

한우 Band 3 및 CHS 유전병의 분자유전학적 기초연구

정행진 · 유성란 · 상병찬 · 이준현

A Fundamental Genetic Study for Identifying Band 3 and CHS Genetic Diseases in Korean Cattle (Hanwoo)

Chung, Haeng-jin · Yu, Seong-Lan · Sang, Byung Chan · Lee, Jun-Heon

ABSTRACT

Many bovine genetic diseases are currently unidentified in Korea because of the relatively low monitoring systems in the livestock farms. The molecular detection system using PCR-RFLP of two genetic diseases, namely Band 3 (Erythrocyte Membrane Protein Band III) and CHS (Chediak-Higashi Syndrome), have been identified in Japan and used for screening large number of cattle whether each individual has the genetic disease or not. Using the 22 unrelated Korean cattle (Hanwoo) individuals, molecular detection system based on PCR-RFLP have been investigated, which can be distinguishable carriers for the genetic diseases. Even though we could not found the causative mutations for two genetic diseases, the PCR-RFLP techniques used in this study are very valuable for the screening the genetics diseases in Korean cattle, especially for the proven or candidate bulls.

Keywords : Band 3, CHS, Genetic disease, Korean cattle

1. 서 론

현재 소에서 이미 일반적으로 널리 알려져 있는 Erythrocyte Membrane Protein Band III (Band 3)와 Chediak-Higashi Syndrome(CHS) 두 가지의 유전병은 오래 전부터 인간에서 발병되어 연구되어지고 있는 질병으로 소에서 유사한 질병 증상이 나타나면서 이를 치료하기 위한 연구가 진행되어 지고 있다(Lux 등, 1989). 이 유전병들은 상염색체 상에 존재하며 열성 호모(homozygous recessive)일 경우에만 유전병의 증상이 나타나며 이 질병들의 carrier들은 정상 표현형을 가지기 때문에 DNA test의 결과로만 유전병의 유무를 판단할 수 있다. 따라서 능력이 우수한 개체들을 선별하여 종축으로 이용하기 위해서는 DNA test로 확인한 후 선별된 개체들간의 교배로 전체집단의 특정 유전병 빈도를 낮추는 쪽으로 계속 선발되어오고 있다(Sasaki 등, 2004).

Band 3(AE1: Erythroid Anion Exchanger 1 이라고도 함) 유전자는 적혈구 음이온교환 단백질의 연구에서 membrane protein의 대표적인 두 가지 기능에 관여한다고 밝혀졌는데(Jay, 1996), 두 가지의 기능은 첫째, 세포질의 생리기능에서 membrane protein이 세포와 모든 생물체에 걸쳐 항상성을 유지하는 기능과 둘째, membrane protein이 세포형태를 유지하기 위해 세포골격에 작용하는 기능이다. 또한, Peters 등(1996)과 Inaba 등(1996)도 항상성과 세포 형태 유지에 있어서 Band 3 유전자의 중요성을 보고한 바 있다. Band 3 protein은 95 kDa으로 세포내 풍부하게 존재하고(1.2×10^6 copies per cell) erythrocyte membrane에 있어 필수 단백질 중 하나이며 쉽게 정제할 수 있어서 membrane protein의 연구

를 통하여 많은 특성이 발표되었으며, membrane protein의 구조와 기능 연구를 위한 우수한 모델로 제시되어 왔다(Jay, 1996). 이와 같은 기능을 하는 Band 3에 mutation이 생기게 되면 유전병에 걸리게 되는데(Inaba 등, 1996), 소의 경우가 유전병의 증상은 용혈성의 빈혈증상을 보이고, 호흡하는 것을 힘들어하고 가슴이 두근거리는 것이 느껴진다. 만약 치료를 하지 않을 경우에는 1년을 넘기기가 힘들고 이 병에 걸린 소가 1년 이상 생존을 하게 되면 외견상으로는 병의 임상적인 증상이 나타나지 않더라도 발달이 다른 소에 비해 늦어진다(Sasaki 등, 2004).

Chediak-Higashi Syndrome(CHS)은 가장 먼저 인간에게서 발견된 질병으로 Chediak-Higashi Syndrome이란 명칭은 혈액학적 장애의 특성을 알아낸 Chediak와 이 병에 걸린 환자의 세포 안에서 과산화수소를 내포한 거대한 과립을 발견한 Higashi의 이름을 따서 명명하였다(Shiraishi 등, 2002). CHS 유전병에 걸린 대부분의 환자들은 감염, 출혈 또는 림프 조직구(lymphohistiocytic)의 침투와 함께 림프구가 증식되어지므로 10년 안에 사망에 이른다. 또한, 소의 품종 중 Hereford, Japanese Black 그리고 Brahman과 Angus의 교잡종인 Brangus에서도 발견되었다. 일본의 경우에는 CHS에 걸린 흑모화우(Japanese Black cattle)를 남쪽의 큐슈(Kyusyu) 지방에서 빈번히 볼 수 있지만(Miyazaki and Kagoshima Prefectures) 다른 지방에서는 CHS 발병이 드물다(Ogawa 등, 1997).

CHS 유전병의 증상은 출혈이 빈번해지고 코피나 하혈을 자주 하게 된다. 또한 혈소판 구조의 변형이 발견되고 커다란 혈중(출혈로 피가 한 곳에 모여 혹처럼 된 것)이 생긴다. 이 유전병에 걸린 소의 대부분은 밝은 털색과 붉은 눈

을 가지고 있다고 알려져 있다. CHS에 걸린 소에서의 가장 중요한 임상적 증상은 출혈하는 병적 소견을 보이는 것으로 Bell 등(1976)은 Washington State University에서 기른 Hereford 중에서 죽은 56마리 중 20마리가 이 질병에 기인한 출혈로 죽었다고 보고하고 있다. CHS에 걸린 Hereford의 출혈 증상은 혈액이 피하에 축적되었다가 사라지면서 섬유종으로 되고, 이전에 생긴 외상이 있는 곳에서 피하에 단단한 작은 혹이 다수 관찰되어 진다. CHS에 걸린 일본 흑모화우의 출혈 모습은 거세 후에 과다 출혈과 같은 모습이나 표면상이나 치골 안의(또는 복부의) 혈종이 발견되어진다고 보고되고 있다(Ogawa 등, 1997). 최근 CHS1/LYST 유전자가 사람의 CHS1과 'beige' 마우스에서 발견되었는데, 이 유전자의 mutation에 의해 이 질병이 발병되는 것이 밝혀졌다(Kunieda 등, 2000). 이 유전자는 세포내 protein trafficking을 조절하는 것으로 추정되는 membrane 관련 단백질을 encode한다고 알려져 있다.

예전에 일본의 화우에서는 Band 3와 CHS의 carrier가 비교적 높은 빈도를 나타내었고 Band 3와 CHS의 돌연변이(mutation)의 경우 드물지 않게 조사되고 있다. 특히 CHS 유전병의 경우 어린 송아지에서 낮은 치사율을 보이며 불완전한 침투력을 가진 homozygous 자손이 발견되었다(Inaba 등, 1996; Yamakuchi 등, 2000). CHS 유전병의 경우 정상인 개체가 33%, carrier인 개체가 26.5%, 유전병에 걸린 개체는 40.5%에 이를 정도로 높은 빈도를 나타내었다(Yamakuchi 등, 2000). 그러나 현재 CHS의 경우 일본 화우에서 수컷의 경우 정상은 95.41%, carrier는 4.48%, 유전병에 걸린 소는 0.11%이고 암컷의 경우 정상은 96.41%, carrier는 3.55%, 유전병에 걸린 소

는 0.23%로 현저히 낮은 빈도로 나타나고 있다(Sasaki 등, 2004). Band 3 유전병에 걸린 성숙일 경우 약물치료를 하면 2-6일 후에 병이 호전되면서 생존하는 것이 보고되어 있다(Inaba 등, 1996). 현재 Band 3의 경우 일본 화우에서 수컷의 경우 정상은 92.75%, carrier는 7.22%, 유전병에 걸린 소는 0.03%이고 암컷의 경우 정상은 91.72%, carrier는 8.27%, 유전병에 걸린 소는 0.01%로 CHS와 마찬가지로 낮은 빈도로 나타났다(Sasaki 등, 2004).

하지만, 한우의 경우에는 유전병에 대한 관심은 있으나 현장에서 유전병을 monitoring할 수 있는 국가적인 체계가 확립되지 않아 현재 어떤 유전병이 어떤 빈도로 나타나는지 확인할 수 없는 상태이다. 최근의 연구결과를 비교하여 보면 한우와 일본의 화우와는 유전적으로 상당히 가까운 것으로 알려져 있으므로 한우에 존재하는 유전병이 화우에서 나타날 확률이 높으며 또한 일본 화우의 유전병이 한우에서 나타날 가능성이 상당히 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구는 일본 화우에서 많이 발병하는 Band 3와 CHS 유전병을 한우에서 조사함과 동시에 앞으로 선발될 후보종모우와 보증종모우에서 이런 유전병을 확인할 수 있는 기초 실험을 하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시재료 및 genomic DNA

이 연구에서 Band 3와 CHS 유전병을 확인하기 위해 사용된 공시재료는 축산연구소에서 사육된 근연관계가 먼 한우 22개체가 이용되었으며, 각 개체로부터 추출한 genomic DNA를 사용하였다.

2. PCR과 PCR-RFLP

1) Band 3 유전자의 증폭

Band 3 유전자를 증폭하기 위해서 Inaba 등 (1996)에 의해 보고된 primer를 사용하였고 (표 1), PCR reaction은 총 부피를 25 μ l로 10ng 농도의 template genomic DNA 5 μ l, 10 pmol oligonucleotide primer 1 μ l, 2.5 mM dNTP 2 μ l, 10 \times PCR buffer 2.5 μ l 그리고 2.5 units *Taq* polymerase(Genet bio, Korea) 0.5 μ l를 혼합하여 사용하였다. PCR의 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분 1회 실시한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 40초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분씩 총 30회로 증폭시켰다. 그리고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간의 조건으로 MJ Research thermocycler(MJ Research, USA)에서 PCR를 수행하였다. PCR이 끝난 후 증폭된 product 5 μ l을 2%의 agarose gel에 전기영동하여 증폭여부 및 크기를 확인하였다.

2) CHS를 나타내는 유전자 부위의 증폭 및 RFLP

CHS의 PCR product를 얻기 위해 Yamakuchi 등(2000)에 의해 보고된 primer를 사용하였으며 (표 1), PCR reaction은 total volume을 25 μ l로 10ng 농도의 template genomic DNA 5 μ l, 10 pmol oligonucleotide primer 1 μ l, 2.5 mM dNTP 2 μ l, 10 \times PCR buffer 2.5 μ l 그리고 2.5 units *Taq* polymerase(Genet bio, Korea) 0.5 μ l를 혼합하여 사용하였다. PCR의 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분 1회 실시한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 56 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 30초 총 35회로 증폭시켰고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간의 조건으로 MJ Research thermocycler (MJ Research, USA)에서 PCR를 수행하였다. PCR이 끝난 후 증폭된 product 5 μ l을 2%의 agarose gel에 전기영동하여 증폭여부 및 크기를

확인하였다.

PCR 증폭 여부가 확인된 product를 FokI 처리에 의하여 polymorphism을 확인하였다. 제한효소 처리 반응액에는 3 unit의 FokI 0.3 μ l, 10 \times buffer 2 μ l 그리고, PCR product 15 μ l를 첨가하여 최종부피를 20 μ l가 되도록 하였고, 이 반응액을 37 $^{\circ}$ C에서 overnight으로 incubation하여 PCR products가 완전히 절단되도록 하였다. 절단된 DNA단편은 3% agarose gel에 전기영동을 하여 polymorphism 여부를 확인하였다.

Table 1. Primer sequences used in this study

Primer name	Primers
Band3-F	5'-AAACTCAGTGTACCTGAAGGC-3'
Band3-R	5'-GTGGTGATCTGGGACTCAAGGA-3'
CHS-F	5'-AGCTTATATCCATGCCCAA-3'
CHS-R	5'-AGAAGTTTGTGGGGTTGTGA-3'

3. Cloning 및 sequencing

PCR을 실시한 후 확인된 product는 sequencing으로 염기서열을 확인하기 위하여 cloning을 실시하였고, cloning을 하기 위하여 pGEM[®]-T easy vector(Promega, USA)를 이용하였다. Ligation 반응액은 PCR product 3 μ l, 50ng/ μ l pGEM[®]-T easy vector 1 μ l, 2 \times ligation reaction buffer 5 μ l와 5 units T4 DNA ligase 1 μ l를 혼합하여 실온에서 3시간 동안 incubation 시킨 후, DH5a cell에 transformation 하였고, 이를 통해 cloning된 vector들은 Wizard Plus Minipreps DNA Purification system(Promega Co., USA)을 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다. 추출된 plasmid DNA는 *EcoRI*의 처리에 의해 insert의 유무 및 정확한 insert size를 확인하였다.

정확한 insert가 들어간 clone들의 염기서열을 결정하기 위하여 재조합된 plasmid DNA 200ng에 Bigdye terminator(PE Applied Biosystems, USA)를 사용하여 cycle sequencing reaction을 실시하였다. PCR은 PE 9600(PE Applied Biosystems, USA)을 이용하였고, 반응조건은 96°C에서 1초, 50°C에서 5초, 60°C에서 4분간으로 총 25회로 증폭시켰고, 반응이 끝난 PCR product는 ethanol로 정제하여 ABI 377 자동염기서열 분석장치(PE Applied Biosystems, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하고 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. PCR 증폭 및 RFLP

1) Band 3 유전자의 증폭

Band 3 유전자는 Inaba 등(1996)에 의해 일본 흑모화우에서 선천적으로 유전되는 구형적혈구증(sphocytosis)을 가지는 몇몇의 개체를 조사한 결과 Band 3 발현이 적음을 확인하였는데, 이 양상은 Band 3 유전자에 polymorphism으로 stop codon이 형성되어 완전한 Band 3 유전자를 만들지 못하게 되므로 나타나는 병증임을 보고하였

다. 이와 같은 Band 3 유전자의 polymorphism을 한우에서 확인하기 위하여 Band 3 유전자를 증폭시키기 위해 PCR를 실시하였고, 전기영동하여 확인한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 한우 22개체 모두에서 Inaba 등(1996)이 보고한 것과 같은 크기의 145 bp의 PCR products가 증폭됨을 확인할 수 있었다.

2) CHS를 나타내는 유전자 부위의 증폭 및 RFLP

Kunieda 등(1999)에 의하면 일본 흑모화우에서 약 11.5 kb의 LYST(lysosomal trafficking regulator) 유전자의 6,065 nucleotide position에 G와 A polymorphism이 나타나는데 이 부위가 G인 경우 CHS가 나타나는 것을 보고하였고, 최근에 Yamakuchi 등(2000)이 일본 흑모화우에서 유전자분석을 한 결과 약 40.5%가 CHS를 나타남을 확인하였다. 이와 같은 결과를 참조하여 한우에서도 CHS가 나타나는지의 여부를 확인하기 위해 Yamakuchi 등(2000)이 사용한 primer를 이용하여 165 bp의 PCR product를 확인할 수 있으며 CHS 유전병 원인 polymorphism 유무를 조사하기 위하여 PCR-RFLP를 실시하였다. PCR-RFLP는 *FokI*으로 확인할 수 있는데, 165 bp가

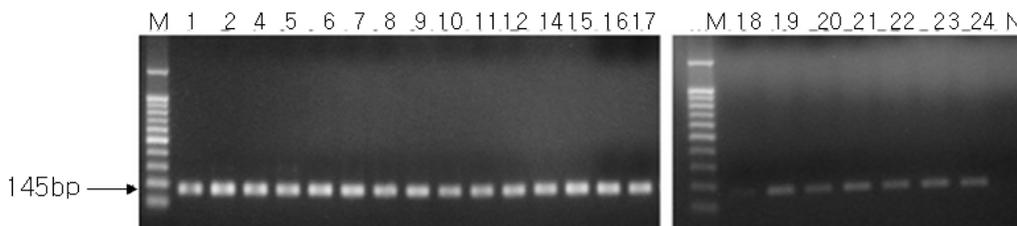


Fig. 1. PCR products of Band 3 gene in 22 Korean cattle. Lane M: 100 bp DNA ladder marker (ELPIS, Korea), lanes 1 - 24: individuals, and lanes N: negative control.

나타나는 경우에는 CHS를 나타내는 것이고, 정상인 경우에는 106 bp와 59 bp의 두개의 band만을 나타내는 것으로 Fig. 2의 결과에서 보면 모든 개체에서 polymorphsim이 없는 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구에서 이용된 샘플에서는 CHS관련 유전자의 변이가 나타나지 않았으나, 이 결과만으로는 우리나라 전체 한우 집단 내에서 CHS가 없다고는 단정을 지을 수 없다. 최근 Sasaki 등(2004)에 의해 일본 흑모화우의 CHS를 조사한 결과 수컷에서 4.48%가 carrier이고, 0.11%만이 발병하였다. 그리고 암컷에서는 더 낮은 빈도의 3.55%가 carrier이고 0.04%만이 발병하였다. 따라서 한우 집단에서도 이런 유전병의 원인유전

자가 낮은 빈도로 존재할 가능성이 충분히 있으므로 더 많은 샘플을 가지고 연구를 해 볼 필요가 있으며 본 연구를 통해 CHS 유전병을 발견할 수 있는 기초자료를 수집한 것이 본 연구의 성과라고 할 수 있다.

2. Band 3 유전자와 CHS을 나타내는 유전자의 염기서열 분석

1) Band 3 유전자의 염기서열 분석

Band 3 유전자의 경우 유전자의 polymorphism은 PCR-RFLP로 확인할 수 없어 우선 PCR product들을 cloning하였고 이 cloning된 vector들을 sequencing하여 얻어진 염기서열을 BLAST

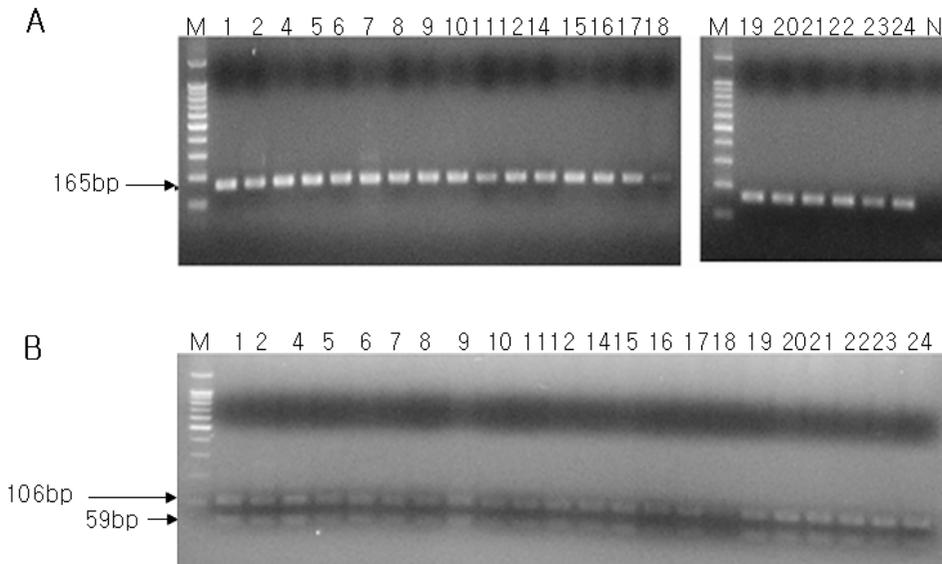


Fig. 2. (A) PCR products of CHS locus located in *LYST* gene. Lane M: 100bp DNA ladder marker (ELPIS, Korea), lanes 1 - 24: Hanwoo individuals, lanes N: negative control. (B) PCR-RFLP of CHS gene digested with *FokI* using 3% agarose gel. Lane M: 100bp DNA ladder marker (ELPIS, Korea), lanes 1 - 24: Hanwoo individuals.

```

HANWOO 12  AAAGTCTGACCTGAAGGCCTCTCTGTATCTAACCCACGGAGCGAGACTGGCTTATC 71
          |||
BOVINE 2093 AAAGTCTGACCTGAAGGCCTCTCTGTATCTAACCCACGGAGCGAGACTGGCTTATC 2152

HANWOO 72  CACCCACTAGGCATACGTGTGCAATTTCCCATCTGGATGATGTTTGTCTTGCCTGCCT 131
          |||
BOVINE 2153 CACCCACTAGGCATACGTGTGCAATTTCCCATCTGGATGATGTTTGTCTTGCCTGCCT 2212

HANWOO 132  GCCCTGCTGGTCTTTATTCTCATCTTCCCTTGAGTCCCAGATCACCAC 178
          |||
BOVINE 2213 GCCCTGCTGGTCTTTATTCTCATCTTCCCTTGAGTCCCAGATCACCAC 2259
    
```

Fig. 3. Sequence alignment of Band 3 gene between Korean cattle (Hanwoo) and the published bovine Band 3 gene sequence (GenBank accession number NM_181036).

```

HANWOO 1    TAGAAGTTTGTGGGGTTGTGACAAACATAAGTATTAGTAGGAGGATGAACTGCTAAAAGG 60
          |||
BOVINE 6089 TAGAAGTTTGTGGGGTTGTGACAAACATAAGTATTAGTAGGAGGATGAACTGCTAAAAGG 6030

HANWOO 61   AAATTGAAGATAATCGTCAATAATTCCAAATCCGGAGGAGATCCAAGGACTTCTGCTGTA 120
          |||
BOVINE 6029 AAATTGAAGATAATCGTCAATAATTCCAAATCCGGAGGAGATCCAAGGACTTCTGCTGTA 5970

HANWOO 121  ATTTTCACAAAGGATCTACAAACCTCTTGGGGCATGGATATAAGC 165
          |||
BOVINE 5969 ATTTTCACAAAGGATCTACAAACCTCTTGGGGCATGGATATAAGC 5923
    
```

Fig. 4. Sequence alignment of CHS locus in LYST gene between Korean cattle (Hanwoo) and the the published bovine CHS gene sequence (GenBank accession number AF114785).

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)에서 확인한 결과 기존에 보고된 염기서열(NM_181036)과 100% 상동성을 보이며 한우의 167 bp 안에는 어떠한 polymorphism도 발견할 수 없었다. 일본 흑모화우에서도 Band 3의 이상은 수컷에서 0.03%, 암컷에서 0.01%로 현저히 낮은 빈도를 나타내므로(Sasaki 등, 2004) 본 연구에서 사용된 22개체의 한우를 가지고는 이와 같은

polymorphism을 찾기가 어려웠던 것으로 판단되며, CHS와 마찬가지로 샘플의 수를 늘릴 경우 이 유전병을 가진 개체를 확인할 수 있을 것으로 사료된다.

2) CHS을 나타내는 유전자의 염기서열 분석 이미 밝혀진 nucleotide polymorphism 이외에 다른 부분의 polymorphism 존재 여부와 PCR-

RFLP의 결과를 재확인하기 위해서 우선 PCR product들을 cloning하였고 이 cloning된 vector들을 sequencing하여 얻어진 염기서열을 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)에서 확인한 결과 AF114785와 100% 상동성으로 한우의 165 bp안에는 어떠한 polymorphism도 발견할 수 없었다. 그러나 본 연구에서 확립된 방법을 이용하여 한우의 보증종모우가 선발되기 전에 유전병에 관한 DNA test를 선발에 이용함으로써 유전병을 가진 유전자가 다음 세대로 전달되는 것을 막는데 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

IV. 적 요

한국의 소 사육 농가에서 유전병을 monitoring 하는 체계가 현재 존재하지 않기 때문에 정확히 한우에서 어떤 유전병이 존재하는지 알 수가 없는 실정이다. 최근에 일본에서는 흑모화우에 존재하는 유전병을 제거하기 위해 많은 노력을 들이고 있다. 본 연구는 일본의 흑모화우에 존재하는 유전병인 Band 3와 CHS의 존재 유무를 혈연관계가 없는 한우 22개체를 이용하여 PCR-RFLP 방법으로 확인하였다. 비록 한우에서 Band 3와 CHS 유전병을 가진 개체는 나오지 않았으나 본 연구에서 확립된 방법을 한우 보증종모우와 후보종모우에서 확인하여 유전병을 가진 유전자가 다음 세대로 전달되는 것을 막을 필요성이 있다.

인용문헌

- Bell, T. G., K. M. Meyers, D. J. Prieur, A. S. Fauci, S. M. Wolff and G. A. Padgett. 1976. Decreased nucleotide and serotonin storage associated with defective function in Chediak-Higashi syndrome cattle and human platelets. *Boold.* 48:175-184.
- Inaba, M., A. Yawata, I. Koshino, K. Sato, M. Takeuchi, Y. Takakuwa, S. Manno, Y. Yawata, A. Kanzaki, J. I. Sakai, A. Ban, K. I. Ono and Y. Maede. 1996. Defective anion transport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell band 3 in cattle due to A nonsense mutation. *Journal of Clinical Investigation.* 97:1804-1817.
- Jay, D. G. 1996. Role of band 3 in homeostasis and cell shape. *Cell.* 86:853-854.
- Kunieda, T., M. Nakagiri, M. Takami, H. Ide and H. Ogawa. 1999. Cloning of bovine LYST gene and identification of a missense mutation associated with Chediak-Higashi syndrome of cattle. *Mammalian Genome.* 10:1146-1149.
- Kunieda, T., H. Ide, M. Nakagiri, K. Yoneda, B. Konfortov, H. Ogawa. 2000. Localization of the locus responsible for Chediak-Higashi syndrome in cattle to bovine chromosome 28. *Animal Genetics.* 31:87-90.
- Lux, S. E., K. M. John, R. R. Kopito and H. F. Lodish. 1989. Cloning and characterization of band 3, the human erythrocyte anion-exchange protein (AE1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 86:9089-9093.
- Ogawa, H., C-H. Tu, H. Kagamizono, K. Soki, Y. Inoue, H. Akatsuka, S. Nagata, T. Wada, M. Ikeya, S. Makimura, K. Uchida, R. Yamaguchi and H. Otsuka. 1997. Clinical, morphologic, and biochemical characteristics of Chediak-Higashi syndrome in fifty-six Japanese black cattle. *American Journal of Veterinary Research.* 58:1221-1226.
- Peters, L. L., R. A. Shivdasani, S-C. Liu, M.

- Hanspal, K. M. John, J. M. Gonzalez, C. Brugnara, B. Gwynn, N. Mohandas, S. L. Alper, S. H. Orkin and S. E. Lux. 1996. Anion exchanger 1 (Band 3) is required to prevent erythrocyte membrane surface loss but not to form the membrane skeleton. *Cell*. 86(6): 917-927.
9. Sasaki, S., Ogino, A., Tanabe, Y., Kanemaki, M. and Morita, M. 2004. Prevalence of mutant alleles for seven genetic disorders in the Japanese cattle population. *Proceeding of 29th International Conference on Animal Genetics*. 77.
10. Shiraishi, M., H. Ogawa, M. Ikeda, S. Kawashima and K. Ito. 2002. Platelet dysfunction in Chediak-Higashi syndrome-affected cattle. *Journal of Veterinary Medical Science*. 64:751-760.
11. Yamakuchi, H., M. Agaba, T. Hirano, K. Hara, J. Todoroki, K. Mizoshita, C. Kubota, N. Tabara and Y. Sugimoto, 2000. Chediak-Higashi syndrome mutation and genetic testing in Japanese black cattle (Wagyu). *Animal Genetics*. 31:13-19.