

2012 年度
修士論文

ウシの *KIT* 遺伝子の多型に基づく品種間差異に
関する研究

21131013 坂本 直樹

指導教員 家畜生産科学 遺伝・育種学 上田 純治 教授

酪農学園大学大学院 酪農学研究科

目 次

ページ

I . 緒 論	・ ・ ・ ・ ・ 1
II . 材 料 と 方 法	・ ・ ・ ・ ・ 4
1 . 供 試 動 物	
2 . サンプルからの DNA の抽出	
(1) 血液からの DNA の採取	
(2) 精液からの DNA の採取	
3 . DNA の増幅と精製	
4 . PCR 反応液	
5 . PCR プロトコル	
6 . アガロースゲル電気泳動	
7 . 7.アガロースゲルからの DNA 断片の回収 (スピнкаラム法)	
8 . ダイレクトシーケンス法	
III . 結 果	・ ・ ・ ・ ・ 10

IV . 考察	• • • • • 11
V . 摘要	• • • • • 13
VI . Summary	• • • • • 14
VII . 謝辞	• • • • • 15
VIII . 参考文献	• • • • • 16
IX . 図表	• • • • • 27

I 緒論

家畜において毛色は、個体および品種を判別するための重要な判断材料となっている。1984年にPCR法がMullisらによって開発され、それ以降、家畜の毛色に関する遺伝はDNAレベルで次々とその原因が明らかにされてきた[1、9、19、20、23]。その中でもウシ[3、22、39]、ウマ[25、37]、ブタ[21、40]に見られる黒い毛色や褐毛は、*MC1R* (melanocortin 1 receptor) 遺伝子や *ASIP* (agouti signaling protein) 遺伝子の変異が原因となっている。また斑紋形質においてもマウスやイヌの斑点の原因は *MITF* (microphthalmia-associated transcription factor) の突然変異や[6、9 33]、ウマのオベロの原因となっている *EDNRB* (endothelin receptor type B) の2塩基の置換によるものなどがある[2、26、34、37]。その斑紋形質の原因の一つとされている *KIT* 遺伝子はチロシンキナーゼ受容体をコードしており、ネコ科の白血病ウイルスと類似した配列を持つ遺伝子として発見され、原癌遺伝子とも呼ばれている[17]。この遺伝子は細胞の増殖に関連すると共に、色素細胞の増殖にも関連している。ウマにおいて、Brookら(2005)によれば、白斑(sabino spotting pattern)の原因は *KIT* 遺伝子の intron16 内の一塩基多型 (SNP: single nucleotide polymorphism) によって

exon17 の読み飛ばしが生じ起こるためであり[4,13]、似たような白斑 (tobiano spotting pattern) の原因も *KIT* 遺伝子の近傍に逆位がおこっていることも報告している[5,13,14]。さらに Haase ら(2007) は *KIT* 遺伝子の exon15 内に存在するナンセンス変異が Franches Montagne horse における優性白色毛の表現型 (W 対立遺伝子) を引き起こすことを報告した[15, 41]。またブタにおいて、ランドレース種における優性白色毛は *KIT* 遺伝子の重複によって生じ[16, 18, 24, 27, 35]、ハンプシャー種のベルト状の模様は *KIT* 遺伝子とのイントロンにある変異箇所に親密に連鎖していることも報告されている[10, 11, 30, 31, 42]。

しかしウシの斑紋については、連鎖不平衡の報告はあるものの原因を特定するまでには至っていない[8, 29, 32 36]。最近の報告では *KIT* 遺伝子内に原因の変異があるのではなくその近傍にあるとされている[12]。

また *KIT* 遺伝子の 5' 上流に存在する *PDGFRA* 遺伝子は、チロシンキナーゼ受容体のうちの一つで、*KIT* 遺伝子に似たような働きをする遺伝子と考えられている。

マウスにおいて Smith ら(1991)により、*KIT* 遺伝子の変異によって Patch の毛色が発現することが分かっている。ネコの白斑は *KIT* 遺伝子と *PDGFRA* 遺伝子の二つの連鎖領域が原因となっている

ことが分かっている[7]。

そこでウシの白斑についても *KIT* 遺伝子と *PDGFRA* 遺伝子の間の領域について、毛色の異なる品種間で塩基配列に違いが見られるのではないかと考えた。本研究の目的は、品種間の差異を DNA レベルで明らかにするため、斑紋を持つホルスタイン種、ヘレフォード種、斑紋を持たない黒毛和種を用いて、*KIT* 遺伝子に注目し、*KIT* 遺伝子の 5' 上流域を詳細に調べ、各品種間で特異的な塩基配列を探索することである。

Ⅱ.材料と方法

1.供試動物

供試動物は社団法人ジェネティクス北海道が飼育しているヘレフォード種 3 頭、ホルスタイン種 20 頭、黒毛和種 20 頭である。

2.サンプルからの DNA の抽出

(1)血液からの DNA 採取

ヘレフォード種 3 頭とホルスタイン種 20 頭は、血液中より抽出した。頸静脈より採血した血液 1 ml を 10 ml の試験管に移し、そこに赤血球と白血球の浸透圧の違いの差を利用し 10ml の $T_{10}E_{10}$ (10 mM Tris-HCl, pH 7.5、10 mM EDTA2Na) を加え、静かに 10 分間混合し赤血球を溶血した。溶血サンプルは 3000 rpm、4℃、10 分間遠心し、水層を捨て、沈殿白血球に 10 ml の $T_{10}E_1$ (10 mM Tris-HCl, pH 7.5、1 mM EDTA2Na) を加え洗浄した。さらに 3000 rpm、4℃、10 分間遠心後、沈殿に細胞を融解するために 2ml の lysed Buffer (4M Urea、0.2M NaCl、0.1 mM Tris-HCl, pH 8.0、10 mM EDTA2Na、2% SDS) を加え、50℃、1 晩静かに振盪し、蛋白質の分解を行った。次に、分解した蛋白質

を除去するため等量のフェノール・クロロホルムを加え 1 晩静かに振盪後、3000 rpm、室温、10 分間遠心し、上層（水層）を静かに回収した。さらに、中間層の白濁がなくなるまで抽出を繰り返した。最後に、3000 rpm、10 分間遠心後上層（水層）を静かに回収し、1/20 容の 5M NaCl と、2.5 倍容の 100%エタノールを加え混合し、DNA を析出させた。3000 rpm、4℃、10 分間遠心により DNA を沈殿させ 70%エタノールを加え、再度、3000 rpm、4℃、10 分間遠心した。DNA の沈殿は 20～30 分間自然乾燥後、2ml の TE 緩衝液に溶解した。

(2)精液からの DNA 抽出

黒毛和種 20 頭の DNA は、精液より抽出した。採取した精液に 10 倍の生理食塩水を加え 3000rpm 10 分間遠心後水層を捨て再度生理食塩水を加えた。この操作を再度行った。その後沈殿した精液と等量の生理食塩水を加え、よく混合後 200 μ l を 10ml の試験管に移し、そこに蛋白質変性剤である 5ml のグアニジンイソチオシアネート（50mM Tris HCl(pH7.5), 25mM EDTA）を加え、精子を浮遊させる。よく振り DNA を抽出した後 37℃、1 晩振盪後、70%エタノールを加え洗浄した。3000rpm、10 分遠心しエタノールを取り除き、乾燥させた後、2ml の TE 緩衝液に溶解した。

3.DNA の増幅と精製

増幅プライマーの設計

GenBank(NC_007304.5)及び Ensembl(ENSBTAG000000002699)に登録されている塩基配列を参考にし、上流域の 50kbp まで比較検討を行い変異部位が見られる箇所について任意のプライマーを設計した (表 1)

4.PCR 反応液

目的とする増幅距離により酵素を使い分けた。1.5 k b p 以下のものは GoTaq® Green Master Mix (Promega,Madison city ,WI)を用いた。PCR 反応液は、GoTaq® Green Master Mix を 12.5 μ l、フォワードプライマー、リバースプライマーを各 0.5 μ l ずつ、滅菌蒸留水を 11 μ l、テンプレート DNA を 0.5 μ l の合計 25 μ l とした。1.5 k b p 以上のものは KOD FX NEO DNA Polymerase (東洋紡、東京、Japan) を用いた。PCR 反応液は 10 \times Buffer を 12.5 μ l、dNTP Mixture (2.5mM each)を 5 μ l、フォワードプライマーとリバースプライマーを各 0.25 μ l ずつ、DNA テンプレートを 0.5 μ l、KOD FX NEO DNA Polymerase を 0.5 μ l、滅菌蒸留水を 5 μ l 入れ、合計 24 μ l とし混合した。

5. PCR プロトコル

PCR プロトコルは、1.5kbp 以下のものは、まず熱変性 95℃・5 分を 1 サイクル行った。次に、熱変性 95℃・30 秒、アニーリング 60℃・30 秒、伸張反応 72℃・60 秒/kbp を 40 サイクル行った。最後に伸張反応 72℃・5 分を行い、目的の領域を増幅した。1.5kbp 以上のものは、まず熱変性 94℃ 2 分を 1 サイクル、次に熱変性を 98℃・10 秒、伸長反応 30 秒/kbp の条件で行い、目的の領域を増幅した。

6. アガロースゲル電気泳動法

増幅できた領域は TBE 溶液 (0.089M Tris、0.089M ほう酸、0.002M EDTA2Na) と 0.8% の濃度になるようにアガロース S (アガロース S、ニッポンジーン、東京) を加え、電子レンジで完全に溶解し、型枠に流し込み、コームをセットしてゲルを作成した。エチジウムブロマイドは 0.05 μ g/ml の濃度になるように溶解後のゲルに加えた。PCR 後のサンプルにローディングバッファーを加え、ゲルのスロットにロード後、100V の定電圧で 30 分間泳動し十分に分離させた。泳動後のゲルはトランスイルミネーター上に置きバンドの有無を確認した。

7.アガロースゲルからの DNA 断片の回収（スピンカラム法）

エッペンチューブの底に 18 G の注射針で穴を開け、チューブを重ねた。必要な DNA のフラグメントをカッターナイフで切り出した。穴を開けたチューブに先ほど切り出したゲルを入れ、8000 rpm、5 分間遠心した。ゲルを落としたチューブに等量の中性フェノールを加え、完全に混合した。その後、 $-70\sim-80^{\circ}\text{C}$ で 15 分間凍結した後、室温で溶解した。溶解したゲルを 15000 rpm、5 分間遠心した後、水層を他のチューブに移し、等量のフェノール・クロロホルムを加え、5 分間混合した。これを 15000 rpm、5 分間遠心した。同様に水層を他のチューブに移し、1/10 容の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) と等量の 2-プロパノールを加え、5 分間放置した。さらに、放置したチューブを 15000rpm、 4°C 、20 分間遠心後、水層を捨てた。最後に、70%エタノールで洗浄し、ペーパータオルの上に逆さまに置き、乾燥させた後、沈殿を 30~50 μl の TE buffer に溶かした。

8.ダイレクトシーケンス法

塩基配列の決定は BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster city, WI) を用いた。PCR 反応液は Reaction Mix(Big Dye Ver1.1)を 0.25 μl 、5 \times Sequence

Buffer を 1.75 μ l、20 倍希釈のプライマーを 0.5 μ l、DNA テンプレート を 0.5 μ l、滅菌蒸留水を 7.0 μ l 入れ、合計 10 μ l とし混合した。PCR のサイクル数と温度条件は、初めに、96 $^{\circ}$ C \cdot 1 分の熱変性を 1 サイクル行った。次に、1 サイクルが熱変性を 96 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒、アニーリングを 50 $^{\circ}$ C \cdot 15 秒、伸長を 60 $^{\circ}$ C \cdot 4 分であるステップを 25 サイクル行い、各蛍光 ddNTP を持つ様々な長さのフラグメントを生成させた。反応終了後、PCR 反応液をミネラルオイルの下からクリスタルチップで 0.5 ml チューブに移し 125mMEDTA を 2.5 μ l、100%エタノールを 30 μ l 加えた。よく混合し、室温遮光 10 分間放置後、10,000rpm、4 $^{\circ}$ C、30 分遠心した。直ちに上清を静かにマイクロピペットで取り除いた。沈殿を剥がさないように、静かに、70%エタノールを 200 μ l 加えてリンスした。15,000rpm、4 $^{\circ}$ C、5 分遠心の後、沈殿を剥がさないように上清を完全に取り除き、遮光風乾した。塩基配列は、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City) を用いて決定した。

Ⅲ.結果

GenBank(NC_007304.5)及び Ensembl(ENSBTAG00000002699)の2つのジーンバンクの塩基配列を図1および図2に示したこれらの比較図の要約を図3に示した。図3の矢印はプライマーの位置である。しかし、領域の並びが同じところが数か所あったため隣あって並んだ領域をそれぞれ増幅することがないように両領域の両端部のプライマーを用いて増幅した。その結果から GenBank の配列とは若干異なり、ホルスタイン種および黒毛和種では A の領域が存在しないことがわかった(図4)。そしてヘレフォード種において特異的な配列を見つけることができた。ヘレフォード種特有の配列は GenBank の A、B、C のみと Ensembl での intron1 に含まれる領域において見つめることができた(図6)。ホルスタイン種および黒毛和種では増幅できたもののヘレフォード種では増幅できない配列は GenBank を参考にした配列の D、B、C、E と Ensembl を参考にした配列の F、C'、D、B、C、E で見られた。しかしこの配列はホルスタイン種 20 頭、黒毛和種 20 頭の全てにおいて増幅することはできなかった(図7-図8)。

IV 考察

Grosz, M. D らは、戻し交配による QTR 解析によってヘレフォード種のホワイトフェイスの斑紋パターンがウシ 6 番染色体の *KIT* 遺伝子付近に位置していることを報告している [12]。しかしその原因となる変異箇所については明らかになっていない。

本研究では、Ensembl と GenBank の 2 つのジーンバンクを参考にしてプライマーを作成した。しかし Ensembl と GenBank の両塩基配列が異なっており、いずれが正しい塩基配列なのかを判断することは困難であった。異なっていた原因としては、次世代シーケンサーの解読単位端部の配列に共通な配列が多くあるため連結の際にエラーがおきたものと思われた。今回の実験において、そのエラーを考慮に入れ両ジーンバンクの塩基配列を比較し、各相同な領域を比較し、その後各領域の繋ぎ目にプライマーを作成し、領域の順序を確認した。

その結果からヘレフォード種のみ増幅できる配列とヘレフォード種が全く増幅できず、ホルスタイン種と黒毛和種が増幅できる領域の 2 か所の存在を確認した。しかしヘレフォード種において増幅できなかった箇所は、ホルスタイン種と黒毛和種でも増幅できない個体も存在した。そのためこの領域は、個体によっては変異が起こっ

ているもののヘレフォード種に特異的な塩基配列とは言い難いものとなった。

ヘレフォード種のみ増幅できる領域は、ホルスタイン種や黒毛和種では1頭も増幅しなかった。ヘレフォード種では3頭と少ないものの、すべて増幅していることから、ヘレフォード種に特異的な変異である可能性が大きい。このことから本研究と Grosz, M. D.等の研究よりヘレフォード種のホワイトフェイスの原因である可能性が考えられた。しかし本研究では、交配実験による同定は行っておらず、増幅できる領域および増幅できない領域の存在を確認したのみで推論の域をでていない。現段階での推測ではあるが、ヘレフォード種の真の配列は図5のように逆位が存在する可能性が最も高いと疑われた。

今後、ヘレフォード種のサンプル数を増やすことや inversePCR や BAC ライブラリーの作成によって、この全領域の塩基配列を決定し、構造的組み換えの詳細を明らかにする必要がある。

V. 摘要

本研究はウシの斑紋の原因であるとされている *KIT* 遺伝子の付近において品種間で特異的な塩基配列の差を明らかにすることを目的とした。

供試動物としてヘレフォード種 3 頭、ホルスタイン種 20 頭、黒毛和種 20 頭を用いた。GenBank および Ensembl の塩基配列を参考に上流域の塩基配列の比較検討を行い、変異部分に着目し、プライマーを作成した。

PCR による増幅の有無について検討したところヘレフォード種のみ増幅できる領域とホルスタイン種および黒毛和種は増幅できる個体はあるもののヘレフォード種では 3 頭すべてが増幅できなかった領域が存在した。このことよりヘレフォード種のみ増幅が可能だった領域は、本研究と Grosz, M. D らの研究からヘレフォード種特有のホワイトフェイスと関連がある変異ではないかと推測することができた。今後は増幅の有無だけでなく、変異についての構造的組み換えの詳細を特定する必要性がある。

VI. SUMMARY

Genetic heterogeneity at the bovine *KIT* gene in cattle breeds

In bovine, the spotted coat color locus has been mapped to the position of the *KIT* gene on the chromosome 6. The SNP of intron 3 of *KIT* gene has also been reported for the linkage disequilibrium with spotted locus of cattle. However, the causative mutation of *KIT* gene to the spotted locus has not yet been elucidated. In this study, polymorphism of the bovine *KIT* gene was investigated for the flanking 5' UTR regions in cattle of Japanese Holstein and Japanese Black and Hereford breeds. The sequences of these regions deposited in GenBank and Ensembl data base were unique structure of the long sequences of replication. Some of PCR primers were designed in the both side of flanking region of replication area and inside of replication area to confirm whether these sequences exist or not.

From the result of PCR, one amplicon was only amplified in Hereford cattle. However, both border parts of this amplicon were amplified in all of cattle breeds. Therefore, it is possible that Hereford breed have a specific DNA structure on the promoter region of the *KIT* gene to be compared with other cattle breeds.

VII 謝 辞

本研究並びに論文作成にあたり、終始ご指導を頂きました上田純治教授に心より感謝の意を表します。また、ご多忙の中、本論文の御校閲の労をお取り頂いた家畜繁殖学の小山久一教授並びに遺伝・育種学の寺脇良悟教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究で行った研究についてご協力及び関係資料を提供して頂いた社団法人ジェネティクス北海道の方々に深く感謝いたします。加えて、温かい励ましや実験のご協力を頂いた家畜遺伝学研究室の学生諸氏に謝意を表します。

VIII.参考文献

- [1] Anderson, L., 2001. Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. *Nat. Rev. Genet.*, 2:130-138.
- [2] Aoki, H., Motohashi, T., Yoshimura, N., Yamazaki, H., Yamane, T., Panthier, J. J. and Kunisada, T. 2005. Cooperative and indispensable roles of endothelin3 and KIT signalings in melanocyte development. *Dev. Dyn.*, 233:407-417.
- [3] Beatriz G. G., Wiener, P. J. and Williams, L. 2007. Genetic effects on coat colour in cattle: dilution of eumelanin and phaeomelanin pigments in an F2-Backcross Charolais \times Holstein population. *BMC Genet*, 8:56-67.
- [4] Brooks, S. A. and Bailey, E. 2005. Exon skipping in the KIT gene causes a Sabino spotting pattern in horse. *Mamm. Genome*, 16:893-902.

- [5] Brooks, S. A., Lear, T. L., Adelson, D. L. and Bailey, E. 2007. A chromosome inversion near the *KIT* gene and the Tobiano spotting pattern in horse. *Cytogenet. Genome Res.*, 119:225-230.
- [6] Chu, T. Y. and Besmer, P. 1995. The Genomic structure of the protooncogene *c-kit* encoded at the murine white spotting locus. *J. Biomed. Sci.*, 2:36-45.
- [7] Cooper, M. P., Fretwell, N., Bailey, S. J. and Lyons, L. A. 2005. White spotting in the domestic cat (*Felis catus*) map near *KIT* on feline chromosome B1. *Anim. Genet.*, 37:63-165.
- [8] Fontanesi L, Tazzoli M, Russo V, Beever J. 2010. Genetic heterogeneity at the bovine *KIT* gene in cattle breeds carrying different putative alleles at the spotting locus. *Anim. Genet.* 41:295-303.
- [9] Giuiffra, E., Evans, G., Tornsten, A., Richard, W., Day, A., Looft, H., Plastow, G. and Andersson, I. 1999. The

belt mutation in pig is an allele at the Dominant White (I/KIT) locus. *Mamm. Genome*, 10:1132-1136.

- [10] Giuffra, E., Tornsten, A., Marklund, S., Bongcam-Rudloff, E., Chardon, P., Kijas, M. H. J., Anderson, S., I. Archibald, L. A. and Andersson, L. 2002. A large duplication associated with dominant white color in pigs originated by homologous recombination between LINE elements flanking *KIT*. *Mamm. Genome*, 13:569-577.
- [11] Gracia, R. J., Ittah, A., Mirabal, S., Figueroa, J., Lopez, L., Glick, B. A. and Kos, L. 2007. Endothelin 3 induces skin pigmentation in a Keratin-Driven induce mouse model. *J. Inv. Der.*, 128:131-142.
- [12] Grosz, M. D. and MacNeil, D. M. 1999. The "Spotting" locus maps to bovine chromosome 6 in a Hereford-cross population. *J. Hered.*, 90:233-236.

- [13] Haase, B., Brooks, S. A., Tozaki, T., Burger, D. P., Poncet, A., Rieder, S., Hasegawa, T., Penedo, C. and Leeb, T. 2009. Seven novel *KIT* mutations in horse with white coat color phenotypes. *Anim. Genet.*, 40:623-629.
- [14] Haase, B., Jude, R., Brooks, S. A. and Leeb, T. 2008. An equine chromosome 3 inversion is associated with the tobiano spotting pattern in German horse breed. *Anim. Genet.*, 39:306-309.
- [15] Haase, B., Brooks, S. A., Schlumbaum, A., Pedro, J. A., Bailey, E., Alaeddine, F., Mevissen, M., Burger, D., Pierre, A. P., Rieder, S. and Leeb, T. 2007. Allelic heterogeneity at the equine *KIT* locus in Dominant White (W) Horses. *PLoS. Genet.*, 3:2101-2108.
- [16] Hadjiconstantouras, C., Sargent, C. A., Skinner, T. M., Archibald, A. L., Haley, C. S. and Plastow, G. S. 2007. Characterization of the porcine *KIT* ligand gene: expression analysis, genomic structure polymorphism

detection and association with coat colour traits. Anim. Genet., 39:217-224.

- [17] Hikono, H., Ohta, M., Sakurai, M. and Momotani, E. 2000. Expression of *Kit*, the receptor for stem cell factor, in bovine peripheral blood. J. Vet. Med. Sci., 63:321-324.
- [18] In-Cheol Cho, Tao Zhong, Bo-Young Seo, Eun-Ji Jung, Chae-Kyoung Yoo, Jae-Hwan Kim, Jae-Bong Lee, Hyun-Tae Lim, Byoung-Woo Kim, Jun-Heon Lee 2011. Whole-genome association study for the roan coat color in an intercrossed pig population between Landrace and Korean native pig. Genes & Genomics, 33, 1, 17-23
- [19] Klungland, H., Olsen, H. G., Hassanane, M. S., Mahrous, K. D. and Vage, I. 2000. Coat color gene in diversity studies. J. Anim. Breed. Genet. 117:217-224.
- [20] Kuehn, C. and Weikard, R. 2007. Multiple splice variants within the bovine silver homologue (*SILV*)

gene affecting coat color in cattle indicate a function additional to fibril formation in melanophores. BMC Genomics, 8:335-347.

[21] Lai, F., Ren, J., Ai, H., Ding, N., Ma, J., Zeng, D., Chen, C., Guo, Y. and Huang, L. 2006. Chinese white Rongchang pig does not have the dominant white allele of *KIT* but has the dominant black allele of *MC1R*. J. Hered., 98:84-87.

[22] Liu, L., Harris, B., Keehan, M. and Zhang, Y. 2009. Genome scan for the degree of white spotting in dairy cattle. Anim. Genet., 40:975-977.

[23] Li, X. L., Zhao, J. W., Tang, C. J., Zhou, R. Y., Zhenag, G. L., Li, H. and Guo, X. L. 2009. Sequencing of part of the goat gene and SNP identification. Bio. Genet., 47:198-206.

[24] Marklund, S., Kijas, J. H., Martinez, R., Ronnstrand, L., Funari, K., Moller, M., Lange, D., Lilja, L. E. and

- Andersson, L. 1998. Molecular basis for the dominant white phenotype in the domestic pig. *Genome. Res.*, 8:826-833.
- [25] Marklund, S., Moller, M., Sandberg, K. and Andersson, L. 1999. Close association between sequence polymorphism in the *KIT* gene and the roan coat color in horse. *Mamm. Genome*, 10:283-288.
- [26] Metallions, D. and Rine, J. 2000. Exclusion of *EDNRB* and *KIT* as the basis for white spotting in Border Collies. *Genome. Bio.*, 1:1-4.
- [27] Moller, M. J., Chaudhary, R., Hellmen, E., Hoyheim, B., Chowdhary, B. and Andersson, L. 1996. Pig with the dominant white coat color phenotype carry a duplication of the *KIT* gene encoding the mast/stem cell growth factor receptor. *Mamm. Genome*, 7:822-830.
- [28] Morris, A. C. and Sponenberg, D. P. 2000. A possible dominant white gene in Jersey cattle. *Genet. Sel. Evol.*,

33:61-67.

[29] Mullis, K. B.; Faloona FA.; 1985. "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol.* 155 : 335-50. PMID 3431465

[30] Nocka, K., Tan, C. J., Chiu, E., Chu, Y. T., Ray, P., Traktman, P. and Besmer, P. 1990. Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine *c-kit*/white spotting locus: W^{37} , W^V , W^{41} and W . *EMBO. J.*, 9:1805-1813.

[31] Okumura, N., Matsumoto, T., Hamasima, N. and Awata, T. 2008. Single nucleotide polymorphisms of the *KIT* and *KITLG* genes in pigs. *Anim. Sci. J.*, 79:303-313.

[32] Olsen, H. G., Vage, D. I., Lien, S. and Klungland, H. 2000. A DNA polymorphism in the bovine *c-kit* gene. *Anim. Genet.*, 31:71.

- [33] Pape, H. 1990. The inheritance of the piebald spotting pattern and its variation in Holstein-Friesian cattle and in LandseerNewfoundland dogs. *Genetics*, 80:115-128.
- [34] Parrott, J. A., Kim, G. and Skinner, M. K. 2000. Expression and action of Kit Ligand/Stem cell factor in nomal human and bovine ovarian surface eputhelium and ovarian cancer. *Biol. Reprod.*, 62:1600-1609.
- [35] Pielberg, G., Olsson, C., Syvanen, A. and Andersson, C. L. 2002. Unexpectedly high allelic diversity at the *KIT* locus causing dominant white color in the domestic pig. *Genetics*, 160:305-311.
- [36] Reinsch, N., Thomsen, H., Xu, N., Brink, M., Looft, C., Kalm, E., Brockmann, G. A., Grupe, S., Kuhn, C., Schwerin, M., Leyhe, B., Hiendleader, S., Erhardt, G., Medjugorac, I., Russ, I., Forster, M., Reents, R. and Averdunk, G. 1999. A QTL for degree of spotting in

cattle show synteny with the *KIT* locus on chromosome 6. *J. Hered.*, 90:629-634.

[37] Rieder, S., Hagger, C., Obexer-Ruff, G., Leeb, T. and Pierre-Andre, P. 2008. Genetic analysis of white facial and leg markings in the Swiss Franches-Montagnes Horse Breed. *J. Hered.*, 99:130-136.

[38] Rieder, S., Taourit, S., Mariat, D., Langlois, B. and Guerin, G. 2001. Mutation in the agouti (*ASIP*), the extension (*MC1R*), and the brown (*TYRP1*) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mamm. Genome*, 12:450-455.

[39] Rouzaud, F., Martin, J., Gallet, F. P., Delourme, D. G., Leger, V., Amigues, Y., Menissier, F., Leveziel, H., Julien, R. and Oulmouden, A. 2000. A first genotyping assay of French cattle breeds based on a new allele of the extension gene encoding the melanocortin-1 receptor (*MC1R*). *Genet. Sel. Evol.*, 32:511-520.

- [40] Shi, R. K., Wang, A. G., Yuan, X. F., Deng, X. M. and Li, N. 2006. Analysis of the *MC1R*, *KIT* and *ASIP* loci in Chinese and European pig. *Anim. Genet.*, 37:293-307.
- [41] Terry, R. R., Bailey, E., Bernoco, D. and Cothran, E. G. 2001. Linked Markers exclude *KIT* as the gene responsible for appaloosa coat color spotting patterns in horses. *Anim. Genet.*, 32:98-101.
- [42] Xu, G. L., Ren, J., Ding, N. S., Ai, H. S., Guo, Y. M., Chen, C. Y. Huang, L. S. 2006. Genetic analysis of the *KIT* and *MC1R* gene in Chinese indigenous pig with belt-like coat color phenotypes. *Anim. Genet.*, 37:518-528.

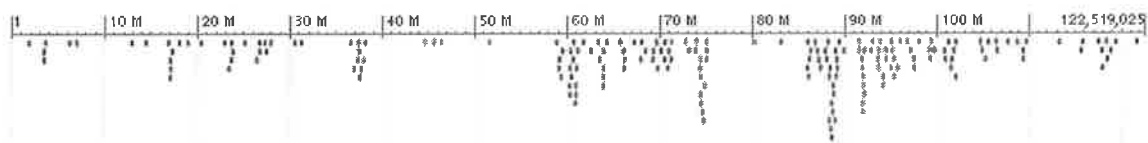


図 1 ウシ 6 番染色体の遺伝子地図 GenBank(NC_007304.5)参照

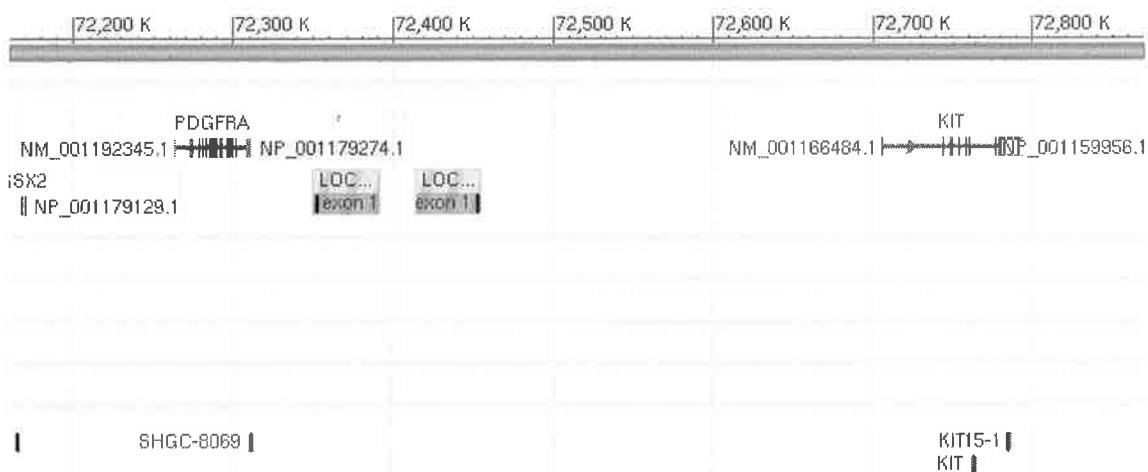
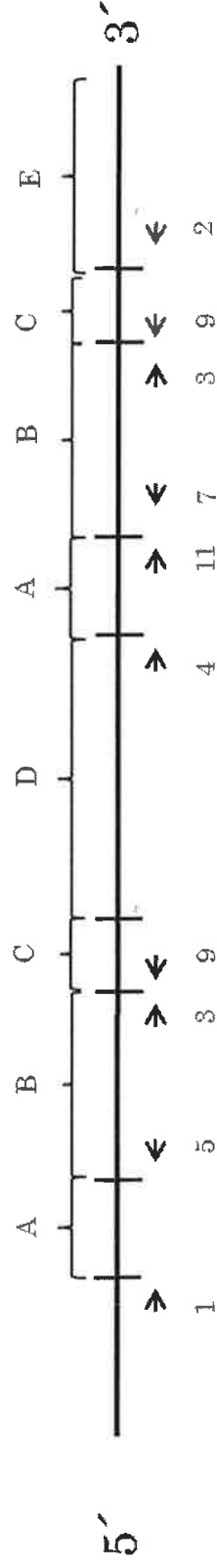


図 2 図 1 の KIT 遺伝子の 5' 上流域を拡大したもの GenBank(NC_007304.5)参照

GenBank



Ensembl

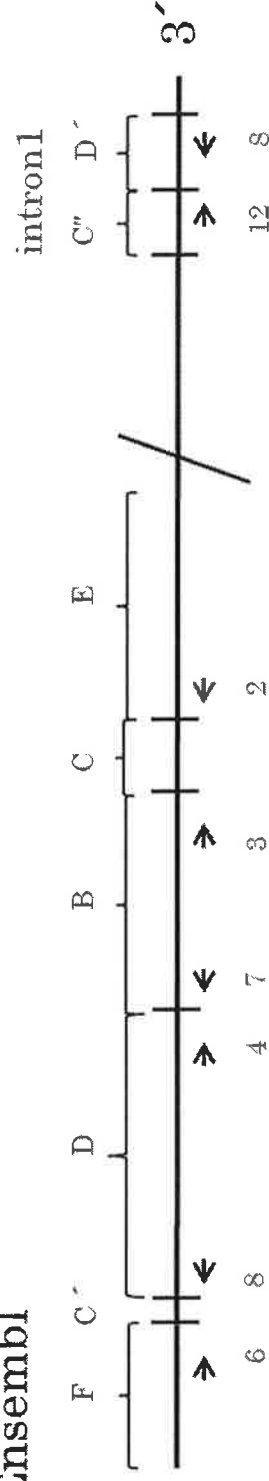


図3 図1の72600K~72700Kまで拡大し簡略化したもの
 2つのジーンバンクの配列と使用したプライマーの位置
 ´は領域が途中で切れたものを表す。
 ※横線は配列、縦線は領域の区切りを表す。



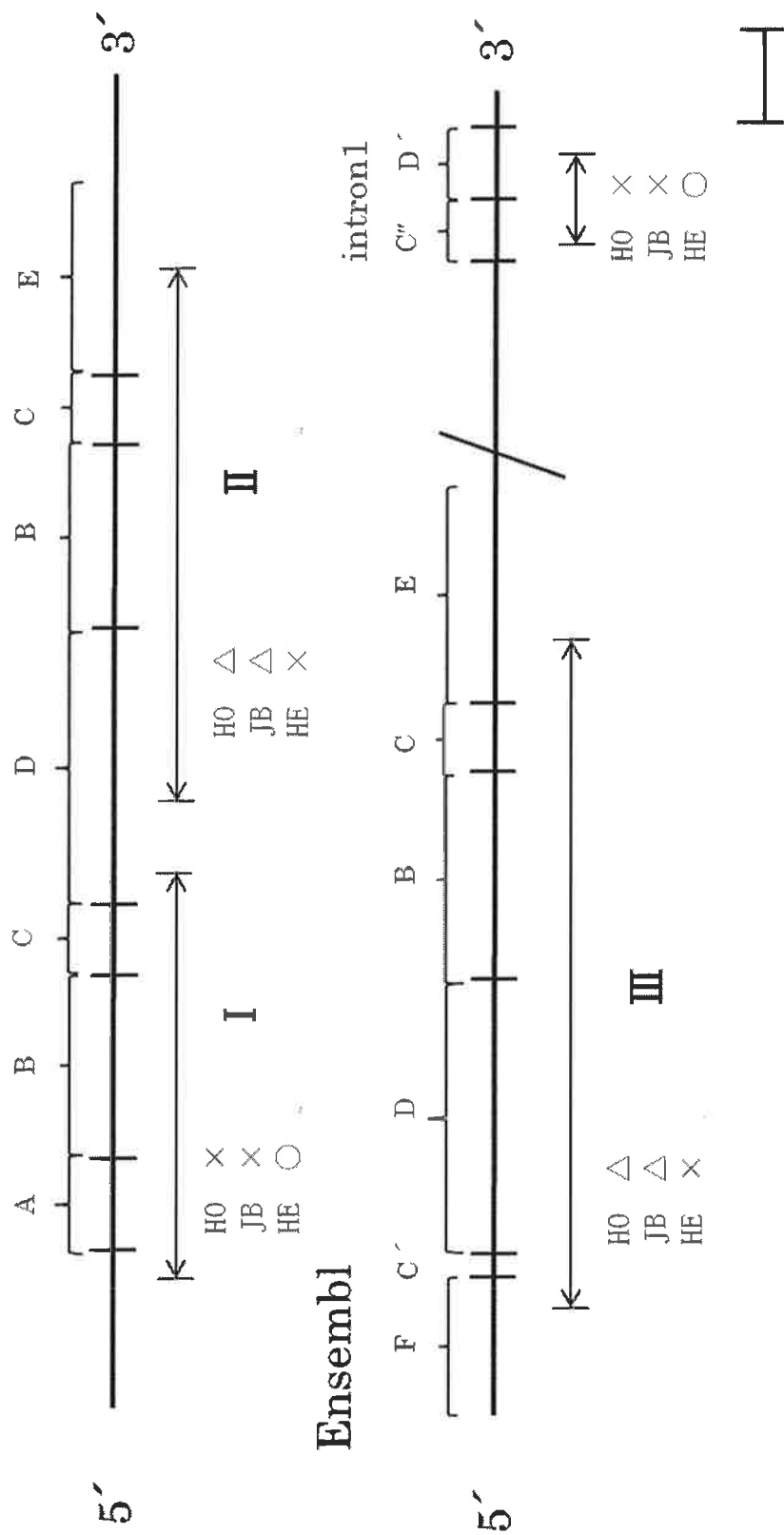


図4 KIT 遺伝子の5' 上流について両ジーンバンクを参考に増幅の有無を調べたもの
A～Fは繋がりの違いが発見されたため領域ごとに区分したものの。
○は増幅できたもの ×はできなかったもの △は増幅できた個体とできない個体が
あったもの。

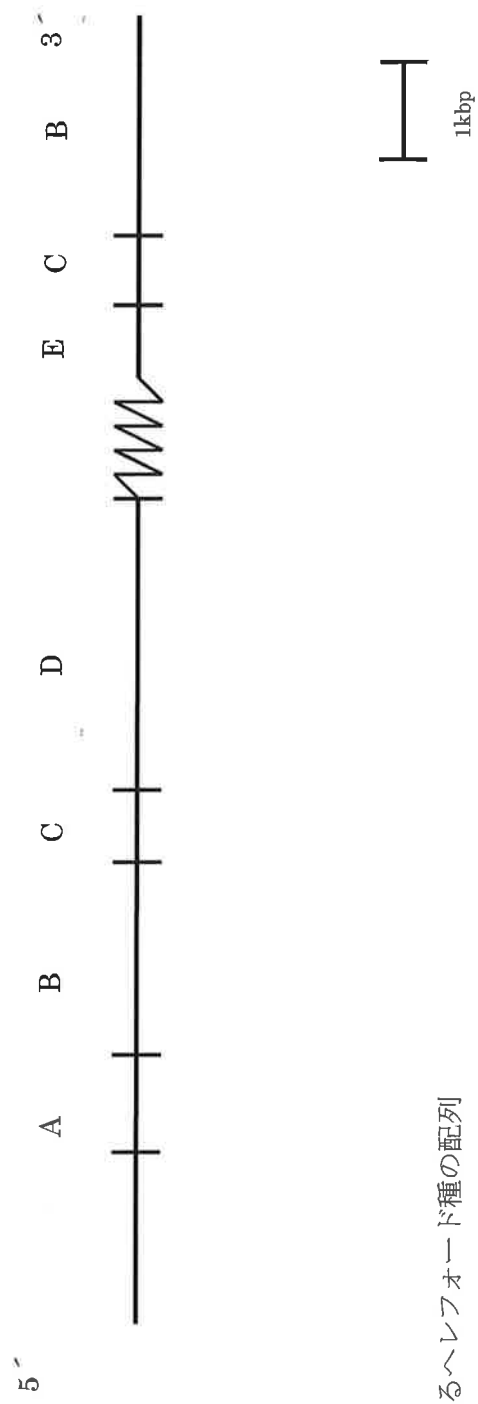


図5 予想されるヘレフォード種の配列

図2のBCEは逆位であったと仮定した。
 C"とD'はCおよびDに含まれていると仮定した。
 DおよびEの距離は推測できなかった。

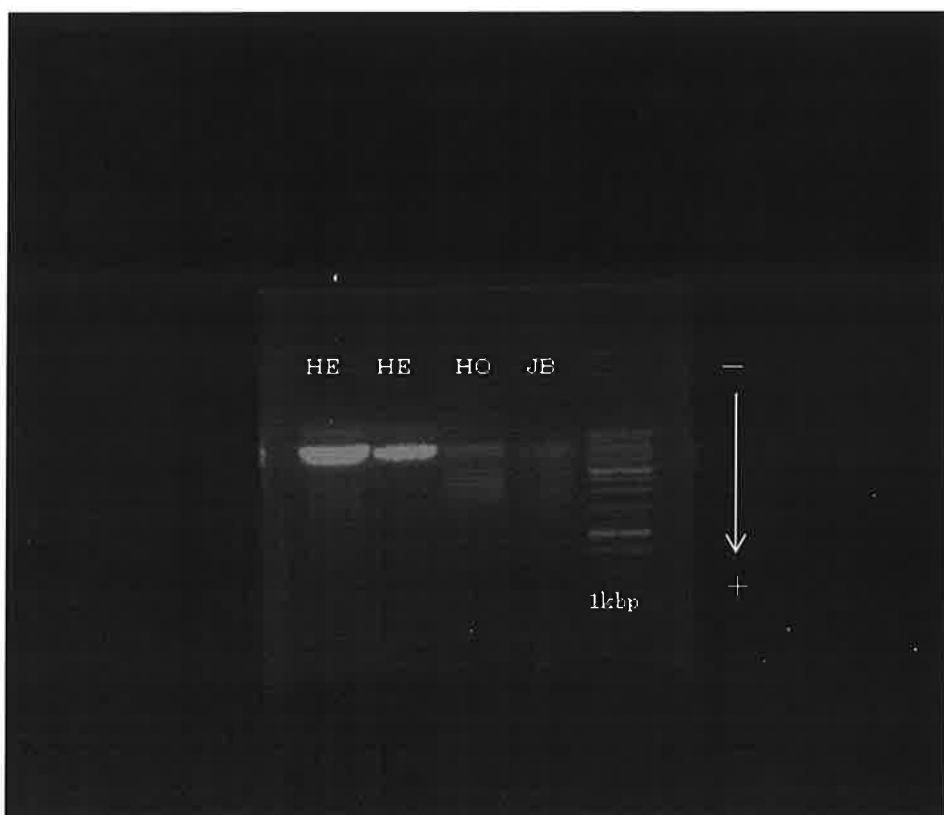


図 6 図 4 での I の領域の電気泳動像

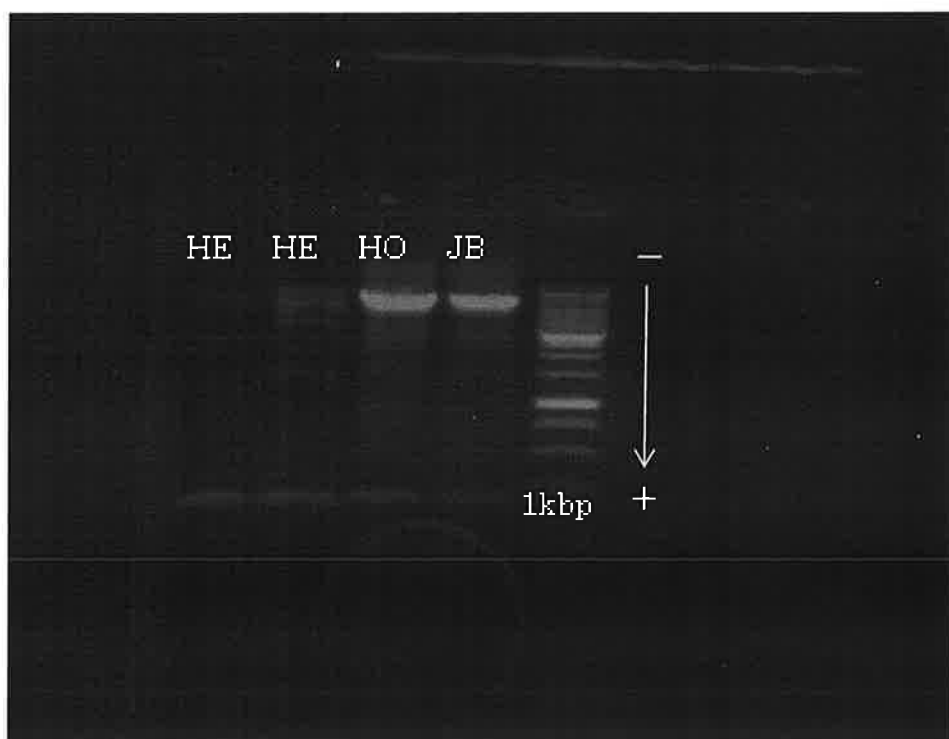


図 7 図 4 での II の領域の電気泳動像



図 8 図 4 でのⅢの領域の電気泳動像

表 1 用いたプライマー名およびその配列

プライマー名	配列
1 b·chr6 72651397F	CACTTTCAACACTTCCCCTCC
2 b·chr6 72662267R	GCTGATGGAACAGAGAAAGCTG
3 b·chr6 GeBank 10823F	TTGACACCACTACACAGACGT
4 b·chr6 72655915F	GTGCTCTATTTTGGGTCTGGCA
5 b·chr6 genbank 15239R	GCTAAAACCCACTACACCCTCA
6 b·chr6 enbl 71746671F	CCCCAGTGTCTTTAAGCATAAGC
7 b·chr6 enbl 71759914R	TGCCTTCAGCTTACTGGTGAAC
8 b·chr6 7265935R	TGCCAGACCCAAAATAGAGCAC
9 b·kit int171802596R	TTTCCTGAGAAGGGGAAGGT
10 b·chr6 emb 7149574F	ACAAAGCAACCAAGGTACCC
11 b·chr6 gebank 15551F	CCTTCAGAGGAGTTTGTAGG
12 b·kit int1 7037F	CTTCTCACCATAACCCTACTCCT

※プライマー名の番号は図 3 に示した番号と同一である