



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 15 号

(平成19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19年度における附属動物遺伝研究所の研究の概要などを中心に、研究所の諸活動についてとりまとめたものです。

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ました。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できました。しかしながら、クローデイン-16欠損症ほどの影響力はないものの、依然として数々の不良因子が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りません。

また、国際コンソーシアムの努力によってウシゲノムのほとんどの領域のDNA配列が公開されるに至りました。これによってヒト・マウスゲノム情報の利用性は格段に進歩し、遺伝子同定の道筋は明らかになりました。遺伝子が同定されれば、分子的なメカニズムの研究から、脂肪交雑や増体の様相が明らかとなり、DNA情報に基づいた改良だけでなく、飼養管理面の改善が図れるかもしれません。QTL責任遺伝子を同定することは依然として困難ですが、平成19年度において増体に関わる遺伝子の特許申請まで至ったことを特筆しておきたいと思います。これからは、肉質・肉量だけでなく抗病性・繁殖性なども視野に入れたQTL解析を進めるため、私どもの研究開発力を一段と優れたレベルに発展させていきたいと思います。

最後に、終始ご指導いただいた農林水産省、ご理解とご支援を頂いた日本中央競馬会、(財)全国競馬・畜産振興会、および、共同研究を進めてきた関係機関の各位に厚くお礼申し上げます。

平成20年3月

社団法人畜産技術協会 附属動物遺伝研究所

所長 杉本 喜憲

平成19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19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) ウシ遺伝性疾患のDNAマーカー育種手法の開発 4
 - 3) 肉用牛経済形質のDNA育種手法の開発 6
 - 4) ウシ抗病性遺伝子座の解析 13
 - 5) ウシ全ゲノムを対象とする相関解析 14
2. 平成19年度研究発表 16
 - 1) 論文発表 16
 - 2) 学会発表 16
 - 3) 講 演 17
 - 4) 学会発表要旨 17
3. 委員会・会議等の開催 22
 - 1) 肉用牛ゲノム研究・開発推進委員会 22
 - 2) 肉用牛ゲノム研究・開発技術推進委員会 22
 - 3) 牛有用性ゲノム等探索・知的財産化事業技術推進委員会 23
 - 4) 全国DNA育種推進会議 24
 - 5) 研究会等の開催 25
4. 委託研究 26
5. 研修員の受け入れ 27
6. 職員の普及活動等 28

第3節 総務

1. 職員名簿……………29
2. 職員の異動……………29
3. 職員の海外出張……………30
4. 施設・機器の整備……………30
5. 購読雑誌一覧……………32

第4節 資料

1. 論文再録……………33

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、望ましい遺伝子型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。しかしながら、個々の遺伝子を解析することは難しく、そのため、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、年々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る。

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

研究の拠点となる建物は平成3年度に設計を開始し、平成4年9月着工、平成5年1月に竣工した。建物は鉄筋コンクリート造り一部2階建て延べ面積884㎡(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116㎡)を増築した。研究プロジェクトの拡大に伴い、実験室が手狭になったことから、平成9年度に新たな実験棟を建設することとなった。平成9

年9月着工、平成10年2月竣工で、建物は鉄筋コンクリート造り一部2階建て延べ面積1,094㎡(DNA解析室、コンピュータ室、大会議室、研究員室、図書保管室等)である。新たな実験棟の建設に伴い、これまでの実験棟を本館、新設棟を別館と呼称している。

研究プロジェクトは、平成4年度から「個体識別システムの開発」、平成6年度から「肉質等経済形質DNAマーカー育種手法開発事業」、平成9年度から「家畜疾病DNAマーカー育種手法開発事業」、平成10年度から「家畜遺伝子解析基盤技術緊急開発事業」及び「食肉品種鑑別技術の確立」が開始されるなど順次拡大されてきた。このうち「個体識別システムの開発」は所期の目的を達成し、平成10年度をもって終了した。このプロジェクトによって数多くのDNAマーカーの開発、遺伝地図上への位置付けを行い、これらのマーカーを適宜選択することにより、個体識別や親子鑑定が実用上支障なくできることを明らかにした。個体識別の手法は、牛肉のトレーサビリティを保証する基本的な技術ともなっている。また、経済形質の解析では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、家畜疾病の事業では、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。

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年度からの「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年度からの「牛肉の品種鑑定技術開発事業」は平成17年度で終了した。これら2つの事業において、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。

平成18年度からは新たにウシDNA育種に関する「ウシゲノム有効活用促進事業(肉用牛DNA育種実証事業)」および「牛有用性ゲノム等探索・知的財産化事業」が始まり、ウシゲノム研究の更なる進展とフィールドでの効果検証に加え、重要な遺伝子情報の特許化を進めることで我が国の畜産を側面から支援するという責任が課せられた。平成19年度の成果については以下詳述している。

職員は平成4年度管理部門2名、研究員2名の計4名から発足し、研究の進展・拡大とともに順次増員し、平成19年度末には所長を含む管理部門3名、研究部門13名(研究員7名、研究補助員6名)となった。

第2節 平成19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) 海外の状況（米国・サンディエゴ、平成20年1月）

平成19年度までの主な進展としては、ウシゲノム配列がBtau_4.0に更新されたことと、50K SNPチップが開発され、市販されるようになったことが挙げられる。

ウシゲノムの塩基配列決定は、テキサスにあるBaylor医科大学のヒトゲノムシーケンシングセンターで行われてきた。まず、平成16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配列を決定したもの）配列が、次いで、平成17年3月に、6x WGS配列が公開された。そして、平成18年8月に初のウシゲノムドラフト配列（Btau_3.1）が公開された。これは、WGSにBAC skim（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、ゲノムの7.1倍長の配列（WGS + BAC skim）から作成されていたが、染色体上には局所的な配列のつなぎ間違いが多く含まれていた。これらのつなぎ間違いをBACフィンガープリントコンティグ地図やヒトゲノム・イヌゲノムとのシンテニー情報などを加えることにより改善したものがBtau_4.0であり、平成19年10月に公開された。Btau_4.0は、ESTのカバー率から、95%のゲノムをカバーしていると推定されている。まだ、小さなギャップや多少のつなぎ間違いが残されているものの、Btau_3.1と比べるとかなり使いやすくなった感がある。

アメリカ、カナダなどの研究グループから成るウシHapMap国際コンソーシアムは、WGS（ヘレフォード種、雄1頭）とその他6品種（アンガス、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等によりSNPを開発してきたが、さらに必要な数のSNPを確保するため、次世代型DNAシーケンサーを用いてリシーケンシングを行った。ホルスタイン、アンガス、その他の肉牛混合品種の計66頭を用いて、5千万配列を読み、62K（6万2千個）のSNP候補とそのアリル頻度を得た。そこから開発した24KのSNPを加えることで、平均間隔52kb（中央値37kb）の50K SNPチップの開発に漕ぎ着けた。50K SNPの多型性は19品種で調べられており、全体での平均マイナーアリル頻度は0.25であった。Khatkarら（2007）による15K SNPを用いたウシゲノムの連鎖不平衡度の解析では、ハプロタイプブロックの平均長は約70 kbと算定されており、このSNPチップを用いることによりウシのゲノム解析が加速されることが期待される。50K SNPチップは、平成19年12月にイルミナ社から市販されるようになった。

50K SNPチップを用いて、アルバータ大（カナダ）やINRA（フランス）でRH地図が作成され、Btau_4.0も14番染色体では配列のつなぎ間違いが残っていると思われること（BACフィンガープリント地図とRH地図は一致している）が報告されている。また、ミズーリ大（アメリカ）では、50K SNPチップを用いてホルスタイン種のQTLマッピングを行っており、ミルクの生産性に関して、すでに知られているDGAT1領域の検出とともに、その近傍に、タンパク質含量についての異なるピークを検出している。

(2) 今後の進め方

50K SNPチップが開発されたことで、ウシゲノムの相関解析が進展することが予想される。相関解析の利点として、(1) 家系によらない解析ができる、(2) 効果の比較的小さいQTLも検出で

きる、(3) 半きょうだい家系解析よりも狭いQTL領域にマッピングできる等が挙げられる。動物遺伝研では、これまでに半きょうだい家系解析で多くの経済形質QTLをマッピングしてきた。これからは、相関解析の手法を用いることによって、脂肪壊死症のように半きょうだいサンプルを収集するのが困難な形質や、繁殖性のように1つのQTLの効果があまり大きくないと予想される形質についても解析できると考えられる。しかし、ヒトでの解析と異なり、黒毛和種では互いの個体に血縁関係があったりするために系統特異的な遺伝子型の偏りの影響を無視できない可能性がある。まずは、黒毛和種における50K SNPの多型性を調べてチップの有用性を検証するとともに、解析方法を検討・確立する必要がある。

2) ウシ遺伝性疾病のDNAマーカー育種手法の開発

(1) 研究年次：平成9年～平成19年

(2) 研究目的と期待される成果

ウシの遺伝性疾病の多くは常染色体性単純劣性遺伝病である。これまでに5種の疾病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病のキャリア（当該遺伝子をヘテロに保有する個体）をDNA診断する手法を開発し、発症を防止する。

本事業では、これらの疾病、あるいは、疾病に対する感受性（抵抗性）について、DNAを指標としたスクリーニング手法を開発すると同時に、さらに進んで遺伝性疾病原因遺伝子の単離・特定を行う。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、遺伝性疾病の発症を制御しつつキャリア牛の遺伝的能力を育種に生かすことができる。

(3) 研究開発の個別目標と成果

(3)-1 ウシ遺伝性疾病解析の平成18年度までの経緯

本課題は平成9年度から実施しており、当研究所が疾病の原因遺伝子を同定し、DNA診断手法を開発し、家畜改良事業団が検査業務を行うことになっている。平成18年度までの成果を表1に示した。

表1. 遺伝性疾病の遺伝子解析のまとめ

劣性遺伝病名	品種	原因遺伝子	変異の種類	遺伝子診断手法	特許
クローディン-16欠損症	黒毛和種	Claudin-16 (新規)	37kbの欠損	あり	受 理
モリブデン補酵素欠損症	黒毛和種	MCSU (新規)	3塩基欠損	あり	受 理
Chediak-Higashi症候群	黒毛和種	CHS-1	1塩基置換	あり	受 理
クローディン-16欠損症タイプ2	黒毛和種	Claudin-16	56kbの欠損	あり	受 理
軟骨異形成性矮小体軀症	褐毛和種	LIMBIN (新規)	1塩基置換 1塩基の2塩基置換	あり	受 理
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。さらに広く疾病の家系を収集するため、道県との共同研究を進めると共に、大学の家畜病院や共済組合などとの連携強化を進めてきた。

(3)-2 ウシ遺伝性疾患の解析に関わる平成19年度の成果

(3)-2-1. 乳頭欠損症（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、農家は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て原因遺伝子座のマッピングを行った。その結果、17番染色体セントロメア側（ $ATPP1:p=2.2 \times 10^{-9}$ ）および1番染色体のセントロメア側（ $ATPP3:p=0.035$ ）とテロメア側（ $ATPP2:p=0.005$ ）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、 $p=2.3 \times 10^{-4}$ ）。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できる。この成果を活用して、農家が保留を希望する雌牛について、乳頭欠損のリスクの低い個体を選抜できる。平成19年度は160頭のDNA診断を行い、3つのリスクハプロタイプを持たない個体89頭を保留対象とした。

原因遺伝子を決定するため、3つのリスク領域に存在し、哺乳類の乳頭形成に必須の遺伝子を探索することとした。マウス新生児の乳頭部位において皮膚組織と比べ発現量の変化している遺伝子を約30種見出した。それらのウシ相同遺伝子の内、最も効果の大きい $ATPP1$ 領域の遺伝子について特定種雄牛の遺伝子配列を調べた。平成19年度までにアミノ酸変異を有する遺伝子1種を検出した。平成20年度は、この遺伝子の型と疾病との関連性を中心に解析を進めていく。

(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、18番染色体の領域にマッピングした。常染色体劣性遺伝病であった。原因遺伝子の同定に成功し、DNA診断法を確立した（論文投稿中）。

(3)-2-3. 前肢帯筋異常症（岡山大学との共同研究）

黒毛和種に見られる前肢帯筋異常症（Forelimb-girdle Muscular Anomaly）の解析を行った。同一地域の集団においてこれまでに2回発症牛が頻発したが、交配の調節で対処してきた。しかしながら、最近、頻発が繰り返された結果、ゲノム解析での解決を図ることとした。父方半きょうだい家系（3頭の種雄牛を含む）に属する26頭の発症牛を集め、DNAを調製した。全染色体上に配置した258のマикроサテライトマーカーを用いて発症との関連を調べたところ、26番染色体のテロメア側にあるマーカー群が発症と有意に連鎖していることがわかった。そこで、この領域にさらにマーカーを追加しハプロタイプを検討した結果、候補領域を10cMにまで絞り込むことができた。ヒトあるいはマウスとの比較地図から、この領域には $N-RAP$ や $PDZ8$ など原因遺伝子となりうる複数の候補遺伝子が含まれている。

平成19年度は、候補領域を3Mbまで絞ったが、依然として多数の候補遺伝子が存在する。そこで、次世代シーケンサーを用いてこの領域のDNA配列を解読することを始めた。平成20年度には解読が終了する予定である。

(4) 国内および海外の状況

英国のデキスター種に見られるブルドッグ子牛はすでに19世紀に報告されており、1904年にはメンデル遺伝様式が推定されていた。Raadsmaら（オーストラリア、Sidney大）は、この疾病の原因遺伝子は軟骨の重要な成分であるAggrecanタンパク質をコードしていることを見出した（*Mammalian Genome*, 18:808-814, 2007）。ゲノム中の8つの候補領域を対象にマイクロサテライトを使ってホモ接合性マッピングを行い、発症牛特異的にホモになっている領域を捜した。マップされた領域にAggrecan遺伝子が存在し、その第11エクソンにおける4塩基挿入というフレームシフト変異を同定した。この変異のため機能的なタンパク質が形成されなくなり、軟骨形成ができなくなっていると予想された。

Georgesら（ベルギー、Liege大）は、Belgian Blue種に見られる劣性遺伝性疾患CMD1（Congenital muscular dystonia type 1）のマッピングをイルミナ60K SNPチップで、CMD2（Congenital muscular dystonia type 2）のマッピングをアフィメトリックス25Kチップを用いて行い、各々原因遺伝子の変異の同定に成功した（学会発表）。

(5) 今後の進め方

黒毛和種の乳頭欠損症について、ウシ新生児からの組織を多数入手することが研究の進展に重要と思われる。前肢帯筋異常症について、次世代シーケンサーで候補領域の全配列を解読し、原因遺伝子の同定を目指す。Georgesらは前章2) - (4)に記載したようにSNPチップを用いてCMD1とCMD2のマッピングに成功したが、400種のマイクロサテライトでの連鎖解析ではマッピングできなかったそうである。今後、常染色体性劣性遺伝病のマッピングにおいてSNPチップが有効かもしれない。平成20年度にはSNPチップを用いる手法について考慮したい。

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19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。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だけでなく、飼養管理技術の改善に結びつくことが望ましい。

(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（21道県、平成19年度）・家畜改良事業団・家畜改良センター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19年度までの収集の状況は表2の通りである。これらの収集した黒毛和種のDNAサンプル数は約3万2千となった。

表2. 平成19年度までの黒毛和種DNAサンプル収集状況

年度	収集数
13	1,054
14	2,503
15	5,387
16	4,922
17	4,634
18	5,827
19	7,330
合計	31,657

(3)-2 ウシ経済形質解析のまとめ

(3)-2-1 ウシ経済形質解析に関わる平成18年度までの事業成果

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18年度までに全国で行った家系解析の結果を当研究所にて確認作業を行い、15家系についての経済形質マッピングについてまとめ、論文発表した(研究発表の章参照: Takasuga, A., Watanabe, T., Mizoguchi, Y., Hirano, T., Ihara, N., Takano, A., Yokouchi, K., Fujikawa, A., Chiba, K., Kobayashi, N., Tatsuda, K., Oe, T., Furukawa-Kuroiwa, M., Nishimura-Abe, A., Fujita, T., Inoue, K., Mizoshita, K., Ogino, A., Sugimoto, Y. (2007) Identification of bovine QTL for growth and carcass traits in Japanese Black cattle by replication and identical-by-descent mapping. *Mammalian Genome*, 18: 125-136)。それらの結果を表3に示す。

表3. 平成18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)-2-2 ウシ経済形質解析に関わる平成19年度の事業成果

(1) 半きょうだい家系のQTLマッピング

道県を中心とした黒毛和種の経済形質解析の結果が蓄積している。これらの結果に一定の基準を示し、平成18年度までにまとめたQTLマップに加え、新しく平成19年度の改訂版QTLマップを作成した（図1）。

(2) 同一種雄牛を始祖とする複数半きょうだい家系のQTL解析（新規）

互いが半きょうだいである複数の種雄牛の家系とそれらの父種雄牛（以下、祖父牛）を統合すれば、大きな3世代家系を構成できる。これを解析の対象とすれば、祖父牛に由来するQTLの探索が可能となる。対象とした祖父牛は、遺伝的能力は高い（BMS No 推定育種価+3.69、ロース芯面積 同+11.81）が、産子数が少なく、半きょうだい家系作成は困難であった。しかしながら、孫世代の産子を統合して3世代家系（表4）を構成し、祖父牛に由来するQTLを検出する手法の開発を試みた。

表4. 対象家系の構成*

種雄牛	川 幸	菊安舞鶴	義安福	安秀165	広 順	貴安福	安重福
所有機関	長崎県	岩手県	秋田県	山形県	事業団	事業団	事業団
産子数	103	54	74	51	90	44	63

*産子数の合計は479頭（すべて去勢）。対象形質として、BMS No.、枝肉重量、ロース芯面積、およびバラ厚を選んだ。表現型値は家系ごとに標準化した。

解析の手順は

- ① 祖父→父、父→産子、祖父→産子の順にハプロタイプ伝達確率を算出、
- ② 伝達確率を産子表現型値へ線形回帰、
- ③ QTLの有無の検定、遺伝モデルの推定（「ヘテロQTLモデル（第1ハプロタイプ=Q）」、「同（第2ハプロタイプ=Q）」、「ホモQTLモデル」）である。

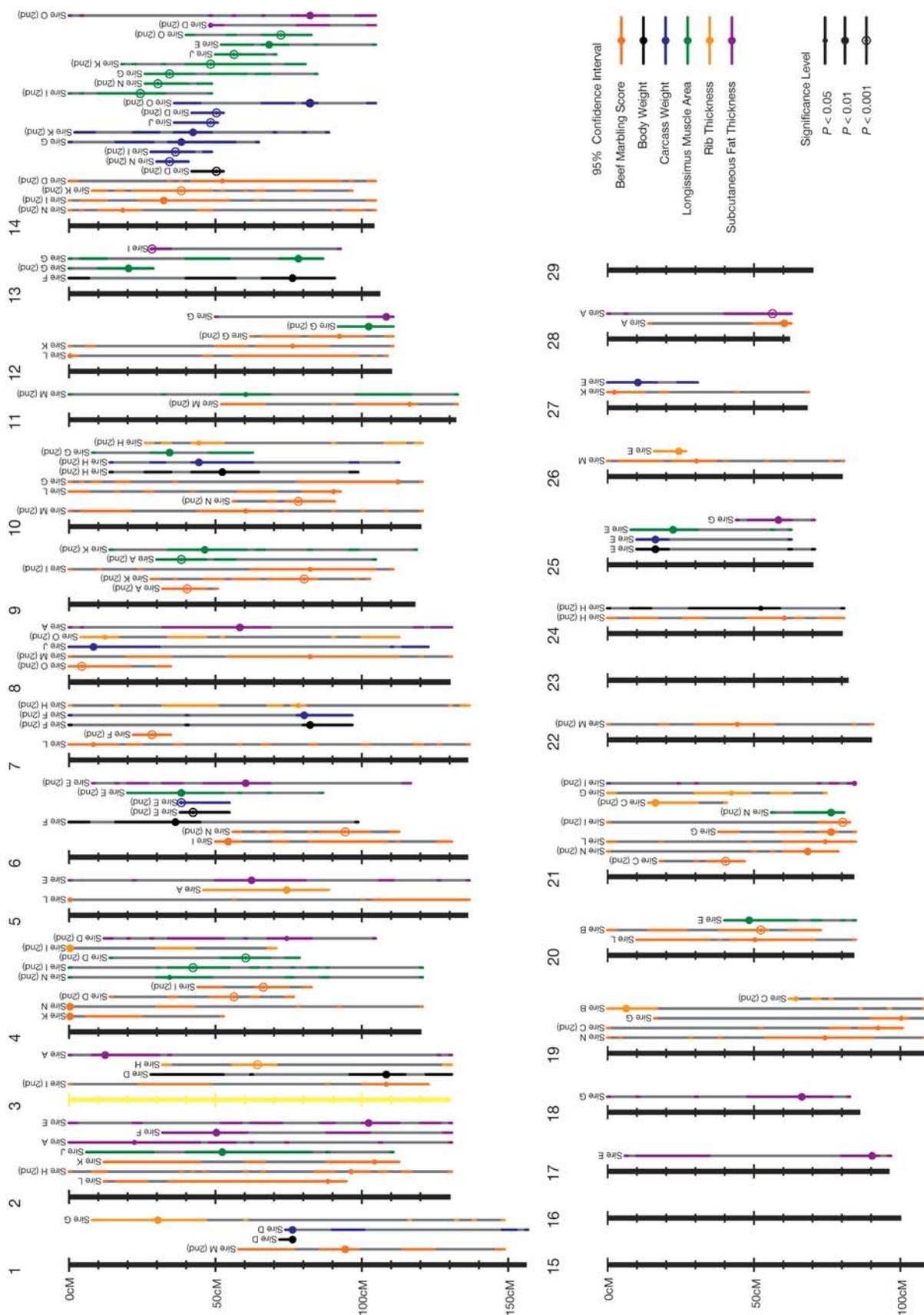
シミュレーションより、本家系を用いた場合、5%有意水準で63%/80%程度のQTL検出力が期待できることがわかった（それぞれヘテロモデル/ホモモデル）。解析の結果、BMS No9カ所、枝肉重量2カ所、ロース芯面積5カ所がQTL領域としてマップされた（染色体ワイズ $P < 0.05$ ）。バラ厚ではマップされなかった。計16カ所中、11カ所がヘテロQTL、5カ所がホモQTLモデルと推定された。これらのうちBMS Noで2カ所（BTA19：ヘテロモデル、BTA19：ホモモデル）、ロース芯面積で3カ所（BTA1：ヘテロモデル、BTA23：ヘテロモデル、BTA28：ホモモデル）が $P < 0.01$ でマップされた。これら5カ所中、3カ所はこれまでに検出されていない新規のQTLであった。

2) ウシ経済形質解析に関わる平成19年度の事業成果と平成20年度の実施計画

半きょうだい家系のQTLマッピングでは、家系を増やし、重複して検出できるQTLを見出す。また、一定の基準を設けて共通のQTL マップを更新する。

同一種雄牛を始祖とする複数半きょうだい家系のQTL解析では、1次スクリーニングを完了させる。さらに、パラメータの信頼区間推定、多重検定により生ずる疑陽性の率を算出した後、有望なQTL領域について2次スクリーニングを行い、信憑性を確認する。

図1. QTLマップ



(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平成19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)

これまでに、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、2種類の集団で母方アリルについての相関解析により約720kbに局限化した。この領域に存在する12種の遺伝子にアミノ酸変異は認められなかったが、3種の遺伝子は筋間脂肪において $q/?$ と比べ Q/q の発現量が22-94倍高かった。 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、経時的発現量の経緯を調べたところ、脂肪部位で28ヶ月と30ヶ月の間で急激な増加を示したGene_1が有力な候補となった。Gene_1は600 bpのnon-coding RNAであり、ウシ脂肪細胞分化系(東北大学麻生先生により樹立)で発現が増加し、レチノイン酸添加でさらに促進された。そこで、Gene_1領域のすべての一塩基多型(SNP)を探索し、アリル頻度から責任SNPを特定することを始めた。

平成19年度はGene_1領域の一塩基多型(SNP)を探索し、 Q 頻度4%、脂肪交雑への寄与率1%の条件で責任SNP候補を12個特定した。これらのSNPはGene_1の5'上流20kbから30kbに位置している。COS7とBIP細胞系でエンハンサー活性をレチノイン酸添加で調べたが、転写を促進する活性を検出できなかった。これら12個のSNPはいずれもMarbling-1の Q と強く連鎖していることから選抜に有効であると思われる。

(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)

平成18年度までにMarbling-2領域を7番染色体セントロメア側の4cMまで狭めており、その領域にDNA tiling array(ゲノム上に相補的な25塩基のプローブを平均150塩基のギャップを持たせて並べたもの、RNAに転写された領域を実験的にサーチできる)を作成し、ロース部位における遺伝子発現の Q vs. q 比較を行った。この手法は網羅的な発現解析に優れていると言われている。

平成19年度は、データの解析を行い、発現に差の見られたいくつかの候補遺伝子を見出した。それらの中にはINSR, ANGPTL4, JUNBなどがあつた。発現の変化を解析するためのサンプルを採取するため、新たにロース部位からの経時的なバイオプシーを始めた(平成20年11月に完了の予定)。また、次世代シーケンサーを用いてMarbling-2領域4cMのDNA配列を解読することを始めた。平成20年度に責任遺伝子の同定を目指している。

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

これまで黒毛和種半兄弟家系解析から、複数の家系において脂肪交雑QTLが4番染色体上に検出されている(Takasuga et al., Mammalian Genome, 2007)。それらのうち血縁関係にある2頭の種雄牛に注目し、ハプロタイプ比較と相関解析によってQTL候補領域を46cM付近の約2cMの領域に絞り込んだ。46cM付近の候補領域は27個のBAC cloneあるいは4個のscaffold配列によってカバーされ、全長が3.2Mbと推定される。Scaffold配列をもとに Q/q 個体でヘテロなSNPを探索し、候補領域内になるべく均等になるように25のSNPマーカーを配置した(最大GAP<300kb)。国内黒毛和種一般集団からBMS_High, Low集団を作成し、これらのSNPマーカーを用いて相関解析を行った。その結果、セントロメア側から2.8MbのSNPマーカーにおいて最小となる P 値($P=1.5 \times 10^{-5}$)が得られた。さらに、全頭の型判定結果をもとに連鎖不平衡度の計算を行ったところ、このSNPマーカーはテロメア側の約0.7MbのLDブロックに含まれていることがわかった。ウシ4番染色体はヒト7番染色体に相同領域を持ち、ウシの46cM付近の候補領域はヒト7q22.1-22.2の約3Mbの領域にシンテニーを持つ。テロメア側の0.7MbのLDブロックには、ヒトの相同領域に4つの遺伝子(Gene_1, Gene_2, Gene_3, Gene_4)が認められた。そこでこれらの遺伝子を責任遺伝子の候補

と考え、exon内の変異探索と発現解析を行った。Gene_1についてはORF内にSNPは検出されず、3'UTRに1SNPのみが検出された。筋間脂肪組織での発現が確認されたことから現在*Q,q*ハプロタイプ間での発現比較を行っている。Gene_2についてはexon 5, 7, 8, 12, 14にSNPが検出され、exon 7以外はアミノ酸置換が予想される。しかしながら、筋間脂肪および筋組織での発現は見られなかった。Gene_3についてはexon 3にアミノ酸置換を伴わないSNPと、3'UTRの3 SNPが検出された。発現解析の結果、*Q/Q*型の筋間脂肪組織では*q/q*型に比べて高発現していることがわかった。また、脂肪細胞分化に伴い発現が増加することからも有力な候補遺伝子であると考えられる。Gene_4についてはexon内にSNPが検出されず、筋間脂肪組織での発現は確認されたが、ハプロタイプ間で発現量の差はみられなかった。

平成20年度は*Marbling-3*の責任遺伝子を決定し、DNA診断の対象となりうるSNPを機能的に証明する。

(3)-3-4. *CW-1* (枝肉重量-1) の解析 (鹿児島県との共同研究)

平成18年度までに、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14番染色体セントロメア付近8.1cMの領域にマップし、相関解析で1.1Mbに狭めた。*CW-1*領域は、729kbであり、3個の候補遺伝子の存在がわかった。本領域内に含まれる3個の遺伝子についてそれぞれBACクローンを純系マウスであるC57BL/6に導入したトランスジェニックマウス (Tgマウス) を作成した。

平成19年度は作成したTgマウスの成長実験 (雄・雌それぞれ個体数18匹以上の集団を20週まで調べる) を行った。C57BL/6マウスをTgマウスと交配して作成した同腹の非Tgマウス (Wt) を対照として用いた。Gene_1及びGene_3ではTg、Wt同腹仔間の成長曲線に差はなかった ($P > 0.05$, $n=16\sim 18$)。Gene_1はウシ、Tgマウスともにユビキタスな発現を示し、ウシでは脳、Tgマウスでは腸でより強い発現が見られ、TgマウスにおけるGene_1の発現量は、Wt同腹子の1.8~3.1倍であった。Gene_3もウシ、Tgマウスともにユビキタスな発現を示し、ウシでは脳・骨格筋、Tgマウスでは骨格筋でより強い発現が見られ、TgマウスにおけるGene_3の発現量は、Wt同腹子の約1.1~1.9倍であった。

Gene_2ではWt同腹仔に対してTgマウスの体重増加が遅く、Tgマウスの体重はWt同腹仔よりも有意に小さかった (male; 10-weeks, $P < 0.02$, $n=5\sim 11$, female; 20-weeks, $P < 0.02$, $n=6\sim 13$)。Tgマウスにおける導入遺伝子の発現は脳で最も強く、ウシにおける発現様式と酷似した。Gene_2の発現様式はウシ、Tgマウスともに骨格筋で強く、他臓器でも広く観察された。

以上、*CW-1*の責任遺伝子はGene_2である可能性が最も高いという結果を得たが、今後、 $n=18$ まで増やして結果を確実にする必要がある。

(3)-3-5 *CW-2* (枝肉重量-2) の解析 (鹿児島県、熊本県等との共同研究：新規)

黒毛和種半きょうだい家系において、ウシ6番染色体上に検出された枝肉重量QTL (*CW-2*) は、14番染色体上の*CW-1*と同程度に大きな効果を持っている (寄与率5.7%、アレル置換効果24kg)。他の黒毛和種2家系と褐毛和種2家系においても、これとほぼ同じ領域に枝肉重量または体重QTLが検出されてきた。これらの優良型 (*Q*) ハプロタイプの比較および連鎖不平衡 (LD) マッピングを行うことによって責任領域を狭め、責任遺伝子の同定を目指した。

6番染色体上に体重または枝肉重量QTLが検出された家系 (黒毛和種種雄牛A、B、C、褐毛和種種雄牛D、E) のうち、種雄牛AとBは、QTL領域全体で同じ*Q*ハプロタイプ (*Q1*) を持っている (瀬戸口ら、日本動物遺伝育種学会第7回大会)。一方、種雄牛Cは、これらとは異なる*Q*ハプロ

タイプ (Q2) を持っていた。また、種雄牛Eは、種雄牛DのQハプロタイプ (Q3) を受け継いだ産子種雄牛である。種雄牛A-Eで検出したQTLが同じものならば、Q1、Q2、Q3に共通するハプロタイプが見つかるはずである。そこで、種雄牛AのQTL領域 (38-55cM) について、マイクロサテライトマーカー39個 (<860kb間隔) を配置して、種雄牛A-Eのハプロタイプを比較した。その結果、Q1、Q2、Q3に共通で、かつ、すべての種雄牛においてヘテロ接合である領域を1箇所 (約600kb) 見出した。

この領域が枝肉重量と相関していることを確認するために、家系C (黒毛和種) と家系D (褐毛和種) において、産子の母方由来アレルを用いてLDマッピングを行った。まず、38-55cMの領域で、父からQを受け継いだ産子とqを受け継いだ産子に分け、それぞれについて、隣接する2マーカー毎に母由来アレルがQアレルを持つ個体と持たない個体との間で、枝肉重量の平均値の差のt検定を行った。尚、家系Cでは、母由来アレルに種雄牛Cと同じQ2をもつ個体はほとんどいなかったため、母由来アレルがQ1を持つ個体とそれ以外の個体との間でt検定を行った。父からqを受け継いだ産子において、家系Cでは38-50cMの広い範囲で低いP値が観察されたが、家系Dでは46cMと50cMに2つのピークが見られた (P=0.01)。46cMのピークは上記の600kbに相当しており、50cMのピーク領域は46cMのピーク領域と連鎖不平衡にあったことから、約600kbの共通Q領域がCW-2の責任領域であると結論した。また、父からQを受け継いだ産子ではp値がそれほど下がらないことから、Qの効果は優性または不完全優性であると推定された。

次に、CW-2約600kbに存在する4遺伝子について、種雄牛Aを用いてタンパク質翻訳領域のSNPを検索した。検出したSNPのうち、アミノ酸置換を伴うGene_3_SNP1は、種雄牛5頭すべてがヘテロで持っていた。また、黒毛和種去勢牛7990頭の枝肉重量上位、下位集団各96頭をタイピングしたところ、このSNPの相関性が最も高く (P=1.2x10⁻¹¹)、また、優良型ハプロタイプを見分ける良いマーカーとなることがわかった (特許申請中)。

(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、ゲノムワイドレベル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。平成19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 (脂肪交雑-1) の解析では、さらに細胞系を変えてエンハンサー活性を調べる。活性が検出できなければ、これまで想定されていない機能があるかもしれない。シミュレーションして調べるべき黒毛集団のサイズを決め、相関解析を行う。DNA育種に有用なSNP情報を得る。

Marbling-2 (脂肪交雑-2) の解析では、種雄牛Aおよびその半兄弟の種雄牛Bの塩基配列4cM (3.5Mb) を次世代シーケンサーで解読し、連鎖するSNPアレルを見出す。

Marbling-3 (脂肪交雑-3) の解析では、Gene_1のハプロタイプ間での発現量比較を行い候補遺伝子となりうるか検討するとともに、Gene_3については発現量と脂肪細胞分化との関連を調べる目的で、細胞系を用いた解析を計画している。候補が絞れたら、KOマウスを作成し、脂質代謝系への効果を調べる。

CW-1 (枝肉重量-1) の解析では、解析個体数が不十分なGene_2、Gene_3について個体数を確保する。Gene_2に絞ることができたら、機能的なSNPを決める。全農と共同でGene_2-KOウシを

作成しており、この実験でKOウシの増体が優れていることを示し、最終的な同定とする。また、Gene_2の機能を調べる。Gene_2は1,566塩基で構成されるsingle exonの遺伝子で、その最大ORFにコードされるアミノ酸が100残基以下（ORF;210bp,70aa）であることから、non-coding RNAと考えられる。増体の変化が観察されたGene_2BAC-Tgマウスの発現プロファイルを調べることから標的遺伝子の解析を始める。

CW-2（枝肉重量-2）の解析では、Gene_3の機能解析を中心に進める。Gene_3がコードするタンパク質は種間の保存性が高いが、SNP1に対応するアミノ酸残基は、Q型、q型、ヒト（とマウスは同じ）、ラットでそれぞれ異なっていた。このタンパク質は染色体凝縮に関わるとともに、遺伝子発現制御への関与が示唆されている。見いだしたアミノ酸置換による機能の差を調べるために、Q型、q型cDNAの強制発現によって遺伝子発現に差が見られるか否かを細胞レベルで検討する。また、KOマウスやノックインマウスの作成を行い、成長に対する効果を個体レベルで調べる。

4) ウシ抗病性遺伝子座の解析

(1) 研究年次：平成7年～平成19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、平成19年度には乳房炎について進展があった。

(3) ウシ抗病性遺伝子座の解析に関わる今年度の成果

(3)-1. 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。染色体22番のQTL（SCC₂₂）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。また、染色体21番のQTLについて、候補遺伝子IGF1Rのプロモーター活性を支配するSNPを見いだした。培養細胞系を用いた実験から、IGF1RのFEZLによる発現調節を明らかにした。プロモーター部位のSNPは抵抗性と連鎖しており、培養細胞系を用いた実験で細菌の捕食性に影響することがわかった。

平成19年度は、培養細胞系を用いた実験で、IGF1Rの発現の上昇が、細菌の捕食性を阻害することを示した（特許申請中）。

(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。最近、米国農務省・ミズーリ大学・アルバータ大学は米国イルミナ社と共同でDNAマーカー

である一塩基多型SNPを多数開発し、50K SNPチップを完成させた。米国農務省のベルツビル研究所が中心となって50K SNPチップの型判定に基づいたゲノミック評価法という新手法をホルスタイン種雄牛の選抜に適用する動きがあり、抗病性も対象にするらしい。

(5) 今後の進め方

日本ホルスタイン登録協会などと共にホルスタイン種雄牛の遺伝子型と搾乳牛の乳房炎発症率についての相関性を調べる。

5) ウシ全ゲノムを対象とする相関解析

(1) 研究年次：平成18年～平成19年

(2) 研究目的と期待される成果

これまでウシ経済形質のゲノム解析では、父方半きょうだい家系を作成し、マイクロサテライトのような多型性の高いDNAマーカーの型判定結果に基づいたQTL解析を行ってきたが、国際コンソーシアムによるウシゲノム解読の進展により、新しい解析手法が確立しつつある。すなわち、多数の一塩基多型（SNP）を用いたゲノムワイド相関解析である。牛有用性ゲノム等探索・知的財産化事業の開始に伴い、新手法を活用しつつ、これまで解析の困難であった表現型も解析の対象に加え、有用なDNA情報を探索していく。

(3) 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、家畜改良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。平成18年度までに、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、有力な候補遺伝子に到達することができた。5回以上の採卵データのある約500頭の黒毛和種メスから採卵数の上位および下位、各42頭ずつを抽出し、常染色体1～29番およびX染色体に配置した約1,000個のマイクロサテライトマーカーの型判定を行った。その結果、22個の染色体で5%水準（多重検定補正済み）の有意な領域を得た。二次スクリーニングで上位下位67頭ずつ使い、9個の染色体で有意な結果を得た。最も相関していた領域を多数のマイクロサテライトで解析したところ、約160kbの領域が有意となった。この領域には遺伝子が1個存在し、塩基配列を調べたところ、アルギニン（N）からセリン（S）へのアミノ酸変異が検出された。

平成19年度はアミノ酸変異の効果を調べた。タンパク質の活性をアフリカツメガエル卵母細胞で調べたところ、S型の方がN型より活性が高かった。供卵牛の成績では、Sを1アレル有すると採卵数は平均3個増えた。S/S、S/N、N/Nの遺伝子型を持つ雌牛の卵胞形成を超音波で調べたところ、小卵胞形成数に有意な差が認められた。これらの結果をまとめ、特許申請した。

(4) 黒毛和種脂肪壊死抵抗性（県との共同研究：新規）

これまでに各地のNOSAIに依頼して脂肪壊死が主因の患畜を約500頭集めてきた。このうち4才以上の経産牛は200頭以上であった。そこで、繁殖雌牛の脂肪壊死抵抗性を調べることとし、

全国の共同研究機関に依頼して直腸検査で脂肪壊死の認められない雌牛サンプルを約500頭集めた。平成19年度はこれらの集団を用いたゲノムワイド相関解析に着手した。イルミナ50K Bovine SNPを用いて、健常集団と疾病集団のアリル頻度の偏りから候補領域を見つける手法である。

(5) 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。Kirkpatrickら（Wisconsin大）は、現在市販されている10K SNPアレイ（アフイメトリックス社）を用いて、乳牛の双子産率を9家系の父方半きょうだい家系で連鎖-連鎖不平衡マッピングを行い、以前に半きょうだい家系でマッピングした5番染色体の同じ領域にQTLを見出した。全ゲノムを対象とする相関解析は期待される手法である。

(6) 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。黒毛和種における脂肪壊死症抵抗性についてのサンプリングは進んでいる。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を平成19年度1月から始めた。5年間くらい継続する。黒毛和種の受胎率では、サンプリングを開始した。サンプリングを充実させ、今後のゲノムワイド相関解析につないでいく。

黒毛和種過排卵処理への反応性について、見出した変異と採卵性の関連をウシだけでなく、ノックアウトマウスやノックインマウスを使って調べていく。また、黒毛和種の繁殖性一般との関連も今後調べていく予定である。

脂肪壊死抵抗性について、サンプル数を増やして一次スクリーニングを終了させる。有望な染色体が見つかったら、多数のマイクロサテライトマーカーを調べて領域を絞る。

2. 平成19年度研究発表

1) 論文発表

1. Imai, K, Watanabe, T., Sugimoto, Y., Matsushige, T., Ihara, N. (2007) Mapping of a quantitative trait locus for beef marbling on bovine chromosome 9 in purebred Japanese Black cattle. *Animal Biotechnology*.18:75-80.
2. 鈴木暁之、佐藤洋一、吉川恵郷、野口龍生、塩谷康生、竹之内直樹、杉本喜憲、渡邊敏夫 (2007) 黒毛和種子牛に発生した遺伝性内水頭症の染色体領域の解明。日本獣医師学会誌、60:196-200。
3. Masoudi, A. A., Uchida, K., Yokouchi, K., Ohwada, K., Abbasi, A. R., Tsuji, T., Watanabe, T., Hirano, T., Sugimoto, Y., Kunieda, T. (2008) Linkage mapping of the locus responsible for forelimb-girdle muscular anomaly of Japanese black cattle on bovine chromosome 26. *Animal Genetics*, 39:46-50.
4. Hirano, T., Watanabe, T., Inoue, K., Sugimoto, Y. (2008) Fine mapping of a marbling trait to 2.9 - cM region on bovine chromosome 7 in Japanese Black cattle. *Animal Genetics*, 39:79-83.

2) 学会発表

1. 横内 耕、溝口 康、岩本英治、渡邊敏夫、高須賀晶子、杉本喜憲：ウシ脂肪交雑QTL (*Marbling-3*) のファインマッピング。日本分子生物学会第30回大会、2007年12月、横浜。
2. 西村翔太、高須賀晶子、渡邊敏夫、杉本喜憲：SNPを用いたゲノムワイド相関解析によるウシ脂肪交雑QTLのマッピング。第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、2007年12月、横浜。
3. 高須賀晶子、瀬戸口浩二、古田雅子、平野 貴、渡邊敏夫、杉本喜憲：ウシ6番染色体上の枝肉重量QTL (*CW-2*) に連鎖するアミノ酸置換SNPの同定。第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、2007年12月、横浜。
4. 杉本真由美、杉本喜憲：Insulin-like growth factor 1 receptor mediates autophagy in response to the forebrain embryonic zinc finger-Like transcription factor。第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、2007年12月、横浜。
5. Takano, A., Mizoshita, K., Takasuga, A., Sugimoto, Y. : Identification of a causative gene for carcass weight QTL (*CW-1*) in Japanese black cattle population by mouse transgenesis strategy. *Plant & Animal Genome XVI*. 国際植物動物ゲノム学会第16

回大会、2008年1月、サンディエゴ、米国。

6. 溝口 康、平野 貴、杉本喜憲：黒毛和種の脂肪交雑に関わる責任遺伝子の同定。キーストンシンポジウム2008、2008年2月、バンフ、カナダ。
7. 渡邊直人、三宅 武、藤田達男、山田宜永、横内 耕、渡邊敏夫、杉本喜憲、佐々木義之：大分県黒毛和種半きょうだい家系の脂肪交雑に関するMQEM-HSプログラムを利用した複数QTLマッピング。日本畜産学会第109回大会、2008年3月、水戸。
8. 瀬戸口浩二、高須賀晶子、渡邊敏夫、木之下明弘、磯部知弘、池田省吾、林 史弘、山口浩、杉本喜憲：黒毛和種枝肉重量QTL (*CW-2*) に連鎖するSNPと間接検定成績との関連性。日本畜産学会第109回大会、2008年3月、水戸。

3) 講演

1. 高須賀晶子：黒毛和種経済形質のゲノム解析。第13回動物遺伝育種シンポジウム、「動物ゲノム解析と新たな家畜育種戦略」、2007年11月、つくば。

4) 学会発表要旨

[学会発表の次の数字は、学会発表の番号に相当する]

学会発表1.

題 目：ウシ脂肪交雑QTL (*Marbling-3*) のファインマッピング

発表者：横内耕¹，溝口康¹，岩本英治²，渡邊敏夫¹，高須賀晶子¹，杉本喜憲¹

所 属：¹畜技協・動物遺伝研、²兵庫県農水総技セ

要 旨：【目的】我々はこれまでに、黒毛和種牛の複数の半きょうだい家系において脂肪交雑QTLが4番染色体上に検出してきた。それらのうち父方半兄弟である2頭の種雄牛の家系に注目し、ハプロタイプ比較と相関解析によってQTL候補領域の絞り込みを行った。その結果、46 cM付近の約2cMの領域が両種雄牛の優良型*Q*ハプロタイプで保存され、その*Q*ハプロタイプは特定地域の一般集団でBMS（脂肪交雑等級）と相関していることがわかった（国際動物遺伝学会2006）。本報告では、2cMの候補領域内にSNPマーカーを開発し、国内黒毛和種一般集団を用いた相関解析によって候補領域のさらなる絞り込みを行った。

【方法と結果】4番染色体上46cM付近の候補領域は約3Mbと推定され、27のBAC clonesあるいは4のscaffold sequencesによってカバーされている。scaffold sequencesをもとに種雄牛のゲノム配列を調べ、候補領域内に均等に分布する25のSNPを得た（<300kb間隔）。国内黒毛和種一般集団として、東京芝浦・十勝・大阪南港市場に出荷された黒毛和種去勢牛824頭（BMS_{high}:409頭, BMS_{≥9}）（BMS_{low}:415頭, BMS_{≤4}）（いずれも1種雄牛につき息牛5頭まで）より採取したDNAサンプルを用いた。これらについて25のSNPマーカーの型判定を行い、allequin©ソフトウェアによって隣接する2つのSNPマーカーから構成されるペアワイズのハプロタイプ頻度を推定した。それらのうち、*Q*ハプロタイプのBMS_{high}とBMS_{low}の各集団における頻度の違いを検定したところ、セントロメア側から2.7Mbの位置にあるSNPマーカーにおいて最小となる*P*値が得

られた ($P < 0.0001$)。また、SNPマーカーの型判定結果をもとにLD (連鎖不平衡度) の計算を行ったところ、このSNPマーカーは700kbのLDブロックに含まれていることが明らかとなった。したがってQTLの責任遺伝子はこのLDブロックに含まれていると考えられる。ヒトの相同領域と比較したところ、このLDブロック内には4つの既知遺伝子が位置していた。それらの中で、脂肪細胞分化に伴い発現量が増加する2つの遺伝子について調べたところ、いずれの遺伝子内にもハプロタイプ間でアミノ酸置換を伴うような変異は検出されなかったが、うち1つの遺伝子はQ/Q個体群の筋間脂肪組織においてq/q個体群と比較して約5倍に発現量が増加していることがわかった。

(日本分子生物学会第30回大会、2007年12月、横浜)

学会発表 2.

発表者：西村翔太¹、高須賀晶子¹、渡邊敏夫¹、杉本喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研

要旨：演者らは黒毛和種牛の脂肪交雑QTLのマッピングを目的として、ゲノムワイドの相関解析を行った。脂肪交雑基準値 (BMS.No. 1-12) に関して、屠場で収集した去勢牛1万3千頭の上位と下位それぞれ約5%の集団から192頭ずつ384頭を抽出した。半兄弟は各集団で10頭以内になるようにした。これらの個体について、10K SNP Array (Affymetrix) のタイピングを行い、上位158頭、下位157頭の計315頭と、6441個のSNPについて解析した。集団の構造化の補正を行うためにEIGENSTRATのプログラムを用いて主成分分析を行い、上位と下位の集団で有意差のある成分について補正した。解析の結果、10番染色体上に位置するSNPのp値が 3.8×10^{-6} と最も低かった (Armitage's trendテスト)。これをGenomic controlで補正した値は 1.2×10^{-4} であった。ゲノムワイド解析に用いた個体384頭について、シーケンシングでこのSNPのタイピングを行い2×2表でFisherの正確検定を行ったところ、 $P=3.16 \times 10^{-7}$ であった。このSNPを含む領域に半きょうだい家系解析ですでに脂肪交雑QTL (染色体レベル、 $P < 0.05$) が検出されているので、このSNPの周辺約1.8Mbに450 kb間隔でマイクロサテライトマーカー5個を配置し、384頭について2×n表でFisherの正確検定を行ったところ、SNPを含む領域でp値が最も低かった ($P=9.0 \times 10^{-4}$)。家系解析で得られているBMSを高めるハプロタイプQとその対立ハプロタイプqの頻度を比較すると、Qハプロタイプ頻度は上位集団で0.21、下位集団で0.13であったのに対し、qハプロタイプ頻度は上位集団で0.13、下位集団で0.22であった。家系解析で検出されたQTL領域とゲノムワイド相関解析で検出されたSNPの位置が一致したことから、この領域に脂肪交雑QTLが存在することが確認された。

(第30回日本分子生物学会年会、2007年12月、横浜)

学会発表 3.

題目：ウシ6番染色体上の枝肉重量QTL (CW-2) に連鎖するアミノ酸置換SNPの同定

発表者：高須賀 晶子¹、瀬戸口 浩二²、古田 雅子³、平野 貴¹、渡邊 敏夫¹、杉本 喜憲¹

所属：¹動物遺伝研、²鹿児島県肉改研、³熊本県農研セ

要旨：【目的】黒毛和種雄牛Aの父方半きょうだい家系で見出されたウシ6番染色体上の枝肉重量QTL (CW-2：瀬戸口ら、日本動物遺伝育種学会第7回大会、2006) は、黒毛和種雄牛Bおよび褐毛和種雄牛Cの家系においても見出された。本研究では、これら3家系で見出されたCW-2は同祖であると仮定し、ハプロタイプ比較によるファインマッピングで3種雄牛において

共通かつヘテロな領域に存在する遺伝子のSNPを検索した。

【方法と結果】 枝肉重量QTL領域（38-55cM）を多型性マイクロサテライトマーカー39個（<860kb間隔）でハプロタイプ再構成を行い、3種雄牛間のハプロタイプを比較した。その結果、3種雄牛で共通かつヘテロ接合である優良型（Q）ハプロタイプ領域を1箇所（約600kb）見出した。この領域に存在する4遺伝子について、エキソン内のSNPを検索したところ、アミノ酸置換を伴うSNPを5個見出した。これらについて、黒毛和種去勢牛7990頭の枝肉重量上位、下位集団各96頭をタイピングすると、3番目のSNPの相関性が最も高く（ $P=1.2 \times 10^{-11}$ ）、かつ、Qアリルと強く連鎖しており、CW-2の責任SNPである可能性が示唆された。

（第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、2007年12月、横浜）

学会発表 4.

題 目：インスリン様成長因子1型レセプターによる食作用（オートファジー）の抑制は、転写因子FEZL（Forebrain Embryonic Zinc Finger-Like）により解除される

発表者：杉本真由美¹、杉本喜憲²

所 属：¹家畜改良セ、²畜技協・動物遺伝研

要 旨：インスリン/インスリン様成長因子シグナル（IIS）を抑制すると、熱ショック・酸化ストレス・紫外線傷害や病原菌などに対する抵抗性が増強され、寿命が延びる。たとえば、ショウジョウバエのインスリン/インスリン様成長因子変異株である*daf-2*は細菌感染に対する抵抗性が強く、寿命が延びる。しかしながら、IISが自然免疫の機能をどのように制御しているかは明らかではない。私たちはポジショナルクローニングと遺伝子の機能解析を行うことにより、ウシのインスリン様成長因子受容体（*IGF1R*）の発現を高めると食作用（オートファジー）活性が抑制されることを見出した。

乳房炎は酪農産業において最も重要な問題の1つであり、菌の感染によって起こる乳腺の炎症である。乳房炎感受性のウシは、*IGF1R*遺伝子の発現制御領域に存在するシトシンストレッチ（C stretch）が比較的長く、そのため、発現が高くなった。乳房炎抵抗性に影響する転写因子FEZLの抵抗型はC stretchに結合することで*IGF1R*タンパク量を減少させたが、感受型はできなかった。*IGF1R*の発現増進（=IIS増強）による免疫機能への影響をウシ乳腺由来細胞系で調べたところ、乳房炎原因菌の1つである*Streptococcus agalactiae*に対する食作用活性を阻害し、その阻害は食作用増強活性を示す薬剤rapamycinによって回復できた。したがって、FEZLの感受型と*IGF1R*の長いC stretch型を持つウシは、その食作用が低下するため乳房炎感受性を示すと考えられる。哺乳類のFEZL-*IGF1R*経路は自然免疫を制御している。

（第30回日本分子生物学会年会、2007年12月、横浜）

学会発表 5.

題 目：遺伝子改変マウスを用いた黒毛和種枝肉重量QTL（CW-1）の責任遺伝子同定に向けて

発表者：高野淳¹、溝下和則²、高須賀晶子¹、杉本喜憲¹

所 属：¹畜技協・動物遺伝研、²鹿児島県・肉改研

要 旨：【目的・方法】 これまでに我々は、相関解析およびハプロタイプ比較によって黒毛和種枝肉重量QTL（CW-1）をBTA14セトロメア付近1Mbに絞り込んだ（溝下ら、2005年）。1Mb内に位置する3遺伝子（Gene_1, Gene_2, Gene_3）のタンパク質コード領域にアミノ酸変異は見いだせず、また、CW-1Qとnon-Qである6ヶ月齢の去勢牛における遺伝子発現量を比較した実験からも、

責任遺伝子の同定に結びつく有力な証拠は得られなかった。そこで、責任遺伝子を同定するために、BACトランスジェニック (Tg) マウスを作成し、各候補遺伝子のTgマウスにおける導入遺伝子の発現量と成長に関する表現型との関係を調べた。

【方法・結果】 各候補遺伝子において、導入遺伝子の発現レベルの高い1系統のTgマウスを繁殖させ、その産子の体重を週齢毎に測定し成長曲線を描いた。定量的PCRにより、ウシにおける候補遺伝子の発現様式とTgマウスにおける導入遺伝子の発現様式を比較するとともに、各Tg系統においてWt同腹仔に対して何倍発現量が増加したか調べた。その結果、Gene_3Tgマウスの体重増加がWt同腹仔よりも有意に小さいことがわかった (オス8weeks; $P=0.0041$)。Tgマウスにおける導入遺伝子の発現は脳で最も強く、ウシにおける発現様式と酷似した。以上より、Gene_3が*CW-1*の責任遺伝子である可能性が最も高いという結果を得た。今後、機能的なSNPを見つけ、増体との関係を調べる必要がある。

(国際植物動物ゲノム学会第16回大会、2008年1月、米国)

学会発表 6.

題 目：黒毛和種の脂肪交雑に関わる責任遺伝子の同定

発表者：溝口 康、平野 貴、杉本喜憲

所 属：畜技協・動物遺伝研究所

要 旨：【目的】 脂肪細胞機能や代謝に関わる遺伝的変異は、ヒトにおけるメタボリック症候群や家畜における肉質や経済的価値に大きな影響を与える。脂肪交雑は、筋肉内に脂肪が沈着するという特徴を持つ。これまでに、我々は父方半きょうだい家系を用いて21番染色体テロメア側に脂肪交雑関連領域を同定し、2つの異なる集団において母方アレルのみを用いた相関解析を行い、関連領域を約350kbに局限化した。本研究では責任遺伝子の同定を目的として、関連領域に存在する遺伝子の変異と発現量を調べ、候補遺伝子の絞り込みを行った。

【方法と結果】

関連領域に存在する12種の遺伝子のエキソンについて種雄牛AのSNP探索を行ったが、アミノ酸置換を伴うSNPは存在しなかった。優良遺伝子型*Q*とそうでない遺伝子型*q*をそれぞれ保有している肥育個体の筋間脂肪において、発現量の異なる遺伝子を調べた。3種の遺伝子Gene_1, Gene_2, Gene_3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。Gene_2, Gene_3にはヒト・マウスの相同遺伝子が存在するが、Gene_1には存在しなかった。*Q*/*q*最長筋コ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、Gene_1, Gene_2, Gene_3の経時的発現量を調べた。筋間脂肪部位において、Gene_1は26ヶ月と28ヶ月の間で増加し、遺伝子*b, c*は28ヶ月以降に増加した。Gene_1発現量はGene_2, Gene_3発現に先立ち増加することから、Gene_1発現がGene_2, Gene_3発現の起因である可能性が考えられた。Gene_1を導入した3T3-L1細胞を用いてwestern blottingを行ったがシグナルは検出されず、Gene_1はnon-coding RNAである可能性が示唆された。レチノイン酸添加したウシ脂肪前駆細胞株において分化誘導後、Gene_1は、有意に増加した。こうしたことから、Gene_1は、筋肉内への脂肪沈着に影響していると考えられる。

(キーストンシンポジウム2008、2008年2月、カナダ、バンフ)

学会発表 7.

題 目：大分県黒毛和種半きょうだい家系の脂肪交雑に関するMQEM-HSプログラムを利用した複

数QTLマッピング

発表者：渡邊直人¹、三宅 武²、藤田達男¹、山田宜永²、横内 耕³、渡邊敏夫³、杉本喜憲³、佐々木義之⁴

所 属：¹大分県農林水産研究セ、²京大院、³畜技協動物遺伝研、⁴(株)BIG研

要 旨：【目的】和牛の枝肉形質など重要な経済形質の多くは量的形質であり、一般に複数の遺伝子座 (Quantitative Trait Loci, QTL) と環境因子によって支配される。これらの複数のQTLを特定の染色体上にマッピングし、枝肉形質を支配する原因遺伝子の同定を行うことは和牛の育種改良において非常に重要である。今回、第107大会で報告した複数QTLマッピングプログラムMQEM-HS (Multiple QTL with Epistasis Mapping - HalfSib) を使用して大分県産種雄牛Aとその半きょうだい家系肥育牛373頭の脂肪交雑形質の解析を行ったので報告する。

【方法】全ゲノムを網羅する269の遺伝子マーカーを用いて、まず肥育牛373頭のハプロタイプを決定した。次にBMS生データ、および、環境因子の影響を補正したデータを用意し、MQEM-HSプログラムによる解析を行った。反復は4,000万回とした。

【結果】主効果を持つQTLが23番染色体に存在し、エピスタシス効果を持つQTLは5番と23番染色体に存在する可能性が示唆された。今後、種々の大分県種雄牛の解析を行い、主効果を持つQTLおよびエピスタシス効果を持つQTLペアをさらに探求していく予定である。

(日本畜産学会第109回大会、2008年3月、茨城)

学会発表 8.

題 目：黒毛和種枝肉重量QTL (CW-2) に連鎖するSNPと間接検定成績との関連性

発表者：瀬戸口浩二¹、高須賀晶子²、渡邊敏夫²、木之下明弘¹、磯部知弘¹、池田省吾¹、林 史弘¹、山口 浩¹、杉本喜憲²

所 属：¹鹿児島肉改研、²動物遺伝研

要 旨：【目的】我々はこれまでに黒毛和種の父方半兄弟家系を用いたQTL解析により、ウシ6番染色体に枝肉重量QTL (CW-2) を検出し (瀬戸口ら、日本畜産学会第106回大会)、さらにCW-2に連鎖するアミノ酸置換SNPを見いだしている (高須賀ら、第30回日本分子生物学会年会)。今回、当所で実施した間接検定牛の検定成績を用い、このアミノ酸置換SNP型と発育、枝肉成績との関連性について検討した。

【方法】県有種雄牛36頭とそれらの息牛である間接検定牛各8頭 (計288頭) の血液よりDNAを抽出し、シークエンスによりアミノ酸置換SNP型 (GG, GT, TT) を決定した。検定は (社) 全国和牛登録協会の種雄牛産肉能力検定法 (間接法) により実施し、体重 (4週毎)、体型 (8週毎)、枝肉成績を調査した。検定牛のうち検定除外 (2頭) と検定中 (16頭) のものを除いた270頭についてSNP型と検定成績との関連性について検討した。

【結果および考察】SNP型は種雄牛についてはGG4頭、GT26頭、TT6頭、間接検定牛はGG49頭、GT154頭、TT85頭であった。体重・体型については、体重・体高・十字部高、かん幅では開始時、終了時ともにそれぞれで有意な差が認められた。枝肉成績では枝肉重量はそれぞれでロース芯面積ではGG, GTとTT間で有意な差が認められた。また検定中の各ステージでの体重、体型の増加量では、体重では8~16週で、体高、十字部高については0~8週でG型の存在により有意に大きくなった。これらによりCW-2に連鎖するアミノ酸置換SNP型を利用した選抜が、発育ならびに肉量の育種改良に役立つ可能性が示唆された。

(日本畜産学会第109回大会、2008年3月、水戸)

3. 委員会、会議等の開催

1) 肉用牛ゲノム研究・開発推進委員会

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

平成19年度の委員会は平成20年3月17日東京で開催された。議事内容は次の通りであった。

- ① 本事業における平成19年度の実施報告及び事業全体（2年間）の研究成果について
- ② 本事業における研究成果の評価について
 - ア. 事業達成目標と自己評価について
 - イ. 研究成果の評価についての全体討議
- ③ 動物遺伝研究所のその他の事業における本年度の成果及び平成20年度の実施計画について
- ④ 話題提供：豚ゲノム研究の現状と育種への応用
- ⑤ その他

これらの議事の中で、動物遺伝研究所の研究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

国枝 哲夫	岡山大学農学部総合農業科学科教授
鹿志村 均	全国畜産関係場所長会会長
柴田 正貴	(独) 農業・食品産業技術総合研究機構理事 (畜産草地研究所長)
新山 正隆	(社) 家畜改良事業団専務理事
菱沼 毅	(社) 中央畜産会副会長
福原 利一	(社) 全国和牛登録協会会長
藤山秋佐夫	情報・システム研究機構国立情報学研究所教授
矢野 秀雄	(独) 家畜改良センター理事長

話題提供 (招聘講師)

小畑 太郎	(社) 農林水産先端技術産業振興センター農林水産先端技術研究所研究第2部長
-------	---------------------------------------

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19年度委員会は、平成20年2月1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 平成19年度の研究成果発表
 - (a) 同一種雄牛を始祖とする複数半きょうだい家系のQTL解析
 - (b) 黒毛和種枝肉重量QTL (CW-1) の責任遺伝子の同定に向けて
 - (c) 黒毛和種枝肉重量QTL (CW-2) の責任遺伝子の同定に向けて
 - (d) 黒毛和種脂肪交雑QTL (Marbling-3) の責任遺伝子の同定に向けて
- ③ 平成19年度のその他の研究成果と平成20年度の研究計画について
- ④ 動物遺伝研究所の研究推進に対する評価及び助言について

肉用牛ゲノム研究・開発技術推進委員会委員

居在家義昭	岩手大学農学部獣医学科教授
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
野村 哲郎	京都産業大学工学部生物工学科教授
廣川 治	(独) 家畜改良センター理事
藤山秋佐夫	情報・システム研究機構国立情報学研究所教授
美濃部脩三	(株) 植物ゲノムセンター代表取締役社長

3) 牛有用性ゲノム等探索・知的財産化事業技術推進委員会

この委員会は、平成18年度から動物遺伝研究所が行う「牛有用性ゲノム等探索・知的財産化事業」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19年度の技術推進委員会は平成20年2月18日に東京で開催された。議事は次の通りであった。

- ① 牛有用性ゲノム等探索・知的財産化事業の進捗状況について
 - (a) SNP-DNAチップを用いたゲノムワイド相関解析
 - (b) マイクロサテライトを用いたゲノムワイド相関解析
- ② 当該事業の平成20年度計画について
- ③ 討議

技術推進委員会委員

居在家義昭	岩手大学農学部教授
河原 孝吉	(社) 日本ホルスタイン登録協会北海道支局情報分析課長
菅野 純夫	東京大学大学院新領域創成科学研究科教授
豊 伸吾	道南NOSAI北部支所家畜診療センター支所長
新山 正隆	(社) 家畜改良事業団専務理事
向井 文雄	神戸大学農学部教授
安江 博	(独) 農業生物資源研究所ゲノム研究ユニット上席研究官

4) 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。平成19年度における共同研究参画機関は21の道県（北海道、青森、岩手、宮城、秋田、山形、福島、茨城、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、沖縄）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19年度全国DNA育種推進会議は平成19年10月3日動物遺伝研究所で開催された。主要議題は次の通りであった。

- ① 和牛知的財産権取得・活用推進協議会について
- ② 動物遺伝研究所の今年度事業について
 - (a) 肉用牛DNA育種実証事業
 - (b) 牛有用性ゲノム等探索・知的財産化事業
 - (c) 和牛知的財産権取得・活用推進事業
- ③ 平成19年度事業の実施計画及び実施状況について
 - (a) 共同研究参加道県試験研究機関
 - (b) （独）家畜改良センター
 - (c) （社）家畜改良事業団
- ④ 動物遺伝研究所からの話題提供
 - (a) 同一種雄牛を始祖とする複数半きょうだい家系のQTL解析
 - (b) 枝肉重量QTL（CW-1）の責任遺伝子の同定に向けて
 - (c) 枝肉重量QTL（CW-2）の責任遺伝子の同定に向けて
 - (d) *Marbling-1*、*Marbling-2*、*Marbling-3*、ゲノムワイド相関解析の進捗状況

第2回の平成19年度全国DNA育種推進会議は平成20年2月26日東京で開催された。主要議題は次の通りであった。

- ① 共同研究参加道県試験研究機関および家畜改良事業団による平成19年度の事業成果の報告
- ② 平成19年度の動物遺伝研究所の研究進捗状況の報告
 - (a) 同一種雄牛を始祖とする複数半きょうだい家系のQTL解析
 - (b) イルミナSNPチップを用いた脂肪壊死抵抗性QTLのゲノムワイド相関解析
- ③ 平成19年度事業成果のまとめと今後の進め方について
 - (a) QTLマップの更新について
 - (b) 共同研究機関への提案：黒毛和種繁殖性QTLおよび飼料効率QTL解析の可能性について
- ④ 和牛知的財産権取得・活用推進協議会について

5) 研究会等の開催

① 第2回家畜DNA西郷シンポジウムの開催

牛ゲノム解析の進展に伴い、フィールドにおけるDNA育種効果、責任遺伝子の機能解明に向けた取り組みが重要な課題となってきた。そのため内外の関係する専門家を招待し、(独)家畜改良センターと共同で、家畜DNA西郷シンポジウムを平成19年10月2日に開催した。

開催場所：(独)家畜改良センター講堂

主催：(独)家畜改良センター、(社)畜産技術協会

第1部 分子生物学の可能性

(1) 一塩基多型を用いたヒト疾患遺伝子解析の進展と課題 (山田 亮、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター)

(2) オートファジー：生体防御にも働く細胞内自己消化システム (吉森 保、大阪大学微生物病研究所)

第2部 肉質改良のための遺伝子解析

(3) 牛の肉質改良のための脂肪交雑遺伝子の解明 (麻生 久、東北大学大学院農学研究科)

(4) 豚の肉質改良のための遺伝子解析とその利用 (鈴木啓一、東北大学大学院農学研究科)

② 招待講演

動物遺伝研究所では、ウシゲノム研究の進展を図るため、平成19年度において、次のような研究者を招待し、動物遺伝研究所において動物遺伝育種に係わるセミナーを開催した。

(1) 「神経回路と繁殖の接点」、崎村建司 (新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野教授)、平成19年9月6日

(2) 「黒毛和種繁殖性の実態と遺伝的な影響」、青柳敬人 (全国農業協同組合連合会ETセンター所長)、平成19年9月6日

(3) “SNPs to Chips: Changing the paradigm of mapping and selection in cattle” (SNPからチップへ：ウシQTLマッピングとマーカーアシスト選抜手法の変化)、Dr. Tad S. Sonstegard (Bovine Functional Genomics Laboratory, Beltsville Agricultural Research Center, United States Department of Agriculture (米国農務省ベルツビル農業研究センターウシファンクショナルゲノミクス研究室)), 平成19年11月21日

③ 動物遺伝育種シンポジウム組織委員会による第13回シンポジウム「動物ゲノム解析と新たな育種戦略：先端的ツールは動物遺伝育種研究にどのように活用できるか？」を動物遺伝育種学会と共催した。

開催日：平成19年11月25日

開催場所：つくば国際会議場 (エポカルつくば) (つくば市)

内容：

- (1) 「ヒトゲノムコピー数多型の全容」、石川俊平（東京大学先端科学技術センター・ゲノムサイエンス部門、大学院医学研究科人体病理学・病理診断学分野助教）
- (2) 「黒毛和種経済形質のゲノム解析」、須賀晶子（（社）畜産技術協会附属動物遺伝研究所動物遺伝研究部長）
- (3) 「ヒト・マウスのゲノムトランスクリプトーム解析で同定された内在性アンチセンス転写物の発現解析」、清澤秀孔（（独）理化学研究所バイオリソースセンター開発研究員）
- (4) 「疾患モデルとしてのメダカ：突然変異の解析とアレイによるヒレ再生の解析」、工藤 明（東京工業大学大学院生命工学研究科生命情報専攻教授）

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19年度は次の5課題を研究及び事業委託した。

- 1) ウシ筋肉内脂肪細胞株を用いた脂肪交雑関連遺伝子発現機構の解明（平成13年度より継続）
 - ①委託先：東北大学大学院農学研究科
 - ②委託研究者：麻生 久
- 2) 黒毛和種種雄牛の多段階選抜におけるmajor genes情報の選抜指標としての効果（平成16年度より継続）
 - 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わる遺伝的研究（平成17年度より継続）
 - 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) ウシとブタ、ヒト、マウスにおける遺伝子転写領域の比較（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) ウシ遺伝子発現解析のための、in situハイブリダイゼーション及びマイクロアレイに適したプローブの作成とそれを利用した解析（平成17年度より継続）
 - 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) モデル動物を利用した脂肪交雑形成遺伝子ネットワークの解明（新規）
 - ①委託先：京都大学農学部
 - ②委託研究者：山田宣永

5. 研修員の受け入れ

所属機関名	氏名	受入期間
長崎県肉用牛改良センター	丸田俊治	平19.5.22～6.12
宮城県畜産試験場	千葉和義	平19.6.7～6.15
青森県農林総合研究センター畜産試験場	鈴木晶夫	平19.7.9～7.20
宮城県畜産試験場	石橋大輔	平19.7.17～8.31
山形県農業総合研究センター畜産試験場	中嶋宏明	平19.8.1～8.10
島根県畜産技術センター	中村亮一	平19.9.18～10.26
岡山県総合畜産センター	中藤由紀	平19.10.5～10.12
茨城県畜産センター肉用牛研究所	藤森祐紀	平19.11.26～12.7
宮城県畜産試験場	千葉和義	平20.1.15～1.18
長崎県肉用牛改良センター	岡部裕	平20.1.21～2.11
青森県農林総合研究センター畜産試験場	鈴木晶夫	平20.1.21～2.8
兵庫県立農林水産技術総合センター北部 農業技術研究センター	秋山敬孝	平20.1.21～2.1
島根県畜産技術センター	中村亮一	平20.1.28～2.15
大分県農林水産研究センター畜産試験場	渡邊直人	平20.1.28～2.8
岐阜県畜産研究所	松橋珠子	平20.2.4～2.15
鹿児島県肉用牛改良研究所	池田省吾	平20.2.12～3.26
茨城県畜産センター肉用牛研究所	藤森祐紀	平20.2.22～2.29
熊本県農業研究センター畜産研究所	古田雅子	平20.2.27～3.5
鳥取県畜産試験場	小江敏明	平20.2.27～3.13
佐賀県畜産試験場	大坪利豪	平20.3.3～3.14
青森県農林総合研究センター畜産試験場	鈴木晶夫	平20.3.3～3.14
宮城県畜産試験場	千葉和義	平20.3.10～3.14

6. 職員の普及活動等

1) 講演

1. 杉本喜憲：「ウシゲノム解析の現状とこれから」、平成19年度DNA解析に関する検討会、岐阜県畜産研究所、2007年11月、高山。
2. 高須賀晶子：「黒毛和種経済形質のゲノム解析」、第13回動物遺伝育種シンポジウム・動物ゲノム解析と新たな家畜育種戦略、2007年11月、つくば。
渡邊敏夫：「ハプロタイプを用いた牛肉の品種鑑定」、JRA畜産振興事業に関する
3. 平野 貴：「最新のウシゲノム研究について：1) 脂肪交雑QTL領域 Marbling-2からの遺伝子同定について、2) 黒毛和種の乳頭欠損症のDNA解析について、3) 黒毛和種の発育不良虚弱牛のDNA解析について」、平成19年度客員研究員招聘事業に関するセミナー、岐阜県畜産研究所、2008年3月、高山。

第3節 総務

1. 職員名簿

(平成20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	西 野 大 樹
	補 助 員	浅 比 紀 子
動物遺伝研究部	部 長	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	横 内 耕
	研 究 員	高 野 淳
	研 究 員	西 村 翔 太
	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	金 内 由美子
	補 助 員	丸 山 久美子
	補 助 員	真 船 文 恵

2. 職員の異動

1) 職員の採用

採用年月日	氏 名	所 属	備 考
平成19年4月1日	西 村 翔 太	動物遺伝研究部研究員	
平成19年7月1日	西 野 大 樹	管理部長	

2) 職員の退職・退任

退職・退任年月日	氏 名	所 属	備 考
平成19年6月30日	高 田 耕 節	管理部長	
平成19年12月14日	鳴 島 亜希子	動物遺伝研究部補助員	
平成20年3月31日	溝 口 康	動物遺伝研究部補助員	
平成20年3月31日	塚 澤 浩 子	動物遺伝研究部補助員	

3. 職員の海外出張

氏名	出張先	期間	用務
高須賀 晶子	アメリカ	20.1.11-20.1.18	米国サンディエゴ市で開催された第16回植物・動物ゲノム学会に参加
高野 淳	アメリカ	20.1.11-20.1.18	米国サンディエゴ市で開催された第16回植物・動物ゲノム学会に参加
溝口 康	アメリカ	20.2.18-20.2.25	カナダバンフ市で開催されたキーストンシンポジア：第3回脂肪代謝と肥満に関する会議に参加
渡邊 敏夫	オーストラリア	20.3.23-20.3.31	オーストラリア国における「ウシの有用遺伝子に関する特許取得状況及び活用体制」の調査

4. 施設・機器の整備

1) 施設

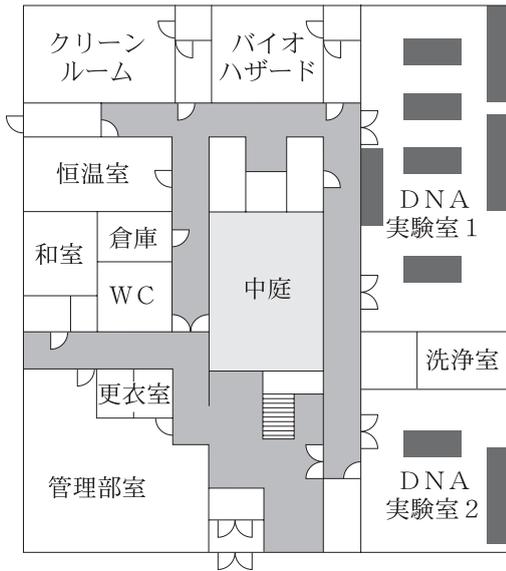
研究施設の平面図は31ページの通り。

2) 平成19年度購入の主要機器（単価百万円以上）

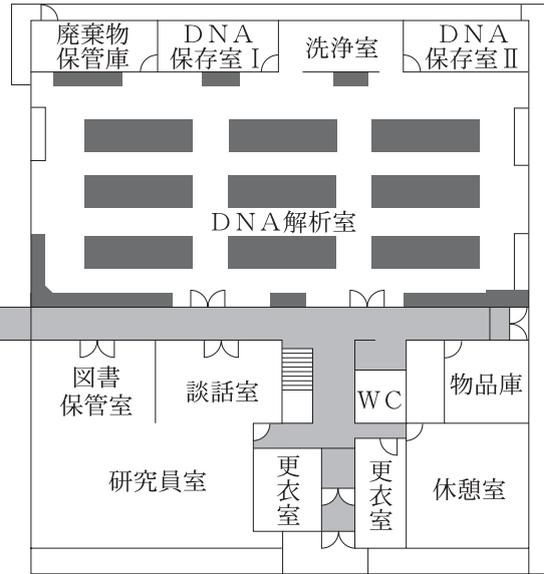
機器名	式数
イルミナSNPジェノタイピング (イルミナBead Station 500GXW、Bead Xpress System)	1
ゲノムアナライザー (イルミナ社製次世代型DNAアナライザー SY-301-1001a)	1

研究施設平面図

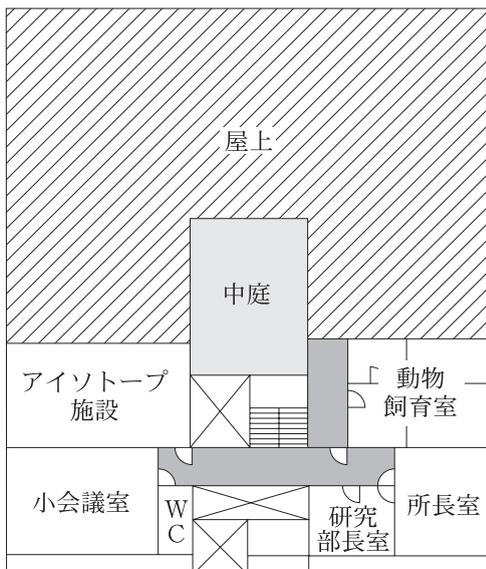
本館1階 (742m²)



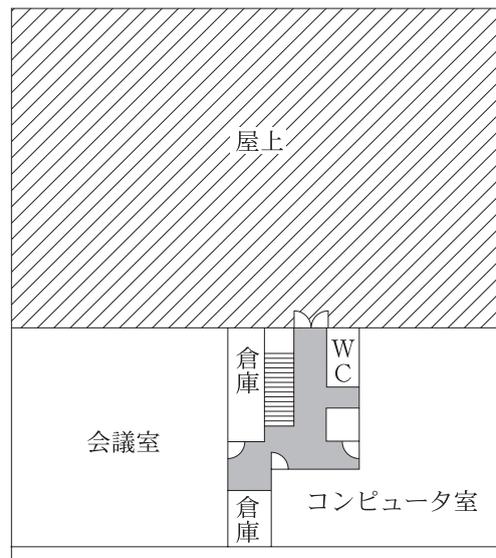
別館1階 (788m²)



本館2階 (258m²)



別館2階 (306m²)



5. 購読雑誌一覧

- 1 Animal Genetics
- 2 Cell
- 3 Cell Metabolism
- 4 Genome Research
- 5 Genomics
- 6 Journal of Biological Chemistry
- 7 Mammalian Genome
- 8 Nature
- 9 Nature Genetics
- 10 Nature Medicine
- 11 Nature Reviews Genetics
- 12 Nature Reviews Molecular Cell Biology
- 13 Science
- 14 The American Journal of Human Genetics
- 15 The Journal of Cell Biology
- 16 Trends in Genetics
- 17 細胞工学
- 18 実験医学
- 19 畜産技術

第4節 資 料

MAPPING OF A QUANTITATIVE TRAIT LOCUS FOR BEEF MARBLING ON BOVINE CHROMOSOME 9 IN PUREBRED JAPANESE BLACK CATTLE

K. Imai and T. Matsughige

Hiroshima Prefectural Livestock Technology Research Center, Shobura, Hiroshima, Japan

T. Watanabe, Y. Sugimoto, and N. Ihara

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

The goal of this study is to detect quantitative trait loci (QTL) for carcass traits applicable for a DNA-based breeding system in a Japanese Black cattle population. A purebred paternal half-sib family from a commercial line composed of 65 steers was initially analyzed using 188 informative microsatellites giving a 16-cM average interval covering 29 autosomes. A significant QTL for marbling was detected in the centromeric portion of bovine chromosome (BTA) 9. After additional marker genotyping across a larger sample size composed of 169 individuals, this locus was refined to a 20-cM confidence interval between microsatellites BM1227 (24 cM) and DIK2741 (50 cM) at a 1% chromosome-wise threshold. The allele substitution effect between Q and q for a beef marbling standard score (1 to 12 range) on BTA9 was 1.0 (5.7% of total phenotypic variance in QTL contribution in this family). This result provides a primary platform for a marker-assisted selection system of the beef marbling trait within the Japanese Black (Wagyu) cattle population.

Keywords: Beef marbling; BTA9; Cattle; QTL mapping

Improving the production and health traits in livestock species is a basic objective for animal breeding. The QTL affecting these traits are of great interest because identification of nucleotide polymorphisms residing on QTL giving phenotypic variations in a segregating population makes it feasible to efficiently select individuals with a superior phenotype through a marker-assisted selection (MAS) scheme. Therefore, genetic assignments of significant QTL onto chromosomes are an essential step for positional cloning of genes responsible for the traits of interest. Towards this aim, a number of populations designed by crossbreeding between different cattle breeds (e.g., Brahman × Angus) have been constructed to increase the power of detection of significant QTL for carcass traits in beef cattle (1–3). Although many

The authors would like to thank Y. Kaneuchi for laboratory assistance, H. Shirasu for sample collecting, and M. Agaba for valuable discussion. This work was supported by a grant from the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

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

significant QTL have been reported using such populations, to our knowledge, a suitable model for integrating such QTL information has not yet been proposed. In contrast, results obtained from purebred populations of commercial lines are expected to be immediately applicable for individual selection through identity-by-descent haplotype inspection (4,5) because several common haplotypes harboring QTL will be segregating from a limited number of founders in the populations. The Japanese Black (Wagyu) cattle breed is a purebred with a hallmark of high performance in marbled beef production. Beef marbling represents meat quality that is a major trait of economic importance as well as other carcass traits such as carcass weight (CW), carcass yield estimate (YE), and rib eye area (REA). In this breed, lines with superior traits are established by animal breeding, thereafter used for mating on commercial base. Bulls representing each line are selected under the breeding schemes such as genetic evaluation and the testing performance and progeny. Progeny are produced from the crossing between a selected sire and dams from several different lines by mating in each local herd planned by a prefectural breeding station for profitability in marketing. Mizoshita and others (6) reported that a genome scan using a paternal half-sib family of Japanese Black cattle had the power to detect 15 significant QTL affecting growth and carcass traits. Further, Mizoguchi and others (7) reported significant QTL of three marbling traits in a different paternal half-sib family of this breed. These two previous reports of QTL mappings for carcass traits including beef marbling in Wagyu populations are particularly noteworthy for our study as the basis of using a similar pedigree construct. In this work, to detect carcass trait QTL applicable for MAS, a paternal half-sib family composed of 169 fattened steers was analyzed to identify chromosomal regions containing QTL-influencing carcass traits.

MATERIALS AND METHODS

Trait Measurement

Fattened steers were slaughtered at approximately 28 mo of age. Four carcass traits, cold CW (kg), carcass YE (%), REA (cm²), and beef marbling measured as a score on the beef marbling standard (BMS, range: 1–12) were measured. Higher BMS scores correspond to more marbling. These phenotypic parameters were estimated according to the Japanese meat grading system, as described previously (6). YE was calculated from REA, rib thickness (RT: cm), subcutaneous fat thickness (SFT: cm), and cold left-side carcass weight (CWL: kg) by the following formula:

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

This formula has been officially used for grading at all Japanese carcass markets since 1988.

Genome Screen

DNA samples for the sire and 169 steers were extracted from peripheral blood leukocytes or semen using standard protocols. One hundred eighty-eight informative

microsatellites in the family, giving a 16-cM average interval covering 29 autosomes, were selected from the Shirakawa-USDA linkage map (8). Polymerase chain reaction (PCR), sizing of PCR products, and data collection were performed as described previously (6).

Statistical Analyses

Correction of genotype errors, reconstruction of haplotype phases, and *F*-statistic profiling were performed with the interval mapping method for half-sib families (9,10). The statistical model for QTL analysis was that of linear regression of the phenotypic value of the probabilities of QTL genotypes at a given location. The sire's two alleles at a putative QTL at a given location were denoted by *Q* and *q*. Probabilities of offspring QTL genotypes denoted by *Prob(Q)* were calculated from the observed genotypes of markers linked to the QTL. A linear regression analysis was performed using the following model:

$$y_i = \mu + a \text{Prob}(Q)_i + e_i$$

where μ is the fixed effect, a is the allele substitution effect of *q* to *Q*; and y_i , $\text{Prob}(Q)_i$, and e_i are unadjusted phenotypic value, probability of *Q* genotype at a given location, and the residual error for individual *i*, respectively. An *F*-statistic value was calculated from the minimum sum of squares of residual error under the model with the least squares estimators of μ and a , and the minimum sum of squares under the null model corresponding to no QTL, where $a = 0$ is assumed. Analyses of QTL were performed at 1-cM intervals along the chromosome. For all analyses marker locations were obtained from the Shirakawa-USDA linkage map (8). Thresholds for the significance of the *F*-statistic value were obtained by 10,000 random permutations of the phenotypic data and permutations were studied for each trait to determine the $P < 0.05$ and $P < 0.01$ significance thresholds (11). QTL contribution (%) in the family was calculated as follows: (phenotypic variance explained by the linear regression model/total phenotypic variance) \times 100. QTL location with 95% confidence interval (CI) was estimated by the bootstrap method as described previously (12). A computer program customized for a paternal half-sib analysis was originally developed using C++ language.

RESULTS AND DISCUSSION

Means (mean \pm SD) of carcass traits in 169 slaughtered fattened steers were 4.3 ± 1.7 (BMS), 450.0 ± 45.4 (CW), 73.1 ± 1.5 (YE), and 54.7 ± 7.7 (REA), where the estimated heritability of these traits is 0.52 (BMS), 0.39 (CW), 0.53 (YE), and 0.47 (REA) (13).

In the first genome scan using 188 informative microsatellite markers and 65 steers, we detected three QTL at the 5% chromosome-wise threshold, which were BTA8 for REA and BTA6 and BTA9 for BMS score. No significant QTL for other carcass traits were observed. These three chromosomes were subjected to locus refinements using additional informative markers and 104 additional steers for a total of 169 steers. As a result, at the 1% chromosome-wise threshold we assigned

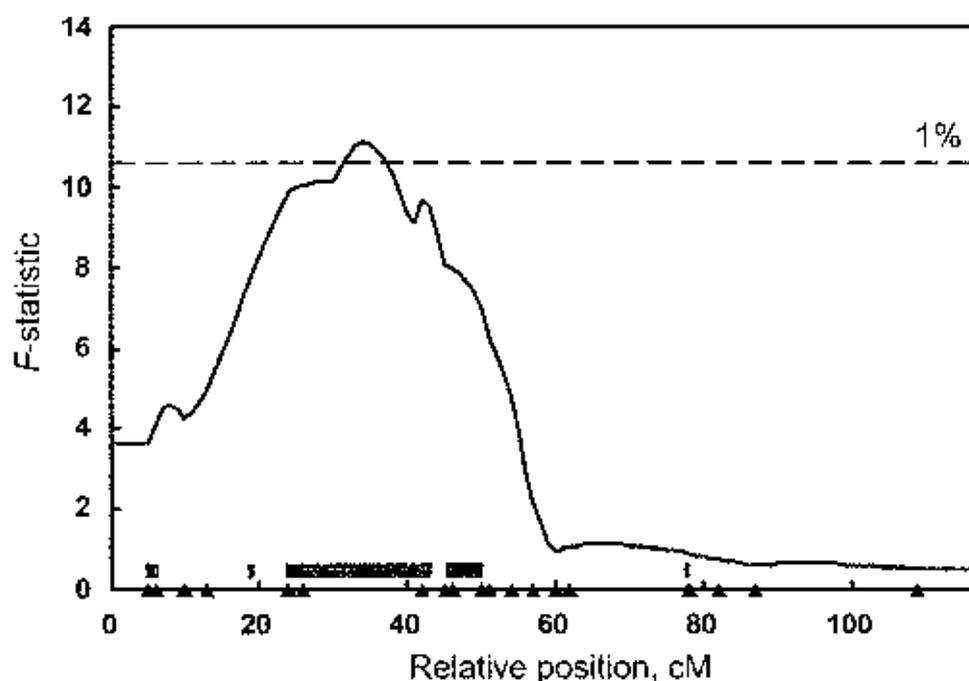


Figure 1 *F*-statistic profile for beef marbling on BTA9. The horizontal broken lines indicate chromosome-wise threshold at each confidence level. Shaded boxes denote 95% CI of QTL. Marker positions from centromeric to telomeric regions (left to right) on BTA9 are shown as triangles above the X-axis, which are *BM757*, *BMS2177*, *DIK5339*, *BMS47*, *BMS1234*, *BM6449*, *BMS425*, *ETH225*, *BM1227*, *ILSTS037*, *BMS817*, *DIK4268*, *DIK2810*, *CSSM25*, *DIK2741*, *BMS1148*, *DIK4247*, *BM1545*, *BMS434*, *BMS1909*, *BMS345*, *BM6436*, *TGLA73*, *BM7209*, *BMS2251*, and *BMS1967*. The orders and positions of markers are based on the Shirakawa-USDA linkage map (8). A computer program customized for a paternal half-sib analysis was used (MATERIALS AND METHODS).

a significant QTL for beef marbling at a 20-cM interval with 95% CI within the region between microsatellites *BM1227* [24 cM] and *DIK2741* [50 cM] on BTA9, where the highest *F*-statistic value of 11.6 was recorded at the position of 34 cM (Figure 1). The *Q* to *q* substitution effect and contribution ratio at this position were 1.0 in BMS score and 5.7% of total phenotypic variance in this family, respectively. Information content, an index of transmission informativeness and segregation distortion (14) in this region on BTA9, was above 0.8. The two QTL on BTA6 and BTA8 detected in the first genome scan were no longer detected in the second screening.

Several QTL for the level of intramuscular fat deposition estimated as marbling score have been reported. Those were mapped on BTA3, BTA5, BTA10, BTA14, and BTA27 (2,15–18). Casas and others (17) detected a potential QTL for marbling score at a 30-cM support interval between microsatellites *CSSM025* [46 cM] and *BM7209* [82 cM] on BTA9 using a family from a *Bos indicus* × *Bos taurus* sire. The 30-cM interval suggested by Casas and others (17), however, does not overlap the 20-cM interval reported in the present study. This might be due to the existence of different genes affecting beef marbling on this chromosome due to differences in breed composition or a different standard of measurement for beef marbling. The 20-cM interval of the mapped region of BTA9 seems to contain segments of human chromosome 6q14.1-q21 (UCSC; <http://www.genome.ucsc.edu/>) which

corresponds to a region including chromosome 1p21 in pig (INRA: <http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare/compare.htm>) that tremendous progress has been made in QTL mapping for carcass traits as well as cattle. According to the well-organized public domain sources for swine QTL for production traits (PigQTLdb; <http://www.animalgenome.org/QTLdb/>), a significant QTL for marbling trait has been mapped on swine chromosome 1. However, this region does not seem to be syntenic to that detected in cattle in this work.

In the Japanese Black cattle population, there is evidence suggesting that significant QTL for marbling exist on BTA4, BTA5, BTA13, and BTA14 (6) and BTA4, BTA6, and BTA21 (7). Although these QTL are not concordant with QTL on BTA9 in the present study, BTA9 does harbor a QTL for marbling trait in a different herd of the Wagyu breed (19). Detection of QTL on the same chromosomal region in different herds in a common breed can be especially meaningful for narrowing the critical region using the linkage disequilibrium (LD) mapping strategy. Mizoshita and others (20) recently demonstrated that a 8.1-cM region for *Carcass Weight-1 (CW-1)* on BTA14 was dramatically refined to a 1.1-Mb interval based on the LD mapping approach using highly saturated microsatellite markers in three paternal half-sib families of Wagyu in which all sires harbored biallelic *Q* haplotypes in *CW-1*. In their report, under fixed paternal *Q* effects, maternal non-*Q* effects on the trait in three populations contributed to narrow the critical region. Considering the dozen QTL mapping efforts underway in different herds of Japanese Black cattle (19), therefore, intensive marker development from the critical region followed by pursuing *Q* haplotype of BTA9 in the related lines and increasing the offspring in this family would accelerate to narrow the critical region, which make it feasible to perform positional cloning of genes for beef marbling in Japanese Black cattle. This might also work well for quick and reliable implementation of MAS. Furthermore, identification of genes involved in body fat composition such as beef marbling in this breed might shed light on understanding the molecular basis controlling adipocyte differentiation or etiology of obesity resulting from impaired lipid metabolism in humans beyond its application for MAS.

REFERENCES

1. Stone RT, Keele JW, Shackelford SD, Kappes SM, Koohmaraie M. A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting carcass and growth traits. *J Anim Sci* 1999; 77(6):1379-1384.
2. Casas E, Shackelford SD, Keele JW, Stone RT, Kappes SM, Koohmaraie M. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J Anim Sci* 2000; 78(3):560-569.
3. Kim JJ, Farnir F, Savell J, Taylor JF. Detection of quantitative trait loci for growth and beef carcass fatness traits in a cross between *Bos taurus* (Angus) and *Bos indicus* (Brahman) cattle. *J Anim Sci* 2003; 81(8):1933-1942.
4. Riquet J, Coppieters W, Cambisano N, Arranz J, Berzi P, Davis SK, Grisart B, Farnir F, Karim L, Mni M, Simon P, Taylor JF, Vanmanshoven P, Wagenaar D, Womack JE, Georges M. Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: Application to milk production in dairy cattle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(16):9252-9257.

5. Li C, Basarab J, Snelling WM, Benkel B, Kneeland J, Murdoch B, Hansen C, Moore SS. Identification and fine mapping of quantitative trait loci for backfat on bovine chromosome 2, 5, 6, 19, 21, and 23 in a commercial line of *Bos taurus*. *J Anim Sci* 2004; 82(4):967-972.
6. Mizoshita K, Watanabe T, Hayashi H, Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Sugimoto Y. Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a half-sib family of purebred Japanese Black (Wagyu) cattle. *J Anim Sci* 2004; 82(12):3415-3420.
7. Mizoguchi Y, Watanabe T, Fujikawa K, Iwamoto E, Sugimoto Y. Mapping of quantitative trait loci for carcass traits in a Japanese Black (Wagyu) cattle population. *Anim Genet* 2006; 37(1):51-54.
8. 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. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3,802 microsatellites. *Genome Res* 2004; 14(10A):1987-1998.
9. Haley CS, Knott SA, Elsen JM. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* 1994; 136(3):1195-1207.
10. Seaton G, Haley CS, Knott SA, Kearsey M, Visscher PM. QTL express: Mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformatics* 2002; 18(2):339-340.
11. Churchill GA, Doerge RW. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 1994; 138(3):963-971.
12. Visscher PM, Thompson R, Haley CS. Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics* 1996; 143(2):1013-1020.
13. Mukai F, Oyama K, Kohno S. Genetic relationships between performance test traits and field carcass traits in Japanese Black cattle. *Livest Prod Sci* 1995; 44:199-205.
14. Knott SA, Marklund L, Haley CS, Andersson K, Davies W, Ellegren H, Fredholm M, Hansson I, Hoyheim B, Lundstrom K, Moller M, Andersson L. Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and large white pigs. *Genetics* 1998; 149(2):1069-1080.
15. Barendse WJ. Assessing Lipid Metabolism. International patent application number PCT/AU98/00882, International publication No. WO 99/23248, 1999.
16. Casas E, Stone RT, Keele JW, Shackelford SD, Kappes SM, Koohmaraie M. A comprehensive search for quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of the myostatin gene. *J Anim Sci* 2001; 79(4):854-860.
17. Casas E, Shackelford SD, Keele JW, Koohmaraie M, Smith TP, Stone RT. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *J Anim Sci* 2003; 81(12):2976-2983.
18. Thaller G, Kuhn C, Winter A, Ewald G, Bellmann O, Wegner J, Zuhlke H, Fries R. DGATI, A new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Anim Genet* 2003; 34(5):354-357.
19. Watanabe T, Takasuga A, Mizoguchi Y, Hirano T, Ihara N, Takano A, Yokouchi K, Fujikawa A, Chiba K, Kobayashi N, Tatsuda K, Oe T, Furukawa M, Nishimura-Abe A, Imai K, Fujita T, Nagai S, Inoue K, Mizoshita K, Ogino A, Sugimoto Y. A Comprehensive QTL Mapping of Japanese Black Cattle (Wagyu). 29th International Conference on Animal Genetics, Tokyo, Japan, Sept 11-16, 2004, F042.
20. Mizoshita K, Takano A, Watanabe T, Takasuga A, Sugimoto Y. Identification of a 1.1-Mb region for a carcass weight QTL on bovine chromosome 14. *Mamm Genome* 2005; 16(7):532-537.

Linkage mapping of the locus responsible for forelimb-girdle muscular anomaly of Japanese black cattle on bovine chromosome 26

A. A. Masoudi*, K. Uchida¹, K. Yokouchi², K. Ohwada³, A. R. Abbasi*, T. Tsuji*, T. Watanabe¹, T. Hirano⁴, Y. Sugimoto² and T. Kunieda*

*Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan; ¹Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki 889-2155, Japan; ²Shirakawa Institute of Animal Genetics, Nishigo, Fukushima 961-8011, Japan; ³Miyazaki Prefectural Federation of Agricultural Mutual Aid Association, Miyazaki 880-0877, Japan

Summary

Forelimb-girdle muscular anomaly is an autosomal recessive disorder of Japanese black cattle characterized by tremor, astasia and abnormal shape of the shoulders. Pathological examination of affected animals reveals hypoplasia of forelimb-girdle muscles with reduced diameter of muscle fibres. To identify the gene responsible for this disorder, we performed linkage mapping of the disorder locus using an inbred pedigree including a great-grand sire, a grand sire, a sire and 26 affected calves obtained from a herd of Japanese black cattle. Two hundred and fifty-eight microsatellite markers distributed across the genome were genotyped across the pedigree. Four markers on the middle region of bovine chromosome 26 showed significant linkage with the disorder locus. Haplotype analysis using additional markers in this region refined the critical region of the disorder locus to a 3.5-Mb interval on BTA26 between BM4505 and MOK2662. Comparative mapping data revealed several potential candidate genes for the disorder, including NRAP, PDZD8 and HSPA12A, which are associated with muscular function.

Keywords hereditary disorder, Japanese black cattle, mapping, muscular anomaly.

Introduction

Many hereditary disorders have been reported in Japanese black cattle, which is the most common beef breed in Japan. These hereditary disorders include Chediak-Higashi syndrome (Ogawa *et al.* 1997), renal tubular dysplasia (Ohia *et al.* 2001) and multiple ocular defect (Uchida *et al.* 2006). However, after the establishment of DNA-based diagnosis systems for identification of carriers (Kunieda *et al.* 1999; Hirano *et al.* 2000; Ohia *et al.* 2000; Abbasi *et al.* 2005; Kunieda 2005), the incidence of these disorders has been dramatically reduced.

Forelimb-girdle muscular anomaly (FMA) is a hereditary disorder reported in a particular local population of Japanese black cattle. Investigation of the pedigree records and

the occurrence of the disorder suggested an autosomal recessive mode of inheritance. Affected calves show tremors and astasia at birth, suckling difficulties and growth retardation. The most characteristic feature of this disorder is an abnormal shape of shoulders with swelling scapula, which can easily be distinguished from that of normal animals (Uchida 2005). Gross pathological observation has revealed hypoplasia of forelimb-girdle muscles, particularly of the musculus latissimus dorsi. This muscle was thin and incompletely developed and its colour was pale in affected animals; in the most severely affected cases, the muscles were divided into two parts or almost absent. These abnormalities were limited to forelimb-girdle muscles, with muscles of the other parts of the body being unaffected. Histological examination of the affected muscles showed reduced diameters of the muscle fibres, but no other obvious abnormalities such as degeneration or inflammation were observed (K. Uchida, unpublished data).

In the present study, we performed linkage mapping and haplotype analysis using an inbred pedigree affected by FMA to map this disorder in the bovine genome.

Address for correspondence

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

Accepted for publication 10 September 2007

Materials and methods

Pedigree material

Animals of an inbred pedigree obtained from a herd of a local population of Japanese black cattle included a great-grand sire (sire A), a grand sire (sire B), a sire (sire C) and 26 affected calves of sire C (Fig. 1). The diagnosis of the affected calves was carried out by visual observation of the animals and by histological examination of the affected muscles (K. Uchida, unpublished data). Genomic DNA from sires A, B and C, from nine dams of the affected calves and from the 26 affected calves was obtained from semen, blood or muscle tissue samples of these animals by phenol/chloroform extraction. DNA samples of 37 unaffected calves of sire C were also used in the study.

Markers and genotyping

The animals were genotyped for microsatellite markers from the USDA-MARU cattle genome map (<http://www.maru.usda.gov/genome/cattle/cattle.html>). The markers were distributed over the entire bovine genome, spaced on average ~12 cM apart. For the haplotype analysis, new microsatellite markers in the critical region were selected from dinucleotide repeats in the published cattle genome sequence. The nucleotide sequences of these new markers were deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank databases with the accession numbers AB359017, AB359018, AB359019, AB359020, AB359021, AB359022, AB359023,

AB359024, AB359025 and AB359026. The microsatellite markers were amplified by a standard PCR protocol and genotyped using an ABI 3700 DNA sequencer and *casosecs* and *casovera* programs (Applied Biosystems) for the whole-genome linkage analysis or polyacrylamide gel electrophoresis followed by silver staining for the haplotype analysis. Using the *casovera* program, we tested for paternity and false genotyping in the cases of questionable genotypes.

Linkage and haplotype analysis

The initial linkage analysis was performed by analysing the segregation of alleles of the microsatellite markers among the offspring of sire C using a linear regression method (Haley *et al.* 1994). Disorder phenotypes (affected and unaffected) were treated as continuous variables as described by Hirooka *et al.* (2002), although they were scored as binary variable (i.e. 0 and 1). The sire's two alleles at a putative disorder locus at a given location were denoted by *D* and *d*. Probabilities of offspring to receive allele *D* from the sire denoted by *P(D)* were calculated from the observed genotypes of markers linked to the disorder locus. A linear regression analysis was performed using following model:

$$y_i = m + P(D_i)a + e_i$$

where *m* is the fixed effect, *a* is the allele substitution effect of *d* to *D*, *y_i* is the phenotypic value, *P(D_i)* is the probability of possessing the *D* allele at a given location and *e_i* is the residual error for individual *i*. A LOD score was calculated from likelihoods under the null hypothesis where *a* = 0 is

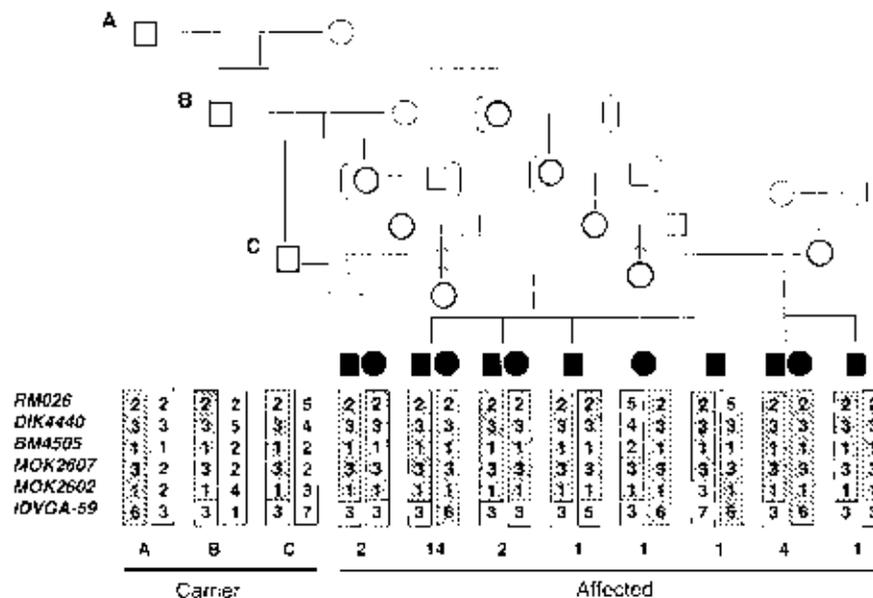


Figure 1 Pedigree of cattle with forelimb grade muscular anomaly and haplotypes of six markers on bovine chromosome 26. This pedigree includes a great-grand sire (A), a grand sire (B), a sire (C) and 26 affected calves. Haplotypes of six markers linked to the *MAA* locus are shown underneath the symbol for each animal. The *MAA*-associated haplotype derived from sire A is shaded. The number of animals with each haplotype is shown at the bottom of the haplotype column.

assumed and the alternative hypothesis where $a \neq 0$. Thresholds for significance of the statistic value were obtained by 10 000 random permutations of the phenotypic data (Churchill & Doerge 1994). The 95% confidence interval of the location was calculated by the bootstrapping method (Visscher *et al.* 1996).

Markers tightly linked to the disorder locus in the initial linkage analysis and new microsatellite markers obtained from the cattle genome sequence in the critical region were then used for the haplotype analysis in which all linkage information obtained from meiosis of sires A, B and C and the dams were included. The most probable interval for the position of the disorder locus was determined by homozygosity of the marker alleles and by minimizing the number of multiple recombinant haplotypes.

Results and discussion

An inbred pedigree composed of 26 affected calves from a single sire was used to map the locus responsible for forelimb-girdle muscular atrophy (*FMA*). No difference in the sex ratio was observed in the affected calves, and all dams and sires of the affected calves were phenotypically normal. The dams of 21 of the 26 affected calves were descendants of either sire A or B, separated two to four generations from these males (Fig. 1). Pedigree information indicated an autosomal recessive mode of inheritance with identity-by-descent of the mutation from the common founding ancestor (sire A).

To identify microsatellite markers informative for the linkage analysis, sire C genotypes of 533 microsatellite markers were determined, of which 258 markers spanning 29 autosomes were heterozygous. Genotypes of these 258 markers were then determined in the 26 affected and 37 unaffected calves, three sires and nine dams of the pedigree. Using whole genome linkage analysis of the genotype data, only markers on BTA26 showed significant linkage rebo-

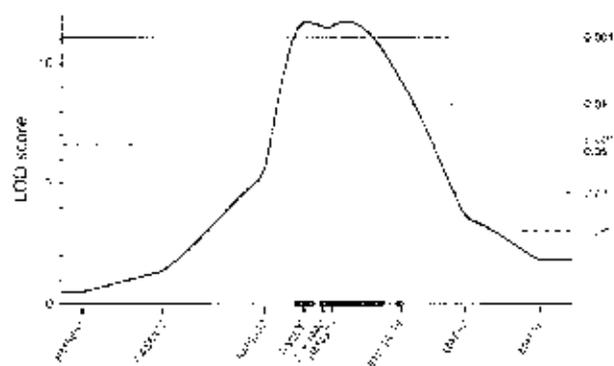


Figure 2 Results of linkage analysis showing LOD scores for the *FMA* locus on bovine chromosome 26. Horizontal solid lines indicate the thresholds for 0.1%, 1% and 5% genome-wide significance levels, respectively and horizontal dotted lines indicate the thresholds for 0.1%, 1% and 5% chromosome-wise significance levels, respectively. The 95% confidence interval is indicated by thick bars.

nosome wise $P < 5\%$ with the disease phenotype (Fig. 2). The highest LOD score (11.7) was observed for the interval between *BM4505* and *DDGA-59*, which exceed the 0.1% genome wide significant level (12.1). According to the recently published cattle genome map (Ihara *et al.* 2003), these markers are located in the middle region of BTA26.

To further define the location of the *FMA* locus, 10 additional markers located in the critical region on BTA26 between *BM4505* and *DDGA-59* were selected from the published cattle genome sequence (Fig. 3) and genotypes were determined for sire C. *MOK2602* and *MOK2607* were heterozygous in sire C and therefore these two markers were genotyped for all animals in the pedigree. The haplotype of the six markers (*RM026*, *DKK449*, *BM4505*, *MOK2607*, *MOK2602* and *DDGA-59*) associated with the disorder was determined by segregation of the alleles in the pedigree. To do this, the haplotypes of sire C were reconstructed from the genotypes of his offspring. As illustrated in Fig. 1, 24 of the 26 affected animals possessed one of the sire C haplotypes (2-3-1-3-1-3), indicating that this haplotype is the *FMA*-associated haplotype and the remaining two affected animals received recombinant haplotypes from sire C. In addition, dams of 15 of the 26 affected animals were descendent of sire A, and these 15 calves possessed one of sire A's haplotypes (2-3-1-3-1-6). There was no other common ancestor in these 15 affected calves. Therefore, this haplotype was identified as the *FMA*-associated haplotype originating from sire A. The *FMA*-associated haplotype of sire B was identical to that of sire C. As illustrated in Fig. 1, 18 and five of the 26 affected calves were compound heterozygotes of the *FMA*-associated haplotypes of sires A and C, and homozygous of the *FMA*-associated haplotypes of sires C respectively. However, four haplotypes formed by recombination between *RM026* and *DKK449*, between *BM4505* and *MOK2607*, between *MOK2607* and *MOK2602* and between *MOK2602* and *DDGA-59* respectively were observed in three affected calves (Fig. 1). These recombinant haplotypes defined the critical region of *FMA*. All 26 affected calves were homozygous for *MOK2607*, while at least one heterozygote was observed for the other five markers. In addition, all of the unaffected calves showed no homozygosity or compound heterozygosity of the *FMA*-associated haplotypes. These data indicated that the *FMA* locus is located in the interval between *BM4505* and *MOK2602*, 3.5 Mb apart from each other on BTA26 (Fig. 3).

As illustrated in Fig. 3, BTA26 has conserved synteny with human chromosome 10q and mouse chromosome 19. There are no loci known to be responsible for human hereditary myopathies or mouse mutants with muscular anomalies on these chromosomes. The clinical and pathological features of the cattle disorder showed some similarities with those of human limb-girdle muscular dystrophies (LGMD), but the genes responsible for human LGMD have been mapped on human chromosome 15q, 2p, 2q, 3p, 4q,

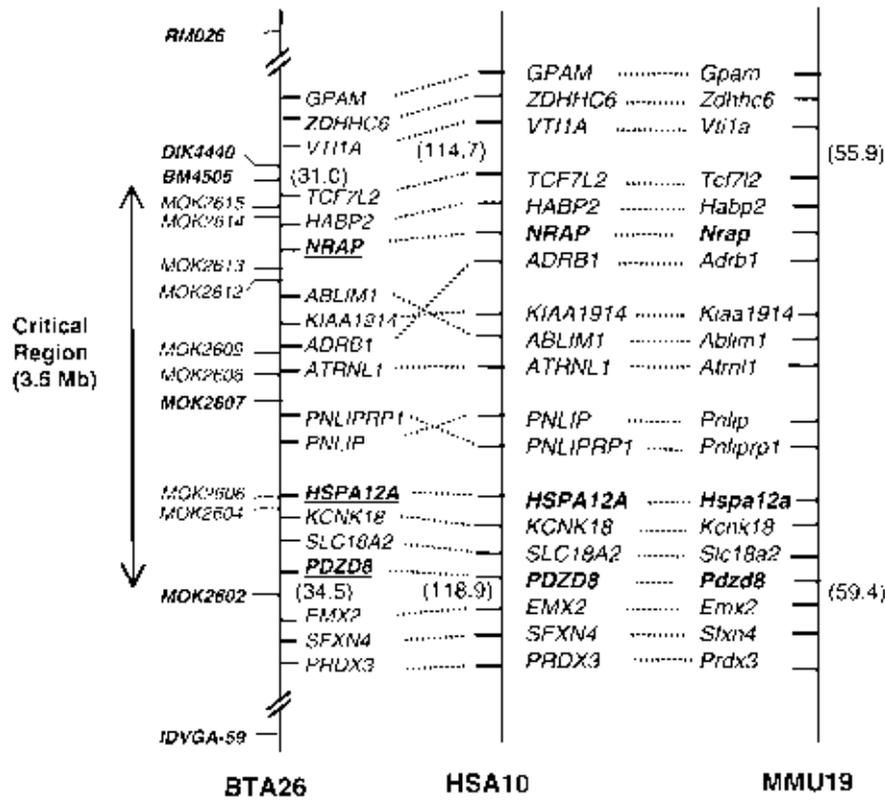


Figure 3 Chromosomal maps of the middle region of bovine chromosome 26 and the corresponding regions of human chromosome 10q and mouse chromosome 19. The positions of the microsatellite markers used in the linkage and haplotype analysis and genes in this region are shown on the bovine map (left). The *FMA* critical region determined by the haplotype analysis is denoted by an arrow. Maps of the corresponding human and mouse regions are shown in the middle and to the right, respectively. Map positions shown in Mb indicate physical distance from the centromeres.

5q, 13q and 19q (Beckmann *et al.* 1991; Azibi *et al.* 1993; Lien *et al.* 1995; Mariashvili *et al.* 1996; Passos-Bueno *et al.* 1996; Haravuori *et al.* 1998; Minetti *et al.* 1998; Driss *et al.* 2000), but not on 10q. Therefore, the cattle disorder appeared not to be caused by a mutation in one of the genes for human LGMD, suggesting a novel gene that has not been involved in human or mouse myopathies.

Several potential candidate genes for *FMA*, including the *nebulin-related anchoring protein* (*NRAP*), *PDZ domain containing 8* (*PDZD8*) and *heat shock protein 12 A* (*HSPA12A*) genes, were identified in the critical region (Fig. 3). Nebulin-related anchoring protein is a muscle-specific protein concentrated at myotendinous junctions in skeletal muscle and serves as a link between the terminal actin of the myofibril and protein complexes at the cell membrane (Luo *et al.* 1999; Lu *et al.* 2003). PDZ domain containing 8 belongs to a group of proteins containing PDZ modular protein interaction domains, which interact with the F-actin cytoskeleton through their interactions with the ezrin-radixin-moesin proteins (Gamer *et al.* 2000; Levi 2003). Heat shock protein 12 A is a member of the heat shock protein family, which could affect actin polymerization in cytoskeleton through interaction with actin-binding proteins (Craig *et al.*

1993; Haus *et al.* 1993). Because these genes have significant involvement in muscular structure and function, sequence analysis of these candidate genes will further advance the discovery of the causative mutation for *FMA* and novel mechanisms regarding muscular development. Identification of the causative mutation will also lead to the reduction of the disorder through a DNA-based diagnosis for identifying carriers. The present finding of the localization of the *FMA* locus on BTA26 is an essential step towards identification of the causative gene and establishment of a DNA-based diagnosis system.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from the Livestock Improvement Association of Japan.

References

Abbasi A.S., Ihara N., Watanabe T. *et al.* (2005) Linkage mapping of the locus responsible for congenital multiple ocular defects in cattle on bovine chromosome 18. *Mammalian Genome* **16**, 731–7.

- Azibi K., Bachner L., Beckmann J.S. et al. (1993) Severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with the deficiency of the 50 kDa dystrophin-associated glycoprotein maps to chromosome 13q12. *Human Molecular Genetics* 2, 1423–8.
- Bauer K., Kratzer M., Olie M. et al. (2000) Human CFP36, a PDZ-domain and LIM-domain protein, binds to γ -actinin-1 and associates with actin filaments and stress fibers in activated platelets and endothelial cells. *Blood* 96, 1236–45.
- Beckmann J.S., Richard I., Hillaire B. et al. (1991) A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 312, 141–8.
- Chuzelhill G.A. & Daerge R.W. (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138, 963–71.
- Craig L.A., Gambi B.D. & Nelson R.J. (1993) Heat shock protein: molecular chaperones of protein biogenesis. *Mitochondrial Reviews* 57, 402–14.
- Driss A., Amouri C., Hamida C.B. et al. (2000) A new locus for autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy in a large consanguineous Tunisian family maps to chromosome 19q13.3. *Neuromuscular Disorders* 10, 240–6.
- Haley C.S., Knott S.A. & Eason J.M. (1994) Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* 136, 1395–207.
- Hannavuori H., Mäkelä-Bengs P., Udd B. et al. (1998) Assignment of the tibial muscular dystrophy locus to chromosome 2q31. *American Journal of Human Genetics* 62, 620–6.
- Haus U., Tröndler P., Fisher P.R. et al. (1993) The heat shock cognate protein from *Drosophila* affects actin polymerization through interaction with the actin-binding protein cap32/34. *The EMBO Journal* 12, 3763–71.
- Hirano T., Kobayashi N., Foh T. et al. (2000) Bovine chronic interstitial nephritis results from null mutation of PCIN-1/Claudin-16. *Genome Research* 10, 659–65.
- Hiraoan H., de Koning D.J., van Arendonk J.A., Harlizius B., de Groot P.N. & Beverbus H. (2002) Genome scan reveals new coat color loci in exotic pig cross. *Journal of Heredity* 93, 1–8.
- Ihara N., Takasuga A., Mizoshita K. et al. (2004) A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Research* 14, 1987–98.
- Illaroslavin S.N., Ivanova-Smolensskaya L.A., Tanaka H. et al. (1996) Clinical and molecular analysis of a large family with three distinct phenotypes of progressive muscular dystrophy. *Bone* 19, 1895–909.
- Kaneda T. (2005) Identification of gene responsible for hereditary disease in Japanese beef cattle. *Animal Science Journal* 76, 523–33.
- Kaneda T., Nakagiri M., Takami M. et al. (1999) Cloning of bovine *DYST* gene and identification of a missense mutation associated with Cheudak-H gashi syndrome of cattle. *Mammalian Genome* 10, 1146–9.
- Levi M. (2003) Role of PDZ domain containing proteins and LIM proteins in regulation of renal function and dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology* 14, 1949–51.
- Lim L.E., Dackiw E., Broux O. et al. (1995) Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nature Genetics* 11, 257–65.
- Lu S., Caspi S.L., Gerner A.H. et al. (2004) New N-RAP binding partners γ -actinin filament and Krpl detected by yeast two-hybrid screening: implications for myofibril assembly. *Journal of Cell Science* 116, 2169–78.
- Luo G., Herrera A.H. & Honowatz R. (1999) Molecular interactions of N-RAP, a nebulin related protein of striated muscle myotendon junctions and intercolated desms. *Biochemistry* 38, 6135–43.
- Manni C., Sotgiu E., Russo C. et al. (1998) Mutations in the *catenin-3* gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nature Genetics* 18, 365–8.
- Ogawa H., Tu C.H., Kagamizono H. et al. (1997) Clinical, morphologic, and biochemical characteristics of Cheudak-H gashi syndrome in fifty six Japanese black cattle. *American Journal of Veterinary Research* 58, 1221–6.
- Ohba Y., Kitagawa H., Kishi K. et al. (2000) A deletion of the *paracitin-1* gene is responsible for renal tubular dysplasia in cattle. *Genomes* 68, 229–36.
- Ohba Y., Kitagawa H., Okura Y. et al. (2001) Clinical features of renal tubular dysplasia, a new hereditary disease in Japanese Black cattle. *Veterinary Record* 149, 115–8.
- Passos Bueno M.R., Moreira C.S., Valzuel M. et al. (1996) Linkage analysis in autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (AR LGMD) maps a sixth form to 5q33–34 (LGMD2F) and indicates that there is at least one more subtype of AR LGMD. *Human Molecular Genetics* 5, 815–20.
- Uchida K. (2005) Hereditary diseases in animals: limb-girdle muscular anomaly of Japanese black cattle. *Proceedings of Society for Veterinary Clinical Genetics* 9, 7–11. (in Japanese).
- Uchida K., Kaneda T., Abbas A.R. et al. (2006) Congenital multiple ocular defects with Ederstrom retinal folds among Japanese Black Cattle. *Veterinary Pathology* 43, 1017–21.
- Visscher P.A., Thompson R. & Haley C.S. (1996) Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics* 143, 1513–20.

Fine-mapping of a marbling trait to a 2.9-cM region on bovine chromosome 7 in Japanese Black cattle

T. Hirano*, T. Watanabe*, K. Inoue¹ and Y. Sugimoto*

*Shirakawa Institute of Animal Genetics, Odakura, Nishigo, Fukushima 961-8061, Japan; ¹Miyazaki Prefectural Livestock Research Institute, Hirohara, Takaharu, Miyazaki 889-441, Japan

Summary

To locate quantitative trait loci (QTL) for intramuscular fat deposition (marbling) in a local population of Japanese Black cattle, we performed a genome scan using a paternal half-sib family of Bull A. A marbling QTL was mapped in the region flanked by *DIK0079* (20.7 cM) and *TGLA3031* (39.3 cM) on bovine chromosome (BTA) 7, affecting 5.0% of the total family variance. Haplotype analysis of the QTL region revealed that the marbling-increasing Q allele was transmitted from the dam. On the other hand, Bull B, a maternal half-sib of Bull A, did not receive the Q allele from its dam, based on the following findings: (i) a marbling QTL on BTA7 was not detected in the Bull B paternal half-sib family; (ii) recombination between *DIK0079* (20.7 cM) and *RM006* (25.4 cM) in the QTL region was observed in the maternal chromosome of Bull B; and (iii) the Q-harboring steers from Bull A exhibited significantly higher marbling than the steers from Bull B and the remaining steers from Bull A. To precisely compare the maternal chromosomes of both bulls, we constructed a bacterial artificial chromosome contig covering the region between *DIK0079* and *RM006* and developed DNA markers. The recombination occurred between *DIK042* and *DIK044*, indicating that the marbling QTL was in a 2.9-cM region flanked by *DIK0079* and *DIK044*.

Keywords half-sib family, intramuscular fat deposition, Japanese Black cattle, quantitative trait loci.

Quantitative trait loci (QTL) mapping studies have been extensively performed in beef cattle. Studies using experimental crosses between the relatively different *Bos indicus* and *Bos taurus* breeds have identified many significant QTL [e.g. Keele *et al.* 1999; Stone *et al.* 1999; Casas *et al.* 2005; the Bovine QTL Viewer (<http://bovinexjv2.tamu.edu/index.html>)]. The phases of the associated haplotypes, however, are different between the lines of the *Bos taurus* breeds (Li *et al.* 2002), resulting in difficulties narrowing down the QTL using this method. On the other hand, the progeny design simulated by Weller *et al.* (1990) and Moody *et al.* (1997) is useful for mapping QTL using paternal half-sib families in purebred Japanese Black cattle populations (Mizoshita *et al.* 2004; Mizoguchi *et al.* 2006; Takasuga *et al.* 2007). We constructed two paternal half-sib

families of a Japanese Black cattle population in a local area. Bull A and Bull B were half-sibs. Here, we report mapping QTL for marbling and fine-mapping of the QTL using these half-sib families.

The steers were slaughtered at approximately 29 months of age. The marbling trait was estimated by the beef marbling standard (BMS), according to Japan's meat grading system as described previously (Mizoshita *et al.* 2004). BMS was scored on a scale from 1 to 12, in which higher numbers correspond to more marbling. Breeding values were not available, and we used raw BMS scores as phenotypic data. Adipose tissue, carcass data and pedigree records for each steer were collected at the slaughterhouses. Genomic DNA was extracted from blood, adipose tissue or semen according to standard protocols. The DNA concentration was adjusted to 20 ng/µl. The DNA samples were used as templates for polymerase chain reaction (PCR). For genotyping microsatellite markers, the PCR conditions were optimized as previously described (Kappes *et al.* 1997; Itharu *et al.* 2003). Electrophoresis was performed using a model 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Genotype data

Address for correspondence

T. Hirano, Shirakawa Institute of Animal Genetics, Odakura, Nishigo, Fukushima 961-8061, Japan.
E-mail: takashi@siag.or.jp

Accepted for publication 26 September 2007

were captured using GENSCAN and GENVIEW software (Applied Biosystems). Correction of genotype errors, reconstruction of haplotypes and *F*-statistic profiling were performed using the interval mapping method for half-sib families (Haley *et al.* 1994; Seaton *et al.* 2002). Marker locations were obtained from the Shirakawa-CSDA bovine linkage map (Hara *et al.* 2004). The statistical model for QTL mapping was that of linear regression of the phenotypic value on the probabilities of QTL genotypes at a given location, as described previously (Mizoshita *et al.* 2004; Mizoguchi *et al.* 2006; Takasuga *et al.* 2007). The linear regression analysis was performed using the following model:

$$y_i = \mu + \text{Prob}(Q)_i a + e_i$$

where y_i is the phenotypic value, μ is the fixed effect, a is the allele substitution effect from q to Q , $\text{Prob}(Q)_i$ is the probability of Q phase at a given location and e_i is the residual error for the i th individual. An *F*-statistic value was calculated from the minimum sum of squares of residual errors under the model, with the least-squares estimators of μ and a , and the minimum sum of squares under the null model corresponding to no QTL, where $a = 0$ is assumed. The threshold for significance of the *F*-statistic value was obtained by 10 000 random permutations of the phenotypic data (Churchill & Doerge 1994). The QTL location with 95% confidence intervals was estimated by the bootstrap method (Visscher *et al.* 1996). Bacterial artificial chromosome (BAC) clones were isolated from the RPCI-42 (<http://bacpac.chori.org/bovine42.htm>) and the CHORI-240 (<http://bacpac.chori.org/bovine240.htm>) bovine BAC libraries using the PCR-based screening method. BAC end sequences were determined with T7 or SP6 primers. BAC

DNA was digested with *AluI*. DNA fragments in the size range of 300–500 bp were purified and ligated into pBlue-script (SK+) vector (Stratagene). The microsatellite-containing plasmid DNA was probed with poly(dA-dC) and poly(dG-dT) (GE Healthcare), and the presence of (GT/CA) $_n$ repeats was confirmed by sequencing.

We performed a genome scan using 246 steers from Bull A and 157 informative microsatellite markers covering all autosomes. A QTL for marbling was mapped on BTA7 (22 cM) at the 1% chromosome-wise significance level in the family. To further confirm the QTL, five additional informative markers were placed on a region from 0 to 135.6 cM (total 15 markers), and 435 steers from Bull A were genotyped as a second screen (Fig. 1a). The *F*-value was increased at the same region (30 cM; 0.1% chromosome-wise significance). Q to q allele substitution effect was 0.94, and the contribution ratio of the QTL was 5.0%, indicating that the QTL exhibits a relatively large effect. The 95% confidence interval for the QTL was calculated as the region from 20.7 to 39.3 cM (flanked by *DIK0079* and *TGLA303* (18.6 cM)). These steers were classified into two groups depend on paternal alleles of *RM006* (allele 3 and allele 4; 25.4 cM). The average BMS of steers harbouring the allele 4 (7.81 ± 4.22 ; $n = 170$) was significantly higher than that of other steers (6.90 ± 4.22 ; $n = 200$; $P < 0.01$), indicating that a haplotype having allele 4 is BMS-increasing Q .

To further characterize the BMS-increasing Q haplotype in the 18.6-cM region, we reconstructed BTA7 haplotypes of Bull A using the genotypes of the 15 microsatellites in the second screen. Ratios of identified paternal alleles ranged from 18.7% to 95.5%. The Q -harbouring haplotype was transmitted from its dam (Fig. 1b). Because

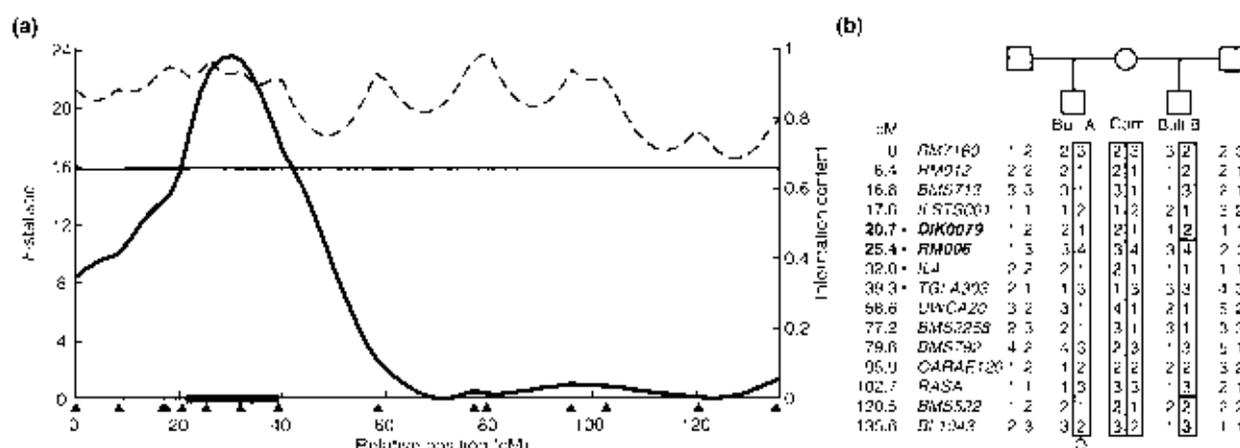


Figure 1 (a) The *F*-statistic profile for marbling detected by the second scan. The horizontal line indicates the threshold for the 0.1% chromosome-wise significance level. The dashed line indicates information content (right y-axis). Marker positions are indicated as triangles under the x-axis and were *BM7160*, *RM012*, *BMS713*, *ILSTS001*, *DIK0079*, *RM006*, *IL4*, *TGLA303*, *UWCA20*, *BMS2258*, *BMS790*, *OARAE126*, *RA5A*, *BMS522* and *BT1943* respectively. The filled box on the x-axis indicates the 95% confidence interval (22–38 cM). (b) Comparison of haplotypes in Bull A, Bull B and their dam. Haplotypes, enclosed by open and shaded boxes, were inherited from the dam. A star (*) indicates the markers located in the 95% confidence interval of the quantitative trait loci (QTL) flanked by *DIK0079* and *TGLA303*. The region flanked by *DIK0079* and *RM006*, shown by bold font, is the narrowed-down QTL region.

another sire employed in the same local area called Bull B was a maternal half-sib of Bull A, 231 steers from Bull B were examined using the 15 microsatellites including four homozygous (namely 11 informative microsatellites) and three additional informative microsatellites to determine whether the marbling QTL on BTA7 was replicated. However, the QTL was not detected in the Bull B family ($F < 0.61$, $P > 0.05$; 20–10 cM). Possible explanations for this finding are as follows: (i) the Q was not transmitted from its dam and (ii) the Q effect detected in the Bull A family was overestimated and false positive. To address the former one, we compared haplotypes of BTA7 in Bull B with Bull A (Fig. 1b). The genotypes of the 14 microsatellites ranging from 49.8% to 87.0% of identified paternal alleles were employed to reconstruct the haplotypes in Bull B. The identical maternal haplotype between Bull A and Bull B was observed from *RM006* (25.4 cM to *RAS1* (102.7 cM). It is possible that the Q from the dam was not transmitted to Bull B because of the recombination between *DIK0079* and *RM006* in the 18.6-cM QTL region. To address the latter one, BTA7 chromosomes were reconstructed for each of the steers from Bull A, and the Q-harboring steers were determined according to the haplotypes in the QTL region (18.6 cM). Of 425 steers, the paternal haplotypes of 325 were identified, and 178 were revealed to harbour the Q allele. Of 231 steers from Bull B, the paternal haplotypes of 158 were identified. The Q-harboring steers from Bull A exhibited significantly higher BMS distribution (average BMS = 7.76 ± 2.05 , $P < 0.01$) than the 147 non-Q-harboring steers from Bull A (average BMS = 6.93 ± 1.73), the 89 steers from Bull B transmitted the paternal haplotype of Bull B (average BMS = 6.35 ± 1.87) and the 69 steers from Bull B transmitted the maternal haplotype of Bull B (average BMS =

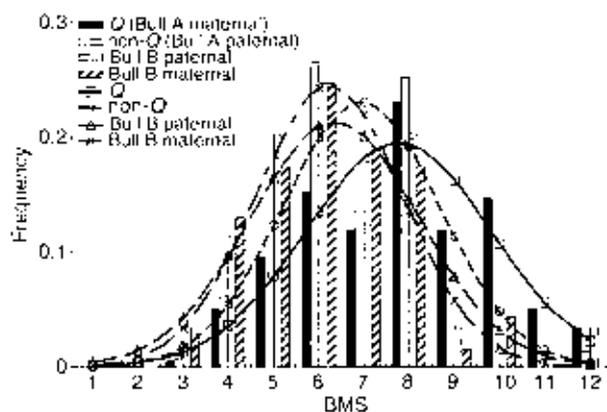


Figure 2 Distribution of marbling BMS score among 178 steers harbouring the Q allele (filled box and open squares), 147 non-Q-harboring steers from Bull A (open box and open circles), 89 steers from Bull B exhibiting the paternal haplotype of Bull B (shaded box and open triangles) and 69 steers from Bull B exhibiting the maternal haplotype of Bull B (hatched box and crosses)

6.23 ± 1.63) respectively (Fig. 2), indicating that the Q allele in Bull A exhibited the BMS increasing effect. Taken together, the Q allele was not transmitted to Bull B because of the recombination between *DIK0079* and *RM006*, so the QTL region could be narrowed to a 4.7-cM region flanked by *DIK0079* and *RM006*.

To precisely compare the maternal haplotypes of both bulls, we constructed a BAC contig covering the region between *DIK0079* and *RM006*, and developed microsatellite markers (Fig. 3a). *DIK0079*, *RM006* and 24 bovine expressed sequence tags for orthologous genes located on a human syntenic region were used to screen the BAC library. The sequence-tagged sites (STSs) that were developed from end sequences of isolated BAC clones were used to screen overlapping BAC clones. The contig was composed of 52 tiled BAC clones, and the region corresponded to the S.22-Mb region of HSA19 spanning p13.3–p13.13. We developed 64 microsatellite markers from the BAC clones. The marker order was determined according to their positions in the BAC contig. Of these microsatellite markers, 27 markers were located between *DIK0079* and *RM006*, and were heterozygous in the dam. Haplotypes of Bull A, Bull B and their parents using the 27 microsatellites were compared (Fig. 3b). The recombination site in Bull B was located between *DIK8042* and *DIK8044*, which narrowed down the QTL region to the region flanked by *DIK0079* and *DIK8044*. The distance between *DIK0079* and *DIK8044* was calculated to be 2.9 cM (Kosambi's function) using 381 paternal half-sibs, and the region corresponded to approximately 5.3 Mb in the human genome. According to Bovine Genome Resources (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/cow/>), the 2.9-cM critical region contained approximately 110 genes including *JUNB*, *LDLR*, *INSR* and *RETN*. Our next step will be to compare the sequences of those genes related to the Q and non-Q alleles, followed by examination of the expression profiles. Because the paternal haplotype of Bull B from *DIK0079* to *DIK8042* harbouring no Q allele looked the same as the Q region in Bull A, the region from *DIK0079* to *DIK8042* might be excluded from QTL region. However, there was no evidence suggesting that they were identical-by-descent. Therefore, the QTL region cannot be narrowed to a region flanked by *DIK8042* and *DIK8044* at this moment, and we concluded that the marbling QTL was in the 2.9-cM region flanked by *DIK0079* and *DIK8044*. Identification of a responsible gene for marbling should provide an efficient selection method and valuable information to understand the molecular mechanisms underlying marbling.

Acknowledgements

The authors would like to thank Chiyoko Itoh, Aki Takada and Fumie Maehara for technical assistance. This study was supported by grants from the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

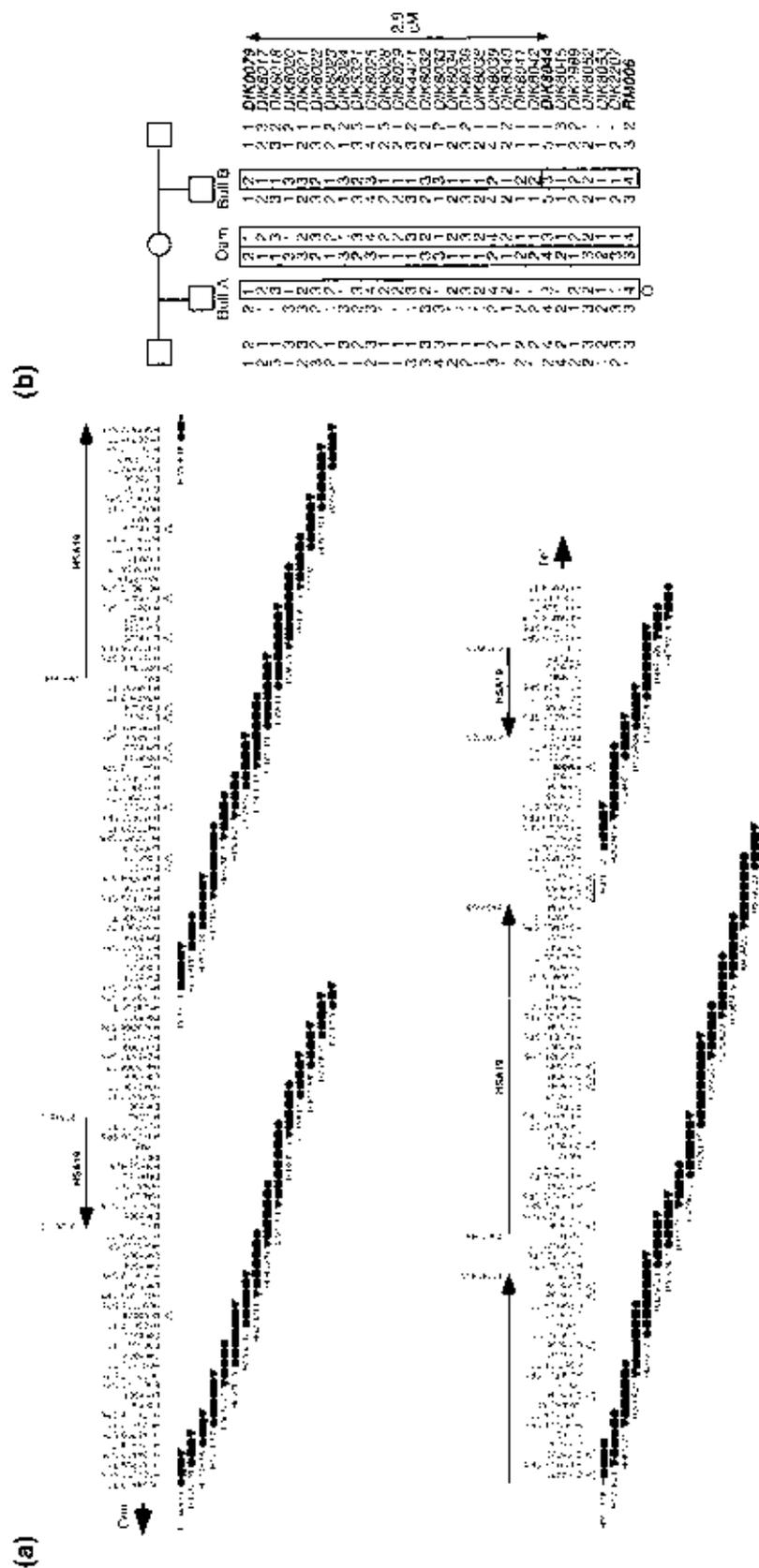


Figure 3 (a) Bacteria artificial chromosome (BAC) contig map covering the 4.7-cM marbling quantitative trait loci (QTL) region. Filled boxes indicate microsatellite markers, 24 exons/seq sequence tags and sequence-tagged sites (STS) derived from BAC clone sequences. Filled circles and triangles indicate the T7 and SP6 ends of BAC clones respectively. The microsatellites, named from D1K80079 to D1K80086, were newly developed in this study. The microsatellites used for haplotype reconstruction are shown by open triangles under the STS name. The gene order in HSA*9 is represented by the arrow above the STS names. (b) Comparison between haplotypes of Bull A, Bull B and their parents using newly developed microsatellite markers. Haplotypes enclosed by open and shaded boxes were mapped from the dam. The QTL region was narrowed to a region flanked by D1K80079 and D1K80084.

References

- Casis E., Shackelford S.D., Keele J.W., Koshimaraie M., Smith T.P.L. & Stone R.T. (2003) Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *Journal of Animal Science* **81**, 2976–83.
- Churchill G.A. & Doerge R.W. (1996) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* **138**, 963–71.
- Haley C.S., Knott S.A. & Tsuris J.M. (1994) Mapping QTL in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* **136**, 2195–207.
- Ihara N., Takasuga A., Mizoshita K. et al. (2004) A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 1802 microsatellites. *Genome Research* **14**, 1987–98.
- Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., McGraw R.A., Sonstegard T.S., Smith T.P.L., Lopez-Corralés N.L. & Beatle C.W. (1997) A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research* **7**, 235–49.
- Keele J.W., Shackelford S.D., Kappes S.M., Koshimaraie M. & Stone R.T. (1999) A region on bovine chromosome 15 influences beef longissimus tenderness in steers. *Journal of Animal Science* **77**, 1361–77.
- Li C., Basarab J., Snelling W.M., Benkel B., Murdoch B. & Moor S.S. (2002) The identification of common haplotypes on bovine chromosome 5 within commercial lines of *Bos taurus* and their associations with growth traits. *Journal of Animal Science* **80**, 1187–94.
- Mizoguchi Y., Watanabe T., Tamaki K., Iwamoto F. & Sugimoto Y. (2006) Mapping of quantitative trait loci for carcass traits in a Japanese Black (Wagyu) cattle population. *Animal Genetics* **37**, 51–4.
- Mizoshita K., Watanabe T., Shibata C., Yamakuchi H., Isidoroki J. & Sugimoto Y. (2004) Quantitative trait loci for growth and carcass traits in a half-sib family constructed from purebred Japanese Black (Wagyu) cattle population. *Journal of Animal Science* **82**, 3415–20.
- Moody D.E., Pomp D. & Buchanan D.S. (1997) Feasibility of the grandprogeny design for quantitative trait loci (QTL) detection in purebred beef cattle. *Journal of Animal Science* **75**, 941–9.
- Seaton G., Haley C.S., Knott S.A., Kearsey M. & Visscher P.M. (2002) QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Biometrics* **18**, 339–40.
- Stone R.T., Keele J.W., Shackelford S.D., Kappes S.M. & Koshimaraie M. (1999) A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci for carcass and growth traits. *Journal of Animal Science* **77**, 1379–84.
- Takasuga A., Watanabe T., Mizoguchi Y. et al. (2007) Identification of bovine QTL for growth and carcass traits in Japanese Black cattle by replication and identical-by-descent mapping. *Mammalian Genome* **18**, 125–36.
- Visscher P.M., Thompson R. & Haley C.S. (1996) Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics* **143**, 1073–20.
- Weiler J.L., Kashi Y. & Soller M. (1990) Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **73**, 2525–37.

動物遺伝研究所年報
第15号（平成19年度）

平成20年10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

