



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 13 号

(平成17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17年度における附属動物遺伝研究所の研究の概要などを中心に、研究所の諸活動についてとりまとめたものである。

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

また、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ものの、目的を達成するにはなお一層の精進が求められていることも明らかとなった。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、それらの遺伝子の内のどれが責任遺伝子なのかを決める段階に至ったことは確かそうに見える。しかしながら、責任遺伝子を同定することは、依然として挑戦的な課題であり続けている。ここを突破してこそ初めて生物学における未知の領域を切り開いたことになる。量的形質に関するメカニズムを分子レベルで解明し、飼養管理等の改善にまでもっていくには更なる努力が必要である。

今年度の特筆すべき成果は、全ゲノムを対象とする相関解析手法が有効なことを示したことである。今後、黒毛和種等で昔から問題になっていた繁殖性や脂肪壊死なども研究対象になり、育種に有用なDNA情報が得られるかもしれない。

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18年 3月

社団法人畜産技術協会

会長 山下 喜 弘

平成17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

1. 設立の経緯と沿革 1

第2節 平成17年度の動き

1. 研究推進の状況 3
 - 1) ウシゲノム解析用ツールの開発 3
 - 2) ウシ遺伝性疾病のDNA育種手法の開発 3
 - 3) 肉用牛経済形質のDNA育種手法の開発 5
 - 4) ウシ抗病性遺伝子座の解析 9
 - 5) 牛肉の品種鑑定技術の開発 10
 - 6) ウシ全ゲノムを対象とする相関解析手法による新たな経済形質の解析 13
2. 平成17年度研究発表 15
 - 1) 論文発表 15
 - 2) 学会発表 16
 - 3) 学会発表要旨 17
3. 委員会・会議等の開催 27
 - 1) 肉用牛ゲノム研究・開発委員会 27
 - 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 28
 - 4) 牛肉の品種鑑定技術検討委員会 29
 - 5) SNP利用検討会議 29
 - 6) 研究会等の開催 30

4. 委託研究	32
5. 研修員の受け入れ	33
6. 職員の普及活動等	34

第3節 研究の解説

「ウシゲノム解析用ツールの開発とゲノム解読の現状」	35
---------------------------	----

第4節 総務

1. 職員名簿	45
2. 職員の異動	45
3. 職員の海外出張	46
4. 施設・機器の整備	48
5. 購読雑誌一覧	48

第5節 資料

1. 論文再録	49
---------	----

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13年度から新たに、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」として進めていたが、平成17年度で終了した。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年度からスタートした「BSE生体診断技術緊急開発事業」は平成16年度で終了した。また、平成15年度から「牛肉の品種鑑定技術開発事業」がスタートし、平成17年度で終了した。この事業では、我が国の肉用牛として飼養されている黒毛和種、ホルスタイン種、黒毛和種とホルスタイン種間の交雑種の3者間をDNA情報で鑑別する技術を確立することに成功した。これまで実施してきた複数年に渉る事業は平成17年度末をもってすべて終了することとなり、平成18年度からは装いも新たにウシDNA育種に関する事業が始まる予定である。

職員は平成4年度管理部門2名、研究員2名の計4名から発足し、研究の進展・拡大とともに順次増員し、平成17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9名）となった。

第2節 平成17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) 国内および海外の状況

国際コンソーシアムによるウシ全ゲノム配列の解読の現状について（米国・サンディエゴ、2006年1月）

ウシゲノムプロジェクトは、PhaseIとPhaseIIから成り、PhaseIは、ウシゲノムの塩基配列決定からAnnotationまでを、PhaseIIは、SNP検索と各品種のHapMapの作成を目的としている。

PhaseIについては、2004年9月に、3x（ゲノムの3倍長に相当する長さ）のWGS（Whole Genome Shotgun：全ゲノムを対象にランダムに解読し、重なり合うものをつないだ配列）配列が公開され、ついで、2005年3月に、6xWGS配列が公開された。後者は、3.1Gbから成り、92%のESTと96%のBAC末端配列を含んでいる。現在用いられているゲノム塩基配列決定の手法は、WGSとBACskim（フィンガープリントで整列化したBACクローンを、単一、もしくは、プールして、読んだ配列）を組み合わせたもので、現在2xBACskim（全BACクローンの長さの2倍長に相当する長さの配列）が進行中である。プールしたBACクローンの配列を読むことにより、特に、リピート配列によるアセンブルエラーの改善が期待される。個々の配列はアセンブルされてscaffold配列（足場となる配列）とされる。一昨年、昨年と当研究所が発表したShirakawa-USDA連鎖地図（4881マーカー）、SUN-RH地図（5513）、および、SNP連鎖地図（2564）、BAC末端配列を並べたBovGen RH地図（9190）とIllinois RH地図（3484）、これら5個の地図からなる統合地図（Composite map）が、アセンブルされたscaffold配列を並べるための基盤となる。

PhaseIIは、SNP検索とHapMapの作成を目的としている。WGS（ヘレフォード種雄1頭）と、その他6品種（アングス、ブラーマン、ホルスタイン、ジャージー、リムジン、ノルウエーレッド）のゲノムシーケンシングにより、1万個以上のSNPが開発された。今後、これらのSNPが各品種でタイピングされ、ハプロタイプブロック等が明らかにされたHapMapが作成される。

2) ウシ遺伝性疾患のDNAマーカー育種手法の開発

(1) 研究年次：平成9年～平成17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、これらの疾患、あるいは、疾患に対する感受性（抵抗性）について、DNAを指標としたスクリーニング手法を開発すると同時に、さらに進んで遺伝性疾患原因遺伝子の単離・特定を行う。このような目的が達成されれば、遺伝子の変異を検出するDNA診断によってキャリアのスクリーニングができるため、遺伝性疾患の発症を制御しつつ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 ウシ遺伝性疾患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、当研究所が疾患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17年度までの成果を表3に示した。

表3. 遺伝性疾患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躯症	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	受 理

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

(3)-2 ウシ遺伝性疾患の解析に関わる今年度の成果

(3)-2-1. 乳頭欠損症（某県との共同研究）

先天的乳頭欠損症（ATPP:Abnormal Teat Patterning Phenotype）が、特定の黒毛和種雄牛の産子の性別に関わらず多発した。乳頭1対の2本欠損、1本欠損、乳頭形状の異常など多様な表現型を示した。乳頭欠損を伴う雌個体は繁殖雌牛として登録できないため、農家に大きな経済損失を被っている。そこで、発症をコントロールする診断手法の開発を目的とし原因遺伝子座のマッピングを行った。

家系内発症頻度は、2本欠損、1本欠損ともに8%、乳頭形状異常が9%であった。発症頻度および血統情報から単一劣性遺伝様式の可能性は排除された。常染色体上に447個のマイクロサテライトマーカーを平均6.7cM間隔で配置し、産子144頭（2本欠損21頭、1本欠損19頭、形状異常13頭、健常91頭）を用いて、Glissadol.3.1による連鎖解析（順位和検定）を行った。その結果、1番、7番、17番、25番染色体に本疾患との連鎖が見られ、複数の遺伝子が関与する不完全優性遺伝様式の量的形質であることがわかった。次に解析頭数を発症152頭、健常454頭

に増やし、この4本の染色体に対し解析を行った。その結果、2本欠損(49頭)と健常個体(454頭)の間で、17番染色体セントロメア(ATPP1: $p=2.2 \times 10^{-9}$)および1番染色体のセントロメア(ATPP3: $p=0.035$)とテロメア(ATPP2: $p=0.005$)の計3カ所に父由来アレル頻度が有意に異なる領域が見いだされた。2本欠損個体のリスク比は、ATPP1=2.2、ATPP2=1.7、ATPP3=1.6でATPP1が発症に対し最も大きく寄与していた。ATPP1は1本欠損個体(48頭)においても有意であった(リスク比:1.9、 $p=2.3 \times 10^{-4}$)。一方、7番、25番染色体の有意性は消滅した。これら3遺伝子座すべてにおいてリスクハプロタイプを排除すれば、乳頭欠損個体の発症確率を0.06にまで下げることが可能となる。

(3)-2-2. 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、染色体18番の領域にマッピングした。常染色体劣性遺伝病であった。

(4) 国内および海外の状況

複合脊椎形成不全症(Complex Vertebral Malformation, CVM)はホルスタイン種に見られる劣性遺伝病で、すでに我が国では遺伝診断がなされているが、この発明グループから最近報告された(Thomsen *et al.*, *Genome Res.*, 16:97-105, 2006)。ゴルジ体に存在するUDP-N-acetylglucosamine transporterであるSLC35A3のミスセンス変異(V180F)が原因であった。ブラウンスイス種における脊髄性筋萎縮症(Spinal Muscular Atrophy, SMA)の解析が進んだ(Krebs *et al.*, *Mammal. Genome*, 17:67-76, 2006)。染色体24番のテロメア部位にファインマッピングし、抗アポトーシス因子であるBCL2を候補遺伝子とした。ヒトにおけるSMA原因遺伝子と同定されたSMNも抗アポトーシス因子である。しかしながら、プロモーター領域だけに変異が見られ、この位置は隣接する神経変性に関わる遺伝子VPS4Bに近いため最終的な同定にまでは至らなかった。

(5) 今後の進め方

乳頭欠損症は、これまで解析してきた遺伝性疾患と異なり、多因子性疾患であり、QTLである。適当な時期のウシ胎児サンプルが得られ、正常個体と欠損個体の乳腺組織におけるmRNA・タンパク質の発現プロファイルをそれぞれ比較することで候補遺伝子を絞ることができるともかもしれない。染色体17番などのリスクハプロタイプを持たない後継種雄牛を作成することで発症頻度はかなり低下すると思われるので、実用上はほぼ解決したと言えよう。

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17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。

経済形質を支配する領域や遺伝子座を同定することでDNA情報を活用した育種が可能になる。多くの家系の連鎖解析を進めて、ハプロタイプに関する情報を豊富にする。一つの遺伝子が同定されれば、分子的なメカニズムの研究から多数の責任遺伝子座を明らかにすることが可能になる。

(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17年度までの収集の状況は表1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1. 平成17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	
	17	12,715	57,519
動物遺伝研究所	13	1,054	
	14	2,503	
	15	5,387	
	16	4,922	
	17	4,634	18,434
合 計			75,953

(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

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) が優れている。肉牛の経済形質のような量的形質には、複数の遺伝子座の間の相互作用であるエピスタティック (非相加的) 効果が見られる場合がある。そこで、相互作用も検証するため、我々はQTL Expressを改良したGlissardoを開発した。平成17年度までに全国で15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2に示す。

表2. 平成17年度までの黒毛和種経済形質マッピングのまとめ

経済形質QTL*	$p < 0.01$	$p < 0.001$
体重	9	2
枝肉重量	13	2
脂肪交雑	19	9
ロース芯面積	13	3
バラ厚	11	1
皮下脂肪厚	18	3
合計	83	20

*染色体ワイズの有意水準。

(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)

昨年度までに、父方半きょうだい家系を用いた連鎖解析を行い、21番染色体テロメア側に脂肪交雑連鎖領域3.5cMを特定した。去勢牛396頭を用いた解析におけるQTLへの寄与率は3.9%であった。この領域を絞り込むため、66個のBACクローンからなるBAC整列地図を作成し、74個の新規マイクロサテライトマーカーを開発した。新規マーカー及び既知マーカーで多型性に富む33マーカーを選択し、2種類の集団で母方アリルについての相関解析を行い、約720kbに局限化した。この近傍には父由来アリルだけ発現するインプリンティング遺伝子が2個見られた。母方アリルを用いた相関解析では検出できないので、この領域も*Marbling-1*候補領域とした。

今年度は、責任遺伝子を同定するため、遺伝子機能の解明などによる候補遺伝子の絞り込みを試みた。まず、*Marbling-1*候補領域に存在する12種の遺伝子の全エクソンについて、ウシドラフト塩基配列及びショットガンシーケンスにより決定した塩基配列を用いてプライマーを設計し、種雄牛のSNP探索を行ったが、アミノ酸変異を伴ったSNPを見いだすことはできなかった。そこで、*Marbling-1*優良遺伝子型Qとそうでない遺伝子型qをそれぞれ保有する肥育個体において、発現の異なる遺伝子を調べた。Q/qの32ヶ月齢去勢牛1頭とq/?の28ヶ月齢去勢牛8頭の筋間脂肪、皮下脂肪、腎臓、肝臓、筋肉組織などを採取した。3種の遺伝子a, b, cは筋間脂肪においてq/?と比べてQ/qの発現量が22-94倍高かった。aにヒト・マウスの相同遺伝子は存在しなかったが、bにヒト相同遺伝子が存在した。cはマウス3T3 L1細胞において脂肪細胞分化抑制

因子として知られている。*Q/q*最長筋ロースのバイオプシーを月齢18ヶ月から30ヶ月まで2ヶ月毎に行い、*c*の経時的発現量の経緯を調べた。筋肉部位では20ヶ月から22ヶ月にかけて20分の1に減少したが、脂肪部位は、28ヶ月と30ヶ月の間で急激な増加を示した。*a*と*b*についても調べる予定である。

次に、これら3種の遺伝子の5'上流1.0~6.1kb、イントロン、3'下流1.0~5.6kbについてを対象にSNP探索を行った。*b, c*周辺にSNPは見つからなかったが、*a*遺伝子の5'上流195bpに1カ所、3'上流168bpに1カ所のSNPを見いだした。ルシフェラーゼアッセイの結果、5'上流SNPはプロモーター活性に影響することがわかった ($p < 0.001$)。

そこで、*a*のORFと予測される部位をpcDNA3.1に挿入し、3T3-L1細胞にトランスフェクションした。*a*の発現量の最も多かったクローンは、コントロールに比べてOil red O染色されず、脂肪細胞分化が抑制された。脂肪細胞分化マーカーの*FABP4/aP2*遺伝子発現量もコントロールに比べて顕著に低かった。コントロールの*c*発現量は、脂肪細胞分化前と比べて分化後に約7分の1に減少したが、*a*クローンは分化前でコントロールと比べて*c*発現量約半分に減少したに過ぎず、その発現量は分化後も維持された。*a*遺伝子の発現が*b*や*c*遺伝子の発現に影響するか、そのメカニズムは何かを今後明らかにしていきたい。

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

昨年度までにSNPの検出で約50kbの領域まで狭めたが、可能性のあるセントロメア側の4cMを除外する根拠があまりないことがわかった。今年度は、約50kbの領域に存在する牛特異的な遺伝子を候補として細胞レベルで機能を調べることで、および、*Marbling-2*の優良遺伝子型*Q*を保有すると考えられる集団を対象とした相関解析を行い、領域を狭めることを試みた。

細胞レベルの遺伝子機能を見るため、マウス脂肪前駆細胞である3T3 L1に候補遺伝子のcDNAを導入した。抗体染色でタンパク質が生成していることは確認できたが、stable transfectantsの単離はこれからである。一方、約1,500頭からなる父方半きょうだい家系から脂肪交雑成績両極端集団を抽出し、母方アリアルについて*Q*相関解析を行った。*Q*保有個体の血統を調べると、いずれも元の解析家系種雄牛の孫であった。該当する地域における*Q*の頻度はきわめて低いことが言える。したがって、相関解析の手法を使ってセントロメア側の4cMを検証することはできない。今後、月齢30ヶ月の*Q*および*q*保有個体のロース芯におけるmRNAとタンパク質の発現プロファイルを比較することで候補遺伝子を絞ることができるかもしれない。

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

これまでに我々は、黒毛和種父方半兄弟家系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。この領域のさらなる絞り込みのために、60個のBACクローンでカバーされる6.8MbのBAC整列地図を作成し、80個のMSマーカーを含む高密度な物理地図を作成した。次に、当該領域のLDマッピングを行い、1.1Mbの領域に有意な相関を得た。さらに、11頭の種雄牛の産子1,700頭において、この1.1Mbの優良遺伝子型*Q*は枝肉重量を23.6kg増加させ、二つ目の*Q*で15.2kgの有意な増加効果を得たことから、この1.1Mbの領域内に*CW-1*の責任遺伝子が存在することが強く示唆された。

今年度は、1.1Mb内の想定される4つのヒト相同遺伝子の全エクソンについて、種雄牛の変異探索を行ったが、アミノ酸置換を伴う変異は見いだせなかった。エクソン以外に見いだされたSNPのなかには、Sp1の結合モチーフに存在するものもあった。そこで、*Q*とnon-*Q*個体間におけ

る遺伝子発現量の違いを比較するため、1.1Mbハプロタイプが Q/Q および $q/-$ である個体（6ヶ月齢）各1頭から各種組織臓器を採取し、RNAを抽出した。本領域内の4つの候補遺伝子について定量的PCRを行ったところ、各遺伝子において2倍以上の差が現れた組織が数多く観察された。したがって、これらの結果から有力な候補遺伝子を絞り込むことはできなかった。そこで、これらの遺伝子をそれぞれ含むBACクローンを単離し、BACクローントランスジェニックマウスの作製を行い、個体レベルで成長関連の表現型と導入遺伝子の発現量との関係を調べることで責任遺伝子の同定を試みることにした。現在、委託中の導入マウスは3月から4月にかけてできあがる予定である。

(4) 国内および海外の状況

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が、ゲノムワイズレベル1%以下、20cM以内にファインマッピングされている例はまだない。今年度においても顕著な報告は見られなかった。

(5) 今後の進め方

Marbling-1、*CW-1*遺伝子を同定するため、報告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、遺伝子機能の解明から責任遺伝子の同定を行う。*Marbling-2*遺伝子については、候補遺伝子を絞っていく。

4) ウシ抗病性遺伝子座の解析

(1) 研究年次：平成7年～平成17年

(2) 研究目的と期待される成果

小型ピロ、脂肪壊死症、乳房炎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更なる進展があった。

(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. 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、連鎖解析した結果、染色体21番と22番に有意な連鎖を見いだした。

昨年度までに、染色体22番のQTL（ SCC_{22} ）について、グリシン残基1個の挿入変異の認められた*FEZL*（*Forebrain embryonic zinc finger-like*）を責任遺伝子とした。挿入変異のある*FEZL*遺伝子は感受型（*S*）で、そうでない方は抵抗型（*R*）であった。責任遺伝子同定の根拠は：(i) 乳腺由来細胞株を大腸菌毒素LPS処理したところ、サイトカインであるインターロイキン8と腫瘍壊死因子 α のmRNA発現が誘導されたが、その程度は挿入変異により低下した、(ii) 挿入変異により、搾乳牛集団における乳房炎発症率が12%（父-*R/S*の娘集団）から18%（父-*S/S*の娘集

団)に増加した。また、FEZL抵抗型1個の導入により体細胞スコアを0.82減少させる効果が認められた。しかしながら、このことは、FEZL挿入変異以外の要因を除外するものではない。

今年度は、染色体21番のQTL (SCC_{21})について解析した。解析対象家系搾乳牛を、 R/R , R/S , S/S に分けた。 R/R と R/S 集団では SCC_{21} の検出はできなかったが、 SCC_{22} QTLの影響の無い S/S 集団では、 SCC_{21} のロッドスコアは大幅に高くなった。すなわち、二つのQTL SCC_{22} と SCC_{21} 間には機能的な相互作用が予想された。 SCC_{21} 領域に存在する候補遺伝子の多型を調べたところ、プロモーター活性を支配するSNPを見いだした。この領域にはFEZLの認識配列があり、実際にFEZLが結合した。すでに、候補遺伝子は自然免疫応答性に影響することが知られていることから、責任遺伝子と考えられる。FEZL導入による発現プロファイルを解析したところ、 SCC_{21} にもう一つの候補遺伝子が存在していた。第二の候補遺伝子も自然免疫応答性に関係することが知られている。この遺伝子のプロモーター領域に4塩基からなるFEZLの認識配列があり、この4塩基内にSNPを見いだした。このSNPは抵抗性と連鎖していた。すなわち、一つのQTLに二つの責任遺伝子を見いだしたことになる。詳細は共同研究者から報告される。 SCC_{22} と SCC_{21} の責任遺伝子候補はいずれも自然免疫応答性に関わっていることから、乳房炎抵抗性の遺伝的要因の大部分は自然免疫応答性かもしれない。

(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。

(5) 今後の進め方

現在供用されているすべてのホルスタイン種の種雄牛精液ストローを入手できたので、今後、遺伝子型を調べて頻度を明らかにするとともに、日本ホルスタイン登録協会などと共同研究を行い、牛群検定のデータから遺伝子型と乳房炎抵抗性などについての相関性を調べる。

5) 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。開発目標とする品種鑑定手法は次の通りである：

- ① あるサンプルが黒毛和種であるのか、ホルスタイン種であるのか、DNAマーカー型検査により判定する手法。（黒毛／ホルスタイン）。
- ② あるサンプルが黒毛和種であるのか、F1（黒毛×ホルスタイン）であるのか、DNAマーカー型検査により判定する手法。（黒毛／F1）。
- ③ あるサンプルが黒毛和種であるのか、外国品種であるのか、DNAマーカー型検査により判定する手法。（黒毛／アングス、または、黒毛／ヘレフォード）。

いずれの手法も、マイクロサテライトマーカーによるハプロタイプ頻度の品種による違いによる鑑定法の確立を試みる。

(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中間、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。

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、 \approx 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*AiBj*の、品種1集団内における頻度を P_{1AiBj} 、品種2集団内での頻度を P_{2AiBj} とする。ある個体をマーカーAおよびBによりジェノタイピングをおこない、ジェノタイプ*Ax*、*Ay*、*Bz*、*Bw*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 $Ax=Ay$ または $Bz=Bw$ のとき（相が決定するので）

$$L_1 = \frac{0.5P_{1AxBz} P_{1AyBw}}{0.5P_{1AxBz} P_{1AyBw} + 0.5P_{2AxBz} P_{2AyBw}}$$

$Ax \neq Ay$ かつ $Bz \neq Bw$ のとき、

$$L_1 = \frac{0.5P_{1AxBz} P_{1AyBw} + 0.5P_{1AxBw} P_{1AyBz}}{0.5P_{1AxBz} P_{1AyBw} + 0.5P_{1AxBw} P_{1AyBz} + 0.5P_{2AxBz} P_{2AyBw} + 0.5P_{2AxBw} P_{2AyBz}}$$

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。

(4)-2. 今年度の成果

上記の方法で、ごく狭い範囲におけるハプロタイプブロック長を調査するために、黒毛和種個体192頭、ホルスタイン個体96頭をそれぞれ対象集団とし、染色体7番、14番、21番の任意の箇所それぞれ約10cMの範囲にマイクロサテライトマーカー48個、23個、38個を選定し、マーカー型を検査した。おのおのの集団において推定されたマーカーペアのハプロタイプ頻度から D' を算出し、これを連鎖不平衡度の指標とした。

その結果1cM以下にブロックが分断されていると考えられる箇所が多く観察された。ウシはヒト（100kb以下）、マウス（数10Mb）の中間程度のブロック長を持つと考えられた。

あらかじめ適当なマーカーを用いて黒毛和種、ホルスタイン種、アンガス種、ヘレフォード種集団のハプロタイプ頻度を調査した。ある個体についてマーカーの型情報を得たとき、この個体が「黒毛和種である事後確率」を算出し、この値を鑑定基準とした。

適切な事後確率の基準値を設けることで、下記のとおり高い判定成功率をもつ鑑定手法を開発することができた。マーカーペア（A,B）を用いた手法でほぼ完全に鑑定できたが、黒毛和種/F1交雑種については十分な情報量が得られなかった。そこで、二つ以上のマーカーペアを組み合わせた得た事後確率をマーカーAとBのペアで得た「黒毛である事後確率」を再び事前確

率として採用し、別のマーカーペア (C,D) の情報から「黒毛である事後確率」を算出した。同様にして用いるマーカーペアを増やした場合の「黒毛である事後確率」を算出できる。黒毛和種/F1交雑種の鑑定では3マーカーペアを用いることで鑑定率100%に到達した。

黒毛和種/ホルスタイン種	100%	(1マーカーペアによる)
黒毛和種/F1交雑種	100%	(3マーカーペアによる)
黒毛和種/アングス種	100%	(1マーカーペアによる)
黒毛和種/ヘレフォード種	100%	(1マーカーペアによる)

(5) 国内および海外の状況

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

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

(6) 今後の進め方

今後は、マイクロサテライトから一塩基置換多型(SNP)を用いることで簡便化を図ると共に、ウシ品種間の差異をゲノム全体で調べる。

6) ウシ全ゲノムを対象とする相関解析の手法による新たな経済形質の解析

(次年度から始まる牛有用ゲノム等知的財産活用事業と関連)

(1) 研究目的と期待される成果

これまでの研究の結果から、家系を解析することでほとんどのウシ経済形質責任遺伝子座のマッピングは可能と考えられる。しかしながら、目標とする表現型が分散している家系を構築できない場合がある。たとえば、精子の授精能欠如、受胎率、過排卵処理への反応性、脂肪壊死症などが挙げられる。そこで、家系の構築に抛らない全ゲノムを対象とする相関解析を行い、懸案になっている形質の育種手法の確立を目標とする。

(2) ウシ全ゲノムを対象とする相関解析の試み～過排卵処理への反応性(全農ETセンターとの共同研究)

黒毛和種では、遺伝的な能力の高い雌牛をFSHなどで過排卵処理して採卵し、受精卵として販売されている。しかしながら、購入した雌牛から採卵できない場合がある。あらかじめ採卵性の高い牛をDNA情報で選抜する手法の確立が期待されているが、特定の系統の雌牛が集中して利用されないため解析家系を構築することができない。ハプロタイプブロック長が、部分的には、従来の報告よりも短いことを受けて、家系の構築に抛らない全ゲノムを対象とする相関解析手法を過排卵処理への反応性に適用した。

703頭の黒毛和種メスから採卵数の上位および下位、各96頭ずつを抽出し、常染色体1～29番およびX染色体に配置した1,073個のマイクロサテライトマーカーにより、ペアワイズハプロタイプによる相関解析をおこなった。その結果、全染色体で10ヵ所程度の5%水準（多重検定補正済み）で有意な領域を得た。6ヵ所についてマーカーを追加したところ、4ヵ所において確認できた。今後は、順次マーカーの追加、および別個体セットによる相関の再現などを行い、候補遺伝子の絞り込みをおこなう予定である。

(3) 国内および海外の状況

連鎖不平衡は、これまで、ベルギーやイスラエルで経済形質のファインマッピングの手法として使われてきたが、全ゲノムを対象とする相関解析の実施例はまだない。

(4) 今後の進め方

過排卵処理への反応性については、責任遺伝子の同定を視野に入れて進める。元々のマーカー密度が高いので、いわゆるファインマッピングから始まっている。現在、進行中の課題の一つは、黒毛和種における脂肪壊死症抵抗性である。昨年11月から7県の協力を得てサンプル集めを開始した。2-3年の内に血統に偏らない脂肪壊死感受性集団を抽出し、相関解析を行う。また、ホルスタイン種における受胎率についてのサンプリングのための交渉をこの1月から始めた。年内にサンプリングが完了する可能性がある。黒毛和種における受胎率では、交渉を始めつつある段階である。SNPによる相関解析を中心とする。

2. 平成17年度研究発表

1) 論文発表

1. Ihara, N., Fujita, T., Shiga, K., Itoh, M., Watanabe, T., Sugimoto, Y. (2005) Linkage analysis reveals two independent loci for ocular disorders in a local Japanese Black cattle population. *Animal Genetics*, 36:132-134.
2. Li, G.H., Liu, W.S., Takasuga, A., Watanabe, T., Carpio, C.M., Rink, A., Sugimoto, Y., Ponce de Leon, F.A., Beattie, C.W. (2005) Characterization and RH mapping of bovine microsatellites generated from a microdissected BTA20-specific DNA library. *Animal Genetics*, 36:146-151.
3. Itoh, T., Takasuga, A., Watanabe, T., Ihara, N., Mariani, P., Beattie, C.W., Sugimoto, Y. (2005) A comprehensive radiation hybrid map of the bovine genome comprising 5,742 loci. *Genomics*, 85:413-424.
4. Yamasaki, T., Inoue-Murayama, M., Tahara, K., Takano, S., Sugiyama, A., Itoh, T., Takasuga, A., Sugimoto, Y., Rose, M.T., Aso, H., Ito, S. (2005) The profile of gene expression during adipocyte differentiation in BIP cells. *Animal Science Journal*, 76:479-489.
5. Mizoshita, K., Takano, A., Watanabe, T., Takasuga, A., Sugimoto, Y. (2005) Identification of a 1.1-Mb region for a carcass weight QTL on bovine chromosome 14. *Mammalian Genome*, 16:532-537.
6. Abbasi, A.R., Khalaj, M., Geriletuya, Ihara, N., Sugimoto, Y., Kunieda, T. (2005) Comparative mapping and structural analysis of a *FOX* gene cluster on bovine chromosome 18. *Journal of Animal Genetics*, 32:13-20.
7. Abbasi, A.R., Ihara, N., Watanabe, T., Khalaj, M., Tsuji, T., Sugimoto, Y., Kunieda, T. (2005) Linkage mapping of the locus responsible for congenital multiple ocular defects in cattle on bovine Chromosome 18. *Mammalian Genome*, 16:731-737.
8. Mizoguchi, Y., Watanabe, T., Fujinaka, K., Iwamoto, E., Sugimoto, Y. (2006) Mapping of quantitative trait loci for carcass traits in a Japanese Black (Wagyu) cattle population. *Animal Genetics*, 37:51-54.
9. Abbasi, A.R., Ihara, N., Khalaj, M., Sugimoto, Y., Kunieda, T. (2006) An integrated radiation hybrid map of bovine chromosome 18 that refines a critical region associated with multiple ocular defects in cattle. *Animal Genetics*, 37:58-61.

10. Guo, H., Liu, W. S., Takasuga, A., Eyer, K., Landrito, E., Xu, S. Z., Gao, X., Ren, H. Y. (2006) Mapping of the CCK, PSMC2, PSMC4, PSMD1, CPB1 and PSPH genes in cattle. *Animal Genetics*, 37:73-75.
11. Itoh, T., Watanabe, T., Sugimoto, Y., Takasuga, A. (2006) Radiation hybrid mapping of seven bovine genes encoding transcription factors involved in adipogenesis. *Animal Genetics*, 37:78-79.

2) 学会発表

1. 萩野 敦、平野 貴、渡邊敏夫、田邊義弘、森田光夫：大規模雌半きょうだい家系データを用いた黒毛和種の枝肉形質に対するQTLの検出。日本畜産学会第105回大会、2005年9月、札幌。
2. 横内 耕、溝下和則、溝口 康、岩本英治、高須賀晶子、杉本喜憲：黒毛和種4番染色体上に検出された脂肪交雑QTLのファインマッピング。日本動物遺伝育種学会第6回大会、2005年9月、札幌。
3. 高須賀晶子、小江敏明、溝口 康、渡邊敏夫、杉本喜憲：黒毛和種9番染色体に見出された脂肪交雑遺伝子座 (*Marbling-4*) のファインマッピング。第6回日本動物遺伝育種学会大会、2005年9月、札幌。
4. 小林直彦、平野 貴、加藤誠二、星野洋一郎、林 登、渡邊敏夫、杉本喜憲：黒毛和種の父方半きょうだい家系において枝肉重量、ロース芯面積、バラの厚さに関する量的形質遺伝子座 (QTL) を18番染色体にマッピングした。動物遺伝育種学会第6回大会、2005年、札幌。
5. 安部亜津子、渡邊敏夫、長谷川清寿、佐々木恵美、杉本喜憲、高仁敏光：しまね和牛における脂肪交雑に関するQTL領域の検索。第6回日本動物遺伝育種学会大会、2005年9月、札幌。
6. 黒澤舞子、三宅 武、小谷 基、成田 暁、渡邊敏夫、横内 耕、杉本喜憲、藤田達男、佐々木義之：MQEM法による大分県黒毛和種の脂肪交雑に関する複数QTLマッピング。第6回日本動物遺伝育種学会大会、2005年9月、札幌。
7. 渡邊真司、小谷 基、小邦朋子、松本道夫、渡邊敏夫、横内 耕、杉本喜憲、佐々木義之：熊本系褐毛和種における連鎖不平衡 (LD) の広がり分布に関するマーカー数を増やしての検討。第6回日本動物遺伝育種学会大会、2005年9月、札幌。
8. 杉本真由美、藤川 朗、杉本喜憲：乳房炎抵抗性遺伝子FEZLの効果検証。日本乳房炎研究会第10回学術集会、2005年10月、つくば。

9. 古川恵、平本圭二、溝口 康、杉本喜憲：DNAマーカーを利用した黒毛和種の選抜技術の実用化について。平成17年度日本産業動物獣医学会（中国）、2005年10月、岡山。
10. 井原尚也、渡邊敏夫、佐藤洋一、杉本喜憲：ウシ黒毛和種における乳頭欠損症原因遺伝子座のマッピング。日本分子生物学会第28回大会、2005年12月、福岡。
11. 高野 淳、溝下和則、高須賀晶子、杉本喜憲：黒毛和種における枝肉重量QTL(*CW-1*)の候補遺伝子の同定。日本分子生物学会第28回大会、2005年12月、福岡。
12. 平野 貴、井上和也、原 好宏、小林直彦、渡邊敏夫、杉本喜憲：和牛における脂肪交雑QTLの特定とBACコンテイング作成および解析。第28回分子生物学会、2005年、福岡
13. 高須賀晶子、小江敏明、溝口 康、渡邊敏夫、杉本喜憲：ウシ黒毛和種9番染色体上の脂肪交雑遺伝子座(*Marbling-4*)のファインマッピング。第28回日本分子生物学会年会、2005年12月、福岡。
14. 渡邊敏夫、高須賀晶子、溝口 康、平野 貴、高野 淳、杉本喜憲：マイクロサテライトマーカーによるウシ・ハプロタイプブロック長の調査および品種特異的ハプロタイプによる品種鑑別の試み。第28回日本分子生物学会年会、2005年12月、福岡。
15. 杉本真由美、藤川 朗、杉本喜憲：連鎖解析によるウシ乳房炎抵抗性遺伝子の同定とその機能解析。第28回日本分子生物学会年会ワークショップ「自然免疫」、2005年12月、福岡。
16. 安部亜津子、渡邊敏夫、中村亮一、長谷川清寿、佐々木恵美、杉本喜憲、高仁敏光：黒毛和種の父方半きょうだい家系解析による脂肪交雑QTLの検出。日本畜産学会第106回大会、2006年3月、福岡。

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：大規模雌半きょうだい家系データを用いた黒毛和種の枝肉形質に対するQTLの検出

発表者：荻野 敦¹、平野 貴²、渡邊敏夫²、田邊義弘¹、森田光夫¹

所 属：¹改良事業団、²畜技協・動物遺伝研

要 旨：【目的】黒毛和種の大規模半きょうだい家系の連鎖解析を行い、脂肪交雑等の枝肉形質と有意に連鎖するQTL領域の検出を試みた。

【方法】1頭の黒毛和種雄牛の雌産子760頭より、低BMS-Noおよび高BMS-Noの190頭を選択、全常染色体上の250マイクロサテライトマーカーのDNA型判定を行い、BMS-Noならびに枝肉重量、ロース芯面積、ばら厚、皮下脂肪厚の各形質についてインターバルマッピングによるQTL解析を行った。その結果検出された候補領域について、マーカーを追加し、全760頭を用いて、その領域のみの解析を行った。

【結果】全常染色体に対する解析では染色体ワイズ5%水準で連鎖する領域がBMS-Noで5カ所、枝肉重量で2カ所、ロース芯面積で4カ所、ばら厚で4カ所、皮下脂肪厚で2カ所検出された。全760頭と追加マーカーを用いた解析は、BMS-Noと連鎖する候補領域BTA6とBTA10、および枝肉重量に連鎖する候補領域BTA14について行った。その結果、BMS-NoについてはBTA6で最大lodスコア11.3、アレル置換効果0.766 (BMS-No)、BTA10で最大lodスコア11.7、アレル置換効果0.770 (BMS-No)を示した。また、この2カ所のQTL候補領域は相加的効果を持つことが示唆された。枝肉重量についてはBTA14で最大lodスコア13.3、アレル置換効果16.49kgを示した。
(日本畜産学会第105回大会、2005年9月、札幌)

学会発表2.

題 目：黒毛和種4番染色体上に検出された脂肪交雑QTLの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兵庫県農水総技セ

要 旨：【目的】我々は、黒毛和種半兄弟家系1の解析で4番染色体40-70cMに脂肪交雑領域を検出してきた。本報告では相関解析とハプロタイプ比較により、領域の絞り込みを行った。

【材料と方法】同一県内市場に出荷された肥育牛より、出荷頭数の多い種雄牛6頭の産子307頭 (BMS \geq 8, 116頭; BMS \leq 4, 191頭)を抽出し、4番染色体の40-70cMに位置するマイクロサテライト (MS) マーカーを調べ、母由来アレルを推定した。次に、高BMSと低BMS集団における母由来Qアレル頻度をそれぞれpairwiseで求め、BMSとの相関を検定した。一方、種雄牛の内の1頭については、その産子344頭を半兄弟家系2とし、0-77cMに位置する37個のマーカーを用いてQTL解析を行った。

【結果】種雄牛6頭の産子307頭の脂肪交雑領域40-70cMについて母由来Qアレル頻度とBMSとの相関を25個のマーカーで検定したところ、45cMと67cM付近に二峰性の有意な相関 ($p<0.001$)が検出された。この領域の位置は半兄弟家系1の解析から導かれた結果と一致しており、Qアレルが県内の繁殖雌牛集団内に保存されていることが確認された。

種雄牛6頭の内1頭はqアレルと母由来の第3のアレルを受け継ぐヘテロ個体であった。この第3のアレルはQアレルと異なるが、県内の繁殖雌牛集団内に高頻度に保存され、ホモで有する種雄牛はBMSに対して高い育種価を示す。そこで、この1頭について半兄弟家系を構成し、QTL解析を行ったところ、同じ領域に1%有意水準を超える脂肪交雑QTLが検出された。Qアレルと第3のアレル間にIBDが存在するかどうか調べるため、25個の新規MSを含む50個のMSマーカー (平均間隔0.68cM, 最大間隔2.97cM)を用いて相関解析を行った。その結果、45cM付近の領域 (1.74cM)と67cM付近の領域 (0.95cM)はBMSに相関し ($p<0.001$)、Qアレルと一致したハプロタイプを持つことが明らかになった。

(第6回日本動物遺伝育種学会大会、2005年9月、札幌)

学会発表3.

題 目：黒毛和種9番染色体に見出された脂肪交雑遺伝子座 (*Marbling-4*) のファインマッピング

発表者：高須賀晶子¹、小江敏明²、溝口 康¹、渡邊敏夫¹、杉本喜憲¹

所 属：¹畜技協・動物遺伝研、²鳥取畜試

要 旨：【目的】*Marbling-4*は、黒毛和種種雄牛Aの父方半兄弟家系を用いた解析で、ウシ9番

染色体にマッピングされたQTLである。9番染色体上に新規マイクロサテライトマーカーを開発し、また、異なる屠場で収集した種雄牛Aの肥育産子を解析に加えることにより、*Marbling-4*のファインマッピングを行った。

【方法・結果】9番染色体の20.4-45.7cMの報告されたマイクロサテライトマーカー26個で、CHORI-240 BAC library(<http://bacpac.chori.org/bovine240.htm>)をスクリーニングし、BAC fingerprint map(<http://www.bcgsc.ca/lab/mapping/bovine>)情報を基に、物理地図を作成した。この物理地図が含むBACクローンよりマイクロサテライトを単離する方法と、公開されたウシゲノム配列(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BtaBlast.html>)からマイクロサテライト配列を検索する方法によって、新規マーカー57個を開発した。これらのマイクロサテライトマーカーのうち26個を用いて、種雄牛Aの去勢肥育産子354頭(屠場1)、および、439頭(屠場2)のQTL解析を行い、*Marbling-4*を37.6-43.8cM領域まで狭めた。また、肥育産子の母方ハプロタイプを検討したところ、種雄牛Aの持つ*Marbling-4*のQアリルは、非常に稀にしか存在しないことがわかった。

(第6回日本動物遺伝育種学会大会、2005年9月、札幌)

学会発表5.

題 目：しまね和牛における脂肪交雑に関するQTL領域の検索

発表者：安部亜津子¹、渡邊敏夫²、長谷川清寿¹、佐々木恵美¹、杉本喜憲²、高仁敏光¹

所 属：¹島根県畜技セ、²畜技協・動物遺伝研

要 旨：【目的】我々は、「しまね和牛」の経済形質に関与するDNA領域を特定し、種牛選抜に活用するために、父方半兄弟家系を用いたQTL解析を行っている。今回、県有種雄牛A(Sire A)を対象として、脂肪交雑(BMS No.)に着目した、Selective genotypingによるQTL解析を行った。

【方法】1次スクリーニングの解析対象個体(162頭)は、Sire A由来の去勢肥育牛(527頭)からBMS No.の上位(8~10)および下位(2~3)を抽出した。常染色体に配置した227個のマイクロサテライトマーカーを型判定後、子個体が染色体上の任意の点においてラージQを伝達された確率を、表現型値に対し線形回帰を行うことでQTLの有無を検定した。1次スクリーニングで有意であった染色体のうち2つの染色体を対象に、48個のマイクロサテライトマーカーを配置して、全個体(527頭)を用いた2次スクリーニングを行った。

【結果】1次スクリーニングにおいて、Genome-wise 5%水準で有意な領域は3か所(BTA4: $p < 0.05$, BTA9: $p < 0.05$, BTA14: $p < 0.001$)検出された。このうち、2本の染色体(BTA9, 14)を対象として2次スクリーニングを行った結果、BTA9, 14いずれの染色体ともに、有意な領域(Chromosome-wise, $p < 0.001$)が確認された。BTA9で最も有意性が高かったのは80cMであり、最大LOD scoreは9であった。BTA14では、38cMが最も有意性が高く、最大LOD scoreは7.4であった。各領域のハプロタイプ置換効果は、BMS No.でBTA9が0.8、BTA14が0.7と推定された。また、この2領域について重回帰分析を行った結果、2つの優良ハプロタイプが両方存在する場合の効果は1.5であり、相加的であった。

(第6回日本動物遺伝育種学会大会、2005年9月、札幌)

学会発表6.

題 目：MQEM法による大分県黒毛和種の脂肪交雑に関する複数QTLマッピング

発表者：黒澤舞子¹、三宅 武¹、小谷 基¹、成田 暁^{1,2}、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現東大医科研、³畜技協・動物遺伝研、⁴大分県畜試

要 旨：【目的】近年、肉牛の産肉性形質に関するQTLの探索が注目されてきている。これまでに演者らは2QTL間エピスタシス効果やポリジーン効果を取り込んだ新たな複数QTLマッピング法であるMultiple QTL with Epistasis Mapping法 (MQEM法, Narita and Sasaki 2004) を確立し、さらに第4回日本動物遺伝育種学会大会において、その半きょうだい家系解析用プログラム (MQEM-HS (Halfsib)) を発表している (成田と佐々木、2003)。本研究では大分県黒毛和種の脂肪交雑について、MQEM法を用いて主効果、エピスタシス効果を持つ複数のQTLを検出し染色体上での位置推定を行う。

【方法】材料として、環境要因を補正した、大分県黒毛和種集団における半きょうだい家系142頭のBMSナンバー、およびゲノムワイドに散在するマイクロサテライトマーカー240個を用いた。エピスタシス効果を探索するための最適な戦略を検討するため、MQEM法におけるMCMCサイクル数を100万、2000万、4000万、6000万と変化させモデルが収束する最適サイクルを調べた。また、モデル採択関数を2種変化させ、より効果の小さなQTLやエピスタシス効果がモデルに取り込まれやすくなった場合の影響も調べた。

【結果】全ゲノムのエピスタシス探索を理論上2回以上行う4000万サイクル以上でモデルは収束し、また、採択関数の違いによって事後確率から期待されるQTL数に変動が見られたことから、これらを適切に設定することの重要性が示唆される。染色体1と8で表型分散比が0.1以上の高い値を示す主効果を持つQTLが検出され、1-26染色体ペアで0.16以上の高い値を示すエピスタシス効果を持つQTLペアが検出された。主効果を持つQTL数の期待値は1.7から3.4個、エピスタシス効果を持つQTLペア数の期待値は0.4から0.5個であった。

(第6回日本動物遺伝育種学会大会、2005年9月、札幌)

学会発表7.

題 目：熊本系褐毛和種における連鎖不平衡 (LD) の広がり と 分布に関するマーカー数を増やしての検討

発表者：渡邊真司¹、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、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

要 旨：【目的】近年、経済形質を支配している量的形質遺伝子座 (QTL) の解析が行われ、LDがQTLファインマッピングに効果的であるとされている。演者等は第104回日本畜産学大会で褐毛和種について広範囲なLDがゲノムワイドに存在することを示した。本研究では褐毛和種に対してさらにマーカー数を増やして、LDの広がりや分布をより詳細に検討した。

【方法】材料として、熊本系褐毛和種種雄牛の後代肥育牛406頭からなる半きょうだい家系を用いた。マーカー数を増やした4本の染色体およびその他の染色体に散在するマイクロサテライトDNAマーカーをそれぞれ68個および131個用いてマーカー型判定を行った。4本の染色体における平均マーカー間距離は7.6cMであった。母方由来配偶子に関してハプロタイプを推定し、Lewontinの D' でLDを評価した。またFisherの正確確率検定を行い、アリル相関の統計的有意性を検定した。次に、4本の染色体の D' 値について染色体、マーカー間距離およびそれらの間の交互作用の効果を取り入れた数学モデルにより最小二乗分散分析を行った。

【結果】 マーカー数を増やしたことにより高度なLDが5cM以内の距離に保たれていることが確認された。前回の報告のようにマーカー間距離5-20cMでD'値は急激に減少し、20cM以上は徐々に減少を示しながら平坦域に達した。アレル相関の統計的有意性では、マーカー間距離40cM以上と配偶子不平衡が似通った水準であった。4本の染色体領域のD'値に対して最小二乗分散分析を行うと、染色体の効果に有意性は見られず、マーカー間距離の効果および染色体とマーカー間距離の交互作用の効果が ($p < 0.05$) で有意であった。今回の結果から、褐毛和種ではマーカー間距離5cM以内に高度なLDが保存されていて、LDの分布が染色体ごとに異なっていることが示唆される。

(第6回日本動物遺伝育種学会大会、2005年9月、札幌)

学会発表 8.

題 目：乳房炎抵抗性遺伝子FEZLの効果検証

発表者：杉本真由美¹、藤川 朗²、杉本喜憲³

所 属：¹家畜改良セ、²北海道畜試、³畜技協・動物遺伝研

要 旨：我々は連鎖解析手法を用いて同定した乳房炎抵抗性遺伝子forebrain embryonic zinc-finger like (FEZL) の効果検証を行った。第9回学術集会において発表したとおり、Walkway chief markを祖父とする6半兄弟種雄牛家系の娘牛478頭ではFEZL遺伝子のグリシン鎖において12個のグリシン(12G)が体細胞数の高い個体では13個(13G)となる多型が見いだされた。この6種雄牛のうち、12Gと13Gをヘテロで持つ5種雄牛の娘牛5950頭の初産次の平均体細胞スコア (2.56 ± 1.42) は、13Gをホモで持つ種雄牛の娘牛611頭の平均スコア (2.97 ± 1.60) より低かった ($p = 3.35E-09$)。ランダムサンプルにおいても、12Gと13Gをヘテロで持つ娘牛44頭の平均スコア (2.00 ± 0.69) は13Gをホモで持つ娘牛448頭の平均スコア (2.31 ± 0.89) より低かった ($p < 0.01$)。乳房炎罹患記録とともに集めたランダムサンプルでは、12Gと13Gをヘテロで持つ娘牛78頭の乳房炎発生率(14.10%)は13Gをホモで持つ娘牛648頭の乳房炎発生率(23.46%)より低かった ($p < 0.05$)。したがって、12GFEZLを持つ種雄牛を選抜することにより、初産次の平均体細胞スコアを下げ、乳房炎発生率を顕著に低下させると思われる。

(日本乳房炎研究会第10回学術集会、2005年10月、つくば)

学会発表 9.

題 目：DNAマーカーを利用した黒毛和種の選抜技術の実用化について

発表者：古川恵¹、平本圭二¹、溝口康²、杉本喜憲²

所 属：¹岡山県総合畜産センター、²畜技協・動物遺伝研

要 旨：【目的】現在、牛の産肉形質(枝肉重量、脂肪交雑、ロース芯面積など)に係る改良は主にBLUP等の育種価を用いて行われている。しかし、個体それぞれが持つ遺伝子から産肉能力が判定できれば、選抜の正確度が向上し、改良速度も上昇する。このことを目的として、今回、岡山県基幹種雄牛「利花」号について大規模半兄弟家系を構築し、QTL解析を実施した。

【方法】種雄牛「利花」号と、これを父とする肥育産子去勢300頭の腎周囲脂肪からDNAを抽出した。このうち、1次スクリーニングとして、種雄牛1頭と産子166頭について、QTL解析を行った。マイクロサテライトマーカー197個を全常染色体に配置し、PCR法を用いてDNAの増幅を行い、遺伝子型判定を実施した。解析対象形質は、枝肉重量、BMS No.、ロース芯面積とした。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、2次スクリーニングを実施した。さ

らに詳細に各染色体28個のマーカーを配置し、300頭の産子を用いてQTL解析を行った。有意な結果が得られた領域について、岡山県所有の利花産子である直接検定牛・候補種雄牛及び繁殖雌牛の遺伝子型判定を行った。【結果】1次スクリーニングの結果、4本の染色体において、枝肉重量、BMS No.、ロース芯面積に関連する領域が染色体レベル5%及び1%有意水準で検出された。2次スクリーニングの結果では、8番染色体に染色体レベル1%でBMSに関連する有意な領域が1カ所、14番染色体ではロース芯面積に関連する有意な領域が染色体レベル1%で2カ所特定された。また、これらの領域について直接検定牛・候補種雄牛及び繁殖雌牛合わせて16頭の調査の結果、BMS No.について、8頭、ロース芯面積について8頭が優良ハプロタイプを保持していた。

【考察】本研究の結果、種雄牛「利花」号のBMS No.及びロース芯面積に関連する領域が染色体上に特定された。また、これらの結果を用いて検定牛の遺伝子領域の調査を実施することによって、DNAマーカーを用いて遺伝子情報を利用した選抜手法を確立することができた。

(平成17年度日本産業動物獣医学会(中国)、2005年10月、岡山)

学会発表10.

題 目：ウシ黒毛和種における乳頭欠損症原因遺伝子座のマッピング

発表者：井原尚也¹、渡邊敏夫¹、佐藤洋一²、杉本喜憲¹

所 属：¹畜技協・動物遺伝研、²岩手農研究セ

要 旨：【目的】ヒトにおいて報告が希な先天的乳頭欠損症が、特定の黒毛和種種雄牛産子に多発した。表現型は、4本ある乳頭の左右2本を欠損、1本を欠損、乳頭の感覚が狭く癒着、乳頭の形状が小など多様であり、性別の発症頻度は13-15%と差はなかった。発症個体は黒毛和種として登録できないため、繁殖に使用できないという問題が生じている。そこで、乳頭欠損症のDNA診断手法の開発を目的とし原因遺伝子座のマッピングを行った。

【方法と結果】常染色体上に430個のマイクロサテライトマーカーを平均7cM間隔で配置し、息牛144頭(発症52頭、健常92頭)を用いて、シブペア・ハプロタイプシェアリング連鎖解析を行った。その結果、1番染色体のテロメア近傍(130-150cM)領域、17番染色体のセントロメア近傍(0-20cM)領域、25番染色体の中央部(15-52cM)領域に本疾病との連鎖が示唆され、劣性遺伝病でないことが明らかとなった。二次スクリーニングとしてサンプル数を増やし(発症116頭、健常230頭)、これらの染色体領域のマーカー数を増やした(平均1.6cM)。さらに表現型を階層化して連鎖解析を行った。その結果、雌の2本欠損個体(22頭)がこれらの染色体と非常に強く連鎖することが確認され、その連鎖の強さは、17番>1番>25番であった。17番染色体においては、雌の2本欠損個体はすべて共通のハプロタイプを有していたが、健常息牛の中にも同じハプロタイプを有する個体が多数存在した。17番染色体疾病遺伝子座の寄与率は32%と計算され、発症の中核を担うものと考えられたが、1番染色体と25番染色体上の遺伝子座も寄与する複合遺伝子疾患であることが明らかとなった。これらの遺伝子座の同定は、哺乳動物の乳腺・乳頭形成のメカニズムのさらなる解明へ貢献すると期待される。

(第28回日本分子生物学会年会、2005年12月、福岡)

学会発表11.

題 目：黒毛和種における枝肉重量QTL(CW-1)の候補遺伝子の同定

発表者：高野 淳¹、溝下和則²、高須賀晶子¹、杉本喜憲¹

所 属：¹畜技協・動物遺伝研、²鹿児島県・肉改研

要 旨：【背景・目的】家畜の育種改良のための重要な目標の一つとして、脂肪交雑や枝肉重量といった経済形質の遺伝子座の同定が上げられる。これまでに我々は、黒毛和種父方半兄弟家系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。この領域のさらなる絞り込みのために、まず、60個のBACクローンでカバーされる約6.8MbのBAC整列地図の作成と、新規マイクロサテライト (MS) マーカーの開発を行い、80個のMSマーカーを含む高密度な物理地図を作成した。次に、*CW-1*領域全体に渡り*Q*ハプロタイプがホモである種雄牛2頭の父方半兄弟家系を用いて、当該領域のLDマッピングを行い、1.1Mbの領域まで狭めた。さらに、11頭の種雄牛の産子1,700頭について、この1.1Mbの*Q*ハプロタイプの枝肉重量における効果を調べ、最初の*Q*で23.6kg、二つ目の*Q*で15.2kgの有意な増加効果を得た。従って、この1.1Mbの領域内に*CW-1*の責任遺伝子が存在することが強く示唆された。現在、責任遺伝子を同定するために、(1) 1.1Mb領域内の遺伝子群のアミノ酸変異の有無の解析、(2) *Q/q*間におけるそれらの遺伝子の発現量の比較、(3) マウスにおける候補遺伝子の影響を調べているので報告する。

【方法・結果】1.1Mb内のヒト相同遺伝子の全エクソンについて、種雄牛AのSNP探索を行ったが、各遺伝子のタンパク質翻訳領域に、アミノ酸置換を伴う変異は見つからなかった。次に、各遺伝子の発現量を*Q/q*間で比較するために、子牛集団についてMSマーカーの型判定を行い、1.1Mbハプロタイプが*Q/Q*および*q/q*である個体(6ヶ月齢)の各種臓器を採取し、RNAを抽出した。本領域内のヒト相同遺伝子およびウシESTについて定量的PCRを行ったところ、4つの遺伝子において各々3-10倍程度の差が認められた。現在この4つの遺伝子の転写制御領域についてSNP探索を進めている。

(日本分子生物学会第28回大会、2005年12月、福岡)

学会発表12.

題 目：和牛における脂肪交雑QTLの特定とBACコンティグ作成および解析

発表者：平野 貴¹、井上和也²、原 好宏²、小林直彦³、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、³岐阜県畜産研

要 旨：【目的】家畜の経済形質の多くはQTLs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効率的な育種が可能となる。我々は、種雄牛Aの父方半きょうだい家系を用いた解析で、脂肪交雑 (BMS) に関するQTLをマップした。このQTL領域のDNA情報を育種選抜に利用するため、領域を狭め、候補遺伝子を特定することを試みた。

【方法】種雄牛Aの母方兄弟である種雄牛Bの家系での解析を行い、これら種雄牛のハプロタイプおよび各産子のBMS値を比較することでQTL領域を狭めることを試みた。狭めた領域をカバーするBACコンティグは、2個のマイクロサテライト (MS) マーカーと24個の既知遺伝子をアンカーとしてライブラリー (RPCI-42) から得られたクローンの末端配列をゲノムウォーキングに用いて作成した。MSはBACクローンから(CA/GT)_nをプローブとして単離した。

【結果】種雄牛Aの家系でBTA7にマップしたBMSに関するQTLは、近縁種雄牛Bの家系では検出できなかった。これら各産子のBMS値の比較から、種雄牛A特有のハプロタイプ中に脂肪交雑関連遺伝子が存在すると考えられた。当該領域のハプロタイプの比較より、種雄牛Aの*Q*は種雄牛Bでは組み換えが起こっていることがわかったので、95%信頼区間のQTL領域から組み換え点より外のIBD領域を除きQTL領域を6-cMまで狭めた。作成したBACコンティグは64個のクローンから構成さ

れ、対応するヒトゲノム領域は9.3-Mbに渡る。コンテイクからMSマーカーを新たに68個開発したので、一般集団による相関解析によりさらに領域を狭めることを試みている。

(日本分子生物学会第28回大会、2005年12月、福岡)

学会発表13.

題 目：ウシ黒毛和種9番染色体上の脂肪交雑遺伝子座(*Marbling-4*)のファインマッピング

発表者：高須賀晶子¹、小江敏明²、溝口 康¹、渡邊敏夫¹、杉本喜憲¹

所 属：¹畜技協・動物遺伝研、²鳥取畜試

要 旨：【目的】 これまでに様々な黒毛和種種雄牛の父方半兄弟家系を用いたQTL解析によって、黒毛和種牛肉の脂肪交雑(BMS値; beef marbling standard score)に影響を及ぼすQTLが、数本のウシ染色体上にマッピングされてきた。その中の、種雄牛Aで見出された9番染色体上のQTL (*Marbling-4*)について、ファインマッピングを行った。

【方法・結果】 種雄牛Aの去勢肥育産子について、屠場-1で収集した354頭と屠場-1で収集した439頭を、ウシ9番染色体上のマイクロサテライトマーカー47個を用いて型判定を行った。屠場による補正BMS値を用いてQTL解析を行い、*Marbling-4*を37.6-43.8cM領域に狭めた。用いた産子の母方ハプロタイプを検討したところ、種雄牛Aの持つ*Marbling-4*のQ(優良型)アリルは、非常に稀にしか存在せず、そのほとんどは、3代祖に種雄牛Aの父牛を持つものであった。そこで、屠場-1と屠場-2で収集した一般去勢肥育牛の血統を調査したところ、母方の2代祖(母の父)または3代祖(母の母の父)が種雄牛AまたはAの父牛である個体が772頭得られた。このうち、高BMS(>=8)129頭と低BMS(=<4)150頭を用いて、狭めた領域を含む30-55cM領域について、20個のマイクロサテライトマーカーを用いて型判定を行った。高BMS集団と低BMS集団におけるQ頻度の比率は1.6から1.0の間で推移し、一方、q頻度の比率は0.70から1.2の間で推移した。Fisherの正確検定を行うと、37.6cM付近のマーカーで最も低いP値(0.031)が得られ、また、40.3-55cMには相関が見られなかった。この結果は、QTL解析の結果を裏付けると同時に、QTL解析で狭めた領域の前半37.6-40.3cMが有力候補領域と考えられた。

(第28回日本分子生物学会年会、2005年12月、福岡)

学会発表14.

題 目：マイクロサテライトマーカーによるウシ・ハプロタイプブロック長の調査および品種特異的ハプロタイプによる品種鑑別の試み

発表者：渡邊敏夫、高須賀晶子、溝口 康、平野 貴、高野 淳、杉本喜憲

所 属：畜技協・動物遺伝研

要 旨：【目的】 近年、量的形質遺伝子座(QTL)領域絞り込みの手法として連鎖不平衡(LD)マッピングが注目されているが、同手法は祖先型のハプロタイプはhistorical recombinationにより細かく分断されているとの仮定に基づく。Farnirら(2000)および小谷ら(2004)は、ウシ(それぞれ乳用品種および黒毛和種品種)のハプロタイプブロック長はいずれも数十cMに及ぶと報告しているが、彼らが用いた多型マーカー密度はいずれも平均間隔が10cM程度と低密度であった。もしこれらの報告が正しいとすれば、たとえLDマッピングの手法を用いてもウシにおいてはQTL領域を狭めることは困難であると予想される。われわれはウシ染色体上に任意に選んだ3箇所(10cM以下の狭い範囲)に高密度にマイクロサテライトマーカーを配置して、黒毛和種品種集団およびホルスタイン種集団におけるハプロタイプブロック長を調査した。さらに2品種

それぞれにおけるハプロタイプを分類し、品種特異的なハプロタイプを利用した品種鑑別の可能性について検討した。

【方法と結果】東京市場および大阪市場で肉片として収集した黒毛和種品種個体サンプルから192頭を、国内において血液として収集したホルスタイン個体サンプルから96頭をそれぞれ抽出し解析対象とした。染色体7番、14番、21番の任意の箇所にマイクロサテライトマーカーをそれぞれ約10cMの範囲に68個、約8cMに28個、約7cMに42個配置し、それぞれ型判定をおこなった。おのおのの集団においてEMアルゴリズムにより推定されたマーカーペアワイズのハプロタイプ頻度から D' を算出し、これを連鎖不平衡度の指標とした。結果、1cM以下にブロックが分断されていると考えられる箇所が多く観察されたが、 D' 平均が急激に低下するマーカー距離は特に観察されなかった。また品種特異的なハプロタイプと考えられる箇所もいくつか観察された。各品種集団におけるハプロタイプの頻度が著しく異なるマーカーペアを選び、品種について事前情報がないと仮定したサンプルの品種推定（黒毛和種/ホルスタイン）を試みた。マーカー型判定後の事後確率比1000をしきい値としたとき、判定成功率97.0%になるマーカーペアを得た。この結果からハプロタイプによる品種鑑別は有望であると考えられた。

(第28回日本分子生物学会年会、2005年12月、福岡)

学会発表15.

題 目：連鎖解析によるウシ乳房炎抵抗性遺伝子の同定とその機能解析

発表者：杉本真由美¹、藤川 朗²、杉本喜憲³

所 属：¹家畜改良セ、²北海道畜試、³畜技協・動物遺伝研

要 旨：【目的】ウシ乳房への常在細菌感染で生じる乳房炎は、国内のホルスタイン種の20-30%に発生する。乳房炎に罹ると、生産乳の出荷停止や治療費の負担だけでなく、完治は困難なため感染牛の廃棄と新規更新の経費がかかり、全国で年間690億円の被害をもたらしている。年間3,000億円と云われる牛乳生産高と比べ、その負担は大きい。現在、集団選抜法により乳牛における乳生産性の遺伝的能力は充分改良されているが、生産経費を下げるためには、乳房炎抵抗性を遺伝的に高めることが急務である。そこで、連鎖解析を用いた抵抗性遺伝子の同定を行った。

【方法と結果】祖父牛を共有する6頭の種雄牛の半姉妹家系を用いて、297頭の抵抗型ウシと181頭の感受型ウシを選択タイピングすることにより、乳房炎抵抗性遺伝子候補を同定した。感受型ウシでは、神経発達に関与する転写因子と知られているforebrain embryonic zinc finger-like (FEZL) 遺伝子の12グリシン鎖に3塩基の挿入が見られ、13グリシン鎖に変異していた。乳房炎発症時及び培養乳腺細胞へのLPS刺激により、乳腺におけるFEZL遺伝子の発現量は上昇した。FEZLを過剰発現させた乳腺細胞のクロマチン免疫沈降法及び電気泳動移動度シフト解析により、FEZLは神経軸索誘導因子と知られているsemaphorin (SEMA) 5A 遺伝子のプロモーター領域におけるGCAG配列に結合することが分かった。SEMA5Aを過剰発現させた乳腺細胞のマイクロアレイ解析により、SEMA5Aはtumor necrosis factor α (TNF α) やinterleukin (IL) 8 等9つの免疫関連遺伝子の発現を誘導していることが確認された。ルシフェラーゼ解析及びリアルタイムPCRにより、感受型FEZLは、抵抗型FEZLに比べ、SEMA5A、TNF α 及びIL-8の発現誘導の程度が低下していた。感受型ウシはFEZL-SEMA5Aを介した免疫反応が抵抗型ウシより弱いために、乳房炎に罹りやすいのかもしれない。我々の結果は、乳房炎抵抗性を遺伝的に高める新しい方法を提供し、FEZL-SEMA5Aは自然免疫応答にも関与していることを示唆している。

(第28回日本分子生物学会年会ワークショップ「自然免疫」、2005年12月、福岡)

学会発表16.

題 目：黒毛和種の父方半きょうだい家系解析による脂肪交雑QTLの検出

発表者：安部亜津子¹、渡邊敏夫²、中村亮一¹、長谷川清寿¹、佐々木恵美¹、杉本喜憲²、高仁敏光¹

所 属：¹鳥根県畜技セ、²畜技協・動物遺伝研

要 旨：【目的】我々は黒毛和種の経済形質に關与する染色体領域を特定するため、父方半きょうだい家系を用いたQTL解析を行っている。今回、1頭の種雄牛(sire A)を対象として、脂肪交雑(BMS No.)に關する解析を行った。

【方法】Sire A由来の去勢産子(527頭)からBMS No.の上位(8~10)および下位(2~3)の個体(161頭)を抽出し、1次スクリーニングの解析対象とした。常染色体上227個のマイクロサテライトマーカーを型判定後、染色体上の任意の点において、産子にQが伝達された確率の表現型値に対する線形回帰を行うことでQTLの有無を検定した。その結果に基づき、2次スクリーニングを行った。【結果】1次スクリーニングでgenome-wise5%水準で有意な領域は3か所(BTA4, BTA9, BTA14)検出された。このうち、BTA 9, 14について25マーカー、711頭を用いた2次スクリーニングを行った結果、BTA9は最大LOD score7.15(72cM)、BTA14では最大LOD score6.52(40cM)を示し、ハプロタイプ置換効果はBTA9、BTA14ともに0.6と推定された。

(日本畜産学会第106回大会、2006年3月、福岡)

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17年度の委員会は平成18年3月2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. ウシゲノム解析用ツールの開発
 - 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. ウシ全ゲノムを対象とする相関解析手法による新たな経済形質の解析
 - e. 牛肉品種鑑定
 - f. ウシ抗病性遺伝子座の解析
- ② 我が国における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
 - a. ヒトゲノム研究の動向から見る家畜ゲノム研究の近未来
 - b. 肉用牛DNA研究・開発推進の今後
- 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
- ④ 次年度開始事業及び継続実施予定事業

これらの議事の中で、動物遺伝研究所の17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
木下 良智	(独) 家畜改良センター理事長
小島 信男	全国畜産関係場所長会会長
佐々木義之	京都大学大学院農学研究科教授
柴田 正貴	(独) 農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所長
辻 莊一	神戸大学農学部名誉教授
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

研究情勢報告者

菅野 純夫	東京大学大学院新領域創成科学研究科教授
辻 莊一	神戸大学農学部名誉教授

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17年度委員会は、平成18年2月23日動物遺伝研究所で開催された。議事は次の通りであった。

- ① ウシゲノム解析用ツールの開発
 - a. ウシゲノム解読の現状
- ② ウシ経済形質遺伝子座の解析
 - a. 黒毛和種経済形質QTLマッピングのまとめ
 - b. 黒毛和種の脂肪交雑遺伝子*Marbling-1*遺伝子の同定について
 - c. 黒毛和種の枝肉重量遺伝子*CW-1*遺伝子の同定について
- ③ ウシにおける連鎖不平衡について～牛肉品種鑑定技術開発と全ゲノム対象相関解析への応用
- ④ 平成17年度のその他の研究成果と平成18年度の研究計画について
- ⑤ 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	東京大学大学院新領域創成科学研究科教授
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官

3) 全国DNA育種推進会議

この会議は畜産新技術実用化対策事業の一環である「DNA育種基盤の確立」にかかる全国推進会議である。平成13年度からは動物遺伝研究所と道県の研究機関との共同研究はこの事業の枠組みの中で実施されることになったもので、平成12年度までの連絡調整会議に相当する。共同研究参画機関は20の道県（北海道、岩手、宮城、秋田、山形、福島、茨城、山梨、岐阜、兵庫、鳥取、島根、岡山、広島、佐賀、長崎、熊本、大分、宮崎、鹿児島）であり、本事業の枠組み外で動物遺伝研究所と共同研究を行っている（独）家畜改良センター、（社）家畜改良事業団も本推進会議に参加した。

第1回の平成17年度推進会議は平成17年10月27日動物遺伝研究所で開催された。主要議題は、① 経済形質のゲノム解析手法について、② 効果検証について、③ 研究報告「*Marbling-3*の解析」、④ 平成17年度事業実施状況について、⑤ 平成17年度事業計画と進展について、⑥ 経済形質解析のまとめと質疑応答等であった。

第2回の平成17年度推進会議は平成18年3月9日東京で開催された。主要議題は、① 平成17年度事業報告と平成18年度事業計画について、② 黒毛和種経済形質のゲノム解析のまとめ、③ 質疑応答および今後の進め方等であった。

4) 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17年度は検討委員会を平成18年2月3日東京で開催された。議事は次の通りであった。

① 平成17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 事業3年間の成果について

- a. 動物遺伝研究所
- b. 神戸大学

③ 事業成果の最終とりまとめについて

牛肉の品種鑑定技術検討委員会委員

椎名 隆	東海大学医学部分子生命科学科助手
高橋 博人	(独) 家畜改良センター技術部長
谷口 幸雄	京都大学大学院農学研究科助手
辻 荘一	神戸大学農学部名誉教授
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

5) SNP利用検討会議

ウシゲノム解析用ツールの開発に伴い、新たなDNAマーカーであるSNP（一塩基多型）の開発が網羅的に進められ、実用段階に至りつつある。今後の活用法などを視野に入れ、専門家を招集した会議を平成17年8月4日に東京で開催した。議事は次の通りであった。

① ウシSNP開発及び利用状況について

② ウシSNP情報利用の留意点と問題点について

ウシSNP利用検討会議委員

大谷 健	岐阜県畜産研究所所長
菊地 令	(独) 家畜改良センター技術部長
小松 正憲	(独) 農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所上席研究官
田原 則男	鹿児島県肉用牛改良研究所研究主幹
辻 荘一	神戸大学農学部名誉教授
新山 正隆	(社) 家畜改良事業団専務理事
藤山秋佐夫	国立情報学研究所学術研究情報系教授
吉村 豊信	(社) 全国和牛登録協会専務理事

6) 研究会等の開催

① (独) 農業生物資源研究所、(社) 農林水産先端技術産業振興センターと共催で国際動物ゲノムワークショップ「抗病性解析と家畜育種・選抜をめざして」を開催した。

開催日：平成17年11月9日

開催場所：日本自転車会館ホール、東京

内容：

第1部 MHC (主要組織適合性複合体) およびMHC様遺伝子の構造

(1) MHC研究の現状について

(猪子英俊、東海大学医学部分子生命科学科)

(2) ニワトリMHCとその疾病との関連について

(Marcia M. Miller, City of Hope National Medical Center)

(3) MHC領域の創成とMHC遺伝子の進化ダイナミクス

(笠原正典、北海道大学大学院医学研究科)

(4) 各種動物のMHC領域の構造と疾病との関連

(椎名 隆、東海大学医学部分子生命科学科)

(5) ブタのMHC様遺伝子CD1のゲノム構造解析

(小川智子、(独) 農業生物資源研究所)

第2部 MHCおよびMHC様遺伝子の機能と感染防御との関連

(6) MHCと感染防御との関連：マウスレトロウイルスの感染におけるMHCを介した感染防御メカニズム (河原佐智代、近畿大学医学部免疫学教室)

(7) MHC遺伝子型と感染防御との関連：サルSIVの感染におけるMHC拘束性エピトープ特異的CTLの抑制効果 (俣野哲朗、東京大学大学院医学研究科)

(8) CD1遺伝子の機能と疾病との関連 (杉田昌彦、京都大学ウイルス研究所細胞制御研究分野)

② 動物遺伝育種シンポジウム組織委員会による第11回シンポジウム「動物ゲノム解析と新たな育種戦略：産業動物育種への新たな視点と技術」を北大21世紀COEプログラムと共催した。

開催日：平成17年9月12日

開催場所：北海道大学学術交流会館 (北海道札幌市)

内容：

セッションI. 育種改良から見た遺伝子発現調節と乳牛の生産寿命

(1) 育種改良とエピジェネティクス

(須田義人、宮城大学食産業学部)

(2) ホルスタインの生産寿命と体型形質の関連

((社) 日本ホルスタイン登録協会北海道支部)

特別講演

Milestone events and future perspective of genetic manipulation for aquaculture
(Yoon Kwon Nam, 大韓民国釜慶大学校水産科学大学)

セッションII. 産業育種へのトランスジェニックおよびクローン技術の応用

- (3) 遺伝子改変家畜の現況とその利用、とくに脂質改変による食への貢献
(佐伯和弘、近畿大学生物理工学部)
- (4) ウシの体細胞クローン技術——その応用に向けた取組み
(澤井 健、北海道立畜産試験場)

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17年度は次の6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年度より）
 - 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17年度新規）
 - ①委託先：北里大学獣医畜産学部 大動物外科学研究室
 - ②委託研究者：渡辺大作

- 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) 量的形質遺伝領域のマッピングのためのヒトーウシ比較地図の高精度化に関わる技術開発（平成17年度新規）
 - ①委託先：（独）農業生物資源研究所ゲノム研究グループ
 - ②委託研究者：安江 博

- 6) 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

- 7) 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

- 8) 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
広島県立畜産技術センター	辻 紗弥香 辻 紗弥香	平17. 4. 18～4. 28 平17. 10. 24～10. 28
佐賀県畜産試験場	片 淵 直 人 片 淵 直 人 片 淵 直 人	平17. 6. 14～6. 17 平17. 10. 24～11. 2 平18. 3. 14～3. 23
山形県農業研究センター	中 嶋 宏 明 中 嶋 宏 明	平17. 7. 6～7. 20 平18. 1. 6～1. 20
岡山県総合畜産センター	古 川 恵	平17. 7. 25～8. 5
鳥取県畜産試験場	小 江 敏 明	平17. 10. 3～10. 28
島根県立畜産技術センター	中 村 亮 一 安 部 亜津子	平17. 9. 28～10. 14 平18. 1. 6～1. 20
福島県畜産試験場	小 林 準 小 林 準	平17. 10. 17～10. 21 平17. 10. 24～10. 28
茨城県畜産センター	木 村 安 之 藤 森 祐 紀 藤 森 祐 紀	平17. 12. 12～12. 16 平17. 12. 12～12. 16 平18. 3. 13～3. 23
大分県農林水産研究センター	藤 田 達 男 藤 田 達 男	平17. 12. 12～12. 23 平18. 1. 30～2. 9
熊本県農業研究センター	古 田 雅 子	平18. 1. 16～2. 10
宮城県畜産試験場	千 葉 和 義 千 葉 和 義	平18. 1. 19～1. 20 平18. 2. 9～2. 16
岐阜県畜産研究所	小 林 直 彦	平18. 2. 2～3. 17
鹿児島県肉用牛改良研究所	瀬戸口 浩 二	平18. 2. 6～2. 17
兵庫県立農林水産技術総合センター	龍 田 健	平18. 2. 15～2. 17
長崎県肉用牛改良センター	丸 田 俊 治	平18. 3. 6～3. 17

6. 職員の普及活動等

1) 講演

1. 杉本喜憲：「ウシゲノム解析とDNA育種」、日本学術会議公開シンポジウム「動植物育種の未来とゲノム研究」、2005年6月、東京。
2. 杉本喜憲：「畜産におけるバイオテクノロジー技術の応用について」、第22回食品産業コーデックス対策委員会、2005年8月、東京。
3. 杉本喜憲：日本の農畜産分野における育種研究：畜産生物「ウシDNA育種の現状と今後の課題」、中央水産研究所ワークショップ「水産における育種－その戦略的研究展開」、2005年10月、横浜。
4. 杉本喜憲：DNA解析研究に関する講演、黒毛和種の経済形質解析。平成17年度DNA解析に関する検討会、2005年11月、高山。
5. 平野 貴：黒毛和種大規模家系QTL解析の現状と展望。平成17年度DNA解析に関する検討会、2005年12月、高山。
6. 井原尚也：家畜ゲノム解析の現状と課題、褐毛和種育種改良技術検討会、熊本県農業研究センター、2006年3月、熊本。
7. 杉本喜憲：「肉用牛育種におけるTgマウス利用の可能性」、教育セミナーフォーラム2006「実験動物及び畜産分野におけるトランスジェニック技術」、(社)日本実験動物協会、2006年3月、東京。

第3節 研究の解説

「ウシゲノム解析用ツールの開発とゲノム解読の現状」 高須賀 晶子

1. はじめに

ゲノム解析のツールとして、連鎖地図、RH地図、BAC整列地図など（後に詳述する）があげられるが、究極は全ゲノム塩基配列の決定である。2001年にヒトゲノムドラフト配列が決定されて以降、哺乳動物としては、マウス（2002年）、ラット（2004年）、チンパンジー（2005年）、イヌ（2005年）のゲノム配列が決定され、次いで、今、ウシのゲノム配列が決定されつつある。家畜の中では、ニワトリに次ぐ2番手となり、3番手にはブタの配列決定が予定されている。ウシのゲノム塩基配列決定は、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で行われているが、ここは、一ヶ月で一つの哺乳動物種ゲノムの塩基配列を読むキャパシティを持っているようだ。が、実際は、最初にあげたような地図（それも、多数のマーカーを持つ高密度のもの）がなければ、染色体上の位置のわからない、短い配列断片が大量にできるだけで、ゲノム配列にはならない。

動物遺伝研究所では、ウシゲノムプロジェクトが始まる以前から、研究を効率良く進めるにはゲノム解析用ツールの充実が必須と考え、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の作成に、また、ネバダ大との共同で高密度RH地図の作成に着手した。その後、米国を中心とした国際コンソシアム（日本の研究機関は参加していない）が結成され、BACフィンガープリント整列地図などが作成されつつある。ウシゲノム塩基配列については、2004年9月に、3xWGS(Whole Genome Shotgun)配列（全ゲノムを断片化した配列を、のべて全ゲノムの3倍に相当する長さ読んだもの）が、ついで、2005年3月に、6xWGS配列が公開された。ここでは、私たちの作成した高密度連鎖地図およびRH地図を、ウシゲノム解読の現状とともに紹介したい。また、ゲノム解析に詳しくない方のために、次項で各地図の特長と役割について記したので、参照していただければと思う。

2. 各々の地図の特徴と役割

地図には、連鎖地図と物理地図（RH地図、BAC整列地図）とがあり、連鎖地図は、マーカー間の距離を遺伝的な物差し（連鎖の度合い、すなわち遺伝上の組み換え頻度）で測り、並べたものであるのに対して、物理地図はDNAの長さという物理的な物差しの上にマーカーを並べたものである。

(1) 連鎖地図

減数分裂の過程で相同染色体間の組み換えが50%の確率で起こるが、ある2マーカーの位置（座位という）が同一染色体上で近い位置にあればあるほど、その間で組み換えの起こる確率は低くなり、ともに親から子に受け継がれる（連鎖する）確率が高くなる。一方、距離が遠ければ、その間で組み換えの起こる確率は高く、連鎖しない。多数の減数分裂が観察できる大きな家系で各マーカーの伝わり方を調べると、マーカー間の組み換え頻度が算定でき、遺伝的尺度上にマーカーを並べることができる。

連鎖地図のマーカーには、相同染色体間を識別できる多型性が必要である。ゲノム上には、マイクロサテライトと呼ばれる短い塩基配列の繰り返しから成る反復配列（(CA)_nなど）が散在しており、その繰り返し数_nは各相同染色体に固有であるので、連鎖地図のマーカーとして汎用される。

連鎖地図の役割には、大きく2つがあり、ひとつは、遺伝病や経済形質などの座位をマッピング

ングするためのマーカーの提供、もう一つは、物理地図作成のための足場の提供である。

(2) RH地図

RH地図は、放射線照射体細胞雑種 (Radiation Hybrid) 地図のことで、一定量の放射線照射で切断されるゲノムDNAの長さが尺度となっている。正常細胞 (私たちの場合は、ウシ正常細胞) の染色体を放射線照射により断片化した後、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、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「RHパネル」を用いて、地図を作成する。RHパネルを構成する各DNAには、断片化された正常細胞 (ウシ) 由来の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地図のマーカーは、連鎖地図のマーカーのように多型性を必要としないため、遺伝子配列からマーカーを設計してマッピングすることにより、遺伝子地図を作ることができる。一方で、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地図の信頼性を確保するためには、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)。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である。

RH地図の有用性は、第一に、遺伝子地図を作ることができるということで、これによって、他の種、例えばヒトとのゲノム比較地図を作成することができ、比較地図を通じて、ヒトなどの豊富な遺伝子情報をはじめとするゲノム情報を利用できるようになることである。連鎖地図との統合によって、遺伝病などをマッピングした染色体領域が、ヒトのどの染色体領域に相当するのか、そこにはどのような候補遺伝子があるか、を一時に知ることができる。第二に、BAC整列地図の作成やゲノム配列を染色体上に並べる際の足場として、重要である。

(3) BAC整列地図

染色体DNAを150-200kb程度の大きさに切断して、大腸菌細胞内で複製できるように人工染色体に組み込んだものをBACクローンといい、これを染色体上の順番で並べたものがBAC整列地図である。BACクローンDNAを特定の制限酵素で切断したパターン (フィンガープリント) 同士を比較し、パターンの相同性に基いてつなぎ合わせることによって、染色体上の順番にBACクローンを並べることができる。このようにして並べたBACクローンの一群をコンティグと呼ぶ。コンティグに含まれるマーカーを用いて、RH地図と統合することにより、コンティグを染色体上に並べたBAC整列地図ができる。

BAC整列地図があるか否かは、ゲノム配列決定の質を左右する。ゲノム配列決定には、通常、全ゲノムを断片化した配列を全ゲノムの6倍長読んだものと、整列化したBACクローンを全ゲノムの2倍長読んだものとを合わせて用いる。後者を加えることにより、配列間のギャップやつなぎ間違いの少ないゲノム配列が得られる。

3. 高密度連鎖地図の作成

ウシでは、1997年に米国農務省肉畜研究センター（USDA-MARC）らのグループが、1250個のDNAマーカーを含む連鎖地図を作成したが（Kappesら1997）、その後は、形質のマッピングにはこの程度の密度でも差し支えないことと、マーカーの開発には多大な労力と費用がかかることから、連鎖地図の更新はなされていなかった。しかし、疾病や経済形質をマッピングした後の原因遺伝子の同定を視野に入れた時、マッピングした領域ごとにマーカーを高密度に開発するのでは、大変に効率が悪い。そこで、全ゲノムを対象にランダムにマーカーを開発し、3000個のマイクロサテライトマーカーを含む連鎖地図を作ることを目標として作成に取りかかった。そして、2293個のマイクロサテライトをUSDA-MARCの連鎖地図に追加することによって、3802個のマイクロサテライトマーカーを含む3960個のマーカーから成る地図を作成し、Shirakawa-USDA連鎖地図として発表した（Iharaら2004）（図1. Shirakawa-USDA連鎖地図BTAI-3）。

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、USDA-MARCのウシ標準家系では、解像度の限界は0.8cM（＝約800kb）である。Shirakawa-USDA連鎖地図の3960個のマーカーは、2423ポジションの「点」であり、マーカー間隔は平均1.4cMであった。連鎖地図の更新により、マーカー間隔が10cMを超えるギャップは、X染色体の一箇所を除いてなくなり、全ゲノムの51%はマーカー間隔2cM以下で、また、91%は5cM以下でカバーされた。この結果、疾病や経済形質のファインマッピングに十分なマーカー密度となり、また、RH地図の足場としても十分なものが作成できた。

4. 高密度RH地図とウシ-ヒトゲノム比較地図の作成

2000年に米国テキサスA&M大学のWomackらのグループ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（Bandら2000）。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、英国のロス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（Williamsら2002）。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た。前者のWomackらのRHパネルについては、イリノイ大のLewinらのグループが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地図を作成し、2004年に報告した（Everts-van der Windら2004）。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ず、信頼性および解像度に限界があると思われた（図2. SUNbRH地図BTA6）。

私たちは、米国ミネソタ大（現、ネバダ大）のBeattie教授と共同で、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、Shirakawa-USDA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2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おり、RH地図の解像度のよいことが一目でわかる。

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）の一部について塩基配列を決定したものをいう。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（Takasugaら2001; Itohら2003）。

このようにして、計5593マーカーから成るRH地図（SUNbRH地図）が完成した（Itohら2005）。

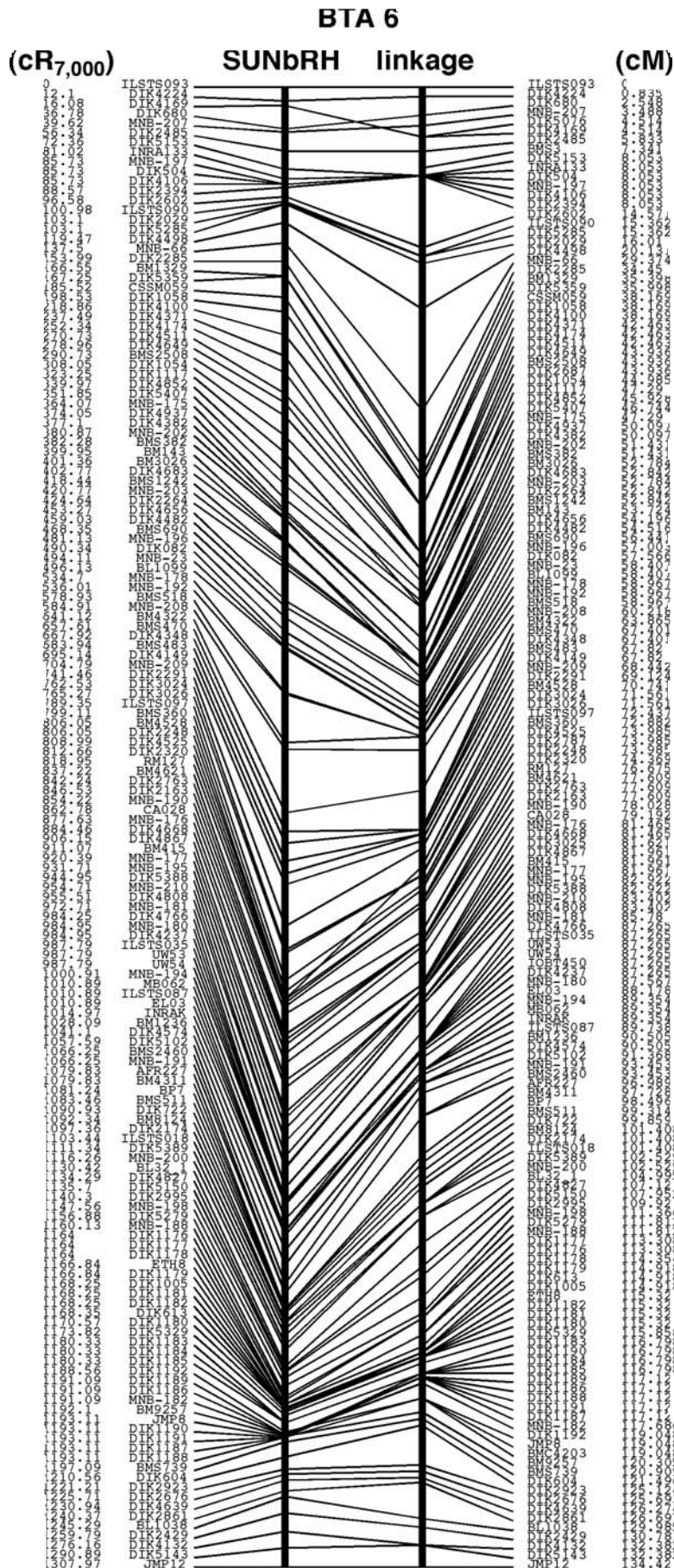


図 2. SUNbRHフレームワーク地図と連鎖地図との対応

例として第 6 番染色体を示した。その他の染色体については、<http://www.animalgenome.org/cattle/maps/RHMap3/>で閲覧できる。

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3)。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。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地図での1cRは、約114kbに相当すると算定された(図3. ウシ-ヒトゲノム比較図BTA1-6)。

5. BACフィンガープリント地図との統合

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(Itohら2005)。前述のように、国際コンソシアムでは、BACフィンガープリント地図を作成中で、随時、データをウェブサイトで公開している(<http://www.bcgsc.ca/lab/mapping/bovine>)。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ンの属するBACコンテイングを検索し、BACクロ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4)。その結果、私たちのRH地図は、BACコンテイン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クロンの末端塩基配列を相同性に基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(図4. SUNbRH地図を用いたBACコンテイングの整列化)。

6. ウシゲノム解読の現状

ウシゲノムプロジェクトは、PhaseIとPhaseIIから成り、PhaseIは、ウシゲノムの塩基配列決定からAnnotationまでを、PhaseIIは、SNP検索と各品種のHapMapの作成を目的としている。

PhaseIについては、先に触れたように、すでに、ゲノムの6倍長のWGS配列が公開されているが、現在、ゲノムの2倍長のBACskim(フィンガープリントで整列化したBACクロンを、単一、もしくは、プールして、配列を読んだもの)が進行中である(<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/>)。現在用いられているゲノム塩基配列決定の手法は、WGSとBACskimを組み合わせたもので、BACskimにより、配列間のギャップが埋まり、また、リピート配列によるつなぎ間違いが改善されることが期待される。実際、現在公開されている6xWGS配列は、92%のESTと96%のBAC末端配列を含んでいて、遺伝子のAnnotationにはほぼ十分であると考えられているが、WGS配列の半分は434kb以下の長さで、特に、遺伝子のプロモーター領域に相当するCpG island部分はギャップになっていることが多いのが現状である。

WGS配列とBAC skim配列は、アセンブルされてscaffold配列となった後、scaffold配列が含むマーカーによって、地図を通してウシ染色体上に配列される。ウシゲノムプロジェクトにおいて、高密度地図の必要性が認識されるのに伴い、前出の5000-radと3000-radのRH地図の充実も図られている。Lewinらのグループは、2005年12月に、3484個のマーカーから成る第3世代のRH地図を報告した(Everts-van der Windら2005)。これは、2516個のBAC末端マーカーを含んでおり、BACフィンガープリント地図との統合を図ったものである。また、カナダのMooreらのグループは、3000-radのRH地図に、多数のSNPをマッピングし、WGS配列との統合を図っている(McKayら2006)。また、米国ミズーリ大のTaylorらは、14世代から成るアンガス種の家系を用いて、多数のSNPをマッピングした連鎖地図を作成している。国際コンソシアムでは、現在これら

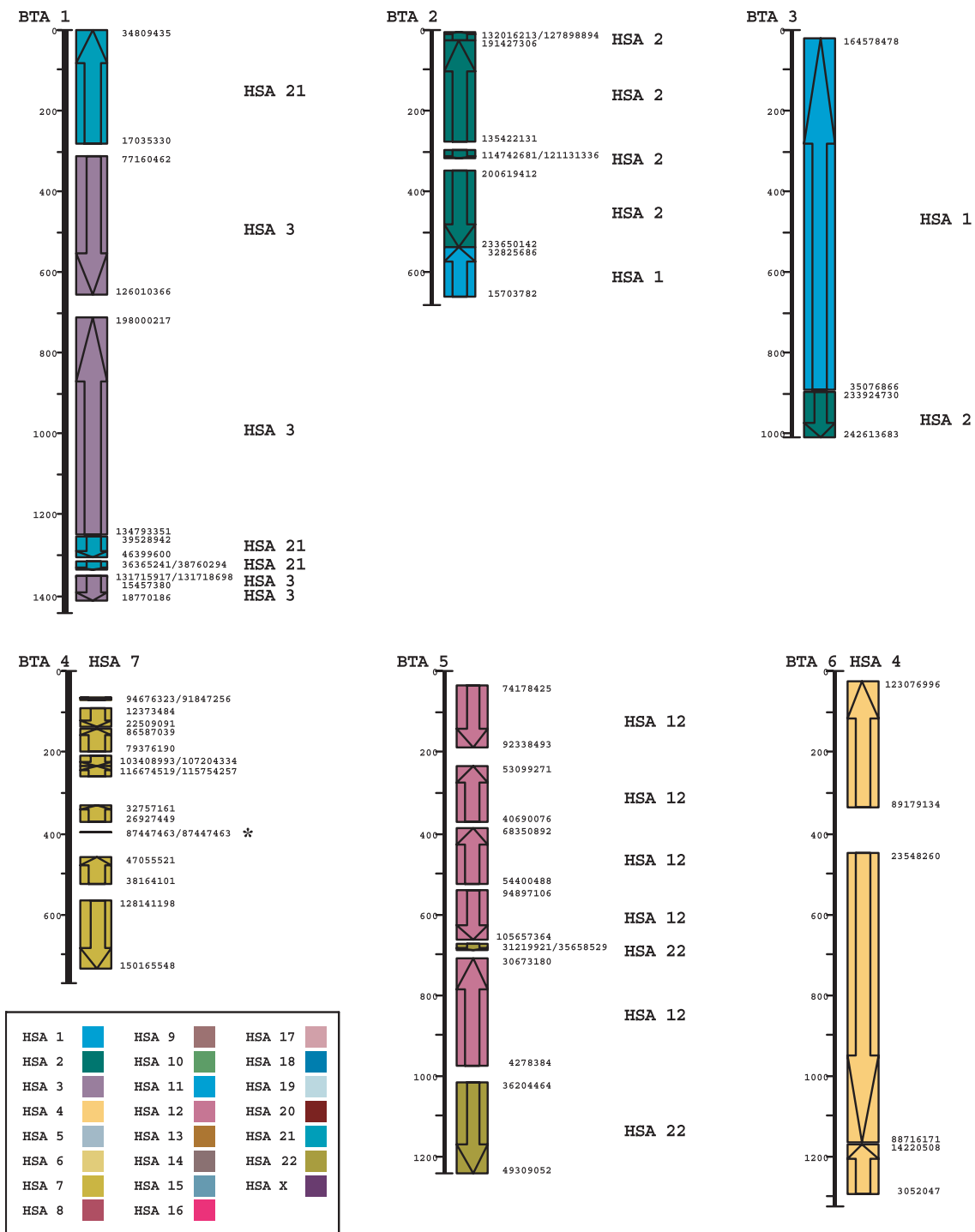


図3. ウシヒトゲノム比較地図

第1番染色体から第6番染色体までを示した。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。その他の染色体については、Itohらの文献（2005）を参照されたい。また、これらの詳細は、<http://www.animalgenome.org/cattle/maps/RHMap3/>で閲覧できる。

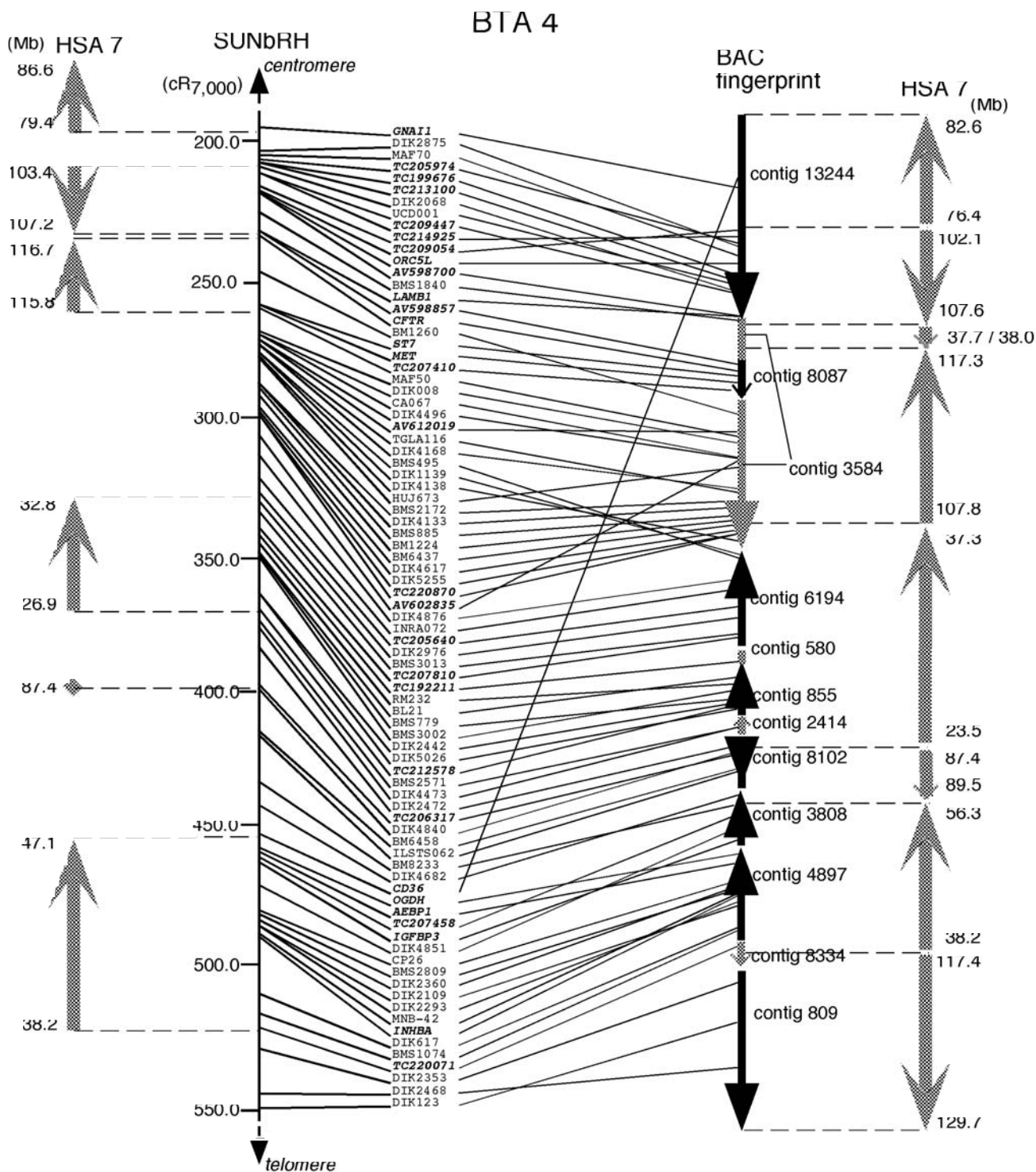


図 4. SUNbRH地図を用いたBACコンティグの整列化

ウシ 4 番染色体上の霜降りの肉質に関する領域について (Mizoshitaら2004)、SUNbRH地図とBACフィンガープリント地図の情報を用いて、BACコンティグの整列化を行った。SUNbRH地図上の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でいる。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。

すべてを含んだ統合地図 (Composite map) を作成中である。この統合地図を用いて、scaffold配列がウシゲノム上にアセンブルされる見込みである。

一方、PhaseIIは、SNP検索とHapMapの作成を目的としている。すでに、WGS (ヘレフォード種を使用) と、その他6品種 (アングス、ブラーマン、ホルスタイン、ジャージー、リムジン、ノルウエーレッド) のゲノムシーケンシングにより、一万個以上のSNPが見出されている。今後、これらのSNPが各品種でタイピングされ、ハプロタイプブロック等が明らかにされていく予定である。

7. おわりに

動物遺伝研究所が取り組んできたゲノム解析用ツールの開発は、時代の流れに沿って、ウシゲノムプロジェクトへ受け継がれた。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、ウシゲノム配列決定へのきわめて重要な貢献であったと位置付けられるだろう。PhaseIで完成度の高いウシゲノム配列が得られることが、PhaseIIのウシHapMapの作成にも重要である。SNPの正しい位置が得られなければ、ハプロタイプブロックの解析などできないからである。PhaseIIが完了する数年後には、ウシ品種間の差が、SNPレベルで明らかにされ、ヒトと同じように、ウシにおいてもSNPアレイを用いて全ゲノムを対象にした相関解析を行える基盤ができるだろう。その時には、ゲノム解析に関して、皆が同じスタートラインに立つことになる。今、その先を見通した戦略が必要とされている。

8. 引用文献

Band MR, Larson JH, Rebeiz M, Green CA, Heyen DW, Donovan J, Windish R, Steining C, Mahyuddin P, Womack JE, Lewin HA. 2000. An ordered comparative map of the cattle and human genomes. *Genome Research*, 10:1359-1368.

Everts-van der Wind A, Kata SR, Band MR, Rebeiz M, Larkin DM, Everts RE, Green CA, Liu L, Natarajan S, Goldammer T, Lee JH, McKay S, Womack JE, Lewin HA. 2004. A 1463 gene cattle-human comparative map with anchor points defined by human genome sequence coordinates. *Genome Research*, 14:1424-1437.

Everts-van der Wind A, Larkin DM, Green CA, Elliott JS, Olmstead CA, Chiu R, Schein JE, Marra MA, Womack JE, Lewin HA. 2005. A high-resolution whole-genome cattle-human comparative map reveals details of mammalian chromosome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 18526-18531.

Ihara N, Takasuga A, Mizoshita K, Takeda H, Sugimoto M, Mizoguchi Y, Hirano T, Itoh T, Watanabe T, Reed KM, Snelling WM, Kappes SM, Beattie CW, Bennett GL, Sugimoto Y. 2004. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Research*, 14:1987-1998.

Itoh T, Takasuga A, Watanabe T, Sugimoto Y. 2003. Mapping of 1400 expressed sequence tags in the bovine genome using a somatic cell hybrid panel. *Animal Genetics*, 34:362-370.

Itoh T, Watanabe T, Ihara N, Mariani P, Beattie CW, Sugimoto Y, Takasuga A. 2005. A comprehensive radiation hybrid map of the bovine genome comprising 5593 loci. *Genomics*, 85:413-424.

Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw RA, Sonstegard TS, Smith TP, Lopez-Corrales NL, Beattie CW. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research*, 7:235-249.

McKay SD, Murdoch BM, Williams JL, Gill C, Aerts J, Law A, Wang Z, Moore SS. 2006. An Illumina based whole genome bovine-human comparative map constructed with high throughput methodology. *Plant & Animal Genome XIV*, P540.

Takasuga A, Hirotsune S, Itoh R, Jitohzono A, Suzuki H, Aso H, Sugimoto Y. 2001. Establishment of a high throughput EST sequencing system using poly(A) tail-removed cDNA libraries and determination of 36,000 bovine ESTs. *Nucleic Acids Research*, 29: E108.

Williams JL, Eggen A, Ferretti L, Farr CJ, Gautier M, Amati G, Ball G, Caramorr T, Critcher R, Costa S, Hextall P, Hills D, Jeulin A, Kiguwa SL, Ross O, Smith AL, Saunier K, Urquhart B, Waddington D. 2002. A bovine whole-genome radiation hybrid panel and outline map. *Mammalian Genome*, 13:469-474.

第4節 総務

1. 職員名簿

(平成18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	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8月31日	高 田 亜 紀	動物遺伝研究部補助員	
平成18年3月31日	井 原 尚 也	動物遺伝研究部研究員	

3. 職員の海外出張

氏名	出張先	期間	用務
杉本喜憲	英国	平成17年7月17日～ 7月23日	英国ロズリン研究所においてウシゲノム解析についてセミナー及び助言（往復航空賃及び滞在費は英国ロズリン研究所負担）
高須賀晶子	アメリカ	平成18年1月31日～ 1月20日	カリフォルニア州サンディエゴ市で開催された第14回植物・動物ゲノム会議に参加

4. 施設・機器の整備

1) 施設

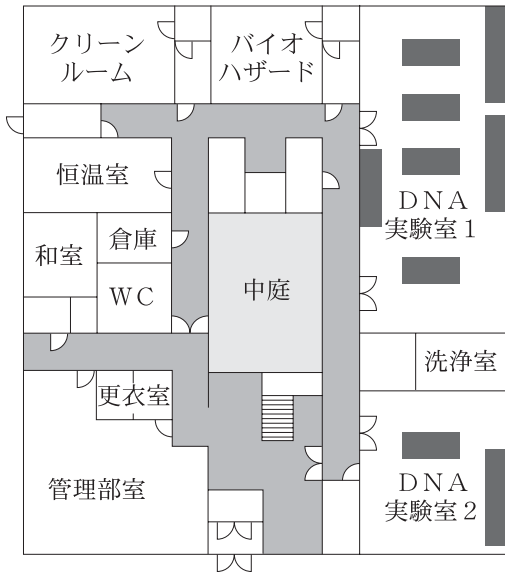
研究施設の平面図は47ページの通り。

2) 平成17年度購入の主要機器（単価百万円以上）

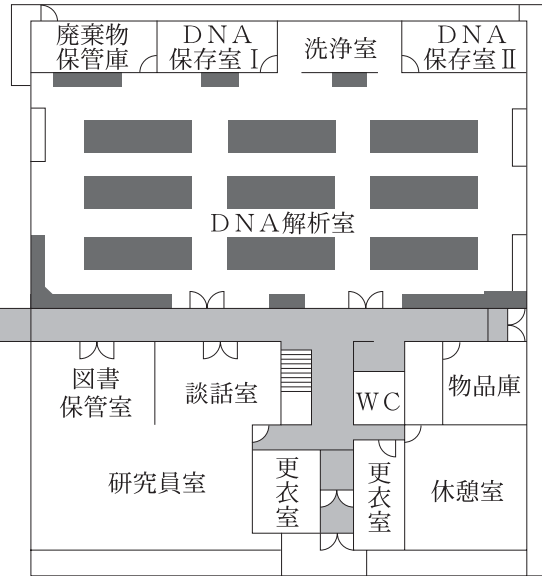
機器名	式数
超純水製造装置（ミリポア社製 Milli-Q Synthesis）	1
オートヒートシーラー（ABgene社製 オートヒートシーラー ALPS 300）	1
SNP型判定（アフィメトリクス・ジャパン製 GeneChip Scanner 300TGシステム）	1

研究施設平面図

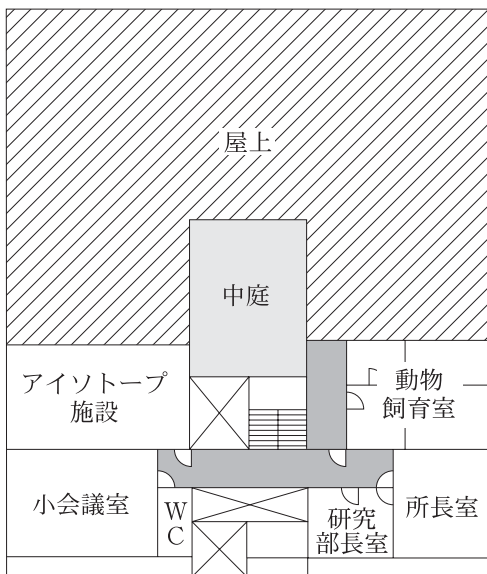
本館1階 (742m²)



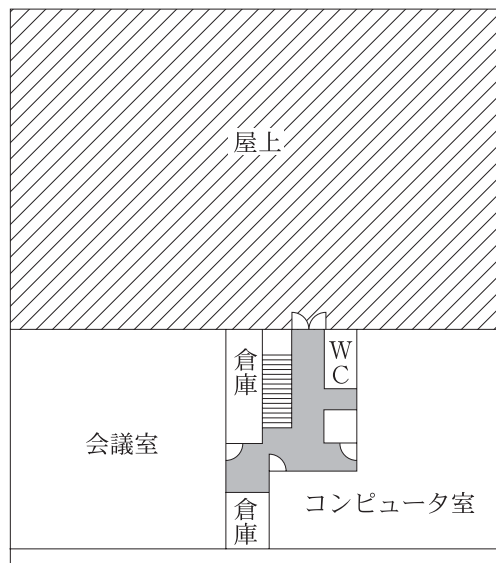
別館1階 (788m²)



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) Cell Metabolism
- 5) Current Biology
- 6) Genes and Development
- 7) Genome Research
- 8) Genomics
- 9) Journal of Biological Chemistry
- 10) Journal of Cell Biology
- 11) Mammalian Genome
- 12) Molecular Cell
- 13) Nature
- 14) Nature Genetics
- 15) Nature Medicine
- 16) Nature Reviews, Molecular Cell Biology
- 17) Nature Reviews, Genetics
- 18) Science
- 19) Trends in Genetics
- 20) 実験医学
- 21) 細胞工学
- 22) 畜産技術

第5節 資 料

Linkage analysis reveals two independent loci for ocular disorders in a local Japanese Black cattle population

N. Ihara*, T. Fujita¹, K. Shiga¹, M. Itoh¹, T. Watanabe* and Y. Sugimoto*

*Shirakawa Institute of Animal Genetics, Odakura, Nishigo, Nishi-shirakawa, Fukushima 961-8061, Japan; ¹Ohita Prefecture Livestock Experimental Station, Kuju, Naom, Ohita 878-0201, Japan

Summary

A vision-impairing ocular disorder was observed in a local Japanese Black cattle population, and assumed to be an autosomal recessive disease based on the presence of a founder cow. A genome scan using seven affected half-sib pairs revealed a linkage to BTA5 ($Z_{max} = 7.0$, $LOD_{max} = 2.31$), designated the bovine ocular disorder 1 (*bod1*) locus. Of the seven animals, three were heterozygous at the *bod1* locus. Analysis in these three animals revealed linkage to markers on BTA18, and this locus was designated *bod2*. Detailed haplotype inspection of 16 affected animals indicated linkage to BTA5 in 12 animals, BTA18 in three animals, and linkage to both BTA5 and BTA18 in one animal. The *bod1* locus was mapped to a 25 cM interval between *DKS137* and *DKS210* on BTA5 ($Z_{max} = 17.0$, $LOD_{max} = 11.81$), and *bod2* was mapped to a 7 cM interval between *DKS411* and *ENR4038* on BTA18 ($Z_{max} = 13.0$, $LOD_{max} = 4.0$). This study demonstrated that the independent involvement of loss of function mutations in two loci is likely responsible for this genetic heterogeneity.

Keywords BTA18, BTA5, cattle, genetic heterogeneity, ocular disorder.

Hereditary eye diseases often result in severe visual impairment or blindness. The most common hereditary cause of blindness is retinal or macular degeneration, characterized by the progressive loss of mature photoreceptor cells through apoptosis. Retinitis pigmentosa (RP), a clinically and genetically heterogeneous disease, can be inherited as autosomal dominant, recessive, X-linked, mitochondrial or genetically more complex modes (Kalloniatis & Fleisher 2004). Such complex and heterogeneous characteristics often hinder fine mapping of the disease locus. To date, 39 genes are reported to be involved in RP (Tosen *et al.* 2004), including those mainly expressed in the retina and retinal pigment epithelium, and encoding proteins involved in the phototransduction cascade, retinal metabolism, photoreceptor structural proteins and regulatory proteins such as transcription factors and splicing factors (Blackshaw *et al.* 2001; Hims *et al.* 2003).

A bovine ocular disorder characterized by visual impairment including blindness was observed in a local population of Japanese Black cattle. Affected animals developed postnatally bilateral visual impairment. The clinical features were heterogeneous between and within pedigrees, and included

dysopia to complete visual loss. The visual impairment resulted in growth retardation, likely due to physiological stresses in affected animals. No other noticeable phenotypic differences were observed in affected and normal animals. Histological retinal sections in an affected animal indicated vacuolar degeneration in both retinas and aberrant reticular structure in both optic nerve fibres (unpublished data).

In this study, DNA samples of 16 affected animals were extracted from peripheral blood leucocytes or semen following standard protocols (Fig. 1). Polymerase chain reaction (PCR) conditions for microsatellite markers were optimized (Kuppes *et al.* 1997; Ihara *et al.* 2004). Microsatellite polymorphisms were analysed using PCR amplification and gel electrophoresis with an ABI PRISM 3700 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Genotype data were analysed using GENESCAN 3.7 and GENOTYPE 3.7 software (Applied Biosystems). 5' RFLP was performed using 5' RFLP kit as described in manufacturer's instructions (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

To map the disease-linked locus, a genome scan using seven affected half-sib pairs was performed. The analysis included 280 microsatellite markers that were heterozygous in bull A, the sire of the seven affected half-sibs, with an average interval of 16 cM across all 29 autosomes. Linkage was assessed using GENASIS 6.0 program (Kruglyak *et al.* 1996). The bovine ocular disorder (*bod1*) locus, an autosomal recessive disorder, was mapped to BTA5 ($Z_{max} = 7.0$, $LOD_{max} = 2.0$).

Address for correspondence

Ihara, Shirakawa Institute of Animal Genetics, Odakura, Nishigo, Nishi-shirakawa, Fukushima 961-8061, Japan
E-mail: ihara@sug.or.jp

Accepted for publication 4 December 2004



Figure 1 Pedigree of autosomal recessive ocular disorder in Japanese Black cattle. Seven affected half-sib pairs (animals 1–7) were used in an autosomal scan using 180 microsatellite markers. Nine affected animals (animals 8–16) were typed only with markers on BTA5 and BTA18. Assigned chromosomes are indicated below affected animals. Individuals that were homozygous for bovine ocular disorder 1 (*bod1*) are shaded black and those that were homozygous for *bod2* are shaded grey. Animal 4, shaded black, was homozygous for both *bod1* and *bod2*. Asterisks indicate disease-causing *bod1* and *bod2* haplotypes. Squares, male; circles, female; open symbols with diagonal line, DNA sources not available; half-filled symbols, carrier; filled symbols, affected animals.

Detailed analysis with 42 microsatellite markers on BTA5 revealed that three of seven affected animals (animals 1–3) were heterozygous for *bod1*. A new analysis of the genotypes of 180 markers in these three animals resulted in an assignment of *bod2* to BTA18. Analysis of the remaining nine affected animals was performed using markers on these two chromosomes, and indicated that all were homozygous for *bod1*. As a result, detailed haplotype inspection in 16 affected animals revealed linkage to *bod1* in 12 animals, *bod2* in three animals, and linkage to both *bod1* and *bod2* in one animal (Fig. 1). Thus, this ocular disorder was independently mapped to a 25 cM interval (Hara *et al.* 2001) between *DIK5237* (29.4 cM) and *DIK5210* (53.9 cM) on BTA5 ($Z_{max} = 17.0$, $LOD_{max} = 11.8$) (Fig. 2a) and a 7 cM interval between *DIK5411* (6.6 cM) and *INRA038* (11.8 cM) on BTA18 ($Z_{max} = 13.0$, $LOD_{max} = 4.0$) (Fig. 2b). These findings suggest that bull C is a carrier for *bod1* and *bod2* and that mutations in these two loci are independently involved in this disease. Although animal 4 was homozygous for both *bod1* and *bod2*, no additional symptoms were observed compared with the other affected animals. However, sophisticated ophthalmological examinations such as electroretinography and electrooculography, which are often performed in humans, were not done with the affected animals in this study.

Using comparative map information (Goldammer *et al.* 2002; Liu *et al.* 2003; UCSC: <http://www.genome.ucsc.edu/>; RefSeq: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>), two positional candidates on BTA5 were chosen for further analysis. Exon 2 (GenBank accession number AB195272) of the bovine $\alpha 1$ type II collagen gene (*COL2A1*), which is reported to be a causative gene for Stickler syndrome

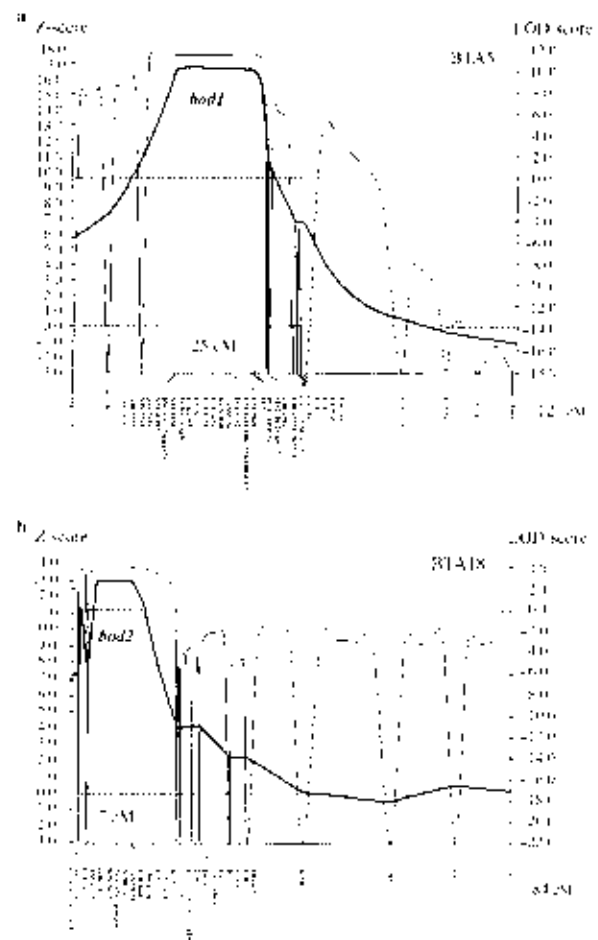


Figure 2 Genetic mapping of the bovine ocular disorder. Solid bold line indicates non-parametric (NPL) plots (Z -score) from $n = 8$ animals. Solid thin line indicates LOD scores. (a) $Z_{max} = 17.0$ and $LOD_{max} = 11.8$ were detected on a 25-cM interval between *DIK5237* and *DIK5210* on BTA5 using 13 affected animals (animals 4–16) (b); $Z_{max} = 13.0$ and $LOD_{max} = 4.0$ for a 7-cM interval between *DIK5411* and *INRA038* on BTA18 among four affected animals (animals 1–4). The information content (IC) values in both critical regions was >0.9 .

type I in humans (Richards *et al.* 2000; Donoso *et al.* 2003), was compared in normal and affected animals, but no nucleotide substitutions or deletions/insertions were observed. Based on gene expression data in the retina (Blackshaw *et al.* 2001), the bovine orthologue of single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase gene (*SARG1*) was cloned using the public bovine EST accession number CN787457 followed by 5'-RACE from pancreas total RNA and its putative coding sequences (accession number AB195271) were compared between normal and affected animals. A single silent nucleotide polymorphism (543C>T of cDNA sequence) was identified, but this SNP had no association in *bod1*-affected animals. No likely candidates were located near *bod2* on BTA18. Detailed catalogs of genes preferentially expressed in the

retina and retinal pigment epithelium and complete physical map annotations from future bovine sequencing efforts will facilitate the identification of genes responsible for bovine ocular disorders.

Acknowledgements

The authors thank A. Takasuga, Y. Mizoguchi, T. Hirano, A. Takano and K. Yokouchi for valuable suggestions, and Y. Kazunuchi for laboratory assistance. This work was supported by a grant from the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

References

Blackshaw S, Trzaski RB, Furukawa T & Copko CJL (2001) Comprehensive analysis of photoreceptor gene expression and the identification of candidate retinal disease genes. *Cell* 107, 579–89.

Darvaso I A, Edwards A.O, Frost A.J., Ruter B. III, Alward M., Arabaci J., Rogers J., Meyer D. & Parina S. (2003) Clinical variability of Stickler syndrome: role of exon 2 of the collagen COL2A1 gene. *Survey of Ophthalmology* 48, 191–203

Goldammer T, Katz S.R., Brunner R.M., Drazoch L., Saittleben H., Schwarz M. & Womack J.E. (2002) A comparative radiation hybrid map of the bovine chromosome 18 and homologous chromosomes in human and mice. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 2106–11.

Hens M.M., Dager S.P. & Ingelheim C.F. (2003) Retinitis pigmentosa: genes, proteins and prospects. *Developmental Ophthalmology* 37, 109–25.

Ihara N., Takasuga A., Mizushima K. et al. (2004) A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3,802 microsatellites. *Genome Research* 14, 1987–98.

Kaloupek M. & Fletcher JL. (2004) Retinitis pigmentosa: understanding the clinical presentation, mechanisms and treatment options. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 32, 65–80.

Kappes S.M., Koel J.W., Shane B.J., McGraw R.A., Sonstegard T.S., Smith J.P., Lopez-Corraler N.I. & Beattie C.W. (1997) A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research* 7, 235–49.

Kung'u L., Daly M.J., Reeve-Daly M.P. & Lander E.S. (1996) Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *American Journal of Human Genetics* 58, 1347–63.

Liu Z., Hansen M., Wozniak J.E. & Antoniou F. (2003) A comparative map of interstitial bovine chromosome 5 with human chromosome 12 and 22. *Cytogenetic and Genome Research* 101, 147–51.

Richards A.J., Martin S., Yates J.R.W., Scott I.D., Bagley D.M., Pope F.M. & Sivasubramanian M.P. (2003) COL2A1 exon 2 mutations relevant to the Stickler and Wagner syndromes. *British Journal of Ophthalmology* 87, 364–70.

Tison M., Marzany G. & Gonzalez-Duarte R. (2004) Mutation of CTBK1, a novel human cytosolic kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26). *American Journal of Human Genetics* 74, 128–38.

(Original paper)

Comparative mapping and structural analysis of a *FOX* gene cluster on bovine chromosome 18

Abdol Rahim ABBASI^{1,3}, Maryam KHALAJ¹, GERILETUYA¹, Naoya IHARA²,
Yoshikazu SUGIMOTO² and Tetsuo KUNIEDA¹

¹ Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Okayama, Japan.

² Shirakawa Institute of Animal Genetics, Nishi-shirakawa, Tokushima, Japan

³ Department of Animal Science, College of Agriculture, Isfahan university of Technology, Isfahan, Iran

ABSTRACT

FOX genes encode a family of transcription factors which play important roles during early development and in regulation of metabolic homeostasis in mammals. Some members of the gene family, including *FOXC2*, *FOXF1*, and *FOXL1* genes comprise a gene cluster on particular regions of human and mouse chromosomes. In this paper, we report chromosomal localization and structure of bovine *FOXC2*, *FOXF1* and *FOXL1* gene cluster and comparative analysis of the gene cluster in cattle, human, and mouse, which were performed by a combination of *in silico* database searching and *in vitro* sequencing and mapping experiments. BLAST search of cattle database with cDNA sequences of human and mouse *FOXC2*, *FOXF1* and *FOXL1* genes identified several ESTs which represent cattle cDNAs of these genes. Radiation hybrid mapping of these cattle cDNAs revealed that the bovine *FOXC2*, *FOXL1*, and *FOXF1* genes are localized on the proximal region of bovine chromosome 18 and form a gene cluster. A comparative map of the region including the *FOX* gene cluster between cattle and human indicated that the localization of these genes on cattle chromosome is in concordant with those in the corresponding human chromosome. Then, we identified a contig of BAC draft sequences containing genomic sequences of these genes by MEGABLAST search of a cattle genome database using the cattle cDNA sequences. Complete genomic sequences of these genes were determined by cloning and sequencing of a part of genomic region in which the nucleotide sequences could not be obtained from the published BAC draft sequences. A comparison of the nucleotide sequences of the cattle, human, and mouse *FOX* gene clusters showed highly conserved structure of the cluster in mammalian species and identified some potential regulatory regions which are conserved in mammalian species.

Key words: *FOX* gene, RH mapping, comparative map, cattle, gene cluster

Introduction

Forkhead proteins belong to a large family of transcription factors, characterized by an evolutionary conserved DNA binding domain known as winged helix (Kaestner *et al.* 1993). FOX (Forkhead box) has been adopted for all chordate winged helix/forkhead transcription factors, which are classified into A to Q subgroups according to phylogenetic analysis of the *FOX* genes (Kaestner *et al.* 2000; <http://www.biology.pomona.edu/fox.html>). The members of the *FOX* gene family are distributed throughout the chromosomes and generally do not form physically linked gene clusters, but some exceptional

clusters of the gene family have been reported. For example, human *FOXF1*, *FOXC2*, and *FOXL1* genes are closely linked each other and comprise a gene cluster on human chromosome (HSA) 16q24.1. This cluster is also conserved on mouse chromosome (MMU) 8 (Carlsson and Mahlapuu 2002; Kaestner *et al.* 1996).

Correspondence: T. Kunieda, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan. E-mail: tkunieda@tc.okayama-u.ac.jp

Received 16 March 2005; accepted for publication 13 April 2005.

The FOX transcription factors have been reported to play important roles during early development of mammals by regulating growth, differentiation and apoptosis of cells (Carlsson and Mahlapuu 2002; Lehmann *et al.* 2003). On the other hand, some of the FOX proteins play a role in maintaining normal metabolic homeostasis of adult differentiated tissues, which is completely distinct from those during development. Particularly, FOXO2 was reported to be an important transcription factor as a key regulator of adipocyte metabolism (Cederberg *et al.* 2001). The expression of the *FoxO2* gene in mouse is restricted in adipose tissue and overexpression of the gene in adipose tissue results in lean and insulin sensitive phenotype, through attenuation of white adipose tissue and formation of brown adipose tissue (Davis *et al.* 2004) with elevated expression of the genes for insulin action of the adipocytes (Cederberg *et al.* 2001; Cromling *et al.* 2002; Flier 2004). The functions of FOXO2 gene in development and metabolism of adipose tissues makes it a potential candidate gene associated with obesity and diabetes in human (Kovacs *et al.* 2003; Ridderstrale *et al.* 2002). The function of the gene also suggests that the FOXO2 gene might be a candidate gene for economic traits of farm animals including beef marbling and fat deposition. In this paper, we report the chromosomal localization and structure of bovine FOXO2, FOXO1 and FOXO3 gene cluster, and comparative analysis of the cluster in cattle, human, and mouse.

Recently, whole genome sequences of several mammalian species including human and mouse have been published and the sequence information is now available from genome databases. The availability of these genomic sequences allow us to perform "*in silico*" analysis of the genes of these species by database searching. On the other hand, whole genome sequencing of cattle has still not yet been completed, but partial draft sequences of bacterial artificial chromosome (BAC) contigs and sequences of various expressed sequence tags (ESTs) have been published in this species. Although the complete *in silico* analysis of cattle gene could not be achieved in the current status of whole genome sequencing of the cattle, a combination of *in silico* analysis by searching partial BAC draft sequences and EST sequences in databases and *in vitro* analysis by sequencing regions of the cattle genome in which sequence information has not yet been obtained from databases is likely to be the most effective and reliable

method to determine genomic structure of particular genes of interest. In the present study, a combination of *in silico* and *in vitro* analyses was applied to investigate the chromosomal localization and genomic structure of the FOX gene cluster.

Materials and Methods

Identification and comparison of bovine ESTs

To identify ESTs for bovine FOXO2, FOXO1, and FOXO3 genes, we performed BLASTN search of bovine dbEST using the sequences of human and mouse FOXO2, FOXO1, and FOXO3 genes. Alignments and comparison of amino acid sequences of the bovine ESTs with those of human and mouse FOXO2 genes were performed using GENETYX software (HITACHI Software).

RFLP mapping

A 7000 rad bovine hamster whole genome radiation hybrid (RH) panel (Boh *et al.* 2005) was used to localize the FOX genes and microsatellite DNA on BAC sequence with cattle specific primers for these sequences (FOXO2, 5'-GATGGCTGTGCTCACTGCTCC-3' and 5'-TGTACAGGGAAGGGAGGAAACC-3'; FOXO1, 5'-CTTCCACCACTGGGAAAGAAG-3' and 5'-GCGGTAGGAGGTCTGAGATGC-3'; FOXO3, 5'-CTTCAACACCATGGCATCC TCG-3' and 5'-GACCTCGATCGGTCCTTTGCCTC-3'); and microsatellite DNA, 5'-AGTCTCTCAGGGCAACA CTTC-3' and 5'-TTCTTCGCTACATTCCTACCA-3'). Published microsatellite markers on BTA18 (UWCA26 and BMS2355) was also subjected to the RFLP mapping. PCR amplification was carried out in a 15 μ l-reaction mixture containing 20 ng DNA of each clone of the RH panel, 0.2 μ M each oligonucleotide primers, 0.2mM each of dNTPs, 1.5mM MgCl₂ and 0.375 unit of AmpliTaq Gold DNA polymerase. After the initial denaturation at 94 °C for 10 min, 40 cycles of amplification were performed each consisting of denaturation for 30 s at 94 °C, annealing for 30s at 55–60 °C, and extension for 30 s at 72 °C followed by a final elongation step of 7 min at 72 °C. The PCR products were electrophoresed through a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. PCR amplification and gel electrophoresis were performed at least twice and the results were scored for present, absent or ambiguous. The scored results were analyzed by RHMAPPER software to determine ordering and localization of the genes.

Comparative analysis of bovine *FOX* gene

Identification of BAC clones

To identify BAC clones containing *FOX* genes, we performed MEGABLAST search of a genome database (Cow Genome Database) using the cattle EST sequences. All of repeat sequences within the sequences were masked by RepeatMasker program (<http://www.repeatmasker.org/>) before BLAST homology searches (Altschul *et al.* 1990) and pairwise BLAST analysis (Tatusova and Madden 1999) for aligning the BAC sequences.

The open reading frames of the bovine *FOX* genes were predicted by GeneEXP (<http://compbio.ornl.gov>) and GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) (Burg and Karlin 1997) on bovine BAC sequence. Alignments and comparison of genomic sequences of the cattle, human and mouse *FOX* gene cluster were performed using VISTA program (Dubchak *et al.* 2000).

Sequencing a gap region

To determine the nucleotide sequence of a gap in the BAC draft sequence, we designed a pair of primers flanking the gap region (5'-TCAGGCTGCCTGGAAGTGGAG-3' and 5'-AAAAC TGC T GAGGGAGTGGTG-3') to amplify the fragment containing the gap region. PCR amplification was carried out in a 30 μ l-reaction mixture containing 30 ng genomic DNA of Japanese black cattle, 0.2 μ M each oligonucleotide primers, 0.2 mM each of dNTPs, 1.5 mM MgCl₂ and 0.75 unit of Taq DNA polymerase. After the initial denaturation at 94 °C for 5 min, 35 cycles of amplification were performed each consisting of denaturation for 30 s at 94 °C, annealing for 30 s at 60 °C and extension for 30 s at 72 °C followed by a final elongation step of 7 min at 72 °C. The PCR product was purified by gel electrophoresis and cloned into pGEM Easy vector (Promega) according to manufacture's instruction. Sequencing was performed on the ABI310 DNA sequencer (Applied Biosystems) by dye terminator method.

Results and Discussion

In the first step of this study, we searched ESTs encoding cDNAs of bovine *FOXC2*, *FOXLI*, and *FOXFI* genes by *in silico* database search using human and mouse sequences. BLASTN search of bovine dbEST database using complete cDNA sequences of human and mouse *FOXC2* (GenBank accession numbers: NM_005251 and NM_013519), *FOXFI* (NM_001451 and NM_010426), and

FOXLI (NM_005250 and NM_008024) genes identified a bovine EST (CN435463) for *FOXC2* gene, at least four bovine ESTs (CN790798, CB454790, CB456366, and CK836076) for *FOXFI* gene, and three bovine ESTs (CB465507, CN440604, BE665899) for *FOXLI* gene. To confirm the authenticity of the similarity between the bovine ESTs and human or mouse cDNAs, we performed BLAST analysis using the sequence of the bovine ESTs against the human and mouse genome in the database. The results indicated highest similarity between the bovine ESTs and the corresponding human or mouse cDNAs. Therefore, these ESTs were confirmed to be the cDNAs of bovine *FOXC2*, *FOXLI*, and *FOXFI* genes.

The cDNAs of bovine *FOXC2*, *FOXLI*, and *FOXFI* genes contained 1509, 1041, and 1065-bp open reading frames, respectively. The predicted amino acid sequences of these bovine genes demonstrated high sequence similarity with their mammalian orthologs. As shown in Fig. 1, an alignment of amino acid sequences of *FOXC2* showed high sequence similarity among the *FOXC2* genes of these species. In particular, the amino acid sequences of the forkhead box domain were completely identical among these species indicating functional importance of the forkhead box domain in the proteins. The similar results were also obtained in the *FOXLI* and *FOXFI* genes (data not shown).

Next, we performed RH mapping of these bovine ESTs to determine the chromosomal localization of the bovine *FOX* genes. The published comparative maps of cattle, human and mouse indicated that the proximal region of BTA18 is the evolutionally conserved ortholog of the regions of HSA16 and MMU8 (Everts-van der Wind *et al.* 2004; Goldammer *et al.* 2002) on which the *FOXC2*, *FOXLI*, and *FOXFI* genes have been localized. Therefore, two microsatellite markers (UWCA28 and BMS2355) on the proximal region of BTA18 (Ihara *et al.* 2002; Kappes *et al.* 1997), were also subjected to the RH mapping. Screening of a 7000-rad bovine-hamster whole genome RH panel using specific primers for these bovine ESTs (CN435463, CN790798, and CB465507) and the microsatellite markers assigned these ESTs on the same location on bovine genome and the genes were flanked by two microsatellite markers with 5.88 cR and 11.33 cR apart from UWCA28 and BMS2355, respectively. These findings clearly indicated that the bovine *FOXC2*, *FOXLI*, and *FOXFI*

Cattle	1	MOARYSVSDNALGVVBYLSRONYYRAGSVKIMTSPNGVYSGHPQQYGGKRSRYAPYH	
Human	1A.....S.....	
Mouse	1A.....	
Cattle	61	HIQPAAPKDLVKKPPYSYIALITMAIQNAPEKKITLNGIYQFINDRFFPFREKZGQKQNSI	
Human	61	
Mouse	61	..QPA.....	
Forkhead box domain			
Cattle	121	RHMLSLNECFVXVPRCDKRFPGKGSYWTLPDSSYKMPENGSLRKRRRRFRKIKVMPKPKRER	
Human	121S.....	
Mouse	120D.....	
Cattle	181	AHLKEPPPAASRGAPAGPFLADTPEEAENKVVIXSEASPALPVITYVETLSPESALGGG	
Human	181T..R...A.....	
Mouse	180STTA...T..T..V...G.....V.....G...A..	
Cattle	241	PRSAASTPAGSPDGSILPQPHAGAPNQLPQPSVENINTLRTPPGGELSPAAGRAGLVVFP	
Human	241B..A.....G.....	
Mouse	240	...S.....K..A.....I.....D...A.....	
Cattle	301	LALFYAAAPPAAAYGQPCAQGLPAACAGCYQCNSKRAMSLYEGAERPAHMCVFPALDEALSD	
Human	301GA.....	
Mouse	300T.....SA.....V.....	
Cattle	361	HPSGPTSPLSALNLAAQCQEGALAAEACGRHHOHGHCHHTQAPPPPAPQPOPAPOFGAAMA	
Human	361IG.....T.....	
Mouse	360	...G...G.....G...GH...QH...L.....A..Q..P..A...AT	
Cattle	421	DAASWYLNHSGDLNHSGETFAACQQTTPPVREKPNSEKLGLENSTLSEKPKVRSNAGSQQL	
Human	420P.....S...G.....	
Mouse	414	..T.....G...S...P...T.....L...S...S...NAS...	
Cattle	481	PYESTPPLYRHAAPYSYDCTKY	502
Human	480P.....	501
Mouse	472	..A.....	494

Fig. 1. Comparison of predicted amino acid sequences of cattle, human and mouse FOXC2. The alignment was obtained using GENETYX software. The conserved residues are shown by dots and blanks are indicated by bar. The forkhead box domain is boxed. The domain is identical in mouse, cattle and human FOXC2.

genes were localized on the proximal region of BTA18 and comprise a gene cluster like human and mouse. As shown in Fig. 2, a comparison of the obtained RH map with published linkage (Ihara *et al.* 2004; Kappes *et al.* 1997) and RH (Everts-van der Wind *et al.* 2004; Goldammer *et al.* 2002; Itoh *et al.* 2005) maps of BTA18 and human genome map revealed that the localization of these genes on the BTA18 is in concordant with those on HSA16.

Next, we searched bovine BAC clones containing *FOXC2*, *FOXF1*, and *FOXL1* genes by a MEGABLAST search of Cow Genome Database using the nucleotide sequences of the bovine cDNAs to reveal the genomic structure of these genes. Consequently, a bovine BAC clone

working draft sequence (AC150991) containing these cDNA sequences was identified. Then, we searched the database again with approximately 2000-bp end sequences of the BAC clone and identified other two BAC draft sequences. Therefore, we obtained a BAC contig comprised of three overlapping BAC sequences, CH240-196n10 (AC150991), CH240-248M16 (AC151427) and CH240-109B14 (AC150514). To confirm the localization of these BAC sequences on BTA18, we performed RH mapping of BAC clones using primers for a microsatellite DNA in one of the BAC sequences (AC150514). The results confirmed the localization of the BAC contig on BTA18 at the same position as these cDNAs. Therefore, the contig appeared to

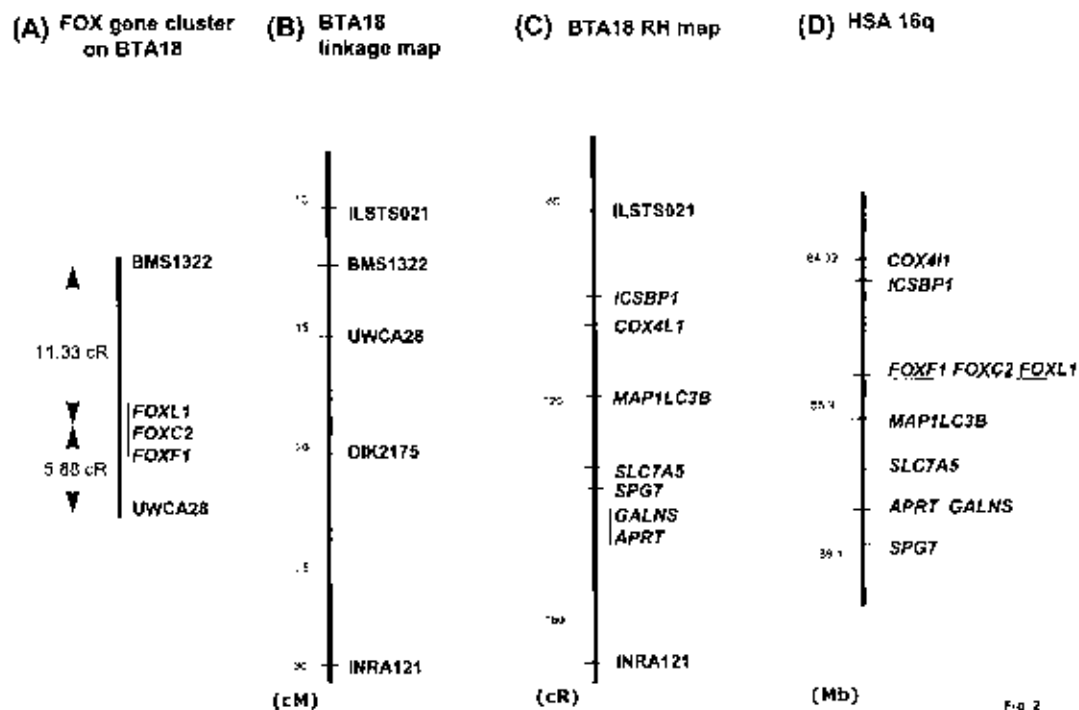


Fig. 2. Comparative map of the regions containing the *FOX* gene cluster on BTA18 and the corresponding region of HSA16. (A) The RH map showing the positions of the *FOX* gene cluster with relative position with microsatellite markers on BTA18 (BMS1322 and UWCA28) obtained in the present study. (B) A partial linkage map of the proximal region of BTA18 (Ihara *et al.* 2004; Kappes *et al.* 1997). (C) A partial RH map showing the relation between the microsatellite markers and functional genes on BTA18 (Goldammer *et al.* 2002; Everts-van der Wind *et al.* 2004). (D) Localization of functional gene including *FOX* genes on HSA16 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Comparison of these maps indicates that the region of BTA18, in which the *FOX* genes were mapped, corresponds to that of HSA16.

cover approximately 560-kb region of the proximal region of BTA18.

These draft sequence of the BAC contig contained entire coding region of the *FOXC2* and *FOXL1* genes and exon 1 of the *FOXF1* gene, but did not contain exon 2 of the gene. The BAC draft sequences had several gaps, in which the nucleotide sequence have not yet been determined, and exon 2 of the *FOXF1* gene was likely to be involved in one of these gaps. Therefore, we determined the nucleotide sequence of a gap located at the 3' region of the exon 1 of *FOXF1* gene to identify exon 2 of the gene. The PCR amplification using primers flanking the gap region amplified a 631-bp fragment. The amplified fragment was cloned into pGEM vector and their nucleotide sequence was

determined. The obtained sequence of the gap contained a 365-bp sequence identical to that of a 3' part of bovine *FOXF1* cDNA sequence. Therefore, entire sequence of the *FOXF1* gene including exon 1, intron 1, and exon 2 was identified by the combined *in silico* and *in vitro* analyses in this study. A comparison of the cDNA sequence of the bovine *FOXC2*, *FOXL1*, and *FOXF1* genes with the BAC sequence revealed the exon intron structure, order, and relative position of these genes. The bovine *FOXC2* and *FOXL1* genes are GC-rich intronless genes while the *FOXF1* gene contains two exons with an intron downstream of the forkhead domain. The splice donor and acceptor sites of bovine *FOXF1* gene agree with the GTAG rule. These structure and sizes of the *FOX* genes are the same as those

of the human and mouse genes.

Then we compared and aligned the nucleotide sequences of the bovine BAC contig with the genomic sequence of human or mouse *FOX* gene cluster. As shown in Fig. 3, the relative position, orientation, and exon-intron structure of the genes and distances between genes were conserved among these mammalian species. It is to be noted that a series of sequences, which are likely to be a functional gene, has been reported in the *FOX* gene clusters of human and mouse. As shown in Fig. 3, seven stretches of sequence which are identical to parts of a human hypothetical protein with unknown function, FLJ12998 (Strausberg *et al.* 2002), have been identified in the region between the *FOXF1* and *FOXG2* genes. These sequences were also conserved in the cattle sequence. These sequences of cattle are, therefore, likely to be exons of bovine homolog of FLJ12998. Furthermore, there were several regions other than the exons of these genes, which were highly conserved among these mammalian species. Particularly, the 5' and 3' adjacent regions of *FOXG2* gene were highly conserved between cattle and human. These conserved regions were predicted to be some functional

sequences playing an important role in the regulation of the genes, such as enhancers or silencers. The results of the alignment also showed higher similarity of the nucleotide sequences between cattle and human than those between human and mouse. This result was in concordant with generally accepted phylogenetic relation of primate, rodent and, ungulate.

In the present study, we identified the genomic structure of the cluster of the bovine *FOX* genes and compared the structure with those of human and mouse. Our results indicated that the cluster is highly conserved among mammalian species and there are some conserved regions beside the exons, which could be common regulatory regions of the genes. As the *FOX* genes plays an important role in development and metabolism of adipose tissues and could be candidate genes for the economical traits of farm animals, further investigation of these potential regulatory regions will provide useful information on the function of these genes on the economical traits.

As demonstrated in this study, the combination of the *in silico* and *in vitro* analysis of the *FOX* gene cluster was effective to determine the genomic structure of the

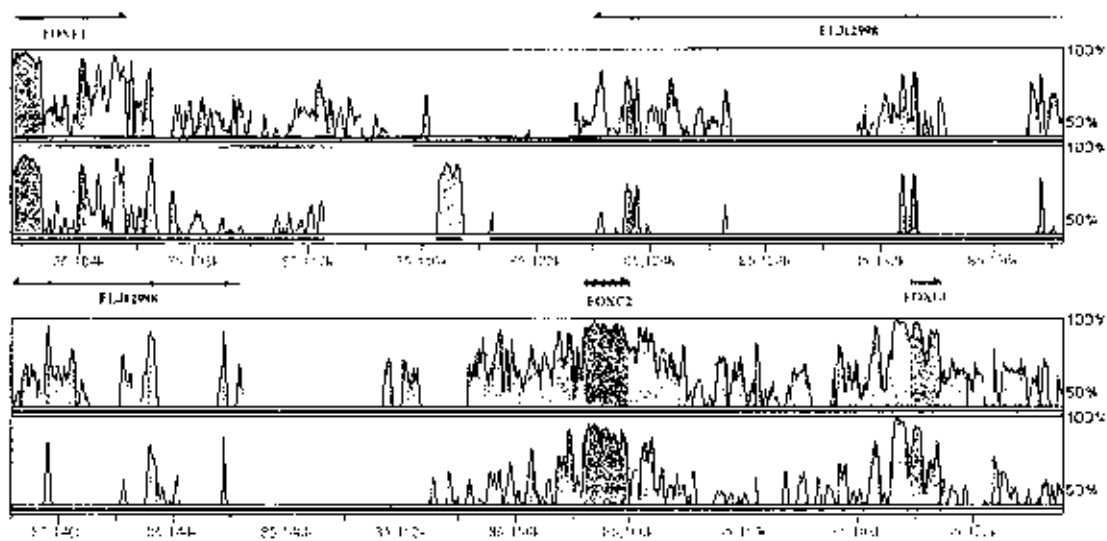


Fig. 3. Pairwise comparative analysis of the cattle/human (upper) and human/mouse (lower) genomic sequences of the *FOX* gene clusters. The alignment and comparison of the sequences were performed by VISTA program. The Y-axis shows the % identity in a 100-bp window. Arrows indicate the regions and orientations of the genes and gray boxes on the arrows denote exons. Numbers at the bottom indicate positions in human genome sequence.

Comparative analysis of bovine *FOX* gene

cluster. The whole genome sequencing of the cattle is now underway and will be completed in near future. After completing whole genome sequencing and being published the genome database of cattle with reliable annotation, sequencing genomic regions of particular cattle genes will be unnecessary as in the cases of human and mouse, but the combination of *in silico* and *in vitro* analysis should be currently the most effective and reliable method for analyzing genomic sequences of cattle genes.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403–410.
- Burge C, Karlin S. 1997. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J. Mol. Biol.*, 268: 78–94.
- Carlsson P, Mahlapuu M. 2002. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev. Biol.*, 250: 1–23.
- Cederberg A, Gronning LM, Ahren B, Tasken K, Carlson P, Enerback S. 2001. *FOXC2* is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell*, 106: 563–573.
- Dubchak I, Brudno M, Loots GG, Pachter J, Mayor C, Rubin EM, Frazer KA. 2000. Active conservation of noncoding sequences revealed by three-way species comparisons. *Genome Res.*, 10: 1304–1306.
- Davis K, Molds M, Farmer SR. 2004. The forkhead transcription factor *FoxC2* inhibits white adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, 279: 42453–42461.
- Everts-van der Wind A, Kata SR, Band MR, Rebeiz M, Larkin DM, Everts RB, Green CA, Liu L, Natarajan S, Goldammer T, Lee JH, McKay S, Womack JE, Lewin HA. 2004. A 1.163 gene cattle-human comparative map with anchor points defined by human genome sequence coordinates. *Genome Res.*, 14: 1424–1437.
- Hier JS. 2004. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*, 116: 337–350.
- Goldammer T, Kata SR, Brunner RM, Darroch U, Sanfleben H, Schwerin M, Womack JE. 2002. A comparative radiation hybrid map of bovine chromosome 18 and homologous chromosomes in human and mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99: 2106–2111.
- Gronning LM, Cederberg A, Miura N, Enerback S, Tasken K. 2002. Insulin and TNF alpha induce expression of the forkhead transcription factor gene *Foxc2* in 3T3-L1 adipocytes via PI3K and ERK 1/2-dependent pathways. *Mol. Endocrinol.*, 16: 873–883.
- Ihara N, Takasuga A, Mizoshita K, Takeda H, Sugimoto M, Mizoguchi Y, Hirano T, Itoh T, Watanabe T, Reed KM, Snelling WM, Kappes SM, Beattie CW, Bennett GL, Sugimoto Y. 2004. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res.*, 14: 1987–1998.
- Itoh T, Watanabe T, Ihara N, Mariani P, Beattie CW, Sugimoto Y, Takasuga A. 2005. A comprehensive radiation hybrid map of the bovine genome comprising 5593 loci. *Genomics*, 85: 413–424.
- Kaestner KH, Lee KH, Schlondorff J, Hiemisch H, Monaghan AP, Schutz G. 1993. Six members of the mouse forkhead gene family are developmentally regulated. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 90: 7628–7631.
- Kaestner KH, Bleckmann SC, Monaghan AP, Schlondorff J, Mincheva A, Pachter P, Schutz G. 1996. Clustered arrangement of winged helix genes *flh-6* and *MFH-1*—possible implications for mesoderm development. *Development*, 122: 1751–1758.
- Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. 2000. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.*, 14: 142–146.
- Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw RA, Sonstegard JS, Smith TP, Lopez-Corrales NL, Beattie CW. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.*, 7: 235–249.
- Kovacs P, Lahu-Stefan A, Stumvoll M, Bogardus C, Baier LJ. 2003. Genetic variation in the human winged helix/forkhead transcription factor gene *FOXC2* in Pima Indians. *Diabetes*, 52: 1292–1295.
- Lehmann OJ, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS. 2003. Foxs in development and disease. *Trends Genet.*, 19: 339–344.
- Ridderstrale M, Carlson E, Klannemark M, Cederberg A, Kosters C, Tornqvist H, Storgaard H, Vaag A, Enerback S, Group U. 2002. *FOXC2* mRNA expression and a 5' untranslated region polymorphism of the gene are associated with insulin resistance. *Diabetes*, 51: 3554–3559.
- Straussberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG,

Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shennan CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B, Buetow KH, Schaefer CF, Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko I, Marusina K, Farmer AA, Rubin GM, Hong L, Stapleton M, Soares MB, Bonaldo MF, Casavant TL, Scheetz TE, Brownstein MJ, Utsdin TB, Toshiyuki S, Carninci P, Prange C, Raha SS, Loquellano NA, Peters GJ, Abramson RD, Mullaly SJ, Bosak SA, McEwan PJ, McKernan KJ, Malek JA, Gunaratne PH, Richards S, Worley KC, Hale S, Garcia AM, Gay LJ, Hulyk SW, Villalon DK, Murray DM, Sodergren EJ, Lu X, Gibbs RA, Fahey J, Helton J, Kettner M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Madan A, Young AC, Shevchenko Y, Bouffard GG, Bakesley RW, Touchman JW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Greenwood J, Schmutz J, Myers RM, Butterfield YS, Krzywinski MJ, Skalska U, Smailus DE, Schnerch A, Schein JE, Jones SJ, Marra MA; Mammalian Gene Collection Program Team. 2002. Generation and initial analysis of more than 15,000 full length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 16899–16903.

Tatusova TA, Madden TL. 1999. Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett.* **174**: 247–250.

ORIGINAL ARTICLE

Isolation of genes showing increased expression during bovine adipocyte differentiation

Tadashi YAMASAKI,¹ Miho INOUE-MURAYAMA,¹ Koji TAHARA,² Sho-ichi TAKANO,³ Akinori SUGIYAMA,² Tomonori ITCHU,^{1,4} Akiko TAKASUGA,⁵ Yoshikazu SUGIMOTO,² Michael T. ROZE,⁶ Hisashi ASO⁷ and Shin'ichi ITO¹

¹The United Graduate School of Agricultural Science and ²Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Gifu-shi; ³Research and Development Center, BML, Kamigata-shi; ⁴Shirakawa Institute of Animal Genetics, Japan Livestock Technology Association, Nishigo-mura, Fukushima-ken; ⁵Livestock Improvement Association of Japan, Maibashi-shi and ⁶Graduate School of Agricultural Sciences, Tohoku University, Arba-ku, Sendai-shi, Japan, and ⁷Institute of Rural Sciences, University of Wales, Aberystwyth, UK

ABSTRACT

The adipocyte is important not only for the storage of excess energy as fat, but also for the secretion of homeostatic factors. Gene expression profiles during adipocyte differentiation have been reported previously for mouse 3T3-L1 cells. However, the profiles of adipogenic gene expression in mice and cattle may be different because several metabolic pathways of the ruminant adipose tissue are different from those of non-ruminants. The gene expression profile in a clonal bovine intramuscular preadipocyte cell line during adipogenesis was examined using the polymerase chain reaction-subtraction method. Six hundred and twenty-one clones, which were expressed at an early stage of differentiation, from the preadipocyte to adipocyte, were isolated and characterized. Further detailed studies were carried out for 86 selected genes using northern blotting. Ten genes were found to be highly expressed after differentiation of bovine intramuscular preadipocyte cells. In particular, the expression profiles of genes for stearyl-CoA desaturase and Fk506 binding protein were quite different from the time course of differentiation of that seen in the 3T3-L1 cells reported previously. In addition, these genes were assigned to bovine chromosomes using a microtransformation cell hybrid panel and public database.

KEYWORDS: adipogenesis, bovine, bovine intramuscular preadipocyte cell, polymerase chain reaction-subtraction.

INTRODUCTION

Adipose tissue plays an important role in energy homeostasis through the accumulation of excess energy in adipose cells. Moreover, the adipocyte is an important endocrine cell that secretes various physiologically active molecules (Trayhurn & Beattie 2001). Although the profile of gene expression during adipocyte differentiation *in vitro* has been reported for the non-ruminant cell line 3T3-L1 (Nishizuka *et al.* 2002; Ross *et al.* 2002), relatively little information is available on ruminants.

In experiments using the mouse cell line 3T3-L1, several transcription factors, such as peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and the

CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) family, have been identified and characterized as the master regulators of adipocyte differentiation. During adipogenesis, it has been shown that hormonal induction is rapidly followed by expression of C/EBP β and C/EBP δ . C/EBP β and C/EBP δ induce the transcriptional activation of PPAR γ and C/EBP α . PPAR γ and C/EBP α are

Correspondence: Miho Inoue-Murayama, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Gifu-shi, 501-1193, Japan. (Email: miho-ot@cgifu-u.ac.jp); Hisashi Aso, Graduate School of Agricultural Sciences, Tohoku University, Arba-ku, Sendai-shi, 981-8555, Japan. (Email: aso@bios.tohoku.ac.jp)

Received 9 November 2004; accepted for publication 30 March 2005.

then able to induce each other's expression in a positive feedback loop that promotes and maintains the differentiated state. These factors induce gene expression changes characteristic of the mature adipocyte. (Grogan *et al.* 1998; Nambi & Young-Cheul 2000; Rosen *et al.* 2002).

Japanese Black cattle have the ability to deposit a large amount of intramuscular fat, known as marbling, in meat (Lunt *et al.* 1993). Increased levels of marbling are caused both by nutritional management and by the genetics of the animal. The physiological and molecular mechanisms involved in marbling are not yet understood, although mapping of appropriate quantitative trait loci (QTL) is currently underway by linkage analysis (Casas *et al.* 1998; MacNeil & Grosz 2002).

A clonal bovine intramuscular preadipocyte (BIP) line was established from the intramuscular white adipose tissue of the *Musculus longissimus thoracis* of Japanese Black cattle (Aso *et al.* 1995). Exponentially growing BIP cells exhibit a fibroblastic appearance. Small lipid droplets appear 5–6 days after adipogenic stimulation and occupy a large fraction of the cell volume at 10 days and beyond. Various changes have been shown to occur during the adipogenesis of BIP cells: DNA synthesis is decreased at 3 days after stimulation, and an increase in glucose and acetate uptake is observed at 5 days after stimulation. The metabolism of BIP cells, which are derived from a ruminant, are different to that of 3T3-L1 cells. For example, this cell line has been shown not to express GLUT 4, an insulin-responsive glucose transporter, during adipogenesis. In addition, acetate is its main precursor for fatty acid synthesis (Aso *et al.* 1995).

In the present study, in order to contribute to the understanding of the mechanisms of adipocyte differentiation in ruminants as well as bovine marbling, we searched the genes that were expressed during adipogenesis in BIP cells, using the polymerase chain reaction (PCR)-subtraction method. In order to examine the genes that are induced during the early stages of differentiation, we used the mRNA from BIP cells at 4 days after stimulation (S4) for the subtraction. Among the genes thus identified, we selected 10 genes and analyzed their mRNA expression profiles. Moreover, in order to connect both approaches (QTL mapping and cell biology for candidate genes), we attempted to assign these 10 genes to bovine chromosomes.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Gibco-Invitrogen (Grand Island, NY, USA). Insulin and dexamethasone were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and the other reagents were purchased from Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan).

Cell culture and adipocyte differentiation

A clonal BIP line was routinely cultured in DMEM containing 10% FBS in a 5% CO₂/95% air atmosphere as described in the study by Aso *et al.* (1995). BIP cells were seeded at a density of 0.88×10^4 cells/cm² and passaged every 3 days. In order to produce mature adipocytes, BIP cells were seeded at a density of 2×10^5 cells/cm² and grown for 2 days to obtain confluency. Confluent cultures were transferred to an adipogenic medium (50 µg/ml of insulin, 0.25 µmol/l of dexamethasone, 5 mmol/l of octanoate, 10 mmol/l of acetate and 10% FBS in DMEM). The medium was exchanged every 2 days. Differentiation was almost complete at 8 days after the initiation of hormone treatment.

RNA preparation

Total RNA samples were extracted using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) from BIP cells cultured in a growth medium for 2 days after seeding and after 0, 2, 4, 6 and 8 days of adipogenic stimulation. Poly (A)⁺ RNA was isolated using MAES mRNA Isolation Kit for Total RNA (Mitsunyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) following the manufacturer's protocol.

Subtraction and cDNA cloning

Suppression subtractive hybridization was carried out using a PCR-select cDNA subtraction kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. In brief, poly (A)⁺ RNA from BIP cells at 4 days after adipogenic stimulation (differentiating phase: S4) and at 2 days after seeding (proliferating phase: C2) were used as 'tester' and 'driver', respectively.

Subtracted PCR products were selected at a size of more than 300 base pairs and ligated with a pTZBlue 1-vector plasmid vector (Novagen, Madison, WI, USA) and amplified using an *Escherichia coli* JM109 (Toyobo, Tokyo, Japan) transfection. Plasmid DNA was prepared using a Qiagen plasmid mini kit (Qiagen GmbH,

Hilden, Germany) and sequenced by the dye termination method using an ABI Prism 377 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The partial cDNA sequences obtained were determined and compared with registered sequences in the DBE using the NCBI-BLAST 2.0 homology search system (NCBI-DBE 1998).

Northern blot analysis

One µg of poly (A)⁺ RNA from BIP cells at C2 and at S4 were electrophoresed on 1% agarose-formaldehyde gels and transferred onto a Nytran SuperCharge membrane with TurboBlotter (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Subtracted fragments were used as probes for northern blot analysis. The reverse transcriptase (RT) PCR product of bovine glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) amplified with the primer set shown in Table 1 was used as a control probe. These probes were radiolabeled with [³²P]-dCTP (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) using a Random Primer DNA Labelling Kit Version 2.0 (Takara, Otsu, Japan). Hybridization was performed in 5 × SSC, 5 × Denhardt's, 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1 mg/ml of salmon sperm DNA (Sigma) and 50% formamide at 42°C with each probe. After hybridization, membranes were washed with 1 × SSC, 0.1% SDS at room temperature, 0.1 × SSC and 0.1% SDS at 55°C, and were exposed to Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia Biotech). The autoradiograph was analyzed using Intelligent Quantifier Software (Genomic Solutions, MI, USA). The results were expressed as the ratio of the intensity of subtracted genes to that of the control gene GAPDH.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Total RNA (2 µg) from BIP cells at 0, 2, 4, 6 and 8 days after adipogenic stimulation were subjected to first strand cDNA synthesis at 42°C for 1 h in a 20 µl reaction volume containing 50 mmol/l of Tris-HCl (pH 8.3), 75 mmol/L of KCl, 3 mmol/L of MgCl₂, 10 mmol/l of DTT, 0.5 mmol/l of deoxynucleotide triphosphate (dNTP) mix, 0.5 µg of oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (Amersham Pharmacia Biotech) and 200 units of SuperScript II RT (Invitrogen). These cDNA were used as templates for PCR under the following cycling profile: initial denaturation (1 min at 95°C), amplifying by 25 or 30 cycles of 30 s at 94°C, annealing for 30 s at 55°C, extension for 1 min at 72°C, followed by extension for 10 min at 72°C in the presence of 1/10 or non-diluted RT products, 0.1 mmol/l of dNTP mix, 10 mmol/l of Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L of KCl, 1.5 mmol/L of MgCl₂, 0.5 units of AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems) and 10 pmol of a subtracted genes-specific primers set. The primer sets used are shown in Table 1. Bovine GAPDH was used as a control. The resulting RT-PCR products were loaded on a 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

Somatic cell hybrid panel mapping

A bovine/hamster somatic cell hybrid (SCH) panel was established at the Shirakawa Institute of Animal Genetics, Fukushima, Japan (Itoh *et al.* 2003). This panel is informative for all bovine autosomes and X/Y chromosomes, allowing regional localization in most

Table 1 The 11 primer sets used in the reverse transcription-polymerase chain reaction and somatic cell hybrid panel

Gene	Accession number	5' primer (5' to 3')	3' primer (5' to 3')
Glyceraldehyde-3-phosphate	U85042	GCCTGGTCACGAGGGCTG	CCGGCTCAACACCTCTCTG
Similar to human alpha-2-macroglobulin	M11313	AGCTCAGTCCCTCTTCCCTG	ACTGGGACTCTGCTTAACAAT
Glutathione peroxidase plasma isoform	U19325	ACCAGCGCAAGATGGGGAI	ACCTTGAACCTGAATGC ACTG
Stenoyl CoA desaturase	AF188719	GCTCACTGGACTGAGTAGTC	ACTACAACCTGGGGTCTCTG
Serum amyloid A protein 3	AF160867	ACCTGGTCCCTGGTCAIAC	CCACGGGCACTATTCTCTGC
Similar to human FK506 binding protein 3	BC042605	ACATGAGAAAATTAAAAGGAATTCATA	ACTGGGGCATTGAATTGGGGC
Similar to human fibronectin	F01162	ACAACGACAGTTAAAGCCAAATC	AGCACTGAGCAACCTGCA
Adipophilin	A101680	ACTCTTGGCTATTGCCGGGAA	ACTGGGGGCTGAGCACT
Bovine EST	BF600253	ACGJGGACCTGAACTCACTCT	ACTGGGGCCAGGAGGATG
Bovine EST	A613466	CCAGTGTCAGCATGGGCT	ACTATAACCTCAGGAAGAAAGA
Bovine EST	BL230375	ACAAAACAGTCCACTCCACA	ACTGGACAGACTATAAAGCAG

cases. Twenty nanograms of DNA from each hybrid was used as the template for PCR under the following cycling profile: initial denaturation (9 min at 95 °C), amplifying by 30 cycles of 30 s at 94 °C, annealing for 1 min at 55 °C, extension for 1 min at 72 °C and followed by extension for 5 min at 72 °C in the presence of 0.15 mmol/L of dNTP mix, 10 mmol/L of Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L of KCl, 1.5 mmol/L of MgCl₂, 0.6 units of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems) and 10 pmol of subtracted genes-specific primer sets (Table 1). The PCR products were loaded on a 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

RESULTS

Cloning of genes that show increased expression during adipocyte differentiation

In the present study, a total of 621 clones were sequenced, and their homology was searched with the registered sequences in the GenBank database. Of these clones, 443 (71.3%) were identified as homologs with known genes and 124 (20.0%) showed homology with bovine expressed sequence tag (EST) clones. The remaining 54 clones (8.7%) did not show homology with reported sequences and were classified as novel genes. The most numerous clone (116 of 621 clones, 18.7%) showed homology with a gene for glutathione peroxidase plasma isoform (GPX-P). Other genes that showed homology with abundant clones were fibronectin (67 clones, 10.8%), adipophilin (ADPH; 34 clones, 5.5%) and serpin amyloid A protein 3 (SAA3; 14 clones, 2.3%).

For 86 genes corresponding to 345 clones, northern blotting was performed using mRNA from BIP cells at C2 and at S4 (Table 2). The expression of 72 genes (328 clones) increased at S4; however, no obvious difference between C2 and S4 was detected for the remaining 14 genes (17 clones). The isolated genes were categorized into groups according to their functions (Table 2). Among the 72 genes that had increased expression, we selected 10 genes for further analysis as they demonstrated a remarkable increase in expression levels. These genes were alpha-2-macroglobulin (Alpha2-M), GPX-P, stearyl-CoA desaturase (SCD), SAA3, FK506 binding protein (FKBP), fibronectin, ADPH, and three bovine EST (accession numbers: BF600253, AV613466 and BF230375). As bovine cDNA sequences are not registered in the

database, we were not able to confirm whether the gene fragments of Alpha2-M and fibronectin were homologous with the bovine gene. However, we were able to confirm a high homology with the corresponding human genes (Alpha2-M was 85% and fibronectin was 88% homologous with the human genes). The results of the northern blot analysis and the estimates of the amount of expression from the density of the bands are shown in Fig. 1a,b, respectively. The expression of SAA3, fibronectin, ADPH and BF230375 was also observed at C2. The expression levels following differentiation were greater by (approximately) 88.8-fold, 67.2-fold, 20.9-fold, 10.9-fold, 10.5-fold, 6.8-fold, 2.7-fold, 7.3-fold, 7.1-fold and 5.0-fold in Alpha2-M, GPX-P, SCD, SAA3, FKBP, fibronectin, ADPH, BF600253, AV613466 and BF230375, respectively.

Gene expression during the time course of differentiation

We studied the expression profiles of these genes by RT-PCR every 2 days following the stimulation for differentiation of BIP cells (Fig. 2). Although the expression after differentiation increased in all of the genes studied, the expression patterns during differentiation were specific for each gene. The expression of GPX-P, SAA3, FKBP and ADPH increased from 2 days after stimulation. In contrast, the expression of fibronectin and BF600253 increased from S4. In these genes, the expression levels were maintained up to 8 days following stimulation. The Alpha2-M gene was expressed from S4 and then increased gradually to 8 days. Interestingly, the expression of the SCD gene appeared to be highest on day 0, and decreased as the cells were stimulated with the adipogenic media. The expression of AV613466 and BF230375 was also detected during C2, and a small increase was observed following differentiation.

Assignment of genes to bovine chromosomes

Seven of the 10 genes that were studied further were assigned to bovine chromosomes (Table 3). The chromosome locations of the three genes, Alpha2-M, SCD and fibronectin, were obtained using the Bovmap database of the Institut National de la Recherche Agronomique (Institut National de la Recherche Agronomique 2003) and the other four genes, GPX-P, FKBP, ADPH and BF230375, were mapped using a bovine SCH panel. The chromosome numbers of the three genes, SAA3, BF600253 and AV613466, could

Table 2 Expression of genes in bovine intramuscular preadipocyte cells at 2 days after seeding and at 4 days after stimulation*

Category	Gene name	Accession number	No. clones	Microarray	Northern blot analysis
Cytokines, growth factors and receptors	Pigment epithelium-derived factor precursor	U45229	8	-	++
	Interleukin-10	M37210	2	+++	+++
	Interferon- γ	M238613	1	-	+++
	Basic fibroblast growth factor	M32976	1	-	+++
	Similar to human natural killer cell enhancing factor	L19185	1	-	+++
	Similar to human E2F1 mRNA for WNT receptor Frizzled-4	AF032417	1	-	+++
	Similar to pig 5-HT2A receptor	S78208	1	-	+++
	Glucathione peroxidase plasma isoform	L10323	116	-	+++
	Angiopoietin	AJ011680	34	-	+++
	Steroid CoA desaturase	AF188710	6	-	+++
Lipid and metabolic pathway	Glutamine synthase gene	Y10347	2	-	+++
	Mit-ATP synthase proteolipid P2 subunit precursor	X05219	1	-	+++
	Cytochrome b5 reductase	M84704	1	-	+++
	Similar to human fibronectin	F01162	29	-	+++
	Fibronectin	K00806	15	-	+++
	Fibronectin 3(a)-B γ region	AF260304	13	-	+++
	Similar to human type XVII collagen, alternatively spliced, short form	AF018082	1	-	+++
	Similar to human collagen type XI alpha 1 precursor	C33728	2	-	+++
	Similar to human alpha tropomyosin	AJ001033	2	-	+++
	Tissue inhibitor of metalloproteinase	M66073	1	-	+++
Signal transduction, transcription and translation factors	Integrin alpha 3 subunit precursor	AF239938	1	-	+++
	Similar to human integrin alpha 3 subunit precursor	AJ109681	1	-	+++
	Similar to human type VI collagen alpha 3 chain	K52823	1	-	+++
	Similar to human cytoskeletal keratin actin	X01898	1	-	+++
	Similar to human serine protease	AF015287	8	-	+++
	Similar to human 201H32 gene for 201H32 transcriptional factor 191C1	AF013883	3	-	+++
	Ribonuclease 4 precursor	AF078116	1	-	+++
	Scp5A	AJ237937	1	-	+++
	Receptor for activated C kinase	AJ122860	1	-	+++
	Similar to human tumor necrosis-associated calcium-independent glycoprotein A2 isoform	AF263013	1	-	+++
Similar to human fibronectin protein S13a	X81407	1	-	+++	

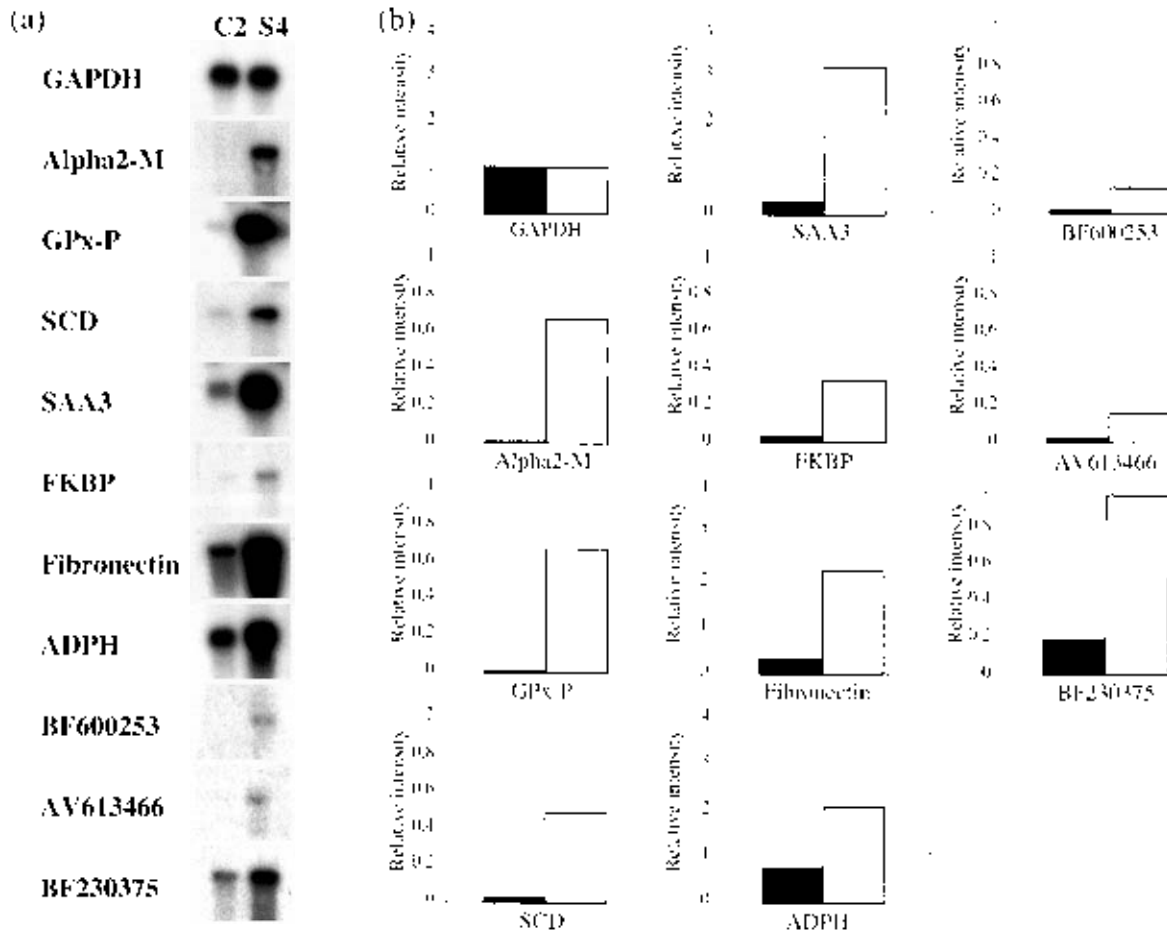


Fig. 1 Northern blot analysis of subtracted gene expression in bovine intramuscular preadipocyte cells: northern blot of subtracted genes (a). Poly (A)⁺ RNA was isolated from bovine intramuscular preadipocyte cells at 2 days after seeding (C2) and at 4 days after stimulation (S4), and 1 µg of RNA was used for northern blot analysis. Subtracted cDNA fragments similar to human alpha-2-macroglobulin (Alpha2-M), glutathione peroxidase plasma isoform (GPx-P), stearyl CoA desaturase (SCD), serum amyloid A protein 3 (SAA3), similar to human FK506 binding protein (FKBP), similar to human fibronectin, adipophilin (ADPH) and bovine EST sequence (BF600253, AV613466, BF230375) were used as probes. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as the control (b). Gene expression levels of C2 (black columns) and S4 (white columns) were normalized to GAPDH.

not be determined because of difficulties in the amplification of the genomic DNA.

DISCUSSION

We analyzed the gene expression of BDP cells, a mutant preadipocyte cell line, during adipocyte differentiation using the PCR-subtraction method. We have previously reported on the expression profiles of type XVIII and type XI collagen genes, which were isolated using a similar method (Inoue-Murayama *et al.* 2000;

Tahara *et al.* 2004). Among the genes isolated in the present study, those related to the synthesis and metabolism of fatty acids, such as long-chain acyl-CoA synthetase, fatty acid synthase and lipoprotein lipase, were hardly detected. Meanwhile, high levels of expression were found for several genes whose products are for cytoskeletal and extracellular structures, such as fibronectin and the family of collagen proteins. Additionally, high levels of expression for genes involved in signal transduction, transcription and translation, such as Stat5 and DFC1, were also found.

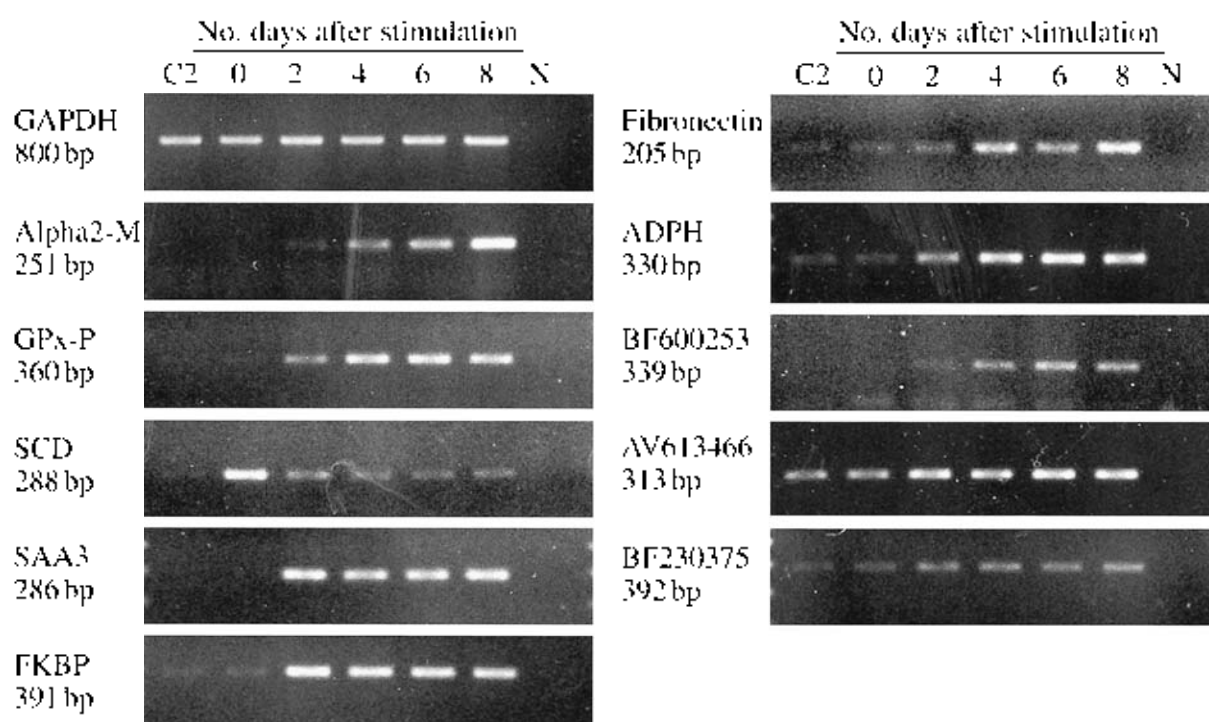


Fig. 2 Time course of gene expression during differentiation by reverse transcriptase (RT) polymerase chain reaction (PCR). First strand cDNA was synthesized from bovine intramuscular preadipocyte cells at 2 days after seeding (C2) and at 0, 2, 4, 6 and 8 days after stimulation. The product was then amplified for 25 cycles of PCR using diluted 1 µL of 10-fold dilution of RT product and specific primers for subtracted genes. Alpha2-M and BF600253 were amplified for 30 cycles of PCR from 1 µL of RT product. GAPDH was used as control amplification. N, negative control (non-template).

Table 3 Bovine chromosome number of genes subtracted by somatic cell hybrid panel

Gene	Chromosome number ¹
Similar to human alpha-2-macroglobulin	9
Glutathione peroxidase plasma isoform	7
Stearyl CoA desaturase	26
Serum amyloid A protein	ND
Similar to human FK506 binding protein 5	23
Similar to human fibronectin	2
Adipophilin	8
BF600253	ND
AV613466	ND
BF230375	11

¹Chromosome numbers in boldface type were obtained from the Bowmap database of the Institut National de la Recherche Agronomique. Other clones were mapped using a bovine somatic cell hybrid panel. ND, no data obtained.

These identified genes seem to be induced at an early stage of differentiation, before the appearance of the lipid droplet. In contrast, we failed to identify the more typical transcription factors, such as PPAR γ , C/EBP α and C/EBP β , which have been reported to be induced during adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. As transcription products for these genes were detected during the C2 as well as the S4 by RT-PCR (data not shown in BIP cells, these genes might not be isolated by the subtraction method.

In the present report, we have confirmed, using northern blot analysis, that 72 of 86 genes (83.7%) were induced during adipogenesis. We selected 10 genes, examined their mRNA expression and attempted to assign them to particular bovine chromosomes. Seven of the 10 genes were homologous to known genes and the others were homologous to bovine EST clones. The expression of these 10 genes at S4 was higher than that at C2. Among these seven known genes, the genes for ADPH, SAA3, fibronectin,

SCD and FKBP have been reported to be expressed during adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. In contrast, the α -2-M gene has not been reported to be expressed during adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells, and the expression of the GPx-P gene has not been reported at all in 3T3-L1 cells. Although the function of the α -2-M and GPx-P genes in adipogenesis is uncertain, we have found that the GPx-P gene is the most numerous clone (16 of 621 clones, 18.6%). The function of GPx-P is most likely to protect against peroxidation of stored lipids in the adipocyte (Maeda *et al.* 1997; Asayama *et al.* 2001). Furthermore, α -2-M has been shown to play an important role in the activity of insulin-like growth factor in 3T3-L1 cells (Westwood *et al.* 2001). The expression of the ADPH (Brasacule *et al.* 1997; Heid *et al.* 1998) and fibronectin (Ross *et al.* 2002) genes during adipogenesis in BIP cells has been found to be similar to that in 3T3-L1 cells; that is, they show high expression before stimulation. SAA3 gene expression increases during adipogenesis in both cell types (Jessen & Stevens 2002). Interestingly, it has been shown that the genes for SCD, which is involved in fatty acid synthesis, and FKBP, a binding protein for the immunosuppressive drug FK506, are induced by different expression profiles in 3T3-L1 cells. We have previously reported on the expression profiles of type XVIII collagen genes, which were found to have a different expression pattern in BIP cells relative to that of 3T3-L1 cells (Inoue-Murayama *et al.* 2000). Although the expression of the SCD gene has been reported to increase as adipocyte differentiation progresses in 3T3-L1 cells (Nambi *et al.* 1988; Martin *et al.* 1999), its expression in BIP cells reaches a maximal level when the cells grow to confluence. The expression of the FKBP gene has been reported to be highest at the clonal expansion phase of differentiation in 3T3-L1 cells, followed by a gradual decrease thereafter. This indicates that FKBP probably plays a specialized role during the cell division cycle (Yeh *et al.* 1995a,b). However, we found that in BIP cells, FKBP is absent from before stimulation until 2 days after stimulation. This difference in the expression stage might indicate that FKBP is related to adipogenesis, which occurs following the clonal expansion phase in BIP cells. Earlier studies have indicated that acetate rather than glucose is the principal precursor for fatty acid synthesis in ruminants and it is incorporated into the fatty acids at a much faster rate than glucose (Ingle *et al.* 1972; Uepa *et al.* 1978; Whitehurst *et al.* 1978). Thus, it is very likely that fatty acid metabolism in ruminant preadipocytes (BIP cells)

will be very different to that of non-ruminant preadipocyte 3T3-L1 cells. Accordingly, genes may show different expression profiles during ruminant adipocyte differentiation, which may be identified using BIP cells. These data indicate that the newly isolated genes in the present study will be useful tools for finding the functional proteins related to adipocyte differentiation of ruminants.

The effect of genes isolated in the present study on adipogenesis in BIP cells have been reported for the first time and may indicate new information on gene expression and function, in comparison with 3T3-L1 cells. However, we did not analyze enough clones (621 clones) to reveal the details of complete gene expression in the differentiating adipocyte. In addition, we chose the PCR-subtraction method to amplify differentially expressed cDNA efficiently by PCR. This method is the most sensitive method of identifying genes with at least a fivefold difference in abundance between the tester and driver RNA. However, if the tester and driver RNA contain genes with increasingly larger or smaller differences in abundance, the identification of genes becomes more difficult. In addition, it must also be considered that the expression of genes may occur at both C2 and S4, while having no connection with the adipogenic differentiation process. In order to obtain further information on the process of adipogenesis, more extensive studies will be required on gene expression at various stages of differentiation using various methods, including DNA microarrays. The difference in adipocyte differentiation between ruminants and non-ruminants can then be clarified by the analysis of the expression profile and function of the isolated gene.

By integrating our information with that of other studies, these data may contribute to an understanding of the mechanisms of adipogenesis, obesity and bovine meat marbling. For example, it may be possible to utilize these genes (α -2-M, GPx-P, etc.) as markers that can be detected in blood during the accumulation of fatty acids in adipose tissue, as well as for the analysis of the mechanism of marbling, and the required cytoskeletal and extracellular structures, by monitoring fibronectin, type XVIII and XII collagens and so on. By comparing the expression of these genes among breeds and at different growth stages in cattle, it may become possible to select for superior individuals for these traits.

Moreover, we were able to assign seven of these 10 genes to bovine chromosomes (Table 3). Except for the information obtained from the database, four genes

were mapped using a bovine SCB panel. However, some primer sets designed on the cDNA sequence could not amplify genomic DNA and thus we were unable to locate the gene on the chromosome. Accordingly, it is also important to perform chromosome assignment for the remaining genes in the present study in order to work towards completing the database of the adipocyte differentiation related genes in cattle. These genes may serve as candidate genes in QTL mapping for beef marbling.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (B-2, 14360262) from the Japan Society for the Promotion of Science, a grant (13-365) from the Japan Livestock Technology Association, as well as the Mishima Unkai Memorial Foundation.

REFERENCES

Asayama K, Nakane T, Dobashi K, Kouera K, Hayashibe H, Uchida N, Nasazawa S. 2001. Effect of obesity and togilization on expression of two glutathione peroxidases: cellular and extracellular types in serum, kidney and adipose tissue. *Proc Natl Acad Resour* **34**, 337-347.

Aso H, Abe H, Nakajima I, Ozutsumi K, Yamaguchi T, Takamori Y, Kotama A, Heshino FU, Takano S. 1995. A preadipocyte clonal line from bovine intramuscular adipose tissue: Nonexpression of GLUT-1 protein during adipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **213**, 369-375.

Brashear JL, Barber T, Wolfus NE, Serrero G, Blanchette-Mackie LJ, Fontana C. 1997. Adipose differentiation-related protein is an abundantly expressed lipid storage droplet-associated protein. *Journal of Lipid Research* **38**, 2249-2263.

Casas E, Keel JW, Shackelford SD, Kohnzinger M, Sonstegard TS, Smith JP, Kappes SM, Stone RT. 1998. Association of the muscle hypertrophy locus with carcass traits in beef cattle. *Journal of Animal Science* **76**, 468-473.

Center for Information Biology and DNA Data Bank of Japan (CIB-DBDJ. 1998. *Sequence Analysis* [homepage on the Internet]. CIB-DBDJ, Mishima, Japan; [cited 10 November 2003]. Available from URL: <http://cib.genes.nig.ac.jp/homology>

Gregoire FM, Sinas CM, Shi HS. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews* **78**, 783-809.

Heid HW, Moll R, Schvetzick L, Backwitz HR, Keenan TW. 1998. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell and Tissue Research* **294**, 309-321.

Hugh DL, Bauman DF, Garrigus US. 1972. Lipogenesis in the ruminant: in vitro study of tissue sites, carbon source and reducing equivalent generation for fatty acid synthesis. *Journal of Nutrition* **102**, 609-616.

Ikeda-Murayama M, Sugimoto Y, Niimi Y, Aso H. 2000. Type XVIII collagen is newly transcribed during bovine adipogenesis. *Differentiation* **63**, 281-285.

Institut National de la Recherche Agronomique. 2003. *Bovine Database* [homepage on the Internet]. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris; [cited 11 November 2003]. Available from URL: <http://locust.ny.nra.fr/cgi-bin/lqbc/mapping/commen/ntro2.pl?BASE=cattle>

Itoh T, Takasuga A, Watanabe I, Sugimoto Y. 2003. Mapping of 1400 expressed sequence tags in the bovine genome using a somatic cell hybrid panel. *Animal Genom* **34**, 362-370.

Jessen BA, Stevens GJ. 2002. Expression profiling during adipocyte differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *Gene* **299**, 95-120.

Ligo GO, Reitz DC, Zander JR. 1978. Fatty acid synthesis in ruminating and nonruminating goats. *Journal of Nutrition* **108**, 1733-1739.

Linn DK, Riley RR, Smith SB. 1993. Growth and carcass characteristics of Angus and American Wagyu steers. *Meat Science* **34**, 327-334.

MacNeil MD, Gross MD. 2002. Genome-wide scans for QTL affecting carcass traits in Hereford x composite double backcross populations. *Journal of Animal Science* **80**, 2316-2324.

Maeda K, Okabe K, Shimozuma I, Mizuno K, Matsuzawa Y, Matsubara K. 1997. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene* **190**, 227-235.

Martin GS, Linn DK, Baird RG, Smith SB. 1999. Postnatal development of stearoyl coenzyme A desaturase gene expression and adiposity in bovine subcutaneous adipose tissue. *Journal of Animal Science* **77**, 630-636.

Nishizuka M, Tsuchiya T, Nishihara I, Enagawa M. 2002. Induction of Bcl-1 and ARA70 gene expression at an early stage of adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells. *Biochemical Journal* **361**, 529-533.

Nizulu JM, Bullock SA, Kuesner KH, Christy SO, Selby E, Kelly TF, Lue MD. 1988. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 17792-17800.

Nambu JM, Young-Chen K. 2000. Adipocyte differentiation and gene expression. *Journal of Nutrition* **130**, 3122S-3126S.

Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. 2002. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARGamma: A unified pathway. *Genes and Development* **16**, 22-26.

Ross SE, Erickson RL, Gerin J, DeRose PM, Barak O, Longo KA, Misk DC, Knack R, Hamai SM, Adams KR, Andersen SM, Nelly EJ, Madsen J, Kristiansen S, MacDougall OA. 2002. Microarray analyses during adipogenesis: Understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 5989-5999.

Tahara K, Aso H, Yamasaki T, Rose MJ, Takasuga A, Sugimoto Y, Yamaguchi T, Takano S. 2004. Cloning and expression of type XII collagen isoforms during bovine adipogenesis. *Differentiation* **72**, 115-122.

Gene expression in adipogenesis

- Tayehani P, Beattie JE. 2001. Physiological role of adipose tissue: White adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proceedings of the Nutrition Society* **60**, 329-339.
- Westwood M, Ap'In JD, Collinge EA, Gill A, White A, Gibson JM. 2001. Alpha 2-Macroglobulin: A new component in the insulin-like growth factor/insulin-like growth factor binding protein-1 axis. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 41668-41674.
- Whitehurst GB, Beitz DC, Poehoven MA, Ellison WR, Crump MH. 1978. Lactate as a precursor of fatty acids in bovine adipose tissue. *Journal of Nutrition* **108**, 1836-1841.
- Yeh WC, Bieren RL, McKnight SL. 1995a. Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 11086-11090.
- Yeh WC, Li TK, Bieren RL, McKnight SL. 1995b. Identification and characterization of an immunophilin expressed during the clonal expansion phase of adipocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 11081-11085.



A comprehensive radiation hybrid map of the bovine genome comprising 5593 loci

Tomohito Itoh^{a,b,1}, Toshio Watanabe^{a,1}, Naoya Ihara^a, Paola Mariani^c, Craig W. Beattie^d, Yoshikazu Sugimoto^a, Akiko Takasuga^{a,*}

^aShirakawa Institute of Animal Genetics, Ohtakara, Nishigo, Nishi-shirakawa, Fukushima 961-8061, Japan

^bLivestock Improvement Association of Japan, Ito, Maebashi, Gunma 351-9121, Japan

^cCPTP-CERS, Palazzo LITA, 5th Floor, Via F.lli Cervi 93, 20090, Segrate (MI), Italy

^dDepartment of Animal Biotechnology, University of Nevada, Reno, NV 89557, USA

Received 30 September 2004; accepted 29 December 2004

Abstract

A bovine whole genome 5000-rad radiation hybrid (RH) panel, SUN5RH_{5000-rad}, was constructed to build a high-resolution RH map. The Shirakawa–USDA linkage map served as a scaffold to construct a framework map of 3216 microsatellites on which 237[†] FISHs were ordered. The resulting RH map provided essentially complete coverage across the genome, with 1 cR₅₀₀₀ corresponding to 114 kb, and a cattle–human comparative map of 1716 bovine genes and sequences annotated in the human genome, which covered 79 and 72% of the bovine and human genomes, respectively. We then integrated the bovine RH and comparative maps with BAC fingerprint information in <http://www.hgsc.ca/lab/mapping/bovine> to construct a detailed, BAC-based physical map covering a reported 40-cM quantitative trait locus region for intramuscular fat or “marbling” on BTA 4. In summary, the new, high-resolution SUN5RH_{5000-rad} comparative, Shirakawa–USDA linkage, and BAC fingerprint maps provide a set of genomic tools for fine mapping regions of interest in cattle.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Radiation hybrid map; Cattle; Microsatellite; FISH; Comparative map

Recent progress in identifying genes associated with disease susceptibility in human and mouse are due in large part to the success of whole genome sequencing [1,2]. In species whose genomes have not been sequenced, high-density, radiation hybrid (RH)-based, comparative maps provide a significant source of information for fine mapping and identification of genes potentially accounting for some or all of the genetic variation describing a phenotype as well as a scaffold on which to build future, sequence-based maps in a species of interest. Comparative maps have also been incorporated into a positional candidate cloning approach to identify several genes for heritable diseases [3] and economically important traits in livestock [4,5]. In

cattle, a whole genome sequencing project has recently released a 3.3-fold coverage of the bovine genome (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/>).

The first whole genome radiation hybrid (WG-RH) map for cattle was constructed using a 5000-rad RH panel [6] and ordered 319 microsatellites and 768 FISHs at low resolution. The map revealed 105 chromosomal segments conserved between the bovine and the human genomes [7]. Later, a WG-RH_{3000-rad} framework map of 1148 microsatellites and 90 genes incorporated virtually all the informative markers publicly available at that time [8]. These initial, low-resolution, bovine RH maps provided the basis for the first comparative maps between BTA X and HSA X [9], BTA 18 and HSA 16 [9], BTA 26/28 and HSA 10 [11], and BTA 15/29 and HSA 11 [12,13]. The initial maps clearly indicated that even conserved segments exhibited significant rearrangement between the bovine and

* Corresponding author. Fax: +81 248 25 5725.

E-mail address: takasuga@sigat.p.ia.takasuga.

[†] These authors contributed equally to this work.

the human genomes. The possibility of a significant number of additional rearrangements within synteny groups between the bovine and the human genomes, the limited number of anchors tied to the available bovine genetic maps, and the reliance on *in silico* comparative mapping to direct the assignment of bovine coding sequences and identify synteny breaks [7,13,14] prompted us to build a well-anchored, high-resolution, bovine human comparative map directly, using bovine sequences, and subsequently compare marker synteny and order with the human sequence map. A well-anchored map ensures the quality of the RH map, provides an opportunity for fine mapping through linkage, and acts as a platform for positional candidate cloning. Our recently reported, high-density Shirakawa USDA linkage map of ~1800 new microsatellite markers, 3960 markers total [15], provided a scaffold to construct the comprehensive RH and comparative maps reported here.

The bovine, comprehensive RH map consists of 3216 framework microsatellites and 2377 ESTs ordered on the 7000-rad Shirakawa Institute–University of Nevada bovine RH panel (SUNbRH₇₀₀₀₋₁₃₂). The new RH map also provided a sufficient number of anchors to construct a BAC (<http://www.bogse.ca/lab/mapping/bovine/>) contig map spanning ~40 cM (357 cR₅₀₀₀) on BTA 4. Taken together, the current maps will facilitate positional cloning and provide an RH-BAC platform on which to assemble an initial sequence of the bovine genome.

Results and discussion

Framework map

We used microsatellite markers mapped on the Shirakawa–USDA linkage map [15] (see also <http://www.nare.usda.gov/genome/>) to construct a dense and robust framework map. Microsatellites that amplified well on bovine

genomic DNA were typed across the 92 hybrid clones of the SUNbRH₇₀₀₀₋₁₃₂ panel. A framework was constructed according to the strategy used to build the mouse RH map [16]. Briefly, markers were ordered based on their location on the linkage map [15] and RH distances computed using the RHMAPPER program [17]. Finally, a framework map consisting of 3216 microsatellites was constructed for 29 autosomes and the X chromosome (Supplements 1 and 2). Each chromosome included microsatellites assigned at or close to the centromeric and telomeric ends on the linkage map [15] (Supplement 1). Most (90.7%) of the pair-wise lod scores between consecutive framework markers shown in Supplement 6 were LOD >20. The average retention frequency for 3216 microsatellites was 17.5%, ranging from 3.3% (for example, *DMK2672* on BTA 8) to 53.3% (*DMK4254* on BTA X) across the genome, except for 72.8% of *ACC40* on BTA X (Fig. 1). Marker *ACC40*, with the highest retention frequency, was tightly linked to the *HPR1* locus [7] that was used as the selection marker for creating the panel. Average retention frequency for individual chromosomes varied from 10.2% on BTA 2 to 24.0% on BTA 23 and 26.7% on BTA X (Table 1). Table 1 provides details of the framework map. The number of framework microsatellites ranged from 51 on BTA 23 to 226 on BTA 1. Relative chromosomal length varied from 419 (BTA 26) to 1852 (BTA X) cR₅₀₀₀, yielding a total length of 23,965 cR₅₀₀₀. This contrasts sharply with the coverage recently reported by Evers-van der Wind et al. [14], of 11,841 cR₅₀₀₀ with an approximate genome-wide ratio of 4 cR₅₀₀₀/cM. The average ratio of physical to genetic distance of the current map was 7.5 cR₅₀₀₀/cM; range 4.6 (BTA 8) to 12.6 (BTA X) cR₅₀₀₀/cM. The reduced coverage may be due to the presence of a significant number of gaps between linkage groups (56) and smaller number of markers assigned to the RH₅₀₀₀ map [14]. The slight increase in the cR:cM ratio is likely due to an increase in overall marker coverage (79% vs 65.8%) over more chromosomes. Fig. 2

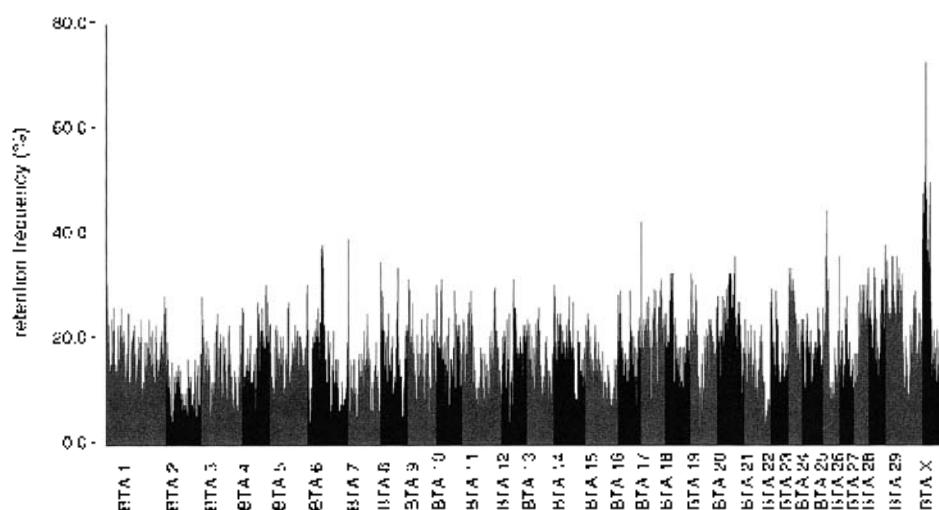


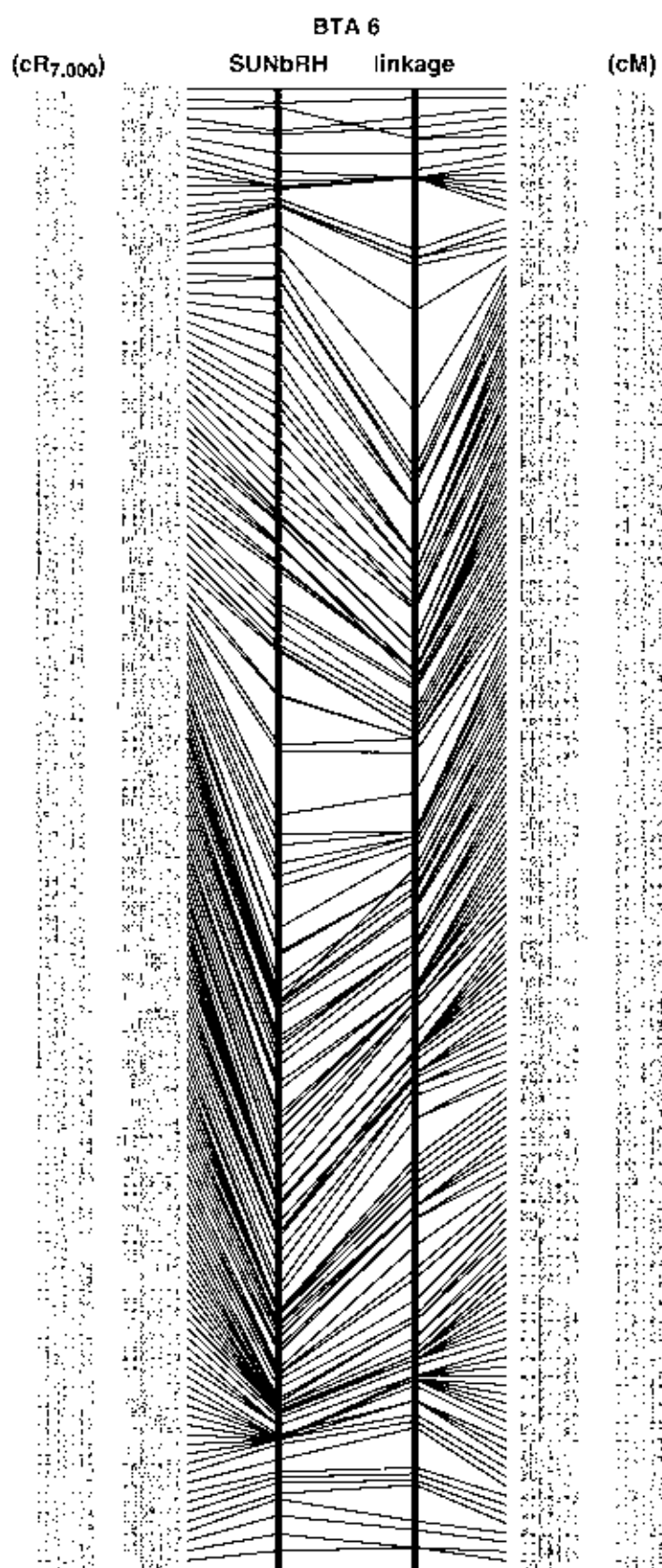
Fig. 1. Retention frequency of framework markers across the genome.

Table 1
Statistics of the SUNRH map by chromosome

BTA	No of markers	No of positions in the framework	No of positions on the linkage map	Average retention frequency (%)	Framework map length (cM)	Genetic length (cM) ^a	Relative distance (cR ₁₀₀₀ cM)	ESTs	Placed on the human genome ^b	Comparative coverage of the SUNRH map (cM/cR ₁₀₀₀ cM)	Comparative coverage of the human genome (cM/Mbp)	% Coverage of human chromosomes
1	236	188	146	27.1	1,128	155	9.2	94	69	90.7 (1,295)	4.7 (942)	HSA3 (57.9), HSA21 (57.6)
2	136	104	97	10.3	605	130	5.2	65	68	91.3 (607)	5.9 (1,173)	HSA1 (73.0), HSA2 (40.9)
3	154	125	91	14.0	908	179	7.7	138	98	98.3 (982)	4.6 (1,381)	HSA1 (52.6), HSA2 (3.6)
4	106	92	69	17.6	772	120	6.4	37	45	86.2 (434)	2.0 (62)	HSA7 (48.9)
5	143	122	103	16.5	1,274	176	9.0	119	84	87.4 (1,061)	3.3 (99)	HSA12 (61.9), HSA22 (38.5)
6	154	136	96	15.2	1,308	134	9.7	56	34	83.8 (1,149)	3.7 (110)	HSA4 (57.8)
7	123	112	80	12.9	884	136	6.5	136	104	83.2 (727)	3.3 (101)	HSA1 (63.1), HSA5 (45.6), HSA19 (28.0)
8	105	86	72	16.8	585	129	4.6	81	60	67.8 (397)	2.3 (69)	HSA4 (1.5), HSA8 (6.5), HSA9 (4.1), 41
9	107	98	69	16.1	906	116	8.9	33	25	65.2 (650)	2.6 (77)	HSA6 (45.3)
10	100	85	59	17.6	794	119	6.7	112	76	83.5 (653)	2.7 (82)	HSA5 (2.7), HSA14 (37.7), HSA15 (37.7)
11	148	132	86	15.9	1,193	131	9.1	120	97	82.7 (987)	3.5 (107)	HSA2 (37.8), HSA9 (10.8)
12	95	82	65	17.6	657	120	6.0	48	28	54.8 (360)	2.0 (62)	HSA1 (58.8)
13	100	54	70	15.6	632	105	6.2	93	72	63.0 (444)	2.2 (66)	HSA10 (21.0), HSA20 (59.7)
14	121	95	72	17.9	683	104	6.6	53	43	93.6 (616)	3.1 (93)	HSA8 (63.8)
15	123	95	82	14.0	629	110	5.7	68	57	66.1 (416)	2.0 (59)	HSA11 (13.9)
16	85	80	61	17.0	789	99	8.0	37	48	61.4 (488)	1.6 (48)	HSA1 (19.3)
17	90	77	65	22.0	713	96	7.5	53	47	76.6 (551)	2.0 (60)	HSA4 (14.1), HSA11 (17.3), HSA22 (21.5)
18	98	58	65	18.4	821	84	9.7	116	83	90.2 (741)	2.0 (61)	HSA16 (40.7), HSA19 (37.5)
19	101	87	77	18.5	767	110	7.0	124	120	73.6 (593)	2.0 (61)	HSA17 (74.1)
20	105	88	60	23.1	793	83	9.6	35	35	93.3 (743)	2.6 (77)	HSA3 (45.6)
21	98	51	66	13.8	533	84	9.4	101	44	71.9 (383)	1.9 (47)	HSA14 (33.9), HSA15 (37.5)
22	69	58	35	17.6	417	88	5.1	94	64	80.1 (386)	1.7 (50)	HSA2 (25.1)
23	51	50	37	21.0	513	50	6.4	57	38	77.1 (396)	1.6 (49)	HSA6 (28.4)
24	81	69	53	18.2	503	78	6.4	34	26	47.8 (241)	1.0 (29)	HSA18 (38.4)
25	62	57	45	18.5	525	68	7.7	96	69	88.5 (467)	1.8 (55)	HSA7 (15.2), HSA16 (34.6)
26	56	48	36	16.3	419	59	4.1	42	33	89.9 (377)	1.7 (51)	HSA10 (37.7)
27	54	48	35	22.0	522	71	7.3	24	15	42.3 (221)	0.5 (15)	HSA8 (10.3)
28	66	53	40	23.8	492	62	8.0	43	34	79.0 (389)	1.3 (41)	HSA1 (4.7), HSA10 (22.2)
29	138	111	72	22.9	806	70	11.6	80	60	81.9 (660)	1.3 (38)	HSA11 (28.5)
X	115	109	59	26.7	1,852	142	12.6	55	40	89.4 (1,489)	3.3 (99)	HSA11 (64.7)
Total	3,216	2,728	2,082	17.4	23,965	3,660	7.5	2,977	1,716	78.9 (18,910)	71.6 (2,161)	

^a Ref. [13]

^b Total number of ESTs and microsatellite-flanking sequences placed on human genome



shows the framework map of BTA 6. Of the 93 markers on the BTA6 linkage map, 68 (73%) were independently located on the framework map. In the centromeric portion of BTA6, including the largest autosomal marker interval on the Shirakawa-USA linkage map [15], the 26.4-cM interval from *DIK2394* to *DIK2285* corresponded to a shorter physical distance of 65.4 cR_{BOV} (Fig. 2). Framework maps of other chromosomes are shown in Supplement 1.

EST mapping and a bovine-human comparative map

We incorporated information from the human genome sequence into the bovine RH map, by directly assigning bovine ESTs annotated in the human genome sequence (BGI; <http://www.tigr.org/tdb-bgi/>) to the framework map to create a bovine-human comparative map. Although 2544 (96.0%) of 2649 ESTs typed across the SUNbRH₁₀₀₀₋₁₀₂ panel were assigned by two-point linkage to the framework markers at LOD >20, 167 assignments were removed for the following reasons: (1) 21 ESTs could not be placed on the assigned chromosomes by the "create placement map" option of RHMAPPER; (2) 51 of 125 ESTs discordant with previous assignments on a bovine somatic cell hybrid panel [18] or the BOVMAP database (<http://locus.jouy.inra.fr/>) were eliminated as inconsistent with synteny information or had no synteny information available, while 14 ESTs newly ordered on the RH panel and 60 ESTs assigned previously [18] (BOVMAP; <http://locus.jouy.inra.fr/>) remained because they were confirmed by synteny information (Supplement 4); (3) 95 ESTs were singletons (Supplement 1). Thus 2377 ESTs (89.7%) were finally ordered on the map.

One thousand three hundred twenty-seven of 2377 (55.8%) chromosomal assignments were confirmed by previous assignments on a somatic cell hybrid panel [18] or the BOVMAP database (<http://locus.jouy.inra.fr/>; *n* = 687) were confirmed by synteny information (see below). Although the remaining 363 assignments with lod scores of more than 20 were not confirmed, as they were neither assigned on the somatic cell hybrid panel [18] nor annotated in the human sequence, we retained them on the SUNbRH₁₀₀₀₋₁₀₂ map because there was no valid technical reason to remove them. Together, the final map includes 3216 framework microsatellites and 2377 ESTs, for a total of 5593 loci.

Of the 2377 ESTs assigned to the SUNbRH₁₀₀₀₋₁₀₂, 1550 ESTs were identified as to location on the human genome sequence using the BGI database (<http://www.tigr.org/tdb-bgi/>), together with 166 microsatellite-flanking sequences (Blast score >100, *E* < 10⁻⁶). This provided a bovine-human comparative map of 1716 loci (Table 1; Fig. 3; Supplements 2

and 5). Gene order and relative distances between adjacent genes in the comparative map showed good consistency with those in the human genome. On average, 1 cR_{BOV} in the SUNbRH₁₀₀₀₋₁₀₂ map corresponded to 114 kb of the human genome (Table 1). Approximately 79% of the SUNbRH₁₀₀₀₋₁₀₂ map covered 72% of the human genome. Distribution of the 2377 ESTs on the bovine genome was not stochastic. A significantly high number were assigned to BTAs 7, 19, 22, and 25, while the incidence was significantly lower on BTAs 6, 9, 20, and X (*p* < 0.001). Chromosomes BTA 7 and 19 correspond to the gene-rich human chromosomes 17 and 19 (HSAs 17 and 19) and BTA X corresponds to the gene-poor human chromosomes (HSA X) [1,19]. We observed 161 conserved segments, including 8 single markers representing individual synteny assignments in this study or in Ref. [14] (Fig. 3). Compared with the recently reported comparative map of 1463 human orthologs ordered on a RH₁₀₀₀₋₁₀₂ panel [14], we observed more internal rearrangements in a synteny block on BTAs 1, 4, 12, 13, 19, and X and additional synteny segments on BTAs 1, 8, and 10. However, we also observed fewer internal rearrangements on BTAs 2, 3, 7, 9, 11, 16, 17, 21, 22, and 24, as one or more conserved segments on the RH₁₀₀₀₋₁₀₂ map were ordered into the adjacent synteny segment (BTAs 2, 3, 7, 11, 16, 21, 22, and 24) or oriented in reverse (BTAs 2 and 9) in the current, high-resolution map. This resulted in larger conserved segments. On BTAs 5, 6, 14, 20, 23, and 25–28, we observed a pattern of synteny similar to that in [14]. Thus, we observed a total of 84 internal rearrangements. Except for 8 single markers representing individual synteny assignments illustrated in this study and that of Everts-van der Wind et al. [14] (Fig. 3), there are 51 single markers breaking a conserved segment or located between two conserved segments. This suggests that these markers represent a microrearrangement or form the basis for another conserved segment. In addition, some of the markers we elected not to assign in this work as a singleton might also represent a synteny segment. Of the 95 singletons, 28 could be placed on the expected synteny segments, whereas 20 produced a break in the placed segment and 47 could not be placed on the predicted chromosomes (LOD >20) (Supplement 4). As described below, we confirmed the conserved segments on BTA 4, in part by developing a BAC contig map. Obviously, any future whole genome BAC contig map will refine synteny and confirm or refute current microrearrangements.

Map construction using the SUNbRH₁₀₀₀₋₁₀₂ and the BAC fingerprint maps

We addressed the issue of whether the SUNbRH₁₀₀₀₋₁₀₂ map facilitates assembly of BAC contigs and a positional

Fig. 2. Integrated SUNbRH₁₀₀₀₋₁₀₂ framework and Shirakawa-USA linkage map of BTA 6. Long vertical lines represent the SUNbRH₁₀₀₀₋₁₀₂ map (left line) and the Shirakawa-USA linkage map (right line). Columns of marker names and positions correspond to each map. Individual maps of other chromosomes are shown in Supplement 1.

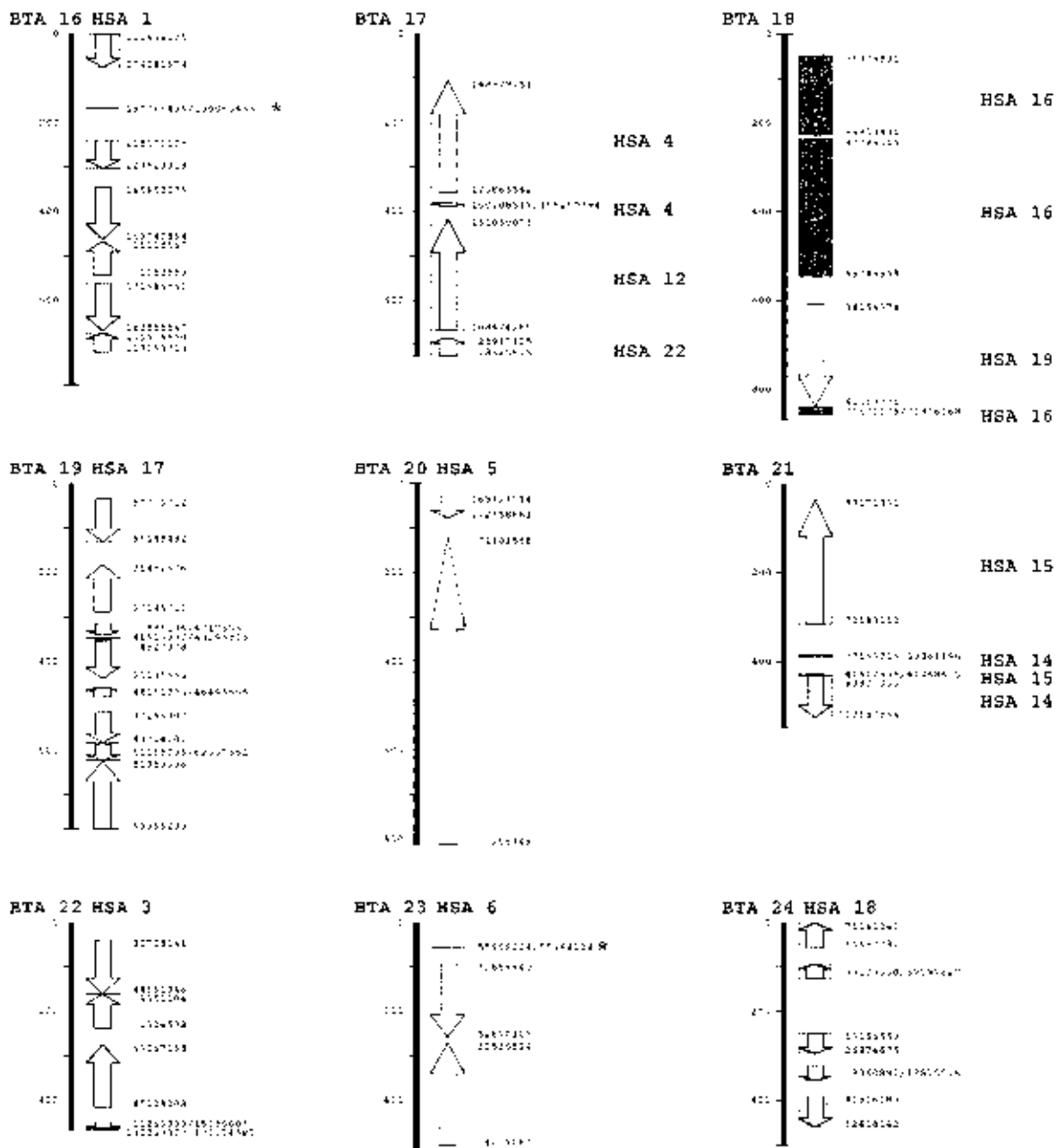


Fig. 4. (continued).

cloning strategy for a quantitative trait locus (QTL) region, by constructing a detailed physical map that covered a QTL region for intramuscular fat content or “marbling” on BTA 4 at 1% experiment-wise significance [20] using BAC fingerprint information available at <http://www.begsc.ca/lab/mapping/bovine>. The SUNBRH₁₀₀ map provided 53 microsatellites and 30 STSs as anchor loci within the 40-cM region from *DIK2875* (204.2 cR₁₀₀) to *DIK123* (552.8 cR₁₀₀). We screened the bovine RPCI (<http://bacpac.chori.org/mbovine42.htm>) and CHORI (<http://bacpac.chori.org/bovine240.htm>) BAC libraries with these 83 markers and

identified 12 fingerprint-based BAC contigs comprising 24 to 1276 clones in the region (Fig. 4, Supplement 2). We were able to order the 12 BAC contigs and correct errors in the assembly of BAC contigs by screening BAC clones using the 83 anchor loci and 8 STSs developed from the BAC end sequences (Supplement 7). For example, the 100th clone of contig 3584 was connected with the end of contig 13244, and contig 8087 was incorporated between the 205th and 206th clone of contig 3584. Also, the 179th clone of contig 8334 appeared to be connected with the beginning of contig 4897 judging by the sequence similarity

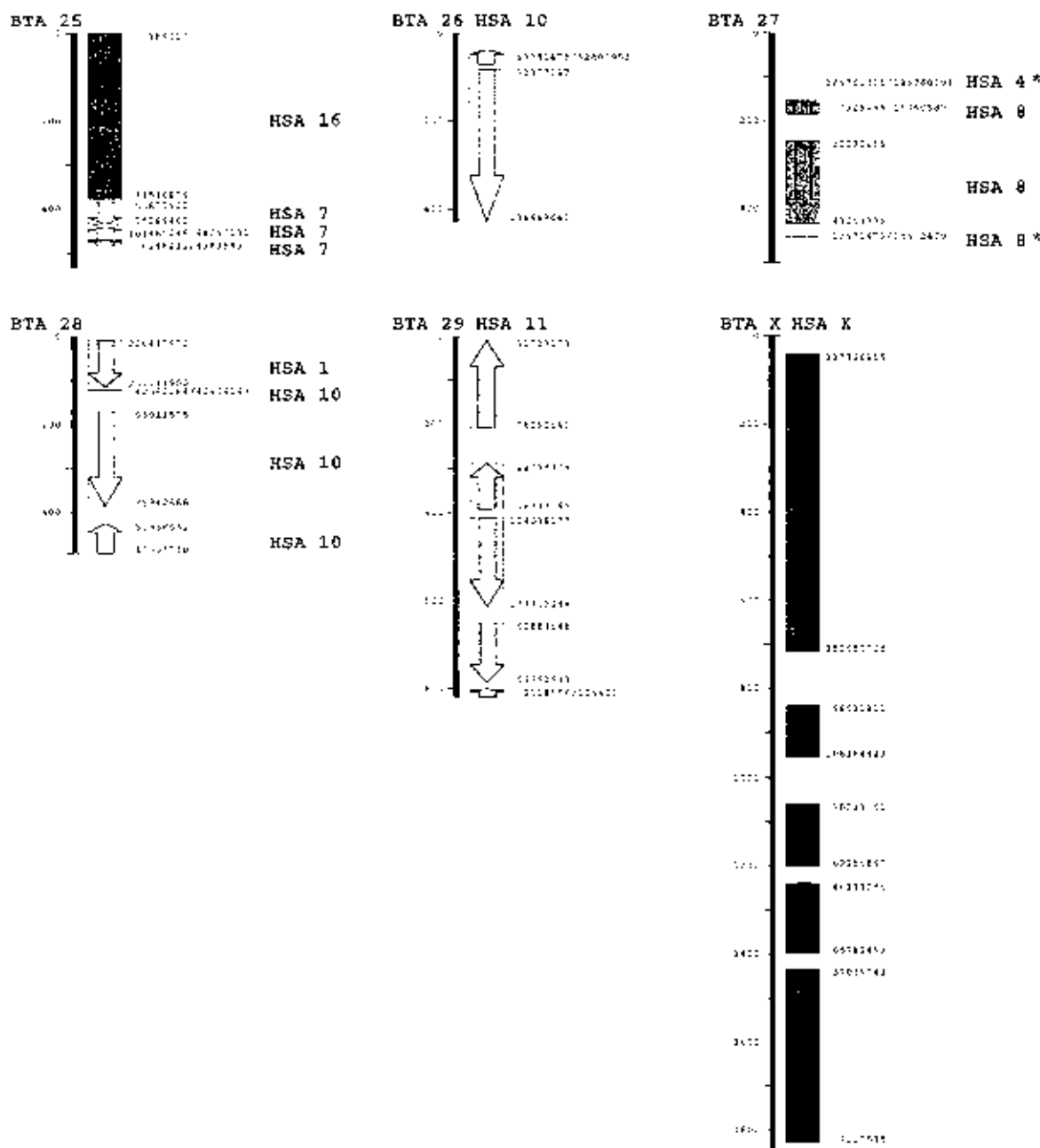


Fig. 3 (continued).

to the human genome. Although this could not be confirmed directly due to difficulty in developing STSs, the 176th clone of contig 8334 was connected with the end of contig 6103, producing a larger conserved segment with HSA 17 (Supplement 7). As shown in Fig. 4, the QTL region for marbling was covered by BAC contigs composed of up to 8564 BAC clones corresponding to ~67.8 Mb of the human genome. The gaps between the contigs were estimated to be 0.05–1.56 Mb from the BAC end sequences placed on the human genome. We confirmed all known and expected synteny observed in the QTL region using the BAC contig

map. Moreover, a microrearrangement of the 0.3-Mb segment corresponding to 37.7–38.0 Mb of HSA 7 was newly assigned and confirmed by screening BAC clones as described above (Fig. 4; Supplement 7). The increase in resolution of the map revealed correct marker order and marker intervals estimated from the BAC fingerprints (<http://www.begsc.ca/lab/mapping/bovine>) and the corresponding positions on the human genome. The resultant fine map should facilitate development of new microsatellite and SNP markers for any future association studies in combination with bovine genome sequences ([— 79 —](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

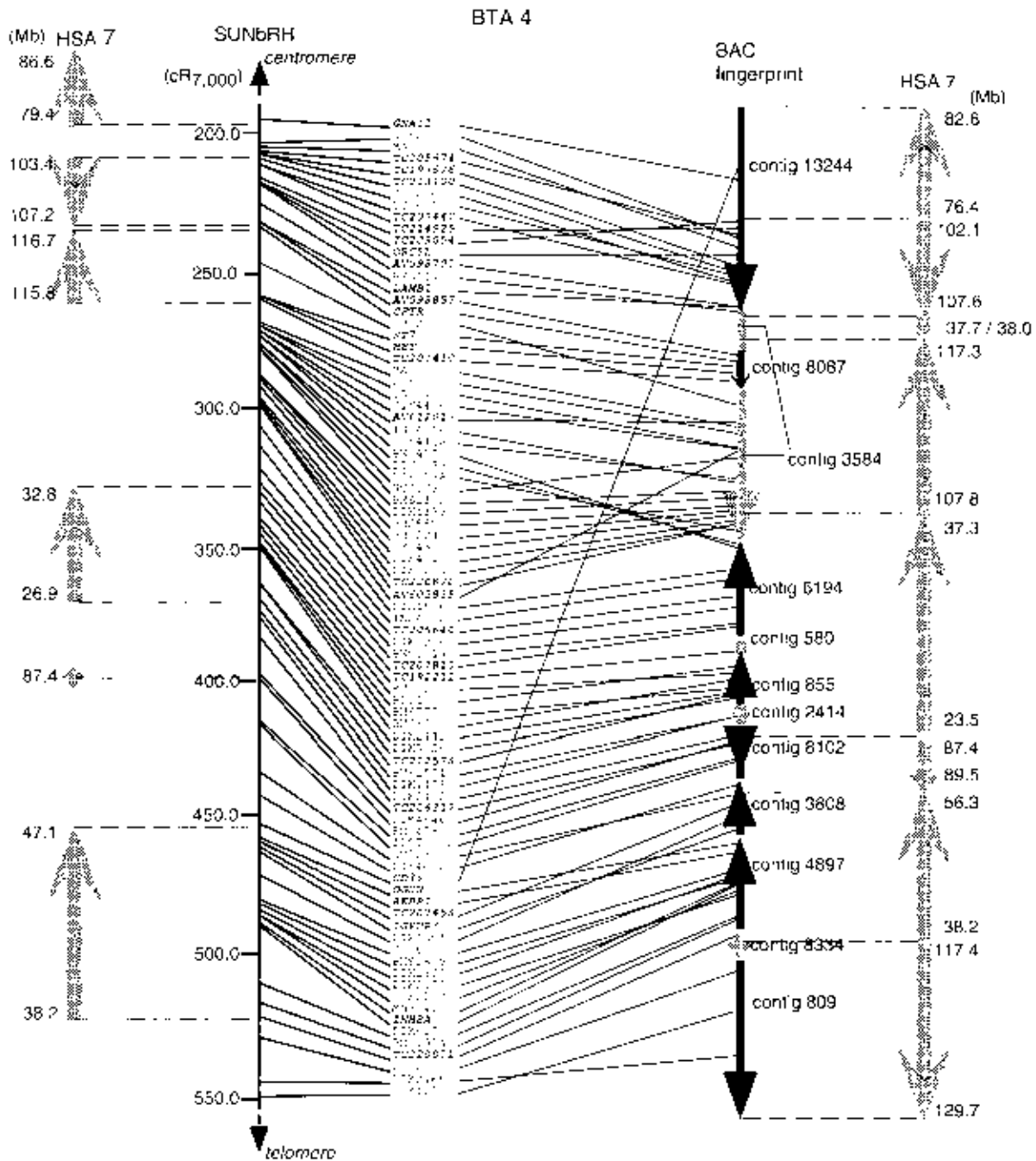


Fig. 4. Integrated SUNbRH₇₀₀₀ and BAC fingerprint map of a QTL region for intramuscular fat on BTA 4. The SUNbRH₇₀₀₀ map is shown on the left and the BAC fingerprint map on the right. Arrowheads indicate the direction of the BAC contigs. ESTs are shown in gene symbols. TC numbers, or GenBank accession numbers, according to the annotation and assembly in BTA4 (<http://www.igf.org/idb/bta4/>), all of which are italicized. Other marker names represent framework markers. The columns for the human genome (HSA) show comparative coverage based on the SUNbRH₇₀₀₀ (left) and the BAC fingerprint maps (right).

www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/) and help identify candidate genes within the reduced interval. The results from BTA 4 suggest the SUNbRH₇₀₀₀ map has sufficient resolution to provide a scaffold for assembling BAC contigs. The resultant BAC contig map will refine the

synteny segments at a sufficient level of resolution to compare with the human, mouse, and rat genomes for revealing mammalian chromosome evolution in their lineages [21] and provide a platform for assembling a draft sequence of the bovine genome.

Materials and methods

Construction of the SUNHRH₇₀₀₀ panel. Bovine fibroblasts were derived from male muscle tissue biopsies. Approximately 1.8×10^7 fibroblasts were irradiated with 7000 rad and fused to HPRT⁺ Wg3hC12 hamster cells [22]. Fused cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1 × IAT at 37 °C. The irradiated bovine and hamster fibroblasts were plated onto 1 × IAT medium and incubated at 37 °C as controls. Independent colonies were picked and grown in four 300-cm² flasks for DNA extraction. Ninety-two hybrid clones were randomly chosen and characterized by FISH to determine donor DNA content, followed by estimation of chromosome retention frequency using 62 microsatellites that spanned all bovine chromosomes at relatively even intervals (P. Mariani, Y. Sugimoto, and C. W. Beattie, unpublished). The SUNHRH₇₀₀₀ panel is available upon request.

Marker amplification by PCR. Microsatellite markers were obtained from the Shirakawa–USDA linkage map [15] (see also <http://www.marc.usda.gov/genome/>). EST markers were derived from 3′ ESTs as described previously [18,23] and published by others [7]. Additional sets of primers were designed for 88 genes, from assembled EST sequences (<http://www.tigr.org/tdb/bgi/>) using Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html) (Supplement 3). Forward (EST markers) or reverse (microsatellite markers) primers were fluorescently labeled. The PCR mixtures were composed of 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 U *Taq* polymerase, 0.2 mM each dNTP, 0.4 μM primers, and 50 ng template DNA in a 15-μl volume. Amplification was performed under the following conditions: denaturation at 94 °C for 4 min followed by 30 cycles of 94 °C for 1 min for denaturation, 50 to 65 °C for 1 min for annealing, and 72 °C for 1 min for extension, followed by a final extension step at 72 °C for 5 min. PCR products were purified using MultiScreen-PCR (Millipore, Cambridge, MA, USA) or NucleoFast 96 PCR plates (MACHERY-NAGEL, GmbH & Co., Germany), followed by electrophoresis using an ABI 3700 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Detailed marker information is available in Supplement 2. Each microsatellite and EST was independently scored as amplified (1), not amplified (0), or ambiguous (2) for each hybrid using Genotyper (Applied Biosystems) in triplicate and duplicate, respectively. The results with discrepancies were reexamined and reanalyzed and any remaining discrepancies scored as ambiguous. Only three ambiguities per marker were allowed.

Construction of framework map. The framework was constructed according to the strategy used by Van Eiten et al. [16]. Initially, microsatellites were ordered according

to their location on the linkage map [15], in which microsatellites with the same typing data, but distinct positions on the linkage map, were removed, and RII distances were computed using the RHMAPPER program [17]. The loci were subjected to the “expansion” test in which any locus whose inclusion expanded the map distance more than 30 cR₇₀₀₀ was excluded. The remaining microsatellites were subjected to a “ripple” test using the “ripple” function in RHMAPPER, in which four consecutive loci were permitted to determine if any permutation yielded a significantly higher likelihood. The best permutation was reinserted into the order and the next four were then considered. The microsatellites that had been removed in the previous steps were inserted back into the map using the “placement” function of RHMAPPER, if they showed a strong pair-wise linkage (LOD >20) to another marker in the genetic linkage group. However, the markers introducing unusual apparent breaks or mapped to a significantly different location were again excluded. Finally, all markers located at a chromosomal end apart from the next marker or in a large interval apart from the adjacent markers on the linkage map were inserted back into the map.

To determine the appropriate lod score threshold for mapping new loci, the highest lod score of each framework marker with a marker on a different chromosome was calculated according to Van Eiten et al. [16] (Supplement 6). We chose LOD 20 as the threshold, because a cross-chromosomal lod score exceeded 20 in only 5% of the framework microsatellite markers.

EST mapping. ESTs were assigned to chromosomes to which they showed the strongest pair-wise linkage with a minimum lod score of 20 using the RHMAPPER program. ESTs were placed on the assigned chromosomes using the “create placement map” option of RHMAPPER, using 20 cR₇₀₀₀ as a maximum distance from terminal framework markers.

Construction of a bovine–human comparative map. The information on ESTs about assembling, annotation, and placement on the human genome was obtained from BGI (<http://www.tigr.org/tdb/bgi/>) (Release 9.0, 2002). MapViewer build 34 version 1 of the human genome assembly (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) was used. For the ESTs that were not placed on the human genome, the 3′ EST sequence was used to search the human genome sequence (Supplement 2). The annotation in BGI is based on the similarity with known proteins. To convert the annotation into gene symbols, GenBank accession numbers of the known proteins were searched against LocusLink (cattle, human, mouse, rat, pig, and dog) (<http://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/LocusLink/>) and either “official symbols” or “preferred symbols” were obtained. The annotations including “similar to” or “weakly similar to” were eliminated to avoid connecting to paralogs.

Bovine mapping data published previously was obtained from the BOVMAP database (<http://locus.jouy.inra.fr/>). The human orthologs were searched using bovine gene symbols against “gene symbols” in LocusLink (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>), and human genomic positions were obtained from the placement of “reference sequences” on the human genome.

Microsatellite-flanking sequences were masked with repetitive sequences using RepeatMasker and Repbase 6.4 [24] and submitted to the Blast search using Blastn [25] against human genomic sequences (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/H_sapiens/). The human sequences with a minimum Blast score of 100 ($E < 10^{-10}$) were queried for the genomic position on MapViewer build 34 version 1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) of the human genome.

Conserved segments were defined by more than one consecutive loci on the comparative map, except for the single markers judged as representing individual synteny assignments from this study or the previous report [14]. Synteny coverage of the conserved segment on the human genome was defined by the starting positions of the most distant intrasegmental orthologs in the human genome. The number of internal rearrangements was calculated as the number of breaks in the human chromosome segment on a bovine chromosome.

Placement of BAC contigs on the bovine and the human genomes. PCR-based screening was performed on the RPCT-42 (<http://haepac.chori.org/mbovine2.htm>) or the CHORI-240 (<http://haepac.chori.org/bovine240.htm>) bovine BAC libraries using microsatellite and EST markers. Identified BAC clone IDs were submitted to search against the BAC fingerprint map (<http://www.bggsc.ca/lab/mapping/bovine/>), to obtain the contig IDs and the clone IDs included in the contigs. The contigs were ordered and oriented using the microsatellites anchored on the RII map. BAC end sequences were searched in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), followed by the Blast search using Blastn [25] against human genomic sequences (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/H_sapiens/) to place them on the human genome.

Acknowledgments

The authors thank I. Fujita, T. Fujii, Y. Midorikawa, C. Itoh, and C. Sobma for laboratory assistance. This work was supported by grants from the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ygeno.2004.12.007](https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.12.007).

References

- [1] Human Genome Consortium, Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* 409 (2001) 860–921.
- [2] X.S. Puente, I.M. Sánchez, C.M. Overhill, C. Lopez-Otin, Human and mouse proteases: a comparative genomic approach, *Mol. Rev.* 4 (2005) 544–558.
- [3] H. Takeda, et al., Positional cloning of the gene LIMBIN responsible for bovine fibrodysplasia dwarfism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 10549–10554.
- [4] B. Grisart, et al., Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition, *Genome Res.* 12 (2002) 222–231.
- [5] A.S. Van Laere, et al., A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig, *Nature* 425 (2003) 842–846.
- [6] J.L. Womack, et al., A whole-genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping, *Mamm. Genome* 8 (1997) 854–856.
- [7] M.R. Band, et al., An ordered comparative map of the cattle and human genomes, *Genome Res.* 10 (2000) 1350–1368.
- [8] J. Williams, et al., A bovine whole-genome radiation hybrid panel and outline map, *Mamm. Genome* 13 (2002) 409–424.
- [9] M.F. Amaral, S.R. Kata, J.E. Womack, A radiation hybrid map of bovine X chromosome (BTAx), *Mamm. Genome* 15 (2002) 266–271.
- [10] T. Goldammer, et al., A comparative radiation hybrid map of bovine chromosome 18 and homologous chromosomes in human and mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 2106–2111.
- [11] M. Gautier, B. Hayes, A. Eggen, A comprehensive radiation hybrid map of bovine chromosome 20 (BTA20), comparative chromosomal organization between BSA10q and BTA26 and BTA28, *Mamm. Genome* 14 (2003) 711–721.
- [12] M. Gautier, B. Hayes, A. Eggen, An extensive and comprehensive radiation hybrid map of bovine chromosome 12, comparison with human chromosome 11, *Mamm. Genome* 13 (2002) 316–319.
- [13] D.M. Larion, et al., A cattle-human comparative map built with cattle BAC ends and human genome sequence, *Genome Res.* 13 (2003) 1966–1972.
- [14] A. Everts van der Wand, et al., A 1463 gene cattle-human comparative map with anchor points defined by human genome sequence coordinates, *Genome Res.* 14 (2004) 1424–1437.
- [15] N. Baur, et al., A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 2802 microsatellites, *Genome Res.* 14 (2004) 1987–1998.
- [16] W.J. Van Euren, et al., Radiation hybrid map of the mouse genome, *Nat. Genet.* 22 (1999) 384–387.
- [17] J. Sleumer, L. Kruglak, L. Stein, L.S. Carder, Building human genome maps with radiation hybrids, *J. Comput. Biol.* 4 (1997) 487–504.
- [18] T. Itoh, A. Takasuga, T. Watanabe, Y. Sagemoto, Mapping of 1400 EST on bovine genome using a spermatocyte cell hybrid panel, *Anim. Genet.* 34 (2003) 362–370.
- [19] I.C. Venter, et al., The sequence of the human genome, *Science* 291 (2001) 1304–1351.
- [20] K. Mizoshita, et al., Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a half-sib family of purebred Japanese Black (Wagyu) cattle, *J. Anim. Sci.* 82 (2004) 3415–3420.
- [21] G. Bourque, P.A. Chevillon, G. Tesler, Reconstructing the genomic architecture of ancestral mammals: lessons from human, mouse, and rat genomes, *Genome Res.* 14 (2004) 507–516.
- [22] S.J. Goss, H. Harris, New method for mapping genes in human chromosomes, *Nature* 255 (1973) 690–684.
- [23] A. Takasuga, et al., Establishment of a high throughput EST sequencing system using pooled and screened cDNA libraries and determination of 36,000 bovine ESTs, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 7108.
- [24] J. Jurka, Repbase update, *Trends Genet.* 16 (2000) 478–420.
- [25] J. Zhang, H. Madler, PowerBLAST, a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation, *Genome Res.* 7 (1997) 649–656.

動物遺伝研究所年報
第13号（平成17年度）

平成18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

