



日本中央競馬会特別
振興資金助成事業

肉用牛遺伝資源活用体制 整備事業報告書

平成16年6月

社団法人 畜産技術協会

ま え が き

本報告書は、日本中央競馬会の畜産振興補助事業として(財)全国競馬・畜産振興会の助成により平成13年～15年度において実施した肉用牛遺伝資源活用体制整備事業の成果をとりまとめたものである。

平成12年度までに当協会では、肉用牛のDNA育種手法の実用化を目的とした家畜遺伝子情報活用体制整備特別対策事業を実施してきた。その結果、DNAマーカーとの遺伝的な連鎖関係から、経済形質に關与する遺伝子座の領域を推定することに成功し、当該個所のマーカー情報を選抜に利用可能な段階まで進めてきた。しかしながら、一般にマーカー情報は血統的に限定された集団においては有用だが、集団一般ではそうでないこと、責任遺伝子まで明らかにしなければ、信頼性の高いDNA育種手法の実用化は困難なこと、遺伝子を明らかにしなければ特許等の知的所有権の対象にならないことなどから、経済形質に關する遺伝子そのものを同定することが緊急の課題となってきた。このため事業では、第一段階として、DNAマーカーによる連鎖地図の高密度化とDNAクローンという実体を持つ断片をつないだ詳細な物理地図の作成を行いつつ、黒毛和種にこれまで世代交代と共に蓄積されてきた遺伝的組換えを活用する相関解析の体制を構築してきた。これらの考え方に基づいて本事業を推進した結果、至難とされていた肉質や肉量に關わる責任遺伝子の同定がもはや夢物語ではない段階まで到達することができた。

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

平成16年3月31日

社団法人畜産技術協会

会長 山下 喜 弘

肉用牛遺伝資源活用体制整備事業報告書

目 次

第1章 要約	1
第2章 ウシゲノム解析用ツールの開発	4
第3章 ウシゲノム連鎖地図の現状	8
第4章 肉用牛経済形質のDNA育種手法の開発	20
第5章 研究発表リスト	26
第6章 参考資料：発表論文	31

第1章 要 約

(1) 目 的

ウシのほとんどの経済形質は量的形質(quantitative trait)であり、遺伝的には量的形質遺伝子座(quantitative trait loci, QTL)に支配されている。現在までに、表型値と血統情報を基に遺伝的能力を推定する統計遺伝学的アプローチを用いた黒毛和種の遺伝的改良が行われ、大きな成果を挙げてきた。この手法では、種畜の保有する優良遺伝子型が後代集団へ遺伝する確率を推定できるが、特定の個体についての情報はない。そこで、近年の発展しているゲノム科学の成果を活用したDNA育種手法を開発し、個体毎のDNA情報から育種の精度を高めることが求められてきた。そこで、当研究所は平成6年度からDNA育種手法を開発する事業に取り組んできた。その結果、平成12年度までにDNAマーカーを利用したゲノム解析手法を確立し、黒毛和種経済形質QTL遺伝子座領域を特定してきた。平成13年度から平成15年度までの本事業においては、次のような3項目を目的として研究を進めてきた。

- ・ 経済形質QTLの責任遺伝子のクローニングを現実的なものにするレベルの高密度で詳細なウシゲノム解析用のツールを整備する。
- ・ マーカーマッピングの効率的な遂行で、共同研究機関と作成してきた父方半きょうだい家系を用いるQTLマッピングの結果を出す。
- ・ 先行している3種の経済形質QTL責任遺伝子のクローニングを進展させ、遺伝子機能の解析レベルまで持っていく。

その結果、以下のような成果を挙げることができた。

(2) ウシゲノム解析用ツールの開発

平成5年の春の段階で、ウシのゲノム解析のためのツールは、経済形質や抗病性遺伝子のマッピング(染色体上の位置を特定する、位置付ける)ができるレベルに達したため、各国の研究機関は一斉にツールの開発からマッピングに移行したが、ヒトゲノム情報を有効に活用し、それらの責任遺伝子を同定するためにもツールの充実が急がれていた。我々は、平成13年度からの本事業において、ウシの育種選抜に利用可能なDNA情報の開発を加速化するため、独自にゲノム解析用ツールの開発を行ってきた。その結果、ウシゲノム連鎖地図の高密度化(3.2倍)、および、ウシ染色体地図の高密度化(7.7倍)を平成15年度までにほぼ完成することができた(表1)。これによって、ウシ経済形質のマッピングを正確に行うことが可能になっただけでなく、ヒトやマウスのゲノム情報を的確に活用してウシ経済形質QTLの責任遺伝子同定という目標を明確にすることができた。

今年度までに進めてきた高密度ゲノム連鎖地図、詳細なウシ染色体地図、ウシ-ヒトゲノム比較地図などの作成により、我々はゲノム解析のための優れたツールを手にすることができた。これらのツールは、経済形質責任遺伝子のポジショナルクローニングだけでなく、遺伝性疾病の原因遺伝子のポジショナルクローニングにも威力を発揮することが期待できる。

(3) 肉用牛経済形質QTLのマッピング

米国などから交雑家系(主として、*Bos taurus*であるアンガス種と*Bos indicus*であるブラーマン種間の交

表1 本事業におけるウシゲノム解析用ツールの開発状況

	従 来	本事業の成果	
高密度ウシゲノム地図	1,250マーカー	3,960マーカー	3.2倍
詳細なウシ染色体地図	768座位	5,876座位	7.7倍

雑)を用いた肉用牛経済形質のマッピングについてこれまでいくつか報告されているが、特定の領域においてマーカー密度を高めて責任遺伝子のクローニングを試みている研究室はまだ無く、ファインマッピング(10 cM以内)に成功した例もまだ無い。

我々は、本課題の第一期に当たる平成6年度に開始された事業で、肉用牛(黒毛和種及び褐毛和種)の増体・肉質等の経済形質についてDNA情報を指標とした改良手法の開発を目的に道県の畜産試験場・研究所や(社)家畜改良事業団家畜改良技術研究所との共同研究を開始した。平成12年度までに、脂肪交雑などの主要な経済形質について連鎖する染色体領域を確実に特定してきており、一部の経済形質についてはマーカーアシスト選抜に適用しうる段階に至った。

平成13年度からは18道県・家畜改良事業団・家畜改良センターの合計20機関との共同研究を行って

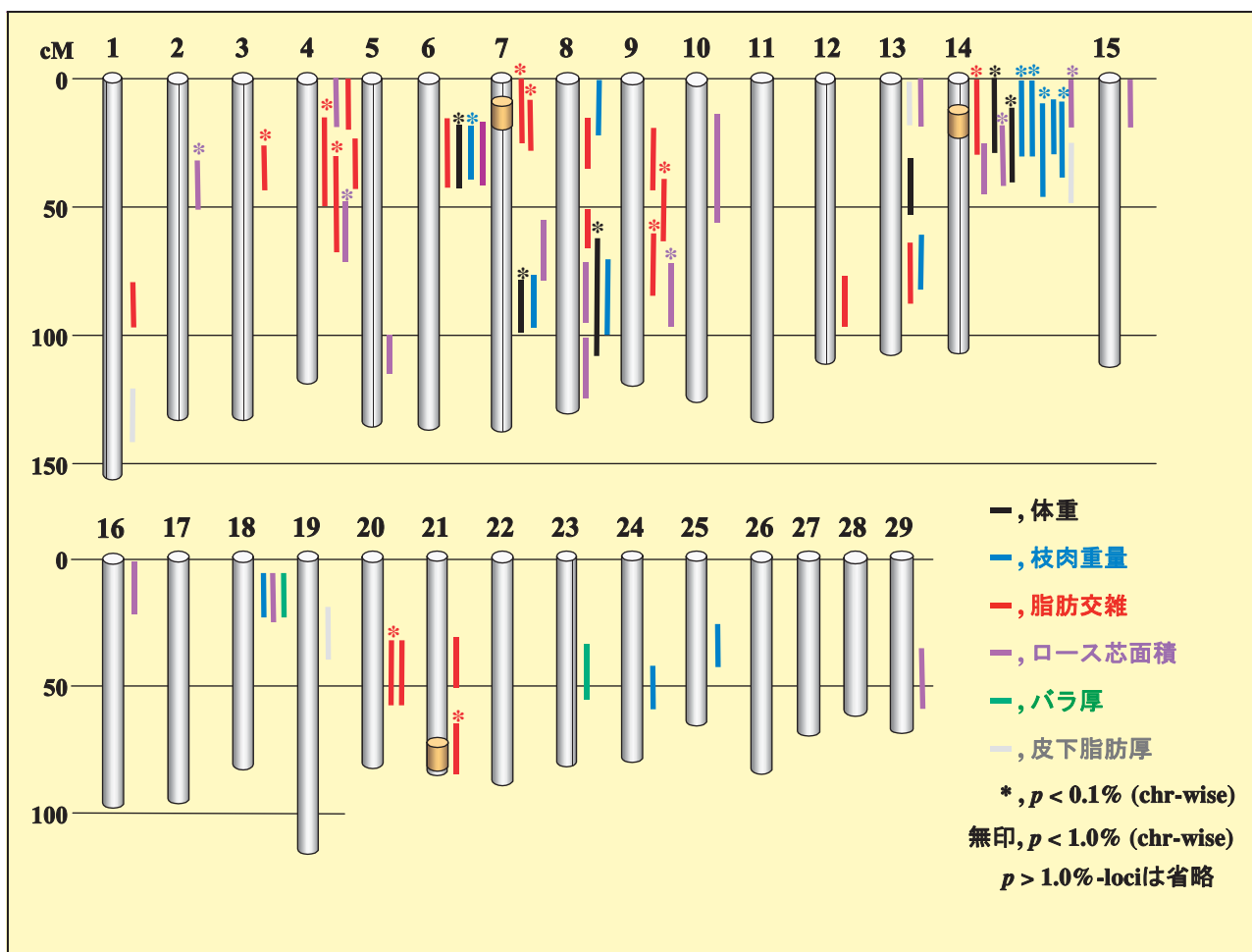
り、平成15年度までに17家系を解析し、表2に示すように多数の経済形質QTLをマッピングした。また、これらのマッピングしたQTLのうち、 $p < 0.01$ レベルで有意であった64 QTLを表示した地図を図1に表し

表2 平成15年度までの黒毛和種経済形質マッピングのまとめ

経済形質QTL*	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p < 0.001$
体重	12	6	5
枝肉重量	21	13	5
脂肪交雑	44	21	10
ロース芯面積	36	18	5
バラ厚	16	2	0
皮下脂肪厚	16	4	0
合計	145	64	25

*染色体ワイズの有意水準。

図1 黒毛和種牛経済形質マッピングのまとめ



た。 $p < 0.01$ レベルでマッピングされた経済形質QTL情報は特定の血統に属する集団内で優良なQTL遺伝子型を保有する個体を選別することができる。しかしながら、それぞれの詳細なQTL情報は限られた地域だけで種雄牛選抜に使われており、全国的にこれらの成果を享受するシステムにはなっていない。今後、これらの情報の利用の仕方を関係者によって調整していく必要があるだろう。

(4) 経済形質QTL責任遺伝子クローニングの試み

多数のマッピングした経済形質QTLのうち、BTA 21番セントロメア領域の脂肪交雑-1 (*Marbling-1*)、BTA 7番セントロメア領域の脂肪交雑-2 (*Marbling-2*)、BTA 14番セントロメア領域の枝肉重量-1 (*CW-1*)のポジショナルクローニングを試みた。

Marbling-1

Marbling-1 では、約1,000頭の産子と高密度マーカーを使って約9 cMまで狭め、BAC整列地図を作成した。さらに相関解析の手法でヒト塩基配列情報から490kbと推定される領域まで狭めた。この領域には既知及び予想される遺伝子は7個存在していた。

Marbling2

父方半きょうだい家系でマッピングしたBTA 7セントロメア約20cMの*Marbling-2*領域で、同じ母を持つ別の種雄牛家系ではバラツキが認められなかったことから、兩種雄牛におけるハプロタイプを詳細に調べた。その結果、*Marbling-2*の*Q* (相対的に優良な方の遺伝子型を*Q*という)は種雄牛aに遺伝しているが、種雄牛bには*q* (相対的に優良でない方の遺伝子型を*q*という)が遺伝していることが考えられた。こ

の*Q/q*の違いを根拠に*Marbling-2*領域を約6cMに狭めた。この領域に位置するマーカーとヒト相同遺伝子をアンカーとしてBAC整列化を完成し、SNPのタイピングにより、*Marbling-2*領域をBACクローン1個内 (約50 kb)まで狭めることに成功した。この領域には既知及び予想される遺伝子は3個存在していた。

CW-1

平成12年度までに、2つの父方半きょうだい家系を解析し、約10 cMのIBD (Identical By Descent, 同祖的。ある共通祖先牛から2頭の種雄牛に遺伝した同じ染色体断片であること)領域を見出したので、平成13年度から*CW-1*のファインマッピングを開始した。このIBD領域で作成したBAC整列地図はヒトドラフト配列情報から、約4.5 Mbと推測された。相関解析の結果、約1.2 cMに狭めた。1.2 cMまで狭めたことで*CW-1*の*Q*は黒毛和種一般に分布し、増体に一役買っていることが明らかになった。*Q*領域には既知及び予想される遺伝子は約10個存在していた。

(5) 今後の展望

3つのQTL領域とも狭めることに成功し、それぞれ数個の候補遺伝子を残すこととなった。とはいえ、これらほとんどの遺伝子の機能は不明である。平成16年度からの継続事業では、*Marbling-1*、*Marbling-2*、*CW-1*遺伝子を同定するため、該当領域の塩基配列を解読してSNP (一塩基多型、*Q/q*を区別する塩基配列)を開発し、SNPを使って相関解析で候補遺伝子を絞り、それぞれの遺伝子機能の解明を培養細胞レベル・マウス個体レベルで進めると共に、ヒトゲノム情報などを活用することで責任遺伝子の同定を行うつもりである。

第2章 ウシゲノム解析用ツールの開発

(1) 研究年次：平成13年～平成15年

(2) 目的と期待される成果

ウシのほとんどの経済形質は量的形質(quantitative trait)であり、遺伝的には量的形質遺伝子座(quantitative trait loci, QTL)に支配されている。現在までに、表型値と血統情報を基に遺伝的能力を推定する統計遺伝学的アプローチを用いた黒毛和種の遺伝的改良が行われ、大きな成果を挙げてきた。この手法では、種畜の保有する優良遺伝子型が後代集団へ遺伝する確率を推定できるが、特定の個体についての情報はない。そこで、近年の発展しているゲノム科学の成果を活用したDNA育種手法を開発し、個体毎のDNA情報から育種の精度を高めることが求められてきた。

1980年代後半よりヒトや実験動物等で、DNAマーカーを利用した連鎖解析手法によって表現型(特に劣性遺伝を示す形質)に影響を及ぼす領域、および、そこに存在する責任遺伝子の同定が行われてきた。ウシにおいても、クローニン-16欠損症やモリブデン補酵素欠損症といった劣性遺伝病の原因遺伝子が当研究所で同定されてきた。DNAマーカーの中でも、CAの繰り返し配列からなるマイクロサテライト(MS)マーカーは、最も多型に富みゲノム全体に分布している優れたマーカーである。畜産の分野において、MSマーカーの多型と表型値との相関性を調べるQTL解析手法を用いることにより、表型値にばらつきをもたらしている領域を明らかにし、その領域に存在するMSマーカーの多型を用いた育種への応用が可能になると考えられる。また、関連領域から責任遺伝子を同定し、機能解析等を行うことにより、量的形質に関わる遺伝子の作用機序を明らかにし、育種学以外の飼養学や栄養学等の分野にも貢献することが期待される。我々は、道県、および、(社)家畜改良事業団との共同で父方半きょうだい家系を用いた経済形質QTLマッピング(位置付け)を行ってきた。

ゲノム解析でマッピングしたQTL遺伝子座領域を

狭めて信頼性の高い高精度マーカー情報を得、それらの責任遺伝子をクローニングするためには詳細なウシ染色体地図が必要である。ウシの育種選抜に利用可能なDNA情報の開発を加速化するため、高密度ゲノム連鎖地図の作成、マッピングされたDNAマーカーによる物理地図である放射線照射ウシ体細胞ハイブリッド地図(Radiation Hybrid Map, RH地図)のフレーム作成、ウシ発現遺伝子座断片(Expressed sequence tagged, EST)のマッピング、ヒトゲノム情報を有効に活用できるウシ-ヒトゲノム比較地図の作成などを行い、詳細なウシ染色体地図を作成する。

QTLをウシゲノム上にマッピングするには、ゲノム連鎖地図が不可欠であり、地図のマーカー密度が高いほど正確な領域が判明する。しかしながら、マーカーの位置は遺伝的組換えの頻度を計算して決められたものであるため、どこまで高密度化していてもマーカーはゲノム上の点に過ぎない。隣接するマーカーとの間から領域特異的にマーカーを開発することはできない。そこで、マーカーで高密度化した、いわゆる計算で作成した連鎖地図から、DNAクローンという物質的な実体で位置付けた物理地図に変換してやらなくてはならない。この役割を演じるのがBACクローンである。マーカーとマーカーの間を複数のBACクローンでつないだものをBAC整列地図、あるいは、BACコンティグ地図という。いったん整列化すると、任意の領域からマーカーを開発することができ、ヒトゲノム情報から予測できるウシ相同遺伝子をコンティグ化した領域から分離できるようになる。なぜなら、整列化領域に存在するBACクロンのDNAからマーカーや遺伝子を開発できるからである。連鎖地図から物理地図への変換にはマーカーの高密度化が必要であり、物理地図を作成できれば、QTL領域の解析は飛躍的に進展する。

最も情報量の多い生物種はヒトであるため、ヒトゲノム情報を有効に活用することはQTL責任遺伝子のクローニングに大いに意義のあることである。ウ

シの染色体領域は、それぞれヒト染色体の特定の領域と類似している（シンテニーであるという）ので、ウシ遺伝子を貼り付けた物理地図を作成すれば、ウシ遺伝子とその隣の遺伝子の間に存在するであろう遺伝子の情報はヒトゲノムから得られる。しかしながら、遺伝子断片であるESTには多型がないため、連鎖地図にマッピングすることはできないが、RH地図にはマッピングできる。そこで、連鎖地図上に並べたDNAマーカーをフレームとしてRH地図を作り、遺伝子をその地図にマッピングすれば、詳細な物理地図が得られることになる。この段階まで進めば、もはやマーカーは点ではなく、マーカーとマーカーの間に存在する遺伝子が推測でき、その領域のBACクローンDNAを鋳型にPCRすれば、任意のウシ遺伝子の塩基配列の変異を調べることが可能になる。

したがって、高密度化したゲノム連鎖地図を作り、物理地図であるRH地図を作ることは、QTL責任遺伝子のクローニングに重要な準備であると言える。

(3) 研究の具体的な目標

(3)-1. マイクロサテライトの開発、および、高密度ゲノム連鎖地図の作成

1997年に公開された米国農務省肉畜研究センター(USDA-MARC)によるウシゲノム連鎖地図には約1,200種のマイクロサテライトがマッピングされている。我々は、USDA-MARCのウシリファレンスファミリー（標準家系）を用い、USDA-MARCと共同でゲノム連鎖地図を完成させる。このリファレンスファミリーで作成する地図の解離度限界は0.8 cMなので、3,000個程度のマイクロサテライト（平均間隔：1 cM以下）を載せたゲノム連鎖地図を完成させる。

(3)-2. ウシ染色体地図の作成：放射線照射ウシ体細胞ハイブリッドパネル地図(RH地図)、および、ウシ-ヒトゲノム比較地図の作成

我々は、これまでに、ヒトゲノム情報を有効に活用できる詳細なウシ染色体地図を作成するための準備を進めてきた。まず、平成12年度までに米国ミネソタ大学と共同で、染色体物理地図の作成に有用な

RHパネルの作成を完了した。また、大まかに遺伝子の染色体マッピングを行うために、ウシ体細胞ハイブリッドパネル(Somatic Cell Hybrid Panel, SCHパネル)を調製した。さらに、ウシ-ヒトゲノム比較地図の作成のため、ウシの各種組織で発現している遺伝子断片であるESTを約3万6千個開発し、GeneBankに登録した。これらのESTに含まれる約7,000配列からPCR増幅用のプライマーセット4,000種を作成した。これらの準備してきたツールと(3)-1で作成するウシゲノム連鎖地図を活用して詳細なウシ染色体地図を作成する。

- ・ゲノム連鎖地図に載せたマイクロサテライトでフレームワークマップを作る。
- ・4,000種のウシESTをマッピングし、ヒトゲノムへ位置づけ、比較地図とする(ウシEST数、419,416：平成16年4月30日現在)。
- ・最終的なウシのRH地図は、3,000個のマイクロサテライト、3,000個のESTを含む合計約6,000座とする。

(4) 研究開発の成果

マイクロサテライト (Microsatellite, MS) 開発とマッピングのまとめ（詳しくは、第3章 ウシゲノム連鎖地図の現状を参照）

1997年のUSDA-MARCウシゲノム連鎖地図のDNAマーカー数	1,236
独自開発し、マッピングを試みた多型性MS数	2,124
マッピングを試みた他機関が開発したMS数	214
ゲノム連鎖地図に新たに載せることのできたMS数	2,277
最新のウシゲノム連鎖地図のMS数	3,802

(独自開発し、物理的に染色体上の位置を決めているが、連鎖解析でマッピングしていないMS、346個を除く)

RH地図のまとめ

フレームワークに用いたMS数	3,219
マッピングしたMS数	3,294

マッピングしたEST数	2,582
合計	5,876
RHパネルの平均保持率	17.5%
ゲノムの全長	25,088 cR (約120 kb/cR)

(5) 国内および海外の状況

本事業は、米国のミネソタ大学（現在は研究者の異動によりネバダ大学）やUSDA-MARCとの共同研究である。ウシのゲノム解析のためのツールの開発は、1997年の春の段階で一応のレベルに達し、ゲノム解析ができるようになったため、各国の研究機関は一斉に経済形質や抗病性の家系を用いた解析に取り掛かっているが、ツールは十分ではなく、ヒトゲノム情報を有効に活用するためにもツールの充実が急がれていた。

一方、ウシ全ゲノム配列の解読のための国際協力プロジェクトが進行中である。平成12年1月より、USDA-MARCの主導でウシゲノム全体を対象とするBAC整列地図作りが開始された。米国・カナダ・英国・フランス・ニュージーランド・オーストラリア・ブラジル等から出資を含む参加があり、ヒトゲノム解析での経験を有する米国のTIGR (The Institute of Genomic Research) とカナダのプリティッシュ・コロンビア大学を含む共同研究体制で進められている。

BACクローンの整列化とは、多数のBACクローンの中からお互いに一部重複するクローンのつながり具合を調べ、並べていくことの繰り返しでBACクローンをつないでいくことである。つなぎ方には2つの方法がある。1つはフィンガープリンティング法である。BACクローンを制限酵素（特定のDNA塩基配列の個所を切断する酵素）で切断してゲル電気泳動でDNA断片のサイズで分離すると、BACクローン特有の切断された断片のパターンが得られる。このパターンをフィンガープリントと言い、お互いに一部重複するクローン間では類似のパターンが見られる。このパターンの類似性からBACクローンをつないでいく方法である。もう一つの方法はBACクローンの末端配列解読法である。BACクローンの末端配列を解読してPCRで増幅できるプライマーを作成する。このプライマーでスクリーニングされるBACクローンはこの末端配列を共通に有する、すなわち、お互いにつながっていることがわかる。BACクローンのフィンガープリントと末端配列はネット上に公開されている。過去2年間で、40万クローンのフィンガープリンティングのデータは、平成16年3月中旬にまとめられ、26万6千クローンの末端配列は4月に終了する。

表3 BAC fingerprinting

Library	Clones	Fingerprints	In contigs	Singles
CHORI-240	200,064	170,644	159,542	11,102
RPCI-42	94848	83,627	76,633	6,954
TAMBT	44,928	40,380	22,998	17,382
Total	339,840	294,651	259,173	35,478

表4 BAC end sequences

Library	Clones	Paired	Single	Clones	Reads	Length
CHORI-240	200,064	119,091	26,067	145,164	264,261	605.4
TAMU	94848	9,686	5,299	14,985	24,671	501.5
INRA	44,928	11,174	544	11,718	22,892	722.8*
Total	339,840	139,957	31,910	171,867	311,824	605.8

表5 Contig coverage of human genome

Human Chr *	Size (bp)	Covered by Bovine Ctgs	% Coverage
1	245,203,898	203,209,542	83
2	243,315,028	189,896,964	78
3	199,411,731	146,712,637	74
4	191,610,523	87,438,872	46
5	180,967,295	164,929,686	91
6	170,740,541	157,704,095	92
7	158,431,299	134,446,220	85
8	145,908,738	130,536,790	89
9	134,505,819	122,085,695	91
10	135,480,874	102,980,468	76
11	134,978,784	93,970,761	70
12	133,464,434	129,723,153	97
13	114,151,656	75,906,289	66
14	105,311,216	56,025,377	53
15	100,114,055	49,252,665	49
16	89,995,999	32,748,104	36
17	81,691,216	30,765,924	38
18	77,753,510	54,277,916	70
19	63,790,860	31,378,878	49
20	63,644,868	27,604,294	43
21	46,976,537	12,194,145	26
22	49,476,972	20,136,019	41
X	152,634,166	136,858,566	90
Y	50,961,097	-	-
Total	3,070,521,116	2,190,783,060	73

* UCSC hg15 masked sequences

(6) 今後の進め方

今年度までに進めてきた高密度ゲノム連鎖地図の作成、および、RH地図とウシ-ヒトゲノム比較地図の作成は現段階で完成とし、論文発表を行う。これ

らの情報は、経済形質の責任遺伝子だけでなく、遺伝性疾患の原因遺伝子のポジショナルクローニングに威力を発揮すると期待できる。

第3章 ウシゲノム連鎖地図の現状

(1) ゲノム連鎖地図とは

ゲノム上の任意の場所である座 (locus) の塩基配列が個体間で異なる場合には多型性があるといい、DNAマーカーと呼ばれる。精子や卵子が生成する減数分裂の過程で相同染色体間の組換えが起こるが、その頻度はマーカー間の距離にほぼ比例する。近接しているほどマーカー間の組換え頻度は小さくなる。ゲノム解析のための基本的なツールであるゲノム連鎖地図 (linkage map) は、DNAマーカーを連鎖の程度に応じて直線上に並べたものである。多数の減数分裂が観察されるリファレンスファミリー (標準家系) を使うと、DNAマーカーの並んだ連鎖地図を作成できる。ウシのゲノムは29本の常染色体と性染色体XYで構成されているので、DNAマーカーは30の連鎖グループに属する(Y染色体には相同染色体がないので組換えは起こらない)。それぞれの連鎖グループで多数のDNAマーカーをcM (センチモルガン) という距離の単位で並べることができる。1-cMとは減数分裂中に1%の頻度で組み換えを起こしうる遺伝的距離を示す単位である。ウシやヒトでは1-cMが約1 Mb (メガベース: 百万塩基対) に相当し、全ゲノムは約3,000-cM、30億塩基対になる。連鎖地図はマーカー間の組換え頻度に依存してマーカーを並べたものゆえ、マーカーは点に過ぎない。しかしながら、地図上に位置の明らかなマーカーが多数あるほど正確なマッピングが可能だけでなく、マーカー間をクローン化されたDNA断片で連結することが可能となる。すなわち、物理的な実体のある染色体地図となり、任意の領域のマーカー開発や遺伝子配列の変異を調べることが容易になる。したがって、マーカー密度が高くなればなるほど、連鎖地図のツールとしての有用性は飛躍的に高まるのである。

(2) 家畜・家禽におけるゲノム連鎖地図の現状

多数のDNAマーカーを含むゲノム連鎖地図は、経済形質や遺伝性疾患などに関わっている遺伝子のマ

ッピングに必要不可欠である。表6に家畜・家禽における連鎖地図の現状を示している。ウシでは、1997年に米国農務省肉畜研究センター (USDA-MARC) からのグループが約1,250個のDNAマーカーを含む連鎖地図を作成した。他の家畜・家禽でも約1,000個のDNAマーカーを含む連鎖地図が報告された。約1,000個のマーカーを含む連鎖地図があれば、遺伝的な形質のマッピングは可能であることと、マーカーを開発するには大変な労力と費用を要するため、家畜・家禽ではそれ以降本格的なマーカーの開発と連鎖地図のアップデートはなされていなかった。しかしながら、マーカーアシスト選抜のためのファインマッピングや目的の遺伝子の単離・同定の局面になるとマーカー数が少ないため、マッピングした領域毎に多大なコストをかけて高密度にマーカーを開発しなくてはならない。そこで、我々はウシゲノムの全体を対象にランダムにマーカーを開発し、USDA-MARCと共同で3,000個のマーカーのマッピングされた連鎖地図の作成を行うことにした。本事業で作成したウシ連鎖地図の概要も表6に示している。

ヒトの場合、全ゲノムの塩基配列が明らかになっても遺伝的形質のマッピングにおける連鎖地図の重要性は変わらない。生活習慣病である高血圧・糖尿病などの感受性遺伝子を探索するには、統計的に有意に連鎖する領域を特定しなければならないからである。表6の下段に示すように1998年に8千個のマーカーを使った連鎖地図が作成されたが、そのマッピングに使った標準家系の減数分裂数は約200のため連鎖地図の解離度が低く、多数のマーカーの位置の違いを区別できず、同じ場所に位置づけられることとなった。そこで、2002年には減数分裂数を1,257まで増やした連鎖地図が作成された。さらに、米国 National Institute of Healthは減数分裂数5,000まで増やしたヒト連鎖地図作成プロジェクトに30億円を使う計画である。因みに、我々の用いたウシ標準家系の減数分裂数は391であるため、解離度の限界は0.8 cM

表6 家畜・家禽のゲノム連鎖地図の現状

畜種	作成年	連鎖地図にマップされているマーカー数	ゲノムの大きさ* (cM)	マーカー密度 (cM/マーカー)
ウシ	1997	1,250	2,990	2.5
ウシ**	2004	3,960	3,214	0.8
				1.4#
ブタ	1996	1,042	2,286	2.2
ヒツジ	2001	1,093	3,500	3.4
ニワトリ	2000	1,889	3,800	2.1
ヒト	1998	8,031	3,567	1.5#
ヒト	2002	5,136	3,615	0.5#

*雌雄平均値。一般に雌の方が大きい。**本事業で作成したウシゲノム連鎖地図。#ヒトやマウスでは同一個所に位置づけられたマーカー集団を1個に数えている。本事業で作成したウシ連鎖地図をヒト・マウスのように個所数で計算すると、ヒト連鎖地図(1998)と同程度のマーカー密度となる。

となり、本事業で作成したウシ連鎖地図はまだ限界まで到達していない。USDA-MARCは独自に約800個の一塩基多型SNPマーカーをマッピングしていることから、合計4,600マーカーになり、さらに限界まで近づくだらう。今後は、解離度の高い連鎖地図を作成するため、減数分裂数を増やす、つまり、マッピングのための標準家系の規模を大きくする必要があるかもしれない。

(3) 本事業で作成したウシゲノム連鎖地図

本事業で作成したウシゲノム連鎖地図は2004年春から夏頃には公表される見込みである。新しい連鎖地図にマッピングされたマーカーの内、当研究所で開発されたマイクロサテライトマーカーが半数以上を占めている。1997年の地図において常染色体上にいくつか存在していた20-cMを越える大きなギャップは消滅し、どの常染色体もマーカー間隔は10-cM未満となっている。この連鎖地図により、ウシの遺伝性疾患などの原因遺伝子をはじめ、肉質など経済形質の責任遺伝子の精度の高い染色体マッピング(ファインマッピング)が可能となる。表7と図2に本事業で作成したウシゲノム連鎖地図を示す。

(4) ゲノム連鎖地図の重要性

現在、米国を中心にウシの全ゲノムの塩基配列を決定するプロジェクトが始まっている。全ゲノムの塩基配列を決定するには、詳細な物理地図(遺伝的な距離ではなく、DNAの長さに基づく地図)を作成する必要がある。詳細な物理地図を作成するには、高密度な連鎖地図が重要な足場となる。したがって、新しいウシゲノム連鎖地図は、遺伝形質の責任遺伝子の正確なマッピングだけではなく、全ゲノムの塩基配列決定にも大きく貢献することが期待される。

2001年にヒトゲノムのドラフト配列が公表され、ゲノム上には約3万の遺伝子の存在が示唆された。ヒトゲノム配列中の未読解ギャップはその後修復されて完成に近づいている。ゲノムの全塩基配列が明らかとなり、全遺伝子の機能がわかったとしても、任意の遺伝形質の原因(責任)遺伝子をそれだけで同定することはできない。しかし、ゲノム連鎖地図を使って該当する遺伝形質をマッピングしておけば、その領域に存在する遺伝子群から効率的に原因(責任)遺伝子の候補を見つけることが可能となる。高密度な連鎖地図は、全ゲノム配列が決定された後においても、遺伝子の同定に重要な役割を果たすのである。

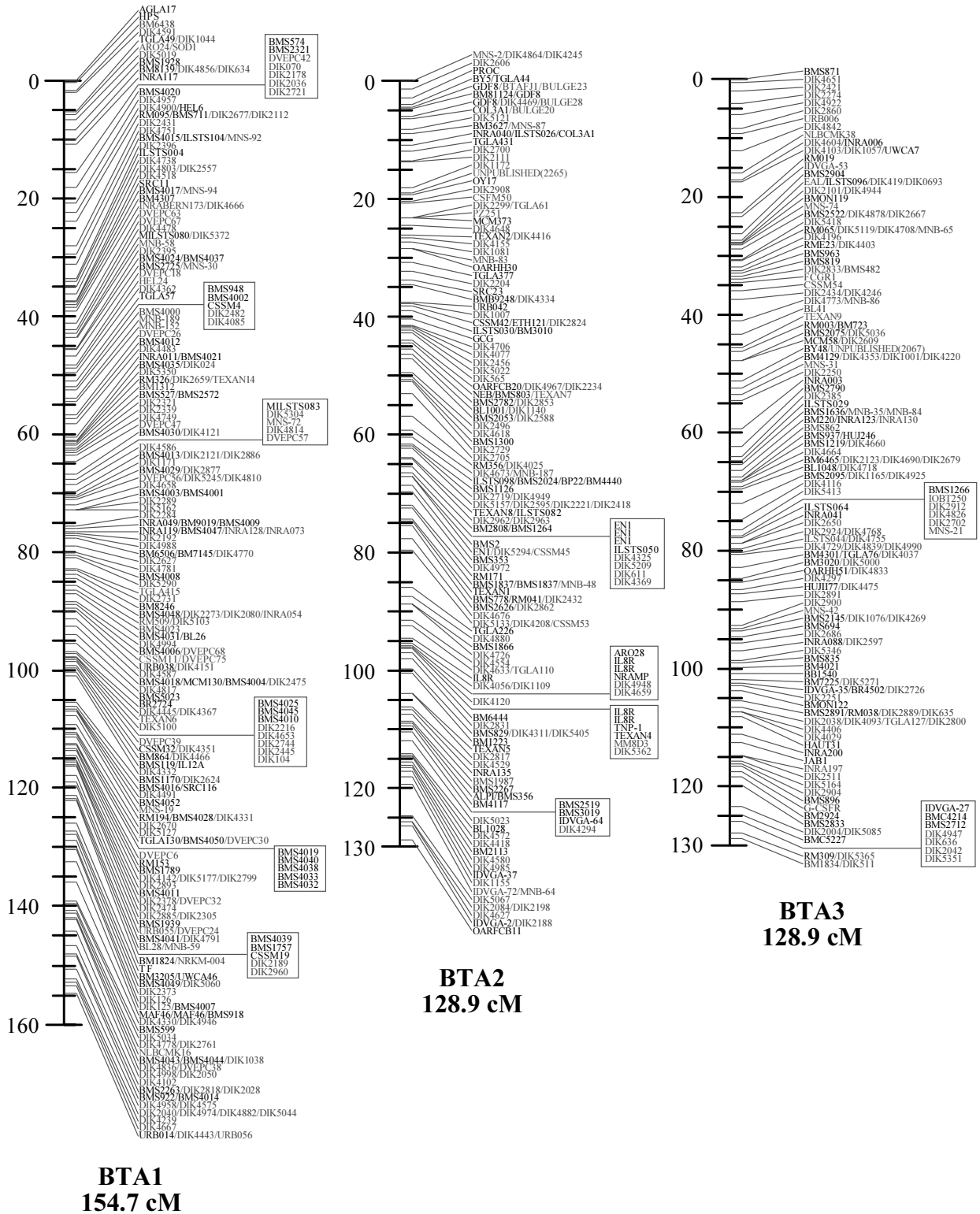
表7 ウシ連鎖地図の概要

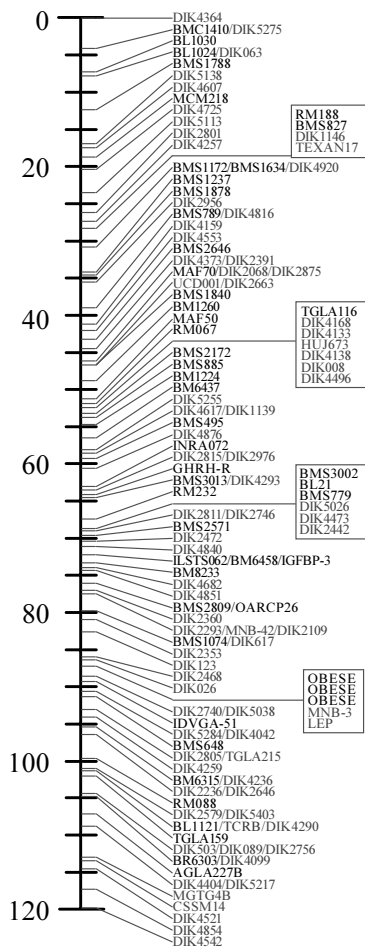
BTA/X ¹⁾	サイズ (cM)	マーカー数	ポジション数	平均間隔 (cM)	間隔最大値 (cM)	間隔の数	
						10~15cM	5~10cM
1	154.7*	266*	151*	1.0	4.6	0	0
2	128.9	188	113	1.2	6.2	0	2
3	128.9	173	102	1.3	5.2	0	1
4	119.9	132	82	1.5	4.7	0	0
5	135.6	184	116	1.2	4.7	0	0
6	134.4	232	133	1.1	9.2	0	3
7	135.6	139	89	1.6	8.6	0	5*
8	128.6	125	85	1.5	7.9	0	4
9	116.2	130	80	1.5	4.9	0	0
10	118.8	126	89	1.4	4.4	0	0
11	131.0	201	104	1.3	7.6	0	2
12	110.0	126	75	1.5	8.9	0	1
13	105.4	116	81	1.3	4.9	0	0
14	103.9	136	78	1.4	5.1	0	1
15	109.8	145	95	1.2	5.6	0	1
16	98.6	104	68	1.5	4.0	0	0
17	95.9	104	70	1.4	5.5	0	1
18	84.4	114	71	1.2	5.1	0	1
19	109.6	136	90	1.2	6.7	0	3
20	82.9	121	65	1.3	5.2	0	1
21	83.8	129	73	1.2	4.0	0	0
22	88.1	82	58	1.6	7.1	0	1
23	80.0	77	49	1.7	6.3	0	2
24	78.1	98	62	1.3	3.8	0	0
25	68.4	74	49	1.5	6.8	0	2
26	79.4	64	44 [#]	1.9*	7.4	0	3
27	71.2	72	44 [#]	1.7	6.2	0	1
28	61.7 [#]	81	44 [#]	1.5	4.7	0	0
29	69.7	158	79	0.9 [#]	3.3 [#]	0	0
X	146.5	189	84	1.8	10.2*	1	5*
total	3159.9	3960	2423	1.4 (平均)	10.2 (最大値)	1	40

*は最大値、#は最小値を示す

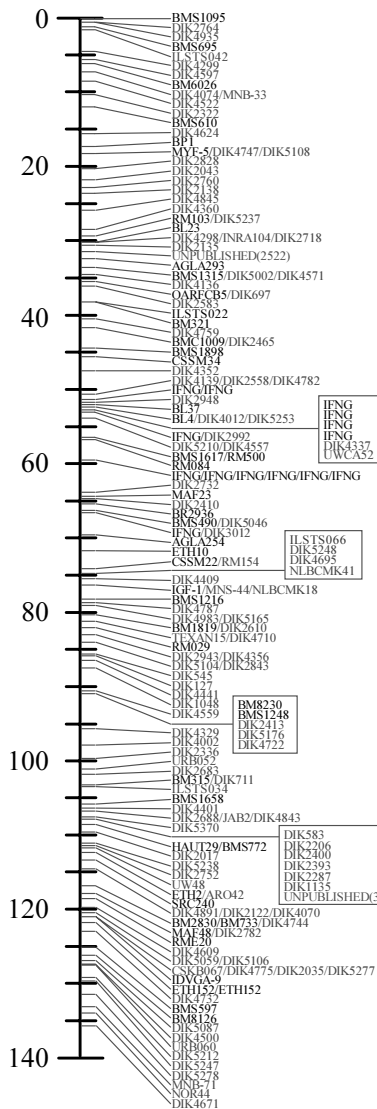
¹⁾ 29番染色体までは、性平均値、X染色体は雌による値

図2 ウシ連鎖地図

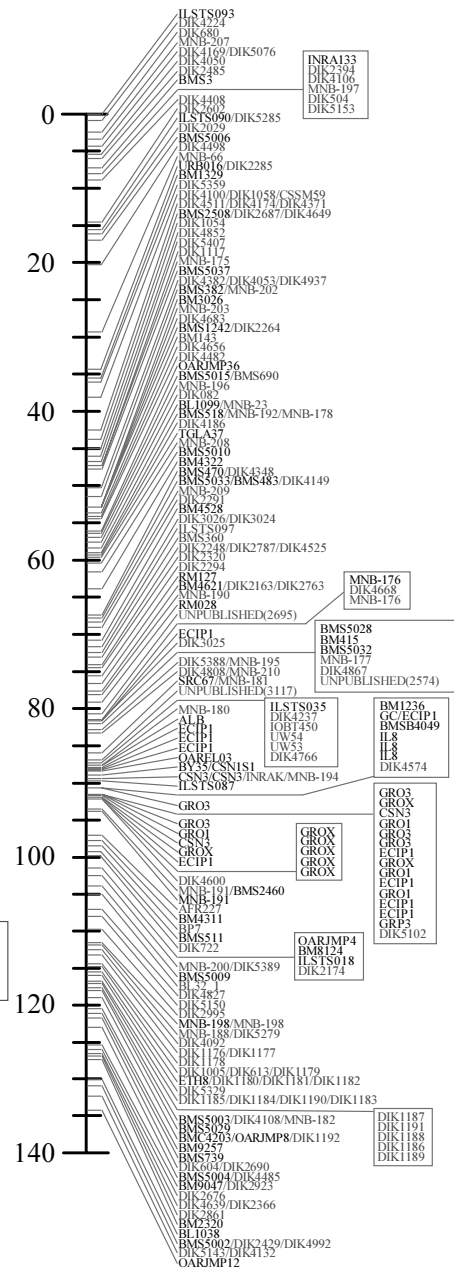




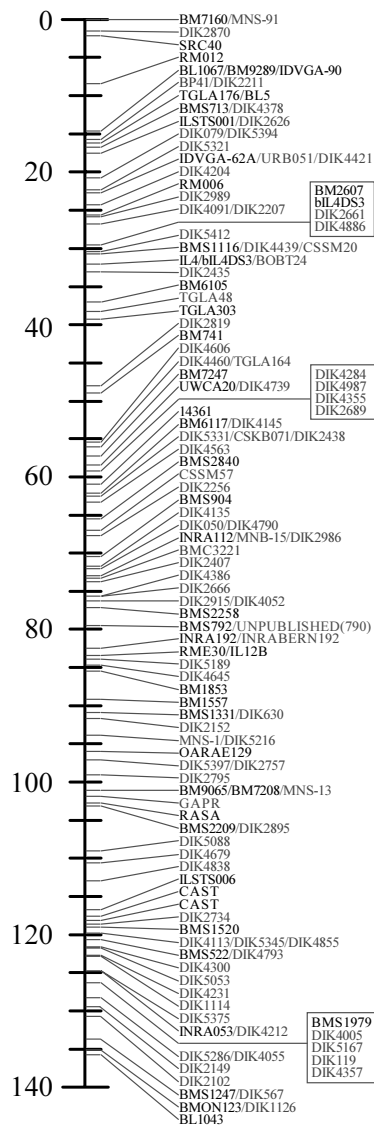
BTA4
119.9 cm



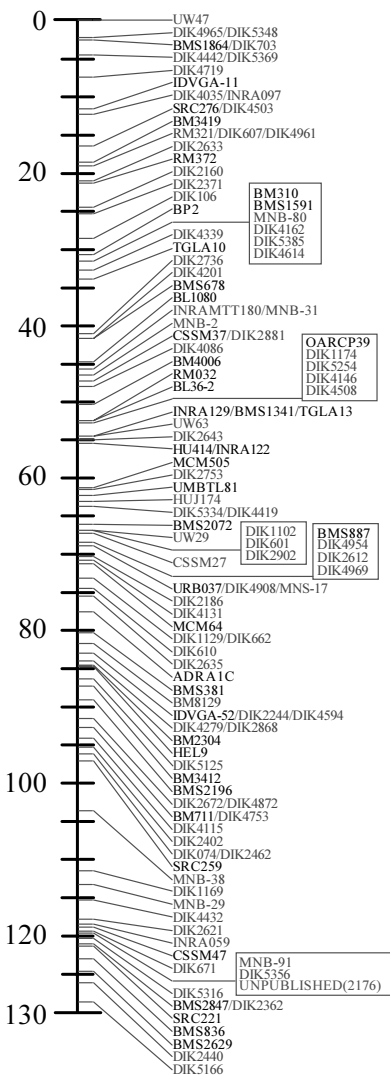
BTA5
135.6 cm



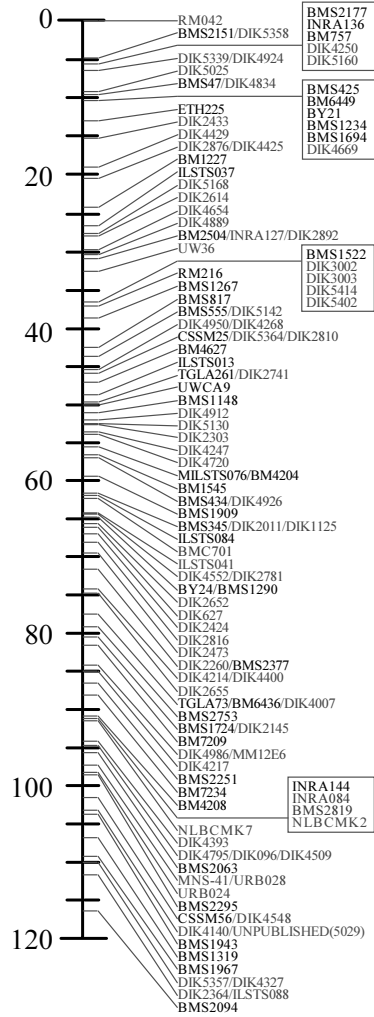
BTA6
134.4 cm



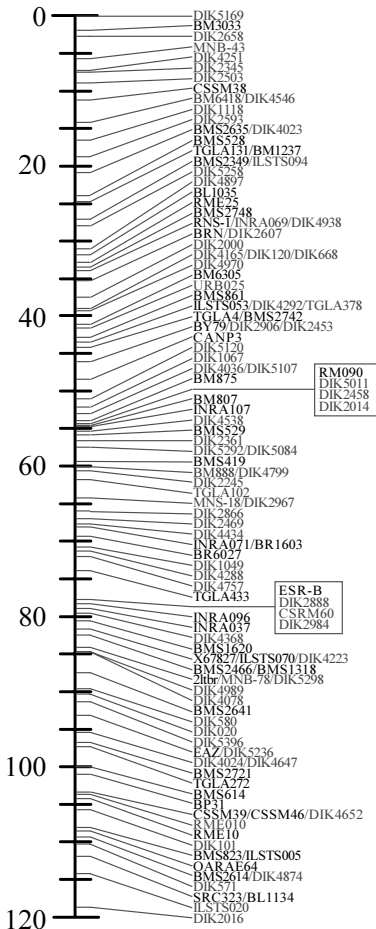
BTA7
135.6 cm



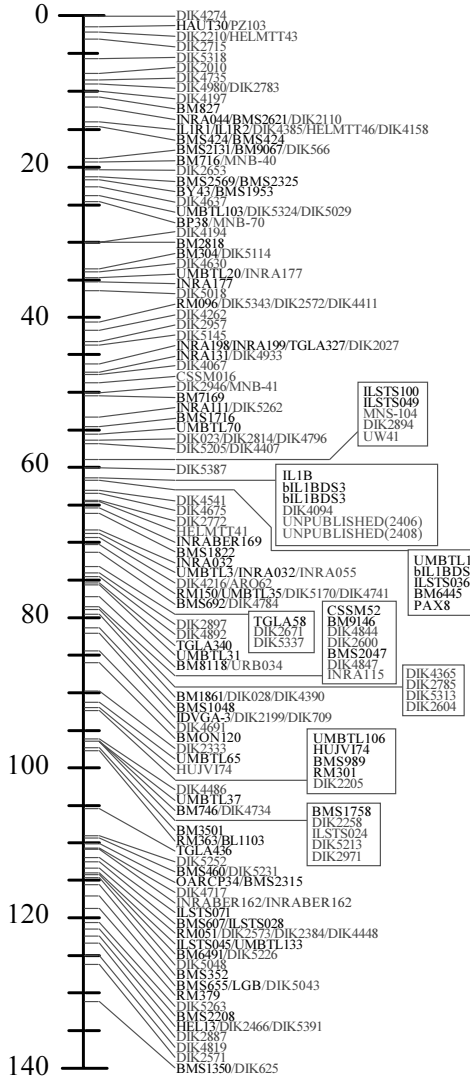
BTA8
128.6 cm



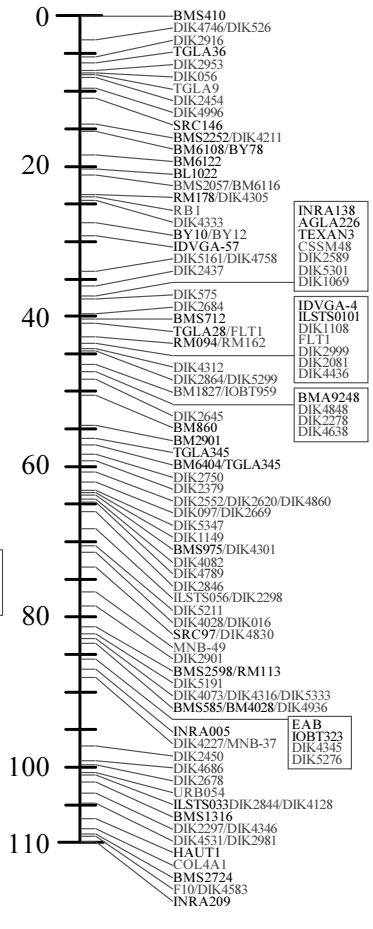
BTA9
116.2 cm



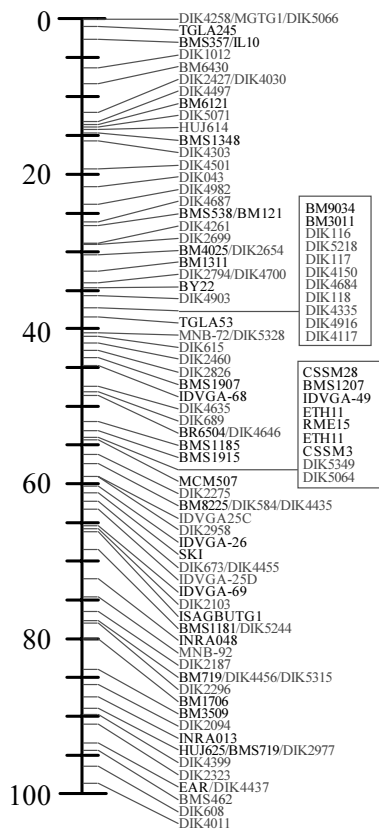
BTA10
118.8 cm



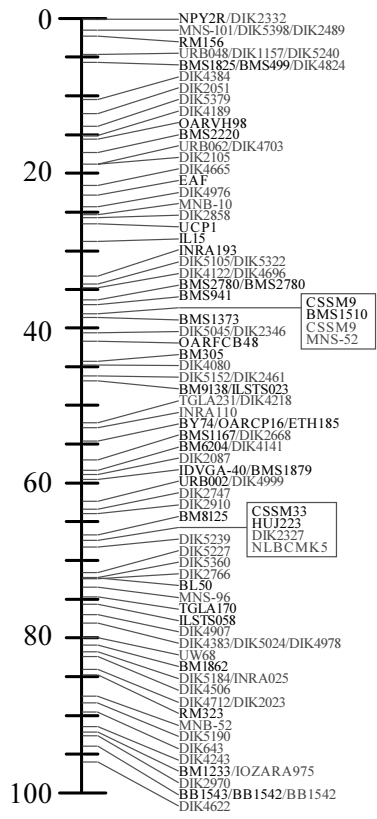
BTA11
131.0 cm



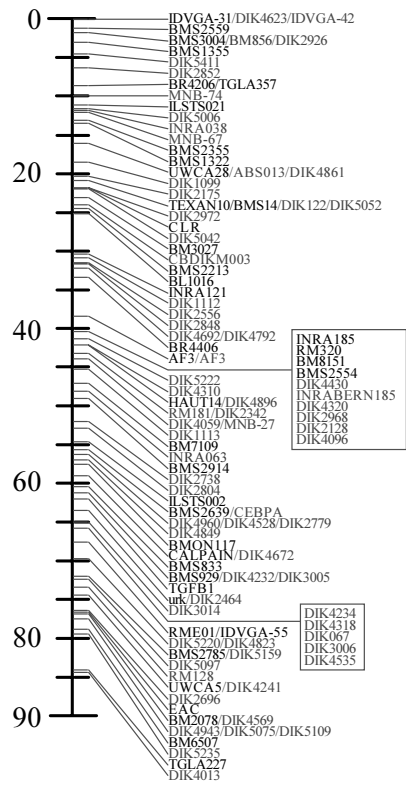
BTA12
110.0 cm



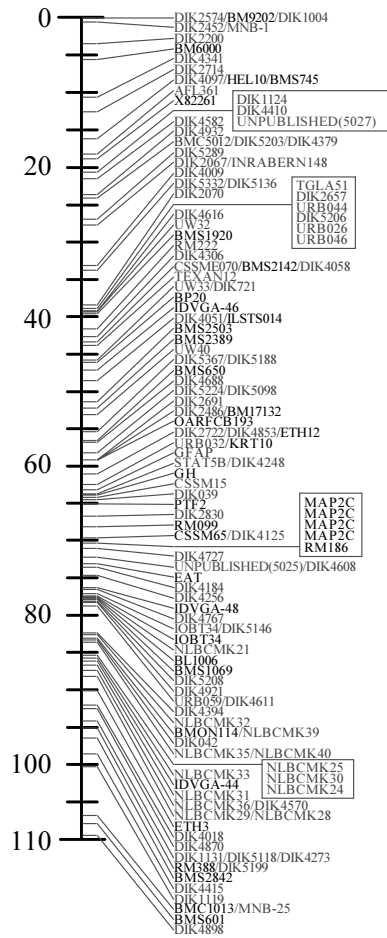
BTA16
98.6 cM



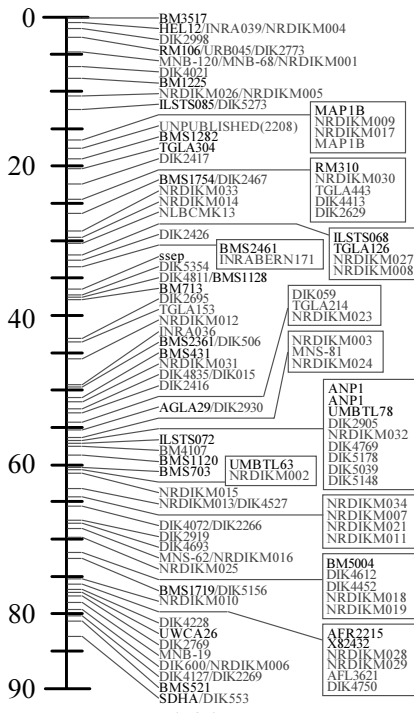
BTA17
95.9 cM



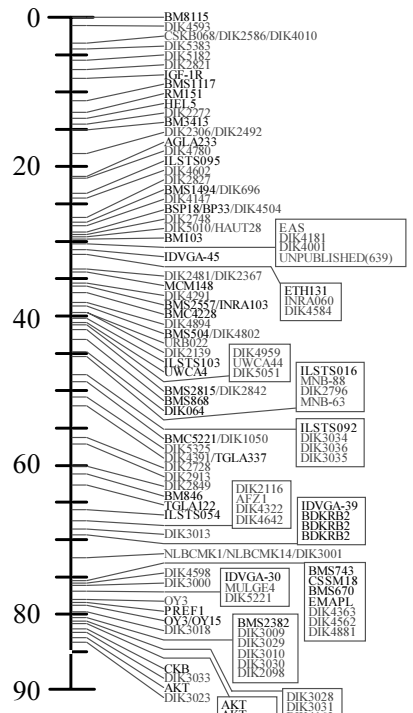
BTA18
84.4 cM



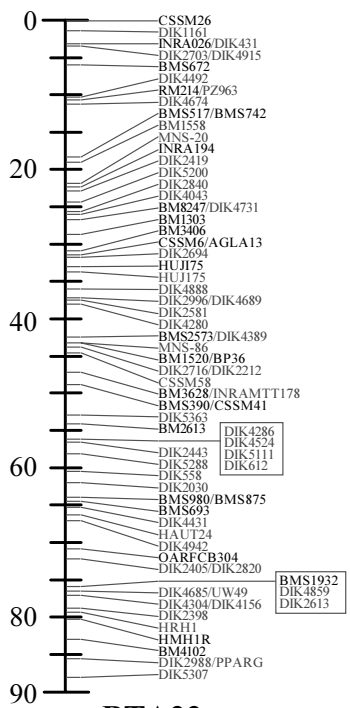
BTA19
109.6 cm

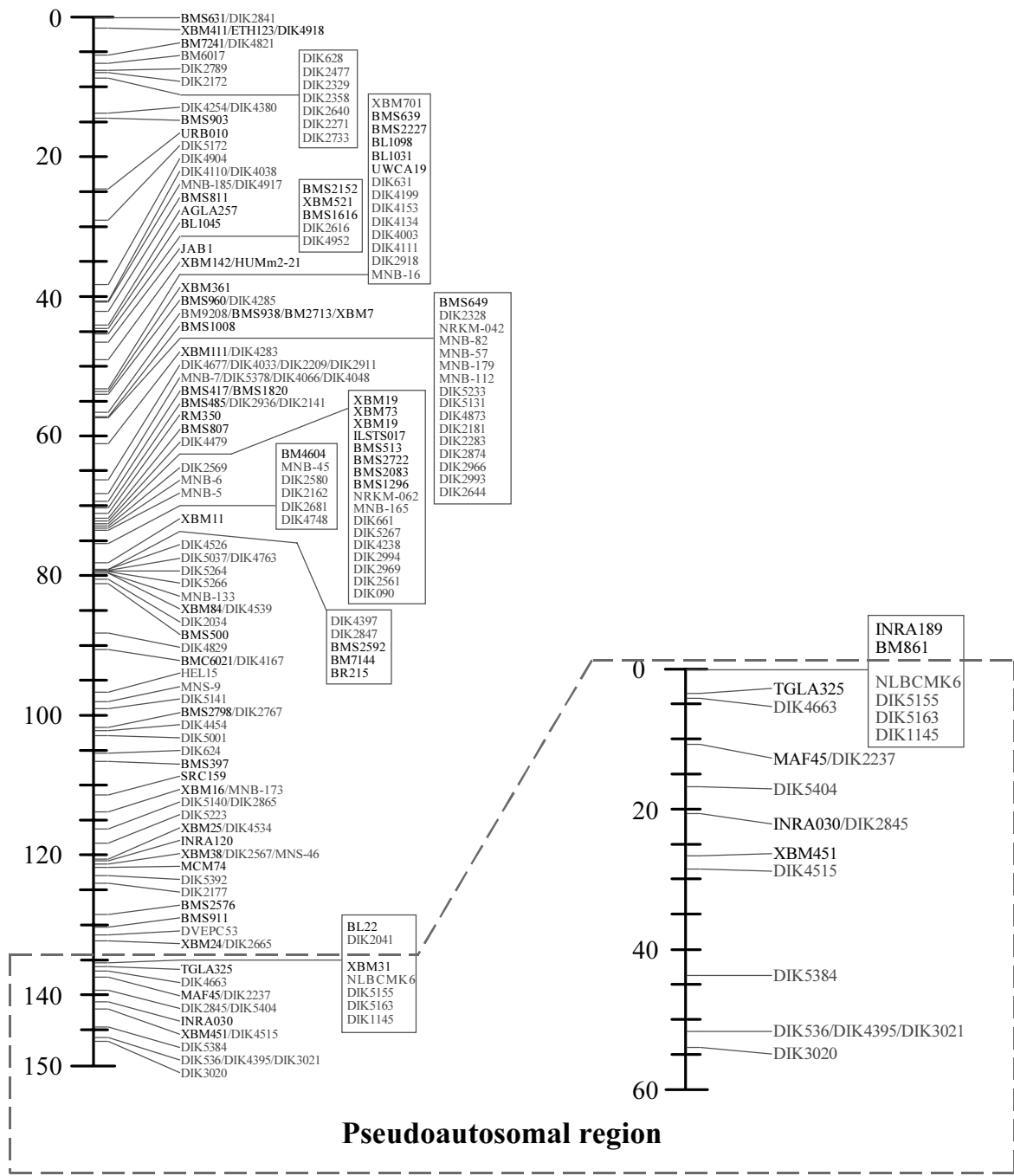


BTA20
82.9 cm



BTA21
83.8 cm





第4章 肉用牛経済形質のDNA育種手法の開発

(1) 研究年次：平成13年～平成15年

(2) 目的と期待される成果

ウシの経済形質の改良はこれまで主としてBLUP等に代表される統計遺伝学的手法によって行われており、大きな成果を挙げてきた。しかしこの方法では種畜評価に要する時間、コストが膨大なものになる欠点がある。一方、近年におけるゲノム解析研究の進展は、ゲノム連鎖地図を用いることにより、特定経済形質に関与する染色体上の遺伝領域、あるいは遺伝子を特定することを可能にしつつある。しかしながら、ウシのほとんどの経済形質は量的形質であるため、責任遺伝子の特定は困難であることが容易に予想できる。責任遺伝子の特定という目的を達成するには明確な戦略に基づいた組織的・継続的な取り組みが欠かせない。

平成6年度に開始された本課題の第一期では、肉用牛（黒毛和種及び褐毛和種）の増体・肉質等の経済形質についてDNA情報を指標とした改良手法の開発を目的に道県の畜産試験場・研究所や(社)家畜改良事業団家畜改良技術研究所との共同研究を開始した。平成12年度までに、脂肪交雑などの主要な経済形質について連鎖する染色体領域を確実に特定してきており、一部の経済形質についてはマーカーアシスト選抜に適用しうる段階に至った。平成13年からの第

二期では、道県等との共同研究を継続して、肉用牛の増体・肉質等の経済形質領域をマッピングする（染色体上の位置を特定する、位置付ける）とともに、マッピングした経済形質、特に、脂肪交雑に影響する遺伝子を同定し、その遺伝子情報を応用することを目的としている。

(3) 研究開発の成果

(3)-1. 経済形質解析のためのDNAサンプルの収集

平成13年度から18道県・家畜改良事業団・家畜改良センターの合計20機関と共同研究を実施している。特定種雄牛を父とする大規模な父方半きょうだい家系を作成することは、道県においては該当種雄牛の遺伝的能力の的確な把握と後継種雄牛の作成に重要であり、かつ、多種多様な解析用家系の作成は経済形質に影響する遺伝子(QTL)を同定するためにも有用である。そこで、枝肉共励会や枝肉共進会等において血統情報の明らかな肥育牛のDNAサンプルを収集することを始めた。当研究所では、東京食肉市場、および、大阪市食肉市場におけるサンプリングを実施している。平成15年度までの収集の状況は表8の通りである。これらの収集したDNAサンプル数は約4万7千となった。これらのサンプルから17以上の父方半きょうだい家系が作成され、経済形質のマッピングに利用されている。

表8 平成15年度までのDNAサンプル収集状況

収 集 数	年 度	収 集 数	合 計
道県、LIAJ	13	7,902	37,973
	14	12,413	
	15	17,658	
動物遺伝研究所	13	1,054	8,944
	14	2,503	
	15	5,387	
合 計			46,917

(3)-2. 父方半兄弟家系を用いた経済形質のマッピング

これまでウシ、ブタ、ニワトリ等の家畜・家禽の量的形質である経済形質QTLマッピングには、遺伝的に離れ、表型値の異なる品種間の交雑家系が使われてきた。たとえば肉用牛では*Bos taurus*のアンガス種と*Bos indicus*のブラーマン種が解析用家系の親に使われている。このような場合、QTLを検出しやすいが、得られた結果を育種に応用することは比較的困難となる。一方、同一品種内での家系は、得られた結果はそのまま育種に応用できると予想されるが、効果の大きいQTLだけがマーカー型判定の多大な労力によって検出されるとシミュレートされている。本事業では、同一品種内の父方半きょうだい家系のデザインを黒毛和種に応用することを試みてきた。平成12年度までに、適度な型判定労力により、脂肪交雑QTLを4家系で4ヶ所、枝肉重量QTLを7家系で4ヶ所検出してきた(表9)。たとえば、表9に示す経済形質遺伝子座である脂肪交雑1の領域について、兵庫県では県内の集団で広くサーベイすることで、その優れたハプロタイプをホモで有する繁殖雌牛を確保することに成功した。このような個体を次世代の種雄牛作りに使うことができる。また、枝肉重量1について鹿児島県内の集団について調査し、

優れたハプロタイプの頻度を知ることができた。

これまで我々がQTLマッピングに用いていた解析法Explorer/ Half-sibは、表型値が正規分布していない場合でも解析できる順位和検定に基づいているという長所があるが、点毎(1 cM毎, point-wise)に有意水準を検定しており、多重検定の補正がなされなかったため、有意水準が高くでやすい欠点が判明した。そこで、解析法を染色体毎(染色体ワイズ, chromosome-wise)やゲノム毎(ゲノムワイズ, experiment-wiseまたはgenome-wise)に有意水準を検定し、多重検定を補正するインターバルマッピング法のQTL Express (Haleyら、1994；2002)に変更した。QTL Expressでは順位和検定をしていないが、ほとんどの表型値分布は正規分布であることを保証する尖度と歪度を示した。2種の解析法でそれぞれ得られた有意なQTLのアリアル効果に差はなかった。表9では2つの解析法の結果を比較している。脂肪交雑-1や枝肉重量-1などほとんどのQTLは有意であったが、枝肉重量-3と枝肉重量-4は有意ではなくなった。

そこで我々はQTL Expressで解析することにした。平成15年度までに全国で17家系についての経済形質のマッピングが得られた。それらの結果を表10と図3に示す。

表9 黒毛和種経済形質マッピングとアリアル効果：Explorer/ Half-sibとQTL Expressの比較

経済形質	有意の度合い Explorer/ Half-sib	有意の度合い* QTL Express	アリアル効果
脂肪交雑-1	$p < 0.00001$	$p < 0.001$	BMS, 1.0
脂肪交雑-2	$p < 0.00005$	$p < 0.001$	BMS, 1.0
脂肪交雑-3	$p < 0.00001$	$p < 0.001$	BMS, 1.0
脂肪交雑-4	$p < 0.0001$	$p < 0.01$	BMS, 1.5
枝肉重量-1	$p < 0.00001$	$p < 0.001$	枝重、36 kg
枝肉重量-1-2#	$p < 0.00001$	$p < 0.001$	枝重、32 kg
枝肉重量-1-3#	$p < 0.0001$	$p < 0.001$	枝重、28 kg
枝肉重量-1-4#	$p < 0.00001$	$p < 0.001$	枝重、27kg/体重、40 kg
枝肉重量-2	$p < 0.00001$	$p < 0.01$	枝重、22kg/体重、45kg
枝肉重量-3	$p < 0.0001$	ns	枝重、23 kg**
枝肉重量-4	$p < 0.0001$	ns	枝重、33 kg**

#同一のQTLと思われる。*染色体ワイズの有意水準。**QTL Expressでは有意でなかった。ns, 有意ではない。

QTL Expressを用いた解析で有意水準 $p < 0.001$ でマッピングされたQTLは、アリアル効果が大きいことが期待される。すなわち、平成15年度までに全国で20のQTLがマーカーアシスト選抜の対象になりうる段階まで至った。図3には、表10に示す $p < 0.01$ の各QTLの染色体領域を表している。興味深いことに、同種のQTLが同じ領域にマッピングされている。表9では、独立に4つの家系でマッピングされている枝肉重量-1は同一QTLと推測しているが、17家系のQTL解析の結果を見ると、2つの体重QTLと5つの枝肉重量QTLがいずれも有意水準 $p < 0.001$ で同じ領域にマッピングされている。我々は、(3)-3-3においてこの領域(黄土色で示している)を枝肉重量-1(CW-1)としてポジショナルクローニングのターゲットにして詳細に研究しており、現在までのところ互いに同祖的であるという結果を得ている。

もう2ヶ所の黄土色で示している領域のBTA21番テロメア領域とBTA7番セントロメア領域は、脂肪交雑-1 (*Marbling-1*) と脂肪交雑-2 (*Marbling-2*) として、それぞれ、(3)-3-1と(3)-3-2に述べるようにポジショナルクローニングのターゲットにして詳細に研究している。

肉牛の経済形質のような量的形質には、複数の遺伝子座の間の相互作用であるエピスタティック(非相加的)効果が見られる場合がある。そこで、相互作用も検証するため、我々はQTL Expressを改良した

Glissardoを開発した。まだ本格的な解析が行われたケースはないが、今後Glissardoを用いる予定である。

(3)-3. 経済形質に影響する遺伝子のポジショナルクローニング

これまでにマッピングしてきた経済形質遺伝子座の内、図3の黄土色で示す領域である脂肪交雑-1・脂肪交雑-2・枝肉重量-1の3領域について、ポジショナルクローニングによる責任遺伝子取りを試みた。

(3)-3-1. *Marbling-1* (脂肪交雑-1) の解析 (兵庫県との共同研究)

中小家畜(ブタ、ニワトリ)におけるQTL解析は、品種間の遺伝的な差異に注目してF2家系やバッククロス家系といった資源家系を構築して行うことが多い。一方、大家畜(ウシ)において資源家系を構築するには、多大な時間と費用を要する。そこで、枝肉成績、血統情報が公開される枝肉共励会・共進会からサンプリングし、父方半きょうだい家系を構築し、QTL解析に供することにした。黒毛和種家系のゲノム解析で得られる結果は品種内における表型値のバラツキを説明できると予想されるため、黒毛和種の育種への実用化が容易であると考えられる。

平成12年度までの家系解析でBTA21テロメア領域約20cMに脂肪交雑QTLをマッピングし、*Marbling-1*と名付けていた。平成13年度からの本事業で、ウシ

表10 平成15年度までのQTL Expressによる黒毛和種経済形質マッピングのまとめ

経済形質QTL*	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p < 0.001$
体重	12	6	5
枝肉重量	21	13	5
脂肪交雑	44	21	10
ロース芯面積	36	18	5
バラ厚	16	2	0
皮下脂肪厚	16	4	0
合計	145	64	25

*染色体ワイズの有意水準。

EST情報・ヒトとの比較地図作成・BAC整列地図作成・相関解析などで、BACクローン3個で構成される約50万塩基対領域まで狭めることができた。

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

平成12年度までに、種雄牛 a の父方半兄弟家系解析によりBTA7セントロメア領域約20 cMまで領域を狭めていた。

同じ母を持つ兄弟の種雄牛bの家系解析では該当部位でバラツキが認められなかったことから、両種雄牛におけるハプロタイプを詳細に調べた。その結果、*Marbling-2*の*Q*は種雄牛aに遺伝しているが、種雄牛bには*q*が遺伝していることが考えられた。この*Q/q*の違いを根拠に*Marbling-2*領域を約6 cMに狭めた。

この領域に位置するマイクロサテライトマーカー2個、ヒト相同遺伝子24種をアンカーとしてBACラ

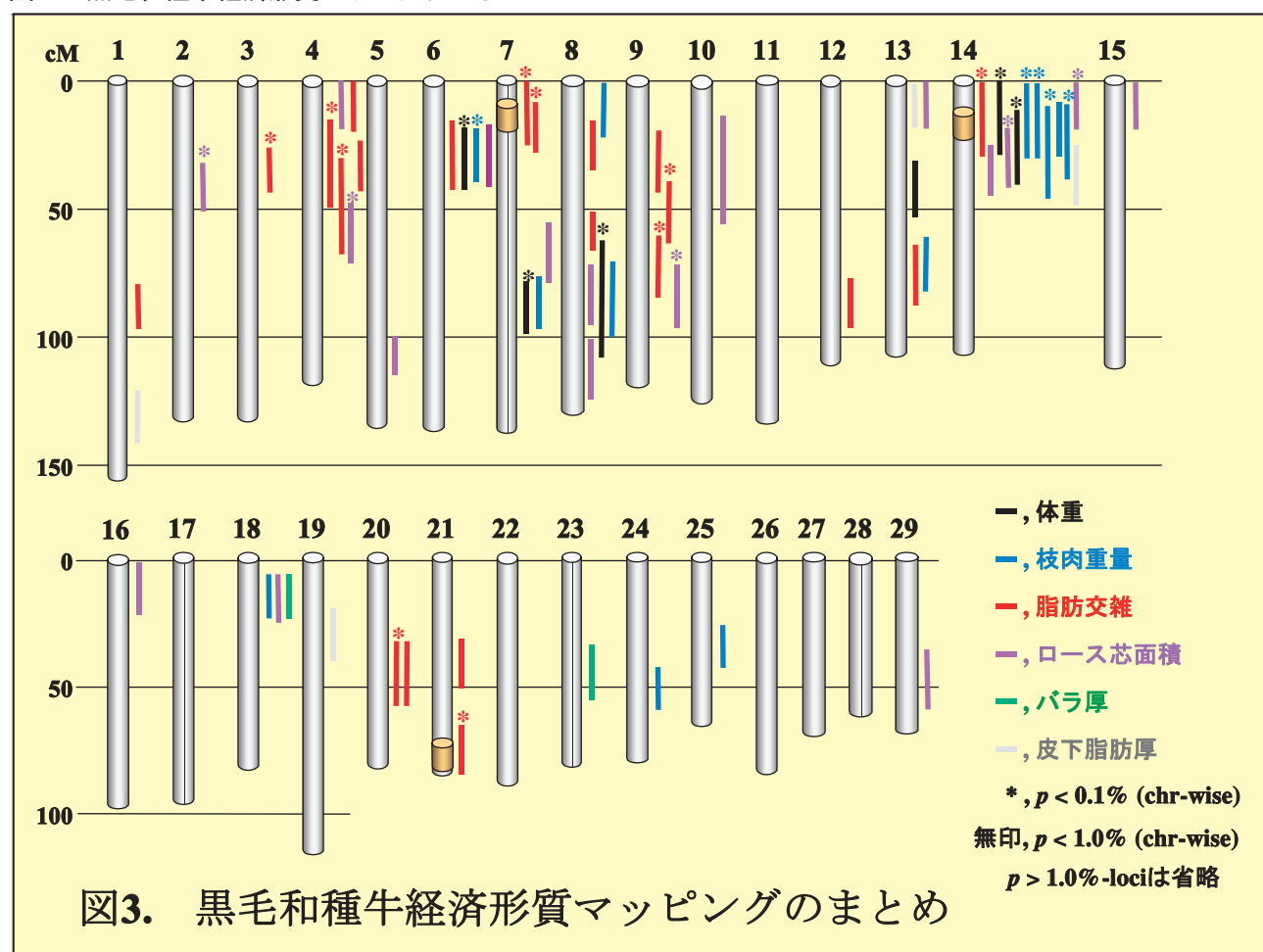
イブラリーをスクリーニングし、60個のクローンで整列化を完成した。この領域の距離はヒトゲノム情報から7.1 Mbと判明し、含まれる多型性を示すマイクロサテライトは68個、既知および予想される遺伝子数は148個であった。2種の家系の解析と、45個のSNPのタイピングにより、*Marbling-2*領域をBACクローン1個内(約50 kb)まで狭めることに成功した。

今後は、この候補領域周辺に存在する遺伝子を探索し、検出された遺伝子の発現様式などを調べ、責任遺伝子を同定していく予定である。

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

平成12年度までに、父方半兄弟家系を解析し、BTA 14の35-60 cMの領域にマッピングした。*CW-1*のアリアル効果は38kgを示した。別の父方半兄弟家系

図3 黒毛和種牛経済形質マッピングのまとめ



の解析により、同様な領域がマッピングされ、アリアル効果は38kgを示した。マッピングされた兩種雄牛のQハプロタイプを比較したところ、約10cMのIBD (Identical By Descent, 同祖的) 領域を見出したので、平成13年度から該当領域の多型性マイクロサテライトを開発し、ファインマッピングを開始した。

BTA14特異的DNAライブラリーからマイクロサテライトを33個開発し、その内25個がBTA14に存在することがわかった。また、ウシ-ヒトゲノム比較地図情報から該当領域に存在すると予想されるESTを2個開発した。これらのマイクロサテライトとESTをアンカーにしてBACクローンによる整列化を行った。整列地図は38個のBACクローンで構成され、ヒトドラフト配列情報から、約4.5Mbと推測された。各BACクローンからマイクロサテライトの開発を行い、45個のマイクロサテライトマーカーを用いた一般の黒毛和種集団等を対象とする相関解析を行った。該当領域のセントロメア側の約1.2cMに有意な相関が得られ、黒毛和種一般に共通なQハプロタイプを見出した。

今後、20個のBACクローンで整列化されたCW-1領域 (1.2cM, 2.3Mb) からマイクロサテライトを開発し、相関解析でさらに候補領域を狭め、SNP解析で候補遺伝子を絞っていく予定である。

(4) 国内および海外の状況

経済形質のような複数の遺伝子の関与する形質のゲノム解析の成果は、平成6年のスウェーデン農業大学のグループによるブタの肉質、および、平成7年のリエージュ大学 (ベルギー) のグループによるホルスタイン種のミルク生産性について報告された。また、平成9年にもリエージュ大学などいくつかのグループによって豚尻形質 (単一遺伝子が関与) について報告された。

平成11年にはリエージュ大学 (ベルギー) のグループは、ホルスタイン種のミルク生産性について、BTA14番のセントロメア領域の7cMに責任遺伝子が存在することを示した。平成14年2月に、問題の領域をさらに3cMまで狭め、乳脂肪含量に影響する遺伝子候補としてジアシルグリセロールアシル基転移

酵素1 (*DGAT1: acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1*)を同定したことを報告した。経済形質QTLの責任遺伝子についての最初の報告と思われる。*DGAT1*タンパク質の232位リジン/アラニンの多型があり、リジンの場合ミルク生産量やタンパク質量を減らす、乳脂肪量を増やす効果がある。

肉牛については、米国などから経済形質のマッピングについてこれまでにいくつか報告されている。いずれの研究も*Bos Taurus* (アンガス種など) と*Bos indicus* (ブラーマン種)の交雑家系を解析に用いている。交雑家系の解析は、表型値が対照的なためQTLを検出しやすいと言われている。染色体ワイズレベル0.1%以下に増体や肉質関連のQTLが多数マッピングされている。しかしながら、特定の領域においてマーカー密度を高めて責任遺伝子のクローニングを試みている研究室はまだ無く、10cM以内のファインマッピングに成功した例もまだ無い。BTA29は最小サイズの染色体であり、かつ、USDA-MARCのCasasらによって肉の柔らかさ (tenderness) や脂肪交雑QTLがマッピングされている。我々はBTA 29の高密度連鎖地図を作成した (Reed et al., 2002) ので、ポジショナルクローニングが行われるかもしれない。黒毛和種ではロース芯面積QTLがBTA 29にマッピングされている ($p < 0.01$)。

ブタにおいて、肉量・肉質に影響するQTLの責任遺伝子としてインスリン様成長因子II (*IGF-II*) がリエージュ大学とスウェーデン農業大学のグループによって同定された。第1イントロン内のSNPによって筋肉内の発現に差が認められたが、主要な臓器である肝臓での発現 (筋肉の約10倍) にも、*IGF-II*タンパク質の血中レベルにも差は無かった。作用機作については今後明らかにされるだろう。

(5) まとめと今後の進め方

フィールドから黒毛和種肥育牛のDNAサンプル・血統記録・枝肉成績を収集する共同研究機関各位の努力の結果、経済形質解析に使える家系を多数作成することができ、マーカー型判定技術の習熟も相俟って145のQTL ($p < 0.05$) を検出することができた。

64のQTLは有意水準1%以下であり、25のQTLに至っては有意水準0.1%以下であった。今後、これらのQTLは同祖的なのか独立なのかを含め、それぞれの中味を検証していく必要がある。また、アリアル効果の大きいQTLは、責任遺伝子クローニングのターゲットになる可能性があると思われる。

我々がこれまで行ってきたゲノム解析用ツールの地道な開発により、マッピングしたQTL領域の詳細な染色体地図の作成が現実的なものとなった結果、*Marbling-1*、*Marbling-2*、*CW-1*の責任遺伝子の同定に向けて着々と進行している。平成16年度からの継続事業では、*Marbling-1*、*Marbling-2*、*CW-1* 遺伝子

を同定するため、SNPを使って候補遺伝子を絞り、それぞれの遺伝子機能の解明を培養細胞レベル・マウス個体レベルで進めると共に、バイオインフォマティクスを活用することで責任遺伝子の同定を行う。

育種に有用と思われるDNA情報が得られてきたため、実用レベルでこれらの情報をどのように使うべきかが緊急の課題となってきた。黒毛和種集団の遺伝的な可能性を保持しつつ、重要な経済形質を向上させていくために広範なシミュレーションを実施し、本事業の生み出す成果を有効に活用するためのプロトコルを確立する必要がある。

第5章 研究発表リスト

(1) 学会発表

1. 伊藤智仁、渡邊敏夫、藤田郁子、藤井友子、緑川淑枝、伊藤千代子、高須賀晶子、Beattie, C. W.、杉本喜憲：ウシRadiation Hybrid (RH) Panelのフレームワーク構築、第99回日本畜産学会大会、2001年9月、長野県南箕輪村。
2. 溝口 康、鳴島亜希子、渡辺恵美子、荻野 敦、杉本喜憲：黒毛和種の間接検定家系を用いたIBD based QTL解析、第99回日本畜産学会大会、2001年9月、長野県南箕輪村。
3. 都築政起、西堀正英、石川 明、高橋秀彰、松田洋一、杉本喜憲、谷本一志：日本初のニワトリの基準家系、Hiroshima家系の完成、関西畜産学会大会、2001年9月、広島。
4. 溝口 康、岩本英治、龍田 健、太田垣 進、杉本喜憲：黒毛和種父方半きょうだい家系を用いた経済形質のQTL解析、第2回動物遺伝育種学会大会、2001年11月、東京。
5. 小林直彦、平野 貴、栃本洋子、兼子栄美子、大谷 健、杉本喜憲：ウシ*Claudin-16*欠損症遺伝子型と黒毛和種繁殖雌牛の予測育種価との関連について、第2回動物遺伝育種学会大会、2001年11月、東京。
6. 伊藤智仁、渡邊敏夫、藤田郁子、藤井友子、緑川淑枝、伊藤千代子、高須賀晶子、Beattie, C. W.、杉本喜憲：ウシRH地図作成のためのフレームワーク構築、第2回動物遺伝育種学会大会、2001年11月、東京。
7. 井原尚也、Reed, K. M.、Ponce de Leon, F. A.、Bennett, G. L.、Beattie, C. W.、杉本喜憲：高密度なウシ29番染色体連鎖地図の作製、第2回動物遺伝育種学会大会、2001年11月、東京。
8. 高須賀晶子、渡邊敏夫、伊藤智仁、森下真一、杉本喜憲：ヒトゲノムドラフト配列上でのウシ/ヒトゲノム比較地図の作成?ウシ/ヒト相同遺伝子5400個の同定と1500遺伝子のウシ染色体への帰属、日本動物遺伝育種学会第2回大会、2001年11月、東京。
9. 伊藤智仁、渡邊敏夫、藤田郁子、藤井友子、緑川淑枝、伊藤千代子、Beattie, C. W.、杉本喜憲：ウシRH地図の全染色体フレームワーク構築、第100回日本畜産学会、2002年3月、武蔵野。
10. 平野 貴、井上和也、原 好宏、原 一夫、竹内真弓、児玉州男、中原高士、浜口定男、杉本喜憲：黒毛和種のQTL解析、第100回日本畜産学会、2002年3月、武蔵野。
11. 井上和也、平野 貴、原 一夫、原 好宏、竹内真弓、児玉州男、中原高士、浜口定男、杉本喜憲：宮崎県における間接検定家系を利用した黒毛和種の経済形質解析、日本畜産学会第100回大会、2002年3月、武蔵野。
12. 須貝正昭、菊地武、猪股永治、高田直和、西田茂、内田宏、杉本喜憲、篠原久、西田朗：宮城県の種雄牛造成におけるQTL情報活用の検討、日本畜産学会第100回大会、2002年3月、武蔵野。
13. Itoh, T.、Watanabe, T.、Ihaara, N.、Beattie, C. W.、Sugimoto, Y.：Construction of a framework map of the Shirakawa/University of Nevada Reno bovine radiation hybrid (SUN-bRH7) panel. XXVIIIth International Conference on Animal Genetics, August

- 2002, Geottingen, Germany.
14. Ihara, N., Takasuga, A., Mizoshita, K., Takeda, H., Sugimoto, M., Mizoguchi, Y., Bennett, G. L., Reed, K. M., Beattie, C. W., Sugimoto, Y.: Mapping of over 1100 bovine polymorphic microsatellite markers to the USDA-MARC cattle linkage map. XXVIIIth International Conference on Animal Genetics, August 2002, Geottingen, Germany.
 15. Kobayashi, N., Hirano, T., Ibi, T., Ohtani, T., Sasaki, Y., Sugimoto, Y.: Association analysis between the deletion mutant allele of Claudin-16 deficiency and carcass traits in Japanese Black cattle. XXVIIIth International Conference on Animal Genetics, August 2002, Geottingen, Germany.
 16. Komatsu, M., Aziz, M. A., Niibayashi, T., Malau-Aduli, A. E. O., Kojima, T., Oshima, K., Mizoguchi, Y., Suginoto, Y.: A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting some growth traits of Japanese Black calves、動物遺伝育種学会第3回大会、2002年11月、京都。
 17. 小林直彦、平野 貴、栃本洋子、兼子栄美子、大谷 健、杉本喜憲：黒毛和種の父方半きょうだい家系におけるQTL解析、日本動物遺伝育種学会第3回大会、2002年11月、京都。
 18. Takasuga, A., Ihara, N., Itoh, T., Mariani, P., Watanabe, T., Takeda, H., Mizoshita, K., Sugimoto, M., Mizoguchi, Y., Bennett, G. L., Reed, K. M., Beattie, C. W., Sugimoto, Y.: Development of genomic tools, a bovine microsatellite-based linkage map and an EST-RH map. Plant & Animal Genome XI, San Diego, USA.
 19. 佐分淳一、阿部 剛、中川哲夫、河村 正、斉藤邦彦、熊谷周一郎、久保岳史、田口圭吾、林武司、杉本喜憲、小林栄治：黒毛和種とリムジン種のF2家系における画像解析を利用したと体形質のQTL解析、日本畜産学会第101回大会、2003年3月、つくば。
 20. 佐藤周史、佐藤慎一、長谷部浩之、杉本喜憲、小林栄治：豚の粗脂肪含量QTL領域におけるBACコンテイング作製とSNP探索、日本畜産学会第101回大会、2003年3月、つくば。
 21. 伊藤智仁、高須賀晶子、渡邊敏夫、井原尚也、杉本喜憲：ウシRHパネルを利用した全染色体ウシ・ヒト比較地図の作製、日本畜産学会第101回大会、2003年3月、つくば。
 22. 小邦朋子、成田 暁、井原尚也、松本道夫、杉本喜憲、佐々木義之：ハーフシブデザイン家系を用いたQTL解析における環境要因補正の効果、日本畜産学会第101回大会、2003年3月、つくば。
 23. 溝口 康、岩本英治、杉本喜憲：黒毛和種における脂肪交雑連鎖領域のBACコンテイングの作成、日本畜産学会第101回大会、2003年3月、つくば。
 24. 谷口幸雄、高野 淳、杉本喜憲、山田宣永、佐々木義之：ウシADM12遺伝子のクローニング、日本畜産学会第101回大会、2003年3月、つくば。
 25. 小林直彦、平野 貴、大谷 健、杉本喜憲：黒毛和種エリート種雄牛の父方半きょうだい家系におけるQTL解析、日本畜産学会第101回大会、2003年3月、つくば。
 26. Malau-Aduli, A. E. O., Niibayashi, T., Kojima, T., Oshima, K., Mizoguchi, Y., Sugimoto, Y., Komatsu, M. : Genome scan of BTA1 for QTL affecting weaning weight, yealing weight and postweaning growth in Japanese Black Cattle, 2003 Joint Animal Meeting, June 2003, Phoenix, USA.

27. Malau-Aduli, A. E. O., Niibayashi, T., Kojima, T., Oshima, K., Mizoguchi, Y., Sugimoto, Y., Komatsu, M.: Microsatellite DNA marker mapping of bovine chromosome 1 for QTL affecting birth weight and preweaning growth in Japanese Black cattle (Wagyu), XIX International Congress of Genetics, July 2003, Melbourne, Australia.
28. 井原尚也、高須賀晶子、溝下和則、竹田晴子、杉本真由美、溝口康、Bennett, G. L., Reed, K. M., Beattie, C. W., 杉本喜憲：ウシ高密度連鎖地図の作製、日本畜産学会第102回大会、2003年9月、岐阜。
29. 高野淳、溝下和則、高須賀晶子、杉本喜憲：黒毛和種の枝肉重量関連領域 (CW-1) におけるBACコンテイング作成、日本畜産学会第102回大会、2003年9月、岐阜。
30. 平野貴、井上和也、原好宏、杉本喜憲：黒毛和種のMarbling-2領域特定のためのBACコンテイング作成、日本畜産学会第102回大会、2003年9月、岐阜。
31. 小林直彦、平野貴、加藤誠二、傍島英雄、林登、平尾一平、大谷健、杉本喜憲：黒毛和種エリート種雄牛の父方半きょうだい家系におけるQTL解析、日本動物遺伝育種学会第4回大会、2003年11月、東京。
32. 阿部剛、佐分淳一、中川哲夫、河村正、斉藤邦彦、熊谷周一郎、林武司、杉本喜憲、小林栄治：黒毛和種とリムジン種のF2家系におけるQTL解析 (I) 肥育期体格ならびにと場格付について、日本畜産学会第103回大会、2004年3月、東京。
33. 佐分淳一、阿部剛、中川哲夫、斉藤邦彦、熊谷周一郎、撫年浩、三角さつき、奥村寿章、田口圭吾、林武司、杉本喜憲、小林栄治：黒毛和種とリムジン種のF2家系におけるQTL解析 (II) 理化学分析と画像解析について、日本畜産学会第103回大会、2004年3月、東京。
34. 横内耕、渡邊敏夫、藤田達男、志賀一穂、杉本喜憲：黒毛和種大規模半兄弟家系を用いた高BMS責任領域同定の試み、日本畜産学会第103回大会、2004年3月、東京。
35. 小林直彦、平野貴、加藤誠二、傍島英雄、林登、平尾一平、大谷健、杉本喜憲：黒毛和種大規模家系における枝肉形質のQTL解析と育種改良への応用、日本畜産学会第103回大会、2004年3月、東京。

(2) 論文発表

1. Takasuga, A., Hirotsune, S., Itoh, R., Jitohzono, A., Suzuki, H., Aso, H., Sugimoto, Y. (2001) Establishment of a high throughput EST sequencing system using poly(A) tail-removed cDNA libraries and determination of 36000 bovine ESTs. *Nucleic Acids Res.*, 29: e108.
2. 鈴木暁之、太田原健二、野口龍生、杉本喜憲、田中修一、小松繁樹、吉川恵郷：日本短角種におけるウシ筋肉肥大 (Double muscling) 原因遺伝子の同定とその産肉性 (2002) 東北畜産学会報、52, 11-17.
3. Fujisaki, S., Mizoguchi, Y., Takahashi, S., Chen, Y. Z., Suzuki, K., Asakawa, S., Soeda, E., Shimizu, N., Sugimoto Y., Yasue, Y. Construction of a bovine bacterial artificial chromosome library from fibroblasts used for cloned cattle. (2002) *Anim. Genet.*, 33: 379-381.
4. Reed, K. M., Ihara, N., Mariani, P., Mendoza, K. M., Jensen, L. E., Bellavia, R., Ponce De Leon, F. A.,

- Bennett, G. L., Sugimoto, Y., Beattie, C. W. High-resolution genetic map of bovine chromosome 29 through focused marker development. (2002) *Cytogenet. Genome Res.*, 96: 210-216.
5. Reed, K. M., Ihara, N., Ponce De Leon, A., Sonstegard, T. S., Smith, T. P., Bennett, G. L., Sugimoto, Y., Beattie, C. W. Development of 47 new microsatellite markers from a BTA6 library. (2002) *Anim. Biotechnol.*, 13: 195-202.
6. Sugimoto, M., Ihara, N., Bennett, G. L., Sugimoto, Y. Eleven previously unreported dinucleotide microsatellite loci on bovine chromosome 19. (2003) *Anim. Genet.*, 34: 236-237.
7. Hanotte, O., Ronin, Y., Agaba, M., Nilsson, P., Gelhaus, A., Horstmann, R., Sugimoto, Y., Kemp, S., Gibson, J., Korol, A., Soller, M., Teale, A. Mapping of Quantitative Trait Loci (QTL) controlling resistance to trypanosomosis in an experimental cross of trypanotolerant West African N⁷ Dama cattle (*Bos taurus*) and trypanosusceptible East African Boran cattle (*Bos indicus*). (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 7443-7448.
8. Takeda, H., Sugimoto, Y. Construction of a physical map of an 8-cM region of bovine chromosome 6q21 with 83 loci including 46 new microsatellite markers. (2003) *Anim. Biotechnol.*, 14: 51-59.
9. Itoh, T., Takasuga, A., Watanabe, T., Sugimoto, Y. Mapping of 1400 expressed sequence tags in the bovine genome using a somatic cell hybrid panel. (2003) *Anim. Genet.*, 34: 362-370.
10. Sato, S., Oyamada, Y., Atsuji, K., Nade, T., Sato, S., Kobayashi, E., Mitsuhashi, T., Nirasawa, K., Komatsuda, A., Saito, Y., Terai, S., Hayashi, T., Sugimoto, Y. QTL analysis for growth and carcass traits in a Meishan X Duroc F2 resource population. (2003) *J. Anim. Sci.*, 81, 2938-2949.
11. Ihara, N., Yamakuchi, H., Taniguchi, Y., Sasaki, Y., Bennett, G. L., Kappes, S., Sugimoto, Y. Mapping of bovine *CEBPD* gene to BTA14q15-17. (2003) *Anim. Genet.*, 34, 470-471.
12. 渡辺大作、阿部正博、齋藤博水、阿部 榮、板垣昌志、阿部省吾、植松正巳、遠藤祥子、平野貴、杉本喜憲：山形県内の和牛枝肉共進会出品牛における枝肉成績と血清総コレステロール値の統計遺伝学的解析 (2003) 家畜臨床誌、26, 2-8.

(3) 講演

1. 杉本喜憲：ウシゲノム解析の現状と展望、日本農学会大会、2001年4月、東京。
2. 溝口 康：黒毛和種におけるQTL解析、家畜ゲノム国際ワークショップ、2001年11月、つくば。
3. 高須賀晶子、渡邊敏夫、伊藤智仁、森下真一、杉本喜憲：ヒトゲノムドラフトを用いたウシ・ヒト比較地図の作成、第9回アニマルゲノム研究会、2002年3月、東京。
4. 杉本喜憲、杉本真由美：乳房炎抵抗性育種の可能性について、日本獣医学会大会、2002年3月、川崎。
5. 杉本喜憲：ウシゲノム解析の現状と今後の課題、北海道受精卵移植研究会、2002年7月、札幌。
6. 溝口 康：黒毛和種DNA育種研究の現状と今後の展開方向、平成14年度近畿中国四国農業研究推進会議畜産草地推進部会問題別研究会、2002年10月、島根県粕淵町。

7. Hirano, T.: QTL analysis for meat quality in Wagyu. International Symposium on Application Strategy of Genomic Information for Livestock Production. Oct. 2002, Suwon, Korea.
8. 平野 貴: 和牛遺伝性疾患および経済形質のゲノム解析、平成14年度宮崎県畜産技術研修会、2002年12月、宮崎。
9. 杉本喜憲: 動物ゲノム研究の現状と今後の展開と課題、岐阜県客員研究員招聘事業講演会、2003年3月、高山。
10. 平野 貴: DNA解析の先進事例：黒毛和種の経済形質QTLマッピングから候補遺伝子クローニングに向けて、岐阜県客員研究員招聘事業講演会、2003年3月、高山。
11. 井原尚也: 家畜ゲノム解析の現状と課題?ウシ遺伝性疾患の解析とゲノム解析ツールの開発、鹿児島県畜産新技術実用化対策事業（DNA育種基盤の確立）技術検討会、2003年3月、鹿児島。
12. 渡邊敏夫: 和牛経済形質のための連鎖解析プログラム～理論と実践～、第一回最先端育種セミナー、2003年6月、京都。
13. 杉本喜憲: 和牛経済形質のQTLマッピングの現状、第一回最先端育種セミナー、2003年6月、京都。
14. 杉本喜憲: ウシゲノム解析の現状と今後の課題、東海大学医学部、2003年7月、神奈川県伊勢原市。
15. 杉本喜憲: ウシQTLのゲノム解析、家畜ゲノム国際ワークショップ、2003年11月、東京。
16. 杉本喜憲: ウシ経済形質のゲノム解析の現状と今後の展開、養殖研究所養殖部会「ゲノム情報の育種への応用」、2003年12月、伊勢。
17. 平野 貴: DNA解析の先進事例：黒毛和種のMarbling-2領域からの脂肪交雑関連遺伝子決定に向けて、岐阜県客員研究員招聘事業講演会、2004年2月、高山。

(4) 総説発表

1. 杉本喜憲: 家畜ゲノム解析の現状と展望、農業および園芸、76(10)、1887-1091、2001年。
2. 杉本喜憲: ウシゲノム解析の現状と展望、畜産の情報 国内編、149、32-33、2002年。

第6章 参考資料：発表論文

Establishment of a high throughput EST sequencing system using poly(A) tail-removed cDNA libraries and determination of 36 000 bovine ESTs

Akiko Takasuga, Shinji Hirotsune, Reiko Itoh, Ayako Jitohzono, Harumi Suzuki, Hisashi Aso¹ and Yoshikazu Sugimoto*

Shirakawa Institute of Animal Genetics, Odakura, Nishigo, Nishishirakawa, Fukushima 961-8061, Japan and

¹Cellular Biology Laboratory, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 981-8555, Japan

Received June 6, 2001; Revised and Accepted September 21, 2001

DDBJ/EMBL/GenBank accession nos[†]

ABSTRACT

We determined 36 310 bovine expressed sequence tag (EST) sequences using 10 different cDNA libraries. For massive EST sequencing, we devised a new system with two major features. First, we constructed cDNA libraries in which the poly(A) tails were removed using nested deletion at the 3'-ends. This permitted high quality reading of sequences from the 3'-end of the cDNA, which is otherwise difficult to do. Second, we increased throughput by sequencing directly on templates generated by colony PCR. Using this system, we determined 600 cDNA sequences per day. The read-out length was >450 bases in >90% of the sequences. Furthermore, we established a data management system for analyses, storage and manipulation of the sequence data. Finally, 16 358 non-redundant ESTs were derived from ~6900 independent genes. These data will facilitate construction of a precise comparative map across mammalian species and isolate the functional genes that govern economic traits. This system is applicable to other organisms, including livestock, for which EST data are limited.

INTRODUCTION

Single pass sequencing of cDNAs to generate expressed sequence tags (ESTs) is an established area of genome studies. Randomly determined cDNA sequences attract considerable interest as a catalog of expressed genes from a given organism. EST sequences are highly conserved between mammals, therefore a dense gene map will be a powerful tool to construct a precise comparative map (1). In human, 3 400 000 EST sequences have been deposited in a public database and over 30 000 genes have been physically mapped (2). In addition, the draft sequence of the human genome has recently become available (3,4). Therefore, the map position of any gene is

available by direct comparison of cDNA and genomic sequences. In mouse, 1 960 000 EST sequences have been deposited in a public database. Approximately 3900 orthologous pairs between human and mouse were recently identified in which ~3000 genes were mapped in the mouse genome and ~180 conserved segments were defined (3). Thus, extensive comparison of the mapping data is indispensable to make use of the wealth of data generated by the Human and Mouse Genome Projects for the isolation of the genes underlying important traits in livestock (5–7).

Economic trait loci (ETL) controlling traits such as growth, fatness and milk yield were recently mapped in livestock (8–10). In addition, recent work demonstrated that a common region between cattle and mouse regulates a quantitative trait such as tolerance to trypanosome infection (11). Therefore, a precise comparative map enables us to use not only livestock but also model animals such as mouse to discover ETL genes. In domestic species, however, the numbers of ESTs deposited in the public databases are quite limited. This limitation has impeded the progress of both constructing a precise comparative map and the activity of candidate positional cloning. Recently, an ordered comparative map between cattle and human including 638 orthologs was reported (12), but more data are required to further refine conserved segments.

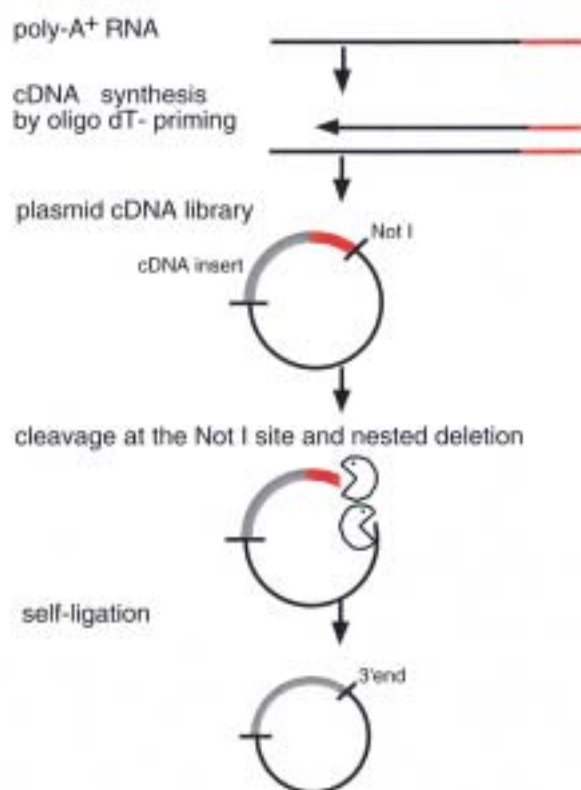
To construct a precise comparative map, radiation hybrid (RH) mapping is a convenient method for gene mapping because the markers need not be polymorphic, and thus large-scale mapping is easier. For RH mapping of the genes, it is desirable to design PCR primers in the non-coding region (3'-UTR) to prevent amplification of host DNA present in the hybrid cells (2,13). A large number of bovine ESTs that were recently deposited in a public database by others (14), however, lack information regarding the 3'-end of the cDNA. Furthermore, the 3'-UTR information is useful for clustering a large number of ESTs, being especially effective for discrimination of gene families.

We report the determination of 36 310 bovine ESTs that are mostly composed of a pair of 5'- and 3'-sequences of a cDNA clone, using newly constructed poly(A) tail-removed cDNA

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +81 248 25 5641; Fax: +81 248 25 5725; Email: kazusugi@siag.or.jp

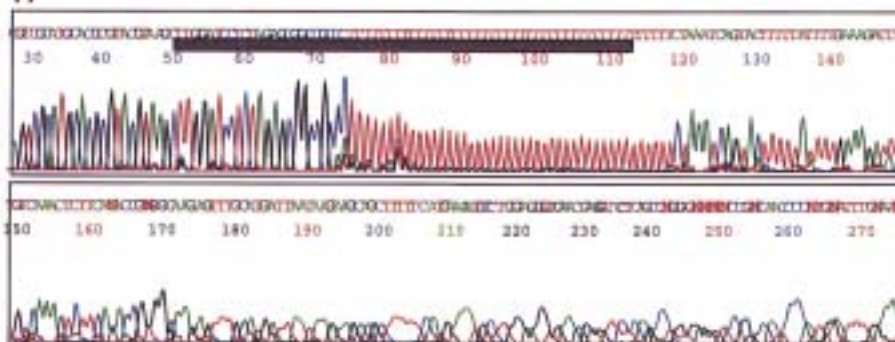
[†]AV588548–AV618892, AV662325–AV668289

A

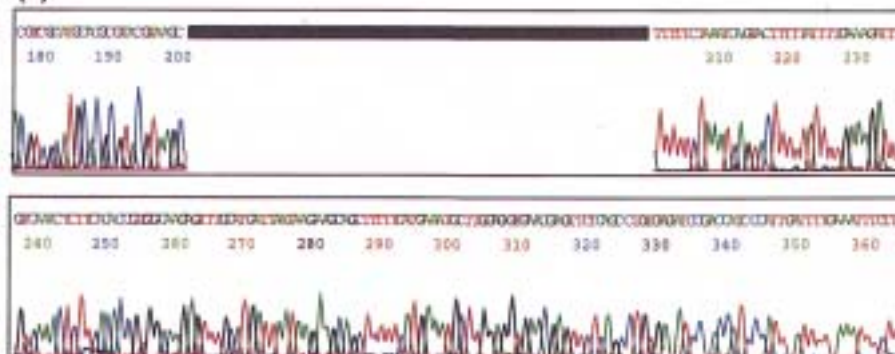


B

(i)



(ii)



libraries. These ESTs will be a valuable resource for livestock ESTs and as markers for RH mapping to construct a precise comparative map.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of cDNA libraries

Total RNA was extracted using Trizol (Gibco BRL, Rockville, MD) from several fetal tissues of Holstein cattle, including kidney, liver, rumen, brain, cartilage, lung and ovary, as well as from an adipocyte cell line established from Japanese Black cattle (15). Poly(A)⁺ RNA was isolated using oligotex-dT30 (Takara, Japan). cDNA synthesis and library construction were performed using the SuperScript λ ZipLox system (Gibco BRL). In each library, 3×10^5 – 10×10^5 independent phage transfectants were obtained. Each library was amplified and transfected into *Escherichia coli* DH10B Zip to convert it to a plasmid library by Cre/loxP-mediated *in vivo* excision. cDNA clones were pooled and plasmid DNA was extracted from each library. The plasmid was cleaved using the *NotI* restriction enzyme, followed by nested deletion to remove the poly(A) tail using a Nested Deletion Kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Deletion conditions were optimized for appropriate deletion sizes (50–100 bp). Briefly, we maintained strict amounts of the linear DNA (1 μ g) and time for deletion (1 min). After self-ligation, DNA was transformed into ElectroMax (Gibco BRL) based on the manufacturer's recommendations. Colonies were picked for subsequent PCR amplification and sequencing.

Preparation of sequencing templates

Each colony was subjected to colony PCR and culture. For colony PCR and DNA sequencing we used the primers CGTC-CCATTCGCCATTCAG for the 5'-end and GCTCTAATAC-GACTCACTATAGGG for the 3'-end. The primer for the 3'-end was located 210 bp downstream of the *NotI* site in the vector to ensure reliable PCR amplification after deletion. Briefly, a small amount of the colony was suspended in 50 μ l of the reaction mixture containing 1 \times regular PCR buffer consisting of 0.2 μ M each primer, 50 μ M dNTP, and 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Takara, Japan). The PCR consisted of 35 cycles of 95°C for 30 s for denaturing, 55°C for 30 s for annealing, 72°C for 3 min for extension. After PCR amplification, the products were analyzed using 1% agarose gel electrophoresis, and 1 μ l of the PCR product that produced the appropriate length and signal was used directly in a DNA sequencing reaction.

DNA sequencing

For the clones derived from ordinary cDNA libraries [i.e. with poly(A) tails], plasmid DNA was extracted as usual and the sequencing reaction was performed using a BigDye primer kit (P.E. Biosystems, Japan). Otherwise, the sequencing reaction was performed in 10 μ l of a reaction mixture containing 6 μ l of

water, 4 μ l of BigDye terminator (P.E. Biosystems), 0.2 μ M sequence-specific primer and 1 μ l of the PCR product. The proportion of PCR product and conditions for sequencing were crucial for a robust sequence signal without purifying the PCR fragments as template DNA. Cycle sequencing was performed under the conditions of 35 cycles of 95°C for 30 s for denaturing, 55°C for 30 s for annealing, 60°C for 4 min for extension. Sequencing was performed on an ABI 3700 Capillary Sequencer. The quality of the sequence was assessed using Phred software (16,17).

Data management system

A series of sequence data processing procedures were automatically performed using an in-house system, named cDNA Information Manager. The cDNA Information Manager is composed of a sequence database and five servers: FTP and HTTP servers, Sequence Processor, Sequence Analyzer and Sequence Manager. The sequence database is used to store sequence data and analysis reports, etc. The FTP server is used to enter new sequences from a Macintosh computer to this system. The Sequence Processor performs basic processing of new sequences, including trimming sequence ends, quality checking and clustering. The Sequence Analyzer performs homology searches against the GenBank database and designs PCR primers targeting the 3'-ESTs from the sequences. The Sequence Manager provides data from the database at the user's request using the HTTP server. The cDNA Information Manager allows direct access to the Human Gene Map (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap/>) and Unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) databases (NCBI).

Sequence data processing and clustering

EST sequences are submitted to the data management system, cDNA Information Manager. The ambiguous regions are removed from the ends of the sequences to achieve less than one ambiguity out of 20 bases in the text files. Then, the vector sequence was searched using BlastN v.2.0.9 (18) and removed. Sequences that were <100 nt long or had >7% ambiguity were removed from the data flow. After basic processing, the sequences were clustered among previously generated ESTs based on sequence identity using BlastN. The criteria were more than 300 bits (for conventional cDNA libraries) and 400 bits [for poly(A) tail-removed cDNA libraries] of the Blast score with 80% nucleotide identity. An ID was allocated to the sequences that had no similarity to earlier entries in our ESTs, followed by homology searches against the GenBank database.

Accession numbers

Bovine ESTs described in this paper were deposited in the DDBJ database, accession nos AV588548–AV618892 and AV662325–AV668289.

Figure 1. (Previous page) (A) The flow chart for preparation of a poly(A) tail-removed cDNA library. An oligo(dT)-primed cDNA library was constructed by a conventional method. Plasmid DNA was extracted from pooled cDNA clones and cleaved at the *NotI* site located at the cDNA 3'-terminus. The DNA fragments were digested with exonuclease III and mung bean nuclease to remove the poly(A) tail (shown as a red line), followed by self-ligation. *Escherichia coli* was transformed with the DNA, resulting in a poly(A) tail-removed cDNA library. cDNA inserts were amplified by colony PCR and used as templates for DNA sequencing. (B) Comparison of the sequences from the 3'-ends of the cDNAs. The sequences were derived from bovine osteonectin cDNA clones with (i) and without (ii) a poly(A) tail. Removal of the poly(A) tail clearly improved sequence quality. Shadowed bars correspond to the deleted region.

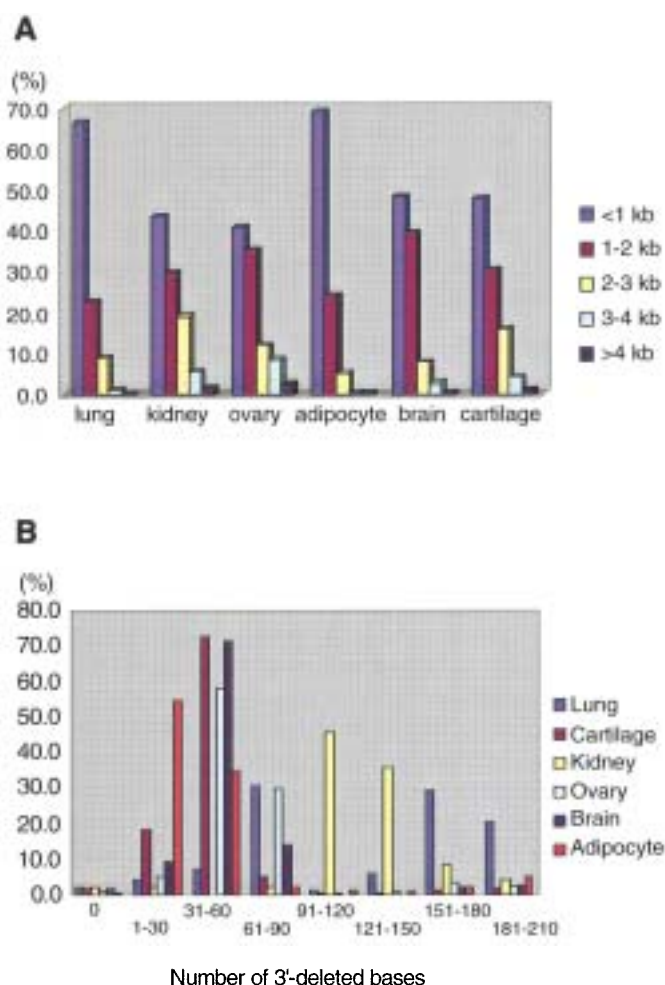


Figure 2. (A) Length of cDNA inserts. cDNA inserts were amplified by PCR and used as templates for DNA sequencing. The data for 1920 cDNA clones in each library are shown. (B) Length of deletion from the 3'-end of the cDNA. The size of the deletion was calculated as the number of excised nucleotides from the *NotI* site to the insert-vector junction.

RESULTS AND DISCUSSION

Establishment of a high throughput EST sequencing system

The basic principle for preparation of a poly(A) tail-removed cDNA library is schematically presented in Figure 1A. Bacterial colonies of the cDNA clones were directly subjected to PCR amplification. The 3' priming site was located 210 bp downstream of the *NotI* site to ensure that it is out of the range of deletion, because the exonuclease excises nucleotides in both directions from the *NotI* site. We confirmed that >60% of the cDNA clones were successfully amplified. Direct sequencing of colony PCR products was performed without prior purification. Removal of the poly(A) tail clearly improved the quality of the 3'-sequences (Fig. 1B). According to the evaluation by Phred software (16,17), base calling was possible beyond 450 bp in 90% of the cases (data not shown). Thus, we constructed six

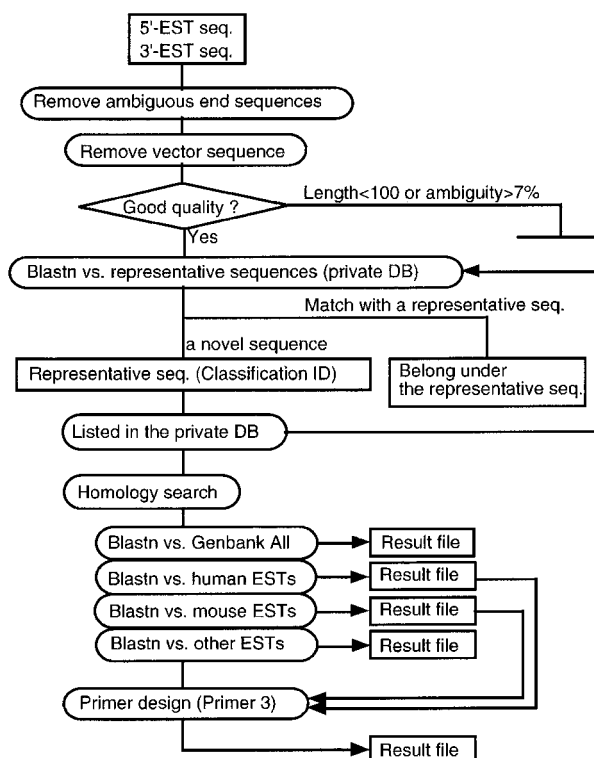


Figure 3. The structure of the data management system, cDNA Information Manager. Text files of the EST sequences produced from a sequencer are submitted to cDNA Information Manager. The sequences are processed and clustered among the sequences deposited in our database. Then novel sequences are subjected to homology searches against each division of the GenBank database, followed by primer design as for the 3'-ESTs. In order to design bovine-specific primers, the results of the homology searches against human and mouse ESTs were linked to Primer 3 software (19).

poly(A) tail-removed cDNA libraries from various tissues. The size of the cDNA inserts in each library ranged from 0.7 to 4 kb, the average size being 1.5 kb (Fig. 2A).

The size of the deletion as calculated from the distance between the *NotI* site and the insert-vector junction is shown in Figure 2B. The size of the deletion was within 60 bp in 80% of the clones in each library, except for the lung cDNA library, which was composed of two preparations. In the cDNA libraries, the average deletion sizes were 41 (adipocyte), 45 (cartilage), 52 (brain), 61 (ovary), 121 (kidney) and 125 bp (lung). The procedure was thus deemed sufficient to remove the poly(A) tail while leaving much of the 3'-UTR.

Construction of a data management system

To deal with a large amount of sequence information, we established a data management system, called the cDNA Information Manager. The flow chart of the data analysis is shown in Figure 3. The sequences were subjected to basic processing, including trimming of ambiguous ends and vector sequence, checking sequence quality and clustering based on identity. Although dispersed repeats in ESTs were not masked out, errors in clustering due to dispersed repeats occurred in <1% of

Table 1. Number of ESTs in each library

cDNA library	No. of determined sequences		No. of unique ESTs	
	5'	3'	5'	3'
Adipocyte	496	251	380	214
Kidney	313	295	272	262
Liver	232	91	125	62
Rumen	380	168	283	140
Adipocyte [poly(A)-removed]	2016	1632	765	759
Brain [poly(A)-removed]	3841	3471	1396	1525
Cartilage [poly(A)-removed]	4147	3764	1684	1609
Kidney [poly(A)-removed]	4167	3772	1962	1730
Lung [poly(A)-removed]	2175	1866	1016	874
Ovary [poly(A)-removed]	1730	1503	673	627
Total	19497	16813	8556	7802
	36310		16358	

sequences (data not shown). A new ID number was allocated to novel sequences, followed by homology searches against the GenBank database. PCR primers were automatically designed for the 3'-sequences for mapping.

The results of the analyses, such as homology searches and primer design, can be browsed and the data can be manipulated as necessary. Our data management system is linked to the Human Gene Map (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap/>) and Unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) databases (NCBI) based on homology to human ESTs. In addition, we can obtain various statistics, for example redundancy and the results of homology searches, using custom made programs.

Characterization of ESTs

We generated 19 500 sequences from the 5'-end and 16 800 sequences from the 3'-end of cDNAs. These were clustered into 16 400 groups, in which 8600 and 7800 IDs were allocated to 5' - and 3'-ESTs, respectively (Table 1). Approximately 12% of the IDs included both 5'- and 3'-ESTs in a group due to short cDNA inserts.

To confirm that the deletion from the 3'-end did not affect EST clustering, we estimated the overlap of the 3'-ESTs to which IDs were allocated, by examining the number of IDs with high homology (score ≥ 400 bits, $E < e^{-109}$) to the same gene. Thus, $\sim 90\%$ of 1500 3'-ESTs matched unique genes in the GenBank database. This suggests that interference with EST clustering due to deletion was negligible and the criteria for clustering were appropriate. Thus, we estimate that the ESTs represent ~ 6900 genes.

Next, clone redundancy was analyzed as the number of 3'-ESTs included in a cluster (Table 2). All 3'-ESTs (16 813) were clustered into 8331 groups, 529 of which had IDs allocated to 5'-ESTs. Seventy-five percent of the groups

Table 2. Redundancy of 3'-ESTs

Redundancy ^a	No. of groups ^b	Ratio to total groups (%)	Ratio to overall 3'-sequences (%)
1	6269	75.2	37.3
2	1016	12.2	12.1
3	380	4.6	6.8
4	202	2.4	4.8
5	97	1.2	2.9
6-10	208	2.5	9.2
11-50	143	1.7	17.0
50-100	10	0.1	3.8
>100	6	0.1	6.3
Total	8331	100.0	100.0

^aThe number of 3'-ESTs included in a group to which an ID was allocated.

^bThe number of groups that include a given number of 3'-ESTs.

Table 3. List of highly redundant cDNA clones

Redundancy ^a	No. of groups ^b	Gene product or gene name
51	1	Ribosomal protein L23
54	2	Ribosomal protein L7a; acidic ribosomal phosphoprotein P1
57	3	Bone proteoglycan II; ribosomal protein L3; ribosomal protein L4
70	2	G β -like protein; acidic ribosomal phosphoprotein P0
72	1	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
94	1	Pro- $\alpha 1$ (I) chain of type I procollagen
105	1	Mitochondrial genome
118	1	Weak homology to human mRNA for insulin-like growth factor II
119	1	60S ribosomal protein L4
175	1	Elongation factor 1 γ
176	1	C10 protein (laminin receptor)
362	1	Elongation factor 1 α

^{a,b}The numbers are as in Table 2.

included a single 3'-EST, and those unique sequences represented 37% of the overall 3'-sequences. The groups with redundancy of less than five times accounted for $>95\%$ of the total groups and corresponded to 64% of the overall 3'-sequences. Therefore, our massive sequencing was effective for isolation of new genes. Some highly redundant sequences were observed (Table 3); most of them were housekeeping genes such as elongation factors, extracellular matrix proteins and ribosomal proteins. A sequence showing a redundancy of 118 times could not be identified from the homology search, but had very weak similarity to human mRNA for insulin-like growth factor II (score = 52 bits, $E = 1e^{-05}$), as well as its

Table 4. Results of the homology searches against a public EST database

	5'-EST, 8556 clones						3'-EST, 7802 clones					
	>200 bits		>400 bits		>600 bits		>200 bits		>400 bits		>600 bits	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Versus bovine ESTs ^a	ND	ND	4137	48.4	2941	34.4	ND	ND	3507	45.0	2224	28.5
Versus human ESTs ^b	4391	51.3	2554	29.9	ND	ND	2937	37.6	1212	15.5	ND	ND
Versus mouse ESTs ^c	3244	37.9	1365	16.0	ND	ND	1787	22.9	509	6.5	ND	ND

ND, not determined.

^aThe numbers were obtained from the results of a homology search against ESTs in the January 13, 2001 release of the GenBank database in which B(b)ovine, *Bos taurus*, *B. taurus* or cattle are contained in the entry name.

^bThe homology search was performed against human ESTs in the January 13, 2001 release of the GenBank database.

^cThe homology search was performed against mouse ESTs in the January 13, 2001 release of the GenBank database.

5'-sequence. There was also a high frequency of the mitochondrial genome, constituting 0.6% of the 3'-sequences.

The results of the homology searches against each division of the GenBank database are shown in Table 4. Scores of 400 and 600 bits were used as a threshold against bovine ESTs, while 200 and 400 bits were used against human and mouse ESTs in order to eliminate possible effects of dispersed repeats, because dispersed repeats usually show less than 400 and 150 bits of the scores against bovine and other ESTs, respectively. More than 50% of the ESTs were novel bovine sequences, providing valuable data. Forty-five percent of the 3'-ESTs were thought to be identical to the 5'-sequences of bovine ESTs deposited in a public database, suggesting that they had been derived from short cDNAs. Homology to human ESTs had a higher score than to mouse ESTs, which is consistent with a previous report that rodents have undergone more sequence changes than other mammals (20). In general, the translated region of cDNA is more conserved than the non-coding region among species. As expected, the homology of the 5'-ESTs to mouse or human ESTs was significantly higher than that of the 3'-ESTs (Table 4), which was thought to reflect the fact that the 5'-sequences contained coding regions. Thus the 5'-ESTs were useful for identifying gene functions, while the 3'-ESTs, which were less conserved among species, were useful for designing bovine-specific primers for RH mapping.

We described a new system to produce large numbers of high quality ESTs, with which we determined 600 ESTs per day. We obtained both 5' and 3' cDNA sequences derived from ~6900 genes that will be used for RH mapping. The draft sequences of the human genome will facilitate finding human orthologs and determining their chromosomal positions (3,4), which will promote construction of a precise comparative map. This approach is applicable to other organisms whose ESTs need to be developed.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Toshio Watanabe for discussions and Hikaru Yamamoto and Ryohta Etoh (Hitachi Software Engineering Co. Ltd) for technical assistance. This study was supported by grants from the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

REFERENCES

- Lyons, L.A., Laughlin, T.F., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Womack, J.E. and O'Brien, S.J. (1997) Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes. *Nature Genet.*, **15**, 47–56.
- Deloukas, P., Schuler, G.D., Gyapay, G., Beasley, E.M., Soderlund, C., Rodriguez-Tomé, P., Hui, L., Matisse, T.C., McKusick, K.B., Beckmann, J.S. *et al.* (1998) A physical map of 30,000 human genes. *Science*, **282**, 744–746.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860–921.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A. *et al.* (2001) The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304–1351.
- Grobet, L., Martin, L.J.R., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Menissier, F., Massabanda, J. *et al.* (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature Genet.*, **17**, 71–74.
- Jeon, J.-T., Carlborg, Ö., Törnsten, A., Giuffra, E., Amarger, V., Chardon, P., Andersson-Eklund, L., Andersson, K., Hansson, I., Lundström, K. and Andersson, L. (1999) A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the *IGF2* locus. *Nature Genet.*, **21**, 157–158.
- Nezer, C., Moreau, L., Brouwers, B., Coppieters, W., Detilleux, J., Hanset, R., Karim, L., Kvasz, A., Leroy, P. and Georges, M. (1999) An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the *IGF2* locus in pigs. *Nature Genet.*, **21**, 155–156.
- Andersson, L., Haley, C.S., Ellegren, H., Knott, S.A., Johansson, M., Andersson, K., Andersson-Eklund, L., Edfors-Lijja, I., Fredholm, M., Hansson, I. *et al.* (1994) Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science*, **263**, 1771–1774.
- Georges, M., Nielsen, D., Mackinnon, M., Mishra, A., Okimoto, R., Pasquino, A.T., Sargeant, L.S., Sorensen, A., Steele, M.R., Zhao, X., Womack, J.E. and Hoeschele, I. (1995) Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics*, **139**, 907–920.
- Coppieters, W., Riquet, J., Arranz, J.-J., Berzi, P., Cambisano, N., Grisart, B., Karim, L., Marcq, F., Moreau, L., Nezer, C. *et al.* (1998) A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine chromosome 14. *Mamm. Genome*, **9**, 540–544.
- Kang'a, S., Nilsson, P.H., Rottengatter, K., Goldammer, T., Kim, C.D., Srinivas, K., Iraqi, F., Mwakaya, J., Mwangi, D., Schwerin, M. *et al.* (2000) Comparative mapping of a cattle trypanotolerance QTL region on Bta7. In *27th International Conference on Animal Genetics Abstract Book*. Blackwell Science Ltd, UK, p. 7.
- Band, M.R., Larson, J.H., Rebeiz, M., Green, C.A., Heyen, D.W., Donovan, J., Windish, R., Steining, C., Mahyuddin, P., Womack, J.E. and Lewin, H.A. (2000) An ordered comparative map of the cattle and human genomes. *Genome Res.*, **10**, 1359–1368.
- Kawamoto, S., Yoshii, J., Mizuno, K., Ito, K., Miyamoto, Y., Ohnishi, T., Matoba, R., Hori, N., Matsumoto, Y., Okumura, T. *et al.* (2000) BodyMap: a collection of 3'ESTs for analysis of human gene expression information. *Genome Res.*, **10**, 1817–1827.

14. Smith, T.P.L., Grosse, W.M., Freking, B.A., Roberts, A.J., Stone, R.T., Casas, E., Wray, J.E., White, J., Cho, J., Fahrenkrug, S.C. *et al.* (2001) Sequence evaluation of four pooled-tissue normalized bovine cDNA libraries and construction of a gene index for cattle. *Genome Res.*, **11**, 626–630.
15. Aso, H., Abe, H., Nakajima, I., Ozutsumi, K., Yamaguchi, T., Takamori, Y., Kodama, A., Hoshino, F.B. and Takano, S. (1995) A preadipocyte clonal line from bovine intramuscular adipose tissue: nonexpression of GLUT-4 protein during adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **213**, 369–375.
16. Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C. and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.*, **8**, 175–185.
17. Ewing, B. and Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.*, **8**, 186–194.
18. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389–3402.
19. Rozen, S. and Skaletsky, H.J. (1998) *Primer3*. Code available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html.
20. Comparative Genome Organization (1996) Comparative genome organization of vertebrates. *Mamm. Genome*, **7**, 717–734.

The SKI oncoprotein appears to be involved in induction of myogenesis probably through activation of myogenic regulators and plays an important role in the development of skeletal muscle^{1,12}. It was shown that the amino acid sequence of the core functional domain of the oncoprotein responsible for transformation and muscle differentiation activities is encoded by exon 1¹³. The assignment of the SKI gene to the porcine RYR1 linkage group makes SKI an attractive candidate for lean meat production, a trait that has been considered to be associated with the RYR1 (CRC) gene¹⁴.

Acknowledgements: We thank Dr M. Yerle and Dr D. Milan (INRA, Castanet-Tolosan, France) for providing the IMPRH panel, and H. Bartenschlager for computer analysis. The determination of AIBG and EAH genotypes by Dr D. Schröfelová, Dr J. Hojný, Dr J. Schröfel and Dr S. Čepica is acknowledged. Laboratory assistance of Mrs M. Datlová is appreciated. This study was supported by Grant Agency of the Czech Republic (Grant no. 523/00/0669) and EC (Contract no. ERBIC15CT960902).

References

- Berk M. *et al.* (1997) *Genes Dev* **11**, 2029–39.
- Colmenares C. *et al.* (2002) *Nat Genet* **30**, 106–9.
- Nomura N. *et al.* (1989) *Nucleic Acid Res* **17**, 5489–500.
- http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/.
- Geldermann H. *et al.* (1996) *J Anim Breed Genet* **113**, 381–7.
- Green P. *et al.* (1990) Documentation for CRI-MAP, Version 2.4. Washington University, School of Medicine, St Louis, MO.
- Geldermann H. *et al.* (1999) *Arch Tierz, Dummerstorf* **42**, 67–81.
- Yerle M. *et al.* (1998) *Cytogenet Cell Genet* **82**, 182–8.
- Hawken R.J. *et al.* (1999) *Mamm Genome* **10**, 824–30.
- Andersson L. *et al.* (1993) *Anim Genet* **24**, 205–16.
- <http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare/compare.htm>.
- Sutrave P. *et al.* (1990) *Genes Dev* **4**, 1462–72.
- Zheng G. *et al.* (1997) *Oncogene* **15**, 459–71.
- Otsu K. *et al.* (1991) *Genomics* **11**, 744–50.

Correspondence: A. Stratil (e-mail: stratil@iapg.cas.cz)

Construction of a bovine bacterial artificial chromosome library from fibroblasts used for cloned cattle

S. Fujisaki*, Y. Mizoguchi[†], S. Takahashi[†], Y. Z. Chen[†], K. Suzuki***, S. Asakawa[§], E. Soeda[†], N. Shimizu[§], Y. Sugimoto[†] and H. Yasue*

*Genome Research Department, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-0901, Japan. [†]Shirakawa Institute of Animal Genetics, Odakura Nishigo, Nishishirakawa, Fukushima 961-8061, Japan. [‡]Department of Animal Breeding and Reproduction, National Institute of Livestock and Grassland. [§]Department of Molecular Biology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0016, Japan. ^{††}Advanced Genotechs Co., Tsukuba, Ibaraki 305-0074, Japan. ^{***}Animal Genome Program Team, STAFF Institute, Tsukuba, Ibaraki 305-0854, Japan

Accepted for publication 28 May 2002

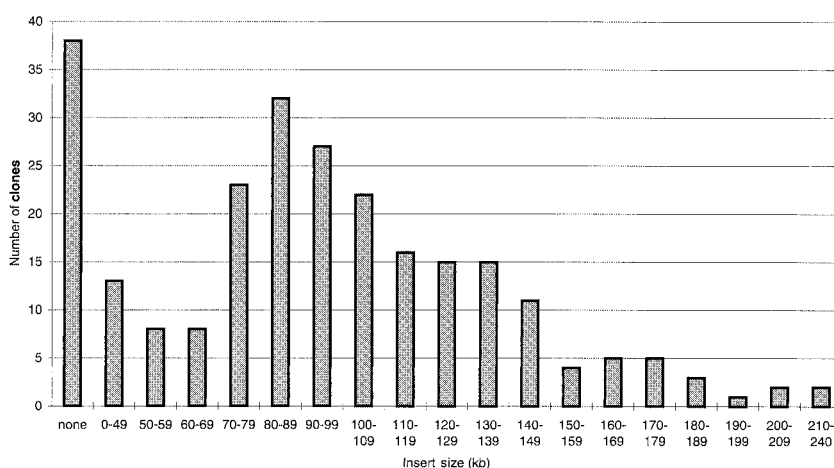


Figure 1 Size distribution of inserts in the bovine BAC genomic library. BAC DNA was extracted from 250 randomly selected clones and digested with *NotI*. The resulting samples were subjected to pulse-field agarose gel electrophoresis with λ -phage DNA ladder (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as the molecular size marker. Insert size was scored at 10 kb intervals.

Table 1 Sequences screened across the bovine BAC library.

STS	BTA	No. of clones	References	Sequence type	Product size	Forward primer	Reverse primer
DIK024	1	5	13	MS ¹	229-251		
DIK089	4	2	13	MS	82-98		
BM6026	5	3	13	MS	158-172		
ILST56	7	5	13	MS	283-297		
DIK106	8	1	13	MS	95-123		
DIK096	9	2	13	MS	246-256		
DIK020	10	6	13	MS	230-254		
DIK097	12	1	13	MS	192-212		
DIK102	15	4	13	MS	123-163		
DIK039	19	4	13	MS	194-220		
BM103	21	2	13	MS	147-157		
INRA130	22	6	13	MS	100-116		
CYP21A2 ³	23	2	13	MS	190-220		
DIK010	24	0	13	MS	185-201		
BM4505	26	4	13	MS	225-251		
CHGA ²	21	2	14	Gene	180		
SERPINA3 ^{2,3}	21	5	14	Gene	220		
ASB2	21	5	Bovine orthologue ASB2 (BF076091)	EST	124	GACCCCTGGCTCATCTTTG	TGGGTGTTCTCGTATTTTCAGG
FLJ21916	21	3	Bovine orthologue FLJ21916 (BE749521)	EST	110	AACATCGCCCTGCAGGTGGAGTA	GTGGGATGTTTTATAGACGAGGTA
DDX24	21	2	Bovine orthologue DDX24 (AW463825)	EST	142	ACATCAAGCTCTGCCCGTATC	TGCCCTCATGCCAATCTTCT
SERPINA1 ^{2,3}	21	5	14	Gene	210		
BDKRB2 ^{2,4}	21	2	15	Gene	191	CGTCACCGCCTGGCTCATCAAT	GCAGCGTGGCCTTCCTCTCAGTCT
EMLT ^{2,3}	21	3	15	Gene	500		
4-69(RNB6)	21	6	13	EST	249	ACAGGAAAAGCTTAGCACACA	ACAGTCACGGTAGGGGGTG
DLK1 ^{2,3}	21	3	14	Gene	60		
WAR5 ²	21	5	14	Gene	105		

¹MS = microsatellite.

²CHGA, chromogranin A; SERPINA3 (AACT), serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3; SERPINA1 (PI), serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1; BDKRB2, bradykinin receptor B2; EML1 (EMAPL), echinoderm microtubule associated protein like 1; DLK1 (DLK), delta-like 1 homolog; WAR5, tryptophanyl-tRNA synthetase.

³The original names of genes/sequences, SERPINA1, DLK1, CYP21A2, and EML1, are AACT, PI, DLK, CYP21, and EMAPL, respectively. The original names were in the papers cited.

⁴The primer pair suggested by Fahrenkrug *et al.* (2000) did not amplify genomic DNA of Japanese Black cattle, so the primer sequences were modified.

Source/description: A bovine bacterial artificial chromosome (BAC) library was constructed from fibroblast cells (ABF2) of a 9-year-old Japanese black (*Bos taurus*) male. Fibroblasts from this cell line had been used previously to produce cloned animals by nuclear transfer¹. For the current experiment, cells were cultured in Dulbecco-modified MEM (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) supplemented with 10% foetal calf serum in an atmosphere of 5% CO₂. Because cultured cells with low passages are likely to maintain original genome organization, cells after 2–4 passages were suspended in Buffer L (100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, and 20 mM NaCl) at a final concentration of 3×10^7 cells/ml. The cell suspension was mixed with an equal volume of liquefied 1.2% agarose and processed for *in situ* isolation of DNA as described previously². High molecular weight DNA in the gel was partially digested with *Hind*III, and then subjected to pulse-field agarose gel electrophoresis to obtain fragments between 145 and 190 kb³. These fragments were ligated into the pBAC-Lac vector, and transformed into DH10B *E. coli*⁴. Using Q-Bot (Genetix, Hampshire, UK), individual white colonies were transferred to wells of 384-well microtitre plates containing LB medium with 7.5% glycerol, and grown overnight at 37 °C. A total of 86 400 clones were arrayed onto 225 microtitre plates and stored at –80 °C.

Characterization of the library: In order to estimate the average insert size, 250 clones were randomly selected and amplified. The BAC DNAs were then digested with *Not*I and separated by pulse-field electrophoresis, along with a λ -phage DNA ladder (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as the size marker. Of the 250 clones, 212 (84.8%) contained inserts with an average size of 103 kb, while the remaining clones (15.2%) apparently had no inserts (Fig. 1). Assuming that the bovine genome is 3×10^6 kb and excluding those clones without an insert, the present library was calculated to contain 2.5 genome equivalents [$(86\,400 \times 0.848 \times 103) / (3 \times 10^6) = 2.5$].

Library screening: For rapid isolation of clones, a two-round PCR-based screening system reported previously⁵ was employed. In the first round, 384-well microtitre plate DNA pools (prepared from individual microtitre plates) were screened for PCR amplification. In the second round, individual clones were identified based on PCR amplification of row and column pools (prepared in ditch plates) from microtitre plates selected in the first round. Using this system, the library was screened for 26 sequences (15 microsatellites, 7 genes and 4 ESTs) using primer pairs that were available in our laboratory (Table 1). Clones were identified for all the sequences except *DIK010*. The resulting amplified fragments were of expected sizes. In addition, sequence was obtained from one clone for each gene or EST; all the sequenced clones contained at least a part of the respective gene or EST (data not shown). The average number of clones per sequence was 3.4; thus, coverage of the library calculated by screening (3.4) was greater than that calculated by the average insert size (2.5).

Other comments: To date, bovine yeast artificial chromosome (YAC)^{6–9} and bacterial artificial chromosome (BAC)^{10–12} libraries have been constructed. However, all these libraries,

except the BAC library constructed from a bovine foetal cell line¹², were constructed using peripheral blood cells. Libraries derived from blood cells may contain rearranged immunoglobulin and T-cell receptor genes, and therefore, may not be desirable for analysing these genes. Because this library was constructed from fibroblasts that contained a germ-line genome, as demonstrated by construction of cloned bulls¹, it will be useful for the analysis of immunoglobulin and T-cell receptor genes.

Acknowledgements: We thank T. Takeda, T. Itoh, N. Hayashi-Sugai, and H. Douguchi for their technical assistance. This research was supported in part by a grant from the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan.

References

- 1 Takahashi S. *et al.* (2000) *Clone Anim Placent*, pp. 30–5.
- 2 Suzuki K. *et al.* (2000) *Anim Genet* **31**, 8–12.
- 3 Asakawa S. *et al.* (1997) *Gene* **191**, 69–79.
- 4 Hanahan D. *et al.* (1991) *Methods Enzymol* **204**, 63–113.
- 5 Chen Y.Z. *et al.* (2001) *Genomics* **74**, 55–70.
- 6 Libert F. *et al.* (1993) *Genomics* **18**, 270–6.
- 7 Smith T.P. *et al.* (1996) *Mamm Genome* **7**, 155–6.
- 8 Takeda H. *et al.* (1998) *Anim Genet* **29**, 216–9.
- 9 Hills D. *et al.* (1999) *Mamm Genome* **10**, 837–8.
- 10 Cai L. *et al.* (1995) *Genomics* **29**, 413–25.
- 11 Buitkamp J. *et al.* (2000) *Anim Genet* **31**, 347–51.
- 12 Eggen A. *et al.* (2001) *Genet Sel Evol* **33**, 543–8.
- 13 Inoue-Murayama M. *et al.* (1997) *Anim Science Tech* **68**, 443–9.
- 14 Shay T.L. *et al.* (2001) *Mamm Genome* **12**, 141–9.
- 15 Fahrenkrug S.C. *et al.* (2000) *Mamm Genome* **11**, 871–6.

Correspondence: H Yasue (e-mail: hyasue@affrc.go.jp)

Partial cloning, cytogenetic and linkage mapping of the porcine resistin (*RSTN*) gene

S. Cepica*, G. A. Rohrer[†], M. Masopust*, S. Kubickova[‡], P. Musilova[‡] and J. Rubes[‡]

*Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Libečov, Czech Republic. [†]USDA ARS US Meat Animal Research Center, Clay Center, NE, USA. [‡]Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Accepted 29 May 2002

Source and description: To determine exon–intron boundaries of the human *RSTN* (resistin, resistin to insulin or found in inflammatory zone 3 – *FIZZ3*) gene, the cDNA sequence (NM_020415)^{1–3} was aligned with human chromosome 19 working draft DNA sequence (NT_011145) as it has been cytogenetically mapped to 19p13.3–19p13.2³. Primer pair A

High-resolution genetic map of bovine chromosome 29 through focused marker development

K.M. Reed,^a N. Ihara,^c P. Mariani,^a K.M. Mendoza,^a L.E. Jensen,^a R. Bellavia,^a F.A. Ponce de León,^b G.L. Bennett,^d Y. Sugimoto^c and C.W. Beattie^e

Departments of ^aVeterinary Pathobiology and ^bAnimal Science, University of Minnesota, St. Paul MN (USA);

^cShirakawa Institute of Animal Genetics Odakura, Nishigo, Nishi-shirakawa, Fukushima (Japan);

^dUSDA, ARS, U.S. Meat Animal Research Center, Clay Center NE; and

^eDepartment of Animal Biotechnology, University of Nevada, Reno NV (USA)

This article is dedicated to Professor Karl Fredga to commemorate his retirement and lifelong cytogenetic research activities.

Abstract. Chromosome-specific libraries aid in the development of genetic maps and focus marker development in areas of the genome with identified quantitative trait loci (QTL). A small-insert BTA29 library constructed by microdissection of a 1:29 Rb-fusion cell line, was screened for dinucleotide repeats (CA)₁₅ and/or (GA)₁₅ with the goal of generating new genetic markers for this, the smallest bovine autosome. A total of 90 primer pairs were designed and 82 of these successfully amplified bovine genomic DNA by PCR. In addition to these 82 loci, primer pairs were developed for nine putative genes identified from the sequenced clones by BLAST searches of GenBank. A somatic cell panel was used to test for synteny of the new loci

with two previously mapped BTA29 markers located on the MARC bovine linkage map. A total of 75 of the 82 microsatellite (ms) loci were integrated into the MARC bovine linkage map. Linkage analysis placed 69 ms markers on BTA29, five on BTAX and one on BTA1. Combined results of the somatic cell and linkage analyses place 79 new markers (ms and gene-related) on BTA29, six loci on BTAX and two loci on BTA1. The results of this effort significantly increase the marker density on BTA29, expanding the ability to fine map QTL associated with this chromosome.

Copyright © 2002 S. Karger AG, Basel

The identification and localization of genes that regulate important production traits (quantitative trait loci, QTL) are key objectives in livestock genomics. Identification of several economically important traits (QTLs) reduces whole-genome screening to the analysis of smaller regions of specific chromo-

somes through focused marker development (Alexander et al., 1997; Riquet et al., 1999) and fine mapping to identify possible candidate genes (Taylor et al., 1998). Once regions are fine mapped with genetic markers such as microsatellites (ms), contigs (continuous overlapping clones) of large genomic inserts (YAC, BAC, and/or P1 clones) can be constructed that cover the chromosome region where the trait has been assigned. This candidate clone set then provides the resource for fine mapping and gene isolation. This process can now be accelerated through comparative genomic approaches. For example, candidate genes can now be identified based on homology with the human genome sequence.

One means of focused marker development is to use chromosome or chromosome region-specific libraries. DNA libraries generated by chromosome flow sorting or microdissection provide a rich source of markers for specific chromosomes.

Supported by a grant from the USDA-NRRCGP, the Japan Livestock Technology Association and the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

Received 5 November 2001; revision accepted 19 February 2002.

Request reprints from Dr. Kent M. Reed

Department of Veterinary Pathobiology, 295 ASVM, 1988 Fitch Ave
University of Minnesota, St Paul, MN 55108 (USA)
telephone: (612) 624-1287; fax: (612) 625-0204; e-mail: reedx054@tc.umn.edu

Request reprints from Dr. C.W. Beattie Department of Animal Biotechnology
University of Nevada, Reno NV 89557 (USA); telephone: (1+) 775-784-6135
e-mail: cbeattie@cabnr.unr.edu

KARGER

Fax + 41 61 306 12 34
E-mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2002 S. Karger AG, Basel
0301-0171/02/0964-0210\$18.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/journals/cgr

Zhao et al. (1999) recently reported 22 new markers from a microdissected library of porcine chr 6 (SSC6) and Wang et al. (2000) isolated 31 markers from an SSC8 library. Recently, Ambady et al. (2001) isolated 17 new ms markers from a BTA11-specific library and Liu et al. (in press) obtained 34 new ms markers from a BTAY library. Here we report on the isolation and mapping of new markers from a bovine chromosome 29 (BTA29) library prepared by microdissection. Our goal was to substantially increase the number of linked markers on BTA29, the smallest bovine autosome.

Materials and methods

The bovine chromosome 29 library was constructed by microdissection of a 1:29 Rb-fusion cell line as described in Ambady et al. (1997, 2001). The λ -ZAP library was plated at ~5,000 pfu per 150-mm LB plate and grown overnight at 37°C. The resulting plaques were transferred to nylon membranes, denatured, neutralized and UV-fixed for screening by hybridization to ³²P-labeled probes. Filters were prehybridized at 65°C for 2 h in 10 ml of hybridization buffer and hybridized overnight at 65°C in 5 ml of the same hybridization solution (minus blocking DNA) with 5 × 10⁶ cpm each of end-labeled (GA)₁₅ and (TG)₁₅. After hybridization, filters were washed in 2× SET, 0.5% SDS 2 × 15 min at 60°C, rinsed briefly in room temperature 2× SSC and exposed to autoradiographic film. Agarose plugs containing positive phage clones were removed from the original plates and the associated phage eluted in 200 µl SM buffer. These primary clones were replated on 100-mm LB plates at a density of 50–100 plaques per plate. The resulting plaques were transferred to nylon membranes as described above and rescreened with the (GA)₁₅ and (TG)₁₅ probes. After hybridization, individual positive clones (2 per plate) were picked and eluted into 50 µl SM buffer.

The inserts of positive secondary clones were amplified from the phage/SM stock by PCR. Each reaction contained as template 5 µl of eluted phage, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 pmol each primer (T3 and T7 flanking primers), 100 µM dNTP, and 0.35 U Taq polymerase (Qiagen, Inc). Amplifications were performed under the following reaction conditions: 15 min at 94°C; 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 58°C, 30 s at 72°C; and a final extension of 5 min at 72°C. PCR products were resolved on 2% agarose gel. Sequencing templates were prepared from the PCR product with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Inc) and sequenced with an automated DNA sequencer (ABI 377) using vector-specific primers. DNA sequences were manually edited with Sequencher software (Gene Codes Corp.) and queried against GenBank by BLAST searching. All sequences were deposited in GenBank (Accession

numbers AF271898–AF271987). Oligonucleotide primers corresponding to sequences flanking the dinucleotide (dn) repeats were designed interactively with Primer v.3. Four sires of the MARC mapping family were screened for locus heterozygosity.

A bovine-hamster somatic cell-hybrid panel (provided by J.E. Womack) was used to test for synteny of the newly developed markers with mapped BTA29 loci. Thirty-one hybrid clones were scored for the presence or absence of two microsatellite loci assigned to BTA29 (BMC2228 and BMC3224, Kappes et al., 1997) and each of the new loci. Amplification patterns of the new markers were compared with those of the mapped loci and synteny was determined based on the correlation coefficient as described by Chevalet and Corpet (1986). Heterozygous markers were used to genotype the MARC mapping family at the Shirakawa Institute. Briefly, loci were amplified by means of PCR using fluorescent labeled primers, alleles were resolved by electrophoresis in polyacrylamide gels using an ABI PRISM 3700 DNA analyzer and genotype data were captured by means of GENESCAN and GENOTYPER software (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

The linkage map reported by Kappes et al. (1997) was used as a starting point for inserting new markers. Two-point lod scores (>3.0) were used to place markers on a linkage group. Multi-point linkage analysis (CRI-MAP v2.4; Green et al., 1990) was used to position markers linked to BTA29. The CHROMPIC option was used to identify unlikely double crossovers so that these genotypes could be checked for possible errors.

Results

A primary screen of 150,000 clones yielded 1200 isolates. Over half of these isolates were plated and secondarily screened to recover single isolated clones. DNA sequences were determined for 458 positive clones. From these, a total of 90 primer pairs were designed and 82 of these successfully amplified bovine genomic DNA by PCR (Table 1). Primer information for each of these loci is included in Table 2. Approximately 80% (65 of 82) of the loci were polymorphic in the four sires of the MARC mapping family. The number of alleles per locus ranged from one to five with an average of 2.5. Only seven of the 82 (8.5%) new ms loci were either not polymorphic in the four sires, or could not be mapped by linkage. In addition to the 82 microsatellite loci, primer pairs were developed for nine putative gene loci obtained from the library (Table 3).

Table 1. Summary of statistical analyses for synteny and linkage. For each locus, the results of SCP analysis (correlation coefficient for probability of synteny [ϕ , Chevalet and Corpet, 1986] with BTA29 markers BMC2228 and BMC3224) and linkage statistics are included. NS indicates loci that could not be scored (positive results for hamster and mouse samples) and E denotes loci where the values of ϕ were out of range of the test statistic (negative values)

Locus	SCP Analysis		Linkage Analysis					BTA assignment	
	ϕ_{2228}	ϕ_{3224}	Inform. meioses	Phase known	Position cM	2pt LODs	2pt marker		2pt recomb
MNB-93	0.8581	0.8673	256	125	24.1	52.05	RM179	0.02	29
MNB-94	0.7984	0.8578	87	53	3.7	16.78	BMS1857	0.03	29
MNB-95	0.6533	0.7964	333	126	56.7	76.67	BMC6004	0.01	29
MNB-96	0.7984	0.8578	208	135	27.5	42.83	BMS1600	0.01	29
MNB-97	0.6546	0.7399	246	170	17.6	54.71	BMS1787	0.01	29
MNB-98	0.7486	0.7285	3	0					29 ^a
MNB-99	0.7715	0.8086	177	49	29.9	33.97	BMS1600	0.02	29
MNB-100	0.7895	0.9304	209	143	8.0	46.33	BMS764	0.02	29
MNB-101	0.7678	0.8048	149	95	62.8	23.00	BMS1948	0.04	29
MNB-102	0.2624	0.2607	128	118		5.80	XBM701	0.10	X ^b
MNB-103	0.8048	0.8757	285	208	29.2	59.58	BMS1600	0.01	29
MNB-104	0.7048	1	301	237	18.6	73.31	BMS1787	0.00	29
MNB-105	0.6589	0.8757	259	209	38.9	74.96	DIK094	0.00	29
MNB-106	0.8581	0.9304	260	178	3.8	59.61	BMS1244	0.02	29

➤

Table 1 (continued)

Locus	SCP Analysis		Linkage Analysis						BTA assignment
	Φ_{2228}	Φ_{3224}	Inform. meioses	Phase known	Position cM	2pt LODs	2pt marker	2pt recomb	
MNB-107	0.8018	0.9337	227	106	20.3	50.63	BMS1787	0.03	29
MNB-108	0.7094	0.8701	173	119	27.5	28.19	RM044	0.05	29
MNB-109	0.6998	0.8000	271	182	35.8	56.59	BMS2149	0.00	29
MNB-110	0.7048	1	252	173	42.3	49.94	BL1100	0.03	29
MNB-111	0.6085	0.9365	163	80	21.1	39.33	RM044	0.01	29
MNB-112	0.3206	0.4110	224	214		25.49	XBM7	0.10	X ^a
MNB-113	0.6018	0.7285	223	50	33.4	33.21	BMS1600	0.06	29
MNB-114	0.8581	0.9304	335	201	26.5	76.11	BMS1600	0.01	29
MNB-115	0.7048	1	61	19	32.9	11.35	RM044	0.07	29
MNB-116	0.8604	0.8701	192	26	28.3	34.88	BMS1600	0.03	29
MNB-117	0.8048	0.8757	no data						29 ^a
MNB-121	0.6086	0.9365	302	241	20.3	62.12	RM179	0.02	29
MNB-122	0.7526	0.9365	239	128	46.2	55.40	BL1100	0.01	29
MNB-123	0.7048	1	228	176	38.5	39.02	RM040	0.07	29
MNB-124	0.7048	1	166	44	30.3	24.06	BMS1600	0.04	29
MNB-125	0.6086	0.9365	297	205	17.2	64.52	BMS1787	0.02	29
MNB-126	0.7526	0.9365	14	9	48.7	3.61	RM389	0.00	29
MNB-127	0.7526	0.9365	327	204	31.5	60.77	BMS1600	0.04	29
MNB-128	0.3671	0.7427	195	144	33.3	23.91	BMS1600	0.08	29
MNB-129	0.7048	1	no data						29 ^a
MNB-130	0.4062	0.5398	180	91	26.5	46.41	RM044	0.01	29
MNB-131	0.6193	0.8787	302	195	10.1	70.48	BMS764	0.01	29
MNB-132	0.7048	1	no data						29 ^a
MNB-133	0.1548	0.1158	142	131		7.70	XBM84	0.17	X ^b
MNB-134	0.1712	0.0262	300	217	48.7	61.43	BL1100	0.03	29 ^b
MNB-135	0.8604	0.8134	285	151	48.7	53.36	BL1100	0.04	29
MNB-136	0.7048	1	256	192	35.8	47.56	BMS2149	0.00	29
MNB-137	NS	NS	0	0					unknown
MNB-138	0.7048	1	306	130	50.5	57.69	URB011	0.04	29
MNB-139	0.7048	1	310	210	38.5	69.41	RM040	0.00	29
MNB-140	0.7048	1	256	107	36.4	49.16	RM040	0.03	29
MNB-141	0.7048	1	162	83	59.2	39.74	BMS1948	0.00	29
MNB-142	0.7048	1	282	205	6.7	58.38	BMS1244	0.04	29
MNB-143	0.7048	1	300	175	42.3	66.60	HHI22	0.01	29
MNB-144	0.7048	1	332	268	13.9	66.41	MB107	0.03	29
MNB-145	0.7048	1	205	94	32.9	31.18	BMS1600	0.05	29
MNB-146	0.3258	0.5375	no data						unknown
MNB-147	0.7048	1	191	65	19.7	40.38	RM044	0.03	29
MNB-148	0.7048	1	246	181	29.2	37.90	BMC8012	0.08	29
MNB-149	0.7048	1	127	82	32.2	22.49	RM044	0.07	29
MNB-150	0.7048	1	148	75	27.2	33.59	BMS1600	0.01	29
MNB-151	0.7048	1	302	215	59.5	59.88	BMS1948	0.02	29
MNB-152	E	E	326	68		70.04	BMS4000	0.03	1
MNB-153	0.7048	1	40	0	5.2	8.29	ILSTS057	0.05	29
MNB-154	0.7048	1	211	30	27.3	50.57	BMS1600	0.00	29
MNB-155	0.7048	1	288	148	47.5	57.64	BL1100	0.02	29
MNB-156	E	E	no data						unknown
MNB-157	0.7048	1	289	206	10.1	65.69	BMS764	0.02	29
MNB-158	0.6086	0.9365	304	225	10.1	69.80	BMS764	0.01	29
MNB-159	0.7048	1	232	122	26.5	46.27	BMS1600	0.02	29
MNB-160	0.7048	1	200	104	21.1	43.96	RM044	0.02	29
MNB-161	0.7048	1	288	139	47.9	55.91	BL1100	0.04	29
MNB-162	0.6086	0.9365	275	192	29.2	56.04	BMS1600	0.01	29
MNB-163	0.7048	1	196	77	6.7	33.64	BMS1244	0.06	29
MNB-164	0.7048	1	272	88	27.2	64.51	BMS1600	0.01	29
MNB-165	0.3671	0.4765	270	212		39.92	BM4604	0.07	X ^b
MNB-166	0.7048	1	161	55	32.2	32.07	RM044	0.04	29
MNB-167	0.7048	1	350	223	54.0	95.46	URB011	0.00	29
MNB-168	0.5130	0.8757	327	204	31.5	62.18	BMS1600	0.04	29
MNB-169	0.6086	0.9365	262	92	24.1	50.65	RM179	0.02	29
MNB-170	0.7526	0.9365	69	45	42.3	11.74	DIK094	0.00	29
MNB-171	0.6086	0.9365	304	213	23.4	72.37	RM179	0.00	29
MNB-172	0.7526	0.9365	325	247	49.3	53.28	URB011	0.07	29
MNB-173	0.3311	0.4330	299	237		59.50	XBM16	0.04	X ^b
MNB-174	0.6606	0.9372	303	207	42.3	69.23	BL1100	0.02	29
MNB-204	0.7048	1	173	115	21.1	39.40	BMS1787	0.02	29
MNB-205	0.7048	1	109	55	32.9	17.92	RM044	0.07	29
MNB-206	0.7048	1	317	194	39.5	69.72	DIK094	0.00	29

^a Chromosome assignment based only on SCP analysis.^b Chromosome assignment based only on linkage analysis.

Table 2. Locus information. The GenBank accession number, primer sequences, type and length of repeat, TM (PCR annealing temperature) of the primers, and observed product size (bp) are given for each locus

Locus	GenBank Accession no.	Forward primer	Reverse primer	Type/length	PCR TM	Product length (bp)
MNB-93	AF271898	GGTATAGGGTGTTCCTGAGTGC	TGGCAATAAAGTGTGTGCATC	(CA) ₁₇ imperfect	55	149–177
MNB-94	AF271899	ACTTTCAGGCAAGAGTACTGG	CCCATTATGTAGCCCTTGTG	(CA) ₁₃	55	154–156
MNB-95	AF271900	CTCTGAGTCAGGGCTAAGGATG	AAGTGGAAATGGGTAGGTTTG	(CA) ₁₅	55	141–161
MNB-96	AF271901	CCCCCTCTGGAGGAAATGC	GCAGGGTTTTCAGCAGGTAG	(CA) ₁₃ + (CA) ₁₃	55	148–182
MNB-97	AF271902	GGAGGTAAGAAGAGCCTGGAG	CAAGCAGGACTGACAAGTATGC	(TG) ₂₈₊	55	144–162
MNB-98	AF271903	AGACCAAGCAGAAGACCATACC	ATATACGCCCATTCGCTGTAC	(CA) ₉	55	133–137
MNB-99	AF271904	TGACTCCTCTTCTTCCTGATTG	TGTTGTTAACTGCTAACCTCTACCC	(CA) ₁₅	52	186–190
MNB-100	AF271905	ATGGGGTCGCAAAGAGTCAG	ACACAAGGGTGGCATTCTAATC	(CA) ₁₅	55	97–119
MNB-101	AF271906	TTTAAGAAGTATCCTGCGTITGG	AAGAATGAATGGTGCCAGAAAG	(CA) ₁₆	55	148–164
MNB-102	AF271907	ACAGGACCGAGCAACTGAGTC	ACATGCCAGACATGGGTCTAAG	(CA) ₁₄	55	130–140
MNB-103	AF271908	GTTACCTTTGGACCTTCATGC	GAGGTCAATTAAGCTATGGATGC	(CA) ₁₈	55	140–155
MNB-104	AF271909	GAGAACACAGTGGGTTAGAAGC	CAAGGTGTGGGCTTGTG	(CA) ₁₃	55	166–179
MNB-105	AF271910	AGGCTTCCAGAACTGAAGAGG	CTGTGTCTCCATGTACGAG	(TG) ₂₀	55	135–147
MNB-106	AF271911	GGAACAGTTAGAACCAGACAGG	CAGACACAAGTGTAGTAAGTGAAGT	(TG) ₁₉	55	162–180
MNB-107	AF271912	TAAGGAGTCGGACAGGACTCAG	GGAATTCCTTAGTAATACTAAC	(CA) ₁₄	55	149–159
MNB-108	AF271913	CGAGCTTCGGTAGGTATATGTG	TGGTCAGACACAGAAAAGAGAC	(TG) ₂₀	55	131–141
MNB-109	AF271914	GTAACGTGATTAGGGAAGCTGG	TGGAATTTAAGCTGTACAGTTG	(TG) ₁₆	55	180–206
MNB-110	AF271915	ACCTCGGATTTGAATATCTTCTG	GAGCAACAATAAGAACAAATCA	(TG) ₁₂	55	142–154
MNB-111	AF271916	ATGGAAATCTCAGAAAAGCTTGC	AAGTGTAAAGCAAAGTATTGATCAGC	(TA) ₅ + (GT) ₁₂	55	123–135
MNB-112	AF271917	ACACCTAACTCATATGTGATTGTGAAG	CCACCAAGAAGGTAGATGAAAC	(GT) ₂₀	55	158–178
MNB-113	AF271918	GGACATGATTGAAGTAACTGAGC	GGATGCTTTGTGTGCATGTAG	(CA) ₁₂	55	164–168
MNB-114	AF271919	GTCCTGGCATCTCTAAACTTG	AGCAACTGAGCAAATAAAACAC	(TG) ₂₁	55	138–180
MNB-115	AF271920	ACTCCAGGTGGTTGCAAGG	AAGCATTAAAATAATTTAGCTACTATC	(CA) ₁₂	55	100–106
MNB-116	AF271921	TGCTTGAGTAGGCTAGAGTTCAC	CGTCTCATTTAGTCTCTTAACC	(CA) ₁₅	60	168–190
MNB-117	AF271922	AATTGAGCATAGTTCCTTGTGC	CTGAGAGGAACCTGACAGTCC	(TG) ₁₅	57	134–158
MNB-121	AF271923	GGAAACATCTTCAAATAAGTATGTA	AGTCGGACACAACCTAAGCAACT	(TG) ₂₅	55	85–113
MNB-122	AF271924	GGATTCATGCTGCTGAGAAAC	CAGACCAGAATTCACCAGTAACC	(CA) ₁₅	55	164–190
MNB-123	AF271925	AACTATAACCCGTTCTGCATC	AAAATGTTTCATACACATGAATAAGG	(TG) ₁₇	52	168–180
MNB-124	AF271926	TTGACATGACTCCTCTTATTC	TGAAGAGTGGTGGTTATAGTGG	(CA) ₂₄ imperfect	55	195–199
MNB-125	AF271927	AACTGAAGCAACTGGTATGCAC	TAAAGGCTGTGAAACAGAGAAG	(CA) ₁₇ + (TA) ₉	55	92–120
MNB-126	AF271928	ACTAAGGGATTGAGCCCTGGTC	CATAGCAAATTTCTGTGTTTGTGAAC	(TG) ₄ + (TA) ₁₁ + (CA) ₁₁	55	149–175
MNB-127	AF271929	GAGAATGTGGCTGGAGGTTTAC	GGGGATGTAATGGACTGG	(CA) ₁₆	55	219–238
MNB-128	AF271930	AGTCCACGGAGTCACAAGAGTC	ATTTCAATTTGGAGGACATTCTG	(CA) ₈	58	104–128
MNB-129	AF271931	GGCATCTCAGGGATTCTTATG	TAGCAATTTCCAAATTTGGTG	(TG/TA) ₁₉	55	189
MNB-130	AF271932	ATGGCCAACTCCACAATC	TTGTTGGAGATAGGTTCTGGTAAAG	(TG) ₁₁	55	141–151
MNB-131	AF271933	CATCAACAAGGGATGATACTTGG	TGTCCTTACACATAGCCTGTGC	(CA) ₁₄	60	168–178
MNB-132	AF271934	CTGGTATTGCCATGAACCTC	AGATGGCACATGGGTTGG	(CA) ₁₆	58	125–131
MNB-133	AF271935	GGCTCTGGACTTCAAGACTTC	AACCTACCTTTTGCCCATCTG	(TG) ₁₆ + (TG) ₁₁	55	157–165
MNB-134	AF271936	GGATTAGCTTGCAGCCTTTG	AAGAGTATTGGAGGCTGACCTG	(TG) ₁₄	55	168–194
MNB-135	AF271937	TGTACAAGAGGCAGACCACAC	ACAGCTCTGTTTGGTGGAAAC	(CA) ₁₈	52	167–185
MNB-136	AF271938	CTTACTCTCCAGCATCAGCAAG	GCTCCTTGTTAAAATGCAGACC	(CA) ₁₄	55	143–165
MNB-137	AF271939	TGCAGCTGACATTATTTCAATC	TGTTCAATGCAACTGTTTAC	(TG) ₁₃	58	145–165
MNB-138	AF271940	AGAAGGGGACCGAGACAATAC	GCTATTTCTGGCCTGTATTCC	(CT) ₁₂ + (CA) ₁₅	55	125–139
MNB-139	AF271941	CACCCAACTGGAAAGTGGATTG	TGCCCTTTGTTAAGTAAATTC	(CA) ₁₃	55	277–295
MNB-140	AF271942	CTGAAACTAACACAACACTGTTCA	GTTGCAAAGAGTTGGAGAAGAC	(TG) ₃₁	58	101–135
MNB-141	AF271943	AGCTTAGCACTCTGAGGATGTC	AACACAGGAGCTATGGAAACTG	(TG) ₁₂	55	141–153
MNB-142	AF271944	ATAAGGTCCGAAAGGCAGATAC	AAGGTGTTTGGGCTGTAGTATG	(CA) ₁₆	55	129–161
MNB-143	AF271945	AAGGAGTGTGCGGCTCAAC	ACCTCTCAATCAAGGCTCAC	(TG) ₁₈	55	93–125
MNB-144	AF271946	CCTCTACCACCTAGTCAAAGC	AAGAGTTGGAACGACTGAGTG	(TG) ₂₃	60	148–178
MNB-145	AF271947	ATAGTGCAGTGCAGAATCAC	GAAATCCTCCTCAGAGTCCAG	(TG) ₁₃	55	164–178
MNB-146	AF271948	GCACTGTTACAGTAGCCAAGAC	TGCAGCTGACATTATTTCAATC	(CA) ₁₃	58	136–154
MNB-147	AF271949	TGCAGTGTGTATCTATTTTGC	CCTCACTAAAAGAGTTCCTCTC	(CA) ₁₆	55	135–165
MNB-148	AF271950	CTTGAATTCAGCCTTGTCTTTC	ATTGTAACCAAGTCCACCTTTTG	(CA) ₁₃	60	148–160
MNB-149	AF271951	GGCTCTGCCTCCCCTCTC	CCTGACGCTTTATTTGTATGTG	(CA) ₁₀ + (CA) ₁₀	55	148–160
MNB-150	AF271952	TTACAAAGAGCTGGACATGACA	TCTCATTGGGAAAACATCACTC	(CA) ₁₂	55	152–158
MNB-151	AF271953	CTGCATGCTTTTGGATTATTTG	CAGTGCATTTCCAGAAGTAACC	(TG) ₃₂	55	133–168
MNB-152	AF271954	CATGAATGTCAAAAATGGCAAG	CCTAAATGCCATCAAGAGAAG	(TG) ₁₂	55	126–150
MNB-153	AF271955	CCTGGACACAACTTAGCAACTAAAC	AGCCTAAGCTGAAGTTTTCTG	(CA) ₇	55	106–112
MNB-154	AF271956	ATGGCTACCCACTCCAGTATTC	TACCTTGAACCTTTGGAGATG	(CA) ₁₁	60	180–213
MNB-155	AF271957	CAGCGTTTTAATGAGTTAGAAAATG	GTCTCCTGACAGTTTCAGATGC	(CA) ₁₄	55	126–146
MNB-156	AF271958	GGGCTTTAAACCTCTTCTTTG	TGACAGTATTTACAGCCTTGAGAC	(TC) ₁₁ imperfect	55	79–79
MNB-157	AF271959	AACAGATGTGGGAATTTGATG	TGGACATGACATAGTGGCTAAAC	(CA) ₁₇	55	181–222
MNB-158	AF271960	TGGACATGACATAGTGGCTAAAC	AACAGATGTGGGAATTTGATG	(TG) ₁₇	55	178–217
MNB-159	AF271961	TCCATTAATTTCCCAAAGTGGAG	TATAAAGAAAGGCGGTGGGAAG	(TG) ₁₁	55	149–155
MNB-160	AF271962	CAAAACTGGGTGATGGCTAAAC	ACGCAGTCAAAAGAGTCAAAC	(TA) ₁₃	55	168–190
MNB-161	AF271963	ACACCAGTCCCTGTTCTTGC	GAAAGTGGAAATGAGCCACAG	(GT) ₁₄	55	144–150
MNB-162	AF271964	ATCACCTAAGTGCCATAAAC	CTCCATGGTGTGGCAAATC	(CA) ₁₆ imperfect	60	132–178
MNB-163	AF271965	ACTACCTGGAGAGGGCAAAGG	CATAAGCCTGGAGCACTTCTTG	(CA) ₃₄ imperfect	55	219–225
MNB-164	AF271966	GTTTCTGCCATGAAGCAACTC	AGCTAGCCTGGTGTCTGTGAC	(TG) ₁₇	58	131–147
MNB-165	AF271967	CACGATTGAGAGACTAAGCACAG	ACTGCTTCAGGACATGCTGITA	(CA) ₃₂ imperfect	58	146–178

Table 2 (continued)

Locus	GenBank Accession no.	Forward primer	Reverse primer	Type/length	PCR TM	Product length (bp)
MNB-166	AF271968	CTGTGTGTCTATCACTTCCATGC	TAAAGCTGGTACTCTGTCTGG	(CA) ₁₅	55	143–163
MNB-167	AF271969	TAGAGCAGGAAGGGACTTTACAG	AGCCTTGACTGCATTGTCTG	(CA) ₂₀	55	140–152
MNB-168	AF271970	TGAGGTTCAAAGCCTGTATGC	GGGGATGTAAATGGACTGG	(CA) ₁₆	55	161–179
MNB-169	AF271971	GCAAGTCAAGCTCTGCAGTTAG	TCCAGACTGTTTTGAAAAGTCAC	(CA) ₂₁ imperfect	55	206–220
MNB-170	AF271972	ATTCTTTGTTTCTGTGGATG	CCAGACTCAGCCTTGTGAATC	(TG) ₁₇	55	186–190
MNB-171	AF271973	TCCCAGCAAGTCTGTATTACC	AACATGAATAAATGGGAGAGACC	(TG) ₁₇	55	211–235
MNB-172	AF271974	ATAAAAGGGGAATCTGTGCTG	TCGGAACACTCTAGAAGCTTGG	(TG) ₁₅ + (TG) ₁₄	58	157–258
MNB-173	AF271975	GAATGGCAATATGAGGAGTTGC	GATAATTTGCTCTGTGCCCTTAG	(CA) ₁₆	55	140–162
MNB-174	AF271976	TGTCAAGGCATATTGTCAAAAAG	GCCTATGAATACTTGCATGCTC	(CA) ₁₈	55	134–152
MNB-204	AF271977	ATGTTTTGGGATGGTTATCTGG	TCTCCATTGTTCTGTTTCTGACTC	(TG) ₁₇	55	156–169
MNB-205	AF271978	ACTGTGTCACGCTTGTTCTG	TCCTCCGTCTGTAGAATAAAGGAC	(TG) ₁₈	60	149–155
MNB-206	AF271979	CATAGAGCATCCCATGTTGTGT	CTCTCTCATCTCCAGCATCTT	(CA) ₁₉ imperfect	55	169–181
MNB-211	AF271980	GGGCCTTCCACTAGATGTACC	TTCTTTTTCTCTGGAGGCTGTC		56-58	122
MNB-212	AF271981	TACGGAAAATCGTTTTACACAG	GGTGCTAAAAGTCCCCAGTTC		56-58	145
MNB-213	AF271982	TATCATGTTGTGCGGTCAATAC	AGTTTGAGAACCAACCCTCAG	(CT) ₅	56-58	127
MNB-214	AF271983	ACAAGTGACCCTTTCATTTGAC	AGGAATTCAGTTCCACAGATG		56-58	196
MNB-215	AF271935	GAAGTACTGGACCAATGGACTGAG	AGAGTTGCACCCTTTATGTGAC		56-58	150
MNB-216	AF271984	TCTGTCTCTGTTTGTCTCAGG	CACACAGTGTAGTTCCCATAG	(GT) ₃	56-58	127
MNB-217	AF271985	TCCAGGATGCTACATTATGGTG	CAGCAAATATACGCCGTAAGC		56-58	168
MNB-218	AF271986	TCTGGTAGTTCCCTGGAGACAG	TCCCAGAACTGTTTCTTTTC	(GA) ₃	58	167
MNB-219	AF271987	TGTACTATGCCCTCTTGGGAAG	CAGAGTGCCCTAAGTCTATTGAATG		58	141

Table 3. Mapping results of gene-specific loci. Included for each locus are the putative sequence similarities based on BLAST search, probability level from BLAST search (*P*), correlation coefficients for probability of synteny (ϕ) with BTA29 markers BMC2228 and BMC3224 and chromosomal assignment. Position in the human genome based on BLAST search of the Human Genome sequence is indicated by HSA. NS indicates loci that could not be scored (positive results for hamster and mouse samples) and E denotes loci where the values of ϕ were out of range of the test statistic (negative values)

Locus	BLAST gene similarity	<i>P</i>	ϕ_{2228}	ϕ_{3224}	BTA	HSA
MNB-211	PGA exon 8	5e ⁻²⁶	0.7048	1	29	11
MNB-212	ZFP36L1	5e ⁻³²	NS	NS	unknown	14
MNB-213	PAG1B exon 8	9e ⁻⁸⁶	0.7048	1	29	unknown
MNB-214	PAG1B intron 2	1e ⁻⁴¹	0.7048	1	29	unknown
MNB-215	UREB1	3e ⁻³⁵	0.3206	0.5424	X ^a	X
MNB-216	HNT	1e ⁻⁵⁴	0.7048	1	29	11
MNB-217	Glucosyltransferase (putative)	2e ⁻³⁵	0.7048	1	29	11
MNB-218	PCCB	4e ⁻²⁸	E	E	1 ^b	3
MNB-219	Canine SRPR	1e ⁻²¹	0.7048	1	29	11

^a Based on comparison with X-linked loci, see Table 5.

^b Based on comparison with BTA1 loci, see Table 4.

Table 4. Correlation coefficients for probability of synteny with BTA1 markers (BMS4008, BMS4017, and BMS4030) for loci not statistically syntenic with the BTA29 markers based on SCP analysis. Comparisons which resulted in out of range statistical values (negative values) are denoted as E

Locus	ϕ_{4008}	ϕ_{4017}	ϕ_{4030}
MNB-102	E	E	E
MNB-112	E	E	E
MNB-130	0.1164	0.0541	0.0854
MNB-133	0.0421	0.1287	0.0053
MNB-134	E	E	E
MNB-146	0.2753	E	0.0529
MNB-152	0.8051	0.9351	1
MNB-156	E	E	E
MNB-165	E	E	E
MNB-173	E	E	E
MNB-215	E	E	E
MNB-218	0.8051	0.8009	0.8675

Tests for synteny of the new microsatellite loci with two BTA29 markers on the MARC bovine linkage map (BMC2228 and BMC3224) found that 82% (65 of 82) of these loci are syntenic (average $\phi > 0.74$) with previously mapped BTA29 loci (Table 1). Non-significant synteny ($0.74 < \phi < 0.59$) was found for five of the remaining markers and nine ms were found to be not syntenic based on somatic cell panel (SCP) analysis. Because the initial library was from a 1:29 Rb-fusion cell line, each of these loci was subsequently compared with SCP scores for three loci from BTA1 (BMS4008, BMS4017, and BMS4030). One of the loci (MNB-152) mapped to BTA1 ($\phi > 0.74$; Table 4) and was confirmed by linkage analysis (Table 1). Of the remaining eight ms, five are part of a separate

syntenic group (MNB-102, MNB-112, MNB-133, MNB-165, MNB-173; Table 5). Each of these loci was subsequently mapped to the bovine X linkage group. Only two discrepancies between the SCP and linkage analyses were detected. Two ms (MNB-130 and MNB-134) not syntenic with BTA29 based on SCP analysis, were placed on BTA29 by linkage analysis.

Microsatellite markers that were heterozygous in at least one of the 28 MARC parent animals were used to genotype the 234 animals of the MARC reference families. Average heterozygosity among the 28 parents was 56.5% with the number of alleles ranging from two to twenty and including null alleles for MNB-123, MNB-128 and MNB-158. Linkage analysis placed 69 of the 90 new ms markers on BTA29, five on BTAX and one

Table 5. Summary of statistical analysis for probability of synteny (ϕ) among six new loci that formed a syntenic group based on SCP analysis. Three of these loci (MNB-102, MNB112 and MNB-133) were placed on BTAX by linkage analysis

Locus	MNB-112	MNB-133	MNB-165	MNB-173	MNB-215
MNB-102	0.6652	0.5839	0.7365	0.6298	0.7365
MNB-112		0.6309	0.9351	0.9303	0.8675
MNB-133			0.6757	0.4913	0.6309
MNB-165				0.8542	0.9351
MNB-173					0.7856

on BTA1. The new loci were distributed along the full length of BTA29 (Fig. 1). MNB-94 was the most proximal marker at 3.7 cM and MNB-101 the most distal at 62.8 cM. The greatest cluster of new markers (28 loci) occurred between 23 and 36 cM, OARVH110 and BMS2149, respectively.

Six of the nine putative gene loci mapped to BTA29 by SCP analysis (Table 3). Of the remaining three loci, MNB-218 was syntenic with the BTA1 ms loci (Table 4) and MNB-215 was part of the X syntenic group (Table 5). Each of these assignments is consistent with the position of this DNA sequence in the Human Genome sequence. MNB-218 showed highest similarity to a sequence on HSA3 (3q21 → q22; homologous to distal two-thirds of BTA1) and MNB-215 showed highest similarity to a sequence on HSA X. Additional support for the assignment of MNB-215 to the X chr is based on its physical linkage to the ms locus MNB-133. The closest linked marker to MNB-133 is XBM84 (Table 1) located on BTAXq. The remaining gene-specific locus (MNB-212) could not be mapped using the SCP because the primers co-amplified the locus in the hamster and mouse samples. However, BLAST search found significant similarity with ZFP36L1 (alias BRF1, butyrate response factor 1 [EGF-response factor 1]) that is located on HSA14q22 → q24 (Maclean et al., 1995). This gene is a putative zinc finger nuclear transcription factor and member of the Tis11 family of early-response proteins.

Discussion

Prior to this study, fine mapping studies of BTA29 were restricted by the limited density of genetic markers. Only 32 ms loci were placed on the MARC linkage map for BTA29, at an average density of one locus per 2.03 cM. The new markers reported in this study, increase marker density on BTA29 by 340% yielding a BTA29 map 62.8 cM in length with an average marker density of one marker per 0.561 cM. Sufficient genetic tools are now available to enhance the robustness of QTL scans and for further mapping of this bovine chromosome. For example, each of the new BTA29 loci are currently being used to characterize a new 7000-rad whole genome radiation panel (Mariani et al., 2000).

Investigation of BTA29, the smallest bovine chromosome, appears to hold promise for improved beef tenderness. Two groups have independently located a QTL for meat tenderness

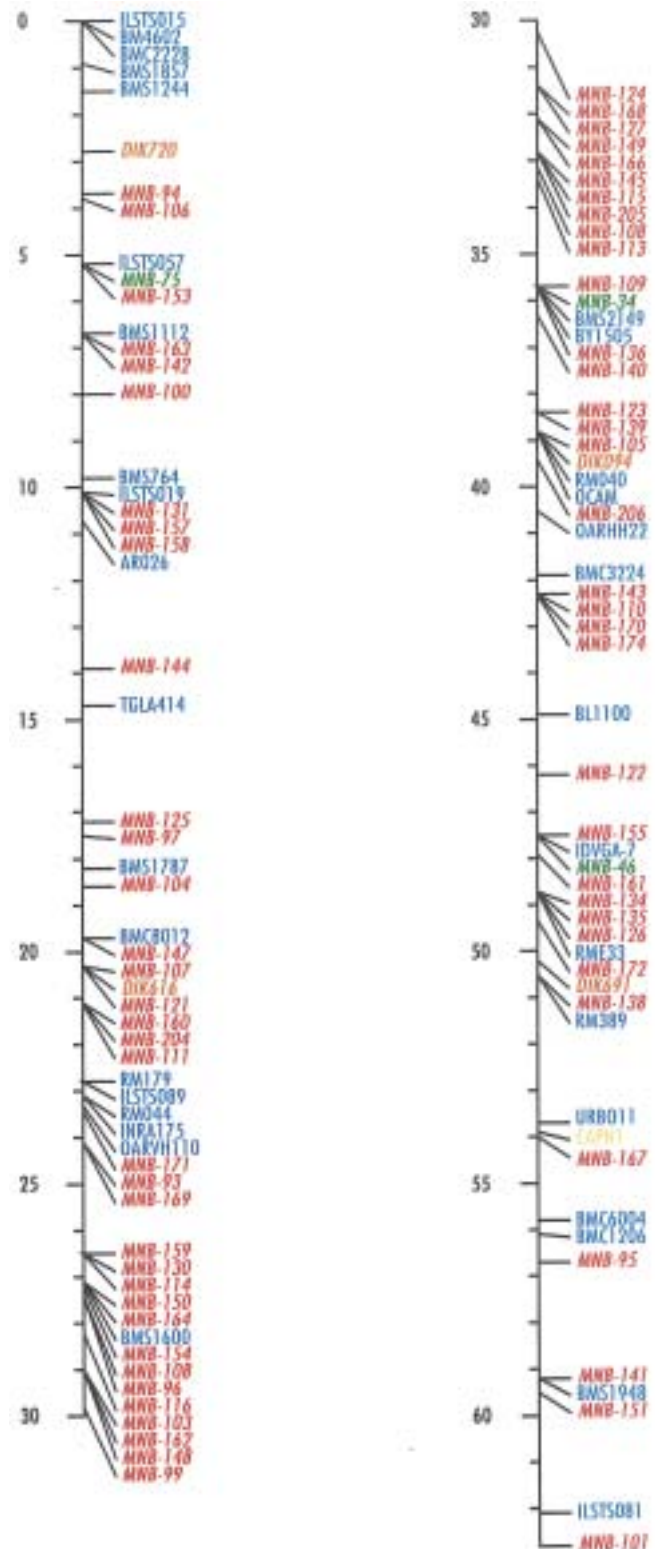


Fig. 1. Linkage map of BTA29. New markers developed as part of this study are indicated in RED, recently published markers developed as part of a separate study (Reed et al., 2001) are indicated in GREEN, and additional new markers developed at the Shirakawa Institute (Hirano et al., 1996; Ihara et al., in preparation) are indicated in ORANGE. Position of the micromolar calcium activated neural protease gene (CAPN1) at 53.9 cM is indicated in YELLOW.

on this chromosome and two candidates for this QTL, micro-molar calcium activated neural protease (CAPN1 at 53.9 cM; Smith et al., 2000) and collagenase (Schmutz et al., 2000) have been hypothesized. One new ms locus described in this study (MNB-167, 54.0 cM) is located just distal to CAPN1.

The results of this study add to the growing number of gene sequences mapped in cattle. In addition to CAPN1, several genes (TYR, CCND1, LDHA, IGF2) have been physically mapped to BTA29 (Schmutz and Moker, 1999; Schmutz et al., 1999 and references therein; Schmitz et al., 2001). Our results place four additional genes on BTA29 and confirm the location of a fifth gene (PAG1, bovine placental-associated glycoprotein 1). PAG1B is a member of the aspartic proteinase family. The gene product is produced specifically in the invasive binucleate cells of the placenta and becomes detectable in maternal serum soon after implantation (Xie et al., 1995). PAG1B was just recently placed on BTA29 between anonymous markers RM40 and ILSTS081 using SINEVA (Sine variable poly(A)) markers (Martin-Burriel et al., 1998).

Loci with sequence similarity to PGA (Pepsinogen A), HNT (human neurotrimin), a putative glucosyltransferase, and SRPR (signal recognition particle receptor) are included in the new BTA29 assignments. PGA, the precursor of Pepsin, is the predominant endopeptidase in the gastric juice of vertebrates, maps to HSA11q13 (Nakai et al., 1986). HNT is a member of the immunoglobulin superfamily located on HSA11q25 and

may function as a GPI-anchored neural cell adhesion molecule (Struyk et al., 1995). SRPR, located in the human genome at 11q23→q24 (NCBI BLAST of human genome sequence), is an essential component of the cellular machinery (docking protein) that mediates the translocation of nascent secretory and membrane proteins to the rough endoplasmic reticulum (Hortsch and Meyer, 1988).

In addition, to genes located on BTAX, SCP analysis placed PCCB (Propionyl Coenzyme A carboxylase) on BTA1 and a sequence with similarity to UREB1 (upstream regulatory element binding protein 1), on BTAX. PCCB acts to degrade branched-chain amino acids, whereas the exact function of UREB1 is not known. Studies with the rat homolog of UREB1 suggest that it may function as a DNA-binding transcriptional regulator (Huibregtse et al., 1995). In conclusion, our results provide a significant number of new ms markers for BTA29. The physical assignment of new gene-specific and ms loci on BTA29 will enhance our ability to fine-map loci putatively associated with meat tenderness.

Acknowledgements

The authors wish to thank J. Womack for providing access to the bovine somatic cell panel.

References

- Alexander LJ, Smith TP, Beattie CW, Broom MF: Construction and characterization of a large insert porcine YAC library. *Mammal Genome* 8:50–51 (1997).
- Ambady S, Ciuffo S, Robl JM, Smyth JR, Ponce de León AF: Development of a chicken Z-chromosome-specific DNA library. *J Hered* 88:247–249 (1997).
- Ambady S, Kappes SM, Park C, Ma RZ, Beever JE, Lewin HA, Smith TPL, Beattie CW, Basrur PK, Ponce de León AF: Development and mapping of microsatellites from a microdissected BTA 11-specific DNA library. *Animal Genet* 32:152–155 (2001).
- Chevalet C, Corpet F: Statistical decision rules concerning synteny or independence between markers. *Cytogenet Cell Genet* 43:132–139 (1986).
- Green P, Falls K, Crooks S: Documentation for CRIMAP, Version 2.4. Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, USA (1990).
- Hirano T, Nakane S, Mizoshita K, Yamakuchi H, Inoue-Murayama M, Watanabe T, Barendse W, Sugimoto Y: Characterization of 42 highly polymorphic bovine microsatellite markers. *Animal Genet* 27:365–368 (1996).
- Hortsch M, Meyer DI: The human docking protein does not associate with the membrane of the rough endoplasmic reticulum via a signal or insertion sequence-mediated mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 150:111–117 (1988).
- Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM: A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci, USA* 92:2563–2567 (1995).
- Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw RA, Sonstegard TS, Smith TP, Lopez-Corrales NL, Beattie CW: A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res* 7:235–249 (1997).
- Liu W, Mariani P, Beattie CW, Alexander LJ, Ponce de León FA: A radiation hybrid map for the bovine Y chromosome. *Mammal Genome* (in press).
- Maclean KN, See CG, McKay IA, Bustin SA: The human immediate early gene BRF1 maps to chromosome 14q22→q24. *Genomics* 30:89–90 (1995).
- Mariani P, Sugimoto Y, Beattie CW: A new whole-genome radiation hybrid (WG-RH) panel for cattle. Abstract B082, p 43. 27th International Conference on Animal Genetics (2000).
- Martin-Burriel I, Elduque C, Osta R, Laurent P, Barendse W, Zaragoza P: SINEVA polymorphism and mapping of the bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 gene. *Mammal Genome* 9:179–180 (1998).
- Nakai H, Byers MG, Shows TB, Taggart RT: Assignment of the pepsinogen gene complex (PGA) to human chromosome region 11q13 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 43:215–217 (1986).
- Reed KM, Mendoza KM, Beattie CW: Development of 90 new bovine microsatellite loci. *Animal Biotech* 12:69–76 (2001).
- Riquet J, Coppeters W, Cambisano N, Arranz JJ, Berzi P, Davis SK, Grisart B, Farnir F, Karim L, Mni M, Simon P, Taylor JF, Vanmanshoven P, Wagenaar D, Womack JE, Georges M: Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in out-bred populations: application to milk production in dairy cattle. *Proc Natl Acad Sci, USA* 96:9252–9257 (1999).
- Schmitz BH, Buchanan FC, Plante Y, Schmutz SM: Linkage mapping of the tyrosinase gene to bovine chromosome 29. *Animal Genet* 32:105–121 (2001).
- Schmutz SM, Buchanan FC, Plante Y, Winkelman-Sim DC, Aalhus J, Boles JA, Moker JS: Mapping collagenase and a QTL to beef tenderness to cattle chromosome 29. Abstract no. 367, International Plant and Animal Genome Conference VIII (2000).
- Schmutz SM, Moker JS: In situ hybridization of TRY and CCND1 to cattle chromosome 29. *Animal Genet* 30:241–242 (1999).
- Struyk AF, Canoll PD, Wolfgang MJ, Rosen CL, D'Eustachio P, Salzer JL: Cloning of neurotrimin defines a new subfamily of differentially expressed neural cell adhesion molecules. *J Neurosci* 15: 2141–2156 (1995).
- Smith TP, Casas E, Rexroad CE III, Kappes SM, Keele JW: Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *J Anim Sci* 78:2589–2594 (2000).
- Taylor JF, Coutinho LL, Herring KL, Gallagher DS Jr, Brenneman RA, Burney N, Sanders JO, Turner JW, Smith SB, Miller RK, Savell JW, Davis SK: Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. *Anim Genet* 29:194–201 (1998).
- Wang Z, Rohrer G, Stone R, Troyer D: Isolation of thirty-one new porcine microsatellites from a microsatellite enriched microdissected chromosome 8 library. *Anim Biotechnol* 11:33–43 (2000).
- Xie S, Green J, Beckers JF, Roberts RM: The gene encoding bovine pregnancy-associated glycoprotein-1, an inactive member of the aspartic proteinase family. *Gene* 159:193–197 (1995).
- Zhao F, Ambady S, Ponce de León FA, Miller LM, Lunney JK, Grimm DR, Schook LB, Louis CF: Microsatellite markers from a microdissected swine chromosome 6 genomic library. *Anim Genet* 30:251–255 (1999).

Mapping of 1400 expressed sequence tags in the bovine genome using a somatic cell hybrid panel

T. Itoh, A. Takasuga, T. Watanabe and Y. Sugimoto

Shirakawa Institute of Animal Genetics, Japan Livestock Technology Association, Odakura, Nishigo, Japan

Summary

A bovine/hamster hybrid cell panel consisting of 30 independent hybrids was developed to locate genes. Polymerase chain reaction analysis of 279 microsatellites on the cattle linkage map in this panel revealed the presence of all chromosomes in either entire or fragmented form. Among primer pairs prepared from bovine 3'-expressed sequence tags (ESTs), 1400 ESTs were assigned to specific chromosomes, of which 1303 were newly assigned in this study, and mapped 854 (61%) to 1 of 192 chromosomal segments using this panel. The regional mapping of new genes to cattle chromosomes can be rapidly achieved using this panel.

Keywords cattle, expressed sequence tags, microsatellite, regional localization, somatic cell hybrid panel.

The construction of mapping tools such as a somatic cell hybrid (SCH) panel is important for gene mapping in cattle (Heuertz & Hors-Cayla 1981; Womack & Moll 1986; Konfortov *et al.* 1998). The current cattle genetic linkage maps contain more than 1000 markers, most of which are microsatellites (Barendse *et al.* 1997; Kappes *et al.* 1997). These microsatellite markers have also been used to develop framework radiation hybrid maps (Williams *et al.* 2002). By using microsatellites selected from the linkage map to characterize the SCH panel, the utility of the SCH panel for locating genes to the sub-chromosomal level and for comparative mapping is increased.

The hamster BHK-21-derived tk^{-ts}13 cell line ($2n = 50-151$; RIKEN Gene Bank, Tsukuba, Japan) was transfected with pL2neo using Lipofectamine (Gibco-BRL, Rackville, MD, USA), and a subclone named BHK-21-tk^{-ts}13neo was fused with bovine fetal fibroblasts derived from a Japanese black bull. Thirty independent hybrid cell lines were isolated and the presence of cattle chromosomes in each cell line was confirmed by fluorescence *in situ* hybridization, using cattle genomic DNA as a probe according to the standard protocols. An average of 70 mg DNA (18.6–137.2 mg) was isolated from each hybrid. Microsatellites were selected at intervals of approximately 10 cM from the bovine genetic map (Kappes *et al.* 1997). The primers were synthesized

using sequence information from the following web site (<http://www.marc.usda.gov/genome/>). Polymerase chain reaction (PCR) products were purified using MultiScreen-PCR (Millipore, Cambridge, MA, USA), followed by electrophoresis using an ABI3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Markers were scored using Genotyper (Applied Biosystems).

Marker retention by cell line can be viewed at the following web site: <http://www.siang.or.jp/paper/SCH/index.html>. The overall average marker retention of the hybrid panel was 37.2%, ranging from 9.5% for BTA5 to 97% for BTA19, where the *TK* gene which was used as the selectable marker during the creation of the hybrids is located. All except two markers (*BMS1248* and *ETH2*) located in the telomeric region of BTA5 were amplified in at least two hybrids, indicating that our SCH panel provides coverage of the complete cattle genome. The marker retention patterns in the panel revealed that 29 autosomes and the X-chromosome could be divided into 215 regions: 192 unique regions (or bins) and 23 regions each of which could be described by a unique PCR profile, but included several microsatellites that are not contiguous on the same chromosome (Table 1). Any PCR profile was chromosome-specifically observed and did not exist in other chromosomes. Thirteen chromosomes (BTA3, 6, 13, 15–17, 19, 23, 25, 26, 28, 29, X) were composed of unique regions, whereas 12 chromosomes (BTA4, 5, 7–10, 12, 14, 18, 20–22) contained one region including several microsatellites that do not map to contiguous locations on the USDA-MARC linkage map of the chromosome (Kappes *et al.* 1997). Approximately 80.9% (2350 cM) of the cattle genome belonged to unique regions and could be regionally

Address for correspondence

Y. Sugimoto, Shirakawa Institute of Animal Genetics, Japan Livestock Technology Association, Odakura, Nishigo, Fukushima 961-8061, Japan.

E-mail: kazusugi@siag.or.jp

Accepted for publication 15 April 2003

Table 1 Characterization of the somatic cell hybrid panel.

Chr.	Region	Characterization of sub-chromosomal regions				EST ¹
		Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4	
1	1	MS ² 1 (AGLA17)				0
	2	MS2 (TGLA49)	MS6 (TGLA57)	MS10 (BR2724)	MS12 (BM1824)	64
		MS3 (BM8139)	MS7 (DIK024)		MS13 (CSSM019)	
			MS8 (BM9019)		MS14 (BMS918)	
	3	MS4 (BMS711)			MS15 (BMS2263)	5
4	MS5 (BM4307)	MS11 (BMS4040)			2	
	5	MS9 (URB038)			0	
	2,3				2	
2	1	MS1 (BM81124)				3
	2	MS2 (TGLA44)				0
	3	MS3 (TGLA431)				4
	4	MS4 (CSSM042)	MS6 (BL1001)			3
	5	MS5 (FCB20)				3
	6	MS7 (BM4440)	MS13 (BM2113)			15
			MS14 (FCB11)			
	7	MS8 (ILSTS050)	MS11 (BM6444)			6
		MS9 (RM041)				
	8	MS10 (TGLA226)	MS12 (BMS1987)			24
	6,8				2	
3	1	MS1 (BMS871)				0
	2	MS2 (MB101)				5
	3	MS3 (BMS2904)				2
	4	MS4 (BMS963)				4
	5	MS5 (BM723)				4
	6	MS6 (MB099)				1
	7	MS7 (HUJ246)				0
	8	MS8 (BM4301)				6
	9	MS9 (BMS2145)				1
	10	MS10 (IDVGA-35)				33
			MS11 (BMC5227)			
	11	MS12 (RM309)			3	
4	1	MS1 (BMC1410)				0
	2	MS2 (BMS1788)				5
	3	MS3 (BMS827)				0
	4	MS4 (MAF70)				0
	5	MS5 (DIK008)	MS7 (BM6458)			7
	6	MS6 (BMS885)				0
	7	MS8 (DIK026)				8
			MS9 (BL1121)			
	5,7					21
5	1	MS1 (BMS695)				0
	2	MS2 (BMS610)				1
	3	MS3 (BP1)				10
	4	MS4 (RM103)				6
	5	MS5 (BM321)				3
			MS6 (CSSM034)			
	6	MS7 (BMS1617)				15
			MS8 (AGLA254)			
	7	MS9 (BM1819)				5
	8	MS10 (BMS1248)				5
		MS11 (BMS1658)	MS13 (BM8126)		12	
	10	MS12 (ETH2)			0	
6	1	MS1 (ILSTS093)				0

Table 1 (Continued.)

Chr.	Region	Characterization of sub-chromosomal regions				EST ¹
		Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4	
	2	MS2 (<i>INRA133</i>)				2
	3	MS3 (<i>BM1329</i>)				6
	4	MS4 (<i>BM143</i>)				0
	5	MS5 (<i>BM4322</i>)				0
	6	MS6 (<i>ILSTS097</i>)				3
	7	MS7 (<i>CA028</i>)				4
	8	MS8 (<i>BM1236</i>)				0
	9	MS9 (<i>AFR227</i>)				3
	10	MS10 (<i>BM2320</i>)				17
	11	MS11 (<i>JMP12</i>)				0
	1,9					1
	2,6					4
	2,7					1
	3,10					1
	3,4					1
	6,7					2
7	1	MS1 (<i>BM7160</i>)				0
	2	MS2 (<i>RM012</i>)				12
	3	MS3 (<i>DIK079</i>)				5
	4	MS4 (<i>IL4</i>)				6
	5	MS5 (<i>TGLA303</i>)	MS9 (<i>BMS2258</i>)			11
	6	MS6 (<i>BM741</i>)				0
	7	MS7 (<i>UWCA20</i>)				6
	8	MS8 (<i>BMS904</i>)				7
	9	MS10 (<i>BM1853</i>)				3
	10	MS11 (<i>AE129</i>)				0
	11	MS12 (<i>MB021</i>)				0
	12	MS13 (<i>MB057</i>)				1
		MS14 (<i>DIK119</i>)				
		MS15 (<i>BL1043</i>)				
	2,4					1
	2,7					2
	3,12					4
	3,5					2
	3,5,9,12					4
	4,7,8					2
	7,8					6
	9,12					4
8	1	MS1 (<i>BMS1864</i>)				1
	2	MS2 (<i>Z27077</i>)				0
	3	MS3 (<i>BMS1591</i>)	MS9 (<i>BM711</i>)			15
			MS10 (<i>DIK074</i>)			
			MS11 (<i>CSSM47</i>)			
	4	MS4 (<i>BMS678</i>)				13
	5	MS5 (<i>CSSM37</i>)				0
	6	MS6 (<i>TGLA13</i>)				0
	7	MS7 (<i>BMS2072</i>)				8
	8	MS8 (<i>MB065</i>)				3
	9	MS12 (<i>BMS2629</i>)				10
	4,6					1
	8,9					1
9	1	MS1 (<i>BM1227</i>)				4
	2	MS2 (<i>BM2504</i>)				1
	3	MS3 (<i>BMS1267</i>)	MS8 (<i>INRA084</i>)			4

Table 1 (Continued.)

Chr.	Region	Characterization of sub-chromosomal regions				EST ¹
		Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4	
10	4	MS4 (CSSM025)				0
	5	MS5 (BMC701)				0
	6	MS6(BMS2753)				0
	7	MS7 (BM7209)				0
	8	MS9 (BMS1943)				1
	9	MS10 (BMS2094)				4
	2,3					3
	3,6					3
	4,5					1
	5,7					1
	5,7,9					3
	5,9					2
	7,9					6
	1	MS1 (BM3033)				4
	2	MS2 (CSSM038)				0
	3	MS3 (BM1237)				21
	4	MS4 (MB077)				5
5	MS5 (ILSTS053)				4	
6	MS6 (BMS2742)	MS8 (BR1603)			24	
7	MS7 (BMS419)				4	
8	MS9 (INRA037)				4	
	MS10 (DIK020)					
	MS11 (BL1134)					
9	MS12 (DIK101)				1	
3,5					1	
3,5,8					1	
4,7					1	
5,6					4	
5,8					1	
6,8					2	
11	1	MS1 (BM827)				1
	2	MS2 (BM716)	MS8 (BMS607)			36
	3	MS3 (BM304)				17
		MS4 (TGLA327)				
	4	MS5 (BMS1716)				8
		MS6 (ILSTS100)				
	5	MS7 (IDVGA-3)	MS9 (BMS2208)			11
3,4					1	
12	4,5					4
	1	MS1 (BMS410)				0
13	2	MS2 (TGLA36)				6
		MS3 (IDVGA-57)				
	3	MS4 (BMS712)				0
	4	MS5 (BM1827)				1
	5	MS6 (DIK016)	MS9 (BMS1316)			17
		MS7 (BM4028)				
	6	MS8 (ILSTS033)				6
1	MS1 (DIK083)				0	
2	MS2 (BMS1742)				0	
3	MS3 (ILSTS077)				0	
4	MS4 (BMS1580)				15	
	MS5 (BM4509)					
5	MS6 (AGLA232)				3	
6	MS7 (DIK093)				16	

Table 1 (Continued.)

Chr.	Region	Characterization of sub-chromosomal regions				EST ¹
		Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4	
14	4,5					1
	1	MS1 (<i>BM1508</i>)	MS4 (<i>RM011</i>)			10
	2	MS2 (<i>ILSTS011</i>)				5
	3	MS3 (<i>DIK121</i>)				0
	4	MS5 (<i>BM302</i>)				2
	5	MS6 (<i>RM192</i>)				0
	6	MS7 (<i>BMS947</i>)				1
	7	MS8 (<i>BM4513</i>)				1
	8	MS9 (<i>BM4305</i>)				0
	9	MS10 (<i>BL1036</i>)				12
	10	MS11 (<i>BM6425</i>)				0
15	3,9					1
	1	MS1 (<i>MGTG13B</i>)				18
	2	MS2 (<i>BR3510</i>)				0
	3	MS3 (<i>MB085</i>)				0
	4	MS4 (<i>JAB1</i>)				5
	5	MS5 (<i>MB069</i>)				0
	6	MS6 (<i>BMS2684</i>)				0
	7	MS7 (<i>MB064</i>)				5
	8	MS8 (<i>INRA145</i>)				1
	9	MS9 (<i>ILSTS061</i>)				15
	10	MS10 (<i>TGLA75</i>)				0
16	11	MS11 (<i>BMS927</i>)				0
	1,9					1
	1	MS1 (<i>BMS357</i>)				1
	2	MS2 (<i>BM6121</i>)				0
	3	MS3 (<i>BM121</i>)				4
	4	MS4 (<i>BM4025</i>)				2
	5	MS5 (<i>CSSM028</i>)				12
	6	MS6 (<i>IDVGA-69</i>)				22
7	MS7 (<i>BMS462</i>)				0	
17	3,6					2
	1	MS1 (<i>BMS499</i>)				1
	2	MS2 (<i>VH98</i>)				0
	3	MS3 (<i>BMS1510</i>)				0
	4	MS4 (<i>FCB48</i>)				10
	5	MS5 (<i>BM305</i>)				14
	6	MS6 (<i>BM1862</i>)				26
18	5,6					1
	1	MS1 (<i>BMS3004</i>)				8
	2	MS2 (<i>BMS2559</i>)				7
	3	MS3 (<i>BR4206</i>)				0
	4	MS4 (<i>INRA121</i>)	MS7 (<i>BM6507</i>)			23
	5	MS5 (<i>BMS2554</i>)				29
	6	MS6 (<i>BMS833</i>)				0
19	2,4,5					2
	2,5					23
	4,5					1
	1	MS1 (<i>BM6000</i>)				9
19	2	MS2 (<i>X82261</i>)				6
	3	MS3 (<i>BP20</i>)				0

Table 1 (Continued.)

Chr.	Region	Characterization of sub-chromosomal regions				EST ¹
		Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4	
20	4	MS4 (<i>BMS2389</i>) MS5 (<i>CSSM065</i>) MS6 (<i>IOBT34</i>) MS7 (<i>RM388</i>) MS8 (<i>BMC1013</i>) MS9 (<i>BMS601</i>)				32
	1	MS1 (<i>BM3517</i>)				0
	2	MS2 (<i>BMS1282</i>)	MS4 (<i>BM713</i>)			13
	3	MS3 (<i>TGLA126</i>)				0
	4	MS5 (<i>BMS2361</i>)				0
	5	MS6 (<i>BMS1120</i>)				0
	6	MS7 (<i>BM5004</i>)				0
	7	MS8 (<i>UWCA26</i>)				3
	21	1	MS1 (<i>BM8115</i>)			
2		MS2 (<i>MB071</i>)	MS4 (<i>UWCA4</i>)			4
3		MS3 (<i>BM103</i>)				11
4		MS5 (<i>TGLA337</i>)				3
5		MS6 (<i>BMS2382</i>)				3
3,4						1
3,4,5						6
22	4,5					5
	1	MS1 (<i>CSSM026</i>)				0
	2	MS2 (<i>MB116</i>)	MS7 (<i>MB084</i>)			67
	3	MS3 (<i>BM3406</i>) MS4 (<i>BMS2573</i>) MS5 (<i>CSSM41</i>) MS6 (<i>FCB304</i>)				6
23	1	MS1 (<i>CSSM005</i>)				3
	2	MS2 (<i>UWCA1</i>)				7
	3	MS3 (<i>CSPS107</i>)				2
	4	MS4 (<i>RM185</i>)				1
	5	MS5 (<i>CSSM024</i>)				4
	6	MS6 (<i>BM1905</i>)				35
24	1,3					1
	1	MS1 (<i>BL6-1</i>)				1
25	2	MS2 (<i>BMS917</i>)				0
	3	MS3 (<i>BM7151</i>)				2
	4	MS4 (<i>CSSM023</i>)	MS8 (<i>INRA090</i>)			12
		MS5 (<i>CSSM031</i>)				
	5	MS6 (<i>BMS1862</i>)	MS9 (<i>BMS3024</i>)			1
	6	MS7 (<i>DIK021</i>)				2
	1	MS1 (<i>ILSTS102</i>)				2
26	2	MS2 (<i>BM4005</i>)				21
	3	MS3 (<i>BP28</i>)				2
	4	MS4 (<i>BM1864</i>)				0
	1	MS1 (<i>BM7226</i>)				1
26	2	MS2 (<i>MB067</i>)				0
	3	MS3 (<i>BM4505</i>)				3
	4	MS4 (<i>IDVGA-59</i>)				1
	5	MS5 (<i>BM804</i>)				10
	6	MS6 (<i>ILSTS091</i>)				5
	1,5					6

Table 1 (Continued.)

Chr.	Region	Characterization of sub-chromosomal regions				EST ¹	
		Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4		
27	1	MS1 (<i>BM3507</i>)	MS4 (<i>INRA183</i>)	MS6 (<i>INRA134</i>)	MS7 (<i>BM1857</i>)	3	
		MS2 (<i>TGLA179</i>)		MS8 (<i>INRA027</i>)			
				MS9 (<i>BM203</i>)			
	2	MS3 (<i>BM6526</i>)				2	
	3	MS5 (<i>CSSM043</i>)				1	
28	1	MS1 (<i>BMS2060</i>)				5	
		MS2 (<i>IDVGA-29</i>)				1	
		MS3 (<i>DIK068</i>)				0	
		MS4 (<i>IDVGA-43</i>)				8	
		MS5 (<i>DIK080</i>)				2	
		MS6 (<i>BM7246</i>)				0	
		MS7 (<i>MB023</i>)				2	
		MS8 (<i>DIK107</i>)				0	
		1,5,8					4
		1,8					5
	4,7					2	
29	1	MS1 (<i>BM4602</i>)				0	
		MS2 (<i>ILSTS057</i>)				2	
		MS3 (<i>ILSTS019</i>)				0	
		MS4 (<i>RM179</i>)				51	
		MS5 (<i>HH22</i>)					
		MS6 (<i>BMC1206</i>)				0	
		MS7 (<i>ILSTS081</i>)				0	
	3,4					3	
X	1	MS1 (<i>BMS631</i>)				0	
		MS2 (<i>BL1098</i>)				1	
		MS3 (<i>XBM7</i>)				0	
		MS4 (<i>BM4604</i>)				8	
		MS5 (<i>XBM11</i>)				1	
		MS6 (<i>BR215</i>)				20	
		MS7 (<i>BMC6021</i>)				0	
		MS8 (<i>XBM24</i>)				0	
		MS9 (<i>INRA30</i>)				6	
			5,9				
Total	215		279 MS	241 segments		1400	

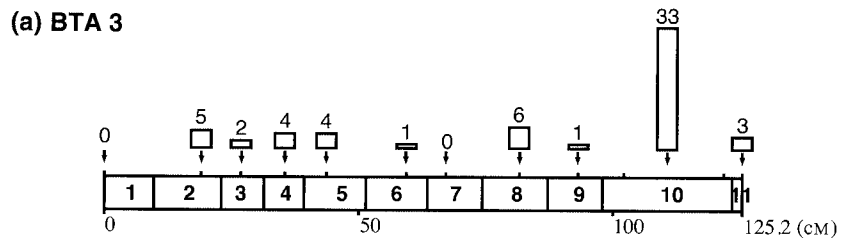
¹Number of expressed sequence tags (ESTs) assigned to each chromosomal region (or regions). Most likely location is shown. ESTs that were linked to more than two regions on the same chromosome with the highest correlation value are shown separately.

²MS1, MS2 and MS3 are microsatellite markers as ordered on the USDA-MARC linkage map. The identity of each microsatellite is shown in parenthesis.

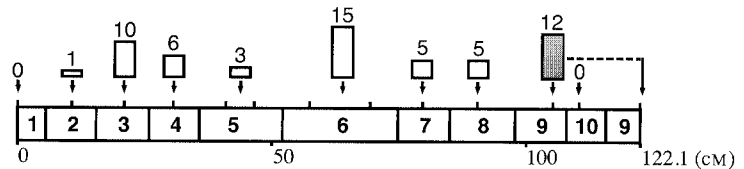
dissected as shown in Fig. 1 and <http://www.siag.or.jp/paper/SCH/bin.html>.

Next, expressed sequence tags (ESTs) were mapped using the marker-characterized SCH panel. PCR primers for EST were designed to target previously produced 3'-ESTs (Takasuga *et al.* 2001) using Primer 3, version 0.9 http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html. To prevent amplification of host DNA present in the hybrid cells, the human and mouse EST sequences that had the highest sequence identity to the query sequence were put into a mispriming library of Primer 3. The list of primer

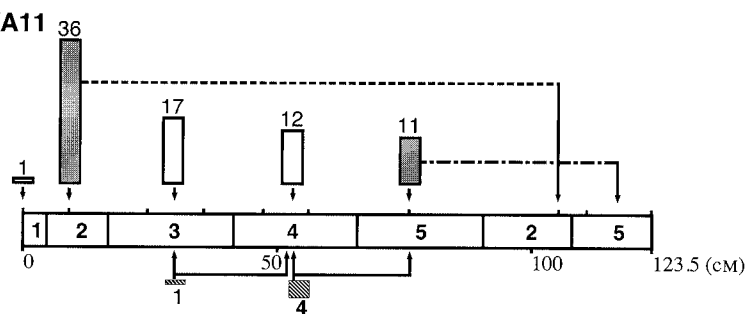
sequences and annealing temperatures is available from <http://www.siag.or.jp/paper/SCH/primer.html>. Among 3826 primer pairs from bovine 3'-ESTs, 2851 (74.5%) gave a specific PCR product on bovine genomic DNA and were submitted to SCH mapping. A correlation value of 0.71 was used as the threshold for the assignment of a marker to a chromosome (Chevalet & Corpet 1986). A total of 1434 ESTs (50.3% of those typed across the SCH panel) were assigned to a specific chromosome. There was some redundancy with more than one EST, derived from some genes ($n = 34$) mapped. The reliability of our mapping



(a) BTA 3



(b) BTA 5



(c) BTA11

Figure 1 Mapping of bovine expressed sequence tag (EST) with a marker-characterized somatic cell hybrid (SCH) panel to chromosomal regions. The x-axis indicates dissected and numbered chromosomal regions. Each region represents the defined PCR profiles of 279 microsatellite markers in 30 hybrids. The upper bar on the x-axis indicates the genetic position of a microsatellite marker. The number of EST linked to the marker is shown on the box. When two consecutive markers define the same region, the box is located between the markers. Grey boxes indicate how many ESTs are linked to the regions defined by the same PCR profiles of inconsecutive markers. Such a region is composed of more than two segments. Hatched boxes in BTA11 indicate how many EST are similarly linked to two consecutive regions. (a) BTA3, (b) BTA5 and (c) BTA11.

protocols was confirmed by the mapping of such redundant groups of ESTs to single locations. On the contrary, there were 1417 ESTs that could not be assigned to a specific chromosome. This indicates that our EST mapping method with the SCH panel should be improved by the addition of more microsatellites in the framework as well as more information on human and mouse orthologs to distinguish a target from pseudogenes or family genes. The ESTs assigned in this study include 97 genes that had been mapped in previous studies (BOVMAP database (<http://www.locus.jouy.inra.fr/>)) and 1303 newly assigned. Thus, the total number of bovine genes assigned to specific chromosomes has been increased to 2779, including 36 genes from the major histocompatibility complex region (BOVMAP database (<http://www.locus.jouy.inra.fr/>)). The number of mapped ESTs per genetic length was high in BTA18, 22, and 29. The BTA18 was predicted to be gene-rich in a previous report (Band *et al.* 2000), consistent with the fact that BTA18 shares homology with HSA19, the most gene-rich chromosome in humans (International Human Gene Sequencing Consortium 2001; Venter *et al.* 2001).

Fifty-nine ESTs were mapped to chromosome 3 (BTA3), with each EST assigned to one of the 11 sub-chromosomal regions (Fig. 1a). In contrast, of the 57 ESTs mapped to BTA5, 12 were assigned to region 9 which corresponds to two non-contiguous segments, as defined by the mapping of

microsatellites in the SCH panel (Fig. 1b). The BTA11 was composed of seven chromosomal segments in which neither the second and the sixth nor the fifth and seventh can be distinguished on the basis of SCH PCR profiles for microsatellites selected from contiguous regions on the BTA11 linkage map. Thus, the scope for sub-chromosomal assignments of ESTs on BTA11 is limited (Fig. 1c). A total of 854 ESTs (61%) among 1400 were located to 1 of 192 unique regions. The list of the ESTs assigned in this study is available at <http://www.siag.or.jp/paper/SCH/primer.html>. The mapping data for 1400 ESTs as well as human and mouse comparative data will facilitate the construction of a comprehensive bovine physical map.

Acknowledgements

We wish to thank our technical staff for excellent assistance and Ryohta Etoh for data management. This study was supported by grants from the Japan Racing and Livestock Promotion Foundation.

References

- Band M.R., Larson J.H., Rebeiz M. *et al.* (2000) An ordered comparative map of the cattle and human genomes. *Genome Research* 10, 1359–68.

- Barendse W., Vaiman D., Kemp S.J., *et al.* (1997) A medium-density genetic map of the bovine genome. *Mammalian Genome* **8**, 21–8.
- Chevalet C. & Corpet F. (1986) Statistical decision rules concerning synteny or independence between markers. *Cytogenetics and Cell Genetics* **43**, 132–9.
- Heuertz S. & Hors-Cayla M.-C. (1981) Cattle gene mapping by somatic cell hybridization study of 17 enzyme markers. *Cytogenetics and Cell Genetics* **30**, 137–45.
- International Human Gene Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921.
- Kapes S.M., Keele 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.
- Konfortov B.A., Jorgensen C.B., Miller J.R. & Tucker E.M. (1998) Characterization of a bovine/murine hybrid cell panel informative for all bovine autosomes. *Animal Genetics* **29**, 302–6.
- Takasuga A., Hirotsune S., Itoh R., Jitohzono A., Suzuki H., Aso H. & Sugimoto Y. (2001) Establishment of a high throughput EST sequencing system using poly(A) tail-removed cDNA libraries and determination of 36000 bovine ESTs. *Nucleic Acids Research* **29**, e108.
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., *et al.* (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304–51.
- Williams J.L., Eggen A., Ferretti L. *et al.* (2002) A bovine whole-genome radiation hybrid panel and outline map. *Mammalian Genome* **13**, 469–74.
- Womack J.E. & Moll Y.D. (1986) Gene map of the cow: conservation of linkage with mouse and human. *Journal of Heredity* **77**, 2–7.