



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 19 号

2011 (平成 23) 年度

Annual Report

Shirakawa Institute of Animal Genetics

社団法人畜産技術協会附属
動物遺伝研究所

序 文

本年報は 2011（平成 23）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してきました。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 460 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、7,000 個の SNP を活用することで、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 情報が蓄積されており、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。

次世代シーケンサーを活用する新分野として、ゲノム中のタンパク質領域を解読するエキソーム解析がヒト遺伝病の研究で威力を発揮しています。当研究所でもエキソーム解析によって新たなウシの不良因子を 8 ヶ月という短期間で解明することができました。この技術は今後大いに期待してよいと思います。

最後に、終始ご指導いただいた農林水産省、ご理解とご支援を頂いた日本中央競馬会、財団法人全国競馬・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。

2012 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

2011（平成 23）年度 動物遺伝研究所年報

目 次

序 文

第 1 節 設立の経緯と沿革	1
第 2 節 2011（平成 23）年度の動き	
1. 研究推進の状況.....	3
1) ウシゲノム研究における国際的な動向	3
2) ウシ遺伝性疾患の DNA 診断法の開発	6
3) ウシ経済形質の DNA 育種手法の開発	9
2. 2011（平成 23）年度研究発表.....	23
1) 論文発表.....	23
2) 学会発表.....	23
3) 講演.....	26
4) 学会発表要旨.....	26
3. 委員会・会議等の開催.....	43
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.....	43
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	43
3) 「牛有用ゲノム解析手法確立事業」に関わる解析手法確立検討委員会	44
4) 全国 DNA 育種推進会議.....	45
5) 研究会等の開催	45
4. 委託研究.....	46
5. 研修員の受け入れ.....	48

第3節 総務.....	49
1. 職員名簿.....	49
2. 職員の異動.....	49
3. 職員の海外出張.....	49
4. 施設・機器の整備.....	50
5. 購読雑誌一覧.....	51
第4節 資料.....	53
論文再録.....	53

第1節 設立の経緯と沿革

第1節 設立の経緯と沿革

家畜育種の基本は、個体の能力を正確に測定し、遺伝的能力に基づいた選抜を行い、選抜された個体間の交配から次世代を生産するという、一連の作業を反復することにより、望ましい遺伝子型を個体内に集積することにある。そのため、血統情報と表現型に基づいて統計遺伝学的手法により種畜の遺伝的能力を推定し選抜が行われてきた。一方、ゲノム研究の進展に伴い、家畜においても遺伝地図の作成が急速に進み、DNA マーカーと経済形質に関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ぬ状況にある。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障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10種の遺伝性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関する多数の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、一時は30名規模となっていたが、財政状況の悪化により減員せざるを得な

くなった。2011 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（次年度 4 月からは更に半減して 7 名の体制となる）。

第2節 2011(平成23)年度の動き

第2節 2011（平成23）年度の動き

1. 研究推進の状況

1) ウシゲノム研究における国際的な動向

（第20回植物動物ゲノム学会、米国・サンディエゴ、2012年1月を中心に）

ウシゲノム参照配列の作成と次世代シーケンサーの登場により、この数年間で低密度から高密度の各種 SNP チップの開発が行われ、これを基盤として米国では乳牛のゲノム育種価予測が行われている。問題となっていた受胎率の低下についても、ゲノム選抜に用いた大量のジェノタイプデータの解析と種雄牛のゲノムリシーケンシングによって、その遺伝的要因が明らかにされようとしている。一方、肉牛においても、ゲノム選抜の正確度の向上を目指して、種雄牛のゲノムリシーケンシングと枝肉形質に関わる責任変異の同定が行われつつある。ウシゲノム研究は、解析用ツールの開発からゲノム選抜法の開発や有用形質の責任変異の探索という次の段階に入った感がある。

（1）ウシ SNP チップ

（ウシ LD SNP チップの開発と牛高密度 SNP チップ HD と BOS1 の比較）

ウシ SNP チップは、イルミナ社から 50K（2007年12月市販開始）、HD（2010年7月）、3K（2010年7月）の3種類が、アフィメトリクス社から Axiom BOS1 アレイ（2011年1月）が市販されている。LD チップは、イルミナ社 3K チップの改良版であり、乳牛において 50K ジェノタイプの推定をより高い正確度で行えるように 50K チップ上の SNP を選びなおしたものである。6,909 個の SNP が搭載されている。

一方、Rincon ら（カリフォルニア大）は、ホルスタイン種とジャージー種を用いて、HD（ゲノム上に等間隔に SNP を配置するように選択した 77 万 8 千個の SNP を搭載）と BOS1（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選択した 64 万 8 千個の SNP を搭載）を比較し、連鎖不平衡度の高い SNP ($r^2 \geq 0.9$) および多型性のない SNP を除くと、HD では 22 万 4 千個、BOS1 では 24 万 1 千個、両者を併せると 35 万 4 千個の SNP 情報を得られることを報告した。コピー数多型（CNV）については、両者で検出できるもの、HD でのみ、あるいは、BOS1 でのみ検出できるものがある。したがって、両者を併用し、相互の遺伝子型を推定することにより最大の情報量を得ることができる。

（2）ゲノム選抜と「1,000 種雄牛ゲノムプロジェクト」

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とジャージー種について、8月にはブラウンスイス種についてもゲノム育種価の公式な表示がなされている。その後、低密度 SNP チップ（2010年 3K チップ、2011年 LD チップ）の開発によるコスト低下および雌牛の低密度 SNP ジェノタイプを含めることによる正確性の向上が図られてきた。

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（オーストラリア）は、2011年、50K SNP ジェノタイプから 800K SNP ジェノタイプを高い正確度で推定できること、800K SNP ジェノタイ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のあることを示した。そして、800K ジェノタイプから全ゲノム配列（すべての SNP ジェノタイプ）が推定できるように、各研究所が種雄牛のゲノム配列データを提供・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」構想を提案した。これまでに 151 種雄牛と 1 雌牛（ホルスタイン種、フレックビー種、ジャージー種、レッドホルスタイン種、アンガス種）のゲノム配列がデータベースに保有されており（<http://1000bullgenomes.com>）、関連解析やゲノム育種価予測に用いられている。

肉牛においてもゲノム育種価予測が試みられているが、アンガス種種雄牛 3,570 頭を用いた場合の正確度は、0.38（雌牛の妊娠率）から 0.85（1 歳時体高）であった（Saatchi *et al.*, *Genetics Selection Evolution*, 2011）。米国においては、アンガス種以外にも多くの品種が肉牛として飼養されていること、肉質や飼料効率、疾病抵抗性などの重要形質についての表型値がルーチンには測定されていないことから、ゲノム育種価の予測の正確度を上げるためには、その形質の責任変異を同定すべきだとの主張がなされている。「アンガスゲノムプロジェクト」では、すでに 11 頭の種雄牛のゲノムリシーケンシングが行われ、生時体重 QTL の責任変異同定が試みられている。

（3）有用形質の責任変異や遺伝的不良因子の同定

最近の 1 年間におけるウシゲノム解析の進展は目覚ましい。50K SNP チップでマッピングし、マップした数 Mb 領域を次世代シーケンサーでターゲットリシーケンシングすることで一気に責任変異へ到達している。しかしながら、当研究所が行ってきたエキソーム解析手法は試みられていない。2011 年秋に Agilent からウシエキソンキャプチャーキットが発売されたので、今後は使用されるだろう。

（3）－ 1. 致死性～繁殖性、受胎率（ホルスタイン種・ジャージー種・ブラウンスイス種）

VanRaden ら（USDA-ARS）は、ゲノム選抜のために収集した 10 万頭以上のホルスタイン種の SNP 遺伝子型情報を用いてハプロタイプを解析し、集団におけるホモのハプロタイプ頻度が期待される頻度より有意に低いものを探索した。上位 3 つ（第 5 番染色体-HH1、第 1 番染色体-HH2、第 8 番染色体-HH3）は致死であることが予想された。これらの頻度は 2.25-2.35%と低いので、選抜に効果があるかどうか疑わしいと結論している。同様にジャージー種（第 15 番染色体-JH1）とブラウンスイス種（第 7 番染色体-BH1）にそれぞれ 1 つ致死性のハプロタイプが見出され、頻度は 11.7%と 7.0%であった。

HH1 は、種雄牛のゲノムリシーケンシングとハプロタイプ再構成により、*APAF1*

(Apoptotic peptidase activating factor 1) 遺伝子のナンセンス変異であることがわかった (*APAF1* ノックアウトマウスは胎生致死を示す)。*APAF1* は生体防御やアポトーシス制御に関係するとされている。

(3) - 2. Brachyspina (ホルスタイン種)

Charlier ら (ベルギー、リエージュ大) は、ホルスタイン種に見られる劣性遺伝性疾患 *Brachyspina* (BY) について、6 頭の発症個体と 15 頭の健常牛を 50K チップでジェノタイプピングし、第 21 番染色体上の約 2.5Mb の領域にマッピングした。1 頭の発症牛と 3 頭の子血縁健常牛のリシーケンシングにより、原因は、*FANCI* (Fanconi anemia group I protein) 遺伝子のエキソン 25-27 に相当する 3.3kb の欠失であることを見出した。稀な疾病であるにもかかわらず、キャリア頻度が 7.4% と高かったことから、ホモ欠失個体の胎児死の可能性を調べたところ、キャリア牛同士の交配は、妊娠不成立の頻度が約 5% 高くなっていた。

BY の遺伝子診断は我が国でも実施される。

(3) - 3. Color sidedness (ベルジアンブルー種、ブラウンスイス種)

Color sidedness (背筋の毛は白いが体側には毛色がある) は、いくつかの品種でみられ、優性遺伝様式を示す。Durkin ら (ベルギー、リエージュ大; *Nature*, 2012) は、ベルジアンブルー種の Color sidedness は第 29 番染色体上に第 6 番染色体の *KIT* 遺伝子座を含む 480kb の重複が転座したことによること、ブラウンスイス種の Color sidedness は第 29 番染色体に転座した *KIT* 遺伝子座が第 6 番染色体の *KIT* 遺伝子座の近傍に再び転座したことによることを明らかにした。これらは、輪状の中間体を介して転座する FoSTeS/NMBIR メカニズム (Zhang *et al.*, *Nature Genetics*, 2009) によると考えられた。

(3) - 4. Weaver 症候群 (ブラウンスイス種)

ブラウンスイス種に見られる劣性遺伝性の進行性神経変性疾患である Weaver 症候群は、1993 年にウシ第 4 番染色体にマッピングされていたものの原因遺伝子は不明であった。McClure ら (USDA-ARS) は、20 頭のキャリア牛と 51 頭の健常牛を HD チップでジェノタイプピングすることにより、約 4Mb の領域にファインマッピングした。10 頭のキャリア牛と 10 頭の健常牛のゲノム DNA をそれぞれプールしてリシーケンシングを行い、原因となる約 250kb のハプロタイプを明らかにした。

(3) - 5. その他

関連解析とノックアウトマウスを用いた解析により *RIPK2* (receptor-interacting serine-threonine kinase 2) が第 14 番染色体上のダニ抵抗性 QTL の責任遺伝子と考えられること (PortoNeto ら、CSIRO、オーストラリア)、2 型 Scurs (異常角) 症候群の原因変異として第 4 番染色体の *TWIST1* (twist-related protein 1) 遺伝子内のフレームシフト変異

を見出したこと (Capitan ら、INRA、フランス)、アンガスの飼料効率についてトランスクリプトームおよびエピジェノム解析を行ったこと (McKay ら、ミズーリ大、米国) 等の報告があった。

また、米国では、ウシ呼吸器病症状候群について、診断法の開発と遺伝的改良を目標とした大型プロジェクト (www.brdcomplex.org) が開始されるとの紹介があった。

(4) 今後の進め方

(4) - 1. SNP ジェノタイプの蓄積

USDA-ARS では、(3) - 1. で述べたように、乳牛における胚死滅をもたらす致死変異を 5 ヲ所見出し、その内 1 ヲ所の原因変異を同定した。この研究では致死変異を含むゲノム領域 (ハプロタイプ) はヘテロで検出されるが、ホモでは存在しないという考え方を取っている。そのため、1 万頭以上の 50K SNP (5 万個) ジェノタイプと 10 万頭規模の LD SNP (7,000 個) ジェノタイプを用いてハプロタイプを再構成し、それぞれのホモ・ヘテロの頻度を調べている。この手法を黒毛和種に適用すると胚死滅の原因変異を明らかにできる可能性がある。

これまで黒毛和種の経済形質の関連解析で数千頭規模の 50K SNP ジェノタイプを蓄積しているが、今後も計画的に増やしていく。

(4) - 2. SNP ジェノタイプのインピューテーション

50K SNP ジェノタイプを増やすにはコストがかかる。安価な LD SNP を用いてジェノタイプを得、50K SNP ジェノタイプや HD SNP (70 万個) ジェノタイプを学習集団として、LD SNP ジェノタイプを 50K SNP ジェノタイプとして予測する (impute) ことが重要になる。近い将来、学習集団の精度が向上すれば、SNP ジェノタイプからゲノム配列レベルの情報が得られるかもしれない。

2) ウシ遺伝性疾病の DNA 診断法の開発

(1) 研究年次：1997 年－2011 年 (平成 9 年－平成 23 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。2011 年度までに 10 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 2011 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	遺伝子診断法	特許
クローディン-16 欠損症	黒毛和種	<i>Claudin-16</i> (新規)	37kb の欠損	あり	受理
モリブデン補酵素 欠損症	黒毛和種	<i>MCSU</i> (新規)	3 塩基欠損	あり	受理
Chediak-Higashi 症候群	黒毛和種	<i>CHS-1</i>	1 塩基置換	あり	受理
クローディン-16 欠損症タイプ 2	黒毛和種	<i>Claudin-16</i>	56kb の欠損	あり	受理
軟骨異形成性 矮小体躯症	褐毛和種	<i>LIMBIN</i> (新規)	1 塩基置換 1 から 2 塩基置換	あり	受理
横隔膜筋症	ホルスタイン種	<i>HSP70</i>	11kb の欠損	あり	受理
眼球形成不全症	黒毛和種	<i>WFDC1</i>	1 塩基挿入	あり	岡山大学
マルファン症候群 (優性)	黒毛和種	<i>FBN1</i>	スプライシング 変異 (1 塩基置換)	あり	申請せず
前肢帯筋異常症	黒毛和種	<i>GFRA1</i>	1 塩基置換	あり	申請中
1 型子牛虚弱症候群	黒毛和種	<i>IARS</i>	1 塩基置換	あり	申請中

(3) ウシ遺伝性疾患の解析

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、76,000 症例データと 4,040 頭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。

(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。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、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、ウシ第 26 番染色体のテロメア側にあるマーカー群が発症と有意に連鎖していることがわかった。そこで、この領域にさらにマーカーを追加しハプロタイプを検討した結果、2007 年度までに FMA 候補領域を 3Mb まで絞ったが、依然として多数の候補遺伝子が存在する (Masoudi *et al.*, *Animal*

Genetics, 2008)。そこで次世代シーケンサーを用いて、半きょうだい関係のある FMA キャリア牛と正常牛のゲノムを対象にこの領域の DNA 配列を解読することを始め、2009 年度に FMA 領域の DNA 配列解読を終了した。

キャリア個体の当該領域には計 6,194 の塩基置換が存在し、そのうちの 4 個は当該領域に存在する機能的遺伝子の機能に関与していることが判明した。そこで、これらの変異について、発症個体、キャリア、正常個体のスクリーニングを行った結果、上記の塩基置換のうち、*GFRA1* 遺伝子の塩基置換は、一般の黒毛和種には検出されず、発症個体およびキャリアに特異的であった。*GFRA1* 遺伝子は神経細胞の成長因子であるグリア細胞由来神経成長因子 (GDNF) の受容体遺伝子であり、神経細胞の成長と分化に重要な役割を果たすことが知られている。同定された塩基置換は 144 番目のコドンを終止コドンにかえるナンセンス変異であり、本遺伝子の機能に大きな影響を与える変異であると考えられた。この塩基置換は制限酵素 *MwoI* を用いた PCR-RFLP 法により診断できる。

(3) - 2. マルフアン症候群 (岐阜県との共同研究)

黒毛和種の特定種雄牛の産子にマルファン症候群と考えられる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。我々は、特定種雄牛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、第 10 番染色体にマッピングし、*Fibrillin1* (*FBN1*) のスプライシング部位のモザイク変異が原因であることを見出した。発症牛 36 頭の内 *FBN1* 変異が検出されたのは 31 頭であった (Hirano *et al.*, *Animal Genetics*, 2011)。*FBN1* はヒトのマルファン症候群の原因遺伝子として知られている。

では残りの 5 頭に何が起こったのか。次 (3) - 3. で述べる 1 型子牛虚弱症候群 (WCS-1) の原因変異である *IARS* c.235 G>C を調べたところ、いずれも原因変異のホモ接合体であることがわかった。種雄牛 A は WCS-1 のキャリアであった。

(3) - 3. 1 型子牛虚弱症候群 (WCS-1) (岐阜県と共同研究)

子牛虚弱症候群は、黒毛和種の子牛損耗原因の約 20% を占めると考えられ、遺伝的背景も疑われているが、これまで家系解析でマッピングは不成功に終わっていた。今回は子牛虚弱症候群発症個体を次のような基準で選択した：(1) 生後 3 ヶ月以内で死亡した子牛、(2) 在胎期間が正常、(3) 生時体重が 20kg 以下、(4) 自力哺乳が困難。発症牛 13 頭、正常牛 30 頭からなる父方半きょうだい家系を作成し、BovineSNP50 BeadChip (イルミナ社) を用いて、ホモ接合マッピングを行った。発症牛 11 頭 (84.6%) で共通してホモになっている領域を第 8 番染色体に検出した。

ウシのエキソーム解析を行うために、174,377 個のエキソンをターゲットとした、ウシエキソンキャプチャーアレイ (NimbleGen) を作成した。発症牛 2 頭および正常牛 2 頭につい

て、エキソームシーケンシング用ライブラリーを作成し、Genome Analyzer *IIx*（イルミナ社）を用いて、40bases×2のPaired-endシーケンシングを行った。検出されたアミノ酸置換変異のタンパク機能への影響は、PolyPhen-2およびSIFTを用いて予測した。

各個体のハプロタイプから予測されるアリル型と一致し、遺伝子機能に影響すると予測される3つのSNPが検出された。これらのうち、イソロイシル tRNA 合成酵素遺伝子 (*IARS*) における変異が原因であると結論した：(1) *IARS* の c.235 G>C (p.Val79Leu) 塩基置換をもたらす変異ホモ個体は、正常牛集団 (1,793 頭) に存在しなかった；(2) *IARS* の 79 位のバリン (Val) は、種を超えて保存されている；(3) 正常型 *IARS* の 79 位のバリンをロイシン (Leu) に変えると、*IARS* のアミノアシル化活性は 38% と低下した。この塩基置換 c.235 G>C は制限酵素 *Hinc*-II を用いた PCR-RFLP 法により診断できる。*IARS* が原因の子牛虚弱症候群を 1 型子牛虚弱症候群 (WCS-1) と名付けた。

IARS の劣性変異の頻度は 7-9% であることから、子牛虚弱発症の 1/4-1/3 が説明できる。今後は *IARS* 以外の原因で起こる子牛虚弱症候群の原因解明に取り組む必要がある。

(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、劣性遺伝病の可能性を調べる。特に、子牛虚弱症候群の内、WCS-1 以外の症例を把握し、家系解析を行っていく。

3) ウシ経済形質の DNA 育種手法の開発

(1) 研究年次：1994 年－2011 年（平成 6 年－平成 23 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、2011 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。2011 年度までの収集の状況は表 2 の通りである。

表 2. 2011 年度までの黒毛和種 DNA サンプル収集状況

年度	収集数
2001-2010 累計	50,573
2011	2,610
合計	53,183

(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、拡張を行うとともに、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,3K,LD SNP による枝肉形質 QTL マッピング

これまで、種雄牛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が、低コストで短時間に QTL マッピングを実施するため 2010 年から約 3,000 個の SNP からなるカスタムチップを導入した。2011 年に 3K SNP (3,000 個) チップが市販され、さらに、LD SNP (7,000 個) も市販された。

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 SNP を使う本解析では 4 家系、全産子の全 SNP マーカー情報を利用して、すべての 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.*, *Nature Genetics*, 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。

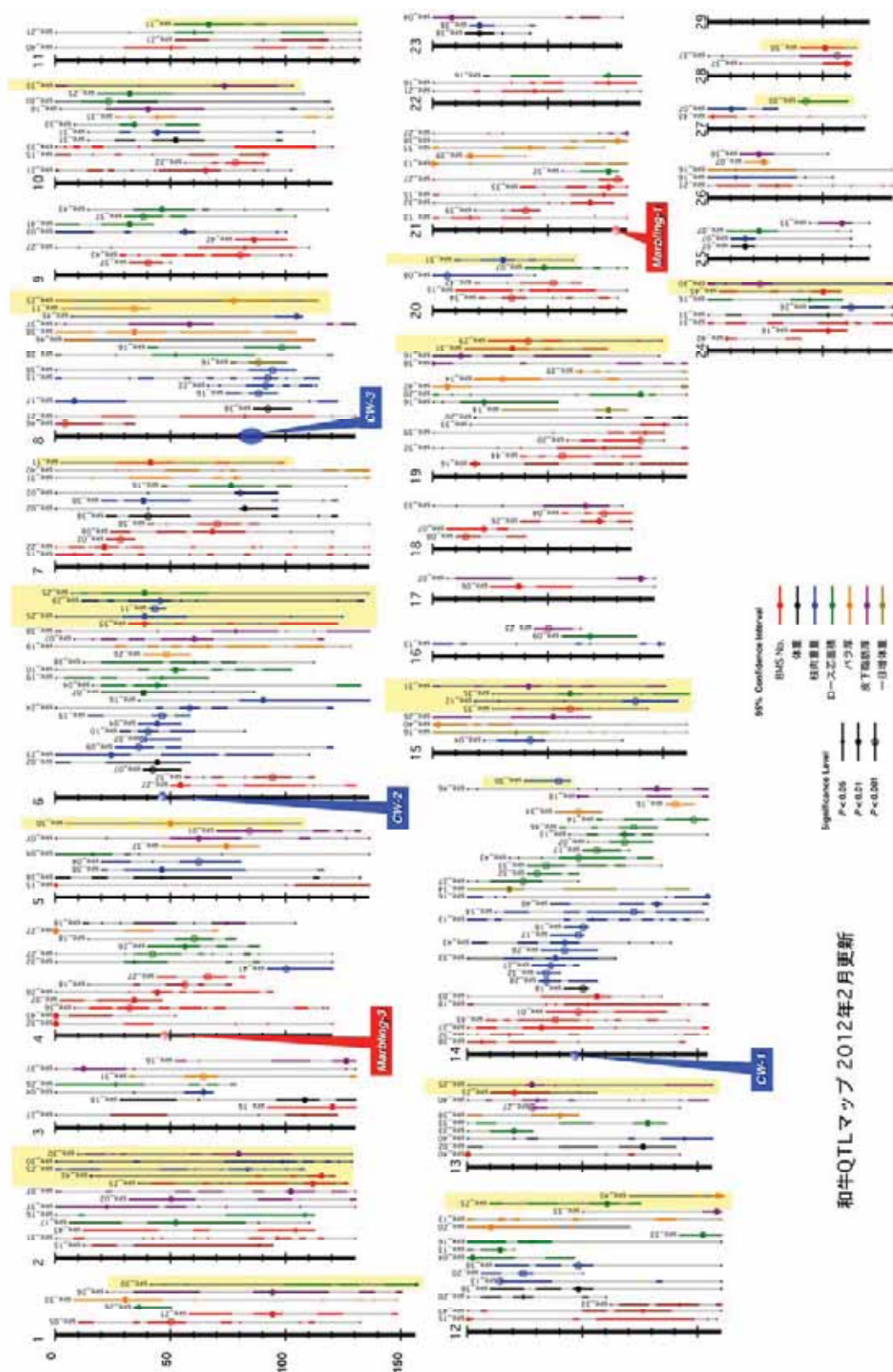
枝肉重量 QTL はこれまでに検出している $CW-1$ 、 2 、 3 の効果が大きかったが、それ以外にも新規の QTL を検出することができた。BMS No についてもいくつか新規の QTL を検出できたと考えられるが、枝肉重量 QTL に比較するといずれも効果は小さいものであった。

(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。

2011 年度に更新された「和牛 QTL マップ」は、3K SNP チップでの結果を含めて 44 家系の結果から成り、用いた産子数は総数 18,714 頭となった (図 1)。検出された QTL をマップに載せる基準は、「染色体ワイズ $P < 0.01$ 」または「FDR < 0.1」とした。



和牛QTLマップ 2012年2月更新

図1. 和牛 QTL マップ

(3) - 5. ウシ枝肉形質遺伝子座の解析

(3) - 5 - 1. CW-1 (枝肉重量・1) の解析 (鹿児島県との共同研究)

50K SNP チップを用いたゲノムワイド関連解析の結果、第4番染色体で最も関連の強かった SNP-4 は、以前に *CW-1* 領域として限定した領域から約 1Mb 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 周辺の方が以前に限定した 1.1Mb 領域よりも強い関連を示し、真の *CW-1* は SNP-4 周辺の約 940kb 内にあると考えられた。そこで、下記 *CW-3* 領域と合わせて、ターゲットリシーケンスを行い、責任変異を探索した。

CW-1, *CW-3* のそれぞれについて、優良型ホモ、ヘテロ、非優良型ホモの遺伝子型を含むように 8 頭の個体を選び、*CW-1* および *CW-3* 領域のターゲットリシーケンスを行い、ヘテロ個体はヘテロ型、かつ、優良型ホモ牛と非優良型ホモ牛は互いに異なるアリル型を示す変異を、責任候補として抽出した。*CW-1* 領域には 213 個の SNP と 15 個の Indel (Insertion-deletion mutation, 挿入欠失変異) が抽出され、これらのうち、遺伝子のエキソン内の変異 4 個と、生物種間での配列の保存性を表す指標のひとつである PhastCons の値が 0.9 以上の変異 6 個 (前者との重複あり) について、枝肉重量との関連を調べた。一方、ターゲット領域のうちリシーケンスで読めなかった領域には PhastCons の値が 0.9 以上の領域が 1 箇所あり、ここには、ジャージー種×ホルスタイン種の集団で同定された体高 QTL の責任変異が含まれていた (Karim *et al.*, *Nature Genetics*, 2011)。そこで、これについても、枝肉重量との関連を調べた。その結果、Karim らの報告した変異が最も関連が強く、*CW-1* の責任変異と考えられた。Karim らの報告した優良型ハプロタイプと黒毛和種の優良型ハプロタイプは、責任変異のみが一致していた。

(3) - 5 - 2. CW-2 (枝肉重量・2) の解析 (鹿児島県との共同研究)

ウシ第 6 番染色体上の枝肉重量 QTL は、黒毛和種の 3 家系と褐毛和種の 2 家系の半兄弟家系解析で検出され、ハプロタイプ比較と連鎖不平衡マッピングによって、責任変異候補として NCAPG (condensin complex subunit 3) のアミノ酸置換 SNP (Ile442Met) を特定し (Setoguchi *et al.*, *BMC Genetics*, 10: 43, 2009)、特許を取得した (2011 年 3 月)。また、鹿児島県の間接検定調査牛約 800 頭を用いて体重および体型測定値との関連を調べ、*CW-2* は体高、体長、体福のいずれとも関連すること、その効果は体長および体重増加曲線に一致して変動することを明らかにした (Setoguchi *et al.*, *Animal Genetics*, 42: 650-655, 2011)。

(3) - 5 - 3. CW-3 (枝肉重量・3) の解析 (大分県・島根県・青森県・長崎県・鳥取県・佐賀県との共同研究)

ウシ第 8 番染色体上には、7 頭の種雄牛の家系解析およびゲノムワイド関連解析において、枝肉重量 QTL が検出されている。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、この QTL (*CW-3*) の領域を、共通祖先由来の 11Mb に限定した。ゲノムワ

イド関連解析の結果より、50K チップ上には単独で *CW-3* のマーカーにできるものがなかったため、イルミナ HD チップを利用して適当な SNP を検索し、50K チップ上の最も関連する SNP (5.3×10^{-9}) よりもはるかに低い P 値 (1.8×10^{-13}) を示す SNP_{HD} を得た。

CW-3 領域のターゲットリシーケンスからは、責任候補として 1,418 個の SNP と 110 個の Indel が抽出された。これらのうちアミノ酸置換を生じる 15 個の SNP と PhastCons スコア > 0.9 の 25 個の変異 (SNP または Indel) を、ターゲットリシーケンスに用いていない 4 頭の *CW-3* ヘテロ種雄牛で調べたところ、6 個のアミノ酸置換 SNP と 13 個の PhastCons スコア > 0.9 の変異が、7 頭すべてのヘテロ種雄牛でヘテロであった。これらと枝肉重量との関連を調べた結果、ヒトの身長に関連することが報告されている遺伝子のアミノ酸置換 SNP が最も強い関連を示し、これを枝肉重量評価用の遺伝子マーカーとして特許出願した (平成 23 年 11 月)。

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

ウシ第 4 番染色体上に脂肪交雑 QTL が検出された 2 頭の種雄牛のハプロタイプ比較と関連解析によって QTL の候補領域を 46cM 付近の 3.7Mb に (Yokouchi *et al.*, *Animal Genetics*, 40: 945-951, 2009)、その後、さらに約 0.7Mb まで絞り込んだ。また、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* (Synaptophysin-like 1) が最も有力な候補と考えられた。*SYPL1* 遺伝子内にアミノ酸置換を伴う変異はなく、優良型 (Q) ホモ型の筋間脂肪組織における発現量は非優良型 (q) ホモ型よりも 2.2 倍多かった。そこで、shRNA をウシ筋間脂肪細胞前駆細胞株 (BIP) に導入して *SYPL1* 遺伝子の発現を抑制したところ、脂肪細胞に分化させた後のトリグリセリド蓄積量が減少した ($P < 0.05$)。 *SYPL1* 遺伝子の 5' 上流域に存在する SNP を検索し、BIP 細胞を用いたプロモーターアッセイにより、*SYPL1* 遺伝子の 5' 上流 718bp に位置する SNP が、*SYPL1* 遺伝子の発現量に差をもたらす変異であることを明らかにし、また、兵庫県の県有種雄牛 102 頭において、この SNP をマーカーとした場合に、 Q ホモ型の平均 BMS (育種価) が q ホモ型に比べて有意に高い ($P < 0.01$) ことを確認した。以上の結果より、この SNP が *Marbling-3* の責任変異であると結論し、特許出願した (2010 年 11 月)。

さらに、*SYPL1* がどのように脂肪蓄積に関わっているのかを明らかにするために、*SYPL1* タンパク質の局在や動態を調べた。ウシなどの反芻動物の場合、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脂肪酸が主に用いられ、BIP 細胞においても分化に伴い酢酸の取り込み量が増加することが報告されている (Aso *et al.*, 1995)。そこで、shRNA を用いて BIP 細胞の *SYPL1* 遺伝子の発現を抑制したところ、酢酸取り込み量は 20% 減少した。一般的に、酢酸などの脂肪酸は、細胞膜上にある脂肪酸トランスポーター (MCT) によって細胞内への取り込みが促進されると考えられている。ヒトでは、MCT は 14 の subtype からなるファミリーを作っており、MCT1 から 4 までは輸送する基質が判明している。MCT3 は網膜色素上皮にのみ発現し、それ以外の MCT1,2,4 については、特異的な阻害剤が知られている。

BIP 細胞の酢酸取り込みは、pCMB 及び DIDS で阻害されることから、MCT1 が酢酸の取り込みに関与していると考えられた。MCT1 は SYPL1 と同じく細胞膜に局在し、SYPL1 の強制発現または発現抑制によって、MCT1 タンパク質も増加または減少した。以上の結果から、ウシ SYPL1 は細胞膜上の MCT1 タンパク質の量を変化させることで脂肪細胞の酢酸取り込み量に関わり、最終的に脂肪蓄積に影響すると考えられた。

(3) - 6. 枝肉重量 QTL (CW-1,2,3) の効果推定と複数保有効果の検証

以下の 3 つの集団で効果検証を行った。

(3) - 6 - 1. 鹿児島間接検定調査牛 (735 頭)

検定開始日齢、年度、季節を固定効果とし、3 代祖までの血縁を考慮した混合モデルにより解析した。CW-1,2 の優良型アリル頻度は 0.79 と 0.40 で、検定終了時 (約 21 ヶ月齢) の枝肉重量への効果は、CW-1:9.1kg/アリル、CW-2:18.8kg/アリルと推定された。両者の間に相互作用は検出されなかった。

(3) - 6 - 2. ランダム集団 (芝浦、南港市場で収集した 2 万頭以上の去勢牛から半兄弟 3 頭以内としてランダム抽出した 1,236 頭)

約 2 万頭の母集団において月齢、年度、市場で補正した枝肉重量値を用い、線形回帰により解析した。各 QTL にドミナンス効果は検出されず、任意の 2 つの QTL 間の相互作用も検出されなかった。各アリル頻度とアリル置換効果は表 3 の通り。3 つの QTL で、表現型値の分散の約 20% を説明した。また、図 2 に示すように、優良型アリル数を多く持つほど、枝肉重量は増加した。

表 3. 枝肉重量における CW-1,2,3 の効果

	Q 頻度 (%)	アリル置換効果 (kg)	表現型値の分散への寄与率 (%)
CW-1	74.2	21.0	7.8
CW-2	19.9	21.3	6.8
CW-3	9.9	24.1	4.4
CW-1+2+3			19.9

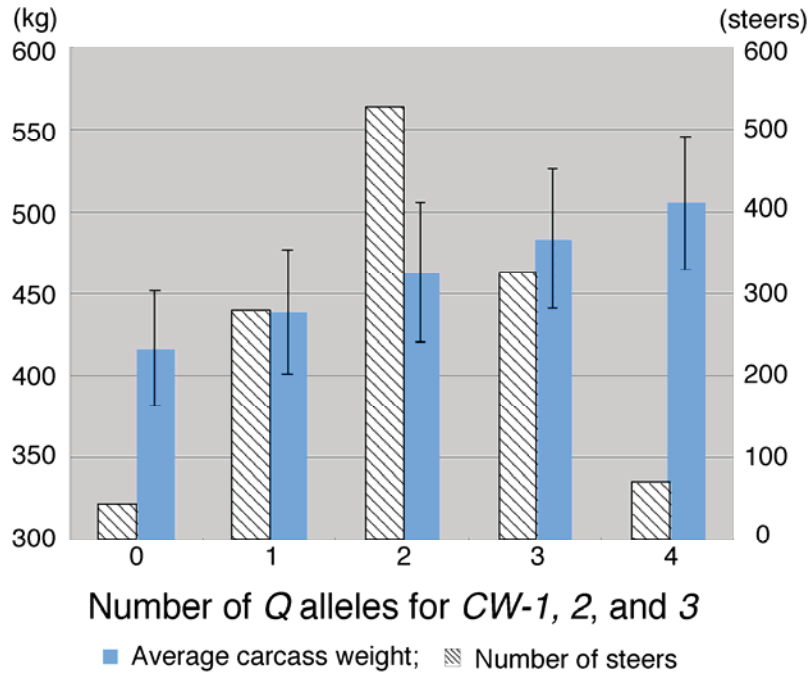


図 2. 枝肉重量における *CW-1,2,3* の優良型アリル Q 数の効果

(3) - 6 - 3. ゲノムワイド関連解析に用いた 1,156 頭 (芝浦、南港市場で収集)

この集団の枝肉重量の分布を図 3 に示す。EMMAX ソフトウェアを用い、月齢、年度、市場を固定効果とし、ゲノム関係行列を用いた混合モデルにより解析した。関連解析では、ゲノムレベルで有意な 3 つの QTL (*CW-1,2,3*) が存在した (図 4)。各 QTL のアリル頻度とアリル置換効果を表 4 に示す。ゲノム関係行列を用いた遺伝率の推定値より、3 つの QTL で遺伝分散の 36% を説明できると考えられた。

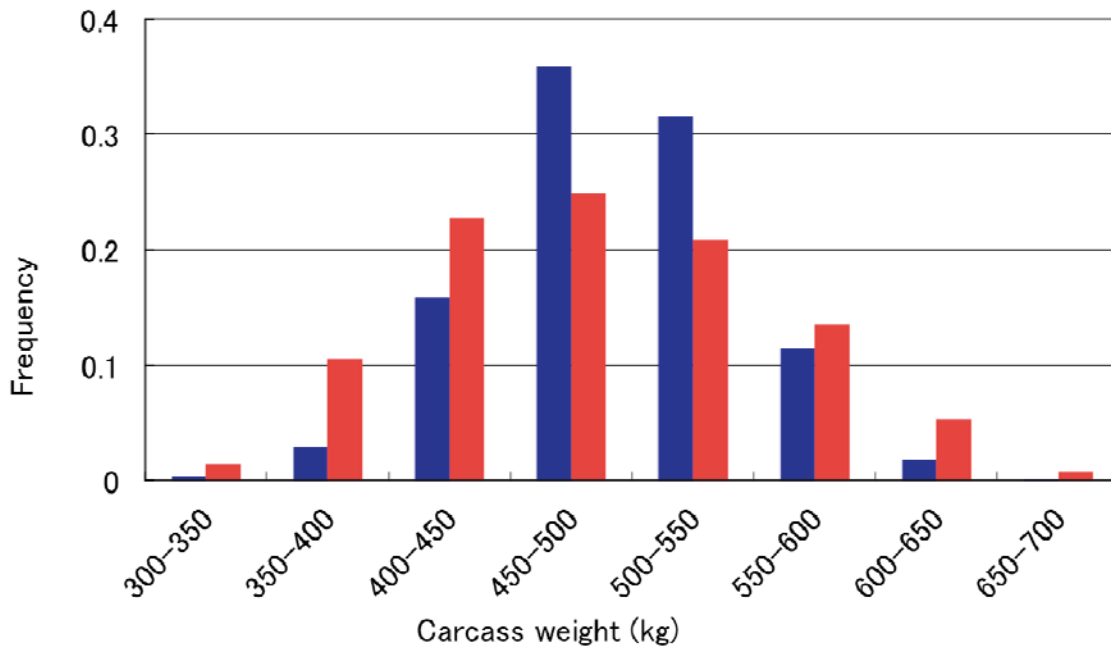


図 3. 枝肉重量の分布

(青：芝浦、南港市場で収集した全去勢牛の枝肉重量の分布/赤：ゲノムワイド関連解析に用いた去勢牛の枝肉重量の分布)

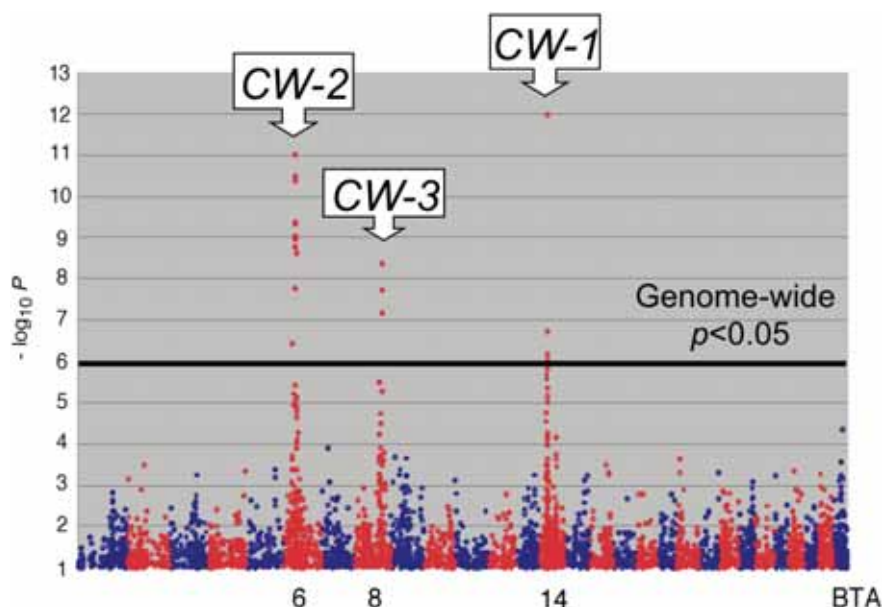


図 4. 枝肉重量の関連解析 (CW-1,2,3がメジャーなQTLとして検出された)

表 4. 枝肉重量の各 QTL の優良型 Q アリル頻度とアリル置換効果

Locus	Causative variations	アリル置換 効果 (kg)	P-value	Q freq. (%)
CW-1	<i>FJX_PLAPROTRI</i>	28.4	4.1E-14	75.4
CW-2	<i>NCAPG</i> c.1326T>G	35.2	5.4E-12	20.0
CW-3	SNP5 (Gene3)	46.3	7.9E-17	9.3

(3) - 7. 枝肉形質 QTL 解析のまとめと今後の進め方

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。

最近の 3、4 年のゲノム分野での技術革新は飛躍的と言える。ウシゲノム配列の解読とウシ 50K SNP チップの開発、ヒトにおける関連解析の発展、次世代シーケンサーを用いたゲノムリシーケンシングおよびターゲットリシーケンシング手法の確立等が行われ、ゲノム解析のスピードは大きく向上した。これら最新のゲノム解析手法を迅速に導入することによって、また、細胞を用いて遺伝子機能を解析することによって、2 つの枝肉重量 QTL (CW-2, CW-3) と 1 つの脂肪交雑 QTL (*Marbling-3*) の責任変異を特定し、特許取得 (CW-2) および特許出願 (CW-3, *Marbling-3*) に至ることができた。また、枝肉重量 QTL (CW-1) については、責任領域を修正し、責任変異を再特定した。ゲノム解析においては、新しい手法の開発や導入のスピードが研究の進展を決する状況になっており、この状況は今後も続くと思われる。

黒毛和種一般集団を対象としたゲノムワイド関連解析の結果、枝肉重量については、*CW-1,2,3*の3つがメジャージーンであると考えられるので、メジャージーンのすべてを特定できたといえる。一方、脂肪交雑については、関連解析において、複数の領域（もしくは候補領域）が検出されたものの、大きな効果を持つものは検出されていない。染色体毎の分散推定からは **Polygenic Model**（それぞれは効果の小さい、多数の変異によって遺伝分散が説明される）が適当と考えられた。

今後は、これらの成果を活用するマーカー選抜だけでなく、全ゲノム情報を用いたゲノム選抜を黒毛和種にどのように適用していくかが課題である。ゲノム選抜の正確度の向上には、信頼できる表型値付きの大規模な学習集団と正確な **QTL** 情報が欠かせない。これらをいかに収集するかが次のステップになるだろう。

（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・繁殖性に関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、初産分娩日齢、4回平均受胎率、3回平均空胎期間の4形質について、ゲノムワイド関連解析を行った。

（4）－1－1．4歳時子牛生産指数

黒毛和種・繁殖雌牛の子牛の生産効率に関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15,225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357頭と331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99%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以上で、イルミナ **HD SNP** チップに含まれる33,303個の **SNP** を用い、**EMMAX** プログラムを用いて解析を行った。

関連解析の結果、**Lander&Kruglyak** の算出したゲノムワイドの有意水準である 2.5×10^{-5} を下回る **SNP** が第12番染色体に3個検出され、3個の **SNP** は、それぞれ $r^2=0.95-0.99$ で完全連鎖不平衡にあり、いずれも **K4-1** 遺伝子のイントロン内に位置していた。**BEAGLE** プログラムで **imputation** 解析を行った結果、132kbが **LD** であることが判った。次に、効果を推定するため、同一牧場で関連解析に使用していない861頭について、関連解析で最も有意であった **SNP** を型判定した結果、優良型ホモ遺伝子型は、非優良型ホモ遺伝子型に対して有意で ($P<0.05$)、0.104頭の増頭効果があり、**SNP** は全分散の2.35%、全遺伝分散の21%を説明することが明らかとなった。**K4-1** 遺伝子のコード領域にアミノ酸置換を伴う関連多型は

検出されなかったことから、遺伝子の発現調整に関与する多型であることが示唆された。そこで、優良型と非優良型アレル由来の K4-1 遺伝子の発現をした調べた結果、優良型由来の転写産物は非優良型に比べ、1.33 倍多く発現していた。次に、発現調整に関与することが疑われる K4-1 遺伝子のプロモーター領域と 3'UTR の多型を検索した結果、それぞれ、6 個と 9 個の関連する多型が検出された。そこで、ハプロタイプ間の発現量の差の原因を調べるため優良型と非優良型の K4-1 遺伝子のプロモーター領域と 3'UTR をルシフェラーゼ遺伝子に結合してレポーター解析を行った結果、優良型 3'UTR は非優良型と比べ、1.35 倍活性が高いことが判った。これらの結果から、K4-1 遺伝子の発現量が高くなることで、4 歳時子牛生産指数が増加する可能性が示唆された。今後、他の黒毛和種集団における効果を確認し、育種利用性について検討を行う。

(4) - 1 - 2. 初産分娩日齢

黒毛和種・繁殖雌牛の初期の繁殖能力に関与する遺伝的な要因を同定することを目的として、初産分娩日齢を対象にゲノムワイド関連解析を行った。方法とサンプルは、4 歳時子牛生産指数のゲノムワイド関連解析に準じて行った。

関連解析の結果、 2.5×10^{-5} を下回る SNP が第 2 番染色体に 1 個検出され、AFC 遺伝子のイントロン内に位置し、112kb が LD であることが判った。次に、効果を推定するため 2,963 頭について、関連解析で最も有意であった SNP を型判定した結果、優良型ホモ遺伝子型は、非優良型ホモ遺伝子型に対して有意で ($P < 0.01$)、23.07 日の初産分娩日齢の短縮効果があり、SNP は全分散の 0.67%、全遺伝分散の 8%を説明することが明らかとなった。AFC 遺伝子のコード領域にアミノ酸置換を伴う関連多型は検出されなかったことから、遺伝子の発現調整に関与する多型であることが示唆された。今後、他の黒毛和種集団における効果を確認し、育種利用性について検討を行う。

(4) - 1 - 3. 4 回平均受胎率

黒毛和種・繁殖雌牛の受胎能力に関与する遺伝的な要因を同定することを目的として、4 回平均受胎率を対象にゲノムワイド関連解析を行った。方法とサンプルは、4 歳時子牛生産指数のゲノムワイド関連解析に準じて行った。

関連解析の結果、 2.5×10^{-5} を下回る SNP が第 2 番染色体に 2 個検出され、2 個の SNP は、完全連鎖不平衡で、1 個の SNP は CR4-1 遺伝子のイントロン内にあった。次に、効果を推定するため、同一牧場の 1,433 頭について、関連解析で最も有意であった SNP を型判定した結果、優良型ホモ遺伝子型は、非優良型ホモ遺伝子型に対して有意で ($P < 0.05$)、3.7%の受胎率を高める効果があり、SNP は全分散の 0.6%、全遺伝分散の 10%を説明することが明らかとなった。遺伝子のコード領域にアミノ酸置換を伴う関連多型が検出されなかったことから、遺伝子の発現調整に関与する多型であることが示唆された。そこで、発現調整に関与することが疑われる遺伝子のプロモーター領域と 3'UTR の多型を検索した結果、非優良型では

プロモーター領域に 3bp 欠損が検出された。そこで、3bp 欠損したプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子に結合してレポーター解析を行った結果、非優良型は優良型と比べ、0.85 倍活性が低いことが判った。これらの結果から、CR4-1 遺伝子の発現量が低くなることで、4 回平均受胎率が低下する可能性が示唆された。今後、他の黒毛和種集団における効果を確認し、育種利用性について検討を行う。

(4) - 1 - 4. 3 回平均空胎期間

黒毛和種・繁殖雌牛の分娩間隔に関与する遺伝的な要因を同定することを目的として、3 回平均空胎期間を対象にゲノムワイド関連解析を行った。方法とサンプルは、4 歳時子牛生産指数のゲノムワイド関連解析に準じて行った。

関連解析の結果、 2.5×10^{-5} を下回る SNP が第 10 番染色体に検出された。次に、効果を推定するため、同一牧場の 1,123 頭について、関連解析で最も有意であった SNP を型判定した結果、優良型アリルは、非優良型アリルに対して有意で ($P < 0.05$)、10.97 日の 3 回平均空胎期間を短縮する効果があった。今後、他の黒毛和種集団における効果を確認し、育種利用性について検討を行うと共に、責任 SNP の同定を行う予定である。

(4) - 1 - 5. 今後の進め方

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、育種利用性について検討を行う。3 回平均空胎期間に関しては、責任候補 SNP の検索を行い、責任候補 SNP のアリ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、繁殖性に関して育種利用性が認められた SNP に関しては、枝肉成績に負の効果が無いことも併せて検討する。

(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、第 3 番、5 番、13 番、18 番、28 番染色体に有意な SNP が見いだされた。

2011 年度は、有力な SNP を有する第 13 番染色体の Gene_3、第 18 番染色体の Gene_4 は、ともにホルモン調節に関与することを見出した。また、有力な SNP を有する第 3 番染色体の Gene_1 及び Gene_2 はウシ子宮内膜細胞においてギャップジャンクションの透過性に

影響することが確認できた。

今後、Gene_1 及び Gene_2 についてマウスを用いた遺伝子機能の解析を進め、受胎の分子機構の解明を行う。

(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。

2. 2011 (平成 23) 年度研究発表

1) 論文発表

1. Setoguchi, K, Watanabe, T, Weikard, R, Albrecht, E, Kühn, C, Kinoshita, A, Sugimoto, Y, Takasuga, A. (2011) The SNP c.1326T>G in the non-SMC condensin I complex, subunit G (NCAPG) gene encoding an Ile442Met variant is associated with an increase in body frame size at puberty in cattle. *Animal Genetics*. 42: 650-655.

2. Sugimoto, M., Itoh, T., Gotoh, Y., Kawahara, T., Moriya, H., Uchimura, Y., Sugimoto, Y. (2011) Enhanced clinical mastitis resistance in Holsteins with a *FEZL* p.Gly105 (12_13) polymorphism. *Journal of Dairy Science*, 94:2103-2107.

3. Hirano, T, Matsushashi, T., Kobayashi, N., Watanabe, T, Sugimoto, Y. (2011) Identification of an *FBN1* mutation in bovine Marfan syndrome-like disease. *Animal Genetics*, 43: 11-17.

4. 平野 貴 (2011) ウシ遺伝性疾患ゲノム解析の 10 年前と現在。動物遺伝育種研究、39: 54-58 (ミニレビュー)。

2) 学会発表

1. 佐々木慎二、揖斐隆之、渡邊敏夫、杉本喜憲：黒毛和種・雌牛の繁殖効率に関する全ゲノム関連解析。44th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (繁殖学会第 44 回大会)、2011 年 7 月、ポータランド、米国。

2. 平野 貴、渡邊敏夫、西村翔太、高須賀晶子、杉本喜憲：黒毛和種の大規模リシーケンシングと大量の SNP 開発。日本畜産学会第 114 回大会、2011 年 8 月、十和田、青森。

3. 小林直彦、松橋珠子、武田賢治、平野 貴、高須賀晶子、坂口慎一、北 和夫：枝肉重量 QTL (*CW-2*) が黒毛和種繁殖雌牛の初産分娩月齢、登録審査時の体側値に及ぼす影響。日本畜産学会第 114 回大会、2011 年 8 月、十和田、青森。

4. 今井佳積、松井茉由、平野 貴、高須賀晶子、杉本喜憲、吉上 渉：黒毛和種 *CW-2* 遺伝子型が広島県肥育牛の産肉成績に及ぼす影響。日本畜産学会第 114 回大会、2011 年 8 月、十和田、青森。

5. 佐藤洋一、藤村和哉、米澤智恵美、平野 貴、渡邊敏夫、高須賀晶子、菊池 雄、熊谷

光洋、杉本喜憲、鈴木啓一：岩手県黒毛和種集団における *NCAPG* 遺伝子型の効果。日本畜産学会第 114 回大会、2011 年 8 月、十和田、青森。

6. 松井茉由、今井佳積、日高健雅、平野 貴、吉上 渉：クローン検定の効率化を目的とした体外受精後 7 日目胚を用いた遺伝子診断法の開発。日本畜産学会第 114 回大会、2011 年 8 月、十和田、青森。

7. 石田沙倉、渡辺大作、木崎景一郎、米澤智洋、富岡美千子、黒瀬陽平、平野 貴、杉本喜憲、橋爪一善：黒毛和種発育不全牛と正常発育牛の単核球における遺伝子発現の網羅的解析。日本獣医学会第 152 回大会、2011 年 9 月、大阪。

8. 小川伸一郎、松田洋和、谷口幸雄、渡邊敏夫、西村翔太、祝前博明：SNP マーカー情報を利用した黒毛和種の経済形質に関する遺伝的評価—ゲノム関係行列の形成に用いる SNP 数と予測育種価の正確度—。第 49 回肉用牛研究会山形大会、2011 年 11 月、山形。

9. 平野 貴、小林直彦、松橋珠子、渡邊敏夫、高須賀晶子、杉本喜憲：黒毛和種に見られる子牛虚弱症候群のマッピング。日本動物遺伝育種学会第 12 回大会、2011 年 11 月、東広島。

10. 秋山耕陽、平野 貴、Ali Akbar Masoudi、内田和幸、辻岳人、熊谷多妙子、大和田孝仁、杉本喜憲、国枝哲夫：黒毛和種牛に発生する前肢帯筋異常症の原因遺伝子の同定と遺伝子診断法の確立。日本動物遺伝育種学会第 12 回大会、2011 年 11 月、東広島。

11. 佐々木慎二、揖斐隆之、松橋珠子、池田省吾、小林直彦、渡邊敏夫、杉本喜憲：黒毛和種における雌牛の繁殖能力に関するゲノム解析。日本動物遺伝育種学会第12回大会、2012年11月、広島。

12. 高須賀晶子、渡邊直人、藤田達男、中村亮一、鈴木晶夫、岡部 裕、田淵一郎、大坪利豪、高野 淳、西村翔太、平野 貴、渡邊敏夫、杉本喜憲：高密度 SNP チップを用いたウシ 8 番染色体上の枝肉重量 QTL (*CW-3*) のマーカー作成。日本動物遺伝育種学会第 12 回大会、2011 年 11 月、東広島。

13. 小林直彦、丸山 新、松橋珠子、平野 貴、高須賀晶子、坂口慎一、杉本喜憲、北 和夫：黒毛和種肥育牛の枝肉形質、脂肪酸組成、ロース芯画像データにおける *NCAPG* の効果。日本動物遺伝育種学会第 12 回大会、2011 年 11 月、東広島。

14. 佐藤洋一、米澤智恵美、平野 貴、中野 光、鈴木強史、児玉英樹、熊谷光洋、高須賀晶子、鈴木啓一：日本短角種の枝肉形質に *NCAPG* 遺伝子多型が及ぼす影響。日本動物遺伝

育種学会第 12 回大会、2011 年 11 月、東広島。

15. 今井佳積、尾形康弘、松井茉由、日高健雅、松重忠美、平野 貴、吉上 渉：効率的な種雄牛造成のための胚遺伝子型判定方法の検討。日本動物遺伝育種学会第 12 回大会、2011 年 11 月、東広島。

16. 高須賀晶子、渡邊直人、藤田達男、中村亮一、鈴木晶夫、岡部 裕、田淵一郎、大坪利豪、高野 淳、西村翔太、平野 貴、渡邊敏夫、杉本喜憲：ターゲットリシーケンシングによるウシ第 8 番染色体上の枝肉重量 QTL (*CW-3*) の責任変異の探索。第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月、横浜。

17. 横内 耕、秋山敬孝、佐々木慎二、杉本喜憲：ウシ脂肪細胞において SYPL1 は SLC16A1 量を増やし、酢酸の取り込みを促進する。第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月、横浜。

18. 杉本真由美、杉本喜憲：Cortactin binding protein 2 N-terminal-like はウシ受胎率に関与する。第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月、横浜。

19. 高須賀晶子、西村翔太、渡邊敏夫、溝下和則、龍田 健、杉本喜憲：ターゲットリシーケンシングによるウシ第 14 番染色体上の枝肉重量 QTL (*CW-1*) の責任変異の同定。Plant&Animal Genome XX (第 20 回国際植物動物ゲノム学会)、2012 年 1 月、サンディエゴ、米国。

20. 佐々木慎二、揖斐隆之、松橋珠子、池田省吾、小林直彦、杉本喜憲：黒毛和種・雌牛の受胎率を低下させる遺伝的要因の解明。日本畜産学会第 115 回大会、2012 年 3 月、名古屋。

21. 松橋珠子、杉本真由美、佐々木慎二、小林直彦、平野貴、坂口慎一、杉本喜憲、北和夫：黒毛和種繁殖雌牛の繁殖成績に対する *GRIA1* 遺伝子の遺伝子型の効果。日本畜産学会第 115 回大会、2012 年 3 月、名古屋。

22. 渡邊敏夫、平野貴、高須賀晶子、杉本喜憲
黒毛和種ゲノムリシーケンシングデータから抽出したアミノ酸非同義置換の評価。第 115 回日本畜産学会大会、2012 年 3 月、名古屋

23. 平野 貴、小林直彦、松橋珠子、渡邊敏夫、高須賀晶子、杉本喜憲：黒毛和種に見られる子牛虚弱症候群のエキソーム解析。日本畜産学会第 115 回大会、平成 24 年 3 月、名古屋。

24. 高須賀晶子、渡邊直人、藤田達男、中村亮一、鈴木晶夫、岡部 裕、田淵一郎、大坪利豪、齋藤陽介、高野 淳、西村翔太、平野 貴、渡邊敏夫、杉本喜憲：ウシ 8 番染色体上の

枝肉重量 QTL (*CW-3*) の責任変異の絞り込み。日本畜産学会第 115 回大会、2012 年 3 月、名古屋。

25. 今井佳積、松井茉由、平野 貴、吉上渉：広島県産牛における *EDG1* 遺伝子型と枝肉形質との関連性について。日本畜産学会第 115 回大会、平成 24 年 3 月、名古屋。

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 154 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」、2011 年 8 月、つくば。

2. 渡邊敏夫：ウシにおける SNP を用いた QTL マッピング法と育種への利用。第 8 回最先端動物遺伝育種セミナー、2011 年 9 月、鹿児島。

3. 杉本喜憲：New Approaches to Drive Discovery in Cattle Genomics. "Genome Research, Challenges and Future Directions" 東京農大国際ワークショップ、2012 年 1 月、東京。

4. 平野 貴：エキソームシーケンシングによるウシ遺伝性疾患解析。日本動物遺伝育種学会・在来家畜研究会合同シンポジウム、2012 年 3 月、名古屋。

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・雌牛の繁殖効率に関する全ゲノム関連解析

発表者：佐々木慎二¹、揖斐隆之²、渡邊敏夫¹、杉本喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²岡大

要旨：【目的】近年、黒毛和種・繁殖雌牛の繁殖効率が低下傾向にあり大きな問題となっている。そこで本研究では、黒毛和種・繁殖雌牛の連産能力に影響を与える遺伝的要因を同定するため、4 歳時子牛生産指数を対象に全ゲノム関連解析を行った。

【方法】黒毛和種、雌牛 15,225 頭の繁殖情報を収集し、成績上位、下位 6.7%に含まれる 707 頭から DNA を抽出し、ウシ 50K ビーズアレイを用い SNP 型判定を行った。関連解析は、Call Rate95%以上、MAF5%以上、HW 平衡の検定 *P* 値が 0.001 以上の 37,238 個の SNP で作成したゲノム関係行列を用いた EMMAX プログラムで行った。

【結果】3ヶ所に 4 歳時子牛生産指数に関連する有意な SNP を検出した。第 12 番染色体に 3 個 ($P=7E-06$ 、オッズ比=1.65)、第 21 番染色体に 1 個 ($P=2.84E-05$ 、オッズ比=1.94)、第 4 番染色体に 1 個 ($P=7.45E-05$ 、オッズ比=1.79) を検出した。これらの結果から、黒毛和種においてこれらの 3ヶ所が、4 歳時子牛生産指数に影響を与えることが示唆された。今

後、各領域の効果と他の集団で再現性を確認することで、責任遺伝子と責任 SNP の探索を行う。

(繁殖学会第 44 回大会、2011 年 7 月、ポートランド、アメリカ)

学会発表 2.

題目：黒毛和種の大規模リシーケンシングと大量の SNP 開発

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、効率的な解析を行うためには、MAF が 0.05 以上の SNP が多数必要である。そこで、我々は黒毛和種で有用な SNP を網羅的に同定するために、黒毛和種 52 頭のリシーケンシングを行った。

【方法】 BovineSNP50 (イルミナ社) 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。これら 4 グループの DNA プールを用いて、Genome Analyzer II (イルミナ社) にて 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 170.8Gb (平均 56.9depth) の配列データ (read) を得られ、約 95.3%の領域が depth \geq 20 でカバーされた。10,000>depth \geq 20 でカバーされる領域を SNP 探索の対象とし、マイナーアレルが \geq 2read、MAF が \geq 0.05 である部位を探索したところ、常染色体から約 1,131 万種の SNP (平均 MAF=0.26) を検出した。また、これらの約 459 万種はリピート領域外に位置し、その平均間隔は 596bp であった。これらによる効率的なゲノム解析が期待される。

(日本畜産学会第 114 回大会、2011 年 8 月、十和田)

学会発表 3.

題目：枝肉重量 QTL (*CW-2*) が黒毛和種繁殖雌牛の初産分娩月齢、登録審査時の体側値に及ぼす影響

発表者：小林直彦¹、松橋珠子¹、武田賢治¹、平野 貴²、高須賀晶子²、坂口慎一¹、北 和夫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、QTL 解析で特定され、*NCAPG c.1326T>G* の変異を検出することにより *CW-2* の優良遺伝子型 (G アレル) の診断が可能である。発育の良い個体では初産分娩月齢が早くなる可能性があるので、今回特定繁殖農家において、繁殖雌牛の種畜性への *NCAPG* の効果を検証した。

【方法】 *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。繁殖雌牛の基本・本源登録時の体測値や初産分娩月齢と、*NCAPG* 遺伝子型との関連を調査した。

【結果】黒毛和種繁殖雌牛 210 頭について遺伝子型判定を行い、GT 型 35 頭 (16.7%)、TT 型 175 頭 (83.3%) で、遺伝子頻度は G アレルが 0.08、T アレルが 0.92 であった。初産分娩月齢は GT 型 22.8 ± 1.7 ヶ月、TT 型は 23.8 ± 2.2 ヶ月で有意差 ($P < 0.05$) がみられた。登録審査時の体高において、GT 型の個体では発育標準の平均以上が 77.4%、平均以下が 22.6% であった。TT 型の個体は平均以上 53.9%、平均以下 46.1% であり、GT 型では登録審査時の体高で平均以上が有意に多くみられた ($P < 0.01$)。これらの成績から、NCAPG は種畜の発育に関する遺伝子マーカーとしての効果が期待できる。

(日本畜産学会第 114 回大会、2011 年 8 月、十和田)

学会発表 4.

題目：黒毛和種 CW-2 遺伝子型が広島県肥育牛の産肉成績に及ぼす影響

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

所属：¹広島県立総技研畜技セ、²畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】CW-2 は黒毛和種父方半きょうだい家系を用いた QTL 解析で検出された QTL であり、その領域に位置する NCAPG は最も有力な候補責任遺伝子である。NCAPG の *c.1326T>G* 変異は枝肉重量と密接に相関しており、この SNP によって枝肉重量の優良遺伝子型判定が可能であることが示されている。広島県でも CW-2 遺伝子型を育種改良に活用するため、県内肥育牛の産肉成績に対する CW-2 の遺伝子型効果を調査した。

【方法】2006 年度広島県子牛せり市場入場牛 233 頭 (去勢 128 頭、雌 105 頭) について、PCR-RFLP 法を用いて NCAPG *c.1326T>G* 遺伝子型判定を実施し、枝肉重量、ロース芯面積、皮下脂肪厚、バラ厚および脂肪交雑評点 (BMS) と遺伝子型との関連性を調査した。

【結果】集団全体の遺伝子型頻度は GG 型 1.3% (3 頭)、GT 型 27.0% (63 頭)、TT 型 71.7% (167 頭)、また、アレル頻度は G アレル 14.8%、T アレル 85.2% であった。遺伝子型別の枝肉重量は、去勢で GT 型群 (30 頭) が TT 型群 (97 頭) と比較して 24.6kg 大きく ($P < 0.005$)、雌でも GT 型群 (33 頭) が TT 型群 (70 頭) を 27.1kg 上回った ($P < 0.0001$)。ロース芯面積、バラ厚および BMS でも GT 型群の平均値が TT 型群に比べ、高くなる傾向が認められた。本実験の結果、CW-2 遺伝子型は広島県の産肉形質の改良に有効活用できることが示唆された。

(日本畜産学会第 114 回大会、2011 年 8 月、十和田)

学会発表 5.

題目：岩手県黒毛和種集団における NCAPG 遺伝子型の効果

発表者：佐藤洋一^{1,3}、藤村和哉¹、米澤智恵美¹、平野 貴²、渡邊敏夫²、高須賀晶子²、菊池 雄¹、熊谷光洋¹、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】Non-SMC Condensin I Complex, Subunit G (NCAPG) 遺伝子は黒毛和種の父方半きょうだい家系による QTL 解析で検出された枝肉重量 QTL (CW-2) の候補責任遺伝

子であり、エキソン 9 に位置する 442 番目のイソロイシンをメチオニンに置換する SNP が、枝肉重量と密接に相関することが報告されている。岩手県黒毛和種集団の育種改良において *NCAPG* 遺伝子型情報の活用を検討するため、遺伝子頻度と効果を調査した。

【方法】岩手県産黒毛和種肥育牛 359 頭から採取したゲノム DNA を用い、PCR-RFLP 法により *NCAPG c.1326T>G* 遺伝子型を判定した。性、遺伝子型を母数効果とし、出荷月齢を共変量とした共分散分析により枝肉形質と遺伝子型との関係を検討した。

【結果】遺伝子型頻度は T/T 型 0.48、T/G 型 0.51、G/G 型 0.02 であった。枝肉重量 (kg) の最小二乗平均値は T/T 型 436.2、T/G 型 466.3、G/G 型 483.9 であり、T/T 型と T/G 型の差は $P<0.001$ で有意であった。相加効果は 23.85、優勢効果は 6.24 であり、遺伝子置換の平均効果は 20.98 であった。以上の結果から、*NCAPG* 遺伝子は岩手県黒毛和種集団の枝肉重量の改良に有効であると思われる。

(日本畜産学会第 114 回大会、2011 年 8 月、十和田)

学会発表 6.

題目：クローン検定の効率化を目的とした体外受精後 7 日目胚を用いた遺伝子診断法の開発

発表者：松井菜由¹、今井佳積¹、日高健雅¹、平野 貴²、吉上 渉¹

所属：¹広島総技研畜技セ、²畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】広島県では種雄牛造成の期間短縮を目的に受精卵クローン検定を導入している。さらに、クローン胚を用いた生前遺伝子診断を行うことで、検定をさらに効率化することが可能である。今回、我々は体外受精胚の胚盤胞期胚を用いて、生前遺伝子診断のための DNA 抽出法およびサンプル量について検討した。

【方法】NaOH 処理または加熱冷却後 NaOH 処理により胚から DNA を抽出した。これら DNA と無処理胚（胚ダイレクト）を用いて、*SCD*、*SREBP-1*、*FASN* の遺伝子型判定を実施し、(1) NaOH 濃度および加熱時間の検討、(2) 1/10 胚相当量までの段階希釈による DNA 少量化の検討、(3) 実際にクローン胚を作出し、胚診断後に移植して誕生した 7 頭の生後診断との整合性調査を行った。

【結果】DNA 抽出は、0.05N NaOH を用いて、37°C 20 分後、95°C 20 分間処理したもので最も安定した判定率を得た。また、*SCD* と *SREBP-1* については 1/10 胚、*FASN* では 1/4 胚相当量で 90% 以上の判定率を得た。胚と生後子牛の遺伝子型整合調査については、3 頭は *SREBP-1* のみ、4 頭は 3 遺伝子について行い、全て遺伝子型は一致した。以上の結果から、クローン胚での遺伝子診断技術の有効性が示された。

(日本畜産学会第 114 回大会、2011 年 8 月、十和田)

学会発表 7.

題目：黒毛和種発育不全牛と正常発育牛の単核球における遺伝子発現の網羅的解析

発表者：石田沙倉¹、渡辺大作¹、木崎景一郎²、米澤智洋¹、富岡美千子¹、黒瀬陽平、平野貴³、杉本喜憲³、橋爪一善²

所属：¹北里大獣医、²岩手大農、³畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】黒毛和種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ている。昨年実施の肝臓の網羅的遺伝子解析では、発育不全牛において IgG 関連遺伝子、ケモカイン (MCP-2)、インターフェロン γ などの有意な低下がみられた。本研究ではこれらの免疫的な側面に注目し、白血球の中でもウシの血中に多く存在する単核球について遺伝子発現の網羅的解析を行った。

【方法】臨床的・血液学的に正常な 11 ヶ月齢の黒毛和種去勢牛 3 頭を用いて単核球分離を行い、トリゾール中で -80°C に保管した。単核球から総 RNA を抽出、ウシオリゴマイクロアレイ解析に供した。

【結果】正常牛と発育不全牛の単核球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 69 遺伝子のうち、特に発育不全牛で低値を示した遺伝子には、chemokine (C-C motif) ligand 16、immunoglobulin light chain VJ region, solute carrier family 20 member 2、chemokine (C-X-C motif) ligand 2 などがみられた。肝臓と単核球の両マイクロアレイで共通して発育不全牛で低下していた因子には、immunoglobulin light chain VJ region と chemokine 類があった。これらの低発現は相対的な免疫能の低下を示しており、発育不良子牛にしばしばみられる新生児虚弱症候群や易罹患性の原因因子となり得る。分析を進め、発育不良に関わる遺伝子異常を特定する予定である。

(日本獣医学会第 152 回大会、2011 年 9 月、大阪)

学会発表 8.

題目：SNP マーカー情報を利用した黒毛和種の経済形質に関する遺伝的評価ーゲノム関係行列の形成に用いる SNP 数と予測育種価の正確度ー

発表者：小川伸一郎¹、松田洋和²、谷口幸雄²、渡邊敏夫³、西村翔太³、祝前博明²

所属：¹京大農、²京大院農、³畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】近年、ウシ 50K SNP チップが開発され、大量の SNP マーカー情報を利用したゲノム育種価評価が手法的に実現可能となってきた。そこで、演者らの共同研究グループは、これまでに、黒毛和種肥育牛に関する枝肉形質および 50K SNP チップのデータを用い、計算の手法、遺伝分散および残差分散の推定、育種価予測の正確度などの観点から、ゲノム評価に関する基礎的検討を行ってきた。本研究では、関連の基礎研究の一つとして、黒毛和種肥育牛の枝肉重量を対象とし、GBLUP 法でのゲノム関係行列 (G 行列) の形成に用いる SNP 数を順次変化させた場合における予測育種価の正確度の変化の様相について検討を加えた。

【方法】黒毛和種去勢肥育牛 872 頭の枝肉重量および SNP のデータを用いた。枝肉重量のデータは、平成 12 年から 20 年までの間に、二か所の食肉市場において収集された記録 (約 22~37 か月齢) である。記録を記述するための線形モデルには、母数効果と残差に加えて、個体の育種価 (ポリジーン効果) の変数を取り上げた。SNP 型の判定は、Illumina Bovine 50K

Infinium II によって 54,001 箇所の SNP について行い、マイナーアレル頻度 >0.01 、データコール率 >0.95 、ハーディー-ワインバーグ平衡から乖離していないこと ($P<0.001$) などを選択基準として、最終的に 37,838 箇所の SNP を選定し利用した。データの分析は、血統情報に基づく相加的血縁行列に代えて、SNP データによって作成した G 行列を用い、ベイジアン・リッジ分析法によって実施した。ここでは、G 行列の形成に利用する SNP 数を 500 から順に増加させ（配置は等間隔）、遺伝分散および残差分散の推定値の推移の様相を調べるとともに、予測育種価の正確度と偏りの検討を行った。

【結果】500 個の SNP を用いたときには計算が不可能であったが、1,000 個を用いた場合には可能であり、遺伝分散および残差分散の各推定値は、全 SNP を用いた場合の値のそれぞれ 54 および 135%であった。SNP 数を順次増加させると、残差分散の当該割合は減少する一方、遺伝分散のそれは増加する顕著な傾向が認められ、4,000 個を用いた場合の遺伝分散の当該割合は 92%であった。さらに SNP 数を増やすと、抽出変動による多少の増減は認められたが、遺伝分散の当該割合は漸増し、10,000 個を用いた場合に 100%に達した。全 SNP を用いた場合と 1,000 個を用いた場合との予測育種価間の相関は 0.91 であったが、4,000 個を用いた場合には 0.986 の値を示し、4,000 個および 10,000 個の場合における予測育種価の全 SNP を用いた場合の値に対する単回帰係数は、それぞれ 0.94 および 1.00 であった。以上の結果は、黒毛和種の枝肉重量を対象とした GBLUP 法に関して、低密度の SNP チップの利用についての有用な情報を与えていると考えられるが、交差確認や異なるデータセットによる検討が必要である。

（第 49 回肉用牛研究会山形大会、2011 年 11 月、山形）

学会発表 9.

題目：黒毛和種に見られる子牛虚弱症候群のマッピング

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

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²岐阜県畜産研

要旨：【目的】生後 3 ヶ月以内の子牛死亡や廃用（子牛損耗）は、国内の肉用種、乳用種に関わらず、4~8%の頻度で発生し、全国的に大きな損失となっている。我々は、ホルスタイン種および黒毛和種の子牛損耗サンプルの収集を進めている。子牛虚弱症候群は、それらの記録から、黒毛和種の子牛損耗原因の約 20%を占めると考えられ、遺伝的背景があることも疑われている。そこで、DNA 診断法を確立し、黒毛和種集団から子牛虚弱症候群の効率的な排除を可能するために、我々は、生後 3 ヶ月以内で子牛虚弱症候群の発症がみられる家系を用いて、マッピングを試みた。

【方法】生後 3 ヶ月以内で死亡した子牛で、在胎期間が正常で生時体重が 20kg 以下、自力哺乳が困難であった個体を子牛虚弱症候群発症牛とした。発症牛 13 頭、正常牛 30 頭からなる父方半きょうだい家系を作成し、BovineSNP50 BeadChip（イルミナ社）を用いて、全ゲノムスクリーニングを行った。そのジェノタイプデータを用いて、ホモ接合マッピングを試みた。

【結果】発症牛 11 頭 (84.6%) で共通してホモになっている領域が、第 8 番染色体で検出された。さらに、第 8 番染色体について、24 個のマイクロサテライトマーカーを用いて連鎖解析を行ったところ、同様の領域で有意な結果が得られた。現在、次世代型シーケンサーを用いて、エキソームシーケンシングを行い、マッピングされた領域を対象として、原因となる遺伝子変異を探索している。

(日本動物遺伝育種学会第 12 回大会、2011 年 11 月、東広島)

学会発表 10.

題目：黒毛和種牛に発生する前肢帯筋異常症の原因遺伝子の同定と遺伝子診断法の確立

発表者：秋山耕陽¹、平野 貴²、Ali Akbar Masoudi¹、内田和幸⁴、辻 岳人¹、熊谷多妙子¹、大和田孝仁³、杉本喜憲²、国枝哲夫¹

所属：¹岡山大・自然、²畜技協・動物遺伝研、³NOSAI 宮崎、⁴東大・農

要旨：【目的】前肢帯筋異常症 (FMA) は、黒毛和種牛に発生する常染色体劣性の遺伝性疾患であり、生後の起立困難や振戦を呈し、外観上は肩甲部の著明な突出や耳介の下垂等が認められ、病理学的には広背筋の形成に顕著な形成異常を呈する。本疾患は特定の種雄牛の家系に集中して発生し、多くの発症個体は廃用となるため、その経済的損失は多大である。本研究では、本疾患の原因遺伝子を同定することを目的とした。

【方法】はじめに、同一家系内の 26 個体の発症個体を用いて全染色体を網羅した MS マーカーのタイピングを行い、その原因遺伝子がウシ第 26 番染色体上の MS マーカー *MOK2611* と *MOK2603* の間約 2.3Mb の領域に存在することを明らかにした。次に、次世代シーケンサーを用いて本疾患のキャリア個体の全ゲノムの塩基配列を決定し、そこから当該の約 2.3Mb の領域について、疾患の原因となる可能性のある変異の探索を行った。

【結果】キャリア個体の当該領域には計 6,194 の塩基置換が存在し、そのうちの 4 個は当該領域に存在する機能的遺伝子の機能に関与していることが考えられた。そこで、これらの変異について、発症個体、キャリア、正常個体のスクリーニングを行った結果、上記の塩基置換のうち、*GFR1* 遺伝子の塩基置換は、一般の黒毛和種には検出されず、発症個体およびキャリアに特異的であることが明らかとなった。*GFR1* 遺伝子は神経細胞の成長因子である *GDNF* の受容体の遺伝子であり、神経細胞の成長と分化に重要な役割を果たすことが知られている。同定された塩基置換は 144 番目のコドンを終止コドンにかえるナンセンス変異であり、本遺伝子の機能に大きな影響を与える変異であると考えられた。以上のことから、*GFR1* 遺伝子におけるナンセンス変異が、前肢帯筋異常症の原因となる変異であると結論づけられた。なお、この塩基置換は制限酵素 *MwoI* を用いた PCR-RFLP 法により判別可能であり、この方法を用いてキャリア個体の遺伝子診断が可能となった。

(日本動物遺伝育種学会第 12 回大会、2011 年 11 月、東広島)

学会発表 11.

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、松橋珠子³、池田省吾⁴、小林直彦³、渡邊敏夫¹、杉本喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²岡大、³岐阜畜研、⁴鹿児島肉改研

要旨：【目的】本研究では黒毛和種・繁殖雌牛の連産能力に影響を与える遺伝的要因を同定するため、4歳時子牛生産指数を対象に全ゲノム関連解析を行った。

【方法】黒毛和種、雌牛 15,225 頭の繁殖情報を収集し、成績上位、下位 6.7%に含まれる 688 頭から DNA を抽出し、ウシ 50K ビーズアレイを用い SNP 型判定を行った。関連解析は、Call Rate95%以上、MAF5%以上、HW 平衡の検定 P 値が 0.001 以上の 37,239 個の SNP で作成したゲノム関係行列を用いた EMMAX プログラムで行った。

【結果】第 12 番染色体に 3 個の有意な SNP を検出し ($P=7E-06$ 、オッズ比=1.65)、135kb の領域が連鎖不平衡 (LD) であった。これらの SNP と 4 歳時子牛生産指数の関連は他の集団でも再現され、優良遺伝子型は非優良遺伝子型に対して、約 0.104 頭の産子の増頭効果があり、全分散に占める割合は約 2.35%であった。LD ブロック内には 2 つの遺伝子 (NCP4-1、NCP4-2) が存在したが、NCP4-2 領域は、LD になく関連が認められなかった。また、2 つの遺伝子のコード領域内に、3 つの SNP と LD にあるアミノ酸置換を伴う多型が存在しないことから、責任多型は NCP4-1 遺伝子の発現量を調整する領域に存在すると考えられた。そこで、LD にある 5 個の SNP と 1 個の indel を含む予想転写開始点から 2,964bp の上流領域と、9 個の SNP を含む 3'UTR をそれぞれレポータープラスミドに組み込みレポーター解析を行った結果、上流領域はハプロタイプ間に差が認められなかったが、3'UTR の優良ハプロタイプは非優良ハプロタイプに比べ、約 1.5 倍のレポーター活性を示した。これらの結果から、黒毛和種における NCP4-1 の 3'UTR 領域の多型が、NCP4-1 の転写量に影響を及ぼし、4 歳時子牛生産指数を制御することが示唆された。

(日本動物遺伝育種学会第 12 回大会、2011 年 11 月、広島)

学会発表 12.

題目：高密度 SNP チップを用いたウシ第 8 番染色体上の枝肉重量 QTL (*CW-3*) のマーカー作成

発表者：高須賀晶子¹、渡邊直人²、藤田達男²、中村亮一³、鈴木晶夫⁴、岡部 裕⁵、田淵一郎⁶、大坪利豪⁷、高野 淳¹、西村翔太¹、平野 貴¹、渡邊敏夫¹、杉本喜憲¹

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

要旨：【目的】これまでに、黒毛和種の 7 種雄牛について、第 8 番染色体上に共通祖先に由来する枝肉重量 QTL (*CW-3*) を検出し、また、黒毛和種一般集団を用いたゲノムワイド関連解析においても、同領域に枝肉重量との関連を検出した。しかし、関連解析に使用した 50K SNP チップ上には、単独で *CW-3* を代表できる SNP がなかったため、高密度 SNP チップを利用して *CW-3* の SNP マーカーを作成した。

【方法と結果】7 頭の *CW-3* ヘテロ種雄牛と、一般集団として、黒毛和種の各系統に属する

肥育牛 52 頭を、イルミナ HD SNP チップで型判定した。*CW-3* 責任領域 (11Mb) において全てのヘテロ種雄牛がヘテロ型を示す SNP の中から、一般集団におけるアリル頻度を考慮して複数個の SNP を選択し、近傍のマイクロサテライト (MS) マーカーとともに、枝肉重量上位下位の計 287 頭を型判定した。隣接する 2 つの MS マーカーから推定される *CW-3* の優良型アリル頻度に最も近い SNP を選び、これをゲノムワイド関連解析に用いた 1,156 頭で型判定し、関連解析を行ったところ、50K チップ上の SNP よりも強い関連を示し、また、この SNP の遺伝子型を固定効果とした場合には、周辺 SNP の関連が消失した。したがって、この SNP は *CW-3* マーカーとして利用できると考えられた。

(日本動物遺伝育種学会第 12 回大会、2011 年 11 月、東広島)

学会発表 13.

題目：黒毛和種肥育牛の枝肉形質、脂肪酸組成、ロース芯画像データにおける *NCAPG* の効果

発表者：小林直彦¹、丸山 新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、北 和夫¹

所属：¹岐阜県畜産研、²畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】Setoguchi らの報告した枝肉重量 QTL である *CW-2* は、本県黒毛和種種雄牛の半きょうだい家系においても枝肉重量などの増体成績にプラスの効果が検出されたことを昨年の本学会で報告をした。*CW-2* は枝肉重量やロース芯面積の増加に皮下脂肪厚低下を伴うことが報告されていることから、脂肪交雑や脂肪代謝に対するマイナス効果を有するおそれがある。そこで今回は県内の一般集団を対象に、*CW-2* の増体に対するプラスの効果を確認すると共に、*CW-2* のロース芯画像データの示す脂肪面積、脂肪交雑の形状の指標である、こざし指数、あらさ指数、及びロース芯内脂肪酸組成への影響を調べた。

【方法】黒毛和種肥育牛 (去勢、461 頭) の DNA サンプルを用いた。*CW-2* の優良遺伝子型判定は、*NCAPG c.1326T>G* を検出する PCR-RFLP 法で実施した。

【結果】*NCAPG* 各遺伝子型の頭数は、GG 型：14 頭 (3.2%)、GT 型：190 頭 (42.9%)、TT 型：239 頭 (53.9%) であった (遺伝子頻度 G アレル：0.25、T アレル：0.75)。*NCAPG* 遺伝子型と枝肉格付成績の間には、枝肉重量、ロース芯面積、皮下脂肪厚において G アレル保有によりその成績が有意に上昇した。ロース芯画像データの画像ロース芯面積では G アレルにより向上効果が見られたが、他の画像データである画像ロース芯脂肪面積、こざし指数、あらさ指数、さらにロース芯内脂肪酸組成には影響が見られなかった。以上の結果から、*NCAPG* は枝肉重量を上昇させるが、脂肪酸組成や脂肪交雑の形状に影響を与えないことが明らかになり、増体の改良に有効な遺伝子マーカーであることが示された。

(日本動物遺伝育種学会第 12 回大会、2011 年 11 月、東広島)

学会発表 14.

題目：日本短角種の枝肉形質に *NCAPG* 遺伝子多型が及ぼす影響

発表者：佐藤洋一¹、米澤智恵美¹、平野 貴²、中野 光³、鈴木強史¹、児玉英樹¹、熊谷光洋¹、高須賀晶子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】 *Non-SMC Condensin I Complex, Subunit G (NCAPG)* 遺伝子は黒毛和種の父方半きょうだい家系による QTL 解析で検出された枝肉重量 QTL (*CW-2*) の候補遺伝子であり、エキソン 9 に位置する 442 番目のイソロイシンをメチオニンに置換する SNP が、枝肉重量と密接に相関することが報告されている。しかし、日本短角種では *NCAPG* 遺伝子多型に関する報告は無い。日本短角種の育種改良での *NCAPG* 遺伝子型情報の有用性を検討するため、遺伝子頻度と効果を調査した。

【方法】 材料は岩手県内の 2 つの市町から 2005 年および 2006 年に出荷された、出荷月齢 30 カ月未満、枝肉重量 300kg 以上である 769 頭の日本短角種肥育牛を用いた。*NCAPG c.1326T>G* 遺伝子型は、材料牛のゲノム DNA を用いた PCR-RFLP 法により判定した。枝肉形質と遺伝子型の関連解析は、性、肥育地、出荷年および遺伝子型を母数効果とし、出荷月齢を共変量とした共分散分析により行った。

【結果】 遺伝子型頻度は TT 型 0.897 (690 頭)、TG 型 0.101 (78 頭)、GG 型 0.001 (1 頭) であった。GG 型の個体は 1 頭であったため表型値の解析から除外し、TT 型と TG 型について検討した。枝肉重量 (kg) の最小二乗平均値は TT 型 410.2、TG 型 420.7 であり、 $P<0.05$ で有意であった。また、ロース芯面積 (cm²) の最小二乗平均値は TT 型 48.6、TG 型 50.6 であり、 $P<0.01$ で有意であった。バラの厚さ、皮下脂肪厚、BMS ナンバーに有意差は認められなかった。GG 型個体のデータ集積と解析が課題であるが、アレル間に一定の影響が認められたので *NCAPG* 遺伝子型は日本短角種の枝肉形質の改良マーカーとして利用できると思われる。

(日本動物遺伝育種学会第 12 回大会、2011 年 11 月、東広島)

学会発表 15.

題目：効率的な種雄牛造成のための胚遺伝子型判定方法の検討

発表者：今井佳積¹、尾形康弘²、松井茉由¹、日高健雅¹、松重忠美⁴、平野 貴³、吉上 渉¹

所属：¹広島総技研畜技セ、²広島総技研、³畜技協・動物遺伝研、⁴広島県北部畜産事務所

要旨：【目的】 広島県では遺伝的能力の高い種雄牛を確実に造成するため、体外受精胚の分離胚から候補種雄牛と受精卵クローン牛を作出し、「クローン検定」を実施している。今回、クローン胚で遺伝子型判定を行うことにより、胚の段階で候補種雄牛の遺伝情報を獲得する技術を検討した。

【方法】 1) 牛肉の脂肪酸関連遺伝子である *SCD*、*FASN*、*SREBP* の 3 遺伝子とも優良型の候補種雄牛作出を試みた。*SCD* および *FASN* 遺伝子で優良型 (*SCD*: AA, *FASN*: TW/TW, *SREBP*: LS) の雌牛から経膈採卵し、3 遺伝子とも優良型 (*SCD*: AA, *FASN*: TW/TW, *SREBP*: SS) の雄精液で体外受精を実施した。受精後 5 日目に細胞剥離法で胚から細胞数個を採取し、

核移植でクローン胚を作出した。一部をクローン検定牛作出用ドナー胚として保存し、その他は変性胚も含めて遺伝子型判定用サンプルとした。2) CL-16 type-1 欠損症陽性雌牛からの CL-16 欠損症陰性産子の作出を試みた。経膈採卵後、CL-16 欠損症陰性の雄精液で体外受精し、以降は1)と同様に実施した。1)、2)で得たサンプルはPVP入りPBS-で洗浄し、滅菌水とともに2-4 μ l採取した。同量の0.05N-NaOH液と混合し、室温で15分放置後、95°Cで15分加熱し、Tris-Hcl (pH8.0)で中和したものをDNA抽出液とした。各遺伝子型はKOD-FX (TOYOBO)でPCR増幅した産物を3%アガロース電気泳動によって判定した。

【結果】1)では11サンプルを用い、6細胞程度では判定不能、8細胞以上で判定可能であった。優良型判明胚4個を移植し、2頭が受胎し出生した。2)では8細胞未満の6サンプルを用い、全て判定可能であった。陰性判定胚のみ移植し、1頭が受胎し出生した。1)、2)とも出生後の遺伝子型判定結果は着床前診断結果と一致した。以上の結果、クローン胚を用いた着床前診断を行うことで、胚の段階で候補種雄牛の遺伝情報を獲得でき、受精胚からの細胞採取と核移植技術を用いた効率的な種雄牛造成が可能であると確認できた。

(日本動物遺伝育種学会第12回大会、2011年11月、東広島)

学会発表 16.

題目：ターゲットリシーケンシングによるウシ第8番染色体上の枝肉重量 QTL (*CW-3*) の責任変異の探索

発表者：高須賀晶子¹、渡邊直人²、藤田達男²、中村亮一³、鈴木晶夫⁴、岡部 裕⁵、田淵一郎⁶、大坪利豪⁷、高野 淳¹、西村翔太¹、平野 貴¹、渡邊敏夫¹、杉本喜憲¹

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

要旨：【目的】これまでに黒毛和種種雄牛の父方半きょうだい家系を用いた QTL 解析によって、7頭の種雄牛に、第8番染色体上の枝肉重量 QTL (*CW-3*) を検出し、また、黒毛和種一般集団を用いたゲノムワイド関連解析においても、同領域に枝肉重量との強い関連を検出している。本研究では、*CW-3* の責任変異を同定するためにターゲットリシーケンシングを行い、候補となる変異を探索した。

【方法と結果】*CW-3* QTL を検出した7頭の種雄牛は、共通祖先由来の優良型ハプロタイプを共有していたため、ハプロタイプの伝達を調べることにより、責任領域を11Mbに限定した。この領域のキャプチャー用アレイ (NimbleGen) を作成し、Illumina GAIIX を用いて、*CW-3* ヘテロ種雄牛3頭、優良型ホモ牛1頭、非優良型ホモ牛3頭のターゲットリシーケンシングを行った (Paired-end run:2 \times 40bases)。CASAVA1.7 を用いてウシゲノムアセンブリ UMD3.1 にアラインメントし、変異検出を行ったところ、*CW-3* の責任候補として1,434個の SNP と112個の Indel が抽出され、うち15個の SNP は、アミノ酸置換を生じるものであった。これらのうち6個の SNP は、*CW-3* ヘテロ種雄牛7頭すべてでヘテロであり、そのうち5個 (3遺伝子) は、一般集団 (枝肉重量上位と下位、計287頭) において枝肉重量と強い関連を示した ($P < 10^{-6}$)。したがって、これらは *CW-3* マーカーとして育種に利用でき、

また、責任変異の有効な候補であると考えられた。

(第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月、横浜)

学会発表 17.

題目：ウシ脂肪細胞において SYPL1 は SLC16A1 量を増やし、酢酸の取り込みを促進する。

発表者：横内 耕¹、秋山敬孝²、佐々木慎二¹、杉本喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²兵庫農総技セ・北部農技セ

要旨：【目的】筋肉内脂肪の蓄積を特徴とする脂肪交雑は、和牛のその優れた肉質と強く関連している。私たちは、脂肪交雑に関わる QTL をウシ染色体 4 番にマッピングし (Yokouchi *et al.*, *Animal Genetics*, 2009)、連鎖不平衡マッピングと遺伝子発現解析によりその領域に位置する *SYPL1* (synaptophysin-like protein 1) を有力な候補遺伝子としてきた。本発表では、培養ウシ脂肪細胞の系で SYPL1 と脂肪交雑の関連性を示す結果を報告する。

【方法】東北大麻生より分与されたウシ筋肉内脂肪前駆体細胞 [Bovine intramuscular preadipocyte (BIP) cells] を用いて、脂肪細胞分化前と分化後における違いを調べた。ウシ *SYPL1* cDNA は pCAG vector (Niwa *et al.*, *Gene*, 1991) に、ノックダウン用標的配列 (585-603bp) は pSilencer vector (Ambion) に入れたプラスミドを調整し、過剰発現とノックダウン実験に使った。トランスフェクションでは Lipofectamine 2000 (Promega) または Nucleofector 2 (Lonza) を用いた。

【結果】ウシ SYPL1 タンパク質は分化前および分化後の BIP 細胞の細胞膜に局在していた。ウシ組織では筋肉内脂肪に局在し、周辺の筋肉組織には見られなかった。ウシの脂肪合成の炭素源はグルコースより専ら酢酸なので、SYPL1 の酢酸取り込みにおける効果を調べた。SYPL1 を過剰発現させると分化した BIP 細胞における酢酸の取り込みは増加し、ノックダウンさせると減少した。阻害剤を使った実験で BIP 細胞の酢酸トランスポーターは SLC16A1 と判明し、SYPL1 の発現増加に対応して SLC16A1 量が増加した。SYPL1 の発現増加により SLC16A1 発現が増加し、酢酸取り込みが増えることで脂肪交雑が亢進すると考えられる。

(第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月、横浜)。

学会発表 18.

題目：Cortactin binding protein 2 N-terminal-like はウシ受胎率に関与する

発表者：杉本真由美¹、杉本喜憲²

所属：¹家畜改良センター、²畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】近年、乳用牛の泌乳能力は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。その改善のため、受胎率に関与する遺伝子の同定を試みた。

【方法と結果】4,362 頭のホルスタイン雌牛について、受胎率育種価が 42 %以下の個体 192 頭及び 51%以上の個体 192 頭を選抜し、ウシ 50K SNP チップを用いて解析した。その結果、受胎率に関与する SNP は、第 3 番染色体に 2 カ所、第 5、13、18、28 番染色体にそれぞれ 1 カ所ずつ存在した ($P < 1E-06$)。このうち、第 3 番染色体セントロメア側に存在した SNP

は Cortactin binding protein 2 N-terminal-like (CTTNBP2NL) の 22bp 下流に位置し、高受胎率の個体では G を、低受胎率の個体では A を有することが多かった。CTTNBP2NL の全てのエキソンにおいて他に SNP は存在しなかったため、1,531 頭のウシについて G+22A の型判定を行ったところ、G/G の平均受胎率±標準誤差は 47.3±0.2%、G/A は 46.5±0.1%、A/A は 45.5±0.2%と有意な差が見られ ($P=2E-09$)、その寄与率は 3.5%であった。そこで、この SNP を含む配列を Luciferase vector に挿入し、その活性を比較したところ、A を含む配列は G を含む配列より 2.2 倍活性が強いことが分かった ($P=0.01$)。CTTNBP2NL は PP2A の catalytic subunit と結合することが報告されているため、CTTNBP2NL を過剰発現させた細胞において PP2A 活性を測定したところ、有意に活性を促進することが分かった ($P=3E-05$)。PP2A は Connexin 43 の脱リン酸化を担うことが知られている。Connexin 43 は gap junction を構成する蛋白であり、gap junction は卵胞と顆粒膜細胞間の物質伝達等妊娠成立においても重要な働きを担っている。CTTNBP2NL は Connexin 43 の脱リン酸化の調節を介して、受胎に影響を及ぼしているのかもしれない。

(日本分子生物学会第 34 回大会、2011 年 12 月、横浜)

学会発表 19.

題目：ターゲットリシーケンシングによるウシ第 14 番染色体上の枝肉重量 QTL (*CW-1*) の責任変異の同定

発表者：¹高須賀晶子、¹西村翔太、¹渡邊敏夫、²溝下和則、³龍田 健、¹杉本喜憲

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²鹿児島肉改研、³兵庫農総技セ

要旨：【目的】私たちは、以前に、黒毛和種の半きょうだい家系を用いた QTL 解析によって、複数の家系の第 14 番染色体上に枝肉重量 QTL (*CW-1*) を検出し、共祖性 (identical-by-descent) ならびに連鎖不平衡マッピングによって責任領域を 1.1Mb に狭めた。その後、黒毛和種一般集団 1,156 頭を用いた 50K SNP チップによるゲノムワイド関連解析で、枝肉重量との最も強い関連を第 14 番染色体上に見いだしたが、この SNP ($P=1.03E-12$) は、上記で狭めた責任領域より約 1Mb セントロメア側に存在したため、再度解析を行い、責任変異を同定した。

【方法・結果】最も強い関連を示した SNP 周辺についてハプロタイプ比較と連鎖不平衡マッピングを行い、以前に特定した領域と比較した結果、*CW-1* は当該 SNP を含む約 1Mb の領域に修正された。この領域について、*CW-1* ヘテロ種雄牛 3 頭、非優良型ホモ牛 1 頭、優良型ホモ種雄牛 3 頭を用いてターゲットリシーケンシングを行い、検出した変異のうち、アミノ酸置換 SNP 1 個と、生物種間で配列の保存性の高い領域に存在する変異 8 個 (PhastCons の値が 0.9 以上) について、枝肉重量との関連を調べた。その結果、最も関連が強かったのは、Karim ら (*Nature Genetics*, 2011) が体高 QTL の責任変異として同定した *PLAG1-CHCHD7* 遺伝子間の変異であり、これが *CW-1* の責任変異と考えられた。黒毛和種の優良型ハプロタイプは、彼らの用いたホルスタインとジャージーの F1 種雄牛の優良型、非優良型ハプロタイプのモザイクになっており、両者の優良型アリルは責任変異のみが一致

していた。

(第 20 回国際植物動物ゲノム学会、2012 年 1 月、米国)

学会発表 20.

題目：黒毛和種・雌牛の受胎率を低下させる遺伝的要因の解明

発表者：佐々木慎二¹、揖斐隆之²、松橋珠子³、池田省吾⁴、小林直彦³、杉本喜憲¹

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²岡大、³岐阜畜研、⁴鹿児島肉改研

要旨：【目的】受胎率は、雌牛の生産効率に影響を与える主な要因であるが、黒毛和種において年々低下する傾向にある。そこで、本研究では黒毛和種・雌牛の受胎率を低下させる遺伝的要因の探索を行った。

【方法】黒毛和種、雌牛約 1 万頭の 4 産目までの受胎記録を収集し、受胎率上位、下位 15% に含まれる 439 頭から DNA を抽出し、50K ビーズアレイを用い SNP 型判定を行った後、関連解析を EMMAX プログラムで行った。

【結果】第 2 番染色体に 2 カ所有意な SNP を検出した ($P=1E-06$ 、 $OR=1.9$)。2 つの SNP は 200kb の LD ブロックを形成し、LD ブロック内には 2 つの遺伝子 (CR4-1、CR4-2) が存在した。そこで、2 つの SNP と LD にある多型を探索した結果、CR4-1 の予想転写開始点から -186bp に 3 塩基欠損、-162bp に SNP が検出された。非優良型は優良型に対して、約 3.7% 受胎率を低下させる効果があり、全遺伝分散に占める割合は約 10% であった。そこで、CR4-1 の開始コドンからこれら 2 つの多型を含む -800bp をレポータープラスミドに組み込みレポーター解析を行った結果、非優良型ハプロタイプは優良型ハプロタイプに比べ、約 0.85 倍レポーター活性が低かった。これらの結果から、黒毛和種における CR4-1 のプロモーター領域の多型が、CR4-1 遺伝子の発現量の低下を引き起こし、受胎率を低下させると考えられた。

(日本畜産学会第 115 回大会、2012 年 3 月、名古屋)

学会発表 21.

題目：黒毛和種繁殖雌牛の繁殖成績に対する *GRIA1* 遺伝子の遺伝子型の効果

発表者：¹松橋珠子、²杉本真由美、³佐々木慎二、¹小林直彦、³平野 貴、¹坂口慎一、³杉本喜憲、¹北 和夫：

所属：¹岐阜畜研、²家畜改良センター、³畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】雌牛の繁殖成績は子牛や牛乳の生産効率に影響を与える重要な形質だが、近年では受胎率の低下や分娩間隔の延長が報告され、対策が課題となっている。杉本ら (*PLoS ONE*, 2010) は和牛の排卵数に影響する遺伝子としてグルタミン酸受容体 (*GRIA1*) を同定し、エキソン 7 で検出された SNP (G62483696A) を責任 SNP と同定した。*GRIA1* は脳内の神経伝達物質受容体のひとつで、排卵数を増加させる *GRIA1* の G 型は性腺刺激ホルモンの産生量も増加させることから、繁殖能力を高めている可能性が考えられた。そこで本研究では、雌牛の繁殖成績一般との関連を調べた。

【方法】岐阜県内の繁殖農家に繋養されている黒毛和種繁殖雌牛 770 頭の繁殖成績と血液を収集し、DNA を抽出してサンガー法によるシーケンシングで遺伝子型を判定した。

【結果】*GRIA1* の遺伝子型頻度は AA 型 0.097、GA 型 0.506、GG 型 0.396 だった。初産月齢 (AA 型>GG 型、 $P<0.01$)、平均分娩間隔 (AA 型>GG 型、 $P<0.05$)、子牛生産指数 (GG 型>GA 型、 $P<0.001$) で遺伝子型間に差が認められた。GG 型は AA 型に比べ初産月齢は 1.0 カ月早く、平均分娩間隔は 13 日短く、子牛生産指数は 0.15 頭分高かった。以上より、いくつかの繁殖形質は *GRIA1* の遺伝子型と関連がある可能性が示された。

(日本畜産学会第115回大会、2012年3月、名古屋。)

学会発表 22.

題目：黒毛和種ゲノムリシーケンシングデータから抽出したアミノ酸非同義置換の評価

発表者：渡邊敏夫、平野貴、高須賀晶子、杉本喜憲

所属：畜技協・動物遺伝研

要旨：【目的】我々は黒毛和種 52 頭のゲノム DNA から、約 1,708 億塩基 (約 60 倍ゲノム量) のリシーケンシングデータを得、ウシゲノム配列にマップすることで 459 万個の SNP 候補を得た (平野ら、日本畜産学会第 114 回大会)。このうちアミノ酸非同義置換を伴うものについて、評価ソフトウェアによりタンパク質の機能に与えるダメージを網羅的に評価し、経済形質等の QTL 変異および潜在的な遺伝病の原因変異の候補を得ることを試みた。

【方法】UMD3.1 上にマップされたウシ RefSeq のアミノ酸コード領域に存在する SNP のうち非同義置換を PolyPhen-2 により評価し、タンパク質の機能に与えるダメージの可能性を分類した。

【結果】RefSeq17,960 件のうち、ゲノム上の塩基長と RefSeq アミノ酸長とに矛盾がある 2,035 件を除いた残り 15,925 件のアミノ酸コード領域に存在する SNP は 55,694 個であった。そのうち非同義置換は 26,039 個あり、停止コドンへの変異 306 個、停止コドンからアミノ酸への変異 58 個を除いた 25,726 個を PolyPhen-2 で評価したところ、「良性」19,760 個、「ダメージの可能性あり」2,375 個、「ダメージの可能性大」2,142 個および「評価不能」1,449 個であった。ダメージの可能性が高い変異の一部についてサンガー法により変異の確認を行ったのでその結果について報告する。

(第 115 回日本畜産学会大会、2012 年 3 月、名古屋)

学会発表 23.

題目：黒毛和種に見られる子牛虚弱症候群のエキソーム解析

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

所属：¹畜技協・動物遺伝研、²岐阜県畜産研

要旨：【目的】生後 3 ヶ月以内の子牛死亡や廃用 (子牛損耗) は、国内の肉用種、乳用種に関わらず、4~8%の頻度で発生し、大きな損失となっている。子牛虚弱症候群は、黒毛和種の子牛損耗原因の約 20%を占めると考えられ、遺伝的背景も疑われている。我々は、父方半き

ようだい家系を用いて、ホモ接合マッピングを行い、子牛虚弱症候群の原因領域を第8染色体に特定した(第12回動物遺伝育種学会)。今回我々は、この領域から原因変異を同定するために、エキソーム解析を試みた。

【方法】ウシのエキソーム解析を行うために、174,377個のエキソンをターゲットとした、ウシエキソンキャプチャーアレイ(NimbleGen)を作成した。虚弱牛2頭および正常牛2頭について、エキソームシーケンシング用ライブラリーを作成し、Genome Analyzer IIX(イルミナ社)を用いて、40bases×2のPaired-endシーケンシングを行った。検出されたアミノ酸置換変異のタンパク機能への影響は、PolyPhen-2およびSIFTを用いて予測した。

【結果】各個体のハプロタイプから予測されるアレル型と一致し、遺伝子機能に影響すると予測される3つのSNPが検出された。これらのうち、*IARS* c.235G>C (p.Val79Leu)は、正常牛集団(1,793頭)に変異型ホモ個体は存在せず、さらに、この変異に伴うVal79Leu置換は、種を超えて保存された残基であることから、この子牛虚弱症候群の原因であると考えた。この塩基置換は制限酵素 *Hinc*-IIを用いたPCR-RFLP法により判別可能であり、この方法を用いた遺伝子診断が可能である。

(日本畜産学会第115回大会、2012年3月、名古屋)

学会発表 24.

題目：ウシ第8番染色体上の枝肉重量QTL (*CW-3*)の責任変異の絞り込み

発表者：高須賀晶子¹、渡邊直人²、藤田達男²、中村亮一³、鈴木晶夫⁴、岡部 裕⁵、田淵一郎⁶、大坪利豪⁷、齋藤陽介⁸、高野 淳¹、西村翔太¹、平野 貴¹、渡邊敏夫¹、杉本喜憲¹
所属：¹畜技協・動物遺伝研、²大分県農水研セ、³島根県畜技セ、⁴青森県産技セ、⁵長崎県肉改セ、⁶鳥取県農総研畜試、⁷佐賀県畜試、⁸宮城県畜試

要旨：【目的】黒毛和種半きようだい家系解析ならびにゲノムワイド関連解析により検出した第8番染色体上の枝肉重量QTL (*CW-3*)について責任領域11Mbのターゲットリシーケンシングを行い、うちアミノ酸置換を生じる変異について調べたところ5個のSNPが枝肉重量と強い関連を示した。本研究では、これら5個のうち1つをヘテロでもつ種雄牛の産子を用いた関連解析により責任変異を絞り込んだ。

【方法と結果】アミノ酸置換を生じる5個のSNPのうち4個は50kb以内に存在し、残り1個(SNP-A)は約1Mb離れて存在した。SNP-Aについて優良型・非優良型アレルをヘテロで持ち他4個について非優良型をホモでもつ種雄牛の産子128頭において、SNP-A遺伝子型と枝肉重量は有意に関連した($P<0.01$)。この種雄牛は、SNP-A周辺に*CW-3*優良型ハプロタイプと共通のハプロタイプを有しており、責任領域を約1.7Mbに、責任候補となるアミノ酸置換SNPは1個に限定できると考えられた。

(日本畜産学会第115回大会、2012年3月、名古屋)

学会発表 25.

題目：広島県産牛における*EDG1*遺伝子型と枝肉形質との関連性について

発表者：今井佳積¹、松井茉由¹、平野 貴²、山田宣永、吉上渉¹

所属：¹広島総技研畜技セ、²畜技協・動物遺伝研、³新潟大農

要旨：【目的】ウシの *EDG1* 遺伝子は脂肪交雑責任遺伝子候補として研究が進められており、*EDG1* の SNP (+166A/G) が大分、鳥取および兵庫系統の黒毛和種集団で BMS と関連することが報告されている。本研究では、広島県産牛について、*EDG1* (+166A/G) 遺伝子型と枝肉形質との関連性を調査し、広島牛改良における *EDG1* 遺伝子型の有効性を検討した。

【方法】広島県産種雄牛 96 頭、繁殖雌牛 35 頭、県内共励会等出品肥育牛 367 頭の *EDG1* 遺伝子型判定を行った。各遺伝子型は、制限酵素 *MscI* を用いた PCR-RFLP 法によって決定し、GG 型（優良型ホモ）、AG 型および AA 型に分類し、遺伝子型頻度を調査した。種雄牛と繁殖雌牛では枝肉形質 5 形質（枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚、皮下脂肪厚および BMS）の育種価、肥育牛では前述 5 形質の格付成績と遺伝子型との関連性を分散分析法により検討した。

【結果】各遺伝子型頻度は、種雄牛 AA:51.0%,AG:41.7%,GG:7.3%、繁殖雌牛 AA:40.0%,AG:48.6%,GG:11.4%、肥育牛 AA:37.6%,AG:43.6%,GG:18.8%であった。分散分析による遺伝子型の効果は、いずれの牛群でも BMS の育種価と格付成績には認められなかったが、種雄牛と繁殖雌牛群で枝肉重量の育種価に GG 型のプラス効果が認められた ($P<0.05$)。今後、血統や肥育農家等の影響を考慮し、*EDG1* 遺伝子の効果を再検討する予定である。

（日本畜産学会第 115 回大会、2012 年 3 月、名古屋）

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 22 年度事業成果についての第 1 回の委員会は平成 23 年 4 月 27 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、22 年度の実施概況について
- ②平成 23 年度実施計画について
- ③その他

第 2 回の委員会は平成 24 年 3 月 9 日東京で開催され、本事業の平成 20 年度から 23 年度までの 4 年間の事業成果についての評価が行われた。議事内容は次の通りであった。

- ①本事業の事業実施概況について
- ②本事業の評価について
- ③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高い評価を受けた。

○ 肉用牛ゲノム研究・開発推進委員会委員

小畑 太郎	社団法人 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	岡山大学大学院 自然科学研究科 教授
新山 正隆	社団法人 家畜改良事業団 相談役
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	社団法人 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	(独立行政法人 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	社団法人 全国和牛登録協会 会長
矢野 秀雄	独立行政法人 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) 黒毛和種・雌牛の繁殖効率に関するゲノム解析
- (b) 黒毛和種脂肪交雑 QTL (*Marbling-3*) の責任遺伝子 *SYPL1* の解析
- (c) 子牛損耗解析-エキソームシーケンシング法を用いた子牛虚弱症候群の解析
- (d) ジェノタイプインピューテーションによる 7 つの半きょうだい家系を合わせた QTL 解析
- (e) 高密度 SNP チップを用いた枝肉重量のゲノムワイド関連解析と分散成分の推定
- (f) ターゲットリシーケンシングによる枝肉重量 QTL (*CW-1, CW-3*) の責任変異の探索

②講評

○ 肉用牛 DNA 育種技術推進委員会委員

- 居在家義昭 岩手大学 農学部 獣医学科 教授
- 猪子 英俊 東海大学 医学部 分子生命学科 教授
- 菅野 純夫 東京大学大学院 新領域創成科学研究科 教授
- 廣岡 博之 京都大学大学院 農学研究科 教授
- 廣川 治 農林水産省 農林水産政策研究所 国際食料情報分析官
- 美濃部侑三 株式会社 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確立事業」に関わる解析手法確立検討委員会

この委員会は、平成 23 年度から開始する新規の「牛有用ゲノム解析手法高度化事業」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 23 年度以降の研究の方向性について、検討委員会が平成 23 年 7 月 21 日に東京で開催された。検討委員会の議事は次の通りであった。

- ①平成 23 年度牛有用ゲノム解析手法確立事業の概要について
- ②平成 23 年度牛有用ゲノム解析手法確立事業の達成目標について
- ③話題提供

菅野 純夫 先生 (東京大学大学院 新領域創成科学研究科 教授)

演題 ; 「新しいゲノム解析手法・次世代シーケンサー等をめぐって」

④その他

○ 解析手法確立検討委員会委員

- 河原 孝吉 社団法人 日本ホルスタイン登録協会 北海道支局 登録部 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 独立行政法人 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
廣川 治 農林水産省 農林水産政策研究所 国際食料情報分析官

4) 全国 DNA 育種推進会議

この会議は「家畜改良推進事業（DNA 解析手法を活用した評価手法の開発等事業）」に関わる全国推進会議である。平成 23 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、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出席した。

第 1 回の平成 23 年度全国 DNA 育種推進会議は平成 23 年 10 月 6 日動物遺伝研究所で開催された。主要議題は次の通りであった。

- ①動物遺伝研究所が実施する平成 23 年度事業について
- ②「平成 23 年度の計画と進捗状況報告」及び「育種現場における DNA 情報の活用状況と今後について」、「3K SNP チップの解析希望及び QTL マップ更新の日程確認」（動物遺伝研究所）
- ③その他 動物遺伝研究所が行う有用形質の遺伝子診断（有料）について

第 2 回の平成 23 年度全国 DNA 育種推進会議は平成 24 年 2 月 15 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 23 年度の事業成果の報告
- ②事業成果のまとめと今後の研究の進め方について
「平成 23 年度 QTL マップ」、「来年度の計画」
- ③平成 23 年度 第 2 回研修会
「子牛損耗解析-エキソームシーケンシング法を用いた子牛虚弱症候群の解析」
「ターゲットリシーケンシングによる枝肉重量 QTL (CW-3) の責任変異の探索」
「高密度 SNP チップを用いた枝肉重量のゲノムワイド関連解析と分散成分の推定」
- ④その他

5) 研究会等の開催

- ①第 5 回家畜 DNA 西郷シンポジウムを（独）家畜改良センターと開催した。

（開催日：平成 23 年 10 月 7 日、開催場所：（独）家畜改良センター）

【内容】座長：国枝 哲夫（岡山大学大学院 自然科学研究科）

第 1 部 SNP 情報の育種利用

- (1)「なぜ大量の SNP は家畜改良に約立つか？」

長嶺 慶隆（（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）

(2) 「肉用牛の遺伝的評価における SNP マーカー情報の利用とその展望」
祝前 博明 (京都大学大学院 農学研究科)

第 2 部 疾患ゲノム研究の新展開

(3) 「全エキソン配列決定による疾患ゲノム研究」
井ノ上逸郎 (国立遺伝学研究所 人類遺伝研究部門)

(4) 「HCV 陽性肝臓がんの全ゲノム解読」
柴田 龍弘 (国立がん研究センター がんゲノミクス研究分野)

②動物遺伝育種シンポジウム組織委員会による第 17 回シンポジウム「動物ゲノム解析と新たな育種戦略—QTL 研究とその発展」を動物遺伝育種学会・(社)家畜改良事業団と共催した。

(開催日：平成 23 年 11 月 20 日、開催場所：広島大学大学院生物圏科学研究科)

【内容】座長：万年 英之 (神戸大学大学院 農学研究科)

- (1) 「ウシ繁殖性 QTL 解析の新たな展開」
杉本真由美 ((独) 家畜改良センター技術部)
- (2) 「ブタにおける QTL 解析とその利用：遺伝子診断の有効性と今後の展開」
美川 智 ((独) 農業生物資源研究所 農業生物先端ゲノム研究センター)
- (3) 「ニワトリゲノム育種：100 週齢 500 個産卵鶏作出の可能性」
後藤 直樹 ((株) 後藤孵卵場 研究開発本部)
- (4) 「量的形質の遺伝的構造:マウス成長関連形質の QTL 解析から学んだこと」
石川 明 (国立大学法人 名古屋大学 大学院生命農学研究科)
- (5) 「完全養殖時代における QTL 情報を利用した粹さ肉腫の現状と未来」
尾崎 照遵 ((独) 水産総合研究センター 増養殖研究所)

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 23 年度は次の 5 課題を研究及び事業委託した。

1) 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

2) 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

3) 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

4) 北海道における黒毛和種雌牛の繁殖性の遺伝学的研究 (2010 年度より継続)

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場

②委託研究者：鹿島 聖志

5) 但馬牛の繁殖性の分子遺伝学的研究 (2010 年度より継続)

①委託先：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

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
鳥取県農林水産部農林総合研究所 畜産試験場	田淵 一郎	2011.06.13～07.07
山形県農業総合研究センター 畜産試験場	小松 智彦	2011.07.04～07.15
宮崎県畜産試験場	築城 努	2011.07.04～07.15
秋田県農林水産技術センター 畜産試験場	鈴木 盛栄	2011.08.22～09.09
鳥取県農林水産部農林総合研究所 畜産試験場	田淵 一郎	2011.09.06～09.22
岐阜県畜産研究所	松橋 珠子	2011.09.12～09.30
鹿児島県肉用牛改良研究所	干場 浩	2011.10.11～10.28
宮崎県畜産試験場	築城 努	2011.10.11～10.21
熊本県農業研究センター 畜産研究所	稲永 敏明	2011.10.17～10.28
青森県産業技術センター 畜産研究所	鈴木 晶夫	2011.10.31～11.11
鳥取県農林水産部農林総合研究所 畜産試験場	田淵 一郎	2011.11.28～12.15
佐賀県畜産試験場	山下 大司	2011.11.28～12.16
山形県農業総合研究センター 畜産試験場	小松 智彦	2012.01.10～01.17
宮城県畜産試験場	齊藤 陽介	2012.01.10～01.20
宮崎県畜産試験場	築城 努	2012.01.20～01.26
大分県農林水産研究指導センター 畜産研究部	衛藤 央好	2012.01.23～02.03
岐阜県畜産研究所	松橋 珠子	2012.01.30～02.23
山形県農業総合研究センター 畜産試験場	小松 智彦	2012.02.06～02.08
鹿児島県肉用牛改良研究所	池田 省吾	2012.02.13～02.24
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	2012.02.13～02.24
島根県畜産技術センター	中村 亮一	2012.02.16～03.02
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	2012.02.21～03.02
秋田県農林水産技術センター 畜産試験場	鈴木 盛栄	2012.02.24～03.02
鳥取県農林水産部農林総合研究所 畜産試験場	田淵 一郎	2012.03.05～03.16
地方独立行政法人北海道立総合研究機構 畜産試験場	内藤 学	2012.03.14～03.30
計	25 人	延べ 351 人日

第 3 節 總 務

第3節 総務

1. 職員名簿（2012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；本年度該当者なし

2) 職員の退職・退任；本年度該当者なし

3. 職員の海外出張

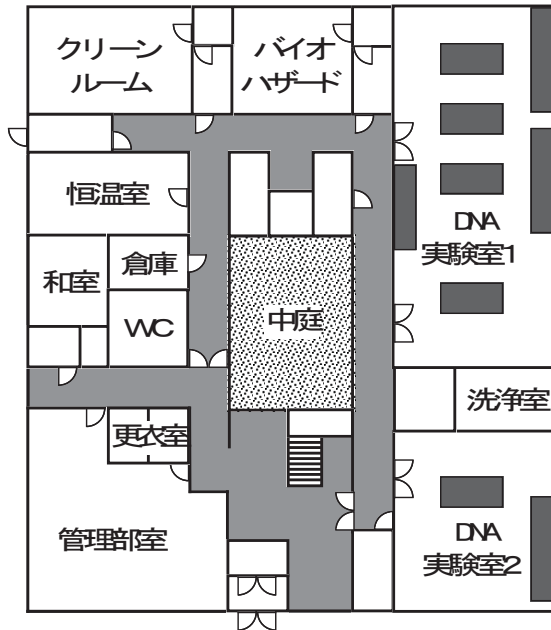
氏 名	出張先	期 間	用 務
佐々木慎二	米国	2011.07.3 ～08.05	米国ポートランド市で開催された「44th Annual Meeting of the Society for Study of Reproduction」に参加
高須賀晶子	米国	2012.01.13 ～01.20	米国サンディエゴ市で開催された第20回植物・動物ゲノム学会（Plant & Animal Genome XX）に参加
渡邊 敏夫	米国	2012.01.13 ～01.20	米国サンディエゴ市で開催された第20回植物・動物ゲノム学会（Plant & Animal Genome XX）に参加

4. 施設・機器の整備

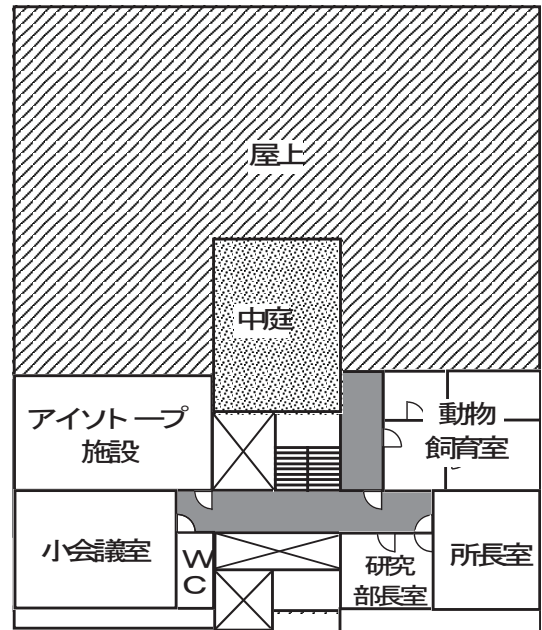
1) 施設

研究施設の平面図は以下の通り。

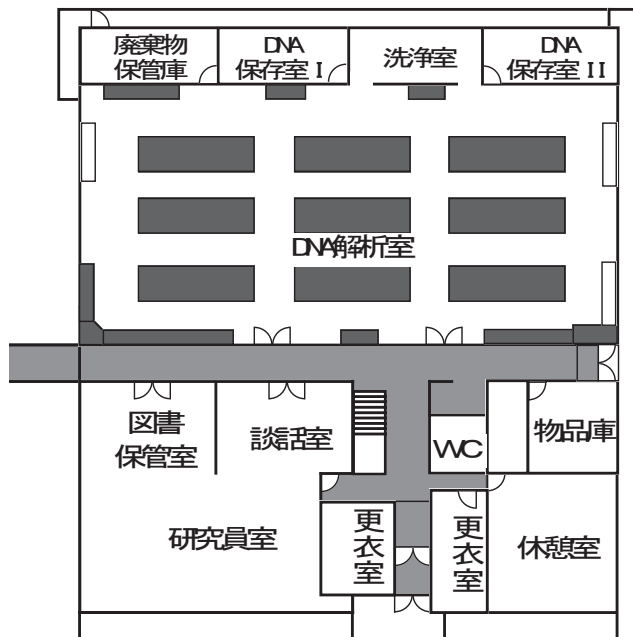
本館 1 階 (742 m²)



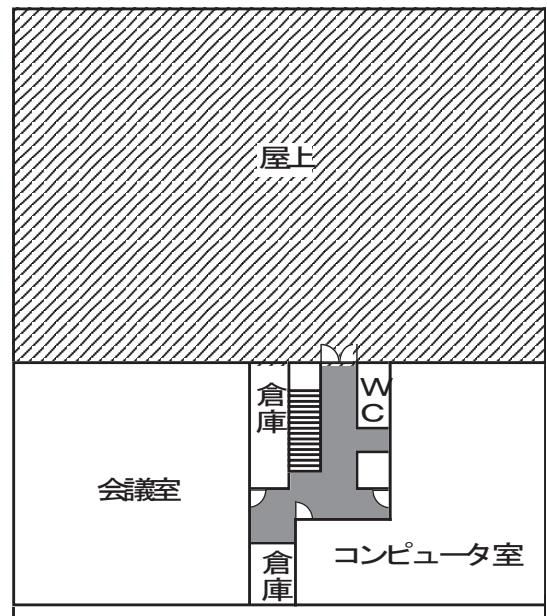
本館 2 階 (258 m²)



別館 1 階 (788 m²)



別館 2 階 (306 m²)



2) 2011 年度購入の主要機器 (単価百万円以上)

機 器 名	式 数
低速冷却遠心機 (トミー社製 CAX370)	1
ルミノ・イメージアナライザー (Image Quant LAS4000)	1
SNP 解析用コンピュータ (DELL 社製 Precision T7500)	1

5. 購読雑誌一覧

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

第 4 節 資 料



The SNP c.1326T>G in the *non-SMC condensin I complex, subunit G (NCAPG)* gene encoding a p.Ile442Met variant is associated with an increase in body frame size at puberty in cattle

K. Setoguchi*, T. Watanabe[†], R. Weikard[‡], E. Albrecht[§], C. Kühn[‡], A. Kinoshita*, Y. Sugimoto[†] and A. Takasuga[†]

*Cattle Breeding Development Institute of Kagoshima Prefecture, Osumi, So, Kagoshima 899-8212, Japan. [†]Shirakawa Institute of Animal Genetics, Japan Livestock Technology Association, Odakura, Nishigo, Fukushima 961-8061, Japan. [‡]Research Unit Molecular Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), 18196 Dummerstorf, Germany. [§]Research Unit Muscle Biology and Growth, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), 18196 Dummerstorf, Germany

Summary

Recently, we had located a bovine carcass weight QTL, *CW-2*, to a 591-kb interval on BTA6 and have identified the SNP c.1326T>G in the *NCAPG* (*non-SMC condensin I complex, subunit G*) gene that leads to the amino acid change p.Ile442Met in the NCAPG protein, which is a candidate causative variation. Here, we examined the association of the *NCAPG:c.1326T>G* locus with linear skeletal measurements of growth-associated traits during adolescence, which is a period of intensive growth, using two historically and geographically distant cattle populations: 792 Japanese Black steers and 161 F₂ bulls of an experimental cross from Charolais and German Holstein. In both populations, the SNP *NCAPG:c.1326T>G* was associated with each component of body frame size: height, length and width at puberty. The associations of *CW-2* with height- and length-associated traits were observed at an earlier growth period compared to the associations with thickness- and width-associated traits, indicating that the primary effect of the *CW-2* QTL may possibly be exerted on skeletal growth. The significant associations of the *NCAPG:c.1326T>G* locus with growth-associated skeletal measurements are similar to the effects of the syntenic region on human chromosome 4 that are associated with adult height in humans, supporting the hypothesis that *CW-2* is analogous to the human locus and pointing to a conserved growth-associated locus or chromosomal region present in both species.

Keywords body frame, carcass weight, growth, *LCORL*, *NCAPG*.

Carcass meat weight is an economically important trait in livestock. QTL mapping studies have detected many loci for carcass weight or growth-associated traits in livestock (e.g. Cattle QTLdb, <http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/index>), while only a few SNPs causal for the loci (quantitative trait nucleotides, QTNs) have been successfully identified. Those SNPs were within genes with well-known functions in muscle cell growth across species, such as *myostatin* (Clop *et al.* 2006) and *IGF2* (Van Laere *et al.* 2003).

Recently, we located a QTL for body or carcass weight in cattle, *CW-2*, to a 591-kb interval on bovine chromosome 6

(BTA6) and identified a variant in the *NCAPG* (*non-SMC condensin I complex, subunit G*) gene, *NCAPG:c.1326T>G*, which causes the amino acid change p.Ile442 as a candidate causative variation (Setoguchi *et al.* 2009). Additional support for the relevance of the bovine *NCAPG* gene region was obtained from a powerful whole-genome association study in cattle, which reported a highly significant association of a chromosomal haplotype comprising the *NCAPG* gene on body weight at different time points (Snelling *et al.* 2010). Furthermore, in another population, significant QTL for birth weight, body length at birth and total bone proportion estimated after commercial carcass dissection was detected in the same chromosomal region (Gutiérrez-Gil *et al.* 2009). Finally, in a further cattle population, an association of the mutation *NCAPG:c.1326T>G* with birth weight and body weight (Eberlein *et al.* 2009; Weikard *et al.* 2010) added further evidence that the *NCAPG:c.1326T>G* mutation may underpin the *CW-2* QTL.

Address for correspondence

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

Accepted for publication 10 January 2011

Powerful genome-wide association studies (Gudbjartsson *et al.* 2008; Weedon *et al.* 2008) have previously described the association of the syntenic region on human chromosome 4 with adult human height. In those studies, SNPs in the *LCORL* gene that comprise a linkage disequilibrium (LD) block with SNPs located in the *NCAPG* gene were found to be associated with adult height. Recent studies (Soranzo *et al.* 2009; Sovio *et al.* 2009) showed associations of SNPs located in this region with human trunk and hip axis lengths and with peak height velocity in infancy. The association analyses and QTL studies for body size-related traits in different species unexpectedly pointed to a small syntenic region as a novel growth-associated locus. However, it is not clear whether *CW-2* in cattle is identical to the human height-associated locus, because the traits that have been examined in the two species were not the same, and the associated LD blocks contain several genes in both species (Weedon & Frayling 2008; Setoguchi *et al.* 2009). Therefore, the aim of this study was to examine whether *NCAPG:c.1326T>G* is associated with linear skeletal measurements of growth-associated traits during adolescence in cattle.

This association study was performed in two historically and geographically distant cattle populations, Japanese Black and an experimental cross from Charolais and German Holstein. The Japanese Black population consisted of 792 steers was taken from a progeny testing programme (family size was restricted to eight offspring steers per sire) at the Cattle Breeding Development Institute of Kagoshima Prefecture from 1997 to 2007. All individuals were kept and traits were recorded according to the official testing programme of the Japan Wagyu Register Association (Oikawa *et al.* 2000). The average age at start of progeny test was 271 (± 12) days. The steers were given *ad libitum* access to concentrate (TDN 73.0%, CP 12.0%), roughage (Timothy, *Phleum pratense*) and water. Body weight, linear skeletal measurements (withers height, body length, chest width, rump length and hip width) and gains were taken every 8 weeks by the persons in charge during the test period (364 days). Heritability estimates of these traits were 0.45–0.66 (Table S1). The F_2 resource population generated from the founder breeds Charolais and German Holstein has been described previously (Kühn *et al.* 2002). The SNP *NCAPG:c.1326T>G* was not fixed in the founder breeds, although the allele frequencies in Charolais and German Holsteins differed substantially (Eberlein *et al.* 2009). After birth, calves were immediately taken from their mothers and fed a milk replacer/hay/concentrate diet until day 121, followed by a semi *ad libitum* feed ration of concentrates and chaffed hay with a hay to concentrate ratio of 1:3 and an energy content of 12.7 MJ ME/kg dry matter until slaughter at 18 months of age. For this study, 161 F_2 bulls were measured for body length, chest width and withers height at 6, 12 and 18 months of age.

Genomic DNA was extracted from blood or adipose tissue according to standard protocols. Genotypes of the SNP

NCAPG:c.1326T>G in exon 9 of the *NCAPG* gene were determined according to Setoguchi *et al.* (2009) and Eberlein *et al.* (2009). The G-allele increased carcass and birth weight in the previous studies, and this corresponds to the Q allele of *CW-2*.

Analyses were performed to evaluate whether locus *NCAPG:c.1326T>G* was associated with the phenotypes by applying the following models:

$$y_i = s_d + a_i + b_i + d_s + \lambda_i g + u_i + e_i \quad (1)$$

and

$$y_i = s_d + \lambda_i g + u_i + e_i \quad (2)$$

for the Japanese Black population (1) and the F_2 resource population of Charolais \times German Holstein (2). Here, y_i is the phenotypic value of individual i , s_d is the fixed effect of the test year (Japanese Black) or slaughter year d (Charolais \times German Holstein), a_i and b_i are the fixed effects of the individual i 's age (days) and the squared age, respectively, and d_s is the fixed effect of season s (summer or winter). λ_i is an indicator variable, which is 1, 0 or -1 depending on the genotype of individual i at locus *NCAPG:c.1326T>G*, g is the additive allelic effect, u_i is the random polygenic effect of individual i and assumed to distribute $N(0, A \sigma_a^2)$ where A is the numerator relationship matrix and σ_a^2 is the additive polygenic variance, and e_i is the residual. The pedigree of Japanese Black steers was traced back to 3 or 4 generations and included 305 founder and 3540 non-founder animals. The allele substitution effect was calculated as an estimate of g . The proportion of variance explained by the genotype at locus *NCAPG:c.1326T>G* was calculated as $R^2 = (V_0 - V_1)/V_0$, where V_0 and V_1 are estimated total variance (residual variance + polygenic variance) without and with the effect of the genotype at locus *NCAPG:c.1326T>G*, respectively. For the time-course analysis, the same model was used, but y_i was the gain of phenotypic values in the time interval, and age (days) was used that of the endpoint of the time interval. These calculations were performed using Qxpack (Perez-Enciso & Misztal 2004).

The frequency of the allele *NCAPG c.1326 G* (*NCAPG 442Met*) was 0.40 in Japanese Black and 0.49 in the Charolais \times German Holstein cross population. In both populations, the allele increasing carcass weight was also associated with each component of the body frame, length, width and height at the time point corresponding to puberty in the respective populations (the middle of the test period at approximately 15 months of age or 12 months of age, respectively) (Tables 1 and S1). For withers height, a very strong association was observed at the end of the test period, and the effect explained by *NCAPG:c.1326T>G* amounted to 15.1% and 26.5% of the phenotypic variance, respectively (Table 1). A dominance effect was not observed for any traits ($P > 0.10$), indicating that only additive effects of

Table 1 Phenotypic data and estimated effects of NCAPG:c.1326T>G on linear measurements.

Trait ¹	792 Japanese Black steers						161 F ₂ bulls generated from Charolais and German Holstein							
	Age (months) ²	Average	SD	P-value	Allele substitution effect NCAPG: c.1326T>G (cm)	Standard error allele substitution effect (cm)	% variance explained by NCAPG: c.1326T>G	Age (months)	Average	SD	P-value	Allele substitution effect NCAPG: c.1326T>G (cm)	Standard error allele substitution effect (cm)	% variance explained by NCAPG: c.1326T>G
Body length	9	122.0	4.7	<0.001	1.56	0.23	5.3	6	114.9	6.1	n.s.			
	15	142.2	4.8	<0.001	2.39	0.24	10.7	12	145.9	6.7	0.0034	1.85	0.621	4.1
	21	155.2	5.2	<0.001	2.80	0.25	12.4	18	161.3	7.7	n.s.			
Hip width	9	35.0	1.7	<0.001	0.36	0.08	2.1							
	15	44.1	1.9	<0.001	0.76	0.10	6.4							
	21	51.7	2.4	<0.001	0.74	0.12	4.0							
Chest width	9	35.5	2.7	n.s.				6	36.2	3.3	0.0024	0.95	0.307	4.2
	15	46.0	2.8	<0.001	0.50	0.13	1.7	12	53.2	4.1	<0.001	1.68	0.363	8.5
	21	54.9	2.9	<0.001	0.72	0.14	3.0	18	60.9	4.8	n.s.			
Withers height	9	115.1	2.8	<0.001	0.91	0.14	4.8	6	103.9	3.9	n.s.			
	15	127.8	3.1	<0.001	1.60	0.15	11.9	12	124.6	4.0	<0.001	1.57	0.358	7.9
	21	136.7	3.5	<0.001	2.05	0.16	15.1	18	134.4	4.1	<0.001	2.06	0.376	26.5

n.s., not significant.

¹The data for other linear measurements in Japanese Black population are shown in Table S1.

²Nine, 15 and 21 months of age correspond to the beginning, the middle (24 weeks) and the end (52 weeks) of the test period.

NCAPG:c.1326T>G for each trait were present. In agreement with results from human studies, where the locus affecting adult height was associated with trunk and hip axis lengths (Soranzo *et al.* 2009), the bovine *NCAPG:c.1326T>G* was significantly associated with the corresponding skeletal measurements, body length and hip width (Table 1), supporting the hypothesis that *CW-2* may be analogous to the human locus that is associated with skeletal growth.

Time-courses for linear skeletal measurement gains and allele substitution effects of *NCAPG:c.1326T>G* in the Japanese Black population were largest at 0–8 weeks of the test period for length (body and rump length) and height (hip and withers height) measurements and gradually decreased along the test period, while those for thickness (chest girth and depth) and width (pin-bone width) peaked at the interval 8–16 weeks of the test period (Fig. 1; Figure S1). In humans, it is well known that there are two stages of fast growth, at infancy and puberty: peak height velocity (PHV1 and 2) followed by peak weight velocity (PWV1 and 2) (Tanner *et al.* 1966). In Japanese Black cattle, the largest gains in length and height in the 0–8 weeks test period corresponded to PHV2, and the peaks of gains in thickness and width corresponded to PWV2, indicating that *NCAPG:c.1326T>G* was associated with PHV2 and PWV2. The latter was consistent with the time-course of average

daily gain and the change of the allele substitution effect of the *NCAPG:c.1326T>G* locus described for the Japanese Black and the Charolais × German Holstein populations (Weikard *et al.* 2010). In the Charolais × German Holstein cross population, the mutation *NCAPG:c.1326T>G* was associated with birth weight (Eberlein *et al.* 2009), while an association with average daily gain was not significant during the period from birth to day 121 ($P = 0.42$) but became highly significant during the period from day 183 to day 273 ($P = 3.4 \times 10^{-6}$) (Weikard *et al.* 2010), indicating that *NCAPG:c.1326T>G* was associated with both prenatal growth and growth at puberty, corresponding to PWV1 and PWV2, respectively. Our data from two historically and geographically distant cattle populations support, (a) that *NCAPG:c.1326T>G* is associated with skeletal measurements in bovines similar to those in humans, (b) that the associations are preferentially observed during puberty, and (c) the hypothesis that the bovine *CW-2* locus is analogous to the human adult height-associated locus that has been shown to be associated with PHV1 (Sovio *et al.* 2009).

In our study, we showed that *NCAPG:c.1326T>G* is associated with body frame size, and we observed that during adolescence, the associations with length- and height-associated traits temporally preceded those with thickness- and width-associated traits, suggesting that the primary effect of *CW-2* may be exerted on skeletal growth.

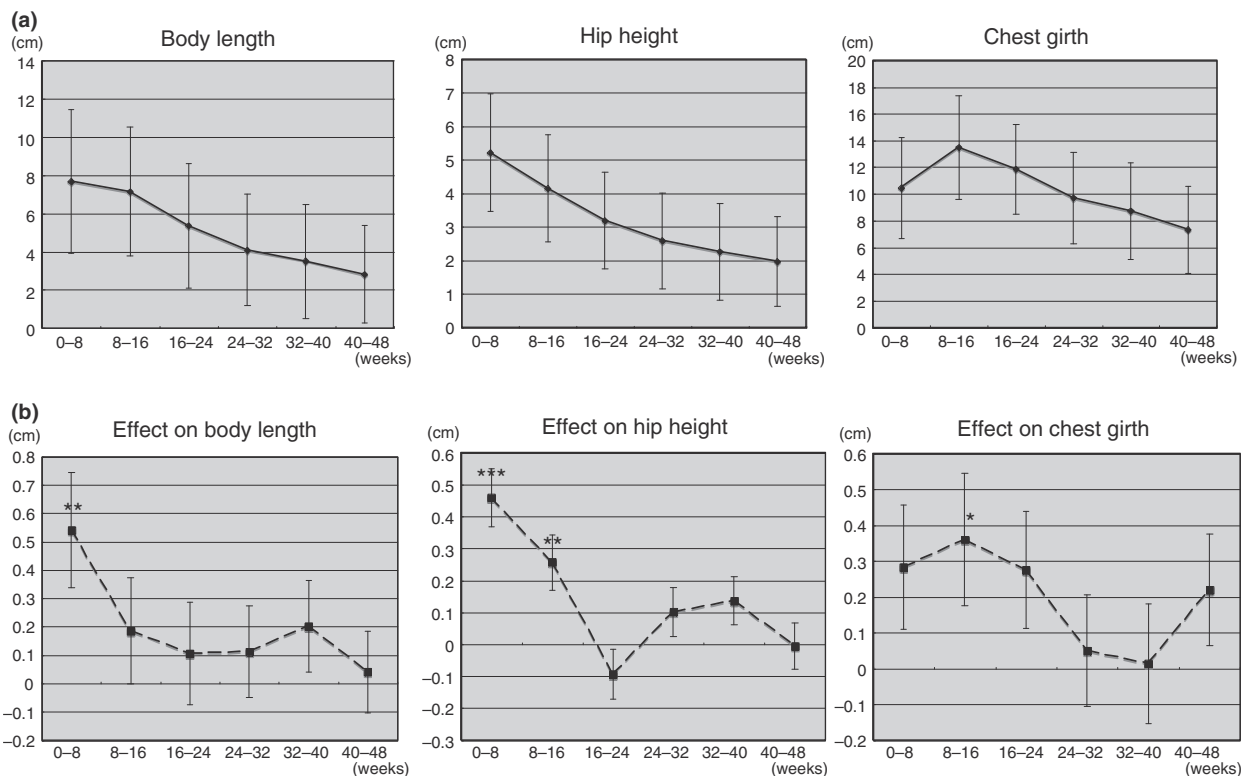


Figure 1 Gain for three dimensions of linear skeletal measurements and allele substitution effects of *NCAPG:c.1326T>G* in the Japanese Black population. Average gain \pm standard deviation of linear skeletal measurements (a) and allele substitution effect (*NCAPG:c.1326T>G*) \pm standard error (b) were shown in each interval of the test period. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

This hypothesis is supported by the results of Gutiérrez-Gil *et al.* (2009), who found that the carcass-related QTL detected in the *CW-2*-containing chromosomal region showed the greatest significance levels for vertebral bone weight and leg bone weight but not for lean weight. However, the possibility of there being two closely linked QTL, one affecting skeletal growth and the other body weight gain, cannot be excluded.

The *NCAPG* gene containing the candidate causative variation underlying *CW-2*, *NCAPG:c.1326T>G* (*NCAPG* p.Ile442Met) (Eberlein *et al.* 2009; Setoguchi *et al.* 2009), encodes a protein of the mammalian condensin I complex, which has an important function in the regulation of mitotic cell division (Dej *et al.* 2004). Seipold *et al.* (2009) previously reported that an *NCAPG* (previously referred to as *CAP-G*) mutant predominantly affected highly proliferative progenitor cells of the zebrafish neural retina. Therefore, it can be hypothesized that in intensively growing cattle, the amino acid substitution in the bovine *NCAPG* protein might affect cell division and proliferation of osteogenic mesenchymal cells, as well as other proliferating cells. Using a combined metabolomic and genetic approach in the Charolais × German Holstein cross population, we found recently that increased endogenous arginine plasma levels are associated with the *NCAPG:c.1326G* allele, promoting proportional growth during the period of puberty (Weikard *et al.* 2010), thus conclusively linking the well-described growth-regulating effects of arginine metabolism with the unknown specific physiological function of *NCAPG* in mammalian metabolism. Further studies are required to improve our understanding of the genetic regulation of physiological processes of mammalian growth involving *NCAPG*.

Acknowledgements

We appreciate the useful discussion with Dr. Shinji Sasaki regarding mammalian growth. The work was partly supported by the Ministry of Agriculture, Forestry and Fishery, Japan, and by the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation. We thank our colleagues at the FBN Dummerstorf that were involved in the generation and care of the SEGfam F₂ resource population for their continuous support of our work.

References

- Clop A., Marcq F., Takeda H. *et al.* (2006) A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the *myostatin* gene affects muscularity in sheep. *Nature Genetics* **38**, 813–8.
- Dej K.J., Ahn C. & Orr-Weaver T.L. (2004) 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.
- Eberlein A., Takasuga A., Setoguchi K., Pfuhl R., Flisikowski K., Fries R., Klopp N., Fürbass R., Weikard R. & Kühn C. (2009) 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**, 951–64.
- Gudbjartsson D.F., Walters G.B., Thorleifsson G. *et al.* (2008) Many sequence variants affecting diversity of adult human height. *Nature Genetics* **40**, 609–15.
- Gutiérrez-Gil B., Williams J.L., Homer D., Burton D., Haley C.S. & Wiener P. (2009) Search for quantitative trait loci affecting growth and carcass traits in a cross population of beef and dairy cattle. *Journal of Animal Science* **87**, 24–36.
- Kühn C., Bellmann O., Voigt J., Wegner J., Guiard V. & Ender K. (2002) An experimental approach for studying the genetic and physiological background of nutrient transformation in cattle with respect to nutrient secretion and accretion type. *Archives Animal Breeding* **45**, 317–30.
- Oikawa T., Sanehira T., Sato K., Mizoguchi Y., Yamamoto H. & Baba M. (2000) Genetic parameters for growth and carcass traits of Japanese Black (Wagyu) cattle. *Animal Science* **71**, 59–64.
- Perez-Enciso M. & Misztal I. (2004) Qxpak: a versatile mixed model application for genetical genomics and QTL analyses. *Bioinformatics* **20**, 2792–8.
- Seipold S., Priller F.C., Goldsmith P., Harris W.A., Baier H. & Abdelilah-Seyfried S. (2009) Non-SMC condensin I complex proteins control chromosome segregation and survival of proliferating cells in the zebrafish neural retina. *BMC Developmental Biology* **9**, 40.
- Setoguchi K., Furuta M., Hirano T., Nagao T., Watanabe T., Sugimoto Y. & Takasuga A. (2009) 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.
- Snelling W.M., Allan M.F., Keele J.W., Kuehn L.A., McDanel T., Smith T.P.L., Sonstegard T.S., Thallman R.M. & Bennett G.L. (2010) Genome-wide association study of growth in crossbred beef cattle. *Journal of Animal Science* **88**, 837–48.
- Soranzo N., Rivadeneira F., Chinappan-Horsley U. *et al.* (2009) Meta-analysis of genome-wide scans for human adult stature identifies novel loci and associations with measures of skeletal frame size. *PLoS Genetics* **5**, e1000445.
- Sovio U., Bennett A.J., Millwood I.Y. *et al.* (2009) Genetic determinants of height growth assessed longitudinally from infancy to adulthood in the northern Finland birth cohort 1966. *PLoS Genetics* **5**, e1000409.
- Tanner J.M., Whitehouse R.H. & Takaishi M. (1966) Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965 Part II*. *Archives of Disease in Childhood* **41**, 613–35.
- Van Laere A.S., Nguyen M., Braunschweig M. *et al.* (2003) A regulatory mutation in *IGF2* causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature* **425**, 832–6.
- Weedon M.N. & Frayling T.M. (2008) Reaching new heights: insights into the genetics of human stature. *Trends in Genetics* **24**, 595–6.
- Weedon M.N., Lango H., Lindgren C.M. *et al.*; Diabetes Genetics Initiative, The Wellcome Trust Case Control Consortium; Johnson T., Bergmann S., Beckmann J.S., Vollenweider P., Waterworth D.M., Mooser V., Palmer C.N., Morris A.D. & Ouwehand W.H., Cambridge GEM Consortium; Caulfield M., Munroe P.B., Hattersley A.T., McCarthy M.I. & Frayling T.M. (2008) Genome-wide

association analysis identifies 20 loci that influence adult height. *Nature Genetics* **40**, 575–83.

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

Supporting information

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

Figure S1 Gain of supplemental linear skeletal measurements and allele substitution effects of *NCAPG:c.1326T>G* in the Japanese Black population.

Table S1 Phenotypic data and estimated effects of *NCAPG:c.1326T>G* on growth traits in the Japanese Black population.

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.



Short communication: Enhanced clinical mastitis resistance in Holsteins with a *FEZL* p.Gly105(12_13) polymorphism

M. Sugimoto,* T. Itoh,† Y. Gotoh,‡ T. Kawahara,‡ H. Moriya,§ Y. Uchimura,§ and Y. Sugimoto#¹

*National Livestock Breeding Center, Fukushima 961-8511, Japan

†Maebashi Institute of Animal Science, Gunma 371-0121, Japan

‡Holstein Cattle Association of Japan, Hokkaido Branch, Hokkaido 001-8555, Japan

§Tokachi NOSAI, Hokkaido 080-2331, Japan

#Shirakawa Institute of Animal Genetics, Fukushima 961-8061, Japan

ABSTRACT

Mastitis is a common infectious disease of the mammary gland and a major problem in the dairy industry. We previously reported that forebrain embryonic zinc finger-like (*FEZL*) encoding a stretch of 12 glycines (p.Gly105[12]) instead of 13 glycines (p.Gly105[13]) is associated with a lower somatic cell score (SCS) in a family derived from Walkway Chief Mark. Here we report that the p.Gly105[12] allele is associated with a significantly decreased incidence of clinical mastitis in a large Holstein population. We genotyped the *FEZL* polymorphism in 918 randomly collected Holstein sires, and investigated the effect of the polymorphism on the estimated breeding value (EBV) for SCS and milk, fat, solids-not-fat, and protein yield, and on the number of cattle with clinical mastitis among daughters derived from these sires. The average EBV for SCS among sires carrying the heterozygous p.Gly105[12] was significantly lower than that among sires carrying the homozygous p.Gly105[13], whereas we found no unfavorable effects of this polymorphism on EBV for milk, fat, solids-not-fat, and protein yield. The proportion of cows with clinical mastitis derived from sires carrying heterozygous p.Gly105[12] was significantly lower than that of daughters derived from sires carrying the homozygous p.Gly105[13]. Thus, selection of sires carrying p.Gly105[12] could be beneficial in the dairy industry by reducing the incidence of mastitis.

Key words: cattle, mastitis, forebrain embryonic zinc finger-like, somatic cell score

Short Communication

Mastitis is an inflammation of the mammary gland caused by bacteria such as *Escherichia coli* that generates large losses in the dairy industry due to reductions

in milk quality and quantity and increased health costs. Recently, linkage analysis of granddaughters derived from Walkway Chief Mark with high and low SCS during their first lactation period revealed that high SCS cows have a forebrain embryonic zinc finger-like (*FEZL*) protein with a longer glycine stretch; that is, 13 glycines (p.Gly105[13]) instead of 12 (p.Gly105[12]; Sugimoto et al., 2006). The *FEZL* protein is a transcription factor containing C2H2-type zinc-finger domains and a glycine stretch (Matsuo-Takasaka et al., 2000). Treatment of bovine mammary epithelial cells with LPS induces *FEZL* expression followed by enhanced production of tumor necrosis factor- α and IL-8 through semaphorin 5A expression (Sugimoto et al., 2006). Because p.Gly105[12] promotes higher semaphorin 5A expression than p.Gly105[13], the high SCS might be due to an impaired immune response of cows carrying p.Gly105[13].

The *FEZL* gene was mapped as influencing SCS in a large family derived from a specific sire, Walkway Chief Mark (Sugimoto et al., 2006); a strong genetic correlation exists between SCS and mastitis (Young et al., 1960; Emanuelson et al., 1988). The effects of the *FEZL* mutation on SCS and the incidence of mastitis, however, must be confirmed among randomly collected samples before genetic selection based on this gene can be implemented in the dairy industry. The aim of this study was to determine the effect of p.Gly105[12] on resistance to mastitis.

For genotyping of the *FEZL* p.Gly105(12_13) mutation, 918 DNA samples were prepared from semen according to standard protocols, and the DNA concentration was adjusted to 20 ng/ μ L. The PCR reaction was performed in a volume of 15 μ L containing 20 ng of genomic DNA, 1.67 mM MgCl₂, 6.25 pmol of each primer [forward: 5'(FAM)-ACTCTGAGCTCTG-GAAAAGCAG-3'; reverse: 5'-CACACGCCACAAGT-TGGTTT-3'], 0.2 mM deoxynucleotides, and 0.375 U of *Taq* DNA polymerase (ABgene, Epsom, UK). The thermal cycling conditions were 1 cycle (94°C for 3 min), 35 cycles (94°C for 1 min, 60°C for 1 min, 72°C

Received April 21, 2010.

Accepted December 14, 2010.

¹Corresponding author: kazusugi@siag.or.jp

Table 1. The average \pm SEM EBV for SCS, milk, fat, SNF, and protein yield of sires with heterozygous p.Gly105[12] compared with sires with homozygous p.Gly105[13] for the FEZL p.Gly105(12_13) mutation

Sire genotype	SCS	Milk, kg	Fat, kg	SNF, kg	Protein, kg
Heterozygous p.Gly105[12]	2.46 \pm 0.04	43.3 \pm 86.6	-0.44 \pm 2.61	1.08 \pm 6.81	-1.64 \pm 2.28
Homozygous p.Gly105[13]	2.60 \pm 0.01	83.5 \pm 28.7	-1.59 \pm 0.86	4.38 \pm 2.30	-0.12 \pm 0.78
<i>P</i> -value ¹	0.004	0.679	0.696	0.678	0.564

¹Calculated by Student's *t*-test.

for 1 min), and 1 cycle (72°C for 10 min). Following PCR, alleles were resolved using an ABI 3700 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) and genotype data were captured using GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems).

Genotyping of *FEZL* in 918 sires revealed that 97 sires had a heterozygous p.Gly105[12] genotype and 821 sires had a homozygous p.Gly105[13] genotype. The National Livestock Breeding Center (Fukushima, Japan) evaluated the EBV for SCS of 693 sires having more than 15 daughters among these 918 sires using a mixed model including a fixed regression:

$$y = HD + A + at + b \times \exp(-0.05t) + u + pe + e,$$

where y = SCS of first calving, HD = fixed effects of herd-test day, A = fixed effects of calving age groups, t = days in milk, a and b = coefficients of Wilmink's curves, u = random effects of additive genetics (EBV) and $u \sim N(0, \mathbf{A}\sigma_u^2)$, pe = random effects of permanent environment, e = random residuals, and $e \sim N(0, \mathbf{A}\sigma_e^2)$,

where \mathbf{A} is the numerator relationship matrix among animals. Heritability for SCS was 0.082. The average EBV for SCS of the heterozygous p.Gly105[12] sires ($n = 59$) was 2.47 ± 0.04 , and the average EBV for SCS of the homozygous p.Gly105[13] sires ($n = 634$) was 2.60 ± 0.01 . Student's *t*-test revealed a difference between these 2 groups (Table 1). These findings confirmed that the p.Gly105[12] allele decreases SCS, not only in the Walkway Chief Mark family, but also in other families in Japan.

To estimate the effect of FEZL on the EBV for milk, fat, SNF, and protein yields, we compared the average EBV of heterozygous p.Gly105[12] sires ($n = 59$) and homozygous p.Gly105[13] sires ($n = 634$). The National Livestock Breeding Center calculated the EBV of each sire for milk, fat, SNF, and protein yield based on a single-trait animal model and a BLUP procedure. The relative EBV for milk, fat, SNF, and protein yields of homozygous p.Gly105[13] sires were not different from those of heterozygous p.Gly105[12] sires (Table 1).

These findings confirmed that the p.Gly105[12] allele does not have unfavorable effects on milk yield.

To determine the effect of FEZL on the incidence of mastitis, we compared the number of cows with mastitis among daughters derived from sires carrying heterozygous p.Gly105[12] or homozygous p.Gly105[13] for each year of age. The Veterinary Clinical Center, Tokachi NOSAI (Hokkaido, Japan), recorded clinical mastitis in the Tokachi area of Hokkaido from 2003 to 2007. Cows diagnosed with mastitis and treated at least once per lactation by veterinarians were considered affected. The Holstein Cattle Association of Japan, Hokkaido Branch, sorted the cows according to their sires and age. They collected 132,210 mastitis records in 491,725 lactation periods from 228,945 cows during these 5 yr in this area. A total of 41,431 records in 162,655 lactation periods were from daughters of the 918 genotyped sires.

In daughters younger than 3 yr old, 2,136 (18.9%) among 11,283 daughters derived from sires carrying heterozygous p.Gly105[12] were affected, whereas 12,691 (20.1%) among 63,165 daughters derived from sires carrying homozygous p.Gly105[13] were affected (Table 2). Fisher's exact test (Agresti, 1992) indicated a difference ($P = 0.004$) between these 2 groups. Consistent with several reports that the incidence of mastitis in cows increases with age (Braund and Schultz, 1963; Batra et al., 1977; Gonyon et al., 1982), the percentage of cows affected in both heterozygous p.Gly105[12] and homozygous p.Gly105[13] daughters increased with age. At almost every age, however, the proportion of affected heterozygous p.Gly105[12] daughters was significantly lower than that of affected homozygous p.Gly105[13] daughters (Table 2). These findings confirmed that FEZL affects the incidence of mastitis as well as SCS.

Escherichia coli is very common in the dairy cow environment, and the severity of mastitis caused by this bacterium is determined mainly by cow factors rather than by *E. coli* pathogenicity (Burvenich et al., 2003). Lipopolysaccharides from *E. coli* induced *FEZL* expression in bovine mammary epithelial cells (Sugimoto et al., 2006). To examine whether the *FEZL* genotype affects the incidence of *E. coli*-caused mastitis, we com-

Table 2. The number of cows (% in parentheses) affected with mastitis in daughters from sires with heterozygous p.Gly105[12] compared with daughters of sires with homozygous p.Gly105[13] grouped by age

Sire genotype	Age, yr											
	<3		Between 3 and 4 yr		Between 4 and 5 yr		Between 5 and 6 yr		More than 6 yr		Affected	Unaffected
Heterozygous p.Gly105[12]	2,136 (18.9)	9,147 (81.1)	1,619 (26.1)	4,594 (73.9)	1,184 (28.8)	2,925 (71.2)	662 (32.4)	1,384 (67.6)	211 (26.4)	588 (73.6)		
Homozygous p.Gly105[13]	12,691 (20.1)	50,474 (79.9)	11,065 (27.9)	28,588 (72.1)	6,872 (32.8)	14,077 (67.2)	3,126 (34.3)	5,982 (65.7)	1,865 (35)	3,465 (65)		
P-value ¹	0.004		0.002		5E-07		0.09		1E-06			

¹Calculated by Fisher's exact test.

Table 3. The number (% in parentheses) of affected cows with *Escherichia coli* mastitis among daughters from sires with heterozygous p.Gly105[12] compared with daughters of sires with homozygous p.Gly105[13] grouped by age

Sire genotype	Age, yr											
	<3		Between 3 and 4 yr		Between 4 and 5 yr		Between 5 and 6 yr		More than 6 yr		Affected	Unaffected
Heterozygous p.Gly105[12]	313 (2.8)	10,970 (97.2)	310 (5)	5,903 (95)	256 (6.2)	3,853 (93.8)	123 (6)	1,923 (94)	34 (4.3)	765 (95.7)		
Homozygous p.Gly105[13]	2,080 (3.3)	61,085 (96.7)	2,234 (5.6)	37,419 (94.4)	1,468 (7)	19,481 (93)	658 (7.2)	8,450 (92.8)	367 (6.9)	4,963 (93.1)		
P-value ¹	0.004		0.04		0.07		0.06		0.004			

¹Calculated by Fisher's exact test.

Table 4. The average EBV (%) for clinical mastitis of sires and of daughters from sires with heterozygous p.Gly105[12] or homozygous p.Gly105[13]

Sire genotype	Sire based on daughter's phenotype		Daughter	
	Number	EBV ± SEM	Number	EBV ± SEM
Heterozygous p.Gly105[12]	74	23.3 ± 0.57	9,742	23.0 ± 0.04
Homozygous p.Gly105[13]	654	24.6 ± 0.25	56,985	25.3 ± 0.03
<i>P</i> -value ¹		0.039		<0.01

¹Calculated by Student's *t*-test.

pared the number of cows affected by *E. coli* mastitis among daughters derived from sires carrying heterozygous p.Gly105[12] or homozygous p.Gly105[13] at each year of age. As shown in Table 3, at almost every age, the proportion of cows with *E. coli*-caused mastitis was significantly lower among heterozygous p.Gly105[12] daughters than among homozygous p.Gly105[13] daughters.

To more closely observe the effect of FEZL on the incidence of mastitis, we evaluated the EBV for mastitis using a threshold animal model:

$$y = A + M + hy + u + pe + e,$$

where y = liabilities to mastitis recorded as 0 (normal) or 1 (clinical), A = fixed effects of calving age group (24 groups classified in the range from 18 to 95 mo of age), M = fixed effects of calving month (12 classes), hy = random effects of herd-year of calving (11,992 subclasses), u = random additive genetic effect (EBV) and $u \sim N(0, \mathbf{A}\sigma_u^2)$, pe = random effects of permanent environment, and e = random residuals and $e \sim N(0,1)$, where \mathbf{A} is the numerator relationship matrix among animals. The programs we used were THRGIBBSF90 to estimate variance components and CBLUP90THR to obtain animal EBV on the underlying scale (Misztal et al., 2002). The EBV of bulls and cows were converted into percentage EBV. Heritability for clinical mastitis was 0.06. Among sires having more than 5 daughters, the average percentage EBV for mastitis of the heterozygous p.Gly105[12] sires ($n = 75$) was $23.3 \pm 0.57\%$. On the other hand, the average percentage EBV for mastitis of the homozygous p.Gly105[13] sires ($n = 654$) was $24.6 \pm 0.25\%$. Student's *t*-test revealed a difference between these 2 groups ($P = 0.039$; Table 4). The average percentage EBV for mastitis of daughters derived from sires carrying heterozygous p.Gly105[12] and homozygous p.Gly105[13] were $23.0 \pm 0.04\%$ ($n = 9,742$) and $25.3 \pm 0.03\%$ ($n = 56,985$), respectively, which were significantly different ($P < 0.01$; Table 4). These findings confirmed that the p.Gly105[12] allele decreases clinical mastitis in terms of percentage EBV.

To confirm the robustness of our analysis, we also estimated the effect of the mutation in an animal model using daughter yield deviations of the sires (VanRaden and Wiggans, 1991). Among 1,429 sires related to Walkway Chief Mark, the average daughter yield deviations for mastitis of the heterozygous p.Gly105[12] sires, the homozygous p.Gly105[13] sires, and unknown sires were -0.000357 , 0.007938 , and 0.000443 , respectively (Table 5). Duncan's multiple range test revealed a difference between the heterozygous p.Gly105[12] sires and the homozygous p.Gly105[13] sires ($P < 0.05$). This result indicated that the p.Gly105[12] genotype did have an effect to reduce mastitis incidence.

A survey of the FEZL p.Gly105(12_13) mutation in sires in Japan revealed that the p.Gly105[12] allele decreases both SCS and the incidence of mastitis. As suggested from cell-based studies (Sugimoto et al., 2006), the p.Gly105[12] allele might enhance immune responses, making the cows resistant to mastitis. Moreover, we demonstrated that the p.Gly105[12] allele is neutral in terms of milk, fat, SNF, and protein yields. Considering the high health costs associated with mastitis, it might be beneficial to select cows based on their FEZL genotype.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank T. Asano and T. Yamashita (both of Holstein Cattle Association of Japan, Hokkaido Branch, Hokkaido, Japan) for assistance. This work was supported by the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation (Tokyo, Japan).

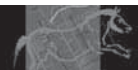
Table 5. The average daughter yield deviation (DYD) for mastitis of the heterozygous p.Gly105[12] sires, the homozygous p.Gly105[13] sires, and unknown sires

Sire genotype	Number	DYD
Heterozygous p.Gly105[12]	70	-0.000357^a
Unknown	996	0.000443^a
Homozygous p.Gly105[13]	363	0.007938^b

^{a,b}Values within a column followed by different superscript letters are different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

REFERENCES

- Agresti, A. 1992. A survey of exact inference for contingency tables. *Stat. Sci.* 7:131–153.
- Batra, T. R., B. J. Nonnechke, F. H. Newbould, and R. R. Hacker. 1977. Incidence of clinical mastitis in a herd of Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 60:1169–1172.
- Braund, D. G., and L. H. Schultz. 1963. Physiological and environmental factors affecting the California Mastitis Test under field conditions. *J. Dairy Sci.* 46:197–203.
- Burvenich, C., V. Van Merris, J. Mehrzad, A. Diez-Fraile, and L. Duchateau. 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.* 34:521–564.
- Emanuelson, U., B. Danell, and J. Philipsson. 1988. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell counts, and milk production estimated by multiple-trait restricted maximum likelihood. *J. Dairy Sci.* 71:467–476.
- Gonyon, D. S., D. O. Everson, and R. E. Christian. 1982. Heritability of mastitis score in Pacific Northwest dairy herds. *J. Dairy Sci.* 65:1269–1276.
- Matsuo-Takasaki, M., J. H. Lim, M. J. Beanan, S. M. Sato, and T. D. Sargent. 2000. Cloning and expression of a novel zinc finger gene, *Fez*, transcribed in the forebrain of *Xenopus* and mouse embryos. *Mech. Dev.* 93:201–204.
- Misztal, I., S. Tsuruta, T. Strabel, B. Auvray, T. Druet, and D. H. Lee. 2002. BLUPF90 and related programs (BGF90). CD-ROM Commun. 28:07; Proc. 7th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod., Montpellier, France.
- Sugimoto, M., A. Fujikawa, J. E. Womack, and Y. Sugimoto. 2006. Evidence that bovine forebrain embryonic zinc finger-like gene influences immune response associated with mastitis resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:6454–6459.
- VanRaden, P. M., and G. R. Wiggans. 1991. Derivation, calculation, and use of national animal model information. *J. Dairy Sci.* 74:2737–2746.
- Young, C. W., J. E. Legates, and J. G. Leece. 1960. Genetic and phenotypic relationships between clinical mastitis, laboratory criteria, and udder height. *J. Dairy Sci.* 43:54–62.



Identification of an *FBN1* mutation in bovine Marfan syndrome-like disease

T. Hirano*, T. Matsushashi[†], N. Kobayashi[†], T. Watanabe* and Y. Sugimoto*

*Shirakawa Institute of Animal Genetics, Odakura, Nishigo, Nishi-Shirakawa, Fukushima 961-8061, Japan. [†]Gifu Prefectural Livestock Research Institute, Hida Beef Cattle Research Department, Makigahora, Kiyomi, Takayama, Gifu 506-0101, Japan

Summary

Mutations in the gene encoding fibrillin-1 (*FBN1*), a component of the extracellular microfibril, cause Marfan syndrome (MFS). Frequent observation of cattle with a normal withers height, but lower body weight than age-matched normal cattle, was recently reported among cattle sired by phenotypically normal Bull A, in Japanese Black cattle. These cattle also showed other characteristic features similar to the clinical phenotype of human MFS, such as a long phalanx proximalis, oval face and crystalline lens cloudiness. We first screened a paternal half-sib family comprising 36 affected and 10 normal offspring of Bull A using the BovineSNP50 BeadChip (illumina). Twenty-two microsatellite markers mapped to a significant region on BTA10 were subsequently genotyped on the family. The bovine Marfan syndrome-like disease (MFSL) was mapped onto BTA10. As *FBN1* is located in the significant region, *FBN1* was sequenced in Bull A, and three affected and one normal cattle. A G>A mutation at the intron64 splicing acceptor site (c.8227-1G>A) was detected in 31 of 36 affected animals (84.7%). The c.8227-1G>A polymorphism was not found in 20 normal offspring of Bull A or in 93 normal cattle unrelated to Bull A. The mutation caused a 1-base shift of the intron64 splicing acceptor site to the 3' direction, and a 1-base deletion in processed mRNA. This 1-base deletion creates a premature termination codon, and a 125-amino acid shorter Fibrillin-1 protein is produced from the mutant mRNA. We therefore conclude that the c.8227-1G>A mutation is causative for MFSL. Furthermore, it was suggested that Bull A exhibited germline mosaicism for the mutation, and that the frequency of the mutant sperm was 14.9%.

Keywords cattle, *fibrillin-1*, Marfan syndrome, mosaicism, splicing acceptor site.

Introduction

To efficiently remove a hereditary defective phenotype from a livestock population such as cattle, it is important to control matings based on the results of established DNA tests that detect a causative mutation for a disease. Human Marfan syndrome (MFS) is a pleiotropic, autosomal dominant disorder of the connective tissue with prominent manifestations affecting the skeletal, ocular and cardiovascular systems. Major clinical features are tall stature, thin body, long limbs, arachnodactyly, joint laxity, myopia, ectopia lentis, aortic dilatation and others. The severity and appearance of affected humans varies considerably.

Address for correspondence

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

Accepted for publication 2 February 2011

A diagnosis of MFS is made based on clinical signs in the cardiovascular, skeletal and ocular systems, and results from genetic tests. The incidence of classic MFS is about 2–3 per 10 000 individuals, and 25% of cases arise from a new mutation (Judge & Dietz 2005). Mutations in the gene encoding fibrillin-1 (*FBN1*), a component of the extracellular microfibril, cause MFS (Dietz *et al.* 1991). Mutations in *FBN1* are detected in 61–91% of the MFS cases, whereas some cases of MFS are due to a mutation in *TGFBR1* or *TGFBR2* (Akutsu *et al.* 2007). Bovine *FBN1* is located on BTA10 and contains at least 65 exons.

Several calves exhibiting symptoms similar to human MFS have been found previously (Singleton *et al.* 2005). These calves, sired by a phenotypically normal bull, had an unusual curvature of the spine, severe joint laxity, long and thin legs, aortic dilatation, mitral valve defects, myopia, microspherophakia and ectopia lentis. Some of the affected calves died at a young age due to rupture of the aorta and pulmonary artery. These researchers identified a causative

FBN1 mutation (c.3598G>A, p.E1200K) by sequencing *FBN1* cDNA from an affected calf.

Recently, cattle with growth retardation have been frequently found among offspring sired by a bull (Bull A) in Japanese Black cattle. These cattle showed normal withers height but body weight was lower than 2σ from normal growth curves. Most of these cattle had a long phalanx proximalis and they could not stand upright. Some cattle showed other features, such as skinny, long and thin legs, spine deformity, oval-face, crystalline lens cloudiness and a pause between heart sounds. These clinical features appearing in the skeletal, ocular and cardiovascular systems are the cardinal ones of human MFS; therefore we considered the disease in cattle to be similar to MFS in humans. Since specific anatomic or pathologic features to MFS in humans were not detected in affected cattle, we called the disease as Marfan syndrome-like (MFSL) disease. Although human MFS is autosomal dominant disease, Bull A, which is thought to be the carrier animal, is phenotypically normal. Furthermore, it was estimated that the frequency of the disease in Bull A progeny was approximately 9%, which is low for an autosomal dominant disease.

To determine the causative gene and establish a DNA test for the disease, we examined genetic markers and sequences of affected and normal cattle sired by Bull A.

Materials and methods

Animal samples

Bull A, 36 affected and 20 normal cattle sired by Bull A, and 94 normal cattle unrelated to Bull A were used for the analysis. Cattle in which withers height was normal or higher but body weight was lower than 2σ from the normal growth curves, were designated as affected cattle. The growth curves for sires, dams and fattened steer cattle of Japanese Black were determined by the Japan Wagyu Registry Association (<http://www.zwtk.or.jp/>). Adult cattle sired by Bull A that were healthy and normal in size were collected in the slaughterhouse along with normal cattle. Genomic DNA was extracted from blood and adipose tissues of affected and normal cattle, and the blood and semen of Bull A according to standard protocols. The DNA concentration was adjusted to 100 ng/ μ l for the BovineSNP50 BeadChip assay, and to 20 ng/ μ l for the microsatellite marker genotyping.

Genotyping

For genotyping with BovineSNP50 BeadChip (illumina), genomic DNA was verified as being unfragmented using agarose gel electrophoresis, and 400 ng of DNA was used for the assay.

For genotyping of 22 microsatellite markers covering the significant region on BTA10 and for which Bull A was heterozygous, the PCR conditions were optimized as previ-

ously described (Kappes *et al.* 1997; Ihara *et al.* 2004). Genotyping was performed using PCR with a fluorescence-labelled reverse primer, followed by electrophoresis with an ABI 3730 DNA analyzer, as previously described (Hirano *et al.* 1996), followed by analysis using GENEMAPPER software (Applied Biosystems).

Statistical analysis

The sire's haplotypes were reconstructed using the interval mapping method for half-sib families (Haley *et al.* 1994; Seaton *et al.* 2002). A SNP marker linkage map was built, with 1 Mb considered to be equivalent to 1 cM. To test the hypothesis that a chromosomal location was related with the disease status, we used the following logistic regression model (Xu & Atchley 1996):

$$y_i = \frac{e^{a+bx_i}}{1 + e^{a+bx_i}}$$

where y_i is disease status (0 or 1) and x_i is the probability that the i th offspring inherited the sire's first haplotype at a given chromosomal location. Parameters a and b were estimated at each location. The log likelihood of the alternative hypothesis and null hypothesis that $b = 0$ are

$$L_1 = \sum_{i=1}^n y_i \log(p_{1i}) + \sum_{i=1}^n (1 - y_i) \log(1 - p_{1i})$$

$$\text{and } L_0 = \sum_{i=1}^n y_i \log(p_{0i}) + \sum_{i=1}^n (1 - y_i) \log(1 - p_{0i}),$$

respectively, where $p_{1i} = \frac{e^{a+bx_i}}{1 + e^{a+bx_i}}$ and $p_{0i} = \frac{e^a}{1 + e^a}$.

The test statistic $LRT = -2(L_0 - L_1)$. To determine the thresholds of the LRT statistics for chromosome-wise and experiment-wise significance, 10 000 random permutations of the phenotypic data were performed (Churchill & Doerge 1994). The disease locus location with 95% confidence intervals was estimated by the bootstrap method (Visscher *et al.* 1996).

Determination of *FBN1* mutation

To sequence all 65 exons of *FBN1*, primers flanking the exons were designed for each intronic region (Table S1). PCR was performed using genomic DNA of Bull A, and three affected and one normal cattle. Two of the three affected animals had a risk haplotype from Bull A, and the remaining one did not have the risk haplotype. Amplified products were sequenced using the Big Dye terminator kit and ABI3730 DNA analyzer (Applied Biosystems).

The cDNA synthesis

Total RNA was extracted from the skeletal muscle of one affected animal according to standard methods using Trizol reagent (Invitrogen). The cDNA was synthesized by priming

random hexamers. The fragment harbouring the exon 64–65 boundary was amplified with a forward primer, 5′-GC ACTGTGTTTCTGGAATGG-3′, and a reverse primer, 5′-GC ACGTTCCTGTACGTCTGC-3′.

Mutation detection and estimation for ratio of sperm harbouring the mutation

To detect the c.8227-1G>A mutation, a forward primer was designed in intron 64 and a reverse primer was designed in exon 65 (F: 5′-ATTTGAGTGAGACTTGAGTCAC-3′ and R: 5′-TCACATTGGCTTCTATCTCAGGTT-3′, PCR product: 112-bp). Genomic DNA extracted from the semen of Bull A was amplified by PCR with these primers. Amplified products were cloned into pGEM-T Easy vector (Promega). The clones were amplified with PCR with M13–20 and M13 reverse primers, and PCR products were sequenced with M13–20 and M13 reverse primer. The ratio of sperm harbouring the mutation in Bull A was estimated from the frequency of clones harbouring the mutant fragment.

PCR–RFLP assays for mutation detection were performed by *ScrF1* digestion of PCR products using the primers described above, followed by agarose gel electrophoresis. When they were digested with *ScrF1*, normal PCR products produced the 82-bp and 30-bp digested fragments, while mutant products produced only the 112-bp uncut fragment.

Results and discussion

Mapping

Abnormal progenies of Bull A had normal or higher withers heights, but body weights were lower than age-matched normal cattle, and their trunk width was noticeably narrower. Another characteristic feature was that most of these cattle had long phalanx proximalis and their hooves did not stand upright (Fig. 1). These features were similar to tall

and thin body and arachnodactyly of human MFS. Other features, such as long and thin legs, spine deformity, oval faces, crystalline lens cloudiness and a pause between heart sounds were showed as minor phenotypes. These clinical features appeared in the skeletal, ocular and cardiovascular systems, which are the cardinal features of human MFS. However, no specific anatomic or pathological features were detected in affected cattle.

To perform a linkage analysis, we collected 36 affected cattle and 10 normal cattle all sired by Bull A. The paternal half-sib family, comprising 46 cattle, was genotyped with the BovineSNP50 BeadChip. Of 13 252 SNPs for which Bull A was heterozygous and an autosomal position was determined, 1179 were selected at almost equal intervals. A region on BTA 10 (61–88 Mb) was associated with affected status at a 1% chromosome-wise significance level. To further confirm the region, 22 informative microsatellite markers in the region from 48 to 94 Mb were genotyped. The *LRT* value increased at the same region (60–71 Mb; 1% chromosome-wise significance) with the additional genetic markers. Three of 36 affected animals did not have a risk haplotype in the mapped region, and three of 10 normal cattle had the risk haplotype. Thirty-three affected cattle with the risk-haplotype were not homozygous. These findings suggest that the bovine MFSL is a dominant disease, similar to the human MFS, although Bull A was not affected. *FBN1*, a causative gene for human MFS, was located in the mapped region (Fig. 2).

Identification of an *FBN1* mutation at the splicing acceptor site

Bovine *FBN1* encodes 2871 amino acids and contains at least 65 exons. To identify a causative *FBN1* mutation, primers flanking the exons were designed for all the intron regions, and direct sequencing was performed for Bull A as well as for three affected and one normal animals. Two of

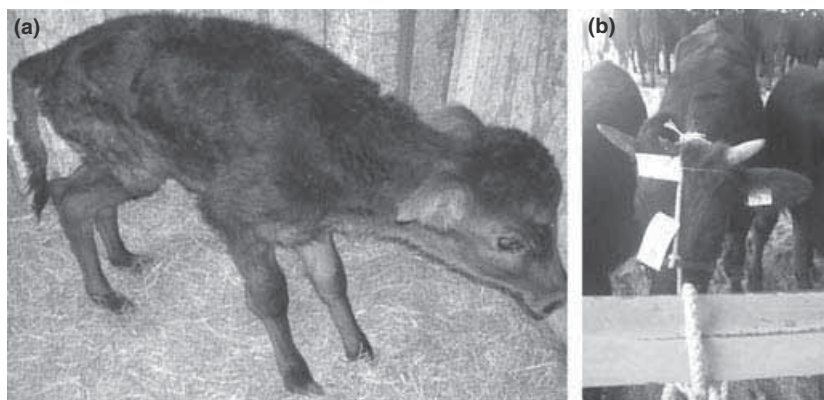


Figure 1 Affected cattle show normal withers height, but have body weights lower than age-matched normal cattle. (a) An affected animal showed long phalanx proximalis (2-day-old). The body weight was 15 kg (age-matched normal average; 30 kg). (b) Another affected animal with a noticeably narrow trunk width. The weight was 287 kg at 315 days old (age-matched normal; 341 kg). The withers height and chest girth were 132 and 175 cm at 448 days old (age-matched normal; 126.9 and 183.4 cm, respectively).

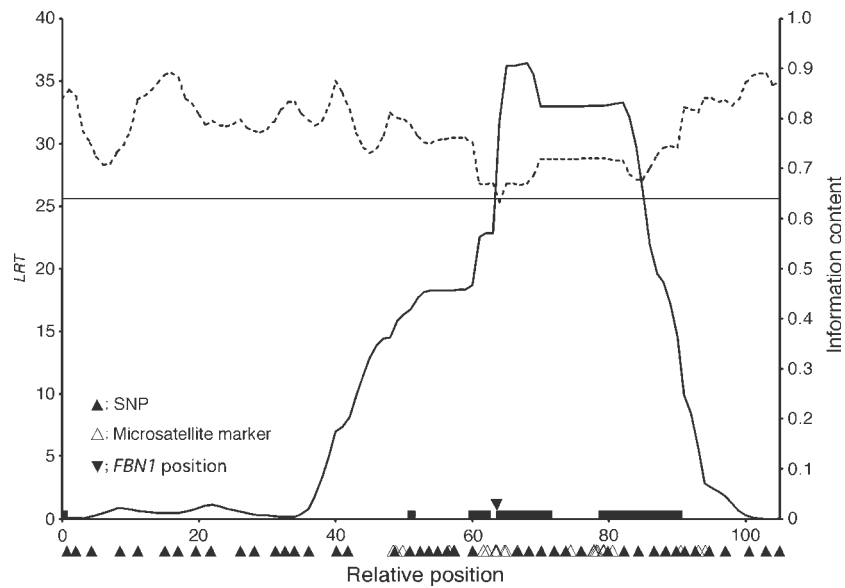


Figure 2 LRT-statistic profile for the disease on BTA 10. Horizontal line indicates the threshold for the 1% chromosome-wide significance level. The dashed line indicates information content (right y-axis). SNP and microsatellite positions are indicated as filled and open triangles under the x-axis, respectively. The inverted triangle indicates fibrillin-1 (*FBN1*) position. The filled boxes on the x-axis represent the 95% confidence interval.

three affected animals had the risk haplotype from Bull A, and one affected did not have the risk-haplotype (60–71 Mb). Any *FBN1* mutation associated with the affected status was not detected from the affected cattle without the risk-haplotype. A G>A mutation at the splicing acceptor site of intron 64 (c.8227-1G>A) was detected in the affected cattle with the risk haplotype, but not in Bull A (Fig. 3a), suggesting that Bull A exhibited germline mosaicism for the mutation. Sequencing of the cDNA fragment harbouring the exon 64–65 boundary from the affected cattle indicated that the mutation resulted in the splicing acceptor site shifting 1-bp to the 3' end of the gene, causing a deletion of G at nt8227 of the coding sequence in mutant transcripts. The deletion of G in transcripts causes a frameshift, creating a premature termination codon five codons from the mutated codon (p.Asp2743IlefsX5), thus decreasing the protein length by 125 amino acids (Fig. 3a,b).

The mutation is located on the post-furin cleavage site sequence of the C-terminal domain (Fig. 4). It is thought that head-to-tail alignment and lateral alignment of Fibrillin-1 molecules are critical for microfibril assembly. The post-furin cleavage site sequence interacts strongly with the N-terminus encoded by exons 1–8, with itself, and with the furin-processed C-terminus region encoded by exons 57–65 (Kielty *et al.* 2002; Marson *et al.* 2005). The mutation may affect microfibril assembly. Many *FBN1* mutations are found in human MFS. Mutations located in exons 24–32 are associated with the most severe form of MFS, such as neonatal MFS, in which survival beyond 24 months is rare, and severe MFS, in which aortic surgery is required by the age of 16 years,

whereas mutations in exons 59–65 and premature termination codon mutations are associated with a mild phenotype without aortic dilatation (Robinson *et al.* 2002). Human patients carrying a mutation at a position similar to the mutation found in offspring of Bull A (c.8236_8237delGA, p.Glu2746AspfsX12) are classified as having mild MFS (Nijbroek *et al.* 1995). These findings might explain why some affected cattle harbouring the mutation in exon 29 died at a young age due to rupture of the aorta and pulmonary artery (Singleton *et al.* 2005), whereas the affected offspring of Bull A did not show rupture of the aorta and pulmonary artery and showed no specific anatomic or histopathological manifestation, suggesting a milder phenotype.

To search for the mutation in affected and normal cattle, we performed direct sequencing for the c.8227-1G>A mutation. The c.8227-1G>A mutation was detected in 31 of 36 affected cattle (84.7%), and was not detected in all the 10 unaffected offspring analysed, despite including three normal animals with the risk-haplotype. The mutation was also not detected in another 10 normal offspring of Bull A and 94 random cattle unrelated to Bull A that grew up without signs of MFS. The five affected animals without the mutation included three affected animals without the risk-haplotype. The remaining two affected animals did not have any other *FBN1* mutation associated with the affected status, and this was confirmed by direct sequencing with primers flanking the exons. We performed a linkage analysis with these five affected and 10 normal cattle. Regions of BTA8 (57–64 Mb) and 11 (12–25 Mb) were detected at the 5% chromosomal-wide significance level (data not shown), indicating that there may be a causative mutation other

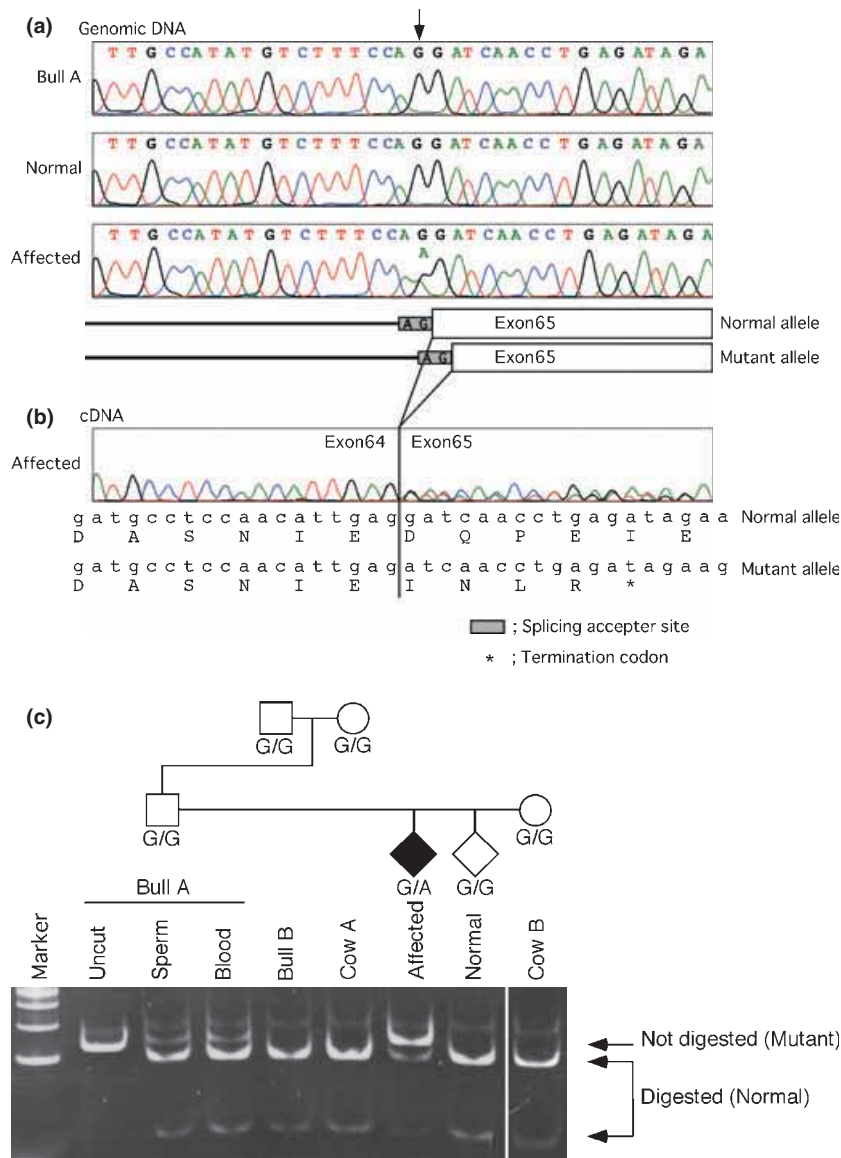


Figure 3 c.8227-1G>A (p.Asp2743IlefsX5) mutation. (a) Direct sequencing of genomic DNA from Bull A and normal and affected offspring, and structure of the intron 64 and exon 65 boundary on normal and mutant alleles. Affected cattle were heterozygous for the mutation, and Bull A looked normal. The splicing acceptor site was shifted 1-bp to the 3' side due to the G>A mutation. The arrow indicates the mutation position. (b) Direct sequencing of cDNA from affected cattle, and translation of normal allele and mutant alleles. In cDNA, G-base deletion was detected at the exon 64–65 boundary due to a 1-bp shift of the splicing acceptor site. This deletion created the premature termination codon mutation. (c) DNA test using the PCR–RFLP method. Normal and mutant alleles can be distinguished by *ScrF1* digestion of PCR products. Presence of an undigested fragment indicates a mutant allele, and digested fragments indicate normal alleles. Genotypes determined by the PCR–RFLP method were also determined by direct sequencing. The same results were obtained in all individuals, except in Bull A, and the mutant allele of Bull A was correctly detected by the PCR–RFLP. The mutant allele was not detected from Bull B and Cow A. Bull A was the offspring of Bull B and Cow A.

than in *FBN1*. Thus, the c.8227-1G>A mutation is the causative mutation for the bovine MFSL.

The mutation (c.8227-1) was located in an *ScrF1* restriction site, and the mutant allele was not digested by *ScrF1*. Therefore, a DNA test for the mutation can be performed easily by using the polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) method (Fig. 3c).

Germline mosaicism

We evaluated whether the PCR–RFLP method can be applied to a DNA test for the mutation (Fig. 3c) using Bull A, Cow B, an affected and a normal cattle (offspring of Bull A and Cow B) and parents of Bull A (Bull B and Cow A). The mutant allele was successfully detected in Bull A and the affected cattle by the PCR–RFLP. The same results were detected by both

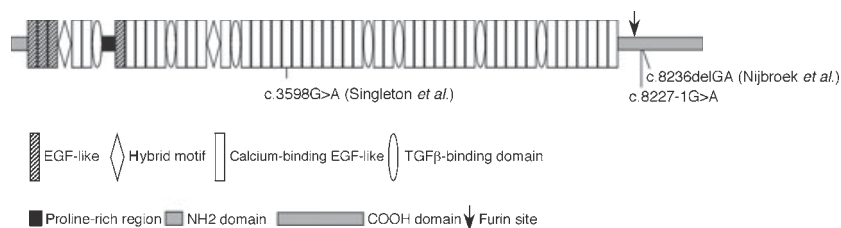


Figure 4 *Fibrillin-1* (*FBN1*) mutations. The c.8227-1G>A mutation was detected in the post-furin cleavage site sequence of the C-terminal domain. The human c.8236delGA mutation is located in almost the same region as the c.8227-1G>A mutation (Nijbroek *et al.* 1995). c.3598G>A, another cattle mutation, is located on part of the 15th calcium-binding epidermal growth factor-like (cbEGF-like) module (Singleton *et al.* 2005). Some cattle harbouring the c.3598G>A mutation died at a young age due to rupture of the aorta and pulmonary artery. The human c.8236delGA mutation was found in a patient with mild Marfan syndrome.

methods, except in Bull A. Normal genotypes of homologous G/G determined by direct sequencing corresponded to the presence of digested bands, while the presence of an undigested band was correlated with the mutant allele A in the affected cattle, but not in Bull A. In Bull A, sperm and blood had bands indicating a lower copy number of the mutant allele than the normal allele, suggesting that Bull A exhibited germline mosaicism for the mutation.

To estimate the percentage of sperm harboring the mutation in Bull A, PCR products amplified from sperm DNA were cloned, and the frequency of clones harbouring the mutant fragment was examined. Of 222 clones, 33 (14.9%) had the mutant fragment. Thus, 14.9% of Bull A sperm was estimated to harbour the mutation. Clones harbouring the mutant fragment were not found in the parents of Bull A (Table 1). Furthermore, mutant alleles were not detected in these parent cattle using PCR-RFLP (Fig. 3c). These findings suggest that the c.8227-1G>A mutation is a sporadic mutation occurring in Bull A, indicating that Bull A is a founder for MFSL. Offspring from Bull A that exhibit the MFSL phenotype will transmit the mutant allele, and normal offspring from Bull A do not carry the mutant allele. Although most cases of MFSL can be diagnosed using the PCR-RFLP DNA test, it is impossible to control all matings due to dominant inheritance.

Acknowledgements

The authors thank Fumie Mafune for technical assistance. This study was supported by grants from the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

Table 1 Frequency of clones harboring mutant fragments.

	Bull A, sperm (%)	Bull A, blood (%)	Bull B, sperm	Cow A, blood
Normal allele 'G' clone	189 (85.1)	199 (88.8)	200	200
Mutant allele 'A' clone	33 (14.9)	25(11.2)	0	0

Bull B and Cow A are parents of Bull A.

References

- Akutsu K., Norisaki H., Takeshita S., Sakamoto S., Tamori Y., Yoshimura T., Yokoyama N., Nonogi H., Ogino H. & Morisaki T. (2007) Phenotypic heterogeneity of Marfan-like connective tissue disorders associated with mutations in the transforming growth factor- β receptor genes. *Circulation Journal* **71**, 1305–9.
- Churchill G.A. & Doerge R.W. (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* **138**, 963–71.
- Dietz H.C., Cutting G.R., Pyeritz R.E. *et al.* (1991) Marfan syndrome caused by a recurrent *de novo* missense mutation in the *fibrillin* gene. *Nature* **352**, 337–9.
- Haley C.S., Knott S.A. & Elsen J.M. (1994) Mapping QTL in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics* **136**, 1195–207.
- Hirano T., Nakane S., Mizoshita K., Yamakuchi H., Inoue-Murayama M., Watanabe T., Barendse W. & Sugimoto Y. (1996) Characterization of 42 highly polymorphic bovine microsatellite markers. *Animal Genetics* **27**, 365–8.
- Ihara N., Takasuga A., Mizoshita K. *et al.* (2004) A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Research* **14**, 1987–98.
- Judge D.P. & Dietz H.C. (2005) Marfan's syndrome. *Lancet* **366**, 1965–76.
- Kappes S.M., Keel J.W., Stone R.T., McGraw R.A., Sonstegard T.S., Smith T.P.L., Lopez-Corrales N.L. & Beattie C.W. (1997) A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research* **7**, 235–49.
- Kielty C.M., Baldock C., Lee D., Rock M.J., Ashworth J.L. & Shuttleworth C.A. (2002) Fibrillin: from microfibril assembly to biomechanical function. *Philosophical Transactions of the Royal Society London, Series B: Biological Sciences* **357**, 207–17.
- Marson A., Rock M.J., Cain S.A., Freeman L.J., Morgan A., Mellody K., Shuttleworth C.A., Baldock C. & Kielty C.M. (2005) Homotypic Fibrillin-1 interactions in microfibril assembly. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 5013–21.
- Nijbroek G., Sood S., McIntosh I., Francomano C.A., Bull E., Pereira L., Ramirez F., Pyeritz R.E. & Dietz H.C. (1995) Fifteen novel *FBN1* mutation causing Marfan syndrome detected by heteroduplex analysis of genomic amplifications. *American Journal of Human Genetics* **57**, 8–21.
- Robinson P.N., Booms P., Katzke S., Ladewig M., Neumann L., Palz M., Pregla R., Tiecke F. & Rosenberg T. (2002) Mutation of *FBN1* and genotype-phenotype correlations in Marfan syndrome and related fibrillinopathies. *Human Mutation* **20**, 153–61.

- Seaton G., Haley C.S., Knott S.A., Kearsley M. & Visscher P.M. (2002) QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformatics* **18**, 339–40.
- Singleton A.C., Mitchell A.L., Byers P.H., Potter K.A. & Pace J.M. (2005) Bovine model of marfan syndrome results from an amino acid change (c.3598G>A, p.E1200K) in a calcium-binding epidermal growth factor-like domain of Fibrillin-1. *Human Mutation* **25**, 348–52.
- Visscher P.M., Thompson R. & Haley C.S. (1996) Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics* **143**, 1013–20.
- Xu S. & Atchley W.R. (1996) Mapping quantitative trait loci for complex binary diseases using line crosses. *Genetics*, **143**, 1417–24.

Supporting information

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

Table S1 Primers used to sequence all exons of bovine *FBN1*.

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.

動物遺伝研究所年報
第 19 号(平成 23 年度)
平成 24 年 11 月 30 日発行

発行 社団法人畜産技術協会
〒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 社団法人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 京和工業印刷株式会社
〒160-0022 東京都新宿区新宿 1-18-6
(TEL:03-3356-3591)

