



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 12 号
(平成16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16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、クローディング-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、ウシゲノム解析のための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しつつある。DNAマーカーによる連鎖地図の高密度化と詳細な物理地図の作成のおかげで、経済形質責任遺伝子の領域を格段に狭め、少数の候補遺伝子に絞りこむことができたことを報告する。生命科学的手法を総合的に駆使することによって、それらの遺伝子の内のどれが責任遺伝子かという答えの見えるスリリングなところに辿り着いたのかもしれない。責任遺伝子を同定できれば、量的形質に関するメカニズムを分子レベルで解明することができ、遺伝的な側面からだけでなく、飼養管理等の改善も可能になるかもしれない。

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16年度 動物遺伝研究所年報

目 次

序 文

第1節 設立の経緯と沿革

第2節 平成16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	6
1) - 3 肉用牛経済形質のDNA育種手法の開発	7
1) - 4 ウシ抗病性遺伝子座の解析	10
2) BSE感受性の遺伝的差異の診断技術の開発	12
3) 牛肉の品種鑑定技術の開発	16
2. 平成16年度研究発表	19
1) 論文発表	19
2) 学会発表	20
3) 研究発表要旨	22
3. 委員会・会議等の開催	28
1) 肉用牛ゲノム研究・開発委員会	28
2) 肉用牛ゲノム研究・開発技術推進委員会	28
3) 全国DNA育種推進会議	29
4) DNAマーカー情報活用検討会議	29
5) BSE生体診断技術緊急開発事業推進検討委員会	30
6) 牛肉の品種鑑定技術検討委員会	31
7) 研究会等の開催	32
4. 委託研究	34

5. 研修員の受け入れ	36
6. 職員の普及活動	37

第3節 研究の解説

1. ウシ物理地図・ウシ-ヒト比較地図作成の意義	39
--------------------------	----

第4節 総務

1. 職員名簿	49
2. 職員の異動	49
3. 職員の海外出張	50
4. 施設・機器の整備	50
1) 施設	50
2) 平成16年度導入の主要機器	50
5. 購読雑誌一覧	52

第5節 資料

1. 論文再録	53
2. 海外出張報告	107

第1節 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1,094m²（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個以上の遺伝子座を位置づけ（ $p < 0.01$ ）、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。遺伝子座が位置づけされたことに基づいて、DNAマーカーを指標にした種畜のスクリーニングが一部で試行されつつある。さらに、黒毛和種、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、「牛肉の品種鑑定技術開発事業」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16年度末には所長を含む管理部門3名、研究部門17名（研究員7名、研究補助員10名）となった。

第2節 平成16年度の動き

1. 研究推進の状況

1) ウシゲノム解析用ツールの開発

1) - 1 ウシゲノム解析用ツールの開発・ウシ染色体地図の作成

(1) 研究年次：平成10年～平成16年

(2) 研究目的と期待される成果

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。

ゲノム解析でQTLをマッピングし、それらの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、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(昨年度年報参照)、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：「第3節 研究の解説」参照)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必要がある。

そこで、本研究では、高密度ゲノム連鎖地図の作成からヒトゲノム情報を有効に活用できるウシの詳細な染色体地図を作成することを目標とした。

(3) 研究の具体的な目標

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昨年度に作成した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、536,315：平成17年3月4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。

(4) 研究開発の成果

高密度ゲノム連鎖地図、および、RH地図とウシ-ヒトゲノム比較地図を作成し、論文発表を行った。

(4)-1. 高密度ウシゲノム連鎖地図のまとめ

昨年度、我々は高密度ウシゲノム連鎖地図を作成した。最新のウシゲノム連鎖地図が含むマーカー数は、3,960個（内、マイクロサテライト：3,802個）となった。すなわち、1997年と比べマーカー密度は3.2倍高まり、平均マーカー間隔は1.4 cMとなった。これらのマイクロサテライトのマッピング、および、マイクロサテライトの開発へ貢献してきた機関を表1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. ウシゲノム連鎖地図におけるマイクロサテライト開発の貢献度

	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	リエージュ大学	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%)

(4)-2. RH地図 (7000-rad)のまとめ

まず、3,802個のマイクロサテライトの内、3,216個で構成されるフレームワーク地図を作成した。RHパネル (SUNb7,000パネル) の平均保持率は17.5%であり、ウシゲノムの全長は23,965 cR (約114kb/cR) となった。このフレームワーク地図に対し、EST 2,377個をマッピングし、合計5,593個となった (表2)。国際コンソーシアムでもRH地図 (5,000 rad) を発表した。マイクロサテライト349個とEST1,564個の合計1,913個 (当研究所の約3分の1) であった。

表 2. RH地図のまとめ

フレームワークに用いたマイクロサテライト数	3,219
マッピングしたマイクロサテライト数	3,216
マッピングしたEST数	2,377
合計	5,593
RHパネルの平均保持率	17.5%
ゲノムの全長	25,088 cR (約120 kb/cR)

(5) 国内および海外の状況

ウシ全ゲノム配列の解読のための国際協力プロジェクトが進行中である。我が国はこのプロジェクトに入っていないが、連鎖地図やRH地図の作成を通して、多大な貢献をした。RH地図は、国際コンソーシアムにおいても最新の情報（植物動物ゲノム会議、サンディエゴ、2005年1月）では5000-rad（マーカー数：3,021個）と3000-rad（マーカー数：2,274個）の地図が作成されているが、当研究所（7000-rad）の地図が、最もマーカー数が多く（5,593個）、また、連鎖地図と統合しているため、最も信頼性が高いと考えられる。国際コンソーシアムでは、我々の連鎖地図と、各国の進めているRH地図（当研究所のRH地図も含めて）のデータをすべて使ったウシゲノム統合地図（Composite Map）を作成中である。国際コンソーシアムは、2005年3月末に米国テキサス州ヒューストンで国際ワークショップ“Bovine Genome Project: The Next Phase”を開催し、最終調整が行われた。

ウシゲノムのショットガンシーケンシング（ヘレフォード種を使用）については、2004年10月に、3.3倍ゲノム長の断片配列が決定され、ウェブサイトで公開された（ショットガンコンティグの平均長：4.2kb）。2005年1月から、6品種（ホルスタイン、ブラーマン、アングス、ノルウェーレッド、リムジン、ジャージー）のSNP検索とハプロタイプマッピングが開始され、また、2006年3月には、7-8倍ゲノム長のショットガン配列の決定とアセンブリが行われ、ウシゲノムのドラフト（下書き）配列が公開される予定である。その後も引き続いてギャップを埋め、完全な配列になるまで遂行されるかどうかかわからないが、大量のSNPの開発でその使命は達成されたと言えよう。

(6) 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、および、RH地図とウシ-ヒトゲノム比較地図の作成はほぼ完成し、論文発表を行った。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。今後は、興味ある特定の領域からさらに高密度にマイクロサテライトや一塩基多型マーカー（SNP）を開発することで目的の遺伝子まで到達できるようにしていかなければならない。現在、国際コンソーシアムが進めている全ゲノム配列解読の試みにより、公表された配列中に多数のマイクロサテライトが見出されることがある。ゲノム全体から開発された一塩基多型マーカー（SNP）の情報も蓄積しつつある。これらの情報を活用することで多型性マーカーの開発は容易になってきている。また、多数のSNPを載せたマイクロチップが開発されれば、ウシのゲノム解析に多数のマーカーを迅速に低コストで判定できることになる。

1) - 2 ウシ遺伝性疾病のDNAマーカー育種手法の開発

(1) 研究年次：平成9年～平成16年

(2) 研究目的と期待される成果

ウシの遺伝性疾患の多くは常染色体性単純劣性遺伝病である。これまでに4種の疾患の原因遺伝子同定に成功しており、そのノウハウを生かして引き続き遺伝性疾患のキャリア（当該遺伝子をヘテロに保有する個体）をDNA診断する手法を開発し、発症を防止する。

本事業では、これらの疾病について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16年度までの成果を表3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の連携強化を進めてきた。

表3. 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	黒毛和種	Claudin-16 (新規)	37kbの欠損	あり	受理
モリブデン補酵素 欠損症	黒毛和種	MCSU (新規)	3塩基欠損	あり	受理
Chediak-Higashi 症候群	黒毛和種	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	黒毛和種	Claudin-16	56kbの欠損	あり	受理
軟骨異形成性矮 小体軀症	褐毛和種	LIMBIN (新規)	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

(3)-2. ウシ遺伝性疾患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患と関連する変異は認められなかった。

(3)-2-2. 乳頭欠損：一次スクリーニングおよび二次スクリーニングの結果、特定の染色体領域にマッピングすることができた。劣性遺伝の様式では説明できず、おそらく、優性であると予想された。しかしながら、もっとも強く連鎖した遺伝子座の疾患アレルだけでは発症しないケースがあったため、他の遺伝子座のアレルとの相互作用の可能性もある。表現型の取り方に工夫が必要と思われる。今後、サンプル数を増やし、原因遺伝子が解明できるように図る。

(3)-2-3. 眼球形成不全症（岡山大学との共同研究）：眼球形成不全症（multiple ocular defects, MOD）を発症した18頭を中心とする集団の連鎖解析を行い、特定の染色体領域にマッピングした。常染色体劣性遺伝病であった。

(3)-2-4. 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、腎機能不全症などである。

(4) 国内および海外の状況

今年度の顕著な進展は認められなかった。

(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。

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16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、特定経済形質に関与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20道県・家畜改良事業団・家畜改良センターの合計22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16年度までの収集の状況は表4の通りである。これらの収集したDNAサンプル数は約5万9千となった。これらのサンプルから25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。

表4. 平成16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	
	16	6,831	44,804
動物遺伝研究所	13	1,054	
	14	2,503	
	15	5,387	
	16	4,922	13,866
合 計			58,670

(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

我々は、ウシ経済形質(QTL)の解析において、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であるQTL Express(Haleyら、1994;2002)を使用している。平成16年度までに全国で23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5に示す。

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

表5. 平成16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	8	8	5
枝肉重量	13	12	6
脂肪交雑	32	17	13
ロース芯面積	28	19	5
バラ厚	21	7	1
皮下脂肪厚	17	10	1
合計	119	68	31

*染色体ワイズの有意水準。

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。

(3)-3. ウシ経済形質遺伝子座のポジショナルクローニングに関わる今年度の成果

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

家系解析により約16cMの領域にマッピングしていたが、ウシEST情報・ヒトとの比較地図作成・BAC整列地図作成の着手によるマーカーの開発を行い、家系産子の去勢牛数を1,010頭まで増やして解析した結果、約10cMまで狭めた。当該染色体領域において組換えを起こしている産子を用いた解析により、3.5cMまで狭め、この領域についてBAC整列地図を作成することに成功した。

今年度は、まず、この整列地図に80kb間隔で多型性マイクロサテライトマーカーを揃え、相関解析を行った。その結果、BACクローン3個で構成される領域に有意な相関を認めることができた。この領域にはヒトやマウスで検出されている遺伝子が相同で存在していた。定量PCRにより、ウシ脂肪組織での顕著な発現が認められ、また、ウシ脂肪細胞前駆細胞の分化細胞で発現が上昇することがわかった。また、イントロンに逆方向の短い転写体が検出され、同様な発現制御を受けていた。今後、遺伝子機能を明らかにしていく予定である。

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

母方半兄弟の種雄牛の父方半兄弟家系の解析で2cMまで領域を狭めた。該当領域に位置する既知のマイクロサテライトマーカー2個、ヒト相同遺伝子24種をアンカーとしてBACクローン合計152個をスクリーニングし、整列化を試みた。昨年度は、該当領域の整列化を完成し、2つの家系の解析から、SNPのタイピングにより、責任遺伝子を含むBACクローン1個（約150kb）まで狭めることに成功した。

今年度は、この領域についてすべてのSNPを明らかにし、さらに約50kbまで狭めた。この領域にヒトやマウスとの明らかな相同遺伝子を認めることはできなかった。遺伝子予測ソフトの予測した1つの転写体の発現が*Marbling-2*の劣った遺伝子型*q*と比べ、優れた遺伝子型*Q*で増加していることがわかった。今後は、この遺伝子に対象を絞り、培養系などで遺伝子機能を明らか

にしていく予定である。

(3)-3-3. CW-1 (枝肉重量-1) の解析 (鹿児島県との共同研究)

昨年度までに、該当領域8.1cMのBACクローンによる整列化を完成した。

今年度は、この領域について47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1.1Mb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。多数の肥育牛を材料とするフィールド試験により、Qは枝肉重量を23.0kg増加させ、二つ目のQは14.9kg増加させることがわかった。Qの遺伝子型頻度は約50%と計算された。

この1.1Mb領域にはヒトやマウスとの相同遺伝子が存在した。今後はこれらの遺伝子を対象に培養系などで遺伝子機能を明らかにしていく予定である。

(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年にリエージュ大学のグループは、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*) 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と報告している。

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。

上記の内容は昨年度までのものであり、今年度の顕著な進展は認められなかった。

(5) まとめと今後の進め方

Marbling-1、*Marbling-2*、*CW-1* 遺伝子を同定するため、候補遺伝子の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クスを活用することで責任遺伝子の同定を行う。

上記以外のファインマッピングされた経済形質領域についても、BAC整列化、高密度の多型性マーカーから、一般の黒毛和種集団を対象とした相関解析を行い、責任遺伝子を同定していく。

1) - 4 ウシ抗病性遺伝子座の解析

(1) 研究年次：平成7年～平成16年

(2) 研究目的と期待される成果

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、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、さらに進んで抗病性責任遺伝子の単離・特定を目的とする。小型ピロ、脂肪壊死症、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DNA診断で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。これらの内、今年度には乳房炎について進展があった。

(3) ウシ抗病性遺伝子座の解析に関わる今年度の成果

(3)-1. 小型ピロ抵抗性（北海道との共同研究）

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)-2. 乳房炎抵抗性の解析（家畜改良センター・北海道との共同研究）

牛群検定に参加した搾乳牛の初産時体細胞数を乳房炎抵抗性の指標とした。特定地域で飼養され、共通の祖父牛由来の6頭の種雄牛の半きょうだい家系集団から、体細胞数が低い集団（<25,000;297頭）と高い集団（>100,000;181頭）を収集し、連鎖解析した。二次スクリーニングの結果、2つの領域に有意な連鎖が認められた。最も強い連鎖のあった染色体22番の領域のBAC整列地図を作成し、既知の6遺伝子を調べたところ、FEZL（Forebrain embryonic zinc finger-like）にグリシン残基1個の挿入変異が見出された。すなわち、FEZLにはグリシン12個のストレッチ（12G）と13個のストレッチ（13G）という2つの遺伝子型があった。祖父牛の遺伝子型は12G/13G、6頭の種雄牛の内5頭も12G/13Gであったが、1頭は13G/13Gであった。種雄牛に12Gを導入した場合、体細胞数スコアを13.1%減少させ、スコア5以上になる確率を26.4%低下させていることがわかった。言い換えれば、12Gを有する種雄牛を選抜すると、乳房炎の発症は約25%減ることになる。乳房炎による損害は発症牛の更新などを含め年600億円と言われていることから、選抜への応用により年150億円の経済効果が期待できる。

次に、この挿入変異がどのようにして乳房炎抵抗性に影響するか調べた。まず、クロマチン

免疫沈降法により、乳腺におけるFEZLのターゲットとしてSema5A遺伝子を同定した。FEZL導入でSema5A発現は増加するが、FEZLのグリシン残基の挿入変異によりSema5A発現は低下すること、Sema5A導入で好中球の遊走を促すサイトカインであるインターロイキン-8 (IL-8) と腫瘍壊死因子- α (TNF- α) が誘導されることがわかった。培養乳腺細胞を大腸菌毒素であるLPSで刺激したところ、FEZL, Sema5A, IL-8, TNF- α の発現はいずれも有意に増加した。また、発現したmRNAからタンパク質への翻訳を特異的に阻害するsiRNAを使った実験により、FEZLは感染後期の自然免疫に寄与していることも明らかになった。従来、FEZLもSema5Aも神経繊維の伸長に関与していることが報告されており、免疫における役割は本研究で初めて示された。これらの結果から、FEZL遺伝子が乳房炎抵抗性の責任遺伝子であることが同定されたと言えよう。

(4) 国内および海外の状況

これまで、米国農務省、イリノイ大学、ノルウェー農業大学などから、体細胞数を指標とした乳房炎抵抗性のマッピングが報告されてきたが、ファインマッピングの段階には至っていない。いずれもグランドドーターデザインによる解析で、本研究のようなドーターデザインとは異なる。

(5) 今後の進め方

平成16年度に十勝地域でホルスタイン種をランダムに集めてFEZLの遺伝子型を調べたところ、抵抗性遺伝子型である12Gの頻度が4.5%まで低下していることがわかった。本研究を遂行するための採材は平成2年度から8年度にかけて行っており、この時採材した搾乳牛の母方由来の12G頻度は36.3%であった。10年程度の期間で約8分の1まで減少したと推定される。一方、「家畜共済事業統計表」によれば、同地域の共済加入件数に対する泌乳器病の件数は平成7年度では20.6%であったが、平成15年度には28.2%と増加している。FEZL-12G遺伝子型の減少と関係しているのだろうか？FEZL遺伝子型による選抜を行う必要があるかもしれない。全国、あるいは、全世界でのFEZL遺伝子型頻度の動向も興味ある課題である。

連鎖解析でマッピングしたもう一つの領域についても遺伝子同定まで進めば、乳腺における免疫抵抗性の機序が明らかになり、遺伝的な面からだけでなく、飼養管理面からの改善も可能になるだろう。

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。ヒトCJDの発症にプリオン

遺伝子129位のメチオニン・バリン多型が影響することが言われており、最近、ヒツジのスクレーパーの発症に抵抗性を示すヒツジプリオン遺伝子型として136位アラニン、154位アルギニン、171位アルギニンが報告された。また、マウスプリオン遺伝子への変異導入によって発症までの時間が変わることも報告されている。したがって、BSEの発症においてウシプリオン遺伝子の遺伝子型が影響することが想定される。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1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。

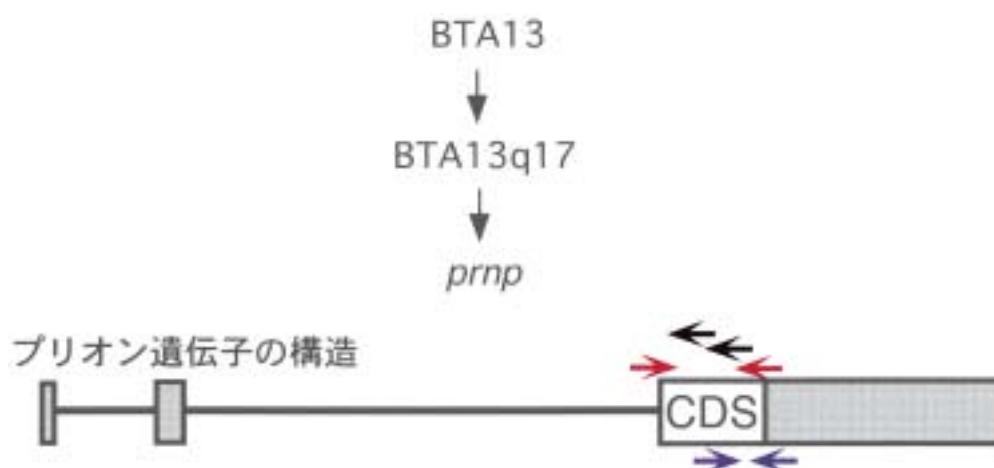


図1. ウシプリオン遺伝子の構造

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。

(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6）。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。

表6 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

(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1塩基多型 (SNP) を見いだしたが、いずれもアミノ酸変異を伴うものではなかった。また、オクタペプチドリピートのくり返し数は、5回、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ため、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 (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。

bovine PRNP	1	AVKSHI	SNT	VLFVAMWSDVGLCKKRPKPGCG	NNTGGSRYPGQGS	SPGGNRYPPQGGGGW	60
human PRNP	1	MA--NL	CKMM	VLFVAITWSDLGLCKKRPKPGG-	NNTGGSRYPGQGS	SPGGNRYPPQGGGGW	57
mouse PRNP	1	--MANL	LYNL	ALFVITWITDVGLCKKRPKPGG-	NNTGGSRYPGQGS	SPGGNRYPPQGGGT-M	56
ovis PRNP	1	AVKSHI	SNT	VLFVAMWSDVGLCKKRPKPGCG	NNTGGSRYPGQGS	SPGGNRYPPQGGGGW	60
bovine PRNP	61	QPHGGGGW	QPHGGGGW	QPHGGGGW	QPHGGGGW	QPHGGGGW	119
human PRNP	58	QPHGGGGW	QPHGGGGW	QPHGGGGW	QPHGGGGW	-----NGGGGTHG-	108
mouse PRNP	57	QPHGGGGW	QPHGGGGW	QPHGGGGW	QPHGGGGW	-----DGGGTHN-	107
ovis PRNP	61	QPHGGGGW	QPHGGGGW	QPHGGGGW	QPHGGGGW	-----NGGGGSHS-	111
bovine PRNP	128	MKHVAGAAAAGAVVGL	GGYMLGSAMSRP	LHFGSDYEDRYRENMH	RYPNQVYYRPVDD		179
human PRNP	109	MKHVAGAAAAGAVVGL	GGYMLGSAMSRP	LHFGSDYEDRYRENMH	RYPNQVYYRPVDE		168
mouse PRNP	108	MKHVAGAAAAGAVVGL	GGYMLGSAMSRP	LHFGSDYEDRYRENMY	RYPNQVYYRPVDD		167
ovis PRNP	112	MKHVAGAAAAGAVVGL	GGYMLGSAMSRP	LHFGSDYEDRYRENMY	RYPNQVYYRPVDD		171
bovine PRNP	180	YSNQNNFVHDCVNITV	KQHTVTTTTKGENFTETDI	KMERVVEQMCITQYQRESQAYYQR			239
human PRNP	169	YSNQNNFVHDCVNITV	KQHTVTTTTKGENFTETDV	KMERVVEQMCITQYQRESQAYYQR			228
mouse PRNP	168	YSNQNNFVHDCVNITV	KQHTVTTTTKGENFTETDV	KMERVVEQMCITQYQRESQAYYD-			226
ovis PRNP	172	YSNQNNFVHDCVNITV	KQHTVTTTTKGENFTETDI	KMERVVEQMCITQYQRESQAYYQR			231
bovine PRNP	240	GA-SV-I-	FSSPPVILLISFLIFLIIVG				264
human PRNP	229	GS-SM-V-	FSSPPVILLISFLIFLIIVG				253
mouse PRNP	227	GRR-SSTV	FSSPPVILLISFLIFLIIVG				254
ovis PRNP	232	GA-SV-I-	FSSPPVILLISFLIFLIIVG				256

図2. プリオンタンパク質のアミノ酸配列とアミノ酸置換

(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。

(4)-2-3. 十勝地域由来のホルスタイン種についての追加検索

次項で述べるように、約10年前に、Yoshimotoらにより、十勝地域のホルスタイン種1頭(7頭を調査)に、154S(セリン)→N(アスパラギン)のアミノ酸置換を起こす多型が報告されている。しかしながら、(4)-2-3.の検索においては、1,110頭のホルスタイン種個体を調査したものの、同多型は検出できなかった。1,110頭の中には、北海道由来の個体は、5頭しか含まれていなかったため(表6)、北海道、特に十勝地域のホルスタイン種について、さらに追加調査を行った。

十勝地域のホルスタイン種500頭について、1:オクタペプチドリピートよりC末端側(106番目のスレオニン残基(T)から終止コドンまで)、2:オクタペプチドリピートよりN末端側(開始コドンから53番目のプロリン残基(P)まで)を調査した。しかしながら、アミノ酸変異をもたらすSNPは検出されなかった。

(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%近くまでには至っていない。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. 前年度までの成果～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、任意のウシ

染色体についてマイクロサテライトマーカー39個のタイピングを行い、母由来ハプロタイプ情報から連鎖不平衡係数 D' を算出した。従来ウシゲノム（乳用種）のハプロタイプブロックは数十cMと報告されていたが、本試験により黒毛和種においても同様の結果を得た。染色体上にはハプロタイプブロックが細かく分断されていると思われる箇所が存在し、品種特異的なハプロタイプブロックが存在する可能性を示唆した。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。

(4)-2. 今年度の成果

従来の連鎖不平衡係数の算出には既存のプログラム「Arlequin」が用いられてきたが、使用時の煩雑さを改善するため、ハプロタイプを推定するプログラムを追加したものを開発した。

解析対象のウシ染色体領域として任意に3ヶ所を選び、新規マイクロサテライトの開発を行った。既存のマイクロサテライトと合わせ、28-30個の多型性マイクロサテライトを選定し、その内の1領域（6cM, 28個）について解析を行った。黒毛和種については市場に出荷された非血縁個体192頭、および父方半きょうだい個体872頭を選び、ホルスタイン種については非血縁個体96頭を選定した。すべてのマーカーペアについての連鎖不平衡係数 D' を求め、連鎖不平衡度の分布を調べた。この領域はBACコンティグとしてBACクローンが連結されているので、BACクローン数をマーカー間の距離の尺度とし、便宜的にBAC単位と呼ぶこととした。仮に平均BAC長が200kbだとすると、（隣接するBACクローン同士は必ず互いに重なりがあるので）10BAC単位は推定1Mbとなる。

比較の結果、黒毛和種において10BAC 単位と20BAC 単位の2ヶ所に比較的大きなハプロタイプブロックと思われる領域が観察されたが、ホルスタインにおいてはいずれの領域もブロックが分断されていた。上記二カ所の領域をそれぞれ表す「マーカーペア1」と「マーカーペア2」のハプロタイプ頻度の比較をおこなった。マーカーペア2において黒毛和種特異的およびホルスタイン特異的なハプロタイプ頻度の顕著な偏りが観察された。

そこで上記のマーカーペアを用いた品種鑑定能力を検討した。2マーカーのアリル情報から、黒毛である事後確率とホルスタインである事後確率を比較した。マーカー A のアリル i および B のアリル j からなるハプロタイプ $A_i B_j$ の、品種1集団内における頻度を $P_{1A_i B_j}$ 、品種2集団内での頻度を $P_{2A_i B_j}$ とする。ある個体をマーカー A および B によりジェノタイプングをおこない、ジェノタイプ A_x, A_y, B_z, B_w を得たとする。個体が品種1である事前確率を0.5とすると、品種1である事後確率は $A_x = A_y$ または $B_z = B_w$ のとき（相が決定するので）

$$L_1 = \frac{0.5P_{1A_x B_z} P_{1A_y B_w}}{0.5P_{1A_x B_z} P_{1A_y B_w} + 0.5P_{2A_x B_z} P_{2A_y B_w}}$$

$A_x \neq A_y$ かつ $B_z \neq B_w$ のとき、

$$L_1 = \frac{0.5P_{1A_x B_z} P_{1A_y B_w} + 0.5P_{1A_x B_w} P_{1A_y B_z}}{0.5P_{1A_x B_z} P_{1A_y B_w} + 0.5P_{1A_x B_w} P_{1A_y B_z} + 0.5P_{2A_x B_z} P_{2A_y B_w} + 0.5P_{2A_x B_w} P_{2A_y B_z}}$$

同様に L_2 を算出した。品種1を試料としたとき、 L_1/L_2 が1000を超えるような事後確率比が得られたものを判定成功とした。また L_1/L_2 が1000分の1を下回るとき誤判定とした。

上記の方法で、ハプロタイプ推定に用いた個体と同一サンプルを対象に検査をした。「ホルスタインをホルスタインと判定」できた例がマーカーペア1およびマーカーペア2を用いたとき、

それぞれ57.1%（77例中44例）および98.9%（90例中89例）であった。また「黒毛和種を黒毛和種と判定」できた例がマーカーペア1、マーカーペア2でそれぞれ10.2%（206例中21例）および99.8%（628例中627例）であった。いずれの品種に関してもマーカーペア2による判定成功率が高かった。なお、誤判定の例はいずれの品種サンプル、いずれのマーカーペアにおいても一つもなかった。

(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。

(6) 今後の進め方

今年度行ったと同様な手法でもう2領域の連鎖不平衡を調べ、黒毛和種とホルスタイン種を識別するマーカーペアを明らかにする。合計3領域について、黒毛和種とホルスタイン種間のF1交雑種、欧米肉用種としてアンガス種とヘレフォード種を解析の対象に加え、開発したマーカーペアの品種識別における有効性を調べる。そのため、2領域から新規マイクロサテライトを開発する。

2. 平成15年度研究発表

1) 論文発表

1. Tahara, K., Aso, H., Yamasaki, T., Rose, M. T., Takasuga, A., Sugimoto, Y., Yamaguchi, T., Tahara, K., Takano, S.: Cloning and expression of type XII collagen isoforms during bovine adipogenesis. (2004) *Differentiation*, 72, 113-122.
2. Mizoshita K, Ihara N, Carpio CM, Bennett GL, Ponce de Leon FA, Beattie CW, Sugimoto Y.: Chromosomal mapping of 65 microsatellites developed from microdissected BTA14 and BTA20 chromosome-specific genomic libraries. (2004) *Anim Genet.*, 35, 408-410.
3. Ihara, N., Takasuga, A., Mizoshita, K., Takeda, H., Sugimoto, M., Mizoguchi, Y., Hirano, T., Itoh, T., Watanabe, T., Reed, K. M., Snelling, W. M., Kappes, S. M., Beattie, C. W., Bennett, G. L., Sugimoto, Y.: A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. (2004) *Genome Res.*, 14, 1987-1998.
4. Snelling, W. M., Gautier, M., Keele, J. W., Smith, T. P., Stone, R. T., Harhay, G. P., Bennett, G. L., Ihara, N., Takasuga, A., Takeda, H., Sugimoto, Y., Eggen, A.: Integrating linkage and radiation hybrid mapping data for bovine chromosome 15. (2004) *BMC Genomics*, 5, 77-90.
5. Mizoshita, K., Hayashi, H., Kubota, T., Yamakuchi, H., Todoroki, J., Watanabe, T., Sugimoto, Y.: Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a half-sib family constructed from a commercial population of purebred Japanese Black (Wagyu) cattle. (2004) *J. Anim. Sci.*, 82:3415-3420.
6. Okada, K., Ishikawa, N., Fujimori, K., Goryo, M., Ikeda, M., Sasaki, J., Watanabe, D., Takasuga, A., Hirano, T., Sugimoto, Y.: Abnormal development of nephrons in claudin-16-defective Japanese black cattle. (2005) *J. Vet. Med. Sci.*, 67, 171-178.
7. Hirayama, H., Kageyama, S., Moriyasu, S., Hirano, T., Sugimoto, Y., Kobayashi, N., Inaba, M., Sawai, K., Sadao Onoe, S., Minamihashi, A.: Genetic diagnosis of claudin-16 deficiency and sex determination in bovine preimplantation embryos. (2004) *J. Reprod. Dev.*, 50, 613-618
8. 渡辺大作、阿部省吾、植松正己、阿部榮、遠藤祥子、後藤浩人、小林隆之、藤倉尚士、小形芳美、伴 顕、平野 貴、杉本喜憲、齋藤博水：腎不全牛における過長蹄の発現と血清ビタミンAおよびレチノール結合蛋白質の動態 (2004) *家畜臨床誌*、27、41-45

2) 学会発表

1. Ihara, N., Takasuga, A., Mizoshita, K., Takeda, H., Sugimoto, M., Mizoguchi, Y., Hirano, T., Itoh, T., Watanabe, T., Reed, K.M., Snelling, W.M., Kappes, S.M., Beattie, C.W., Bennett, G.L., Sugimoto, Y.: A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. XXIX International Conference on Animal Genetics, September 2004, Tokyo, Japan
2. Takasuga, A., Itoh, T., Watanabe, T., Ihara, N., Mariani, P., Beattie, C.W., Sugimoto, Y.: A comprehensive radiation hybrid map of the bovine genome comprising 5,757 loci, XXIX International Conference on Animal Genetics, September 2004, Tokyo, Japan.
3. Taniguchi, Y., Takano, A., Doronbekov, K., Sugimoto, Y., Yamada, T., Sasaki, Y.: Genomic organization and promoter analysis of the bovine ADAM12 gene. XXIX International Conference on Animal Genetics, September 2004, Tokyo, Japan
4. Abdol-Rahim, A., Uchida, K., Ihara, N., Maryam, K., Tsuji, T., Hasegawa, T., Sugimoto, Y., Ogawa, H., Kunieda, T.: Linkage mapping of the locus responsible for bovine congenital eye abnormality on the bovine chromosome 18. XXIX International Conference on Animal Genetics, September 2004, Tokyo, Japan
5. Sugimoto, M., Ohtake, T., Fujikawa, A., Sugimoto, Y.: FEZL affects somatic cell count through SEMA5A in Holstein-Friesian cattle. XXIX International Conference on Animal Genetics, September 2004, Tokyo, Japan
6. Fujikawa, A., Kawamoto, S., Watanabe, T., Hokiyama, H., Yamamoto, Y., Sugimoto, Y.: QTL mapping of resistance to *Theileria sergenti* in backcross calves. XXIX International Conference on Animal Genetics, September 2004, Tokyo, Japan
7. Watanabe, T., Takasuga, A., Mizoguchi, Y., Hirano, T., Ihara, N., Takano, A., Yokouchi, K., Fujikawa, A., Chiba, K., Kobayashi, N., Tatsuda, K., Oe, T., Furukawa, M., Nishimura, A., Imai, K., Fujita, T., Nagai, H., Inoue, K., Mizoshita, K., Ogino, A., Sugimoto, Y.: A comprehensive QTL map of Japanese Black cattle (Wagyu). XXIX International Conference on Animal Genetics, September 2004, Tokyo, Japan
8. Takano, A., Mizoshita, K., Nagai, S., Tatsuda, K., Mizoguchi, Y., Takasuga, A., Sugimoto, Y.: A 1.4 Mb-critical region for carcass weight QTL on BTA 14 (*CW-1*) identified in Japanese black cattle population using IBD-based analysis and association study. XXIX International Conference on Animal Genetics, September 2004, Tokyo, Japan
9. Mizoguchi, Y., Iwamoto, E., Tatsuda, K., Watanabe, T., Sugimoto, Y.: Identification of a

major gene locus for marbling spanning 450 kb at the telomeric region of BTA 21 using Japanese Black cattle population. XXIX International Conference on Animal Genetics, September 2004, Tokyo, Japan.

10. Hirano, T., Inoue, K., Hara, Y., Watanabe, T., Sugimoto, Y.: Characterization of marbling Q-specific haplotype in Japanese Black cattle (Wagyu) population through BAC contig construction. XXIX International Conference on Animal Genetics, September 2004, Tokyo, Japan.
11. Yokouchi, K., Mizoshita, K., Mizoguchi, Y., Iwamoto, E., Takasuga, A., Sugimoto, Y.: Fine-mapping of a bovine QTL for marbling on BTA 4 using association study. XXIX International Conference on Animal Genetics, September 2004, Tokyo, Japan
12. Kobayashi, N., Hirano, T., Watanabe, T., Katoh, S., Sobajima, H., Hayashi, N., Ohtani, Sugimoto, Y.: QTL mapping for carcass traits on BTA 2 and BTA 24 in a paternal half-sib family comprising purebred Japanese Black cattle (Wagyu) population. XXIX International Conference on Animal Genetics, September 2004, Tokyo, Japan
13. Imai, K., Ihara, N., Watanabe, T., Tsuji, S., Fukuma, T., Osaki, Y., Ogata, Y., Matsushige, T., Sugimoto, Y.: QTL for beef marbling mapped on BTA 9 and BTA 14 in a paternal half-sib family from purebred Japanese Black cattle population. XXIX International Conference on Animal Genetics, September 2004, Tokyo, Japan
14. Ogino, A., Tanabe, Y., Hirano, T., Watanabe, T., Morita, M.: Mapping of QTL for carcass traits in Japanese Black cattle using data from half-sib families. XXIX International Conference on Animal Genetics, September 2004, Tokyo, Japan
15. Burrell, D., Moser, G., Hetzel, J., Mizoguchi, Y., Hirano, T., Sugimoto, Y., Mengersen, K.: Meta analysis confirms associations of the TG5 thyroglobulin polymorphism with marbling in beef cattle. XXIX International Conference on Animal Genetics, September 2004, Tokyo, Japan
16. Odani, M., Watanabe, T., Yokouchi, K., Sugimoto, Y., Fujita, T., Sasaki, Y.: Genome-wide linkage disequilibrium in Japanese Black cattle. XXIX International Conference on Animal Genetics, September 2004, Tokyo, Japan
17. 杉本真由美、藤川朗、杉本喜憲：乳房炎抵抗性遺伝子の同定とフィールドにおける遺伝子型調査。日本乳房炎研究会第9回学術集会、
18. Abdol-Rahim, A., 内田和幸, 井原尚也, Grirotoyal, Maryam, K., 辻 岳人, 杉本喜憲, 小川博之, 国枝哲夫: Comparative mapping of bovine chromosome 18 revealed candidate genes

for bovine multiple ocular defects. 日本畜産学会第104回大会、2005年3月、東京。

19. 齊藤健志、中津祐一郎、高須賀晶子、Hussein, B.、森田光夫、杉本喜憲、上田純治、渡辺智正：ウシMx遺伝子のプロモーターに関する解析。日本畜産学会第104回大会、2005年3月、東京。
20. 小江敏明、溝口康、杉本喜憲：黒毛和種・気高系種雄牛の父方半兄弟家系における枝肉形質のQTL解析。日本畜産学会第104回大会、2005年3月、東京。
21. 古川恵、平本圭二、溝口康、杉本喜憲：黒毛和種の父方半兄弟家系におけるQTL解析とマーカーアシスト選抜への応用。日本畜産学会第104回大会、2005年3月、東京。
22. 谷口幸雄、高野 淳、杉本喜憲、山田宣永、佐々木義之：ウシADAM12プロモーター解析。日本畜産学会第104回大会、2005年3月、東京。
23. 小谷 基、小邦朋子、松本道夫、渡邊敏夫、横内 耕、杉本喜憲、藤田達男、佐々木義之：褐毛和種における連鎖不平衡の広がりや分布に関する検討。日本畜産学会第104回大会、2005年3月、東京。

3) 学会発表要旨

[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1.

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】マイクロサテライトベースの連鎖地図は、単一遺伝形質のみならず、QTLのような量的形質の染色体マッピングに必須のゲノム解析ツールである。ウシにおいては、1997年に米国農務省肉畜研究センター（USDA MARC）が開発したマーカー数1,250からなる連鎖地図が標準となっていたが、精度の高いマッピングやマップされた領域から候補遺伝子の絞り込み、そして、物理地図へのアンカーの橋渡しを行うには、マーカー数が足りなかった。そこで、我々は、マイクロサテライト濃縮ライブラリーから大規模なマイクロサテライトの単離を行い、ウシ高密度連鎖地図を作製するために、USDA MARCの連鎖地図の大幅な改訂を行った。

【方法・結果】まず濃縮ライブラリーから57,600クローンを単離し、コロニーハイブリダイゼーションにより5,750個が陽性であった。その中から繰り返し数9以上で新規のものについて、プライマー設計可能な2,382個を得た。中でもマッピング家系内で多型を示し、適切な増幅断片を与えた1,750個を連鎖マッピングの対象とした。さらに、染色体特異的ライブラリーや、BAC/YACなどから単離した多型な196個、そして既に報告されているが、USDA MARCの地図上にマ

ップされていない424個も連鎖マッピングの対象とした。その結果2,277個を地図上にマップすることができた。これにより、新しい連鎖地図は、全マーカー数3,960個より成り、平均のマーカー間隔が1.4cM、全ゲノムの半分以上がマーカー間隔2cM未満でカバーされた非常に高密度な連鎖地図となった。

(国際動物遺伝学会第29回大会、2004年9月、東京)

学会発表 2.

題 目：5,757マーカーからなるウシRH地図の作製

発表者：高須賀晶子¹、渡邊敏夫¹、井原尚也¹、Mariani,P.²、Beattie,C.W.³、杉本喜憲¹

所 属：¹畜技協・動物遺伝研、²ミネソタ大・病態生物、³ネバダ大・動物生物工

要 旨：【目的】私たちは、これまでに、92細胞株から成る7000-rad放射線照射体細胞雑種 (Radiation hybrid: RH) パネルを作成し (Marianiら、ISAG 2000)、マイクロサテライトマーカーによるフレームワークの構築と遺伝子のマッピングを行ってきた (伊藤ら、ISAG 2002)。今回、マイクロサテライトおよび遺伝子マーカーの数を倍加することによって、ウシの全常染色体 (29本) とX染色体の、信頼性の高い詳細なRH地図を作成した。

【方法・結果】まず、動物遺伝研究所と米国農務省肉畜研究センター (USDA-MARC) との共同で作成したShirakawa-USDAウシ連鎖地図上にマッピングされた3216個のマイクロサテライトを用いて、連鎖地図上の位置を基準としてフレームワーク地図を作成した。その結果、私たちのパネルは、全ゲノム領域をよく保持しており、十分な解像度を持つと判断された。次に、このフレームワークを用いて、2,377個のウシ遺伝子をマッピングし、全マーカー数5593個のRH地図を作成した。これらのマーカーのうち1,716個は、ヒトゲノム上の配列と同一性をもち、これらを用いてウシ-ヒトゲノム比較地図を作成した。この比較地図により、ウシ-ヒトゲノム間のより複雑なシンテニーが明らかになった。

ウシの全ゲノムRH地図には、他に、Womackらの5,000-rad RHパネルを用いたもの (マーカー数：3,021、2005年1月時点) と、ロスリン研究所とINRAなどの共同で作られた3,000-rad RHパネルを用いたもの (マーカー数：2,274) があるが、私たちの地図が、最もマーカー数が多く、また、連鎖地図と統合しているため、最も信頼性が高いと考えられる。

私たちの地図 (SUNbRH地図) は、ウシの遺伝子やBACクローン末端塩基配列をマッピングするツールを提供し、また、発現遺伝子地図の作成やBACフィンガープリント地図の正確度の評価に役立つ。このRH地図は、Shirakawa-USDA連鎖地図やBACフィンガープリント地図とともに、ポジショナルクローニングに必須のゲノムツールと言える。

(国際動物遺伝学会第29回大会、2004年9月、東京)

学会発表 7.

題 目：黒毛和種 (和牛) における包括的QTL地図。

発表者：渡邊敏夫¹、高須賀晶子¹、溝口 康¹、平野 貴¹、井原尚也¹、高野 淳¹、横内 耕¹、藤川 朗²、千葉和義³、小林直彦⁴、龍田 健⁵、小江敏明⁶、古川 恵⁷、西村一安部亜津子⁸、今井佳積⁹、藤田達男¹⁰、永井晴治¹¹、井上和也¹²、溝下和則¹³、荻野 敦¹⁴、杉本喜憲¹

所 属：¹畜技協・動物遺伝研、²北海道畜試、³宮城県畜試、⁴岐阜県畜産研、⁵兵庫県中農技セ、⁶鳥取県畜試、⁷岡山県総畜セ、⁸鳥根県畜試、⁹広島県畜技セ、¹⁰大分県畜試、¹¹長崎県肉改セ、¹²宮崎県畜試、¹³鹿児島県肉改研、¹⁴家畜改良事業団

要 旨：【目的・方法・結果】動物遺伝研、各道県試験場、および家畜改良事業団との共同研究により、15の大規模な父方半きょうだい家系をゲノムワイドでQTL解析することで、肉質、枝肉重量等のQTLを5%有意水準で100以上検出することができた。このうち1%有意水準を超えた63個のQTLをウシゲノム連鎖地図上に描き、「和牛QTLマップ」を作製した。これほど多くのQTLを同一の連鎖地図上にマップした報告例はこれまでにない。個々の解析の詳細は同学会大会において、高野ら（学会発表6）、溝口ら（学会発表7）、平野ら（学会発表8）、横内ら（学会発表9）、小林ら（学会発表12）、今井ら（学会発表13）および荻野ら（学会発表14）がおこなっている。

（国際動物遺伝学会第29回大会、2004年9月、東京）

学会発表8.

題 目：黒毛和種14番染色体の枝肉重量関連領域*CW-1*におけるIBD解析・相関解析を用いた1.4 Mb critical regionの同定

発表者：高野 淳¹、溝下和則²、永井晴治³、龍田 健⁴、溝口 康¹、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、³長崎県肉改セ、⁴兵庫県中農技

要 旨：【目的】現在までに我々は、黒毛和種の父方半きょうだい家系Aを用いた連鎖解析により、枝肉重量QTL (*CW-1*) をBTA14セントロメア付近8.1cMの領域にマップした (Mizoshita *et al.*, 2004: 上記論文リスト5)。黒毛和種の枝肉重量における*CW-1*の遺伝的寄与率は16.6%で、*CW-1-Q*、*-q*のアリル効果は枝肉重量で最大37kgの増加効果が見込まれる。別な黒毛和種の家系Bにおいても*CW-1*と同領域に枝肉重量QTLを検出していることから、この2家系の種雄牛のハプロタイプを比較したところ、8.1cMに渡って共通の*Q*領域が見つかった。

【方法・結果】本領域に位置する5種類のヒト相同遺伝子および18個のマイクロサテライト (MS) マーカーをもとに、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、60個のBACクローンで構成される約6.8MbのBAC整列地図を得た。各BACクローンから合計54個の新規MSマーカーを開発し、高密度なMSマーカー地図を作成した。これらのMSマーカーを用いて、*CW-1* QTLを検出している別家系EおよびF、QTLは検出していないが増体のよい産子が多い家系Cの3頭の種雄牛を含めた計4頭のハプロタイプ再構成を行ったところ、さらに狭い領域において*Q*共通領域が検出された。ヒトに換算して約1.4Mbであるこの*Q*領域の存在は黒毛和種一般集団を対象とした相関解析からも実証された。現在1.4MbにおいてSNP探索を進めおり、このSNPを用いた相関解析により*CW-1*の候補遺伝子を絞り込む予定である。

（国際動物遺伝学会第29回大会、2004年9月、東京）

学会発表9.

題 目：黒毛和種の染色体21番テロメア部分にマッピングされた脂肪交雑遺伝子座は450kb領域に存在する

発表者：溝口 康¹、岩本英治²、龍田 健²、渡邊敏夫¹、杉本喜憲¹

所 属：¹畜技協・動物遺伝研、²兵庫県中農技

要 旨：【目的】現在までに我々は、父方半きょうだい家系 (872頭) を用いた連鎖解析を行い、21番染色体のテロメア側に脂肪交雑連鎖領域を同定した。当該領域を狭め、責任遺伝子同定を行うには、この領域の詳細な物理地図が不可欠である。そこで本研究は、BACコンテグ地図の作成及びマイクロサテライトマーカー (MS) の開発を行った。更に、開発したマーカーを用い

て相関解析を行い、当該領域を狭めることを試みた。

【方法】 この領域に存在する既知の14個のEST及び8個のMSを含むBACクローンをPCRスクリーニング法により単離した。BACクローン末端配列でゲノムウォーキングした。得られたBACクローンより(CA/GT)_nをプローブとして、MSを単離した。3,747頭の集団より脂肪交雑スコアの高い個体378頭と低い個体430頭を相関解析に用いた。相関解析は、多型性のある45マーカーを選択し、フィッシャー正確テストによりマーカーワイズとペアワイズで検出した。

【結果】 BACクローン126個単離し整列化した。コンティグ地図を構成するBACクローンは、65個であった。この領域から新たに開発したMSは74個、既知マーカーを含め80kbの平均間隔で配置した。ヒトドラフト配列情報(UCSC)より、この領域は約6.5Mbと推定され、既知遺伝子は35個、予想される遺伝子は27個存在していた。相関解析の結果、有意な領域(450kb)を推定した。その領域には6個の遺伝子が存在していた。今後は、この領域のシーケンシングとSNPの開発、遺伝子発現プロファイルを解析する予定である。

(国際動物遺伝学会第29回大会、2004年9月、東京)

学会発表10.

題 目：和牛集団における脂肪交雑関連領域のBACコンティグ作成と*Q*-ハプロタイプの解析

発表者：平野 貴¹、井上和也²、原 好宏²、渡邊敏夫¹、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】家畜の重要な経済形質の多くはQTLであり、これらを特定することでマーカーアシスト選抜を利用したより効率的な育種が可能となる。我々は、黒毛和種のある特定種雄牛の去勢牛産子327頭からなる父方半きょうだい家系を用いてQTL解析を行い、脂肪交雑に関するQTLをBTA7にマップした。しかし、用いた種雄牛と異父兄弟である種雄牛とその父牛の父方半きょうだい家系を用いた解析では、両家系ともBTA7に同様な結果を得ることはできなかった。そこで、これら3種雄牛のハプロタイプと各家系の平均BMS値を比較した。我々は、脂肪交雑に関する*Q*-ハプロタイプは有意な結果を得た家系の種雄牛だけが有すると考え、QTL領域を6-cM以内に絞り込んだ。QTL領域をさらに詳細に解析するために、我々はBACライブラリー(RPCI-42)を用いて当該領域をカバーするBACコンティグを作成し、新たにマイクロサテライト(MS)マーカーとSNPを開発した。コンティグの作成は、6-cM領域に位置する2つのMSマーカーと24個の既知遺伝子を用いてBACライブラリーをスクリーニングし、単離したBACクローンの末端配列を用いて行った。

BACコンティグは60個のクローンから構成され、対応するヒトゲノム領域は7.1-Mbに渡る。ヒトゲノムの情報から、当該領域には148個の遺伝子が存在すると考えられた。また、コンティグから68個のMSマーカーと45個のSNPを開発し、3種雄牛のハプロタイプを決定した。最終的に、我々は一つのBACクローン内に約50-kbの*Q*-特異的ハプロタイプを確認した。

(国際動物遺伝学会第29回大会、2004年9月、東京)

学会発表11.

題 目：ウシ染色体4番脂肪交雑QTL領域の相関解析によるファインマッピング

発表者：横内 耕¹、溝下和則²、溝口康¹、岩本英治³、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、³兵庫県中農技セ

要 旨：【目的】4番染色体についてはこれまで、溝下らにより鹿児島県の黒毛和種1家系を用

いた半兄弟家系解析が行われ、35-85cMの領域に脂肪交雑QTLが報告された (J. Anim. Sci., 2004: 上記論文リスト5)。一方、溝口らによって行われた兵庫県の黒毛和種1家系を用いた家系解析によって、やはり4番染色体40-80 cMの領域に脂肪交雑QTLが検出されている。我々は、これらが共通祖先より由来した同一QTLであると仮定し、両種雄牛のハプロタイプ比較と、黒毛和種集団を対象とした相関解析によって脂肪交雑QTLの絞り込みを試みた。

【方法・結果】 4番染色体上40-70cMの領域に50のマイクロサテライトマーカーを配置しハプロタイプを比較したところ、両種雄牛のQ間で広範囲に一致した領域は検出されず、共通であるのは3cM未満の狭い9領域のみであった。したがって候補領域はこれらの狭い領域のいずれかに保存されていると考えられた。次に、BMSによってHighとLowの2グループに分けられた黒毛和種集団について、集団間で各種雄牛のQ頻度の違いを検定し、BMSとの相関が強い領域を検出した。その結果、45.9, 46.1, 46.5, 58.1, 67.8cMの5つの領域において有意な相関が検出され ($p < 0.05$)、また58.1cM付近において最大の相関が得られた ($p = 0.012$)。58cM付近には両種雄牛間でQが共通である2cMの領域が含まれることから、領域内に新たに25のマーカーを配置し、同様に解析したところ、6マーカーによって支持される1.5cMの候補領域が検出された ($p = 0.03$)。

以上のように、共通ハプロタイプ領域を調べることで脂肪交雑QTLの候補領域を大幅に絞り込むことに成功した。しかしながら、両種雄牛のQがいずれも母由来であったことからその共通祖先は推定出来ず、これらのQTLが真にIBDあるかどうかについてはさらなる検討が必要と思われる。最近の関連した報告として、各種雄牛と血縁関係にある他の種雄牛についても半兄弟家系解析が行われており、Qを有する種雄牛について、やはり4番染色体上に脂肪交雑QTLが検出された。今後、こうした種雄牛と比較によってIBDの検証が期待される。

(国際動物遺伝学会第29回大会、2004年9月、東京)

学会発表20.

題 目：黒毛和種・気高系種雄牛の父方半兄弟家系における枝肉形質のQTL解析

発表者：小江敏明¹、溝口康²、杉本喜憲²

所 属：¹鳥取県畜試、²畜技協・動物遺伝研

要 旨：【目的】鳥取県では現在、黒毛和種のDNA情報を用いた育種手法の開発に取り組んでいる。本研究では優良遺伝子座領域を推定するために気高系種雄牛の父方半兄弟家系を用いてQTL解析を行った。

【方法】 気高系種雄牛Aの肥育産子383頭について、234個のマイクロサテライトマーカー (MSマーカー) を全常染色体上に配置し、1次スクリーニングを行った。解析対象形質は枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚、皮下脂肪、歩留基準値、BMSとした。ゲノムワイズ1%水準で有意であった領域について、さらにMSマーカーを追加し2次スクリーニングを行った。

【結果】 1次スクリーニングの結果、染色体ワイズ1%水準で有意であったQTL領域を11カ所同定した。BMSにおいてゲノムワイズ1%水準で有意であった9番染色体に着目し、MSマーカーを29個追加し、2次スクリーニングを行った。その結果、ロッドスコア12.4、ハプロタイプ効果はBMS-Noで1.1を示し、この効果の全分散に占める割合は0.074であった。この領域について、種雄牛Aの後代牛である種雄牛および候補種雄牛のハプロタイプ解析を行った結果、10頭中5頭が優良遺伝子座領域を保有していた。また、繁殖雌牛においては4頭中、3頭が保有していた。今後、県内の改良基礎雌牛群等の調査を行い、効果検証を実施する予定である。

(第104回日本畜産学会大会、2005年3月、東京)

学会発表21.

題 目：黒毛和種の父方半兄弟家系におけるQTL解析とマーカーアシスト選抜への応用

発表者：古川恵¹、平本圭二¹、溝口康²、杉本喜憲²

所 属：¹岡山総畜セ、²畜技協・動物遺伝研

要 旨：【目的】効率的な岡山県種雄牛造成のため、経済形質に影響を及ぼしているゲノム領域を検出することを目的として、岡山県基幹種雄牛1頭に着目した半兄弟家系を構築し、QTL解析を実施した。

【方法】1次スクリーニングは岡山県基幹種雄牛1頭とその産子去勢166頭についてQTL解析を行った。解析対象形質は枝肉重量、BMS No、ロース芯面積とした。MSマーカー197個を全常染色体に配置した。染色体レベル5%有意水準で検出された領域の染色体について、さらに詳細に各染色体28個のマーカーを配置し、273頭を用いて2次スクリーニングを実施した。有意な結果が得られた領域について、岡山県所有の種雄牛産子の直接検定牛及び候補種雄牛及び供卵牛16頭について優良ハプロタイプ保持調査を行った。

【結果】BMS No.に関して8番染色体に、ロース芯面積に関して9、14番染色体に、chromosome-wise 5%及び1%水準で有意な領域を同定した。これら優良ハプロタイプを含むマーカーを使用して産子のマーカー型判定を行った結果、各形質全てにおいて優良ハプロタイプを保持している子孫牛はいなかったが、BMS No.については8頭、ロース芯面積については8頭保持していた。今後県内の繁殖雌牛の調査等も行い、同定した優良ハプロタイプの保有状況を明らかにし、本県のDNA手法の役立てたいと考える。

(日本畜産学会第104回大会、2005年3月、東京)

学会発表23.

題 目：褐毛和種における連鎖不平衡の広がりや分布に関する検討

発表者：小谷基¹、小邦朋子²、松本道夫²、渡邊敏夫³、横内耕³、杉本喜憲³、藤田達男⁴、佐々木義之¹

所 属：¹京大院農、²熊本農研セ畜研、³畜技協・動物遺伝研、⁴大分県畜試

要 旨：【目的】演者等は黒毛和種集団における連鎖不平衡の広がりや分布に関する検討を行い、国際動物遺伝学第29回大会(2004)において報告した。そこで、本研究では褐毛和種集団において同様の検討を行い、結果を比較した。

【方法】材料として、熊本系褐毛和種集団における406頭の肥育牛からなる半きょうだい家系およびゲノムワイドに散在するマイクロサテライトDNAマーカー156個を用いた。連鎖不平衡をD'およびマーカーアレル間に存在する関連性の有意性検定により評価した。さらに、D'値についてマーカー間距離、染色体、集団およびそれらの間の交互作用の効果を挙げた最小二乗分散分析をおこなった。

【結果】高水準の連鎖不平衡が数十cMにわたって広がっており、マーカー間距離が増加するに従ってD'値は有意に減少した。マーカー間距離が40cM以下であるマーカー対において有意な連鎖不平衡が高頻度で観察された。狭いマーカー間距離においてD'値が急激に減少したことから、より精細にQTLを位置づける戦略として連鎖不平衡の情報を利用することが有益であるものと推察される。D'値に関する分散分析の結果、集団の効果が5%水準で有意でなく、黒毛和種集団と褐毛和種集団においてD'値の分布に異質性がないことが示唆される。

(日本畜産学会第104回大会、2005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16年度の委員会は平成17年3月15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開発の成果について

- a. ウシ染色体地図の作成
- b. ウシ遺伝性疾患の解析
- c. ウシ経済形質遺伝子座の解析
- d. ウシ抗病性遺伝子座の解析
- e. ウシプリオンタンパク質多型の探索
- f. 牛肉品種鑑定

② 国際会議ISAG 2004に見る家畜ゲノム研究の動向について

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16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

伊藤 克己	(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
新山 正隆	(社) 家畜改良事業団専務理事
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 圀生	(独) 農業・生物系特定産業技術研究機構理事

研究情勢報告者

国枝 哲夫	岡山大学農学部教授
佐々木義之	京都大学大学院農学研究科動物遺伝育種学教授

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16年度委員会は、平成17年2月14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 ウシゲノム解析用ツールの作成について
- ② ウシ経済形質遺伝子座の解析について
 - a. 黒毛和種の脂肪交雑遺伝子*Marbling-1*遺伝子のクローニング
 - b. 黒毛和種の脂肪交雑遺伝子*Marbling-2*遺伝子のクローニング
 - c. 黒毛和種の枝肉重量遺伝子*CW-1*遺伝子のクローニング
 - d. ウシ全ゲノムを対象とする層化解析の試み～過排卵処理への反応性
- ③ 平成16年度の成果と平成17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

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
松尾 昌一	(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員

3) 全国DNA育種推進会議

この会議は畜産新技術実用化対策事業の一環である「DNA育種基盤の確立」にかかる全国推進会議である。平成13年度からは動物遺伝研究所と道県の研究機関との共同研究はこの事業の枠組みの中で実施されることになったもので、平成12年度までの連絡調整会議に相当する。共同研究参画機関は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。

第1回の平成16年度推進会議は平成16年10月7日動物遺伝研究所で開催された。主要議題は、①平成16年度事業報告、②平成16年度成果のまとめ、③平成16年度事業計画、④来年度予算について、等であった。

第2回の平成16年度推進会議は平成17年3月14日東京で開催された。主要議題は、①平成16年度事業成果の報告、②平成16年度事業成果のまとめ、③平成17年度以降の共同研究の持ち方について、④平成17年度交付金の仕組みについて、等であった。

4) DNAマーカー情報活用検討会議

ウシゲノム研究は動物遺伝研究所と道県の研究機関との共同研究で行われており、主要な経済形質に関わるDNAマーカー情報が数多く開発され、成果が蓄積されてきた。これらの成果の活用について検討を加えるため、DNAマーカー情報活用検討会議を設置した。平成16年度は、事前

検討会およびDNAマーカー情報活用検討会議を次の通り開催した。

事前検討会は平成16年11月30日に東京で開催された。主要議題は、①DNAマーカーの開発状況及び利用状況の報告、②利用にあたっての論点整理、等であった。第1回DNAマーカー情報活用検討会議は平成16年12月14日に東京で開催された。主要議題は、①畜産新技術実用化対策事業（うちDNA育種基盤の確立）について、②DNAマーカーの開発及び利用状況について、③DNAマーカー情報の活用について、等であった。第2回DNAマーカー情報活用検討会議は平成17年2月17日に東京で開催された。主要議題は、DNAマーカー情報の共同利用の推進方策（案）について、等であった。

DNAマーカー情報活用検討会議委員

青柳 敬人	全国農業協同組合連合会ETセンター所長
猪八重 悟	鹿児島県肉用牛改良研究所研究主幹
大谷 健	岐阜県畜産研究所所長
土屋 博義	宮崎県畜産試験場場長
新山 正隆	(社)家畜改良事業団専務理事
向井 文雄	神戸大学農学部教授
吉村 豊信	(社)全国和牛登録協会専務理事

5) BSE生体診断技術緊急開発事業推進検討委員会

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16年度は推進検討委員会を平成17年3月8日東京で開催している。議事は次の通りであった。

- ① 本年度までの各参加機関における事業成果について
 - 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 海外におけるBSE関連研究の動向について（報告）
- ③ 事業成果のとりまとめについて
 - a. 報告書のとりまとめについて
 - b. 作出されたトランスジェニックマウスの取り扱いについて

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	前神戸大学農学部応用動物遺伝学科教授
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委員

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
逆瀬川如美	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社長
塩田 明	(株) ワイエスニューテクノロジー研究所研究室長

6) 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16年度は検討委員会を平成17年1月21日東京で開催している。議事は次の通りであった。

- ① 平成16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17年度の研究計画について
 - a. 動物遺伝研究所
 - b. 神戸大学
- ③ 牛肉の品種鑑定技術の開発計画について

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遺伝学科教授
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) 全国和牛登録協会専務理事

7) 研究会等の開催

① 日本動物遺伝学会によって開催された第29回国際動物遺伝学会大会 (29th International Conference on Animal Genetics, ISAG 2004 Tokyo) を後援した。メインテーマはゲノム研究の発展による家畜生産の向上 “Development of Genetic Research and Animal Production” であった。平成16年9月11日から16日までの6日間、東京都千代田区神田駿河台の明治大学駿河台キャンパスにて開催された国際学会には、49カ国、649名の参加があり、6割以上が海外からの参加であったことは特筆されてよいだろう。本学会ではプレナリーセッション、ワークショップ、ポスター発表、セレクトドポスターの口頭発表の4種類の型式による講演あるいは発表が行われた。プレナリーセッションでは、「家畜の遺伝的多様性と育種への応用」、「究極の染色体地図」、「QTL解析の光と影」、「将来のゲノム解析へ向けたシーズ」のテーマで講演が行われた。2日間にわたって行われたポスター発表では、400近い演題が申し込まれ、この中から16の演題がセレクトドポスターとして口頭発表された。セレクトドポスターの企画は、本学会で初めての試みとして行われたものである。

② 動物遺伝育種シンポジウム組織委員会によるジョイントシンポジウム「DNA情報を活かした新しい家畜育種の方向性」を農業生物資源研究所、農林水産先端技術産業振興センター、と共催した。

開催日：平成16年9月16日～17日

開催場所：如水会館（東京都千代田区一ツ橋）

内容：

I. 講演会

- (1) Harvesting the Swine Genome: A Roadmap for QTL Analysis
(Larry B. Schook、米国・イリノイ大学)
- (2) Prospects for Positional Cloning of QTL in General Pedigrees Using the Bovine Whole Genome Sequence
(Jeremy F. Taylor、米国・みずーり大学)
- (3) Strategy for Marker-Assisted Selection in Cattle
(Luis Gomez-Raya、米国・ネバダ大学)
- (4) The Pig Major Histocompatibility Complex: Sequence and Expression
(Patrick Chardon、フランス・INRA)

II. 話題提供&パネルディスカッション

話題提供 マーカー育種の現状と将来展望

- (1) 乳牛におけるQTL (マーカー) 情報利用による育種法
(富樫研治、(独) 農業・生物系特定産業技術研究機構北海道農業研究センター)
- (2) 肉牛におけるマーカー育種の現状と展望

(渡邊敏夫、(社)畜産技術協会附属動物遺伝研究所)

(3) ブタにおけるマーカー育種の現状と将来展望

(林 武司、(独)農業生物資源研究所)

(4) マーカー育種の現状と将来展望?魚類?

(岡本信明、東京海洋大学)

パネルディスカッション ゲノム解析の成果を肉牛育種に活用する

パネラー：藤田達男 (大分県畜産試験場)

溝下和則 (鹿児島県肉用牛改良研究所)

西田 朗 (東北大学大学院農学研究科)

小林直彦 (岐阜県畜産研究所)

今井佳積 (広島県立畜産技術センター)

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16年度は次の9課題を研究及び事業委託した。

- 1) ウシの筋肉内脂肪細胞の分化関連遺伝子の単離と機能解明（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) QTLを用いた選抜から期待される肉用牛の育種効率の定量的評価（平成16年度新規）
 - ①委託先：神戸大学農学部
 - ②委託研究者：向井文雄

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

- 4) ウシとヒト、マウスにおける遺伝子転写制御領域の比較（平成15年度より継続）
 - ①委託先：佐賀大学農学部
 - ②委託研究者：和田康彦

- 5) 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造成・維持（平成13年度より継続）
 - ①委託先：株式会社 ワイエス研究所
 - ②委託研究者：上田正次

- 6) 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年度より継続）
 - ①委託先：動物衛生研究所
 - ②委託研究者：高田益宏

- 7) ウシプリオン遺伝子とプロモーター因子の相互作用に関する研究（平成15年度より継続）
 - ①委託先：東京大学
 - ②委託研究者：小野寺 節

- 8) 国産牛肉と豪州産牛肉の識別を目的としたインド系牛（*Bos indicus*）に特異的なDNAマーカーの開発（平成15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

9) 実験動物講習会開催事業「実験動物における遺伝子改変技術の現状と畜産分野への展開」
(平成16年度新規)

①委託先：財団法人 日本実験動物協会

②委託実施者：光岡知足

5. 研修員の受け入れ

所属機関名	氏名	受け入れ期間
鳥取県畜産試験場	小江敏明	平16. 5. 24～6. 25
北海道立畜産試験場	太田朗	平16. 6. 7～6. 18
	太田朗	平16. 6. 19～6. 22
福島県畜産試験場	坂本秀樹	平16. 6. 8～6. 9
	小林準	平16. 6. 8～6. 9
	坂本秀樹	平16. 9. 28～9. 30
	小林準	平16. 9. 28～9. 30
	小林準	平16. 12. 13～12. 15
	小林準	平17. 3. 14～3. 15
岡山県総合畜産センター	古川恵	平16. 7. 1～7. 16
大分県畜産試験場	宇都宮恭子	平16. 6. 23～6. 25
北海道立畜産試験場	森井泰子	平16. 8. 3～8. 30
島根県立畜産試験場	安部亜津子	平16. 8. 9～8. 27
佐賀県畜産試験場	片淵直人	平16. 9. 27～10. 15
	片淵直人	平17. 2. 28～3. 4
茨城県畜産センター	堀越忠泰	平16. 9. 2～9. 3
	堀越忠泰	平16. 9. 6～9. 10
	木村安之	平16. 9. 6～9. 10
	堀越忠泰	平16. 9. 21～9. 22
	堀越忠泰	平16. 9. 24
	堀越忠泰	平16. 9. 27～9. 30
	堀越忠泰	平16. 10. 18～10. 22
	堀越忠泰	平16. 10. 25～10. 29
	木村安之	平16. 10. 25～10. 29
	堀越忠泰	平16. 11. 1～11. 2
	大川清充	平16. 11. 1～11. 2
	堀越忠泰	平16. 11. 4～11. 5
	木村安之	平16. 11. 4～11. 5
山梨県酪農試験場	鈴木希伊	平16. 10. 12～10. 23
	鈴木希伊	平16. 12. 13～12. 24
宮城県畜産試験場	千葉和義	平16. 11. 1～11. 2
山形県農業研究研修センター	中嶋宏明	平16. 12. 13～12. 24
熊本県農業研究センター	小邦朋子	平17. 1. 27～2. 10
長崎県肉用牛改良センター	丸田俊治	平17. 2. 15～2. 25
岐阜県畜産研究所	小林直彦	平17. 2. 21～3. 4
兵庫県立農林水産技術総合センター	龍田健	平17. 2. 14～2. 18
岩手県農業研究センター	佐藤洋一	平17. 3. 8～3. 11
宮崎県畜産試験場	井上和也	平17. 3. 24～3. 25

6. 職員の普及活動等

1) 講演

1. 杉本喜憲：ウシQTLのゲノム解析、家畜DNA育種事業に係る研究成果検討会、2004年8月、北海道立畜産試験場、北海道。
2. 平野 貴：Genetic Disease and Genetic Diagnosis of Cattle. Educational Seminar by JICA, 2004年9月, 東京。
3. 渡邊敏夫：マーカー育種の現状と将来展望（肉牛）、ジョイントシンポジウム、第10回動物遺伝育種シンポジウム「動物ゲノム解析と新たな家畜育種戦略」、および、平成16年度家畜ゲノム国際ワークショップ、2004年9月、東京。
4. 杉本喜憲：ウシゲノム解析研究収穫時代の到来?ゲノム解析から遺伝子機能解析へ-、平成16年度農政研究会、2004年9月、東京。
5. 杉本喜憲：Genetic Analysis of Economically Important Traits and Hereditary Diseases in Cattle, International Symposium on Prospects in Animal Biotechnology, 2004年11月、Institute of Biotechnology, Yeungnam University, 韓国。
6. 平野 貴：DNA解析研究に関する講演、黒毛和種の経済形質解析
平成16年度DNA解析に関する検討会、2005年2月、高山。
7. 渡邊敏夫：黒毛和種における増体・肉質形質のQTL解析、平成16年度教育セミナーフォーラム、(社)日本実験動物協会、2005年3月。

第3節 研究の解説

1. ウシ物理地図・ウシ_ヒト比較地図作成の意義

放射線照射体細胞雑種 (Radiation Hybrid: RH) パネルを用いたウシ物理地図・ウシ-ヒトゲノム比較地図作成の意義

ゲノム解析のツールとして、連鎖地図、RH物理地図、BAC整列地図などがあげられるが、究極は全ゲノム塩基配列の決定である。ヒトおよびマウスやラットの実験動物において、全ゲノムの塩基配列が決定されたが、家畜においても、昨年、ニワトリゲノムのドラフト配列が報告された。これに代表されるように、家畜ゲノムの解析ツールの開発は、ここ数年間に著しい進展を見せている。ウシにおいては、動物遺伝研究所が、米国農務省肉畜研究センター (USDA-MARC) と共同で高密度連鎖地図を作成し (昨年の解説記事を参照)、また、高密度RH物理地図をネバダ大との共同で作成した。BACフィンガープリント整列地図は、米国を中心とした国際協力プロジェクト (日本の研究機関は参加していない) で作成されつつあり、ゲノムの塩基配列決定も米国テキサス大学ベイラー校のヒトゲノムシーケンシングセンターにおいて進行中で、昨年10月には、第1期のウシゲノム塩基配列が公開された。ここでは、私たちの作成したRH物理地図について、連鎖地図との関係や、国際協力プロジェクトによるBAC整列地図の作成およびウシゲノム塩基配列決定に果たす役割を交えて解説したい。

(1) RH地図、ゲノム比較地図とは何か

ゲノム上のマーカーの位置を示す地図には連鎖地図と物理地図とがあり、連鎖地図は、マーカー間の距離を遺伝上の組み換え頻度に基づいて算定して作成するのに対して、物理地図はDNAの長さに基づいて作成したものである。RH地図は、物理地図のひとつで「RHパネル」を使って作成する。RHパネルは、放射線照射によりウシ正常細胞の染色体を断片化した後、ハムスターなどの齧歯類由来の細胞 (宿主細胞) と融合させ、約100種類程度の融合細胞から各々DNAを回収してセットとしたものである。RHパネルを構成する各DNAには、断片化されたウシ染色体の一部が宿主細胞の染色体内に組み込まれて保持されているので、任意のマーカーをPCR増幅することで、どの融合細胞DNAがそのマーカーを含む染色体領域を保持していたか否かを知ることができる。ある2つのマーカーが近接していれば、各RHパネルにおけるPCR増幅の有無のパターンは相似し、離れていれば相似しない。このような原理で、各マーカーの順番とマーカー間距離が算定できる。

RHマッピングはPCR増幅の有無のみに依拠するため、エラーを除くことが難しい。そこで、RHマッピングの信頼性を確保するため、連鎖地図の情報を基本にしなければならない。つまり、連鎖地図上で染色体上の位置が特定されているマーカー、通常はマイクロサテライトマーカー、の並ぶ順番の情報を用いて、RH地図のフレームワークを構築する (枠作りを行う) ことが不可欠である。照射放射線量が高いほど、染色体は細かく分断されてRH地図の解像度は上がるものの、これらを正確につなぐためには、数多くのマーカーが必要になる。したがって、解像度の良いRH地図を作るためには、高密度連鎖地図の作成が不可欠ということになる (昨年の解説記事を参照)。

連鎖地図に比べてRH地図の有利な点は、解像度の良さと、遺伝子のマッピングの容易さである。連鎖地図の解像度は、マッピングに用いる標準家系の規模に依存するので、米国農務省肉畜研究センター (USDA-MARC) のウシ標準家系では、解像度の限界は0.8cM (=約800kb) となる。

そのため、私たちが連鎖地図上にマップした3960個のマーカーは、2423ポジションの「点」であった（昨年の解説記事を参照）。一方、RH地図では、染色体を断片化する際の照射放射線量を上げることによって容易に高い解像度を得ることができる。したがって、RH地図では、連鎖地図で団子状に並んでいたマーカーを一個一個の点に分離することが可能となる。このRH地図に載せたマーカー・遺伝子を足がかり（アンカー）にして、マーカー間をBACクローンなどのクローン化されたDNA断片で連結すれば、点と点を線でつなぐことができ、物理的な実体のある染色体地図（BAC整列地図）を作成できる。また、これらのアンカー情報は、決定されるウシゲノムの部分塩基配列の順番を決めるための重要な足場（scaffold）である。先に紹介したニワトリのゲノム塩基配列決定においては、高密度連鎖地図もRH地図も無い状態で行われたので、配列の読まれていないギャップを埋めて完成させるには相当な時間が必要らしい。

RHマッピングは、連鎖地図へのマッピングと異なり、マーカーの多型性を必要としないため、特に遺伝子のマッピングに威力を発揮する。多数の遺伝子をマッピングしたウシ遺伝子地図と、ヒトゲノムの配列を比較することにより、ウシ-ヒトゲノム比較地図の作成が可能になる。ゲノム比較地図とは、例えばウシ4番染色体はヒト7番染色体と同じような順番で遺伝子が並んでいる（シンテニーを保持している）というように、異なる生物種間において染色体同士の相同な部分を示した地図のことである。ヒトやマウスでは、全ゲノムの塩基配列が決定され、個々の遺伝子の発現に関する情報や機能に関する情報も蓄積されつつある。したがって、ゲノム比較地図を用いることにより、ヒトおよびマウスの遺伝子情報を最大限利用することが、遺伝性疾患の原因遺伝子や肉質など経済形質の責任遺伝子に、いかに早くたどり着くかに、きわめて重要である。また、ゲノム比較地図は、BAC整列地図の作成やウシゲノム塩基配列決定との関わりにおいても重要であるが、これについては、後で述べる。

(2) ウシRH地図の現状

2000年に米国テキサスA&M大学のWomackらが最初のウシ全ゲノムRH地図（5000-rad 放射線照射RHパネルによる）を報告した。これは、319個のマイクロサテライトと768個の遺伝子から成り、ウシ-ヒトゲノム比較地図において105以上のシンテニーが観察されることがわかった。2002年には、英国のロズリン研究所やフランスの国立農業研究機構（INRA）などの共同で3000-rad 放射線照射RHパネルを用いた地図が報告された。これは、当時の連鎖地図にマップされていたマーカーから、できるだけ多くのマーカーを用いてフレームワークを構築しようとしたもので、1148個のマイクロサテライトと90個の遺伝子から成っている。その後、これらのRHパネルを用いて、15番、18番、26番、28番、29番、X染色体について、ヒト染色体との詳細なゲノム比較地図を作成することを目的として、遺伝子のマッピングが行われた。前述のWomackらのRHパネルについては、1913個のマーカー（うち、667個をフレームワークマーカーとして使用）から成る第2世代の全ゲノムRH地図が、昨年報告されている。しかしながら、これらのウシRH地図では、フレームワークに用いたマーカー数が充分とはいえ、信頼性および解像度に限界があると思われた。

(3) 私たちの作成したRH地図

私たちは、米国ミネソタ大のBeattie教授（現、ネバダ大）と共同で、7000-rad放射線照射RHパネルを作成した。このRHパネル（SUNbRHパネル）を用いて、私たちの作成した高密度連鎖地図上にマップされたマイクロサテライトマーカー3216個を用いてフレームワークを作成した。

図1をみると、連鎖地図と比較して、マーカー同士がよく分離していることがわかる。

このフレームワーク上に、2377個の遺伝子またはESTをマップした。ESTとは、ゲノム上で発現している配列（遺伝子）の一部分について塩基配列を決定したもののことをいう。ここで用いたほとんどのESTは、私たちが過去に開発したものである（H13年度年報参照）。

このようにして、計5593マーカーから成るRH地図（SNUbRH地図）が完成した。このうち1716マーカーについて、ヒトゲノム上に相同配列を見いだすことができ、これらを用いてウシ-ヒトゲノム比較地図を作成した（図2）。少なくとも161個のシンテニーが観察され、特に4番、8番、10番、13番、19番などの染色体について、過去の報告と比べて、より複雑なシンテニーが観察された。前述のWomackらのRHパネルによる第2世代の全ゲノムRH地図では、2番、3番、7番、9番などの染色体が、私たちの比較地図に比べてシンテニーが分断されており、彼らのマッピングの解像度には、難のあることが推測された。私たちの比較地図で観察された全シンテニーは、ウシRH地図の79%、ヒトゲノムの72%をカバーしていた。また、RH地図1cRは、約114 kbに相当すると算定された。

私たちの作成したRH地図が物理的な実体のある染色体地図を作成する上でどの程度有効かを、4番染色体を例に検証した。前述の国際協力プロジェクトでは、BAC整列地図を作るために、まず、BACクローンをその制限酵素切断パターン（フィンガープリント）に基づいてつなぎ合わせたコンティグ（FPC）を作成している。すなわち、BACクローン同士は、それぞれが持つウシ染色体断片の重複部分については、その制限酵素切断断片を共有しているので、一致する（同じ長さの）断片は重複部分、一致しない断片はその外側の染色体領域に相当する部分として順次並べていけば、染色体上の順番にBACクローンを並べることができる。このデータは随時公開されており、ウェブサイトで検索可能である。そこで、4番染色体のマイクロサテライトマーカーおよびESTについてBACクローンのスクリーニングを行い、ウェブサイトでこれらのクローンの属するBACコンティグを検索し、BACクローンの末端塩基配列とヒトゲノム塩基配列との相同性の情報も含めて、ウシ染色体上に並べてみた（図3）。その結果、私たちのRH地図は、BACコンティグをウシ染色体上に並べていくのに十分なマーカー数を持つことが確認された。また、私たちの比較地図は、BACクローンの末端塩基配列を相同性に基づいてヒトゲノム上に並べた結果と、よく一致しており、私たちの比較地図は十分な解像度をもつ、信頼性の高い地図であることが確認された。

(4) RH地図、ウシ-ヒトゲノム比較地図の重要性

(3)で触れたように、国際協力プロジェクトでは、BACコンティグを作成してきたが、BAC整列地図をつくるためには、これらのBACコンティグをウシゲノム上に位置づけることが必要である。しかしながら、BACコンティグのうち、ウシゲノム上に位置づけできるマーカーを含んでいるものは少ない。一方、BACクローンの末端塩基配列を用いて、BACコンティグをヒトゲノム上に位置づけることは、比較的容易である。したがって、私たちの作成した、解像度の良いウシ-ヒトゲノム比較地図は、ヒトゲノム上に位置づけられたBACコンティグをウシゲノム上に並べていく足場を提供する。国際協力プロジェクトにおいても、前出の5000-rad（マーカー数：3021、2005年1月時点）と3000-rad（マーカー数：2274）のRH地図の充実が図られているが、私たちの地図が、最もマーカー数が多く（7000-rad、マーカー数：5593）、また、連鎖地図と統合しているため、最も信頼性が高いと考えられている。国際協力プロジェクトでは、連鎖地図と、私たちのRH地図も含めた上記3つのRH地図のデータをすべて使って、ウシゲノム統合地図を作成

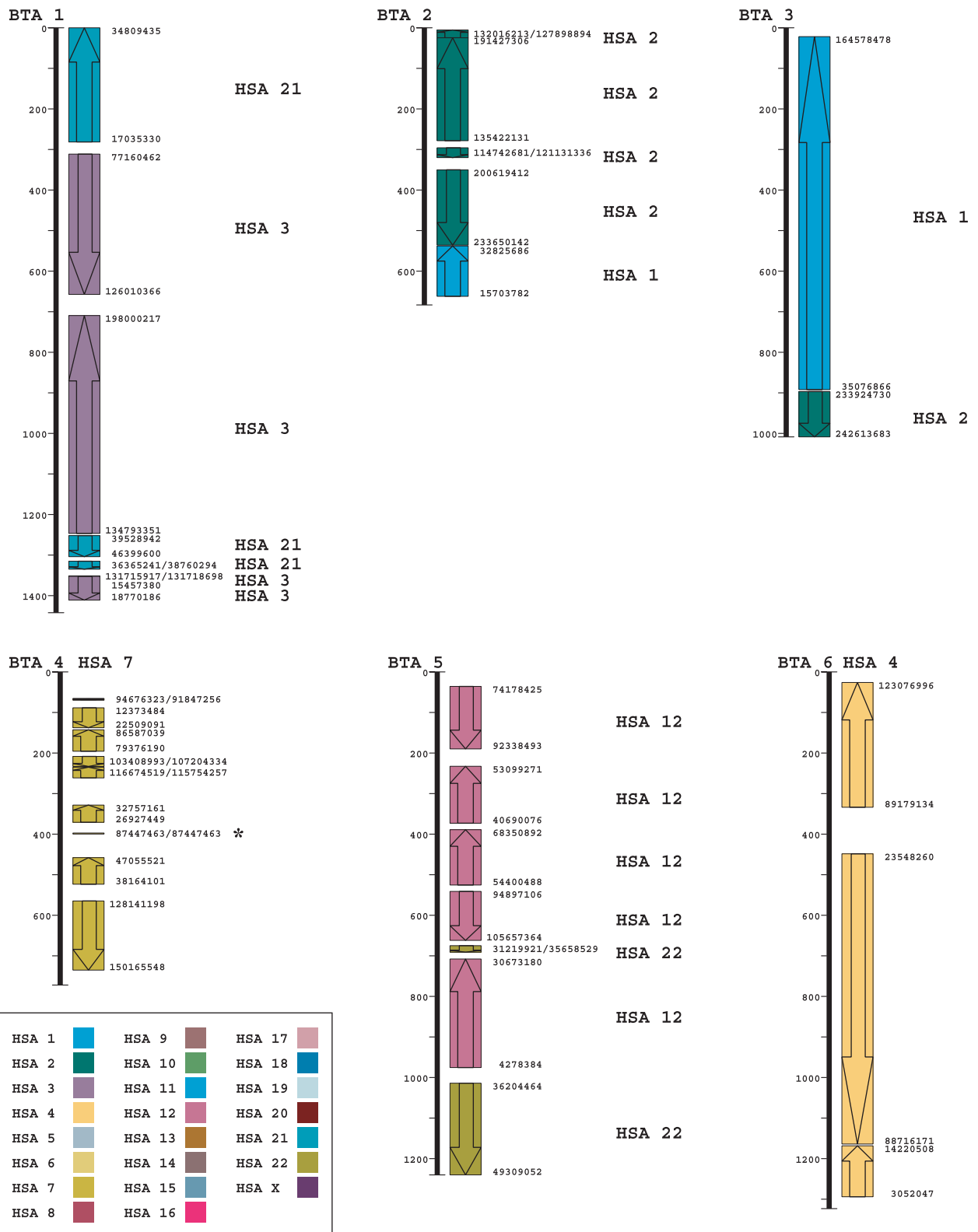
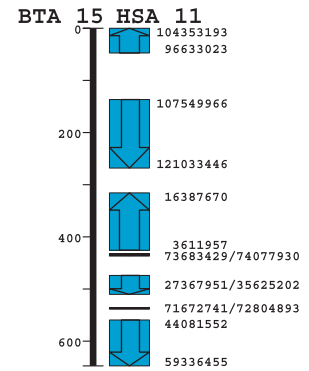
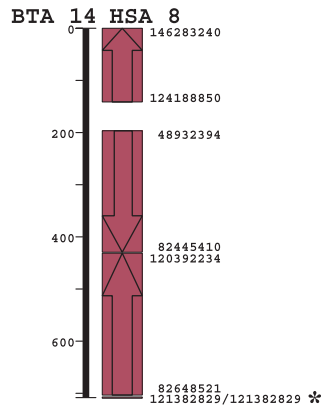
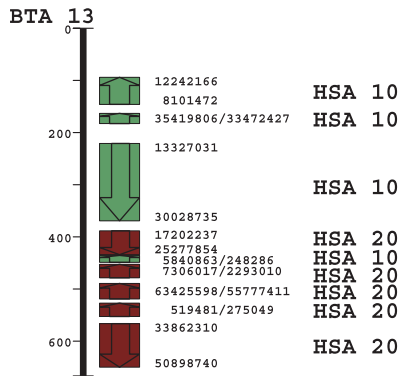
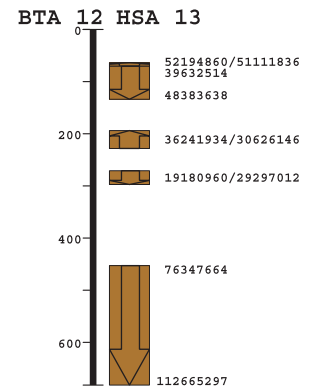
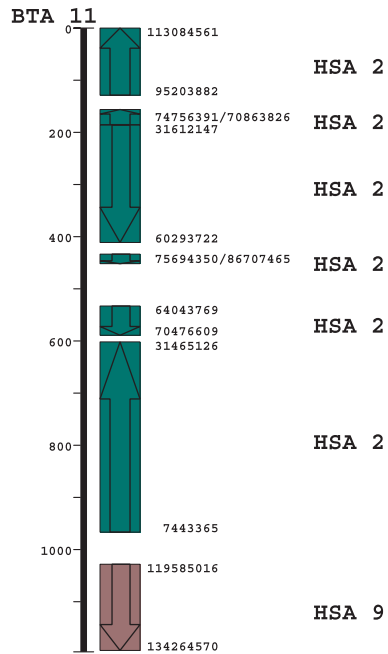
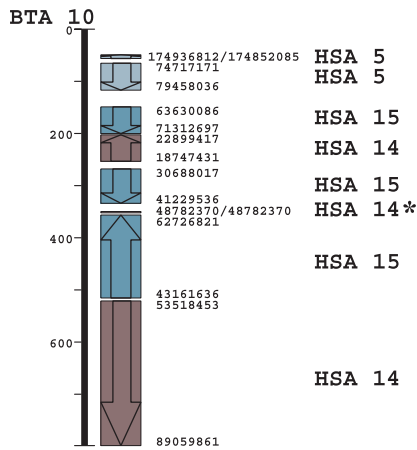
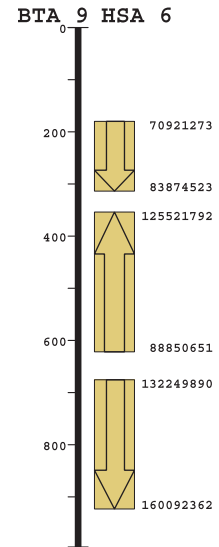
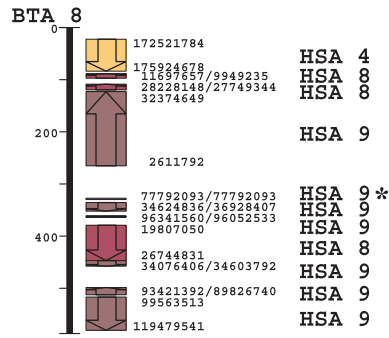
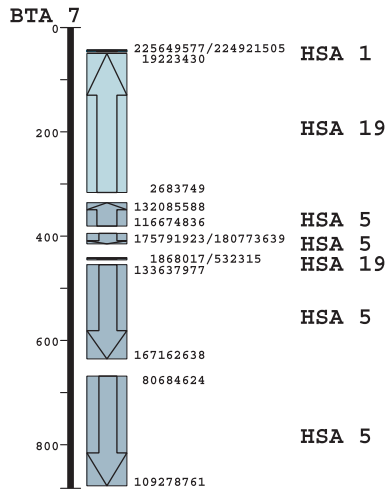
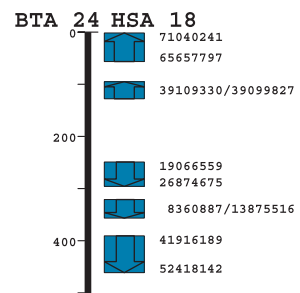
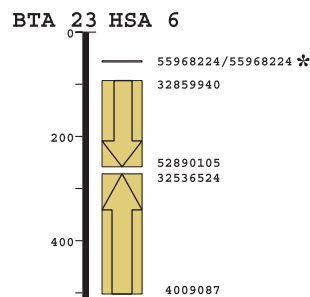
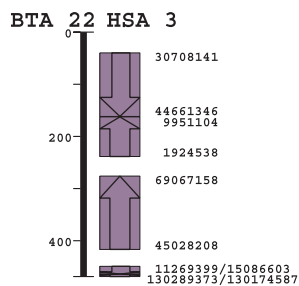
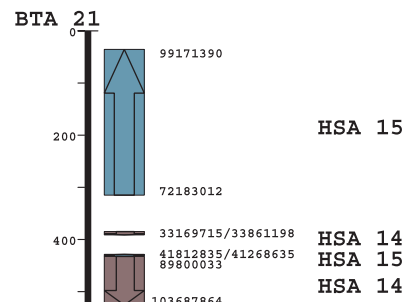
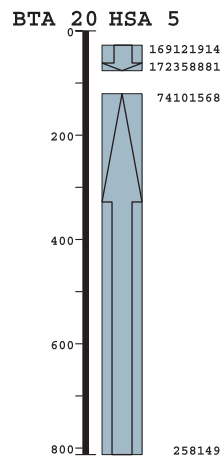
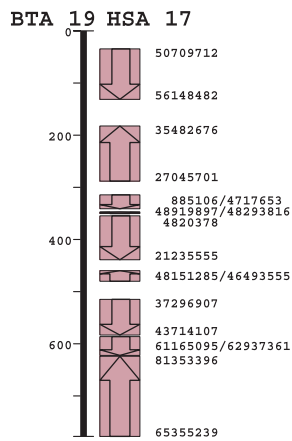
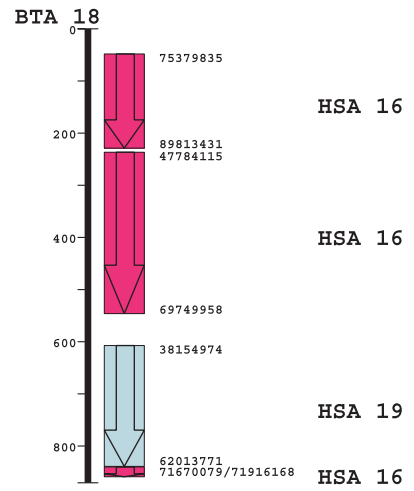
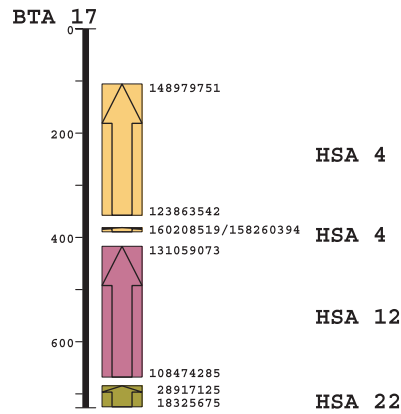
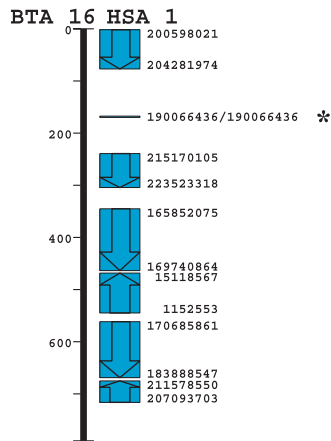
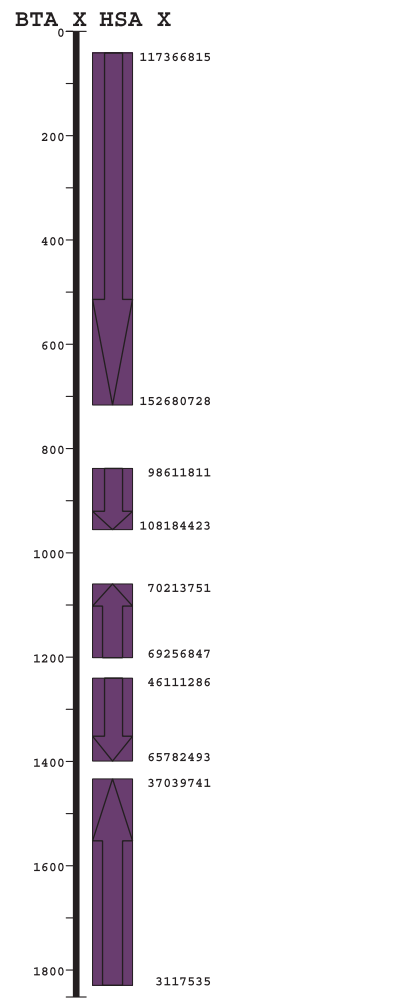
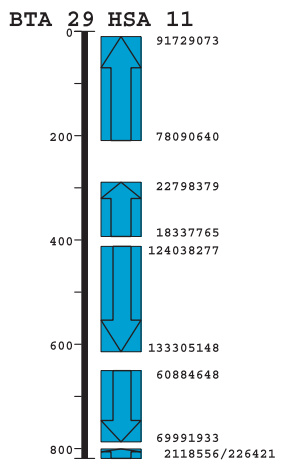
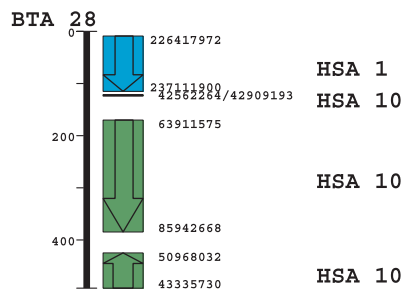
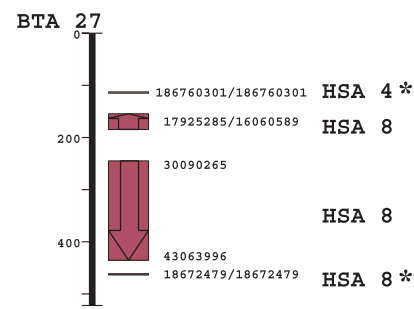
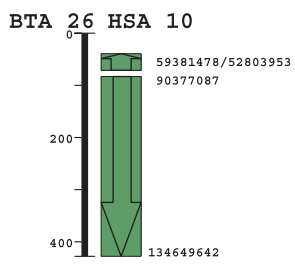
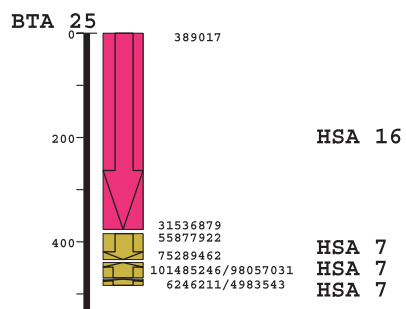


図2. ウシ-ヒトゲノム比較地図

ウシ染色体（黒太線、数字の単位はcR）上に、ヒト染色体との相同領域（シンテニー）を、□で示した。□の右側の数字は、ヒト染色体の塩基配列番号（単位は、bp）を示し、□内の矢印は、シンテニーの向きを示す。







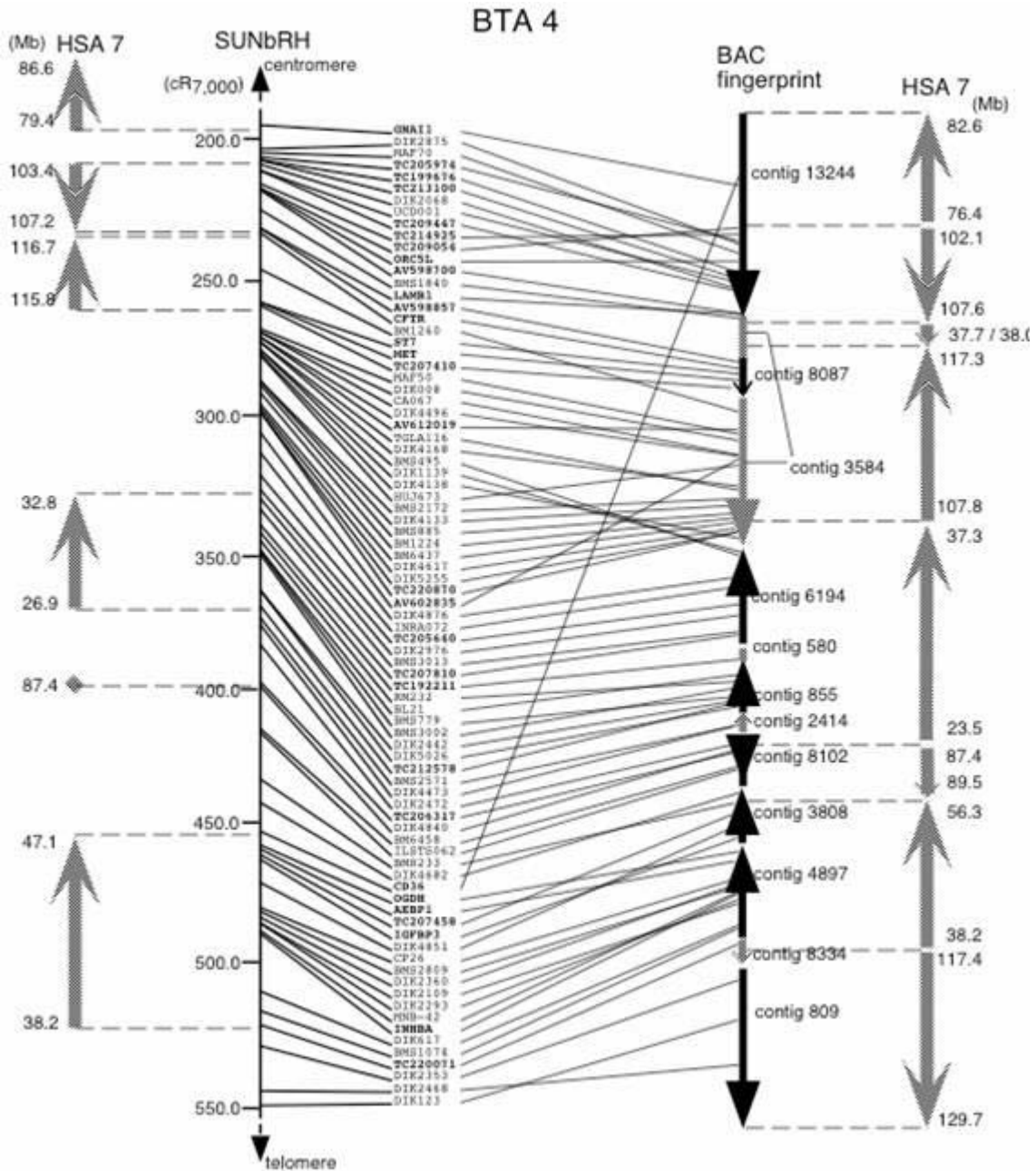


図3. SUNbRH地図を用いたBACコンティグの整列化（第4番染色体）

SUNbRH地図上のマーカーと、各マーカーでスクリーニングしたBACクローンのBACコンティグ内での位置を線で結んだ。左端はSUNbRH地図の、右端はコンティグに含まれるBACクローンの末端塩基配列を用いた場合のヒトゲノムとの比較地図を示す。BACコンティグを整列化することによって、ヒトゲノムとのシンテニーが、より詳細に明らかになった。また、この時点で用いたBACコンティグの情報には誤りがあることも明らかになったが、(contig8087はcontig3584の間に入る)、その後の改訂で修正されている。

している。これらの地図を頼りに、BACコンティグをウシ染色体上に並べる作業が現在行われており、近々、BACフィンガープリントマップとして完成、発表されると思われる。

さらに、昨年10月に公開されたウシゲノム塩基配列は、3.3倍ゲノム長の断片配列から成り、これらをヒトゲノム上に位置づけた情報もウェブサイトで閲覧できる。したがって、私たちのウシ-ヒトゲノム比較地図は、BACコンティグの場合と同様に、ヒトゲノム上に並べられたウシゲノム断片塩基配列をウシゲノム上に並べていく足場ともなる。今年8月には、7-8倍ゲノム長のウシゲノム断片配列が決定され、公開される予定である。

このように、ウシゲノム解析をめぐる状況は、大きく進展しつつある。数年前には、連鎖解析でマップした領域がヒトゲノム上のどの領域に相当するのかを知るためには、BACクローンをマーカーでスクリーニングし、BACクローンのショットガンシーケンスなどを行う必要があったが、私たちのRH地図によって、一目で見いだせるようになった。

また、私たちのRHパネルを用いて、任意のマーカーをマッピングすることが可能になった。実際、いくつかの研究グループが、興味のあるESTやゲノム断片のマッピングに利用しており、今後もウシゲノムを対象とする研究者に用いられると思われる。なお、SUNbRH地図は、他の地図とともに、ウェブサイト (<http://www.animalgenome.org/cattle/maps/>) で、閲覧できる。

ニワトリ、ウシに続いてブタのゲノム配列解読が進められている。ブタの場合、ニワトリと同様に連鎖地図にマッピングされているマーカー数は少なく、したがって、RH地図上のアンカーは数も少なく、信頼性に問題がある可能性が高い。ドラフト配列の段階まで進んでも、ギャップを埋めた質の高いゲノム配列を完成させるには問題があるだろう。ヒトゲノムで行われているように、改めて連鎖地図の高密度化を行う必要があるかもしれない。その点、ヒツジはウシとの相同性が高いので、ウシの配列情報を利用することで問題なく進むと考えられる。ともあれ、連鎖地図の高密度化を行い、その結果を利用して構築したフレームワークに基づいたRH地図の作成は、究極のゲノム解析ツールであるウシ全配列解読へのきわめて重要な貢献であったと位置付けられよう。

第4節 総務

1. 職員名簿

(平成17年 3月31日現在)

所 属	職 名	氏 名
所 長	所 長	杉 本 喜 憲
管 理 部	部 長	高 田 耕 節
	補 助 員	浅 比 紀 子
動物遺伝研究部	部 長	(兼) 杉 本 喜 憲
	主任研究員	高須賀 晶 子
	主任研究員	渡 邊 敏 夫
	研 究 員	溝 口 康
	研 究 員	平 野 貴
	研 究 員	井 原 尚 也
	研 究 員	横 内 耕
	研 究 員	高 野 淳
	補 助 員	渡 辺 恵美子
	補 助 員	塚 澤 浩 子
	補 助 員	藤 井 友 子
	補 助 員	鳴 島 亜希子
	補 助 員	金 内 由美子
	補 助 員	丸 山 久美子
補 助 員	高 田 亜 紀	
補 助 員	真 船 文 恵	
補 助 員	星 優 美	
補 助 員	相 馬 千 裕	

2. 職員の異動

1) 職員の採用

なし

2) 職員の退職・退任

退職・退任年月日	氏 名	所 属	備 考
平成17年 1月10日	藤 田 郁 子	動物遺伝研究部	

3. 職員の海外出張

氏名	出張先	期間	用務
杉本喜憲	韓国	平成16年11月9日～ 11月12日	韓国国際シンポジウムから招待 (受託出張)
高須賀晶子	米国	平成17年1月14日～ 1月21日	サンディエゴ市で開催されたPlant & Animal Genome XIII出席
溝口康	米国	平成17年1月14日～ 1月21日	サンディエゴ市で開催されたPlant & Animal Genome XIII出席
渡邊敏夫	米国	平成17年3月28日～ 4月2日	テキサス州ヒューストン市で開催 されたウシゲノム国際ワークショ ップに参加

4. 施設・機器の整備

1) 施設

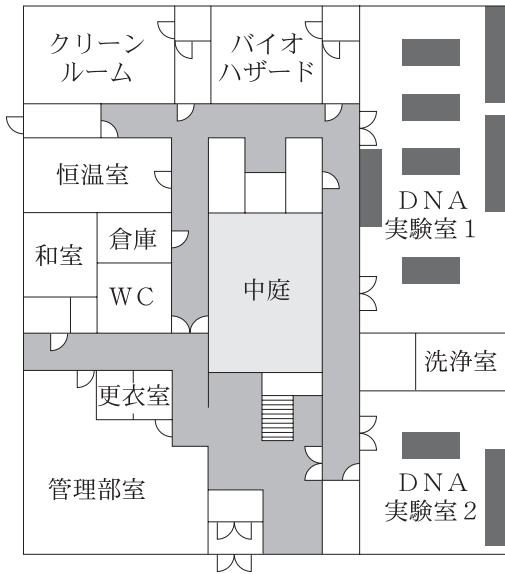
研究施設の平面図は51ページの通り。

2) 平成16年度購入の主要機器（単価百万円以上）

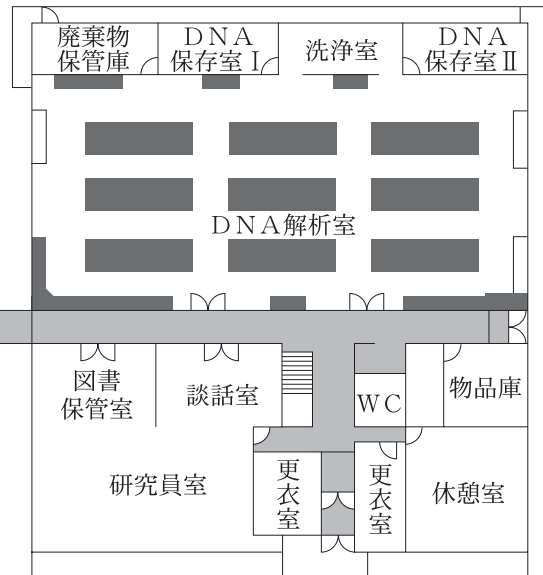
機器名	式数
データベース用コンピュータ（IBMXies235+IBMXies225+L150p モニター2台）	1
高速冷却遠心機（ベックマン・コールター製 Avanti HP-251）	1
DNAシーケンサー（アプライドバイオシステム社 3730XL-200）	1
マイクロプレートリーダー（パーキンエルマー製）	1
GeneChip専用解析装置（AFFYMETRIX）	1
ラボラトリーオートメーションシステム（ベックマン・コー ルター製）	1

研究施設平面図

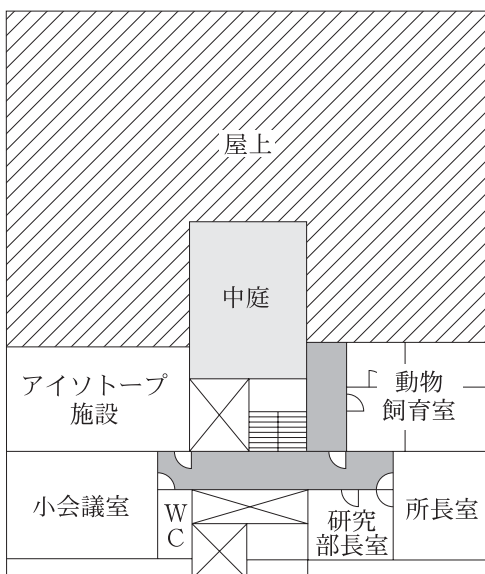
本館1階 (742m²)



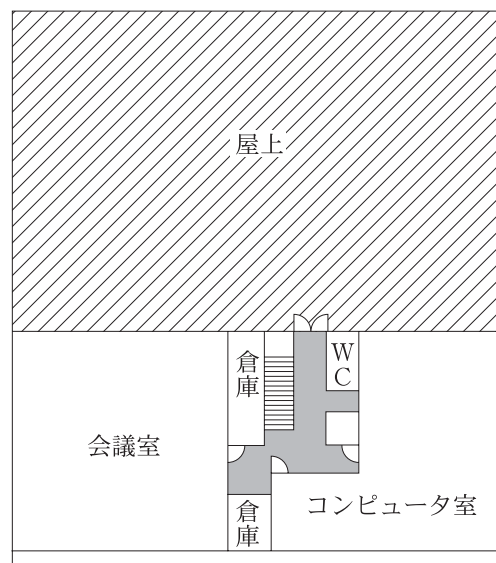
別館1階 (788m²)



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

第5節 資 料

1. 論文再録

BRIEF NOTES

doi:10.1111/j.1365-2052.2004.01170.x

Chromosomal mapping of 65 microsatellites developed from microdissected BTA14 and BTA20 chromosome-specific genomic libraries

K. Mizoshita*, N. Ihara[†], C. M. Carpio[‡], G. L. Bennett[§], F. A. Ponce de Leon[¶], C. W. Beattie^{||} and Y. Sugimoto[†]

*Cattle Breeding Development Institute Kagoshima, Osumi, Kagoshima, Japan. [†]Satohkawa Institute of Animal Genetics Odakura, Nishigo, Fukushima, Japan. [‡]US Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), US Meat Animal Research Center, Clay Center, NE, USA. [§]Department of Veterinary and Animal Science, University of Massachusetts-Amherst, 311 Paige Laboratory, Amherst, MA, USA. [¶]Department of Animal Biotechnology, University of Nevada, Reno, NV, USA. Present address: F. A. Ponce de Leon, Department of Animal Science, University of Minnesota, St Paul, MN 55108, USA.

Accepted for publication 15 June 2004

Summary: The BTA14 and BTA20 chromosome-specific genomic libraries were developed from a bovine-transformed fibroblast cell line containing the 01:29 and 020:14 translocations (provided by Mr Lance Breen, University of Minnesota, USA). Chromosomal inserts were prepared from scraped chromosomes from coverslips preparation, and ligated into λ -ZAP express vector (Stratagene, LaJolla, CA, USA) as described.¹ The resulting λ -ZAP libraries were screened with ³²P-end labelled (GGT)_n, (GCT)_n, (ATT)_n and (AGC)_n.² Positive clones were sequenced on an ABI377 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All sequences were queried against GenBank by BLAST. Polymerase chain reaction (PCR) primers were designed interactively with Primer 3.3 (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 were optimized for PCR amplification by testing over a range of annealing temperatures (50–60 °C). PCR included 20 ng genomic DNA, 1.67 mM MgCl₂, 0.25 pmol each primer, 0.2 mM dNTPs and 0.375 unit of *Taq* DNA polymerase (AmGene, Ipswich, UK) in a 25 μ l volume. Amplifications were performed under the following 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.

Polymorphism and chromosomal assignments: Polymorphisms at each locus were identified by examining 28 parents of the USDA-MARC mapping population.³ The PCR product sizes were measured using an ABI 377 sequencer and analysed the USDA-MARC mapping population² by Genescan software 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 2.4.⁴ We developed 65 polymorphic microsatellite markers from the two libraries. Of the 65 markers, 33 were from the BTA14 chromosome-specific library, and 25 were subsequently located to BTA14 (Table 1). The remaining eight microsatellite markers were located on chromosomes other than BTA14, indicating the complexity of the translocation and chromosome rearrangement in the bovine cell line. We developed 32 microsatellites from the BTA20 chromosome-specific library, and all were located to BTA20 (Table 2).

Comments: Previous reports^{3–5} have described the successful use of chromosome-specific libraries for developing microsatellite markers to increase marker density on specific chromosomes. These polymorphic microsatellites should accelerate fine mapping of quantitative trait loci located on these two chromosomes as well as positional cloning of their responsible genes.

Acknowledgements: The authors thank Y. Kaneuchi for laboratory assistance. The work was partly supported by the Ministry of Agriculture, Forestry and Fishery, Japan, and by the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

References

1. Ponce de Leon F. A. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3450–4.
2. Bishop M. D. *et al.* (1994) *Genetics* **136**, 619–19.
3. Green P. *et al.* (1989) Documentation for CRI-MAP, Version 2.4. Washington University School of Medicine, St Louis, MO, USA.
4. Sonstegard T. S. *et al.* (1997) *Genome Res* **7**, 76–80.
5. Reed K. M. *et al.* (2002) *Cytogenet. Genome Res* **96**, 210–6.

Correspondence: Y. Sugimoto (ksugus@sa.azabu-u.ac.jp)

Table 1. Characteristics of 32 polymorphic microsatellites developed from the BTA14 chromosome specific genomic library

Microsatellite	Repeat type	Product size (bp)	No. of alleles	Heterozygosity	Chromosomal assignment	Cloned marker (LOD score)	Forward primer	Reverse primer	Accession number
NRKM-001	(CA) _n	131-147	6	0.643	14	DMS1899 (60.0)	ATGACTGAGCCACAC	GATACTTGAGCTTTCG	AB166508
NRKM-003	(CA) _n imperfect	219-234	5	0.679	14	RM180 (65.6)	GGGATTTGTTACCGTTC	CTA*GTATTATTTG*GTGTG	AB166510
NRKM-004	(CA) _n	142-146	3	0.464	1	RM1824 (58.7)	GTCTGTGTTCTAAGCTTAA*	ATGATGGCCCTCTTGGCT	AB166511
NRKM-005	(CA) _n motif	109-146	8	0.75	14	RM181899 (46.6)	TTCCTCTCTCTGCTACTA	TTCCTCTCTCTTGGCC	AB166512
NRKM-006	(CA) _n	233-260	8	0.679	14	BM6125 (61.4)	GACTCTGCTCCAGGAAC	ATGCGGTGATACAGGCTG	AB166513
NRKM-008	(CA) _n	227-255	7	0.643	14	SM5140 (73.2)	TAGCAITCAACCACTCCGA	CCCTACTCTCCACTCTC	AB166514
NRKM-009	(CA) _n	263-272	4	0.321	14	DMS1947 (16.1)	AAATGCGGAATGAGGGCA	TTTACAAACCGCCAAACATAC	AB166515
NRKM-010	(CA) _n	120-124	3	0.357	14	RM181899 (13.1)	CTGCACTCTCACAAAGC	AG*ATTGTTGGCTGGAA	AB166516
NRKM-012	(CA) _n	181-193	5	0.357	14	BM2934 (10.6)	GGAAAGGAGATGCCAAT	TATGGGAGAGACAGACA	AB166517
NRKM-013	(CA) _n	97-105	4	0.393	29	BM51787 (50.9)	ACAGGAC*CA*CC*CC*CC*CA*	ACACTCTGGTGGCTCAATTC	AB166518
NRKM-014	(CA) _n imperfect	130-136	3	0.071	14	RI1009 (28.0)	CGAAGAATAATCCACAC	ACGTTAATCAGCCAGTTG	AB166519
NRKM-015	(CA) _n imperfect	154-156	2	0.357	14	RM18746 (25.5)	CTCACATAACGTCAGAAG	AATAGCCACTTCTCAGCTG	AB166520
NRKM-016	(CA) _n	209-223	6	0.714	14	BM2934 (58.2)	TGGAGTGAGCAGCA*TTGT	TTCCTGCTGCTATCAG	AB166521
NRKM-017	(CA) _n	113-139	4	0.214	23	BM1815 (28.7)	CTGGTAC*GATAGG*TAGCT	CTTAGACAGGGACACAGGA	AB166522
NRKM-018	(CA) _n	186-194	5	0.607	24	RM52719 (11.8)	TAACCC*AGC*CT*CT*CCA	GAGAGAGAGTATGCGCA	AB166523
NRKM-019	(CA) _n	135-141	3	0.149	14	RM5740 (26.2)	CTCAGTACCAC*AGAAAC	AAATGTTTACAGCCAGCAG	AB166524
NRKM-020	(CA) _n imperfect	123-127	3	0.607	14	BM51899 (25.7)	ACAGCCAGCCGAGTTACA	AACTCATTC*GCACCTT	AB166525
NRKM-022	(CA) _n (TATG) _n	169-226	10	0.679	14	BM2934 (60.4)	CTTC*GGATTA*ATG*CT*CT*CT	ACCTTTTTGCTTCCAGATC	AB166526
NRKM-024	(CCA) _n	211-224	3	0.071	14	BM51899 (13.9)	CACAGGACTGAGCCAACTTA	TGGGCTAATTTCTCTGCTGA	AB166527
NRKM-030	(CA) _n	179-151	6	0.429	23	BSJA-0188 (43.0)	TTACTCCGCTGCTCAA	CTGCTTTCGGTTCGG	AB166528
NRKM-032	(CA) _n imperfect	252-254	2	0.429	14	RM186 (16.7)	CCAAATTC*CCAGTTAG	AAAAGCCAGAAAGAAGC	AB166529
NRKM-034	(CA) _n	182-218	11	0.679	29	BM51636 (44.0)	AACTTCCATCTAGCCCAA	CTTCTACAGTCACTCCA	AB166530
NRKM-035	(CA) _n	100-102	2	0.107	14	RI1009 (5.7)	CGTCAAAACATCAGACCCGCT	AATCAGCCAGAGGAGAGCGAGAAAT	AB166531
NRKM-039	(CA) _n (TA) _n	194-250	20	0.82	14	RM5740 (16.4)	ATGCTACTCTGCATGGC	TATCCGGAGGCTGTCTGA	AB166532
NRKM-040	(CA) _n	104-124	7	0.643	14	RMUT1 (60.1)	TGCATCCACTGGTAGGTTCTT	GATCCCTGAATTGCTGCTG	AB166533
NRKM-042	(CA) _n	172-170	5	0.441	X	BL1093 (60.1)	TGGACACAACTGAGCTAATAACAC	AA*CC*ATA*CA*AA*CC*TA*AA*CA*AT*G*TC	AB166534
NRKM-044	(CA) _n imperfect	177-133	6	0.714	14	RM186 (61.9)	AGGTGTGCGGCTCTTCTAT	AA*CC*LL*AA*AT*CT*AT*CC*AA*AT*G*TC	AB166536
NRKM-046	(CA) _n	147-145	5	0.5	14	RM186 (60.0)	CACATGCAATGCTCAGCTG	ACC*CA*CC*AT*G*CA*GA*AG*CC	AB166537
NRKM-047	(CA) _n	243-261	4	0.5	14	BL1009 (49.1)	AGGACTGAGCGACTGACCA	CCCTAAGCC*CC*AC*G*TT*G*AC	AB166538
NRKM-050	(CA) _n	95-105	6	0.643	14	BM51899 (58.9)	CC*CA*AA*AG*GA*ACT*AT*AT*CC*CC	GT*GT*AG*TT*CC*CT*G*AG*TT*GG*	AB166539
NRKM-052	(CA) _n	170-137	7	0.643	14	RMUT1 (73.0)	TACCGAGACACCA*CA*CC*G	GAG*CA*AG*CC*AA*AG*CA*CA*CA*AG	AB166540
NRKM-060	(CA) _n	125-148	8	0.357	14	BM51899 (10.2)	AA*AC*AA*CA*AG*G*TT*CT*AC	AA*CC*CA*GT*CT*CT*TT*ACA	AB166542
NRKM-062	(CA) _n	230-252	7	0.714	X	(LST07) (73.2)	CA*AC*CC*AT*TT*CT*CA*CC*CT*AG	ACT*GG*TA*CA*AG*AT*G*AG*CT*GG	AB166543

Table 2. Characteristics of 33 polymorphic microsatellites cloned from a B1A20 specific genomic library.

Accession	Repeat type	Product size (bp)	No. of alleles	Heterozygosity by assignment	Chromosomal assignment	Closest marker (LOD score)	Forward primer	Reverse primer	Accession number
NRDJKM-01	(CA) _n , (TA) _n , imperfect	246-295	4	0.43	20	BM1225 (20.3)	ATCCTGGCTAGTTTCTGCTG	AAGTTTCCCGGTGATGCTCC	AB166580/AB166581
NRDJKM-02	(CA) _n , (TA) _n , imperfect	284-308	7	0.464	20	AG1A29 (16.7)	GTTATTCGACCAGAAATAGCC	TTAGGGAAACCTGTGTCATG	AB166582/AB166583
NRDJKM-03	(CA) _n	285-294	5	0.571	20	AG1A29 (16.7)	GGACACTTACTTACTCAGAGC	AGCCAGGTTTCTTCAACCTC	AB166584/AB166585
NRDJKM-04	(CA) _n , (ATAC) _n , imperfect	291-261	4	0.536	20	HR112 (56.3)	CTTGTCCAGCATGTGAAAAATATTG	AACCTTACTTCTCCCTGACTCC	AB166586/AB166587
NRDJKM-05	(CA) _n	215-239	7	0.75	20	HR112 (56.3)	CCCACTCAACTGCAMTCCAVAC	CAATCAATCTGTGGGAGGACLL	AB166588/AB166589
NRDJKM-06	(CA) _n , imperfect	304-312	6	0.643	20	BM5027 (35.1)	TCCCTTAAATLCTAATCTACLL	CAACGAGAGCGTACTCCCGC	AB166590/AB166591
NRDJKM-07	(CA) _n	273-300	9	0.893	20	HR150M (47.3)	TGGAAATTCAGTACTGATTTCC	GGTACTAGATACACAGAGGATG	AB166592/AB166593
NRDJKM-08	(CA) _n , imperfect	171-197	8	0.75	20	HR150M (47.3)	TCTAGGGATAGAAACATTTTCC	CAAAATTAGCTCCCAATAGCC	AB166594/AB166595
NRDJKM-09	(CA) _n	159-179	7	0.786	20	TC1A104 (57.5)	CAGCTACACCCACATCCAG	AGTCCAGTAACTGACAGC	AB166596/AB166597
NRDJKM-10	(CA) _n , (TA) _n , imperfect	286-286	3	0.493	20	HR12275 (33.7)	TGCATATCAATCAAGAAACAG	GACTGAAGTCAACTCAAGCC	AB166598/AB166599
NRDJKM-11	(CA) _n	239-265	9	0.893	20	HR150M (47.3)	CAGCTTCCATTAATATTCAGT	AGGTCTAAGTCACTCATATTTGGT	AB166600/AB166601
NRDJKM-12	(CA) _n	322-342	7	0.679	20	HR150M (47.3)	CGAAAGTGGAGGTGAGTACG	ATCCACAGGCTGGTCAGCCAC	AB166602/AB166603
NRDJKM-13	(CA) _n	289-301	6	0.5	20	HR150M (47.3)	AACTGAAGTTGGTAAACAGGAC	ATAGTGGCAGATAAATTCACCTGC	AB166604/AB166605
NRDJKM-14	(CA) _n	193-165	3	0.25	20	HR150M (47.3)	AVGTCAGCTGCAAGATAGAAATG	GGTCTACAGCAAAAGTGAATCAG	AB166606/AB166607
NRDJKM-15	(CA) _n	210-222	5	0.571	20	AG1A29 (16.7)	ACCGAGCCCTGCACTACAG	ACCTCAACTTCTAACTCAATGCC	AB166608/AB166609
NRDJKM-16	(GC) _n	301-304	2	0.5	20	HR150M (47.3)	CGTGAATGAGCCACTCAGG	ATTAGCCCACTTCCATCTCT	AB166610/AB166611
NRDJKM-17	(CA) _n	106-116	4	0.429	20	TC1A104 (57.5)	TCCGCTCCAAAGTGTGGCAC	TGGACATGAAATAGCCAGAGTC	AB166612/AB166613
NRDJKM-18	(CA) _n , (TA) _n , imperfect	283-323	12	0.786	20	HR150M (47.3)	AGAGGACCCUGAACGCTAG	GTGTAAAGCAGTCAAGGGAGTTC	AB166614/AB166615
NRDJKM-19	(CA) _n	236-254	4	0.679	20	HR150M (47.3)	CTAACTAGTCAATTTTGTACT	CTCGAATATCAATCTGAGCCCC	AB166616/AB166617
NRDJKM-20	(CA) _n	303-327	11	0.929	20	AG1A29 (16.7)	GCATTAACATTCGACTGTGG	ATAAGCCATTCATCCACTCC	AB166618/AB166619
NRDJKM-21	(CA) _n , imperfect	185-224	10	0.827	20	AG1A29 (16.7)	CAACTCCCATCTGCTGGC	CTGTATTAGTCAAGATTTCC	AB166620/AB166621
NRDJKM-22	(CA) _n , imperfect	249-283	8	0.464	20	AG1A29 (16.7)	GLTTCAGGTTTATGTTGGC	CCCTAGGCTCCCAATCTCC	AB166622/AB166623
NRDJKM-23	(CA) _n	137-147	6	0.571	20	HR150M (47.3)	AAACCCAGAGAAACAATCTAG	AATTCATCCGATACAGAGCC	AB166624/AB166625
NRDJKM-24	(CA) _n , imperfect	213-230	7	0.75	20	HR112 (56.3)	CATGCCACAGCTAAGAGCC	GGGAGTTTAACTCCAGGCTC	AB166626/AB166627
NRDJKM-25	(CA) _n	209-253	3	0.536	20	BM5027 (35.1)	GAACCCAGGTCCTTCCAAAG	GGACCCCTCAATCTCTGCG	AB166628/AB166629
NRDJKM-26	(CA) _n , (TA) _n , imperfect	359-167	5	0.857	20	HR12275 (33.7)	CCTTGGATTTCAAGAGATG	GATGAACCTATACTCTTTGTG	AB166630/AB166631
NRDJKM-27	(CA) _n	337-363	7	0.75	20	HR12275 (33.7)	GAACCTCACAGGCTTAGCCAC	GGACATCCAACTCAGGTACG	AB166632/AB166633
NRDJKM-28	(CA) _n , imperfect	326-146	7	0.679	20	HR112 (56.3)	CAAGTCTTCCATGCTTGG	AGAGCTCCAACTCAGCAGG	AB166634/AB166635
NRDJKM-29	(CA) _n	360-172	5	0.571	20	AG1A29 (16.7)	TCAGTGTCTCTGGGCAAC	TGLACACTTAACAGACCCACAG	AB166636/AB166637
NRDJKM-30	(CA) _n , imperfect	374-388	3	0.107	20	AG1A29 (16.7)	CTTCTGTGCCCTAGACCCG	CAATAAAGCTTCAACCTCTCC	AB166638/AB166639
NRDJKM-31	(CA) _n	288-340	8	0.75	20	BM1241 (17.6)	ATAGCCAGCAATCGAAGTACC	CTTCTGGTTTTACTGGTAAACC	AB166640/AB166641
NRDJKM-32	(CA) _n , imperfect	251-285	6	0.711	20	AG1A29 (16.7)	CCTATCTTAGTCAAGATCCCAAC	TGGTGGGCTAACAACTCATGG	AB166642/AB166643

A Comprehensive Genetic Map of the Cattle Genome Based on 3802 Microsatellites

Naoya Ihara,¹ Akiko Takasuga,¹ Kazunori Mizoshita,² Haruko Takeda,^{1,3}
 Mayumi Sugimoto,⁴ Yasushi Mizoguchi,¹ Takashi Hirano,¹ Tomohito Itoh,^{1,5}
 Toshio Watanabe,¹ Kent M. Reed,⁶ Warren M. Snelling,⁷ Steven M. Kappes,⁷
 Craig W. Beattie,⁸ Gary L. Bennett,⁷ and Yoshikazu Sugimoto^{1,9}

¹Surakawa Institute of Animal Genetics, Odakura, Nishigo, Nishi-shirakawa, Fukushima, 961-8061, Japan; ²Cattle Breeding Development Institute Kagoshima, Kagoshima, 899-8212, Japan; ³Department of Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, 4000 Liege, Belgium; ⁴National Livestock Breeding Center, Odakura, Nishigo, Nishi-shirakawa, Fukushima, 961-8061, Japan; ⁵Livestock Improvement Association of Japan, Inc., Maebashi, Gunma, 351-0121, Japan; ⁶Department of Veterinary Pathobiology, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota 55108, USA; ⁷U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), U.S. Meat Animal Research Center, Clay Center, Nebraska 68915-0166, USA; ⁸Department of Animal Biotechnology, University of Nevada, Reno, Nevada 89557, USA

A microsatellite-based high-density genetic map facilitates for fine mapping of hereditary traits of interest, characterization of meiosis, and providing a foundation for physical map construction. Here, we developed a comprehensive genetic map on the basis of >880,000 genotypes across the USDA MARC cattle reference families with a potential genetic resolution of 0.8 cM at the 95% confidence level (~800 kb in the bovine genome). We incorporated 2325 microsatellites into the second-generation genetic map by linkage analysis based on sex-averaged two-point LOD scores (>3.0), of which 2293 were fine-mapped by multipoint linkage analysis. The new 3160-cM map comprised of 29 sex-averaged autosomal linkage groups and a sex-specific X-chromosome linkage group includes 3960 markers with 2389 positions, resulting in an average interval size of 1.4 cM. More than half (51%) of the total length of the map is covered with intervals of 2.0 cM or less, and the largest gap is a 10.2-cM interval on the X-linkage group. The new map should accelerate fine mapping and positional cloning of genes for genetic diseases and economically important traits in cattle, as well as related livestock species, such as sheep and goat.

[Supplemental material is available online at www.genome.org. Marker information of new microsatellites is available from DDBJ under accession nos. AB164707 to AB166543 including flanking sequences and AB166544 to AB166659 for only primer sequences. Linkage groups for all autosomes and X- and Y-chromosomes are presented at <http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>.]

Microsatellites are excellent genetic markers because of their high polymorphism and abundant distribution throughout the genome. A microsatellite-based genetic map is an essential tool for linkage mapping of monogenic as well as polygenic traits of interest. Cattle genetic maps have been constructed with 746 markers (Barendse et al. 1997) and 1250 markers (Kappes et al. 1997), respectively. The latter map, spanning 2993 cM, is the current standard genetic map with an average interval of nearly 3.0 cM, similar to the resolution of the most current genetic maps for pig, sheep, and chicken (Kahner et al. 1999; Groenen et al. 2000; Mackay et al. 2001). This cattle genetic map is probably sufficient to assign hereditary phenotypes to specific chromosomal regions of ~20-cM intervals, but not to fine-map them. An intensive effort to develop more markers from mapped regions to narrow the critical region is commonly required (Takeda et al. 2002; Takeda and Sugimoto 2003). A comparative positional candidate cloning to infer candidate genes from conserved chromosomal segments containing the same complement of genes as in other species is then more feasible and clearly depends on the resolution of physical maps substituted with many well-ordered anchors

integrated with genetic linkage maps. However, the time, labor, and cost per marker of isolating DNA markers from a specific chromosomal region is substantially greater than randomly isolating markers. Thus, large-scale random isolation of microsatellites would be the best choice for searching markers across the genome, followed by construction of a high-density genetic map to facilitate narrowing regions of interest and identifying genes of agricultural importance.

Furthermore, a high-density genetic map can provide a scaffold for physical map construction, such as radiation hybrid (RH) and BAC contig maps. More framework markers on an RH map make mapping genes much easier and improve reliability of the map. Larsin et al. (2003) recently determined 63,847 cattle BAC end sequences that will contribute to the construction of the BAC contig map, of which 30% could be located on the human genome and assigned to bovine chromosomes in silico using the comparative mapping by an annotation and sequence similarity (COMPASS). Then, they placed ~180 BAC ends on the cattle RH maps to improve the resolution of synteny borders on HSAT1 RH mapping. Of many BAC ends will be needed for assembling BAC contigs on a whole genome level, especially for the BAC contigs located around the border of synteny. A high-density genetic map can provide an alternative method for assembling BAC contigs by screening BAC clones containing microsatellite markers

*Corresponding author.

E-MAIL knzusugi@siag.or.jp; FAX 81-248-25-5725.

Article and publication are at <http://www.genome.org> doi:10.1101/g.2541704

and anchoring them on the bovine genome. Construction of a reliable BAC contig map is indispensable for the primary stage of whole-genome sequencing.

We report here a microsatellite-based high-density bovine genetic map consisting of 3960 markers including 3802 polymorphic microsatellites with an average interval of 1.4 cM, covering 3160 cM for 29 sex-averaged linkage groups and a sex-specific X-linkage group. This map can provide powerful resources for fine mapping of QTLs and a genetic backbone for the development of well-annotated gene maps in cattle and other related livestock species.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and Characterization of Microsatellites

Using microsatellite-enriched libraries (Stone et al. 1995) with minor modifications, 5750 previously unreported microsatellites containing C-AT_n were isolated. Of these, 1750 were heterozygous in the USDA MARC cattle reference population (Bishop et al. 1994). In addition to those, 196 unreported heterozygous microsatellites from other sources and 421 heterozygous microsatellites from public domain sources (BovMAP database; <http://locus.jimmy.umd.edu/bovmap/igbe/>) mapping constant map (p.7345) cattle (Supplemental table) that had already been reported but not genotyped and included in the previous map (Kappes et al. 1997) were also genotyped. A total of 2370 heterozygous microsatellites were subjected to genetic mapping in this work. The average heterozygosity (*H*) and allele number of 2370 heterozygous microsatellites across 28 parents of the MARC reference population were 0.52 and 5.7, respectively. Of these, 1035 microsatellites had *H* > 0.60, and 175 microsatellites were highly polymorphic (*H* > 0.80) in the mapping population.

Genetic Linkage Mapping

Of 2370 microsatellites heterozygous in the mapping population, 2428 microsatellites were assigned to chromosomes by two-point linkage analysis with LOD scores >3.0 using CROMMAP (Green et al. 1996). From this, a total of 2293 (99%) microsatellites were fine-mapped by multi-point linkage analysis. The new genetic map is composed of 3960 markers including 3802 microsatellites and 79 SNPs (Supplemental table), and spans a genetic distance of 3160 cM for 29 sex-averaged linkage groups and a sex-specific X-chromosomal linkage group. The markers are distributed among 2489 distinct positions, thus the average marker interval is 1.4 cM. This reference population includes a maximum of 392 informative meiosis, resulting in an estimated potential map resolution of 0.8 cM at the 95% confidence level, which suggests that additional markers may be incorporated. The diagram and the parameters of each linkage group are shown in Figure 1 and Table 1, respectively. The average marker interval of each autosome ranged from 0.9 cM for B1A29 to 1.9 cM for B1A26. Approximately 51% of the whole genome was covered with <2.0 cM between markers and 91% of the length by intervals of <5.0 cM. No gaps >10.0 cM have remained in the 29 autosomes. Several large gaps in the previous map, such as centromeric portions of B1A, B1A1, B1A13, and B1A19, were dramatically reduced by saturating with new markers (Fig. 1).

A difference in size between male and female genetic maps has been reported in human, cattle, sheep, and other species (Beever et al. 1999; Mohravyseer et al. 1998; Madariy et al. 2000; Kong et al. 2002). Similar to the previous map (Kappes et al. 1997), the overall sizes of the male and female maps are comparable (male, 3158 cM; female, 3142 cM). It has been shown that the male pseudoautosomal region has a nearly 10-fold increase in recombination frequency compared with any other au-

tosomal regions and is due to obligate crossover in this region (Rappold 1993). Consistent with human, considerable size expansion in the map of the male pseudoautosomal region was also observed in this work (Fig. 1; Table 1). The state of the coverage of the genome with markers was considered reasonable from the view of the human genetic map reported by Dib et al. (1996). In most regions, the order of the markers on the new map was consistent with the previous map, although some regions were rearranged through incorporating the new markers and correcting old marker data.

Genotype Validation

Microsatellites yielding ambiguous genotypes or poor amplification were excluded because they can produce unlikely double or more crossover events through genotyping errors and inflate the map length as a result. To detect potential genotyping errors, double or more crossover events within a small chromosomal region (<20 cM) were identified using the CHROMPIC option of CROMMAP (Green et al. 1996). Intensive inspection and a second PCR validation of marker genotypes with potential genotyping errors were done in this work. Following a second PCR validation, genotypes were removed from the data if multiple likely errors for a marker suggested amplification problems or multiple likely errors for an animal suggested DNA problems. As a result, the total size of the new map (3160 cM) was 170.4 cM larger than the 1997 map. Extensions of the map beyond previous centromeric and telomeric ends sum to 171.2 cM, similar to the 170.1 cM overall increase. Therefore, the intensive effort to correct markers with potential genotyping errors, such as unlikely double or more crossover events, generally worked well.

METHODS

Isolation of Bovine Microsatellites

Most of the microsatellites were isolated using microsatellite-enriched libraries (Stone et al. 1995) with some modifications. Briefly, microsatellite-enriched libraries were constructed using (CA)_n or (CT)_n as a primer, producing unidirectional CA or CT dinucleotide repeat-containing libraries. Clones colony hybridized with Poly(A) dt (poly(A) dt) (Invitrogen, Biosciences) were subjected to colony PCR, followed by sequencing. Sequencing was performed on an ABI 3700 Capillary Sequencer, using BigDye Ver. 3.0 and dGTP BigDye Ver. 3.0.4 cycle Sequencing Ready Reaction kits (Applied Biosystems). Microsatellites containing (CA)_n were subjected to primer design, using Primer 4 (Boveri and Skalketsky 2000), and targeting a product size of 100 to 300 bases. Redundant microsatellites were identified by BLAST searches against ComBank (Benson et al. 2002) and the sequences of previously developed microsatellites, and were eliminated. These data manipulations were performed using DNA space software (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.).

Isolation using the magnetic beads method was essentially as described by Takata and Segimoto (2003). Coupled isolation from chromosome-specific libraries was used for B1V4 and B1A20, essentially as described by Reed et al. (2002a,b). Markers isolated from YAC-BAC DNA are described in the Supplemental table.

PCR Amplification of Microsatellites and Data Collection

Microsatellites were amplified by means of PCR using flanking conserved primers as described (Sugimoto et al. 2003). Markers were genotyped across the MARC reference population (Bishop et al. 1994). Marker heterozygosity was determined only on the reference mapping population as described (Kappes et al. 1997). PCR conditions for each marker are available from the Supplemental table.

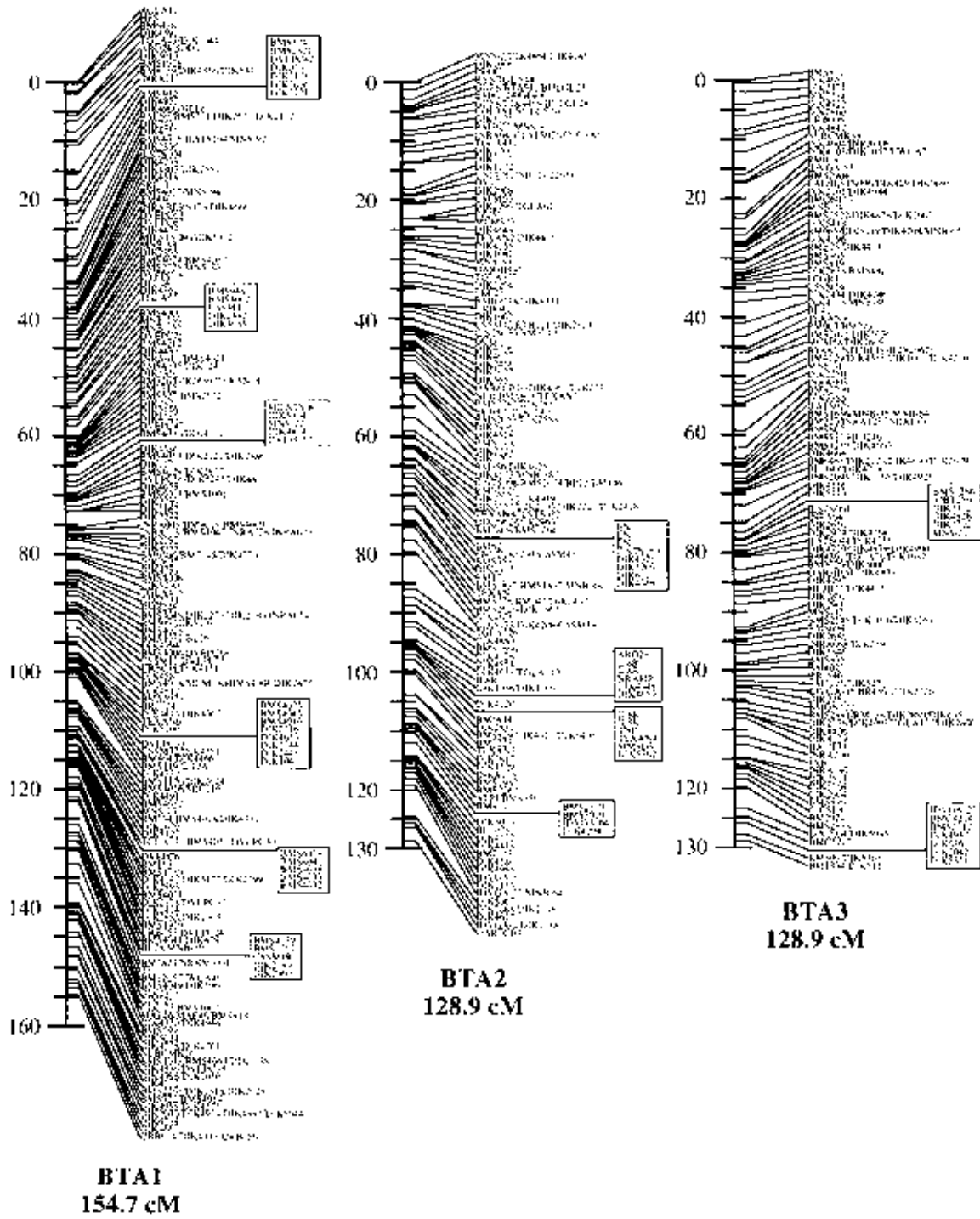


Figure 1 (Continued on next page)

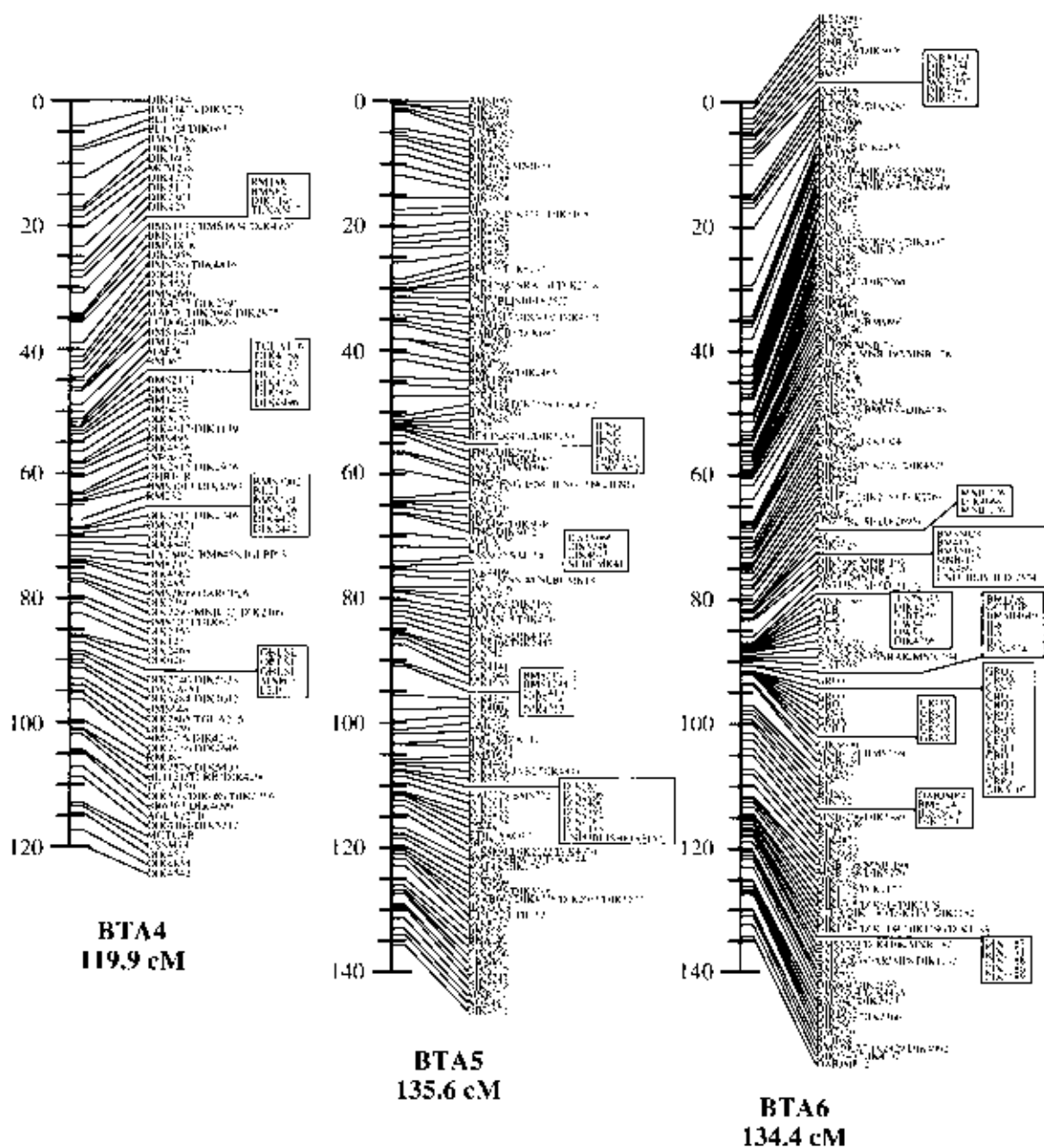


Figure 1 (Continued on next page)

Linkage Analysis

CRIMAP 2.4 software (Green et al., 1990), was used for linkage analysis. Markers were placed into linkage groups based on two-point LOD scores >3.0 with markers from the previous map. Owing to computational requirements of CRIMAP 2.4, all genotypes for heterozygous progeny resulting from mating like heterozygous parents were temporarily removed from the data. Ordering the markers within a linkage group began with the previous map. A new marker was inserted into the map by evaluating the LOD at every possible location. The marker was then

inserted at the location with the best LOD, and the change in length of the linkage group was evaluated. If the change was <0.75 cM, then the marker was retained. An arbitrary 0.75-cM increase in length was imposed to prevent the inclusion of a large number of probable genotyping errors in the early stages of map building before they had been checked by re-genotyping. A single genotyping error typically resulted in a 0.75-cM increase in length. Once the set of markers meeting the 0.75-cM criteria was inserted, their pairs of markers were mutually interchanged, and the LOD was evaluated. If a switched pair improved the LOD, the

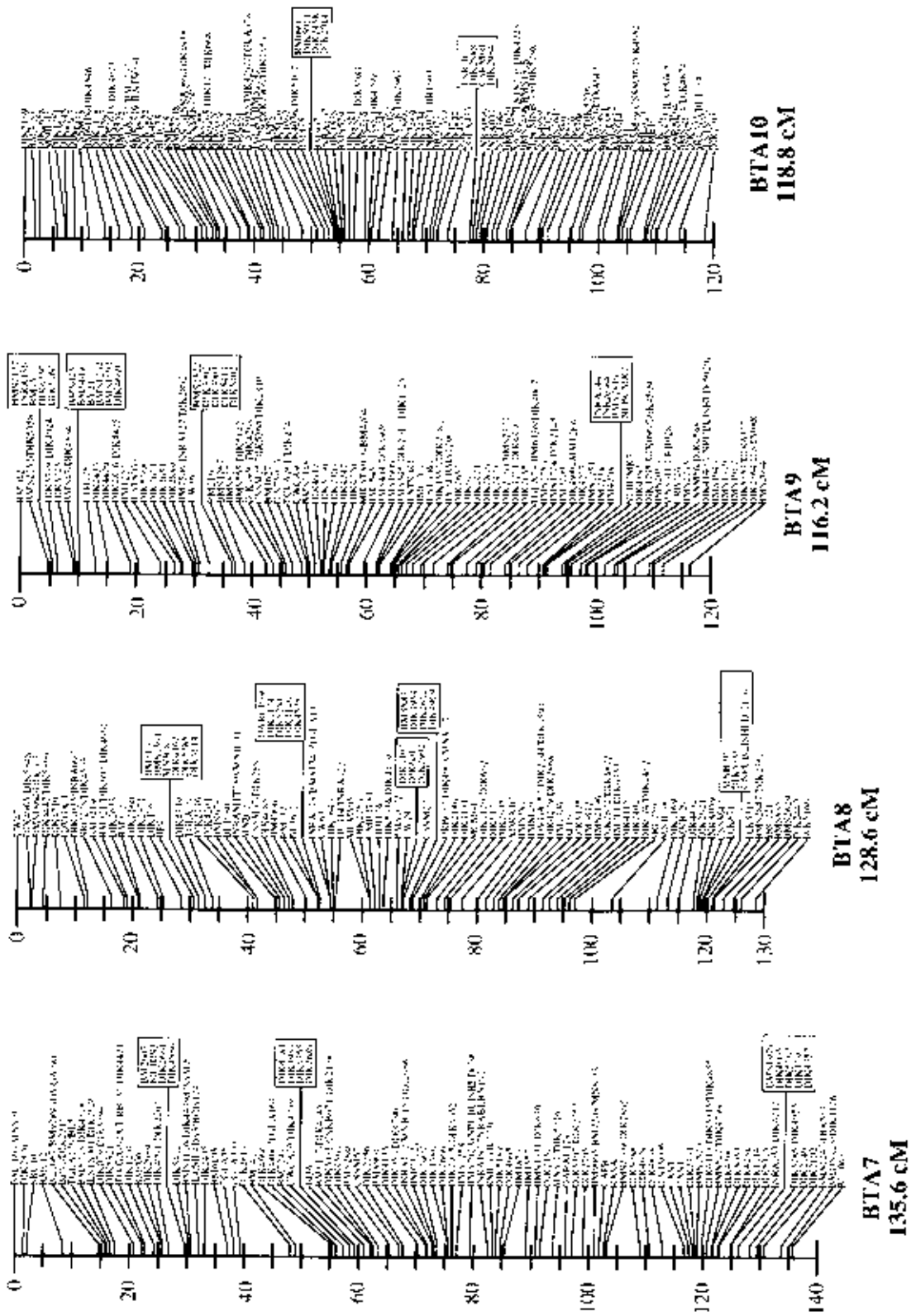


Figure 1 (Continued on page 2)

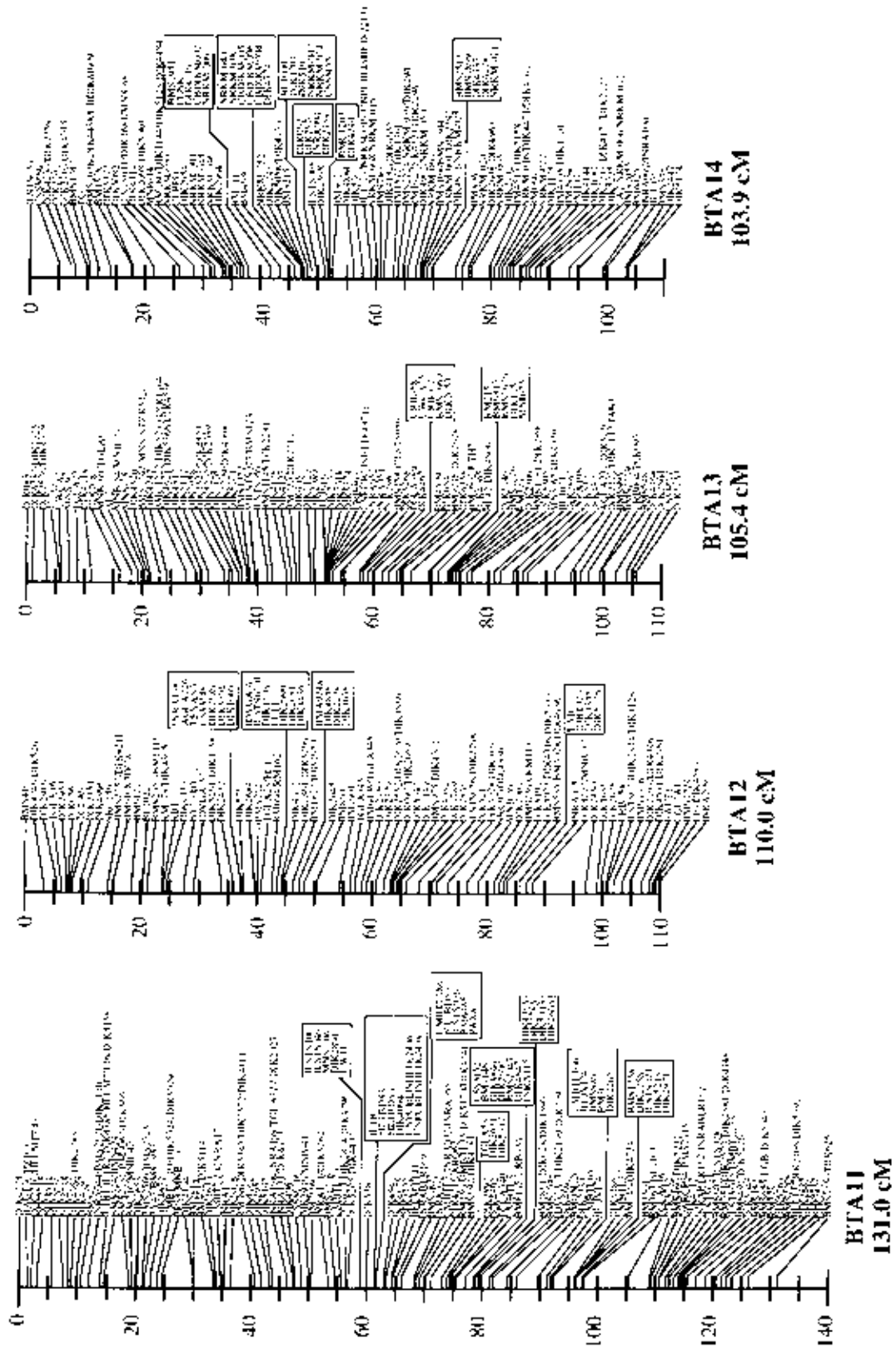


Figure 1 (Continued on next page.)

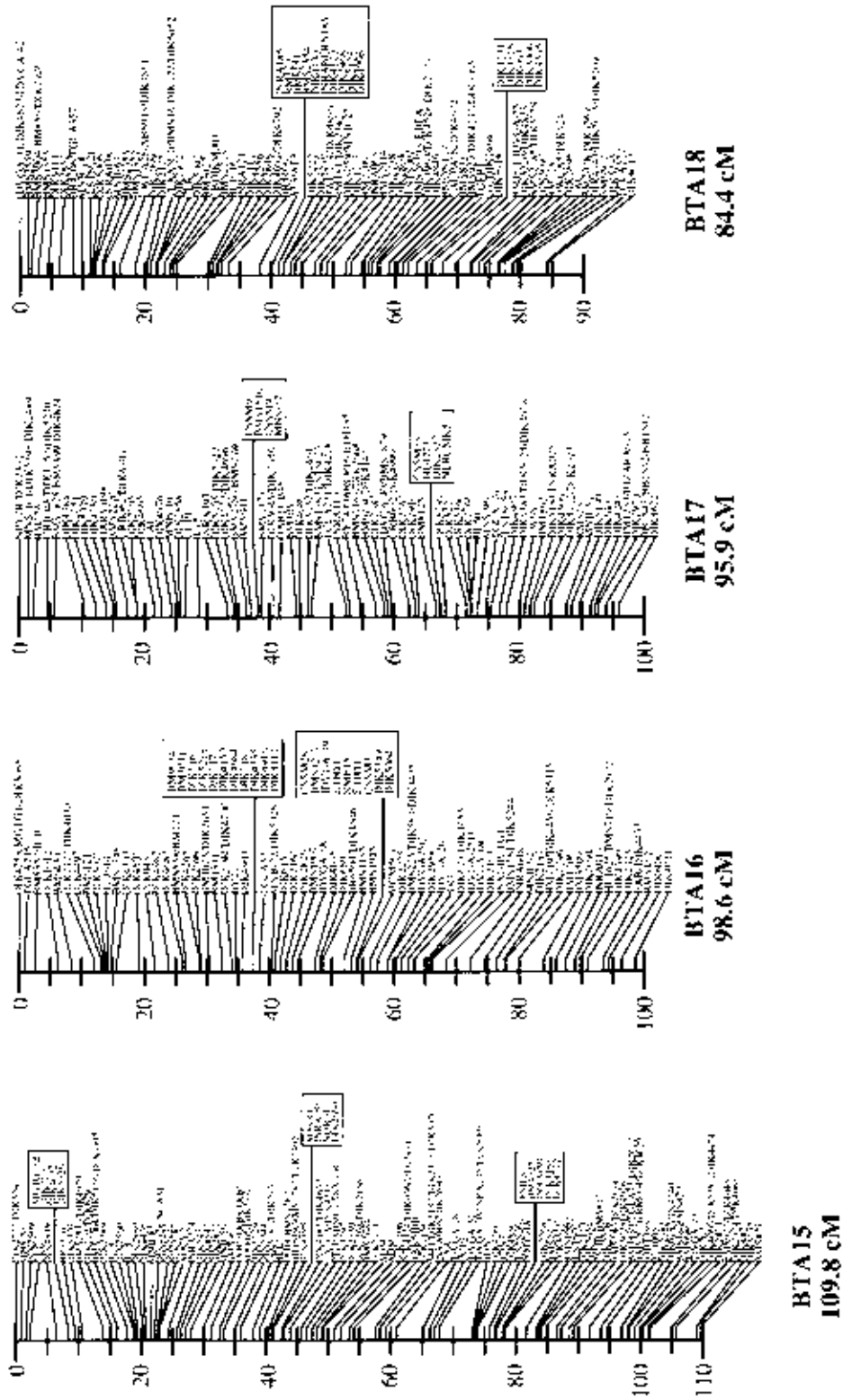


Figure 1 (Continued on next page)

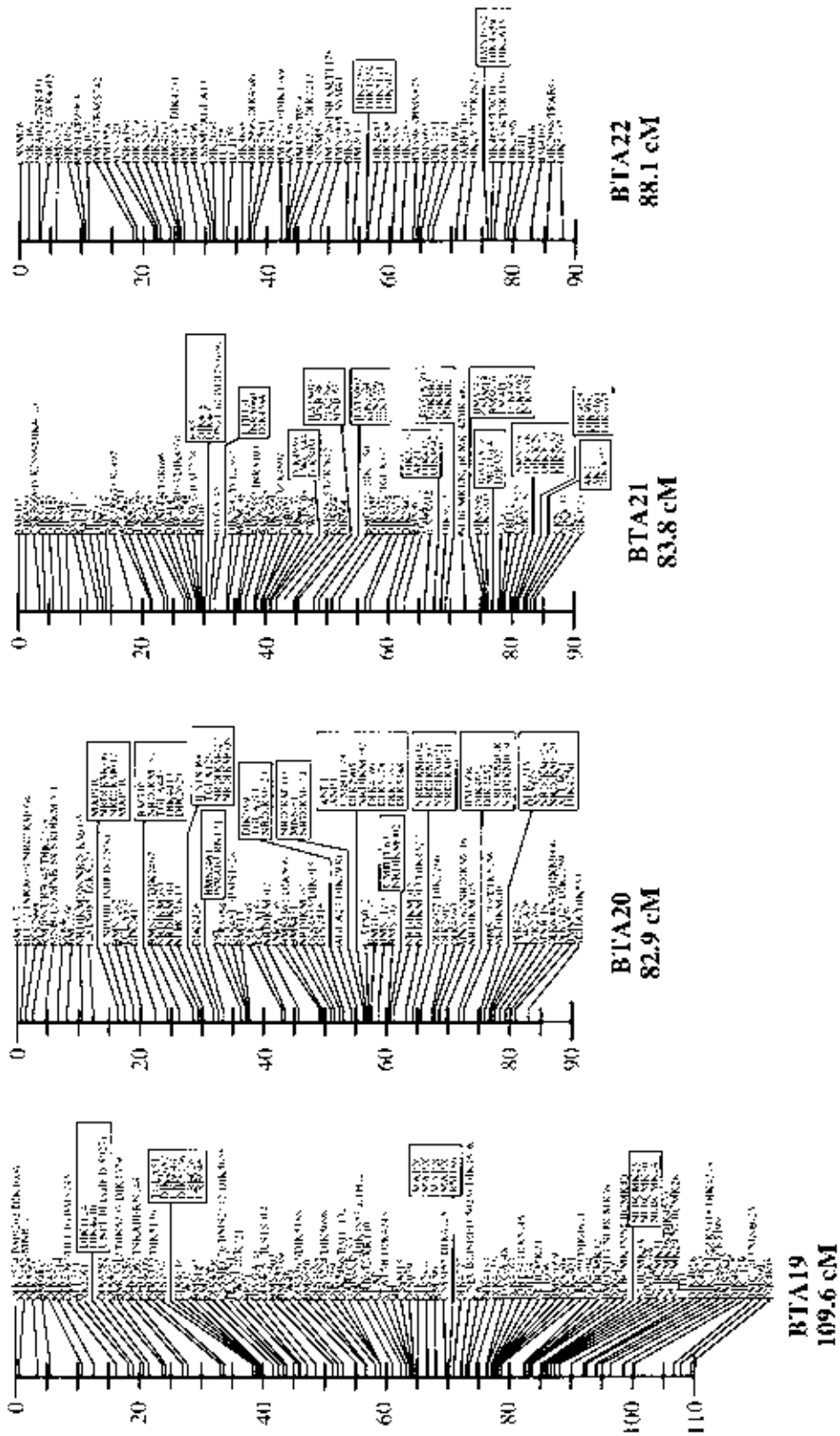


Figure 1 (Continued on next page)

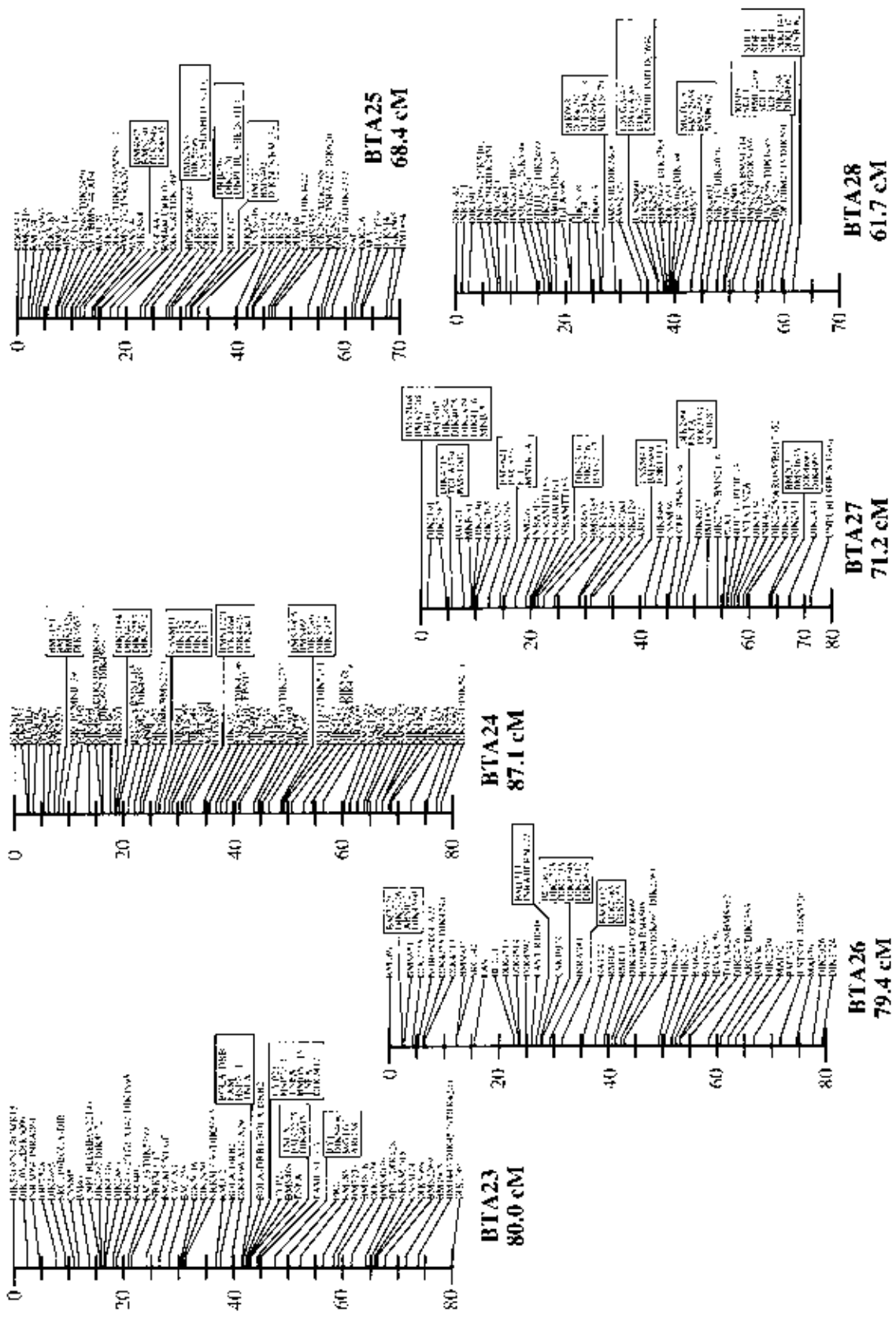


Figure 1 (Continued on next page)

Table 1. Parameters of the Bovine Linkage Map

BTA/X*	Length (cM)	No. of markers	No. of positions	Average interval (cM)	Maximum interval (cM)	No. of intervals	
						10-15 cM	5-10 cM
1	154.7*	263*	150*	1	4.6	0	0
2	128.9	186	112	1.2	6.2	0	2
3	128.9	171	101	1.3	5.2	0	1
4	119.9	130	81	1.5	4.7	0	0
5	155.6	181	115	1.2	4.7	0	0
6	154.4	232	128	1.1	9.2	0	3
7	135.6	158	88	1.6	8.6	0	5*
8	128.6	123	84	1.5	7.9	0	4
9	116.2	127	79	1.5	4.9	0	0
10	134.8	125	88	1.4	4.4	0	0
11	131	195	103	1.3	7.6	0	2
12	110	122	74	1.5	8.9	0	1
13	105.4	114	80	1.3	4.9	0	0
14	103.9	133	77	1.4	5.1	0	1
15	109.8	144	94	1.2	5.6	0	1
16	98.6	103	67	1.5	4	0	0
17	95.9	103	69	1.4	5.5	0	1
18	84.4	111	70	1.2	5.1	0	1
19	109.6	134	89	1.2	6.7	0	3
20	82.9	120	64	1.4	5.2	0	1
21	83.8	125	72	1.2	4	0	0
22	88.1	79	52	1.6	7.1	0	1
23	80	76	48	1.7	6.3	0	2
24	78.1	94	61	1.3	3.8	0	0
25	68.4	72	48	1.5	6.8	0	2
26	79.4	64*	43*	1.9*	7.4	0	3
27	71.2	72	43*	1.7	6.2	0	1
28	61.7*	80	43*	1.5	4.7	0	0
29	69.7	54	76	0.9*	3.3*	0	0
X	146.5	189	83	1.8	10.2*	1	5*
Total	3159.9	3960	2189	1.4 (average)	10.2 (maximum)	1	40

Maximum number and minimum number in each column were shown by * and #, respectively.

*Data for 29 sex-averaged autosomal linkage groups and a sex-specific X-chromosome linkage group.

pair was switched and the process repeated until no better LOD could be found. Once this occurred, each new marker was temporarily removed from the linkage group and the change in length was evaluated. If removing the marker reduced the length by ≥ 0.75 cM, then the marker was evaluated at all possible positions and reinserted at the position with the highest LOD. If removing the marker reduced the length by < 0.75 cM or more, the marker was removed from the linkage group. The process of switching in pairs and repositioning markers was repeated until the LOD no longer changed. If this process changed marker order, another attempt was made to insert markers that did not meet the 0.75 cM criterion. After no more markers could be inserted and the algorithms did not reveal a more likely marker order, computation proceeded using the entire data set, including heterozygous progeny genotypes from like-heterozygote matings. The process of switching the order of marker pairs was repeated to finalize marker order. The final maps represent the most likely marker order identified with the complete data set, although an exhaustive evaluation of all possible orders was not conducted.

After determining the final marker order, the CHROMPIC option of CRIMAP 2.4 was used to identify potential genotyping errors in the data for all markers, including markers removed because they increased map length by ≥ 0.75 cM. When corrections to genotypes were made, the entire process was repeated,

starting from data with genotypes for heterozygous progeny from like-heterozygote parents removed. Special attention was given to new markers that appeared to map on the ends of linkage groups. Because new markers on the ends of the linkage groups are often expected to increase the length by ≥ 0.75 cM, CHROMPIC outputs for these markers were closely scrutinized. Following a second genotyping and re-examination of crosses at the ends of linkage groups, these markers were included in linkage groups even though they increased lengths by ≥ 0.75 cM. After determining marker order, markers genotyped by other groups that were not published and had not completed checking potential errors were eliminated, and distances were calculated.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Y. Kanouchi, E. Matsume, Y. Hoshi, and K. Maruyama for laboratory assistance. This work was supported by grants from the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

REFERENCES

- Barendse, W., Van der, J., Kemp, N.J., Sugratta, Y., Amstutz, S.M., Williams, J.L., Sun, H.S., Egan, V., Agaba, M., Meyer, S.A., et al. 1997. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mamm. Genome* 8: 21-28.
- Beever, T.L., Town, H.A., Barendse, W., Andersson, L., Amstutz, S.M.,

Figure 1 Diagrams of linkage groups for 29 sex-averaged and a female-specific X-chromosome with a male-specific pseudautosomal region. All markers are indicated as the locus name based on the MARRC database, whose detailed information is available from the Supplemental Table. The markers in a row or within a box indicate no recombination between them. Genetic distances between markers are given in centimorgans (cM).

- Bermejo J. W., Jarvis, B.M., Davis, S.K., Kappes, S.M., Kirkpatrick, B.W., et al. 1996. Report of the first workshop on the genetic maps of bovine chromosome 23. *Anim. Genet.* **27**: 69-75.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, H., Lipman, D.J., Ostell, L., Rapp, B.A., and Wheeler, D.L. 2000. GenBank. *Nucleic Acids Res.* **30**: 17-20.
- Bishop, M.D., Kappes, S.M., Keele, J.W., Stone, R.L., Sanderson, N.J., Hayes, G.V., Gold, S.S., Gray, R., Gross, M.D., Yess, T., et al. 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics* **146**: 619-639.
- Dry, C., Feare, S., Izames, C., Sansom, D., Devant, N., Vignal, A., Millonot, P., Marin, S., Hazan, J., Schanin, J., et al. 1996. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,261 microsatellites. *Nature* **380**: 152-154.
- Genet. 2002. K. and Ueda, S. 1990. *Dissemination of BMAP*. Version 2.7. Washington University School of Medicine, St. Louis, MO.
- Groenen, M.A., Cheng, H.H., Gunnarsson, N., Isakkel, R.L., Briles, W.L., Ripke, T., Yang, D.W., Cattanach, F.Z., Dostajovic, I., Hildebrand, J., et al. 2000. A consensus linkage map of the chicken genome. *Genom. Res.* **10**: 137-147.
- Kappes, S.M., Keele, J.W., Stone, R.L., McGowan, B.A., Sørstingrud, L.S., Smith, J.P., Top of Straks, S.J., and Beattie, C.W. 1987. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genom. Res.* **7**: 235-249.
- Li, Y., Guiboparison, M.L., Kautz, J., Lindstrand, M., Andersson, S.V., Richardson, B., Signoriletti, S., Barnard, L., Hallbeck, B., Messer, G., et al. 2003. A high-resolution recombinative map of the human genome. *Nat. Genet.* **31**: 241-247.
- Larkin, D.M., Overstveen, der Wurff, A., Balcar, M., Schwartz, P.A., Scherman, A., Cohen, C., Wright, G.L., Campion, L.L., Benson, L.D., Edwards, L., et al. 2003. A cattle-human comparative map built with cattle BACs and human genomic sequence. *Genom. Res.* **13**: 1966-1973.
- Maddox, H.E., Davies, K.R., Crawford, A.M., Hillier, D.G., Avramis, H., Cribbe, J.P., Ewing, B.A., Bell, K.L., Cockett, M.J., King, N., et al. 2001. An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 100,000 markers. *Genom. Res.* **11**: 1275-1283.
- Miltenberger, H.W., Tsujimoto, S., Gordon, J., and Olsen, A.S. 1998. Regions of sex-specific hyper- and hyper-recombination identified through integration of 180 genetic markers into the official physical map of human chromosome 19. *Genom. Res.* **4**: 153-162.
- Koppe, J.J. 1961. The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum. Genet.* **9**: 415-424.
- Frost, K.M., Ihara, N., Mariani, D., Mendonça, S.M., Jensen, L.J., de Lencastre, J., Pires, De Jesus, L.A., Bennett, G.L., Sugimoto, Y., and Beattie, C.W. 2002a. High-resolution genetic maps of bovine chromosome 29 through focused marker development. *Chromosom. Res.* **9**: 219-226.
- Frost, K.M., Ihara, N., Pires, De Jesus, L.A., Sørstingrud, L.S., Smith, J.P., Bennett, G.L., Sugimoto, Y., and Beattie, C.W. 2002b. Development of 47 new microsatellite markers from a BAC library. *Genet. Test.* **13**: 195-202.
- Solomon, G.A., Alexander, T.L., Hu, Z., Smith, J.P., Keele, J.W., and Beattie, C.W. 1996. A comprehensive map of the porcine genome. *Genom. Res.* **6**: 3-1-391.
- Solov, S., and Sack, D.A. 1988. Primer on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Genbank, methods and protocols*. Methods in molecular biology, eds. S. Kravitz and S. Misra, vol. 19, pp. 163-186. Humana Press, Totowa, NJ. Available at: <http://www.genome.wvu.edu/homepage/software/other/primers.html>.
- Stone, R.L., Prather, D.L., Durr, G.M., Kappes, S.M., Keele, J.W., and Beattie, C.W. 1995. A small insert bovine genomic library highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Mamm. Genome* **6**: 23-24.
- Sugimoto, Y., Ihara, N., Bennett, G.L., and Sugimoto, Y. 2002. A newly discovered double-strand microsatellite locus on bovine chromosome 19. *Gen. Genet.* **34**: 238-23.
- Isakkel, R. and Sugimoto, Y. 2003. Construction of BAC/BAC contig map for the 21 Awq21 region containing a locus for bovine chondrodysplasia. *Anim. Gen. Res. Lett.* **14**: 81-89.
- Isakkel, R., Ihara, N., Ogami, T., Esiri, T., Yoneda, K., Sato, H., Ihara, N., Itoh, T., Iwata, S.R., Mishima, Y., et al. 2003. Position cloning of the gene HMPIN responsible for bovine chondrodysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 10549-10554.

WEB SITE REFERENCES

- <http://www.genome.wvu.edu/Mapping/submitting/submitting.html> (BMAP analysis)
- <http://www.genome.wvu.edu/genome/cattle/links.html> (linkage groups for all autosomes and X and Y chromosomes)
- <http://www.genome.wvu.edu/genome/software/other/primers.html>

Received April 2, 2004; accepted in revised form August 11, 2004.

Research article

Open Access

Integrating linkage and radiation hybrid mapping data for bovine chromosome 15

Warren M Snelling*¹, Mathieu Cautier², John W Keele¹, Timothy P. Smith¹, Roger T Stone¹, Gregory P Harhay¹, Gary L Bennett¹, Naoya Ihara³, Akiko Takasuga³, Haruko Takeda³, Yoshikazu Sugimoto³ and André Eggen²

Address: ¹HISDA, ARS, U.S. Meat Animal Research Center, Spur 1810, Clay Center, Nebraska 68933-0100, USA; ²Biochemical Genetics and Cytogenetics Unit, Department of Animal Genetics, Laboratory of Genetics and Biotechnology, INRA S-RJ 78350 Jouy-en-Josas, France and ³Nihonkawa Institute of Animal Genetics, Livestock Technology Association of Japan, Takashima, Japan

E-mail: Warren M Snelling* - wsnelling@centralmail.usda.gov; Mathieu Cautier - cautier@chamant.jouy.inra.fr; John W Keele - keele@email.mare.usda.gov; Timothy P Smith - smith@email.mare.usda.gov; Roger T Stone - stone@email.mare.usda.gov; Gregory P Harhay - harhay@email.mare.usda.gov; Gary L Bennett - bennetl@email.mare.usda.gov; Naoya Ihara - ihara@siag.or.jp; Akiko Takasuga - takasuga@siag.or.jp; Haruko Takeda - htakeda@lig.ac.be; Yoshikazu Sugimoto - kazusugi@siag.or.jp; André Eggen - eggen@dam.inra.jouy.inra.fr

* Corresponding author

Published: 08 October 2004

Received: 16 June 2004

BMC Genomics 2004, 5:77 doi:10.1186/1471-2164-5-77

Accepted: 08 October 2004

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/5/77>

© 2004 Snelling et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Bovine chromosome (BTA) 15 contains a quantitative trait loci (QTL) for meat tenderness, as well as several breaks in synteny with human chromosome (HSA) 11. Both linkage and radiation hybrid (RH) maps of BTA 15 are available, but the linkage map lacks gene-specific markers needed to identify genes underlying the QTL, and the gene-rich RH map lacks associations with marker genotypes needed to define the QTL. Integrating the maps will provide information to further explore the QTL as well as refine the comparative map between BTA 15 and HSA 11. A recently developed approach to integrating linkage and RH maps uses both linkage and RH data to resolve a consensus marker order, rather than aligning independently constructed maps. Automated map construction procedures employing this maximum-likelihood approach were developed to integrate BTA RH and linkage data, and establish comparative positions of BTA 15 markers with HSA 11 homologs.

Results: The integrated BTA 15 map represents 145 markers: 42 shared by both data sets, 36 unique to the linkage data and 67 unique to RH data. Sequence alignment yielded comparative positions for 77 bovine markers with homologs on HSA 11. The map covers approximately 32% of HSA 11 sequence in five segments of conserved synteny, another 15% of HSA 11 is shared with BTA 29. Bovine and human order are consistent in portions of the syntenic segments, but some rearrangement is apparent. Comparative positions of gene markers near the meat tenderness QTL indicate the region includes separate segments of HSA 11. The two microsatellite markers flanking the QTL peak are between defined syntenic segments.

Conclusions: Combining data to construct an integrated map not only consolidates information from different sources onto a single map, but information contributed from each data set increases the accuracy of the map. Comparison of bovine maps with well annotated human sequence can provide useful information about genes near mapped bovine markers, but bovine gene order may be different than human. Procedures to connect genetic and physical mapping data, build integrated maps for livestock species, and connect those maps to more fully annotated sequence can be automated, facilitating the maintenance of up-to-date maps, and providing a valuable tool to further explore genetic variation in livestock.

Background

Genome maps for livestock species are necessary to identify genes affecting economically important production traits. Linkage maps, based primarily on highly polymorphic, anonymous microsatellite markers, have been important for identifying chromosomal regions influencing economically important traits in cattle [1-3]. Because a lack of recombination between closely linked markers limits resolution, and because cattle linkage maps [4,5] contain few genes, linkage maps are of limited value for ordering closely linked markers and identifying genes underlying quantitative trait loci (QTL). The radiation hybrid (RH) approach allows mapping monomorphic markers for genes and can provide a higher resolution for ordering close markers [6,7], but high breakage frequency RH data are less reliable than linkage data for ordering widely separated groups of markers [8]. Integrating linkage and RH data into a single map will refine marker order to facilitate genomic sequencing and will also increase the efficiency of identifying genes associated with QTL.

Integrated analysis of both linkage data and RH data allows each source of information to complement the other, providing coarse to intermediate scale maps of the bovine genome, populated with gene markers to facilitate discovery of positional candidate genes for QTL. These integrated maps will lack the fine scale of complete genome sequence, but represent a resource useful for gene identification through comparative mapping approaches, using more complete genome sequence and annotation from other organisms. Similarity between segments of bovine DNA and genomic sequence from other species may supplement integrated data to predict the location of unmapped genes in the bovine genome [9]. A comprehensive integrated map, containing all identified genes and markers, will simplify database queries and reduce ambiguity inherent in mixing information from other mammals.

An integrated map can also provide a framework for assembling bovine genomic sequence as data becomes available. A well-ordered map of sequence-tagged sites (STS) was essential for assembling the human sequence [10]. The National Institutes of Health (NIH) identified the bovine genome as high priority for sequencing [11], and sequencing is underway. One pivotal criterion to classifying the bovine genome as ready for sequencing was the availability of well-maintained genetic and physical maps; integrating these maps will provide additional support for sequence assembly.

Integration of linkage and RH maps has been reported for a number of species [11-14] and individual bovine chromosomes [15-17]. The general approach to integrated mapping has been to score several markers from linkage

maps on an RH panel, then align the independent maps via common markers. Nadkarni [18] and White et al. [19] described procedures to synthesize information from multiple independent maps onto a single merged map. These approaches do not directly use data contributing to each map, but merge results of independent analyses. A fundamentally different approach is to merge independent data sets with common markers, so each data set contributes to constructing a single integrated map. Agarwala et al. [20] developed procedures for integrating RH maps where markers common to independent RH panels contributed to the solution of a comprehensive RH map. Schlex et al. [8], developed procedures and released CarthaGene software [21] to merge and solve integrated maps representing multiple linkage and RH data sets.

A large volume of data are being generated in cattle and other livestock species that is not rapidly reflected in current map representations. The result is a lack of truly up-to-date maps of any livestock species, as the maps may lag by months or years in their representation of existing data. It is not feasible to devote significant human resources to constantly maintain and update these maps, so it is critical that automated procedures be developed to free human map curators from many of the time-consuming, error-prone tasks experienced in the mapping process. Existing map construction software is automated to the extent that the likelihoods of many alternative marker orders can be evaluated with a single command, but the entire process of gathering and formatting raw data, constructing maps, examining results and publishing on the internet, or elsewhere, requires human intervention at several stages. Automated procedures will streamline the process in order to focus human effort on the critical stages of verifying raw data and examining the resulting maps.

Bovine chromosome (BTA) 15 provides an interesting example to study the integration of linkage and RH data, and comparison of the bovine to the human genome. A QTL for meat tenderness has been reported on bovine chromosome 15 [22,23]. Comparative mapping indicates that alternating segments of human chromosome (HSA) 11 are conserved on BTA 15 and BTA 29 [15,23,24]. We combined the available linkage and RH data to further examine BTA 15. An integrated linkage and RH map was constructed using CarthaGene software (version 0.99 [21]), and the comparative positions of DNA sequences shared by segments of HSA 11 and the integrated BTA 15 map were established. We also assessed the potential for automating integrated mapping procedures, anticipating a need to extend integration to the entire bovine genome in order to provide up-to-date maps.

Results and discussion

The low resolution of the bovine linkage map is indicated by multiple markers sharing the same map position, even when they may be separated by a substantial physical distance. Inclusion of RH data provides additional evidence by which markers that are inseparable only with linkage data can be ordered. The BTA 15 linkage map (Figure 1A; Additional file 1) shows 78 markers placed in 54 distinct positions, with ten positions representing a pair of markers and seven representing three markers. Marker separation on the higher resolution RH map is greater (Figure 1B; Additional file 1), with 109 markers mapped to 105 distinct positions. Projected onto a common scale, the integrated map represents 145 markers in 118 different positions (Figure 1C; Additional file 1). Eighteen positions contain two markers, at three positions three markers are represented, and one position is occupied by four markers.

Integrated RH and linkage maps

Markers common to both the linkage and RH data sets provide a basis for integrating the data and constructing maps representing both types of data. Primer sequences associated with the RH and linkage markers indicated 42 common markers in the two data sets, with 36 markers unique to the linkage data and 67 unique to RH, for a total of 145 markers represented on the integrated linkage-RH map.

Four sets of markers with different primer sequences matching the same bovine sequence were identified. In two instances (MB064 and 118BMS matching Genbank accession AC130787; T608B5 and SP608B5 matching Genbank accession NM_001732), markers in the set were placed adjacent to each other by the map building routine. In the two other cases (ESH8, ESH8MS, and CSPS101 matching accession Genbank M83753; NCAM1MS and MB085 matching Genbank accession X16451), markers in the set were separated by several markers after initial map construction. In both cases, the map could be reordered so markers in each set were placed next to each other without decreasing likelihood of the map. The final integrated order includes these manual adjustments, so that in all cases of different markers matching the same sequence, the markers are adjacent on the map.

Comparison of the integrated map to independently solved linkage (Figure 2A) and RH (Figure 2B) maps indicates relatively good agreement between the maps. Product-moment correlations between independent (CRIMAP linkage map; CarthaGene diploid RH map) and integrated (CarthaGene backcross linkage data merged by order with diploid RH data) map positions were greater than 0.99 for both the linkage and RH maps. The final integrated map did suggest some rearrangement of both

the linkage and RH maps. Solved using CRIMAP, the integrated map order of linkage markers was somewhat more likely than the order of the independent linkage map (lod score of 2.4 favors integrated order). This result suggests that the most likely order identified by the integrated mapping process had not been evaluated while using CRIMAP to construct the linkage map. Because of differences in speed, CarthaGene can feasibly evaluate many more orders than CRIMAP, even without integration with RH data. CarthaGene might be utilized to identify errors in marker order and refine linkage maps.

Comparison of the integrated map to the RH map shows the markers remained in the five blocks identified by Gauthier et al. [24], and the order of those blocks is the same for both maps (Figure 2B). Some markers were reordered within blocks of the RH map. As with the linkage map, the integrated map order was more likely than the original independent map order (lod score of 3.4 favors integrated order; both likelihoods solved using CarthaGene with a diploid RH model).

Comparative bovine and human map

Comparative map positions for 77 markers mapped to BTA15 were established using primersearch [26] to identify bovine DNA sequence associated with each marker, and subsequent BLASTN against HSA11 contig sequences. Positions of the bovine-human matches were between 4.16 Mbp and 135.59 Mbp on the HSA11 draft sequence (Build 31). Percentage identities of the matches ranged from 83% (475/570 bases) to 100% (1941/1941 bases), with a mean of 93% (449/475 bases). The syntenic group segments (S1, S2, S3, S4 and S4') identified by Gauthier et al. [24] were retrieved in the comparison of the integrated BTA15 map with HSA11 (Figure 3). The integrated BTA15 map covers approximately 32% of HSA11. There are eight gaps in coverage containing between 4.2 and 25.6 Mbp of HSA11 sequence. Boundaries of the syntenic segments encompass 36% of the loci on HSA11 (Table 1), not counting the 76 loci within large internal gaps in S1 (7.8 Mbp) and S4 (8.9 Mbp). Some of these gaps in HSA11 coverage are syntenic with BTA29 [15,22,23]. Our current BTA29 linkage map places at least one marker in each of the previously identified segments shared by HSA11 and BTA29, accounting for another 15% of HSA11 sequence. Accounting for segments shared with BTA29 leaves 7 gaps containing from 4.9 to 16.1 Mbp of HSA11 sequence that has not been shown to be homologous to mapped regions of bovine chromosomes 15 and 29, although two of the gaps are located within syntenic segments S1 and S4.

Markers more recent [23,24] than the original description of the meat tenderness QTL [22] have resulted in some rearrangement of the BTA15 map, so position of the QTL must be shifted to current positions of markers defining

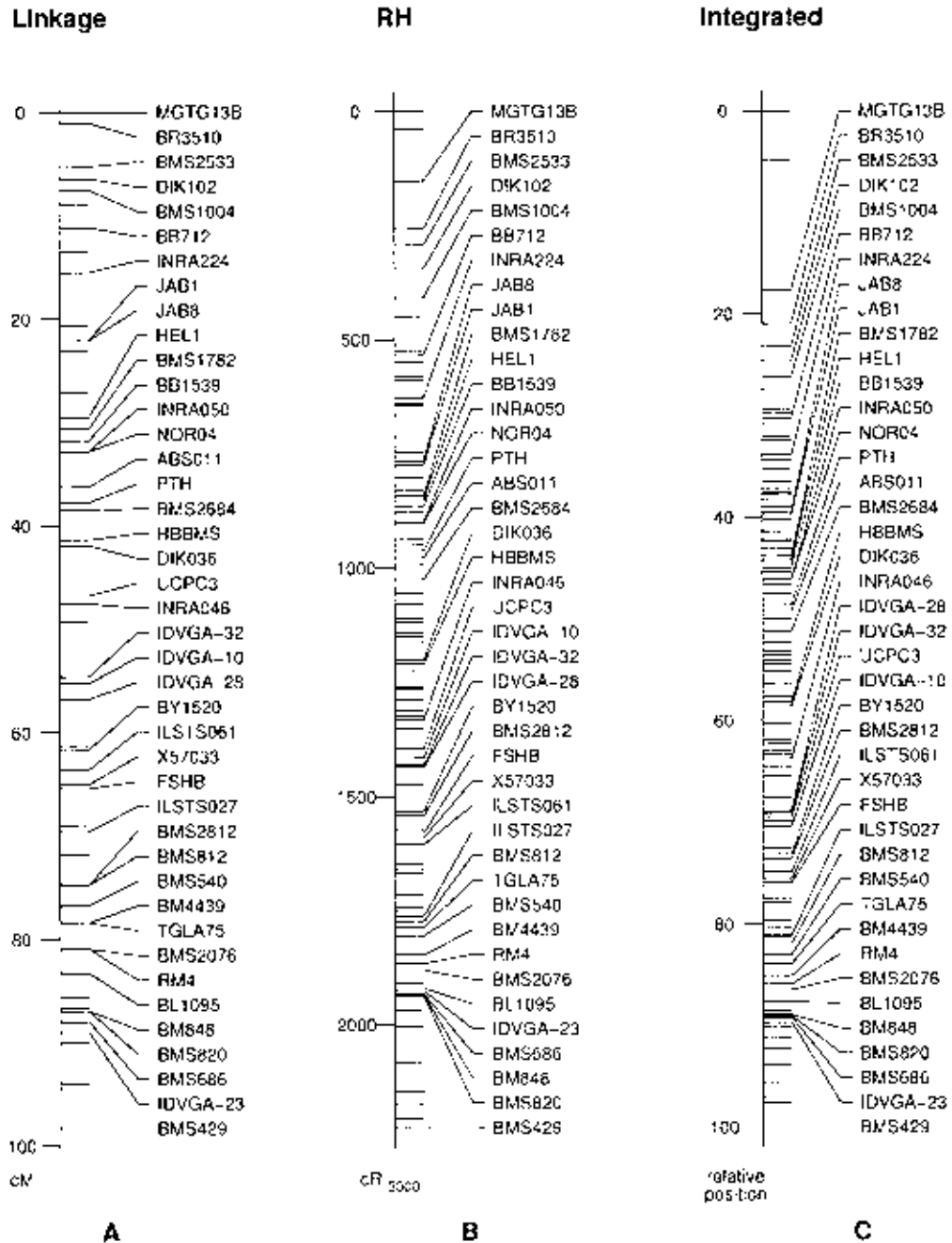
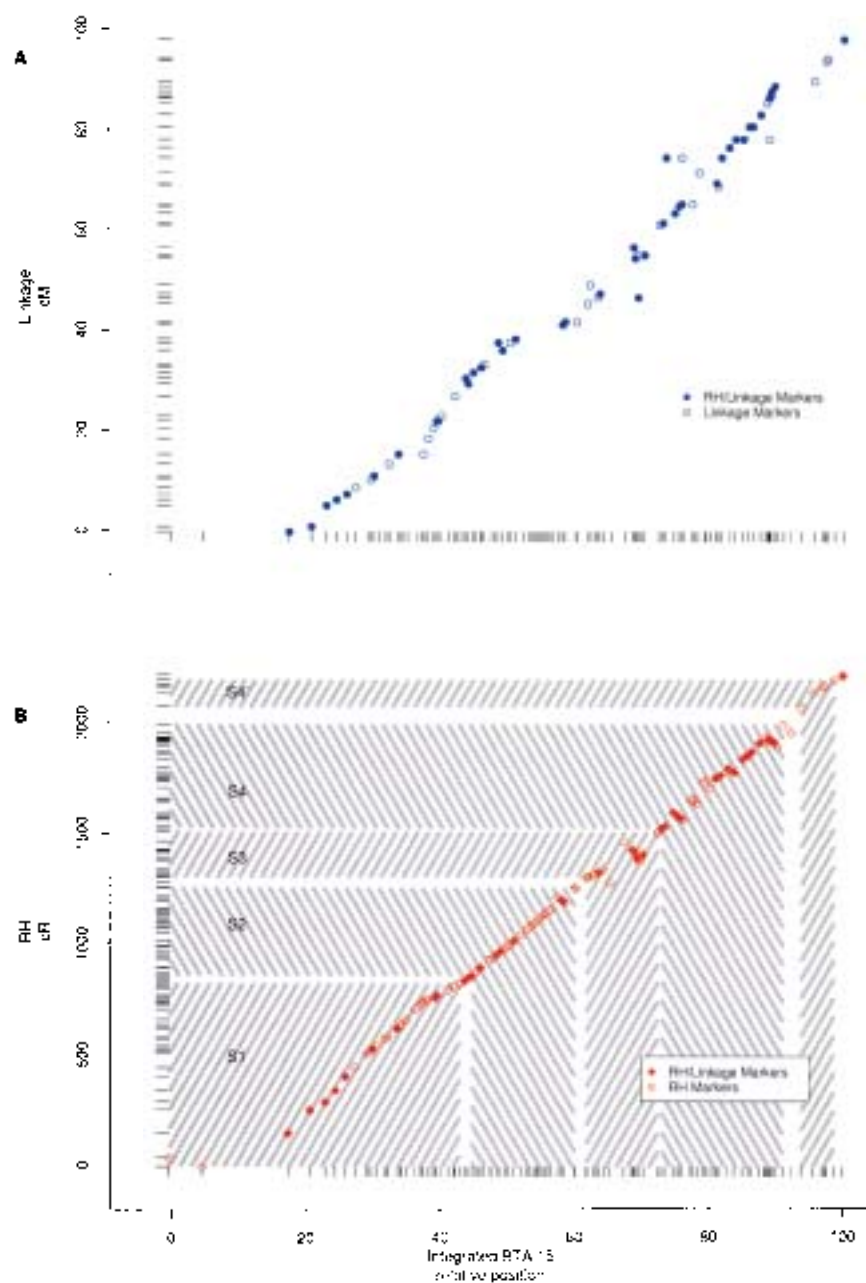


Figure 1
 Linear representations of bovine chromosome 15 (BTA15) linkage (A), radiation hybrid (RH) (B) and integrated linkage/RH maps (C). Named markers are common to both linkage and RH data sets. Tick marks without a marker name represent markers unique to an individual data set. The linkage map was solved with CRIMAP, and the RH map solved using Carthagene diploid RH data. The integrated linkage/RH map was ordered using CarthaGene with backcross linkage data merged by order with RH data.

**Figure 2**

Comparison of independent bovine chromosome 15 (BTA15) linkage (A) and radiation hybrid (RH, B) maps with the integrated BTA15 map. The independent linkage map was solved with CRIMAP, and the independent RH map solved using CarthaGene diploid RH data. The integrated linkage/RH map was ordered using CarthaGene with backcross linkage data merged by order with RH data. Tick marks along each axis represent positions of markers on the respective linear map. Symbols indicate the intersection of the maps. Symbols forming a straight line indicate agreement between the maps, while deviations from a straight line indicate inconsistencies between the maps. Syntenic group segments are indicated by shading on the RH map (B).

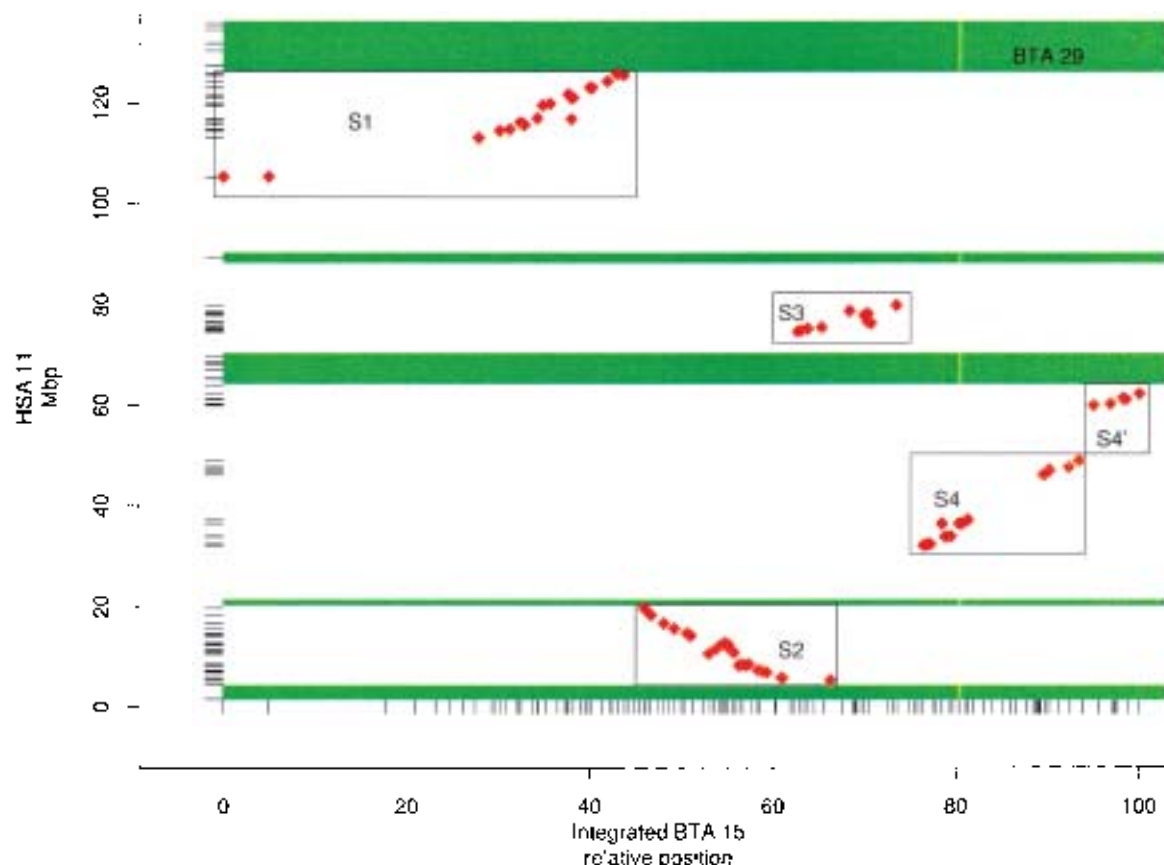
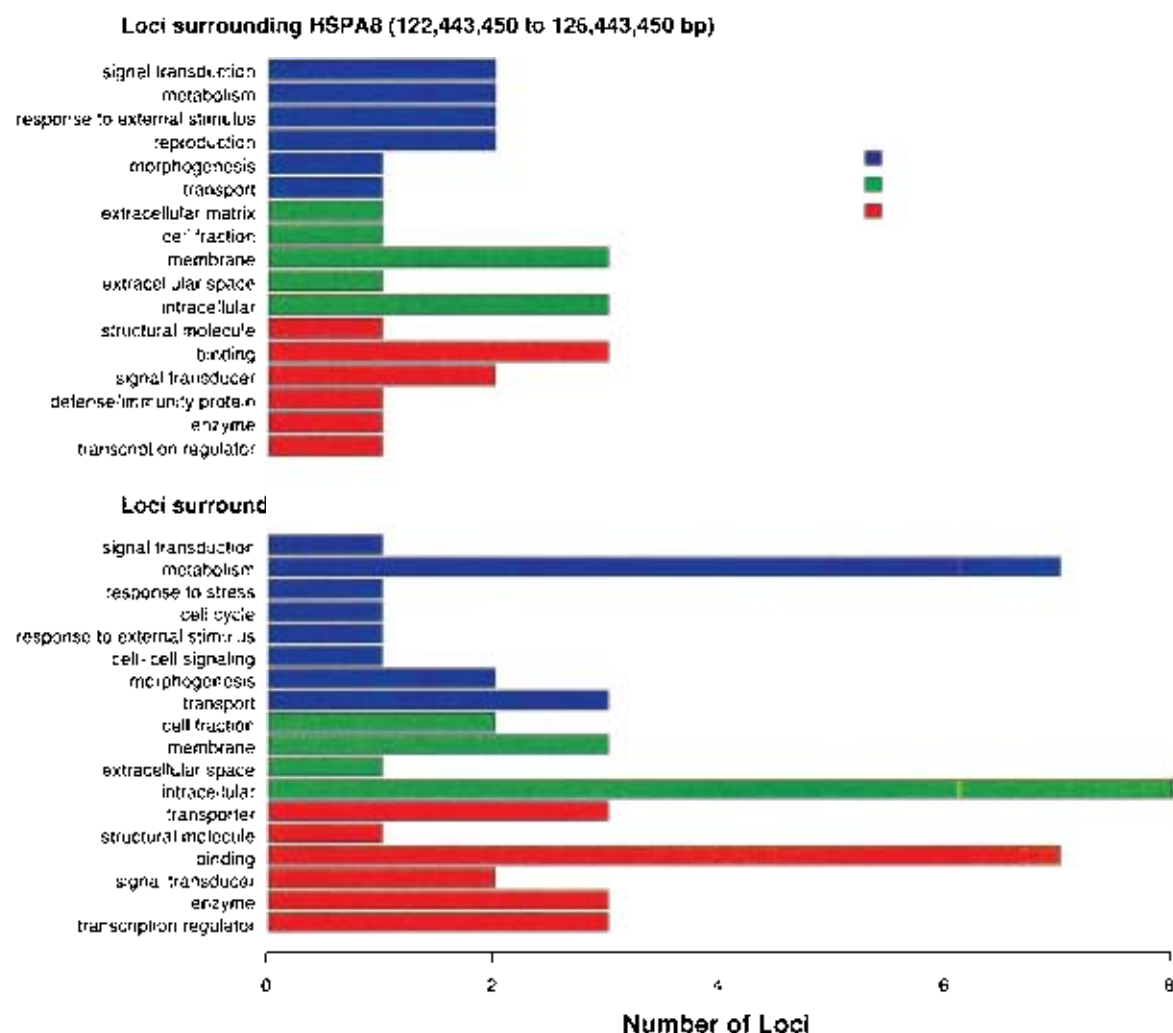


Figure 3
 Comparison of the integrated bovine chromosome 15 (BTA15) map with human chromosome 11 (HSA11) DNA sequence (Build 31). Tick marks along the HSA11 axis indicate positions of HSA11 sequence homologous to bovine sequence mapped to either BTA15 or BTA29. Tick marks along the BTA15 axis indicates positions of markers on BTA15. Shading marks regions shared by HSA11 and BTA29. Boxes indicate syntenic group segments.

the QTL region. The syntenic segment S1 contains several markers that were within the 95% confidence interval surrounding the QTL, but the two markers most closely flanking the QTL peak, HEL1 and BM51782, could not be matched to HSA11 sequence and are between defined boundaries of syntenic group segments S1 and S2. Because this QTL region includes a break in bovine-human synteny, the ends of both syntenic segments should be examined to identify positional candidate loci influencing the tenderness QTL. Human loci, in two 4 Mbp segments surrounding the boundaries of S1 and S2 that flank the QTL peak, were identified and associated with gene ontology (GO; [27]) terms to further describe genes near the QTL. These two segments contain 116 loci

(Table 1); 25 of these loci have GO annotation [28] with terms representing various biological processes, cellular components and molecular functions (Figure 4). The GO annotation of loci in both syntenic segments near the QTL may guide further marker development to fine-map the QTL by associations between new markers and tenderness. Adding new markers to this region will also refine boundaries of S1 and S2, and position of the breakpoint between these two segments.

Order is well conserved within syntenic group segments S1, S3, S4' and portions of S2 and S4. The most notable rearrangements within segments are an inversion of several markers in the center of S2, and inconsistent ordering

**Figure 4**

Gene ontology classification of loci on human chromosome 11 (HSA11) in regions near a quantitative trait loci (QTL) for meat tenderness. Bovine markers flanking the QTL peak are between defined syntenic regions, so loci in two 4 Mbp regions of HSA 11 (16.3 to 20.3 Mbp; 122.4 to 126.4 Mbp) surrounding markers that define syntenic regions were identified and classified by gene ontology annotation.

within a subset of 54. The internal rearrangements within syntenic groups found here, pig-human rearrangements [29], and mouse-human rearrangements [30] suggest that precise ordering requires reliable data from the species of interest. Comparative information can be used to predict gene location in regions where within species mapping data are not available [9] or the available data are ambiguous, and may guide marker development and fine map

ping efforts in specific regions [23,24]. Marker orders based on comparative data, however, should be used with caution. For each syntenic segment of BTA 15, marker orders predicted from human order were less likely than the order identified from bovine data (Table 2).

Table 1: Loci and gene ontology (GO) annotation of human chromosome 11 (HSA11).

Segment ^a	HSA11 position (Mb)		Number of Loci	Loci with GO Term	Unique GO Terms
	Start	End			
S1	104.0	124.4	200	70	176
S1 gap	104.0	111.8	44	15	54
S2	3.9	18.3	228	52	135
S3	73.3	78.5	80	27	68
S4	30.8	47.6	107	31	86
S4 gap	35.9	44.8	32	6	19
S4'	58.6	60.9	63	12	31
All syntenic regions			672	192	344
internal gaps removed			596	171	310
Entire chromosome		0.0	1640	433	578
>QTL	16.3	20.3	53	16	46
<QTL	122.4	126.4	63	9	25

^a Syntenic group segments S1, S2, S3, S4, S4' identified by Gaubier et al. (2002). Gaps are relatively long segments within a syntenic group that do not contain sequence common to HSA11 and bovine chromosome 15 (BTA15). Segments designated >QTL and <QTL are 4 Mb segments of HSA11 centered around syntenic markers defining boundaries of S1 (<QTL) and S2 (>QTL), flanking the BTA15 meat tenderness QTL identified by Keele et al. (1998). All syntenic regions represents the union of S1, S2, S3, S4 and S4'. Entire chromosome includes all loci with a position established on HSA11 sequence.

Table 2: Comparison of integrated bovine chromosome 15 (BTA15) map where marker order is based on bovine data with alternative maps where segments are reordered according to order of human chromosome 11.

Map	log ₁₀ likelihood ^b			Total LOD
	Linkage	RH	Total	
Bovine data	-790.2	-890.4	-1680.6	
Syntenic segments ^a reordered				
S1	-790.3	-896.5	-1686.8	-6.2
S2	-859.6	-916.4	-1776.0	-95.4
S3	-790.2	-900.0	-1690.2	-9.6
S4	-922.0	-924.6	-1846.6	-166.1
S4'	-790.2	-892.1	-1682.3	-2.3

^a syntenic group segments described by Gaubier et al. (2002).

^b likelihoods computed with backcross linkage data merged by order with diploid RH model data

Challenges for building high-resolution integrated maps and leveraging data from various sources, both within and across species, will be to determine regions where additional data may be informative and placing appropriate emphasis on the different sources of information at different levels of resolution. Linkage maps can provide the scaffold for ordering an entire chromosome, so linkage data may receive the greatest emphasis for initially determining a coarse order. Increased emphasis should be given to higher resolution RH and other physical mapping data to resolve order where placement of linkage markers is uncertain, and markers are too close to provide definitive order. Comparative sequence and mapping information from other species should be most useful to position

markers within regions where physical data have insufficient resolution and within-species sequence data are not available. Using appropriate weights to combine genetic and physical mapping data, within-species sequence and comparative sequence data should allow the different data sources to complement each other, resulting in consensus maps supported by the combined sources of information.

Automation

Genome maps of livestock species need to represent current information in order to maximize utility of the maps. Positions of putative QTL may become misleading if QTL positions are not updated to reflect subtle rearrangements

resulting from new mapping data. Genes associated with phenotypic variation will be more readily identified if available information to link mapping data to genes and their function is maintained. Continually updating the maps to depict relevant existing information will be facilitated by automation, but a number of issues must be addressed for implementation of automated procedures to be fruitful.

Access to dynamic sources of mapping data must be maintained, so that new information can be incorporated into the maps soon after it is generated. Information to connect data from various sources must be available to expedite integration. Map computation strategies deserve some attention, to minimize the delay between acquiring new data and appearance of those data in subsequent maps.

Procedures developed to integrate BTA15 linkage and RH data can be applied to available data for the entire bovine genome. The integration effort will be more valuable, however, if sources of data for the integrated map are periodically updated. Success of a comprehensive integration effort will also depend on information available to establish connections between the data sets. One alternative is to resolve marker nomenclature, perhaps by developing and maintaining a database of marker names and synonyms. A more straightforward, and easily automated, approach is to use primer sequences as universal identifiers to establish connections between mapping data sets. Database curation efforts to associate mapping records (animal genotypes and RH vectors) with primer pairs may be more worthwhile than attempts to resolve all possible names for a given marker.

Primer sequence can also be used to establish connections to sequence databases. Sequence similarity searches should reveal connections to STS sequences associated with markers; the process will also identify connections to other sequences, including more completely annotated and assembled sequence. Sequences identified in this process can be used to establish connections with human and other well annotated, assembled genomic sequence for comparative mapping. Similar associations between mapping and sequence data may be established using marker and locus names, provided that marker nomenclature can be resolved. Sequence-based connections between mapping data sets, integrated maps, and genomic sequence may be more reliable and are more amenable to automation than attempts to connect names using names and other information.

Connections between maps and annotated sequence can accelerate positional candidate gene discovery if the sequence annotation includes functional information.

Harhay and Keele [31] used GO and GO-annotated human sequence to link livestock EST with function; mapping the EST can extend their procedures to relate map position to function. Connecting map positions to GO terms requires synchronizing several information sources, including livestock maps, human sequence annotated GO terms, and GO databases.

Placement of new markers on integrated maps must keep pace with new marker development, if integrated maps are to remain current with available mapping and sequence data. The basic concept of map construction, finding the most likely marker order out of all possible orders, is conceptually simple but computationally demanding, because the number of possible orders increases factorially with the number of markers. Evaluating all possible marker orders is not feasible when mapping data represents more than twenty or thirty markers on a chromosome. Cost and time constraints limit map construction to strategies that evaluate a sufficient number of possible orders to ensure that a reasonably good order is identified.

As bovine sequence data becomes available, methods to exploit that resource to refine both the integrated maps and sequence assemblies must be implemented. Advent of whole-genome sequence assemblies has not diminished the value of maps in sequenced species. Discrepancies between human maps and sequence assemblies have been noted [32,33], although concordance between a SNP linkage map and sequence assemblies increased in later assemblies [33]. A comprehensive linkage-RH map has been used to validate mouse sequence assemblies, revealing cases of significant inversions and translocations in sequence, as well as confirming sequence order in other regions where the sequence order disagrees with previous mouse RH maps [34]. An integrated linkage-RH map of the rat suggests some errors in the draft sequence, but more importantly, provides a mechanism to anchor QTL on the genomic sequence [35].

The strategies employed must be sufficiently flexible to allow manual manipulation of the resulting maps. Some evidence, such as STS markers sharing the same sequence, and ordering information from other species, is not easily represented in linkage and RH mapping data. In some cases of markers sharing the same sequence, markers can be forced to share the same position, or data from multiple markers can be combined to create a single haplotype representing multiple markers. Marker orders suggested by maps of other species may be compared with likely orders identified from within-species data. Incorporating information not directly represented in mapping data can require manually evaluating additional orders, and

Table 3: Description of previously unpublished linkage markers placed on the integrated bovine chromosome 15 map.

Marker Name	Forward Primer	Accession number
	Reverse Primer	
DIK2411	CTAACGCCCTGAGACAGAC GTGGCGTTAGTGGTCCTTC	AB112806
DIK2374	CCTGTTTGGGACACTCTCCT GAATCTCTTCAATGCCGAATG	AB112803

making some judgement about which results are most acceptable.

In exploratory analyses merging BTA15 linkage and RH data, simulated annealing and taboo search algorithms in CarthaGene were explored as methods of initially ordering the integrated map, before refinement with the polish and flips routines. Resulting maps were similar to the map presented, but required more than 24 hours to compute. The map presented was initially ordered by placing each marker against a pair of markers common to both data sets, and was constructed in less than four hours. Another approach involved initially placing markers against the set of all markers common to both the linkage and RH data sets, in the linkage map order. While map construction was somewhat faster using this approach, the resulting map was less likely than the map initiated from a pair of markers and showed greater disagreement with the linkage map.

Parallelization of the mapping algorithms can substantially increase the speed of map construction. Likelihoods of a number of alternative orders must be computed at several steps during the map building process. If these calculations are distributed across multiple processors, time required to compute all likelihoods and arrive at a final order will be reduced because computations are performed simultaneously. Increased parallelization should also increase the feasibility of implementing more thorough algorithms that examine a larger number of possible orders, therefore increasing the probability of identifying more likely maps.

Conclusions

Linkage and radiation hybrid maps are powerful tools to facilitate discovery of genomic regions and ultimately genes influencing livestock production traits. Combining linkage and RH data can provide more accurate, consolidated maps representing more information, especially if the maps are connected to well annotated genomic sequence. Automating map construction and comparative mapping procedures will expedite construction of whole-genome integrated maps and maintaining a comprehen-

sive resource as new data becomes available. Success of automated procedures to connect data from various sources and construct integrated maps depends on information available to establish connections between data; sequence based approaches to connect data are preferable.

Methods

Data sets for integrated map construction

Linkage data for 78 markers in the BTA15 linkage group were obtained from the U.S. Meat Animal Research Center (MARC) reference population (224 animals; [4]). Radiation hybrid data for 109 markers were obtained from the ComRad project radiation hybrid panel (94 cell lines; [7,24]). These data include two newly developed microsatellite markers genotyped in the MARC families (Table 3), and seventeen previously unpublished markers with RH data (Table 4).

All bovine sequence information stored in GenBank was identified using the taxonomy ID field of the sequence file annotation and obtained from NCBI. Provisional sequence data consisting of tentative consensus clustering of bovine EST data was obtained from the *Bos taurus* gene index (BTGI; [36]) assembled by The Institute for Genomics Research (IGR; [37]). Other sources of sequence were the NCBI nt database (NT; [38]), and human chromosome 11 data sequence contigs (Build 31; [38]).

Data integration

Connections between data sets are necessary for integrated analyses of those data to be meaningful. Because some marker names were ambiguous, connections between markers in the linkage and RH data were established using primer sequence. Markers with identical primers were considered to be the same, regardless of marker name. Primer sequence was also used to establish connections with human sequence. Primer pairs were matched against bovine sequence from GenBank, NT and BTGI databases using the EMBOSS [26] *primersearch* tool. The longest matching sequence having one or fewer mismatches and an ampimer less than 600 bp was selected for homology search against HSA11 contigs. The selected

Table 4: Description of previously unpublished radiation hybrid markers placed on the integrated bovine chromosome 15 map.

Locus Symbol	Gene Name	Forward Primer	Accession Number
		Reverse Primer	
CI1ORF15	chromosome 11 open reading frame 15	GCATCCTAGAACAGACTGGCT GGAGGCAACCCGAACTCCAGT	AW657178
DKK3	diskkopf (Xenopus laevis) homolog 3	CGAAGACCATTATCAGCCACA CTCTGGATGCAACATGAAGGA	AW336328
EIF4G2	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma. 2	AGCTTGAGGCCTGCTCAGTCT GTGCCAAAGGTGGCGTTGA	AV602677
FLJ11790	protocadherin 16 dachsous-like (Drosophila)	CCCAGTTCTCACCTTCACTA GATATGGAGCTCGGTGTCGTCT	AW428073
INPPL1	inositol polyphosphate phosphatase-like 1	CAGCTCAACTGGAGCGGGAA GAACCCCGCTCATAGCGGTAA	BF705795
KIAA0750	hypothetical protein KIAA0750	GTGGGAAGCTGGCTATTGCA GAAGATGAAAGCCACACCGCT	AW652984
MRPL17	mitochondrial ribosomal protein L 17	CACCTGTTGCAGAACTTGCTT CCGAGTTCCCGTAGCAATA	BE899833
PARVA	parvin, alpha	GCCGTATCCCTCAACTCCTT CTCAAGAGTCCCTGTTGAAGA	BE477207
PSMA1	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type. 1	GAATATGCAATGGAAGCTGTC GCTGCAAGTTCTGACTGTGCT	AV602233
RANBP7	RAN binding protein 7	GGGTGAAGAGATGAGGAAGAT CTGATACTCATCAACAGGGTT	BF45355
RNF21	tripartite motif-containing 34	GAAGAGAACTCCTACTCTTCT CTCCTGAGATCGTTCACAAAGA	AW447063
STS	suppression of tumorigenicity 5	CGCTGCTCTGGTCTATCACTT ATTGCCAGCCCTGGCAGGAA	BF604586
STIM1	stromal interaction molecule 1	GCCCTCCAGGCTAGCCGAAAT CACTGCCACGCCCATCCTGTT	BE756550
TAF2H	TAF10 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 30 kDa	TGGTGTCCAGCACGCCCTCTA GTAGTAACCAGTCACTGCATCA	AW315164
UVRAG	UV radiation resistance associated gene	GTACATTTTCAGCTGAGCACC CGCGGTACACTCCTTCTCAA	BE590188
WEE1	wee1+ (S. pombe) homolog	GATGGATGCGTTTATGCCATA CGAACTACAAGAGAAATGTGC	AV598317
ZFP26	C3HC4-like zinc finger protein	CTGCTAAAGTGGCTTCTGGC GGTACAGACCACTCGTACAA	BF04414

sequences were examined for gaps, and where gaps occurred, only the ungapped pieces matching a primer pair was used in the homology search. Connections between the individual sequences matching bovine markers and human sequence were then determined via BLASTN [39] with an expectation value of e^{-4} , and default values for other parameters.

Connections between human position and functional GO annotation were extracted from the downloadable locuslink database [38]. Procedures using the GO database [40] and perl API [41] were developed to classify specific GO terms into general categories described by higher level terms.

Integrated map construction

Observations for RH data are binary (0/1), indicating absence or presence of a particular marker in a cell line, where each cell line represents a relatively short segment of DNA on a chromosome. Physically close markers are more likely to be observed on the same cell line than distant markers. Linkage data includes pedigree information and marker genotypes, where individual genotypes represent alleles inherited from each parent. Alleles for physically close markers on a single chromosome are more likely to be inherited from the same grandparent; the likelihood of marker alleles with different grandparental origin appearing on the same chromosome increases with distance between markers. These chromosomes can be represented in a binary, RH-like format that can be

merged with RH data using CarthaGene. Analogous to RH data representing presence or absence of a marker in a cell line, binary representation of linkage data indicates presence or absence of a maternal allele on an individual chromosome. The *chrompic* option of CRIMAP [42] was used to construct these individual chromosomes, using the most likely order identified by an automated linkage mapping routine. No distinction was made between definite phase known maternal and paternal inheritance, and statistically predicted inheritance when phase could not be determined.

An interface to the CarthaGene shared library was developed using perl and the perl Inline modules [43] to automate map construction (see Additional file 2). This interface includes procedures to initially place markers on a map and refine map order, as well as a number of utility routines. A map construction script using this interface was also developed (see Additional file 3). The script to order markers on the integrated map starts by merging the binary backcross representation of linkage data with the haploid model RH data, assuming common marker order (*dsmerger*). Two markers shared by the linkage and RH data sets are identified, and all other markers are inserted, one at a time, into the most likely position using the CarthaGene *buildfile* procedure. Once all markers from both data sets are placed, the marker order is refined iteratively, cycling through *polish* and *flips* routines until likelihood does not improve. The *polish* procedure individually tests each marker in all alternative positions, and *flips* evaluates permutations of all sets of six adjacent markers.

After convergence using the map construction script, further evaluation of alternative orders was carried out with the backcross linkage data merged with a diploid model of the RH data, again assuming common marker order. Marker orders consistent with available sequence information were evaluated. Where primer pairs for different markers matched the same bovine sequence, but the markers were separated by one or more other markers by the map construction routine, likelihoods of orders with the matching markers placed adjacent to each other were determined. Likelihoods of marker orders consistent with human sequence within each syntenic segment were also computed. The sequence-based orders were used in the final integrated map if they did not decrease likelihood of the map. Log-likelihoods of the final integrated map order were computed with the RH and linkage data sets for comparison to the independent maps, using CarthaGene for the RH map and CRIMAP for the linkage map.

The final integrated marker order was projected onto a common relative scale representing all markers. This was accomplished by merging the linkage data with RH data,

modeled as backcross, using *dsmerger*. Marker order was set to the final integrated order, map distances computed, then scaled to range from zero to 100.

Computation

All computation was performed on a 10-node Linux cluster, each node configured with 2 AMD 1900+ CPUs and 3 Gb RAM. When practical, computation was parallelized using perl scripts and open source Grid Engine software [44] to distribute tasks to each node in the cluster. Steps that were parallelized included matching primers to sequence, and the Blast searches to align bovine with human sequence.

Authors' contributions

WMS developed perl scripts for automated analyses, conducted analyses to match markers from linkage and RH data sets, constructed the linkage and integrated maps, and drafted the manuscript. MG and AE developed RH markers and constructed the RH map. AE and JWK conceived the research, and contributed to planning analyses and evaluating results. RTS and TPLS assisted with evaluation of the integrated map. CPH conducted BLAST analyses and associated bovine sequence with human CO annotation. NL, AT, HT developed linkage markers. YS and CLB coordinated linkage map data collection. CLB curates the MARC linkage data and linkage maps.

Additional material

Additional File 1

linkage, RH, and integrated maps of BTA 15

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-5-77-S1.xls>]

Additional File 2

perl interface to CarthaGene, requires perl Inline::Tie module

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-5-77-S2.pl>]

Additional File 3

perl script to construct integrated maps using CarthaGene, requires *carthaGene.pl* interface to CarthaGene

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-5-77-S3.pl>]

Acknowledgments

Thanks to Randy Bradley and Phil Anderson for network support, Jim Wiray for database development, Linda Flathman and Sandra Nejzichleb for marker genotyping at MARC, and Thomas Schlex for providing and supporting CarthaGene.

References

- Casas F, Stone RT, Keele JW, Shackelford SD, Kappes SM, Koohmarai M: **A comprehensive search for quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of the myostatin gene.** *J Anim Sci* 2001, **79**:854-860.
- MacNeil MD, Grosz MD: **Genome-wide scans for QTL affecting carcass traits in Hereford x composite double backcross populations.** *J Anim Sci* 2002, **80**:2316-2324.
- Li C, Basarab J, Snelling WM, Benket B, Murdoch B, Moore SS: **The identification of common haplotypes on bovine chromosome 5 within commercial lines of *Bos taurus* and their associations with growth traits.** *J Anim Sci* 2002, **80**:1187-1194.
- Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw RA, Sonstegard TS, Smith TP, Lopez-Corriales NL, Beattie CW: **A second-generation linkage map of the bovine genome.** *Genome Res* 1997, **7**:235-249.
- Barendse W, Varman D, Kemp SJ, Sugimoto Y, Armstrong SM, Williams JL, Sun HS, Eggen A, Agaba M, Aleyasin SA, Band M, Bishop MD, Buitkamp J, Byrne K, Collins F, Cooper L, Coppeters W, Denis B, Drinkwater RD, Easterday K, Elduque C, Ennis S, Erhardt G, Ferruzzi L, Flavin N, Gao Q, Georges M, Gurung B, Harlizius B, Hawkins G, Hezel J, Hirano T, Hulme D, Jorgensen C, Kessler M, Kirkpatrick BW, Konfortov B, Kostov S, Kuhn C, Lenstra JA, Leveziel H, Lewin HA, Leyhe B, Li L, Martin-Burnell J, McGraw RA, Miller JR, Moody DE, Moore SS, Nakane S, Nijman I, Olsaker I, Pomp D, Rando A, Ron M, Shalom A, Teale AJ, Thieven U, Urquhart BGD, Vage DL, Van de Weghe A, Varvio S, Velmab R, Vilkkä J, Weikard R, Woodside C, Womack JE: **A medium-density genetic linkage map of the bovine genome.** *Mamm Genome* 1997, **8**:21-28.
- Band MR, Larson JM, Rebeiz M, Green CA, Heyen DW, Donovan J, Windish R, Steining C, Mahyuddin P, Womack JE, Lewin HA: **An ordered comparative map of the cattle and human genomes.** *Genome Res* 2000, **10**:1359-1368.
- Williams JL, Eggen A, Ferruzzi L, Farr CJ, Gautier M, Amati G, Bahl G, Caramon T, Cretcher R, Costa S, Hextall P, Hills D, Jeulin A, Kiguwa SL, Ross O, Smith AL, Saunier K, Urquhart B, Waddington D: **A bovine whole-genome radiation hybrid panel and outline map.** *Mamm Genome* 2002, **13**:469-474.
- Schieff T, Chabrier P, Bouchez M, Milan D: **Boosting EM for Radiation Hybrid and Genetic Mapping.** *WABI'2001: Workshop on Algorithms in Bioinformatics (LNCS 2003):2149.*
- Rebeiz M, Lewin HA: **Compass of 47,787 cattle ESTs.** *Anim Biotechnol* 2000, **11**:25-241.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, et al: **The sequence of the human genome.** *Science* 2001, **291**:1304-1351.
- NIH News Release [<http://www.genome.gov/page.cfm?pageID=10506668>]
- Breen M, Jouquand S, Renier C, Meliresh CS, Hitz C, Holmes NG, Cherou A, Suter N, Vignaux F, Bristow AE et al: **Chromosome-specific single-locus FISH probes allow anchorage of an 1800-marker integrated radiation-hybrid/linkage map of the domestic dog genome to all chromosomes.** *Genome Res* 2001, **11**:1784-1795.
- Steen RG, Kwolek-Black AE, Glenn C, Gullags-Handley J, Van Erten W, Atkinson OS, Appel D, Twigger S, Muir M, Mull T, et al: **A high-density integrated genetic linkage and radiation hybrid map of the laboratory rat.** *Genome Res* 1999, **9**:AP1-AP8.
- Sun S, Murphy WJ, McEntee-Raymond M, O'Brien SJ: **Integration of the feline radiation hybrid and linkage maps.** *Mamm Genome* 2001, **12**:436-441.
- Amarante MR, Yang YP, Kata SR, Lopes CR, Womack JE: **RH maps of bovine chromosomes 15 and 29: conservation of human chromosomes 11 and 5.** *Mamm Genome* 2000, **11**:364-368.
- Rexroad CE, Schlapfer JS, Yang Y, Harlizius B, Womack JE: **A radiation hybrid map of bovine chromosome one.** *Anim Genet* 1999, **30**:325-332.
- Drogemüller C, Bader A, Wohlke A, Kuiper H, Leeb T, Distl O: **A high-resolution comparative RH map of the proximal part of bovine chromosome 1.** *Anim Genet* 2002, **33**:271-279.
- Nadkarni P: **Mapmerge: merge genomic maps.** *Bioinformatics* 1998, **14**:310-316.
- White PS, Sulman EP, Porter CJ, Matise JC: **A comprehensive view of human chromosome 1.** *Genome Res* 1999, **9**:978-988.
- Agrawal R, Applegate DL, Maglott D, Schuler GD, Schaffer AA: **fast and scalable radiation hybrid map construction and integration strategy.** *Genome Res* 2000, **10**:350-364.
- CarthaGene home page [<http://www.nraa.frb.ca/TC/CarthaGene/>]
- Keele JW, Shackelford SD, Kappes SM, Koohmarai M, Stone RT: **A region on bovine chromosome 15 influences beef longissimus tenderness in steers.** *J Anim Sci* 1999, **77**:1364-1371.
- Rexroad CE Jr, Bennett GL, Stone RT, Keele JW, Fahrenkrug SC, Freking BA, Kappes SM, Smith TP: **Comparative mapping of BTA15 and HSA11 including a region containing a QTL for meat tenderness.** *Mamm Genome* 2001, **12**:561-565.
- Gautier M, Hayes H, Eggen A: **An extensive and comprehensive radiation hybrid map of bovine Chromosome 15: comparison with human Chromosome 11.** *Mamm Genome* 2002, **13**:316-319.
- Gautier M, Hayes H, Taouat S, Laurent P, Eggen A: **Assignment of eight additional genes from human chromosome 11 to bovine chromosomes 15 and 29: refinement of the comparative map.** *Cytogenet Cell Genet* 2001, **93**:60-64.
- The European molecular biology open software suite home page [<http://www.emboss.org/>]
- Gene Ontology Consortium home page [<http://www.geneontology.org/>]
- NCBI LocusLink home page [<http://www.ncbi.nlm.gov/locuslink/>]
- Rink A, Sanschi EM, Eyer KM, Roelofs B, Hess M, Godfrey M, Karajusuf EK, Yefe M, Milan D, Beattie CW: **A first-generation EST RH comparative map of the porcine and human genome.** *Mamm Genome* 2002, **13**:578-587.
- Gregory SG, Sekhon M, Schein J, Zhao S, Osoegawa K, Scott CE, Evans RS, Burnidge PV, Cox TV, Fox CA, et al: **A physical map of the mouse genome.** *Nature* 2002, **418**:743-750.
- Harhay GP, Keele JW: **Positional candidate gene selection from livestock EST databases using Gene Ontology.** *Bioinformatics* 2003, **19**:249-255.
- Matise TC, Porter CJ, Buyske S, Cuttrich AJ, Sulman EP, White PS: **Systematic evaluation of map quality: human chromosome 22.** *Am J Hum Genet* 2002, **70**:1398-410.
- Matise TC, Sachidanandam R, Clark AG, Kruglyak L, Wijman E, Kakiol J, Buyske S, Cui B, Cohen P, de Toma C, Ehm M, Glanowski S, He C, Heil J, Markianos K, McMillen I, Pericak-Vance MA, Silbergliet A, Stein L, Wagner M, Wilson AF, Winick JD, Winn-Deen ES, Yamashiro CT, Cahn HM, Lu E, Holden AL: **A 3.9-centimorgan-resolution human single-nucleotide polymorphism linkage map and screening set.** *Am J Hum Genet* 2003, **73**:271-84.
- Rowe LB, Barter ME, Kelmenson JA, Eppig JT: **The comprehensive mouse radiation hybrid map densely cross-referenced to the recombination map: a tool to support the sequence assemblies.** *Genome Res* 2003, **13**:122-33.
- Wilder SP, Bilhoreau MT, Argoud K, Watanabe TK, Lathrop M, Gauguier D: **Integration of the rat recombination and EST maps in the rat genomic sequence and comparative mapping analysis with the mouse genome.** *Genome Res* 2004, **14**:758-65.
- Smith TP, Grosse WM, Freking BA, Roberts AJ, Stone RT, Casas E, Wray JE, White J, Cho J, Fahrenkrug SC, Bennett GL, Meaton MP, Laegreid WW, Rohrer GA, Chitko-McKown CG, Perica G, Holt I, Karaymycheva S, Long F, Quackenbush J, Keele JW: **Sequence evaluation of four pooled-tissue normalized bovine cDNA libraries and construction of a gene index for cattle.** *Genome Res* 2001, **11**:626-630.
- The Institute for Genomic Research home page [<http://www.tigr.org/>]
- NCBI ftp site [<ftp://ftp.ncbi.nlm.gov/>]
- Alescu S, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:3389-3402.
- Gene Ontology Database [<http://www.godatabase.org/devdata/bases/>]
- Perl modules for accessing and utilising Gene Ontology data [<http://sourceforge.net/projects/geneontology/>]
- Green P, Falls K, Crooks S: **Documentation for CRIMAP, version 2.4.** Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri 1990.
- Perl Inline modules [<http://perl.org/~rsadkat/inline-Telnetline-TC-0.J0.tar.gz>]


44. **Grid Engine** project home page [<http://gridengine.sunsource.net>]

Publish with **BioMed Central**
scientist can i

**BioMed Central will disseminating the res*
Sir Paul Nurse, Co

Your research p,
+ available free of
+ peer reviewed a
+ cited in PubMed
+ yours — you kee

Submit your manuscript here
<http://www.biomedcentral.com>



Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a half-sib family of purebred Japanese Black (Wagyu) cattle¹

K. Mizoshita*, T. Watanabe†, H. Hayashi*, C. Kubota*, H. Yamakuchi*, J. Todoroki*, and Y. Sugimoto†²

*Cattle Breeding Development Institute of Kagoshima Prefecture, Tsukino, Osuni, So, Kagoshima 899-8212, Japan; and †Shirakawa Institute of Animal Genetics, Japan Livestock Technology Association, Odakura, Nishigo, Fukushima 961-8061, Japan

ABSTRACT: We used a half-sib family of purebred Japanese Black (Wagyu) cattle to locate economically important quantitative trait loci. The family was composed of 348 fattened steers, 236 of which were genotyped for 342 microsatellite markers spanning 2,664 cM of 29 bovine autosomes. The genome scan revealed evidence of 15 significant QTL (<5% chromosome-wise level) affecting growth and carcass traits. Of the 15 QTL, six QTL were significant at the 5% experiment-wise level and were located in bovine chromosomes (BTA) 4, 5, and 14. We analyzed these three chromosomes in more detail in the 348 steers, with an average marker interval of 1.2 cM. The second scan revealed

that the same haplotype of the BTA 4 region (52 to 67 cM) positively affected LM area and marbling. We confirmed the QTL for carcass yield estimate on BTA 5 in the region of 45 to 54 cM. Five growth-related QTL located on BTA 14, including slaughter and carcass weights, were positively affected by the same region of the haplotype of BTA 14 (29-51 cM). These data should provide a useful reference for further marker assisted selection in the family and positional cloning research. The research indicates that progeny design with moderate genotyping efforts is a powerful method for detecting QTL in a purebred half-sib family.

Key Words: Carcass Traits, Cattle, Half-Sib Family, Progeny Design, Quantitative Trait Loci

© 2004 American Society of Animal Science. All rights reserved.

J. Anim. Sci. 2004. 82:3415–3420

Introduction

A major goal of livestock genome research is to understand the basis of the genetic contribution to variations in production traits. Andersson et al. (1994) first reported a cluster of loci affecting growth and fatness on pig chromosome 4 in wild boar and Large White pigs based on the interval mapping method described by Haley et al. (1994). Using similar designs, several studies reported the location of QTL in experimental resource families constructed by crossbreeding animals from relatively different breeds. In beef cattle, most QTL mapping studies have used crosses between *Bos*

indicus and *Bos taurus* breeds (e.g., Keele et al., 1999; Stone et al., 1999; Casas et al., 2000).

When progeny are grouped according to the marker allele received from a heterozygous parent, the presence of alternative alleles at the linked QTL tends to generate a difference in the mean quantitative value between the two progeny groups. Weller et al. (1990) simulated the power of daughter and granddaughter designs to determine linkages between marker loci and QTL in dairy cattle, and concluded that the granddaughter design generally requires fewer marker assays to have equivalent power to the daughter design. Moody et al. (1996) simulated the grand progeny design (GPD) to detect QTL in a purebred beef cattle population, and hypothesized that large amounts of genotyping are required to achieve reasonable power and only QTL with moderate to large effects could be identified. Neither the GPD nor the progeny design have been used for QTL mapping in beef cattle, probably due to the high cost, although these strategies might provide information on haplotypes of immediate application to marker-assisted selection. The objective of this research was to identify QTL for growth and carcass traits using the progeny design in a paternal half-sib family composed of 348 fattened purebred Japanese Black (Wagyu) steers.

¹The authors thank T. Hayashi, A. Takasuga, and K. Hara for comments, and T. Yanamoto, M. Nakatsugawa, Y. Amuro, and M. Hashimoto for technical assistance. The work was supported in part by the Ministry of Agriculture, Forestry, and Fishery, Japan, and by the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

²Correspondence: phone 81-246-25-5641; fax 81-248-25-5725; e-mail: kazusugi@singer.jp

Received May 14, 2004

Accepted August 10, 2004

Table 1. Phenotypic data for growth and carcass traits of a half-sib family

Trait ^a	Average	SD	Range	Skewness	Kurtosis	Heritability estimate ^b
Primary screen						
(236 animals)						
BW-1, kg	291.6	26.5	199 to 380	0.085	0.902	0.30
BW-2, kg	718.6	52.7	385 to 861	-0.008	-0.209	0.36
CW, kg	117.0	37.3	33.2 to 330.3	0.095	0.348	0.39
LMA, cm	54.6	7.6	38 to 81	0.597	0.373	0.47
RT, cm	8.2	0.8	6.2 to 10.1	0.112	0.001	0.11
SFT, cm	2.9	0.8	0.8 to 5.8	0.328	0.291	0.53
YE, %	55.0	1.2	52.2 to 78.5	0.322	0.089	0.52
BMS	6.5	2.1	2 to 12	0.203	0.733	0.52
ADG-1, kg	1.06	0.11	0.78 to 1.33	0.132	0.184	0.19
ADG-2, kg	0.71	0.09	0.49 to 0.96	0.009	0.085	0.15
Secondary screen						
(348 animals)						
BW-1, kg	289.7	26.0	199 to 380	0.052	0.713	0.30
BW-2, kg	713.8	55.6	376 to 861	-0.024	-0.267	0.36
CW, kg	113.3	39.0	31.2 to 330.0	0.083	0.311	0.39
LMA, cm ²	50.5	7.5	33 to 81	0.571	0.661	0.47
YE, %	54.8	1.2	51.0 to 78.5	0.285	0.163	0.53
BMS	6.5	2.1	2 to 12	0.257	-0.661	0.52
ADG-1, kg	1.06	0.11	0.78 to 1.34	0.031	0.012	0.19
ADG-2, kg	0.70	0.09	0.49 to 0.98	0.158	0.058	0.15

^aBody measurements recorded were BW-1, BW-2, ADG-1, and ADG-2. Weight at 270 ± 12 d was used for ADG-1 and BW-1. Weight at 30 mo was used for ADG-2 and BW-2. See the text for further description of BW and ADG terms. Trait records for carcass weight (CW), LM area (LMA), rib thickness (RT), s.c. fat thickness (SFT), and beef marbling score (BMS) were obtained from Japan Meat Grading Association. Carcass yield estimate (YE) was calculated from LMA, RT, left-side CW, and SFT.

^bMukai et al. (1995).

Materials and Methods

Phenotype Measurement

A paternal half-sib family of 348 steers was constructed from carcass data and pedigree records collected by the Japan Wagyu Registry Association (Kyoto, Japan). Samples of DNA for these steers were available as part of a systematic program for collecting DNA at slaughterhouses. Steers were slaughtered at approximately 30 mo of age. Body measurements recorded were ADG before fattening (ADG-1), BW at 9 mo before fattening (BW-1), ADG from 9 to 30 mo during fattening (ADG-2), and BW at slaughter (BW-2). Carcasses were dissected at the sixth and seventh rib section according to the Japanese meat grading system by certified graders from the Japan Meat Grading Association (Tokyo) to measure carcass traits. Traits measured were cold carcass weight (CW), LM area (LMA), rib thickness (RT), s.c. fat thickness (SFT), carcass yield estimate (YE), and beef marbling score (BMS). The YE is the estimated ratio of wholesale cuts from which the surface fat was trimmed, to carcass weight as a percentage and is calculated by the following equation:

$$\text{YE, \%} = 69.419 + 0.130 \times \text{LMA} + 0.667 \times \text{RT} - 0.025 \times \text{CWL} - 0.896 \times \text{SFT}$$

where CWL is a cold left-side carcass weight. This equation has been used officially for grading in all Japanese

carcass markets since 1988. The BMS was scored from one to 12 with a standard model panel, in which higher scores correspond to more marbling. Table 1 summarizes the data of the 10 traits, including growth and carcass traits. Heritability estimates in Table 1 were taken from a study of Wagyu cattle ($n = 8,329$) by Mukai et al. (1995).

Genome Screen

Samples of DNA were prepared from semen, blood, or adipose tissue according to standard protocols, and the DNA concentration was adjusted to 20 ng/ μL . A genome screen was conducted using microsatellite markers (Kappes et al., 1997; <http://sol.marc.usda.gov/cattle>). Polymerase chain reaction was performed in a volume of 15 μL containing 20 ng of genomic DNA, 1.67 mM MgCl_2 , 6.25 pmol each primer, 0.2 mM deoxy-nucleotides (dNTPs), and 0.375 U of *Taq* DNA polymerase (ABgene, Epsom, U.K.). The thermal cycling conditions were optimized for each primer set as recommended (Kappes et al., 1997), and the other reaction conditions were set as recommended by the manufacturer. Following polymerase chain reaction, alleles were resolved by electrophoresis in polyacrylamide gels using an ABI 377 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) and genotype data were captured using GENESCAN and Genotyper software (Applied Biosystems).

Table 2. Summary of QTL location and chromosome-wise and experiment-wise probabilities

Trait ^a	BTA ^b	cM	<i>F</i> -statistic	FDR
BW-1, kg	14	23	11.8	0.039
BW-2, kg	3	105	11.2	0.043
BW-2, kg	14	15	28.86 ^c	0.034
CW, kg	14	45	28.13 ^c	0.011
LMA, cm ²	2	98	9.4	0.037
LMA, cm ²	4	64	15.4 ^b	0.019
SFT, cm	14	49	10.3	0.034
YE, %	5	56	21.7 ^c	0.026
BMS	4	75	17.0 ^b	0.011
BMS	5	36	9.4	0.034
BMS	13	75	9.1	0.036
BMS	14	53	9.8	0.036
ADG-1, kg	14	32	23.5 ^c	0.020
ADG-2, kg	5	136	11.0	0.057
ADG-2, kg	14	49	12.8	0.022

^a5% chromosome-wise significance level.

^b1% chromosome-wise significance level.

^c5% experiment-wise significance level.

^d1% experiment-wise significance levels, respectively.

^aWeight at 276 ± 12 d was used for ADG-1 and BW-1. Weight at 30 mo was used for ADG-2 and BW-2. See the text for further description of BW and ADG terms. Trait records for carcass weight (CW), LM area (LMA), s.c. fat thickness (SFT), beef marbling score (BMS), and carcass yield estimate (YE).

^bBovine chromosome.

^cFalse discovery rate.

Statistical Analyses

Correction of genotype errors, reconstruction of haplotypes, and *F*-statistic profiling were performed with the interval mapping method for half-sib family analysis (Haley et al., 1994; Seaton et al., 2002). Briefly, the phase of a sire's chromosomes was determined at each pair of two consecutive heterozygous markers using allele transmission information to offspring so that recombination between two markers was minimized. The statistical model for QTL analysis was that of linear regression of the phenotypic value of the probabilities

of QTL genotypes at a given location. The sire's two alleles at a putative QTL at a given location were denoted by *Q* and *q*. Probabilities of offspring QTL genotypes denoted by *Prob(Q)* were calculated from the observed genotypes of markers linked to the QTL. A linear regression analysis was performed using the following model:

$$y_i = \mu + \text{Prob}(Q_i) \cdot a + e_i$$

where μ is the fixed effect, a is the allele substitution effect of q to Q , and y_i , $\text{Prob}(Q_i)$, and e_i are unadjusted phenotypic value, probability of Q genotype at a given location, and the residual error for individual i , respectively. An *F*-statistic value was calculated from the minimum sum of squares of residual errors under the model with the least squares estimators of μ and a , and the minimum sum of squares under the null model corresponding to no QTL, where $a = 0$ is assumed. To evaluate whether the QTL effect was well estimated, the information content was calculated as a variance of $\text{Prob}(Q)$, divided by 0.25, the possible maximal variance of $\text{Prob}(Q)$ (Knott et al., 1998). Analyses of QTL were performed at 1-cM intervals along the chromosome. For all analyses, marker locations were obtained from the Shirakawa-USDA linkage map (Ihara et al., 2004). The LOD drop-off method was used to calculate the support interval for each putative QTL (Ott, 1992). Thresholds for significance of the *F* statistic value were obtained by 10,000 random permutations of the phenotypic data. The largest *F*-value over all analysis points for each analysis was recorded, and the 1 and 5% thresholds were defined as the 100th and 500th ranked *F*-values. For chromosome-wise and experiment-wise thresholds, the largest statistic value on each chromosome and on all chromosomes was recorded. The largest statistic values among all the traits for each permutation were recorded to obtain overall significance levels with multiple tests of multiple traits.

Table 3. Summary of eight QTL fine-mapped on bovine chromosomes 4, 5, and 14

Trait ^a	BTA ^b	cM	<i>F</i> -statistic value	<i>Q</i> to <i>q</i> allele substitution effect	QTL contribution (%)
LMA, cm ²	4	60.52 to 67	19.3	3.56	4.8
BMS	4	55.52 to 62	30.5	1.18	8.2
YE, %	5	52.45 to 54	23.5	0.61	5.6
BW-1, kg	14	34.99 to 42	12.1	9.67	3.4
BW-2, kg	14	59.18 to 50	48.7	38.11	12.3
CW, kg	14	50.48 to 51	41.5	25.75	11.4
ADG-1, kg	14	33.29 to 30	15.8	0.045	4.4
ADG-2, kg	14	50.15 to 51	15.8	0.014	6.7

^aWeight at 276 ± 12 d was used for ADG-1 and BW-1. Weight at 30 mo was used for ADG-2 and BW-2. See the text for further description of BW and ADG terms. Carcass traits are weight (CW), LM area (LMA), beef marbling score (BMS), and carcass yield estimate (YE).

^bBovine chromosome.

^cSupport interval in parentheses.

^dA QTL contribution (%) in the family was calculated as follows: variance explained by the linear regression model/total variance × 100.

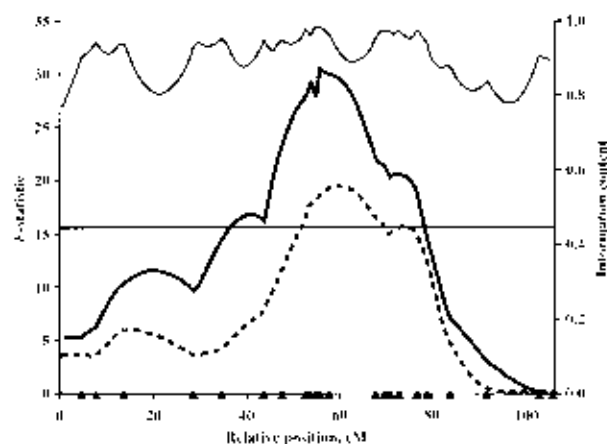


Figure 1. *I*-statistic profiles for carcass LM area (----) and beef marbling score (—) on B1A 4 (cM position; x-axis). The horizontal line indicates the threshold for the 0.1% chromosome-wise level. The upper line indicates information content (right y-axis). Marker positions are identified as triangles above the x-axis and were BMC1416, BL1030, BMS1788, RM188, BMS1237, BMS2646, BMS1840, RM067, IGLA116, BMS885, BM1224, BM6437, BMS779, RM232, BMS2571, BM6458, Or CP26, MNB42, DIK123, BMS648, IGLA159, and BR303, respectively.

To control the thresholds for error rate of multiple-trait analysis, we applied the false discovery rate (FDR) suggested by Weller et al. (1998). False discovery rate is the expected proportion of true null hypotheses within the class of rejected null hypotheses. The *P*-values corresponding to multiple comparisons are ordered such that $P_{(1)} \leq P_{(2)} \leq \dots \leq P_{(i)} \leq \dots \leq P_{(n)}$, where *n* is the total number of tests and $P_{(i)}$ is the *P* value corresponding to the null hypothesis of the *i*th test. Defining $q = nP_{(i)}/i$, the FDR can be controlled at some level q^* by determining the largest *i* for which $q^* \leq nP_{(i)}/i$. That is, under this condition, among *i* rejected null hypotheses, the expected proportion of falsely rejected hypotheses is no greater than q^* .

Results and Discussion

Population for QTL Analysis

The pedigree and carcass trait data for each steer were obtained from the Japan Wagyu Registry Association and the Japan Meat Grading Association, respectively. Each parentage relationship was confirmed with microsatellite marker genotypes. The paternal half-sib family of a specific bull used was composed of 348 steers, 236 of which were used for the first genome scan, and all 348 steers were used for the second scan. Deviation from normality was tested for each of 10 traits, including BW 1, BW-2, CW, LMA, RT, SFT, YE, BMS, ADG 1, and ADG 2. Their skewness and kurtosis values are shown in Table 1. The Wagyu steers were slaughtered

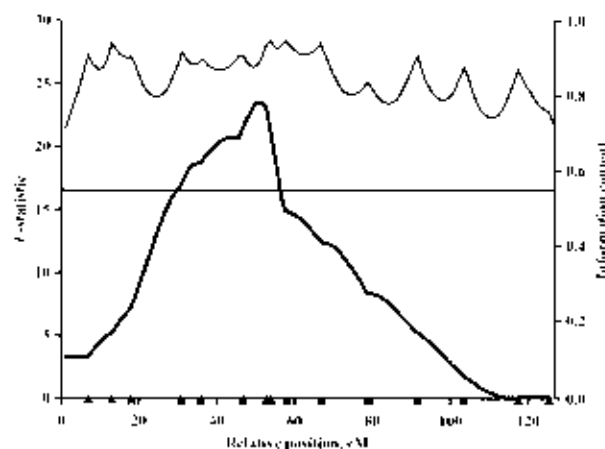


Figure 2. *I*-statistic profile for carcass yield estimate (—) on B1A 5 (cM position; x-axis). The horizontal line indicates the threshold for the 0.1% chromosome-wise level. The upper line indicates information content (right y-axis). Marker positions are identified as triangles above the x-axis and were BM6026, BMS640, BP3, BL23, Or-FCB5, CSSM034, B14, UWC A52, RM084, BMS490, BMS1216, BMS1248, BM315, BM733, and BMS597, respectively.

at an older age (882 ± 36 d) and at heavier weights (714 ± 56 kg) than in previous studies (467 d and 493 kg, Casas et al., 2003; Kim et al., 2003). Thus, QTL results

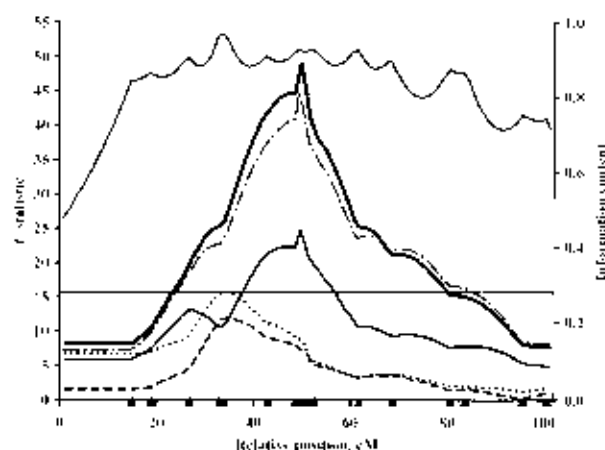


Figure 3. *I*-statistic profiles for weights at 9 mo (----) and 30 mo (—), carcass weight (— · —), ADG-1 (· · · ·) and ADG-2 (— —) on B1A 14 (cM position; x-axis). The horizontal line indicates the threshold for the 0.1% chromosome-wise level. The upper line indicates information content (right y-axis). Marker positions are identified as triangles above the x-axis and were BM1508, BMS1678, HST5001, MNB14, RM180, BMS1941, BMS2215, BL1009, DIK062, HST5008, BM302, BMS740, BMS108, BM4513, BM4805, BL1036, and BM6425, respectively.

from these two studies and ours must be compared with caution.

QTL Mapping Results by the First Genome Scan

We genotyped 342 microsatellite markers on 29 autosomes across 236 steers in a paternal half-sib family for the first genome scan. The present linkage map for the 29 autosomes spanned 2,664 cM with an average marker interval of 7.8 cM. The information content ranged from 0.62 to 0.89, with an average of 0.84. The QTL mapping results are summarized in Table 2. We initially identified 26 QTL for nine traits at the 5% chromosome-wise level. The QTL detected were examined in terms of FDR due to multiple trait analysis of whether FDR were less than 0.10, where the QTL would be reliable (Weller et al., 1998). Eleven QTL had calculated FDR of greater than 0.10 and were thus excluded. Of the resulting 15 QTL, we located three QTL for two traits in the same regions as previously reported: CW on BTA 14 (Kim et al. 2003); BMS on BTA 5 (Stone et al., 1999) and BTA 14 (Casas et al., 2003; Thaller et al., 2003). We mapped QTL for SFT on BTA 14, whereas the back fat thickness trait was located in the same region by Stone et al. (1999), Casas et al. (2000, 2001), and Moore et al. (2003). The QTL for BMS and SFT were detected in the same region of BTA 14 where Barondse (1999) observed an association of marbling with the microsatellite *CSSM66* near *thyroglobulin*, and Grisart et al. (2002) and Winter et al. (2002) identified a gene responsible for milk fat content as *diacylglycerol O-acyltransferase*. Twelve QTL, however, were first observed in this work.

Confirmation of Significant QTL by the Second Genome Scan

Of the 15 QTL, six QTL for six traits were significant at the 5% experiment-wise level and were located on three chromosomes: LMA and BMS on BTA 4, YE on BTA 5, and three growth related traits (ADG-1, BW-2, and CW) on BTA 14. Two other QTL affecting growth-related traits (BW-1 and ADG-2), were also located on BTA 14 as shown in Table 2. Thus, we investigated the three chromosomes comprising the eight QTL using 345 steers with increased markers as the second scan and estimated their allele effects. Table 3 summarizes the second scan results with QTL positions, *F*-statistic values, *Q* to *q* allele substitution effects, and QTL contributions (ratio of variance explained by the regression model to total variance) at the positions where the highest *F*-statistic values were recorded. For the second scan of BTA 4, 22 microsatellite markers were genotyped as shown in Figure 1. The QTL for LMA and BMS were located at 52 to 67 cM of the support interval with the high *F* statistic values. The same haplotype derived from a bull was related to positive effects on LMA and BMS. The contribution ratios of QTL for LMA and BMS were calculated to be 4.8 and 8.2%, respectively. The

results support the notion by Moody et al. (1996) that GPD could detect QTL with large effects, although we used the progeny design. We confirmed the YE QTL on BTA 5 (45 to 54 cM) with an *F*-statistic value of 23.5 by genotyping 15 microsatellite markers as shown in Figure 2. The contribution ratio for YE corresponded to 5.6%. We used 17 microsatellite markers to confirm the QTL for five growth related traits (BW-1, BW-2, CW, ADG-1, and ADG-2) on BTA 14. Three QTL for ADG-2, BW-2, and CW were located on 45-51 cM of BTA 14, whereas BW-1 and ADG-1 were on 29 to 42 cM (Figure 3). Notably, the five growth-related traits were positively affected by the same haplotype. The contribution ratios for these five growth-related traits ranged from 3.4 to 12.3% of the total variances, respectively, supporting the notion by Moody et al. (1996). Mukai et al. (1995) estimated a significant correlation between BW-2 and CW with a coefficient of 0.87 in a purebred Wagyu population. Kim et al. (2003), however, observed a significant QTL for CW, but not for BW-2, on BTA 14 in an Angus × Brahman family. Finally, FDR for the eight QTL were less than 0.01 in the second scan, confirming the presence of these QTL.

Our progeny design to detect QTL was composed of one paternal half-sib family comprising more than 200 progeny and informative microsatellite markers with a 7 to 8 cM marker interval with an information content of approximately 0.85. Results indicated that this design is useful for detecting QTL in a Wagyu purebred population. Mapping of QTL based on a single sire, however, will uncover only a fraction of the segregating QTL present in the population. Additional analyses of half-sib families will provide valuable information for marker-assisted breeding of the population.

Implications

The progeny design in a purebred Wagyu population successfully detected quantitative trait loci. Eight quantitative trait loci exhibited large effects immediately applicable to marker-assisted selection in the family. The refined quantitative trait loci regions on bovine chromosomes 4, 5, and 14 are promising targets for positional cloning research.

Literature Cited

- Andersson, L., C. S. Haley, H. Ellegren, S. A. Knott, M. Johansson, K. Andersson, L. Andersson-Eklund, J. Edfors-Lilja, M. Fredholm, J. Hansson, J. Hakansson, and K. Lundström. 1994. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pig. *Science* 263:1771-1774.
- Barondse, W. J. 1999. Assessing lipid metabolism. International Patent No. WO 99/24248, World Int. Property Org.
- Casas, E., J. W. Keele, S. D. Shackelford, M. Kohnmann, and R. T. Stone. 2004. Identification of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *Anim. Genet.* 35:2-6.
- Casas, E., J. W. Keele, R. T. Stone, S. M. Kapper, and M. Kohnmann. 2000. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J. Anim. Sci.* 78:5606-5609.

- Casas, E., S. D. Shackelford, J. W. Keele, M. Kothmarate, T. P. L. Smith, and R. T. Stone. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *J. Anim. Sci.* 81:2976–2984.
- Casas, E., R. T. Stone, J. W. Keele, S. D. Shackelford, S. M. Kappes, and M. Kothmarate. 2004. A comprehensive search for quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of myostatin gene. *J. Anim. Sci.* 79:854–860.
- Grisart, B., W. Coppeters, F. Farnir, I. Kamm, C. Fauré, P. Berzi, N. Camillema, M. Mazi, S. Rudi, P. Semone, R. Spelman, M. Georges, and R. Snell. 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res.* 12:222–231.
- Haley, C. S., S. A. Knott, and J. M. Elsen. 1994. Mapping QTL in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* 136:1199–1207.
- Ihara, N., A. Takasuga, K. Mizoshita, H. Takeda, M. Sugimoto, Y. Mizoguchi, T. Hirano, T. Itoh, T. Watanabe, K. M. Reed, W. M. Snelling, S. K. Kappes, C. W. Beattie, G. L. Bennett, and Y. Sugimoto. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3,869 microsatellites. *Genome Res.* In press.
- Kappes, S. M., J. W. Keele, R. T. Stone, R. A. McGrath, T. S. Sonstegard, T. P. L. Smith, N. Lopez-Corrales, and C. W. Beattie. 1997. A second generation linkage map of bovine genome. *Genome Res.* 7:235–249.
- Keele, J. W., S. D. Shackelford, S. M. Kappes, M. Kothmarate, and R. T. Stone. 1999. A region on bovine chromosome 18 influences beef longissimus tenderness in steers. *J. Anim. Sci.* 77:1364–1371.
- Kim, J.-J., F. Farnir, J. Savel, and J. P. Taylor. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and beef carcass fitness traits in a cross between *Bos taurus* (Angus) and *Bos indicus* (Brahman) cattle. *J. Anim. Sci.* 81:1933–1942.
- Knott, S. A., L. Marklund, C. S. Haley, K. Andersson, W. Davies, H. Ellegren, M. Fredholm, I. Hansson, B. Hedehjelm, 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.
- Moray, D. E., D. Pomp, and D. S. Buchanan. 1997. Feasibility of the grandprogeny design for quantitative trait loci (QTL) detection in purebred beef cattle. *J. Anim. Sci.* 75:944–949.
- Monte, S. S., C. L. J. Basarab, W. M. Snelling, J. Lvecklund, B. Merzsch, C. Hansen, and B. Bealke. 2003. Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate gene for backfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of *Bos taurus*. *J. Anim. Sci.* 81:1919–1925.
- Mukai, F., K. Ootani, and S. Kubo. 1995. Genetic relationships between performance test traits and field carcass traits in Japanese Black cattle. *Jap. J. Anim. Prod. Sci.* 44:199–205.
- Ott, J. 1992. *Analysis of Human Genetic Linkage*. Rev. ed. The Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, MD.
- Seaton, G., C. S. Haley, S. A. Knott, M. Kearsey, and P. M. Visscher. 2002. QTL Express: Mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformatics* 18:339–340.
- Stone, R. T., J. W. Keele, S. D. Shackelford, S. M. Kappes, and M. Kothmarate. 1998. A primary screen of the bovine genome for QTL affecting carcass and growth traits. *J. Anim. Sci.* 77:1379–1384.
- Thaller, G., C. Kuehn, A. Winter, G. Ewald, O. Hellmann, J. Wegner, H. Zumbke, and R. Fries. 2003. *DGAT1*, a novel positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Anim. Genet.* 34:354–357.
- Weller, J. L., Y. Kashi, and M. Soller. 1990. Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 73:2525–2537.
- Weller, J. L., J. Z. Song, D. W. Heyen, H. A. Lewin, and M. Ron. 1998. A new approach to the problem of multiple comparisons in the genetic dissection of complex traits. *Genetics* 150:1699–1706.
- Winter, A., W. Kraemer, F. Werner, S. Koller, S. Kott, G. Durstewitz, Z. Bentkamp, J. E. Wenzel, G. Thaller, and R. Fries. 2002. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 99:9309–9313.

Abnormal Development of Nephrons in *Claudin-16*-Defective Japanese Black Cattle

Kosuke OKADA¹, Naoko ISHIKAWA², Kouichi FUJIMORI¹, Masanobu GORYO¹, Manabu IKEDA², Jun SASAKI¹, Daisaku WATANABE¹, Akiko TAKASUGA¹, Takashi HIRANO² and Yoshikazu SUGIMOTO³

¹Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture, Iwate University, 3-18-8 Ueda, Morioka Iwate 020-8550, ²United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagida, Gifu 501-1193, ³NOSAI Yamagata Veterinary Training Center, Kitagawara 386-1, Yamagata 990-2171 and ⁴Shirakawa Institute of Animal Genetics, Oshikura, Nishigo, Nishi Shirakawa, Fukushima 961-8061, Japan

(Received 26 December 2002/Accepted 9 November 2004)

ABSTRACT. The kidneys of 37 Japanese Black calves aged 2 to 65 months diagnosed with *Claudin 16 (CL-16)* defect by the DNA based test were examined pathologically. The animals exhibited clinical symptoms such as growth impairment, renal failure, overgrowth of hooves, and anemia at a young age. There was no correlation between the time of onset and age. Kidney weights relative to body weight were similar to those in normal animals, but both kidney net weights and size were reduced due to atrophy in animals that showed severe renal dysfunction. Histopathological examination of the kidneys showed reduction in the number of glomeruli, compensatory hypertrophy of glomeruli and tubules, and glomerular and tubular atrophy accompanied by interstitial fibrosis and lymphocytic infiltration. Glomeruli were clearly less in number in the kidneys of *CL-16*-defective animals than those of normal animals even in the cases with mild lesions. A small number of immature glomeruli and tubules were also detected, suggesting that there were fewer nephrons developed at birth in *CL-16*-defective animals. It was suggested that a defect of the *CL-16* gene is involved in the "abnormal development of nephrons". Immunohistopathological examination of the kidneys showed that the epithelium of thick ascending limb of Henle was stained with anti-*CL-16* antibody in the control animals, but not in the affected animals, suggesting a defect of *CL-16* in the epithelium of renal tubules in the affected animals.

KEY WORDS: abnormal development, *Claudin 16*, Japanese Black cattle, nephrons, *Paracellin-1*.

J. vet. Med. Sci. 69(2): 171–178, 2005

The *claudin 16 (CL-16)* defective in Japanese Black cattle is a hereditary disease that causes severe renal failure, growth retardation, and overgrowth of hooves in young animals [5, 23]. It is also known as "renal tubular dysplasia in Japanese Black cattle" [13–17] or "bovine chronic interstitial nephritis with diffuse zonal fibrosis" [5, 8]. This disease is caused by a homozygous deletion of gene and is transmitted by autosomal recessive inheritance [8, 14].

Since it occurs particularly in bulls of breeds with good meat quality, it causes large economic losses to cattle breeders. The *CL-16* gene is considered to correspond to the *Paracellin-1* gene [5], defective of which causes hypomagnesaemia, hypercalcauria, calcium deposition in renal parenchyma, and renal failure in humans [20].

Paracellin-1 protein in humans exists in the epithelium of ascending limb of Henle's loop. A lack of it causes a failure of Mg resorption, and results in hypomagnesaemia [20]. It is thought that Paracellin-1 protein forms a component of magnesium channel [20, 21]. Although the amino acid has more than 90% homology with Paracellin-1 [5, 13], the *CL-16* defect in cattle exhibits no hypomagnesaemia [17] which is a common finding in humans.

In bovines, although studies of the *CL-16* defect in the genetic field have developed considerably [5, 8, 13–18], pathology of the defect remains to be elucidated. The purpose of this study was to clarify the histopathological characteristics of the *CL-16* defect and conditions that lead to renal failure, and to examine the distribution of *CL-16* protein immunohistochemically.

MATERIALS AND METHODS

Samples: The kidneys of 37 Japanese Black calves (aged 2–65 months) diagnosed with the *CL-16* defect by DNA-based test [5] were studied (Table 1). Clinical, blood biochemical, and autopsy reports of each animal were evaluated. Among the present cases, 7 animals that underwent autopsy at Iwate University (Nos. 3, 5, 7, 11, 19, 28, 32) were available for body weights and kidney weights and size together with histopathology of all organs (Table 1).

As the control, 16 Japanese Black calves (aged 1–49 months) that had no *CL-16* defect and showed no microscopic lesions in the kidney were examined.

Body weight: Growth of the animals was compared with the control data presented in the archives of Wagyu Registry Association [22].

Histopathological examination: The kidneys of 37 animals and 16 controls were examined. Kidney sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E), Masson's trichrome, periodic acid-Schiff reaction, periodic acid-methenamine-silver (Yajima's modification), and Watanabe's method for reticulum (silver impregnation).

Glomeruli were counted in 10 low-power fields (object lens: ×4), and the number of glomeruli per field was calculated and compared. Obsolescent glomeruli were included in the counting.

In Nos. 3 and 28, samples were collected from the anterior margin, anterior part, middle part, posterior part, and posterior margin of the kidney, and the number of glomeruli

Table 1 Kidney size, weight and results of blood biochemical examinations in *CL-16* defect calves

Animal No.	Age (month)	Size of kidney (cm)		Weight of kidney (g)		Cre (mg/dl)	BUN (mg/dl)	RBC (10 ⁹ /µl)	WBC (10 ³ /µl)	Ht (%)	Alb (g/dl)	Ca (mg/dl)	Corrected Ca level* (mg/dl)	IP (mg/dl)	Mg (mg/dl)
		Left	Right	Left	Right										
1	2	9.5×5.3	9×5×4	100	95	10.6	153	NE	NE	NE	2.5	5.4	6.9	18.2	1.8
2	3	NE	NE	NE	NE	6.7	140	1150	148	33	3.4	6.3	7.5	20	2.2
3	4	10.5×4×3	12.5×5×2.8	104	106	3.1	58.8	NE	NE	NE	NE	9.2	NE	5.5	2.9
4	4	NE	NE	NE	NE	21.1	146.5	813	108	35.6	4.01	3.5	3.49	17.7	1.5
5	4	11.5×5.5×4.5	12×6.5×3.2	150	148	NE	127.4	881	169	29	NE	NE	NE	NE	NE
6	5	NE	NE	195	150	2.9	45.3	664	64	25	3.3	8.9	9.6	11.3	1.7
7	5	13.5×6×4	11.7×4.5	165	163	2.99	87.5	1413	74	41	4.212	8.4	8.188	14.3	NE
8	6	NE	NE	NE	NE	1.7	35.7	841	57	27	3.21	8.5	9.26	6.1	2.2
9	6	NE	NE	NE	NE	2.8	70	893	120	25	3.2	11.1	11.7	11	2.1
10	6	NE	NE	NE	NE	7	45	584	42	24	4.1	7	7.6	5.9	NE
11	7	9.5×5.5×3	9.7×5.5×3	93	86	5.63	57.5	457	76	16	4.66	7.2	6.54	4.9	NE
12	8	NE	NE	NE	NE	3	64.7	617	84	23	4	7.8	7.8	6.7	4.9
13	8	10×6×5	10×6×5	NE	NE	4.7	52	686	87	23	3.6	8.8	8.5	4.7	NE
14	8	7×14×7	6×12×7	NE	NE	6.8	53	594	73	22	4	9.1	9.6	5.9	3.7
15	9	NE	NE	NE	NE	7.4	88.9	605	66	23	3.1	9.9	10.2	8.5	2.4
16	9	NE	NE	NE	NE	9.8	76	755	203	38	4.3	6.8	6.8	10.7	3.5
17	10	NE	NE	NE	NE	3.6	29.1	948	102	42	3.7	11.3	12.1	7.8	2.3
18	10	NE	NE	NE	NE	5.4	72	677	84	29	3.7	8.9	9.2	11.9	6.7
19	11	13×7×4.5	13.5×6×3.2	193	192	2.15	47.3	1158	109	42	4.28	11.7	11.42	6.3	NE
20	13	NE	NE	NE	NE	7.7	135	482	NE	20	NE	8.8	NE	12.6	NE
21	14	NE	NE	NE	NE	3.4	73.4	646	NE	27	2.8	9.6	10	9.3	2.9
22	15	NE	NE	NE	NE	4.3	82.5	850	71	40	3.6	8.5	9.4	5.9	2.1
23	15	NE	NE	NE	NE	11.6	116.7	548	32	25	4.2	NE	NE	1.9	NE
24	16	NE	NE	NE	NE	2.7	56.9	700	64	32	3.2	9.3	10.4	9.1	1.9
25	16	NE	NE	NE	NE	16.1	187.8	671	77	27	3.5	4.3	4.1	23.1	NE
26	21	NE	NE	NE	NE	3.9	65.6	896	202	42	2.74	NE	NE	NE	NE
27	21	NE	NE	NE	NE	4.4	43.1	497	54	23	3.1	NE	NE	NE	NE
28	21	13×6×6	14×8×4.5	268	224	7.65	123.3	533	71	21	4.39	7	6.61	19.5	NE
29	22	NE	NE	NE	NE	16.4	150	424	NE	19	NE	5.7	NE	15.5	2.2
30	23	NE	NE	NE	NE	8.1	73.7	747	35	33	3.1	8.4	9.3	9	4.7
31	25	NE	NE	NE	NE	3.6	28.8	NE	NE	40	NE	8.1	NE	13.1	2.4
32	25	16×10×7	18×9×5	413	430	9.98	104.4	406	47	20.1	3.96	3.4	3.44	8.7	NE
33	25	NE	NE	NE	NE	10.6	80.3	460	56	21	3.4	7.2	7.7	16.9	NE
34	26	NE	NE	NE	NE	4.2	148	775	60	37	2.9	6.1	6	11.6	1.6
35	26	NE	NE	NE	NE	11.1	83.9	1140	117	56.4	4.1	4.6	4.5	10.5	1.7
36	28	NE	NE	NE	NE	5.4	130	530	6.2	21	3.5	7.8	8.6	9.1	2
37	65	NE	NE	NE	NE	3.1	98.4	455	NE	26	NE	6.9	NE	8.7	2.5

* Corrected serum Ca level (mg/dl) = Measured serum Ca level (mg/dl) + [4 - serum albumin level (g/dl)]. NE: Not examined.

was compared among the various parts.

Immunohistochemical examination: The kidney samples of Nos. 4, 5, 11, 18, 19, 21, 35, 36, 52, 53 were examined. Samples of the liver, spleen, kidney, heart, lung and intestine collected from Nos. 18, 22 and 53 were examined. These samples were embedded in OCT compound, and frozen sections made with a cryostat and fixed in acetone. The sections were examined with the avidin-biotin-complex (ABC) method using a Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.). We used the anti-C-terminal of *CL-16* peptide rabbit serum (at a dilution of 1:10) [7] as a primary antibody. Briefly, the polypeptide CRSHAIPRTQTAKMYAVDTRV corresponding to the COOH-terminal cytoplasmic domain of bovine claudin-16 was synthesized and coupled via cystein to keyhole limpet haemocyanin. The conjugated peptide was used as the antigen to generate polyclonal antibody in a rabbit. The speci-

ficity of the antibody was confirmed using total lysates of *Escherichia coli* expressing glutathione S-transferase fusion proteins with cytoplasmic domains of claudin-1 to -16. Finally, the sections were developed with a 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride solution.

RESULTS

Clinical and blood biochemical findings: Retarded growth (Fig. 1), diarrhea, and elongated hooves were observed in most affected animals. The animals showed no abnormality at birth and grew normally for a period, but with aging they exhibited growth retardation and refractory diarrhea, although activity and appetite were relatively good. Almost all affected animals showed overgrowth of hooves. On blood biochemical examination (Table 1), increased levels of blood urea nitrogen (BUN) and creati-

PATHOLOGY OF *CLAUDIN 16* DEFECT OF CATTLE

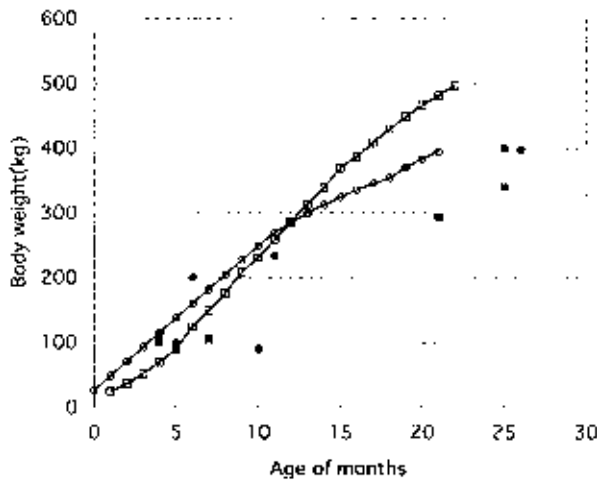


Fig. 1. Age and body weight of calves examined. ○: Normal growth curve (□): Lower limit. □: Normal growth curve (○): castrated commercial cattle, Lower limit. ●: *CL-16*-defective calves (●), animal Nos. 6-8, 18, 19, 35. ■: *CL-16*-defective calves (■), animal Nos. 3, 5, 11, 28, 31, 32.

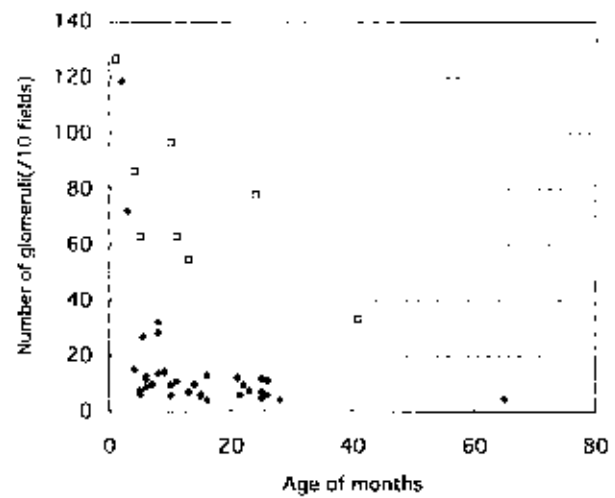


Fig. 3. Age and number of glomeruli of calves examined. ◆: *CL-16*-defective calves, animal Nos. 1, 3, 7. □: Control calves, animal Nos. 38, 40, 42, 44, 45, 48, 50, 52.

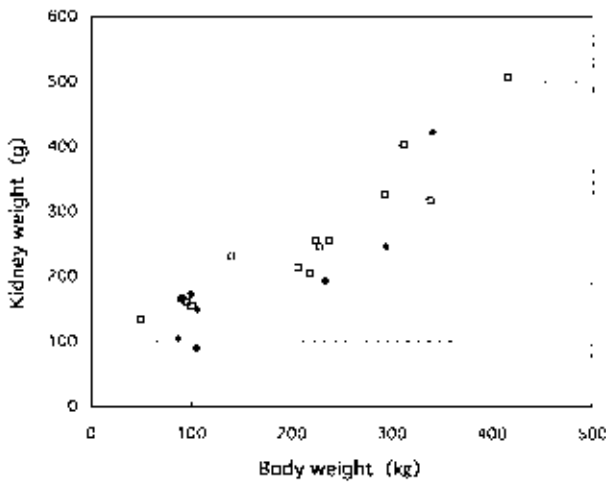


Fig. 2. Body weight and kidney weight of calves examined. ◆: *CL-16*-defective calves, animal Nos. 3, 5, 7, 11, 19, 28, 32. □: Control calves, animal Nos. 38-42, 44-48, 50, 53.

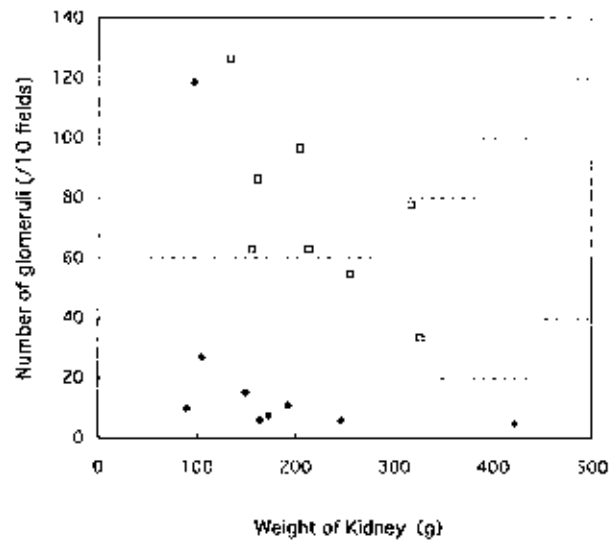


Fig. 4. Kidney weight and number of glomeruli of calves examined. ◆: *CL-16*-defective calves, animal Nos. 1, 3, 5, 7, 11, 19, 28, 32. □: Control calves, animal Nos. 38, 40, 42, 44, 45, 48, 50, 52.

nine (*Cre*) were observed in all animals, suggesting renal failure. Anemia (13/37), decreased levels of calcium (16/29), and increased levels of inorganic phosphate (26/34) were also noted. The magnesium (*Mg*) level increased in 8 and decreased in 4 of the 25 animals. No correlation was observed between the appearance of clinical symptoms and age.

Gross changes: Grossly, coarse granular changes on the surface and discoloration of the cortex were noted in the bilateral kidneys. Thinning of the parenchyma and small size of kidney were observed in severe renal failure cases. No marked difference was observed in either size or weight

between the right and left kidneys. And no marked differences were observed between 8 affected animals examined (aged 4-25 months) and 14 controls (aged 1-49 months) concerning ratio of body weight and mean weight of right or left kidney (Fig. 2).

Hypoplasia of the pituitary gland (5/7, about 1 g) and thyroid gland (5/8, 6-12 g) was noted. There were no significant changes in other organs.

Histopathological findings: The number of glomeruli in the affected animals was markedly less than that in the con-

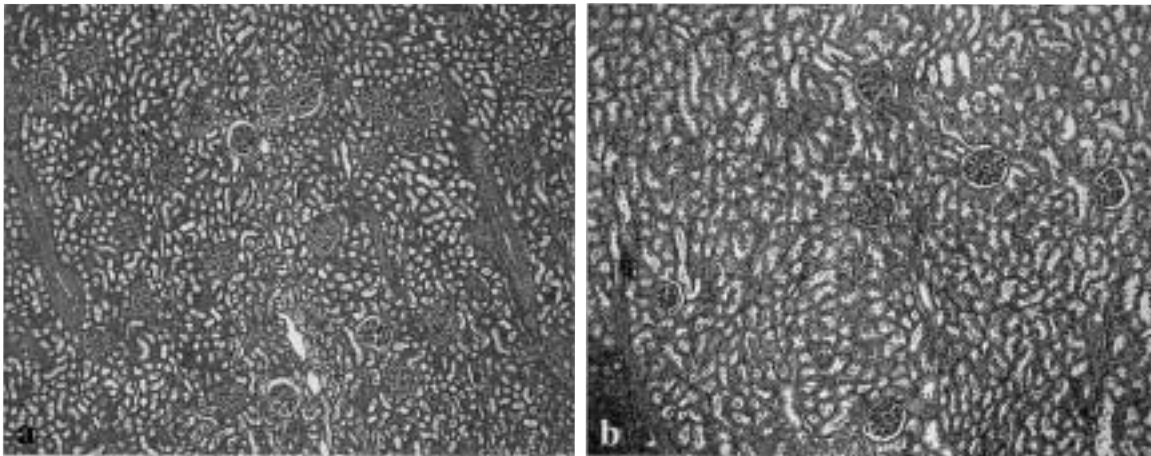


Fig. 5. a. Normal renal cortex. Animal No. 42. No abnormality is observed in the number of glomeruli or tubular distribution. HE, $\times 40$. b. Renal cortex of a *CT-16*-defective animal. HE, $\times 40$. Animal No. 19. Glomeruli are markedly reduced in number compared with the normal kidney.

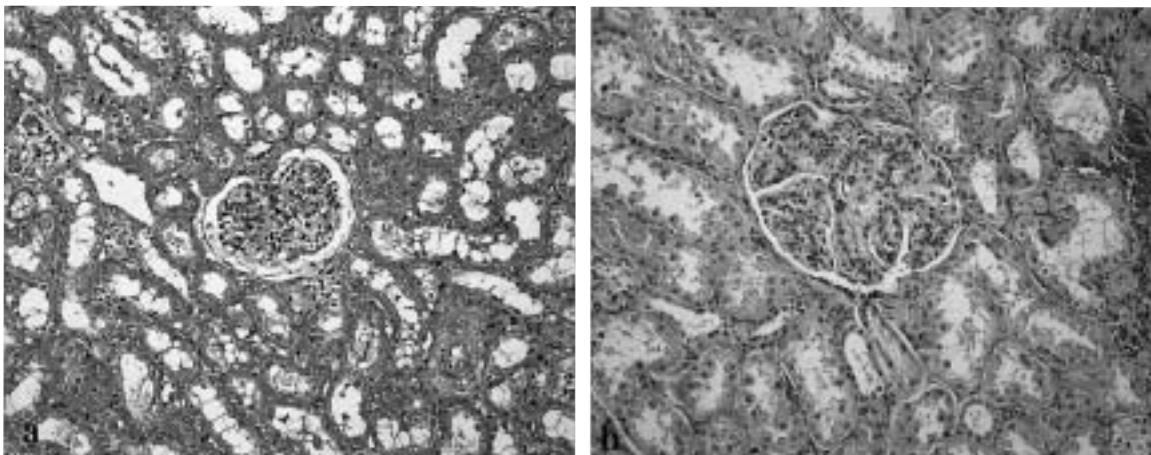


Fig. 6. a. A glomerulus of a normal calf. HE, $\times 700$. b. A glomerulus of a *CT-16*-defective calf, $\times 700$. The glomerulus and tubules are large in size showing compensatory hypertrophy. HE, $\times 700$.

controls of the same age or same body weight except in 2 animals (Figs. 3 and 4; Figs. 5a and b). No differences were observed in the number of glomeruli between the parts of the kidney examined. Some glomeruli were atrophic, others were hypertrophic (Figs. 6a and b), and a small number of immature glomeruli were also noted (Fig. 7). Atrophic glomeruli were accompanied with periglomerular fibrosis and thickening of the basement membrane. Around atrophic glomeruli, regressive changes of tubules such as narrowing of the tubular lumen and thickening of the basement membrane of the proximal convoluted tubules, were notable. And marked interstitial fibrosis and lymphocytic infiltration were observed. Such atrophic glomeruli appeared to be more frequent in the superficial layer of the cortex beneath the capsule. In hypertrophic glomeruli, on the other hand, an enlargement of tufts due to increases in mesangial cells and mesangial matrix and dilation of Bowman's cap-

sules were noted, and tubules around them were markedly hypertrophic. No correlation was observed between the Cre level and the total number of glomeruli. An increase in the level of Cre was observed in the animals with many atrophic glomeruli and few hypertrophic glomeruli. These kidneys showed marked interstitial fibrosis and lymphocytic infiltration, and regressive changes of renal tubules.

Three major patterns of fibrosis were observed: cord like (fibrous tissue proliferated as bundles in the medullary rays), focal (fibrous tissue proliferated as aggregates in the interstitium), and diffuse (fibrous tissue proliferated nearly equally in the interstitium between the tubules). Fibrosis looked to start as cord-like in the cortex, extended to the medullary rays, and progressed in the outer zone of medulla. However, diffuse fibrosis of the entire inner zone of medulla was observed also in the animals with low Cre levels. As fibrosis progressed, the cortical labyrinth was segmented

PATHOLOGY OF *CLAUDIN 16* DEFECT OF CATTLE

into lobules by fiber bundles. And interstitial fibrosis and tubular atrophy progressed in each lobule, suggesting that degeneration and loss of tubules were promoted by individual nephrons.

In animals over 10 months, the cystic dilation of tubules and flattening of the epithelium were noted in all areas (Fig. 8), and detachment and regeneration of the epithelium of proximal tubules were noted frequently and particularly in the deep cortex and the outer zone of medulla.

Immature tubules were composed of cells resembling the epithelial cells of proximal tubules with a rich cytoplasm and a clear, large nucleus, and their lumens were markedly narrowed or absent, appearing like an endocrine gland-like

structure. Many of the narrowed tubular lumens contained proteinaceous casts. Most of these tubules forming cords or loci were present in the cortex, and also in the outer zone of medulla in severely affected cases. There were also many tubules that showed deposition of a large amount of lipofuscin and thickening of the basement membrane (Fig. 9a). Another type of tubules was composed of cells that had scant cytoplasm and a small, intensely stained nucleus and resembled to the epithelial cells of Henle's loop (Fig. 9b). These tubules were observed in large numbers in the outer zone of medulla. They were observed in small number also in the inner zone of medulla but not in the cortex.

Kidneys of control animals: No immature glomerulus or

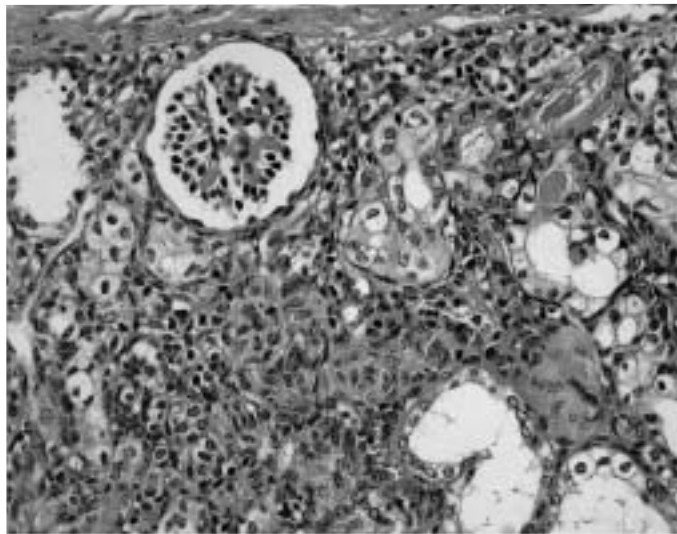


Fig. 7. An immature glomerulus. Animal No. 3. Immature nephrons are observed under the capsule. Glomeruli are small, the vasculature is poorly developed. Narrowing of the tubular lumen and marked interstitial fibrosis and lymphocytic infiltration are seen. HE, $\times 418$.

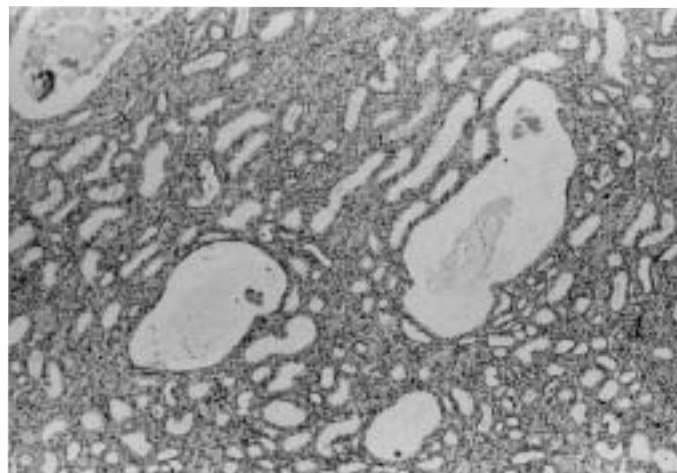


Fig. 8. Cystic ectasia of renal tubules. Animal No. 17. HE, $\times 50$.

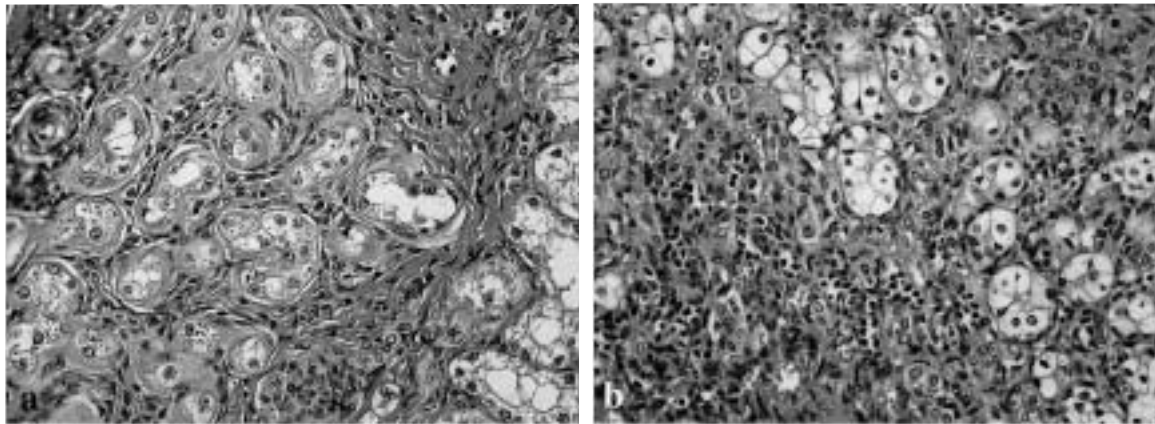


Fig. 9a. Immature tubules observed in the renal cortex. No. 3. Immature epithelium with a rich cytoplasm and large nucleus show lipofuscin depositing. HE, $\times 400$. b. Another type of immature tubules observed in the outer zone of medulla. Animal No. 3. Epithelium have scant cytoplasm and a small, intensely stained nucleus. HE, $\times 400$.

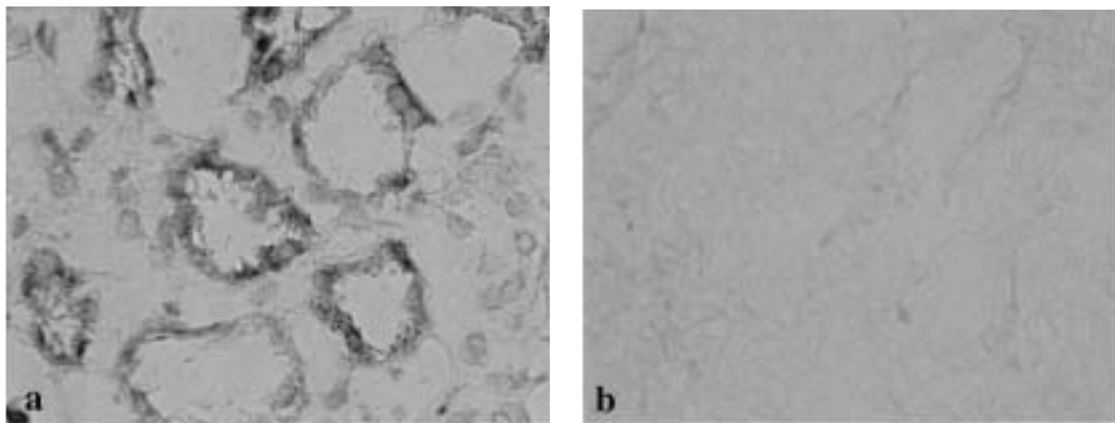


Fig. 10a. Epithelium of thick ascending limb of Henle showed positive staining with anti-CL-16 protein. Kidney of normal control animal No. 52, ABC stains, $\times 50$. b. Epithelium of thick ascending limbs of Henle no staining with anti-CL-16 protein. Kidneys of CL-16-defective animal No. 21, ABC stains, $\times 50$.

Table 2. The profile of control animals

Animal No.	Age of (month)	Weight of body (kg)	Size of kidney (cm)		Weight of kidney (g)		BUN (mg/dl)	Cre (mg/dl)	Analysis of DNA	Diagnosis at necropsy
			Left	Right	Left	Right				
38	1	50	12 \times 7 \times 2	11 \times 7 \times 4	121	147	NE	NE	NE	Formation of false joint from coxofemoral luxation
39	4	91	10.5 \times 6.5 \times 4.5	11.5 \times 6.5 \times 4	168	162	14	NE	NE	Duplication of spinal cord
40	4	95	11 \times 7 \times 3	12 \times 7 \times 3	163	160	NE	NE	NE	Hypoplasia of pituitary gland, thyroid gland and atrophy of thymus
41	4	140	14 \times 10 \times 4	16 \times 6 \times 4	218	242	NE	NE	NE	Multiple lipoma
42	5	100	11 \times 7 \times 4	12 \times 6 \times 3	170	141	NE	NE	NE	Normal
43	8	NE	16 \times 8 \times 5	17 \times 9 \times 4	310	318	73	NE	NE	Severe atony of reticulum, omasum, and abomasum
44	10	218	12 \times 7 \times 4	14 \times 6 \times 2.5	184	225	NE	NE	NE	Normal
45	11	206	15 \times 7 \times 4.5	14 \times 7 \times 3	211	216	NE	NE	NE	Catarrhal enteritis of jejunum
46	12	224	14 \times 9 \times 4	15 \times 9.5 \times 3.5	250	260	NE	NE	NE	Normal
47	13	228	14 \times 9 \times 4	15 \times 9.5 \times 3.5	250	260	NE	NE	NE	Normal
48	13	237	14 \times 6.8 \times 5.2	15 \times 8.5 \times 4	242	268	NE	NE	NE	Normal (used for experiment)
49	22	NE	17 \times 10.5 \times 5	18 \times 9 \times 4	470	422	NE	NE	NE	Obstruction of duodenum
50	24	338	16.5 \times 8 \times 4.5	16 \times 7.5 \times 4.5	328	305	NE	NE	NE	Hemophilic
51	35	415	12 \times 6.5 \times 3.5	17 \times 7.5 \times 4	166.6	193	NE	NE	NE	Heart failure and malnutrition
52	41	292	15 \times 8 \times 4	17 \times 7.5 \times 5	316	336	NE	NE	NE	Normal
53	49	312	17 \times 8.3 \times 5.5	17 \times 7.5 \times 6	402	404	NE	NE	NE	Enzootic bovine leukema

tubule was noted in any of the control animals (aged 1–49 months).

Immunohistopathological findings: No cells showed positive to anti-CL-16 sera in the liver, spleen, heart, lung or intestine. The epithelial cells of the thick ascending limb of Henle from control cattles were positive to anti-CL-16 serum, but those of affected cattle were negative (Figs. 10a, b, Table 2). Glomeruli and the interstitium of all cattles were negative for staining.

DISCUSSION

Generally, renal hypoplasia is defined as a developmentally small but normally differentiated kidney [1]. In this study, kidney weights relative to body weight in affected animals were nearly same as those in normal animals. Therefore, the present cases were not “renal hypoplasia”.

In 8 affected animals (Nos. 3, 5, 7, 11, 19, 28, 32), the number of glomeruli was clearly less than that in normal kidneys of the same weight. Moreover, when the relationship between the number of glomeruli and age was examined in all animals, the number of glomeruli was markedly reduced in 35 animals. The degree of kidney growth differed between animals of the same age depending on the degree of development of the whole body. Body weights and kidney weights were not measured in many of the affected animals examined in this study, preventing the accurate comparison of these two parameters. However, it is most likely that the number of glomeruli was readily decreased also in the animals despite of no data available for body weights and kidney weights.

We speculated the following three features as the characteristics of renal lesions in *CL-16*-defective Japanese Black cattle: 1) Animals are born with various degree of maturation of glomeruli. 2) Kidney size is nearly normal in the mid cases, but is reduced in the progressed cases due to parenchymal atrophy accompanied by fibrosis, and 3) the immature nephrons are prone to be degenerated and destroyed while the mature glomeruli become compensatory hypertrophy. Hereditary renal disorders with an early onset have been reported in various species [3, 9, 11, 19]. However, as mentioned above, no disease that exhibits the same histological features as those observed in *CL-16*-defective animals have not reviewed, to our knowledge, in the literatures.

The results of immunohistopathological examination showed that the renal tubular epithelium of *CL-16*-defective cattle lacked CL-16 protein. This is consistent with the previous immunoblot study [5]. The CL family is comprised of more than 18 types of protein and CL-16 is shown in tight junctions (TJs) of the intercellular space between the epithelium of renal tubules [20, 21]. Kluchi-Saishin *et al.* [7] reported that claudin-16 expresses in the thick ascending limb of Henle in mice. TJs are one of several cell junctions and CL family proteins play a role as a barrier and fence [2, 4, 6, 10, 20]. We speculated that the epithelial cell junction became loosened, resulting in leakage of the tubular fluid through the epithelium. This was thought to cause atrophy

of renal tubules and inflammation of the interstitium.

Sasaki *et al.* [18] considered that the renal tubular dysplasia was the primary change, and reduced number of nephrons was secondary change. But we considered that the latter was also primary lesion. Because reduction in number of glomeruli and immature tubules was observed in all defective animals. Therefore this disease might be diagnosed as abnormal development of nephron but not solely of glomeruli or tubules. Because degree of interstitial fibrosis and lymphocytic infiltration was varied in each case, these were considered as secondary changes. In future studies, close histological examination of the kidneys of *CL-16*-defective cattle at birth and at a stage in which no clinical renal dysfunction has as yet been observed may be needed to elucidate the pathogenesis of this disease.

A high percentage of *CL-16*-defective animals show growth retardation. Growth impairment is a non-specific symptom observed secondarily to renal failure and many other diseases, and its cause is difficult to identify. In the animals examined in this study, however, hypoplasia of pituitary gland and thyroid were observed frequently. These findings are often observed in bulls and cows [12] that show growth retardation due to causes other than a defect of *CL-16*. It could not be ruled out that, hypoplasia of pituitary gland and thyroid might play a critical role to cause growth impairment in the *CL-16*-defective animals, although more evidences should be accumulated in future to interpret the relationship between the two.

ACKNOWLEDGMENTS. We are grateful to Dr. Shigeru NUMAKUNAI for his invaluable assistance and advice, and Dr. Koumei KURAMOCHI for her preparing this manuscript.

REFERENCES

- Bernstein, J. and Gilbert-Barness, E. 1994. Developmental abnormalities of the Kidney, pp. 1631–1644. *In: Diagnostic Surgical Pathology*, 2nd ed., Raven Press, Ltd., New York.
- Fanning, A. S., Mitic, J. L. and Anderson, J. M. 1999. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**: 1337–1345.
- Finco, D. R., Duncan, J. R., Crowell, W. A. and Hulse, M. L. 1977. Familial renal disease in Norwegian Elkhound dogs: Morphologic examinations. *Am. J. Vet. Res.* **38**: 941–947.
- Gow, A., Southwood, C. M., Li, J. S., Pariali, M., Riordan, G. P., Brodie, S. D., Danias, J., Brounstein, J. M., Kachar, B. and Lazzarini, R. A. 1999. CNS myelin and Sertoli cell tight junction strands are absent in *Occludin 11* null mice. *Cell* **99**: 629–659.
- Hirano, T., Kobayashi, N., Itoh, T., Takasuga, A., Nakamura, T., Hiratsune, S. and Sugimoto, Y. 2000. Null mutation of PC1.6 (claudin-16) results in bovine chronic interstitial nephritis. *Genome Res.* **10**: 659–663.
- Knigasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X. and Reinecker, H. C. 2000. Claudin regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* **118**: 1001–1011.
- Kluchi-Saishin, Y., Gotoh, S., Funase, M., Takasuga, A., Tani, Y. and Tsukita, S. 2002. Differential expression patterns of

- cludins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**: 875–886.
8. Kobayashi, K., Hirano, T., Maruyama, S., Matsuno, H., Mokuujima, K., Morimoto, H., Noike, H., Tomimatsu, H., Hara, K., Itoh, T., Imakawa, K., Nakayama, H., Nakamaru, T. and Sugimoto, Y. 2000. Genetic mapping of a locus associated with bovine chronic interstitial nephritis to chromosome 1. *Anim. Genet.* **31**: 91–95.
 9. Maxe, M. G. 1995. The urinary system, pp. 447–538. *In: Pathology of Domestic Animals*, vol. 2, 4th ed. (Jubb, K. V. F., Kennedy, P. C. and Palmer, N. eds.), Academic Press, San Diego.
 10. Moritz, K., Furuse, M., Fujimoto, K. and Tsukita, S. 1999. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 511–516.
 11. Nadascy, T., Bane, B. L. and Silva, F. G. 1994. Adult renal diseases, pp. 1645–1705. *In: Diagnostic Surgical Pathology*, 2nd ed. Raven Press, Ltd., New York.
 12. Nigel, P. 1993. Hormonal influences, pp. 56–57. *In: Pathology of Domestic Animals*, vol. 1, 4th ed. (Jubb, K. V. F., Kennedy, P. C. and Palmer, N. eds.), Academic Press, San Diego.
 13. Ohba, Y., Kitagawa, H., Kitoh, K., Asahina, S., Nishimori, K., Yoneda, K., Kuniida, T. and Sasaki, Y. 2000. Homozygosity mapping of the locus responsible for renal tubular dysplasia of cattle on bovine Chromosome 1. *Mammalian Genome* **11**: 316–319.
 14. Ohba, Y., Kitagawa, H., Kitoh, K., Okawa, T. and Sasaki, Y. 2001. Inheritance of renal tubular dysplasia in Japanese Black cattle. *Ver. Rec.* **149**: 153–154.
 15. Ohba, Y., Kitagawa, H., Kitoh, K., Sasaki, Y., Takami, M., Shinkai, Y. and Kuniida, T. 2000. A deletion of the *paracellin-1* gene is responsible for renal tubular dysplasia in cattle. *Genomics* **68**: 229–236.
 16. Ohba, Y., Kitagawa, H., Okawa, Y., Kitoh, K. and Sasaki, Y. 2001. Clinical features of renal tubular dysplasia, a new hereditary disease in Japanese Black cattle. *Ver. Rec.* **149**: 115–118.
 17. Ohba, Y., Kitoh, K., Nakamura, H., Okada, H., Kamada, T., Sasaki, Y. and Kitagawa, H. 2002. Renal reabsorption of magnesium and calcium by cattle with renal tubular dysplasia. *Ver. Rec.* **151**: 381–387.
 18. Sasaki, Y., Kitagawa, H., Kitoh, K., Okawa, Y., Suzuki, K., Mizukoshi, M., Ohba, Y. and Masegi, T. 2002. Pathological changes of renal tubular dysplasia in Japanese Black cattle. *Ver. Rec.* **150**: 628–632.
 19. Schmeiner, G. F. and Kissane, J. M. 1998. The urinary system, pp. 804–847. *In: Anderson's Pathology*, vol. 1, 9th ed. (Kissane, J. M. ed), J. C. V. Mosby Company, Philadelphia.
 20. Simon, D. B., Lu, Y., Chishti, K. A., Velazquez, H., Al-Salhani, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez Soriano, J., McCredie, D., Milford, D., Sanjad, S. and Litton, R. P. 1999. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* **285**: 103–106.
 21. Tsukita, S. and Furuse, M. 2000. Pores in the wall: Claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *Cell Biol.* **149**: 13–16.
 22. Wagya Registry Association. 2004. Normal Growth Curve of Japanese Black Cattle. Kyoto (in Japanese).
 23. Watanabe, D., Ban, A., Takahashi, M., Ishikawa, H., Watanabe, A., Yamamoto, H., Tunokane, S., Fujimori, K., Miyake, Y., Okaiki, K., Otsuka, H., Oguro, M., Kawamura, S., Hiroto, T., Sugimoto, Y., Abe, S. and Saito, H. 2002. Heredity and clinicopathological examinations of *PCLN-1/Claudin-16* deficiency in Japanese Black cattle in the Tohoku region. *Jpn. J. Large Anim. Clin.* **25**: 1–10 (in Japanese with English abstract).

—Original—

Genetic Diagnosis of Claudin-16 Deficiency and Sex Determination in Bovine Preimplantation Embryos

Hiroki HIRAYAMA¹⁾, Soichi KAGEYAMA¹⁾, Satoru MORIYASU¹⁾,
Takashi HIRANO²⁾, Yoshikazu SUGIMOTO²⁾, Naohiko KOBAYASHI³⁾,
Mutsumi INABA⁴⁾, Ken SAWAI¹⁾, Sadao ONOE¹⁾ and Akira MINAMHASHI¹⁾

¹⁾Hokkaido Animal Research Center, Hokkaido 081-0038, ²⁾Shirakawa Institute of Animal Genetics, Japan Livestock Technology Association, Fukushima 961-8061, ³⁾Gifu Prefectural Livestock Research Institute, Gifu 506-0101, and ⁴⁾Laboratory of Molecular Medicine, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Hokkaido 060-0818, Japan

Abstract. Renal tubular dysplasia is an autosomal recessively inherited disorder in Japanese black cattle that is due to deletion mutations in the *claudin-16* gene and causes chronic renal failure and death of affected animals. Here, we report a multiplex-PCR procedure to determine the genotype for claudin-16 deficiency in preimplantation embryos. The presence or absence of the wild-type and mutant allele(s) was precisely detected with the multiplex-PCR using as little as 5 pg of genomic DNA from leukocytes. When biopsied embryo cells were examined for claudin-16 deficiency, 97.2% of genotypes were consistent with the PCR results obtained for the corresponding embryos. In addition, sexing of embryos by PCR was performed using an aliquot of DNA extracted from biopsied embryo cells, and determination of *claudin-16* genotype and sex was successfully achieved with an efficiency of 91.7% for *claudin-16* genotyping and 83.3% for sexing. The production of a 100-day fetus that was male and homozygous for claudin-16 deficiency, as expected from the analysis of biopsied embryo cells, gave evidence of the reliability and applicability of this procedure for preventing the transmission of this disease and for enabling advances in animal breeding.

Key words: Claudin-16, Sexing, Preimplantation genetic diagnosis, Cattle, Embryo

(J. Reprod. Dev. 50: 613–618, 2004)

The combined use of embryo transfer and molecular genetics has greatly improved the efficiency of animal reproduction and breeding. Analyses based on DNA amplification, for example, of nucleotide sequences specific to the sex chromosome are precise and efficient procedures for sexing of preimplantation embryos and have been commonly utilized in commercial embryo production [1–4]. Development of analytical procedures that are sensitive and specific for the detection in embryos of genetic mutations leading

to inherited disorders [5–8], or of quantitative trait loci for milk and meat production [9–13], will provide advantages for preventing the transmission of genetic disorders and for marker-assisted selection of animals for breeding.

Renal tubular dysplasia associated with chronic interstitial nephritis and diffuse zonal fibrosis is a genetic disorder in Japanese black cattle [14, 15]. This autosomal recessive disorder is characterized by atrophic renal tubes and extensive interstitial fibrosis with inflammatory cell infiltration, and leads to death of calves prior to puberty, usually within the first 6 months of life. Recently, a 37-kb deletion mutation encompassing the first four

Accepted for publication: July 27, 2004

Correspondence: H. Hirayama, (e-mail: h.hirayama@agri.pref.hokkaidu.jp)

exons (Type-1 mutation) and another 56-kb deletion mutation encompassing exons 1–5 (Type-2 mutation) of the *claudin 16/paracellin-1* (*CL-16/PCLN-1*) gene were identified as causative mutations for the disorder, and determination of the *CL-16* genotype based on PCR has been reported [6, 7]. These PCR procedures have been utilized for *CL-16* genotyping of blood sample from calves and adult animals, but analysis of very small amounts of DNA, for example, samples from preimplantation embryos, has not been reported. Determination of the *CL-16* genotype in embryos makes it possible to select animals free from *CL-16* deficiency and to maintain carrier animals as a genetic resource for the improvement of cattle.

In this study, we established an effective procedure for detecting *CL-16* wild-type and type-1 mutant alleles in bovine preimplantation embryos. Furthermore, we attempted to diagnose two characters (*CL-16* deficiency and sex) in embryos, and to demonstrate the availability of the procedure by embryo transfer.

Materials and Methods

Embryo production

Japanese black cattle were superovulated by administering FSH (20 IU/cow, Antorin[®]R•10, Denka Pharmaceutical Co., Ltd., Kanagawa, Japan) twice daily in decreasing doses over 3 days. PGF2 α (cloprostenol 0.5 mg/cow, Resipron[®]-C, Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd., Tokyo, Japan) was injected on the third day of superovulation. The cows were inseminated 24 h after the onset of estrus, and their uteri were flushed at 6–7 day after artificial insemination. Cows homozygous for the wild-type allele (Experiment 1) and heterozygous for the type-1 mutant allele (Experiment 2) of the *CL 16* gene were inseminated with sperm derived from a heterozygous carrier of the *CL-16* type-1 mutant allele.

Detection of *CL-16* alleles by multiplex-PCR

Multiplex-PCR was performed using a Multiplex PCR Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The sequences of wild-type specific primers were CLNF; 5'-TGGGAGGAAGTGCACCTATGA-3' and CLNR; 5'-ATGAGCCTACTCTGCCCCACT-3' (PCR product; 338 bp). The sequences of type-1 mutation

specific primers were CLMF; 5'-GCAGGAGAGTTTGAGCTTGTTAGT-3' and CLMR; 5'-CCCCACCCCCACICTATAC-3' (PCR product; 84 bp). The PCR mixture (total volume of 20 μ l) contained 2 μ l of 5 \times Q-solution, 0.3 μ M CLNF and CLNR, 1 μ M CLMF and CLMR and the template. The reaction conditions consisted of initial denaturing at 95 C for 15 min followed by 45 cycles of 97 C for 30 sec, 56 C for 90 sec and 72 C for 30 sec. The final extension step was followed by 10 min of incubation at 72 C.

Sexing of embryos

Sexing of embryos was performed as previously described [16]. PCR was performed using a HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol. DNA was amplified in a 20 μ l reaction mixture containing 0.75 μ M primers and the template. The sequences of the primers were S4b1; 5'-CAACTCCTGCAGAGGATGTGGAG-3' and S4b2; 5'-GAGTGAGATTCTGGATCATAATGGCTAC-3'. The reaction conditions consisted of initial denaturing at 95 C for 15 min followed by 15 cycles of 97 C for 8 sec, 50 C for 25 sec and 72 C for 15 sec, and 30 cycles of shuttle PCR at 98 C for 8 sec and at 66 C for 20 sec. The final extension step was followed by 5 min of incubation at 72 C. A PCR product common to males and females (145 bp) was amplified in the reaction. Furthermore, an additional male-specific PCR product (178 bp) was amplified in the same reaction only when male DNA was used as the template.

Experiment 1: Sensitivity and accuracy of *CL 16* genotyping

Bovine genomic DNA was extracted using QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) from peripheral blood leukocytes obtained from a cow that had been determined to be a heterozygote for the *CL-16* type-1 mutant allele by a previously reported method [6]. Amplification of the DNA by the multiplex-PCR was carried out at various concentrations of genomic DNA (1–50 pg per reaction) to estimate the sensitivity of detection of wild-type and type-1 mutant alleles of the *CL-16* gene. Electrophoresis was performed in a 6% polyacrylamide gel.

In vivo derived embryos were biopsied by cutting or microaspiration using a micromanipulator. Ten to twenty percent of the trophoblast of blastocysts

and 2–12 cells (mean \pm SD; 7 ± 2 cells) of the morulae were removed by cutting and microaspiration, respectively. Biopsied cells (E-S) and the rest of the cells in corresponding embryos (E-L) were lysed for 10 min at 37 C in 5 μ l of 0.1 mg/ml proteinase K (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) and 0.5% Tween 20 (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) (PK-TW method). Proteinase K was then deactivated for 10 min at 99 C. The *CL-16* genotypes of E-S and E-L were determined by the multiplex-PCR.

Experiment 2: Determination of *CL-16* genotype and sex in preimplantation embryos

Ten to twenty percent of the trophoblast of *in vitro* derived blastocysts were biopsied by cutting. Biopsied cells were lysed in 5 μ l of extraction solution by the PK-TW method, and were then subjected to determination of *CL-16* genotype and sex. Aliquots, 4 and 1 μ l, of the DNA solutions were used as templates for *CL-16* genotyping and sexing, respectively. Electrophoresis was performed in 3% agarose gel.

Manipulated embryos were maintained for 5 h in IVD-101 medium (Research Institute for the Functional Peptides, Yamagata, Japan) at 39 C under 5% CO₂. Five manipulated embryos that had been judged as homozygous for the *CL-16* type-1 mutant allele were transferred into five recipient cows at 7–9 day after estrus. Pregnancy diagnosis was performed using ultrasound at 45 or 46 day after estrus. A pregnant cow was slaughtered by intravenous injection of an overdose of sodium pentobarbital at day 100, and the fetus was obtained from the uterus. The slaughter procedure was approved by the Animal Care Committee of Hokkaido Animal Research Center. The genomic DNA of leukocytes, liver and skin of the fetus was extracted using QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), and genotyping of *CL-16* and sexing were performed by the above-mentioned procedures.

Statistical analysis

The statistical significance of differences between values obtained using different biopsy methods or *CL-16* genotypes were evaluated by the Chi-square test.

Results

Experiment 1: Sensitivity and accuracy of *CL-16* genotyping

When multiplex-PCR was performed using genomic DNA heterozygous for the type-1 mutation as the template, both the wild-type and mutant alleles were detected. The minimal amount of DNA template required for visualization of amplified products appeared to be 5 μ g in a single reaction (Fig. 1).

As shown in Table 1, all PCR amplifications produced detectable amplification products when genomic DNA from biopsied cells (E-S) was used as the template except that no amplification was observed in one of the samples from cells biopsied by cutting. Genotypes of *CL-16* alleles determined for E-S cells were consistent with those identified in the rest, i.e., the vast majority, of cells of corresponding embryos (E-L), although one of the samples that was demonstrated to be heterozygous for *CL-16* mutation by analysis of the relevant E-L was misjudged as homozygous by analysis of the E-S cells. Thus, both the efficiency of DNA amplification and accuracy of genotype identification based on the coincidence of the results obtained with E-S and E-L cells were estimated to be about 97%. There was no significant difference in these values for cells prepared by different biopsy procedures, and for cells with distinct *CL-16* genotypes.

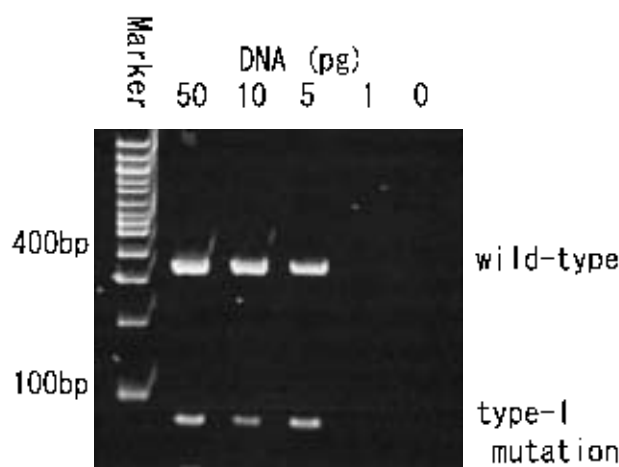


Fig. 1. Sensitivity of detection of *CL-16* alleles by multiplex-PCR. Wild-type and type-1 mutant alleles were amplified from as little as 5 μ g of heterozygous genomic DNA. Electrophoresis was performed in a 6% polyacrylamide gel. Marker, 100bp DNA ladder.

Table 1. Accuracy of *CL-16* genotyping in bovine embryos

Biopsy method	E-L		E-S	
	<i>CL-16</i> genotype	No. of embryos	No. (%) with <i>CL-16</i> genotype identified	No. (%) of coincidence with E-L
Cutting	wild/wild	9	8 (88.9)	8 (100)
	wild/type-1	9	9 (100)	8 (88.9)
Aspiration	wild/wild	12	12 (100)	12 (100)
	wild/type-1	7	7 (100)	7 (100)
Total		37	36 (97.3)	35 (97.2)

E-L; biopsied morulae and blastocysts.

E-S; biopsied cells from morulae and blastocysts.

Table 2. Frequency and genotyping efficiency of two analyzed loci in bovine embryos

No. of embryos	Locus	Efficiency of genotyping (%)	Genetic variant	Frequency of genetic variant (%)
12	<i>CL-16</i>	11/12 (91.7)	wild/wild	2/11 (18.2)
			wild/type-1	4/11 (36.4)
			type-1/type-1	5/11 (45.5)
	Sex	10/12 (83.3)	male	5/10 (50.0)
			female	5/10 (50.0)

Experiment 2: Determination of *CL-16* genotype and sex in preimplantation embryos

As shown in Table 2, the genotyping of *CL-16* was successful in 11/12 (91.7%) embryos, among which 2 embryos (18.2%) were determined to have wild/wild alleles, 4 embryos (36.4%) were determined to have wild/type-1 mutant alleles and the rest (45.5%) was determined to have type-1 mutant/type-1 mutant alleles. Sexing was also successful in embryos at the rate of 10/12 (83.3%). In 9 out of a total of 12 embryos examined, both *CL-16* genotype and sex were accurately determined (Fig. 2).

Five embryos (one male, three females, and one sex-unidentified) homozygous for the *CL-16* type-1 mutation were transferred into the uteri of recipients, and one of the recipients was diagnosed as pregnant by ultrasound at day 46. PCR analysis of DNA extracted from leukocytes, liver, and skin of the 100-day fetus demonstrated that the fetus was homozygous for the *CL-16* type-1 mutant allele and male, as predicted (Fig. 2).

Discussion

The procedure using multiplex-PCR in the present study showed high sensitivity and accuracy for the determination of *CL-16* genotype. First, genotyping of the wild-type and type-1 mutant alleles of the *CL-16* gene was achieved in a single reaction using a small amount of DNA as the template. The *CL-16* genotype in biopsied embryo samples was precisely determined using this procedure. Although separation of DNA samples into two parts for PCR tests reduces the quantity of template, multiplex-PCR makes improvement of the sensitivity possible by using all templates in a single reaction. In addition, this method of examination gave accurate results for genotyping regardless of the procedure used for biopsy, i.e., cutting versus microaspiration. Cutting of the trophoblast using a microblade is convenient and allows many embryos to be processed in a short time [3]. Biopsy by microaspiration is a suitable technique for obtaining a small number of cells from embryos at stages earlier than the morula, and is useful for reducing the damage caused by the embryo biopsy procedure [1].

To date, several distinct methods have been

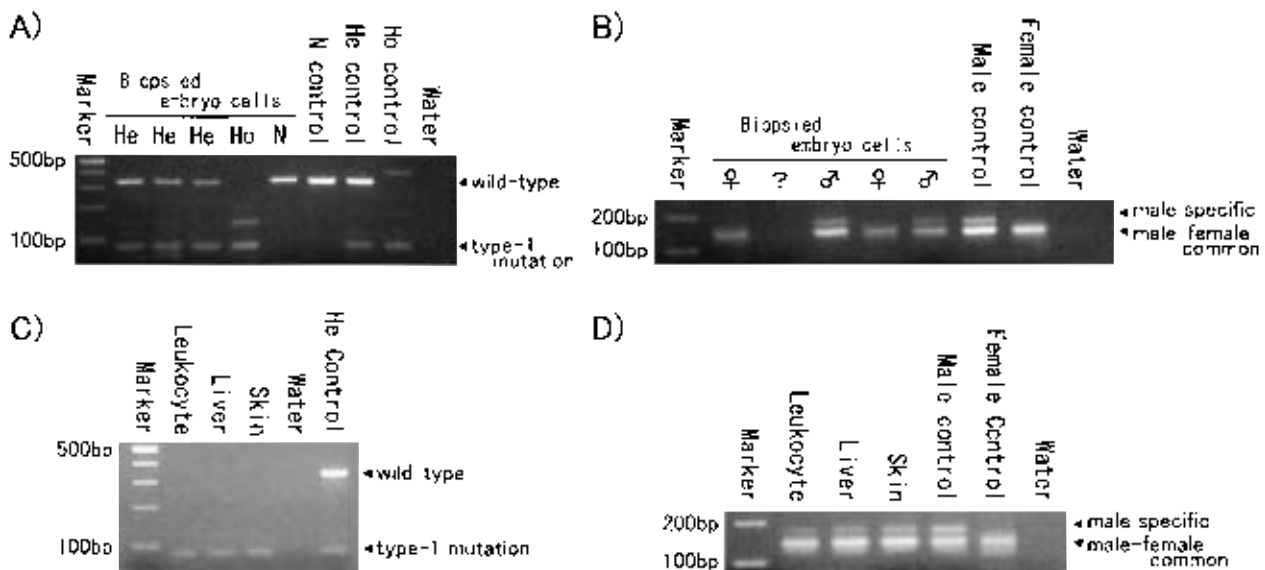


Fig. 2. *CL-16* genotyping and sex determination of embryos and a fetus produced from a genetically diagnosed embryo. A) Representative data of *CL-16* genotyping of biopsied embryo cells. B) Representative data of sex determination of biopsied embryo cells. C) *CL-16* genotyping of DNA extracted from leukocytes, liver and skin of a 100-day fetus. All samples were identified as homozygous for the type-1 mutant allele, as predicted from the analysis of the embryo. D) Sex determination of DNA extracted from leukocytes, liver and skin of a 100-day fetus. All samples were identified as male, as predicted from the analysis of the embryo. He: heterozygous for type-1 mutant allele. He: homozygous for type-1 mutant allele. N: homozygous for wild-type allele. Marker: 100 bp DNA ladder. Electrophoresis was performed in 3% agarose gel.

employed to increase the sensitivity of PCR detection using embryo specimens. Preliminary amplification of a small number of copies of a genome is an effective method for obtaining the material for several types of genetic analyses. Primer extension preamplification (PEP)-PCR for amplification of the whole genome from a small number of cells using random oligonucleotides has been used to determine the genotypes in preimplantation embryos [17, 18]. Nested-PCR is also a suitable method for the detection of trace amounts of DNA from preimplantation embryos [19]. However, these methods have the risk of generating false positives because of DNA contamination during the handling of PCR products in duplicate PCR procedures. Moreover, the application of PEP to samples from a small number of cells is hampered by uncertainties, and amplification artifacts are likely to occur frequently. The multiplex-PCR used in the present study has the additional advantage of eliminating artificial contamination and inadequate amplification in the reaction. The current protocol takes only 5 hours for completion after biopsy. Furthermore, we also

performed sex determination using aliquots of the DNA samples. These results indicate that our procedures are useful for rapid and accurate determination of the *CL-16* genotype and sex of preimplantation embryos without preliminary amplification.

The generation of a male fetus homozygous for *CL-16* deficiency, which had been predicted from the analysis of the embryo prior to embryo transfer, demonstrated the accuracy of the procedures. No obvious morphological abnormality or defect was observed in the fetus (data not shown). Detailed analysis of the fetus will be performed in order to investigate the mechanism of incidence of renal tubular dysplasia in the future.

If high-performance bulls have some mutation(s) causing inherited disorders, it substantially influences the diffusion of the disorders. The selection of carrier animals leads to economic losses and the loss of genetic resources. In our cattle herd, the examinations performed so far indicate that the type-1 mutation is present in the major population of carriers, and the frequency of the type-2 mutation is very low (data not shown). Therefore,

our procedure to detect the type-1 mutation will be useful for eliminating the spread of CL-16 deficiency. Furthermore, it will also be useful for maintaining genetic resources and variations of carrier animals without incidence of the disease.

In conclusion, we established the procedure to determine the CL-16 genotype and sex in bovine preimplantation embryos. This procedure can be used for the prevention of genetically caused CL-16 deficiency and the promotion of animal breeding.

References

1. **Thibier M, Nibart M.** The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 1995; 43: 71–80.
2. **Shea BF.** Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six year retrospective study. *Theriogenology* 1999; 51: 841–854.
3. **Hasler JF, Cardey E, Stokes JE, Bredbacka P.** Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment. *Theriogenology* 2002; 58: 1457–1469.
4. **Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Takahashi Y, Katagiri S, Toen K, Watanabe K, Notomi T, Yamashina H, Matsuzaki S, Minamihashi A.** Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology* 2004; 62: 887–896.
5. **Nagahata H, Miura T, Tagaki K, Ohtake M, Noda H, Yasuda T, Nioka K.** Prevalence and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian cattle in Japan. *J Vet Med Sci* 1997; 59: 233–238.
6. **Hirano T, Kobayashi N, Itoh T, Takasuga A, Nakamaru T, Hirotsune S, Sugimoto Y.** Null mutation of PCLN-1/Claudin-16 results in bovine chronic interstitial nephritis. *Genome Res* 2000; 10: 659–663.
7. **Hirano T, Hirotsune S, Sasaki S, Kikuchi T, Sugimoto Y.** A new deletion mutation in bovine Claudin-16 (CL-16) deficiency and diagnosis. *Anim Genet* 2002; 33: 118–122.
8. **Nagahata H, Oota H, Nitani A, Oikawa S, Higuchi H, Nakade T, Kurosawa T, Morita M, Ogawa H.** Complex vertebral malformation in a stillborn Holstein calf in Japan. *J Vet Med Sci* 2002; 64: 1107–1112.
9. **Georges M, Nielsen D, Mackinnon M, Mishra A, Okimoto R, Pasquino AT, Sargeant LS, Sorensen A, Steele MR, Zhao X, Womack JE, Hoeschele I.** Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* 1995; 139: 907–920.
10. **Velkala RJ, Vilkki HJ, Elo KT, de Koning DJ, Maki-Tanila AV.** A search for quantitative trait loci for milk production traits on chromosome 6 in Finnish Ayrshire cattle. *Anim Genet* 1999; 30: 136–143.
11. **Riquet J, Coppieters W, Cambisano N, Arranz JJ, Berzi P, Davis SK, Crisart B, Farnir F, Karim L, Mni M, Simon P, Taylor JF, Vanmanshoven P, Wagenaar D, Womack JE, Georges M.** Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: application to milk production in dairy cattle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9252–9257.
12. **Casas E, Shackelford SD, Keele JW, Koohmaraie M, Smith TPL, Stone RT.** Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *J Anim Sci* 2003; 81: 2976–2983.
13. **Kim JJ, Farnir F, Savell J, Taylor JF.** Detection of quantitative trait loci for growth and beef carcass fatness traits in a cross between *Bos taurus* (Angus) and *Bos indicus* (Brahman) cattle. *J Anim Sci* 2003; 81: 1933–1942.
14. **Kobayashi N, Hirano T, Maruyama S, Matsuno H, Mukoujima K, Morimoto H, Noike H, Tomimatsu H, Hara K, Itoh T, Imakawa K, Nakayama H, Nakamaru T, Sugimoto Y.** Genetic mapping of a locus associated with bovine chronic interstitial nephritis to chromosome 1. *Anim Genet* 2000; 31: 91–95.
15. **Michimae Y, Morita T, Sawada M, Shimada A, Akashi S, Sato K, Hikasa Y.** A Japanese black calf with claudin-16 deficiency associated with marked loss of the renal tubular epithelium. *J Jpn Vet Med Assoc* 2005; 56: 798–800 (In Japanese).
16. **Kageyama S, Yoshida I, Kawakura K, Chikuni K.** A novel repeated sequence located on the bovine Y chromosome: its application to rapid and precise embryo sexing by PCR. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 509–514.
17. **Garcia JF.** Practical considerations of embryo manipulation: preimplantation genetic typing. *Theriogenology* 2001; 56: 1393–1399.
18. **Chrenek P, Boulanger L, Heyman Y, Uhrin P, Laurincik J, Bulla J, Renard JP.** Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogenology* 2001; 55: 1071–1081.
19. **Apparao KBC, Totey SM.** Cloning and sequencing of buffalo male-specific repetitive DNA: sexing of in-vitro developed buffalo embryos using multiplex and nested polymerase chain reaction. *Theriogenology* 1999; 51: 785–797.

腎不全牛における過長蹄の発現と血清ビタミンA およびレチノール結合蛋白質の動態

渡辺大作¹ 阿部省吾² 植松正巳³ 阿部 榮⁴
遠藤祥子¹ 後藤浩人¹ 小林隆之¹ 藤倉尚士¹
小形芳美¹ 伴 顕⁵ 平野 貴⁵ 杉本志憲⁵
斎藤博水⁵

¹ NOSAI山形家畜診療研修所、² NOSAI山形中央家畜診療所、³ NOSAI山形庄内家畜診療所、
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

Serum Vitamin A and RBP Changes and Occurrence of Long Hooves in Cattle with Renal Failure

D. Watanabe¹, S. Abe², M. Uematsu³, S. Abe⁴, S. Endo¹, H. Gotou¹,
T. Kobayashi¹, T. Fujikura¹, Y. Ogata¹, A. Ban⁵, T. Hirano⁵,
Y. Sugimoto⁵, H. Saito⁵

¹ NOSAI Yamagata Veterinary Training Center, ² NOSAI Yamagata
Central Veterinary Clinic Center, ³ NOSAI Yamagata Shounai Veterinary
Clinic Center, ⁴ NOSAI Yamagata Okitama Veterinary Clinic Center,
⁵ Japan Livestock Technology Association

要 約 クロロゲン-16 (CL-16) 欠損症19頭およびそれ以外の腎不全黒毛和種牛2頭におけるビタミンA (VA) とレチノール結合蛋白質 (RBP) の動態および過長蹄の発現について調査した。CL-16欠損症では、1-6ヶ月齢の子牛3頭を除き84%で過長蹄がみられた。CL-16欠損症を過長蹄群と正常蹄群にわけて正常黒毛和種子牛群36頭と比較したところ、過長蹄群ではRBP、VA、尿素窒素 (UN) およびクレアチニン (Cre) の有意な増加がみられ、正常蹄群ではVAのみ有意な増加がみられた。RBPはVA、UN、およびCreと有意な正の相関を示し、VAはVA添加飼料が給与される5-13ヶ月齢で著しい高値を示した。腎不全牛2頭 (腎盂腎炎、腎低形成症) でも過長蹄がみられ、VAおよびRBPは高値を示した。CL-16欠損症で正常蹄の牛は、若齢または軽度の腎障害であったことから、過長蹄はCL-16欠損症に特異な症状ではなく、重度の腎機能障害の持続により発現すると考えられた。

キーワード クロロゲン-16、過長蹄、RBP、腎不全、ビタミンA

DOI: 10.2501/JVS-27-2-641-45, 2004

Received 20 May 2004 / Accepted 2 August 2004

*Correspondence to: D.Watanabe, NOSAI Yamagata Veterinary Training Center, Kitagawara, 286-1, Yamagata, 990-2171, Japan. ☎990-2171. 山形大学工学部畜産学系原286-1.

ABSTRACT Nineteen claudin-16 (CL-16) deficient Japanese Black cattle, as well as two Japanese Black cattle with renal failure due to other causes, were studied with regards to the dynamics of vitamin A (VA) and retinol binding protein (RBP) and the development of long hooves. All of the CL-16 deficient cattle, except for three calves that were between one and six months of age, had long hooves (81%). The CL-16 deficient cattle were divided into normal and long-hoof groups, each of which was then compared to a group of 36 normal Japanese Black calves. The CL-16 deficient, long hoof group showed a significant increase in RBP, VA, urea nitrogen (UN), and creatinine (Cre) levels, while the CL-16 deficient, normal hoof group showed a significant increase in VA levels only. The RBP levels significantly and positively correlated with VA, UN, and Cre levels. VA levels were markedly high in calves of ages between five and thirteen months, during which the calves received feed containing VA. The non-CL-16 deficient cattle (with pyelonephritis and renal hypoplasia, respectively) also had long hooves as well as high VA and RBP levels. Based on the fact that the CL-16 deficient, normal hoof cattle were either young or affected with mild nephropathy, it was considered that the development of long hooves was not a CL-16 deficiency specific symptom, but rather attributable to persistent, severe renal dysfunction.

Key Words : Claudin-16, long hooves, RBP, renal failure, vitamin A

Jpn. J. Vet. Clinics 27 : 103-115, 2003

1. はじめに

牛クラウジン-16 (CL-16) 欠損症は、遺伝的には発育不全、尿毒症を、また病態学的には腎臓細管畸形、尿管上皮細胞の変性、糸球体数減少などを特徴とする遺伝性腎疾患である〔7、8〕。著者らはCL-16欠損症牛において、血清ビタミンA (VA) およびレチノール結合蛋白質 (RBP) の増加することを報告した〔1〕。また、CL-16欠損症では高い頻度で過長蹄がみられることが知られている〔7、8〕。しかし、過長蹄の原因がそれかCL-16欠損症に特有の症状なのかは不明である。このため、この研究ではCL-16欠損症を含む腎不全牛における過長蹄の発現および血清VAとRBPの動態を調査した。

2. 材料および方法

CL-16欠損症と、別な原因で腎臓病をきたした黒毛和種20ヶ月齢のオス種牛1頭および12ヶ月齢の正常な黒毛和種種牛16頭について発育状態および過長蹄の有無を調べ、過長蹄はI群、正常蹄はII群とした。また、過長蹄を認めずCL-16欠損症以外の腎不全牛2頭についても調査した。腎不全牛のうち、症例1は黒毛和種20ヶ月齢のオス種牛で、食慾不振と過長蹄があり、剖検で腎萎縮と診断された。症例2は浅水渡系の近親交配で生誕された黒毛和種2ヶ月齢の雄牛で、発育不良と下頰腫小および過長蹄を認め、剖検では腎臓の低形成が、組織所見では腎単位の減少、髓質

領域の減少位がみられた。腎不全牛2頭のCL-16欠損症の遺伝子型はともに正常ホモであった。

血液は抗凝剤よりヘリン真空採血管を用いて採血し、分離した血清を用いて、尿素窒素 (UN) はウレアアゼGLDH法、クレアチニン (Cre) は酵素法により自動分析装置 (オリンパスAU600) を用いて測定した。また、血清VAとしてレチノールを高速液相クロマトグラフィー (HPLC) 法で、RBPは一光放射免疫測定法 (牛レチノール結合蛋白SRID定量測定キット) を用いて中央研究所 (東京) を用いて測定した。CL-16欠損症の診断は凍結保存したヘパリン抗凝固管を用いて平野らの方法〔4〕により遺伝子診断した。血清の糖の測定は1検定を用いて行った。

3. 成 績

① 過長蹄の発現頻度と月齢

CL-16欠損症では、1-6ヶ月齢未満の3頭中1頭で発育不良を見たが過長蹄は認められなかった。6ヶ月齢以降16頭で根拠元はあるものを含めて過長蹄 (図1) を認め、全体では19頭中16頭 (84%) で観察した。初診時の月齢は、過長蹄の1群では7-15ヶ月齢で平均13.9ヶ月齢、正常蹄のII群では1-6ヶ月齢、平均3.7ヶ月齢で、1群はII群よりも有意に月齢が高かった。表1に過長蹄の程度は月齢が進んだものにおいてより顕著に見られた。また、19頭中17頭 (89%) で発育不良が見られた。

表1 CL-16欠損症（I群・II群）と正常子牛群の血清VA、RBP、UNおよびCreの平均と標準偏差値

	頭数	月齢	VA IU/dl	RBP μg/ml	UN mg/dl	Cre ng/dl
CL-16欠損症I群 (最小-最大値)	16	18.9±15.4 ^a (7-66)	333±241 ^a (16-748)	112±44 ^a (58-241)	83.8±23.5 ^a (51.1-121.0)	1.8±2.2 ^a (0.3-9.5)
CL-16欠損症II群 (最小-最大値)	3	3.7±2.5 ^b (1-6)	156±57 ^b (113-221)	98±37 ^b (59-128)	68.5±61.4 ^b (10.8-133.0)	1.7±4.3 ^b (1.2-9.5)
正常子牛群 (最小-最大値)	36	7.1±3.7 ^c (3-12)	126±44 ^c (32-224)	51±10 ^c (35-66)	10.8±3.2 ^c (3.2-17.9)	0.9±0.1 ^c (0.7-1.1)

CL-16欠損症I群：過長蹄症、CL-16欠損症II群：正常蹄症
VA：ビタミンA、RBP：レチノール結合蛋白質、UN：尿素窒素、Cre：クレアチニン
異なる文字間で有意差あり：a-b：p<0.05、a-c：p<0.01



図1 a：CL-16欠損症にみられた過長蹄、前肢突張り歩行困難、25ヶ月齢牝。
b：前肢の拡大、UN62mg/dl、Cre 8.5ng/dl、VA 163IU/dl、RBP 124 μg/ml、Ca5.8mg/dl、iP16.2ng/dl

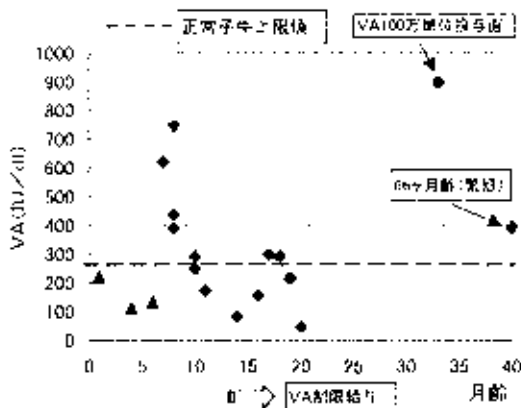


図2 CL-16欠損症の月齢と血清VA値
▲はCL-16欠損症の正常蹄牛

2. 血液検査成績

血清VAは正常子牛群と比較しI、II群で有意に増加し、血清RBPはI群で有意な増加を示した。また血清VAおよびRBPは、I群がII群より有意に高値であった。血清UNおよびCreはI群で正常子牛群と比較して有意

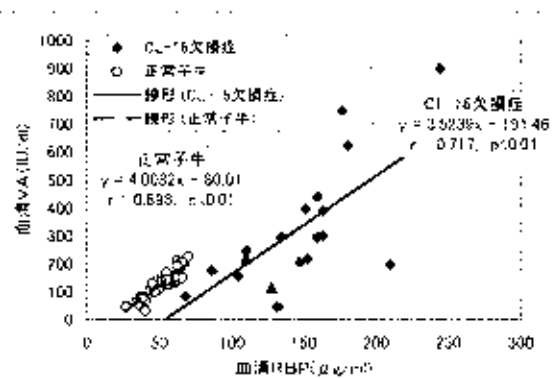


図3 CL-16欠損症と正常子牛の血清VAとRBPの散布図
正常子牛36頭、CL-16欠損症19頭
▲はCL-16欠損症の正常蹄牛

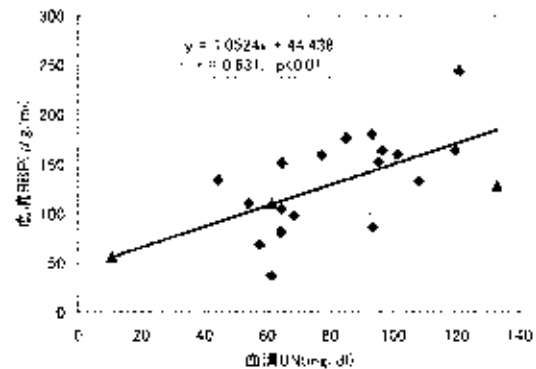


図4 CL-16欠損症における血清UNとRBPの散布図
▲はCL-16欠損症の正常蹄牛

に増加したが、I群は1頭が正常値の範囲内にあり、増加傾向は見られたが有意ではなかった（表1）。

採血時の月齢で見ると、血清VAの高値は5ヶ月齢から13ヶ月齢のVA添加飼料給与時期で顕著であった。また、肥育後期にVA剤を投与された非産生や繁殖牛でも著しい高値を示した。一方、飼料中のVAが制限される14ヶ月齢以降は100IU/dlを下回る症例も見られたが、V

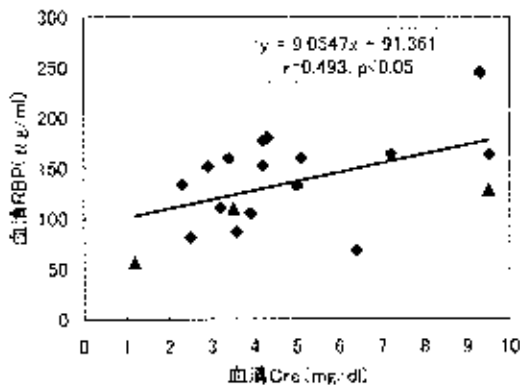


図5 CL-16欠損症における血清CreとRBPの散布図
▲はCL-16欠損症の正常例牛



図6 腎低形成症にみられた過長蹄。症例2；2ヶ月齢、雄、体重30kg、茂系波一平茂勝一紋次郎一茂重波下顎短小を伴う。

A号実母牛にもかかわらず200IU/mlを越える例も3頭あり、全体的に高値であった(図2)。

正常子牛とCL-16欠損症における血清VAとRBPの間それぞれ有意な正の相関($r=0.898$, $r=0.717$)が見られた(図3)。CL-16欠損症では、血清UNとRBP(図1)、血清CreとRBP(図5)の間にもそれぞれ有意な正の相関($r=0.631$, $r=0.493$)が見られた。一方、血清VAとUNおよび血清VAとCreとの間には有意な相関は見られなかった。

④ 腎不全牛の血液検査所見

CL-16欠損症以外の腎不全2頭(腎盂腎炎、腎低形成症)でも過長蹄が見られた(図6、7)。この2頭は血清UNおよびCreが著準しており、腎盂腎炎の事例1は20ヶ月齢の肥育牛で半年以上VA制限飼育されていたにもかかわらず血清VA値は131IU/dlと高く、また腎低形成症の症例2は生後2ヶ月齢で血清VAは235IU/dl、RBP117 μ g/mlと高値であった(表2)。



図7 腎低形成症；症例2。左右腎臓の低形成。長径5cm、短径3cm。皮質・髄質は境界不明瞭で髄質領域狭小化。

4. 考 察

生体におけるVAの運搬にはRBPが深く関与している。経口で取り込まれたVAは小腸において加水分解・吸収され、肝臓に送られ脂肪肝臓細胞(伊東細胞)に蓄えられる。肝臓からはRBPがトランスサイリニン(TTR)と1:1のモル比で結合し複合体を形成してVAを標的臓器まで輸送する。VAを渡した後RBPはapo-RBPという分子量20,000前後の小さな蛋白質となり、腎糸球体から濾過され、そのほとんどは尿細管から再吸収され尿細管上皮細胞において異化除去される[16]。遊離型RBPのほとんどの生物学的半減期は正常者で3.5時間、腎不全患者で36時間とされ[16]。慢性腎疾患で血清RBPおよびVA値が上昇することが知られている[13]。

牛CL-16欠損症においても血清VAおよびRBP値が高値を示すことが報告されており[11]、今回の剖検でも正常子牛群と比較して有意な増加を認めた。前述のように、RBPは糸球体から濾過され、腎尿管管で再吸収と異化を受けるが、CL-16欠損症では尿細管の低形成および尿細管上皮細胞の増殖・脱離が早期から見られ、また月齢の進行に伴い腎糸球体数の減少が見られる[2、8、9]。このことから、CL-16欠損症ではRBP濾過量の減少および異化の減退などのため血清RBPが増加したと考えられ、腎低形成症についても同様の機序が考えられた。

また、血清RBPは腎機能障害の程度に相関して増加したか、血清VAは相関しなかった。著者らはCL-16欠損症牛に根拠料中心の低蛋白飼料を給与する大血清UNの増加が軽度もしくは減少することを見ているが、血清VAについてもVAが制限給与されたことにより、腎機能障害に相関した増加を示さなかったと考えられた。

表2 腎不全2頭の血清VA、RBP、UNおよびCre値

	頭数	性	月齢	VA IU/dL	RBP μg/ml	UN mg/dl	Cre mg/dl
病例1(腎臓腎炎)	1	公勢	20	131	NT	131	15.8
病例2(腎臓形成症)	1	牝	2	205	117	92	7.1

NT:未検査

CL-16欠損症では過長蹄が多く見られ、東北地方の調査では殆どみられたと報告されている〔9〕。今回は比較的月齢の高い牛が多かったためか、81%と高率に過長蹄が見られた。CL-16欠損症で過長蹄が見られるかわかったのは、月齢が若い腎臓炎の異変が比較的軽いためであった。一方、CL-16欠損症以外の腎不全でも過長蹄がみられた。血清VA、RBPおよびUNの高値が観察された。このうち、先天性異常と思われる腎臓形成症では、生後2ヶ月齢と若齢にも関わらず過長蹄が見られたが、これはCL-16欠損症と異なり出生時から重度の腎不全を抱えていたためと考えられた。

CL-16欠損症で見られる過長蹄の病理学的所見について、北川らは角質層の伸長のほか組織学的異常を認めなかったと報告し、蹄基膜における角質形成がなんらかの原因により阻害されていることを示唆している〔北川、駒・佐々木英第:1998、獣医臨床遺伝研究会講演〕。

VA(レチノール)の代謝産物であるレチノイン酸は細胞の分化や発生、動物の正常な成長促進作用、皮膚病変形成など多くの作用が知られている。また、細胞外マトリックスや灌膜接着蛋白質であるⅡ型コラーゲン、グリコサミノグリカンやケラチンなどの合成にVAが促進的に作用することが知られている〔5〕。また、過長蹄を認めた症例全てで血清UNの増加が見られたことから、血清VAおよびUNの高値持続が蹄の伸長に関与する可能性が考えられたが、過長蹄の成因については今後さらに検討する必要がある。

調査を終えるにあたり、村田氏等に協力していただいたNOSAI山形、NOSAI秋田の獣医師の方々、貴重な世話をいただいた酪農学園大学 樋口交紀博士、岐阜大学 北川 均博士に心から感謝する。本研究の一部は「牛畜産技術協会 畜産先端技術確立普及促進事業委託研究費」により行われたものであることを記し添える。

引用文献

1. 岡部省吾, 植松正巳, 鎌谷智子, 渡辺大作, 斎藤博水, 河部 繁, 三沢 隆, 金野清之(2003). 一応放射免疫拡散法を用いた半レチノール結合蛋白質の測定と臨床応用. 家畜医学 50(5):355-363.
2. 藤森康一郎(2001). 黒毛和種牛におけるClaudin-16(CL-16)欠損症に関する病理学的研究. 岩手大学農学部獣医学科卒業論文.
3. Goodman DS.(1974). レチノール結合蛋白質及びビタミンA代謝の栄養学的展望. ビタミン 18(10):11:495-502.
4. 宇野 貴, 広常真治, 佐々木繁輝, 下坂美佐生, 菊池 正, 杉本喜彦(2001). CL-16欠損症の新たな変異の創発と遺伝子診断法. 日本畜産学会第98回大会講演要旨:81.
5. 市立京子(2004). ビタミンA欠乏と疾病. 家畜医学 51(1):5-17.
6. 武井幸敏(1980). ビタミンAの体内輸送とレチノール結合蛋白質. ビタミン学1(日本ビタミン学会編) pp. 33-62. 東京化学同人, 東京.
7. Ohba Y., Kitagawa H., Okura Y., Kitoh K. and Sasaki Y.(2001). Clinical features of renal tubular dysplasia a new hereditary disease in Japanese Black cattle. Vet. Rec. 149:115-118.
8. Sasaki Y., Kitagawa H., Kitoh H., Okura Y., Suzuki K., Mizukoshi Y., Ohba Y.,Masegi T. (2002). Pathological changes of renal tubular dysplasia in Japanese black cattle. Vet. Rec. 151:628-632.
9. 渡辺大作, 宇野 貴, 斎藤博博, 石川 弘, 渡辺昭夫, 川野辺 浩, 佐々木 三, 藤森康一郎, 三宅陽一, 岡田幸助, 大塚清通, 小黒雅史, 村田清市, 宇野 貴, 杉本喜彦, 岡部省吾, 斎藤博水(2003). 東北地方における半レチノール-16欠損症の遺伝学的調査と臨床病理学的特徴. 家畜医学誌 25:1-10.

2. 海外出張報告

2-1. Plant & Animal Genome XIII (第13回植物動物ゲノム学会) に参加して

溝 口 康

2005年1月15日から19日まで開催されたPlant & Animal Genome XIII (植物、動物のゲノムに関する国際学会大会) に初めて参加する機会を得た。この学会は、米国カリフォルニア州サンディエゴで毎年行われており、植物、動物のゲノム科学に携わる人々の研究発表、情報交換等の場となっている。プレナリーレクチャー9題、ワークショップ79のセクションがあり、ポスター発表888題であった。その中で家畜ゲノムに関する発表は、プレナリーレクチャー1題、ワークショップ10セクション、ポスター発表90題であった。ワークショップとポスター発表は、動物、植物、解析方法、解析ツールなどの様々なセクションに分かれており、最先端の技術を開発している企業の参加もあった。全体として、詳細な物理地図の作成とゲノムシーケンシング、マイクロアレイ等を用いた遺伝子発現プロファイリング、ポストゲノムとして注目されているプロテオミクスに関する発表が多く見られた。その中で家畜の分野において興味深かったトピックスについて紹介する。

プレナリーレクチャーでイヌゲノムに関して、フレッド・ハッチンソン癌研究センターのOstrander博士より発表があった。イヌは世界で最も歴史のある家畜種であり、現在はコンパニオン動物として広く愛用されている。現在までに、10,543個(遺伝子も含む)のマーカーを用いた9,000radのRH地図と比較ゲノム地図が構築されている。また、全ゲノムシーケンシングが進行しており全ゲノムの96%が終了している。イヌ85品種の遺伝的系統樹が96個のマイクロサテライトマーカーを用いて作成され、大きく4つのグループに分離することが明らかとなった。10,000個のSNP(一塩基多型)を用いたハプロタイプブロック解析により、連鎖不平衡は約2.5Mbであることが示された。ヒトの連鎖不平衡は約50kbであることから、その50倍の大きさであった。現在は、ガン、てんかん、股関節異形成等の遺伝病に関する原因遺伝子の同定や、身体の大きさや成長に関する様々な形質のQTL解析が精力的に行われている。家畜ゲノムにおいて、最も進んでいる研究のレクチャーを聴くことができ、大きな収穫であった。

ウシゲノムのワークショップの中で、米国が中心となって行っている国際プロジェクトの全ゲノムシーケンシングに関する進捗状況と今後の計画について、この分野の先駆者であるテキサスA&M大学のWomack博士より報告があった。2004年10月までに、全ゲノムに対して3倍量のシーケンシングが終了しており、最終的には、2005年7月までに7倍量のシーケンシングを完了する予定とのことだった。そのシーケンスはweb上に公開されており、その情報を利用することが可能である。もう一つのプロジェクトとして、6品種(ホルスタイン、ブラーマン、アングス、ノーマンレッド、リムジン、ジャージー)の全ゲノムを対象としたSNPの探索がある。このSNP情報を基にハプロタイプ地図を作成するのが目的である。このプロジェクトは、2005年1月より開始されたばかりであり、詳しい内容については述べられなかった。今後イヌゲノムで用いられたような手法により、ハプロタイプブロックを用いた連鎖不平衡の解析が高速度で進むように感じた。

ウシの経済形質に関するQTL解析について、いくつかのグループがワークショップとポスター

で発表していた。米国の農務省肉畜研究センター（USDA-MARC）のグループは、肉の柔らかさについてのQTL解析を行っている。現在までに候補遺伝子として29番染色体に存在するmu-カルパイン遺伝子（筋繊維タンパクを分解する酵素のひとつ）を同定し、アミノ酸置換をおこす2箇所のSNPとイントロン領域に存在する3つのSNPを見出している。今回、その中の2つのSNPが、*Bos taurus*集団と*Bos indicus*との交雑種の2つの集団を用いて、肉の柔らかさと相関があることを示した。それ以外に、ミルク生産性、抗病性、食物摂取におけるエネルギー効率に関するQTL解析や候補遺伝子多型の解析の報告があったが、そうした多型を機能的に証明している報告はなかった。

ブタゲノムのワークショップでは、米国・イリノイ大学のSchook博士より全ゲノムシーケンシングの前段階であるBAC フィンガープリント 地図の進捗状況について報告があった。現在、BAC末端配列が全ゲノムの10%に相当する約47万塩基解読されており、今後は全ゲノムシーケンシングに向け進んでいくと思われた。

ポスター発表では、家畜（ウシ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ、ウマ）においてはRH地図と比較ゲノム地図の作成に関するものが、魚類（アユ、ニジマス、タイ、フグ、スズキ等）においてはDNAマーカーの開発と連鎖地図の作成に関するものが多く報告されていた。経済形質や抗病性に関するQTL解析の発表もあったが、多くはまだマッピングの段階で責任遺伝子の同定までには到っていないようだ。

筆者はウシゲノムに携わる者であるが、今大会でイネゲノムやポプラゲノム等の普段関わることのない分野の研究者と議論することも出来、非常に有意義な5日間であった。

2-2. ウシゲノムプロジェクト国際ワークショップに参加して

渡 邊 敏 夫

近年、ヒトをはじめとする多くの高等動物における全ゲノム塩基配列解読プロジェクトがすでに完了、またはそのドラフトが発表になっている（ヒト、マウス、ラット、イヌ、ニワトリ等）。その他の動物種においても、ウシ、ブタなどのゲノム解読プロジェクトが進行中であり、ウシゲノムに関するBovine Genome Project International Workshop（ウシゲノムプロジェクト国際ワークショップ）が2005年3月29日から3日間、米国ヒューストンにおいて開催された。筆者はこれに参加したので、そこで報告されたことについて紹介する。

このワークショップはウシゲノムプロジェクトの進行について討論する場であり、同プロジェクトは米国国立健康研究所（NIH）、農務省のほか、オーストラリア、ニュージーランドの複数の国や企業の出資によるものである（同プロジェクトに対し当研究所は、新連鎖地図やRH地図の作製により、重要な貢献をしている）。

3月29日の夕食後、ベイラー医科大Weinstockがプロジェクト進行の概要を紹介した。工程としては（1）ショットガンシーケンシングによるデータの生成、（2）シーケンシングアセンブリ、（3）自動処理による遺伝子のアノテーション（注釈付け）（4）人手を介した遺伝子のアノテーションの4段階を経るとのことである。この発表の時点での進捗は、ウシゲノムの総延長を28億塩基とするとその6.2倍量である約174億塩基（重複を含む）の解読が完了しており、それらのアセンブリが進行中であった。各工程それぞれの終了時点でデータの公表が予定されており、2005年7月現在、上記のアセンブリは完成し、whole genome shotgun sequence 2nd

release として公開されている。解読された配列の総延長は約26億2千万塩基である。

30日のワークショップの一つめの討論は、「SNPs」というタイトルでおこなわれた。バイラー医科大ヒトゲノムシーケンシングセンターの Gibbs がプレゼンテーションをおこない、ヒトハップマップ (HapMap) プロジェクトの例について紹介をし、ウシHapMapプロジェクトの計画についても報告した。Gibbs はヒトゲノムシーケンシングプロジェクトの責任者の一人であり、また、米農務省肉畜研究センターの Kappes とともにこのワークショップのオーガナイザーにもなっている。

ヒトの多因子性の疾患など個々の遺伝的効果の小さい例について連鎖解析による遺伝子の特定は非常に困難である。一方、集団におけるマーカー・遺伝子座間の連鎖不平衡を利用した解析 (連鎖不平衡 (LD) マッピング) は、「歴史的な組み換え」を利用できるため通常の連鎖解析よりもさらなる原因領域の絞り込みが期待できる。ヒトHapMapプロジェクトは全ゲノムを網羅的かつ大量のSNPをLDマッピングのためのマーカーとして提供することができる。最終的には生活習慣病に代表されるいわゆるcommon disease (ありふれた疾病) に関与するSNPを発見し、その治療に役立てるのがプロジェクトの大きな目的である。

ウシゲノムプロジェクトについても、その解読が完了後は網羅的なSNP探索とハプロタイプ地図作製が予定されており、2004年1月の時点で方針決定がなされ公表された。すなわちウシHapMapプロジェクトである。プロジェクトの目的は複数の品種において網羅的にSNPを開発し各品種集団における頻度、ハプロタイプを調査する。この結果は多くの多型マーカーとハプロタイプ情報を提供し、経済形質等QTL解析に大いに役立つことが期待される。

アングス種、ホルスタイン種、リムジン種等、欧米で一般的な品種については既に検査対象となっており、これらの個体DNAを集めたものを「国際品種パネル」としている。検査頭数はヒトの例を参考に、一品種あたり最低45頭とされている。最終的には全ゲノムを網羅した2万個のSNPを開発し、これをすべての品種個体について検査する計画である。試算では45頭を一セットとした検査当たり、約4,500米ドル必要であるとされ、日本からの参加とサンプル提供も可能である。

次に「ウシ完全長cDNAシーケンシング」についてカナダ・アルバータ大のMooreと、ブリテイッシュ・コロンビア大 (BCGSC) のHoltがその概要と重要性について紹介した。完全長cDNAを得る目的としてファンクショナル (機能) ジェノミクスとしての利用価値とゲノムアノテーションの評価を大きな理由としてあげた。前者は、ゲノムが解読されただけではおのおのの配列が遺伝子としてどのような役割を持っているのか、予測は可能であるがすべてを知りうるわけではない。いつ、どの組織で、どのような転写単位が発現しているのか、すなわち発現プロファイルを構築するために完全長cDNAを利用しようというものである。後者の理由は、既存の遺伝子予測プログラムは既知のエクソンの75%しか正しく予測することができないことに加え、現実に存在する転写単位に正しく対応する遺伝子予測は50%に満たないという報告が根拠になっている。転写単位を明らかにする方法は完全長cDNAの解読によるほかないという考えである。その他、完全長cDNAはゲノムアセンブリの補助になるであろうし、SNPの探索にも貢献することが期待できる。現状は1,500余りの完全長cDNAの解読が完了しており、最終的に1万個を目標としている。シーケンシング作業は主にBCGSCが担当している。

英ロスリン研究所のWilliamsは「ゲノムのカバー率を高めるようなマップの改善」について議論した。ゲノムアセンブリには正確なゲノム地図が欠かせないが、彼らは多型マーカー連鎖地図、3種類のRH地図、フィンガープリンティングコンティグの統合を目指している。

ベルギー・リエージュ大のGeorgesは「GenomicsからBiologyへ」と題して、家畜等のQTL解析がこれまでどのようになされてきたかと、ゲノムプロジェクトの成果をQTLマッピングにどのように利用するかについて述べた。ゲノムプロジェクトが進行するに従って多型マーカーや転写単位等の情報が蓄積されることが予想されるので、それらをマッピングのツールとして有効に活用すべきであることを述べた。

ミシガン州立大 Coussensは「遺伝子機能の決定とモデル動物としてのウシの利用」について論じた。ウシ遺伝子について網羅的な発現解析、機能推定、プロテオミクス（遺伝子産物としてのタンパク質の網羅的解析）の努力が既におこなわれている。またヒトを含む他の動物における生物学的現象を研究するためのモデル動物としてウシを利用する可能性について紹介がされた。すなわち筋肉分化、繁殖性、代謝、脂肪蓄積、免疫応答、泌乳などの形質がウシを使っ

ての研究テーマになりうる。

ヒトゲノムシーケンシングプロジェクトのリーダーの一人として、米国立ヒトゲノム研究所のCollinsは、ゲノムプロジェクトの未来図を描いて見せた。ゲノム研究の成果を生物学的研究へ、医療へ、その他の社会貢献への可能性を論じた。

コールド・スプリング・ハーバー研究所のSteinはbioinformatics（生物情報工学）の側面からゲノムプロジェクトの成果についてそこからどのように情報を引き出し、どのように整理し関連づけるかについて論じた。単純な情報管理データベースから始まって、アノテーションデータベース、遺伝子機能データベース、他生物との関連データベースなど、データベースの種類は後者ほど高次の情報を扱うような階層構造になっている。さらにヒトゲノムやマウスゲノムのデータが現状どのように整理されているか、ウシに関してはどのようなデータベースの枠組みを使用すべきか（既存のものを使用するか、新規に開発するか）などが論じられた。全ゲノム配列が明らかになった後は、ウシ遺伝子転写単位の解明、遺伝子の機能解明、ヒトその他動物種の遺伝子との相同遺伝子の情報、他動物種における表現形質との関連情報等、膨大な量の情報を集積、更新、探索しなければならないことは必至で、bioinformaticsの手法はゲノムプロジェクトの成果の質を左右する。

ウシゲノムプロジェクトが完了して、DNA配列情報がすべて明らかになったからといって、遺伝子多型と経済形質との関係が明らかになる訳ではないが、これを機にウシゲノム解析が新たな段階に進むことは疑いない。例えば、全ゲノム配列決定後も多型マーカーによる遺伝解析の重要性は変わらないが、（現にヒトにおいてそうであるように）新規マイクロサテライトマーカー開発の労力はほとんどなくなる。塩基配列中に反復配列を検索しさえすれば、それが高い確率で多型マーカーとして使用できる。

QTL解析は複雑な高次の現象を説明する遺伝因子の探索であり、解析のための多くの労力や証明の困難さを伴う。リエージュ大Georgesはそのプレゼンテーションの中で、RutherfordらがNature Geneticsに載せた総説を引用して「量的形質の原因を明らかにすることは遺伝学にとって最後のフロンティアの一つである」と言った。今回のワークショップの副題は「The Next Phase」であり、ゲノムプロジェクトの成果はわれわれの目的の一つであるQTL解析に多くの情報、材料、そして道具立てを与えてくれるであろうことを実感するとともに、われわれの解析も新局面を迎えるであろうことを大いに期待させた。

動物遺伝研究所年報
第12号（平成16年度）

平成17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

