



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 18 号

2010 (平成22) 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

2011（平成23）年3月11日の東日本大震災に際し、多くの方々からお見舞いや激励をいただきました。この場を借りてお礼申し上げます。附属動物遺伝研究所に被害はありませんでしたが、改めて自然の怖さを思い知らされ、この年報の序文を書いていることすら不思議な気がいたします。

本年報は2010（平成22）年度における当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、肉牛・乳牛における子牛損耗率は高く、畜産現場と連携しつつ対処していかなくてはなりません。

ウシゲノムの解読以来、大量のSNP（1塩基多型）マーカーの開発が容易となり、5万個（50K）/70万個（700K）のSNPを搭載したチップが市販されています。当研究所でも2010年度の成果の一つとして、黒毛和種牛由来の情報量の多いSNPを1,300万個開発し、データベース化しました。また、ウシ枝肉形質QTLの解析では、3,000個のSNPを活用することで従来の手法と比べ、大幅な迅速化とコストの削減を達成することができました。当研究所は、肉牛でも乳牛でも詳細なSNP情報を蓄積しており、世界中で進んでいるウシゲノム情報の解明と合わせて、今後の新たな展開を期するところです。

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、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。

2011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

2010（平成22）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 2010（平成22）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10
 - 3) ウシ経済形質のDNA育種手法の開発13
2. 2010（平成22）年度研究発表26
 - 1) 論文発表26
 - 2) 学会発表26
 - 3) 講演29
 - 4) 学会発表要旨29
3. 委員会・会議等の開催47
 - 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47
 - 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48
 - 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48
 - 4) 全国DNA育種推進会議49
 - 5) 研究会等の開催50
4. 委託研究52
5. 研修員の受け入れ54

第3節 総務

1. 職員名簿55
2. 職員の異動55
3. 職員の海外出張56
4. 施設・機器の整備56
5. 購読雑誌一覧58

第4節 資料

1. 論文再録59

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。

1992（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、ホルスタイン種に見られた計8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。遺伝性疾患の解析は、その後、ウシ全ゲノムの解読（2009年）から始まるSNPの実用化やウシ遺伝子構造の解明などの進展により加速されている。

1994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。経済形質の解析においても、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。

職員は1992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、2010年度末には所長を含む管理部門3名、研究部門11名（研究員6名、研究補助員5名）となった。

第2節 2010(平成22)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) ウシゲノム配列の現状

ウシゲノム配列(*Bos taurus*, ヘレフォード種)は、現在2つのアセンブリが登録・公開されている。1つは、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SEMBルが行われたもので、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(Btau_4.0)、2010年10月には、Y染色体の配列を加えたBtau_4.5が登録・公開された。もう1つのアセンブリは、メリーランド大が、Btau_4.0と同じ塩基配列を用いて別の手法でアSEMBルしたもので、2010年10月にNCBIのパイプラインでアノテーションされた(UMD3.1)。どちらのアセンブリにも、小さなギャップや配列のつなぎ間違い(アSEMBルエラー)が残されているため、ゲノム配列の完成度を上げることが優先課題となっている。BCMヒトゲノムシーケンシングセンターでは、ウシゲノム配列と同じ手法 [= BACクローンと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) を組み合わせたもの] で作成したラットのゲノム配列を、新型シーケンサーのデータを加えて改良しており、ウシのゲノム配列も同様のやり方で改良できると述べていた。今後の進展に期待したい。

一方、米国農務省(USDA-ARS)では、世界のウシの3分の1を占め、熱帯気候に順応した*Bos indicus*のゲノム配列を決定するため、新型シーケンサーを用いて、ネローレ種個体の塩基配列決定とアSEMBリ、SNP探索、mRNA配列の決定などを行っていた。さらに、水牛(*Bubalus bubalus*)についても、労働力や乳、肉、角、革など経済的に非常に優れていることから、ゲノム配列決定のためのコンソーシアムが組まれていた。

ウシゲノム配列のアノテーションについては、現在、Btau_4.2アセンブリには24,000
個の遺伝子が、UMD3.1アセンブリには26,000個の遺伝子が注釈されている。この中には、ヒトなど他の生物種の遺伝子との配列の相同性から予測されたものも多く含まれるが、遺伝子の5'側および3'側非翻訳領域は他生物種との配列の相同性が低いいため、予測遺伝子の5'側および3'側非翻訳領域は注釈されていない。米国農務省(USDA-ARS)は、ウシの81種類の組織からそれぞれ抽出したmRNAの配列を新型シーケンサーで決定し、UMD3.1アSEMBリにアラインメントすることで、遺伝子の5'側および3'側非翻訳領域を正しく決定した。その結果、ウシゲノム中の全エクソン領域は、32 Mb (3,200万塩基

対) から40 Mbとなった。

(2) 新型シーケンサーと従来のシーケンサーの違い

従来のシーケンサーは、サンガー法という方法で500-1,000 bp(塩基対)のDNA配列を効率よく読むことができる。当研究所で使用しているABI 3730 DNAシーケンサーは、一度に96個のDNAサンプルを1時間で読む。BACクローンの長さ150 kb(15万塩基対)くらいなら多数のDNA配列をつなぎ合わせて解読が完成する。この作業の繰り返しで全ゲノム解読に至るのである。

一方、新型シーケンサーはアダプター上で36 bp x 2 のDNA配列を40時間で読むことができる。短い長さしか読めず、時間もかかるが、アダプターは1レーンに2,750万個あり、1回の解読でレーン当たりゲノムの2/3倍に相当する2 Gb (20億塩基対)を読むことができる。8サンプル8レーン使うと、16 Gb、5.3ゲノム相当となるが、36 bp断片を互いにつなでいくことはできない。ところが、ウシゲノム解読でウシの参照配列が完成しているので、36 bpであっても参照配列と比較する(貼り付けていく)ことでつないでいける。すなわち、新型シーケンサーはゲノムの参照配列が存在して初めて役に立つ。

(3) 新型シーケンサーによるウシSNPの大量開発

新型シーケンサーでゲノムを読むことをリシーケンシングというが、リシーケンシングすると多くのSNP(1塩基多型)が見つかる。大量に開発したSNPをまとめてチップやアレイ化した商品が販売されている。

ウシSNPチップは、イルミナ社が先行し、現在、50K(2007年12月市販開始)、HD(2010年7月)、3K(2010年7月)の3種類が市販されているが、今回、**アフィメトリクス社がAxiom BOS 1アレイを発表した。**これは、*Bos taurus*や *Bos indicus*を新型シーケンサーで配列決定している研究室がそれぞれのデータをアフィメトリクス社に提供し、様々な品種のデータを合わせて解析することで、質の高い多数のSNP開発を可能にしたものである。検出された4,600万個のSNPのうち、2品種以上で検出された約300万個をスクリーニングアレイに載せ、20品種 計400個体でタイピングし、各品種における連鎖不平衡度を基に、遺伝的カバー率が最大となるようにSNPを選択した。その結果、Axiom BOS 1アレイ(64.8万個のSNPを搭載)は、イルミナHD SNPチップ(ゲノム上に等間隔にSNPを配置するように選択した77.8万個のSNPを搭載)よりも各品種における遺伝的カバー率が高く、*Bos taurus*で88-99%、*Bos indicus*で79-87%をカバーしているという。

(3) ウシ全エクソンキャプチャー

全エクソンキャプチャー法は、断片化したゲノムからエクソン(= 遺伝子としてmRNAに転写される領域)部分を濃縮して取り出す方法であり、新型シーケンサーで配列決定することによってエクソン部分に生じた変異を効率良く探索できる。ヒトの遺伝病の原因変異を見出す方法として開発されたもので、発症個体の少ない比較的稀な遺伝病においても原因変異を同定することができる新しい解析手法である。ヒト全エクソンキャプチャー用キットは、現在、ロッシュNimblegen、アジレント、イルミナの3社から市販されていて、最大62 Mb (最新ヒトRefSeqデータベースの91%、タンパク質コード領域の95%をカバー)をターゲットとしている。

ウシにおいても遺伝子情報が整備されてきたことから ((1) 項参照)、アジレント社が米国農務省 (USDA-ARS) と共同で、ウシ全エクソンキャプチャー用キットの製品化に向けた試作を行うことになった。ウシの遺伝性疾患解析のための新しいツールとなるだけでなく、ゲノム選抜を念頭においた遺伝子領域の集中的なSNP開発に利用できることが期待される。

(4) 新たな育種価推定手法—ゲノム選抜法の進展

ゲノム選抜とは、種雄牛数千頭についての遺伝子型と評価育種価との相関を基に各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。米国では、2009年1月からホルスタイン種のゲノム育種価を(評価育種価と併記で)公開している。ゲノム選抜法は、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大幅に削減できるというメリットがあるが、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。Hayesらは、高密度SNPチップを用いることによって、ゲノム選抜の正確度を上げ、また、異なる品種にも適用できる可能性を示した。彼らによると、イルミナ50K SNPチップでタイピングしたホルスタイン種2,203種雄牛のうち、この集団内に大きな遺伝的影響を与えている祖先種雄牛45頭と他の400頭をイルミナHD (約800K) SNPチップでタイピングすることによって、残りの個体の800K SNP 遺伝子型を97%以上の正確さで推定することができ、800K SNP 遺伝子型では50K SNP 遺伝子型よりもやや上回る形質との相関を検出した。新たに検出された相関は、ジャージー種398種雄牛においても再現された。次に、これらの種雄牛を、ホルスタイン種1,886頭 + ジャージー種325頭の参考集団と、ホルスタイン種317頭 + ジャージー種73頭の検証集団に分割し、50K SNP 遺伝子型と800K SNP 遺伝子型のそれぞれでゲノム育種価を算出したところ、その相関 (0.5-0.6) はいずれも800K SNP 遺伝子

型の方がやや上回っていた。彼らは、800K SNP遺伝子型から全ゲノム配列（すべてのSNP遺伝子型）を推定することを次の課題としていて、各研究所が種雄牛のゲノムリシークエンスデータを提供・共有し、ゲノム配列推定のための参考集団として利用できる「1,000種雄牛ゲノム」構想を提案していた。

肉牛のゲノム選抜については、Garrickらが、50K SNP遺伝子型を用いて、アンガス種を参考集団、ヘレフォード種を検証集団とした場合と、その逆の場合を試していたが、いずれも育種価との相関は低かった（0.16-0.18）。

(5) 当研究所における取り組み：新型シーケンサーを用いた黒毛和種由来のSNP開発

SNPは関連解析などのゲノム解析に有効なDNAマーカーである。ウシの全ゲノム配列が整ってきたことにより、新型シーケンサーを用いた網羅的なSNP探索が可能になった。黒毛和種で効率的なゲノム解析を行うため、黒毛和種で情報量の多いSNP [マイナーアレル頻度 (MAF) ≥ 0.05]を開発し、「黒毛和種SNPマップ」としてデータベース化した。

黒毛和種集団のSNPを偏りなく探索するために、イルミナ50K SNP遺伝子型を用いた主成分分析と各個体の血統情報に基づき、4つの系統グループに分け、半きょうだいを含まない52頭（気高系；15頭、田尻系；19頭、藤良系；11頭、茂金系；7頭）の肥育去勢牛を選抜した。ゲノムDNAは、グループごとにプールした（図1）。

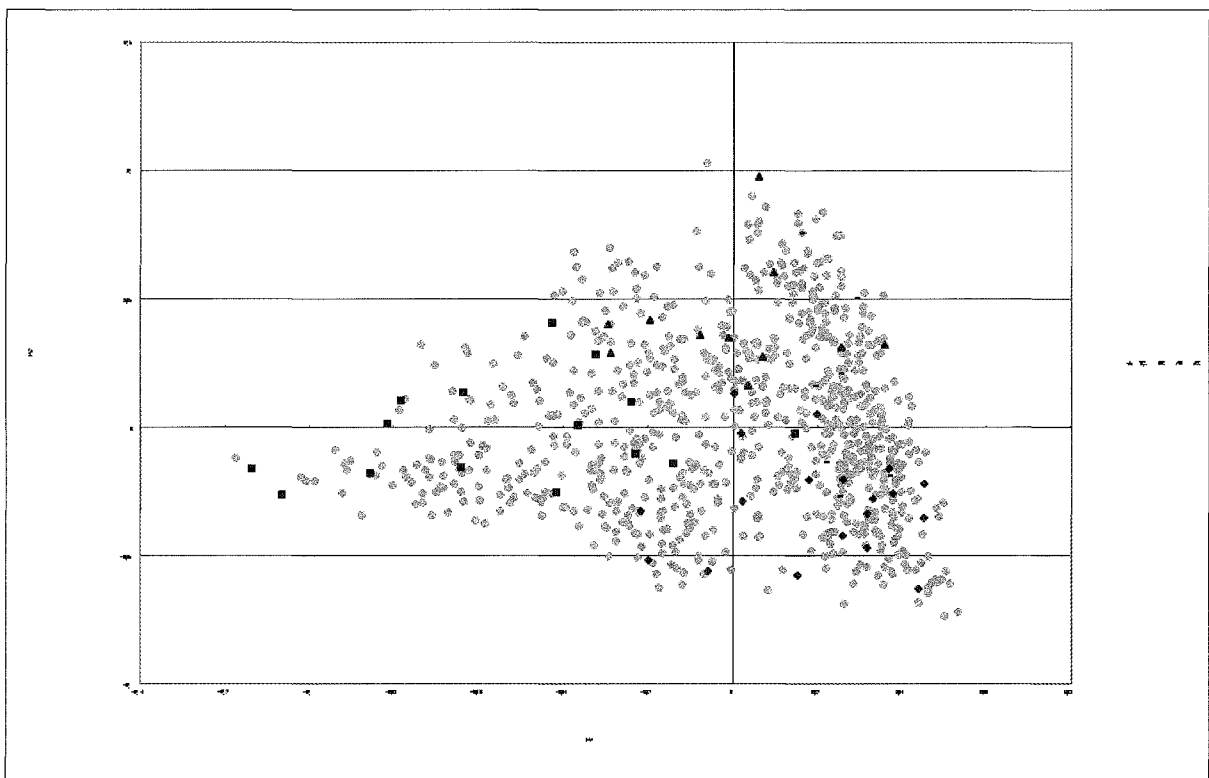


図1. 黒毛和種集団と選抜個体の分布

これら4つのDNAプールに対して、それぞれPaired-End用シーケンシングライブラリーを作成し、Genome Analyzer IIにてシーケンシングを行った。フローセルは8レーンに分かれているため、各グループに2レーンずつ使用して、36 bpのread長で4ラン、40 bpで11ラン行った。リファレンス配列にはUMD3.0を用い、 $10,000 > \text{depth} \geq 20$ でカバーされている領域を対象としてSNP探索を行い、マイナーアリルが2 reads以上、推定MAF (eMAF) が0.05以上である部位をSNPとして検出した。

全15ランで170.8 Gb (x 63.94: 1,708億塩基対)の配列データが得られた。各グループについては、気高系; 40.8 Gb (x 15.27)、田尻系; 43.9 Gb (x 16.45)、藤良系; 44.8 Gb (x 16.77)、茂金系; 41.3 Gb (x 15.45)であり、全グループで同程度の配列データが得られた。全readの93.2%はUMD3.0にマップでき、解析に使用された。これらread (総塩基数 = 159.4 Gb; x 59.70) によって、ゲノムの95.3%が20 depth以上でカバーされ、**常染色体およびX染色体から見出したSNP (推定MAF ≥ 0.05) の総数は13,281,834個であり、リピート領域外では4,594,381個となった。**平均推定MAFは0.26 (リピート領域外、0.28)、平均間隔;は202 bp (リピート領域外、308 bp)であった。各常染色体の検出されたSNP数と配列の長さは同様のパターンを示すため、SNP探索はゲノム全体から偏りなく行うことができたと考えられる (図3)。

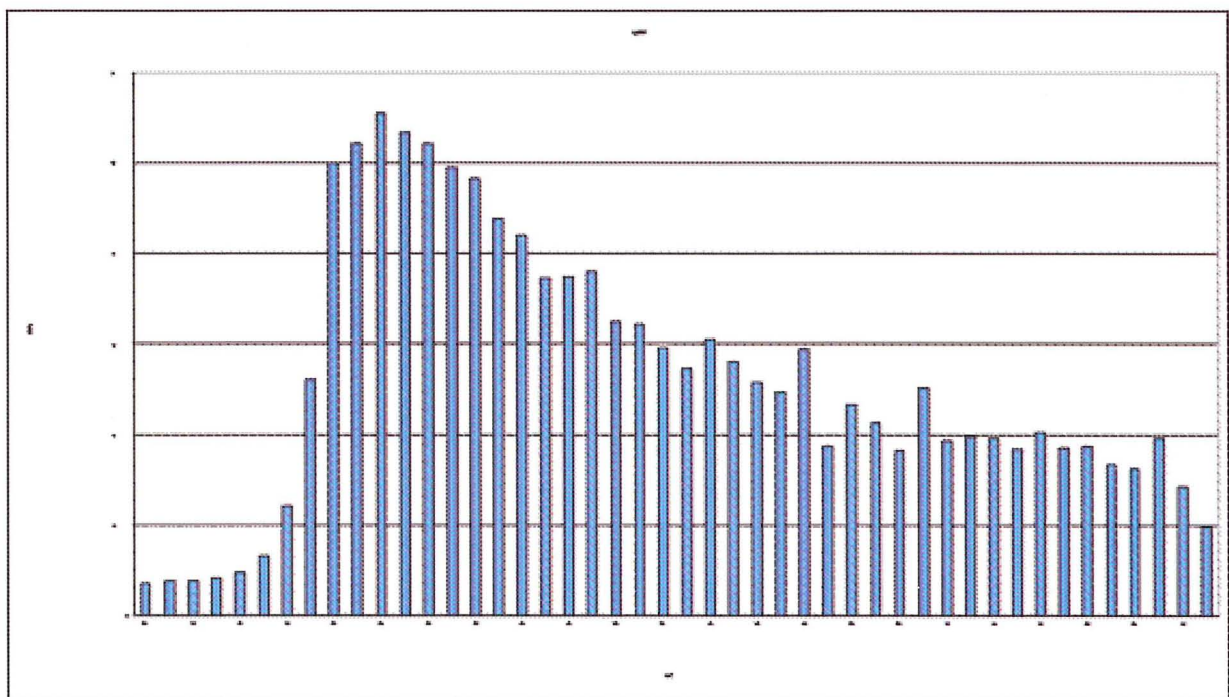


図2. eMAFとSNP数

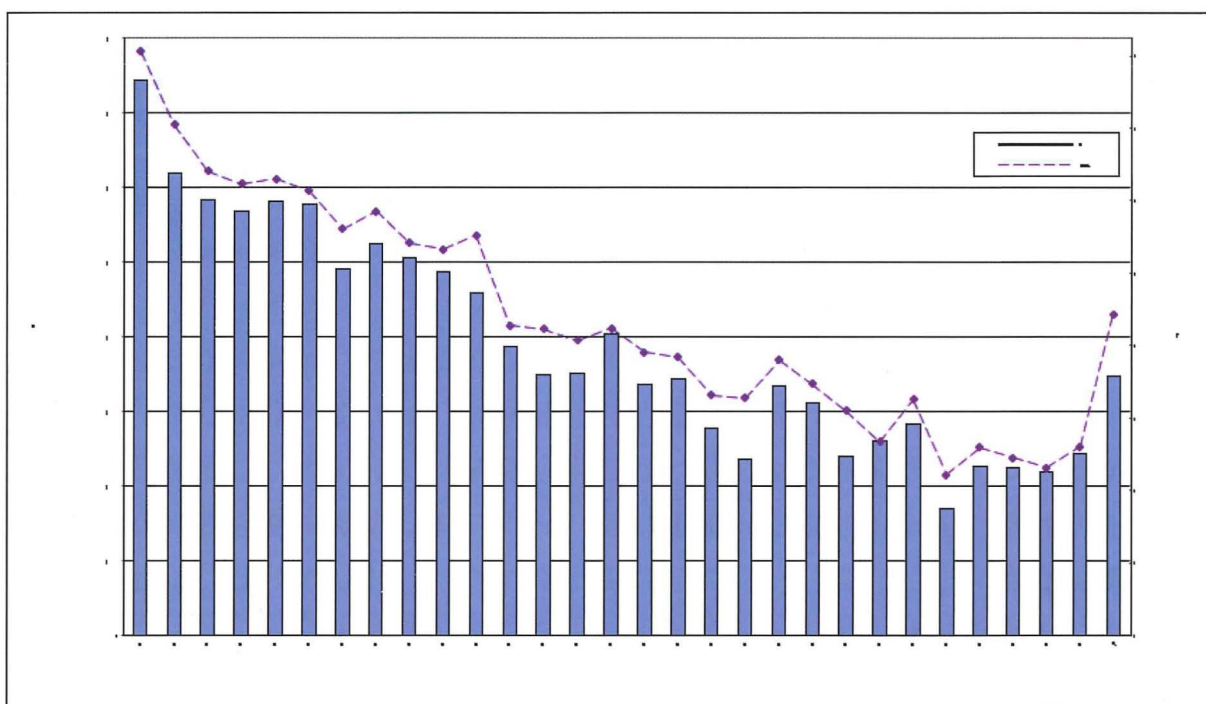


図3. 各染色体のSNP数と長さ

解析の対象とした52頭をイルミナHD SNPチップで型判定して得られた染色体 29番のSNPのMAFを、ここで得られたeMAFと比較した。イルミナHD SNPチップには $0.05 < \text{MAF} < 0.20$ のSNPは4,068個あり、その内2,684個(66.0%)だけが52頭のリシーケンシングで見出された。しかし、リシーケンシングでのread数が多くなる $\text{MAF} \geq 0.20$ のSNPでは6,809個中6,522個(95.8%)を検出できた。リシーケンシングで検出したSNPのeMAFは、HDチップのMAFとよく一致していたことから、MAF推定の信頼性は高いことがわかった。

今回開発したSNPは、黒毛和種でアレル頻度が高い一般的なSNP (Common SNP) である。アレル頻度の低いSNPは含まれないので、不良形質の原因SNP候補を絞り込む目的にも有用かもしれない。

(6) SNP を用いる品種鑑定手法の確立

当研究所ではこれまでに、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 \times ホルスタイン種) の品種鑑別法を開発した (Watanabe *et al.*, *Anim. Genet.*, 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コンソーシアムの論文においては、約37,000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、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。

国内のホルスタイン種雄牛125頭と黒毛和種去勢牛129頭（両品種とも半きょうだいを含まない）をイルミナ50K SNPチップでタイピングし、マイナーアリル頻度が0.1以上でデータ欠損のない約33,000個のSNPを解析に用いた。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 ）と両品種のアリ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_T ）を用いてWrightの F_{ST} 統計量を計算した [$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$]。

F_{ST} の大きい順に18個のSNP（ $r^2 < 0.12$ ）を選び、96頭のF1を加え、品種鑑定を行った。SNP 18個の遺伝子型を用いてLinear Discriminant Analysisを行ったところ、黒毛和種をホルスタイン種及びF1と識別することに成功した。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。

(7) 今後の進め方

(7)-1. SNPチップ

アフィメトリクスAxiom BOS 1アレイの黒毛和種における有用性を確認する。イルミナHD SNPチップを、黒毛和種の各系統に属する計52頭（半きょうだいを含まない）で評価すると、マイナーアリル頻度0.01以上の常染色体上のSNPが約59万個、500 kb以上のギャップが6本の染色体上に7箇所（最大1.47 Mb）存在した。Axiom BOS 1アレイは、SNP探索に韓牛のゲノム配列も使われおり、また、遺伝的カバー率が高くなるようにSNP選択されているため、HDチップより有用であるかもしれない。Axiom BOS 1アレイに搭載されたSNPを、上記黒毛和種52頭を用いて作成した「黒毛和種SNPマップ」と照合し、その有用性を検討する。

(7)-2. ウシ全エクソンキャプチャー

NCBIで公開されているBtau_4.2アセンブリ上および UMD3.1アセンブリ上の計2万6千個の遺伝子情報を用いて、配列キャプチャー用のロッシユNimblegenカスタムアレイを作成中である。これを用いて、子牛損耗のゲノム解析に新たに取り組む。エクソン上のSNPを集中的に探索できるので、新たに見出したSNPを加えて「黒毛和種SNPマップ」を充実させる。アジレント社の試作品の使用も検討する。

2) ウシ遺伝性疾病のDNA診断法の開発

(1) 研究年次：1997年-2010年（平成9年-平成22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単純劣性遺伝病であり、発症すると胎児死や子牛の損耗となり、経済的な損失は大きい。本事業では、これらの疾病について、DNAを指標としたスクリーニング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。2010年度までに8種の遺伝性疾病の原因変異を明らかにし、遺伝子診断法を確立した（表1）。

表1. 遺伝性疾病の遺伝子解析の2010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
クローデイン-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
クローデイン-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
眼球形成不全症	黒毛和種	WFDC1	1塩基挿入	あり	岡山大学
マルファン症候群様不良形質	黒毛和種	FBN1	スプライシング変異	あり	申請せず

(3) ウシ遺伝性疾患の解析

(3)-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、2007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.*, *Anim. Genet.*, 2008）。そこで新型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、2009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約1,700個のSNPを見出した。

2010年度は、引き続いて疾病の原因となる変異を探索した。

(3)-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。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）に類似している。ヒトでは優性の遺伝様式を示し、*Fibrillin1* (*FBN1*) の変異が原因の一つと判明している。

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）を用いてイルミナ50K SNPチップで型判定し、染色体10番にマッピングした。染色体10番にマッピングされた領域には*FBN1*が位置し、発症牛のハプロタイプはヘテロであることから、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が、種雄牛Aは発症していない。そこで、*FBN1*の配列を調べたところ、種雄牛Aのエクソン65のスプライシング部位に1塩基欠損のモザイク変異を見出した。この変異は、発症牛36頭中31頭にヘテロで認められ、種雄牛Aの正常産子20頭と非血縁牛94頭に存在しなかった。モザイク変異の頻度は15%であったことから種雄牛Aの産子の15%が発症する。したがって、産子についてDNA診断することが望ましいと考えられる（Hirano *et al.*,

Anim. Genet., 2011)。

(3)-3. 子牛損耗

黒毛和種およびホルスタイン種の生後6ヶ月までの子牛損耗率は約15%に達しており、経済的な損失は無視できない。子牛死亡における遺伝的要因を解析するため、2009年度から、生後3週間内に死亡した胎児・新生子のサンプルを収集してきた。これまで黒毛和種の「子牛虚弱症候群」サンプルを163頭、および、死亡子牛の耳片490サンプルを収集した。また、ホルスタイン種の子牛損耗に関して、58,000症例データ（2006–2009年度）と1,600頭（2009年11月以降）の耳片サンプルを収集した。症例中に多数の「子牛虚弱症候群」や「腸炎」などが見られ、黒毛和種およびホルスタイン種の子牛損耗率推定育種価は種雄牛による違いが認められた。

(4) 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。

2011年度は、全エクソンキャプチャー法 [1)-(6)-2 参照] による変異の探索ができるようにする。遺伝病の疑われる子牛損耗の原因についてイルミナ50K SNPチップによるマッピングを行い、全エクソンキャプチャー法で変異を探索して、遺伝的要因の解明を目指す。

(5) 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。2010年度における国内外の成果を紹介する。

(5)-1. 蜘蛛肢症

ブラウンスイス種に見られる蜘蛛肢症 (Arachnomelia) は、四肢遠位端が著しく長く細い特徴があり、劣性の脊柱背側彎症である。Leebらは、これまでにマッピングされていた染色体5番の7 Mb領域をアレーキャプチャー法でリシーケンシングし、*Sulfite Oxidase (SUOX)* に1塩基挿入変異を見出した。この挿入変異によってタンパク質の停止コドンができる (Drogemuller *et al.*, *PLoS Genet.*, 2010)。

(5)-2. 無毛性外胚葉形成不全症

無毛性外胚葉形成不全症 (Anhidrotic ectodermal dysplasia) は、ヒトやマウスにおいて認められた伴性遺伝疾患で、原因遺伝子として *Ectodysplasin-A (EDA)* が報告されている。荻野らは、ホルスタイン種において同様の疾病を認め、EDA を調べ、第1エクソン中に19 bpの欠損を見出した (Ogino *et al.*, *Hereditas*, 2011)。

3) ウシ経済形質のDNA育種手法の開発

(1) 研究年次: 1994年-2010年 (平成6年-平成22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。また、ウシ全ゲノムの解読で一気に加速したゲノム解析用ツールの整備により、SNPを用いる家系解析や一般集団を対照とするゲノムワイド関連解析の実施が可能となった。これらの手法を用いて枝肉形質や繁殖形質などの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) ウシ枝肉形質のゲノム解析

(3)-1. 枝肉形質解析のためのDNAサンプルの収集

1994年度から道県 (19道県、2010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。2010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約5万となった。

表2. 2010年度までの黒毛和種DNAサンプル収集状況

年度	収集数
2001-2009累計	44,358
2010	6,215
合計	50,573

(3)-2. 父方半きょうだい家系を用いる枝肉形質のゲノム解析

ほとんどの枝肉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 (染色体ワイズ、chromosome-wise) やゲノム毎 (ゲノムワイズ、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*, 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)。

平成22年度から約3,000個のSNPパネルによる半きょうだい家系QTLマッピングを開始した。SNPデータを用いる場合、父染色体の相推定には総当たりの尤度計算を要求するが、旧バージョンでは、一染色体あたり32を超えるマーカーを扱うことができなかった。また尤度の計算速度も遅かったため、制限数以下のマーカー数であっても実用的な計算時間内にSNPパネルによるデータを解析できなかった。本バージョンは1染色体あたり1,024個までのマーカーを扱えるよう、拡張をおこなうとともに、アルゴリズムの見直しにより計算速度の大幅な向上を達成し、SNPデータを解析できるようになった (Glissado version 2.2.7: build 259)。

(3)-3. カスタム3K SNPによる枝肉形質QTLマッピング

これまでわれわれは、子世代で分離する、父親においてヘテロな枝肉形質QTLを検出する目的で、黒毛和種父方半きょうだいを対象に、マイクロサテライト (MS) マーカーを用いて解析を行ってきた。MSは一般に多型性が高く、情報量が多いという利点があるものの、マーカー型判定作業には多大な労力を要する。

一方、SNPマーカーは2アリルしかないため、情報量は少ないが、大量かつ高速に型判定を行うことができる。半きょうだい家系解析の型判定に要するコストを圧縮する目的で、約3,000個のSNPからなるカスタムチップをデザインした。これらのSNPは、イルミナ50K SNPチップの中から黒毛和種集団において多型性が高いものが選ばれている。2010年度は、このカスタムチップを用いて170-280頭の半きょうだい家系4つを対象にQTL解析を行った。低コストで短時間にQTLマッピングができることがわかった。

4家系合計で1,000頭あまりの個体を全ての常染色体を対象に同一マーカーセットで型判定を行ったことになるが、半きょうだい家系解析の際には「父親でホモ」のマーカー情報は一切使用していない。そこで本研究では4家系、全産子の全SNPマーカー情報を利用して、子世代で分離するもの以外のQTLの検出を試みるとともに、QTLマッピングの検出力を高めることを目的とした。

解析対象は4組の黒毛和種父方半きょうだいで、産子数はそれぞれ175頭、282頭、283頭、および251頭からなる。合計991頭で、2004年から2010年の間に8箇所の市場で採材された。解析対象形質は、枝肉重量および脂肪交雑等級（以下BMS No）とした。2,800個のSNPを含むカスタム3K SNPチップにより型判定し、個体あたりの型判定率0.95以上（データ欠損率 5%以下）、SNPあたりの型判定率0.95以上を採用し、2,764個のSNPを選択した。

サンプルは半きょうだいであるため、単純な相関解析を行うのは不適切である。同サンプルの場合、集団の構造化を補正するよりも、血縁情報を利用した混合モデルでSNP効果を推定する方が適切である。しかしながら、異なる県集団間の血縁係数を得るのはきわめて困難である。

解析ソフトウェア EMMAX (Efficient Mixed-Model Association eXpedite, Kang *et al.*, *Nat. Genet.*, 2010) は混合モデルによりSNP効果を推定することができるが、血統情報による分子血縁係数行列を得られないとき、SNP遺伝子型データから「ゲノム関係行列」を作成することができる。今回は、3K SNP 遺伝子型データから同ソフトウェアによりゲノム関係行列を得、これを利用した。市場、年次、月齢を固定効果とし、各SNPが持つ効果の推定を行い、そのP値を算出した。

今回の解析においてBonferroni補正した $P = 0.05$ は $P = 1.8 \times 10^{-5}$ であるが、この閾値はあまりに保守的であると考えられる。 P 値の期待値からの乖離が十分見られた $P = 0.001$ を暫定的な閾値とし、これを下回ったSNPを有意とした。枝肉重量の場合、6本の染色体上に関連が検出され、うち3領域はCW-1、CW-2、およびCW-3と一致した。2領域(3個)のSNPは黒毛和種半きょうだい家系解析では報告されていないQTLであった。検出されたQTLのうち4領域については各半きょうだい家系解析において分離するQTLとして検出されていた。BMS Noの場合、 $P < 0.001$ の10個中、6個が未報告QTLであった。また、各半きょうだい家系解析において分離するQTLとして検出されたものは2個のみであった。

枝肉重量QTLはこれまでに検出しているCW-1、2、3の効果が大きかったが、それ以外にも新規のQTLを検出することができた。BMS No についてもいくつか新規のQTLを検出できたと考えられるが、枝肉重量QTLに比較するといずれも効果は小さいものであった。

(3)-4. 枝肉形質QTLマップの更新

道県等の共同研究機関と行ってきた父方半きょうだい家系を用いた経済形質のマッピング成果を2006年からまとめ、経済形質QTLマップを作成してきた。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ることができる。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。

2010年度の更新QTLマップは、3K SNPチップでの結果を含め、44家系の結果から成り、用いた産子数は総数 17,389頭となった (図4)。

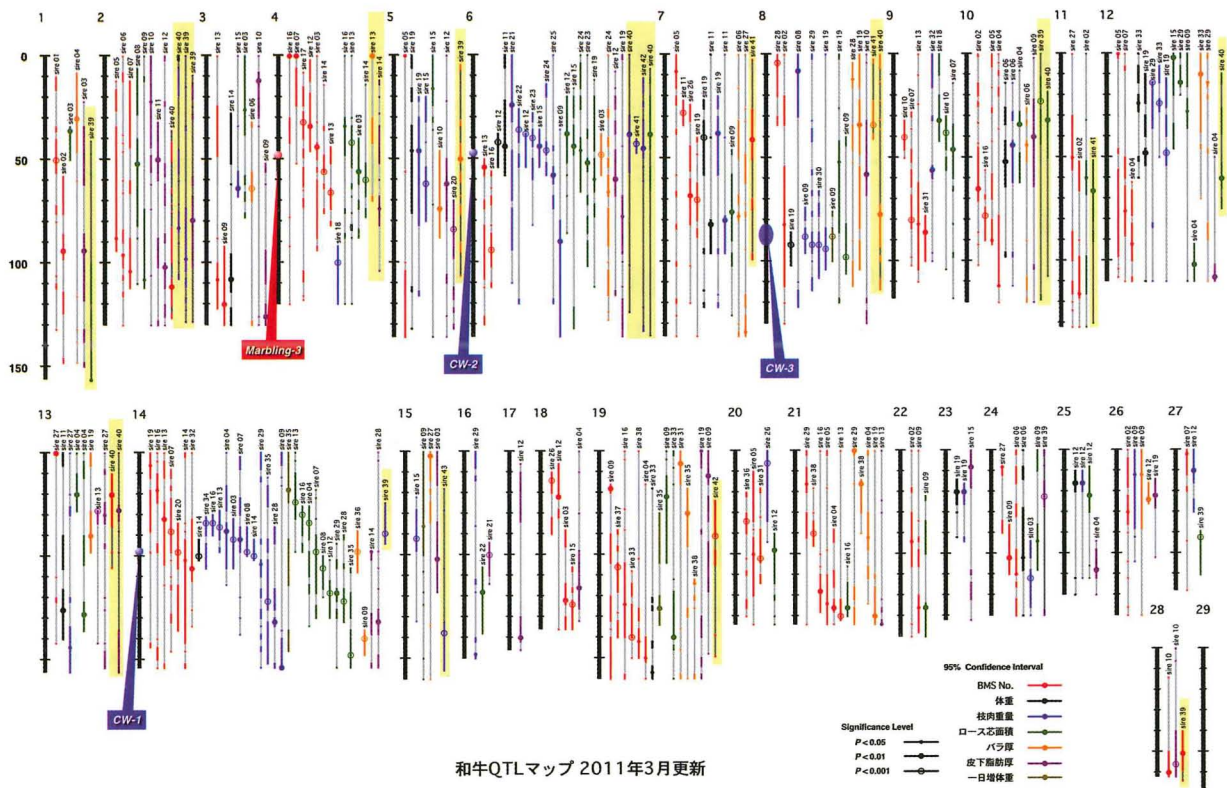


図4. 黒毛和種QTLマップ

検出されたQTLを、Lander & Kruglyak (*Nat. Genet.*, 1995)の基準に沿ってまとめると、「有意な連鎖」は、ゲノムレベル5%有意を超えたものである。

(3)-5. SNPを用いた脂肪交雑・枝肉重量のゲノムワイド関連解析

ゲノムワイド関連解析では、一般集団を対照に表型値の上位下位の両極端集団間におけるSNPアレルの偏りを観察し、表型値に影響する遺伝子座を見出す。2010年度までに

屠場から黒毛和種の肥育牛約5万頭のDNAと枝肉成績を収集してきたが(表2)、この集団から去勢牛の脂肪交雑と枝肉重量について両極端集団を抽出し、ゲノムワイド関連解析を行っている。

(3)-5-1. 枝肉重量のゲノムワイド関連解析

2009年度までに、ゲノムワイド有意水準を超えた領域を染色体6番(CW-2)と染色体14番(CW-1)に見出した。 $P < 0.001$ 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、さらに関連座位を検出できると考えられた。また、染色体8番の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。

2010年度は、2大市場で収集した黒毛和種去勢牛27,531頭の枝肉重量(月齢、年度、市場で補正)上位・下位15%から、グループ内で半兄弟を含まないように計502個体を選択し、イルミナ50K SNPチップでタイピングした。また、脂肪交雑の関連解析でタイピング済みの計664個体も加えて関連解析を行った。型判定率0.95以上、マイナーアレル頻度(MAF)0.01以上、ハーディ・ワインバーグ平衡検定 $P \geq 0.001$ を満たす約3万9千個のSNPを解析に用いた。統計解析は、EMMAXプログラムを用い、線形混合モデルにより行った。

ゲノムワイドで有意な関連を、染色体6番、8番、14番に検出した(20 SNPs; $P < 1.2 \times 10^{-6}$)。これらの領域は父方半きょうだい家系解析で検出したCW-2, CW-3, CW-1とそれぞれ同じと考えられた。染色体6番と14番では、最も関連の強かったSNP(SNP-1と4)について、染色体8番では最も関連の強かったSNP(SNP-2)ともう1つのSNP(SNP-3)について、Conditional Analysis(特定のSNPの効果を固定効果とし、別のSNPの効果を解析する方法)を行うと有意な関連は検出されなくなり、これら3領域で検出された関連は、それぞれ1つのQTLによるものと考えられた。また、これら4つのSNPのConditional Analysisでは、Quantile-QuantileプロットにおいてP値の期待値からの乖離は見られず、3座位以外の関連座位を検出することはできなかった。

次に、関連解析の結果と家系解析の結果を比較すると、染色体14番で最も関連の強かったSNP-4は、CW-1領域として限定した領域から約1 Mbセントロメア側に存在していた。SNP-4の周辺にマイクロサテライトマーカーを開発し、再度連鎖不平衡マッピングを行ったところ、SNP-4周辺の方がCW-1領域として限定していた1.1 Mbよりも強い関連を示し、真のCW-1はSNP-4周辺の約940 kb内にあると考えられた。この領域は、ヒトの身長関連座位およびジャージー種 x ホルスタイン種の集団で同定された体高QTLを含んでい

た (Karim *et al.*, *Nat. Genet.*, 2010)。

CW-3については、2010年度、家系解析に用いた種雄牛のハプロタイプの由来を精査することによって、領域を、共通祖先由来の11 Mbに限定した。関連解析の結果より、SNP-2, 3は単独ではCW-3のマーカールにできないため、最近市販されたイルミナHD SNPチップを利用して適当なSNPを検索し、SNP-2 (5.3×10^{-9})よりはるかに低いP値 (1.8×10^{-13})を示すSNP_{HD}を得た。マイクロサテライトによる連鎖不平衡マッピングでは、領域をさらに狭めることはできなかったものの、P値が最も低くなる約1.2 Mbが候補領域として有望と思われた。この領域にも、ヒトの身長関連座位が存在していた。

CW-1, CW-2, CW-3の効果は、黒毛和種去勢牛1,236頭 (半兄弟3頭以内で構成。表現型値は母集団において月齢、年度、市場で補正。)を用い、各SNPマーカール (SNP-4, NCAPG c.1326T>G, SNP_{HD})の遺伝子型(0, 1, 2)による線形回帰によって推定した。各座位は、枝肉重量の分散の4.9-7.4%を説明し、全部で20%を説明した。また、CW-2とCW-3のアリル頻度は比較的低いので、今後の改良に役立つと思われた(表3)。

表3. 黒毛和種におけるCW-1, CW-2, CW-3の枝肉重量への効果

	Q freq. (%)	Allele substitution effect (kg)	% variance explained
CW-1	74.7	20.6	7.4
CW-2	19.9	21.3	6.8
CW-3	10.2	24.8	4.9
CW-1+2+3			20.2

2010年度の成果として、黒毛和種集団には枝肉重量に影響するメジャージーンCW-1, CW-2, CW-3の存在を明らかにすることができた。CW-1, CW-2について道県と検証試験を行い、有効であることが確認できた [2-(2) 学会発表の項参照]。CW-3についての詳細な解析を今後進めていく。

(3)-5-2. 脂肪交雑のゲノムワイド関連解析

2009年度までに、染色体4番と染色体7番にゲノムレベル有意水準を超えた領域を検出した。染色体4番の最も関連の強い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。染色体7番は関連の強い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。

2010年度は解析の頭数を増やして解析を続けたが、脂肪交雑ではメジャージーン

在を示唆する結果は得られなかった。

黒毛和種で枝肉重量のメジャージーンが検出できるその理由の1つとして、黒毛和種は相対的に成長が遅く、体格も小ぶりなため遺伝的な影響を受けやすいことがあげられる。それに対し、脂肪交雑のメジャージーンはすでに固定されているのではないだろうか。

(3)-6. ウシ枝肉形質遺伝子座の解析

(3)-6-1. CW-2 (枝肉重量-2) の解析 (鹿児島県・熊本県・鳥取県・宮崎県との共同研究)

黒毛和種3家系と褐毛和種2家系の半きょうだい家系QTL解析において、ウシ6番染色体上の重複する領域に枝肉重量または体重QTLが検出され、平成20年度までに、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の責任領域を590 kbに狭めた。590 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 (Ile442Met) を伴うSNP (SNP-9) は枝肉重量と有意に関連し ($P = 1.2 \times 10^{-11}$)、責任候補と考えられた。また、CW-2の優良型アリルを持つと、ロース芯面積は有意に大きく、去勢牛については皮下脂肪厚が有意に薄いことがわかった (Setoguchi *et al.* BMC Genetics, 2009)。その後、外国品種においても、シャロレー種とドイツホルスタイン種のF2集団において、Ile442Met SNPと生時体重との関連が (Eberlein *et al.*, Genetics, 2009)、7品種から成る交雑種の集団において、CW-2と同じ領域が生時体重、205日齢体重、365日齢体重のそれぞれと関連することが報告された (Snelling *et al.*, J. Anim. Sci., 2009)。平成21年度には、鹿児島の間接検定牛のデータ100セット (1997~2006年度の調査牛、約800頭の去勢牛) を用いた解析によって、CW-2の一日平均増体量への効果は、一日平均増体量の推移に一致して推移し、一日平均増体量が最大となる検定8-16週 (平均11-13ヶ月齢) において最大となることがわかった (アリル置換効果96.7g/day、寄与率8.1%: Weikard *et al.*, Physiol. Genom., 2010)。また、体型測定値への効果については、体長、体高、腰骨幅のいずれにおいても、検定開始時 (平均9ヶ月齢) に寄与率2-5%、終了時 (平均21ヶ月齢) には寄与率4-15%の効果がみられ、優良型保有牛は有意に体格が大きく、特に、十字部高とかん幅に対する寄与率は、検定開始時に12-16%、終了時に20-21%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 (Setoguchi *et al.*, Anim. Genet. in press)。CW-2と体格との関連は、ヒトのCW-2相同領域が身長に関連する遺伝子領域のひとつとして報告されていることにも一致しており (Weedon *et al.*, Nat. Genet., 2008; Gudbjartsson *et al.*, Nat. Genet., 2008)、CW-2優良型保有牛では体格が大きくなるのが体重・枝肉重量の増加につながっている可能性が推測された。

2010年度は、責任候補遺伝子NCAPGについて、1) 生体の発育とNCAPG遺伝子発現との関係、2) NCAPGのアミノ酸置換I1e442Metによる細胞分裂・増殖への影響について解析を行った。ウシの各成育段階で遺伝子発現を調べるには採材が困難なため、マウスを用いて解析することにし、出生から初回発情までの発育曲線をウシ（全国和牛登録協会、2004）とマウス（Lupu, *Dev. Biol.*, 2001）で比較することによって、ウシで生後約8ヶ月に認められる初回発情後の最高頂点速度期は、マウスの生後24日に相当すると考えられた。そこで、マウスの生後0日から24日まで7日ごとに様々な組織におけるNCAPG遺伝子の発現を調べた結果、NCAPGは全ての組織で分裂M期マーカーであるリン酸化ヒストンH3陽性細胞に発現していることが分かった。また、培養細胞にNCAPGに対するsiRNAを導入して発現阻害を行った結果、細胞分裂のanaphaseからtelophaseにおける染色体の分離が不十分で、染色体が分離しない、あるいは、分裂期が延長し、細胞が大型化することが観察された。最近、コンデンシン複合体の別のサブユニットの変異によっても、不均一な染色体分離が誘起され、その結果、娘細胞のDNA量が増えることが報告された（Fazzio *et al.*, *J. Cell Biol.*, 2010; Seipold *et al.*, *BMC Dev. Biol.*, 2009）。そこで、この系を用いて、NCAPGのアミノ酸置換による機能の変化を検出することを試みている。培養細胞の内在性NCAPGをsiRNA導入によって発現抑制すると同時に、Met442型ウシNCAPGまたはI1e442型ウシNCAPGの遺伝子を導入し、細胞あたりのDNA量の変化をフローサイトメーターで定量的に観察する予定である。

一方、2009年度に、新型DNAシーケンサーを用いたCW-2ヘテロ種雄牛Aのゲノムリシーケンシングにより、CW-2領域に約1,300個のヘテロSNP候補を得ていたが、これらのうち、遺伝子上流3 kb以内、CpG領域、3' UTR領域に存在する41個のSNPと2個のIndelについて解析を進めた。これらのうち、2箇所以外は種雄牛Aでヘテロであることが確認され、SNP検出の偽陽性率は低いと考えられた。これらのうち、CW-2ヘテロ種雄牛5頭全てでヘテロであったのは3個のSNPのみで、これらは枝肉重量と関連し、NCAPGのアミノ酸置換（I1e442Met）SNPと連鎖不平衡にあったが、周辺の配列にヒトとの保存性などは見られなかった。したがって、NCAPGのアミノ酸置換（I1e442Met）SNPが依然有力な責任SNP候補であり、アミノ酸置換による細胞分裂等への影響を引き続き調べる。また、子牛時の成長関連ホルモンの測定等を行う。

(3)-6-2. Marbling-3（脂肪交雑-3）の解析（兵庫県との共同研究）

ウシ4番染色体上に脂肪交雑QTLが検出された2頭の種雄牛（A、B）に注目し、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3.7 Mbに（Yokouchi *et al.*, *Anim. Genet.*, 2009）、その後、さらに約0.7 Mbにまで絞り込んだ。また、候補領

域内の4つの遺伝子について変異探索と発現解析を行った結果、*SYPL1* (*pantophysin*) が最も有力な候補と考えられた。*SYPL1*はQQ型の筋間脂肪組織においてqq型に比べて約2.4倍発現量が高く、*SYPL1*の5'上流3.2 kbに存在する7個のSNPのうちエクソン1に最も近いSNP 1 (-718位) が発現量の差をもたらす変異であることを、ウシ筋間脂肪由来脂肪前駆細胞株 (BIP) を用いたプロモーターアッセイにより明らかにした。*SYPL1*タンパク質は、マウス3T3L1細胞において、その一部がグルコース輸送タンパク質 (GLUT4) の輸送小胞に局在していることが報告されており、インスリン刺激によるGLUT4の細胞膜への移行に参与する可能性が示唆されているが、詳細はわかっていない。

2010年度は、ウシBIP細胞において*SYPL1*タンパク質の局在や動態を調べた。BIP細胞では、*SYPL1*タンパク質は、分化の前後あるいはインスリンの有無に関わらず細胞膜画分に分布していたが、GLUT4タンパク質は細胞内小胞画分(HDMとLDM)に分布しており、*SYPL1*とGLUT4との共局在は見られなかった。ウシの場合、脂肪細胞の炭素源としてはグルコースよりも酢酸などの血中の脂肪酸が主であり、BIP細胞においても分化に伴い酢酸の取り込みが増加することが報告されていることから、脂肪酸の取り込みに関わる4種類の単鎖脂肪酸トランスポーターに注目し、BIP細胞における局在を調べている。2011年度は、*SYPL1*と単鎖脂肪酸トランスポーターおよび脂肪酸の取り込みとの関連を調べる。

(3)-7. 枝肉形質QTL解析の今後の進め方

道県等と行っている父方半きょうだい家系を用いた枝肉形質QTLのマッピングは、後継種雄牛の選抜に活用できるという利点がある。種雄牛の半きょうだい家系を用いたウシ枝肉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、3K SNPチップで解析する。

(3)-7-1. ゲノム育種価予測への展開

後代の成績を得ずに、多数のSNP型判定を行うことだけで個体の遺伝的能力を推定する試みとして、ゲノム育種価予測 (Genomic Prediction) という手法がある。同手法は一般に、高密度SNPセットにより「学習群」の遺伝子型データを得、予測式をたてるものであるが、低密度のSNPセットでもある程度の子推測精度を達成することができるという研究報告もある。この3K SNPチップによるデータでゲノム育種価予測が可能かどうか、血縁情報から得られる育種価との相関がどの程度あるかなどについて検討を行う。

(3)-7-2. SNP遺伝子型の推定: Imputation

低密度SNP遺伝子型データからより高密度のSNP遺伝子型データを推定する、

Imputationの研究が現在盛んにおこなわれている。このImputationにより、カスタム3K SNP遺伝子型データと市販3K SNPデータから50Kなどの高密度SNPデータを推定し、より多くのサンプルに由来するデータを統合してQTL解析およびゲノム育種価予測に利用することを検討する。

(4) ウシ繁殖形質のゲノム解析

(4)-1. 黒毛和種繁殖性のゲノムワイド関連解析（岡山大学・鹿児島県・岐阜県・大分県・熊本県・岡山県・北海道・兵庫県・民間牧場との共同）

黒毛和種・繁殖雌牛の子牛の生産効率に關与する遺伝的な要因を同定することを目的として、4歳時子牛生産指数を対象にゲノムワイド関連解析を行った。

黒毛和種・繁殖雌牛で、4歳時以降に分娩記録を持つ約12,943頭のデータからMTDF-REMLで算出された4歳時子牛生産指数を解析に用いた。成績上位6.7%と下位6.7%の集団から、それぞれ365頭と342頭(各グループ内に父方半きょうだいは最大5頭)を選択し、イルミナ50K SNPチップを用いてSNPの型判定を行った。関連解析には、型判定率が95%以上、マイナーアレル頻度が1%以上、ハーディ・ワインバーグ平衡から乖離しない P 値が0.001以上の37,238個のSNPを用い、EMMAXプログラムを用いて解析を行った。

EMMAXを用いてSNP遺伝子型から得られるゲノム関係行列を混合モデルに組み入れることにより、集団の構造化の指標であるGenomic Control λ の値は、1.539から0.99になった。期待値を下回るSNPが染色体12番に3個、21番に1個、4番に1個観察された。12番の3つのSNPは遺伝子のイントロン内に位置し、同じ連鎖不平衡ブロック内に位置していた。21番のSNPは遺伝子間に位置していた。4番のSNPは遺伝子のイントロン内に位置していた。これらの領域に4歳時子牛生産数QTLが存在することが示唆された。

今後、黒毛和種の連産性のゲノムワイド関連解析を行う。連産性の指標として「4歳時子牛生産指数」を用いる。1民間牧場から繁殖雌牛約5万頭の繁殖記録の提供を受け、これまでに約3,000頭のDNAサンプルを収集した。これらの繁殖形質の表型値は、環境要因(牧場、出生年等)と血統の偏りを補正するため、岡山大学揖斐隆之博士の協力を得て、育種価補正を行っている。今後も繁殖記録やDNAサンプルは蓄積される。その他、道県の協力を得て繁殖記録を持つ黒毛和種繁殖雌牛約15,000頭(一般集団)のDNAサンプルを収集しており、得られるDNA情報の効果検証に用いる。黒毛和種では地域ごとに血統の偏りが見られるため、この一般集団はゲノムワイド関連解析には適していない。

2010年度に、5万頭の集団から選抜した約1,000頭の「4歳時子牛生産指数」の育種価を持つ個体について高密度SNPチップを用いたゲノムワイド関連解析の1次スクリーニングを終了する。

2012年度以降は、関連が認められたSNPに関して、他の黒毛和種集団における再現性を確認し、再現性が認められた領域についてターゲット配列捕捉法で回収し、そのDNA配列を次世代シーケンサーで読み、責任候補SNPの検索を行う。責任候補SNPのアレル間におけるタンパク質機能や遺伝子発現量の差などの検討を行い、責任SNPの同定を目指す。また、一般集団を用いて、責任候補SNPのアレルと「4歳時子牛生産指数」との関連性を調べる。

(4)-2. ホルスタイン種受胎率のゲノムワイド関連解析(家畜改良センター、日本ホルスタイン登録協会北海道支局との共同)

ホルスタイン種における改良は乳量や乳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。道内75万頭の雌牛の妊娠率育種価はほぼ正規分布していた。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集めた個体4,362頭の妊娠率育種価もほぼ同様な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、ウシ全ゲノムをカバーする43,924個のSNPの型判定を行った。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 λ は1.02に抑えられ、染色体 3番、5番、13番、18番、28番に有意なSNPが見いだされた。

2010年度は、染色体 3番のGene_1、3番のGene_2、13番のGene_3、18番のGene_4のそれぞれのSNPが有力であることを見出した。Gene_1とGene_2は脱リン酸化を介した関係にあり、ギャップジャンクションの透過性に影響する可能性がある。

今後、遺伝子機能の解析を進め、受胎の分子機構の解明を行う。

(4)-3. ホルスタイン種生時体重(分娩難易度)のゲノム解析(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。2009年度までに、染色体 3番の73,870,987 bpから73,970,396 bpの領域に強い連鎖を見出した。この領域に存在するGene_5のプロモーター領域SNPのアリルGをホモで持つ個体1,471頭の平均体重は、アリルAをホモで持つ個体61頭の平均体重より2.6 kg大きかった。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のプロモーター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く、発現を増加させることが予測され、Gをホモで持つ個体の大脳におけるGene_5の発現量は、Aを持つ個体より高いことが確認できた。

2010年度はGene_5の機能を調べた。ヒト子宮頸ガン由来のHeLa細胞を用いた増殖試験により、siRNAでGene_5の発現を抑えると増殖が促進され、過剰発現させると抑制された。Gene_5はコリン輸送体と予想され、細胞膜合成に必須であり、その欠乏は細胞死を引き起こすというこれまでの知見と矛盾する。そこで、 $[^3\text{H}]$ コリン輸送の実験を行ったところ、Gene_5はコリンの取り込みではなく放出に寄与していた。したがって、コリン動態が出生時の成長に大きく影響していると思われる。

2011年度は、このSNPに結合するタンパク質を同定し、アリルによって発現量が異なる仕組みを解明する。

(5) 黒毛和種の飼料利用性のゲノム解析

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、イルミナ50K SNPチップ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、2002年度から2007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。3形質の上位15%および下位15%から、半きょうだい数をカテゴリーあたり最大3頭までとして抽出し、それぞれ262頭、260頭、および238頭を型判定の対象とした。SNP型判定はイルミナ50K SNP チップを用いた。EMMAXプログラムを用い線形混合モデルにより解析をおこなった結果、3形質それぞれにおいて79個、49個、および71個のSNPにおいて、 P 値の期待値から十分乖離した $P < 0.0001$ となった。

しかしながら、いずれの形質においても極端に強い効果を持つQTLと関連するSNPは得られなかった。従って、QTLマッピングのためには、検出力を高めるためサンプルの追加が必要である。あるいはゲノム育種価予測を試みるためには、2011年度以降の直接検定牛の追加と育種価の分布の中間に位置する個体の追加が必要であり、関係機関の協力を得て実施したい。

(6) ホルスタイン種のゲノムワイド関連解析

畜産技術協会を含む共同研究体（畜産技術協会、家畜改良センター、家畜改良事業団、北海道ジェネティクス、十勝家畜人工授精所）は、ホルスタイン種雄牛を対象としたゲノム選抜法の開発を進めているが、その過程で2,000頭を超えるホルスタイン種雄牛の50K SNP遺伝子型データが得られている。本研究ではこのデータを利用して、ホルスタイン種の有用形質を対象としたゲノムワイド関連解析を行い、QTLマッピングを試みた。

ゲノム選抜のために型判定を行ったホルスタイン種雄牛2,590頭（314家系父方半きょうだい数最大79頭）のイルミナ 50K SNPチップの遺伝子型データと、泌乳形質7個および体型形質20個の育種価を解析に用いた。育種価については娘牛の記録があり信頼度が0.5以上の値を抽出し、泌乳形質は2,260頭、体型形質は1,955頭を解析対象とした。それぞれのサンプルセットで型判定率 ≥ 0.95 、MAF ≥ 0.01 、ハーディ・ワインバーグ平衡の検定 $P \geq 0.001$ をクリアした約42,000個のSNPについて解析した。関連解析には集団の構造化を補正するために、SNP遺伝子型データからゲノム関係行列を作り、分散成分の推定と混合モデル方程式による検定を行うプログラムEMMAXを用いた。また、泌乳形質の解析を行う際に構造化の補正が過剰にならないように、効果が非常に大きいことが知られている既知のQTLである*DGATI*領域のSNPの遺伝子型を固定効果として混合モデルに含めた。

解析サンプルは多数の半きょうだいを含んでいたが、ゲノム関係行列で分散成分を推定することによって集団の構造化を補正することができた。関連解析の結果、Bonferroniの補正を考慮しても有意水準 $\alpha = 0.05$ ($P = 1.18 \times 10^{-6}$) で有意であるSNPが、泌乳形質では7つの形質について12染色体21カ所で検出された。そのうち14カ所はデータベースに登録されている既知のQTLと同一の領域であったが、染色体23番、24番、26番、28番および29番ではこれまでに報告例のない7カ所の領域でSNPが検出された。一方、体型形質では20形質の内12形質について、8染色体15カ所で関連の強いSNPを検出した。染色体18番、23番、26番の3カ所では既知のQTL領域で検出されたが、それ以外の染色体5番、11番、23番、24番、26番、27番および29番の12カ所はこれまでに報告されていない新規のQTL領域であると考えられた。

ホルスタイン種牛を対象としたゲノムワイド関連解析で、有用形質と関連のあるSNPを多数検出することができた。特に体型形質では多くの新規領域で関連の強いSNPを検出した。今後は、ゲノム選抜のために追加されたサンプルを関連解析にも加え、さらに検出力を高めるとともに関連解析で得られた結果のゲノム選抜へのフィードバックについて検討する。

2. 2010 (平成22) 年度研究発表

1) 論文発表

1. Mizoguchi, Y., Hirano, T., Itoh, T., Aso, H., Takasuga, A., Sugimoto, Y., Watanabe, T. (2010) Differentially expressed genes during bovine intramuscular adipocyte differentiation profiled by serial analysis of gene expression. *Animal Genetics*, 41: 436-441.

2. Sugimoto, M., Sasaki, S., Watanabe, T., Nishimura, S., Ideta, A., Yamazaki, M., Matsuda, K., Yuzaki, M., Sakimura, K., Aoyagi, Y., Sugimoto, Y. (2010) Ionotropic glutamate receptor AMPA 1 is associated with ovulation rate. *PLoS ONE*, 5, e13817.

3. Weikard, R., Altmaier, E., Suhre, K., Weinberger, K.M., Hammon, H. M., Albrecht, E., Setoguchi, K., Takasuga, A., Kühn, C. (2010) Metabolomic profiles indicate distinct physiological pathways affected by two loci with major divergent effect on *Bos taurus* growth and lipid deposition. *Physiol. Genomics*, 42A: 79-88.

2) 学会発表

1. 平野 貴、渡邊 敏夫、国枝 哲夫、杉本 喜憲、高須賀 晶子：黒毛和種の全ゲノムリシーケンシングによる *Marbling-2*, *CW-2* および *FMA* 関連領域からの網羅的 SNP 探索。32th International Conference on Animal Genetics (第32回国際動物遺伝学会大会)、2010年7月、エディンバラ、英国。

2. 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 遺伝子型データを用いた黒毛和種枝肉形質の分散成分の推定。32th International Conference on Animal Genetics (第32回国際動物遺伝学会大会)、2010年7月、エディンバラ、英国。

3. 守屋 真、溝口 康、佐藤 昭利、高須賀 晶子、杉本 喜憲、渡邊 敏夫：ウシ筋肉内脂肪前駆細胞の脂肪生成時における遺伝子発現プロファイル。第32回国際動物遺伝学会大会、2010年7月、エディンバラ、英国。

4. 高須賀 晶子、西村 翔太、平野 貴、渡邊 敏夫、杉本 喜憲：イルミナウシHDチップの黒毛和種における有用性評価と遺伝的構造の解析。日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村。
5. 西村 翔太、渡邊 敏夫、高須賀 晶子、杉本 喜憲：黒毛和種牛家系解析用カスタム3K SNPチップの作成と性能評価。日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村。
6. 渡邊 敏夫、中村 亮一、松橋 珠子、渡邊 直人、西村 翔太、高須賀 晶子、杉本 喜憲：カスタム3K SNPチップによる黒毛和種3家系を対象とした枝肉形質QTLのマッピング。日本動物遺伝育種学会第11回大会、2011年10月、西白河郡西郷村。
7. 中村 亮一、西村 翔太、渡邊 敏夫、岡 尚之、長谷川 清寿、坂本 洋一、遠藤 治、杉本 喜憲：カスタム3K SNPチップを用いた黒毛和種父方半きょうだい家系のQTL解析。日本動物遺伝育種学会第11回大会、2011年10月、西白河郡西郷村。
8. 松橋 珠子、西村 翔太、平野 貴、小林 直彦、丸山 新、渡邊 敏夫、高須賀 晶子、杉本 喜憲、坂口 慎一、加藤 勉：カスタム3K SNPチップを用いた岐阜県産黒毛和種のQTL解析。日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村。
9. 伊藤 智仁、高野 淳、瀬戸口 浩二、高須賀 晶子、清水 一広、森田 光夫：黒毛和種における枝肉重量に係わる2つの遺伝子(CW-1, CW-2)の種雄牛および検定材料牛を利用した効果検証。日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村。
10. 小林 直彦、松橋 珠子、平野 貴、高須賀 晶子、坂口 慎一、杉本 喜憲、加藤 勉：黒毛和種における枝肉重量QTL (CW-2) の効果。日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村。
11. 今井 佳積、松井 茉由、平野 貴、高須賀 晶子、吉上 渉、杉本 喜憲：広島県産牛における枝肉重量QTL (CW-2) の遺伝子型効果について。日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村。
12. 渡邊 敏夫、荒川 愛作、祝前 博明、西村 翔太、高須賀 晶子、杉本 喜憲：黒毛和

種の枝肉重量に関するQTL候補領域のSNPsが説明する相加的遺伝分散の割合の推定。日本動物遺伝育種学会第11回大会、2011年10月、西白河郡西郷村。

13. 鈴木 晶夫、西村 翔太、小野 博之、木村 勉、渡邊 敏夫、杉本 喜憲、間山 潤二：青森和牛における産肉形質に關与するQTL解析の1次スクリーニング。日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村。

14. 佐藤 洋一、安田 潤平、米澤 智恵美、細川 泰子、鈴木 強史、菊池 雄、平野 貴、渡邊 敏夫、杉本 喜憲、鈴木 啓一：日本短角種における枝肉形質QTLのマッピング。日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村。

15. 佐々木 慎二、揖斐 隆之、渡邊 敏夫、松橋 珠子、中藤 由紀、小林 直彦、杉本 喜憲：黒毛和種における雌牛の繁殖能力に關するゲノム解析。日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村。

16. 永來 沙夜子、渡辺 大作、木崎 景一郎、富岡 美千子、平野 貴、杉本 喜憲、橋爪 一善：黒毛和種發育不全牛と正常發育牛の肝組織に発現する遺伝子の網羅的解析。日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村。

17. 黒木 一仁、宮崎 義之、荻野 敦、西村 翔太、島貫 伸一、塗本 政伸、高須賀 晶子、田邊 義弘：親子判定および個体識別用国際基準SNPマーカーセットを用いた黒毛和種およびホルスタイン種における父権否定確率。日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村。

18. 宮崎 義之、黒木 一仁、島貫 伸一、塗本 政伸、西村 翔太、高須賀 晶子、田邊 義弘：SNPとMS（マイクロサテライト）を用いた牛の親子判定。日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村。

19. 杉本 真由美、後藤 裕作、河原 孝吉、杉本 喜憲：ウシ50K SNP Chipを用いた受胎率に關与する遺伝子の同定。第33回日本分子生物学会年会、2010年12月、神戸。

20. 西村 翔太、渡邊 敏夫、高須賀 晶子、杉本 喜憲：黒毛和種牛のゲノムワイド関連解析；IBS行列を用いた構造化の補正と枝肉重量QTLの効果推定。第33回日本分子生物学

会年会、2010年12月、神戸。

21. 平野 貴、渡邊 敏夫、西村 翔太、高須賀 晶子、杉本 喜憲：黒毛和種の全ゲノム SNP探索。Plant & Animal Genome XIX (第19回国際植物動物ゲノム学会大会)、2011年1月、サンディエゴ、米国。

22. 渡邊 敏夫、中村 亮一、松橋 珠子、渡邊 直人、鹿島 聖志、西村 翔太、杉本 喜憲、高須賀 晶子：複数の黒毛和種父方半きょうだい家系を用いた中密度カスタムSNPチップによる枝肉形質QTLマッピング。Plant & Animal Genome XIX (第19回国際植物動物ゲノム学会大会)、2011年1月、サンディエゴ、米国。

3) 講演

1. 高須賀 晶子：ウシSNPチップを用いた黒毛和種のゲノム解析。第148回農林交流センターワークショップ「次世代シーケンサーを利用したゲノム解析の実際」、2010年9月、つくば。

2. 平野 貴：次世代シーケンサーを用いた黒毛和種のゲノムリシーケンシング
2010年10月、第16回動物遺伝育種シンポジウム、西白河郡西郷村

3. 平野 貴：黒毛和種に見られたマルファン症候群様疾患について
2010年10月、遺伝性疾患シンポジウム、西白河郡西郷村

4. 平野 貴：黒毛和種に見られたマルファン症候群様疾患
2011年2月、日本獣医師会獣医学術学会 日本産業動物獣医学会シンポジウム、岐阜

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：黒毛和種の全ゲノムリシーケンシングによるMarbling-2, CW-2およびFMA関連領域における網羅的SNP探索

発表者：平野 貴¹、渡邊 敏夫¹、国枝 哲夫²、杉本 喜憲¹、高須賀 晶子¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²岡山大大学院

要旨：【目的】 *Marbling-2*, *CW-2*はそれぞれ脂肪交雑、枝肉重量に関するQTLである。また、*FMA*は劣性遺伝病である前肢帯筋異常症 (Forelimb-girdle Muscular Anomaly) の原因領域である。*Marbling-2*と*CW-2*は種雄牛Aの家系でマッピングされ、*FMA*は種雄牛Aと母方半きょうだいである種雄牛Bの家系でマッピングされた。我々はこれら *Marbling-2*、*FMA*、*CW-2*領域をそれぞれ4.6 Mb、2.4 Mb、0.9 Mbまで狭めたが、これ以上のファインマッピングは困難であった。そこで、これらの責任 (原因) 遺伝子または特異的SNPを同定するために、次世代型シーケンサーを用いて、これら2種雄牛のリシーケンシングを行い、網羅的SNP探索を行った。

【方法】 リシーケンシングには、Genome Analyzer II (イルミナ社) を用いた。シーケンシングは全ゲノムを対象とし、参照配列にはターゲット領域部のみを使用した。両個体ともにシーケンシングライブラリーの片端のみを読み取るSingle End Runと、DNA断片長の異なる3種類のライブラリーを用い、ライブラリーの両端を読み取るPaired End Runを行った。各読み取りの長さは主に36塩基で行った。ターゲット領域の参照配列は、Btau4.0から抽出した。

【結果】 種雄牛Aは32.0億個の配列データ (read) を得て、ターゲット領域 (計8 Mb) に合計1,160万reads、総塩基数412.3 Mb (x 52.03; 41.2億塩基対) がマップされた。種雄牛Bは31.7億readsを得て、ターゲット領域 (計7 Mb) に合計1,170万reads、総塩基数415.3 Mb (x 58.96; 41.5億塩基対) がマップされた。その結果、それぞれ21,136種、19,598種のSNP候補が検出された。責任 (原因) 遺伝子またはSNPを同定するために、種雄牛AとBのSNP型を比較していく予定である。

(第32回国際動物遺伝学会大会、2010年7月、エジンバラ、英国)

学会発表2.

題目：50K SNP遺伝子型データを用いた黒毛和種枝肉形質の分散成分の推定

発表者：渡邊 敏夫¹、荒川 愛作²、西村 翔太¹、山田 宜永³、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、³新潟大院自然科学

要旨：【目的】 高密度SNP遺伝子型データを用いたゲノム選抜の手法は家畜の遺伝的改良を大いに進展させる可能性がある。ゲノム選抜へ向けての一予備検討として、われわれは黒毛和種肥育個体の枝肉成績とそれらのイルミナ50K SNP遺伝子型データから、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予定である。

(第32回国際動物遺伝学会大会、2010年7月、エディンバラ、英国。)

学会発表4.

題目：イルミナウシHD SNPチップの黒毛和種における有用性評価と遺伝的構造の解析

発表者：高須賀 晶子、西村 翔太、平野 貴、渡邊 敏夫、杉本 喜憲

所属：畜技協・動物遺伝研

要旨：**【目的】** 黒毛和種には、血縁の異なるいくつかの系統が存在し、系統によって体の大きさや肉質などに違いがあることが知られている。系統については、これまでに血縁を用いた解析は行われているが、ゲノム情報を用いた解析はあまり行われていない。最近、ウシにおいては、低密度から高密度まで3種類のイルミナSNPチップ（3K、50K、HD）が市販されるようになり、ゲノム全体に配置された多数のSNPを用いて系統を解析することが可能になった。そこで、黒毛和種における、これらのチップの性能（多型性のあるSNPの数やゲノム上の間隔）を評価するとともに、それぞれのチップを用いて把握できる遺伝的構造を主成分分析により検討した。

【方法と結果】 2代祖まで同じ系統に属する黒毛和種去勢牛52頭（気高15頭、田尻19頭、藤良11頭、茂金7頭、半兄弟を含まない）において、マイナーアレル頻度（MAF）0.01以上、かつ、ハーディ・ワインバーグ平衡検定 $P > 0.001$ の条件を満たす常染色体上のSNPは、3Kチップで2,367個、50Kチップで約4万1千個、HDチップで約59万個であった。SNP間隔は、50Kチップでは、1 Mb以上のギャップが6箇所、500 kb-1 Mbの間隔が70箇所もあったが、HDチップでは、500 kb以上の間隔が7箇所（最大間隔1.47 Mb、染色体6番）となっていた。したがって、HDチップは、50K チップから大幅に改善されたが、十分にカバーされていないゲノム領域が若干残っていると思われる。52頭の遺伝子型を用いた主成分分析では、どのチップを用いた場合でも、系統間に差のある主成分（分散分析 $P < 0.001$ ）は上位3成分であり、これらで全体の約15%の分散を説明した。また、上位3

主成分は各チップで良く一致していたが、第4主成分では、3Kチップに若干の違いが見られた。したがって、遺伝的構造の把握は、50KチップとHDチップでは同等に、3Kチップでもほぼ同等にできることがわかった。

(日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村)

学会発表5.

題目：黒毛和種牛家系解析用カスタム3K SNPチップの作成と性能評価

発表者：西村 翔太、渡邊 敏夫、高須賀 晶子、杉本 喜憲

所属：畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】ウシの大規模半きょうだい家系解析の遺伝子型判定作業の効率化を目指して、黒毛和種集団におけるイルミナ50K SNP遺伝子型データを基に約3,000個のSNPを選定し家系解析用カスタムチップを作成した。作成したカスタムチップと市販のイルミナ3K SNPチップ (2,900 SNP) について性能評価を行った。

【方法】SNPの選定にはこれまでに脂肪壊死や枝肉形質の関連解析に用いた黒毛和種牛1,349頭 (種雄牛8頭を含む) のイルミナ50K SNPチップの遺伝子型データを用いた。マイナーアレル頻度が0.2以上の多型性の高いSNPからマーカー間隔が0.5-1.5 Mbになるように選んだ。さらに8頭の種雄牛ごとにヘテロマーカー間隔が5 Mb以下になるようにマーカーを追加した。開発したカスタムチップと市販のチップで家系解析において得られる情報量について、8種雄牛のうち遺伝子型データのある産子数が20頭以上の3家系を用いて模擬的な連鎖解析を行うことで情報量 (Information Content: IC) を算出した。

【結果】3,065個のSNPを選定しイルミナ社にカスタムチップの作成を依頼した。完成したチップには約91%にあたる2,800個のSNPが搭載されていた。8種雄牛の平均ヘテロマーカー数と平均マーカー間隔はそれぞれカスタムチップが1564個と1.7 Mb、市販チップが925個と2.9 Mbであり、家系解析で得られるICはカスタムチップが0.82-0.89、市販チップが0.77-0.86であった。動物遺伝研究所と共同研究機関がこれまでに行ってきたMSマーカーによる家系解析で得られるICは0.7前後であることから、SNPチップによる家系解析でMSマーカー以上の情報量が得られることがわかった。また、カスタムチップは市販のチップと比較してより多くの情報量を得られることが示唆された。

(日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村)

学会発表6.

題目：カスタム3K SNPチップによる黒毛和種3家系を対象とした枝肉形質QTLのマッピング

発表者：渡邊 敏夫¹、中村 亮一²、松橋 珠子³、渡邊 直人⁴、西村 翔太¹、高須賀 晶子¹、杉本 喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²島根県畜技セ、³岐阜県畜産研、⁴大分農林水産研指畜産

要旨：【目的】これまでわれわれは子世代で分離する父親の枝肉形質QTLを検出する目的で、黒毛和種父方半きょうだいを対象に、カスタム3K SNPチップを用いたQTLマッピングを行った（西村ら、中村ら、松橋ら、日本動物遺伝育種学会第11回大会）。本研究では、未発表の1家系を含む3家系分のSNP遺伝子型データをあわせて、各SNPの効果を混合モデルにおける固定効果として推定することで、子世代で分離するもの以外のQTLの検出を試みるとともに、QTL検出力を上げることを目的とした。

【材料と方法】解析対象は、それぞれ176頭、282頭、285頭の去勢肥育牛からなる、3つの黒毛和種父方半きょうだい（743頭）とした。解析対象形質は、枝肉重量およびBMS Noとした。各個体のDNAを2,800種類のSNPで構成されるカスタムSNPチップにより型判定を行い、マイナーアレル頻度5%以上、型判定率95%以上のフィルターの後、2,750個のSNPを選択した。対象個体は日本各地からサンプリングしているため、これらについての分子血縁係数行列を得ることが困難であった。そこで得られたSNP遺伝子型データからゲノム関係行列を作成し代用した。解析ソフトウェアはEMMAXを用い、と畜場、年次、月齢を固定効果とし、各SNPが持つ効果の推定を行い、そのP値を算出した。

【結果】枝肉重量およびBMS Noに関して、それぞれ26個、10個のSNPが形質と強い関連を示した（ $P < 0.001$ ）。枝肉重量に関して有意だったSNPのうち、染色体6番、8番、14番のものは既知のQTL領域（CW-2、CW-3、およびCW-1）と一致した。BMS Noについては、8個のSNPが既知の黒毛和種QTL領域の近傍に位置していた。枝肉重量およびBMS Noでそれぞれ4個および2個のSNPは既知のQTL領域ではない箇所が存在した。今後は他の枝肉形質を対象としてQTL解析を行うとともに、同SNPによるゲノム育種価予測の可能性を検討したい。

（日本動物遺伝育種学会第11回大会、2011年10月、西白河郡西郷村）

学会発表7.

題目：カスタム3K SNPチップを用いた黒毛和種父方半きょうだい家系のQTL解析

発表者：中村 亮一¹、西村 翔太²、渡邊 敏夫²、岡 尚之¹、長谷川 清寿¹、坂本 洋一¹、遠藤 治¹、杉本 喜憲²

所属：¹島根県畜技セ、²畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】我々はこれまでに、マイクロサテライトマーカーによる枝肉形質に関するQTLマッピングを行ってきたが、型判定のために多くの時間と労力を要することが

課題であった。そこで今回、解析効率の改善を目的に、短時間に大量の型判定が可能な SNPチップを用いて、黒毛和種父方半きょうだい家系の枝肉形質に関するQTL解析を試みた。

【方法】 対象家系は、1頭の黒毛和種種雄牛およびその去勢産子176頭とした。SNPタイピングは、黒毛和種の家系解析用に作成されたカスタム3K SNPチップにより、常染色体上の2,800マーカーについて行った。それらのSNPデータをもとに、種雄牛でヘテロ型かつ型判定率が0.95以上のマーカーを選抜してQTL解析に用いた。対象形質は枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚、皮下脂肪厚、歩留基準値およびBMS No.とし、線形回帰によるインターバルマッピングの手法を用いてQTLの検出を行った。このとき、食肉処理場および出荷日齢を固定効果として計算した。

【結果】 2,800個のSNPマーカー中、型判定率が0.95以上のマーカーは2,772個、このうち種雄牛がヘテロ型のマーカーは1,326個であり、平均マーカー間隔は1.9 Mb（最大26.4 Mb、最小75 b）であった。QTL解析の結果、枝肉重量について5か所、ロース芯面積について3か所、バラ厚について4か所、皮下脂肪厚について1か所、歩留基準値について6か所、BMS No.について2か所、総計21か所に5%有意水準（染色体ワイズ）でQTLが検出された。また、Information Contentは平均0.91（最大0.99、最小0.55）であった。（日本動物遺伝育種学会第11回大会、2011年10月、西白河郡西郷村）

学会発表8.

題目：カスタム3K SNPチップを用いた岐阜県産黒毛和種のQTL解析

発表者：松橋 珠子¹、西村 翔太²、平野 貴²、小林 直彦¹、丸山 新¹、渡邊 敏夫²、高須賀 晶子²、杉本 喜憲²、坂口 慎一¹、加藤 勉¹

所属：¹岐阜畜研、²畜技協・動物遺伝研

要旨：**【目的】** 父方半きょうだい家系のQTL解析において、マイクロサテライト（MS）マーカーを用いた従来の手法はタイピング作業に膨大な時間を必要とする。そこで本研究ではMSマーカーに代えてSNPマーカーを用いて岐阜県産黒毛和種の枝肉形質に関するQTL解析を行い、その有効性を検討した。

【方法】 2007-2009年に県内の1カ所の食肉センターに出荷された特定種雄牛の去勢産子282頭から枝肉格付成績と枝肉断面画像、腎周囲脂肪組織を収集した。腎周囲脂肪からDNAを抽出し、黒毛和種の多型性を考慮して作成したカスタム3K SNPチップを用いてタイピングした後、型判定率 > 95%のSNPについて種雄牛ハプロタイプの産子への伝達確率を形質値へ線形回帰することにより枝肉格付形質及び画像解析形質のQTL解析を行った。

【結果】解析対象とした2,775個のSNPのうち、解析した種雄牛の遺伝子型がヘテロで型判定率 > 95%の解析対象SNPは927個だった。これらの平均情報量は0.785であった。ヘテロのSNPマーカーがほとんど存在しない染色体領域が複数見られたが、その多くはMSマーカーがホモである領域と重なっていた。10,000回のPermutation Testに基づくゲノムワイズ5%水準で検出されたQTLは、枝肉格付成績では枝肉重量が1ヶ所（染色体14番）、ロース芯面積は2ヶ所（染色体10番、27番）、バラの厚さは1ヶ所（染色体5番）、皮下脂肪の厚さは1ヶ所（染色体24番）だった。画像解析形質では画像ロース芯面積で2ヶ所（染色体10番、27番）のQTLが検出された。

（日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村）

学会発表9.

題目：黒毛和種における枝肉重量に係わる2つの遺伝子(CW-1, CW-2)の種雄牛および検定材料牛を利用した効果検証

発表者：伊藤 智仁¹、高野 淳²、瀬戸口 浩二³、高須賀 晶子²、清水 一広¹、森田 光夫¹

所属：¹家畜改良事業団・家畜改良技術研究所、²畜技協・動物遺伝研、³鹿児島県肉改研

要旨：【目的】近年、家畜において経済形質に関与する遺伝子のポジショナルクローニングが行われている。当団では海外で報告されているホルスタイン種の泌乳形質や繁殖形質、肉用牛の増体に関与する遺伝子等の効果検証を行っている。国内において、これまでに動物遺伝研究所および各県の共同研究の成果として、枝肉重量に係わる遺伝子が2つ（CW-1、CW-2）報告されている。今回、当団の保有する種雄牛における各形質の育種価（BV）と間接検定材料牛の成績を利用して、2つの遺伝子の効果について検証する。

【方法】CW-1遺伝子内にあるSNP 5カ所、CW-2遺伝子内にあるSNP 1カ所について、アレルト異的PCRで検出する方法を構築した。続いて、種雄牛約500頭についてアレルト異的PCRによるタイピングを行い、CW-1およびCW-2の遺伝子型と種雄牛のBVを用いて分散分析を行った。次にCW-1のSNP 1カ所とCW-2を利用して間接検定材料牛約440頭を用いて同様にタイピングし、分散分析による解析を行った。

【結果】CW-1の5カ所のSNPのうち、増体に関する効果が大きい責任SNPを同定した。種雄牛BVを用いたCW-1、CW-2の解析の結果、ともに有意水準 $P < 0.001$ となった形質とアレル置換効果は1日増体量、枝肉重量、皮下脂肪厚、バラ厚であった。増体の効果はCW-1よりCW-2が大きく、それぞれの枝肉重量のアレル置換効果は + 16.332 kg、+ 33.430

kgであった。検定材料牛を用いた結果でCW-1、CW-2ともに $P < 0.001$ となった形質は1日増体量、枝肉重量、終了体重であった。

学会発表10.

題目：黒毛和種における枝肉重量QTL (CW-2) の効果

発表者：小林 直彦¹、¹松橋 珠子¹、平野 貴²、高須賀 晶子²、坂口 慎一¹、杉本 喜憲²、加藤 勉¹

所属：¹岐阜県畜産研究所、²畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】黒毛和種枝肉重量に関するQTL領域として報告されているCW-2は、特定種雄牛の大規模父方半きょうだい家系を用いたQTL解析で特定された (Setoguchi *et al.*, *BMC Genet.*, 2009)。CW-2の責任遺伝子はNCAPGと考えられ、エクソン9の候補責任SNPの変異を検出することにより、CW-2の優良遺伝子型診断が可能である。今回、岐阜県内産の肥育牛で、発育や枝肉形質に対するCW-2の効果を検証した。

【方法】黒毛和種肥育牛の増体成績（導入時日齢体重、肥育開始4ヶ月後の日齢体重）、特定枝肉共進会出品牛の枝肉成績、特定種雄牛による半きょうだい家系の枝肉成績をもつサンプルを用いた。CW-2の優良遺伝子型診断は、NCAPG c.1326T>G を検出するPCR-RFLP法で実施した。

【結果】NCAPG c.1326T>G を検出するPCR-RFLP法で、GG型、GT型、TT型に分類した。黒毛和種肥育牛の増体成績（導入時日齢体重、肥育開始4ヶ月後の日齢体重）ではGT型がTT型より有意に高かった。さらに、特定枝肉共進会出品牛では、肥育牛と同様に増体成績（と殺前体重、枝肉重量、肥育期間通算1日増体量）でGT型がTT型より有意に高かった。NCAPG c.1326T>GがGT型のヘテロである種雄牛の家系では、GG型（9頭）の枝肉重量 483.0 ± 44.2 kg、GT（124頭） 475.3 ± 50.5 kg、TT型（103頭） 456.7 ± 49.7 kgでGT型とTT型に有意差が（ $P < 0.01$ ）みられた。これらの成績から、CW-2 (NCAPG c.1326T>G)は枝肉重量QTLの改良に貢献できる遺伝子マーカーであることが示された。本研究の一部は生研センターイノベーション創出基礎研究推進事業で実施した。

（日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村）

学会発表11.

題目：広島県産牛における枝肉重量QTL (CW-2) の遺伝子型効果について

発表者：今井 佳積¹、松井 茉由¹、平野 貴²、高須賀 晶子²、吉上 渉¹、杉本 喜憲²

所属：¹広島総研畜技セ、²畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】CW-2は、黒毛和種の父方半きょうだい家系を用いたQTL解析によって検

出された枝肉重量QTLである (Setoguchi *et al.*, *BMC Genet.*, 2009)。このQTLの責任遺伝子はNCAPG と考えられ、候補責任SNPのアレル型判定によって枝肉重量における優良遺伝子型判定が可能であることが示唆されている。広島県でもCW-2を育種改良の現場に活用するために、今回広島県での枝肉重量に対するCW-2の遺伝子型効果を調査した。

【方法】 広島県産種雄牛（直接検定牛含む）43頭、繁殖雌牛18頭の計61頭を用いた。遺伝子型判定はPCR-RFLP法でNCAPGの候補責任SNP (c.1326T>G) を検出し、GG型（優良ホモ）、GT型およびTT型に分類した後、育種価を持つ個体について、育種価から算出した枝肉重量推定能力値と遺伝子型との関連性を調査した。

【結果】 全61頭におけるCW-2遺伝子型を調査した結果、アレル頻度はGアレル19.7%に対し、Tアレル80.3%であり、遺伝子型頻度はGG型1頭（1.6%）、GT型22頭（36.1%）、TT型38頭（62.3%）であった。育種価保有種雄牛20頭および雌牛15頭で枝肉重量推定能力値を遺伝子型別に比較した結果、種雄牛ではGT型群（6頭）はTT型群（14頭）と比較して41 kg大きく（ $P < 0.05$ ）、雌牛でもGT型群（5頭）がTT型群（10頭）を38 kg上回った（ $P < 0.01$ ）。これらの成績から、CW-2遺伝子型は広島牛における枝肉重量の改良に有効活用できることが示唆された。今後、広島県内産肥育牛を用いて、実際の肥育成績との関連性を詳細に調査し、広島牛での遺伝子型効果をさらに検証していく必要があると考えられる。

（日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村）

学会発表12.

題目：黒毛和種の枝肉重量に関するQTL候補領域のSNPsが説明する相加的遺伝分散の割合の推定

発表者：渡邊 敏夫¹、荒川 愛作²、祝前 博明²、西村 翔太¹、高須賀 晶子¹、杉本 喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²京大院農

要旨：**【目的】** これまでに、黒毛和種の枝肉重量に関する種々のQTL解析により、関与するQTLの候補領域が絞り込まれてきている。また、現在では、イルミナ50K SNPチップも開発され、SNPの遺伝子型判定も可能となっている。本研究では、これらの情報を合わせて取り上げ、黒毛和種肥育牛の枝肉重量について、現時点までに同定されているQTL候補領域内のSNPsによって説明される相加的遺伝分散の割合を推定した。

【方法】 枝肉重量の記録の分布の上位・下位それぞれ15% に属する468個体の記録を利用し、EIGENSTRATによって集団の構造化を補正した後に、Armitage傾向検定によりP値を計算した。ついで、これらの個体とは別の872個体の形質記録および個体あたり39,510

個のSNPs情報を利用して、分散成分の推定を行った。SNPについては、 P 値が5%を下回る2,271のSNPs群、ならびにそれらのSNPsからこれまでに報告されている染色体6番、8番および14番のQTL候補領域に存在する計34のSNPsを抽出し、それぞれのSNPsを説明変数とした解析を実施した。分析モデルには、ポリジーン効果および選択したSNPsの効果を取り上げ、分散の推定はベイズ法により行った。ここでは、相加的血縁行列に代えて、選択したSNPsを除いたSNPsのデータによって作成したゲノム関係行列を用いた。

【結果】 残差分散およびトータルの相加的遺伝分散の推定値には、SNPの選択の如何に関わらず、大きな変化は認められなかった。モデルにQTL候補領域内に存在する34のSNPsの効果を取り上げた場合、それらのSNPsによって説明される相加的遺伝分散は、トータルの相加的遺伝分散の23%程度であった。ゲノムワイド関連解析における P 値が5%を下回る2,271のSNPsをすべて取り上げたときには、トータル相加的遺伝分散の50%程度が説明された。今後は、主に他品種に関して明らかにされているQTL候補領域をも取り上げ、説明される相加的遺伝分散の割合の評価を行う予定である。

(日本動物遺伝育種学会第11回大会、2011年10月、西白河郡西郷村)

学会発表13.

題目：青森和牛における産肉形質に関与するQTL解析の1次スクリーニング

発表者：鈴木 晶夫¹、西村 翔太²、小野 博之¹、木村 勉²、渡邊 敏夫¹、杉本 喜憲¹、間山 潤二²

所属：¹青森県産技セ畜研、²畜技協・動物遺伝研

要旨：**【目的】** 我々は本県を代表する県基幹種雄牛「sireA」が持つ優良遺伝子を受け継ぐ次世代の優良種雄牛を効率的かつ早期に作出する精度の高い選抜指標を確立するために、産肉形質について父方半きょうだい家系解析を実施した。

【方法】 東京芝浦市場及び青森県十和田食肉センターにおいて、県基幹種雄牛「sireA」を父に持つ肥育牛319頭（去勢244頭、雌75頭）の腎周囲脂肪組織を収集し、ゲノムDNAを抽出した。常染色体上に概ね10-20 cM間隔で配置されるように選定した231個のマイクロサテライトマーカーをタイピングした。解析対象の枝肉形質は、枝肉重量、BMS No.、ロース芯面積、バラ厚および皮下脂肪厚の5形質とした。これらの表現型値は環境効果（性別、出荷年次、出荷先、農家、月齢）を除くため、農家が不明な64頭を除く255頭（去勢200頭、雌55頭）について、本県のフィールド記録からBLUP法により算出される育種価解析時のパラメータを用いて日本格付協会発行の牛枝肉格付明細書の数値を補正した。QTL解析は、染色体上の任意の点において父から子にQハプロタイプが伝達された確率の表現型値に対する線形回帰を行うことでQTLの有無を検定した。

【結果】 319頭のうち、育種価解析時のパラメータによる環境効果の補正ができた255頭を用いて、県基幹種雄牛「sireA」を対象に1次スクリーニングを行った結果、BMS No. は染色体7番に、枝肉重量は染色体8番に、バラの厚さは染色体11番に染色体ワイズでそれぞれ $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.01$ で有意に関与するQTL領域が検出された。各領域でのハプロタイプ置換効果は、BMS No. で0.9、枝肉重量で37 kg、バラの厚さで0.4 cmとそれぞれ推定された。

(日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村)

学会発表14.

題目：日本短角種における枝肉形質QTLのマッピング

佐藤 洋一^{1,3}、安田 潤平¹、米澤 智恵美¹、細川 泰子¹、鈴木 強史¹、菊池 雄¹、平野 貴²、渡邊 敏夫²、杉本 喜憲²、鈴木 啓一³

所属：¹岩手農研セ畜研、²畜技協・動物遺伝研、³東北大院農

要旨：【目的】日本短角種は和牛の一品種であり、その多くは岩手県を中心とした北東北地域で繁養されている。日本短角種の経済形質に関わるQTLを明らかにし、その情報を利用した育種が望まれるが、集団の規模が小さい、まき牛による繁殖方法が主流である等の理由から、解析用家系の構築が困難であり、QTL解析の報告はない。岩手県では放牧地での血液サンプルの収集体制を構築し、これまでに数年間サンプルを収集・累積した。そこで、これらサンプルを用いてQTL解析を行い、日本短角種のゲノム育種の可能性を検討した。

【方法】日本短角種種雄牛1頭を父とする半きょうだい家系78頭のサンプルを用い、全常染色体を対象にQTL解析を行った。対象形質は、BMSナンバー、枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚、皮下脂肪厚、しまり、きめ、BCSナンバー、BCS光沢スコア、BFSナンバー、BFS光沢と質スコアとした。DNAマーカーには、マイクロサテライトマーカー266種を用い、各染色体に4-17個配置した。補正効果は肥育地域、性、出荷年、出荷月齢の他、日本短角種の飼養管理特性を考慮し、出荷月、生れ月をとりあげた。

【結果】5% 染色体ワイズの有意水準で、枝肉重量；染色体21番、ロース芯面積；20番、バラ厚；18番、BMSナンバー；19番、BCSナンバー；4番、BCS光沢スコア；22番及び25番、しまり；19番、きめ；20番の8形質9カ所、1% 染色体ワイズの有意水準でしまり；18番の1カ所、計8形質10カ所がマッピングされた。染色体19番のBMSナンバーとしまり、20番のロース芯面積ときめのQTLはハプロタイプ置換効果が同一方向であった。今後、さらに血縁家系のハプロタイプを調査し検証するが、日本短角種においてもQTL解析結果に基づくゲノム育種の可能性が示唆された。

(日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村)

学会発表15.

題目：黒毛和種における雌牛の繁殖能力に関するゲノム解析

発表者：佐々木 慎二¹、揖斐 隆之²、渡邊 敏夫¹、松橋 珠子³、中藤 由紀⁴、小林 直彦³、杉本 喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²岡山大学、³岐阜県畜産研究所、⁴岡山県備前県民局農林水産事業部

要旨：【目的】繁殖雌牛は子牛を生産する基本的能力に加え、年1産する連産性が求められている。このような背景から、本研究では連産能力に影響を与える遺伝的要因を同定するため、平成20年度から全国和牛登録協会が連産能力の評価に採用している4歳時子牛生産指数を対象にゲノムワイド関連解析を行った。

【方法】黒毛和種、雌牛約1万3千頭の繁殖情報を収集し、4歳時子牛生産指数の成績上位15%と下位15%に含まれる676頭の血液からDNAを抽出し、イルミナ50K SNPチップを用いてSNPの型判定を行った。関連解析には、型判定率が95%以上、マイナーアレル頻度が5%以上、ハーディ・ワインバーク平衡から乖離しないP値が0.001以上の約38,500個のSNPを用いた。

【結果】P値は期待される分布より全体に高い分布を示し、4歳時子牛生産指数の遺伝率の低さを反映していると考えられた。そこでGenomic Controlにより補正を行ったところ、期待値を下回るSNPが染色体4番に1カ所、13番に2カ所観察された。染色体4番のSNPは遺伝子のイントロン内に位置し、この遺伝子産物は繁殖性に関与する蛋白質の調節因子であることが報告されていた。そこで、このSNPを含む約2.5 Mbの領域にあるマイクロサテライトマーカー11個を選択し、関連解析に用いた676頭について隣接する2マーカー間でのハプロタイプ頻度推定を行い、Fisher正確検定によってハプロタイプの偏りを検定したところ、SNPに隣接する2カ所が有意であった。これらの結果から、この領域に4歳時子牛生産数QTLが存在することが示唆された。今後、他の牛群での再現性の確認と効果の推定を行う予定である。

(日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村)

学会発表16.

題目：黒毛和種発育不全牛と正常発育牛の肝組織に発現する遺伝子の網羅的解析

発表者：永來 沙夜子¹、渡辺 大作¹、木崎 景一郎²、富岡 美千子¹、平野 貴³、杉本 喜憲³、橋爪 一善²

所属：¹北里大獣医学部、²岩手大農学部、³畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】黒毛和種牛に発生する原因不明の発育不全症は、これまでの研究から免疫系・代謝系に異常がある多因子疾患と推定され、十分に栄養を摂取しても栄養不良で消瘦体型を呈する。本研究ではその原因を明らかにする目的で、肝組織に発現する遺伝子の網羅的解析を行った。

【方法】臨床的・血液学的に正常な12ヵ月齢の黒毛和種去勢牛3頭および10-12ヵ月齢の黒毛和種の発育不全牛3頭を用いて肝生検を行い、液体窒素で凍結、-80℃に保管した。肝組織から総RNAを抽出、ウシオリゴマイクロアレイ解析に供した。

【結果】発育不全牛では、血清総コレステロール、インスリン、インスリン様成長因子-1 (IGF-1)、サイロキシン (T4) が低値で、成長ホルモン (GH) 分泌は亢進した。正常牛と発育不全牛の肝組織に発現した遺伝子の網羅的解析から有意な変動 ($P < 0.05$) があった257遺伝子のうち、特に発育不全/正常牛の比率が0.4以下と低値を示した遺伝子には、ハプトグロビン、メタロペプチダーゼ、heat shock protein (HSP) 関連遺伝子、IgG関連遺伝子、ケモカイン (MCP-2)、インターフェロン γ などがみられた。脂質関連では発育不全牛でfatty acid binding protein 関連遺伝子、PPARおよびhydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase 関連遺伝子などが、またヒトの遺伝病であるShwachman - Diamond syndrome遺伝子も有意に発現が低下していた。発育不全牛の肝組織において発現が有意に低い遺伝子には、ヘモグロビン代謝、免疫、糖代謝、蛋白質の輸送と構造維持、脂質代謝および膵分泌機能に関わる遺伝子があり、発症に関与している可能性がある。分析を進めて、発育不全に関わる遺伝子異常を特定する必要がある。

(日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村)

学会発表17.

題目：親子判定および個体識別用国際基準SNPマーカーセットを用いた黒毛和種およびホルスタイン種における父権否定確率

発表者：黒木 一仁¹、宮崎 義之¹、荻野 敦¹、西村 翔太²、島貫 伸一¹、塗本 政伸¹、高須賀 晶子²、田邊 義弘¹

所属：¹家畜改良事業団、²畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】現在、牛の親子判定を行っている世界の検査機関は、国際標準マイクロサテライト (MS) マーカーセット (12種類) をベースに、独自に追加したMSマーカーセットを用いている。近年SNPマーカーを用いた親子判定の可能性の検証とSNPマーカーの国際標準化を目的とする取り組みとして、国際比較試験が実施され2010年7月の国際動物遺伝学会 (ISAG2010) でその結果の一部が報告された。本研究は親子判定および個体

識別用国際標準SNPマーカーを用いた日本における黒毛和種およびホルスタイン種の判定効率について検討することを目的とした。

【方法】 国際標準SNPマーカーは121種類で、そのうちの116種類がイルミナ50K SNPチップに含まれており、イルミナ50K SNPチップのタイピング結果から、国際標準SNPマーカーのデータを抜粋し分析を行った。父権否定確率の計算には動物遺伝研究所においてゲノムワイド関連解析に用いられた父牛の明確な黒毛和種肥育牛1,221頭、ゲノミック評価のために解析された国内外のホルスタイン種雄牛2,590頭の合計3,811頭を用いた。

【結果】 黒毛和種において型判定率が0.95を下回ったSNPおよび全頭ホモが確認されたSNPを除いた110種類のSNPでの父権否定確率は0.999999991（父-母-子）、0.99992（父-子）であった。ホルスタイン種において同様の条件で計算したところ、父権否定確率は0.999999996（父-母-子）、0.99997（父-子）であった。各品種において遺伝子頻度が極端に偏っているSNPマーカーが確認されたものの、国際標準SNPマーカーセットは日本国内においても高い精度で親子判定、個体識別が可能であることが確認された。

（日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村）

学会発表18.

題目：SNPとMS（マイクロサテライト）を用いた牛の親子判定

発表者：宮崎 義之¹、黒木 一仁¹、鳥貫 伸一¹、塗本 政伸¹、西村 翔太²、高須賀 晶子²、田邊 義弘¹

所属：¹家畜改良事業団、²畜技協・動物遺伝研

要旨：**【目的】** 日本における牛の親子判定は18 MS（12種の国際標準ISAGマーカー+6種）を用いて行っており、父権否定確率（父-母-子：PE1）は > 0.999997 である。また、判定が困難な場合はさらに14種のマーカーを追加して判定を行っている。近年、国際的にSNPを用いた親子判定の評価が報告されている。本研究では、当団で親子判定用として選択したSNPと現在使用しているMSの父権否定確率の比較、さらにそれらを用いた実際の親子判定結果およびコスト面について検証することを目的とした。

【方法】 サンプルは2005年から2007年までAIまたはETで供用された種雄牛、母牛およびその産子の計1,061頭（黒毛：680頭、ホルスタイン：381頭）を用いた。SNPはISAG2008で演者らが報告した85マーカー、MSは32マーカーを用いた。SNPの実用性を検証するために、種雄牛622頭（黒毛：427頭、ホルスタイン：195頭）に対して、血縁の確認されている母子183組（黒毛：104組、ホルスタイン：79組）を全組合せで親子判定を行った。

【結果】 85種類のSNPのPE値は > 0.99999993 であり、18種類のMSと同等のPE1値を得るに

は、少なくとも61種類のSNPが必要であった。マーカーセットのPE1値は32 MS>85 SNP>18 MSの順で高い値を示した。タイピングを行った種雄牛において、85種類のSNP中ヘテロ接合を示したマーカーの割合は0.28-0.69（平均0.47）と個体間で大きな差がみられ、特に父子関係において親子判定に利用できるSNP数に違いが生じた。母のデータのない実際の父子判定において、85種類のSNPでも真の父のみに絞り込むことはできなかったがSNPとMSを併用した場合には全ての父子関係において真の父のみを特定することが可能であった。コスト面では85 SNP>>32 MSであった。

（日本動物遺伝育種学会第11回大会、2010年10月、西白河郡西郷村）

学会発表19.

題目：ウシ50K SNPチップを用いた受胎率に関与する遺伝子の同定

発表者：杉本 真由美¹、後藤 裕作²、河原 孝吉²、杉本 喜憲³

所属：¹家畜改良セ、²日本ホルスタイン登録協会北海道支局、³畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】酪農家にとって、乳牛の泌乳能力の向上と共に繁殖性の改善は重要である。近年、ホルスタインの泌乳能力は飼養管理の改善及び遺伝改良により飛躍的に向上した一方、受胎率の低下が顕著である。受胎率の低下は、泌乳量の増大によるストレス等環境要因の影響だけでなく、繁殖性の改善のための遺伝改良を行っていなかったためと考えられる。そこで、イルミナ50K SNPチップを用いた受胎率に関与する遺伝子の同定を試みた。

【方法・結果】北海道において採血された4,362頭のホルスタイン雌牛について、閾値・線形アニマルモデルを用いて受胎率の育種価を推定したところ、平均受胎率育種価は45.25 ± 0.05%であった。このうち、受胎率育種価が低い個体192頭（42.08%以下）及び高い個体192頭（51.04%以上）を選抜し、各個体の血液よりDNAを抽出し、ウシ全ゲノムをカバーする54,001個のSNPについて、イルミナ50K SNPチップを用いて解析した。54,001個のSNPのうち、型判定率が95%を超え、マイナーアレル頻度（MAF）が1%以上であり、ハーディ・ワインバーグ平衡（HWE）に達し（ $P > 0.001$ ）、ウシゲノム上の位置が判明しているSNPは43,924個であった。集団の構造化を示す指標であるGenomic ControlのGenomic Inflation Factor（ λ ）は2.89であり、解析に用いたサンプルには構造化が存在していることが示唆された。そこで、判定率が100%であり、MAFが10%以上であり、HWEに達し、受胎率に関与せず（ $P > 0.01$ ）、ゲノム上の位置が100 kb以上離れている8,267個のSNPを用いて主成分分析を行った。主成分分析の結果に基づいた補正を行ったところ、 λ は1.02まで下がり、受胎率に関与するSNPは、染色体3番に2カ所、5番、13番、18番、28番染色体にそれぞれ1カ所ずつ存在した（ $P < 1.2E-06$ ）。

(第33回日本分子生物学会年会、2010年12月、神戸)

学会発表20.

題目：黒毛和種牛のゲノムワイド関連解析；IBS行列を用いた構造化の補正と枝肉重量QTLの効果推定

発表者：西村 翔太、渡邊 敏夫、高須賀 晶子、杉本 喜憲

所属：畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】我々は高密度SNPチップを用いて枝肉市場から収集した黒毛和種集団を対象とした枝肉形質のゲノムワイド関連解析を行ってきたが、家畜のように半きょうだいを多数含む血縁関係が複雑な集団に対しては主成分分析を用いた方法では集団の構造化の十分な補正が困難であった。本研究では、遺伝子型データから推測した個体間のIBS行列を用いて表現型に対する血縁の効果を補正する手法であるEMMAX の家畜集団に対する有効性を検討し、従来の家系解析で検出されているQTLと同一の領域に検出されたSNPの効果の大きさを推定した。

【材料・方法】2カ所の枝肉市場から収集した27,531頭の肥育去勢牛のうち、これまでに枝肉形質の関連解析のために抽出した1,156頭を材料として用いた。解析サンプルの枝肉重量の分布は母集団の分布を反映していた。イルミナ50K SNPチップでタイピングした40,037 個のSNPを解析に用いて、EMMAXで構造化を補正して分散成分の推定を行った。市場、年次、月齢を固定効果として含む混合モデル方程式により各SNPの効果の大きさを推定した。

【結果】解析に用いたサンプルは父方半きょうだいを最大で20頭含むGenomic Controlの λ は5.503で構造化の程度が非常に大きい集団であったが、EMMAXによる補正後の λ は約1.008で構造化を効果的に補正できた。解析の結果、これまでに複数の家系解析で枝肉重量QTLの検出が再現されている染色体6番、8番および14番のQTL領域に強い関連を示すSNPを複数検出した。それぞれの染色体で最も関連の強いSNPの効果の大きさは、6番では35.5 kg、8番では26.0 kg、14番では27.2 kgであり、家系解析で検出されたQTLは一般集団においても大きな効果を持っていることが分かった。

(第33回日本分子生物学会年会、2010年12月、神戸)

学会発表21.

題目：黒毛和種の全ゲノムSNP探索

発表者：平野 貴、渡邊 敏夫、西村 翔太、高須賀 晶子、杉本 喜憲

所属：畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】 SNPは関連解析や連鎖解析などのゲノム解析に有用なマーカーであるが、ウシで効率的なゲノム解析を行うためには、マイナーアレル頻度（MAF）が0.05以上のSNPを大量に開発する必要がある。今回、我々は黒毛和種で有用なSNPを網羅的に全ゲノムから同定することを目的として、黒毛和種52頭を用いて、リシーケンシングを行った。

【方法】 黒毛和種集団で有用なSNPを探索するために、イルミナ50K SNPチップを用いた主成分分析と各個体の血統情報に基づき、気高系、田尻系、藤良系、茂金系の4グループに分類される黒毛和種集団を代表する52頭を選抜した。各固体から抽出したゲノムDNAは、グループごとにプールした。これら4つのDNAプールを用いて、Genome Analyzer II（イルミナ社）にて36または40塩基でライブラリーの両端を読み取るPaired-Endシーケンシングを行った。参照配列にはUMD3.0を用いた。

【結果】 シーケンシングは1グループ/レーンで15ラン行い、全体で170.8 Gb（平均63.94 depth）の配列データ（read）を得た。これらにより約95.3%の領域がdepth 20でカバーされ、10,000 > depth 20でカバーされる領域をSNP探索の対象とした。マイナーアレルが2 reads以上、推定MAFが0.05以上である部位を探索し、常染色体及びX染色体から1,328万個のSNP（平均推定MAF = 0.26、202 bp）を検出した。

[Plant & Animal Genome XIX（第19回国際植物動物ゲノム学会大会）、2011年1月、サンディエゴ、米国]

学会発表22.

題目：複数の黒毛和種父方半きょうだい家系を用いた中密度カスタムSNPチップによる枝肉形質QTLマッピング

発表者：渡邊敏夫¹、中村亮一²、松橋珠子³、渡邊直人⁴、鹿島聖志⁵、西村翔太¹、杉本喜憲¹、高須賀晶子¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²鳥根県畜技セ、³岐阜県畜産研、⁴大分農林水産研指畜産、⁵北海道畜試

要旨：【目的】 これまでわれわれは子世代で分離する父親の枝肉形質QTLを検出する目的で、黒毛和種父方半きょうだいを対象に、カスタム3K SNPチップを用いたQTLマッピングを行った本研究では、未発表の1家系を含む4家系分のSNP遺伝子型データをあわせて、各SNPの効果をもとに混合モデルにおける固定効果として推定することで、子世代で分離するもの以外のQTLの検出を試みるとともに、QTL検出力を上げることを目的とした。

【材料と方法】 イルミナ50K SNPチップから黒毛和種において多型性の高いSNPを2800個選択し、中密度カスタムSNPチップをデザインした。同SNPセットの黒毛和種におけるマ

イナーアレル頻度は平均0.36であり、全ての常染色体を0.025 - 3.4 Mbの間隔（平均0.9 Mb）でカバーする。解析対象は、それぞれ176、282、285、251頭の去勢肥育牛からなる、4つの黒毛和種父方半きょうだい（991頭）とした。解析対象形質は、枝肉重量およびBMS Noとした。各個体のDNAをカスタムSNPチップにより型判定を行い、マイナーアレル頻度5%以上、型判定率95%以上のフィルターの後、2,771個のSNPを選択した。解析対象個体のサンプリング場所は多様なため、これらについての分子血縁係数行列を得ることが困難であった。そこで得られたSNP遺伝子型データからゲノム関係行列を作成し代用した。解析ソフトウェアはEMMAXを用い、と畜場、年次、月齢を固定効果とし、各SNPが持つ効果の推定を行い、そのP値を算出した。

【結果】 枝肉重量に関して29個のSNPが形質と強い関連を示した ($P < 0.0001$)。有意だったSNPのうち26個は既知のQTL領域 (Takasuga *et al.*, *Mamm. Genome*, 2007) に位置していた。BMS Noについては10個のSNPが $P < 0.0001$ で有意となったが、うち6個は既知の黒毛和種QTL領域の近傍に位置していた。低密度のSNP遺伝子型データから高密度のSNP遺伝子型データを推定する手法が提案されているが (Browning, *Hum. Genet.*, 2010)、本研究で用いた中密度SNPデータから50K SNP遺伝子型データの推定についても検討した。今後は他の枝肉形質を対象としてQTL解析を行うとともに、同SNPによるゲノム育種価予測の可能性を検討したい。

[Plant & Animal Genome XIX. (国際植物動物ゲノム学会第19回大会)、2011年1月、サンディエゴ、米国]

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 応用生物科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

2) 「DNA育種技術開発・利用促進事業」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22年度委員会は、平成23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22年度の研究成果発表

- (a) 次世代シーケンサーを用いたの網羅的 SNP探索
- (b) ホルスタイン種のゲノムワイド関連解析
- (c) 黒毛和種枝肉重量のゲノムワイド関連解析
- (d) 4家系を合わせた 3K SNP による QTL 解析
- (e) 黒毛和種脂肪交雑QTL (*Marbling-3*) の責任遺伝子 Pantophysinの解析
- (f) 黒毛和種繁殖性のゲノムワイド関連解析
- (g) 平成22年度のその他の研究成果

② 平成23年度の研究計画について

- ③ 講評
- ④ 閉会

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
廣岡 博之	京都大学大学院農学研究科 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21年度から当研究所が行った「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22年度以降の研究の方向性について、検討委員会が平成22年4月22日に東京で開催された。また、平成22年度の事業成果についての検討会は平成23年3月9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22年4月22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
- ③ その他

・平成23年3月9日の検討委員会

- ① 平成21、22年度事業実施結果について
「事業の目標と成果の概略」
「次世代シーケンサーを用いた黒毛和種の網羅的SNP探索」
- ② 平成21?22年度事業結果の評価について
- ③ その他

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 相談役
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研究企画調整室 研究専門委員
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「DNA育種技術開発・利用促進事業」に関わる全国推進会議である。平成22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22年度全国DNA育種推進会議は平成22年10月8日動物遺伝研究所で開催された。主要議題は次の通りであった。

- ① 動物遺伝研究所の平成22年度事業について
- ② 「平成22年度の計画と進捗状況報告」
 - 1. 成果報告：カスタム 3K SNP チップを用いた半きょうだい家系解析
 - 「カスタム 3K SNP チップの作成」
 - 「実際の解析と結果」(2題)
 - 「4家系を合わせた 3K SNP チップによる QTL 解析」
 - 2. 計画・進捗状況報告
- ③ 動物遺伝研究所からの話題提供
 - 「市販 3K SNP チップの評価と解析スケジュールについて」
 - 「イルミナ ウシ HD SNP チップの黒毛和種における有用性評価とCW-3 マーカー開発への利用」
 - 「平成22年度 QTL マップ更新スケジュール変更について」
- ④ その他

第2回の平成22年度全国DNA育種推進会議は平成23年3月3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22年度の道県等の事業成果の報告
- ② 平成22年度の動物遺伝研究所の進捗状況報告
 - 「脂肪交雑QTL (Marbling-3) の責任遺伝子同定」
 - 「繁殖性に関するゲノム解析」
- ③ 事業成果のまとめと今後の研究の進め方について
 - 「平成22年度QTL マップ」
 - 「枝肉重量QTL (CW-1, -2, -3) の効果検証」
 - 「平成23年度の計画」
- ④ その他

5) 研究会等の開催

- ① 日本動物遺伝育種学会第11回年次大会を(独)家畜改良センターと平成22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/中央畜産研修施設(体育館)

主催：日本動物遺伝育種学会

- (1) 学会会長挨拶 国枝 哲夫 (岡山大学)
- (2) 特別講演 座長: 居在家 義昭 (岩手大学)
 - 「寿しネタ育種の現状と将来」 岡本 信明 (東京海洋大学)
 - 「豚ゲノム研究成果を育種に生かす」 小畑 太郎 (農林水産先端技術研究所)
- (3) 総会
- (4) ランチョンセミナー
- (5) ポスター発表
- (6) 特別賞選考対象の口頭発表
- (7) 懇親会

② 動物遺伝育種シンポジウム組織委員会による第16回シンポジウム「動物ゲノム解析と新たな育種戦略?ゲノム解析から始まる多面的アプローチ: 生命現象の解明へ向けて」を動物遺伝育種学会と共催した。

開催日:平成22年10月7日

開催場所: (独) 家畜改良センター講堂

内容: 座長: 安江 博 (生物資源研究所)

- (1) 「次世代シーケンサーを用いた黒毛和種牛のゲノムリシーケンシング」、平野 貴
((社) 畜産技術協会附属動物遺伝研究所)
- (2) 「マイクロサテライトマーカーを用いた牛ゲノム相関解析」、杉本 真由美
((独) 家畜改良センター改良部)
- (3) 「Bovine Genomics ? The next set of grand challenges」、Tad S. Sonstegard
(USDA-ARS, Bovine Functional Genomics Laboratory)
- (4) 「ゲノムインプリンティング、体細胞クローンと個体発生」、幸田 尚 (東京医
科歯科大学 難治疾患研究所)
- (5) 「最新のヒトゲノム多様性研究の現状と方向性」、鎌谷 直之 ((独) 理化学研究
所 ゲノム医科学研究センター)

*毎年10月初旬に (独) 家畜改良センターと開催していた家畜DNA西郷シンポジウムは、日本動物遺伝育種学会第11回年次大会、および、第16回シンポジウムを開催するため中止した。

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22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（2001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（2008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（2005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) 和牛の繁殖性の分子遺伝学的解明（2008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：池田 省吾

5) 飛騨牛における繁殖性の分子遺伝学的研究（2008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

6) 和牛の繁殖性の分子遺伝学的研究（2009年度より継続）

- ① 委託先：岡山県総合畜産センター
- ② 委託研究者：片岡 博行

7) 北海道における黒毛和種雌牛の繁殖性の遺伝学的研究（新規）

- ① 委託先：地方独立行政法人北海道立総合研究機構農業研究本部畜産試験場
- ② 委託研究者：鹿島 聖志

8) 但馬牛の繁殖性の分子遺伝学的研究（新規）

- ① 委託先：兵庫県立農林水産技術総合センター畜産技術センター
- ② 委託研究者：秋山 敬孝

5. 研修員の受け入れ

所属機関名	氏名	受入期間
山形県農業総合研究センター畜産試験場	本田 光平	2010.06.07～06.11
島根県畜産技術センター	中村 亮一	2010.06.21～07.09
青森県産業技術センター畜産研究所	小野 博之	2010.07.05～07.16
岐阜県畜産研究所	松橋 珠子	2010.07.20～08.06
岐阜県畜産研究所	松橋 珠子	2010.08.09～08.20
大分県農林水産研究指導センター畜産研究部	渡邊 直人	2010.08.16～09.03
北海道立畜産試験場	鹿島 聖志	2010.08.3～09.17
佐賀県畜産試験場	山下 大司	2010.09.07～09.17
長崎県肉用牛改良センター	岡部 裕	2010.10.06～10.22
鹿児島県肉用牛改良研究所	干場 浩	2010.10.12～10.19
山形県農業総合研究センター畜産試験場	本田 光平	2010.10.18～10.29
青森県産業技術センター畜産研究所	小野 博之	2010.10.18～10.29
熊本県農業研究センター畜産研究所	稲永 敏明	2010.11.15～12.10
岐阜県畜産研究所	松橋 珠子	2010.11.29～12.17
佐賀県畜産試験場	山下 大司	2010.12.06～09.17
島根県畜産技術センター	中村 亮一	2010.12.09～12.22
鹿児島県肉用牛改良研究所	干場 浩	2010.12.13～12.22
宮城県畜産試験場	齊藤 陽介	2011.01.11～01.21
岐阜県畜産研究所	松橋 珠子	2011.01.18～02.10
鹿児島県肉用牛改良研究所	池田 省吾	2011.01.24～02.03
山形県農業総合研究センター畜産試験場	本田 光平	2011.01.31～02.10
長崎県肉用牛改良センター	岡部 裕	2011.01.31～02.19
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	吉田 恵美	2011.02.07～02.18
青森県産業技術センター畜産研究所	小野 博之	2011.02.14～02.25
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	2011.02.21～03.02
鹿児島県肉用牛改良研究所	干場 浩	2011.02.23～03.02
島根県畜産技術センター	中村 亮一	2011.03.04～03.18
宮崎県畜産試験場	築城 努	2011.03.04～03.18

第3節 総務

1. 職員名簿 (2011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	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	小 松 まゆみ
	臨時職員	吉 成 加奈子

2. 職員の異動

1) 職員の採用

採用年月日	氏 名	所 属	備 考
2010年7月1日	吉 成 加奈子	動物遺伝研究部臨時職員	
2010年10月1日	小 松 まゆみ	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
2010年8月31日	吉 田 加奈子	動物遺伝研究部補助員	
2010年9月30日	高 野 淳	動物遺伝研究部研究員	
2010年9月30日	真 船 文 恵	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
杉本喜憲	英国	2010.07.25～08.01	英国エディンバラ市で開催された第32回国際動物遺伝学会2010大会に参加
渡邊敏夫	英国	2010.07.25～08.01	英国エディンバラ市で開催された第32回国際動物遺伝学会2010大会に参加
平野貴	英国	2010.07.25～08.01	英国エディンバラ市で開催された第32回国際動物遺伝学会2010大会に参加
高須賀晶子	米国	2011.01.14～01.21	米国サンディエゴ市で開催された第19回植物・動物ゲノム学会 (Plant & Animal Genome XIX) に参加
渡邊敏夫	米国	2011.01.14～01.21	米国サンディエゴ市で開催された第19回植物・動物ゲノム学会 (Plant & Animal Genome XIX) に参加
平野貴	米国	2011.01.14～01.21	米国サンディエゴ市で開催された第19回植物・動物ゲノム学会 (Plant & Animal Genome XIX) に参加

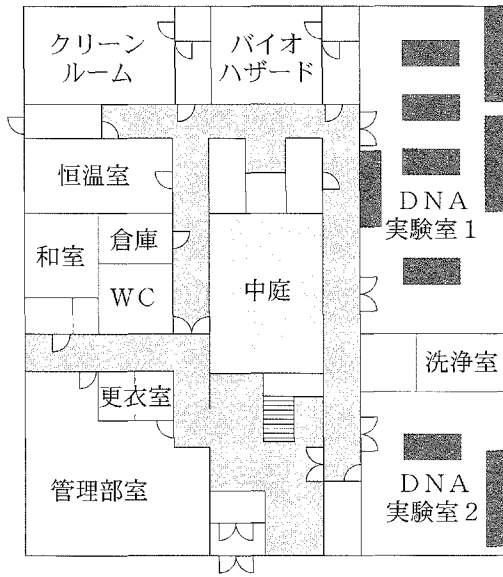
4. 施設・機器の整備

1) 施設

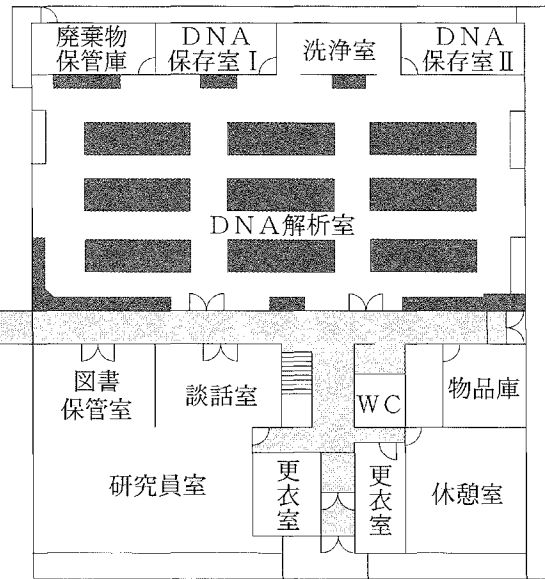
研究施設の平面図は57ページの通り。

研究施設平面図

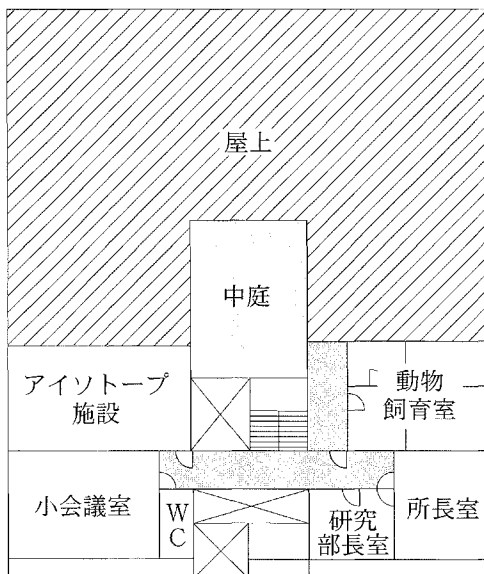
本館 1階 (742m²)



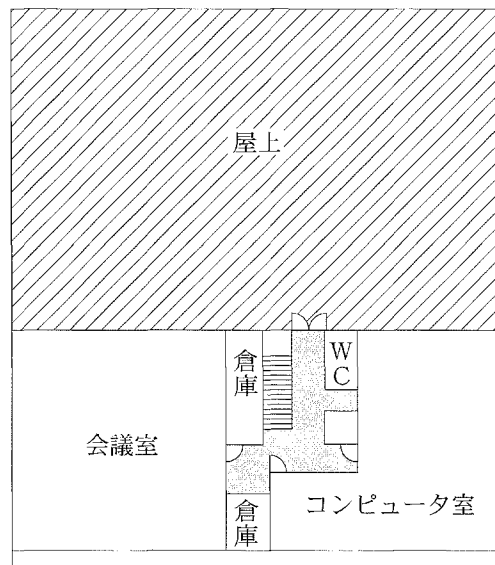
別館 1階 (788m²)



本館 2階 (258m²)



別館 2階 (306m²)



2) 2010年度購入の主要機器（単価百万円以上）

機 器 名	式 数
超純水製造装置(日本ミリポア社製 Milli-Q Integral バイオタイプ)	1
高密度SNP解析装置 (イルミナ社製 Iscan スキャナー (SY-101-1001))	1
超低温槽 (日本フリーザー社製 CLN-50CW)	2
ピペットステーション (バイオテック社製 EDR-384UX)	1
ハイブリダイゼーション (NimbleGen社製 5223652 4枚スライド用)	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

Ionotropic Glutamate Receptor AMPA 1 Is Associated with Ovulation Rate

Mayumi Sugimoto¹, Shinji Sasaki², Toshio Watanabe², Shota Nishimura², Atsushi Ideta³, Maya Yamazaki⁴, Keiko Matsuda⁵, Michisuke Yuzaki⁵, Kenji Sakimura⁴, Yoshito Aoyagi³, Yoshikazu Sugimoto^{2*}

1 National Livestock Breeding Center, Nishigo, Japan, **2** Shirakawa Institute of Animal Genetics, Nishigo, Japan, **3** Embryo Transfer Center ZEN-NOH, Kamishihoro, Japan, **4** Brain Research Institute, Niigata University, Niigata, Japan, **5** Department of Physiology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

Abstract

Ionotropic glutamate receptors mediate most excitatory neurotransmission in the central nervous system by opening ion channels upon the binding of glutamate. Despite the essential roles of glutamate in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion, there is a limited understanding of how glutamate receptors control ovulation. Here we reveal the function of the ionotropic glutamate receptor AMPA-1 (GRIA1) in ovulation. Based on a genome-wide association study in *Bos taurus*, we found that ovulation rate is influenced by a variation in the N-terminal leucine/isoleucine/valine-binding protein (LIVBP) domain of GRIA1, in which serine is replaced by asparagine. GRIA1^{Asn} has a weaker affinity to glutamate than GRIA1^{Ser}, both in *Xenopus* oocytes and in the membrane fraction of bovine brain. This single amino acid substitution leads to the decreased release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in immortalized hypothalamic GT1-7 cells. Cows with GRIA1^{Asn} have a slower luteinizing hormone (LH) surge than cows with GRIA1^{Ser}. In addition, cows with GRIA1^{Asn} possess fewer immature ovarian follicles before superovulation and have a lower response to hormone treatment than cows with GRIA1^{Ser}. Our work identified that GRIA1 is a critical mediator of ovulation and that GRIA1 might be a useful target for reproductive therapy.

Citation: Sugimoto M, Sasaki S, Watanabe T, Nishimura S, Ideta A, et al. (2010) Ionotropic Glutamate Receptor AMPA 1 Is Associated with Ovulation Rate. PLoS ONE 5(11): e13817. doi:10.1371/journal.pone.0013817

Editor: Paul A. Bartell, Pennsylvania State University, United States of America

Received: June 24, 2010; **Accepted:** October 14, 2010; **Published:** November 3, 2010

Copyright: © 2010 Sugimoto et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Patent applications Unites States publication number US-2009-0311705-A1 and Japan patent application number 2008-153767 are for the method of determining efficiency of ovum collection in bovine. The following authors are named on the applications: MS, AI, YA, and YS. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: kazusugi@siag.or.jp

Introduction

Cattle, like humans, usually have single ovulations. Superovulation is a method often used in the livestock industry to obtain more descendants from exceptional dams, but the treatments produce inconsistent results [1]. Identifying the gene variants responsible for the variable responses to superovulation treatments may help toward selecting cows that will be more responsive to the superovulation treatment. The molecular mechanisms that regulate ovarian follicular development in mammals are poorly understood, mainly because of species-specific differences between mono-ovulatory and polyovulatory animals. Analyses of mouse models with female fertility defects have revealed numerous gene products with key roles at various stages of ovarian folliculogenesis [2]. It is important, however, to identify specific gene products that control ovulation in mono-ovulatory animals.

Although genome-wide scans to identify the genes that influence ovulation rate in cattle have been performed, no specific genes have been identified to date [3]. The estimated maternal heritability of ovulation rate is relatively high (0.23) [4], but other factors, such as environment and technical expertise, are potential impediments to determining genetic variations and identifying the specific genes involved. To overcome this problem, we collected blood and superovulation records of 639 Japanese Black cattle at

the Embryo Transfer Center ZEN-NOH, where professionals routinely perform repeated superovulation treatments to collect embryos for commercial purposes. The average number of ova and embryos collected over five treatments ranged from 0.4 to 44.2 per superovulation with a median of 13.8 (Figure 1).

Using these samples, we found that ovulation rate in cattle was associated with the GRIA1. GRIA1 mediates most excitatory neurotransmission by opening ion channels upon the binding of glutamate [5]. Cows with GRIA1^{Asn}, in which serine is replaced by asparagine, have fewer immature follicles in their ovaries than cows with GRIA1^{Ser}. This single amino acid substitution decreases the affinity of the receptor to glutamate. Immortalized hypothalamic cells transfected with GRIA1^{Asn} release less GnRH than do cells with GRIA1^{Ser}. Cows with GRIA1^{Asn} have a slower LH surge than cows with GRIA1^{Ser}. Our work would lead to more efficient breeding practices for cattle and to a better understanding of folliculogenesis in mono-ovulatory animals.

Results

GRIA1 is associated with ovulation rate in cattle

Among the samples we collected at the Embryo Transfer Center ZEN-NOH, we selected 42 cows from which many ova and embryos were collected (high, ≥ 18.2) and 42 cows from which

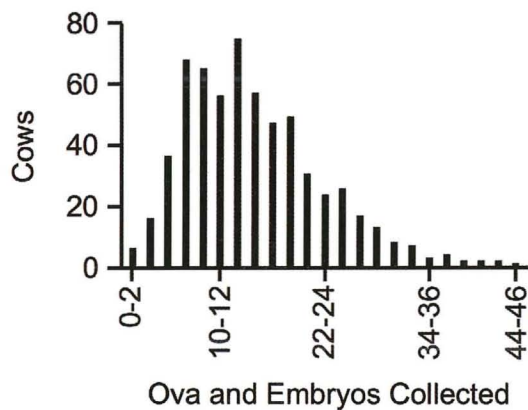


Figure 1. The average number of ova and embryos collected per superovulation over five treatments.
doi:10.1371/journal.pone.0013817.g001

only a few ova and embryos were collected (low, ≤ 9.6). To reduce the effects of specific sires, fewer than five cows derived from the same father were included. Based on typing 1154 microsatellite markers covering from chromosomes 1 to 29 and X, the

population structure of the selected samples was evaluated with STRUCTURE [6] and we found no evidence of a systematic bias (Figure S1). The stratification [7] of our samples was also low ($\lambda = 1.104$). The estimated effective population size [8] of the selected samples, 29.6, was similar to previously reported population sizes of Japanese Black cattle [9] (14.0–52.1), indicating that the sample in this study well represented the Japanese Black cattle population.

We scanned a total of 84 bovine genomes and revealed a significant association at the chromosome-wise or genome-wise level between ovulation rate and markers associated with chromosomes 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 19, 21, 23, 24, 27, and X (Figure S2, Panel A). Minor haplotypes whose frequencies were less than 5% were removed from the calculations and all of the markers were reasonably within Hardy-Weinberg equilibrium (HWE, $P > 0.002$ for either high or low). When the number of samples was increased from 84 to 134 (67 high ≥ 16.6 , 67 low ≤ 7.7), the analysis demonstrated that chromosomes 6, 7, 8, 14, 16, 19, and 24 maintained a significant association (Figure S2, Panel B). Further analysis with an additional 50 markers showed the most robust association on chromosome 7 (Figure S2, Panel C). Scanning of this chromosome with an additional 86 markers indicated that candidate genes were located in the region between 62 and 63 Mb (Figure 2, Panel A), which harbors *GRIA1* (Figure 2, Panel B).

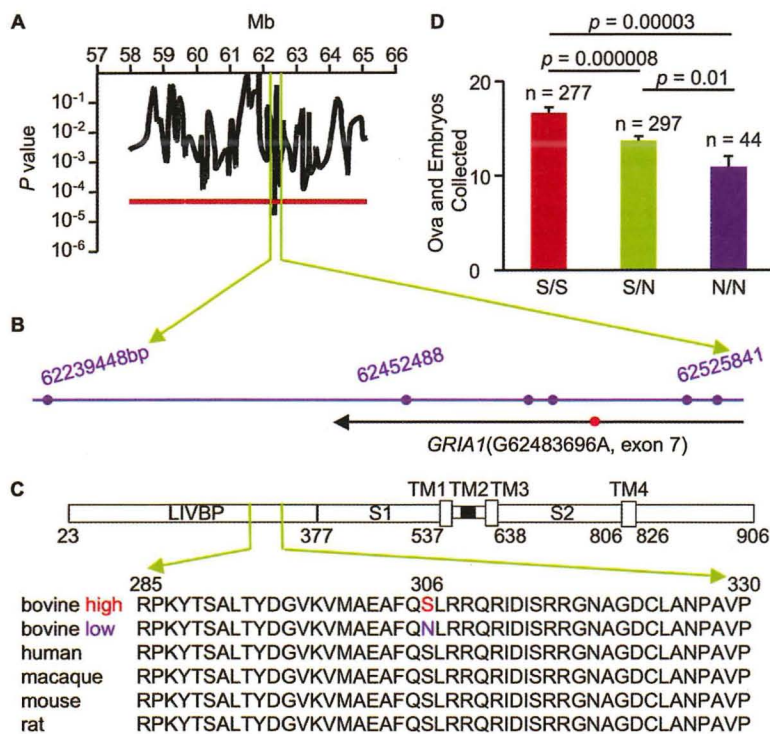


Figure 2. *GRIA1* is associated with ovulation rate in cattle. (A) Association signals with ovulation rate on chromosome 7 using plots of the P values for Fisher's exact test after estimating haplotypes of consecutive marker pairs by expectation-maximization algorithm. The red line represents the threshold for genome-wise significance after correction using the Bonferroni correction for multiple comparisons. (B) The map of markers (blue circles) and a gene (black line) found in the candidate region of chromosome 7. The red circle represents an SNP found in the gene. (C) Schematic illustration of *GRIA1* that harbors 4 transmembrane (TM) domains and the LIVBP domain, which includes alignment of partial mammalian amino acid sequences. (D) The average number of ova and embryos collected per superovulation of S/S, S/N, and N/N cows over five treatments. Data are presented as mean \pm SEM. P values were calculated by Student's t -test.
doi:10.1371/journal.pone.0013817.g002

To detect possible causative polymorphisms in *GRIA1*, we sequenced all exons of this gene in selected samples with homozygous high- or low-specific haplotypes (Figure S3) and found that the high samples had G alleles, while the low samples had A alleles in exon 7 (Figure 2, Panel B). The identified single nucleotide polymorphism (SNP) and its three neighboring microsatellite markers were in strong linkage disequilibrium (LD) with each other; pairwise χ^2 measures were all greater than 0.7 (Figure S4). This SNP replaces a serine with an asparagine at amino acid residue 306 (S306N) in the LIVBP domain of GRIA1, which is highly conserved from rat to human (Figure 2, Panel C). Encouraged by this finding, we sequenced *GRIA1* in all 639 samples and confirmed that S306N of GRIA1 is linked to ovulation rate and one copy of GRIA1^{Asn} decreases the number of ova and embryos collected per superovulation by three ova (Figure 2, Panel D).

To check the general ratio of this naturally occurring variant in cattle, we sequenced *GRIA1* in commercially available sires and observed that the Mendelian 1:2:1 genotype ratio remained and this SNP does not depart from HWE in either the Japanese Black ($P=0.125$) or Holstein populations ($P=0.547$, Figure S5, Panel A). Intensive genetic selection for high yields of meat or milk among beef or dairy cattle has not changed the frequency of variants in *GRIA1*. On the other hand, in the Embryo Transfer Center ZEN-NOH, they choose cows to collect many embryos after conducting three to five superovulations, which might reduce the number of N/N cows in their population (44/618 = 7.1%; HWE, $P=0.004$, Figure 2, Panel D). We did not have enough superovulation records to confirm that GRIA1 influences ovulation rate among Holsteins; however, the average conception rate of the N/N population was lower than the S/S population based on artificial insemination (AI) records (Figure S5, Panel B). GRIA1 might affect the conception rate through effects on the ovulation rate in cattle.

S306N in GRIA1 affects ligand affinity

The functions of the N-terminal LIVBP domain of GRIA1 are largely unknown. A 170-residue deletion in the LIVBP domain of the ionotropic glutamate receptor delta 2 (Grid2) impairs its exit from the endoplasmic reticulum in mice [10]. To examine whether S306N in GRIA1 affects protein transport to the cell surface, we stained GRIA1-expressing HEK 293 cells with an anti-hemagglutinin (HA) antibody under nonpermeabilizing conditions. There was no difference between GRIA1^{Ser}, GRIA1^{Asn}, and murine wild-type Grid2 as a positive control (PC) in the fluorescence intensity ratio of the HA staining to green fluorescent protein (GFP) expressed in the nucleus (Figure S6, Panel A). Expression of murine deletion mutant Grid2 as a negative control (NC) under nonpermeabilizing and permeabilizing conditions confirmed the plausibility of the experiments (Figure S6, Panel B). We also compared GRIA1 expression in membrane fractions from the brain of S/S, S/N, and N/N cows and found no difference (Figure S6, Panel C). A single mutation, not a large deletion, of the LIVBP domain might not affect quality control mechanisms.

The N-terminal domain of ionotropic glutamate receptors mediates dimerization [11] and affects ligand affinity [12]. GRIA1^{Asn} might have lower ligand affinity than GRIA1^{Ser}. Indeed, a ligand binding assay using membrane fractions extracted from bovine brain showed that the K_D for AMPA, was 27.7, 43.6, and 59.6 nM in S/S, S/N, and N/N cows, respectively (Figure 3, Panel A). Moreover, current responses in *Xenopus* oocytes injected with *GRIA1* mRNA revealed that the EC_{50} for GRIA1^{Ser} and GRIA1^{Asn} was 4.5 and 10.7 μ M, respectively (Figure 3, Panel B). When coexpressed with GRIA2, the dimer partner of GRIA1, the

EC_{50} for GRIA1^{Ser} (4.9 μ M) was also lower than that for GRIA1^{Asn} (10.4 μ M, Figure 3, Panel C), although the $I-V$ relationships of both GRIA1 were similar (Figure 3, Panel D). The N-terminal domain of *N*-methyl-D-aspartate receptors controls channel gating [13]. S306N in the N-terminal LIVBP domain of GRIA1 might affect its ligand affinity through controlling dimer assembly.

S306N in GRIA1 affects hormone release

The molecular link between GRIA1 and ovulation is not well understood. To address this issue, we first investigated GnRH secretion in murine immortalized hypothalamic GT1-7 cells [14] expressing GRIA1, because glutamate stimulates hypothalamic GnRH release [15] (Figure 4, Panel A). As expected, stimulation of GT1-7 cells expressing GRIA1^{Ser} with 100 μ M glutamate for 30 min induced the release of more GnRH than that from cells expressing GRIA1^{Asn} (Figure 4, Panel B). There was no difference in the transfection efficiency between GRIA1^{Ser} and GRIA1^{Asn} (Figure 4, Panel C). S306N in GRIA1 might influence GnRH release by altering glutamate affinity.

GnRH regulates follicle stimulating hormone (FSH) and LH secretion in the anterior pituitary [16] (Figure 4, Panel A). FSH induces follicle growth [17] while LH induces ovulation [18]. Because GRIA1 variants might influence FSH and LH secretion through the regulation of GnRH release, we examined FSH and LH concentrations in the serum of S/S, S/N, and N/N cows during superovulation. For superovulation, cattle were administered decreasing doses of FSH twice a day on Days 10, 11, and 12 of their estrus cycle (Figure 4, Panel D). The prostaglandin (PG) $F_{2\alpha}$ was also administered at the fifth FSH treatment. We detected no differences in the FSH concentration between S/S and N/N cows (Figure 4, Panel E). On the other hand, N/N cows exhibited slower LH surge than S/S cows at 55 h after PGF_{2 α} treatment (Figure 4, Panel F and Figure S7).

S306N in GRIA1 affects ovulation

To more closely observe the effects of S306N in GRIA1 on folliculogenesis during superovulation, we examined the ovaries in S/S, S/N, and N/N cows by ultrasound scanning (Figure 5, Panel A). N/N cows had fewer immature follicles ($\phi=2-5$ mm) than S/S cows before superovulation at Day 9 (Figure 5, Panel B). Moreover, N/N cows also had fewer maturing follicles ($\phi=6-9$ mm) than S/S cows and the ratio of maturing follicles to total follicles in N/N cows was lower than that of S/S cows at Day 12 (Figure 5, Panel C, 16.5 \pm 6.4 % vs. 42.9 \pm 5.7 %, $P=0.0097$), indicating that N/N cows responded less to FSH administration than S/S cows. At Day 13, N/N cows had fewer mature follicles ($\phi>10$ mm) than S/S cows (Figure 5, Panel D). We also counted corpora lutea (CL), however, it was not a statistically significant difference between S/S and N/N cows ($P=0.07$, Figure 5, Panel E).

Discussion

We identified a naturally occurring genetic variant with a rather large effect on a quantitative trait, ovulation rate. Based on typing many microsatellite markers, we narrowed the region associated with ovulation rate, where locates only one candidate gene, *GRIA1*. GRIA1 carries one SNP changing from serine to asparagine. Cows with GRIA1^{Ser} have an average of six more ova and embryos than cows with GRIA1^{Asn}, comprising a 10% variation of the average number of ova and embryos collected during five superovulations. Our results might provide a method for selecting cows to be superovulated so that ova and embryos can be collected more efficiently.

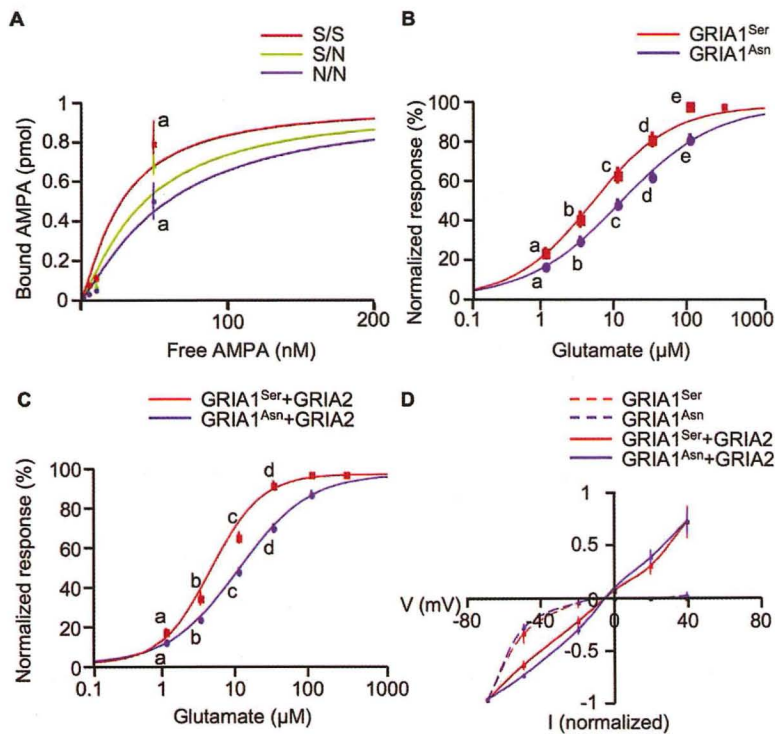


Figure 3. S306N in GRIA1 affects ligand affinity. (A) Saturation curves for [3 H] AMPA binding to brain of S/S (red, $n=3$), S/N (green, $n=3$), and N/N cows (blue, $n=3$). Data are presented as mean \pm SEM. a indicates $p<0.05$ by Student's t-test between S/S and N/N cows. (B) Dose-response curves of *Xenopus* oocytes expressing GRIA1^{Ser} (red, $n=10$) or GRIA1^{Asn} (blue, $n=9$). Normalized response means current normalized to the current evoked by a saturating dose of glutamate. Data are presented as mean \pm SEM. a-e indicate $p<0.05$ by Student's t-test between GRIA1^{Ser} and GRIA1^{Asn}. (C) Dose-response curves of *Xenopus* oocytes expressing GRIA1^{Ser}+GRIA2 (red, $n=8$) or GRIA1^{Asn}+GRIA2 (blue, $n=8$). Data are presented as mean \pm SEM. a-d indicate $p<0.05$ by Student's t-test between GRIA1^{Ser} and GRIA1^{Asn}. (D) I - V relationships of oocytes expressing GRIA1^{Ser} (red broken line; $n=4$), GRIA1^{Ser} with GRIA2 (red line; $n=5$), GRIA1^{Asn} (blue broken line; $n=4$), and GRIA1^{Asn} with GRIA2 (blue line; $n=5$). Each I - V relationship was normalized to the current obtained at -70 mV. Data are presented as mean \pm SEM. doi:10.1371/journal.pone.0013817.g003

Based on *in vitro* studies, we found that this single amino acid substitution changes the affinity of the receptor to glutamate. Immortalized hypothalamic cells transfected with GRIA1^{Asn} release less GnRH than do cells with GRIA1^{Ser}. Based on *in vivo* studies, we observed that cows with GRIA1^{Asn} have a slower LH surge than cows with GRIA1^{Ser} at 55 h after PGF_{2 α} treatment, although cows usually exhibit LH surge at 43.9 ± 1.5 h (mean \pm SEM, $n=28$) after PGF_{2 α} treatment [19], LH administration from Day 7 to 13 stimulates continued growth of large follicles [20], suggesting that earlier LH surges might increase the number of follicles that are ovulated. Moreover, AMPA infusion into the third cerebral ventricle in ovariectomized estrogen-primed adult female rats induces LH release [21]. A dominant negative mutant of GRIA1 expressed in the preoptic area of female rats attenuates LH secretion [22]. Therefore, GRIA1 might control LH secretion by regulating GnRH release.

In addition to LH secretion, GRIA1 polymorphism might affect the ovary directly through GnRH. Choi et al. [23] observed expression of GnRH receptors in the human ovary during follicular development. Because hypothalamic cells with GRIA1^{Ser} release more GnRH than do cells with GRIA1^{Asn}, released GnRH might contribute ovulation in the ovary directly.

Many studies have evaluated various physiologic aspects of Holstein cows that have high and low numbers of follicles. For example, intrafollicular concentration of estradiol was greater for

cows with low antral follicle count than for cows with high antral follicle count [24]. GRIA1 might influence estradiol concentrations of other hormone in addition to LH.

In this study, we demonstrated that GRIA1 has an important role in ovarian follicular development among cattle, a mono-ovulatory animal. Although glutamate influences LH release [21], reproduction is not affected in mice deficient in GRIA1 [25]. Mice lacking *Gria2* in GnRH neurons have normal fertility despite impaired reproductive behavior [26]. It might be difficult to observe the effects of GRIA1 in folliculogenesis in mice, a polyovulatory animal. In humans, a mono-ovulatory species, superovulation is often conducted for the treatment of infertility [27]. Increasing the number of ova and embryos released by superovulation combined with *in-vitro* fertilization to enhance conception improves pregnancy rates. Our results indicate that GRIA1 might be a useful target for reproductive therapy in women.

Materials and Methods

Ethics Statement

All animal experimentation was undertaken with the approval of the National Livestock Breeding Center Committee on Animal Research (H21-35).

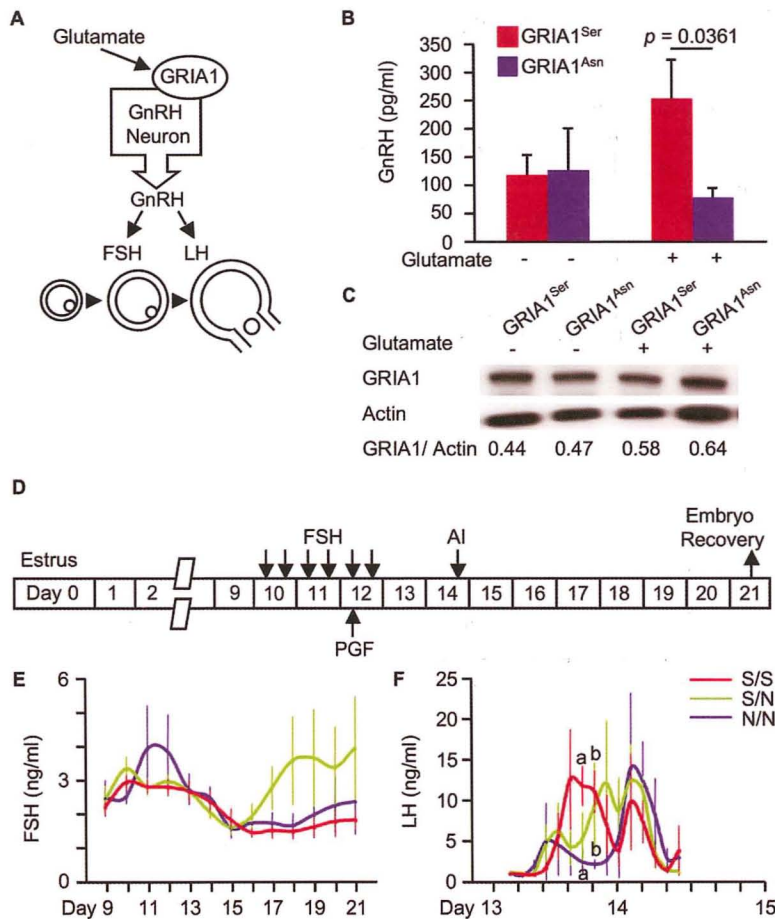


Figure 4. S306N in GRIA1 affects hormone release. (A) Schematic of ovulation control. (B) The concentration of GnRH released from GT1-7 cells expressing GRIA1^{Ser} (red) or GRIA1^{Asn} (blue). Data are presented as mean \pm SEM ($n=3$ each). P values were calculated by Student's t -test. (C) Representative immunoblots with anti-HA (GRIA1) and anti-actin (control) antibody. (D) The protocol for superovulation in cattle. (E-F) The concentration of FSH (E) and LH (F) in the serum of S/S (red, $n=6$), S/N (green, $n=5$), and N/N cows (blue, $n=4$) during superovulation. Data are presented as mean \pm SEM. a and b indicate $p<0.05$ by Student's t -test between S/S and N/N cows. doi:10.1371/journal.pone.0013817.g004

Superovulation

The cattle were administered 5 armour units (AU) of FSH (Antrin R-10, Kawasaki-Mitaka, Kanagawa, Japan) at 0800h and 1600h on Day 10, 3 AU at 0800 h and 1600 h on Day 11, and 2 AU at 0800 h and 1600 h on Day 12 of their estrus cycle. A PGF_{2 α} analogue (3 ml Resipron-C containing 0.25 mg/ml cloprostenol, ASKA Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) was administered at 0800 h on Day 12. The cattle were inseminated with one dose of frozen-thawed semen in the afternoon on Day 14 or on the morning of Day 15. Ova and embryos were recovered by uterine flushing on Day 21. Superovulated ovaries were examined by real-time B-mode ultrasonography (Tringa Linear Ultrasound System; Esaote-Pie Medical, Maastricht, Netherlands) with a 7.5 MHz rectal transducer.

Mapping

Genomic DNA was isolated from the blood or semen using NA-1000/48S (Kurabo, Tokyo, Japan) or Easy-DNA kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Fluorescence-labeled (CA) n microsatellite markers

were selected from the Shirakawa-USDA genetic map [28]. Genotyping was performed using the ABI 3730 sequencer and GeneMapper (Applied Biosystems, Foster City, CA).

The population structure of our samples was estimated with STRUCTURE [6]. 155 markers were extracted from 1154 markers, with at least a 20-cM interval. We set 100,000 Markov chain Monte Carlo interactions including 10,000 burn-in interactions, and assumed the subpopulation number to be 2. Eighty-four individuals were separated into populations 1 and 2.

The degree of stratification of the samples in this study was examined using the genomic control method [7]. Briefly, λ was the observed median of χ^2 values of multiple testing divided by the expected median of χ^2 value ($P=0.5$) under the null hypothesis. λ indicates degree of inflation of χ^2 statistic values throughout multiple tests. If there is no stratification, λ is equal to 1. Because the degree of freedom of each test in this study was not always the same (from 1 to 9 in 1122 tests), the overall average of λ weighted by the number of tests for each degree of freedom was calculated. χ^2 values with Yates' correction for continuity were used because the expected value of the cells in the contingency tables was often less than 5.

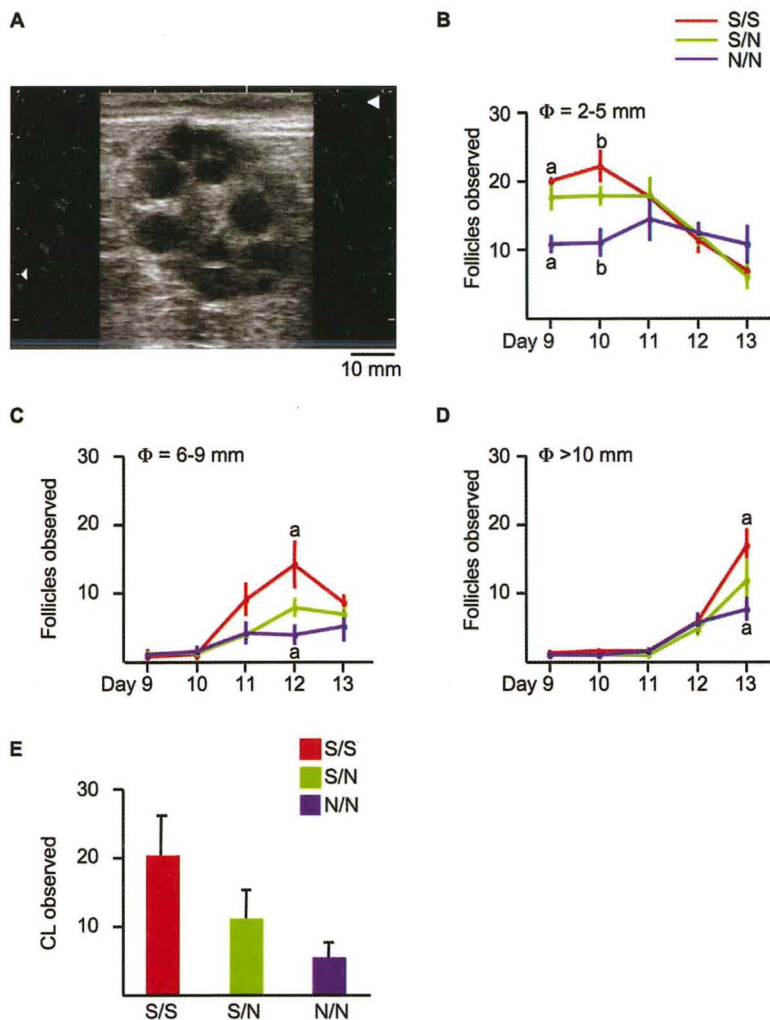


Figure 5. S306N in GRIA1 affects ovulation. (A) Representative photo of an ovary of an S/S cow at Day 13 by ultrasound scanning. Mature follicles ($\phi > 10$ mm) were recognizable. (B–D) The average number of immature follicles (B, $\phi = 2-5$ mm), maturing follicles (C, $\phi = 6-9$ mm), and mature follicles (D, $\phi > 10$ mm) observed by ultrasound scanning of S/S (red, $n = 6$), S/N (green, $n = 5$), and N/N cows (blue, $n = 4$) during superovulation. Data are presented as mean \pm SEM. a and b indicate $p < 0.05$ by Student's t-test between S/S and N/N cows. (E) The average number of CL of S/S (red, $n = 6$), S/N (green, $n = 5$), and N/N cows (blue, $n = 4$) after superovulation. Data are presented as mean \pm SEM. doi:10.1371/journal.pone.0013817.g005

Effective population size, N_e , was estimated as the coefficient in the equation reported by Sved [8];

$$r^2 = 1 / (1 + 4N_e c) + e$$

where r^2 is the linkage disequilibrium coefficient, c is a genetic distance between two markers in Morgans, and e is the residual error. To estimate an effective population size using microsatellite markers, χ^2 value is preferred over r^2 as the linkage disequilibrium coefficient [29]. Effective population size was estimated with χ^2 values of 5192 pairs of two markers on all autosomes within a 15-cM window. Non-linear regression of genetic distances on χ^2 values was performed with the nls function of R software (<http://www.r-project.org/>).

Fisher's exact test was used for association studies after estimating haplotypes of consecutive marker pairs by expectation-maximization algorithm as described previously [30]. Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium were computed as described previously [30].

All exons of bovine *GRIA1* were sequenced after amplifying by polymerase chain reaction (PCR) with primers shown on Table 1. A SNP in *GRIA1* was typed with primers GRIA1exon7 F and R (Table 1).

Immunohistochemical analysis

Bovine *GRIA1* coding sequences were derived by reverse-transcription PCR with primers GRIA1F and R (Table 1). These coding sequences were cloned into pTracer-nucGFP (Invitrogen) to express GRIA1 protein with a hemagglutinin (HA) tag in its N-terminal and GFP in the nucleus were transfected into HEK 293

cells, which were provided by the RIKEN CELL BANK (Tsukuba, Japan). Immunocytochemical analysis was performed as described previously [31]. Stained cells were visualized with a microscope (IX81, Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a CCD camera (Luca, Andor Technology, Tokyo, Japan). The intensity of staining based on 10 cells each from 3 independent experiments was quantified by Andor iQ1.9 (Andor Technology).

Western blotting analysis

Membrane fractions were extracted from bovine brain as described previously [32], and 25 µg of protein were resolved by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The blots were incubated with rabbit polyclonal antibody

to GRIA1 (1:1000, AB1504, Millipore, Tokyo, Japan) or actin (1:200, A2066, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Ligand binding analysis

Protein (500 µg/ml) was used for a ligand binding assay with [³H] AMPA (392.2 GBq/mmol, 1–200 nM) as described previously [33]. Non-specific binding obtained by incubating 1 mM L-glutamate in the binding assay was subtracted from total binding to yield specific [³H] AMPA-binding.

Electrophysiological analysis

Bovine *GRIA1* mRNAs were synthesized using mMESSAGE mMACHINE® SP6 Kit (Applied Biosystems) and injected into *Xenopus* oocytes as described previously [34]. Whole-cell current responses to 1, 3, 10, 30, 100, and 300 µM glutamate were recorded as described previously [35].

GnRH enzyme immunoassay

We amplified bovine *GRIA1* that had been cloned into pTracer-nucGFP with primers GRIA1InFusionF and R and then switched into pCAGGS (N-R) [36] using the In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) to produce HA-tagged protein under the control of a ubiquitous strong promoter that was based on the β-actin promoter.

GT1-7 cells were cultured in six-well dishes coated with poly-L-ornithine (BD Biocoat [PLO/LM] 354658, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) with conditioned-Dulbecco's modified Eagles medium (C-MEM), which was comprised of a 1:1 mixture of conditioned medium from mouse embryonic astrocytes in primary culture and Dulbecco's modified Eagles medium with high glucose (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml). When cells reached 90% confluence, C-MEM was replaced with Opti-MEM (Invitrogen) and transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) for 24 h.

The next day, confluent GT1-7 cells were treated as described previously [37]. The concentration of GnRH in the media was assayed using an LH-releasing hormone enzyme immunoassay kit (S-1217, Peninsula Laboratories, LLC, San Carlos, CA) according to the manufacturer's instructions.

Cells were extracted with phosphate-buffered saline containing 0.5% sodium deoxycholate and 0.5% NP-40. Aliquots of 5 µg of protein were used for Western blotting with rat monoclonal antibody to HA (1:1000, 11867423001, Roche, Mannheim, Germany).

Radioimmunoassay

Blood was collected daily by coccygeal venipuncture from Day 9 to Day 21 and alternately once every 2 h from 30 to 58 h after PGF_{2α} treatment. Blood was stored at 4°C until serum was harvested by centrifugation. Serum was stored at –30°C until assayed. The serum concentrations were measured by radioimmunoassay for FSH [38] and LH [39]. Assay sensitivity of FSH and LH were 0.003 ng/tube and 0.008 ng/tube, respectively. Intra-assay coefficients of variation for FSH and LH were 2.7% and 3.5%, respectively.

Supporting Information

Figure S1 The population structure of analyzed samples based on STRUCTURE. The population structure of our samples was estimated with STRUCTURE [6]. 155 markers were extracted from 1154 markers, with at least a 20-cM interval. We set 100,000 Markov chain Monte Carlo interactions including 10,000 burn-in

Table 1. Primer sequences.

Name	Sequence
GRIA1exon1 F	ATTGGACCTGGGCTCTTTT
GRIA1exon1 R	CAGCACAAACAGCCCATAGTG
GRIA1exon2 F	GCCCAGATACCATGTTGCAT
GRIA1exon2 R	CCCTCCCTTAAATGGTCGAT
GRIA1exon3 F	AATTTCTCTCTCTCTTTTCCA
GRIA1exon3 R	TTC AATGTCTCCCTCCCTA
GRIA1exon4 F	TGCTCTACTACCCCACTC
GRIA1exon4 R	CCTTCGCTGCGCTACTA
GRIA1exon5 F	GGATAGGACAGGGCAGTCAG
GRIA1exon5 R	AGTTGAGGGCTGCAGTGTT
GRIA1exon6 F	ACTTCTTCCCTCTCCACC
GRIA1exon6 R	AGAGACCAGCAGGGCTCTTT
GRIA1exon7 F	AGCCTCCCTACCAGCTCTCT
GRIA1exon7 R	CGTTGTTGCCAGCTCAC
GRIA1exon8 F	AGGAAAAGCCAGCAAATGAA
GRIA1exon8 R	TGGAAGCAAAGGGAGCTTAA
GRIA1exon9 F	CCACACCCCTCTCTTAAACA
GRIA1exon9 R	CCTCTGTGTGGCTAGCTC
GRIA1exon10 F	GTCTCCCATTTCTCCACCAG
GRIA1exon10 R	CCCTACCCTATGGGGACT
GRIA1exon11 F	GGAACAGAGGGCTGATGAAC
GRIA1exon11 R	TGATGAGAAGAGCCGACTGA
GRIA1exon12 F	TGCTTCTGATATCTCTCCCTG
GRIA1exon12 R	TGGTTCCTTCTGTGGAAGT
GRIA1exon13 F	CATCCAGCTTGTCTGTCC
GRIA1exon13 R	GGAAGCAAATCTGGCTACTTA
GRIA1exon14 F	TGCTGAGTGTCTCCACCTG
GRIA1exon14 R	GGTTACTGGCCATGCTGTTT
GRIA1exon15 F	CCTGGCTCATTGGACTCTC
GRIA1exon15 R	CCAGGAAACCCAGCTGTATC
GRIA1exon16 F	CGTGGTAGGGAGGAGAGTT
GRIA1exon16 R	GCTCCAGTGACACAGGCTCT
GRIA1 F	GGAATTCCTCCCAACAATATCCAG
GRIA1 R	TTTGTACAAGCGCGCCGCTTACAATCCAGTGGCTC
GRIA1InFusion F	CCGGGATCCCGAATTCGCCACCATGGTCTGCTGGT
GRIA1InFusion R	CCTGAGGAGTGAATTCCTACAATCCAGTGGCTCCCA

doi:10.1371/journal.pone.0013817.t001

interactions, and assumed the subpopulation number to be 2. Eighty-four individuals were separated into populations 1 and 2. The inferred proportion of ancestry in population 1 of high (red) and low (blue) were similar.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013817.s001 (0.06 MB TIF)

Figure S2 Chromosome 7 is associated with ovulation rate in cattle. (A–C) Association signals with ovulation rate using plots of the *P* values for Fisher's exact test after estimating the haplotypes of consecutive marker pairs by the expectation-maximization algorithm. Different bands of green are used to differentiate marker pairs on consecutive chromosomes. Blue and red lines represent the thresholds for chromosome-wise and genome-wise significance based on Bonferroni's correction for multiple comparisons, respectively. (A) Genome-wide scans. (B) Scans at selected chromosomes with additional samples. (C) Scans at selected chromosomes with additional markers.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013817.s002 (0.39 MB TIF)

Figure S3 Samples for sequencing are selected by their haplotypes. (A) Frequency of haplotypes of consecutive marker pairs in the candidate region. Red and blue indicate 'high'- and 'low'-specific haplotypes, respectively. NLBCMS3, 4, 5, 6, and 7 and BMS792 are microsatellite markers located in the critical region. (B) Selected samples for sequencing. Sample 1 and 2 represent 'high' samples which have both 'high'-specific haplotypes and 'high' phenotype. Sample 3 and 4 represent 'low' samples which have both 'low'-specific haplotypes and 'low' phenotype.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013817.s003 (0.39 MB TIF)

Figure S4 Linkage disequilibrium structure for chromosome 7 based on r^2 . The linkage disequilibrium coefficient, r^2 , indicates that the region between the microsatellite markers, BMS792 and NLBCMS6, harbors strong linkage disequilibrium structure.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013817.s004 (1.36 MB TIF)

Figure S5 Variants of *GRIA1* are observed in both Japanese Black and Holstein. (A) Frequency of S/S (red), S/N (green), and

N/N (blue) sires among Japanese Black and Holstein. (B) The average number of AI trials per delivery during two deliveries among daughters derived from S/S, S/N, and N/N fathers in Holstein. AI trials means the number of inseminations needed per pregnancy. Data are presented as mean \pm SEM. *P* values were calculated by Student's *t*-test.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013817.s005 (0.09 MB TIF)

Figure S6 S306N in *GRIA1* does not affect expression. (A) The ratio of red (HA, surface expression) and green (GFP, expressed cells) fluorescence intensity in HEK 293 cells expressing *GRIA1*^{Ser}, *GRIA1*^{Asn}, NC, or PC under nonpermeabilizing conditions. Data are presented as mean \pm SEM. (B) Representative photos of HEK 293 cells transfected with *GRIA1*^{Ser}, *GRIA1*^{Asn}, NC, or PC under nonpermeabilizing (-Triton) and permeabilizing (+Triton) conditions. (C) Immunoblots of membrane and cytosol fractions extracted from brain of S/S, S/N, and N/N cows.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013817.s006 (0.92 MB TIF)

Figure S7 The concentration of LH in the serum of each animal after PGF treatment. S/S, S/N, and N/N cows were shown in red, green, and blue, respectively.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013817.s007 (0.30 MB TIF)

Acknowledgments

We thank Kumiko Maruyama for laborious genotyping; Yusaku Goto, Susan Mayo, and Jun-ichi Miyazaki for providing the AI records, GT1-7 cells, and pCAGGS expression vector, respectively.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MS AI MY KM MY KS YA YS. Performed the experiments: MS SS AI MY KM YA. Analyzed the data: MS TW SN AI MY YA. Contributed reagents/materials/analysis tools: MS SS. Wrote the paper: MS SS MY YS.

References

- Hasler JF (1992) Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J Dairy Sci* 75: 2857–2879.
- Matzuk MM, Lamb DJ (2008) The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 14: 1197–1213.
- Gonda MG, Arias JA, Shook GE, Kirkpatrick BW (2004) Identification of an ovulation rate QTL in cattle on BTA14 using selective DNA pooling and interval mapping. *Anim Genet* 35: 298–304.
- König S, Bosselmann F, von Borstel UC, Simianer H (2007) Genetic analysis of traits affecting the success of embryo transfer in dairy cattle. *J Dairy Sci* 90: 3945–3954.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51: 7–61.
- Pritchard JK, Stephens MW, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Devlin B, Roeder K, Wasserman L (2001) Genomic control, a new approach to genetic-based association studies. *Theor Popul Biol* 60: 155–166.
- Sved JA (1971) Linkage disequilibrium and homozygosity of chromosome segments in finite populations. *Theor Popul Biol* 2: 125–141.
- Nomura T, Honda T, Mukai F (2001) Inbreeding and effective population size of Japanese Black cattle. *J Anim Sci* 79: 366–370.
- Matsuda S, Yuzaki M (2002) Mutation in hotfoot-4J mice results in retention of 82 glutamate receptors in ER. *Eur J Neurosci* 16: 1507–1516.
- Matsuda S, Kamiya Y, Yuzaki M (2005) Roles of the N-terminal domain on the function and quaternary structure of the ionotropic glutamate receptor. *J Biol Chem* 280: 20021–20029.
- Madry C, Mesic I, Betz H, Laube B (2007) The N-Terminal domains of both NR1 and NR2 subunits determine allosteric Zn²⁺ inhibition and glycine affinity of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 72: 1535–1544.
- Gielen M, Retchless BS, Mony L, Johnson JW, Paoletti P (2009) Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* 459: 703–707.
- Wetsel WC, Valença MM, Merchenthaler I, Liposits Z, López FJ, et al. (1992) Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone-secreting neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4149–4153.
- Ojeda SR, Lomniczi A, Mastroratti C, Heger S, Roth C, et al. (2006) Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinol* 147: 1166–1174.
- Schally AV (1970) Hypothalamic regulation of FSH and LH secretion. *Res Reprod* 2: 2–3.
- Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kiro S (2000) The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 163: 53–60.
- Felig P, Baxter JD, Broadus AE, Froman LA *Endocrinology and Metabolism*: McGraw Hill. 1562 p.
- Bervers MM, Dieleman SJ (1987) Superovulation of cows with PMSG: variation in plasma concentrations of progesterone, oestradiol, LH, cortisol, prolactin and PMSG and in number of preovulatory follicles. *Anim Reprod Sci* 15: 37–52.
- Tafti R, Ahmad N, Inskeep EK (1996) Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. *J Anim Sci* 74: 2983–2991.
- Brann DW, Mahesh VB (1997) Excitatory amino acids: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. *Endocr Rev* 18: 678–700.
- Funahashi T, Hagiwara Y, Kiyu F, Takahashi T (2008) Expression of AMPA receptor subunit glutamate receptor 1 (GluR1) in the preoptic area (POA) delays the onset of puberty in female rats. The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, P1-m04.
- Choi JH, Gilks CB, Auersperg N, Leung PC (2006) Immunolocalization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and type I GnRH receptor during follicular development in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4562–70.
- Ireland JJ, Zielak-Steciwko AE, Jimenez-Krassel F, Folger J, Bettgeowda A, et al. (2009) Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular

- estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biol Reprod* 80: 954–964.
25. Zamanillo D, Sprengel R, Hvalby O, Jensen V, Burnashev N, et al. (1999) Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* 284: 1805–1811.
 26. Shinshek DR, Bus T, Grinevich V, Single FN, Mack V, et al. (2006) Impaired reproductive behavior by lack of GluR-B containing AMPA receptors but not of NMDA receptors in hypothalamic and septal neurons. *Mol Endocrinol* 20: 219–231.
 27. Crosignani PG, Walters DE, Soliani A (1991) The ESHRE multicentre trial on the treatment of unexplained infertility: a preliminary report. *Hum Reprod* 6: 953–958.
 28. Ihara N, Takasuga A, Mizoshita K, Takeda H, Sugimoto M, et al. (2004) A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res* 14: 1987–1998.
 29. Heifetz E, Fulton JE, O'Sullivan N, Zhao H, Dekkers JC, et al. (2005) Extent and consistency across generations of linkage disequilibrium in commercial layer chicken breeding populations. *Genetics* 171: 1173–1181.
 30. Wataabe T, Hirano T, Takano A, Mizoguchi Y, Sugimoto Y, et al. (2008) Linkage disequilibrium structures in cattle and their application to breed identification testing. *Anim Genet* 39: 374–382.
 31. Wang Y, Matsuda S, Drews V, Torashima T, Meisler MH, et al. (2003) A hot spot for hotfoot mutations in the gene encoding the $\delta 2$ glutamate receptor. *Eur J Neurosci* 17: 1581–1590.
 32. Mikoshiba K, Hatanaka H (1990) *Manuals for Neurobiochemistry*: Yodosya. 263 p.
 33. Chen G, Gouaux E (1997) Overexpression of a glutamate receptor (GluR2) ligand binding domain in *Escherichia coli*: application of a novel protein folding screen. *Proc. Natl Acad Sci USA* 94: 13431–13436.
 34. Ikeno K, Yamakura T, Yamazaki M, Sakimura K (2001) The Lurcher mutation reveals Ca^{2+} permeability and PKC modification of the GluR δ channels. *Neurosci Res* 41: 193–200.
 35. Yamazaki M, Ohno-Shosaku T, Fukaya M, Kano M, Watanabe M, et al. (2004) A novel action of stargazin as an enhancer of AMPA receptor activity. *Neurosci Res* 50: 369–374.
 36. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 103: 193–199.
 37. El-Etr M, Akwa Y, Baulieu E, Schumacher M (2006) The neuroactive steroid pregnenolone sulfate stimulates the release of gonadotropin-releasing hormone from GT1-7 hypothalamic neurons, through N -methyl-D-aspartate receptors. *Endocrinol* 147: 2737–2743.
 38. Keugaku K, Tanaka T, Kamomae H (2007) Changes in the peripheral concentrations of inhibin, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, progesterone and estradiol-17 β during turnover of cystic follicles in dairy cows with spontaneous follicular cysts. *J Reprod Dev* 53: 987–993.
 39. Mori Y, Kano Y (1984) Changes in plasma concentrations of LH, progesterone and oestradiol in relation to the occurrence of luteolysis, oestrus and time of ovulation in the Shiba goat (*Capra hircus*). *J Reprod Fertil* 72: 223–230.

Differentially expressed genes during bovine intramuscular adipocyte differentiation profiled by serial analysis of gene expression

Y. Mizoguchi^{*1}, T. Hirano^{*}, T. Itoh^{*2}, H. Aso[†], A. Takasuga^{*}, Y. Sugimoto^{*} and T. Watanabe^{*}

^{*}Shirakawa Institute of Animal Genetics, Odakura, Nishigo, Fukushima 961-8061, Japan. [†]Laboratory of Cellular Biology, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 981-8555, Japan

Summary

Beef marbling or intramuscular fat deposition is an economically important carcass trait in Japanese Black cattle. To investigate genes involved in intramuscular adipogenesis, differential gene expression during adipogenesis in a clonal bovine intramuscular preadipocyte (BIP) cell line was profiled with serial analysis of gene expression (SAGE). We sequenced 75 283 tags for the proliferation phase (day 0) and 81 878 tags for the differentiation phase (4 days after adipogenic stimulation: day 4). A comparison of the unique SAGE tag frequencies between the day 0- and day 4-libraries revealed that 878 (2.8%) of the 30 989 unique putative transcripts were expressed at significantly different levels ($P < 0.05$); 401 tags (1.4%) were up-regulated and 477 tags (1.2%) were down-regulated in the day 4-library relative to the day 0-library. We confirmed up-regulation of 10 tags of the genes that were up-regulated in the previous subtraction cloning studies in BIP cells [*Animal Science Journal*, 76 (2005) 479]. Of the 878 differentially expressed tags, 377 were identified in the bovine RefSeq library and 356 were assigned a bovine draft genomic sequence. Fifteen tags were mapped in previously detected beef marbling quantitative trait loci (QTL) regions [*Mammalian Genome*, 18 (2007) 125]. These genes may be involved in the adipogenic processes of beef marbling.

Keywords bovine intramuscular preadipocyte, differentiation, marbling QTL, serial analysis of gene expression.

Genetic variations in fatness impact metabolic diseases in humans, as well as feed efficiency, meat tenderness, taste, and meat price in livestock. Beef marbling is characterized as intramuscular fat deposition in the muscle and is economically important with respect to beef quality. The molecular mechanisms involved in marbling, however, are still largely unknown. Most *in vitro* studies on adipocyte differentiation and metabolism have been performed using the mouse preadipocyte cell line 3T3-L1, and a number of genes have been shown to be involved in adipocyte differ-

entiation using this cell line (Ntambi & Kim 2000; Soukas *et al.* 2001; Feve 2005).

We have mapped a number of marbling QTL on bovine chromosomes using Japanese Black cattle paternal half-sib families (Takasuga *et al.* 2007). However, QTL regions are no smaller than several megabases, and we have not yet determined any gene responsible for marbling in these chromosomal regions. A comprehensive gene expression analysis during adipogenesis would provide information about genes involved in intramuscular fat deposition.

A clonal bovine intramuscular preadipocyte (BIP) line was established from the intramuscular adipose tissue of the musculus longissimus thoracis of Japanese Black cattle (Aso *et al.* 1995). The BIP cells exhibit a fibroblastic appearance. Adipocyte differentiation is initiated by treating confluent BIP cells with differentiation medium supplemented with 50 ng/ml insulin, 0.25 μM dexamethasone, 5 mM octanate, 10 mM acetic acid and 10% foetal bovine serum. After staining with Oil-Red O, small lipid droplets appear 5–6 days after stimulation and occupy a large proportion of the cell volume by 10 days (Inoue-Murayama *et al.* 2000). This cell line is useful for studying bovine adipogenesis because

Address for correspondence

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

Present Addresses:

¹Graduate School of Agriculture, Meiji University, Tama-ku, Kawasaki, Kanagawa 214-8571, Japan.

²Livestock Improvement Association of Japan, Maebashi, Gunma 371-0121, Japan.

Accepted for publication 16 December 2009

the differentiation induction method is well-established (Nakajima *et al.* 1998; Inoue-Murayama *et al.* 2000) and has characteristics apparently different from 3T3-L1. Firstly, peroxisome proliferator-activated receptor- γ and CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP- α), which are master regulators in 3T3-L1 adipogenesis (MacDougald & Lane 1995; Tontonoz *et al.* 1995), are not detected (Yamasaki *et al.* 2006). In addition, the glucose transporter responsive to insulin, GLUT-4, is not detected (Aso *et al.* 1995). C/EBP- δ , expressed during BIP adipogenesis (Yamasaki *et al.* 2006), was up-regulated, and is known to be an early marker of adipogenesis in humans (Urs *et al.* 2004), but it is not up-regulated in mouse 3T3-L1.

Current technologies make it possible to study thousands of genes simultaneously using an integrated approach that includes differential display, subtractive cloning, serial analysis of gene expression (SAGE) and cDNA microarrays. The major disadvantages of differential display and subtractive cloning are the high number of false positives and the low sensitivity for detecting rare transcripts (David *et al.* 2005). The sensitivity of cDNA microarrays for detecting rare transcripts is also limited. Transcriptome-wide quantification is difficult using differential display or microarray. On the other hand, SAGE enables sensitive transcriptome-wide qualitative and quantitative analysis of gene expression within tissues during distinct differentiation stages (Velculescu *et al.* 1995; Sun *et al.* 2004). Here, we used SAGE to characterize and compare gene expression levels in BIP cells. The cell culture conditions for proliferation and differentiation of a BIP cell line were described previously (Aso *et al.* 1995). Total RNA samples were extracted using Trizol (Invitrogen) from BIP cells cultured in growth medium for 2 days after seeding (day 0 of stimulation) and after 4 days of adipogenic stimulation (day 4; Yamasaki *et al.* 2005). We confirmed that BIP cells in the same experiment accumulated lipid 8 days after stimulation. The SAGE libraries were generated using the I-SAGE kit (Invitrogen) based on the manufacturer's recommendations and sequenced using an ABI 3730 DNA Analyzer using BigDye terminator v3.1 (Applied Biosystems). Quality assessment of the sequences was performed using PHRED (Ewing *et al.* 1998) with a minimum quality score of 18 and a minimum sequence length of 28 nucleotides.

The statistical significance of different expression levels of tags between the two libraries was determined using the Z-test (Kal *et al.* 1999). Briefly, proportions of a specific mRNA molecule in the two libraries were calculated as $p = n_{\text{specific tags}}/N_{\text{total tags}}$.

The test statistic can be calculated as the difference in the proportions of a tag ($p_1 - p_2$) divided by the standard error of the proportion under the null hypothesis (p_0) that p_1 and p_2 are equal:

$$Z = (p_1 - p_2) / \sqrt{p_0(1 - p_0)(1/N_1 + 1/N_2)}$$

where N_1 and N_2 are total tag numbers of the two libraries and $p_0 = (n_1 + n_2)/(N_1 + N_2)$. The test statistic Z asymptotically distributes normally.

A total of 157 161 tags were obtained from the day 0- (75 283 tags) and day 4- (81 878 tags) SAGE libraries. The day 0- and day 4-libraries consisted of 20 929 and 22 441 unique tags respectively. Combined, the two libraries represented 34 223 unique tags, with 9147 tags (27%) common to both libraries and 11 782 tags (34%) and 13 294 tags (39%) unique to day 0 and day 4 respectively. In day 0 and day 4, 0.6% (120/20 929) and 0.5% (114/22 441) of the tags had expression levels of at least 0.1% (i.e. one tag per 1000 sequenced) respectively. The origins of the tags were searched using the bovine RefSeq library (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) where predicted cDNAs (XM series) with no 3'-untranslated region were excluded. Of the 34 223 unique tags, 5960 tags were identified in the bovine RefSeq library. Of the unique tags, 27 558 were not found and 705 had two or more hits in RefSeq genes. A comparison of the 34 223 unique tag frequencies between the two libraries revealed that 878 putative transcripts were differentially expressed at a significance level of $P < 0.05$. A total of 401 (1.4%) were up-regulated and 477 tags (1.2%) were down-regulated in the day 4-library after differentiation. Of these 878 tags, 377 were found in the bovine RefSeq library and 356 were assigned on the bovine genome (Table S1).

As SAGE is a type of multiple testing, we calculated the false discovery rate (FDR) to control for the proportion of false positive results (Benjamini & Hochberg 1995) on the basis of the number of tags (5960) that corresponded to RefSeq genes. FDR is the expected proportion of true null hypotheses within the class of rejected null hypotheses. FDR values for 377 tags ($P < 0.05$ and mapped on bovine chromosomes) are listed in Table S1. Among the 79 putative transcripts in Table 1, where FDR is less than 0.039, the number of true null hypotheses is expected to be no more than 3. For those with $FDR < 0.039$, Gene Ontology annotations were searched in the database (http://www.ebi.ac.uk/GOA/cow_release.html). With regard to biological functions, multiple transcripts were commonly up-regulated in the categories of proteinaceous extracellular matrix (ECM) (GO:0005578, 5), peptidase activity (GO:0008233, 4), serine-type endopeptidase inhibitor activity (GO:0004867, 3), cell adhesion (GO:0007155, 3) and metalloendopeptidase activity/collagen catabolic process (GO:0004222/GO:0030574, 2). Two of IGF binding (GO:0005520), and two of glycolysis (GO:0006096) were down-regulated. Burton *et al.* (2004) reported that *Thbs1*, *Serpinf1* and *Press23* were down-regulated during 3T3-L1 differentiation, while all of these were up-regulated in this study. These three genes are components of the ECM. Extracellular proteinases and proteinase inhibitors have been suggested to be involved in ECM remodelling (Lilla *et al.* 2002). ECM organization during adipogenesis in BIP may be different from

Table 1 Putative transcripts expressed in significant difference.

Gene symbol of putative transcript	Annotation	Up/Down	<i>P</i> -value	FDR	Category
<i>ADFP</i>	Adipose differentiation-related protein	UP	<1E-16	<6E-13	*
<i>ANPEP</i>	Alanyl (membrane) aminopeptidase	UP	<1E-16	<6E-13	2
<i>BGN</i>	Biglycan	UP	<1E-16	<6E-13	1
<i>CLU</i>	Clusterin	UP	<1E-16	<6E-13	*
<i>FN1</i>	Fibronectin 1, transcript variant 2	UP	<1E-16	<6E-13	*, 1, 4
<i>GPX3</i>	Glutathione peroxidase 3 (plasma)	UP	<1E-16	<6E-13	*
<i>PTX3</i>	Pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	UP	<1E-16	<6E-13	
<i>TIMP1</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	UP	<1E-16	<6E-13	*
<i>NP</i>	Nucleoside phosphorylase	UP	5.1E-10	1.8E-07	
<i>COL6A1</i>	Collagen, type VI, alpha 1	UP	2.3E-09	7.0E-07	
<i>NET1</i>	Neuroepithelial cell transforming gene 1	UP	4.1E-09	1.2E-06	
<i>MMP9</i>	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92 kDa gelatinase, 92 kDa type IV collagenase)	UP	6.0E-08	1.4E-05	1, 2, 5
<i>C13H20orf149</i>	Chromosome 20 open reading frame 149 ortholog	UP	6.4E-08	1.5E-05	
<i>PRSS23</i>	Protease, serine, 23	UP	7.2E-08	1.6E-05	*, 2
<i>CCL2</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 2	UP	1.2E-07	2.5E-05	
<i>MDK</i>	Midkine (neurite growth-promoting factor 2)	UP	1.4E-07	2.9E-05	
<i>COL18A1</i>	Collagen, type XVIII, alpha 1	UP	1.5E-07	3.0E-05	*, 4
<i>APOD</i>	Apolipoprotein D	UP	4.9E-07	9.2E-05	
<i>COL6A3</i>	Collagen, type VI, alpha 3	UP	8.3E-07	1.5E-04	
<i>TSC22D3</i>	TSC22 domain family, member 3	UP	1.0E-06	1.8E-04	
<i>LUM</i>	Lumican	UP	1.2E-06	1.9E-04	1
<i>DDIT4</i>	DNA-damage-inducible transcript 4	UP	1.9E-06	3.0E-04	
<i>ECM1</i>	Extracellular matrix protein 1	UP	1.9E-06	3.0E-04	
<i>SERPINE1</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	UP	2.4E-06	3.7E-04	3
<i>TMEM132A</i>	Transmembrane protein 132A	UP	2.7E-06	4.0E-04	
<i>JUNB</i>	Jun B proto-oncogene	UP	3.0E-06	4.4E-04	
<i>EIF4EBP1</i>	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	UP	2.0E-05	2.5E-03	
<i>SERPINF1</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	UP	2.5E-05	3.1E-03	*, 3
<i>THBS1</i>	Thrombospondin 1	UP	2.9E-05	3.4E-03	4
<i>RPS8</i>	Ribosomal protein S8	UP	5.8E-05	6.4E-03	*
<i>UGP2</i>	UDP-glucose pyrophosphorylase 2	UP	8.2E-05	8.7E-03	
<i>NUPR1</i>	Nuclear protein 1	UP	1.2E-04	0.012	
<i>NID2</i>	Nidogen 2 (osteonidogen)	UP	1.7E-04	0.015	
<i>RNASE4</i>	Ribonuclease, RNase A family, 4	UP	1.7E-04	0.015	
<i>PMEPA1</i>	Prostate transmembrane protein, androgen induced 1	UP	2.0E-04	0.018	
<i>TFPI2</i>	Tissue factor pathway inhibitor 2	UP	2.1E-04	0.018	3
<i>MMP2</i>	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72 kDa type IV collagenase)	UP	2.3E-04	0.020	1, 2, 5
<i>SAA3</i>	Serum amyloid A 3	UP	2.7E-04	0.022	
<i>BHLHB2</i>	Basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	UP	2.7E-04	0.022	
<i>GLUL</i>	Glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)	UP	3.3E-04	0.027	

Table 1 (Continued)

Gene symbol of putative transcript	Annotation	Up/Down	P-value	FDR	Category
<i>ACTG1</i>	Actin, gamma 1	DOWN	<1E-16	<6E-13	
<i>VIM</i>	Vimentin	DOWN	<1E-16	<6E-13	
<i>SPARC</i>	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	DOWN	1.6E-15	8.4E-13	
<i>IGFBP6</i>	Insulin-like growth factor binding protein 6	DOWN	1.8E-15	8.8E-13	6
<i>S100A4</i>	S100 calcium binding protein A4	DOWN	3.6E-15	1.6E-12	
<i>SST</i>	Somatostatin	DOWN	8.9E-15	3.8E-12	
<i>IGFBP4</i>	Insulin-like growth factor binding protein 4	DOWN	3.3E-12	1.3E-09	6
<i>ANXA2</i>	Annexin A2	DOWN	5.1E-11	1.9E-08	
<i>CAV1</i>	Caveolin 1, caveolae protein, 22 kDa	DOWN	1.8E-09	5.8E-07	
<i>TSPO</i>	Translocator protein (18 kDa)	DOWN	2.0E-09	6.2E-07	
<i>HMGB1</i>	High-mobility group box 1	DOWN	3.9E-08	1.1E-05	
<i>CTSK</i>	Cathepsin K	DOWN	4.5E-08	1.2E-05	2
<i>COL3A1</i>	Collagen, type III, alpha 1	DOWN	5.6E-08	1.4E-05	
<i>CFL1</i>	Cofilin 1 (non-muscle)	DOWN	2.6E-07	5.0E-05	
<i>PKM2</i>	Pyruvate kinase, muscle	DOWN	1.1E-06	1.9E-04	7
<i>PGAM1</i>	Phosphoglycerate mutase 1 (brain)	DOWN	4.1E-06	5.9E-04	7
<i>PPIA</i>	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	DOWN	4.1E-06	5.7E-04	
<i>MYL6</i>	Myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	DOWN	4.6E-06	6.2E-04	
<i>YWHAQ</i>	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	DOWN	1.7E-05	2.2E-03	
<i>PRRX1</i>	Paired-related homeobox 1	DOWN	1.7E-05	2.2E-03	
<i>B2M</i>	Beta-2-microglobulin	DOWN	2.0E-05	2.5E-03	
<i>SH3BGRL3</i>	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3	DOWN	3.3E-05	3.8E-03	
<i>CSRP1</i>	Cysteine and glycine-rich protein 1	DOWN	3.7E-05	4.3E-03	
<i>HSPA5</i>	Heat shock 70 kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78 kDa)	DOWN	4.3E-05	4.8E-03	
<i>SERPINH1</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)	DOWN	7.4E-05	8.0E-03	3
<i>SPATA20</i>	Spermatogenesis associated 20	DOWN	1.1E-04	0.011	
<i>CD9</i>	CD9 molecule	DOWN	1.2E-04	0.012	4
<i>CALR</i>	Calreticulin	DOWN	1.2E-04	0.012	
<i>ID3</i>	Inhibitor of DNA-binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	DOWN	1.4E-04	0.013	
<i>RPS12</i>	Ribosomal protein S12	DOWN	1.4E-04	0.014	
<i>LMNA</i>	Lamin A/C	DOWN	1.5E-04	0.014	
<i>CDC20</i>	Cell division cycle 20 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	DOWN	1.7E-04	0.015	
<i>PLP2</i>	Proteolipid protein 2 (colonic epithelium-enriched)	DOWN	2.0E-04	0.018	
<i>S100A11</i>	S100 calcium binding protein A11 (calgizzarin)	DOWN	2.3E-04	0.019	
<i>COL1A1</i>	Collagen, type I, alpha 1	DOWN	3.9E-04	0.031	
<i>ACTB</i>	Actin, beta	DOWN	3.9E-04	0.031	
<i>LOC540962</i>	Similar to QIL1 protein	DOWN	4.3E-04	0.033	
<i>CUEDC1</i>	CUE domain containing 1	DOWN	5.0E-04	0.038	

*Up-regulated as previously reported by means of subtraction cloning in BIP cells (Inoue-Murayama *et al.* 2000; Yamasaki *et al.* 2005, 2006).

1, GO:0005578 (proteinaceous extracellular matrix).

2, GO:0008233 (peptidase activity).

3, GO:0004867 (serine-type endopeptidase inhibitor activity).

4, GO:0007155 (cell adhesion).

5, GO:0004222/GO:0030574 (metalloendopeptidase activity/collagen catabolic process).

6, GO:0005520 (insulin-like growth factor binding).

7, GO:0006096 (glycolysis).

that in 3T3-L1. Intramuscular fat deposition is observed in livestock animals but is not normally evident in mice. The ECM organization of adipocytes in muscle tissue in cattle may have caused localization to be different to that of mice.

We compared the results of this study with those of a previous study in which the genes were detected using subtraction cloning followed by Northern blot analysis (Yamasaki *et al.* 2005, 2006). The up-regulation of several genes, *COL18A1*, *GPX3*, *SAA3*, *FN1* and *ADFP*, was well reproduced in the current study (Table 1), with a few exceptions [*FKBP4* ($P = 0.3$), *TMEM49* ($P = 0.4$) and *ECM2* (presumed tag not detected)]. Although the FDR for *A2M*, *CEPBD*, and *SCD* exceeded 0.1, these transcripts were also up-regulated in this study ($P = 0.011$, 0.005 and 0.015 respectively, Table 1).

Although *PPARG* and *CEBPA* presumably produce SAGE tags, both of these transcripts were not detected in this study, while both mouse *Pparg* and *Cebpa* were up-regulated during 3T3-L1 differentiation (Burton *et al.* 2004). The expression level of *CEBPA* in bovine stromal vascular cells after adipose differentiation induction treatment was reported to be six times lower than that of *SCD* (Ohsaki *et al.* 2007). Therefore, the expression level of *CEBP* as well as *PPARG* in BLP cells may be at undetectable levels, although a possibility that breed-specific polymorphisms might cause no detection of the tags is not excluded.

Recently, Takasuga *et al.* (2007) identified QTL for marbling on bovine chromosomes 4, 6 and 10, using identical-by-descent mapping in Japanese Black cattle. We mapped 15 genes, whose tag frequencies were changed at $P < 0.05$, to the marbling QTL regions above (Table 2), which suggests that these genes may be involved in marbling in Japanese Black cattle. Interestingly, *IGFBP3* was down-regulated after adipocyte differentiation, which is

Table 2 Transcripts mapped in the marbling QTL regions previously reported (Takasuga *et al.* 2007).

Bovine chromosome	Chromosomal location (base)	Gene symbol	Up/Down	P-value
4	51 752 381	<i>SFRP4</i>	UP	1.3E-03
4	54 006 274	<i>CAV1</i>	DOWN	1.8E-09
4	54 362 517	<i>TES</i>	DOWN	0.037
4	63 399 085	<i>EEPD1</i>	UP	0.016
4	66 317 434	<i>FKBP9</i>	UP	0.032
4	71 609 761	<i>HOXA9</i>	DOWN	0.037
4	78 895 680	<i>IGFBP3</i>	DOWN	0.003
4	79 456 746	<i>H2AFV</i>	DOWN	0.012
6	57 540 897	<i>LOC781512</i>	UP	0.004
6	72 298 906	<i>PDGFRA</i>	UP	0.006
6	74 387 353	<i>PAICS</i>	UP	0.019
6	75 005 844	<i>POLR2B</i>	UP	0.016
6	86 793 135	<i>YTHDC1</i>	UP	0.045
6	105 589 012	<i>PTPN13</i>	DOWN	0.024
10	83 321 941	<i>GALNTL1</i>	DOWN	0.020

known to be involved in myoblast differentiation. This *IGFBP3* down-regulation may contribute to the promotion of preadipocyte differentiation in beef marbling.

In this study, we have found large number of transcripts up-regulated and down-regulated in bovine adipogenic processes. Our results will provide information to help understand the molecular biochemical pathway underlying bovine intramuscular preadipocyte differentiation. There were 425 tags of unknown origin whose frequencies changed significantly. When the whole bovine mRNA sequencing is completed, these unknown tags may be identified and will provide more information about gene regulation in adipogenesis.

Acknowledgements

The authors thank the staff of the Shirakawa Institute of Animal Genetics 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

- Aso H., Abe H., Nakajima I., Ozutsumi K., Yamaguchi T., Takamori Y., Kodama A., Hoshino F.B. & Takano S. (1995) A preadipocyte clonal line from bovine intramuscular adipose tissue: non expression of GLUT-4 protein during adipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **213**, 369–75.
- Benjamini Y. & Hochberg Y. (1995) Controlling the false discovery rate: practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* **57**, 289–300.
- Burton G.R., Nagarajan R., Peterson C.A. & McGehee R.E. Jr (2004) Microarray analysis of differentiation-specific gene expression during 3T3-L1 adipogenesis. *Gene* **329**, 167–85.
- David D.C., Hoerndli F. & Gotz J. (2005) Functional Genomics meets neurodegenerative disorders Part I: Transcriptomic and proteomic technology. *Progress in Neurobiology* **76**, 153–68.
- Ewing B., Hillier L., Wendl M. & Green P. (1998) Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* **8**, 175–85.
- Feve G. (2005) Adipogenesis: cellular and molecular aspects. Best practice & research. *Clinical Endocrinology & Metabolism* **19**, 483–99.
- Inoue-Murayama M., Sugimoto Y., Niimi Y. & Aso H. (2000) Type XVIII collagen is newly transcribed during bovine adipogenesis. *Differentiation* **65**, 281–5.
- Kal A.J., van Zonneveld A.J., Benes V. *et al.* (1999) Dynamics of gene expression revealed by comparison of serial analysis of gene expression transcript profiles from yeast grown on two different carbon sources. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 1859–72.
- Lilla J., Stickens D. & Werb Z. (2002) Metalloproteases and adipogenesis: a weighty subject. *American Journal of Pathology* **160**, 1551–4.
- MacDougald O.A. & Lane M.D. (1995) Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annual Review of Biochemistry* **64**, 345–73.

- Nakajima I., Yamaguchi T., Ozutsumi K. & Aso H. (1998) Adipose tissue extracellular matrix; newly organized by adipocytes during differentiation. *Differentiation* **63**, 193–200.
- Ntambi J.M. & Kim Y.C. (2000) Adipocyte differentiation and gene expression. *Journal of Nutrition* **130**, 3122S–6S.
- Ohsaki H., Sawa T., Sasazaki S., Kano K., Taniguchi M., Mukai F. & Mannen H. (2007) *Stearyl-CoA desaturase* mRNA expression during bovine adipocyte differentiation in primary culture derived from Japanese Black and Holstein cattle. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular & Integrative Physiology* **148**, 629–34.
- Soukas A., Socci N.D., Saatkamp B.D., Novelli S. & Friedman J.M. (2001) Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro. *Journal of Biochemical Chemistry* **276**, 34167–74.
- Sun M., Zhou G., Lee S., Chen J., Shi R.Z. & Wang S.M. (2004) SAGE is far more sensitive than EST for detecting low-abundance transcripts. *BMC Genomics* **5**, 1.
- 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.
- Tontonoz P., Hu E. & Spiegelman B.M. (1995) Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Current Opinion in Genetics & Development* **5**, 571–6.
- Urs S., Smith C., Campbell B., Saxton A.M., Taylor J., Zhang B., Snoddy J., Jones Voy B. & Moustaid-Moussa N. (2004) Gene expression profiling in human preadipocytes and adipocytes by microarray analysis. *Journal of Nutrition* **134**, 762–70.
- Velculescu V.E., Zhang L., Vogelstein B. & Kinzler K.W. (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* **270**, 484–7.
- Yamasaki T., Inoue-Murayama M., Tahara K., Sugiyama A., Itoh T., Takasuga A., Sugimoto Y., Rose M.T., Aso H. & Ito S. (2005) Isolation of genes showing increased expression during bovine adipocyte differentiation. *Animal Science Journal* **76**, 479–89.
- Yamasaki T., Tahara K., Takano S., Inoue-Murayama M., Rose M.T., Minashima T., Aso H. & Ito S. (2006) Mechanism of plasma glutathione peroxidase production in bovine adipocytes. *Cell Tissue Research* **326**, 139–47.

Supporting information

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

Table S1 Expression of genes in BIP cells at 2 days after seeding and at 4 days after stimulation ($P < 0.05$).

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.

CALL FOR PAPERS *Technology Development for Physiological Genomics*

Metabolomic profiles indicate distinct physiological pathways affected by two loci with major divergent effect on *Bos taurus* growth and lipid deposition

Rosemarie Weikard,¹ Elisabeth Altmaier,² Karsten Suhre,² Klaus M. Weinberger,³ Harald M. Hammon,⁴ Elke Albrecht,⁵ Kouji Setoguchi,⁶ Akiko Takasuga,⁷ and Christa Kühn¹

¹Research Unit Molecular Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Dummerstorf; ²Institute of Bioinformatics and Systems Biology, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany; ³Biocrates Life Sciences Aktiengesellschaft, Innsbruck, Austria; Research Units ⁴Nutritional Physiology “Oskar Kellner” and ⁵Muscle Biology and Growth, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Dummerstorf, Germany; ⁶Cattle Breeding Development Institute of Kagoshima Prefecture, Osumi, So, Kagoshima; and ⁷Shirikawa Institute of Animal Genetics, Japan Livestock Technology Association, Odakura, Nishigo, Fukushima, Japan

Submitted 18 June 2010; accepted in final form 14 July 2010

Weikard R, Altmaier E, Suhre K, Weinberger KM, Hammon HM, Albrecht E, Setoguchi K, Takasuga A, Kühn C. Metabolomic profiles indicate distinct physiological pathways affected by two loci with major divergent effect on *Bos taurus* growth and lipid deposition. *Physiol Genomics* 42A: 79–88, 2010. First published July 20, 2010; doi:10.1152/physiolgenomics.00120.2010.—Identifying trait-associated genetic variation offers new prospects to reveal novel physiological pathways modulating complex traits. Taking advantage of a unique animal model, we identified the *I442M* mutation in the non-SMC condensin I complex, subunit G (*NCAPG*) gene and the *Q204X* mutation in the growth differentiation factor 8 (*GDF8*) gene as substantial modulators of pre- and/or postnatal growth in cattle. In a combined metabolomic and genotype association approach, which is the first respective study in livestock, we surveyed the specific physiological background of the effects of both loci on body-mass gain and lipid deposition. Our data provided confirming evidence from two historically and geographically distant cattle populations that the onset of puberty is the key interval of divergent growth. The locus-specific metabolic patterns obtained from monitoring 201 plasma metabolites at puberty mirror the particular *NCAPG I442M* and *GDF8 Q204X* effects and represent biosignatures of divergent physiological pathways potentially modulating effects on proportional and disproportional growth, respectively. While the *NCAPG I442M* mutation affected the arginine metabolism, the *204X* allele in the *GDF8* gene predominantly raised the carnitine level and had concordant effects on glycerophosphatidylcholines and sphingomyelins. Our study provides a conclusive link between the well-described growth-regulating functions of arginine metabolism and the previously unknown specific physiological role of the *NCAPG* protein in mammalian metabolism. Owing to the confirmed effect of the *NCAPG/LCORN* locus on human height in genome-wide association studies, the results obtained for bovine *NCAPG* might add valuable, comparative information on the physiological background of genetically determined divergent mammalian growth.

non-SMC condensin I complex, subunit G gene; arginine; disproportional growth; carnitine; genetic association

THE GENETIC AND PHYSIOLOGICAL mechanisms and interactions underlying the genetically determined variation in mammalian pre- and postnatal growth and lipid metabolism are still only partially understood. Identifying trait-associated genetic varia-

tion offers new prospects to reveal novel physiological pathways modulating such complex traits. Large animal models as supplied by livestock populations can provide substantial information about the genetic and physiological mechanisms underlying the genetically determined variation of complex traits, especially when targeting pre- and postnatal development: Livestock species offer uniparous models, a high phenotypic variability for complex traits in outbred populations due to long-term selective breeding, suitable sample sizes, and high-quality genome sequences (4).

In a previous study, we identified the nonsynonymous mutation *I442M* (*c.1326T>G*) in the bovine nonstructural maintenance of chromosomes (SMC) condensin I complex, subunit G (*NCAPG*) gene on *Bos taurus* chromosome 6 (BTA6) to be strongly associated with prenatal growth in cattle (18). Further data on the bovine *NCAPG* gene (45), as well as comparative information from the human and mouse genomes (23, 27, 47, 54), suggested that the *NCAPG* locus might also be associated with postnatal growth and lipid deposition. Until now, data on the physiological function of the *NCAPG* gene in mammals have been scarce. *NCAPG* has a catalytic function in the mammalian condensin I complex and is important during mitotic cell division (15). Owing to its interaction with the DNA methyltransferase 3 β , *NCAPG* links the regulation of DNA methylation with mitotic chromosome condensation in mammalian cells (20). However, a detailed analysis of the role of *NCAPG* in mammalian physiological pathways has yet to be undertaken.

Recently, progress in mass spectrometry has enabled extensive targeted metabolomic studies on body fluids providing a direct readout of biological processes (24). The resulting comprehensive analysis of specific targeted plasma metabolite concentrations can reveal details on the physiological background of genetically determined differences in physiological processes and disclose new regulatory pathways for complex traits as demonstrated in recent studies in human and mice (16, 24). For large animal models, e.g., ruminants, comprehensive metabolomic plasma analyses are lacking despite their potential to improve our understanding of genetically determined variation of ruminant physiology and comparative physiology of mammals.

Address for reprint requests and other correspondence: C. Kühn, Research Unit Molecular Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Wilhelm-Stahl-Allee 2, 18196 Dummerstorf, Germany (e-mail: kuehn@fbn-dummerstorf.de).

Our experimental population facilitated discriminating the specific effects of the *NCAPG I442M* mutation from unspecific growth-related effects due to the parallel segregation of the *NCAPG I442M* locus and the disrupting *Q402X* mutation in the myostatin encoding growth differentiation factor 8 (*GDF8*). As a consequence, the effects of both loci could be monitored on an identical genetic background. Myostatin is a well-characterized inhibitor of the myoblast terminal differentiation (29, 41) and myogenic cell proliferation (50). The *GDF8* gene is well confirmed as a major locus affecting growth and lipid deposition in mammals. In cattle, a variety of mutations are described (17). However, most association studies, e.g., Refs. 22, 35, focused on carriers of the *c.819_829del* 11 bp deletion or the *F94L* (*c.283C>A*) mutation. In the current study, we combined meticulous phenotypic monitoring and genetic association analyses with the new method of targeted metabolomic profiling to elucidate the physiological background of the divergent genetic effects of the *NCAPG I442M* and *GDF8 Q204X* mutations on growth and lipid deposition. Our metabolomic data provided discriminating biosignatures for two distinct loci, *NCAPG I442M* and *GDF8 Q204X*, both of which are associated with divergent postnatal body-mass gain and lipid deposition. Interestingly, the amino acid arginine and its metabolite symmetric dimethylarginine showed a significant association with the *NCAPG I442M* mutation. Arginine is frequently proposed as a food additive due to the important regulatory role of arginine and its metabolites in pre- and postnatal growth in many species (58).

MATERIALS AND METHODS

Animals. Our study comprised 156 male individuals from an F_2 resource population (28) generated from the founder breeds Charolais and German Holstein. All F_1 and F_2 animals of the resource population were generated by multiple ovulation and embryo transfer to dissect any potential systematic effect of maternal alleles on intrauterine development from the specific effect of the fetal alleles. Embryos were transferred randomly to virgin heifers kept in the experimental herd of the FBN Dummerstorf according to a standard protocol. The calves were weaned from their mothers immediately after birth. Until *day 121* post natum, the calves were fed a milk replacer diet according to requirements, which was gradually replaced by ad libitum access to hay and concentrates. Subsequently, the individuals were kept in a tie-stall barn on a daily semi-ad libitum feed ration, which was composed of chaffed hay and a concentrate (RM 2007; Vollkraft Mischfutterwerke, Rendsburg, Germany) with a hay-to-concentrate ratio of 1:3 and an energy content of 12.7 MJ ME/kg dry matter. The ration provided for a maximal average daily weight gain, while still being compatible with ruminant requirements. All experimental procedures were carried out according to the German animal care guidelines and were approved and supervised by the relevant authorities of the State Mecklenburg-Vorpommern, Germany.

For a confirmation study of the effects of the *NCAPG I442M* mutation on postnatal growth, a Japanese black (Wagyu) population used for the official progeny tests was investigated. A total of 792 steers were tested under standardized environmental conditions determined for progeny testing by the Japan Wagyu Register Association (36). The individuals entered the test station at 271 days of age (average age, ± 12 days SD) and were fed an ad libitum diet of concentrates (total digestible nutrients 73.0%, crude protein 12.0%) and roughage (timothy) during the test period of 364 days.

Monitoring of growth and lipid deposition. The average daily weight gain for all individuals from the experimental resource population was obtained from monthly weight measurements and calcu-

lated for six intervals from birth to *day 547* (Supplemental Table S1),¹ when all individuals were slaughtered at the same age. After death, a detailed dissection of the body (Supplemental Table S2) was performed to monitor the weight of the different body compartments as well as the total amount and the specific depots of body fat deposition (38).

For the confirmation population from the Japanese Wagyu breed, the average daily gain was recorded in 2-mo intervals from *day 271* to *day 607* (Supplemental Table S1).

Genetic markers. The *NCAPG I442M* locus (*NCAPG c.1326T>G*) was genotyped in all P_0 , F_1 , and F_2 individuals of the resource population, as described by Eberlein et al. (18). For genotyping all P_0 , F_1 , and F_2 individuals at the *GDF8 Q204X* (*GDF8 c.611C>T*) mutation, a Tetra-ARMS assay was applied with the following primers (5'-3') and PCR conditions: embracing forward primer: AGACTCATCAAACCCATGAAAG (0.2 μ M), embracing reverse primer: TGAGTACAGGGCTACCACTGG (0.2 μ M), specific inner forward primer: ACTCAGGCACTGGTATTTGGT (0.2 μ M), specific inner reverse primer: ACTGTCTTCACATCAATACTCTG (1 μ M) at 60°C annealing temperature. All genotypes were meticulously checked for inconsistencies according to a previously described protocol (18).

Metabolomic analyses. Because the initial association analyses had suggested that the most divergent growth was observed between 180 and 270 days after birth, a targeted metabolome scan on plasma samples from 156 individuals at the age of 240 days was performed. To avoid any potential effects on plasma metabolite concentration due to differences in circadian rhythms or feeding, all blood samples were drawn from the left jugular vein into K-EDTA-containing tubes at 7:30 AM with a prior fasting time for the individuals of 12 h. Blood samples were immediately stored on ice and transferred to the laboratory, where plasma was obtained by centrifugation within 30 min after blood sampling. The plasma was stored at -80°C until further analysis.

For the targeted metabolomic analysis, essentially, plasma metabolites were determined by electrospray ionization tandem mass spectrometry with the Biocrates AbsoluteIDQ targeted metabolomics technology analogously to Refs. 3, 21, 24. Briefly, a targeted profiling scheme is applied to quantitatively screen for known small-molecule metabolites using multiple reaction monitoring, neutral loss, and precursor-ion scans. Appropriate internal standards served as reference for quantification of the metabolites in the plasma samples. Details of the experimental metabolomics measurement techniques are described in the patent US 2007/0004044 (accessible online at <http://www.freepatentsonline.com/20070004044.html>). A further summary of the method can be found in Refs. 55, 56, and a comprehensive overview of the field and the related technologies is given by Wenk (57). Because initial data and results on *GDF8 Q204X* in the literature (2) had suggested effects of both genes, *NCAPG* and *GDF8*, on lipid deposition, the investigation of plasma metabolites focused on indicators of lipid metabolism: free carnitine (C0), acylcarnitines (Cx:y), hydroxylacylcarnitines [C(OH)x:y], dicarboxylacylcarnitines (Cx:yDC), acylglycerophosphatidylcholines (lysoPCCx:y), diacylglycerophosphatidylcholines (PCaaCx:y), acylethylglycerophosphatidylcholines (PCaeCx:y), sphingomyelins (SMx:y), N-hydroxydicarboxylsphingosyl-phosphocholines [SM(OHCOOH)x:y], and N-hydroxyacylsphingosyl-phosphocholines [SM(OH)x:y]. The lipid side chain formation is abbreviated as Cx:y, where x summarizes the number of carbons, and y indicates the number of double bonds in the side chains. The set of lipid metabolites was complemented by amino acids, sugars (with Hn corresponding to n-hexose, dH to desoxyhexose, UA to uronic acid, HNAC to N-acetylglucosamine, P to Pentose, NANA to N-acetylneuraminic acid), and biogenic amines. A full list of all tested metabolites, as well as their acronyms, mean

¹ The online version of this article contains supplemental material.

levels, and standard deviations (in μM), is provided in Supplemental Table S3.

Statistical analyses. Association linkage disequilibrium (LD) studies in the experimental resource population were performed essentially as described by Eberlein et al. (18) to evaluate, if the target mutations *NCAPG I442M* and *GDF8 Q204X* were associated with additive effects on growth, lipid deposition, or metabolic profile. The following model as implemented in the LD association analysis in Qxpack (37) was applied: $y_i = s_d + \lambda_i g_k + u_i + e_{dik}$, where y_i is the record of individual i , s_d is the fixed effect of slaughter year d , λ_i is an indicator variable, which is 1, 0, or -1 depending on the genotype of individual i at locus *NCAPG I442M* or *GDF8 Q204X*, g_k is the additive allelic effect of allele k , u_i is the infinitesimal genetic effect of individual i , and e_{dik} is the residual. For analyzing metabolites, we added a fixed effect w_g to the analysis plate g to the model.

To evaluate joined effects of *NCAPG I442M* and *GDF8 Q204X*, a model including both mutations was tested as previously described (18): $y_i = s_d + \lambda_i g_k + \delta_i h_j + u_i + e_{dijk}$, where y_i is the record of individual i , s_d is the fixed effect of slaughter year d , λ_i is an indicator variable, which is 1, 0, or -1 depending on the genotype of individual i at locus *NCAPG I442M*, g_k is the additive allelic effect of allele k at locus *NCAPG I442M*, δ_i is an indicator variable, which is 1, 0, or -1 depending on the genotype of individual i at locus *GDF8 Q204X*, h_j is the additive allelic effect of allele j at locus *GDF8 Q204X*, u_i is the infinitesimal genetic effect of individual i , and e_{dijk} is the residual. Two likelihood ratio tests (A, likelihood of model with *locus 1* and *locus 2* vs. likelihood of model with *locus 1*; B, likelihood of model with *locus 1* and *locus 2* vs. likelihood of model without loci) were calculated to test for statistical significance.

Multiple testing within phenotype categories (growth, body composition and lipid deposition, metabolites) had to be accounted for to avoid false positive associations. For this purpose, a false discovery rate (48) within each phenotype category (q -value) was calculated to account for multiple testing within phenotype categories (growth, metabolites, body composition and lipid deposition). A level of $\alpha < 0.05$ was considered an experiment-wise significant association.

A linear regression model was applied for the confirmation study in the Japanese Wagyu population: $y = Xb + e$, where y is the vector of phenotypic value, X is the design matrix of fixed effects composed of the number of *NCAPG I442M* alleles (0, 1, or 2) and covariates [age (in days) at the beginning of the test, sire, year, and season (summer or winter)], b is the vector of fixed effects, and e is the residual error. The proportion of variance explained by the *NCAPG I442M* locus was calculated as the difference between the variance explained by the above model and the variance explained by the model including only the covariates. The calculations were performed applying R statistical packages (<http://www.r-project.org/>).

RESULTS

Confirmation of *NCAPG I442M* and *GDF8 Q204X* allele effects on postnatal growth. Due to the experimental design of the F_2 resource population that was established by means of embryo transfer into foster mothers followed by separation of mothers and calves immediately after birth, exclusively direct genetic effects on the growth of the offspring were monitored in the association study for postnatal growth. For the *NCAPG I442M* locus, an experiment-wise significant association ($q < 0.05$) between *NCAPG I442M* alleles and average daily gain was observed in the intervals 121–182 days, 183–273 days, and 274–365 days (Fig. 1A, Supplemental Table S4). The difference in weight gain between alleles *442I* and *442M* in the most distinctive interval 183–273 days amounted to 98 g/day. The *NCAPG I442M* locus explained 20.2% of the variance for average daily gain in this interval. In the first and last 3-mo

intervals of observation, the effects on average daily gain associated with the two alleles were almost identical.

A confirmation study regarding the time point of the strongest differential growth associated with the *NCAPG I442M* mutation in the historically and geographically distant Japanese Wagyu population showed an analogous result: The effects of the *NCAPG I442M* mutation on average daily weight gain were time-specific (Fig. 1B), and the strongest allele-associated effect on postnatal growth was observed during the period of highest daily gain (see Supplemental Table S1).

The association analysis between the *GDF8 Q204X* mutation and postnatal growth resulted in an association pattern very similar to the one revealed for the *NCAPG I442M* locus in our experimental population: The interval 183–273 days displayed the strongest differences in average daily weight gain associated with the alternative *GDF8 Q204X* alleles ($q < 0.006$) (Fig. 1A, Supplemental Table S4).

Distinct effects of the *NCAPG I442M* and *GDF8 Q204X* alleles on plasma metabolites during puberty pinpoint divergent affected physiological pathways. A comprehensive targeted metabolome analysis focused on plasma lipid metabolites at the 240th day of life was undertaken to elucidate the relevant physiological processes involved in genetically determined divergent growth during the onset of puberty, the key interval for differential weight gain. A total of 229 plasma metabolites were identified and quantified, including 18 amino acids, free carnitine, 47 acyl-, hydroxyacyl-, and dicarboxyacylcarnitines, 79 glycerophosphatidylcholines, three prostaglandins, arachidonic acid, docosahexaenoic acid, eight biogenic amines, 52 mono- and oligosaccharides, and 19 sphingomyelins (Supplemental Table S3). From the total of 229 metabolites, 28 had $>5\%$ missing data points, leaving 201 metabolites that were tested for their potential association with the *NCAPG I442M* and *GDF8 Q204X* alleles.

For the *NCAPG I442M* mutation, a significant ($q = 0.013$), positive effect of the *442M* allele associated with arginine plasma level was observed (Fig. 2, Table 1). In contrast, there were no significant *NCAPG I442M* effects for the arginine precursors, its metabolites [citrulline, ornithine, or putrescine ($P_{\text{nominal}} > 0.50$)], or for other amino acids in plasma (Supplemental Table S5). Dimethylarginines represent protein degradation products resulting from methylated arginine during intracellular protein turnover. Interestingly, our study revealed a suggestive ($P_{\text{nominal}} = 0.004$) effect of the *NCAPG I442M* locus on total dimethylarginine (TDMA); however, no significant effect on asymmetric dimethylarginine (ADMA) was observed. Consecutively, a refined association analysis with the difference between TDMA and ADMA concentration, which is supposed to reflect the symmetric dimethylarginine (SDMA) level, showed a highly significant result ($q = 0.019$). The allele *NCAPG I442M*, which is associated with a superior daily weight gain between 182 and 273 days of age and with elevated arginine levels, was also associated with an increased plasma SDMA concentration (Fig. 2). For the acylcarnitines, the *NCAPG I442M* allele showed a significant, positive association with plasma linoleylcarnitine (C18:2) level ($q = 0.013$). Ten additional nominally significant effects on acylcarnitines were obtained for the *NCAPG I442M* locus (Supplemental Table S5), predominantly for the C5–C8 and C16 fatty acid acylcarnitines.

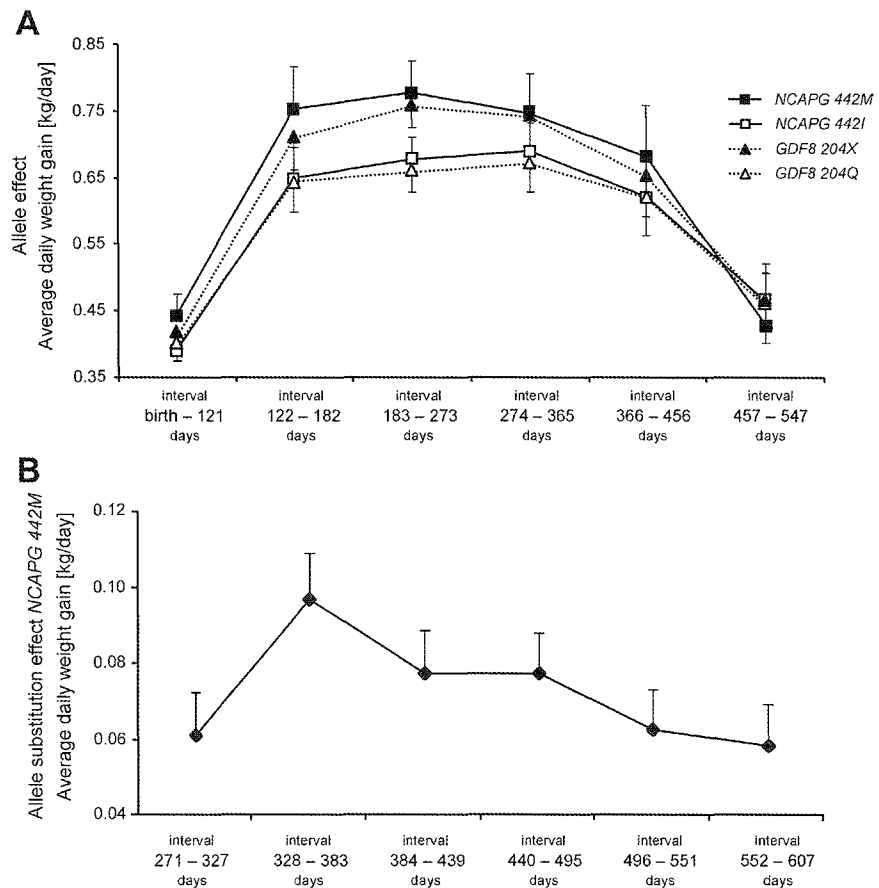


Fig. 1. Association of *NCAPG 1442M* and *GDF8 Q204X* alleles with average daily gain in 2 independent populations. A: allele effects (\pm SE) of the *NCAPG 1442M* and *GDF8 Q204X* alleles on average daily body weight gain in 6 intervals during ontogenesis in an experimental resource population. B: allele substitution effect of the *NCAPG 442M* allele on average daily body weight gain in 6 intervals during ontogenesis in the Japanese Wagyu population.

For the *GDF8 Q204X* locus, a significant association ($q = 0.007$) with free carnitine level was observed (Table 1, Fig. 3): The *GDF8 204X* allele, which is associated with increased body weight, was also associated with a decrease in the plasma level of free carnitine. In contrast to the *NCAPG 1442M* locus, where the glycerophosphatidylcholines and sphingomyelins seemed to be unaffected by the mutation, nominally significant effects on 22 glycerophosphatidylcholines and eight sphingomyelins were detected for the *GDF8 Q204X* locus (Fig. 4, Supplemental Table S5) with a concordant decreasing effect of the *GDF8 204Q* allele for all respective metabolites. A significant effect was almost exclusively obtained for diacylglycerophosphatidylcholines, whereas lysoglycerophosphatidylcholines were mostly unaffected. In contrast to the *NCAPG 1442M* locus, there were no effects of the *GDF8 Q204X* locus on arginine, TDMA, or SDMA.

NCAPG 1442M and *GDF8 Q204X* alleles are associated with particular effects on postnatal body composition and lipid deposition. Both loci, *NCAPG 1442M* and *GDF8 Q204X*, showed a similar pattern with regard to allelic effects on quantitative postnatal body-mass gain (Fig. 1, Supplemental Table S4), while they exhibited substantial differences regarding effects on the plasma metabolites (Table 1, Supplemental Table S5). Therefore, a refined association analysis regarding effects on detailed body composition and lipid deposition at the end of the test period at 18 mo of age evaluated

whether differences between loci existed not only with respect to the quantity but also to the quality of body-mass accretion.

The absolute and/or relative protein accretion in the carcasses (CPROT, CPROTrel) showed a highly significant, positive effect for those alleles associated with increases in body weight (442M and 204X) at the *GDF8 Q204X* locus [$q = 1.17 \times 10^{-8}$ (CPROT) or 8.25×10^{-7} (CPROTrel, Supplemental Table S6)] and (less pronounced) at the *NCAPG 1442M* locus ($q = 6.14 \times 10^{-3}$, CPROT). In contrast, the respective *NCAPG 442M* and *GDF8 204X* allelic effects on lipid deposition in the body had an opposite direction: The alleles at both loci were associated with a highly significant decreased fat content in the carcass [CFATrel: $q = 4.36 \times 10^{-3}$ (*NCAPG 1442M*), $q = 2.84 \times 10^{-5}$ (*GDF8 Q204X*)]. This resulted from a concordant decrease (Supplemental Table S6) in fat deposition in all lipid storage compartments (e.g., the percentage of subcutaneous fat in the carcasses (SFATrel, Fig. 5A)).

Whereas the *NCAPG 1442M* and the *GDF8 Q204X* locus showed analogous effects on lipid and protein deposition in the carcass, further analyses of whole body composition revealed substantial differences between these loci. For example, the proportion of carcass weight relative to the empty body weight (CR) showed a highly significant association only with the *GDF8 Q204X* alleles ($q < 10^{-16}$), whereas no effect was observed for the *NCAPG 1442M* locus (Fig. 5B). Furthermore,

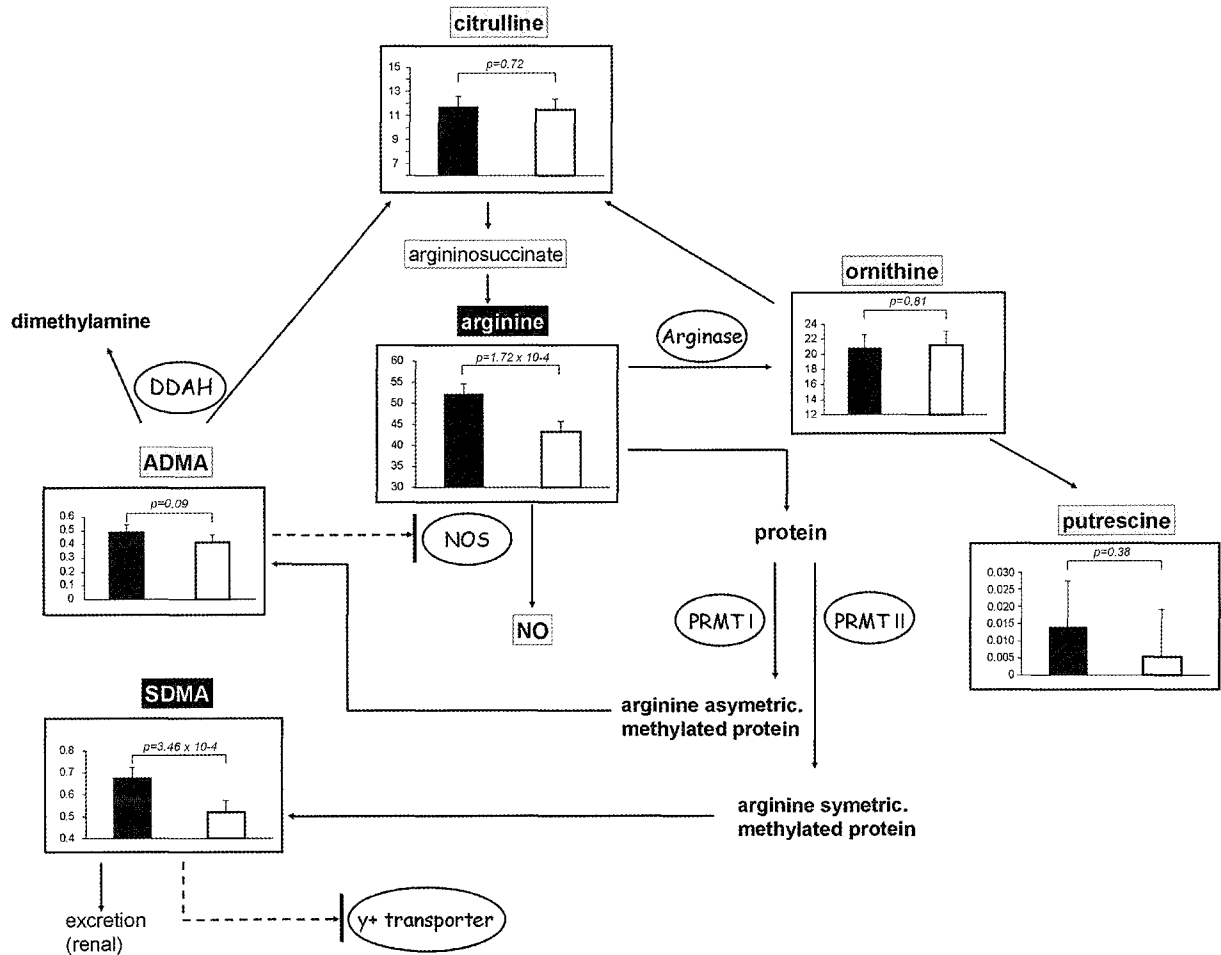


Fig. 2. Effects of the *NCAPG 1442M* alleles on arginine metabolism. Allele effects (\pm SE) of the *NCAPG 442I* allele are indicated in white columns, allele effects (\pm SE) of the *442M* allele are indicated in black columns. Solid arrows designate metabolic substrate pathways; dashed lines designate a regulatory function. y-Axis displays plasma concentration of the respective metabolite in μ M. All metabolites in shaded boxes (white letters indicating a significant association) were analyzed. P values indicate nominal significance for the difference in allele effect. ADMA, asymmetric dimethylarginine; SDMA, symmetric dimethylarginine; NOS, nitrogen oxide synthase; PRMT I, protein arginine methyltransferase type I; PRMT II, protein arginine methyltransferase type II; DDHA, dimethylarginine dimethylaminohydrolase.

the percentage of liver or kidney weight in carcasses (Llrel2, Klrel2) was not affected by the *NCAPG 1442M* locus, whereas the effects of the *GDF8 Q204X* alleles were highly significant (Supplemental Table S6). These data indicate that *GDF8 Q204X* alleles specifically affect the growth of the carcass comprising mostly muscle, fat, and bone tissue, whereas for

NCAPG 1442M alleles, a proportional effect on entire body weight and carcass weight is exerted. In the two-locus model fitting *NCAPG 1442M* and *GDF8 Q204X* effects, essentially identical effects regarding direction and magnitude of effects were obtained for both loci compared with the single locus models (Fig. 5).

Table 1. Experiment-wise significant associations of *NCAPG 1442M* and *GDF8 Q204X* alleles with targeted plasma metabolites

Trait	Mutation	LRT	P_{nominal}	q	a, μ M	SE _a , μ M	% of Variance Explained
C18:2	<i>NCAPG 1442M</i>	14.90	1.13×10^{-04}	1.27×10^{-02}	0.000526	0.000151	16.5
Arginine	<i>NCAPG 1442M</i>	14.12	1.72×10^{-04}	1.29×10^{-02}	9.04	2.34	8.2
SDMA	<i>NCAPG 1442M</i>	12.80	3.46×10^{-04}	1.94×10^{-02}	0.1543	0.0433	11.2
Free carnitine	<i>GDF8 Q204X</i>	17.44	2.96×10^{-05}	6.65×10^{-03}	0.716	0.165	10.4

C18:2, linoleylcarnitine; SDMA, symmetric dimethylarginine; LRT, likelihood ratio test; P_{nominal} , nominal P value; q , false discovery rate accounting for multiple testing as determined by Storey and Tibshirani (48). a is the allele substitution effect allele 1 – allele 2. *NCAPG 1442M*: allele 1 = *442M*, allele 2 = *442I*; *GDF8 Q204X*: allele 1 = *204Q*, allele 2 = *204X*. SE_a, standard error for a.

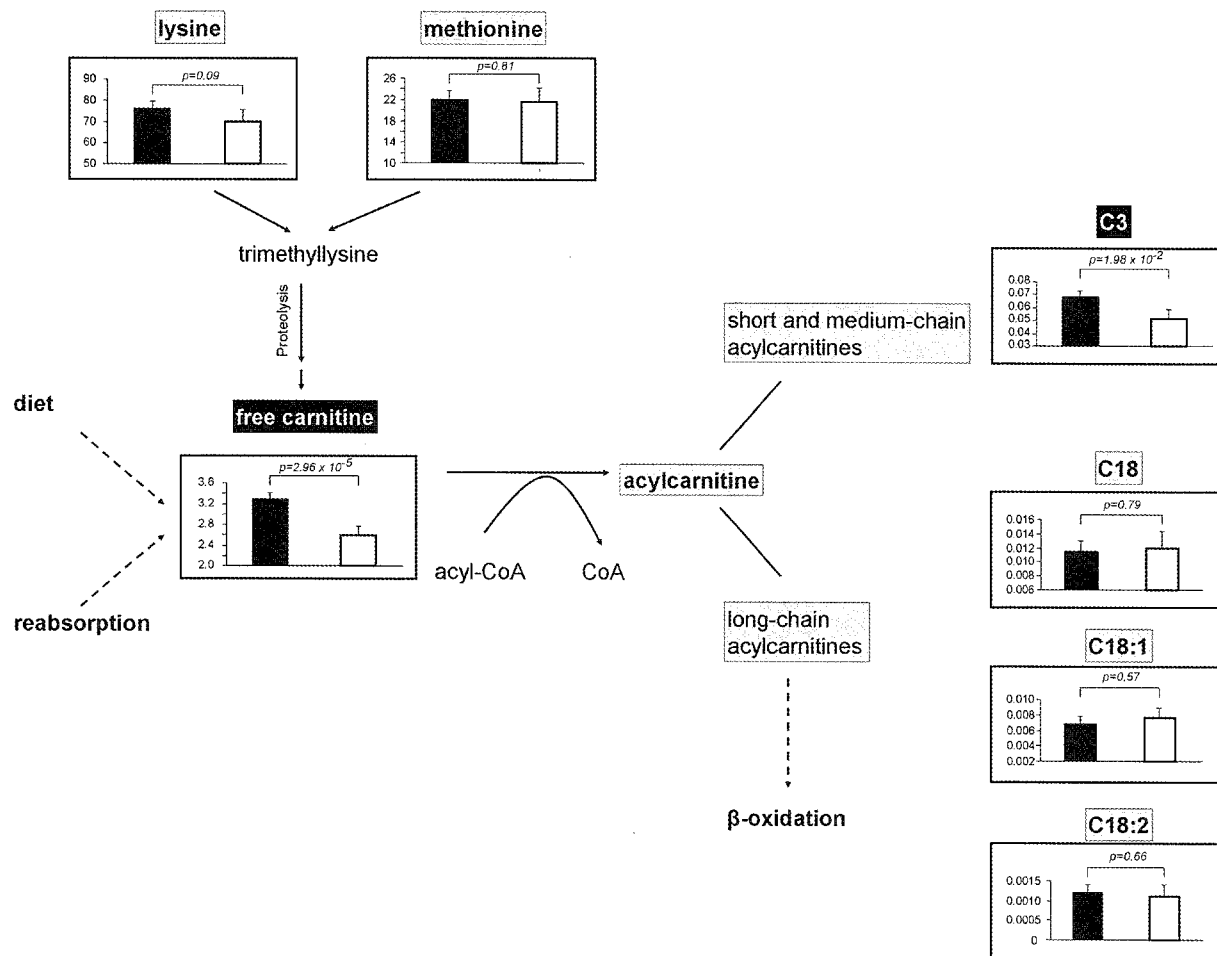


Fig. 3. Effects of the *GDF8* *Q204X* alleles on carnitines. Allele effects (\pm SE) of the *GDF8* *204X* allele are indicated in white columns, allele effects (\pm SE) of the *204Q* allele are indicated in black columns. Solid arrows designate metabolic substrate pathways; dashed lines designate a regulatory function. y-Axis displays plasma concentration of the respective metabolite in μ M. All metabolites in shaded boxes (white letters and black boxes indicating a significant association) were analyzed. P values indicate nominal significance for the difference in allele effect. C3, propionylcarnitine; C18, stearoylcarnitine; C18:1, oleoylcarnitine; C18:2, linoleoylcarnitine.

Comparing the results from the association analyses for *NCAPG* *I442M* and *GDF8* *Q204X* reveals that there is a strong similarity of associated effects regarding the key interval of divergent growth and relative content of body protein and body fat. However, the main difference in effects associated with the *NCAPG* *I442M* and the *GDF8* *Q204X* mutation is the proportional or disproportional character of divergent carcass growth.

DISCUSSION

Identification of the age at puberty as key interval for genetically divergent postnatal growth. Our study investigated the effect of both the *NCAPG* *I442M* and *GDF8* *Q204X* alleles on body-mass gain, plasma metabolite levels, and lipid deposition. Both the *NCAPG* *I442M* and *GDF8* *Q204X* loci pinpointed the interval 183 and 273 days of age as the key interval for divergent growth in our resource population. In those European cattle breeds, which were founders of our experimental population, this interval includes the onset of puberty

(6), a period that plays a central role in mammalian growth (1, 9). The results obtained in the experimental Charolais \times German Holstein resource population regarding the key interval of divergent growth correspond to the data obtained from the Wagyu population. Considering that Wagyus are known for a later onset of puberty compared with Holstein or Charolais (11) when kept under similar conditions, the ontogenetic stage of the most distinctive growth associated effects of the *NCAPG* *I442M* mutation corresponded in both populations.

Our observation that the *NCAPG* *I442M* mutation predominantly acts at the time of most rapid growth during postnatal ontogenesis fits to the observation of Seipold et al. (44). Using the zebrafish model, the authors revealed that mutations in the *NCAP* genes predominantly affected rapidly amplifying progenitor cells compared with postmitotic cells. In our animal model, we postulate that there is a high proportion of proliferating cells during puberty, which represent the potential targets for *NCAPG* protein action. Considering our previous

metabolism by mediating insulin sensitivity and glucose uptake in skeletal muscle (31, 42). A decrease in arginase activity, as suggested by our metabolomic data, favors NO synthesis due to reduced competition of NO synthase (NOS) for arginine, and the elevated arginine levels themselves enhance NO synthesis by increasing inducible NO synthase mRNA translation (30, 60). Metabolomic data from mice highlight that wild-type mice have increased plasma arginine levels compared with type II diabetes mice (3), which is in agreement with an increased plasma arginase activity in human type II diabetes (25). Previous studies on the founder breeds of our animal model, Charolais and German Holstein bulls kept under environmental conditions identical to this study, demonstrated that the German Holsteins, which exhibited a decreased growth rate, an increased fat deposition, and a high frequency of the *NCAPG 442I* allele, also showed a significantly increased plasma insulin level at 8 mo of age (8, 18).

Whether arginine is the cause or effect of increased growth has to be evaluated carefully in our model. However, the elevated plasma arginine level observed in individuals carrying the *NCAPG 442M* allele is presumably not an unspecific result of an increased body-mass gain, because the *GDF8 204X* allele, also associated with a significant increase of postnatal growth in the respective time period, did not show any effects on plasma arginine levels. Furthermore, data on ADMA and SDMA indicate that specific mechanisms are in effect for the *NCAPG 1442M* locus prohibiting increased levels of ADMA, because elevated ADMA concentration would exert a growth-impairing effect due to reduced NO synthesis from its arginine precursor. We can also conclude that the elevated arginine levels are not due to random protein degradation but specifically reflect a direct effect of the *NCAPG 1442M* mutation on arginine metabolism itself, because there is no difference in the concentration of other amino acids in plasma of individuals with divergent *NCAPG 1442M* genotype.

In addition to a direct effect on plasma arginine level, we identified a significant positive effect of the *NCAPG 442M* variant on TDMA, but no effect for ADMA (Fig. 2). Thus, the *NCAPG 1442M* effect is obviously due to increased levels of SDMA, an isomer of ADMA. Because there is no synthesis of ADMA or SDMA from free arginine, the production of dimethylarginines is solely dependent on arginine methylation in proteins and proteolysis (33). Arginine is asymmetrically methylated by protein arginine methyltransferases type 1 (PRMT 1), whereas PRMT type 2 methylate arginine symmetrically (10). Protein arginine methylation is important for transcriptional regulation, RNA processing, and signal transduction (7). Data on ADMA and SDMA indicate that specific mechanisms are initiated by the *NCAPG 1442M* locus that prohibit increased levels of ADMA, which might exert negative effects on growth due to a reduced NO synthesis. While ADMA is enzymatically degraded into citrulline and dimethylamines via dimethylarginine-dimethylaminohydrolases (33), SDMA is eliminated almost exclusively via renal excretion (26). Whether the difference in plasma levels of SDMA in our *NCAPG 1442M* animal model is the result of divergent synthesis, liver reabsorption, or renal excretion remains to be elucidated.

In contrast to ADMA, a well-described, potent inhibitor of the NOS (39), which synthesizes NO from arginine, no analogous effect is described for SDMA. Thus, our data suggest

that the increased arginine levels during a period of intensive growth are not results of NOS inhibition by elevated dimethylarginines. Only recent reports provided any indication of alternative functions of SDMA. These studies highlight the relevance of SDMA on the pathophysiology of stroke and cardiovascular disease (43, 53).

Free plasma carnitine levels associated with disruptive mutation in the myostatin-encoding GDF8 gene. In our resource population, free plasma carnitine at 240 days of age is significantly decreased in individuals carrying the *GDF8 204X* allele, which increases body weight and decreases body fat deposition. Free carnitine plays a major role during fatty acid transportation into the mitochondrion for β -oxidation and is involved in additional fatty acid, glucose, and nitrogen metabolic pathways. The impact of external dietary carnitine supplementation on mammalian growth and muscle development is controversially discussed (32). The agonistic signals from plasma fatty acids that lead to increased carnitine synthesis (40) might provide a link between plasma carnitine levels and the *GDF8 204X* mutation, because *GDF8* knockout mice exhibit decreased free fatty acid concentrations (52). Although physiological effects of *GDF8* mutations on muscle development and multiple metabolic pathways have been comprehensively reported (e.g., Ref. 12), no direct effect of myostatin on carnitine metabolism has been described. Thus, the question remains to be resolved, whether the variation in free carnitine plasma level associated with the *GDF8 204X* mutation is a cause or consequence (via a yet unknown physiological mechanism) of alterations in myofiber or adipocyte development. However, the lack of association between free plasma carnitine and the *NCAPG 442M* allele indicates that the effect on free plasma carnitine is indeed locus specific and not related to generally divergent growth or lipid deposition. Because all individuals received a diet with an identical composition, a dietary effect on carnitine level seems also unlikely.

The decreased plasma concentration of glycerophosphatidylcholines and the increased lipid deposition associated with the *GDF8 204Q* allele are analogous to reports about similar effects observed in mice treated with Rosiglitazon, which fosters lipid deposition in adipose tissues (3). Alternatively, the concerted increase in glycerophosphatidylcholines that was associated with the *GDF8 204X* allele might also be due to an elevated level of phospholipids in muscle tissues, which has been described in individuals with a mutation in the *GDF8* gene (14). Glycerophosphatidylcholines are the most common phospholipids in mammals. In higher organisms, perturbation of glycerophosphatidylcholine synthesis can lead to inhibition of growth or even cell death (13). Thus, the increased glycerophosphatidylcholine levels in plasma associated with the *GDF8 204X* allele might also specifically reflect the increased muscle growth associated with this allele.

Metabolic biosignatures mirror particular growth pattern. In conclusion, our study, which to our knowledge is the first combining targeted comprehensive metabolomic plasma analysis and genetic association studies in a large animal species, discriminates distinct metabolomic biosignatures associated with two genetic loci exhibiting major effects on pre- and/or postnatal growth. For *NCAPG*, a previously unknown, conclusive link could be drawn to the arginine metabolism, which is crucial for many regulatory mechanisms in growth and energy metabolism. Furthermore, our study of the *GDF8 204X*

mutation indicated novel pathways that seem to be affected by a functional deficit in the growth-inhibiting factor myostatin. The hypothesis of different physiological processes involved in the action of the two loci is supported by the observation that the *NCAPG I442M* and *GDF8 Q204X* mutations showed independent effects on growth as demonstrated by the results from the single- and two-locus association models. The divergent, locus-specific metabolomic patterns at the onset of puberty were mirrored by particular proportional or nonproportional modulations of compartmental growth and lipid deposition associated with the two mutations. Interestingly, our genetic analyses highlighted associations between the *NCAPG I442M* or *GDF8 Q204X* locus, respectively, and two metabolites (carnitine, arginine) that are frequently discussed as feed additives promoting growth and physical performance in, e.g., cattle and humans (51, 58). Our resource population provides a valuable, uniparous large animal model to survey these specific effects of both genes, *GDF8* and *NCAPG*, regarding the underlying functional mechanisms during pre- and postnatal growth and lipid deposition.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank our colleagues at the FBN Dummerstorf who helped in the generation and care of the SEGAM F₂ resource population for their continuous support of our work. The technical support from A. Kühl, S. Wöhl, P. Widmann, A. Eberlein, A. Schulz, C. Fiedler, and I. Rothe is also thankfully acknowledged. Dr. R. Pfuhl provided valuable information on carcass dissection traits.

GRANTS

The work was supported by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) within the scope of the FUGATO QUALIPID project (FKZ 0313391C).

DISCLOSURES

This study was conducted under the direction of the Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), Dummerstorf/Germany, independently of Biocrates, which provided the metabolomics measurements on a fee-for-service basis. FBN researchers did not receive any financial advantages (e.g., consultancy fees) from this company. There are no further competing interests to declare.

REFERENCES

- Akslae L, Olsen LW, Sorensen TIA, Juul A. Forty years trends in timing of pubertal growth spurt in 157,000 Danish school children. *PLoS One* 3: e2728, 2008.
- Allais S, Leveziel H, Payet-Duprat N, Hocquette JF, Lepetit J, Rousset S, Denoyelle C, Bernard-Capel C, Journaux L, Bonnot A, Renand G. The two mutations, Q204X and nt821, of the myostatin gene affect carcass and meat quality in young heterozygous bulls of French beef breeds. *J Anim Sci* 88: 446–454, 2010.
- Altmaier E, Ramsay SL, Graber A, Mewes HW, Weinberger KM, Suhre K. Bioinformatics analysis of targeted metabolomics - Uncovering old and new tales of diabetic mice under medication. *Endocrinology* 149: 3478–3489, 2008.
- Andersson L, Georges M. Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. *Nat Rev Genet* 5: 202–212, 2004.
- Ansary M, Hanset R. Anatomical, physiological and biochemical differences between conventional and double-muscling cattle in the Belgian blue and white breed. *Livestock Prod Sci* 6: 5–13, 1979.
- Barber KA, Almquist JO. Growth and feed efficiency and their relationship to pubertal traits of Charolais bulls. *J Anim Sci* 40: 288–301, 1975.
- Bedford MT, Richard S. Arginine methylation: an emerging regulator of protein function. *Mol Cell* 18: 263–272, 2005.
- Bellmann O, Wegner J, Teuscher F, Schneider F, Ender K. Muscle characteristics and corresponding hormone concentrations in different types of cattle. *Livestock Prod Sci* 85: 45–57, 2004.
- Brody S. *Bioenergetics and Growth*. New York: Reinhold, 1945.
- Bulau P, Zakrzewicz D, Kitowska K, Leiper J, Gunther A, Grimmlinger F, Eickelberg O. Analysis of methylarginine metabolism in the cardiovascular system identifies the lung as a major source of ADMA. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L18–L24, 2007.
- Casas E, Lunstra DD, Cundiff LV, Ford JJ. Growth and pubertal development of F-1 bulls from Hereford, Angus, Norwegian Red, Swedish Red and White, Friesian, and Wagyu sires. *J Anim Sci* 85: 475, 2007.
- Chelh I, Meunier B, Picard B, Reecy MJ, Chevalier C, Hocquette JF, Cassar-Malek I. Molecular profiles of quadriceps muscle in myostatin-null mice reveal PI3K and apoptotic pathways as myostatin targets. *BMC Genomics* 10: 196, 2009.
- Cui Z, Houweling M. Phosphatidylcholine and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1585: 87–96, 2002.
- De Smet S, Raes K, Demeyer D. Meat fatty acid composition as affected by fatness and genetic factors: a review. *Anim Res* 53: 81–98, 2004.
- 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* 168: 895–906, 2004.
- Dumas ME, Wilder SP, Bihoreau MT, Barton RH, Fearnside JF, Argoud K, D'Amato L, Wallis RH, Blancher C, Keun HC, Baungsgaard D, Scott J, Sidelmann UG, Nicholson JK, Gauguier D. Direct quantitative trait locus mapping of mammalian metabolic phenotypes in diabetic and normoglycemic rat models. *Nat Genet* 39: 666–672, 2007.
- Dunner S, Miranda ME, Amigues Y, Canon J, Georges M, Hanset R, Williams J, Menissier F. Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds. *Genet Sel Evol* 35: 103–118, 2003.
- Eberlein A, Takasuga A, Setoguchi K, Pfuhl R, Flisikowski K, Fries R, Klopp N, Furbass R, Weikard R, Kuhn 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.
- Everts RE, Chavatte-Palmer P, Razzak A, Hue I, Green CA, Oliveira R, Vignon X, Rodriguez-Zas SL, Tian XC, Yang XZ, Renard JP, Lewin HA. Aberrant gene expression patterns in placentomes are associated with phenotypically normal and abnormal cattle cloned by somatic cell nuclear transfer. *Physiol Genomics* 33: 65–77, 2008.
- Geiman TM, Sankpal UT, Robertson AK, Chen Y, Mazumdar M, Heale JT, Schmiesing JA, Kim W, Yokomori K, Zhao YM, Robertson KD. Isolation and characterization of a novel DNA methyltransferase complex linking DNMT3B with components of the mitotic chromosome condensation machinery. *Nucl Acids Res* 32: 2716–2729, 2004.
- Gieger C, Geistlinger L, Altmaier E, de Angelis MH, Kronenberg F, Meitinger T, Mewes HW, Wichmann HE, Weinberger KM, Adamski J, Illig T, Suhre K. Genetics meets metabolomics: a genome-wide association study of metabolite profiles in human serum. *Plos Genet* 4: e1000282, 2008.
- Grobet L, Martin LJR, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet* 17: 71–74, 1997.
- Gudbjartsson DF, Walters GB, Thorleifsson G, Stefansson H, Halldorrsson BV, Zusmanovich P, Sulem P, Thorlacius S, Gylfason A, Steinberg S, Helgadóttir A, Ingason A, Steinthorsdóttir V, Olafsdóttir EJ, Olafsdóttir GH, Jonsson T, Borch-Johnsen K, Hansen T, Andersen G, Jorgensen T, Pedersen O, Aben KK, Witjes JA, Swinkels DW, den Heijer M, Franke B, Verbeek ALM, Becker DM, Yanek LR, Becker LC, Tryggvadóttir L, Rafnar T, Gulcher J, Kiemeneý LA, Kong A, Thorsteinsdóttir U, Stefansson K. Many sequence variants affecting diversity of adult human height. *Nat Genet* 40: 609–615, 2008.
- Illig T, Gieger C, Zhai G, Römisch-Margl W, Wang-Sattler R, Prehn C, Altmaier E, Kastenmuller G, Kato BS, Mewes HW, Meitinger T, Hrabe de Angelis M, Kronenberg F, Soranzo N, Wichmann HE, Spector TD, Adamski J, Suhre K. A genome-wide perspective of genetic variation in human metabolism. *Nat Genet* 42: 137–141, 2010.
- Kashyap SR, Lara A, Zhang R, Park YM, DeFronzo RA. Insulin reduces plasma arginase activity in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 31: 134–139, 2008.
- Kielstein JT, Salpeter SR, Bode-Boeger SM, Cooke JP, Fliser D. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function - a meta-analysis. *Nephrol Dial Transpl* 21: 2446–2451, 2006.
- Kluge R, Giesen K, Bahrenberg C, Plum L, Ortlepp JR, Joost HG. Quantitative trait loci for obesity and insulin resistance (Nob1, Nob2) and

- their interaction with the leptin receptor allele (Lper(A720T/T1044I)) in New Zealand obese mice. *Diabetologia* 43: 1565–1572, 2000.
28. Kühn C, Bellmann O, Voigt J, Wegner J, Guiard V, Ender K. An experimental approach for studying the genetic and physiological background of nutrient transformation in cattle with respect to nutrient secretion and accretion type. *Arch Anim Breed* 45: 317–330, 2002.
 29. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem* 277: 49831–49840, 2002.
 30. Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM, Ratan RR. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4843–4848, 2003.
 31. Lira VA, Soltow QA, Long JHD, Betters JL, Sellman JE, Criswell DS. Nitric oxide increases GLUT4 expression and regulates AMPK signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1062–E1068, 2007.
 32. Losel D, Kalbe C, Rehfeldt C. L-Carnitine supplementation during suckling intensifies the early postnatal skeletal myofiber formation in piglets of low birth weight. *J Anim Sci* 87: 2216–2226, 2009.
 33. Mangoni AA. The emerging role of symmetric dimethylarginine in vascular disease. *Adv Clin Chem* 48: 73–94, 2009.
 34. McKay S, Schnabel R, Murdoch B, Matukumalli L, Aerts J, Coppeters W, Crews D, Dias Neto E, Gill C, Gao C, Mannen H, Wang Z, Tassell C, Williams J, Taylor J, Moore S. An assessment of population structure in eight breeds of cattle using a whole genome SNP panel. *BMC Genetics* 9: 37, 2008.
 35. Morris CA, Pitchford WS, Cullen NG, Esmailizadeh AK, Hickey SM, Hyndman D, Dodds KG, Afolayan RA, Crawford AM, Bottema CDK. Quantitative trait loci for live animal and carcass composition traits in Jersey and Limousin back-cross cattle finished on pasture or feedlot. *Anim Genet* 40: 648–654, 2009.
 36. Oikawa T, Sanehira T, Sato K, Mizoguchi Y, Yamamoto H, Baba M. Genetic parameters for growth and carcass traits of Japanese Black (Wagyu) cattle. *Anim Sci* 71: 59–64, 2000.
 37. Perez-Enciso M, Misztal I. Qxpak: a versatile mixed model application for general genomics and QTL analyses. *Bioinformatics* 20: 2792–2798, 2004.
 38. Pfuhl R, Bellmann O, Kuhn C, Teuscher F, Ender K, Wegner J. Beef versus dairy cattle: a comparison of feed conversion, carcass composition, and meat quality. *Arch Anim Breed* 50: 59–70, 2007.
 39. Pope AJ, Karrupiah K, Kearns PN, Xia Y, Cardounel AJ. Role of dimethylarginine dimethylaminohydrolases in the regulation of endothelial nitric oxide production. *J Biol Chem* 284: 35338–35347, 2009.
 40. Ringseis R, Wege N, Wen GP, Rauer C, Hirche F, Kluge H, Eder K. Carnitine synthesis and uptake into cells are stimulated by fasting in pigs as a model of nonproliferating species. *J Nutr Biochem* 20: 840–847, 2009.
 41. Rios R, Carneiro I, Arce VM, Devesa J. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C993–C999, 2002.
 42. Roy D, Perreault M, Marette A. Insulin stimulation of glucose uptake in skeletal muscles and adipose tissues in vivo is NO dependent. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 274: E692–E699, 1998.
 43. Schulze F, Carter AM, Schwedhelm E, Ajjan R, Maas R, von Holtzen RA, Atzler D, Grant PJ, Boger RH. Symmetric dimethylarginine predicts all-cause mortality following ischemic stroke. *Atherosclerosis* 208: 518–523, 2010.
 44. Seipold S, Priller FC, Goldsmith P, Harris WA, Baier H, Abdelilah-Seyfried S. Non-SMC condensin I complex proteins control chromosomal segregation and survival of proliferating cells in the zebrafish neural retina. *BMC Dev Biol* 9: 40, 2009.
 45. 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* 10: 43, 2009.
 46. Snelling WM, Allan MF, Keele JW, Kuehn LA, McDanel T, Smith TPL, Sonstegard TS, Thallman RM, Bennett GL. Genome-wide association study of growth in crossbred beef cattle. *J Anim Sci* 88: 837–848, 2010.
 47. Soranzo N, Rivadeneira F, Chinappan-Horsley U, Malkina I, Richards JB, Hammond N, Stolk L, Nica A, Inouye M, Hofman A, Stephens J, Wheeler E, Arp P, Gwilliam R, Jhamai PM, Potter S, Chaney A, Ghorri MJR, Ravindrarajah R, Ermakov S, Estrada K, Pols HAP, Williams FM, McArdle WL, van Meurs JB, Loos RJJ, Dermitzakis ET, Ahmadi KR, Hart DJ, Ouweland WH, Wareham NJ, Barroso I, Sandhu MS, Strachan DP, Livshits G, Spector TD, Uitterlinden AG, Deloukas P. Meta-analysis of genome-wide scans for human adult stature identifies novel loci and associations with measures of skeletal frame size. *Plos Genet* 5: e1000445, 2009.
 48. Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9440–9445, 2003.
 49. Symonds ME, Sebert SP, Hyatt MA, Budge H. Nutritional programming of the metabolic syndrome. *Nat Rev Endocrinol* 5: 604–610, 2009.
 50. Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J, Kambadur R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem* 275: 40235–40243, 2000.
 51. Tomassini V, Pozzilli C, Onesti E, Pasqualetti P, Marinelli F, Pisani A, Fieschi C. Comparison of the effects of acetyl L-carnitine and amantadine for the treatment of fatigue in multiple sclerosis: results of a pilot, randomised, double-blind, crossover trial. *J Neurol Sci* 218: 103–108, 2004.
 52. Tu P, Bhasin S, Hruz P, Herbst K, Castellani L, Hua N, Hamilton J, Guo W. Genetic disruption of myostatin reduces the development of proatherogenic dyslipidemia and atherogenic lesions in Ldlr null mice. *Diabetes* 58: 1739–1748, 2009.
 53. Wang ZN, Tang WHW, Cho L, Brennan DM, Hazen SL. Targeted metabolomic evaluation of arginine methylation and cardiovascular risks potential mechanisms beyond nitric oxide synthase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1383–1391, 2009.
 54. Weedon MN, Lango H, Lindgren CM, Wallace C, Evans DM, Mangino M, Freathy RM, Perry JRB, Stevens S, Hall AS, Samani NJ, Shields B, Prokopenko I, Farrall M, Dominiczak A; Diabetes Genetics Initiative; Wellcome Trust Case Control Consortium, Johnson T, Bergmann S, Beckmann JS, Vollenweider P, Waterworth DM, Mooser V, Palmer CNA, Morris AD, Ouweland WH; Cambridge GEM Consortium, Zhao JH, Li S, Loos RJ, Barroso I, Deloukas P, Sandhu MS, Wheeler E, Soranzo N, Inouye M, Wareham NJ, Caulfield M, Munroe PB, Hattersley AT, McCarthy MI, Frayling TM. Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height. *Nat Genet* 40: 575–583, 2008.
 55. Weinberger KM. Metabolomics in diagnosing metabolic diseases. *Ther Umsch* 65: 487–491, 2005.
 56. Weinberger KM, Graber A. Using comprehensive metabolomics to identify novel biomarkers. *Screen Trends Drug Discov* 6: 42–45, 2008.
 57. Wenk MR. The emerging field of lipidomics. *Nat Rev Drug Discov* 4: 594–610, 2005.
 58. Wu G, Bazer F, Davis T, Kim S, Li P, Rhoads J, Satterfield M, Smith S, Spencer T, Yin Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 37: 153–168, 2009.
 59. Wu GY, Knabe DA, Flynn NE, Yan WE, Flynn SP. Arginine degradation in developing porcine enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 271: G913–G919, 1996.
 60. Wu GY, Meininger CJ. Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Ann Rev Nutr* 22: 61–86, 2002.
 61. Yao K, Yin YL, Chu WY, Li ZQ, Deng D, Li TJ, Huang RL, Zhang JS, Tan B, Wang W, Wu G. Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs. *J Nutr* 138: 867–872, 2008.

動物遺伝研究所年報
第18号（平成22年度）

平成23年12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

