TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

# クロマグロにおける全ゲノム情報を用いた連鎖地図の作成と優良形質のQTL解析に関する研究



| メタデータ | 言語: Japanese |
| --- | --- |
| | 出版者: |
| | 公開日: 2016-07-04 |
| | キーワード (Ja): |
| | キーワード (En): |
| | 作成者: 内野, 翼 |
| | メールアドレス: |
| | 所属: |
| URL | https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1287 |

博士学位論文

# クロマグロにおける全ゲノム情報を用いた連鎖地図の作成と優良形質の QTL 解析に関する研究

平成 27 年度

（2016 年 3 月）

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

応用生命科学専攻

内野　翼

博士学位論文

# クロマグロにおける全ゲノム情報を用いた連鎖地図の作成と優良形質の QTL 解析に関する研究

平成 27 年度

（2016 年 3 月）

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

応用生命科学専攻

内野　翼

目次

第 1 章　緒言……5

第 2 章　クロマグロ連鎖地図の作成と比較ゲノム解析
2 - 1　緒言 …… 26
2 - 2　材料と方法 …… 30
2 - 3　結果 …… 70
2 - 4　考察 ……147

第 3 章　成長に関する QTL 解析
3 - 1　緒言 ……153
3 - 2　材料と方法 ……157
3 - 3　結果 ……161
3 - 4　考察 ……187

第 4 章　イリドウイルス耐性に関する QTL 解析
4 - 1　緒言 ……190
4 - 2　材料と方法 ……196
4 - 3　結果 ……214
4 - 4　考察 ……239

第 5 章　総括……250

参考文献……262

謝辞……294

# 第 1 章　緒言

本研究は、太平洋クロマグロ（Pacific Bluefin Tuna, *Thunnus orientalis*）（図 1-1）を研究対象魚種とする。太平洋クロマグロは分類学上、脊椎動物門-脊椎動物亜門-顎口上綱-硬骨魚綱-条鰭亜綱-棘鰭上目-スズキ目-サバ亜目-サバ科-サバ亜科-マグロ族-マグロ属に属する。太平洋クロマグロは太平洋に生息し、その分布は広く、北は北海道北端の沖合からバンクーバー島沖、まれにはアラスカ湾にまで分布する。主な産卵場は、台湾～南西諸島近海と、日本海南西部とされている[1]。太平洋を横断して米国沿岸域に達し、数年後にまた戻ってくる回遊魚である[2]。太平洋クロマグロは、以前は大西洋や地中海に生息するタイセイヨウクロマグロ（Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*）の地理的亜種とされてきたが、現在では分子遺伝学的研究等により両種は別種であるとされている[3]。そのため、本博士論文では単にクロマグロと表記した場合、太平洋クロマグロのことを意味することとする。マグロ属は太平洋クロマグロと大西洋クロマグロの他、ミナミマグロ（Southern Bluefin Tuna, *Thunnus maccoyii*）、メバチ（Bigeye Tuna, *Thunnus obesus*）、ビンナガ（Albacore Tuna, *Thunnus alalunga*）、キハダ（Yellowfin Tuna, *Thunnus albacares*）の 8 種類からなる[4]。太平洋クロマグロは市場価値が高いマグロ属の魚の中でも最高級品とされており、「本鮪」とも呼ばれ、主に寿司や刺身用の高級食材として利用されている。また、0 ～1 歳の若齢魚は「めじ」または「よこわ」と呼ばれ、主に刺身用食

図1- 1　太平洋クロマグロ（*Thunnus orientalis*）
左から順に大型魚、尾叉長60 cm、20 cm の太平洋クロマグロの写真を示す[5]。

材として比較的安価に流通している。外国による漁獲の多くは日本向けに輸出されている[5]。最近では健康志向および寿司ブームのために、韓国、中国をはじめ欧米でも消費が増加し、日本の消費量は 8 割を切っているが、依然として多い[6]。

太平洋クロマグロは、回遊を行う上で生涯を通して持続的な高速遊泳などの特性を有している。この持続的な遊泳は、太平洋における長距離遊泳を可能にするものである。体長 2 m 程度の太平洋クロマグロは、時速 7 ～ 29 km 程度で一生泳ぎ続けているとされる。一方、爆発的遊泳はせいぜい数秒間、それも 30 秒間隔程度で 10 分間程度しかもたないとされるが、時速で表すと 86 ～ 108 km と推定されている[6]。太平洋クロマグロや近縁種の生理学的な特徴の一つとして、体の真ん中、脊椎骨近くまで血合筋（深部血合筋または真正血合筋）入り込み、発達している点が挙げられる。筋肉は含有する色素タンパク質（ミオグロビン）の色により、遅収縮性の赤筋と速収縮性の白筋に分類され、血合筋は赤筋に相当する。赤筋は収縮が遅いものの持続力が多いことから[6]、持続的遊泳に向いているといえる。また、高い代謝速度や大きな体サイズ、体型（水の抵抗を受けにくい流線型）や遊泳方法（尾鰭を高速で振動させて泳ぐ）なども、優れた遊泳能力に関わるものと考えられている[6]。さらに、クロマグロの成長速度は非常に早く、孵化後 1 年以内に全長 50 cm 程度まで成長する。最大体長と体重はそれぞれ 2.5 m と 300 kg に及ぶ。

太平洋クロマグロの資源管理は、全海域ごとに設置されている 5 つの地域漁業管理機関（Regional Fisheries Management Organization, RFMO）のうち、中西部太平洋

マグロ類委員会（Western and Central Pacific Fisheries Commission, WCPFC）と全米熱帯マグロ類委員会（Inter American Tropical Tuna Commission, IATTC）の 2 つの機関が主に資源管理を行っている。また、太平洋クロマグロは WCPFC と IATTC の両機関にまたがって分布回遊している関係上、北太平洋におけるまぐろ類およびまぐろ類似種に関する国際科学委員会（ISC）が WCPFC および IATTC に対して、資源に対する資源管理に関する勧告を行っている[1]。最近の動向として、ISC は 2012 年の親魚資源量（約 2.6 万トン）は、歴史的最低水準（約 1.9 万トン）まで減少しており、最近年（2012 年）の加入も極めて低水準であるとの資源評価がなされた。この結果を受けて 2014 年に WCPFC の小委員会は、2015 年からの 10 年間での親魚資源量の回復、小型魚の漁獲量の半減、大型魚の漁獲量を増加させないための措置などの保存管理措置案を提出し、採択された。また、同年の IATTC の会合においても、商業漁業の漁獲上限を設けるなどの措置が採択された[5]。このように、近年のクロマグロの天然資源量は減少してきている。過去 60 年間の漁獲量の推移から見ても、近年の漁獲量減少の様子が見て取れる（図 1-2）。

クロマグロ養殖は、現在、天然（日本近海）から漁獲されたヨコワの時期の稚魚を、網生簀へ収容し、出荷サイズまで畜養する方法を一般的に用いている。このように天然種苗を用いた養殖方法の場合、稚魚の採捕量に養殖生産量が依存していることや、近年の資源量の減少により国際的な漁獲規制に漁獲量を規制される可能性があることから[7]、安定供給が困難であり、いずれ種苗不足となることが予想さ

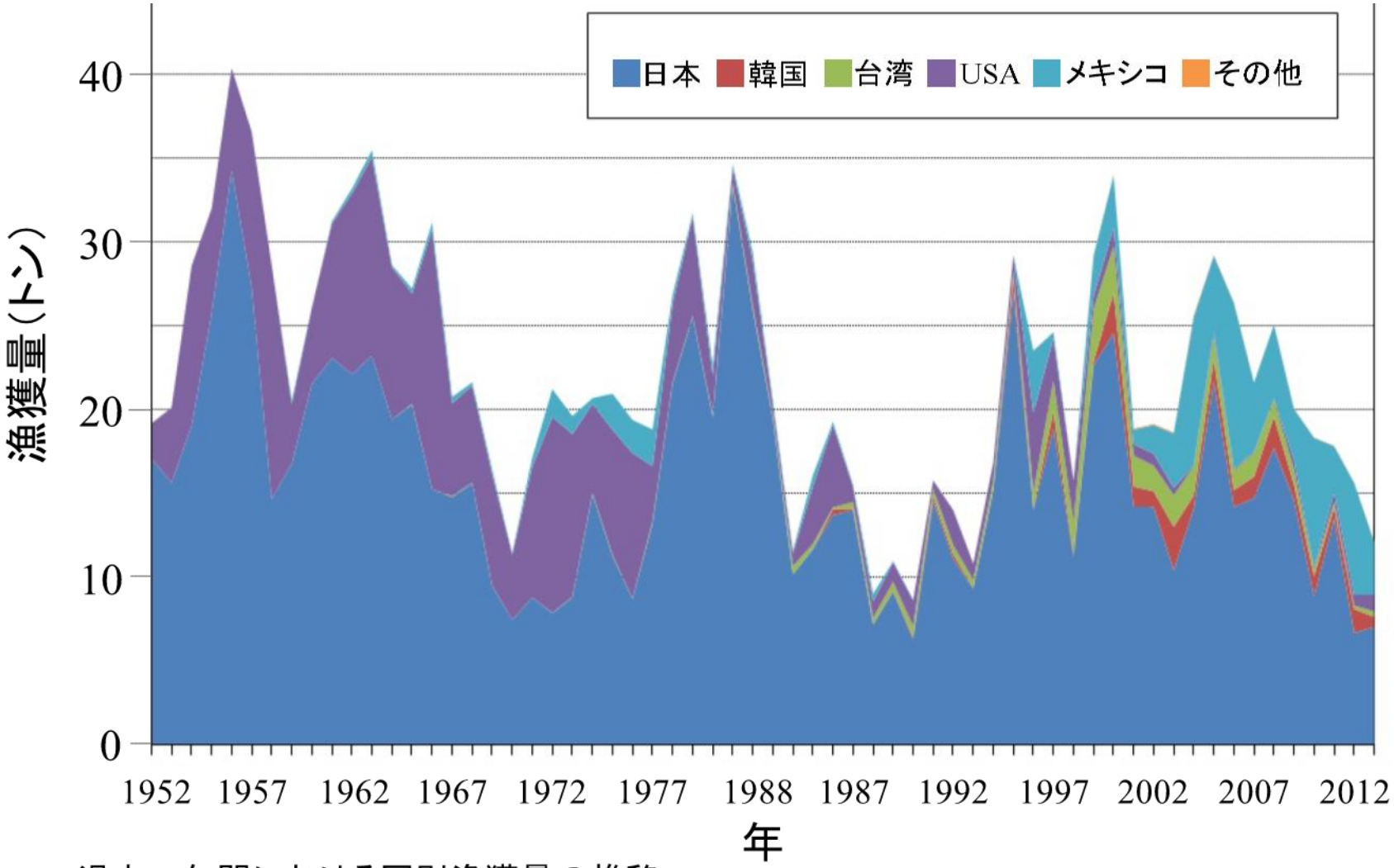



図1–2　過去60年間における国別漁獲量の推移
1952年から2012年までの太平洋クロマグロの国別漁獲量を表す。グラフの右上に、各国の色分けを示す。

れる。したがって、現在主流となっている天然種苗に依存する養殖方法は、持続困難であると考えられる。

太平洋クロマグロは養殖化が進んでいる魚種の１つであり、国産養殖の供給が増加している。2002 年に近畿大学で、世界で初めて人工種苗による養殖施設内での生活環の完結、すなわち完全養殖が達成された[8]。完全養殖達成後も、継代飼育が進んでいる。完全養殖とは、捕獲されたヨコワが親魚となって産卵し、産卵された子供が成長して、再び産卵するまでを指す（図 1-3）。また、2014 年には独立行政法人（現・国立研究開発法人）水産総合研究センターにおいて、大型陸上水槽でのクロマグロ産卵の成功が報告された。陸上水槽での採卵は海面養殖の場合と異なり、飼育環境条件（水温及び日長）を制御出来るため、将来的にはより安定した採卵が可能になると期待される。この完全養殖や陸上水槽での産卵の例に見られるように、クロマグロの飼育技術は向上しつつある。しかしながら、クロマグロの養殖では未だに様々な飼育技術上の問題を抱えている[7]。成長段階の初期段階では、孵化後 10 日齢（全長約 7 mm : 屈曲期）くらいまでに、浮上死や沈降死などによる初期減耗が起こり、死亡率は 60 から 90 %程度とされる。初期減耗後の 30 日齢くらいまでには（全長 30 ～40 mm : 稚魚中期）、激しい共喰いが起こり、数日間のうちに死亡率が 50%に及ぶ場合もある[7]。その後 1 ヶ月余りにわたって、水槽の壁面への衝突による死亡や、沖出し後の大量へい死が多発する[9]。またこの時期には、イリドウイルス病などのウイルス病も蔓延するケースがある[10]。

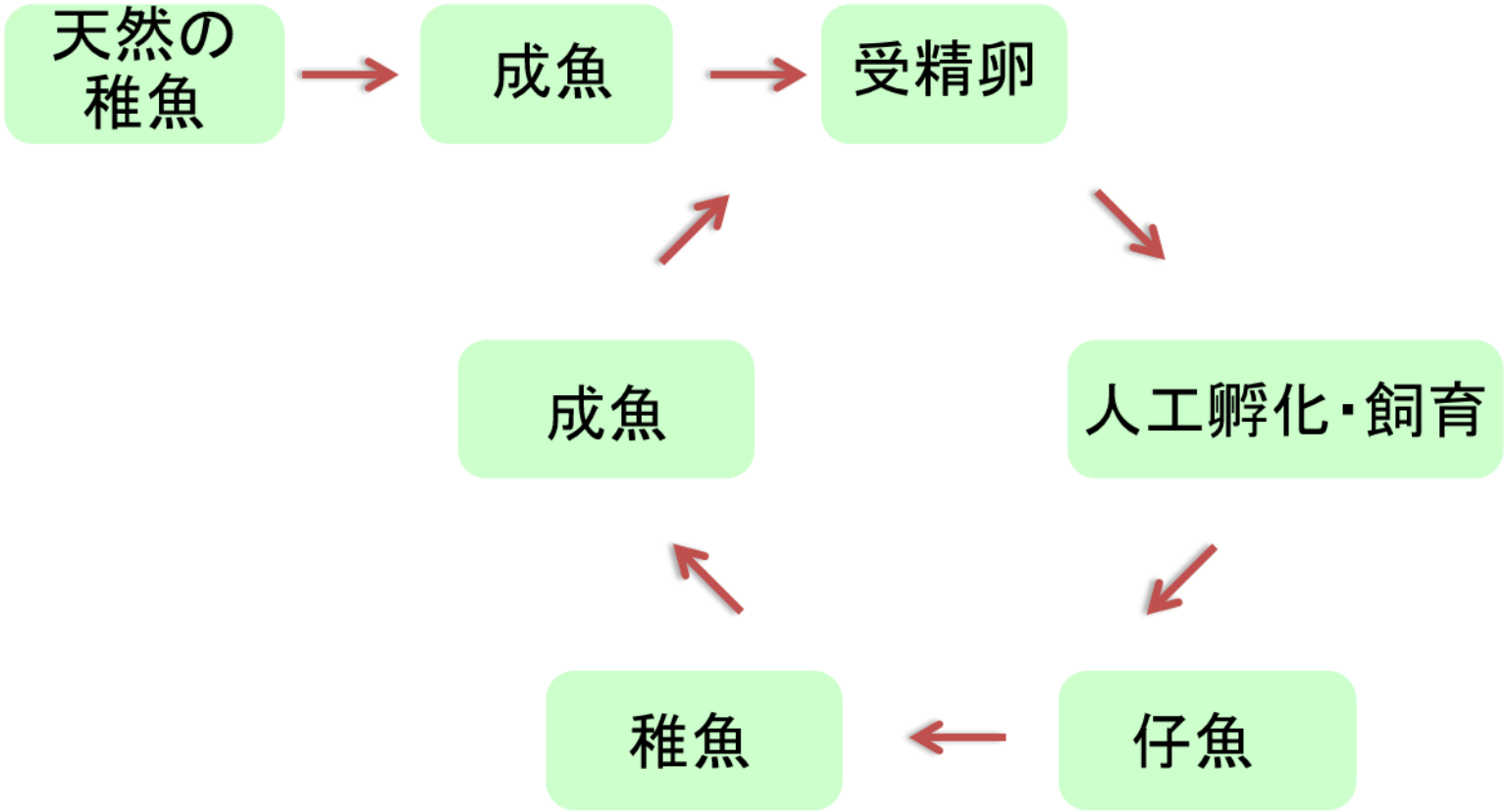



図1–3　完全養殖の流れ
太平洋クロマグロの完全養殖の達成までの流れを示す。まず、天然の海域で採捕された太平洋クロマグロの稚魚を成魚まで育成し、成熟後の産卵により受精卵を得る。得られた人工孵化し、仔魚、稚魚、未成魚（図では省略）、そして成魚に至るまで飼育する。成魚が成熟し産卵すると、人為環境下で生活史が一巡することになり、完全養殖の達成となる。

このように、人工種苗を用いてクロマグロ養殖を行う上では問題点が多い。しかしながら、遺伝的に優れた特性を保持する親魚を選抜し、種苗生産を行うことにより、上記の問題を解決出来る可能性がある。品種改良技術は、これまで植物栽培や畜産で多くの例がある。水産物においても遺伝的改良のための選抜育種は、ノルウェーにおける大西洋サケの育種など[11]、長い年月をかけて 60 種におよぶ魚類や甲殻類で行われてきた。しかしながら、水産海産魚の養殖魚の歴史は比較的浅く、ましてクロマグロのような難養殖魚の場合、表現型の明らかな系統はほぼ皆無である[12]。育種による人工種苗の品質向上には、安定的かつ効率的に種苗を生産できる形質をもつ親魚の確保が欠かせない。そのため、まず天然集団の中から優良形質を持つ親魚を選抜することからスタートする必要がある。天然集団は遺伝的な多様性に富み、表現型にばらつきがあることが多い。そのため天然集団の特定の個体は、優良形質を持っている可能性を秘めている。

人工種苗を遺伝的に改良するためには、優良遺伝形質と連鎖する遺伝マーカーを用いたマーカーアシスト選抜（Marker Assisted Selection: MAS）育種法が有用であると考えられている[13,14]。MAS 育種法を実践するためには、まず優良遺伝形質を司る遺伝子座と連鎖する遺伝マーカーを開発し、それを親魚の選抜に利用する必要がある。MAS 育種法はこれまで我が研究室においても、耐病性ヒラメの作出[15]や冷水病耐性アユの作出[16]などで行われており、共に耐病性形質に関わる遺伝子座に連鎖した遺伝マーカーが QTL 解析（量的形質に関わる遺伝子座を探索する遺

伝学的解析手法。後述。）により見つかっている。しかしながら、太平洋クロマグロにおいては、未だそのような優良形質に連鎖した遺伝マーカー開発の報告は存在しない。例外的に性決定に関しては、雄特異的な AFLP 断片の存在が報告されている[17,18]。

目的の優良形質に関連した遺伝マーカー開発の報告がない理由の一つとして、クロマグロの連鎖地図が作成されていないことが挙げられる。仮に多くの遺伝マーカーが開発されたとしても、連鎖地図が存在しなければその染色体上における位置（座位）が不明であるので、QTL 解析により効率的に遺伝子座を探索することは難しい。そのため、まずは遺伝マーカーを多数配置した太平洋クロマグロの連鎖地図を作成する必要がある。連鎖地図に十分なマーカーが配置されている場合、連鎖群の数は半数染色体数に一致するものとなる。細胞学的手法により、マグロ属は 24 対の半数染色体を有することが報告されている[19,20]。そのため、クロマグロの連鎖群は最終的に 24 本の染色体に対応する本数にまとめられるものと予想される。

連鎖地図に配置する遺伝マーカーはその開発に際し、ゲノム DNA の塩基配列を利用することが多い。2000 年代後半から普及された次世代シークエンサーの発展により、近年いく種もの硬骨魚類の全ゲノム配列解読が次々と報告されている。公共データベースには、ゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）[21]、メダカ（*Oryzias latipes*）[22]などのモデル魚種のほか、トラフグ（*Takifugu rubripes*）[23]、ミドリフグ

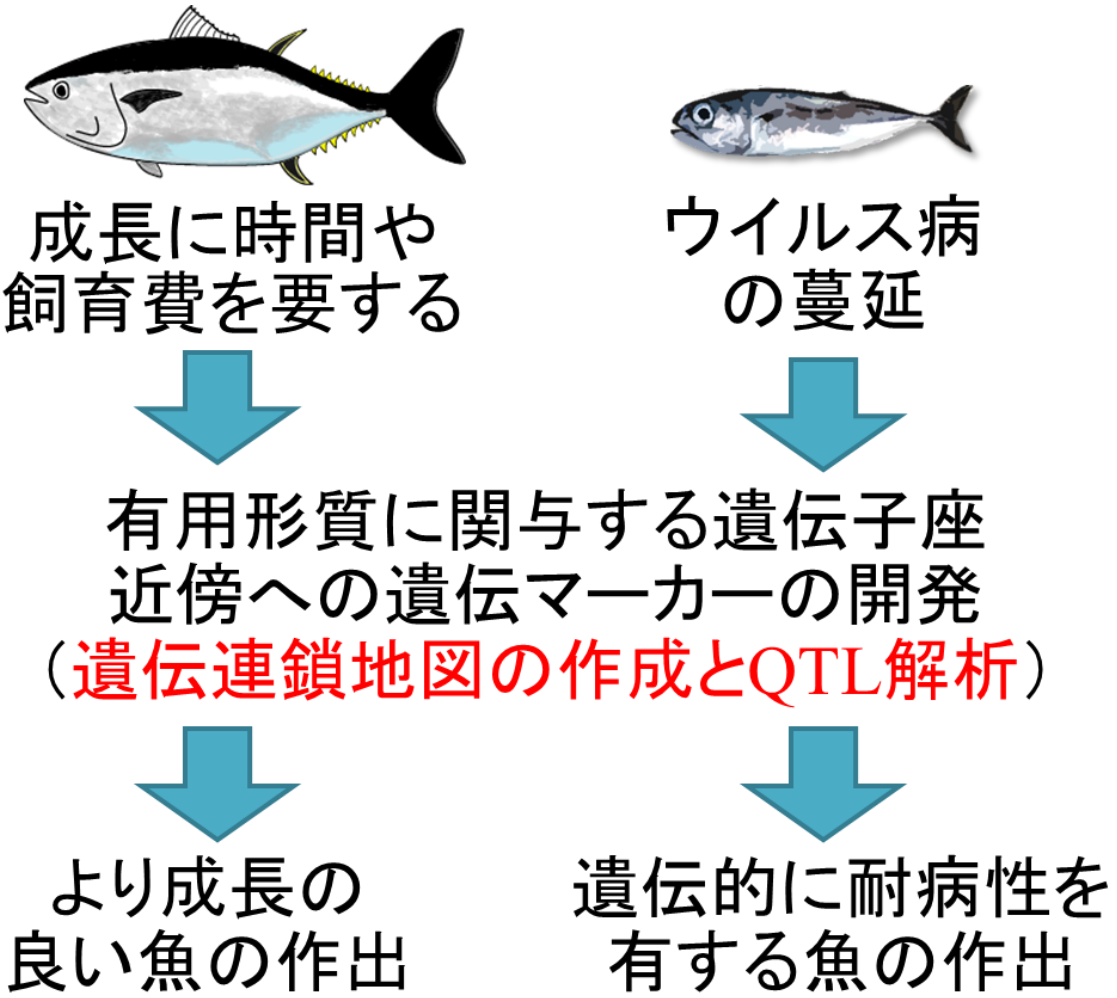



図1-4　太平洋クロマグロ養殖における問題点と解決法
太平洋クロマグロの養殖では、孵化後成魚まで成長するのに時間や飼育費用（餌など）を要することや、イリドウイルス症などのウイルス病の蔓延が問題となる。高成長や耐病性といった有用形質に関わる遺伝子座を見出し、その近傍に遺伝マーカーを開発出来れば、親魚選抜に利用することでより成長の良い魚や耐病性魚を作出できる。しかしながら、そのような遺伝マーカーの開発には、先んじて遺伝連鎖地図の作成とQTL解析が必要となる（赤字）。

（*Tetraodon nigroviridis*）[24]、イトヨ（*Gasterosteus aculeatus*）[25]、 シタビラメ（*Cynoglossus semilaevis*）[26]、フウセイ（*Larimichthys crocea*）[27]、大西洋マダラ（*Gadus morhua*）[28]、ニジマス（*Oncorhynchus mykiss*）[29]、コイ（*Cyprinus carpio*）[30]、ソウギョ（*Ctenopharyngodon idellus*）[31]、プラティ（*Xiphophorus maculatus*）[32]、ヨーロッパシーバス（*Dicentrachus labrax*）[33]、そして本研究の共同研究機関である国立研究開発法人　水産総合研究センター 中央水産研究所 水産遺伝子解析センターによって、太平洋クロマグロ[34]の全ゲノム配列が登録されている。

太平洋クロマグロの概要ゲノム配列は、Roche 454 FLX Titanium と Illumina GaIIx の 2 台の次世代シークエンサーを用いて解読された（図 1-2）。クロマグロゲノム概要解読の統計量に関しては、表 1-2 にまとめた。全ゲノムショットガンシークエンシングとアセンブリにより、192,169 本のコンティグ（Contig, >500 bp）と 16,802 本のスキャフォルド（Scaffold, >2 kb）が得られた。アセンブリの繋がり具合の指標となる N50 長は、コンティグで 7,588 bp、スキャフォルドで 136,950 bp となっている。クロマグロのコンティグ総数は 192,169 本、スキャフォルド総数は 16,802 本、総延長は 740.4 Mbp であり、推定ゲノムサイズ 800 Mbp の 92.6%に相当する。スキャフォルド配列とは、複数のコンティグ配列をペアエンド / メイトペアシークエンシング（配列断片の両末端をシークエンスする手法）の配列データを利用して整列化したものであり、コンティグ間は予測されたインサートサイズの N（ギャップ）で連結されている[35]。全ゲノム解読データのまとまり具合を示す指標とし

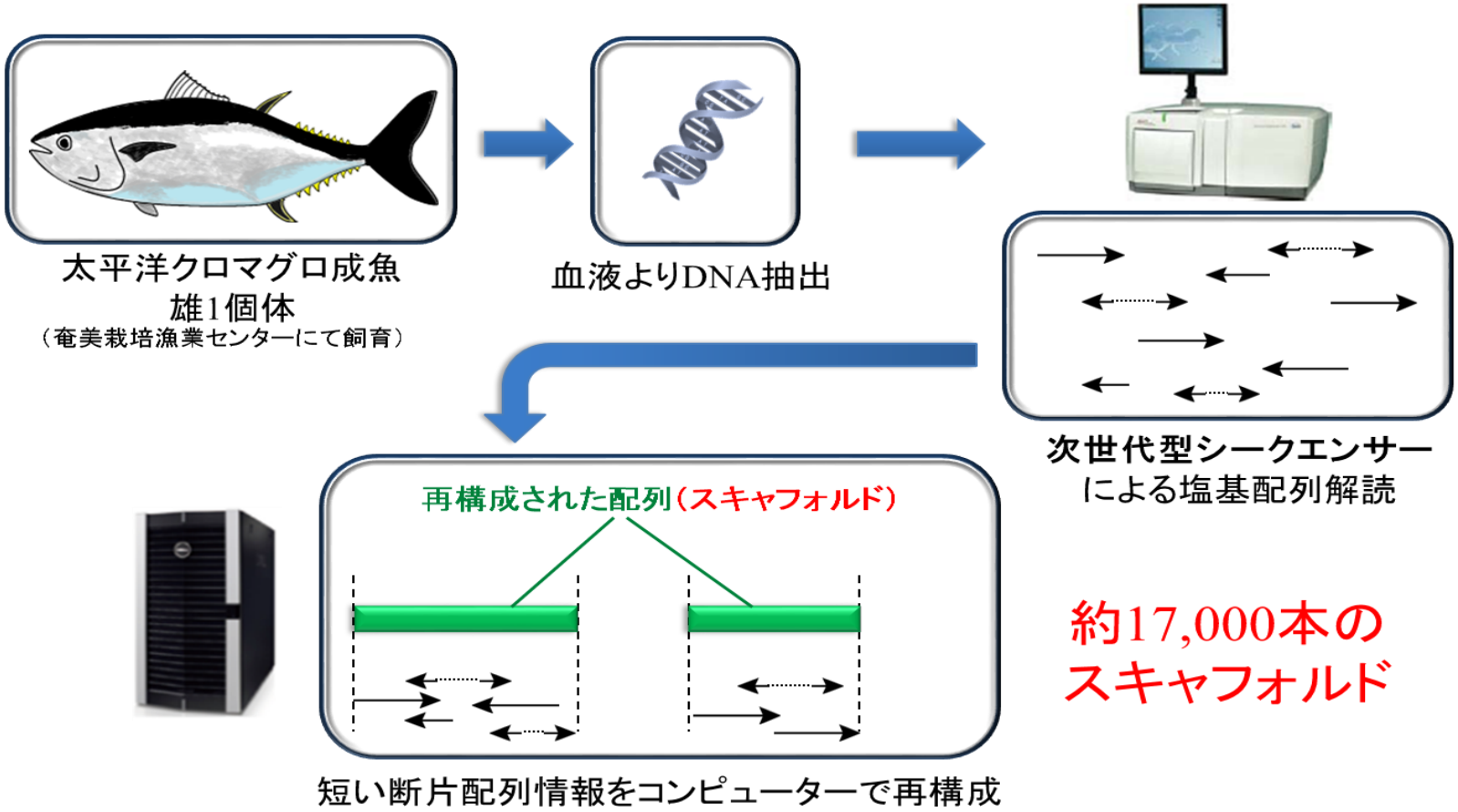



図1-5　クロマグロ全ゲノム解読
クロマグロ全ゲノム解読の流れを示す。この解析では太平洋クロマグロの成魚雄1個体をサンプルとし、血液よりDNAが抽出された。抽出したDNAをもとに、次世代型シークエンサーを用いた塩基配列解読によって短い配列情報が大量に出力さた。配列情報はコンピュータ上で再構成されることにより、スキャフォルドとよばれる状態へとまとめられた。

| | | |
|---|---|---|
| スキャフォールド | 数 | 16,802本<br>（1本は完全長ミトコンドリア） |
| | 全長 | 740.3 Mbp |
| | 平均長 | 44,064 bp |
| | 最大 | 1,021,118 bp |
| | N50値 | 136,950 bp |
| 被覆度 | 454 | 11.9 倍 |
| | イルミナ | 43 倍 |
| 予測遺伝子数 | | 26,433 個 |

表１-１　クロマグロゲノム解読の統計量

て N50 があり、これまでのスキャフォルドの N50 は 137 kbp（136,950 bp）である。N50 は、スキャフォルド配列またはコンティグ配列をサイズの大きい順にその塩基数を合計し、ゲノムサイズの 50 %に達したときのスキャフォルド配列またはコンティグ配列のサイズで示される[36]。先に述べたクロマグロの生態学的特性は、ゲノム配列にコードされている遺伝情報に基づくものと考えられる。1 つの例として、クロマグロゲノム解読によって青色光や緑色光のオプシン遺伝子について、遺伝子重複や遺伝子変換が起こった痕跡が見つかり、海中の微妙な青色から緑色の認識に関与するものと考えられている。そのため、このクロマグロゲノム情報は、本研究の連鎖地図作成に限らず、様々なクロマグロの生物学的研究の基盤となるものである。しかし、概要配列（ドラフト配列）と呼ばれるように、未解読部分を多く含み、また未だに数多くの配列断片から構成されることは間違いない。今後、配列データを補完することにより、より完全なゲノム配列になることが望まれる。現在、クロマグロゲノム情報のアップデートが進行中である（国立研究開発法人　水産総合研究センター　中央水産研究所　中村洋路博士　私信）。

本研究では、このように魚類のゲノム配列決定が次々に進んでいる現況の中で、連鎖地図作成にクロマグロゲノム情報を活用することが遺伝マーカーの開発の上で重要と考えた。全ゲノム解析が行われた後に連鎖地図を作成（図 1-6）する研究方法は、トラフグ[37, 38]などで行われている。本種のゲノム配列は断片化していることから、配列断片を結び付ける上でも連鎖地図を構築することが重要である。

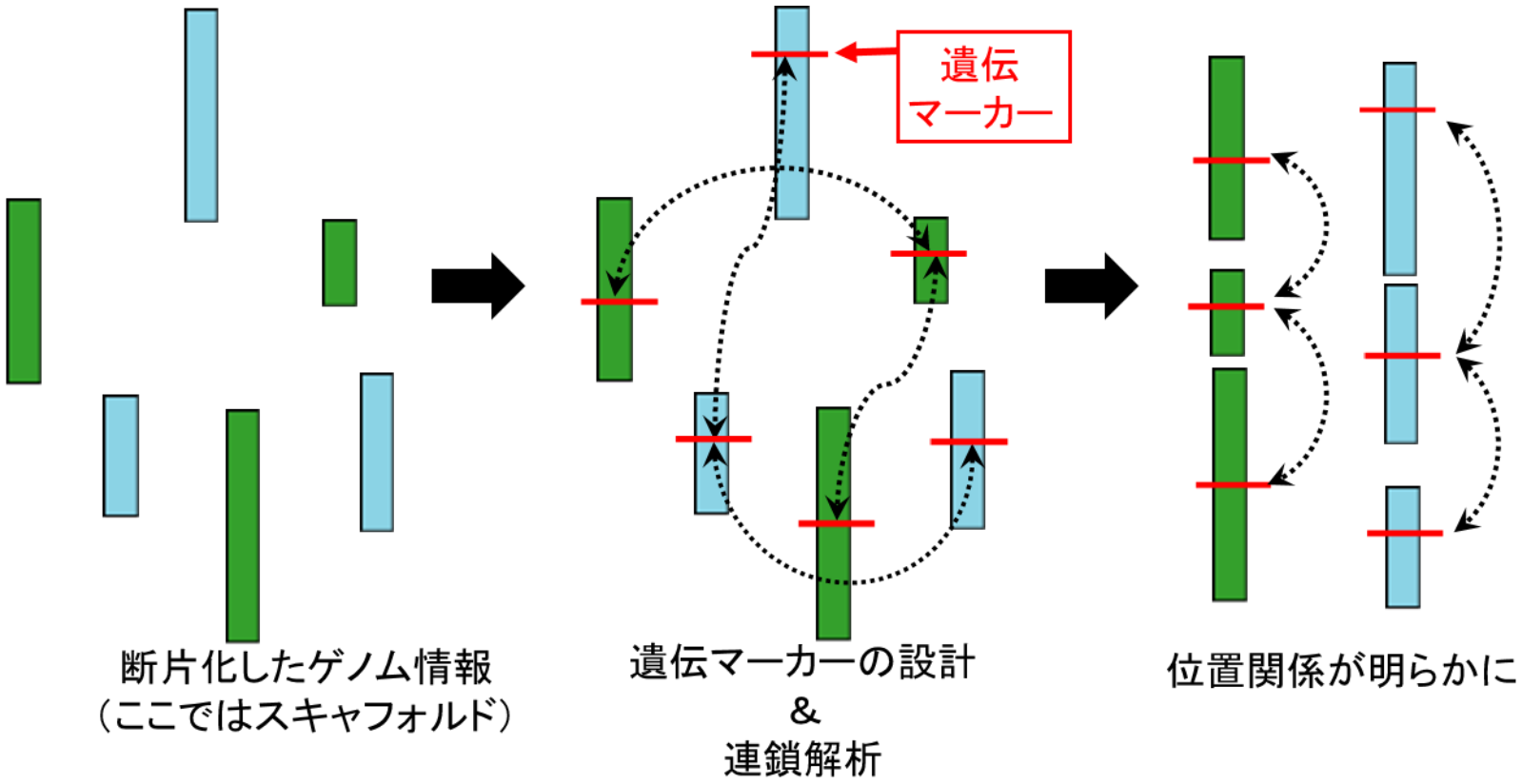



図1 - 6 クロマグロゲノム解読情報を利用した連鎖地図の作成
クロマグロゲノムを構成する各スキャフォルド上に遺伝マーカーを開発し、連鎖解析を行うことによって、それぞれの位置関係を明らかにすることが可能となる。

連鎖地図は配列断片を結び合わせるために、魚類[37,38]のほか植物 [39–42]、家畜[43]等で利用されている。連鎖地図は、スキャフォルド上に遺伝マーカーを開発し、マーカー同士の連鎖関係を調べることにより行う。図 1 - 6 は、断片化したゲノム情報（ここではスキャフォルド）に対して遺伝マーカーを開発し、連鎖解析と呼ばれる手法により位置関係を明らかにする過程（イメージ図）を示している。連鎖地図は、耐病性や高成長などの優良遺伝形質に関与する遺伝子座の探索に役に立つものである。仮にその後の QTL 解析により、優良形質に関連した遺伝マーカーが発見された場合、遺伝マーカーを開発したスキャフォルド内に含まれる遺伝子情報や遺伝子発現調節領域、non-coding 領域などが既に情報として得られているため、優良遺伝子の探索といった詳細解析も進みやすいと考えられる。

優良形質に関わる遺伝子座を識別可能な遺伝マーカーの探索では、従来古典的選抜により、成長や耐病性などの形質の異なる系統を見い出し、2 系統の交配からバッククロスや F2 を作出して解析集団とする（図 1-7）。相同染色体間の組み換えを利用した遺伝学的解析により、量的形質に関わる染色体上の領域、QTL（Quantitative Trait Loci）が探索される。しかし、クロマグロは天然集団であるために QTL 解析を行う上では、いくつかの問題が生じ得る。例えば遺伝的に優れた系統などが存在しないこと、世代時間が 5 年程度と比較的長いこと、自然交配である（人工交配が難しい）ことが挙げられる。このような問題点に対してはそれぞれ、形質の測定法を確立し、家系ごとの形質情報を蓄積する、F1 の世代を用いた遺伝学的解析を行

1. 古典的選抜により
形質の異なる2系統

2. 戻し交配、または
F2世代等を作出

3. 遺伝学的解析
（連鎖地図作成, QTL解析）

Quantitative Trait Loci
(QTL)

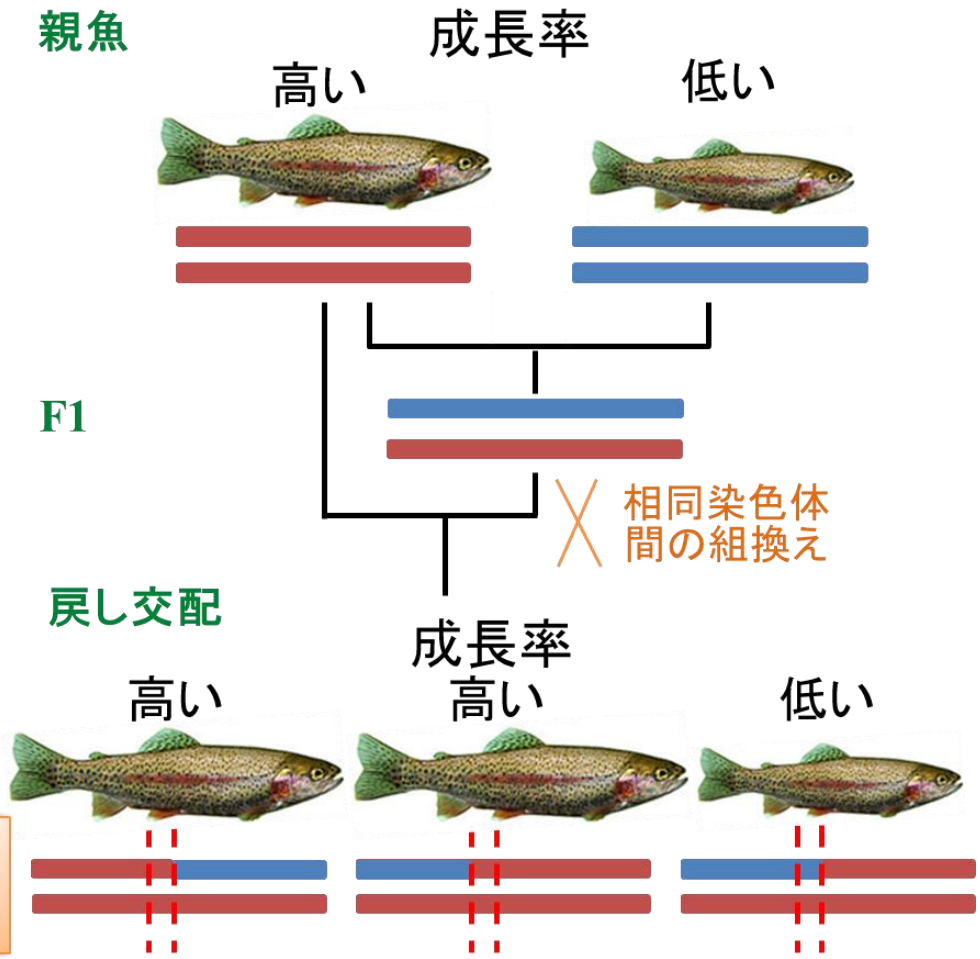



図1 - 7 従来のQTLマッピングの概要図
従来のQTL解析では、まず古典的選抜により形質の異なる2系統を得る（図では成長率の異なる2系統のニジマスの例）。解析集団として、戻し交配またはF2世代等を作出し、遺伝学的解析を行うことにより量的形質遺伝子座（Quantitative Trait Loci, QTL. 図では赤い点線で示す領域.）を探索する。

う、親子鑑定により同胞を抽出するなどによって対処できると考えられる。形質に対して未選抜ではあるが、天然集団は遺伝的な多様性に富むというメリットを有している。この図 1-8 のように、親魚の染色体はヘテロになっていることが多く、実際にはよりモザイク状になっているものと考えられる。そのため、F1 の集団を解析した際に親魚の染色体座間で形質への寄与率に違いが生じ、QTL を探索することができる。よって、この QTL 解析により、形質に対して重要となる親魚を見つけることが可能となる。この親魚に由来する集団を残し、それ以降継代飼育していくことによって、太平洋クロマグロにおけるマーカーアシスト選抜育種を進めることが出来るものと思われる。耐病性形質に関しても、天然集団を用い、親子鑑定と分子遺伝学的解析を組み合わせた本育種戦略は有効と考えられる（図 1-9）。クロマグロ養殖場においてウイルス病などの病気が蔓延し大量斃死が起こった際に、生き残った魚を含めたサンプルを用いて耐病性識別マーカーを開発することで、重要な親魚を残すことや次世代の親魚選抜に貢献し得る。

本博士論文研究では第 2 章において、まずクロマグロゲノム育種の基盤となる連鎖地図作成を行うことを目的とした。クロマグロは難養殖魚であるために、連鎖地図作成に必要な一対交配の家系を入手することが困難である。そのため、自然交配による受精卵から育てた稚仔魚集団から、同一親魚に由来する稚仔魚サンプルの抽出を試みるところからスタートした。第 2 章で構築したクロマグロ連鎖地図を用い、第 3 章と第 4 章ではそれぞれ、初期成長とイリドウイルス章耐性に関わる QTL 解

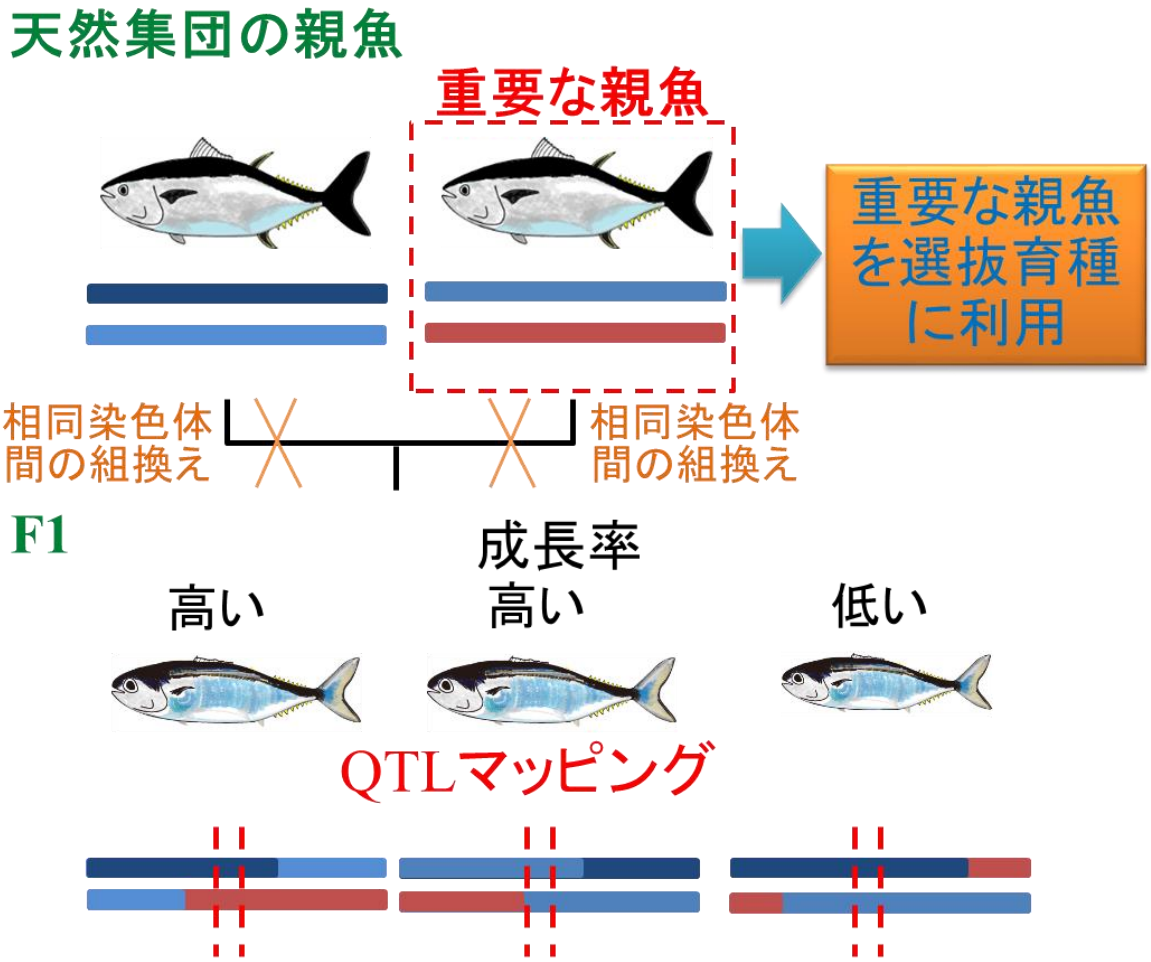



図1-8　太平洋クロマグロにおけるQTLマッピングの概要図
太平洋クロマグロにおけるQTL解析では、解析集団としてF1を利用する。天然集団は遺伝的な多様性に富み親魚の染色体はヘテロになっていることが多いことから、親魚の染色体座間で形質への寄与率に違いが生じやすい。F1の遺伝学的解析を行うことによりQTL（図で赤い点線で示す領域.）を探索する。本方法により明らかになる重要な親魚をもとに、選抜育種をすすめる。

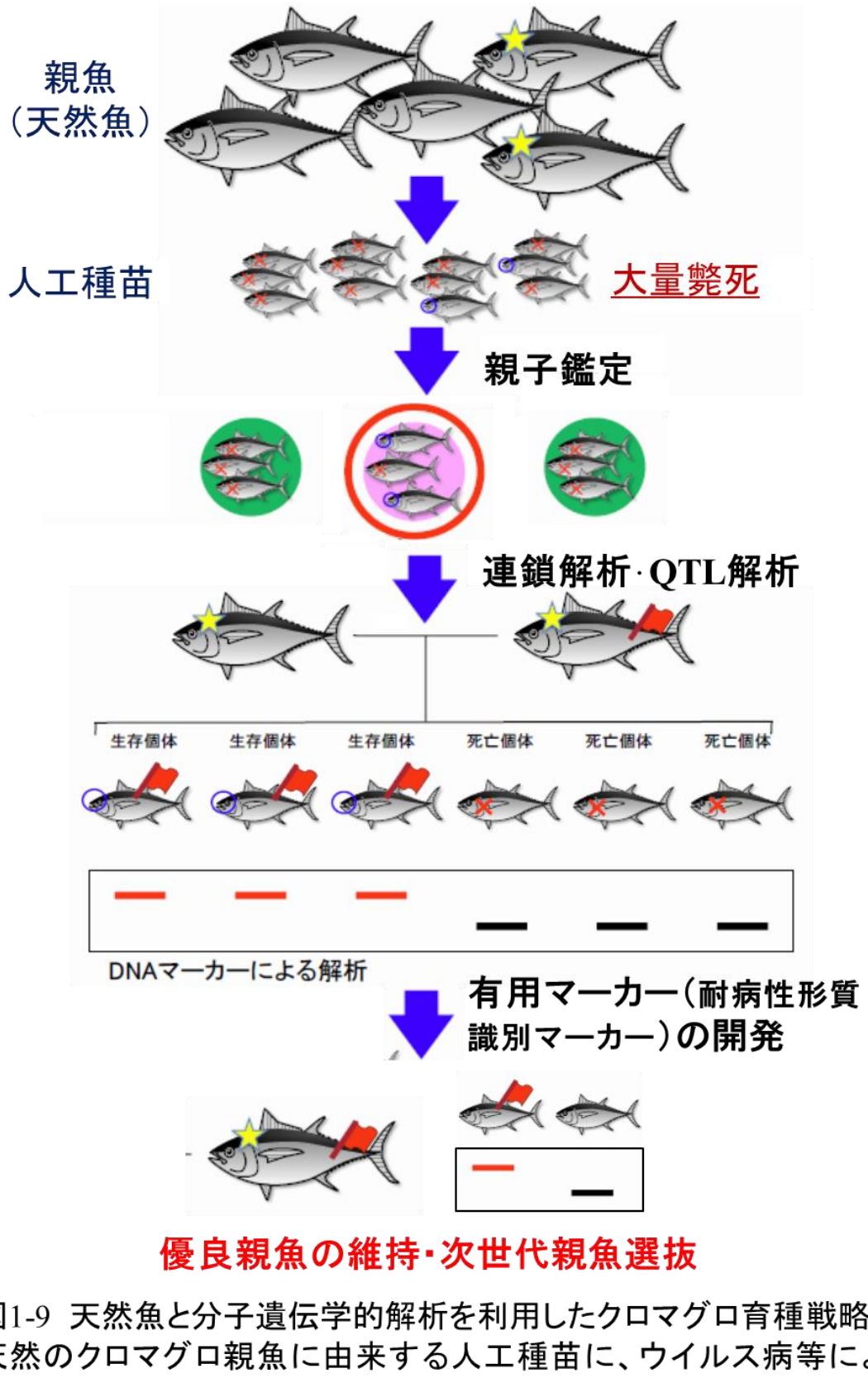



図1-9 天然魚と分子遺伝学的解析を利用したクロマグロ育種戦略
天然のクロマグロ親魚に由来する人工種苗に、ウイルス病等による大量斃死が起こった際の、有用マーカーの開発と、優良親魚の維持・次世代親魚選抜のイメージ図。

析を行った。これらの成果は、クロマグロにおける優良形質に関わる遺伝子座探索としては初の報告例となるものである。これらの研究成果を、博士学位論文としてまとめた。

なお、本博士学位論文の成果の一部（第 2 章）は、以下の通り公表ずみである。

Tsubasa Uchino, Yoji Nakamura, Masashi Sekino, Wataru Kai, Atushi Fujiwara, Motoshige Yasuike, Takuma Sugaya, Himeko Fukuda, Motohiko Sano, and Takashi Sakamoto. (2016) Constructing genetic linkage maps using the whole genome sequence of Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) and a comparison of chromosome structure among teleost species. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 7(2), 85-122.

# 第 2 章　クロマグロ連鎖地図の作成と比較ゲノム解析

## 2-1　緒言

タイプの異なるいくつかの遺伝マーカーが、連鎖地図作成に利用可能である。クロマグロに限らず、真核生物のゲノム上にはマイクロサテライト（Microsatellite, MS）あるいは短縦列リピート（Short tandem repeats, STR）と呼ばれる 2～6 塩基の反復単位からなる繰り返し配列が豊富に存在している。この MS 領域は変異性が高く、個体間、あるいは同一個体の染色体間でも繰り返し数に差が生じる特性を有し、優れた遺伝マーカーとして広く用いられている。そのため、連鎖地図作成家系において多型性を示すことが期待される。また MS マーカーは、一塩基多型（Single nucleotide polymorphism, SNP）マーカーと異なり、種内でも多アレル性を示すという利点を有する。そのため、雄親あるいは雌親に由来するアレルの分離について、子供を調べることで容易に追跡可能である。一方、SNP マーカーの場合は、4 塩基間の相違による多型性のためホモ接合体になりやすく、また両親共に同一塩基のヘテロ接合体の場合にも、子供を用いて連鎖関係を調べる際に情報量が減ってしまい、連鎖解析の精度が悪くなる。しかしながら、太平洋クロマグロにおいては MS マーカーの開発はほとんどなされておらず[44]、連鎖地図作成に十分な数ではないことから、本種において新たに MS マーカーを開発する必要がある。

近年、脊椎動物の性決定遺伝子として、新たに 4 つの性決定遺伝子が魚類において見つかった。パタゴニアペヘレイ（*Odontesthes bonariensis*）における *amhy* 遺伝子[45]、ルソンメダカ（*Oryzias luzonensis*）における *Gsdf* 遺伝子[46]、トラフグにおける *Amhr2* 遺伝子[47] 、そしてニジマス（*Oncorhynchus mykiss*）における *sdY* 遺伝子[48]である。硬骨魚類では多数の性決定遺伝子座が同定されており、性染色

体の若返りにより、性決定遺伝子座同士は配列相同性を有していないことが知られている[49]。クロマグロにおいては、性決定機構は XY 型であることが知られており、雄特異的マーカー（*male delta 6, Md6*）が単離されている[18]。硬骨魚類において、*Md6* やその周辺領域についてのシンテニー情報は存在しない。そこで本研究の目的の一つとして、*Md6* に隣接したゲノムスキャフォルド上に MS マーカーを開発し、遺伝連鎖地図上に性決定領域を位置づけることとした。

Percomprpha は棘鰭上目の大きな一群であり、メダカ、プラティ、トラフグ、ミドリフグ、イトヨ、シタビラメ、ヨーロッパシーバス、そして太平洋クロマグロもこのグループに含まれる。したがって、全ゲノムに由来するスキャフォルド上の遺伝子情報を用いて Percomorpha に属する非モデル魚種の連鎖地図を構築することは、このグループの比較ゲノム研究に新たな知見をもたらすものである。硬骨魚類の染色体進化に関する研究の多くは、Percomorpha（棘鰭上目の大きな 1 群）に属する複数の魚種で行われている[22,26,38]。比較ゲノム解析により、複数の魚種間での染色体進化が明らかになりつつある。メダカは MTZ 祖先（メダカ Medaka、ミドリフグ *Tetraodon*、ゼブラフィッシュ Zebrafish の 3 種が分岐する前の共通祖先）の染色体が保存されており、3 億年以上の間、大規模な染色体間の再編成が起こっていないことが示唆されている。一方で、ゼブラフィッシュのゲノムは大規模な転座のために、進化上多くの染色体間の再編成を経たとされている[22,50]。トラフグによる比較ゲノム解析によっても上記の仮説は支持されるとともに、フグとミドリフグそれぞれの系統における染色体内再編成について論じられている[38]。シタビラメについては、メダカ、ミドリフグ、トラフグの共通祖先から分岐した後に、3 回の大規模な染色体融合が起こっていると考えられている[26]。プラティについては、

高密度連鎖地図作成と物理地図を配置する解析が行われた。プラティとメダカ間では全染色体ペアは類似しているために、約 1 億 2,000 年前に両種が分岐後、ほとんど染色体間の再編成は起こっていないが、転座や逆位などの染色体内再編成が複数回起こった可能性が示された。また、イトヨやミドリフグの祖先では染色体融合が起こったことも示唆された[51]。これらの結果は、Percomorpha に属する魚種おける染色体構成とシンテニー関係は、系統的な距離に関わらず高度に保存されているが、染色体内部での再編成は頻繁に生じていることを示すものである[52,53]。

クロマグロはスズキ目サバ亜目サバ科マグロ族マグロ属に属し、Percomorpha の祖先から現在に至るまでにどのような染色体進化を遂げたのかに関しては非常に興味深い。しかしながら、Percomorpha の中でスズキ目 Perciformes の魚種に関しては、ゲノム配列や連鎖地図の不足等から染色体進化に関する知見はほとんど得られてこなかった。しかしながら近年、、スズキ目スズキ亜目 Percoidei モロネ科 Moronidae に属するヨーロッパシーバス（*Dicentrarchus labrax*）のゲノム情報が公開された[33]。同様に、スズキ目スズキ亜目のニベ科 Sciaenidae に属するフウセイ（*Larimichthys crocea*）に関しては、2014 年、2015 年に 2 つの研究機関から概要ゲノム解読が報告された[27,54]。また、スズキ目アジ亜目（Carangidae）に属するブリ（*Seriola quinqueradiata*）に関しては、青木らによって、ブリにおいてラディエーションハイブリッドマッピングを用いた物理地図[55]が報告されている。このように、スズキ目の魚種に関してもゲノム配列や連鎖地図の情報が得られつつあり、今後の染色体比較解析に関する知見の蓄積が期待される。ただし、サバ亜目 Scombroidei に属する魚種のゲノム配列は太平洋クロマグロでしか報告されておらず[34]、連鎖地図や物理地図などの遺伝的地図情報もない。例外的に、菊池ら（2011）

によって種間共通 MS マーカーを用い、サバ亜目サバ科 Scombridae に属するマサバの連鎖地図が構築された例がある[56]。しかしながら、サバの 1 連鎖群が構築されたのみであり、配置された遺伝マーカー数も少ないことからも、部分的なものに過ぎない。そこで本研究ではサバ科に属する太平洋クロマグロのゲノム地図を利用し、Percomorpha に属する他魚種と染色体構造を比較することで染色体進化過程について検討した。モデル魚種については、ゲノム解読の結果クロマグロと近縁とされるイトヨと、祖先染色体からの染色体構造の保存性が高いとされるメダカ、染色体の比較構造解析が進んでいるトラフグおよびミドリフグを用いた。また、スズキ目の魚種との比較として、ヨーロッパシーバスのゲノム情報と、ブリの物理地図情報を用いた。クロマグロ特異的に検出される染色体再編成のうち、モデル魚種との分岐後まもなく起こった再編成はサバ科に近縁なアジ科の魚種においても見られる可能性がある。一方、比較的最近起こった再編成はサバ科の魚種でのみ見られると思われる。このように本研究では、各系統で生じた染色体再編成を系統ごとに分けて推定することを目指した。

本章の目的は、太平洋クロマグロの遺伝連鎖地図を構築し、Percomorpha における本種のゲノム構造を理解することである。そこで本研究では、はじめにクロマグロの自然産卵由来の F1 稚魚集団から、マッピング家系として同胞集団を抽出した。次に、概要ゲノム配列を構成する各スキャフォルド上に開発した MS マーカーを用いて連鎖地図を構築した。さらに、ゲノム配列や物理地図情報を有する他魚種との、染色体構造比較解析を行った。

## 2-2 材料と方法

### マッピング家系の抽出

多数の同胞関係にある稚魚を、連鎖地図構築のためのマッピング家系として選抜することを試みた。人工授精が容易な他魚種とは異なり、太平洋クロマグロでは 1 対 1 交配を人工授精で行うことが困難である。このため、複数の親魚間の自然産卵に由来する仔魚集団の中から、同胞の選抜を試みた。まず共同研究先である水産総合研究センター　西海区水産研究所　奄美庁舎の海上生簀にて、比較的少数の太平洋クロマグロ親魚が産卵行動をとっていることが目視で確認され、その際に多数の受精卵が採取された。これらの親魚群は、日本海の島根沖で採捕され、奄美庁舎で 3 年間蓄養されたものである。受精卵は、陸上水槽にて孵化され（2011 年 8 月 19 日）、F1 のクロマグロ仔魚が得られた。稚魚段階まで飼育した後、18 日齢の時点（9 月 6 日）で 500 個体が回収された。回収された魚体は、ゲノム DNA 抽出まで、全身を個別に 100%エタノール中にて保存された。

ゲノム DNA の抽出は、Quick Gene（富士フィルム，東京，日本）を用いて行った。実験プロトコールは、メーカーの推奨方法に従った。これらの稚魚の親魚候補は、筋肉を用いた点以外は、仔魚の場合と同様の方法でゲノム DNA 抽出を行った。抽出した仔魚のゲノム DNA は、Illustra GenomiPhi Amplification Kit（GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA）を用いて増幅した。プロトコールはメーカーの推奨に従って行った。同胞個体の選抜は、500 個体の仔魚を 11 座位の MS マーカー（表 2-1）でジェノタイピングすることにより行った。親子関係の同定は、親魚と仔魚間でのジェノタイプの不一致が見られたペアを除外（排除法）することで行った。PARFEX

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00022 | 03538_117_F | tgatgttttcacagagaaccaga | 59.8 | 03538_117_R | cggttcaggtatgtcagagtga | 60.2 | 177 | 2 | perfect | (TG)13 |
| Ba00124 | 03220_1809_F | tgaatgcctatttgtgtccaag | 60.0 | 03220_1809_R | actttctatcccacatcgtgct | 60.0 | 300 | 3 | imperfect with no gaps | (ATT)16 |
| Ba01645 | 01493_2405_F | tagtgaaggaggcgtagagagg | 60.0 | 01493_2405_R | gagctcatgagtgtgactgctt | 59.7 | 281 | 2 | perfect | (AC)13 |
| Ba02786 | 04610_3871_F | agtgaaagaggtggatgcattt | 60.0 | 04610_3871_R | gatcgacgtgtttcagcttatg | 59.8 | 289 | 3 | perfect | (CAT)17 |
| Ba03183 | 04429_2197_F | actctggtgcagtgcatcttta | 59.9 | 04429_2197_R | aggatgcttggagtggtaagaa | 60.1 | 188 | 3 | imperfect with gaps | (TAT)12 |
| Ba03465 | 00485_3129_F | attttgtgactgcaatggactg | 60.0 | 00485_3129_R | gtggtggtttaaaaggcaattc | 59.8 | 397 | 5 | imperfect with no gaps | (AATTC)19 |
| Ba04221 | 00190_1837_F | gtcagacgtgaattagtgctgc | 60.0 | 00190_1837_R | tgaatagacaccgtctcacctg | 60.2 | 240 | 3 | perfect | (CAA)14 |
| Ba06853 | 02017_617_F | tgaactaacagcggatgatttg | 60.1 | 02017_617_R | tggacatcaagacaacatgaca | 60.0 | 259 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)18 |
| Ba13816 | 03504_798_F | ataactgccctggagatgtgat | 59.9 | 03504_798_R | tttaagtgaaacggtagcagca | 60.0 | 391 | 3 | imperfect with no gaps | (TGA)11 |
| - | 00190_460_F | tttgtgataacactgctgaccc | 60.04 | 00190_460_R | gtggtctttgccagtcttttct | 59.79 | 107 | 2 | imperfect with gaps | (CA)22 |
| - | 03929_814_F | agagcagcctgacagttagacc | 60.08 | 03929_814_R | taatggcaccaacatctacagg | 59.88 | 381 | 2 | perfect | (TG)12 |

表2-1　親子鑑定に用いたPCRプライマー情報

ソフトウェアによる親の割り当ては[57] は、この排除法を用いている。ミッシングデータの存在や、ヌルアレルの影響を考慮するため、親魚間でのジェノタイプのミスマッチを 2 以下に設定した。ソフトウェアによる親の割り当ては[57]は、この排除法を用いている。ミッシングデータの存在や、ヌルアレルの影響を考慮するため、親魚間でのジェノタイプのミスマッチを 2 以下に設定した。

マイクロサテライトマーカーの開発

太平洋クロマグロのゲノムアセンブリを構成する 16,802 本のスキャフォルドは、1.02 Mbp から 1.98 Mbp の配列長の分布である[34]。長めのスキャフォルドの位置情報を、物理地図を構築する上で、連鎖解析により明らかにすることとした。そのため、マッピング候補として上位 2,000 番以内のスキャフォルドを選抜した。Primer 3 [57]を用いて、2 塩基から 5 塩基のリピート単位を有するマイクロサテライト領域周辺にポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase chain reaction, PCR）用プライマーを設計した。リファレンス配列上の PCR 増幅産物のサイズは、100 から 400 bp に設定した。各スキャフォルドから PCR プライマーを選抜し、計 606 座位の MS 領域に設計した PCR プライマーを用いて、マッピング家系における多型性を調べた（表 2-2）。

ジェノタイピングと連鎖解析

4 座位の標的領域を同時に増幅するために、マルチプレックス PCR 法を適用した。ユニバーサルプライマー-マルチプレックス PCR 法 [58]を、4 座位の増幅に用いた。本手法は、増幅産物サイズが重複するマーカー同士を同時増幅するため、特

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00002 | 00002_358935_F | tttgtcagtgggaaacaatctg | 60.01 | 00002_358935_R | gtggtgtgtgtgtttgtacgtg | 59.88 | 140 | 2 | perfect | (CA)14 |
| Ba00003 | 00003_495686_F | gtgtggaagcaacaagcaaata | 60.17 | 00003_495686_R | tggatttgggtacaggtaaagg | 60.1 | 321 | 2 | perfect | (AC)36 |
| Ba00004 | 00004_886445_F | agcatctgtgtctgcataatgg | 60.16 | 00004_886445_R | cgacaatgtgacatgtttgttg | 59.93 | 148 | 2 | perfect | (CA)12 |
| Ba00005 | 00005_610364_F | caaaggggattttagtctgctg | 60.12 | 00005_610364_R | cttgccaaaaacctcgacttac | 60.16 | 141 | 2 | imperfect with gaps | (GT)16 |
| Ba00006 | 00006_761447_F | gcaagcatatggcacatttaga | 60.12 | 00006_761447_R | atcttgctcctcctcttcctct | 59.98 | 130 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)42 |
| Ba00007 | 00007_770851_F | gccccatatgtacatggagttt | 59.97 | 00007_770851_R | gggcgttattctagtgatgtttg | 59.91 | 185 | 2 | perfect | (AC)21 |
| Ba00008 | 00008_803992_F | catttggttttctttggtccat | 60.09 | 00008_803992_R | tccaaaaccagaaaggacactt | 60.01 | 128 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)15 |
| Ba00009 | 00009_514635_F | tgtgcttcgtaaacacaacctc | 60.21 | 00009_514635_R | gaggctgcaggatatgaatagg | 60.08 | 111 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)21 |
| Ba00010 | 00010_781278_F | ggtgaattcaattgccagtttag | 59.89 | 00010_781278_R | ccattacttacttctcgcccag | 60.14 | 106 | 2 | perfect | (CA)14 |
| Ba00011 | 00011_657238_F | atcacgtttatttagcccgaga | 60.0 | 00011_657238_R | atgagaccgttaacattttgcc | 60.2 | 141 | 2 | perfect | (AC)16 |
| Ba00013 | 00013_638192_F | tgacctcttcccaatggactat | 59.8 | 00013_638192_R | gctcagtctctggtttcctgtc | 60.4 | 142 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)19 |
| Ba00014 | 00014_385141_F | gattccacatggtcagcttgta | 60.0 | 00014_385141_R | ctccaaaaggaaagtcaaccac | 60.0 | 139 | 2 | perfect | (CA)22 |
| Ba00015 | 00015_721830_F | aagcgctactttcaggtgagtc | 60.1 | 00015_721830_R | ctcactactcccacctggagat | 59.6 | 138 | 2 | perfect | (CA)13 |
| Ba00016 | 00016_658769_F | tttaatttgtcacccgtctgtg | 59.9 | 00016_658769_R | catgtctccatattttccgtga | 59.8 | 121 | 2 | perfect | (AC)13 |
| Ba00017 | 00017_135995_F | cactgttgctctgggtaaaggt | 60.6 | 00017_135995_R | ccgggtttgatatattgtgctt | 60.1 | 150 | 2 | perfect | (TG)16 |
| Ba00018 | 00018_365575_F | ttcagttatgggtctgggctat | 59.9 | 00018_365575_R | ctgaaacatgtatggttgtggg | 60.2 | 143 | 2 | perfect | (AC)15 |
| Ba00019 | 00019_259174_F | gagtgatggcctggatagactc | 60.1 | 00019_259174_R | gtctgcctgtctgtctgttcac | 60.0 | 123 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)25 |
| Ba00020 | 00020_291940_F | tagcatatttgtattcgggcac | 59.0 | 00020_291940_R | ccctgaagtcagtcaaggtaca | 59.3 | 116 | 2 | perfect | (AC)17 |
| Ba00021 | 00021_81471_F | cttgtggatggcacagagatag | 59.8 | 00021_81471_R | caagtcacgcataaaaaccaga | 60.2 | 140 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)24 |
| Ba00022 | 00022_661885_F | agataccgcagggattatctga | 60.0 | 00022_661885_R | aaaataaaaatcagcccacacg | 60.2 | 146 | 2 | imperfect with gaps | (TG)25 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00023 | 00023_682414_F | tgtccaatatagcaagcagtgg | 60.2 | 00023_682414_R | gctgtggtatttacatttgcga | 60.0 | 135 | 2 | imperfect with gaps | (TC)22 |
| Ba00026 | 00026_267152_F | acagcccctattcacaatgagt | 59.9 | 00026_267152_R | gtgagccttcacaaacaacaag | 59.8 | 107 | 2 | imperfect with gaps | (TG)32 |
| Ba00027 | 00027_603499_F | tctgacaccaccatatagcacc | 59.9 | 00027_603499_R | tggagacgacgatcctaatgta | 59.6 | 400 | 2 | perfect | (CA)21 |
| Ba00028 | 00028_464941_F | aaactgtgggacatgttctttt | 57.6 | 00028_464941_R | cagaaacacaaccctaaccctc | 59.9 | 201 | 2 | perfect | (CA)21 |
| Ba00029 | 00029_643815_F | tgtgtgtgtgtgaatgtgtgtg | 60.0 | 00029_643815_R | taatccctcgagacgtgaattt | 60.0 | 102 | 2 | perfect | (TG)15 |
| Ba00030 | 00030_319912_F | ttgtccctggagaaaagtgttt | 60.0 | 00030_319912_R | acatgggaacacataggacaca | 60.2 | 128 | 2 | perfect | (TG)21 |
| Ba00031 | 00031_368460_F | ttcctctgtgaactgaagcaga | 60.2 | 00031_368460_R | gagatgaggcagaacatctgtg | 59.9 | 101 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)21 |
| Ba00032 | 00032_435309_F | gccagaggaaaagacagagaaa | 60.0 | 00032_435309_R | tcaggtaggacagctcacaaaa | 59.9 | 103 | 2 | perfect | (GT)14 |
| Ba00033 | 00033_575768_F | gcgaggaaccttcagttcatac | 60.1 | 00033_575768_R | tgcagtgtctcaattttgctct | 60.1 | 129 | 2 | perfect | (AC)20 |
| Ba00034 | 00034_183287_F | aattgccagttgaagtgtgtgt | 59.6 | 00034_183287_R | gacatgtacctttgttctggca | 60.0 | 131 | 2 | perfect | (TG)22 |
| Ba00035 | 00035_115704_F | gcagagtttcatacatggtgga | 60.0 | 00035_115704_R | gtcatgggaaaatgaagcaaat | 60.2 | 125 | 2 | perfect | (GT)19 |
| Ba00036 | 00036_456502_F | tggaaagttgttgttatgcacc | 59.9 | 00036_456502_R | aaaacaaccaaaccaaccaaac | 60.0 | 110 | 2 | perfect | (GT)20 |
| Ba00038 | 00038_356123_F | caaatagccagacagacagcac | 59.9 | 00038_356123_R | actgacagacagaccagacagg | 59.4 | 147 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)24 |
| Ba00039 | 00039_394087_F | ggaggatgaggtgttgctctac | 60.1 | 00039_394087_R | tagttgaaggcgtcatgacatt | 59.6 | 109 | 2 | perfect | (AC)18 |
| Ba00040 | 00040_154055_F | gcatctacctcctcttttggaa | 59.7 | 00040_154055_R | ccctcaaagcaaatttttgaac | 60.0 | 101 | 2 | perfect | (TG)13 |
| Ba00041 | 00041_262465_F | aactttgacttgatgatggcg | 60.1 | 00041_262465_R | ttgacagctatgggatgtgttc | 60.0 | 146 | 2 | imperfect with no gaps | (AT)19 |
| Ba00042 | 00042_205845_F | aagtgatggaaacacgactgtg | 60.1 | 00042_205845_R | tgtatgctgactccccatagtg | 60.0 | 137 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)16 |
| Ba00044 | 00044_557436_F | tgctggatgggataagaagttt | 60.0 | 00044_557436_R | tattccagaggcatcttcagtg | 59.3 | 145 | 2 | perfect | (GT)19 |
| Ba00045 | 00045_218346_F | agcatttagcaagtgaagcaaa | 59.2 | 00045_218346_R | caaattctctctctcctcagcc | 59.6 | 397 | 2 | perfect | (TG)45 |
| Ba00046 | 00046_354953_F | actgtctgctcctgtcgtaaca | 60.0 | 00046_354953_R | cccctctttgctcttaatctga | 59.9 | 366 | 2 | perfect | (CA)17 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00047 | 00047_153600_F | ctctctcctcctccttgtgtgt | 59.9 | 00047_153600_R | attttccctctgtgttggtttg | 60.3 | 234 | 2 | perfect | (GA)22 |
| Ba00048 | 00048_150402_F | cagtctctctggctctgtcaaa | 59.8 | 00048_150402_R | caggagacaaatctgaccttcc | 60.1 | 145 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)18 |
| Ba00049 | 00049_329914_F | cttgcagacatctctctccctt | 60.0 | 00049_329914_R | gaatgccaatgcaaaagtgtaa | 60.0 | 130 | 2 | imperfect with gaps | (TG)30 |
| Ba00050 | 00050_328297_F | tctgctcctgttcatgtctgat | 59.9 | 00050_328297_R | gcctgtaatgcttcatttaggg | 60.0 | 148 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)29 |
| Ba00051 | 00051_211304_F | gcatgtccaatattcagctcag | 59.7 | 00051_211304_R | attgatttgtgtggaaaaggct | 59.9 | 294 | 2 | perfect | (TG)18 |
| Ba00052 | 00052_385529_F | gccgttagcatggctaaaatac | 60.0 | 00052_385529_R | tcatcactgagccagacagagt | 60.1 | 137 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)24 |
| Ba00053 | 00053_380153_F | gtctttctgtctgggtttgtcc | 60.0 | 00053_380153_R | aagcacatgtttttctccctgt | 60.0 | 126 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)20 |
| Ba00054 | 00054_476399_F | ggggacttcagtcattctgttc | 60.0 | 00054_476399_R | gttattagaaagcatgcagggc | 60.1 | 285 | 2 | perfect | (AC)14 |
| Ba00055 | 00055_557397_F | cacctggtaagtgttaaagggg | 59.8 | 00055_557397_R | gaacagcttgctgtgcataatc | 59.9 | 122 | 2 | perfect | (GT)14 |
| Ba00056 | 00056_277475_F | cagatgccaaaccaactctgta | 60.2 | 00056_277475_R | tgcaacagctagcattcttcat | 60.1 | 146 | 2 | perfect | (TG)17 |
| Ba00057 | 00057_560819_F | cacgtcacaggctatttgtcat | 60.1 | 00057_560819_R | taaagaaggaccaaaaggacca | 60.0 | 138 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)19 |
| Ba00058 | 00058_544515_F | gcaagagcaggtagtgtttcaa | 59.6 | 00058_544515_R | gcatatgctcagaagagagtgc | 59.3 | 121 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)29 |
| Ba00059 | 00059_177790_F | ggtacaccctgcagttttgaat | 60.3 | 00059_177790_R | tggctgttaaatagctccctgt | 60.2 | 330 | 2 | perfect | (AC)30 |
| Ba00060 | 00060_449308_F | cacatggtcaaacgttttctgt | 59.9 | 00060_449308_R | taaacgtctcaacaggatgtgg | 60.0 | 117 | 2 | perfect | (TG)13 |
| Ba00061 | 00061_227060_F | ggaagcagtgtgactgtgaaag | 60.0 | 00061_227060_R | ggttctaaggcctaatgctgaa | 59.8 | 118 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)18 |
| Ba00062 | 00062_36778_F | ttcaagggcaataaagtgtgtg | 60.0 | 00062_36778_R | ttctctgttctcttctcccctg | 60.0 | 243 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)29 |
| Ba00063 | 00063_195848_F | cttgcacagtggaaatccataa | 60.0 | 00063_195848_R | tttactgtgtttaatgcacccg | 59.9 | 128 | 2 | imperfect with gaps | (GT)24 |
| Ba00065 | 00065_349693_F | cttgcagcaacagagatacacc | 59.9 | 00065_349693_R | cactgctgatttttatgcttcg | 59.9 | 150 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)19 |
| Ba00066 | 00066_257637_F | atctgggtccagcaaatatcac | 60.2 | 00066_257637_R | ctcttggcttatcgtgacctct | 59.9 | 106 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)18 |
| Ba00067 | 00067_289897_F | catccagcttattggtgcatta | 60.0 | 00067_289897_R | agagcaggaatcaaaattggaa | 60.1 | 196 | 2 | perfect | (AC)22 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00068 | 00068_46927_F | ctttcatttcccaagaaacgtc | 60.0 | 00068_46927_R | agtcagtgataggtgttggcct | 60.1 | 309 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)25 |
| Ba00069 | 00069_102016_F | ttttcctggtaaattcaccctc | 59.4 | 00069_102016_R | ttcacactgttggtttctgtcc | 60.1 | 127 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)15 |
| Ba00070 | 00070_316720_F | ctgtggtgtttgtacgtcaggt | 60.0 | 00070_316720_R | aaacggacacagctgagaaaat | 60.2 | 307 | 2 | perfect | (TA)19 |
| Ba00072 | 00072_331722_F | ggaggaaccataattgtccgta | 60.1 | 00072_331722_R | cacagtgataacaacccttttgc | 59.5 | 117 | 2 | imperfect with gaps | (AC)15 |
| Ba00074 | 00074_240980_F | ggaaagtcagctcaggagaaaa | 60.0 | 00074_240980_R | aaatacagacacccaaacagca | 59.5 | 146 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)20 |
| Ba00075 | 00075_95644_F | ctgttgatgactggagaaggct | 60.8 | 00075_95644_R | cactcactcactcgcacacata | 60.0 | 129 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)19 |
| Ba00076 | 00076_171876_F | agaatatttctgtccctgccaa | 60.0 | 00076_171876_R | gttgggtataaatgcctggtgt | 60.0 | 140 | 2 | perfect | (AC)13 |
| Ba00077 | 00077_231443_F | cctcagttcagcctctgtctct | 60.2 | 00077_231443_R | tcatatacctgcttacaaccgc | 59.2 | 112 | 2 | perfect | (GT)13 |
| Ba00078 | 00078_132497_F | aatgattgtctaggccacatcc | 60.2 | 00078_132497_R | caggggtctaaacctcacactc | 60.0 | 122 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)20 |
| Ba00079 | 00079_517200_F | ggtttgcatttggctattcttc | 60.0 | 00079_517200_R | ttgcaacatgtgattgaaacaa | 60.0 | 128 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)16 |
| Ba00080 | 00080_298907_F | tgcacgtgatattttgatgatg | 59.5 | 00080_298907_R | ctgatgttgagaacagaggctg | 60.1 | 144 | 2 | perfect | (GT)16 |
| Ba00082 | 00082_412469_F | ccacactgactgactggatgat | 60.0 | 00082_412469_R | atttcctttacctgcaatcctg | 59.5 | 148 | 2 | perfect | (CA)16 |
| Ba00083 | 00083_506654_F | tttctggtgtactgaaacggtg | 60.1 | 00083_506654_R | tgtcactttagccctgccttat | 60.2 | 316 | 2 | perfect | (CA)23 |
| Ba00084 | 00084_322090_F | aggattgtgtgcaccataactg | 59.9 | 00084_322090_R | tgatctcactcacagatacagca | 58.5 | 121 | 2 | perfect | (TG)18 |
| Ba00085 | 00085_363474_F | atctcctctaggagctgtgtgc | 60.1 | 00085_363474_R | gcggaaaatacagagtggaatc | 60.0 | 135 | 4 | perfect | (AGAC)7 |
| Ba00086 | 00086_310160_F | caggacttacaatccctcttgc | 60.1 | 00086_310160_R | caacaatgcatttctctctcca | 60.3 | 147 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)33 |
| Ba00087 | 00087_101769_F | tccgacaacttaaaattggctt | 60.0 | 00087_101769_R | catgcaggtcagcatagttgat | 60.2 | 163 | 2 | perfect | (TG)21 |
| Ba00089 | 00089_38868_F | ctgtttcaatattgccctgaca | 60.0 | 00089_38868_R | agtccagtctcccaaaatgtgt | 59.9 | 138 | 2 | perfect | (CA)19 |
| Ba00090 | 00090_474748_F | ctgtctttgagggaagcaaaat | 59.8 | 00090_474748_R | ctgcagacaagacacacaaaca | 60.0 | 126 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)15 |
| Ba00091 | 00091_276727_F | cccagtgagaaggctaaggtaa | 59.8 | 00091_276727_R | atcattcacagacgatgtttgc | 60.0 | 116 | 2 | perfect | (GT)14 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00093 | 00093_24283_F | agtatccagattgccaaattgc | 60.3 | 00093_24283_R | attttattaggcttcctgggga | 60.2 | 148 | 2 | imperfect with gaps | (TG)21 |
| Ba00094 | 00094_323057_F | cacattgcaacttatgcacaga | 59.8 | 00094_323057_R | aatcagttgctcaatgctgaga | 60.0 | 141 | 2 | perfect | (AC)15 |
| Ba00095 | 00095_365782_F | gtacccattaggctgtagtggc | 59.9 | 00095_365782_R | aaaacaattgacaccaaccaca | 60.2 | 117 | 4 | imperfect with no gaps | (TTTG)9 |
| Ba00096 | 00096_85218_F | ttctgtctctgctcttgtttgc | 59.8 | 00096_85218_R | gctgagttgccatcacattaaa | 60.1 | 121 | 2 | perfect | (TG)12 |
| Ba00097 | 00097_394083_F | tcaaggacaagagtgtgtgcat | 60.8 | 00097_394083_R | tccaaggtcctactgtccatct | 60.0 | 121 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)18 |
| Ba00098 | 00098_401184_F | ggcaaggactctctgtctgtct | 60.1 | 00098_401184_R | aacaatacggtcaccaagtgtg | 59.8 | 142 | 4 | imperfect with no gaps | (TATG)9 |
| Ba00099 | 00099_435286_F | gtgtcaaaccctcaaggaaaac | 59.9 | 00099_435286_R | cacatggctctttttcctctct | 59.9 | 141 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)21 |
| Ba00100 | 00100_205743_F | cccaggcagtgtattgtgagt | 60.0 | 00100_205743_R | ataagcagcatgagtgaaggtg | 59.4 | 132 | 2 | imperfect with gaps | (TG)28 |
| Ba00101 | 00101_439063_F | gcaagtatgttggagctctgtg | 59.9 | 00101_439063_R | agcagtaaaaagtggaaatgcc | 59.7 | 140 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)17 |
| Ba00103 | 00103_228054_F | atgcagtatgacaaggtcatgg | 59.9 | 00103_228054_R | ttaagtcaggtgtgtgtccctg | 60.1 | 167 | 2 | perfect | (TG)18 |
| Ba00104 | 00104_395600_F | aaatttgggccctatttgaatc | 60.4 | 00104_395600_R | gctaatgttgtcatgctgcact | 60.3 | 120 | 2 | imperfect with gaps | (TG)15 |
| Ba00105 | 00105_119773_F | tcacccagttatttgtcccttt | 59.7 | 00105_119773_R | ggacaagatttgcagtgtgtgt | 60.1 | 146 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)17 |
| Ba00106 | 00106_187871_F | cgacaagaagctaaacccactt | 59.8 | 00106_187871_R | aggcctagagatatcgcatctg | 59.9 | 119 | 2 | perfect | (GT)12 |
| Ba00108 | 00108_370173_F | cttctgctttttcatgcttgtg | 60.1 | 00108_370173_R | aagttgggggtgaaaaagtgta | 59.8 | 119 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)20 |
| Ba00109 | 00109_128874_F | tgctgttggctgctacactact | 60.1 | 00109_128874_R | ctttgtcacagcttgtcctgtc | 60.0 | 150 | 2 | perfect | (CA)26 |
| Ba00110 | 00110_99146_F | ccgtcgtgtagtgttgtccata | 60.9 | 00110_99146_R | aggatactactaccaccgctgc | 59.7 | 104 | 2 | perfect | (TG)22 |
| Ba00111 | 00111_291702_F | tttaaggggaaagacaaatcctc | 59.8 | 00111_291702_R | gtttgctgaaagaaggaaaacg | 60.3 | 114 | 2 | perfect | (AC)20 |
| Ba00112 | 00112_219640_F | tcagatgagagatgcagagagc | 59.9 | 00112_219640_R | aatgatggggttaaatttgtgc | 60.0 | 128 | 2 | perfect | (AC)14 |
| Ba00113 | 00113_423636_F | ttcttgcgctttatttctcaca | 60.0 | 00113_423636_R | gtccccaaaggtgacctaagtt | 60.6 | 104 | 2 | perfect | (CA)17 |
| Ba00114 | 00114_369105_F | tctgtagactgagctggtggaa | 60.1 | 00114_369105_R | tgctcaactgcagacttgtttt | 60.1 | 123 | 2 | perfect | (CA)16 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00115 | 00115_267973_F | atctcgacaaatgatgatgctg | 60.1 | 00115_267973_R | ggtccaagtgtgtctgtgtgtt | 60.0 | 119 | 2 | perfect | (AC)16 |
| Ba00116 | 00116_417144_F | ttacattgctgctgtgtgtgaa | 60.4 | 00116_417144_R | cacacatcacatcttgcatctg | 60.2 | 138 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)22 |
| Ba00117 | 00117_154563_F | gaggaagcactcctcactccta | 60.0 | 00117_154563_R | aagctgtgtgggaaagtagctc | 60.0 | 146 | 3 | perfect | (AGC)10 |
| Ba00118 | 00118_445594_F | gtgcgagtttacccactttacc | 59.9 | 00118_445594_R | ttaagtggctctctcttcctgg | 60.0 | 150 | 2 | perfect | (AC)24 |
| Ba00119 | 00119_335944_F | ggttaggatttgcatgtgtgtg | 60.3 | 00119_335944_R | caagggattgagaggctaattg | 60.1 | 145 | 2 | imperfect with no gaps | (TC)18 |
| Ba00120 | 00120_340187_F | aaactgtctccatccaactggt | 59.9 | 00120_340187_R | agaaaacacatggcactgacac | 60.1 | 128 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)20 |
| Ba00121 | 00121_314068_F | cacagccatcaagaagattcaa | 60.3 | 00121_314068_R | gttggtttgaccattacaagca | 59.9 | 136 | 2 | perfect | (GT)20 |
| Ba00122 | 00122_266017_F | tttgtaccagaaacgcaatgac | 60.0 | 00122_266017_R | attggatggcatgggagtatag | 60.1 | 143 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)22 |
| Ba00123 | 00123_167823_F | ccttctttgttggtctgctttc | 60.3 | 00123_167823_R | ccactggtcccttaagtagctg | 60.2 | 137 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)19 |
| Ba00124 | 00124_210364_F | cattccaaagcgttgtgtttta | 60.0 | 00124_210364_R | agatttccccaattctttccat | 60.0 | 169 | 2 | perfect | (TG)19 |
| Ba00125 | 00125_425690_F | ggtcctgtccttctcatattgc | 60.0 | 00125_425690_R | gtggtgagctgatttacgtctg | 59.8 | 262 | 2 | perfect | (GT)16 |
| Ba00126 | 00126_455614_F | gcatcgcatcataggcatacta | 60.1 | 00126_455614_R | tatctctcacacacttgcccac | 60.2 | 143 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)21 |
| Ba00127 | 00127_236472_F | gtatgacatccgttcacaatgg | 60.1 | 00127_236472_R | ttagcatgttttgaggttccct | 60.0 | 105 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)19 |
| Ba00128 | 00128_315130_F | caacatctggaccataagcaga | 60.1 | 00128_315130_R | ttcgttctggtatgcatttttg | 60.0 | 124 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)21 |
| Ba00129 | 00129_342326_F | catgatgtgtcaaccaccacta | 59.3 | 00129_342326_R | tttgagtttgtggtgaggaatg | 60.0 | 130 | 2 | perfect | (AC)12 |
| Ba00130 | 00130_79916_F | cctgagttctgttacagctccat | 59.8 | 00130_79916_R | acttcaatgtaaaaacaccccg | 60.1 | 124 | 2 | imperfect with gaps | (GT)19 |
| Ba00131 | 00131_455118_F | ccagaacaactgctacatctgg | 59.8 | 00131_455118_R | gcagacaccatgttttacaagc | 59.7 | 148 | 2 | perfect | (AC)19 |
| Ba00132 | 00132_191501_F | atttccctgactttgagtgcat | 60.0 | 00132_191501_R | cctctcctgcttcatcactgta | 59.5 | 125 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)38 |
| Ba00133 | 00133_441269_F | ttggcaaccatgcaatatagtc | 59.9 | 00133_441269_R | gagtctattgacaacaaggccc | 60.0 | 136 | 3 | perfect | (GAT)10 |
| Ba00134 | 00134_312921_F | tgacaagtctttctactgaggca | 59.2 | 00134_312921_R | tctttgaatggcttcactctca | 60.0 | 121 | 2 | perfect | (CA)13 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00135 | 00135_23239_F | agaagatcaccacattggcttt | 60.0 | 00135_23239_R | aaggcgtgtcaatatctgtgtg | 60.1 | 142 | 2 | perfect | (CA)21 |
| Ba00136 | 00136_215754_F | ctgtggacatatgagggtttca | 59.9 | 00136_215754_R | ggacactgagtactgaacgctg | 60.0 | 134 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)21 |
| Ba00139 | 00139_63813_F | tgagtggacagcttttcttcaa | 60.0 | 00139_63813_R | gtctgcatgcaaagaaacacat | 60.2 | 150 | 2 | perfect | (TG)19 |
| Ba00140 | 00140_111707_F | gacatgtgacagaaagcaaagc | 59.9 | 00140_111707_R | cagctgactcaccaaacaacat | 60.2 | 131 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)21 |
| Ba00141 | 00141_408598_F | ccatactgtcctcaggcttacc | 60.0 | 00141_408598_R | tgtgtaagagagagagagagagagc | 57.9 | 150 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)32 |
| Ba00142 | 00142_277539_F | tgtttttggtgtgtacagaggc | 60.1 | 00142_277539_R | gcttttgttaagctgaaatggg | 60.1 | 141 | 2 | perfect | (AC)13 |
| Ba00143 | 00143_408087_F | attcaagctgtatgattggcct | 60.0 | 00143_408087_R | ttcagatttttaacaagccggt | 60.0 | 133 | 2 | perfect | (GT)19 |
| Ba00145 | 00145_238363_F | agcctcccttgtatgtttaccc | 60.6 | 00145_238363_R | atgtggtgattaattgcactgg | 59.8 | 129 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)24 |
| Ba00146 | 00146_75017_F | aataaaccaaaactgacacgca | 59.6 | 00146_75017_R | ggctgttgctcactgttatgtc | 59.8 | 130 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)17 |
| Ba00147 | 00147_105521_F | cagagcataagcattccaaaca | 60.3 | 00147_105521_R | tatgggtgttaagagcaaggct | 60.2 | 360 | 2 | perfect | (CA)25 |
| Ba00149 | 00149_250489_F | ttttcccatagagttagcgcag | 60.7 | 00149_250489_R | ccatcattattgccctcttagc | 60.0 | 136 | 2 | perfect | (CT)16 |
| Ba00150 | 00150_9590_F | tcggctcactctgctgtattta | 60.0 | 00150_9590_R | agcatatcagtctctgggcatt | 60.1 | 246 | 2 | perfect | (TG)18 |
| Ba00151 | 00151_31055_F | gtcctgaggagttgactgttcc | 60.2 | 00151_31055_R | aattagcctgctgtgctgtgta | 60.0 | 120 | 2 | perfect | (GT)24 |
| Ba00152 | 00152_78998_F | tcaaacactaacagagcaggga | 59.9 | 00152_78998_R | gttaaacagcttgttggcattg | 59.7 | 143 | 2 | perfect | (GT)17 |
| Ba00153 | 00153_401556_F | gtctaggactgccaaaaactgg | 60.2 | 00153_401556_R | atgttcattttgggctgaatct | 59.8 | 147 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)26 |
| Ba00154 | 00154_270166_F | tcctgctctgtgctcacatact | 60.1 | 00154_270166_R | gactggtgtgtaagcagtttcg | 59.8 | 110 | 2 | perfect | (CA)18 |
| Ba00155 | 00155_332581_F | ncctcttgttgcgtaagctg | 59.8 | 00155_332581_R | taacttgagtttggaaggggaa | 60.0 | 144 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)35 |
| Ba00156 | 00156_123482_F | ggaagaagggatcacaacagac | 60.0 | 00156_123482_R | tgctgggagaaatctaagatcc | 59.7 | 115 | 2 | imperfect with no gaps | (AG)18 |
| Ba00159 | 00159_126940_F | ttgagccggaaaagatagagag | 60.0 | 00159_126940_R | acacgttacaaaatgtgcaagc | 60.1 | 144 | 2 | perfect | (TG)17 |
| Ba00160 | 00160_258703_F | gtcagagtgttgagacaggcac | 60.0 | 00160_258703_R | ttttgctggtgattgaaaactg | 60.1 | 169 | 2 | perfect | (CA)16 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00161 | 00161_292321_F | attacacccagtttacatcggc | 60.1 | 00161_292321_R | aatgggtgtgttcagacagatg | 59.9 | 149 | 2 | perfect | (CT)12 |
| Ba00162 | 00162_313019_F | tttctctctcccccctctctt | 60.0 | 00162_313019_R | cacaagagccatgtgttttagc | 59.8 | 144 | 2 | imperfect with no gaps | (TC)19 |
| Ba00163 | 00163_233910_F | agtagaggtgtgggatgctgtt | 60.1 | 00163_233910_R | tcctgtcatgctcacaataacc | 60.0 | 124 | 2 | perfect | (TG)15 |
| Ba00165 | 00165_248757_F | gatttaaccaatcctccatcca | 60.0 | 00165_248757_R | aaatcatttctcttttggtgcc | 59.5 | 268 | 2 | perfect | (AC)17 |
| Ba00166 | 00166_89208_F | attgccaaaccatatccacttc | 60.1 | 00166_89208_R | tggtcctctactccatccaagt | 60.0 | 122 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)20 |
| Ba00167 | 00167_150448_F | acactgattctcagctgctctg | 59.8 | 00167_150448_R | gaggtgagcgcacatatatcct | 60.5 | 149 | 3 | imperfect with no gaps | (CAG)11 |
| Ba00168 | 00168_209325_F | tgaccaattaaatgagccagtg | 60.0 | 00168_209325_R | ttcctacttgtgtgtctgcctc | 59.4 | 169 | 2 | perfect | (AC)18 |
| Ba00169 | 00169_177627_F | ttacctggtcagaaactcagca | 59.9 | 00169_177627_R | catgcctgtgacctacagaaag | 59.8 | 131 | 2 | perfect | (CA)16 |
| Ba00171 | 00171_222856_F | cagacgagcagacagacagttc | 60.2 | 00171_222856_R | cctcttgttcactgctaatccc | 60.1 | 131 | 2 | imperfect with gaps | (CA)30 |
| Ba00172 | 00172_167230_F | tgtttctaggcggtttggtatt | 59.9 | 00172_167230_R | ggtgcaccagtaaacacaaatg | 60.3 | 174 | 2 | perfect | (TG)16 |
| Ba00174 | 00174_235377_F | aagtccatatcagcctgaggaa | 60.1 | 00174_235377_R | tcaacacagtctgcttgatcct | 59.9 | 122 | 2 | perfect | (AG)18 |
| Ba00175 | 00175_169417_F | gctggggagttaaattccttct | 60.0 | 00175_169417_R | tatcacagacaaagccactggt | 59.7 | 130 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)23 |
| Ba00178 | 00178_369300_F | acagtaacaaggggtctcgatg | 60.4 | 00178_369300_R | cacatatgacacagtctggcaa | 59.6 | 106 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)18 |
| Ba00179 | 00179_24241_F | cttttaggctggaaccagtcac | 60.2 | 00179_24241_R | tgtgtgtatttgtgcttgtgga | 60.1 | 186 | 2 | imperfect with no gaps | (AG)18 |
| Ba00180 | 00180_52086_F | aacggcgaaaagaagtaggag | 59.9 | 00180_52086_R | ttcatgtcctcacaatcacaca | 60.0 | 153 | 2 | perfect | (GT)18 |
| Ba00181 | 00181_145357_F | tttctgctttttcctcttccag | 60.0 | 00181_145357_R | gtttccacagaggagatcaacc | 60.0 | 139 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)18 |
| Ba00182 | 00182_47978_F | ctgtgctccctgtgtatttttg | 59.7 | 00182_47978_R | catgaaagcatgaatgtgtgtg | 60.0 | 123 | 2 | perfect | (AC)18 |
| Ba00183 | 00183_234545_F | ccatgatccacagtttgtatgc | 60.3 | 00183_234545_R | cactcaggacggatattcacaa | 60.0 | 116 | 2 | perfect | (TG)13 |
| Ba00184 | 00184_263120_F | ttgacaatggtgtgctctctct | 59.9 | 00184_263120_R | tgactcacacacacatacgctc | 59.8 | 140 | 2 | imperfect with gaps | (TC)31 |
| Ba00185 | 00185_18196_F | cacactctgacacgactcacaa | 60.0 | 00185_18196_R | ttcatggactttggatgacaag | 60.0 | 137 | 2 | perfect | (CA)18 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00186 | 00186_302547_F | aatgaccttcttcttccccttc | 60.0 | 00186_302547_R | gacatgcagcttcattcatctc | 59.9 | 240 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)32 |
| Ba00187 | 00187_105168_F | gtgaatgaaaagtgcggtacaa | 60.0 | 00187_105168_R | gatttaaactcccaacattgtgt | 57.1 | 129 | 3 | perfect | (ATA)8 |
| Ba00189 | 00189_278390_F | agccaattgagactgtgagtga | 59.9 | 00189_278390_F | aaggagagaagtaaaatatggcga | 59.7 | 149 | 2 | perfect | (CA)15 |
| Ba00191 | 00191_224363_F | gcaatagttgtagtgggcacag | 59.7 | 00191_224363_R | gtgtgtatgtatgtgtgcgtgc | 60.0 | 225 | 2 | perfect | (GT)18 |
| Ba00193 | 00193_210757_F | atggtggtgaaaaacaatttcc | 60.0 | 00193_210757_R | cattgtgagcacaggaccataa | 60.9 | 138 | 2 | imperfect with no gaps | (AT)18 |
| Ba00194 | 00194_309657_F | acagcccatctctgtctctctc | 60.0 | 00194_309657_R | atagaacagtgggagtggttgg | 60.3 | 127 | 2 | perfect | (AC)17 |
| Ba00196 | 00196_154314_F | tggcctgcagtatttacacagt | 59.7 | 00196_154314_R | ctctggatctatggcgtctctc | 60.4 | 105 | 2 | perfect | (TG)21 |
| Ba00197 | 00197_295591_F | ttggaccttgctaaaaatcctc | 59.6 | 00197_295591_R | cacaaaatcaaagcgtcattgt | 60.0 | 119 | 2 | perfect | (AC)22 |
| Ba00198 | 00198_258441_F | tttctggcatgattttgtgttc | 60.0 | 00198_258441_R | tataagctcatacagtccgccc | 60.5 | 145 | 2 | perfect | (AC)13 |
| Ba00199 | 00199_174137_F | gggggactaaagggatacagtc | 60.1 | 00199_174137_R | tcctgcatcttacaggacagaa | 59.9 | 123 | 2 | perfect | (GT)18 |
| Ba00202 | 00202_221706_F | caggcctctgctagacaacata | 59.5 | 00202_221706_R | taatcgctgttccatgagattg | 60.1 | 148 | 2 | perfect | (GT)16 |
| Ba00203 | 00203_136570_F | ttcatatatcttgccgaaccct | 59.8 | 00203_136570_R | aaacgactgtcaatctatgtttgc | 59.6 | 144 | 2 | perfect | (AC)22 |
| Ba00205 | 00205_303932_F | cgcagtgcaagcatcttaatag | 60.1 | 00205_303932_R | tctcaaaattcccgtcttctgt | 60.1 | 140 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)28 |
| Ba00208 | 00208_257727_F | gccaaagtttcactgggtctac | 60.0 | 00208_257727_R | ccctgtctttctctctggctaa | 60.0 | 114 | 2 | perfect | (AC)13 |
| Ba00210 | 00210_54610_F | gaagggagacaccatctacgac | 60.0 | 00210_54610_R | gcaactccatatgtcaccagaa | 60.0 | 150 | 3 | imperfect with no gaps | (AGT)16 |
| Ba00212 | 00212_127426_F | ggtccgtccctaccacatctat | 61.3 | 00212_127426_R | gctatatcaggcagatgcacag | 59.9 | 146 | 2 | perfect | (CA)19 |
| Ba00213 | 00213_68215_F | tacacaaaagccagcgtaagaa | 60.0 | 00213_68215_R | tgtcagtgctcatgtttgtgtc | 59.8 | 125 | 2 | perfect | (AC)16 |
| Ba00214 | 00214_171320_F | ttgtcactgtctgcctctgttt | 60.0 | 00214_171320_R | ccgaaaccaattactagactgaca | 59.6 | 246 | 2 | perfect | (AC)19 |
| Ba00215 | 00215_56434_F | ctcaaacttctccccagtcatc | 60.1 | 00215_56434_R | cagtgaccgtgtcattcatctc | 60.6 | 121 | 2 | perfect | (AC)14 |
| Ba00217 | 00217_189367_F | tcctctgaagtgatggaaacac | 59.2 | 00217_189367_R | accccggggaaataagtaagta | 60.0 | 297 | 2 | perfect | (GT)31 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00218 | 00218_311412_F | gggtttggatcgaaatgtatgt | 60.0 | 00218_311412_R | gcacacaaggctgctactactg | 60.1 | 141 | 2 | perfect | (GT)16 |
| Ba00220 | 00220_358437_F | accacaagtctttctcaaggga | 60.2 | 00220_358437_R | gatgcaataccatcaaggaggt | 60.2 | 151 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)22 |
| Ba00221 | 00221_265802_F | cttgtccttcctgtcagagctt | 60.1 | 00221_265802_R | cattctcctgtcctgtttcctt | 59.6 | 118 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)16 |
| Ba00222 | 00222_65123_F | gctctcagttgcttgtcacatc | 60.1 | 00222_65123_R | gttattgtgccccaatttgttt | 60.0 | 145 | 2 | perfect | (CA)15 |
| Ba00227 | 00227_70020_F | gagaacactgacagaatgcagg | 59.9 | 00227_70020_R | caccaaaacctacacaacgaaa | 59.9 | 317 | 2 | perfect | (CA)18 |
| Ba00228 | 00228_22684_F | ctagtatgtgaccacccagcaa | 60.1 | 00228_22684_R | caatattgccaaagcatcaaga | 60.1 | 290 | 2 | perfect | (CA)19 |
| Ba00229 | 00229_230871_F | gagagaagagaaagggtagggtg | 59.8 | 00229_230871_R | aacctgacaaatcctgatccat | 59.7 | 104 | 2 | perfect | (GT)17 |
| Ba00230 | 00230_325570_F | attttcctagtaacagggctca | 57.1 | 00230_325570_R | ctctctgccttggaaagacatt | 59.9 | 120 | 2 | perfect | (GT)16 |
| Ba00231 | 00231_259399_F | aatgccaacgttttattctgct | 60.0 | 00231_259399_R | atctgtttccaagcaacaaggt | 60.0 | 223 | 2 | perfect | (GA)27 |
| Ba00232 | 00232_301439_F | taccagctgaacacagcaatct | 59.9 | 00232_301439_R | aatactgaaggaaatgagcgga | 60.1 | 147 | 2 | perfect | (CA)18 |
| Ba00233 | 00233_211140_F | cctgtagatgggggtgtgtatt | 60.0 | 00233_211140_R | ttccagcagcttataacttccc | 59.8 | 129 | 2 | perfect | (TG)12 |
| Ba00236 | 00236_269275_F | tgtctgagcactttcatgtgtg | 60.0 | 00236_269275_R | tctgctgaccagtatgagtgct | 60.1 | 131 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)17 |
| Ba00239 | 00239_273631_F | tgaatggttaatcggactgttg | 59.9 | 00239_273631_R | caaatagtttgggggtttgtgt | 60.0 | 136 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)21 |
| Ba00242 | 00242_90122_F | aagtggaagtggactgtgtgtg | 60.1 | 00242_90122_R | acagcatgtacacagggaaatg | 59.9 | 248 | 2 | perfect | (CA)27 |
| Ba00244 | 00244_137400_F | cccgacaatgactaatgtctca | 60.0 | 00244_137400_R | cagtgctgatgagtgctttttc | 60.1 | 341 | 2 | perfect | (AC)20 |
| Ba00245 | 00245_310245_F | acactgctgcaagactgtagga | 60.1 | 00245_310245_R | tgaagaagggtgcatgtgtaag | 60.2 | 139 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)23 |
| Ba00246 | 00246_232655_F | tgttttctgtccttccgatttt | 60.0 | 00246_232655_R | gtgaagactgtgacagctgagg | 60.1 | 276 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)24 |
| Ba00248 | 00248_41311_F | tctctgagatggtgtgtgtgtg | 59.8 | 00248_41311_R | actggctgattaaagcaggatt | 59.3 | 136 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)22 |
| Ba00249 | 00249_88492_F | tatctgggtgtcacttgtcctg | 60.0 | 00249_88492_R | gagattgttcgtaactccccag | 60.0 | 122 | 2 | perfect | (TG)19 |
| Ba00250 | 00250_172203_F | aaatcatctgccctactcctga | 60.1 | 00250_172203_R | caggaacacacatacacccact | 59.8 | 150 | 2 | perfect | (GT)15 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00251 | 00251_176303_F | caagtgaggtaatgaatcagcg | 59.8 | 00251_176303_R | cacatgttggcaagattcagat | 60.0 | 131 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)20 |
| Ba00252 | 00252_284152_F | gcttgttgtctgggagttatcc | 60.0 | 00252_284152_R | actagagccagccactaggatg | 59.9 | 101 | 2 | perfect | (CA)17 |
| Ba00254 | 00254_115440_F | tggctgtaacaagtacaacatgc | 60.1 | 00254_115440_R | cgtgaattatggagtctgtcca | 60.0 | 125 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)18 |
| Ba00255 | 00255_110427_F | atgaccctccagactcctgtaa | 60.0 | 00255_110427_R | attgtggtatgacgaggtaggg | 60.1 | 143 | 2 | perfect | (GT)21 |
| Ba00257 | 00257_230233_F | cccaacaccaatacacattcac | 60.0 | 00257_230233_R | ttagggcagctgttaccatttt | 60.0 | 144 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)18 |
| Ba00259 | 00259_38068_F | tccctctctctctctcatccag | 60.1 | 00259_38068_R | aaatccgtctgttgaccctcta | 60.0 | 233 | 2 | perfect | (TG)22 |
| Ba00260 | 00260_213233_F | gagaggggactagggtcaaact | 60.0 | 00260_213233_R | ggtgagtctttgttgctgtctg | 60.0 | 204 | 2 | perfect | (AC)17 |
| Ba00261 | 00261_176016_F | gtgctcgctctcttttctctc | 59.9 | 00261_176016_R | ctggtttgtcaaggctctctct | 60.1 | 327 | 2 | perfect | (CA)22 |
| Ba00262 | 00262_114168_F | gccgtttgtagaacaaggattc | 60.0 | 00262_114168_R | cagagtgagacaaataaggaacga | 59.8 | 237 | 2 | perfect | (TG)21 |
| Ba00263 | 00263_250029_F | actagcatcatgcacactccag | 60.3 | 00263_250029_R | tagactgagagcaatgatcgga | 60.0 | 120 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)17 |
| Ba00264 | 00264_296767_F | gagtcagatcttgggctcactt | 59.9 | 00264_296767_R | tccctataaatggatgattggc | 60.0 | 137 | 2 | perfect | (AC)13 |
| Ba00265 | 00265_126950_F | gacatgtagtgtgttggatggg | 60.2 | 00265_126950_R | cattaaggggacttgctttttg | 60.0 | 147 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)17 |
| Ba00267 | 00267_52317_F | gatgaagctgaggaagaggaaa | 60.0 | 00267_52317_R | aaagaagcactccagatgaagc | 60.0 | 226 | 2 | perfect | (CA)18 |
| Ba00268 | 00268_35309_F | tttgtatgagtcatccgctgtt | 59.6 | 00268_35309_R | ggctcctctgttagtggctaga | 60.0 | 152 | 2 | perfect | (TG)13 |
| Ba00269 | 00269_183859_F | gtatctggtatctccacccacc | 59.6 | 00269_183859_R | aagtctccaaaccagctctcag | 60.1 | 145 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)20 |
| Ba00271 | 00271_88447_F | aaatgcagagatccacacaatg | 60.0 | 00271_88447_R | taccacaaatgttctggctcac | 60.0 | 112 | 2 | imperfect with gaps | (TG)17 |
| Ba00272 | 00272_69652_F | atttctagccaaggctcatttg | 59.8 | 00272_69652_R | catttagcaggtcacaaaccaa | 60.0 | 268 | 2 | perfect | (GT)15 |
| Ba00273 | 00273_203030_F | acccagaaaagcaagttacagc | 59.8 | 00273_203030_R | ggacaatgaaaagacatacgca | 60.0 | 137 | 2 | perfect | (GT)18 |
| Ba00274 | 00274_94421_F | gttcaactcgtaacaaggtccc | 59.9 | 00274_94421_R | gcatttgcaatacatttgcagt | 60.0 | 376 | 2 | perfect | (AC)26 |
| Ba00275 | 00275_165989_F | catgtcacctcactgtcctcat | 60.0 | 00275_165989_R | tggcactgaaagaaagtttgtg | 60.3 | 126 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)20 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00279 | 00279_163067_F | caacaacagcaatatccagcat | 60.0 | 00279_163067_R | cctgctcctcatacacacacat | 60.1 | 124 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)21 |
| Ba00280 | 00280_100118_F | aaacgaaacaggatgaggagaa | 60.1 | 00280_100118_R | ggtttgtgttgcaatctaagca | 60.2 | 146 | 2 | perfect | (AC)15 |
| Ba00281 | 00281_302083_F | acatgaacctttacaccaccc | 60.0 | 00281_302083_R | tacttcacacgatggctcattc | 60.1 | 206 | 2 | perfect | (GT)16 |
| Ba00283 | 00283_163507_F | tgacctcttgttcattcttcca | 59.7 | 00283_163507_R | caagcaaatacaaaacaacacaga | 59.3 | 113 | 2 | perfect | (TG)15 |
| Ba00284 | 00284_267020_F | gatttacataaaaagcccgcag | 60.0 | 00284_267020_R | gcctctgtttaccaaccaagtc | 60.0 | 273 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)21 |
| Ba00285 | 00285_91074_F | acaaccatctggtgtgtatgga | 60.2 | 00285_91074_R | cagctgcctcactctatcaatg | 60.0 | 126 | 2 | imperfect with gaps | (CA)25 |
| Ba00287 | 00287_212724_F | gactggtgagtttgcacagatg | 60.8 | 00287_212724_R | gcaaaacaatacactgccttca | 60.2 | 122 | 2 | perfect | (TG)15 |
| Ba00288 | 00288_182806_F | ttccattcagaaaacaatgcac | 60.0 | 00288_182806_R | atacacaggttgcctttgatcc | 60.3 | 102 | 3 | perfect | (ATG)9 |
| Ba00289 | 00289_110193_F | aacgaaaccgctgtaaaacaat | 59.9 | 00289_110193_R | cccattcatttgagtaggggta | 60.1 | 345 | 2 | perfect | (CT)27 |
| Ba00291 | 00291_55459_F | ggaatgggatgatagtggactg | 60.6 | 00291_55459_R | tctgtctctgtctcttgcttgc | 59.9 | 147 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)31 |
| Ba00293 | 00293_239989_F | gtgggagtgcattgtctgtaaa | 60.0 | 00293_239989_R | aaggactcctacactctctgcg | 60.1 | 164 | 2 | perfect | (CA)15 |
| Ba00294 | 00294_168402_F | gctttattcctgtctctcccct | 60.1 | 00294_168402_R | tttcaagggcagttgaattttt | 60.0 | 285 | 2 | perfect | (CA)18 |
| Ba00296 | 00296_77766_F | tccaagcattatgtgcgaatac | 60.0 | 00296_77766_R | gaggggagtgagcttcagttac | 59.4 | 147 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)17 |
| Ba00298 | 00298_179563_F | gggaaaagaagggagagaatgt | 60.0 | 00298_179563_R | actgcagcttaccctgaaactc | 60.0 | 136 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)28 |
| Ba00299 | 00299_219226_F | ttgaattgtctgatgtcaaggg | 60.0 | 00299_219226_R | tgtgggctaattacatgtcagc | 60.0 | 200 | 2 | perfect | (AC)25 |
| Ba00301 | 00301_147576_F | ccctcccattctctctctctct | 60.3 | 00301_147576_R | tgggtatgccattaaagcaaat | 60.6 | 131 | 2 | imperfect with gaps | (CT)27 |
| Ba00302 | 00302_117386_F | ccaagcaaccaggtttatgaat | 60.2 | 00302_117386_R | tgtttctgtatgcacagctacg | 59.1 | 127 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)22 |
| Ba00303 | 00303_288918_F | tgtaacttcctgtgtctggtgg | 60.1 | 00303_288918_R | agaatgaccactgaatacgcct | 60.0 | 149 | 2 | perfect | (CA)15 |
| Ba00307 | 00307_134557_F | tgctaaatcggtggagttcttt | 60.1 | 00307_134557_R | aggcaatgtttgagatgacctt | 60.0 | 129 | 2 | perfect | (AC)17 |
| Ba00308 | 00308_198364_F | gtgcagttatggttgcatgttt | 59.9 | 00308_198364_R | aaacaaagcactgaaagaagcc | 59.9 | 179 | 2 | perfect | (TG)17 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00311 | 00311_2504_F | tgtattttgcctaatttgctgg | 59.2 | 00311_2504_R | catgtctctgacttccatcctg | 59.7 | 142 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)25 |
| Ba00315 | 00315_214426_F | gtattcctctgtgccgtagacc | 60.0 | 00315_214426_R | cgtggtctgttgacatgaaagt | 60.1 | 237 | 2 | perfect | (AC)16 |
| Ba00316 | 00316_307181_F | tgaccagtaaagcacagattgg | 60.2 | 00316_307181_R | agtaagaactggtggctggtgt | 60.1 | 191 | 2 | perfect | (TG)17 |
| Ba00317 | 00317_245129_F | actgaatcagccctcgctataa | 60.2 | 00317_245129_R | ggccacagccttctgtattatc | 60.0 | 155 | 2 | perfect | (TG)19 |
| Ba00319 | 00319_291741_F | cagtgtgtctcaagggagtctg | 59.9 | 00319_291741_R | cgcacataacttctctcattgc | 59.9 | 114 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)20 |
| Ba00320 | 00320_152143_F | tcacacaagtctaacctgcacc | 60.2 | 00320_152143_R | aggatggcaaacagtctgatct | 60.1 | 265 | 2 | perfect | (GT)21 |
| Ba00321 | 49362_2269_F | tttggactgtgattggaaactg | 60.0 | 49362_2269_R | tcaggaaattccattatgaccc | 60.0 | 287 | 2 | perfect | (TG)17 |
| Ba00322 | 00322_215349_F | aagagctatgacagaattgtcgg | 59.8 | 00322_215349_R | attctcatttccatggttgctg | 61.2 | 110 | 2 | perfect | (CA)15 |
| Ba00323 | 00323_106563_F | ttactcaccacacacatgcaaa | 60.1 | 00323_106563_R | ggatcggacaagaagtggttag | 60.0 | 146 | 2 | perfect | (AC)12 |
| Ba00324 | 00324_45366_F | gagttgcatgtgaagtgtccat | 60.0 | 00324_45366_R | gttttcttttctcctcctggct | 60.2 | 266 | 2 | perfect | (TG)20 |
| Ba00325 | 00325_150740_F | acagctgtggtgctgagataga | 60.1 | 00325_150740_R | ttttcacagagtcattgttggc | 60.2 | 103 | 2 | perfect | (AG)15 |
| Ba00327 | 00327_126646_F | acgggagatgaatcatgacag | 59.9 | 00327_126646_R | tatgtcagactacactgcgcct | 60.0 | 113 | 2 | perfect | (TG)15 |
| Ba00329 | 00329_44622_F | taaagggaaacgccatagtgac | 60.4 | 00329_44622_R | cggacaggaaaatacactcaca | 60.0 | 122 | 2 | perfect | (TG)17 |
| Ba00330 | 00330_206854_F | gccagagcaaccaaattaaatc | 60.0 | 00330_206854_R | atgtggtagcaaaatggtgttg | 59.8 | 230 | 2 | perfect | (TG)23 |
| Ba00332 | 00332_70603_F | acacgacacacacaaacagtga | 60.2 | 00332_70603_R | caacttctgcacctcgtctatg | 59.9 | 151 | 2 | perfect | (AC)17 |
| Ba00333 | 00333_218804_F | tttgcatcatcattgtcactca | 60.1 | 00333_218804_R | agcatggaagagcagttacaca | 59.9 | 150 | 2 | perfect | (TG)13 |
| Ba00334 | 00334_134051_F | ttgtttttctcaggcttttggt | 60.1 | 00334_134051_R | acgcacacacacatatggtaca | 59.8 | 150 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)15 |
| Ba00336 | 00336_277236_F | cacttaagtctccccctctgtg | 60.2 | 00336_277236_R | ncagttcaggacaagtaaaacatc | 58.0 | 255 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)23 |
| Ba00337 | 00337_63516_F | cacatcctcactcagagactgc | 60.1 | 00337_63516_R | atgattgcattttcttcctcgt | 60.0 | 325 | 2 | perfect | (AC)16 |
| Ba00338 | 00338_132157_F | ttacctggagcaaacaaaggat | 60.0 | 00338_132157_R | tggtgcattgctaataaacctg | 60.0 | 282 | 2 | perfect | (AC)19 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00340 | 00340_211772_F | tatatgtggcgtcttgtgctct | 59.8 | 00340_211772_R | tatattcccatgcatagtcgca | 60.3 | 133 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)17 |
| Ba00342 | 00342_217848_F | taatcacgctatctccgaacaa | 59.7 | 00342_217848_R | accattctcacgttcacacttg | 60.1 | 350 | 2 | perfect | (GT)27 |
| Ba00344 | 00344_229141_F | agatgtagcctccctctgtgag | 59.9 | 00344_229141_R | cttcttgtgtttgtgtgcgttt | 60.3 | 144 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)15 |
| Ba00348 | 00348_249836_F | tagcaggtcttgatgtagcagc | 59.7 | 00348_249836_R | ctggcaagtacaccctctctct | 59.9 | 324 | 2 | imperfect with no gaps | (GA)17 |
| Ba00349 | 00349_117312_F | ttcaacgtgtgctgagctaaat | 60.0 | 00349_117312_R | atgtttgcagaatgttttcacg | 60.0 | 197 | 2 | perfect | (GT)21 |
| Ba00351 | 00351_225199_F | actctgccaattgtgtgtatgc | 60.1 | 00351_225199_R | tgtcatgggatagtttggtcag | 59.9 | 128 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)23 |
| Ba00352 | 00352_17553_F | ccctaacctcagtcctgttgtc | 60.0 | 00352_17553_R | gtcacaatctccccttctgttc | 60.0 | 122 | 2 | perfect | (TG)18 |
| Ba00353 | 00353_80333_F | atcacttttctcctcacagcc | 59.8 | 00353_80333_R | tatcgttcagacaccgtactgc | 60.2 | 256 | 2 | perfect | (CA)40 |
| Ba00354 | 00354_195889_F | cacttactactgctgcactggg | 60.0 | 00354_195889_R | acatcagtgacatgctccaatc | 60.0 | 283 | 2 | perfect | (GA)16 |
| Ba00355 | 00355_85820_F | gcaagtgcaacattaggtgtgt | 60.1 | 00355_85820_R | ctgcatgaaaatcagaccacat | 60.0 | 126 | 2 | perfect | (TG)20 |
| Ba00357 | 00357_114080_F | atttccatagacccacatccac | 60.0 | 00357_114080_R | catctgtttagctgatggcaag | 59.9 | 130 | 2 | perfect | (CA)14 |
| Ba00360 | 00360_144136_F | cattgtagtcctcagtgggtga | 60.0 | 00360_144136_R | taatccttttcaaggctctgc | 59.9 | 108 | 2 | perfect | (TG)20 |
| Ba00361 | 00361_142893_F | gatcgtgtatgacactggagga | 60.0 | 00361_142893_R | tgttaagcactttgagctgcat | 60.1 | 137 | 3 | perfect | (TGA)11 |
| Ba00362 | 00362_103951_F | tggtgattacaggtcaaagctg | 60.2 | 00362_103951_R | tggttggaagctttttattggt | 59.9 | 101 | 2 | perfect | (TG)24 |
| Ba00363 | 00363_133525_F | tacatttccattacgagcaacg | 60.0 | 00363_133525_R | gccatggcttctttaaaaactg | 60.1 | 271 | 2 | perfect | (AT)16 |
| Ba00364 | 00364_110919_F | tctgttaaatcagccagcagaa | 60.0 | 00364_110919_R | cggaaaaccactgttaccctta | 60.3 | 265 | 2 | perfect | (AC)23 |
| Ba00366 | 00366_155573_F | gtcgctgagattctgtgcatac | 59.9 | 00366_155573_R | cgttccaatgaggctagactgt | 60.7 | 143 | 2 | perfect | (AC)21 |
| Ba00367 | 00367_13599_F | taacacttgcattgggtttgtt | 59.4 | 00367_13599_R | tgaaagacaatgtttcggaatg | 60.0 | 135 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)21 |
| Ba00368 | 00368_199352_F | acatacagtgcgtgtggacatt | 60.4 | 00368_199352_R | cttgttcttggaaaccctgaag | 60.1 | 114 | 2 | perfect | (GT)16 |
| Ba00369 | 00369_212510_F | agctggagagtgtaggcacatt | 60.3 | 00369_212510_R | gaagaaagatgggcgacattag | 60.1 | 141 | 2 | perfect | (AC)15 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00370 | 00370_61671_F | ggttgcacattttgtttgagaa | 60.0 | 00370_61671_R | ttttatttttggcctgctgagt | 60.1 | 112 | 3 | perfect | (AGT)12 |
| Ba00371 | 00371_126709_F | gaatcacgcatccaaaactgta | 60.0 | 00371_126709_R | gttgacgcatgtcattcaagtt | 60.0 | 145 | 2 | perfect | (AC)19 |
| Ba00372 | 00372_156446_F | acccatacatgtgctgtgtctt | 59.4 | 00372_156446_R | ccgtgtttcttttatctctggg | 60.0 | 145 | 2 | perfect | (TG)16 |
| Ba00373 | 00373_285303_F | acaggccacaaactatctccat | 59.9 | 00373_285303_R | gacagagagagggaggggtg | 61.2 | 122 | 2 | perfect | (CA)16 |
| Ba00374 | 00374_206401_F | atgcgaaaaagaaaacgtcatt | 60.0 | 00374_206401_R | acacctgcaacacatgaaaaag | 60.1 | 135 | 2 | perfect | (TG)19 |
| Ba00379 | 00379_34874_F | tgcatagcctgaaacaagacac | 60.3 | 00379_34874_R | cagctatcaaacctgcctctct | 60.0 | 133 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)19 |
| Ba00380 | 00380_65256_F | actatcagcatcatcatcacgg | 60.0 | 00380_65256_R | tcatgctccatatttcccttct | 59.9 | 271 | 2 | perfect | (AC)18 |
| Ba00382 | 00382_106409_F | aatcaccctcatcgatatcacc | 60.1 | 00382_106409_R | nctctctctctctctctcactca | 59.0 | 226 | 2 | perfect | (TG)15 |
| Ba00384 | 00384_241972_F | agatcatgcctgtgtttgaatg | 60.0 | 00384_241972_R | atgcgcaaatcctaaaatccta | 60.0 | 186 | 2 | perfect | (TG)17 |
| Ba00385 | 00385_3161_F | aggagctgcttctgtctaaacg | 60.2 | 00385_3161_R | agcctcacgatacctaaaacca | 60.0 | 142 | 2 | perfect | (GT)15 |
| Ba00386 | 00386_215848_F | tgtatctagctcctgagacccc | 59.7 | 00386_215848_R | ttattccttcaccccctactga | 59.8 | 149 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)24 |
| Ba00387 | 00387_110610_F | gaaatggggagtttgagagaca | 60.5 | 00387_110610_R | acacacactgagctaaaggcaa | 60.0 | 137 | 2 | perfect | (CA)16 |
| Ba00388 | 00388_5491_F | atagcagttaagcagcagaggg | 60.1 | 00388_5491_R | ttggtccaaccagggtataaaa | 60.4 | 293 | 2 | perfect | (CA)25 |
| Ba00389 | 00389_86907_F | ttttcactgctgactgctgaat | 60.1 | 00389_86907_R | aataatgtgtcaggtaggggttg | 59.2 | 183 | 2 | perfect | (AC)15 |
| Ba00390 | 00390_94555_F | gcatgaaagtccagcaattgta | 60.1 | 00390_94555_R | gtgttgtttttgacagccacat | 59.9 | 143 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)27 |
| Ba00391 | 00391_186975_F | taaaagagcggcattgtgtcta | 59.9 | 00391_186975_R | gtaatgagaaaagcagccaacc | 60.1 | 134 | 2 | perfect | (TG)23 |
| Ba00392 | 00392_266915_F | tgtctgtctctctctgcctctg | 59.9 | 00392_266915_R | gatcccatcattaaaaggctca | 60.3 | 133 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)31 |
| Ba00395 | 00395_196629_F | agtcatccaaaaatgactggct | 60.0 | 00395_196629_R | cacacctgcactaaaactggtc | 59.7 | 117 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)26 |
| Ba00396 | 00396_49430_F | tttgacctgcctttcttgctat | 60.3 | 00396_49430_R | cagtgaggtcagaattgctctg | 60.1 | 110 | 3 | perfect | (TTA)12 |
| Ba00397 | 00397_124125_F | aggattggaatgtgaaatggag | 60.2 | 00397_124125_R | gttctatcccaagaagcacacc | 60.0 | 139 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)20 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00398 | 00398_90943_F | taatccgatagtcgtttcctgg | 60.3 | 00398_90943_R | cgtctatgggacactgactctg | 59.8 | 132 | 2 | imperfect with gaps | (TG)16 |
| Ba00401 | 00401_253434_F | cgtttatgtctcaggggaaaag | 60.0 | 00401_253434_R | ccggtaaaactctaacaccagc | 60.1 | 208 | 2 | perfect | (TG)26 |
| Ba00403 | 00403_159090_F | ccagtagtcgctctgcttacct | 60.1 | 00403_159090_R | tagatctcagatgggagtgggt | 60.0 | 164 | 2 | perfect | (TG)17 |
| Ba00405 | 00405_275398_F | gactgatctgtggaggacactg | 59.8 | 00405_275398_R | ttaacaatagtgcaaaaccccc | 60.1 | 135 | 4 | imperfect with gaps | (TTGT)8 |
| Ba00408 | 00408_171705_F | tcccagtttgatgtgaagacac | 60.0 | 00408_171705_R | cttttgatgggagaaccgttac | 59.9 | 232 | 2 | perfect | (TG)17 |
| Ba00409 | 00409_36083_F | tatatgacgtccgaaagctgaa | 59.7 | 00409_36083_R | accactatggcacagaacacag | 60.1 | 110 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)26 |
| Ba00411 | 00411_197292_F | gaaagcttattaacccgcctct | 60.1 | 00411_197292_R | tgatcccaatgtctctttacca | 59.4 | 324 | 2 | imperfect with gaps | (AC)19 |
| Ba00414 | 00414_248669_F | gagcattcactaatgcataccg | 59.6 | 00414_248669_R | tgatgcaccatgtgttcttgta | 60.0 | 145 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)28 |
| Ba00415 | 00415_58321_F | cagcctcattagagagagggaa | 60.0 | 00415_58321_R | tgtaagtatgcgccagagaaaa | 59.9 | 149 | 2 | perfect | (AC)14 |
| Ba00418 | 00418_158396_F | ttgtgtgaattgcatgttgtgt | 59.9 | 00418_158396_R | tgtttcacacacagctcagaca | 60.6 | 112 | 2 | perfect | (TG)14 |
| Ba00419 | 00419_162528_F | agtcgtactgtggggaaaaaga | 60.0 | 00419_162528_R | attgcccatcagtcctcttcta | 60.1 | 130 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)20 |
| Ba00420 | 00420_110640_F | tctctctcctcctctctctctc | 59.1 | 00420_110640_R | agggattagggaggttcaaaaa | 60.2 | 111 | 2 | perfect | (CA)14 |
| Ba00425 | 00425_185935_F | ccaaatgtttgtcagatgcaat | 59.9 | 00425_185935_R | ttggtgtgttttccaagttctg | 60.1 | 139 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)21 |
| Ba00426 | 00426_225612_F | tttagcccattgacctttgtt | 59.9 | 00426_225612_R | gaagtccagaccagctgagagt | 60.1 | 140 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)24 |
| Ba00429 | 00429_126533_F | gttctgaacctttgtggtctcc | 60.0 | 00429_126533_R | gtgtgtgtgggggtggtaac | 61.0 | 128 | 2 | perfect | (AC)17 |
| Ba00430 | 00430_55738_F | cccgactatgtgtgactagcg | 60.7 | 00430_55738_R | cagccagtgatgtgtgtgtatg | 60.1 | 278 | 2 | perfect | (AC)19 |
| Ba00431 | 00431_177546_F | ctgtctgtgtctgtggggaata | 60.0 | 00431_177546_R | ttagactggaggtaggctggag | 59.9 | 135 | 2 | perfect | (AC)15 |
| Ba00436 | 00436_19386_F | ctcattcatcccttcctctgac | 60.1 | 00436_19386_R | gagtcatgaacagaaacctccc | 60.0 | 140 | 2 | perfect | (TG)17 |
| Ba00437 | 00437_117112_F | tccttagtacgcctcattgtga | 59.8 | 00437_117112_R | tgtgtgtgtgttgtgtgtgtgt | 59.5 | 119 | 2 | imperfect with gaps | (CT)24 |
| Ba00438 | 00438_221425_F | gacacagccgaagagaagaact | 60.1 | 00438_221425_R | aaaaatgcccttgatgctgtat | 59.9 | 149 | 2 | perfect | (AC)15 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00439 | 00439_256922_F | ccaacctccataccttcagaat | 59.4 | 00439_256922_R | nctgcaaagttgtagcagattta | 57.6 | 135 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)22 |
| Ba00441 | 00441_269547_F | acagcactctgactccaatgaa | 59.9 | 00441_269547_R | ttagactgagacctgagccaca | 60.1 | 286 | 2 | perfect | (TG)19 |
| Ba00443 | 00443_76931_F | ttgcccatctggagtaaagact | 60.1 | 00443_76931_R | ctgcaatagaggaaagaggagc | 59.6 | 142 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)17 |
| Ba00444 | 00444_36874_F | tcaaactgccctttttgaagat | 60.1 | 00444_36874_R | cagaaagctgtttcttttgcct | 60.1 | 234 | 2 | perfect | (AT)12 |
| Ba00445 | 00445_150042_F | ggatgtgttggatgggactatt | 60.0 | 00445_150042_R | agcttgtttgttcatgggaaat | 59.9 | 188 | 2 | perfect | (CA)15 |
| Ba00448 | 00448_48208_F | caaaacatgtgtgaggaggaaa | 60.0 | 00448_48208_R | gtgtcctgtctggaaacacaag | 59.7 | 146 | 2 | perfect | (GT)17 |
| Ba00449 | 00449_190409_F | taacagccaaaacaaatatgcg | 60.0 | 00449_190409_R | atgcatctgaaccactgaaatg | 60.0 | 121 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)21 |
| Ba00450 | 00450_64216_F | tttttccctttggcagttgtat | 59.9 | 00450_64216_R | aatttgtccccgaaagtaacct | 60.1 | 244 | 2 | perfect | (GT)14 |
| Ba00452 | 00452_238268_F | tgggacactaggaagaggaaaa | 60.1 | 00452_238268_R | tcattatggctcctggaatagc | 60.4 | 141 | 2 | perfect | (AC)29 |
| Ba00454 | 00454_124238_F | tgtgaacaaacctaccttgacg | 60.1 | 00454_124238_R | acagggcttattgaacacacct | 59.9 | 281 | 2 | perfect | (CA)16 |
| Ba00457 | 00457_145224_F | gctctgttcctttcagcttgtt | 60.1 | 00457_145224_R | tcaaagatgaggcttgaagaca | 60.0 | 346 | 2 | perfect | (AC)23 |
| Ba00461 | 00461_72438_F | atgccaacaataatgcaaactg | 59.9 | 00461_72438_R | tcactctgaaagcgtttttgaa | 60.0 | 164 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)22 |
| Ba00462 | 00462_45158_F | attaatgagtggccttcatgct | 60.0 | 00462_45158_R | agacaatcctgatgtttggcac | 61.3 | 184 | 2 | imperfect with no gaps | (CT)19 |
| Ba00463 | 00463_73801_F | acatcagagcaacaatagcagc | 59.6 | 00463_73801_R | cctgttcatgagtgtcctcaaa | 60.2 | 144 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)20 |
| Ba00464 | 00464_227462_F | gaaaattcaccttcagtccagg | 60.0 | 00464_227462_R | ccccctcgtatacatcacagtt | 60.1 | 140 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)18 |
| Ba00466 | 00466_201546_F | atatcaggggaggattggagtt | 60.0 | 00466_201546_R | tcctctgagcactgtgtttgtt | 60.0 | 244 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)31 |
| Ba00468 | 00468_62179_F | caaatccctaggttggagttga | 60.3 | 00468_62179_R | caagcaattatccaagtgtcca | 60.0 | 149 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)24 |
| Ba00471 | 00471_29393_F | ggacacacacttctcctcacac | 59.7 | 00471_29393_R | ttggcatcaaatgtcaccttac | 59.9 | 399 | 2 | perfect | (AG)35 |
| Ba00477 | 00477_3475_F | tgatatgtatgcagcagcagtg | 59.9 | 00477_3475_R | atgggaaagaacgtgagtgaat | 59.9 | 252 | 2 | perfect | (GT)16 |
| Ba00479 | 00479_164430_F | agagacggaccaacattagcat | 60.0 | 00479_164430_R | ngagagagagagagagtgagacaca | 60.2 | 116 | 2 | perfect | (AC)25 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00481 | 00481_256170_F | accataaaagtgaaaaggccaa | 59.9 | 00481_256170_R | gacctttgagtctaatgggcac | 60.0 | 245 | 2 | perfect | (CT)14 |
| Ba00488 | 00488_15510_F | ctaccacagatttccacccac | 59.3 | 00488_15510_R | ttacccctttctctcatctcca | 60.1 | 223 | 2 | perfect | (AC)14 |
| Ba00491 | 00491_193325_F | aacgctgcttttgaatcatgta | 59.8 | 00491_193325_R | gcactgctgtgttaatgaggag | 59.9 | 140 | 2 | perfect | (GT)15 |
| Ba00492 | 00492_109640_F | gggatagactgcatgtgtgaaa | 60.0 | 00492_109640_R | acaggtttggtcttgacaggtt | 59.9 | 182 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)20 |
| Ba00496 | 00496_15884_F | ggaggaggaagtcaaggttttt | 60.0 | 00496_15884_R | ggctgcagtaccatctgtcata | 60.2 | 149 | 2 | imperfect with gaps | (GT)24 |
| Ba00498 | 00498_193397_F | ttactggtgccagtttgatgtc | 60.0 | 00498_193397_R | accagcaaatgctctgaatttt | 60.1 | 141 | 3 | perfect | (TAA)9 |
| Ba00500 | 00500_1665_F | gcacccacagctaataagaagg | 60.2 | 00500_1665_R | tacatgtgctcgagtgtgtgag | 60.0 | 146 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)32 |
| Ba00501 | 00501_163327_F | gtccaccctatgacctaagcac | 59.9 | 00501_163327_R | gctgagtgctctgggataaaat | 59.8 | 119 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)19 |
| Ba00502 | 00502_177633_F | cactgcttgggtgatgtcata | 59.6 | 00502_177633_R | aatttgcctacctccttccttc | 60.0 | 148 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)17 |
| Ba00505 | 00505_173542_F | tggccctgaattagaaagtcat | 60.0 | 00505_173542_R | cagcacctttgcatttctacac | 59.8 | 150 | 2 | perfect | (CA)16 |
| Ba00506 | 00506_153914_F | gtgtaaaattccccacaagctc | 59.9 | 00506_153914_R | tcacacacacagataaacgcac | 59.7 | 127 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)24 |
| Ba00507 | 00507_138886_F | gacaggagagagatcaggcagt | 60.0 | 00507_138886_R | aggctgataccccttgtgtttgt | 59.9 | 173 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)18 |
| Ba00513 | 00513_127218_F | ttgaaagtactctgtgtgcctg | 58.1 | 00513_127218_R | ctgtccttccctttatctccct | 60.0 | 133 | 2 | perfect | (TG)16 |
| Ba00514 | 00514_61710_F | ggctacaacggtatgagaggac | 60.0 | 00514_61710_R | catctggagacgtgacagagag | 60.1 | 204 | 2 | perfect | (CA)16 |
| Ba00518 | 00518_85385_F | agtgtggccttggagatagtgt | 60.1 | 00518_85385_R | tatttggggatgtttttggaag | 60.1 | 352 | 2 | perfect | (CA)13 |
| Ba00519 | 00519_90493_F | tcaagtgagagtagggcgtaca | 59.9 | 00519_90493_R | aggtcaaaaataacctgagcca | 60.0 | 127 | 2 | perfect | (GT)14 |
| Ba00522 | 00522_93906_F | ctgcctgcatctctctctctct | 60.4 | 00522_93906_R | ttagcattgagcacaaagcact | 60.1 | 185 | 2 | perfect | (TG)14 |
| Ba00524 | 00524_24113_F | ggttattgttgccgaagttttc | 59.9 | 00524_24113_R | ttcatgccagtatacacagcaa | 59.3 | 111 | 2 | perfect | (TG)12 |
| Ba00525 | 00525_73008_F | tgtcgagatcagatcattttgc | 60.2 | 00525_73008_R | gtcttctaacggatgttttgcc | 60.0 | 250 | 2 | perfect | (TG)17 |
| Ba00526 | 00526_103784_F | gctccgtttgtttacatccttc | 60.0 | 00526_103784_R | ttttcagtaatgagtctgctgc | 57.3 | 145 | 2 | perfect | (TG)20 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00528 | 00528_118258_F | gacggctttagttctgtcttgg | 60.3 | 00528_118258_R | agtgtttgtaggtgtgtgggtg | 59.9 | 150 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)18 |
| Ba00529 | 00529_11236_F | ttaagtccgcaagtgctctaca | 60.1 | 00529_11236_R | aatcgcattgacattcacaaag | 60.0 | 220 | 2 | perfect | (CA)13 |
| Ba00530 | 00530_206867_F | tgaccttgagctggatgactaa | 59.9 | 00530_206867_R | tcacagaggggtgcagtataga | 59.8 | 134 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)21 |
| Ba00532 | 00532_28858_F | agacaataaattcccccaaggt | 60.0 | 00532_28858_R | caactgaaaaatacaaaaactgctg | 59.3 | 122 | 2 | perfect | (TG)16 |
| Ba00539 | 00539_199922_F | attgcaggaaaaagggaaaaat | 60.2 | 00539_199922_R | agggaacgggtagaggagatag | 60.0 | 121 | 2 | perfect | (CA)13 |
| Ba00540 | 00540_147465_F | ccaaaaatcctaaccctaaccc | 60.0 | 00540_147465_R | tttccagccatataccacacag | 59.9 | 273 | 2 | perfect | (AC)17 |
| Ba00541 | 00541_245376_F | tttcctttgttaaagtccccct | 60.2 | 00541_245376_R | tgtctggatatctcaagcaaaca | 59.8 | 146 | 2 | imperfect with gaps | (AC)39 |
| Ba00542 | 00542_22467_F | gacagggaacacatgaagtcaa | 60.0 | 00542_22467_R | tgtaacgcaaattgtctcatcc | 60.0 | 118 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)18 |
| Ba00543 | 00543_91589_F | acacagtccacgaaatagaataca | 57.8 | 00543_91589_R | cttttgatctcttccagccagt | 59.9 | 202 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)25 |
| Ba00544 | 00544_183223_F | tgcagtaaagggaaaggtttgt | 60.0 | 00544_183223_R | attgctagtggcttcgcataat | 60.1 | 106 | 2 | perfect | (CA)13 |
| Ba00545 | 00545_157496_F | tgtctatctcccgctcacacta | 59.9 | 00545_157496_R | acgtgtatgtatgcatggtggt | 60.1 | 312 | 2 | perfect | (CA)18 |
| Ba00546 | 00546_227598_F | catttcagactgtttcagctcg | 60.1 | 00546_227598_R | aaggggtcactaacctgtcaga | 60.0 | 175 | 2 | perfect | (TG)12 |
| Ba00549 | 00549_102351_F | ttgtaaggtttcccacctgtct | 59.9 | 00549_102351_R | gctttgttttcactaaatgggc | 60.0 | 282 | 2 | perfect | (AC)16 |
| Ba00550 | 00550_31082_F | agtgtagccaaaatgcaggaat | 60.0 | 00550_31082_R | atgtgccaaacatttcagagtg | 60.0 | 124 | 2 | perfect | (AG)14 |
| Ba00551 | 00551_183042_F | gtgcagcacagaggaaagaaag | 61.5 | 00551_183042_R | aaggtttgtaaaaaggcgttga | 60.0 | 239 | 2 | perfect | (GT)24 |
| Ba00552 | 00552_45779_F | catcctgtcaaactgtcagctc | 59.9 | 00552_45779_R | atgcaaagaatgtcacagcaac | 60.2 | 259 | 2 | perfect | (TG)19 |
| Ba00554 | 00554_194224_F | ggagaaatgcagagaaggaaaa | 59.8 | 00554_194224_R | tactccgaccttgtttcgattt | 60.0 | 337 | 2 | perfect | (TC)19 |
| Ba00556 | 00556_116025_F | tcagacctgtaccggtttttct | 60.0 | 00556_116025_R | tgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtg | 61.2 | 221 | 2 | perfect | (AT)16 |
| Ba00559 | 00559_232640_F | tgaaggaacacaggagctgata | 59.9 | 00559_232640_R | gaacaagcttttctaagcaccc | 59.4 | 116 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)18 |
| Ba00561 | 00561_195912_F | ttagcaaagggtcaattcaggt | 60.0 | 00561_195912_R | tgctgcttctgaaaactccata | 60.0 | 275 | 2 | perfect | (TG)23 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00562 | 00562_82104_F | ngcctccctacctactgtgc | 60.4 | 00562_82104_R | tcatcgctgtcttcctgactta | 60.0 | 127 | 2 | perfect | (CA)15 |
| Ba00564 | 00564_45473_F | caggtcattctcctctgctctt | 60.0 | 00564_45473_R | gatgcattatcctcacacatgc | 60.4 | 163 | 2 | perfect | (CA)14 |
| Ba00568 | 00568_212794_F | gtttgtccagtaacccaatggt | 60.0 | 00568_212794_R | tcaggatgctgactcctgtaaa | 59.9 | 168 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)17 |
| Ba00571 | 00571_140169_F | gccagagccaagataaagctaa | 60.0 | 00571_140169_R | cacacacatgcaaacctaacct | 60.0 | 139 | 2 | perfect | (TG)13 |
| Ba00577 | 00577_13831_F | ggcgagaaatttggtgagatag | 60.1 | 00577_13831_R | aataaactgcaagtccgtttgc | 60.5 | 121 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)19 |
| Ba00578 | 00578_32552_F | tcctttggaaagacaacagctt | 60.3 | 00578_32552_R | cagtggtgtgtttgtgtgtgtc | 60.0 | 121 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)17 |
| Ba00583 | 00583_197206_F | aaccaagttttcatctaggcca | 60.0 | 00583_197206_R | taaggccaagtgtaaagccaat | 60.0 | 105 | 2 | perfect | (GT)18 |
| Ba00587 | 00587_86605_F | cgtcaggtttctcatagcacaa | 60.3 | 00587_86605_R | tgctaagagcaaaaacaccaaa | 59.9 | 150 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)21 |
| Ba00589 | 00589_151519_F | ggggaactgaatgtggagatta | 60.2 | 00589_151519_R | cctttctttccttcatcctcct | 60.1 | 136 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)27 |
| Ba00591 | 00591_222305_F | tgttcgacacagctcctgtaat | 59.8 | 00591_222305_R | cagtcaggtttacagtaggccc | 60.1 | 396 | 2 | perfect | (CA)25 |
| Ba00593 | 00593_113620_F | ngaaaacaaaacaaaaacaagtg | 57.3 | 00593_113620_R | tggtgttatcttgaaatgcagc | 60.1 | 346 | 2 | perfect | (TG)17 |
| Ba00597 | 00597_49293_F | agggaactagcacaaagagctg | 60.1 | 00597_49293_R | acttgtgccaaaatctgactga | 59.8 | 201 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)18 |
| Ba00598 | 00598_34944_F | atttacctcaaaccctcccatt | 60.0 | 00598_34944_R | ctgaggactggaaaatactgcc | 60.1 | 128 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)19 |
| Ba00599 | 00599_215025_F | ccaagcagtacgactgagtgac | 60.0 | 00599_215025_R | gctccaggaagaagacttcaaa | 60.0 | 147 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)28 |
| Ba00601 | 00601_158674_F | agcaacatccagccatgtagta | 59.7 | 00601_158674_R | tcccattactgatccagtgaca | 60.4 | 107 | 2 | perfect | (GT)14 |
| Ba00606 | 00606_117549_F | ggcactgagaaccaatctctct | 59.9 | 00606_117549_R | gggaaaaacacacaaacactga | 59.9 | 103 | 2 | perfect | (TG)18 |
| Ba00607 | 00607_205941_F | gttccttatttcctttcacccc | 60.1 | 00607_205941_R | acaacccccaaccaacaata | 60.0 | 176 | 2 | perfect | (TG)16 |
| Ba00608 | 00608_192669_F | aaagacaccaggaaaagttcca | 60.0 | 00608_192669_R | aggacacacctcaaattacgct | 60.1 | 235 | 2 | perfect | (CA)20 |
| Ba00609 | 00609_215496_F | gtgggttttcaaatgggattta | 59.9 | 00609_215496_R | agtgtacacacatgcatcagca | 60.3 | 144 | 2 | perfect | (TG)19 |
| Ba00611 | 00611_213574_F | tgcagctgagtcaagggtaata | 59.9 | 00611_213574_R | gtttaggtccatgtggttccat | 60.0 | 198 | 2 | perfect | (TG)14 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00612 | 00612_4182_F | gtttcaggctggatttaccaag | 60.0 | 00612_4182_R | aaaagggaaagtttagttggca | 59.2 | 145 | 2 | perfect | (GT)15 |
| Ba00613 | 00613_53311_F | agagatgttgggagttcagagc | 59.9 | 00613_53311_R | gggagatgatcagtatgaaggc | 59.9 | 114 | 2 | perfect | (AC)21 |
| Ba00615 | 00615_146462_F | tttgtcacgcatacacacacat | 60.0 | 00615_146462_R | tgtgagcaggataattgaggtg | 60.1 | 245 | 2 | perfect | (CA)15 |
| Ba00616 | 00616_69185_F | actttaggtcatgcagcctgtt | 60.2 | 00616_69185_R | gactgacaaagcagtaagcgtg | 60.1 | 211 | 2 | perfect | (GT)14 |
| Ba00618 | 00618_77660_F | ttatttgtgttgcagaccttgg | 60.0 | 00618_77660_R | acagagacaggaaggctctgac | 60.1 | 119 | 2 | perfect | (GT)18 |
| Ba00621 | 00621_181178_F | gggagagctggttgtttatgac | 60.0 | 00621_181178_R | aatgacttcatgctccaggttt | 60.0 | 222 | 2 | perfect | (GT)14 |
| Ba00622 | 00622_88033_F | aaacaaggagaaatcaccctca | 60.0 | 00622_88033_R | aagcactttgtaactgtgttttgaa | 59.4 | 134 | 3 | imperfect with no gaps | (ATA)19 |
| Ba00623 | 00623_138547_F | tccccttcacttacctgttttg | 60.4 | 00623_138547_R | tatttacaacatggggtgtgga | 60.0 | 167 | 2 | perfect | (AC)19 |
| Ba00627 | 00627_83670_F | catgtaatgcttcttaagcccc | 60.0 | 00627_83670_R | cacatgttgactgtgtgtgtcc | 60.0 | 347 | 2 | perfect | (AC)16 |
| Ba00631 | 00631_217115_F | acagatcacccattatttggct | 59.7 | 00631_217115_R | tgtggtggagaataatcacagc | 60.0 | 182 | 2 | perfect | (CA)16 |
| Ba00634 | 00634_187757_F | agtgaatgtatgtttgttgccg | 59.9 | 00634_187757_R | ctaatgcacatcagccagagag | 60.0 | 380 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)25 |
| Ba00635 | 00635_226359_F | gctcacacaaccctgcataata | 60.0 | 00635_226359_R | ctatcccagtgaaatgcagtga | 60.1 | 346 | 2 | perfect | (AC)20 |
| Ba00638 | 00638_25913_F | gtgggagatgggtttgtatgtt | 60.0 | 00638_25913_R | aggcagaaaccaacctctactg | 59.8 | 126 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)22 |
| Ba00639 | 00639_63945_F | gctgtgcacacatcgtctct | 60.1 | 00639_63945_R | ctattgctgtcaccattgagga | 60.1 | 245 | 2 | perfect | (CA)17 |
| Ba00640 | 00640_218522_F | tttctctatcagccaccactga | 59.9 | 00640_218522_R | cgcgtcactctgacattagaag | 60.1 | 182 | 2 | imperfect with no gaps | (TA)15 |
| Ba00641 | 00641_95262_F | atcctgcctctctctaccctct | 59.9 | 00641_95262_R | ttaaaaacttcctgtgcaaacc | 58.4 | 118 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)33 |
| Ba00645 | 00645_157801_F | cgtgagagtgtgagactgaagg | 60.1 | 00645_157801_R | atcagcactatggagcaaacct | 60.2 | 337 | 2 | perfect | (AC)16 |
| Ba00646 | 00646_39958_F | atcaattgccactcactcacac | 60.0 | 00646_39958_R | agtgtctctttggggaaaaaca | 60.0 | 135 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)15 |
| Ba00647 | 00647_18112_F | cacttcacaggaacaggatgaa | 60.2 | 00647_18112_R | tggggattaggagctgagtaaa | 60.1 | 336 | 2 | perfect | (GA)18 |
| Ba00649 | 00649_8071_F | caccagatctaggtttgcacag | 59.8 | 00649_8071_R | aacattgattttcttccccctt | 60.1 | 261 | 2 | perfect | (CA)18 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00650 | 00650_71824_F | tctgtgaggagcacagttgatt | 59.9 | 00650_71824_R | gacttcctcccatagtcacgtc | 60.0 | 183 | 2 | perfect | (GT)20 |
| Ba00652 | 00652_95261_F | taatataggcctaccaaccccc | 60.3 | 00652_95261_R | ccagcatcattagtgagcagac | 59.9 | 124 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)24 |
| Ba00654 | 00654_73567_F | catgtaatagcatgcaggaacaa | 60.0 | 00654_73567_R | atcacaaggtgtggcattacag | 59.9 | 109 | 2 | perfect | (AC)25 |
| Ba00655 | 00655_188487_F | aaaagcacatagatgagagggc | 59.8 | 00655_188487_R | aagaggtgaaggcaagagacag | 60.1 | 125 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)23 |
| Ba00657 | 00657_186033_F | accatggtaactgacccagact | 59.8 | 00657_186033_R | cacaacgtgagaaatacctgga | 60.0 | 150 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)24 |
| Ba00658 | 00658_22126_F | ttgtgtcgtgttctttgcttct | 60.0 | 00658_22126_R | gcagcagagctagagggttaaa | 60.2 | 281 | 2 | perfect | (TG)15 |
| Ba00659 | 00659_143811_F | ctgatcaggtgattagtgggtg | 59.5 | 00659_143811_R | ctttcctccgtcctagtttcct | 60.1 | 295 | 2 | perfect | (CT)16 |
| Ba00661 | 00661_199929_F | tgcacttttcatatctgcacct | 59.8 | 00661_199929_R | gttctggaagcttttcacatcc | 60.1 | 140 | 2 | perfect | (AC)19 |
| Ba00662 | 00662_10641_F | tttatgtcagcagttgggtttg | 60.0 | 00662_10641_R | ataataaggcgcacagagtggt | 60.1 | 183 | 2 | perfect | (TG)15 |
| Ba00663 | 00663_53252_F | gcaggcctagtagcaataccat | 59.7 | 00663_53252_R | aggcctctggcataataattca | 60.0 | 292 | 2 | perfect | (TG)17 |
| Ba00664 | 00664_98309_F | ataaccgcagcaatctcctaaa | 60.1 | 00664_98309_R | gctgctgtctatgtttaaccctg | 60.2 | 148 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)16 |
| Ba00665 | 00665_91072_F | cacaagctgacaggtgacattt | 60.2 | 00665_91072_R | cacctgtgtctgtgtgttgaga | 59.8 | 132 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)19 |
| Ba00672 | 00672_101631_F | ctttccaagtatgtgcgtgtgt | 60.1 | 00672_101631_R | cagtcagttacggcttcattca | 60.3 | 133 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)33 |
| Ba00673 | 00673_147435_F | ctttccatcaaacccaactagc | 60.0 | 00673_147435_R | atgaacagggacatgacatgag | 59.9 | 141 | 2 | imperfect with no gaps | (GA)17 |
| Ba00675 | 00675_35983_F | agtcatggcagtgaaatgtacg | 60.1 | 00675_35983_R | cttgtctatttccagaatgccc | 60.0 | 169 | 2 | perfect | (TG)16 |
| Ba00677 | 00677_116910_F | gaaaatgatggccttaaagctg | 60.1 | 00677_116910_R | gatggttttagtgctacctggc | 60.0 | 127 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)25 |
| Ba00679 | 00679_48521_F | atattatcgagagccccacgta | 59.9 | 00679_48521_R | gaaatgaactggtgagaccaca | 60.0 | 370 | 2 | perfect | (GT)16 |
| Ba00680 | 00680_103597_F | agcatggctcggttttatatgt | 59.9 | 00680_103597_R | cggagctttgaaaacaaactg | 59.9 | 110 | 3 | imperfect with no gaps | (TTG)16 |
| Ba00681 | 00681_151223_F | cgtcagcatccctcttagactt | 59.9 | 00681_151223_R | tcaaatcaccaggatagcagtg | 60.1 | 118 | 2 | perfect | (GT)17 |
| Ba00682 | 00682_10180_F | agtcatttgaacttcagcccat | 60.0 | 00682_10180_R | ttggtattagggagttggcatt | 59.7 | 111 | 2 | perfect | (CA)16 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00683 | 00683_153133_F | gacattccactttgttacccgt | 60.2 | 00683_153133_R | tccaataaagcactccaaagtt | 57.9 | 157 | 2 | perfect | (CA)15 |
| Ba00684 | 00684_16035_F | tgatccaggatgaataccagtg | 59.8 | 00684_16035_R | agccaagatagctggcttcata | 60.4 | 120 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)23 |
| Ba00685 | 00685_2827_F | gcgtgtagcatttcatttgtgt | 60.1 | 00685_2827_R | aagttcatttcaagcaggaagc | 59.9 | 136 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)20 |
| Ba00686 | 00686_84565_F | ccaacgaggcttatggagatag | 60.1 | 00686_84565_R | gcctgtggcttttacagttctc | 60.3 | 106 | 2 | perfect | (GT)13 |
| Ba00692 | 00692_182106_F | ggagcataacagattgctgaca | 60.3 | 00692_182106_R | tgttgtcagtagctcgactggt | 60.0 | 142 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)19 |
| Ba00693 | 00693_47943_F | ttaatttaaagggccaatgcag | 60.3 | 00693_47943_R | tgatttctgttgtgctacaggc | 60.3 | 258 | 2 | perfect | (AC)23 |
| Ba00697 | 00697_95618_F | accatggattaccagaaccatc | 60.0 | 00697_95618_R | tgtcatagttgtttgaccctgc | 60.0 | 235 | 2 | perfect | (AC)14 |
| Ba00699 | 00699_205382_F | caggctaccactcaactcactg | 60.0 | 00699_205382_R | ccttttgaagccatttcatctc | 60.1 | 178 | 2 | perfect | (GT)15 |
| Ba00700 | 00700_63539_F | gtagcgactccagctctctctc | 59.9 | 00700_63539_R | tatgaagaccctggtgtgtttg | 59.9 | 372 | 2 | perfect | (CA)12 |
| Ba00703 | 00703_106777_F | tttcaggggaaatctaaaacca | 59.8 | 00703_106777_R | ccagttaattgggaaaaagctg | 60.0 | 387 | 2 | perfect | (AC)33 |
| Ba00706 | 00706_63620_F | ctggtgtgcctgttgaatctta | 60.2 | 00706_63620_R | caaactctgcagtcagttggag | 60.1 | 210 | 2 | perfect | (CA)18 |
| Ba00707 | 00707_13000_F | ccttcatggaagtcttttaccg | 60.0 | 00707_13000_R | tttcctgtattgtgattggctg | 60.0 | 187 | 2 | perfect | (CT)24 |
| Ba00708 | 00708_100317_F | gtgtatgtgtgtatgtgcgtgc | 60.0 | 00708_100317_R | gctttgtctctctttgtcaccc | 60.3 | 282 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)26 |
| Ba00709 | 00709_165201_F | ccctatgcattctgtgttttca | 60.0 | 00709_165201_R | tacaggctgagaaagacgtcaa | 60.1 | 262 | 2 | perfect | (GT)14 |
| Ba00711 | 00711_149557_F | acacagccaatttagagccatt | 60.0 | 00711_149557_R | cttgatttgagagcccatgaat | 60.5 | 131 | 2 | perfect | (CA)15 |
| Ba00712 | 00712_32975_F | actaagcatgattgcacagcag | 60.5 | 00712_32975_R | atgaagcagagacattggtcct | 60.1 | 143 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)18 |
| Ba00714 | 00714_19543_F | tttgtgctgctgtgataaacct | 59.8 | 00714_19543_R | ccatttaagcacaaacaggtga | 60.0 | 175 | 2 | perfect | (CA)15 |
| Ba00729 | 00729_16418_F | gctgattgagcctacaagcg | 61.1 | 00729_16418_R | gagatcacaaaggcaaaaggac | 60.1 | 107 | 2 | imperfect with gaps | (GT)26 |
| Ba00731 | 00731_72616_F | tgggctggaaagtagtacctgt | 60.1 | 00731_72616_R | aacgagatcatcaacccagact | 60.0 | 178 | 2 | imperfect with gaps | (CA)18 |
| Ba00732 | 00732_205680_F | atacagctccaagtccactggt | 60.1 | 00732_205680_R | tgagtgtgttgcctttgcttat | 59.8 | 102 | 2 | perfect | (AC)18 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00733 | 00733_52024_F | tttaaaaagcgaggctttcatc | 59.9 | 00733_52024_R | tctaactggctctgatagccct | 59.5 | 122 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)26 |
| Ba00735 | 00735_142037_F | aggtggaaaatgagcagaatgt | 60.0 | 00735_142037_R | gtgtgtatttagcgtagcccaa | 59.2 | 144 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)29 |
| Ba00736 | 00736_28103_F | gtattaagcagatgggacgctt | 59.7 | 00736_28103_R | ccagctaaataaaacagggcac | 60.0 | 132 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)16 |
| Ba00739 | 00739_156044_F | ctgggaatgtgagttcattcaa | 60.0 | 00739_156044_R | tcctgtgttagcttagctgcaa | 60.2 | 138 | 3 | perfect | (TTG)22 |
| Ba00740 | 00740_129410_F | aatgcaaaaacacagcattcac | 60.1 | 00740_129410_R | tgttccaacattcctttcagtg | 60.0 | 359 | 2 | perfect | (TG)18 |
| Ba00741 | 00741_134776_F | aaaagtgtgtgtaagcgtgtgg | 60.1 | 00741_134776_R | tgagcttcggataatggtttct | 60.1 | 101 | 2 | perfect | (TG)15 |
| Ba00742 | 00742_20341_F | ataaaaccaaagccatctgcat | 59.9 | 00742_20341_R | aaagtgccacatcatcacagag | 60.2 | 333 | 2 | perfect | (TG)21 |
| Ba00745 | 00745_120874_F | caccaactgtcacaaatgacct | 59.9 | 00745_120874_R | ggctgtgtggagaaaatacaca | 60.0 | 238 | 2 | perfect | (CA)33 |
| Ba00746 | 00746_27380_F | taggaaccactggagttaggga | 60.0 | 00746_27380_R | cagagaggctgagagacagtga | 59.9 | 134 | 2 | imperfect with no gaps | (CT)29 |
| Ba00747 | 00747_77239_F | acattacccgccactatttttg | 60.1 | 00747_77239_R | tgccacctactgtactggaatg | 60.1 | 146 | 2 | imperfect with no gaps | (CT)20 |
| Ba00749 | 00749_68946_F | aggatatccactgcacacactg | 60.1 | 00749_68946_R | acttttgttccgtttccaccta | 59.9 | 108 | 2 | imperfect with no gaps | (GA)17 |
| Ba00751 | 00751_167377_F | tagcagtaaaataacggcagca | 59.9 | 00751_167377_R | tattgtgtgtctccaggtgagg | 60.0 | 279 | 2 | perfect | (CA)16 |
| Ba00755 | 00755_129270_F | taaacatcttcctcgtgtggtg | 60.0 | 00755_129270_R | ttgccactgcatttttattttg | 60.0 | 254 | 2 | imperfect with no gaps | (TA)16 |
| Ba00758 | 00758_136813_F | ccaataaaggcacacaaagaca | 60.0 | 00758_136813_R | gtgtatgcagtgtgaagtgcaa | 59.8 | 308 | 2 | perfect | (TG)17 |
| Ba00760 | 00760_109813_F | ttcatgagaaattgtttggcac | 60.0 | 00760_109813_R | aatgtgcagtctgaggaacaga | 59.9 | 180 | 2 | perfect | (GT)19 |
| Ba00761 | 00761_181066_F | gacacccccctctactacacg | 60.1 | 00761_181066_R | atgccctgcatctgtttaaagt | 60.0 | 125 | 2 | perfect | (AC)13 |
| Ba00762 | 00762_180208_F | atctcaaggattgacctggttg | 60.4 | 00762_180208_R | tggagatgagactttgatgtgg | 60.1 | 224 | 2 | perfect | (TG)16 |
| Ba00763 | 00763_149998_F | gacaatttgagcaggtgtggta | 60.0 | 00763_149998_R | atggaacctaagcaaggactca | 60.1 | 137 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)17 |
| Ba00764 | 00764_33855_F | ttttacattgccctcatcacag | 60.0 | 00764_33855_R | ccgtgtgtctacaaattcccn | 60.9 | 185 | 2 | perfect | (AC)17 |
| Ba00768 | 00768_151767_F | ggcccatattgtcttgtgatct | 60.2 | 00768_151767_R | ttcaaaccctcgttagtgtcct | 60.0 | 130 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)24 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00769 | 00769_24620_F | cagcaaagtggttagtcaggtg | 59.8 | 00769_24620_R | ggaaagttatgccctctgtttg | 60.0 | 287 | 2 | perfect | (TG)25 |
| Ba00770 | 00770_193378_F | gaatcttacttccagagcctgc | 59.5 | 00770_193378_R | ttcctgccacctcagatatttt | 60.0 | 344 | 2 | perfect | (CA)22 |
| Ba00771 | 00771_194722_F | gcaagtctgggaacacacataa | 60.0 | 00771_194722_R | gtgtgtgcctctatcagtcagc | 59.9 | 255 | 2 | perfect | (GT)15 |
| Ba00772 | 00772_188965_F | gttttaacagaggggaccagtg | 59.9 | 00772_188965_R | actgccttatacaagctgcctc | 59.9 | 327 | 2 | perfect | (TG)27 |
| Ba00773 | 00773_62883_F | ccctgtcacatcgtgttagtgt | 60.0 | 00773_62883_R | tgtgtgtccttgtgaatttaaacc | 60.2 | 144 | 2 | perfect | (CA)19 |
| Ba00776 | 00776_154787_F | gtctttatcagaaccacctgcc | 60.0 | 00776_154787_R | tcaaactttaaaccgacagcaa | 59.8 | 326 | 2 | perfect | (TG)16 |
| Ba00777 | 00777_98600_F | aaagccttcctcctctctgtct | 60.0 | 00777_98600_R | aaccaatatctcacacccaacc | 60.0 | 368 | 2 | perfect | (AC)19 |
| Ba00778 | 00778_204378_F | atgactgatgatgaatggcttg | 60.0 | 00778_204378_R | gataaaggaggagggaaaagga | 59.9 | 213 | 2 | perfect | (GT)19 |
| Ba00781 | 00781_193138_F | aggattctgagtgacggaacat | 60.0 | 00781_193138_R | agccaagcaggaagtgtgag | 60.6 | 134 | 2 | perfect | (TG)19 |
| Ba00783 | 00783_22974_F | caccagaagtgcttcatatcca | 60.1 | 00783_22974_R | tcataaatatcccccacaaagc | 60.0 | 246 | 2 | perfect | (GT)16 |
| Ba00786 | 00786_188276_F | gaggagaatggagaatggacag | 60.1 | 00786_188276_R | catacacacacacacacactacacn | 59.6 | 375 | 2 | perfect | (TA)22 |
| Ba00787 | 00787_21001_F | agacttggctctactccaggtg | 59.9 | 00787_21001_R | ttgccagcagccttattttatt | 60.1 | 189 | 2 | perfect | (TG)24 |
| Ba00788 | 00788_133172_F | ttcaaatactagccacgagacg | 59.4 | 00788_133172_R | tcaatcatgacaaacttgcctc | 60.1 | 182 | 2 | perfect | (CT)16 |
| Ba00790 | 00790_149838_F | atacagcatgacctttgagca | 59.8 | 00790_149838_R | gacgcatatgctttgtgtttgt | 60.1 | 240 | 2 | perfect | (TG)27 |
| Ba00791 | 00791_125354_F | cattttgcacagaacaaatggt | 59.9 | 00791_125354_R | gataaagcccagtggaaagatg | 60.0 | 336 | 2 | perfect | (AC)30 |
| Ba00795 | 00795_9771_F | gctacaccgctctcgtctttat | 59.9 | 00795_9771_R | gagcacattgtgttttggagaa | 60.2 | 136 | 2 | perfect | (TG)17 |
| Ba00799 | 00799_175806_F | ctccttctgctttcttttgga | 60.0 | 00799_175806_R | aaagagtcttagcaagcggatg | 60.0 | 106 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)19 |
| Ba00804 | 00804_765_F | tacgtcatcttgttcctgatgg | 60.0 | 00804_765_R | tctcctccaggaaacactcact | 60.3 | 350 | 2 | perfect | (AC)16 |
| Ba00807 | 00807_15806_F | aaaagccatctcatcatgtcct | 60.0 | 00807_15806_R | cccatgtcatttttccattctt | 60.1 | 177 | 2 | perfect | (TG)17 |
| Ba00809 | 00809_161938_F | catttcatcaactctgcctctg | 59.9 | 00809_161938_R | aatgtgtgtttgtcatgaagcc | 59.9 | 103 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)20 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00814 | 00814_163533_F | gccccatggttgatgtattagt | 60.0 | 00814_163533_R | acagtgggtggtagaggaggta | 59.9 | 260 | 2 | perfect | (AC)17 |
| Ba00815 | 00815_144058_F | tagctgatgtttactgcctgga | 59.9 | 00815_144058_R | acaccgtctggatgagagtttt | 60.0 | 298 | 2 | perfect | (CA)17 |
| Ba00816 | 00816_37075_F | actgcactatcacaacaatggc | 60.1 | 00816_37075_R | agtggctatggtcagggttaga | 60.0 | 287 | 2 | perfect | (AC)29 |
| Ba00817 | 00817_131946_F | tctctgccggattcttctagtc | 60.0 | 00817_131946_R | caccacacactcctcttgacat | 60.1 | 264 | 2 | perfect | (CA)23 |
| Ba00819 | 00819_168963_F | gatattctaagggtgtcggctg | 60.0 | 00819_168963_R | tgtaaataccccaaagtgaccc | 60.0 | 363 | 2 | perfect | (AC)22 |
| Ba00820 | 00820_135582_F | ttggaagtgcagtagaggacaa | 59.9 | 00820_135582_R | taacctgcatctgtggaaacac | 60.0 | 194 | 2 | perfect | (TG)18 |
| Ba00821 | 00821_176782_F | cttactactacctaccctacccctc | 57.2 | 00821_176782_R | ttgtgttaatttgtggcaaagg | 59.9 | 180 | 2 | perfect | (CA)17 |
| Ba00826 | 00826_12131_F | ggtgggctgtaggtcttagatg | 60.0 | 00826_12131_R | atcatcacagcgtgagaagaac | 59.4 | 335 | 2 | perfect | (TG)20 |
| Ba00828 | 00828_109198_F | ttggtttcaagatgaactgtgg | 60.0 | 00828_109198_R | gtgaagaacatcctcatcacca | 60.0 | 272 | 2 | perfect | (AC)18 |
| Ba00833 | 00833_77351_F | ggcagttcaaggtgcttaacat | 60.5 | 00833_77351_R | cagctgtgtgtatttttgagctt | 58.7 | 150 | 2 | perfect | (AC)21 |
| Ba00835 | 00835_35085_F | acgaggcagatgagagaaagtc | 60.0 | 00835_35085_R | acactgtcactcaaacaccacc | 60.0 | 127 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)20 |
| Ba00836 | 00836_149429_F | atcatggaacatcacattagcg | 59.9 | 00836_149429_R | tcatgttttgttgttccctctg | 60.0 | 100 | 2 | perfect | (GT)13 |
| Ba00837 | 00837_71847_F | tcattttcaattctgttcgctg | 60.2 | 00837_71847_R | taaacatagcaatgcaaatgcc | 60.0 | 332 | 2 | perfect | (AT)15 |
| Ba00839 | 00839_21044_F | aaagcaggaaacacggattaaa | 60.0 | 00839_21044_R | tcagcgtttgtctctttgtgtt | 60.0 | 198 | 2 | perfect | (AC)17 |
| Ba00841 | 00841_157365_F | aaacgacatgctttcctcattt | 60.0 | 00841_157365_R | ttatgacaacattcaagggcag | 60.0 | 133 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)17 |
| Ba00843 | 00843_27849_F | ccttgaaatacagctcaggtcc | 60.1 | 00843_27849_R | gtttatctttccaagtccgtgc | 60.0 | 252 | 2 | perfect | (TG)16 |
| Ba00845 | 00845_96881_F | gcacatgtcacacacataccag | 60.0 | 00845_96881_R | ttggctcattagctgctttaca | 60.0 | 209 | 2 | perfect | (AC)16 |
| Ba00846 | 00846_50838_F | aacaagataaagcagacggctc | 59.9 | 00846_50838_R | agtgctgggtaggatcaacagt | 60.1 | 281 | 2 | perfect | (TG)16 |
| Ba00847 | 00847_127421_F | tacatgtgtgtctgaggggtgt | 60.3 | 00847_127421_R | tgcttgagaactggagatgaaa | 60.0 | 124 | 2 | perfect | (TG)19 |
| Ba00854 | 00854_147469_F | actgtgctgtaccactctgcac | 60.4 | 00854_147469_R | ccaaggtacaacagcactgaaa | 60.2 | 140 | 5 | perfect | (TAATC)8 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00856 | 00856_1876_F | ttcatcaccaaccaccaaaata | 60.1 | 00856_1876_R | aatgtcagccctcactctgtct | 60.3 | 315 | 2 | perfect | (AC)16 |
| Ba00857 | 00857_38754_F | atgattgccctaagtacagcgt | 60.1 | 00857_38754_R | atatttcatccacgacacctcc | 60.1 | 203 | 2 | perfect | (TG)15 |
| Ba00858 | 00858_125335_F | caaagtactgctctgcctctga | 59.8 | 00858_125335_R | tgtcatgtgtcctgttgtgaaa | 60.1 | 342 | 2 | perfect | (TG)16 |
| Ba00859 | 00859_104637_F | cctgcatgcatcacagtttaat | 60.0 | 00859_104637_R | atgttactgagcatgttggtgc | 60.1 | 224 | 2 | perfect | (CA)18 |
| Ba00862 | 00862_125083_F | ctcttctctgctccctcttcac | 59.8 | 00862_125083_R | tgaggtaacgacacaaaaatgc | 60.0 | 130 | 2 | perfect | (TC)14 |
| Ba00864 | 00864_54093_F | agctgaagaaggagaggaaggt | 60.0 | 00864_54093_R | acagtgtagctggatgctgaga | 60.1 | 120 | 2 | perfect | (CA)19 |
| Ba00866 | 00866_166922_F | gagacgtcaacaggtgaagaaa | 59.4 | 00866_166922_R | gtacacacccatgtgcttcagt | 60.0 | 117 | 2 | perfect | (TG)15 |
| Ba00868 | 00868_187920_F | aggcccaaaaataaaggaagag | 60.0 | 00868_187920_R | agtgtgttgtgtttctgatggg | 59.9 | 250 | 2 | perfect | (AC)23 |
| Ba00872 | 00872_135029_F | tacagctggcctgtcagataaa | 59.9 | 00872_135029_R | aagcaaaatgggaccaaatcta | 59.8 | 295 | 2 | perfect | (AC)18 |
| Ba00873 | 00873_188013_F | tgcataggattgtatctgcgtc | 60.1 | 00873_188013_R | ttccagtttttctccaccatct | 60.0 | 300 | 2 | perfect | (GT)12 |
| Ba00875 | 00875_106151_F | agctgtgaggggaaatatgaaa | 60.0 | 00875_106151_R | aaataaagccatcagctgtcgt | 60.2 | 276 | 2 | perfect | (TG)19 |
| Ba00878 | 00878_146379_F | gctagctcagagttgagtgggt | 60.1 | 00878_146379_R | tgggcccagtttgttagtctac | 60.4 | 140 | 2 | perfect | (TC)16 |
| Ba00882 | 00882_77228_F | caccagttcagctctgcttatg | 60.1 | 00882_77228_R | aacaatcaaggactctgggaaa | 60.0 | 394 | 2 | perfect | (AC)16 |
| Ba00883 | 00883_134414_F | nggtgcctacatactgtagatttc | 57.6 | 00883_134414_R | cactcaaactgatttttgcagc | 59.9 | 274 | 2 | perfect | (GT)26 |
| Ba00885 | 00885_143593_F | aagtgacattgcctggtctttt | 60.0 | 00885_143593_R | catgtgcaggtgtaattgtgtg | 60.0 | 211 | 2 | perfect | (AC)15 |
| Ba00889 | 00889_109127_F | tttttcacgtaaaatcctgcct | 60.0 | 00889_109127_R | actggtaccgcttgaatgttct | 60.1 | 287 | 2 | perfect | (AC)20 |
| Ba00892 | 00892_38605_F | caaactaacatcttggcaacca | 60.0 | 00892_38605_R | caccaaactgtgcaaaaacatt | 59.9 | 364 | 2 | perfect | (CA)20 |
| Ba00894 | 00894_115217_F | tgaggcagggatatttactcgt | 60.0 | 00894_115217_R | ctccttactgagacgagcctgt | 60.1 | 272 | 2 | perfect | (TG)26 |
| Ba00895 | 00895_124894_F | acaaatgaatgatgctgattgg | 59.8 | 00895_124894_R | agattccattttcaccactgct | 60.0 | 315 | 2 | perfect | (AC)21 |
| Ba00899 | 00899_61488_F | ttaaaatgaggcttcagtgggt | 60.0 | 00899_61488_R | caggttgtaccccactgatttt | 60.1 | 304 | 2 | perfect | (AC)22 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00902 | 00902_75955_F | gcaggagtagacagacatgcac | 59.9 | 00902_75955_R | aagcactttcgttaaaaggcag | 60.0 | 186 | 2 | perfect | (TA)16 |
| Ba00903 | 00903_63693_F | ctattttgtcgtcggtttgtga | 60.0 | 00903_63693_R | agcttttggaaaacaacagagc | 59.9 | 163 | 2 | perfect | (TG)15 |
| Ba00905 | 00905_129588_F | gagaccatactacgatggcaca | 60.0 | 00905_129588_R | ctctgcaaacaacaacacatca | 59.8 | 304 | 2 | perfect | (TG)25 |
| Ba00906 | 00906_34904_F | tgtaaggaagatgcatttgtgg | 60.0 | 00906_34904_R | agcaacatcaggaagaaggaaa | 60.2 | 389 | 2 | perfect | (AT)16 |
| Ba00909 | 00909_89223_F | gtaacagccgacagactctcct | 59.9 | 00909_89223_R | cctaaccaggatattgctgcat | 60.4 | 202 | 2 | perfect | (TG)13 |
| Ba00910 | 00910_65961_F | tttataagaccatggggattgc | 60.0 | 00910_65961_R | gaaggaaagctgtgagtgtgtg | 60.0 | 200 | 2 | perfect | (TG)15 |
| Ba00911 | 00911_167209_F | ngtgtgtagtgaaaagtaattctgc | 57.9 | 00911_167209_R | gtaagctgaatatctgtggggg | 59.9 | 199 | 2 | perfect | (TG)17 |
| Ba00913 | 00913_106376_F | ttctttcatgccttttgttgaa | 59.7 | 00913_106376_R | tcctacattggtctcgcctatt | 60.0 | 384 | 2 | perfect | (CT)13 |
| Ba00915 | 00915_183244_F | gaccttgagagtcacatgacca | 60.2 | 00915_183244_R | agggttagagtctgtctggctg | 59.9 | 364 | 2 | perfect | (AC)28 |
| Ba00916 | 00916_67468_F | tctgaccaaaagtggactgaga | 59.9 | 00916_67468_R | ctgtgctaggaagtagcctggt | 60.0 | 280 | 2 | perfect | (AC)13 |
| Ba00917 | 00917_2632_F | accctaggtgggattttgtttt | 60.0 | 00917_2632_R | gcatcggattaaagtgataggc | 60.0 | 389 | 2 | perfect | (AT)40 |
| Ba00918 | 00918_35163_F | agggataagaggggtcattcat | 60.0 | 00918_35163_R | ctcttgagcgagactgacagaa | 59.9 | 143 | 2 | imperfect with gaps | (CA)24 |
| Ba00920 | 00920_111110_F | ttgcagcttcacatgctagttt | 60.1 | 00920_111110_R | actgtgtgtggtttctgaatgg | 59.9 | 259 | 2 | perfect | (GT)13 |
| Ba00921 | 00921_56424_F | tgacttttcctggatcaggttt | 60.0 | 00921_56424_R | cttttcatcaatttccagcaca | 60.1 | 297 | 2 | perfect | (AC)13 |
| Ba00926 | 00926_178429_F | cttcctcaattgatatggagcc | 59.9 | 00926_178429_R | tgtaacagtggaggttgaatgc | 60.0 | 206 | 2 | perfect | (GT)14 |
| Ba00927 | 00927_74939_F | tcaagcttctccagacatttca | 60.0 | 00927_74939_R | gtacatggggaaatcaaccagt | 60.0 | 331 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)18 |
| Ba00930 | 00930_14611_F | atgggaactgctgctaagtagg | 59.8 | 00930_14611_R | aacaacttgacgttttcaggct | 60.2 | 198 | 2 | perfect | (GT)19 |
| Ba00931 | 00931_32550_F | tctcattaagccagccaaaaat | 60.1 | 00931_32550_R | ggtaaagccttcatttcctgtg | 60.0 | 260 | 2 | perfect | (CA)21 |
| Ba00932 | 00932_179206_F | aggacagttccaacattcctgt | 59.9 | 00932_179206_R | tgaatgtgtgtgtgtgtgtgtg | 60.0 | 280 | 2 | perfect | (GT)18 |
| Ba00933 | 00933_85820_F | ttcaagctttgtttgtctccaa | 59.9 | 00933_85820_R | ggtgtgtgtgtttatgtattgctc | 58.5 | 123 | 2 | perfect | (CA)20 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00934 | 00934_70815_F | atgtgagtgtcattatgcggag | 60.0 | 00934_70815_R | cctctcccatcctgtttatctg | 60.0 | 176 | 2 | perfect | (AC)14 |
| Ba00935 | 00935_155990_F | tccatttgtaatcaccctgtca | 60.2 | 00935_155990_R | attccttcacgacatgtaggct | 60.0 | 132 | 2 | perfect | (TG)22 |
| Ba00936 | 00936_23116_F | acgtaaaccaataaaactgcaan | 57.5 | 00936_23116_R | tttgcagaatatgatcaatggc | 59.9 | 270 | 2 | perfect | (CA)26 |
| Ba00937 | 00937_53528_F | aatgttgctgttgaaaacgatg | 60.0 | 00937_53528_R | ctgggctctctctcgtgtgat | 61.9 | 137 | 2 | perfect | (AC)20 |
| Ba00938 | 00938_145208_F | ggagataaggggaactaaacgg | 60.2 | 00938_145208_R | gaaaggaacatggaaaggagtg | 60.0 | 179 | 2 | perfect | (TA)29 |
| Ba00940 | 00940_5717_F | acaagtctccagtggctctttc | 59.9 | 00940_5717_R | caaactggtatttgaagtggca | 60.0 | 203 | 2 | perfect | (AG)14 |
| Ba00944 | 00944_65398_F | ctcatgaagccattcacacaat | 60.0 | 00944_65398_R | gagccaaacctctatgagcagt | 59.9 | 116 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)24 |
| Ba00953 | 00953_123140_F | acactcagctggcagacattta | 59.9 | 00953_123140_R | gtgactgctaacatgaagtcgc | 60.0 | 108 | 2 | perfect | (GT)12 |
| Ba00955 | 00955_124695_F | agcagtttaactaagacaaggattg | 57.5 | 00955_124695_R | ggataacgagaagagctaccga | 59.9 | 235 | 2 | perfect | (TG)20 |
| Ba00956 | 00956_154565_F | ctcattcaaggtaatgggaagg | 59.8 | 00956_154565_R | tagagtcgccgtcatgctaata | 59.9 | 268 | 2 | perfect | (GT)17 |
| Ba00957 | 00957_84992_F | cttgctgcccaatatgtatcaa | 60.0 | 00957_84992_R | gttgccaaagcatcaaaataca | 60.0 | 255 | 2 | perfect | (AC)16 |
| Ba00958 | 00958_133110_F | ttgtcacttgtccatcctcaac | 60.0 | 00958_133110_R | atcagtttgaatgagctggctt | 60.3 | 284 | 2 | perfect | (TG)21 |
| Ba00962 | 00962_9072_F | ctagcccttcgtttccctttat | 60.0 | 00962_9072_R | ttgtgtagcctcttgcttgtgt | 60.0 | 285 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)26 |
| Ba00963 | 00963_169877_F | tctttgcactcctgttgtgact | 60.0 | 00963_169877_R | ctagccgaatgttacctgctct | 59.9 | 139 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)15 |
| Ba00966 | 00966_43581_F | aggtgctgtcactacccaaact | 60.1 | 00966_43581_R | cacaaccatacagaaaagccaa | 60.0 | 216 | 2 | perfect | (TG)18 |
| Ba00967 | 00967_158089_F | ctcagtctattcccaccacaca | 60.0 | 00967_158089_R | ccacccagcagtaatactctcc | 60.0 | 118 | 2 | imperfect with no gaps | (CT)17 |
| Ba00970 | 00970_154333_F | aaaaacaagcctcatcttgagc | 59.9 | 00970_154333_R | tgtttttaaggctttatgggga | 59.9 | 198 | 2 | perfect | (TG)15 |
| Ba00971 | 00971_110457_F | tgtgattaattaagccgtgtgg | 59.9 | 00971_110457_R | acggatcacaaaaagaatttcc | 59.4 | 192 | 2 | perfect | (AC)15 |
| Ba00973 | 00973_74660_F | ttacaccggttaaggagttgct | 60.1 | 00973_74660_R | aaaacttgaaatgcgtcaaatg | 59.2 | 192 | 2 | perfect | (AC)16 |
| Ba00974 | 00974_18978_F | ccaatcaaagcttatgaccctc | 60.0 | 00974_18978_R | tagatgcctctcgtctgaaaca | 60.0 | 113 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)21 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba00979 | 00979_44555_F | gagatttgcaggtgggtttaag | 60.0 | 00979_44555_R | cattgcttatgcaggtgagaac | 59.8 | 121 | 2 | perfect | (TG)12 |
| Ba00981 | 00981_113310_F | agttgagactgagcaaaggagc | 60.2 | 00981_113310_R | tgatagactgcaggcagaaaaa | 60.0 | 147 | 2 | perfect | (CA)17 |
| Ba00982 | 00982_115106_F | gtcatcactgtgctgtctggtt | 60.2 | 00982_115106_R | tgtgaatgtgtgtcaccagtgt | 60.0 | 351 | 2 | perfect | (TC)16 |
| Ba00984 | 00984_169741_F | agtgcagtcaaatgtcaagcat | 59.8 | 00984_169741_R | cattgaactctgaacatgcctc | 59.7 | 378 | 2 | perfect | (TG)18 |
| Ba00988 | 00988_100199_F | gtcagaggacagcatcaacact | 59.4 | 00988_100199_R | ctggtttccttctctttccctt | 60.1 | 127 | 2 | perfect | (AG)12 |
| Ba00989 | 00989_7275_F | tccccttaggtctctgtaacca | 60.0 | 00989_7275_R | caccagcacagctaaacaagag | 60.1 | 237 | 2 | perfect | (AC)14 |
| Ba00992 | 00992_130518_F | agtggtggagacaggatgtttt | 59.9 | 00992_130518_R | tcatcccaaaatttacatgcag | 59.8 | 266 | 2 | perfect | (TG)21 |
| Ba00993 | 00993_79659_F | agagtcgtggagatgaaccatt | 60.0 | 00993_79659_R | ctgtcctaccattcctactggc | 60.0 | 261 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)32 |
| Ba00994 | 00994_81046_F | ttcctctgaatacatgcgtttg | 60.1 | 00994_81046_R | gaagatggagagagagggtgaa | 59.8 | 382 | 2 | perfect | (TG)14 |
| Ba00997 | 00997_851_F | atgcctctctaacctaatgcca | 60.1 | 00997_851_R | aggagagaggaggagagacgn | 60.3 | 241 | 2 | perfect | (TG)34 |
| Ba01000 | 01000_1001_F | tcagtagttgctgatgatgcct | 59.9 | 01000_1001_R | cttgtactcaaggggtttggag | 60.0 | 278 | 2 | perfect | (CA)14 |
| Ba01045 | 01045_146520_F | atttttgtgtgtatttgcgtgc | 59.9 | 01045_146520_R | gggagttttaattaagggtcgg | 60.1 | 120 | 2 | perfect | (GT)12 |
| Ba01054 | 01054_116762_F | tactgctgaggcaacacagtct | 60.1 | 01054_116762_R | tgtgagtgcatacaaacagtgc | 59.8 | 148 | 2 | perfect | (TG)14 |
| Ba01063 | 01063_150945_F | tgatttaggggactaagaggca | 60.1 | 01063_150945_R | gcttctccttatctctccccat | 60.1 | 136 | 2 | imperfect with gaps | (AG)24 |
| Ba01098 | 01098_106052_F | gtatgacaagccaagcagagtg | 59.9 | 01098_106052_R | ctgattaggtggaggatgaagg | 60.0 | 129 | 2 | perfect | (AC)13 |
| Ba01217 | 01217_118109_F | tccctctcttctctcacacaca | 60.0 | 01217_118109_R | actccaagttcatcctctgctc | 59.9 | 114 | 2 | perfect | (AC)16 |
| Ba01223 | 01223_104303_F | aatgacacatgcaggaacagag | 60.2 | 01223_104303_R | ctttcctgttttccttctccct | 60.1 | 141 | 2 | perfect | (GT)19 |
| Ba01263 | 01263_44111_F | tccctgtttaacattcaccaaa | 59.4 | 01263_44111_R | taaggcagcgctttagttcttt | 59.7 | 143 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)22 |
| Ba01267 | 01267_129645_F | tgtggtgtcagagtaatttggg | 59.9 | 01267_129645_R | agggagtggtacatctgctcat | 60.0 | 142 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)31 |
| Ba01354 | 01354_47986_F | gacgaacctgtgagataggtga | 59.2 | 01354_47986_R | agcaaagagctggagagagaga | 60.0 | 116 | 2 | perfect | (TG)18 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

| Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ba01561 | 01561_90042_F | acaacatgtccctgcagctc | 61.3 | 01561_90042_R | tttacagtgtgtgcatccatcc | 60.8 | 139 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)23 |
| Ba01564 | 01564_12423_F | aagcagtgtatgggtcaaaggt | 59.9 | 01564_12423_R | tgtgaatgtgcatcagtgtgtt | 60.1 | 319 | 2 | perfect | (AC)20 |
| Ba01632 | 01632_2485_F | accctctctccaagaagactcc | 60.2 | 01632_2485_R | agaggagctgagtagcacatcc | 60.1 | 149 | 2 | perfect | (TG)13 |
| Ba01757 | 01757_83020_F | gccgctaatgaaaagaataagc | 59.4 | 01757_83020_R | ctttcgtccctaaccagcatac | 60.0 | 122 | 2 | perfect | (GT)19 |
| Ba01850 | 01850_84397_F | tgggcttcagtttttcttgttt | 60.1 | 01850_84397_R | ctccgaatctcgttttaaatgc | 60.1 | 140 | 2 | perfect | (TG)15 |
| Ba01894 | 01894_59038_F | ctttccctgaaccaatgttctc | 60.0 | 01894_59038_R | gaaaatcacgctgtgtaatcca | 60.0 | 188 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)18 |

表2-2　連鎖地図作成に用いたPCRプライマー情報（続き）

有の 4 種類の蛍光色素（FAM, VIC, NED, PET）でそれぞれ標識した多種類の PCR プライマーを使用した[58]。ユニバーサルプライマーおよび、リバースプライマーの末端に付加した PCR 産物末端ポリアデニル付加を促進する 7 塩基の配列情報を、表 2-3 に示す。マルチプレックス PCR には Type-it Microsatellite PCR kit（Qiagen, Hilden, Germany）を用い、メーカー推奨の実験プロトコールに従って行った。PCR 増幅は、5 µl の Qiagen multiplex master mix、1 µl の Qiagen Q solution、終濃度 0.02 µM のフォワードプライマー、終濃度 0.2 µM のリバースプライマー、そして終濃度 0.2 µM の蛍光標識されたユニバーサルプライマーをそれぞれ含んだ 10 µl の反応系により行った。PCR の条件は以下の通りに行った：初期変性 94℃5 分間、94°C30 秒間、58°C 90 秒間、72°C 30 秒間を 28 サイクル、94°C 30 秒間、53°C 90 秒間、72°C 30 秒間を 8 サイクル、そして最終伸長反応を 59°C 3 分間とした。PCR 産物を LIZ-600 size standard（Life Technologies, Carlsbad, CA, USA）と混合し、熱変性（94°C 2 分間）後、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）を用いてフラグメント解析を行った。GENE MAPPER ver. 4.0（Life Technologies 社）を用いて、アレルサイズを決定した。各マーカーのジェノタイピングデータを得た後、アレルの由来が母方であるか父方であるかを決定し、雄雌連鎖地図をそれぞれ構築した。MapDisto software [59]を用いて、LOD スコアを 4.0 に設定することにより各連鎖群を決定した後、連鎖群上の MS マーカーの順序を決定した。最終的に、連鎖地図上の距離をコサンビ関数により算出した。各マーカー同士の分離比において、バッククロスモデルにおけるメンデル遺伝の分離比の期待値（1 : 1）に適合しないマーカーを、カイ二乗検定を行うことにより調べた。多重比較に対す

| Sequence ID | Fluorescent | Sequence (5'-3') |
|---|---|---|
| RV3 | 6-FAM | AGCAAAATAGGCTGTCCC |
| pVP16 | VIC | GCCGACTTCGAGTTTGAG |
| PQE-E | NED | TTGAGAGGATCGCATCCA |
| M13 | PET | TGTAAAACGACGGCCAGT |
| Non-Labeled (addition of A) | | GTTTCTT |

表2-3　ユニバーサルプライマーの配列

るボンフェローニ補正を行った後、5%水準で有意にカイ二乗分布から逸脱するマーカーについて調べた。連鎖地図のゲノム被覆度の推定は、*Chakravarti* et al.[60] の方法 4 にある次の数式に従って行った。$c = 1 - e^{-2dn/L}$, $d$ はマーカー間の平均遺伝距離、$n$ はマーカー数、$L$ は連鎖地図長である。雄雌遺伝地図間の組み換え率の差異は、両地図共通して配置されたマーカー間の遺伝距離を算出することにより行った。

性に連鎖した配列のマッピング

完全養殖の太平洋クロマグロを用いて同定された雄特異的断片 *Md6* の DNA 配列を元に、太平洋クロマグロのゲノムアセンブリに対して BLAST 検索を行うことにより、Ba00007445 スキャフォルドを構成するコンティグ *BADN01109032* と高い配列相同性を示した（Expect value:$8^{e-139}$）[18]。そこで、遺伝連鎖地図に *Md6* 配列を配置させるため、計 4 座位の MS 領域に PCR プライマーを設計した（表 2-2）。ジェノタイピングと連鎖解析は、他の MS マーカーと同様に行った。

ゲノム配列比較とアミノ酸配列比較

6 魚種の硬骨魚類間で保存されているオルソログ遺伝子の探索では、まず各魚種の遺伝子のアミノ酸配列と、位置情報、アノテーション情報を取得した。太平洋クロマグロ全遺伝子[34]のアミノ酸配列、アノテーション情報は、水産総合研究センター　中央水産研究所から提供していただいた。クロマグロ遺伝子の位置情報は、雄雌融合連鎖地図の作成によって得られた連鎖群番号と遺伝距離（cM）とした。メダカ（HdrR, release 83）[22]、イトヨ（release 83）[25]、トラフグ（fr3）[23]、ミドリフグ（tetNig2）[24]は Ensembl Genome Browser（http://asia.ensembl.org/）から、

全遺伝子のアミノ酸配列、帰属する染色体番号遺伝子開始位置（bp）およびアノテーション情報をそれぞれ取得して用いた。なお、トラフグに関しては、染色体上の遺伝子開始位置の情報を得ることはゲノムのバージョン（4.0）の関係上から出来なかった。ヨーロッパシーバス（dicLab v1.0c）[33]については、UCSC Genome Browser（http://seabass.mpipz.mpg.de）から、全アミノ酸配列、帰属する連鎖群番号と遺伝子開始位置（bp）およびアノテーション情報を取得した。

まず、取得した 5 魚種（ヨーロッパシーバスを除く）の全アミノ酸配列を用いて、Protein BLAST を行うことで、5 魚種間で共通するオルソログを抽出した（双方向ベストヒットを抽出。水産総合研究センター　中央水産研究所　中村洋路博士）。E-value の設定は、1e-5 とした。他のパラメーター設定は、デフォルトの値を用いた。次に、ヨーロッパシーバスの全アミノ酸配列を加え、Proteinortho V5.11[61]を用いて 6 魚種間で共通するオルソログを同定した。E-value の設定は、1e-10 とした。他のパラメーター設定は、デフォルトの値を用いた。

次に、クロマグロ雄雌連鎖地図に配置された遺伝子に対応する、6 魚種共通オルソログを抽出した。クロマグロ全連鎖群に配置された 6 魚種共通オルソログについて、ヨーロッパシーバス、メダカ、トラフグ、ミドリフグ、イトヨのそれぞれと比較した。各魚種における連鎖群または染色体番号上の遺伝子配置を調べ、共有されるオルソログの数をカウントすることで、Oxford Grid[62]を作成した。

染色体内のオルソログ分布について調べる際には、クロマグロの連鎖群ごとに、ヨーロッパシーバス、メダカ、ミドリフグ、イトヨのそれぞれで、対応するオルソ

ログをドット形式で描画し、ドットプロットを作成することで行った。オルソログの位置は、クロマグロでは連鎖群上の遺伝距離（cM）を、それ以外の魚種では染色体上の遺伝子（第一エキソン）開始位置（bp）とした。尚、トラフグに関してはスキャフォルド上の遺伝子開始位置（bp）のみの公開であったため、解析には含めなかった。また、ヨーロッパシーバスでマッピングされていないオルソログに関しては、解析から除外した。

ゲノム配列の比較は、メダカゲノム（HdrR, release 83）の 24 本の染色体の配列[22]を Ensembl Genome Browser（http://asia.ensembl.org/）からダウンロードし、太平洋クロマグロの概要ゲノムを構成するスキャフォルド[34]の上位 2,000 本と、LastZ を用いて比較することで行った。ゲノムアラインメントを行う上では HSP=2000 とし、他のパラメーター設定はデフォルトの値を用いた。

クロマグロとブリの連鎖群比較

ブリのラディエーションハイブリッドマッピングを用いた物理地図と、EST 上の SNP マーカーを用いた連鎖地図[63]に配置された EST 配列を、水産総合研究センター　増養殖研究所　青木純哉博士から提供していただいた。2 魚種に共通して存在するクロマグロオルソログに相当するアミノ酸配列に対して、Blast X 検索を行うことにより、オルソログを同定した。E-value の設定は、1e-10 とした。他のパラメーター設定は、デフォルトの値を用いた。各魚種における連鎖群上の遺伝子配置を

調べ、共有されるオルソログの数をカウントすることで、Oxford Grid[62]を作成した。

## 2-3 結果

### マッピング家系

親子関係の推定により、8 尾の雄親と 4 尾の雌親に由来する 8 つの同胞グループから構成されていた （図 2-1, 表 2-4）。連鎖地図構築には多数の個体が必要となり、グループ No. 5 の 193 個体を連鎖地図作成の家系とした。

### マイクロサテライトマーカーの開発

上位 2,000 番のスキャフォルド総延長は 436.8 Mbp となり、全スキャフォルド総延長の 59.0%を占める。606 座位の PCR プライマーを MS 解析用として供試し、そのうち 473 マーカーが解析家系において多型性を示した。

### ジェノタイピングと連鎖解析

グループ No. 5 の 93 個体と親魚 2 個体を、マッピング集団として用いた。我々は連鎖解析に 473 PCR プライマーを用いた。470 マーカーからなる雄雌それぞれ 24 連鎖群を構築した（図 2-2, 表 2-5）。多型性を示し、連鎖解析に用いたマーカー中、99.4%はいずれかのマーカー間で連鎖関係を示した。3 マーカーのみが、連鎖しなかった。

雄連鎖地図は、24 連鎖群、374 MS マーカーから構成された。総遺伝距離は 992.9 cM となり、2 マーカー間の平均遺伝距離は 2.7 cM となった。各連鎖群の長さは 5.4 cM から 84.2 cM に及び、平均は 41.4 cM であった。各連鎖群におけるマーカー数

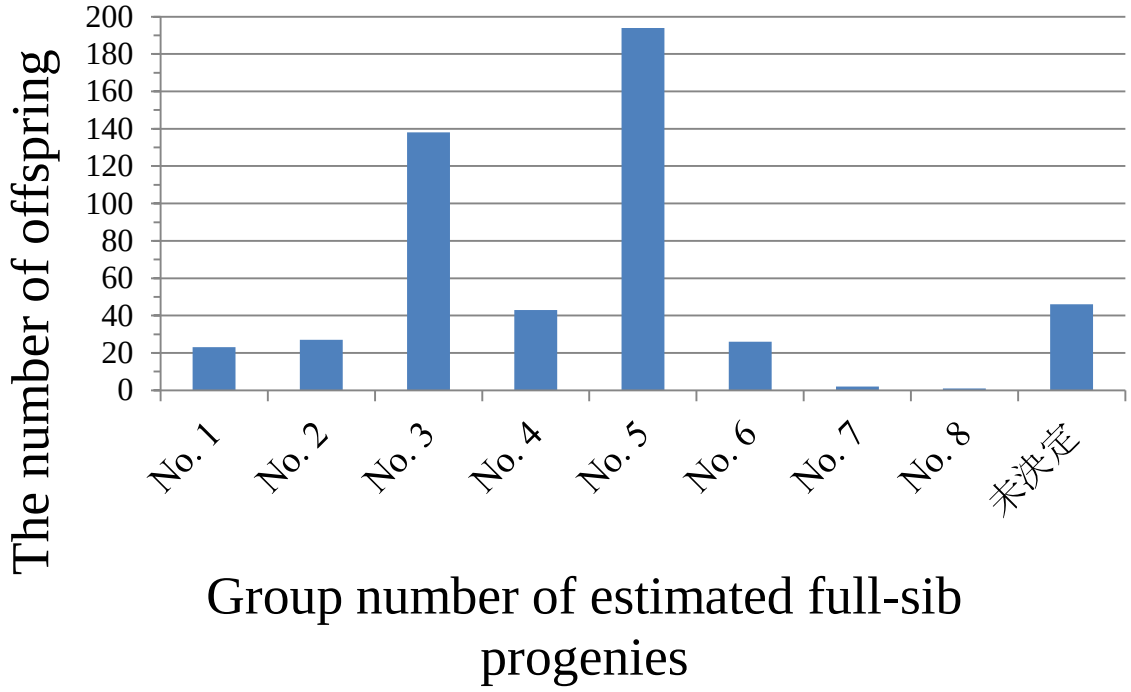



図 2-1　500 個体の太平洋クロマグロ稚魚における同胞集団の組成

推定された同胞群は、8 個体の雄親と 4 個体の雌親に由来する 500 個体の稚魚から構成される。親子鑑定は、11 座位の MS マーカーを用いて行った。X 軸は各同胞群の番号を、Y 軸は稚魚の数を示す。ND：未決定。

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| The number of offspring | 23 | 27 | 138 | 43 | 194 | 26 | 2 | 1 | 46 |
| Group number of estimated full-sib population | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 | No. 6 | No. 7 | No. 8 | ND |
| Male Parent No. | ♂No. 1 | ♂No. 2 | ♂No. 3 | ♂No. 4 | ♂No. 5 | ♂No. 6 | ♂No. 7 | ♂No. 8 | - |
| Female Parent No. | ♀No. 1 | ♀No. 2 | | | | ♀No. 3 | | ♀No. 4 | - |

表2-4 親子鑑定の結果

(A)

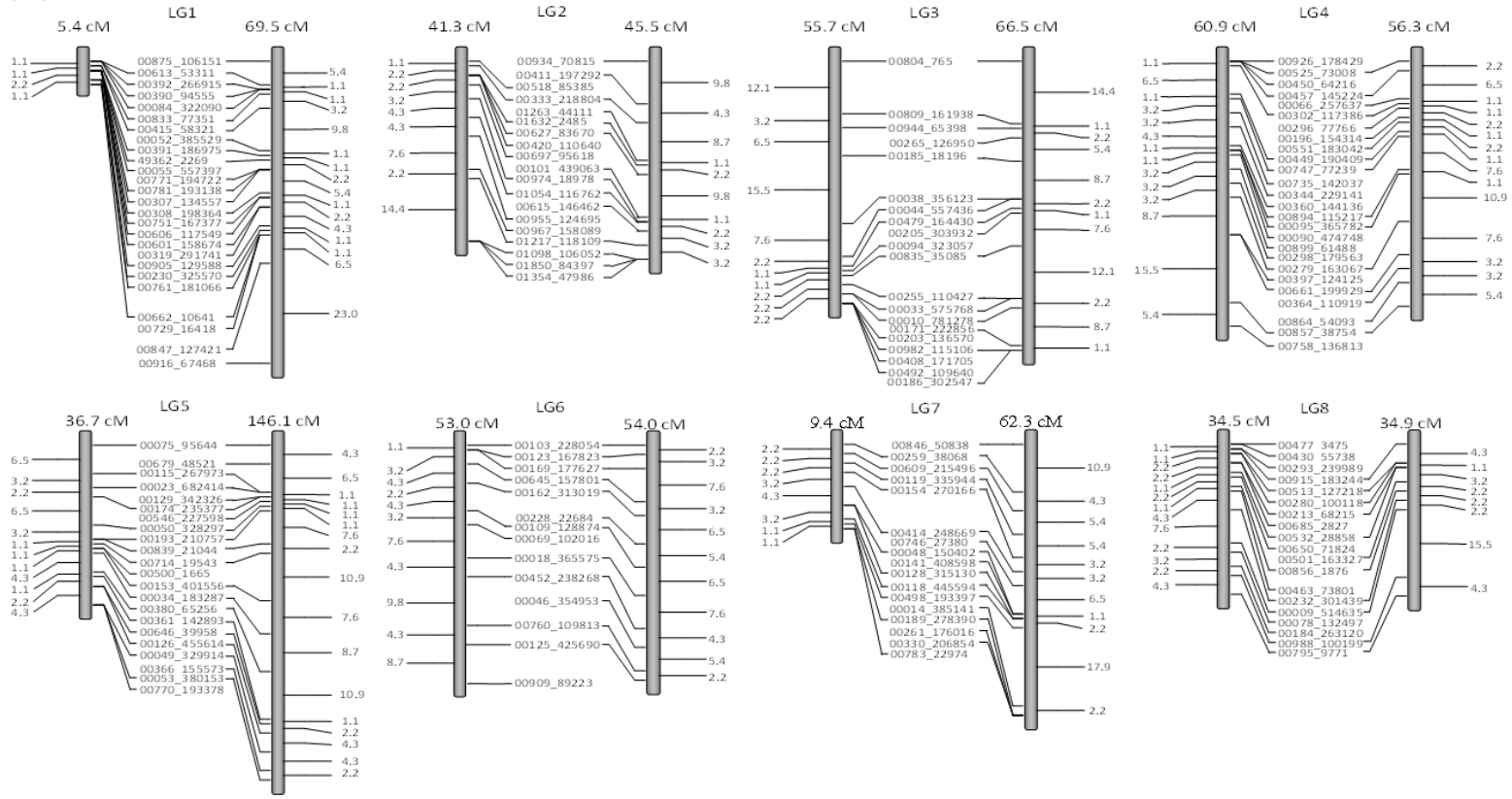



図2-2　太平洋クロマグロの雄雌連鎖地図

左右のバーは、それぞれ雄連鎖群、雌連鎖群を示す。コサンビ関数で算出した隣接マーカー間の遺伝距離（cM）は両端に示す。雄雌連鎖群に共通して配置されたマーカーは、線で結んだ。赤いアスタリスクは、雌親の連鎖地図においてメンデルの1:1分離から有意に逸脱が見られたマーカーを表す。（A）連鎖群1から連鎖群8。

(B)

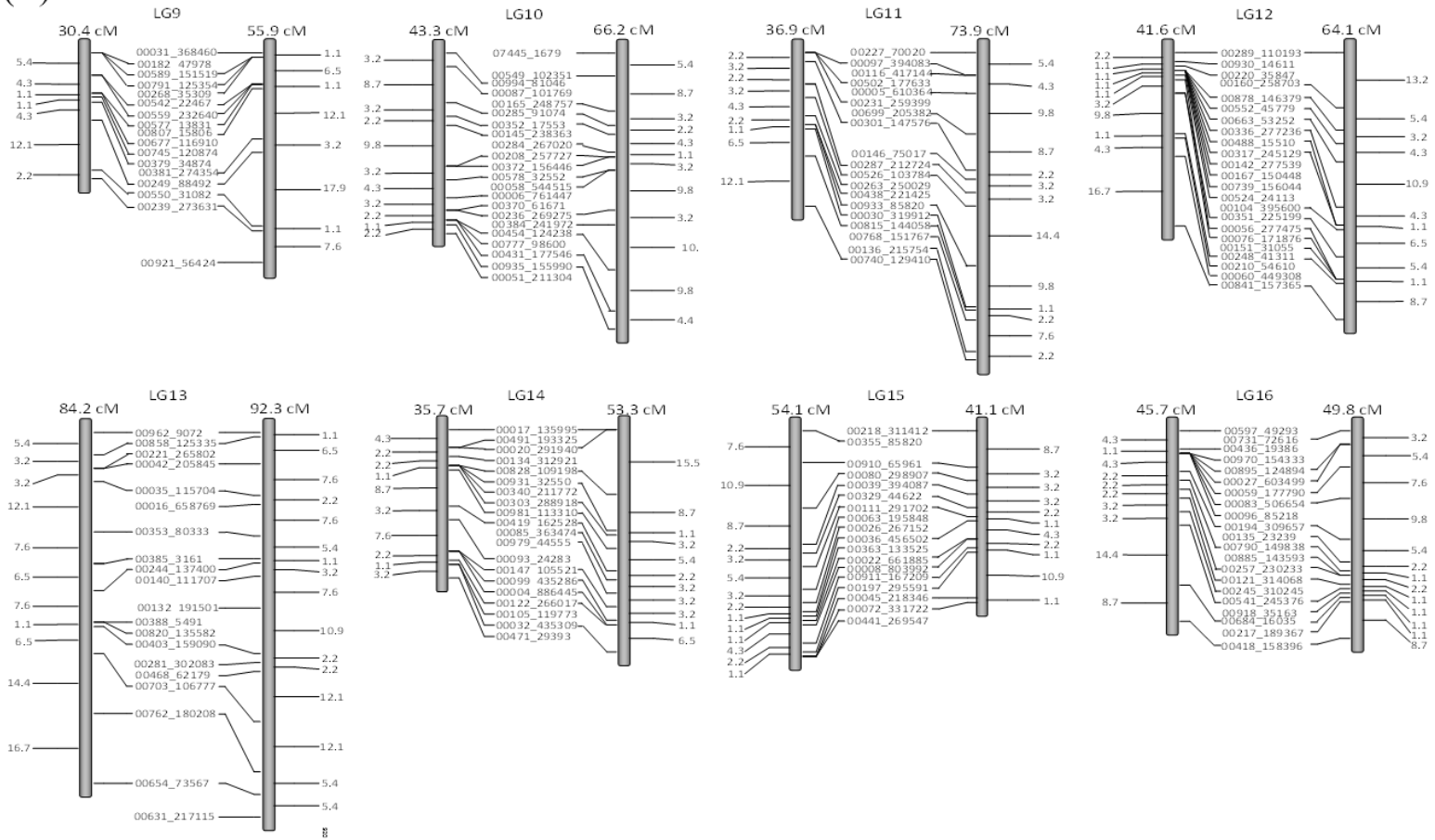



図2-2　太平洋クロマグロの雄雌連鎖地図（続き）
（B）連鎖群9から連鎖群16。

(C)

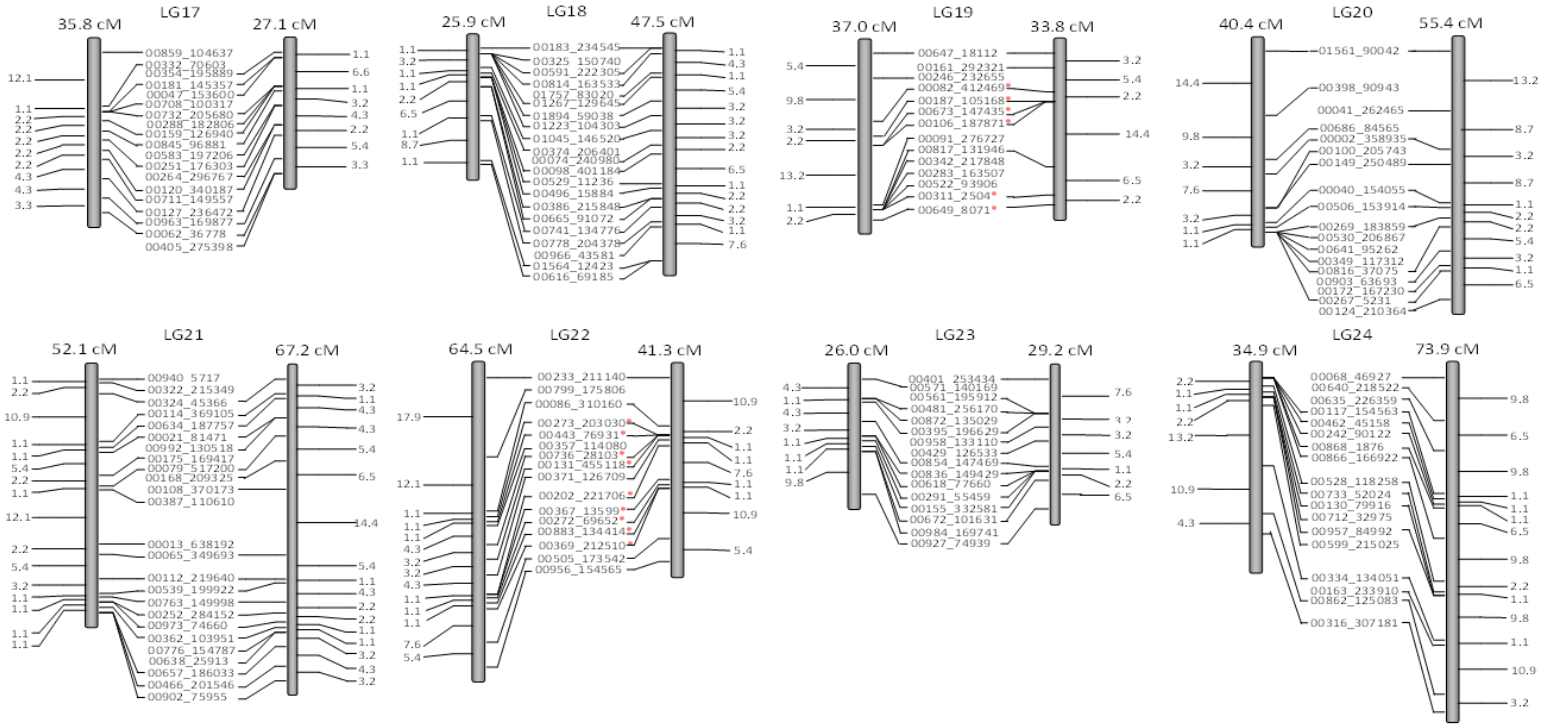



図2-2　太平洋クロマグロの雄雌連鎖地図（続き）
（C）連鎖群17から連鎖群24。

| LGs | Genetic map | | | | | | | Physical map | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Male | | | Female | | | Total no. of markers | No. of anchored scaffolds | Size (bp) | No. of genes |
| | Genetic distance (cM) | No. of markers | Marker interval (cM) | Genetic distance (cM) | No. of markers | Marker interval (cM) | | | | |
| LG1 | 5.4 | 19 | 0.3 | 69.5 | 25 | 2.9 | 26 | 26 | 7,311,548 | 227 |
| LG2 | 41.3 | 14 | 3.2 | 45.5 | 14 | 3.5 | 19 | 19 | 4,013,609 | 93 |
| LG3 | 55.7 | 16 | 3.7 | 66.5 | 16 | 4.4 | 20 | 20 | 7,566,954 | 167 |
| LG4 | 60.9 | 20 | 3.2 | 56.3 | 16 | 3.8 | 26 | 26 | 7,445,291 | 189 |
| LG5 | 36.7 | 18 | 2.2 | 76.9 | 20 | 4.0 | 22 | 22 | 8,683,432 | 290 |
| LG6 | 53.0 | 12 | 4.8 | 54.0 | 12 | 4.9 | 14 | 14 | 5,824,343 | 149 |
| LG7 | 19.4 | 11 | 1.9 | 62.3 | 16 | 4.2 | 17 | 17 | 3,758,735 | 186 |
| LG8 | 34.5 | 18 | 2.0 | 34.9 | 11 | 3.5 | 19 | 19 | 5,886,385 | 226 |
| LG9 | 30.4 | 12 | 2.8 | 50.5 | 13 | 4.2 | 17 | 17 | 4,872,438 | 150 |
| LG10 | 43.3 | 16 | 2.9 | 66.2 | 15 | 4.7 | 22 | 22 | 7,525,825 | 197 |
| LG11 | 34.7 | 12 | 3.2 | 73.9 | 15 | 5.3 | 19 | 19 | 6,890,034 | 145 |
| LG12 | 41.6 | 20 | 2.2 | 64.1 | 15 | 4.6 | 23 | 23 | 7,880,459 | 186 |
| LG13 | 84.2 | 14 | 6.5 | 92.3 | 17 | 5.8 | 20 | 20 | 6,805,915 | 179 |
| LG14 | 35.7 | 18 | 2.1 | 53.3 | 14 | 4.1 | 20 | 20 | 8,512,497 | 226 |
| LG15 | 54.1 | 17 | 3.4 | 41.1 | 13 | 3.4 | 18 | 18 | 8,527,022 | 239 |
| LG16 | 45.7 | 16 | 3.0 | 49.8 | 16 | 3.3 | 21 | 21 | 7,004,297 | 207 |
| LG17 | 35.8 | 13 | 3.0 | 27.1 | 15 | 1.9 | 19 | 19 | 6,185,918 | 196 |
| LG18 | 25.9 | 18 | 1.5 | 47.5 | 19 | 2.6 | 21 | 21 | 5,107,399 | 119 |
| LG19 | 37.0 | 13 | 3.1 | 33.8 | 9 | 4.2 | 14 | 14 | 4,691,049 | 146 |
| LG20 | 40.4 | 14 | 3.1 | 55.4 | 12 | 5.0 | 18 | 18 | 6,731,092 | 152 |
| LG21 | 52.1 | 20 | 2.7 | 67.2 | 20 | 3.5 | 25 | 25 | 8,650,511 | 214 |
| LG22 | 64.5 | 16 | 4.3 | 41.3 | 14 | 3.2 | 16 | 16 | 4,817,797 | 130 |
| LG23 | 26.0 | 12 | 2.4 | 29.2 | 13 | 2.4 | 16 | 16 | 3,887,699 | 104 |
| LG24 | 34.9 | 15 | 2.5 | 73.9 | 16 | 4.9 | 18 | 18 | 5,216,393 | 126 |
| Total | 992.9 | 374 | 2.7 | 1332.3 | 366 | 3.7 | 470 | 470 | 153,796,642 | 4,243 |

表2-5　太平洋クロマグロの遺伝地図と物理地図の概要

は最小 11 マーカー、最大 20 マーカーとなり、平均 15.6 マーカーが配置された。ゲノムの推定被覆度は 86.5 %と算出された。

雌連鎖地図は、24 連鎖群、366 MS マーカーから構成された。総遺伝距離は 1332.3 cM となり、2 マーカー間の平均遺伝距離は 3.7 cM となった。各連鎖群の長さは 27.1 cM から 92.3 cM に及び、平均は 55.5 cM であった。各連鎖群におけるマーカー数は最小 9 マーカー、最大 25 マーカーとなり、平均 15.3 マーカーが配置された。ゲノムの推定被覆度は 86.5%と算出された。

雄連鎖地図と雌連鎖地図の比率は、1.0 : 1.4 となった。両連鎖地図において共通して存在するマーカー間の遺伝距離の分布は、ほぼ同じとなった（図 2-3）が、いくつかの連鎖群においては明確に雄雌で異なる組み換え率を示す例が見られた（図 2-4）。特に、LG1，LG5，LG7，LG11，LG14，LG18 そして LG24 に雄雌共通して存在するマーカー間の遺伝距離は、雄よりも雌において高い組み換え率が示すことが分かった。対照的に、LG15 と LG22 においては、雌よりも雄において高い組み換え率を示していた。

性に連鎖した配列のマッピング

スキャフォルド Ba00007445 に開発することが出来た MS マーカー07445_1679 は、マッピング家系の雌親において多型性を示し、雌地図の連鎖群 10 の末端領域に配置された（図 2-2）。硬骨魚類のいくつかの性決定遺伝子のオルソログ[49] は、連鎖群 10 に配置されたスキャフォルド上には見つからなかった。

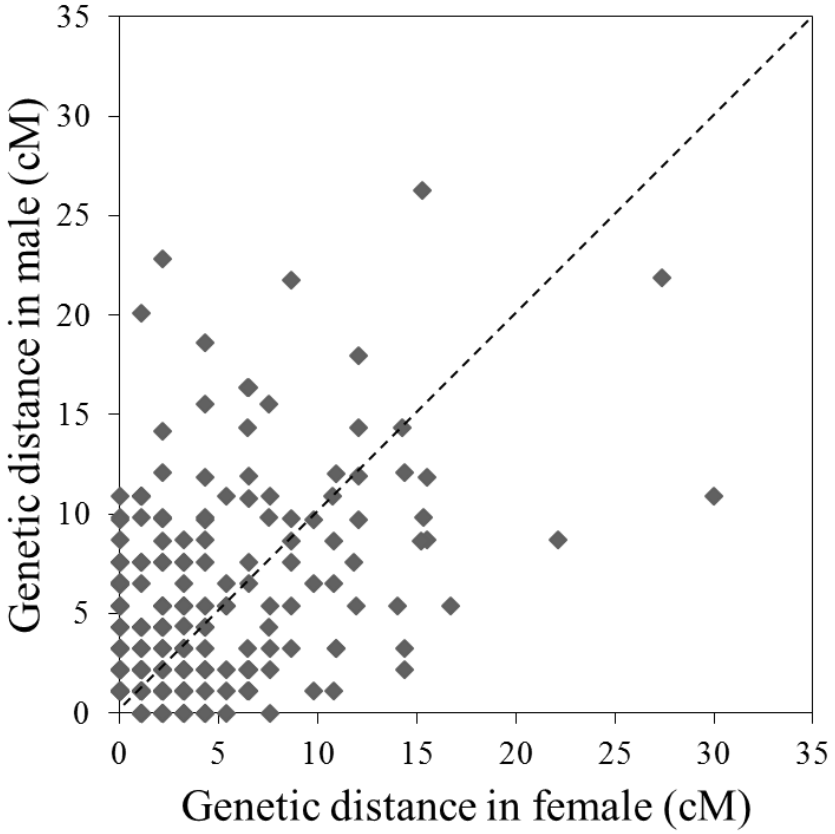



図2-3　雄雌地図間の組み換え率の比較
雄雌連鎖地図間で共通して存在する隣接した2マーカー間の組み換え率をプロットした。

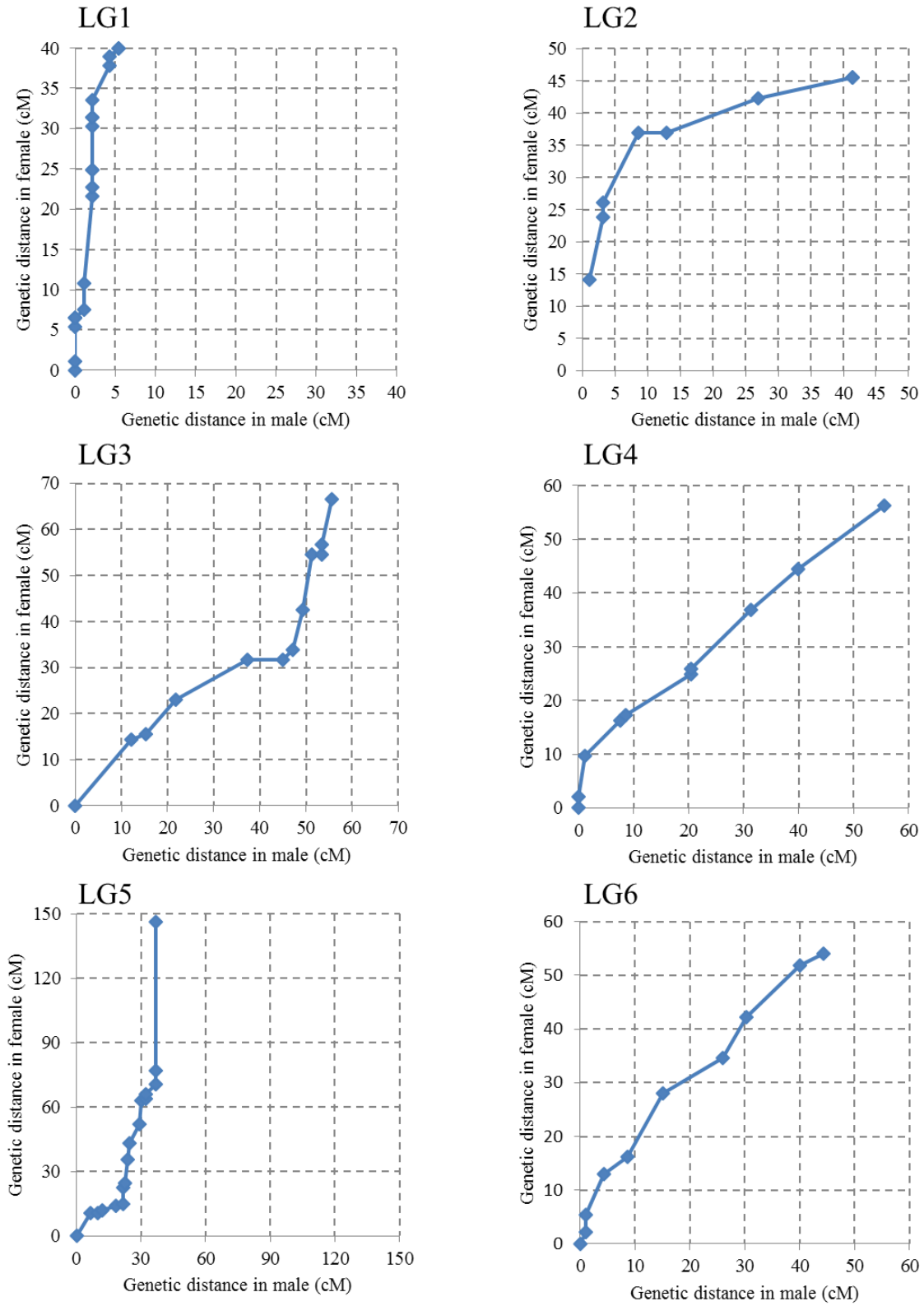



図2-4　隣接する2つの雄雌共通マーカー間の遺伝距離

雄連鎖地図と雌連鎖地図に共通して配置された、隣接する2マーカー間の遺伝距離（cM）をドット形式でプロットした。X軸とY軸は、雄連鎖群と雌連鎖群における累積遺伝距離を示す。（A）LG1 - LG6。

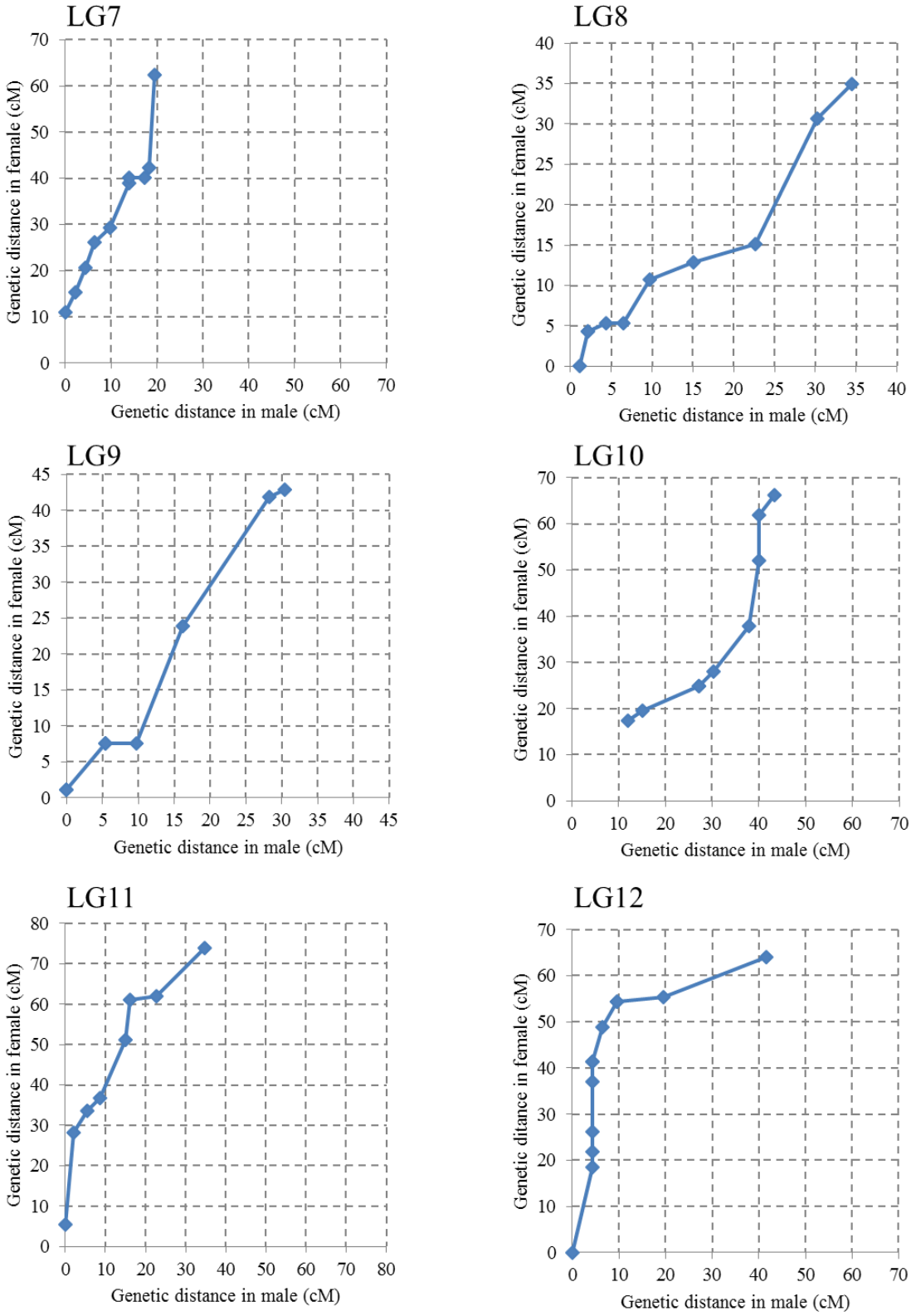



図2-4　隣接する2つの雄雌共通マーカー間の遺伝距離（続き）
（B）LG7 - LG12。

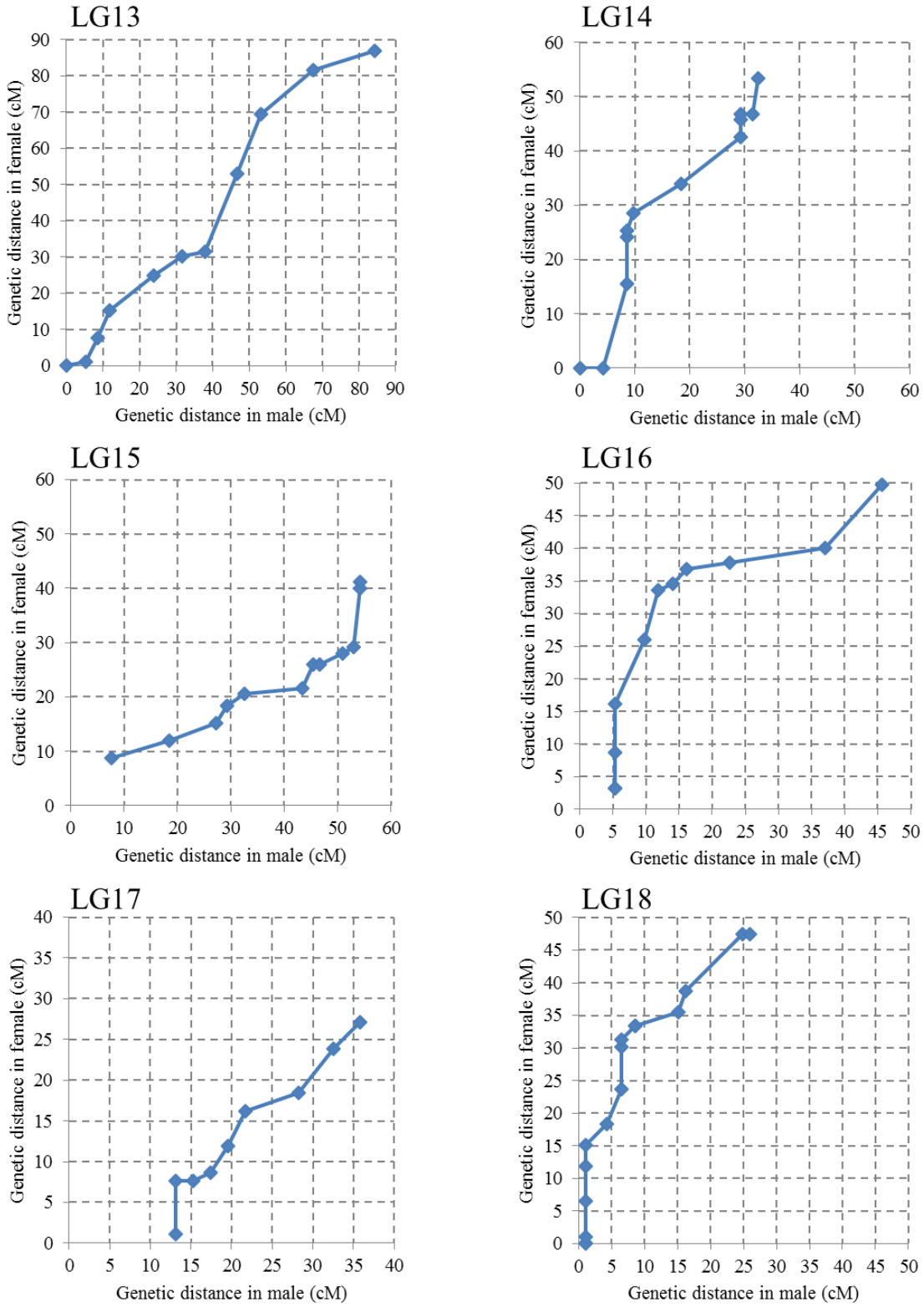



図2-4　隣接する2つの雄雌共通マーカー間の遺伝距離（続き）
（C）LG13 - LG18。

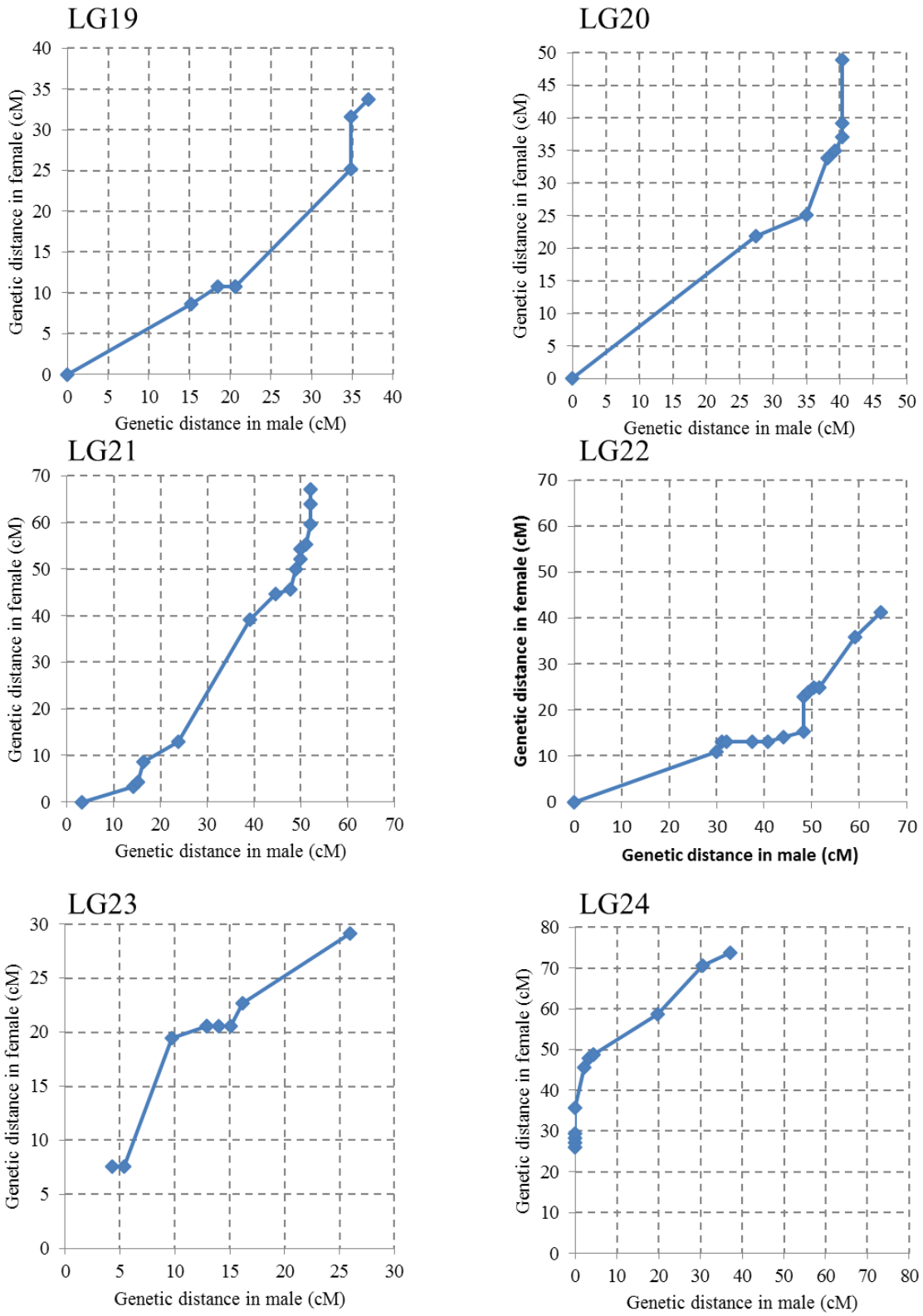



図2-4　隣接する2つの雄雌共通マーカー間の遺伝距離（続き）
（D）LG19 – LG24。

連鎖地図と物理地図の統合

各スキャフォルド上に MS マーカーを開発することで、連鎖地図と物理地図を、ゲノム地図へと統合することが可能となった。我々は、470 本のスキャフォルドを MS 連鎖地図により決定したマーカー順序に従って配置した。このように、概要ゲノム配列の 20.8 %に相当する 153.8 Mbp の配列を連鎖地図上に位置づけることが出来た（表 2-3）。連鎖群あたりで見ると、最大で 8.7 Mbp（連鎖群 5）、最小で 3.9 Mbp（連鎖群 23）、平均では 6.4 Mbp の配列が配置された。これらの配置されたスキャフォルド上には、計 4,243 の予測遺伝子が含まれていた[34]。連鎖群あたりで見ると、最大で 290（連鎖群 5）、最小で 93（連鎖群 2）、平均では 177 の予測遺伝子が含まれた。

他の硬骨魚類とのゲノム構造比較

太平洋クロマグロの統合された地図の構築により、他の硬骨魚類のゲノムと保存された領域について比較することが可能となった。そこで、クロマグロ連鎖群と、他魚種の連鎖群あるいは染色体に対するオルソログ遺伝子数の分布を調べることにした。まず、クロマグロと 5 種類の硬骨魚類（ヨーロッパシーバス、メダカ、トラフグ、ミドリフグ、イトヨ）の全アミノ酸配列を元に、Protein BLAST を行うことにより、6 魚種に共通するオルソログを抽出した。その結果、5,696 遺伝子が抽出された（表 2-6）。

上記の 6 魚種間に共通するオルソログのうち、クロマグロの MS 連鎖地図に位置

| | 遺伝子数 |
|---|---|
| クロマグロ | 26,433 |
| シーバス | 26,719 |
| イトヨ | 22,456 |
| メダカ | 20,459 |
| 4魚種共通 | 8,425 |

表2-6　魚種別遺伝子数

づけられているものは、1,229 遺伝子であった。次に、各連鎖群や染色体上のオルソログ遺伝子数に従って、5 種の硬骨魚類それぞれと比較した際の Oxford grid [62] を構築した（図 2-5, 表 2-7）。

太平洋クロマグロの連鎖地図に配置された全推定遺伝子に占める 6 魚種共通オルソログの割合は、約 29%（1,229 / 4,243）となった。また連鎖群別に調べた結果では、連鎖群 14 において最も割合が高く（94 / 226, 42%）、連鎖群 18 において最も割合が低くなった（3 / 119, 3%. 表 2-7.）。

Oxford grid により、太平洋クロマグロ 24 連鎖群とヨーロッパシーバス 24 連鎖群（マッピングされていない UN を除く）の比較では、23 組の連鎖群ペアが明確な 1 対 1 の対応関係を示した（図 2-5A）。対応する連鎖群ペアあたりの平均で 52.2 遺伝子、計 1,201 のオルソログ遺伝子と全体オルソログ遺伝子（計 1,229）の 97.8%が配置された。最もオルソログ数の多いペアは、クロマグロ連鎖群 14-ヨーロッパシーバス連鎖群 14 間であり 91 遺伝子が、最もオルソログ数の少ないペアは、クロマグロ連鎖群 2-ヨーロッパシーバス連鎖群 24 間であり 20 遺伝子が共有されていた。クロマグロ連鎖群 18 に対して多くのオルソログを共有するヨーロッパシーバス連鎖群は存在しなかったが、連鎖群 3 と 3 遺伝子のみが共有されていた。ヨーロッパシーバスの連鎖群にマッピングされていない（連鎖群番号：UN）遺伝子は計 8 個存在しており、クロマグロの連鎖群 1，2，12，14，15，16，24 に対するグリットにそれぞれ配置された。

(A) *T. orientalis* linkage groups

Seabass linkage groups

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 7 | 61 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24 | | 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | 50 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 2 |
| 4 | | | | 49 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1A | | | | | 48 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | 36 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 22-25 | | | | | | | 78 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | 57 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | | | | | | | | | 55 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | 68 | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | 3 | | | | | | | | 26 | | | | | | | | | | | | | |
| 19 | | | | | | | | | | | | 53 | 2 | | | | | | | | | | | |
| 13 | 4 | | | | | | | | | | | | 45 | | | | | | | | | | | |
| 14 | | | | | | | | | | | | | | 91 | | | | | | | | | | |
| 11 | | | | | | | | | | | | | | | 70 | | | | | | | | | |
| 16 | | | | | | | | | | | | | | | | 70 | | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | 70 | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 3 | | | | | | |
| 1B | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 47 | | | | | |
| 18-21 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 49 | | | | |
| 15 | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | 69 | | | |
| 12 | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | 41 | | 3 |
| x | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | 24 | |
| 17 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 24 |
| UN | 1 | 1 | | | | | | | | | | 1 | | 3 | 1 | | | | | | | | | 1 |

(B) *T. orientalis* linkage groups

Medaka chromosomes

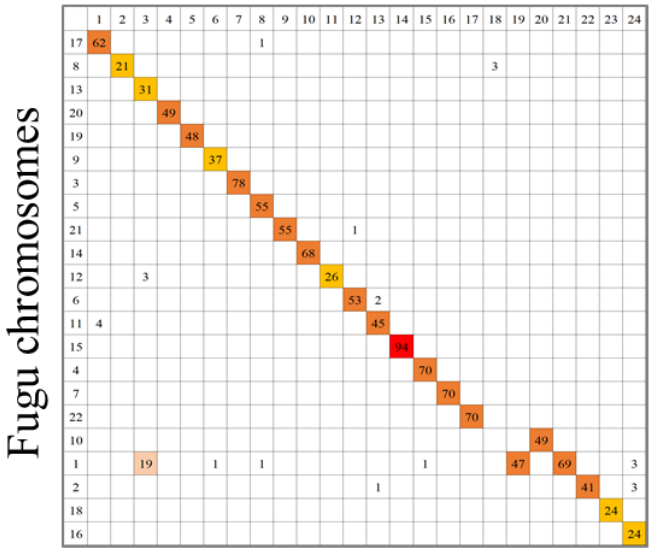
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 62 | | | | | | | 1 | | | | | | | 1 | | | | | | | | | |
| 2 | | 21 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | 49 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 3 |
| 4 | | | | 49 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | 48 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | 37 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | 78 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | 56 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | 55 | | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | | | | 68 | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | | | 3 | | | | | | | | 25 | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | | | | | | | | | | | | 53 | 2 | | | | | | | | | | | |
| 13 | 4 | | | | | | | | | | | | 45 | | | | | | | | | | | |
| 14 | | | | | | | | | | | | | | 94 | | | | | | | | | | |
| 15 | | | | | | | | | | | | | | | 70 | | | | | | | | | |
| 16 | | | | | | | | | | | | | | | | 70 | | | | | | | | |
| 17 | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | 69 | | | | | | | |
| 18 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 3 | | | | | | |
| 19 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 47 | | | | | |
| 20 | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | 49 | | | | |
| 21 | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | 69 | | | |
| 22 | | | 1 | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | 41 | | 3 |
| 23 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 24 | |
| 24 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 24 |

<5 5-10 11-20

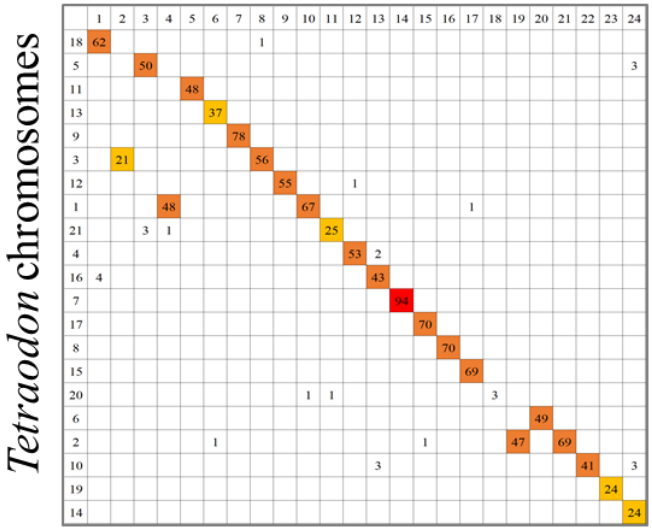
21-40 41-80 80<

図2-5 太平洋クロマグロと5種の硬骨魚類間のOxford grid（続き）
5魚種間で共通して存在する1,229のオルソログ遺伝子をOxford gridにプロットした。セル内の数字は、各魚種のゲノムにおけるオルソログ数を示す。各グリッドは、オルソログ数に従い色分けした。太平洋クロマグロにおける連鎖群番号は、本解析で決定したものに従った。（A）太平洋クロマグロ – ヨーロッパシーバス間の比較。（B）太平洋クロマグロ – メダカ間の比較。

(C) *T. orientalis* linkage groups




(D) *T. orientalis* linkage groups



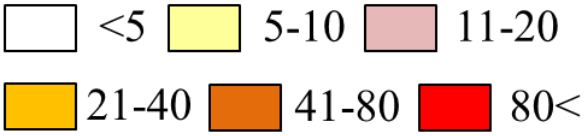




図2-5 太平洋クロマグロと5種のモデル魚種間のOxford grid（続き）
（C）太平洋クロマグロ - トラフグ間の比較。（D）太平洋クロマグロ - ミドリフグ間の比較。

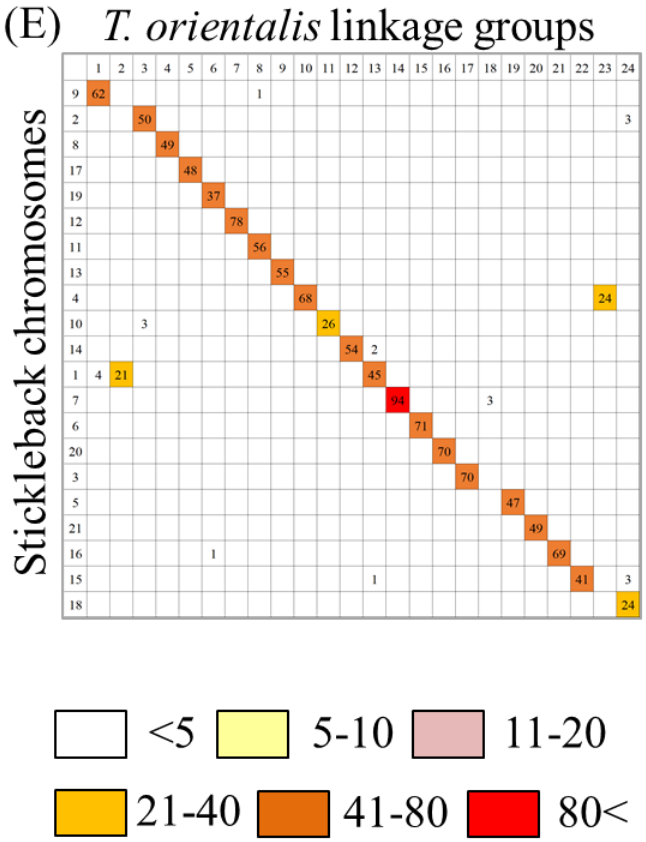



図2-5 太平洋クロマグロと5種のモデル魚種間のOxford grid（続き）
（E）太平洋クロマグロ - イトヨ間の比較。

| ヨーロッパシーバス | | | | | | | | イトヨ | | | | | | メダカ | | | | | | トラフグ | | | | | | ミドリフグ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 連鎖群 | オルソログ数 | 連鎖群 | オルソログ数 | 連鎖群 | オルソログ数 | 連鎖群 | オルソログ数 | 染色体 | オルソログ数 | 染色体 | オルソログ数 | 染色体 | オルソログ数 | 染色体 | オルソログ数 | 染色体 | オルソログ数 | 染色体 | オルソログ数 | 染色体 | オルソログ数 | 染色体 | オルソログ数 | 染色体 | オルソログ数 | 染色体 | オルソログ数 | 染色体 | オルソログ数 | 染色体 | オルソログ数 |
| 7 | 61 | 13 | 4 | UN | 1 | | | 9 | 62 | 1 | 4 | | | 1 | 62 | 13 | 4 | | | 17 | 62 | 11 | 4 | | | 18 | 62 | 16 | 4 | | |
| 24 | 20 | UN | 1 | | | | | 1 | 21 | | | | | 2 | 21 | | | | | 8 | 21 | | | | | 3 | 21 | | | | |
| 5 | 50 | 9 | 3 | | | | | 2 | 50 | 10 | 3 | | | 3 | 49 | 11 | 3 | 22 | 1 | 1 | 19 | 12 | 3 | 13 | 31 | 5 | 50 | 21 | 3 | | |
| 4 | 49 | | | | | | | 8 | 49 | | | | | 4 | 49 | | | | | 20 | 49 | | | | | 1 | 48 | 21 | 1 | | |
| 1A | 48 | | | | | | | 17 | 48 | | | | | 5 | 48 | | | | | 19 | 48 | | | | | 11 | 48 | | | | |
| 6 | 36 | 15 | 1 | x | 1 | | | 16 | 1 | 19 | 37 | | | 6 | 37 | 21 | 1 | | | 9 | 37 | 1 | 1 | | | 2 | 1 | 13 | 37 | | |
| 22-25 | 78 | | | | | | | 12 | 78 | | | | | 7 | 78 | | | | | 3 | 78 | | | | | 9 | 78 | | | | |
| 8 | 57 | | | | | | | 9 | 1 | 11 | 56 | | | 1 | 1 | 8 | 56 | | | 1 | 1 | 5 | 55 | 17 | 1 | 3 | 56 | 18 | 1 | | |
| 20 | 55 | | | | | | | 13 | 55 | | | | | 9 | 55 | | | | | 21 | 55 | | | | | 12 | 55 | | | | |
| 2 | 68 | | | | | | | 4 | 68 | | | | | 10 | 68 | | | | | 14 | 68 | | | | | 1 | 67 | 20 | 1 | | |
| 9 | 26 | | | | | | | 10 | 26 | | | | | 11 | 25 | 17 | 1 | | | 12 | 26 | | | | | 20 | 1 | 21 | 25 | | |
| 19 | 53 | UN | 1 | | | | | 14 | 54 | | | | | 9 | 1 | 12 | 53 | | | 6 | 53 | 21 | 1 | | | 4 | 53 | 12 | 1 | | |
| 13 | 45 | 19 | 2 | 12 | 1 | | | 1 | 45 | 14 | 2 | 15 | 1 | 12 | 2 | 13 | 45 | 22 | 1 | 2 | 1 | 6 | 2 | 11 | 45 | 4 | 2 | 10 | 3 | 16 | 43 |
| 14 | 91 | UN | 3 | | | | | 7 | 94 | | | | | 14 | 94 | | | | | 15 | 94 | | | | | 7 | 94 | | | | |
| 15 | 70 | UN | 1 | | | | | 6 | 71 | | | | | 1 | 1 | 15 | 70 | | | 1 | 1 | 4 | 70 | | | 2 | 1 | 17 | 70 | | |
| 16 | 70 | | | | | | | 20 | 70 | | | | | 16 | 70 | | | | | 7 | 70 | | | | | 8 | 70 | | | | |
| 10 | 70 | | | | | | | 3 | 70 | | | | | 17 | 69 | 20 | 1 | | | 22 | 70 | | | | | 1 | 1 | 15 | 69 | | |
| 18 | 3 | | | | | | | 7 | 3 | | | | | 18 | 3 | | | | | 8 | 3 | | | | | 20 | 3 | | | | |
| 1B | 47 | | | | | | | 5 | 47 | | | | | 19 | 47 | | | | | 1 | 47 | | | | | 2 | 47 | | | | |
| 18-21 | 49 | | | | | | | 21 | 49 | | | | | 20 | 49 | | | | | 10 | 49 | | | | | 6 | 49 | | | | |
| 15 | 69 | | | | | | | 16 | 69 | | | | | 21 | 69 | | | | | 1 | 69 | | | | | 2 | 69 | | | | |
| 12 | 41 | | | | | | | 15 | 41 | | | | | 22 | 41 | | | | | 2 | 41 | | | | | 10 | 41 | | | | |
| x | 24 | | | | | | | 4 | 24 | | | | | 23 | 24 | | | | | 18 | 24 | | | | | 19 | 24 | | | | |
| 5 | 2 | 12 | 3 | 17 | 24 | UN | 1 | 2 | 3 | 15 | 3 | 18 | 24 | 3 | 3 | 22 | 3 | 24 | 24 | 1 | 3 | 2 | 3 | 16 | 24 | 5 | 3 | 10 | 3 | 14 | 24 |

表2-7　魚種別オルソログ遺伝子の分布

太平洋クロマグロ 24 連鎖群とメダカ 24 染色体の比較においても、23 組の連鎖群-染色体ペアが 1 対 1 関係を示した（図 2-5B）。対応する連鎖群-染色体ペアあたりの平均で 52.3 遺伝子、計 1,203 のオルソログ遺伝子と全体の 92.6%が配置された。最もオルソログ数の多いペアは、クロマグロ連鎖群 14-メダカ染色体 14 間であり 94 遺伝子が、最もオルソログ数の少ないペアは、クロマグロ連鎖群 2-メダカ染色体 2 間であり 21 遺伝子が共有されていた。クロマグロ連鎖群 18 に対して多くのオルソログを共有するメダカ染色体は存在しなかったが、染色体 18 と 3 遺伝子のみが共有されていた。

他の 3 魚種との比較においても、高度に保存された 1 対 1 の対応関係が示されたが、いくつかの 2 対 1 または 3 対 1 の対応関係を示す連鎖群-染色体ペアが見られた。

太平洋クロマグロ 24 連鎖群とトラフグ 22 染色体の比較においては、21 組の連鎖群-染色体ペアが 1 対 1 関係を示した（図 2-5C）。対応する連鎖群-染色体対ペアあたりの平均で 51.0 遺伝子、計 1,070 のオルソログ遺伝子と全体の 82.4%が配置された。最もオルソログ数の多いペアは、クロマグロ連鎖群 14-トラフグ染色体 15 間であり 94 遺伝子が、最もオルソログ数の少ないペアは、クロマグロ連鎖群 2-トラフグ染色体 8 間であり 21 遺伝子が共有されていた。この他トラフグとの比較では、3 対 1 の対応関係を示すオルソログ染色体対が見られ、太平洋クロマグロの連鎖群 3, 19, 21 のそれぞれとトラフグの 1 番染色体が対応した。クロマグロの連鎖

群 21 は、トラフグの 1 番染色体にある計 135 遺伝子のうち、最も多くの 69 遺伝子が共有されていた。クロマグロ連鎖群 18 に対して多くのオルソログを共有するトラフグ染色体は存在しなかったが、染色体 8 と 3 遺伝子のみが共有されていた。

太平洋クロマグロ 24 連鎖群とミドリフグ 21 染色体の比較においては、17 組の染色体ペアが 1 対 1 関係を示した（図 2-5D）。対応する連鎖群-染色体ペアあたりの平均で 52.4 遺伝子、計 892 のオルソログ遺伝子と全体の 72.6%が配置された。最もオルソログ数の多いペアは、クロマグロ連鎖群 14-ミドリフグ染色体 7 間であり 94 遺伝子が共有されていた。最もオルソログ数の少ないペアは、クロマグロ連鎖群 23-ミドリフグ染色体 19 間およびクロマグロ連鎖群 24-ミドリフグ染色体 14 間であり、それぞれ 24 遺伝子が共有されていた。またミドリフグとの比較においては､3 組の 2 対 1 関係を示すクロマグロ連鎖群-ミドリフグ染色体のペアが見られた。クロマグロの連鎖群 4，10 はミドリフグ染色体 1 番と、クロマグロの連鎖群 19，21 はミドリフグ染色体 2 番と、クロマグロの連鎖群 2，8 はミドリフグ染色体 3 番とそれぞれ対応した。クロマグロ連鎖群 18 に対して多くのオルソログを共有するミドリフグ染色体は存在しなかったが、染色体 20 と 3 遺伝子のみが共有されていた。

太平洋クロマグロ 24 連鎖群とイトヨ 21 染色体の比較においては、19 組の連鎖群-染色体ペアが 1 対 1 関係を示した（図 2-5E）。対応する連鎖群-染色体対ペアあたりの平均で 55.3 遺伝子、計 1,050 のオルソログ遺伝子と全体の 80.8%が配置され

た。最もオルソログ数の多いペアは、クロマグロ連鎖群 8-イトヨ染色体 7 番間であり 94 遺伝子が、最もオルソログ数の少ないペアは、クロマグロ連鎖群 22-イトヨ染色体 18 間であり 24 遺伝子が共有されていた。またイトヨとの比較においては、2 組の 2 対 1 関係を示すクロマグロ連鎖群-ミドリフグ染色体のペアが見られた。クロマグロの連鎖群 2，13 はイトヨ染色体 1 番と、クロマグロの連鎖群 10，23 はイトヨ染色体 4 番とそれぞれ対応した。クロマグロ連鎖群 18 に対して多くのオルソログを共有するイトヨ染色体は存在しなかったが、染色体 7 と 3 遺伝子のみが共有されていた。

以上の比較結果を、表 2-8 にまとめた。上記で太平洋クロマグロ 24 連鎖群の構成は、ヨーロッパシーバス 24 連鎖群、メダカ 24 染色体とそれぞれ比較した際に、23 組のペア間で明確な対応関係が見られた。次に、この明確な対応関係を示したヨーロッパシーバスとメダカの 2 魚種間での比較を、これまでの解析と同じ 1,229 遺伝子オルソログを用いて Oxford grid を作成することにより行った。Oxford grid により、ヨーロッパシーバス 24 連鎖群（マッピングされていない UN を除く）とメダカ 24 染色体の比較では、23 組の連鎖群ペアが明確な 1 対 1 の対応関係を示した（図 2-6）。対応する連鎖群ペアあたりの平均で 52.7 遺伝子、計 1,211 のオルソログ遺伝子と全体の 98.5%が配置された。最もオルソログ数の多いペアは、ヨーロッパシーバス連鎖群 14-メダカ 14 番染色体間であり 91 遺伝子が、最もオルソログ数の少ないペアは、ヨーロッパシーバス連鎖群 24-メダカ 2 番染色体間であり 20 遺伝

| 比較魚種 | 連鎖群または染色体数 | クロマグロ連鎖群との対応関係 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1:1 | | | 2:1 | | 3:1 | |
| | | 連鎖群または染色体数 | オルソログ遺伝子 | | 連鎖群または染色体数 | オルソログ遺伝子総数 | 連鎖群または染色体数 | オルソログ遺伝子総数 |
| | | | 総数 | ペアあたりの平均数 | | | | |
| ヨーロッパシーバス | 24 | 23 | 1,201 | 52.2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| メダカ | 24 | 23 | 1,203 | 52.3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| トラフグ | 22 | 21 | 1,070 | 51.0 | 0 | 0 | 1 | 135 |
| ミドリフグ | 21 | 17 | 892 | 52.4 | 3 | 308 | 0 | 0 |
| イトヨ | 21 | 19 | 1,080 | 55.3 | 2 | 158 | 0 | 0 |

表2-8　クロマグロ連鎖群の他魚種との比較解析結果

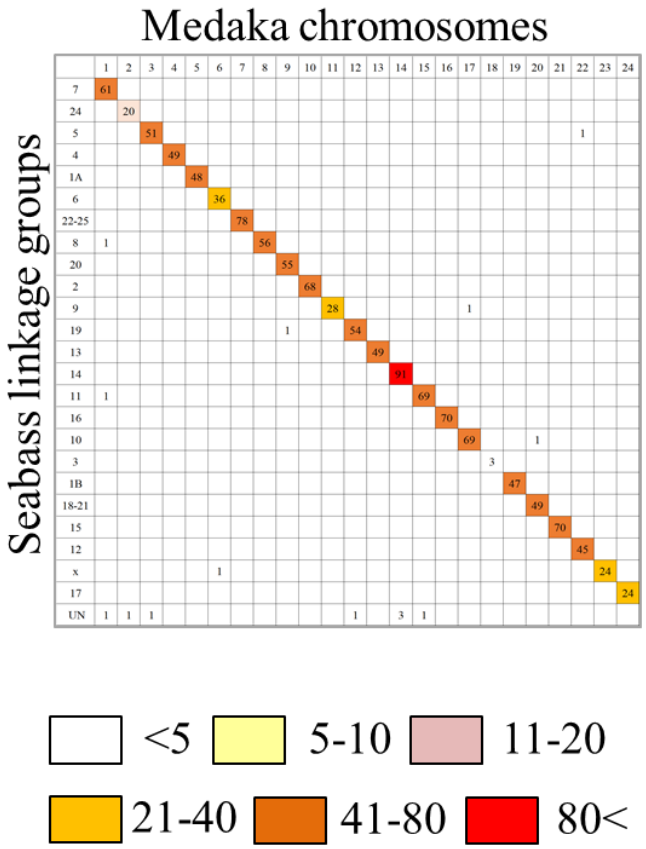



図2-6 ヨーロッパシーバスとメダカ間のOxford grid
5魚種間で共通して存在する1,229のオルソログ遺伝子を、ヨーロッパシーバス連鎖群とメダカ染色体に従ってOxford gridにプロットした。セル内の数字は、各魚種のゲノムにおけるオルソログ数を示す。各グリッドは、オルソログ数に従い色分けした。

子が共有されていた。ヨーロッパシーバス連鎖群 3 に対して多くのオルソログを共有するメダカ染色体は存在しなかったが、連鎖群 3 と 3 遺伝子のみが共有されていた。ヨーロッパシーバスの連鎖群にマッピングされていない（連鎖群番号：UN）遺伝子は計 8 個存在しており、メダカの染色体 1，2，3，12，14，15 に対するグリットにそれぞれ配置された。このように、ヨーロッパシーバス連鎖群とメダカ染色体間のオルソログ分布の比較結果は、太平洋クロマグロ連鎖群とヨーロッパシーバス連鎖群と非常に類似したものとなった。また、太平洋クロマグロとメダカ染色体を比較した際の比較結果とも、マッピングされていない遺伝子が存在する点を除けば、類似している。したがって、同定されたオルソログ遺伝子の分布は 3 魚種（太平洋クロマグロ，ヨーロッパシーバス，メダカ）の連鎖群または染色体間で共通しており、起源となる祖先の染色体が同じである可能性が示された。

次に、太平洋クロマグロの連鎖地図と、ブリの連鎖地図の比較解析を行った。ブリの連鎖地図に配置されたの 1,434 の EST 配列と、太平洋クロマグロ全遺伝子のアミノ酸配列を用いた配列比較により、641 のオルソログ遺伝子を抽出した。上記の 2 魚種間に共通するオルソログのうち、本章で構築された太平洋クロマグロの MS 連鎖地図に位置づけられているものは、122 遺伝子のみであった。この 122 遺伝子に基づき、2 魚種の各連鎖群上のオルソログ遺伝子数に従って、Oxford grid を構築した（図 2-7）。太平洋クロマグロ 24 連鎖群とブリ 24 連鎖群の比較においては、10 組の連鎖群-染色体ペアが 1 対 1 関係を示した（図 2-5E）。対応する連鎖群ペア

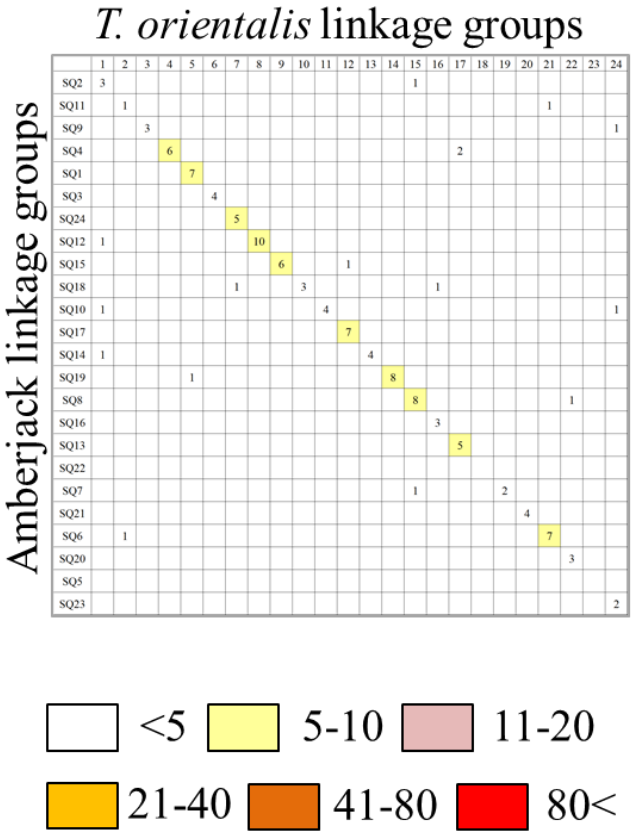



図2-7 太平洋クロマグロとブリ間のOxford grid
2魚種間で共通して存在する121のオルソログ遺伝子を、太平洋クロマグロ連鎖群とブリ連鎖群に従ってOxford gridにプロットした。セル内の数字は、各魚種のゲノムにおけるオルソログ数を示す。各グリッドは、オルソログ数に従い色分けした。

あたりの平均で 6.9 遺伝子、計 69 のオルソログ遺伝子と全体の 56.6%が配置された。最もオルソログ数の多いペアは、クロマグロ連鎖群 8-ブリ連鎖群 SQ12 間であり 10 遺伝子が、最もオルソログ数の少ないペアは、クロマグロ連鎖群 7-ブリ連鎖群 SQ24 と、クロマグロ連鎖群 17-ブリ連鎖群 13 間であり、それぞれ 5 遺伝子が共有されていた。他にも、5 未満のオルソログ遺伝子を共有する連鎖群対はいくつか見られたが、遺伝子数が少ないために明確な対応関係を示すまでは至らなかった。

オルソログ遺伝子の染色体内配置比較

上記の 6 魚種共通オルソログが帰属する連鎖群または染色体情報により、太平洋クロマグロ 24 連鎖群-ヨーロッパシーバス 24 連鎖群-イトヨ 21 染色体-メダカ 24 染色体-トラフグ 22 染色体-ミドリフグ 21 染色体の対応関係が明らかとなった。次に、抽出された 1,229 の 6 魚種オルソログ遺伝子を用いて、太平洋クロマグロの連鎖群ごとに、ヨーロッパシーバス連鎖群、イトヨ染色体、メダカ染色体それぞれにおけるオルソログの配置について調べた。太平洋クロマグロにおいては雄連鎖地図と雌連鎖地図を融合し、再計算された遺伝距離（cM）を位置情報の指標として用いた（表 2-9）。ヨーロッパシーバス、イトヨ、メダカにおいては、染色体上の遺伝子開始位置（Mbp）を利用した。クロマグロの各連鎖群について、シーバス連鎖群、イトヨ染色体、メダカ染色体での遺伝子をドットでプロットした結果を、図 2-8 から図 2-32 に示す。なお、この際トラフグ染色体上のオルソログに関しては、

| クロマグロ | | ヨーロッパシーバス | | イトヨ | | メダカ | | ミドリフグ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 連鎖群 | 雄雌融合遺伝距離（cM） | 連鎖群 | 物理距離（Mbp） | 染色体 | bp | 染色体 | bp | 染色体 | bp |
| 1 | 38.9 | 1A | 29.0 | 1 | 28.2 | 1 | 40.0 | 1 | 23.0 |
| 2 | 59.7 | 1B | 18.0 | 2 | 23.3 | 2 | 31.1 | 2 | 21.6 |
| 3 | 71.2 | 2 | 26.2 | 3 | 16.8 | 3 | 36.6 | 3 | 15.5 |
| 4 | 66.4 | 3 | 13.5 | 4 | 32.6 | 4 | 34.6 | 4 | 9.9 |
| 5 | 135.7 | 4 | 27.6 | 5 | 12.3 | 5 | 33.8 | 5 | 13.4 |
| 6 | 64.3 | 5 | 32.6 | 6 | 17.1 | 6 | 26.6 | 6 | 7.0 |
| 7 | 60.7 | 6 | 28.2 | 7 | 27.9 | 7 | 29.5 | 7 | 11.7 |
| 8 | 33.9 | 7 | 28.5 | 8 | 19.4 | 8 | 25.9 | 8 | 10.5 |
| 9 | 49.9 | 8 | 23.1 | 9 | 20.2 | 9 | 33.2 | 9 | 10.6 |
| 10 | 66.1 | 9 | 22.4 | 10 | 15.7 | 10 | 27.6 | 10 | 13.3 |
| 11 | 64.4 | 10 | 24.1 | 11 | 16.7 | 11 | 29.4 | 11 | 12.0 |
| 12 | 76.7 | 11 | 26.2 | 12 | 18.4 | 12 | 30.0 | 12 | 12.6 |
| 13 | 95.8 | 12 | 23.2 | 13 | 20.1 | 13 | 33.4 | 13 | 13.3 |
| 14 | 49.7 | 13 | 27.6 | 14 | 15.2 | 14 | 33.6 | 14 | 10.2 |
| 15 | 53.0 | 14 | 28.4 | 15 | 16.2 | 15 | 30.0 | 15 | 7.3 |
| 16 | 55.1 | 15 | 25.6 | 16 | 18.1 | 16 | 30.0 | 16 | 9.0 |
| 17 | 44.0 | 16 | 25.8 | 17 | 14.6 | 17 | 31.8 | 17 | 12.1 |
| 18 | 49.9 | 17 | 22.9 | 18 | 16.3 | 18 | 29.9 | 18 | 11.1 |
| 19 | 41.6 | 18-21 | 16.5 | 19 | 20.2 | 19 | 23.5 | 19 | 7.3 |
| 20 | 59.4 | 19 | 23.2 | 20 | 19.7 | 20 | 24.7 | 20 | 3.8 |
| 21 | 66.6 | 20 | 28.4 | 21 | 11.7 | 21 | 31.9 | 21 | 5.8 |
| 22 | 71.6 | 22-25 | 26.4 | | | 22 | 28.8 | | |
| 23 | 33.7 | 24 | 13.9 | | | 23 | 24.1 | | |
| 24 | 76.7 | x | 17.8 | | | 24 | 24.2 | | |
| | | UN | 96.9 | | | | | | |
| 計 | 1485.0 | | 675.9 | | 400.8 | | 724.2 | | 241.0 |

表2-9　5魚種の連鎖群および染色体の長さ

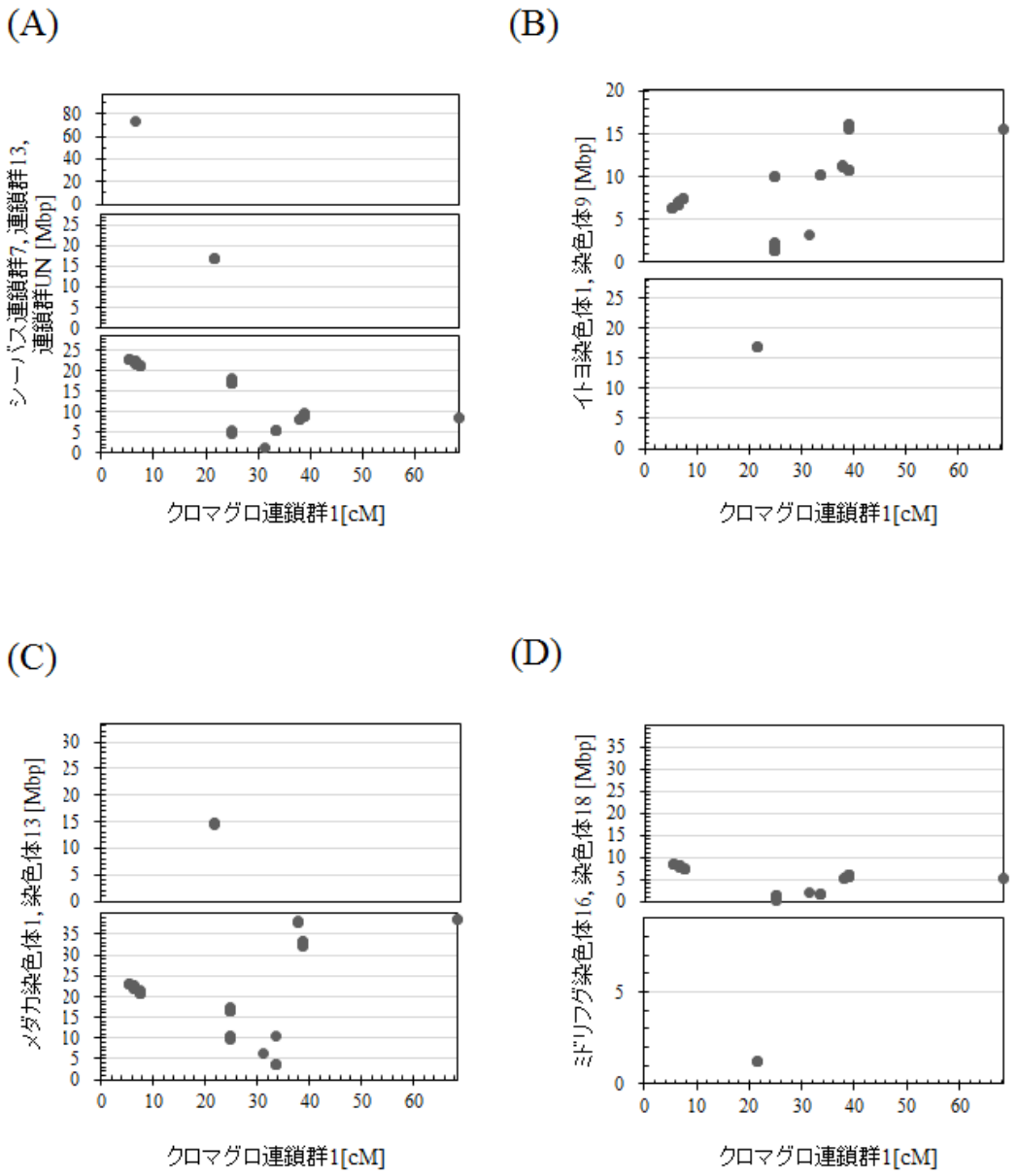



図2-8 クロマグロ連鎖群1の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群1-ヨーロッパシーバス連鎖群1, 13, UN間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群1-イトヨ染色体9, 1間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群1-メダカ染色体1, 13間のドットプロット (D) クロマグロ連鎖群1-ミドリフグ染色体16, 18間のドットプロット

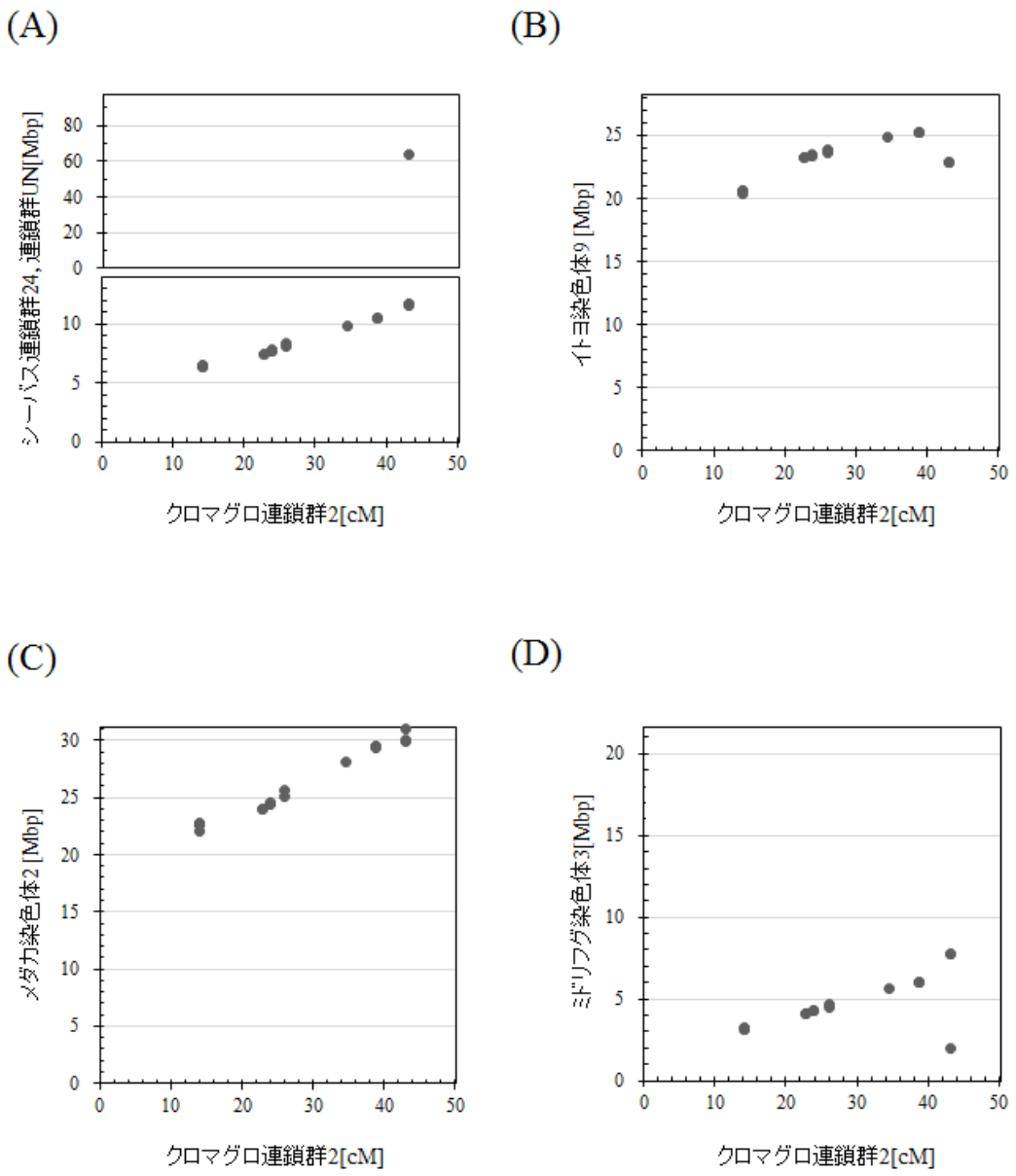



図2-9 クロマグロ連鎖群2の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群2-ヨーロッパシーバス連鎖群24, UN間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群2-イトヨ染色体9間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群2-メダカ染色体2間のドットプロット (D) クロマグロ連鎖群2-ミドリフグ染色体3間のドットプロット

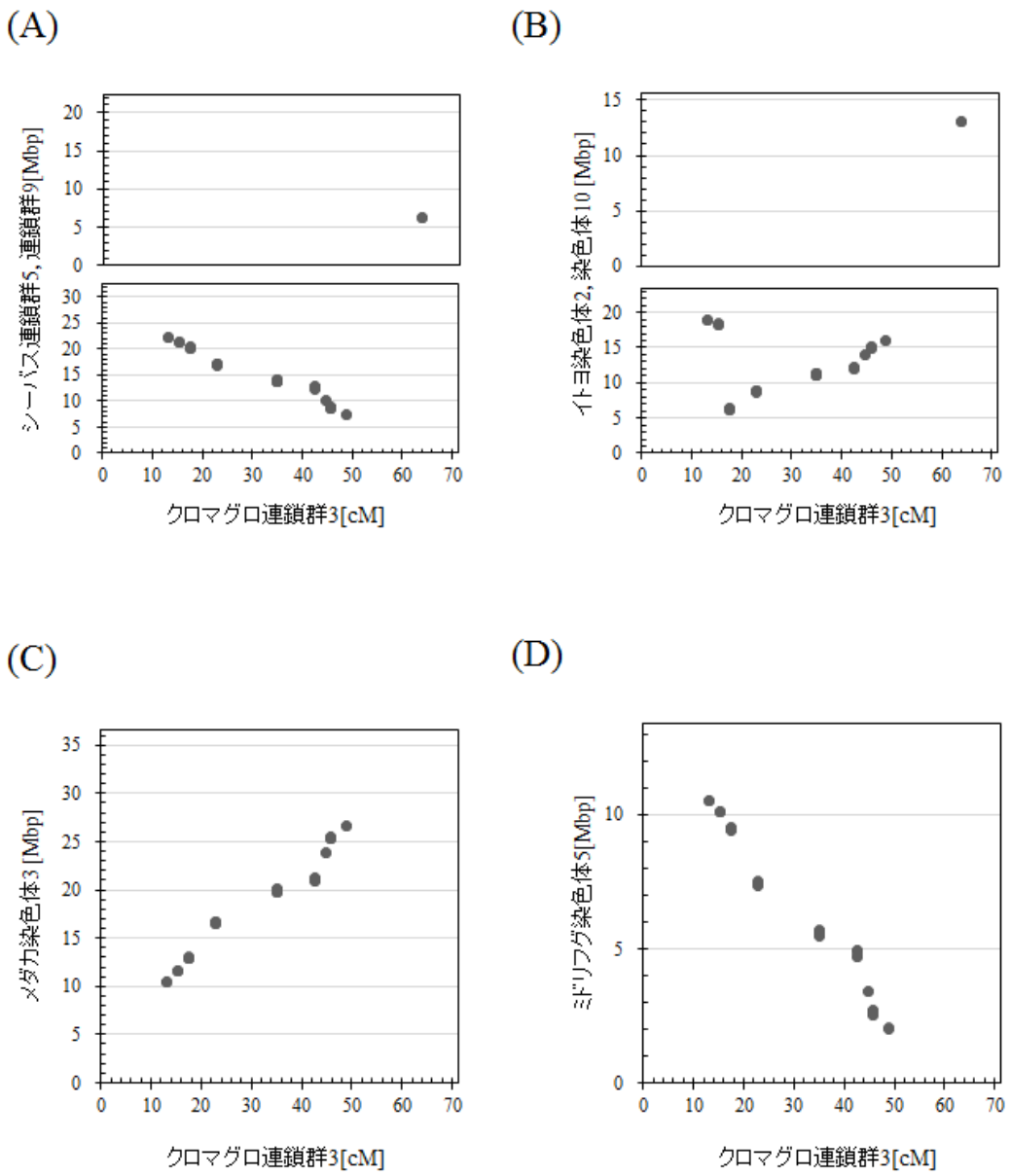



図2-10 クロマグロ連鎖群3の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群3-ヨーロッパシーバス連鎖群5, 9間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群3-イトヨ染色体2, 10間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群3-メダカ染色体3間のドットプロット (D) クロマグロ連鎖群3-ミドリフグ染色体5間のドットプロット

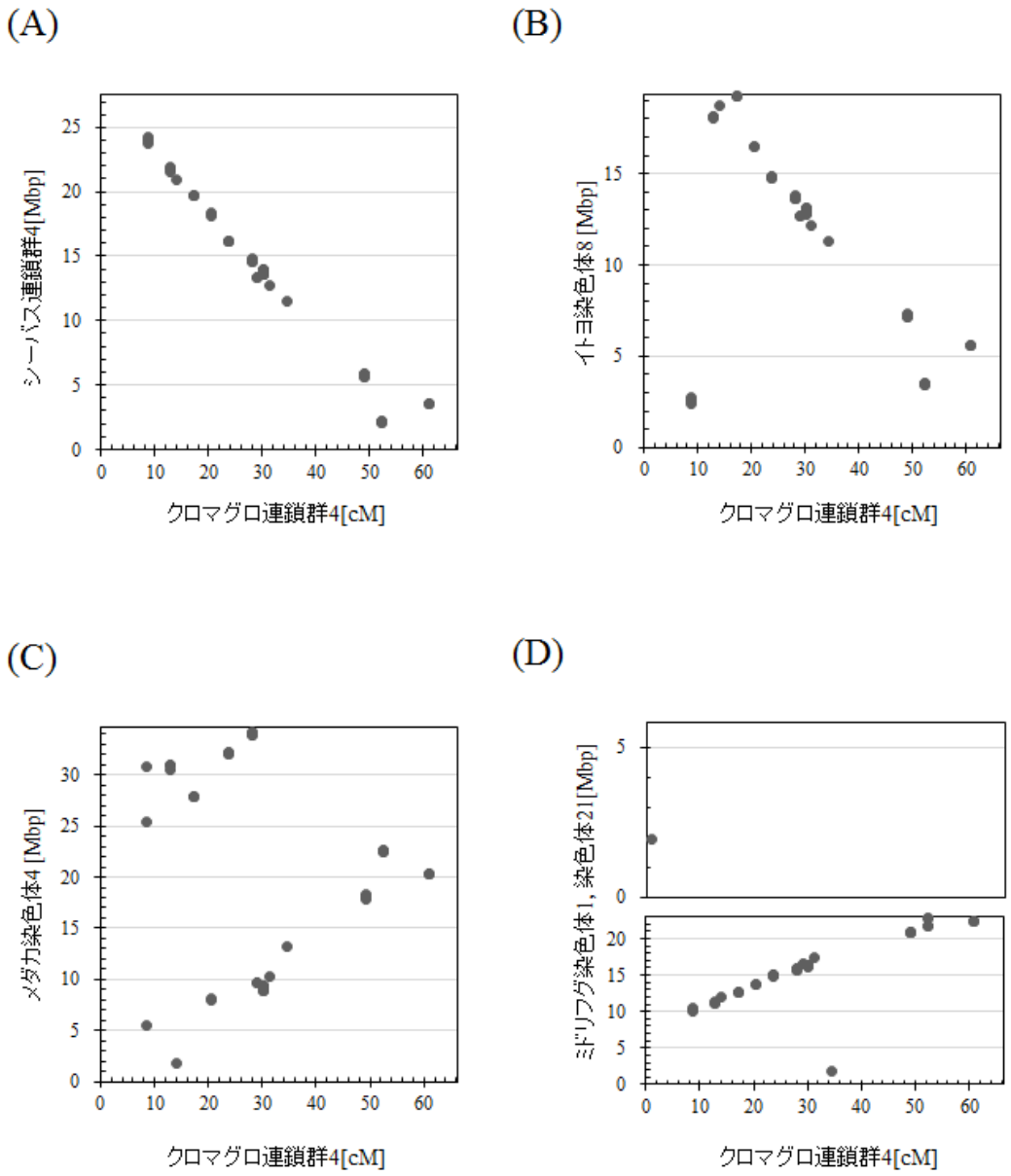



図2-11 クロマグロ連鎖群4の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群4-ヨーロッパシーバス連鎖群4間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群4-イトヨ染色体8間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群4-メダカ染色体4間のドットプロット (D) クロマグロ連鎖群4-ミドリフグ染色体1間のドットプロット

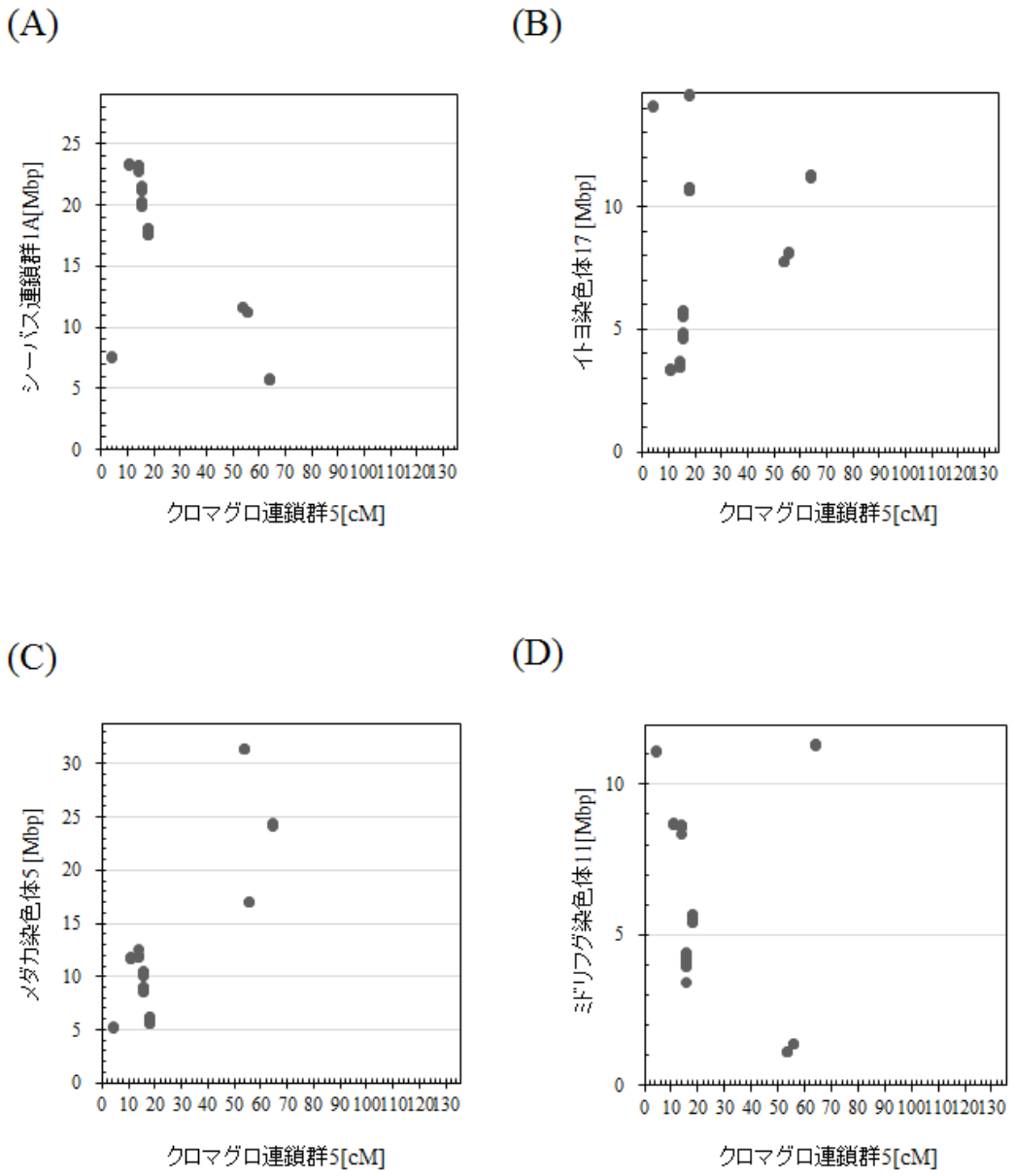



図2-12 クロマグロ連鎖群5の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群5-ヨーロッパシーバス連鎖群1A間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群5-イトヨ染色体17間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群5-メダカ染色体5間のドットプロット (D) クロマグロ連鎖群5-ミドリフグ染色体11間のドットプロット

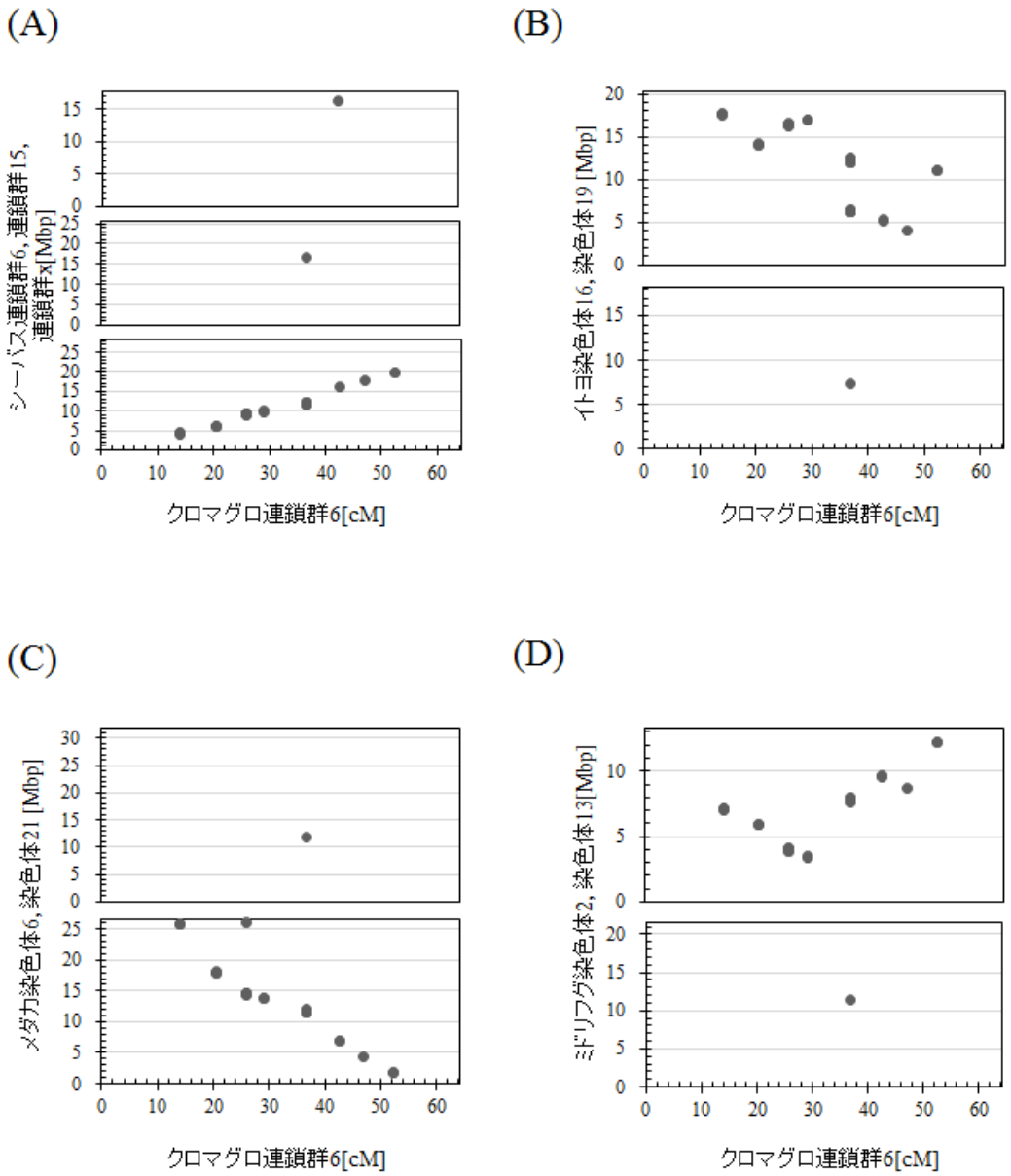



図2-13 クロマグロ連鎖群6の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群6-ヨーロッパシーバス連鎖群6, 15, x間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖6群-イトヨ染色体16, 19間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群6-メダカ染色体6 ,21間のドットプロット (D) クロマグロ連鎖群6-ミドリフグ染色体2, 13間のドットプロット

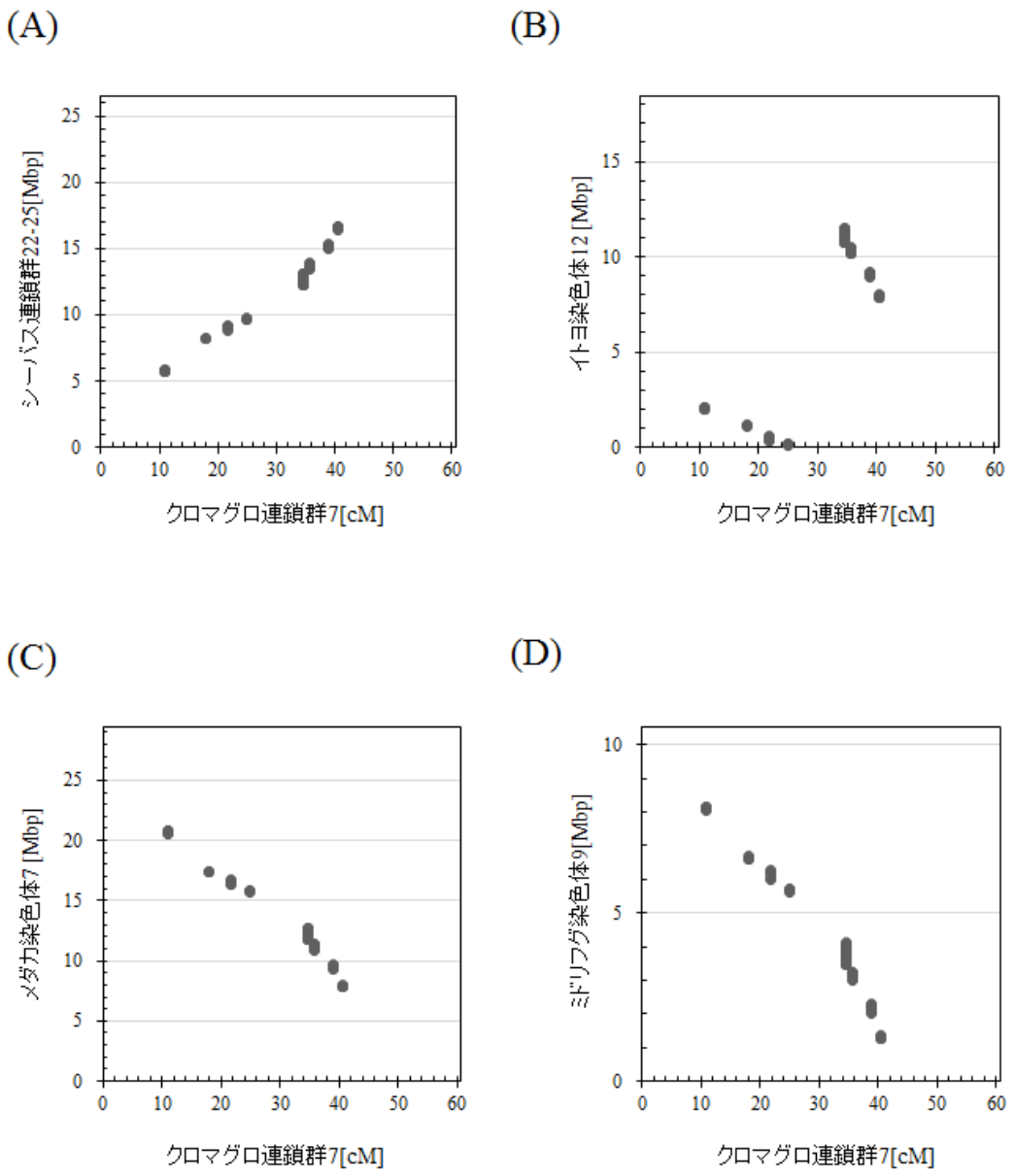



図2-14 クロマグロ連鎖群7の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群7-ヨーロッパシーバス連鎖群22-25間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群7-イトヨ染色体12間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群7-メダカ染色体7間のドットプロット (D)クロマグロ連鎖群7-ミドリフグ染色体7間のドットプロット

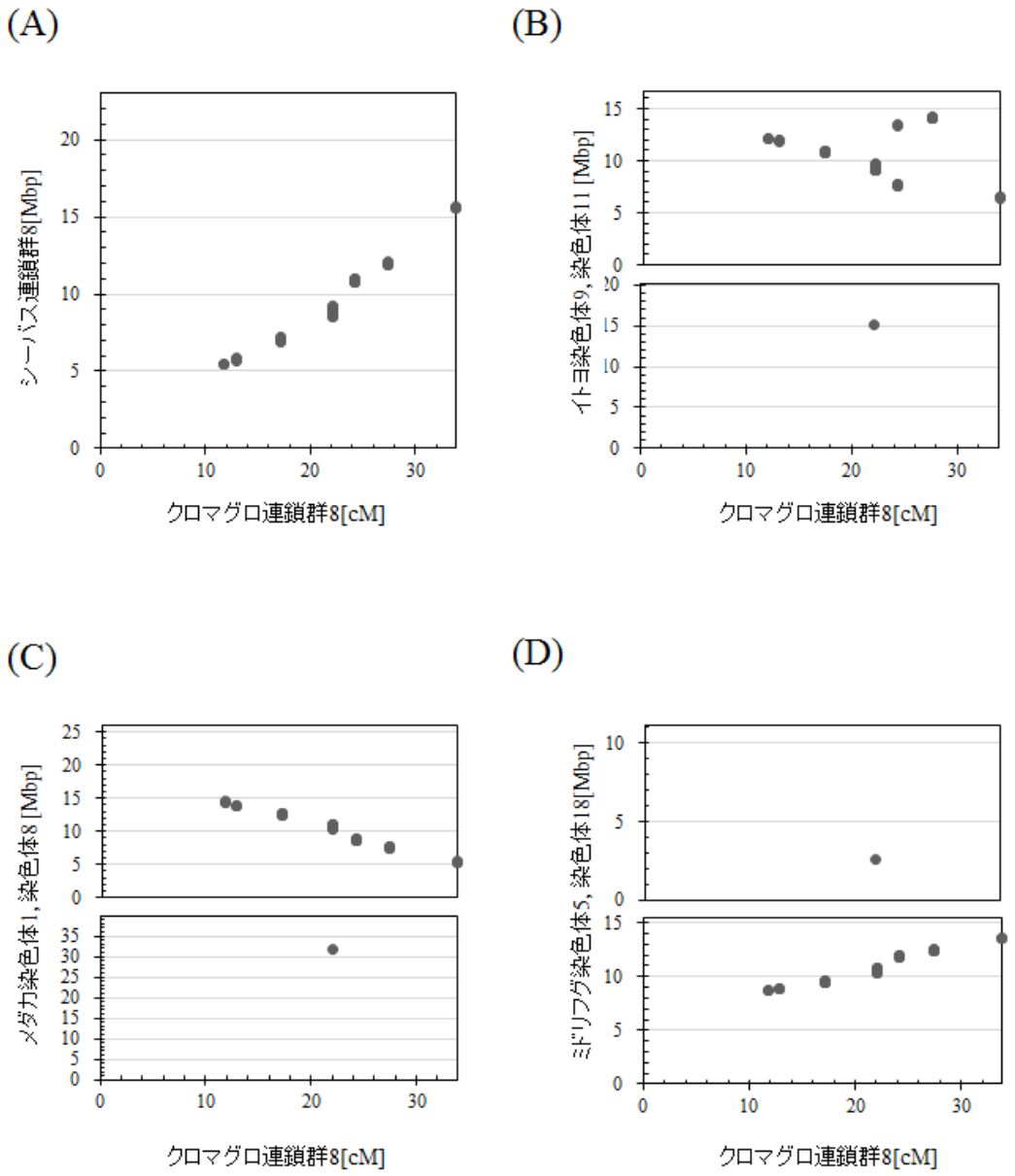



図2-15 クロマグロ連鎖群8の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群8-ヨーロッパシーバス連鎖群8間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群8-イトヨ染色体9, 11間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群8-メダカ染色体8間のドットプロット (D)クロマグロ連鎖群8-ミドリフグ染色体3, 18間のドットプロット

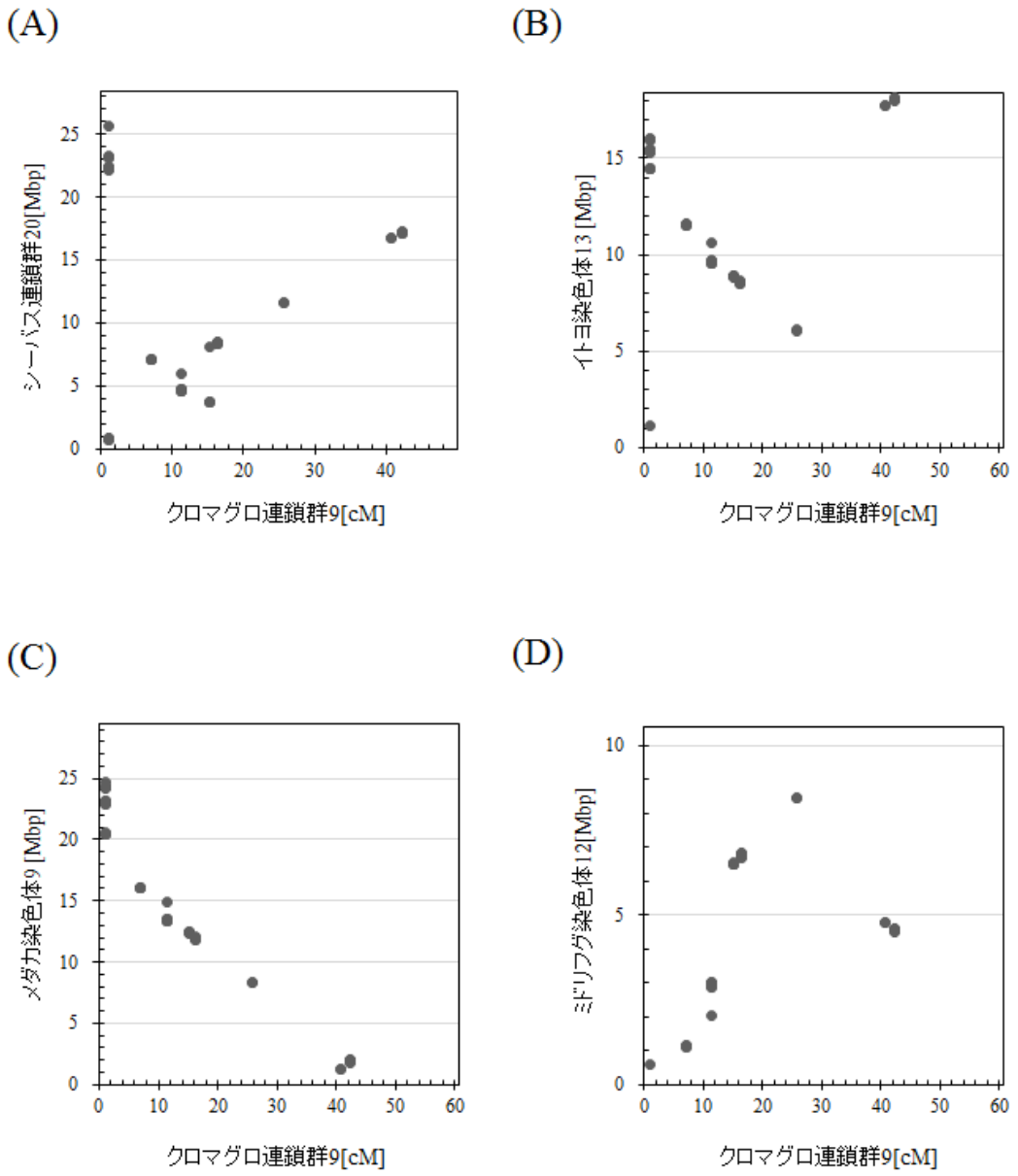



図2-16 クロマグロ連鎖群9の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群9-ヨーロッパシーバス連鎖群20間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群9-イトヨ染色体13間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群9-メダカ染色体9間のドットプロット (D) クロマグロ連鎖群9-ミドリフグ染色体12間のドットプロット

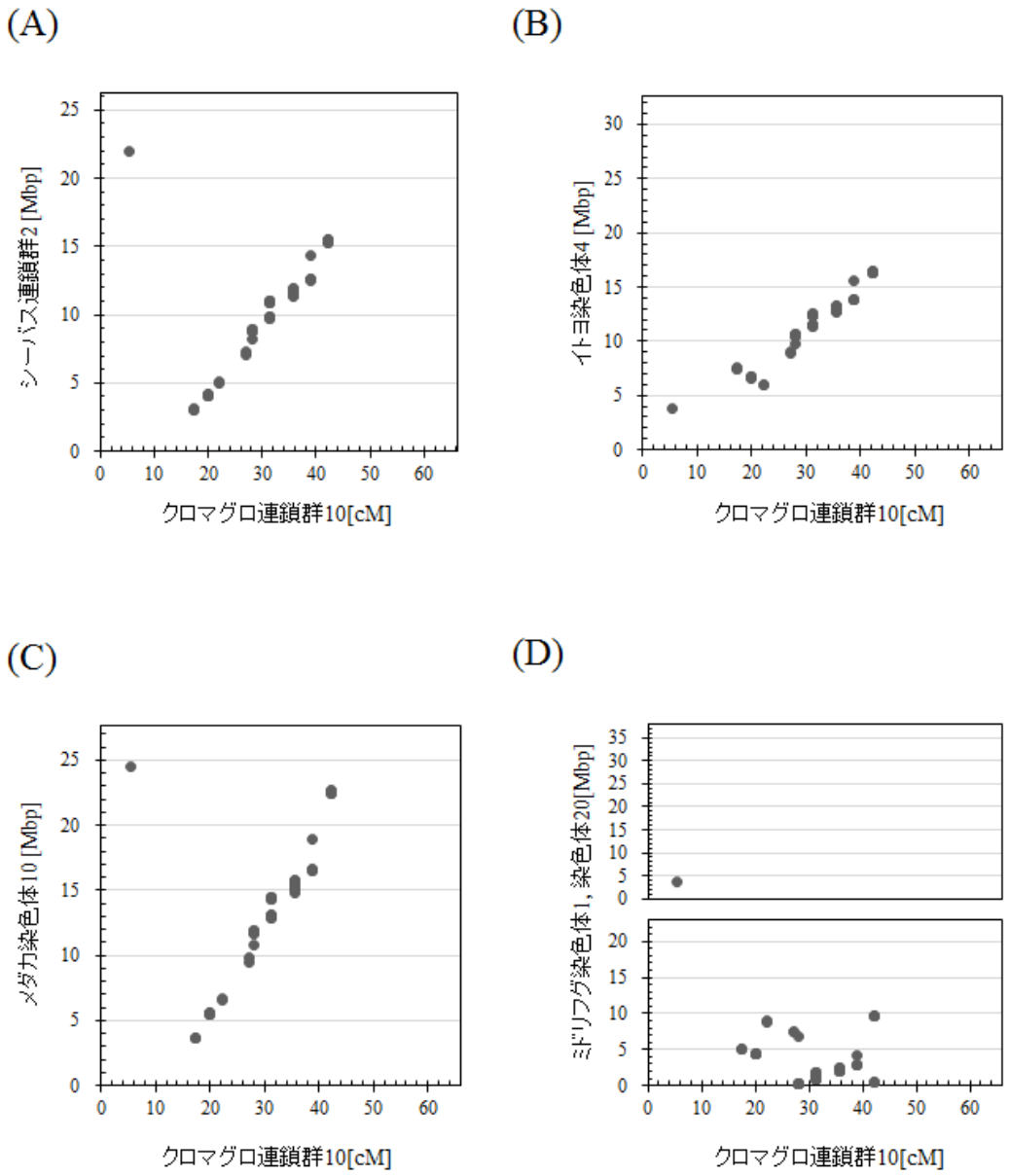



図2-17 クロマグロ連鎖群10の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群10-ヨーロッパシーバス連鎖群2間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群10-イトヨ染色体4間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群10-メダカ染色体10間のドットプロット (D) クロマグロ連鎖群10-ミドリフグ染色体1, 20間のドットプロット

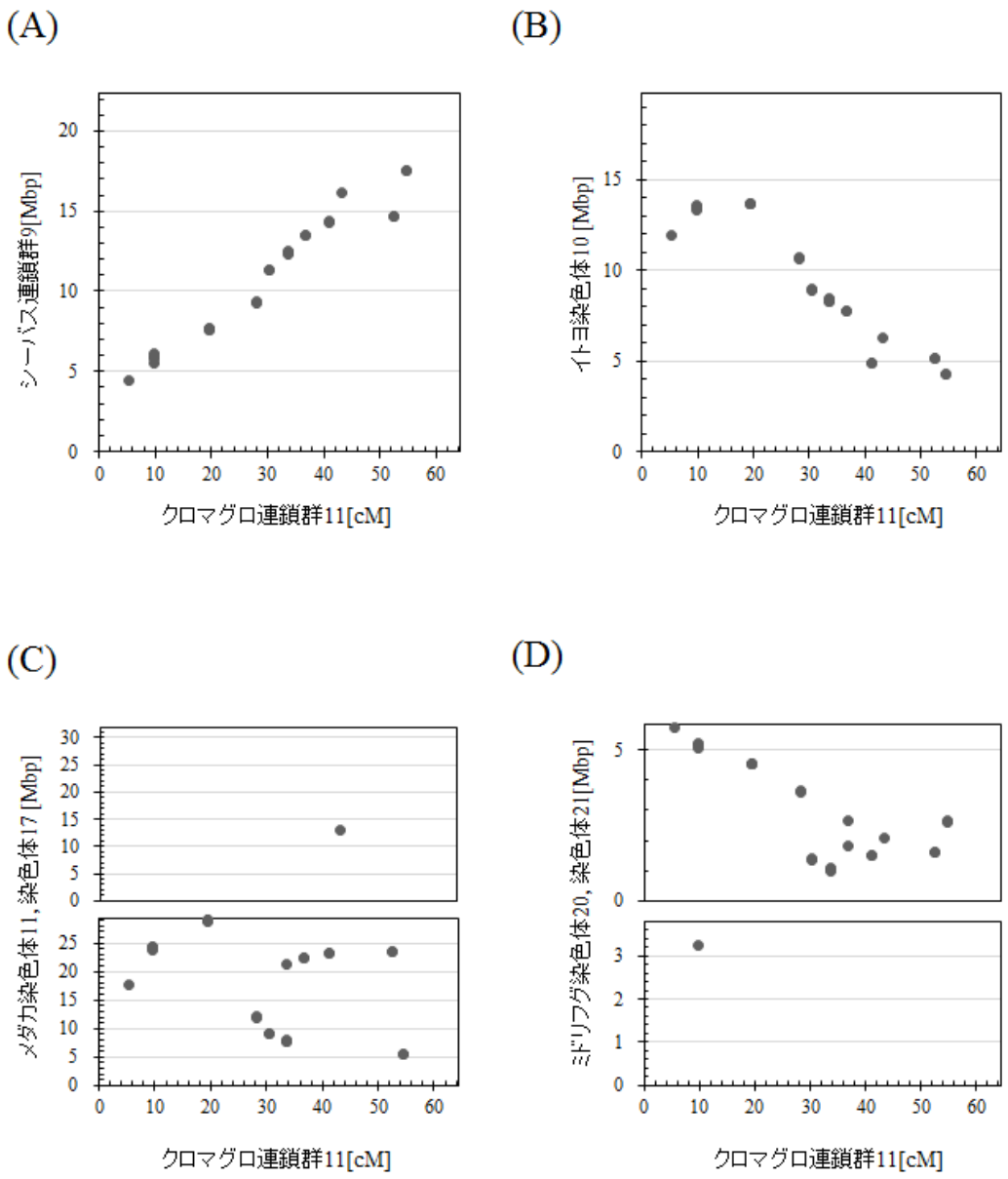



図2-18 クロマグロ連鎖群11の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群11-ヨーロッパシーバス連鎖群9間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群11-イトヨ染色体10間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群11-メダカ染色体11, 17間のドットプロット (D)クロマグロ連鎖群11-ミドリフグ染色体20, 21間のドットプロット

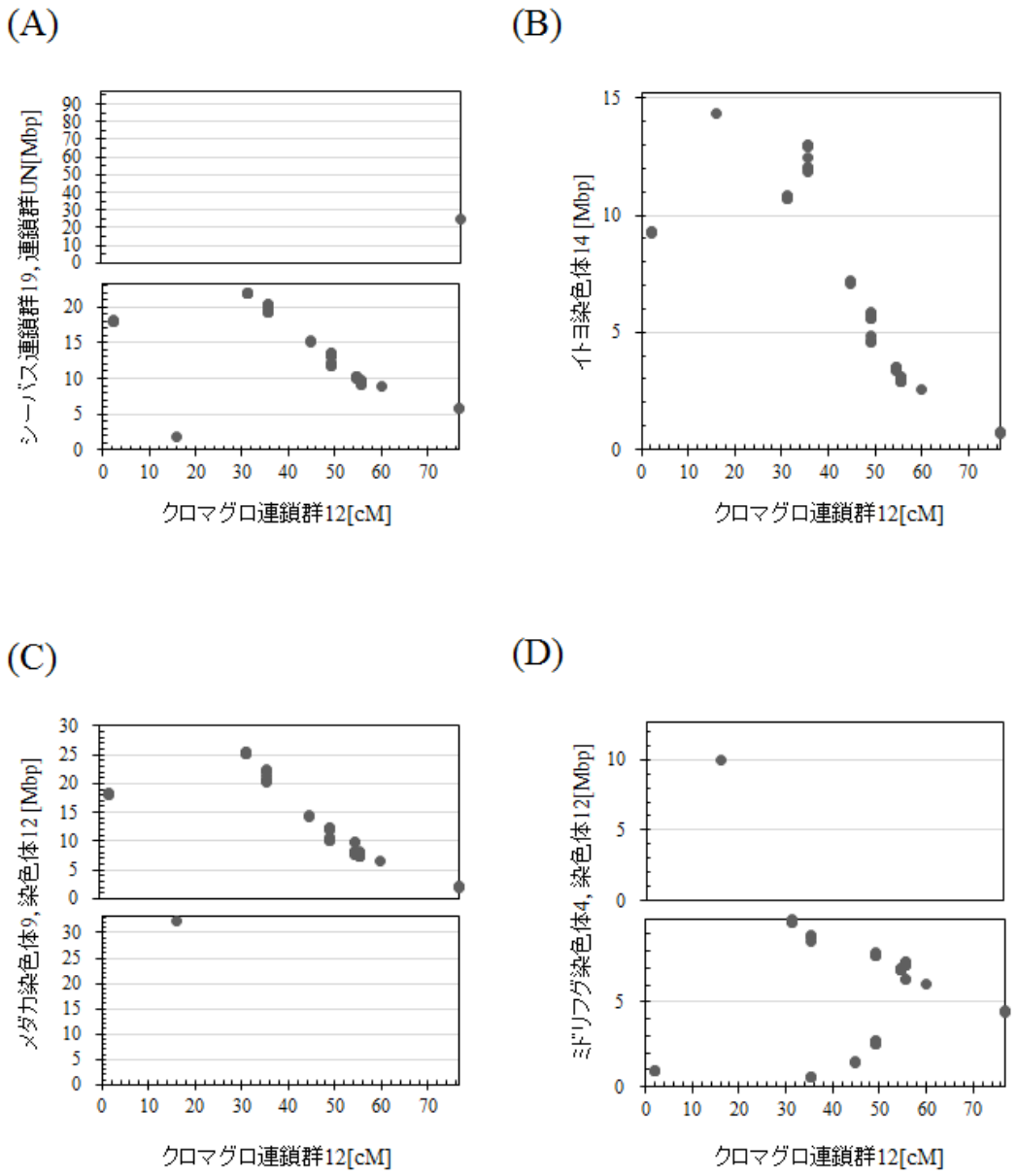



図2-19 クロマグロ連鎖群12の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群12-ヨーロッパシーバス連鎖群19, UN間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群12-イトヨ染色体14間のドットプロット © クロマグロ連鎖群12-メダカ染色体9, 12間のドットプロット (D) クロマグロ連鎖群12-ミドリフグ染色体4, 12間のドットプロット

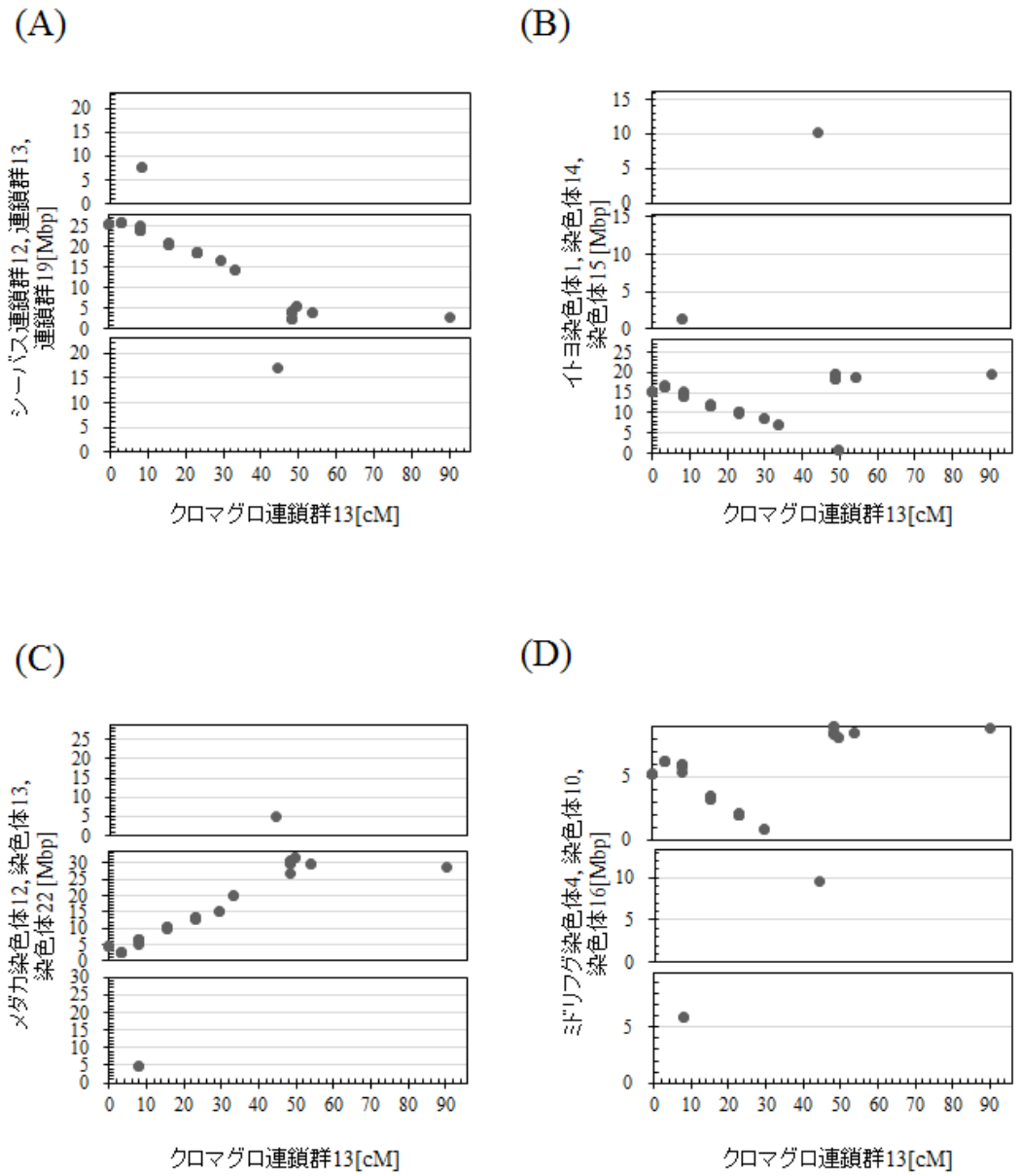



図2-20 クロマグロ連鎖群13の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群13-ヨーロッパシーバス連鎖群12, 13, 19間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群13-イトヨ染色体1, 14, 15間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群13-メダカ染色体12, 13, 22間のドットプロット (D)クロマグロ連鎖群13-ミドリフグ染色体4, 10, 16間のドットプロット

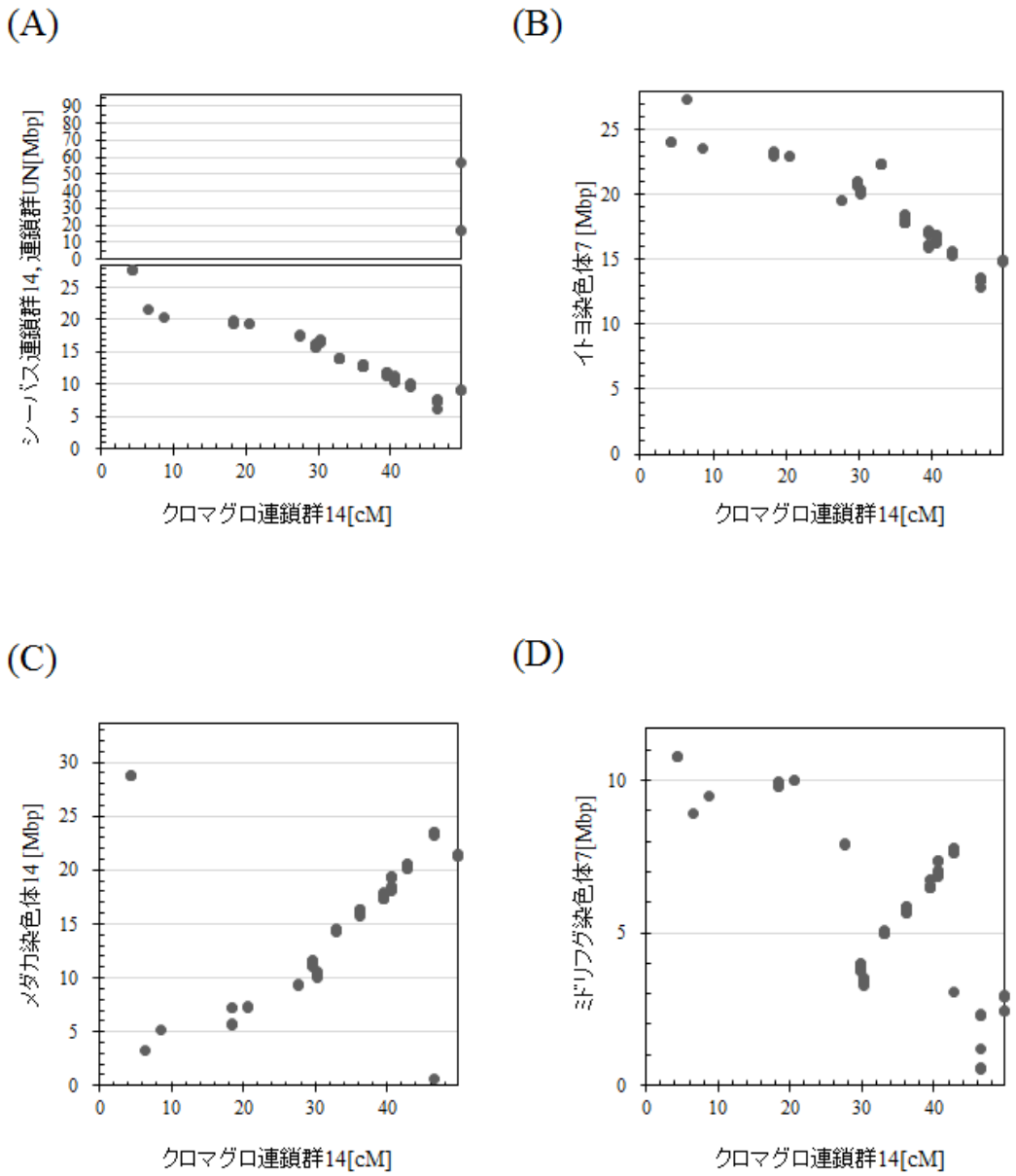



図2-21 クロマグロ連鎖群14の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群14-ヨーロッパシーバス連鎖群14, UN間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群-イトヨ染色体7間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群14-メダカ染色体14間のドットプロット (D)クロマグロ連鎖群14-ミドリフグ染色体7間のドットプロット

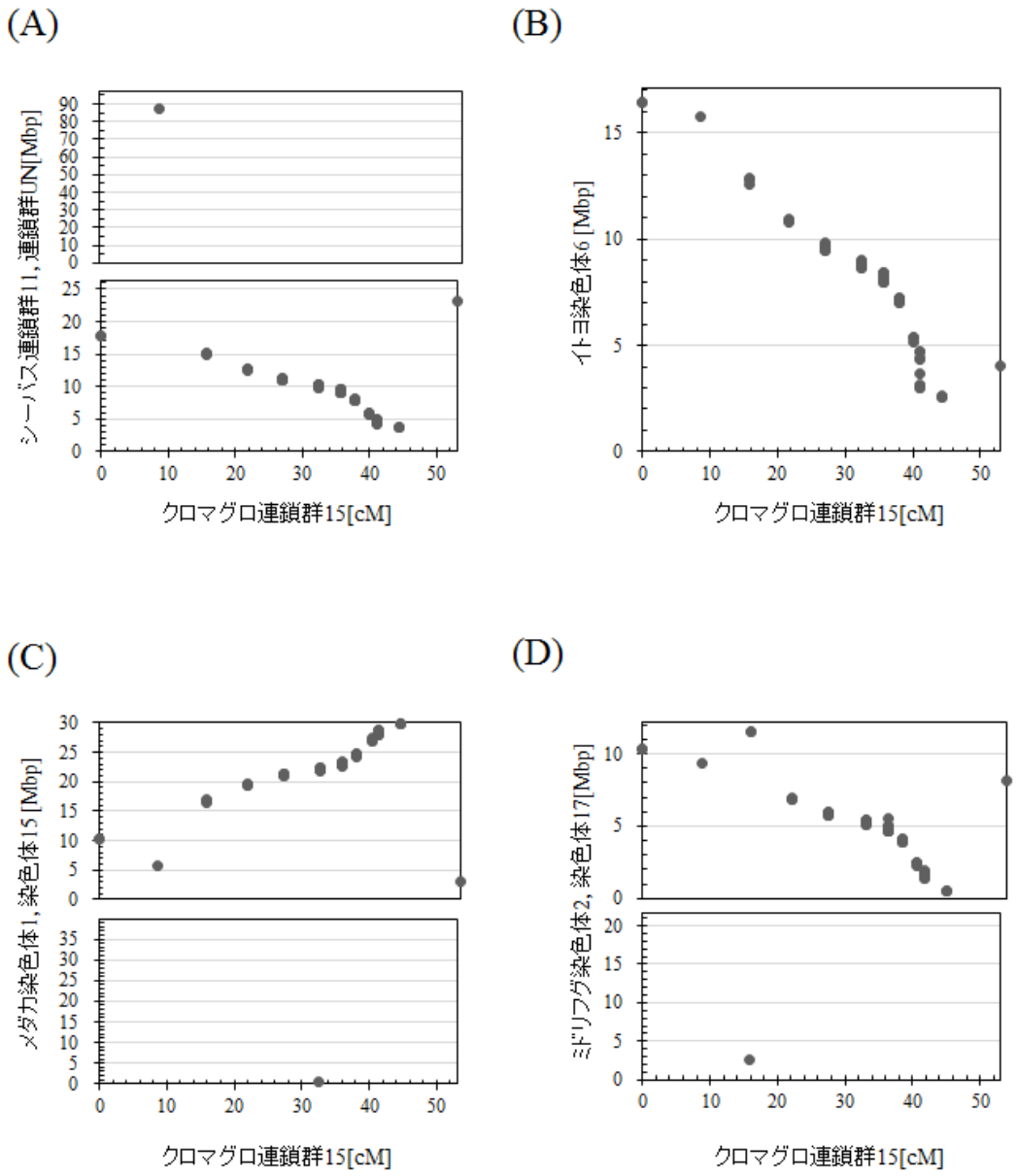



図2-22 クロマグロ連鎖群15の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群15-ヨーロッパシーバス連鎖群11, UN間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群15-イトヨ染色体6間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群15-メダカ染色体1, 15間のドットプロット (D) クロマグロ連鎖群15-ミドリフグ染色体2, 17間のドットプロット

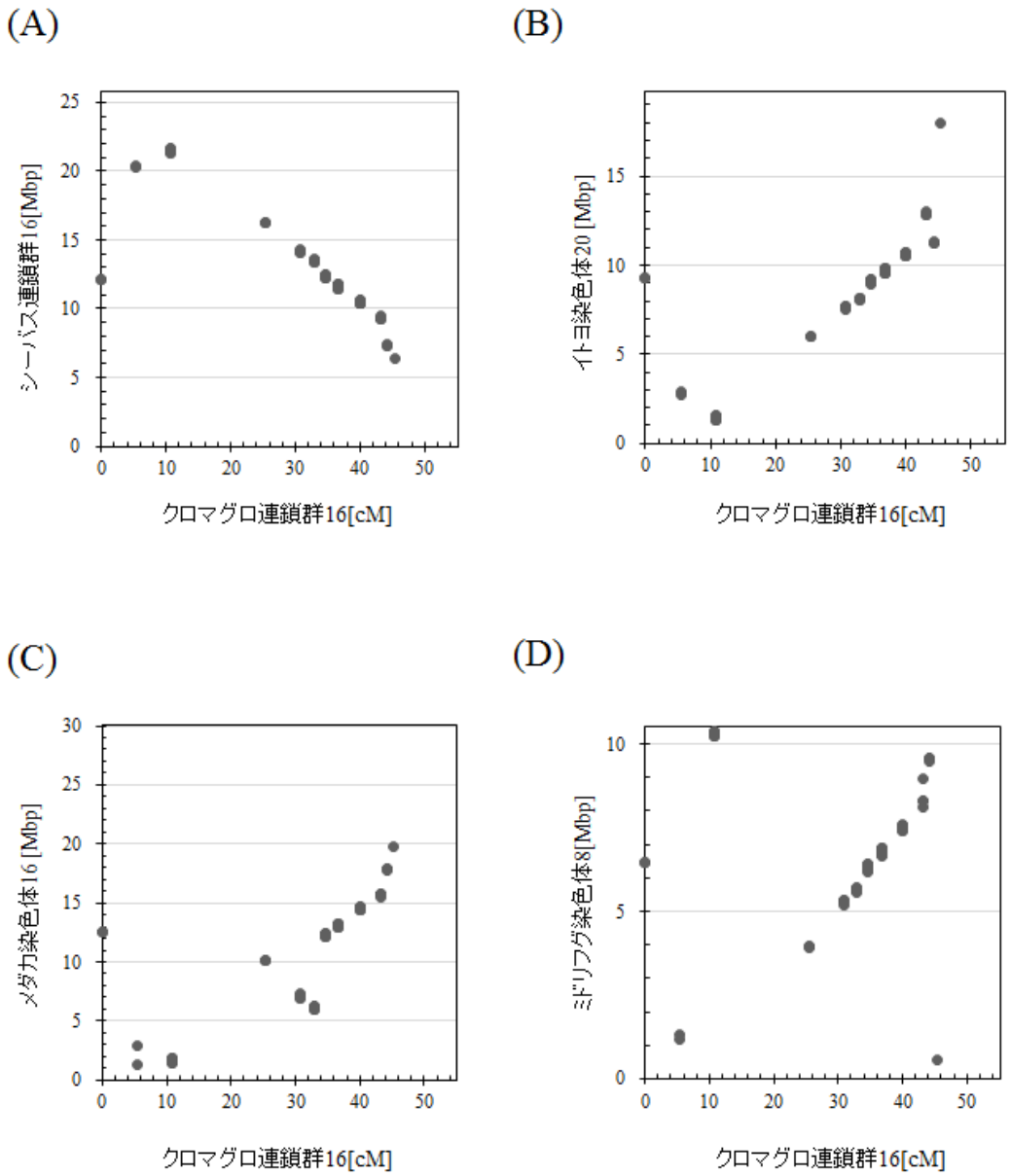



図2-23 クロマグロ連鎖群16の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群16-ヨーロッパシーバス連鎖群16間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群16-イトヨ染色体20間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群16-メダカ染色体16間のドットプロット (D) クロマグロ連鎖群16-ミドリフグ染色体8間のドットプロット

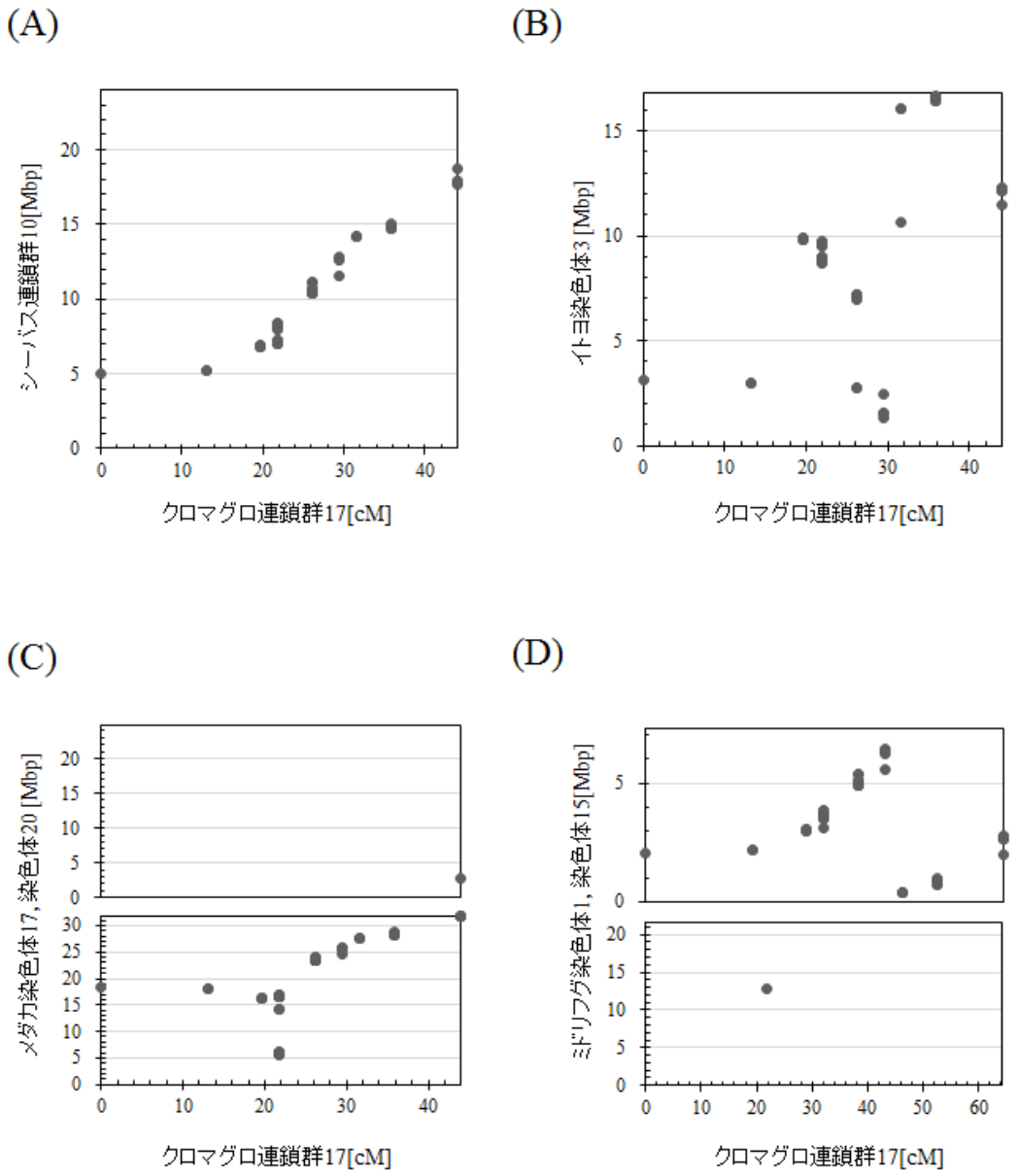



図2-24 クロマグロ連鎖群17の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群17-ヨーロッパシーバス連鎖群10間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群17-イトヨ染色体3間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群17-メダカ染色体17, 20間のドットプロット (D) クロマグロ連鎖群17-ミドリフグ染色体1, 15間のドットプロット

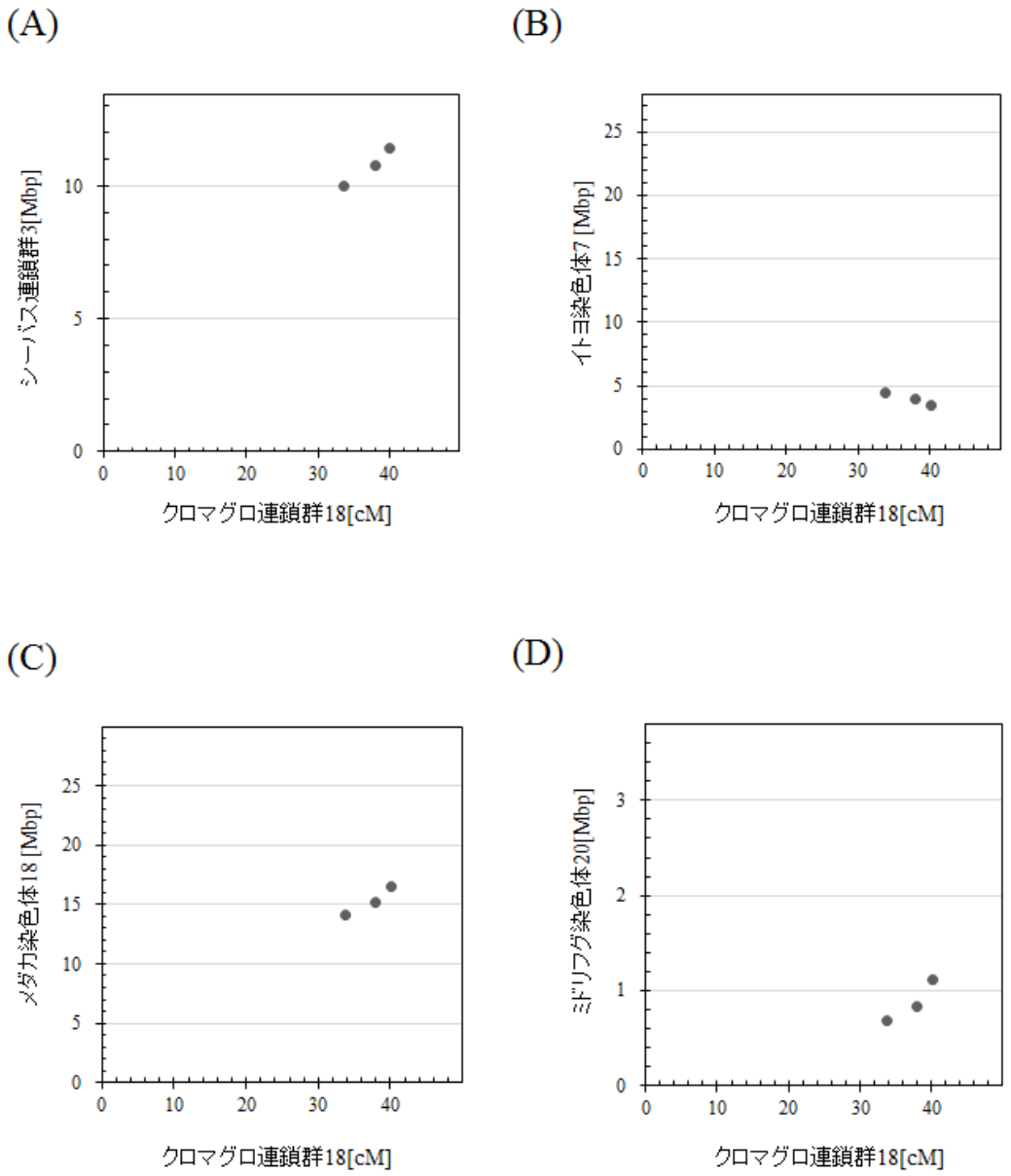



図2-25 クロマグロ連鎖群18の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群18-ヨーロッパシーバス連鎖群3間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群18-イトヨ染色体7間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群18-メダカ染色体18間のドットプロット (D) クロマグロ連鎖群18-ミドリフグ染色体20間のドットプロット

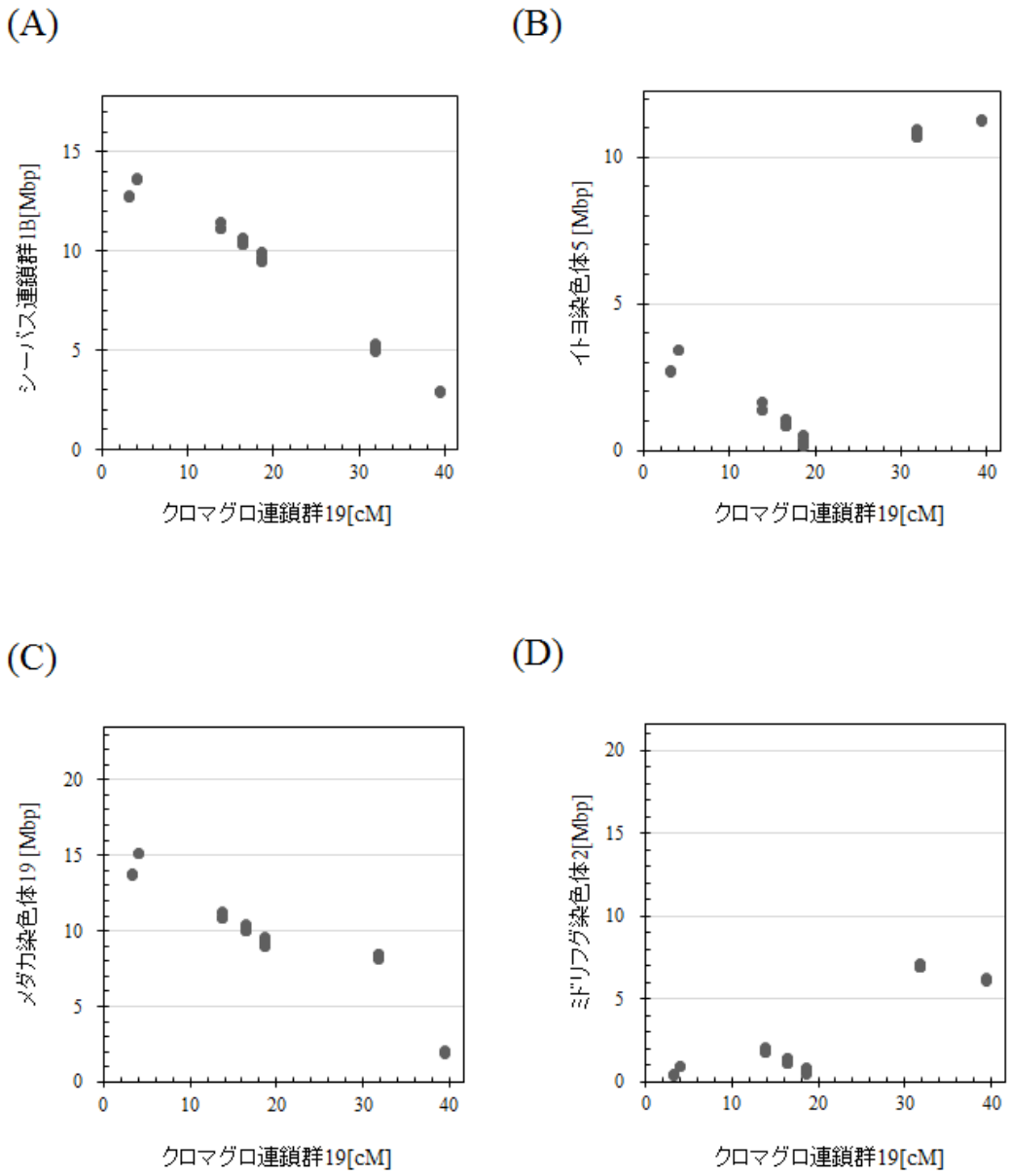



図2-26 クロマグロ連鎖群19の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群19-ヨーロッパシーバス連鎖群1B間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群19-イトヨ染色体5間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群19-メダカ染色体19間のドットプロット (D)クロマグロ連鎖群19-ミドリフグ染色体2間のドットプロット

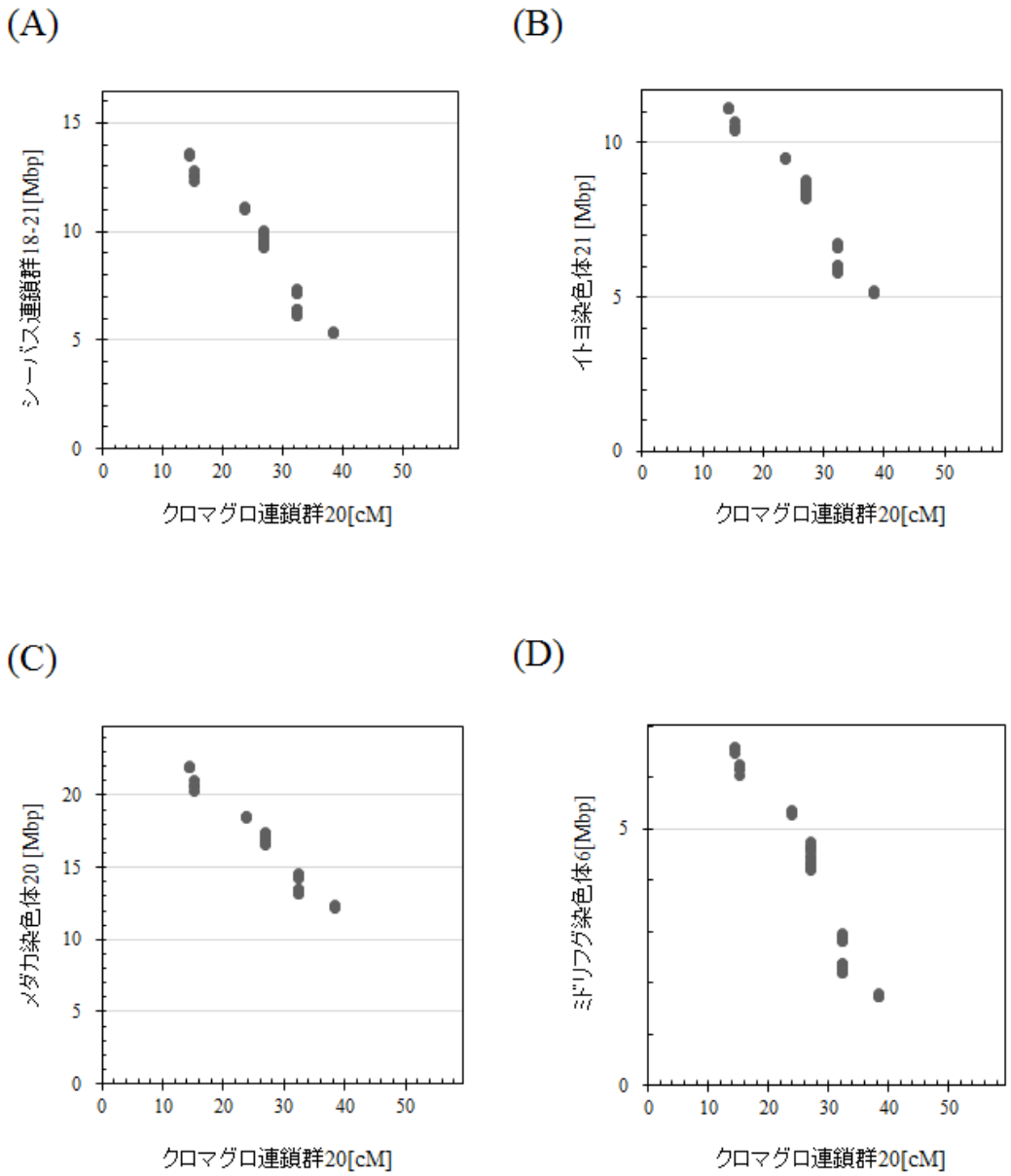



図2-27 クロマグロ連鎖群20の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群20-ヨーロッパシーバス連鎖群18-21間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群20-イトヨ染色体21間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群20-メダカ染色体20間のドットプロット (D)クロマグロ連鎖群20-ミドリフグ染色体6間のドットプロット

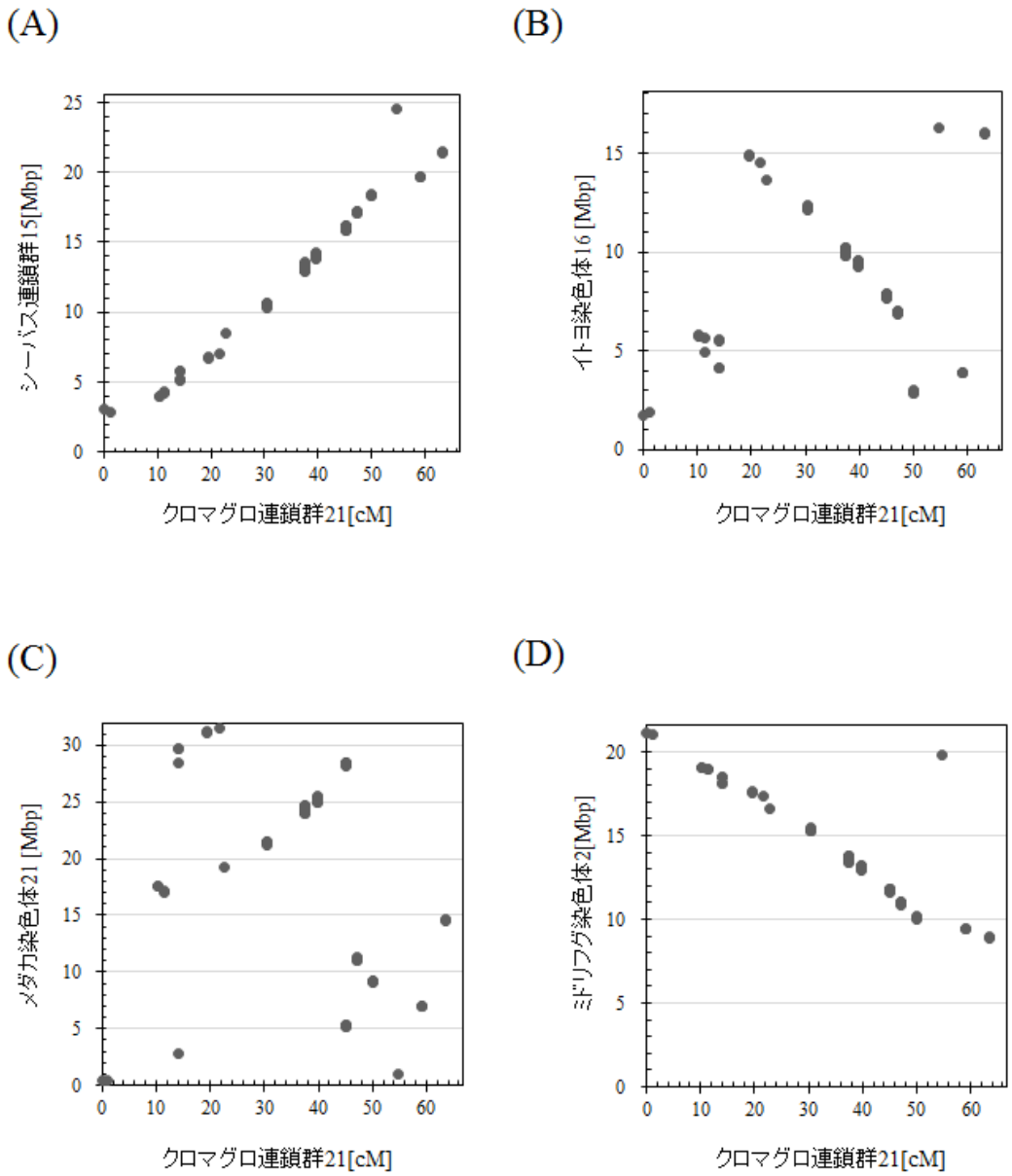



図2-28 クロマグロ連鎖群21の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群21-ヨーロッパシーバス連鎖群15間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群21-イトヨ染色体16間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群21-メダカ染色体21間のドットプロット (D)クロマグロ連鎖群21-ミドリフグ染色体2間のドットプロット

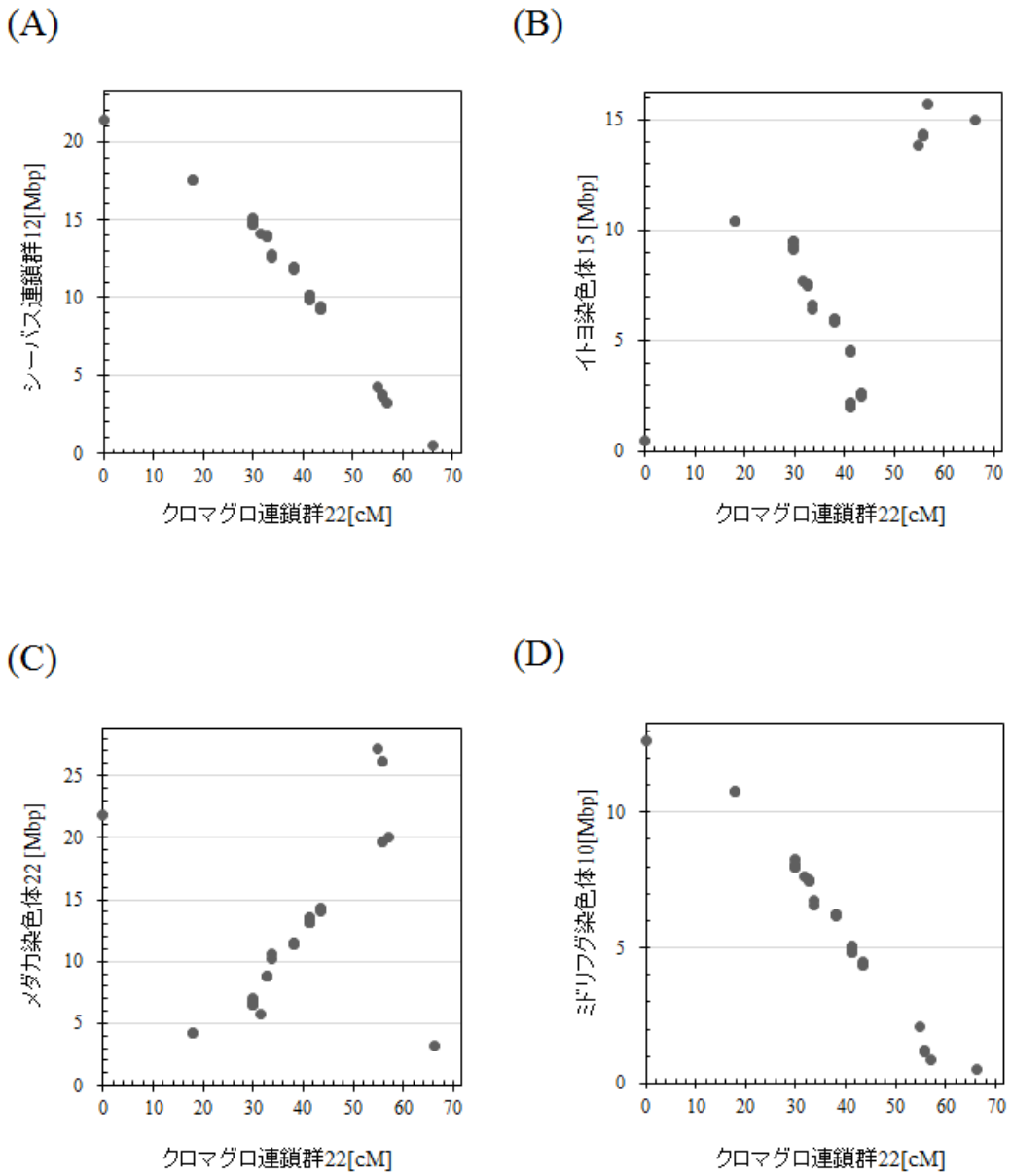



図2-29 クロマグロ連鎖群22の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群22-ヨーロッパシーバス連鎖群12間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群22-イトヨ染色体15間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群22-メダカ染色体22間のドットプロット (D) クロマグロ連鎖群22-ミドリフグ染色体10間のドットプロット

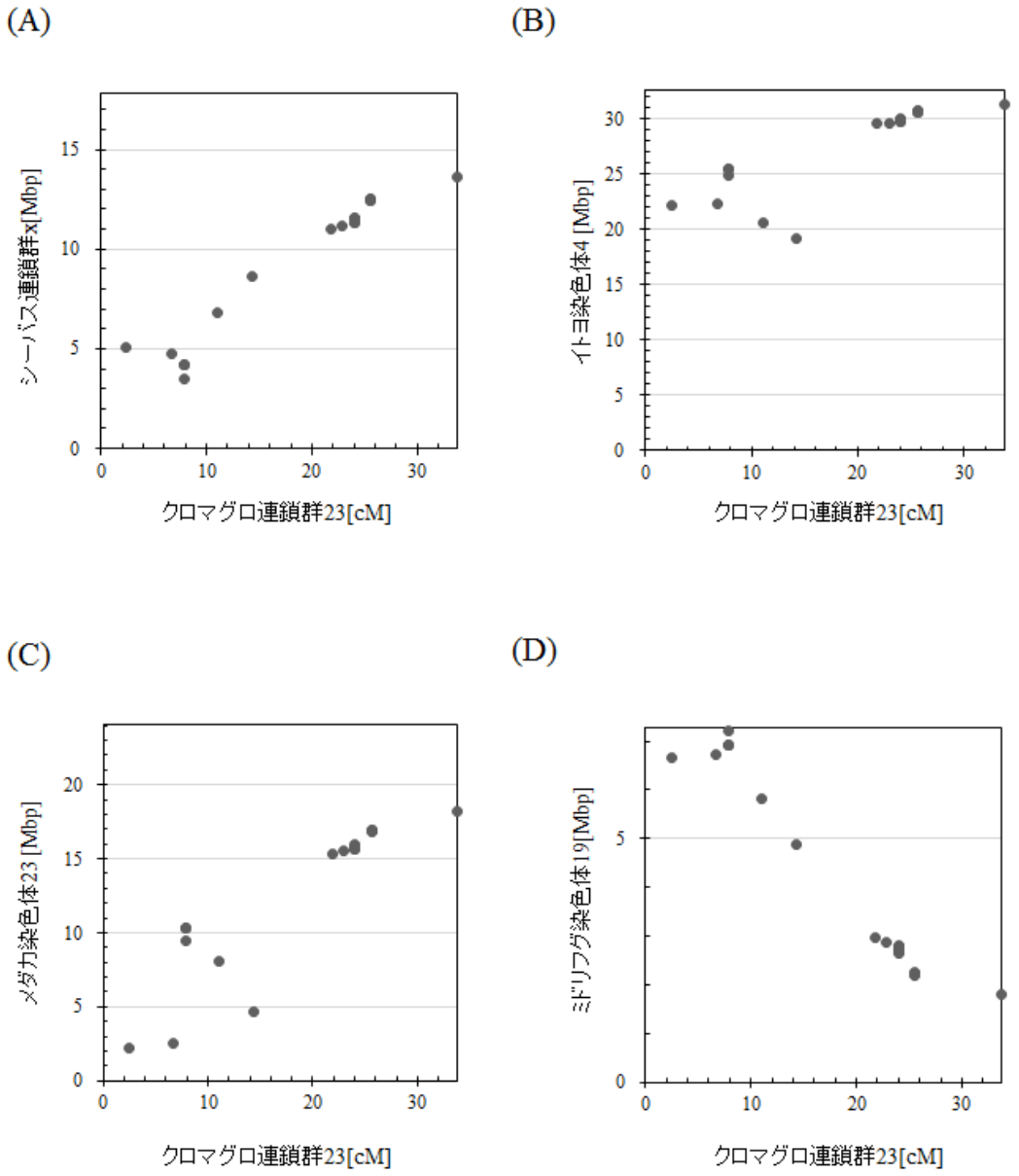



図2-30 クロマグロ連鎖群23の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群23-ヨーロッパシーバス連鎖群x間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群23-イトヨ染色体4間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群23-メダカ染色体23間のドットプロット (D) クロマグロ連鎖群23-ミドリフグ染色体19間のドットプロット

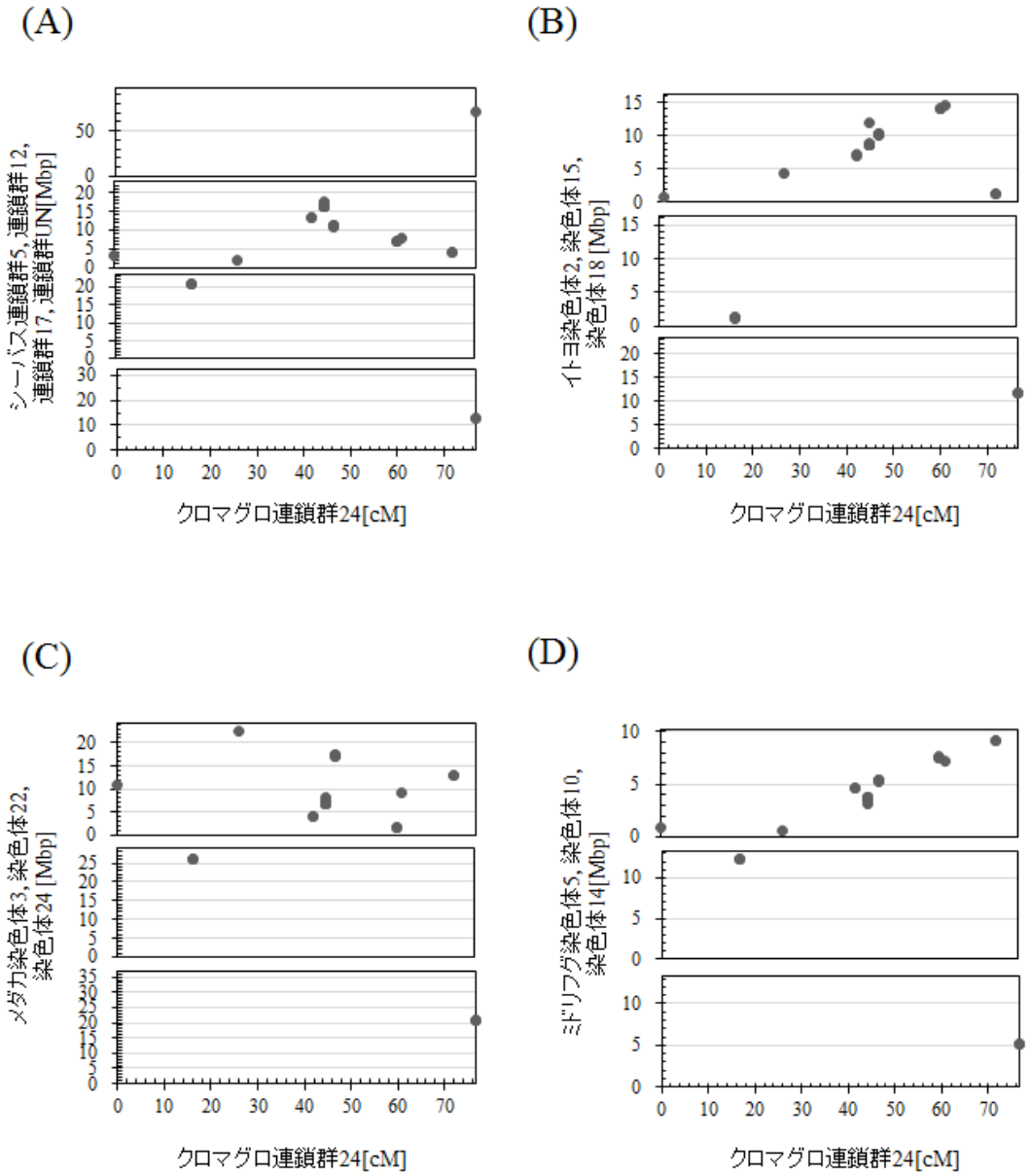



図2-31 クロマグロ連鎖群24の4魚種との比較
(A) クロマグロ連鎖群24-ヨーロッパシーバス連鎖群5, 12, 17, UN間のドットプロット (B) クロマグロ連鎖群24-イトヨ染色体2, 15, 18間のドットプロット (C) クロマグロ連鎖群24-メダカ染色体3, 22, 24間のドットプロット (D) クロマグロ連鎖群24-ミドリフグ染色体5, 10, 14間のドットプロット

既に行われていることから、オルソログの位置情報については遺伝距離（cM）でなく遺伝子開始点を示す物理距離（Mbp）となっている。

クロマグロの連鎖群 1 に配置されたオルソログ遺伝子をシーバス（図 2-8A）、イトヨ（図 2-8B）、メダカ（図 2-8C）、ミドリフグ（図 2-8D）それぞれと比較した結果、どの種と比較した際にも遺伝子の並びが複雑に入れ替わっており、クロマグロで特異的に並びが変化した可能性が示唆された。また、クロマグロ連鎖群 1 上の 21.7 cM に位置する 4 遺伝子は、シーバス連鎖群 13 の 17.0 から 17.1 Mbp、イトヨ染色体 1 の 89.3 から 89.6 Mbp、メダカ染色体 13 の 14.6 Mbp、ミドリフグ染色体 16 の 12.0 Mbp にそれぞれ位置しており、太平洋クロマグロにおいて特異的に配置が異なる領域である可能性が示された。

クロマグロの連鎖群 2 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-9）、どの魚種に対する比較においても遺伝子の並びがかなり保存されている様子が見られた。ただし、クロマグロ連鎖群 2 の 43.2 cM に位置する 4 遺伝子は、シーバス連鎖群 24 の 11.6 から 11.7 Mbp と染色体 UN の 64.0 Mbp（図 2-9A）、イトヨ染色体 9 の 22.8 から 22.9 Mbp（図 2-9B）、メダカ染色体 2 の 30.0 から 31.0 Mbp（図 2-9C）、ミドリフグ染色体 3 の 1.9 Mbp と 7.7 から 7.8 Mbp（図 2-9D）にそれぞれ位置しており、イトヨとミドリフグでそれぞれ並びが異なっている様子が見られた。

クロマグロの連鎖群 3 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較し

Ensembl データベースから遺伝子開始位置に関する情報を取得することが出来なかったため、以降の解析に含めることは出来なかった。また、ヨーロッパシーバスに関しては表記上は連鎖群となっているものの、連鎖地図とゲノム配列の統合がた結果（図 2-10）、どの魚種に対する比較においても遺伝子の並びがかなり保存されている様子が見られた。ただし、クロマグロ連鎖群 3 の 13.2 cM から 15.4 cM に位置する 7 遺伝子は、シーバス連鎖群 5 の 21.3 から 22.3 Mbp（図 2-10A）、イトヨ染色体 2 の 18.3 から 19.0 Mbp（図 2-10B）、メダカ染色体 3 の 10.5 から 11.6 Mbp（図 2-10C）、ミドリフグ染色体 5 の 10.1 から 10.5 Mbp（図 2-10D）にそれぞれ位置しており、イトヨで並びが異なっている様子が見られた。

クロマグロの連鎖群 4 に配置されたオルソログ遺伝子をシーバス（図 2-11A）、イトヨ（図 2-11B）、メダカ（図 2-11C）、ミドリフグ（図 2-11D）それぞれと比較した結果、メダカと比較した際に遺伝子の並びが複雑に入れ替わっており、メダカで特異的に並びが変化した可能性が示唆された。一方で残りの 3 魚種に対する比較においては、遺伝子の並びがかなり保存されている様子が見られた。ただし、クロマグロ連鎖群 4 の 8.6 cM に位置する 3 遺伝子は、シーバス連鎖群 4 の 23.8 から 24.2 Mbp（図 2-11A）、イトヨ染色体 8 の 2.4 から 2.8 Mbp（図 2-11B）、メダカ染色体 4 の 5.5 Mbp、25.4 Mbp と 31.0 Mbp（図 2-11C）、ミドリフグ染色体 1 の 10.1 Mbp から 10.4 Mbp（図 2-11D）にそれぞれ位置しており、イトヨ（とメダカ）でそれぞれ並びが異なっている様子が見られた。また、クロマグロ連鎖群 4 の 52.3 cM に位置

する 4 遺伝子は、シーバス連鎖群 4 の 2.1 から 2.2 Mbp（図 2-11A）、イトヨ染色体 8 の 3.4 から 3.5 Mbp（図 2-11B）、メダカ染色体 4 の 22.5 から 22.7 Mbp（図 2-11C）、ミドリフグ染色体 1 の 21.8 Mbp と 22.8 Mbp（図 2-11D）にそれぞれ位置しており、同様にイトヨとメダカでそれぞれ並びが異なっている様子が見られた。

クロマグロの連鎖群 5 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-12）、シーバスとの比較において遺伝子の並びがかなり保存されている様子が見られた（図 2-12A）。一方で残りの 3 魚種に対する比較においては、遺伝子の並びが複雑に入れ替わっている様子が見られた。また、クロマグロ連鎖群 5 上の 4.3 cM に位置する 2 遺伝子は、シーバス連鎖群 1A の 7.5 から 7.6 Mbp、イトヨ染色体 17 の 14.1 Mbp、メダカ染色体 5 の 5.2 から 5.3 Mbp、ミドリフグ染色体 11 の 11.1 Mbp にそれぞれ位置しており、太平洋クロマグロとミドリフグにおいてそれぞれ並びが異なる領域であることがが分かった。

クロマグロの連鎖群 6 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-13）、シーバスおよびメダカとの比較において遺伝子の並びがかなり保存されている様子が見られた（図 2-12A, B）。一方で残りの 2 魚種に対する比較においては、遺伝子の並びが複数箇所で入れ替わっている様子が見られた。また、クロマグロ連鎖群 6 上の 36.7 cM に位置する 1 遺伝子は、シーバス連鎖群 15 の 16.7 Mbp、イトヨ染色体 16 の 7.3 Mbp、メダカ染色体 21 の 11.8 Mbp、ミドリフグ染色体 2 の 11.3 Mbp にそれぞれ位置しており、太平洋クロマグロにおいて特異的に転

座した領域である可能性が示された。さらに、クロマグロ連鎖群 6 上の 36.7 cM に位置する 1 遺伝子は、シーバス連鎖群 x の 16.4 Mbp、イトヨ染色体 19 の 52.3 Mbp、メダカ染色体 6 の 6.9 Mbp、ミドリフグ染色体 13 の 9.6 Mbp にそれぞれ位置しており、シーバスにおいて特異的に配置が異なる領域である可能性が示された。

クロマグロの連鎖群 7 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-14）、シーバス、メダカおよびミドリフグとの比較において遺伝子の並びがかなり保存されている様子が見られた（図 2-14A, C, D）。一方でイトヨに対する比較においては、遺伝子の並びが 1 か所入れ替わっていた（図 2-14B）。

クロマグロの連鎖群 8 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-15）、シーバス、メダカおよびミドリフグとの比較において遺伝子の並びがかなり保存されている様子が見られた（図 2-15A, C, D）。ただし、クロマグロ連鎖群 8 上の 22.1 cM に位置する 1 遺伝子は、シーバス連鎖群 8 の 9.1 Mbp（図 2-15A）、イトヨ染色体 9 の 15.2 Mbp（図 2-15B）、メダカ染色体 1 の 31.6 Mbp（図 2-15C）、ミドリフグ染色体 18 の 2.6 Mbp（図 2-15D）にそれぞれ位置しており、太平洋クロマグロとシーバスの共通祖先において同一の染色体に配置されていた領域である可能性が示された。一方でメダカと比較した結果、遺伝子の並びが複雑に入れ替わっており、メダカで特異的に並びが変化した領域である可能性が示唆された。

クロマグロの連鎖群 9 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較し

た結果（図 2-16）、イトヨ、メダカおよびミドリフグとの比較において遺伝子の並びがかなり保存されている様子が見られた（図 2-16B, C, D）。ただし、クロマグロ連鎖群 9 上の 1.1 cM に位置する 1 遺伝子は、シーバス連鎖群 20 の 25.6 Mbp（図 2-16A）、イトヨ染色体 13 の 1.1 Mbp（図 2-16B）、メダカ染色体 9 の 30.6 Mbp（図 2-16C）、ミドリフグ染色体 12 の 0.6 Mbp（図 2-16D）にそれぞれ位置しており、イトヨにおいて特異的に配置が異なる領域である可能性が示された。また、クロマグロ連鎖群 9 上の 40.7 cM に位置する 2 遺伝子と 42.3 cM に位置する 5 遺伝子は、シーバス連鎖群 20 の 16.8 から 17.3 Mbp（図 2-16A）、イトヨ染色体 13 の 17.8 から 18.1 Mbp（図 2-16B）、メダカ染色体 9 の 1.2 から 2.0 Mbp（図 2-16C）、ミドリフグ染色体 12 の 4.5 から 4.8 Mbp（図 2-16D）にそれぞれ位置しており、太平洋クロマグロで特異的に並びが変化した領域である可能性が示された。一方でシーバスと比較した結果、遺伝子の並びが複雑に入れ替わっており、シーバスで特異的に並びが変化した領域である可能性が示唆された（図 2-16A）。

クロマグロの連鎖群 10 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-17）、シーバス、イトヨ、およびメダカとの比較において遺伝子の並びがかなり保存されている様子が見られた（図 2-17A, B, C）。ただし、クロマグロ連鎖群 10 上の 5.4 cM に位置する 1 遺伝子は、シーバス連鎖群 2 の 21.9 Mbp（図 2-17A）、イトヨ染色体 4 の 3.8 Mbp（図 2-17B）、メダカ染色体 10 の 24.5 Mbp（図 2-17C）、ミドリフグ染色体 20 の 3.5 Mbp（図 2-17D）にそれぞれ位置しており、シ

ーバスとメダカにおいて並びが異なり、ミドリフグにおいては配置が異なる領域である可能性が示された。また、クロマグロ連鎖群 10 上の 17.3 から 22.2 cM に位置する 5 遺伝子は、シーバス連鎖群 2 の 3.0 から 5.0 Mbp（図 2-17A）、イトヨ染色体 4 の 5.9 から 7.5 Mbp（図 2-17B）、メダカ染色体 10 の 3.6 から 6.7 Mbp（図 2-17C）、ミドリフグ染色体 20 の 5.0 から 9.0 Mbp（図 2-17D）にそれぞれ位置しており、イトヨとミドリフグにおいて並びが異なる領域である可能性が示された。一方でミドリフグと比較した結果、遺伝子の並びが複雑に入れ替わっており、ミドリフグで特異的に並びが変化した領域である可能性が示唆された（図 2-17D）。

クロマグロの連鎖群 11 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-18）、シーバス、イトヨとの比較において遺伝子の並びがかなり保存されている様子が見られた（図 2-18A, B）。ただし、クロマグロ連鎖群 11 上の 5.4 cM に位置する 1 遺伝子は、シーバス連鎖群 9 の 4.5 Mbp（図 2-18A）、イトヨ染色体 10 の 11.9 Mbp（図 2-18B）、メダカ染色体 11 の 17.7 Mbp（図 2-18C）、ミドリフグ染色体 21 の 5.8 Mbp（図 2-18D）にそれぞれ位置しており、シーバスとメダカにおいて並びが異なる様子が見られた。また、クロマグロ連鎖群 11 上の 43.3 cM に位置する 1 遺伝子は、シーバス連鎖群 9 の 16.2 Mbp（図 2-18A）、イトヨ染色体 10 の 6.2 Mbp（図 2-18B）、メダカ染色体 17 の 12.9 Mbp（図 2-18C）、ミドリフグ染色体 21 の 2.1 Mbp（図 2-18D）にそれぞれ位置しており、クロマグロ特異的に並びが異なる領域である可能性が示唆された。

クロマグロの連鎖群 12 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-19）、シーバス、メダカとの比較において遺伝子の並びがかなり保存されている様子が見られた（図 2-19A, C）。ただし、クロマグロ連鎖群 19 上の 2.2 cM と 16.0 cM に位置する 5 遺伝子は、シーバス連鎖群 19 の 1.9 Mbp と 18.0 Mbp から 18.1 Mbp（図 2-19A）、イトヨ染色体 14 の 14.4 Mbp と 9.3 Mbp（図 2-19B）、メダカ染色体 12 の 18.2 M bp と染色体 9 の 32.4 Mbp（図 2-19C）、ミドリフグ染色体 4 の 0.9 Mbp と染色体 12 の 10.0 Mbp（図 2-17D）にそれぞれ位置しており、クロマグロにおいて特異的に並びや配置が異なる領域である可能性が示された。一方で、イトヨおよびミドリフグとの比較では、遺伝子の並びが複数箇所で異なる様子が見られた。

クロマグロの連鎖群 13 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-20）、シーバス、メダカとの比較において遺伝子の並びがかなり保存されていた（図 2-20A, C）。ただし、クロマグロ連鎖群 13 上の 8.1 cM に位置する 2 遺伝子は、シーバス連鎖群 19 の 7.6 Mbp（図 2-20A）、イトヨ染色体 14 の 1.3 Mbp（図 2-20B）、メダカ染色体 12 の 4.7 Mbp（図 2-20C）、ミドリフグ染色体 4 の 5.9 Mbp（図 2-20D）にそれぞれ位置しており、太平洋クロマグロにおいて特異的に配置が異なる領域である可能性が示唆された。また、クロマグロ連鎖群 13 上の 44.3 cM に位置する 2 遺伝子は、シーバス連鎖群 12 の 17.2 Mbp（図 2-20A）、イトヨ染色体 15 の 10.1 Mbp（図 2-20B）、メダカ染色体 22 の 4.9 Mbp（図 2-20C）、ミドリフグ染

色体 10 の 9.5 Mbp（図 2-20D）にそれぞれ位置しており、上記の遺伝子の場合と同様にクロマグロにおいて特異的に配置が異なる領域である可能性が示唆された。

クロマグロの連鎖群 14 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-21）、シーバス、メダカとの比較において遺伝子の並びがかなり保存されていた（図 2-21A, C）。ただし、クロマグロ連鎖群 14 上の 4.3 cM に位置する 3 遺伝子は、シーバス連鎖群 14 の 27.8 Mbp（図 2-20A）、イトヨ染色体 7 の 24.1 Mbp（図 2-20B）、メダカ染色体 14 の 28.8 Mbp（図 2-20C）、ミドリフグ染色体 7 の 10.8 Mbp（図 2-20D）にそれぞれ位置しており、メダカとの比較においては遺伝子の並びが異なっている領域であることが示された。また、クロマグロ連鎖群 14 上の 49.7 cM に位置する 7 遺伝子は、シーバス連鎖群 14 の 9.1 から 9.2 Mbp と連鎖群 UN の 16.9 Mbp, 57.1 Mbp（図 2-21A）、イトヨ染色体 7 の 14.9 から 15.0 Mbp（図 2-20B）、メダカ染色体 14 の 21.3 から 21.5 Mbp（図 2-20C）、ミドリフグ染色体 7 の 2.4 から 2.9 Mbp（図 2-20D）にそれぞれ位置しており、クロマグロにおいて特異的に配置が異なる領域である可能性が示唆された。一方で、イトヨおよびミドリフグとの比較では、遺伝子の並びが複数箇所で異なる様子が見られた。

クロマグロの連鎖群 15 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-22）、全比較において遺伝子の並びがかなり保存されていた（図 2-22A, B, C, D）。ただし、クロマグロ連鎖群 15 上の 8.7 cM に位置する 3 遺伝子は、シーバス連鎖群 UN の 87.3 Mbp（図 2-22A）、イトヨ染色体 6 の 15.7 Mbp（図 2-22B）、

メダカ染色体 15 の 5.7 Mbp（図 2-22C）、ミドリフグ染色体 17 の 9.4 Mbp（図 2-22D）にそれぞれ位置しており、クロマグロにおいて特異的に並びが異なる領域である可能性が示唆された。また、クロマグロ連鎖群 15 上の 53.0 cM に位置する 1 遺伝子は、シーバス連鎖群 11 の 23.2 Mbp（図 2-22A）、イトヨ染色体 6 の 4.0 Mbp（図 2-22B）、メダカ染色体 15 の 3.1 Mbp（図 2-22C）、ミドリフグ染色体 17 の 8.1 Mbp（図 2-22D）にそれぞれ位置しており、上記の遺伝子の場合と同様に、クロマグロにおいて特異的に並びが異なる領域である可能性が示唆された。さらに、マグロ連鎖群 15 上の 15.8 cM に位置する 1 遺伝子がメダカ染色体 1 の 0.5 Mbp に、マグロ連鎖群 15 上の 32.5 cM に位置する 1 遺伝子がミドリフグ染色体 2 の 2.6 Mbp にそれぞれ位置し、メダカ、ミドリフグそれぞれで特異的に配置の異なる遺伝子である可能性が示された。

クロマグロの連鎖群 16 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-23）、シーバス、イトヨとの比較において遺伝子の並びがかなり保存されていた（図 2-23A, B）。ただし、クロマグロ連鎖群 16 上の 0 と 5.4 cM に位置する 5 遺伝子は、シーバス連鎖群 16 の 12.1 から 12.2 Mbp と 20.3 から 20.4 Mbp（図 2-23A）、イトヨ染色体 20 の 2.7 から 2.9 Mbp と 9.3 Mbp（図 2-23B）、メダカ染色体 16 の 1.3 Mbp 、2.9Mbp、12.5 から 12.6 Mbp（図 2-23C）、ミドリフグ染色体 8 の 1.2 から 1.3 Mbp と 6.5 Mbp（図 2-23D）にそれぞれ位置しており、クロマグロにおいて特異的に並びが異なる領域である可能性が示唆された。また、クロマグ

ロ連鎖群 16 上の 44.3 cM に位置する 3 遺伝子は、シーバス連鎖群 16 の 7.3 から 7.4 Mbp（図 2-23A）、イトヨ染色体 20 の 11.3 Mbp（図 2-23B）、メダカ染色体 16 の 17.7 から 17.9 Mbp（図 2-23C）、ミドリフグ染色体 8 の 9.5 から 9.6 Mbp（図 2-23D）にそれぞれ位置しており、イトヨにおいて特異的に並びが変化している領域である可能性が示された。一方、メダカおよびミドリフグとの比較では、遺伝子の並びが複数箇所で異なる様子が見られた。

クロマグロの連鎖群 17 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-24）、シーバスとの比較において遺伝子の並びがかなり保存されていた（図 2-24A）。一方、イトヨ、メダカおよびミドリフグとの比較では、遺伝子の並びが複数箇所で異なる様子が見られた（図 2-24B, C, D）。

クロマグロの連鎖群 18 に配置された 3 つのオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-25）、全魚種いずれの比較においても遺伝子の並びが保存された様子が見られた。

クロマグロの連鎖群 19 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-26）、シーバス、メダカとの比較において遺伝子の並びがかなり保存されていた（図 2-26A, C）。ただし、クロマグロ連鎖群 19 上の 3.2 cM に位置する 3 遺伝子は、シーバス連鎖群 1B の 12.7 から 12.8 Mbp（図 2-26A）、イトヨ染色体 5 の 2.7 Mbp（図 2-26B）、メダカ染色体 19 の 13.7 から 13.8 Mbp（図 2-26C）、ミドリフグ染色体 2 の 0.4 Mbp（図 2-26D）にそれぞれ位置しており、クロマグロに

おいて特異的に並びが異なる領域である可能性が示唆された。一方で、イトヨ、ミドリフグとの比較では、クロマグロ連鎖群 19 上の 31.9 から 39.4 cM に位置する 17 遺伝子の並びがそれぞれの染色体で異なる様子が見られた（図 2-26B, D）。

クロマグロの連鎖群 20 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-27）、全魚種いずれの比較においても遺伝子の並びが保存された様子が見られた。

クロマグロの連鎖群 21 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-28）、シーバス、ミドリフグとの比較において遺伝子の並びがかなり保存されていた（図 2-28A, D）。ただし、クロマグロ連鎖群 21 上の 54.8 cM に位置する 1 遺伝子は、シーバス連鎖群 15 の 24.5 Mbp（図 2-28A）、イトヨ染色体 16 の 16.3 Mbp（図 2-28B）、メダカ染色体 21 の 1.0 Mbp（図 2-28C）、ミドリフグ染色体 2 の 19.8 Mbp（図 2-28D）にそれぞれ位置しており、クロマグロにおいて特異的に並びが異なる領域である可能性が示唆された。一方でイトヨ、メダカとの比較では、遺伝子の並びが複数箇所で異なる様子が見られた（図 2-28B, C）。

クロマグロの連鎖群 22 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-29）、シーバス、ミドリフグとの比較において遺伝子の並びがかなり保存されていた（図 2-29A, D）。一方でイトヨ、メダカとの比較では、遺伝子の並びが複数箇所で異なる様子が見られた（図 2-29B, C）。

クロマグロの連鎖群 23 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較

した結果（図 2-30）、シーバス、ミドリフグとの比較において遺伝子の並びがかなり保存されていた（図 2-30A, D）。ただし、クロマグロ連鎖群 23 上の 7.8 cM に位置する 4 遺伝子は、シーバス連鎖群 x の 4.2 から 5.0 Mbp（図 2-30A）、イトヨ染色体 4 の 25.0 から 25.5 Mbp（図 2-30B）、メダカ染色体 23 の 9.5 から 10.4 Mbp（図 2-30C）、ミドリフグ染色体 19 の 6.9 から 7.2 Mbp（図 2-30D）にそれぞれ位置しており、クロマグロにおいて特異的に並びが異なる領域である可能性が示唆された。一方で、イトヨ、メダカとの比較では、クロマグロ連鎖群 23 上の 11.1 から 14.3 cM に位置する 2 遺伝子の並びがそれぞれの染色体で異なる様子が見られた（図 2-30B, C）。

クロマグロの連鎖群 24 に配置されたオルソログ遺伝子を 4 魚種それぞれと比較した結果（図 2-31）、全魚種いずれの比較においても、遺伝子の並びが複数箇所で異なる様子が見られた（図 2-31A, B, C, D）。クロマグロ連鎖群 24 上の 16.3 cM に位置する 3 遺伝子は、シーバス連鎖群 12 の 20.7 から 20.8 Mbp（図 2-31A）、イトヨ染色体 15 の 1.2 から 1.3 Mbp（図 2-31B）、メダカ染色体 22 の 25.9 から 26.0 Mbp（図 2-31C）、ミドリフグ染色体 10 の 12.3 から 12.4 Mbp（図 2-31D）にそれぞれ位置しており、クロマグロにおいて特異的に配置が異なる領域である可能性が示唆された。また、クロマグロ連鎖群 24 上の 76.7 cM に位置する 2 遺伝子は、シーバス連鎖群 5 の 12.9 から 13.0 Mbp（図 2-31A）、イトヨ染色体 2 の 11.8 から 11.9 Mbp（図 2-31B）、メダカ染色体 3 の 20.7 Mbp（図 2-31C）、ミドリフグ染色体 5 の 5.1 Mbp

（図 2-31D）にそれぞれ位置しており、上記の遺伝子の場合と同様にクロマグロにおいて特異的に配置が異なる領域である可能性が示唆された。

次に、1,229 の 6 魚種オルソログ遺伝子のうち、トラフグを除く 5 魚種（太平洋クロマグロ、ヨーロッパシーバス、イトヨ、メダカ、ミドリフグ）間で同じ染色体または連鎖群上に位置するオルソログ遺伝子の抽出を行った。その結果、1,193 遺伝子が抽出された（表 2-10）。これらの 1,193 遺伝子について描画し、5 魚種間まとめた形での配置を調べた（図 2-32）。

| 連鎖群または染色体番号 | | | | | オルソログ数 |
|---|---|---|---|---|---|
| クロマグロ | ヨーロッパシーバス | イトヨ | メダカ | ミドリフグ | |
| 1 | 7 | 9 | 1 | 18 | 61 |
| 2 | 24 | 1 | 2 | 3 | 20 |
| 3 | 5 | 2 | 3 | 5 | 49 |
| 4 | 4 | 8 | 4 | 1 | 49 |
| 5 | 1A | 17 | 5 | 11 | 48 |
| 6 | 6 | 16 | 6 | 2 | 36 |
| 7 | 22-25 | 12 | 7 | 9 | 78 |
| 8 | 8 | 9 | 1 | 3 | 55 |
| 9 | 20 | 13 | 9 | 12 | 55 |
| 10 | 2 | 4 | 10 | 1 | 67 |
| 11 | 9 | 10 | 11 | 20 | 24 |
| 12 | 19 | 14 | 9 | 4 | 52 |
| 13 | 13 | 1 | 12 | 4 | 45 |
| 14 | 14 | 7 | 14 | 7 | 91 |
| 15 | 15 | 6 | 1 | 2 | 68 |
| 16 | 16 | 20 | 16 | 8 | 70 |
| 17 | 10 | 3 | 17 | 1 | 68 |
| 18 | 18 | 7 | 18 | 20 | 3 |
| 19 | 1B | 5 | 19 | 2 | 47 |
| 20 | 18-21 | 21 | 20 | 6 | 49 |
| 21 | 15 | 16 | 21 | 2 | 69 |
| 22 | 12 | 15 | 22 | 10 | 41 |
| 23 | x | 4 | 23 | 19 | 24 |
| 24 | 5 | 2 | 3 | 5 | 24 |
| | | | | | 1,193 |

表2-10　魚種別オルソログ遺伝子の分布

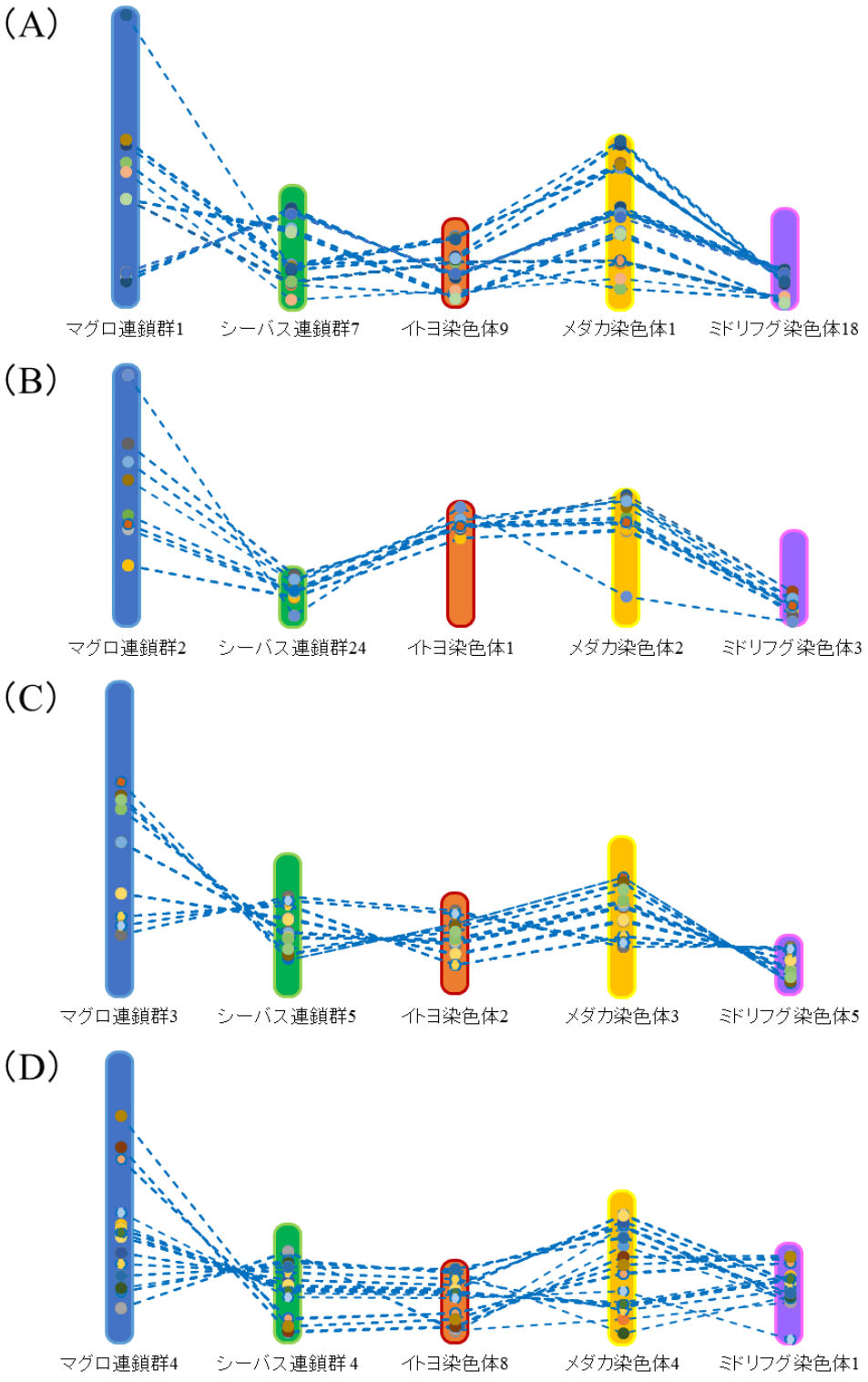



図2-32　5魚種間での染色体内部オルソログ分布比較

クロマグロ、ヨーロッパシーバス、イトヨ、メダカ、ミドリフグの5魚種で対応する染色体または連鎖群について、オルソログの分布を示した。5魚種に共通するオルソログ遺伝子をドットで表し、各魚種の染色体または連鎖群間を点線で結ぶことで描画した。(A)クロマグロ連鎖群1の比較 (B)クロマグロ連鎖群2の比較 (C)クロマグロ連鎖群3の比較(D)クロマグロ連鎖群4の比較

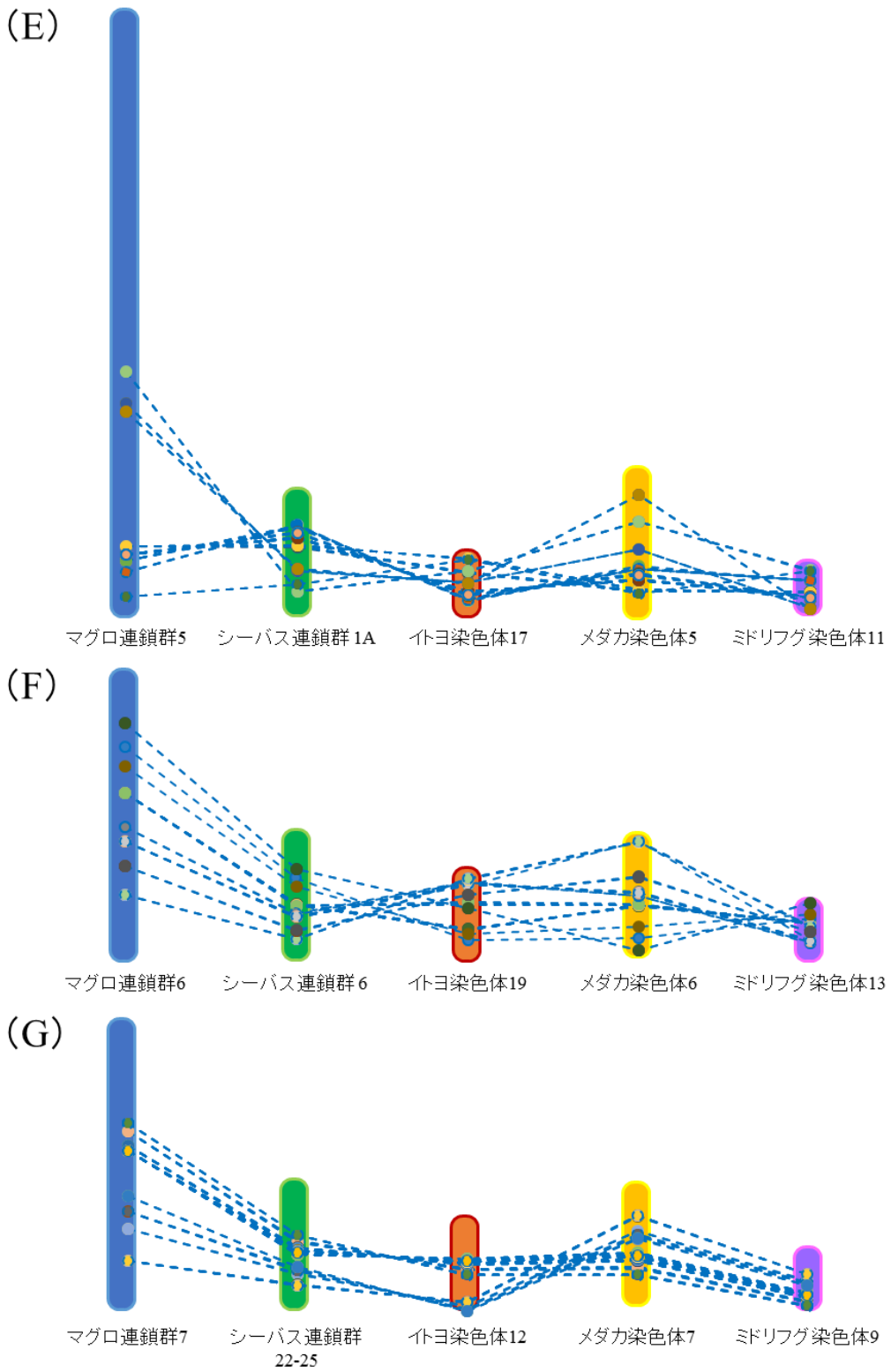



図2-32　5魚種間での染色体内部オルソログ分布比較（続き）
（E）クロマグロ連鎖群5の比較（F）クロマグロ連鎖群6の比較（G）クロマグロ連鎖群7の比較

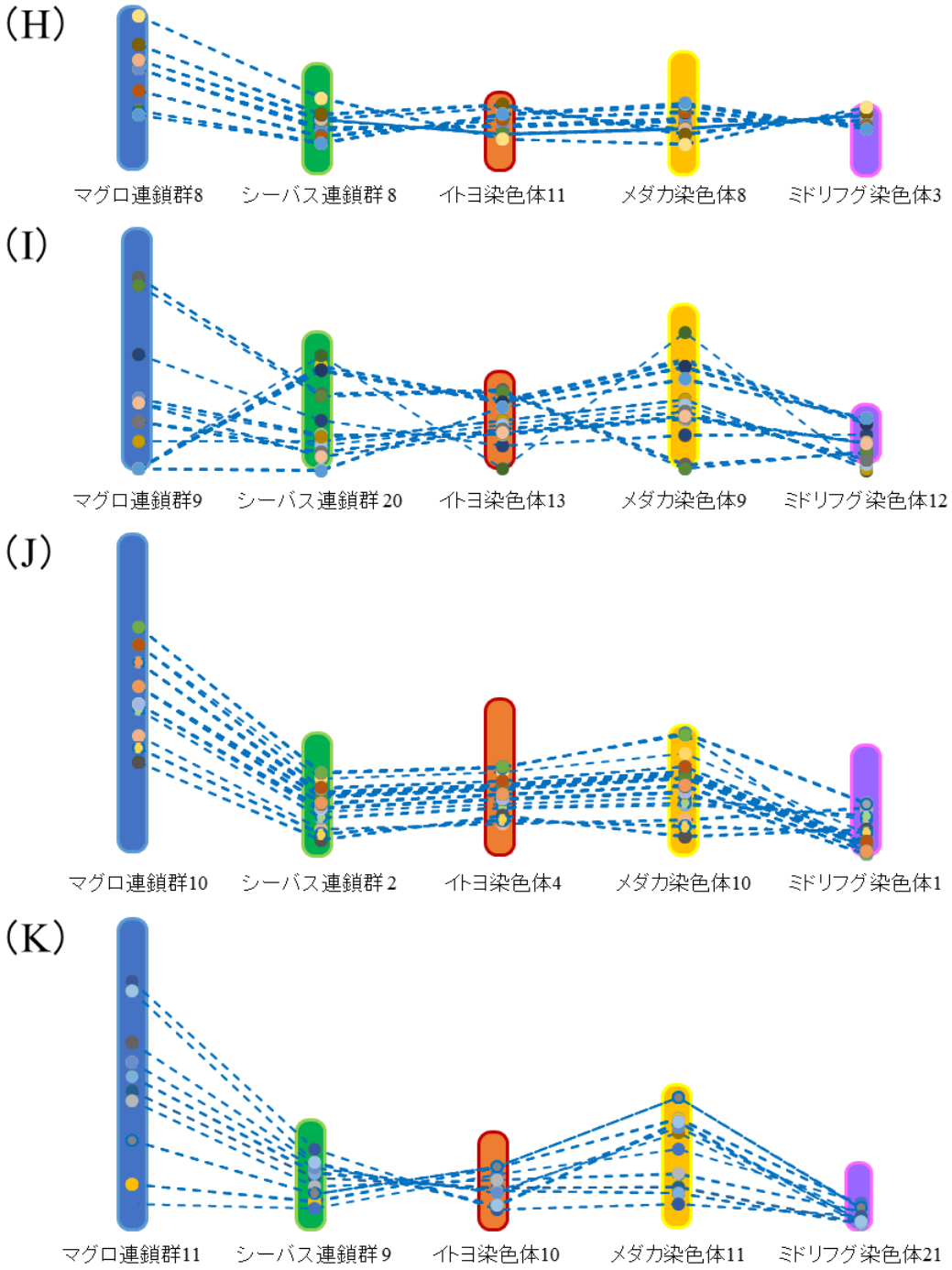



図2-32　5魚種間での染色体内部オルソログ分布比較（続き）
（H）クロマグロ連鎖群8の比較（I）クロマグロ連鎖群9の比較（J）クロマグロ連鎖群10の比較（K）クロマグロ連鎖群11の比較

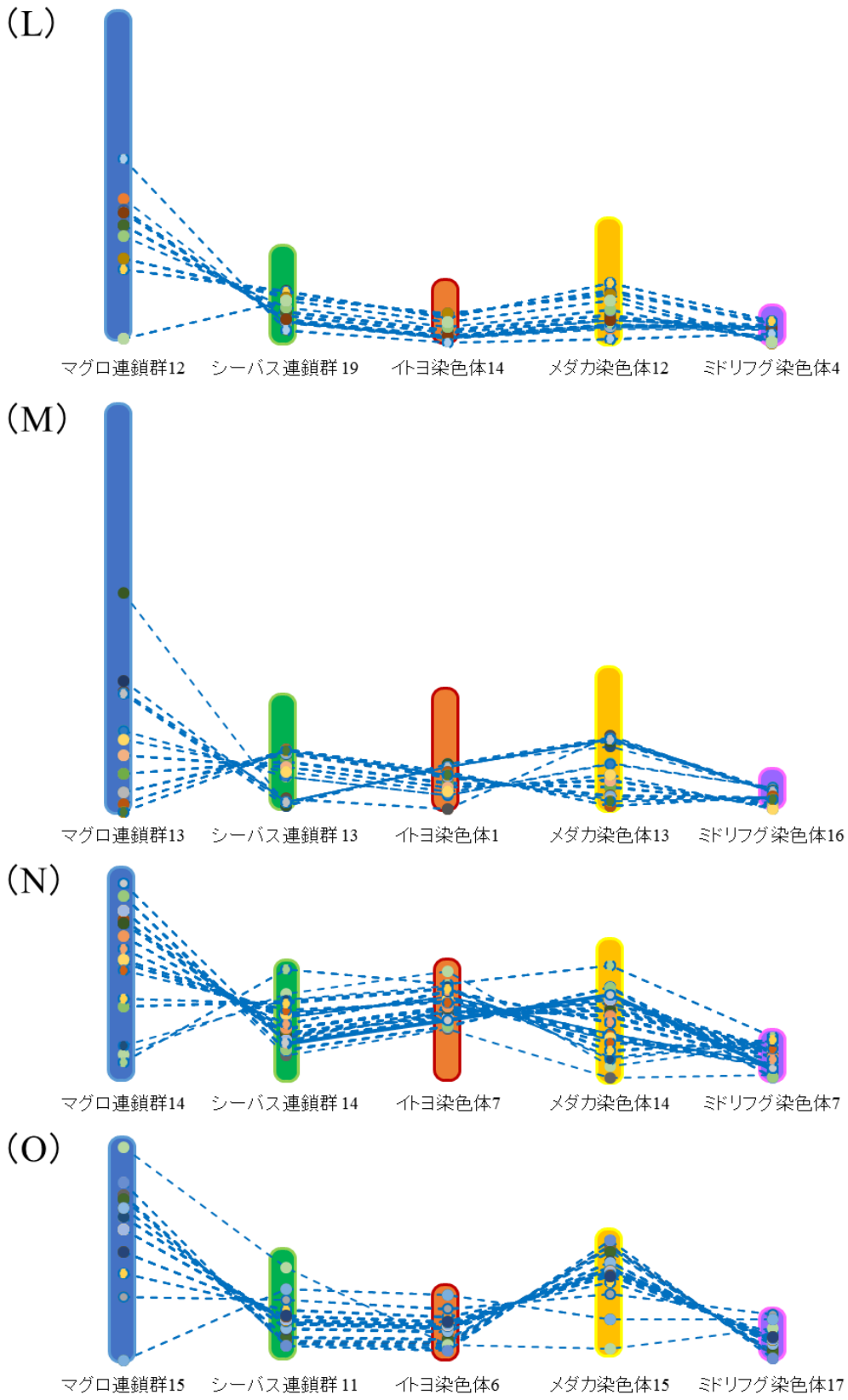



図2-32　5魚種間での染色体内部オルソログ分布比較（続き）
（L）クロマグロ連鎖群12の比較（M）クロマグロ連鎖群13の比較（N）クロマグロ連鎖群14の比較（O）クロマグロ連鎖群15の比較

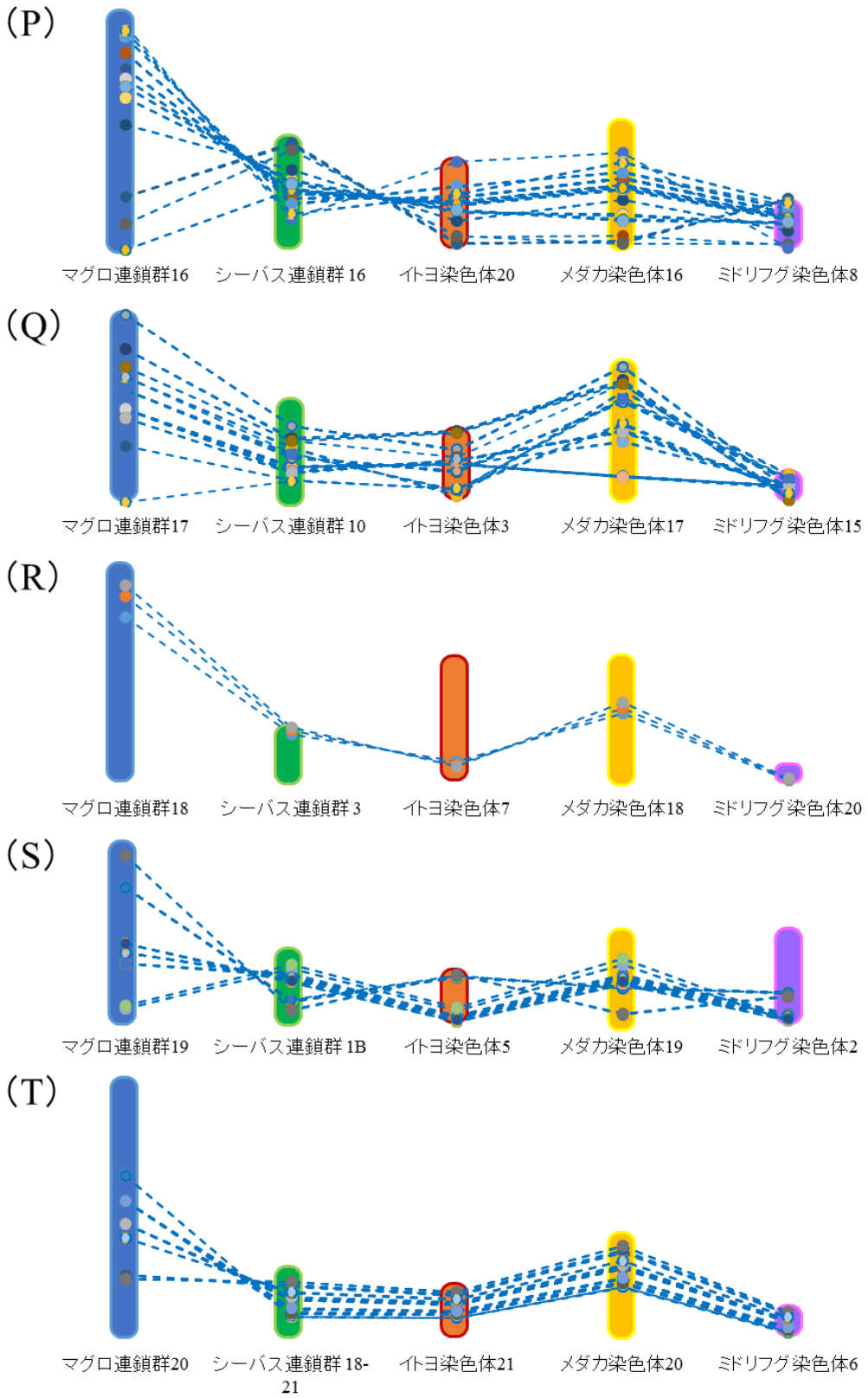



図2-32　5魚種間での染色体内部オルソログ分布比較（続き）
（P）クロマグロ連鎖群16の比較（Q）クロマグロ連鎖群17の比較（R）クロマグロ連鎖群18の比較（S）クロマグロ連鎖群19の比較（T）クロマグロ連鎖群20の比較

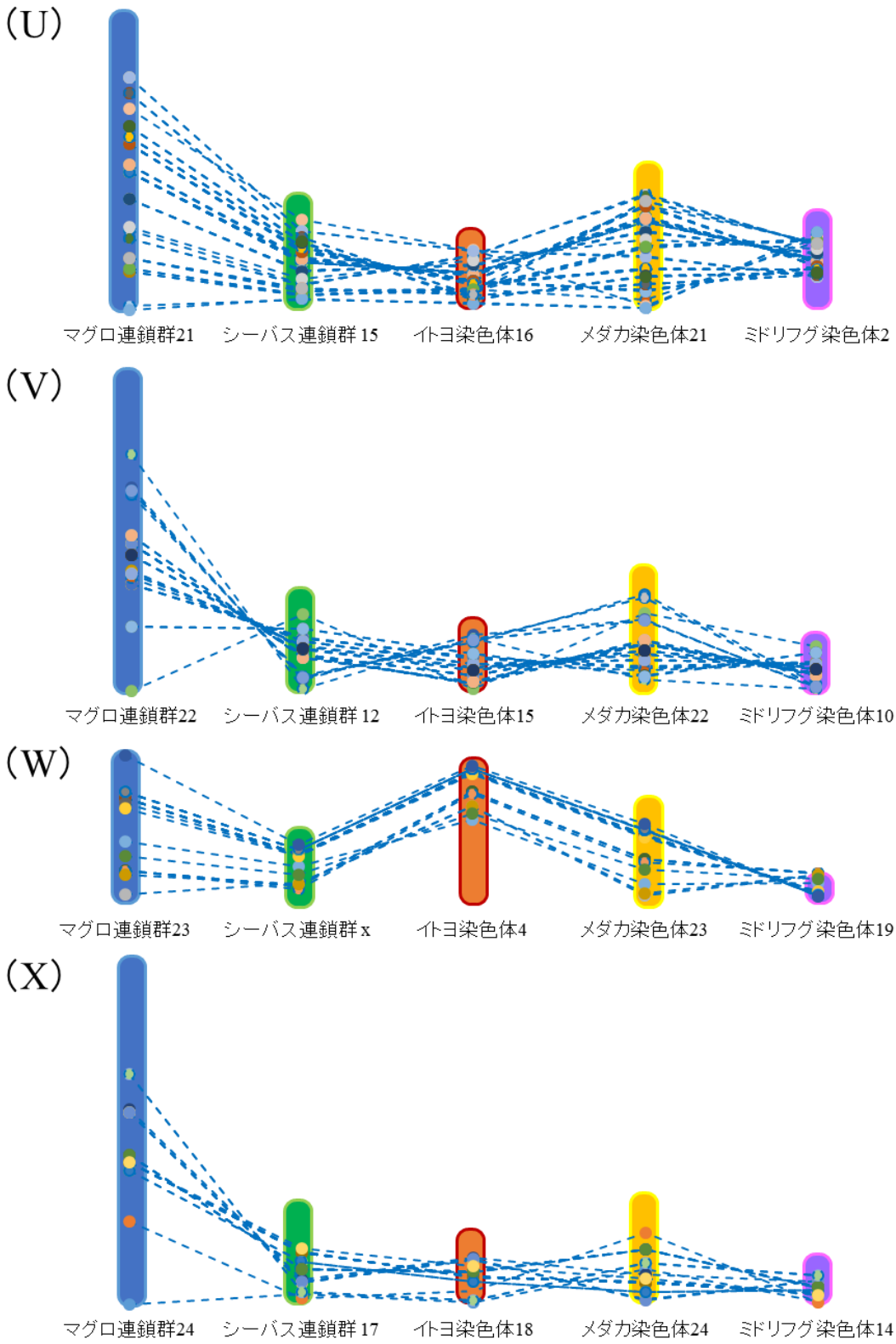



図2-32　5魚種間での染色体内部オルソログ分布比較（続き）
（U）クロマグロ連鎖群21の比較（V）クロマグロ連鎖群22の比較（W）クロマグロ連鎖群23の比較（X）クロマグロ連鎖群24の比較

メダカゲノムと、太平洋クロマグロの上位 2,000 本のスキャフォルドを、LastZ を用いて比較し、相同なスキャフォルドの抽出を行った。遺伝連鎖地図に配置された 470 本のスキャフォルドのうち、373 本のスキャフォルド（79.4 %）にて配列相同性を示した。相同性を示したスキャフォルド配列と、メダカの染色体配列により、2 魚種の染色体構造の比較を行った（図 2-33）。いくつかの染色体ペアにおいて、クロマグロとメダカ間の相同領域は逆位を生じていた（表 2-11）。1、2 箇所相同領域の順番が異なった連鎖群-染色体のペアが最も多く、13 対見られた（クロマグロ連鎖群 2-メダカ染色体 2, クロマグロ連鎖群 3-メダカ染色体 3, クロマグロ連鎖群 6-メダカ染色体 6 番, クロマグロ連鎖群 7-メダカ染色体 7 番, クロマグロ連鎖群 9-メダカ染色体 9 番, クロマグロ連鎖群 10-メダカ染色体 10 番, クロマグロ連鎖群 12-メダカ染色体 12 番, クロマグロ連鎖群 13-メダカ染色体 13 番, クロマグロ連鎖群 15-メダカ染色体 15 番, クロマグロ連鎖群 17-メダカ染色体 17 番, クロマグロ連鎖群 18-メダカ染色体 18 番, クロマグロ連鎖群 19-メダカ染色体 19 番, クロマグロ連鎖群 23-メダカ染色体 23 番.）。また、マーカーがクラスターになっている場所はあるものの、ほぼ完全に順番が同じ連鎖群-染色体対は 2 ペア（クロマグロ連鎖群 8-メダカ染色体 8 番, クロマグロ連鎖群 20-メダカ染色体 20 番.）、3 箇所以上で並びの異なったものは 9 ペア（クロマグロ連鎖群 1-メダカ染色体 1 番, クロマグロ連鎖群 4-メダカ染色体 4 番, クロマグロ連鎖群 5-メダカ染色体 5 番, クロマグロ連鎖群 11-メダカ染色体 11 番, クロマグロ連鎖群 14-メダカ染色体 14 番, クロマグロ

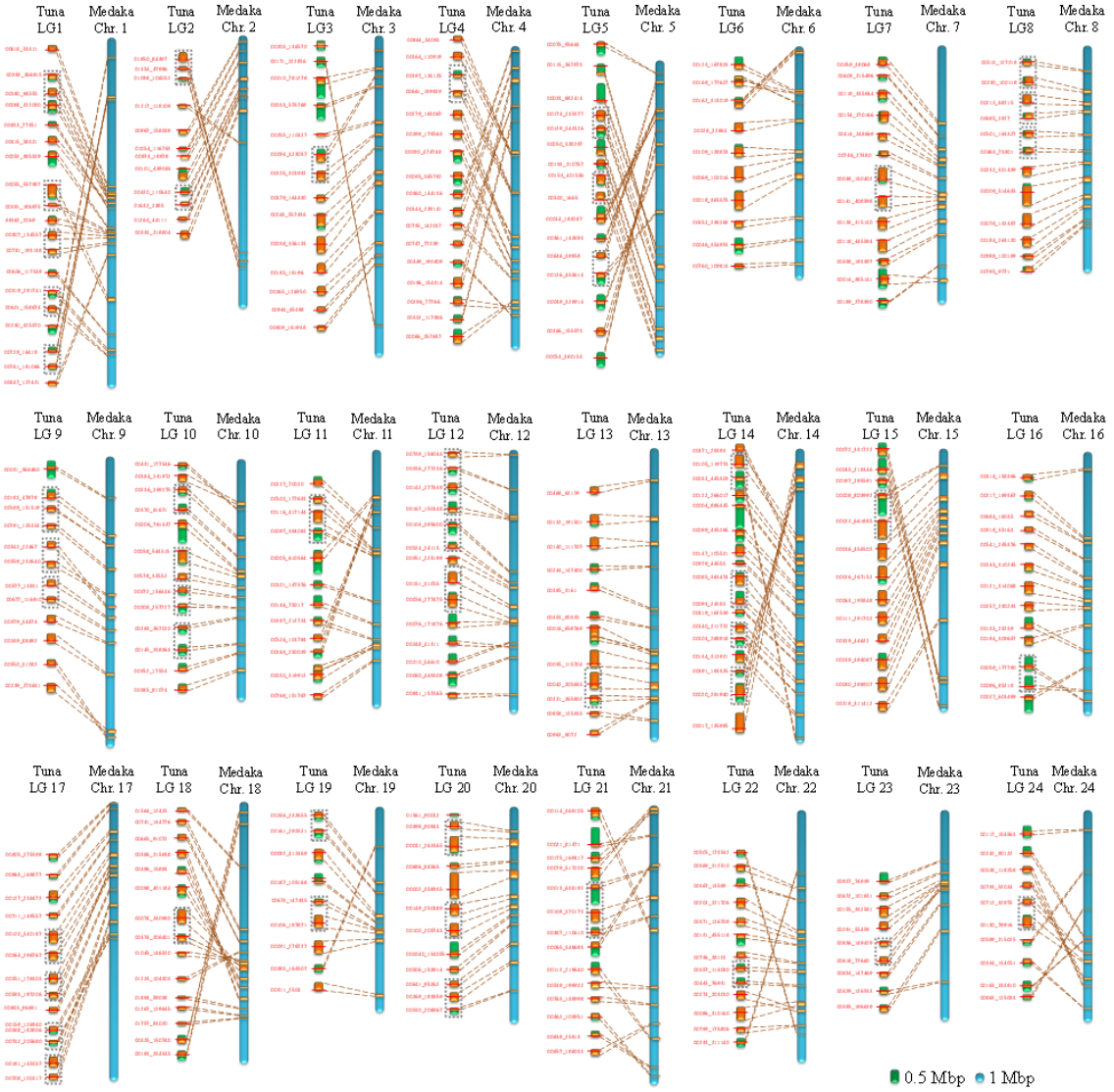



図2-33　太平洋クロマグロの全連鎖群とメダカの全染色体間の染色体構造比較　赤色の数字はMSマーカーの名称を、オレンジ色の四角は太平洋クロマグロとメダカ間の相同領域を表す。クラスターとなりマーカー順序が不明な箇所は、ドットの線で四角を囲った。.

| クロマグロ連鎖群 | メダカ染色体 | 並びの異なる箇所の数（点線の四角内は含めない） |
|---|---|---|
| 1 | 1 | 4 |
| 2 | 2 | 2 |
| 3 | 3 | 2 |
| 4 | 4 | 5 |
| 5 | 5 | 3 |
| 6 | 6 | 2 |
| 7 | 7 | 1 |
| 8 | 8 | 0 |
| 9 | 9 | 1 |
| 10 | 10 | 1 |
| 11 | 11 | 3 |
| 12 | 12 | 1 |
| 13 | 13 | 1 |
| 14 | 14 | 3 |
| 15 | 15 | 2 |
| 16 | 16 | 3 |
| 17 | 17 | 1 |
| 18 | 18 | 2 |
| 19 | 19 | 1 |
| 20 | 20 | 0 |
| 21 | 21 | 7 |
| 22 | 22 | 3 |
| 23 | 23 | 1 |
| 24 | 24 | 3 |

表2-11　太平洋クロマグロ連鎖群-メダカ染色体間のゲノム相同領域の配置

連鎖群 16-メダカ染色体 16 番，クロマグロ連鎖群 22-メダカ染色体 22 番，クロマグロ連鎖群 24-メダカ染色体 24 番.）存在した。このように 2 魚種間でゲノム配列の保存領域の順番が異なる箇所は、2 魚種が共通の祖先から分岐した後に、どちらかの魚種で染色体内の転座または逆位が生じることによって起こり得る。このことから、6 魚種共通オルソログ遺伝子の配置比較結果と同様に、ゲノム配列の比較においても染色体内部で保存領域が入れ替わっている様子が観察された。

## 2-4 考察

本研究において、MS マーカー470 座位、24 連鎖群からなる連鎖地図と、それにより統合されたゲノム地図を構築した。本研究によって構築された太平洋クロマグロのゲノム地図は、完全な物理地図の構築や、硬骨魚類における比較ゲノム解析、そして太平洋クロマグロの優良遺伝形質に関する遺伝学的解析を行う上で有用なリソースとなり得るものである。

太平洋クロマグロの核型組成は、2 本のメタセントリック染色体、3 本のサブメタセントリック染色体、2 本のサブテロセントリック染色体、17 本のアクロセントリック染色体から構成されることが報告されている[19]。雄雌連鎖地図の各連鎖群数は、顕微鏡観察に基づいた染色体数に一致するものとなった。今後、連鎖地図に統合されたスキャフォルドを蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法によって検出することにより、他魚種における報告と同様に[38,64]、連鎖群と染色体の対応関係を明らかにすることが可能である。また、テロメア領域やセントロメア領域を含むスキャフォルドを連鎖地図上にマッピングすることも、連鎖群と染色体の対応関係を明らかにする上で望ましい。

雄雌連鎖地図の全ゲノムの被覆度は、共に 86.5 %と算出された。このことから、本連鎖地図により太平洋クロマグロの染色体は、全ゲノム領域を網羅的にカバーするものと考えられる。しかしながら連鎖群の平均長（雄: 41.4 cM、雌: 55.5 cM）は、近縁の硬骨魚類の連鎖地図[37,65, 67, 68]と比較していくらか短いものとなっており、染色体全体領域におよぶ遺伝マーカーの配置や、テロメア領域やセントロメア領域を含むスキャフォルドの欠如を示唆するものである。

連鎖地図の総遺伝距離は、雄雌でほぼ同じとなり、他の魚種とそれほど相違ないものとなっている[38,66,69,70]。しかしながら、雌地図は雄地図と比べていくらか長いものとなった（雌と雄の比, 1.4:1）。一方で、雄雌間で共通しているマーカー間の分布は、ほぼ同じであった。

性決定遺伝子座に連鎖する *MD6* 配列は、雌連鎖地図の連鎖群 10 の末端領域に配置された。マッピング家系は 18 日齢の稚魚であったことから、表現型の上での性を識別することは出来なかった。それゆえに、我々は遺伝的な性と表現型の性との間で連鎖解析を行うことは困難であった。将来的には、表現型の性を識別するマッピング家系を用いることで、太平洋クロマグロの性決定遺伝子座に関わる詳細情報を得ることが出来るものと考える。

他の硬骨魚類における性決定遺伝子[49] は、本研究で構築したゲノム地図の *MD6* が配置された連鎖群 10 には見つからなかった。このため、既存の性決定遺伝子座と太平洋クロマグロの性との関係性について調べるには、これらの遺伝子を連鎖地図に位置づけることも有効かもしれない。

5 魚種間の染色体構造比較からは、太平洋クロマグロの染色体はヨーロッパシーバスおよびメダカの染色体構成に非常に近いことが明らかになった。また染色体内部のゲノム配列相同領域の比較により、複数回の染色体内部の再編成が起こっている可能性が示された。一方で太平洋クロマグロのゲノム解読の報告では、5 魚種（太平洋クロマグロ、メダカ、イトヨ、トラフグ、ミドリフグ）間のオルソログ遺伝子の網羅的比較解析により、太平洋クロマグロは系統的にメダカよりもイトヨに近いことが報告されている[34]。これらの知見を合わせると、太平洋クロマグロは系統的にはメダカよりもイトヨに近いが、染色体構成においては逆の関係になると推定

される。メダカゲノムは MTZ 祖先（メダカ、ミドリフグ、ゼブラフィッシュの共通祖先）の保存されたゲノム構造を有し、3 億年以上の間大規模な染色体再編成を経ずに現在に至るとされている。本研究の解析結果において、2 魚種の染色体構造の間で高い類似性を示すことから、太平洋クロマグロの染色体構造においてもまた MTZ 祖先の染色体構造が保存されている可能性がある。ヨーロッパシーバスも 24 本の染色体対を有し、ゲノム解読によりメダカに最も近い染色体構成であることが報告されている[33]。したがって、この太平洋クロマグロ-メダカ-ヨーロッパシーバスの 3 魚種の染色体構成は、かなり似通ったものであり、MTZ 祖先の染色体構成を染色体融合や分裂を経ることなく受け継いでいる可能性がある。

太平洋クロマグロと同様にスズキ目に属するブリの染色体構造についても、MTZ 祖先と高い類似性を示すことが報告されている[63]。本章ではブリの連鎖地図との比較解析も行ったが、クロマグロ連鎖地図と共通して配置されたオルソログ数が 122 と非常に少なかったため、十分な結論が得られなかった。今後、両魚種の連鎖地図の遺伝マーカー数が増加し、共通して配置されるオルソログ数も増えることにより、より明確な結果が得られるものと考えられる。

イトヨ[51]、トラフグ、ミドリフグ[38]においては、24 本の染色体を有すると推定されている MTZ 祖先から分岐した後に、2 回または 3 回の染色体融合が起こったと考えられている。イトヨの 1 番染色体は、太平洋クロマグロの LG2 と LG13 に対応する様子が見られた。同様に、イトヨの 4 番染色体は、太平洋クロマグロの連鎖群 10 と連鎖群 23 に対応する。これらの 1 対 2 の対応関係は、2 魚種が分岐した後に染色体間の再編成が起こった痕跡であるかもしれない。この場合、共通祖先から分岐した後に、イトヨにおいて 2 本の染色体の融合が起こった可能性がある。

メダカと太平洋クロマグロは Percomorpha において進化上に遠縁であり、形態的そして生理学的にも異なっているが、染色体構成の上では類似していた。この事実は驚きであるとともに、新たな発見であった。本結果は、Percomorpha における他魚種においても同様の染色体構成を有する可能性を示唆する。また、染色体構成は塩基配列やアミノ酸配列レベルでの系統的な距離を、常に反映するとは限らないことも示唆された。

4 魚種（ヨーロッパシーバス、イトヨ、メダカ、ミドリフグ）との染色体内のオルソログ分布の比較では、多くの連鎖群で遺伝子の並びが類似している領域が見られた。遺伝子の並びが似ている魚種は連鎖群ごとに異なっており、一貫した結果は得られなかったが、ヨーロッパシーバスと類似していることが多い結果となった。例外的に、連鎖群 1,　9, 24 はヨーロッパシーバスの対応する連鎖群とは遺伝子の並びが異なっており、特に連鎖群 1 と 24 はいずれの比較魚種とも異なる遺伝子の並びであった。したがって、これらの連鎖群は比較魚種との共通祖先から分岐後に、染色体内の再編成（逆位や転座など）が生じたことによって、現在の太平洋クロマグロに至るまでに遺伝子の並びが変化したものと想定される。また遺伝子の並びが他魚種と似ている連鎖群についても、部分的な領域は太平洋クロマグロで特異的に異なっている場合が見られた。。これらの領域は、太平洋クロマグロで独自に進化した領域の候補であると考えらる。オルソログ遺伝子の比較だけでなく、より広範なゲノムの相同領域の比較においても、クロマグロとメダカ間でいくつかの染色体対で逆向きとなった様子が見られた。染色体逆位は、相同性配列間の異所的組み換えと非相同末端結合（non-homologous end-joining）によって生じ得るとされる[71]染色体の逆位が起こると、逆位が生じた領域の末端部分（切断点、またはブレーク

ポイントと呼ばれる）にある遺伝子のエキソンや調節領域が分断されることがあり、遺伝子構造や発現に影響を及ぼす場合があることが知られている。染色体逆位以外にも、転座や融合によって組み換えが生じた場所の遺伝子は、場合によって分裂または融合が起こるとされている。このような現象は、新規の遺伝子誕生のメカニズムであると考えられている[71]。このことから、太平洋クロマグロとヨーロッパシーバスやメダカの遺伝子やゲノム配列の比較により示唆された染色体内再編成の痕跡がある領域は、その末端部分にコードされている遺伝子の構造や発現調節機構が、太平洋クロマグロ独自である可能性がある。しかしながら、このようなブレークポイントにある遺伝子を同定する作業は非常に困難であり、より完全な物理地図情報が必要とされ、遺伝マーカーをさらに高密度に配置連鎖地図やゲノム解読情報のアップデート等が望まれる。本章の解析で遺伝マーカーが配置されなかったゲノム領域は、魚種間の染色体構造の比較解析に用いられなかったために、染色体内再編成の取りこぼしの可能性が残る。

本章で構築された太平洋クロマグロの概要ゲノム配列を用いて雄雌連鎖地図は、MS マーカー間の平均遺伝距離が雄地図で 2.7 cM、雌地図で 3.7 cM であった。このマーカー密度は初期の QTL 解析を行う上では十分である[72]。したがって本連鎖地図は、本種における優良遺伝形質に関する QTL 解析に有用なリソースとなり得る。本研究で構築された多数の DNA マーカーを配置した連鎖地図は、量的形質遺伝子座（QTL）に連鎖する遺伝マーカーの効率的な探索に利用できるため、太平洋クロマグロの仔稚魚における耐病性、高成長、性決定などの遺伝的優良形質に関するマーカーアシスト選抜が将来的には実施できると期待される。特定の形質に関する QTL 解析[13] は、スズキ目の太平洋クロマグロに近縁なアジ科ブリ属の 2 魚種、

ブリ（*Seriola quinqueradiata*）とヒラマサ（*Seriola lalandi*） [65,73]、カレイ科の 2 魚種、ヒラメ（*Paralichthys olivaceus*）とオヒョウ（*Hippoglossus hippoglossus*） [74–76]等で行われている。また本連鎖地図により統合された配列情報は、QTL 解析により検出され得る候補領域上の責任遺伝子の同定の手助けとなる。このように、太平洋クロマグロの優良形質に関する遺伝的基礎を解明するのに用いることが出来る。

# 第 3 章　クロマグロ MS 連鎖地図を用いた成長に関する QTL 解析

## 3-1 緒言

太平洋クロマグロの全長は卵から孵化した時点で約 3 mm ほどであり、20 日齢前後で全長約 1 cm に達する。この全長 10 mm 以下の仔魚期における成長は緩やかであり、1 日あたりの全長増加する量（成長速度）は 0.3 から 0.5 mm 程度とされている[77,78]。その後は仔魚期から稚魚期にかけて、より成長が良好になり、30 日齢の時点で全長 4 cm ほどまで成長する。100 日齢では全長 30 cm（体重 300 g）、150 日齢では全長 40 cm（体重 900 g）に及ぶと Sawada らにより報告されている[8]。特に太平洋クロマグロの場合、他の魚と比べて成長が早く、また巨大になることが知られている。天然魚と養殖魚では成長の度合いが異なり、養殖魚の方が早く生育するとされる。奄美大島などの水温の比較的高い養殖場で飼育され、活発な摂餌を受けることが、その一要因であると考えられている。奄美大島で養成された太平洋クロマグロは、4 歳魚で 173.8 cm、7 歳魚で 240.9 cm まで成長すると報告されている。

第 1 章で述べたように、太平洋クロマグロ養殖における種苗の遺伝的改良の候補となる優良遺伝形質は、さまざまなものが考えられるが、その 1 つとして高成長が挙げられる。現在の種苗よりも、より高成長する種苗を作出することが出来れば、出荷サイズに至るまでの時間を短縮できる上、餌などの飼育コストや労力の軽減に繋がる。また、生残率に関しても、減耗の激しい仔魚期（日齢）において、成長の

早い魚は成長の遅い魚よりも、生残率が高いと報告されている[77,79]。Tanaka ら[77]は仔魚期における屈曲前と屈曲後のクロマグロの標準長測定と耳石による孵化後の日齢を調べ、同じ日齢での標準長を逆算し比較すると、両群では有意に差があることを示した。陸上養殖では、10 日齢の脊索屈曲期以降から沖だし前の 30 日にかけて、共喰いが活発になる。太平洋クロマグロは他のサバ科に属する魚と同様に、成長段階の初期から非常に魚食性が強く、仔魚期において共喰いが起こり得る。太平洋クロマグロの養殖場で頻繁に観察され、数日間で死亡率が 50%にも及ぶとされる[7]。この共喰いは、孵化後 10 日目までに起こる浮上死や沈降死、30 日齢以降の衝突死と並んで、陸上水槽を用いた初期飼育における 3 大減耗要因となっている[7]。共喰いが生じるのは餌不足時の飢餓状態に限られるが[8]、餌が十分な状況下においても、個体間で成長差が生じる際に顕著になるとされている。仮に 26 日齢の同じ水槽から採取したクロマグロ種苗にもおいても、全長で 2 倍以上、乾燥重量で 10 倍以上の成長差が生じ得ることが報告されている。このように成長度合いのばらつきにより成長差が生じると、大きい個体が小さい個体を攻撃することにより、共喰いが生じ得る。餌の種類は成長差の一要因であり、仔魚期の主な餌であるシオミズツボワムシやアルテミア幼生（プランクトン類）よりも、孵化仔魚に切り替えた方が良好に成長することが報告されている[80]。他の要因として、遺伝的な差異によっても、個体間の成長差が生じると考えられる。一般的に魚の成長には、飼育温度や餌の取る機会など環境要因に加えて、遺伝要因も寄与する。体重、全長や標

準体長などのような成長関連形質は、比較的影響の小さないくつかの遺伝子によって影響を受ける量的形質とされている[81]。成長に関わる遺伝子座と連鎖する遺伝マーカーを用いて、人工種苗集団内の成長に関わる遺伝的要因を均一化することで、大小差の低減に繋がり、共喰いによる減少を低減できる可能性が期待される。

成長に関与する遺伝子の例として、インスリン様成長因子（Insulin-like Growth Factor, IGF）は脊椎動物に特異的なタンパク質で、成長や分化、生殖などを制御することが知られている。イヌでは、IGF-1 のイントロン中の一塩基多型が体サイズに大きな影響があることが示されている[82]。また、アジアシーバスにおいては、成長に相関のある遺伝子多型としてパルブアルブミン（PVALB1）や IFABP-a 遺伝子が見つかっている[83,84]。GHR2 などの成長ホルモン受容体なども、ティラピアを含むいくつかの魚種において成長との相関が示されている[85]。しかしながら、クロマグロにおいては上述したような成長に関する遺伝学的解析は行われておらず、原因遺伝子もまた見つかっていない。

成長等の量的形質に関わる遺伝子座（Quantitative trait loci: QTL）の探索は、測定された形質の情報と、染色体に多数の遺伝マーカーを配置した連鎖地図情報によって行える[5]。クロマグロにおいても、本研究でゲノム配列情報を用いて多数のマイクロサテライト（MS）マーカーを配置した雌雄連鎖地図が構築されていることから、QTL 解析に利用可能である。魚類で成長に関与する QTL 解析や関連解析は、大西洋サーモン[86]、北極イワナ[87]、ターボット[88]、ゴウシュウマダイ[89]、ヨ

ーロッパシーバス[90]、アジアンシーバス[84]などをはじめとした多くの魚種において行われており、有効な遺伝マーカーが探索されている。

今後は、クロマグロ MS 連鎖地図情報を用いて優良形質に関わる遺伝子座近傍の遺伝マーカーを開発することで、親魚選抜に利用することが期待される。その優良形質の一つとして、上述した初期成長段階における高成長が挙げられる。そこで本研究では、クロマグロ連鎖地図作成に用いられた F1 仔魚の標準長を形質として用い、クロマグロ仔魚の成長に関わる QTL 解析を行った。

## 3-2 材料と方法

### 解析試料

親魚と稚魚の飼育は水産総合研究センター 西海区水産研究所 奄美庁舎にて行われた。稚魚は孵化後 18 日経過した時点で 500 個体を取り上げた。形質データ取得後、ゲノム DNA 抽出まで 100 %エタノール中にて保存した。QTL 解析には、第 2 章で親子鑑定により同胞関係にあることを確認し、クロマグロ MS 連鎖地図の作成に用いた仔魚 93 個体と P6_156_M（雄親）、P6_211_F（雌親）を用いた。検出された QTL 領域の検証には、MS 連鎖地図作成に用いた稚魚と同じ雌親（P6_211_F）で、異なる雄親（P6_317_M）に由来する半同胞の稚魚 138 個体を用いた。

### 形質の測定と統計

取り上げた仔魚の全長、標準長（mm）を実体顕微鏡にて測定した。全長、標準長の分布について、統計ソフト R を用い Shapiro-Wilk の正規性検定[91]を行った。正規性検定は、第 1 章の親子鑑定により家系組成が明らかになった 452 個体に対して、家系ごとに行った（個体数の少ない家系 No. 7 と No. 8 を除いた 449 個体）。家系別の全長、標準長の差の検定には、統計ソフト R を用いた。等分散の検定には bartlett の検定を、ノンパラメトリック法の多群検定であるクラスカル・ウォリス検定（Kruskal-Wallis test）により行った。多重比較は、ウィルコクソンの符号順位和検定により行い、p 値をボンフェローニ法により補正した。

QTL 解析

QTL 解析には、第 2 章でのクロマグロ MS 連鎖地図の作成に用いられた 470 座位の MS マーカーのマーカー型を用いた[92]。マーカー型の判定には GENE MAPPER version 4.0（Thermo Fisher Scientific）を、連鎖解析は MapDisto software[59]を用いて行った。各個体のジェノタイプを、雄親・雌親由来アレルに分け、別々に解析した。連鎖解析によって構築された雄雌連鎖地図について、Kosambi 関数による遺伝距離（cM）、各個体の全長データ（mm）を R-QTL[93]に入力し、Composite interval mapping 法[94]によって QTL 解析を行った。Cross type を”bc”（バッククロス）としてデータの読み込みを行った。Permutation test を 1,000 回行うことにより、ゲノムワイドで有意水準 5%と 1%の LOD スコア値を算出した。標準長データ（mm）に関しても、同様に解析した。クロモゾームワイドの有意水準に関しては、Ooijen らの提唱した数式により算出した[95]。また、雄雌に共通してマッピングされている MS マーカーに関しては、両親由来のアレルの組み合わせ（4 通り）による QTL 効果を検証するため、MergeMap[96]を用いて雄雌連鎖地図の融合を行った。算出された遺伝距離（cM）を元に、R-QTL に Cross type を”4-way”としてデータの読み込み、Composite interval mapping 法によって QTL 解析を行った。Permutation test を 1,000 回行うことにより、ゲノムワイドで有意水準 5%と 1%の LOD スコア値を算出した。

検出された QTL の連鎖群上における 95%信頼区間は、R-QTL を用い、1.5-LOD support interval[97]を算出することにより求めた。

成長に関与する遺伝子の探索

クロマグロ概要ゲノム解読情報[34]を参照し、雌親由来連鎖群 10 の QTL 領域近傍に配置されている 5 座位の MS マーカー（表 3-1）が由来するスキャフォルドにコードされた遺伝子情報について調べた。Gene Ontology 解析には、Blast2GO[98]を用いた。

| Scaffold ID | MS marker ID | Forward | Reverse | Linkage group | Genetic distance (cM) in female linkage group 10 |
|---|---|---|---|---|---|
| Ba00284 | 00284_267020 | gatttacataaaaagcccgcag | gcctctgtttaccaaccaagtc | 10 | 6.5 |
| Ba00372 | 00372_156446 | acccatacatgtgctgtgtctt | ccgtgtttcttttatctctggg | 10 | 7.5 |
| Ba00208 | 00208_257727 | gccaaagtttcactgggtctac | ccctgtctttctctctggctaa | 10 | 7.5 |
| Ba00578 | 00578_32552 | gtgtgcattgccattgtaagat | aaatagtcgcaggtggatcaat | 10 | 10.8 |
| Ba00058 | 00058_544515 | gcaagagcaggtagtgtttcaa | gcatatgctcagaagagagtgc | 10 | 10.8 |

表 3-1　QTL 領域周辺の MS マーカー情報

## 3-3 結果

### 形質の分布

クロマグロ仔魚 500 個体の全長は、最小で 6.1 mm、最大で 12.8 mm であった（表 3-2）。平均は 9.3 mm、標準誤差は 0.1 mm、標準偏差は 1.3 mm となった。ヒストグラムの分布は（図 3-1A）、正規分布に近い形状となった。Shapiro-Wilk の正規性検定の結果、p-value=0.07 となった。有意水準 5 %で帰無仮説は棄却されなかったため、統計的にも正規分布に従うと支持された。家系別にみると、平均値が最も高い家系 No. 2 で 10.1 mm、最も低い家系 No. 1 で 8.1 mm であった。家系別（個体数の少ない家系 No. 7 と No. 8 を除く）にも Shapiro-Wilk の正規性検定を行ったところ、p-value は家系 No. 1 で 0.82、家系 No. 2 で 0.34、家系 No. 3 で 0.44、家系 No. 4 で 0.91、家系 No. 5 で 0.10、家系 No. l6 で 0.99 となった。したがって、いずれの家系においても有意水準 5 %で帰無仮説は棄却されず、正規分布に従うと支持された。また等分散の検定を行った結果、1%の有意水準で棄却され（p-value=0.007）、各群の分散は等しくないことが示唆された。6 家系の間でクラスカル・ウォリスによる多群検定を行ったところ、0.1%の有意水準で棄却され（p-value = 1.2e-11）、いずれかの群間で全長に有意差があることが示された。さらにウィルコクソンの符号順位和検定により多重比較を行うことで、特定の家系間で有意差が見られることが分かった（図 3-2A, 表 3-4）。

| 統計量 | 家系 | | | | | | | | 全個体 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 | No. 6 | No. 7 | No. 8 | |
| 個体数 | 23 | 27 | 138 | 43 | 193 | 25 | 2 | 1 | 452 |
| 最小(mm) | 6.1 | 7.7 | 6.9 | 6.6 | 6.2 | 6.4 | 8.9 | 9.3 | 6.1 |
| 最大(mm) | 9.6 | 11.9 | 12.6 | 11.9 | 12.8 | 10.1 | 9.8 | 9.3 | 12.8 |
| 平均(mm) | 8.1 | 10.1 | 9.6 | 9.3 | 9.3 | 8.3 | 9.4 | 9.3 | 9.3 |
| 標準誤差(mm) | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.0 | 0.1 |
| 標準偏差(mm) | 0.8 | 1.2 | 1.1 | 1.2 | 1.4 | 0.9 | 0.6 | - | 1.3 |
| 分散 | 0.7 | 1.3 | 1.2 | 1.4 | 1.8 | 0.8 | 0.4 | - | 1.7 |

表3-2　クロマグロ18日齢仔魚452個体の統計量(全長)

| 統計量 | 家系 | | | | | | | | 全個体 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | No. 1 | No. 2 | No. 3 | No. 4 | No. 5 | No. 6 | No. 7 | No. 8 | |
| 個体数 | 23 | 27 | 138 | 43 | 193 | 25 | 2 | 1 | 452 |
| 最小（mm） | 5.8 | 7.2 | 6.4 | 6.3 | 5.8 | 6.2 | 7.9 | 8.3 | 5.8 |
| 最大（mm） | 8.5 | 10.3 | 11.1 | 10.4 | 11.2 | 9.0 | 8.6 | 8.3 | 11.2 |
| 平均（mm） | 7.2 | 8.9 | 8.5 | 8.2 | 8.2 | 7.5 | 8.3 | 8.3 | 8.3 |
| 標準誤差（mm） | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.4 | 0.0 | 0.0 |
| 標準偏差（mm） | 0.6 | 0.9 | 0.9 | 0.9 | 1.1 | 0.7 | 0.5 | - | 1.0 |
| 分散 | 0.4 | 0.8 | 0.8 | 0.9 | 1.1 | 0.5 | 0.2 | - | 1.0 |

表3-3　クロマグロ18日齢仔魚452個体の統計量（標準長）

一方、家系 No. 5 の中で連鎖地図作成に用いられたクロマグロ仔魚 93 個体の全長は、最小で 6.3 mm、最大で 11.6 mm であった。平均は 9.4 mm、標準誤差は 0.1 mm、標準偏差は 1.2 mm となった（表 3-4）。全長データのヒストグラムの分布の様子は、ほぼ正規分布に従っていた（図 3-3A）。Shapiro-Wilk の正規性検定の結果、有意水準 5 %で帰無仮説は棄却されなかったため（p-value=0.17）、正規分布に従うと支持された。したがって、母集団のデータ分布の傾向をほぼ反映していた。

クロマグロ仔魚 500 個体の標準長は、最小で 5.8 mm、最大で 11.2 mm であった（表 3-3）。平均は 8.3 mm となり、全長よりも尾の長さ分として約 1 mm 短くなった。標準誤差は 0.0 mm、標準偏差は 1.0 mm となった。ヒストグラムの分布は（図 3-1B）、正規分布に近くなったが、全長の場合よりもややシャープな形状となった。Shapiro-Wilk の正規性検定の結果、p-value=0.09 となった。有意水準 5 %で帰無仮説は棄却されなかったため、統計的には正規分布に従うと支持された。家系別にみると（個体数の少ない家系 No. 7 と No. 8 を除く）、平均値が最も高い家系 No. 2 で 8.9 mm、最も低い家系 No. 1 で 7.2 mm となり、全長の場合と同じ 2 家系で最も差が見られた。家系別にも Shapiro-Wilk の正規性検定を行ったところ（個体数の少ない家系 No. 7 と No. 8 を除く）、p-value は家系 No. 1 で 0.89、家系 No. 2 で 0.35、家系 No. 3 で 0.21、家系 No. 4 で 0.81、家系 No. 5 で 0.19、家系 No. 6 で 0.63 となった。したがって、いずれの家系においても有意水準 5 %で帰無仮説は棄却されず、正規

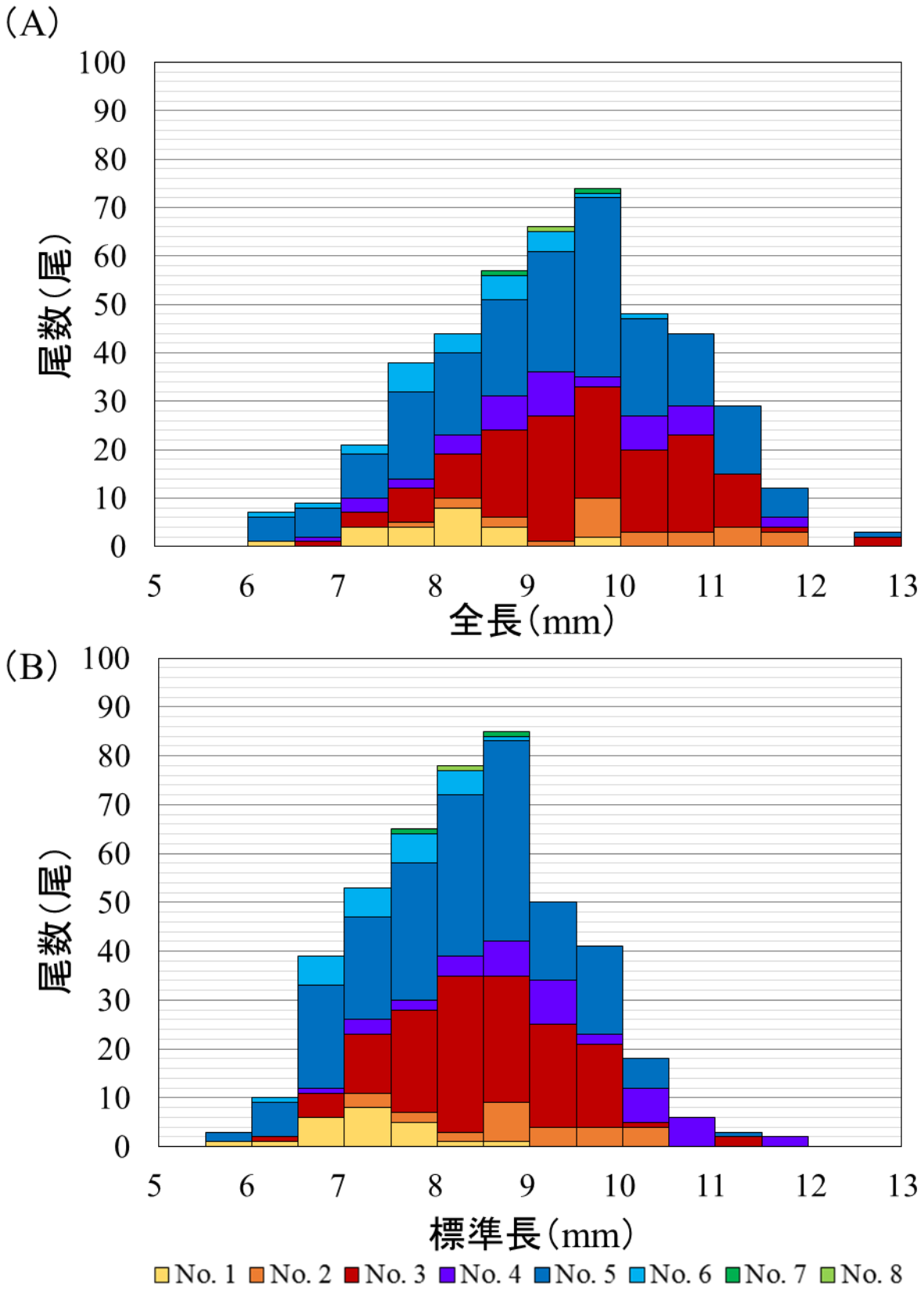



図3-1 18日齢仔魚の体サイズ分布

18日齢仔魚452個体の家系別の体サイズ分布。縦軸に尾数を示す。家系別にバーを色分けして表す。(A)全長の分布。(B)標準長の分布。

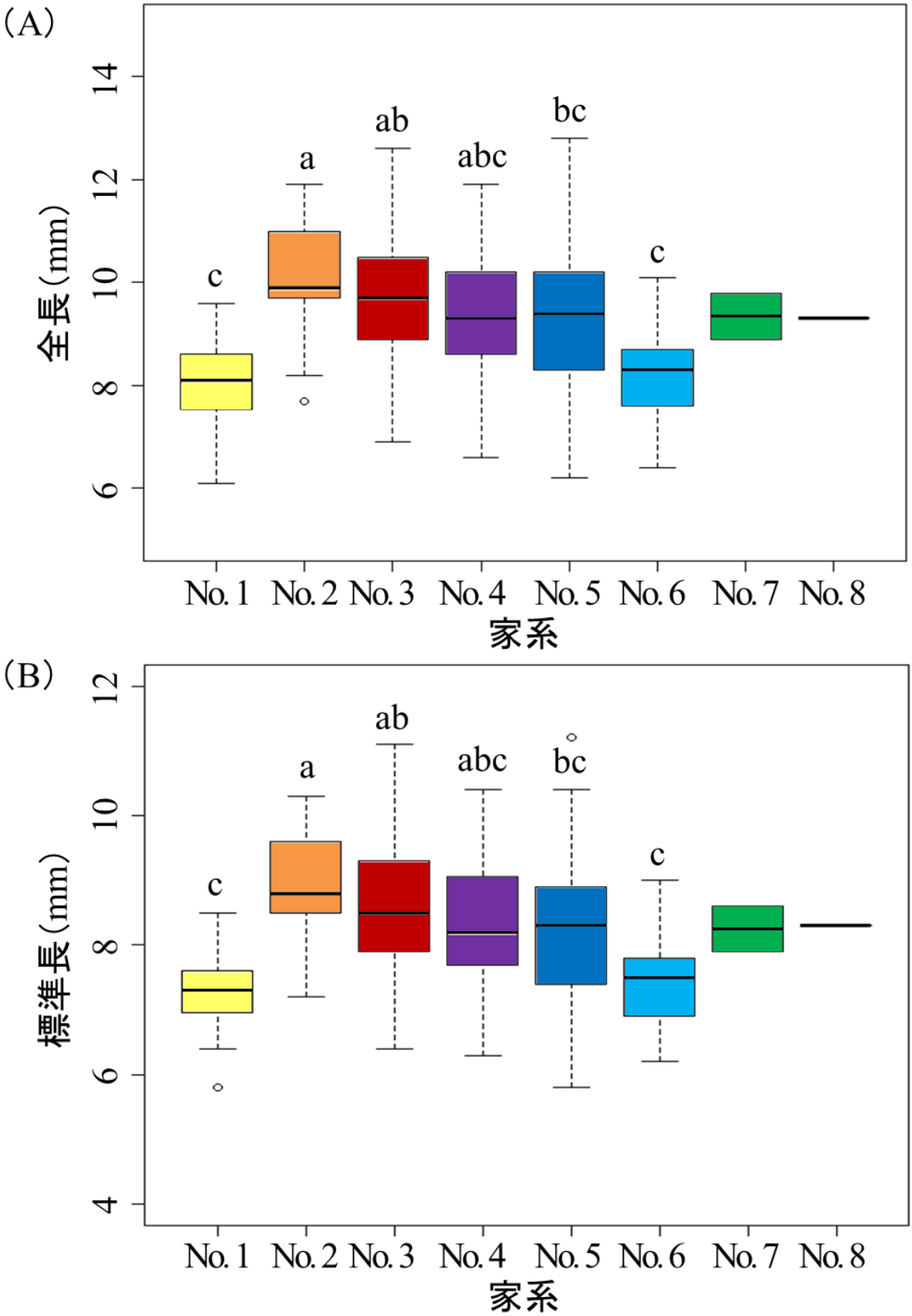



図3-2 18日齢仔魚452個体の家系別体サイズ

18日齢仔魚452個体の家系別体サイズについて、ボックスプロットで描画した。アルファベットの異なる家系間は、有意差があることを示す。(A)全長の分布。(B)標準長の分布。

| 統計量 | 全長 | 体長 |
|---|---|---|
| 最小（mm） | 6.3 | 6.0 |
| 最大（mm） | 11.6 | 10.1 |
| 平均（mm） | 9.4 | 8.3 |
| 標準誤差（mm） | 0.1 | 0.1 |
| 標準偏差（mm） | 1.2 | 1.0 |
| 分散 | 1.5 | 0.9 |

表3-4　第2章の連鎖地図作成に用いられたクロマグロ仔魚93個体の全長、標準長に関する統計量

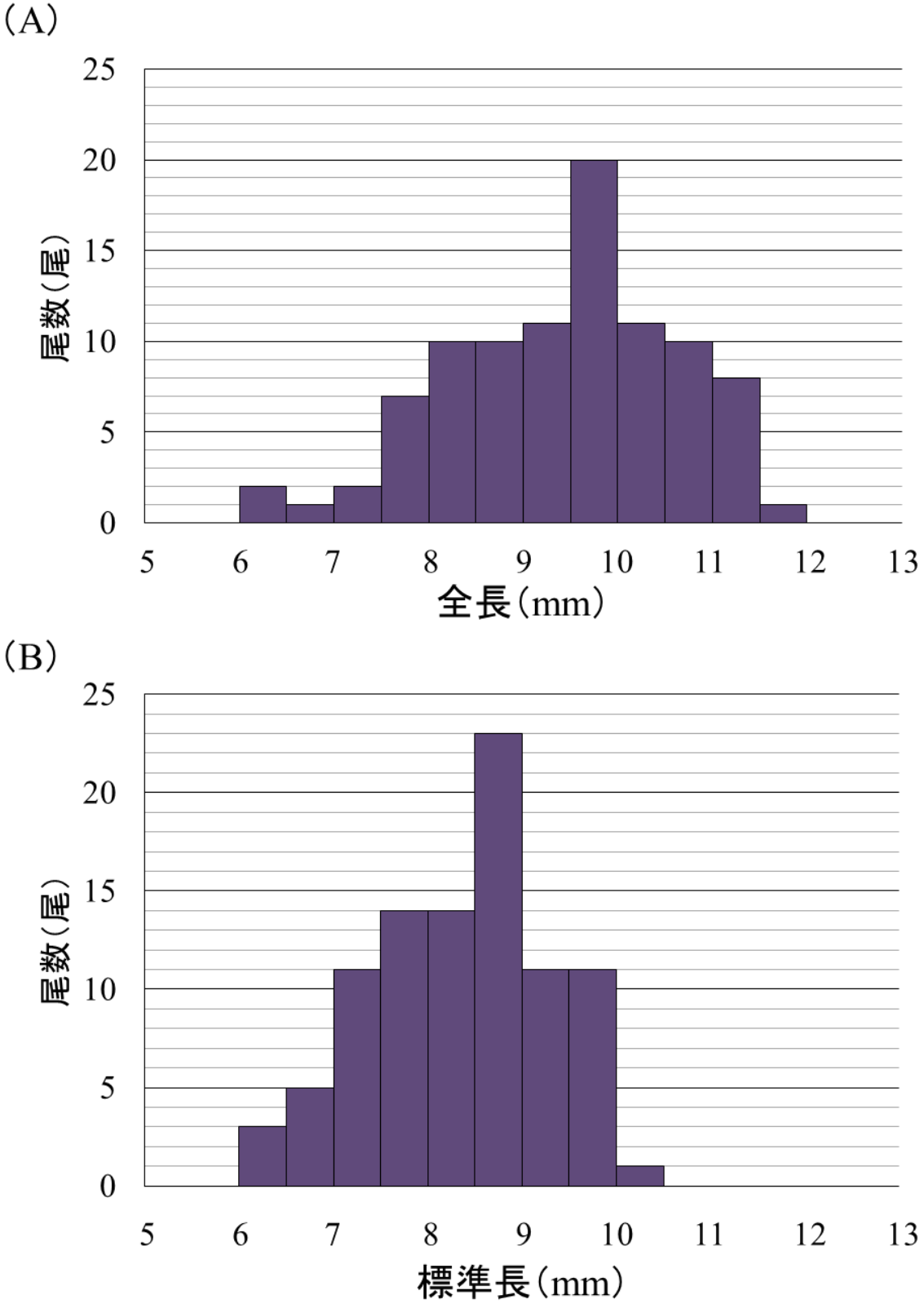



図3-2 18日齢仔魚93個体の全長・標準長

連鎖地図作成に用いた18日齢仔魚93個体の標準長データの分布のヒストグラム。縦軸に尾数を示す。(A)全長の分布。(B)標準長の分布。

分布に従うと支持された。また等分散の検定を行った結果、1%の有意水準で棄却され（p-value=0.004）、各群の分散は等しくないことが示唆された。6 家系の間でクラスカル・ウォリスによる多群検定を行ったところ、0.1%の有意水準で棄却され（p-value = 1.0e-11）、いずれかの群間で全長に有意差があることが示された。さらにウィルコクソンの符号順位和検定により多重比較を行うことで、特定の家系間で有意差が見られることが分かった（図 3-2B, 表 3-4）。

一方で、家系 No. 5 の中で連鎖地図作成に用いられたクロマグロ仔魚 93 個体の標準長は、最小で 6.0 mm、最大で 10.1 mm であった。平均は 8.3 mm、標準誤差は 0.1 mm、標準偏差は 1.0 mm となった。ヒストグラムの分布は、ほぼ正規分布に従った（図 3-2B）。Shapiro-Wilk の正規性検定の結果、有意水準 5 %で帰無仮説は棄却されなかったため（p-value=0.17）、母集団と同じく正規分布に従うと支持された。

QTL 解析

雄親連鎖地図の QTL 解析を、MS マーカー374 座位に関する 93 個体分のアレルと形質（全長、標準長）データを用いて行った。形質を全長とした際、雄親由来の連鎖群について、Permutation test を 1,000 回行いゲノムワイドの有意水準 5 %と 1%の LOD スコア閾値を算出したところ、それぞれ 2.84 と 3.39 となった。Composite Interval Mapping の結果、雄親由来の全連鎖群では、この有意水準 5 %の LOD スコア閾値 2.84 以上を示すピークは検出されなかった（図 3-3A）。比較的高い LOD ス

コア（2 以上）を示したものは連鎖群 5 の LOD ピーク（LOD=2.0）と、連鎖群 8 の LOD ピーク（LOD=2.5）であった（表 3-5）。次に、形質を標準長とした際、ゲノムワイドの有意水準 5 %と 1%の LOD スコア閾値を算出したところ、それぞれ 2.83 と 3.50 となった。Composite Interval Mapping の結果、雄親由来の全連鎖群でこの有意水準 5 %の LOD スコア 2.83 以上を示すピークは検出されず、比較的高い LOD スコア（2 以上）を示す連鎖群も存在しなかった（図 3-3B）。

次に雌親連鎖地図の QTL 解析を、MS マーカー366 座位に関する 93 個体分のアレルと形質（全長、標準長）データを用いて行った。形質を全長とした際、雄親由来の雌親由来の連鎖群についても、Permutation test を 1,000 回行い、ゲノムワイドの有意水準 5 %と 1%の LOD スコア閾値を算出したところ、それぞれ 2.99 と 3.54 であった。Composite Interval Mapping を行った結果、雌親由来の全連鎖群でこの有意水準 5%以上の LOD スコア 2.99 以上を示すピークは検出されなかった（図 3-4A）。比較的高い LOD スコア（2 以上）を示したものは、連鎖群 10 の LOD ピーク（LOD=2.8）であった（表 3-5）。次に、形質を標準長とした際、ゲノムワイドの有意水準 5 %と 1%の LOD スコア閾値を算出したところ、それぞれ 2.84 と 3.33 となった。Composite Interval Mapping の結果、連鎖群 10 においてこの有意水準 5 %の LOD スコアで有意となり、3.2 の LOD スコアを示す QTL が検出された（図 3-4B）。

さらに、雄親由来アレルと雌親由来アレルの組み合わせを考慮した成長 QTL の探索を行うため、雄雌連鎖地図に共通してマッピングされている MS マーカー270

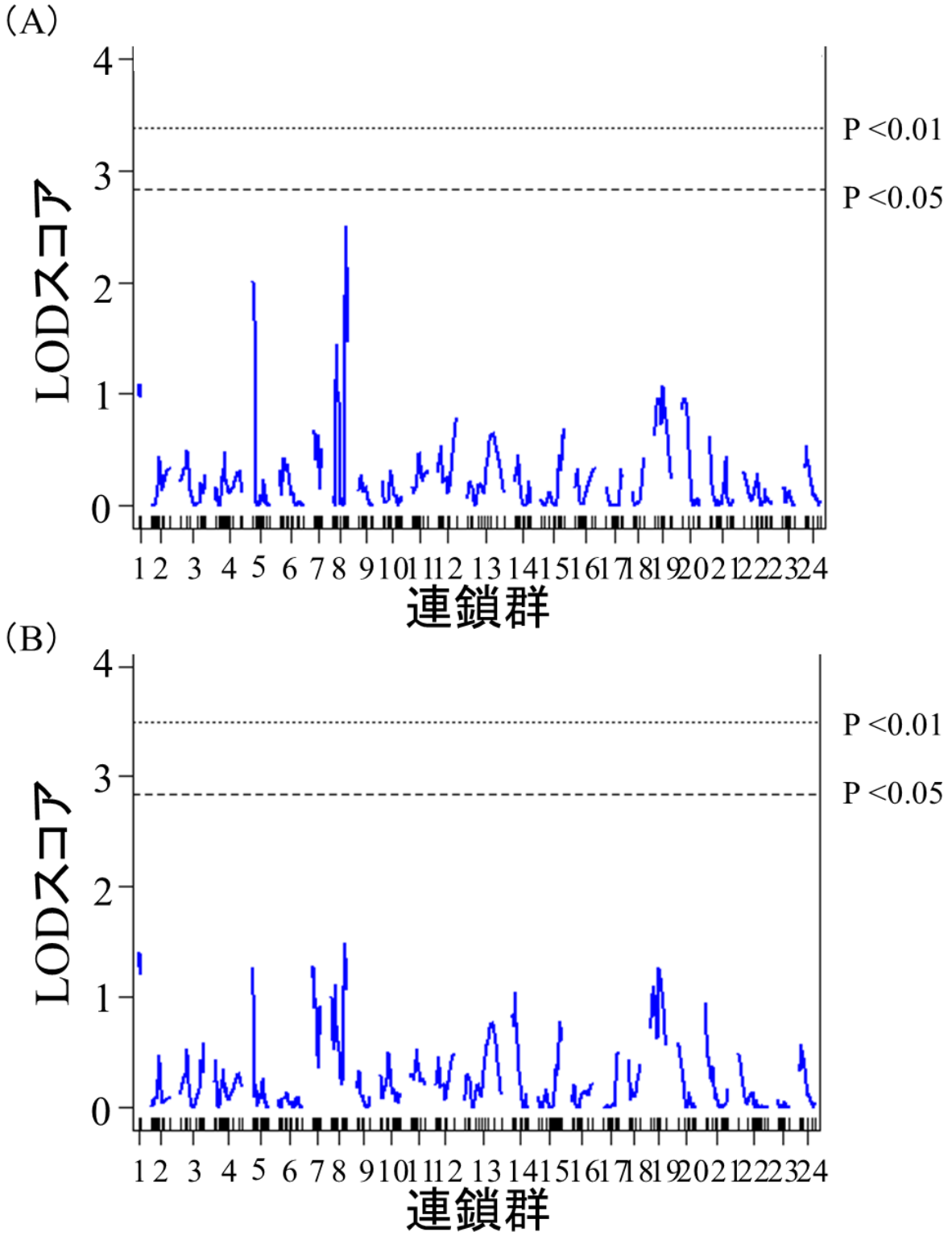



図3-3 雄親由来全連鎖群のLODスコアの分布

Composite Inteval Mappingによる雄親全連鎖群解析結果。横軸に各連鎖群を、縦軸にLODスコアを示す。Permutation test（1,000回）により算出した有意水準5 %と1 %のLODスコアを点線と破線でそれぞれ示した。
（A）形質：全長。（B）形質：標準長。

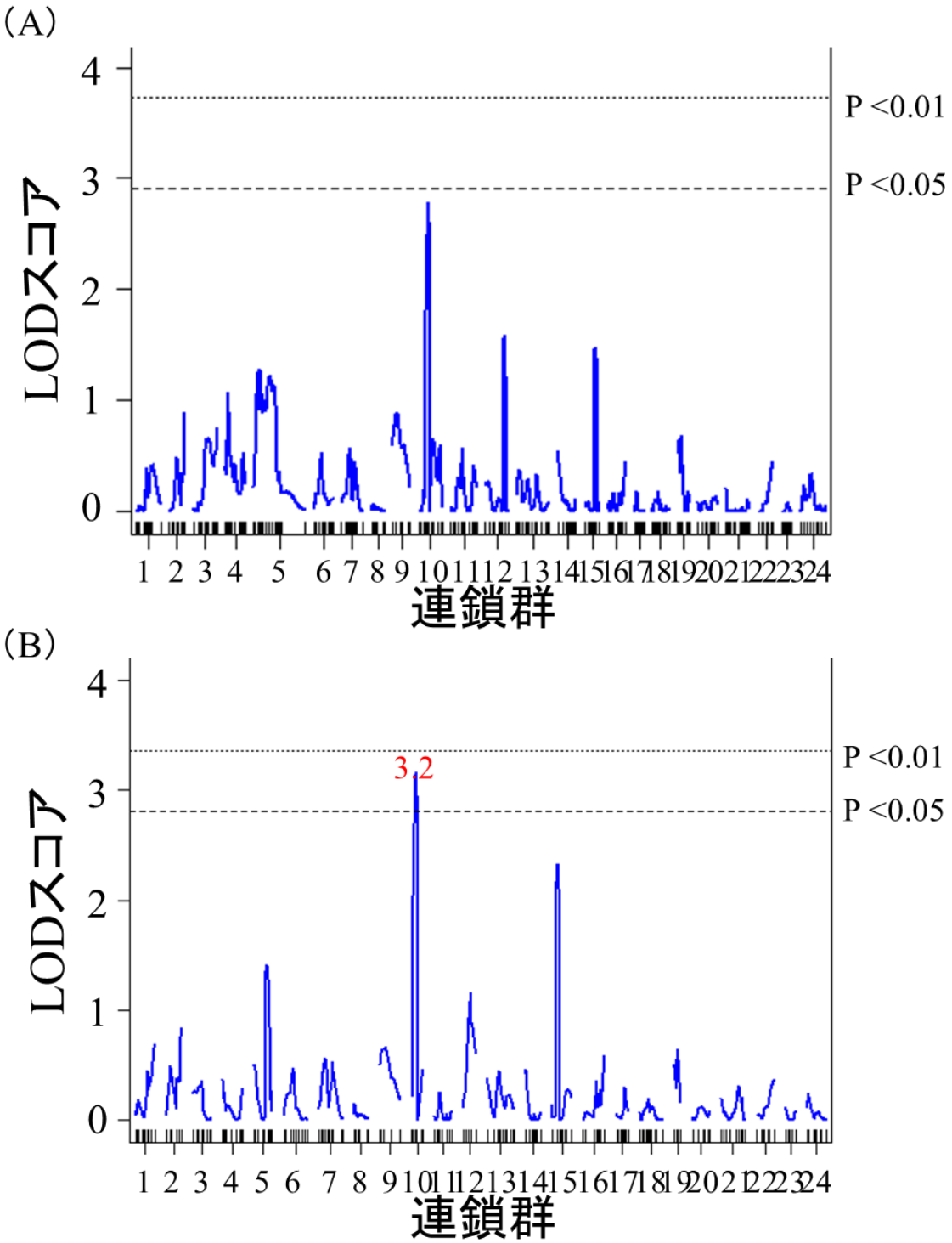



図3-4 雌親由来全連鎖群のLODスコアの分布

Composite Inteval Mappingによる雌親全連鎖群解析結果。横軸に各連鎖群を、縦軸にLODスコアを示す。Permutation test（1,000回）により算出した有意水準5 %と1 %のLODスコアを点線と破線でそれぞれ示した。連鎖群10で得られたLODピークの値を赤字で重ねて示す。

（A）形質：全長。（B）形質：標準長。

| 由来 | 形質 | 連鎖群 | 遺伝距離（cM） | LODスコア | 近傍MSマーカー | ゲノムワイド5%水準で有意 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 雄親 | 全長 | 5 | 0 | 2.0 | 00075_95644 | |
| 雄親 | 全長 | 8 | 30.2 | 2.5 | 00988_100199 | |
| 雌親 | 全長 | 10 | 25.7 | 2.8 | 00208_257727, 00372_156446 | |
| 雌親 | 標準長 | 10 | 26.0 | 3.2 | 00208_257727, 00372_156446 | * |
| 雌親 | 標準長 | 15 | 28.5 | 2.4 | 00911_167209 | |
| 両親 | 全長 | 10 | 9.0 | 2.8 | 00208_257727, 00372_156446 | |
| 両親 | 全長 | 12 | 48.8 | 2.1 | 00056_277475, 00076_171876 | |
| 両親 | 標準長 | 10 | 9.0 | 2.8 | 00208_257727, 00372_156446 | |
| 両親 | 標準長 | 12 | 76.7 | 2.0 | 00841_157365 | |

表3-5　LODピーク2以上を示したQTL候補領域のまとめ

座位について、93 個体分のアレルと形質（全長、標準長）データを用いた QTL 解析を行った。形質を全長とした際に算出されたゲノムワイドの有意水準 5%と 1%の LOD

スコア閾値は、それぞれ 3.73 と 4.45 となった。Composite Interval Mapping を行った結果、全連鎖群でこの有意水準 5%以上の LOD スコア 3.73 以上を示すピークは検出されなかった（図 3-5A）。比較的高い LOD スコア（2 以上）を示したものは、連鎖群 10 の LOD ピーク（LOD=2.8）、連鎖群 12 の LOD ピーク（LOD=2.1）であった（表 3-5）。次に、形質を標準長とした際、ゲノムワイドの有意水準 5 %と 1%の LOD スコア閾値を算出したところ、それぞれ 3.77 と 4.57 となった。Composite Interval Mapping の結果、連鎖群 10 においてこの有意水準 5 %の LOD スコア 3.77 以上を示すピークは検出されなかった（図 3-5B）。比較的高い LOD スコア（2 以上）を示したものは、連鎖群 10 の LOD ピーク（LOD=2.8）、連鎖群 12 の LOD ピーク（LOD=2.0）であった（表 3-5）。

ゲノムワイドの有意水準 5%で有意となった雌親由来の連鎖群 10 の QTL については、詳細解析を進めた。その結果、00372_156446, 00208_257727 マーカー（表 3-1）が位置する 26.0 cM 付近に LOD スコアのピークが見られた（図 3-6）。QTL の 95%信頼区間は、連鎖群上の 22 cM から 29 cM と推定された。

QTL 付近に配置された 00372_156446 または 00208_257727 マーカー（連鎖群 10 の 24.8 cM）の雌親に由来する 2 種類のアレル別に標準長の平均値を求めたところ、

7.95 mm と 8.61 mm となった（表 3-6, 図 3-7B）。よって、2 種類のアレル間では平

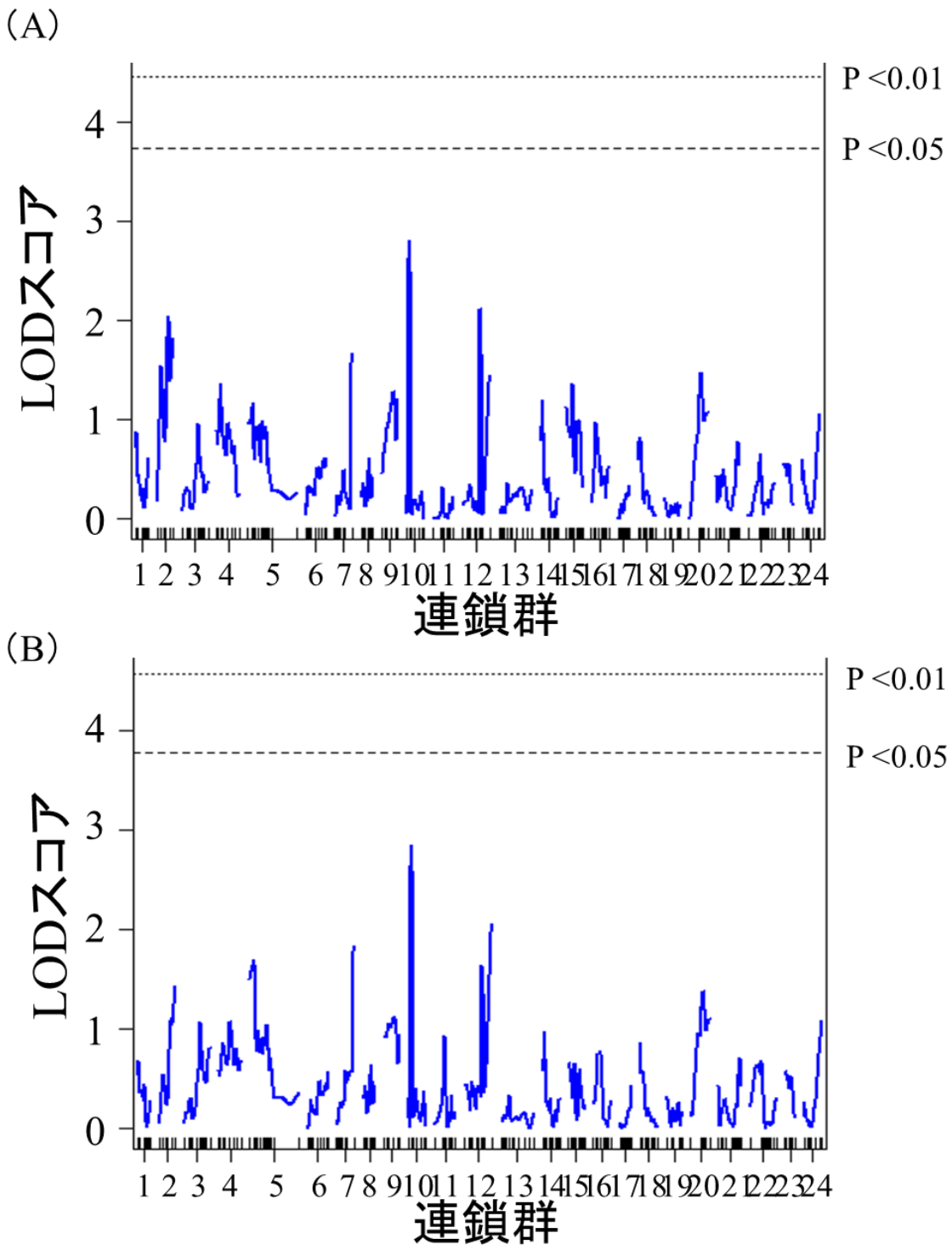



図3-5 両親由来全連鎖群のLODスコアの分布

Composite Inteval Mappingによる雌親全連鎖群解析結果。横軸に各連鎖群を、縦軸にLODスコアを示す。Permutation test（1,000回）により算出した有意水準5 %と1 %のLODスコアを点線と破線でそれぞれ示した。
（A）形質：全長。（B）形質：標準長。

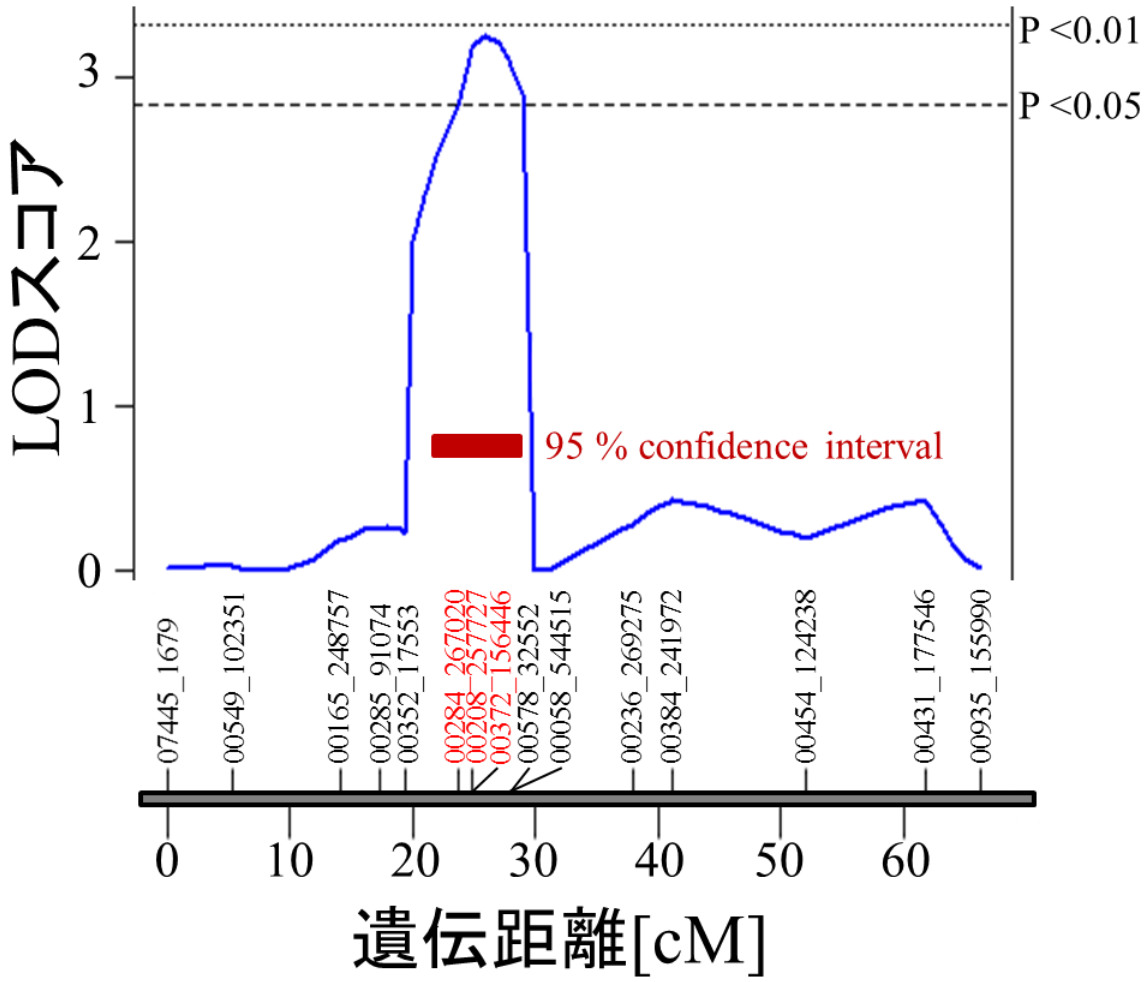



図3-6 雌親連鎖群10のLODスコア分布

Composite Inteval Mappingによる雌親連鎖群10の解析結果。横軸に各連鎖群を、縦軸にLODスコアを示す。Permutation test（1,000回）により算出した有意水準5 %と1 %のLODスコアを点線と破線でそれぞれ示した。QTLの95%信頼区間を、赤色のバーで示した。

| LG10QTL のアレル | 個体数 | 全長 | | 標準長 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 平均 (mm) | 分散 | 平均 (mm) | 分散 |
| A | 55 | 9.79 | 1.29 | 8.61 | 0.85 |
| B | 38 | 8.94 | 1.41 | 7.95 | 0.84 |

表3-6　連鎖群10のQTL上MSマーカーのアレル別全長・標準長

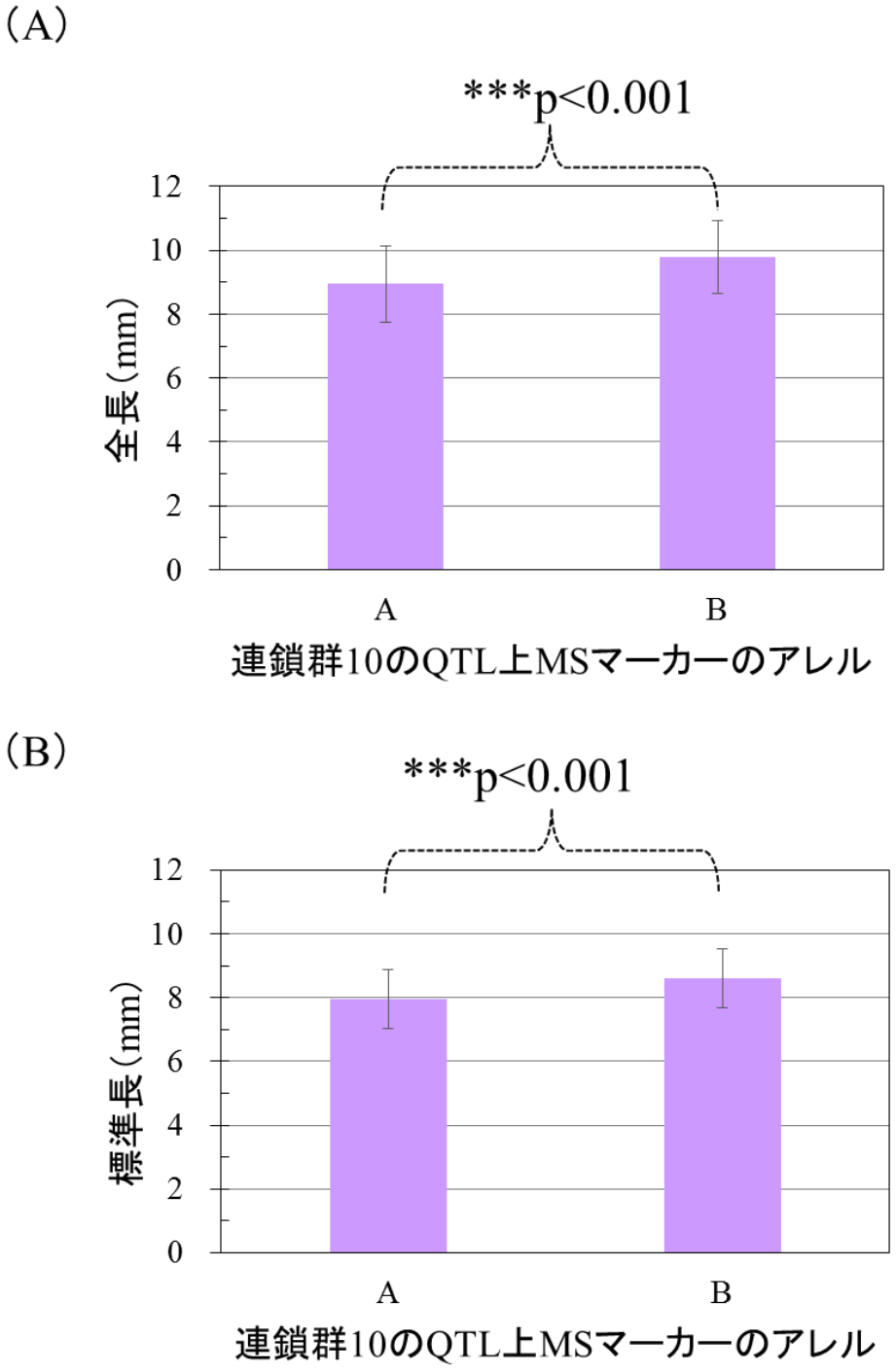



図3-7 連鎖群10 QTL上MSマーカーのアレル別全長・体長の分布
雌親由来連鎖群10のQTL近傍MSマーカー(00208_257727, 00372_156446)の2種類のアレル(A, B)別に形質を分け、平均値および標準偏差を算出した。
t検定の結果を、グラフの上に示した。
(A)全長のアレル別平均値。(B)標準長のアレル別平均値。

均の標準長は 0.66 mm 異なることが分かった。

半同胞家系における成長 QTL の検証

上記で検出された雌親に由来する連鎖群 10 の QTL 効果を検証するため、連鎖地図作成家系 No. 5 と同じ雌親で異なる雄親に由来する半同胞家系 No. 3 を解析した（図 2-1）。半同胞家系 No. 3 は 138 個体から構成され、標準長に関して平均 8.5 mm、最小 6.4 mm、最大 11.1 mm であった（表 3-3, 図 3-1, 図 3-8）。これらの 138 個体を、連鎖解析家系で検出された雌親連鎖群 10 の標準長の QTL 領域に位置する 2 座位の MS マーカー（00208_257727, 00372_156446）を用いて解析した。雌親に由来する 2 つのアレル別に標準長を分類したところ、ほとんど差は見られなかった（表 3-7, 図 3-9）。なお、半同胞家系においても 2 座位のマーカー間では組換え個体は見られなかった。

成長に関与する遺伝子候補の探索

検出された 2 つの QTL の責任遺伝子の候補を探索するため、有意な LOD スコアを示した MS マーカーが存在するスキャフォルド上に存在する遺伝子について調べた。該当する MS マーカー座位、スキャフォルド番号、遺伝子 ID、Gene Ontology 解析結果について表に示す（表 3-7, 表 3-8）。連鎖群 10 上の QTL 領域近傍に配置された 5 マーカー（00284_267020, 00372_156446, 00208_257727, 00578_32552,

00058_544515：遺伝距離 6.5 cM から 10.8 cM に位置）によって位置づけられた 5 個のスキャフォルド（Ba00284, Ba00372, Ba00208, Ba00578, Ba00058）には、計 59 遺伝子がコードされていた。その中には、シグナル伝達に関わる遺伝子（guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1, nucleoside diphosphate kinase homolog 5,ras-gef domain-containing family member 1c, ras-related protein rab-9b-like, cgmp-dependent protein kinase 1-like isoform x2）や細胞骨格関連遺伝子（collagen alpha-1 chain-like isoform x2）等が含まれていた。これらの遺伝子は、QTL 領域にコードされていたことから、成長に関わる責任遺伝子の候補になり得るものである。

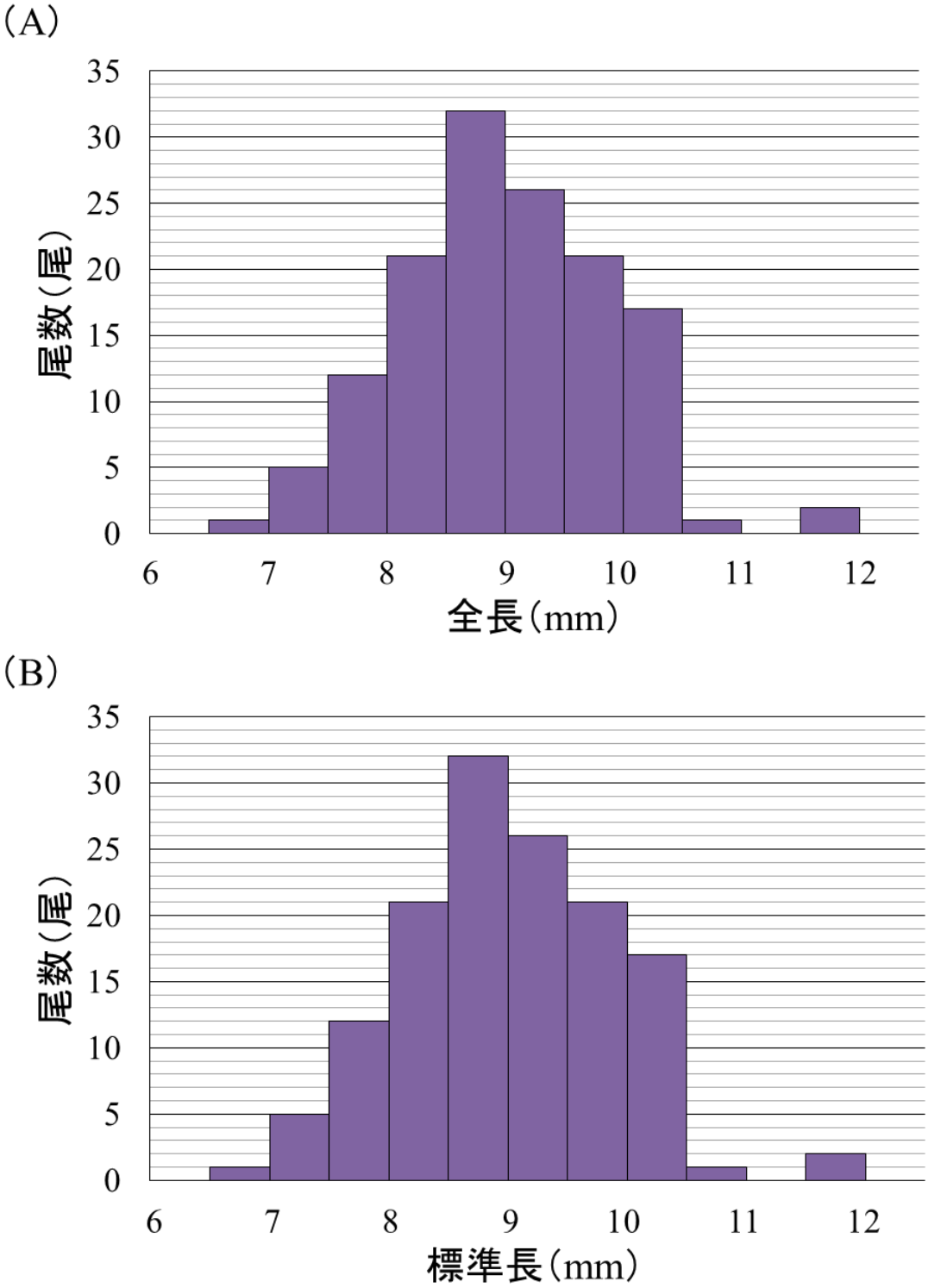


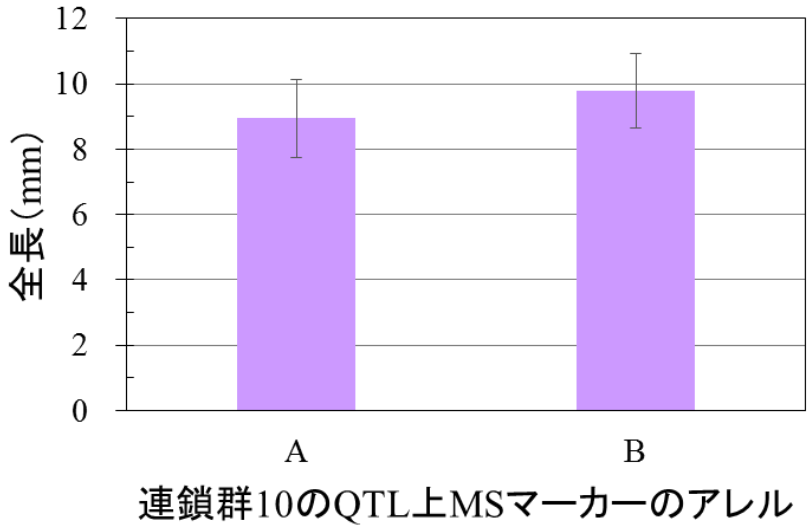

図3-8 半同胞家系(No. 3)における18日齢仔魚138個体の全長・標準長

連鎖地図作成家系と雌親が同じ、家系No. 3の18日齢仔魚138個体の体サイズの分布。縦軸に尾数を示す。(A)全長の分布。(B)標準長の分布。

| LG10 QTL のアレル | 個体数 | 全長 | | 標準長 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 平均 (mm) | 分散 | 平均 (mm) | 分散 |
| A | 78 | 9.59 | 1.23 | 8.46 | 0.78 |
| B | 60 | 9.71 | 1.29 | 8.58 | 0.79 |

表3-7　半同胞家系における連鎖群10のQTL上
MSマーカーのアレル別全長・標準長

（A）




（B）

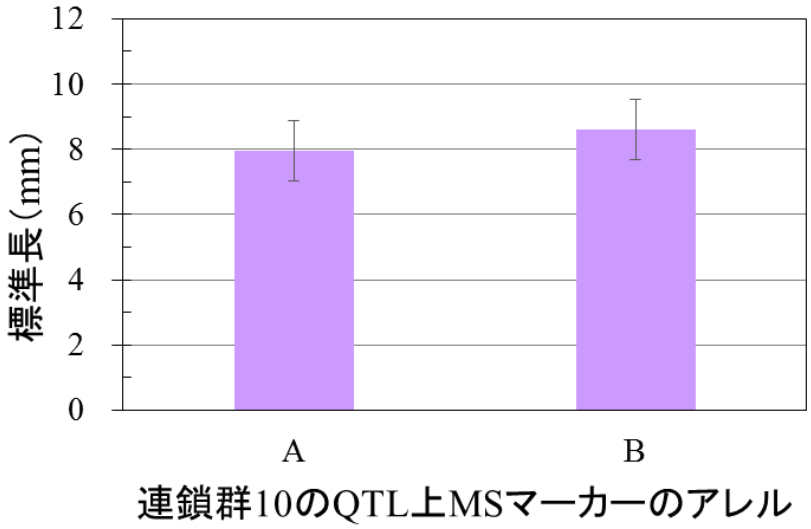



図3-9 半同胞家系における連鎖群10 QTL上MSマーカーのアレル別全長・体長の分布

雌親由来連鎖群10のQTL近傍MSマーカー（00208_257727, 00372_156446）の2種類のアレル（A, B）別に形質を分け、平均値および標準偏差を算出した。（A）全長のアレル別平均値。（B）標準長のアレル別平均値。

| Gene ID | Description | Length | #Hits | e-Value | sim mean | #GOs | GO Names list |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| superscaffoldBa00000208_g2715.t1 | cgmp-dependent protein kinase 1-like isoform x2 | 568 | 20 | 0 | 83.6% | 3 | F:ion binding; P:cellular protein modification process; F:kinase activity |
| superscaffoldBa00000208_g2716.t1 | protein diaphanous homolog 1 isoform x1 | 781 | 20 | 0 | 89.8% | 4 | P:cytoskeleton organization; P:protein complex assembly; F:cytoskeletal protein binding; F:enzyme binding |
| superscaffoldBa00000208_g2717.t1 | PREDICTED: uncharacterized protein LOC104961544 isoform X2 | 112 | 2 | 4.03E-39 | 90.0% | 0 | - |
| superscaffoldBa00000208_g2718.t1 | short transient receptor potential channel 7 | 1,089 | 20 | 0 | 94.7% | 3 | P:transmembrane transport; F:transmembrane transporter activity; C:cellular_component |
| superscaffoldBa00000208_g2719.t1 | dedicator of cytokinesis protein 2 | 942 | 20 | 0 | 92.9% | 3 | P:signal transduction; C:intracellular; F:molecular_function |
| superscaffoldBa00000208_g2720.t1 | protein fam196b-like | 528 | 14 | 0 | 72.5% | 0 | - |
| superscaffoldBa00000208_g2721.t1 | dedicator of cytokinesis protein 2 | 930 | 20 | 0 | 91.7% | 3 | P:signal transduction; C:intracellular; F:molecular_function |
| superscaffoldBa00000208_g2722.t1 | histamine h2 receptor-like | 735 | 20 | 0 | 85.5% | 3 | P:signal transduction; C:cellular_component; F:signal transducer activity |
| superscaffoldBa00000208_g2723.t1 | kv channel-interacting protein 1-like isoform x2 | 116 | 20 | 3.91E-63 | 87.7% | 1 | F:ion binding |
| superscaffoldBa00000284_g3490.t1 | kelch-like protein 4 isoform x1 | 915 | 20 | 0 | 82.1% | 0 | - |
| superscaffoldBa00000284_g3491.t1 | protocadherin-11 x-linked-like isoform x1 | 182 | 20 | 2.68E-69 | 84.8% | 0 | - |
| superscaffoldBa00000284_g3492.t1 | protocadherin-11 x-linked-like isoform x1 | 81 | 20 | 1.05E-35 | 90.5% | 0 | - |
| superscaffoldBa00000284_g3493.t1 | protocadherin-11 x-linked-like isoform x1 | 1,070 | 20 | 0 | 97.3% | 4 | F:ion binding; P:cell adhesion; C:cellular_component; C:plasma membrane |
| superscaffoldBa00000284_g3494.t1 | ---NA--- | 88 | 0 | | | 0 | - |

表3-8　QTL領域の遺伝子情報（ScaffoldBa00208, Ba00284）

| Gene ID | Description | Length | #Hits | e-Value | sim mean | #GOs | GO Names list |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| superscaffoldBa00000372_g4181.t1 | ---NA--- | 70 | 0 | | | 0 | - |
| superscaffoldBa00000372_g4182.t1 | testican-1-like isoform x1 | 557 | 20 | 0 | 88.5% | 3 | P:signal transduction; F:ion binding; C:proteinaceous extracellular matrix |
| superscaffoldBa00000372_g4183.t1 | protein bicaudal c homolog 1-like | 786 | 20 | 0 | 83.6% | 1 | F:RNA binding |
| superscaffoldBa00000372_g4184.t1 | death ligand signal enhancer isoform x1 | 515 | 20 | 0 | 70.7% | 0 | - |
| superscaffoldBa00000372_g4185.t1 | ---NA--- | 129 | 0 | | | 0 | - |
| superscaffoldBa00000372_g4186.t1 | amyloid beta a4 precursor protein-binding family b member 2-like isoform x1 | 848 | 20 | 0 | 82.7% | 0 | - |
| superscaffoldBa00000372_g4187.t1 | methyltransferase nsun7 | 726 | 20 | 0 | 74.5% | 0 | - |
| superscaffoldBa00000372_g4188.t1 | neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-9-ii-like | 545 | 20 | 0 | 89.3% | 4 | P:transmembrane transport; F:transmembrane transporter activity; C:cellular_component; C:plasma membrane |
| superscaffoldBa00000372_g4189.t1 | ubiquitin-conjugating enzyme e2 k | 200 | 20 | 3.29E-135 | 99.2% | 15 | P:catabolic process; P:signal transduction; F:ion binding; P:cellular protein modification process; C:organelle; C:extracellular region;<br>F:molecular_function; P:response to stress; C:nucleus; C:cell; C:cytoskeleton; P:cell death; C:cytoplasm; F:ligase activity; F:enzyme binding |
| superscaffoldBa00000372_g4190.t1 | beta-klotho | 1,047 | 20 | 0 | 83.8% | 2 | P:carbohydrate metabolic process; F:hydrolase activity, acting on glycosyl bonds |
| superscaffoldBa00000372_g4191.t1 | toll-like receptor 1 | 798 | 20 | 0 | 76.0% | 8 | P:biological_process; P:signal transduction; P:biosynthetic process; C:cellular_component; F:signal transducer activity; P:transport; P:response to stress; P:immune system process |
| superscaffoldBa00000372_g4192.t1 | integrator complex subunit 10-like isoform x2 | 700 | 20 | 0 | 87.5% | 3 | C:protein complex; P:cellular nitrogen compound metabolic process; C:nucleoplasm |
| superscaffoldBa00000372_g4193.t1 | solute carrier family 25 member 51 | 306 | 20 | 0 | 89.8% | 2 | C:cellular_component; P:transport |
| superscaffoldBa00000372_g4194.t1 | fermd pdz domain-containing protein 1-like isoform x1 | 1,769 | 20 | 0 | 85.4% | 0 | - |

表3-9　QTL領域の遺伝子情報（ScaffoldBa00372）

3-4 考察

本論文では、18 日齢という仔魚期のクロマグロでの成長に関わる QTL 解析を行った。本論文第 1 章にて構築されたクロマグロ雌雄 MS 連鎖地図は、マーカー間の平均遺伝距離が雄親地図で 2.7 cM、雌親地図で 3.7 cM となっている。全ゲノムをラフにスキャンする QTL 解析において、配備するマーカー間距離は 10 - 15 cM が推奨されており、それよりマーカー間隔が大きいと検出力が下がる可能性がある[72]。本解析により初期成長の QTL が検出されたことから、雄雌共に 24 連鎖群からなる連鎖地図の全体にわたって配置された各 MS マーカーの密度は、QTL 検出に必要な検出力を満たしているものと考えられた。本研究によって検出された QTL によって、クロマグロの成長に関わるゲノム領域や候補遺伝子についての理解が進むと共に、成長に関与するマーカーアシスト選抜[99]を行う上での基盤になるものと期待される。クロマグロの仔魚期における成長に及ぼす環境要因としては、水温の関与が考えられている[77]。また、十分な餌の獲得と摂取が重要であることも報告されている。しかしながら、クロマグロの初期成長への遺伝的寄与については、これまでほとんど報告されておらず、本解析によって初めて示された。

雌親連鎖群 10 の QTL に位置する 00372_156446 または 00208_257727 MS マーカーのアレル別に標準長を分けると、平均 0.66 mm 異なっていた。今回検出されたこの標準長の差が、以降の成長段階においても反映されるか否か、またどの程度の標準長差となるのかについては不明である。一方で、Tanaka らは特に 8 日齢から 12

日齢にかけての高成長が高生残をもたらすことを報告しているが[77]、それ以降 18 日齢までの成長と生残との関連は分かっていない。より成長した段階の魚体を用いて QTL 解析を行うことによって、クロマグロの各成長段階を通じての成長に関わる遺伝子座を明らかに出来るものと考えられる。

同雌親に由来する半同胞家系においては、連鎖群 10 の QTL 上マーカーのアレル別標準長に差が見られなかった。再現性が得られなかった原因として、雄親側の遺伝的影響や、QTL 領域の厳密な推定が出来ていない可能性などが考えられるが、現在のところは不明である。今後、他家系における QTL 解析を進めることにより、家系間を超えて有意となる QTL 領域の探索が出来るものと期待される。

成長度合いを測定するための形質としては、標準長のほかに、体重や Fulton's condition Factor（体重を体長の 3 乗で割ったもの）等があるため、これらの形質を用いた QTL 解析が今後望まれる。また、本解析とは異なる家系での連鎖解析や関連解析を行うことにより、共通して出現する QTL の探索も今後の試みとなる。

本解析で見出された連鎖群 10 の QTL 候補領域上のスキャフォルドには、シグナル伝達や細胞骨格構成タンパク質等を遺伝子が含まれていた。魚類の成長に関連する原因遺伝子は、未解明な部分もあるが、アジアシーバスやターボット等で、インスリン成長因子 1 受容体や GHR2、パルブアルブミン（*PVALB1*）等の関連が示唆されている。これらの遺伝子は、本解析で見つかった QTL 候補領域上のスキャフォルドにはコードされていなかった。QTL 領域周辺に新たに配置される遺伝マー

カーが探索され、配置される遺伝子情報が充実化された際には、共に既知の成長関連遺伝子が見つかる可能性がある。クロマグロ連鎖地図に関連づけられたスキャフォルド上の遺伝子に関して、他魚種と染色体上の配置を比較したシンテニー解析では、クロマグロ連鎖群 10 はメダカの 10 番染色体やイトヨの 4 番染色体と対応しており、共通して保存された遺伝子（オルソログ）が配置されていることが示唆されている[92]。雌親に由来する連鎖群 10 の QTL 領域周辺へ、新規の遺伝マーカーを効率的に開発する際には、これらの魚種とのオルソログがコードされているスキャフォルドの選択が有効であると考えられる。

# 第 4 章　マダイイリドウイルス耐性遺伝子座の探索

## 4-1 緒言

第 1 章において、クロマグロ養殖における優良遺伝形質の 1 つとして、耐病性を挙げた。太平洋クロマグロの病気に関する知見は少ないが、仔魚期あるいは稚魚期に、さまざまな病気に罹患することが知られている[10]。一方で、成魚は比較的病気に耐性を有し、罹患しづらいと考えられている。細菌性の病気では、発光バクテリアの一種　*Photobacterium phosphoreum* を原因菌とするパスツレラ症[100]、　ウイルス性の病気では、マダイイリドウイルス（Red sea bream iridovirus）によるイリドウイルス症[7,10]、ベタノダウイルス（ノダウイルス科）によるウイルス性神経壊死症（Viral nervous necrosis, VNN）[7,101]、また寄生虫による病気では、住血吸虫カルジコラ *Cardicola orientalis*[102,103]、クドア *Kudoa hexapunctata* による脳粘液胞子虫症等[104]が報告されている。この他に、マグロ属の別種の罹患が報告されている病気も複数あるが、太平洋クロマグロが罹患するか否かは定かでない。

本研究では、先に述べたウイルス病の一つイリドウイルス症について取り上げる。太平洋クロマグロの養殖現場では、夏季にマダイイリドウイルスを原因とするイリドウイルス病[105]が蔓延し、深刻な被害をもたらしている。マダイイリドウイルスは元々、1990 年に四国の養殖マダイの大量死を通して発見され、病理組織学的検査、ウイルス検査及び分離ウイルスを用いた感染実験の結果から、イリドウイル

ス科に属するウイルスの感染が原因であることが明らかにされた。それ以来、西日本の養殖場でマダイのみならず、カレイ目、フグ目、そして太平洋クロマグロを含むスズキ目の多くの海産養殖魚（30 種以上）に病原性を示し、被害を及ぼしている。病魚は体色が黒化し、運動が不活発となり海面を力無く遊泳する。また、鰓の色が貧血症状、鰓弁の点状出血や鰓弁先端部より出血が認められることもある[105]。また、囲心腔内の出血、内臓諸器官の褪色、脾臓の肥大を特徴とする[106]。病理組織学的には、細胞質が塩基性色素で均質に濃染あるいは顆粒状に染まる大型で類円形を呈する細胞（異形肥大細胞）が脾臓、心臓、腎臓、肝臓、鰓に多数観察される[107]。

多くの魚種から単離されたイリドウイルスはラナウイルス科に属するが、RSIV ウイルスは異なる。RSIV ウイルスのゲノムは、直鎖状 2 本鎖 DNA であるが他のイリドウイルスと同様、円環的置換が許され、末端が重複していると考えられている。ゲノムの長さは 112,415bp、GC 含量は 53.4 %であり、116 個のオープンリーディングフレームを有する（Genbank: AB104413.1）[108]。RSIV 感染魚の診断法としては、モノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法[109]や PCR 法[110]がある。本病の防除法としては、ホルマリン不活化ワクチンが開発され、実用化されるに至っている[111,112]。

太平洋クロマグロのイリドウイルス病の場合、1 歳未満の幼魚が感染し得る。本疾病の発生は、高水温期（24℃以上）に限られる。その死亡率は、時として若齢魚

の数 10%に達することが知られている。感染魚は体色の黒化および食欲不振を示す。病気の急性期に死亡しない場合でも、しだいに衰弱し、最終的には死亡に至る。他の魚種の場合と同様に、感染魚から作製された脾臓切片において、好塩基性の肥大化した細胞（おそらく白血球）が観察される[10]。脾臓、腎臓、鰓における、ギムザ染色によって強く染色される肥大化細胞の病理組織像は、RSIV 感染の特徴である。

マグロ属の魚種における本疾病の感染については、太平洋クロマグロのみで報告されている[113]。ウイルスに感染した他魚種の網の周囲において、捕獲された天然の太平洋クロマグロ幼魚を飼育すると、それまでウイルス感染履歴のない魚であっても感染する可能性がある。また、2015 年 12 月下旬に東京都葛西臨海水族園で飼育されていたクロマグロの大量死が起こった（リファレンス）。未だ原因は未解明のままであるが、イリドウイルス症も診断項目の 1 つであった。将来的にゲノム育種によりイリドウイルス症や他の疾病症に対する抵抗性魚を作出することが出来れば、感染症による被害を低減出来るかもしれない。

　現在のところ、本疾病に対する有効な治療法は存在せず、ワクチンの利用も考えられるが、実用化に至っていない。遺伝的に本疾病に対して耐病性を保持する人工種苗をゲノム育種により作出できれば、感染被害を低減できると考える。そこで QTL 解析を行うことにより、イリドウイルス病耐性形質に関連した遺伝子座を探索する。太平洋クロマグロではこれまでに QTL 解析に必要な遺伝マーカーを多数

配置した連鎖地図が存在せず、また自然死亡率の高さやウイルス液の注射に伴うハンドリングの困難さなどから、感染試験を実施する上で問題点も多く、耐病性に関わる QTL 解析の報告はなされていない。しかしながら他魚種において、耐病性形質に関わる QTL 解析や GWAS 解析は、現在に至るまでに様々な魚種、疾病について行われている。以下に、特にウイルス病耐性についての QTL 解析や GWAS 解析についての知見について述べる。

ヒラメ（Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*）のリンホシスチス症の例では[15,74,114]、リンホシスチス病（Lymphocystis disease, LD）に耐病性を示す系統（KP-B 系統）と感受性を示す系統（KP-A 系統）の戻し交配を用いて、LD 耐病性に関する解析を行ったところ、耐病性に関連する 1 つの遺伝子座が連鎖群 15 に見出された。ターボット（Turbot, *Scophthalmus maximus*）のウイルス性出血性敗血症（Viral Hemorrhagic Septicemia, VHS）[115]の例では、3 つの家系においてそれぞれ VHS 耐性に関わる QTL の探索を行っている。

ニジマスにおける伝染性膵臓壊死症（IPN）[116]の例では、Ozaki らが高感受性系統（RT-101）系統と耐病性（RT-201）系統の戻し交配家系を用いて、IPN 耐病性形質についての解析を行った。その結果、耐病性に関連する 2 つの遺伝子座を見出した。伝染性造血器壊死症（IHN）[117]については、Palti らがニジマスとカットスロート（*Oncorhynchus clarki*）の種間雑種を用いて戻し交配家系を作成し、DNA フィンガープリントパターンから IHN 耐病性に関連するバンドを作成した。Khoo ら

（2004）は、MS マーカーと戻し交配家系をもちいて IHN の耐病性形質の解析を行い、耐病性に関連する 1 つの遺伝子座を報告した。

大西洋サケ（Atlantic salmon, *Salmo salar*）においては、2008 年の Houston らの報告[118]を筆頭に、この約 7 年間で精力的に IPNV に連鎖した遺伝マーカーの探索が行われてきた[118–124]。また甲殻類ではあるが、ウシエビ（Indian black tiger shrimp, *Penaeus monodon*）のホワイトスポット病（White spot syndrome virus, WSSV）[125]に関わる QTL 探索も行われている。

ウイルス耐性の原因となる遺伝子そのものが何であるかは、非常に興味深い。長い間、QTL 領域の遺伝子推定やシンテニー解析も合わせて、責任遺伝子の探索も様々な解析で試みられてきた[126]。しかしながら、解像度の低さや個体数・マーカー数を増やした網羅的解析に必要な労力・コスト、家系や集団ごとの再現性の問題などから、原因遺伝子自体についてはいずれの研究においても明らかにされてこなかった。しかしながら今年になり、大西洋サケの IPNV 耐性の責任遺伝子としてカドヘリン遺伝子が見つかり[124]、他の研究チームによっても同様の解析が進められている（ISGA XII, 2015）。

そこで本研究では、太平洋クロマグロを用いて、イリドウイルス症耐性に関与する遺伝子座を探索する。まず、F1 の仔魚集団を用いて感染試験を実施する。感染試験は、希釈したウイルス液を利用した浸漬法で行う。QTL 解析には、親子鑑定によって抽出した F1 の同胞仔魚集団を用いる。F1 作出に用いられた雄親か雌親内

の 2 つのアレル間で、ウイルス耐性に遺伝的な寄与が異なれば、QTL 検出が可能となる。また、雄親と雌親からそれぞれ 1 つずつアレルを選んだ際に考えられる組み合わせ（雄雌共にヘテロで、最大で 4 通りとなる）の間で、ウイルス耐性に遺伝的な寄与が異なれば、同様に QTL を検出出来ると予想される。

## 4-2　材料と方法

種苗生産

　水産総合研究センター 増養殖研究所 上浦庁舎にて種苗生産を行った。60 kL 水槽を使用し、複数の天然親魚群に由来する F1 稚魚を用いた。感染試験開始 1 日前の、44 日齢の時点での生残尾数は 855 尾であった。

感染試験

　45 日齢の時点で感染試験を開始し、計 836 尾を供試した。マダイイリウイルス感染により死亡したマダイの肝臓摩砕物を懸濁し、約 120 万倍に希釈されたものを用いて浸漬によるウイルス攻撃を行った。攻撃は、6 時間の止水飼育で行った。感染試験の実施については、水産総合研究センター　増養殖研究所　米加田徹博士との共同研究で行われた。

核酸の抽出

　死亡魚を回収し、サンプルは全て DNA 抽出まで ISOGEN（和光純薬工業株式会社）中で-80℃にて保存した。DNA を肝臓から DNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN 株式会社）を用いて抽出した。プロトコールは、メーカーの推奨に従った。抽出したゲノム DNA は 4℃または-20℃にて保存し、MS マーカー解析（家系判別と連鎖解析）およびウイルス定量に用いた。

家系判別

11 座位の MS マーカーを用いて親子鑑定を行うことにより、複数親魚の自然交配により生まれた子集団から、同胞関係にある個体の抽出を行った。用いた MS マーカーの情報を表 4-1 に、日齢別の各個体数を表 3-2 に示す。マーカー型の判定には GENE MAPPER version 4.0（Life Technologies）を用いた。得られたアレルデータを PARFEX[127]に入力し、排除法で親子鑑定を行った。親魚と稚魚間でミスマッチが生じた際に許容するマーカー数は 1 に設定した。ミスマッチの要因については、ヌルアレルの寄与についても含めた。これらの解析は、国立研究開発法人 水産総合研究センター　中央水産研究所にて行われた。

ウイルス定量

家系判別により得られた同胞 130 個体について、マダイイリドウイルスの定量のため、ORF458L 遺伝子（GenBank:AB104413.1）を標的とした。ORF458L はマダイイリドウイルスゲノム（112,415 bp）[108]の 80,207 bp から 81,217bp の相補鎖側に位置する。FV3 immediate-eary protein ICP46 homolog タンパク質をコードする（GenBank: BAK14292.1）。全長 336 アミノ酸残基から構成されており、213 aa から 288 aa の領域に CMD（Carboxymuconolactone decarboxylase） superfamily ドメイン（Accession No. cl00460）を有する。ウイルス感染させた培養細胞を用いたマイク

| Primer ID | Primer sequences (5'-3') | Primer Tm (°C) | Expected allele size (bp) | Primer end position (3') | Simple notation | Repeat type | Fluorescent |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 00190_461_F | tttgtgataacactgctgaccc | 60.0 | 107 | 442 | (CA)22 | imperfect with gaps | VIC |
| 00190_461_R | gtggtctttgccagtcttttct | 59.8 | | 506 | | | |
| 00190_1837_F | gtcagacgtgaattagtgctgc | 60.0 | 240 | 1715 | (CAA)14 | perfect | NED |
| 00190_1837_R | tgaatagacaccgtctcacctg | 60.2 | | 1912 | | | |
| 00485_3129_F | attttgtgactgcaatggactg | 60.0 | 397 | 3034 | (AATTC)19 | imperfect with no gaps | PET |
| 00485_3129_R | gtggtggtttaaaaggcaattc | 59.8 | | 3388 | | | |
| 01493_2405_F | tacattttgtcactgcctgtcc | 60.0 | 168 | 2326 | (CA)19 | imperfect with gaps | NED |
| 01493_2405_R | attccatgtgtttatgaagggc | 60.1 | | 2451 | | | |
| 02017_617_F | tgaactaacagcggatgatttg | 60.1 | 259 | 535 | (GT)18 | imperfect with no gaps | PET |
| 02017_617_R | tggacatcaagacaacatgaca | 60.0 | | 751 | | | |
| 03220_1809_F | tgaatgcctatttgtgtccaag | 60.0 | 300 | 1685 | (ATT)16 | imperfect with no gaps | FAM |
| 03220_1809_R | actttctatcccacatcgtgct | 60.0 | | 1942 | | | |
| 03504_798_F | ataactgccctggagatgtgat | 59.9 | 391 | 757 | (TGA)11 | imperfect with no gaps | VIC |
| 03504_798_R | tttaagtgaaacggtagcagca | 60.0 | | 1105 | | | |
| 03538_117_F | tgatgttttcacagagaaccaga | 59.8 | 177 | 66 | (TG)13 | perfect | NED |
| 03538_117_R | cggttcaggtatgtcagagtga | 60.2 | | 199 | | | |
| 03929_814_F | agagcagcctgacagttagacc | 60.1 | 381 | 754 | (TG)12 | perfect | VIC |
| 03929_814_R | taatggcaccaacatctacagg | 59.9 | | 1092 | | | |
| 04429_2197_F | actctggtgcagtgcatcttta | 59.9 | 188 | 2091 | (TAT)12 | imperfect with gaps | NED |
| 04429_2197_R | aggatgcttggagtggtaagaa | 60.1 | | 2236 | | | |
| 04610_3871_F | agtgaaagaggtggatgcattt | 60.0 | 289 | 3691 | (CAT)17 | perfect | PET |
| 04610_3871_R | gatcgacgtgtttcagcttatg | 59.8 | | 3937 | | | |

表4-1　家系判別に用いたMSマーカー情報

| 日齢 | 攻撃開始から死亡までの日数 | 尾数 |
|---|---|---|
| 53 | 8 | 131 |
| 54 | 9 | 21 |
| 55 | 10 | 18 |
| 56 | 11 | 0 |
| 57 | 12 | 6 |
| 58 | 13 | 10 |
| 59 | 14 | 39 |
| 60 | 15 | 26 |
| 61 | 16 | 17 |
| 62 | 17 | 5 |
| 合計 | | 273 |

表 4-2　家系判別を行った日齢別の個体数

ロアレイ解析では、感染の 48 時間後に発現することが報告されている（Kinettic class:late）[128]。ウイルス定量の実施については、水産総合研究センター　増養殖研究所　米加田徹博士との共同研究で行われた。

ウイルス DNA を用いた定量では、まず ORF458L 遺伝子の標的領域をプラスミドに組み込んだコンストラクトを構築した。次に、クロマグロから抽出した DNA と標準プラスミドを鋳型として、ORF458L 遺伝子の標的領域をリアルタイム PCR により同時に増幅した。検出には TaqMan プローブを用いた。ウイルスのコピー数を算出後、DNA 濃度により補正し、用いた DNA 1 mg あたりに含まれるウイルスのコピー数を求めた。全ての反応はデュプリケートで行い、平均値を算出した。

連鎖地図の作成

まず、第 2 章で構築した連鎖地図および、有用形質関連遺伝子をマッピングした連鎖地図から、蛍光色素の組み合わせを考慮し計 188 座位の MS マーカーを選抜した（表 4-3）。親子鑑定により得られた同胞 130 個体（家系 No. 5）と親魚 2 個体（P6-015 と P6-342）を、選抜した MS マーカーを用いて解析した。PCR の反応条件等は、第 1 章の材料と方法の項で示した方法に従って行った。マーカー型の判定には GENE MAPPER version 4.0（Life Technologies 社）を用いた。各個体のマーカー型を、雄親・雌親由来アレルに分け、別々に解析した。得られたアレルを元に、マーカー間の遺伝距離（cM、Kosambi 関数）を、MapDisto[59]で算出した。各マーカーごと

に、130 個体分のアレルについてカイ二乗検定を行うことにより、メンデル遺伝に従ったバッククロス分離モデル（1：1 分離）から有意に逸脱するマーカーを探索した。

| Multiplex No. | Linkage Group | Genetic Distance (cM) | | Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation | Fluorescent | PCR Amplification | Polymorphism | | | | Multiplex PCR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Male | Female | | | | | | | | | | | | | | Female | Male | Either | Both | |
| 1 | 1 | 0.0 | 5.4 | Ba00613 | 00613_53311_F | agagatgttgggagttcagagc | 59.88 | 00613_53311_R | gggagatgatcagtatgaaggc | 59.93 | 114 | 2 | perfect | (AC)21 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Available |
| | 1 | 2.2 | 21.7 | Ba00391 | 00391_186975_F | taaaagagcggcattgtgtcta | 59.91 | 00391_186975_R | gtaatgagaaaagcagccaacc | 60.14 | 134 | 2 | perfect | (TG)23 | VIC | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 1 | 2.2 | 31.4 | Ba00606 | 00606_117549_F | ggcactgagaaccaatctctct | 59.88 | 00606_117549_R | gggaaaaacacacaaacactga | 59.91 | 103 | 2 | perfect | (TG)18 | NED | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 1 | - | 46.5 | Ba00847 | 00847_127421_F | tacatgtgtgtctgaggggtgt | 60.34 | 00847_127421_R | tgcttgagaactggagatgaaa | 59.99 | 124 | 2 | perfect | (TG)19 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| 2 | 2 | 1.1 | 14.1 | Ba00333 | 00333_218804_F | tttgcatcatcattgtcactca | 60.12 | 00333_218804_R | agcatggaagagcagttacaca | 59.94 | 150 | 2 | perfect | (TG)13 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Available |
| | 2 | 3.2 | 23.9 | Ba01632 | 01632_2485_F | accctctctccaagaagactcc | 60.24 | 01632_2485_R | agaggagctgagtagcacatcc | 60.05 | 149 | 2 | perfect | (TG)13 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 2 | 27.0 | 42.3 | Ba01217 | 01217_118109_F | tccctctcttctctcacacaca | 60.03 | 01217_118109_R | actccaagttcatcctctgctc | 59.88 | 114 | 2 | perfect | (AC)16 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 2 | 41.3 | 45.5 | Ba01850 | 01850_84397_F | tgggcttcagttttcttgttt | 60.14 | 01850_84397_R | ctccgaatctcgttttaaatgc | 60.1 | 140 | 2 | perfect | (TG)15 | NED | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 3 | 3 | 12.1 | 14.4 | Ba00809 | 00809_161938_F | catttcatcaactctgcctctg | 59.88 | 00809_161938_R | aatgtgtgtttgtcatgaagcc | 59.9 | 103 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)20 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Available |
| | 3 | 21.8 | 23.0 | Ba00185 | 00185_18196_F | cacactctgacacgactcacaa | 59.98 | 00185_18196_R | ttcatggactttggatgacaag | 59.97 | 137 | 2 | perfect | (CA)18 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 3 | 47.0 | 33.8 | Ba00479 | 00479_164430_F | agagacggaccaacattagcat | 60.03 | 00479_164430_R | ngagagagagagagtgagacaca | 60.15 | 116 | 2 | perfect | (AC)25 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 3 | 55.7 | - | Ba00203 | 00203_136570_F | ttcatatatcttgccgaaccct | 59.83 | 00203_136570_R | aaacgactgtcaatctatgtttgc | 59.61 | 144 | 2 | perfect | (AC)22 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| 4 | 4 | - | 8.6 | Ba00066 | 00066_257637_F | atctgggtccagcaaatatcac | 60.22 | 00066_257637_R | ctcttggcttatcgtgacctct | 59.91 | 106 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)18 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Available |
| | 4 | 11.9 | - | Ba00735 | 00735_142037_F | aggtggaaaatgagcagaatgt | 60 | 00735_142037_R | gtgtgtatttagcgtagcccaa | 59.21 | 144 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)29 | FAM | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 4 | 28.0 | - | Ba00298 | 00298_179563_F | gggaaaagaagggagagaatgt | 59.95 | 00298_179563_R | actgcagcttaccctgaaactc | 59.95 | 136 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)28 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 4 | - | 50.9 | Ba00864 | 00864_54093_F | agctgaagaaggagaggaaggt | 60.02 | 00864_54093_R | acagtgtagctggatgctgaga | 60.08 | 120 | 2 | perfect | (CA)19 | NED | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| 5 | 5 | 0.0 | 0.0 | Ba00075 | 00075_95644_F | ctgttgatgactggagaaggct | 60.82 | 00075_95644_R | cactcactcactcgcacacata | 59.97 | 129 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)19 | VIC | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Unavailable |
| | 5 | 11.9 | 11.9 | Ba00174 | 00174_235377_F | aagtccatatcagcctgaggaa | 60.1 | 00174_235377_R | tcaacacagtctgcttgatcct | 59.91 | 122 | 2 | perfect | (AG)18 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 5 | 30.2 | 63.0 | Ba00361 | 00361_142893_F | gatcgtgtatgacactggagga | 60 | 00361_142893_R | tgttaagcactttgagctgcat | 60.08 | 137 | 3 | perfect | (TGA)11 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 5 | 36.7 | 70.5 | Ba00049 | 00049_329914_F | cttgcagacatctctctccctt | 60.02 | 00049_329914_R | gaatgccaatgcaaaagtgtaa | 60.01 | 130 | 2 | imperfect with gaps | (TG)30 | PET | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | |

表 4-3　第 4 章の解析家系で用いた PCR プライマー情報

| Multiplex No. | Linkage Group | Genetic Distance (cM) | | Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation | Fluorescent | PCR Amplification | Polymorphism | | | | Multiplex PCR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Male | Female | | | | | | | | | | | | | | Female | Male | Either | Both | |
| 6 | 6 | - | - | Ba00169 | 00169_341702_F | aatgtatcctggtggtttgacc | 59.98 | 00169_341702_R | agtgggcgtaaactggataaga | 60.02 | 391 | 2 | perfect | (TG)20 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Available |
| | 6 | 18.3 | - | Ba00069 | 00069_102016_F | ttttcctggtaaattcaccctc | 59.35 | 00069_102016_R | ttcacactgttggtttctgtcc | 60.05 | 127 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)15 | VIC | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 6 | 30.2 | 42.2 | Ba00452 | 00452_238268_F | tgggacactaggaagaggaaaa | 60.1 | 00452_238268_R | tcattatggctcctggaatagc | 60.43 | 141 | 2 | perfect | (AC)29 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 6 | 53.0 | 51.9 | Ba00760 | 00760_109813_F | ttcatgagaaattgtttggcac | 59.98 | 00760_109813_R | aatgtgcagtctgaggaacaga | 59.91 | 180 | 2 | perfect | (GT)19 | FAM | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 7 | 7 | 0.0 | 10.9 | Ba00259 | 00259_38068_F | tccctctctctctcatccag | 60.09 | 00259_38068_R | aaatccgtctgttgaccctcta | 60 | 233 | 2 | perfect | (TG)22 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Unavailable |
| | 7 | 9.7 | 29.3 | Ba00414 | 00414_248669_F | gagcattcactaatgcataccg | 59.64 | 00414_248669_R | tgatgcaccatgtgttcttgta | 60.03 | 145 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)28 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 7 | 18.3 | 42.2 | Ba00498 | 00498_193397_F | ttactggtgccagtttgatgtc | 60.04 | 00498_193397_R | accagcaaatgctctgaatttt | 60.14 | 141 | 3 | perfect | (TAA)9 | VIC | Failed | - | - | - | - | |
| | 7 | 19.4 | 62.3 | Ba00189 | 00189_278390_F | agccaattgagactgtgagtga | 59.91 | 00189_278390_F | aaggagagaagtaaaatatggcga | 59.68 | 149 | 2 | perfect | (CA)15 | NED | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 8 | 8 | 2.2 | 4.3 | Ba00513 | 00513_127218_F | ttgaaagtactctgtgtgcctg | 58.09 | 00513_127218_R | ctgtcctteccttttatctccct | 59.96 | 133 | 2 | perfect | (TG)16 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Available |
| | 8 | 15.1 | 12.9 | Ba00232 | 00232_301439_F | taccagctgaacacagcaatct | 59.94 | 00232_301439_R | aatactgaaggaaatgagcgga | 60.1 | 147 | 2 | perfect | (CA)18 | FAM | Succeed | Non Polymorphic (Null Alleles) | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 8 | 22.7 | 15.1 | Ba00009 | 00009_514635_F | tgtgcttcgtaaacacaacctc | 60.21 | 00009_514635_R | gaggctgcaggatatgaatagg | 60.08 | 111 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)21 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 8 | 34.5 | 34.9 | Ba00795 | 00795_9771_F | gctacaccgctctcgtctttat | 59.94 | 00795_9771_R | gagcacattgtgttttggagaa | 60.15 | 136 | 2 | perfect | (TG)17 | VIC | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic (Null Alleles) | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 9 | 9 | 0.0 | - | Ba00182 | 00182_47978_F | ctgtgctccctgtgtattttttg | 59.67 | 00182_47978_R | catgaaagcatgaatgtgtgtg | 60.03 | 123 | 2 | perfect | (AC)18 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Available |
| | 9 | 5.4 | 7.6 | Ba00559 | 00559_232640_F | tgaaggaacacaggagctgata | 59.88 | 00559_232640_R | gaacaagcttttctaagcaccc | 59.44 | 116 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)18 | PET | Succeed | Non Polymorphic (Null Alleles) | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 9 | 16.2 | 23.9 | Ba00249 | 00249_88492_F | tatctgggtgtcacttgtcctg | 60.03 | 00249_88492_R | gagattgttcgtaactccccag | 60 | 122 | 2 | perfect | (TG)19 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 9 | 30.4 | 42.9 | Ba00239 | 00239_273631_F | tgaatggttaatcggactgttg | 59.86 | 00239_273631_R | caaatagtttgggggtttgtgt | 60.01 | 136 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)21 | VIC | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 10 | 10 | 11.9 | 17.3 | Ba00285 | 00285_91074_F | acaaccatctggtgtgtatgga | 60.16 | 00285_91074_R | cagctgcctcactctatcaatg | 60.04 | 126 | 2 | imperfect with gaps | (CA)25 | VIC | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Unavailable |
| | 10 | 27.1 | 24.8 | Ba00372 | 00372_156446_F | acccatacatgtgctgtgtctt | 59.41 | 00372_156446_R | ccgtgtttcttttatctctggg | 59.99 | 145 | 2 | perfect | (TG)16 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 10 | 34.6 | - | Ba00006 | 00006_761447_F | gcaagcatatggcacatttaga | 60.12 | 00006_761447_R | atcttgctctctctcttcctct | 59.98 | 130 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)42 | PET | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 10 | 40.0 | 61.8 | Ba00431 | 00431_177546_F | ctgtctgtgtctgtggggaata | 60.03 | 00431_177546_R | ttagactggaggtaggctggag | 59.9 | 135 | 2 | perfect | (AC)15 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |

表 4-3　第 4 章の解析家系で用いた PCR プライマー情報（続き）

| Multiplex No. | Linkage Group | Genetic Distance (cM) | | Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation | Fluorescent | PCR Amplification | Polymorphism | | | | Multiplex PCR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Male | Female | | | | | | | | | | | | | | Female | Male | Either | Both | |
| 11 | 11 | - | - | Ba00070 | 00070_398970_F | catgaatgccaaattttgtgac | 60.23 | 00070_398970_R | ggaaaggctattttggaatcct | 59.82 | 100 | 3 | imperfect with no gaps | (AAT)13 | PET | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic (Null Alleles) | Polymorphic | Non Polymorphic | Unavailable |
| | 11 | - | 9.7 | Ba00005 | 00005_610364_F | caaagggggattttagtctgctg | 60.12 | 00005_610364_R | cttgccaaaaacctcgacttac | 60.16 | 141 | 2 | imperfect with gaps | (GT)16 | NED | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 11 | 8.6 | 36.8 | Ba00526 | 00526_103784_F | gctccgtttgtttacatccttc | 60.01 | 00526_103784_R | ttttcagtaatgagtctgctgc | 57.33 | 145 | 2 | perfect | (TG)20 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 11 | - | 64.2 | Ba00768 | 00768_151767_F | ggcccatattgtcttgtgatct | 60.22 | 00768_151767_R | ttcaaaccctcgttagtgtcct | 60.03 | 130 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)24 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| 12 | 12 | 4.3 | - | Ba00739 | 00739_156044_F | ctgggaatgtgagttcattcaa | 59.97 | 00739_156044_R | tcctgtgttagcttagctgcaa | 60.21 | 138 | 3 | perfect | (TTG)22 | VIC | Failed | - | - | - | - | Unavailable |
| | 12 | 6.5 | 48.9 | Ba00351 | 00351_225199_F | actctgccaattgtgtgtatgc | 60.07 | 00351_225199_R | tgtcatgggatagtttggtcag | 59.85 | 128 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)23 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 12 | 20.6 | - | Ba00210 | 00210_54610_F | gaagggagacaccatctacgac | 60 | 00210_54610_R | gcaactccatatgtcaccagaa | 60 | 150 | 3 | imperfect with no gaps | (AGT)16 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 12 | 41.6 | 64.1 | Ba00841 | 00841_157365_F | aaacgacatgctttcctcattt | 60.01 | 00841_157365_R | ttatgacaacattcaagggcag | 60 | 133 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)17 | NED | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 13 | 13 | 0.0 | 0.0 | Ba00962 | 00962_9072_F | ctagcccttcgtttccctttat | 59.99 | 00962_9072_R | ttgtgtagcctcttgcttgtgt | 59.98 | 285 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)26 | NED | Succeed | Non Polymorphic (Null Alleles) | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | Unavailable |
| | 13 | 11.9 | 15.1 | Ba00035 | 00035_115704_F | gcagagtttcatacatggtgga | 60 | 00035_115704_R | gtcatgggaaaatgaagcaaat | 60.19 | 125 | 2 | perfect | (GT)19 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 13 | 31.5 | - | Ba00391 | 00391_91549_F | ggagagaaaggggaagttgaag | 60.58 | 00391_91549_R | gcacaaacaacacctgaaagtt | 59.19 | 149 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)18 | PET | Failed | - | - | - | - | |
| | 13 | - | 57.4 | Ba00468 | 00468_62179_F | caaatccctaggttggagttga | 60.34 | 00468_62179_R | caagcaattatccaagtgtcca | 60 | 149 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)24 | FAM | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 14 | 14 | - | - | Ba99533 | 99533_2282_F | cactcgctgatacagtaggtgg | 59.82 | 99533_2282_R | aaagcgagcagaataattagcg | 60.03 | 338 | 3 | imperfect with gaps | (GAA)16 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Available |
| | 14 | - | 36.1 | Ba00085 | 00085_363474_F | atctcctctaggagctgtgtgc | 60.05 | 00085_363474_R | gcggaaaatacagagtggaatc | 59.97 | 135 | 4 | perfect | (AGAC)7 | NED | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 14 | 29.2 | 46.8 | Ba00004 | 00004_886445_F | agcatctgtgtctgcataatgg | 60.16 | 00004_886445_R | cgacaatgtgacatgtttgttg | 59.93 | 148 | 2 | perfect | (CA)12 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 14 | 35.7 | - | Ba00471 | 00471_29393_F | ggacacacacttctcctcacac | 59.65 | 00471_29393_R | ttggcatcaaatgtcaccttac | 59.87 | 399 | 2 | perfect | (AG)35 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| 15 | 15 | 18.5 | 11.9 | Ba00080 | 00080_298907_F | tgcacgtgatattttgatgatg | 59.45 | 00080_298907_R | ctgatgttgagaacagaggctg | 60.05 | 144 | 2 | perfect | (GT)16 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Unavailable |
| | 15 | 32.6 | 20.5 | Ba00111 | 00111_291702_F | tttaaggggaaagacaaatcctc | 59.84 | 00111_291702_R | gtttgctgaaagaaggaaaacg | 60.27 | 114 | 2 | perfect | (AC)20 | NED | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 15 | 45.5 | 25.9 | Ba00022 | 00022_661885_F | agataccgcagggattatctga | 59.95 | 00022_661885_R | aaaataaaaatcagcccacacg | 60.23 | 146 | 2 | imperfect with gaps | (TG)25 | VIC | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 15 | 54.1 | 41.1 | Ba00072 | 00072_331722_F | ggaggaaccataattgtccgta | 60.08 | 00072_331722_R | cacagtgataacaacccttttgc | 59.54 | 117 | 2 | imperfect with gaps | (AC)15 | PET | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |

表 4-3　第 4 章の解析家系で用いた PCR プライマー情報（続き）

| Multiplex No. | Linkage Group | Genetic Distance (cM) | | Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation | Fluorescent | PCR Amplification | Polymorphism | | | | Multiplex PCR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Male | Female | | | | | | | | | | | | | | Female | Male | Either | Both | |
| 16 | 16 | 5.4 | 3.2 | Ba00027 | 00027_603499_F | tctgacaccaccatatagcacc | 59.88 | 00027_603499_R | tggagacgacgatcctaatgta | 59.59 | 400 | 2 | perfect | (CA)21 | VIC | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | Available |
| | 16 | - | 31.4 | Ba00135 | 00135_23239_F | agaagatcaccacattggcttt | 60 | 00135_23239_R | aaggcgtgtcaatatctgtgtg | 60.06 | 142 | 2 | perfect | (CA)21 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 16 | 22.6 | 37.9 | Ba00541 | 00541_245376_F | tttcctttgttaaagtccccct | 60.2 | 00541_245376_R | tgtctggatatctcaagcaaaca | 59.76 | 146 | 2 | imperfect with gaps | (AC)39 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 16 | 45.7 | 49.8 | Ba00418 | 00418_158396_F | ttgtgtgaattgcatgttgtgt | 59.93 | 00418_158396_R | tgtttcacacacagctcagaca | 60.55 | 112 | 2 | perfect | (TG)14 | NED | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 17 | 17 | 13.1 | 1.1 | Ba00181 | 00181_145357_F | tttctgctttttcctcttccag | 59.99 | 00181_145357_R | gtttccacagaggagatcaacc | 59.98 | 139 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)18 | NED | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | Unavailable |
| | 17 | 19.6 | 11.9 | Ba00251 | 00251_176303_F | caagtgaggtaatgaatcagcg | 59.77 | 00251_176303_R | cacatgttggcaagattcagat | 60 | 131 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)20 | PET | Succeed | Non Polymorphic (Null Alleles) | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 17 | 28.2 | 18.4 | Ba00127 | 00127_236472_F | gtatgacatccgttcacaatgg | 60.12 | 00127_236472_R | ttagcatgttttgaggttccct | 60 | 105 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)19 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 17 | - | 27.1 | Ba00405 | 00405_275398_F | gactgatctgtggaggacactg | 59.76 | 00405_275398_R | ttaacaatagtgcaaaacccce | 60.11 | 135 | 4 | imperfect with gaps | (TTGT)8 | VIC | Succeed | Non Polymorphic (Null Alleles) | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 18 | 18 | 0.0 | - | Ba00183 | 00183_234545_F | ccatgatccacagtttgtatgc | 60.26 | 00183_234545_R | cactcaggacggatattcacaa | 59.99 | 116 | 2 | perfect | (TG)13 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Available |
| | 18 | 5.4 | - | Ba00374 | 00374_206401_F | atgcgaaaaagaaaacgtcatt | 60.01 | 00374_206401_R | acacctgcaacacatgaaaag | 60.07 | 135 | 2 | perfect | (TG)19 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 18 | 8.6 | 33.4 | Ba00386 | 00386_215848_F | tgtatctagctcctgagacccc | 59.73 | 00386_215848_R | ttattccttcacccctactga | 59.83 | 149 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)24 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 18 | 24.9 | 47.5 | Ba01564 | 01564_12423_F | aagcagtgtatgggtcaaaggt | 59.93 | 01564_12423_R | tgtgaatgtgcatcagtgtgtt | 60.08 | 319 | 2 | perfect | (AC)20 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| 19 | 19 | 5.4 | - | Ba00246 | 00246_232655_F | tgtttctgtccttccgatttt | 59.98 | 00246_232655_R | gtgaagactgtgacagctgagg | 60.1 | 276 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)24 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Unavailable |
| | 19 | 15.2 | 8.6 | Ba00082 | 00082_412469_F | ccacactgactgactggatgat | 60.03 | 00082_412469_R | atttcctttacctgcaatcctg | 59.5 | 148 | 2 | perfect | (CA)16 | PET | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 19 | - | - | Ba00673 | 00673_111050_F | gtagaggctgccgtaaatctgt | 59.81 | 00673_111050_R | cgattcatttacacaaaggcaa | 60 | 259 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)28 | FAM | Failed | - | - | - | - | |
| | 19 | 34.9 | - | Ba00283 | 00283_163507_F | tgacctcttgttcattcttcca | 59.71 | 00283_163507_R | caagcaaatacaaaacaacacaga | 59.27 | 113 | 2 | perfect | (TG)15 | NED | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 20 | 20 | 0.0 | 0.0 | Ba01561 | 01561_90042_F | acaacatgtccctgcagctc | 61.29 | 01561_90042_R | tttacagtgtgtgcatccatcc | 60.82 | 139 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)23 | FAM | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | Available |
| | 20 | 14.4 | - | Ba00398 | 00398_90943_F | taatccgatagtcgtttcctgg | 60.32 | 00398_90943_R | cgtctatgggacactgactctg | 59.79 | 132 | 2 | imperfect with gaps | (TG)16 | VIC | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 20 | 35.0 | 25.1 | Ba00149 | 00149_250489_F | ttttcccatagagttagcgcag | 60.73 | 00149_250489_R | ccatcattattgccctcttagc | 59.96 | 136 | 2 | perfect | (CT)16 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 20 | 39.3 | 34.9 | Ba00506 | 00506_153914_F | gtgtaaaattcccccacaagctc | 59.88 | 00506_153914_R | tcacacacacagataaacgcac | 59.69 | 127 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)24 | NED | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |

表 4-3　第 4 章の解析家系で用いた PCR プライマー情報（続き）

| Multiplex No. | Linkage Group | Genetic Distance (cM) | | Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation | Fluorescent | PCR Amplification | Polymorphism | | | | Multiplex PCR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Male | Female | | | | | | | | | | | | | | Female | Male | Either | Both | |
| 21 | 21 | 14.2 | 3.2 | Ba00114 | 00114_369105_F | tctgtagactgagctggtggaa | 60.05 | 00114_369105_R | tgctcaactgcagacttgtttt | 60.1 | 123 | 2 | perfect | (CA)16 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Unavailable |
| | 21 | 24.9 | - | Ba00387 | 00387_110610_F | gaaatggggagtttagagaca | 60.48 | 00387_110610_R | acacacactgagctaaaggcaa | 59.98 | 137 | 2 | perfect | (CA)16 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 21 | 39.1 | 39.2 | Ba00065 | 00065_349693_F | cttgcagcaacagagatacacc | 59.94 | 00065_349693_R | cactgctgatttttatgcttcg | 59.91 | 150 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)19 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 21 | - | 56.4 | Ba00638 | 00638_25913_F | gtgggagatgggtttgtatgtt | 59.98 | 00638_25913_R | aggcagaaaccaacctctactg | 59.81 | 126 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)22 | PET | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 22 | 22 | 59.1 | 35.9 | Ba00505 | 00505_173542_F | tggccctgaattagaaagtcat | 59.97 | 00505_173542_R | cagcaccttttgcatttctacac | 59.81 | 150 | 2 | perfect | (CA)16 | NED | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic (Null Alleles) | Polymorphic | Non Polymorphic | Unavailable |
| | 22 | 48.3 | 15.2 | Ba00202 | 00202_221706_F | caggcctctgctagacaacata | 59.54 | 00202_221706_R | taatcgctgttccatgagattg | 60.1 | 148 | 2 | perfect | (GT)16 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 22 | 30.0 | 10.9 | Ba00086 | 00086_310160_F | caggacttacaatccctcttgc | 60.13 | 00086_310160_R | caacaatgcatttctctctcca | 60.25 | 147 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)33 | PET | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 22 | 0.0 | 0.0 | Ba00233 | 00233_211140_F | cctgtagatgggggtgtgtatt | 60 | 00233_211140_R | ttccagcagcttataacttccc | 59.76 | 129 | 2 | perfect | (TG)12 | VIC | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 23 | 23 | 5.4 | 7.6 | Ba00395 | 00395_196629_F | agtcatccaaaaatgactggct | 60 | 00395_196629_R | cacacctgcactaaaactggtc | 59.7 | 117 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)26 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Available |
| | 23 | 12.9 | 20.5 | Ba00836 | 00836_149429_F | atcatggaacatcacattagcg | 59.85 | 00836_149429_R | tcatgttttgttgttccctctg | 60.01 | 100 | 2 | perfect | (GT)13 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 23 | 15.1 | 20.5 | Ba00155 | 00155_332581_F | ncctcttgttgcgtaagctg | 59.78 | 00155_332581_R | taacttgagtttggaaggggaa | 59.97 | 144 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)35 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 23 | 26.0 | 29.2 | Ba00927 | 00927_74939_F | tcaagcttctccagacatttca | 59.99 | 00927_74939_R | gtacatggggaaatcaaccagt | 59.98 | 331 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)18 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| 24 | 24 | 2.2 | 45.6 | Ba00528 | 00528_118258_F | gacggctttagttctgtcttgg | 60.29 | 00528_118258_R | agtgtttgtaggtgtgtgggtg | 59.85 | 150 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)18 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Available |
| | 24 | 6.5 | - | Ba00599 | 00599_215025_F | ccaagcagtacgactgagtgac | 59.98 | 00599_215025_R | gctccaggaagaagacttcaaa | 60 | 147 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)28 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 24 | 19.7 | 58.6 | Ba00334 | 00334_134051_F | ttgtttttctcaggcttttggt | 60.14 | 00334_134051_R | acgcacacacacatatggtaca | 59.84 | 150 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)15 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 24 | 30.6 | 70.6 | Ba00862 | 00862_125083_F | ctcttctctgctccctcttcac | 59.76 | 00862_125083_R | tgaggtaacgacacaaaaatgc | 60.04 | 130 | 2 | perfect | (TC)14 | PET | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 25 | 19 | - | - | Ba00416 | 00416_263189_F | ggtatctgcacgtctgtgagag | 59.94 | 00416_263189_R | tatggatgaggtcatggttcag | 59.81 | 203 | 2 | perfect | (GT)15 | 6-FAM | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | Unavailable |
| | 21 | - | - | Ba00421 | 00421_259112_F | acatgatagcgcaagacagaaa | 59.91 | 00421_259112_R | ctgaggccaaagctttacattt | 59.79 | 384 | 2 | perfect | (AC)19 | VIC | Failed | - | - | - | - | |
| | 21 | - | - | Ba00447 | 00447_256901_F | gacacagactcctcagagaccc | 60.30 | 00447_256901_R | taacaaccacagtaacccagca | 60.45 | 400 | 2 | perfect | (GT)30 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 1 | - | - | Ba00478 | 00478_171967_F | gtttcctgcttgtttcagaggt | 59.79 | 00478_171967_R | atggtttcatgcacagtgtttc | 59.9 | 263 | 2 | perfect | (TG)18 | PET | Failed | - | - | - | - | |

表 4-3　第 4 章の解析家系で用いた PCR プライマー情報（続き）

| Multiplex No. | Linkage Group | Genetic Distance (cM) | | Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation | Fluorescent | PCR Amplification | Polymorphism | | | | Multiplex PCR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Male | Female | | | | | | | | | | | | | | Female | Male | Either | Both | |
| 26 | 21 | - | - | Ba01507 | 01507_97576_F | tgagttctctgtcacttgccat | 59.91 | 01507_97576_R | gcaaaatgcctagcgtagaagt | 59.94 | 159 | 3 | perfect | (CA)12 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Unavailable |
| | 21 | - | - | Ba02088 | 02088_31084_F | aagcccgagataagcctaaaac | 60.11 | 02088_31084_R | agccacatgcagttagagtgaa | 59.94 | 233 | 2 | imperfect with no gaps | (AG)21 | NED | Succeed | Non Polymorphic (Common Alleles) | Non Polymorphic (Common Alleles) | Non Polymorphic (Common Alleles) | Non Polymorphic (Common Alleles) | |
| | 1 | - | - | Ba01627 | 01627_26136_F | agagacagcaagaccaaagacc | 59.92 | 01627_26136_R | gagctcaatgtcaatcaacagc | 59.89 | 184 | 2 | perfect | (GT)20 | PET | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 21 | - | - | Ba01720 | 01720_27535_F | tgaatttcttcagcagcagtgt | 60.06 | 01720_27535_R | gagctctctctgtcccagatgt | 60.02 | 273 | 2 | perfect | (AC)14 | 6-FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 20 | - | - | Ba01832 | 01832_54670_F | atccactgtgattgtaaacccc | 59.98 | 01832_54670_R | tgtggcaaacaaaagatgaaac | 60.02 | 323 | 2 | perfect | (GT)15 | NED | Failed | - | - | - | - | |
| 27 | 19 | - | - | Ba03166 | 03166_3378_F | tccttggacgaatggtaagtct | 60 | 03166_3378_R | cttcagcactgtgaccctacag | 59.97 | 147 | 4 | perfect | (CTAT)19 | 6-FAM | Non Specific | - | - | - | - | Unavailable |
| | 18 | - | - | Ba03471 | 03471_37962_F | tactccctcattcctccacagt | 59.99 | 03471_37962_R | attttgagttggcatttcgtct | 60.01 | 216 | 2 | perfect | (AC)13 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 20 | - | - | Ba03830 | 03830_36944_F | aaaaccccaacacacatacaca | 60.05 | 03830_36944_R | atcaactggttggacgagtttt | 59.91 | 333 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)17 | NED | Failed | - | - | - | - | |
| | 20 | - | - | Ba03925 | 03925_21998_F | cacatagtagccaggagaggct | 59.93 | 03925_21998_R | ttgaggttggagatgacttttt | 59.98 | 308 | 2 | perfect | (TG)16 | PET | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 28 | 18 | - | - | Ba06480 | 06480_3112_F | gtgacctgtatgtttgcacgtt | 59.96 | 06480_3112_R | gaacctgtggatggatttgatt | 60.06 | 138 | 2 | perfect | (CA)13 | 6-FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Unavailable |
| | 20 | - | - | Ba00805 | 00805_196181_F | ggtgtgtatgaacgctgagaga | 60.32 | 00805_196181_R | agaaaggatgagaacaaagcca | 60.24 | 120 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)18 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 19 | - | - | Ba07022 | 07022_10015_F | atttcatgcagagacacacacc | 60.04 | 07022_10015_R | cttcaccaaaacaagcagagtg | 59.95 | 250 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)31 | NED | Failed | - | - | - | - | |
| | 19 | - | - | Ba01514 | 01514_70976_F | aggttcaaacgaagaaggaaca | 60 | 01514_70976_R | ggttgaattttactcaggctgg | 60 | 211 | 2 | perfect | (TG)13 | NED | Failed | - | - | - | - | |
| 29 | 18 | 1.1 | 15.1 | Ba01223 | 01223_104303_F | aatgacacatgcaggaacagag | 60.18 | 01223_104303_R | ctttcctgttttccttctccct | 60.1 | 141 | 2 | perfect | (GT)19 | 6-FAM | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | Unavailable |
| | 18 | 1.1 | 0.0 | Ba00325 | 00325_150740_F | acagctgtggtgctgagataga | 60.08 | 00325_150740_R | ttttcacagagtcattgttggc | 60.15 | 103 | 2 | perfect | (AG)15 | VIC | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 2 | - | 22.8 | Ba01263 | 01263_44111_F | tccctgtttaacattcaccaaa | 59.36 | 01263_44111_R | taaggcagcgctttagttcttt | 59.72 | 143 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)22 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 15 | 43.4 | 21.6 | Ba00036 | 00036_456502_F | tggaaagttgttgttatgcacc | 59.9 | 00036_456502_R | aaaacaaccaaaccaaccaaac | 60.04 | 110 | 2 | perfect | (GT)20 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| 30 | 18 | - | 5.4 | Ba01757 | 01757_83020_F | gccgctaatgaaaagaataagc | 59.42 | 01757_83020_R | ctttcgtccctaaccagcatac | 60.02 | 122 | 2 | perfect | (GT)19 | 6-FAM | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Unavailable |
| | 18 | 1.1 | 6.5 | Ba01267 | 01267_129645_F | tgtggtgtcagagtaatttggg | 59.89 | 01267_129645_R | agggagtggtacatctgctcat | 60.02 | 142 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)31 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 18 | 1.1 | 11.9 | Ba01894 | 01894_59038_F | ctttccctgaaccaatgttctc | 59.98 | 01894_59038_R | gaaaatcacgctgtgtaatcca | 60 | 188 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)18 | NED | Succeed | Non Polymorphic (Common Alleles) | Non Polymorphic (Common Alleles) | Non Polymorphic (Common Alleles) | Non Polymorphic (Common Alleles) | |
| | 18 | 4.3 | 18.3 | Ba01045 | 01045_146520_F | atttttgtgtgtatttgcgtgc | 59.94 | 01045_146520_R | gggagttttaattaggggtcgg | 60.07 | 120 | 2 | perfect | (GT)12 | PET | Failed | - | - | - | - | |

表 4-3　第 4 章の解析家系で用いた PCR プライマー情報（続き）

| Multiplex No. | Linkage Group | Genetic Distance (cM) | | Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation | Fluorescent | PCR Amplification | Polymorphism | | | | Multiplex PCR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Male | Female | | | | | | | | | | | | | | Female | Male | Either | Both | |
| 31 | 19 | 33.8 | - | Ba00091 | 00091_276727_F | cccagtgagaaggctaaggtaa | 59.78 | 00091_276727_R | atcattcacagacgatgtttgc | 60.01 | 116 | 2 | perfect | (GT)14 | 6-FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Available |
| | 19 | - | - | Ba00106 | 00106_305188_F | agatttggttcatctgcacctt | 60 | 00106_305188_R | aacagcattgcgattgacttta | 59.79 | 141 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)23 | VIC | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 19 | 20.6 | 10.8 | Ba00673 | 00673_147435_F | ctttccatcaaacccaactagc | 60 | 00673_147435_R | atgaacagggacatgacatgag | 59.85 | 141 | 2 | imperfect with no gaps | (GA)17 | NED | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 19 | - | - | Ba00187 | 00187_236426_F | attccacagtggtgaatgacag | 59.89 | 00187_236426_R | gagccacaacacctgatcaata | 60 | 103 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)22 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| 32 | 21 | 37.0 | - | Ba00013 | 00013_638192_F | tgacctcttcccaatggactat | 59.83 | 00013_638192_R | gctcagtctctggtttcctgtc | 60.44 | 142 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)19 | 6-FAM | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | Available |
| | 15 | 54.1 | 40.1 | Ba00045 | 00045_218346_F | agcatttagcaagtgaagcaaa | 59.21 | 00045_218346_R | caaattctctctctcctcagcc | 59.6 | 397 | 2 | perfect | (TG)45 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 21 | 44.5 | 44.6 | Ba00112 | 00112_219640_F | tcagatgagagatgcagagagc | 59.86 | 00112_219640_R | aatgatggggttaaatttgtgc | 59.96 | 128 | 2 | perfect | (AC)14 | NED | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 19 | 34.9 | 31.6 | Ba00311 | 00311_2504_F | tgattttgcctaatttgctgg | 59.17 | 00311_2504_R | catgtctctgacttccatcctg | 59.72 | 142 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)25 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| 33 | 2 | 8.6 | 36.9 | Ba00974 | 00974_18978_F | ccaatcaaagcttatgaccctc | 59.97 | 00974_18978_R | tagatgcctctcgtctgaaaca | 60.02 | 113 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)21 | 6-FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Available |
| | 2 | 41.3 | 45.5 | Ba01098 | 01098_106052_F | gtatgacaagccaagcagagtg | 59.94 | 01098_106052_R | ctgattaggtggaggatgaagg | 59.96 | 129 | 2 | perfect | (AC)13 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 6 | 15.1 | 28.1 | Ba00109 | 00109_128874_F | tgctgttggctgctacactact | 60.14 | 00109_128874_R | ctttgtcacagcttgtcctgtc | 59.95 | 150 | 2 | perfect | (CA)26 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 6 | 1.1 | 2.2 | Ba00123 | 00123_167823_F | ccttctttgttggtctgctttc | 60.27 | 00123_167823_R | ccactggtccttaagtagctg | 60.18 | 137 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)19 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| 34 | 1 | 0.0 | 6.5 | Ba00390 | 00390_94555_F | gcatgaaagtccagcaattgta | 60.14 | 00390_94555_R | gtgttgtttttgacagccacat | 59.94 | 143 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)27 | 6-FAM | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Unavailable |
| | 6 | 8.6 | 16.2 | Ba00162 | 00162_313019_F | tttctctctctcccctctctt | 59.96 | 00162_313019_R | cacaagagccatgtgttttagc | 59.81 | 144 | 2 | imperfect with no gaps | (TC)19 | VIC | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 18 | 6.5 | 23.7 | Ba00098 | 00098_401184_F | ggcaaggactctctgtctgtct | 60.06 | 00098_401184_R | aacaatacggtcaccaagtgtg | 59.82 | 142 | 4 | imperfect with no gaps | (TATG)9 | NED | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 2 | 24.8 | - | Ba00967 | 00967_158089_F | ctcagtctattcccaccacaca | 60.03 | 00967_158089_R | ccacccagcagtaatactctcc | 60.02 | 118 | 2 | imperfect with no gaps | (CT)17 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| 35 | 18 | 6.5 | 31.3 | Ba00496 | 00496_15884_F | ggaggaggaagtcaaggttttt | 59.98 | 00496_15884_R | ggctgcagtaccatctgtcata | 60.16 | 149 | 2 | imperfect with gaps | (GT)24 | 6-FAM | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | Available |
| | 1 | 2.2 | 22.7 | Ba49362 | 49362_2269_F | tttggactgtgattggaaactg | 60.01 | 49362_2269_R | tcaggaaattccattatgaccc | 60.02 | 287 | 2 | perfect | (TG)17 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 18 | 8.6 | 33.4 | Ba00665 | 00665_91072_F | cacaagctgacaggtgacattt | 60.22 | 00665_91072_R | cacctgtgtctgtgtgttgaga | 59.83 | 132 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)19 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 18 | 15.1 | 35.6 | Ba00741 | 00741_134776_F | aaaagtgtgtgtaagcgtgtgg | 60.13 | 00741_134776_R | tgagcttcggataatggtttct | 60.1 | 101 | 2 | perfect | (TG)15 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |

表 4-3　第 4 章の解析家系で用いた PCR プライマー情報（続き）

| Multiplex No. | Linkage Group | Genetic Distance (cM) | | Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation | Fluorescent | PCR Amplification | Polymorphism | | | | Multiplex PCR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Male | Female | | | | | | | | | | | | | | Female | Male | Either | Both | |
| 36 | 20 | 27.4 | 21.9 | Ba00002 | 00002_358935_F | tttgtcagtgggaaacaatctg | 60.01 | 00002_358935_R | gtggtgtgtgtttgtacgtg | 59.88 | 140 | 2 | perfect | (CA)14 | 6-FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Unavailable |
| | 1 | 2.2 | 33.5 | Ba00601 | 00601_158674_F | agcaacatccagccatgtagta | 59.66 | 00601_158674_R | tcccattactgatccagtgaca | 60.38 | 107 | 2 | perfect | (GT)14 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 1 | - | 20.6 | Ba00052 | 00052_385529_F | gccgttagcatggctaaaatac | 60.02 | 00052_385529_R | tcatcactgagccagacagagt | 60.06 | 137 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)24 | NED | Failed | - | - | - | - | |
| | 20 | 24.2 | - | Ba00686 | 00686_84565_F | ccaacgaggcttatggagatag | 60.11 | 00686_84565_R | gcctgtggcttttacagttctc | 60.3 | 106 | 2 | perfect | (GT)13 | PET | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 37 | 5 | 36.7 | 77.0 | Ba00053 | 00053_380153_F | gtctttctgtctgggtttgtcc | 60.02 | 00053_380153_R | aagcacatgtttttctccctgt | 60.04 | 126 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)20 | FAM | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | Available |
| | 4 | 8.6 | 17.3 | Ba00747 | 00747_77239_F | acattacccgccactatttttg | 60.13 | 00747_77239_R | tgccacctactgtactggaatg | 60.05 | 146 | 2 | imperfect with no gaps | (CT)20 | VIC | Succeed | Non Polymorphic (Null Alleles) | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 9 | 28.2 | 41.9 | Ba00550 | 00550_31082_F | agtgtagccaaaatgcaggaat | 60.03 | 00550_31082_R | atgtgccaaacatttcagagtg | 60.04 | 124 | 2 | perfect | (AG)14 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 4 | - | 47.7 | Ba00364 | 00364_110919_F | tctgttaaatcagccagcagaa | 60.02 | 00364_110919_R | cggaaaaccactgttaccctta | 60.26 | 265 | 2 | perfect | (AC)23 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| 38 | 6 | - | 46.5 | Ba00046 | 00046_354953_F | actgtctgctcctgtcgtaaca | 59.98 | 00046_354953_R | ccccctetttgctcttaatctga | 59.85 | 366 | 2 | perfect | (CA)17 | FAM | Succeed | Non Polymorphic (Null Alleles) | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | Unavailable |
| | 7 | - | 60.1 | Ba00014 | 00014_385141_F | gattccacatggtcagcttgta | 60 | 00014_385141_R | ctccaaaaggaaagtcaaccac | 60.01 | 139 | 2 | perfect | (CA)22 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 10 | 15.1 | 19.5 | Ba00352 | 00352_17553_F | ccctaacctcagtcctgttgtc | 60.03 | 00352_17553_R | gtcacaatctccccttctgttc | 59.98 | 122 | 2 | perfect | (TG)18 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 5 | 6.5 | 10.8 | Ba00115 | 00115_267973_F | atctcgacaaatgatgatgctg | 60.1 | 00115_267973_R | ggtccaagtgtgtctgtgtgtt | 59.97 | 119 | 2 | perfect | (AC)16 | PET | Failed | - | - | - | - | |
| 39 | 8 | 10.8 | - | Ba00463 | 00463_73801_F | acatcagagcaacaatagcagc | 59.55 | 00463_73801_R | cctgttcatgagtgtcctcaaa | 60.15 | 144 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)20 | FAM | Failed | - | - | - | - | Unavailable |
| | 9 | 5.4 | 7.6 | Ba00542 | 00542_22467_F | gacagggaacacatgaagtcaa | 60.01 | 00542_22467_R | tgtaacgcaaattgtctcatcc | 60 | 118 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)18 | VIC | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 11 | 2.2 | 28.2 | Ba00301 | 00301_147576_F | cccteccattctctctctctct | 60.34 | 00301_147576_R | tgggtatgccattaaagcaaat | 60.55 | 131 | 2 | imperfect with gaps | (CT)27 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 7 | 17.2 | 40.1 | Ba00118 | 00118_445594_F | gtgcgagtttacccactttacc | 59.93 | 00118_445594_R | ttaagtggctctctcttcctgg | 60.01 | 150 | 2 | perfect | (AC)24 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| 40 | 8 | 30.2 | 30.6 | Ba00988 | 00988_100199_F | gtcagaggacagcatcaacact | 59.38 | 00988_100199_R | ctggtttccttctctttcccctt | 60.1 | 127 | 2 | perfect | (AG)12 | FAM | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | Available |
| | 12 | 24.9 | - | Ba00060 | 00060_449308_F | cacatggtcaaacgttttctgt | 59.94 | 00060_449308_R | taaacgtctcaacaggatgtgg | 60.03 | 117 | 2 | perfect | (TG)13 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 12 | 4.3 | 37.1 | Ba00336 | 00336_277236_F | cacttaagtctcccccctctgtg | 60.16 | 00336_277236_R | ncagttcaggacaagtaaaacatc | 58.03 | 255 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)23 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 10 | 37.9 | 37.9 | Ba00236 | 00236_269275_F | tgtctgagcactttcatgtgtg | 59.95 | 00236_269275_R | tctgctgaccagtatgagtgct | 60.08 | 131 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)17 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |

表 4-3　第 4 章の解析家系で用いた PCR プライマー情報（続き）

| Multiplex No. | Linkage Group | Genetic Distance (cM) | | Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation | Fluorescent | PCR Amplification | Polymorphism | | | | Multiplex PCR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Male | Female | | | | | | | | | | | | | | Female | Male | Either | Both | |
| 41 | 17 | 32.5 | 23.8 | Ba00963 | 00963_169877_F | tctttgcactcctgttgtgact | 59.95 | 00963_169877_R | ctagccgaatgttacctgctct | 59.93 | 139 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)15 | FAM | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | Available |
| | 13 | 5.4 | 1.1 | Ba00858 | 00858_125335_F | caaagtactgctctgcctctga | 59.82 | 00858_125335_R | tgtcatgtgtcctgttgtgaaa | 60.05 | 342 | 2 | perfect | (TG)16 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 13 | 31.5 | 30.3 | Ba00385 | 00385_3161_F | aggagctgcttctgtctaaacg | 60.21 | 00385_3161_R | agcctcacgatacctaaaacca | 60.02 | 142 | 2 | perfect | (GT)15 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 11 | - | 0.0 | Ba00227 | 00227_70020_F | gagaacactgacagaatgcagg | 59.91 | 00227_70020_R | caccaaaacctacacaacgaaa | 59.93 | 317 | 2 | perfect | (CA)18 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| 42 | 20 | - | 13.2 | Ba00041 | 00041_262465_F | aactttgacttgatgatggcg | 60.13 | 00041_262465_R | ttgacagctatgggatgtgttc | 60 | 146 | 2 | imperfect with no gaps | (AT)19 | FAM | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Unavailable |
| | 13 | - | 42.2 | Ba00132 | 00132_191501_F | atttccctgactttgagtgcat | 60 | 00132_191501_R | cctctcctgcttcatcactgta | 59.5 | 125 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)38 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 15 | 29.3 | 18.4 | Ba00329 | 00329_44622_F | taaagggaaacgccatagtgac | 60.36 | 00329_44622_R | cggacaggaaaatacactcaca | 60.03 | 122 | 2 | perfect | (TG)17 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 14 | 21.6 | - | Ba00093 | 00093_24283_F | agtatccagattgccaaattgc | 60.34 | 00093_24283_R | attttattaggcttcctgggga | 60.16 | 148 | 2 | imperfect with gaps | (TG)21 | PET | Succeed | Non Polymorphic (Common Alleles) | Non Polymorphic (Common Alleles) | Non Polymorphic (Common Alleles) | Non Polymorphic (Common Alleles) | |
| 43 | 20 | 40.4 | 37.0 | Ba00269 | 00269_183859_F | gtatctggtatctccacccacc | 59.58 | 00269_183859_R | aagtctccaaaccagctctcag | 60.05 | 145 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)20 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Unavailable |
| | 19 | 20.6 | 10.8 | Ba00106 | 00106_187871_F | cgacaagaagctaaacccacctt | 59.82 | 00106_187871_R | aggcctagagatatcgcatctg | 59.86 | 119 | 2 | perfect | (GT)12 | VIC | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 16 | 5.4 | 8.6 | Ba00059 | 00059_177790_F | ggtacaccctgcagttttgaat | 60.28 | 00059_177790_R | tggctgttaaatagctccctgt | 60.15 | 330 | 2 | perfect | (AC)30 | NED | Failed | - | - | - | - | |
| | 16 | - | 41.1 | Ba00217 | 00217_189367_F | tcctctgaagtgatggaaacac | 59.19 | 00217_189367_R | acccccggggaaataagtaagta | 59.97 | 297 | 2 | perfect | (GT)31 | PET | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 44 | 21 | 52.1 | 59.6 | Ba00657 | 00657_186033_F | accatggtaactgacccagact | 59.78 | 00657_186033_R | cacaacgtgagaaatacctgga | 60.03 | 150 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)24 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Unavailable |
| | 22 | 17.9 | - | Ba00799 | 00799_175806_F | ctccttctgctttctttttgga | 59.99 | 00799_175806_R | aaagagtcttagcaagcggatg | 60.04 | 106 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)19 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 17 | 13.1 | 7.6 | Ba00732 | 00732_205680_F | atacagctccaagtccactggt | 60.06 | 00732_205680_R | tgagtgtgttgcctttgcttat | 59.81 | 102 | 2 | perfect | (AC)18 | NED | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 17 | - | 11.9 | Ba00583 | 00583_197206_F | aaccaagttttcatctaggcca | 60 | 00583_197206_R | taaggccaagtgtaaagccaat | 60.02 | 105 | 2 | perfect | (GT)18 | PET | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 45 | 23 | 14.0 | 20.5 | Ba00291 | 00291_55459_F | ggaatgggatgatagtggactg | 60.58 | 00291_55459_R | tctgtctctgtcttcttgcttgc | 59.94 | 147 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)31 | FAM | Succeed | Non Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | Unavailable |
| | 24 | - | - | Ba02148 | 02148_80143_F | catgcatgaataccaagcaagt | 60.02 | 02148_80143_R | aggaaataccagctaccgcata | 60.01 | 110 | 2 | perfect | (AC)17 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 22 | 31.1 | 13.1 | Ba00273 | 00273_203030_F | acccagaaaagcaagttacagc | 59.83 | 00273_203030_R | ggacaatgaaaagacatacgca | 60 | 137 | 2 | perfect | (GT)18 | NED | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 22 | 49.4 | 23.9 | Ba00272 | 00272_69652_F | atttctagccaaggctcatttg | 59.76 | 00272_69652_R | catttagcaggtcacaaaccaa | 60.03 | 268 | 2 | perfect | (GT)15 | PET | Failed | - | - | - | - | |

表 4-3　第 4 章の解析家系で用いた PCR プライマー情報（続き）

| Multiplex No. | Linkage Group | Genetic Distance (cM) | | Scaffold ID | Forward Primer ID | Forward Primer Sequences (5'-3') | Forward Primer Tm (°C ) | Reverse Primer ID | Reverse Primer Sequences (5'-3') | Reverse Primer Tm (°C ) | Expected Allele Size (bp) | MS Unit Size | Perfect or Imperfect | Simple Notation | Fluorescent | PCR Amplification | Polymorphism | | | | Multiplex PCR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Male | Female | | | | | | | | | | | | | | Female | Male | Either | Both | |
| 46 | 1 | - | 40.0 | Ba00729 | 00729_16418_F | gctgattgagcctacaagcg | 61.07 | 00729_16418_R | gagatcacaaaggcaaaaggac | 60.12 | 107 | 2 | imperfect with gaps | (GT)26 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Unavailable |
| | 1 | 5.4 | 40.0 | Ba00761 | 00761_181066_F | gacacccctctctactacacg | 60.05 | 00761_181066_R | atgccctgcatctgtttaaagt | 60.03 | 125 | 2 | perfect | (AC)13 | VIC | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 1 | 2.2 | 24.9 | Ba00781 | 00781_193138_F | aggattctgagtgacggaacat | 60 | 00781_193138_R | agccaagcaggaagtgtgag | 60.59 | 134 | 2 | perfect | (TG)19 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| 47 | 1 | 2.2 | - | Ba00055 | 00055_557397_F | cacctggtaagtgttaaagggg | 59.79 | 00055_557397_R | gaacagcttgctgtgcataatc | 59.92 | 122 | 2 | perfect | (GT)14 | FAM | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Unavailable |
| | 1 | - | 33.5 | Ba00319 | 00319_291741_F | cagtgtgtctcaagggagtctg | 59.94 | 00319_291741_R | cgcacataacttctctcattgc | 59.91 | 114 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)20 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 1 | 4.3 | 38.9 | Ba00230 | 00230_325570_F | attttcctagtaacagggctca | 57.1 | 00230_325570_R | ctctctgccttggaaagacatt | 59.89 | 120 | 2 | perfect | (GT)16 | NED | Failed | - | - | - | - | |
| | 1 | 2.2 | 24.9 | Ba00307 | 00307_134557_F | tgctaaatcggtggagttcttt | 60.13 | 00307_134557_R | aggcaatgtttgagatgacctt | 60 | 129 | 2 | perfect | (AC)17 | PET | Succeed | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | Non Polymorphic | |
| 48 | 2 | - | - | Ba01488 | 01488_109263_F | aaaaggaacatggagatggaga | 59.94 | 01488_109263_R | cctgagttattcttcccaggtg | 59.99 | 234 | 2 | perfect | (CA)15 | FAM | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | Available |
| | 2 | - | - | Ba00993 | 00993_79659_F | agagtcgtggagatgaaccatt | 60 | 00993_79659_R | ctgtcctaccattcctactggc | 60.02 | 261 | 2 | imperfect with no gaps | (CA)32 | VIC | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 2 | - | 35.8 | Ba00101 | 00101_439063_F | gcaagtatgttggagctctgtg | 59.94 | 00101_439063_R | agcagtaaaaagtggaaatgcc | 59.67 | 140 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)17 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 2 | - | - | Ba00215 | 00215_56434_F | ctcaaacttctcccagtcatc | 60.11 | 00215_56434_R | cagtgaccgtgtcattcatctc | 60.58 | 121 | 2 | perfect | (AC)14 | PET | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| 49 | 2 | - | - | Ba01907 | 01907_4198_F | cctgtttggattgttgggtaat | 59.98 | 01907_4198_R | gagagacacccctctgtgaaac | 60.16 | 137 | 2 | imperfect with no gaps | (AC)19 | FAM | Failed | - | - | - | - | Unavailable |
| | 2 | 3.2 | - | Ba00420 | 00420_110640_F | tctctctcctctctctctctc | 59.13 | 00420_110640_R | agggattagggaggttcaaaaa | 60.17 | 111 | 2 | perfect | (CA)14 | VIC | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic | Polymorphic | Non Polymorphic | |
| | 2 | - | - | Ba00568 | 00568_212794_F | gtttgtccagtaacccaatggt | 60.02 | 00568_212794_R | tcaggatgctgactcctgtaaa | 59.88 | 168 | 2 | imperfect with no gaps | (TG)17 | NED | Succeed | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | Polymorphic | |
| | 2 | - | - | Ba01907 | 01907_78345_F | tatgtcacagctggggatactg | 60.02 | 01907_78345_R | actgttgctggacacagaagaa | 59.95 | 252 | 2 | imperfect with no gaps | (GT)24 | PET | Succeed | Polymorphic | Non Polymorphic (Null Alleles) | Polymorphic | Non Polymorphic | |

表 4-3　第 4 章の解析家系で用いた PCR プライマー情報（続き）

多重比較の補正として、ボンフェローニの補正法を適用した。有意水準は、5%、1%、0.1%の 3 段階とした。

QTL 解析

連鎖地図の作成によって算出された遺伝距離（cM）、各個体の全長データ（mm）を R-QTL[93]に入力し、Composite interval mapping 法によって QTL 解析した。permutation test を 1,000 回行うことにより、ゲノムワイドにおける有意水準 5%の LOD スコア値を算出した。また、クロモゾームワイドにおける有意水準 1%の LOD スコア値を同様に算出した。

QTL 上に位置する MS マーカーの表現型への効果は、各個体の表現型値（死亡日）をアレル別に分け、平均値と標準偏差を求めることで調べた。また統計処理は、R を用いた *U* 検定（ウィルコクソンの順位和検定）により行った。

イリドウイルス耐性に関与する遺伝子候補の探索

クロマグロ概要ゲノム解読情報[34]を参照し、雌親由来連鎖群 1 の QTL 領域近傍に配置されている 2 座位の MS マーカーが由来するスキャフォルドにコードされた遺伝子情報について調べた。GO（Gene Ontology）解析には、CLC Genomics Workbench にプラグインされた Blast2GO PRO を用いた。GO term の付加は、クロマグロ遺伝子のアミノ酸配列を用いて、BLAST 解析、Mapping、アノテーション付

加の流れで行った。その後、Enrichment analysis を Fisher exact test によって行った。

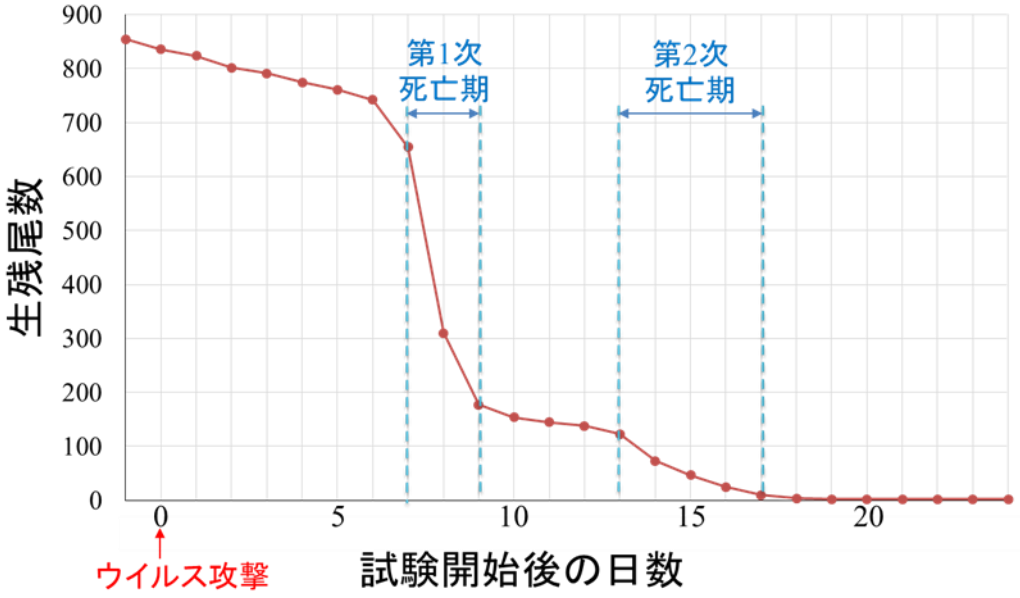
## 4-3　結果

感染試験結果

複数の天然親魚群に由来する F1 稚魚 853 尾を用いた。試験結果のグラフを図 3-1 に示す。生残尾数を縦軸に、試験開始後の日数を横軸に表した。魚体の平均全長は 6.3 cm であった。ウイルス攻撃は 45 日齢に行い、攻撃開始時の尾数は 836 であった。ウイルス攻撃開始までの 1 日間に、自然減耗により 19 尾が死亡した。1 日あたりの自然減耗率を算出したところ、2.2%となった。また、ウイルス感染による明確な死亡ピークが現れるまでの 7 日間に、累計 113 尾が死亡した。この値から再度 1 日あたりの自然減耗率を算出したところ、1.9%となり、初日とほぼ変わらない値が得られた。

ウイルス攻撃開始後 7 日目から 9 日目の間に、第 1 次の死亡ピークが現れた。この際に死亡した尾数は 465 尾となり、全体の約 8 割に相当する（図 4-1A）。一旦弊死は穏やかになったが、試験開始後 14 日目（59 日齢）から 19 日目（64 日齢）にかけて再び死亡ピークが生じた。この第 2 次の死亡ピークにより、ほぼ全個体が死亡した（図 4-1B）。本感染試験結果から、大きく分けて感染初期（試験開始後 6 日目から 9 日目）に死亡する群と後期（試験開始後 10 日目以降）に死亡する群が存在したことが分かった。死亡魚の症状としては、遊泳不活発、貧血、脾臓の肥大、および腹腔内出血などが認められた（図 4-2）。

A.




B.

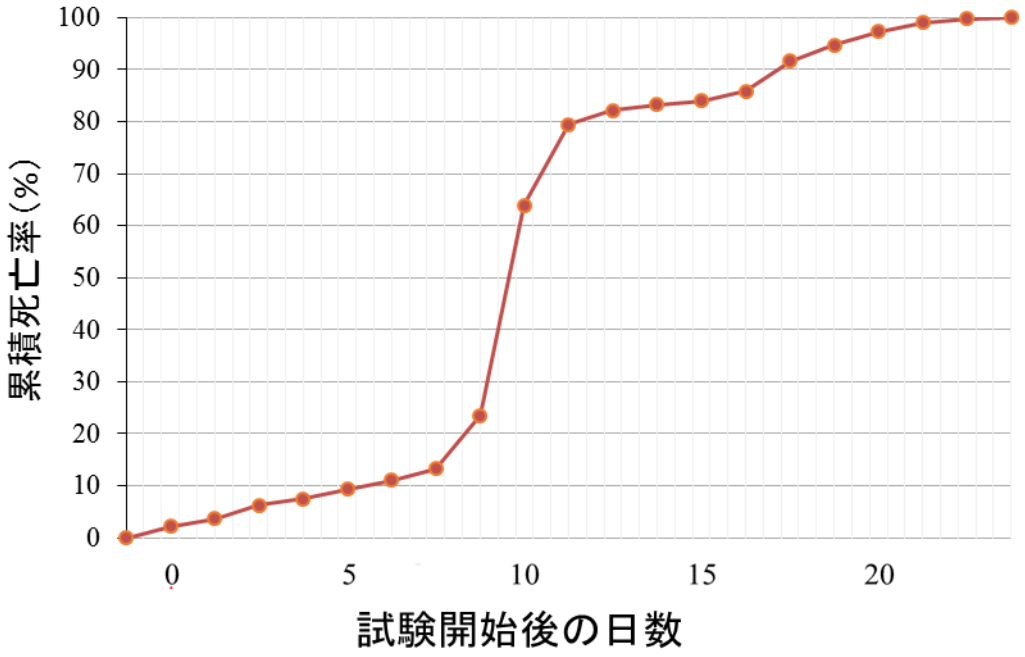
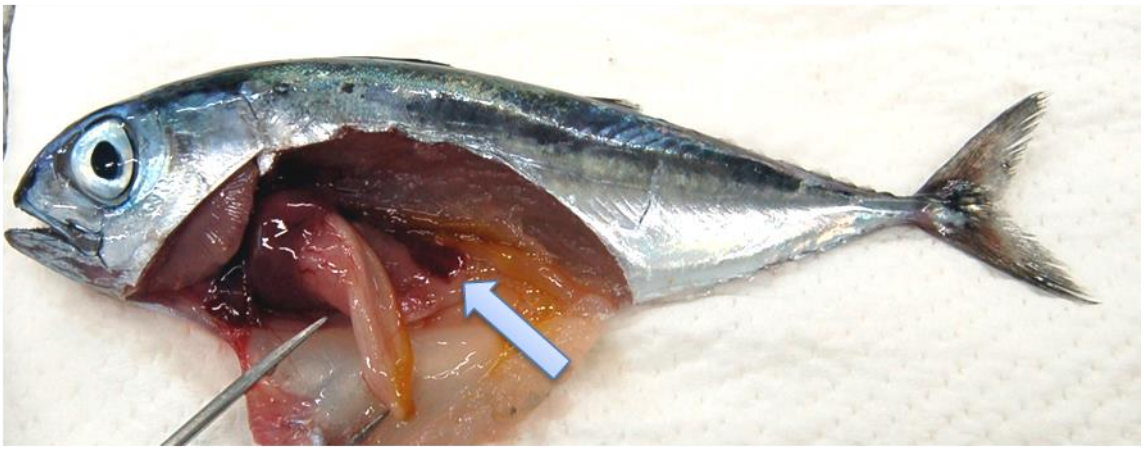
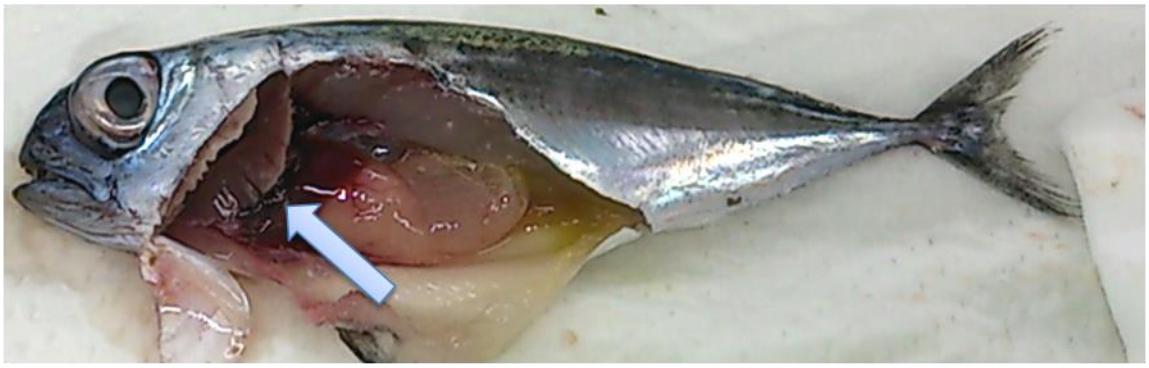



図 4-1　RSIV 感染試験結果
日数は、ウイルス攻撃開始後の日数とする。その上に、日齢も併せて示す。A. 生残尾数　B. 累積死亡率

（A）



（B）



（C）

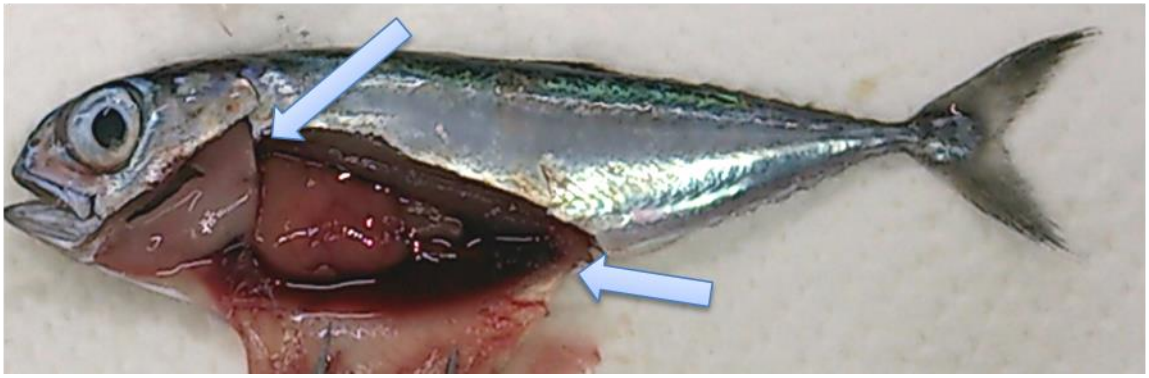


図 4-2　RSIV 感染死亡魚の症状

RSIV 感染試験で死亡した病魚の症状を示す。症状の顕著な部位を、矢印で強調した。（A）脾臓の肥大（B）貧血（C）腹腔内出血（写真提供：国立研究開発法人　水産総合研究センター　増養殖研究所　米加田博士）

家系判別の結果

感染試験に供試された計 836 個体のうち、ウイルス攻撃開始後 8 日目から 17 日目までに回収した計 273 個体の死亡魚（表 4-2）について、11 座位の MS マーカーを用いた家系判別を行った。MS マーカーのアレルデータから PARFEX により家系判別した結果、雄親 11 個体、雌親 7 個体に由来する 15 家系から構成されていた（表 4-4, 図 4-3）。各家系の最小尾数は 1（家系 No. 2, No. 9, No. 12）、最大尾数は 137（家系 No. 3）であった。

次に、雄親と雌親それぞれについて、273 個体の稚魚産卵に対する寄与率を算出した（図 4-4）。雄親の寄与率は最小で No. 6 の 0.4%、（稚魚 1 個体）、最大で No. 2 の 50.9%（稚魚 137 個体。家系 No. 3 のみ。）となった。また、雌親の寄与率は最小で No. 1 と No. 6 の 0.7%（稚魚 2 個体。）、最大で No. 2 の 56.8%（稚魚 155 個体。家系 No. 2 から No. 5 の計 4 家系。）となった。

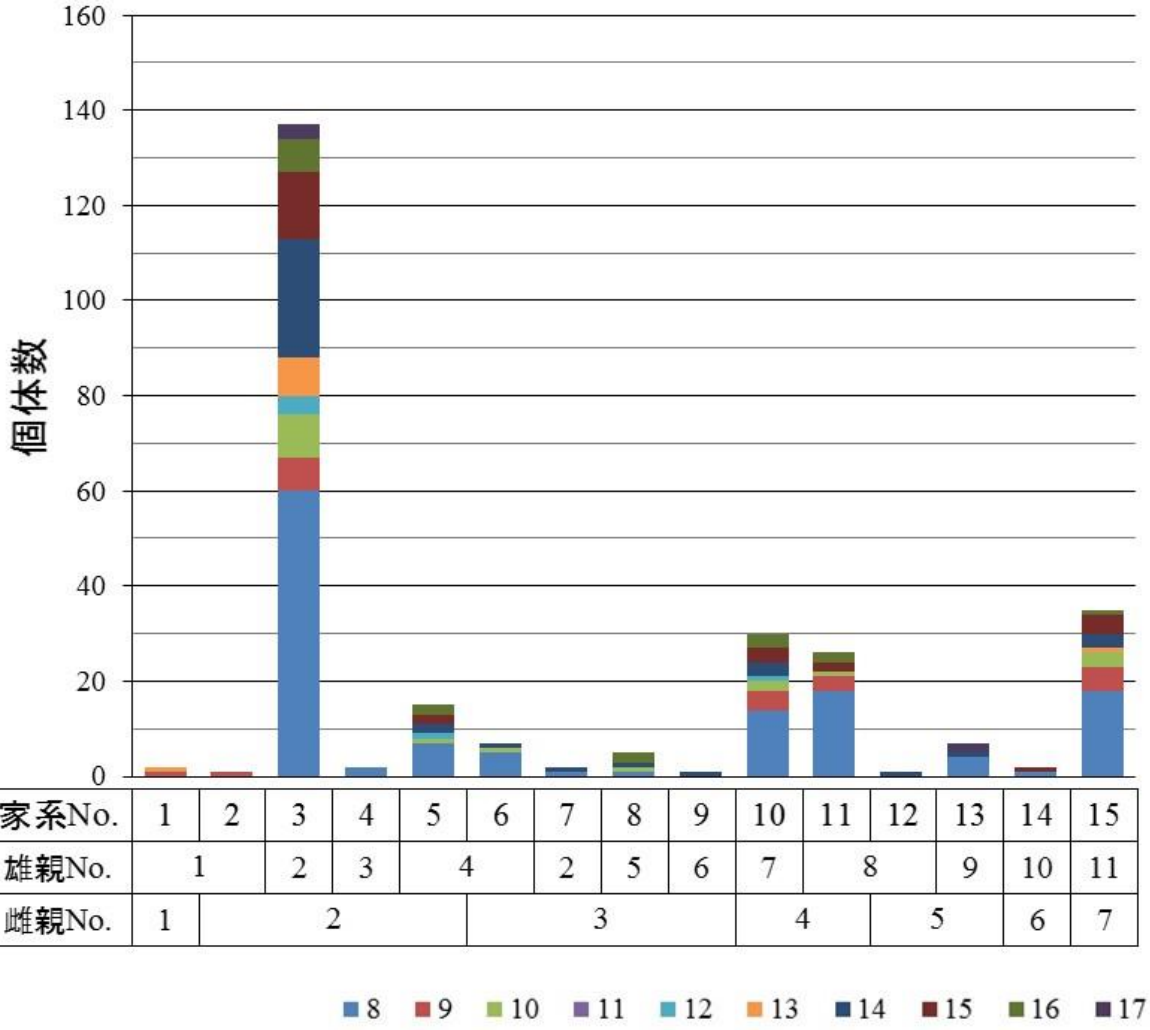
特に、家系 No. 3（雄親 No. 2, 雌親 No. 2）は最も多い 137 個体の稚魚から構成されており、この後の遺伝解析を行う上で必要個体数が多いことから適していると判断した。この 137 個体の稚魚のうち、東京海洋大学に送付された 130 個体をその後の解析に用いた。

ウイルス定量

家系判別により得られた同胞 130 個体の中には、マダイイリドウイルス感染では

| 雄親 | | 雌親 | | 同胞 | |
|---|---|---|---|---|---|
| ID | 番号 | ID | 番号 | 番号 | 尾数 |
| P6_275 | 1 | P6_035 | 1 | 1 | 2 |
| P6_275 | 1 | P6_015 | 2 | 2 | 1 |
| P6_342 | 2 | P6_015 | 2 | 3 | 137 |
| P6_473 | 3 | P6_015 | 2 | 4 | 2 |
| P6_336 | 4 | P6_015 | 2 | 5 | 15 |
| P6_336 | 4 | P6_212 | 3 | 6 | 7 |
| P6_342 | 2 | P6_212 | 3 | 7 | 2 |
| P6_297 | 5 | P6_212 | 3 | 8 | 5 |
| P6_302 | 6 | P6_212 | 3 | 9 | 1 |
| P6_432 | 7 | P6_262 | 4 | 10 | 30 |
| P6_202 | 8 | P6_262 | 4 | 11 | 26 |
| P6_202 | 8 | P6_412 | 5 | 12 | 1 |
| P6_387 | 9 | P6_412 | 5 | 13 | 7 |
| P6_365 | 10 | P6_148 | 6 | 14 | 2 |
| P6_355 | 11 | P6_195 | 7 | 15 | 35 |
| 計 | | | | | 273 |

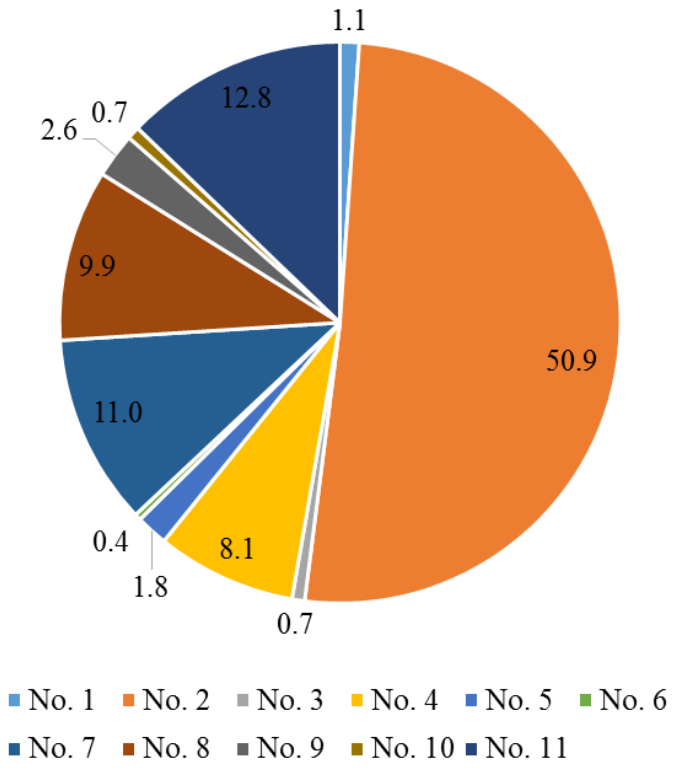
表 4-4　仔魚集団の家系組成




| 家系No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 雄親No. | 1 | | 2 | 3 | 4 | | 2 | 5 | 6 | 7 | 8 | | 9 | 10 | 11 |
| 雌親No. | 1 | 2 | | | | 3 | | | | 4 | | 5 | | 6 | 7 |

図 4-3　家系判別の結果

A.




B.

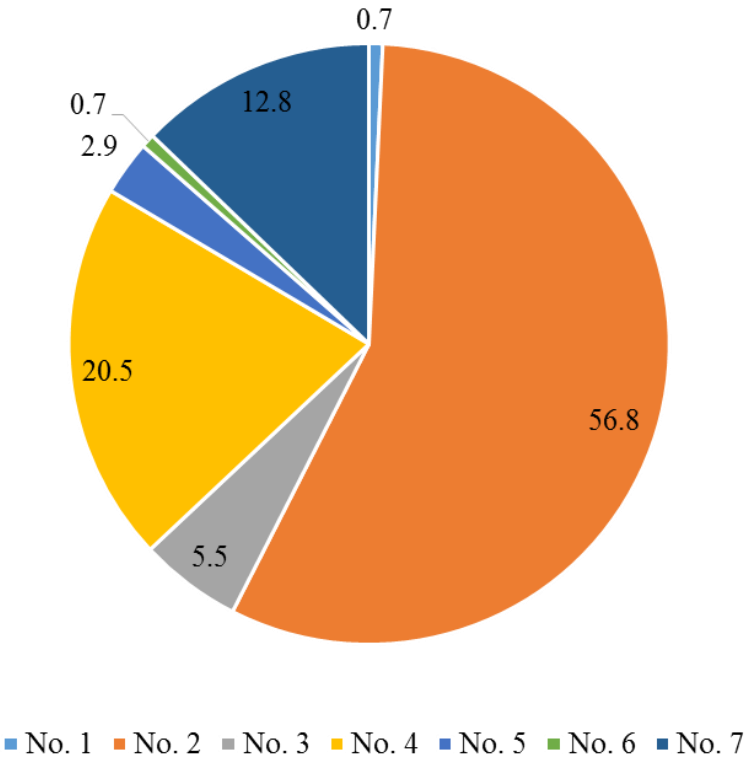



図 4-4　稚魚産卵に対する親魚の寄与率
家系判別により明らかになった、273 個体の稚魚産卵に対する親魚の寄与率を百分率（%）で示す。（A）雄親の寄与率　（B）雌親の寄与率

なく、自然減耗により死亡した個体が含まれている可能性がある。自然減耗魚を用いると、QTL の解析結果に影響を与え得る。そこで、ウイルス感染の度合いを確かめるために、リアルタイム PCR によりウイルス量の定量を行った。全個体について、ウイルス DNA を標的とした定量結果を図 4-5 に示す。DNA 1 mg あたりのコピー数を求めた結果、最小で $3.0\times10^{10}$ RSIV genome copies/DNA mg、最大で $3.9\times10^{12}$ RSIV genome copies/DNA mg、平均で $6.5\times10^{11}$ RSIV genome copies/DNA mg であった。また、ウイルス DNA を標的とし、最も発現量の低いものを 1 と置いたときの相対発現量を求めた結果、最大値は 128.0 倍、平均値は 21.5 倍、中央値は 17.3 倍となった。感染試験開始 8 日目から 18 日目の死亡日別に個体を分類し、クラスカル･ウォリス検定により群間における発現量の差の有無を調べた。その結果、p 値は 0.29 となり、特定の群間における有意な差は見られなかった。

連鎖解析の結果

各 MS マーカーについて取得されたデータの雄親と雌親についてジェノタイピングを行った結果、計 190 マーカーのうち、172 マーカーで増幅が確認された。増幅した 172 マーカーのうち、雄親で 123 マーカー、雌親で 128 マーカーについて多型性が得られた。雄親雌親のいずれかで多型性が得られたのは 152 マーカーであり、約 80 %の MS マーカーが QTL 解析家系で有効であることが分かった。また、雄親雌親で共通して多型性が得られたのは 100 マーカーであった。

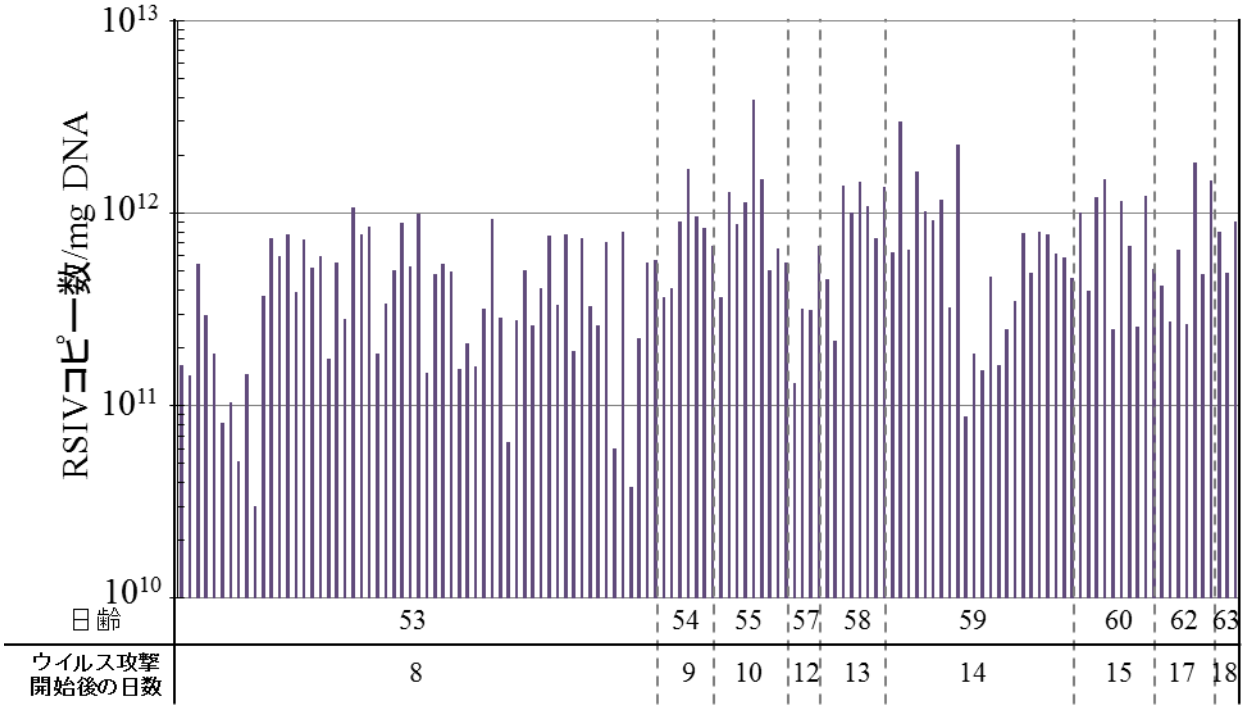



図 4-5　マダイイリドウイルス DNA の定量結果

多型性が得られた計 152 座位の MS マーカー情報を元に、MapDisto ソフトウェアを用いて、本解析家系での各連鎖群における遺伝距離（cM）を新たに算出し、雄雌連鎖地図を作成した。作成した連鎖地図の統計量を表 4-5 に、連鎖地図を描画したものを図 4-6 に示す。雄に由来する連鎖地図では 1 連鎖群あたり平均 5.1 マーカー、雌に由来する連鎖地図では 1 連鎖群あたり平均 5.3 マーカーが配置された。雄連鎖地図 1 連鎖群あたりの最小マーカー数は 2（連鎖群 22）、最大マーカー数は 11（連鎖群 2）となった。また、雌連鎖地図 1 連鎖群あたりの最小マーカー数は 2（連鎖群 5, 17）、最大マーカー数は 14（連鎖群 2）となった。

雄連鎖地図の総遺伝距離は 888.5 cM、雌連鎖地図の総遺伝距離は 1121.8 cM と算出された。マーカー間の平均遺伝距離は、雄連鎖地図で 7.3 cM、雌連鎖地図では 8.8 cM であった。雄連鎖地図におけるマーカー間の遺伝距離は、最小で 0 cM（連鎖群 1：00319_291741 - 00606_117549 間；連鎖群 6：00169_341702 - 00123_167823 間；連鎖群 18：01267_129645 - 00374_206401 間）、最大で 39.8 cM（連鎖群 14：99533_2282 - 00004_886445 間）であった。雌連鎖地図におけるマーカー間の遺伝距離は、最小で 0 cM（連鎖群 18 : 00496_15884 - 00386_215848 - 00665_91072 間）、最大で 52.9 cM（連鎖群 17：00181_145357 - 00127_236472 間）であった。

メンデル遺伝に従ったバッククロス分離モデル（1：1 分離）から 5%水準で有意に逸脱するマーカーを探索したところ、雄連鎖地図で 4 マーカー、雌連鎖地図で 19 マーカーが見つかった（図 4-6, 表 4-6.）。

| Genetic map | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| LGs | Male | | | Female | | | Total no. of markers |
| | Genetic distance (cM) | No. of markers | Marker interval (cM) | Genetic distance (cM) | No. of markers | Marker interval (cM) | |
| LG1 | 39.0 | 8 | 5.6 | 55.2 | 10 | 6.1 | 11 |
| LG2 | 43.3 | 11 | 4.3 | 63.8 | 14 | 4.9 | 14 |
| LG3 | 39.4 | 4 | 13.1 | 48.6 | 4 | 16.2 | 4 |
| LG4 | 60.5 | 6 | 12.1 | 54.8 | 3 | 27.4 | 6 |
| LG5 | 10.1 | 3 | 5.0 | 19.4 | 2 | 19.4 | 3 |
| LG6 | 44.4 | 7 | 7.4 | 38.2 | 5 | 9.5 | 8 |
| LG7 | 29.6 | 5 | 7.4 | 46.9 | 4 | 15.6 | 5 |
| LG8 | 7.7 | 3 | 3.9 | 49.9 | 4 | 16.6 | 5 |
| LG9 | 43.9 | 5 | 11.0 | 54.0 | 4 | 18.0 | 6 |
| LG10 | 28.1 | 5 | 7.0 | 55.5 | 4 | 18.5 | 5 |
| LG11 | 20.2 | 4 | 6.7 | 41.9 | 5 | 10.5 | 5 |
| LG12 | 57.0 | 5 | 14.3 | 49.5 | 4 | 16.5 | 5 |
| LG13 | 78.1 | 5 | 19.5 | 54.2 | 5 | 13.5 | 6 |
| LG14 | 40.6 | 3 | 20.3 | 37.5 | 4 | 12.5 | 4 |
| LG15 | 24.0 | 5 | 6.0 | 51.2 | 5 | 12.8 | 6 |
| LG16 | 37.2 | 4 | 12.4 | 18.7 | 3 | 9.3 | 5 |
| LG17 | 21.1 | 3 | 10.5 | 52.9 | 2 | 52.9 | 4 |
| LG18 | 31.0 | 9 | 3.9 | 55.3 | 11 | 5.5 | 11 |
| LG19 | 31.5 | 5 | 7.9 | 50.5 | 8 | 7.2 | 9 |
| LG20 | 58.8 | 5 | 14.7 | 40.7 | 6 | 8.1 | 8 |
| LG21 | 40.0 | 7 | 6.7 | 63.3 | 8 | 9.0 | 8 |
| LG22 | 28.0 | 2 | 28.0 | 51.8 | 4 | 17.3 | 4 |
| LG23 | 30.6 | 5 | 7.6 | 28.9 | 4 | 9.6 | 5 |
| LG24 | 44.7 | 4 | 14.9 | 39.6 | 5 | 9.9 | 5 |
| Total | 888.5 | 123 | 7.3 | 1121.8 | 128 | 8.8 | 152 |

表 4-5　QTL 解析家系における雄雌連鎖地図の統計量

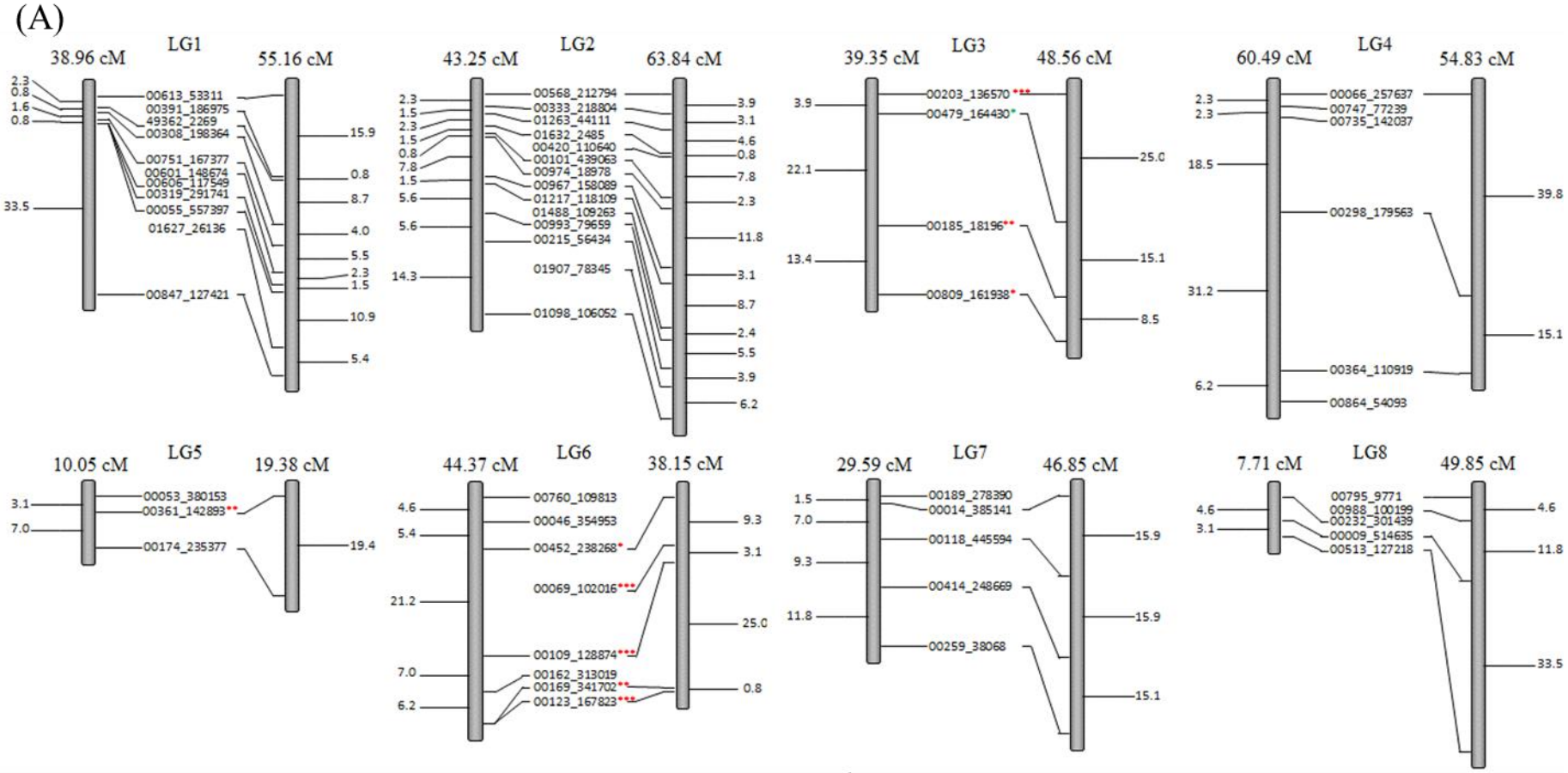



図4-6　RSIV感染試験家系における太平洋クロマグロの雄雌連鎖地図
左右のバーは、それぞれ雄連鎖群、雌連鎖群を示す。コサンビ関数で算出した隣接マーカー間の遺伝距離（cM）は両端に示す。雄雌連鎖群に共通して配置されたマーカーは、線で結んだ。赤いアスタリスクは、雌親の連鎖地図においてメンデルの1:1分離から有意に逸脱が見られたマーカーを表す。（A）連鎖群1から連鎖群8。

(B)

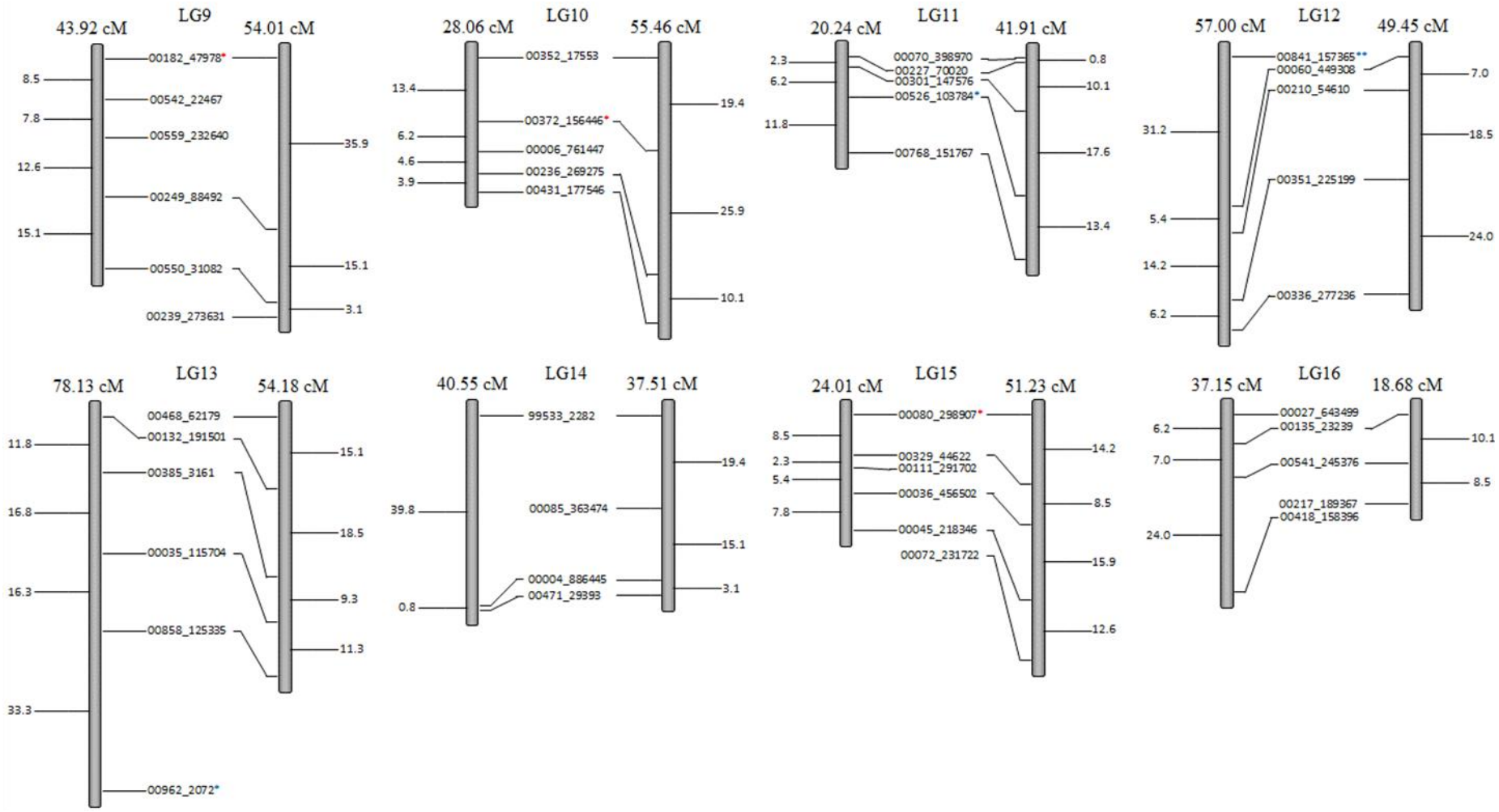



図4-6　RSIV感染試験家系における太平洋クロマグロの雄雌連鎖地図（続き）
（B）連鎖群9から連鎖群16。

(C)

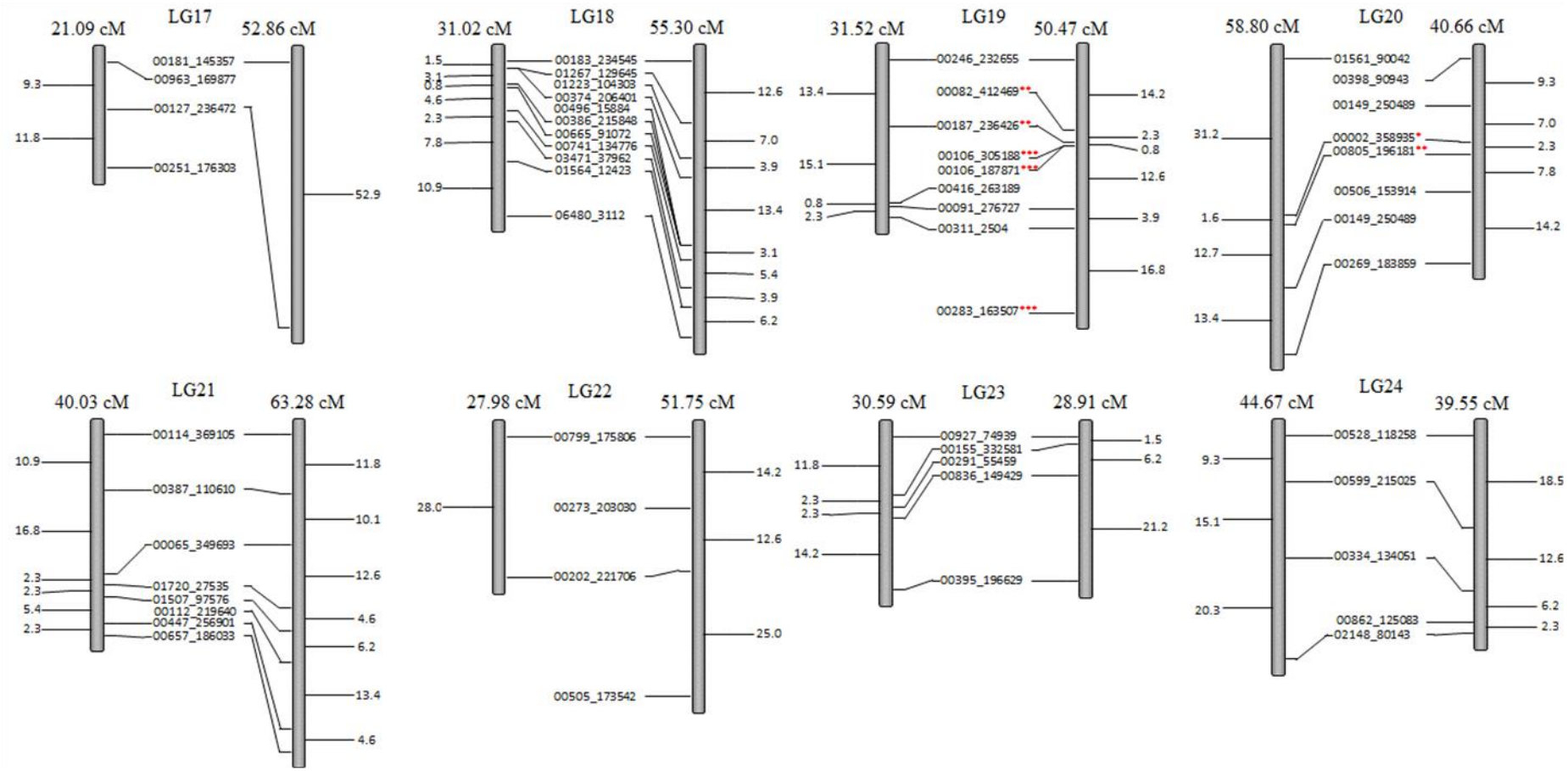



図4-6　RSIV感染試験家系における太平洋クロマグロの雄雌連鎖地図（続き）
（C）連鎖群17から連鎖群24。

| 雄雌 | 連鎖群 | Marker | $\chi^2_{1:1}$ | $p$ | 逸脱 |
|---|---|---|---|---|---|
| 雄 | LG3 | 00479_164430 | 14.9 | 1.1E-04 | * |
| 雌 | LG3 | 00479_164430 | 13.6 | 2.3E-04 | * |
| 雌 | LG3 | 00185_18196 | 17.7 | 2.6E-05 | ** |
| 雌 | LG3 | 00809_161938 | 13.6 | 2.3E-04 | * |
| 雌 | LG5 | 00361_142893 | 16.3 | 5.5E-05 | ** |
| 雌 | LG6 | 00452_238268 | 13.6 | 2.3E-04 | * |
| 雌 | LG6 | 00069_102016 | 25.9 | 3.6E-07 | *** |
| 雌 | LG6 | 00109_128874 | 29.6 | 5.4E-08 | *** |
| 雌 | LG6 | 00169_341702 | 19.2 | 1.2E-05 | ** |
| 雌 | LG6 | 00123_167823 | 20.8 | 5.1E-06 | *** |
| 雌 | LG9 | 00182_47978 | 14.9 | 1.1E-04 | * |
| 雌 | LG10 | 00372_156446 | 14.9 | 1.1E-04 | * |
| 雄 | LG11 | 00526_103784 | 13.6 | 2.3E-04 | * |
| 雄 | LG12 | 00841_157365 | 19.2 | 1.2E-05 | ** |
| 雄 | LG13 | 00962_2072 | 33.5 | 7.1E-09 | *** |
| 雌 | LG15 | 00080_298907 | 13.6 | 2.3E-04 | * |
| 雌 | LG19 | 00082_412469 | 17.7 | 2.6E-05 | ** |
| 雌 | LG19 | 00187_236426 | 19.2 | 1.2E-05 | ** |
| 雌 | LG19 | 00106_305188 | 20.8 | 5.1E-06 | *** |
| 雌 | LG19 | 00106_187871 | 20.8 | 5.1E-06 | *** |
| 雌 | LG19 | 00283_163507 | 31.5 | 2.0E-08 | *** |
| 雌 | LG20 | 00805_196181 | 16.3 | 5.5E-05 | ** |
| 雌 | LG20 | 00002_358935 | 14.3 | 1.5E-04 | * |

表 4-6　分離比異常を示した MS マーカー情報

イリドウイルス感染試験家系における本連鎖地図により、クロマグロ概要ゲノム配列を構成するスキャフォルドのうち、151 本が配置された。連鎖群 19 に配置された 00106_305188, 00106_187871 の 2 マーカーは、同じスキャフォルド Ba00106 に位置するので、配置された全スキャフォルド数は全マーカー数 152 本よりも 1 本少なくなっている。

QTL 解析の結果

雄親由来の連鎖群について、Permutation test を 1,000 回行い、クロモゾームワイドの有意水準 1%とゲノムワイドの有意水準 5 %の LO スコア閾値を算出したところ、それぞれ 1.92 と 2.72 となった。Composite Interval Mapping の結果、雄親由来の全連鎖群では、このそれぞれの有意水準以上の LOD スコアを示すピークは検出されなかった（図 4-7）。最大の LOD スコアを示したものは連鎖群 5 の 00174_235377 マーカーであり、LOD スコアは 1.52 と求められた。

雌親由来の連鎖群についても、雄親由来の連鎖群の場合と同様に Permutation test を 1,000 回行い、クロモゾームワイドの有意水準 1%とゲノムワイドの有意水準 5 %の LOD スコア閾値を算出したところ、それぞれ 2.03 と 2.77 であった。Composite Interval Mapping を行った結果、雌親由来の連鎖群 1 においてクロモゾームワイドの有意水準 1 %以上で有意となり、2.22 の LOD スコアを示す QTL が検出された（図 4-8）。連鎖群 1 において、00601_148674 マーカーが位置する 35.0 cM 付近に LOD

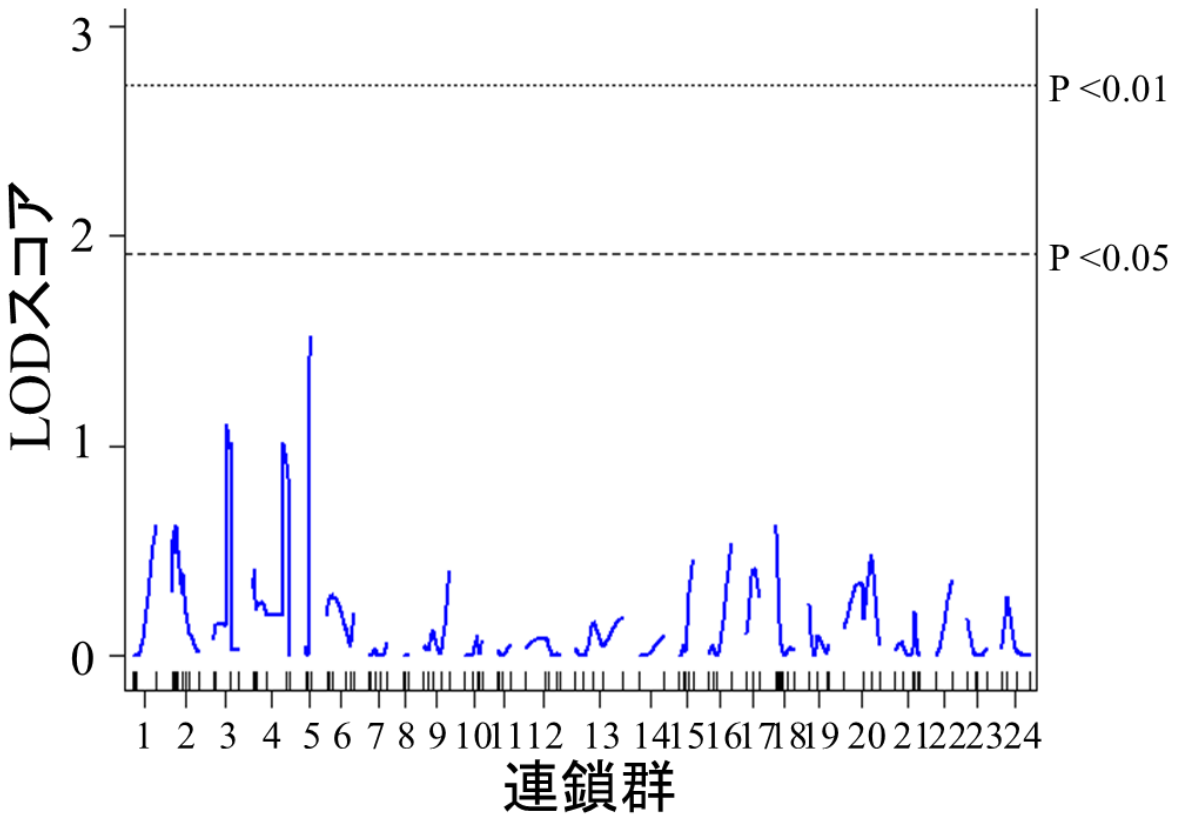



図 4-7 雄親由来全連鎖群の LOD スコアの分布
Composite Inteval Mapping による雄親全連鎖群解析結果。横軸に各連鎖群を、縦軸に LOD スコアを示す。Permutation test（1,000 回）により算出した有意水準 5 %と 1 %の LOD スコアを点線と破線でそれぞれ示した。

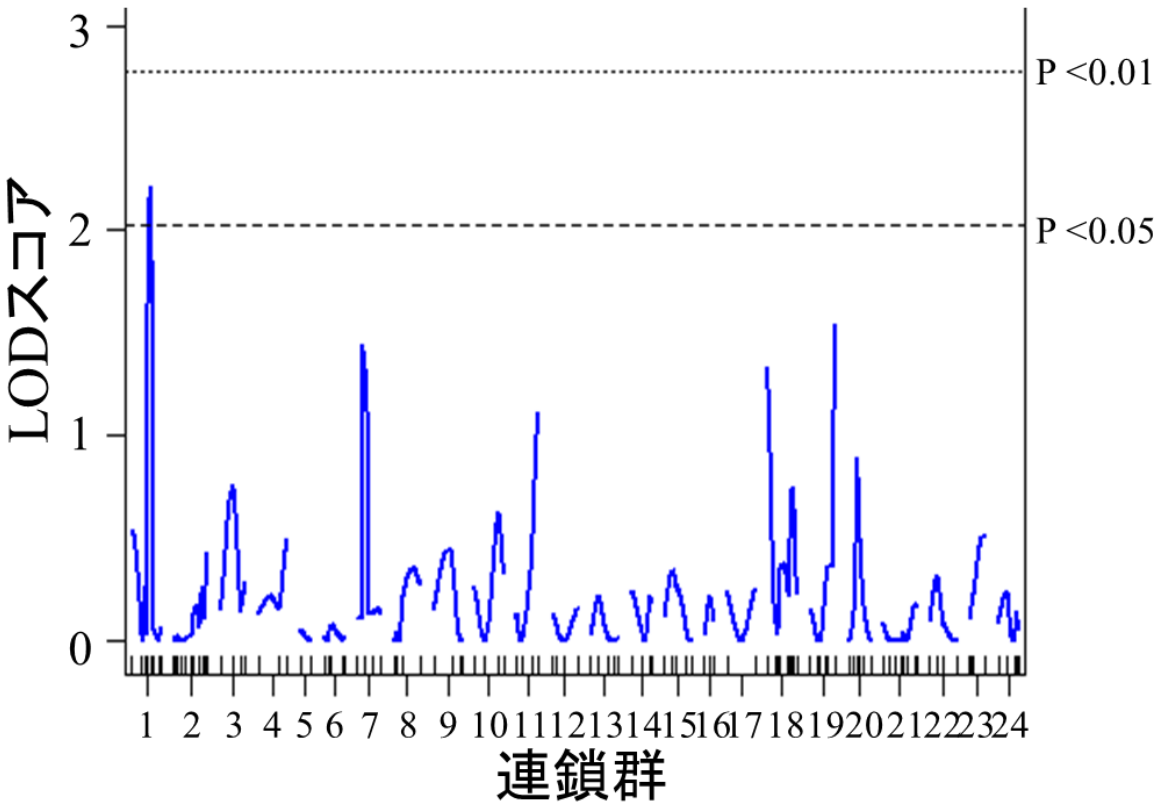



図 4-8 雌親由来全連鎖群の LOD スコアの分布
Composite Inteval Mapping による雌親全連鎖群解析結果。横軸に各連鎖群を、縦軸に LOD スコアを示す。Permutation test（1,000 回）により算出した有意水準 5 %と 1 %の LOD スコアを点線と破線でそれぞれ示した。連鎖群 1 で得られた LOD ピークの値を赤字で重ねて示す。

スコアのピークが存在していた（図 4-9）。

また雌親の連鎖地図において、クロモゾームワイドの有意水準 1%の LOD スコア値以上を示した 00601_148674 マーカーについては、雌親に由来する 2 種類のアレル別に死亡日を分け、各群における死亡日の分布を調べた。アレル別の死亡日の平均値を求めたところ、それぞれ 10.2 日と 11.8 日であった。よって、2 種類のアレル間では平均の死亡日は約 2 日間異なることが分かった（表 4-7）。ウィルコクソンの順位和検定の結果、p-value= 0.0025 となり、0.1%水準で有意な差が見られた。

イリドウイルス耐性に関与する遺伝子候補の探索

検出された 2 つの QTL の責任遺伝子の候補を探索するため、有意な LOD スコアを示した MS マーカーが存在するスキャフォルド上に存在する遺伝子について調べた。該当する MS マーカー座位、スキャフォルド番号、遺伝子 ID、Gene Ontology 解析結果について表に示す（表 4-8, 4-9, 4-10）。連鎖群 1 上の QTL 領域近傍に配置された 3 マーカー（00055_557397, 00319_291741, 00601_148674. 遺伝距離 35.0 cM から 38.8 cM に位置.）によって位置づけられた 3 個のスキャフォルド（Ba00055, Ba00319, Ba00601.）には、計 44 遺伝子がコードされていた。Blast2GO によりこれらの遺伝子を解析した結果、多く（26 遺伝子）が blast 検索でヒットしないものであったが、シグナル伝達に関わる遺伝子（表 4-8, ras and rab interactor 2.）や細胞間結合に関わる遺伝子（表 4-9, integrin alpha-1-like.）、自然免疫に関わる遺伝子（表

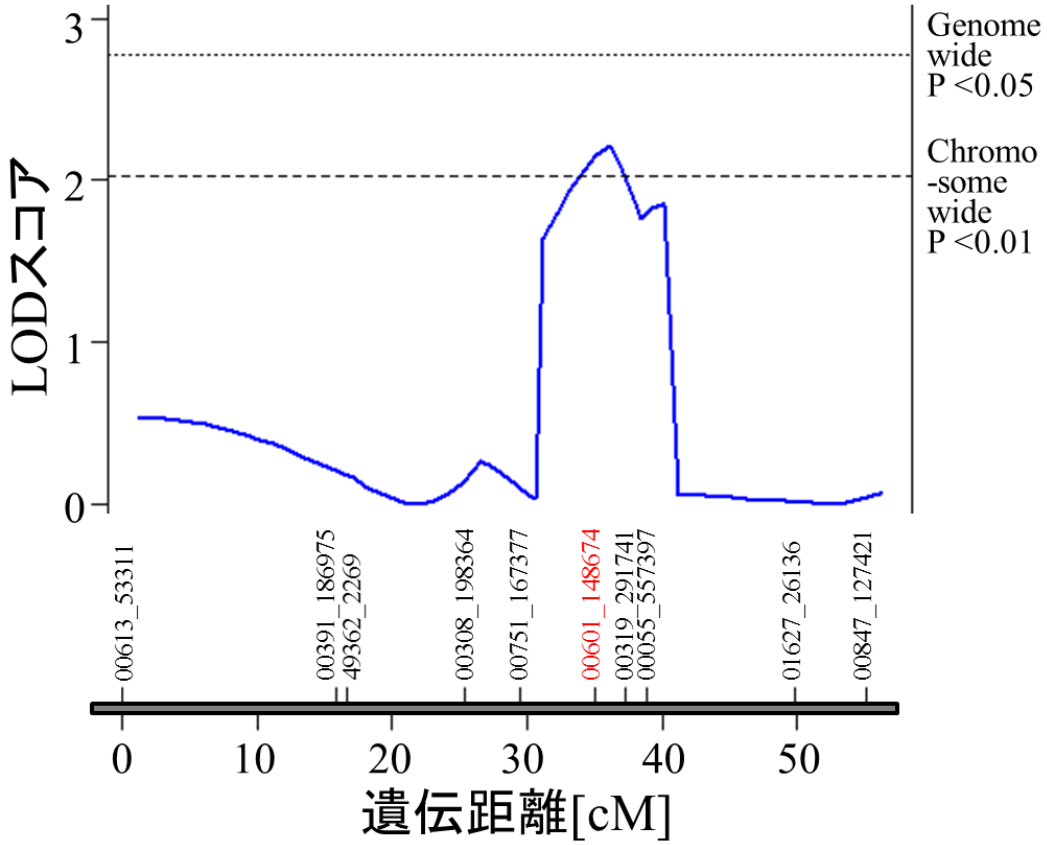



図 4-9 雌親連鎖群 1 の LOD スコア分布

Composite Inteval Mapping による雌親連鎖群 1 の解析結果。横軸に各連鎖群を、縦軸に LOD スコアを示す。Permutation test（1,000 回）により算出した有意水準 5 %と 1 %の LOD スコアを点線と破線でそれぞれ示した。

| | A | B |
|---|---|---|
| 8 | 41 | 18 |
| 9 | 4 | 3 |
| 10 | 5 | 4 |
| 11 | 0 | 0 |
| 12 | 4 | 0 |
| 13 | 6 | 2 |
| 14 | 15 | 9 |
| 15 | 1 | 9 |
| 16 | 2 | 5 |
| 17 | 0 | 2 |

表 4-7　00601_148674 マーカーの
雌親アレル別死亡日分布

| SeqName | Description | Length | #Hits | e-Value | sim mean | #GO | GO Names list |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| superscaffoldBa00000055_g911.t1 | ---NA--- | 84 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000055_g912.t1 | ---NA--- | 228 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000055_g913.t1 | ---NA--- | 575 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000055_g915.t1 | ---NA--- | 72 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000055_g916.t1 | ---NA--- | 129 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000055_g917.t1 | ras and rab interactor 2 | 1362 | 5 | 1.90E-33 | 47.80% | 1 | P:signal transduction |
| superscaffoldBa00000055_g918.t1 | elongation factor 1-alpha 1 | 320 | 20 | 3.90E-56 | 54.85% | 6 | P:translational elongation; F:GTP binding; F:translation elongation factor activity; F:GTPase activity; C:cytoplasm; F:nucleotide binding |
| superscaffoldBa00000055_g919.t1 | potassium voltage-gated channel subfamily kqt member 5-like isoform x3 | 706 | 20 | 6.70E-19 | 53.75% | 1 | P:transport |
| superscaffoldBa00000055_g920.t1 | ---NA--- | 84 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000055_g921.t1 | ---NA--- | 86 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000055_g922.t1 | regulating synaptic membrane exocytosis protein 1-like isoform x1 | 1075 | 20 | 3.10E-31 | 51.40% | 0 | - |
| superscaffoldBa00000055_g923.t1 | ---NA--- | 276 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000055_g924.t1 | ---NA--- | 237 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000055_g925.t1 | ---NA--- | 95 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000055_g926.t1 | ---NA--- | 292 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000055_g927.t1 | ---NA--- | 229 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000055_g928.t1 | ---NA--- | 277 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000055_g929.t1 | insulin-like growth factor-binding protein 4 isoform x1 | 179 | 20 | 1.80E-26 | 55.30% | 1 | F:insulin-like growth factor binding |
| superscaffoldBa00000055_g930.t1 | zinc finger protein aiolos-like | 374 | 20 | 1.40E-39 | 50.80% | 1 | F:binding |
| superscaffoldBa00000055_g931.t1 | protein af-17 | 581 | 20 | 6.10E-43 | 62.90% | 2 | F:metal ion binding; F:zinc ion binding |
| superscaffoldBa00000055_g932.t1 | ---NA--- | 48 | 0 | - | - | | - |

表 4-8　QTL 領域の遺伝子情報（ScaffoldBa00055）

| SeqName | Description | Length | #Hits | e-Value | sim mean | #GO | GO Names list |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| superscaffoldBa00000319_g3759.t1 | transcription factor sp6 | 209 | 20 | 8.90E-19 | 64.35% | 5 | F:metal ion binding; F:nucleic acid binding; P:positive regulation of cell proliferation; P:regulation of odontogenesis; C:nucleus |
| superscaffoldBa00000319_g3760.t1 | secernin-2 | 266 | 18 | 2.70E-46 | 50.17% | 2 | P:proteolysis; F:dipeptidase activity |
| superscaffoldBa00000319_g3761.t1 | ---NA--- | 176 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000319_g3762.t1 | ---NA--- | 454 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000319_g3763.t1 | group xiib secretory phospholipase a2-like protein | 143 | 20 | 2.90E-28 | 63.90% | 4 | F:phospholipase A2 activity; F:calcium ion binding; P:lipid catabolic process; C:extracellular region |
| superscaffoldBa00000319_g3764.t1 | ---NA--- | 228 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000319_g3765.t1 | integrin alpha-l-like | 805 | 20 | 1.80E-63 | 47.25% | 5 | P:integrin-mediated signaling pathway; C:integral component of membrane; P:cell adhesion; C:membrane; C:integrin complex |
| superscaffoldBa00000319_g3766.t1 | nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase | 203 | 17 | 4.80E-20 | 49.76% | 1 | F:catalytic activity |
| superscaffoldBa00000319_g3768.t1 | tho complex subunit 4 | 332 | 3 | 9.30E-12 | 61.67% | | - |
| superscaffoldBa00000319_g3769.t1 | ---NA--- | 176 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000319_g3770.t1 | ---NA--- | 59 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000319_g3771.t1 | ---NA--- | 110 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000319_g3772.t1 | ---NA--- | 325 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000319_g3773.t1 | regulatory-associated protein of mtor isoform x1 | 1122 | 20 | 1.30E-43 | 58% | 4 | C:intracellular membrane-bounded organelle; F:protein binding; P:single-organism cellular process; P:regulation of cellular process |

表 4-9　QTL 領域の遺伝子情報（ScaffoldBa00319）

| SeqName | Description | Length | #Hits | e-Value | sim mean | #GO | GO Names list |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| superscaffoldBa00000601_g5976.t1 | perforin-1-like | 322 | 20 | 3.20E-26 | 55.75% | | - |
| superscaffoldBa00000601_g5977.t1 | ---NA--- | 190 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000601_g5978.t1 | ---NA--- | 1141 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000601_g5979.t1 | ---NA--- | 158 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000601_g5981.t1 | ---NA--- | 361 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000601_g5982.t1 | chromobox protein homolog 8 | 238 | 4 | 1.10E-16 | 41.50% | 1 | C:nucleus |
| superscaffoldBa00000601_g5983.t1 | ---NA--- | 84 | 0 | - | - | | - |
| superscaffoldBa00000601_g5984.t1 | diacylglycerol kinase epsilon | 343 | 20 | 7.70E-70 | 53.95% | 10 | F:transferase activity; P:intracellular signal transduction; F:diacylglycerol kinase activity; P:phosphorylation; F:nucleotide binding; F:ATP binding; F:kinase activity; C:intracellular; P:protein kinase C-activating G-protein coupled receptor signaling |
| superscaffoldBa00000601_g5985.t1 | e3 ubiquitin isg15 ligase trim25-like isoform x1 | 382 | 11 | 2.70E-19 | 64.73% | 3 | F:metal ion binding; F:zinc ion binding; C:intracellular |

表 4-10　QTL 領域の遺伝子情報（Scaffold00601）

4-10, perforin-1-like）等が含まれていた。

## 4-4 考察

感染試験

本試験では、感染試験には 45 日齢の魚体を用い、ウイルス攻撃開始までの 1 日あたりの自然減耗率は 2.2%となった。また、ウイルス感染による明確な死亡ピークが現れるまでの 7 日間で算出した 1 日あたりの自然減耗率は、1.9%となった。クロマグロの自然減耗は他の魚種と比較して激しく、Sawada らによりこの時期（44 日齢から 74 日齢まで）の魚体の累積死亡率は 33.4%と報告されており[8]、1 日あたりの自然減耗率では 1.1%と計算される。孵化後 10 日目までの浮上死や沈降死による初期減耗は落ち着いてきている段階であるといえるが、一方で陸上水槽や海上生簀の壁面への衝突やイリドウイルス病の蔓延などにより死亡が生じ得る[8]。

特に、ウイルス攻撃開始後 7 日目から 9 日目の間に現れた第 1 次死亡期に死亡した魚体と、それ以降まで生残した個体間では、明確にウイルスに対する耐性に差があるものと考えられる。一方で、第 2 次死亡ピークは 2 次的な発症によるものと考えられた。第 1 次死亡ピークを乗り越えた後も、ウイルスは魚体内で排除されずに、留まっていたこととなる。特に、生簀内に死亡魚が混在している場合、生残魚もより高い濃度のウイルスに晒されることになるため、感染するリスクが高まる。この可能性は、ウイルス定量結果においても、後期に死亡した魚ほどウイルス量が高い傾向にあったことによっても裏付けられる。このように、第 1 次死亡ピークを乗り越えた魚も、その後ウイルス濃度が高まったため、最終的に耐性の閾値を超え

てしまい、死亡したものと考えられた。

家系判別

ウイルス攻撃開始後 8 日目から 17 日目までに回収した計 273 個体の死亡魚について家系判別を行ったところ、雄親 11 個体、雌親 7 個体からなる 15 家系からなることが分かった。目視による産卵状況の確認では、比較的少数の親魚の交配によると予想されたが、家系判別の結果に従うと、実際には雄雌合わせて計 18 個体の親魚が産卵に関与していたことになる。繁殖期に捕獲されるクロマグロ雄の多くは放精し性成熟が確認できる一方、雌は産卵期において個体毎に卵巣成熟度が大きく異なり、飼育下では、成熟する個体の割合が低いことが報告されている[7]。従って、雌の方が雄よりも産卵に関与する数が少なくなり、1 尾の雌に対して複数尾の雄が関わる産卵形式となり易いのかもしれない。今回の種苗生産においても雌親の方がその傾向が反映された可能性がある。

家系判別を行った稚魚 273 個体の産卵に関する、各親魚の寄与率を算出したところ、寄与率にはかなり偏りがあった。雄親では最小で 0.4 %、最大で 50.9 %、雌親では最小で 0.7%、最大で 56.8 %となっている。このうち雄雌でそれぞれ最大の寄与率を示した雄親 No. 3 と雌親 No. 2 に由来する家系 No. 3 が、稚魚全体の 50.2% となっている。したがって、家系の数では計 15 家系から構成されるものの、その約半分は、特定の雄親と雌親の交配による 1 家系が占めていることが分かる。

この傾向は連鎖地図作成家系抽出時の親子鑑定結果（第 2 章）とも一致しており、普遍的な養殖生簀でのクロマグロ産卵状況を反映するものかもしれない。

ウイルス定量

同胞関係にある 130 個体についてマダイイリドウイルスゲノムの遺伝子を標的に、ウイルス量の定量を行ったところ、DNA 1 mg あたりのコピー数は $3.0\times10^{10}$ から $3.9\times10^{12}$ の間で推移した。浸漬法による RSIV 感染により死亡した魚体の臓器から抽出された DNA を元に、リアルタイム PCR で定量を行った Ito らの実験では、DNA 1 mg あたりのコピー数は $7.3\times10^{6}$ から $5.8\times10^{9}$ 程度であることが報告されている。また、感染試験で生き残った魚体の中には、検出限界以下の魚が含まれるものの（ウイルスが体内から排除されたと考えられる）、比較的高いウイルスコピー数を示した魚（$3.5\times10^{5}$ から $6.8\times10^{8}$ 程度）も見られている[129]。したがって、Ito らの報告と比較して、本研究で検出されたウイルスコピー数は、それよりも遥かに高い値であることから、その基準でいえば確実にウイルス感染していると判断できる。ただし、本研究との相違点として、対象魚種としてブリ *Seriola quinqueradiata* を用いていること、調べた臓器に肝臓が含まれていないこと（尾鰭、鰓、脾臓、腎臓、心臓、腸）、標的として Major capsid protein をコードする MCP 遺伝子（GenBank: AB666333.1）を選んでいること等が挙げられる。より本研究の状況に近い知見に関しては、その他の報告が待たれる。

感染試験結果の項で求めた自然減耗率（1.9% /日）を元に、同胞 130 個体中に含まれる自然減耗魚の数を推定したところ、約 9 個体が含まれると算出された（表 3-6）。しかしながら、上記のウイルス定量結果では、全ての個体が高いウイルス量を示したことから、自然減耗魚と判断可能な個体は含まれていなかった。感染試験時に、仮に自然減耗で死亡する可能性のあった魚でも、ウイルス量が高い状況下においては、早期にウイルス感染し死亡してしまったのかもしれない。今回の感染試験では、感染試験区のみを用意し、ウイルス液を添加しないコントロール区を用意することは出来なかった。今後、感染試験区と、ウイルス液を添加しないコントロール区を両方設置した感染試験を行うことによって、ウイルス感染の効果をより正確に見積もることが出来ると考える。ただし、今回の感染試験は非常に大掛かりなものであり、場所や労力、飼育コスト等の面から、もう一つ水槽を増やすだけでも、実施にはやや困難な面もある。

ウイルス定量結果では、感染試験開始から時間が経過するにつれて、ウイルス量が高くなる傾向が見られた。RSIV ウイルス魚体内で増殖し、また試験水槽内で感染魚が増えてウイルスが濃縮される状況にあることが、その理由と考えられる。このことは、感染試験攻撃開始後 3 日目から 7 日目のウイルスコピー数が、攻撃 3 日目に $10^3$ 程度から始まり、7 日目に $10^8$ から $10^9$ 程度まで増加していることによっても裏付けられる（私信　研究開発法人　水産総合研究センター　増養殖研究所　米加田　徹　博士）。しかしながら、感染試験開始 8 日目から 18 日目の死亡日別に

個体を分類し、群間における発現量の差の有無検定したところ、特定の群間における有意な差は見られなかった。おそらく、各群のサンプル数が、統計的に十分でない（最小で 3 尾）ことから、有意差が得られなかったものと思われる。

ウイルス定量は感染魚から抽出された RNA を鋳型に、同 ORF458L 遺伝子を標的とした定量も行った（データは示さない）。RNA を用いた定量結果を選ばなかった理由を、以下に述べる。今回解析に用いたサンプルは、全てウイルス感染によって死亡した魚体の臓器に由来する。そのため、死亡後から取り上げまでに、活性化した DNA や RNA 分解酵素によって、核酸の分解が進んでいることが懸念された。特に物理的に不安的な RNA を定量に用いた場合では、RNA 分解酵素による影響を受けやすいと懸念された。また、相対定量のためにユビキチン遺伝子を選んだが、ユビキチンの発現量に対するイリドウイルス感染の影響に関しては、これまでに報告がないので不明である。このような理由から、DNA を用いた定量結果の方が、信頼度が高いものと判断した。RNA 定量と DNA 定量の結果を比較すると、個体ごとにパラレルな発現量にはならなかったが、統計的には有意な相関を示した。

連鎖解析の結果

本章の解析家系で多型性を示した計 152 座位の MS マーカーについて、各連鎖群における遺伝距離（cM）を再計算することにより、雄雌連鎖地図を得た。第 1 章で構築した雄雌連鎖地図が 470 MS マーカーから構成されていることから、約 3 割

の MS マーカーが配置された。

123 座位の MS マーカーからなる雄連鎖地図の総遺伝距離は 888.5 cM、128 座位からなる雌連鎖地図の総遺伝距離は 1121.8 cM であった。総遺伝距離を第 1 章で構築した雄雌連鎖地図（雄連鎖地図 992.9 cM, 雌連鎖地図 1332.9 cM）と比較すると、供試マーカー数が少ないためか、やや短くなっていることが分かる。雌地図は雄地図に比べて約 1.3 倍の遺伝距離となり、雌地図において組み換えが起こりやすくなる傾向は、第 1 章で構築した連鎖地図（雌地図は雄地図に対して約 1.4 倍）と変わらなかった。

マーカー間の遺伝距離は、雄連鎖地図で 0 から 39.8 cM の範囲であり、平均 7.3 cM であった。また雌連鎖地図で 0 から 52.9 cM の範囲であり、平均 8.8 cM であった。一般的に、マーカー間の遺伝距離が 20 cM 程度以上になると QTL の検出力が低下すると言われている[130]。このため、平均的なマーカー密度は問題ないと考えられるが、間隙が広く空いた領域の QTL については、検出出来ないものがある可能性がある。今後、第一章で構築したリファレンス地図や有用形質に関わる遺伝子をマッピングした地図を参考に、新たな MS マーカーを選出し解析を行うことにより、補完できるものと考えられる。

第 1 章で構築した雄親由来の連鎖群 1 は、5.4 cM と非常に短く、雄親生殖細胞の減数分裂において組み換えがほとんど起こらなかったことが示唆された。興味深いことに、本書で構築した雄親由来の連鎖群 1 においても、00055_557397 から

00613_53314 までの遺伝距離は 5.5 cM と非常に短くなった。末端の 00847_127421 マーカーの間は 33.5 cM と間隙が広く空いているが、第 1 章の連鎖群 1 では雌親でのみ多型性が得られているため、雄親側での配置については不明である。いずれにしても、雄親でマーカー間の組み換えが生じにくい領域が家系間で共通しているものと考えられる。

分離比異常を示すマーカーを探索したところ、雄連鎖地図で 4 マーカー、雌連鎖地図で 19 マーカー存在した。第 1 章で構築した連鎖地図では、分離比異常を示す 6 マーカーが、雌親連鎖群 19 の 2 つの領域に集中している様子が見られた。本章の連鎖地図においても、雌親の連鎖群 19 で 5 マーカー（00082_412469, 00187_236426, 00106_305188, 00106_187871, 00283_163507）が分離比異常を示していた。分離比異常を示す要因としては、劣性致死遺伝子などの分離比を歪める遺伝子の存在などが考えられている（清水, 遺伝子型データのまとめ方）。

QTL 解析の結果

Composite Interval Mapping によって、クロモゾームワイドの有意水準 1 %以上で有意となる QTL が、雌親由来の連鎖群 1 の 35.0 cM 付近に検出された。クロマグロにおいては耐病性の QTL 探索の報告はないため、本研究が初めての報告となる。本研究では、LOD スコアがゲノムワイドの 5%水準を超える、効果の大きな QTL を検出することは出来なかった。従来の QTL 解析は、表現型が明確に違いのある

2 系統を交配し、F2 もしくは BC 集団を解析することが多い。

本解析では、表現型（ウイルス耐性）について未選抜の天然個体を親魚に用いているために、QTL を検出することが比較的困難な状況であると言える。天然個体で QTL を検出することは、ブリのハダムシ耐性などの例で可能であることが立証されているものの[73]、モジャコ由来の天然魚を古典的選抜育種法により親魚として選抜し、その天然魚由来の F1 世代を解析個体として用いていることから、未選抜とは言えない。本解析で得られた連鎖群 1 の雌親に由来する 00601_148674 マーカーのアレル別に死亡日を分類した際、有意差が得られたことは、同一個体の対立遺伝子内で、ウイルス耐性に差がある可能性を示すものである。このような同一個体内の母型染色体、父型染色体それぞれに由来する対立遺伝子の遺伝的な差は、遺伝的多様性に富む天然個体ならではと考える。形質が明らかに異なる 2 系統を用いた解析ほどの効果をもたらす QTL は、現在のところ得られていないものの、系統作出や任意交配が困難な種を解析対象とする場合には、有効な手法であると思われた。QTL の効果の推定は、表現型を評価する精度によっても影響を受けるため、実際よりも QTL 効果が小さく見積もられてしまう可能性がある。今回の解析では、表現型の評価を死亡日で行っているが、それ以外の脾臓の肥大量やウイルス量など、他の評価項目を加えることにより、今後ウイルス耐性 QTL への包括的な理解が進むと期待される。また、RSIV は一般的に若齢魚で死亡するが、感染が起こった網の生き残りは、遺伝的に本疾病に対して耐性を保持する可能性があり、解析する価

値があると考える。

他魚種におけるマダイイリドウイルス耐性 QTL 探索の例として、マダイ（*Pagrus major*）を用いた報告がある。マダイの RSIV QTL 解析では、構築された連鎖地図上の 130 座位の MS マーカーを用いた解析によって、6 座位の MS マーカーで有意な関連性が見出されている。また、そのうち 2 座位の MS マーカーは、遺伝的背景の異なる他の 2 系統においても有意な関連性が見られた[131]。本研究で耐性 QTL との得られた連鎖群 1 の領域が、マダイで見出された QTL 領域と相同な領域であるかについて調べることは、種を超えて保存されたウイルス耐性に関わる遺伝子探索を行う上で、興味深い。

イリドウイルス耐性に関与する遺伝子候補の探索

検出された 2 つの QTL の責任遺伝子の候補を探索する上で、有意な LOD スコアを示した QTL 上の 3 マーカーが属する 3 本のスキャフォルドを調べた結果、計 44 遺伝子がコードされていた。今後、QTL 領域に配置される他のスキャフォルド上の遺伝子とともに、これらの遺伝子はイリドウイルス耐性への責任遺伝子候補となり得る。特に、LOD ピークの得られた 00601_148674 マーカーと同じスキャフォルド上に、自然免疫に関与する perforin-1-like 遺伝子がコードされていたことは興味深い。

以下に、パーフォリンの分子機能についての知見を述べる。ヒトにおいて、ナチ

ュラルキラー細胞（natural killer cell, NK 細胞）は、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞がアポトーシスを起こすように誘導する。このアポトーシス誘導においては、NK 細胞が疾患細胞と結合し、細胞間間隙にエキソサイトーシスによって小さな細胞内顆粒を放出する。放出されたタンパク質の一部であるパーフォリンは、標的細胞の膜に挿入され、穴を開ける。別の放出タンパク質（グランザイム）は標的細胞内に入り、カスパーゼ 3 の前駆体のような重要な基質を分解し、アポトーシスを引き起こす[132]。魚類では NK 細胞は存在しないが、それに相当する血球系細胞において[107]、パーフォリンが同等の役割をすると考えられている。マダイイリドウイルスに感染した細胞のアポトーシスの動員を、パーフォリンの配列多型などが関与するかは不明であり、今後の知見が待たれる。

マダイイリドウイルス耐性にはこの他に、獲得免疫も関わるかもしれない。孵化後 1 日目から 25 日目までのクロマグロ仔稚魚を用いたマイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果、孵化後 1〜5 日目から自然免疫に関連する遺伝子群の発現が始まり、3〜13 日目からウイルス感染を抑えるインターフェロンに関連する遺伝子群の発現が、そして肝腎の獲得免疫に関わる遺伝子群は孵化後 25 日目以降から発現することが明らかになっている（安池ら，水産総合研究センター）。本解析で用いた供試魚は 45 日齢以降の魚体であるため、免疫系は既に確立されているものと考えられる。当研究室では、複数の耐病性遺伝子のクロマグロ連鎖地図へのマッピングを行っているが、QTL 領域には獲得免疫に関与する遺伝子は配置されていなか

った（細田, 2014）。今後、まだマッピングされていない免疫関連遺伝子のクロマグロ連鎖地図上における位置を明らかにすることによって、免疫関連遺伝子と QTL の関連性について詳細に調べることが可能になると考えられる。

# 第 5 章　総括

本博士論文の第 2 章において、全ゲノム解読により得られたゲノム配列断片（スキャフォルド）情報から多数の MS マーカーを開発した。また、親子鑑定法により同胞集団を抽出し、それを用いた連鎖解析によって、太平洋クロマグロの雄雌連鎖地図を作成した。雄連鎖地図は MS マーカー374 座位、雌連鎖地図は MS マーカー366 座位から構成され、ともにクロマグロ染色体数（24 対）に一致する 24 の連鎖群が得られた。連鎖地図上の MS マーカーの配置から、スキャフォルド総延長の 20.8 %に相当する 154 Mbp の配列の位置情報が明らかとなった。他魚種との染色体構造の比較解析では、クロマグロおよび 5 魚種（ヨーロッパシーバス、イトヨ、メダカ、トラフグ、ミドリフグ）に共通したオルソログ遺伝子である 6,445 遺伝子を抽出し、その中で 1,229 遺伝子が連鎖地図上に配置されていた。このオルソログ遺伝子において、他魚種の各染色体に対する遺伝子数の分布を調べた結果、染色体構成はメダカに最も近いことが示唆された。連鎖地図に位置づけられた配列相同領域の比較からは、クロマグロ-メダカ間では進化上の分岐後に同一染色体内で複数回の逆位が起こっている可能性が示された。

本研究で構築された遺伝連鎖地図により、目的の形質に関連した遺伝子座をラフに探索することが可能になる。しかしながら、マーカー選抜育種においては、精度の高い親魚判別が必要となるため、将来的にはその配置マーカー数を増やす必要があるかもしれない。また、マグロ全スキャフォルドが約 17,000 本あり、約 80 %の

ゲノム配列はマッピング出来ていないのが現状である。クロマグロゲノムのアップデートは現在行われているとのことであるが（国立研究開発法人　水産総合研究センター　中央水産研究所　中村洋路博士　私信）、それでも本連鎖地図上の MS マーカーだけでは取り残しが生じるだろう。最近になって、第 3 世代シークエンサーとも呼ばれる一分子リアルタイム DNA シークエンサーPacBio RSII の精度が向上してきているため、よりまとまりの良いゲノム配列の構築には有用かもしれない。PacBio RSII は 1 分子単位でゲノムを解読し、DNA 増幅を伴わないため、GC 含量の影響を比較的受けることなく配列決定可能と言われている。そして他のシークエンサーよりも遥かに長いリード（平均 10 kbp）を出力出来るので、アセンブリの向上に効果的とされる。ただし 2016 年 1 月現在のところは、他の次世代シークエンサーと比べてエラー率が比較的高いと未だ言われていることから、今後の性能向上が期待される。いずれにしても、今後、全ゲノムスキャフォルドを連鎖地図上にマッピングするには、ゲノム配列のアセンブリ向上と、連鎖地図の高密度化の両方が望まれる。連鎖地図の高密度化には、数千単位の遺伝マーカーの配置が必要とされる。ゲノムの塩基配列が決定されている場合、MS マーカーの開発は過去の手法と比べて非常にシンプルで迅速にできる。また本論文で適用した 4 色蛍光のマルチプレックス法などの利用により、解析時間は短縮される。しかしながら、マッピングの候補となる MS マーカーの数が多くなればなるほど、未だに多くの時間と労力を要する。トラフグの例[38]を考えても数年の時間を要することになるため、より効

率のよい解析方法が望まれる。

近年、次世代シーケンサーを利用した RAD-tag sequencing（RAD-seq）法と呼ばれる、迅速でかつ非常に大多数の（塩基配列情報を持った）SNP マーカーを開発可能な手法が報告されている[133]。RAD-seq ライブラリーの作成では、まず特定の制限酵素でゲノム DNA を消化する。制限酵素部位に起こる 1 塩基多型（SNPs）の有無等により、制限酵素による切断の有無は異なる。切断された場合、各個体により配列を少しずつ変化させてある短いアダプター配列を付加し、プーリングを行う。PCR による増幅後、次世代型シークエンサーを用いて制限酵素部位近傍の塩基配列を決定する。RAD-seq 法にはこれ以外にも様々な変法が開発されており、用いる制限酵素の種類を増やすことで、検出するサイト数を限定させる ddRAD-Seq 法[134,135]や、illumina 社の TruSeq DNA preparation kit を利用した ezRAD 法[136]も同様に広く用いられている。また、RAD-seq 法以外にも、より簡易的にライブラリーを作成可能な Genotyping by Sequencing（GBS）法も開発されており[137,138]、連鎖地図作成や QTL 解析にも利用されつつある[139]。データ解析には Stacks と呼ばれるソフトウェアが大抵使用されるが[140]、RADtools[141]や、系統解析用ではあるが pyRAD[142]など他のいくつかのソフトウェアも利用可能である[143]。Stacks では各解析ステップ別に各コマンドライン（ustacks, cstacks, sstacks）が分かれているが、ref_map.pl などの各コマンドラインを繋ぐパイプラインも利用可能であるので、比較的扱いやすい。RAD-seq が開発された当初、大量（数千から数万）の SNP デ

ータを解析するためにこれまで連鎖解析に使用されていたソフトウェアである R/qtl や JoinMap[144]、OneMap[145]などではデータを処理しきれない問題も生じていたが[146]、LepMap[147]や HighMap[148]などのより処理能力に優れたソフトウェアが開発され、解決されつつある[149]。また開発当初は養殖魚類で RAD-seq を用いた連鎖地図の報告は滞っていたものの、スポッテッド・ガー（*Lepisosteus oculatus*）の高密度連鎖地図作成[150]を皮切りに、現在では数多くの魚種にて RAD-seq を用いた連鎖地図作成が行われているほか、特定の形質に着目した QTL 解析や関連解析、また集団遺伝学的解析手法の主流になりつつある。魚類だけでも、ここ 5 年ほどの間に、ベニザケ（*Oncorhynchus nerka*）[151]、モロコの種間雑種（*Gnathopogon*）[146]、日本ウナギ（*Anguilla japonica*）[152]、プラティ[51]、2 種のシクリッド[153]などにおいて RAD-seq や ddRAD-Seq から開発した数千の SNP マーカーからなる高密度連鎖地図作成の報告がなされている。また、特定の形質に着目した QTL 解析や関連解析に関しても、RAD-seq 法により様々な魚種で行われている[154]。大西洋オヒョウ（*Hippoglossus hippoglossus*）[155]やターボット（*Scophthalmus maximus* L.）[88]、ナイルティラピア（*Oreochromis niloticus*）[156]における性決定遺伝子座の探索や、ニジマスにおける冷水病[157,158]と IHN[117]、大西洋サケにおける IPN[122]、ヒラメにおけるビブリオ症[159]それぞれに対する耐病性遺伝子座の探索、大西洋サケにおける成長[160]やレイクホワイトフィッシュ（*Coregonus clupeaformis*）における体形に関与する遺伝子座の探索[161]などがその例である。また、イトヨにお

いて集団構造の遺伝学的解析[162]にも利用されている。

解析速度やマーカー配置数などでは、MS マーカーをはじめとした従来の遺伝マーカーは圧倒的に RAD-seq 法に対して効率が悪い。したがって、今後太平洋クロマグロの遺伝連鎖地図をより高密度化するには、RAD-seq 法や GBS 法などの次世代シークエンサーを利用した SNP 探索方法により行うことが望ましい。これらの方法により、配置マーカー数が増加するだけでなく、ゲノムスキャフォルドのより多くを連鎖地図に位置づけることが可能になる。RAD-seq 法により得られたリードをスキャフォルドへとマッピングし、その出力ファイル（.sam 形式）を Stacks に入力することにより、最終的に得られた SNP と近傍配列が属するスキャフォルドを調べることが出来る。

ただし、解析コストと手軽さにおいては、MS マーカーは（それも現在のところでは）メリットがあると考えられるので、MS マーカーと RAD - tag マーカーを併用することは有効と考えられる。特に RAD-seq 法の特徴として、シークエンスエラーを含みやすく、そのためマーカー間の組換え率が過剰推定になりやすい。本博士論文で構築した太平洋クロマグロ連鎖地図は、リファレンスマップとしては十分に役に立つ精度を有すると考える。RAD-seq 法により得られた連鎖地図を、統合されるスキャフォルド情報を利用して、現 MS マーカーにより得られた連鎖地図と比較し、潜在的なエラーを取り除くことがより高精度な連鎖地図を構築する上で有用かもしれない。また、目的の形質に連鎖する遺伝子座の探索（QTL 解析）は、マ

ーカー密度がそれほど高くなくても十分であると言われるため、本博士論文の太平洋クロマグロ連鎖地図を構成する MS マーカーで行うことが出来る。しかしながら、より有意に連鎖するマーカーを探索する必要が生じた場合には、RAD-tag マーカーの利用は有効と思われる。ただし、一般的に SNP マーカーの多型性は MS マーカーほど高くないため、目的形質と連鎖する SNP マーカーが別家系では多型性を示さない可能性もある。そのような場合、RAD-tag マーカーがマッピングされたスキャフォルド上のマイクロサテライト領域を探し出し、MS マーカーを新たに開発すれば、多型性を示すマーカーを得られるかもしれない。MS マーカーの開発自体は、これまでの例（第 2 章）では設計したうちの約 80 %が多型性を示しており、容易である。また多型性を示さなかった場合にも、同一スキャフォルドから別の MS マーカー開発が行える。このように、両手法のメリット・デメリットを良く理解した上で、解析の目的にあわせて RAD-seq 法と従来の MS マーカーを使い分けるのが良いかもしれない。他魚種との染色体構造の比較解析に関しては、RAD-seq 法では数多くのスキャフォルドを連鎖地図に統合することができることから、より網羅的に比較を行うことが可能となる[51]。本博士論文で構築した連鎖地図により、太平洋クロマグロの染色体構成はヨーロッパシーバスやメダカに近いことが明らかになったが、連鎖群 18 などのように、他魚種とのオルソログ数の少ない連鎖群も一部見られた。また染色体内部の比較に関しては、染色体内部の構造比較解析をラフに行うことが出来た。しかしながら、上記の解析を行う上では、より多くのスキャ

フォルドが統合された連鎖地図を用いることが望ましいので[38]、検出される染色体内部の再編成の中には取りこぼしが残されている可能性がある。Rad-seq マーカーにより配置されたスキャフォルドから、魚種間に共通して存在するオルソログ遺伝子を探索し、染色体上の配置情報を魚種間で比較することにより、より網羅的なゲノム構造の比較解析が可能になると期待される。

第 3 章では、クロマグロ連鎖地図情報を用いて、クロマグロ稚魚の成長に関わる QTL の探索を行った。クロマグロ連鎖地図作成に用いた 18 日齢仔魚 93 個体の標準長は平均 9.4 mm、標準誤差は 0.13 mm であった。全長データのヒストグラムおよび正規性の検定から、標準長データは正規分布に従っていた。仔魚 93 個体の標準長と、連鎖地図上 MS マーカー470 座位のマーカー型・遺伝距離を元に、R-QTL による Composite interval mapping を行った。その結果、雌親に由来する連鎖群 10 の 25 cM 付近において、有意水準 5 %以上の LOD スコア（3.3）を示す QTL が出された。初期成長についての QTL 解析結果は、成長のみならず、今後の優良遺伝形質に着目した QTL 解析や GWAS 解析に役立つ知見を与えるものと考えられる。本章の解析で用いられた集団は F1 の仔魚であり、連鎖地図に配置された多数の MS マーカーの中で、雌親に由来する 2 種類のアレル間で成長への寄与率に差が生じるマーカーが存在したことにより、高い LOD スコアを示した。通常の QTL 解析に用いられる純系の動物などでは、このように 1 個体（同一個体）内の 2 つアレル間で形質への寄与率に差が生じづらく、そのため F2 解析家系を作出する必要があ

り、F1 解析家系での解析は、遺伝的多様性に富む天然個体ならではの解析結果である。残念ながら連鎖解析家系と同雌親に由来する家系では、同マーカーは有効でなかったことから、本解析で得られた QTL は絶対的なものではない。したがって今後、太平洋クロマグロで成長に関与する遺伝子座を探索し、理解を進めていく上では、解析個体数の増加、他家系における表現型の評価と解析、別な成長段階の魚体を用いた解析などが、必要になるものと考えられる。いずれにしても、上記の解析を進める上では、今回見られた QTL 領域やその周辺領域は、解析候補となり得るものである。他の天然個体においては、QTL 領域の MS マーカー型（アレル）にはより多くのバリエーションがあると期待できるので、さらに成長に優れたタイプのアレルが内在する可能性がある。また、他の成長段階では、今回検出された QTL 領域に加えて、他の QTL 領域も関与しており、その QTL 領域または遺伝子座間にはエピスタシスが生じる場合もあるかもしれない。一般的に、成長は多くの遺伝子座による支配を受けている形質と考えられていることから、この仮説は十分に成り立つものであると思われる。近縁種でも QTL 領域にある重要遺伝子のオルソログが存在している場合には、やはりその遺伝子のアレルによって成長度合いが異なる可能性が考えられる。このような今後の解析によって、成長に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーが得られた場合、次のステップはそれを指標にしたマーカーアシスト選抜となる。また、近年ではゲノミックセレクションなども着目されている。太平洋クロマグロの場合、養殖における生残率は未だ低く、またハンドリ

ング可能な時期が極めて限られており、目的の形質に連鎖する遺伝マーカーが得られても、親魚選抜にすぐに利用できない可能性がある。これらの遺伝マーカーを利用するにあたっての太平洋クロマグロならではの様々な問題を解決していくことが、形質に連鎖した遺伝マーカーを探索するのと同様に、重要である。

第 4 章では、マダイイリドウイルス耐性遺伝子座の探索を行った。複数の天然親魚群に由来する F1 稚魚 836 個体を用いて RSIV の人為感染試験が実施された。大型水槽を用い、マダイ臓器摩砕物を用いた大掛かりな感染試験法は、過去に例を見ないものである。太平洋クロマグロにおける人為感染実験を行った例はほとんど報告されておらず、本試験結果は太平洋クロマグロにおいて RSIV 人為感染方法の確立に向けた第一歩の知見になるものと考えられた。死亡日 8 日目から 17 日目に回収された稚魚 264 個体の家系判別では、同胞関係にある 130 個体が抽出され、比較的少数の親魚に由来する稚魚が稚魚集団中の大多数を占めていたことが分かった。この傾向は第 2 章における連鎖地図作成に用いる同胞集団の抽出時にも見られており、海上生簀における産卵状況（比較的少数の親魚が成熟状態にある）を反映するものと思われた。既存の連鎖地図から選択した 190 座位の MS マーカーを用いてこれらの同胞 130 個体と親魚 2 個体を解析したところ、約 8 割（151）座位の MS マーカーが雄親雌親のいずれかで多型性を示し、本家系でも有効であることが分かった。この 8 割という数字は、他魚種における MS マーカーの開発報告の例と比べても比較的高い数字であると思われ、第 2 章で開発されたゲノム配列（スキャフォ

ルド）情報に基づいて開発された MS マーカーの有効性を示すものと考えられた。連鎖地図作成に用いた仔魚集団の親魚も、人為感染試験が行われた稚魚集団の親魚も、元は日本近海で採捕された後に蓄養された天然個体であることから、他の天然個体を使った際にも同程度の数の MS マーカーが多型性を示すかもしれない。ただし、より遠縁な（遺伝的に異なる）集団を解析した際には、配列の類似度が低下することにより使えるマーカー数も減少する可能性はある。表現型に死亡日を用い、R-QTL による Composite interval mapping を行った結果、雌親に由来する連鎖群 1 の 35 cM 付近において、比較的高い LOD スコア（2.2）を示す QTL の存在が示唆された。遺伝学的解析により得られた本 QTL は、太平洋クロマグロにおけるウイルス耐性魚作出への重要な手がかりになるものと考えられる。QTL 効果の検証にはさらなる解析が望まれ、感染試験系の確立や、本疾病への耐性遺伝子座を他家系、または他魚種において探索することなどが挙げられる。いずれにしても、本章で見つかった QTL は、それらの解析を進めていく上で優先的にスクリーニングする候補の領域になるだろうと考えられる。

本博士論文では、太平洋クロマグロの育種を進めるための優良遺伝形質として高成長（第 3 章）、耐病性（特にイリドウイルス症への耐性。第 4 章）の 2 形質を選んだ。太平洋クロマグロの優良遺伝形質としては他にも、高生残や早期成熟などが候補として挙げられ、遺伝的な改良を施した親魚を選抜出来れば望ましい。しかしながら、優良遺伝形質の解析や育種研究を進める上では、初期の生残率の低さや、

種苗の輸送方法など、様々な問題を抱えている。そこで、形質評価のための準備をある程度整えることが出来れば、他の形質についても同様な解析を行うことが可能になると考える。また今後は、他魚種には見られないクロマグロ特有の形質（たとえば、高速遊泳や急成長など）に関わる遺伝子座の探索といったことも興味深いので考慮していきたい。既に遺伝子の機能解析などにより、特定の構造遺伝子が形質に対して重要であるという知見が収集されている場合には、候補遺伝子領域を有するスキャフォルドを選択して順次連鎖地図へと位置付け、その周辺に配置されているスキャフォルドの遺伝情報と関連づけることも可能であると考える。マイクロアレイを用いた免疫関連遺伝子の発現量解析研究[163]なども行われていることから、これらの有用な情報を収集しつつ、耐病性形質の候補遺伝子のマッピングとして考慮して研究をすすめる必要がある。

本博士論文研究で得られた太平洋クロマグロの遺伝連鎖地図とそれに付随するゲノム配列情報は、より高密度に遺伝マーカーを配置した遺伝連鎖地図の作成や、完全なゲノム配列情報（物理地図）の構築への足掛かりとして役に立つものである。また有用形質に着目した遺伝解析（QTL 解析など）に役立つリソースとなり得る。さらに高成長と耐病性にそれぞれ着目した QTL 解析結果は、形質について未選抜の魚を用いた QTL マッピングの可能性について示すとともに、今後の QTL 解析を進めることにも貢献すると思われる。

本博士論文研究により得た遺伝学的な知見の数々は、今後太平洋クロマグロでゲ

ノム育種を進めていく上での重要な基盤となる情報を与えるものと期待される。

参考文献

[1] 水産総合研究センター独立行政法人 (2014) マグロの資源と生物学, 成山堂書店.

[2] Itoh, T., Tsuji, S., and Nitta, A. (2003) Migration patterns of young Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) determined with archival tags. *Fishery Bulletin*, 101, 514–534.

[3] Collette, B. B. (1999) Mackerels, molecules, and morphology. *Proceedings of the 5th Indo-Pacific Fish Conference*, 149–164.

[4] Viñas, J., and Tudela, S. (2009) A validated methodology for genetic identification of tuna species (genus *Thunnus*). *PloS one*, 4, e7606.

[5] 国立研究開発法人 水産総合研究センター (2014) 国際漁業資源の現況 -平成26年度現況- 04クロマグロ 太平洋.

[6] 阿部宏喜 (2009) カツオ・マグロのひみつ : 驚異の遊泳能力を探る. *恒星社厚生閣*, 17-37.

[7] Masuma, S., Takebe, T., and Sakakura, Y. (2011) A review of the broodstock management and larviculture of the Pacific northern bluefin tuna in Japan. *Aquaculture*, 315, 2–8.

[8] Sawada, Y., Okada, T., Miyashita, S., Murata, O., and Kumai, H. (2005) Completion of the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck et Schlegel) life cycle. *Aquaculture Research*, 36, 413–421.

[9] Miyashita, S. (2006) Surfacing and bottoming death in seedling production, *Nippon Suisan Gakkaishi*. 72, 947–948.

[10] Munday, B. L., Sawada, Y., Cribb, T., and Hayward, C. J. (2003) Diseases of tunas, *Thunnus* spp. *Journal of fish diseases*, 26, 187–206.

[11] Gjedrem, T. (2010) The first family-based breeding program in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 2, 2–15.

[12] 岡内正典 (2011) 魚類育種の取り組みと問題点. *水産育種*, 40.

[13] Yue, G. H. (2013) Recent advances of genome mapping and marker-assisted selection in aquaculture. *Fish and Fisheries*, 15, 376–396.

[14] Sonesson, A. K., and Meuwissen, T. H. E. (2009) Testing strategies for genomic selection in aquaculture breeding programs. *Genetics Selection Evolution*, 41, 37.

[15] Fuji, K., Hasegawa, O., Honda, K., Kumasaka, K., Sakamoto, T., and Okamoto, N. (2007) Marker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 272, 291–295.

[16] Sakamoto, T., (Kobayashi) Fuji, K., Sanchez, C. C., Hasegawa, O., Honda, K., Kumasaka, K., Murakami, H., Nagai, T., Kawaguchi, O., Iida, Y., and Okamoto, N. (2012) Linkage analysis and marker-associated selection of disease resistance in aquaculture. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 78, 268.

[17] Agawa, Y., Komiya, T., Honryo, T., Kurata, M., Okada, T., Murata, O., Kumai,

H., and Sawada, Y. (2011) Screening of the male characteristic DNA fragment using AFLP analysis in Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 77, 639–646.

[18] Agawa, Y., Iwaki, M., Komiya, T., Honryo, T., Tamura, K., Okada, T., Yagishita, N., Kobayashi, T., and Sawada, Y. (2014) Identification of male sex-linked DNA sequence of the cultured Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fisheries Science*, 81, 113–121.

[19] Ida, H., Oka, N., and Hayashigaki, K. (1991) Karyotypes and cellular DNA contents of three species of the subfamily Clupeinae. *Japanese Journal of Ichthyology*, 38, 289–294.

[20] Soares, R. X., Bertollo, L. A., C. Costa, G. W. W. F., and Molina, W. F. (2013) Karyotype stasis in four Atlantic Scombridae fishes: mapping of classic and dual-color FISH markers on chromosomes. *Fisheries Science*, 79, 177–183.

[21] Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E. J., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L. T., Guerra-Assunção, J. A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.-H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S. F., Laird, G. K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S.,

McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliot, D., Eliott, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Mortimore, B., Mortimer, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthravadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J. D., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C. M., Ersan-Ürün, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberländer, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F. Carter, N. P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S. M. J. Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R. H. A., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P. J., Zon, L. I., Postlethwait, J. H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T. J. P., Roest Crollius, H., Rogers, J., Stemple, D. L., Begum, S., Lloyd, C., Lanz, C., Raddatz, G., and

Schuster, S. C. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496, 498–503.

[22] Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan, B., Yamada, T., Nagayasu, Y., Doi, K., Kasai, Y., Jindo, T., Kobayashi, D., Shimada, A., Toyoda, A., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Sasaki, T., Shimizu, A., Asakawa, S., Shimizu, N., Hashimoto, S.-I., Yang, J., Lee, Y., Matsushima, K., Sugano, S., Sakaizumi, M., Narita, T., Ohishi, K., Haga, S., Ohta, F., Nomoto, H., Nogata, K., Morishita, T., Endo, T., Shin-I, T., Takeda, H., Morishita, S., and Kohara, Y. (2007) The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*, 447, 714–719.

[23] Aparicio, S., Chapman, J., Stupka, E., Putnam, N., Chia, J.-M., Dehal, P., Christoffels, A., Rash, S., Hoon, S., Smit, A., Gelpke, M. D. S., Roach, J.,Oh, T., Ho, I. Y., Wong, M., Detter, C., Verhoef, F., Predki, P., Tay, A., Lucas, S., Richardson, P., Smith, S. F., Clark, M. S., Edwards, Y. J. K., Doggett, N., Zharkikh, A., Tavtigian, S. V, Pruss, D., Barnstead, M., Evans, C., Baden, H., Powell, J., Glusman, G., Rowen, L., Hood, L., Tan, Y. H. Elgar, G., Hawkins, T., Venkatesh, B., Rokhsar, D., and Brenner, S. (2002) Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science*, 297, 1301–1310.

[24] Jaillon, O., Aury, J.-M., Brunet, F., Petit, J.-L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., Bouneau, L., Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Bernot, A., Nicaud, S., Jaffe, D., Fisher, S.,

Lutfalla, G., Dossat, C., Segurens, B., Dasilva, C., Salanoubat, M., Levy, M., Boudet, N., Castellano, S., Anthouard, V., Jubin, C., Castelli, V., Katinka, M., Vacherie, B., Biémont, C., Skalli, Z., Cattolico, L., Poulain, J, De Berardinis, V., Cruaud, C., Duprat, S., Brottier, P., Coutanceau, J.-P., Gouzy, J., Parra, G., Lardier, G., Chapple, C., McKernan, K., J., McEwan, P., Bosak, S., Kellis, M., Volff, J.-N., Guigó, R., Zody, M. C., Mesirov, J. Lindblad-Toh, K., Birren, B. Nusbaum, C. Kahn, D. Robinson-Rechavi, M. Laudet, V. Schachter, V. Quétier, F. Saurin, W. Scarpelli, C. Wincker, P. Lander, E. S. Weissenbach, J. and Roest Crollius, H. (2004) Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature*, 431, 946–957.

[25] Jones, F. C., Grabherr, M. G., Chan, Y. F., Russell, P., Mauceli, E., Johnson, J., Swofford, R., Pirun, M., Zody, M. C., White, S., Birney, E., Searle, S., Schmutz, J., Grimwood, J., Dickson, M., C. Myers, R. M., Miller, C. T., Summers, B. R., Knecht, A. K., Brady, S. D., Zhang, H., Pollen, A. A., Howes, T., Amemiya, C., Baldwin, J., Bloom, T., Jaffe, D. B., Nicol, R., Wilkinson, J., Lander, E. S., Di Palma, F., Lindblad-Toh, K., and Kingsley, D. M. (2012) The genomic basis of adaptive evolution in threespine sticklebacks. *Nature*, 484, 55–61.

[26] Chen, S., Zhang, G., Shao, C., Huang, Q., Liu, G., Zhang, P., Song, W., An, N., Chalopin, D., Volff, J.-N., Hong, Y., Li, Q., Sha, Z., Zhou, H., Xie, M., Yu, Q., Liu, Y., Xiang, H., Wang, N., Wu, K., Yang, C., Zhou, Q., Liao, X., Yang, L., Hu, Q., Zhang, J.,

Meng, L., Jin, L., Tian, Y., Lian, J., Yang, J., Miao, G., Liu, S., Liang, Z., Yan, F., Li, Y., Sun, B., Zhang, H., Zhang, J., Zhu, Y., Du, M., Zhao, Y., Schartl, M., Tang, Q., and Wang, J. (2014) Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle. *Nature Genetics*, 46, 253–260.

[27] Wu, C., Zhang, D., Kan, M., Lv, Z., Zhu, A., Su, Y., Zhou, D., Zhang, J., Zhang, Z. Xu, M., Jiang, L., Guo, B., Wang, T., Chi, C., Mao, Y., Zhou, J., Yu, X., Wang, H., Weng, X., Jin, J. G., Ye, J., He, L., and Liu, Y. (2014) The draft genome of the large yellow croaker reveals well-developed innate immunity. *Nature communications*, 5, 5227.

[28] Star, B., Nederbragt, A. J., Jentoft, S., Grimholt, U., Malmstrøm, M., Gregers, T., F., Rounge, T. B., Paulsen, J., Solbakken, M. H., Sharma, A., Wetten, O. F., Lanzén, A., Winer, R., Knight, J., Vogel, J.-H., Aken, B., Andersen, O. Lagesen, K., Tooming-Klunderud, A., Edvardsen, R. B., Tina, K. G., Espelund, M., Nepal, C., Previti, C., Karlsen, B. O., Moum, T., Skage, M., Berg, P. R., Gjøen, T., Kuhl, H., Thorsen, J., Malde, K., Reinhardt, R., Du, L., Johansen, S. D., Searle, S., Lien, S., Nilsen, F., Jonassen, I., Omholt, S. W., Stenseth, N. C., and Jakobsen, K. S. (2011) The genome sequence of Atlantic cod reveals a unique immune system. *Nature*, 477, 207–210.

[29] Berthelot, C., Brunet, F., Chalopin, D., Juanchich, A., Bernard, M., Noël, B., Bento, P., Da Silva, C., Labadie, K., Alberti, A., Aury, J.-M., Louis, A., Dehais, P., Bardou, P., Montfort, J., Klopp, C., Cabau, C., Gaspin, C., Thorgaard, G. H., Boussaha, M., Quillet,

E., Guyomard, R., Galiana, D., Bobe, J., Volff, J.-N., Genêt, C., Wincker, P., Jaillon, O., Roest Crollius, H., and Guiguen, Y. (2014) The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nature communications*, 5, 3657.

[30] Xu, P., Zhang, X., Wang, X., Li, J., Liu, G., Kuang, Y., Xu, J., Zheng, X., Ren, L., Wang, G., Zhang, Y., Huo, L., Zhao, Z., Cao, D., Lu, C., Li, C., Zhou, Y., Liu, Z., Fan, Z., Shan, G., Li, X., Wu, S., Song, L., Hou, G., Jiang, Y., Jeney, Z., Yu, D., Wang, L., Shao, C., Song, L., Sun, J., Ji, P., Wang, J., Li, Q., Xu, L., Sun, F., Feng, J., Wang, C., Wang, S., Wang, B., Li, Y., Zhu, Y., Xue, W., Zhao, L., Wang, J., Gu, Y., Lv, W., Wu, K., Xiao, J., Wu, J., Zhang, Z., Yu, J., and Sun, X. (2014) Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Nature genetics*, 46, 1212–1219.

[31] Wang, Y., Lu, Y., Zhang, Y., Ning, Z., Li, Y., Zhao, Q., Lu, H., Huang, R., Xia, X., Feng, Q., Liang, X., Liu, K., Zhang, L., Lu, T., Huang, T., Fan, D., Weng, Q., Zhu, C., Lu, Y., Li, W., Wen, Z., Zhou, C., Tian, Q., Kang, X., Shi, M., Zhang, W., Jang, S., Du, F., He, S., Liao, L., Li, Y., Gui, B., He, H., Ning, Z., Yang, C., He, L., Luo, L., Yang, R., Luo, Q., Liu, X., Li, S., Huang, W., Xiao, L., Lin, H., Han, B., and Zhu, Z. (2015) The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation. *Nature genetics*, 47, 625–631.

[32] Schartl, M., Walter, R. B., Shen, Y., Garcia, T., Catchen, J., Amores, A., Braasch,

I., Chalopin, D., Volff, J.-N., Lesch, K.-P., Bisazza, A., Minx, P., Hillier, L., Wilson, R. K., Fuerstenberg, S., Boore, J., Searle, S., Postlethwait, J. H., and Warren, W. C. (2013) The genome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*, provides insights into evolutionary adaptation and several complex traits. *Nature genetics*, 45, 567–572.

[33] Schartl, M., Walter, R. B., Shen, Y., Garcia, T., Catchen, J., Amores, A., Braasch, I., Chalopin, D., Volff, J.-N., Lesch, K.-P., Bisazza, A., Minx, P., Hillier, L., Wilson, R. K., Fuerstenberg, S., Boore, J., Searle, S., Postlethwait, J. H., and Warren, W. C. (2014) European sea bass genome and its variation provide insights into adaptation to euryhalinity and speciation. *Nature communications*, 5, 5770.

[34] Nakamura, Y., Mori, K., Saitoh, K., Oshima, K., Mekuchi, M., Sugaya, T., Shigenobu, Y., Ojima, N., Muta, S., Fujiwara, A., Yasuike, M., Oohara, I., Hirakawa, H., Chowdhury, V. S., Kobayashi, T., Nakajima, K., Sano, M., Wada, T., Tashiro, K., Ikeo, K., Hattori, M., Kuhara, S., Gojobori, T., and Inouye, K. (2013) Evolutionary changes of multiple visual pigment genes in the complete genome of Pacific bluefin tuna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 11061–11066.

[35] 清水厚志., and 佐々木貴史 (2011) 次世代シークエンサーを使いこなす 目的別解析法からデータ処理まで. *細胞工学*, 30, 795.

[36] 菅野純夫., and 鈴木穣 (2012) 次世代シークエンサー 目的別アドバンスメソッド（細胞工学別冊）. *学研メディカル秀潤社*.

[37] Kai, W., Kikuchi, K., Fujita, M., Suetake, H., Fujiwara, A., Yoshiura, Y., Ototake, M., Venkatesh, B., Miyaki, K., and Suzuki, Y. (2005) A genetic linkage map for the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Genetics*, 171, 227–238.

[38] Kai, W., Kikuchi, K., Tohari, S., Chew, A. K., Tay, A., Fujiwara, A., Hosoya, S., Suetake, H., Naruse, K., Brenner, S., Suzuki, Y., and Venkatesh, B. (2011) Integration of the genetic map and genome assembly of fugu facilitates insights into distinct features of genome evolution in teleosts and mammals. *Genome biology and evolution*, 3, 424–442.

[39] Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., Sasamoto, S., Watanabe, A., Ono, A., Kawashima, K., Fujishiro, T., Katoh, M., Kohara, M., Kishida, Y., Minami, C., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimizu, Y., Shinpo, S., Takahashi, C., Wada, T., Yamada, M., Ohmido, N., Hayashi, M., Fukui, K., Baba, T., Nakamichi, T., Mori, H., and Tabata, S. (2008) Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA research*, 15, 227–239.

[40] Ren, Y., Zhao, H., Kou, Q., Jiang, J., Guo, S., Zhang, H., Hou, W., Zou, X., Sun, H., Gong, G., Levi, A., and Xu, Y. (2012) A high resolution genetic map anchoring scaffolds of the sequenced watermelon genome. *PloS one*, 7, e29453.

[41] Yang, H., Tao, Y., Zheng, Z., Zhang, Q., Zhou, G., Sweetingham, M. W., Howieson, J. G., and Li, C. (2013) Draft genome sequence, and a sequence-defined genetic linkage map of the legume crop species *Lupinus angustifolius* L. *PloS one*, 8, e64799.

[42] Ma, X.-F., Jensen, E., Alexandrov, N., Troukhan, M., Zhang, L., Thomas-Jones, S., Farrar, K., Clifton-Brown, J., Donnison, I., Swaller, T., and Flavell, R. (2012) High resolution genetic mapping by genome sequencing reveals genome duplication and tetraploid genetic structure of the diploid Miscanthus sinensis. *PloS one*, 7, e33821.

[43] Wong, A. K., Ruhe, A. L., Dumont, B. L., Robertson, K. R., Guerrero, G., Shull, S. M., Ziegle, J. S., Millon, L. V, Broman, K. W., Payseur, B. A., and Neff, M. W. (2010) A comprehensive linkage map of the dog genome. *Genetics*, 184, 595–605.

[44] Morishima, K., Yamamoto, H., Sawada, Y., Miyashita, S., and Kato, K. (2009) Developing 23 new polymorphic microsatellite markers and simulating parentage assignment in the Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Molecular ecology resources*, 9, 790–792.

[45] Hattori, R. S., Murai, Y., Oura, M., Masuda, S., Majhi, S. K., Sakamoto, T., Fernandino, J. I., Somoza, G. M., Yokota, M., and Strussmann, C. A. (2012) A Y-linked anti-Mullerian hormone duplication takes over a critical role in sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 2955–2959.

[46] Myosho, T., Otake, H., Masuyama, H., Matsuda, M., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Naruse, K., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. (2012) Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*. *Genetics*, 191, 163–170.

[47] Kamiya, T., Kai, W., Tasumi, S., Oka, A., Matsunaga, T., Mizuno, N., Fujita, M.,

Suetake, H., Suzuki, S., Hosoya, S., Tohari, S., Brenner, S., Miyadai, T., Venkatesh, B., Suzuki, Y., and Kikuchi, K. (2012) A trans-species missense SNP in Amhr2 is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS genetics*, 8, e1002798.

[48] Yano, A., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Fostier, A., Guyomard, R., and Guiguen, Y. (2013) The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary applications*, 6, 486–496.

[49] Kikuchi, K., and Hamaguchi, S. (2013) Novel sex-determining genes in fish and sex chromosome evolution. *Developmental dynamics*, 242, 339–353.

[50] Naruse, K., Tanaka, M., Mita, K., Shima, A., Postlethwait, J., and Mitani, H. (2004) A medaka gene map: the trace of ancestral vertebrate proto-chromosomes revealed by comparative gene mapping. *Genome research*, 14, 820–828.

[51] Amores, A., Catchen, J., Nanda, I., Warren, W., Walter, R., Schartl, M., and Postlethwait, J. H. (2014) A RAD-Tag Genetic Map for the Platyfish (*Xiphophorus maculatus*) Reveals Mechanisms of Karyotype Evolution Among Teleost Fish. *Genetics*, 197, 625–641.

[52] Kawahara, R., Miya, M., Mabuchi, K., Lavoué, S., Inoue, J. G., Satoh, T. P., Kawaguchi, A., and Nishida, M. (2008) Interrelationships of the 11 gasterosteiform

families (sticklebacks, pipefishes, and their relatives): a new perspective based on whole mitogenome sequences from 75 higher teleosts. *Molecular phylogenetics and evolution*, 46, 224–236.

[53] Setiamarga, D. H. E., Miya, M., Yamanoue, Y., Mabuchi, K., Satoh, T. P., Inoue, J. G., and Nishida, M. (2008) Interrelationships of Atherinomorpha (medakas, flyingfishes, killifishes, silversides, and their relatives): The first evidence based on whole mitogenome sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 49, 598–605.

[54] Ao, J., Mu, Y., Xiang, L.-X., Fan, D., Feng, M., Zhang, S., Shi, Q., Zhu, L.-Y., Li, T., Ding, Y., Nie, L., Li, Q., Dong, W., Jiang, L., Sun, B., Zhang, X., Li, M., Zhang, H.-Q., Xie, S., Zhu, Y., Jiang, X., Wang, X., Mu, P., Chen, W., Yue, Z., Wang, Z., Wang, J., Shao, J.-Z., and Chen, X. (2015) Genome Sequencing of the Perciform Fish *Larimichthys crocea* Provides Insights into Molecular and Genetic Mechanisms of Stress Adaptation, *PLOS Genetics*, 11, e1005118.

[55] Aoki, J., Kai, W., Kawabata, Y., Ozaki, A., Yoshida, K., Tsuzaki, T., Fuji, K., Koyama, T., Sakamoto, T., and Araki, K. (2014) Construction of a radiation hybrid panel and the first yellowtail (Seriola quinqueradiata) radiation hybrid map using a nanofluidic dynamic array. *BMC genomics*, 15, 165.

[56] KAKEN - ゲノム情報を利用した魚類汎用連鎖解析システムの開発 (20380107) - 2009年度研究実績報告書. *科学研究費助成事業データベース*研究課題

番号：20380107.

[57] Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., and Rozen, S. G. (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40, e115.

[58] Blacket, M. J., Robin, C., Good, R. T., Lee, S. F., and Miller, A. D. (2012) Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments--an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular ecology resources*, 12, 456–463.

[59] Lorieux, M. (2012) MapDisto: fast and efficient computation of genetic linkage maps. *Molecular Breeding*, 30, 1231–1235.

[60] Chakravarti, A., Lasher, L. K., and Reefer, J. E. (1991) A maximum likelihood method for estimating genome length using genetic linkage data. *Genetics*, 128, 175–182.

[61] Lechner, M., Findeiss, S., Steiner, L., Marz, M., Stadler, P. F., and Prohaska, S. J. (2011) Proteinortho: detection of (co-)orthologs in large-scale analysis. *BMC bioinformatics*, 12, 124.

[62] Edwards, J. H. (1991) The Oxford Grid. *Annals of human genetics*, 55, 17–31.

[63] Aoki, J.-Y., Kai, W., Kawabata, Y., Ozaki, A., Yoshida, K., Koyama, T., Sakamoto, T., and Araki, K. (2015) Second generation physical and linkage maps of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) and comparison of synteny with four model fish. *BMC*

*genomics*, 16, 406.

[64] Fujiwara, A., Fujiwara, M., Nishida-Umehara, C., Abe, S., and Masaoka, T. (2007) Characterization of Japanese flounder karyotype by chromosome bandings and fluorescence in situ hybridization with DNA markers. *Genetica*, 131, 267–274.

[65] Ohara, E., Nishimura, T., Nagakura, Y., Sakamoto, T., Mushiake, K., and Okamoto, N. (2005) Genetic linkage maps of two yellowtails (*Seriola quinqueradiata* and *Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 244, 41–48.

[66] Reid, D. P., Smith, C.-A., Rommens, M., Blanchard, B., Martin-Robichaud, D., and Reith, M. (2007) A Genetic linkage map of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Genetics*, 177, 1193–1205.

[67] Castaño-Sánchez, C., Fuji, K., Ozaki, A., Hasegawa, O., Sakamoto, T., Morishima, K., Nakayama, I., Fujiwara, A., Masaoka, T., Okamoto, H., Hayashida, K., Tagami, M., Kawai, J., Hayashizaki, Y., and Okamoto, N. (2010) A second generation genetic linkage map of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *BMC genomics*, 11, 554.

[68] Fuji, K., Koyama, T., Kai, W., Kubota, S., Yoshida, K., Ozaki, A., Aoki, J., Kawabata, Y., Araki, K., Tsuzaki, T., Okamoto, N., and Sakamoto, T. (2014) Construction of a high-coverage bacterial artificial chromosome library and comprehensive genetic linkage map of yellowtail Seriola quinqueradiata. *BMC research notes*, 7, 200.

[69] Sakamoto, T., Danzmann, R. G., Gharbi, K., Howard, P., Ozaki, A., Khoo, S. K.,

Woram, R. A., Okamoto, N., Ferguson, M. M., Holm, L. E., Guyomard, R., and Hoyheim, B. (2000) A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics*, 155, 1331–1345.

[70] Singer, A., Perlman, H., Yan, Y., Walker, C., Corley-Smith, G., Brandhorst, B., and Postlethwait, J. (2002) Sex-specific recombination rates in zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics*, 160, 649–57.

[71] Guillén, Y., and Ruiz, A. (2012) Gene alterations at Drosophila inversion breakpoints provide prima facie evidence for natural selection as an explanation for rapid chromosomal evolution. *BMC genomics*, 13, 53.

[72] Broman, K. W. (1999) Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. *Lab animal*, 30, 44 – 52.

[73] Ozaki, A., Yoshida, K., Fuji, K., Kubota, S., Kai, W., Aoki, J., Kawabata, Y., Suzuki, J., Akita, K., Koyama, T., Nakagawa, M., Hotta, T., Tsuzaki, T., Okamoto, N., Araki, K., and Sakamoto, T. (2013) Quantitative trait loci (QTL) associated with resistance to a monogenean parasite (*Benedenia seriolae*) in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) through genome wide analysis. *PloS one*, 8, e64987.

[74] Fuji, K., Kobayashi, K., Hasegawa, O., Coimbra, M. R. M., Sakamoto, T., and Okamoto, N. (2006) Identification of a single major genetic locus controlling the resistance

to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), *Aquaculture*, 254, 203–210.

[75] Song, W., Pang, R., Niu, Y., Gao, F., Zhao, Y., Zhang, J., Sun, J., Shao, C., Liao, X., Wang, L., Tian, Y., and Chen, S. (2012) Construction of high-density genetic linkage maps and mapping of growth-related quantitative trail loci in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *PloS one*, 7, e50404.

[76] Palaiokostas, C., Bekaert, M., Davie, A., Cowan, M. E., Oral, M., Taggart, J. B., Gharbi, K., McAndrew, B. J., Penman, D. J., and Migaud, H. (2013) Mapping the sex determination locus in the Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus) using RAD sequencing. *BMC genomics*, 14, 566.

[77] Tanaka, Y., Satoh, K., Iwahashi, M., and Yamada, H. (2006) Growth-dependent recruitment of Pacific bluefin tuna Thunnus orientalis in the northwestern Pacific Ocean. *Marine ecology*, 319, 225–235.

[78] Satoh, K., Tanaka, Y., and Iwahashi, M. (2008) Variations in the instantaneous mortality rate between larval patches of Pacific bluefin tuna Thunnus orientalis in the northwestern Pacific Ocean. *Fisheries Research*, 89, 248–256.

[79] Satoh, K., Tanaka, Y., Masujima, M., Okazaki, M., Kato, Y., Shono, H., and Suzuki, K. (2012) Relationship between the growth and survival of larval Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, *Marine Biology*, 160, 691–702.

[80] Tanaka, Y., Minami, H., Ishihi, Y., Kumon, K., Eba, T., Nishi, A., Nikaido, H., and Shiozawa, S. (2010) 安定同位体比分析によるクロマグロ仔魚の生物餌料の利用実態の推定：成長差との関連. *水産増殖*, 58, 501–508.

[81] Wang, C. M., Lo, L. C., Zhu, Z. Y., and Yue, G. H. (2006) A genome scan for quantitative trait loci affecting growth-related traits in an F1 family of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *BMC genomics*, 7, 274.

[82] Sutter, N. B., Bustamante, C. D., Chase, K., Gray, M. M., Zhao, K., Zhu, L., Padhukasahasram, B., Karlins, E., Davis, S., Jones, P. G., Quignon, P., Johnson, G. S., Parker, H. G., Fretwell, N., Mosher, D. S., Lawler, D. F., Satyaraj, E., Nordborg, M., Lark, K. G., Wayne, R. K., and Ostrander, E. A. (2007) A Single IGF1 Allele Is a Major Determinant of Small Size in Dogs. *Science*, 316, 112–115.

[83] Xu, Y. X., Zhu, Z. Y., Lo, L. C., Wang, C. M., Lin, G., Feng, F., and Yue, G. H. (2006) Characterization of two parvalbumin genes and their association with growth traits in Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Animal Genetics*, 37, 266–268.

[84] Xia, J. H., Lin, G., He, X., Liu, P., Liu, F., Sun, F., Tu, R., and Yue, G. H. (2013) Whole genome scanning and association mapping identified a significant association between growth and a SNP in the IFABP-a gene of the Asian seabass. *BMC genomics*, 14, 295.

[85] Liu, F., Sun, F., Xia, J. H., Li, J., Fu, G. H., Lin, G., Tu, R. J., Wan, Z. Y., Quek,

D., and Yue, G. H. (2014) A genome scan revealed significant associations of growth traits with a major QTL and GHR2 in tilapia. *Scientific reports*, 4, 7256.

[86] Baranski, M., Moen, T., and Våge, D. I. (2010) Mapping of quantitative trait loci for flesh colour and growth traits in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genetics selection evolution*, 42, 17.

[87] Moghadam, H. K., Poissant, J., Fotherby, H., Haidle, L., Ferguson, M. M., and Danzmann, R. G. (2007) Quantitative trait loci for body weight, condition factor and age at sexual maturation in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): comparative analysis with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular genetics and genomics*, 277, 647–61.

[88] Wang, W., Hu, Y., Ma, Y., Xu, L., Guan, J., and Kong, J. (2015) High-density genetic linkage mapping in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) based on SNP markers and major sex- and growth-related regions detection. *PloS one*, 10, e0120410.

[89] Loukovitis, D., Sarropoulou, E., Batargias, C., Apostolidis, A. P., Kotoulas, G., Tsigenopoulos, C. S., and Chatziplis, D. (2012) Quantitative trait loci for body growth and sex determination in the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* L. *Animal genetics*, 43, 753–9.

[90] Massault, C., Hellemans, B., Louro, B., Batargias, C., Van Houdt, J. K. J., Canario, A., Volckaert, F. A. M., Bovenhuis, H., Haley, C., and de Koning, D. J. (2010) QTL for

body weight, morphometric traits and stress response in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Animal genetics*, 41, 337–45.

[91] Royston, P. (1995) Remark AS R94: A Remark on Algorithm AS 181: The W-test for Normality. *Applied Statistics*, 44, 547.

[92] Tsubasa Uchino., Yoji Nakamura., Masashi Sekino., Wataru Kai., Atushi Fujiwara., Motoshige Yasuike., Takuma Sugaya., Himeko Fukuda., Motohiko Sano., and Takashi Sakamoto. (2016) Constructing genetic linkage maps using the whole genome sequence of Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) and a comparison of chromosome structure among teleost species. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 7(2), 85-122.

[93] Broman, K. W., Wu, H., Sen, S., and Churchill, G. A. (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 19, 889–90.

[94] Zeng, Z. B. (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, 136, 1457–68.

[95] Van, O. J. W. (1999) LOD significance thresholds for QTL analysis in experimental populations of diploid species. *Heredity*, 83, 613–624.

[96] Wu, Y. Close, T. J., and Lonardi, S. (2008) On the accurate construction of consensus genetic maps. *Computational systems bioinformatics*, 7, 285–96.

[97] Manichaikul, A., Dupuis, J., Sen, S., and Broman, K. W. (2006) Poor performance of bootstrap confidence intervals for the location of a quantitative trait locus. *Genetics*, 174,

481–9.

[98] Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., and Robles, M. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21, 3674–6.

[99] Sánchez-Ramos, I., Cross, I., Mácha, J., Martínez-Rodríguez, G., Krylov, V., and Rebordinos, L. (2012) Assessment of tools for marker-assisted selection in a marine commercial species: significant association between MSTN-1 gene polymorphism and growth traits. *The Scientific World Journal*, 2012, 369802.

[100] 浜口昌巳., and 楠田理一 (1992) 養殖クロマグロから分離された *Photobacterium phosphoreum*の病原性に関する研究. *南西海区水産研究所研究報告*, 59–92.

[101] Sugaya, T., Mori, K., Nishioka, T., Masuma, S., Oka, M., Mushiake, K., Okinaka, Y., and Nakai, T. (2009) Genetic heterogeneity of betanodaviruses in juvenile production trials of Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* (Temminck & Schlegel). *Journal of fish diseases*, 32, 815–23.

[102] Ogawa, K. (2010) Parasitic diseases of fish and shellfish of Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 76, 586–598.

[103] Sugihara, Y., Yamada, T., Tamaki, A., Yamanishi, R., and Kanai, K. (2014) Larval stages of the bluefin tuna blood fluke Cardicola opisthorchis (Trematoda:

Aporocotylidae) found from Terebella sp. (Polychaeta: Terebellidae). *Parasitology international*, 63, 295–9.

[104] Yokoyama, H., Suzuki, J., and Shirakashi, S. (2014) Kudoa hexapunctata n. sp. (Myxozoa: Multivalvulida) from the somatic muscle of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* and re-description of K. neothunni in yellowfin tuna *T. albacares*. *Parasitology international*, 63, 571–9.

[105] Nakajima, K., and Kunita, J. (2005) Red sea bream iridoviral disease. *Uirusu*, 55, 115–25.

[106] Inouye, K., Yamano, K., Maeno, Y., Nakajima, K., Matsuoka, M., Wada, Y., and Sorimachi, M. (1992) Iridovirus Infection of Cultured Red Sea Bream, *Pagrus major*. *Fish Pathology*, 27, 19–27.

[107] 中井敏博 (2012) 改訂・魚病学概論 第二版, 恒星社厚生閣, 46-47.

[108] Kurita, J., Nakajima, K., Hirono, I., and Aoki, T. (2002) Complete genome sequencing of Red Sea Bream Iridovirus (RSIV), *Fisheries science*, 68, 1113–1115.

[109] Nakajima, K., Maeno, Y., Fukudome, M., Fukuda, Y., Tanaka, S., Matsuoka, S., and Sorimachi, M. (1995) Immunofluorescence Test for the Rapid Diagnosis of Red Sea Bream Iridovirus Infection using Monoclonal Antibody. *Fish Pathology*, 30, 115–119.

[110] Kurita, J., Nakajima, K., Hirono, I., and Aoki, T. (1998) Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification of DNA of Red Sea Bream Iridovirus (RSIV). *Fish*

*Pathology*, 33, 17–23.

[111] Nakajima, K., Maeno, Y., Honda, A., Yokoyama, K., Tooriyama, T., and Manabe, S. (1999) Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in a field trial test. *Diseases of aquatic organisms*, 36, 73–5.

[112] Nakajima, K., Maeno, Y., Kurita, J., and Inui, Y. (1997) Vaccination Against Red Sea Bream Iridoviral Disease in Red Sea Bream. *Fish Pathology*, 32, 205–209.

[113] Kawakami, H., and Nakajima, K. (2002) Cultured Fish Species Affected by Red Sea Bream Iridoviral Disease from 1996 to 2000. *Fish Pathology*, 37, 45–47.

[114] Iwakiri, S., Song, J.-Y., Nakayama, K., Oh, M.-J., Ishida, M., and Kitamura, S.-I. (2014) Host responses of Japanese flounder Paralichthys olivaceus with lymphocystis cell formation. *Fish & shellfish immunology*, 38, 406–11.

[115] Rodríguez-Ramilo, S. T., De La Herrán, R., Ruiz-Rejón, C., Hermida, M., Fernández, C., Pereiro, P., Figueras, A., Bouza, C., Toro, M. A., Martínez, P., and Fernández, J. (2014) Identification of quantitative trait loci associated with resistance to viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in turbot (*Scophthalmus maximus*) : a comparison between bacterium, parasite and virus diseases. *Marine biotechnology*, 16, 265–76.

[116] Ozaki, A., Sakamoto, T., Khoo, S., Nakamura, K., Coimbra, M. R., Akutsu, T., and Okamoto, N. (2001) Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular genetics and genomics* , 265, 23–31.

[117] Campbell, N. R., LaPatra, S. E., Overturf, K., Towner, R., and Narum, S. R. (2014) Association mapping of disease resistance traits in rainbow trout using restriction site associated DNA sequencing. *G3*, 4, 2473–81.

[118] Houston, R. D., Haley, C. S., Hamilton, A., Guy, D. R., Tinch, A. E., Taggart, J. B., McAndrew, B. J., and Bishop, S. C. (2008) Major quantitative trait loci affect resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genetics*, 178, 1109–15.

[119] Moen, T., Baranski, M., Sonesson, A. K., and Kjøglum, S. (2009) Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait. *BMC genomic*s, 10, 368.

[120] Gheyas, A. A., Haley, C. S., Guy, D. R., Hamilton, A., Tinch, A. E., Mota-Velasco, J. C., and Woolliams, J. A. (2010) Effect of a major QTL affecting IPN resistance on production traits in Atlantic salmon. *Animal genetics*, 41, 666–8.

[121] Houston, R. D., Haley, C. S., Hamilton, A., Guy, D. R., Mota-Velasco, J. C., Gheyas, A. A., Tinch, A. E., Taggart, J. B., Bron, J. E., Starkey, W. G., McAndrew, B. J., Verner-Jeffreys, D. W., Paley, R. K., Rimmer, G. S. E., Tew, I. J., and Bishop, S. C. (2010) The susceptibility of Atlantic salmon fry to freshwater infectious pancreatic

necrosis is largely explained by a major QTL. *Heredity*, 105, 318–27.

[122] Houston, R. D., Davey, J. W., Bishop, S. C., Lowe, N. R., Mota-Velasco, J. C., Hamilton, A., Guy, D. R., Tinch, A. E., Thomson, M. L., Blaxter, M. L., Gharbi, K., Bron, J. E., and Taggart, J. B. (2012) Characterisation of QTL-linked and genome-wide restriction site-associated DNA (RAD) markers in farmed Atlantic salmon. *BMC Genomics*, 13, 244.

[123] Gonen, S., Baranski, M., Thorland, I., Norris, A., Grove, H., Arnesen, P., Bakke, H., Lien, S., Bishop, S. C., and Houston, R. D. (2015) Mapping and validation of a major QTL affecting resistance to pancreas disease (salmonid alphavirus) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Heredity*, 115, 405–14.

[124] Moen, T., Torgersen, J., Santi, N., Davidson, W. S., Baranski, M., Ødegård, J., Kjøglum, S., Velle, B., Kent, M., Lubieniecki, K. P., Isdal, E., and Lien, S. (2015) Epithelial Cadherin Determines Resistance to Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Atlantic Salmon. *Genetics*, 200, 1313–26.

[125] Robinson, N. A., Gopikrishna, G., Baranski, M., Katneni, V. K., Shekhar, M. S., Shanmugakarthik, J., Jothivel, S., Gopal, C., Ravichandran, P., Gitterle, T., and Ponniah, A. G. (2014) QTL for white spot syndrome virus resistance and the sex-determining locus in the Indian black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *BMC genomics*, 15, 731.

[126] Li, J., Boroevich, K. A., Koop, B. F., and Davidson, W. S. (2011) Comparative

genomics identifies candidate genes for infectious salmon anemia (ISA) resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Marine biotechnology*, 13, 232–41.

[127] Sekino, M., and Kakehi, S. (2011) PARFEX v1.0: an EXCEL$^{TM}$-based software package for parentage allocation, Conservation Genetics Resources, 4, 275–278.

[128] Lua, D. T., Yasuike, M., Hirono, I., and Aoki, T. (2005) Transcription program of red sea bream iridovirus as revealed by DNA microarrays. *Journal of virology*, 79, 15151–64.

[129] Ito, T., Yoshiura, Y., Kamaishi, T., Yoshida, K., and Nakajima, K. (2013) Prevalence of red sea bream iridovirus among organs of Japanese amberjack (Seriola quinqueradiata) exposed to cultured red sea bream iridovirus. *The Journal of general virology*, 94, 2094–101.

[130] Massault, C., Bovenhuis, H., Haley, C., and de Koning, D.-J. (2008) QTL mapping designs for aquaculture. *Aquaculture*, 285, 23–29.

[131] 竹井祥郎 (2005) 海洋生物の機能：生命は海にどう適応しているか. *東海大学出版会*, 223.

[132] Strachan, T., and Andrew, R. (2011) ヒトの分子遺伝学 第4版. *メディカル・サイエンス・インターナショナル*, 138.

[133] Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., Selker, E. U., Cresko, W. A., and Johnson, E. A. (2008) Rapid SNP discovery and

genetic mapping using sequenced RAD markers. *PloS one*, 3, e3376.

[134] Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., and Hoekstra, H. E. (2012) Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PloS one*, 7, e37135.

[135] Recknagel, H., Jacobs, A., Herzyk, P., and Elmer, K. R. (2015) Double-digest RAD sequencing using Ion Proton semiconductor platform (ddRADseq-ion) with nonmodel organisms. *Molecular ecology resources*, 15, 1316–29.

[136] Toonen, R. J., Puritz, J. B., Forsman, Z. H., Whitney, J. L., Fernandez-Silva, I., Andrews, K. R., and Bird, C. E. (2013) ezRAD: a simplified method for genomic genotyping in non-model organisms. *PeerJ*, 1, e203.

[137] Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., and Mitchell, S. E. (2011) A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS one*, 6, e19379.

[138] Jiang, Z., Wang, H., Michal, J. J., Zhou, X., Liu, B., Woods, L. C. S., and Fuchs, R. A. (2016) Genome Wide Sampling Sequencing for SNP Genotyping: Methods, Challenges and Future Development. *International journal of biological sciences*, 12, 100–8.

[139] Bielenberg, D. G., Rauh, B., Fan, S., Gasic, K., Abbott, A. G., Reighard, G. L., Okie, W. R., and Wells, C. E. (2015) Genotyping by Sequencing for SNP-Based Linkage

Map Construction and QTL Analysis of Chilling Requirement and Bloom Date in Peach (*Prunus persica* L.). *PloS one*, 10, e0139406.

[140] Catchen, J. M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., and Postlethwait, J. H. (2011) Stacks: building and genotyping Loci de novo from short-read sequences. *G3*, 1, 171–82.

[141] Baxter, S. W., Davey, J. W., Johnston, J. S., Shelton, A. M., Heckel, D. G., Jiggins, C. D., and Blaxter, M. L. (2011) Linkage mapping and comparative genomics using next-generation RAD sequencing of a non-model organism. *PloS one*, 6, e19315.

[142] Eaton, D. A. R. (2014) PyRAD: assembly of de novo RADseq loci for phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 30, 1844–9.

[143] 柿岡諒 (2013) 生態・進化ゲノミクスのためのRADシーケンシング. *生物科学*, 64, 168–176.

[144] VAN OOIJEN, J. W. (2011) Multipoint maximum likelihood mapping in a full-sib family of an outbreeding species. *Genetics Research*, 93, 343–349.

[145] Margarido, G. R. A., Souza, A. P., and Garcia, A. A. F. (2007) OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas*, 144, 78–9.

[146] Kakioka, R., Kokita, T., Kumada, H., Watanabe, K., and Okuda, N. (2013) A RAD-based linkage map and comparative genomics in the gudgeons (genus Gnathopogon, Cyprinidae). *BMC genomics*, 14, 32.

[147] Rastas, P., Paulin, L., Hanski, I., Lehtonen, R., and Auvinen, P. (2013) Lep-MAP: fast and accurate linkage map construction for large SNP datasets. *Bioinformatics*, 29, 3128–34.

[148] Liu, D., Ma, C., Hong, W., Huang, L., Liu, M., Liu, H., Zeng, H., Deng, D., Xin, H., Song, J., Xu, C., Sun, X., Hou, X., Wang, X., and Zheng, H. (2014) Construction and analysis of high-density linkage map using high-throughput sequencing data. *PloS one*, 9, e98855.

[149] Fierst, J. L. (2015) Using linkage maps to correct and scaffold de novo genome assemblies: methods, challenges, and computational tools. *Frontiers in Genetics*, 6, 220.

[150] Amores, A., Catchen, J., Ferrara, A., Fontenot, Q., and Postlethwait, J. H. (2011) Genome evolution and meiotic maps by massively parallel DNA sequencing: spotted gar, an outgroup for the teleost genome duplication. *Genetics*, 188, 799–808.

[151] Everett, M. V., Miller, M. R., and Seeb, J. E. (2012) Meiotic maps of sockeye salmon derived from massively parallel DNA sequencing. *BMC genomics*, 13, 521.

[152] Kai, W., Nomura, K., Fujiwara, A., Nakamura, Y., Yasuike, M., Ojima, N., Masaoka, T., Ozaki, A., Kazeto, Y., Gen, K., Nagao, J., Tanaka, H., Kobayashi, T., and Ototake, M. (2014) A ddRAD-based genetic map and its integration with the genome assembly of Japanese eel (*Anguilla japonica*) provides insights into genome evolution after the teleost-specific genome duplication. *BMC genomics*, 15, 233.

[153] Recknagel, H., Elmer, K. R., and Meyer, A. (2013) A hybrid genetic linkage map of two ecologically and morphologically divergent Midas cichlid fishes (Amphilophus spp.) obtained by massively parallel DNA sequencing (ddRADSeq). *G3*, 3, 65–74.

[154] Jamann, T. M., Balint-Kurti, P. J., and Holland, J. B. (2015) QTL mapping using high-throughput sequencing. *Methods in molecular biology*, 1284, 257–85.

[155] Carmichael, S. N., Bekaert, M., Taggart, J. B., Christie, H. R. L., Bassett, D. I., Bron, J. E., Skuce, P. J., Gharbi, K., Skern-Mauritzen, R., and Sturm, A. (2013) Identification of a sex-linked SNP marker in the salmon louse (Lepeophtheirus salmonis) using RAD sequencing. *PloS one*, 8, e77832.

[156] Palaiokostas, C., Bekaert, M., Khan, M. G. Q., Taggart, J. B., Gharbi, K., McAndrew, B. J., and Penman, D. J. (2015) A novel sex-determining QTL in Nile tilapia (Oreochromis niloticus). *BMC genomics*, 16, 171.

[157] Palti, Y., Vallejo, R. L., Gao, G., Liu, S., Hernandez, A. G., Rexroad, C. E., and Wiens, G. D. (2015) Detection and Validation of QTL Affecting Bacterial Cold Water Disease Resistance in Rainbow Trout Using Restriction-Site Associated DNA Sequencing. *PloS one*, 10, e0138435.

[158] Liu, S., Vallejo, R. L., Palti, Y., Gao, G., Marancik, D. P., Hernandez, A. G., and Wiens, G. D. (2015) Identification of single nucleotide polymorphism markers associated with bacterial cold water disease resistance and spleen size in rainbow trout. *Frontiers in*

*genetics*, 6, 298.

[159] Shao, C., Niu, Y., Rastas, P., Liu, Y., Xie, Z., Li, H., Wang, L., Jiang, Y., Tai, S., Tian, Y., Sakamoto, T., and Chen, S. (2015) Genome-wide SNP identification for the construction of a high-resolution genetic map of Japanese flounder (Paralichthys olivaceus): applications to QTL mapping of Vibrio anguillarum disease resistance and comparative genomic analysis. *DNA research*, 22, 161–70.

[160] Gutierrez, A. P., Yáñez, J. M., Fukui, S., Swift, B., and Davidson, W. S. (2015) Genome-wide association study (GWAS) for growth rate and age at sexual maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *PloS one*, 10, e0119730.

[161] Laporte, M., Rogers, S. M., Dion-Côté, A.-M., Normandeau, E., Gagnaire, P.-A., Dalziel, A. C., Chebib, J., and Bernatchez, L.(2015) RAD-QTL Mapping Reveals Both Genome-Level Parallelism and Different Genetic Architecture Underlying the Evolution of Body Shape in Lake Whitefish (*Coregonus clupeaformis*) Species Pairs. *G3*, 5, 1481–91.

[162] Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Etter, P. D., Stiffler, N., Johnson, E. A., and Cresko, W. A. (2010) Population genomics of parallel adaptation in threespine stickleback using sequenced RAD tags. *PLoS genetics*, 6, e1000862.

[163] Yasuike, M., Fujiwara, A., Nakamura, Y., Iwasaki, Y., Nishiki, I., Sugaya, T., Shimizu, A., Sano, M., Kobayashi, T., and Ototake, M. (2015) A functional genomics tool for the Pacific bluefin tuna: Development of a 44K oligonucleotide microarray from

whole-genome sequencing data for global transcriptome analysis. *Gene*, 576, 603–609.

# 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始熱心なご指導を賜りました、指導教官である東京海洋大学 坂本崇 教授に心から感謝の意を申し上げます。坂本先生には活発な議論、有益なご助言をいただき、実験が上手くいかなくなったときも、何度となく救いの手を差し伸べてくださいました。さらに共同研究先とのディスカッションの際には、お忙しいなかにも関わらず付き添ってくださいました。厚くお礼を申し上げます。

博士論文の副指導教官の東京海洋大学　佐野元彦教授には、国立研究開発法人水産総合研究センター　中央水産研究所　水産遺伝子解析センターのセンター長を務められていた時代から、クロマグロゲノム育種事業の一環としてさまざまなご提案、ご助言を頂きました。東京海洋大学の病理学研究室に移られてからも、常日頃何かと面倒を見てくださりました。本当にありがとうございました。

博士論文の副指導教官の東京海洋大学　近藤秀裕准教授には、本博士論文研究をまとめるにあたり、御指導、御助言を頂きました。また、本論文の一部の成果を国際学会で発表する際には、現地において大変お世話になりました。厚く御礼を申し上げます。

国立研究開発法人　水産総合研究センター　瀬戸内海区水産研究所　海産無脊椎動物研究センター　菅谷琢磨博士には、連鎖解析用サンプルや QTL 解析用サン

プルの準備において全面的にご協力いただきました。また常に、解析手法などについての私の質問に丁寧なご回答をくださいました。大変感謝致しております、ありがとうございました。

国立研究開発法人　水産総合研究センター　中央水産研究所の藤原篤志博士には、同センターや本学で行われたクロマグロ事業のディスカッションにおいて、適格なアドバイスを頂きました。ありがとうございました。

同研究所の中村洋路博士には、クロマグロとメダカ染色体配列の比較および、PCR プライマー設計など多岐にわたりご解析を行っていただきました。本研究の多くの結果は中村博士のご協力なしでは達成できなかったものと思われます。この場をお借りして御礼申し上げます。

同研究所の安池元重博士には、MS マーカーの開発においてヘテロ接合体率の算出のためのフォーマットの作成にご協力いただきました。感謝いたしております。

同研究所の関野正志博士には、連鎖解析用の同胞個体の推定を行っていただき、信頼のおける解析サンプルを提供してくださいました。どうもありがとうございました。

同研究所（現フリューダイム株式会社）の甲斐渉博士には、他魚種とのオルソログ遺伝子の同定や、比較ゲノム解析において大変お世話になりました。誠にありがとうございます。

本学の放射性同元素利用施設の利用（特にキャピラリーシークエンサーの利用）

にあたっては、施設管理者である伊藤　友加里氏にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

2011 年度　卒業生の福田姫子さん、そして 2014 年度　卒業生の細田江梨奈さんの二人は、私にとって大事な後輩であっただけでなく、自分が未熟な先輩であったことから、教えることによって、逆に知識や考え方などのより多くを教わることになり、再認識することに繋がりました。また、第 2 章のマイクロサテライトマーカーの開発、第 4 章の QTL 領域の免疫関連遺伝子探索は、彼女達の努力の成果によるものであることを、ここに強調したいと思います。本当にありがとうございました。

実験が上手くいかないときも様々なご助言をくださり、楽しい研究生活を送らせて下さった、水族病理学研究室の皆さまに心から感謝いたします。博士前期課程の 2 年間と合せて、当研究室で過ごした 5 年間が自分の人生の中で非常に貴重な財産となり、たいへん思い出深いものとなることを確信しております。

最後になりましたが、研究生活を営むことに理解を示し、自宅通学の時には帰宅が遅くなってしまうことを寛大にも許してくれた両親に深く感謝いたします。長年にわたり学費を負担していただき、また両親は一人暮らしとなってからも頻繁に連絡をくれることで、私を励まし、元気づけてくれました。

本研究は、上記の方々のご助力なくしては遂行し得なかったことを、ここにあらためて記します。