭について、種雄牛でヘテロであったマイクロサテライトマーカーを中心に254個のマーカーを全染色体に配置した。それぞれについてDNA型判定を行い、連鎖解析を行った。その結果Chromosome-wise 5%有意水準で検出された2箇所のQTL候補領域に、さらに52個のマイクロサテライトマーカーを配置し、さらに解析頭数を524頭

に増やして2スクリーニングを行った。

【結果】 2箇所BMSに関するQTL候補領域のうち、2番染色体(BTA2)の候補領域では、BMS No.に関してLODスコア2.02、ハプロタイプ効果として、BMS No.を0.55上昇させる効果が見られた。さらに同じ領域には、Beef Color Standard (BCS)に関して、LODスコア1.55、ハプロタイプ効果として、BCSを0.15下げる効果が見られた。24番染色体(BTA 24)の候補領域では、BMS No.に関してLODスコア1.25、ハプロタイプ効果として、BMS No.を0.45上昇させる効果が見られた。さらに同じ領域には、枝肉重量(CW)に関して、LODスコア2.1、ハプロタイプ効果として、CWを14.8kg上げる効果が見られた。これら2箇所のQTL候補領域の優良ハプロタイプによりウシの選抜を行えば、BMSだけでなくBCS, CWに関しても改良が期待できる。今後これらのQTL候補領域の効果検証を実施する予定である。

(日本動物遺伝育種学会第4回大会、2003年11月、東京)

学会発表7.

題目：ウシ高密度RH地図作成

発表者：伊藤智仁^{1,2}、高須賀晶子¹、井原尚也¹、渡邊敏夫¹、杉本喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²畜改団・畜改技研

要旨：**【目的】**我々はこれまでにマイクロサテライトマーカー約1100個をフレームワークとするウシRH地図の作成し、発現遺伝子座EST約2000個をマッピングしたウシ物理地図の作成について報告してきた(日畜第101回大会、2003)。ウシRH地図の精度を高めるため、約3,500個のマイクロサテライトマーカーを使用したフレームワークの作成を試み、高密度にしたフレームワークの効果を検討したので報告する。

【方法】井原らによって新規に開発されたマイクロサテライトマーカー(井原ら、日畜第102回大会、2003)は報告されたプライマーでPCR増幅した。RH地図の作成は、前回と同様にRHMAP v3.0を用いて2ポイントLODスコア>4による連鎖グループの各染色体への帰属に基づいて行った。

【結果】約3500個のマイクロサテライトマーカーの内、約3,100個をフレームワークに使用できた。各染色体について2ポイント解析(2pt)によりLodスコア>4によるグループ化を行った。マーカーの最も多い染色体はBTA 1で215マーカー、最も少ない染色体はBTA 23で48マーカーであった。前回の報告において、BTA 1は約100個のマーカーでフレームワークを作成すると、4つの連鎖グループで構成されていたが、今回約200個のマーカーを使ったところ、連鎖グループは2つとなった。このBTA 1のフレームワークに、BTA 1に位置付けられているウシESTを2pt Lodスコア>10の条件でマッピングしたところ、50個のESTの位置が決まり、ヒト遺伝子との相同性からBTA 1はヒト第3番および21番染色体とシンテニーを形成していることが明らかになった。マイクロサテライトマーカー約1100個のフレームワークでは約30個のESTしかマッピングできなかったことから、フレームワークの充実により、これまでマップされなかったESTもRH地図上にマップできることが期待できる。現在、EST約2,700個をタイピング済みであり、フレームワークと合わせてマーカー数約6,000個以上によるマップ作成が可能となった。今後はフレームワークに使ったマイクロサテライトマーカーの連鎖地図上における並び方との整合性を調整し、もっとも確からしいRH地図作成を続けていくつもりである。

(日本動物遺伝育種学会第4回大会、2003年11月、東京)

学会発表10.

題 目：黒毛和種大規模半兄弟家系を用いた高BMS責任領域同定の試み

発表者：横内耕¹、渡邊敏夫¹、藤田達夫²、志賀一穂²、杉本喜憲¹

所 属：¹畜技協・動物遺伝研、²大分県畜試

要 旨：【目的】黒毛和種において筋肉内脂肪交雑スコア（BMS）を左右するゲノム上の責任領域、さらには遺伝子の同定が重要な課題となっている。本研究は大分県内市場に出荷された去勢牛で父方半兄弟家系を作成し、QTL解析を行うことで高BMS責任領域の同定を試みた。また、QTL解析の手法としてselective genotypingを採用し、解析効率の改善をはかった。

【方法】一次スクリーニングはselective genotypingの手法に従い、sire Aの産子330頭からBMS \leq 3とBMS \geq 7の個体163頭のみを解析した。常染色体上に均等に配置した242 マイクロサテライトマーカの型判定を行い、線形回帰によりBMSに相関するマーカーからなるゲノム上領域を検出した。有意な相関が検出された領域については全個体での型判定を行い、selective genotypingの結果を再検討した。相関が再確認された領域について、二次スクリーニングとして新たにマーカーを追加して解析を進めた。

【結果】BMSの偏った163頭の解析から、1, 8, 10, 11, 22番染色体上に、BMSに相関した領域が検出された ($p < 0.05$)。さらに330頭全頭を解析した結果から、同様の位置に有意な領域が検出されることが確認され、selective genotypingの手法を用いることで一次スクリーニングの解析効率を大幅に上げられることが示された。

これらの染色体について二次スクリーニングを行ったところ、特に1, 10番染色体上の領域にBMSへの強い相関が検出され[BTA1, 84 cM; BTA10, 55 cM ($p < 0.01$)]、QTLの存在が示唆された。そこで、sire Aとは兄弟にあたるsire Bの産子についても解析を行った。両sireの優良ハプロタイプはほぼ同一であり、QTL解析の結果、sire Bの1,10番のいずれの染色体上にもBMSへの弱い相関を示す領域が検出されたが、その位置はsire Aとは異なっていた[BTA 1, 43 cM; BTA 10, 92 cM ($p < 0.05$)]。今後さらに解析頭数を増やし、QTLのより正確な位置を同定する予定である。

(日本畜産学会第103回大会、2004年3月、東京)

学会発表11.

題 目：黒毛和種種雄牛の父方半きょうだい家系における枝肉形質のQTL解析と育種改良への応用

発表者：小林直彦¹、平野 貴²、加藤誠二¹、傍島英雄¹、林 登¹、平尾一平¹、大谷 健¹、杉本喜憲²

所 属：¹岐阜県畜産研、²畜技協・動物遺伝研

要 旨：【目的】我々は、黒毛和種の経済形質を支配するQTL領域を明らかにするために、岐阜県保有のエリート種雄牛産子で父方半きょうだい家系を構築し、連鎖解析を行っている。あるエリート種雄牛家系で、脂肪交雑に関して2箇所のQTL候補領域が検出された。さらに、枝肉重量、肉色（BCS）に関するQTL候補領域が検出された。これらのQTL候補領域の保有が枝肉形質に及ぼす効果について検討し、DNA情報利用した育種改良手法の可能性について検討した。

【方法】エリート種雄牛の産子である肥育牛190頭について、種雄牛でヘテロであったマイクロサテライトマーカーを中心に254個のマーカーを全染色体に配置した。それぞれについてDNA型判定を行い、解析ソフトQTL Expressで連鎖解析を行った。その結果Chromosome-wise 5%有意

水準で検出された2箇所のQTL候補領域に、さらに52個のマイクロサテライトマーカーを配置し、さらに解析頭数を524頭に増やして2次スクリーニングを行った。

【結果】 2箇所のQTL候補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箇所のハプロタイプの種類と脂肪交雑(BMS No.)について比較した。候補領域2箇所の2番染色体(BTA 2)と、24番染色体(BTA 24)の脂肪交雑に効果のあったハプロタイプを各々 Q_2 、 Q_{24} とし、効果のないハプロタイプを q_2 、 q_{24} とした。効果のあるハプロタイプを両方保有する個体($Q_2 Q_{24}$)は113頭でそのBMS No. 平均値、標準偏差は 6.98 ± 2.21 、 $Q_2 q_{24}$ が131頭で 6.68 ± 2.26 、 $q_2 Q_{24}$ が92頭で 6.5 ± 2.03 、 $q_2 q_{24}$ が152頭で 6.02 ± 2.02 であった。各タイプのBMS No. 平均値の差の検定をF検定で行った。各タイプのBMS No. 平均値には、 $Q_2 Q_{24}$ と $q_2 q_{24}$ 、 $q_2 Q_{24}$ に有意差($p < 0.01$)がみられた。以上の結果から、2箇所のQTL候補領域の脂肪交雑に効果のあるハプロタイプは、相加的效果を持つことが示唆された。さらに、BTA2の候補領域では、Beef Color Standard (BCS) に関して、LODスコア3.65、ハプロタイプ効果として、BCSを0.15下げる効果が見られた。BTA 24の候補領域では、枝肉重量(CW)に関して、LODスコア6.05、ハプロタイプ効果として、CWを14.9kg上げる効果が見られた。これら2箇所のQTL候補領域の優良ハプロタイプによりウシの選抜を行えば、BMSだけでなくBCS、CWに関しても改良が期待できる。今後これらのQTL候補領域の効果検証を実施する予定である。

(日本畜産学会第103回大会、2004年3月、東京)

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15年度の委員会は平成16年3月11日東京で開催された。議事内容は次の通りであった。

① 動物遺伝研究所におけるウシゲノム研究の進展状況について

- a. ウシ高密度連鎖地図の作成
- b. ウシRHパネルを用いた物理地図の作成
- c. ウシ脂肪交雑遺伝子の探索
- d. ウシ枝肉重量遺伝子の探索
- e. ウシプリオンタンパク質多型の検索
- f. ウシ品種鑑定のためのゲノム解析

② 他の家畜・家禽のゲノム研究の進展状況について

- a. ブタゲノム研究について
- b. ニワトリゲノム研究について

③ 今後のウシゲノム研究の方向と成果の活用方法について

これらの議事の中で、動物遺伝研究所の15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。

肉用牛ゲノム研究・開発推進委員会委員

板井康明	(社) 家畜改良事業団専務理事
栗山憲司	(財) 競走馬理化学研究所理事長
佐々木義之	京都大学大学院農学研究科動物遺伝育種学教授
辻 荘一	神戸大学農学部応用動物遺伝学科教授
南波利昭	(独) 家畜改良センター理事長
菱沼 毅	(独) 農畜産業振興機構副理事長
福原利一	(社) 全国和牛登録協会会長
藤山秋佐夫	国立情報学研究所学術研究情報系教授
松田延義	全国畜産関係場所長会会長
横内囃生	(独) 農業・生物系特定産業技術研究機構理事

2) 肉用牛ゲノム研究・開発技術推進委員会

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15年度委員会は、平成16年1月21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15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. ウシRHパネルを用いた物理地図の作成
 - c. ウシ脂肪交雑遺伝子の探索
 - d. ウシ枝肉重量遺伝子の探索
- ③ 平成16年度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について
- ⑤ 都道府県におけるDNA育種技術の確立普及について

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	(独) 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	(独) 農業生物資源研究所ゲノム研究グループ上席研究官

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20の道県（北海道、岩手、宮城、秋田、山形、福島、茨城、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（独）家畜改良センター、（社）家畜改良事業団も本推進会議に参加した。

平成15年度推進会議は平成16年2月24日白河で開催された。主要議題は、①平成15年度事業報告、②平成15年度成果のまとめ、③解析手法の改善について、④アンケート結果及び来年度予算について、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15年度は推進検討委員会と研究打ち合わせ会議を開催した。推進検討委員会は平成15年12月25日東京で開催している。議事は次の通りであった。

- ① 平成15年度における各参加機関における研究業務の進捗状況と次年度の計画について
 - a. 動物遺伝研究所
 - b. (株)ワイエスニューテクノロジー研究所
 - c. 動物衛生研究所
 - d. 東京大学
- ② 討議
- ③ 海外情勢報告
東京大学 小野寺教授

研究打ち合わせ会議は、平成15年10月28日に東京で開催した。

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	(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	神戸大学農学部応用動物学科教授
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) 牛肉の品種鑑定技術検討委員会

検討委員会は平成15年度から開始された「牛肉の品種鑑定技術開発事業」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る。

平成15年度は検討委員会を2回開催した。第1回検討委員会は平成15年8月25日東京で開催している。議事は次の通りであった。

- ①先端技術を活用した畜産技術研究開発推進事業について
 - a. 先端技術を活用した畜産技術研究開発推進事業の趣旨と「牛肉の品種鑑定技術開発事業」の位置づけ

- b. 先端技術を活用した畜産技術研究開発推進事業の達成目標
- ② 牛肉の品種鑑定技術開発事業について
 - a. 牛肉の品種鑑定技術開発事業の推進体制
 - b. 牛肉の品種鑑定技術の現状と成果目標
- ③ 牛肉の品種鑑定技術の開発計画について
 - a. ゲノム解析による品種鑑定の技術的課題について
 - b. 年次別技術開発計画について

第2回検討委員会は平成16年2月20日東京で開催した。議事は次の通りである。

- ① 平成15年度における研究の進捗状況について
 - a. 動物遺伝研究所
 - b. 神戸大学
- ② 平成16年度の研究達成目標と研究計画について
 - a. 動物遺伝研究所
 - b. 神戸大学

牛肉の品種鑑定技術検討委員会委員

北池 隆	(独) 家畜改良センター技術部長
椎名 隆	東海大学医学部分子生命科学科助手
谷口幸雄	京都大学大学院農学研究科動物遺伝育種学教室助手
辻 莊一	神戸大学農学部応用動物学科教授
津曲公夫	(社) 日本食肉格付協会専務理事
安江 博	(独) 農業生物資源研究所ゲノム研究グループ上席研究官
吉村豊信	(社) 全国和牛登録協会事務局長

6) 研究会等の開催

- ① (独) 農業生物資源研究所、(社) 農林水産先端技術産業振興センターと共催で国際動物ゲノムワークショップ「動物ゲノム研究成果の産業への応用」を開催した。

開催日：平成15年11月6日

開催場所：KKRホテル東京

- 内容：(1) ニワトリのウイルス抵抗性Mx遺伝子のゲノム解析（渡邊智正、北海道大学大学院農学研究科家畜改良増殖学）
- (2) ヒトゲノム研究成果とその産業化への応用（藤澤幸夫、武田薬品工業株式会社医薬研究本部）
- (3) ブタMHC領域のゲノム解析の現状と医学・畜産学分野における応用（安藤麻子、東海大学医学部基礎医学系分子生命科学科）
- (4) The application of Genomic Research in the Pig Industry

- (Graham S. Plastow, 米国Sygen International)
- (5) ウシQTLのゲノム解析 (杉本喜憲、(社) 畜産技術協会附属動物遺伝研究所)
- (6) Positional Identification of Structural and Regulatory QTN in Livestock (Michel Georges, ベルギーUniversity of Liege)

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、と共催した。

開催日：平成15年11月9日

開催場所：明治大学駿河台校舎大学会館

内容：特別講演：Positional Identification of Structural and Regulatory QTN in Livestock (Michel Georges, ベルギーUniversity of Liege)

I. シグナル伝達系におけるバイオインフォマティクス

- (1) シグナル伝達系を表現する枠組みを支えるオントロジー
(高井貴子、東京大学大学院情報理工学系研究科)
- (2) 植物の自己・非自己認識と防御応答
(渋谷直人、明治大学農学部生命科学科)

II. 植物と魚類でのゲノム解析

- (1) イネゲノム解析
(肥後健一、(独) 農業生物資源研究所)
- (2) ヒラメ・カレイの身体に左右非対称性をもたらす発生機構
(鈴木 徹、(独) 水産総合研究センター)

③ 動物遺伝研究所講演会

国際動物遺伝学会会長であるWomack博士が東京で開催された国際動物遺伝学会評議委員会へ参加された機会に、動物遺伝研究所で講演会を開催した。

開催日：平成15年9月24日

開催場所：動物遺伝研究所大会議室

内容：Cattle Genome Analysis: Past, Present and Future (James E. Womack, 米国Texas A&M University)

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15年度は次の11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：齊藤博水

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

- 6) 量的形質遺伝領域マッピングのためのヒトーウシ比較地図の高精度化に関わる技術開発（平成13年度より継続）
 - 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年度より継続）
 - 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

- 8) ウシPrp遺伝子トランスジェニックマウスに対するBSE感染実験（平成15年度新規）
 - ①委託先：動物衛生研究所
 - ②委託研究者：高田益宏

- 9) プロモーター領域多型とプリオン遺伝子発現に関する細胞生物学的研究（平成15年度新規）
 - ①委託先：東京大学

②委託研究者：小野寺 節

10) ウシと人、マウスにおける遺伝子転写制御領域の比較（平成15年度新規）

①委託先：佐賀大学農学部

②委託研究者：和田康彦

11) ウシ食肉品種鑑定の実用化を目指した迅速・低コスト・省力的分析技術の検討（平成15年度新規）

①委託先：神戸大学農学部

②委託研究者：万年英之

5. 研修員の受け入れ

所属機関名	氏名	受け入れ期間
岩手県農業畜産センター畜産研修所	鈴木 暁之	平15. 4. 24～4. 25 平15. 8. 5～8. 6
福島県畜産試験場	本多 巖 本多 巖 坂本 秀樹	平15. 5. 27～5. 29 平16. 2. 2～2. 3 平16. 2. 2～2. 3
山梨県酪農試験場	菊島 一人 菊島 一人	平15. 6. 9～6. 20 平16. 3. 8～3. 19
鳥取県畜産試験場	小江 敏明	平15. 8. 13～8. 20 平16. 1. 13～2. 27
岡山県総合畜産センター	古川 恵	平15. 9. 1～9. 12
佐賀県畜産試験場	片淵 直人 片淵 直人 片淵 直人	平15. 10. 6～10. 10 平15. 12. 16～12. 19 平16. 1. 19～1. 23
兵庫県立農林水産技術総合センター	龍田 健	平15. 10. 16～10. 17
茨城県畜産センター肉用牛研究所	堀越 忠泰 木村 安之 堀越 忠泰 木村 安之 堀越 忠泰 木村 安之	平15. 11. 10～11. 14 平15. 11. 10～11. 14 平15. 11. 17～11. 21 平15. 11. 17～11. 20 平16. 3. 1～3. 5 平16. 3. 1～3. 5
大分県畜産試験場	藤田 達男	平15. 11. 11～11. 13
山形県農業研究研修センター	斎藤 真希 斎藤 真希	平15. 11. 22～11. 25 平16. 3. 15～3. 19
岡山大学大学院	Abdol Rahim Abbasi	平15. 12. 15～12. 22 平16. 1. 13～2. 9
鹿児島県肉用牛改良研究所	瀬戸口 浩二	平16. 1. 19～2. 27
島根県立畜産試験場	安部 亜津子	平16. 2. 23～2. 27
岐阜県畜産研究所	小林 直彦	平16. 2. 25～2. 27
宮城県畜産試験場	千葉 和義	平16. 3. 15～3. 17
北海道立畜産試験場	藤川 朗	平16. 3. 22～3. 23

6. 職員の普及活動等

1) 講演

1. 渡邊敏夫：和牛経済形質のための連鎖解析プログラム～理論と実践～、第一回最先端育種セミナー、2003年6月、京都。
2. 杉本喜憲：QTLから遺伝子同定に向けての戦略、第一回最先端育種セミナー、2003年6月、京都。
3. 杉本喜憲：ウシゲノム解析の現状と今後の課題、東海大学医学部、2003年7月、神奈川県伊勢原市。
4. 杉本喜憲：ウシQTLのゲノム解析、家畜ゲノム国際ワークショップ、2003年11月、東京。
5. 杉本喜憲：牛のDNA解析から見えてくるもの、平成15年度鹿児島県肉用牛振興協議会始良支部 肉用牛肥育技術検討会、2003年11月、鹿児島県隼人町。
6. 杉本喜憲：ウシ経済形質のゲノム解析の現状と今後の展開、平成15年度水産養殖関係試験研究推進会議「育種部会」、2003年12月、伊勢。
7. 平野 貴：DNA解析の先進事例：黒毛和種のMarbling-2領域からの脂肪交雑関連遺伝子決定に向けて、岐阜県客員研究員招聘事業講演会、2004年2月、高山。

Ⅲ 研究の解説

1. ウシゲノム連鎖地図の現状

(1) ゲノム連鎖地図とは

ゲノム上の任意の場所である座（locus）の塩基配列が個体間で異なる場合には多型性があるといい、DNAマーカーと呼ばれる。精子や卵子が生成する減数分裂の過程で相同染色体間の組換えが起こるが、その頻度はマーカー間の距離にほぼ比例する。近接しているほどマーカー間の組換え頻度は小さくなる。ゲノム解析のための基本的なツールであるゲノム連鎖地図（linkage map）は、DNAマーカーを連鎖の程度に応じて直線上に並べたものである。多数の減数分裂が観察されるリファレンスファミリー（標準家系）を使うと、DNAマーカーの並んだ連鎖地図を作成できる。ウシのゲノムは29本の常染色体と性染色体XYで構成されているので、DNAマーカーは30の連鎖グループに属する（Y染色体には相同染色体がないので組換えは起こらない）。それぞれの連鎖グループで多数のDNAマーカーをcM（センチモルガン）という距離の単位で並べることができる。1-cMとは減数分裂中に1%の頻度で組み換えを起こしうる遺伝的距離を示す単位である。ウシやヒトでは1-cMが約1 Mb（メガベース：百万塩基対）に相当し、全ゲノムは約3,000-cM、30億塩基対になる。連鎖地図はマーカー間の組換え頻度に依存してマーカーを並べたものゆえ、マーカーは点に過ぎない。しかしながら、地図上に位置の明らかなマーカーが多数あるほど正確なマッピングが可能だけでなく、マーカー間をクローン化されたDNA断片で連結することが可能となる。すなわち、物理的な実体のある染色体地図となり、任意の領域のマーカー開発や遺伝子配列の変異を調べることが容易になる。したがって、マーカー密度が高くなればなるほど、連鎖地図のツールとしての有用性は飛躍的に高まるのである。

(2) 家畜・家禽におけるゲノム連鎖地図の現状

多数のDNAマーカーを含むゲノム連鎖地図は、経済形質や遺伝性疾患などに関わっている遺伝子のマッピングに必要不可欠である。表1に家畜・家禽における連鎖地図の現状を示している。

ウシでは、1997年に米国農務省肉畜研究センター（USDA-MARC）らのグループが1,250個のDNAマーカーを含む連鎖地図を作成した。他の家畜・家禽でも約1,000個のDNAマーカーを含む連鎖地図が報告された。約1,000個のマーカーを含む連鎖地図があれば、遺伝的な形質のマッピングは可能であることと、マーカーを開発するには大変な労力と費用を要するため、家畜・家禽ではそれ以降本格的なマーカーの開発と連鎖地図のアップデートはなされていなかった。しかしながら、マーカーアシスト選抜のためのファインマッピングや目的の遺伝子の単離・同定の局面になるとマーカー数が少ないため、マッピングした領域毎に多大なコストをかけて高密度にマーカーを開発しなくてはならない。そこで、我々はウシゲノムの全体を対象にランダムにマーカーを開発し、USDA-MARC と共同で3,000個のマーカーのマップされた連鎖地図の作成を行うことにした。本事業で作成したウシ連鎖地図の概要も表1に示している。

ヒトの場合、全ゲノムの塩基配列が明らかになっても遺伝的形質のマッピングにおける連鎖地図の重要性は変わらない。生活習慣病である高血圧・糖尿病などの感受性遺伝子を探索するには、統計的に有意に連鎖する領域を特定しなければならないからである。表1の下段に示すように1998年に8千個のマーカーを使った連鎖地図が作成されたが、そのマッピングに使った標準家系の減数分裂数は約200のため連鎖地図の解離度が低く、多数のマーカーの位置の違いを区別できず、同じ場所に位置づけられることとなった。そこで、2002年には減数分裂数を1,257まで増やした連鎖地図が作成された。さらに、米国National Institute of Healthは減数分裂

表1 家畜・家禽のゲノム連鎖地図の現状

畜種	作成年	連鎖地図にマップされているマーカー数	ゲノムの大きさ* (cM)	マーカー密度 (cM/マーカー)
ウシ	1997	1,250	2,990	2.5
ウシ**	2004	3,802	3,214	0.8
				1.4#
ブタ	1996	1,042	2,286	2.2
ヒツジ	2001	1,093	3,500	3.4
ニワトリ	2000	1,889	3,800	2.1
ヒト	1998	8,031	3,567	1.5#
ヒト	2002	5,136	3,615	0.5#

*雌雄平均値。一般に雌の方が大きい。**本事業で作成したウシゲノム連鎖地図。#ヒトやマウスでは同一個所に位置づけられたマーカー集団を1個に数えている。本事業で作成したウシ連鎖地図をヒト・マウスのように個所数で計算すると、ヒト連鎖地図（1998）と同程度のマーカー密度となる。

数5,000まで増やしたヒト連鎖地図作成プロジェクトに30億円を使う計画である。因みに、我々の用いたウシ標準家系の減数分裂数は391であるため、解離度の限界は0.8 cMとなり、本事業で作成したウシ連鎖地図はまだ限界まで到達していない。USDA-MARCは独自に約800個の一塩基多型SNPマーカーをマッピングしていることから、合計4,600マーカーになり、さらに限界まで近づくだらう。今後は、解離度の高い連鎖地図を作成するため、減数分裂数を増やす、つまり、マッピングのための標準家系の規模を大きくする必要があるかもしれない。

(3) 本事業で作成したウシゲノム連鎖地図

本事業で作成したウシゲノム連鎖地図は2004年春から夏頃には公表される見込みである。新しい連鎖地図にマッピングされたマーカーの内、当研究所で開発されたマイクロサテライトマーカーが半数以上を占めている。1997年の地図において常染色体上にいくつか存在していた20-cMを越える大きなギャップは消滅し、どの常染色体もマーカー間隔は10-cM未満となっている。この連鎖地図により、ウシの遺伝性疾患などの原因遺伝子をはじめ、肉質など経済形質の責任遺伝子の精度の高い染色体マッピング（ファインマッピング）が可能となる。表2と図1に本事業で作成したウシゲノム連鎖地図を示す。

(4) ゲノム連鎖地図の重要性

現在、米国を中心にウシの全ゲノムの塩基配列を決定するプロジェクトが始まっている。全ゲノムの塩基配列を決定するには、詳細な物理地図（遺伝的な距離ではなく、DNAの長さに基づく地図）を作成する必要がある。詳細な物理地図を作成するには、高密度な連鎖地図が重要な足場となる。したがって、新しいウシゲノム連鎖地図は、遺伝形質の責任遺伝子の正確なマッピングだけではなく、全ゲノムの塩基配列決定にも大きく貢献することが期待される。

2001年にヒトゲノムのドラフト配列が公表され、ゲノム上には約3万の遺伝子の存在が示唆された。ヒトゲノム配列中の未解読ギャップはその後修復されて完成に近づいている。ゲノムの

全塩基配列が明らかとなり、全遺伝子の機能がわかったとしても、任意の遺伝形質の原因（責任）遺伝子をそれだけで同定することはできない。しかし、ゲノム連鎖地図を使って該当する遺伝形質をマッピングしておけば、その領域に存在する遺伝子群から効率的に原因（責任）遺伝子の候補を見つけることが可能となる。高密度な連鎖地図は、全ゲノム配列が決定された後においても、遺伝子の同定に重要な役割を果たすのである。

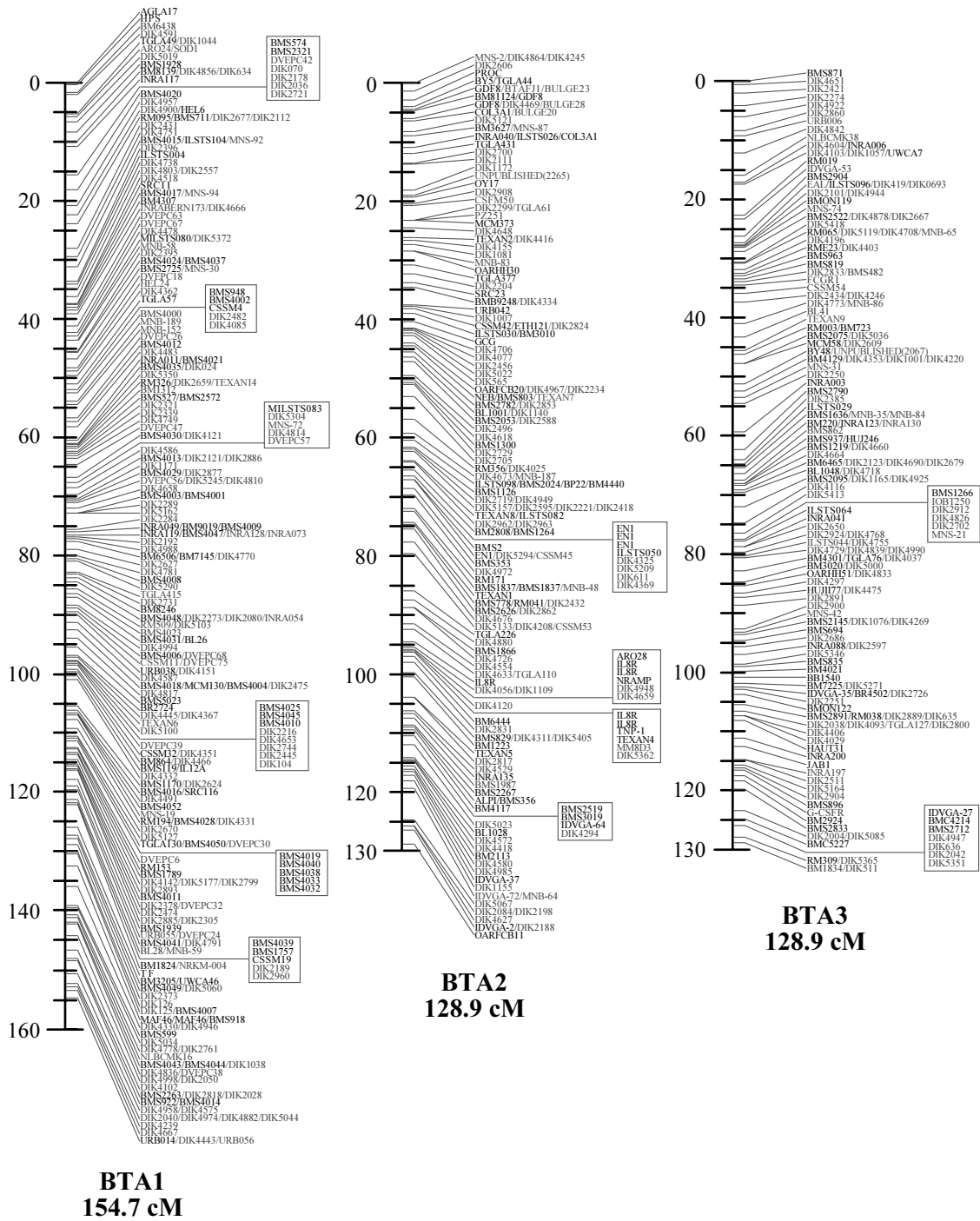
表7 ウシ連鎖地図の概要

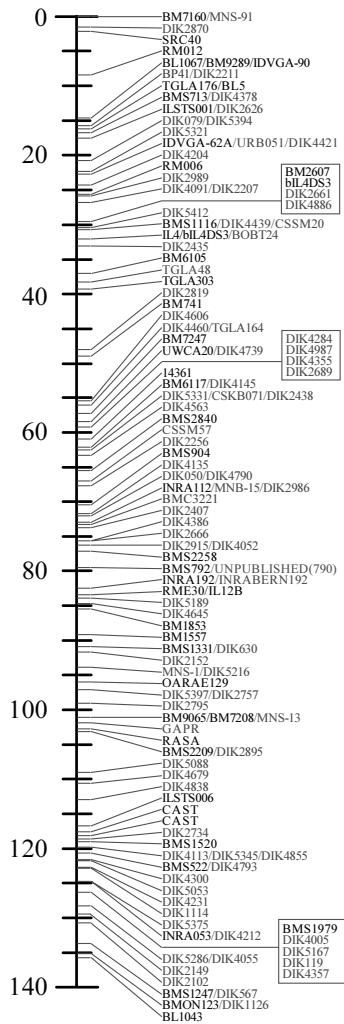
BTA/X ¹⁾	サイズ (cM)	マーカー数	ポジション数	平均間隔 (cM)	間隔最大値 (cM)	間隔の数	
						10~15cM	5~10cM
1	154.7*	266*	151*	1.0	4.6	0	0
2	128.9	188	113	1.2	6.2	0	2
3	128.9	173	102	1.3	5.2	0	1
4	119.9	132	82	1.5	4.7	0	0
5	135.6	184	116	1.2	4.7	0	0
6	134.4	232	133	1.1	9.2	0	3
7	135.6	139	89	1.6	8.6	0	5*
8	128.6	125	85	1.5	7.9	0	4
9	116.2	130	80	1.5	4.9	0	0
10	118.8	126	89	1.4	4.4	0	0
11	131.0	201	104	1.3	7.6	0	2
12	110.0	126	75	1.5	8.9	0	1
13	105.4	116	81	1.3	4.9	0	0
14	103.9	136	78	1.4	5.1	0	1
15	109.8	145	95	1.2	5.6	0	1
16	98.6	104	68	1.5	4.0	0	0
17	95.9	104	70	1.4	5.5	0	1
18	84.4	114	71	1.2	5.1	0	1
19	109.6	136	90	1.2	6.7	0	3
20	82.9	121	65	1.3	5.2	0	1
21	83.8	129	73	1.2	4.0	0	0
22	88.1	82	58	1.6	7.1	0	1
23	80.0	77	49	1.7	6.3	0	2
24	78.1	98	62	1.3	3.8	0	0
25	68.4	74	49	1.5	6.8	0	2
26	79.4	64	44 [#]	1.9*	7.4	0	3
27	71.2	72	44 [#]	1.7	6.2	0	1
28	61.7 [#]	81	44 [#]	1.5	4.7	0	0
29	69.7	158	79	0.9 [#]	3.3 [#]	0	0
X	146.5	189	84	1.8	10.2*	1	5*
total	3159.9	3960	2423	1.4 (平均)	10.2 (最大値)	1	40

*は最大値、#は最小値を示す

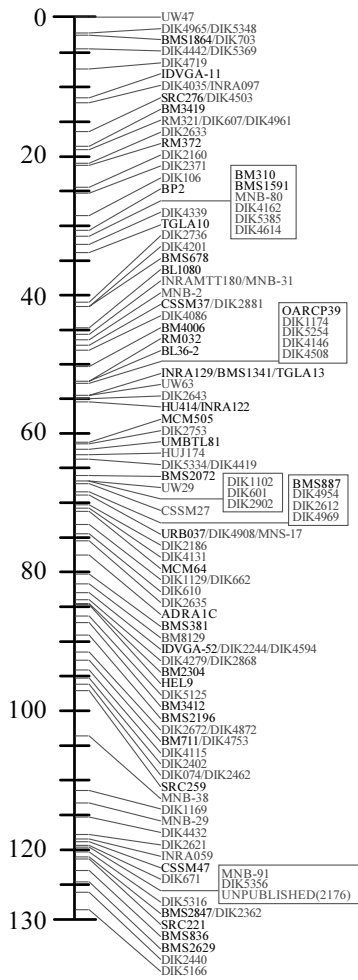
¹⁾ 29番染色体までは、性平均値、X染色体は雌による値

図1 ウシ連鎖地図

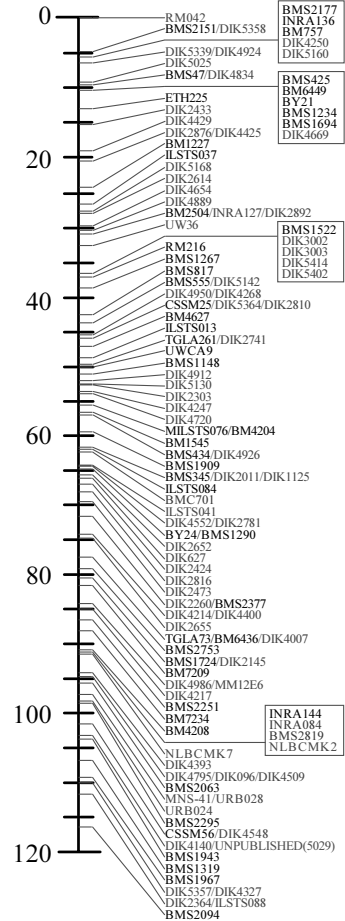




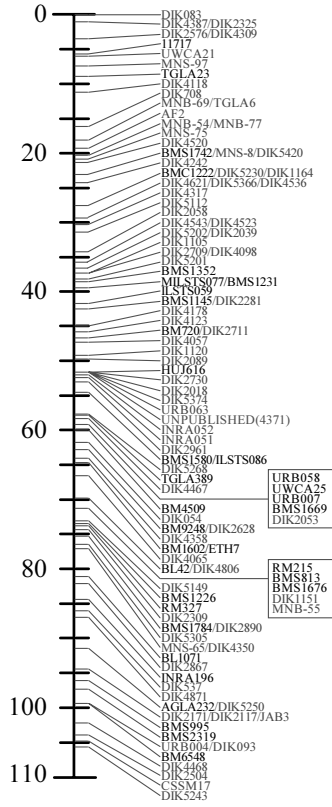
BTA7
135.6 cm



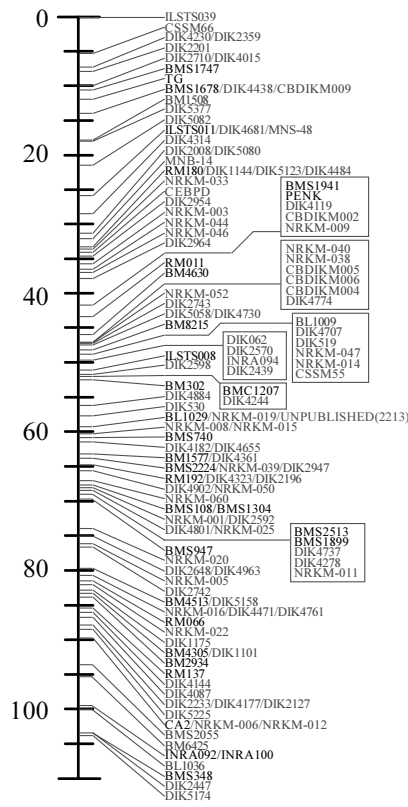
BTA8
128.6 cm



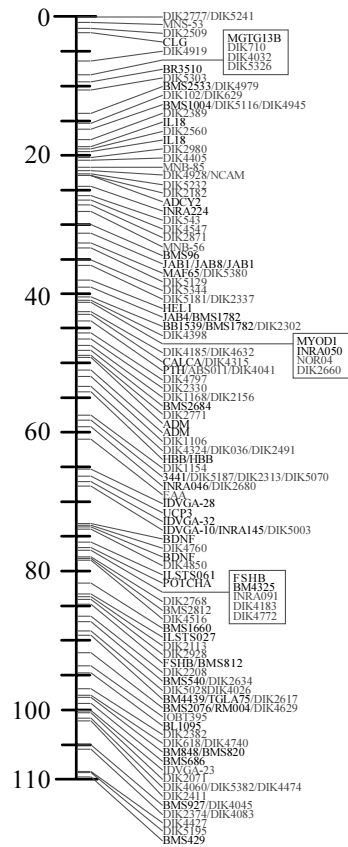
BTA9
116.2 cm



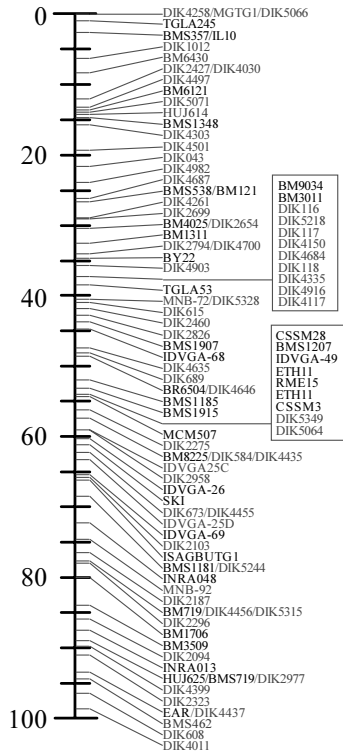
BTA13
105.4 cM



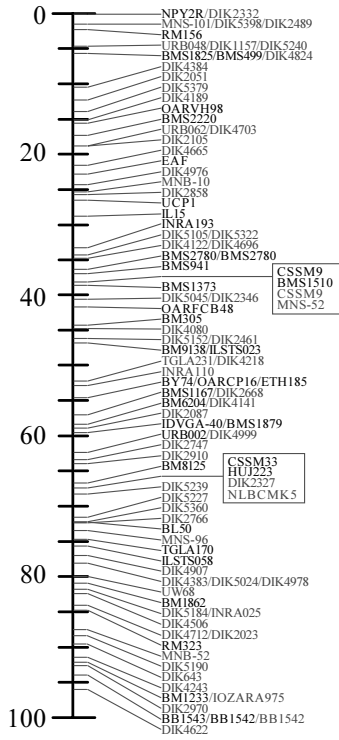
BTA14
103.9 cM



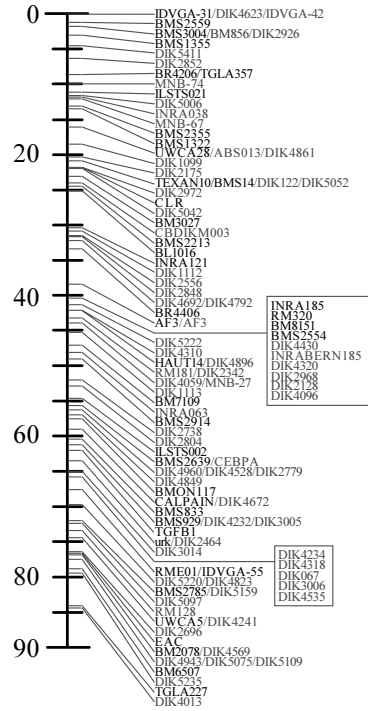
BTA15
109.8 cM



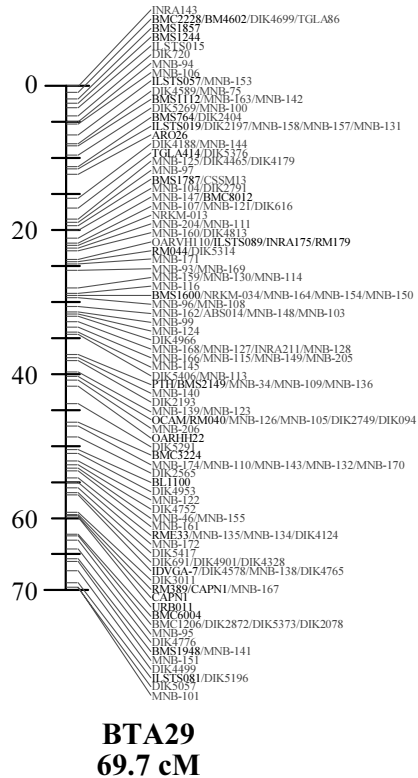
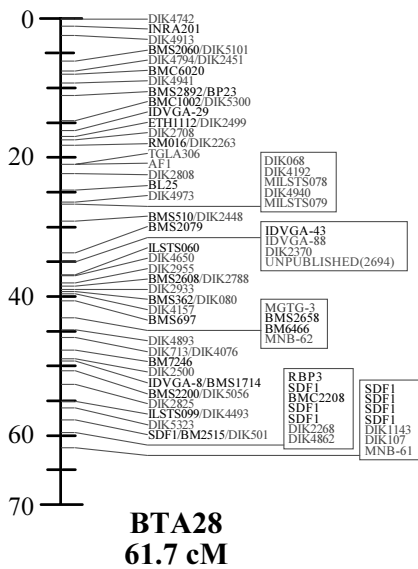
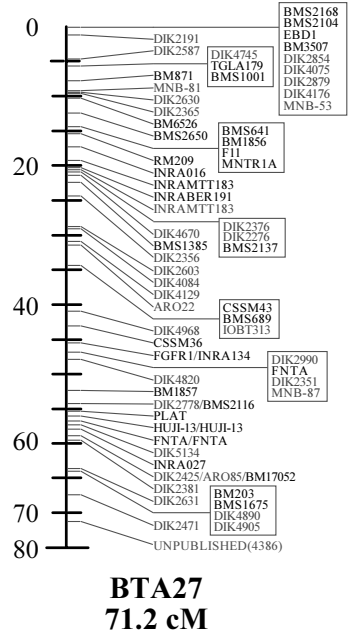
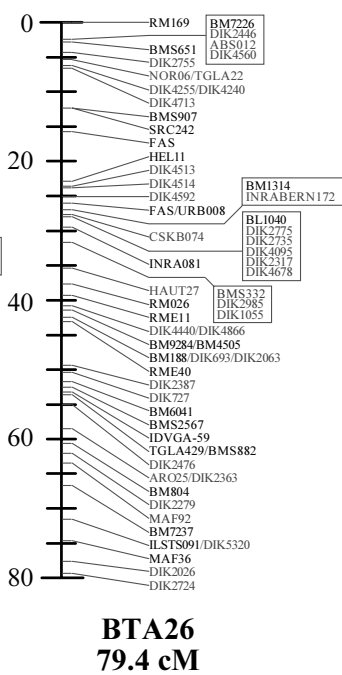
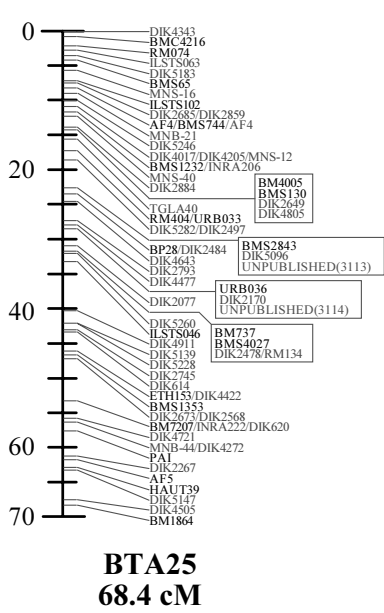
BTA16
98.6 cm

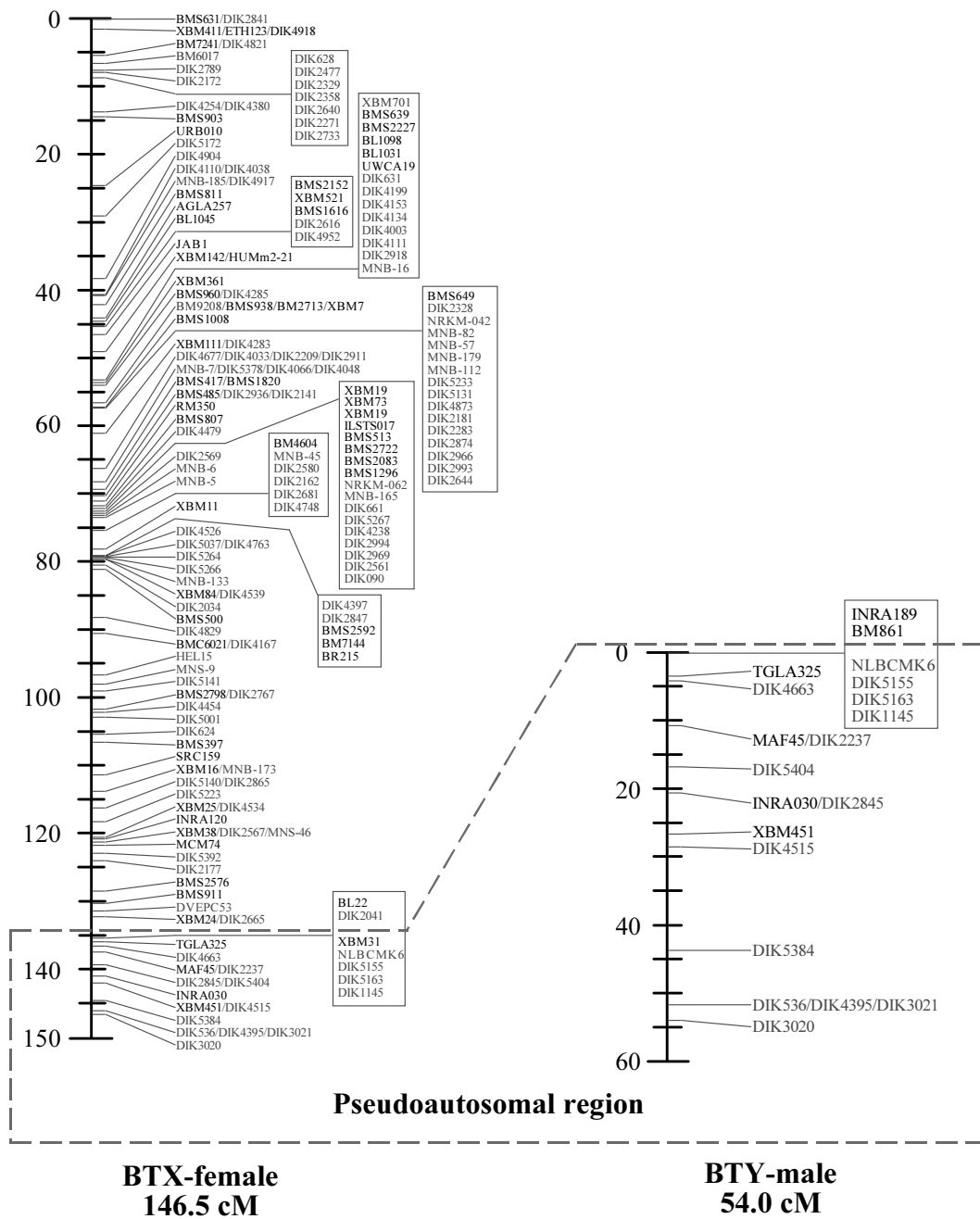


BTA17
95.9 cm



BTA18
84.4 cm





IV 総務

1. 職員名簿

(平成16年 3月31日現在)

所 属	職 名	氏 名
所 長	所 長	松 川 正
管 理 部	部 長	高 田 耕 節
	補 助 員 補 助 員	浅 比 紀 子 芳 賀 元 子
動物遺伝研究部	部 長	杉 本 喜 憲
	主任研究員 主任研究員	高 須 賀 晶 子 渡 邊 敏 夫
	研 究 員 研 究 員 研 究 員 研 究 員 研 究 員	溝 口 康 平 野 貴 井 原 尚 也 横 内 耕 高 野 淳
	補 助 員 補 助 員 補 助 員 補 助 員 補 助 員 補 助 員 補 助 員 補 助 員 補 助 員 補 助 員 補 助 員 補 助 員	渡 辺 恵 美 子 塚 沢 浩 子 藤 田 郁 子 伊 藤 千 代 子 藤 井 友 子 鳴 島 亜 希 子 金 内 由 美 子 緑 川 淑 枝 丸 山 久 美 子 高 田 亜 紀 真 船 文 恵 星 優 美 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15年4月1日	横内 耕	動物遺伝研究部	

2) 職員の退職・退任

退職・退任年月日	氏名	所属	備考
平成15年8月31日	竹田 晴子	動物遺伝研究部	
平成15年11月16日	伊藤 智仁	動物遺伝研究部	
平成16年3月31日	伊藤 千代子	動物遺伝研究部	
平成16年3月31日	緑川 淑枝	動物遺伝研究部	
平成16年3月31日	芳賀 元子	管理部	

3. 職員の海外出張

氏名	出張先	期間	用務
竹田 晴子	米国	平成15年4月1日～ 6月30日	National Institute of Environmental Health Sciencesにおいて在外研究
高須賀 晶子	米国	平成16年1月9日～ 1月16日	サンディエゴ市で開催されたPlant & Animal Genome XII出席
渡邊 敏夫	米国	平成16年1月9日～ 1月16日	サンディエゴ市で開催されたPlant & Animal Genome XII出席

4. 施設・機器の整備

1) 施設

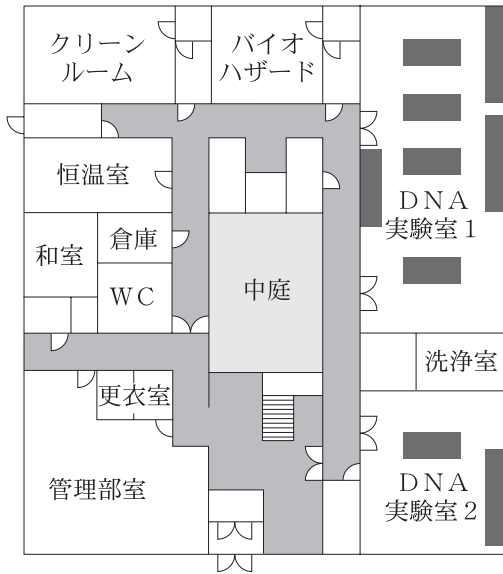
研究施設の平面図は58ページの通り。

2) 平成15年度購入の主要機器（単位百万円以上）

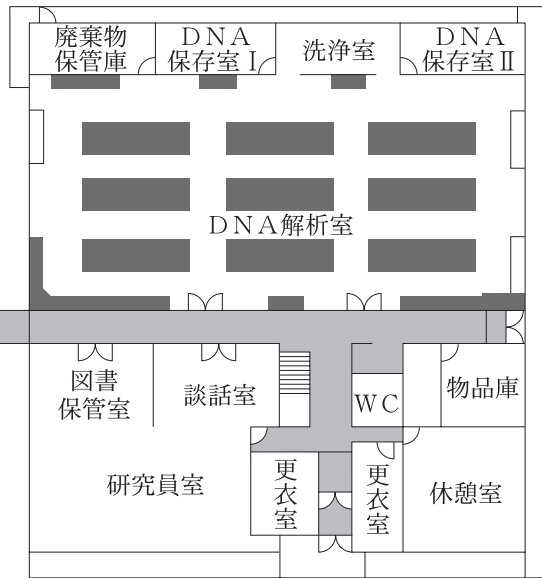
機 器 名	式 数
蛍光分光光度計（パーキンエルマー LS55ルミネッセンス）	1
PCR増幅装置（アプライドバイオシステム社 9700 Gold96-Well）	15
DNAシーケンサー（アプライドバイオシステム社 3730XL-300）	1
リアルタイム定量PCR増幅装置（ABI PRISM 7900HT）	1

研究施設平面図

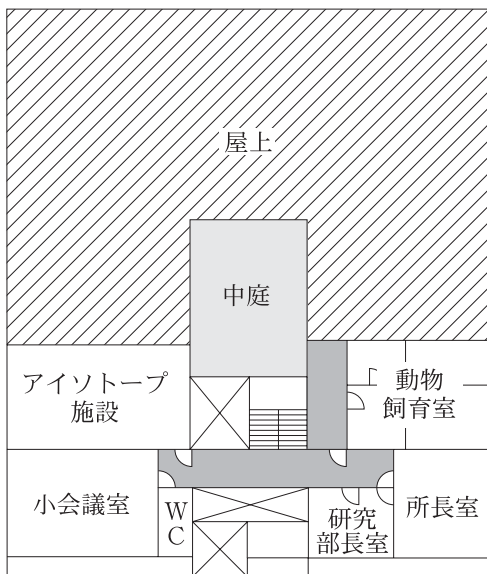
本館 1階 (742m²)



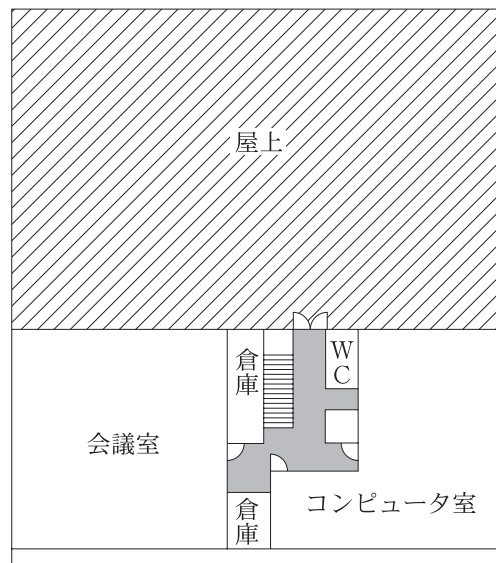
別館 1階 (788m²)



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

V 資 料

Deletion of one of the duplicated *Hsp70* genes causes hereditary myopathy of diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cattle

M. Sugimoto*, H. Furuoka[†] and Y. Sugimoto[‡]

*National Livestock Breeding Center, Nishigo, Fukushima, Japan. [†]Department of Veterinary Pathology, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, Japan. [‡]Shirakawa Institute of Animal Genetics, Nishigo, Fukushima, Japan

Summary

Heat-shock protein 70 (*Hsp70*) is a major chaperone that folds protein and prevents aggregation. The *Hsp70* family contains both constitutive and stress-inducible forms. In humans, two of the inducible *Hsp70* genes are located within the human major histocompatibility complex (MHC) on 6p21.3, as a duplicated locus, 12 kb apart from each other. We report that loss of one of the duplicated *Hsp70* genes, the bovine homologue within the bovine MHC, is responsible for hereditary myopathy of diaphragmatic muscles (HMDM) in Holstein-Friesian cattle. Although the remaining *Hsp70* gene is intact, *Hsp70* protein levels are dramatically decreased in affected cattle. In normal diaphragmatic muscle, *Hsp70* binds several proteins involved in energy metabolism including glycogen phosphorylase (PYGM). Immunohistochemical staining indicated that PYGM accumulated in the HMDM-specific core-like structures in affected cattle. Misfolding of energy-related proteins due to *Hsp70* deficiency might lead to protein aggregation and muscle fibre degeneration.

Keywords autosomal recessive disease, Holstein-Friesian cattle, *Hsp70*, linkage analysis, myopathy.

Introduction

Hereditary myopathy of diaphragmatic muscles (HMDM) in Holstein-Friesian cattle is an autosomal recessive disease characterized by late onset, ruminal tympany and respiratory insufficiency (Furuoka *et al.* 1995). The histopathological feature is a central core-like structure containing actin and ubiquitin in the diaphragmatic muscle (Furuoka *et al.* 1999). Hereditary myopathies in humans have a broad range of clinical features, pathology and mode of inheritance. Although it is difficult to classify HMDM in the categories of human myopathy, the presence of core-like structures suggests a similarity to desmin-related myopathy (DRM). The DRM is an autosomal dominant myopathy with cores containing desmin that is caused by mutations in the desmin gene (Goldfarb *et al.* 1998) or in its chaperone, the alpha-B-crystallin gene (Vicart *et al.* 1998). Identification of

a causative gene in HMDM might facilitate a better understanding of the molecular mechanism underlying the core-like structure formation, which leads to muscle fibre degeneration.

Materials and methods

Genetic mapping

Genomic DNA was isolated from diaphragmatic muscle or blood using the QIAamp tissue or blood kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). A total of 1200 fluorescent labelled (CA)_n microsatellite markers were selected from the USDA Cattle Genome Map (<http://sol.marc.usda.gov/>). Genotyping was performed using the Applied Biosystems 377/3700 sequencer, GENESCAN v.3.1.2, and Genotyper v.2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Linkage analysis was performed with Genehunter v.1.3 (Kruglyak *et al.* 1996).

Physical mapping

We screened the male bovine RPCI-42 bacterial artificial chromosome (BAC) library (<http://www.chori.org/bacpac/>) by polymerase chain reaction (PCR) or by hybridization with PCR fragments.

Address for correspondence

Yoshikazu Sugimoto, Shirakawa Institute of Animal Genetics, Nishigo, Fukushima 961-8061, Japan.
E-mail: kazusugi@siag.or.jp

Accepted for publication 20 January 2003

Mutation detection

We amplified the HMDM region from genomic DNA using primers F (5'-ACGTCGTTGATCCTGTGGG-3') and R (5'-GGTCTACTACAGACAGACAAAAAGTAAGG-3') in a PCR reaction [400 μ M deoxynucleotide triphosphates (dNTPs), 1 \times 1A PCRTM BufferII(Mg²⁺), 0.2 μ M of each primer, 2.5 U TaKaRa LA *Taq*TM (TaKaRa, Tokyo, Japan)] cycled 30 times (98 °C for 10 s, 64 °C for 45 min).

Western-blot analysis

Bovine diaphragmatic muscle was cut into 1–2-cm squares, suspended in 10 volumes (w/v) of buffer consisting of 20 mM Tris/acetate, pH 7.4, 20 mM NaCl, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 5 mM 2-mercaptoethanol, homogenized in a Polytron homogenizer at a medium setting for 1 min and centrifuged at 10 000 *g* for 20 min at 4 °C (Gutierrez & Guerriero 1995). Total protein (50 μ g) in the supernatants was loaded on a 10% polyacrylamide gel and run at 9 mA. After electrophoretic separation, proteins were stained with Coomassie blue R-250 or blotted on a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). One percent skimmed milk blocking blots were incubated with a mouse monoclonal antibody to *Hsp70* (W27; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or to glycogen phosphorylase (PYGM) (0100–0419; Biogenesis, England, UK).

Histopathological analysis

Fresh samples of diaphragmatic muscles from normal and affected cattle were frozen in liquid nitrogen and cut transversely at 10 μ m with a cryostat. Immunohistochemistry was performed using the avidin–biotin–peroxidase complex (ABC) method with an ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and a mouse monoclonal antibody to *Hsp70* (W27; Santa Cruz Biotechnology) or to PYGM (0100–0419; Biogenesis). To assess specificity of the immunostaining, normal mouse serum was substituted for the primary antibody.

Immunoaffinity chromatography analysis

Total protein (3 mg) from bovine diaphragmatic muscle suspended in a Tris/Triton-X-100 immunoprecipitation buffer consisting of 0.1% Triton-X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride was applied to an anti-*Hsp70* agarose (250 μ l; W27; Santa Cruz Biotechnology) column or a Protein A agarose (P9269; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) column as a negative control at 4 °C. The flow-through was applied repeatedly up to four times. The column was washed three times with Tris/Triton-X-100 immunoprecipitation buffer and rinsed three times with 10 mM Tris-HCl

(pH 8.0) and 1 mM EDTA. The protein was eluted from the column by 0.1% trifluoroacetic acid, electrophoresed and blotted on a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Nippon Genetics, Tokyo, Japan). Peptide sequencing was performed by Aprosience (Tokushima, Japan).

Results

Mapping of HMDM locus

To find a causative gene, we collected DNA from 26 cattle in the HMDM pedigree, including 12 affected cattle (Fig. 1a). For 10 of the affected cattle, both parents were descendants of the presumed founder animal; for the other two affected cattle, there was information for only one of the parents. As the presumed founder animal was separated by five to 10 generations from the affected cattle, a causative region identical to descent should be narrow. Thus, we typed 1200 microsatellite markers covering 29 autosomal chromosomes with an average interval of 2.5-centimorgan (cM). The whole-genome scan revealed significant linkage of an HMDM locus to a 0.6-cM interval between *BOLA-DRB1* and *CYP21/BMS468* within the bovine MHC on BTA23q21 (Fig. 1b). The maximum multipoint non-parametric linkage score, 7.67, was obtained for marker *CYP21*, which was homozygous for the same allele in all affected cattle except for #3 (Fig. 1a). We constructed a BAC contig containing *CYP21* (Fig. 1c), in which the order from *LSM2* to *NOTCH4* indicated conserved synteny between HSA6q21.3 and BTA23q21 (Fig. 1c), as reported by others (McShane *et al.* 2001). An expressed sequence tag (EST) E1OV002B02 (Takasuga *et al.* 2001) was located near the genes encoding heat-shock 70-kilodalton (kDa) protein 1 A (*HSPA1A*) and B (*HSPA1B*) in this contig (Fig. 1d). The PCR analysis for this locus indicated that all 12 affected cattle did not have the amplification product while 14 family members had the predicted 113-bp product. This complete co-segregation with the EST marker indicated that a causative mutation/deletion for HMDM should be close to *HSPA1A* and *B*.

Identification of HMDM-specific deletion

Bovine *HSPA1A* and *B* are duplicated *Hsp70* loci lacking introns (Grosz *et al.* 1992), 9 kb apart from each other (Fig. 2a). Human *HSPA1A* and *B* encode identical 641-amino acid proteins while bovine *HSPA1A* and *B* encode identical 641 amino acids except for M5T (Fig. 2a) (Gutierrez & Guerriero 1995). To find a causative mutation/deletion for HMDM, a PCR amplification conducted for *HSPA1A* and *B* using primers F and R (Fig. 2a). A 13-kb amplification product was obtained for normal cattle DNA, as expected, and a 2-kb product was obtained from the affected cattle as shown in Fig. 2b. Sequencing of these amplified products revealed that affected cattle had only one copy of *HSPA1* and did not have the 9-kb interval between

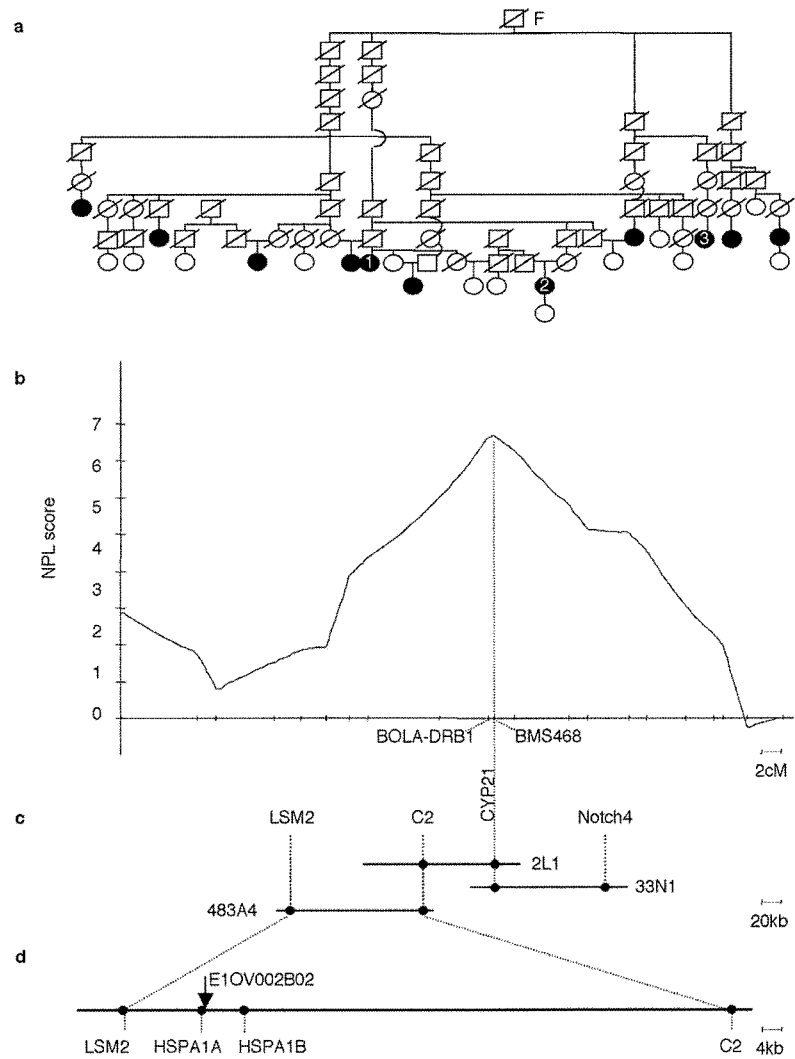


Figure 1 Hereditary myopathy of diaphragmatic muscle (HMDM) region close to *HSPA1A* & *B*. (a) HMDM pedigree. Filled symbols indicate affected cattle. Both parents of all affected cattle except for 1 and 2 were descendants of the presumed founder animal: F. (b) Profile for non-parametric linkage scores. The positions of the microsatellite markers used in the analysis are shown on the horizontal axis. All affected cattle except for 3 were homozygous for the same allele for *CYP21*. (c) Bacterial artificial chromosome (BAC) clone contig containing *CYP21*. Black circles indicate the position of known genes in the equivalent human chromosomal region: HSA6p21.3. (d) Representation of BAC clone 483A4 containing HMDM candidate genes. Arrow indicates the position of a completely co-segregated expressed sequence tag marker E1OV002B02.

HSPA1A and *B*. The remaining *HSPA1* in affected cattle was *HSPA1A* encoding a methionine at position 5 in the protein, followed by an intact 3'-untranslated sequence of *HSPA1B*. The deleted region was 11 kb, including the 9-kb interval and *HSPA1B* coding sequence. Neither exon nor gene was predicted in the 9-kb interval between *HSPA1A* and *B* using Genscan analysis (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>). Three of 113 randomly selected Holstein-Friesian cattle were heterozygous for the deleted allele (data not shown). However, the deleted allele was not detected among 111 randomly selected Japanese Black cattle used as controls (data not shown). We therefore hypothesized that deletion of *HSPA1B* is associated with HMDM.

Hsp70 protein deficiency linked to HMDM

There were transcripts of both *HSPA1A* and *B* in brain, kidney, lung, ovary, cardiac muscle and diaphragmatic

muscle of normal cattle based on reverse transcription PCR analysis (data not shown). Affected cattle expressed the same amount of *HSPA1A* as normal cattle (data not shown), indicating that the HMDM-specific deletion did not alter the expression of the remaining *HSPA1A*. To examine the possibility of RNA editing in the remaining *HSPA1A*, we compared the sequences of DNA and complementary DNA in affected cattle and found no differences. The *Hsp70* promoter, TGAGGCGAAACCCCTGGAATATTCCCGACCTGGCAG (Nakai *et al.* 1995), of the remaining *HSPA1A* was conserved. Western-blot analysis demonstrated, however, that Hsp70 protein levels in affected cattle were dramatically decreased (Fig. 3a). Immunohistochemical staining indicated that affected diaphragmatic muscle had undetectable Hsp70 protein, while normal cattle had Hsp70 protein in both the fibrous and interstitial regions (Fig. 3b). Although Hsp70 protein seems to be unstable in affected cattle, currently we have no explanation for this marked reduction.

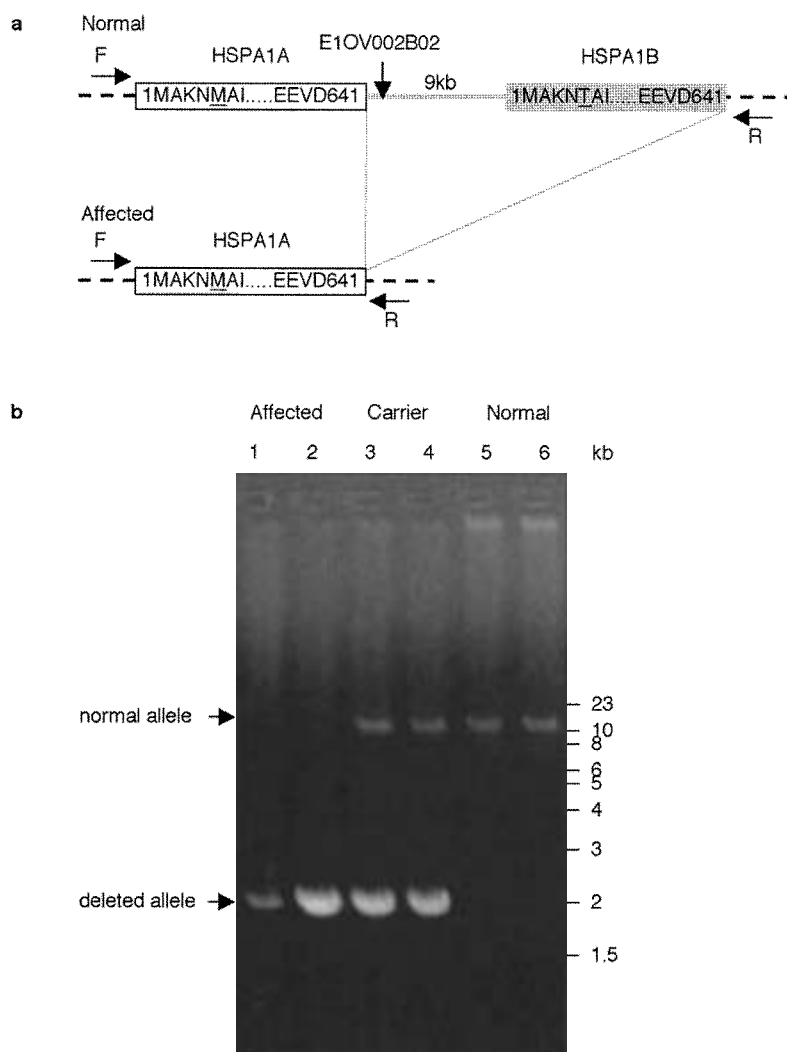


Figure 2 Complete deletion of *HSPA1B* in hereditary myopathy of diaphragmatic muscle (HMDM) cattle. (a) Schematic diagram of HMDM locus. Grey represents the deleted region. (b) PCR analysis of *HSPA1* using primers F and R in affected (lanes 1 and 2), carrier (lanes 3 and 4) and normal cattle (lanes 5 and 6).

Similar results were obtained for one of the duplicated genes, *hsp70.1*, a murine homologue of *HSPA1B*, knockout mice in which the remaining *Hsp70* gene was intact. The *hsp70.1*^{-/-} mice were viable with no obvious abnormalities (Huang *et al.* 2001; Molle *et al.* 2002). Nonetheless, they had no Hsp70 protein 12 h after heat shock (Molle *et al.* 2002) or their Hsp70 protein levels were reduced under both normal and heat stress conditions (Huang *et al.* 2001).

PYGM accumulated in HMDM-specific core like structures

To address the question of why the decreased Hsp70 protein resulted in HMDM, an investigation of Hsp70-associated proteins using immunoaffinity chromatography was performed. We identified several Hsp70-associated proteins including creatine kinase (CK), beta enolase (ENO3), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD), phospho-

glucomutase (PGM1), and PYGM in normal bovine diaphragmatic muscle (Fig. 4a). All five proteins have target peptides preferred by Hsp70 (Hartl & Hayer-Hartl 2002) such as SPLLLAS for CK. They are all involved in glucose and energy metabolism. Finally, affected diaphragmatic muscle had most of PYGM in the central core-like structures (Fig. 4b), indicating that Hsp70 deficiency induced accumulation of disordered PYGM.

Discussion

In conclusion a deletion of one of the duplicated inducible *Hsp70* genes results in markedly decreased Hsp70 protein levels, leading to HMDM. Hsp70 protein deficiency may stimulate aggregation of misfolded enzymes such as CK. The CK aggregates in HMDM may be secondarily attached with other misfolded proteins including actin and converted to central core-like structures. As ubiquitin coexists with actin

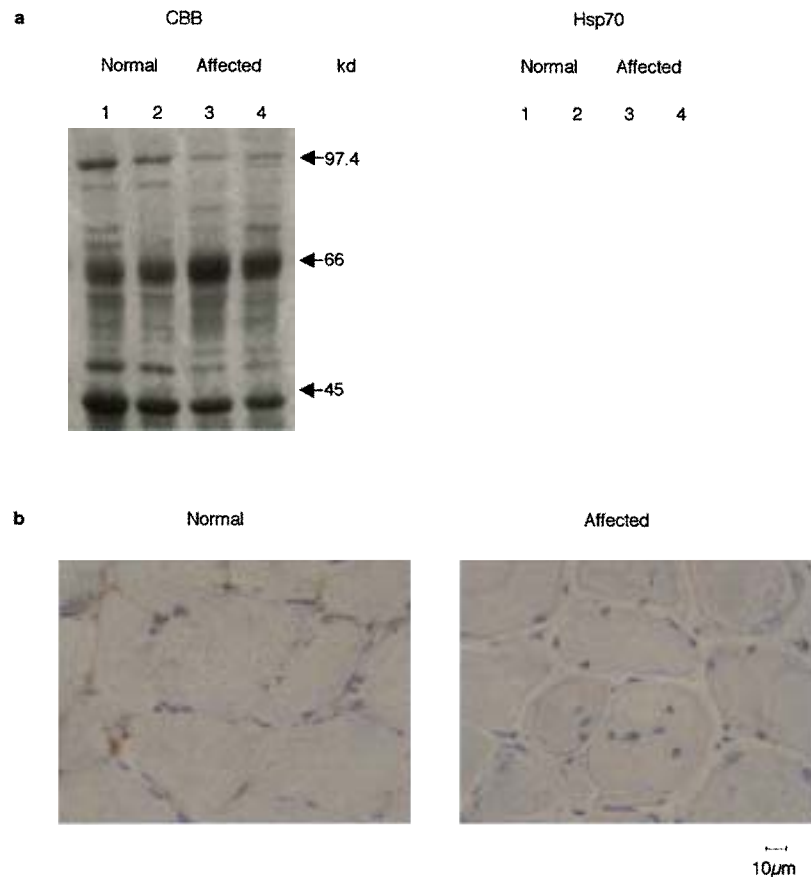


Figure 3 Reduced Hsp70 protein in hereditary myopathy of diaphragmatic muscle (HMDM) cattle. (a) Western blot analysis of Hsp70 protein levels (Hsp70) using mouse monoclonal anti-Hsp70 in normal (lanes 1 and 2) and affected diaphragmatic muscles (lanes 3 and 4). Coomassie blue R-250-stained profiles (CBB) indicate protein integrity. (b) Immunohistochemical staining of Hsp70 in normal and affected diaphragmatic muscle.

in central core-like structures in HMDM (Furuoka *et al.* 1999), the structures might consist of misfolded proteins that are degraded through proteasomes. Hartl & Hayer-Hartl (2002) reported that misfolded proteins readily self-associate into disordered protein complexes. In cell cultures overexpression of Hsp70 significantly decreases toxic protein aggregates in polyglutamine diseases, such as spinocerebellar ataxia type 1 (SCA-1; Cummings *et al.* 1998) and spinal and bulbar muscular atrophy (Kobayashi *et al.* 2000). In SCA-1 mice (Cummings *et al.* 2001) and a *Drosophila* model of Parkinson's disease (Auluck *et al.* 2002) overexpression of Hsp70 prevents neuronal degeneration. Our findings support the notion that Hsp70 could prevent aggregation of misfolded proteins.

The reason that Hsp70 deficiency induces protein aggregation mainly in diaphragmatic muscle remains to be clarified. Grosz *et al.* (1992) reported that the Hsp70 family consists of at least three members in cattle. Other Hsp70 members might fail to compensate for the Hsp70 deficiency in HMDM diaphragmatic muscle. Interestingly, *hsp70.1*^{-/-} mice are no longer protected against tumour necrosis factor lethality after heat shock (Molle *et al.* 2002), indicating no compensation for the *hsp70.1* deficiency by other *hsp70* members.

The relationship between central core-like structures and muscle fibre degeneration requires further investigation. It could be confirmed by checking whether central core-like structures are diminished by expression of Hsp70 in diaphragmatic muscle cells from HMDM-affected cattle. Although central core-like structures might indirectly cause fibre degeneration, impaired protein folding due to Hsp70 deficiency appears to underlie the pathogenesis of HMDM-type myopathy.

Data depositions

The nucleotide sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank database under GenBank Accession Number for normal cattle *HSPA1A* & *B*, AY149618; affected *HSPA1A* & *B*, AY149619.

Acknowledgements

We thank R.I. Morimoto for critical reading of the manuscript and our colleagues H. Takeda, N. Ihara, T. Hirano, T. Itoh, A. Takasuga and T. Watanabe for valuable discussions.

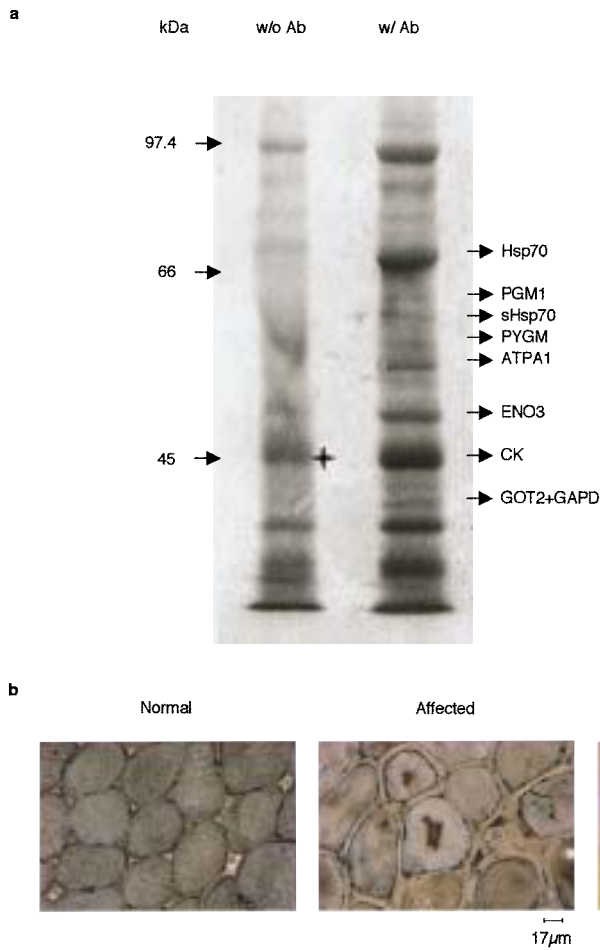


Figure 4 Interaction between Hsp70 and glycogen phosphorylase (PYGM). (a) Coomassie blue R-250-stained profiles indicate proteins bound to anti-Hsp70 IgG agarose (w/Ab) and to Protein A agarose (w/o Ab). Peptide sequences from the N-terminals, using the single-letter code, are VKIVT for PGM1, VRTNFD for PYGM, KTGTAEVs for ATPA1 (H⁺-transporting two-sector ATPase), PFGNT-HNK for CK, SSWWAHVEMG for GOT2 (glutamate oxaloacetate transaminase-2), and VKVGVNGF for GAPD. ENO3 had an internal sequence after trypsin digestion as GNP-TVEVDLHTA. Although PYGM is 97 kDa, this isoform is 55 kDa (Artigas *et al.* 1994). sHsp70 indicates a shortened Hsp70 beginning from the proline at position 81 (PVVQSDMK). This 62-kDa protein could be processed through protein assembly or an alternative isoform of Hsp70 in skeletal muscle. The star indicates a non-specifically associated protein: isocitrate dehydrogenase (ADKRIKVA). (b) Immunohistochemical staining of PYGM in normal and affected diaphragmatic muscle. Western blot analysis indicates specificity of the antibody.

References

- Artigas A.C., Baron C. & Parody-Morreale A. (1994) Purification of two forms of bovine liver glycogen phosphorylase b with distinct subunit composition. *Protein Expression and Purification* **5**, 157–63.
- Auluck P.K., Chan H.Y., Trojanowski J.Q., Lee V.M. & Bonini N.M. (2002) Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science* **295**, 865–8.
- Cummings C.J., Mancini M.A., Antalffy B., DeFranco D.B., Orr H.T. & Zoghbi H.Y. (1998) Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nature Genetics* **19**, 148–54.
- Cummings C.J., Sun Y., Opal P., Antalffy B., Mestril R., Orr H.T., Dillmann W.H. & Zoghbi H.Y. (2001) Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Human Molecular Genetics* **10**, 1511–8.
- Furuoka H., Doi T., Nakamura N., Inada I., Osame S. & Matsui T. (1995) Hereditary myopathy of the diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cattle. *Acta Neuropathologica* **90**, 339–46.
- Furuoka H., Murakami A., Doi T., Kobayashi Y., Matsui T. & Nakamura N. (1999) Immunohistochemical study of some cytoskeletal proteins in hereditary myopathy of the diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cattle. *Acta Neuropathologica* **97**, 177–84.
- Goldfarb L.G., Park K.Y., Cervenakova L. *et al.* (1998) Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nature Genetics* **19**, 402–3.
- Grosz M.D., Womack J.E. & Skow L.C. (1992) Syntenic conservation of HSP70 genes in cattle and humans. *Genomics* **14**, 863–8.
- Gutierrez J.A. & Guerriero V. Jr (1995) Chemical modifications of a recombinant bovine stress-inducible 70 kDa heat-shock protein (Hsp70) mimics Hsp70 isoforms from tissues. *Biochemical Journal* **305**, 197–203.
- Hartl F.U. & Hayer-Hartl M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**, 1852–8.
- Huang L., Mivechi N.F. & Moskophidis D. (2001) Insights into regulation and function of the major stress-induced hsp70 molecular chaperone in vivo: analysis of mice with targeted gene disruption of the hsp70.1 or hsp70.3 gene. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 8575–91.
- Kobayashi Y., Kume A., Li M., Doyu M., Hata M., Ohtsuka K. & Sobue G. (2000) Chaperones Hsp70 and Hsp40 suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells

- expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 8772–8.
- Kruglyak L., Daly M.J., Reeve-Daly M.P. & Lander E.S. (1996) Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multi-point approach. *American Journal of Human Genetics* **58**, 1347–63.
- McShane R.D., Gallagher D.S. Jr, Newkirk H., Taylor J.F., Burzlaff J.D., Davis S.K. & Skow L.C. (2001) Physical localization and order of genes in the class I region of the bovine MHC. *Animal Genetics* **32**, 235–9.
- Molle W.V., Wielockx B., Mahieu T., Takada M., Taniguchi T., Sekikawa K. & Libert C. (2002) HSP70 protects against TNF-induced lethal inflammatory shock. *Immunity* **16**, 685–95.
- Nakai A., Kawazoe Y., Tanabe M., Nagata K. & Morimoto R.I. (1995) The DNA-binding properties of two heat shock factors, HSF1 and HSF3, are induced in the avian erythroblast cell line HD6. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 5268–78.
- Takasuga A., Hirotsune S., Itoh R., Jitohzono A., Suzuki H., Aso H. & Sugimoto Y. (2001) Establishment of a high throughput EST sequencing system using poly (A) tail-removed cDNA libraries and determination of 36,000 bovine ESTs. *Nucleic Acids Research* **29**, E108.
- Vicart P., Caron A., Guicheney P. *et al.* (1998) A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nature Genetics* **20**, 92–5.

A radiation hybrid map of bovine chromosome 24 and comparative mapping with human chromosome 18

E. Kurar*, J. E. Womack[†] and B. W. Kirkpatrick*

*Department of Animal Sciences, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53706, USA. [†]Department of Veterinary Pathobiology and Center for Animal Genetics, Institute of Biosciences and Technology, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA

Summary

We present herein a bovine chromosome 24 (BTA24) radiation hybrid (RH) map using 40 markers scored on a panel of 90 RHs. Of these markers, 29 loci were ordered with odds of at least 1000:1 in a framework map. An average retention frequency of 17.4% was observed, with relatively higher frequencies near the centromere. The length of the comprehensive map was 640 centiray₅₀₀₀ (cR₅₀₀₀) with an average marker interval of approximately 17.3 cR₅₀₀₀. The observed locus order is generally consistent with currently published bovine linkage and physical maps. Nineteen markers were either Type I loci or closely associated with expressed sequences and thus could be used to compare the BTA24 RH map with human mapping information. All genes located on BTA24 were located on human chromosome 18, and previously reported regions of conserved synteny were extended. The comparative data revealed the presence of at least six conserved regions between these chromosomes.

Keywords bovine chromosome 24, radiation hybrid map.

Introduction

Previous mapping efforts demonstrated that human chromosome (HSA) 18 is homologous to bovine chromosome (BTA) 24. Hayes (1995) observed an exclusive conservation between HSA18 and BTA24 using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Other cross-species chromosome painting studies confirmed the homology between BTA24 and HSA18 and suggested a small part of BTA24 was also painted by HSA4 (Solinas-Toldo *et al.* 1995; Chowdhary *et al.* 1996). However, no gene present on HSA4 has yet been assigned on BTA24. More than 18 loci on HSA18 have been previously assigned to BTA24 using somatic cell panels (Womack *et al.* 1991; Larsen *et al.* 1996; Agaba *et al.* 1997), ZOO-FISH techniques (Hayes 1995; Solinas-Toldo *et al.* 1995; Chowdhary *et al.* 1996), linkage mapping (Agaba *et al.* 1997; Larsen *et al.* 1999) or radiation hybrid (RH) mapping (Band *et al.* 2000). Most of these loci

or associated microsatellites markers were represented in BTA24 linkage maps (Barendse *et al.* 1997; Larsen *et al.* 1999; Kurar *et al.* 2002). Larsen *et al.* (1999) suggested that gene order of this chromosome was not the same as on HSA18 and that there were at least four conserved regions. A BTA24 comparative map becomes more valuable as boundaries of the conserved regions are defined more precisely.

A high-resolution BTA24 linkage map is now available to conduct quantitative trait loci linkage studies (Kurar *et al.* 2002). However, the density of actual genes in this linkage map is low and consequently its utility for comparative mapping purposes is limited. In this study, we constructed an integrated physical and linkage map of BTA24 using RH mapping technology. The resulting BTA24 RH map was compared with current BTA24 linkage maps and also human mapping data.

Materials and methods

Bovine radiation hybrid panel

A hamster-bovine whole genome-radiation hybrid panel (BOVRH5) constructed by Womack *et al.* (1997) was used for mapping. This RH panel consists of 90 hybrid cell lines constructed by fusion of the Chinese hamster A23

Address for correspondence

Dr Brian W. Kirkpatrick, Department of Animal Sciences, University of Wisconsin-Madison, 1675 Observatory Drive, Madison, WI 53706, USA.
E-mail: kirkpat@calshp.cals.wisc.edu

Accepted for publication 31 January 2003

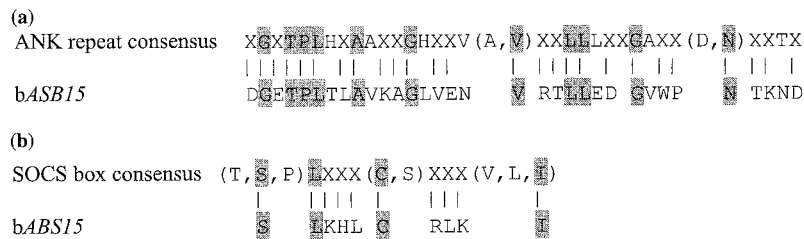


Figure 1 Bovine *ASB15*, ankyrin repeat, and suppressor of cytokine signalling (SOCS) box motifs. (a) Alignment of the ankyrin repeat of bovine *ASB15* (b*ASB15*) with the consensus sequence for ankyrin repeats. (b) Alignment of the SOCS box motif of b*ASB15* to the consensus sequence for SOCS box motif. Shaded regions indicate amino acid residues identical to the consensus sequence. Parentheses indicate alternate amino acids contained in the consensus sequence, while X indicates an ambiguous amino acid.

bovine *ASB15* sequence, respectively, and were identified by general consensus sequence (Fig. 1a,b).

Genomic organization: Genomic sequence containing the bovine *ASB15* gene was obtained by restriction mapping, subcloning, and sequencing fragments of clone 150A3 of the RPCI-42 bovine large insert BAC library (<http://www.chori.org/bacpac/mbovine42.htm>). Sequencing primers were designed from *ASB15* cDNA sequence to recover the complete coding sequence and identify all intron/exon boundaries. Comparison of bovine cDNA and genomic sequence revealed nine exons (GenBank accession numbers AF541269–AF541277). This is consistent with the genomic organization of human *ASB15* (GenBank accession number XM_095100).

Chromosome mapping: Chromosome localization was determined using bovine radiation hybrid (RH) and somatic cell mapping panels. Dr James Womack kindly provided DNA samples representing a 5000-rad cattle whole genome radiation hybrid panel³ and a bovine/hamster somatic cell panel⁴. A fragment of *ASB15* was polymerase chain reaction amplified across the mapping panels using standard reaction ingredients and conditions (forward primer: ATGTTTCCAGACCCCTCTACC, reverse primer: GCCTGAGAAAGTAGACAACC). Based on the results from the somatic cell panel, *ASB15* mapped to bovine chromosome 4 with 100% concordance. The RH panel revealed greatest linkage between *ASB15* and marker RM067⁵ (LOD = 6.9). This location in the bovine genome corresponds to the location of *ASB15* on human chromosome 7 (<http://bos.cvm.tamu.edu/bovgbase.html>).

Acknowledgements: This work was supported in part through the Purdue University Agricultural Research Program (manuscript identification number 16883) and a grant from Elanco Animal Health.

References

- 1 Kile B. & Alexander W. (2001) *Cell Mol Life Sci* **58**, 1627–35.
- 2 Zhang J. *et al.* (1999) *PNAS* **96**, 2071–6.
- 3 Rexroad C. *et al.* (2000) *Anim Genet* **31**, 262–5.
- 4 Womack J. & Moll Y. (1986) *J Hered* **77**, 2–7.
- 5 Kossarek L. *et al.* (1993) *J Ani Sci* **71**, 3178.

Correspondence: D E Moody (moodyd@purdue.edu)

Eleven previously unreported dinucleotide microsatellite loci on bovine chromosome 19

M. Sugimoto*, N. Ihara[†], G. L. Bennett[‡] and Y. Sugimoto[†]

*National Livestock Breeding Center, Nishigo, Fukushima 961-8511, Japan. [†]Shirakawa Institute of Animal Genetics, Nishigo, Fukushima 961-8061, Japan. [‡]USDA-ARS, US Meat Animal Research Center, Clay Center, NE 68933, USA

Accepted 14 February 2003

Source/description: Bacterial artificial chromosome (BAC) clones from the RPCI-42 bovine BAC library (BAC PAC Resources, Children's Hospital Oakland Research Institute, <http://www.chori.org/bacpac/mbovine42.htm>) positive for known microsatellite loci on bovine chromosome 19 (BTA19) as well as known genes located on human chromosome 17 (HSA17) having conserved synteny with BTA19 (Texas A&M University, <http://bos.cvm.tamu.edu/htmls/rhbov19.html>) were identified by polymerase chain reaction (PCR) amplification. A plasmid library was constructed in dephosphorylated *EcoRV* digested pBluescript II SK (+) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) using size-selected (300–500 bp) bovine BAC DNA restricted with *AhaI*. The library was screened with ³²P-labelled poly-(CA) probes. Positive clones were sequenced with an ABI377 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All sequences were queried against GenBank by BLAST searching. Polymerase chain reaction primers 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 for each locus (Table 1) were optimized for PCR amplification by testing over a range of annealing temperatures (50–60 °C). Polymerase chain reactions (15 µl total volume) included 25 ng genomic DNA, 1.67 mM MgCl₂, 6.25 pmol each primer, 0.2 mM dNTPs, and 0.375 U *Taq* DNA polymerase (ABgene, Epsom, UK). Amplifications were performed in ABI GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) under the following reaction conditions: 5 min at 94 °C; 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at annealing temperature, 30 s at 72 °C; and a final extension of 7 min at 72 °C.

Table 1 Bovine microsatellite information.

Microsatellite	BAC clone	Locus ¹	Repeat length	Product size (bp)	No of alleles ²	Location (cM)	Forward primer	Reverse primer	Accession number
NLBCMK21	228L24	DIK042	(GT)18	190–06	7	82.3	CCCATGTGGCAAAC ATAAAA	TCAGAGTTTTT CTTGTCAGAGC	AY230652
NLBCMK35	95L10	DIK042	(CA)11	148–54	4	88.0	GAGCCAGGCCAGCT TTTATAG	AGGGGAGTTGCA TTTTGATG	AY230659
NLBCMK39	87A8	MSF	(GT)14	178–02	7	89.8	CTTCTTGCAAGCCCA TGAGA	TTTGCAAAAA TGGCAAGTC	AY230661
NLBCMK40	482D17	SEC14L1	(CA)11	141–67	9	91.0	CACGCCTTTCTCG TGTGA	AAGGCAGGGAAA AATAAATGC	AY230662
NLBCMK28	491C3	DIK042	(GT)10	298–03	3	92.0	GCAACCACACACTC AGAGGA	TGACCTAGTT CCAGCCAACA	AY230655
NLBCMK29	491C3	DIK042	(GT)9	264–84	4	92.0	TCAGCTGAGCAGAA AGCAAA	TGGAAAATTC CAGCCTCAAG	AY230656
NLBCMK30	71F21	IDVGA44	(CA)12	161–71	3	92.0	CTTTCCTCTGCTT GGCCTCT	CTATCAGGACAA CCGCCATC	AY230657
NLBCMK25	308M15	IDVGA44	(CA)16	145–71	9	92.5	AAGGCATTAACAG GCAGGTG	AGGCTGACAT GGGAGACACT	AY230654
NLBCMK24	27P4	IDVGA44	(CA)10	193–03	3	93.3	CCCTCGAAGTGTG GCAGAG	ATCCTTGAAGCCC TGGAAAC	AY230653
NLBCMK31	71F21	IDVGA44	(CA)14	120–31	6	93.9	TCCAGCTTTTCT TTCCA	AGATTGTGTGTGTG TGTGTGTG	AY230658
NLBCMK36	133G14	AANAT	(GT)10	150–56	3	95.0	TTCCCAAGTAGG GATCAAA	GGGGTCGCAGA GAGATACAA	AY230660

¹MSF, *MLL septin-like fusion protein*; SEC14L1, SEC14-like 1 (*Saccharomyces cerevisiae*); AANAT, *arylalkylamine N-acetyltransferase*.

²In USDA-MARC cattle reference families (Bishop *et al.* 1994).

Polymorphism and chromosomal locations: Polymorphisms at each locus were identified by examining 28 parents of the USDA-MARC cattle reference families¹. Deoxyribonucleic acid fragments for each locus were amplified and labelled with three fluorescent dyes (6-FAM, HEX and NED) in the PCR reaction. Polymerase chain reaction products were examined with an ABI3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Allele sizes were determined using ABI GeneScan and Genotyper software (Applied Biosystems). Chromosomal assignments of microsatellite loci were based on sex-averaged two-point LOD scores >3.0 using CRI-MAP version 2.4². Four new microsatellite loci (NLBCMK21, 35, 28 and 29) derived from BAC clones containing DIK042³ at 89.8 cM on BTA19 were assigned from 82.3 to 92.0 cM and four other new microsatellite loci (NLBCMK30, 25, 24 and 31) derived from BAC clones containing IDVGA44⁴ at 93.3 cM on BTA19 were assigned from 92.0 to 93.9 cM. NLBCMK39 derived from a BAC clone containing *MLL septin-like fusion protein* (MSF) assigned to HSA17q25.3 was mapped at 89.8 cM. NLBCMK40 derived from a BAC clone containing SEC14-like 1 (*Saccharomyces cerevisiae*) (SEC14L1) assigned to HSA17q25.3 was mapped at 91.0 cM. NLBCMK36 derived from a BAC clone containing *arylalkylamine N-acetyltransferase* (AANAT) assigned to HSA17q25.1 was mapped at 95.0 cM.

Acknowledgement: The authors thank Yumiko Kaneuchi for laboratory assistance.

References

- Bishop M. D. *et al.* (1994) *Genetics* **136**, 619–39.
- Green P. *et al.* (1989) Documentation for CRI-MAP, Version 2.4. Washington University School of Medicine, St Louis.
- Hirano T. *et al.* (1996) *Anim Genet* **27**, 365–8.
- Kappes S. M. *et al.* (1997) *Genome Res* **7**, 235–49.

Correspondence: Y. Sugimoto (kazusugi@siag.or.jp)

Chicken syndecan-4 (*SDC4*) maps to linkage group E32E47W24

I. R. Paton, J. Smith and D. W. Burt

Department of Genomics and Bioinformatics, Roslin Institute, Roslin (Edinburgh), Midlothian, EH25 9PS, UK

Accepted 4 April 2003

Source/description: The *SDC4* gene encodes the syndecan-4 protein. The syndecans are transmembrane heparan sulphate proteoglycans that appear to act as receptors involved in intracellular communication. The highly conserved tails of all four members of the syndecan family contain a carboxy-

Mapping of quantitative trait loci controlling trypanotolerance in a cross of tolerant West African N'Dama and susceptible East African Boran cattle

O. Hanotte^{*†}, Y. Ronin[‡], M. Agaba^{§¶}, P. Nilsson^{||**}, A. Gelhaus^{††}, R. Horstmann^{††}, Y. Sugimoto[§], S. Kemp^{||}, J. Gibson^{*}, A. Korol[‡], M. Soller^{**}, and A. Teale^{*¶}

^{*}International Livestock Research Institute, P.O. Box 30709, Nairobi 00100, Kenya; [†]Institute of Evolution, University of Haifa, Haifa 31905, Israel; [§]Shirakawa Institute of Animal Genetics, Fukushima 961-8006, Japan; ^{||}School of Biological Sciences, University of Liverpool, Liverpool L69 7ZD, United Kingdom; [‡]Bernhard Nocht Institute of Tropical Medicine, 20359 Hamburg, Germany; and ^{**}Department of Genetics, Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem 91904, Israel

Communicated by James E. Womack, Texas A&M University, College Station, TX, April 22, 2003 (received for review July 19, 2002)

Trypanosomosis, or sleeping sickness, is a major disease constraint on livestock productivity in sub-Saharan Africa. To identify quantitative trait loci (QTL) controlling resistance to trypanosomosis in cattle, an experimental cross was made between trypanotolerant African N'Dama (*Bos taurus*) and trypanosusceptible improved Kenya Boran (*Bos indicus*) cattle. Sixteen phenotypic traits were defined describing anemia, body weight, and parasitemia. One hundred seventy-seven F₂ animals and their parents and grandparents were genotyped at 477 molecular marker loci covering all 29 cattle autosomes. Total genome coverage was 82%. Putative QTL were mapped to 18 autosomes at a genomewide false discovery rate of <0.20. The results are consistent with a single QTL on 17 chromosomes and two QTL on BTA16. Individual QTL effects ranged from ≈6% to 20% of the phenotypic variance of the trait. Excluding chromosomes with ambiguous or nontrypanotolerance effects, the allele for resistance to trypanosomosis originated from the N'Dama parent at nine QTL and from the Kenya Boran at five QTL, and at four QTL there is evidence of an overdominant mode of inheritance. These results suggest that selection for trypanotolerance within an F₂ cross between N'Dama and Boran cattle could produce a synthetic breed with higher trypanotolerance levels than currently exist in the parental breeds.

African tsetse fly-transmitted trypanosomosis (ATT) affects a wide range of wild and domesticated animal species. The consequences of infection include anemia, weight loss, lymphadenopathy, infertility, and abortion. In susceptible animals, death may result within a few weeks to several months after infection (reviewed in refs. 1–3). In cattle alone, ATT is estimated to cost the sub-Saharan African economy billions of U.S. dollars annually (3). Trypanocidal drugs are expensive and may be rendered ineffective by drug resistance, vector control can be environmentally damaging and difficult to maintain, and there is no vaccine for ATT. In consequence, despite a century of research, ATT still ranks among the world's more serious livestock diseases.

A small number of indigenous African ruminant breeds that are “trypanotolerant” (i.e., relatively resistant to the consequences of infection) may provide a means to mitigate the ravages of the disease. Under ATT challenge, trypanotolerant animals are better able than trypanosusceptible animals to control parasite proliferation, maintain their packed red blood cell volume (PCV), mount an immune response, and maintain body weight. Among trypanotolerant cattle breeds, the West African N'Dama (*Bos taurus*) is the best characterized (4–11).

Trypanotolerance in N'Dama cattle was identified as a potentially rewarding area for quantitative trait loci (QTL) mapping (12). Construction of the required F₂ population between trypanotolerant N'Dama and a susceptible breed was initiated in 1989 (13). Thus, the experiment described here was among the first to construct a livestock population specifically for QTL mapping.

Materials and Methods

Resource Families for Mapping. In 1983, with the assistance of the International Trypanotolerance Center (Banjul, The Gambia),

embryos were collected from N'Dama cows in The Gambia. They were implanted into recipient cows of the trypanosusceptible improved Kenya Boran breed (*Bos indicus*; in all that follows, the term “Boran” will refer to “improved Kenya Boran”), and five N'Dama males and five N'Dama females were born in 1984 (14). In 1989, construction of large full-sibling F₂ families was initiated by crossing four of the five N'Dama males with four Boran cows by using multiple ovulation and embryo transfer (MOET) into surrogate Boran dams (13, 14).^{§§} Four large F₁ families were produced and subsequently intercrossed to produce by MOET seven F₂ families, comprising 177 offspring in total, that were genotyped and used for QTL analysis. Family size ranged from 21 to 39; families 1, 2, 5, and 6 had the same N'Dama and Boran grandparents; and families 3, 4, and 7 shared a different set of N'Dama and Boran grandparents. The F₂ animals were born between November 1992 and September 1996. The structure of the pedigree can be found in Fig. 1, which is published as supporting information on the PNAS web site, www.pnas.org.

Challenge and Phenotypic Recording. Twenty-three groups of F₂ animals, each containing 3–13 calves born over a period of 3 weeks, were reared on their Boran dams at Kapiti Plains Estate, a tsetse fly-free area near Nairobi. Weaning was at 8 mo of age, and after a further 2 mo the animals were moved to the International Livestock Research Institute (ILRI), also a tsetse fly-free area, for a 2-mo period of acclimatization. This was followed by ATT challenge at 12 mo of age with *Trypanosoma congolense* clone IL1180 (16, 17), delivered through the bites of eight infected tsetse flies *Glossina morsitans centralis* (18, 19). Phenotyping of the last group ended in January 1998.

Trait monitoring began 3 wk before challenge and continued until 150 days after challenge. PCV, level of parasitemia (estimated by the dark-ground/phase contrast buffy coat method) (20), and body weight were recorded at least once per week. Twenty-eight of the F₂ offspring in which PCV declined to ≤12% were treated and removed from the experiment. The mean day of treatment was day 98 (minimum day 14, maximum day 146) after ATT challenge. For these animals, the value of the phenotypic traits on the last

Abbreviations: ATT, African tsetse fly-transmitted trypanosomosis; PCV, packed red blood cell volume; QTL, quantitative trait loci; ILRI, International Livestock Research Institute; PCV_i, initial PCV; BW_i, initial body weight; BW_m, mean body weight; BW_f, final body weight; FDR, false discovery rate; PCV_m, minimum PCV; PCV_f, final PCV; PCV_fm, PCV_f minus PCV_m; PCV_d, percentage decrease in PCV; PAR_{LN}m, mean of natural logarithm of parasites; PAR_{LN}, natural logarithm of mean number of parasites.

[†]To whom correspondence should be addressed. E-mail: o.hanotte@cgiar.org.

[¶]Present address: University of Stirling, Institute of Aquaculture, FK9 4L4 Stirling, Scotland.

^{**}Present address: Department of Medical Genetics, University Medical Centre, 3508 GA, Utrecht, The Netherlands.

^{§§}Kennedy, D. J., Leak, S. G. A., Kemp, S. J. & Teale, A. J. (1994) *Theriogenology* 41, 226 (abstr.).

Table 1. Phenotypic traits for QTL mapping analysis

Prechallenge (nontrypanotolerance) traits	
PCVI	PCVI (mean PCV days 21–0) before challenge
BWI	BWI (BWM days 21–0) before challenge
Ambiguous (trypanotolerance or nontrypanotolerance traits)	
BWM	BWM after challenge (days 0–150)
Postchallenge (trypanotolerance) traits	
PCV	
PCVF	PCVF (day 150 or day before treatment)
PCVM	PCVM recorded during the postchallenge period (days 0–150)
PCVI minus PCVF (PCVIF)	PCVI (day 0) minus PCVF
PCVI minus PCVM (PCVIM)	PCVI (day 0) minus PCVM
PCVFM	PCVF (day 150 or last day before treatment) minus PCVM
PCV variance (PCVV)	Variance of the PCV values postchallenge (days 0–150)
PCVD150	Percentage decrease in PCV up to day 150 after challenge [(Mean PCV days 0–11) – (mean PCV days 13–150)]/(mean PCV days 0–11)
PCVD100	Percentage decrease in PCV up to day 100 after challenge [(Mean PCV days 0–11) – (mean PCV days 13–100)]/(mean PCV days 0–11)
Body weight	
BWF/BWI	BWF scaled by BWI
BWD 150	Percentage decrease in body weight up to day 150 after challenge [(BWM days 0–11) – (mean BWM days 13–150)]/(BWM days 0–11)
Parasitemia	
PARLn	Mean of natural logarithm ($ni + 1$), ni = number of parasites at day i after challenge (days 11–150)
PARLnM	Natural logarithm of the mean number of parasites after challenge (days 11–150)
Detection rate (DR60–150)	Number of times an individual is detected to be infected (days 60–150)

BWD, percentage decrease in body weight.

recording day before treatment was taken as the value of the trait for the remainder of the challenge period. Six N'Dama controls and six Boran controls were challenged with the F₂ offspring to serve as positive controls for the challenge procedure.

Phenotypic Traits for QTL Analysis. We used a set of 16 phenotypic traits (Table 1). Some of these traits correspond to traits that were analyzed biometrically by van der Waaij (ref. 21; and see ref. 22). The two prechallenge traits, initial PCV (PCVI) and initial body weight (BWI), were considered unrelated to trypanotolerance. Mean body weight (BWM) in the postchallenge period is an ambiguous trait because it can be affected by both BWI, a nontrypanotolerance trait, and weight loss after challenge, a trypanotolerance trait. Thus, alleles with positive effects on BWM can derive from nontrypanotolerance loci through effects on BWI or from trypanotolerance loci through effects on weight loss after challenge. The remaining postchallenge traits were all directly related to trypanotolerance. These include traits related to changes in PCV, body weight after challenge, and parasitemia. It should be noted that for most of the trypanotolerance traits, a lower trait value is associated with higher trypanotolerance. The exceptions are minimum PCV (PCVM), final PCV (PCVF), PCVF minus PCVM (PCVFM), final body weight (BWF), BWI, and BWM. Spearman correlation coefficients between the 16 traits are presented as Table 4, which is published as supporting information on the PNAS web site. Means and SD were calculated by using the MULTIQTL software package (<http://esti.haifa.ac.il/~poptheor>).

DNA Isolation and Molecular Typing. DNA was isolated from blood according to a standard protocol (23). PCR conditions for microsatellite amplification were as described (24, 25). Fluorescent PCR products were coloaded and separated on automated DNA sequencers (ABI PRISM 377, Applied Biosystems). Fragment length identifications were performed by using GENESCAN 672 (Version 2.0.2, Applied Biosystems) and GENOTYPER (Version 2.0, Applied Biosystems) software. Approximately half of the microsatellites were genotyped at ILRI and the remainder were genotyped at the

Shirakawa Institute of Animal Genetics (Fukushima, Japan) and the University of Liverpool (Liverpool, U.K.). Nonmicrosatellite markers were genotyped at the Bernhard Nocht Institute of Tropical Medicine (Hamburg, Germany).

QTL Analyses. Four hundred seventy-seven markers, mainly microsatellites, distributed among the 29 cattle autosomes were genotyped in the 177 F₂ animals, 14 F₁ parents, and 8 F₀ grandparents. By tracing alleles from the grandparent to the F₂ generation, F₂ marker genotypes were recorded as NN (both alleles of N'Dama origin), BB (both alleles of Boran origin), or H (NB or BN, with one allele of N'Dama origin and one of Boran origin). The genotyping data on the seven F₂ families were pooled, assuming the grandparental generation F₀ to be fixed for alternative susceptible or tolerant QTL alleles (26–28). The linkage map position of the markers is available from the U.S. Department of Agriculture (USDA) and Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO) publicly available linkage maps (www.marc.usda.gov/genome/genome.html and www.cgd.csiro.au, respectively). The markers in common with the USDA cattle linkage map were first placed along each autosome in accordance with the published order, then, by using the information of the CSIRO map, the remaining markers were placed into the linkage group. In the few cases where the position of the marker was ambiguous, the position of the marker showing the smaller number of single crossing-over with flanking markers was chosen. Genotyping data of markers <10 centimorgans (cM) apart were combined, filling in for the most informative marker the missing genotypes (NN, BB, or H), as inferred from the other markers when available. Data on markers or groups of markers showing <120 observations were not used in the analysis, with the exception of one marker on BTA22, $n = 113$, and two markers on BTA21, $n = 117$ and $n = 119$. The total number of markers or groups of markers was consequently reduced to 210 (genotyping data available on request from O.H.). The total length of the autosomal map, calculated by adding the size of each chromosomal linkage group, was 2,256 cM or 82% of the USDA linkage map.

All traits were corrected by least-squares analysis of variance for

Table 2. Characteristics of the phenotypic traits of N'Dama (trypanotolerant) and Boran (trypanosusceptible) controls and F₂ animals

Traits*	N'Dama control, mean ± SD (n = 6)	Boran control, mean ± SD (n = 6)	Interpretation	F ₂ , mean ± SD	F ₂ , maximum	F ₂ , minimum	F ₂ , outliers
PCVI	36.60 ± 5.47	38.70 ± 3.98	No breed difference in PCV	36.63 ± 3.36	46.16	27.18	—
BWI	135.50 ± 24.67	253.90 ± 115.63	Breed body weight greater in Boran	156.31 ± 90.35	202.55	98.14	90.35
BWM	140.05 ± 26.38	241.40 ± 111.44	Breed body weight greater in Boran	154.51 ± 20.66	209.42	100.87	20.66
PCVM	20.57 ± 2.88	14.00 ± 1.37	Lower decrease in PCV in N'Dama	16.26 ± 7.91	24.45	10.85	25.27, 27.04
PCVF	28.80 ± 3.33	14.76 ± 2.43	Faster PCV recovery in N'Dama	21.78 ± 4.24	36.5	10.90	—
PCVIF	7.83 ± 6.06	23.98 ± 4.50	Faster PCV recovery in N'Dama	15.04 ± 3.62	33.45	-1.55	-6.94
PCVIM	15.98 ± 6.82	24.65 ± 3.73	Lower decrease in PCV in N'Dama	20.23 ± 6.24	29.34	9.09	5.44, 9.09, 32.39
PCVFM	8.20 ± 2.40	0.70 ± 1.40	Little or no PCV recovery in Boran	5.29 ± 2.06	16.16	-0.04	17.45
PCVV	17.57 ± 7.09	35.60 ± 7.72	Less variation of PCV in N'Dama	26.95 ± 6.30	42.55	13.59	46.39
PCVD150	26.68 ± 13.12	47.48 ± 5.45	Lower decrease in PCV in N'Dama	42.11 ± 9.36	62.41	14.16	13.01
PCVD100	27.88 ± 14.07	44.49 ± 4.44	Lower decrease in PCV in N'Dama	40.99 ± 8.00	60.2	19.21	11.18
BWF/BWI	1.14 ± 0.09	0.88 ± 0.23	Greater weight recovery in N'Dama	0.97 ± 0.12	1.26	0.71	—
BWD 150	16.14 ± 4.83	25.79 ± 4.74	Less decrease in weight in N'Dama	20.25 ± 0.45	21.52	18.78	—
PARMLn	2.66 ± 0.72	5.17 ± 0.43	Fewer parasites in N'Dama	3.37 ± 0.16	5.53	1.61	0.84
PARLnM	2.42 ± 0.86	4.89 ± 1.22	Fewer parasites in N'Dama	3.47 ± 0.75	5.51	1.60	5.95
DR60-150	0.27 ± 0.09	0.46 ± 0.07	Fewer parasites in N'Dama	0.45 ± 0.16	0.85	0.02	0.97

*See Table 1 for definitions of the traits.

sex and time of challenge. With the exception of BWI, none of the traits were corrected for group effects, because the groups were of different sizes and with unequal representation of F₂ individuals from different families. BWI was corrected for group effect, because this trait is subject to seasonal environmental factors, and the animals were reared for the first 10 mo of their lives at the ILRI Kapiti Plains Estate and only then moved to more controlled conditions at ILRI Kabete. Outliers (listed in Table 2) with trait values greater than ±3 SD of the mean of the trait were removed before QTL analysis. The distributions of some traits deviated from normality (namely, PCVFM, PCVM, PCVD150, PCVD100, and PARLnM). These traits were transformed and the QTL analysis was repeated. Very similar results were obtained with only a slight improvement in statistical significance (data not shown). Therefore, for consistency, only nontransformed traits were used for QTL mapping.

Single-trait QTL mapping analysis was performed on the basis of the standard single-interval maximum likelihood model (29) by using the software package MULTIQTL. For each marker, the MULTIQTL software package uses “virtual” marker restoration by calculating the three probabilities (for NN, BB, and H) for each missing genotype based on available scores of the nearest-neighbor markers, and these probabilities enter the likelihood function. Logarithm-of-odds scores and *P* values were calculated for all trait-by-chromosome combinations with the significance of the QTL estimated after 10,000 chromosomewise permutation tests (30).

The MULTIQTL program was first run as a general model, with parameters *d* (main effect) and *h* (dominance) both fitted. The dominance ratio, *D*, was taken as $2h/d$, where *d* is the difference between the means of the F₂ homozygotes calculated as NN – BB, and *h* is the mean value of the F₂ heterozygotes minus the mean of the NN and BB homozygotes. The trypanotolerant allele was assigned to the N'Dama grandparent when the sign of *d* or *h* was the same as the sign of the difference of the mean values of the trait in the control animals (N'Dama mean minus Boran mean). The trypanotolerant allele was assigned to the Boran grandparent when the reverse was true.

The genetic model for the QTL allele was then set as additive when $-0.50 < D < 0.50$, dominant when $0.50 < D < 3.00$, recessive when $-0.50 > D > -3.00$, and overdominant when $D > 3.00$ or $D < -3.00$, and the analysis was repeated under the appropriate genetic model: additive ($h = \pm d/2$), dominant or recessive ($h = \pm d$), or overdominant ($d = 0$). The cut-off point for the additive model was set as half the distance from complete additivity ($D = 0$) and

complete dominance or recessiveness ($D = 1.0$ or -1.0). An overdominant model was chosen when the main effect was very small relative to the dominance effect. There was a fairly continuous distribution of *D* values until $D = \pm 3.0$; then there was a series of very high values. Hence, $D = \pm 3.0$ was taken as the effective cut-off value for overdominance. The MULTIQTL package does not estimate the power of discrimination between corresponding models. Therefore, only tests of significance between the models were performed. This was tested for situations where the logarithm of odds was rather high, so that one could expect some of the submodels to differ from the general model (see Table 5, which is published as supporting information on the PNAS web site, for the full results of the QTL analysis).

The false discovery rate (FDR) (31, 32) was used to set significance levels. Critical comparisonwise error rates (*P* values), estimated by permutation test for FDR 0.05, FDR 0.10, and FDR 0.20, were *P* < 0.0008, 0.0043, and 0.0185, respectively. The chromosomal location of the QTL was taken as the position with the highest logarithm-of-odds score; its SE was calculated after 5,000 bootstrappings (33). With the exception of BTA16, the results were consistent with a single QTL per chromosome affecting several correlated traits; hence, the estimated QTL location was calculated as the average location across traits weighted by their SE. The individual QTL effect for a given phenotypic trait was estimated as the proportion of the observed F₂ phenotypic variance explained by the QTL.

Results

BWI of the Boran control animals were almost twice that of the N'Dama, whereas PCVI were similar. Under challenge, the superior trypanotolerance of the N'Dama was evident in all traits (Table 2). None of the six N'Dama controls needed treatment at any point during or after the challenge period, whereas five of the six Boran controls had to be removed from the experiment when their PCV values fell to 12% or less and treatment was required to prevent probable death. The Boran suffered a greater proportional loss of body weight than the N'Dama (BWD 150). By the end of the experiment, the N'Dama had recovered their body weight, whereas the Boran had not (BWF/BWI). The decrease in PCV (PCVI minus PCVM) was less for N'Dama than for Boran, and the recovery in PCV (PCVFM) was greater for N'Dama than for Boran, which showed little recovery. Mean number of parasites after challenge (PARMLn and PARLnM) and parasite detection rate (DR60-150) in the N'Dama were about half those in the Boran.

Table 3. Characteristics of the mapped QTL

Trait	1	2	4	7	8	13	14	16	17	20	22	23	24	25	26	27	28	29
PCVI	D*** 14.3	(R) 9.3																
BWI		(A) 7.4																R** 7.7
BWM		(A) 9.9		(A) 6.3	R* 9.6											D* 7.8		R* 6.8
PCVM		A* 7.4									R* 15.6		A* 7.2					
PCVF									R** 8.2									
PCVIF		R*** 11.9							R** 7.9									
PCVIM		R*** 15.3																
PCVFM				(D) 10.0					D** 9.0	R* 7.4	R* 7.7			D* 8.1			R* 8.1	
PCVV										R*** 11.7	R* 8.2			(D) 6.9			R* 8.1	
PCVD150		A* 9				D** 12.9				R*** 12.0	(R) 5.6				A* 6.6		A* 7.2	R** 8.7
PCVD100		(A) 6.7			(R) 7.1	D* 11.3	R* 6.8			R*** 10.5							D** 9.9	R*** 10.7
BWF/BWI																	A* 6.7	
BWD 150																	A* 7.6	
PARMLn					R*** 16.4													
PARLnM						D** 11.2	(D) 6.1											
DR60-150						(R) 8.2	D* 6.7											D* 13.4

Numbers on the top row of the table indicate BTA (e.g., 1 indicates BTA1). For each chromosome-trait combination, the significance, genetic model, and breed origin of the QTL are indicated as well as the percentage of the F₂ phenotypic variance explained by the QTL. Genetic model: A, additive; R, recessive; D, dominant; D_o, overdominant; R_o, negative overdominance; level of significance: () = *P* < 0.1; *, *P* < 0.0185 (FDR 20%); **, *P* < 0.0043 (FDR 10%); ***, *P* < 0.0008 (FDR 5%). The origin of the allele conferring higher trypanotolerance or increase in body weight is indicated by black (for N'Dama) or gray (for Boran).

All F₂ animals showed a decrease in PCV and loss of body weight after challenge. By the end of the experiment, none of the PCV values in the F₂ offspring had reached prechallenge values, although some of the animals had recovered their body weight (Table 2, BWF/BWI). Typically, the level of parasites decreased over the course of the experiment. A proportion of F₂ animals had become aparasitemic based on the visual scoring method used. It is possible that these animals were truly free of parasites. However, this would be somewhat surprising, because persistence of infection, albeit at very low levels, is common even in the N'Dama. A more plausible alternative is that apparently self-curing animals were parasitemic, but at levels below the detection limit of the method used.

Table 3 shows the traits with significant effects at FDR ≤ 0.20, according to chromosomes. In addition, because of the strong correlations among trypanotolerance traits (see Table 4), if one of the trypanotolerance traits on a chromosome was significant at FDR ≤ 0.20, then all trypanotolerance traits having comparisonwise error rates of *P* < 0.10 are also shown, on the assumption that they all reflect effects of the same underlying QTL. For each listed trait, Table 3 also shows the breed origin and dominance status of the chromosomal haplotype with positive effects on trait value for the nontrypanotolerance traits, and degree of trypanotolerance for the trypanotolerance traits. The full details of the QTL analysis are in Table 5.

All 16 defined phenotypic traits were associated with putative QTL, with 40 significant trait–chromosome combinations on 18 different chromosomes (FDR ≤ 0.20). All but four traits (PCVI, PCVF, PCVFM, and PARMLn) were associated with significant effects on more than one chromosome.

For the nontrypanotolerance traits, highly significant effects were found for PCVI on BTA1 and for BWI on BTA28. The effect on PCVI was not accompanied by an effect on the trypanotolerance traits. The positive effect on BWI was associated with the haplotype derived from the Boran grandparent, as expected on the basis of the breed difference. This positive effect was recessive.

With respect to BWM, there was also a significant effect on BTA28 with the positive effect derived from the Boran. This is probably a secondary consequence of the effect on BWI of the putative QTL on this chromosome. Hence, we do not include this effect among the positive effects on trypanotolerance. In addition, there was a significant negative overdominance effect on BTA8, which was not associated with significant effects on either BWI or the trypanotolerance traits. Its interpretation is unclear. Three remaining effects on BWM on BTA2, -7, and -26 (one

significant, the other two at *P* < 0.10) were all associated with strong effects on one or more other trypanotolerance traits, without a significant effect on BWI. In all three cases, the haplotype with positive effect derives from the N'Dama. Thus, the positive effect on BWM in these instances is probably a secondary effect of the trypanotolerance locus.

Fifteen chromosomes had effects on the trypanotolerance traits. Of these, seven chromosomal haplotypes of N'Dama origin (BTA2, -7, -14, -22, -24, -26, and -27) and two chromosomal haplotypes of Boran origin (BTA17 and -20) were associated with positive effects on trypanotolerance. In addition, the positive haplotype of BTA16 had a mixed origin with two positive effects of N'Dama origin and one of Boran origin, and BTA13 had a positive effect of Boran origin and two due to overdominance. Four chromosomes (BTA4, -23, -25, and -29) showed significant effects due to overdominance.

QTL were identified on BTA4, -14, -22, and -23 through only one of the defined trypanotolerance traits. QTL on the remaining 11 chromosomes were identified through more than one trait (i.e., at least one significant effect at FDR ≤ 0.20 and one or more effects that were either significant or at *P* < 0.10). For two of these chromosomes (BTA4 and -23), the effect was due to overdominance, and it involved a parasitemia trait. On the other two chromosomes (BTA14 and -22), the effects were recessive with the positive haplotype derived from the N'Dama.

A conservative interpretation of these results is that, with the exception of BTA16, a single QTL has been identified per chromosome and that differences in the spectrum of effects presented are due to sampling variation.

Of the 40 significant effects (FDR ≤ 0.20), 22 showed a recessive or negative overdominance mode of action, 12 showed a dominant or overdominant mode of action, and 6 showed an additive mode of action. The majority of the recessive effects was concentrated among the correlated PCV trypanotolerance traits, whereas for the parasitemia trypanotolerance traits, there was a slight excess of dominant compared with recessive effects. The genetic model for the inheritance of the trypanotolerance allele was the same for all significant trait–chromosome combinations on BTA13, -16, -17, -20, -24, -27, and -29. However, on BTA2, there were additive and recessive effects for trypanotolerance, and on BTA26 there were recessive, additive, and dominance effects for trypanotolerance. The overall consistency of dominance effects on a given chromosome supports the hypothesis that all effects detected are associated with a single QTL.

When a higher trait value is associated with higher trypanotolerance, dominance for trait value is also dominance for trypanotolerance. As noted above, however, for most of the trypanotolerance traits, a lower trait value is associated with higher trypanotolerance. For these traits, a recessive effect on trait value is a dominant effect on trypanotolerance. Therefore, when coded to express effects on trypanotolerance, 17 of the 35 significant effects on trypanotolerance traits showed a dominant (or overdominant) mode of action, 6 showed additive action, and 12 showed a recessive (or negative overdominant) mode of action. Thus, there is a slight preponderance of dominant effects at the trypanotolerance level. In this case, the dominant effects were concentrated among the PCV traits, body weight traits were equally divided among dominant and recessive effects, and parasitemia traits showed mostly recessive effects.

Table 3 indicates also the proportion of phenotypic variance of the traits in the F₂ population explained by individual QTL identified at $P < 0.1$, for chromosomes with at least one effect significant at $FDR \leq 0.20$. The proportion explained for individual chromosome-trait combinations ranges from 6% to 20%. Effects averaged $\approx 10\%$ and were similar among categories (PCV, body weight, and parasitemia). The total proportion of the phenotypic variance explained across all chromosomes carrying putative QTL ranges from 8.2% (PCVF, one chromosome) to 63% (PCVD150, seven chromosomes).

Discussion

The results strongly support a multilocus model for the inheritance of trypanotolerance. Several QTL on several chromosomes contribute to the three major tolerance indicators: anemia, body weight, and parasitemia controls. Summing the individual gene effects at a single trait, the proportion of the phenotypic variance of the traits explained by these QTL remains relatively low (Table 3). It should also be noted that estimated effects of QTL that are detected in experiments of only moderate power tend to be overestimated. This suggests the presence of (i) other QTL affecting trypanotolerance that are segregating in the N'Dama; (ii) other QTL with effects too small to be detected in this experiment; and/or (iii) environmental or complex epistatic effects affecting the traits under consideration.

At four chromosomes (BTA13, -16, -17, and -20) showing significant effects on trypanotolerance, the trypanotolerance haplotype appears to derive from the susceptible Boran. The origin of these Boran trypanotolerant haplotypes is unclear. The improved Boran at Kapiti Plains Estate that were the source of "Boran" genes in this study have not been exposed to ATT, because the herd was established many decades ago. Moreover, the four Boran founders of the F₂ population required treatment when challenged with the same clone of parasite as that used in the F₂ study, whereas the N'Dama founders did not. However, all existing evidences point to the Boran breed having evolved in a broad region from southern Sudan across southern Ethiopia to southern Somalia, and tsetse flies were present in parts of this region until relatively recent times. Thus, it is possible that the forebears of the Kapiti Plains Estate Boran had been exposed to ATT and, as a result, may have evolved a degree of tolerance. There are also anecdotal reports that the Boran, although susceptible when compared with the N'Dama, withstand ATT better than exotic European breeds. In this context, the Orma Boran, a breed with the same origin as the Kenya Boran but which, unlike the latter, has been maintained in a high-challenge tsetse-infested area (34), has been reported to be relatively trypanotolerant (35, 36). Moreover, positive heritability estimates for trypanotolerance were found in East African *B. indicus* cattle in Ethiopia (37). Alternatively, the improved Kenya (Kapiti) Borans have probably always faced, and are relatively resistant to, tick-borne diseases. These are caused by hemoprotozoa that induce severe anemia in susceptible individuals. Although not sufficient on their own to provide protection against ATT, the loci involved

might contribute to anemia control after ATT infection in cross-bred N'Dama \times Boran animals. Indeed, three of the four Boran trypanotolerance QTL (BTA16, -17, and -20) exerted their primary positive effects on control of PCV.

Although the two parental breeds differ strongly in body weight and trypanotolerance, the experiment uncovered (excluding those with ambiguous effects) only a single chromosome (BTA28) affecting BWI with a QTL explaining $\approx 10\%$ of the F₂ phenotypic variance, whereas 15 chromosomes affecting trypanotolerance were revealed. This seemingly anomalous result is readily accommodated by the different evolutionary histories of the two traits. Trypanotolerance is a trait for which an extreme phenotype is optimal. Hence, alleles of strong positive effect will tend to reach fixation rapidly. The experiment was of a magnitude that can detect alleles of large effect (26, 38). In contrast, body weight is a trait for which an intermediate phenotype is optimal. In this case, alleles of large effect are eliminated by stabilizing selection, and genetic variation is due to alleles generally of too small effect to be detected in an experiment of the present size.

Of the five chromosomes affecting parasitemia, only two (BTA13 and -29) show a significant effect on PCV or body weight. Furthermore, in the case of BTA13, the parasitemia effect maps as an outlier with respect to the PCV effects. It should also be noted that a recessive model applies to most of the PCV QTL, whereas a dominant or overdominant (dominant) model is associated with four of five of the QTL controlling parasitemia. Thus, the genetic control of anemia and parasitemia after infection may be distinct.

The use of only measures of change in body weight under challenge to select for trypanotolerance in a synthetic population, although convenient, might miss many of the relevant QTL. Indeed, although in a number of chromosomes (BTA2, -7, and -26) body-weight effects under challenge were associated with trypanotolerance as reflected in PCV and parasitemia, there was an isolated high-body-weight effect on BTA28. Moreover, on most chromosomes, positive PCV and/or parasitemia effects were not associated with effects on body weight. Selection for trypanotolerance in N'Dama populations or in synthetic populations formed by crossing N'Dama and susceptible breeds might, however, be based jointly on parasitemia and PCV traits, because control of anemia is often unaccompanied by control of parasitemia and vice versa (refs. 2 and 21; see Table 5). Also, the finding that BTA28 carries a QTL with a strong positive effect on body weight without any effects on trypanotolerance suggests that marker-assisted introgression of this chromosome from the Boran to the N'Dama may result in an increase in body weight while preserving trypanotolerance.

The finding of trypanotolerance QTL not present in the N'Dama but present in the Boran (BTA17, -20, and -16) raises the exciting possibility that selection for trypanotolerance within an F₂ cross between N'Dama and Boran cattle would produce a synthetic breed that would exceed either parental breed in trypanotolerance terms. This is supported by the presence of some F₂ animals showing higher levels of trypanotolerance than any of the N'Dama controls (Table 2). Also, chromosomal regions carrying positive QTL alleles identified in this study and heavily marked by microsatellites and single-nucleotide polymorphisms could be introduced into more productive breeds to provide a degree of trypanotolerance. However, the large number of chromosomes carrying trypanotolerance QTL identified suggests that in most instances marker-assisted selection from an F₂ population, rather than marker-assisted introgression, would be the most effective way to produce synthetic breeds combining high productivity and trypanotolerance.

The map locations of the trypanotolerance QTL also provide a platform for a search for population-wide linkage disequilibrium between marker loci and QTL affecting trypanotolerance in purebred N'Dama cattle and, particularly, in admixture populations produced in the recent or more distant past by crosses

between N'Dama and susceptible breeds. Population-wide linkage disequilibrium of this nature can be a powerful tool for within-breed selection.

Recently, trypanosomosis-resistance QTL have been mapped in a mouse model (15, 39) after infection with the same clone of *T. congolense* as that used in the cattle study reported here. Ongoing comparative mapping has so far revealed a region of homology between one of the cattle chromosomal regions containing a trypanotolerance QTL identified in this study (conferring control of parasitemia on BTA7) and a chromosomal region in the C57BL/6 mouse containing a major QTL linked to survival time after infection (40). Thus, the mouse model may enable the genes corresponding to the mapped cattle QTL affecting trypanotolerance to be identified. This will enable much more effective use of marker-assisted selection and introgression for improvement of trypanotolerance in domestic livestock.

We thank T. Jordt, D. Kennedy, B. King, S. Leak, J. Mwakaya, D. Mwangi, M. Ogugo, H. ga'Thuo, and the farm personnel at ILRI headquarters and Kapiti Plains Estate for help in producing ILRI F₂ resources, blood collection, phenotypic recording of the raw data, and/or technical help in producing the genotyping data. We also acknowledge Max Murray, Ivan Morrison, Jack Doyle, and Ross Gray [all formerly of the International Laboratory for Research on Animal Diseases (ILRAD)], and John Trail (formerly of the International Livestock Center for Africa), for the vision and support that led to the establishment of the N'Dama cattle resource in the former ILRAD, without which the work described here would not have been possible. Leyden Baker and John Rowlands provided useful comments on the manuscript. ILRI research is principally funded by program grants from the United Kingdom, Japan, the European Union, Ireland, Germany (Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung), and France, and unrestricted funding from other donors to the Consultative Group on International Agricultural Research. This is ILRI publication 2002-41.

1. Urquhart, G. M. (1980) *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74**, 726–729.
2. d'Ieteren, G., Authié, E., Wissocq, N. & Murray, M. (1999) in *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*, eds. Axford, R. F. E., Bishop, S. C., Nicholas, F. W. & Owen, J. B. (CABI, Wallingford, U.K.), 2nd Ed., pp. 195–216.
3. Kristjansson, P. M., Swallow, B. M., Rowlands, G. J., Kruska, R. L. & de Leeuw, P. N. (1999) *Agric. Syst.* **59**, 79–98.
4. Stewart, J. L. (1937) *Vet. Rec.* **49**, 1289–1297.
5. Roberts, C. J. & Gray, A. R. (1973) *Trop. Anim. Health Prod.* **5**, 220–233.
6. Roelants, G. E. (1986) *Parasite Immunol.* **8**, 1–10.
7. Doko, A., Guedegbe, B., Baelmans, R., Demey, F., N'Diaye, A., Pandey, V. S. & Verhulst, A. (1991) *Vet. Parasitol.* **40**, 1–7.
8. Trail, J. C., d'Ieteren, G. D. & Teale, A. J. (1989) *Genome* **31**, 805–812.
9. Paling, R. W., Moloo, S. K., Scott, J. R., Gettinby, G., McOdimba, F. A. & Murray, M. (1991) *Parasite Immunol.* **13**, 427–445.
10. Paling, R. W., Moloo, S. K., Scott, J. R., McOdimba, F. A., Logan-Henfrey, L. L., Murray, M. & Williams, D. J. (1991) *Parasite Immunol.* **13**, 413–425.
11. Murray, M., Stear, M. J., Trail, J. C. M., d'Ieteren, G. D. M., Ageymang, K. & Dwinger, R. H. (1991) in *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*, eds. Owen, J. B. & Axford, R. F. E. (CABI, Wallingford, U.K.), 1st Ed., pp. 203–223.
12. Soller, M. & Beckmann, J. S. (1987) *Toward an Understanding of the Genetic Basis of Trypanotolerance in the N'Dama Cattle of West Africa* (Consultation Report submitted to Food and Agriculture Organization, Rome, March 1987).
13. Teale, A. (1993) *Bioscience* **43**, 475–483.
14. Jordt, T., Mahon, G. D., Touray, B. N., Ngulo, W. K., Morrison, W. I., Rawle, J. & Murray M. (1986) *Trop. Anim. Health Prod.* **18**, 65–75.
15. Iraqi, F., Clapcott, S. J., Kumari, P., Haley, C. S., Kemp, S. J. & Teale, A. J. (2000) *Mamm. Genome* **11**, 645–648.
16. Geigy, R. & Kauffmann, M. (1973) *Acta Trop.* **30**, 12–23.
17. Nantulya, V. M., Musoke, A. J., Rurangirwa, F. R. & Moloo, S. K. (1984) *Infect. Immun.* **43**, 735–738.
18. Emery, D. L. & Moloo, S. K. (1981) *Acta Trop.* **38**, 15–28.
19. Dwinger, R. H., Murray, M. & Moloo, S. K. (1987) *Parasite Immunol.* **9**, 353–362.
20. Paris, J., Murray, M. & McOdimba, F. (1982) *Acta Trop.* **39**, 307–316.
21. van der Waaij, E. H. (2001) Ph.D. thesis (Wageningen University, Wageningen, The Netherlands).
22. Falconer, D. S. & MacKay, T. F. C. (1996) *Introduction to Quantitative Genetics* (Longman, New York), 4th Ed.
23. Sambrook, J. E. F., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY).
24. Hirano, T., Nakane, S., Mizoshita, K., Yamakuchi, H., Inoue-Murayama, M., Watanabe, T., Barendse, W. & Sugimoto, Y. (1996) *Anim. Genet.* **27**, 365–368.
25. Kemp, S. J., Hishida, O., Wambugu, J., Rink, A., Longeri, M. L., Ma, R. Z., Da, Y., Lewin, H. A., Barendse, W. & Teale, A. J. (1995) *Anim. Genet.* **26**, 299–306.
26. Beckmann, J. S. & Soller, M. (1988) *Theor. Appl. Genet.* **76**, 228–236.
27. Andersson, L., Haley, C. S., Ellegren, H., Knott, S. A., Johansson, M., Andersson, K., Andersson-Eklund, L., Edfors-Lilja, I., Fredholm, M., Hansson I., et al. (1994) *Science* **263**, 1771–1774.
28. Haley, C. S., Knott, S. A. & Elsen, J. M. (1994) *Genetics* **136**, 1195–1207.
29. Knott, S. A. & Haley, C. S. (1992) *Genetics* **132**, 1211–1222.
30. Churchill, G. A. & Doerge, R. W. (1994) *Genetics* **138**, 963–971.
31. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995) *J. R. Stat. Soc. B* **57**, 289–300.
32. Mosig, M. O., Lipkin, E., Khutoreskaya, G., Tchourzyna E., Soller, M. & Friedmann, A. (2001) *Genetics* **157**, 1683–1698.
33. Visscher, P. M., Thompson, R. & Haley, C. S. (1996) *Genetics* **143**, 1013–1020.
34. Rege, J. E. O., Kahi, A. K., Okomo-Adhiambo, M., Mwacharo, J. & Hanotte, O. (2001) *Zebu Cattle of Kenya: Uses, Performance, Farmer Preferences, Measures of Genetic Diversity and Options for Improved Use* (Animal Genetic Resources Research 1, International Livestock Research Institute, Nairobi).
35. Njogu, A. R., Dolan, R. B., Wilson, A. J. & Sayer, P. D. (1985) *Vet. Rec.* **117**, 632–636.
36. Dolan, R. B. (1998) *The Orma Boran: A Trypanotolerant East African Breed* (Kenya Trypanosomiasis Research Institute, Kikuyu, Kenya).
37. Rowlands, G. J., Mulatu, W., Nagda, S. M., Dolan, R. B. & d'Ieteren, G. D. M. (1995) *Livestock Prod. Sci.* **43**, 75–84.
38. Soller, M., Brody, T. & Genezi, A. (1976) *Theor. Appl. Genet.* **47**, 35–39.
39. Kemp, S. J., Iraqi, F., Darvasi, A., Soller, M. & Teale, A. J. (1997) *Nat. Genet.* **16**, 194–196.
40. Kang'a, S. (2003) Ph.D. thesis (Kenyatta Univ., Nairobi).

Construction of YAC/BAC Contig Map for the BTA 6q21 Region Containing a Locus for Bovine Chondrodysplastic Dwarfism

Haruko Takeda* and Yoshikazu Sugimoto

Shirakawa Institute of Animal Genetics, Odakura, Nishigo, Fukushima, Japan

ABSTRACT

To characterize the bovine chromosome 6q21 for bovine chondrodysplastic dwarfism (BCD), we developed 48 new microsatellite markers from yeast artificial chromosome (YAC) and bacterial artificial chromosome (BAC) clones using a modified magnetic bead capture method. These new markers were used to construct a high-resolution physical map of the region with a total of 85 loci. The physical map will be a powerful tool for successful positional cloning experiments.

INTRODUCTION

A high resolution physical map of clone contigs is critical for positional cloning. The map enables the ordering of genes and markers using a sequence-tagged site (STS)-content mapping and provides sequence-ready genomic resources for cloning the targeted genes.

Bovine chondrodysplastic dwarfism (BCD) in Japanese brown cattle is an autosomal recessive disorder with the phenotype of short limbs, joint abnormality, and ateliosis (1,2).

*Correspondence: Haruko Takeda, Shirakawa Institute of Animal Genetics, Odakura, Nishigo, Fukushima 961-8061, Japan; E-mail: haruko@cococoa.ocn.ne.jp.

A locus responsible for BCD was mapped in an 11-cM region between microsatellite markers BP7 and BM9257 on bovine chromosome (BTA) 6q21 (3). To characterize the BTA 6q21 region, we modified the magnetic bead capture method to rapidly and efficiently isolate microsatellites from yeast artificial chromosome (YAC) and bacterial artificial chromosome (BAC) clones. Among STS markers, microsatellite markers are particularly useful for coordinating the physical map with a genetic map of the corresponding chromosomal region. Several approaches using the magnetic bead capture method were recently developed for a rapid isolation of microsatellites from total genomic DNA (4,5). In this method, biotinylated (CA) n probes are used to capture the complementary microsatellites. The captured microsatellites are subsequently immobilized on streptavidin-coated magnetic beads, purified, and employed to construct a (CA) n -enriched library. Because all experimental steps are performed in solution, the method is time- and space-saving as compared with a typical colony-hybridization strategy.

In the present paper, we describe details of the construction of a high-resolution physical map spanning an 8-cM region of BTA 6q21, a critical region for BCD.

MATERIALS AND METHODS

Screening of Yeast Artificial Chromosome/Bacterial Artificial Chromosome Clones

A bovine YAC library (6) was screened using a polymerase chain reaction (PCR)-based method. The bovine BAC library (RPC1-42) purchased from Children's Hospital (Oakland, CA) was screened by colony hybridization with high-density filters. The bovine YAC/BAC libraries were screened with microsatellite markers and genes located in the critical region of BTA 6q21. Newly developed microsatellite markers and STS markers derived from the screened YAC/BAC clone ends were also used for screening.

Isolation of (CA) n Microsatellite Markers from Screened Yeast Artificial Chromosome/Bacterial Artificial Chromosome Clones with Modified Magnetic Bead Capture Method

Microsatellites from YAC 192D2 and YAC 74A6 clones were isolated using a standard colony hybridization strategy (7). Microsatellites from the YAC/BAC clones listed in Table 1 were isolated using the magnetic bead capture method (4,5) with some modifications as follows. The YAC/BAC DNAs were randomly fragmented by nebulization rather than digestion with restriction enzymes, because digestion depends on genome base compositions and recognition sequences. Transformed clones were subjected to sequencing without selection by colony-hybridization or plasmid DNA purification.

For the modified magnetic bead capture method, YAC DNAs were separated in 1.2% low-melting point agarose using pulsed-field gel electrophoresis, cut out from the agarose, and solubilized with beta-agarase (FMC BioProducts, Rockland, ME). Bacterial artificial chromosome DNAs were extracted using a standard alkaline lysis protocol. One to five YAC or BAC DNAs (1–10 μ g in total, Table 1) were pooled and sheared using a disposable

Table 1. Characterization of microsatellite-enriched libraries and isolated bovine microsatellites.

Pooled clones	Number of sequenced clones	Number of microsatellites	Microsatellite names	Accession numbers
YAC: 86F6	72	14	DIK1187-DIK1190 DIK1197-DIK1206	AB080352-AB080355 AB093333-AB093342
YAC: 15G1, 51F2, 86F6, 101C7, 209A9	72	18	DIK1178-DIK1179 DIK1207-DIK1222	AB080343-AB080344 AB093343-AB093358
YAC: 15G1, 99E3, 155A4, 210F7	136	10	DIK1176-DIK1177 DIK1223-DIK1230	AB080341-AB080342 AB093359-AB093366
YAC: 36B2, 98G6, 178F2	136	22	DIK1231-DIK1252	AB093367-AB093388
BAC: 313F12, 343P17, 561I8	96	5	DIK1181-DIK1182 DIK1253-DIK1255	AB080346-AB080347 AB093389-AB093391
BAC: 148K24, 345C14	192	8	DIK1256-DIK1263	AB093392-AB093399
BAC: 127F23, 153A3, 237M6	192	13	DIK1185 DIK1264-DIK1275	AB080350 AB093400-AB093411
BAC: 88A8, 293N13, 362I7, 539D14	192	13	DIK1183-DIK1184 DIK1276-DIK1286	AB080348-AB080349 AB093412-AB093422

Note: DIK1213 and DIK1215 were located in only one-YAC, 209A9. DIK1225, DIK1228, and DIK1229 were located in only one-YAC, 210F7. Other microsatellites were detected more than two YAC/BAC clones in Fig. 1.

medical nebulizer (Okada Medical Products, Tokyo, Japan) (8). Nebulization for ~90 s at ~3 kg/cm² generated DNA fragments in the range of 400–1500 bp. The DNA fragments were blunt-ended with a Blunting High Kit (Toyobo, Osaka, Japan) at 72°C for 5 min. The enzyme and small fragments of DNA were removed using Micropure-EZ and Microcon YM-100 columns (Millipore, Bedford, MA). The 5' ends of sheared DNA were phosphorylated with a Kination Kit (Toyobo), followed by single A tailing of the 3' ends with 2 mM of dATP and 15 U/mL of Taq DNA polymerase (Takara Shuzo, Kyoto, Japan) in the same kinase buffer at 72°C for 10 min. The DNA fragments were purified using Micropure-EZ and Microcon YM-100 columns and ligated with linkers consisting of two synthetic oligonucleotides, LinkBlunt24Phos; 5' phosphorylated-TGCGGTGA-GAGGCTGGAGAGTGCT and LinkBlunt21T; ACTCTCCAGCCTCTCACCGCAT. Excess linker was removed by washing through SUREC-02 columns (Takara Shuzo). The 3' A-overhangs prevented ligation between DNA fragments and increased the efficiency of the linker-ligation.

For enrichment of microsatellites, the DNA fragments were denatured at 95°C and hybridized to 0.28 mM of biotinylated (CA)₁₀ probe in 0.5× saline sodium citrate (SSC) at 45°C for 1 h with 0.05 mM of LinkBlunt primer AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCAT, which hybridized to the linker sequences of the single stranded DNA and thereby prevented hybridization between the DNA fragments within the linker sequences. DNA molecules hybridized to biotinylated (CA)₁₀ probes were captured with streptavidin magnetic beads (Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles; Promega, Madison, WI) in 0.5× SSC at room temperature for 10 min, washed three times with 0.1×SSC at room temperature, and eluted with H₂O. The DNA was then spin-cleaned on SUREC-02 columns and resuspended in 15 µL of Tris–EDTA buffer. Five microliters of recovered DNA was amplified by 10–30 PCR-cycles with denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 60°C for 45 s, and extension at 72°C for 60 s in 20 µL of 1× *Ex Taq*TM buffer containing 2.5 U of *Ex Taq*TM DNA polymerase (Takara Shuzo), 200 ng of LinkBlunt primer, and 0.2 mM of each dNTP. The PCR products were directly ligated into a pGEM-T vector according to the manufacturer's instructions (Promega).

Epicurian coli XL1-Blue cells (Toyobo) were transformed with the ligation reaction and plated on LB/ampicillin/X-gal/IPTG agar plates. White colonies (72–192) were picked up and amplified by 36 PCR-cycles with denaturation at 94°C for 20 s, annealing at 58°C for 20 s, and extension at 72°C for 2 min in 30 µL of 1× PCR buffer containing 0.75 U of *Taq* DNA polymerase (Takara Shuzo), 4 pmols of each T7 and SP6 primers, and 0.2 mM of each dNTP. The PCR products were purified using MultiScreen 96-well Filtration Plates (Millipore) to remove excess primers and dNTPs. One microliter of the PCR product was used for sequencing analysis using T7 and SP6 primers, and BigDye terminator chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequences derived from yeast DNA were eliminated using DNA Space software (Hitachi Software Engineering, Yokohama, Japan) with BLAST searches of the GenBank yeast database. Overlapped sequences were assembled using Sequencher software (Gene Codes, Ann Arbor, MI). Sequences containing more than six perfect CA or CAG repeats were regarded as microsatellites. Unique microsatellites were selected using DNA Space software with BLAST searches of the GenBank dbSTS database of *Bos taurus*. The microsatellites sequences have been deposited in the GenBank database (accession nos. AB080341, AB080342, and AB093333–AB093422). Primers were designed using Primer 3 software and used for subsequent screening of bovine YAC/BAC libraries.

Construction of Physical Map

Yeast artificial chromosome end sequences were obtained by the end rescue method (9). Bacterial artificial chromosome end sequences were identified by direct sequencing of BAC DNAs using T7 and SP6 primers with BigDye chemistry. Primers were designed using Primer 3 software and used for subsequent screening of bovine YAC/BAC libraries. Primer sequences of STS markers at clone ends are shown in Table 2.

Sequence-tagged site contents of YAC/BAC clones were confirmed by PCR using a DNA panel of the screened clones and all STS markers for microsatellites, genes, and clone ends, shown in Fig. 1. The STS-content data were used to construct a YAC/BAC contig map, as described by Green and Olson (10).

RESULTS AND DISCUSSION

A critical region for BCD has been mapped in an 11-cM region between microsatellite markers BP7 and BM9257 on BTA 6q21 and the region corresponds to human chromosome 4 (3). To refine the region, we screened bovine YAC/BAC libraries with two microsatellite markers [ETH8 (11) and JMP8 (12)] located in the critical region, and seven genes (*MLLT2*, *DMP1*, *WFS1*, *PPP2R2C*, *CRMP1*, *HSA250839*, and *MSX1*) located in the corresponding region of human chromosome 4 (GRL human genome database, <http://grl.gi.k.u-tokyo.ac.jp>) (13) (Fig. 1). Seven contigs were constructed with 19 YAC and 9 BAC clones (Fig. 1).

To test the modified magnetic bead capture method for microsatellite isolation, we first constructed a microsatellite-enriched library from a 250-kb fragment of YAC 86F6 clone purified by pulsed-field gel electrophoresis. Of 72 clones, 59 (82%) had more than six perfect CA repeats, five (10%) had four or five perfect CA repeats, and the remaining eight (11%) were not sequenced well. The 59 microsatellite sequences were derived from 14 microsatellite loci, and we could design suitable PCR primer pairs for 10 of the 14 (Table 1), giving an average marker resolution of approximately one every 25 kb. Thus, this protocol is useful for microsatellite isolation from YAC clones.

Using the modified protocol, we employed pooled YAC and BAC DNAs to develop microsatellites as shown in Table 1. Developed microsatellite markers were used for further screening of bovine YAC/BAC libraries. From a total of 11 YACs and 12 BACs, we isolated 103 microsatellites with an average of 12 simple repeats, and developed 64 microsatellite markers (Table 1). We could not develop microsatellite markers from the remaining 39 microsatellites, because of the lack of suitable flanking sequences for primer design and unreliable PCR amplification of the loci. Of the 64 microsatellites markers developed in this study, 59 were located in more than two YAC/BAC clones while the remaining five were in only one-YAC clone (Table 1). The YACs could be chimeric and the five microsatellites might be derived from other chromosomal regions, so these markers were excluded from the physical map.

We performed STS-content mapping using all of screened YAC/BAC clones to order 85 STS markers (59 microsatellites isolated by the magnetic bead method, four microsatellites isolated by the colony-hybridization method, eight genes, 12 clone ends, and two microsatellites ETH8 and JMP8; Fig. 1). We constructed a closed contig map of an 8-cM

Table 2. Yeast artificial chromosome/BAC end STS markers.

YAC/BAC names	End names	Forward primers	Reverse primers
YAC27A10	Left	AGCAGAGGATGAGATGGTGA	AAGCGTTCAGAACAGTATCG
YAC60D2	Right	CTACAGCAGAAAGGCCCA	CATTCCTTTGTACACCTTGTGTTTGC
YAC63B12	Right	GAAGCCCACATACCACTCAT	GAAGCTACATGAGTTTCCAGTG
YAC98G6	Right	ATCACGTGCTGAATGCAGTGC	CACCTCCTAAAACTCTGTGTC
YAC195C8	Left	TGGCACTCATGGTAAAGAAC	CTCTGGGCAAGAATTACACATAG
BAC313F12	SP6	AACAGGAAGCTGGAGTGCAGCAAG	ATCTGAGGACCATCTGTTTTGCTG
BAC462J18	SP6	TGTTGTTACTTCAGCAGAGGAGC	TCCCTGAGCATCTGAGCACACA
BAC569I2	SP6	GTGGGAGAATGTGGGTTCCATTCC	ACAGAGCAGGCCCTCCATTTGCCAC
BAC569I2	T7	TCCGCCTGAGAAACCCATTCTGTG	CTGGTCTGGGAATGTCAGTCCACG

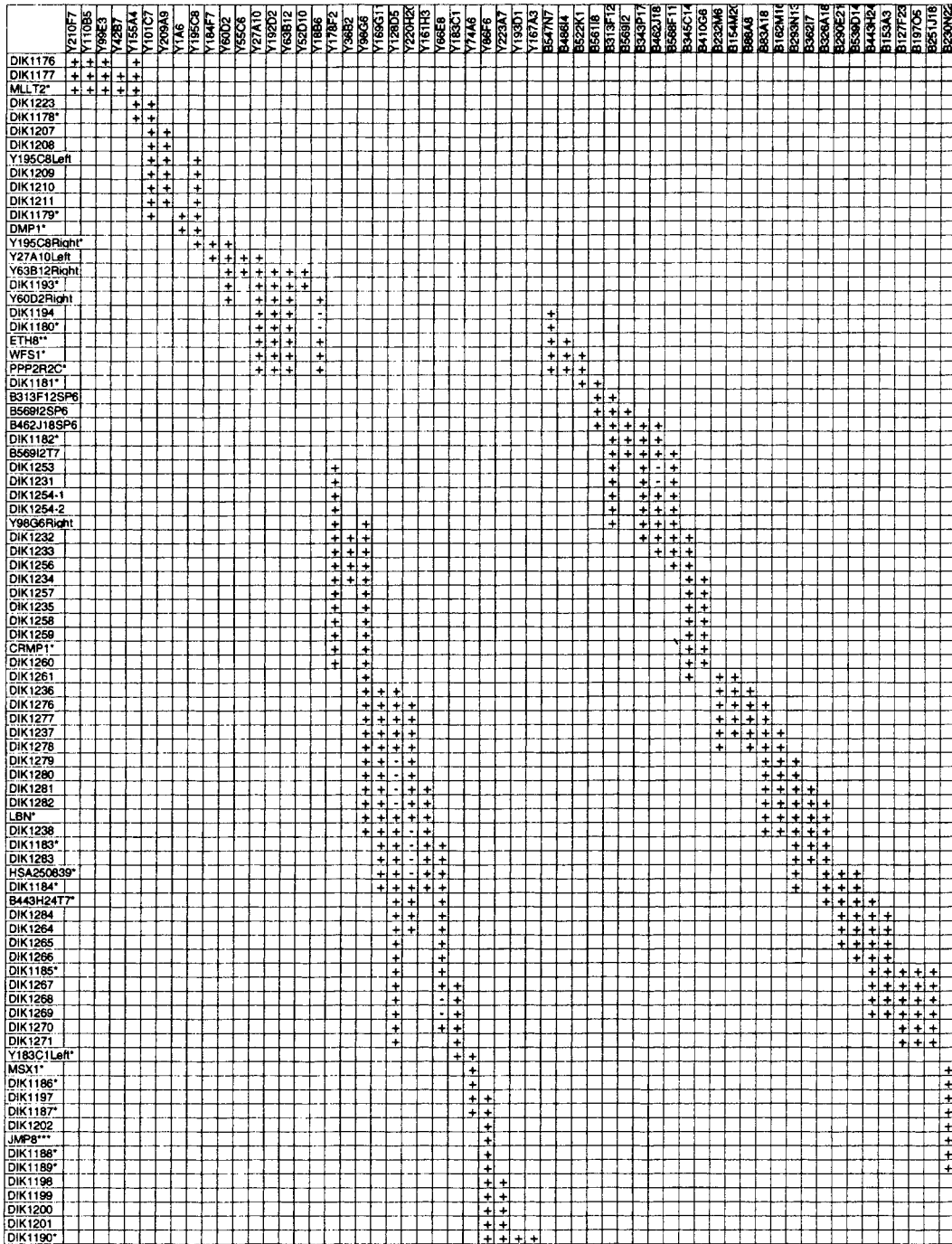


Figure 1. Physical map consisting of YAC/BAC clones with high-density STS markers. Shaded boxes represent YAC/BAC clones used in the magnetic bead capture method. Sequence-tagged sites are represented in the most parsimonious order as determined from STS content of individual YAC/BAC clones. Key: +, STS content of individual YAC/BAC clones, -, conflict in the contig, given marker order. Sequence-tagged sites reported previously in Takeda et al. (14), Toldo et al. (11), and Lumsden et al. (12) are included *, **, and ***, respectively.

region of BTA 6q21, consisting of 31 YAC and 27 BAC clones and the 85 STS markers, given a resolution of 0.09-cM per STS (Fig. 1).

This strategy using the modified magnetic bead capture method enables rapid isolation of microsatellites from genomic clones and facilitates construction of high resolution physical maps in genomic areas of interest. The physical maps will be a powerful tool for successful positional cloning experiments. This map provided a valuable resource for a positional cloning of BCD in Japanese brown cattle (14). In addition, our work provides a set of overlapping BAC clones that can be used as templates for genome sequencing of this region.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank M. Agaba, N. Ihara, and T. Itoh for valuable suggestions, and H. Tsukazawa and K. Maruyama for technical assistance. This work was supported by a grant from the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

REFERENCES

1. Moritomo Y, Ishibashi T, Ashizawa H, Shibata T. Chondrodysplastic dwarfism in Japanese brown cattle. *J Jpnt Vet Med Assoc* 1989; 42:173–177.
2. Moritomo Y, Ishibashi T, Miyamoto H. Morphological changes of epiphyseal plate in the long bone of chondrodysplastic dwarfism in Japanese brown cattle. *J Vet Med Sci* 1992; 54:453–459.
3. Yoneda K, Moritomo Y, Takami M, Hirata S, Kikukawa Y, Kunieda T. Localization of a locus responsible for the bovine chondrodysplastic dwarfism (bcd) on chromosome 6. *Mamm Genome* 1999; 10:597–600.
4. Kijas JM, Fowler JC, Garbett CA, Thomas MR. Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques* 1994; 16:656–660, 662.
5. Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol* 2002; 11:1–16.
6. Takeda H, Yamakuchi H, Ihara N, Hara K, Watanabe T, Sugimoto Y, Oshiro T, Kishine H, Kano Y, Kohno K. Construction of a bovine yeast artificial chromosome (YAC) library. *Anim Genet* 1998; 29:216–219.
7. Inoue M, Hirano T, Nakane S, Watanabe T, Takeda H, Yamakuchi H, Morita M, Barendse W, Sugimoto Y. Five bovine polymorphic dinucleotide microsatellite loci (DIK008, DIK010, DIK015, DIK016 and DIK020). *Anim Genet* 1995; 26:447–448.
8. Hengen PN. Shearing DNA for genomic library construction. *Trends Biochem Sci* 1997; 22:273–274.
9. Ogilvie DJ, James LA. End rescue from YACs using the vectorette. *YAC Protocols. Methods in Molecular Biology*. Markie, D, ed. Totowa, New Jersey: Human Press, 1995:131–138.
10. Green ED, Olson MV. Chromosomal region of the cystic fibrosis gene in yeast artificial chromosomes: a model for human genome mapping. *Science* 1990; 250:94–98.

11. Toldo SS, Fries R, Steffen P, Neibergs HL, Barendse W, Womack JE, Hetzel DJ, Stranzinger G. Physically mapped, cosmid-derived microsatellite markers as anchor loci on bovine chromosomes. *Mamm Genome* 1993; 4:720–727.
12. Lumsden JM, Lord EA, Montgomery GW. Characterization and linkage mapping of ten sheep microsatellite markers derived from a sheep × hamster cell hybrid. *Anim Genet* 1996; 27:203–206.
13. Honkura T, Ogasawara J, Yamada T, Morishita S. The gene resource locator: gene locus maps for transcriptome analysis. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:221–225.
14. Takeda H, Takami M, Oguni T, Tsuji T, Yoneda K, Sato H, Ihara N, Itoh T, Kata SR, Mishina Y, Womack JE, Moritomo Y, Sugimoto Y, Kunieda T. Positional cloning of the gene LIMBIN responsible for bovine chondrodysplastic dwarfism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:10549–10554.

Mapping of 1400 expressed sequence tags in the bovine genome using a somatic cell hybrid panel

T. Itoh, A. Takasuga, T. Watanabe and Y. Sugimoto

Shirakawa Institute of Animal Genetics, Japan Livestock Technology Association, Odakura, Nishigo, Japan

Summary

A bovine/hamster hybrid cell panel consisting of 30 independent hybrids was developed to locate genes. Polymerase chain reaction analysis of 279 microsatellites on the cattle linkage map in this panel revealed the presence of all chromosomes in either entire or fragmented form. Among primer pairs prepared from bovine 3'-expressed sequence tags (ESTs), 1400 ESTs were assigned to specific chromosomes, of which 1303 were newly assigned in this study, and mapped 854 (61%) to 1 of 192 chromosomal segments using this panel. The regional mapping of new genes to cattle chromosomes can be rapidly achieved using this panel.

Keywords cattle, expressed sequence tags, microsatellite, regional localization, somatic cell hybrid panel.

The construction of mapping tools such as a somatic cell hybrid (SCH) panel is important for gene mapping in cattle (Heuertz & Hors-Cayla 1981; Womack & Moll 1986; Konfortov *et al.* 1998). The current cattle genetic linkage maps contain more than 1000 markers, most of which are microsatellites (Barendse *et al.* 1997; Kappes *et al.* 1997). These microsatellite markers have also been used to develop framework radiation hybrid maps (Williams *et al.* 2002). By using microsatellites selected from the linkage map to characterize the SCH panel, the utility of the SCH panel for locating genes to the sub-chromosomal level and for comparative mapping is increased.

The hamster BHK-21-derived tk⁻13 cell line ($2n = 50-151$; RIKEN Gene Bank, Tsukuba, Japan) was transfected with pL2neo using Lipofectamine (Gibco-BRL, Rackville, MD, USA), and a subclone named BHK-21-tk⁻13neo was fused with bovine fetal fibroblasts derived from a Japanese black bull. Thirty independent hybrid cell lines were isolated and the presence of cattle chromosomes in each cell line was confirmed by fluorescence *in situ* hybridization, using cattle genomic DNA as a probe according to the standard protocols. An average of 70 mg DNA (18.6–137.2 mg) was isolated from each hybrid. Microsatellites were selected at intervals of approximately 10 cM from the bovine genetic map (Kappes *et al.* 1997). The primers were synthesized

using sequence information from the following web site (<http://www.marc.usda.gov/genome/>). Polymerase chain reaction (PCR) products were purified using MultiScreen-PCR (Millipore, Cambridge, MA, USA), followed by electrophoresis using an ABI3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Markers were scored using Genotyper (Applied Biosystems).

Marker retention by cell line can be viewed at the following web site: <http://www.siag.or.jp/paper/SCH/index.html>. The overall average marker retention of the hybrid panel was 37.2%, ranging from 9.5% for BTA5 to 97% for BTA19, where the TK gene which was used as the selectable marker during the creation of the hybrids is located. All except two markers (*BMS1248* and *ETH2*) located in the telomeric region of BTA5 were amplified in at least two hybrids, indicating that our SCH panel provides coverage of the complete cattle genome. The marker retention patterns in the panel revealed that 29 autosomes and the X-chromosome could be divided into 215 regions: 192 unique regions (or bins) and 23 regions each of which could be described by a unique PCR profile, but included several microsatellites that are not contiguous on the same chromosome (Table 1). Any PCR profile was chromosome-specifically observed and did not exist in other chromosomes. Thirteen chromosomes (BTA3, 6, 13, 15–17, 19, 23, 25, 26, 28, 29, X) were composed of unique regions, whereas 12 chromosomes (BTA4, 5, 7–10, 12, 14, 18, 20–22) contained one region including several microsatellites that do not map to contiguous locations on the USDA-MARC linkage map of the chromosome (Kappes *et al.* 1997). Approximately 80.9% (2350 cM) of the cattle genome belonged to unique regions and could be regionally

Address for correspondence

Y. Sugimoto, Shirakawa Institute of Animal Genetics, Japan Livestock Technology Association, Odakura, Nishigo, Fukushima 961-8061, Japan.

E-mail: kazusugi@siag.or.jp

Accepted for publication 15 April 2003

Table 1 Characterization of the somatic cell hybrid panel.

Chr.	Region	Characterization of sub-chromosomal regions				EST ¹
		Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4	
1	1	MS ² 1 (AGLA17)				0
	2	MS2 (TGLA49)	MS6 (TGLA57)	MS10 (BR2724)	MS12 (BM1824)	64
		MS3 (BM8139)	MS7 (DIK024)		MS13 (CSSM019)	
			MS8 (BM9019)		MS14 (BMS918)	
					MS15 (BMS2263)	
	3	MS4 (BMS711)				5
	4	MS5 (BM4307)	MS11 (BMS4040)			2
	5	MS9 (URB038)				0
	2,3					2
	2	1	MS1 (BM81124)			
2		MS2 (TGLA44)				0
3		MS3 (TGLA431)				4
4		MS4 (CSSM042)	MS6 (BL1001)			3
5		MS5 (FCB20)				3
6		MS7 (BM4440)	MS13 (BM2113)			15
			MS14 (FCB11)			
7		MS8 (ILSTS050)	MS11 (BM6444)			6
		MS9 (RM041)				
8		MS10 (TGLA226)	MS12 (BMS1987)			24
6,8					2	
3	1	MS1 (BMS871)				0
	2	MS2 (MB101)				5
	3	MS3 (BMS2904)				2
	4	MS4 (BMS963)				4
	5	MS5 (BM723)				4
	6	MS6 (MB099)				1
	7	MS7 (HUJ246)				0
	8	MS8 (BM4301)				6
	9	MS9 (BMS2145)				1
	10	MS10 (IDVGA-35)				33
		MS11 (BMC5227)				
	MS12 (RM309)				3	
4	1	MS1 (BMC1410)				0
	2	MS2 (BMS1788)				5
	3	MS3 (BMS827)				0
	4	MS4 (MAF70)				0
	5	MS5 (DIK008)	MS7 (BM6458)			7
	6	MS6 (BMS885)				0
	7	MS8 (DIK026)				8
		MS9 (BL1121)				
5,7					21	
5	1	MS1 (BMS695)				0
	2	MS2 (BMS610)				1
	3	MS3 (BP1)				10
	4	MS4 (RM103)				6
	5	MS5 (BM321)				3
		MS6 (CSSM034)				
	6	MS7 (BMS1617)				15
		MS8 (AGLA254)				
	7	MS9 (BM1819)				5
	8	MS10 (BMS1248)				5
9	MS11 (BMS1658)	MS13 (BM8126)			12	
	MS12 (ETH2)				0	
6	1	MS1 (ILSTS093)				0

Table 1 (Continued.)

Chr.	Region	Characterization of sub-chromosomal regions				EST ¹
		Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4	
	2	MS2 (<i>INRA133</i>)				2
	3	MS3 (<i>BM1329</i>)				6
	4	MS4 (<i>BM143</i>)				0
	5	MS5 (<i>BM4322</i>)				0
	6	MS6 (<i>ILSTS097</i>)				3
	7	MS7 (<i>CA028</i>)				4
	8	MS8 (<i>BM1236</i>)				0
	9	MS9 (<i>AFR227</i>)				3
	10	MS10 (<i>BM2320</i>)				17
	11	MS11 (<i>JMP12</i>)				0
	1,9					1
	2,6					4
	2,7					1
	3,10					1
	3,4					1
	6,7					2
7	1	MS1 (<i>BM7160</i>)				0
	2	MS2 (<i>RM012</i>)				12
	3	MS3 (<i>DIK079</i>)				5
	4	MS4 (<i>IL4</i>)				6
	5	MS5 (<i>TGLA303</i>)	MS9 (<i>BMS2258</i>)			11
	6	MS6 (<i>BM741</i>)				0
	7	MS7 (<i>UWCA20</i>)				6
	8	MS8 (<i>BMS904</i>)				7
	9	MS10 (<i>BM1853</i>)				3
	10	MS11 (<i>AE129</i>)				0
	11	MS12 (<i>MB021</i>)				0
	12	MS13 (<i>MB057</i>)				1
		MS14 (<i>DIK119</i>)				
		MS15 (<i>BL1043</i>)				
	2,4					1
	2,7					2
	3,12					4
	3,5					2
	3,5,9,12					4
	4,7,8					2
	7,8					6
	9,12					4
8	1	MS1 (<i>BMS1864</i>)				1
	2	MS2 (<i>Z27077</i>)				0
	3	MS3 (<i>BMS1591</i>)	MS9 (<i>BM711</i>)			15
			MS10 (<i>DIK074</i>)			
			MS11 (<i>CSSM47</i>)			
	4	MS4 (<i>BMS678</i>)				13
	5	MS5 (<i>CSSM37</i>)				0
	6	MS6 (<i>TGLA13</i>)				0
	7	MS7 (<i>BMS2072</i>)				8
	8	MS8 (<i>MB065</i>)				3
	9	MS12 (<i>BMS2629</i>)				10
	4,6					1
	8,9					1
9	1	MS1 (<i>BM1227</i>)				4
	2	MS2 (<i>BM2504</i>)				1
	3	MS3 (<i>BMS1267</i>)	MS8 (<i>INRA084</i>)			4

Table 1 (Continued.)

Chr.	Region	Characterization of sub-chromosomal regions				EST ¹
		Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4	
10	4	MS4 (CSSM025)				0
	5	MS5 (BMC701)				0
	6	MS6(BMS2753)				0
	7	MS7 (BM7209)				0
	8	MS9 (BMS1943)				1
	9	MS10 (BMS2094)				4
	2,3					3
	3,6					3
	4,5					1
	5,7					1
	5,7,9					3
	5,9					2
	7,9					6
	1	MS1 (BM3033)				4
	2	MS2 (CSSM038)				0
	3	MS3 (BM1237)				21
	4	MS4 (MB077)				5
	5	MS5 (ILSTS053)				4
	6	MS6 (BMS2742)	MS8 (BR1603)			24
	7	MS7 (BMS419)				4
8	MS9 (INRA037)				4	
	MS10 (DIK020)					
	MS11 (BL1134)					
9	MS12 (DIK101)				1	
3,5					1	
3,5,8					1	
4,7					1	
5,6					4	
5,8					1	
6,8					2	
11	1	MS1 (BM827)				1
	2	MS2 (BM716)	MS8 (BMS607)			36
	3	MS3 (BM304)				17
		MS4 (TGLA327)				
	4	MS5 (BMS1716)				8
		MS6 (ILSTS100)				
		MS7 (IDVGA-3)	MS9 (BMS2208)			11
	3,4					1
	4,5					4
	12	1	MS1 (BMS410)			
2		MS2 (TGLA36)				6
		MS3 (IDVGA-57)				
3		MS4 (BMS712)				0
4		MS5 (BM1827)				1
5		MS6 (DIK016)	MS9 (BMS1316)			17
	MS7 (BM4028)					
	MS8 (ILSTS033)				6	
13	1	MS1 (DIK083)				0
	2	MS2 (BMS1742)				0
	3	MS3 (ILSTS077)				0
	4	MS4 (BMS1580)				15
		MS5 (BM4509)				
	5	MS6 (AGLA232)				3
	6	MS7 (DIK093)				16

Table 1 (Continued.)

Chr.	Region	Characterization of sub-chromosomal regions				EST ¹
		Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4	
14	4,5					1
	1	MS1 (<i>BM1508</i>)	MS4 (<i>RM011</i>)			10
	2	MS2 (<i>ILSTS011</i>)				5
	3	MS3 (<i>DIK121</i>)				0
	4	MS5 (<i>BM302</i>)				2
	5	MS6 (<i>RM192</i>)				0
	6	MS7 (<i>BMS947</i>)				1
	7	MS8 (<i>BM4513</i>)				1
	8	MS9 (<i>BM4305</i>)				0
	9	MS10 (<i>BL1036</i>)				12
	10	MS11 (<i>BM6425</i>)				0
15	3,9					1
	1	MS1 (<i>MGTG13B</i>)				18
	2	MS2 (<i>BR3510</i>)				0
	3	MS3 (<i>MB085</i>)				0
	4	MS4 (<i>JAB1</i>)				5
	5	MS5 (<i>MB069</i>)				0
	6	MS6 (<i>BMS2684</i>)				0
	7	MS7 (<i>MB064</i>)				5
	8	MS8 (<i>INRA145</i>)				1
	9	MS9 (<i>ILSTS061</i>)				15
	10	MS10 (<i>TGLA75</i>)				0
16	11	MS11 (<i>BMS927</i>)				0
	1,9					1
	1	MS1 (<i>BMS357</i>)				1
	2	MS2 (<i>BM6121</i>)				0
	3	MS3 (<i>BM121</i>)				4
	4	MS4 (<i>BM4025</i>)				2
	5	MS5 (<i>CSSM028</i>)				12
	6	MS6 (<i>IDVGA-69</i>)				22
17	7	MS7 (<i>BMS462</i>)				0
	3,6					2
	1	MS1 (<i>BMS499</i>)				1
	2	MS2 (<i>VH98</i>)				0
	3	MS3 (<i>BMS1510</i>)				0
	4	MS4 (<i>FCB48</i>)				10
	5	MS5 (<i>BM305</i>)				14
18	6	MS6 (<i>BM1862</i>)				26
	5,6	MS7 (<i>BM1233</i>)				1
	1	MS1 (<i>BMS3004</i>)				8
	2	MS2 (<i>BMS2559</i>)				7
	3	MS3 (<i>BR4206</i>)				0
	4	MS4 (<i>INRA121</i>)	MS7 (<i>BM6507</i>)			23
	5	MS5 (<i>BMS2554</i>)				29
19	6	MS6 (<i>BMS833</i>)				0
	2,4,5					2
	2,5					23
	4,5					1
	1	MS1 (<i>BM6000</i>)				9
19	2	MS2 (<i>X82261</i>)				6
	3	MS3 (<i>BP20</i>)				0

Table 1 (Continued.)

Chr.	Region	Characterization of sub-chromosomal regions				EST ¹
		Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4	
20	4	MS4 (BMS2389) MS5 (CSSM065) MS6 (IOBT34) MS7 (RM388) MS8 (BMC1013) MS9 (BMS601)				32
	1	MS1 (BM3517)				0
	2	MS2 (BMS1282)	MS4 (BM713)			13
	3	MS3 (TGLA126)				0
	4	MS5 (BMS2361)				0
	5	MS6 (BMS1120)				0
	6	MS7 (BM5004)				0
	7	MS8 (UWCA26)				3
	21	1	MS1 (BM8115)			
2		MS2 (MB071)	MS4 (UWCA4)			4
3		MS3 (BM103)				11
4		MS5 (TGLA337)				3
5		MS6 (BMS2382)				3
3,4						1
22	3,4,5					6
	4,5					5
	1	MS1 (CSSM026)				0
	2	MS2 (MB116)	MS7 (MB084)			67
	3	MS3 (BM3406) MS4 (BMS2573) MS5 (CSSM41) MS6 (FCB304)				6
23	1	MS1 (CSSM005)				3
	2	MS2 (UWCA1)				7
	3	MS3 (CSPS107)				2
	4	MS4 (RM185)				1
	5	MS5 (CSSM024)				4
	6	MS6 (BM1905)				35
	1,3					1
24	1	MS1 (BL6-1)				1
	2	MS2 (BMS917)				0
	3	MS3 (BM7151)				2
	4	MS4 (CSSM023) MS5 (CSSM031)	MS8 (INRA090)			12
	5	MS6 (BMS1862)	MS9 (BMS3024)			1
	6	MS7 (DIK021)				2
	25	1	MS1 (ILSTS102)			
26	2	MS2 (BM4005)				21
	3	MS3 (BP28)				2
	4	MS4 (BM1864)				0
	1	MS1 (BM7226)				1
	2	MS2 (MB067)				0
26	3	MS3 (BM4505)				3
	4	MS4 (IDVGA-59)				1
	5	MS5 (BM804)				10
	6	MS6 (ILSTS091)				5
	1,5					6

Table 1 (Continued.)

Chr.	Region	Characterization of sub-chromosomal regions				EST ¹	
		Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4		
27	1	MS1 (<i>BM3507</i>)	MS4 (<i>INRA183</i>)	MS6 (<i>INRA134</i>)		3	
		MS2 (<i>TGLA179</i>)		MS7 (<i>BM1857</i>)			
			MS8 (<i>INRA027</i>)	MS9 (<i>BM203</i>)			
	2	MS3 (<i>BM6526</i>)				2	
	3	MS5 (<i>CSSM043</i>)				1	
28	1	MS1 (<i>BMS2060</i>)				5	
	2	MS2 (<i>IDVGA-29</i>)				1	
	3	MS3 (<i>DIK068</i>)				0	
	4	MS4 (<i>IDVGA-43</i>)				8	
	5	MS5 (<i>DIK080</i>)				2	
	6	MS6 (<i>BM7246</i>)				0	
	7	MS7 (<i>MB023</i>)				2	
	8	MS8 (<i>DIK107</i>)				0	
	1,5,8					4	
	1,8					5	
	4,7					2	
29	1	MS1 (<i>BM4602</i>)				0	
	2	MS2 (<i>ILSTS057</i>)				2	
	3	MS3 (<i>ILSTS019</i>)				0	
	4	MS4 (<i>RM179</i>)				51	
			MS5 (<i>HH22</i>)				0
			MS6 (<i>BMC1206</i>)				0
	6	MS7 (<i>ILSTS081</i>)				0	
	3,4					3	
X	1	MS1 (<i>BMS631</i>)				0	
	2	MS2 (<i>BL1098</i>)				1	
	3	MS3 (<i>XB M7</i>)				0	
	4	MS4 (<i>BM4604</i>)				8	
	5	MS5 (<i>XB M11</i>)				1	
	6	MS6 (<i>BR215</i>)				20	
	7	MS7 (<i>BMC6021</i>)				0	
	8	MS8 (<i>XB M24</i>)				0	
	9	MS9 (<i>INRA30</i>)				6	
	5,9					1	
Total	215		279 MS	241 segments		1400	

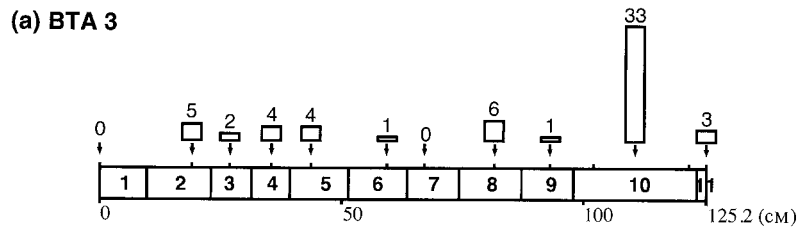
¹Number of expressed sequence tags (ESTs) assigned to each chromosomal region (or regions). Most likely location is shown. ESTs that were linked to more than two regions on the same chromosome with the highest correlation value are shown separately.

²MS1, MS2 and MS3 are microsatellite markers as ordered on the USDA-MARC linkage map. The identity of each microsatellite is shown in parenthesis.

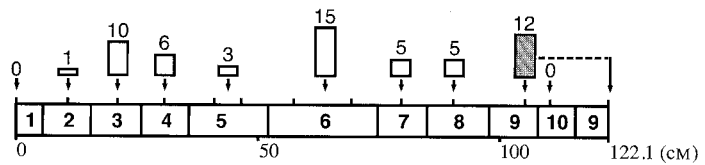
dissected as shown in Fig. 1 and <http://www.silag.or.jp/paper/SCH/bin.html>.

Next, expressed sequence tags (ESTs) were mapped using the marker-characterized SCH panel. PCR primers for EST were designed to target previously produced 3'-ESTs (Takasuga *et al.* 2001) using Primer 3, version 0.9 http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html. To prevent amplification of host DNA present in the hybrid cells, the human and mouse EST sequences that had the highest sequence identity to the query sequence were put into a mispriming library of Primer 3. The list of primer

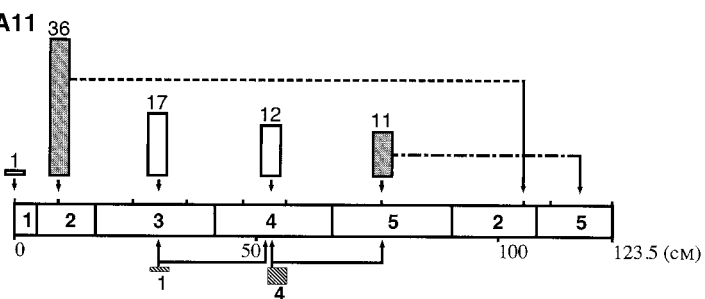
sequences and annealing temperatures is available from <http://www.silag.or.jp/paper/SCH/primer.html>. Among 3826 primer pairs from bovine 3'-ESTs, 2851 (74.5%) gave a specific PCR product on bovine genomic DNA and were submitted to SCH mapping. A correlation value of 0.71 was used as the threshold for the assignment of a marker to a chromosome (Chevalet & Corpet 1986). A total of 1434 ESTs (50.3% of those typed across the SCH panel) were assigned to a specific chromosome. There was some redundancy with more than one EST, derived from some genes ($n = 34$) mapped. The reliability of our mapping



(a) BTA 3



(b) BTA 5



(c) BTA11

Figure 1 Mapping of bovine expressed sequence tag (EST) with a marker-characterized somatic cell hybrid (SCH) panel to chromosomal regions. The x-axis indicates dissected and numbered chromosomal regions. Each region represents the defined PCR profiles of 279 microsatellite markers in 30 hybrids. The upper bar on the x-axis indicates the genetic position of a microsatellite marker. The number of EST linked to the marker is shown on the box. When two consecutive markers define the same region, the box is located between the markers. Grey boxes indicate how many ESTs are linked to the regions defined by the same PCR profiles of inconsecutive markers. Such a region is composed of more than two segments. Hatched boxes in BTA11 indicate how many EST are similarly linked to two consecutive regions. (a) BTA3, (b) BTA5 and (c) BTA11.

protocols was confirmed by the mapping of such redundant groups of ESTs to single locations. On the contrary, there were 1417 ESTs that could not be assigned to a specific chromosome. This indicates that our EST mapping method with the SCH panel should be improved by the addition of more microsatellites in the framework as well as more information on human and mouse orthologs to distinguish a target from pseudogenes or family genes. The ESTs assigned in this study include 97 genes that had been mapped in previous studies (BOVMAP database (<http://www.locus.jouy.inra.fr/>)) and 1303 newly assigned. Thus, the total number of bovine genes assigned to specific chromosomes has been increased to 2779, including 36 genes from the major histocompatibility complex region (BOVMAP database (<http://www.locus.jouy.inra.fr/>)). The number of mapped ESTs per genetic length was high in BTA18, 22, and 29. The BTA18 was predicted to be gene-rich in a previous report (Band *et al.* 2000), consistent with the fact that BTA18 shares homology with HSA19, the most gene-rich chromosome in humans (International Human Gene Sequencing Consortium 2001; Venter *et al.* 2001).

Fifty-nine ESTs were mapped to chromosome 3 (BTA3), with each EST assigned to one of the 11 sub-chromosomal regions (Fig. 1a). In contrast, of the 57 ESTs mapped to BTA5, 12 were assigned to region 9 which corresponds to two non-contiguous segments, as defined by the mapping of

microsatellites in the SCH panel (Fig. 1b). The BTA11 was composed of seven chromosomal segments in which neither the second and the sixth nor the fifth and seventh can be distinguished on the basis of SCH PCR profiles for microsatellites selected from contiguous regions on the BTA11 linkage map. Thus, the scope for sub-chromosomal assignments of ESTs on BTA11 is limited (Fig. 1c). A total of 854 ESTs (61%) among 1400 were located to 1 of 192 unique regions. The list of the ESTs assigned in this study is available at <http://www.siang.or.jp/paper/SCH/primer.html>. The mapping data for 1400 ESTs as well as human and mouse comparative data will facilitate the construction of a comprehensive bovine physical map.

Acknowledgements

We wish to thank our technical staff for excellent assistance and Ryohta Etoh for data management. This study was supported by grants from the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

References

Band M.R., Larson J.H., Rebeiz M. *et al.* (2000) An ordered comparative map of the cattle and human genomes. *Genome Research* 10, 1359–68.

- Barendse W., Vaiman D., Kemp S.J., *et al.* (1997) A medium-density genetic map of the bovine genome. *Mammalian Genome* **8**, 21–8.
- Chevalet C. & Corpet F. (1986) Statistical decision rules concerning synteny or independence between markers. *Cytogenetics and Cell Genetics* **43**, 132–9.
- Heuertz S. & Hors-Cayla M.-C. (1981) Cattle gene mapping by somatic cell hybridization study of 17 enzyme markers. *Cytogenetics and Cell Genetics* **30**, 137–45.
- International Human Gene Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921.
- Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., McGraw R.A., Sonstegard T.S., Smith T.P.L., Lopez-Corrales N.L. & Beattie C.W. (1997) A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research* **7**, 235–49.
- Konfortov B.A., Jorgensen C.B., Miller J.R. & Tucker E.M. (1998) Characterization of a bovine/murine hybrid cell panel informative for all bovine autosomes. *Animal Genetics* **29**, 302–6.
- Takasuga A., Hirotsune S., Itoh R., Jitohzono A., Suzuki H., Aso H. & Sugimoto Y. (2001) Establishment of a high throughput EST sequencing system using poly(A) tail-removed cDNA libraries and determination of 36000 bovine ESTs. *Nucleic Acids Research* **29**, e108.
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., *et al.* (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304–51.
- Williams J.L., Eggen A., Ferretti L. *et al.* (2002) A bovine whole-genome radiation hybrid panel and outline map. *Mammalian Genome* **13**, 469–74.
- Womack J.E. & Moll Y.D. (1986) Gene map of the cow: conservation of linkage with mouse and human. *Journal of Heredity* **77**, 2–7.

Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a Meishan × Duroc F2 resource population

S. Sato^{*1}, Y. Oyamada^{*}, K. Atsuji^{*}, T. Nade^{*}, Shin-ichi Sato^{*}, E. Kobayashi^{*},
T. Mitsuhashi^{**2}, K. Nirasawa^{**3}, A. Komatsuda[†], Y. Saito[†],
S. Terai[†], T. Hayashi[‡], and Y. Sugimoto[§]

^{*}National Livestock Breeding Center, Nishigo, Fukushima 961-8511, Japan; [†]Ibaraki Branch of National Livestock Breeding Center, Fujigaya, Ibaraki 308-0112, Japan; [‡]National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-0901, Japan; and [§]Shirakawa Institute of Animal Genetics, Nishigo, Fukushima 961-8061, Japan

ABSTRACT: We constructed a pig F2 resource population by crossing a Meishan sow and a Duroc boar to locate economically important trait loci. The F2 generation was composed of 865 animals (450 males and 415 females) from four F1 males and 24 F1 females and was genotyped for 180 informative microsatellite markers spanning 2,263.6 cM of the whole pig genome. Results of the genome scan showed evidence for significant quantitative trait loci (<1% genomewide error rate) affecting weight at 30 d and average daily gain on *Sus scrofa* chromosome (SSC) 6, carcass yield on SSC 7, backfat thickness on SSC 7 and SSC X, vertebra number on SSC 1 and SSC 7, loin muscle area on SSC 1 and SSC 7, moisture on SSC 13, intramuscular fat con-

tent on SSC 7, and testicular weight on SSC 3 and SSC X. Moreover, 5% genomewide significant QTL were found for birth weight on SSC 7, average daily gain on SSC 4, carcass length on SSC 6, SSC 7, and SSC X and lightness (L value) on SSC 3. We identified 38 QTL for 28 traits at the 5% genomewide level. Of the 38 QTL, 24 QTL for 17 traits were significant at the 1% genomewide level. Analysis of marker genotypes supported the breed of origin results and provided further evidence that a suggestive QTL for circumference of cannon bone also was segregating within the Meishan parent. We identified genomic regions related with growth and meat quality traits. Fine mapping will be required for their application in introgression programs and gene cloning.

Key Words: Growth, Linkage Analysis, Meat Quality, Pigs, Quantitative Trait Loci

©2003 American Society of Animal Science. All rights reserved.

J. Anim. Sci. 2003. 81:2938–2949

Introduction

Quantitative trait loci affecting economically important traits of livestock are of great interest. Several recent studies reported the location of QTL regions on a variety of pig chromosomes. Andersson et al. (1994) first reported a cluster of loci affecting growth and fatness on *Sus scrofa* chromosome (SSC) 4 in wild boar and Large White pigs. A more detailed whole-genome scan of the same population identified more QTL (Knott et al., 1998). Marklund et al. (1999) confirmed the pres-

ence of QTL with major effects on growth and fatness on SSC 4 by backcrossing.

We generated an F2 resource population from a cross between a Meishan female and a Duroc male in order to map loci affecting economically important traits. Duroc boars are extensively used in terminal crosses as sires for the production of pork meat with improved meat quality in Japan because the Duroc breed is characterized by high meat quality and large muscle mass. Meishan, characterized by large litter size, differ from commercial breeds in many respects, including genetic characters. These two breeds exhibit large differences not only in growth performance, carcass composition, and meat quality, but also in reproductive traits. Therefore, we selected Meishan and Duroc breeds as parents for a resource population to detect QTL affecting growth, carcass and reproductive traits in pig and to obtain information and tools for breeding programs, such as marker-assisted introgression. We report porcine QTL results for 48 traits, including carcass traits and meat quality.

¹Correspondence: Odakura (phone: 81-248-25-6165; fax: 81-248-25-3990; E-mail: s0sato@nlbc.go.jp).

²Present address: National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-0901, Japan.

³Present address: Ibaraki Prefectural Livestock Research Center, Yasato, Ibaraki, 315-0132, Japan.

Received February 27, 2003.

Accepted August 20, 2003.

Table 1. Performance, growth, carcass composition, and meat quality traits of F2 animals from an intercross of F1 derived from a Meishan sow and Duroc boar

Trait	n	Avg	SD	Minimum	Maximum
Testicular wt					
Right, g	449	9.10	3.31	1.57	23.32
Left, g	449	9.54	3.32	1.62	24.01
Total, g	449	18.64	6.51	3.19	46.31
Growth					
Birth wt, kg	864	1.07	0.17	0.50	1.65
Weight at 3 wk, kg	859	4.51	0.89	1.62	8.00
Weight at 30 d, kg	859	6.90	1.50	1.14	10.90
Weight at 60 d, kg	292	18.40	3.28	7.00	27.70
Day at 30 kg body wt, d	165	80.42	5.71	65	107
Day at 90 kg body wt, d	165	164.10	16.29	133	226
Days from 30 to 90 kg body wt, d	165	83.67	14.18	57	146
Daily gain from 30 to 90 kg body wt, g/d	165	734.4	106.7	421.2	1,026.3
Slaughter wt, kg	165	86.36	1.83	82.0	91.2
Body length at slaughter, cm	165	108.00	4.97	95.0	122.7
Body size					
Circumference of chest, cm	165	100.91	3.06	93.5	112.0
Circumference of cannon bone, cm	165	15.30	0.89	13.8	18.0
Height at withers, cm	165	61.09	2.95	52.2	70.8
Chest depth, cm	165	34.27	1.53	25.7	37.8
Chest width, cm	165	27.43	1.84	22.0	38.0
Carcass measurements					
Carcass wt, kg	165	64.54	1.93	60.0	69.3
Carcass yield, %	165	74.74	1.59	69.2	78.3
Carcass length					
I, cm	165	86.46	4.22	74.0	98.5
II, cm	165	72.28	3.24	65.8	82.0
III, cm	165	62.52	3.20	55.3	72.0
Carcass thickness, cm	165	34.08	1.22	31.1	38.0
Vertebra number					
Thoracic	165	14.84	0.62	14	16
Lumbar	165	5.68	0.54	5	7
Total	165	20.52	0.70	19	22
Subcutaneous fat thickness					
Shoulder, cm	165	5.57	0.78	3.0	7.5
Back, cm	165	3.15	0.67	1.6	5.2
Loin, cm	165	4.33	0.72	2.3	6.8
Avg, cm	165	4.35	0.65	2.63	5.87
Forebelly, cm	165	2.87	0.56	1.3	4.5
Middle belly, cm	165	2.20	0.49	1.0	3.4
Hind belly, cm	165	3.57	0.61	1.8	4.8
Avg, cm	165	2.88	0.40	1.93	3.80
Longissimus muscle					
Length, cm	165	52.30	2.91	45.0	60.5
Loin muscle area					
at 4–5 rib, cm ²	165	10.65	1.79	6.6	16.4
at the middle, cm ²	165	17.68	2.68	11.7	27.0
Wholesale cuts					
Shoulder and picnic, %	165	31.53	1.63	27.00	35.51
Loin and belly, %	165	42.68	2.07	36.30	48.18
Ham, %	165	25.78	1.29	22.27	29.20
Meat quality					
Redness (a value)	165	9.57	1.14	6.10	12.60
Yellowness (b value)	165	8.73	1.54	6.28	16.09
Lightness (L value)	165	44.25	3.72	29.14	51.57
Cooking loss, %	165	31.09	2.70	22.08	41.39
Shear force value, kg/cm ²	165	41.44	9.94	21.15	71.70
Moisture, %	165	72.16	1.72	61.25	74.89
Intramuscular fat, %	165	5.45	1.95	2.01	11.94

Table 2. Summary of QTL location, genomewide probability, additive and dominance effects

Trait	Genomewise ^a		Location		<i>F</i> -ratio	Additive ^c effect	Dominance ^c effect	Variance explained
	5%	1%	SSC	cM				
Testicular wt								
Right, g	8.6	10.4	3	47.3	10.57**	-1.01	0.56	0.05
			X	77.7	20.26**	-1.02		0.09
Left, g	8.6	10.5	3	47.3	10.53**	-0.99	0.61	0.05
			X	77.7	15.99**	-0.92		0.07
Total, g	8.5	10.4	3	47.3	11.62**	-2.05	1.23	0.05
			X	77.7	19.36**	-1.96		0.09
Growth								
Birth wt, kg	8.6	10.2	7	84.7	10.97*	-0.04	-0.02	0.03
Weight at 30 d, kg	8.5	10.2	6	102.7	16.16**	0.36	-0.20	0.04
Day at 30 kg body wt, d	8.7	10.7	7	70.2	9.27*	2.54	-1.83	0.10
Days from 30 to 90 kg body wt, d	8.9	11.1	6	126.2	9.93*	-6.72	2.61	0.11
Daily gain from 30 to 90 kg body wt, g/d	8.9	10.8	4	81.1	9.62*	3.18	62.66	0.11
			6	116.7	12.65**	49.95	-7.89	0.14
Carcass measurements								
Carcass yield, %	8.8	10.7	7	63.2	13.00**	0.95	-0.07	0.14
Carcass length								
I, cm	8.9	10.8	6	138.2	9.37*	-1.98	1.36	0.10
II, cm	8.9	10.9	X	76.7	10.64*	1.03		0.12
III, cm	8.8	10.8	7	113.3	10.24*	1.51	-0.72	0.11
Vertebra number								
Thoracic	8.8	10.7	7	98.1	70.77**	0.64	0.10	0.47
Lumbar	8.9	10.9	1	132.9	12.54**	0.29	0.04	0.13
Total	8.9	10.8	1	130.9	25.94**	0.48	-0.22	0.24
			7	100.1	35.93**	0.60	-0.02	0.31
Subcutaneous fat thickness								
Shoulder, cm	8.8	10.7	7	56.2	11.45**	0.35	0.24	0.12
Back, cm	8.8	10.9	X	74.6	15.79**	-0.29		0.16
Loin, cm	9.0	11.0	X	73.6	11.54**	-0.27		0.12
Avg, cm	8.9	11.0	7	56.2	11.11**	0.28	0.20	0.12
			X	73.6	14.67**	-0.28		0.15
Middle belly, cm	8.9	10.7	4	30.7	9.35*	-0.16	0.26	0.10
Avg, cm	8.8	10.8	1	63.7	9.38*	0.15	0.15	0.10
Longissimus muscle								
Length, cm	8.9	10.8	1	130.9	14.42**	1.51	-0.50	0.15
			7	111.3	11.20**	1.43	-0.53	0.12
Loin muscle area								
at 4–5 rib, cm ²	8.8	10.7	1	137.9	10.75**	0.93	-0.53	0.12
			7	59.2	15.54**	1.01	-0.46	0.16
at the middle, cm ²	8.8	10.8	7	63.2	9.19*	1.23	-0.61	0.10
Wholesale cuts								
Loin and belly, %	8.8	10.9	8	6.0	9.37*	-0.91	0.89	0.10
Meat quality								
Lightness (L value)	8.8	10.8	3	37.6	10.14*	-0.41	2.43	0.11
Moisture, %	8.5	10.5	7	114.3	10.48*	-0.73	0.68	0.11
			13	112.6	11.04**	-0.74	0.54	0.12
Intramuscular fat, %	8.9	11.0	7	113.3	13.60**	0.95	-0.88	0.14
			9	0	10.75*	0.61	-0.94	0.12

^aGenomewide *F*-statistic thresholds at the 1 and 5% levels determined by permutation test.

^b* and ** = 5 and 1% genomewide significance levels, respectively.

^cAdditive (a) and dominance (d) QTL effects correspond to genotype values of +a, d, and -a for, respectively, individuals having inherited two Duroc alleles, heterozygous, and individuals with two Meishan alleles. Positive additive effects indicate that Duroc alleles increased the trait and negative, that Duroc alleles decreased it. Dominance effects are relative to the mean of two homozygous.

Materials and Methods

Phenotype Measurement

Population. Construction of an F2 resource family and measurement of phenotypes were performed in the Ibaraki Branch of the National Livestock Breeding Center. An F1 generation (27 males, 25 females) was pro-

duced from a Meishan sow and a Duroc boar. A total of 865 progeny (450 males, 415 female) was produced with six farrowings from 4 F1 males and 24 F1 females. The same sows were always mated to the same boars.

Coat Color. Coat color was recorded from six angled photographs taken of each animal, and scored as follows: Class 1 score = gray coat color; Class 2 score = brown coat color; Class 3 score = black; Class a score =

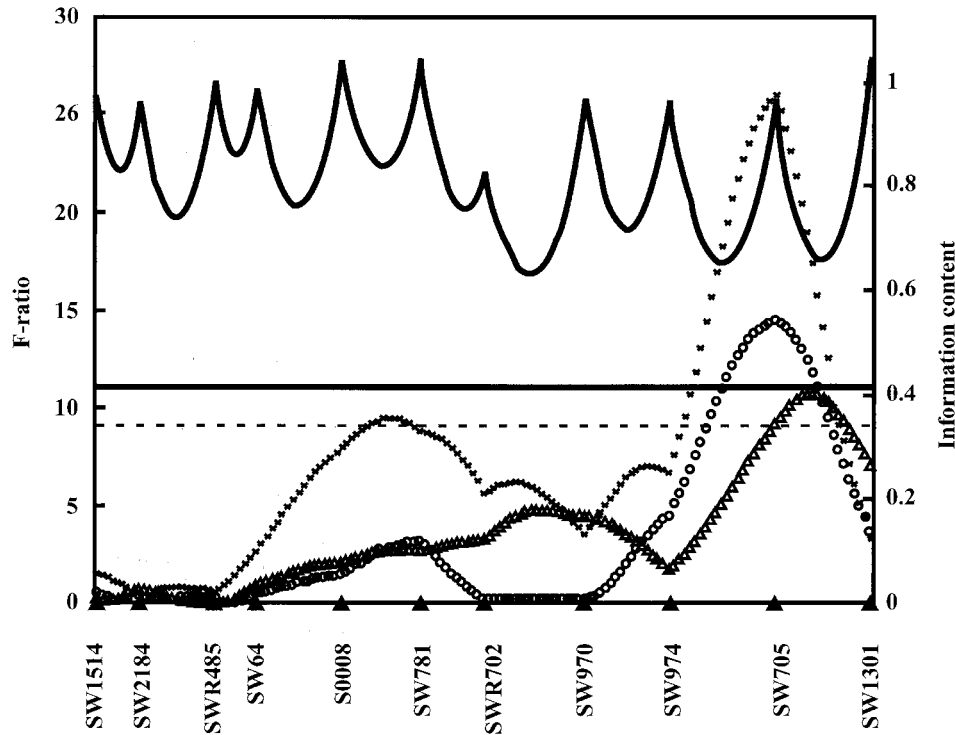


Figure 1. SSC 1. Plot of the F -ratio from multilocus least squares analysis (Haley et al. 1994). The x-axis indicates the relative position in the linkage map. The y-axis represents the F -ratio. Triangles on the x-axis indicate a marker position. Horizontal lines indicate threshold values for genomewide 5% level (dashed line) and genomewide 1% level (solid line). These levels were different for each trait but, for simplicity, values of 9.00 and 11.00, respectively, are indicated. The specific thresholds are in Table 2. Curved lines indicate information content, Δ = loin muscle area 4th to 5th rib, \circ = loin length, and \times = vertebra number.

spotting; Class b score = no spotting. Although coat color is a qualitative trait, we treated it as a quantitative trait for analysis.

Data Collection. Pigs were weighed at birth and at 21, and 30 d of age. From these pigs, 292 were weighed at 60 d of age. Testicular weights were recorded from F2 males that were castrated at 2 mo of age. Among the castrated males, 165 were raised until they obtained a body weight of 90 kg. Average daily gain was calculated between 30-kg and 90-kg body weights. These males were slaughtered at a live weight of approximately 90 kg. At slaughter, these males were recorded for body weight, size, and length, including the circumference of the chest and cannon bone, the height at the withers, and the chest depth and width. Carcasses were scalded and dehaired, and chilled overnight. Then carcass measurements were recorded for weight; lengths I, II, and III; thickness; and vertebra number. Carcass lengths I, II, and III refer to the lengths from the first cervical to the pubic bone, from the first rib to the pubic bone, and from the first rib to last lumbar vertebra, respectively. Depth of backfat over the midline was recorded at the first rib (shoulder), the thinnest depth at ribs (back), and the first lumbar vertebra (loin) with

a ruler. Depth of belly over the midline was recorded at the last rib (forebelly), at the diaphragm (middle belly), and at the last lumbar vertebra (hind belly). One side of the carcass was split between the 4th and 5th ribs, last rib, and the first lumbar vertebra (at the middle); the longissimus muscle was traced on acetate paper, and the area was determined using computerized morphometric planimetry. The remaining side was then weighed and cut into the major wholesale cuts. The weight of each wholesale cut was recorded. Intramuscular fat (**IMF**) content was measured as described by Gerbens et al. (1999). After minced meat was dried by heating to 102°C for 24 h in a drying oven, moisture was calculated from weights taken before and after drying and was expressed as a percentage. Objective measurements of meat color were taken with a color meter, model ZE 2000 (Nippon Denshoku Industries Co., Tokyo, Japan); L values measure light reflectance, a values represent the degree of redness, and b values represent the degree of yellowness. Cooking loss and shear force were measured as described by Hovenier et al. (1992).

Table 1 summarizes the data of 48 traits, including ADG, vertebra number, backfat thickness (**BFT**), and

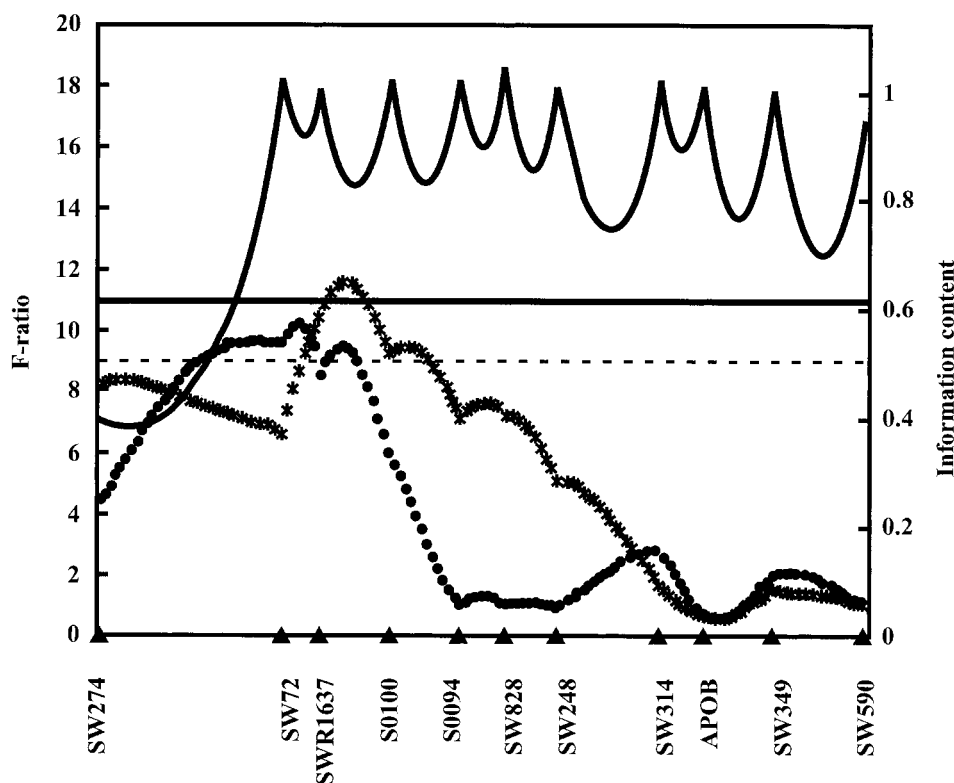


Figure 2. SSC 3. Plot of the F -ratio from multilocus least squares analysis (Haley et al. 1994). The x-axis indicates the relative position in the linkage map. The y-axis represents the F -ratio. Triangles on the x-axis indicate a marker position. Horizontal lines indicate threshold values for genomewide 5% level (dashed line) and genomewide 1% level (solid line). These levels were different for each trait but, for simplicity, values of 9.00 and 11.00, respectively, are indicated. The specific thresholds are in Table 2. Curved lines indicate information content, ● = lightness (L value) and * = testicular weight.

IMF. Because the 165 F₂ males were produced in three independent groups and in different parities, possible phenotypic differences derived from groups and parities were corrected for using the mixed-model least squares, maximum-likelihood computer program described by Harvey (1977).

Genotyping

The DNA was extracted from blood using an automatic extraction machine (Kurabo, Osaka, Japan), and the DNA concentration was adjusted to 20 ng/ μ L. Polymerase chain reaction primers for microsatellite markers were labeled with fluorescent dyes: 6-FAM, HEX, and TET (Perkin-Elmer, Foster City, CA). The PCR was performed in a total volume of 15 μ L containing 20 ng of genomic DNA, 6.25 pmol of each primer, 0.2 mM each dNTP, 10 mM tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, and 0.375 U of recombinant Taq polymerase (Takara, Kyoto, Japan). Reaction mixtures were denatured at 94°C for 4 min, cycled 30 times (94°C for 30 s, 55°C or 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s), and incubated at 72°C for 5 min. The PCR product sizes

were measured using an ABI 377 sequencer and analyzed by Genescan software and Genotyper software (Perkin-Elmer).

Linkage Analysis

Linkage maps were constructed using CRI-MAP (Green et al., 1990) for 18 autosomes and the sex chromosome. The sex-averaged map was used for the whole-genome scan of QTL. The information content was calculated using the method described by Knott et al. (1998). When a given location belonged to a pseudoautosomal region of a sex chromosome, analyses were performed using the same method as for autosomes. For testing QTL in sex-specific regions of the sex chromosome, the analysis model was modified as described by Knott et al. (1998). We assumed that the Y chromosome contained no loci. A test statistic for detecting QTL and the threshold was constructed as for autosomes.

A QTL analysis for each trait was performed using the method developed by Haley et al. (1994). The statistical model in the method is based on a linear regression of phenotypes on the probabilities of QTL genotypes at

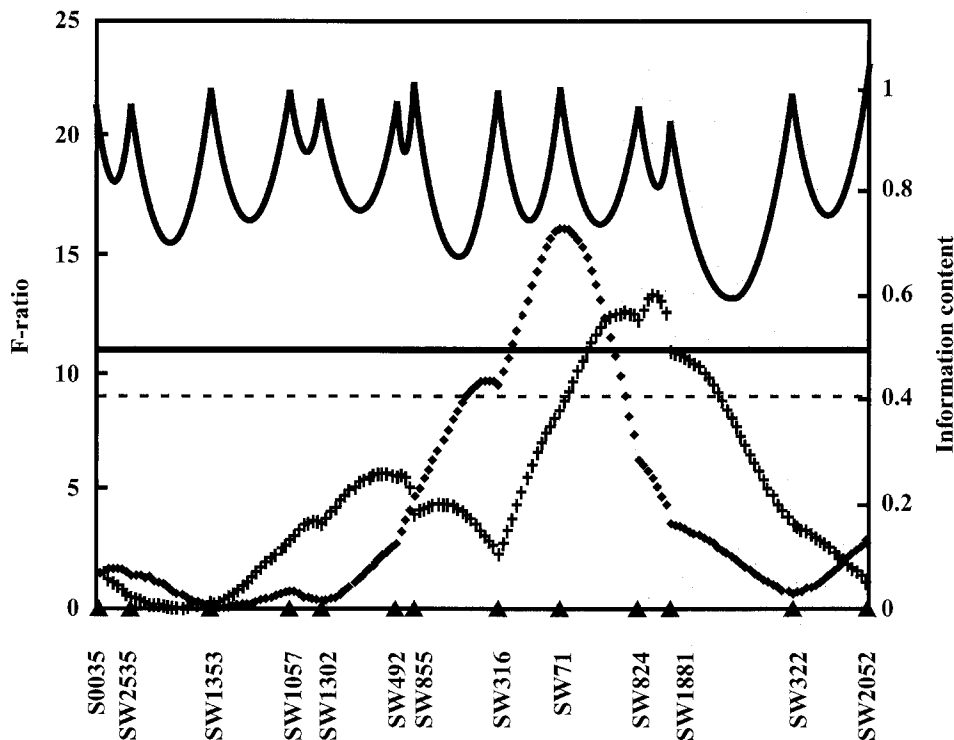


Figure 3. SSC 6. Plot of the *F*-ratio from multilocus least squares analysis (Haley et al. 1994). The x-axis indicates the relative position in the linkage map. The y-axis represents the *F*-ratio. Triangles on the x-axis indicate a marker position. Horizontal lines indicate threshold values for genomewide 5% level (dashed line) and genomewide 1% level (solid line). These levels were different for each trait but, for simplicity, values of 9.00 and 11.00, respectively, are indicated. The specific thresholds are in Table 2. Curved lines indicate information content, ♦ = 30-d weight and + = ADG.

a given location. We assumed that the grandparental breeds were fixed for alternative alleles at a QTL. Two alleles at a putative QTL at a given location were denoted by *Q* and *q*. Probabilities of QTL genotypes, denoted by Prob(*QQ*), Prob(*Qq*), and Prob(*qq*), were calculated from the observed genotypes of markers linked to the QTL. The calculation was described by Haley et al. (1994). In the analyses of real data, sex difference was taken into account.

There are three possible genotypes, *QQ*, *Qq*, and *qq*, for a QTL at the given location on an autosome. Let the effects of genotypes *QQ*, *Qq*, and *qq* be denoted by *a*, *d*, and $-a$. We assume that phenotypic value of a trait is written for the *i*th individual in F2 as follows:

$$y_i = \mu + s_i h + c_{ai} a + c_{di} d + e_i$$

where μ is the mean; s_i is the indicator of the sex of individual *i*, which is equal to 1 or -1 for male or female, respectively; *h* is a sex effect; c_{ai} is the coefficient for the additive component for individual *i* at the given location that is calculated from the probability of QTL genotypes, and equal to Prob(*QQ*) - Prob(*qq*); c_{di} is the coefficient for the dominance component for individual

i at the given location, which is equal to Prob(*Qq*); and e_i is the residual error. Model parameters, μ , *h*, *a*, and *d*, are estimated by a least squares method. That is, estimators of the parameters are obtained such that a sum of squares,

$$S = \sum_{i=1}^n (y_i - \mu - s_i h - c_{ai} a - c_{di} d)^2$$

is minimized, where *n* is the number of individuals of F2. Denoting least squares estimators of μ , *h*, *a*, and *d*, by the terms $\hat{\mu}$, \hat{h} , \hat{a} , and \hat{d} , the minimum sum of squares is obtained as

$$S_1 = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{\mu} - s_i \hat{h} - c_{ai} \hat{a} - c_{di} \hat{d})^2$$

Under the null model corresponding to no QTL, where $a = d = 0$ is assumed, the minimum sum of squares is denoted by S_0 . Significance detection of QTL is declared based on the ratio of S_1 and S_0 . In this report, we used *F*-ratio, $[(S_0 - S_1)/2]/[S_1/(n - 2)]$, as a statistic for detecting QTL. Significance thresholds were obtained with 10,000 repeated permutation test cycles for each trait.

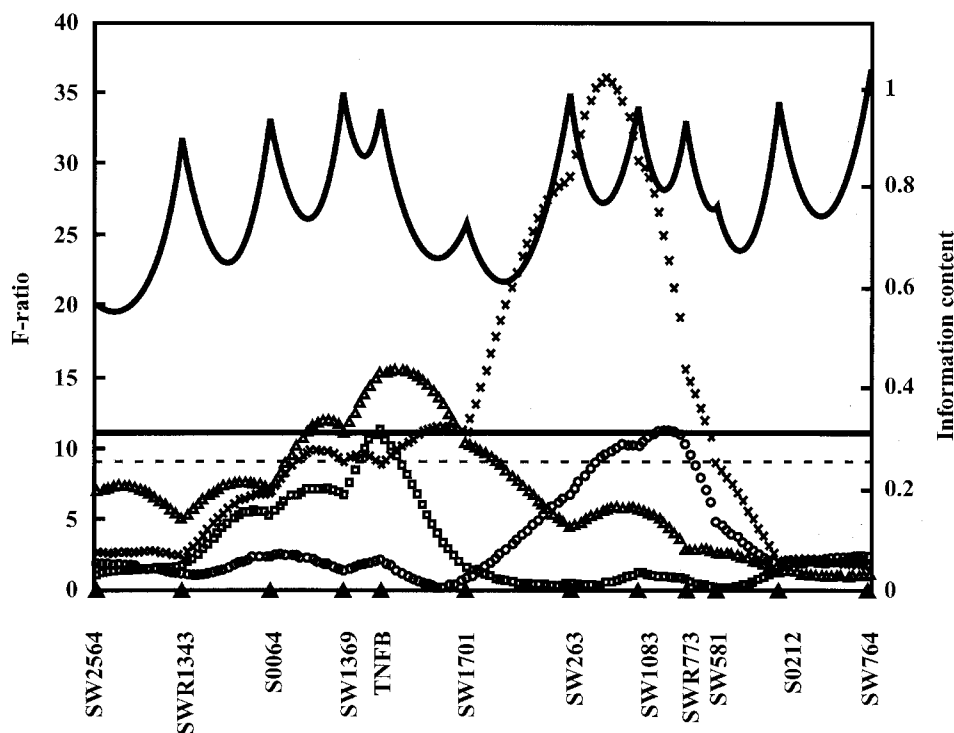


Figure 4. SSC 7. Plot of the F -ratio from multilocus least squares analysis (Haley et al. 1994). The x-axis indicates the relative position in the linkage map. The y-axis represents the F -ratio. Triangles on the x-axis indicate a marker position. Horizontal lines indicate threshold values for genomewide 5% level (dashed line) and genomewide 1% level (solid line). These levels were different for each trait but, for simplicity, values of 9.00 and 11.00, respectively, are indicated. The specific thresholds are in Table 2. Curved lines indicate information content, \square = backfat thickness, Δ = loin muscle area 4th to 5th rib, \circ = loin length, and \times = vertebra number.

In chromosomal regions exceeding the suggestive and significance level on some QTL, P -values of the nearby markers were computed by SAS-GLM (SAS Inst. Inc., Cary, NC). When two parents have more than two marker alleles, an analysis of the individual marker genotypes will efficiently detect the associations of the different alleles in one or both breeds with specific traits. Phenotypic difference among genotypes of nearby markers was estimated with SAS-GLM. The number of marker genotypes was different depending on the genotypes of the parents. This analysis of variance supported results of QTL analysis and estimated within-breed allele effects rather than between-breed allele effects.

Linkage Map

We searched for informative microsatellites from the USDA-MARC linkage map (Rohrer et al., 1996) and selected 180 microsatellites at approximately 20-cM intervals in the whole pig genome. The 180 microsatellites were genotyped across parents, 28 F1, and 865 F2 animals. A sex-averaged linkage map was constructed with multipoint analysis. The order of the markers was the same as in the USDA-MARC linkage map (Rohrer et

al., 1996). The average interval was 12.6 cM, and the total length was 2,263.6 cM, which was comparable to that of the USDA-MARC linkage map (Rohrer et al., 1996). Two large gaps existed between SW274 and SW72 on SSC 3 (34.6 cM) and SW949 and SW980 on SSC X (40.7 cM). The average information content was 0.80.

As this F2 population consisted of only full-sib families, each genotype was checked for segregation distortion. To confirm the presence of a lethal allele, we examined whether the segregation ratio at each marker fit with mendelian ratios 1:2:1, Duroc homozygous, heterozygous, and Meishan homozygous, respectively, by chi-squared test.

Results and Discussion

Population

Although we constructed a pig F2 resource population by crossing only a Meishan sow and a Duroc boar, the genotypes (Duroc homozygous, heterozygous, and Meishan homozygous) segregated in a ratio of 1:2:1 at 159 markers on autosomes. Another 11 markers had segregation distortion ($P < 0.05$). However, adjacent marker

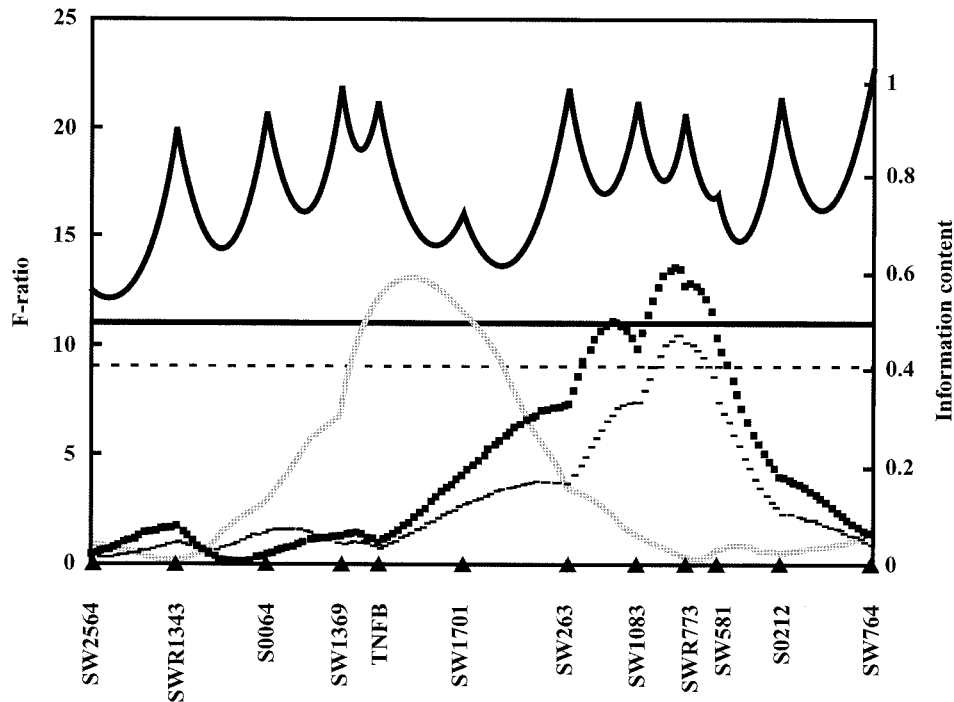


Figure 5. SSC 7. Plot of the F -ratio from multilocus least squares analysis (Haley et al. 1994). The x-axis indicates the relative position in the linkage map. The y-axis represents the F -ratio. Triangles on the x-axis indicate a marker position. Horizontal lines indicate threshold values for genomewide 5% level (dashed line) and genomewide 1% level (solid line). These levels were different for each trait but, for simplicity, values of 9.00 and 11.00, respectively, are indicated. The specific thresholds are in Table 2. Curved lines indicate information content, ■ = IMF %, — = moisture%, and bold line = carcass yield.

information indicated that this F2 population did not have lethal alleles. This mating made linkage analysis simple and results easily understood.

Mapping of Coat Color Traits

The F2 animals exhibited coat colors of black ($n = 373$), brown ($n = 383$), and gray ($n = 109$). Several brown and gray pigs had black spotting (spotting, $n = 289$; no spotting, $n = 576$). The regions associated with coat color were mapped on SSC 1 (107.7 cM) at an F -ratio of 28.2 and SSC 6 (1 cM) at an F -ratio of 122.0. The spotting region was also mapped on SSC 6 (2 cM) with an F ratio of 111.7. The locus on SSC 1 was not previously reported. On SSC 6, the genotypes of marker S0035 at the coat color and the spotting loci were tightly linked to black and brown coat color and spotting. Because the *melanocortin-1 receptor (MC1R)* gene was mapped on the SSC 6 telomeric region (Mariani et al., 1996) and the mutations were associated with pig coat color and spotting (Kijas et al., 1998, 2001), partial *MC1R* was amplified by PCR using genomic DNA from F1 and F2 pigs, and sequenced. We confirmed a previous report that Duroc and Meishan pigs are homozygous for *MC1R**4 and heterozygous for *MC1R**2/3 (Ki-

jas et al., 1998), respectively, suggesting that the *MC1R* gene is responsible for coat color and spotting on SSC 6.

QTL Mapping Results

The QTL mapping results are summarized in Table 2. We identified 38 QTL for 28 traits at the 5% genomewide level. Of the 38 QTL, 24 QTL for 17 traits were significant at the 1% genomewide level. The significant QTL are presented in Figures 1 through 7 in detail. Some of the detected QTL replicated previous findings.

We mapped significant QTL for 2-mo testicular weight on SSC 3 (Figure 2) and SSC X (Figure 7). Our results show that males with Meishan alleles at each QTL had larger testicular weight than males with Duroc alleles. The onset of sperm production occurs at a much younger age (56 to 84 d) in Meishans than in conventional boars (120 to 180 d; Lunstra et al., 1997). Ford et al. (2001) have reported mapping a QTL for 220-d testicular size on SSC X using a Meishan \times White composite crossbred population. Boars with Meishan alleles at SSC X QTL had smaller testicles than boars with White composite alleles. Therefore, our results for testicular weight at 2 mo of age support the Lunstra et al. (1997) report and are not inconsistent with the

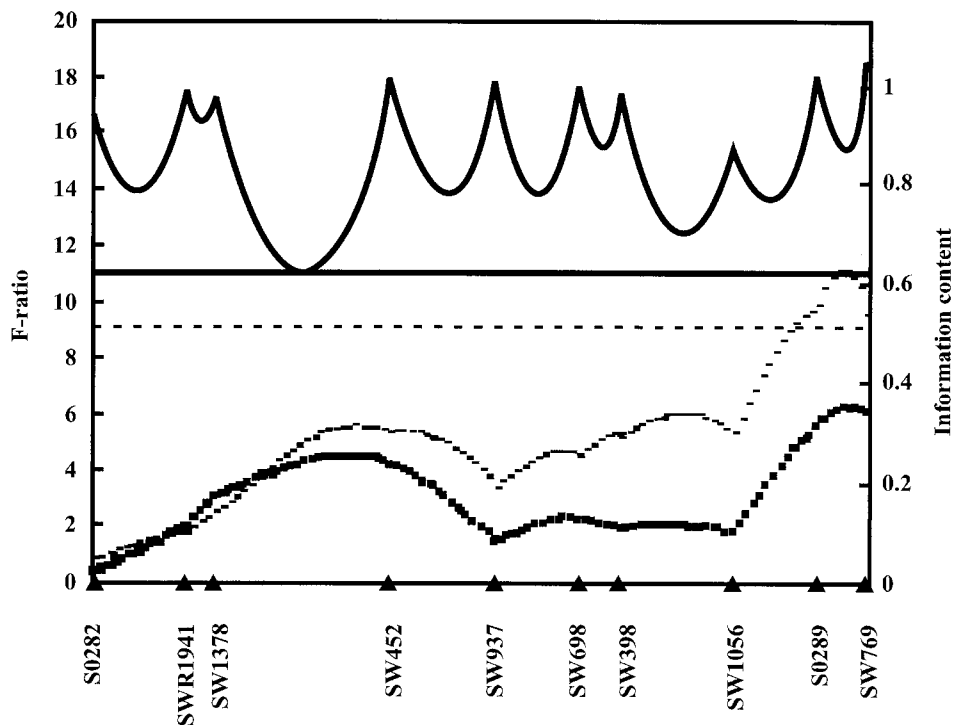


Figure 6. SSC 13. Plot of the F -ratio from multilocus least squares analysis (Haley et al. 1994). The x-axis indicates the relative position in the linkage map. The y-axis represents the F -ratio. Triangles on the x-axis indicate a marker position. Horizontal lines indicate threshold values for genomewide 5% level (dashed line) and genomewide 1% level (solid line). These levels were different for each trait but, for simplicity, values of 9.00 and 11.00, respectively, are indicated. The specific thresholds are in Table 2. Curved lines indicate information content, ■ = IMF % and — = moisture%.

result of Ford et al. (2001). The *androgen receptor* (*AR*) gene was mapped to the same region of SSC X (Seifert et al., 1999), and testicular weight in *AR*-knockout mice was 80% smaller than wild type mice (Yeh et al., 2002). The location of the QTL on SSC X corresponds to human chromosome Xp11.23-21 and the distal end of mouse chromosome Xp, where mouse *Ihtw1* (*Interspecific hybrid testis weight 1*), one of the loci responsible for testicular weight, was mapped (Elliott et al., 2001). Although the two genes were located near the testicular weight QTL, there could be additional genes affecting testicular weight on SSC X.

We located a significant QTL for birth weight on SSC 7 (Figure 4) and QTL for 30-d weight and ADG (from 30 to 90 kg) on SSC 6 (Figure 3). A potential QTL for ADG was detected on SSC 4, and almost the same region was previously characterized as a QTL affecting growth rates between weaning and 70 kg (Knott et al., 1998) and between weaning and 35 to 56 kg (Paszek et al., 1999). Growth-related QTL other than on SSC 4 that were reported previously, however, were not detected in the present study. On SSC 4, large overdominance effects detected in this study may be due to two QTL linked in repulsion or the negative effect of homozygotes at this QTL. The unique effect at this QTL in

our family will provide good information on the role of genes responsible for growth traits. The overdominance effect at this QTL needs to be investigated further. Understanding this QTL based on molecular genetics may aid our understanding of the heterosis effect.

For carcass traits, significant QTL affecting vertebra number were located on SSC 1 and SSC 7 as shown in Figures 1 and 4. At the same regions on SSC 1, we detected QTL for loin length and loin area (Figure 1). Rohrer and Keele (1998a) and Wada et al. (2000) reported QTL for carcass length and vertebra number on the corresponding region of SSC 1, suggesting that a vertebra number QTL could be important for carcass length. A potential QTL was mapped on SSC 6 for carcass length (Table 2) and probably replicated the carcass length QTL on SSC 6 (P -value < 0.01) reported by Paszek et al. (2001). We confirmed the presence of a BFT QTL reported previously on SSC 7 (Rohrer and Keele, 1998a; de Koning et al., 1999; Wada et al., 2000; Malek et al., 2001b) and on SSC X (Knott et al., 1998; Rohrer and Keele, 1998a). Near the BFT QTL on SSC 7, we located a significant QTL for carcass yield and loin muscle area.

For meat quality, we located a significant QTL for IMF on SSC 7, where a potential QTL for muscle mois-

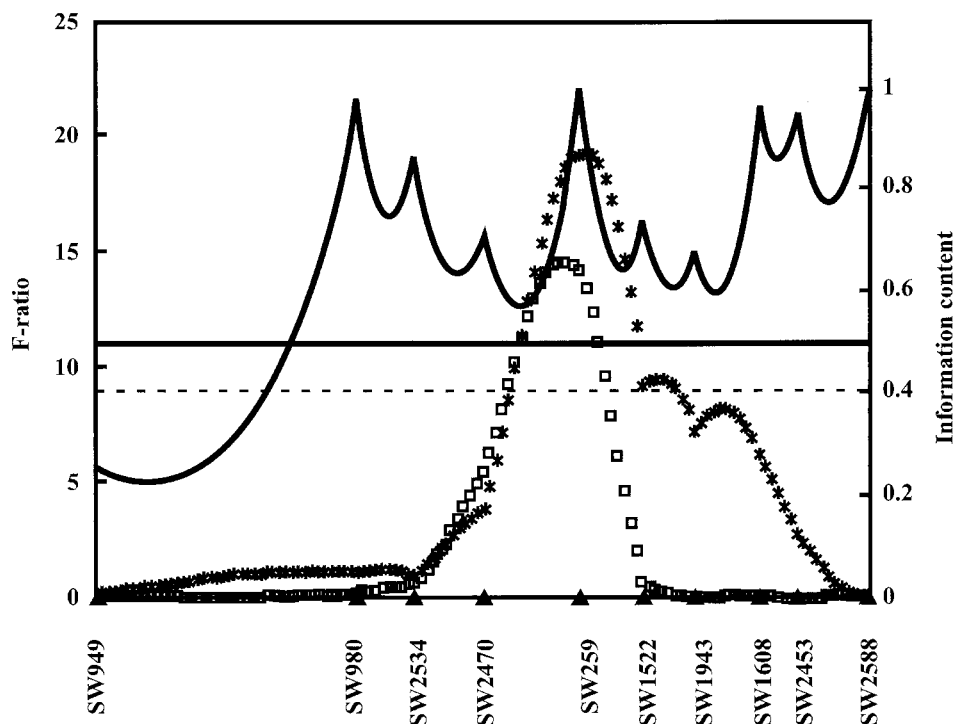


Figure 7. SSC X. Plot of the F -ratio from multilocus least squares analysis (Haley et al. 1994). The x-axis indicates the relative position in the linkage map. The y-axis represents the F -ratio. Triangles on the x-axis indicate a marker position. Horizontal lines indicate threshold values for genomewide 5% level (dashed line) and genomewide 1% level (solid line). These levels were different for each trait but, for simplicity, values of 9.00 and 11.00, respectively, are indicated. The specific thresholds are in Table 2. Curved lines indicate information content, \square = backfat thickness and * = testicular weight.

ture was detected (Figure 5). In addition, we located both IMF and muscle moisture QTL at the same regions of SSC 9 (near SW983) and SSC 13 (near S0289; Figure 6). On the SSC 9 QTL, the F -ratios were 10.75 for IMF and 5.18 for muscle moisture. On the SSC 13 QTL, F -ratios were 6.20 for IMF and 11.04 for muscle moisture. Paszek et al. (2001) mapped both QTL on the same region of SSC 6. Whether IMF is directly associated with muscle moisture is not known. *Uncoupling proteins 2 and 3 (UCP2 and UCP3)*, which are mitochondrial membrane transporters involved in thermogenesis, were mapped to SSC 9p21-p24 (Werner et al., 1999). Because *UCP2* is associated with hyperinsulinemia and obesity in mouse and human (Fleury et al., 1997), *UCP2* and *UCP3* might affect lipid metabolism related to porcine IMF phenotypes.

The results ($P < 0.05$) from analysis of variance based on allele sizes for 22 QTL for 17 traits are shown in Table 3. The genomewide suggestive ($P < 0.10$) QTL for circumference of cannon bone had the highest P -value based on analysis of allele sizes. This QTL was mapped at 56.2 cM on SSC 7 with an F -ratio of 8.5, and the P -value of the nearby marker SW1856 was 9.51×10^{-17} (Table 3). Most of F2 animals that inherited allele 1 from Meishan had larger circumferences of cannon

bone. The Meishan population may have genes that affect the circumference of the cannon bone near this marker.

In this study, we detected 24 QTL for 17 traits at the 1% genomewide level. Although crosses with a Meishan breed have been used for detection of QTL by whole-genome scan (de Koning et al., 1999; Paszek et al., 1999; Rohrer and Keele, 1998a,b; Jeon et al., 1999; Wada et al., 2000), we detected more QTL at the 1% genomewide level in this study than previously reported. First, our F2 resource family had a simple structure, with a single boar and sow as founding parents. Second, we genotyped 180 microsatellite markers across 865 F2 offspring, resulting in a high information content of 0.80 in the pig linkage map. These two factors facilitate performing a reliable linkage analysis. Finally, we analyzed a comprehensive set of pig traits, including performance, growth, body size, and carcass and meat quality (Table 1).

Our results identified the presence of several previously identified QTL, such as for testicular weight on SSC X (Ford et al., 2001), growth on SSC 4 (Knott et al., 1998; Paszek et al., 1999), vertebra number on SSC 1 (Wada et al., 2000), and BFT on SSC 7 (Rohrer and Keele, 1998a; de Koning et al., 1999; Wada et al., 2000;

Table 3. Results from analysis of alleles sizes

Trait	SSC	Marker	Alleles ^a	P-value
Testicular wt				
Total	3	SWR1637	2/3, 1/3	< 0.001
	3	S0100	2/2, 1/3	< 0.001
Growth				
Birth wt	7	SJ047	1/3, 1/2	0.002
Weight at 30 d	6	SW71	1/1, 2/2	< 0.001
Daily gain from 30 to 90 kg body wt	6	SW1881	2/3, 1/1	< 0.001
Body size				
Circumference of cannon bone	7	SW1856	3/3, 1/2	< 0.001
Carcass measurements				
Carcass yield	7	TNFB	3/4, 1/2	< 0.001
Carcass length III	7	SWR773	1/1, 2/3	0.005
Vertebra number				
Thoracic	7	SW252	1/1, 2/3	< 0.001
Total	1	SW705	1/1, 2/2	< 0.001
Subcutaneous fat thickness				
Shoulder	7	TNFB	3/4, 1/2	< 0.001
Hind belly	6	SW316	1/4, 2/3	0.011
Longissimus muscle				
Length	1	SW705	1/1, 2/2	< 0.001
Loin muscle area at 4–5 rib	7	TNFB	3/4, 1/2	< 0.001
Wholesale cuts				
Loin and belly	8	SW905	1/3, 2/2	0.004
Meat quality				
Lightness (L value)	3	SW72	2/2, 1/3	< 0.001
Moisture	7	SWR773	1/1, 2/3	< 0.001
	9	SW983	1/4, 2/3	0.011
	13	S0289	2/2, 1/3	0.001
Intramuscular fat	7	SWR773	1/1, 2/3	< 0.001
	9	SW983	1/4, 2/3	0.002
	13	SW769	2/2, 1/3	0.003

^aThe value on the left indicates grandparent Duroc alleles, and the value on the right indicates grandparent Meishan alleles. Allele 1 is the smallest-size allele at marker; Allele 4 is the largest-size allele.

Malek et al., 2001b) and on SSC X (Knott et al., 1998; Rohrer and Keele, 1998a). On the other hand, we detected IMF QTL on SSC 7, SSC 9, and possibly SSC 13, although IMF and marbling have also been mapped on SSC 1 (Malek et al., 2001a) and SSC 2, SSC 4, and SSC 5 (de Koning et al., 1999).

Implications

The findings from this study have provided the basic information on the transmission of porcine quantitative traits. Because quantitative trait loci associated with reproduction, growth, and carcass characters were located at the 1% genomewide level in this study, additional markers are necessary to refine the regions. The refined regions should be tested in more commercial populations to estimate their effects. Several quantitative trait loci replicated in this study could be promising targets for marker-assisted selection.

Literature Cited

- Andersson, L., C. S. Haley, H. Ellegren, S. A. Knott, M. Johansson, K. Andersson, L. Andersson-Eklund, I. Edfors-Lilja, M. Fredholm, I. Hånsson, J. Hakansson, and K. Lundström. 1994. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science* 263:1771–1774.
- De Koning, D. J., L. G. Janss, A. P. Rattink, P. A. M. van Oers, B. J. de Vries, M. A. M. Groenen, J. J. van der Poel, P. N. de Groot, E. W. Brascamp, and J. A. M. van Arendonk. 1999. Detection of quantitative trait loci for back fat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). *Genetics* 152:1679–1690.
- Elliott, R. W., D. R. Miller, R. S. Pearsall, C. Hohman, Y. Zhang, D. Poslinski, D. A. Tabaczynski, and V. M. Chapman. 2001. Genetic analysis of testis weight and fertility in an interspecies hybrid congenic strain for chromosome X. *Mamm. Genome* 12:45–51.
- Fleury, C., M. Neverova, S. Collins, S. Raimbault, O. Champigny, C. Levi-Meyrueis, F. Bouillaud, M. F. Seldin, R. S. Surwit, D. Ricquier, and C. H. Warden. 1997. Uncoupling protein 2: A novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat. Genet.* 15:269–272.
- Ford, J. J., T. H. Wise, D. D. Lunstra, and G. A. Rohrer. 2001. Interrelationships of porcine X and Y chromosomes with pituitary gonadotropins and testicular size. *Biol. Reprod.* 65:906–912.
- Gerbens, F., A. J. M. van Erp, F. L. Harders, F. J. Verburg, T. H. E. Meuwissen, J. H. Veerkamp, and M. F. W. te Pas. 1999. Effect of genetic variants of the heart fatty acid-binding protein gene on intramuscular fat and performance traits in pigs. *J. Anim. Sci.* 77:846–852.
- Green, P., K. Falls, and S. Crooks. 1990. Documentation for CRI-MAP, Version 2.4. Washington University School of Medicine, St. Louis, MO.
- Haley, C. S., S. A. Knott, and J. M. Elsen. 1994. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* 136:1195–1207.
- Harvey, W. R. 1977. User's guide for LSML 76, mixed model least-squares and maximum likelihood computer program. Mimeo. Ohio State Univ. Press, Columbus.

- Hovenier, R., E. Kanis, T. van Asseldonk, and N. G. Westerink. 1992. Genetic parameters of pig meat quality traits in a Halothane negative population. *Livest. Prod. Sci.* 32:309–321.
- Jeon, J.-T., Ö. Carlborg, A. Törnsten, E. Giuffra, V. Amarger, P. Chardon, L. Andersson-Eklund, K. Andersson, I. Hansson, K. Lundström, and L. Andersson. 1999. A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the IGF2 locus. *Nat. Genet.* 21:157–158.
- Kijas, J. M. H., M. Moller, G. Plastow, and L. Andersson. 2001. A frameshift mutation in MC1R and a high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs. *Genetics* 158:779–785.
- Kijas, J. M. H., R. Wales, A. Törnsten, P. Chardon, M. Moller, and L. Andersson. 1998. Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. *Genetics* 150:1177–1185.
- Knott, S. A., L. Marklund, C. S. Haley, K. Andersson, W. Davies, H. Ellegren, M. Fredholm, I. Hansson, B. Hoyheim, K. Lundström, M. Moller, and L. Andersson. 1998. Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and large white pigs. *Genetics* 149:1069–1080.
- Lunstra, D. D., J. J. Ford, J. Klindt, and T. H. Wise. 1997. Physiology of the Meishan boar. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52:181–193.
- Malek, M., J. C. M. Dekkers, H. K. Lee, T. J. Baas, K. Prusa, E. Huff-Lonerger, and M. F. Rothschild. 2001a. A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. *Mamm. Genome* 12:637–645.
- Malek, M., J. C. M. Dekkers, H. K. Lee, T. J. Baas, and M. F. Rothschild. 2001b. A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. I. Growth and body composition. *Mamm. Genome* 12:630–636.
- Mariani, P., M. J. Moller, B. Hoyheim, L. Marklund, W. Davies, H. Ellegren, and L. Andersson. 1996. The extension coat color locus and the loci for blood group O and tyrosine aminotransferase are on pig chromosome 6. *J. Hered.* 87:272–276.
- Marklund, L., P. Nyström, S. Stern, L. Andersson-Eklund, and L. Andersson. 1999. Confirmed quantitative trait loci for fatness and growth on pig chromosome 4. *Heredity* 82: 134–141.
- Paszek, A. A., P. J. Wilkie, G. H. Flickinger, L. M. Miller, C. F. Louis, G. A. Rohrer, L. J. Alexander, C. W. Beattie, and L. B. Schook. 2001. Interval mapping of carcass and meat quality traits in a divergent swine cross. *Anim. Biotechnol.* 12:155–165.
- Paszek, A. A., P. J. Wilkie, G. H. Flickinger, G. A. Rohrer, L. J. Alexander, C. W. Beattie, and L. B. Schook. 1999. Interval mapping of growth in divergent swine cross. *Mamm. Genome* 10:117–122.
- Rohrer, G. A., L. J. Alexander, Z. Hu, T. P. L. Smith, J. W. Keele, and C. W. Beattie. 1996. A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Res.* 6:371–391.
- Rohrer, G. A., and J. W. Keele. 1998a. Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: I. Fat deposition traits. *J. Anim. Sci.* 76:2247–2254.
- Rohrer, G. A., and J. W. Keele. 1998b. Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: II. Muscling and wholesale product meat traits. *J. Anim. Sci.* 76:2255–2262.
- Seifert, J. N., N. J. Larsen, S. Marklund, Z. L. Hu, G. A. Rohrer, and M. F. Rothschild. 1999. Genetic linkage and physical mapping of porcine androgen receptor (AR) gene. *J. Anim. Sci.* 77:785–786.
- Wada, Y., T. Akita, T. Awata, T. Furukawa, N. Sugai, Y. Inage, K. Ishii, Y. Ito, E. Kobayashi, H. Kusumoto, T. Matsumoto, S. Mikawa, M. Miyake, A. Murase, S. Shimanuki, T. Sugiyama, Y. Uchida, S. Yanai, and H. Yasue. 2000. Quantitative trait loci (QTL) analysis in a Meishan × Gottingen cross population. *Anim. Genet.* 31:376–384.
- Werner, P., S. Neuenschwander, and G. Strassinger. 1999. Characterization of the porcine uncoupling proteins 2 and 3 (UCP2 & UCP3) and their localization to chromosome 9 p by somatic cell hybrids. *Anim. Genet.* 30:221–224.
- Yeh, S., M.-Y. Tsai, Q. Xu, X.-M. Mu, H. Lardy, K.-E. Huang, H. Lin, S.-D. Yeh, S. Altuwajri, X. Zhou, L. Xing, B. F. Boyce, M.-C. Hung, S. Zhang, L. Gan, and C. Chang. 2002. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: An *in vivo* model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:13498–13503.

Center for Integrated Animal Genomics, Iowa State University,
2255 Kildee Hall, Ames, IA 50011, USA

Accepted for publication 28 August 2003

Source/description: The *peroxisome proliferator activated receptor alpha* gene (*PPARA*) is a ligand-activated nuclear hormone receptor that mediates the effects of fatty acids and their derivatives at the transcriptional level.¹ Primers were designed in exon 4 (PPARA1-F) and exon 5 (PPARA1-R) from a published porcine partial cDNA sequence (GenBank accession number AF228696). The 1700-bp product was sequenced (GenBank accession number AY364466) with 85 and 87% nucleotide identity to the corresponding human and mouse exon sequences, respectively. Sequence analysis of the polymerase chain reaction (PCR) products from several individual pigs of different breeds revealed a nucleotide substitution in intron 4 at nucleotide 251. Because a natural restriction endonuclease recognition site did not exist, a restriction site for enzyme *BsrGI* was created using a mismatch primer (PPARA2-F and PPARA2-R). The PCR fragment from these primers was 317 bp in length and spanned intron 4 and exon 5.

Primer sequences:

PPARA1-F: 5'-TCT CCA GCC TCC AGC CCC TC-3'

PPARA1-R: 5'-CAC AGG CTT CAT ACG CAG GA-3'

PPARA2-F: 5'-CAT TCG GCT AAA GCT GGT CT-3'

PPARA2-R: 5'-TGA CTA GTT CTA ATT ATT CCG AGG ATC TGC TGT AC-3'

PCR conditions: Both PCR reactions were performed using 12.5 ng porcine DNA, 1× PCR buffer, 1.25 mM MgCl₂ (PPARA1-F and PPARA1-R) or 1.0 mM MgCl₂ (PPARA2-F and PPARA2-R), 0.125 mM dNTPs, 0.3 μM of each primer, and 0.5 U Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) in a 10 μl final volume. The PCR profile included 4 min at 94 °C; 35 cycles of 45 s at 94 °C, 45 s at 60 °C (PPARA1-F and PPARA1-R) or 57 °C (PPARA2-F and PPARA2-R) and 30 s at 72 °C; and a final 7 min extension at 72 °C in a PTC200 thermocycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA, USA).

Polymorphism and Mendelian inheritance: The *BsrGI* digestion of the 317-bp PCR product produced allelic fragments of 317 bp (allele 1), or 286 and 31 bp (allele 2) that were resolved on 4% agarose gels. Mendelian segregation of the *BsrGI* PCR-RFLP was observed in the three-generation Iowa State Berkshire × Yorkshire resource population.² Allele frequencies were determined by genotyping several commercial breeds. Allele 1 was the most common allele, with a frequency of 0.87 in Landrace ($n = 16$), 0.68 in Yorkshire/Large White ($n = 331$), 0.75 in Berkshire ($n = 16$) and 0.90 in Duroc ($n = 20$).

Chromosomal location: Two-point and multipoint linkage analyses (CRIMAP⁴) were performed using the genotypes of the Iowa State Berkshire × Yorkshire resource population.³ *PPARA* was significantly linked with several markers on porcine chromosome 5 (SSC5). Two-point linkage analysis determined that the most closely linked markers (recombination fraction and LOD score) were *ACR* (0.06, 21.8) and *SW413* (0.10, 15.0). The best map order for this region of SSC5 produced by multipoint linkage analysis (with distances in centimorgans

listed between markers) was: *PPARA* – 6.3 – *ACR* – 2.3 – *SW413* – 27.3 – *SW1482*.

Comments: Peroxisome proliferator activated receptor alpha belongs to the superfamily of steroid/thyroid nuclear hormone receptors. Its role in lipid metabolism makes it an interesting candidate gene affecting intramuscular fat and other fat-related meat quality traits.⁴ *PPARA* expression is mainly detected in tissues exhibiting high rates of β-oxidation, i.e. liver, kidney, heart and skeletal muscle, where it promotes cellular uptake, activation and oxidation of fatty acids through activation of target gene expression.⁵ *PPARA* transcriptionally regulates the production of enzymes such as acyl-coenzyme A (CoA) oxidase (the key enzyme in the peroxisomal β-oxidation pathway) and carnitine palmitoyl transferase I (implicated in the translocation of fatty acids across the inner mitochondrial membrane) as well as CYP4A6, which is an important microsomal ω-hydroxylase.¹

Acknowledgements: The authors thank CAPES/Brazilian Ministry of Education for its sponsorship of R.H. Pita during her stay at Iowa State University. This work was supported in part by funding from Sygen International, PIC USA and the Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station, Ames, Iowa and by Hatch Act and State of Iowa funds, project 3600. The authors also thank Dr K.S. Kim for technical advice.

References

- 1 Hiji A. K. *et al.* (2002) *Cell Mol Life Sci* **59**, 790–8.
- 2 Malek M. *et al.* (2001) *Mamm Genome* **12**, 637–45.
- 3 Green P. *et al.* (1990) Documentation for CRIMAP, Version 2.4. Washington University, School of Medicine, St Louis, MO, USA.
- 4 Bocher V. *et al.* (2002) *Ann NY Acad Sci* **967**, 7–18.
- 5 Sundvold H. *et al.* (2001) *Gene* **273**, 105–13.

Correspondence: M. F. Rothschild (mfrothsc@iastate.edu)

Mapping of bovine *CEBPD* to BTA14q15–17

N. Ihara^{*}, H. Yamakuchi[†], Y. Taniguchi[‡], Y. Sasaki[‡], G. L. Bennett[§], S. Kappes[§] and Y. Sugimoto^{*}

^{*}Shirakawa Institute of Animal Genetics, Nishigo, Fukushima 961-8061, Japan. [†]Cattle Breeding Development Institute Kagoshima, Kagoshima 899-8212, Japan. [‡]Laboratory of Animal Genetics and Breeding, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Sak-yoku, Kyoto 606-8502, Japan. [§]USDA-ARS, U.S. Meat Animal Research Center, Clay Center, NE 68933, USA

Accepted for publication 28 August 2003

Source/description: CCAAT/enhancer-binding proteins (CEBPs) and peroxisome proliferator activated receptor γ (*PPARG*) are transcription factors that regulate the expression of fat-specific genes, and have been reported to control differentiation of mouse preadipocyte cell lines.¹ These bovine orthologs may influence body fat composition and distribution, which are economically important traits in beef cattle. We have mapped

bovine *CEBPA* and *PPARG* genes to BTA18q24 and BTA22q24, respectively.² Here we report the mapping of bovine *CEBPD* gene to BTA14q15–17 by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using a yeast artificial chromosome (YAC) clone harbouring the gene, and by genetic linkage mapping of a polymorphic microsatellite marker isolated from the YAC clone. Polymerase chain reaction (PCR) primers (DS4; 5'-AGC TGC CGC GTG GAC CCT AAG T-3' and DA4; 5'-CAT GCT CAG TCT TTC CCT CGT ATC-3') were designed from the bovine *CEBPD* gene sequence³ (GenBank accession no. D82986). Three YAC clones, Y122D11, Y130E11 and Y175F8, were isolated by PCR screening⁴ and validated by sequencing. Clone Y122D11, which contained a 800 kb non-chimeric insert was randomly amplified with primers designed from consensus bovine short interspersed nuclear element (SINE) regions with slight modifications (retro1a: 5'-AAT ACT GGA GTG GGT TGC C-3' and retro2a: 5'-AGG CTACAG TCC ATG GGA T-3'),⁵ (AMS1a: 5'-AAT CTT CTC CAA CAC CAC AG-3')⁶ and YAC right/left arm regions (YAC-right-R: 5'-AAC GCC CGA TCT CAA GAT TA-3' and YAC-left-S: 5'-CAA GTT GGT TTA AGG CGC AA-3').⁷ The PCR products containing microsatellites were verified by Southern hybridization using a fluorescent-labelled (dC-dA/dG-dT) probe (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and subcloned into pCR2.1 (TA Cloning Kit; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) followed by colony hybridization. Positive clones were sequenced using an ABI 377 automated DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and primers that amplified microsatellite *DIK121* were designed (5'-CTA CAG TCC ATG GGA TCA CA-3' and 5'-GCA GCT TGC AGC AAG AAT TC-3'; GenBank accession nos. AB107878 and AB107879, respectively).

PCR conditions: SINE PCR mixture contained 2 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTPs, 2.5 U Ex *Taq*TM (Takara Biomedical, Otsu, Japan), 50 pM primer, and 100 ng of Y122D11 DNA. The profile for SINE PCR was 2 min at 94 °C, 30 cycles of 30 s at 94 °C,

2 min at 53 °C, and 3 min at 74 °C, and a final 10 min at 74 °C followed by cooling to 4 °C. The PCR mixture for *DIK121* contained 1.7 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP, 0.75 U *Taq* DNA polymerase (ABgene, Epsom, UK), 6.25 pM primer, and 20 ng of genomic DNA. The profile for microsatellite PCR was 2 min at 94 °C, 29 cycles of 1 min at 94 °C, 2 min at 60 °C, and 20 s at 72 °C, and a final 10 min at 72 °C followed by cooling to 4 °C.

Polymorphism and chromosomal locations: Using FISH, Y122D11 DNA was hybridized to BTA14q15–17 (data not shown) corresponding to HSA8q11 where human *CEBPD* gene is located.⁸ Heterozygosity of *DIK121* was 0.62 across 28 parents in the USDA-MARC mapping population,⁹ with identification of seven alleles and a product size of 189–201 bp. Using CRIMAP version 2.4,¹⁰ *DIK121* was linked to *RM180* (recombination fraction = 0.004, LOD = 65.2) and *RM011* (recombination fraction = 0.073, LOD = 42.1) on BTA14 (Fig. 1). Thus there is a good agreement between the physical assignment of *CEBPD* gene by FISH and genetic localization by linkage analysis.

Acknowledgements: The authors thank H. Takeda for valuable suggestions and Y. Kaneuchi for laboratory assistance. This work was supported by a grant from the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

References

- 1 Lowell B. B. (1999) *Cell* **99**, 239–42.
- 2 Ihara N. *et al.* (1998) *Anim Genet* **29**, 398–400.
- 3 Taniguchi Y & Sasaki Y. (1997) *J Anim Sci* **75**, 586.
- 4 Takeda H. *et al.* (1998) *Anim Genet* **29**, 216–9.
- 5 Kaukinen J. & Varvio S. L. (1992) *Nucleic Acids Res* **20**, 2955–8.
- 6 Lenstra J. A. *et al.* (1993) *Anim Genet* **24**, 33–9.
- 7 Kuhn R. M. & Ludwig R. A. (1994) *Gene* **141**, 125–7.
- 8 Cleutjens C. B. *et al.* (1993) *Genomics* **16**, 520–3.
- 9 Bishop M. D. *et al.* (1994) *Genetics* **136**, 619–39.
- 10 Green P. *et al.* (1990) Documentation for CRIMAP Version 2.4. Washington University School of Medicine, St Louis, MO, USA.

Correspondence: Y. Sugimoto (kazusugi@siag.or.jp)

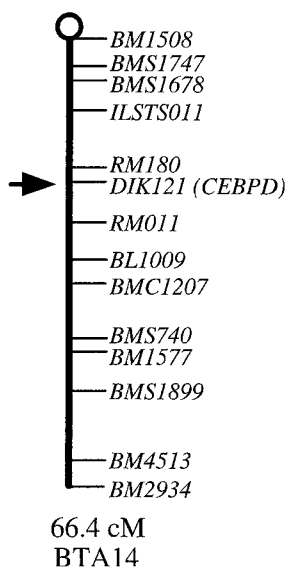


Figure 1 Genetic localization of bovine *CEBPD* gene on BTA14.

Assignment** of the porcine stearoyl-CoA desaturase (*SCD*) gene to SSC14q27 by fluorescence *in situ* hybridization and by hybrid panel mapping

J. Ren^{*,†}, C. Knorr^{*}, F. Habermann[†], R. Fries[‡], L. S. Huang[†] and B. Brenig^{*}

^{*}Institute of Veterinary Medicine, Georg-August-University of Göttingen, Göttingen, Germany. [†]Jiangxi Provincial Key Laboratory for Animal Biotechnology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, P.R. China. [‡]Institute of Animal Breeding and Molecular Genetics, Technical University of Munich, Munich, Germany

Accepted for publication 29 August 2003

**This is a more precise localization of *SCD* previously mapped to SSC14q15–16 by Wimmers *et al.* (2002).

山形県内の和牛枝肉共進会出品牛における枝肉形質と血清総コレステロール値の統計遺伝学的解析

渡辺 大作¹⁾ 阿部 正博²⁾ 齋藤 博水³⁾ 阿部 榮³⁾
板垣 昌志⁴⁾ 阿部 省吾¹⁾ 植松 正巳¹⁾ 遠藤 祥子¹⁾
平野 貴⁵⁾ 杉本 喜憲⁵⁾

¹⁾NOSAI山形家畜診療研修所、²⁾山形県最上総合支庁、³⁾NOSAI山形中央家畜診療所
⁴⁾NOSAI山形置賜家畜診療所、⁵⁾畜産技術協会附属動物遺伝研究所

Genetic Statistical Analysis of Carcass Traits and Serum Total Cholesterol of Japanese Black Beef Cattle Entered in The Meat Fairs in Yamagata Prefecture

D.Watanabe¹⁾, M.Abe²⁾, H.Saito³⁾, S.Abe³⁾, M.Itagaki⁴⁾, S.Abe¹⁾,
M.Uematsu¹⁾, S.Endo¹⁾, T.Hirano⁵⁾, Y.Sugimoto⁵⁾

¹⁾NOSAI Yamagata Veterinary Training Center

²⁾Mogami Branch, Yamagata Prefecture

³⁾NOSAI Yamagata Central Veterinary Clinic Center

⁴⁾NOSAI Yamagata Okitama Veterinary Clinic Center

⁵⁾Japan Livestock Technology Association

要 約 山形県内の枝肉共進会に出品された血統の明確な黒毛和種肥育牛を用い、性および枝肉共進会開催日（以下と殺時期）を母数効果、父牛を変量効果とした最小二乗法により枝肉形質とと殺時の血清総コレステロール（TC）値等の8形質について遺伝的パラメータを推定した。その結果、血清TCと枝肉重量および牛脂肪交雑基準（B.M.S.No.）の間には中程度以上の遺伝相関がみられた。遺伝率は血清TC値および枝肉重量でそれぞれ0.85、0.66と高く、B.M.S.No.では0.34であった。枝肉重量および血清TCにおける母数効果は、雌および7月と9月で負、去勢と11月は正であり、性・時期による差がみられた。以上から枝肉性状は遺伝的能力と季節に大きく影響され、また血清TC値は枝肉重量およびB.M.S.No.をモニターする生化学マーカーとして有用であることが示唆された。

——キーワード：肥育牛、育種価、コレステロール、遺伝率、脂肪交雑

.....家畜臨床誌26(1):2-8, 2003

Received 5 May 2003 / Accepted 17 July 2003

*Correspondence to Daisaku Watanabe, NOSAI Yamagata Veterinary Training Center, 286-1 Kitagawara, Nanaura, Yamagata, 990-2171, Japan (〒990-2171 山形市大字七浦字北川原286-1 TEL 023-684-5531, Fax : 023-684-5538 E-mail: watanabe_dais@yynosai.or.jp)

ABSTRACT The present study was performed to estimate the genetic parameters and the breeding values (BV) of the carcass traits and serum total cholesterol (TC) values for 1,132 head of Japanese Black beef cattle entered in meat fairs in Yamagata Prefecture from 1997 to 2000. As a result, it was found that high hereditary correlation was seen between serum TC and hot carcass weight (carcass wt.) and beef marbling standard (BMS). Heritability of serum TC and also carcass wt. were high, 0.85 and 0.66, respectively. Heritability of BMS was 0.34. The constant effects of carcass wt and serum TC differed significantly depending on sex and seasons. Negative correlation was seen in heifers, and in July and September; conversely positive correlations were seen in steers and in November. Findings suggested that carcass characteristics were influenced by hereditary factors and seasons, and serum TC was seen to be a useful biochemical-monitoring marker to estimate carcass wt and BMS.

— Key words: beef cattle, breeding value, cholesterol, heritability, marbling

.....Jpn. J. Large Anim. Clin. 26(1):2-8, 2003

緒言

和牛において肉質と枝肉重量は生産性に大きく影響する。安定して上物を生産し枝肉重量を確保する肥育技術と和牛の改良は国際競争の面からも急務となっている。このため、著者らは(社)畜産技術協会附属動物遺伝研究所の協力を得て増体・肉質に関わる生化学マーカーの開発を研究してきた。

これまで生化学マーカーとしては、ビタミンA (VA) が牛脂肪交雑基準 (B.M.S.No.) との関わりにおいて研究され多くの報告がある [6,7,11,13-15,17-20]。一方著者らは、血清VA値を16-24ヶ月齢にかけて低値に誘導した場合でも、血清総コレステロール (TC) 値が低値を持続または後期に著しく低下した場合には枝肉成績が良くないこと、血清TC値は血統により差がみられ、枝肉重量が大きくB.M.S.No.も良い牛群は、枝肉重量の少ない牛群に比較して血清TC値が高いことを報告した [19,20]。しかし、枝肉形質のみにおける遺伝的影響に関する報告 [8,9,10,16] はあるが、血清TC値と枝肉成績との関連性はいまだ明確でなく、また性・遺伝および季節による影響も不明であった。このため、山形県内の血統の明確な枝肉共進会出品牛を用い、性、種雄牛および殺時期の違いが枝肉性状や血清TCにどのように影響するかについて遺伝統計プログラムを用いて解析した。

材料および方法

1997-2000年にかけて、県内の共進会に出品された黒毛種肥育牛のうち種雄牛あたり3頭以上のデータ

(後代) が完全である1,132頭 (雌; 694頭、去勢; 438頭) について枝肉成績を調査するとともに、と畜場にて採材した血液について血清TC値を測定した。血清TCは酵素法により自動分析装置を用いて測定した。

これらのデータについて、性および枝肉共進会開催日 (以下と殺時期) を母数効果、父牛を変量効果とした最小二乗法により遺伝的パラメータを推定した。分析は、Harveyの最小二乗分散分析用プログラムLSMLMW [4]を用いた。分析の対象形質は、と殺時日齢 (日齢)、枝肉重量、ロース芯面積 (ロース)、バラ厚、皮下脂肪厚 (皮下)、B.M.S.No.、牛肉色基準 (B.C.S.) および血清TC値の8形質であり、これらについて遺伝的パラメータを推定した。また、LSMLMWで推定したパラメータを用いて枝肉重量、B.M.S.No.および血清TCの3形質について、母牛と後代3頭以上の父牛のみの血統情報により多形質のアニマルモデルによる最良線形不偏予測法 (BLUP) を用い各種雄牛の遺伝的能力を推定した。

なお、遺伝率とは表型分散に対する遺伝分散の割合で、一般に h^2 で表し、0~1の範囲にあり、その大きさは選抜による改良の可能性の指標となる [12]。遺伝率は表現型値から育種価を予測する際の信頼性、あるいは表現型値と育種価の一致の程度を表している [3]。

遺伝相関及び表型相関は、育種価間及び表現型値間の関係の強さを表し、-1~+1の間にある。一方の形質の変化にともない他方の形質が同じ方向へ変化すれば正の相関、反対の方向へ変化すれば負の相関があるという。

育種価は親から子に確実に伝えることのできる遺伝的能力で、個体の育種価は集団平均からの偏差として表さ

れる。集団の血統と測定値がある場合、アニマルモデルによる最良線形不偏予測 (BLUP) 法で個体の育種価を推定できる[12]。BLUP法は、母数効果について、その効果の一般化最小二乗推定値で補正したうえで、一般に後代の測定値をもつ雄親の育種価予測するために使われたり、反復記録を持つ個体の育種価を予測したり、血統中の全個体の育種価を予測するために使われる[2]。

成績

(1) 分散分析結果

B.C.S.における種雄牛間差、B.M.S.No.における性差、皮下脂肪厚とと殺時期について以外のすべての枝肉形質において、種雄牛、性、と殺時期間において有意差が認められた。血清TC値についてはそれら3つの効果すべてで有意差が認められた(表1)。

(2) 全平均および母数効果の水準(最小二乗平均値)

血清TC値における性の母数効果は、去勢で+3.19、雌で-3.19であった。と殺時期の母数効果をみると、血清TC値はと殺時期(月)が11月の場合に正、7および9月がほぼ負であることから、夏季に低下し秋から冬にかけて高くなることが認められた。枝肉重量においても9月開催において負になる傾向がみられた(表2)。対象集団の全平均は、出荷日齢962日、枝肉重量405.87kg、B.M.S.No. 8.19、ロース58.55cm²、バラ厚8.10cm、および血清TC値131mg/dlであった。

(3) 各形質の遺伝的パラメータ

表型相関は表3(3)の対角右上に表した。表型相関では、血清TC値と枝肉重量の間に0.32、枝重とロース、バラ厚の間に0.38、0.65、B.M.S.No.とロース、バラ厚の間に0.49、0.41、ロースとバラ厚の間に0.57とそれぞれ

表1. 最小二乗法による分散分析結果

	日齢	枝肉重量	ロース 芯面積	バラ厚	皮下 脂肪厚	BMS	BCS	血清TC
種雄牛	**	**	**	**	**	**	ns	**
性	**	**	**	**	**	ns	**	**
と殺時期*	**	*	**	**	ns	**	**	**

* : p<0.05以下で有意差あり ** : p<0.01以下で有意差あり ns:有意差なし

*枝肉共進会開催時期

表2. 平均および母数効果の水準(最小二乗法)

	頭数	日齢	枝肉重量 (kg)	ロース芯 面積(cm ²)	バラ厚 (cm)	皮下脂肪 (cm)	BMS.No.	BCS	血清TC (mg/dl)
全平均	1,132	962.19	405.87	58.55	8.10	2.54	8.19	3.81	131.08
性									
去勢	438	-10.87	30.43	1.08	0.31	-0.07	0.1	-0.1	3.19
雌	694	10.87	-30.43	-1.08	-0.31	0.07	-0.1	0.1	-3.19
と殺時期*									
1997. 9. 4	139	-4.31	-5.97	-2.05	-0.34	-0.08	0.03	0.08	-11.89
1997.11.23	142	-18.59	-1.27	-3.61	-0.36	0.18	-0.01	0.28	28.79
1998. 7.23	117	17.86	5.40	1.85	0.24	-0.03	0.71	-0.11	-5.78
1998.11.17	131	-2.08	2.19	1.71	0.01	0.12	0.73	-0.07	10.55
1999. 7.22	97	1.53	3.38	0.42	0.02	0.00	-0.39	0.07	-9.21
1999. 9.10	56	-20.57	-8.79	0.36	0.16	-0.09	-0.49	0.04	-11.09
1999.11.11	152	-3.34	5.09	1.83	0.19	-0.06	-0.18	-0.08	6.70
2000. 7.18	148	7.48	2.86	-1.54	-0.02	0.05	-0.77	-0.07	0.69
2000. 9.12	150	22.01	-2.88	1.01	0.10	-0.08	0.37	-0.13	-8.76

*枝肉共進会開催時期

正の中程度の相関がみられた。

表3(3)の対角左下が遺伝相関である。各形質間の遺伝相関では、血清TC値と枝肉重量、バラ厚、B.M.S.No.の間に0.90、0.81、0.40、枝肉重量とバラ厚の間に0.81、B.M.S.No.とロース、バラ厚の間に0.60、0.75、ロースとバラ厚、皮下、B.C.S.が0.46、0.32、0.43、皮下と

B.C.S.が0.49とそれぞれ正の中程度以上の相関がみられた。

表3(3)の対角線上の太字数字が遺伝率である。各形質の遺伝率は、血清TC値が0.85、枝肉重量が0.66と高い遺伝率となった。また、ロースが0.39、バラ厚が0.39、B.M.S.No.が0.34であった。

表3. 枝肉形質・血清TCの遺伝的パラメータ

(1) 表型分散共分散

項目	日齢	枝肉重量	ロース	バラ	皮下脂肪厚	BMS	BCS	血清TC
日齢	4313.90							
枝肉重量	144.94	1484.91						
ロース	17.80	117.93	63.80					
バラ厚	-1.27	22.11	4.02	0.79				
皮下脂肪厚	-0.87	8.00	-0.37	0.12	0.64			
BMS	8.39	14.15	9.58	0.89	-0.06	5.90		
BCS	3.24	-1.22	-0.61	-0.07	-0.02	-0.38	0.34	
血清TC	-136.48	412.14	31.65	8.36	2.07	6.28	-0.14	1151.05

(2) 遺伝分散共分散

項目	日齢	枝肉重量	ロース	バラ	皮下脂肪厚	BMS	BCS	血清TC
日齢	469.33							
枝肉重量	-238.46	977.75						
ロース	18.98	19.52	24.52					
バラ厚	2.52	13.96	1.25	0.30				
皮下脂肪厚	-3.34	3.09	0.70	0.08	0.18			
BMS	16.76	11.30	4.18	0.58	0.17	1.99		
BCS	-0.80	0.94	0.24	0.04	0.02	-0.01	0.01	
血清TC	-3.65	877.21	30.89	14.00	0.68	17.75	-0.27	972.02

(3) 表型相関、遺伝相関および遺伝率

項目	日齢	枝肉重量	ロース	バラ	皮下脂肪厚	BMS	BCS	血清TC
日齢	0.11	0.06	0.03	-0.02	-0.18	0.05	0.08	-0.06
枝肉重量	-0.35	0.66	0.38	0.65	0.26	0.15	-0.05	0.32
ロース	0.18	0.13	0.39	0.57	-0.06	0.49	-0.13	0.12
バラ厚	0.21	0.81	0.46	0.39	0.17	0.41	-0.13	0.28
皮下脂肪厚	-0.36	0.23	0.32	0.32	0.29	-0.03	-0.04	0.07
BMS	0.55	0.26	0.60	0.75	0.27	0.34	-0.27	0.08
BCS	-0.35	0.27	0.43	0.62	0.49	-0.11	0.04	-0.01
血清TC	-0.01	0.90	0.20	0.81	0.05	0.40	-0.07	0.85

注) 対角右上(斜体文字); 表型相関、対角左下; 遺伝相関、対角太字; 遺伝率、

ロース; ロース芯面積、BMS; Beef Marbling Standard、

BCS; Beef Color Standard、血清TC; 血清総コレステロール

(4) BLUPによる種雄牛の推定育種価

表4には種雄牛ごとの枝肉重量、B.M.S.No.、血清TC値の各育種価を示し、血清TC値の高い種雄牛順に並べた。平茂勝、北国7の8、安福165-9など枝肉重量・B.M.S.No.に優れた種雄牛は血清TCの育種価が40mg/dl以上と高く、それら種雄牛は枝肉重量も40kg以上、B.M.S.No.も1.0以上高かった。全体に血清TCの育種価が低い種雄牛は枝肉重量およびB.M.S.No.の育種価がともに低かったが、福神、茂糸波などでは枝肉重量の育種価は低いもののB.M.S.No.の育種価は高かった。

考 察

今回の調査から枝肉成績は遺伝的影響を受けるが、なかでも枝肉重量において遺伝的影響が大きいことが判明した。

遺伝率の値は一般に集団によって異なる[12]。今回の研究に用いられた牛は山形県の和牛枝肉共進会に出品されたもので、平均出荷日齢が962日と長く、かつ平均B.M.S.No.が8.19ときわめて高い集団であった。得られた肉質形質の遺伝率は、母数効果の扱いが異なる山形県（アニマルモデルによる育種価評価結果、第20回目：平成15年2月）の算出結果に比較して、枝肉重量ではやや高く、脂肪交雑でやや低かったもののロースおよびバラ厚ではほぼ同等であった。川田ら[8]の岩手県南地方の黒毛和種集団の解析では、産肉性形質の遺伝率はB.M.S.No.が0.66、枝肉重量0.64、ロース芯面積0.36、バラ厚0.25、皮下脂肪厚0.33であり、今回の成績は枝肉重量、ロース芯面積の遺伝率についてはほぼ同じ結果であったが、B.M.S.No.については低かった。これは県内の枝肉共進会出品牛を用いたため、飼育環境の異なる牛が多く、B.M.S.No.について飼育環境の差がより強く現れたためではないかと推察された。

血清TC値が枝肉性状のモニタリングとして意義があるという報告はあるが[1,5,7,19,20]、種雄牛の遺伝的能力や性および殺時期などの環境的要因の影響についての報告はみられない。今回の研究で、枝肉以外の形質である血清TC値の遺伝率が非常に高いこと、かつ血清TC値は枝肉重量およびバラ厚との遺伝相関が高いことが新たに判明し、血清TC値には遺伝的能力が大きく影響することがわかった。また、46頭の種雄牛の育種価において、一般に枝肉重量が大きくかつB.M.S.No.も高い種雄牛の産子は血清TC値が高いことが示された。著者らは北国7の8系と但馬系の肥育牛を比較し、同じA5格付けの牛でも血清TC値が異なり、血清TC値が高く推移

表4. BLUPによる推定育種価

枝肉重量育種価順				
種雄牛名	頭数	枝肉重量	BMS	血清TC
H S K	4	54.25	1.97	58.06
K 7 3	4	51.70	0.35	43.50
K T F	6	48.30	0.11	42.87
Y 1 6 5 9	7	44.13	1.55	42.38
K 7 8	216	43.60	1.22	50.80
Y H	6	42.96	1.03	35.98
D 5 N	10	27.73	0.18	16.85
T E	46	25.38	-0.37	35.42
T H 3	13	21.85	-1.71	4.04
K 7 9	14	16.50	-2.68	-1.86
A H S	3	15.65	0.55	21.14
O J	4	15.10	-0.11	9.42
D 7 Y	3	12.06	0.91	17.00
S K	87	11.79	0.67	6.05
D 3 3 H S	5	11.24	1.08	18.10
I F	3	8.20	0.35	4.80
T M 6	5	4.20	-0.41	2.10
M F	5	4.10	1.82	12.10
O S	39	-1.95	-1.73	-12.66
F K	8	-2.63	0.93	11.88
Y N	3	-6.03	-0.48	-9.56
D 2 N S	167	-6.43	0.73	2.16
S I N	102	-9.58	1.65	-22.40
K S N	6	-10.01	0.23	-7.53
T T 3	7	-10.52	-1.47	-10.87
K T	21	-10.71	0.12	-11.35
Y F Z	3	-11.02	-0.23	-9.56
S S N	7	-11.86	0.26	-6.73
K T	52	-16.30	0.25	-3.50
A F	3	-16.57	0.37	-12.90
Y K	28	-18.28	-0.82	-20.04
Y F S	24	-18.62	0.16	-11.71
M A F	32	-19.22	0.37	-5.04
K Y	14	-20.64	-0.78	-13.19
S M	5	-21.83	-0.20	-24.58
K T U	10	-21.85	-2.44	-30.60
A A D	8	-22.02	-1.69	-25.18
F K	8	-22.03	1.82	-7.37
T M 6	3	-24.74	-1.22	-28.52
T H	8	-30.51	-1.40	-29.88
Y T	3	-31.55	-0.77	-26.99
T Z	5	-32.07	-1.16	-33.81
M J R	36	-34.22	-0.29	-38.78
T S	12	-40.32	-1.46	-44.78
A S	15	-43.42	-0.06	-44.77
O K S	62	-47.06	0.38	-39.67
平均		-2.24	-0.05	-2.15
標準偏差		26.56	1.12	26.09

した北国7の8系の牛で枝肉重量が大きいこと報告した[20]が、今回の成績はこの報告を裏付けるものであった。

血清TC値はビタミンE値と強い相関がみられ、飼料摂取を反映するといわれている[19,20]。このため、血清TC値が高いということは飼料摂取量が高いともいえ、このことが枝肉重量やB.M.S.No.の向上につながっているのかもしれない。しかし、血清TC値は著者らの調査で増体の著しい牛において栄養が追いつかないためか低値を維持する個体もみられ[19]、またB.M.S.No.の優れた牛でも低い個体が存在する。さらに加熱大豆、大豆粕、ビール粕などの高蛋白質飼料給与で増加することが知られている[5]。したがって、血TC値は生産性向上のための生化学マーカーのひとつとして利用できるが、その際は遺伝的影響や給与飼料を考慮して活用していく必要があると思われる。

血清TC値の母数効果は夏季7-9月に低下し、11月に増加した。同時に枝肉重量やB.M.S.No.の母数効果も夏季の共進会において低下がみられた。山形の夏は35℃以上になる日が珍しくなく、これら枝肉成績の低下は暑熱ストレスとそれによる食欲低下を反映したものと考えられ、暑熱対策の重要性を改めて示唆するものであった。一農場で同一個体を追跡調査した著者らの未発表データでも夏季には冬季に比較して血清TC値が20%前後低下することを認めている。血清TC値は現在、肥育牛の栄養をモニタリングする検査項目としてビタミンAおよび血液尿素窒素(BUN)とともに広く検査されているが、検査成績を判読する際は季節の影響も考慮する必要があると思われる。

今回の調査は、肥育牛において血清TC値が遺伝の影響を強く受けていること、および枝肉性状特に枝肉重量、バラ厚およびB.M.S.No.と関連性が強いことを明らかにした。これらの得られた成績を農家指導に活用するとともに、和牛の育種改良や農家の栄養管理指導に役立つ新たな生化学マーカーを開発し、肉牛の生産性向上に寄与したい。

謝 辞

この研究を行なうにあたり、協力を賜ったNOSAI山形の同僚獣医師、山形県内陸食肉公社、内陸食肉衛生検査所、農協畜産担当者および生産者各位に心から感謝する。本研究の一部は(社)畜産技術協会応用技術開発委託研究で実施した。記して謝意を表す。

文 献

1. 浅田 勉, 木村 容子, 砂原 弘子ら(2000). 加工形態が異なるトウモロコシ給与時の血液性状および血液性状と肉質との関係について. 肉用牛研究会誌 70: 37-39.
2. Cameron N.D. (2000). 最新家畜育種の基礎と展開. 大学教育出版 149.
3. Falconer D.S. (1993). 量的遺伝学入門. 蒼樹書房 209-210.
4. Harvey W. R. (1990). User's guide of LSMLMW and MIXMDL PC-2 VERSIO 22-55 Ohio State University, Columbus.
5. 橋端堅次郎, 森田 宏, 成瀬満佐子ら(1995). 種々の飼料給与条件が黒毛和種牛の飼料摂取量, 第一胃内発酵, 血液性状, 増体成績, と畜解体成績および経済性に及ぼす影響. 畜試研究資料 8: 3-14.
6. 甫立京子(1999). 肉牛の栄養学-最新の話題-. 獣畜新報 52: 221-224.
7. 岩木史之, 岡 章生, 道後 泰治 (2000). 但馬去勢肥育牛の発育および血液性状と枝肉性状の関係. 肉用牛研究会誌 70: 32-34.
8. 川田啓介, 兼松重任, 黒澤弥悦ら(2003). 岩手県南地方における黒毛和種集団の産肉性形質に関する統計遺伝的解析. 日畜会報 74: 187-193.
9. 守屋和幸, 道後泰治, 佐々木義之(1994). 黒毛和種の基礎集団並びに現集団における屠肉性に関する遺伝率のREML推定. 日畜会報, 65:720-725.
10. 向井文雄(1994). 黒毛和種の産肉形質の選抜法ならびに遺伝的評価に関する研究. 日畜会報, 65: 890-905.
11. 中村一生, 山本和利, 福田輝俊(1999). 黒毛和種牛におけるビタミンA濃度の推移と肉質. 畜産の研究 53: 503-507.
12. 日本畜産学会編(2000). 新編畜産用語辞典. 養賢堂. 11: 18-19.
13. 岡 章生(1997). 肉質・脂肪交雑とビタミンA給与. 農業技術体系畜産編追録16(3): 技256の2-7.
14. Oka A., Maruo Y., Miki T., Yamasaki T. and Saito T.(1998a). Influence of Vitamin A on the quality of beef from the Tajima strain of Japanese black cattle. Meat Sci. 48:159-167.
15. Oka A., Dohgo T., Juen M. and Saito T.(1998b). Effect of Vitamin A on beef

- quality, weight gain, and serum concentrations of thyroid hormones, insulin-like growth factor-1, and insulin in Japanese black steers, 日畜会報 69: 90-99.
16. 白井達夫, 長嶺慶隆, 安宅倭ら(1996). 褐毛和種の枝肉形質における遺伝的パラメーターとその遺伝的趨勢の推定. 日畜会報67:1095-1100.
 17. 鳥居伸一郎(1998). 肉牛における脂肪細胞分化の制御. 栄養生理研究会報 42: 39-57.
 18. 渡辺大作(1999a). 産肉成績とビタミン類の関わり. 生産獣医療システム-肉牛編- pp90-101. 農村漁村文化協会, 東京.
 19. 渡辺大作(1999b). 肥育牛の代謝プロファイルテスト. 生産獣医療システム-肉牛編- pp195-202. 農村漁村文化協会, 東京.
 20. 渡辺大作(1999c). 黒毛和種牛における肥育成績と血清ビタミンA, Eおよび総コレステロールの関連性. 栄養生理研究会報 43: 119-128.

2. 海外出張報告

Plant & Animal Genome XII (第12回植物動物ゲノム学会)に参加して

高須賀 晶子、渡邊 敏夫

2004年1月10日から14日までの5日間、米国カリフォルニア州サンディエゴにおいてPlant & Animal Genome XIIが開催された。この学会は毎年同地にて開催され、主に農畜産水産関係の生物種におけるゲノム研究の国際的な発表の場となっている。

サンディエゴは西海岸の温暖な気候に恵まれており、1月というのに半袖でも表を歩けるほどの、日本で言えば晩春の暖かさがあった。その地のTown & Country Hotelをほぼ借り切って、口頭発表がホールにおいて、ポスター発表と企業展示が地下駐車場の広大な面積において行われた。総演題数はワークショップが267題、ポスターが995題であった。ワークショップは家畜の動物種ごと、植物の栽培品種ごとに分かれていたり、あるいは解析理論など分野ごとに分かれていたりした。植物と動物という分け方をすると、演題数としては植物の演題が動物のそれよりも3~4倍多い印象があった。以下、家畜動物種に関するものの内容について一部紹介したい。高須賀がプレナリーセッション、ワークショップなどの口頭発表について、渡邊が主にポスター発表について紹介する。

今年の家畜ゲノムの最大の進展は、ニワトリの全ゲノムドラフト配列決定であり、家畜の中での最初の全ゲノム配列決定となった。これによって、ニワトリでは、アミノ酸置換を生じるような一塩基多型(SNP)が多いと推定されること、また、ヒトとのシntenニーは、少なくとも231個と細かく、進化の過程で染色体内転位が起こったことが推定されることなどが明らかになった。しかしながら、明らかにされたゲノム配列を用いてのQTLマッピングや、ポジショナルクローニングへの取り組みは、残念ながら、まだこれからといったところであった。ニワトリは、ゲノムサイズが小さいことと、鳥類の代表ということで、ゲノムシーケンシングの対象に選ばれたわけだが、全ゲノムドラフト配列決定が、家禽研究者の必要性に先んじて行われた感がある。

一方、ウシゲノムに関しては、現在、米国が中心となって国際プロジェクトとして進行しているBACフィンガープリント地図の進捗状況、および、全ゲノムシーケンシングの計画が報告された。BACフィンガープリント地図は、昨年この学会で完成間近と報告され、その進展の早さに大変な衝撃を受けたが、結局、完成には1年を要することになった。この発表では、完成度がどの程度なのかが把握しづらかったのだが、日本に戻ってきて、実際に使ってみると、目的領域のBACコンティグの作成に大いに役立つものだということがわかった。BACの末端塩基配列も、現在、283,000配列がGenBankに登録されており、まだ十分ではないが、SNPの検索等に利用できるリソースが徐々に整備されつつあると思われる。今後の全ゲノムシーケンシングが大いに期待される。

プレナリーレクチャーで、プロテオミクスの研究が2つも紹介されたことに、新しい兆しを感じた。一つは、国際プロジェクトとして、生体内のタンパク質をより微量まで検出、同定するために、様々なレベルで技術開発が行われているという話題、もう一つは、「ショットガンプロテオミクス」と名付けて、片っ端からタンパク質を断片化して、その配列を決めるという手法をとることによって、細胞内のオルガネラなど、生物の基礎的な知見が新たに得られている

という話であった。家畜ゲノムは、全ゲノムシーケンシングにまだ少し(2?3年)時間がかかると思われるが、イネの全ゲノムシーケンシングを終了した植物の研究者たちには、時宜を得たレクチャーだったに違いない。

QTLクローニングと題されたワークショップにおいては、総演題数12題のうち家畜に関するものは2題であった。そのうちの一つは、ベルギー・リエージュ大学の M. Georges によるもので、氏は近年乳牛のミルク脂肪含量のQTLが DGAT1 遺伝子の多型によるものであることを突き止めた実績がある。またスウェーデン・ウプサラ大学との共同でブタの骨格筋量のQTLが IGF2 遺伝子の非翻訳領域における多型であることを論文発表しており、ワークショップではそれについての詳細な報告を行った。

もう一つの家畜に関する演題は米国・農務省肉畜研究所(US-MARC)の D. Nonneman によるブタの精巣サイズのQTLに関する報告であった。彼らはQTLマッピングの手法により精巣サイズをコントロールするQTLがX染色体上にあることを突き止めた。最終的に thyroxin binding globulin (TBG; セリンプロテアーゼインヒビターの一種) のアミノ酸置換を伴う多型が精巣サイズと相関があることを示した。TBG は thyroxin (甲状腺ホルモン) に結合する活性があるが、げっ歯類において thyroxin は精巣のセルトリ細胞の増殖に関与している報告があり、これは TBG が精巣サイズの QTL であることを強く示唆するものである。

ポスター発表の中で印象に残ったものを以下に紹介する。

放射線照射体細胞雑種(RH)パネルによるRH地図はゲノム研究における強力なツールである(本年報の研究報告を参照)。ウシ、ブタのRH地図の報告は以前からあったが、今回、ウマ全ゲノム、ヒツジ全ゲノム、ニワトリ4番染色体のRH地図を作製した結果がそれぞれテキサスA&M大学、ユタ大学、ワーゲニンゲン大学などによって相次いで報告された。今のところこれらの動物種に関するQTL解析の報告例あるいは成功例は少ないが、新たなツールの開発によって今後その解析が進展することが大いに期待される。

米国では牛肉の柔らかさ(tenderness)が経済的に重要な形質の一つとされているが、tenderness に関するQTL原因遺伝子としてCAPN1がUS-MARCにより同定された。同遺伝子は屠殺後の筋繊維タンパク質を分解するプロテアーゼの一つである μ -カルパインをコードしている。 μ -カルパインの316番目のグリシンがアラニンへ、または530番目のバリンがイソロイシンへアミノ酸置換をおこすといずれも tendernessを上昇させる。今回CAPN1のイントロン領域に3つの塩基多型を見だし、これらがtendernessと相関があることを新たに報告した。彼らはこれらの多型マーカーが市場に出荷される集団においても相関を検討し、検査手法として実用的であることを示している。CAPN1はQTL解析と候補遺伝子アプローチの手法で同定されたQTL原因遺伝子であり、候補遺伝子の絞り込みが容易であったため検査マーカーとしての実用化への道が短い例である。

最後に、学会期間中に海外の共同研究者や友人に多くあう機会があり、食事をともにしながら彼らと議論することで研究上の多くの刺激を受けることができた。今回の海外出張はその意味でも貴重な機会であったと思う。

動物遺伝研究所年報
第11号 (平成15年度)

平成16年 8 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