

## ホルスタイン種における MUC1-VNTR 多型と 乳中体細胞数との関連性について

山本 直幸・西浦 明子・富樫 研治  
北海道農業研究センター畜産草地部, 札幌市豊平区 062-8555

### Relationship between MUC1-VNTR polymorphisms and somatic cell count in Holstein cows

Naoyuki YAMAMOTO, Akiko NISHIURA and Kenji TOGASHI

Department of Animal Production and Grassland,  
National Agricultural Research Center for Hokkaido Region (NARCH),  
Toyohira-ku, Sapporo-shi 062-8555

**キーワード** : ホルスタイン種, ムチン, MUC1, VNTR 多型, 乳中体細胞数

**Key words** : Holstein cows, mucin, MUC1, VNTR polymorphisms, somatic cell count

#### Abstract

A polymorphic glycoprotein, MUC1 mucin, of high molecular weight is found on the bovine milk fat globule membrane. The milk fat globule membrane is deposited into the milk during secretion and is a source of apical glycoproteins of lactating mammary epithelial cells. Milk MUC1 mucin has the function concerned with the immunity by such cases as the infection defense. MUC1 gene contains a segment of tandemly repeated VNTR type polymorphisms (60bp/1 consensus sequence unit) at exon2 region. The purposes of this study was to detect the MUC1-VNTR type polymorphisms and to estimate the relationship between MUC1-VNTR type polymorphisms and milk MUC1 mucin protein function using SCC for indirectly index in Holstein dairy cows. MUC1 gene contains 2 to 17 tandem repeats of 20 amino acids within the repeat domain. There was high frequency (90.41%) of eight times and more in the number of repeats. And RFLPs type polymorphisms was confirmed within the consensus sequence unit of VNTR digestion with restriction enzyme *PvuII*. Mean of SCC ( $\times 10^3$ /ml) and LS were high frequency of VNTR12 (144.94, 2.02) than VNTR9 (84.77, 1.53) and VNTR13 (103.78, 1.59) ( $p < 0.01$ ). The frequency of less than 100 ( $\times 10^3$ /ml) of SCC in VNTR9 was high, and the frequency of over 100 ( $\times 10^3$ /ml) of SCC in VNTR12 was high. These results suggested that MUC1-VNTR polymorphisms were related to milk MUC1 mucin function such as the first line of infection defense.

#### 要 約

乳中にある MUC1 ムチンは脂肪球皮膜上に発現しており, 感染防御等一次免疫に関わる機能を有する高分子量の糖タンパク質である。この乳中 MUC1 ムチンの遺伝子 MUC1 はエクソン 2 に VNTR 型の反復繰返し多型構造 (60 塩基/1 繰返し単位) を持つ。そこで, ホルスタイン種における MUC1-VNTR 多型を解

析するとともに, 乳中 MUC1 ムチンの持つ機能性が MUC1-VNTR 多型と関連性があるかどうかを, SCC を間接的な機能性指標として用い検討を行った。その結果, MUC1-VNTR の反復繰返し回数は 8 回以上の割合 (90.41%) が多く, さらに VNTR 配列の繰返し単位内にも RFLPs 多型が確認された。3 つの VNTR 型間で平均 SCC ( $\times 10^3$ /ml) および平均 LS を比較すると, VNTR12 (144.94, 2.02) は VNTR9 (84.77, 1.53) と VNTR13 (103.78, 1.59) より有意 ( $p < 0.01$ ) に高かった。SCC の分布では VNTR9 は 100 ( $\times 10^3$ /

ml)以下の割合が他の VNTR 型より多く、 $100(\times 10^3/\text{ml})$ を越える分布では VNTR12 の割合が多かった。以上の結果より、MUC1-VNTR 多型は乳中 MUC1 ムチンの持つ感染防御能と関連性がある可能性を示唆するものと考えられた。

## 緒 言

乳中の脂肪球皮膜上に発現している主要タンパク質 (PETERSON *et al.*, 2001) の一つであるムチンタンパク質(乳中 MUC1 ムチン)は乳腺上皮細胞を由来とし、糖鎖が結合した高分子量の膜結合型糖タンパク質である (GENDLER *et al.*, 1987; GENDLER *et al.*, 1988; GENDLER, 2001)。

これまでに、ヒトにおいては 12 種類のムチンタンパク質遺伝子の存在が報告されており (GENDLER, 2001), このうちの乳中 MUC1 ムチンは第 1 染色体上にマップされている MUC1 遺伝子によってコードされている。ウシの乳中 MUC1 ムチンもヒトと同じく MUC1 遺伝子の産物であるが、その遺伝子は第 3 染色体上に存在すると推定されている。MUC1 をはじめ、いずれの MUC 遺伝子にも翻訳領域内に縦列反復配列 (VNTR: variable number of tandem repeat) 型の多型を有していることが明らかとなっている。MUC1 遺伝子には第 2 エクソンに 60 塩基 (20 アミノ酸) を一つの反復繰返し単位とする VNTR 配列が存在している (LANCASTER *et al.*, 1990)。MUC1 遺伝子の構造、すなわち 7 つのエクソンとエクソン領域に VNTR を持つという特徴は動物種間で共通であるが、塩基配列ではウシ (PALLESEN *et al.*, 2001) ヒト (GENDLER *et al.*, 1990), テナガザル (SPICER *et al.*, 1995), マウス (SPICER *et al.*, 1991), ウサギ (HEWETSON and CHILTON, 1997) など動物種間でかなり異なった配列であることが報告されている。

MUC1-VNTR 構造の生理的な機能はまだ十分に解明されていないが、ヒトにおいては乳中 MUC1 ムチンが微生物の増殖を強く抑制する働きを持っているとの報告がある (NEWMAN, 1995; YOLKEN *et al.*, 1992)。また、ウシにおいてはロタウィルスの感染により発症する下痢を乳中 MUC1 ムチンが予防あるいは症状を低減する効果を持つことが、マウスを使った実験により明らかにされている (EBINA, *et al.*, 1992)。乳中に限らず一般にムチンタンパク質は接着性の免疫的防御作用を有すること (FUKUDA, 2002), さらにその遺伝子の翻訳領域に極めて大きな繰返し構造を有することなどから、MUC1-VNTR の多型が乳中 MUC1 ムチンの機能性に影響を及ぼす可能性を推定することが出来る。

そこで本研究では、乳用牛であるホルスタイン種において MUC1-VNTR 多型の検出と同定を試みるとともに、非特異的な一次免疫に関与していると考えら

れている乳中 MUC1 ムチンの機能が MUC1-VNTR 多型との間に関連性をもつかどうかについて、乳中に検出される体細胞数 (SCC) およびそのリニアスコア (LS) を間接的な機能性指標として用いることで検討を試みた。

## 材料および方法

### 供試家畜

北海道農業研究センター (北農研) において飼養されたホルスタイン種で、平成元年 1 月から平成 14 年 6 月の間に在籍した個体のうちの 103 個体を用いた。また、東千歳地区の一般酪農家で飼養されているホルスタイン種 5 牛群の合計 304 個体についても MUC1-VNTR の多型検出と同定を行った。

### DNA 抽出

ゲノム DNA の抽出には血液あるいは乳を用いた。血液には EDTA を抗凝固剤として用い PBS による洗浄を 2 回行った。凍結保存 ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) 後、市販の核酸抽出用キット (Code No. 9081, TAKARA 社製) で DNA を抽出した。また乳は変性を防ぐためにアジ化ナトリウム (最終濃度 0.02%) を添加後、冷蔵 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) あるいは冷凍 ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) で保存した。DNA 抽出は Chelex 100 resin 樹脂 (Cat. No. 142-1253, BIO-RAD 社製) と Proteinase K (MERCK 社製) を用いた樹脂ビーズ法 (AMILLS *et al.*, 1997) で行い解析に用いた。

### 多型検出

MUC1-VNTR 領域の DNA 増幅には、エクソン 2 の塩基配列情報よりプライマーセットを設計し、2 点 PCR プログラムで増幅特異性を高めた。PCR 法の条件を Table 1 および Table 2 に示した。

PCR 増幅産物は 2% アガーロースゲル電気泳動法で分離した。エチジウムブロマイドによる染色後、紫外線ランプ照射下でポラロイド撮影を行い、検出された DNA 長から VNTR の反復繰返し回数の同定を行った。さらにマイクロチップ電気泳動システム (SV1210, HITACHI 社製) を用いて同一個体の PCR 産物長を測定することで繰返し回数の再同定と確認を行った。MUC1 遺伝子の塩基配列は PCR 産物のダイレクトシーケンシングにより決定した。

MUC1-VNTR 内の RFLPs 解析には、PCR 産物 20  $\mu\text{l}$  を 20 単位の制限酵素 *PvuII* (Code No. 1076A, TAKARA 社製) で  $37^{\circ}\text{C}$  2 時間以上消化し 2% アガーロースゲルで検出した。

### SCC 測定

SCC の測定は隔週で実施し、夜および翌朝の搾乳時に個体毎に採取した生乳サンプルを用い、体細胞数測定装置 (FOSSMATIC 90, N. FOSS ELECTRIC 社

Table 1 Preparation of the PCR master mixes.

Component	Volume per reaction ( $\mu$ l)	Final concentration
Template DNA	2	-
Primer 1 (AACGTCCAGTCCCACTAAAG)	2	0.2 $\mu$ M
Primer 2 (CAGCTCCTGATAGTAGCTGG)	2	0.2 $\mu$ M
dNTPs Mix	2	200 $\mu$ M of each
10 X PCR Buffer	2	1 X
Taq (AmpliTaq Gold, AB*)	0.2	1 unit
MgCl <sub>2</sub>	1.2	1.5 mM
H <sub>2</sub> O	8.6	-
Total	20.0	

\*) Applied Biosystems.

Table 2 Thermal cycling protocol.

Step	Initial	PCR Cycle (40 cycles)		Final
		Denature	Anneal-Extend	
Temp. (°C)	95	94	60	72
Time (sec)	540	30	300	600

Thermal Cycler: GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

製)により計測されたものである。LSは対数変換された SCC の分類に従った値を用いた。解析には平成元年1月から平成14年6月までの期間で在群中に記録された個体毎の全データを用いた。

### 結果および考察

MUC1-VNTR の反復繰返し回数を北農研、一般酪農家のホルスタイン種合計6牛群407頭について解析したところ、2回から17回の繰返し回数を持つ個体が確認された。また、反復繰返しのない個体も確認された (Figure 1)。

反復繰返し回数の分布を見ると、8回以上の個体の割合 (90.41%) が多く、7回以下の割合 (9.59%) は少なかった。このうち、北農研の個体については殆どが9回 (VNTR9, 44.7%)、12回 (VNTR12, 32.0%)、13回 (VNTR13, 21.4%) の3型で占められ、その他

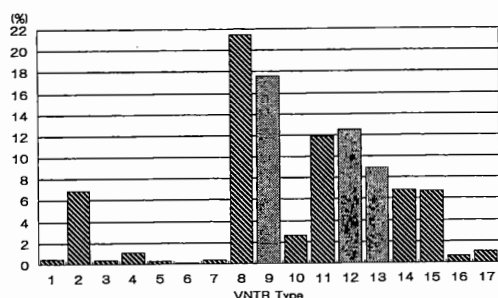


Figure 1 The distribution of MUC1-VNTR type (number of repeats). Major three types of MUC1-VNTR detected in NARCH Holstein cows were VNTR9, 12 and 13.

の型を持つ個体は若干であった。一方、一般酪農家の個体では繰返し回数が極めて少ないものが確認された。これらは PCR に用いた鋳型 DNA の状態などの影響により正確に増幅されなかった可能性が疑われたため再検討を行ったが、同様の結果であった。

ヒトにおいては、北部ヨーロッパの女性を対象とした解析で MUC1-VNTR に 21 回から 125 回の反復繰返し回数があることが報告されている (GENDLER *et al.*, 1990)。ウシでは米国のホルスタイン種集団の解析で 25 回から 35 回の繰返し回数があると報告されている (HENS *et al.*, 1995; HUOTT *et al.*, 1995)。また、エアシャー種、ブラウンスイス種、ジャージー種などでは、乳中 MUC1 ムチンのタンパク質解析による分子量からの推定で、MUC1-VNTR 多型はホルスタイン種より少ないと報告されている (PATTON and MULLER, 1992)。これらの報告と本研究の結果を合わせて考察すると、MUC1-VNTR は動物種間および系統間あるいは集団間においてその多型性が大きく異なると考えられる。

MUC1-VNTR は繰返し回数の違いが PCR 産物の長さの差となり、それが多型として検出されるが、この多型の他にさらに VNTR の繰返し単位内に塩基の変異に由来する多型が存在するかどうかを北農研の個体について調べた。VNTR 領域を含む塩基配列を解析し、決定した塩基配列情報より制限酵素認識部位を検索し RFLPs を検出した。その結果、制限酵素 *Pvu*II (認識配列: cagctg) での消化において塩基変異が確認された (YAMAMOTO, 2002A; 2002B; 2002C)。この RFLPs は MUC1 の VNTR9, VNTR12, VNTR13 それぞれの型に特異的に対応する変異であった (Figure 2)。また、この変異はアミノ酸の置換は伴わないものであった。

これらのことから、MUC1-VNTR 領域は 60 塩基 20 アミノ酸を 1 単位とする規則的な反復繰返し配列構造を保持しつつ、さらに繰返し単位内の塩基変異による複数のタイプが存在することが明らかとなった。

乳中 SCC の増加は、乳頭口から乳腺内に侵入した細菌の感染増殖に対する防御反応として好中球をはじ

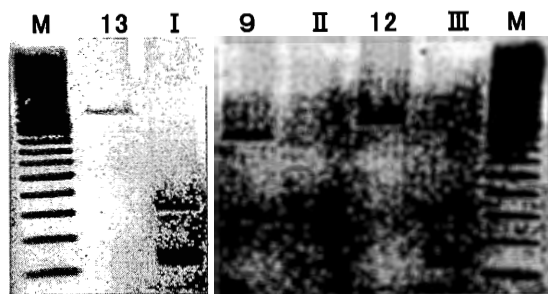


Figure 2 Correspondence with MUC1-VNTR type and RFLPs type digestion with restriction enzyme PvuII.  
M: 100 bp ladder marker, 13・9・12: VNTR type, I・II・III: RFLPs type.

めとする白血球等が乳中へ浸潤することに起因する (BRADLEY, 2002) 場合が多い。乳腺内感染の過程で、乳中にある細菌の増殖阻止物質の一つである MUC1 ムチンが細菌増殖を抑える機能の一部を担っていることは推定できる。そこで、乳中 MUC1 ムチンの主たる機能である微生物に対する感染防御能と MUC1-VNTR 多型との間に関連性があるかどうかについて、北農研牛群で確認された MUC1-VNTR の 3 つの型 (VNTR9, VNTR12, VNTR13) を SCC と LS を間接的な機能性指標として用いて比較検討を行った。

その結果、各 MUC1-VNTR 型の平均 SCC は VNTR9 が最も低く  $84.77 (\times 10^3/\text{ml})$ 、VNTR12 が最も高く  $144.94$  で大きな差が認められた。VNTR13 は  $103.78$  であり、各型間の分散分析の結果においても有意な差 ( $p < 0.01$ ) が確認された。平均 LS は VNTR9 が  $1.53$ 、VNTR12 が  $2.02$ 、VNTR13 が  $1.59$  であり、VNTR12 と VNTR9, VNTR13 の間に有意な差 ( $p < 0.01$ ) が認められた (Table 3)。

また、MUC1-VNTR の 3 型毎の SCC 分布を見てみると、 $100 (\times 10^3/\text{ml})$  以下は VNTR12 の割合 (73.88%) が VNTR9 (85.5%)、VNTR13 (81.96%) と比較して有意 ( $p < 0.01$ ) に少なく (Figure 3A)、 $100 (\times 10^3/\text{ml})$  を越える分布では逆に VNTR12 が他の型に比べて高い割合を示した (Figure 3B: Figure 3A の  $100 (\times 10^3/\text{ml})$  を越える SCC 分布を拡大して示す)。この差が上記の平均 SCC と平均 LS の差として現れたものと考えられた。

解析に使用した SCC データは平成元年 1 月から平

Table 3 Mean of SCC and LS in milk each of the MUC1-VNTR types.

VNTR Type	No. of cows	No. of Data	SCC Mean <sup>a)</sup>	LS Mean
9	46	5222	$84.77^a)$	$1.53^a)$
12	35	4004	$144.94^b)$	$2.02^b)$
13	22	2522	$103.78^c)$	$1.59^a)$

\* :  $\times 10^3/\text{ml}$ , Mean values with different superscript letters were significantly different ( $p < 0.01$ ).

成 14 年 6 月までに測定されたものである。産次別の供試個体数割合は、VNTR12 で 3 産次の割合が 34.29 と VNTR9 (17.39)、VNTR13 (18.18) より高い割合であったが、いずれも 2 産次から 5 産次までで供試個体数の 80% 以上を占めていた (VNTR9 : 80.43, VNTR12 : 82.87, VNTR13 : 81.82)。3 産次以外の産次における供試個体数割合の VNTR 型間差は 0.69 から 9.62 であった。産次別の平均 SCC データ数には VNTR 型間に差はなく、産次を重ねるに従い SCC データ数も増加した。総データ数は 11,748 (合計 103 個体)、平均データ数は 1 個体当たり 114.1、{VNTR9 : 113.5 (32~252), VNTR12 : 114.4 (32~260), VNTR13 : 114.6 (42~251)}, 平均産次数は 3.91 産 {VNTR9 : 3.93 (1~8), VNTR12 : 3.80 (1~8), VNTR13 : 4.05 (2~8)} であった。VNTR 型に基づき分類された 3 群の間には、産次別個体数割合、平成元年から平成 14 年までの各年次における個体数割合と産次別割合など供試個体群構成に大きな差異は認められなかった。

乳中 MUC1 ムチン上には O 型結合と呼ばれるグループの糖鎖が結合しており、この糖鎖分子はアミノ酸のセリン、スレオニンに特異的に結合し機能性発現に大きく関わっている (HANISCH *et al.*, 1996)。本研究で決定した MUC1 遺伝子のエクソン 1 から 6 までのアミノ酸配列 (Table 4) のどの領域にこの糖鎖が結合するかを、NetOGlyc 2.0 Prediction Server (The Center for Biological Sequence Analysis, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) を用いて解析を行った。その結果、エクソン 2 の VNTR 配列が主たる糖化部位であることが強く推定された (山本, 未発表)。

MUC1 ムチンを構成する糖は MUC1 ムチン全重量の 50~80% を占め、数個から 20 個程度の糖鎖分子として VNTR 配列の特異的アミノ酸部分に結合し、3 次構造の保持に寄与していると考えられている。MUC1-VNTR の繰返し回数が異なることにより乳中 MUC1 ムチンの分子量も比例して異なってくる。それとともに、結合する糖鎖の量も相対的に変化することが考えられる。さらには VNTR の 1 繰返し単位が 20 アミノ酸と大きいこと、翻訳領域に存在する VNTR 配列については、mRNA の安定性や翻訳効率に影響を及ぼす可能性があることなどを総合的に考えると、MUC1-VNTR 多型の同定は乳中 MUC1 ムチンの機能性を解明するためにも極めて重要であると言える。

MUC1 遺伝子の多型は一次免疫能のみならず、乳脂肪率、乳タンパク質率や乳房炎感受性等との関連性についても指摘されている (HENS *et al.*, 1995)。MUC1-VNTR 配列の長さや免疫的機能性との関連を解析した報告は極めて少ないが、ヒトにおいて過敏性皮膚炎の炎症の程度が MUC1 遺伝子の長さ、つまり VNTR

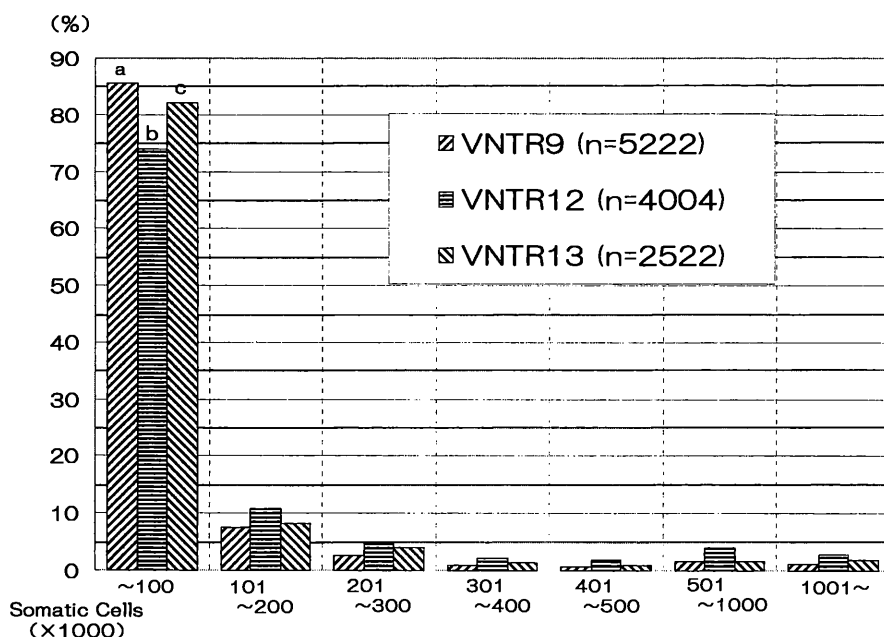


Figure 3A The distribution of somatic cell count (SCC) in milk of VNTR9, VNTR12 and VNTR13. a), b), c): Mean values with different superscript letters were significantly different ( $p < 0.01$ ).

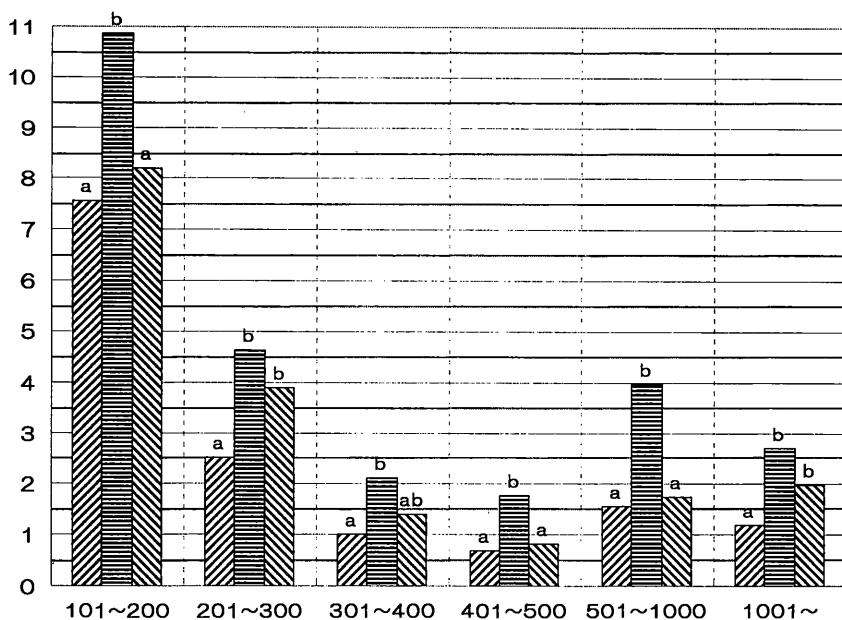


Figure 3B The distribution of somatic cell count (SCC) in milk of VNTR9, VNTR12 and VNTR13. a), b), ab): Mean values with different superscript letters were significantly different ( $p < 0.01$ ).

配列の繰返し回数と関連性があるとの報告がある (ANDO *et al.*, 1998).

本研究における MUC1-VNTR と乳中 MUC1 ムチン機能との関連性についての解析は、北農研牛群で確認された3つのVNTR型について、SCCから間接的に機能性推定を行ったものであり直接的に評価したものではない。MUC1-VNTR型間の平均SCCの比較で認められた有意な差が、乳中MUC1ムチンのタンパク質の大きさに起因する機能の差なのか、あるいは3次構造が異なるために現れた機能の差なのかは不明であ

る。また、生体の免疫的防御能に関わる様々な因子によってもSCCは変動する。しかしながら、MUC1-VNTR配列が機能性発現に極めて重要な領域であることを考慮すると、本結果は乳中MUC1ムチンの機能とMUC1-VNTR多型との間に関連性があることを示唆するものであると考える。今後、ウシにおいてMUC1-VNTR多型がどの程度あるのか、またウシ品種間での差異の有無等を明らかにするとともに、SCCを用いた乳中MUC1ムチン機能評価法の有効性について継続して検討を行う必要がある。

Table 4 Amino acid sequences of MUC1 gene exon 1 to 6.

Exon No.	Amino acid sequence
1	MTPDIQAPFL SLLLLFPVLT
2	VANVPTLTTS DSINPRRTTP VSTTQSSPTS SPTKETSWSW TTTLLTASSP APSPAASPGH DGASTPTSSP APSPAASPGH NGTSSPTGSP AP <i>SPAASPGHDG ASTPTSSPAP (VNTR region)</i> SDTSSMTTRS MSSSMV TSAH KGTSSPATMT PVS KGT PSSV PSSETAP TAA SHIHRTAASS PSIALSTSSN PKTSQQLSVR VSLYFLSFRI TNLQFNSSLE NPQTSYYQEL QRSIWGL
3	ILQIYKQGEF LGLSEIKFR
4	PGSVVVELTL AFREGTTAEW VKAQFSQLEA HAASYNLTIS GVSGE
5	VYSAPFGSSA QAGSGVPGWG IALLVLCVL VALAIHYLIA L
6	VVCQCGRKKC EQLDVFP TLD TYHPMSPYEE

## 文 献

- AMILLS, M., O. FRANCINO, M. JANSÁ and A. SANCHEZ (1997) Isolation of genomic DNA from milk samples by using Chelex resin. *J. Dairy Res.*, **64**: 231-238.
- ANDO, I., A. KUKITA, G. SOMA and H. HINO (1998) A large number of tandem repeats in the polymorphic epithelial mucin gene is associated with severe acne. *J. Dermatol.*, **25**(3): 150-152.
- BRADLEY, A. (2002) Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.*, **164**(2): 116.
- EBINA, T., M. OHTA, Y. KANAMARU, Y. YAMAMOTO-Osumi and K. BAKA (1992) Passive immunizations of suckling mice and infants with bovine colostrum containing antibodies to human rotavirus. *J. Med. Virol.*, **38**(2): 117-123.
- FUKUDA, M. (2002) Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1573**(3): 394-405.
- GENDLER, S. J., J. M. BURCHELL, T. DUHIG, D. LAMPORT, R. WHITE, M. PARKER and J. TAYLOR-PAPADIMITRIOU (1987) Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**(17): 6060-6064.
- GENDLER, S. J., J. TAYLOR-PAPADIMITRIOU, T. DUHIG, J. ROTHBARD and J. BURCHELL (1988) A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. *J. Biol. Chem.*, **263**(26): 12820-12823.
- GENDLER, S. J., C. A. LANCASTER, J. TAYLOR-PAPADIMITRIOU, T. DUHIG, N. PEAT, J. BURCHELL, L. PEMBERTON, E. N. LALANI and D. WILSON (1990) Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J. Biol. Chem.*, **265**(25): 15286-15293.
- GENDLER, S. J. (2001) MUC1, the renaissance molecule. *Mammary Gland Biol. Neoplasia*, **6**(3): 339-353.
- HANISCH, F. G., T. R. STADIE, F. DEUTZMANN and J. PETER-KATALINIC (1996) MUC1 glycoforms in breast cancer cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation. *Eur. J. Biochem.*, **236**(1): 318-327.
- HENS, J. R., G. W. ROGERS, M. L. HUOTT and S. PATTON (1995) Associations of the epithelial mucin, PAS-1, with yield, health, and reproductive traits in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **78**(11): 2473-2480.
- HEWETSON, A. and B. S. CHILTON (1997) Molecular cloning and hormone-dependent expression of rabbit Mucl in the cervix and uterus. *Biol. Reprod.*, **57**(2): 468-477.
- HUOTT, M. L., R. V. JOSEPHSON, J. R. HENS, G. W. ROGERS and S. PATTON (1995) Polymorphic forms of the epithelial mucin, PAS-I (MUC1), in milk of Holstein cows (*Bos taurus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **111B**(4): 559-565.
- LANCASTER, C. A., N. PEAT, T. DUHIG, D. WILSON, J. TAYLOR-PAPADIMITRIOU and S. J. GENDLER (1990) Structure and expression of the human polymorphic epithelial mucin gene: an expressed VNTR unit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**(3): 1019-1029.
- MATHER, I. H. (2000) A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *J. Dairy Sci.*, **83**(2): 203-247.
- NEWMAN, J. (1995) How breast milk protects newborn. *Scientific Am.*, **Dec**: 58-61.
- PALLESEN, L. T., M. H. ANDERSEN, R. L. NIELSEN, L. BERGLUND, T. E. PETERSEN, L. K. RASMUSSEN and J. T. RASMUSSEN (2001) Purification of MUC1 from bovine milk-fat globules and characterization of a corresponding full-length cDNA clone. *J. Dairy Sci.*, **84**(12): 2591-2598.

- PATTON, S. and L. D. MULLER (1992) Genetic polymorphism of the epithelial mucin, PAS-I, in milk samples from the major dairy breeds. *J. Dairy Sci.*, **75**(3): 863-867.
- PETERSON, J. A., C. D. SCALLAN, R. L. CERIANI and M. HAMOSH (2001) Structural and functional aspects of three major glycoproteins of the human milk fat globule membrane. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **501**: 179-187.
- SPICER, A. P., G. PARRY, S. PATTON and S. J. GENDLER (1991) Molecular cloning and analysis of the mouse homologue of the tumor-associated mucin, MUC1, reveals conservation of potential O-glycosylation sites, transmembrane, and cytoplasmic domains and a loss of minisatellite-like polymorphism. *J. Biol. Chem.*, **266**(23): 15099-15109.
- SPICER, A. P., T. DUHIG, B. S. CHILTON and S. J. GENDLER (1995) Analysis of mammalian MUC1 genes reveals potential functionally important domains. *Mamm. Genome*, **6**(12): 885-888.
- YAMAMOTO, N. (2002A) *Bos taurus* MUC1/VNTR1 gene for mucin, partial cds. Accession number AB084273, DDBJ/EMBL/GenBank.
- YAMAMOTO, N. (2002B) *Bos taurus* MUC1/VNTR2 gene for mucin, partial cds. Accession number AB084274, DDBJ/EMBL/GenBank.
- YAMAMOTO, N. (2002C) *Bos taurus* MUC1/VNTR3 gene for mucin, partial cds. Accession number AB084275, DDBJ/EMBL/GenBank.
- YOLKEN, R. H., J. A. PETERSON, S. L. VONDERFECHT, E. T. FOUTS, K. MIDTHUN and D. S. NEWBURG (1992) Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. *J. Clin. Invest.*, **90**(5): 1984-1991.

