

# 和牛において見いだされた成長ホルモン遺伝子の多型

千国幸一・長妻常人<sup>1</sup>・田畑利幸<sup>2</sup>・門間美千子

斎藤昌義・小沢 忍<sup>3</sup>・小堤恭平<sup>4</sup>

農林水産省食品総合研究所，茨城県筑波農林研究団地 305

<sup>1</sup> 家畜改良事業団産肉能力検定場，広島県河内町 729-15

<sup>2</sup> 茨城大学農学部，茨城県阿見町 300-03

<sup>3</sup> 農林水産省中国農業試験場，大田市 694

<sup>4</sup> 農林水産省畜産試験場，茨城県筑波農林研究団地 305

(1993. 7. 9 受付)

**要 約** ウシの成長ホルモンは 127 番目のアミノ酸で Leu/Val の多型が存在する。この多型の原因となる塩基配列の違いを決定するため、黒毛和種、ホルスタイン種、ヘレフォード種、アバーデンアンガス種から成長ホルモン遺伝子のイントロン 4 とエキソン 5 を含む 652 bp の領域を PCR によって増幅し、塩基配列を決定した。その結果、127 番目のアミノ酸に対するコドンは A 型 (Leu) が CTG、B 型 (Val) が GTG で、1 塩基の違いによる多型であることが明らかとなった。黒毛和種においてはさらに、別の部位で新たな多型が認められた。この変異は 172 番アミノ酸のコドンが ACG から ATG (C 型) となるもので、コードしているアミノ酸は Thr から Met に変化する。上記の 4 品種と褐毛和種について、*Alu I* 切断とドットハイブリダイゼーションを用い遺伝子型を決定した結果、黒毛和種と褐毛和種には A 型 (Leu<sup>127</sup>, Thr<sup>172</sup>)、B 型 (Val<sup>127</sup>, Thr<sup>172</sup>)、C 型 (Val<sup>127</sup>, Met<sup>172</sup>) の 3 種が存在し、分析したホルスタイン種、ヘレフォード種、アバーデンアンガス種には、C 型が認められなかった。これらのことから、C 型遺伝子は黒毛和種と褐毛和種の共通祖先の B 型遺伝子に生じた変異であると考えられた。遺伝子頻度は 59 頭の黒毛和種で 0.500 (A)、0.144 (B)、0.356 (C) であった。これらの遺伝子型と枝肉形質との間に明確な関連は認められなかった。

日畜会報, 65 (4): 340-346, 1994

ウシの成長ホルモンは 191 個のアミノ酸残基からなるペプチドホルモンで、そのアミノ酸配列<sup>13)</sup>と遺伝子の塩基配列<sup>16)</sup>はすでに決定されている。アミノ酸配列における多型<sup>11,14)</sup>は、N 末端の Ala の有無と 127 番アミノ酸における Leu/Val の多型の存在が知られているが、生理的作用の違いについては報告が少ない<sup>9)</sup>。ウシ成長ホルモン遺伝子のアミノ酸に翻訳されない領域に関しては Højら<sup>6)</sup>が RFLP と乳脂肪量との関係を報告している。

われわれは前報<sup>3)</sup>で 127 番アミノ酸部位での多型を PCR 産物の *Alu I* 切断から判定できることを報告した。しかし、この判定は 127 番アミノ酸に相当する遺伝子の配列に、違いが有るか無いかを示すものであり、変異型の遺伝子が Val をコードしているかは決定していない。また、その他の配列に多型が存在しているかについても

明らかでない。そこで、黒毛和種、ホルスタイン種、ヘレフォード種、アバーデンアンガス種の 4 種のウシから *Alu I* 切断で多型を示す個体を選び、イントロン 4 とエキソン 5 の塩基配列を決定した。

黒毛和種については、間接検定を行なった 4 頭の種雄牛の産子 55 頭を用い、遺伝子型と枝肉成績との比較検討を行なった。

## 材料および方法

試験動物：遺伝子型の分析は 117 頭の黒毛和種、19 頭のホルスタイン種、10 頭のヘレフォード種、6 頭のアバーデンアンガス種、11 頭の褐毛和種について行なった。黒毛和種のうち 3 頭は検定種雄牛で 55 頭はそれらの産子、また褐毛和種の 11 頭は 1 頭の種雄牛の産子で

ある。産子の 66 頭と農林水産省中国農業試験場で屠殺した 35 頭は筋肉よりゲノム DNA をとりだし、農林水産省畜産試験場で屠殺した 5 頭の黒毛和種、5 頭のホルスタイン種は肝臓、その他の個体については凍結精液より DNA を抽出した。凍結精液は農林水産省畜産試験場、農林水産省中国農業試験場、北海道立新得畜産試験場、茨城県畜産試験場に保存されていた試料を用いた。

PCR 産物の塩基配列は 18 頭の黒毛和種およびホルスタイン種、ヘレフォード種、アバーデンアンガス種各 2 頭について決定した。その他の動物については *Alu* I 切断とドットハイブリダイゼーションの結果から遺伝子型を決定した。

検定種雄牛の産子はすべて雄去勢牛で、検定終了時に牛枝肉取引規格（日本食肉格付協会）に基づき、枝肉の肉質評価を行なった。

試料 DNA の調製：約 30 mg の細切した筋肉に 600  $\mu$ l の 100 mM Tris-HCl (pH 9.0), 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% SDS を加え、約 30 分間室温でゆるやかに攪拌することによって溶解した。等量のフェノール・クロロホルムで 2 回、クロロホルムで 1 回抽出した後、エタノール沈澱を行ない DNA と RNA の混合した分画を得た。肝臓と凍結精液の試料は前報<sup>3)</sup>と同様の方法で DNA を調製した。

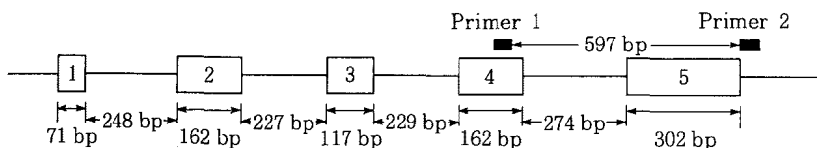
PCR 法による DNA の増幅と塩基配列の決定：プライマーの塩基配列は、エキソン 4 内に設定した Primer 1 が 5'-TATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAA-3' (27 mer), エキソン 5 直後の Primer 2 が 5'-AGAA-TAGAATGACACCTACTCAGACAAT-3' (28mer) で

ある (図 1)。これらのプライマーと PCR の反応は前報<sup>3)</sup>と同様の条件で行なった。

塩基配列を決定するため、PCR 産物を 4% NuSieve GTG (FMC) アガロースゲル電気泳動で分離し、Ultrafree C3-VV (MILIPORE, 0.1  $\mu$ m) を用いてゲルから目的の断片を得た後、この液の一部をテンプレートとして 2 回目の PCR を行なった。この PCR は 2 本鎖の両端から塩基配列を決定するため、Primer 1 と Primer S2, Primer S1 と Primer 2 の 2 組について行なった。Primer S1 と Primer S2 の 5' 側 18 塩基はシーケンス反応のプライマーと同じ配列となっており、相補鎖のこの部位に Dye Primer (ABI) をハイブリダイズさせるサイクルシーケンス法を行ない、全自動シーケンサー (ABI 373 A) で塩基配列を決定した。

*Alu* I による切断と 127 番アミノ酸部位多型の判定：Primer 1 と Primer 2 による PCR 反応産物に約 50  $\mu$ l のクロロホルムを加えて攪拌し、反応産物を含む水層を分離した。その 8  $\mu$ l に、1  $\mu$ l の 10  $\times$  Low Buffer (TOYOBO; 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT) と 4 ユニットの *Alu* I (TOYOBO) を加え 37°C 1 晩の反応を行なった。4% NuSieve GTG (FMC) アガロースゲル電気泳動で DNA フラグメントを分離し、185 bp に断片のあるものを A 型、236 bp に断片のあるものを B 型とした。

ドットハイブリダイゼーションによる 172 番アミノ酸部位多型の判定：プローブは 169-175 番アミノ酸残基をコードしている領域に作成した。Probe A は発表されている塩基配列<sup>6)</sup>の 5'-CTGCATAAGACGGAGA-



Primer 1 : 5'-TATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAA-3'

Primer 2 : 5'-AGAATAGAAATGACACCTACTCAGACAAT-3'

Primer S1 : 5'-TGTA AAAACGACGGCCAGTCTGAAGGACCTGGAGGAA-3'

Primer S2 : 5'-TGTA AAAACGACGGCCAGTAAATGACACCTACTCAGAC-3'

Fig. 1. Structure of bGH gene and primers for the PCR amplification.

Exons are indicated by open boxes. The common sequences of Primer 1 and Primer S1 are underlined, and that of Primer 2 and Primer S2 are double-underlined. A target region was amplified by the 1st PCR with Primer 1/Primer 2, and then two kinds of 2nd PCRs with Primer S1/Primer 2 and Primer 1/Primer S2 were performed to make an annealing site for Dye Primer Cycle Sequencing (ABI).

CGTAC-3'である。Probe CはProbe Aの相補鎖であるが、中心部に1塩基の違いをもつ5'-GTACGT-CTCCATCTTATGCAG-3'である。これらのオリゴヌクレオチドの3'末端をTerminal Deoxynucleotidyl Transferase (TOYOBO)を用いて Digoxigenin (Boehringer Mannheim)で標識し、プローブとした。

ドットハイブリダイゼーションはProbe AとProbe Cのそれぞれについて行なった。PCR産物の1 $\mu$ lをナイロンメンブランに固定した後、5 $\times$ SSC、50 $^{\circ}$ Cで1晩ハイブリダイズし、0.5 $\times$ SSC、50 $^{\circ}$ Cで15分の洗浄を2度行なった。プローブの検出はDigoxigenin検出用キットの方法で行ない、発色時間はコントロール試料の発色をみながら調節した。

### 結 果

127番アミノ酸部位(127部位)多型: PCR産物のAul I切断によって判定したA型、B型の個体を黒毛和種、ホルスタイン種、ヘレフォード種、アバーデン Angus種から各1頭選び、PCR産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法によって決定した。PCRで増幅した領域はプライマー部分を除くとエキソン4にある119番アミノ酸部位からエキソン5末端のポリA付加部位までである(図1)。この597bpの塩基配列を見ると、127部位をコードしている配列は4品種ともA型でCTG(Leu)、B型でGTG(Val)であった。またA型はWOYCHIKら<sup>16)</sup>によって発表されているウシ成長ホルモン遺伝子の塩基配列と完全に一致していた。

172番アミノ酸部位(172部位)多型: 各品種2頭ずつの塩基配列決定で、黒毛和種のB型(Val)個体(127部位; Aul Iによる判定)は他のウシと異なり、172部位で1塩基の置換が認められた。これが個体の突然変異であるか、またはある頻度で存在する多型であるかを判定するため、さらに16頭の黒毛和種についてPCR産物の塩基配列を決定した。その結果、かなりの頻度で172部

位でACG(Thr)ではなくATG(Met)となるウシ(C型)が存在し、C型の遺伝子は127部位でGTG(Val)型をとることが明らかとなった(図2)。

5品種のウシについて、127部位多型をAul I切断で判定し、172部位多型をオリゴヌクレオチドプローブによるドットハイブリダイゼーションで判定した結果、C型遺伝子は黒毛和種と褐毛和種に存在し、分析したホルスタイン種、ヘレフォード種、アバーデン Angus種には全く存在していなかった(表1)。

遺伝子型と枝肉形質: 成長ホルモンの遺伝子型と形質との関係を検討するため、4頭の種雄牛とその産子の遺伝子型を調べた。1頭の種雄牛(IV)は試料を得ることができなかったため、その正確な遺伝子型は不明である。しかし、10頭の産子はC型遺伝子頻度が高く、C型のホモまたはヘテロ個体だけであることから種雄牛IVの遺伝子型はCCであると推定した(表2)。

この4頭の種雄牛を比較すると、間接検定の項目で有意な差異のみられた項目はB.M.S.と肉質等級だけであった。そこで、各種雄牛の産子を遺伝子型に分け、B.

Genotype	126	127	128	171	172	173		
(A)	E	L	E	L	T	E		
	----	GAG	CTG	GAA	--AAG	ACG	GAG	----
(B)	E	<u>V</u>	E	L	T	E		
	----	***	G**	***	----	***	***	----
(C)	E	<u>V</u>	E	L	<u>M</u>	E		
	----	***	G**	***	----	*T*	***	----

Fig. 2. Sequences of the genetic variants in the exon 5 of bGH gene.

Asterisks indicate identical nucleotides to the A type. Amino acid sequences deduced from the nucleotide sequences are indicated over the nucleotide sequences. Amino acids variants differ from the A type are underlined.

Table 1. Genotypes of bGH gene from five breeds

Breed	Number of animals	Genotype						Frequency		
		AA	AB	BB	AC	BC	CC	A	B	C
Japanese Black	59	15	8	1	21	7	7	0.500	0.144	0.356
Holstein	19	12	5	2	0	0	0	0.763	0.237	0
Hereford	10	7	2	1	0	0	0	0.800	0.200	0
Aberdeen Angus	6	2	3	1	0	0	0	0.583	0.417	0
Japanese Brown*	11	3	5	0	3	0	0	0.636	0.227	0.136

\* Steers from one bull.

## bGH 遺伝子の多型

Table 2. Effect of bGH genotype on beef marbling score(BMS) of steers from four bulls of Japanese Black

Bull		Frequency in steers			BMS in different genotypes of steers					
Name	Genotype	A	B	C	AA	AB	AC	BB	BC	CC
I	AA	0.650	0.175	0.175	4.17(6) <sup>a</sup>	4.71(7) <sup>ab</sup>	5.57(7) <sup>b</sup>	—	—	—
II	AB	0.550	0.400	0.050	7.50(2)	7.00(7)	—	—	7.00(1)	—
III	BC	0.300	0.433	0.267	—	4.67(6)	4.67(3)	4.00(1)	4.80(5)	—
IV	(CC)*	0.300	0.100	0.600	—	—	7.33(6)	—	6.50(2)	8.00(2)

\* The genotype of bull IV is estimated from the genotypes of steers.

A number in parentheses indicates the number of animals.

Means with different superscripts in the same line are significantly different ( $P < 0.05$ ).

M.S.の比較を行なった(表2)。兄弟牛間の遺伝子型比較で有意差の認められたのは種雄牛Iだけで、AC型がAA型よりも良い値を示した。しかし、おなじAC型の産子でも種雄牛IIIとIVでは明らかにB.M.S.の値が異なり、成長ホルモンの多型はB.M.S.を直接に支配している因子ではないと考えられた。

## 考 察

牛成長ホルモンのアミノ酸多型はN末端のAla/Pheと127アミノ酸残基のLeu/Valが知られている<sup>11,14</sup>。N末端の多型はシグナルペプチド切断位置の違いによるもので、成長ホルモン遺伝子自体の違いによるものではないと考えられている<sup>14</sup>。一方、127アミノ酸残基の多型は遺伝子に生じた変異によると考えられ、*Alu I*切断で生じるDNA断片の長さの違いがある<sup>3)</sup>。

われわれは前報<sup>3)</sup>で127アミノ酸残基がValならば成長ホルモン遺伝子のこの部位が*Alu I*で切断されず、Woychikら<sup>16)</sup>の発表したLeu型遺伝子と区別できることを示した。しかし、*Alu I*は4塩基認識の制限酵素であり、認識部位のどの塩基に置換が生じても同じ結果となる。LeuとVal以外のアミノ酸がこの部位に存在しているという報告は無いものの、Valではなく別のアミノ酸となる置換やLeuの同義置換がこの部位にあってもVal型変異と区別することはできない。仮にこのような変異が混在していた場合、*Alu I*で判断した遺伝子型を用い、その効果を検討しても正しい結果を得ることはできない。そこで本試験では*Alu I*切断の結果からAA型(Leu/Leu)、BB型(Val/Val)型と判定されたウシ各1頭を黒毛和種、ホルスタイン種、ヘレフォード種、アバーデンアンガス種から選び、PCRで増幅される597bpの塩基配列を決定した。

その結果、各品種ともAA型は発表されている配列と一致し、BB型は4品種ともValをコードしている

GTGの配列であった。したがって、*Alu I*切断で判定される遺伝子型は127部位のLeu、Valの多型を示していると考えられた。

この塩基配列の比較で黒毛和種のVal/Val型(127部位)は172部位でMetをコードするATGの配列を示した。発表されている塩基配列はACGであり、アミノ酸はThrである。この部位の変異については報告されていないため、頻度および127部位多型との関係を検討した(表1, 2)。

その結果Met(172部位)型の遺伝子は黒毛和種と褐毛和種にしか認められず、ホルスタイン種、ヘレフォード種、アバーデンアンガス種には存在していなかった。PCRは2本の染色体にある遺伝子座から増幅するため、127部位と172部位の多型の連鎖はヘテロな遺伝子型を示す個体について確定することができない。しかし、表1と表2の黒毛和種114頭で172部位にMet/Metのホモを示す9頭は127部位でVal/Valの遺伝子型を示し、逆にLeu/Leu(127部位)の23頭は必ずThr/Thr(172部位)の遺伝子型を示した。また、Thr/Met(172部位)の52頭は15頭がVal/Val(127部位)で37頭がLeu/Val(127部位)であった。すなわち、172部位のMetには必ず127部位にValがあり、この多型遺伝子はVal<sup>127</sup>-Met<sup>172</sup>の形で存在していると考えられた。また127部位のLeuは172部位にThrがあり、べつにVal<sup>127</sup>-Thr<sup>172</sup>の遺伝子型も存在する。このように、黒毛和種と褐毛和種ではA型(Leu<sup>127</sup>, Thr<sup>172</sup>)、B型(Val<sup>127</sup>, Thr<sup>172</sup>)、C型(Val<sup>127</sup>, Met<sup>172</sup>)の3種の成長ホルモン遺伝子があり(図2)、ホルスタイン種、ヘレフォード種、アバーデンアンガス種ではA型とB型の2種が存在していた。これらのことから、C型遺伝子はB型(Val<sup>127</sup>, Thr<sup>172</sup>)の牛の172部位に生じた1塩基の変異であり、これは黒毛和種と褐毛和種の共通祖先が他の3種の祖先から分かれた後に起きたものと推定された。1頭の分析

結果ではあるが、日本在来のウシに近いといわれている見島牛は AC 型であった。

成長ホルモンは脂肪の代謝に直接、間接に影響しており、成長ホルモンの投与は成長を早め、脂肪蓄積量を減少させる<sup>12)</sup>。合成牛成長ホルモンの投与試験<sup>9)</sup>では配列の異なるホルモン間で生理的効果に違いが認められている。また、ニワトリでは遺伝子型によってリポリシスに違いのあったことが報告されている<sup>2)</sup>。牛成長ホルモンの遺伝子型の効果については Høj ら<sup>8)</sup> が第 3 イントロンでの多型と乳脂肪量との関係を報告しているが、本試験ではこの部位についての分析を行っていないため、第 5 エキソンでの多型と第 3 イントロンでの多型の関係は不明である。ただ、枝肉形質に関しては顕著な効果が無いことが本試験の結果から明らかとなった。

表 2 の B.M.S. データで、産子の遺伝子型間で有意差の見られた種雄牛 I の遺伝子型は AA 型であり、産子の AA 型と AC 型の違いは母牛に起因する。C 型遺伝子は日本在来牛の祖先から由来していると考えられ、同じく在来牛の特徴である高い B.M.S. 値と弱い連鎖を持つ可能性は存在する。牛成長ホルモンの遺伝子は HEDIGER ら<sup>7)</sup> によって 19 番染色体の長腕にあることが明らかとされており、その他に POLR 2 (polymerase II large polypeptide)<sup>10)</sup>、HOX 2 (homeo box region 2)<sup>6)</sup>、PRKCA (protein kinase C,  $\alpha$  polypeptide)<sup>10)</sup>、cytokeratin<sup>5)</sup> 遺伝子が 19 番染色体に存在している。牛の 19 番染色体はヒト 17 番染色体、マウス 11 番染色体とよく一致しており、これらには、さらに THRA 1 (thyroid hormone receptor  $\alpha$  1)<sup>10)</sup> など代謝に関係する遺伝子も存在している。B.M.S. に関与する遺伝子が 19 番染色体に存在するかを議論するにはデータが不足しているが、今後、牛の遺伝子地図が決定されるにしたがって明らかになると思われる。

172 部位アミノ酸は成長ホルモン分子を形成する第 4 ヘリックスにあり<sup>14)</sup>、ヒト成長ホルモン分子<sup>4)</sup>では第 4 ヘリックスがレセプターとの結合部位となる。ヒト成長ホルモン分子で 172 部位は  $\alpha$ -ヘリックスの内側となり、疎水性アミノ酸がこの位置に来ることによって、分子を安定化させている。他の動物<sup>15)</sup>では Val や Ala などの疎水性の高いアミノ酸がこの部位にあり、牛 (A, B 型) の Thr はこれらのアミノ酸よりも疎水性が低い、C 型遺伝子の Met は Thr よりも疎水性が高く、ホルモンの性質として何らかの違いがある可能性も残されている。

## 謝 辞

凍結精液試料の収集には、北海道立新得畜産試験場陰

山聡一研究員、茨城県畜産試験場桃沢賢二研究員に多大のご協力をいただいた。稿を終えるにあたり、深く謝意を表する。

## 文 献

- 1) ABDEL-MEGUID, S.S., H.-S. SHIEH, W.W. SMITH, H. E. DAYRINGER, B.N. VIOLAND and L.A. BENTLE, Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84** : 6434-6437. 1987.
- 2) ARAMBURO, C., J.L. MONTIEL, G. PERERA, S. NAVARRETE and R. SANCHEZ, Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH): Different bioactivities of cGH change variants. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **80** : 59-67. 1990.
- 3) 千国幸一・寺田典文・陰山聡一・小石川常吉・加藤貞雄・小堤恭平, PCR 法を用いた牛成長ホルモン遺伝子 127 番アミノ酸部位塩基配列の多型検出. *日畜会報*, **62** : 660-666. 1991.
- 4) DE VOS, A.M., M. ULTSCH and A.A. KOSSIAKOFF, Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: Crystal structure of the complex. *Science*, **255** : 306-312. 1992.
- 5) FRIES, R., D.W. THREADGILL, R. HEDIGER, A. GUNAWARDANA, M. BLESSING, L. JORCANOJ, G. STRANZINGER and J.E. WOMACK, Mapping of bovine cytokeratin sequences to four different sites on three chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, **57** : 135-141. 1991.
- 6) GUNAWARDANA, A. and R. FRIES, Assignment of the HOX 2 and HOX 3 gene clusters to the bovine chromosome region 19q17-qter and 5q14-23. *Anim. Genet.*, **23** : 161-165. 1992.
- 7) HEDIGER, R., S.E. JOHNSON, W. BARENDSE, R.D. DRINKWATER, S.S. MOORE and J.HETZEL, Assignment of the growth hormone gene locus to 19q26-qter in cattle and to 11q25-qter in sheep by in situ hybridization. *Genomics*, **8** : 171-174. 1990.
- 8) Høj S., M. FREDHOLM, N.J. JARSEN, and V.H. NIELSEN, Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. *Anim. Genet.*, **24** : 91-96. 1993.
- 9) KRIVI, G.G. G.M. LANZA, W.J. SALSGIVER, N.R. STATEN, S.D. HAUSER, E. ROWOLD, T.R. KASSER, T.C. WHITE, P.J. EPPARD, L. KUNG, R.L. HINTZ, K. C. GLEEN and D.C. WOOD, Biological activity of amino-terminal amino acid variants of bovine somatotropin. in *Biotechnology in growth regulation* (HEAP, R.B., C.G. PROSSER and G.E. LAMMING, eds.). 223. Butterworth. London. 1989.

bGH 遺伝子の多型

- 10) O'BRIEN, S.J., J.E. WOMACK, L.A. LYONS, K.J. MOORE, N.A. JENKINS and N.G. COPELAND, Anchored reference loci for comparative genome mapping in mammals. *Nature Genet.*, **3** : 103-112. 1993.
- 11) SEAVEY, B.K., R.N.P. SINGH and U.J. LEWIS, Bovine growth hormone : Evidence for two allelic forms. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **43** : 189-195. 1971.
- 12) VERNON, R.G. and D.J. FLINT, Role of growth hormone in the regulation of adipocyte growth and function. in *Biotechnology in growth regulation* (HEAP, R.B., C.G. PROSSER and G.E. LAMMING, eds.). 57-71. Butterworth. London. 1989.
- 13) WALLIS, M., The primary structure of bovine growth hormone. *FEBS letters*, **35** : 11-14. 1973.
- 14) WALLIS, M. and R.V. DAVIES, Studies on the chemistry of bovine and rat growth hormones. in *Growth hormone and related peptides* (PECILE, A. and E.E. MULLER, eds.). 1-13. Excerpta Medica. Amsterdam. 1976.
- 15) WALLIS, M., Species specificity and structure-function relationships of growth hormone. in *Biotechnology in growth regulation* (HEAP, R.B., C.G. PROSSER and G.E. LAMMING eds.). 3-14. Butterworth. London. 1989.
- 16) WOYCHIK, R.P., S.A. CAMPER, R.H. LYONS, S. HOROWITZ, E.C. GOODWINE and F.M. ROTTMAN, Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. *Nucleic Acids Res.*, **10** : 7197-7210. 1982.

## Genetic Variants of the Growth Hormone Gene in Japanese Cattle

Koichi CHIKUNI, Tsuneto NAGATSUMA<sup>1</sup>, Toshiyuki TABATA<sup>2</sup>,  
Michiko MONMA, Masayoshi SAITO, Shinobu OZAWA<sup>3</sup>  
and Kyouhei OZUTSUMI<sup>4</sup>

National Food Research Institute, Tsukuba-shi 305

<sup>1</sup> Livestock Improvement Association of Japan, Kouchi-machi 729-15

<sup>2</sup> Ibaraki University Faculty of Agriculture, Ami-machi, Ibaraki-ken 300-03

<sup>3</sup> Chugoku National Agricultural Experiment Station, Oda-shi 694

<sup>4</sup> National Institute of Animal Industry, Nourinkenkyudanchi,  
Tsukuba-shi 305

We have previously reported that a nucleotide sequence variant of the bovine growth hormone (bGH) gene at amino acid position 127 can be detected by using the *Alu* I digestion of a PCR product. To determine the nucleotide sequence of the variant (B type), we amplified and then sequenced 652 bp fragments of intron 4/exon 5 of the bGH gene from A and B types of Japanese Black, Holstein, Hereford and Aberdeen Angus cattle. Codon at amino acid position 127 was a GTG for the B type instead of a CTG for the A type, and the other sequence of the B type was in agreement with the A type in the four breeds except for the Japanese Black. In some Japanese Black cattle, a substitution was present at amino acid position 172. This variant (C type) differed from the A and B types by having an ATG at position 172 which caused a replacement of Thr by Met in the deduced amino acid sequence. We designed two oligonucleotide probes for the identification of the variants at position 172. The sequences of the probes were probe A (for Thr<sup>172</sup>), 5'-CTGCATAAGACGGAGACGTAC-3' and probe C (for Met<sup>172</sup>), 5'-GTACGTCTCCATCTTATGCAG-3'. The genotypes of the four breeds and Japanese Brown cattle were determined using *Alu* I digestion for position 127 and a dot hybridization for position 172. Three types of bGH were present in Japanese Black and Japanese Brown cattle; A type (Leu<sup>127</sup>, Thr<sup>172</sup>), B type (Val<sup>127</sup>, Thr<sup>172</sup>) and C type (Val<sup>127</sup>, Met<sup>172</sup>). Frequencies of the variants were 0.500 (A), 0.144 (B) and 0.356 (C) in 59 Japanese Black cattle. The C type gene of bGH was not present in the other breeds consisting of 19 Holstein, 10 Hereford and 6 Aberdeen Angus. These results suggest that the C type was caused in the B type gene of ancestral Japanese Black and Japanese Brown cattle. Carcass traits were not affected by the genotypes of the bGH gene.

*Anim. Sci. Technol. (Jpn.)* 65 (4) : 340-346, 1994

**Key words** : growth hormone, variants, PCR, direct sequencing