



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 16 号
(平成20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20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。

これまで当研究所は、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、不良因子であるクローディン-16 欠損症のDNA 診断法を開発し、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。

平成20年度の大きな動きは、当研究所と国際コンソーシアムの努力によってウシゲノムの解読をほぼ完成させ、論文発表の段階に至ったことです（平成21年4月の *Science* 誌に掲載）。この成果をベースに、5万個（50K）という多数のDNA マーカーを搭載した50K SNP（一塩基多型）チップが開発されました。このチップの出現で、以前から提案されていたゲノム選抜法が現実のものとなり、乳牛の育種現場で応用される動きとなりました。QTL 責任遺伝子を同定することは依然として困難ではありますが、SNP 情報を使うゲノム選抜法によりQTL 責任遺伝子はわからなくとも個体毎の育種価を正確に予測できるかもしれません。今後、50K SNP から700K SNP へとパワーアップすることで詳細なSNP 情報が得られるようになり、そのSNP 情報を乳牛だけでなく肉牛でもいかに活用するかが重要となってくると思います。「牛有用ゲノム等探索・知的財産化事業（H18-20）」はまさにこの潮流の先駆けの事業であり、その成果を本年報で報告しています。

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21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 20 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
第 2 節 平成 20 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 診断法の開発	6
3) 肉用牛経済形質の DNA 育種手法の開発	12
4) ウシ抗病性遺伝子座の解析	19
5) ウシ全ゲノムを対象とする相関解析	20
2. 平成 20 年度研究発表	24
1) 論文発表	24
2) 学会発表	24
3) 学会発表要旨	26
3. 研究の解説「ゲノムワイド相関解析について」.....	37
4. 委員会・会議等の開催	44
1) 育種推進検討委員会	44
2) 技術推進委員会	45
3) 牛有用ゲノム等探索・知的財産化事業技術推進委員会	45
4) 全国 DNA 育種推進会議	46
5) 研究会等の開催	48
5. 委託研究	49
6. 研修員の受け入れ	51

第3節 総務

1. 職員名簿 53
2. 職員の異動 53
3. 職員の海外出張 54
4. 施設・機器の整備 54
5. 購読雑誌一覧 57

第4節 資料

1. 論文再録 59

第1節 設立の経緯と沿革

第 1 節 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。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。一方、ゲノム研究の進展に伴い、家畜においても遺伝地図の作成が急速に進み、DNA マーカーと経済形質に關与する遺伝領域あるいは遺伝子座 (QTL) との連鎖解析が可能になった。連鎖解析が進めば、DNA マーカーを指標として、育種目標に適合した遺伝子型を選抜する新しい育種法の開発が期待できる。また、DNA マーカーを指標とした遺伝性疾患原因遺伝子のキャリアのスクリーニングも可能になる。

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

平成 4 年度から開始された研究のプロジェクトは、ウシ個体識別システムの開発から始まり、遺伝性疾患の DNA 診断法の確立や肉質等経済形質のゲノム解析へと順次拡大されてきた。個体識別システムの開発では多数の 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證する基本的な技術ともなっている。遺伝性疾患では、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 DNA 診断法を開発した。平成 6 年度から経済形質の解析が始まったが、この過程で都道府県の畜産研究機関と始まった共同研究は、現在に至るまで継続され、当研究所の研究進展にとって不可欠な中核となっている。経済形質の解析では、脂肪交雑や枝肉重量に關与する 60 個以上の QTL を位置づけ ($P < 0.01$)、各 QTL の効果の推定を試

み、QTL の遺伝子そのものを同定すべく努力を続けている。

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病のキャリア診断技術の開発などを進め、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進めてきた。牛肉の品種鑑定では、我が国の肉用牛として飼養されている黒毛和種・ホルスタイン種・黒毛和種とホルスタイン種間の交雑種の 3 者間を DNA 情報で鑑別する技術を確立することに成功した。

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。ウシゲノム解析は全ゲノムの解読に伴うツールの整備によって解析手法そのものも家系解析からゲノムワイド相関解析へ発展している。平成 20 年度において、この潮流にどのように対応したか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 20 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 7 名）となった。

第2節 平成20年度の動き

第2節 平成20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) ウシ全ゲノム配列の解読と SNP 開発

(1)-1. 海外の状況（米国・サンディエゴ、2009年1月）

次世代型 DNA シーケンサーの登場で、これまで以上に様々な種、あるいは品種のゲノム配列が読まれつつある。ウシに関しては、米国テキサスにある Baylor 医科大のヒトゲノムシーケンシングセンターにより、すでに従来型 DNA シーケンサーを用いて 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）と 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）でゲノムの 7.1 倍長の配列が読まれており、2007年10月に Btau_4.0（4回目の更新）のゲノム配列が公開されている。Btau_4.0は、EST（expressed sequence tagの略。発現している遺伝子の配列の一部。）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るが、配列中には小さなギャップや多少のつなぎ間違い（アセンブルエラー）が残されている。ゲノム配列中にアセンブルされなかった配列は、染色体不明（Chr_unknown）として区分されている。

米国メリーランド大では、種々のアセンブラーソフトウェアと Composite map（注1）を用いて独自に配列をつなぎ、UMD_Freeze_2.0を2008年11月に公開した。これは、Btau_4.0に比べて、約7%多くの配列を含んでいる。特に、X染色体でBtau_4.0より多くの配列を含んでおり、また、26番と27番染色体では、Btau_4.0と配列が逆位になっている箇所が存在している。Composite mapには含まれていない UMC 連鎖地図におけるマーカー位置は UMD_Freeze_2.0と一致していることから、UMD_Freeze_2.0は、現時点で最も質の良いゲノム配列といえる。

ゲノム配列をより完成度の高いものにするために、Baylor 医科大のヒトゲノムシーケンシングセンターでは、次世代型 DNA シーケンサーを用いて約 13 Gb の配列を読む予定である。現在、次世代型 DNA シーケンサーを用いて、米国農務省農業研究局（USDA-ARS）がホルスタイン種のゲノム配列を、米国ミズー

り大がアンガス種の cDNA の配列を読んでおり、これらも加えてゲノム配列の更新を行う予定だという。

(注 1) Composite map は、当研究所が発表した Shirakawa-USDA 連鎖地図 (4,881 マーカー)、SUN-RH 地図 (5,513 座)、および、Alberta-Missouri (UAMU)連鎖地図 (2,564 マーカー)、BovGen RH 地図 (9,190 座)、Illinois-Texas (ILTX-2005) RH 地図 (3,484 座) を米国農務省肉畜研究所 (USDA-MARC) が統合したものである。Btau_3.0 では Composite map が使われていたが、Btau_4.0 では、ILTX RH 地図と BAC FPC 地図、ヒトやイヌゲノムとのシンテニー情報などが使われている。

一方、ウシゲノム配列 Btau_4.0 のアノテーション (注釈付け) は研究者の自発参加で行われ、コンソーシアムによるウシゲノム配列解読の論文が現在投稿中である (当研究所との共同研究)。それによると、ウシの染色体では、ヒトやマウスなどの他の種に比べて segmental duplication が多く起こっており、そこに含まれていた遺伝子が重複されることによって遺伝子ファミリーとなっている。その多くは自然免疫に関与するもので、結果として、ウシはヒトやマウスより自然免疫に関与する遺伝子を多種類持っている。それらは、ウシが反芻胃動物として進化する過程で、反芻胃の微生物発酵に適応して代謝や免疫を変化させるのに必要であったと考えられる。

SNP チップについては、次世代型 DNA シーケンサーによるホルスタイン種、アンガス種、その他交雑肉牛品種のリシーケンシングによる SNP 開発を経て、2007 年 12 月にイルミナ社から市販されるようになった。これを用いて、アメリカでは、ホルスタイン種の種雄牛選抜を、従来の育種価による選抜法からゲノム選抜法に移行しようとしている。ゲノム選抜というのは、種雄牛数千頭についての各 SNP の遺伝子型と育種価との相関から種雄牛候補牛の能力を評価し、選抜するというものである。ある程度の正確度が保たれば、育種価選抜に比べて、後代の成績を得るまでの時間やコストを削減できるのでメリットは大きい。遺伝子型検査にかかる費用を減らすために、効果の大きい方から 384 個の SNP を用いて種雄牛の能力を推定するという。

肉牛では、乳牛ほど多くの頭数が飼養されていないため、ゲノム選抜は行われていないが、Taylor ら (ミズーリ大) は、アンガス種の種雄牛約 2,000 頭のタイプングを行い、脂肪交雑については 129 個の SNP で 59%の遺伝分散が説明

できるとしている。

(1)-2. 今後の進め方

ホルスタイン種、アングス種の解析は、50K SNP チップで十分だが、品種間マッピングには 300K SNP が必要との試算もある (de Roos ら、*Genetics*, **179**: 1503-1512, 2008)。黒毛和種については、50K SNP の多型性は他品種とほぼ同等で、枝肉重量 QTL のように他品種にも存在している QTL の解析には有効であるが、脂肪交雑のように黒毛和種に特有の形質のマッピングについては、その有用性を早期に検証する必要がある。また、黒毛和種では互いの個体に血縁関係があるために集団の構造化が起こりやすく、解析個体の選択に工夫が必要であることがわかってきている。種々の解析方法を試み、解析法を確立する必要がある。

(2) ウシ遺伝子の発現プロファイル

(2)-1. SAGE によるウシ脂肪細胞分化遺伝子プロファイル

黒毛和種における脂肪交雑の形成はきわめて重要で、筋間組織における脂肪細胞分化が必須のプロセスと推定されている。脂肪細胞分化の分子生物学的研究はマウス 3T3-L1 細胞で行われ、その経路や調節機構など明らかにされている。しかしながら、3T3-L1 細胞分化系は内臓白色脂肪モデルであり、ウシの脂肪交雑モデルとは考えにくい。麻生ら (*Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **213**: 369-375, 1995) は黒毛和種牛筋間組織由来の脂肪前駆体細胞 (BIP 細胞) を確立し、マウス 3T3-L1 との違いを報告してきた。われわれは BIP の脂肪細胞分化を脂肪交雑のモデルと位置付け、分化に伴って発現の変化する遺伝子の網羅的なプロファイリングを行うことで脂肪交雑の分子機構解明を目指した。

プロファイリングは SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 法を用いて行った。SAGE 法は、シーケンシングにより遺伝子転写産物にユニークなタグ (3'-UTR の 14 塩基) の数をカウントすることで遺伝子発現量を計測する方法である。任意のタグが由来する遺伝子を特定するには全 mRNA 配列が既知である必要があるが、近年のウシゲノム解読の進展と共に RefSeq ライブラリーが充実し、タグの特定、さらにはタグの染色体へのマッピングが可能となった。

BIP 細胞分化前 (C2) と分化後 (S4) から作成した SAGE ライブラリーから

合計 157,161 タグ (C2: 75,283 個、S4: 81,878 個) を得、30,989 種のユニークなタグを検出した。分化に伴って 401 タグ (1.4%) の発現が増加し、477 タグ (1.2%) は減少した ($P < 0.05$)。

サブトラクション法により村山ら (*Differentiation*, **65**: 281-285, 2000)、山岸ら (*Animal Science Journal*, **76**: 479-489, 2005; Doctoral Thesis, Gifu University, Japan, 2006) は BIP 細胞分化後に発現が増加した遺伝子をいくつか報告したが、これらの遺伝子のうち、*CEBPD*、*COL18A1*、*SCD* などの発現増加が再確認された。Burton ら (*Gene*, **329**: 167-185, 2004) はマウス cDNA マイクロアレイを用い 3T3-L1 細胞分化における遺伝子発現の増加/減少を網羅的に調べたが、BIP 細胞分化においては 3T3-L1 の結果と一致しない遺伝子が多く見られた。これらの結果はウシ筋間組織における脂肪分化研究に重要な情報と考えられる。

高須賀ら (*Mammalian Genome*, **18**: 125-136, 2007) はウシ 4 番染色体 (BTA 4)、BTA 6、BTA 10 上において脂肪交雑 QTL の存在が複数の黒毛和種家系解析により支持されることを報告した。SAGE 法により発現増加/減少が見られた遺伝子のうち、15 個が上記の脂肪交雑 QTL 領域内にマップされた。これらの遺伝子は脂肪交雑 QTL の候補遺伝子になりうる。

(2)-2. 今後の進め方

今後は、次世代型のイルミナ社製シーケンサを用いて大量のタグを読むことでより多くの転写産物をゲノム上に位置づけ、脂肪分化関連遺伝子マップを製作する予定である。

2) ウシ遺伝性疾患の DNA 診断法の開発

(1) 研究年次：平成 9 年—平成 20 年

(2) 研究目的と期待される成果

ウシの遺伝性疾患の多くは常染色体性単純劣性遺伝病である。これまでに 5 種の疾患の原因遺伝子同定に成功しており、そのノウハウを生かして引き続き遺伝性疾患のキャリア (当該遺伝子をヘテロに保有する個体) を DNA 診断する手法を開発し、発症を防止する。

本事業では、これらの疾患、あるいは、疾患に対する感受性 (抵抗性) につ

いて、DNA を指標としたスクリーニング手法を開発すると同時に、さらに進んで遺伝性疾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19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19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)	37 kb 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	56 kb の欠損	あり	受理
軟骨異形成性矮小体躯症	褐毛和種	LIMBIN (新規)	1 塩基置換 1 塩基の 2 塩基置換	あり	受理
横隔膜筋症	ホルスタイン種	HSP70	11 kb の欠損	あり	受理

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

(3)-2 ウシ遺伝性疾患の解析に関わる平成 20 年度の成果

(3)-2-1. 乳頭欠損症（県との共同研究）

乳頭欠損症 (ATPP: Abnormal Teat Patterning Phenotype) は、2 対ある乳頭の 1 対 2 本または 1 本を欠損する不良形質である。特定の黒毛和種雄牛 A の産子で発生し、その頻度に性差がないことから、常染色体性の遺伝的不良形質と考えられた。種雄牛や繁殖雌牛を選抜する際の DNA 診断を可能にするためにゲノムスクリーニングを行い、これまでに BTA 17 セントロメア (ATPP-1)、BTA1 セントロメア (ATPP-3) とテロメア (ATPP-2) に関連領域をマップした (井原ら、*Animal Genetics*, **38**: 15–19, 2006)。また、これらの領域は発症牛でホモになっていなかったことから、単一劣性遺伝形質ではないことがわかった。解析に用いた全ての 2 本欠損個体 (47 個体) は父牛 A から ATPP-1 リスクハプロタイプを受け継いでおり、3 座位の中で乳頭欠損に最も大きく寄与していた。そこで、我々は、ATPP-1 のファインマッピングを試みた。

2 本欠損個体における組み換え情報を利用して、ATPP-1 領域のファインマッピングを行うために、2 本欠損個体 137 頭のハプロタイプを再構成し、種雄牛 A 由来ハプロタイプを比較した。その結果、ATPP-1 領域を 3.15 Mb にまで狭めた。この領域はヒト 4 番染色体に相当し、7 個の遺伝子が存在すると考えられた。また、種雄牛の父 (ATPP-1 リスクハプロタイプを持つ) を祖父とする別の種雄牛 B の産子から 2 本欠損個体が発生したことから、この 2 本欠損個体およびこの種雄牛 B のハプロタイプを調べることによって、さらに 2.04 Mb 領域にまで狭めた。ATPP-1 領域に位置する遺伝子は 6 個となった。これら遺伝子のうち、種雄牛 A でアミノ酸置換を伴う SNP が検出された遺伝子は *Gene_1* と *Gene_2* の 2 個であった。種雄牛 A 産子を用いてこれら遺伝子の SNP アレル頻度を調べた。*Gene_1* のアミノ酸置換を伴う SNP は、2.04 Mb 領域のリスクハプロタイプと同様の頻度を示し、表現型と相関すると思われたが、*Gene_2* の SNP や周辺他の SNP は、正常な表現型を示す個体にも高い頻度で存在していた。*Gene_1* が有力な候補遺伝子と考えられた。

(3)-2-2. 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、3 度目の頻発が繰り返された。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 個のマイクロ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、BTA 26 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、平成 19 年度までに候補領域を 3 Mb まで絞ったが、依然として多数の候補遺伝子が存在する（報告済み：Masoudi ら、*Animal Genetics*, **39**: 46-50, 2008）。そこで、平成 20 年度に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。

(3)-3. 今後の進め方

今年度までに黒毛和種の乳頭欠損発症のリスクとなる有力な候補遺伝子 *Gene_1* を見出した。今後は、リスク型 SNP によるアミノ酸置換が *Gene_1* タンパク質の機能に及ぼす影響を調べる予定である。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。

国内で発生している子牛の損耗対策が本事業の究極である。そのためにも包括的なサンプリングを行う必要がある。次年度から黒毛和種およびホルスタイン種の生後 20 日くらいで死亡した子牛死亡サンプルの収集を行い、劣性遺伝病の存在・免疫能の低下などの可能性を調べる。

(4) 国内および海外の状況

2006 年以降のウシ遺伝性疾病の状況を示す。ゲノム解析用のツールが充実し、また、ヒトなどでの遺伝病の解析が蓄積していることから、研究の進展が期待される。一方、依然として疾病の診断は難しく、類似の様相を示す複数の疾病、原因遺伝子の異なる疾病を解析の対象にしかねないという問題が残る。

1. 合指症 (Syndactyly)：ホルスタイン種やアングス種に見られる指の癒合で、常染色体性劣性遺伝病として知られている。テキサスウェスタン医科大学の Johnson ら (*Genomics*, **88**: 600-609, 2006) はアングス種で *Lrp4* のスプライシング部位変異を見出し、一方、フランス INRA の Duchesne ら (*Genomics*, **88**:

610-621, 2006) はホルスタイン種において同じ遺伝子 *Lrp4* の N1621K と G1622C の連続した 2 つのアミノ酸変異をそれぞれ合指症の原因として同定した。*Lrp4* は低密度脂質タンパク質レセプターのメンバーで、マウスにおいて多指症 (Polydactyly) の原因遺伝子として知られている。哺乳動物の四肢の形成に重要な役割を持つらしい。

2. 亜鉛欠乏症 (Zinc Deficiency : 遺伝性角化不全症、Hereditary Parakeratosis) : フリージアン種、Black Pied 種、ショートホーン種などに見られ、ヒトの亜鉛欠乏症の 1 つである Adema Disease と症状が似ていることから、亜鉛輸送体として働くその原因遺伝子 *SLC39A4* を候補として解析したところ、スプライシング部位変異を見出した (Yuzbasivan-Gurkan & Bartlett, *Genomics*, **88**: 521-526, 2006)。

3. 軟骨異形成矮小体軀症 (Chondrodysplasia Dwarfism) : 褐毛和種では本症の原因遺伝子として *LIMBIN* が同定された (竹田ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 49-54, 2002) が、英国のデキスター種に見られる同様な疾病であるブルドッグ子牛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た (Raadsma ら、*Mammalian Genome*, **18**: 808-814, 2007)。Aggrecan の第 11 エクソンにおける 4 塩基挿入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 (平成 19 年度年報に記載)。

4. 脊髄性筋萎縮症 (Spinal Muscle Atrophy) : ブラウンスイス種に見られる脊髄性筋萎縮症は常染色体性劣性遺伝病である。家系解析により 3 つの候補遺伝子まで絞り、*FVT1* (3-Ketodihydrospingosine Reductase) のアミノ酸変異 Ala175Thr を見出した。この reductase はスフィンゴシン糖脂質合成に不可欠な酵素で、このアミノ酸変異により活性が消失した (Krebs ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**: 6746-6751, 2007)。

5. ヤギ様形成不全症候群 (Caprine-like Hypoplasia) : 1999 年頃からフランスの Montbeliarde 種でヤギのような頭を特徴とする発育不全症が多発した。150 頭以上の発症牛を含む家系解析を行い、BTA 13 の 6 cM 領域にマップした (Duchesne ら、*Animal Genetics*, **39**: 112-120, 2008)。

6. 先天性筋緊張異常症 (Congenital Muscular Dystony) : Georges らは SNP チップ (イルミナ 60K SNP チップ及びアフィメトリックス 25K チップ) を用いて常染色体性劣性遺伝病のマッピングを行い、原因遺伝子の同定に成功した (*Nature Genetics*, **40**: 449-454, 2008)。Belgian Blue 種に見られる先天性筋緊張異常症 1 型 (CMD1) では発症個体 12 例を用い、2 型の CMD2 では発症個体 7 例を用いた。CMD1 では Ca^{2+} ポンプである *ATP2A1* の活性を無くすアミノ酸変異 Arg559Cys を見出した。また、CMD2 では、グリシントランスポーターである *SLC6A5* のグリシン輸送活性を無くすアミノ酸変異 Leu270Pro を見出した。

7. 胎児性魚鱗癬 (Ichthyosis Fetalis) ; 上記と同じ論文で Georges らは、イタリアのキアニーナ種で見られる胎児性魚鱗癬の発症個体 3 例を用いて SNP チップでマッピングし、ケラチン細胞で脂質輸送を行う *ABCA12* のアミノ酸変異 His1935Arg を見出した。この領域は ATP 結合に関わり、1935-His は生物種で保存されているので原因の変異と考えられた。

一方、Drogemuller ら (*Genomics*, **92**: 474-477, 2008) は、スイスのキアニーナ種で見られる胎児性魚鱗癬の原因として、同じ遺伝子である *ABCA12* に別のアミノ酸変異 Arg164His を見出した。この 164-Arg も広く保存されている。

8. クモ肢症 (Arachnomelia) : ブラウンスイス種に見られる常染色体性劣性遺伝病クモ肢症の発症個体 15 例を用いた家系解析で BTA5 の 7.19 Mb 領域にマップした (Drogemuller ら、*Mammalian Genome*, **20**: 53-59, 2009)。

9. 心筋症 (Cardiomyopathy and Woolly Haircoat Syndrome, CWH) : 無角ヘレフォード種で見られる心筋症は体毛が羊毛に見える特徴がある。13 発症個体を用い、ヒトの心筋症の原因遺伝子と知られている 7 つの遺伝子座周辺のホモザイゴシティーマッピングで BTA 18 の *PPP1R13L* を検出した。この遺伝子のエクソン 6 の 7 bp の重複が原因と考えられた。*PPP1R13L* は NF κ B interacting protein 1 であり、炎症や免疫応答などに関与することが知られている (Simpson ら、*Animal Genetics*, **40**: 42-46, 2009)。

10. 拡張型心筋症 (Dilated Cardiomyopathy) : ホルスタイン種の著名な種雄牛である ABC Reflection Sovereign を始祖とする常染色体性劣性遺伝病の拡張型

心筋症がマッピングされた。発症個体 304 例のパラフィン固定心臓組織からの DNA が用いられた。BTA 18 の 1.0 Mb まで狭められた (Owczarek-Lipska ら、*Mammalian Genome*, **20**: 187-192, 2009)。

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 20 年

(2) 研究目的と期待される成果

近年のゲノム解析研究の進展は、連鎖地図を用いて経済形質に關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てきた。経済形質に關与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を実用化する。

(3) 経済形質解析のための DNA サンプルの収集

平成 6 年度から道県 (19 道県、平成 20 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 サンプルを収集している。平成 20 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 サンプル数の累計は 3 万 8 千となった。

表 2. 平成 20 年度までの黒毛和種 DNA サンプル収集状況

年度	収集数
13-19 累計	31,657
20	6,559
合計	38,216

(4) ウシ経済形質解析

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、*Genetics*, **136**: 1195-1207, 1994）が優れている。肉牛の経済形質の QTL 解析を行う際は、しばしば複数形質を同時に解析するが、このような場合 false discovery rate (FDR) により偽陽性率を把握する必要がある。我々は QTL Express が持つ機能に加え、FDR 算出機能、LOD スコア算出機能、順位和検定機能、pleiotropic QTL 検出機能等を実装し、さらに結果の PDF ファイル出力など、利用者の利便性を向上させたしたプログラムである Glissado を開発した。

(4)-1. 父方半きょうだい家系を用いる経済形質 QTL マップの更新

道県等の共同研究機関と行ってきた父方半きょうだい家系を用いた経済形質 QTL のマッピングの成果を 2006 年にまとめ、経済形質 QTL マップを作成した。この間、複数家系で検出された（Replicate された）QTL は、優良ハプロタイプの比較と相関解析によって責任領域を狭められることが、枝肉重量 QTL CW-1 と CW-2、脂肪交雑 QTL *Marbling*-3 で示された。QTL マップ作成以降も、さらに多くの種雄牛について半きょうだい家系解析が行われ、新規 QTL の検出もしくは既に検出した QTL の確認がなされている。これらのデータを追加して QTL マップを更新することで、有用ゲノム領域に関する情報を共同研究機関内で共有し、また、次期の責任遺伝子探索のターゲットを探すことを目的としている。

今年度において、黒毛和種 9 家系のゲノムスキャンの結果と黒毛和種 3 家系および褐毛和種 2 家系の染色体スクリーニングの結果を追加した。その結果、更新 QTL マップは、24 家系のゲノムスキャンと 6 家系の染色体スクリーニングの結果から成り、用いた産子数は総数 12,960 頭となった（図 1）。

検出された QTL を、Lander & Kruglyak (*Nature Genetics*, **11**: 241-247, 1995) の基準に沿ってまとめると、「有意な連鎖」は、ゲノムレベル 5%有意を超えたものであり、79 個となった（都合上、2 次スクリーニングで染色体レベル 0.01%有意を超えたものも含めた）。これ以外に、有意な連鎖とは言えないが、染色体レベル 5%有意を超えたものが 129 個あった（いずれも False Discovery Rate (FDR) < 0.1)。

新たに複数家系で検出されたものは、BTA 8 と BTA 12 の枝肉重量 QTL、BTA 19 と BTA 20 の脂肪交雑 QTL であり、これらの QTL 領域について種雄牛間の

ハプロタイプ比較を行った。その結果、BTA 8 と BTA 12 の枝肉重量 QTL では、それぞれ共通の優良型ハプロタイプが見出され（BTA 12 は 2 領域）、各種雄牛の 1—4 世代上には共通祖先が存在することから、これらの共通優良型ハプロタイプは同祖であると思われる。

経済形質遺伝子領域マップ (30家系、2008年10月更新)

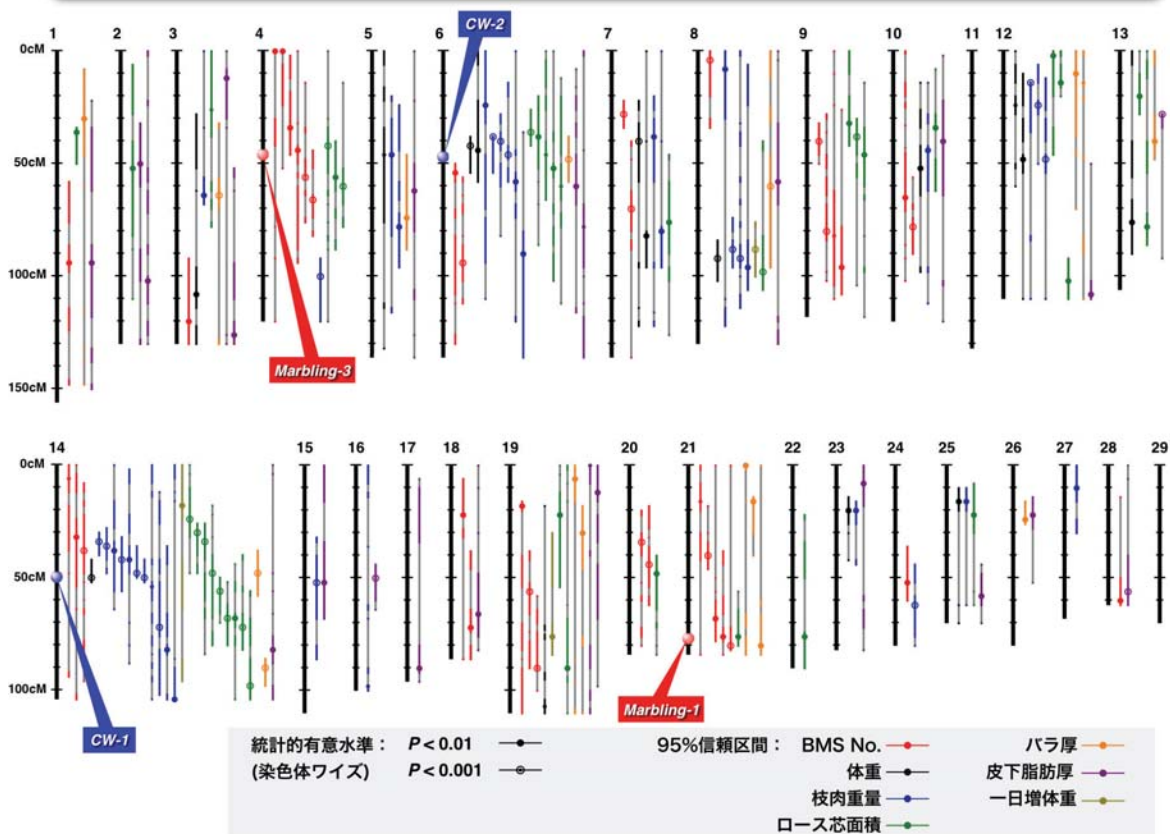


図 1 黒毛和種 QTL マップ

(4)-2. 今後の進め方

道県等の行っている父方半きょうだい家系を用いた経済形質 QTL のマッピングは、後継種雄牛の選抜に活用できるという利点がある。今後もさらに解析家系を増やしていく。マッピングされた QTL が複数家系で検出された場合、共通の QTL なら、領域を絞り込んで、責任遺伝子の同定や選抜のための SNP の特定を行える可能性がある。今年度見出した BTA 8 の枝肉重量 QTL については、領域の絞り込みと選抜用マーカーの開発を行う。

(5) ウシ経済形質遺伝子座のポジショナルクローニング

(5)-1. CW-1 (枝肉重量-1) の解析 (鹿児島県との共同研究)

黒毛和種 BTA 14 の CW-1 は、優良型アリル (Q) 1 つで 23.6 kg (ウシ体重の約 5%)、2 つでさらに 15.2 kg の相加的な枝肉重量増加効果をもつ (溝下ら、*Mammalian Genome*, 16: 532-537, 2005)。これまでに、相関解析とハプロタイプ比較で絞り込んだ CW-1 領域 1 Mb には 3 遺伝子 (*Gene_1*, *Gene_2*, *Gene_3*) が存在する。これらにアミノ酸変異はなく、また、Q 個体と non-Q 個体の遺伝子発現量から責任遺伝子に直結する有力な証拠は得られなかった。相加的な重量増加効果をもつ CW-1 の責任遺伝子のマウスへの導入は、表現型に影響を及ぼす効果を持つと予想されたため、責任遺伝子を同定するために、各遺伝子を導入した遺伝子改変マウスを作製し、体重増加との関係を調べた。

各遺伝子をカバーする BAC クローンを導入した BAC-トランスジェニック (Tg) マウスを作製し、その産子の成長曲線を描いた。定量的 PCR の結果、Tg マウスにおける導入遺伝子とマウス内在性遺伝子の総発現量は *Gene_1* で 1.1-1.9 倍、*Gene_3* で 1.8-3.1 倍増加していたが、Tg マウスと Wt 同腹仔間の成長曲線に差はなかった ($P > 0.05$, $n = 18$)。一方、*Gene_2* はウシ、Tg マウスの脳で強く発現し、他の組織での発現パターンも酷似した。*Gene_2* の雄 Tg マウスの体重は同週齢の Wt 同腹仔よりも有意に小さかった (20 週齢, 雄の平均体重の差: 2.92 g (95% 信頼区間 Confidential Interval (CI), 1.32-4.53 g), $P < 0.001$, $n = 18$)。従って、CW-1 の責任遺伝子は *Gene_2* である可能性が高く、その作用は体重増加に抑制的に働くと考えられた。ウシでのみ転写産物が報告されている *Gene_2* は約 1.6 kb のシングルエクソンの遺伝子で、最大 ORF にコードされるアミノ酸残基数が 69 個と、non-coding RNA 様の特徴がある。ウシ *Gene_2* とヒト・マウスのゲノム配列の相同性は、マウスで 54.2%、ヒトで 64.2% であり、ヒトでは *Gene_2* に相当する塩基配列が存在した。両種間で予測された最大 ORF の塩基配列相同性は 67.5% であったが、それらにコードされるアミノ酸残基では両種間に相同性はない。*Gene_2* の上流 3 kb 内には CW-1 をマップした種雄牛で共通の 10 個の多型 (SNP, del) が存在した。これらの多型位置では、Sp1 などの転写因子の結合モチーフが予測され (ソフトウェアの TFSEARCH で推測)、Q、q アリルの違いでモチーフの有無や相同性が変わる多型があった。この領域のレポーターアッセイでは、細胞種によって 1.2-1.3 倍 Q アリルが強く発現することが確認され ($P < 0.05-0.005$)、Q-q アリル間で転写レベルが異なる

ると予測された。

(5)-2. CW-2 (枝肉重量-2) の解析 (鹿児島県・熊本県・鳥取県・宮崎県との共同研究)

黒毛和種3家系と褐毛和種2家系の半きょうだい家系 QTL 解析において、BTA 6 上の重複する領域に枝肉重量または体重 QTL が検出されている (種雄牛 A における寄与率 6.9%、アレル置換効果 26 kg)。これら 5 種雄牛の優良型 (Q) ハプロタイプの比較と連鎖不平衡 (LD) マッピングにより、この QTL (CW-2) の責任領域を約 600 kb に狭めた。600 kb 内に存在する 4 つの遺伝子のうち、NCAPG (Chromosome Condensation Protein G) のアミノ酸置換を伴う SNP (SNP-9) は枝肉重量との相関性が高く ($P = 1.2 \times 10^{-11}$)、優良型ハプロタイプを見分ける良いマーカーであり、責任候補と考えられた。

今年度は CW-2 による他の枝肉形質への効果を調べた。種雄牛 A の QTL 解析では、CW-2 と同領域にロース芯面積と皮下脂肪厚についても染色体レベル 5% 以下の有意性で QTL が検出されている。そこで、他の 4 家系についても SNP-9 の遺伝子型とロース芯面積、皮下脂肪厚との関連をみると、いずれの家系においても、SNP-9 の優良型アレルを持つとロース芯面積が大きく、また、去勢牛については皮下脂肪厚が薄いことがわかった。したがって、CW-2 は多面的な効果を持つ QTL で、優良型アレルは肉用牛の形質として好ましい効果を併せ持っていると考えられた。これらの結果を基に国内特許を出願した。

次に、CW-2 ヘテロ種雄牛の去勢産子 6 頭について出荷時の脾臓の大きさを比較したところ、CW-2 優良型アレル保有牛は脾臓の大きい傾向が見られた。細胞周期の負の制御因子である $p27^{Kip1}$ のノックアウトマウスでは、細胞増殖が盛んになるため体重増加とともに脾臓や胸腺が肥大することが報告されており (Fero ら、*Cell*, 31: 783-744, 1996)、CW-2 優良型においても細胞増殖が盛んになっている可能性がある。NCAPG の SNP-9 によるアミノ酸置換が細胞増殖に影響を与えるか否かを調べる目的で、マウス繊維芽細胞由来 Flp-In3T3 株を用いて NCAPG の Q 型と q 型の安定発現株をそれぞれ取得し、細胞増殖速度を比較したが、有意な結果は得られなかった。NCAPG は種間でよく保存されているが、SNP-9 に対応するアミノ酸残基は、Q 型は Met、q 型は Ile であるのに対して、マウス (とヒト) は Val であり、導入ウシ NCAPG 遺伝子の発現量がマウス NCAPG 遺伝子発現量と同程度でしかなかったために Q 型と q 型の細胞増殖の

差を検出できなかったのかもしれない。

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

昨年度までに、種雄牛 A 家系を用いて BTA 7 セントロメア領域 18.6 cM に脂肪交雑領域 (*Marbling-2*) を特定し、A の半兄弟の種雄牛 B がこの QTL 領域内で組み換えをおこなっていることを利用して、2.9 cM にまで狭めた (平野ら、*Animal Genetics*, **39**: 79-83, 2008)。しかし、黒毛和種一般集団での優良遺伝子型 Q の頻度が低いため、相関解析で領域を狭めることはできなかった。連鎖する SNP アリルを見出すため、種雄牛 A および B の 2.9 cM 領域 (4.2 Mb) の塩基配列を解読することを開始した。次世代型 DNA シーケンサを用いて、種雄牛 A の 5.5 ゲノム分の配列 (SNP 検索に必要なデータ量の約 1/5) を出力した。データ解析を外注して、解析方法の良否を検討するとともに途中経過を把握した。

また、前事業からの継続である、種雄牛 A の Q 産子と q 産子各 3 頭のバイオプシーサンプルの収集 (8—30 ヶ月齢) を平成 20 年 10 月に終了した。

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

これまでに、BTA 4 に脂肪交雑 QTL が検出された 2 頭の種雄牛 (A、B) のハプロタイプ比較と相関解析によって QTL の候補領域を 46 cM 付近の約 0.7 Mb まで絞り込んだ。さらに、候補領域内の 4 つの既知遺伝子について変異探索と発現解析を行い、QTL の責任遺伝子となりうるか検討した。今年度も引き続き QTL の責任遺伝子と責任 SNP の同定を試みた。

同一県内市場に出荷された肥育牛より、出荷頭数の多い種雄牛 6 頭の産子を解析に用いた。BTA 4 上に配置したマイクロサテライトの型判定を行い、父方由来と母方由来アリルを推定した。隣接する各マーカーペアにおいて、優良型 (Q) アリル保有数 (0、1、2) と BMS との線形回帰を行った。回帰分析によってこれまでの相関解析の結果を再検討したところ、種雄牛 A と B のいずれの Q アリルにおいても 46 cM 付近の候補領域で有意な P 値が得られ、この領域が BMS と強く相関していることが確認された。

最終的に絞り込まれた約 0.7 Mb の領域には 4 つの既知遺伝子 (*Gene_1*、*Gene_2*、*Gene_3*、*Gene_4*) が存在していた。エクソン内の SNP 検索とアリル間の発現量比較から、*Gene_2* と *Gene_4* が責任遺伝子である可能性は低いですが、*Gene_3* は有力な候補遺伝子であると考えられた。*Gene_1* の筋間脂肪およ

び筋組織での発現は確認されたが、QQ 個体（2 頭）と qq 個体（3 頭）の間の明瞭な発現差は観察されなかった。また、アミノ酸置換 SNP が検出されず、また脂肪細胞分化との関連を示唆する報告もないことから、責任遺伝子である可能性は低いと考えられた。

そこで、Gene_3 を最も有力な候補遺伝子と考え、筋間脂肪と筋組織において、優良型（Q）個体と非優良型（q）個体間の発現量の違いを定量的 PCR により比較した。Gene_3 は QQ 型の筋間脂肪組織において qq 型に比べて約 4.5 倍発現量が高い。発現差の原因となる変異の検出を目的として 5'上流 3.2 kb を調べ、6 個の SNP を検出した。黒毛和種一般集団の型判定結果をもとに BMS 上位、下位集団でのディプロタイプ（Diplotype）再構成を行い、ハプロタイプ頻度推定を行うと、2 つの SNP（SNP-6 と SNP-9）の Q アリルは BMS 上位集団に多いハプロタイプのみで見られた。したがって、原因となる変異は SNP-6 か SNP-9 であると予想された。

Gene_3 の 5'上流域を PCR 法により増幅し、pGL3-basic あるいは pGL3-promoter vector に連結し、レポーターアッセイを行った。マウス脂肪細胞前駆体細胞株の 3T3L1 を脂肪細胞分化培地に移し、8 日間培養することで脂肪細胞に分化させ、遺伝子導入した。遺伝子導入 24 時間後、ルシフェラーゼ活性を測定した。それぞれの SNP を含む 5'上流域をレポーター遺伝子に連結し、アリルと転写活性の関係について検討したところ、SNP-6 を含む construct では Q 型が q 型よりも転写活性が高い傾向が見られた。

(5)-5. 今後の進め方

CW-1 については、現在 Gene_2-Tg マウスのもう一系統の体重を調べている。先の Tg 系統と同様に、体重増加に抑制的に作用した場合、Q、q アリル間の発現レベルに影響する機能的な変異を見つける。一方で、全農と共同で作成している Gene_2-KO ウシの増体が優れていた場合、責任遺伝子としての直接的証拠と考えられる。次に、non-coding RNA 様の特徴を有する Gene_2 の機能を明らかにする。マウス cDNA マイクロアレイで、増体に変化した Gene_2-Tg マウスの遺伝子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。また、CW-2 の Q 型は Met、q 型は Ile であるが、このアミノ酸変異の影響を細胞レベルで調べる。

Marbling-1(脂肪交雑-1)の有力な候補遺伝子 Gene_1 は 600 bp の non-coding

RNA であり、ウシ脂肪細胞分化系で発現が増加し、レチノイン酸添加でさらに促進される。今年度の進展は無かった。*Marbling-2* (脂肪交雑-2) については、特定した BTA7 セントロメア領域 2.9 cM (4.1 Mb) の解読を次年度には終え、責任 SNP の同定を行う。*Marbling-3* については、SNP-6 および SNP-9 のプロモーター活性に及ぼす影響をさらに詳しく調べるとともに、大規模黒毛和種集団を用いた効果検証を行いたい。さらに、*Gene_3* の脂肪交雑との関連を調べる目的で、細胞系を用いた解析を進行中である。

4) ウシ抗病性遺伝子座の解析

(1) 研究年次：平成 7 年—平成 20 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、遺伝的差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 20 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（家畜改良センターとの共同研究）

牛群検定に参加した搾乳牛の初産次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、BTA 21 と BTA 22 に有意な連鎖を見いだした。BTA 22 の QTL 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、BTA 21 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。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）。

今年度は FEZL の乳房炎発症率に対する効果を調べるため、十勝農業共済組合とホルスタイン登録協会北海道支局の協力を得て、2003 年度から 2006 年度までの十勝地方における発症率と雌牛の父親 170 頭の FEZL の遺伝子型との関係を調べた。この 4 年間に十勝地方において登録されており、かつ、父親の FEZL の遺伝子型が判明した娘牛は、延べ 107,280 頭であった。このうち 12G/13G FEZL を持つ種雄牛から生まれた娘牛は 17,280 頭であり、13G/13G FEZL を持つ種雄牛から生まれた娘牛は 90,350 頭であった。3 歳齢以降における発症率は 12G/13G FEZL を持つ種雄牛から生まれた娘牛の方が発症率は有意に低かった。

(4) 今後の進め方

日本ホルスタイン登録協会などと共同でホルスタイン種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継続して調べる。また、種雄牛の SCS 育種価との関係も調べる。

(5) 国内および海外の状況

これまで、米国農務省、米国イリノイ大学、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いる。

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 20 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、当研究所と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 SNP を用いたゲノムワイド相関解析である。ウシにおいて数 10K の SNP 解析システムが実用化され、家系によらない一般集団を対象としたゲノムワイド相関解析が可能になりつつある。牛有用ゲノム等探索・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形質も解析の対象に

加え、有用な DNA 情報を探索していく。

(3) ウシ 50K SNP チップを用いたゲノムワイド相関解析

(3)-1. 脂肪壊死抵抗性

解析サンプルは、脂肪壊死が主因の死産牛あるいは重篤な症状の個体を Case とし、脂肪壊死の症状が確認されない健常牛を Control とした。血統の偏りを少なくするために Case と Control で父親あるいは母方祖父が共通となるようにした。相関解析に使用するサンプル数は Case が 142 頭、Control が 167 頭で合計 309 頭となった。これらのサンプルについて 50K SNP チップのタイピングを行った結果、黒毛和種で多型性を持ち解析に使える SNP 数は 54,001 個のうち約 40,000 個であった。PLINK プログラムを用いて遺伝子型の同祖性（血統）に基づくクラスタリングを行い（構造化の影響を回避するため）、アリル頻度の偏りについて検定した結果、BTA3 の 2 つの SNP がそれぞれ $P = 5.1 \times 10^{-6}$ 、 $P = 7.5 \times 10^{-6}$ で帰無仮説からの乖離が見られた。2 つの SNP は完全連鎖不平衡状態にあり、約 76 kb の LD ブロックを構成していた。このブロック内の遺伝子については、ヒトの内臓脂肪における発現量が BMI（Body Mass Index）と負の相関があると報告されている。

(3)-2. 脂肪交雑

屠場から収集した肥育去勢牛について、BMS No.の上位と下位 10%ずつからサンプルを選抜した。市場別に、BMS No.上位と下位で半きょうだいをマッチさせるように個体を選び、上位と下位で 303 頭ずつ、合計 606 頭を解析に用いた。まず PLINK で上記の脂肪壊死抵抗性の集団と同様に統計解析を行ったが構造化を回避できなかった。そこで EIGENSTRAT プログラムを用いて主成分分析による補正を行い、遺伝子型頻度の偏りについて検定した結果、BTA4、BTA19、BTA23 で関連のある SNP を検出した。特に BTA4 の SNP は $P = 6.1 \times 10^{-7}$ でボンフェローニの補正を考慮しても $\alpha = 0.05$ で有意であった。BTA4 の SNP は近傍の SNP と約 500 kb の範囲に LD ブロックを構成しており、この領域は家系解析で検出された脂肪交雑 QTL の近くに存在していた。

(4) マイクロサテライトを用いたゲノムワイド相関解析

(4)-1. 採卵性（家畜改良センター、新潟大学・全農 ET センターとの共同研究）

ウシの育種を進めるには、優秀な個体の子孫を多く残すことが重要である。そのために過排卵処理で多数の胚を採集する手法がとられるが、1回あたりに得られる回収卵数は0個から50個と個体差は大きい。個体の卵子生産能力は遺伝的な側面が少なくないので、連鎖解析を用いた過排卵反応性遺伝子の同定を試みた。

1999年から2005年にかけて、全農ETセンターでは、639頭のウシを用いて、6,128回FSH漸減投与方法により過排卵処理を行った。これらのデータを用いて、平均回収卵数が少ない個体67頭（7.8個以下）及び多い個体67頭（16.6個以上）を選抜した。選抜した個体の血液よりDNAを抽出し、ウシ全ゲノムをカバーする1,157個のマイクロサテライトについて型判定を行い、連鎖解析したところ、BTA 7に有意な連鎖が見られた。BTA 7上にさらに89個のDNAマーカーを加えて連鎖解析を行ったところ、80-82 cM領域が候補領域であることが判明した。この候補領域に存在するイオンチャネル型グルタミン酸受容体 *GRIA1* 遺伝子について塩基配列を解析したところ、高排卵型と低排卵型との間にアミノ酸変異を起こすSNPを見いだした（ 17 ± 9 個 vs. 11 ± 7 個、 $P = 3.3E-05$ ）。このアミノ残基の相違がグルタミン酸受容体機能に及ぼす影響を検討するために、それぞれの配列を持つウシ *GRIA1* cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、電気生理学的に測定した。その結果、高排卵型配列を持つ *GRIA1* は低排卵型配列を持つものよりもグルタミン酸に対する親和性が高いことが明らかになった（ $4.45 \mu\text{M}$ vs. $10.68 \mu\text{M}$ ）。興奮性神経伝達の中心を構成するAMPA型グルタミン酸受容体 *GRIA1* は、性腺刺激ホルモン放出ホルモンの調節にも関与することが報告されており、この2つの多型による受容体の機能的な相違が卵胞発育の違いをもたらすことが示唆された。

(4)-2. 生時体重（分娩難易度）の解析（家畜改良センターとの共同研究）

約1,800頭のホルスタイン種子牛集団を対象とした相関解析を行っている。上下15%に当たる86頭ずつのグループ（high, 51-65 kg vs. low, 22-35 kg）について1,151個のマイクロサテライトを用いた一次スクリーニングを行い、有意な相関性が見られた12個の染色体についてマーカーを増やした二次スクリーニングを行った。有意な相関が見られた9個の染色体について三次スクリーニング中である。

(5) 今後の進め方

50K SNP チップを用いたゲノムワイド相関解析により、脂肪壊死症および脂肪交雑と関連のある SNP がいくつか検出された。血統を考慮したサンプリングやプログラムを用いた補正により、集団の構造化の影響を低減することができ、黒毛和種一般集団を対象とした相関解析が有効な手法であると考えられる。

これまで、SNP とマイクロサテライトの比較を行ってきたが、SNP の方に利点が多い。マーカー数が多くなればなるほど SNP の型判定手法そのものの容易さが際立ってくる。現時点での SNP チップには多型性の高い SNP が少ないという問題があるが、ゲノム上に存在する SNP 数はマイクロサテライトと比べ桁違いに多いので、今後の SNP 開発で解決されるだろう。黒毛和種で有用性を高めるには、黒毛和種由来の多型性の高い SNP を多数搭載することが望ましく、この点を次年度の課題としなければならない。

相関解析のためのサンプル収集を引き続いて行う。黒毛和種では、枝肉形質、繁殖性、食味、脂肪壊死、飼料効率などのデータ付きの DNA を収集していきたい。ホルスタイン種では、搾乳牛の諸形質（ミルク生産性・繁殖性・分娩難易度・体型・気質・乳房炎抵抗性など）を解析の対象としたい。

(6) 国内および海外の状況

連鎖不平衡マッピングは、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 10 K SNP アレイ (アフィメトリックス社) 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。

米国・カナダ、EU、オーストラリア、ニュージーランドなどはホルスタイン種雄牛の選抜に、50K SNP チップの型判定に基づいたゲノム選抜法 (参考資料: 富樫研治 (2009) 「ゲノム選抜法実用化への動き」、畜産技術、648 号、16-21 ページ) という新手法を適用する試みを行っている。ゲノム選抜法では QTL についての個々の遺伝子座を問題にせず、多数のマーカー情報を計算して育種価を求める。やがて、肉牛でも利用可能なゲノミック評価法が開発されるかもしれない。

2. 平成 20 年度研究発表

1) 論文発表

1. Watanabe, T., Hirano, T., Takano, A., Mizoguchi, Y., Sugimoto, Y., Takasuga, A. (2008) Linkage disequilibrium structures in cattle and their application to breed identification testing. *Animal Genetics*, **39**: 374-382.

2. Abe, T., Saburi, J., Hasebe, H., Nakagawa, T., Kawamura, T., Saito, K., Nade, T., Misumi, S., Okumura, T., Kuchida, K., Hayashi, T., Nakane, S., Mitsuhashi, T., Nirasawa, K., Sugimoto, Y., Kobayashi, E. (2008) Bovine quantitative trait loci analysis for growth, carcass, and meat quality traits in an F2 population from a cross between Japanese Black and Limousin. *Journal of Animal Science*. **86**: 2821-2832.

3. Taniguchi, Y., Doronbekov, K., Yamada, T., Sasaki, Y., Takano, A., Sugimoto, Y., (2008) Genomic organization and promoter analysis of the bovine ADAM12 gene. *Animal Biotechnology*, **19**: 178-189.

4. Yamada, K., Nakatsu, Y., Onogi, A., Takasuga, A., Sugimoto, Y., Ueda, J., Watanabe, T. (2009) Structural and functional analysis of the bovine Mx1 promoter. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, .

5. 渡邊敏夫 (2008) ウシ連鎖平衡ブロックの分析とその利用。動物遺伝育種研究、**36**: 13-21 (ミニレビュー)。

2) 学会発表

1. Takasuga, A., Setoguchi, K., Furuta, M., Hirano, T., Watanabe, T., Sugimoto, Y. : The Ile-442-Met substitution in NCAPG as a positional candidate for bovine carcass weight QTL (CW-2) on chromosome 6. 30th International Conference on Animal Genetics (第 31 回国際動物遺伝学会大会)、2008 年 7 月、

アムステルダム、オランダ。

2. Miyazaki, Y., Kurogi, K., Kozono, Y., Shimanuki, S., Shimizu, K., Nishimura, S., Takasuga, A., Morita, M. : The validity of SNP markers for Bovine Parentage Test in Japan. 30th International Conference on Animal Genetics (第 31 回国際動物遺伝学会大会)、2008 年 7 月、アムステルダム、オランダ。
3. 平野 貴、佐藤洋一、渡邊敏夫、杉本喜憲 : 黒毛和種乳頭欠損のファインマッピングと候補遺伝子探索。30th International Conference on Animal Genetics (第 31 回国際動物遺伝学会大会)、2008 年 7 月、アムステルダム、オランダ。
4. Watanabe, T., Sekiya, M., Sato, Y., Nakajima, H., Maruta, S., Itoh, T., Takasuga, A., Sugimoto, Y.: QTL mapping of Japanese Black cattle using a family structure combining seven paternal half-sib families. 30th International Conference on Animal Genetics (第 31 回国際動物遺伝学会大会)、2008 年 7 月、アムステルダム、オランダ。
5. 渡邊敏夫、関屋万里生、佐藤洋一、中嶋宏明、丸田俊治、伊藤智仁、高須賀晶子、杉本喜憲 : 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。第 9 回日本動物遺伝育種学会大会、2008 年 11 月、岡山。
6. 杉本喜憲、溝口康、平野貴、伊藤智仁、麻生久、高須賀晶子、渡邊敏夫 : SAGE 法によるウシ筋間脂肪分化の遺伝子発現プロファイリング。第 9 回日本動物遺伝育種学会大会、2008 年 11 月、岡山。
7. 西村翔太、高須賀晶子、杉本喜憲 : 50K SNP チップを用いたウシ脂肪壊死症のゲノムワイド相関解析。日本動物遺伝育種学会第 9 回大会、2008 年 11 月、岡山。
8. 平野 貴、佐藤洋一、渡邊敏夫、杉本喜憲、高須賀晶子 : マウスを用いた黒毛和種乳頭欠損症候補遺伝子の探索。第 9 回日本動物遺伝育種学会、2008

年 11 月、岡山。

9. 高野 淳、杉本喜憲、高須賀晶子：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。第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月、神戸。

10. 杉本真由美、出田篤司、山崎真弥、崎村建司、青柳敬人、杉本喜憲：連鎖解析によるウシ採卵性制御遺伝子の同定。第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月、神戸。

11. Watanabe, T., Mizoguchi, Y., Hirano, T., Itoh, T., Aso, H., Takasuga, A., Sugimoto, Y.: Differentially expressed genes during bovine intramuscular adipocyte differentiation profiled by using serial analysis of gene expression (SAGE). Plant & Animal Genome XVII. 国際植物動物ゲノム学会第 17 回大会、2009 年 1 月、サンディエゴ、米国。

3) 学会発表要旨

[学会発表の次の数字は、学会発表の番号に相当する]

学会発表 1.

題目：NCAPG 遺伝子の Ile-442-Met 置換が、ウシ 6 番染色体上の枝肉重量 QTL (CW-2) の責任候補である。

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畜技協・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 BTA6 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 と C および褐毛和種雄牛 D と E の家系においても見出された。これら 5 家系で見出された QTL が同一であると仮定し、ハプロタイプ比較と連鎖不平衡マッピングによって責任領域の同定を試みた。

【方法と結果】CW-2 領域 (38-55 cM) を多型性マイクロサテライト 39 個 (< 860

kb 間隔) でハプロタイプ再構成を行い、種雄牛間のハプロタイプを比較した。また、黒毛和種種雄牛 C と褐毛和種種雄牛 D の産子について母方由来ハプロタイプを用いて連鎖不平衡マッピングを行った。その結果、5 種雄牛で共通の優良型 (Q) ハプロタイプ約 810 kb 領域が体重・枝肉重量と有意に関連していることを見出した。この領域に 42 個の SNP を追加することで、共通 Q ハプロタイプ領域を 660 kb に狭めることができた。この領域に存在する 4 遺伝子について、タンパク質コード領域の SNP を検索したところ、NCAPG 遺伝子の Ile-442-Met 置換を起こす SNP のみが、5 種雄牛はヘテロで、かつ、黒毛和種去勢牛集団 (7,990 頭の枝肉重量上位・下位 4.7% から選択した計 187 頭) で枝肉重量と強く相関していた ($P = 1.2 \times 10^{-11}$)。したがって、この SNP は CW-2 の責任候補 SNP と考えられた。

(第 31 回国際動物遺伝学会大会、2008 年 7 月、オランダ)

学会発表 2.

題目：SNP を用いた日本におけるウシ親子判定のマーカ―評価

発表者：宮崎義之¹、黒木一仁¹、小園勇輔¹、島貫伸一¹、清水一広¹、西村翔太²、高須賀昌子²、森田光夫¹

所属：¹家畜改良事業団・家畜改良技術研、²畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】家畜改良事業団では、現在 ISAG 推奨 9 マーカ―を含む計 17 個のマイクロサテライトを用いて PE1 (両親と子をタイピングした場合の親子関係の否定率) > 0.99998 以上の精度で親子判定を行っている。近年、SNP タイピングの技術が確立し、低コスト化も図られていることから、我々は、親子判定用に SNP を選定し、その精度を従来法と比較した。

【方法】アフィメトリックス社の Bovine Mapping 10K SNP Kit を用いて黒毛和種 87 頭、ホルスタイン種 84 頭をタイピングした結果から、(1) ヘテロ率 ≥ 0.4 、(2) ゲノム上の位置が特定されていること、(3) 各染色体あたり 2~4 個で、互いに 5.7 Mb 以上離れて位置すること、を条件として、91 個の SNP を選別した。これらについて、イルミナ社の BeadExpress GoldenGate Assay 法を用いて、日本における主要な種雄牛 (黒毛和種 104 頭、ホルスタイン種 71 頭) のタイピングを行った。解析には同社の提供する BeadStudio3 ソフトウェアを用いた。

【結果】91 個の SNP による親子関係の否定率は、PE1 > 0.99999997 となった。17 個のマイクロサテライトと同等の否定率は、60~65 個の SNP で確保できる

と予想され、SNP を用いてより精度の高い親子判定ができることを示した。

(第 31 回国際動物遺伝学会大会、2008 年 7 月、オランダ)

学会発表 3.

題目：黒毛和種乳頭欠損のファインマッピングと候補遺伝子探索

発表者：平野 貴¹、佐藤洋一²、渡邊敏夫¹、杉本喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²岩手県農研セ畜研

要旨：【目的】乳頭欠損症 (ATPP: Abnormal Teat Patterning Phenotype) は、乳頭の 2 本欠損または 1 本欠損を示す不良形質である。乳頭欠損の蔓延を防ぐための選抜手法を開発するために、我々は種雄牛 A の発症産子 152 頭、正常産子 454 頭を用いて、BTA 17 セントロメア (ATPP-1)、BTA 1 セントロメア (ATPP-3) とテロメア (ATPP-2) 領域にマップした (井原ら、*Animal Genetics*, **38**: 15–19, 2006)。今回、最もリスクの大きい ATPP-1 領域のファインマッピングと候補遺伝子の探索を試みた。

【方法・結果】2 本欠損個体は、種雄牛 A 由来 ATPP-1 リスクハプロタイプを有していたため、我々は ATPP-1 領域を 136 頭の 2 本欠損個体が共通してリスク型を示す 3.15 Mb にまで狭めた。乳頭形成に関わる遺伝子を探索するために、乳頭が確認できた生後 3 日目のマウスの乳頭と胸部皮膚を用いて cDNA マイクロアレイ解析を行った。ATPP-1 領域に対応する領域で発現量の違いが検出された遺伝子は 2 個であった。これらの遺伝子は乳頭欠損の候補遺伝子かもしれない。

(第 31 回国際動物遺伝学会、2008 年 7 月、オランダ)

学会発表 4.

題目：7 つの半きょうだい家系を統合した家系による黒毛和種の QTL マッピング

発表者：渡邊敏夫¹、関屋万里生²、佐藤洋一³、中嶋宏明⁴、丸田俊治⁵、伊藤智仁⁶、高須賀晶子¹、杉本喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²秋田県農技セ畜試、³岩手県農業研究セ、⁴山形県農業総合研究セ、⁵長崎県肉用牛改良セ、⁶家畜改良事業団・家畜改良技術研

要旨：【目的】一般に枝肉形質 QTL は効果が小さいものが多いので、QTL マッピングを行うのに検出力が十分な大家系を構成するのは困難である。互いが半

きょうだいである複数の種雄牛家系とそれらの父（以下、祖父牛）からなる 3 世代家系を用い、祖父に由来する QTL を解析し、その有用性を検証した。

【材料と方法】祖父牛 A、種雄牛 7 頭、及び各種種雄牛の去勢産子半きょうだい合計 521 頭からなる 3 世代家系を構成し、1 次解析に用いた。対象形質は BMS No.、枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚とした。全常染色体を対象とし、種雄牛ごとに 185-436 個のマイクロサテライトを配置した。祖父のハプロタイプが 3 世代目産子へ伝達された確率を表現型値へ線形回帰し、F 値を算出することで QTL の有無を検定した。染色体ワイズ有意水準はパーミュテーションテストにより算出した。QTL が祖父の第 1 ハプロタイプにあるモデル、第 2 ハプロタイプにあるモデル、両ハプロタイプにあるモデルを想定した。1 次解析で有意な染色体／形質について 3 世代目産子を合計 629 頭にふやし、2 次解析を行った。更に 2 次解析で有意な QTL が検出された染色体／形質について、祖父 A の去勢産子半きょうだい家系 402 頭を用い QTL の存在を確認した。

【結果】1 次解析で染色体ワイズ 5%有意に達した QTL は 4 形質で合計 17 個であった。1 次解析で有意だった染色体のうち 13 本を対象とし 2 次解析を行った結果、染色体ワイズ 5%有意水準に達した QTL は 4 形質合計で 9 個であった。2 次解析において QTL が検出された 9 本の染色体について祖父 A 産子半きょうだい家系を用いて解析を行った結果、2 形質で合計 4 箇所の QTL が半きょうだい産子において分離することを確認した。2 次解析と祖父 A 産子家系解析の結果から、BTA1 のロース芯面積 QTL は祖父 A においてホモザイガスである可能性が示唆された。以上の結果から、血縁のある半きょうだい家系を統合し大家系を構成することは新規の QTL マッピングに貢献する。

（国際動物遺伝学会第 31 回大会、2008 年 7 月、アムステルダム、オランダ）

学会発表 5.

題目：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

発表者：渡邊敏夫¹、関屋万里生²、佐藤洋一³、中嶋宏明⁴、丸田俊治⁵、伊藤智仁⁶、高須賀晶子¹、杉本喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²秋田県農技セ畜試、³岩手県農業研究セ、⁴山形県農業総合研究セ、⁵長崎県肉用牛改良セ、⁶家畜改良事業団・家畜改良技術研

要旨：【目的】われわれはこれまでに父方半きょうだい家系を用いて和牛の枝肉形質 QTL マッピングを行ってきたが、一般に枝肉形質 QTL は効果が小さいもの

が多く、検出力が十分な大家系を構成するのは困難である。互いが半きょうだいである複数の種雄牛家系とそれらの父（以下、祖父牛）からなる 3 世代家系を用い、祖父に由来する QTL を解析し、その有用性を検証した。

【材料と方法】祖父牛 A、種雄牛 7 頭、及び各種種雄牛の去勢産子半きょうだい合計 521 頭からなる 3 世代家系を構成し、1 次解析に用いた。対象形質は BMS No、枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚、皮下脂肪厚とした。全常染色体を対象とし、種雄牛ごとに 185～436 個のマイクロサテライトを配置した。祖父のハプロタイプが 3 世代目産子へ伝達された確率を表現型値へ線形回帰し、F 値を算出することで QTL の有無を検定した。染色体ワイズ有意水準はパーミュテーションテストにより算出した。QTL が祖父の第 1 ハプロタイプにあるモデル、第 2 ハプロタイプにあるモデル、両ハプロタイプにあるモデルを想定した。1 次解析で有意な染色体／形質について 3 世代目産子を合計 629 頭にふやし、2 次解析を行った。更に 2 次解析で有意な QTL が検出された染色体／形質について、祖父 A の去勢産子半きょうだい家系 402 頭を用い QTL の存在を確認した。

【結果】1 次解析で染色体ワイズ 5%有意に達した QTL は 5 形質で合計 25 個であった。1 次解析で有意だった染色体のうち 13 本を対象とし 2 次解析を行った結果、染色体ワイズ 5%有意水準に達した QTL は 5 形質で合計 14 個あった。うち 9 箇所はこれまでに和牛において報告されていない新規 QTL であった。2 次解析において QTL が検出された 9 本の染色体について祖父 A 産子半きょうだい家系を用いて解析を行った結果、3 形質で合計 5 箇所の QTL が半きょうだい産子において分離することを確認した。2 次解析と祖父 A 産子家系解析の結果から、BTA1 のロース芯面積 QTL は祖父 A においてホモザイガスである可能性が示唆された。以上の結果から、血縁のある半きょうだい家系を統合し大家系を構成することは新規の QTL マッピングに貢献する。

（第 9 回日本動物遺伝育種学会大会、2008 年 11 月、岡山）

学会発表 6.

題目：SAGE 法によるウシ筋間脂肪分化の遺伝子発現プロファイリング

発表者：杉本喜憲¹、溝口 康²、平野 貴¹、伊藤智仁³、麻生 久⁴、高須賀晶子¹、渡邊敏夫¹

所属：¹ 畜技協・動物遺伝研、² 明治大農、³ 家畜改良事業団・家畜改良技術研、⁴ 東北大農

要旨：【目的】肉牛産業において重要な経済形質の1つである脂肪交雑では、筋間組織における脂肪細胞分化が必須のプロセスと推定されている。脂肪細胞分化の分子生物学的研究はマウス 3T3-L1 細胞で詳細に行われ、その経路や調節機構など明らかにされている。しかしながら、3T3-L1 細胞分化系は内臓白色脂肪モデルであり、ウシの脂肪交雑モデルとは考えにくい。麻生らは黒毛和種牛筋間組織由来の脂肪前駆体細胞（BIP 細胞）系を確立し、マウス 3T3-L1 系との違いを報告してきた。私たちは、BIP の脂肪細胞分化を脂肪交雑のモデルと位置付け、分化に伴って発現の変化する遺伝子の網羅的なプロファイリングを行うことで脂肪交雑の分子機構解明を目指した。

【方法】プロファイリングは SAGE 法を用いて行った。SAGE 法は、遺伝子転写物に特有な tag 数を調べ、発現の変化を明らかにする方法であり、未知の転写物についても調べることができる。任意の tag に該当する遺伝子を特定するには全ゲノム配列の解読が必要であるが、近年のウシゲノム解読の進展と共に tag の特定が可能となってきた。

【結果】BIP 細胞分化前（C2）と分化後（S4）から作成した SAGE ライブラリーから合計 157,161 tags（C2: 75,283 個、S4: 81,878 個）を得、30,989 種の tag を検出した。分化に伴って 401 tags（1.4%）の発現が増加し、477 tags（1.2%）は減少した（ $P < 0.05$ ）。BIP 細胞サブトラクション法（村山ら、2004）で発現増加の報告されている遺伝子の内、CEBPD, COL18A1, SCD などの発現増加が再確認された。BIP 細胞系で得られた結果は、3T3-L1 細胞系の遺伝子発現の様相（Burton ら、2004）と異なっていた。これらの結果はウシ筋間組織における脂肪分化研究に重要な情報と考えられる。

（第9回日本動物遺伝育種学会大会、2008年11月、岡山）

学会発表 7.

題目：50K SNP チップを用いたウシ脂肪壊死症のゲノムワイド相関解析

発表者：西村翔太、高須賀晶子、杉本喜憲

所属：畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】ウシの脂肪壊死症関連座位をマッピングするために、Illumina 50K Bovine SNP chip を用いたゲノムワイド相関解析を行った。

【方法】Case として脂肪壊死が主因の死産牛あるいは人頭大以上の脂肪壊死塊を持つ疾病牛を繁殖群で 95 頭、肥育群で 85 頭の合計 180 頭、Control として異

常のない繁殖雌牛 139 頭と枝肉市場で脂肪壊死塊が見いだされなかった肥育直腸検査牛 86 頭で合計 225 頭、全体で 405 頭のタイピングを行った。Call rate (> 95%) やマイナーアリル頻度 (> 0.01)、ハーディ・ワインバーグ平衡検定 ($P > 0.001$) の条件を満たす約 40,000 個の SNP を解析に用いた。構造化の補正を行うために、Plink プログラムを用いて Cochran-Mantel-Haenszel 検定を行った。

【結果】繁殖群のみの解析では BTA 3 の 2 つの SNP が最も低い P 値 (4.9×10^{-5}) を示し、これらはヒトにおいて内臓脂肪での発現量と BMI (Body Mass Index) との負の相関が報告されている遺伝子の第 1 エキソンを含む約 76 kb の LD ブロックを構成していた。肥育群では BTA 4 の SNP が最も低い P 値 (5.1×10^{-5}) を示したが、この SNP の近傍には既知遺伝子は存在しなかった。繁殖群と肥育群それぞれ個別の解析では帰無仮説からのずれが見られず、解析頭数が少ないために十分な検出力が得られていないと考えられた。2 群を統合して解析すると、肥育群で検出された BTA 4 の SNP でのみ帰無仮説からのずれが見られた ($P = 3.9 \times 10^{-6}$)。繁殖群で検出された BTA 3 の SNP は、その次に P 値が低く (5.3×10^{-5})、上記の知見から候補 SNP になると考えられた。シミュレーションの結果、この SNP を統計的に有意に検出するには、解析頭数を Case と Control で 100~200 頭ずつ増やして解析する必要があると考えられた。

(日本動物遺伝育種学会第 9 回大会、2008 年 11 月、岡山)

学会発表 8.

題目：マウスを用いた黒毛和種乳頭欠損症候補遺伝子の探索

発表者：平野 貴¹、佐藤洋一²、渡邊敏夫¹、杉本喜憲¹、高須賀晶子¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²岩手農研セ畜研

要旨：【目的】乳頭欠損症 (ATPP: Abnormal Teat Patterning Phenotype) は、乳頭の 2 本欠損または 1 本欠損を示す不良形質である。我々は、これまでに乳頭欠損関連領域を BTA 17 セントロメア (ATPP-1)、BTA 1 セントロメア (ATPP-3) とテロメア (ATPP-2) 領域にマップした (井原ら、*Animal Genetics*, **38**: 15–19, 2006)。しかし、乳頭形成に関わる遺伝子の情報は少なく、候補遺伝子の探索は困難であった。そこで、我々は、サンプルの入手が容易でゲノム情報が充実しているマウスを用いて、各 ATPP 関連領域で乳頭形成に関わると考えられる遺伝子の探索を試みた。

【方法】乳頭が確認できた生後 3 日目のマウスから乳頭と、コントロールとし

て胸部の皮膚を採取した。これらから抽出した RNA と Mouse Genome 430 2.0 Array (アフィメトリックス) を用いて、両組織間の遺伝子発現量を比較した。また、発現量に差が見られた遺伝子について、定量的 PCR 解析を行った。

【結果】 *ATPP-1, -2, -3* 領域は、それぞれ MMU 3 と 8、MMU10 と 16、MMU16 に相当し、101、111、112 個の転写単位が存在すると考えられた。これら転写単位の内、19、21、21 個は cDNA マイクロアレイおよび定量的 PCR で発現量の違いが確認され、マウスの乳頭形成に関わる可能性が示された。ウシ乳頭欠損症発症個体や正常個体における、これら転写単位の発現量や SNP などの情報を利用して、責任遺伝子の絞り込みを行っていく予定である。

(第 9 回日本動物遺伝育種学会、2008 年 11 月、岡山)

学会発表 9.

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

発表者：高野 淳、杉本喜憲、高須賀晶子

所属：畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】黒毛和種で見いだされたウシ BTA 14 の CW-1 は、優良型アリル (Q)1 つで 23.6 kg、2 つでさらに 15.2 kg の相加的な枝肉重量増加効果をもち、Q 1 つでウシ体重の約 5%に相当する大きな効果をもつ (溝下ら、*Mammalian Genome*, 16: 532-537, 2005)。これまでに、相関解析およびハプロタイプ比較で絞り込んだ CW-1 領域約 1 Mb には 3 遺伝子 (*Gene_1*, *Gene_2*, *Gene_3*) が存在する。これらにアミノ酸変異はなく、また、Q を持つ個体とそうでない個体の遺伝子発現量から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 (筆者ら、第 28 回分子生物学会)。相加的な重量増加効果をもつ CW-1 の責任遺伝子のマウスへの導入は、十分に表現型に影響を及ぼす効果を持つと予想されたため、責任遺伝子を同定するために、各遺伝子を導入した遺伝子改変マウスを作製し、体重増加との関係を調べた。

【方法・結果】各遺伝子をカバーする BAC クローンを各々導入した BAC-Tg マウスを作製し、導入遺伝子の発現レベルが高い各 1 系統の Tg マウスについて、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 の結果、Tg マウスにおける導入遺伝子とマウス内在性遺伝子の総発現量は *Gene_1* で 1.1-1.9 倍、*Gene_3* で 1.8-3.1 倍増加していたが、Tg マウスと Wt 同腹仔間の成

長曲線に差はなかった ($P > 0.05$, $n = 18$)。一方、ウシ特異的な遺伝子である *Gene_2* はウシ、Tg マウスともに脳で強く発現し、他の組織における発現パターンも酷似していた。*Gene_2* の Tg マウスの体重は同週齢の Wt 同腹仔よりも有意に小さかった (male; 10-weeks, $P = 0.00028$, $n = 18$, 20-weeks, $P = 0.0067$, $n = 13-18$)。従って、CW-1 の責任遺伝子は *Gene_2* で、その作用は体重増加に抑制的に働くと考えられた。

(第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月、神戸)

学会発表 10.

題目：連鎖解析によるウシ採卵性制御遺伝子の同定

発表者：杉本真由美¹、出田篤司²、山崎真弥³、崎村建司³、青柳敬人²、杉本喜憲⁴

所属：¹家畜改良セ、²全農 ET セ、³新潟大学脳研、⁴畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】ウシの育種を進めるには、優秀な個体の子孫を多く残すことが重要である。そのために過排卵処理で多数の胚を採集する手法がとられるが、1 回あたりに得られる回収卵数は 0 個から 50 個と個体差は大きい。個体の卵子生産能力は遺伝的な側面が少なくないので、連鎖解析を用いた過排卵反応性遺伝子の同定を試みた。

【方法と結果】1999 年から 2005 年にかけて、全農 ET センターでは、639 頭のウシを用いて、6,128 回 FSH 漸減投与方法により過排卵処理を行った。これらのデータを用いて、平均回収卵数が少ない個体 67 頭 (7.8 個以下) 及び多い個体 67 頭 (16.6 個以上) を選抜した。選抜した個体の血液より DNA を抽出し、ウシ全ゲノムをカバーする 1,157 個の DNA マーカーを用いて連鎖解析したところ、BTA 7 に有意な連鎖が見られた。BTA 7 上にさらに 89 個の DNA マーカーを加えて連鎖解析を行ったところ、80-82 cM 領域が候補領域であることが判明した。この候補領域に存在するイオンチャネル型グルタミン酸受容体 *GRIA1* 遺伝子について塩基配列を解析したところ、高排卵型と低排卵型との間にアミノ酸変異を起こす 1 塩基の相違を見いだした (17 ± 9 個 vs. 11 ± 7 個、 $P = 3.3E-05$)。この残基の相違がグルタミン酸受容体機能に及ぼす影響を検討するために、それぞれの配列を持つウシ *GRIA1* cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、電気生理学的に測定した。その結果、高排卵型配列を持つ *GRIA1* は低排卵型配

列を持つものよりもグルタミン酸に対する親和性が高いことが明らかになった (4.45 μ M vs. 10.68 μ M)。興奮性神経伝達を中心を構成する AMPA 型グルタミン酸受容体 GRIA1 は、性腺刺激ホルモン放出ホルモンの調節にも関与することが報告されており、この 2 つの多型による受容体の機能的な相違が卵胞発育の違いをもたらすことが示唆された。

(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 11.

題目：ウシ筋間脂肪細胞分化において発現の異なる遺伝子群の SAGE 法によるプロファイル

発表者：渡邊敏夫¹、溝口 康²、平野 貴¹、伊藤智仁³、麻生久⁴、高須賀晶子¹、杉本喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²明治大農、³家畜改良事業団・家畜改良技術研、⁴東北大農

要旨：【目的】肉牛産業において重要な経済形質の 1 つである脂肪交雑では、筋間組織における脂肪細胞分化が必須のプロセスと推定されている。麻生らは黒毛和種牛筋間組織由来の脂肪前駆体細胞 (BIP 細胞) 系を確立した。我々は、BIP の脂肪細胞分化を脂肪交雑のモデルと位置付け、分化に伴って発現の変化する遺伝子の網羅的なプロファイリングを行うことで脂肪交雑の分子機構解明を目指した。

【方法】プロファイリングは SAGE 法を用いて行った。SAGE 法は、遺伝子転写物に特有な tag 数を調べ、発現の変化を明らかにする方法であり、未知の転写物についても調べることができる。任意の tag に該当する遺伝子を特定するには全ゲノム配列の解読が必要であるが、近年のウシゲノム解読の進展と共に tag の特定が可能となってきた。

【結果】BIP 細胞分化前 (C2) と分化後 (S4) から作成した SAGE ライブラリーから合計 157,161 tags (C2: 75,283 個、S4: 81,878 個) を得、30,989 種の tag を検出した。分化に伴って 401 tags (1.4%) の発現が増加し、477 tags (1.2%) は減少した ($P < 0.05$)。BIP 細胞サブトラクション法 (村山ら、2004) で発現増加の報告されている遺伝子の内、*CEBPD*, *COL18A1*, *SCD*, *FN1*, *SAA3*, *GPX3*, *A2M*, および *ADFP* などの発現増加が再確認された。発現が有意に変化した

878 個中 356 個はウシゲノム上にマップされた。高須賀ら (2007) は BTA 4, BTA 6, および BTA 10 に脂肪交雑 QTL 領域があることを示したが、これらの領域内の 15 個の遺伝子の発現が変化していることを突き止めた。これらは脂肪交雑 QTL 候補遺伝子になりうる。

(国際植物動物ゲノム学会第 17 回大会、2009 年 1 月、サンディエゴ、米国)

3. 研究の解説

「ゲノムワイド相関解析について」

西村 翔太

はじめに

2007年12月にイルミナ社よりウシ50K SNPチップが発売された。これによりウシゲノム上の非常に高密度に配置されたSNPマーカーを短時間にタイピングすることが可能となり、ウシにおいてゲノムワイド相関解析が進展することが予想される。従来の家系解析と比較してゲノムワイド相関解析の利点として、(1) 家系に拠らない一般集団を用いた解析ができる、(2) 効果の比較的小さいQTLも検出できる、(3) 家系解析よりも狭い領域にマッピングができる、等が挙げられる。

動物遺伝研究所では現在、黒毛和種牛で多発し経済的損失の大きい脂肪壊死症と、重要な経済形質である脂肪交雑を対象としたゲノムワイド相関解析を進めている。本項では脂肪交雑を対象とした解析を例に、ゲノムワイド相関解析の原理や解析の進行状況について解説していくことにする。

ゲノムワイド相関解析の研究デザイン

ゲノムワイド相関解析には症例・対照研究、コホート研究、介入研究など、種々の研究デザインがあり、解析対象は質的形質と量的形質がある。最も頻繁に行われる症例・対照研究は、症例と対照を別々に集め、2つの群の間のアリル頻度、または遺伝子型頻度の偏りを検定する方法であり、本研究でもこの方法を採用している。脂肪交雑は量的形質であるが、BMS No.を基準にサンプルを上位群と下位群に分類し、質的形質として上位群・下位群を症例群・対照群とみなして症例・対照研究を行うこととした。

サンプル収集

一般集団からのサンプリングは、東京芝浦市場と大阪南港市場から2000～2008年の間に収集した24,512頭の去勢肥育牛を対象として、BMS No.の上位群と下位群を抽出した（BMS No.の上位と下位それぞれ10%以内）。後述の集団

の構造化の問題を考慮し、上位群と下位群で半きょうだいをマッチングさせた。例えば、ある種雄牛の産子を抽出する場合、上位群と下位群で半きょうだい数がそろるように抽出した。特定の種雄牛に偏らないように、半きょうだいの数は各種雄牛で上位下位 4 頭ずつ 8 頭以内になるようにした。103 頭の種雄牛の産子を上位群と下位群で 303 頭ずつ抽出し、合計 606 頭のサンプル（表 3）をゲノムワイド相関解析に用いた。

表 3. 解析サンプルの内訳

	芝浦	南港	合計
上位群	184	119	303
下位群	180	123	303
合計	364	242	606

50K SNP チップ

相関解析に用いる SNP（一塩基多型）は必ずしも直接表現型に影響を及ぼす SNP（責任 SNP）である必要はなく、責任 SNP と連鎖不平衡状態にあればよい。連鎖不平衡とは、特定の集団において、複数の座位におけるアレルの配偶子内での存在が非独立（連鎖）の状態を示す。連鎖不平衡が強い領域をハプロタイプブロック（連鎖不平衡ブロック）といい、Khatkar ら（*Genetics*, **176**: 763-772, 2007）によると、ウシのハプロタイプブロックの平均の長さは約 70 kb であると算定されている。すなわち、理論的にはゲノム上に 70 kb に一個の間隔で SNP を配置すれば全ゲノムをカバーした相関解析ができることになる。ただし、ハプロタイプブロックの長さはばらつきが大きく、数 kb から数 100 kb にもおよび一定ではないことに注意が必要である。

イルミナ社から発売されたウシ 50K SNP チップは 54,001 個の SNP をタイピングすることができる。しかし、相関解析に使うマーカーは黒毛和種集団内で多型性のあるマーカーでなければならない。マイナーアレル頻度が 0.01 以上を基準としてマーカーを選抜すると 50K SNP のうち、黒毛和種集団で解析に使える SNP 数は約 40,000 であった。40,000 SNP のマーカー間隔は大半が 20~200 kb の範囲内にあり、平均マーカー間隔は約 63 kb でほぼゲノム全体をカバーしていると考えられる（図 2）。従来の半きょうだい家系解析で特定できる QTL 領

域の長さは 10~20 cM であるが、ゲノムワイド相関解析ではそれよりも大幅に狭い範囲の数 10—数 100 kb に QTL 領域を特定できることが期待される。

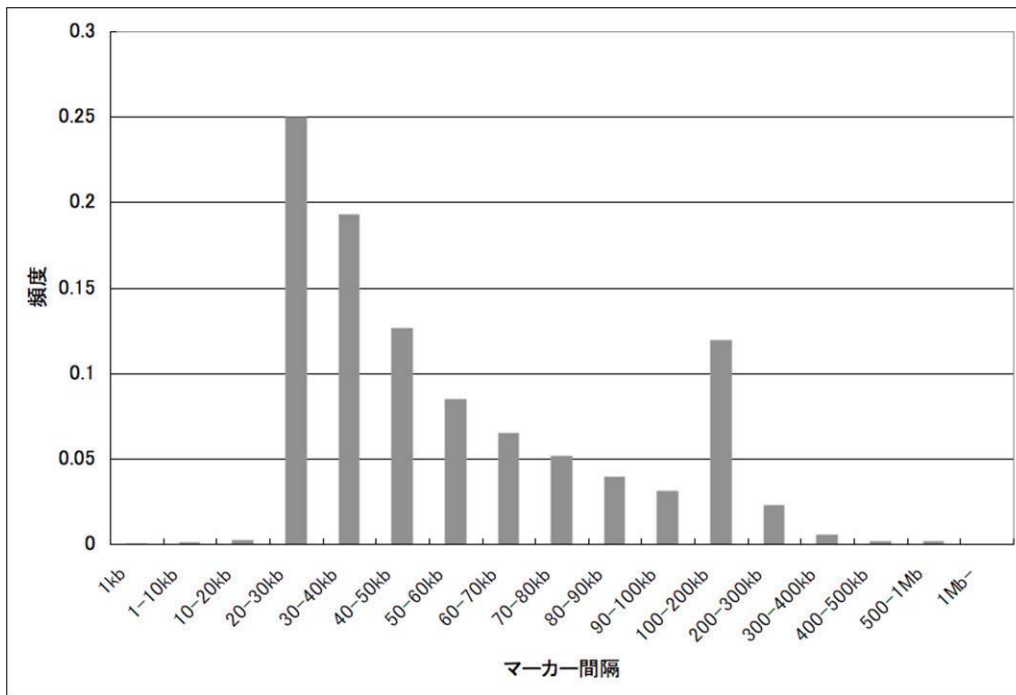


図 2. 50K SNP のマーカー間隔

実際のタイピングでは、血液あるいは脂肪サンプルから抽出したゲノム DNA を使って、3 日間で 1 度に 96 サンプルをタイピングすることができる。従来のシーケンシングによる SNP の型判定と比較して、実験に必要な労力や時間が大幅に削減できる。

統計解析

症例・対照研究では、SNP 毎に 2 群間のアリル頻度 (A,a)、あるいは遺伝子型頻度 (AA, Aa, aa) の偏りを検定する。アリル頻度の場合は 2×2 の分割表について、遺伝子型頻度の場合は 2×3 の分割表について χ^2 乗検定や Fisher の正確検定、Armitage 傾向検定などを行う。

多数の SNP について検定を行う場合、多重検定の問題が生じる。すなわち、1 つの SNP についての検定における有意水準は 0.05 で良いが、同じ基準で 40,000 個の検定を行えば、2,000 個の偽陽性が検出されることになる。これを

解決するための最も保守的な方法として Bonferroni の補正が知られている。これは単一の検定における有意水準を SNP 数で除した値を多重検定の有意水準とするものである。40,000 SNP の検定では $0.05/40,000 = 1.25 \times 10^{-6}$ が有意水準となる。ただし、各 SNP が完全に独立していない場合（例えば複数の SNP が連鎖不平衡状態にある場合）、過剰に保守的な検定となってしまう。

多重検定の問題を解消するもうひとつの方法として、実際に観察された統計量の、帰無仮説において期待される検定統計量からの乖離を可視的に示す方法がある。すべての SNP に形質と相関がなければ統計量の分布は帰無仮説における分布に従い、平均値は平坦分布となる。帰無仮説のもとで期待される P 値を横軸に、実際に観察された P 値を縦軸にとった Q-Q (quantile-quantile) プロット (図 5、後に掲載) では、形質と相関のない SNP は $y = x$ のグラフ上に分布すると期待されるが、相関のある SNP は $y = x$ の直線からずれるはずである。

集団の構造化

ゲノムワイド相関解析の解析対象集団が遺伝的バックグラウンドの異なるいくつかの分集団から構成されている状態を集団の構造化と呼ぶ。構造化の影響が大きいとき、例えば症例・対照研究で症例・対照間の分集団の比率が均一でない（血統に偏りがある）場合、分集団間でアリル頻度に差がある座位が解析対象の形質とは相関がないにも関わらず偽陽性として検出される (図 3)。

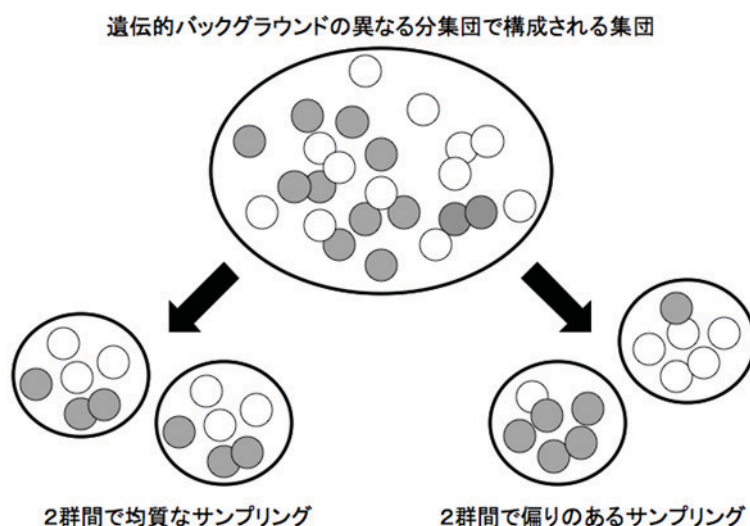


図 3. 集団の構造化

家畜としてのウシは品種を確立する過程で集団のランダムさを排除し、特定の形質を固定することが歴史的に行われてきた。肉用牛として改良が進められてきた黒毛和種集団は、種雄牛の系統（例えば田尻系、気高系など）によっていくつかの分集団にわかれていることが予想される。そのため、脂肪交雑の相関解析において血統が偏らないように、前述の通り上位群と下位群で半きょうだいの数をそろえてサンプルを抽出した。

統計プログラムを用いて構造化の程度を把握し補正することもできる。構造化の程度を推測し過大評価された統計量を補正する Genomic Control 法や、主成分分析を利用して構造化を補正する EIGENSTRAT などがある。Genomic Control は観察された検定統計量のふくらみを帰無仮説における χ^2 統計量の分布と比較することで構造化の程度を推測する手法である。EIGENSTRAT はサンプル数×SNP 数の膨大な遺伝子型情報から、その集団の個体間の遺伝的なばらつきを最大にする成分から第 1 成分、第 2 成分、第 3 成分…と順次決定していく。個体毎に各成分の固有値が与えられ、第 1 成分、第 2 成分について平面上にプロットすると、個体間の遺伝的距離を視覚化できる。黒毛和種集団を対象にこの解析を行った場合、気高系、田尻系、藤良系の 3 系統に大まかに分類される傾向が見られる（図 4）。症例・対照間で有意差のある成分で各個体の遺伝子型値と表現型値を補正することで構造化の影響を低減することができる。

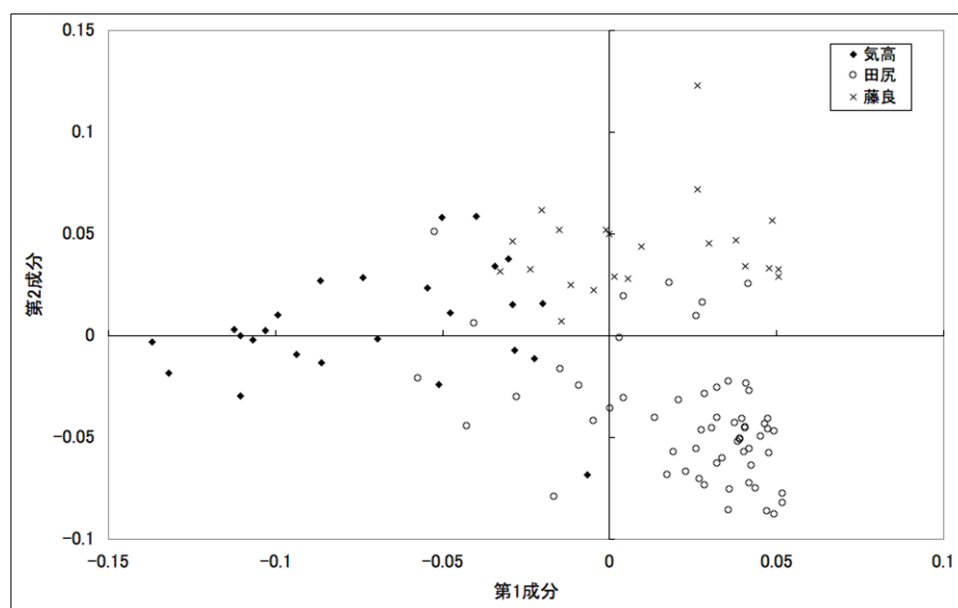


図 4. 主成分分析の第 1・第 2 成分のプロット

これまでの成果

肥育去勢牛 606 頭を用いて脂肪交雑を対象としたゲノムワイド相関解析を行った。EIGENSTRAT プログラムを用いて主成分分析による構造化の補正を行った。Armitage 傾向検定で遺伝子型頻度の偏りを検定し、相加的モデル・優性モデル・劣性モデルを比較し、SNP ごとに最も p 値が小さくなるモデルを選択した。構造化の程度を示す指標となる Genomic Control の λ (1 に近いほど構造化の程度が小さい) は未補正では 1.39-1.53 であったが、主成分分析による補正後は 1.06-1.14 となった。

相関解析の結果、BTA 4、BTA 19、BTA 23 で脂肪交雑と相関のある SNP を検出した。これらの SNP は Q-Q plot で帰無仮説からの乖離が見られた。特に BTA 4 の SNP は $P = 6.1 \times 10^{-7}$ で Bonferroni の補正を考慮しても有意であった(図 5)。BTA 4 の SNP は近傍の SNP と約 500 kb の範囲にハプロタイプブロックを構成しており、この領域は家系解析で検出された脂肪交雑 QTL の近くに存在していた(図 6)。

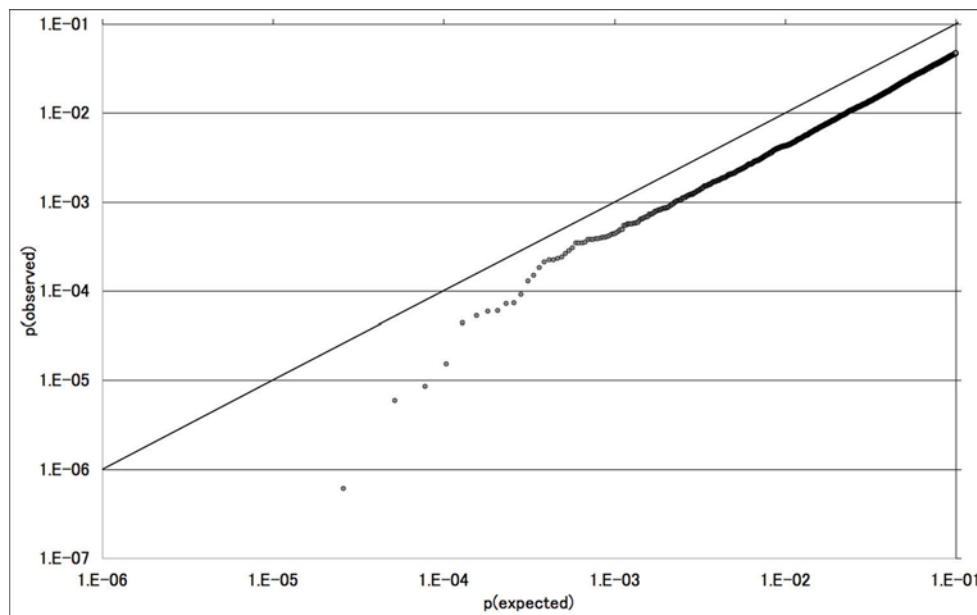


図 5. 脂肪交雑の Q-Q plot

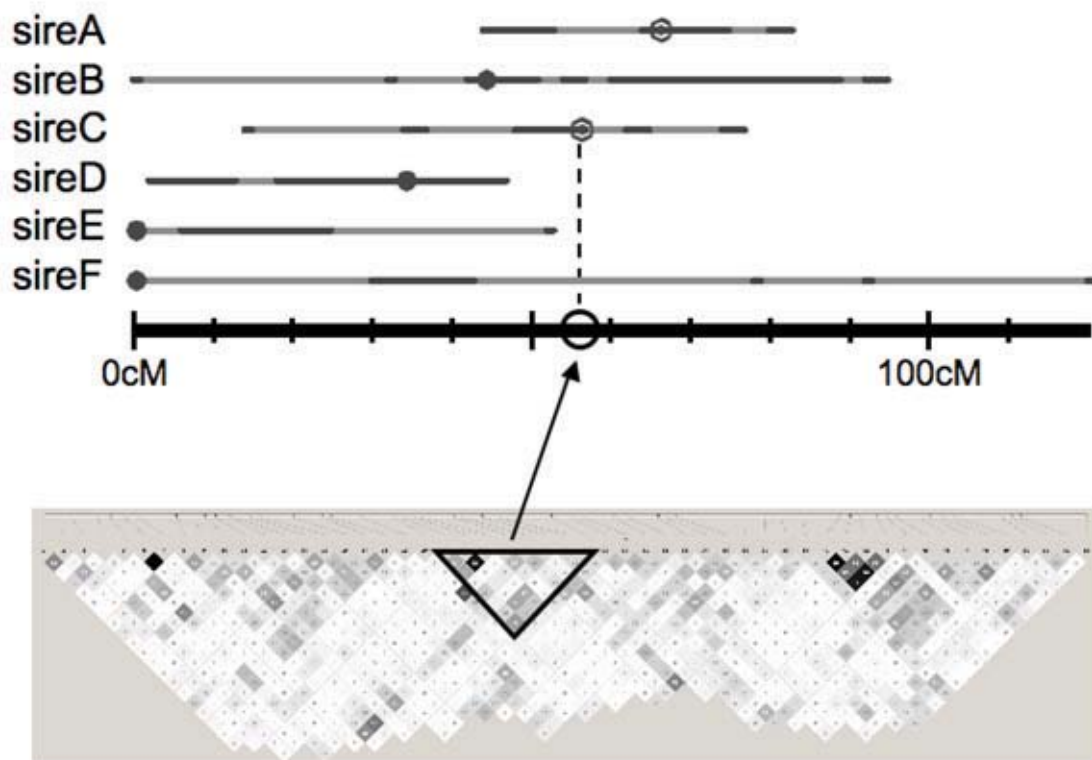


図 6. 家系解析による脂肪交雑 QTL 領域と相関解析のハプロタイプブロック

おわりに

家系解析でも検出されている座位に脂肪交雑と相関のある QTL 領域を検出することができ、ゲノムワイド相関解析は有効な手法であると考えられた。

しかし、一般集団とは言っても半きょうだい数が多く近交度の強い黒毛和種集団では集団の構造化の影響が避けられず、サンプリング方法が非常に重要になってくる。今後、繁殖性や飼料効率などの形質についてもゲノムワイド相関解析を進めるために、組織的なサンプリング体制を整えることが必要不可欠であると考えられる。

4. 委員会・会議等の開催

1) 育種推進検討委員会

この委員会は、当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、必要な助言を行うために開催されている。

平成 20 年度からの新規事業の立ち上げに伴い、第 1 回目の委員会は平成 20 年 8 月 22 日東京で開催された。議事内容は次の通りであった。

- ① 事業内容及び達成目標について
- ② 平成 20 年度計画について
- ③ 和牛知的財産権取得・活用推進協議会について
- ④ 話題提供：農業分野における最新ゲノム解析技術の応用
- 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諒とされた。

【育種推進検討委員会委員】

小畑 太郎	(社) 農林水産先端技術産業振興センターSTAFF 研究所 研究開発第 2 部長
鹿志村 均	全国畜産関係場所長会会長 (茨城県畜産センター長)
国枝 哲夫	岡山大学農学部 総合農業科学科教授
武政 政明	(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
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
向井 文雄	(社) 全国和牛登録協会会長
矢野 秀雄	(独) 家畜改良センター理事長

話題提供 (招聘講師)

登内 未緒 イルミナ株式会社マーケティング

2) 技術推進委員会

この委員会は、当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、助言するとともに、研究開発成果の学術的評価するため平成 13 年度より開催されている。平成 20 年度委員会は、平成 21 年 2 月 3 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 20 年度の研究成果発表

- (a) 先天性乳頭欠損症責任領域-1 (ATPP-1) のファインマッピング
- (b) SAGE によるウシ脂肪細胞分化遺伝子プロファイル
- (c) 黒毛和種脂肪交雑 QTL (Marbling-3) の責任遺伝子の同定に向けて
- (d) ウシ 50K SNP チップを用いたゲノムワイド相関解析
- (e) 黒毛和種枝肉重量 QTL (CW-1) の責任遺伝子の同定に向けて
- (f) 経済形質 QTL マップと枝肉重量 QTL (CW-2) の解析

② 平成 20 年度のその他の研究成果と平成 21 年度の研究計画について

③ 講評

【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
美濃部 侑三	(株) 植物ゲノムセンター代表取締役社長

3) 牛有用ゲノム等探索・知的財産化事業に係る技術推進委員会等

この委員会は、平成 18 年度から当研究所が行う「牛有用ゲノム等探索・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するとともに、事業の実施結果の確認及び達成目標の評価を行うものとして開催されている。

平成 20 年度において、検討会が平成 20 年 4 月 14 日に東京で開催され、技術推進委員会が平成 21 年 3 月 3 日に東京で開催された。それぞれの議事は次の通りであった。

(1) 検討会

- ① 今後の牛ゲノム研究の展開方向について
- ② 附属動物遺伝研究所の有用遺伝子探索について
- ③ 討議

【検討委員】

辻 莊一	和牛知的財産権取得・活用促進協議会会長
新山 正隆	(社) 家畜改良事業団専務理事
松永 直行	農業組合法人松永牧場 牧場長
吉村 豊信	(社) 全国和牛登録協会専務理事

(2) 技術推進委員会

- ① 牛有用ゲノム等探索・知的財産化事業の各年度成果について
(ウシの繁殖性関連遺伝子、脂肪代謝(脂肪壊死)関連遺伝子の探索について)
- ② 当該事業の成果の総括と評価について
- 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
富樫 研治	(独) 農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター研究管理官
新山 正隆	(社) 家畜改良事業団専務理事
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推進事業(国補)の一環である「DNA 育種基盤の確立」に関わる全国推進会議である。平成 13 年度から当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 20 年度における共同研究参画機関は 19 道県（北海道、青森、岩手、宮城、秋田、山形、福島、岐阜、兵庫、鳥取、島根、岡山、広島、佐賀、長崎、熊本、大分、宮崎、鹿児島）であり、本事業の枠組み外で当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 20 年度全国 DNA 育種推進会議は平成 20 年 10 月 10 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 動物遺伝研究所の平成 20 年度事業について
- ② これまでの主要成果と平成 20 年度計画について
 - (a) QTL マップ更新および効果検証（宮城、熊本、大分、家畜改良事業団、動物遺伝研究所）
 - (b) 繁殖性について（岐阜）
- ③ 平成 20 年度事業の実施計画と進捗状況について
 - (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) イルミナ SNP チップを用いた脂肪壊死のゲノムワイド相関解析
- ⑤ 和牛知的財産権取得・活用推進協議会について

第 2 回の平成 20 年度全国 DNA 育種推進会議は平成 21 年 2 月 25 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による平成 20 年度の事業成果の報告（北海道、青森、岩手、宮城、島根、長崎、鹿児島）
- ② 平成 20 年度の動物遺伝研究所の研究進捗状況
 - (a) 多機能性 QTL（Pleiotropic QTL）の検定について
 - (b) イルミナ SNP チップを用いたゲノムワイド相関解析
- ③ 平成 20 年度事業成果のまとめと今後の進め方について
 - (a) 複数家系で検出された経済形質 QTL のハプロタイプ比較結果

(b) 昨年度提案した繁殖性・飼料効率ゲノム解析の現況

④ 討議

5) 研究会等の開催

① 第3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20年10月9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 家畜飼養と遺伝子発現

- (1) 「代謝調節による国内草資源高度活用型の革新的牛飼養システムの開発」(後藤 貴文、九州大学大学院農学研究科)

第2部 ヒト・マウスのゲノム解析最前線と今後の展望

- (1) 「マウス亜種間コンソミック系統によるゲノム機能解析」(城石 俊彦、国立遺伝研究所・系統生物研究センター)
- (2) 「糖尿病の遺伝素因とテーラーメイド医療」(春日 雅人、国立国際医療センター研究所)

② 招待講演

当研究所では、ウシゲノム研究の進展を図るため、平成20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セミナーを開催した。

- (1) 「大脳新皮質の形成メカニズムの解明を目指して」、佐々木 慎二 (慶応義塾大学医学部解剖学教室助教)、平成21年2月9日

- (2) 「細胞達による形作りの仕組み」、仲嶋 一範 (慶応義塾大学医学部解剖学教室教授)、平成21年3月18日

③ 動物遺伝育種シンポジウム組織委員会による第 14 回シンポジウム「動物ゲノム解析と新たな育種戦略：動物における疾患の遺伝的コントロール」を、動物遺伝育種学会と共催した。

開催日：平成 20 年 11 月 30 日

開催場所：岡山大学（津島キャンパス）自然科学研究棟（岡山市）

内容：

(1) 「乳房炎抵抗性遺伝子の同定」

杉本 真由美（（独）家畜改良センター技術部）

(2) 「MHC をマーカーにした牛白血病抵抗性牛作出に向けた育種戦略」

間 陽子（（独）理化学研究所）

(3) 「ブタの MHC ハプロタイプと抗体産生」

安藤 麻子（東海大学）・今枝 紀明（岐阜県畜産研究所）・北川 均
（岐阜大学応用生物科学部）

(4) 「ニワトリ MHC 領域の多型データベースの構築と感染症研究への応用」

細道 一義・椎名 隆（東海大学医学部）

(5) 「水産分野における耐病性形質のマーカー選抜育種研究」

坂本 崇・岡本 信明（東京海洋大学海洋科学部）

5. 委託研究

当研究所の研究と深く関わりを持つテーマについて、平成 20 年度は次の 7 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) 脂肪交雑に影響を及ぼす遺伝子の単離とその機能解析（新規）

① 委託先：明治大学農学部

② 委託研究者：溝口 康

- 3) 子牛の発育不全症に係る遺伝的研究（平成 17 年度より継続）
 - ① 委託先：北里大学獣医畜産学部
 - ② 委託研究者：渡辺 大作

- 4) 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（平成 19 年度より継続）
 - ① 委託先：京都大学農学部
 - ② 委託研究者：山田 宣永

- 5) ウシ経済形質研究のためのモデルマウス系樹立とその分子相関の解明（新規）
 - ① 委託先：新潟大学医学部
 - ② 委託研究者：崎村 健司

- 6) 和牛の繁殖性の分子遺伝学的解明（新規）
 - ①委託先：鹿児島県肉用牛改良研究所
 - ②委託研究者：溝下 和則

- 7) 飛騨牛における繁殖性の分子遺伝学的研究（新規）
 - ① 委託先：岐阜県畜産研究所
 - ② 委託研究者：小林 直彦

6. 研修員の受け入れ

所属機関名	氏名	受入期間
大分県農林水産研究センター畜産試験場	藤田 達男	平 20.05.26～06.06
青森県農林総合研究センター畜産試験場	鈴木 晶夫	平 20.07.07～07.18
青森県農林総合研究センター畜産試験場	小野 博之	平 20.07.10～07.18
熊本県農業研究センター畜産研究所	古田 雅子	平 20.07.14～08.08
佐賀県畜産試験場	大坪 利豪	平 20.07.31～08.08
山形県農業総合研究センター畜産試験場	中嶋 宏明	平 20.08.15～08.22
岡山県総合畜産センター	中藤 由紀	平 20.09.24～10.08
島根県畜産技術センター	中村 亮一	平 20.09.22～10.17
岐阜県畜産研究所	松橋 珠子	平 20.10.06～10.23
長崎県肉用牛改良センター	丸田 俊治	平 20.11.04～11.26
大分県農林水産研究センター畜産試験場	渡邊 直人	平 21.01.19～01.23
兵庫県立農林水産技術総合センター 北部農業技術センター	秋山 敬孝	平 21.01.19～01.30
岐阜県畜産研究所	松橋 珠子	平 21.01.19～02.06
青森県農林総合研究センター畜産試験場	鈴木 晶夫	平 21.01.26～02.06
青森県農林総合研究センター畜産試験場	小野 博之	平 21.01.26～02.06
宮城県畜産試験場	齊藤 陽介	平 21.01.26～02.06
鹿児島県肉用牛改良研究所	瀬戸口 浩二	平 21.02.09～02.24
島根県畜産技術センター	中村 亮一	平 21.02.26～03.13
大分県農林水産研究センター畜産試験場	渡邊 直人	平 21.02.26～03.13
佐賀県畜産試験場	大坪 利豪	平 21.03.10～03.19
宮崎県畜産試験場	石橋 大輔	平 21.03.10～03.19
岐阜県畜産研究所	小林 直彦	平 21.03.13～03.19

第3節 總 務

第3節 総務

1. 職員名簿（平成21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	平野 貴
	研究員	佐々木 慎二
	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	榎本 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
	臨時職員	吉田 加奈子
	臨時職員	小松 まゆみ

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20年4月16日	相山 美幸	動物遺伝研究部臨時職員	
平成20年10月16日	吉田 加奈子	動物遺伝研究部臨時職員	
平成21年2月16日	小松 まゆみ	動物遺伝研究部臨時職員	
平成21年3月1日	佐々木 慎二	動物遺伝研究部研究員	

2) 職員の退職・退任

退職・退任年月日	氏名	所属	備考
平成 21 年 1 月 29 日	相山 美幸	動物遺伝研究部臨時職員	

3. 職員の海外出張

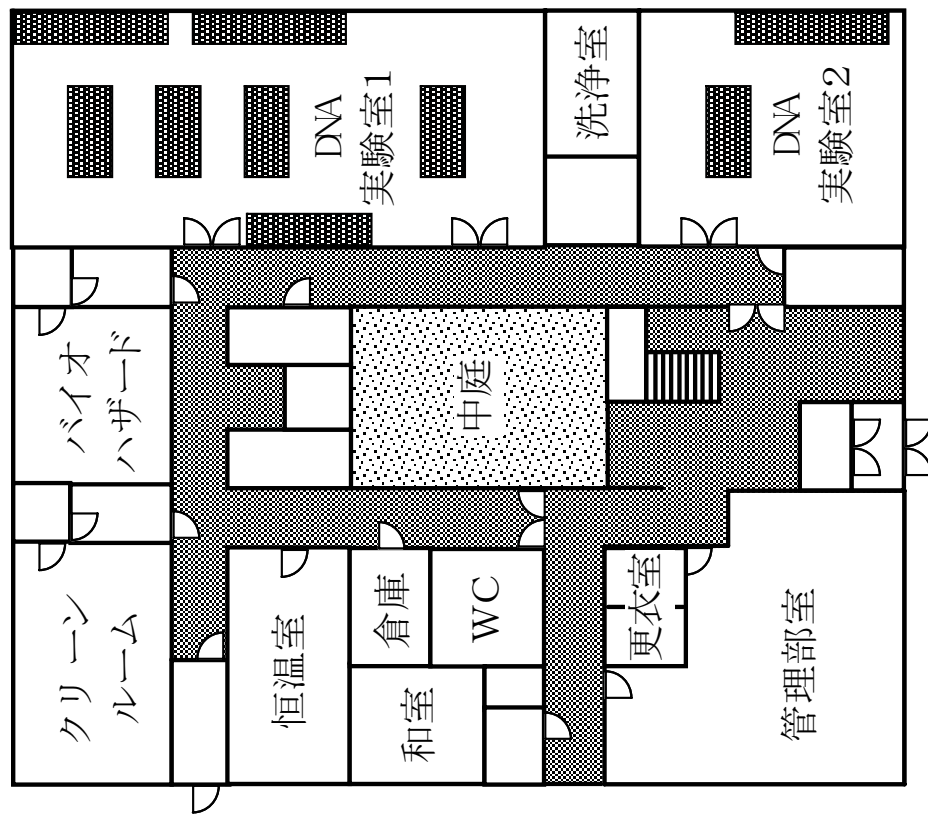
氏名	出張先	期間	用務
高須賀 晶子	オランダ	平 20.07.19～07.26	オランダ国アムステルダム市で開催された第 31 回国際動物遺伝学会 2008 年大会に参加
渡邊 敏夫	オランダ	平 20.07.19～07.26	オランダ国アムステルダム市で開催された第 31 回国際動物遺伝学会 2008 年大会に参加
平野 貴	オランダ	平 20.07.19～07.26	オランダ国アムステルダム市で開催された第 31 回国際動物遺伝学会 2008 年大会に参加
渡邊 敏夫	アメリカ	平 20.10.27～11.03	米国における「ウシ SNP を利用したゲノム能力予測手法」に関する調査
高須賀 晶子	アメリカ	平 21.01.09～01.16	米国サンディエゴ市で開催された第 17 回植物・動物ゲノム学会に参加
渡邊 敏夫	アメリカ	平 21.01.09～01.16	米国サンディエゴ市で開催された第 17 回植物・動物ゲノム学会に参加

4. 施設・機器の整備

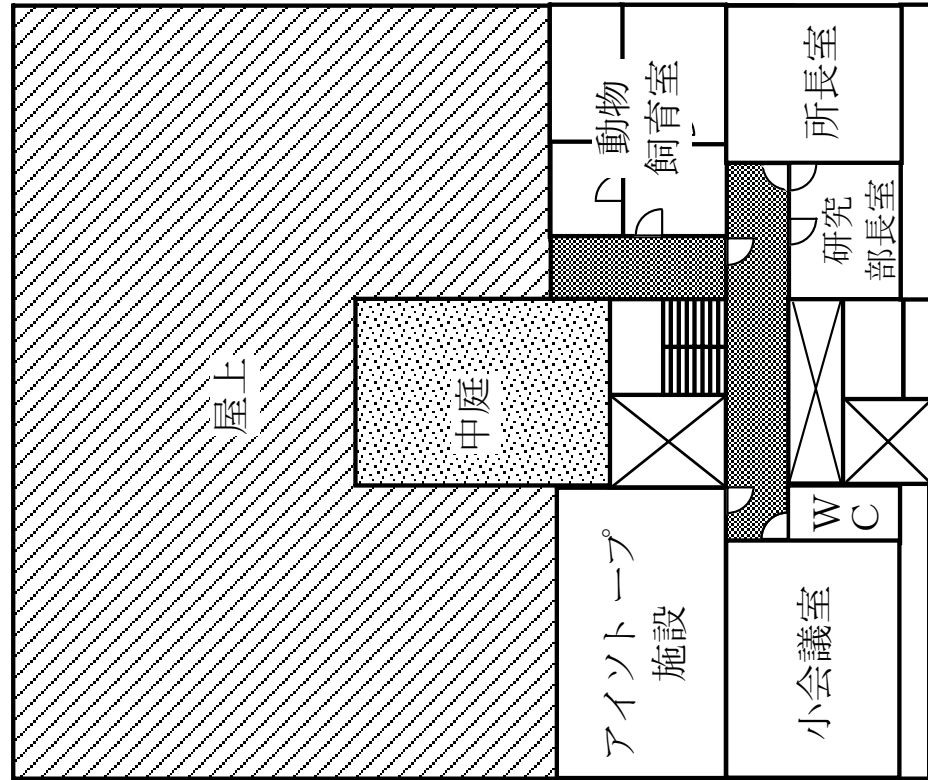
1) 施設

研究施設の平面図は、55～56 ページのとおり。

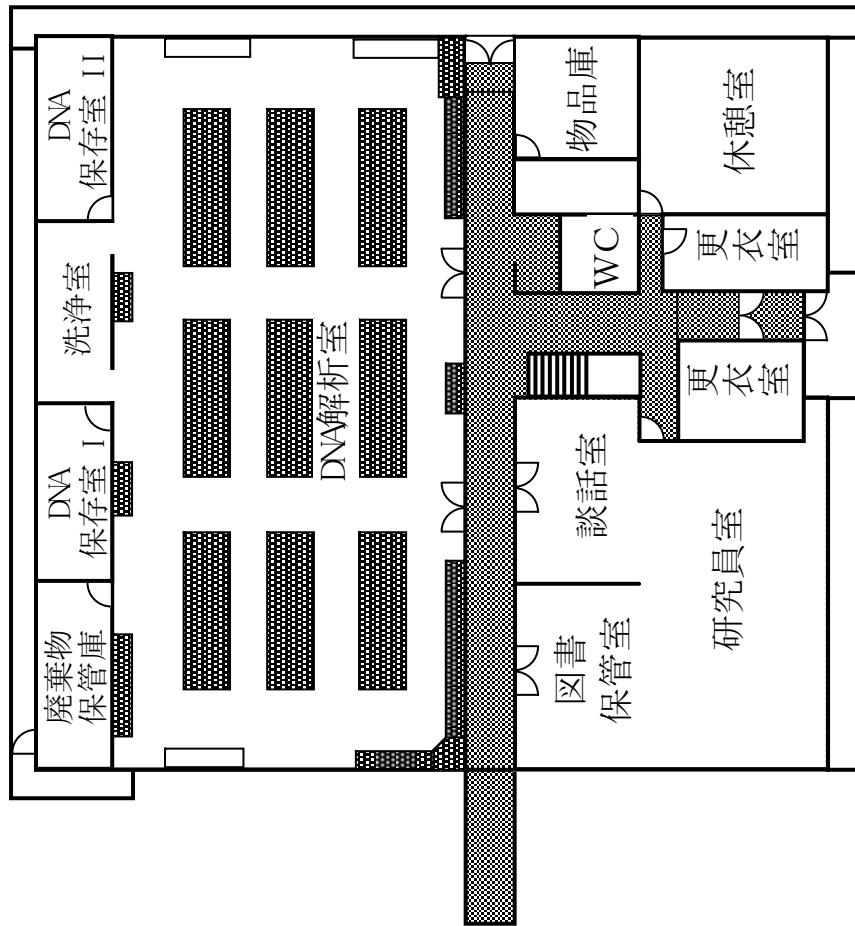
本館1階 (742m²)



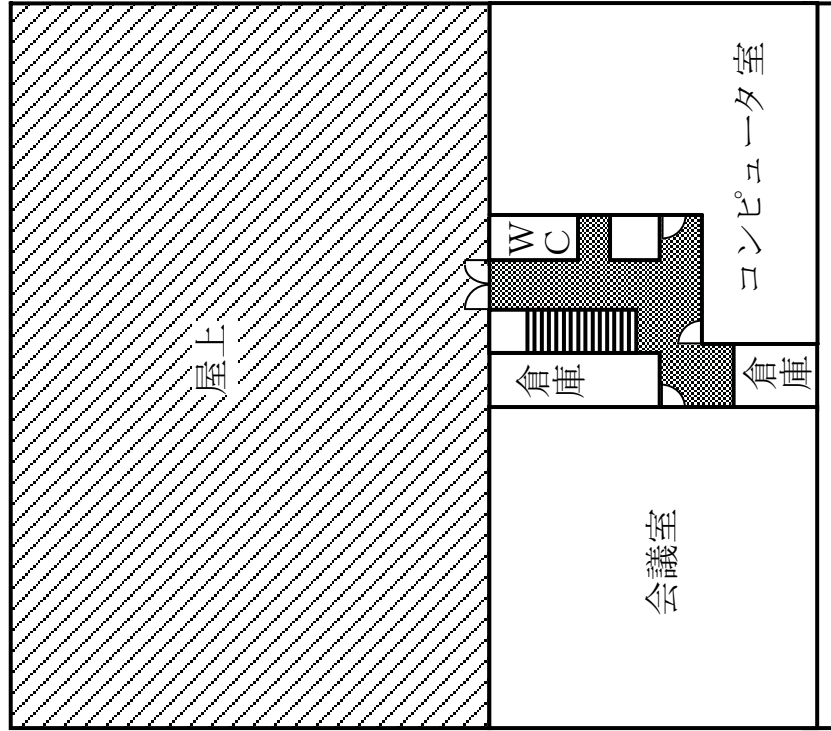
本館2階 (258 m²)



別館1階 (788 m²)



別館2階 (306 m²)



2) 平成 20 年度購入の主要機器 (単価 百万円以上)

機 器 名	式 数
低速冷却遠心機 (トミー精工社製 トミーLX-141)	1
蛍光顕微鏡 (オリンパス社製 倒立型電動リサーチ顕微鏡 IX81N-22TFL/PH-2-SP)	1
DNA抽出機 (キアゲン社製 QIAsymphony-SP)	1
バイオアナライザー (アジレントテクノロジー社製 AGILLENT 2100)	1
生体遺伝子導入装置 (ネッパージーン社製 CUY-21-SC)	1
実体顕微鏡システム (オリンパス社製 研究用 SZX2-ZB16)	1

5. 購読雑誌一覧

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

第4節 資 料

Linkage disequilibrium structures in cattle and their application to breed identification testing

T. Watanabe, T. Hirano, A. Takano, Y. Mizoguchi, Y. Sugimoto and A. Takasuga

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

Summary

We examined the extent of linkage disequilibrium (LD) block lengths in four breed populations: Japanese Black, Angus, Hereford and Holstein. Three chromosomal regions in which QTL were previously mapped in Japanese Black populations were scanned with 84 microsatellite markers. The estimated LD lengths in these four purebred populations varied from 535 to 683 kb, which is much shorter than the values reported previously. Our findings suggest that QTL can be mapped in sub-centimorgan regions in these populations using an LD-mapping method. We also developed breed identification methods to distinguish Japanese Black from Angus, Hereford, Holstein and F₁ animals (Japanese Black × Holstein) respectively using the haplotypic frequencies of a pair of markers in the breed populations. After assessing the distributions of posterior probabilities to be Japanese Black, we obtained several pairs of markers that completely distinguished Japanese Black from the other breeds. We also obtained several combinations of six markers that completely distinguished Japanese Black animals from F₁ animals.

Keywords breed identification, cattle, haplotypic frequency, linkage disequilibrium.

Introduction

The degree of linkage disequilibrium (LD) in livestock populations has attracted much attention because it provides useful information regarding the plausibility of fine-mapping QTL and the potential for employing marker-assisted selection. In cattle, previous reports using a low density of microsatellite markers (~10-cM interval on average) showed that LD extends over several tens of centimorgans (Farnir *et al.* 2000; Odani *et al.* 2006). On the other hand, we previously fine-mapped a carcass weight QTL on BTA14 to a 1.1-Mb region using a high density of microsatellite markers (0.17-cM interval on average) (Mizoshita *et al.* 2005). Recently, Khatkar *et al.* (2007) reported that the average LD length was 69.7 kb using 15036 SNP markers (251.8 kb mean interval), although the median length was 2.9 kb and the largest was 2.3 Mb. These results indicate that LD length varies by chromosomal region and by population, and that a dense marker set is required to examine LD structures.

Address for correspondence

A. Takasuga, Shirakawa Institute of Animal Genetics, Odakura, Nishigo, Nishi-shirakawa, Fukushima 961-8061, Japan.
E-mail: takasuga@siag.or.jp

Accepted for publication 10 March 2008

Here, we examined LD structures of three QTL regions using a high density of microsatellite markers (intervals of 0.32–0.63 cM on average). Although SNPs might be more suitable for examining LD structures because they are more abundant in the genome, the numbers of SNPs available from the Bovine Genome Sequencing Project (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/>) in these regions were relatively low; thus we used microsatellite markers developed for fine-mapping. These QTL were for beef marbling (BTA14, Mizoshita *et al.* 2004; BTA21, Mizoguchi *et al.* 2006; and BTA7, Hirano *et al.* 2008) and carcass weight (BTA14, Mizoshita *et al.* 2004, 2005) and had been mapped in a Japanese Black population. In addition, a carcass weight QTL in the BTA14 region has been mapped in another breed population (Kim *et al.* 2003). Therefore, we compared LD structures in four breed populations: Japanese Black, Angus, Hereford and Holstein. Because selection within a livestock population increases the extent of LD around a QTL region (Schnabel *et al.* 2005; de Koning *et al.* 2006), a higher or a longer LD might be observed in the Japanese Black population.

The distribution of allelic/haplotypic frequencies of polymorphic markers in livestock varies depending on the population selection history. Haplotypic frequencies of the *DGAT1* locus (Winter *et al.* 2002) and the *myostatin* locus (Dunner *et al.* 2003), for example, are different among

cattle breeds. Differences in LD structures or haplotypic frequencies might be utilized to distinguish breed populations. We proposed a method to identify the breed of a DNA sample using the posterior probability calculated from observed genotypes, which will be useful to suppress beef breed falsification.

Materials and methods

Populations and DNA samples

Adipose tissues or white blood cells were collected from 103, 96, 51, 45 and 96 cattle from domestic Japanese Black, Holstein, Angus, Hereford and F₁ (Japanese Black × Holstein) populations respectively. The Japanese Black and F₁ samples were collected at Tokyo Metropolitan Central Wholesale Market. Angus and Hereford samples were collected in the Hokkaido prefecture. Holstein samples were collected from dairy farms from a variety of regions in Japan. Japanese Black and Hereford samples included up to two paternal half-sibs. Holstein, Angus and F₁ samples included no half-sibs. The DNA was prepared from adipose tissue or white blood cells using standard protocols.

Markers and genotyping

We used 35, 23 and 26 microsatellites as polymorphic DNA markers on chromosomes 7, 14 and 21 respectively; these covered 10, 8 and 7 cM (8.0, 6.8 and 8.1 Mb) respectively. Of the 84 microsatellite markers, 18 were newly developed from BAC DNA as described previously (Mizoshita *et al.* 2005). These included *DIK3100* (AB297942), *DIK3101* (AB297943), *DIK3102* (AB297944), *DIK3103* (AB297945), *DIK3104* (AB297946), *DIK3105* (AB297947), *DIK3106* (AB297948), *DIK3107* (AB297949), *DIK3108* (AB297950), *DIK3109* (AB297951), *DIK3110* (AB297952), *DIK3111* (AB297953), *DIK3112* (AB297954), *DIK3113* (AB297955), *DIK3114* (AB297956), *DIK8060* (AB297957), *DIK8061* (AB297958) and *DIK8065* (AB297959). Briefly, DNA fragments (0.5–1.0 kb) were subcloned into pUC118. Microsatellite-containing bacterial clones were identified using poly(dA-dC)poly(dG-dT) (Amersham Pharmacia Biotech) as a probe. PCR primers were designed for microsatellites with more than nine repeats using PRIMER3 (<http://primer3.sourceforge.net/>). The map positions of these markers are shown in Table S1. The genetic map locations of the newly developed markers were calculated using data from a Japanese Black paternal half-sib family (872 offspring) with CRIMAP software (Green *et al.* 1990).

PCR conditions were described previously (Mizoshita *et al.* 2004). PCR products were resolved by electrophoresis using an ABI 3700 DNA analyser (Applied Biosystems). Genotype

data were captured using GENESCAN and GENOTYPER software (Applied Biosystems).

To compute population-pairwise estimates of Reynolds *et al.*'s (1983) coefficient of ancestry F_{ST} and Slatkin's (1995) genetic distance R_{ST} , we used the program ARLEQUIN 3.1.1 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>). The significance levels of F_{ST} and R_{ST} were calculated by a permutation test. Briefly, genotypic data from both populations were shuffled and resampled 10 000 times with the same size as the tested samples. The F_{ST} and R_{ST} values provided by the permutation distribute according to the null hypothesis that the two populations are the same.

Estimation of haplotypic frequencies

Because Hardy–Weinberg (HW) equilibrium is assumed for the estimation of haplotypic frequencies of a pair of markers in a population, we tested HW proportions of all markers using a Monte-Carlo approximation of Fisher's exact test (Weir 1996). The repeat number of Monte-Carlo simulations was 1 000 000. Markers that were not in HW equilibrium ($P < 0.01$) were excluded and were not subjected to subsequent estimation of haplotypic frequencies.

Haplotypic frequencies of marker pairs were estimated using an expectation-maximization (EM) algorithm (Dempster *et al.* 1977) in each population. Seeding of an initial value was performed 50 times to avoid local maximization of likelihood and to choose the estimate with the highest likelihood.

Calculation of LD coefficient and degree of LD

The χ^2 value was computed following Hedrick (1987) for all syntenic marker pairs in each population. To determine the threshold for LD, χ^2 values were calculated using permuted genotypic data (1000 times) for each pair of syntenic markers and the 99th and 95th percentiles from the bottom of the χ^2 distribution were regarded as the thresholds for $P = 0.01$ and $P = 0.05$ respectively.

To observe the decline of LD along a map distance, a scatter of χ^2 and a fitted curve were drawn. The curve was based on the equation of Sved (1971):

$$LD_i = \frac{1}{1 + 4\beta d_i} + e_i,$$

where LD_i is the observed LD for marker pair i , d_i is the distance in morgans for marker pair i , β is a coefficient that describes the decline of LD with distance and e_i is a random residual.

To compare the degree of cross-chromosomal LD among breed populations, the 99th and 95th percentiles were determined by calculating χ^2 values of all the non-syntenic marker pairs in each breed population.

Posterior probability to be Japanese Black

To distinguish Japanese Black from the other purebred populations, we calculated a posterior probability for the sampled specimen to be Japanese Black as follows. Assuming the possibility that a beef specimen is either Japanese Black or 'other', prior probabilities to be Japanese Black and to be 'other' were equally set to 0.5. When obtaining the genotypic data of a pair of syntenic markers (e.g. markers A and B), such as A_1A_2 and B_1B_2 , a posterior probability that the specimen is Japanese Black (P_{AB}) is:

$$P_{AB} = \frac{P_{1AB}}{P_{1AB} + P_{2AB}},$$

where P_{1AB} and P_{2AB} are the probabilities to be Japanese Black and to be 'other' respectively. If $A_1 = A_2$ or $B_1 = B_2$ (the phases are determined), P_{1AB} and P_{2AB} are:

$$P_{1AB} = 0.5f_{1A_1B_1}f_{1A_2B_2}$$

$$P_{2AB} = 0.5f_{2A_1B_1}f_{2A_2B_2}$$

and if $A_1 \neq A_2$ and $B_1 \neq B_2$ (the phases are not determined),

$$P_{1AB} = 0.5(f_{1A_1B_1}f_{1A_2B_2} + f_{1A_1B_2}f_{1A_2B_1})$$

$$P_{2AB} = 0.5(f_{2A_1B_1}f_{2A_2B_2} + f_{2A_1B_2}f_{2A_2B_1}),$$

where $f_{1A_1B_1}$ and $f_{2A_1B_1}$ are the haplotypic frequencies of A_1B_1 observed in the Japanese Black population and in the 'other' breed population respectively. The prior probability value was arbitrarily chosen because the assumption of prior probability values does not change ranks of posterior probability values observed with samples. A threshold value to distinguish two breeds was defined as the highest observed posterior probability value in the 'other' (non-Japanese Black) breed.

When assuming the specimen to be either Japanese Black or F_1 , a posterior probability to be Japanese Black was calculated in the same way. Because one of the parents of an F_1 individual is always Japanese Black and the other is Holstein, the probability to be Japanese Black (P_{1AB}) and to be F_1 (P_{2AB}) is as follows.

If $A_1 = A_2$ or $B_1 = B_2$,

$$P_{1AB} = 0.5 \cdot 2 \cdot f_{1A_1B_1}f_{1A_2B_2}$$

$$P_{2AB} = 0.5(f_{1A_1B_1}f_{2A_2B_2} + f_{1A_2B_2}f_{2A_1B_1})$$

and if $A_1 \neq A_2$ and $B_1 \neq B_2$,

$$P_{1AB} = 0.5 \cdot 2 \cdot (f_{1A_1B_1}f_{1A_2B_2} + f_{1A_1B_2}f_{1A_2B_1})$$

$$P_{2AB} = 0.5(f_{1A_1B_1}f_{2A_2B_2} + f_{1A_1B_2}f_{2A_2B_1} + f_{1A_2B_1}f_{2A_1B_2} + f_{1A_2B_2}f_{2A_1B_1}).$$

A posterior probability to be Japanese Black considering multiple pair of markers was also calculated. When

considering two pairs of markers, such as {A, B} and {C, D}, a posterior probability to be Japanese Black (P_{ABCD}) is:

$$P_{ABCD} = \frac{P_{1AB} \cdot P_{1CD}}{P_{1AB} \cdot P_{1CD} + P_{2AB} \cdot P_{2CD}},$$

where P_{1AB} is the probability to be Japanese Black with marker A and B calculated as above. Markers were chosen so that A and C, A and D, B and C, and B and D were not in LD ($P > 0.001$). Likewise, the number of combinations of marker pairs was increased to three.

Results and discussion

Genetic variability and LD structures in four breed populations

We genotyped 84 microsatellites from three chromosomal regions (BTA7, 14 and 21) in Japanese Black, Angus, Hereford and Holstein populations (103, 51, 45 and 96 samples respectively). The mean marker interval was 0.45, 0.32 and 0.63 cM on BTA7, 14 and 21 respectively. There was <5% missing genotype data for each marker in each population. The average heterozygosity of the markers was 0.61, 0.55, 0.56 and 0.55, and the average number of alleles was 6.4, 4.6, 5.1 and 5.8 in the Japanese Black, Angus, Hereford and Holstein populations respectively (Table S1). A marker was excluded if it deviated from HW equilibrium ($P < 0.01$) or was monomorphic in the population (Table S1) and was not subjected to subsequent calculations to estimate haplotypic frequencies (two for Japanese Black, four for Holstein, two for Angus and three for Hereford).

To examine genetic variability among these four populations, population-pairwise estimates of F_{ST} (Reynolds *et al.* 1983) and R_{ST} (Slatkin 1995) were calculated. To avoid bias due to genetic linkage between loci, we chose nine microsatellites (*DIK8036*, *DIK8000*, *DIK8061*, *INRA094*, *DIK4730*, *DIK7010*, *DIK3106*, *IDVGA39* and *DIK3113*), three from each chromosomal region, which were shown to be unlinked by the LD analysis described in the next section. Estimates of F_{ST} and R_{ST} are shown in Table 1. All of these values were highly significant ($P < 0.001$). The obtained F_{ST} values were similar to those observed in European breeds (Brown Swiss, Jersey and Holstein; 0.079–0.190) using 15 microsatellites (Hansen *et al.* 2002). The F_{ST} values between Japanese Black and the three other breeds were similar to those among the three breeds, which are originally from Europe. These results indicated that each population is genetically distinct, and that LD structures and haplotypic frequencies would therefore be different among the four breed populations.

To measure LD in the chromosomal regions, we used the standardized χ^2 , χ^2' (Yamazaki 1977; Hedrick 1987). Simulation studies by Zhao *et al.* (2005) demonstrated that

Table 1 Population-pairwise estimates of F_{ST} and R_{ST} .

	Japanese Black	Holstein	Hereford	Angus
Japanese Black		0.211	0.152	0.121
Holstein	0.312		0.172	0.165
Hereford	0.356	0.054		0.085
Angus	0.357	0.052	0.081	

F_{ST} estimates (above diagonal) and R_{ST} estimates (below diagonal). All values were highly significant ($P < 0.001$, by 10 000 permutations using ARLEQUIN).

$\chi^{2'}$ is the preferred measure of LD for multiallelic markers for purposes of QTL mapping. D' values calculated in non-syntenic marker pairs were much higher than the $\chi^{2'}$ values and did not appear to correspond to the reality of linkage equilibrium across chromosomes (Heifetz *et al.* 2005). Figure 1 illustrates the decline of $\chi^{2'}$ along the map distance between markers on BTA7, 14 and 21 in the Japanese Black, Angus, Hereford and Holstein populations. Rapid decays of LD in shorter distances (~ 2 cM) were observed in all regions and in all breed populations.

Using permuted genotypic data, the threshold values of $\chi^{2'}$ for each pair of syntenic markers were determined. The 99th and 95th percentiles from the bottom of the collected $\chi^{2'}$ values were regarded as the threshold values to reject the null hypothesis of LD at the 1% and 5% levels respectively. Figure 2 shows two-dimensional diagrams of LD in Japanese Black, Angus, Hereford and Holstein populations in the BTA7, 14 and 21 regions. An LD block length was determined as a side length of a square where $\chi^{2'}$ values exceeded the 5% critical value. The average LD length was 566, 535, 683 and 567 kb in the Japanese Black, Angus, Hereford and Holstein populations respectively (Table 2). The average lengths were not greatly different. The LD block size ranges were 22–2568 kb (Japanese Black), 0.2–3123 kb (Angus), 0.2–3303 kb (Hereford) and 16–1991 kb (Holstein). Selection in a livestock population increases the extent of LD around a QTL region on a chromosome. In commercial chicken broilers, higher LD was observed around the QTL region on chicken chromosome 4 (de Koning *et al.* 2006). Therefore, it is presumed that a superior haplotype (harbouring an allele more favourable for the trait of interest, Q) has been more strongly selected around a QTL region. Unexpectedly, the Q frequencies of BTA7 and 21, where marbling QTL mapped, were relatively low ($< 5\%$) in the Japanese Black samples (data not shown), indicating that these QTL have not yet been strongly selected. In the case of BTA14, the Q haplotype for carcass weight (composed of *DIK7019* and *DIK7015*), where carcass weight QTL have been mapped (Mizoshita *et al.* 2005), was 46% in the Japanese Black samples. This haplotype exists in an LD block of 2253 kb in Japanese Black, which is much larger than the

average block length. This may be caused by a strong selection on the carcass weight trait. In other breed samples, this Q haplotype was observed at 38% (Angus), 4% (Hereford) and 36% (Holstein). Though these Q haplotypes may not be identical-by-descent to each other across breeds, long LD blocks including this haplotype were also observed (Angus, 3123 kb; Hereford, 3303 kb; Holstein, 2253 kb), possibly indicating a similar strength of selection on the carcass weight trait.

In previous studies, LD lengths in the cattle genome were estimated to be several tens of centimorgans, in both Holstein (Farnir *et al.* 2000) and Japanese Black populations (Odani *et al.* 2006). The LD lengths of the four populations in the present study were estimated to be much shorter. One of the reasons that previously reported LD lengths were large is probably because the densities of the microsatellite markers (~ 10 -cM interval on average) were lower than the densities of those used in the present study (mean interval ~ 0.3 cM). The LD length of Holstein in this study was several times longer than the mean length (69.7 kb) recently reported by Khatkar *et al.* (2007), which was determined using 15036 SNP markers in the Australian Holstein population.

Our findings suggest that it is possible to map QTL in a sub-centimorgan region using LD mapping in these populations. Indeed, Mizoshita *et al.* (2005) narrowed down a carcass weight QTL in a 1.1-Mb region by LD mapping. We examined only $\sim 1\%$ of the total length of the cattle genome. Further studies are needed to reveal the genome-wide extent of LD in cattle.

Next, to examine cross-chromosomal LD, the 99th and 95th percentiles of non-syntenic $\chi^{2'}$ values were calculated and compared among the four breeds. Values were larger in Angus and Hereford than in Japanese Black and Holstein (Table 2). One of the reasons for these observations might be a difference in the degree of inbreeding. Angus and Hereford populations in Japan have been isolated and closed from European populations for about 40 years. The Japanese Black population has been isolated from other breeds for more than 60 years, while the Holstein population in Japan has not been closed. The number of Angus, Hereford, Japanese Black and Holstein cows available for calf production were 1845, 151, 620 300 and 1 058 000 respectively (The Ministry of Agriculture, Forestry and Fishery of Japan 2004). In Japan, the degree of inbreeding in Angus and Hereford may be more than in Japanese Black and Holstein. Indeed, the median P -value of cross-chromosomal LD, which is expected to be 0.5 with no cross-chromosomal LD, was 0.404 in Hereford samples and 0.458 in Holstein, indicating that the degree of cross-chromosomal LD in Hereford samples was greater than that of Holstein.

Development of marker sets for breed identification

Using the obtained genotypes, we aimed to develop a method to distinguish Japanese Black from the other breeds.

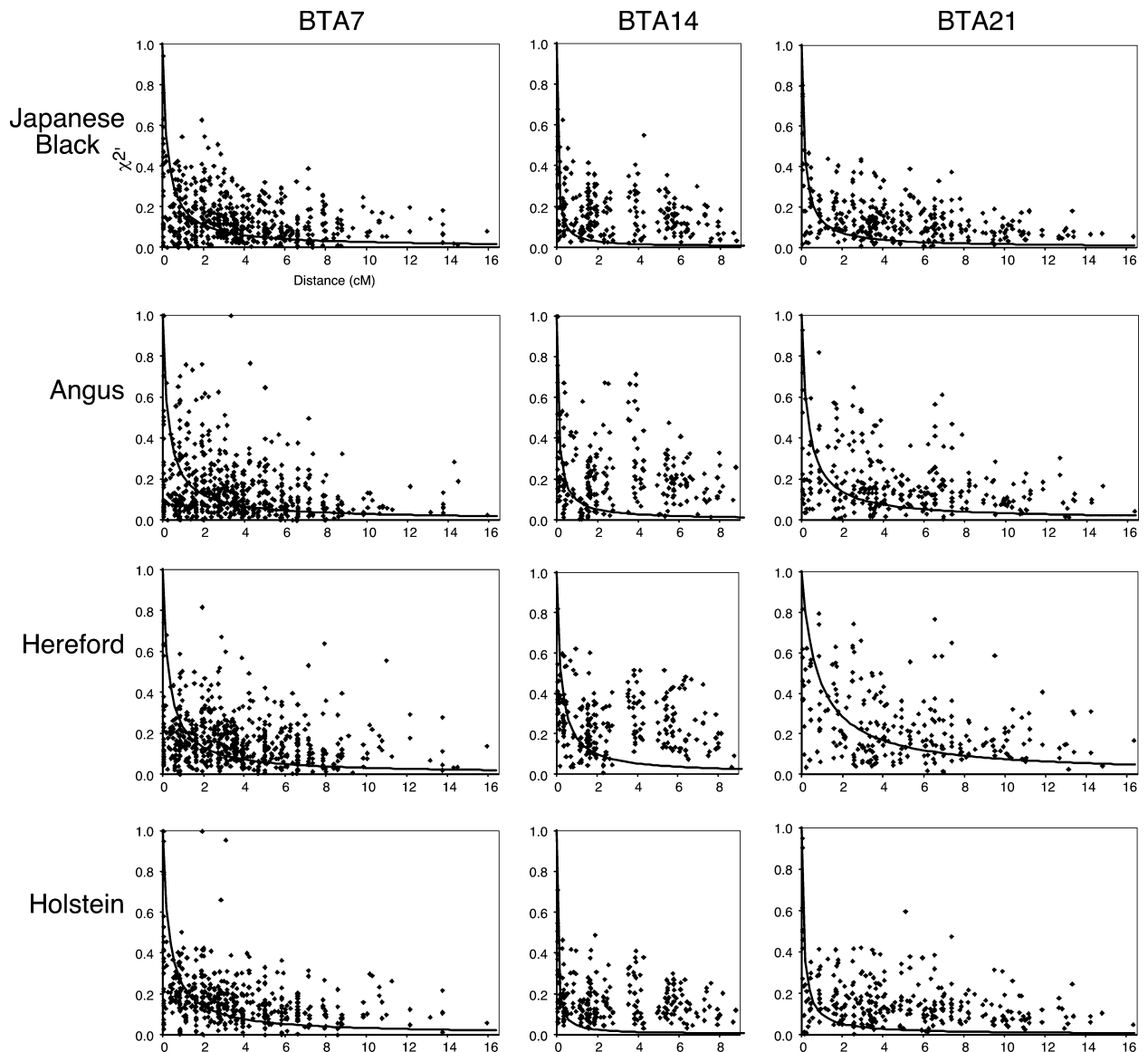


Figure 1 Scatter of χ^2 and decline of LD along a map distance in the BTA7, 14 and 21 regions of Japanese Black, Angus, Hereford and Holstein populations. The fitted curve is drawn based on the equation of Sved (1971).

For all possible pairs of syntenic markers, posterior probabilities to be Japanese Black were calculated for all samples in the Japanese Black population and in the other three purebred populations (see Materials and methods). We dealt with the posterior probability value not as a true posterior probability to be Japanese Black but as a kind of statistic. The numbers of syntenic marker pairs examined for the tests of Japanese Black/Angus, Japanese Black/Hereford and Japanese Black/Holstein were 1114, 1067 and 1018 respectively. If the lowest observed posterior probability value given by a pair of markers among Japanese Black samples was greater than the highest observed value among the other population samples, the pair of markers could be used to distinguish Japanese Black samples from the other breeds. The assumption of prior probability to be Japanese

Black did not influence our ability to distinguish breeds. Changing the prior probability between 0.1 and 0.9 caused the distributions of posterior probabilities of individuals to change; however, the proportions of individuals that exceeded a threshold value of each marker pair did not change where the highest observed posterior probability in the other breed value was defined as a threshold (data not shown). This is because a rank of a sample's posterior probability in tested samples depended only on the observed haplotypic frequencies in two populations and not on a prior probability.

We obtained 13, 9 and 6 pairs of syntenic markers that distinguished Japanese Black/Angus, Japanese Black/Hereford and Japanese Black/Holstein respectively (Table 3). The haplotypes of these perfect marker pairs tended to be present

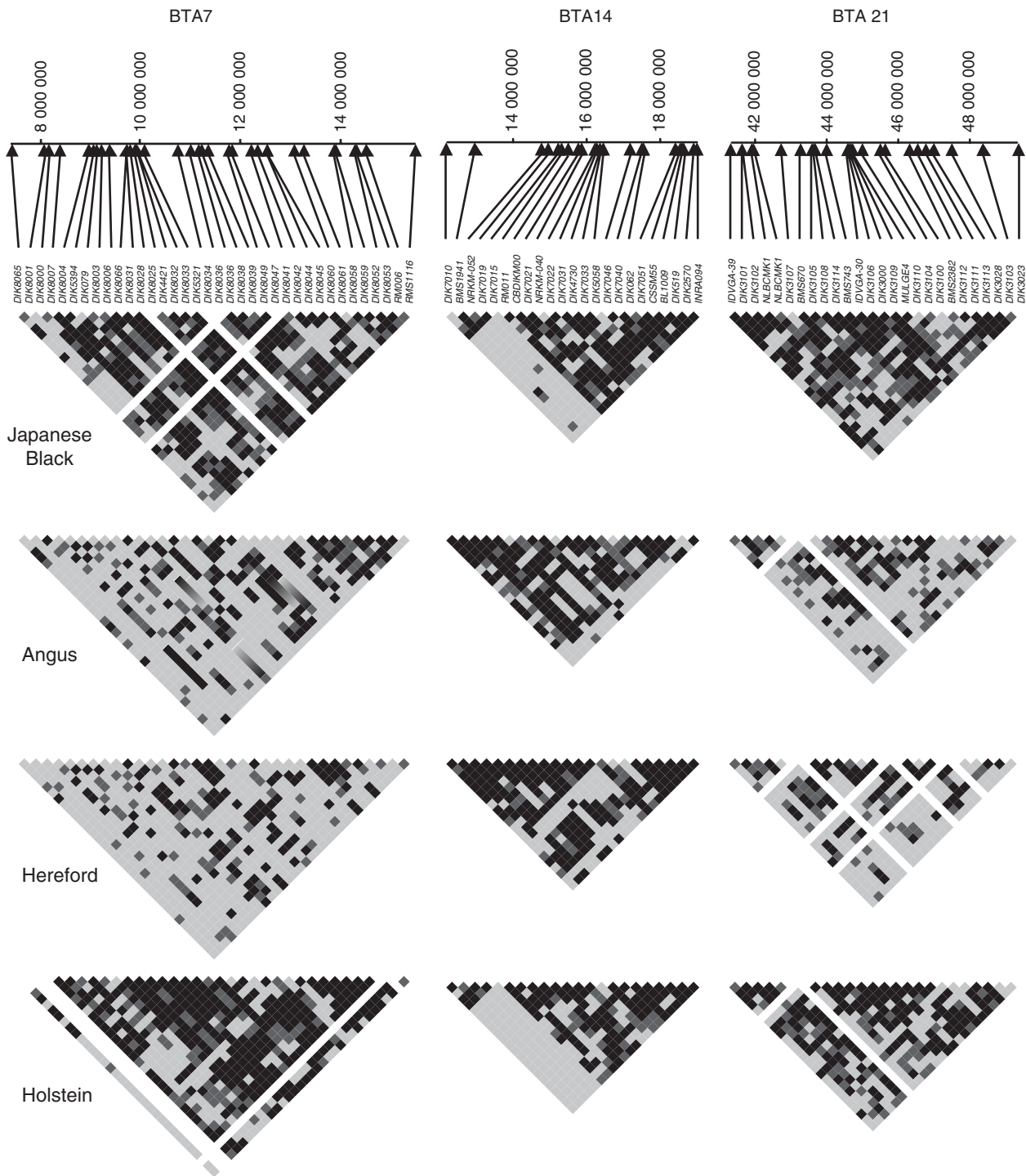


Figure 2 Two-dimensional diagrams of LD in the BTA7, 14 and 21 regions of Japanese Black, Angus, Hereford and Holstein populations. Degrees of LD are indicated by light grey ($P \geq 0.05$), dark grey ($0.01 \leq P < 0.05$) and black ($P < 0.01$). White gaps are the locations of excluded markers that are either monomorphic or not in HW equilibrium.

exclusively in the Japanese Black breed or in the other breed (Table S2).

Next, we applied the method to distinguish the Japanese Black animals from the F_1 animals (Japanese Black \times Holstein), which comprise 23% of the domestic beef production

(Japanese Black: 39%; Holstein: 37%) (The Ministry of Agriculture, Forestry and Fishery of Japan 2005). Testing three pairs of markers (166 650 combinations), we obtained five combinations of six markers that distinguished Japanese Black from F_1 (Table 4).

Table 2 Averages of LD block length and cross-chromosomal distributions of χ^2 '.

	Estimated LD block length in kb (no. of blocks)				Percentiles of cross-chromosomal χ^2 values	
	BTA 7	BTA 14	BTA 21	All	99th	95th
Japanese Black	401 (12)	521 (8)	957 (6)	566 (26)	0.260	0.171
Angus	385 (8)	785 (6)	502 (9)	535 (23)	0.385	0.210
Hereford	469 (8)	1803 (3)	477 (8)	683 (19)	0.489	0.296
Holstein	733 (8)	352 (8)	623 (7)	567 (23)	0.268	0.143

An LD block length was determined as a side length of a square where χ^2 ' values exceeded a 5% critical value by a permutation test.

Table 3 Marker pairs to distinguish Japanese Black/Angus, Japanese Black/Hereford and Japanese Black/Holstein.

	First marker	Second marker	BTA	Minimal posterior probability value ¹	Maximal posterior probability value ²	Missing data rate (%)
Japanese Black/Angus	<i>DIK8031</i>	<i>DIK8049</i>	7	0.485	0.073	2.9
	<i>DIK8006</i>	<i>DIK8025</i>	7	0.557	0.205	4.1
	<i>DIK8033</i>	<i>DIK4421</i>	7	0.420	0.099	4.5
	<i>DIK8033</i>	<i>DIK8049</i>	7	0.463	0.374	4.5
	<i>DIK4421</i>	<i>DIK8025</i>	7	0.489	0.175	4.5
	<i>DIK8025</i>	<i>DIK8047</i>	7	0.435	0.357	4.5
	<i>DIK8025</i>	<i>DIK8049</i>	7	0.745	0.132	4.5
	<i>DIK8033</i>	<i>DIK8031</i>	7	0.290	0.208	4.9
	<i>DIK519</i>	<i>DIK2570</i>	14	0.367	0.153	3.7
	<i>DIK7040</i>	<i>DIK519</i>	14	0.278	0.107	4.9
	<i>DIK3000</i>	<i>MULGE4</i>	21	0.322	0.156	4.5
Japanese Black/Hereford	<i>DIK3113</i>	<i>MULGE4</i>	21	0.334	0.037	4.5
	<i>NLBCM1</i>	<i>MULGE4</i>	21	0.088	0.045	4.9
	<i>DIK4421</i>	<i>DIK8032</i>	7	0.743	0.648	3.0
	<i>DIK8033</i>	<i>DIK4421</i>	7	0.564	0.456	3.4
	<i>DIK8025</i>	<i>DIK8049</i>	7	0.420	0.405	4.6
	<i>DIK8049</i>	<i>DIK8060</i>	7	0.083	0.069	4.6
	<i>RM011</i>	<i>INRA094</i>	14	0.323	0.257	2.1
	<i>RM011</i>	<i>NRKM040</i>	14	0.295	0.223	2.5
	<i>DIK7015</i>	<i>DIK519</i>	14	0.446	0.087	3.8
	<i>DIK519</i>	<i>DIK2570</i>	14	0.543	0.339	4.2
	<i>DIK3110</i>	<i>DIK3000</i>	21	0.290	0.045	3.0
Japanese Black/Holstein	<i>BMS1116</i>	<i>DIK8045</i>	7	0.378	0.261	2.8
	<i>DIK8045</i>	<i>DIK8061</i>	7	0.150	0.074	3.1
	<i>DIK8003</i>	<i>DIK8061</i>	7	0.478	0.404	3.5
	<i>DIK8033</i>	<i>DIK8061</i>	7	0.506	0.467	3.5
	<i>DIK8060</i>	<i>DIK8061</i>	7	0.669	0.036	3.8
	<i>DIK8025</i>	<i>DIK8045</i>	7	0.093	0.085	4.5

¹Posterior probability value observed in Japanese Black.

²Posterior probability value observed in the other breed.

We developed Japanese Black breed identification methods that are suitable for breed label falsification tests in retail beef. Because haplotypic frequencies in livestock populations can change due to breeding and selection, a periodic survey in populations of interest is necessary to ensure the reliability of this test.

In summary, we showed differences in LD structures among four breed populations. LD block lengths were

shorter than those previously reported; this suggests that narrowing down QTL to sub-centimorgan regions using LD approaches is possible. Based on the differences in haplotypic frequencies between the populations, we developed breed identification testing methods to distinguish Japanese Black from the other three purebred and F₁ (Japanese Black × Holstein) populations, which can be utilized for breed label falsification tests in retail beef.

Table 4 Combinations of six markers to distinguish Japanese Black from F₁.

Marker pair 1		Marker pair 2		Marker pair 3		Minimal posterior probability value ¹	Maximal posterior probability value ²	Rate successfully identified (%)	Missing data rate (%)
Marker 1	Marker 2	Marker 3	Marker 4	Marker 5	Marker 6				
DIK5394	DIK8052	DIK8036	DIK8007	DIK3114	IDVGA30	0.146	0.132	100.0	11.5
DIK8031	DIK8038	DIK8052	DIK8001	DIK3100	IDVGA39	0.234	0.192	100.0	11.8
DIK8036	DIK8038	DIK8007	DIK8061	DIK8052	DIK8001	0.386	0.364	100.0	12.2
DIK5394	DIK8052	DIK8036	DIK8007	DIK8007	DIK8001	0.127	0.056	100.0	12.5
DIK8031	DIK8038	DIK8052	DIK8001	DIK3114	IDVGA30	0.159	0.122	100.0	12.5
DIK8036	DIK8038	DIK8052	DIK8001	DIK3114	IDVGA30	0.042	0.075	99.2	11.8
DIK5394	DIK8036	DIK8052	DIK8001	DIK3100	IDVGA30	0.237	0.250	99.2	14.2
DIK5394	DIK8052	DIK8036	DIK8001	DIK3100	IDVGA30	0.154	0.168	99.2	14.2

¹Posterior probability value observed in Japanese Black.

²Posterior probability value observed in the other breed.

Acknowledgements

The authors thank T. Hayashi for valuable discussions; A. Fujikawa, T. Kikuchi and T. Abe for providing blood specimens of F₁ animals, Angus and Hereford cattle; and E. Watanabe, K. Maruyama and T. Fujii for technical assistance. This study was supported in part by the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

References

- Dempster A., Laird N. & Rubin D. (1977) Maximum likelihood estimation from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society* **39**, 1–38.
- Dunner S., Miranda M.E., Amigues Y., Canon J., Georges M., Hanset R., Williams J. & Menissier F. (2003) Haplotype diversity of the *myostatin* gene among beef cattle breeds. *Genetics Selection Evolution* **35**, 103–18.
- Farnir F., Coppeters W., Arranz J.J. *et al.* (2000) Extensive genome-wide linkage disequilibrium in cattle. *Genome Research* **10**, 220–7.
- Green P., Falls K. & Crooks S. (1990) *Documentation for CRMAP*, Version 2.4. Washington University School of Medicine, St Louis, MO, USA.
- Hansen C., Shrestha J.N.B., Parker R.J., Crow G.H., McAlpine P.J. & Derr J.N. (2002) Genetic diversity among Canadian, Brown Swiss, Holstein and Jersey cattle of Canada based on 15 bovine microsatellite markers. *Genome* **45**, 897–904.
- Hedrick P.W. (1987) Gametic disequilibrium measures: proceed with caution. *Genetics* **117**, 331–41.
- Heifetz E., Fulton J., O'Sullivan N., Zhao H., Dekkers J. & Soller M. (2005) Extent and consistency across generations of linkage disequilibrium in commercial layer chicken breeding populations. *Genetics* **171**, 1173–81.
- Hirano T., Watanabe T., Inoue K. & Sugimoto Y. (2008) Fine-mapping of a marbling trait to a 2.9-cM region on bovine chromosome 7 in Japanese Black cattle. *Animal Genetics* **39**, 79–83.
- Khatkar M.S., Zenger K.R., Hobbs M. *et al.* (2007) A primary assembly of a bovine haplotype block map based on a 15k SNP panel genotyped in Holstein-Friesian cattle. *Genetics* **176**, 763–72.
- Kim J.J., Farnir F., Savell J. & Taylor J.F. (2003) Detection of quantitative trait loci for growth and beef carcass fatness traits in a cross between *Bos taurus* (Angus) and *Bos indicus* (Brahman) cattle. *Journal of Animal Science* **81**, 1933–42.
- de Koning D.J., Windsor D., Morrice D., Hocking P.M., Burt D.W. & Haley C.S. (2006) Increased linkage disequilibrium around QTL in commercial broilers. *Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. Belo Horizonte, MG, Brazil.
- Mizoguchi Y., Watanabe T., Fujinaka K., Iwamoto E. & Sugimoto Y. (2006) Mapping of quantitative trait loci for carcass traits in a Japanese Black (Wagyu) cattle population. *Animal Genetics* **37**, 51–4.
- Mizoshita K., Watanabe T., Hayashi H., Kubota C., Yamakuchi H., Todoroki J. & Sugimoto Y. (2004) Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a half-sib family of purebred Japanese Black (Wagyu) cattle. *Journal of Animal Science* **82**, 3415–20.
- Mizoshita K., Takano A., Watanabe T., Takasuga A. & Sugimoto Y. (2005) Identification of a 1.1-Mb region for a carcass weight QTL on bovine chromosome 14. *Mammalian Genome* **16**, 532–7.
- Odani M., Narita A., Watanabe T., Yokouchi K., Sugimoto Y., Fujita T., Oguni T., Matsumoto M. & Sasaki Y. (2006) Genome-wide linkage disequilibrium in two Japanese beef cattle breeds. *Animal Genetics* **37**, 139–44.
- Reynolds J., Weir B.S. & Cockerham C.C. (1983) Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* **105**, 767–79.
- Schnabel R.D., Kim J.J., Ashwell M.S., Sonstegard T.S., Van Tassell C.P., Connor E.E. & Taylor J.F. (2005) Fine-mapping milk production quantitative trait loci on BTA6: analysis of the bovine osteopontin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 6896–901.
- Slatkin M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **139**, 457–62.
- Sved J.A. (1971) Linkage disequilibrium and homozygosity of chromosome segments in finite populations. *Theoretical Population Biology* **2**, 125–41.
- The Ministry of Agriculture, Forestry and Fishery of Japan (2004) <http://lin.lin.go.jp/statis/dome/data2/nstatis.htm> (in Japanese).
- The Ministry of Agriculture, Forestry and Fishery of Japan (2005) <http://lin.lin.go.jp/statis/dome/data2/nstatis.htm> (in Japanese).
- Weir B.S. (1996) Genetic data analysis II. In: *Methods for Discrete Population Genetic Data* (Ed. by B.S. Weir), 117 pp. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, MA.

- Winter A., Kramar W., Werner F.A.O., Kollers S., Kata S., Durstewitz G., Buitkamp J., Womack J.E., Thaller G. & Fries R. (2002) Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (*DGAT1*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 9300–5.
- Yamazaki T. (1977) The effect of overdominance on linkage in a multilocus system. *Genetics* **86**, 227–36.
- Zhao H., Nettleton D., Soller M. & Dekkers J.C.M. (2005) Evaluation of linkage disequilibrium measures between multi-allelic markers as predictors of linkage disequilibrium between markers and QTL. *Genetic Research* **86**, 77–87.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article online from <http://www.blackwell-synergy.com/doi/full/10.1111/j.1365-2052.2008.01742.x>.

Table S1 Marker information used in this study.

Table S2 Estimated haplotypic frequencies of the marker pairs that distinguished the breeds.

Please note: Blackwell Publishing is not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors.

Bovine quantitative trait loci analysis for growth, carcass, and meat quality traits in an F₂ population from a cross between Japanese Black and Limousin

T. Abe, J. Saburi, H. Hasebe, T. Nakagawa, T. Kawamura, K. Saito, T. Nade, S. Misumi, T. Okumura, K. Kuchida, T. Hayashi, S. Nakane, T. Mitsuhasi, K. Nirasawa, Y. Sugimoto and E. Kobayashi

J Anim Sci 2008.86:2821-2832.

doi: 10.2527/jas.2007-0676 originally published online Jul 3, 2008;

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://jas.fass.org/cgi/content/full/86/11/2821>



American Society of Animal Science

www.asas.org

Bovine quantitative trait loci analysis for growth, carcass, and meat quality traits in an F₂ population from a cross between Japanese Black and Limousin

T. Abe,^{*1} J. Saburi,^{*} H. Hasebe,^{*} T. Nakagawa,^{*} T. Kawamura,^{†2} K. Saito,^{‡3} T. Nade,^{*4} S. Misumi,^{*} T. Okumura,^{*5} K. Kuchida,[§] T. Hayashi,[#] S. Nakane,^{*6} T. Mitsuhasi,^{*7} K. Nirasawa,^{*7} Y. Sugimoto,^{||} and E. Kobayashi^{*}

^{*}National Livestock Breeding Center, Nishigo, Fukushima 961-8511, Japan; [†]Tokachi Branch of National Livestock Breeding Center, Otofuke, Hokkaido 080-0572, Japan; [‡]Ohu Branch of National Livestock Breeding Center, Shichinohe, Aomori 039-2567, Japan; [§]Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan; [#]National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan; and ^{||}Shirakawa Institute of Animal Genetics, Nishigo, Fukushima 961-8061, Japan

ABSTRACT: A genome-wide scan for QTL affecting economically important traits in beef production was performed using an F₂ resource family from a Japanese Black × Limousin cross, where 186 F₂ animals were measured for growth, carcass, and meat-quality traits. All family members were genotyped for 313 informative microsatellite markers that spanned 2,382 cM of bovine autosomes. The centromeric region of BTA2 contained significant QTL (i.e., exceeding the genome-wide 5% threshold) for 5 carcass grading traits [LM area, beef marbling standards (BMS) number, luster, quality grade, and firmness], 8 computer image analysis (CIA) traits [LM lean area, ratio of fat area (RFA) to LM area, LM area, RFA to musculus (M.) trapezius area, M. trapezius lean area, M. semispinalis lean area, RFA to M. semispinalis area, and RFA to M. semispinalis capitis area], and 5 meat quality traits (contents

of CP, crude fat, moisture, C16:1, and C18:2 of LM). A significant QTL for withers height was detected at 80.3 cM on BTA5. We detected significant QTL for the C14:0 content in backfat and C14:0 and C14:1 content in intermuscular fat around the 62.3 to 71.0 cM region on BTA19 and for C14:0, C14:1, C18:1, and C16:0 content and ratio of total unsaturated fatty acid content to total SFA content in intramuscular fat at 2 different regions on BTA19 (41.1 cM for C14:1 and 62.3 cM for the other 4 traits). Overall, we identified 9 significant QTL regions controlling 27 traits with genome-wide significance of 5%; of these, 22 traits exceeded the 1% genome-wide threshold. Some of the QTL affecting meat quality traits detected in this study might be the same QTL as previously reported. The QTL we identified need to be validated in commercial Japanese Black cattle populations.

Key words: bovine, F₂ family, meat quality, quantitative trait loci

©2008 American Society of Animal Science. All rights reserved.

J. Anim. Sci. 2008. 86:2821–2832
doi:10.2527/jas.2007-0676

¹Corresponding author: t0abe@nlbc.go.jp

²Current address: National Livestock Breeding Center, Nishigo, Fukushima 961-8511, Japan.

³Current address: Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Kasumigaseki, Tokyo 100-8950, Japan.

⁴Current address: Nippon Veterinary and Life Science University, Musashino, Tokyo 180-8602, Japan.

⁵Current address: Tokachi Branch of National Livestock Breeding Center, Otofuke, Hokkaido 080-0572, Japan.

⁶Current address: Kinki Regional Agricultural Administration Office, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Kamigyō, Kyoto 602-8054, Japan.

⁷Current address: National Institute of Livestock and Grassland Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-0901, Japan.

Received October 23, 2007.

Accepted June 27, 2008.

INTRODUCTION

Many studies have successfully detected QTL for economically important traits of beef cattle such as growth, carcass, and meat quality traits by using crossbred experimental populations (Keele et al., 1999; Stone et al., 1999; Casas et al., 2000, 2003; MacNeil and Grosz, 2002; Kim et al., 2003). Alexander et al. (2007a,b) recently reported the results of QTL analysis of a population for which Japanese Black and Limousin cattle were the parents.

Since 1994, we have generated an F₂ resource population derived from crosses between Japanese Black sires and Limousin dams to map loci affecting economically important traits. A unique characteristic of

Table 1. Composition of the recipient dams of the F₂ population

Breed	Age (yr)										Total
	2	3	4	5	6	7	8	9	12	13	
Angus		2	1	6	3	1	2	4	1	1	21
F ₁ ¹							1				1
Hereford					2	2					4
Japanese Black		2	3								5
Japanese Shorthorn	52	42	43	8							145
Limousin	10										10
Total	62	46	47	14	5	3	3	4	1	1	186

¹Derived from the cross of Japanese Black × Murray Gray.

the Japanese Black breed is the high fat content in the meat (so-called highly marbled beef), which is an important criterion for beef quality in the present Japanese market. May et al. (1993) described the difference in fatty acid compositions of the intramuscular fat of Wagyu crossbred and Angus steers, and Kuber et al. (2004) reported that Wagyu steaks had lower Warner-Bratzler shear force values than did Limousin steaks (note that most cattle known as Wagyu are Japanese Black breeds). Given those findings, Japanese Black cattle may have other economically favorable traits, in addition to marbling, compared with other breeds. In contrast to Japanese Black cattle, Limousin cattle produce leaner meat and have a larger body size. We chose these 2 breeds, the phenotypes of which differ dramatically, to construct an experimental F₂ resource family for bovine QTL analysis.

In this report, we describe QTL underlying the difference in growth, carcass, and meat quality traits between Japanese Black and Limousin cattle. We incorporated physicochemical property traits of the F₂ beef, including the fatty acid composition of backfat, intermuscular fat, and LM i.m. fat. We also identified QTL for computer image analysis (CIA) traits.

MATERIALS AND METHODS

Animal care and use was according to the protocol approved by the National Livestock Breeding Center Animal Care and Use Committee.

Generation and Feeding of F₂ Population

F₂ Population. An F₂ resource population was generated at the Tokachi and Ohu branches of the National Livestock Breeding Center in Japan. The animals used as parents were 2 Japanese Black (JB) sires (JB-A and JB-B) and 2 Limousin (L) dams (L-A and L-B). The F₁ animals were obtained by crossing JB-A with L-A (family A) and JB-B with L-B (family B). Family A consisted of 2 F₁ males and 17 F₁ females, and family B consisted of 2 F₁ males and 15 F₁ females. To avoid obtaining progeny homozygous for latent recessive hereditary disease loci that may be present in the 2 JB sires, F₂ animals were obtained by crossing F₁ males

and their nonsibling F₁ females (between family A and B) using embryo transfer techniques. Both F₁ families were produced and raised at the Tokachi branch, and fertilized eggs were collected in a frozen state. The majority of the frozen eggs were then sent to the Ohu branch and used to produce F₂ animals. We produced 37 F₂ animals at the Tokachi branch from July 1999 to January 2000. The remaining 149 F₂ animals were produced at the Ohu branch during 4 periods: October to December 1999 (18 cattle); April to June 2000 (44 cattle); January to March 2001 (52 cattle); and July to October 2001 (35 cattle). The recipient dams of the F₂ population consisted of 6 breeds, and ages were distributed from 2 to 13 yr (Table 1).

Feeding Conditions. A total of 186 F₂ animals were weaned at 56 d of age. Calves were raised by artificial suckling. In the period from weaning to immediately before the fattening stage (rearing period), animals were fed with mixed feed (Snow Brand Seed Co. Ltd., Sapporo, Japan), with free intake of hay, water, and mineral salts. At 8 mo of age, F₂ animals were moved to fattening stalls and began to receive the mixed feed for the fattening stage. The mixed feed comprised 30.2% barley corn, 39.4% dent corn, 15.1% wheat bran, 3.4% rice bran, 4.0% wheat flour, 5.7% soybean waste, 1.0% NaCl, and 1.0% monocalcium phosphate. The digestible CP of this diet was 11.4% and the total digestible nutrients were 83.1%. All of these percentages were calculated on a DM basis. The amount of mixed feed provided during the fattening stage was calculated considering the energy requirement given in the Japanese Feeding Standard for beef cattle (JLIA, 1995). To accurately control feed intake, every F₂ animal was tagged with individual recognition equipment for an automatic feeding system. The allowed proportions of hay and mixed feed for the fattening stage were 25:75 for animals <14 mo old, 15:85 for animals 15 to 20 mo old, and 10:90 for animals 21 to 24 mo old. Hay, water, and mineral salts were fed without restriction.

Phenotype Measurements

Growth and Carcass Traits. The F₂ animals were weighed at birth, 4 wk of age, and on the first and last day of the fattening period. Withers height (from

the ground to the peak between shoulder blades), hip cross height (from the ground to the intersecting point of hip points line and the median line), body length (from lower edge of the scapula to the end of the ischial tuberosity), chest girth and width (close behind the fore foot), hip length (from the hip cross to back end of the ischial bone), hip point width (between the points of the hip), rump width, and pin bone (back end of the ischial bone) width were measured 1 d before slaughter. The F₂ animals were slaughtered at the age of 24 mo (731.62 ± 5.01 d of age). At the meat plant, HCW of the F₂ animals were obtained, and carcass quality was evaluated about 48 h after slaughter by certified graders belonging to the Japan Meat Grading Association (Tokyo, Japan). Graded traits were LM area, rib thickness (the length from the abdominal lining to the external side of latissimus dorsi at around the midpoint of entire rib bone of the cross section), backfat thickness (the length from the external side of latissimus dorsi to carcass surface on the vertical line from the lower end of iliocostalis to carcass surface), beef marbling standards (BMS; No. 1 to 12), beef color standards (No. 1 to 7), beef fat standards (No. 1 to 7), luster, firmness, and texture. All graded traits were measured at the sixth rib bone side of the cross section between the sixth and seventh rib bones.

Meat Quality Traits. Physicochemical property traits of the F₂ beef were measured. The rib roast blocks of the seventh to eighth rib bone were sampled in all F₂ animals. The LM was excised from the block and minced for analysis of moisture, crude fat, and CP content as described by Okumura et al. (2007), where approximately 50 g of LM was excised and put in a plastic bag, and then incubated for 1 h in a constant-temperature bath at 70°C, and reweighed to calculate the cooking loss value. This incubated muscle was then cut thinly to yield pieces that were 1 cm × 1 cm × 5 cm cuboids and used to measure the Warner-Bratzler shear force (Salter, Kent, UK). Meat color was measured as described by Sato et al. (2003). In addition, we determined the fatty acid content of 3 parts of the rib loin block: backfat (on M. trapezius), intermuscular fat (between M. rhomboideus and LM), and intramuscular fat (of LM). Fat extractions were done as described by Folch et al. (1957), and extracted fat was saponified with potassium hydrate-ethanol solution and methyl-esterified with boron trifluoride-methanol complex. Processed fat was analyzed by gas chromatography (6890A, Agilent Technologies Japan Ltd., Tokyo, Japan) under the following conditions: the temperature of the inlet was 150°C, the oven was warmed from 150 to 220°C, and the temperature of the detector sensor was 220°C. We used helium gas as a carrier, a capillary column (TC-70, 0.25 mm i.d. × 60 m, df (the phase thickness of the inside of the capillary column) = 0.25 µm; GL Science, Tokyo, Japan), and flame-ionization detector for detection.

Computer Image Analysis Traits. Digital images of the carcass cross section were taken between

the sixth and seventh ribs using photographic equipment developed by Kuchida et al. (2001a). This equipment comprised 2 parts: a dome with 570 white light-emitting diodes and a digital camera (2 megapixels, FinePix2900Z, Fuji Film, Tokyo, Japan) with a wide conversion lens (WL-FX29, Fuji Film). The distance between the camera and the surface of the carcass was fixed, and the lens was always parallel to the carcass cross section. As a result, area and length could be measured with high accuracy using the equipment. Obtained digital images were then analyzed using software developed by Kuchida et al. (2000). The total muscle area, lean area, and fat area of LM, M. trapezius, M. semispinalis, and M. semispinalis capitus were calculated by this software. Here, the total muscle area represents the internal area of the muscle outline form. Therefore, the lean and fat areas are summed to give total muscle area. The ratio of the length of minor and major axes of LM was also calculated.

Genotyping

We extracted DNA from blood using automatic extraction equipment (NA1000, Kurabo, Osaka, Japan), and the final DNA concentration was adjusted to 20 ng/µL. A genome screen was conducted with microsatellite markers (Kappes et al., 1997; Ihara et al., 2004). Polymerase chain reaction amplification was performed in a volume of 15 µL containing 20 ng of genomic DNA, 1.67 mM MgCl₂, 6.25 pmol of each primer, 0.2 mM deoxynucleotides, and 0.375 U of *Taq* DNA polymerase (ABgene, Epsom, UK). The annealing temperatures of each marker in thermocycling steps were optimized by referencing those recommended by Ihara et al. (2004). Amplifications were performed under the following conditions: 5 min at 94°C, 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at annealing temperature, 30 s at 72°C, and a final extension of 7 min at 72°C. After PCR amplification, reaction products were fractionated on an ABI377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA), and fragment analysis was performed with GeneScan and Genotyper software (Applied Biosystems).

Linkage Analysis

Linkage maps for the 29 bovine autosomes were constructed by using CRI-MAP (Green et al., 1990), and the constructed map was used for the whole-genome QTL scan. The information content of markers was calculated by the method described by Knott et al. (1998).

A QTL analysis for each trait was performed by the method developed by Haley et al. (1994). The statistical model is based on linear regression of phenotypes on the probabilities of QTL genotypes at a given location. We assumed that the grandparental breeds, Limousin and Japanese Black, were fixed for alternative alleles at a QTL. Two alleles at a putative QTL at a given location were denoted by Q and q. There are 3

possible genotypes, QQ, Qq, and qq, for a QTL at the given location on an autosome. The probabilities of the QTL genotypes [denoted as Prob(QQ), Prob(Qq), and Prob(qq)] were calculated from the observed genotypes of markers linked to the QTL. The calculation was done as described by Haley et al. (1994). In analyses of actual data, some fixed effects other than QTL effects including sex-associated differences, breeds, and ages of the recipient cows, seasons, and locations were taken into account.

Let the effects of genotypes QQ, Qq, and qq be denoted by a , d , and $-a$, respectively. We assumed that the phenotypic value of a trait is written for the i th individual in F_2 as follows:

$$y_i = \sum_j x_{ij} b_j + c_{ai} a + c_{di} d + e_i,$$

where b_j is the j th element of the vector of fixed effects, which includes overall mean, sex effect, breeds of the recipients (6 breeds), ages of the recipients (10 levels), and combinations of seasons and locations (5 levels); x_{ij} is the (i,j) th element of the design matrix associating b_j to y_i ; c_{ai} is the coefficient for the additive component for individual i at the given location that is calculated from the probabilities of QTL genotypes and equal to Prob(QQ) – Prob(qq); c_{di} is the coefficient for the dominance component for individual i at the given location, which is equal to Prob(Qq); and e_i is the residual error. Model parameters μ , h , a , and d are estimated by a least squares method. That is, estimators of the parameters are obtained such that the sum of squares,

$$S = \sum_{i=1}^n \left(y_i - \sum_j x_{ij} b_j - c_{ai} a - c_{di} d \right)^2,$$

is minimized, where n is the number of individuals of F_2 . Denoting least squares estimators of b_j , a , and d by the terms \hat{b}_j , \hat{a} , and \hat{d} , the minimal sum of squares is obtained as

$$S_1 = \sum_{i=1}^n \left(y_i - \sum_j x_{ij} \hat{b}_j - c_{ai} \hat{a} - c_{di} \hat{d} \right)^2.$$

Under the null model corresponding to no QTL, where $a = d = 0$ is assumed, the minimal sum of squares is denoted by S_0 . Detection of a significant QTL is declared based on the ratio involving S_1 and S_0 . In this report, we used the F -ratio, $[(S_0 - S_1)/2]/[S_1/(n - 20)]$, as a statistic for detecting QTL, where it should be noted that degrees of freedom of 20 is assigned to the fixed effects. Significance thresholds were obtained by a permutation test with 1,000 repetitions for each trait.

Correlation coefficients among the 27 F_2 phenotypes for which significant QTL were detected were calculated by PROC CORR (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

RESULTS AND DISCUSSION

Phenotype Measurement and Marker Selection

The 76 traits measured are summarized in Table 2. One trait of particular interest was the BMS number, because in the Japanese market, the value of a beef carcass is heavily dependent on this grading score. Although BMS numbers are categorized as 1 to 12 in Japanese grading systems, the highest number in our F_2 population was 7. Furthermore, the distribution of the BMS numbers was extremely biased and was skewed toward lower scores (Figure 1).

The 4 parents of our F_2 family were genotyped with bovine autosomal microsatellite markers (Kappes et al., 1997; Ihara et al., 2004) to select informative markers. Contrary to our expectations, the allele types were quite similar between the 2 parental breeds for many markers, so we could not help eliminating a large part of them (data not shown). Overall, we genotyped these 4 parents for a total of 1,755 markers. We selected the markers in consideration of the marker distances based on the published bovine linkage map (Kappes et al., 1997; Ihara et al., 2004) and the number of characteristic alleles that could distinguish the origin among 4 parental animals or 2 parental breeds.

Linkage Analysis and QTL Mapping

From the marker linkage analysis, 313 markers were mapped to 29 bovine autosomal chromosomes over 2,382 cM, and the average distance between markers was 8.4 cM. With this linkage map, we detected QTL on BTA2, 5, and 19 (Table 3). We identified 9 QTL for 27 traits at the 5% genome-wide threshold level; QTL for 22 traits were significant at the 1% genome-wide level. Details of the significant QTL are presented in Figures 2, 3, and 4. In the QTL analysis, we took into account the fact that our F_2 population was produced at 2 different stations over different time periods. We also took into account the effects of recipient dams of the F_2 population, including their breed and age, as they might have an effect on the performance of the offspring (Table 1).

We mapped significant QTL for 5 carcass grading traits (Figure 2, panel A), 8 CIA traits (Figure 2, panels C to E), and 5 meat quality traits (Figure 2, panel B) to the same centromeric region of BTA2. Among the CIA traits, LM lean area showed the greatest F -ratio of all QTL identified in this study (Figure 2, panel C; Table 3). In addition, QTL for M. semispinalis and M. trapezius lean area were detected at 4.7 and 2.0 cM, respectively, on BTA2 (Figure 2, panel C). Animals that

Table 2. Performance, growth, traits of carcass grade, meat quality, computer image analysis (CIA), and fatty acid composition of F₂ animals from an intercross of F₁ animals derived from 2 Japanese Black sires and 2 Limousin dams

Trait	n	Mean	SD	Minimum	Maximum
Growth ¹					
Birth BW, kg	186	34.4	5.1	20.0	47.0
BW at 4 wk of age	186	48.1	5.8	28.5	63.0
BW daily gain in fattening period	186	0.9	0.1	0.7	1.2
BW on first day of fattening	186	227.4	26.7	157.0	291.7
BW on last day of fattening	186	678.0	62.6	536.0	842.0
Withers height, cm	186	138.7	5.8	125.0	154.0
Hip cross height, cm	186	141.4	5.9	127.0	157.2
Body length, cm	186	136.2	5.9	122.5	154.0
Chest girth, ² cm	186	219.5	7.8	198.0	243.0
Chest width, ² cm	186	74.0	2.9	67.4	81.4
Hip length, cm	186	54.6	3.4	46.0	63.0
Hip point width, cm	186	53.0	2.5	47.0	59.0
Rump width, cm	186	51.3	3.1	41.0	60.0
Pinbone width, cm	186	30.2	3.1	23.0	41.0
Carcass grade					
Carcass weight, kg	186	424.8	40.1	332.5	534.0
Carcass grade (1 to 5)	186	2.4	0.6	2.0	4.0
LM area, cm ²	186	52.3	6.5	39.0	80.0
Rib thickness, cm	186	6.7	0.7	5.4	9.7
Back fat thickness, cm	186	3.1	1.0	0.3	5.7
Beef marbling standards (1 to 12)	186	3.0	1.0	2	7
Beef color score (1 to 7)	186	4.2	0.5	2	5
Luster (1 to 5)	186	2.9	0.5	2	4
Firmness (1 to 5)	186	2.5	0.6	2	4
Texture (1 to 5)	186	3.0	0.3	2	4
Beef fat score (1 to 7)	186	3.0	0.1	2	4
Meat quality					
Moisture, %	186	62.7	4.4	49.2	71.1
Crude fat content, %	186	17.7	5.9	6.2	35.4
CP content, %	186	19.0	1.4	15.2	21.9
Cooking loss, %	186	27.3	2.2	19.6	32.8
Warner-Bratzler shear force, kg/cm ²	186	5.6	1.5	1.9	10.7
Redness (a* value)	186	16.2	1.8	10.6	20.7
Yellowness (b* value)	186	9.3	1.9	4.3	13.6
Lightness (L* value)	186	47.1	3.8	36.8	58.0
Computer image analysis					
LM area, cm ²	186	47.3	6.5	33.7	76.4
LM lean area, cm ²	186	37.0	6.3	23.2	64.0
LM fat area, cm ²	186	10.3	3.2	4.4	22.4
RFA ³ to LM area, %	186	21.9	6.3	7.9	40.1
LM major axis, pixels	186	580.5	57.6	53.0	762.8
LM minor axis, pixels	186	415.8	46.2	21.4	507.1
Ratio of minor and major axes of LM	186	0.7	0.1	0.4	0.9
M. semispinalis capitus area, cm ²	186	8.7	2.9	1.2	16.1
M. semispinalis capitus lean area, cm ²	186	6.6	2.3	0.9	12.8
M. semispinalis capitus fat area, cm ²	186	2.0	0.8	0.3	4.2
RFA to M. semispinalis capitus area, %	186	23.2	5.0	9.3	36.1
M. semispinalis area, cm ²	186	31.8	3.9	21.5	42.0
M. semispinalis lean area, cm ²	186	22.7	3.1	15.5	31.1
M. semispinalis fat area, cm ²	186	9.1	2.3	3.4	15.2
RFA to M. semispinalis area, %	186	28.5	5.7	12.1	45.6
M. trapezius area, cm ²	186	35.0	5.1	20.7	55.2
M. trapezius lean area, cm ²	186	26.8	4.0	17.1	39.2
M. trapezius fat area, cm ²	186	8.2	3.1	2.9	24.1
RFA to M. trapezius area, %	186	23.1	6.9	9.4	43.6
Fatty acid composition					
Backfat					
C14:0 content, %	178	3.1	0.5	2.1	5.1
C14:1 content, %	178	1.4	0.5	0.5	5.7
C16:0 content, %	178	23.7	1.6	19.2	30.5
C16:1 content, %	178	6.0	1.0	3.8	12.6

Continued

Table 2 (Continued). Performance, growth, traits of carcass grade, meat quality, computer image analysis (CIA), and fatty acid composition of F₂ animals from an intercross of F₁ animals derived from 2 Japanese Black sires and 2 Limousin dams

Trait	n	Mean	SD	Minimum	Maximum
C18:0 content, %	178	8.2	1.6	0.1	13.2
C18:1 content, %	178	51.9	2.7	42.6	58.8
C18:2 content, %	178	2.7	0.8	1.5	5.2
US/S ⁴	178	1.8	0.2	1.1	2.3
Intermuscular fat					
C14:0 content, %	177	3.7	0.7	2.3	8.2
C14:1 content, %	177	1.0	0.3	0.4	2.2
C16:0 content, %	177	25.1	2.4	9.4	31.2
C16:1 content, %	177	4.8	0.8	3.1	7.7
C18:0 content, %	177	12.7	2.3	3.2	20.5
C18:1 content, %	177	47.2	3.0	40.5	55.7
C18:2 content, %	177	2.5	0.8	1.4	4.9
US/S	177	1.4	0.2	0.9	2.0
Intramuscular fat					
C14:0 content, %	184	3.7	0.6	2.3	6.6
C14:1 content, %	184	0.8	0.3	0.3	2.0
C16:0 content, %	184	28.4	2.0	22.5	34.6
C16:1 content, %	184	4.2	0.7	2.1	7.0
C18:0 content, %	184	12.7	1.9	4.9	18.4
C18:1 content, %	184	44.7	2.6	37.4	51.8
C18:2 content, %	184	2.8	0.8	0.1	6.4
US/S	184	1.2	0.1	0.8	1.7

¹Withers height = the length from the ground to the peak between shoulder blades; hip cross height = the length from the ground to the intersecting point of hip points line and the median line; body length = the length from the lower edge of the scapula to the end of the ischial tuberosity; hip length = the length from the hip cross to the back end of the ischial bone; hip point width = the length between the points of the hip; pinbone width = the length between the ischial tuberosities.

²Measured at close behind the fore foot.

³RFA = ratio of fat area.

⁴The ratio between total unsaturated fatty acid and total SFA.

inherited the Limousin alleles had larger lean area in those 3 muscles than did those that inherited the Japanese Black alleles. A QTL for LM area was detected at the same position of 1.0 cM on BTA2 (Figure 2, panel D); animals that inherited the Limousin allele had a greater muscle area. Because a positive correlation between muscle area and lean area in our F₂ family occurred in every muscle measured by CIA (data not shown), animals that inherited the Limousin alleles at this QTL had greater muscle area with leaner meat.

In contrast, the QTL for RFA to LM, M. semispinalis, M. semispinalis capitus, and M. trapezius area were detected at 4.7 cM on BTA2 (Figure 2, panel E), as was the QTL for BMS number (Figure 2, panel A). Furthermore, QTL for crude fat content of LM and the C16:1 content of intramuscular fat were detected at 5.7 and 0 cM, respectively, on BTA2 (Figure 2, panel B). In all these cases, animals that inherited the Japanese Black alleles had greater values. Kuchida et al. (2000; 2001b) described significant relationships between crude fat content and RFA ($r = 0.98$), and between RFA and BMS number ($r = 0.93$), respectively. They suggested that crude fat content and RFA are useful data for evaluating marbling objectively. This suggestion is consistent with the results of our study.

All of our F₂ animals showed BMS numbers of 2 to 5, except for one animal that had a 6 and one that had a 7 (Figure 1). This indicates the lower intramuscular

fat content of the F₂ population than of purebred Japanese Black cattle. In fact, Okumura et al. (2007) noted that the crude fat content (%) of Japanese Black cattle slaughtered at 24 mo of age (identical to the age at slaughter for our F₂ population) was 37.0 ± 4.4 , whereas that in our F₂ population was 17.7 ± 5.9 (Table 2). Summarizing these results, we suggest that the Limousin alleles, which produced larger lean and muscle area, had a more extreme effect than those of the Japanese Black alleles, which produced beef with greater BMS, RFA, crude fat, and C16:1 content. Using a population that inherited the muscle hypertrophy locus, Casas et al. (1998) detected a QTL for ribeye area, marbling, and fat thickness. Their results were similar to ours not only in the type of phenotypes affected, but also in the QTL regions reported; the multiple QTL were in the same chromosomal region. Furthermore, using a Wagyu \times Limousin crossbred F₂ population, Alexander et al. (2007a) detected a QTL for LM area in the centromeric region of BTA2.

Recently, Sellick et al. (2007) reported the effect of the F94L mutation of the myostatin gene. They treated this gene as a positional candidate of the QTL for meat percentage, eye muscle area, and silverside (meat block composed of M. gluteobiceps and M. semitendinosus) percentage detected in the 0 to 15 cM region of BTA2. They analyzed a population derived from a Jersey \times Limousin cross and explained that the F94L mutation

Table 3. Summary of QTL location, genome-wide probability, and additive and dominance effects

Trait	Genome-wide probability ¹		Location		<i>F</i> -ratio ²	Additive ³ effect	Dominance ³ effect	Variance explained
	5%	1%	BTA	cM				
Growth								
Withers height, cm	9.06	11.82	5	80.3	10.59*	-1.87	-1.44	0.06
Carcass grade								
Carcass grade (1 to 5)	9.41	12.08	2	4.7	16.27†	0.32	0.09	0.16
LM area, cm ²	9.29	11.71	2	1.0	26.63†	-4.35	-1.95	0.23
Beef marbling score (1 to 12)	9.31	11.22	2	4.7	23.65†	0.61	0.19	0.21
Luster (1 to 5)	9.47	11.00	2	4.7	18.47†	0.25	0.11	0.16
Firmness (1 to 5)	9.47	11.87	2	4.7	14.51†	0.32	0.05	0.15
Meat quality								
Moisture	9.16	10.79	2	5.7	24.58†	-2.83	-1.39	0.21
Crude fat content	9.12	11.29	2	5.7	26.37†	3.85	1.94	0.23
CP content	9.18	10.98	2	4.7	32.57†	-0.96	-0.50	0.27
Computer image analysis								
LM area, cm ²	9.46	11.78	2	1.0	20.29†	-3.95	-0.90	0.18
LM lean area, cm ²	9.13	11.25	2	3.0	43.21†	-5.02	-2.04	0.33
RFA ⁴ to LM area, %	9.47	12.00	2	4.7	28.55†	4.18	2.28	0.25
RFA to M. semispinalis capitus area, %	9.22	11.59	2	4.7	11.91†	2.36	0.93	0.12
M. semispinalis lean area, cm ²	8.97	11.07	2	4.7	15.55†	-1.73	-0.13	0.15
RFA to M. semispinalis area, %	9.49	11.06	2	4.7	14.45†	2.56	2.26	0.14
M. trapezius lean area, cm ²	9.21	10.9	2	2.0	28.37†	-2.73	-0.58	0.22
RFA to M. trapezius area, %	9.17	11.27	2	4.7	11.69†	3.27	1.35	0.12
Fatty acid composition								
Backfat								
C14:0 content, %	9.38	11.71	19	62.3	9.65*	-0.22	-0.06	0.11
Intermuscular fat								
C14:0 content, %	9.49	12.06	19	62.3	27.47†	-0.39	-0.08	0.18
C14:1 content, %	9.44	11.40	19	71.0	13.59†	-0.18	0.04	0.15
Intramuscular fat								
C14:0 content, %	9.19	11.01	19	62.3	30.44†	-0.43	-0.13	0.28
C14:1 content, %	9.19	11.18	19	41.1	12.50†	-0.14	-0.13	0.14
C16:0 content, %	9.14	11.73	19	62.3	10.68*	-0.86	-0.39	0.11
C16:1 content, %	9.17	11.14	2	0.0	9.18*	0.23	0.23	0.09
C18:1 content, %	9.28	10.78	19	62.3	21.12†	1.56	0.42	0.20
C18:2 content, %	9.36	12.20	2	2.0	19.22†	-0.27	-0.23	0.07
US/S ⁵	8.96	10.66	19	62.3	9.65*	0.06	0.03	0.09

¹Genome-wide *F*-statistic thresholds at the 1% and 5% levels as determined by permutation tests.

²Asterisk (*) and dagger (†) represent the 5% and 1% genome-wide significance levels, respectively.

³Additive (a) and dominance (d) QTL effects correspond to the genotype values of +a, d, and -a for animals having inherited 2 Japanese Black alleles, 1 of each allele, or 2 Limousin alleles, respectively. If the additive effect is positive, the Japanese Black allele increases the phenotypic value; if it is negative, the Japanese Black allele decreases it (conversely, the Limousin allele increases the phenotypic value). Dominance effects are relative to the mean of the 2 homozygous genotypes.

⁴RFA = ratio of fat area.

⁵The ratio between total unsaturated fatty acid and total SFA.

of the myostatin gene originated from the Limousin breed and significantly increased these traits. Their results seem applicable to our findings. Myostatin is one of the strong candidate genes for QTL of BTA2 detected in our F₂ population.

Interestingly, a QTL for C18:2 content of LM was detected at 2 cM on BTA2 (Figure 2, panel B). Animals that inherited the Limousin alleles had greater content of C18:2. This fatty acid is a constituent of CLA, which has recently been studied for its favorable effect on human health, especially for reducing human cancer cell growth (De La Torre et al., 2006). The C18:2 fatty acid in beef cannot be synthesized in the bovine body, but originates from feedstuffs. Therefore, it seems strange that the genetic effect was observed on this trait. On the other hand, several studies have reported the dif-

ference in C18:2 content between muscle and adipose of cattle (Hristov et al., 2005; Noci et al., 2005). According to these studies, C18:2 is more abundant in muscle than in adipose. In our F₂ population, animals that inherited the Limousin allele had leaner meat, as described above. Furthermore, there was a weak but positive correlation between C18:2 content and both CP content and LM lean area ($r = 0.11$ and 0.12 , respectively). Conversely, there was a negative correlation between C18:2 and both crude fat content and RFA to LM area ($r = -0.12$ and -0.13 , respectively). These results may relate to the fact that the QTL for C18:2 content was detected at the centromeric end of BTA2.

There are several reports on candidate gene analysis of BMS and subcutaneous fat depth (SFD) traits using similar Wagyu × Limousin F₂ populations. Jiang et al.

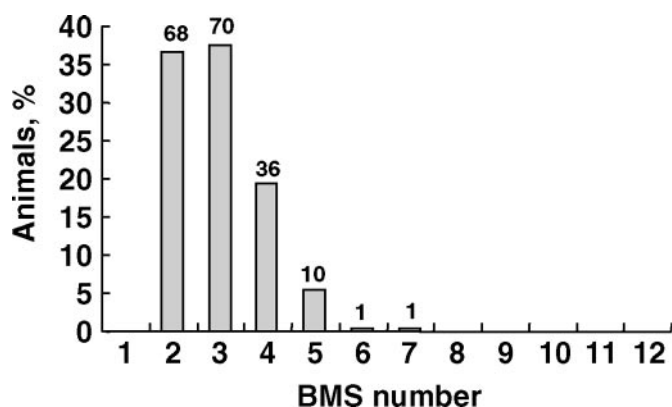


Figure 1. Bar chart of the beef marbling standards (BMS) numbers of 186 F₂ animals. The x-axis indicates the BMS numbers (1 to 12), the y-axis indicates the percentage, and the numeral on each bar represents the number of F₂ animals with that particular BMS.

(2005) detected genetic variation in the mitochondrial transcription factor A (*TFAM*) gene and determined its significant effect on both BMS and SFD. Michal et al. (2006) analyzed the bovine fatty acid binding protein 4 (*FABP4*) gene as a candidate, and found a significant relationship between detected SNP and these 2 traits. Wibowo et al. (2007) reported a significant effect of mutations detected in the corticotrophin-releasing hormone (*CRH*) gene on BMS and SFD. The first *TFAM* gene is located on BTA28, and the latter 2 genes (*FABP4* and *CRH*) are both located on BTA14. We detected no significant (or suggestive) QTL for BMS or backfat thickness on those chromosomes. One possible explanation for this observation was the difference in parental individuals between those 2 F₂ populations. In our F₂ population, the mutations detected in these 3 genes might be fixed in the 2 breeds. In addition, the difference in the measuring procedure of BMS and SFD between the United States and Japan might have caused the different results.

We detected a QTL for withers height at 80.3 cM on BTA5 (Figure 3). Animals that inherited the Limousin alleles were taller than those that inherited the Japanese Black alleles. Quantitative trait loci for birth weight were detected in this region (Casas et al., 2003; Kim et al., 2003) by use of a *Bos indicus* × *Bos taurus* crossbred family. Mizoshita et al. (2004) detected a QTL for carcass yield on BTA5 in a half-sib population of purebred Japanese Black cattle, but the position was different from our QTL. Li et al. (2004) detected a QTL for preweaning ADG and ADG on feed in the 73.5- to 77.6-cM region on BTA5 using a crossbred population developed from several bovine breeds. Those investigators considered IGF-I to be a positional candidate and included information regarding IGF-I polymorphisms in their analysis. Although we measured 14 growth-associated traits in total, including birth weight and

ADG during the fattening period, the genome-wide significant QTL was detected only for withers height.

On BTA19, we detected QTL for fatty acid composition (Figure 4, panels A to C). In addition, QTL for C14:0 content were detected at 62.3 cM for backfat (Figure 4, panel A); QTL for C14:0 and C14:1 content were detected at 62.3 and 71.0 cM for intermuscular fat (Figure 4, panel B) and at 62.3 and 41.1 cM for intramuscular fat (Figure 4, panel C). For each of these 3 loci, animals that inherited the Limousin alleles showed increased C14:0 and C14:1 content. We also detected QTL for C16:0 and C18:1 content and the ratio of total unsaturated fatty acid content to total SFA content of intramuscular fat at 62.3 cM on BTA 19 (Figure 4, panel C). Individuals that inherited the Japanese Black allele at this QTL demonstrated reduced C16:0 content, but increased C18:1 content and the ratio of total unsaturated fatty acid content to total SFA content. The degree of fatty acid composition in the intramuscular fat is an important factor for the eating quality of beef. Generally, the melting points of unsaturated fatty acids are less than those of SFAs, so beef with more unsaturated fatty acid in the intramuscular fat has superior eating quality and good texture. In addition, Mandell et al. (1998) suggested that C18:1 content has a favorable effect on beef flavor. In contrast, Fernandez and West (2005) stated that C12:0, C14:0, and C16:0 are considered to be associated with hypercholesterolemia, because they increase the concentration of low-density lipoprotein in human plasma, and Bláha et al. (2000) suggested that SFA concentrations and coronary atherosclerosis are related. Considering these points, we suggest that our findings here may facilitate the production of beef that is both pleasant to eat and healthier for human consumption. Furthermore, Viitala et al. (2003) detected a QTL for milk fat percentage at 67 cM on BTA19. Subsequently, Roy et al. (2006) studied the bovine fatty acid synthase (*FASN*) gene as a candidate gene for the QTL and found various SNP that had significant effects on milk fat percentage. Morris et al. (2007) detected QTL for fatty acid composition in both adipose tissue and milk fat in the 60 to 80 cM region on BTA19; the locations of those QTL overlap those that we detected. Morris et al. (2007) also analyzed *FASN* as a candidate gene for this QTL and found that the SNP haplotype had a significant effect on fatty acid composition; *FASN* may also be a strong candidate gene for controlling fatty acid composition in our F₂ family. On the other hand, Alexander et al. (2007b) analyzed the fatty acid composition of the LM of their Wagyu × Limousin F₂ population, and carried out QTL mapping on this trait, but did not detect significant QTL on BTA19. A possible reason for this result is the difference in parental individuals of the 2 Wagyu × Limousin reference populations. Whereas their F₂ population originated from 8 Wagyu bulls and 108 Limousin females, our family was constructed from only 2 Japanese Black sires and 2 Limousin females. Our 2 Japanese Black

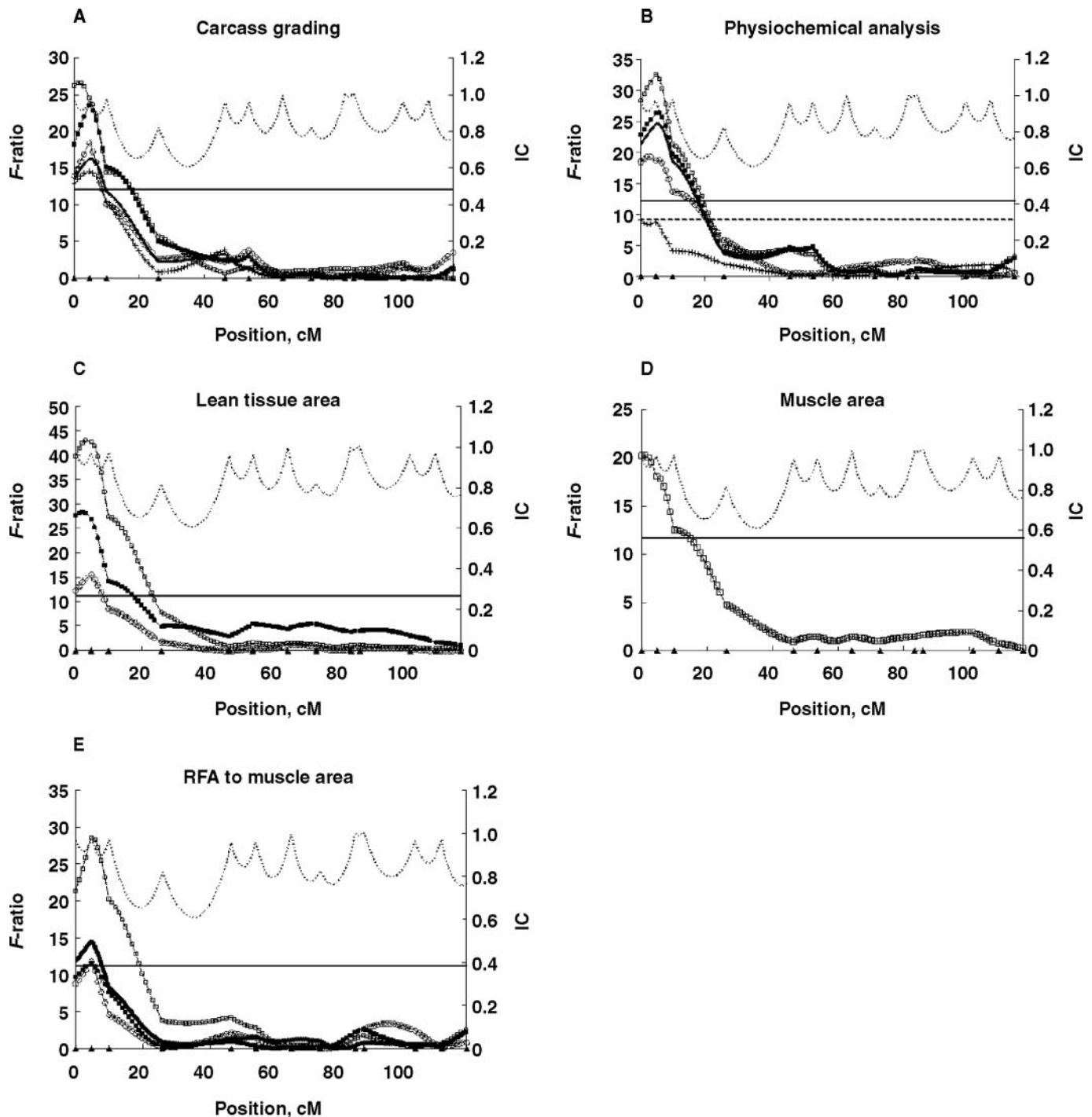


Figure 2. Plot of the F -ratios from multilocus least squares analysis (Haley et al., 1994) of carcass grade and physicochemical property traits on BTA2. The x-axis indicates the relative position on the linkage map; the left-hand y-axis represents the F -ratio; and the right-hand y-axis (dotted curve) indicates information content (IC). Triangles on the x-axis indicate marker positions. Markers were *MNS-2*, *DIK621*, *ILSTS026*, *DIK1081*, *DIK1140*, *BM4440*, *RM041*, *TGLA226*, *DIK1109*, *MM8D3*, *INRA135*, *IDVGA-37*, and *IDVGA-2*. The horizontal lines indicate genome-wide threshold values for 5% level (dotted line) and 1% level (solid line). (A) QTL profile of carcass grade traits: \square = LM area; \blacksquare = beef marbling standards; \circ = luster; $-$ = carcass grade; and $+$ = firmness. (B) QTL profile of physicochemical property traits: \square = CP content; \blacksquare = crude fat content; $-$ = moisture content; \circ = C18:2 content; $+$ = C16:1 content of intramuscular fat. (C) QTL profile of lean area: \square = LM; \blacksquare = M. trapezius; \circ = M. semispinalis. (D) QTL profile of muscle area: \square = LM. (E) QTL profile of ratio of fat area (RFA) to muscle area: \square = LM; \blacksquare = M. trapezius; \circ = M. semispinalis capitis; $-$ = M. semispinalis. There is no public information for marker *DIK621*. The primer sequences of marker *DIK621* were forward primer = TCATGGCCATCATAATCAAG, reverse primer = CCCCTTCCAAACCCATAAT.

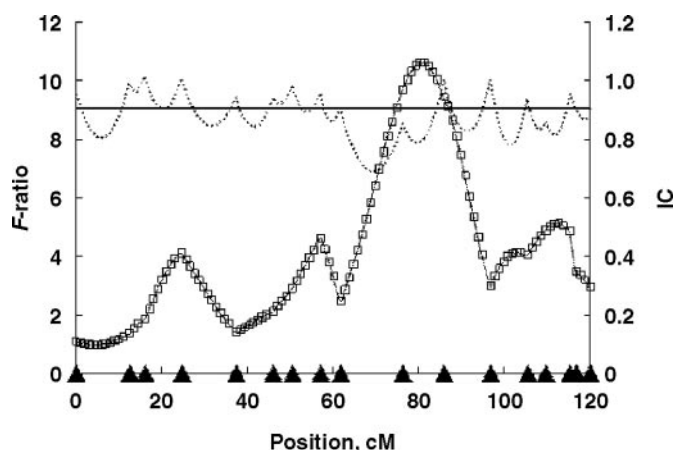


Figure 3. Plot of the F -ratios from multilocus least squares analysis (Haley et al., 1994) of withers height (\square) on BTA5. The x-axis indicates the relative position on the linkage map; the left-hand y-axis represents the F -ratio; and the right-hand y-axis (dotted curve) indicates information content (IC). Triangles on the x-axis indicate marker positions. Markers were *BMS1095*, *BMS610*, *BP1*, *RM103*, *BMS1898*, *MS2106*, *CA084*, *ETH10*, *MNS-44*, *BMS1248*, *BM315*, *DIK2206*, *DIK2287*, *DIK2122*, *BM733*, *DIK2035*, and *BMS597*. The horizontal line indicates threshold values for genome-wide 1% level.

sires were considered excellent individuals in 1995, so several favorable genes (for meat qualities) might be fixed in the 2 sires. It could be said that the structure of our F_2 population was more suitable for detecting effective QTL. Interestingly, Alexander et al. (2007b) detected significant QTL for fatty acid composition on the centromeric region of BTA2, where we also detected the QTL on C16:1 and C18:2. The latent factor with effects on beef fatty acid composition may also be located in this region.

We observed several pairs of traits that showed highly positive or negative correlations among the 27 QTL-detected traits in this study. For example, BMS number had a strong positive relationship with RFA and LM muscle area ($r = 0.85$), but also showed a negative correlation with CP content ($r = -0.78$). Notably, QTL of those 3 traits were located at the same position, 4.7 cM on BTA2. This suggests that markers targeted for one trait may improve performance of the other trait. The opposite result might occur for other trait combinations. We may have to pay attention to this matter when consideration is given to marker-assisted selection.

Overall, the findings we report here provide fundamental information on the transmission of bovine quantitative traits. Because the QTL we detected may represent only breed-associated differences between Japanese Black and Limousin cattle, we need to confirm these QTL effects in a purebred Japanese Black population to obtain information useful in breeding Wagyu cattle.

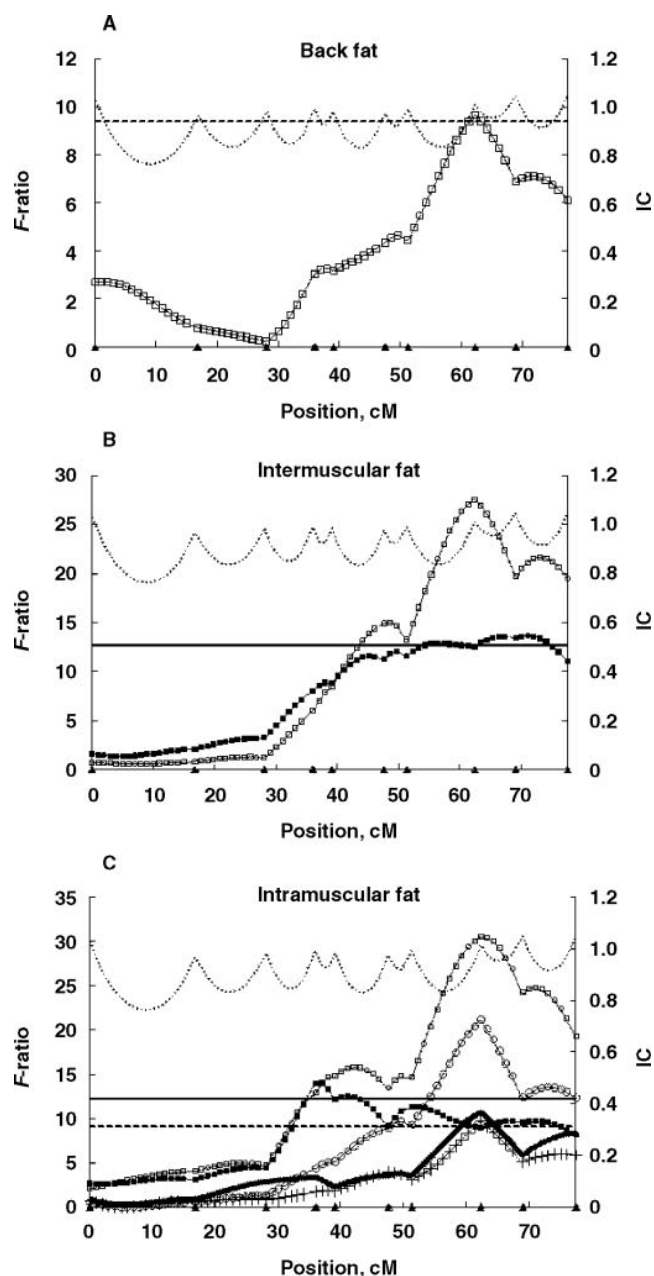


Figure 4. Plot of the F -ratios from multilocus least squares analysis (Haley et al., 1994) for fatty acid composition traits on BTA19. The x-axis indicates the relative position on the linkage map; the left-hand y-axis represents the F -ratio; and the right-hand y-axis (dotted curve) indicates information content (IC). Triangles on the x-axis indicate marker positions. Markers were *DIK2452*, *X82261*, *INRABERN148*, *URB044*, *CSSME070*, *BMS2389*, *BM17132*, *IOBT34*, *NLB-CMK39*, and *DIK688*. The horizontal lines indicate threshold values for genome-wide 5% level (dotted line) and genome-wide 1% level (solid line). (A) QTL profile of fatty acid composition in backfat: \square = C14:0 content. (B) QTL profile of fatty acid composition in intermuscular fat: \square = C14:0 content; \blacksquare = C14:1 content. (C) QTL profile on fatty acid composition of LM intramuscular fat: \square = C14:0 content; \blacksquare = C14:1 content; \circ = C18:1 content; $-$ = C16:0 content; and $+$ = the ratio between total unsaturated fatty acid and total SFA.

LITERATURE CITED

- Alexander, L. J., T. W. Geary, W. M. Snelling, and M. D. MacNeil. 2007a. Quantitative trait loci with additive effects on growth and carcass traits in a Wagyu-Limousin F₂ population. *Anim. Genet.* 38:413–416.
- Alexander, L. J., M. D. MacNeil, T. W. Geary, W. M. Snelling, D. C. Rule, and J. A. Scanga. 2007b. Quantitative trait loci with additive effects on palatability and fatty acid composition of meat in a Wagyu-Limousin F₂ population. *Anim. Genet.* 38:506–513.
- Bláha, V., D. Solichová, D. Cernohorský, M. Brátová, P. Vyroubal, and Z. Zadák. 2000. Bioanalysis of PUFA metabolism and lipid peroxidation in coronary atherosclerosis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22:563–572.
- Casas, E., J. W. Keele, S. D. Shackelford, M. Koohmaraie, T. S. Sonstegard, T. P. Smith, S. M. Kappes, and R. T. Stone. 1998. Association of the muscle hypertrophy locus with carcass traits in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 76:468–473.
- Casas, E., S. D. Shackelford, J. W. Keele, M. Koohmaraie, T. P. Smith, and R. T. Stone. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *J. Anim. Sci.* 81:2976–2983.
- Casas, E., S. D. Shackelford, J. W. Keele, R. T. Stone, S. M. Kappes, and M. Koohmaraie. 2000. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J. Anim. Sci.* 78:560–569.
- De La Torre, A., E. Debiton, P. Juanéda, D. Durand, J. M. Chardigny, C. Barthelemy, D. Bauchart, and D. Gruffat. 2006. Beef conjugated linoleic acid isomers reduce human cancer cell growth even when associated with other beef fatty acids. *Br. J. Nutr.* 95:346–352.
- Fernandez, M. L., and K. L. West. 2005. Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *J. Nutr.* 135:2075–2078.
- Folch, J., M. Lees, and G. H. S. Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497–509.
- Green, P., K. Falls, and S. Crooks. 1990. Documentation for CRIMAP, Version 2.4. Washington University School of Medicine, St. Louis, MO.
- Haley, C. S., S. A. Knott, and M. Elsen. 1994. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* 136:1195–1207.
- Hristov, A. N., L. R. Kennington, M. A. McGuire, and C. W. Hunt. 2005. Effect of diets containing linoleic acid- or oleic acid-rich oils on ruminal fermentation and nutrient digestibility, and performance and fatty acid composition of adipose and muscle tissues of finishing cattle. *J. Anim. Sci.* 83:1312–1321.
- Ihara, N., A. Takasuga, K. Mizoshita, H. Takeda, M. Sugimoto, Y. Mizoguchi, T. Hirano, T. Itoh, T. Watanabe, K. M. Reed, W. M. Snelling, S. M. Kappes, C. W. Beattie, G. L. Bennett, and Y. Sugimoto. 2004. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res.* 14:1987–1998.
- Jiang, Z., T. Kunej, J. J. Michal, C. T. Gaskins, J. J. Reeves, J. R. Busboom, P. Dove, and R. W. Wright Jr. 2005. Significant associations of the mitochondrial transcription factor A (TFAM) promoter polymorphisms with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu × Limousin F₂ crosses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334:516–523.
- JLIA. 1995. Japanese Feeding Standard for Beef Cattle. Japan Livestock Industry Association, Tokyo.
- Kappes, S. M., J. W. Keele, R. T. Stone, R. A. McGraw, T. S. Sonstegard, T. P. Smith, N. L. Lopez-Corrales, and C. W. Beattie. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.* 7:235–249.
- Keele, J. W., S. D. Shackelford, S. M. Kappes, M. Koohmaraie, and R. T. Stone. 1999. A region on bovine chromosome 15 influences beef longissimus tenderness in steers. *J. Anim. Sci.* 77:1364–1371.
- Kim, J. J., F. Farnir, J. Savell, and J. F. Taylor. 2003. 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.* 81:1933–1942.
- Knott, S. A., L. Marklund, C. S. Haley, K. Andersson, W. Davies, H. Ellegren, M. Fredholm, I. Hansson, B. Hoyheim, K. Lundström, M. Moller, and L. Andersson. 1998. Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and Large White pigs. *Genetics* 149:1069–1080.
- Kuber, P. S., J. R. Busboom, E. Huff-Lonergan, S. K. Duckett, P. S. Mir, Z. Mir, R. J. McCormick, M. V. Dodson, C. T. Gaskins, J. D. Cronrath, D. J. Marks, and J. J. Reeves. 2004. Effects of biological type and dietary fat treatment on factors associated with tenderness: I. Measurements on beef longissimus muscle. *J. Anim. Sci.* 82:770–778.
- Kuchida, K., M. Hasegawa, M. Suzuki, and S. Miyoshi. 2001a. Prediction of beef color standard number from digital image obtained by using photographing equipment for the cross section of carcass. *Anim. Sci. J. (Jpn.)* 72:321–328.
- Kuchida, K., S. Kono, K. Konishi, L. D. Van Vleck, M. Suzuki, and S. Miyoshi. 2000. Prediction of crude fat content of longissimus muscle of beef using the ratio of fat area calculated from computer image analysis: Comparison of regression equations for prediction using different input devices at different stations. *J. Anim. Sci.* 78:799–803.
- Kuchida, K., M. Suzuki, and S. Miyoshi. 2001b. Development of photographing equipment for the cross section of carcass and prediction of BMS number by using obtained image from that equipment. *Anim. Sci. J. (Jpn.)* 72:224–231.
- Li, C., J. Basarab, W. M. Snelling, B. Benkel, B. Murdoch, C. Hansen, and S. S. Moore. 2004. Assessment of positional candidate genes *myf5* and *igf1* for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos taurus*. *J. Anim. Sci.* 82:1–7.
- MacNeil, M. D., and M. D. Grosz. 2002. Genome-wide scans for QTL affecting carcass traits in Hereford × composite double back-cross populations. *J. Anim. Sci.* 80:2316–2324.
- Mandell, I. B., J. G. Buchanan-Smith, and C. P. Campbell. 1998. Effects of forage vs grain feeding on carcass characteristics, fatty acid composition, and beef quality in Limousin-cross steers when time on feed is controlled. *J. Anim. Sci.* 76:2619–2630.
- May, S. G., C. A. Strudicant, D. K. Lunt, R. K. Miller, and S. B. Smith. 1993. Comparison of sensory characteristics and fatty acid composition between Wagyu crossbred and Angus steers. *Meat Sci.* 35:289–298.
- Michal, J. J., Z. W. Zhang, C. T. Gaskins, and Z. Jiang. 2006. The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu × Limousin F₂ crosses. *Anim. Genet.* 37:400–402.
- Mizoshita, K., T. Watanabe, H. Hayashi, C. Kubota, H. Yamakuchi, J. Todoroki, and Y. Sugimoto. 2004. Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a half-sib family of purebred Japanese Black (Wagyu) cattle. *J. Anim. Sci.* 82:3415–3420.
- Morris, C. A., N. G. Cullen, B. C. Glass, D. L. Hyndman, T. R. Manley, S. M. Hickey, J. C. McEwan, W. S. Pitchford, C. D. Bottema, and M. A. Lee. 2007. Fatty acid synthase effects on bovine adipose fat and milk fat. *Mamm. Genome* 18:64–74.
- Noci, F., F. J. Monahan, P. French, and A. P. Moloney. 2005. The fatty acid composition of muscle fat and subcutaneous adipose tissue of pasture-fed beef heifers: Influence of the duration of grazing. *J. Anim. Sci.* 83:1167–1178.
- Okumura, T., K. Saito, H. Sakuma, T. Nade, S. Nakayama, K. Fujita, and T. Kawamura. 2007. Intramuscular fat deposition in principal muscles from twenty-four to thirty months of age using identical twins of Japanese Black steers. *J. Anim. Sci.* 85:1902–1907.
- Roy, R., L. Ordovas, P. Zaragoza, A. Romero, C. Moreno, J. Altarriba, and C. Rodellar. 2006. Association of polymorphisms in the bovine FASN gene with milk-fat content. *Anim. Genet.* 37:215–218.

- Sato, S., Y. Oyamada, K. Atsuji, T. Nade, S. Sato, E. Kobayashi, T. Mitsuhashi, K. Nirasawa, A. Komatsuda, Y. Saito, S. Terai, T. Hayashi, and Y. Sugimoto. 2003. Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a Meishan \times Duroc F2 resource population. *J. Anim. Sci.* 81:2938–2949.
- Sellick, G. S., W. S. Pitchford, C. A. Morris, N. G. Cullen, A. M. Crawford, H. W. Raadsma, and C. D. Bottema. 2007. Effect of myostatin F94L on carcass yield in cattle. *Anim Genet.* 38:440–446.
- Stone, R. T., J. W. Keele, S. D. Shackelford, S. M. Kappes, and M. Koohmaraie. 1999. A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting carcass and growth traits. *J. Anim. Sci.* 77:1379–1384.
- Viitala, S. M., N. F. Schulman, D. J. de Koning, K. Elo, R. Kinos, A. Virta, J. Virta, A. Mäki-Tanila, and J. H. Vilkki. 2003. Quantitative trait loci affecting milk production traits in Finnish Ayrshire dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 86:1828–1836.
- Wibowo, T. A., J. J. Michal, and Z. Jiang. 2007. The corticotrophin releasing hormone is a promising candidate gene for marbling and subcutaneous fat depth in beef cattle. *Genome* 50:939–945.

References

This article cites 36 articles, 21 of which you can access for free at:
<http://jas.fass.org/cgi/content/full/86/11/2821#BIBL>

GENOMIC ORGANIZATION AND PROMOTER ANALYSIS OF THE BOVINE ADAM12 GENE

Y. Taniguchi¹, K. Doronbekov¹, T. Yamada¹, Y. Sasaki¹,
A. Takano², and Y. Sugimoto²

¹Laboratory of Animal Breeding and Genetics Graduate School of Agriculture,
Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, Japan

²Shirakawa Institute of Animal Genetics, Nishigo, Fukushima, Japan

A disintegrin and metalloprotease (ADAM) 12 is a member of the ADAM family possessing a putative role in a variety of biological processes such as modulation of proteolytic processing, cell adhesion, cell fusion, and signaling. Recently, it has been suggested that ADAM12 is involved in regulation of adipogenesis as well as myogenesis. In this study, we have determined the genomic structure of 5'- and 3'-regions in the bovine ADAM12 gene. We could obtain characteristics of lower homology of its exon 2 with human counterpart. Human exon S19 encodes for the sequence specific to a shorter secreted form of ADAM12S. The bovine ADAM12 gene had no canonical 3'-splice acceptor site at 5'-side of the putative exon S19, suggesting that the cattle could not produce a ADAM12S counterpart. To identify the regulatory elements, a 12 kb 5'-flanking region of the gene was cloned and luciferase reporter assay was carried out. Reporter plasmids with different length of proximal promoter region indicated the similar patterns of promoter activities between 3T3-L1 preadipose and Cos-1 nonadipose cells. However, 2.0 and 0.2 kb fragments located at -8 and -4.5 kb upstream of the putative transcription start site, respectively, increased the ADAM12 promoter activity about 1.5- to 2-fold in 3T3-L1, but not in Cos-1. These results suggested that the two distal regions might contribute to the preadipocyte-specific expression of ADAM12 gene.

Keywords: ADAM12; Adipogenesis; Cattle; Promoter analysis

INTRODUCTION

An ADAM family, of which the prototype is a membrane-anchored cell surface protein composed of several distinct domains including a prodomain, metalloprotease, disintegrin, cystein-rich, EGF-like and transmembrane domains as well as a cytoplasmic tail, seems to be implicated in a variety of biological processes, such as modulation of proteolytic processing, cell adhesion, cell fusion, and signaling (1–3).

This work was supported by the research funds of Japanese Livestock Technology Association, by a Grant-in-Aid for Scientific Research (A) (no. 09306019) from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan, and by a Grant-in-Aid (Bio Design Program) from the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan.

Address correspondence to Y. Taniguchi, Laboratory of Animal Breeding and Genetics, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan. E-mail: tyukio@kais.kyoto-u.ac.jp

ADAM12 has been isolated as one of the ADAM family genes expressed in muscle (4). The *ADAM12* is expressed predominantly in neonatal muscle as well as placenta, but slightly in adult muscle (4, 5). Its expression has been reported to decrease during differentiation of myogenic cell line in vitro or to increase dramatically in response to regeneration of muscle in vivo (6). These studies, together with immunocytochemical localization and functional expression studies, have suggested that the *ADAM12* is implicated in muscle development and regeneration (4-8).

On the other hand, Kawaguchi and colleagues (9) have developed muscle-specifically *ADAM12*-overexpressing transgenic mice, which exhibit the increased intramuscular adipogenesis characterized by appearance of cells expressing early markers of adipogenesis in the perivascular space and of mature, lipid-laden adipocytes, at one to two and three to four weeks of age, respectively. Furthermore, Kurisaki and colleagues (10) have recently demonstrated that *ADAM12*-deficient mice exhibit the reduction of the interscapular brown adipose tissue, in addition to the impaired formation of the neck and interscapular muscles in some pups. These observations, together with the recent report that the *ADAM12* is transiently expressed at the cell surface of preadipocyte just before the onset of adipogenesis (11), have suggested that the *ADAM12* may be involved in regulating adipogenesis and myogenesis through a linked developmental pathway.

It has been reported that, in humans, the *ADAM12* exists in two alternatively spliced forms, a shorter secreted form, *ADAM12S*, and a longer transmembrane form, *ADAM12L*, that diverge at their 3'-ends and specifically make use of exon S19 and exons L19 to L23, respectively (5). As a consequence, the shorter form, but not the longer form, lacks the transmembrane and cytoplasmic domains at its C-terminus. In contrast, only the longer transmembrane form has been detected in mouse (4).

The expression of *ADAM12* mRNA are detected in growing preadipocyte and transiently up-regulated in early stage during the adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells (11), suggesting that the *ADAM12* gene expression may be transcriptionally regulated during adipogenesis. However, little is known about the expressional regulation of the *ADAM12* gene. Additionally, it is interesting to focus on the bovine gene, in that beef marbling (12) phenotypically resembles increased adipogenesis observed in *ADAM12* transgenic mouse muscle. As a step toward understanding the regulation in the cattle, we thus have cloned and sequenced the promoter, as well as 5'- and 3'-regions, in the bovine *ADAM12* gene, and characterized promoter activity in transient transfection assays in 3T3-L1 preadipocyte.

MATERIALS AND METHODS

Primers

Primer sequences were Ex1-S1, 5'-GCTCATTTATTGCAACGGTCA; Ex5-A1, 5'-TAATGAGTCCCCTGAGACCA; 3'S1, 5'-ACAGGTTTGGCTTCGGAGG-GAG; S-A1, 5'-CGGCCAAGCCACAGATTCAA; and S-A2, 5'-AGAGTTAGT-GACTCCATGGGT.

Isolation of Bovine Genomic Clones

We screened a bovine λ phage library (13), first by hybridization with a partial bovine cDNA fragment, and the Roswell Park Cancer Institute-42, Children's Hospital Oakland Research Institute-240, and Japanese black cattle fibroblast-derived (14) bovine BAC libraries as well as the λ phage library, repeatedly for genomic walking, by PCR using primers designed based on upstream end sequences of positive clones. DNA from positive clones was isolated and characterized by restriction mapping and Southern analysis using bovine and human cDNA fragments for exons in 3' region of *ADAM12L* and for exons 1 to 5, respectively, as probe. Specific restriction fragments subcloned into pBluescript SK- (Stratagene, La Jolla, CA) were sequenced using an ABI377 sequencer (ABI, Foster City, CA) with the DYEnamic ET terminator cycle sequencing kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). A nested-deletion and primer-walk strategies were used for determination of promoter sequence. Analyses of sequences and alignments were performed with the GENETYX-WIN ver. 7 sequence analysis software package (Software Development, Tokyo, Japan). The promoter region was analyzed for potential transcription binding sites with MOTIF SEARCH program (<http://motif.genome.jp>). Primer sequences used for genomic walking are available on request.

RT-PCR

A pregnant cow was slaughtered at day 60 of gestation. The whole embryo and placenta were collected from the uterine cavity of the slaughtered cow, immediately dipped into liquid nitrogen and stored at -80° until RNA extraction. RNA was extracted from the bovine whole embryo or placenta using Trizol reagent (Invitrogen, Groningen, Netherlands), and used as a template for RT-PCR. Reverse transcription was performed by First-strand cDNA synthesis kit (Takara, Shiga, Japan) according to manufacturer's protocol. PCR was performed in a volume of 50 μ l with the following conditions: 2 μ l of cDNA, 50 pmol of primers, and 2.5 units of *LATaq* polymerase (Takara) for 35 cycles of 94 $^{\circ}$ C 0.5 min, 55 $^{\circ}$ C 0.5 min and 72 $^{\circ}$ C 1 min. PCR primers Ex1-S1/Ex5-A1 were used to yield product from the exons 1 to 5 splicing. The PCR products were cloned into pCR2.1 using TOPO TA cloning kit (Invitrogen), and sequenced as described above. PCR primers 3'S1/S-A1 or S-A2 were used to examine the possibility of splicing acceptance from exon 18 to exon S19.

Plasmid Construction

Luciferase reporter constructs were based on a modified pGL3-basic plasmid (Promega, Madison, WI), in which the *Sma*I site was converted to a *Eco*RI site, via cleavage with *Sma*I followed by insertion of a *Eco*RI linker. A genomic *ADAM12* fragment from the *Eco*RI site at -1147 to the *Hind*III site at $+205$ relative to the putative transcription start site was inserted into the modified pGL3-basic double-digested with *Eco*RI-*Hind*III to generate bovine *ADAM12* promoter/luciferase fusion plasmid (pbADAM12proEH-Luc). Reporter plasmids with progressive deletion of proximal promoter were constructed from pbADAM12proEH-Luc using exonuclease III/mung bean nuclease system. For the analysis of distal promoter

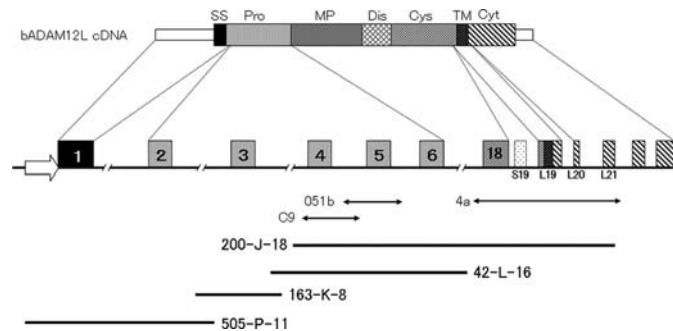


Figure 1 Genomic organization of 5' and 3' regions in bovine *ADAM12* gene. Organization of the bovine *ADAM12* gene (*middle*) is aligned with protein domains of *ADAM12L* (*top*). Exons are indicated by *solid boxes* and numbered accordingly. S19 represents putative exonic sequences homologous to alternatively spliced exon S19 specific to a shorter secreted form, *ADAM12S*, detected in human, and is indicated by *dotted box*. The domains of the *ADAM12L* protein are designated as follows: SS, signal peptide; Pro, prodomain; MP, metalloprotease; Dis, disintegrin; Cys, cystein-rich; TM, transmembrane; Cyt, cytoplasmic domains. The promoter is indicated by *arrow*. The genomic fragments (*bottom*) obtained by upstream genomic walking are also aligned with genomic organization of the *ADAM12* gene.

region, each restriction fragment (1.5, 2.0, 3.4, 0.2, and 3.3 kb) from -1.15 kb to -12 kb upstream of the putative transcription start site was inserted into the *EcoRI* site of pbADAM12proEH-Luc (Figure 1B). To construct the deletion mutants of 0.2 kb distal promoter fragment, the corresponding fragments were amplified by PCR and then cloned into the *EcoRI* site of pbADAM12proEH-Luc (Figure 2B). The authenticity of the constructs was confirmed by sequencing.

Transfection and Reporter Assay

Because bovine preadipocyte was not available, we used 3T3-L1 as preadipose cells, and then Cos-1 as non-adipose cells. The 3T3-L1 and Cos-1 cells were maintained at 37°C in 5% CO_2 , in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum. Both cells were transfected with $0.5\ \mu\text{g}$ per well of the reporter plasmids in 12-well culture plates by employing LipofectAMINE PLUS Reagent (Invitrogen). To normalize for the efficiency of transient transfection, 10 ng per well of phRL-CMV (Promega) was simultaneously cotransfected. Transfectants were lysed with 0.4 ml reporter lysis buffer (Promega) after 30 h according to manufacturer's recommendation (Invitrogen). Firefly and *Renilla* luciferase activities in 75 μl aliquot were measured using a microtiter plate luminometer (L-max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) with Dual-Glo luciferase assay system (Promega). The firefly activity adjusted for *Renilla* activity was represented as relative light units.

GenBank Accession Numbers

Bovine *ADAM12* cDNA, [AB164682](#); bovine *ADAM12* promoter and exon 1, [AB164436](#); bovine *ADAM12* exon 2, [AB164437](#); bovine *ADAM12* exon 3, [AB164438](#);

```

bovine 1' ATGGC CGCGCGCCG CGGCCGCGC CCACCGCCG CGCCCTCTG CTCGCCCTG CCGGGGCTC GCTGGCGCCG
          ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x *****
human 1' ATGGC AGCGCGCCG CTGCCGTGT CCCCAGCCG CGCCCTCTG CTCGCCCTG CCGGTGCTC GCTCGCGCCG
          ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x *****
76' CGCGCGCCG GAGGGTGAA CTGGGAAGC CAGTITGTG CTTCCATGCA GCAGCCCGG ACGAGGGATG GGGCAGGAGC
          ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x *****
76' TCGAGGCCG GAGGGTGAG CTTATGGAAC CA-----AGGAAGAGC
          ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x *****
156' CTATGAAGTG GTCAGTGTCT CTCTTTTGA TGGAGATCCA TGAACCCAA TGAAGACTGC AGACTCAGAG AATCACCAG
          ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x *****
117' TGATGAAGTT GTCAGTGCCT CTGTTGGGAG TGGGACCTC TGGATCCAG TGAAGAGCTT CGACTCCAAG AATCATCCAG
          ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x *****
236' GAGTGTGAA TTTTGAATA CAATGACAA GCAAAGAGCT GATCGTGAAC CTGGAAGAA ATGAAGTCT CATCGCCAGC
          ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x *****
197' AAGTGTGAA TATTCGACTA CAACGGGAAA GCAAAGAAGT GATCATAAAT CTGGAAGAA ATGAAGTCT CATTGCCAGC
          ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x *****
316' AGTTTCACGG AAACCCACTA TCTACAGGAT GGCACGGACA TCTCTCTCAT CCGAAATTAC ACAGGCTACT GTTATTATCA
          ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x *****
277' AGTTTCACGG AAACCCACTA TCTGCAAGAC GGTACTGATG TCTCCCTCGC TCGAAATTAC ACGGCTACT GTTACTACCA
          ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x *****
          (GTAATCTG)
          |
396' TGGACGTGTG CAAGGCTCTT TCGGATCGGC GGTGAGTCTC AGCACTGTT CTGGTCTCAG GGGACTCATT ACATTTGAAA
          ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x *****
357' TGGACATGTA CCGGGATATT CTGATTCAGC AGTCACTCTC AGCACTGTT CTGGTCTCAG GGGACTTATT GTGTTTGAAG
          ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x *****
476' ATAACACCTA TATTTGGAG CCAATGAAAA ATGCAACCAA CAGATACAAA CTCTTCCCAG TGGAAAACCT GCCGGGCACC
          ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x *****
437' ATGAAAGCTA TGCTTAGAA CCAATGAAAA GTGCAACCAA CAGATACAAA CTCTTCCCAG CGAAGAAGCT GAAAAGCGTG
          ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x ***** x *****

```

Figure 2 Nucleotide sequence of bovine *ADAM12* exons 1, 2, 3, 4, and 5, and its alignment with those of human. The sequences from the ATG translation start codon to the initial 100 p of exon 6 in the bovine (upper row) and human (lower row) *ADAM12* gene are represented. The exon 2 sequence is *stippled*. The human sequence is from GenBank accession no. **BC060804**. The final 9 p in exon 4 from GenBank accession no. **AF023476** is represented *beneath lower row*. The exon/intron boundaries are indicated by *solid inverted triangles*.

bovine *ADAM12* exon 4, **AB164439**; bovine *ADAM12* exon 5, **AB164440**; bovine *ADAM12* exons 18 to L20, **AB164441**; bovine *ADAM12* exon L21, **AB164442**.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of Bovine *ADAM12* Genomic Clones

Genomic clones containing 5'- and 3'-regions of bovine *ADAM12* gene were isolated by screening λ phage and BAC libraries (Figure 3). Clones 4a and 051b were first isolated using a partial bovine *ADAM12L* cDNA (GenBank accession no. **AB164682**) lacking 5'-region as probe. Iteration of upstream genomic walking subsequently resulted in isolation of additional clones C9, 200-J-18, 42-L-16, 163-K-8, and 505-P-11. Restriction mapping and Southern analysis using bovine (for exons in 3' region of *ADAM12L*) or human cDNA fragments (for exons 1 to 5) as probe have revealed that clones 505-P-11, 163-K-8, C9, 051b, and 4a, respectively, contain exons 1, 3, 4, 5, and 18-L21. It has been reported that, in human *ADAM12* genes, the sizes of introns 1, 2, and 3 are extremely long (Human Genome Resources, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>). As to the bovine *ADAM12* gene, the 5'-region of exon1 to upstream portion in intron 3 spans the genomic coverage composed of two BAC clone contig, 505-P-11 and 163-K-8, while the 3'-region of downstream portion in intron 3 to upstream portion in intron L21 is enclosed with only one BAC clone, 200-J-18 (Figure 3). This is thus indicative of extremely long sizes of introns 1, 2, and 3, equivalent to that of the human gene.

	5' -donor site	3' -acceptor site
Exon1	CGGCCCGAGtaagtggc.....	gtgttacagGGTGA
Exon2 (137bp)	GACTCAGAGgtcagtttt.....	atotttcagAATCACCCA
Exon3 (74bp)	AAGAAATGAgtaagtcgg.....	tttccacagAGGTCTCAT
Exon4 (79bp)	AATTACACAgtaagtcctgcgtggaca.....	tcttttcagGGTCACTGT
Exon5 (77bp)	TGGTCTCAGtaagtgc.....	
Exon18	GGCAAGCAGgttagtggt.....	ttgtttcagATAACCAGG
ExonL19 (136bp)	AAAGCTAAGgtaccctgg.....	gacttcagGTGCGTGCG
ExonL20 (109bp)	ACACCTAAGgtgagtttc.....	atcccagGACAACACC
ExonL21 (180bp)	CAGGCCAGgtaccccg.....	

Figure 3 Exon/intron boundaries for the bovine *ADAM12* gene. The exon and intron sequences are shown in *uppercase* and *lowercase letters*, respectively. The sizes of exons are represented in the parentheses. The dinucleotides GC 10 bp downstream of exon 4 are *doubly underlined* (see Discussion).

Genomic Structure of 5'-region in Bovine *ADAM12* Gene

Partial sequence analysis of the two clones, 505-P-11 and 051b, respectively, revealed putative exonic sequences sharing a homology with human exons 1 and 5. A 5'-portion of bovine *ADAM12* cDNA spanning exons 1 to 5 was thus amplified with RT-PCR using the primers (Ex1-S1/Ex5-A1) designed from the putative sequences, and then sequenced. The exon/intron organization of 5'-region covering exon 1 to intron 5 has been determined by partially sequencing the corresponding genomic fragments, and then comparing with the bovine cDNA sequence; the organization of exon 2 by genomic sequencing of the fragment from the clone 505-P-11 (identified by Southern analysis using the obtained bovine cDNA as probe), and comparing the genomic sequence with the cDNA sequence (Figures 4 and 5). The splicing consensus sequences were identified in the exon/intron boundary, and all splicing donor and acceptor sites conformed to the GT/AG rule (Figure 5). While the exon/intron organization of the 5'-region was conserved between cattle and human, exon 2 showed lower homology, which results from 39-bp genomic insertion/deletion in cattle/human (Figure 4, stippled sequences), consistent with no detection of exon 2-containing clone in Southern analysis using human probe.

The human *ADAM12* exon 4 has been shown to be subjected to alternative splicing due to the variable inclusion (GenBank accession no. **AF023476**) or exclusion (GenBank accession no. **BC060804**) of the final 9 bp. The bovine *ADAM12* exon 4 detected in this study is in accordance with alternatively spliced form excluding the final 9 bp in GenBank accession no. **BC060804**. The dinucleotides immediately downstream of the final 9 bp are GC in cattle, as compared to GT in human, suggesting elimination of an alternate splice donor site in bovine intron 4 (Figure 5, doubly underlined sequences). However, it remains unclear whether there is alternatively spliced form including the 9 bp, equivalent to that of the human gene.

We have further demonstrated characteristics that are lower homology of bovine exon 2 with human counterpart (Figure 4). The *ADAM12* prodomain encoded by exon 2 to 6, has been reported to show lower homology between human and mouse than that of the other domains (5). The prodomain plays a pivotal role in regulating the ADAM12 protease through both mechanisms of latency and of exit from the endoplasmic reticulum (15, 16). Therefore, our present result on exon 2,

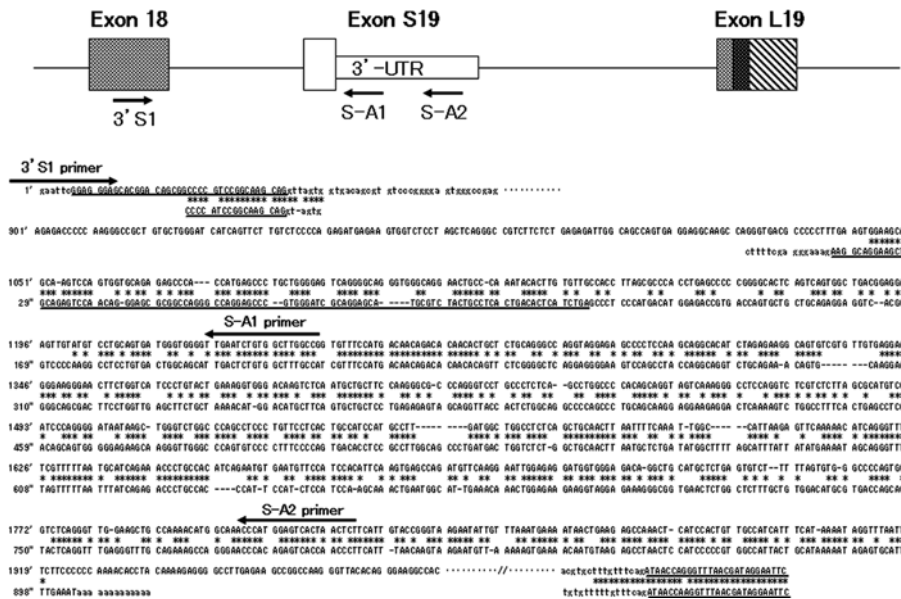


Figure 4 Organization and nucleotide sequence of bovine *ADAM12* exons 18 to L19, and alignment with those of human. (A) The structure of the gene is shown with the positions of primers used in this study. Exons 18 and L19 are indicated by *solid boxes*, and putative exon S19 with 3'-untranslated region by *open box*. (B) The sequences downstream from exon 18 and upstream from exon L19 in the bovine (*upper row*) and human (*lower row*) *ADAM12* gene are represented. The sequences around the putative bovine exon S19, as well as exon 18, human exon S19 and exon L19 sequences, are shown in *uppercase letters*, while the intron sequences in *lowercase letters*. Poly(A) tail is shown following human exon S19. The coding regions are *underlined*, and the primers used in this study are shown in *arrows* above the sequences.

together with the previous report of lower homology in prodomain, may suggest the existence of species-specific difference in regulatory mechanism of the *ADAM12* protease by the prodomain.

Aside from the fact that the *ADAM12* genomic reference sequence (41529303–41388616 of GenBank accession no. [NC007327](#)) obtained by the bovine genome sequencing project starts with exon 4, genomic structure of the other 5'-region in bovine *ADAM12* gene, including the dinucleotides GC 10 bp downstream of exon 4, in the reference sequence was consistent with our data.

Genomic Structure of 3'-region in Bovine *ADAM12* Gene

Partial sequencing of the clone 4a, followed by comparison with the bovine cDNA sequence (GenBank accession no. [AB164682](#)), determined the exon/intron organization, in which the splicing consensus sequences were identified at the boundary (Figure 5), of 3'-region spanning exon 18 to intron L21, except for alternatively spliced exon S19 specific to a shorter secreted form, *ADAM12S*, which is reported to be located between exons 18 and L19 (5). The exon/intron organization of the 3'-region, except for the exon S19, was conserved between cattle and human.

```

EHK(-1147)
-1147 ▼ gaattcccts sacasagssg tctggcagsc tacagtcctat gssgttgcaa agastcagac aascctatgc gactaacact tcagctcca
-1057 tccatsscts saaatgctga aaaatctsss ttgssstgatt atcaacccct tagcccttag gtttctaata sststcaag attagsgatc
-967 ttgstggtc cacagstgt sscacccat cttaagccc tctcagctcc tttagctgc saagccctct tcttctgst occatgstct
-877 agzagaagc aagccctgct ttaataaaca ctgatactgt gttctttgag sccatgaggg cagaagagaa gtagactgcc aagaactcag
-787 actzagaaca agtctcatt atctactgc tgttccag acaccaagc ctccctggc ccttggctg agagcctcat ttcaagstc
-697 tsszagscca ccaggaaca gtattttga cagacaacc castcattc ttacaccag acagtttssg aaacattgt atcaccttt
(-804)
-607 tagtttttss scszzsszsa gzttagtcca tctctgsgaa aagaaacag agccaatcta tzagstataa acctaaagca acsctcaa
(-457)
-517 agcacatgc ccagaagtc cgtctctca gttccaaatt caatctcag csszazatg ccccttttss gaatttaacs ssscczccc
(-391)
-427 scttsszssg csczsgzazg cctttcagac czgctacccg cgttcczctg attcczscg sscctsszg sagcazccga stcatcatt
-337 ccagcctcag actzgaagc tssaccatgc ccccctgtg gctcttssca scczsczcc csczccccc csczccatc accccczzzc
-247 ssszgtgtgt stzccctcct gcgcccggc gccacczgc cagctctgts cczcccccg ccczcczcc ssczcczcc accccczzzg
-157 cccttccc ccagccccc czzzztssg czazcczcg ccttsszcg saocctssg ssszttgag ssszazccc azcstctc
(-53)
-67 tagzacczcc ssszcczcc csczsczcg ssszazag aatttattcc stzstcagaa saaczstgac tgcgggczct ggatccattt
24 cacagczctg cctctcgc ctaacgatct toctctgccc gggczcaact cggacagttt gctcatttat tgcaaczgct aagczttgcz
114 czgtgczagc acagczcgcz czgczacaca cacacacaca czgczcgcz caacacaczg ccaagczgaa actttctttt aaaaaatga
204 aagcttagac gagctcttcc czgczczgag czctgczgca gggczttczg agctgczctc czgczczgag aagctczczg ggzctgczg
294 gczczgczcc tgczczgczg czgczgczga tgztczagcz czgczczczc agczczgag czgczczgcz aczgaagcz gczczgczg
384 gczczgczcc czgczczczg czczaczczg czgczczctc tgztcgczct gczczgczct czgczczgcz czgczczgcz czgczgczg
474 tssczazcc cazzsczcg czgczczczc azccactgss ssczczctcc tccczssct czczczccc tcttsszazc ssszsszazc
564 sczsszcg atzsczcg sczsszazc szctczgag czczszatt czczczccc szctczszg accczczcz ctaczczcc
654 czczczczc czstczczg ctcczssz ssszsszazg szccctgact czczczccc aagczczct czczczszg tsszsszazg
744 azctczszg czctczczg szctczct czctszgct atctczazg stzctctc ctgaczatt acaczgct cccczszazg
834 tsczszcg tctctcacc ctgczctca tsaatgcz cczazctca tctctgact czctczctc tczczszg tczctgcz
924 cccctczct cccctczaz cc

```

Figure 5 Nucleotide sequences of ~2.1-kb *EcoRI-BamHI* restriction fragment containing exon 1 and 5'-flanking regions. The exon 1 sequences are shown in *uppercase letters*, and the promoter and intron sequences in *lowercase letters*. Nucleotide numbering starts with the putative transcription start site numbered +1. The ATG translation initiation codon is *doubly underlined*.

On the other hand, from completely sequencing the corresponding genomic fragment between exons 18 and L19 of the clone 4a, putative exonic sequences homologous to human S-specific exon S19 have been retrieved (Figure 6). However, no canonical 3'-splice acceptor site was detected in the vicinity upstream of the putative sequences, suggesting that the cattle could not produce an *ADAM12S* counterpart. This may be corroborated by the fact that even if using placenta tissue, in which human *ADAM12S* is the most abundantly expressed, no product was detected by RT-PCR using 3/S1 and S-A1 or S-A2 primers designed based on exon 18 and the putative sequences, respectively (data not shown).

The two splice variants of *ADAM12*, *ADAM12S*, and *ADAM12L* are active metalloproteases in human. *ADAM12S* can cleave IGF binding proteins 3 and 5, as well as the extracellular matrix proteins, gelatin, type IV collagen, and fibronectin, while *ADAM12L* has been shown to shed heparin-binding EGF and placental leucine aminopeptidase from their membrane-anchored forms (17). Further study will be needed on possible effects of loss of *ADAM12S* function in animal species including cattle.

Aside from the fact that the *ADAM12* genomic reference sequence (41529303–41388616 of GenBank accession no. **NC007327**) obtained by the bovine genome sequencing project contains exons L22 and L23, genomic structure of the other 3'-region in bovine *ADAM12* gene, including absence of exon S19, in the reference sequence was consistent with our data.

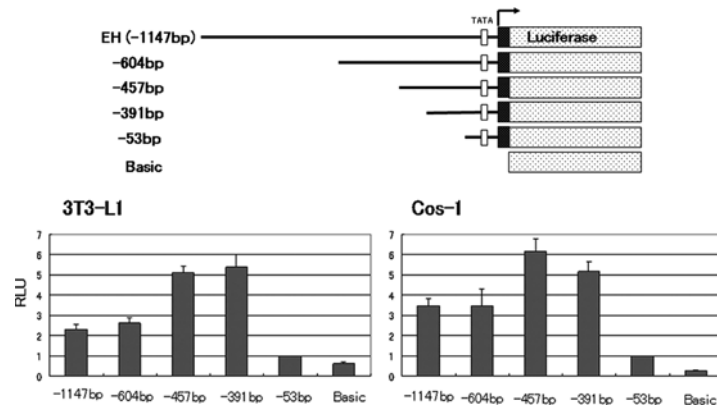


Figure 6 Transfection assay of the bovine *ADAM12* proximal promoter. The 0.5 μ g of *ADAM12*-luciferase reporter plasmids with different length of proximal promoter region were transfected into 3T3-L1 or Cos-1 cells with 10 ng of phRL-CMV. Firefly and *Renilla* luciferase activities were measured 30 h after transfection. Results are firefly activity normalized for transfection efficiency and -53 bp (relative to the putative transcription start site) *ADAM12* promoter activity. Data are the mean \pm standard deviation from four independent experiments.

Promoter Analysis

The entire sequence of ~ 2.1 -kb *EcoRI*-*Bam*HI restriction fragment containing exon 1 and 5'-flanking regions was determined (Figure 7). The putative transcription start site was predicted as 380 bp upstream of the coding start codon ATG, on the basis of comparison of the genomic sequences in cattle and human. The start site was 83 bp longer than that of bovine *ADAM12* cDNA reference sequence (GenBank accession no. **NM001001156**) derived from our cDNA sequence (GenBank accession no. **AB164682**). The expression of *ADAM12* gene was detected in 3T3-L1 preadipocyte and transiently up-regulated in the early-stage of the adipocyte differentiation (11). To identify the regulatory elements, reporter plasmids with the different lengths of proximal promoter region were constructed and transfected into 3T3-L1 preadipocyte. As shown in Figure 8, -391 and -457 (relative to the putative transcription start site) promoters showed higher activities, as compared with the longer promoters (-604 and -1147). Deletion of nucleotides to -53 resulted in a significant decrease of promoter activity. These results revealed that the highly GC-rich sequence from -53 to -391 enhanced the *ADAM12* promoter activity. However, such promoter activity profiles observed in 3T3-L1 were similar to those of Cos-1 cells, suggesting that proximal promoter could not support preadipocyte-specific expression.

To determine the promoter regions directing preadipocyte-specific expression of *ADAM12* gene, further analysis using distal promoter fragments was performed. Each restriction fragment (1.5, 2.0, 3.4, 0.2, and 3.3 kb) from -1.15 kb to -12 kb (relative to the putative transcription start site) was inserted in front of -1147 bp (relative to the putative transcription start site) proximal promoter within pbADAM12proEH-Luc and transfected into 3T3-L1 preadipocyte (Figure 1). The 2.0 and 0.2 kb fragments located at -8 and -4.5 kb upstream of the putative

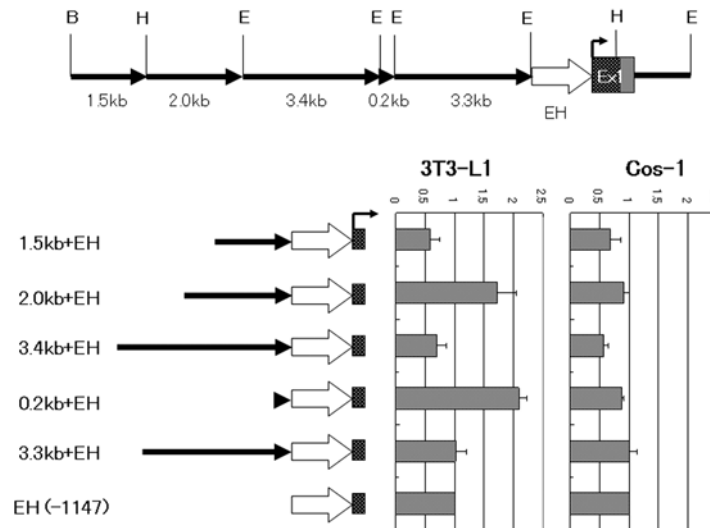


Figure 7 Transfection assay of the bovine *ADAM12* distal promoter. (A) Restriction map of 14 kb genomic fragment containing the bovine *ADAM12* exon 1 and 5'-flanking region. (B) Each restriction fragment (1.5, 2.0, 3.4, 0.2, and 3.3 kb) from -1.15 kb to -12 kb (relative to the putative transcription start site) was inserted in front of -1147 bp (relative to the putative transcription start site) proximal promoter within pbADAM12proEH-Luc and transfected into 3T3-L1 or Cos-1 cells. Firefly and *Renilla* luciferase activities were measured 30 h after transfection. Results are firefly activity normalized for transfection efficiency and -1147 bp *ADAM12* promoter activity. Data are the mean \pm standard deviation from four independent experiments.

transcription start site, respectively, increased the *ADAM12* promoter activity about 1.5- to 2-fold in 3T3-L1, but not in Cos-1 cells (Figure 1). These results suggested that the two distal regions might contribute to the preadipocyte-specific expression of *ADAM12* gene. It is unclear whether there are the regulatory elements in even farther upstream or intron regions.

The MOTIF search of the 0.2 kb fragment suggested three putative transcription factor binding sites (NF-AT, TCF11/AP-1, and Cdx) (Figure 2A). When oligonucleotides corresponding to these binding sites were inserted within pbADAM12proEH-Luc and transfected into 3T3-L1 preadipocyte, they could not enhance promoter activity (data not shown). Reporter plasmids harboring 5' and 3' progressive deletions of the 0.2 kb fragment were prepared and transfected into 3T3-L1 preadipocyte. Whereas the deletion of 5'-end 40 bp sequence completely abolished the enhancer activity (Figure 2B, 5'-160), its fragment in itself did not activate the promoter as in 0.2 kb fragment (Figure 2B, 3'-40). This result suggested that the 5'-end 40 bp sequence is necessary but not sufficient for the enhancer-like activity in 0.2 kb. The progressive deletion from 3' end of 0.2 kb fragment showed the gradual decrease of promoter activities, supposing that multiple elements might function sufficiently in combination. We need further analysis to understand the mechanism by which the distal promoter regions increase the promoter activity in preadipocyte-specific manner.

In conclusion, we have determined the genomic organization of 5'- and 3'-regions in the bovine *ADAM12* gene. Furthermore, we have identified the promoter regions

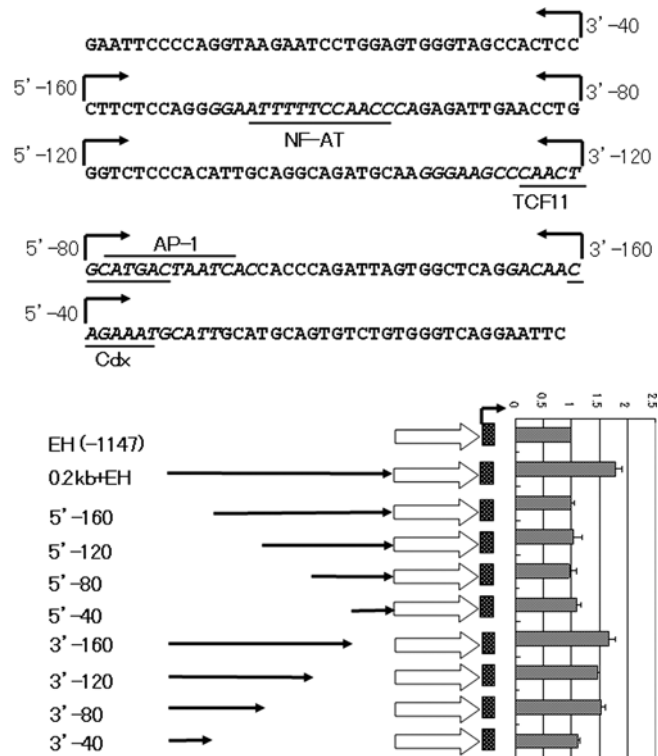


Figure 8 Transfection assay of the deletion mutants of 0.2 kb distal promoter fragment. (A) Nucleotide sequence of 0.2 kb distal promoter fragment. The MOTIF search suggested three putative transcription factor binding sites (NF-AT, TCF11/AP-1, and Cdx). The oligonucleotide sequences containing these binding sites and used in transfection (data not shown) are represented by *italic letters*. The 5'- and 3'-end positions of 5' and 3' deletion mutants used in (B), respectively, are shown in *arrow*. (B) Reporter plasmids harboring 5' and 3' progressive deletions of 0.2 kb fragment were prepared and transfected into 3T3-L1 preadipocyte. Firefly and *Renilla* luciferase activities were measured 30h after transfection. Results are firefly activity normalized for transfection efficiency and -1147 bp (relative to the putative transcription start site) *ADAM12* promoter activity. Data are the mean \pm standard deviation from four independent experiments.

that might direct preadipocyte-specific expression of *ADAM12* gene. These results will lead to the understanding of the expressional regulation of bovine *ADAM12* gene.

REFERENCES

1. Black RA, White JM. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10:654–659.
2. Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 2003; 17:7–30.
3. Wolfsberg TG, Primakoff P, Myles DG, White JM. ADAM, a novel family of membrane proteins containing a disintegrin and metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol* 1995; 131:275–278.

4. Yagami-Hiromasa T, Sato T, Kurisaki T, Kamijo K, Nabeshima Y, Fujisawa-Sehara A. A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature* 1995; 377:652–656.
5. Gilpin BJ, Loechel F, Mattei MG, Engvall E, Albrechtsen R, Wewer UM. A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. *J Biol Chem* 1998; 273:157–166.
6. Galliano MF, Huet C, Frygeliuss J, Polgren A, Wewer UM, Engvall E. Binding of ADAM12, a marker of skeletal muscle regeneration, to the muscle-specific actin-binding protein, alpha -actinin-2, is required for myoblast fusion. *J Biol Chem* 2000; 275: 13933–13939.
7. Kurisaki T, Masuda A, Osumi N, Nabeshima Y, Fujisawa-Sehara A. Spatially- and temporally-restricted expression of meltrin alpha (ADAM12) and beta (ADAM19) in mouse embryo. *Mech Dev* 1998; 73:211–215.
8. Borneman A, Kuschel R, Fujisawa-Sehara A. Analysis for transcript expression of meltrin alpha in normal, regenerating, and denervated rat muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 2000; 21:475–480.
9. Kawaguchi N, Xu X, Tajima R, Kronqvist P, Sundberg C, Loechel F, Albrechtsen R, Wewer UM. ADAM 12 protease induces adipogenesis in transgenic mice. *Am J Pathol* 2002; 160:1895–1903.
10. Kurisaki T, Masuda A, Sudo K, Sakagami J, Higashiyama S, Matsuda Y, Nagabukuro A, Tsuji A, Nabeshima Y, Asano M, Iwakura Y, Sehara-Fujisawa A. Phenotypic analysis of Meltrin alpha (ADAM12)-deficient mice: involvement of Meltrin alpha in adipogenesis and myogenesis. *Mol Cell Biol* 2003; 23:55–61.
11. Kawaguchi N, Sundberg C, Kveiborg M, Moghadaszadeh B, Asmar M, Dietrich N, Thodeti GK, Nielsen FC, Moller P, Mercurio AM, Albrechtsen R, Wewer UM. ADAM12 induces actin cytoskeleton and extracellular matrix reorganization during early adipocyte differentiation by regulating beta1 integrin function. *J Cell Sci* 2003; 116: 3893–3904.
12. Cameron PJ, Zembayashi M, Lunt DK, Mitsuhashi T, Mitsumoto T, Ozawa S, Smith SB. Relationship between Japanese beef marbling standard and intramuscular lipid in the M. longissimus thoracis of Japanese Black and American Wagyu cattle. *Meat Sci* 1994; 38:361–364.
13. Taniguchi Y, Sasaki Y. Rapid communication: Nucleotide sequence of bovine C/EBP alpha gene. *J Anim Sci* 1996; 74:2554.
14. Fujisaki S, Mizoguchi Y, Takahashi S, Chen YZ, Suzuki K, Asakawa S, Soeda E, Shimizu N, Sugimoto Y, Yasue H. Construction of a bovine bacterial artificial chromosome library from fibroblasts used for cloned cattle. *Anim Genet* 2002; 33:379–381.
15. Loechel F, Overgaard MT, Oxvig C, Albrechtsen R, Wewer UM. Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch. *J Biol Chem* 1999; 274:13427–13433.
16. Cao Y, Kang Q, Zhao Z, Zolkiewska A. Intracellular processing of metalloprotease disintegrin ADAM12. *J Biol Chem* 2002; 277:26403–26411.
17. Kveiborg M, Albrechtsen R, Rudkjaer L, Wen G, Damgaard-Pedersen K, Wewer UM. ADAM12-S stimulates bone growth in transgenic mice by modulating chondrocyte proliferation and maturation. *J Bone Miner Res* 2006; 21:1288–1296.

Copyright of *Animal Biotechnology* is the property of Taylor & Francis Ltd and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.

**動物遺伝研究所年報
第 16 号 (平成 20 年度)**

平成 21 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 - 2 0 - 9
TEL : 0 3 - 3 8 3 6 - 2 3 0 1

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
TEL : 0 2 4 8 - 2 5 - 5 6 4 1