



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 17 号
(平成21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21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、ウシゲノム解析用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。しかしながらまだ不良因子が黒毛和種集団に残存していることから、今後とも育種現場との連携を密にして対処していかなくてはなりません。また、ウシ経済形質QTLの解析では、昨年度の枝肉重量責任遺伝子の同定に続き、脂肪交雑の責任遺伝子を同定しました。関係機関の協力でDNAサンプル収集を行ってきましたが、これまでの蓄積が最終的な証明を可能にしたと言えます。

ここ1-2年のウシゲノム解析における変化には特筆すべきものがあります。国際コンソーシアムとかねて進めていたウシゲノムの全配列解読が完成を見、平成21年4月にScience誌に発表することができました。当研究所にとっても大きな成果です。このウシゲノム解読は、大量のSNP（一塩基多型）マーカーの開発をもたらし、5万個（50K）のSNPを搭載したチップが市販され、ゲノム解析の手法を様変わりさせました。このチップの出現で、以前から提案されていたDNA情報で若雄の能力を推定する方法、ゲノム選抜法が乳牛で応用される動きとなりました。今後、50K SNPから700K SNPへとパワーアップすることは必定で、その詳細なSNP情報を乳牛だけでなく肉牛でも活用する場面をいかに構築するかが重要になってくると思います。

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

平成22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21年度 動物遺伝研究所年報

目 次

序 文

第1節 設立の経緯と沿革

1. 設立の経緯と沿革1

第2節 平成21年度の動き

1. 研究推進の状況3
 - 1) ウシゲノム解析用ツールの開発3
 - 2) ウシ遺伝性疾病のDNA診断法の開発11
 - 3) 肉用牛経済形質のDNA育種手法の開発14
 - 4) ウシ抗病性遺伝子座の解析23
 - 5) その他のウシ有用形質遺伝子座の解析25
2. 平成21年度研究発表30
 - 1) 論文発表30
 - 2) 学会発表30
 - 3) 講演31
 - 4) 学会発表要旨32
 - 5) 講演要旨37
3. 委員会・会議等の開催40
 - 1) 「牛DNA解析技術を活用した家畜育種等推進事業
(肉用牛DNA育種検証事業)」に関わる育種推進検討委員会40
 - 2) 「DNA育種技術開発実用化事業」に関わるDNA育種技術推進委員会、
兼、「肉用牛DNA育種検証事業」に関わる技術推進委員会41
 - 3) 「牛有用ゲノム解析手法高度化事業」に関わる
解析手法高度化検討委員会41
 - 4) 全国DNA育種推進会議42
 - 5) 研究会等の開催43

4. 委託研究	45
5. 研修員の受け入れ	47

第3節 総務

1. 職員名簿	49
2. 職員の異動	49
3. 職員の海外出張	50
4. 施設・機器の整備	50
5. 購読雑誌一覧	52

第4節 資料

1. 論文再録

1) Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium (2009)	57
2) 横内ら (2009)	64
3) 瀬戸口ら (2009)	71

第1節 設立の経緯と沿革

1. 設立の経緯と沿革

家畜育種の基本は、個体の能力を正確に測定し、遺伝的能力に基づいた選抜を行い、選抜された個体間の交配から次世代を生産するという、一連の作業を反復することにより、望ましい遺伝子型を個体内に集積することにある。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る。このような状況から、農林水産省の指導のもとに、日本中央競馬会及び（財）全国競馬・畜産振興会のご理解を得て、日本中央競馬会の畜産振興資金の助成により、（社）畜産技術協会附属動物遺伝研究所が設立されることとなった。

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証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多数の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患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関連解析へ発展している。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10,11年度には管理部門4名、研究部門25名（研究員13名、研究補助員12名）となった。その後漸減し、平成21年度末は所長を含む管理部門3名、研究部門13名（研究員7名、研究補助員6名）である。

第2節 平成21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. ウシゲノム配列の更新と今後の計画

ウシゲノムは、Baylor医科大 (BCM) のヒトゲノムシーケンシングセンターにより塩基配列の決定とアセンブルが行われてきた。2004年にゲノムの3倍長の配列を予備的にアセンブルした配列 (Btau_1.0) が公開されて以降、順次更新が行われ、2007年10月のBtau_4.0 (4回目の更新) がコンソーシアムによるアノテーション (注釈付け) を経て、2009年4月にウシゲノム配列解読としてScience誌に論文発表された。Btau_4.0は、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) をゲノムの7.1 倍長読み、それらの配列をアセンブルしたもので、EST (Expressed Sequence Tag: 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。また、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。

そのため、ゲノム配列をさらに完成度の高いものにするための作業が行われている。BCMヒトゲノムシーケンシングセンターでは、Y染色体の配列を決定するためのBACクローンを従来型DNAシーケンサーで読んでおり、また、全ゲノムについて、次世代型DNAシーケンサー (ABI社SOLiD) で13 Gbの配列 (1-2 kb長断片の両端25 bp) を読んだ。これらを加えてアセンブルしたBtau_4.5が公開予定である。

一方、メリーランド大では、独自にゲノムアセンブルを行っており、ウシゲノムアセンブリは、2009年8月にUMD3.0に更新された。UMD2.0に比べて、5本の染色体 (ウシ染色体 (BTA) 2, 4, 14, 26, 27:) 以外は、より多くの配列を含んでおり、特にX染色体の配列が改善されているとのことだった。UMD3.0では、BCMヒトゲノムシーケンシングセンターで読まれた配列 (35.62 million reads) と他のシーケンシングセンターで読まれた配列 (BAC末端配列など1.2 million reads) とをCelera Assembler version 5.2を用いて波形データでアセンブルを行い、BAC skim のアセンブルエラー (BACクローンをプールして読んだ配列をアセンブルする際に生じたエラー) を、BACの両末端の配列とマーカー情報を加えることによって修正したとのことである。

Liuら (米国農務省農業調査局; USDA-ARS) は、Btau_4.0に含まれるsegmental

duplicationを検索し、その一部について、蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション (FISH) による検証を行っている (BMC Genomics 2009)。その中で、segmental duplicationの約半分 (94.4 Mbの47%) はウシ染色体に帰属されていないこと (Chr_unknown)、一方で、染色体配列上には計267 Mbに相当するduplication (≥ 1 kb, $\geq 94\%$ 一致) が人為的にもしくはアSEMBルエラーとして含まれていること、さらに、Btau_4.0とUMD3.0の2つのアSEMBリに関しては、10箇所のFISHがUMD3.0を、2箇所のFISHがBtau_4.0を支持したことを報告している。したがって、現時点では、UMD3.0が最良のゲノム配列であり、解析にはこれを用いる必要がある。

今後については、BCMヒトゲノムシーケンシングセンターは、次世代型DNAシーケンサー (ロッシュ社454) で読んだホルスタイン種の配列を加えることによりゲノム配列を改善する可能性があるという。メリーランド大は、*Bos indicus*配列のアSEMBルを進行中であり、また、次世代型DNAシーケンサーで読まれた配列が送付されれば、それらを加えて解析することは可能とのことだった。

(1)-2. ウシSNPチップの更新

ウシ50K SNPチップ (イルミナ社) が、2007年12月に市販され、これを用いて、特にホルスタイン種種雄牛選抜では、後代検定から算出した評価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遺伝子型と評価育種価との関連を基に各SNPの遺伝子型にスコアを付けておき、種雄牛候補牛の能力を遺伝子型によるスコアで評価し、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、後代検定に比べて、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。しかしながら、一定の正確度を得るためには、参考集団として数千頭の種雄牛が必要なため、米国以外の国や他の品種においてゲノム選抜法を適用するのは難しかった。高密度のSNPチップが開発されれば、品種を超えた乳牛全体の解析を行うことができるため、参考集団の規模を大きくすることができ、また、より正確に有用形質関連領域を特定できることが期待される。このような背景から、イルミナ社、ファイザー社、米国農務省等が共同で、高密度SNPチップを開発し、今春には市販予定という。彼らは、20以上の品種に属する約300頭のウシから約120種類のDNAライブラリーを調製しSNPを検索した。得られた約4,500万個のSNPから、マイナーアレル頻度、マーカー間隔、品種、ゲノム領域 (エキソン、リピート配列、segmental duplicationなど) 等を考慮して580万個のSNPについてプローブをデザインし、最終的には50K SNPチップ上に搭載された全SNPを含む約85万個のSNPから成るチップを作成するとのことだった。

一方、親子判別、トレーサビリティ、(ゲノム選抜後の) 遺伝的能力予測などについては、低密度SNPチップで必要十分との考えから、約3,000個のSNPから成るチップも作成されていた。

(2) 今後の進め方

(2)-1. 黒毛和種のSNP開発

黒毛和種はウシHapMapに参加していないことから、現在、独自にSNP開発を行っている。今後、黒毛和種に特徴的なSNPや、黒毛和種の各系統に特徴的なSNPが明らかになることが期待される。これらの情報は、有用形質関連領域のファインマッピングや責任SNPの同定に有用である。

(2)-2. SNPチップ

① イルミナ高密度SNPチップの黒毛和種における有用性の確認を行う。50K SNPチップは、黒毛和種ゲノムの少なくとも15%は十分にカバーできていなかったため、高密度SNPチップを用いることで、より確実に精度の高いマッピングが可能になることが期待される。繁殖性のように遺伝率の低い形質のマッピングには、多数のDNAサンプルを要することから、異なる品種であっても同じ形質について表現型値付きのDNAサンプルを収集し、高密度SNPチップを用いて品種を超えたマッピングを試行する必要があるかもしれない。

② 連鎖解析用カスタムSNPチップを用いた父方半きょうだい家系解析を行う。これまで用いていたDNAマーカーであるマイクロサテライトは、SNPと比べ情報量が多いが、型判定に熟練が必要で時間がかかるという欠点があったため、家系解析に年単位の時間を要していた。SNPチップを用いると月単位の時間で解析が完了するかもしれない。どのような組み合わせのSNPを使うか検討すべきだろう。

(3) ウシゲノム解読の意義

ウシゲノムが解読されたわけであるが、その意義について「ウシゲノム解読と今後の展望」(ブレインテクノニュース・136, 2009) と題する解説を転載する。

ウシゲノムの解読と今後の展望

社団法人畜産技術協会附属動物遺伝研究所

杉本 喜憲

当研究所の設立された 1993 年 2 月はウシゲノム解析の揺籃期であった。当時、10 数個の DNA マーカーしか報告されておらず、400 個のマーカーが特許化されたという噂があった。以来、ヒトゲノムで築き上げられたルートを営々と歩み、2009 年 4 月のウシゲノム解読の発表に至った。これでようやく完成されたゲノム解析用ツールを手にすることとなった。ウシの DNA 育種手法の迅速な発展が期待できる。

1. ヒトゲノム解読の始まり

1986 年、レナート・ダルベッコ博士（1975 年ノーベル医学生理学賞受賞）は Science 誌に、「ヒトの癌研究の転回点に至った今、ヒトゲノム配列の解読という目標を掲げよう」と提案した¹⁾。この提言がきっかけとなって、米国エネルギー省/厚生省は 1990 年から 15 年計画の ”Human Genome Project”を開始した。当時の技術レベルから言えば第 2 のアポロ計画ともいえるべき無謀な出発であった。幸運にもその後の技術革新のおかげで 2003 年の完成を告げる発表まで到達した。ダルベッコの夢見たあらゆる遺伝子の時間的空間的な発現が把握できるだけでなく、生物の複雑さを担保する様々な機構が明らかとなり、生物学は豊穡期を迎えようとしている。

ヒトゲノム研究の進展に刺激され、ウシゲノム解読のための国際コンソーシアムが 1999 年 12 月にカナダのバンクーバーで結成された。その努力は 9 年後の 2009 年 4 月に Science 誌へウシゲノムの解読が報告されることで結実した²⁾。

2. これまでのウシの育種手法

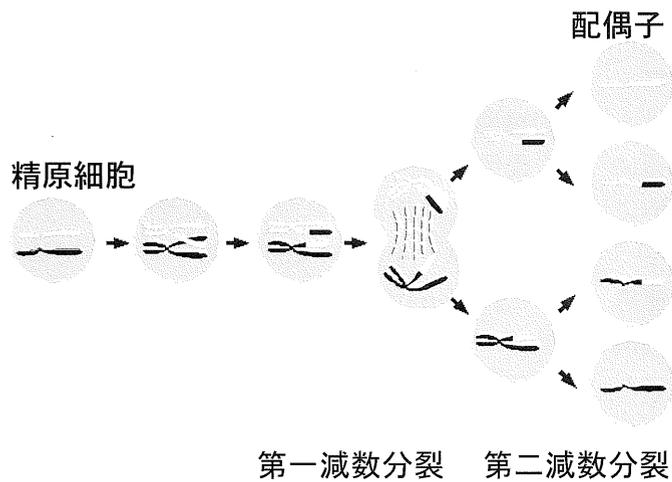
近年におけるウシの育種は、1940 年代までに

理論的な集大成がなされ、コンピュータの発達とも相俟って、BLUP 法に代表されるような理論と計算手法の発展があり、家畜の能力は大きく向上した。推定された遺伝的能力の信頼度をさらに高めることに関し、Niemann-Sorensen & Robertson (1961)³⁾は、QTL (量的形質) と LD (連鎖不平衡ブロック：祖先から現在まで組換えが起こらず、そのまま遺伝してきた領域) 状態にある DNA マーカー情報は選抜指数方式で利用できると報告し、Meuwissen ら (2001)⁴⁾はさらに踏み込んで 5 万個の DNA マーカーをゲノム解析に用いるケースのシミュレーションを行い、雄牛の遺伝的能力を信頼度 85%で推定可能と報告した。そのためには高密度 DNA マーカー地図などのゲノム解析用ツールを充実させる必要があった。ツールの充実、すなわち DNA マーカーの大量開発はゲノム解読によって初めて可能になった。

3. ウシゲノム解読までのステップ

3-1. 哺乳動物の遺伝の特徴

哺乳動物の有性生殖では減数分裂の過程を経て、親の 2 本の染色体 (祖父と祖母由来) から 1 本の染色体だけの配偶子が作られる。配偶子の持つ染色体は、祖父由来・祖母由来・組換え体 (2 種) の 4 種の内どれかである。ウシには 29 本の常染色体が存在するので、ウシの精原細胞 1



個から生ずる配偶子の多様性は、 $4^{29} = \text{約 } 10 \text{ 京}$

図 1 減数分裂による精原細胞からの配偶子生成

(10^{17}) 通りである。親の染色体のどの領域が子に伝わったかを知るには、DNA マーカー地図(連鎖地図)を作り、DNA マーカーの型(アリル)を調べる必要がある。

3-2. 連鎖地図作成の黎明から発展まで (1997 年春まで)

異なる染色体に位置する DNA マーカーは互いに独立に遺伝するので組換え頻度 50%となる。同じ染色体に位置するマーカーは近接しているとマーカー間の組換え頻度は 50%より小さくなる(共に遺伝する:連鎖という)。組換え頻度をそのまま遺伝距離とし、cM(センチモルガン)単位で表示する。マーカー数が増えてくると同じ染色体に位置するマーカー同士は連鎖グループを形成することになる。

ウシ連鎖地図作りの突破口を開いたのは米国 Genmark 社の Georges である。1992 年までに DNA マーカー 354 個を特許化した。1994 年に第 1 世代のウシ連鎖地図が 2 つ報告された。米国農務省肉畜研究センター(USDA-MARC)の Beattie らは 313 個の DNA マーカーで⁵⁾、また USDA-MARC 以外の BovMap グループも同年に DNA マーカー 202 個で地図を作った⁶⁾。これら

第 1 世代の連鎖地図は解析に使えるような代物ではなかったが、この年の夏プラハで開催された国際動物遺伝学会のウシゲノムワークショップに参加者が多数詰めかけ、何か新しいことが始まるという期待に満ちたものとなった。

連鎖地図を有用なものにするため、(1) 多型性の高い DNA マーカーであるマイクロサテライトを多数開発する、(2) マーカー間の空隙を埋める、(3) 連鎖グループを染色体に対応させる、(4) 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(FISH)で染色体の方向を決めるなどの積み重ねが行われた。私たちは BovMap に加わり、マイクロサテラ

イトの開発と位置付け(マッピング)を行った。1997 年の春、2 つのグループはそれぞれ第 2 世代のウシ連鎖地図を発表した。BovMap の 703 個のマイクロサテライトからなる地図のサイズは 3,567 cM と大きく、しかも 252 個の正確な位置が決まっていない⁷⁾。多くの機関が参加している BovMap の地図にはマーカーの型判定エラーが多く含まれていた。一方、USDA-MARC の 1,236 個のマイクロサテライトからなる地図のサイズは 2,990 cM であり、これまで想定されていた 3,000 cM に近い⁸⁾。USDA-MARC はすべて単独でマーカーの型判定を行い、エラーを厳しくチェックしながら地図作りを行った。したがって、USDA-MARC の地図はウシゲノム解析のゴールドスタンダードとなって、遺伝病や QTL のマッピングに使われてきた。USDA-MARC は論文中で、彼らの連鎖地図の DNA マーカーは平均して多型性が低く (< 60%)、マーカー間隔が 10 cM 以上のものが 14% (177/1220) も存在するため、マーカーアシスト選抜には不十分であるにもかかわらず、各国で QTL 検出に熱中しているため、自分たちが行ったような大規模なマーカー開発で地図を改良することは近未来には無いだろうと述べている。

3-3. 高密度連鎖地図から物理地図への道 (1997年から2005年)

USDA-MARCの地図で遺伝病やQTLのマッピングはできたが、マッピングした領域をさらに狭め、マーカーアシスト選抜へ発展させるには多大な努力が必要であった。明らかにUSDA-MARCの地図の高密度化がなされるべきであったが、各国の動きは鈍く、国際的に連携してマーカー開発することにならなかった(国際動物遺伝学会,1998年夏,ミネアポリス)。私たちはこの問題を解決するため、単独でマイクロサテライトの大規模な開発を決定し、USDA-MARCの地図を高密度化するだけでなく、遺伝子の位置情報を含んだ物理地図作成を1998年秋から始めた。連鎖地図はマーカー間の組換え頻度から求められた遺伝的な距離だが、物理地図はDNAの長さに基づいてマーカーや遺伝子を並べたものである。私たちは多数のマイクロサテライトを開発し、USDA-MARCの協力を得ながら、2,325個のマーカーを加えた第三世代のShirakawa-USDA連鎖地図を作成した(2004)⁹⁾。また、約7,000種の遺伝子断片を分離し(2001)¹⁰⁾、その内の2,377種を含む合計5,593座からなるウシ物理地図SUN-RH地図(Shirakawa-University of Nevada Radiation Hybrid地図)を作成した(2004)¹¹⁾。これらの地図に他機関の地図も加わった統合地図(Composite map)が作成され、年々改善された。

4. ウシゲノム解読へ

国際コンソーシアムは、1999年のバンクーバー会議でウシゲノム解読へ向けて次のようなことを決めた：(1) 解読の対象にヘレフォード種雄1頭を選び、そのBACライブラリー(約150 kbのDNA断片を含むクローンで構成)をオークランド小児病院のDejongが作成し、必要機関に配布する；(2) ヒトやマウスで経験豊富なブリティッシュ・コロンビア大のMarraが中心になって、フィンガープリントでウシBACの整列化を

行う；(3) テキサスBaylor医科大ヒトゲノムシーケンシングセンターのGibbsが中心になって、全ゲノムを対象にショットガンシーケンシングを行い、ゲノムの3倍長分の配列を決める；(4) 参加機関は基金を拠出し、様々な品種のウシDNAを提供する。

Dejongが作成したウシBACライブラリーは、平均DNAサイズ167 kbの19万クローンで構成された。Marraのフィンガープリントでは、各BACクローンを制限酵素で切断し、ゲル電気泳動を行うとクローン毎に特徴あるDNAのバンドパターンを示す。BACクローン同士でオーバーラップしている部分は、そのフィンガープリントも重なるので、この重なりを利用してBACクローンをつなぐことができる(整列化するという)。整列化されたBACクローン集団の染色体への位置付けを正確に行うため、前述の統合地図が使われた。

Gibbsらは、まず、2004年9月に全ゲノムを対象にランダムに決定した配列(WGS)をゲノムの3倍長分得、2007年10月にBtau_4.0(4回目の更新)としてゲノムドラフト配列を完成させた。これは、WGSにBAC skim(フィンガープリントで整列化したBACクローンを、単一、もしくは、プールして読んだ配列)を組み合わせたもので、ゲノムの7.1倍長の配列(WGS+BAC skim)からなる。これまで位置不明だった配列は延長されることで、29本の常染色体とX性染色体の計30本の染色体の配列となった。Btau_4.0は、EST(遺伝子の発現断片)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がり間違い(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。

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。他の品種の配列も解読し、これらも加えてゲノム配

列の更新を行う予定だという。

5. ウシゲノムの特徴

ウシの染色体では、ヒトやマウスなどの他の種に比べてゲノム DNA の部分的な重複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つこととなった。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。

また、ゲノム解読に伴って開発された約4万個の SNP が 19 品種、497 頭で調べられ、これまでの家畜化や品種確立の過程でゲノムに残された痕跡が明らかになった。品種当たり 25 頭程度なので今後 50 頭くらいまで増やせば結果の信頼性が高まる。

6. ウシの SNP チップ

ヒトゲノムの解読後、500K の SNP を搭載したチップ/アレーが発売され、ヒト生活習慣病や癌の感受性遺伝子座の探索がゲノムワイド相関解析 (WGAS) の手法で始まった。WGAS では、患者群をケースとし、そうでない群をコントロールとし、ケース・コントロール間で SNP アリルの頻度の偏りをゲノム全体にわたって調べるといった家系に拠らない解析法である。

WGAS をウシで行うには多数の SNP が必要となる。ヘレフォード種雄のリファレンス配列が示されたことで、SNP 開発が行われ、50K SNP チップが市販された。Meuwissen ら (2001)⁴⁾ の提唱したゲノム選抜法 (参考資料: ref 12) を実用化する条件が整った。ゲノム選抜法というのは、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するというものである。2009 年 1 月に米国ホルスタイン登録協会は種雄牛にゲノム育種価を付けて公表した。ある程度の信頼度が保たれ

れば、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。米国の他、カナダ、EU、オーストラリア、ニュージーランドなどもホルスタイン種種雄牛の選抜に、この方法を適用する試みを行っている。

市販されている 50K SNP チップは広く使われているが、マーカー間隔が LD の長さより長い個所が多数あり、多型性の低いものも多い。多型性の高い SNP を LD ブロックに数個置くことができれば、解析の能力の高いものになるだろう。

7. 我が国における今後の展開

7-1. 黒毛和種の有用な SNP の開発

黒毛和種において 50K SNP チップに搭載されている SNP の多型性は他品種とほぼ同等で、多型性の高い (> 10%) SNP は 80% に過ぎなかった。したがって、黒毛和種の LD (約 100 kb) 1 個に多型性の高い有用な SNP を 3 個ずつ配置するには、少なくとも 15,000 個の SNP の追加が必要である。黒毛和種のリシーケンシングを行って有用な SNP を大量に開発することが目下の課題である。世界的にも有用な SNP が大量に開発される方向にある。

7-2. SNP で行う黒毛和種父方半きょうだい

家系解析

黒毛和種父方半きょうだい家系解析は、父で多型性を示すマイクロサテライト 300 個を 300 頭の産子で型判定してきた。一次スクリーニングに約 1 年かかり、経費もかかる。選抜された黒毛和種で有用な SNP 1,000 個を型判定できるようにすれば、4 週程度で完了する。SNP 判定技術は日進月歩ゆえ、経費も少なくて済むようになるだろう。

7-3. ウシ WGAS のための集団

ウシゲノムの詳細な情報、網羅的な発現解析手法、SNP チップの改良などでウシ WGAS の解析威力は高まるだろう。WGAS に必要なもう一

つのポイントは、表型値付きの集団の DNA サンプルである。計画的なサンプリングが伴えば、産肉性だけでなく繁殖性・抗病性などの解析が進むだろう。

7-4. ウシのゲノム選抜法

ホルスタイン種で試みられているゲノム選抜法は、マーカーアシスト選抜に関する新しい展開である。ホルスタイン種雄牛の場合、多数の娘牛の成績から遺伝的能力を評価するので信頼度が高い。一方、肉牛の場合、遺伝的能力を評価された種雄牛を多数確保することは難しい。産子そのもののデータだけで可能なゲノム選抜法が開発されるだろう。

ヒトの WGAS で多数の生活習慣病などのリスク SNP 情報が蓄積されており、個人毎のリスク評価を定量的に行うというゲノム選抜法に似た動きがある。子牛の段階で脂肪交雑や子牛生産性など個体毎のスコア化が信頼度高くできるようになれば、育種の現場は様相を変えることになるだろう。

文 献

- 1) Dulbecco, R. (1986), *Science*, 231, 1055-1056
- 2) The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium (2009), *Science*, 324, 522-528
- 3) Niemann-Sorensen & Robertson (1961), *Acta. Agric. Scand.*, 11, 163-196
- 4) Meuwissen et al. (2001), *Genetics*, 157, 1819-1829
- 5) Bishop, M. D. et al. (1994), *Genetics*, 36, 619-639
- 6) Barendse, W. et al. (1994), *Nat. Genetics*, 6, 227-235
- 7) Kappes, S. M. et al. (1997), *Genome Res.*, 7: 235-249
- 8) Barendse, W. et al. (1997), *Mamm. Genome*, 8, 21-28
- 9) Ihara, N. et al. (2004), *Genome Res.*, 14, 1987-1998
- 10) Takasuga, A. et al. (2001), *Nucleic Acids Res.* 29, e108
- 11) Itoh, T. et al. (2005), *Genomics*, 85, 413-424
- 12) 富樫研治 (2009), 畜産技術, 648 号, 16-21 ページ

2) ウシ遺伝性疾病のDNA診断法の開発

(1) 研究年次：平成9年-平成21年

(2) 研究目的と期待される成果

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

本事業では、これらの疾病、あるいは、疾病に対する感受性（抵抗性）について、DNAを指標としたスクリーニング手法を開発すると同時に、さらに進んで遺伝性疾病原因遺伝子の単離・特定を行う。このような目的が達成されれば、遺伝子の変異を検出するDNA診断によってキャリアのスクリーニングができるため、遺伝性疾病の発症を制御しつつキャリア牛の遺伝的能力を育種に生かすことができる。

(3) ウシ遺伝性疾病解析の平成20年度までのまとめ（表1）

表1. 遺伝性疾病の遺伝子解析の平成20年度までのまとめ

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軀症	褐毛和種	LIMBIN (新規)	1塩基置換 1塩基の2塩基置換	あり	受理
横隔膜筋症	ホルスタイン種	HSP70	11 kbの欠損	あり	受理

(4) ウシ遺伝性疾患の解析

(4)-1. 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（FMA: 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性を調べたところ、ウシ染色体26番（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FMA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（Masoudi *et al.*, *Animal Genetics*, 39: 46-50, 2008）。そこで平成20年度から次世代シーケンサーを用いて、半きょうだい関係のあるFMAキャリア牛と正常牛のゲノムを対象にこの領域のDNA配列を解読することを始めた。

平成21年度にFMA領域のDNA配列解読を終了し、FMAキャリア牛でヘテロかつ正常牛でホモのマーカー型を示すSNPを探索した。この条件に適合する約1,700個のSNPを見出した。今後、ヒトやマウスゲノムとの相同性からFMA領域に存在するウシ遺伝子群を明らかにする。

(4)-2. マルファン症候群様不良形質（岐阜県との共同研究）

黒毛和種の特定種雄牛の産子に発育不良と見られる不良形質が散見され、体高は正常値を示すが体幅が得られない（薄く痩せている印象）、ヒトの指にあたる部位が長い（猫足）など、ヒトのマルファン症候群に似ていた。マルファン症候群は優性遺伝様式を示し、*Fibrillin1* (*FBNI*) が原因遺伝子の1つと考えられている。父方半きょうだい家系（典型的発症牛36頭、正常牛10頭）を50K SNPチップ（イルミナ社）でタイピングし、連鎖解析を行ったところ、BTA 10上に有意な連鎖が得られ、マッピングされた領域の近傍には*FBNI*が位置していた。マイクロサテライトマーカーを用いてハプロタイプを確認したところ、発症牛はリスク型ハプロタイプをヘテロで有しており、この不良形質はマルファン症候群と同様に優性遺伝様式を示すと考えられた。現在、*FBNI*を第1の候補として、変異の探索を行っている。

(4)-3. 子牛損耗解析の準備の開始

子牛死亡による損耗率は約10%に達しており、経済的な損失は無視できない。子牛死亡の内、遺伝性疾病例についてはDNA解析で改善することが可能である。そこで、黒毛

和種およびホルスタイン種の生後3週間内に死亡した胎児・新生子のサンプル収集を平成21年度から開始した。

(5) 今後の進め方

国内で発生している子牛の損耗対策のために、包括的なサンプリングと症例記録を収集する必要がある。関係者の協力を募り、劣性遺伝病の存在・免疫能の低下などの可能性を調べる。

(6) 国内および海外の状況

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。平成21年度における国内外の成果を紹介する。

(6)-1. 偽筋硬直症 (Pseudomyotonia: Sacchetto *et al.*, *American Journal of Pathology*, 174: 565-573, 2009)

Pseudomyotoniaはキアニーナ種に見られる筋肉障害で、運動によって筋拘攣が起こるヒトのBrody症と類似している。ヒトBrody症の原因遺伝子として知られているSERCA1 (sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase) のウシ相同遺伝子の配列を調べ、164位のアルギニンがヒスチジンに変わる変異を検出した。この変異により、SERCA1のmRNA量は変わらないが、タンパク質量の減少が認められた。

(6)-2. 脊髄ミエリン変性症 (Spinal dysmyelination: Thomsen *et al.*, *Neurogenetics*, 11: 175-183, 2009)

Spinal dysmyelinationはアメリカブラウンスイス種に発症する疾病で、2001年にBTA 11の2.6 cM領域にマッピングされていた。ウシゲノム配列が解読され、ヒト遺伝性硬直性対麻痺の原因遺伝子であるSPASTがこの領域に存在することが判明したので、ウシ中枢神経系でのSPAST発現を確認し、560位のアルギニンからグルタミンへの変異を検出した。この変異により、SPASTタンパクのATPase活性の消失が認められた。

(6)-3. ねじれ尾症候群 (Crooked tail syndrome: Fasquelle *et al.*, *PLoS Genetics*, 5: e1000666, 2009)

Crooked tail syndromeは骨格異常を特徴とし、ベルジアン・ブルー種に頻発する。

2008年に8症例を解析し、BTA 19の2.4 Mbにマッピングしていた。さらに105症例を加えてファインマッピングを行い、812 kbまで狭めた。この領域の7種の遺伝子の配列を調べ、*Mannose receptor C type 2 (MRC2)* に2 bp欠損のフレームシフト変異を見出した。この欠損によって骨化の過程での細胞外マトリックス形成不全が起こる。キャリア個体のMRC2タンパク量は半減しており、そのため骨格が細く、ロース芯が大きい。この肉牛としての利点のため、変異アリルは25%という高い頻度で維持されてきたと考えられる。

(6)-4. A型血友病 (Haemophilia A: Khataj *et al.*, *Animal Genetics*, 40: 763-765, 2009)

褐毛和種に伴性遺伝様式で発症するA型血友病が見られ、血液凝固因子を測定し、第VIII因子量が低いことが明らかになった。第VIII因子遺伝子の配列を調べた結果、2,153位のロイシンからヒスチジンへの変異が起こっていた。

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21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関与する染色体上の領域、あるいは遺伝子を特定することを可能にしてきた。経済形質に関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21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4万4千となった。

表2. 平成21年度までの黒毛和種DNAサンプル収集状況

年度	収集数
13-20累計	38,595
21	5,443
合計	44,038

(4) 父方半きょうだい家系を用いる経済形質のゲノム解析

ほとんどの経済形質は多数の遺伝子の関与する量的形質 (QTL) である。QTLのゲノム解析 (QTL解析) において、染色体毎 (染色体レベル、chromosome-wise) やゲノム毎 (ゲノムレベル、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 et al., *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、結果のPDFファイル出力など、利用者の利便性を向上させてきた。これまで、枝肉形質の表現型値は、生データ (格付け成績の値) をそのまま用いてきたが、これらは、日齢、肥育期間、年度、季節、市場、農家等の影響を受けるため、これらを固定効果として扱えるようにプログラム Glissado を改善した (build 219)。今後は、固定効果を含めた解析結果もしくは育種価を用いた解析結果に更新していきたい。

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のマッピング成果を2006年にまとめ、経済形質QTLマップを作成した。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関連解析によって責任領域を狭められることが、枝肉重量QTLである CW-1とCW-2、脂肪交雑QTLである Marbling-3で示されており、マップを作成・更新することは、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、次の責任遺伝子探索のターゲットを探すために重要である。毎年定期的にマップを更新し、複数家系で検出されたQTLについては、優良ハプロタイプの比較を行っている。

平成21年度のQTLマップの更新は以下のようなになった。1家系のゲノムスキャン結果、3家系の染色体限定スキャン結果、および2家系の2次解析結果を新たに加えた。さらに1家系の2次解析結果については修正を行った。その結果、更新QTLマップは、25家系のゲノムスキャンと9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14,400頭となった (図1)。

シ経済形質遺伝子座のマッピングは、これまで、マイクロサテライトマーカーを用いて行ってきたが、より迅速に解析を行うために、市販SNPチップより安価なウシ連鎖解析用カスタムSNPチップ（約3,000個のSNPを型判定できる）を作成し、SNPによる半きょうだい家系解析を試行する。カスタムSNPチップは、順次、有用形質関連SNP等を加え改良する。

経済形質のうち枝肉重量については、黒毛和種の家系解析でQTLが検出されたのと同じ領域に、アンガス種や交雑種など他の品種集団において、すでに50K SNPチップで関連座位が報告されている。半きょうだい家系解析と並行して50K SNPチップを用いた全ゲノム関連解析を行い、経済形質遺伝子座のマッピングを加速する。マッピングした領域からより早く責任遺伝子に到達するには、より多くのDNAサンプルを収集してファインマッピングを行うことに加え、候補遺伝子を解析する手順と技術を確立しておくことが必要である。

ゲノム選抜法については、黒毛和種の種雄牛は乳牛に比べて数が少ない上、県単位で種雄牛の育種価が算出されているので、乳牛のようなゲノム選抜を行うことはできない。しかし、高密度SNPチップを用いて多数の肥育牛を解析対象とすることにより、個体間の血縁係数が未知であっても遺伝分散の推定が可能となり、SNPの遺伝子型に基づく個体のゲノム育種価を予測できる可能性があることから、今後の研究課題である。しかしながら、Soller（イスラエル）によると、ホルスタイン種では乳タンパク質含量と乳量に関するQTLの約半数が両方の形質に効果を持ち、かつ、両形質は相反するため、ゲノム選抜で両形質を同時に改良することは難しく、乳タンパク質含量のみもしくは乳量のみにも効果のあるQTLをマーカー選抜する方が良いという。これと同じように、肉牛の枝肉重量QTLの中には、肉量を増やすが同時に難産を引き起こす可能性のあるものも含まれていることから、何らかの工夫が必要となる。

(6) ウシ経済形質遺伝子座の解析

(6)-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（Mizoshita *et al.*, *Mammalian Genome*, 16: 532-537, 2005）。CW-1領域1 Mbには3遺伝子（Gene_1, Gene_2, Gene_3）が存在する。

平成21年度は、Gene_2上流のSNP 7個をランダムな384頭について型判定したところ、連鎖不平衡が強くいずれのSNPでもCW-1を区別できることわかった。このうちの一つ、SNP2066を用いて、黒毛和種一般集団1,232頭の型判定を行った。その結果、CW-1の寄与

率は4.6%、アレル置換効果は14.2 kgであった。

(6)-2. CW-2 (枝肉重量-2) の解析 (鹿児島県との共同研究)

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; c.1326 T>G)は枝肉重量との関連性が高く($P = 1.2 \times 10^{-11}$)、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。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、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。

(6)-3. CW-1 (枝肉重量-1) とCW-2 (枝肉重量-2) の効果検証 (鹿児島県との共同研究)

黒毛和種においてこれまでに検出された枝肉重量QTLのうち2つのQTL(CW-1, CW-2)は、それぞれ約730 kbと約600 kbに責任領域を限定しており、有力な責任候補遺伝子を特定している。CW-1の効果については、優良型アレルを1本持つと+ 23.6 kg、2本めを持つとさらに+ 15.2 kgの枝肉重量が増加することが、約1700頭の去勢牛を用いて示されているが(Mizoshita et al., 2005)、CW-2の大規模一般集団での効果や、CW-1とCW-2

が独立に作用して相加的に働くのか、相互作用があるのかについては、未解明であった。これらを明らかにすることは、2つのQTLをどのようにマーカーアシスト選抜に用いていくかという実用的な問いに答えるだけでなく、これらの責任遺伝子の機能を明らかにしていく上でも大いに参考になる。鹿児島においては、候補種雄牛の能力評価のために間接検定が行われており、間接検定では、体重や体型の各項目が定期的に測定されているので、両QTLの体重や体型への効果を経時的に調べることも可能である。そこで、間接検定牛を用いて、*CW-1*と*CW-2*の各形質(体重、体型測定値、枝肉成績)への効果を調べることにした。

鹿児島において1997-2006年度に間接検定にかけられた100頭の候補種雄牛の去勢産子792頭(1候補種雄牛につき8去勢牛; 8頭は事故等により検定途中で調査中止)を用いた。これらは、体重(364日間の検定期間中、4週間ごとに測定)、体型測定値(体高、体長、胸囲など10項目、8週間ごとに測定)、枝肉格付け成績(枝肉重量、ロース芯面積、皮下脂肪厚、脂肪交雑、バラ厚)のデータを持つ。*CW-1*の遺伝子型判定は、4個のマイクロサテライトマーカーおよび周辺のマイクロサテライトマーカーで候補種雄牛と産子をタイピングし、アレル伝達情報を用いて優良型(Q)か否かを判定した。*CW-2*については、NCAPGのアミノ酸置換(Ile442Met)を生じるSNPを用いて優良型か否かを判定した。統計解析は線形回帰により行い、検定開始日齢、父種雄牛、年度、季節を固定効果とした。

*CW-1*と*CW-2*の優良型アレル頻度は約64%と約40%であり、各QTLの効果および相互作用を検討するのに適当であると考えられた。まず、それぞれのQTLの、検定開始時(約9ヶ月齢)と終了時(約21ヶ月齢)における体重と体型測定値への効果を調べた。各QTLともにドミナンス効果は検出されず、効果は相加的であった。*CW-1*と*CW-2*の相互作用も有意ではなく、2つのQTLは独立に相加的に働くと考えられた。*CW-1*の効果は、検定開始時(寄与率0.5-1.3%)、終了時(寄与率0.4-3.3%)ともに比較的小さかったが、*CW-2*の効果は、検定開始時が寄与率0.5-18.4%、終了時が寄与率2.0-23.6%で、優良型保有牛は体全体が大きいことがわかった。特に、十字部高とかん幅に対する寄与率は、検定開始時に15-18%、終了時に約23%と大きく、*CW-2*優良型保有牛は後躯が発達していることが推察された。次に、各QTLの一日平均増体量への効果を検定期間8週ごとに調べたところ、一日平均増体量が最大となる検定8-16週において、*CW-1*と*CW-2*ともに効果は最大であった。*CW-2*の一日平均増体量への効果の経時推移は、一日平均増体量の経時推移と一致していたが、*CW-1*の一日平均増体量への効果は、検定24週以降ふたたび増加する傾向にあった。約21ヶ月齢での枝肉成績については、枝肉重量への効果が、*CW-1*は8.1kg/アレル(寄与率2.1%)、*CW-2*は19.9kg/アレル(寄与率14.6%)、*CW-2*については、ロース芯面積を大きくし、皮下脂肪厚は薄くする効果を併せ持つことが確認された(Setoguchi *et*

al., *BMC Genetics*, 10: 43, 2009)。

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

平成20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 (Hirano *et al.*, 2008)。しかし、黒毛和種一般集団での優良遺伝子型*Q*の頻度が低いために関連解析で領域を狭めることはできなかった。そこで、連鎖するSNPアリルを見出すために、種雄牛AおよびBの2.9 cM領域 (4.2 Mb) の塩基配列を、次世代型DNAシーケンサーを用いて解読することにした。平成20年度と21年度で、種雄牛AとBについて、それぞれ117 Gb(ギガベース; 10⁹塩基)、114 Gbのゲノム配列 (ウシゲノムの38~39倍の長さに相当、ひとつの配列の長さは36塩基) を読み、*Marbling-2*領域4.2 Mbにマッピングされる284 Mb (種雄牛A)、308 Mb (種雄牛B) の配列を得た。これらを参照配列と比較することにより、種雄牛Aの*Marbling-2*領域に13,488個、種雄牛Bに14,045個のSNP候補を見出した。*Marbling-2*に連鎖するSNPは、種雄牛Aではヘテロ、種雄牛Bでは(非優良型の)ホモであることが期待されるので、これに該当するSNP候補を抽出したところ、1,324個以上あることがわかった。

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

平成20年度までに、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関連解析によってQTLの候補領域を46 cM付近の約0.7 Mbまで絞り込んだ (Yokouchi *et al.*, *Animal Genetics*, 40: 945-951, 2009)。この領域には4つの既知遺伝子が存在していた。各遺伝子のエキソン内のSNP検索とアリル間の発現量比較を行ったところ、1つの遺伝子の発現量のみが優良型 (*Q*) 個体の筋間脂肪において非優良型 (*q*) 個体より有意に高いことから有力な候補遺伝子であると考えられた。その遺伝子の5'上流3.2 kbには、*Q*と*q*で異なる7個のSNPが存在しており、国内黒毛和種一般集団の型判定結果をもとにBMS上位、下位集団のハプロタイプ頻度推定を行ったところ、3個のSNP (SNP-1、-3、-4) 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、原因となる変異はこれら3個のSNPのどれかであると予想された。

平成21年度は、当該遺伝子の5'上流域をPCR法により増幅してpGL3-basic vector (Promega) に連結し、アリルと転写活性の関係について検討した。まず、SNP-1、-3、-4を含む5'上流1.8 kbの領域と、SNP-1のみを含む5'上流0.9 kbの領域について*Q*, *q*ハプロタイプ間の転写活性を比較したところ、5'上流0.9 kbの領域のみでハプロタイプ間の発現差が再現された。さらに、5'上流1.8 kbの領域からSNP1のみを*Q*型から*q*型に置換

することで転写活性が59%低下し ($P < 0.05$)、SNP-3, 4については転写活性の有意な変化が見られなかったことから、SNP-1がハプロタイプ間の発現差の原因となる変異であると考えられた。SNP-1の脂肪交雑度への効果を検証する目的で、兵庫県の県有種雄牛102頭と、家畜改良事業団所有の種雄牛44頭の型判定を行い、遺伝子型間で平均BMS (育種価) を比較したところ、いずれの集団においてもQホモ型の平均値がqホモ型に比べて有意に高かった ($P < 0.05$)。

この遺伝子は細胞膜および細胞内小胞の膜タンパクであり、マウス3T3L1細胞ではグルコース輸送との関係が報告されている。そこで、この遺伝子の発現を抑制するshRNAを用いて脂肪蓄積への効果を調べた。3T3 L1細胞に当該遺伝子のshRNAを導入し、脂肪細胞分化後のトリグリセリド蓄積量を測定したところ、コントロールに比べて有意に蓄積量が減少していた ($P < 0.05$)。ここまでの成果について特許申請するべく準備中である。

(6)-6. ウシ50K SNPチップを用いた黒毛和種の脂肪交雑ゲノムワイド関連解析

これまで、ゲノムワイド関連解析の手法の確立を目的としてきた。屠場から収集した黒毛和種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頭をウシ50K SNPチップ (イルミナ社) で解析した。まずPLINKで統計解析を行ったが集団の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、BTA 4、BTA 19、BTA 23で関連のあるSNPを検出した。特にBTA 4のSNPは $P = 6.1 \times 10^{-7}$ でBonferroniの補正を考慮しても $\alpha = 0.05$ で有意であった。BTA 4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。

平成21年度は、解析の頭数を増やし、手法の改善を試みた。東京芝浦市場と大阪南港市場から収集した肥育去勢牛について、BMS No. の上位と下位の約10%ずつから解析に用いるサンプルを、上位群と下位群で半きょうだい数をそれぞれ5頭以内でそろるように抽出した。芝浦市場から461頭、南港市場から414頭を抽出した合計875頭のサンプルをウシ50K SNPチップでタイピングした。Call Rate ($> 95\%$) やマイナーアレル頻度 (> 0.01)、Hardy-Weinberg平衡検定 ($P > 0.001$) の条件を満たす約38,500個のSNPを解析に用いた。集団の構造化を補正するためにEIGENSTRATプログラムを用いて主成分分析を行った。上位群と下位群の間で有意差のある主成分を用いて補正し、Armitage Trend Test で遺伝子型頻度の偏りを検定した。さらに、芝浦市場と南港市場で個別に解析後、

それぞれの市場の解析サンプル数で重み付けして統合するメタアナリシスを行うこととした。

主成分分析の結果、集団構造を最もよく表している第1および第2主成分は、黒毛和種雄牛の主要な3系統の違いを反映していることがわかった。主成分分析を利用した補正の結果、構造化の指標となるGenomic Controlの λ 値 (Inflation Factor) は両市場とも1.1以下に抑えることができた。メタアナリシスの結果、前年度の解析と同様にBTA 4で脂肪交雑と強い関連のあるSNPを検出し、新たにBTA 7にも関連のあるSNPを検出することができた。これらのSNPはBonferroniの補正を考慮しても有意であった。BTA 4の最も関連の強いSNP ($P = 7.31 \times 10^{-9}$) 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いた。BTA 7は関連の強い2個のSNP ($P = 2.77 \times 10^{-7}$, 7.75×10^{-7}) が強い連鎖不平衡状態 ($r^2 = 0.81$) にあった。最も関連の強いSNPを検出したBTA 4にマイクロサテライトマーカーを約100 kb間隔で16個配置して、関連解析に使ったサンプル606頭をタイピングした。隣り合うマーカーペアのハプロタイプ頻度についてFisherの正確検定を行った結果、50K チップのSNPによる約500 kbのLDブロック内で脂肪交雑との関連が強く、最も関連の強いSNPを含む約340 kbの範囲で強いLDブロックを形成していた。

(6)-7. ウシ50K SNPチップを用いた黒毛和種の枝肉重量ゲノムワイド関連解析

関連解析には、芝浦と南港市場で収集した去勢牛DNAサンプル20,493頭の枝肉重量上位・下位各15%(月齢、年度、市場で表型値を補正) から、父種雄牛をマッチさせて選択した150組の個体を用いた。50K SNPチップでタイピングし、クオリティチェックをパスした(マイナーアレル頻度 ≥ 0.01 、Call Rate ≥ 0.95 、かつHardy-Weinberg平衡から乖離していない ($P \geq 0.001$)) 約4万個の常染色体上のSNPについて、Armitage傾向検定を行った。集団の構造化 ($\lambda = 1.843$) を補正するために、EIGENSTRATプログラムを用いて、枝肉重量とは関連しない ($P \geq 0.01$) SNPで主成分分析を行い、上位5主成分を用いて補正を行った ($\lambda = 1.007$ に改善)。ゲノムレベル有意水準 ($0.05/4万個SNP = 1.25 \times 10^{-6}$) を超えた領域は、BTA 6 (CW-2) とBTA 14 (CW-1) のみであったが、 $P < 0.001$ において一様分布からの乖離が見られたことから、解析個体数を増やすことで、さらに多くの関連座位を検出できると考えられた。また、BTA 8のCW-3領域において、最も関連するSNP ($P = 8.8 \times 10^{-6}$) が、機能的にも責任候補となる遺伝子のイントロンにあったことから、候補遺伝子アプローチが有効かもしれないと思われた。

(7) ウシ経済形質遺伝子座の解析の今後の予定

CW-1は肥育後期から作用を発揮するのに対して、CW-2は子牛期から作用を発揮し体型自体を大きくする作用があることがわかった。2つのQTLは相加的に枝肉重量を増加させるが、これは、両者の作用が異なっているためと理解できる。CW-1の効果が顕著となる肥育中期-後期の組織において、ウシQ、non-Q個体間でGene_2、Gene_3の発現量を調べ、2つの遺伝子発現量の関連性や増体との関連を調べる。CW-2については、体型（骨格）自体を大きくすることがわかったので、引き続き、責任候補遺伝子NCAPGのアミノ酸置換（Ile442Met）による細胞分裂への影響を調べるとともに、子牛時の成長関連ホルモンの測定等を行う予定である。

脂肪交雑QTLの解析では、Marbling-2に領域で見出したSNPのうち、アミノ酸置換を起こすSNPや遺伝子の5'近傍に存在するSNPから優先して調べ、Marbling-2に連鎖するSNPを見出す。Marbling-3では、引き続き有力候補遺伝子のトリグリセリド蓄積や、グルコースあるいは脂肪酸の取り込みへの影響について調べ、また、SNP-1の黒毛和種集団全体におけるアリル頻度と寄与率を調べる予定である。

脂肪交雑のゲノムワイド関連解析では、BTA 4の候補領域約340 kbを網羅的に解析し、真の責任変異を特定する。枝肉重量のゲノムワイド関連解析では、関連解析の個体数を追加して、関連SNPの検出を行う。関連解析の結果と家系解析の結果と対応させて、Qアリルに連鎖したSNPマーカーを開発する。開発したSNPマーカーを用いて、一般集団におけるアリル頻度や効果の大きさの推定、および、後代検定牛を用いた作用発揮時期の特定などを行っていく。

4) ウシ抗病性遺伝子座の解析

(1) 研究年次：平成7年-平成21年

(2) 研究目的と期待される成果

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21年度には乳房炎について進展があった。

(3) ホルスタイン種の乳房炎抵抗性（家畜改良センターとの共同研究）

十勝地域で収集したWalkway Chief Mark家系を用い、体細胞スコアに影響する遺伝子としてFEZLを同定した（Sugimoto *et al.*, 2006）。

一般集団におけるFEZLの効果調べるため、種雄牛693頭のFEZL遺伝子型を調べた。59頭は抵抗性12Gをヘテロで持つが、634頭は感受性の13Gのホモだった。体細胞数スコア育種価はヘテロの方が低いスコアを示した ($P = 0.004$)。しかしながら、乳量、乳脂肪、乳タンパク質等ミルク生産性に関わる育種価に有意な差は見られなかった。

次に、FEZLの臨床性乳房炎に対する効果を調べるため、平成20年度から十勝NOSAI、日本ホルスタイン登録協会北海道支局(以下、ホル協北海道という)、家畜改良事業団の協力を得て、調査を行っている。平成21年度には、平成15年度から平成19年度までの十勝地方における発症(延べ162,655頭)と雌牛の父親693頭のFEZLの遺伝子型との関係を調べた。2歳以降における発症率はFEZLヘテロの種雄牛から生まれた娘牛の方が有意に低かった。3歳未満ではヘテロ種雄牛娘の発症牛2,136頭/11,283頭(18.9%)、ホモ種雄牛娘の発症牛12,691/63,435頭(20.1%) ($P = 0.004$)。3-4歳ではヘテロ種雄牛娘1,619/6,213頭(26.1%)、ホモ種雄牛娘の発症牛11,065/39,653頭(27.9%) ($P = 0.002$)。4-5歳ではヘテロ種雄牛娘の発症牛1,184/4,109頭(28.8%)、ホモ種雄牛娘の発症牛6,872/20,949頭(32.8%) ($P = 5E-07$)とそれぞれ有意な効果の差が得られた。

したがって、フィールドにおいてFEZL 12G型を保有する雄の選抜は、ミルク生産性を損なうことなく、集団における乳房炎抵抗性を高めることが期待できる。

(4) 今後の進め方

十勝NOSAI・ホル協北海道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臨床性乳房炎の発症率についての関連性を継続して調べる。また、種雄牛の体細胞スコア育種価との関係も調べる。

(5) 国内および海外の状況

(5)-1. 乳房炎抵抗性

これまで、グランドドーターデザイン(Grand-Daughter Design)によるホルスタイン種雄牛の半兄弟家系を用いた体細胞数や乳房炎のマッピングが数々報告されてきた。それらの内、ノルウェー農業大学のLienらは、ノルウェー赤ホルスタイン種において乳房炎抵抗性領域をBTA 6(1-49 cM)にゲノムレベルで有意にマッピングしていた(Klungland *et al.*, *Mammalian Genome*, 12: 837-842, 2001)。その後、種雄牛とその娘牛の数を増やし、自ら開発した399個のSNP(Nilsen *et al.*, *Animal Genetics*, 39: 97-104, 2008)でBTA 6のファインマッピングを行い、*Mucin 7*の4つのアミノ酸変異SNPに有意な関連を見出したが、それらの変異の分子生物学的な意味付けは不明である(Nilsen *et al.*, *Animal Genetics*, 40: 701-712, 2009)。

5) その他のウシ有用形質遺伝子座の解析

(1) 研究年次：平成18年-平成21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、産肉能力やミルク生産性などを対象に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解析が行われてきたが、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多数のSNPの開発が容易になり、SNPチップが実用化された。SNPチップの開発により全ゲノム関連解析というランダムな集団を対象にする解析が可能になった。繁殖性や飼料利用性なども解析の対象に加え、有用なDNA情報を探索していく。

(3) その他のウシ有用形質遺伝子座の解析

(3)-1. 黒毛和種の飼料利用性

効率の高い肥育牛生産のためには、飼料利用性を向上させることが重要である。飼料利用性の向上には、飼養管理の改善とともに、遺伝的能力の改善が必要である。本解析の目的は、ウシ50K SNPチップ（イルミナ社）を用い黒毛和種における飼料利用性に関するQTLを同定し、より精度の高い飼料利用性の遺伝的能力評価に貢献することである。

全国和牛登録協会が定めた直接検定法に則り、平成14年度から19年度までに県畜産試験場等の機関において実施された直接検定の対象牛、1,876頭を解析対象とした。解析対象形質は余剰飼料摂取量（Residual Feed Intake, RFI）とした。濃厚飼料RFI、粗飼料RFI、TDN RFIを独立に解析し、それぞれの形質に関連するQTLの同定を目指す。表型値は全和により算出された3形質の育種価推定値を用いた。

表型値の分布の上位15%、下位15%を「高RFI」、「低RFI」とし、半兄弟数を群あたり最大3頭までに制限して抽出し、SNP型との関連を検定した。関連解析にはEIGENSTRATプログラムを用いた。

まず、濃厚飼料RFIを優先して解析を行った。同形質は3形質中、最も遺伝率が高く（推定値0.236）、年度による変動が小さい。現時点までに収集できたサンプル225頭のSNP型判定を行った。このうち、不良データ個体2頭を除いた223頭（上位100頭、下位123頭）を関連解析に用いた。

54,001個のSNPのうち、常染色体上の、マイナーアレル頻度 > 0.01 、Call Rate > 0.9 、かつHardy-Weinberg 平衡から乖離していない ($P > 0.001$) 39,594個を用いて関

連解析を行った。P 値は期待される分布から遙かに低い側へ偏った結果となり、高度な集団の構造化 ($\lambda = 4.7$) が観察された。直接検定の対象牛集団に血統の偏りが大きいことを意味する。

SNP型の主成分分析の結果、上位集団と下位集団間で有意差 ($P < 0.1$) を生じた5つの主成分 (第2、3、9、12、13主成分) により補正を行い、再度全SNPについて検定を行ったところ、 $\lambda = 1.7$ まで構造化を抑えることができた。14個のSNPについて有意な結果が得られた (最小P 値 = 1.5×10^{-5})。

(3)-2. 黒毛和種の繁殖性 (鹿児島県、岐阜県、大分県、熊本県、岡山県、民間)

繁殖能力の遺伝的改良を行うため、子牛の生産効率の1つの指標である「4歳時子牛生産数」を対象に全ゲノム関連解析を行い、関連する遺伝子座と有用な多型の同定を目指す。

平成21年度は、繁殖記録付きのDNAサンプル収集を行い、解析対象個体を次の条件で選抜した：1) 1産からの連続した記録がある。2) 双子がない。3) 受精卵での出産がない。4) 供卵による産子がない。5) 流死産の産歴がない。6) 妊娠期間が261～310日。7) 分娩間隔が276～730日。8) 初産月齢が37ヶ月未満。9) 牧場の移動がない。条件を満たす約12,000頭の4歳時子牛生産数成績上位、下位各15%の中から半きょうだい上限5頭とすると、676頭が選抜された。この676頭をウシ50K SNPチップ (イルミナ社) でジェノタイプングした。4歳時子牛生産数は、成績上位と下位をそれぞれ症例群、対照群とみなし関連解析を行った。また、それぞれの個体が持つ初産分娩月齢は量的形質として扱い関連解析を行った。

P 値は期待される分布より全体に高い分布を示した。そこで2、3代祖を考慮に入れ解析個体を選抜したところ、P 値が期待値に近くなった。また、Genomic Controlで補正を行うことで、期待値を下回るP 値が、BTA 4とBTA 13のSNPに観察された。この中で、BTA 4のSNPは初産分娩月齢においても有意な関連性が観察された。

(3)-3. 黒毛和種の採卵性 (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、5回の過排卵反応につき平均回収卵数が少ない黒毛和牛 (平均9.6個以下) 42頭及び多い個体 (平均18.2個以上) 42頭についてウシ全ゲノムをカバーする1,020個のDNAマー

カーを用いた相関解析を行い、採卵性の責任遺伝子としてイオンチャネルをコードすることが知られている *glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1 (GRIA1)* 遺伝子を同定した。*GRIA1*の306番目のセリンからアスパラギンへの変異により採卵性が低下していた。この変異の機能に対する影響を調べるため、ウシ*GRIA1*の野生型（多排卵）と変異型（少排卵）をカエル卵母細胞にて強制発現を行い、濃度の異なるグルタミン酸を加えることによってどの程度電流活性をもたらすか調べた。その結果、野生型*GRIA1*は変異型*GRIA1*よりグルタミン酸の50%効果濃度が低いことが分かった（国内、および、米国にて特許申請中）。

平成21年度は以下の実験を行った。

① *GRIA1*タンパク質のリガンド結合性

野生型又は変異型*GRIA1*遺伝子を有するウシの脳より膜タンパク質を抽出し、 $[^3\text{H}]$ -AMPAとの結合を調べたところ、変異型*GRIA1*は野生型*GRIA1*よりリガンドとの結合能力が弱いことが分かった。このアミノ酸変異は細胞表面への発現に影響を与えていないことも確認できたため、変異型*GRIA1*は野生型*GRIA1*と同様に細胞表面に発現し、チャネルを形成しているが、リガンドとの結合能力が弱いため、チャネル活性の低下をもたらしていると思われる。

② *GRIA1*遺伝子のホルモンに対する影響

マウス視床下部細胞より樹立したGT1-7細胞に、HA tag をつけたウシ野生型又は変異型*GRIA1*クローンを過剰発現させ、グルタミン酸刺激後のGnRH産生量を比較した。その結果、変異型*GRIA1*は野生型*GRIA1*よりGnRH産生量が少ないことが観察された。

野生型*GRIA1*、又は変異型*GRIA1*遺伝子を有するウシにおいて、過排卵処理前及び後の血清中の性ホルモン量を測定した。その結果、野生型*GRIA1*遺伝子を有する個体では変異型*GRIA1*遺伝子を有する個体と比べ、LHサージの2峰性のピークが早く現れることが分かった。*GRIA1*はホルモン調節に関与することにより、排卵数に影響を及ぼしていることが示唆された。

③ *GRIA1*遺伝子の卵巣に対する影響

野生型*GRIA1*、又は変異型*GRIA1*遺伝子を有するウシにおいて、過排卵処理前及び後の卵巣における未成熟卵胞数および成熟卵子数を観察した。その結果、野生型*GRIA1*遺伝子を有する個体では変異型*GRIA1*遺伝子を有する個体と比べ、過排卵処理前の未成熟卵胞数が有意に多く、さらに過排卵処理後の成熟卵胞数も有意に多いことが分かった。*GRIA1*のチャネル活性が低下することにより、グルタミン酸刺激後のGnRH産生量を下げ、過排卵処理前の卵巣中の未成熟卵胞数が減少するため、排卵可能な成熟卵胞数が減少すると考えられる。

(3)-4. ホルスタイン種の妊娠率（家畜改良センター・ホル協北海道との共同研究）

ウシにおける改良は乳量や肉質については飛躍的に進んだ反面、妊娠率は低下する傾向が見られる。十勝及び石狩地方における農家において妊娠率育種価とその個体の血液を集めたところ、4,362頭の妊娠率育種価はほぼ正規分布していることが分かった。そこで、妊娠率育種価が低い個体（42% 以下）179頭及び高い個体（51% 以上）187頭を選抜した。選抜した個体について、ウシ全ゲノムをカバーする43,924個の50K SNPチップ（イルミナ社）の型判定を行い、集団の構造化の影響を取り除くための主成分分析を行った結果、Genomic Controlの λ 値は1.02に抑えられ、かつBTA 3、5、13、18、28に有意なSNPが見いだされた。

(3)-5. ホルスタイン種の生時体重（家畜改良センターとの共同研究）

乳牛の育種においては、乳量を増やすために体重が大きくなる傾向が強まる中、産子体重を小さくする遺伝子が同定されれば、分娩事故を減らし、母牛に負担が減らすことが出来る。また、産子体重の遺伝率は0.3から0.4と比較的高く、当該遺伝子が同定されればその効果も大きいと予測される。家畜改良センター各牧場において生時体重とその個体の血液を集めたところ、体細胞クローン牛及び双子を除く雌1,483頭の生時体重はほぼ正規分布していることが分かった。そこで、生時体重が小さい個体（35 kg以下）86頭及び多い個体（51 kg以上）86頭を選抜した。なお、血統による偏りを防ぐため、同じ種雄牛を父とする個体が各群5頭以下となるように調整した。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1,151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った。有意な関連性が見られた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い、有意な関連性を9個の染色体に見出した。

平成21年度は、連鎖が認められた染色体について、さらに290個のDNAマーカーを加えて三次スクリーニングを進めたところ、BTA 3の100 kb 領域に強い連鎖が見られた。この領域にはウシ胎児脳から分離されたESTが存在し、そのESTの326 bp上流のGが体重の大きい個体ではAに変異していた。Gをホモで持つ個体1,471頭の平均体重とAをホモで持つ個体61頭の平均体重の差は、2.6 kgであった。また、Gをホモで持つ種雄牛61頭の平均難産出現頻度は0.58%に対し、Aをホモ又はヘテロで持つ種雄牛20頭の平均難産出現頻度は0.72%であった。この変異を含む領域についてLuciferase活性を調べたところ、Gを含む領域はAを含む領域より活性が高いことが分かった。Gをホモで持つ個体の脳におけるESTの発現量は、Aを持つ個体より高いことが確認できた。このESTの発現量が、産子体重に影響を及ぼしているかもしれない。

(4) 今後の予定

黒毛和種の飼料効率について、現時点では検出されたSNPの P 値は期待値からの乖離の度合いがまだ小さい。今後は平成20年度以降の個体についても検査対象として追加し、検定の検出力と信頼性の向上に努める。また粗飼料RFI、TDN RFIの残り2形質についても、順次解析を進めてゆく。

黒毛和種の繁殖性について、1) 検出力を高めるため、解析頭数をさらに増やす、2) 解析個体の選抜条件に、一代祖に加え、2、3代祖の頭数を考慮に入れる、3) 他の牛群で再現性実験を行う、またそのためのサンプリングを行う、4) 他の方法で関連解析の結果を検証する（種雄牛の4歳時子牛生産数の育種価と遺伝子型の関連など）、5) 効果検証実験を行う、またそのためのサンプリングを行う。

黒毛和種の採卵性について、新潟大学が作成したノックインマウスを使い、繁殖性全般におけるアミノ酸変異の影響、パッチクランプ法によるチャンネル活性の測定、GnRHを介する排卵メカニズムについて調べる。

ホルスタイン種の妊娠率について、解析対象のサンプルを増やす必要がある。ホルスタイン種の生時体重では責任遺伝子の同定を行う。

(5) 国内および海外の状況

飼料利用性のゲノム解析では、アンガス種やヘレフォード種などの交雑去勢集団を対象に余剰飼料摂取量（RFI）などの形質がマッピングされている。繁殖性は、グランドドーターデザインに基づいたホルスタイン種雄牛の半兄弟家系を対象に、初産次月齢や受胎率育種価についてマッピングが行われている。どちらの形質においてもファインマッピングの段階まで進んだ例はない。また、50K SNP チップなどを用いたゲノムワイド関連解析の報告もない。

2. 平成21年度研究発表

1) 論文発表

1. Abbasi, A. R., Khalaj, M., Tsuji, T., Tanahara, M., Uchida, K., Sugimoto, Y., Kunieda, T. A mutation of the WFDC1 gene is responsible for multiple ocular defects in cattle. *Genomics*, 94: 55-62, 2009.
2. Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, Sugimoto, Y., Takasuga, A. *et al.* The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science*, 324: 522-528, 2009.
3. Yokouchi, K., Mizoguchi, Y., Watanabe, T., Iwamoto, E., Sugimoto, Y., Takasuga, A. Identification of a 3.7-Mb region for a marbling QTL on bovine chromosome 4 by identical-by-descent and association analysis. *Animal Genetics*, 40: 945-951, 2009.
4. Setoguchi, K., Furuta, M., Hirano, T., Nagao, T., Watanabe, T., Sugimoto, Y., Takasuga, A. Cross-breed comparisons identified a critical 591-kb region for bovine carcass weight QTL (*CW-2*) on chromosome 6 and the Ile-442-Met substitution in *NCAPG* as a positional candidate. *BMC Genetics*. Aug 4, 10: 43, 2009.
5. Eberlein, A., Takasuga, A., Setoguchi, K., Pfuhl, R., Flisikowski, K., Fries, R., Klopp, N., Fu"rbass, R., Weikard, R., K?hn, C. Dissection of genetic factors modulating fetal growth in cattle indicates a substantial role of the non-SMC condensin I complex, subunit G (*NCAPG*) gene. *Genetics*, 183: 951-964, 2009.
6. 杉本喜憲：「ウシゲノムの解読と今後の展望」 ブレインテクノニュース、136、2009年。

2) 学会発表

1. 高須賀晶子、西村翔太、渡邊敏夫、荻野 敦、清水一広、森田光夫、杉本喜憲：SNPを用いたウシの品種鑑別法の開発。日本動物遺伝育種学会第10回大会、2009年11月、前橋。
2. 平野 貴、松橋珠子、小林直彦、渡邊敏夫、高須賀晶子、杉本喜憲：黒毛和種のマルファン症候群様不良形質のマッピング。日本動物遺伝育種学会第10回大会、2009年11月、前橋。
3. 横内 耕、溝口 康、岩本英治、麻生久、渡邊敏夫、高須賀晶子、杉本喜憲：ウシ脂肪交雑QTL (*Marbling-3*) の責任SNPの検出。日本動物遺伝育種学会第10回大会、2009年11月、前橋。
4. 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交雑のゲノムワイド関連解析。日本動物遺伝育種学会第10回大会、2009年11月、前橋。
5. 高野 淳、渡邊直人、藤田達男、岡部 裕、大坪利豪、鈴木晶夫、田淵一郎、中村亮一、高須賀晶子、杉本喜憲：ウシ8番染色体上の枝肉重量QTL (*CW-3*) の同祖 (IBD) 領域の同定と高密度マイクロサテライト (MS) マーカーの開発。日本動物遺伝育種学会第10回大会、2009年11月、前橋。
6. 増田 豊、山口茂樹、荻野 敦、渡邊敏夫：乳用候補種雄牛におけるゲノミック評価値の正確度。日本動物遺伝育種学会第10回大会、2009年11月、前橋。
7. 渡邊敏夫、荒川愛作、西村翔太、山田宜永、杉本喜憲、祝前博明：50K SNPデータを利用した黒毛和種枝肉重量の分散の推定。日本畜産学会大112回大会、2010年3月、東京。

3) 講演

1. 高須賀晶子：ウシ50K SNPチップを用いた黒毛和種のゲノム解析。イルミナアグリバイオセミナー「SNPを用いた新しいアグリバイオ研究の時代」へ、2009年10月、秋葉原。

2. 西村翔太：SNPチップを用いた黒毛和種牛QTLのゲノムワイド関連解析。「SNPアレイを利用した動物ゲノム解析」、第15回動物遺伝育種シンポジウム「動物ゲノム解析と新たな育種戦略」、2009年11月、前橋。

4) 学会発表要旨

[学会発表の次の数字は、学会発表の番号に相当する]

学会発表1.

題目：SNPを用いたウシの品種鑑別法の開発

発表者：高須賀晶子¹、西村翔太¹、渡邊敏夫¹、荻野 敦²、清水一広²、森田光夫²、杉本喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²家畜改良事業団

要旨：【目的】動物遺伝研ではこれまでに、6個のマイクロサテライト（MS）マーカーを用いた黒毛和種とホルスタイン種、F1（黒毛和種×ホルスタイン種）の品種鑑別法を開発した（Watanabe *et al.*, 2008）。しかしながら、MSマーカーのタイピングは、多数検体の処理には不向きである。一方、最近発表されたウシHapMapコンソシアムの論文においては、約3万7千個のSNPの遺伝子型を主成分分析することにより、ウシの各品種をクラスター化できることが示されている（*Science*, 2009）。そこで、SNPを用いた簡便な品種鑑別法を開発するために、今回、黒毛和種とホルスタイン種、F1の識別に必要なSNPマーカーを選別した。

【方法と結果】国内のホルスタイン種雄牛125頭と黒毛和種去勢牛127頭（両品種とも半兄弟を含まない）を50K SNPチップ（イルミナ社）でタイピングし、252頭中のマイナーアレル頻度が0.1以上でデータ欠損のない約3万3千個のSNPを解析に用いた。まず、これらのSNPの遺伝子型で主成分分析を行うと、第一主成分のみで両品種を分けることができた。次に、各SNPについて、それぞれの品種におけるヘテロ接合率期待値の平均値（ H_s ）と両品種のアレル頻度の相加平均から計算されるヘテロ接合率期待値（ H_r ）を用いてWrightの F_{ST} 統計量を計算した（ $F_{ST} = (H_r - H_s) / H_r$ ）。 F_{ST} の大きい順にソートし、500 kb以内に存在するものは除いて上位10個（ $F_{ST} > 0.70$ ）および29個（ $F_{ST} > 0.63$ ）のSNPを選び、主成分分析を行っても、両品種の識別は可能であった。そこで、これらのSNPについて、F1個体96頭をタイピングしたところ、20個のSNPを用いれば、F1を両品種から識別できることがわかった。今後、多数の検体で検証するとともに、マルチプレックス化による簡便な鑑別技術の確立を目指す。

（日本動物遺伝育種学会第10回大会、2009年11月、前橋）

学会発表2.

題目：黒毛和種のマルファン症候群様不良形質のマッピング

発表者：平野 貴¹、松橋珠子²、小林直彦²、渡邊敏夫¹、高須賀晶子¹、杉本喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²岐阜県畜産研

要旨：【目的】黒毛和種種雄牛Aの産子で、発育不良と見られる不良形質が散見された。その特徴的な症状は、体高は正常値を示すが体幅が得られない（薄く痩せている印象）、ヒトの指にあたる部位が長い（猫足）、などである。その他に、背骨奇形、眼球異常、結膜炎、目の中心が白濁、耳が垂れている、などの症状を示す個体も見られた。これらの症状は、ヒトのマルファン症候群で見られる症状（盲目、緑内障、白内障等による視力低下または視力喪失、高身長、手足や指が細くて長い、長身瘦躯の体型、面長、大きい耳介）に似ると思われた。マルファン症候群は優性遺伝様式を示し、*Fibrillin1* (*FBN1*) が原因遺伝子の一つと考えられている。

【方法・結果】我々は、種雄牛Aの父方半きょうだい家系（典型的発症牛36頭、正常牛10頭）を用いてマッピングを試みた。ジェノタイピングは50K SNPチップ（イルミナ社）を用いて行った。その結果、BTA 10で有意な結果が得られた。BTA 10にマイクロサテライトマーカをさらに配置して解析したところ、同様の結果が得られた。また、マッピングされた領域には*FBN1*が位置することがわかった。ハプロタイプを確認したところ、発症牛はリスク型をヘテロで有しており、この不良形質はマルファン症候群と同様に優性遺伝様式を示すと考えられた。現在、*FBN1*を第1の候補として解析を進めている。

（日本動物遺伝育種学会第10回大会、2009年11月、前橋）

学会発表3.

題目：ウシ脂肪交雑QTL (*Marbling-3*) の責任SNPの検出

発表者：横内耕¹、溝口康²、岩本英治³、麻生久⁴、渡邊敏夫¹、高須賀晶子¹、杉本喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²明治大、³兵庫県農林水産総技セ、⁴東北大

要旨：【目的】これまでに、複数の黒毛和種半きょうだい家系解析から、4番染色体に脂肪交雑QTLが検出されている。それらのうち血縁関係にある2頭の種雄牛に注目し、ハプロタイプ比較と相関解析によってQTL候補領域の絞り込みを行った。その結果、候補領域は46 cM付近の約0.7 Mbの連鎖不平衡領域まで絞り込むことができた。本報告では、0.7 Mbの候補領域内にある4個の既知遺伝子について、脂肪交雑QTLの原因遺伝子となりうるかどうか検討し、さらにQTLの責任SNPの同定を試みた。

【方法と結果】候補領域内の4個の既知遺伝子に対して、エキソン内の変異探索とウシ筋間脂肪組織における発現量比較を行った。その結果、それらのうちの一つの遺伝子では、

QQ個体での発現量がqq個体よりも高く、また、3T3 L1脂肪前駆細胞の分化に伴い発現が増加するとの報告もあったことから、最も有力な候補遺伝子であると考えられた。こうした発現差の原因となる多型検出を目的として遺伝子の5'上流3.2 kbを調べたところ、Qとqハプロタイプ間で異なる7個のSNPを検出した。国内黒毛和種集団19,112頭から脂肪交雑等級の上位406頭と下位412頭を選び、各集団内のハプロタイプ頻度を比較したところ、3個のSNP (SNP-1, -3, -4) をQ型で持つハプロタイプ頻度が、上位集団で有意に高かった ($P < 10^{-8}$)。さらに、ウシ筋間脂肪組織由来脂肪前駆細胞を用い、Luciferase assayによってこれら3SNPのアリルと転写活性の関係について検討した結果、SNP-1においてのみ、アリルをQ型からq型に置換することで転写活性が60%低下した ($P < 0.005$)。よってSNP-1がMarbling-3の責任SNPであると考えられた。

(日本動物遺伝育種学会第10回大会、2009年11月、前橋)

学会発表4.

題目：50K SNPチップを用いたウシ脂肪交雑のゲノムワイド関連解析

発表者：高須賀晶子¹、西村翔太¹、渡邊敏夫¹、荻野 敦²、清水一広²、森田 光夫²、杉本 喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²家畜改良事業団

要旨：【目的】ウシの脂肪交雑関連座位をマッピングするために、50K SNPチップ（イルミナ社）を用いたゲノムワイド関連解析を行った。

【方法】東京芝浦市場と大阪南港市場から収集した肥育去勢牛について、BMS No. の上位と下位の約10%ずつから解析に用いるサンプルを、上位群と下位群で半きょうだい数がそろそろように抽出した。芝浦市場から461頭、南港市場から414頭を抽出した合計875頭のサンプルをウシ50K SNPチップでタイピングした。Call rate ($> 95\%$) やマイナーアリル頻度 ($P > 0.01$)、Hardy-Weinberg平衡検定 ($P > 0.001$) の条件を満たす約38,500個のSNPを解析に用いた。集団の構造化を補正するためにEIGENSTRATプログラムを用いて主成分分析を行った。種雄牛の系統を反映している第1および第2成分と、第3成分以下の上位群と下位群の間で有意差のある成分を用いて補正し、Armitage Trend Testで遺伝子型頻度の偏りを検定した。芝浦市場と南港市場で個別に解析後、それぞれの市場の解析サンプル数で重み付けして統合するメタアナリシスを行った。

【結果】 BTA 4およびBTA 7で脂肪交雑と関連のあるSNPを検出した。これらのSNPはBonferroniの補正を考慮しても有意であった。BTA 4の最も関連の強いSNP ($P = 7.31 \times 10^{-9}$) 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、種雄牛Aの半きょうだい家系解析で検出した脂肪交雑QTLのピークとほぼ一致していた。BTA 7は

関連の強い2 SNP ($P = 2.77 \times 10^{-7}$, 7.75×10^{-7}) が強い連鎖不平衡状態 ($r^2 = 0.81$) にあったが、2 SNPのマーカー間隔は約1 Mb離れており、種雄牛Bの家系解析で検出された脂肪交雑QTLの信頼区間内であった。

(日本動物遺伝育種学会第10回大会、2009年11月、前橋)

学会発表5.

題目：ウシ8番染色体上の枝肉重量QTL (CW-3) の同祖 (IBD) 領域の同定と高密度マイクロサテライト (MS) マーカーの開発

発表者：高野 淳¹、渡邊 直人²、藤田 達男²、岡部 裕³、大坪 利豪⁴、鈴木 晶夫⁵、田淵 一郎⁶、中村 亮一⁷、高須賀 晶子¹、杉本 喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²大分県農水研セ、³長崎県肉改セ、⁴佐賀県畜試、⁵青森県産技セ、⁶鳥取県農総研畜試、⁷島根県畜技セ

要旨：【目的】家畜の育種改良のための重要な目標の一つに、脂肪交雑や枝肉重量などの経済形質遺伝子座の同定が挙げられる。これまでに、共通祖先を有する6つの黒毛和種父方半兄弟家系において独立に枝肉重量QTLが8番染色体上に検出されている。本研究では、当該領域の絞り込みに向けて、高密度に多型性の良いMSマーカーを開発するとともに、6種雄牛の優良型 (Q) ハプロタイプを比較し、共通祖先に由来するIBD領域を同定した。

【方法・結果】6家系の去勢産子数は163-523頭、染色体上のマーカー情報量は0.79-0.94であった。各家系で検出された枝肉重量QTLはいずれも染色体レベル0.01 %有意を超え、False Discovery Rateは0.01以下、アレル置換効果は21.0-37.8 kg、寄与率は4.7-14.6 %であった。

家系規模が大きい種雄牛Aと種雄牛Bの共通の95%信頼区間；*DIK1129-DIK2402*のゲノム配列 (Btau4.0) を用いて、9回以上のリピート数を持つMS配列 (96座位) についてプライマーを設計した。領域内の22個の既存MSマーカーのうち18個および新規開発MSマーカーのうち71個が、いずれかの種雄牛でヘテロ接合を示した (平均間隔0.29 Mb)。これら89個のMSマーカーで6種雄牛のハプロタイプを比較した結果、共通のQハプロタイプ領域 (MS063-MS071, 17.7 Mb) を見出した。各種雄牛のQアレルの由来より、この領域はIBDであることが確認され、我々はこれをCW-3と名付けた。CW-3 領域の高多型性MSマーカーは40個、平均間隔は0.45 Mbであった。これまでにWatanabeら (2008) により黒毛和種のLDブロック長が3 Mb以下 (3 cM以下) と推測されていることから、本研究で開発したマーカーを用いて、今後、連鎖不平衡マッピングが可能であると考えられる。

(日本動物遺伝育種学会第10回大会、2009年11月、前橋)

学会発表6.

題目：乳用候補種雄牛におけるゲノミック評価値の正確度

発表者：増田 豊¹、山口茂樹²、萩野 敦²、渡邊敏夫³

所属：¹帯畜大、²家畜改良事業団、³畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】本研究では、高密度SNPマーカーに基づくゲノミック予測値の正確度について検証した。

【材料と方法】現在までにわが国で供用されたホルスタイン種雄牛1,835頭の精液からDNAを抽出し、50K SNPチップ（イルミナ社）を用いてSNP型判定を行った。マイナーアレル頻度とCall Rateにより選別を行い、最終的に個体あたり39,081個のSNPを分析に供した。不明アレルは、Genglerら（2007）の混合モデル法により補完した。前述の種雄牛のうち、2005年2月の段階で育種価（EBV09）が得られた407頭を予測対象集団とした。対象形質は、乳量、乳脂質、乳蛋白量、肢蹄、乳器および決定得点とした。EBV05とSNPデータに基づき、リッジ回帰、BLUP、Van Raden（2008）の線形法、非線形AおよびB法を用いて、各形質についてそれぞれ直接ゲノム価（DGV）を算出し、EBV09との相関を計算した。また、国際種雄牛評価値が利用可能になった平成16年度の候補種雄牛84頭について、育種価の両親平均（PA）との相関も計算した。

【結果】予測対象集団において、DGVとEBV09の相関は、いずれの手法においても各形質とも0.30から0.65の範囲にあった。非線形A法からの相関係数は平均して高く、上記の各形質に対して、それぞれ0.47、0.65、0.32、0.50、0.43、0.51であった。平成16年度の種雄牛について、乳量、乳蛋白量、乳器、決定得点について、PAとEBV09との相関は、それぞれ0.17、0.03、0.02、0.00であった。一方、非線形A法によるDGVとEBV09との相関は、それぞれ0.37、0.14、0.27、0.25であった。わが国において、ゲノミック予備選抜は、PAにもとづくそれよりも正確であると示唆された。

（日本動物遺伝育種学会第10回大会、2009年11月、前橋）

学会発表7.

題目：50K SNPデータを利用した黒毛和種枝肉重量の分散の推定

発表者：渡邊敏夫¹、荒川愛作²、西村翔太¹、山田宜永²、杉本喜憲¹、祝前博明²

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²京大院農

要旨：【目的】50K SNPチップ（イルミナ社）が開発され、ホルスタイン種種雄牛においてゲノム育種価予測（GP）が行われつつあるが、黒毛和種種雄牛においてもGPについて検討を行っていく必要がある。今回は、一予備検討として、肥育個体の成績とそれらの50K SNPデータから、遺伝および残差分散の推定を試みた。

【方法】 黒毛和種去勢肥育牛673頭の枝肉重量およびSNP（39,442個）を用いて、線形回帰分析により、LODスコアの高い81個（ $P < 0.0001$ ）から4,216個（ $P < 0.05$ ）のSNPを選択した。選択したSNPの効果とポリジーン効果を取り上げたモデルにより、ベイズ法を用いて分散の推定を行った。ここでは、分子血縁係数行列に代えて、全SNPのデータにより作成したゲノム関係行列を用いた。

【結果】 モデルにLODスコアの高いSNPをより多く含めると、推定SNP分散は増加し、ポリジーン効果変数による推定分散は減少した。選択したSNP数の増加に伴う残差分散およびトータル遺伝分散の推定値の大幅な変化はみられず、ポリジーン効果変数のみのモデルによる推定値と概ね同程度の値であった。 $P < 0.1$ のSNP（32,590個）により説明される遺伝分散は、ほぼ0であった。今後は、枝肉重量以外の形質も対象とし、解析頭数を増やすことでより詳細な検討を続ける。

（日本畜産学会大112回大会、2010年3月、東京）

5) 講演要旨

講演1.

題目：ウシ50K SNPチップを用いた黒毛和種のゲノム解析

発表者：高須賀晶子

所属：畜技協・動物遺伝研

【はじめに】

黒毛和種は、霜降り（脂肪交雑）に優れているという特質をもっており、日本のもつ貴重な遺伝資源のひとつである。脂肪交雑や枝肉重量のような経済形質に関わるゲノム領域を明らかにし、種雄牛選抜に利用するために、これまで、動物遺伝研究所では、19道県の畜産試験場や研究所および家畜改良事業団と共同で、半きょうだい家系を用いたQTLマッピングを行ってきた。しかし、近年、ウシにおいてもSNPチップが市販されるようになり、家系によらない一般集団を対象としたゲノムワイド関連解析（GWAS）が可能になった。GWASは、比較的効果の小さい座位も検出することができ、また、家系解析より狭い領域にマッピングできるので、有力なツールになることが期待される。一方で、ウシは有効な集団の大きさが小さく、血縁関係が濃いこと、また、系統によって、脂肪交雑が入りやすい、あるいは、増体がよいなどの特長があることから、集団の構造化が生じやすく、解析個体の選び方や統計解析手法に工夫が必要となる。そこで、まず脂肪交雑をターゲットとして、黒毛和種におけるSNPチップの有効性およびGWASの有用性を

検証したので、その結果を紹介したい。

【方法と結果】

2つの大きなと場で収集した肥育去勢牛について、脂肪交雑基準値 (Beef Marbling Standard, BMS) の上位と下位10%ずつから、と場別にBMS上位・下位で半きょうだいをマッチさせるように解析個体を選択した。と場1については、14,132頭の肥育去勢牛より計461頭を、と場2については、10,380頭の肥育去勢牛より計414頭を選別し、イルミナ ウシ50K SNPチップでタイピングした (Call Rate > 95%)。マイナーアレル頻度が0.01以下およびHardy-Weinberg 平衡にない ($P < 0.001$) SNPを除外すると、黒毛和種においては、約40,000個のSNPを検定に使うことができ、ゲノムの約85%を200 kb以下の間隔でカバーできていることがわかった。次に、集団の構造を把握するために、タイピングデータをEIGENSTRATプログラムで主成分分析し、各個体を第一主成分 (X軸) と第二主成分 (Y軸) でプロットすると、その分布は系統を反映していると考えられた。そこで、これらの成分を補正して検定を行った。と場別に、上位2個の主成分およびBMS上位・下位間で有意差のあるその他の主成分 ($P < 0.1$) (と場1;10個、と場2;8個) について補正を行い、相加的、優性、劣性の各モデルにおける遺伝子型頻度の差を検定した (Armitage's Trend Test)。構造化の指標である λ (Inflation Factor) は約1.05 (と場1) と1.09 (と場2) に抑えられ、それぞれ、さらにGenomic Controlによる補正を行ってP値とオッズ比を算出した。また、と場1と2の結果をメタアナリシスにより統合し、統合したP値とオッズ比を算出した。 $P < 1.25 \times 10^{-6}$ で関連の検出された領域は2箇所あり、それぞれ家系解析で検出された脂肪交雑QTL領域に含まれていた。これらについて、マイクロサテライトマーカーを用いて関連ハプロタイプを調べたところ、ともに家系解析で検出されたQTLに一致していることが確認された。

【まとめと今後の展望】

これまでの半きょうだい家系を用いた解析では、脂肪交雑QTLは枝肉重量QTLに比べて信頼区間が広くマッピングされてしまうため、ファインマッピングに多大な労力を要していた。一方、GWASでは、検出された関連座位が偽陽性でないことを確認するためにreplication実験を行うのが一般的である。今回、GWASと家系解析を組み合わせることで、信頼度の高い座位を検出することができ、GWASの有用性を確認することができた。さらに多くの関連座位を見出すには、解析個体数を増やす必要があり、広くサンプルを収集することが課題である。今後、GWASを用いて、飼料効率や繁殖性、抗病性などの解析を予定しているが、いずれも、信頼できる表型値付きのDNAサンプルをいかに多く集

めることができるかにかかっており、関係各所の方々のご理解とご協力を賜りたい。
(イルミナアグリバイオセミナー「SNPを用いた新しいアグリバイオ研究の時代」へ、
2009年10月、秋葉原)

3. 委員会・会議等の開催

1) 「牛DNA解析技術を活用した家畜育種等推進事業（肉用牛DNA育種検証事業）」 に関わる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21年度事業成果についての委員会は平成22年4月28日東京で開催された。議事内容は次の通りであった。

- ① 本事業の平成21年度実施概況及び平成22年度実施計画について
- ② 本事業以外のDNA関連事業の平成21年度研究成果について
- ③ 話題提供：

「肉用牛におけるゲノミック評価と選抜」、祝前 博明（京都大学大学院農学研究科応用生物学専攻動物遺伝育種学分野）

- ④ 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。

肉用牛ゲノム研究・開発推進委員会委員

小畑 太郎	(社) 農林水産先端技術産業振興センター (STAFF) 農林水産先端技術研究所 研究開発第2部長
国枝 哲夫	岡山大学農学部大学院自然科学研究科 教授
新山 正隆	(社) 家畜改良事業団 専務理事
花澤 信幸	全国畜産関係場所長会 会長 (千葉県畜産総合研究センターセンター長)
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
松本 光人	(独) 農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所 所長
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）

祝前 博明 京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻動物遺伝育種学分野
教授

2) 「DNA育種技術開発実用化事業」に関わるDNA育種技術推進委員会、兼、「肉用牛DNA育種検証事業」に関わる技術推進委員会

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21年度委員会は、平成22年2月2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21年度の研究成果発表

(a) 次世代シーケンサーを用いた *Marbling-2* と前肢帯筋異常症領域の網羅的 SNP探索

(b) 黒毛和種枝肉重量 QTL (*CW-1*) の責任遺伝子の同定に向けて

(c) 黒毛和種脂肪交雑QTL (*Marbling-3*) の責任遺伝子の同定に向けて

(d) 50K SNPチップを用いたウシ脂肪交雑のゲノムワイド関連解析

(e) 飼料利用性に関するゲノム解析

(f) 平成21年度のその他の研究成果

② (独)家畜改良センター実施事業の研究成果報告

③ 平成22年度の研究計画について

④ 講評

肉用牛DNA育種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) 「牛有用ゲノム解析手法高度化事業」に関わる解析手法高度化検討委員会

この委員会は、平成18年度から当研究所が行った「牛有用ゲノム等探索・知的財産化

事業」の後継事業と位置付けられる「牛有用ゲノム解析手法高度化事業」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、必要な助言をするものとして開催されている。

平成21年度以降の研究の方向性について、検討委員会が平成21年8月6日に東京で開催された。また、平成21年度の事業成果についての検討会は平成22年4月22日に東京で開催された。それぞれの検討委員会の議事は次の通りであった。

・平成21年8月6日の検討委員会

- ① 牛有用ゲノム解析手法高度化事業の概要及び事業計画について
- ② 牛有用ゲノム解析手法高度化事業の達成目標について
- ③ 話題提供：

「ゲノミック選抜法」、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

- ④ その他

・平成22年4月28日の検討委員会

- ① 平成21年度事業実施結果について
- ② 平成22年度事業実施計画について

解析手法高度化検討委員会委員

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 次長
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 東部支所長
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 研究管理監
新山 正隆	(社) 家畜改良事業団 専務理事
松川 正	(社) 畜産技術協会 参与
安江 博	(独) 農業生物資源研究所ゲノム研究ユニット 上席研究員
吉村 豊信	(社) 全国和牛登録協会 専務理事

4) 全国DNA育種推進会議

この会議は畜産新技術実用化対策事業の一環である「DNA育種基盤の確立」に関わる全国推進会議である。平成13年度からは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21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21年度全国DNA育種推進会議は平成21年10月7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 動物遺伝研究所が実施する平成21年度事業について
- ② 「平成21年度計画と進捗状況報告」及び「育種現場におけるDNA情報の活用状況と今後の予定（アンケート関係）」について
- ③ 動物遺伝研究所からの話題提供
- ④ アンケート「DNA育種事業の現状と今後に向けて」の取りまとめ結果

第2回の平成21年度全国DNA育種推進会議は平成22年2月23日東京で開催された。主要議題は次の通りであった。

- ① 平成21年度の道県等の事業成果について
 - (a) 枝肉形質QTLの家系解析
 - (b) 枝肉重量QTL *CW-1*/*CW-2*の効果検証
- ② 平成21年度の動物遺伝研究所の研究進捗状況について
 - (a) 飼料利用性に関するゲノム解析
 - (b) 繁殖性に関するゲノム解析
- ③ 動物遺伝研究所事業の研究成果のまとめ、及び、今後の研究の進め方について
 - (a) 5番染色体上の枝肉重量QTLのハプロタイプ比較
 - (b) 連鎖解析用カスタム 3K SNPチップを用いた半きょうだい家系解析：対象家系の募集
- ④ 平成22年度のDNA育種技術関連事業について
- ⑤ その他

5) 研究会等の開催

- ① 第4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21年10月6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 食肉生産とプロテオーム解析

- (1) 「筋肉の繊維型と食肉の品質」、千国 幸一 ((独)農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所食肉プロテオーム研究チーム)
- (2) 「プロテオーム解析による牛枝肉形質バイオマーカーの探索」、松本 和也 (近畿大学生物理工学部)

第2部 RNAの解析から見えてくるもの

- (1) 「ハイスループットなデジタル遺伝子発現解析の活用について」、松村 秀生 ((財)岩手生物工学研究センター生命科学研究部)
- (2) 「核内ノンコーディングRNAの世界-Xistから新規遺伝子まで」、中川 真一 ((独)理化学研究所基幹研究所中川独立主幹研究ユニット)

② 動物遺伝育種シンポジウム組織委員会による第15回シンポジウム「動物ゲノム解析と新たな育種戦略：SNPアレイを利用した動物ゲノム解析」を動物遺伝育種学会と共催した。

開催日：平成21年11月10日

開催場所：群馬会館2階ホール (前橋市)

内容：

- (1) 「乳用牛の新たな遺伝的能力評価法に用いる高密度SNPマーカーの有用性」、荻野 敦 ((社)家畜改良事業団家畜改良技術研究所)
- (2) 「乳用牛におけるゲノム情報を使った遺伝的能力評価法の検証」、佐分 淳一 ((独)家畜改良センター改良部)
- (3) 「SNPチップを用いた黒毛和種QTLのゲノムワイド関連解析」、西村 翔太 ((社)畜産技術協会附属動物遺伝研究所)
- (4) 「ブタのSNP開発、集団の遺伝学的構造解析および育種への応用の試み」、奥村

直彦 ((社) 農林水産先端技術産業振興センター)

- (5) 「DigiTag2法を用いたニワトリSNPの解析について」、下桐 猛 (鹿児島大学農学部生物生産学科)

4. 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21年度は次の9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 (平成20年度より継続)

- 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 宜永

- 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 (平成20年度より継続)

- 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 (平成20年度より継続)

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（平成20年度より継続）

① 委託先：岐阜県畜産研究所

② 委託研究者：小林 直彦

8) 和牛繁殖性の遺伝学的研究（新規）

① 委託先：岡山県総合畜産センター

② 委託研究者：中藤 由紀

9) 大分牛における繁殖性の遺伝学的研究（新規）

① 委託先：大分県農林水産研究センター畜産試験場

② 委託研究者：佐藤 邦雄

5. 研修員の受け入れ

所属機関名	氏名	受入期間
岐阜県畜産研究所	松橋 珠子	平21.05.16～06.17
鹿児島県肉用牛改良研究所	池田 省吾	平21.05.25～06.05
宮崎県畜産試験場	築木 努	平21.06.01～06.12
福島県農業総合センター畜産研究所	内田 守譜	平21.06.15～07.03
北海道立畜産試験場	内藤 学	平21.06.16～07.09
佐賀県畜産試験場	大坪 利豪	平21.06.16～06.26
山形県農業総合研究センター畜産試験場	中嶋 宏明	平21.08.10～08.13
岡山県総合畜産センター	中藤 由紀	平21.09.28～10.16
北海道立畜産試験場	内藤 学	平21.09.29～10.09
鳥根県畜産技術センター	中村 亮一	平21.10.08～10.23
青森県農林総合研究センター畜産試験場	小野 博之	平21.10.19～11.06
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21.10.26～11.06
広島県立総合技術研究所畜産技術センター	松井 茉由	平21.11.16～11.20
宮城県畜産試験場	齊藤 陽介	平21.11.16～11.20
鳥取県農林総合研究所畜産試験場	田淵 一郎	平21.11.24～12.10
大分県農林水産研究センター畜産試験場	佐藤 邦雄	平22.01.25～02.05
大分県農林水産研究センター畜産試験場	渡邊 直人	平22.01.25～02.05
鳥根県畜産技術センター	中村 亮一	平22.02.24～03.19
岐阜県畜産研究所	松橋 珠子	平21.03.08～03.19
鹿児島県肉用牛改良研究所	池田 省吾	平22.03.08～03.19
佐賀県畜産試験場	大坪 利豪	平22.03.09～03.19
宮城県畜産試験場	齊藤 陽介	平22.03.15～03.19

第3節 總 務

1. 職員名簿（平成22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
	主任研究員	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	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21年10月1日	吉 田 加奈子	動物遺伝研究部補助員	動物遺伝研究部 臨時職員から

2) 職員の退職・退任

退職・退任年月日	氏 名	所 属	備 考
平成22年2月28日	榊 本 友 子	動物遺伝研究部補助員	

3. 職員の海外出張

氏名	出張先	期間	用務
平野 貴	米国	平21.05.08~05.13	米国コールドスプリングハーバー市で開催されたウシゲノム共同研究会議 (Bovine Genome Consortium Meeting) に参加
西村 翔太	米国	平21.05.08~05.13	米国コールドスプリングハーバー市で開催されたウシゲノム共同研究会議 (Bovine Genome Consortium Meeting) に参加
高須賀 晶子	米国	平22.01.08~01.15	米国サンディエゴ市で開催された第18回植物・動物ゲノム学会 (Plant & Animal Genome XVIII) に参加

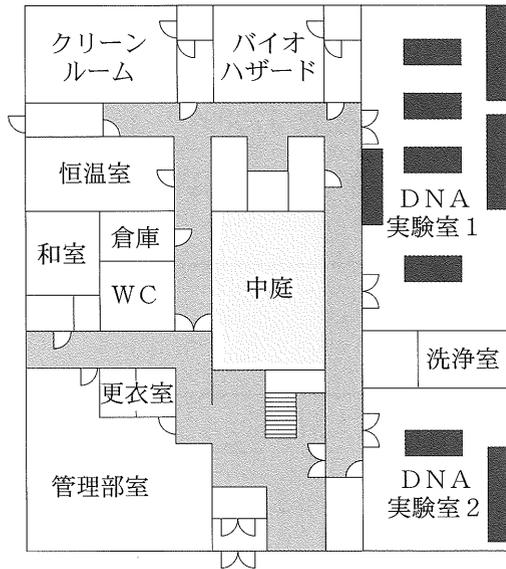
4. 施設・機器の整備

1) 施設

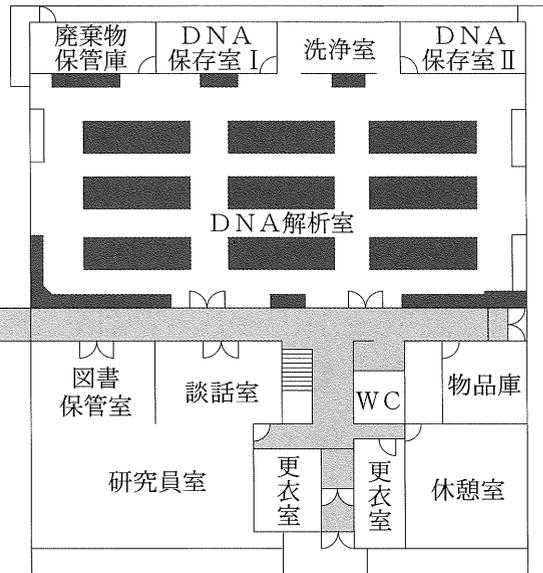
研究施設の平面図は51ページの通り。

研究施設平面図

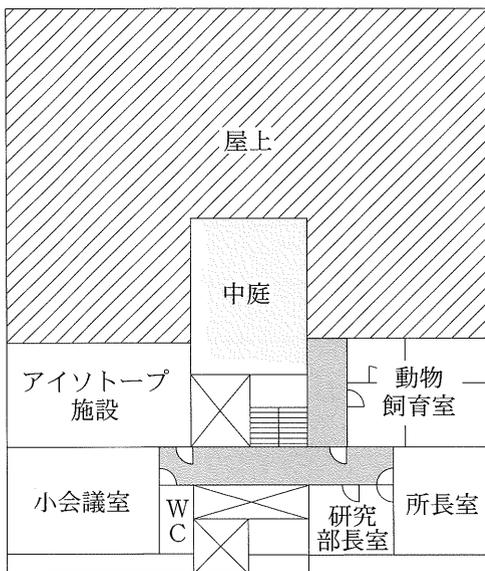
本館 1階 (742㎡)



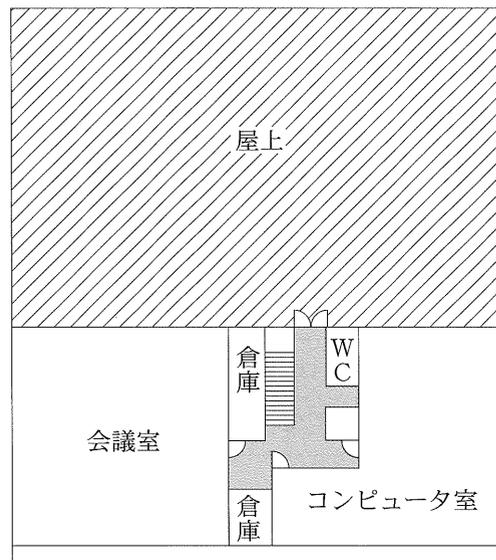
別館 1階 (788㎡)



本館 2階 (258㎡)



別館 2階 (306㎡)



2) 平成21年度購入の主要機器（単価百万円以上）

機 器 名	式 数
遺伝子導入システム（Lonza社製 ヌクレオフェクター II AAD-101S）	1
Imark マイクロプレートリーダー（Bio Rad社製 168-1130 J1-CAM）	1
1 μ l 8 チャンネル分光光度計（テルモ社製 Nano Drop 8000）	1
フリーズ超低温槽（日本フリーザー社製 CLN-50CW）	1
DNA塩基配列情報抽出用ワークステーション（DELL社製 T7500）	2
データベースネットワーク用ワークステーション（DELL社製 T7500）	1
共焦点レーザー走査型顕微鏡（オリンパス社製 IX81組合せ FV1001-IX81TS）	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

The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution

The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium,* Christine G. Elsik,¹
Ross L. Tellam,² Kim C. Worley³

To understand the biology and evolution of ruminants, the cattle genome was sequenced to about sevenfold coverage. The cattle genome contains a minimum of 22,000 genes, with a core set of 14,345 orthologs shared among seven mammalian species of which 1217 are absent or undetected in noneutherian (marsupial or monotreme) genomes. Cattle-specific evolutionary breakpoint regions in chromosomes have a higher density of segmental duplications, enrichment of repetitive elements, and species-specific variations in genes associated with lactation and immune responsiveness. Genes involved in metabolism are generally highly conserved, although five metabolic genes are deleted or extensively diverged from their human orthologs. The cattle genome sequence thus provides a resource for understanding mammalian evolution and accelerating livestock genetic improvement for milk and meat production.

Domesticated cattle (*Bos taurus* and *Bos taurus indicus*) provide a significant source of nutrition and livelihood to nearly 6.6 billion humans. Cattle belong to a clade phylogenetically distant from humans and rodents, the Cetartiodactyl order of eutherian mammals, which

first appeared ~60 million years ago (1). Cattle represent the Ruminantia, which occupy diverse terrestrial environments with their ability to efficiently convert low-quality forage into energy-dense fat, muscle, and milk. These biological processes have been exploited by humans since domestication, which began in the Near East some 8000 to 10,000 years ago (2). Since then, over 800 cattle breeds have been established, representing an important world heritage and a scientific resource for understanding the genetics of complex traits.

The cattle genome was assembled with methods similar to those used for the rat and sea

urchin genomes (3, 4). The most recent assemblies, Btau3.1 and Btau4.0, combined bacterial artificial chromosome (BAC) and whole-genome shotgun (WGS) sequences. Btau3.1 was used for gene-specific analyses. Btau4.0, which includes finished sequence data and used different mapping methods to place the sequence on chromosomes, was used for all global analyses other than gene prediction. The contig N50 (50% of the genome is in contigs of this size or greater) is 48.7 kb for both assemblies; the scaffold N50 for Btau4.0 is 1.9 Mb. In the Btau4.0 assembly, 90% of the total genome sequence was placed on the 29 autosomes and X chromosome and validated (3). Of 1.04 million expressed sequence tag (EST) sequences, 95.0% were contained in the assembled contigs. With an equivalent gene distribution in the remaining 5% of the genome, the estimated genome size is 2.87 Gbp. Comparison with 73 finished BACs and single-nucleotide polymorphism (SNP) linkage data (5, 6) confirmed this assembly quality with greater than 92% genomic coverage, and fewer than 0.8% of

SNPs were incorrectly positioned at the resolution of these maps (3, 4).

We used the cattle genome to catalog protein-coding genes, microRNA (miRNA) genes, and ruminant-specific interspersed repeats, and we manually annotated over 4000 genes. The consensus protein-coding gene set for Btau3.1 (OGSv1), from six predicted gene sets (4), consists of 26,835 genes with a validation rate of 82% (4). On this basis, we estimate that the cattle genome contains at least 22,000 protein-coding genes. We identified 496 miRNA genes of which 135 were unpublished miRNAs (4). About half of the cattle miRNA occur in 60 genomic miRNA clusters, containing two to seven miRNA genes separated by less than 10 kbp (fig. S2). The overall GC content of the cattle genome is 41.7%, with an observed-to-expected CpG ratio of 0.234, similar to that of other mammals.

The cattle genome has transposable element classes like those of other mammals, as well as large numbers of ruminant-specific repeats (table S4) that compose 27% of its genome. The

¹Department of Biology, 406 Reiss, Georgetown University, 37th and O Streets, NW, Washington, DC 20057, USA. E-mail: ce75@georgetown.edu ²CSIRO Livestock Industries, 306 Carmody Road, St. Lucia, QLD 4067, Australia. E-mail: ross.tellam@csiro.au ³Human Genome Sequencing Center, Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, MS BCM226, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030, USA. E-mail: kworley@bcm.edu

*All authors with their affiliations and contributions are listed at the end of this paper.

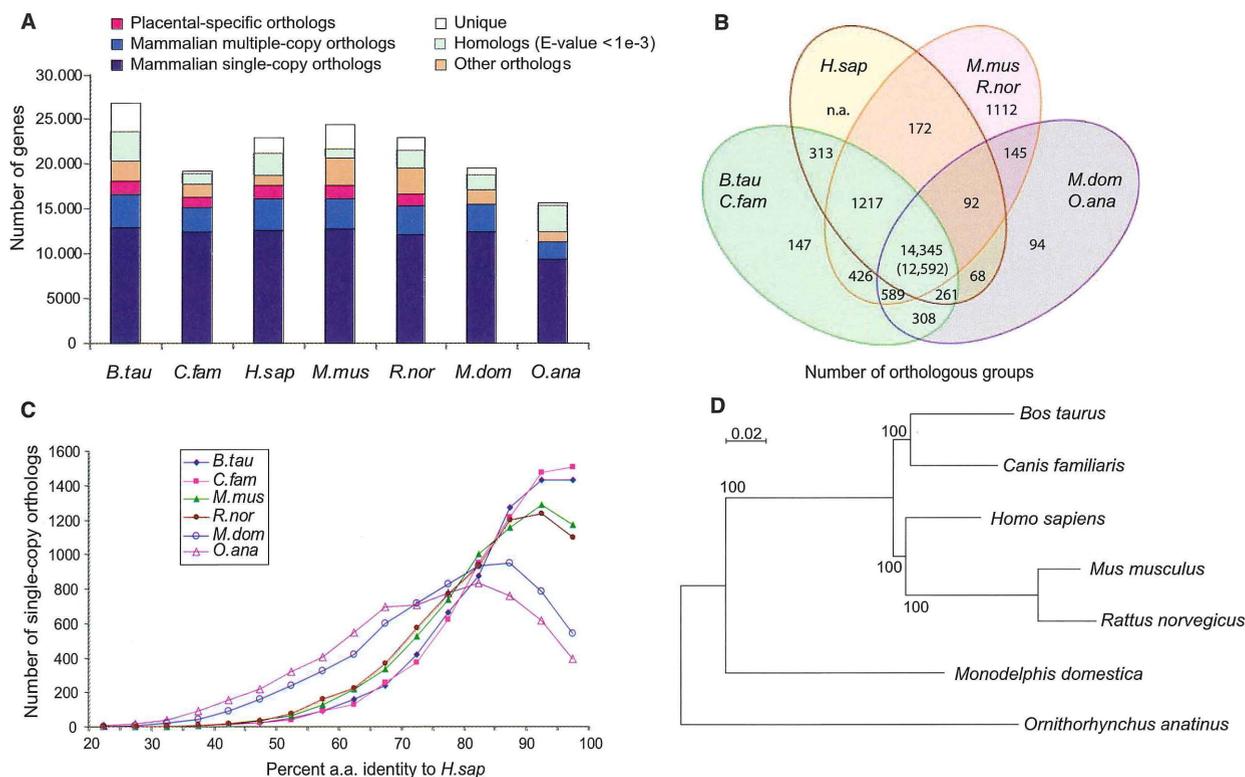


Fig. 1. Protein orthology comparison among genomes of cattle, dog, human, mouse, and rat (*Bos taurus*, *Canis familiaris*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, representing placental mammals), opossum (*Monodelphis domestica*, marsupial), and platypus (*Ornithorhynchus anatinus*, monotreme). **(A)** The majority of mammalian genes are orthologous, with more than half preserved as single copies (dark blue); a few thousand have species-specific duplications (blue); another few thousand have been lost in specific lineages (orange). We also show those lacking confident orthology assignment (green), and those that are apparently lineage specific [unique (white)]. Placental-specific orthologs are shown in pink. Single- or multiple-copy genes were

defined on the basis of representatives in human, bovine, or dog; mouse or rat; and opossum or platypus. **(B)** Venn diagram showing shared orthologous groups (duplicated genes were counted as one) between laurasiatherians (cattle and dog), human, rodents (mouse and rat), and nonplacental mammals (opossum and platypus) on the basis of the presence of a representative gene in at least one of the grouped species [as in (A)]. **(C)** Distribution of ortholog protein identities between human and the other species for a subset of strictly conserved single-copy orthologs. **(D)** A maximum likelihood phylogenetic tree using all single-copy orthologs supports the accepted phylogeny and quantifies the relative rates of molecular evolution expressed as the branch lengths.

REPORTS

consensus sequence of Bov-B, a long interspersed nuclear element (LINE) lacked a functional open reading frame (ORF), which suggested that it was inactive (7). However, Bov-B repeats with intact ORF were identified in the genome, and their phylogeny (fig. S4) indicates that some are still actively expanding and evolving. Mapping chromosomal segments of high- and low-density ancient repeat content, L2/MIR [a LINE/SINE (short interspersed nuclear element) pair] and Bov-B, and more recent repeats, Bov-B/ART2A (Bov-B-derived SINE pair), revealed that the genome consists of ancient regions enriched for L2/MIR and recent regions enriched for Bov-B/ART2A (fig. S7). Exclusion of Bov-B/ART2A from contiguous blocks of ancient repeats suggests that evolution of the ruminant or cattle genome experienced invasions of new repeats into regions lacking ancient repeats. Alternatively, older repeats may have been destroyed by insertion of ruminant- or cattle-specific repeats. AGC trinucleotide repeats, the most common simple-sequence repeat (SSR) in artiodactyls (which include cattle, pigs, and sheep), are 90- and 142-fold overrepresented in cattle compared with human and dog, respectively (fig. S10). Of the

AGC repeats in the cattle genome, 39% were associated with Bov-A2 SINE elements.

A comparative analysis examined the rate of protein evolution and the conservation of gene repertoires among orthologs in the genomes of dog, human, mouse, and rat (representing placental mammals); opossum (marsupial); and platypus (monotreme). Orthology was resolved for >75% of cattle and >80% of human genes (Fig. 1A). There were 14,345 orthologous groups with representatives in human, cattle, or dog; mouse or rat; and opossum or platypus, which represent 16,749 cattle and 16,177 human genes, respectively, of which 12,592 are single-copy orthologs. We also identified 1217 placental mammal-specific orthologous groups with genes present in human, cattle, or dog; mouse or rat; but not opossum or platypus. About 1000 orthologs shared between rodents and laurasiatherians (cattle and dog), many of which encode G protein-coupled receptors, appear to have been lost or may be misannotated in the human genome (Fig. 1B). Gene repertoire conservation among these mammals correlates with conservation at the amino acid-sequence level (Fig. 1C). The elevated rate of evolution in rodents relative to other mammals (8) was supported by the higher amino acid sequence identity between human and dog or cattle proteins relative to that between human and rodent

proteins. However, maximum-likelihood analysis of amino acid substitutions in single-copy orthologs supports the accepted sister lineage relation of primates and rodents (1) (Fig. 1D).

Alternative splicing is a major mechanism for transcript diversification (9), yet the extent of its evolutionary conservation and functional impact remain unclear. We used the cattle genome to analyze the conservation of the most common form of alternative splicing, exon skipping, defined as a triplet of exons in which the middle exon is absent in some transcripts, in a set of 1930 exon-skipping events across human, mouse, dog, and cattle (4). We examined 277 cases, with different conservation patterns between human and mouse, in 16 different cattle tissues with reverse transcription polymerase chain reaction (4). These splicing events were divided into a shared set (163 in both human and mouse) and a nonshared set (114 in human but not in mouse). Of the 277, we detected exon-skipping for 188 cases in cattle (table S5), which suggested that the majority of genes with exon-skipping in human were present and regulated in cattle and that, if an event is shared between human and mouse, it was more likely to be found in cattle. It was estimated that at most 40% of exon-skipping is conserved among mammals; thus, our data agree with the upper bound from previous analyses with human and rodents [e.g., (10)].

We constructed a cattle-human Oxford grid (fig. S12) (4) to conduct synteny-based chromosomal comparisons, which reinforced that human genome organization is more similar to cattle's than rodents' because most cattle chromosomes primarily correspond to part of one human chromosome, albeit with multiple rearrangements [e.g., (11)]. In contrast, the cattle-mouse Oxford grid shows poorer chromosomal correspondence. Lineage-specific evolutionary breakpoints were identified for cattle, artiodactyls, and ferungulates (a group encompassing artiodactyls and carnivores, represented by cattle, pig, and dog) and are shown with cattle (fig. S11) and human sequence coordinates (Fig. 2) (4). Primate, dog, rodent, mouse, and rat lineage-specific breakpoint positions were similarly identified. A total of 124 evolutionary breakpoint regions (EBRs) were identified in the cattle lineage, of which 100 were cattle- or ruminant-specific and 24 were artiodactyl-specific (e.g., Fig. 2). Nine additional EBRs represent presumptive ferungulate-specific rearrangements. *Bos taurus* chromosome 16 (BTA16) is populated with four ferungulate-specific EBRs, which suggests that this region was rearranged before the Artiodactyla and Carnivora divergence (Fig. 2). Such conserved regions demonstrate that many inversions that occurred before the divergence of the carnivores and artiodactyls have probably been retained in the ancestral form within the human genome. In contrast to the cattle genome, a pig physical map identified only 77 lineage-specific EBRs. Interchromosomal rearrangements and inversions characterize most of the lineage-specific rearrangements observed in the cattle, dog, and pig genomes.

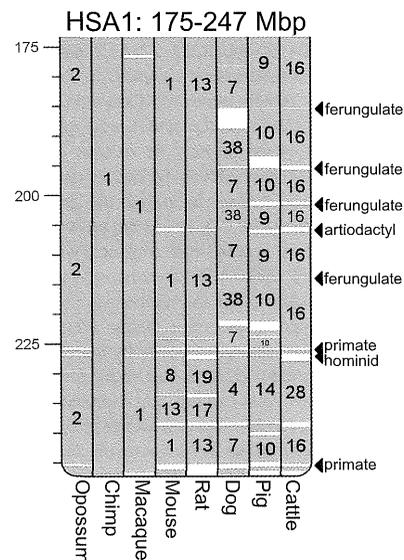


Fig. 2. Examples of EBRs. Ferungulate-, artiodactyl-, and primate-specific EBRs on HSA1 at 175 to 247 Mbp (other lineage-specific EBRs not shown). Homologous synteny blocks constructed for the macaque, chimp, cattle, dog, mouse, rat, and pig genomes were used for pairwise comparisons (4). White areas correspond to EBRs. Arrows to the right of the chromosome ideogram indicate positions of representative cattle-specific; artiodactyl-specific (specific to the chromosomes of pigs and cattle); ferungulate-specific (cattle, dog, and pig); primate-specific (human, macaque, and chimp); and hominoid-specific (human and chimp) rearrangements. Opossum is shown as an outgroup to the eutherian clade, which allows classification of ferungulate-specific EBRs.

Table 1. Changes in the number of genes in innate immune gene families. Many of the β -defensin genes are present in unassigned scaffolds, i.e., they are not yet part of the current assembly. The exact number of β -defensin genes is uncertain. Interferon subfamily pseudogenes predicted on the basis of frame-shift mutations or stop codons within the first 100 amino acids of the coding sequence have been excluded from the table. The IFN χ genes represent a newly discovered subfamily of IFN and are so named for convenience. BPI, Bactericidal and/or permeability-increasing; RNase, ribonuclease; LBP, lipopolysaccharide-binding protein; ULBP, UL16-binding protein.

Gene family	Bovine	Human	Murine
Cathelicidin	10	1	1
RNase	21	13	25
BPI-like	13	9	11
BPI/LBP	3	2	2
β -Defensin	~106	39	52
Interferon subfamilies			
IFNK	1	1	1
IFNE	1	1	1
IFNB	6	1	1
IFNA	13	13	14
IFNW	24	1	0
IFNT	3	0	0
IFNX	3	0	0
IFNL	0	3	2
IFNZ	0	0	2
C-type lysozyme	10	1	3
ULBP ¹	30	3	1

¹(31).

An examination of repeat families and individual transposable elements within cattle-, artiodactyl- and ferungulate-specific EBRs showed a significantly higher density of LINE-L1 elements and the ruminant-specific LINE-RTE repeat family (12) in cattle-specific EBRs relative to the remainder of the cattle genome (table S6). In contrast, the SINE-BovA repeat family and the more ancient tRNA^{Glu}-derived SINE repeats (13) were present in lower density in cattle-specific EBRs, similar to other LINEs and SINEs (table S7). The differences in repeat densities were generally consistent in cattle-, artiodactyl- and ferungulate-specific EBRs, with the exception of the tRNA^{Glu}-derived and LTR-ERV1 repeats, which are at higher densities in artiodactyl EBRs compared with the rest of the genome.

The tRNA^{Glu}-derived SINEs originated in the common ancestor of Suina (pigs and peccaries), Ruminantia, and Cetacea (whales) (13), which suggests that tRNA^{Glu}-derived SINEs were involved in ancestral artiodactyl chromosome rearrangements. Furthermore, the lower density of the more ancient repeat families in cattle-specific EBRs suggests that either more recently arising repeat elements were inserted into regions lacking ancient repeats or that older repeats were destroyed by this insertion (table S7). The repeat elements differing in density in EBRs were also found in regions of homologous synteny, which suggests that repeats may promote evolutionary rearrangements (see below). Differences in repeat density in cattle-specific EBRs are thus unlikely to be caused by the accumulation of repeats in EBRs after such rearrangements occur. We identified a cattle-specific EBR associated with a bidirectional promoter (figs. S14 and S15) that may affect control of the expression of the *CYB5R4* gene, which has been implicated in human diabetes and, therefore, may be important in the regulation of energy flow in cattle (4).

We identified 1020 segmental duplications (SDs) corresponding to 3.1% (94.4 Mbp) of the cattle genome (4). Duplications assigned to a chromosome showed a bipartite distribution with respect to length and percent identity (fig. S16), and interchromosomal duplications were shorter (median length 2.5 kbp) and more divergent (<94% identity) relative to intrachromosomal duplications (median length 20 kbp, ~97% identity) and tended to be locally clustered (fig. S17). Twenty-one of these duplications were >300 kbp and located in regions enriched for tandem duplications (e.g., BTA18) (fig. S18). This pattern is reminiscent of the duplication pattern of the dog, rat, and mouse but different from that of primate and great-ape genomes (14, 15). On average, cattle SDs >10 kbp represent 11.7% of base pairs in 10-kbp intervals located within cattle-specific EBRs and 23.0% of base pairs located within the artiodactyl-specific EBRs. By contrast, in the remainder of the genome sequence assigned to chromosomes the fraction of SDs was 1.7% ($P < 1 \times 10^{-12}$). These data indicate that SDs play a role in promoting chromosome rearrangements by nonallelic homologous recombi-

nation [e.g., (16)] and suggest that either a significant fraction of the SDs observed in cattle occurred before the Ruminant-Suina split, and/or that the sites for accumulation of SDs are non-randomly distributed in artiodactyl genomes.

SDs involving genic regions may give rise to new functional paralogs. Seventy-six percent (778 out of 1020) of the cattle SDs correspond to complete or partial gene duplications with high sequence identity (median 98.7%). This suggests that many of these gene duplications are specific to either the artiodactyla or the *Bos* lineage and tend to encode proteins that often interface with the external environment, particularly immune proteins and sensory and/or olfactory receptors. Several of these gene duplications are also duplicated in other mammalian lineages (e.g., cytochrome P-450, sulfotransferase, ribonuclease A, defensins, and pregnancy-associated glycoproteins). Paralogs located in segmental duplications that are present exclusively in cattle may have functional implications for the unique physiology, environment, and diet of cattle.

An overrepresentation of genes involved in reproduction in cattle SDs (tables S8 and S9) is associated with several gene families expressed in the ruminant placenta. These families encode the intercellular signaling proteins pregnancy-associated glycoproteins (on BTA29), trophoblast Kunitz domain proteins (on BTA13), and interferon tau (*IFNT*) (on BTA8). A gene family encoding prolactin-related proteins (on BTA23) was only identified in the assembly-dependent analysis of SDs. These genes regulate ruminant-specific aspects of fetal growth, maternal adaptations to pregnancy, and the coordination of parturition (17, 18). Although type I interferon (IFN) genes are primarily involved in host defense (19), *IFNT* prevents regression of the corpus luteum during early pregnancy, which results in a uterine environment receptive to early conceptus development (20).

Signatures of positive selection (obtained by measurement of their rates of synonymous and nonsynonymous substitutions) identified 71 genes (4), including 10 immune-related genes (i.e., *IFNAR2*, *IFNG*, *CD34*, *TREMI1*, *TREML1*, *FCERIA*, *IL23R*, *IL24*, *IL15*, and *LEAP2*). As previously mentioned, immune genes are overrepresented in SDs (see Table 1 and fig. S20). Examples of genes varying in cattle relative to mouse include a cluster of β -defensin genes, which encode antimicrobial peptides; the antimicrobial cathelicidin genes [which show increased sequence diversity of the mature cathelicidin peptides (21)]; and changes in the numbers of interferon genes (22) and the number and organization of genes involved in adaptive immune responses in cattle compared with human and mouse (4). This extensive duplication and divergence of genes involved in innate immunity may be because of the substantial load of microorganisms present in the rumen of cattle, which increases the risk of opportunistic infections at mucosal surfaces and positive selection for the traits that enabled stronger and more diversified innate immune responses at these locations. Another possibility is

that immunity may have been under selection due to the herd structure, which can promote rapid disease transmission. Also, immune function-related duplicated genes have gained nonimmune functions, e.g., *IFNT* (see above), and the C-class lysozyme genes, which are involved in microbial degradation in the abomasum (see below).

There has been substantial reorganization of gene families encoding proteins present in milk. One such rearrangement affecting milk composition involves the histatherin (*HSTN*) gene within the casein gene cluster on BTA6 (fig. S21). In the cattle genome, *HSTN* is juxtaposed to a regulatory element (*BCE*) important (23) for β -casein (*CSN2*) expression, and as a probable consequence, *HSTN* is regulated like the casein genes during the lactation cycle. This rearrangement that led to the juxtaposition of *HSTN* next to the *BCE* is also the probable cause of deletion of one of the two copies of α -S2-like casein genes (*CSN1S2A*) present in other mammalian genomes (24). The biological implications of this change in casein gene copy number are not yet clear.

Additionally, the cattle serum amyloid A (*SAA*) gene cluster arose from both a laurasiatherian SD and a cattle-specific EBR, which resulted in two mammary gland-expressed *SAA3*-like genes, *SAA3.1* and *SAA3.2* on BTA29, and an *SAA3*-like gene on BTA15 (fig. S21). *SAA3.2* has been shown to inhibit microbial growth (25). Two additional milk protein genes were associated with SDs: cathelicidin (*CATHL1*) and β_2 -microglobulin (*B2M*)—part of the neonatal Fc receptor (FcRn) that transfers immunoglobulin IgG across epithelial cells of many tissues including the gut and mammary gland (26, 27). IgG is the predominant immunoglobulin in cow's milk compared with IgA in human milk (28). Unlike humans, who acquire passive immunity from the mother via placental transfer of immunoglobulins during pregnancy, calves acquire passive immunity by ingestion of IgG in milk (28). *B2M* is also redistributed in epithelial cells upon calving, and it protects IgG from degradation (26). A genetic variant of *B2M* has negative effects on passive immune transfer (29). The additional copy of the gene encoding *B2M* might be associated with the abundance of IgG in cows' milk and an increased capacity for uptake in the neonatal gut. Considering that the passive transfer of immunity to the calf is one of the important functions of milk, it is striking that lactation-related genes affected by genomic rearrangements often encode immune-related proteins in milk.

Cattle metabolic pathways demonstrated a strong degree of conservation among the comprehensive set of genes involved in core mammalian metabolism (4) and permitted an examination of unique genetic events that may be related to ruminant-specific metabolic adaptations. However, among 1032 genes examined from the human metabolic pathways, five were deleted or extensively diverged in cattle: *PLA2G4C* (phospholipase A2, group IVC), *FAAH2* (fatty acid amide hydrolase 2), *IDI2* (isopentenyl-diphosphate delta isomerase 2), *GSTT2* (glutathione *S*-transferase

theta 2), and *TYMP* (thymidine phosphorylase), which may be adaptations that impact on fatty acid metabolism (*PLA2G4C* and *FAAH2*); the mevalonate pathway (synthesis of dolichols, vitamins, steroid hormones, and cholesterol) (*ID12*); detoxification (*GSTT2*); and pyrimidine metabolism (*TYMP*). Phylogenetic analysis shows that *PLA2G4C* was deleted ~87 to 97 million years ago in the Laurasiatherian lineages (fig. S22). Strikingly, ~20% of the sequences from two abomasum (last chamber of the cattle stomach) EST libraries (a total of 2392 sequences) correspond to three C-type lysozyme genes. Lysozyme primarily functions in animals as an antibacterial protein, which suggests that they probably function in the abomasum (similar to the monogastric stomach) to degrade the cell walls of bacteria entering from the foregut (30). The cattle genome contains 10 C-type lysozyme genes (table S14 and fig. S23), and EST evidence (fig. S23) shows that six of the seven remaining C-type lysozyme genes are expressed primarily in the intestinal tract, which suggests additional roles for the encoded proteins in ruminant digestion.

In summary, the biological systems most affected by changes in the number and organization of genes in the cattle lineage include reproduction, immunity, lactation, and digestion. We highlighted the evolutionary activity associated with chromosomal breakpoint regions and their propensity for promoting gene birth and rearrangement. These changes in the cattle lineage probably reflect metabolic, physiologic, and immune adaptations due to microbial fermentation in the rumen, the herd environment and its influence on disease transmission, and the reproductive strategy of cattle. The cattle genome and associated resources will facilitate the identification of novel functions and regulatory systems of general importance in mammals and may provide an enabling tool for genetic improvement within the beef and dairy industries.

References and Notes

1. W. J. Murphy, P. A. Pevzner, S. J. O'Brien, *Trends Genet.* **20**, 631 (2004).
2. R. L. Wilham, *J. Anim. Sci.* **62**, 1742 (1986).
3. Y. Liu *et al.*, *BMC Genomics* **8**, 180 (2009).
4. Materials, methods, and additional discussion are available on Science online.
5. H. Nilsen *et al.*, *Anim. Genet.* **39**, 97 (2008).
6. A. Prasad *et al.*, *BMC Genomics* **8**, 310 (2007).
7. H. S. Malik, T. H. Eickbush, *Mol. Biol. Evol.* **15**, 1123 (1998).
8. C. I. Wu, W. H. Li, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 1741 (1985).
9. B. Modrek, C. J. Lee, *Nat. Genet.* **34**, 177 (2003).
10. R. Sorek, R. Shamir, G. Ast, *Trends Genet.* **20**, 68 (2004).
11. A. Everts-van der Wind *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 18526 (2005).
12. D. Kordis, F. Gubensek, *Gene* **238**, 171 (1999).
13. M. Shimamura, H. Abe, M. Nikaido, K. Ohshima, N. Okada, *Mol. Biol. Evol.* **16**, 1046 (1999).
14. J. A. Bailey, E. E. Eichler, *Nat. Rev. Genet.* **7**, 552 (2006).
15. J. A. Bailey *et al.*, *Science* **297**, 1003 (2002).
16. W. J. Murphy *et al.*, *Science* **309**, 613 (2005).
17. K. Hashizume *et al.*, *Reprod. Fert. Dev.* **19**, 79 (2007).
18. J. H. Larson *et al.*, *Physiol. Genomics* **25**, 405 (2006).
19. S. Y. Zhang *et al.*, *Immunol. Rev.* **226**, 29 (2008).
20. R. M. Roberts, Y. Chen, T. Ezashi, A. M. Walker, *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**, 170 (2008).
21. M. Scocchi, S. Wang, M. Zanetti, *FEBS Lett.* **417**, 311 (1997).

22. M. G. Katze, Y. He, M. Gale Jr., *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 675 (2002).
23. C. Schmidhauser *et al.*, *Mol. Biol. Cell* **3**, 699 (1992).
24. M. Rijnkels, L. Elnitski, W. Miller, J. M. Rosen, *Genomics* **82**, 417 (2003).
25. A. J. Molenaar *et al.*, *Biomarkers* **14**, 26 (2009).
26. B. Mayer *et al.*, *J. Dairy Res.* **72** (suppl. S1), 107 (2005).
27. D. C. Roopenian, S. Akilesh, *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 715 (2007).
28. T. J. Newby, C. R. Stokes, F. J. Bourne, *Vet. Immunol. Immunopathol.* **3**, 67 (1982).
29. M. L. Clawson *et al.*, *Mamm. Genome* **15**, 227 (2004).
30. D. M. Irwin, *J. Mol. Evol.* **41**, 299 (1995).
31. J. H. Larson *et al.*, *BMC Genomics* **7**, 227 (2006).
32. Funded by the National Human Genome Research Institute (NHGRI US4 HG003273); the U.S. Department of Agriculture's Agricultural Research Service (USDA-ARS agreement no. 59-0790-3-196) and Cooperative State Research, Education, and Extension Service National Research Initiative (grant no. 2004-35216-14163); the state of Texas; Genome Canada through Genome British Columbia; the Alberta Science and Research Authority; the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization of Australia (CSIRO); Agritech Investments Ltd., Dairy Insight, Inc., and AgResearch Ltd., all of New Zealand; the Research Council of Norway; the Kleberg Foundation; and the National, Texas, and South Dakota Beef Check-off Funds. The master accession for this WGS sequencing project is AAF03000000. The individual WGS sequences are AAF03000001 to AAF03131728, and the scaffold records are CM000177 to CM000206 (chromosomes) and DS490632 to DS495890 (unplaced scaffolds).

The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium

Principal Investigator: Richard A. Gibbs¹
Analysis project leadership: Christine G. Elsik,^{2,3} Ross L. Tellam⁴
Sequencing project leadership: Richard A. Gibbs,¹ Donna M. Muzny,¹ George M. Weinstock^{5,1}
Analysis group organization: David L. Adelson,⁶ Evan E. Eichler,^{7,8} Laura Elnitski,⁹ Christine G. Elsik,^{2,3} Roderic Guigó,¹⁰ Debora L. Hamernik,¹¹ Steve M. Kappes,¹² Harris A. Lewin,^{13,14} David J. Lynn,¹⁵ Frank W. Nicholas,¹⁶ Alexandre Reymond,¹⁷ Monique Rijnkels,¹⁸ Loren C. Skow,¹⁹ Ross L. Tellam,⁴ Kim C. Worley,¹ Evgeny M. Zdobnov,^{20,21,22}
Sequencing project white paper: Richard A. Gibbs,¹ Steve M. Kappes,¹² Lawrence Schook,¹³ Loren C. Skow,¹⁹ George M. Weinstock,^{5,1} James Womack²³
Gene prediction and consensus gene set: Tyler Alioto,¹⁰ Stylianos E. Antonarakis,²⁰ Alex Astashyn,²⁴ Charles E. Chapple,¹⁰ Hsiu-Chuan Chen,²⁴ Jacqueline Chrast,¹⁷ Francisco Câmara,¹⁰ Christine G. Elsik,^{2,3} (leader), Olga Ermolaeva,²⁴ Roderic Guigó,¹⁰ Charlotte N. Henrichsen,¹⁷ Wratko Hlavina,²⁴ Yuri Kapustin,²⁴ Boris Kiryutin,²⁴ Paul Kitts,²⁴ Felix Kokocinski,²⁵ Melissa Landrum,²⁴ Donna Maglott,²⁴ Kim Pruitt,²⁴ Alexandre Reymond,¹⁷ Victor Sapojnikov,²⁴ Stephen M. Searle,²⁵ Victor Solovvey,²⁶ Alexandre Souvorov,²⁴ Catherine Ucla,²⁰ George M. Weinstock,^{5,1} Carine Wyss²⁰
Experimental validation of gene set: Tyler Alioto,¹⁰ Stylianos E. Antonarakis,²⁰ Charles E. Chapple,¹⁰ Jacqueline Chrast,¹⁷ Francisco Câmara,¹⁰ Roderic Guigó,¹⁰ (leader), Charlotte N. Henrichsen,¹⁷ Alexandre Reymond,¹⁷ Catherine Ucla,²⁰ Carine Wyss²⁰
MicroRNA analysis: Juan M. Anzola,² Daniel Gerlach,^{20,21} Evgeny M. Zdobnov,^{20,21,22} (leader)
GC composition analysis: Eran Elhaik,^{27,28} Christine G. Elsik,^{2,3} (leader), Dan Graur,²⁷ Justin T. Reese²
Repeat analysis: David L. Adelson⁶ (leader), Robert C. Edgar,²⁹ John C. McEwan,³⁰ Gemma M. Payne,³⁰ Joy M. Raison³¹
Protein ortholog analysis: Thomas Junier,^{19,20} Evgenia V. Kriventseva,³² Evgeny M. Zdobnov,^{20,21,22} (leader)
Exon-skipping analysis: Jacqueline Chrast,¹⁷ Eduardo Eyras,^{33,34} Charlotte N. Henrichsen,¹⁷ Mireya Plass,³⁴ Alexandre Reymond¹⁷ (leader)
Evolutionary breakpoint analysis and Oxford grid: Ravikiran Donthu,¹³ Denis M. Larkin,^{13,14} Harris A. Lewin,^{13,14} (leader), Frank W. Nicholas¹⁶
Bidirectional promoter analysis: Laura Elnitski⁹ (leader), Denis M. Larkin,^{13,14} Harris A. Lewin,^{13,14} James Reay,³⁵ Mary Q. Yang⁹
Segmental duplication analysis: David L. Adelson,⁶ Lin Chen,⁷ Ze Cheng,⁷ Carol G. Chitko-McKown,³⁶ Evan E. Eichler,^{7,8} (leader), Laura Elnitski,⁹ Christine G. Elsik,^{2,3} George E. Liu,³⁷ Lakshmi K. Matukumalli,^{38,37} Jiuzhou Song,³⁹ Bin Zhu³⁹
Analysis of gene ontology in segmental duplications: Christine G.

Elsik,^{2,3} David J. Lynn¹⁵ (leader), Justin T. Reese²
Adaptive evolution: Daniel G. Bradley,⁴⁰ Fiona S.L. Brinkman,¹⁵ Lilian P.L. Lau,⁴⁰ David J. Lynn¹⁵ (leader), Matthew D. Whiteside¹⁵
Innate immunity: Ross L. Tellam⁴ (leader), Angela Walker,⁴¹ Thomas T. Wheeler⁴²
Lactation: Theresa Casey,⁴³ Bruce German,^{44,45} Danielle G. Lemay,⁴⁵ David J. Lynn,¹⁵ Nauman J. Maqbool,⁴⁶ Adrian J. Molenaar,⁴² Monique Rijnkels¹⁸ (leader)
Metabolism: Harris A. Lewin^{13,14} (leader), Seongwon Seo,⁴⁷ Paul Stothard⁴⁸
Adaptive immunity: Cynthia L. Baldwin,⁴⁹ Rebecca Baxter,⁵⁰ Candice L. Brinkmeyer-Langford,¹⁹ Wendy C. Brown,⁵¹ Christopher P. Childers,² Timothy Connelley,⁵² Shirley A. Ellis,⁵³ Krista Fritz,¹⁹ Elizabeth J. Glass,⁵⁰ Carolyn T.A. Herzig,⁴⁹ Antti Iivanainen,⁵⁴ Kevin K. Lahmers,⁵¹ Loren C. Skow¹⁹ (leader)
Annotation data management: Anna K. Bennett,² Christopher P. Childers,² C. Michael Dickens,³ Christine G. Elsik,^{2,3} (leader), James G.R. Gilbert,²⁵ Darren E. Hagen,² Justin T. Reese,² Hanni Salih³
Manual annotation organization: Jan Aerts,⁵⁵ Alexandre R. Caetano,⁵⁶ Brian Dalrymple,⁴ Christine G. Elsik,^{2,3} Jose Fernando Garcia,⁵⁷ Richard A. Gibbs,¹ Clare A. Gill,^{3,58} Debora L. Hamernik,¹¹ Stefan G. Hiendleder,⁵⁹ Erdogan Memili,⁶⁰ Frank W. Nicholas,¹⁶ James Reay,³⁵ Monique Rijnkels,¹⁸ Loren C. Skow,¹⁹ Diane Spurlock,³⁵ Paul Stothard,⁴⁸ Ross L. Tellam,⁴ George M. Weinstock,^{5,1} John L. Williams,⁶¹ Kim C. Worley¹
cDNA tissues, libraries, and sequencing: Lee Alexander,⁶² Michael J. Brownstein,⁶³ Leluo Guan,⁶⁴ Robert A. Holt⁶⁴ (leader), Steven J.M. Jones⁶⁴ (leader), Marco A. Marra⁶⁴ (leader), Richard Moore,⁶⁴ Stephen S. Moore⁴⁸ (leader), Andy Roberts,⁶² Masaaki Taniguchi,^{65,48} Richard C. Waterman⁶²
Genome sequence production: Joseph Chacko,¹ Mimi H. Chandrabose,¹ Andy Cree¹ (leader), Marvin Diep Dao,¹ Huyen H. Dinh¹ (leader), Ramatu Ayiesha Gabisi,¹ Sandra Hines,¹ Jennifer Hume¹ (leader), Shalini N. Jhangiani,¹ Vandita Joshi,¹ Christie L. Kovar¹ (leader), Lora R. Lewis,¹ Yih-shin Liu,¹ John Lopez,¹ Margaret B. Morgan,¹ Donna M. Muzny¹ (leader), Ngoc Bich Nguyen,¹ Geoffrey O. Okwuonu,¹ San Juana Ruiz,¹ Jireh Santibanez,¹ Rita A. Wright¹
Sequence finishing: Christian Buhay¹ (leader), Yan Ding,¹ Shannon Dugan-Rocha¹ (leader), Judith Herdandez,¹ Michael Holder,¹ Aniko Sabo¹
Automated BAC assembly: Amy Egan,¹ Jason Goodell,¹ Katarzyna Wilczek-Boney¹
Sequence production informatics: Gerald R. Fowler¹ (leader), Matthew Edward Hitchens,¹ Ryan J. Lozado,¹ Charles Moen,¹ David Steffen,^{66,1} James T. Warren,¹ Jingkun Zhang¹
BAC mapping: Readman Chiu,⁶⁴ Steven J.M. Jones,⁶⁴ Marco A. Marra⁶⁴ (leader), Jacqueline E. Schein⁶⁴
Genome assembly: K. James Durbin,^{67,1} Paul Havlak,^{68,1} Huaiyang Jiang,¹ Yue Liu,¹ Xiang Qin,¹ Yanru Ren,¹ Yufeng Shen,^{1,69} Henry Song,¹ George M. Weinstock,^{5,1} Kim C. Worley¹ (leader)
Sequence library production: Stephanie Nicole Bell,¹ Clay Davis,¹ Angela Jolivet Johnson,¹ Sandra Lee,¹ Lynne V. Nazareth¹ (leader), Bella Mayurkumar Patel,¹ Ling-Ling Pu,¹ Selina Vattathil,¹ Rex Lee Williams Jr.¹
BAC production: Stacey Curry,¹ Cerissa Hamilton,¹ Erica Sodergren^{5,1} (leader)
Sequence variation detection: Lynne V. Nazareth,¹ David A. Wheeler¹
Markers and mapping: David L. Adelson,⁶ Jan Aerts,⁵⁵ Wes Barris,⁴ Gary L. Bennett,³⁶ Brian Dalrymple,⁴ André Eggen,⁷⁰ Clare A. Gill,^{3,58} Ronnie D. Green,⁷¹ Gregory P. Harhay,³⁶ Matthew Hobbs,⁷² Oliver Jann,⁵⁰ Steve M. Kappes,¹² (leader), John W. Keele,³⁶ Matthew P. Kent,⁷³ Denis M. Larkin,^{13,14} Harris A. Lewin,^{13,14} Sigbjørn Lien,⁷³ John C. McEwan,³⁰ Stephanie D. McKay,⁷⁴ Sean McWilliam,⁴ Stephen S. Moore,⁴⁸ Frank W. Nicholas,¹⁶ Gemma M. Payne,³⁰ Abhirami Ratnakumar,^{75,4} Hanni Salih,³ Robert D. Schnabel,⁷⁴ Timothy Smith,³⁶ Warren M. Snelling,³⁶ Tad S. Sonstegard,³⁷ Roger T. Stone,³⁶ Yoshikazu Sugimoto,⁷⁶ Akiko Takasuga,⁷⁶ Jeremy F. Taylor,⁷⁴ Ross L. Tellam,⁴ Curtis P. Van Tassel,²⁷ John L. Williams,⁶¹
Genomic DNA: Michael D. MacNeil⁶²
Manual annotation: Antonio R.R. Abatepaulo,⁷⁷ Colette A. Abbey,³ Jan Aerts,⁵⁵ Virpi Ahola,⁷⁸ Iassudara G. Almeida,⁵⁷ Ariel F. Amadio,⁷⁹ Elen Anatriello,⁷⁷ Suria M. Bahadue,² Cynthia L. Baldwin,⁴⁹ Rebecca Baxter,⁵⁰ Anna K. Bennett,² Fernando H. Biase,¹³ Clayton R. Boldt,³ Candice L. Brinkmeyer-Langford,¹⁹ Wendy C. Brown,⁵¹ Alexandre R. Caetano,⁵⁶ Jeffery A. Carroll,⁸⁰ Wanessa A. Carvalho,⁷⁷ Theresa Casey,⁴³ Eliane P. Cavelatti,⁵⁷ Elsa Chacko,⁸¹ Jennifer E. Chapin,³ Yeh Cheng,³⁵ Christopher P. Childers,² Jungwoo Choi,³ Adam J. Colley,⁸² Timothy Connelley,⁵² Tatiana A. de Campos,⁵⁶ Marcos De Donato,⁸³

Isabel K.F. de Miranda Santos,^{56,77} Carlo J.F. de Oliveira,⁷⁷ Heather Deobald,⁸⁴ Eye Devinoy,⁸⁵ C. Michael Dickens,³ Kaitlin E. Donohue,² Peter Dovic,⁸⁶ Annett Eberlein,⁸⁷ Shirley A. Ellis,⁵³ Carolyn J. Fitzsimmons,⁵⁹ Alessandra M. Frantz,⁷⁷ Krista Fritz,¹⁹ Gustavo R. Garcia,⁷⁷ Jose Fernando Garcia,⁵⁷ Sem Genini,⁶¹ J. Bruce German,^{44,45} James G.R. Gilbert,²⁵ Clare A. Gill,^{3,58} Cody J. Gladney,³ Elizabeth J. Glass,⁵⁰ Jason R. Grant,⁴⁸ Marion L. Greaser,⁸⁸ Jonathan A. Green,⁷⁴ Darryl L. Hadsell,³⁸ Darren E. Hagen,² Hatam A. Hakimov,⁸⁹ Rob Halgren,⁴³ Jennifer L. Harrow,²⁵ Elizabeth A. Hart,²⁵ Nicola Hastings,^{90,50} Marta Hernandez,⁹¹ Carolyn T.A. Herzig,⁴⁹ Stefan G. Hiendleder,⁵⁹ Matthew Hobbs,⁷² Zhi-Liang Hu,³⁵ Antti Iivanainen,⁵⁴ Aaron Ingham,⁴ Terhi Iso-Touru,⁷⁸ Catherine Jamis,² Oliver Jann,⁵⁰ Kirsty Jensen,⁵⁰ Dimos Kapetis,⁶¹ Tovah Kerr,⁵¹ Sari S. Khalil,² Hasan Khatib,⁹² Davood Kolbehani,^{48,93} Charu G. Kumar,¹³ Dinesh Kumar,^{94,35} Richard Leach,⁵⁰ Justin C-M Lee,² Danielle G. Lemay,⁴⁵ Changxi Li,^{95,48} George E. Liu,³⁷ Krystin M. Logan,⁹⁶ Roberto Malinverni,⁶¹ Nauman J. Maqbool,⁴⁶ Elisa Marques,⁴⁸ William F. Martin,⁴⁵ Natalia F. Martins,⁵⁶ Sandra R. Maruyama,⁷⁷ Raffaele Mazza,⁹⁷ Kim L. McLean,⁸⁴ Juan F. Medrano,⁹⁸ Erdogan Memili,⁶⁰ Adrian J. Molenaar,⁴² Barbara T. Moreno,⁵⁷ Daniela D. More,⁷⁷ Carl T. Muntean,³ Hari P. Nandakumar,¹⁹ Marcelo F.G. Nogueira,⁹⁹ Ingrid Olsaker,¹⁰⁰ Sameer D. Pant,⁸² Francesca Panzitta,⁶¹ Rosemeire C.P. Pastor,⁵⁷ Mario A. Poli,¹⁰¹ Nathan Poslusny,² Satyanarayana Rachagan,³⁵ Shoba Ranganathan,^{81,102} Andrej Razpet,⁸⁶ James Reecy,³⁵ Penny K. Riggs,^{3,58} Monique Rijinks,³⁸ Gonzalo Rincon,⁹⁸ Nelida Rodriguez-Osorio,^{60,103} Sandra L. Rodriguez-Zas,¹³ Natasha E. Romero,² Anne Rosenwald,² Lillian Sando,⁴ Sheila M. Schmutz,⁸⁴ Seongwon Seo,⁴⁷ Libing Shen,² Laura Sherman,⁴⁸ Loren C. Skow,¹⁹ Bruce R. Southey,¹⁰⁴ Diane Spurlock,³⁵ Yva Strandberg Lutzow,⁴ Jonathan W. Sweedler,¹⁰⁴ Imke Tammen,⁷² Masaaki Taniguchi,^{65,48} Rori L. Tellam,⁴ Bhanu Prakash V.L. Telugu,⁷¹ Jennifer M. Urbanski,² Yuri T. Utsumiya,⁸⁷ Chris P. Verschoor,⁸² Ashley J. Waardenberg,^{4,105} Angela Walker,⁷¹ Zhiqun Wang,⁸⁸ Robert Ward,¹⁰⁶ Rosemarie Weikard,⁸⁷ Thomas H. Welsh Jr.,^{3,58} Thomas T. Wheeler,¹² Stephen N. White,^{51,107} John L. Williams,⁶¹ Laurens G. Wilming,²⁵ Kris R. Wunderlich,³ Jianqi Yang,¹⁰⁸ Feng-Qi Zhao¹⁰⁹

¹Human Genome Sequencing Center, Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030, USA. ²Department of Biology, 406 Reiss, Georgetown University, 37th & O Streets NW, Washington, DC 20057, USA. ³Department of Animal Science, Texas A&M University, 2471 TAMU, College Station, TX 77843-2471, USA. ⁴Livestock Industries, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), 306 Carmody Road, St. Lucia, Queensland, 4067, Australia. ⁵The Genome Center at Washington University, Washington University School of Medicine, 4444 Forest Park Avenue, St. Louis, MO 63108, USA. ⁶School of Molecular and Biomedical Science, School of Agriculture, Food and Wine, The University of Adelaide, Adelaide, SA, 5005, Australia. ⁷Department of Genome Sciences, University of Washington, 1705 NE Pacific Street, Seattle, WA 98195-5065, USA. ⁸Howard Hughes Medical Institute, Seattle, WA 98195, USA. ⁹National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, 5625 Fishers Lane, Rockville, MD 20878, USA. ¹⁰Center for Genomic Regulation and Grup de Recerca en Informàtica Biomèdica, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Universitat Pompeu Fabra, 08003 Barcelona, Catalonia, Spain. ¹¹U.S. Department of Agriculture (USDA), Cooperative State Research, Education, & Extension Service, 1400 Independence Avenue SW, Stop 2220, Washington, DC 20250-2220, USA. ¹²National Program Staff, USDA-Agricultural Research Service, 5601 Sunnyside Avenue, Beltsville, MD 20705, USA. ¹³Department of Animal Sciences, University of Illinois at Urbana-Champaign, 1201 West Gregory Drive, Urbana, IL 61801, USA. ¹⁴Institute for Genomic Biology, University of Illinois at Urbana-Champaign, 1201 West Gregory Drive, Urbana, IL 61801, USA. ¹⁵Department of Molecular Biology and Biochemistry, Simon Fraser University, 8888 University Drive, Burnaby, BC, V5A 1S6, Canada. ¹⁶Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, Sydney, NSW, 2006, Australia. ¹⁷Center for Integrative Genomics, University of Lausanne, Lausanne, 1015, Switzerland. ¹⁸Children's Nutrition Research Center, USDA-Agricultural Research Service, Department of Pediatrics-Nutrition, Baylor College of Medicine, 1100 Bates Street, Houston, TX 77030-2600, USA. ¹⁹Department of Veterinary Integrative Biosciences, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA. ²⁰Department of Genetic Medicine and Development, University of Geneva Medical School, 1 rue Michel-Servet,

Geneva, 1211, Switzerland. ²¹Swiss Institute of Bioinformatics, 1 rue Michel-Servet, Geneva, 1211, Switzerland. ²²Division of Molecular Biosciences, Imperial College London, South Kensington Campus, London, SW7 2AZ, UK. ²³Department of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA. ²⁴National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892, USA. ²⁵Informatics Department, Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, CB10 1HH, UK. ²⁶Department of Computer Science, University of London, Royal Holloway, Egham, Surrey, TW20 OEX, UK. ²⁷Department of Biology and Biochemistry, University of Houston, Houston, TX 77204, USA. ²⁸McKusick—Nathans Institute of Genetic Medicine, BRB 579, Johns Hopkins University School of Medicine, 733 North Broadway, Baltimore, MD 21205, USA. ²⁹45 Monterey Drive, Tiburon, CA 94920, USA. ³⁰Animal Genomics, AgResearch, Invermay, PB 50034, Mosgiel, 9053, New Zealand. ³¹Research SA, University of Adelaide, North Terrace, Adelaide, SA, 5005, Australia. ³²Department of Structural Biology and Bioinformatics, University of Geneva Medical School, 1 rue Michel-Servet, Geneva, 1211, Switzerland. ³³Catalan Institution for Research and Advanced Studies, 08010 Barcelona, Catalonia, Spain. ³⁴Computational Genomics, Universitat Pompeu Fabra, 08003 Barcelona, Catalonia, Spain. ³⁵Department of Animal Science, Iowa State University, 2255 Kildee Hall, Ames, IA 50011-3150, USA. ³⁶Meat Animal Research Center, USDA-Agricultural Research Service, Clay Center, NE 68933, USA. ³⁷Bovine Functional Genomics Laboratory, USDA-Agricultural Research Service, Beltsville Agricultural Research Center (BARC)—East, Beltsville, MD 20705, USA. ³⁸Department of Bioinformatics and Computational Biology, George Mason University, 10900 University Blvd, Manassas, VA 20110, USA. ³⁹Department of Bioengineering, University of Maryland, College Park, MD 20742, USA. ⁴⁰Merfitt Institute of Genetics, Trinity College Dublin, Dublin 2, Ireland. ⁴¹Department of Veterinary Pathobiology, 245 Bond Life Sciences Center, University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA. ⁴²Dairy Science and Technology Section, AgResearch, Ruakura Research Centre, East Street, Private Bag 3123, Hamilton, 3240, New Zealand. ⁴³Department of Animal Science, Michigan State University, East Lansing, MI 48824-1225, USA. ⁴⁴Nestlé Research Centre, Vers chez les Blancs CH, Lausanne 26, 1000, Switzerland. ⁴⁵Department of Food Science and Technology, University of California—Davis, Davis, CA 95616, USA. ⁴⁶Bioinformatics, Mathematics and Statistics, AgResearch, Ruakura Research Centre, East Street, Private Bag 3123, Hamilton, 3240, New Zealand. ⁴⁷Division of Animal Science and Resource, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea. ⁴⁸Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta, 410 AgFor Centre, Edmonton, AL, T6G 2P5, Canada. ⁴⁹Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Massachusetts, Amherst, MA 01003, USA. ⁵⁰The Roslin Institute and Royal (Dick) School of Veterinary Studies, University of Edinburgh, Roslin, Midlothian, EH25 9PS, UK. ⁵¹Department of Veterinary Microbiology and Pathology, Washington State University, Pullman, WA 99164, USA. ⁵²Division of Infection and Immunity, The Roslin Institute, Royal (Dick) School of Veterinary Science, University of Edinburgh, Roslin, Midlothian, EH25 9RG, UK. ⁵³Immunology Division, Institute for Animal Health, Compton, RG20 7NN, UK. ⁵⁴Department of Basic Veterinary Sciences, University of Helsinki, Post Office Box 66, Helsinki, FIN-00014, Finland. ⁵⁵Genome Dynamics and Evolution, Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, CB10 1SA, UK. ⁵⁶Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Final Avenida W5 Norte, Brasília, DF, 70770-900, Brazil. ⁵⁷Animal Production and Health Department, UNESP—Sao Paulo State University, Aracatuba, SP, 16050-680, Brazil. ⁵⁸Texas AgriLife Research, College Station, TX 77843, USA. ⁵⁹J. Davies Epigenetics and Genetics Group, School of Agriculture, Food & Wine and Research Centre for Reproductive Health, The University of Adelaide, Roseworthy Campus, Roseworthy, SA, 5371, Australia. ⁶⁰Department of Animal and Dairy Sciences, Mississippi Agricultural and Forestry Experiment Station, Mississippi State University, Mississippi State, MS 39762, USA. ⁶¹Parco Tecnologico Padano, Via Einstein, Polo Universitario, Lodi, 26900, Italy. ⁶²Fort Keogh Livestock and Range Research Laboratory, USDA-Agricultural Research Service, Miles City, MT 59301, USA. ⁶³Laboratory of Genetics, National Institute of Mental Health, NIH, Building 49, B1EE16, 49 Convent Drive, Bethesda, MD

20892, USA. ⁶⁴Genome Sciences Centre, British Columbia Cancer Agency, 675 West 10th Avenue, Vancouver, BC, V5Z 1L3, Canada. ⁶⁵Division of Animal Sciences, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki, 305-8602, Japan. ⁶⁶Bioinformatics Research Center, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030, USA. ⁶⁷Department of Biomolecular Engineering, University of California at Santa Cruz, Santa Cruz, CA 95064, USA. ⁶⁸Department of Computer Science, University of Houston, Houston, TX 77204-3010, USA. ⁶⁹Department of Computer Science and Center for Computational Biology and Bioinformatics, Columbia University, New York, NY 10032, USA. ⁷⁰NRA, Animal Genetics and Integrative Biology, Bovine Genetics and Genomics, 78350 Jouy-en-Josas, France. ⁷¹Pfizer Animal Genetics, Pfizer Animal Health, New York, NY 10017, USA. ⁷²Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, Camden, NSW, 2570, Australia. ⁷³Centre for Integrative Genetics and Department of Animal and Aquacultural Sciences, Norwegian University of Life Sciences, Arbotveien 6, Ås, 1432, Norway. ⁷⁴Division of Animal Sciences, University of Missouri, 920 East Campus Drive, Columbia, MO 65211, USA. ⁷⁵Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University, Uppsala Biomedical Center Husargatan 3, Uppsala, 75 123, Sweden. ⁷⁶Shirakawa Institute of Animal Genetics, Nishigo, Fukushima 961-8061, Japan. ⁷⁷Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Av Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil. ⁷⁸Biotechnology and Food Research, MTT Agrifood Research Finland, Jokioinen, FI-31600, Finland. ⁷⁹EEA Rafaela, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Ruta 34 Km 227, Rafaela, Santa Fe, 2300, Argentina. ⁸⁰Livestock Issues Research Unit, USDA-Agricultural Research Service, Lubbock, TX 79403, USA. ⁸¹Department of Chemistry and Biomolecular Sciences & ARC Centre of Excellence in Bioinformatics, Macquarie University, Sydney, 2109, NSW, Australia. ⁸²Department of Animal and Poultry Science, University of Guelph, Guelph, ON, N1G2W1, Canada. ⁸³Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Universidad de Oriente, Avenida Universidad, Cumana, Sucre, 6101, Venezuela. ⁸⁴Department of Animal and Poultry Science, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, S7N 5A8, Canada. ⁸⁵INRA-UR1196, Génétique et Physiologie de la Lactation, F78352 Jouy-en-Josas, France. ⁸⁶Department of Animal Science, University of Ljubljana, Groblje 3, Domžale, SI-1230, Slovenia. ⁸⁷Research Unit Molecular Biology, Research Institute for the Biology of Farm Animals (FBN), Dummerstorf, 18196, Germany. ⁸⁸Department of Animal Sciences, University of Wisconsin—Madison, 1805 Linden Drive, Madison, WI 53706, USA. ⁸⁹Department of Molecular and Cellular Biology, University of Guelph, Guelph, ON, N1G 2W1, Canada. ⁹⁰Cell Biology and Biophysics, European Molecular Biology Laboratory (EMBL)—Heidelberg, Meyerhofstrasse 1, Heidelberg, Germany. ⁹¹Laboratory of Molecular Biology, Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACYL), Carretera de Burgos km 119, Valladolid, 47071, Spain. ⁹²Department of Dairy Science, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, USA. ⁹³Monsanto Company, 3302 SE Convenience Blvd, Ankeny, IA 50021, USA. ⁹⁴Genes & Genetic Resources Molecular Analysis Lab, National Bureau of Animal Genetic Resources, Baldi Bye Pass, Karnal, Haryana, 132001, India. ⁹⁵Lacombe Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Lacombe, AL, T4L 1W1, Canada. ⁹⁶Biomedical Sciences, University of Guelph, Guelph, ON, N1G 2W6, Canada. ⁹⁷Zootechnics Institute, Università Cattolica del Sacro Cuore, via Emilia Parmense 84, Piacenza, 29100, Italy. ⁹⁸Department of Animal Science, University of California at Davis, One Shields Avenue, Davis, CA 95616, USA. ⁹⁹Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras, UNESP—São Paulo State University, Av Dom Antônio 2100, Vila Tênis Clube, Assis, SP, 19806-900, Brazil. ¹⁰⁰Department of Basic Sciences and Aquatic Medicine, Norwegian School of Veterinary Science, Post Office Box 8146 Dep, Oslo, NO-0033, Norway. ¹⁰¹Instituto de Genética Ewald Favret, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Las Cabañas y de Los Reseros s/n CC25, Castelar, Buenos Aires, B1712WAA, Argentina. ¹⁰²Department of Biochemistry, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, 8 Medical Drive, Singapore, 117597, Singapore. ¹⁰³Grupo CENTAURO, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. ¹⁰⁴Department of Chemistry, University of Illinois, Urbana, IL 61801, USA. ¹⁰⁵Eskitis Institute for Cell and Molecular Therapies, Griffith University, Nathan, QLD, 4111, Australia.

¹⁰⁶Nutrition and Food Sciences, Utah State University, Logan, UT 84322, USA. ¹⁰⁷Animal Disease Research Unit, USDA—Agricultural Research Service, Pullman, WA 99164, USA. ¹⁰⁸Department of Pharmacology, 2-344 BSB, University of Iowa, 51 Newton Road, Iowa City, IA 52242, USA. ¹⁰⁹Department of Animal Science, 211 Terrill, Uni-

versity of Vermont, 570 Main Street, Burlington, VT 05405, USA.

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/324/5926/522/DC1
Materials and Methods

Figs. S1 to S23
Tables S1 to S14
References

10 December 2008; accepted 16 March 2009
10.1126/science.1169588

Genome-Wide Survey of SNP Variation Uncovers the Genetic Structure of Cattle Breeds

The Bovine HapMap Consortium*

The imprints of domestication and breed development on the genomes of livestock likely differ from those of companion animals. A deep draft sequence assembly of shotgun reads from a single Hereford female and comparative sequences sampled from six additional breeds were used to develop probes to interrogate 37,470 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in 497 cattle from 19 geographically and biologically diverse breeds. These data show that cattle have undergone a rapid recent decrease in effective population size from a very large ancestral population, possibly due to bottlenecks associated with domestication, selection, and breed formation. Domestication and artificial selection appear to have left detectable signatures of selection within the cattle genome, yet the current levels of diversity within breeds are at least as great as exists within humans.

The emergence of modern civilization was accompanied by adaptation, assimilation, and interbreeding of captive animals. In cattle (*Bos taurus*), this resulted in the develop-

ment of individual breeds differing in, for example, milk yield, meat quality, draft ability, and tolerance or resistance to disease and pests. However, despite mapping and diversity studies (1–5) and the identification of mutations affecting some quantitative phenotypes (6–8), the detailed genetic structure and history of cattle are not known.

Cattle occur as two major geographic types, the taurine (humpless—European, African, and Asian) and indicine (humped—South Asian, and East African), which diverged >250 thousand years ago (Kya) (3). We sampled individuals representing 14 taurine ($n = 376$), three indicine ($n = 73$) (table S1), and two hybrid breeds ($n = 48$), as well as two individuals each of *Bubalus quarlesi* and *Bubalus bubalis*, which diverged from *Bos taurus* ~1.25 to 2.0 Mya (9, 10). All breeds except Red Angus ($n = 12$) were represented by at least 24 individuals. We preferred individuals that were unrelated for ≥ 4 generations; however, each breed had one or two sire, dam, and progeny trios to allow assessment of genotype quality.

Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) that were polymorphic in many populations were primarily derived by comparing whole-genome sequence reads representing five taurine and one indicine breed to the reference genome assembly obtained from a Hereford cow (10) (table S2). This led to the ascertainment of SNPs with high minor allele frequencies (MAFs) within the discovery breeds (table S5). Thus, as expected, with trio progeny removed, SNPs discovered within the taurine breeds had higher average MAFs

*The full list of authors with their contributions and affiliations is included at the end of the manuscript.

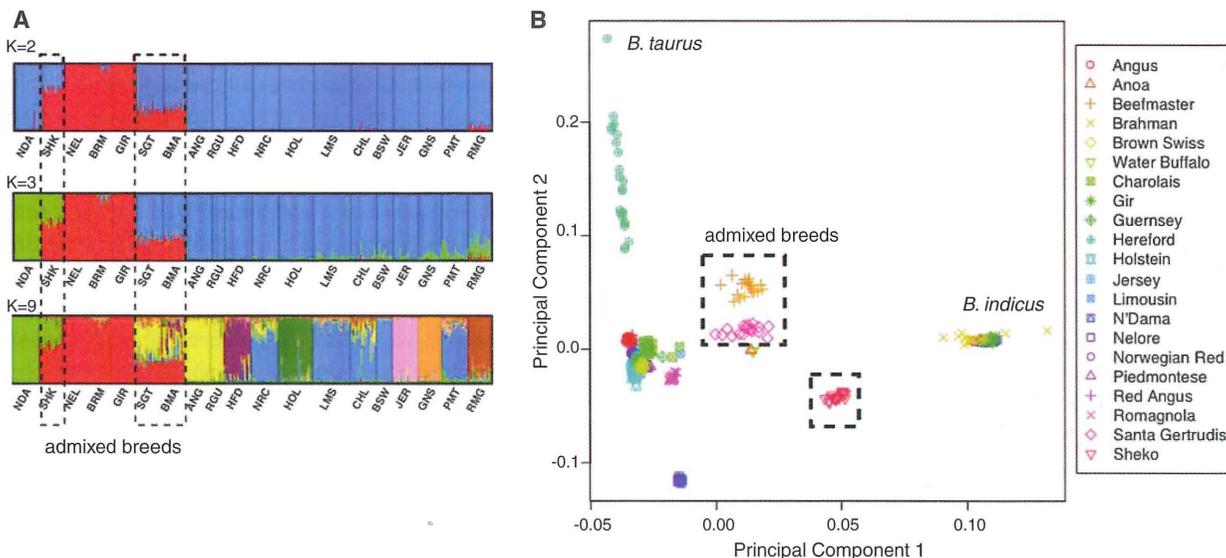
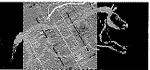


Fig. 1. (A) Population structure assessed by InStruct. Bar plot, generated by DISTRICT, depicts classifications with the highest probability under the model that assumes independent allele frequencies and inbreeding coefficients among assumed clusters. Each individual is represented by a vertical bar, often partitioned into colored segments with the length of each segment representing the proportion of the individual's genome from $K = 2, 3,$ or 9 ancestral populations. Breeds are separated by black

lines. NDA, N'Dama; SHK, Sheko; NEL, Nelore; BRM, Brahma; GIR, Gir; SGT, Santa Gertrudis; BMA, Beefmaster; ANG, Angus; RGU, Red Angus; HFD, Hereford; NRC, Norwegian Red; HOL, Holstein; LMS, Limousin; CHL, Charolais; BSW, Brown Swiss; JER, Jersey; GNS, Guernsey; PMT, Piedmontese; Red Angus; Romagnola. **(B)** Principal components PC1 and PC2 from all SNPs. Taurine breeds remain separated from indicine breeds, and admixed breeds are intermediate.



Identification of a 3.7-Mb region for a marbling QTL on bovine chromosome 4 by identical-by-descent and association analysis

K. Yokouchi*, Y. Mizoguchi*[†], T. Watanabe*, E. Iwamoto[‡], Y. Sugimoto* and A. Takasuga*

*Shirakawa Institute of Animal Genetics, Odakura, Nishigo, Fukushima 961-8061, Japan. [†]Meiji University, Higashi-Mita, Tama-ku, Kawasaki-shi 214-8571, Japan. [‡]Hyogo Prefectural Institute of Agriculture, Forestry & Fisheries, Kasai, Hyogo 679-0198, Japan

Summary

QTL mapping for growth and carcass traits was performed using a paternal half-sib family composed of 325 Japanese Black cattle offspring. Nine QTL were detected at the 1% chromosome-wise significance level at a false discovery rate of less than 0.1. These included two QTL for marbling on BTA 4 and 18, two QTL for carcass weight on BTA 14 and 24, two QTL for longissimus muscle area on BTA 1 and 4, two QTL for subcutaneous fat thickness on BTA 1 and 15 and one QTL for rib thickness on BTA 6. Although the marbling QTL on BTA 4 has been replicated with significant linkages in two Japanese Black cattle sires, the three *Q* (more marbling) haplotypes, each inherited maternally, were apparently different. To compare the three *Q* haplotypes in more detail, high-density microsatellite markers for the overlapping regions were developed within the 95% CIs (65 markers in 44–78 cM). A detailed haplotype comparison indicated that a small region (<3.7 Mb) around 46 cM was shared between the *Q*s of the two sires, whose dams were related. An association of this region with marbling was shown by a regression analysis using the local population, in which the two sires were produced and this was confirmed by an association study using a population collected throughout Japan. These results strongly suggest that the marbling QTL on BTA 4 is located in the 3.7-Mb region at around 46 cM.

Keywords identical-by-descent, intramuscular fat deposition, quantitative trait loci.

Introduction

Marbling as a form of intramuscular fat deposition is an important economic trait that is related to beef quality. The regulation mechanisms and the genes involved in marbling are not clear, but quantitative trait locus (QTL) mapping is expected to be an effective method for detecting the genomic region responsible for marbling. Significant QTL with marbling were recently detected on BTA 4, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 20 and 21 in Japanese Black cattle (Mizoshita *et al.* 2004; Mizoguchi *et al.* 2006; Takasuga *et al.* 2007), based on a progeny design (Weller *et al.* 1990; Moody *et al.* 1997). An identical-by-descent (IBD) haplotype of *Q* (more marbling) or *q* (less marbling) was detected for the QTL on BTA 4, 6 and 10, but these IBD haplotypes were too long (>20 cM) for positional cloning or a candidate gene approach. On the

other hand, a carcass weight QTL on BTA 14 (*CW-1*) was mapped in seven half-sib families whose superior *Q* haplotypes were clustered into two groups, each spanning more than 8 cM, but they shared a 1.1-Mb region responsible for the QTL (Mizoshita *et al.* 2005; Takasuga *et al.* 2007). These results suggested that additional QTL mapping studies might lead to the detection of a replication of the marbling QTL and allow us to narrow down the QTL region using IBD-mapping.

In this study, we analysed another paternal half-sib family of Japanese Black cattle and replicated the mapping of the marbling QTL on BTA 4. The QTL was previously mapped in two families and a paternally inherited QTL explained 5.9% to 7.8% of the phenotypic variance (Mizoshita *et al.* 2004; Mizoguchi *et al.* 2006), which was a relatively large effect among marbling QTL (Takasuga *et al.* 2007). Here, we performed a detailed haplotype analysis and association study using the microsatellites developed from the previously constructed physical map (Itoh *et al.* 2005), which allowed us to narrow down the QTL region from a 34-cM region (39 Mb) to approximately 3.7 Mb.

Address for correspondence

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

Accepted for publication 15 June 2009

Materials and methods

DNA samples and phenotype data

In this study, Sire A's paternal half-sib family was constructed from carcass data and pedigree records collected by the Japan Wagyu Registry Association (Kyoto, Japan). The offspring were reared in different herds in a local area. The sire DNA were obtained from semen. Offspring DNA samples were extracted from adipose tissues around the kidney that had been collected at the two slaughterhouses in the same local area in Japan from 1997 to 2000. Five traits were analysed in this study (Table 1): cold carcass weight (CW), longissimus muscle area (LMA), rib thickness (RT, thickness of the muscle layer in a rib of beef), subcutaneous fat thickness (SFT) and marbling. Marbling was scored using a beef marbling score (BMS) that ranks the carcass from 1 to 12 according to the degree of intramuscular fat deposition, where higher scores correspond to more marbling. These traits were systematically measured by certified graders and recorded at the slaughterhouse.

Genotyping and QTL mapping

The genome screen was conducted using the microsatellite markers on the Shirakawa-USDA linkage map (Ihara *et al.* 2004). The markers were selected as heterozygous for the sire and were at approximately 10-cM intervals on autosomes. Polymerase chain reaction products were resolved using an ABI 3700 DNA analyzer (Applied Biosystems). Genotype data were captured using Genotyper (Applied Biosystems).

The QTL analysis was performed with the interval mapping method using a linear regression model for a half-sib family (Knott *et al.* 1996; Seaton *et al.* 2002). Briefly, phases of the sire's chromosomes were determined at each pair of two consecutive heterozygous markers using allele transmission information to the offspring so that recombination between the two markers was minimized. Linear regression analysis was performed according to the following model: $y = X\beta + e$, where y is the vector of individual phenotypic values, β is the

vector of fixed effects {sex, slaughter year, slaughterhouse and the probability having the Q phase [Prob(Q)] at a given location}, X is the corresponding design matrix and e is the vector of residual error. An F -statistic value of regression was calculated at 2-cM intervals along each chromosome. To evaluate whether the QTL effect was well estimated, the information content was calculated as a variance of Prob(Q) divided by 0.25, which was the maximum possible value of Prob(Q) (Knott *et al.* 1998). The contribution ratio was calculated as a proportion of the trait variance explained by the paternal allele substitution from q to Q . Thresholds for significance of the F -statistic value were obtained by 10 000 random permutations of the phenotypic data (Churchill & Doerge 1994). To control the error rate of multiple trait analysis, we applied the false discovery rate (FDR) proposed by Weller *et al.* (1998). A nominal P -value for FDR was calculated at each analysis point on the chromosome. The 95% CI of the QTL location was calculated by bootstrapping (Visscher *et al.* 1996).

Microsatellite development

The region from *DIK2875* (46.0 cM) to *DIK123* (82.5 cM) consisted of 12 bacterial artificial chromosome (BAC) fingerprint contigs (Itoh *et al.* 2005) corresponding to scaffold NW931283-NW931289 (NCBI Map Viewer, *Bos taurus* Build 2.1). Microsatellite sequences over 11 repeats were searched in the scaffold sequences. PCR primers were designed for the microsatellites using Primer3 v.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). The heterozygous markers in Sire A were selected from these microsatellite markers. Marker order was confirmed by screening the CHORI-240 bovine BAC library (<http://bacpac.chori.org/bovine240.htm>) using the microsatellite markers followed by positioning the clones on the BAC fingerprint contigs (<http://www.bcgsc.ca/platform/mapping/bovine>), and this was also confirmed by the latest bovine genome assembly *Bos taurus* Build 4.0 (NCBI Map Viewer) (Table S1). Some markers were positioned on the BAC clones using the Blast search using BLASTN against bovine high-throughput genomic sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

Association study

From the local population, in which the two sires (Sire A and B in Fig. 1) were produced, 654 steers of five paternal half-sib families (not including Sire A, B and Sire C families) were collected. Of them, 109 BMS-high (BMS ≥ 8) and 162 BMS-low steers (BMS ≤ 4) were genotyped. The numbers from the families were 4–85 in BMS-high and 10–72 in BMS-low groups respectively (Table S2). Microsatellites that were heterozygous in either Sire A or Sire B and had more than three alleles in the population were used for the test. The marker intervals were less than 2.3 Mb. Five sires were

Table 1 Phenotypic data for carcass traits of Sire A half-sib family.

Offspring	Number	Trait	Average	SD
Steers	263	CW, Kg	402.5	38.7
		LMA, cm ²	53.6	6.8
		RT, cm	6.9	0.7
		SFT, cm	2.1	0.6
		BMS	5.8	1.9
Cows	62	CW, Kg	361.4	28.2
		LMA, cm ²	52.4	6.3
		RT, cm	6.9	0.8
		SFT, cm	2.6	0.6
		BMS	5.2	1.8

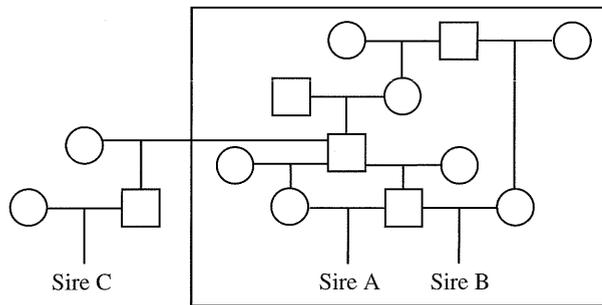


Figure 1 Pedigree of the sires in which the marbling QTL on BTA 4 were detected. Sire A (this study), Sire B (Mizoguchi *et al.* 2006) and Sire C (Mizoshita *et al.* 2004). The square indicates the local area where Sires A and B were produced.

also genotyped and the phase of sire’s chromosomes was determined in the same way as the QTL analysis. This is shown in Table S2. Following this, probabilities of alleles transmitted from a sire to an offspring were calculated. For 258 of the 271 steers, paternally inherited alleles were successfully determined with $P > 0.7$ for every marker. As for the residual steers, the alleles estimated with $P > 0.7$ were used for the analysis. The maternal alleles were determined by removing the paternal alleles (those with $P > 0.7$) from the offspring genotype. To consider the effect of both paternal and maternal alleles, an association with marbling was assessed by a linear regression of the number of the Q allele (0, 1 or 2) on the BMS scores at each of the two adjacent markers. A nominal P-value was obtained from the F-statistic value with the degrees of freedom ($P, n-p-1$) at each location, where $P = 1$, and n is the number of the individuals whose diplotypes were determined.

A follow-up study was performed using a population collected throughout Japan. From 19 100 steers, 406 BMS-high ($BMS \geq 8$) and 411 BMS-low ($BMS \leq 4$) steers were chosen to include no more than six paternal half-siblings in each group and genotyped using eight markers between M1 and M9. Allele frequencies of two consecutive microsatellite markers were estimated using the ARLEQUIN program (<http://lgb.unige.ch/arlequin/>). Association with marbling was

assessed by Fisher’s exact test comparing the Q and non-Q allele frequencies of two consecutive microsatellite markers between BMS-high and low groups.

Results and discussion

QTL mapping in Sire A family

We constructed Sire A’s half-sib family, composed of 325 offspring (263 steers and 62 cows) and performed a genome scan using 225 microsatellite markers on 29 autosomes (Shirakawa-USDA linkage map, Ihara *et al.* 2004). Markers were selected at approximately 10-cM intervals, except for chromosomes 9 and 22 (3 markers on each chromosome), on which we could not find informative microsatellite markers. The 31 microsatellite markers between 26 and 109 cM on chromosome 9 and the 11 microsatellite markers between 0 and 56 cM on chromosome 22 were homozygous in Sire A. There may be wide homozygous regions on these chromosomes because Sire A’s parents were related (Fig. 1). The overall average information content was 0.71. QTL analysis was performed with an interval mapping method using a linear regression model (Knott *et al.* 1996). The power to detect a paternally inherited QTL accounting for 5% and 10% of the phenotypic variance was estimated to be 67% and 97% respectively, at the 1% chromosome-wise significance level using 300 offspring (Takasuga *et al.* 2007). We detected nine QTL for carcass traits at 1% chromosome-wise significance levels that also passed the FDR threshold (<0.1) (Weller *et al.* 1998): two QTL for marbling on BTA 4 and 18, two QTL for CW on BTA 14 and 24, two QTL for LMA on BTA 1 and 4, two QTL for SFT on BTA 1 and 15 and one QTL for RT on BTA 6 (Table 2).

Among them, a marbling QTL on BTA 18, an LMA QTL on BTA 1, two SFT QTL on BTA 1 and 15 and an RT QTL on BTA 6 were first mapped in the Japanese Black cattle population, and the other QTL were mapped in the regions that overlapped with previously detected QTL (Takasuga

Table 2 Summary of the QTL detected in Sire A half-sib family.

Trait	Chromosome	No. markers	Average IC	Position (cM)	F-statistic	Q to q allele substitution effect	Contribution ratio (%)	FDR	Chromosome-wise significance level	Genome-wise significance level
CW	14	5	0.65	46	32.92	25.64	9.0	0.00	<0.01	<0.01
	24	7	0.77	60	18.69	19.94	5.2	0.01	<0.01	
LMA	1	12	0.79	36	13.44	2.93	3.7	0.03	<0.01	
	4	11	0.72	54	11.90	2.70	3.3	0.05	<0.01	
RT	6	14	0.78	48	18.16	3.67	5	0.01	<0.01	<0.01
SFT	1	12	0.79	96	10.92	2.49	3.0	0.07	<0.01	
	15	8	0.77	52	11.30	2.53	3.1	0.06	<0.01	
BMS*	4	22	0.75	44	10.90	0.70	3.0	0.07	<0.01	<0.05
	18	14	0.81	72	11.00	0.70	3.0	0.05	<0.01	

*2nd scan (FDR is the value calculated in the 1st scan).

et al. 2007). The CW QTL on BTA 14 was a replication of CW-1 (Mizoshita *et al.* 2004; Mizoguchi *et al.* 2006; Takasuga *et al.* 2007), which was confirmed using six microsatellite markers from DIK7012 to DIK7020 as described previously (Takasuga *et al.* 2007). The marbling QTL on BTA 4 was expected to be the same as those detected in Sire B (Mizoguchi *et al.* 2006) and Sire C (Mizoshita *et al.* 2004), because the three sires were related (Fig. 1). Therefore, it was fine-mapped by adding 11 microsatellite markers (Fig. 2a). The maximal *F*-statistic value was 10.90 at position 44 cM and the paternal *Q* explained 3.0% of the total variance (Table 2). The 95% CI was 30–88 cM (Fig. 2a). The *F* profiles of the three sires were similar and the 95% CI overlapped between 47 and 75 cM (Sire B's QTL, 47–75 cM; Sire C's QTL, 47–76 cM; Fig. 2b).

Identical-by-state (IBS) *Q* region in the marbling QTL on BTA 4

As the marbling QTL on BTA 4 was expected to be a replication of the QTL detected in Sires B and C, we compared the haplotypes of the three sires. As reported previously,

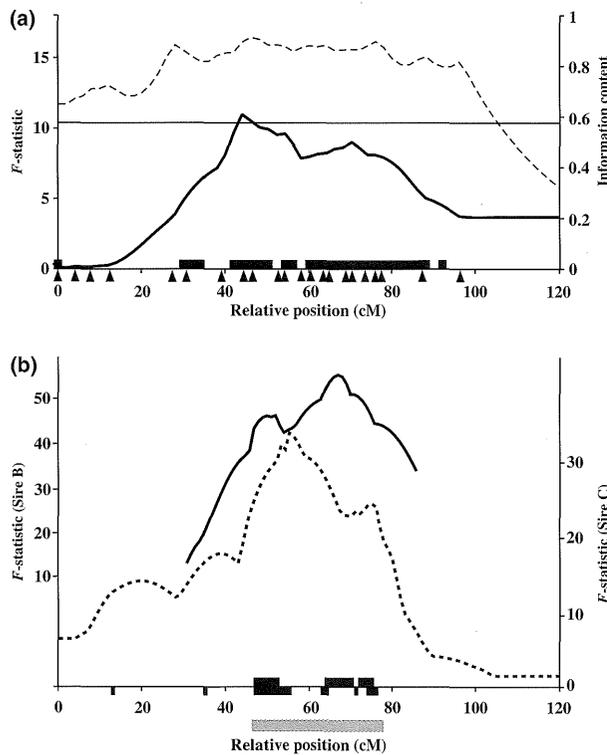


Figure 2 Marbling QTL on BTA 4 detected in paternal half-sib families. (a) *F*-statistic profile of Sire A. Horizontal line indicates the threshold for the chromosome-wise 1% levels of marbling. Broken line indicates information content. Boxes on the x-axis indicate the 95% CIs. Marker positions are shown as triangles on the x-axis. (b) *F*-statistic profiles of Sire B (solid line, Mizoguchi *et al.* 2006) and C (dotted line, Mizoshita *et al.* 2004). Boxes on the x-axis indicate the 95% CI of the Sire B's QTL (upper) and Sire C's QTL (lower). The grey rectangle under the panel represents the interval applied for haplotype comparison.

cM	SireA		SireB		SireC	
	<i>Q</i>	<i>q</i>	<i>Q</i>	<i>q</i>	<i>Q</i>	<i>q</i>
M1 44.549	1	2	2	2	3	2
M2 44.549	1	2	2	2	1	2
M3	1	2	2	2	3	2
M4 45.958	1	4	1	4	3	4
M5	1	4	1	4	3	4
M6	1	3	1	3	3	3
M7	1	3	1	3	3	3
M8 46.475	1	3	1	3	3	3
M9	1	4	2	4	3	4
M10	1	1	2	1	3	1
M11 46.536	1	4	2	4	1	4
M12	1	1	1	1	3	1
M13	1	1	2	1	2	1
M14	1	4	2	4	2	4
M15	1	1	2	1	1	1
M16	1	2	2	2	3	2
M17 51.211	1	1	2	1	1	1
M18 52.490	1	1	2	1	1	1
M19 52.490	1	1	2	1	1	1
M20	1	2	2	2	2	2
M21	1	1	2	1	1	1
M22 52.490	1	4	2	4	3	4
M23 52.490	1	2	2	2	1	2
M24 53.332	1	4	2	4	3	4
M25 52.490	1	1	2	1	1	1
M26 53.892	1	2	2	2	3	2
M27	1	1	2	1	3	1
M28	1	4	2	4	3	4
M29	1	4	1	4	1	4
M30 58.143	1	4	1	4	1	4
M31 58.493	1	4	2	4	3	4
M32 59.339	1	2	2	2	2	2
M33 60.422	1	2	2	2	3	2
M34	1	2	2	2	2	2
M35 62.953	1	1	2	1	2	1
M36	1	1	1	1	3	1
M37 63.442	1	4	2	4	2	4
M38 63.442	1	4	1	4	3	4
M39 64.731	1	3	2	3	3	3
M40	1	2	2	2	3	2
M41	1	4	2	4	3	4
M42 68.740	1	4	2	4	1	4
M43 67.471	1	4	2	4	3	4
M44	1	3	2	3	3	3
M45	1	4	1	4	3	4
M46 68.740	1	4	1	4	1	4
M47	1	4	2	4	2	4
M48 68.740	1	3	1	3	3	3
M49 68.740	1	3	2	3	3	3
M50 69.014	1	2	2	2	2	2
M51 70.213	1	4	2	4	1	4
M52 71.046	1	4	2	4	3	4
M53 72.311	1	4	2	4	3	4
M54 72.311	1	3	2	3	3	3
M55 74.016	1	3	2	3	3	3
M56 73.447	1	2	2	2	2	2
M57 74.414	1	1	1	1	1	1
M58	1	4	1	4	1	4
M59	1	3	2	3	3	3
M60	1	4	2	4	3	4
M61 76.007	1	4	1	4	3	4
M62 77.052	1	3	1	3	3	3
M63 76.007	1	3	2	3	3	3
M64 77.575	1	4	1	4	3	4
M65 77.575	1	4	2	4	3	4

Figure 3 Haplotype comparison between 44.5 and 77.6 cM on BTA 4. Sire A's *Q* alleles are coloured black, and common alleles of the other two Sire for *Q* are also coloured. Marker locations were obtained from the Shirakawa-USDA bovine linkage map (Ihara *et al.* 2004) and BAC fingerprint contigs (<http://www.bcgsc.ca/platform/mapping/bovine>).

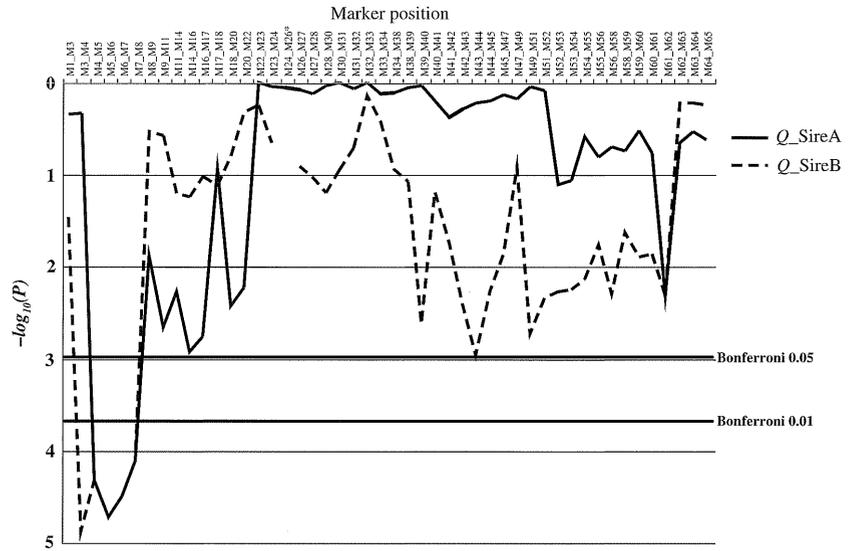


Figure 4 Association analysis between 44.5 and 77.6 cM on BTA 4. The number of Q alleles in the paternal and maternal haplotypes (0, 1 or 2) was linearly regressed on the BMS scores at each set of adjacent markers. A nominal *p*-value was obtained from the *F*-statistic value with degrees of freedom (*P*, *n*-*p*-1) at each location, where *P* = 1 and *n* is the number of individuals whose diplotypes were determined. The solid and broken lines indicate the *P*-values obtained for Sire A's and Sire B's Q alleles respectively. The horizontal lines indicate the thresholds of Bonferroni-corrected *P*-values (*P* < 0.05 and *P* < 0.01). *M24-M26, Sire B's Q allele was not detected.

Sires B and C shared a *q* haplotype, whereas the *Q*s were different (Takasuga *et al.* 2007). Sire A also shared the *q* haplotype, which was inherited paternally (Fig. 3). On the other hand, Sire A's *Q* was apparently different from both Sire B's and C's *Q*s. As Sire A was related to Sire B both paternally and maternally (Fig. 1), we expected that an IBD *Q* region between Sire A and B would exist. Therefore, a total of 65 microsatellite markers were prepared between 44 and 78 cM to cover the overlapping 95% CI and were used to compare the *Q* haplotypes (Fig. 3). The marker interval was less than 1.6-Mb, except for the 2.3-Mb interval between M59 and M60, where two other microsatellites were not polymorphic in the sires (Table S1).

Sires A and B harboured the common alleles for five consecutive markers around 46 cM (2.3 Mb region between M4 and M8) in their *Q*s, but for less than three consecutive markers in other regions (M29-30: 192 kb; M45-46: 385 kb; M57-58: 33 kb; M61-62: 130 kb). This IBS region around 46 cM might be IBD. On the other hand, an apparent IBS with three consecutive markers was detected around 52 cM (1.7 Mb region between M17 and M19) in the *Q*s of Sires A and C (Fig. 3). This region, however, was homozygous in both Sires A and C (Fig. 3), and therefore we did not investigate this region further.

Association of the IBS Q region with marbling

We then examined whether the IBS region around 46 cM was associated with marbling. As all the dams of the pedigree of Sires A and B belonged to the same local population (Fig. 1), we expected that the superior *Q* might be widely distributed in this local population. Therefore, we chose five sires with many offspring in this population, and 654 steers of their offspring were collected (Table S2). From this population, 109 BMS-high (BMS 8) and 162 BMS-low (BMS 4) steers were genotyped, and paternal and maternal haplo-

types were estimated. Of the 65 microsatellite markers covering the 44.5–77.6 cM region, 49 microsatellites that were heterozygous in either Sire A or Sire B and had more than three alleles were used for the analysis. The heterozygosity of these microsatellites ranged from 0.28 to 0.77. The marker intervals were less than 2.3 Mb (Table S1). To consider the effect of both paternally and maternally inherited *Q* haplotype (Table S2), a regression analysis was performed for each set of adjacent markers. The centromeric-side region was most significantly associated with marbling (Bonferroni-corrected *P* < 0.01; Fig. 4). The M4-M7 region corresponded to the IBS region around 46 cM. The *Q* allele frequencies of M5-M6 were 0.75 in BMS-high and 0.62 in BMS-low groups respectively. Sire B's *Q* haplotype, comprising M3 and M4, was also associated with marbling, but this association appeared to be derived from a longer *Q* haplotype from M3 to M7. Sire B's *Q* allele frequency of M3-M4 (0.68 in BMS-high and 0.49 in BMS-low groups) was comparable to that of M6-M7 (0.67 in BMS-high and 0.50 BMS-low groups).

To further examine the association of this centromeric region, a population collected throughout Japan was used.

Table 3 Association of Sire B's Q allele with marbling.

Region	<i>P</i> -value	Bonferroni-corrected <i>P</i> -value	Q freq in BMS-high (%)	Q freq in BMS-low (%)
M1-M3	0.2086	1	23	20
M3-M4	0.0187	0.131	18	14
M4-M5*	0.0015	0.011	34	26
M5-M6*	0.0012	0.008	28	21
M6-M7*	0.0035	0.024	22	16
M7-M8	0.0079	0.055	23	18
M8-M9	0.0733	0.513	5	3

*The M4-M7 region is an IBS between Sire A' and B's Q haplotypes.

From 19 100 steers, 406 BMS-high (BMS \geq 8) and 411 BMS-low (BMS \leq 4) steers were chosen to include no more than six paternal half-sibs in each group and were genotyped using eight markers between M1 and M9 (Table 3). The IBS region between M4 and M7 was significantly associated with marbling (Bonferroni-corrected $P < 0.05$), whereas Sire B's Q of M3-M4 was not significantly associated (Bonferroni-corrected $P = 0.13$). The result that the association of the IBS Q region was replicated in this large less-related population strongly suggests that the marbling QTL is located in the IBS region. In this population, the Q allele frequency was lower than that in the local population (M5-M6: 0.28 in BMS-high and 0.21 in BMS-low groups). A relatively high frequency of the IBS Q region in the local population might be a result of a breeding history of this population that emphasized selection for marbling.

The IBS Q region bracketed by M3 and M9 comprises 3.7 Mb on the bovine genome assembly Btau4.0 (Table S1). As indicated by the comparative maps (Everts-van der Wind *et al.* 2005; Itoh *et al.* 2005), this region shows a conserved synteny with human chromosome 7. The corresponding region on human chromosome 7 contains 20 genes. Several genes among them, such as *PBEF1* and *SYPL1*, are involved in adipocyte function. *PBEF1* (also called *Nampt*), an adipocytokine expressed mainly in visceral fat, is related to obesity and insulin resistance (Beltowski 2006). *PBEF1* expression is increased during adipogenic conversion (Kralisch *et al.* 2005). *SYPL1* (also called *pantophysin*) is also abundant in adipose tissue and is associated with GLUT4-containing vesicles (Brooks *et al.* 2000). Although the regulatory system of bovine intramuscular fat differentiation and/or fat deposition has not been elucidated, these genes are strong candidates for this marbling QTL.

Perspective

Based on a QTL analyses of closely related sires and association analysis using a local population and a larger population collected throughout Japan, we narrowed down the region containing a marbling QTL on BTA 4 to a 3.7-Mb region. Sire C's Q alleles between M3 and M8 were different from those of Sires A and B (Fig. 3). Sire C might have a different allele (mutation) of the QTL or have a different QTL from that of Sire A and B. Sequencing analysis of the candidate genes as well as other genes in the critical region will reveal the gene responsible for the QTL and provide a novel mechanism for bovine intramuscular fat development.

Acknowledgements

The authors thank Y. Sohma for technical assistance. This work was supported by the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

References

- Beltowski J. (2006) Apelin and visfatin: unique "beneficial" adipokines upregulated in obesity? *Medical Science Monitor* **12**, RA112–9.
- Brooks C.C., Scherer P.E., Cleveland K. *et al.* (2000) Pantophysin is a phosphoprotein component of adipocyte transport vesicles and associates with GLUT4-containing vesicles. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 2029–36.
- Churchill G.A. & Doerge R.W. (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* **138**, 963–71.
- Everts-van der Wind A., Larkin D.M., Green C.A. *et al.* (2005) A high-resolution whole-genome cattle-human comparative map reveals details of mammalian chromosome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 18526–31.
- Ihara N., Takasuga A., Mizoshita K. *et al.* (2004) A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Research* **14**, 1987–98.
- Itoh T., Watanabe T., Ihara N. *et al.* (2005) A comprehensive radiation hybrid map of the bovine genome comprising 5593 loci. *Genomics* **85**, 413–24.
- Knott S.A., Elsen J.M. & Haley C.S. (1996) Methods for multiple-marker mapping of quantitative trait loci in half-sib populations. *Theoretical and Applied Genetics* **93**, 71–80.
- Knott S.A., Marklund L., Haley C.S. *et al.* (1998) Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and large white pigs. *Genetics* **149**, 1069–80.
- Kralisch S., Klein J., Lossner U. *et al.* (2005) Hormonal regulation of the novel adipocytokine visfatin in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Endocrinology* **185**, R1–8.
- Mizoguchi Y., Watanabe T., Fujinaka K. *et al.* (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. *et al.* (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. *et al.* (2005) Identification of a 1.1-Mb region for a carcass weight QTL on bovine Chromosome 14. *Mammalian Genome* **16**, 532–7.
- Moody D.E., Pomp D. & Buchanan D.S. (1997) Feasibility of the grandprogeny design for quantitative trait loci (QTL) detection in purebred beef cattle. *Journal of Animal Science* **75**, 941–9.
- Seaton G., Haley C.S., Knott S.A. *et al.* (2002) QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformatics* **18**, 339–40.
- Takasuga A., Watanabe T., Mizoguchi Y. *et al.* (2007) Identification of bovine QTL for growth and carcass traits in Japanese Black cattle by replication and identical-by-descent mapping. *Mammalian Genome* **18**, 125–36.
- Visscher P.M., Thompson R. & Haley C.S. (1996) Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics* **143**, 1013–20.
- Weller J.I., Kashi Y. & Soller M. (1990) Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **73**, 2525–37.
- Weller J.I., Song J.Z., Heyen D.W. *et al.* (1998) A new approach to the problem of multiple comparisons in the genetic dissection of complex traits. *Genetics* **150**, 1699–706.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Table S1 Marker information.

Table S2 Five paternal half-sib families used for the association study.

As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

Research article

Open Access

Cross-breed comparisons identified a critical 591-kb region for bovine carcass weight QTL (CW-2) on chromosome 6 and the Ile-442-Met substitution in NCAPG as a positional candidate

Kouji Setoguchi¹, Masako Furuta², Takashi Hirano³, Tomoko Nagao², Toshio Watanabe³, Yoshikazu Sugimoto³ and Akiko Takasuga*³

Address: ¹Cattle Breeding Development Institute of Kagoshima Prefecture, Osumi, So, Kagoshima 899-8212, Japan, ²Kumamoto Prefectural Agricultural Research Center, Sakae, Koushi, Kumamoto 861-1113, Japan and ³Shirakawa Institute of Animal Genetics, Japan Livestock Technology Association, Odakura, Nishigo, Fukushima 961-8061, Japan

Email: Kouji Setoguchi - setogu-k@po.minc.ne.jp; Masako Furuta - furuta-m@pref.kumamoto.lg.jp; Takashi Hirano - takashih@siag.or.jp; Tomoko Nagao - oguni-t-dh@pref.kumamoto.lg.jp; Toshio Watanabe - toshiow@siag.or.jp; Yoshikazu Sugimoto - kazusugi@siag.or.jp; Akiko Takasuga* - takasuga@siag.or.jp

* Corresponding author

Published: 4 August 2009

Received: 17 February 2009

BMC Genetics 2009, 10:43 doi:10.1186/1471-2156-10-43

Accepted: 4 August 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/10/43>

© 2009 Setoguchi et al; licensee BioMed Central Ltd.

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

Abstract

Background: Growth-related traits have been mapped on bovine chromosome 6 (BTA 6) in various bovine breed populations. We previously mapped a significant quantitative trait locus (QTL) for carcass and body weight (CW-2) between 38 and 55 cM on BTA 6 using a Japanese Black half-sib family. Additional QTL mapping studies detected four QTL for body or carcass weight that overlapped with CW-2 in Japanese Black and Japanese Brown half-sib families. To map the region in greater detail, we applied cross-breed comparisons of haplotypes that have been shown to be powerful in canine.

Results: We used 38 microsatellite markers to search for a shared *Q* (increasing carcass and/or body weight) haplotype within the 17-cM CW-2 region among five sires. Linkage disequilibrium mapping using maternal alleles of the offspring showed that an 815-kb shared *Q* haplotype was associated with body or carcass weight in both breeds. The addition of 43 single nucleotide polymorphism (SNP) markers narrowed the region to 591 kb containing 4 genes. The SNP changing Ile-442 to Met in NCAPG (chromosome condensation protein G) was significantly associated with carcass weight ($p < 1.2 \times 10^{-11}$) in a large Japanese Black population as well as in the five families. The *Q* allele of the SNP was also associated with a larger longissimus muscle area and thinner subcutaneous fat thickness in steers of all five families, indicating that the CW-2 locus is pleiotropic and favorable for marker-assisted selection of beef cattle.

Conclusion: A 591-kb critical region for CW-2 was identified. The SNP changing Ile-442 to Met in NCAPG (chromosome condensation protein G) can be used as a positional candidate of CW-2 for marker-assisted selection.

Background

Body size is one of the most visible animal characteristics and many genes can affect body size. In cattle, body size is correlated with meat quantity, an economically important trait that varies within and across breeds. We previously performed bovine quantitative trait locus (QTL) mapping for growth and carcass traits using Japanese Black paternal half-sib families constructed from a commercial population [1-3]. In these studies, a carcass weight QTL, *CW-1* on bovine chromosome 14 (BTA 14), was detected in five families with significant linkages and successfully narrowed down to a 1.1-Mb region by identical-by-descent mapping [3] and linkage disequilibrium (LD) mapping [4]. In contrast with *CW-1*, another significant QTL for carcass and body weight, designated *CW-2*, on BTA 6 was replicated at a 1% chromosome-wise significance level, but the two significantly segregating sires had no apparent shared Q haplotypes [3]. LD mapping only narrowed the region down to 13.1 Mb (see Results). We thus changed strategies to narrow down the *CW-2* region. We recently detected carcass weight QTL in regions that overlapped with *CW-2* in Japanese Brown populations. The Japanese Black breed was established in 1948, basically from indigenous populations of the Japanese Islands, while the Japanese Brown breed originated from indigenous populations of the Korean Peninsula. Approximately 100 years ago, the Korean cattle were imported to Japan and crossed several times with Simmental bulls, followed by the establishment of the Japanese Brown breed in 1948. Therefore, it can be estimated that the two indigenous populations have survived separately for thousands of years. It will be interesting if a common carcass weight QTL is present across the entire *Bos taurus* population. Indeed, the *CW-2* region was repeatedly highlighted for its association with growth-related traits in a mixed breed population [5], postweaning growth in a beef cattle population [6], and weight and body length at birth in a Charolais × Holstein cross-bred population [7]. These data indicate that *CW-2* may be shared across breeds. If this is the case, cross-breed comparisons might be useful for fine-mapping to identify a shared hypothetical identical-by-descent haplotype.

In dogs, cross-breed comparisons have been proposed for fine-mapping to pinpoint disease-related genes [8]. Canine LD patterns reflect two bottlenecks in dog history (early domestication and recent breed creation) and long-range breed-specific haplotype blocks retain the underlying short-range ancestral haplotype blocks, suggesting that genetic risk factors are shared across breeds. This situation provides for an efficient mapping strategy: initial mapping within breeds and subsequent fine-mapping by cross-breed comparisons. The strategy was validated in coat color and hair ridge studies [9], in which cross-breed comparisons successfully refined the location of the coat

color locus from 800 kb to 100 kb within the pigmentation-related gene. A recent study in cattle also revealed footprints of ancestral LD at short distances (< 10 kb) and these ancestral blocks are organized into larger blocks of a few hundred kilobases within a breed [10].

Here, we demonstrate that cross-breed comparisons are also efficient for fine-mapping of QTL in cattle. The *CW-2* locus was narrowed down from a 17-cM region to a 591-kb region shared by the Japanese Black and Japanese Brown breeds. Furthermore, a single nucleotide polymorphism (SNP) changing Ile-442 to Met in *NCAPG* (chromosome condensation protein G) was identified as a positional candidate. The *NCAPG-LCORL* locus was recently mapped as a locus associated with human adult height [11,12]. The findings of the present study indicate that genetic variations in *NCAPG* may affect body size in cattle as well as in humans.

Results

Carcass and/or body weight QTL in Japanese Black and Japanese Brown cattle

Carcass and/or body weight QTL on BTA 6 were mapped in three Japanese Black half-sib families (Sires A-C) and two Japanese Brown half-sib families (Sires D and E; Figure 1; Additional file 1). Sires A and B had the same Q haplotype (*Q1*) in the QTL region, whereas Sire C had a different Q haplotype (*Q2*) (Figure 2A). Sire E is an offspring of Sire D and inherited the Q haplotype of Sire D (*Q3*). In these QTL analyses, the highest *F*-statistic was obtained in Sire A's family, whose QTL was previously designated as *CW-2* [3]. Because the 95% confidence intervals (CI) of the QTL in the other families overlapped with the *CW-2* region (38–55 cM), we assumed that these QTL had an identical genetic origin and attempted to find a shared haplotype among the three Q haplotypes. By comparing the three Q haplotypes using 38 microsatellite markers with an interval of less than 1.18 Mb, three possible identical-by-state (IBS)Q regions were detected between 38 and 55 cM: *DIK9006-BMS2508* (663 kb), *DIK9010-DIK9011* (537 kb), and *DIK4852-DIK9017* (815 kb) (Figure 2A; Additional file 2).

Identical-by-state haplotype associated with carcass and body weight

To examine whether any of the possible IBS regions were associated with carcass or body weight, we performed LD mapping between 38 and 54 cM using the maternal alleles of the offspring from Sire C (Japanese Black) and Sires D and E (Japanese Brown) (Figure 3). The offspring steers were divided into two groups according to their paternally inherited haplotypes (*Q* or *q*) in this region. The average carcass or body weight was then compared between the steers that harbored two consecutive Q alleles in the maternal alleles and the other steers in each group. In Sire

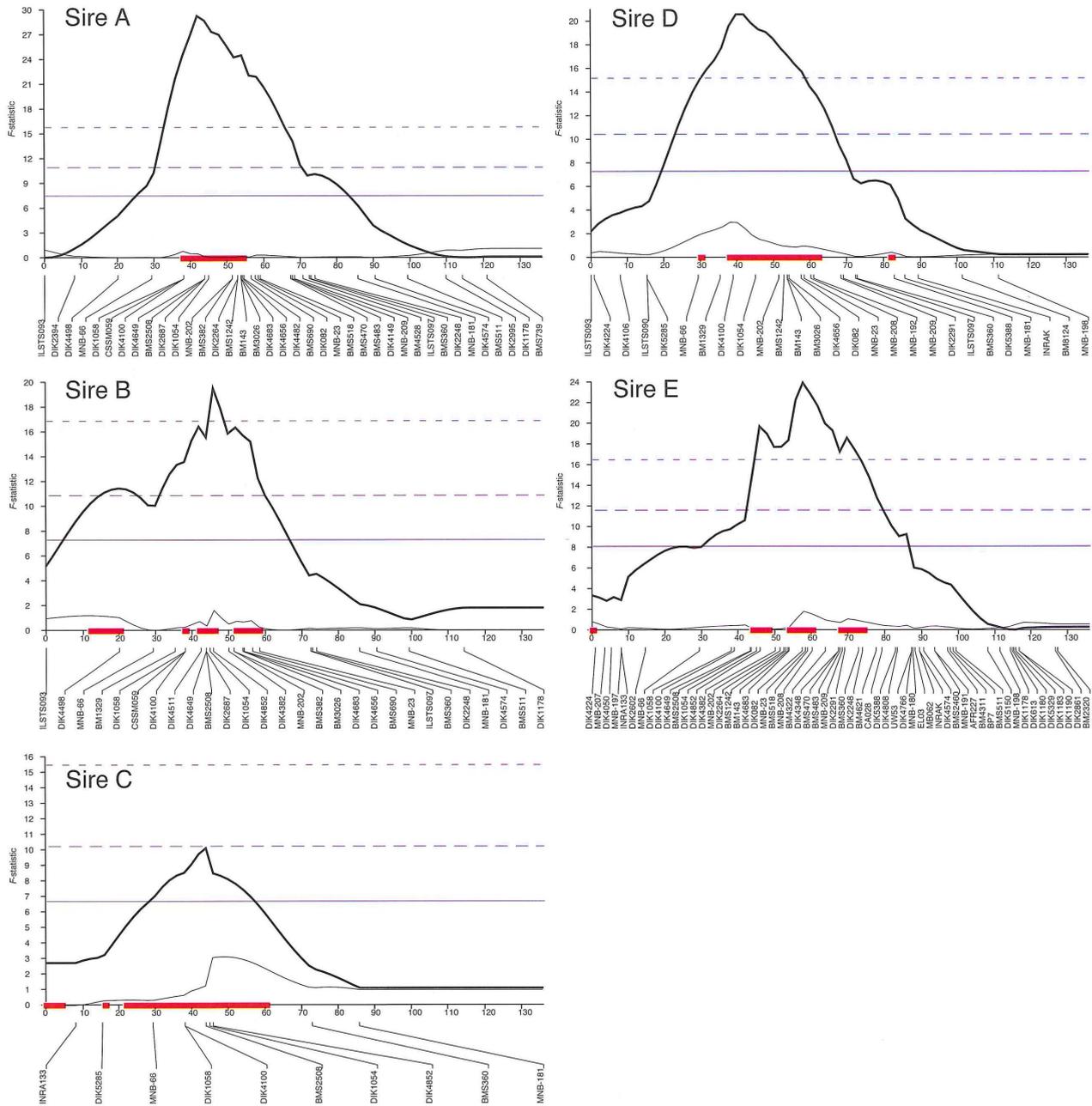


Figure 1

F-statistic profiles for carcass or body weight (Sire C only) on BTA 6. Marker locations were obtained from the Shirakawa-USDA linkage map [20]. Bold and thin lines indicate a fixed-effect QTL model and a fixed-effect QTL model accounting for the effect of SNP-9 of NCAPG, respectively. The boxes on the x-axis indicate the 95% CI of the QTL. The horizontal lines indicate the thresholds for chromosome-wise 0.1% (- - -), 1% (- · -), and 5% (- · ·) significance levels.

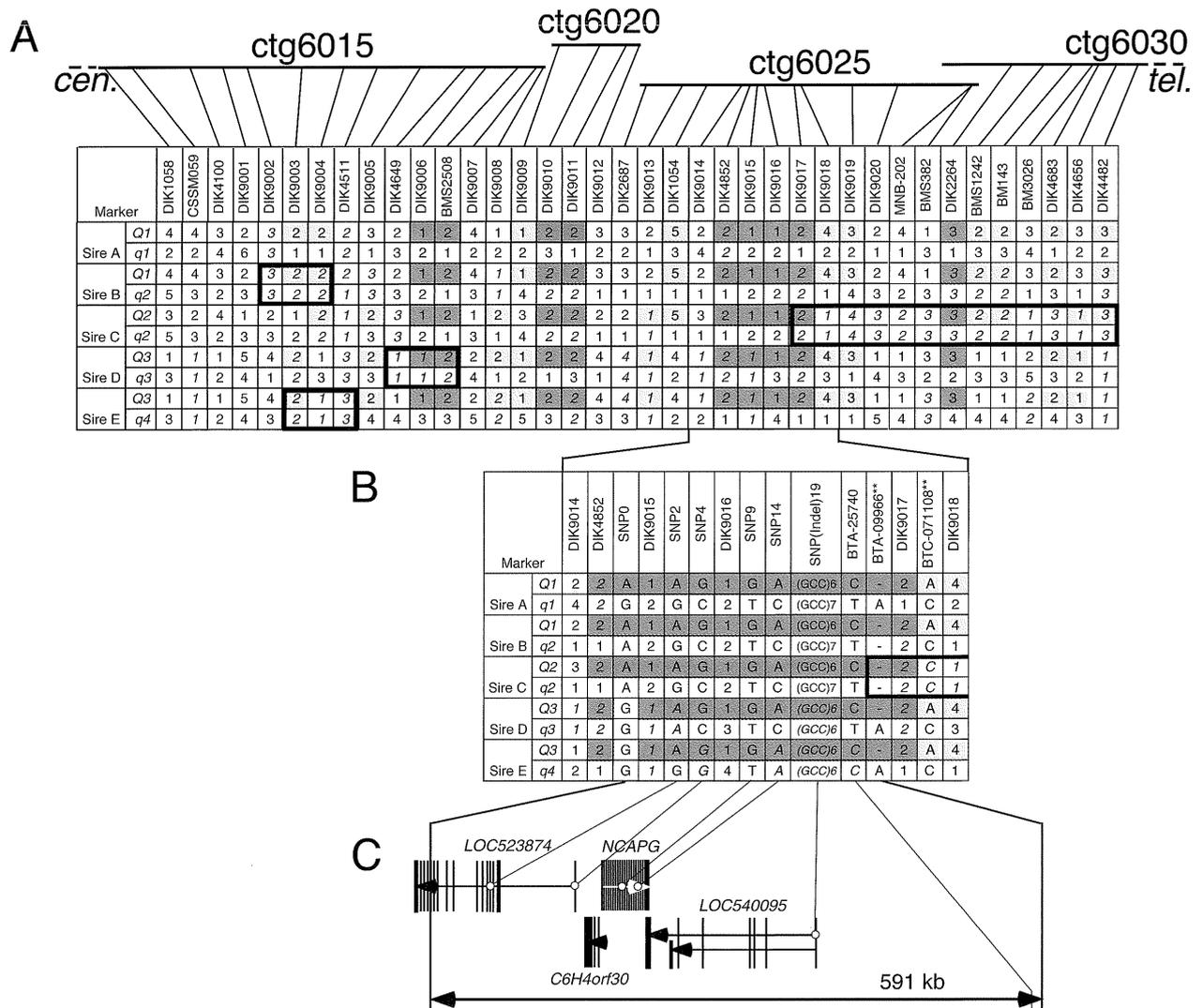


Figure 2
Haplotype comparison in the CW-2 region. The alleles shared among two or three Q haplotypes are colored light grey or grey, respectively. The alleles homozygous in a sire are shown in italics. The regions homozygous for more than two consecutive markers are boxed. (A) Haplotypes between 38 and 55 cM. Locations of the microsatellite markers in the BAC fingerprint map are shown [27]. (B) Haplotypes around the critical 591-kb region. (C) Genes located in the 591-kb region. Exons are indicated by the vertical lines. Each arrow shows the location and direction of a transcript.

C's family, the frequency of two consecutive Q2 alleles among the maternal alleles was less than 3% in most regions, while the frequency of two consecutive Q1 alleles was greater than 17% between *DIK1058* and *DIK9019*. Therefore, average body weight was compared between the steers harboring Q1 alleles in the maternal alleles and those harboring non-Q1 alleles, and between the steers harboring maternal Q2 alleles and those harboring non-Q2 alleles, in the regions where corresponding Q frequencies for two consecutive markers were higher than 5%.

Body weight was significantly higher ($p < 10^{-3}$) in the regions between *DIK1058* and *DIK9019* in the maternal Q1-harboring steers than in the non-Q1-harboring steers in the paternal *q*-inherited offspring group (Figure 3A). This finding allowed us to narrow down the CW-2 region to the 13.1 Mb flanked by *DIK1058* and *DIK9020*, which contained all possible IBS regions. As for Q2, Sire C was homozygous in the telomeric part at the 95% CI (Figures 1 and 2), which allowed us to narrow down the QTL to the centromeric side of *DIK9017*.

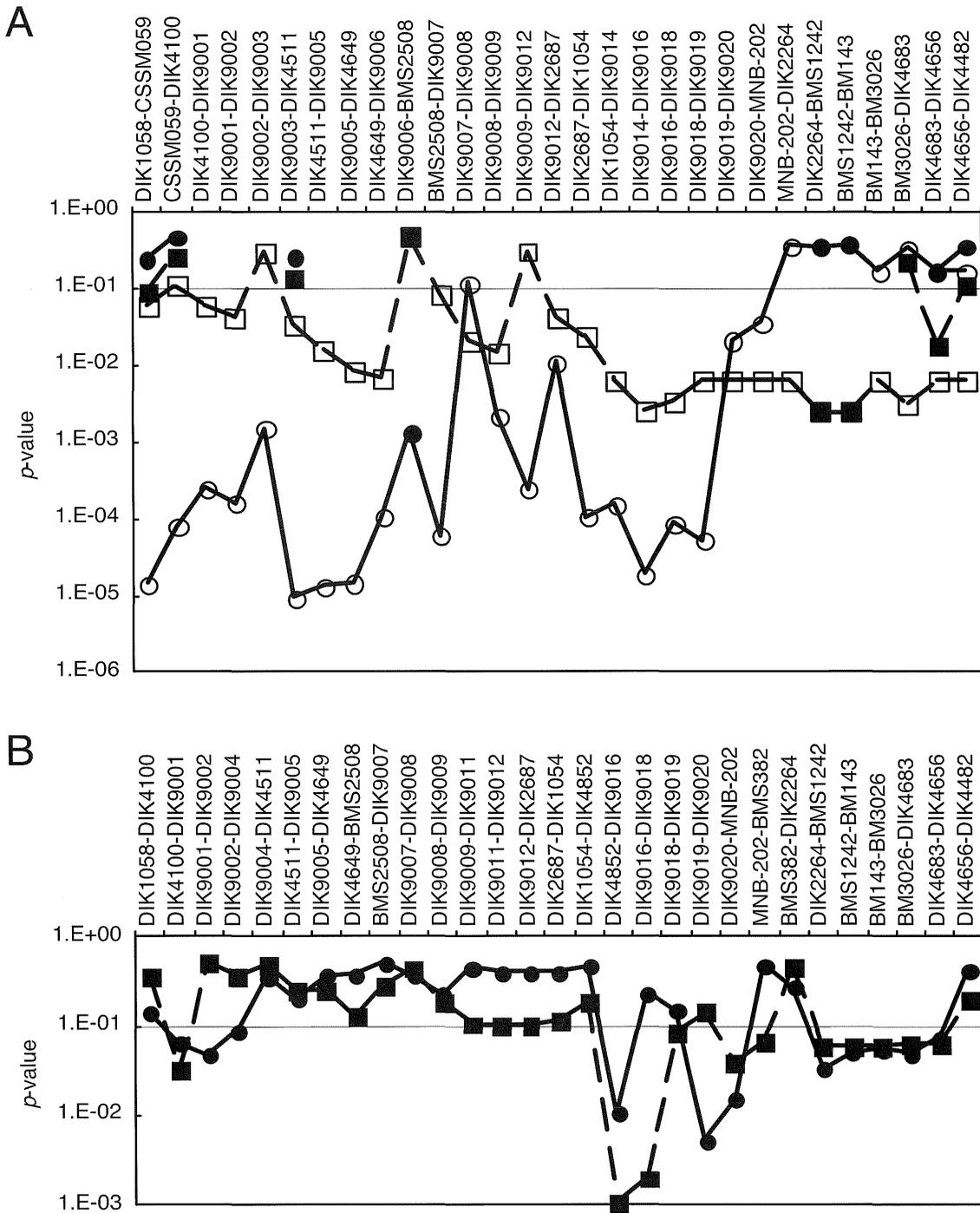


Figure 3
LD mapping using maternal alleles of the offspring in Japanese Black and Japanese Brown families. The average of slaughter year- and age-adjusted body or carcass weight was compared between the steers harboring two consecutive *Q* alleles in the maternal alleles and other steers using a *t*-test. The broken and solid lines indicate the *p*-values for the paternal *Q*- and *q*-inherited offspring, respectively. (A) Japanese Black Sire C family. Open and closed marks indicate the *p*-values for the *Q*₁ and *Q*₂ alleles, respectively. (B) Japanese Brown families of Sires D and E.

In Japanese Brown families, offspring from Sires D and E were combined to maximize the number of offspring. Carcass weight was higher in *DIK4852-DIK9016* ($p = 0.011$) and in *DIK9019-MNB202* ($p = 0.0052$ at *DIK9019-DIK9020*) in the maternal Q3-harboring steers than in the non-Q3-harboring steers among the offspring with the paternally inherited *q* haplotype (Figure 3B). The two regions were in linkage disequilibrium. Among 161 steers that inherited the paternal *q* haplotype, 50 harbored maternal Q3 in *DIK4852-DIK9016*, 31 of which harbored maternal Q3 in *DIK9019-DIK9020*. On the other hand, all of the steers that harbored maternal Q3 in *DIK9019-DIK9020* also harbored maternal Q3 in *DIK4852-DIK9016*. The *DIK4852-DIK9016* region was included in the narrowed-down CW-2 region and corresponded to one of the possible IBS regions, whereas the *DIK9019-MNB202* region was included in a homozygous region in Sire C. An association of the *DIK4852-DIK9016* region with carcass weight was also observed among offspring with the paternally inherited Q haplotype.

These results strongly suggest that the causal alleles in the three QTL haplotypes Q1, Q2, and Q3 are identical, and that the IBS region between *DIK4852* and *DIK9017* might be responsible for the QTL.

Ile-442-Met Mutation as a positional candidate

The possible IBS region between *DIK4852* and *DIK9017* corresponds to the 17.2 to 17.9-Mb region on human chromosome 4 that contains six genes (*LAP3*, *MED28*, *FAM184B*, *C6H4orf30*, *NCAPG*, and *LCORL*) [13-15]. To examine the region in detail, SNPs were searched for by resequencing Sire A in the coding regions of the six orthologous bovine genes (*LAP3*, *MED28*, *LOC523874*, *C6H4orf30*, *NCAPG*, and *LOC540095*) and genotyped in the five sires (Figure 2B; Additional file 3). This ensured and refined the IBS Q region to an 879-kb interval flanked by SNP-0 and BTC-071108**. In addition, the telomeric part of the region from BTA-09966** to BTC-071108** was homozygous in Sire C, resulting in the narrowing of the CW-2 region to a 591-kb interval flanked by SNP-0 and BTA-09966** (Figure 2B; Additional file 3).

The critical 591-kb region contained four genes (*LOC523874*, *C6H4orf30*, *NCAPG*, and *LOC540095*; Figure 2C). In their coding regions, four non-synonymous SNPs and one Indel causing an amino acid insertion were found in Sire A (Figure 2BC; Additional file 3). A causative sequence variation, however, should be heterozygous in all five sires. Among the sequence variations in the coding regions, only the SNP in exon 9 of *NCAPG* (SNP-9) that substitutes a Met (ATG) for Ile-442 (ATT) was heterozygous in all five sires. Four intronic SNPs locating in *LOC523874*, *NCAPG*, and *LOC540095* were also hetero-

zygous in all five sires (bUSO1_e8, NGS-45457, SNP16, and BTC-041023 in Figure 4C; Additional file 3).

To assess the association of these SNPs with carcass weight, 187 steers selected from the 4.7% extremes of 7990 Japanese Black steers were genotyped. SNP-9 of *NCAPG* had the strongest association ($p < 1.2 \times 10^{-11}$, Fisher's exact test for independence; frequency of G-allele, 0.14; Figure 4A; Additional file 3), and it was in strong linkage disequilibrium with the four intronic SNPs (Figure 4BC). These data indicated that SNP-9 is the most appropriate CW-2 marker among the examined SNPs as a candidate for the causative sequence variation, although three other genes are in the same LD block and cannot be excluded as candidate genes for CW-2.

To further confirm the association of SNP-9 with carcass weight in Japanese Brown as well as Japanese Black populations, the steers of all five families and the cows of Sire D's offspring were genotyped with SNP-9 and average carcass weight was compared between genotypes in each family. Because steers and cows sometimes show different trait characteristics, the cows were separately evaluated from the steers in Sire D family (Figure 5). The G/G-genotype (442-Met/Met of *NCAPG*) and G/T-genotype (442-Met/Ile of *NCAPG*) had significantly greater average carcass weight than the T/T-genotype (442-Ile/Ile of *NCAPG*) in the steers of all five families and the cows of Sire D's offspring ($p < 0.01$, *t*-test). The carcass weight of the G/G-genotype tended to be higher than that of the G/T-genotype, but the difference was significant only in the families of Sires B and E. The effect of SNP-9 was also confirmed by QTL analyses including the genotype of SNP-9 as a fixed effect. The QTL peaks were all extinguished by including the SNP-9 genotype (Figure 1). These data confirmed that SNP-9 of *NCAPG* is a positional candidate for the quantitative trait nucleotide for CW-2.

Pleiotropy of CW-2

QTL mapping studies detected QTL for the longissimus muscle area (LMA) and subcutaneous fat thickness (SFT) in the regions overlapping with CW-2 at less than 5% chromosome-wise significance levels in families of Sires A and B (Additional file 4). A QTL for LMA was also detected in Sire D's family at the 1% chromosome-wise significance level (Additional file 4). These QTL peaks were also extinguished in a fixed effect QTL model accounting for the effect of SNP-9 (Additional file 4). Therefore the SNP-9 genotypes were tested for LMA and SFT in each family (Figure 5). The G/G- or G/T-genotypes had a significantly greater average LMA than the T/T-genotype in the steers of the five families and the cows of Sire D's offspring ($p < 0.01$, *t*-test), although the correlation between carcass weight and LMA traits was not high ($r = 0.26-0.54$). On the other hand, the G/G-genotype had a significantly

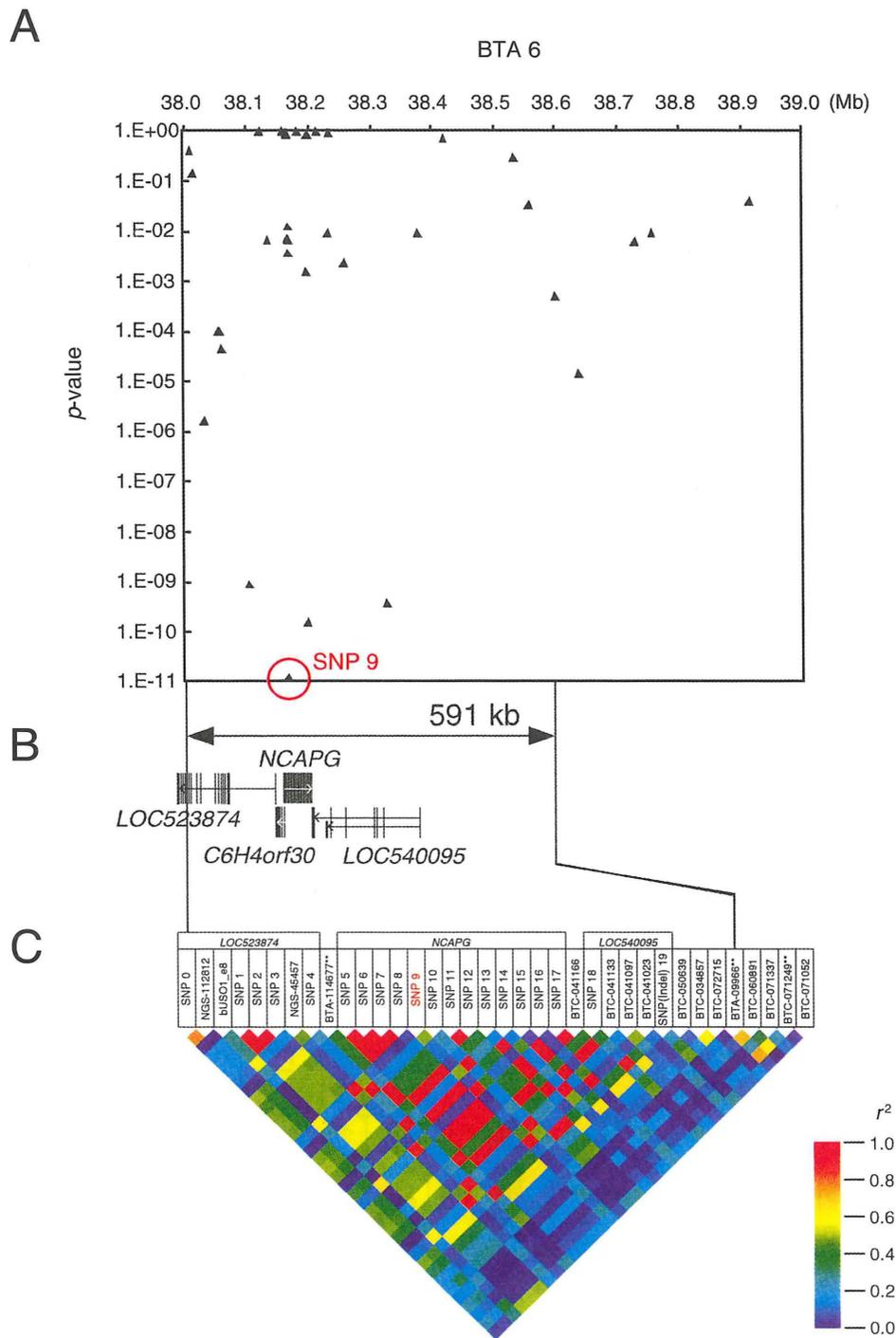


Figure 4
Association study in the IBS region using a Japanese Black population. (A) Association of the SNPs with carcass weight. A hundred and eighty-seven steers selected from the 4.7% extremes of 7990 steers were genotyped. P-values were calculated by Fisher's exact test for independence. (B) Genes located in the 591-kb region. (C) LD map. The LD was calculated for the 187 steers.

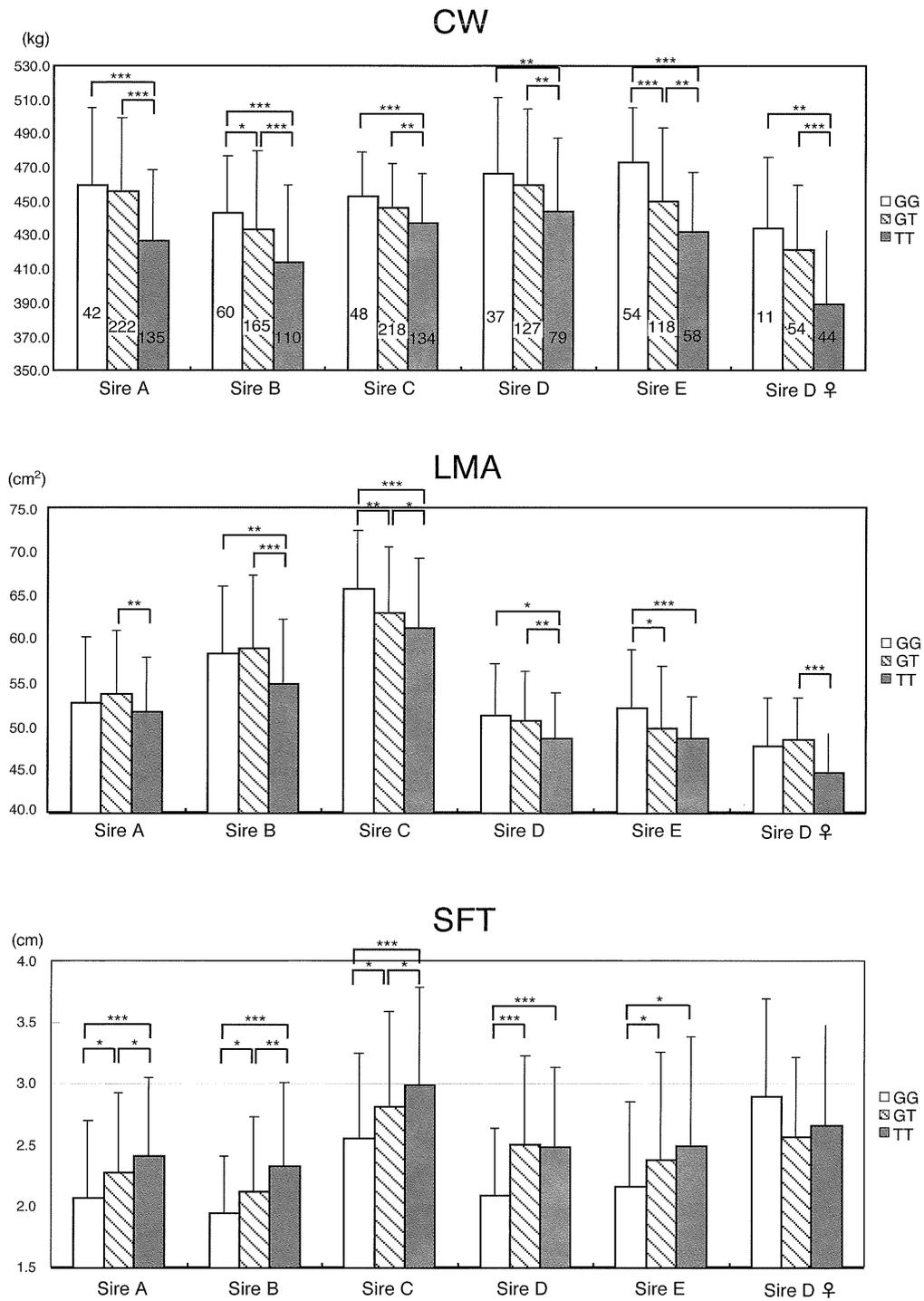


Figure 5
Association of the SNP-9 genotypes of NCAPG with carcass weight, LMA, and SFT. The steers of the five families and the cows of Sire D's family were genotyped with SNP-9. The number of offspring of each genotype is shown in the bar of the upper panel. The averages of slaughter year- and age-adjusted phenotypic values were compared between genotypes using a *t*-test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

lower average SFT than the T/T or G/T-genotypes in the steers of the five families ($p < 0.039$, *t*-test). This is a particularly interesting finding because the correlation between carcass weight and SFT traits was $r = 0.18-0.39$ in each family (Additional file 5), meaning that greater carcass weight was correlated with thicker SFT. For example, a Q allele of another carcass weight QTL *CW-1* on BTA 14 is associated with greater carcass weight and thicker SFT [1]. In *CW-2*, however, the SNP-9 genotype was associated with thinner SFT in the steers of the five families, indicating that the *CW-2* locus is pleiotropic. The results further support the notion that the *CW-2* QTL in the Japanese Black population is the same as the QTL in a respective position in the Japanese Brown population.

Discussion

Here we show that cross-breed comparisons are useful for fine-mapping of the QTL in cattle, as recently demonstrated in the fine-mapping of a monogenic trait locus in dogs [9]. We detected a carcass weight QTL on BTA 6 in two breed populations, Japanese Black and Japanese Brown. The genetic distance between the two cattle breeds can be thousands of years, because their ancestors have survived separately on the Japanese Islands and the Korean Peninsula. Linkage disequilibrium mapping using the two breeds narrowed the *CW-2* QTL region to a 591-kb section. Comparison of the Q haplotypes inherited in different lineages is, therefore, a useful strategy for narrowing down a QTL.

One of the critical issues should be whether the *CW-2* Q in the Japanese Black population is identical to the QTL in the Japanese Brown population. In this study, the effects of the *CW-2* on carcass weight, LMA, and SFT traits were similar in the two breed populations. Namely, the *CW-2* Q allele was associated with greater carcass weight, larger LMA, and thinner SFT. Importantly, although greater carcass weight is generally associated with a thicker SFT, in both populations the *CW-2* Q allele was associated with a thinner SFT. In addition, QTL for growth-related traits were mapped around the *CW-2* region in various cattle populations [5-7], suggesting that the *CW-2* Q allele is widely distributed in *Bos taurus* populations.

The 591-kb critical region contains four genes, *LOC523874*, *C6H4orf30*, *NCAPG*, and *LOC540095* (the bovine ortholog of *LCORL*). The *NCAPG-LCORL* region was recently identified as a QTL for human adult height [11,12]. An SNP causing Ile-442 to Met in *NCAPG* was detected as a positional candidate for the quantitative trait nucleotide for *CW-2*. The *NCAPG* gene encodes chromosome condensation subunit G, which is a catalytic subunit of the mammalian condensin I complex. Disruption of the *NCAPG* ortholog (*cmd3*) causes defective chromosome condensation in fission yeast [16], while in *Drosophila*,

the *NCAPG* ortholog (*Cap-G*) is essential for chromosome condensation in the metaphase of single, unreplicated sister chromatids, and also has a role during the interphase in regulating heterochromatic gene expression [17]. In HeLa cells, *NCAPG* interacts with HSF2 to mediate *HSPA1A* (*hsp70i*) bookmarking [18]. The *NCAPG* expression is upregulated in more aggressive metastatic melanomas than in less aggressive primary melanomas [19]. These findings indicate that *NCAPG* may affect cell proliferation and growth through regulating cell cycle and chromosome condensation. Further studies are required to reveal the molecular mechanism that links *NCAPG* to growth and body size.

Conclusion

We identified a 591-kb critical region for *CW-2*. Among the four genes located within the region, *NCAPG* is a candidate for the causative gene because it has an amino acid substitution that is significantly associated with carcass weight. The SNP for the amino acid substitution provides a useful *CW-2* marker for marker-assisted selection. The pleiotropic characteristic of *CW-2*, especially the effect on SFT, is clearly different from a previously fine-mapped carcass weight QTL, *CW-1* [1]. Therefore, the two QTL probably affect carcass weight in different ways and both will be useful for breeding beef cattle.

Methods

DNA samples and phenotype data

Paternal half-sib families of Sires A through E were constructed from carcass data and pedigree records collected by the Japan Wagyu Register Association (Kyoto, Japan) and Kumamoto Union of Livestock and Agriculture Cooperation (Kumamoto, Japan). Offspring of each sire were reared in different herds in a prefecture. The offspring of each sire were collected over a period ranging from 2 to 5 years. The average slaughter age was 878 days for the offspring of Japanese Black Sires A through C and 750 days for the offspring of Japanese Brown Sires D and E. Sire DNA was obtained from semen. Offspring DNA samples were collected from adipose tissues around the kidney at the slaughterhouses or blood at the individual farmer's houses. Six traits were analysed in this study: body weight at slaughter (Sire C only), cold carcass weight, LMA, rib thickness (thickness of a muscle layer in a rib of beef), SFT, and marbling. These traits were systematically measured by certified graders and recorded at the slaughterhouses in Japan.

QTL mapping

The genome or chromosome screen was conducted using the microsatellite markers on the Shirakawa-USDA linkage map [20]. QTL analyses were performed with the interval mapping method using a linear regression model for half-sib families [21,22], as described previously [1].

Linear regression analysis was performed using the following model:

$$y = Xb + e,$$

where y is the vector of phenotypic value, X is the design matrix of fixed effects composed of sex, slaughter year, age (day), and probability of having the Q phase at a given location ($Prob(Q)$), b is the vector of fixed effects, and e is the residual error. b was estimated by the least squares method. An F -statistic value at each position was calculated from the residual sum square regressed with $Prob(Q)$, and the total residual sum square without $Prob(Q)$. The analysis was performed at 2-cM intervals along each chromosome. To evaluate whether the QTL effect was well estimated, the information content was calculated as a variance of $Prob(Q)$ divided by 0.25, which was the maximum possible value of $Prob(Q)$ [23]. The allele substitution effect from q to Q was calculated as an estimator of the cofactor for $Prob(Q)$ in the b . The contribution ratio was calculated as a proportion of the trait variance explained by the paternal allele substitution from q to Q . A threshold for significance of the F -statistic value was obtained by 10,000 random permutations of the phenotypic data [24]. The 95% CI of the QTL locations was calculated using the bootstrapping method [25]. Briefly, a set of offspring was chosen so as to be the same number as the original half-sibs by resampling from the original half-sibs. Resampling was repeated 10,000 times. The position of the F -statistic peak in each bootstrapping was collected. The CI was determined by the distribution of the peaks. Therefore, the CI may be fragmented into separated regions, and not a single contiguous region.

Microsatellite development and genotyping

Microsatellites were searched for in the genomic sequences and the primers were designed using Primer 3 [26]. Twenty microsatellite markers from *DIK9001* to *DIK9020* were developed in this study. The markers were anchored to the BAC fingerprint map [27] by a BLAST search (BLASTN) against bovine BAC sequences (HTGS) [28] or by screening bovine BAC libraries, RPCI-42 [29] and CHORI-240 [30]. Marker information, such as primer sequences, genomic positions, and locations in the BAC fingerprint map, is shown in Additional file 2. Genotyping was performed using polymerase chain reaction (PCR) with a fluorescent-labeled reverse primer, followed by electrophoresis using ABI 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) and analysis using GeneMapper software (Applied Biosystems). The sires and their offspring were genotyped to determine the phase of the sires' chromosomes.

Linkage disequilibrium mapping

Linkage disequilibrium mapping was performed using the maternal alleles of the offspring steers. First, offspring were divided into two groups according to paternally inherited haplotypes (Q or q) of the *CW-2* region (38–55 cM). When a crossover was observed or suspected within the region in the paternal haplotype, the offspring were eliminated. The numbers of paternal Q - and q -inherited steers were 126 and 117 in Sire C's family, 106 and 94 in Sire D's family, and 104 and 67 in Sire E's family, respectively. The maternal allele was determined by subtracting the paternal allele from the genotype. The markers for which the number of alleles was less than four (Sire C family) or three (families of Sires D and E), or heterozygosity was less than 0.4 were eliminated. The effect of pairwise Q alleles on body or carcass weight was evaluated in each group using a t -test. Phenotypic values for carcass and body weight were adjusted based on slaughter year and age in the family. The average of the adjusted carcass or body weight was compared between the steers that harbored two consecutive Q alleles in the maternal alleles and the other steers, in each group. In Sire C family, the test was performed for $Q1$ and $Q2$ alleles in the regions where corresponding Q frequencies were higher than 5%. In Japanese Brown families, offspring from Sires D and E were combined to maximize the number of offspring. Carcass weight was not adjusted between families, because the effect of sire was not significant ($p = 0.21$). Frequencies of two consecutive $Q3$ alleles in the maternal alleles were more than 4.3% in the entire region.

SNP discovery and genotyping

Six genes (*LAP3*, *MED28*, *LOC523874*, *C6H4orf30*, *NCAPG*, and *LOC540095*) were located between *DIK4852* and *DIK9017*. SNPs in the coding regions of the genes were searched for by resequencing Sire A. SNPs chosen from a 120 K SNP collection [31] and a commercially available bovine 50 K SNP chip (Illumina, San Diego, CA) were also used. The sires and their offspring were genotyped to determine the phases of the sires' chromosomes. SNPs were genotyped by direct sequencing of the genomic PCR products. As for SNP (Indel) 19, PCR was performed using a fluorescent-labeled reverse primer and genotyped in the same way as a microsatellite marker. SNP information, such as alleles, genomic positions, and primer sequences used for amplification and sequencing, is shown in Additional file 3.

Association study

A population consisting of 7990 Japanese Black steers was constructed from DNA samples collected at one slaughterhouse over 7 years. These cattle were reared in different herds throughout Japan. To maximize the power and minimize the pedigree effect of a selected population, steers were selected from the 4.7% extremes, from many differ-

ent sires, and did not include more than 5 half-sibs in each extreme. The selected population consisted of 90 offspring (> 570 kg) from 41 sires and 97 offspring (< 410 kg) from 52 sires, among which 18 sires were common. The 187 steers were genotyped with SNPs. The association of each SNP with carcass weight was assessed by Fisher's exact test for independence using a 2×2 contingency table consisting of an observed number of each allele in each extreme population.

Calculation of LD

SNPs were confirmed not to have deviated from Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). Haplotype frequencies consisting of two SNPs were estimated using the expectation-maximization algorithm of Dempster et al. [32]. An LD coefficient (r^2) between two SNPs was calculated from the estimated haplotype frequencies.

Authors' contributions

KS, MF, TH, and TN performed the QTL analyses. KS also performed molecular genetic studies. TW performed the statistical analyses and developed microsatellite markers. YS coordinated the study and helped draft the manuscript. AT designed the study, performed molecular analyses and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional material

Additional file 1

Summary of carcass or body weight QTL detected on BTA 6. This table shows the summaries of the half-sib QTL analyses.

Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2156-10-43-S1.xls]

Additional file 2

Microsatellite marker information. This table shows primer sequences and physical positions of the microsatellite markers.

Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2156-10-43-S2.xls]

Additional file 3

SNPs and haplotypes of the five sires around the IBS region. This table shows primer sequences and physical positions of the SNP markers and haplotypes of the five sires.

Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2156-10-43-S3.xls]

Additional file 4

F-statistic profiles for LMA and SFT on BTA 6. F-statistic profiles for LMA and SFT on BTA 6 are shown as Figure 1.

Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2156-10-43-S4.pdf]

Additional file 5

Correlation between carcass weight and SFT in each family. Slaughter year- and age-adjusted phenotypic values for carcass weight and subcutaneous fat thickness are plotted by dots colored per genotype.

Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2156-10-43-S5.pdf]

Acknowledgements

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

References

- Mizoshita K, Watanabe T, Hayashi H, Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Sugimoto Y: **Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a half-sib family of purebred Japanese Black (Wagyu) cattle.** *J Anim Sci* 2004, **82**:3415-3420.
- Mizoguchi Y, Watanabe T, Fujinaka K, Iwamoto E, Sugimoto Y: **Mapping of quantitative trait loci for carcass traits in a Japanese Black (Wagyu) cattle population.** *Anim Genet* 2006, **37**:51-54.
- Takasuga A, Watanabe T, Mizoguchi Y, Hirano T, Ihara N, Takano A, Yokouchi K, Fujikawa A, Chiba K, Kobayashi N, et al.: **Identification of bovine QTL for growth and carcass traits in Japanese Black cattle by replication and identical-by-descent mapping.** *Mamm Genome* 2007, **18**:125-136.
- Mizoshita K, Takano A, Watanabe T, Takasuga A, Sugimoto Y: **Identification of a 11-Mb region for a carcass weight QTL on bovine Chromosome 14.** *Mamm Genome* 2005, **16**:532-537.
- Allan MF, Thallman RM, Cushman RA, Echternkamp SE, White SN, Kuehn LA, Casas E, Smith TP: **Association of a single nucleotide polymorphism in SPPI with growth traits and twinning in a cattle population selected for twinning rate.** *J Anim Sci* 2007, **85**:341-347.
- White SN, Casas E, Allan MF, Keele JW, Snelling WM, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M, Smith TP: **Evaluation in beef cattle of six deoxyribonucleic acid markers developed for dairy traits reveals an osteopontin polymorphism associated with postweaning growth.** *J Anim Sci* 2007, **85**:1-10.
- Gutierrez-Gil B, Williams JL, Homer D, Burton D, Haley CS, Wiener P: **Search for QTL affecting growth and carcass traits in a cross population of beef and dairy cattle.** *J Anim Sci* 2009, **87**:24-36.
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ 3rd, Zody MC, et al.: **Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog.** *Nature* 2005, **438**:803-819.
- Karlsson EK, Baranowska I, Wade CM, Salmon Hillbertz NH, Zody MC, Anderson N, Biagi TM, Patterson N, Pielberg GR, Kulbokas EJ 3rd, et al.: **Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association.** *Nat Genet* 2007, **39**:1321-1328.
- Gautier M, Faraut T, Moazami-Goudarzi K, Navratil V, Foglio M, Grohs C, Boland A, Garnier JG, Boichard D, Lathrop GM, et al.: **Genetic and haplotypic structure in 14 European and African cattle breeds.** *Genetics* 2007, **177**:1059-1070.
- Weedon MN, Lango H, Lindgren CM, Wallace C, Evans DM, Mangino M, Freathy RM, Perry JR, Stevens S, Hall AS, et al.: **Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height.** *Nat Genet* 2008, **40**:575-583.
- Gudbjartsson DF, Walters GB, Thorleifsson G, Stefansson H, Halldorsson BV, Zusmanovich P, Sulem P, Thorlacius S, Gylfason A, Steinberg S, et al.: **Many sequence variants affecting diversity of adult human height.** *Nat Genet* 2008, **40**:609-615.
- Weikard R, Goldammer T, Laurent P, Womack JE, Kuehn C: **A gene-based high-resolution comparative radiation hybrid map as a framework for genome sequence assembly of a bovine chromosome 6 region associated with QTL for growth, body**

- composition, and milk performance traits. *BMC Genomics* 2006, **7**:53.
14. Niilsen H, Hayes B, Berg PR, Roseth A, Sundsaasen KK, Nilsen K, Lien S: **Construction of a dense SNP map for bovine chromosome 6 to assist the assembly of the bovine genome sequence.** *Anim Genet* 2008, **39**:97-104.
 15. **Human (*Homo sapiens*) Genome Browser Gateway** [<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>]
 16. Sutani T, Yuasa T, Tomonaga T, Dohmae N, Takio K, Yanagida M: **Fission yeast condensin complex: essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4.** *Genes Dev* 1999, **13**:2271-2283.
 17. Dej KJ, Ahn C, Orr-Weaver TL: **Mutations in the *Drosophila* condensin subunit dCAP-G: defining the role of condensin for chromosome condensation in mitosis and gene expression in interphase.** *Genetics* 2004, **168**:895-906.
 18. Xing H, Wilkerson DC, Mayhew CN, Lubert EJ, Skaggs HS, Goodson ML, Hong Y, Park-Sarge OK, Sarge KD: **Mechanism of hsp70i gene bookmarking.** *Science* 2005, **307**:421-423.
 19. Ryu B, Kim DS, Deluca AM, Alani RM: **Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression.** *PLoS ONE* 2007, **2**:e594.
 20. Ihara N, Takasuga A, Mizoshita K, Takeda H, Sugimoto M, Mizoguchi Y, Hirano T, Itoh T, Watanabe T, Reed KM, et al.: **A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites.** *Genome Res* 2004, **14**:1987-1998.
 21. Knott SA, Elsen JM, Haley CS: **Methods for multiple-marker mapping of quantitative trait loci in half-sib populations.** *Theor Appl Genet* 1996, **93**:71-80.
 22. Seaton G, Haley CS, Knott SA, Kearsley M, Visscher PM: **QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees.** *Bioinformatics* 2002, **18**:339-340.
 23. Knott SA, Marklund L, Haley CS, Andersson K, Davies W, Ellegren H, Fredholm M, Hansson I, Hoyheim B, Lundström K, et al.: **Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and large white pigs.** *Genetics* 1998, **149**:1069-1080.
 24. Churchill GA, Doerge RW: **Empirical threshold values for quantitative trait mapping.** *Genetics* 1994, **138**:963-971.
 25. Visscher PM, Thompson R, Haley CS: **Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping.** *Genetics* 1996, **143**:1013-1020.
 26. **Primer 3** [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi]
 27. **A BAC fingerprint map of the bovine genome** [<http://www.bcgsc.ca/platform/mapping/bovine>]
 28. **NCBI/BLAST Home** [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]
 29. **RPCI - 42 Male Bovine BAC Library** [<http://bacpac.chori.org/mbovine42.htm>]
 30. **CHORI-240 Bovine BAC Library (Male)** [<http://bacpac.chori.org/bovine240.htm>]
 31. **Bovine Genome Project** [<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/>]
 32. Dempster A, Laird N, Rubin D: **Maximum likelihood estimation from incomplete data via the EM algorithm.** *J R Stat Soc* 1977, **39**:1-38.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



動物遺伝研究所年報
第17号 (平成21年度)

平成22年10月1日発行

発行 (社)畜産技術協会

〒113-0034 東京都文京区湯島3-20-9 緬羊会館内
TEL: 03-3836-2301

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: 0248-25-5641

印刷 (有)ワタベ印刷所

〒961-0936 福島県白河市大工町18
電話 0248-22-3241

