

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

タイ国における選抜育種に向けたアカマダラハタと
タマカイの
雑種ハタF1集団を用いた成長関連形質のQTL解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-01-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 久保田, 諭 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1490

博士学位論文

タイ国における選抜育種に向けたアカマダラハタとタマカイの
雑種ハタ F₁ 集団を用いた成長関連形質の QTL 解析

平成 28 年度

(2017 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

久保田 諭

博士学位論文

タイ国における選抜育種に向けたアカマダラハタとタマカイの
雑種ハタ F₁ 集団を用いた成長関連形質の QTL 解析

平成 28 年度

(2017 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

久保田 諭

目次

序論	1
第 1 章 アカマダラハタ（雌）とタマカイ（雄）の連鎖地図の作製	7
第 2 章 F_1 雑種ハタを用いた成長関連形質の QTL 解析	34
第 3 章 F_1 雑種ハタにおける成長関連形質の QTL と環境要因との関連性	53
総合考察	74
謝辞	78
参考文献	79

序論

ハタ類はスズキ目ハタ科に属する魚の総称であり、東アジアおよび東南アジアにおいて、その市場価値と高密度での飼育が可能であるといった養殖環境への適応性が高いことから盛んに養殖されている (Heemstra & Randall 1993; Pierre *et al.* 2008)。現在養殖されているハタ類の主な種として、アカマダラハタ (*Epinephelus fuscoguttatus*)、サラサハタ (*Cromileptes altivelis*)、スジアラ (*Plectropomus leopardus*)、タマカイ (*E. lanceolatus*)、チャイロマルハタ (*E. coioides*) およびヤイトハタ (*E. malabaricus*) が挙げられる (Pomeroy 2002; Rahimnejad *et al.* 2015)。しかしながら、ハタ類は繁殖が難しく、仔魚期における生存率が低いことから人工的に生産された稚魚の安定的な確保が難しいことに加え、成長するのに時間がかかるために、飼育時にウイルス性神経壊死症などの疾病による被害を受けるリスクが高いなど、養殖するにあたって多くの問題を抱えている (Kohno *et al.* 1997; Marte 2003; Harikrishnan *et al.* 2011; Petersen *et al.* 2013)。早く成長する種苗を開発することは、疾病による被害を受けうる期間や飼料、設備等の養殖にかかる費用を削減することにつながるために、ハタ類の育種計画を検討するうえで、体長や体重等の成長関連形質の改良は重要な指標の 1 つとして考えられている。特に、日本ではクエ (*E. bruneus*)、タイ国ではアカマダラハタが主要な養殖ハタ類の 1 種であるため、これまでに同種に対する研究の一環として、成長関連形質の改良を目指した分子遺伝学的研究が行われている (Liu 2013; Kessuwan 2015)。

従来、体長や体重等の成長関連形質はその表現型を基に個体を選抜し、交配する選抜育種による改良が行われてきたが、種間交雑による雑種強勢を利用して、高成長や耐病性といった望ましい形質を保有する交雑種を作出する育種方法も魚類においては広く用いられている (Bartley *et al.* 2001; Epifanio & Nielsen 2001)。ハタ類ではアカマダラハタとマダラハタ (*E. polyphekadion*) の雑種ハタにおいて、その稚魚が親魚種の稚魚よりも早い成長を示したことが報告されている (James *et al.* 1999)。また、2008 年にはマレ

ーシアの研究チームがアカマダラハタ雌とタマカイ雄を交配して交雑種を作出することに成功している (Ch'ng & Senoo)。この交雑種の親魚種であるアカマダラハタは他のハタ類より比較的早く成長し、養殖環境への適応性も高いことが報告されている (Rachmansyah *et al.* 2009; Shapawi *et al.* 2014)。また、タマカイは2種類ある最も大型のハタ類のうちの1種であり、生育環境によっては1年で3 kg に達する例もあり、その成長はとても早い (Heemstra & Randall 1993; Sadovy *et al.*, 2003)。この2種類のハタから作出された雑種ハタはその成長の早さと嗜好性の良さからアジア、特に香港において多く消費されている (Senoo 2010)。そのため、本雑種ハタにおいては、最適な生育環境条件の検討、飼料開発のほか、高成長を示す遺伝的なメカニズムを探るための成長関連遺伝子の発現解析が行われるなど精力的に研究されている (Othman *et al.* 2015; Rahimnejad *et al.* 2015; Sun *et al.* 2016)。タイ国の政府機関であるタイ水産局クラブ沿岸漁業研究開発センターでは、本雑種ハタの雄親であるタマカイの未受精卵を得る技術が確立していないため、タマカイの種苗生産は実施されていないが、本雑種ハタの作出には成功しており、同じアカマダラハタ雌親個体を用いて同日に作出したアカマダラハタと雑種ハタではその成長が大きく異なることが確かめられている (Figure 1)。また、本雑種ハタで認められる雑種強勢による高成長はF₁世代で確認できるが、同じタマカイ雄親個体と複数のアカマダラハタ雌親個体を用いて同日に作出した雑種ハタを同一の環境下で飼育した際に、家系間および家系内の個体間でその成長に差が認められることも確認されている (Figures 2 and 3)。このことから、雑種ハタを作出する際に使用した親魚が雑種ハタの成長に影響を与えており、雑種ハタの作出に優良な親魚を使用することでより早く成長する雑種ハタ種苗が作出できるものと予想される。

成長や肉質、疾病への抵抗性のような養殖における有用形質の多くは連続的な変動を示す量的形質 (Quantitative Traits, QT) であり、複数の異なる遺伝子座 (量的形質遺伝子座群、Quantitative Trait Loci, QTLs) により支配されている (Massault *et al.* 2008)。この複雑な形質変動を支配する QTL の染色体上の位置や効果を推定する解析 (QTL 解析)

は盛んに行われており、養殖対象魚種においても有用形質に関与する QTL が報告されている (Koral *et al.* 2007; Presti *et al.* 2009; Tong & Sun; 2015)。QTL 解析により育種に有用な形質と強く連鎖する DNA マーカー座が明らかになれば、そのマーカー座の遺伝子型をもつ個体を選抜するマーカーアシスト選抜 (Marker Assisted Selection, MAS) 育種が可能となる。DNA マーカーを用いることで、有用形質に関与する遺伝子の構造や機能などがわからなくても、QTL 遺伝子型を間接的に選抜することができ、遺伝情報を考慮したより精度の高い選抜育種を行うことが可能となる (鵜飼 2002; Presti *et al.* 2009)。ヒラメにおいてウイルス病に抵抗性を示す対立遺伝子 (アレル) に連鎖した DNA マーカーを用いた選抜により、短期間での抵抗性系統の作出が報告されたことで、水産養殖魚でも MAS 育種の有用性が実証されている (Fuji *et al.* 2007)。これまでに、成長関連形質に関与する QTL に関しては、サケ科魚類 (Moghadam *et al.* 2007; Wringe *et al.* 2010)、コイ (Wang *et al.* 2012)、スズキ (Wang *et al.* 2015)、ターボット (Wang *et al.* 2015)、ティラピア (Liu *et al.* 2014)、ヒラメ (Song *et al.* 2012)、ヨーロッパヘダイ (Loukovitis *et al.* 2012) において報告されているほか、ハタ類ではクエ (Kessuwan *et al.* 2016) およびチャイロマルハタ (Yu *et al.* 2016) において報告されている。また、雑種ハタの親魚種であるアカマダラハタでは、成長関連形質に関与する 2 つの QTL が検出されているが (Kessuwan 2015)、タマカイおよび雑種ハタにおいては未だ報告されていない。

以上のような背景の下、本研究ではアカマダラハタ雌とタマカイ雄から作出される雑種ハタにおいて、MAS 育種を利用して、より早く成長する F_1 雑種ハタを開発することを目標とし、その第一歩として両親魚種由来の成長形質に関連する遺伝マーカーの開発を行った。第 1 章では、両親魚種の連鎖地図を作製した。第 2 章では、各親魚種において成長関連形質に関与する QTL および遺伝マーカーを特定した。第 3 章では、検出した QTL と環境要因との関連性を評価した。最後に、本研究で得られた成長形質に関連する遺伝マーカーを用いて、早く成長する F_1 雑種ハタを作出する育種方法を検討した。

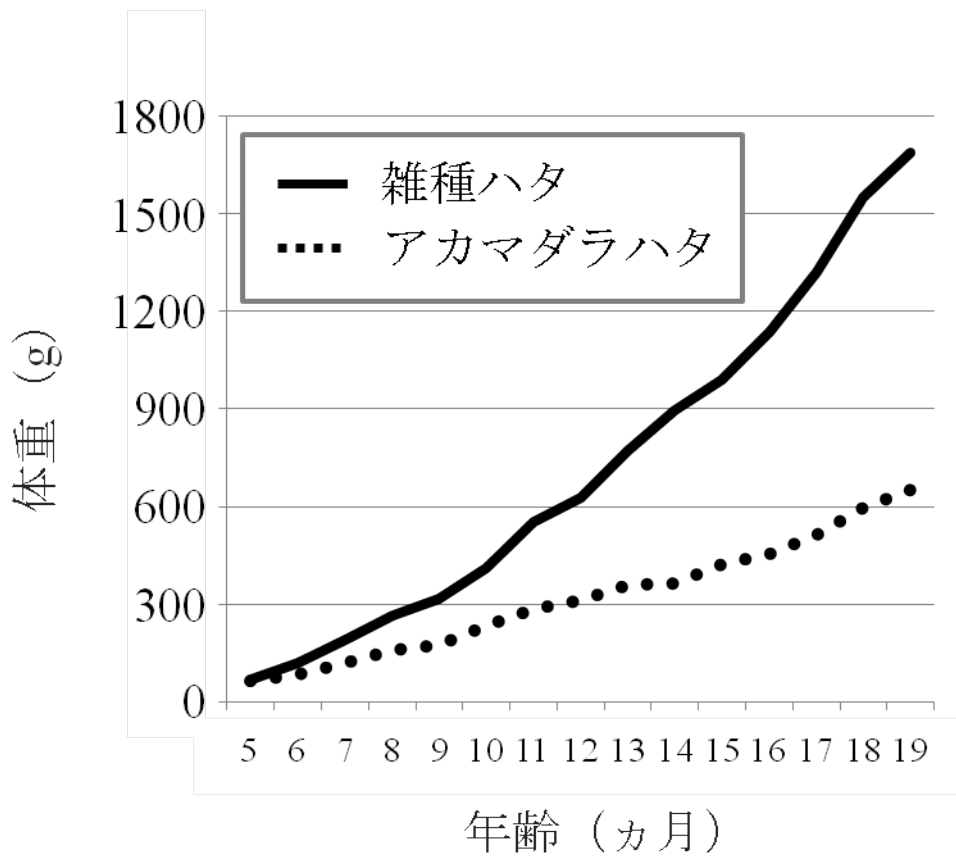


Figure 1 同日に作出した雑種ハタとアカマダラハタの成長曲線(5~19ヵ月
 齢)

雑種ハタとアカマダラハタの作出には同一のアカマダラハタ雌親 1 尾の未受精卵を使用した。

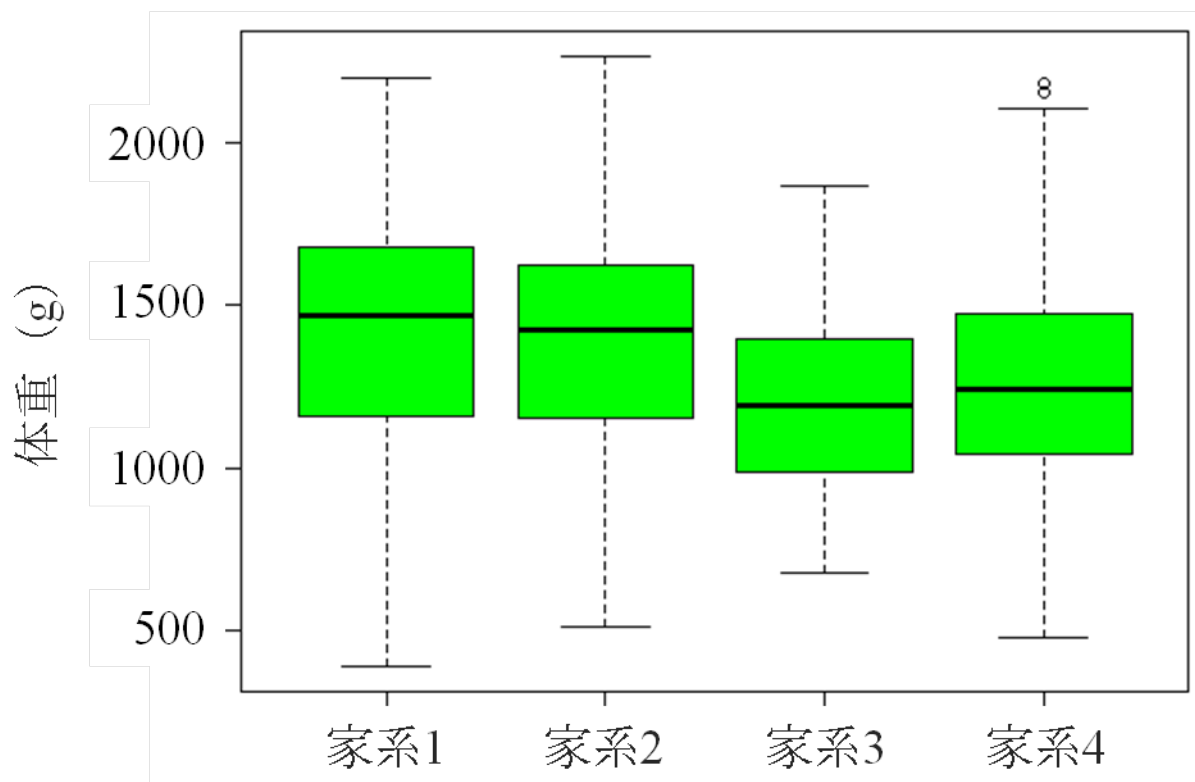


Figure 2 同日に作出した雑種ハタ 4家系の 19 ヲ月齡時の体重を示した箱ひげ図

家系 1 から 4 はそれぞれ異なるアカマダラハタ雌親個体の未受精卵を同一のタマカイ雄親個体 1 尾の精子と混合することで作出し、同じ環境下で飼育した。箱内の横線は各家系における体重データの中央値を示す。

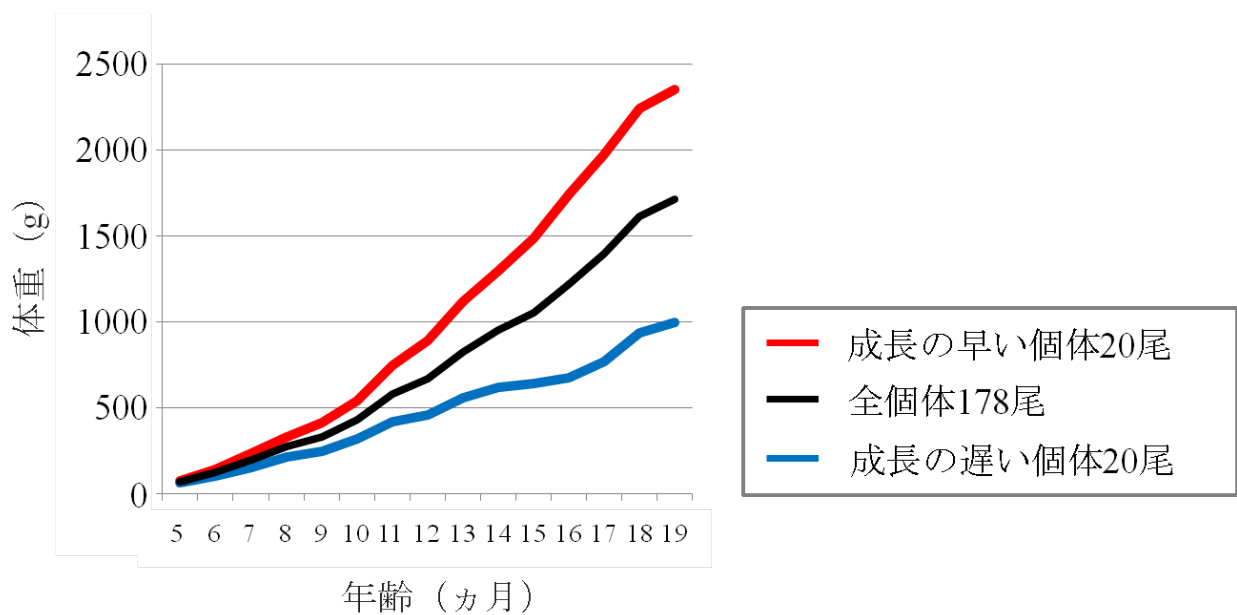


Figure 3 同一家系内で成長率に違いが認められた雑種ハタの成長曲線（5～19カ月齢）

雑種ハタはアカマダラハタ雌親 1 尾の未受精卵をタマカイ雄親個体 1 尾の精子と混合することで作出し、同じ環境下で飼育した。

第 1 章

アカマダラハタ（雌）とタマカイ（雄）の連鎖地図の作製

ゲノム上に散在する各種の優良形質に関与する QTL を特定するためには、DNA 多型を検出する多くの DNA マーカーとそれを用いて作製される連鎖地図が必要である。連鎖地図とは、DNA マーカーの染色体上での相対的位置を示した地図であり、マーカー間の組換え頻度に基づき作製される。連鎖地図を構成する DNA マーカーには RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)、SSR (Simple Sequence Repeat)、SNP (Single Nucleotide Polymorphism) マーカーがあり、これまでに 40 種以上の養殖対象魚種においてこれらのマーカーを用いた連鎖地図が作製されている (Yue 2014)。ハタ類においては、ホワイトグルーパー (*E. aeneus*)、クエおよびアカマダラハタにおいて SSR マーカーを、チャイロマルハタにおいて SNP マーカーを用いて作製された連鎖地図が報告されている (Dor *et al.* 2014; Kessuwan *et al.* 2016; Kessuwan 2015; You *et al.* 2013)。DNA マーカーの中でも、ゲノム上の主に非翻訳領域に広く、多く散在する単純反復配列を対象とした SSR マーカーは高い多型性を有する共優性マーカーであり、近縁種（異種）でも利用できる利点があるため (Liu & Cordes 2004; Barbará *et al.* 2007)、本研究で成長関連形質の QTL 解析に供試するアカマダラハタ雌とタマカイ雄から作出した F₁ 雑種ハタの解析に適していると考えられる。また、これまでに主にクエのゲノム配列情報から 1,500 個以上の SSR マーカーが開発されており、それらを用いてクエおよびアカマダラハタの連鎖地図が作製されていることから (Liu 2013; Kubota *et al.* 2014; Kessuwan 2015)、同じ SSR マーカーを使用することにより、連鎖地図の魚種間での比較が可能となる。そこで本章では、これまでに開発された SSR マーカーを用いて、アカマダラハタ（雌）とタマカイ（雄）の連鎖地図の作製を試みた。

材料および方法

連鎖解析用ゲノム DNA の調整

タイ水産局クラビ沿岸漁業研究開発センターにて 2013 年 3 月に F₀ としてアカマダラハタ雌 1 尾とタマカイ雄 1 尾を人為交配し、作出した F₁ 雑種ハタ 178 尾を連鎖解析に使用した。人為交配は染色体操作を行わず、両親魚から採取した未受精卵と精子を単純に混合することで行った。ゲノム DNA は鱗の一部より Coimbra *et al.* (2003) の方法に従い抽出した。抽出した DNA は NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて純度 (濃度) を測定した。

遺伝子型の解析

遺伝子型は Kubota *et al.* (2014) の方法を基に、単純反復配列領域を PCR 法にて増幅した後、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて DNA 断片のサイズで分離することで判定した。PCR は蛍光色素 TET で標識した 0.05 pmol μl^{-1} forward primer、0.5 pmol μl^{-1} reverse primer、2.0 mM MgCl₂ を含む 1× *Ex Taq* buffer、0.2 mM dNTP、1% bovine serum albumin、0.025 U TaKaRa *Ex Taq* (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan) および 50 ng のテンプレート DNA を含む 10 μl の反応液中で、Mastercycler pro S (Eppendorf, Barkhauseweg, Hamburg, Germany) にて行った。PCR 反応は 95°C 5 分間の熱変性後、95°C 30 秒、56°C 1 分、72°C 1 分のサイクルを 36 サイクル行い、72°C で 10 分間伸長反応した後、4°C まで急冷した。得られた PCR 産物は、等量の Loading dye (98% formamide, 10 mM EDTA (pH 8.0), 0.05% bromophenol blue) を加え、95°C で 15 分間変性させた後、8 M 尿素を含む 6% ポリアクリルアミド変性ゲルを用いて、1800 V で約 2 時間の電気泳動を行った。電気泳動終了後、Typhoon FLA 9500 biomolecular imager (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) を用いて PCR 産物を可視化することで遺伝子型を判別した。

DNA マーカー座の連鎖解析と連鎖地図の作製

連鎖解析に用いる DNA マーカーは、これまでに報告されたクエおよびアカマダラハタの連鎖地図に配置された SSR マーカーから、上述したアカマダラハタ雌またはタマカイ雄の F_0 において、多型性が確認できたものを選択した。この際、次章で行う QTL 解析に必要な最低限の検出力を得るために、各連鎖群において選択したマーカー間の遺伝的距離が 20 センチモルガン (cM) 以内となるように SSR マーカーを選出した (Massault *et al.* 2008)。連鎖解析には選択した SSR マーカーの F_0 および F_1 雑種ハタ 178 尾を解析して得られた遺伝子型情報を用いた。各マーカー間の連鎖検定と組換え価の推定は LINKMFEX software package version 2.3 (Danzmann 2006) を用いて行った。本解析ソフトウェアは、各マーカー座において分離世代が両親から受け取るアレルを雌親または雄親由来別に解析するため、雌雄別々の連鎖地図を作製することが可能となる。連鎖解析は得られた遺伝子型情報を戻し交配形式に変換して行った。連鎖群は logarithm of odds (LOD) 値 4.0 以上で連鎖するマーカーを同じ連鎖群に属するとみなした。各連鎖群内のマーカーの順序および二重組換えは Map Manager QTX ソフトウェア (Manly *et al.* 2001) を用いて確認し、マーカー間の二重組換えが最も少なくなるようにマーカーの順序を変更した。各マーカーにおける遺伝子型の期待分離比に対する適合度はカイ二乗検定により評価した。連鎖群番号および連鎖群内のマーカー順序は先に報告されたクエ連鎖地図に基づいて決定した。また、片方の親魚種の連鎖地図ではクエ連鎖地図と同じ連鎖群に位置していた SSR マーカーが、もう片方の親魚種の連鎖地図では異なる連鎖群に配置された際は、該当する連鎖群を連鎖群名+2 と表記した。連鎖地図は MapChart version 2.1 ソフトウェア (Voorrips 2002) を用いて描画した。 F_1 雑種ハタの親魚種であるアカマダラハタおよびタマカイのゲノムサイズは得られた連鎖地図より Song *et al.* (2012) の方法に従い推定した。

結果

SSR マーカーの評価

869 個の SSR マーカーを解析した結果、804 個の SSR マーカーにおいて、その遺伝子型を判別することができた。このうち、457 個 (56.8%) が雌親のゲノムにおいて、また 289 個 (35.9%) が雄親のゲノムにおいて多型性を示した。さらに 189 個の SSR マーカーにおいては雌親、雄親ともに多型性が認められた。遺伝子型を判別できた SSR マーカーのうち、416 個の SSR マーカーを F₁ 雑種ハタ 178 尾の解析に使用した。

連鎖地図の作製

416 個の SSR マーカーを用いて、24 連鎖群からなるアカマダラハタ (雌) およびタマカイ (雄) の連鎖地図を作製した (Figure 4)。アカマダラハタ (雌) の連鎖地図は 347 個の SSR マーカーが配置され、その遺伝的距離の合計は 1,201.8 cM であった。各連鎖群における合計遺伝距離は最小で 41.2 cM (連鎖群 20)、最大で 59.0 cM (連鎖群 14) であった。タマカイ (雄) の連鎖地図は 235 個の SSR マーカーが配置され、その遺伝的距離の合計は 953.7 cM であった。各連鎖群における合計遺伝距離は最小で 2.8 cM (連鎖群 13)、最大で 61.4 cM (連鎖群 14) であった。同じマーカー座に複数の SSR マーカーが配置されたため、それらを 1 つのマーカー座とみなしたところ、アカマダラハタ (雌) の連鎖地図では 263 個、タマカイ (雄) の連鎖地図は 171 個の独立したマーカー座が見いだされた。これを基にした隣接する 2 つのマーカー座間の平均遺伝距離はアカマダラハタ (雌)、タマカイ (雄) でそれぞれ 4.6 cM および 5.6 cM と算出された。また、独立したマーカー座のうち、アカマダラハタ (雌) の連鎖地図では 10 連鎖群に属する 37 個 (14.6%)、タマカイ (雄) の連鎖地図では 9 連鎖群に属する 23 個 (13.6%) のマーカーにおいて、その遺伝子型が期待される分離比から有意に逸脱していた ($P < 0.05$, Figure 4)。これら遺伝子型の期待される分離比からの逸脱が認められたマーカーの多くは連鎖群

の一部に集中して配置されていたが、4連鎖群（アカマダラハタ（雌）連鎖群 5、タマカイ（雄）連鎖群 1、2 および 13）においては、連鎖群全域にわたって配置されたマーカーにおいて、その遺伝子型が期待される分離比から逸脱していた。得られた連鎖地図の遺伝的距離からアカマダラハタ、タマカイのゲノムサイズは 1,445.3 cM および 1,294.0 cM と推定され、本連鎖地図による推定ゲノムカバー率はそれぞれ 83.2%、73.7%と算出された（Tables 1 and 2）。

雌と雄の減数分裂における組換え率

連鎖地図に配置された SSR マーカーの中から、雌親と雄親の両親で多型を示すマーカーは 166 個であった。166 個の SSR マーカーにおいて隣接する 2 つのマーカー座間の遺伝距離の合計はアカマダラハタ（雌）で 1,111.8 cM、タマカイ（雄）で 870.2 cM（雌雄比 1.28:1）であり、雌に比べ雄において組換え率が低い傾向が認められた（Table 3）。

考察

アカマダラハタおよびタマカイのハプロイド染色体数は 24 本であると報告されている (Guo *et al.* 2014)。本章で 416 個の SSR マーカーを用いて作製された両魚種の連鎖地図は 24 連鎖群からなりハプロイド染色体数と一致している。しかしながら、タマカイ (雄) の連鎖地図の遺伝的距離の合計 (953.7 cM) はアカマダラハタ (雌) (1201.8 cM) と比べると短く、2 つの連鎖群 (Ela_LG9 および 13) は短い 2 つの連鎖群で構成されている。これは雄親のゲノムにおいて多型性を示した SSR マーカーが少なかったこと、および雌雄間の組換え率の差が影響したために、タマカイ (雄) の連鎖地図では異なる連鎖群としてみなされたものと考えられる。魚類における雄の組換え率は雌のそれに比べ全般的に低いことが知られており、それゆえに報告されている連鎖地図でも雌の連鎖地図の遺伝的距離は雄のものよりも長い。ハタ類における雌:雄の組換え率はクエ (1.12:1)、チャイロマルハタ (1.03:1)、ホワイトグルーパー (1.19:1) において報告されており、若干ではあるが雄の組換え率が雌のそれに比べ低い傾向にある (Kessuwan *et al.* 2016; You *et al.* 2013; Dor *et al.* 2014)。雌雄間で組換え率に差が見られる理由として、ニジマスのセントロメア領域において雄における組換え率が抑制されていることが示唆されており (Sakamoto *et al.* 2000)、ゼブラフィッシュでは、雄のセントロメア領域と同様、雌ではテロメア領域において組換え率が抑制されることが報告されている (Singer *et al.* 2002)。本章では各マーカー座において F₁ 雑種ハタが両親から受け取るアレルを雌親、雄親由来別に解析し、作製したアカマダラハタ (雌) およびタマカイ (雄) の連鎖地図に配置された両親魚種で共通する SSR マーカーから雌:雄の組換え率を 1.28:1 と算出した。今後、両親魚種内での雌雄の組換え率を確認する必要があるが、本章でアカマダラハタ (雌) よりも遺伝的距離の短い連鎖地図がタマカイ (雄) で得られたのはハタ類の配偶子形成時の減数分裂機構に起因する雄の低い組換え率が影響していると予想される。

ゲノム解析において、遺伝マーカーの遺伝子型が期待される分離比から逸脱することは一般的に見受けられる現象である。分離比の歪みが生じる領域（Segregation Distortion Loci, SDL）は配偶子選択や接合体選択の対象であると予想され、その結果として、遺伝マーカーの遺伝子型が期待される分離比から逸脱するものと考えられている（Xu 2008）。また、SDL と関連する領域では遺伝的ヒッチハイキングにより間接的に分離比に歪みが生じる（Xu *et al.* 1997）。隣接する遺伝マーカーの分離比の歪みを検定することで、特に4連鎖群（アカマダラハタ（雌）連鎖群5、タマカイ（雄）連鎖群1、2および13）において、SDL の存在が認められた。しかしながら、これらの SDL が F₁ 雑種ハタに共通するものであるかは、今後異なる集団を用いた解析による検証が必要である。

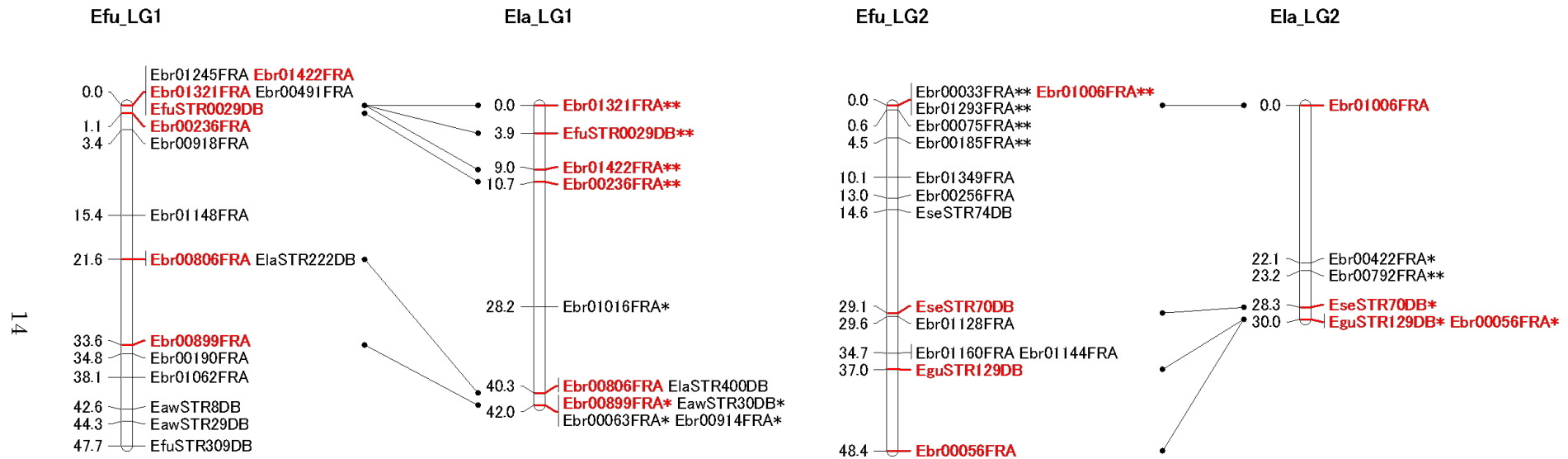


Figure 4 アカマダラハタ雌（左）とタマカイ雄（右）の連鎖地図

アカマダラハタ雌の連鎖地図は“Efu_LG”、タマカイ雄の連鎖地図は“Ela_LG”で示す。連鎖群の全長はセンチモルガン（cM）単位で示す。両魚種間で共通した遺伝マーカーは実線で結び、赤字で示した。遺伝子型に期待される分離比からの逸脱が認められた遺伝マーカーはアスタリスクで表記した（* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ）。

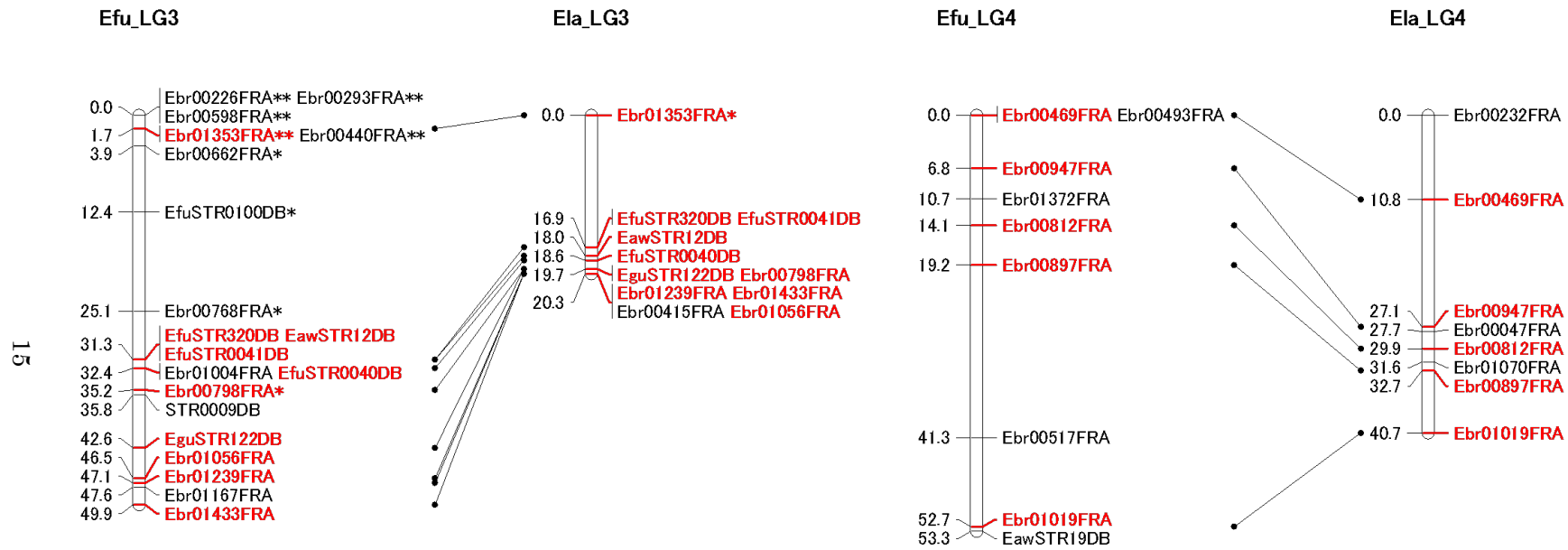


Figure 4 続き

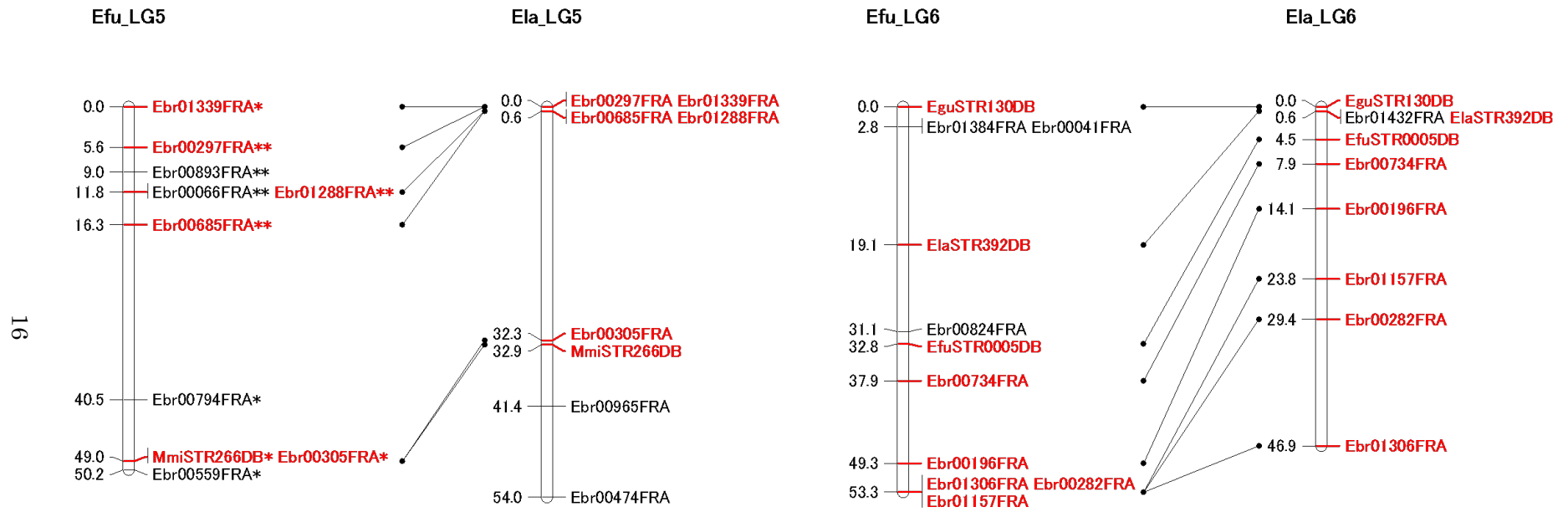


Figure 4 続き

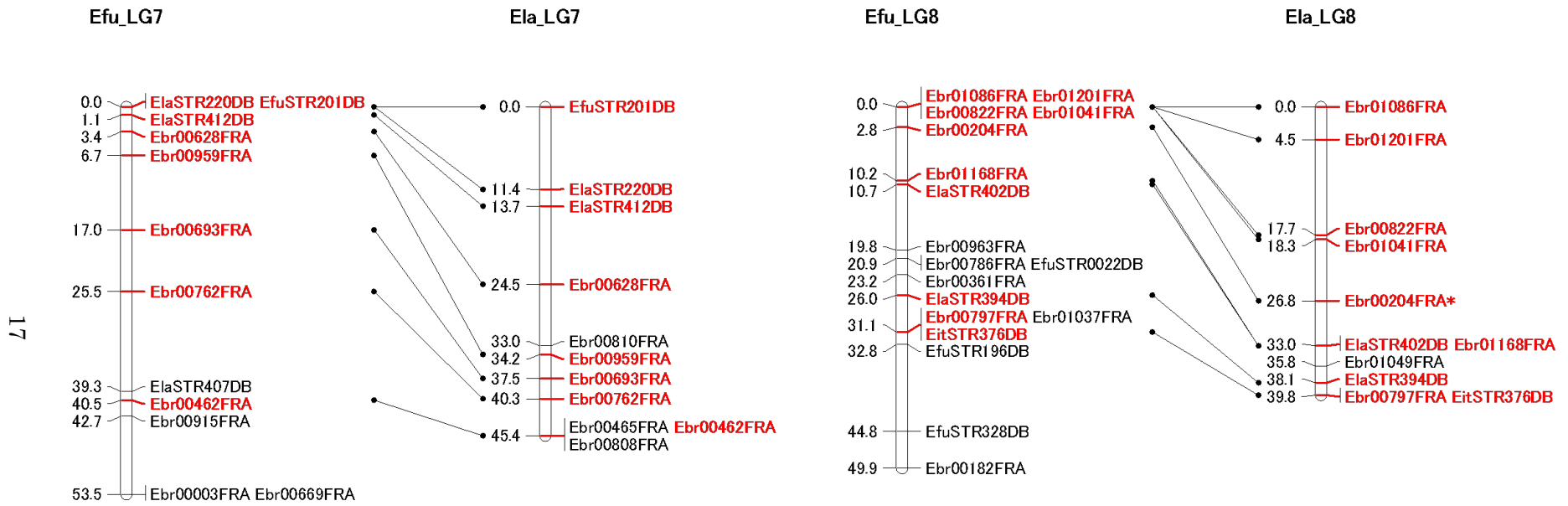


Figure 4 続き

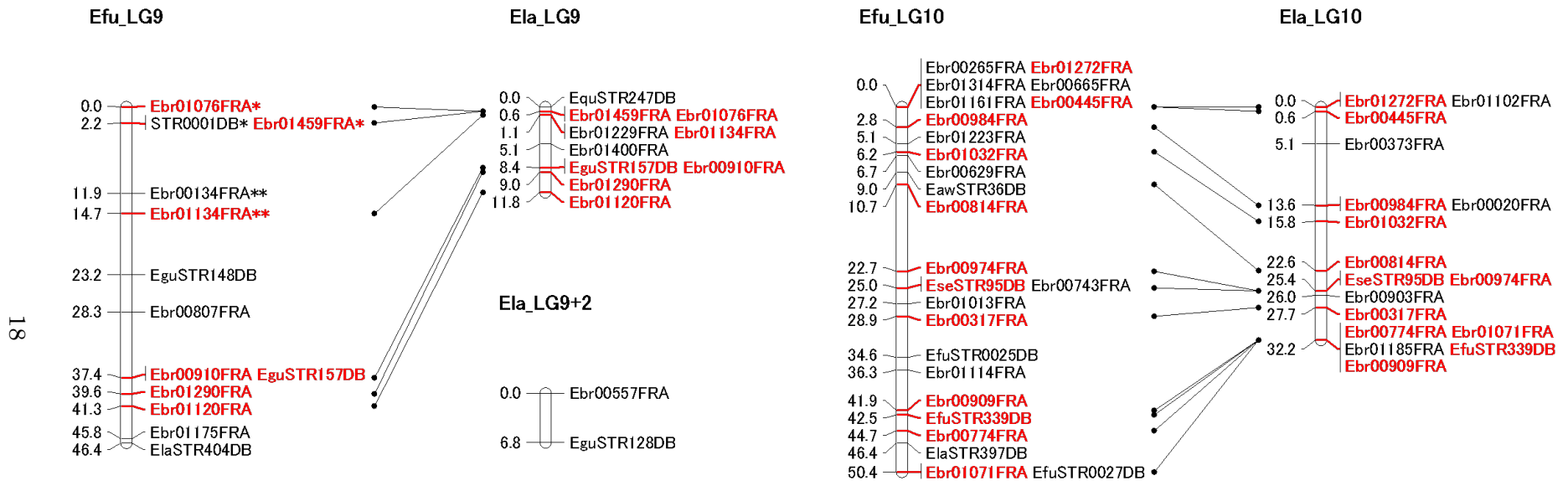


Figure 4 続き

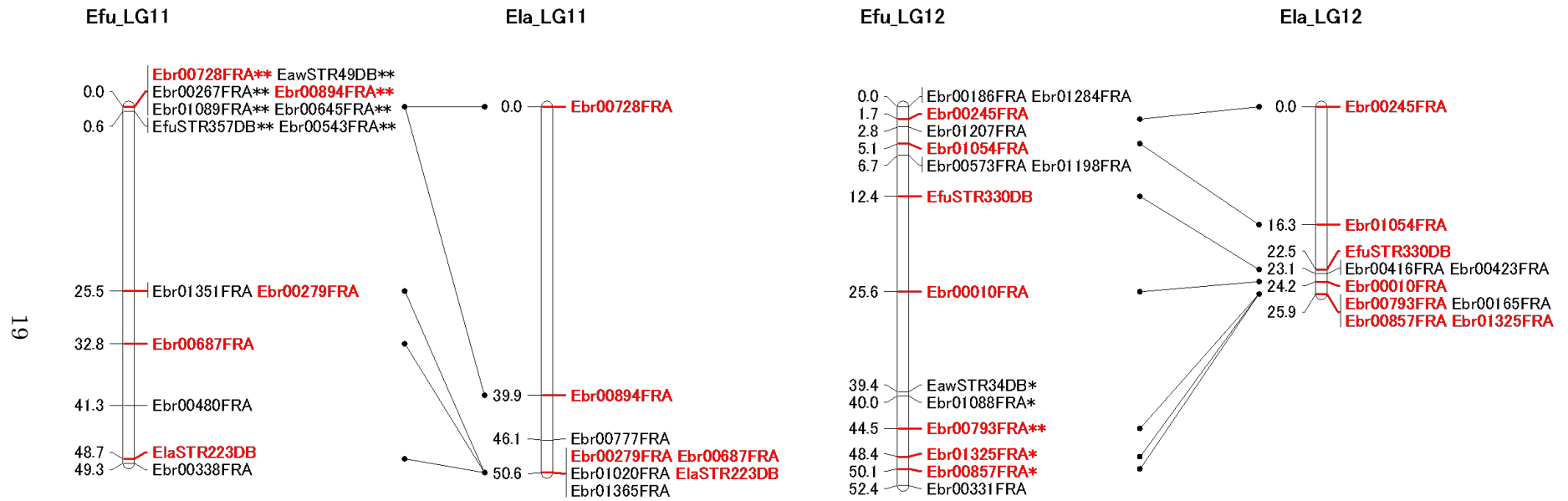


Figure 4 続き

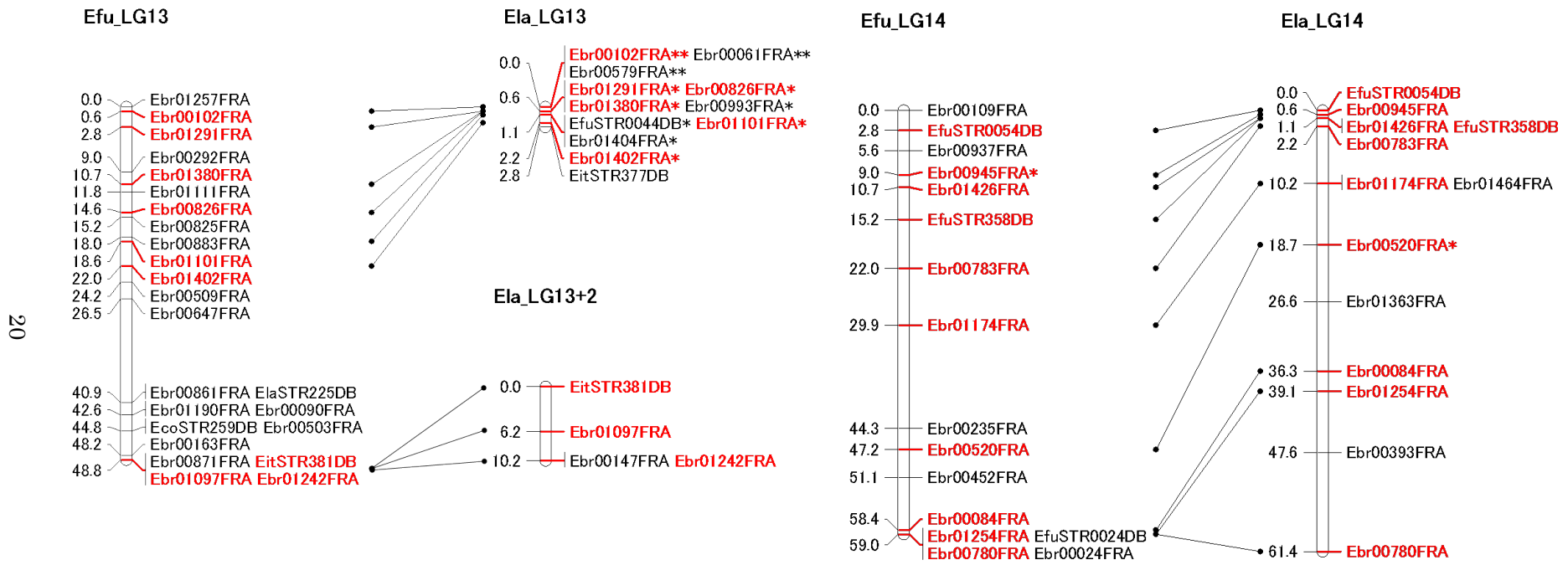
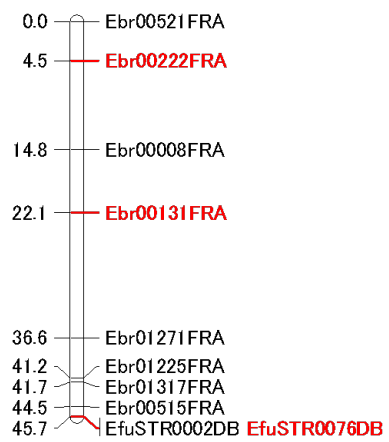


Figure 4 続き

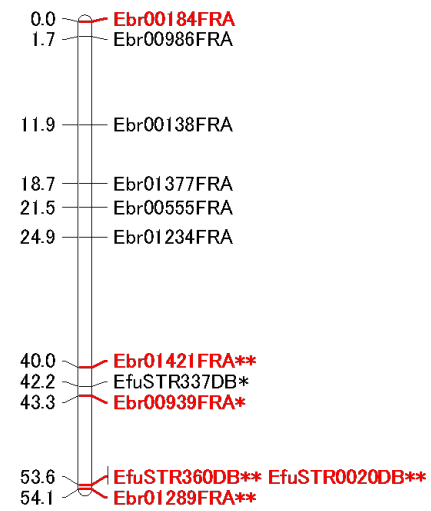
Efu_LG15



Ela_LG15



Efu_LG16



Ela_LG16

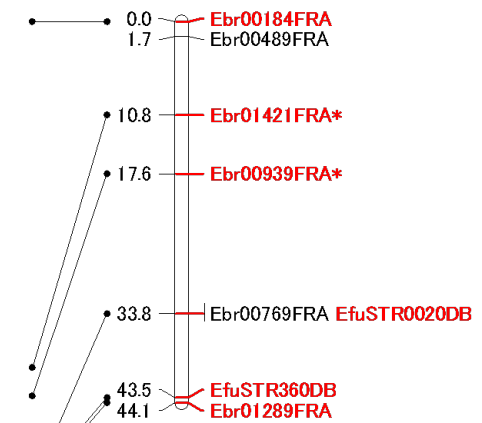
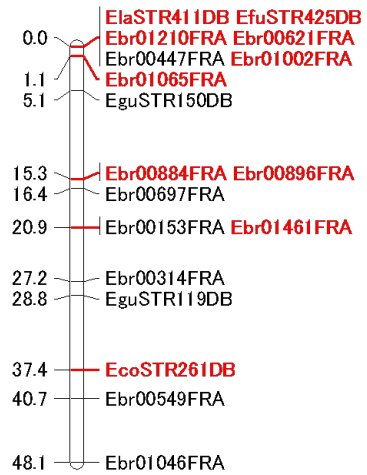
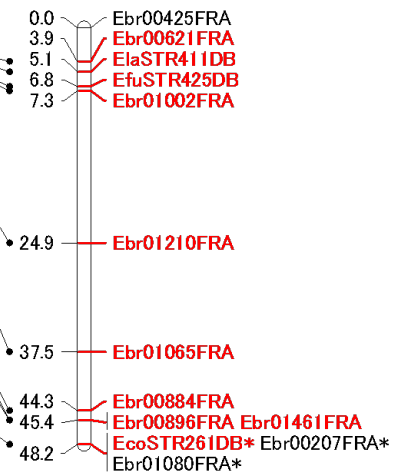


Figure 4 続き

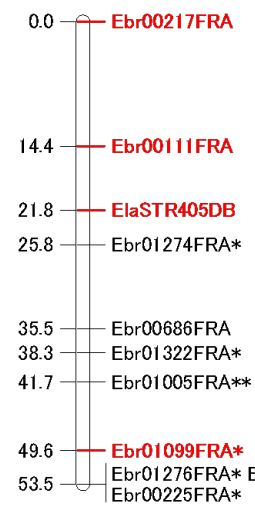
Efu_LG17



Ela_LG17



Efu_LG18



Ela_LG18

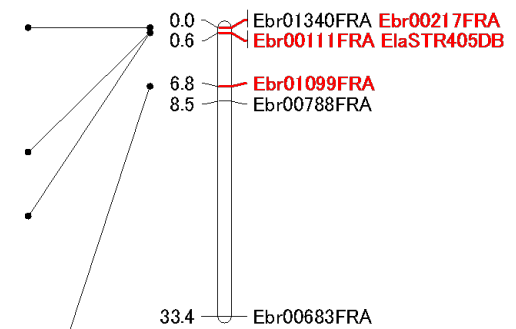


Figure 4 続き

Efu_LG19

Ela_LG19

Efu_LG20

Ela_LG20

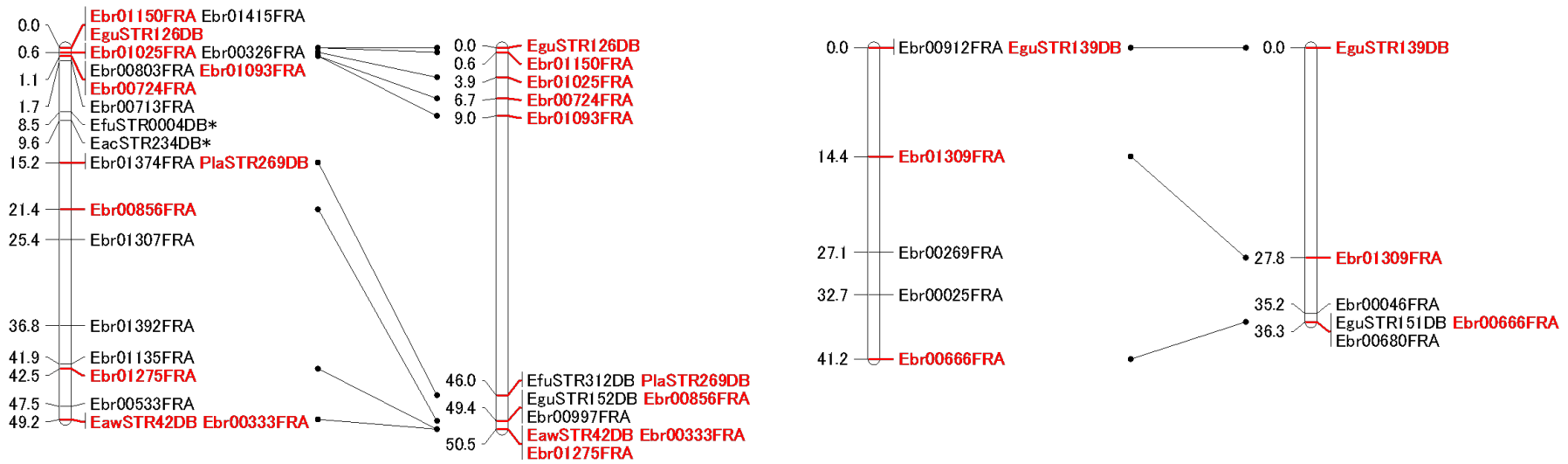


Figure 4 続き

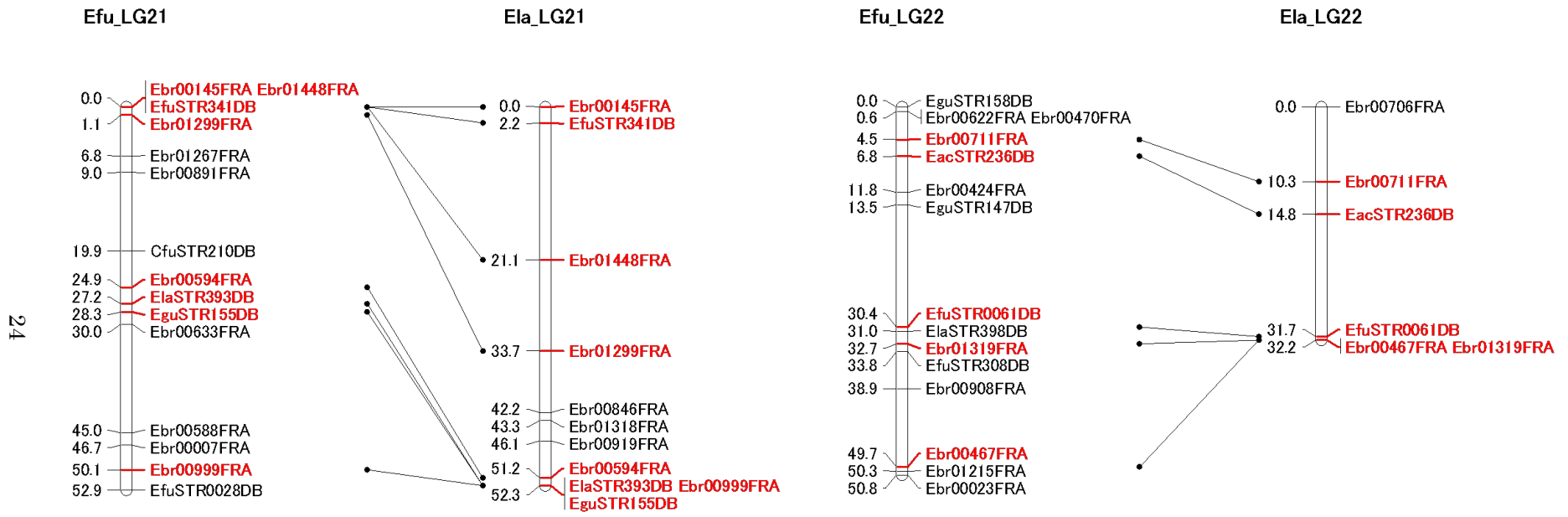


Figure 4 続き

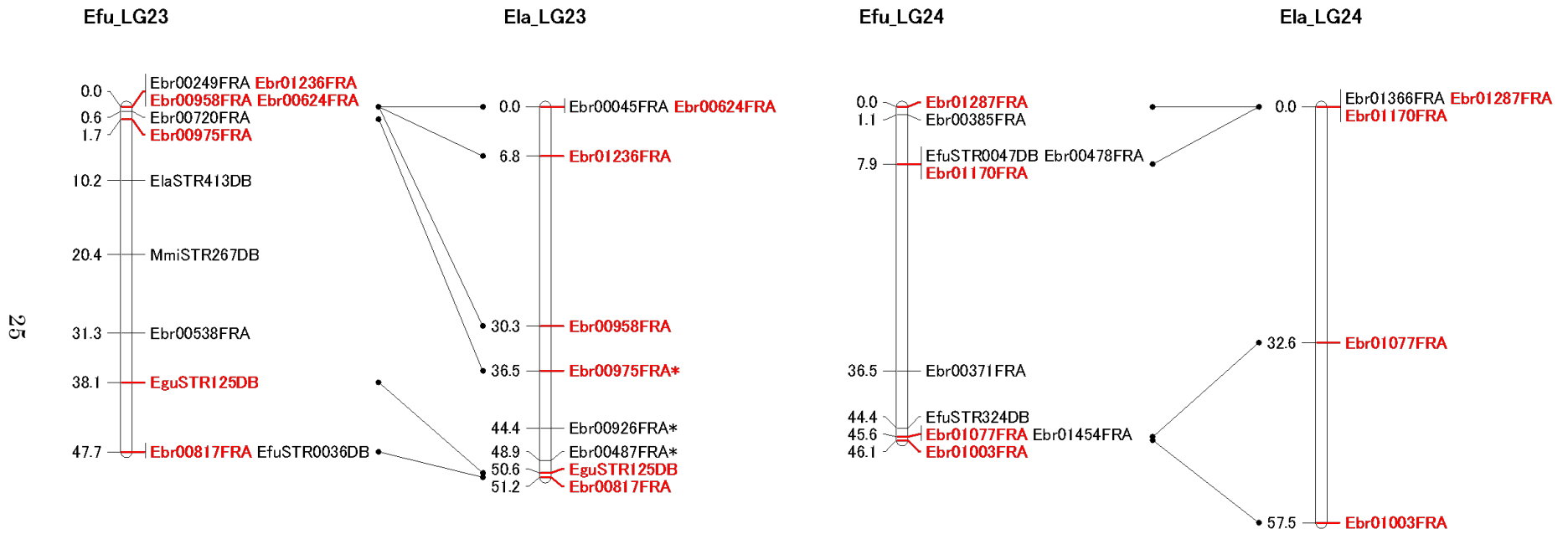


Figure 4 続き

Table 1 アカマダラハタ（雌）連鎖地図の各連鎖群におけるマーカー数および遺伝距離

連鎖群	配置されたマーカー数	独立したマーカー座の数	マーカー間遺伝距離			推定ゲノムサイズ			
			全長 (cM)	平均 (cM)	最大 (cM)	方法 1 (cM)	方法 2 (cM)	平均 (cM)	カバー率 (%)
Efu_LG1	16	11	47.7	4.3	12.0	56.8	57.2	57.0	83.6
Efu_LG2	14	11	48.4	4.4	14.4	57.5	58.1	57.8	83.7
Efu_LG3	20	14	49.9	3.6	12.6	59.0	57.6	58.3	85.6
Efu_LG4	9	8	53.3	6.7	22.1	62.4	68.5	65.5	81.4
Efu_LG5	10	8	50.2	6.3	24.2	59.3	64.5	61.9	81.0
Efu_LG6	11	8	53.3	6.7	16.3	62.4	68.5	65.5	81.4
Efu_LG7	12	10	53.5	5.4	13.8	62.6	65.4	64.0	83.6
Efu_LG8	18	12	49.9	4.2	12.0	59.0	59.0	59.0	84.6
Efu_LG9	13	11	46.4	4.2	9.7	55.5	55.7	55.6	83.4
Efu_LG10	25	18	50.4	2.8	12.0	59.5	56.3	57.9	87.0
Efu_LG11	14	7	49.3	7.0	24.9	58.4	65.7	62.1	79.4
Efu_LG12	15	13	52.4	4.0	13.8	61.5	61.1	61.3	85.4
Efu_LG13	24	18	48.8	2.7	14.4	57.9	54.5	56.2	86.8
Efu_LG14	16	13	59.0	4.5	14.4	68.1	68.8	68.5	86.1
Efu_LG15	10	9	45.7	5.1	14.5	54.8	57.1	56.0	81.6
Efu_LG16	12	11	54.1	4.9	15.0	63.2	64.9	64.1	84.4
Efu_LG17	18	11	48.1	4.4	10.3	57.2	57.7	57.5	83.7
Efu_LG18	11	9	53.5	5.9	14.4	62.6	66.9	64.8	82.6
Efu_LG19	21	14	49.2	3.5	11.4	58.3	56.8	57.6	85.5
Efu_LG20	6	5	41.2	8.2	14.4	50.3	61.8	56.1	73.5
Efu_LG21	15	13	52.9	4.1	15.0	62.0	61.7	61.9	85.5
Efu_LG22	15	14	50.8	3.6	16.9	59.9	58.6	59.3	85.7
Efu_LG23	12	8	47.7	6.0	10.8	56.8	61.3	59.1	80.7
Efu_LG24	10	7	46.1	6.6	28.6	55.2	61.5	58.4	79.0
合計	347	263	1201.8	4.6		1421.1	1469.4	1445.3	83.2

Table 2 タマカイ（雄）連鎖地図の各連鎖群におけるマーカー数および遺伝距離

連鎖群	配置されたマーカー数	独立したマーカー座の数	マーカー間遺伝距離			推定ゲノムサイズ			
			全長 (cM)	平均 (cM)	最大 (cM)	方法 1 (cM)	方法 2 (cM)	平均 (cM)	カバー率 (%)
Ela_LG1	11	7	42.0	6.0	17.5	53.2	56.0	54.6	77.0
Ela_LG2	6	5	30.0	6.0	22.1	41.2	45.0	43.1	69.6
Ela_LG3	11	6	20.3	3.4	16.9	31.5	28.4	29.9	67.8
Ela_LG4	8	8	40.7	5.1	16.3	51.9	52.3	52.1	78.1
Ela_LG5	8	6	54.0	9.0	31.8	65.2	75.6	70.4	76.7
Ela_LG6	9	8	46.9	5.9	17.5	58.1	60.3	59.2	79.3
Ela_LG7	11	9	45.4	5.0	11.4	56.6	56.8	56.7	80.1
Ela_LG8	11	9	39.8	4.4	13.2	51.0	49.8	50.4	79.0
Ela_LG9	10	7	11.8	1.7	3.9	23.0	15.7	19.3	61.0
Ela_LG9+2	2	2	6.8	3.4	6.8	18.0	20.4	19.2	35.5
Ela_LG10	17	10	32.2	3.2	8.5	43.4	39.4	41.4	77.9
Ela_LG11	8	4	50.6	12.7	39.9	61.8	84.3	73.0	69.3
Ela_LG12	10	6	25.9	4.3	16.3	37.1	36.3	36.7	70.7
Ela_LG13	12	5	2.8	0.6	1.1	14.0	4.2	9.1	30.8
Ela_LG13+2	4	3	10.2	3.4	6.2	21.4	20.4	20.9	48.9
Ela_LG14	13	11	61.4	5.6	13.8	72.6	73.7	73.1	84.0
Ela_LG15	6	6	27.2	4.5	18.2	38.4	38.1	38.2	71.2
Ela_LG16	8	7	44.1	6.3	16.3	55.3	58.8	57.0	77.3
Ela_LG17	13	10	48.2	4.8	17.5	59.4	58.9	59.1	81.5
Ela_LG18	7	5	33.4	6.7	24.9	44.6	50.1	47.3	70.6
Ela_LG19	13	8	50.5	6.3	37.0	61.7	64.9	63.3	79.8
Ela_LG20	6	4	36.3	9.1	27.8	47.5	60.5	54.0	67.3
Ela_LG21	11	9	52.3	5.8	18.8	63.5	65.4	64.4	81.2
Ela_LG22	6	5	32.2	6.4	16.9	43.4	48.3	45.8	70.3
Ela_LG23	9	8	51.2	6.4	23.5	62.4	65.8	64.1	79.9
Ela_LG24	5	3	57.5	19.2	32.6	68.7	115.0	91.8	62.6
合計	235	171	953.7	5.6		1243.7	1344.3	1294.0	73.7

Table 3 アカマダラハタ (雌) とタマカイ (雄) で共通した遺伝マーカーの遺伝距離

連鎖群 (LG)	共通したマーカー	遺伝距離 (cM)	
		アカマダラハタ (雌)	タマカイ (雄)
LG1	Ebr01321FRA/EfuSTR0029DB	0.0	3.9
	EfuSTR0029DB/Ebr01422FRA	0.0	5.1
	Ebr01422FRA/Ebr00236FRA	1.1	1.7
	Ebr00236FRA/Ebr00806FRA	20.5	29.6
	Ebr00806FRA/Ebr00899FRA	12.0	1.7
	小計 (LG1)	33.6	42.0
LG2	Ebr01006FRA/EseSTR70DB	29.1	28.3
	EseSTR70DB/EguSTR129DB	7.9	1.7
	EguSTR129DB/Ebr00056FRA	11.4	0.0
	小計 (LG2)	48.4	30.0
LG3	Ebr01353FRA/EfuSTR320DB	29.6	16.9
	EfuSTR320DB/EfuSTR0041DB	0.0	0.0
	EfuSTR0041DB/EawSTR12DB	0.0	1.1
	EawSTR12DB/EfuSTR0040DB	1.1	0.6
	EfuSTR0040DB/Ebr00798FRA	2.8	1.1
	Ebr00798FRA/EguSTR122DB	7.4	0.0
	EguSTR122DB/Ebr01056FRA	3.9	0.6
	Ebr01056FRA/Ebr01239FRA	0.6	0.0
	Ebr01239FRA/Ebr01433FRA	2.8	0.0
	小計 (LG3)	48.2	20.3
LG4	Ebr00469FRA/Ebr00947FRA	6.8	16.3
	Ebr00947FRA/Ebr00812FRA	7.3	2.8
	Ebr00812FRA/Ebr00897FRA	5.1	2.8
	Ebr00897FRA/Ebr01019FRA	33.5	8.0
	小計 (LG4)	52.7	29.9
LG5	Ebr01339FRA/Ebr00297FRA	5.6	0.0
	Ebr00297FRA/Ebr01288FRA	6.2	0.6
	Ebr01288FRA/Ebr00685FRA	4.5	0.0
	Ebr00685FRA/Ebr00305FRA	32.7	31.7
	Ebr00305FRA/MmiSTR266DB	0.0	0.6
	小計 (LG5)	49.0	32.9
LG6	EguSTR130DB/ElaSTR392DB	19.1	0.6

Table 3 続き

連鎖群 (LG)	共通したマーカー	遺伝距離 (cM)	
		アカマダラハタ(雌)	タマカイ(雄)
	EfuSTR0005DB/Ebr00734FRA	5.1	3.4
	Ebr00734FRA/Ebr00196FRA	11.4	6.2
	Ebr00196FRA/Ebr01157FRA	4.0	9.7
	Ebr01157FRA/Ebr00282FRA	0.0	5.6
	Ebr00282FRA/Ebr01306FRA	0.0	17.5
	小計 (LG6)	53.3	46.9
LG7	EfuSTR201DB/ElaSTR220DB	0.0	11.4
	ElaSTR220DB/ElaSTR412DB	1.1	2.3
	ElaSTR412DB/Ebr00628FRA	2.3	10.8
	Ebr00628FRA/Ebr00959FRA	3.3	9.7
	Ebr00959FRA/Ebr00693FRA	10.3	3.3
	Ebr00693FRA/Ebr00762FRA	8.5	2.8
	Ebr00762FRA/Ebr00462FRA	15.0	5.1
	小計 (LG7)	40.5	45.4
LG8	Ebr01086FRA/Ebr01201FRA	0.0	4.5
	Ebr01201FRA/Ebr00822FRA	0.0	13.2
	Ebr00822FRA/Ebr01041FRA	0.0	0.6
	Ebr01041FRA/Ebr00204FRA	2.8	8.5
	Ebr00204FRA/Ebr01168FRA	7.4	6.2
	Ebr01168FRA/ElaSTR402DB	0.5	0.0
	ElaSTR402DB/ElaSTR394DB	15.3	5.1
	ElaSTR394DB/Ebr00797FRA	5.1	1.7
	Ebr00797FRA/EitSTR376DB	0.0	0.0
	小計 (LG8)	31.1	39.8
LG9	Ebr01076FRA/Ebr01459FRA	2.2	0.0
	Ebr01459FRA/Ebr01134FRA	12.5	0.5
	Ebr01134FRA/Ebr00910FRA	22.7	7.3
	Ebr00910FRA/EguSTR157DB	0.0	0.0
	EguSTR157DB/Ebr01290FRA	2.2	0.6
	Ebr01290FRA/Ebr01120FRA	1.7	2.8
	小計 (LG9)	41.3	11.2
LG10	Ebr01272FRA/Ebr00445FRA	0.0	0.6
	Ebr00445FRA/Ebr00984FRA	2.8	13.0

Table 3 続き

連鎖群 (LG)	共通したマーカー	遺伝距離 (cM)	
		アカマダラハタ(雌)	タマカイ(雄)
	Ebr00984FRA/Ebr01032FRA	3.4	2.2
	Ebr01032FRA/Ebr00814FRA	4.5	6.8
	Ebr00814FRA/Ebr00974FRA	12.0	2.8
	Ebr00974FRA/EseSTR95DB	2.3	0.0
	EseSTR95DB/Ebr00317FRA	3.9	2.3
	Ebr00317FRA/Ebr00909FRA	13.0	4.5
	Ebr00909FRA/EfuSTR339DB	0.6	0.0
	EfuSTR339DB/Ebr00774FRA	2.2	0.0
	Ebr00774FRA/Ebr01071FRA	5.7	0.0
	小計 (LG10)	50.4	32.2
LG11	Ebr00728FRA/Ebr00894FRA	0.0	39.9
	Ebr00894FRA/Ebr00279FRA	25.5	10.7
	Ebr00279FRA/Ebr00687FRA	7.3	0.0
	Ebr00687FRA/ElaSTR223DB	15.9	0.0
	小計 (LG11)	48.7	50.6
LG12	Ebr00245FRA/Ebr01054FRA	3.4	16.3
	Ebr01054FRA/EfuSTR330DB	7.3	6.2
	EfuSTR330DB/Ebr00010FRA	13.2	1.7
	Ebr00010FRA/Ebr00793FRA	18.9	1.7
	Ebr00793FRA/Ebr01325FRA	3.9	0.0
	Ebr01325FRA/Ebr00857FRA	1.7	0.0
	小計 (LG12)	48.4	25.9
LG13	Ebr00102FRA/Ebr01291FRA	2.2	0.6
	Ebr01291FRA/Ebr01380FRA	7.9	0.0
	Ebr01380FRA/Ebr00826FRA	3.9	0.0
	Ebr00826FRA/Ebr01101FRA	4.0	0.5
	Ebr01101FRA/Ebr01402FRA	3.4	1.1
	Ebr01402FRA/EitSTR381DB	26.8	0.0
	EitSTR381DB/Ebr01097FRA	0.0	6.2
	Ebr01097FRA/Ebr01242FRA	0.0	4.0
	小計 (LG13)	48.2	12.4
LG14	EfuSTR0054DB/Ebr00945FRA	6.2	0.6
	Ebr00945FRA/Ebr01426FRA	1.7	0.5

Table 3 続き

連鎖群 (LG)	共通したマーカー	遺伝距離 (cM)	
		アカマダラハタ(雌)	タマカイ(雄)
	Ebr01426FRA/EfuSTR358DB	4.5	0.0
	EfuSTR358DB/Ebr00783FRA	6.8	1.1
	Ebr00783FRA/Ebr01174FRA	7.9	8.0
	Ebr01174FRA/Ebr00520FRA	17.3	8.5
	Ebr00520FRA/Ebr00084FRA	11.2	17.6
	Ebr00084FRA/Ebr01254FRA	0.6	2.8
	Ebr01254FRA/Ebr00780FRA	0.0	22.3
	小計 (LG14)	56.2	61.4
LG15	Ebr00222FRA/Ebr00131FRA	17.6	18.2
	Ebr00131FRA/EfuSTR0076DB	23.6	6.2
	小計 (LG15)	41.2	24.4
LG16	Ebr00184FRA/Ebr01421FRA	40.0	10.8
	Ebr01421FRA/Ebr00939FRA	3.3	6.8
	Ebr00939FRA/EfuSTR0020DB	10.3	16.2
	EfuSTR0020DB/EfuSTR360DB	0.0	9.7
	EfuSTR360DB/Ebr01289FRA	0.5	0.6
	小計 (LG16)	54.1	44.1
LG17	Ebr00621FRA/ElaSTR411DB	0.0	1.2
	ElaSTR411DB/EfuSTR425DB	0.0	1.7
	EfuSTR425DB/Ebr01002FRA	0.0	0.5
	Ebr01002FRA/Ebr01210FRA	0.0	17.6
	Ebr01210FRA/Ebr01065FRA	1.1	12.6
	Ebr01065FRA/Ebr00884FRA	14.2	6.8
	Ebr00884FRA/Ebr00896FRA	0.0	1.1
	Ebr00896FRA/Ebr01461FRA	5.6	0.0
	Ebr01461FRA/EcoSTR261DB	16.5	2.8
	小計 (LG17)	37.4	44.3
LG18	Ebr00217FRA/Ebr00111FRA	14.4	0.6
	Ebr00111FRA/ElaSTR405DB	7.4	0.0
	ElaSTR405DB/Ebr01099FRA	27.8	6.2
	小計 (LG18)	49.6	6.8
LG19	EguSTR126DB/Ebr01150FRA	0.0	0.6
	Ebr01150FRA/Ebr01025FRA	0.6	3.3

Table 3 続き

連鎖群 (LG)	共通したマーカー	遺伝距離 (cM)	
		アカマダラハタ(雌)	タマカイ(雄)
	Ebr01025FRA/Ebr00724FRA	0.5	2.8
	Ebr00724FRA/Ebr01093FRA	0.0	2.3
	Ebr01093FRA/PlaSTR269DB	14.1	37.0
	PlaSTR269DB/Ebr00856FRA	6.2	3.4
	Ebr00856FRA/Ebr01275FRA	21.1	1.1
	Ebr01275FRA/EawSTR42DB	6.7	0.0
	EawSTR42DB/Ebr00333FRA	0.0	0.0
	小計 (LG19)	49.2	50.5
LG20	EguSTR139DB/Ebr01309FRA	14.4	27.8
	Ebr01309FRA/Ebr00666FRA	26.8	8.5
	小計 (LG20)	41.2	36.3
LG21	Ebr00145FRA/EfuSTR341DB	0.0	2.2
	EfuSTR341DB/Ebr01448FRA	0.0	18.9
	Ebr01448FRA/Ebr01299FRA	1.1	12.6
	Ebr01299FRA/Ebr00594FRA	23.8	17.5
	Ebr00594FRA/ElaSTR393DB	2.3	1.1
	ElaSTR393DB/EguSTR155DB	1.1	0.0
	EguSTR155DB/Ebr00999FRA	21.8	0.0
	小計 (LG21)	50.1	52.3
LG22	Ebr00711FRA/EacSTR236DB	2.3	4.5
	EacSTR236DB/EfuSTR0061DB	23.6	16.9
	EfuSTR0061DB/Ebr01319FRA	2.3	0.5
	Ebr01319FRA/Ebr00467FRA	17.0	0.0
	小計 (LG22)	45.2	21.9
LG23	Ebr00624FRA/Ebr01236FRA	0.0	6.8
	Ebr01236FRA/Ebr00958FRA	0.0	23.5
	Ebr00958FRA/Ebr00975FRA	1.7	6.2
	Ebr00975FRA/EguSTR125DB	36.4	14.1
	EguSTR125DB/Ebr00817FRA	9.6	0.6
	小計 (LG23)	47.7	51.2
LG24	Ebr01287FRA/Ebr01170FRA	7.9	0.0
	Ebr01170FRA/Ebr01077FRA	37.7	32.6
	Ebr01077FRA/Ebr01003FRA	0.5	24.9

Table 3 続き

連鎖群 (LG)	共通したマーカー	遺伝距離 (cM)	
		アカマダラハタ(雌)	タマカイ(雄)
	小計 (LG24)	46.1	57.5
LG1-24	合計	1111.8	870.2
	組換え率	1.28	1

第 2 章

F₁ 雑種ハタを用いた成長関連形質の QTL 解析

QTL の染色体上の位置と遺伝効果を推定するには実験交配集団（解析家系）が必要であり、一般的に F₂ 集団または戻し交配家系が用いられる。これは形質とマーカー遺伝子型が分離する集団を解析に用いることで QTL を効率よく検出するためである (Wang *et al.* 2006; Guimarães *et al.* 2007)。そのため、各個体の遺伝子型が同一であると予想される F₁ 集団は本来 QTL 検出を目的とする解析家系として用いるには不向きであると考えられている (Doerge 2002)。しかしながら、アカマダラハタ（雌）とタマカイ（雄）から作出した雑種ハタは成熟するまでに 6 年以上かかるために (Luin *et al.* 2013)、F₂ 集団の作出には 10 年以上の長い生育期間が必要となる。これまでにいくつかの魚種では F₁ 集団を用いて成長関連形質に関与する QTL が検出されており (Song *et al.* 2012; Wang *et al.* 2015; Kessuwan *et al.* 2016)、これらの研究は QTL 解析における解析家系としての F₁ 集団の有用性を実証している。また、QTL の検出力は目的とする形質の遺伝率、目的形質との関連が推定されたアレル (QTL アレル) の効果、QTL に関連するマーカーと QTL との遺伝的距離および解析サンプル数に影響され (Mackay 1996)、対象とする量的形質の遺伝についての知見が乏しい場合は、交配親にできるだけ大きな差異を示す品種を選ぶことで、形質に関与する QTL 中の主要なものが検出できると考えられている (鵜飼 2000)。そこで、本章では成長率の異なるアカマダラハタとタマカイを交雑した F₁ 雑種ハタを用いて QTL 解析を行うことで、両親魚種由来の成長関連形質に関与する QTL の検出を試みた。

材料および方法

解析家系と成長関連形質データの収集

タイ水産局クラビ沿岸漁業研究開発センターにて 2013 年 3 月に F_0 としてアカマダラハタ雌 2 尾とタマカイ雄 1 尾を人為交配し、異なる雌親から作出した F_1 雑種ハタ半兄弟家系 2 家系を得た。人為交配は染色体操作を行わず、両親魚から採取した未受精卵と精子を単純に混合することで行った。個体ごとの成長関連形質データを収集するために PIT (Passive Integrated Transponder) タグを 5 カ月齢時 (平均体長約 15 cm) に挿入した。PIT タグ挿入後、魚は同センター内にある養魚池の生簀 (2 メートル四方、深さ 5 メートル) 内にて 2014 年 10 月まで維持した。成長関連形質データとして、毎月の体長 (cm) と体重 (g) を測定した。

ゲノム DNA の調整および遺伝子型の解析

ゲノム DNA は第 1 章と同様に鰭の一部より Coimbra *et al.* (2003) の方法に従い抽出した。抽出した DNA は NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて純度 (濃度) を測定した。遺伝子型は第 1 章と同じ手法を用いて PCR 法とアクリルアミドゲル電気泳動法により判別した。

成長関連形質の QTL 解析

成長関連形質の測定最終月 (2014 年 10 月) における体長 (TL)、体重 (BW) および肥満度 (Fulton's condition factor, FK) を QTL 解析の表現型データとして用いた。肥満度は Luin *et al.* (2013) の方法に従い、Fulton (1902) により考案された次式 $100 \times BW / TL^3$ を用いて算出した。ここで BW は体重 (g)、 TL は体長 (cm) を示す。QTL 解析を行う前に Shapiro–Wilk 検定により各表現型データの正規性を検定し、正規分布から逸脱する表現型データに対しては Yang *et al.* (2006) の方法に従い、Box–Cox 変換を用いてデー

タの分布を正規分布に近づけたのち、QTL 解析に付した。連鎖解析は第 1 章と同様に LINKMFEX software package version 2.3 (Danzmann 2006) および Map Manager QTX ソフトウェア (Manly *et al.* 2001) を用いて行い、分離世代が両親から受け取る雌親、雄親由来別の遺伝子型情報と各マーカー座間の遺伝距離を入手し、QTL 解析に使用した。QTL 解析は、それぞれの形質において雌親、雄親由来の各遺伝子型情報を R/qtl ソフトウェア (Broman *et al.* 2003) を用いて解析することで、雌親、雄親由来の QTL の検出を試みた。QTL 解析ではまず区間マッピング法による single-QTL スキャンを行った。この際、計算方法として EM (Expectation-Maximization) アルゴリズムを適用し、解析する区間は 1 cM ごととした。次に、解析区間を 2.5 cM に設定し、two-QTL スキャンを行うことで相互に作用している QTL を探索した。最後に single-QTL スキャンおよび two-QTL スキャンで検出された QTL を multiple QTL model を用いて解析することにより、各形質における QTL の位置を特定した。QTL の存在を示すために、解析した全連鎖群に対して 1,000 回の permutation test (Churchill & Doerge 1994) を行うことで有意水準 5% の閾値を算出し、解析により得られた LOD 値が閾値を超えた場合を有意な QTL であると判断した。各 QTL の表現型への寄与率は同ソフトウェアの drop-one-term 分析機能を用いて各 QTL の分散を算出し、全表現型分散に対する割合 (percentage of Phenotypic Variation Explained, PVE) として推定した。また、各 QTL における 95% 信頼区間 (Confidence Interval, CI) はベイズ推定を用いて算出した 95% 信用区間とした。雌親、雄親由来のそれぞれで QTL が検出された場合には、Wang *et al.* (2006) の方法に従い、QTL に最も近い DNA マーカーの遺伝子型情報と表現型値を用いて二元配置分散分析を行い、相互関係の有無を確認した。なお、QTL 解析は作出した半兄弟家系のうち 1 家系 (家系 A) を全連鎖群に配置された SSR マーカーを用いて行い、成長関連形質に関与する QTL を特定したのち、残りのもう 1 家系 (家系 B) を QTL が特定された連鎖群に配置された SSR マーカーのみを用いて同様に解析することで得られた QTL を検証した。

結果

成長関連形質データの収集と解析家系の決定

2014年10月に体長および体重を測定した F₁ 雑種ハタ半兄弟家系 2 家系の各個体に対して 7 つの SSR マーカー (Ebr00008FRA, Ebr00010FRA, Ebr00184FRA, Ebr00317FRA, Ebr00333FRA, EguSTR151FRA, and EacSTR236DB) を用いて親子鑑定を行った結果、家系 A と B でそれぞれ 178 尾、168 尾の成長関連形質データを得た (Table 4)。ピアソンの積率相関係数を算出し、各形質間の相関関係を調べた結果、家系 A、B ともに、体長と体重において強い正の相関が認められた ($P < 0.01$, Table 5)。肥満度においても体長および体重との間に正の相関が認められたが、体重と比べ体長との相関関係は弱いものであった。QTL 解析ソフトウェアは一般的に表現型データが正規分布に従う統計モデルを仮定しているため、各形質の表現型データのヒストグラムと正規確率プロットを作成し、表現型データの分布を確認した (Figures 5 and 6)。個体数と表現型データの分布より家系 A を全連鎖群に配置された SSR マーカーを用いての成長関連形質の QTL 解析に付し、家系 B を特定した QTL の検証に使用することとした。なお、家系 A の 178 尾は第 1 章で連鎖地図作製に使用した個体と同じ個体である。

家系 A における成長関連形質の QTL 解析

成長関連形質として体長、体重および肥満度の表現型値を用いて QTL 解析を行った結果、7 つの QTL が 6 つの連鎖群において検出された (Table 6)。アカマダラハタ雌親由来の遺伝子型情報を用いた解析では、体長に関与する 4 つの QTL がアカマダラハタ地図の連鎖群 8、10、13 および 19 に配置された SSR マーカー Ebr01086FRA、Ebr00814FRA、Ebr01402FRA および Ebr01150FRA の近傍でそれぞれ検出された。各 QTL の LOD 値は 3.57–6.61 であり、全表現型分散に対する各 QTL の寄与率は 6.3–12.1%であった。体重を表現型データとして用いた QTL 解析では QTL の位置と LOD 値がわずかに異なるがほと

んど同じ結果が得られた。体長、体重のどちらの解析においても、連鎖群 8 および 10 で検出された QTL には相互関係が認められた。これらの QTL の近傍マーカーである Ebr01086FRA および Ebr00814FRA の遺伝子型情報を確認したところ、アレルの組合せにより約 400 g の体重の違いが認められた (Figure 7)。しかしながら、肥満度を表現型データとして用いた QTL 解析では QTL は検出されなかった。

一方、タマカイ雄親由来の遺伝子型情報を用いた解析では、体重に関与する 2 つの QTL がタマカイ地図の連鎖群 3 および 10 に配置された SSR マーカー EawSTR12DB および EfuSTR339DB の近傍でそれぞれ検出された。各 QTL の LOD 値は共に 3.00 であり、全表現型分散に対する各 QTL の寄与率は 6.9%であった。肥満度を表現型データとして用いた QTL 解析ではタマカイ地図の連鎖群 3 に配置された SSR マーカー EfuSTR0040DB の近傍で QTL が検出された。これは体重に関与する QTL として検出された QTL の 1 つとほぼ同じ位置であり、その LOD 値と寄与率はそれぞれ 3.57 および 8.8%であった。しかしながら、体長を表現型データとして用いた QTL 解析では QTL は検出されなかった。

家系 A における雌親、雄親由来別の体重に関与する QTL の相互作用

雌親由来、雄親由来の遺伝子型情報を用いた QTL 解析により、それぞれで QTL が検出された体重の表現型値と QTL に最も近い DNA マーカーの遺伝子型情報 (4 つのアレルの組合せ) を用いて二元配置分散分析を行い、相互関係の有無を確認した (Table 7)。4 つの QTL の組合せ、すなわち qBW13t:qBW3g、qBW19t:qBW3g、qBW13t:qBW10g および qBW19t:qBW10g において、雌親由来、雄親由来それぞれのアレルの違いが体重の差異に有意に影響しており、アレルの組合せ t1g1 を保有する個体が高い表現型値を示した。また、そのうち 3 つの QTL の組合せにおいて、雌親由来および雄親由来の QTL 間で相互作用が認められた。アレルの組合せによる最大の体重差は qBW13t:qBW3g の QTL の組合せにおける t1g1 または t2g2 を保有する魚で確認され、その差は 504.6 g であった。

家系 B を用いた成長関連形質の QTL の検証

家系 A での QTL 解析により検出された 7 つの QTL は 6 つの連鎖群に位置していた。そこで、これら 6 つの連鎖群に配置された 87 個の SSR マーカーを用いて家系 B で同様の解析を行い、QTL を検証した (Table 8)。アカマダラハタ雌親由来の遺伝子型情報を用いた解析では、体重に関与する QTL が連鎖群 8 に配置された SSR マーカー Ebr00822FRA の近傍に検出され、その LOD 値と寄与率はそれぞれ 2.19 および 5.8%であった。しかしながら、体長および肥満度を表現型データとして用いた QTL 解析では QTL は検出されなかった。

一方、タマカイ雄親由来の遺伝子型情報を用いた解析では、体長および体重に関与する QTL がタマカイ地図の連鎖群 10 に配置された SSR マーカー Ebr00317FRA および Ebr01032FRA の近傍でそれぞれ検出された。各 QTL の LOD 値は 2.34 および 2.48 であり、全表現型分散に対する各 QTL の寄与率はそれぞれ 6.2% および 6.5%であった。しかしながら、肥満度を表現型データとして用いた QTL 解析では QTL は検出されなかった。また、雌親由来、雄親由来の遺伝子型情報を用いた QTL 解析のそれぞれで QTL が検出された体重の表現型値と QTL に最も近い DNA マーカーの遺伝子型情報 (4 つのアレルの組合せ) を用いて家系 A と同様に二元配置分散分析を行い、相互関係の有無を確認した結果、雌親由来、雄親由来それぞれのアレルの違いが体重の差異に有意に影響していたが、雌親由来および雄親由来の QTL 間で相互作用は認められなかった。

考察

アカマダラハタ雌とタマカイ雄を人為交配して作出した雌親の異なる F₁ 雑種ハタ半兄弟家系を用いて、成長関連形質の QTL 解析を行った。体長、体重および肥満度を表現型データとして使用し、第 1 章で解析した個体と同じ 178 尾（家系 A）を全連鎖群に配置された SSR マーカーを用いての成長関連形質の QTL 解析に付し、特定した QTL を家系 B の 168 尾を解析することで検証した。十分な検出力のもとで QTL 解析を行うには、全連鎖群を網羅するように DNA マーカーを選択することに加え、解析に用いた DNA マーカーの各連鎖群内でのマーカー座間距離が 20 cM より狭い間隔となることが望ましい (Massault *et al.* 2008)。第 1 章で作製したアカマダラハタ（雌）およびタマカイ（雄）の連鎖地図はマーカー座間の距離が 20 cM 以上となる箇所がそれぞれ 4 および 9 箇所確認できる (Tables 1 and 2)。しかしながら、これらの望ましくない箇所はタマカイ連鎖地図の連鎖群 Ela_LG24 を除いて、各連鎖群につき 1 箇所のみである (Figure 4)。より短い DNA マーカー座間距離を得るためには、より多くの DNA マーカーを解析に用いる必要があるが、前章で作製したアカマダラハタ（雌）とタマカイ（雄）の連鎖地図内の独立したマーカー座による隣接する 2 つのマーカー座間の平均遺伝距離はそれぞれ 4.6 cM、5.6 cM であり、推定ゲノムカバー率は 83.2% および 73.7% であった。コイおよびティラピアでは、同様のマーカー座間距離またはゲノムカバー率による連鎖地図を用いた解析により、成長関連形質に関与する QTL が検出されている (Wang *et al.* 2012; Liu *et al.* 2014)。従って、第 1 章で作製した連鎖地図を用いて QTL 解析を行うことで、成長関連形質の QTL を大まかに推定できると考えられた。しかしながら、近年の次世代シーケンシング (Next-Generation Sequencing, NGS) 技術の発達により、モデル生物、非モデル生物を問わず、全ゲノムを網羅する SNP マーカーの探索や遺伝子型の判定が短時間で可能となっている (Davey *et al.* 2011)。RAD シーケンス (Restriction Site Associated DNA Sequence, RAD-seq) のような NGS 技術を用いることで、SNP マーカーを多く配置した、

隣接する2つのマーカー座間の距離が短い高解像度の連鎖地図が作製され、QTLのより詳細な位置を特定することに成功している。高解像度の連鎖地図を用いた成長関連形質に関するQTL解析では、スズキで0.2–5.6 cM (Wang *et al.* 2015)、チャイロマルハタで0.2–0.7 cM (Yu *et al.* 2016)、ヒラメで0.7–15.3 cM (Song *et al.* 2012)の領域までQTLが絞り込まれており、第1章で作製した雑種ハタの各親魚種の連鎖地図の解像度は未だ低いことがわかる。今後、QTLの詳細な位置を特定し、形質を司る責任遺伝子を同定するためには、SNPマーカーに基づく解像度の高い連鎖地図の作製が必要である。

F₁雑種ハタ家系Aの解析により成長関連形質に関する7つのQTLが6つの連鎖群、すなわちアカマダラハタ(雌)連鎖地図の連鎖群8、10、13および19とタマカイ(雄)連鎖地図の連鎖群3および10に特定された(Table 6)。各QTLの表現型に対する寄与率は6.3–12.1%であった。クエでは体重に関する8つのQTLが検出されており、それぞれの寄与率は7.5–18.9%であった(Kessuwan *et al.* 2016)。また、スズキにおいては、成長関連形質に関する6つのQTLの寄与率が10.5–16.0%であったと報告されており(Wang *et al.* 2015)、本章で得られた値と類似している。これらの結果より、雑種ハタにおける成長関連形質も、クエやスズキと同様に小さな効果を持つ複数のQTLにより支配されているものと推測される。アカマダラハタ(雌)連鎖地図において体長に関するQTLとして検出された4つのQTLは、体長と体重に強い正の相関関係が認められるのと同様に、ほぼ同じLOD値、寄与率で体重に関するQTLとしても検出され、それらの95%信頼区間も重複していた。しかしながら、タマカイ(雄)連鎖地図の連鎖群3および10において体重に関するQTLとして検出された2つのQTLは、体長に関するQTLとしては検出されず、そのうちの一方は肥満度に関するQTLとして検出された。これらの結果からF₁雑種ハタの成長において、アカマダラハタ雌親由来の4つのQTLは体長と体重に、タマカイ雄親由来のQTLは体重と肥満度の増加に関与しているものと考えられる。

体長および体重を表現型データとして用いた解析では、アカマダラハタ(雌)連鎖地

図の連鎖群 8 および 10 で検出された QTL に有意な相互関係（エピスタシス）が確認でき（Table 6）、これらの QTL の近傍マーカーである Ebr01086FRA および Ebr00814FRA のアレルの組合せにより最大約 400 g の体重の違いが認められた（Figure 7）。成長関連形質のような複雑な形質は多くの遺伝子により決定されているため、本章のように関連しあう QTL が検出されることも予想される。このように関連し合う QTL は鶏（Carlborg *et al.* 2003; Ankra-Badu *et al.* 2010）およびニジマス（Wringe *et al.* 2010）における成長関連形質に関与する QTL の研究においても報告されている。ニジマスの研究では成長率の異なる 2 種類の系統から作出された個体を雄親として用いた場合に、他の個体を雄親として用いた場合に比べ、多くの連鎖群間の相互作用が検出されており、集団間での多様性の違いや形質の遺伝率の違いがエピスタシスを検出できた理由として推測された。本研究で雑種ハタの作出に用いたアカマダラハタ雌親の起源はわからないが、本章でエピスタシス効果を示す QTL が検出されたのも同様の理由によるものではないかと考えられる。遺伝子間の相互作用は一般的なものとして考えられているが、十分な検出力を備えた解析手法が確立されていないために、相互に関連する QTL に関する報告は少ない。Cui *et al.* (2015) はベイズモデルに基づき、倍加半数体ヒラメを用いて体重に関与する遺伝的な構造を解析し、主効果を示す 42 の QTL とエピスタシス効果を示す 59 の QTL を検出した。しかしながら、彼らはベイズモデルに基づき得られた解析結果は区間マッピング法により得られた結果とはまったく異なっていることを報告しており、これは用いた統計学的手法および解析集団が違うためであると推測している。相互に関係している QTL 内に位置する遺伝子は、共通する経路に関与する酵素等をコードしていると予想される。本章で得られたエピスタシス効果を示す QTL 内に位置する遺伝子を特定することは成長関連形質を調整する機構を理解することにもつながると期待される。

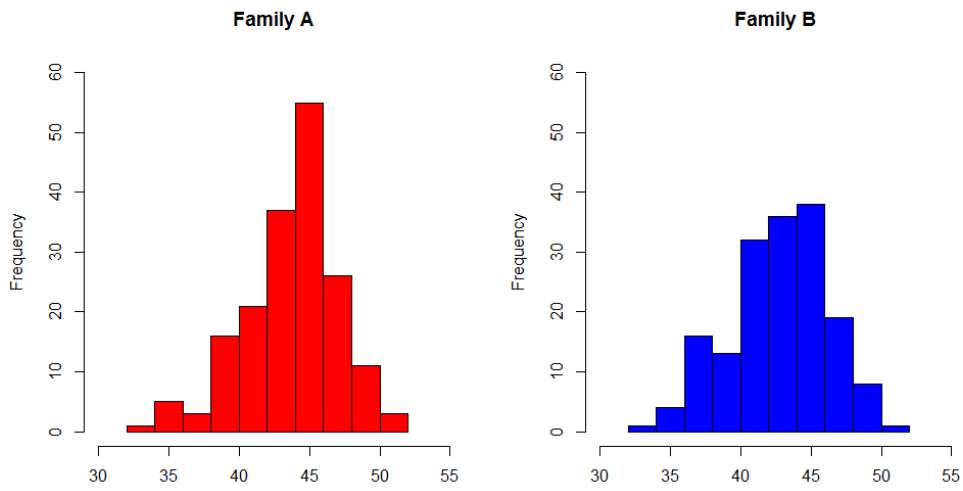
体重の表現型値と QTL に最も近い DNA マーカーの遺伝子型情報を用いて二元配置分散分析を行い、相互関係の有無を確認した（Table 7）。本解析では、アカマダラハタ（雌）連鎖地図の連鎖群 8 および 10 で検出された QTL に関して、雌親由来のアレル間で有意

な差は検出されなかったが、これはゲノムワイドの QTL 解析において検出された QTL の連鎖群間での相互作用が影響したものと推測される (Figure 7)。また、他の QTL の組合せにおいては、雌親由来および雄親由来のそれぞれのアレル間で有意な効果が確認されたことから、 F_1 雑種ハタにおいて雌親および雄親から受け継がれた QTL アレルはお互いを抑制することなく体重の増加に関与しているものと考えられる。3 つの QTL の組合せ、すなわち $qBW13t:qBW3g$ 、 $qBW19t:qBW3g$ および $qBW13t:qBW10g$ においては、アカマダラハタ雌親由来およびタマカイ雄親由来の QTL アレル間での相互作用が認められた。 F_1 世代においても確認されることがある雑種強勢の遺伝的メカニズムは複雑であり、これまでに雑種強勢を説明する仮説として、優性説、超優性説およびエピスタシス説の 3 つが提唱されている (Birchler *et al.* 2006; Tang *et al.* 2010; Shang *et al.* 2016)。雑種強勢は一般的に多くの遺伝子が複合的にかかわっていると考えられるため、雑種強勢を説明するためには、まずゲノム全体で起きている相互作用を排除しなければならない。トマトや陸地綿の研究においては、イントログレッション系統や組換え自殖系統を解析することで、雑種強勢に関する多くの QTL が特定されており、陸地綿の収量に關与する雑種強勢には、単一座位の部分的な優性やエピスタシスが他の遺伝的効果より重要な役割を担っていると推測されている (Semel *et al.* 2006; Shang *et al.* 2016)。また、マウスにおいては、コンジェニック系統を用いた研究により体重に關与し、超優性を示す雑種強勢 QTL が報告されている (Ishikawa 2009)。アカマダラハタ (雌) とタマカイ (雄) から作出した雑種ハタは成熟するまでに長い生育期間を要するために本研究では F_1 集団を解析に使用した。今後、アレル効果を推定し、雑種強勢の遺伝的な根拠を解明するためにはより適した実験交配集団 (F_2 集団等) を使用したさらなる解析が必要である。しかしながら、本章で明らかとなった F_1 雑種ハタにおける雌親および雄親から受け継がれた QTL アレルが相互作用を有していたことは本雑種ハタの成長関連形質の遺伝的構造を理解する第 1 歩になるものと期待される。

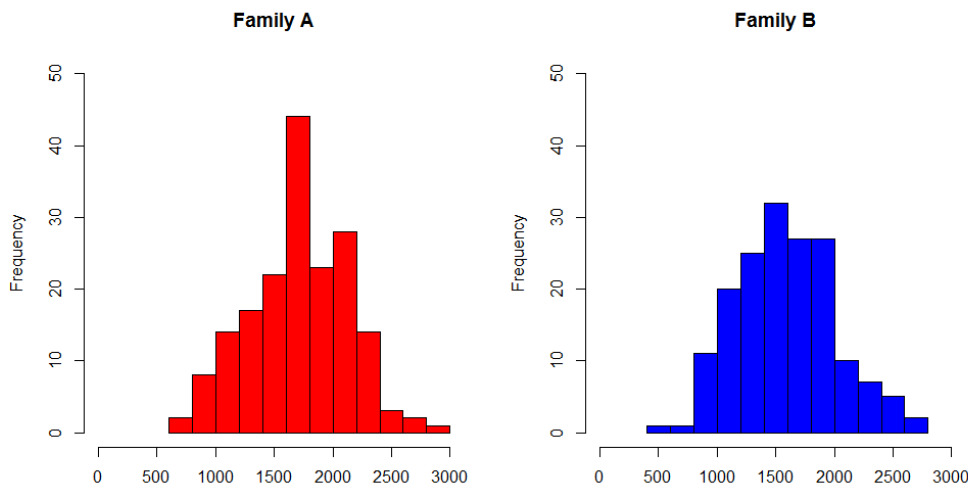
家系 A とは異なる雌親から作出した F_1 雑種ハタ半兄弟家系 B を用いて、家系 A で検

出された7つの QTL を検証した (Table 8)。体重の表現型値を用いた解析では、アカマダラハタ (雌) 連鎖地図の連鎖群 8 に配置された SSR マーカー Ebr00822FRA およびタマカイ (雄) 連鎖地図の連鎖群 10 に配置された SSR マーカー Ebr01032FRA の近傍にそれぞれ QTL が検出された。これらの SSR マーカーは家系 A での体重の表現型値を用いた解析において検出された QTL の 95%信頼区間内に位置していた (Figure 4 and Table 6)。また、二元配置分散分析の結果でも家系 A と同様に、雌親由来および雄親由来の QTL 間の相互作用は確認されなかった。このことから、家系 A と家系 B で検出された2つの QTL、すなわち qBW8t と qBW10g は F₁ 雑種ハタで共通のものである可能性が考えられた。しかしながら、本章で QTL の検証に用いた家系は雌親のみ異なる F₁ 雑種ハタ半兄弟家系であるので、今後は雄親のみ異なる家系や雌親、雄親ともに異なる集団を用いた解析による QTL の検証が必要である。一方、家系 A において比較的高い LOD 値を示して検出されたアカマダラハタ (雌) 連鎖地図の連鎖群 8、13 および 19 の QTL とタマカイ (雄) の連鎖群 3 に検出された QTL はいずれの表現型データを用いた解析においても家系 B では検出されなかった。しかしながら、Kessuwan *et al.* (2016) はクエ F₁ 家系を用いた研究により、クエ連鎖地図の連鎖群 8、10、13 および 19 において、体重または体長に關与する QTL を推定している。クエ連鎖地図における連鎖群 8、10、13 および 19 はアカマダラハタ (雌) 連鎖地図およびタマカイ (雄) 連鎖地図における連鎖群 8、10、13 および 19 にそれぞれ相当する。サケ科魚類では、QTL が近縁種間で保存されている事例も報告されていることから (Reid *et al.* 2005)、これら4つの連鎖群はクエとアカマダラハタに共通する成長関連形質に關与する QTL を保有している可能性が考えられる。特に、連鎖群 10 はクエ、アカマダラハタ、タマカイの3種で共通して体重に關与する QTL が検出されたことから、そのゲノム領域は保存されていると推測される。これら3種のハタのゲノムの類似性はわからないが、本章で検出された QTL はハタ類の成長関連形質に關与するゲノム構造の理解および選抜育種を実施する際に多いに役立つものと期待される。

(A) 体長 (cm)



(B) 体重 (g)



(C) 肥満度

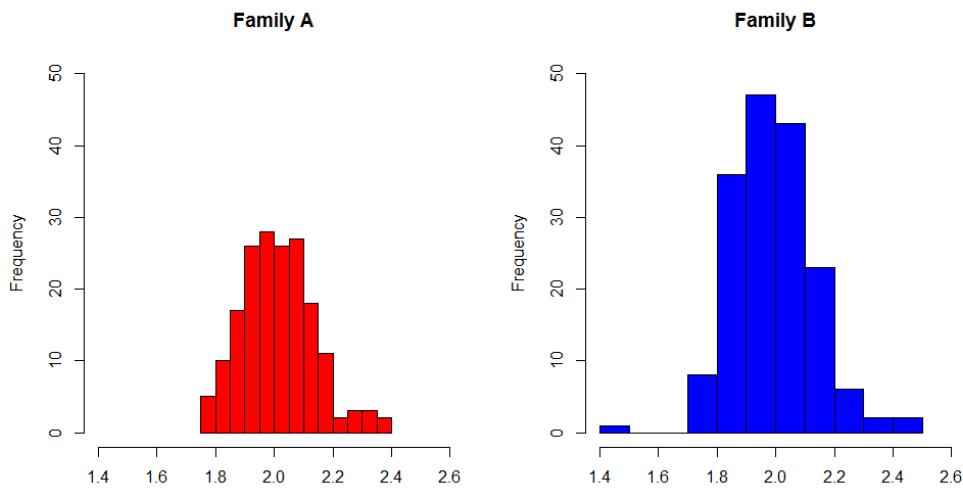
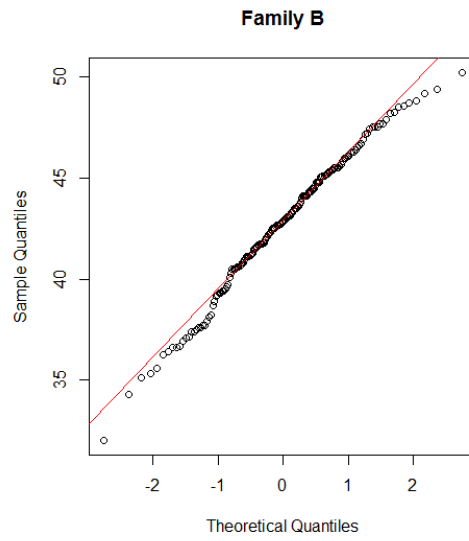
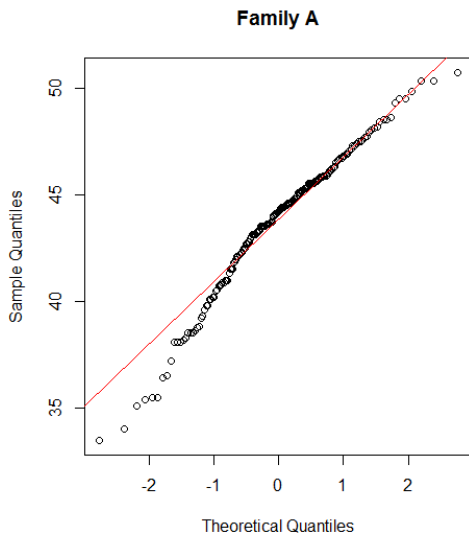


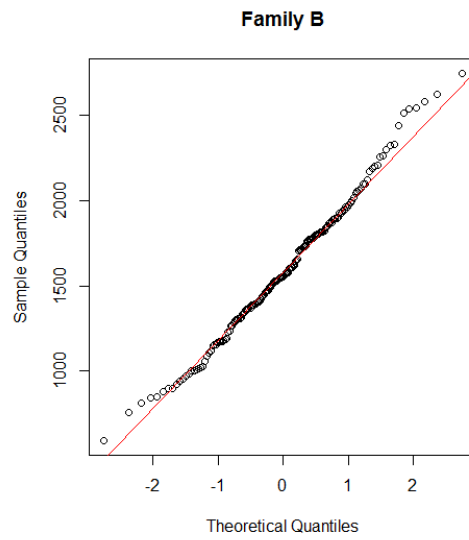
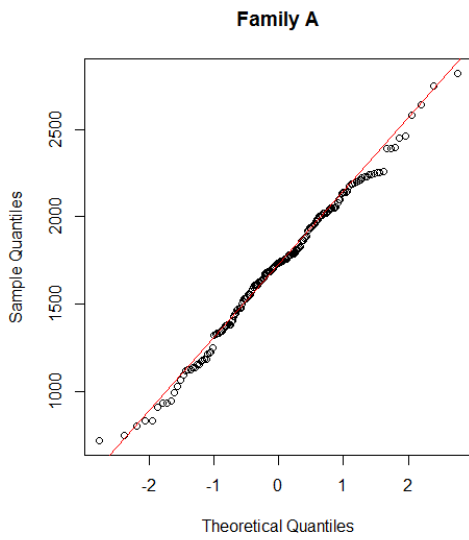
Figure 5 F₁ 雑種ハタ 2 家系の各成長形質の分布を示すヒストグラム

縦軸に尾数を、横軸にそれぞれの表現型値を示す。

(A) 体長 (cm)



(B) 体重 (g)



(C) 肥満度

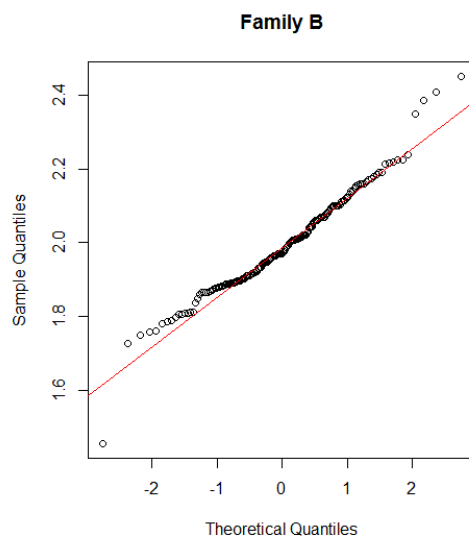
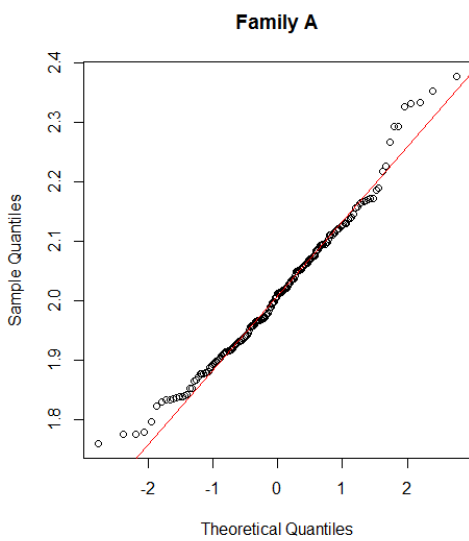


Figure 6 F_1 雑種ハタ 2 家系の各成長形質の分布を示す正規確率プロット

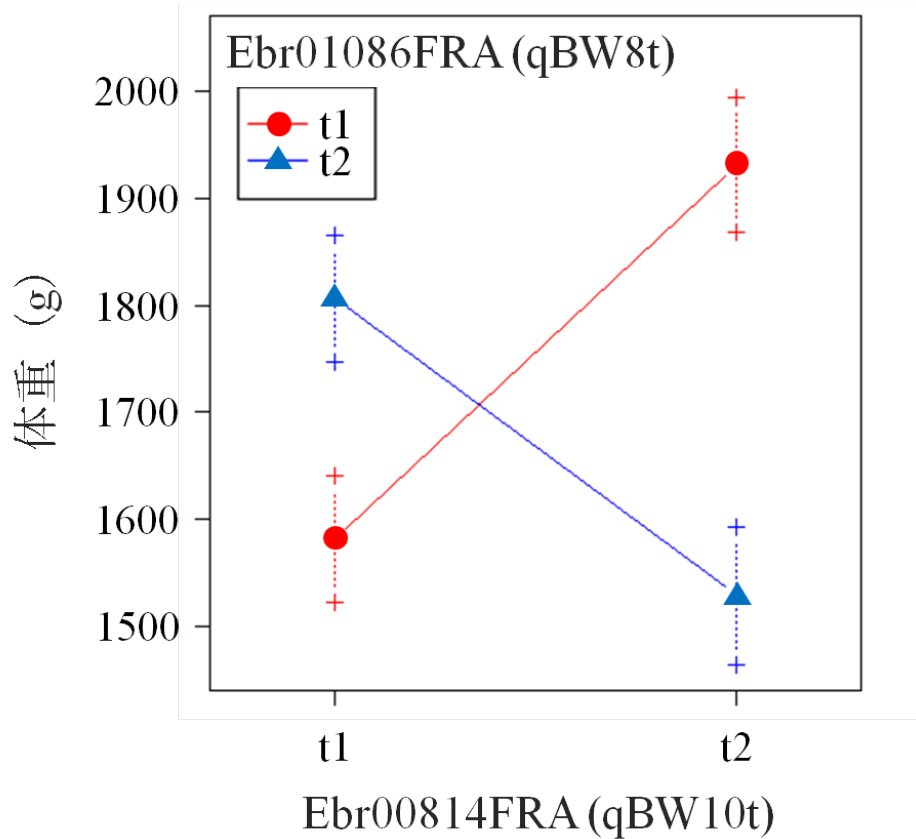


Figure 7 アカマダラハタ雌親由来の QTLs (qBW8t, qBW10t)の交互作用プロット

縦軸に体重の表現型値 (g)を示す。各 QTL (qBW8t, qBW10t)において最近傍に位置していた DNA マーカー、それぞれ Ebr01086FRA と Ebr00814FRA の遺伝子型を使用した。Ebr00814FRA の遺伝子型は横軸に、Ebr01086FRA の遺伝子型は図中に示した。Ebr01086FRA において遺伝子型が“t1”であった場合、Ebr00814FRA における遺伝子型が“t1”もしくは“t2”であれば、その魚体重はそれぞれ 1,580 g または 1,930 g であった。同様に、Ebr01086FRA において遺伝子型が“t2”であった場合、Ebr00814FRA における遺伝子型が“t1”もしくは“t2”であれば、その魚体重はそれぞれ 1,806 g または 1,528 g であった。エラーバーは各遺伝子型における標準偏差±1を示す。

Table 4 F₁ 雑種ハタ 2 家系の成長関連形質の表現型データ

形質	家系 A (178 尾)					家系 B (168 尾)				
	中央値	最大値	最小値	四分位範囲	<i>P</i> 値	中央値	最大値	最小値	四分位範囲	<i>P</i> 値
体長 (<i>TL</i>)	44.22	50.70	33.50	3.94	0.0007*	42.86	50.20	32.04	4.57	0.1458
体重 (<i>BW</i>)	1736.00	2819.00	721.00	565.75	0.4383	1559.00	2745.00	596.00	539.50	0.3504
肥満度 (<i>FK</i>)	2.01	2.37	1.76	0.16	0.0098*	1.97	2.44	1.45	0.18	0.0015*

体長および体重はそれぞれ cm、g 単位で示す。*P* 値は Shapiro–Wilk 検定により各表現型データの正規性を検定した結果であり、正規分布からの逸脱が認められた表現型データはアスタリスクを表記した ($P < 0.05$)。

Table 5 各成長関連形質間におけるピアソンの積率相関係数

形質	家系 A (178 尾)			家系 B (168 尾)		
	<i>TL</i>	<i>BW</i>	<i>FK</i>	<i>TL</i>	<i>BW</i>	<i>FK</i>
体長 (<i>TL</i>)		0.961	0.286		0.955	0.292
体重 (<i>BW</i>)			0.513			0.532
肥満度 (<i>FK</i>)						

有意水準 1%での相関関係を示す。

Table 6 F₁ 雑種ハタ家系 A における成長関連形質の QTL 解析結果

形質	由来する親魚種	QTL の位置 (連鎖群、(cM))	最近傍に位置する マーカー (cM)	LOD 値	表現型分散 (%)	95%信頼区間 (cM)	QTL 名
体長 (<i>TL</i>)	アカマダラハタ	Efu_LG8 (0.0)	Ebr01086FRA (0.0)	6.56	12.0	0.0–10.0	qTL8t
		Efu_LG10 (10.0)	Ebr00814FRA (10.7)	6.61	12.1	2.5–15.0	qTL10t
		Efu_LG13 (22.5)	Ebr01402FRA (22.0)	6.48	11.9	14.6–35.0	qTL13t
		Efu_LG19 (0.0)	Ebr01150FRA (0.0)	3.57	6.3	0.0–12.5	qTL19t
		Efu_LG8 (0.0) :Efu_LG10 (10.0)		6.48	11.9		qTL8:10t
体重 (<i>BW</i>)	アカマダラハタ	Efu_LG8 (0.0)	Ebr01086FRA (0.0)	6.00	11.2	0.0–10.2	qBW8t
		Efu_LG10 (12.5)	Ebr00814FRA (10.7)	6.19	11.5	2.5–17.5	qBW10t
		Efu_LG13 (25.0)	Ebr00509FRA (24.2)	5.95	11.1	12.5–35.0	qBW13t
		Efu_LG19 (0.0)	Ebr01150FRA (0.0)	3.60	6.5	0.0–12.5	qBW19t
		Efu_LG8 (0.0) :Efu_LG10 (12.5)		5.83	10.8		qBW8:10t
	タマカイ	Ela_LG3 (17.5)	EawSTR12DB (18.0)	3.00	6.9	5.0–20.3	qBW3g
		Ela_LG10 (32.2)	EfuSTR339DB (32.2)	3.00	6.9	15.0–32.2	qBW10g
肥満度 (<i>FK</i>)	タマカイ	Ela_LG3 (18.6)	EfuSTR0040DB (18.6)	3.57	8.8	12.5–20.3	qFK3g

QTL 解析の結果、5%ゲノムワイドで有意であると認められた QTL を示す。相互関係が認められた QTL ペアは“:”を用いて QTL:QTL と表記した。

Table 7 F₁ 雑種ハタ家系 A における親魚種由来の QTL の相互作用

QTL ペア	各遺伝子型における体重の平均値 (g)				結果
	t1g1	t1g2	t2g1	t2g2	
qBW8t : qBW3g	1830.77	1662.52	1794.52	1506.57	†
qBW10t : qBW3g	1792.27	1582.77	1831.69	1610.58	†
qBW13t : qBW3g	1923.64	1758.69	1675.25	1419.00	‡†§
qBW19t : qBW3g	1968.17	1692.65	1674.92	1520.93	‡†§
qBW8t : qBW10g	1835.85	1635.92	1789.33	1565.58	†
qBW10t : qBW10g	1758.74	1632.04	1868.42	1554.94	†
qBW13t : qBW10g	1942.03	1719.58	1624.28	1496.20	‡†§
qBW19t : qBW10g	1915.08	1751.57	1712.08	1501.78	‡†

QTL ペアは“:”を用いて QTL (アカマダラハタ) : QTL (タマカイ) と表記した。アカマダラハタ雌親から受け継がれたアレルは“t1”、“t2”、タマカイ雄親から受け継がれたアレルは“g1”、“g2”とそれぞれ表記した。アカマダラハタ雌親から受け継がれたアレル内およびタマカイ雄親から受け継がれたアレル内で魚体重との関連が確認された QTL ペアをそれぞれ“‡”、“†”で示し、アカマダラハタ雌親、タマカイ雄親から受け継がれたアレル間で相互作用が認められた QTL ペアは“§”で示した。

Table 8 F₁ 雑種ハタ家系 B における成長関連形質の QTL 解析結果

形質	由来する親魚種	QTL の位置 (連鎖群、cM)	最近傍に位置する マーカー (cM)	LOD 値	表現型分散 (%)	95%信頼区間 (cM)	家系 A における QTL 名
体長 (<i>TL</i>)	タマカイ	Ela_LG10 (35.5)	Ebr00317FRA (35.5)	2.34	6.2	10.0–37.5	
体重 (<i>BW</i>)	アカマダラハタ	Efu_LG8 (1.8)	Ebr00822FRA (1.8)	2.19	5.8	0.0–37.5	qBW8t
	タマカイ	Ela_LG10 (18.1)	Ebr01032FRA (18.1)	2.48	6.5	10.0–37.5	qBW10g

QTL 解析の結果、5%エクスペリメントワイドで有意であると認められた QTL を示す。

第3章

F₁ 雑種ハタにおける成長関連形質の QTL と環境要因との関連性

一般的に、成長関連形質のように複数の異なる遺伝子座により支配されている形質では、小さな効果をもつ多くの遺伝子が関与しており、遺伝的要因と環境要因およびそれらの相互作用により表現型が決定される (Mackay 2001)。植物では異なる条件や環境を考慮し、収量や生育関連形質の QTL 解析が行われており、環境の変化と連動する QTL が報告されている (Poormohammad Kiani *et al.* 2009; Souza *et al.* 2013)。また、動物においては異なる年齢時の表現型データを用いて成長関連形質の QTL 解析が行われており、年齢に特異的な QTL が報告されている (Hadjipavlou & Bishop 2008; Ishikawa 2009)。魚では異なる年齢時の表現型データを用いて成長関連形質の QTL 解析を行った報告はあるが (Wang *et al.* 2006; Wang *et al.* 2015; Kessuwan *et al.* 2016)、これまでに環境の変化と QTL の変動に関する報告はない。第2章では成長率の異なるアカマダラハタとタマカイを交雑した F₁ 雑種ハタを用いて QTL 解析を行い、成長関連形質に関与する7つの QTL を検出した。QTL 解析に使用した F₁ 雑種ハタは熱帯域に分類されるタイ国にて作出、飼育されており、成長関連形質データの飼育試験期間中に冬季、夏季、雨季の季節を経験している。そこで、本章では成長関連形質データを3つの異なる季節に分けて解析することで、成長関連形質に関与する QTL の特徴を環境要因との関連性から評価することを試みた。

材料および方法

解析家系と成長関連形質データの収集

第2章で解析したアカマダラハタ雌2尾とタマカイ雄1尾を人為交配し、異なる雌親から作出したF₁雑種ハタ半兄弟家系2家系を解析家系とした。これら2家系の成長関連形質データとして2013年8月から2014年10月までの各個体の毎月の体長 (cm) と体重 (g) が測定されている。この期間のF₁雑種ハタの年齢は5カ月齢から19カ月齢である。

ゲノムDNAの調整および遺伝子型の解析

ゲノムDNAは第1章と同様に鰭の一部より Coimbra *et al.* (2003) の方法に従い抽出した。遺伝子型は第1章と同じ手法を用いてPCR法とアクリルアミドゲル電気泳動法により判別した。

各季節における成長関連形質のQTL解析

体長 (cm) および体重 (g) の増加量を成長関連形質のQTL解析の表現型データとして用いた。各季節における成長関連形質の表現型値はタイ気象局の報告書 (2015) に基づき、成長関連形質データを季節ごとに分けることで得た。タイ気象局の報告書では10月中旬から2月中旬までを冬季、2月中旬から5月中旬までを夏季、5月中旬から10月中旬までを雨季と定めている。飼育試験期間中の雑種ハタは2013年8月、10月、2014年2月、5月および10月時はそれぞれ5カ月、7カ月、11カ月、14カ月および19カ月齢である。冬季における成長関連形質の表現型値は11カ月齢時から7カ月齢時の成長関連形質データを減算して算出した。同様に、夏季および雨季における成長関連形質の表現型値は14カ月齢時から11カ月齢時、7カ月齢時から5カ月齢時 (1年目) および19カ月齢時から14カ月齢時 (2年目) の成長関連形質データを減算してそれぞれ算出

した。雨季においては1年目と2年目の成長関連形質データを加算した値を雨季における成長関連形質の QTL 解析に用いる表現型データとした。従って、冬季における体長 (*WLe*)、体重 (*WWe*)、夏季における体長 (*SLe*)、体重 (*SWe*)、雨季における体長 (*RLe*) および体重 (*RWe*) の合計6つの表現型データを QTL 解析に使用した。QTL 解析は第2章と同様にそれぞれの形質において雌親、雄親由来の各遺伝子型情報を R/qtl ソフトウェア (Broman *et al.* 2003) を用いて解析することで、雌親、雄親由来の QTL の検出を試みた。また、QTL 解析を行う前には、Shapiro–Wilk 検定により各表現型データの正規性を検定し、正規分布から逸脱する表現型データに対しては Yang *et al.* (2006) の方法に従い、Box–Cox 変換を用いてデータの分布を正規分布に近づけたのち、QTL 解析に付した。なお、連鎖解析は第1章と同様に LINKMFEX software package version 2.3 (Danzmann 2006) および Map Manager QTX ソフトウェア (Manly *et al.* 2001) を用いて行い、分離世代が両親から受け取る雌親、雄親由来別の遺伝子型情報と各マーカー間の遺伝距離を入手し、QTL 解析に使用した。第2章と同様に家系 A を全連鎖群に配置された SSR マーカーを用いての成長関連形質の QTL 解析に付し、家系 B の QTL 解析では家系 A の解析により QTL が検出された連鎖群に配置された SSR マーカーのみを使用し、同様に解析することで得られた QTL を検証した。また、検出した QTL が各季節において異なった際には、QTL アレルの保有状況を基に魚を分け、各季節におけるそれぞれの日間成長率 (Specific Growth Rate, SGR) を算出、比較することで、QTL アレルの有効性を検証した。

結果

各季節における成長関連形質データの収集

アカマダラハタ雌2尾とタマカイ雄1尾を人為交配して作出したF₁雑種ハタ半兄弟家系AとBの飼育試験期間中の成長曲線を作成し、各季節における成長関連形質データを得た (Figure 8 and Table 9)。ピアソンの積率相関係数を算出し、各形質間の相関関係を調べた結果、家系A、Bともに体長と体重において強い正の相関が認められた ($P < 0.01$, Table 10)。QTL解析ソフトウェアは一般的に表現型データが正規分布に従う統計モデルを仮定しているため、第2章と同様に各形質の表現型データのヒストグラムと正規確率プロットを作成し、表現型データの分布を確認した (Figures 9 and 10)。なお、飼育試験期間中に計測した環境要因は Table 11 に示した。

家系Aの各季節における成長関連形質のQTL解析

各季節における体長および体重を表現型データとして用いたQTL解析の結果、各季節で異なるQTLが検出された (Table 12)。アカマダラハタ(雌)連鎖地図において、連鎖群13に特定されたQTLは全季節において検出された。このQTLは冬季において最も高いLOD値(8.05)および全表現型分散に対する寄与率(18.8%)を示し、夏季において最も低いLOD値(2.78)および全表現型分散に対する寄与率(6.9%)を示した。また、第2章で体長に關与するQTLとして検出された連鎖群8、10および19のQTLと連鎖群8および10で検出されたQTL間の相互関係は雨季においてのみ検出された。全季節で体長に關与するQTLとして連鎖群13に特定されたQTLは、体重を表現型データに用いてQTL解析を行った際にも全季節において検出された。さらに、最も高いLOD値および最も低いLOD値も体長を表現型データとして用いた解析と同様にそれぞれ冬季、夏季であった。また、第2章で体重に關与するQTLとして検出された連鎖群8、10および

19 の QTL と連鎖群 8 および 10 で検出された QTL 間の相互関係は雨季および冬季において検出され、夏季では検出されなかった。しかしながら、第 2 章で体長および体重に関与する QTL として検出された QTL 以外に各季節で特異的に関与する QTL は検出されなかった。

一方、タマカイ（雄）連鎖地図において、第 2 章で体重に関与する QTL として連鎖群 3 に特定された QTL は冬季および雨季において検出され、その LOD 値はそれぞれ 2.87 および 2.77 であった。また、同じく体重に関与する QTL として連鎖群 10 に特定された QTL は夏季においてのみ検出され、その LOD 値は 2.80 であった。これらタマカイ（雄）連鎖地図において特定された QTL は 5%ゲノムワイドの閾値をわずかに超えるものであった。しかしながら、第 2 章で体重に関与する QTL として検出された QTL 以外に各季節で特異的に関与する QTL は検出されなかった。

家系 A の各季節における QTL アレルの効果

各季節における体重を表現型データとして用いた QTL 解析の結果、各季節で異なる QTL が検出されたことから、QTL アレルの保有状況を基に魚を 2 群に分け、各季節における成長率（SGR）を用いて QTL アレルの効果を検証した（Table 13）。アカマダラハタ（雌）連鎖地図の連鎖群 13 に特定された QTL は冬季および夏季において、連鎖群 19 に特定された QTL は冬季および雨季（2 年目）において、QTL アレルを保有している魚が保有していない魚に比べ、有意に高い成長率を示した。また、タマカイ（雄）連鎖地図の連鎖群 10 に特定された QTL は夏季において、QTL アレルを保有している魚が保有していない魚に比べ、有意に高い成長率を示した。これら 3 つの QTL アレルの保有状況を基に魚を 2 群に分け、同様の解析を行った結果、雨季（2 年目）における成長率に有意な差は認められなかったが、冬季および夏季において、QTL アレルを 3 つすべて保有している魚がまったく保有していない魚に比べ、有意に高い成長率を示していた。

家系 B における成長関連形質の QTL の検証

家系 A で確認された各季節における QTL の特徴を第 2 章と同様に家系 B を用いて解析を行うことで検証した (Table 14)。アカマダラハタ雌親由来の遺伝子型情報を用いた解析では、冬季においてのみ体長に關与する QTL が連鎖群 3 および 8 に配置された SSR マーカー EfuSTR0040DB および Ebr00786FRA の近傍に検出され、それら QTL 間には相互關係が認められた。家系 B において検出された連鎖群 3 の QTL は家系 A での解析では検出されていない新規の QTL であった。連鎖群 3 との相互作用により冬季における体長に關与する QTL が検出された連鎖群 8 では、体重に關与する QTL も検出された。しかしながら、体重を表現型データとして用いた解析において連鎖群 8 に検出された QTL は連鎖群 3 との相互作用を示さなかったことに加え、冬季における体長に關与する QTL として検出された位置とは異なる位置に特定された。また、夏季および雨季においては体長および体重に關与する QTL は検出されず、家系 A での解析で特定された連鎖群 10、13 および 19 の QTL と連鎖群 8 および 10 で検出された QTL 間の相互關係も家系 B を用いた解析では検出されなかった。

一方、タマカイ雄親由来の遺伝子型情報を用いた解析では、体長に關与する QTL が連鎖群 10 において検出され、特に夏季において高い LOD 値 (3.23) および全表現型分散に対する QTL の寄与率 (8.4%) を示した。また、同 QTL は体重に關与する QTL としても検出され、体長を表現型データとして用いた解析と同様に LOD 値および全表現型分散に対する QTL の寄与率は夏季において高い値を示した。しかしながら、冬季においては体長および体重に關与する QTL は検出されず、家系 A での解析で特定された連鎖群 3 の QTL は家系 B を用いた解析では検出されなかった。また、QTL アレルの効果を検証した結果、タマカイ (雄) 連鎖地図の連鎖群 10 に特定された QTL アレルを保有する魚は、家系 A と同様、保有していない魚に比べ、夏季において有意に高い成長率を示した (Table 15)。

考察

成長関連形質は温度や塩分濃度のような環境要因に影響されることが知られている。本章では成長率の異なるアカマダラハタおよびタマカイを交雑した F_1 雑種ハタの成長関連形質データを3つの異なる季節、すなわち冬季、夏季、雨季に分け、QTLと環境要因との関連性を評価した。家系Aの各季節における体長および体重を表現型データとしてQTL解析を行った結果、得られたQTLは第2章で検出された体重に関与するQTLの95%信頼区間内に位置していたが、季節間では異なる特徴が認められた (Figure 4, Tables 6 and 12)。アカマダラハタ (雌) 連鎖地図の連鎖群13に特定されたQTLは全季節を通じて体長および体重に関与するQTLとして検出された。また、連鎖群8、10、19に特定された3つのQTLおよび連鎖群8と10の相互関係は雨季における体長に関与するQTL、および冬季と雨季における体重に関与するQTLとして検出された。これらの結果は連鎖群13に特定されたQTLは成長関連形質に対して単独で大きな効果を有しており、連鎖群8、10および19に特定されたQTLは体長または体重の増加に関わる共通の機構を共有しているものと考えられる。

興味深いことに、第2章でタマカイ (雄) 連鎖地図において体重に関与するQTLとして検出された2つのQTLはそれぞれ異なる季節で検出された。これは環境の変化に応じて異なる遺伝子が働いていることを示唆している。冬季と夏季の体重増加量には有意な差が認められないにもかかわらず、体重に関与するQTLとして検出されたQTLの中で、アカマダラハタ (雌) 連鎖地図の連鎖群8、10および19に特定されたQTLとタマカイ (雄) 連鎖地図の連鎖群3に特定されたQTLは夏季においてのみ検出されなかった (Tables 9 and 12)。また、アカマダラハタ (雌) 連鎖地図の連鎖群13に特定されたQTLは全季節において有意なQTLとして検出されたが、夏季においては最も低いLOD値を示した。対照的に、タマカイ (雄) 連鎖地図の連鎖群10に特定されたQTLは夏季においてのみ検出された。QTLアレルの効果を検証した結果においても、タマカイ (雄) 連

鎖地図の連鎖群 10 の QTL アレルを保有する魚は、保有していない魚に比べ、夏季における成長率が有意に高かった (Table 13)。飼育試験期間中に調査した環境要因の中では、塩分濃度のみが他の季節に比べ、夏季において有意に高いことが確認された (Table 11)。塩分濃度は水生生物における代謝、浸透圧の調節やバイオリズムのような様々な生理現象に影響を及ぼすことが知られている (Varsamos *et al.* 2005)。本研究に供試したアカマダラハタ雌およびタマカイ雄を交雑して作出した F₁ 雑種ハタの稚魚においても、異なる塩分濃度が成長、飼養成績および血漿コルチゾール濃度に与える影響が調査されており、Othman *et al.* (2005) は塩分濃度 30 g L⁻¹ よりも 35 g L⁻¹ の際に有意に高い血漿コルチゾール濃度を検出し、両塩分濃度にて飼育した稚魚は成育が良くなかったことを報告している。血液中のコルチゾール濃度の上昇は浸透圧調節機能障害などにより引き起こされ、生理的なストレスを評価する際の指標となる。カワマスでは、血漿コルチゾール濃度を指標として、ストレスに関連する 2 つの QTL が異なる連鎖群に特定されており、それらが成長に関与する QTL と同じ位置であったことが報告されている (Sauvage *et al.* 2012)。また、ストレス関連 QTL の最も近傍に位置していた DNA マーカーの 1 つは脊椎動物におけるケトン生成やロイシン異化作用に関与するミトコンドリアの 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA (HMG-CoA) 前駆体と関連付けられていた。血漿コルチゾール濃度のようなストレス関連 QTL が成長に関与する QTL へ与える影響は不明であるが、ハタ類においてもストレス応答と成長の間に遺伝的な相関があり、タマカイ (雄) 連鎖地図の連鎖群 10 に特定された体重に関与する QTL は環境ストレスに対する耐性に関与する遺伝子を保持している可能性が考えられる。

家系 A とは異なる雌親から作出した F₁ 雑種ハタ半兄弟家系 B を用いて、家系 A で検出された QTL を検証した結果、第 2 章にて検出された 2 つの QTL と同じ QTL が検出された (Tables 8 and 14)。また、アカマダラハタ (雌) の連鎖群 8 に検出された QTL は家系 A と同様に夏季では検出されず、タマカイ (雄) の連鎖群 10 に検出された QTL は体長および体重の両方の形質において夏季に比較的高い LOD 値を示した。さらに、QTL

アレルの効果を検証した結果、家系 B においても、タマカイ（雄）連鎖地図の連鎖群 10 の QTL アレルを保有する魚は、保有していない魚に比べ、夏季における成長率が有意に高かった (Table 15)。これらの結果は、環境の変化に応じて異なる遺伝子が働いており、タマカイ（雄）連鎖地図の連鎖群 10 に特定された体重に関与する QTL は環境ストレス、特に高塩分濃度に対する耐性付与にも関連しているという上述した仮説と一致する。また、家系 B の解析では、家系 A のものとは異なる相関関係をもつ QTL が冬季における体長を表現型データとして用いた解析において検出された。このことから遺伝子間の相互作用は一般的なものであることが予想される。しかしながら、QTL の検証に用いた家系 B は雌親のみ異なる F₁ 雑種ハタ半兄弟家系であり、QTL が検出された連鎖群のみを検証解析に用いているので、今後は雄親のみ異なる家系や雌親、雄親ともに異なる集団を用いて全連鎖群を網羅した DNA マーカーによる解析を行うことで検出された QTL 間の相互作用を検証する必要がある。

スズキにおいて、90 日齢と収穫時である 289 日齢の異なる年齢時の表現型データを用いて成長関連形質の QTL 解析が行われており、年齢に関わらず一貫して体重に関与する QTL が報告されている (Wang *et al.* 2006)。一方、ギンザケやターボットでは年齢に特異的な QTL が報告されている (O'Malley *et al.* 2010; Wang *et al.* 2015)。本章では各季節において異なる QTL を検出し、環境要因との関連を評価したが、飼育試験の性質上、環境要因と年齢による影響とを区別することができなかった。現在、雑種ハタは親魚種であるアカマダラハタとタマカイの産卵および排精期が重なる限られた期間でのみ作出可能である。今後、種苗生産技術の向上により、雑種ハタ種苗が通年入手できるようになれば、各季節に年齢の同じ個体を用いて同様の試験、解析を行うことで、本章で季節特異的に検出された QTL から年齢による影響を取り除くことができると考えられる。今後の詳細な解析が必要ではあるが、本章で夏季における高塩分濃度との関連が予想されたタマカイ（雄）連鎖地図の連鎖群 10 に検出された QTL はハタ類の成長関連形質に関与するゲノム構造の理解および選抜育種を実施する際に役立つものと期待される。

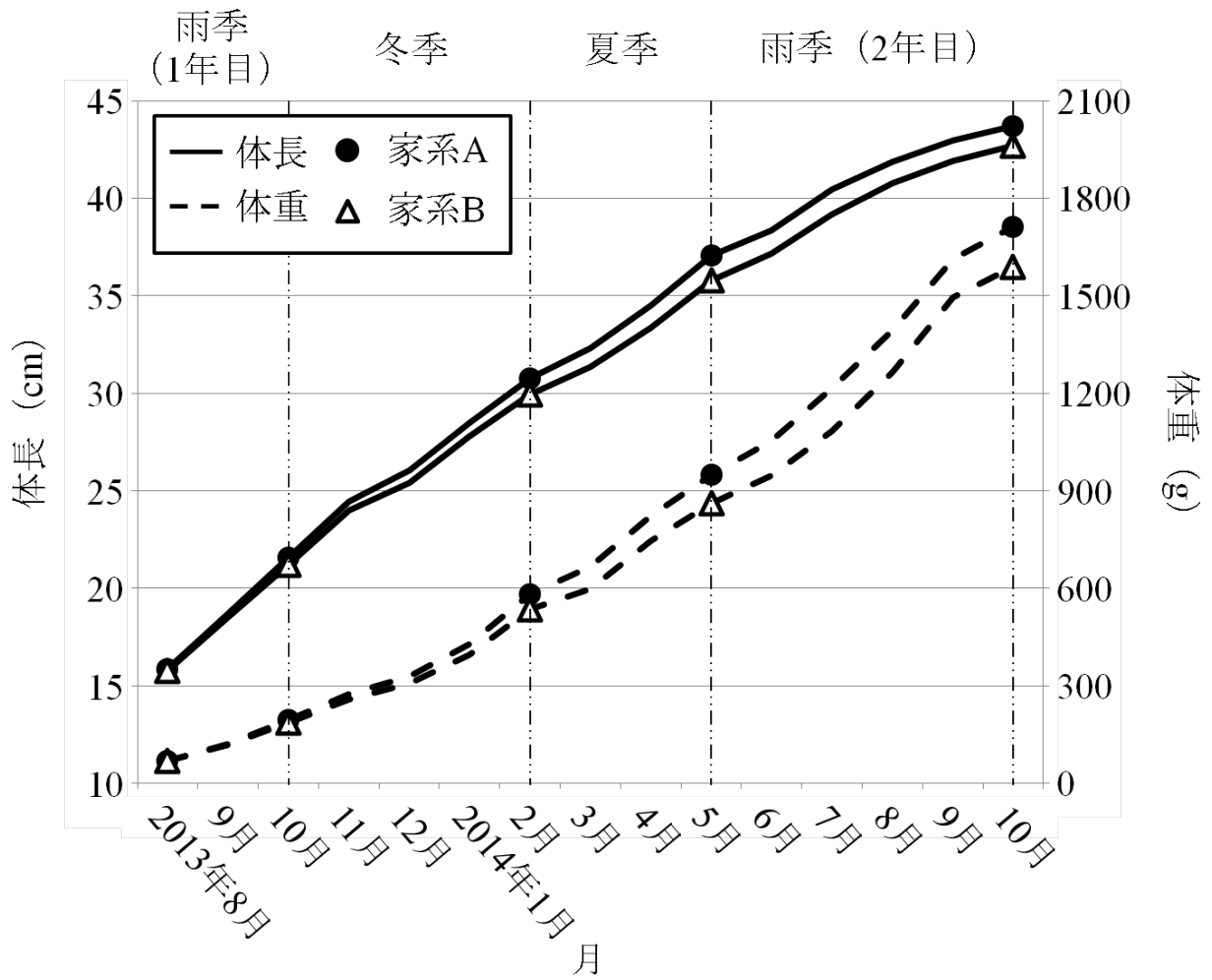
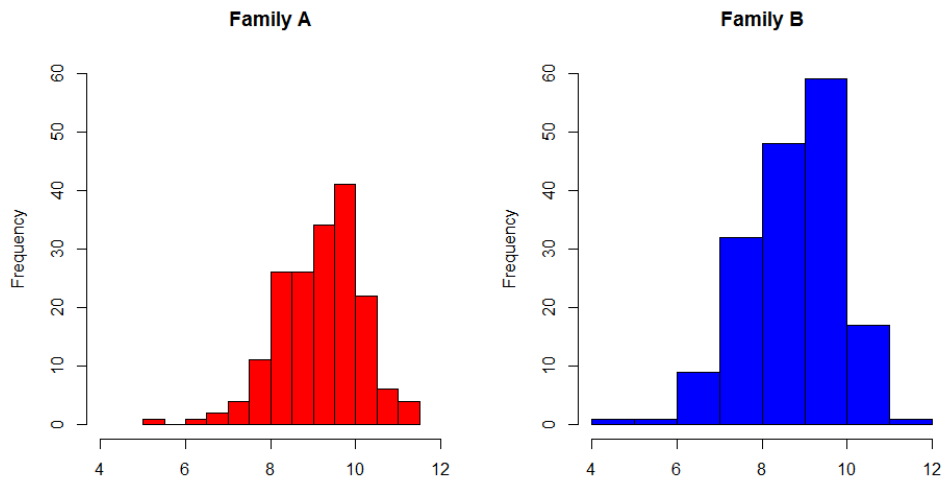


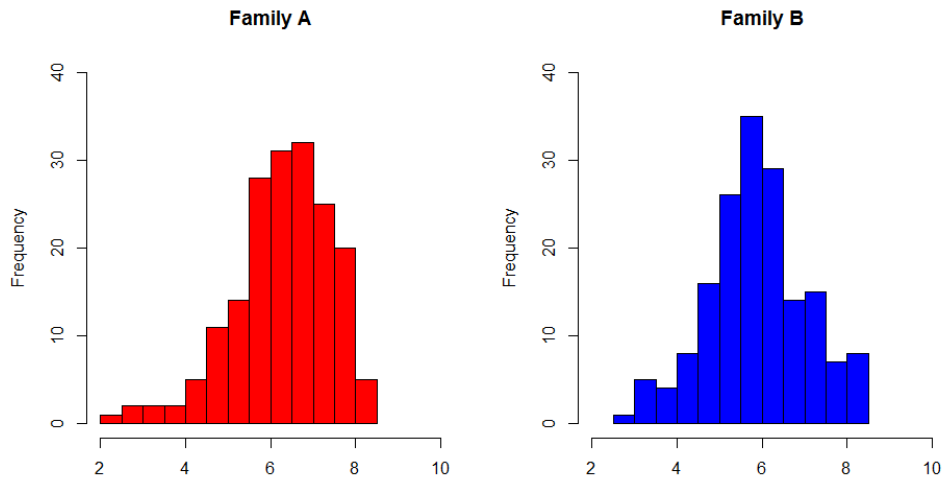
Figure 8 F₁ 雑種ハタ 2 家系の成長曲線

縦軸に体長（左側）と体重（右側）の表現型値を cm、g 単位でそれぞれ実線、破線にて示す。

(A) 冬季における体長の増加量 (WLe , cm)



(B) 夏季における体長の増加量 (SLe , cm)



(C) 雨季における体長の増加量 (RLe , cm)

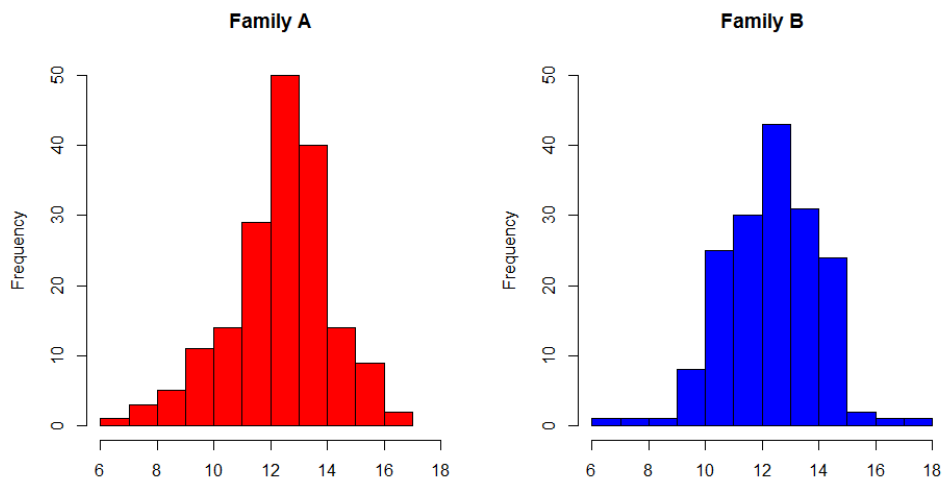
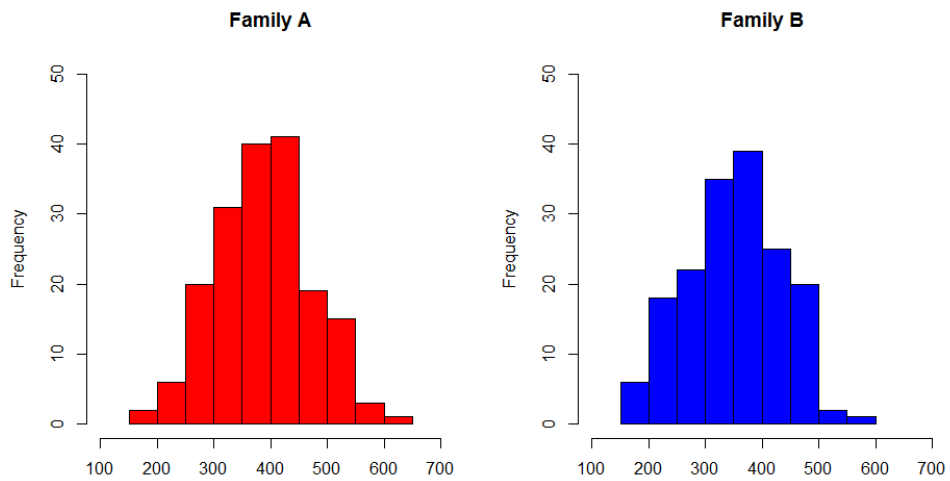


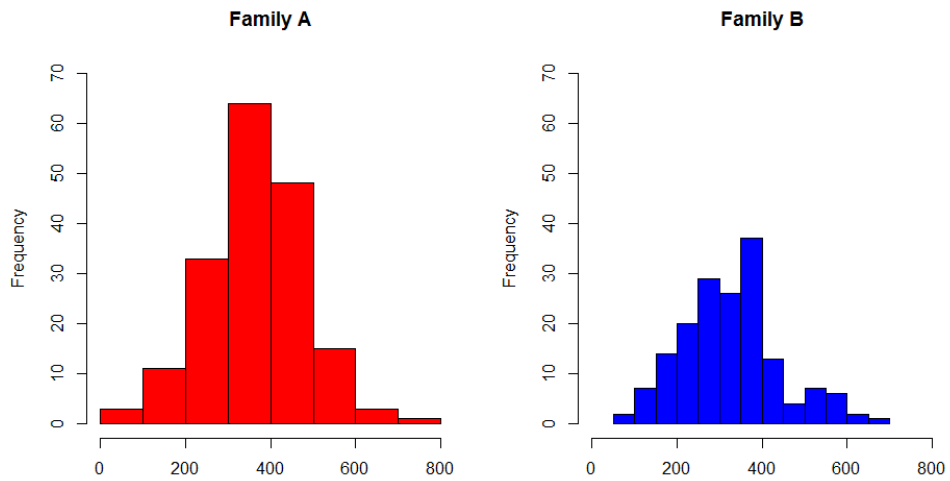
Figure 9 F_1 雑種ハタ 2 家系の各成長形質の分布を示すヒストグラム

縦軸に尾数を、横軸にそれぞれの表現型値を示す。

(D) 冬季における体重の増加量 (WWe, g)



(E) 夏季における体重の増加量 (SWe, g)



(F) 雨季における体重の増加量 (WWe, g)

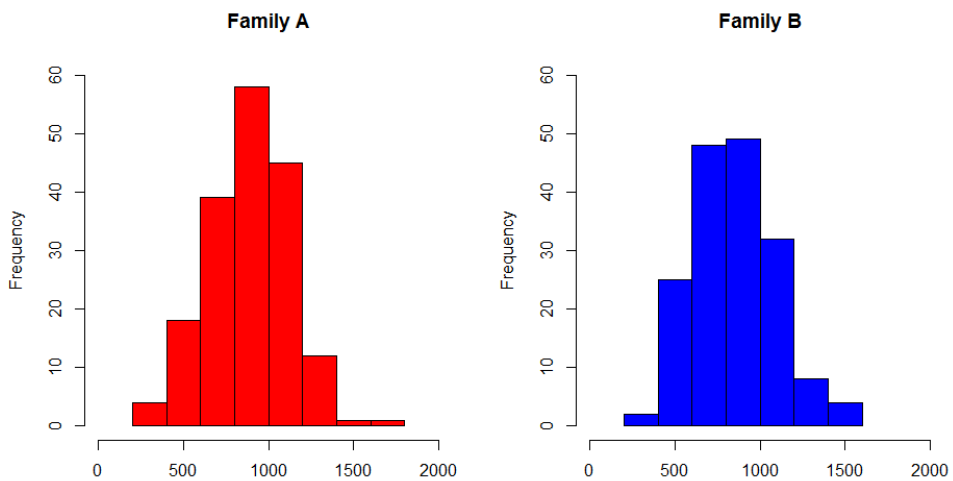
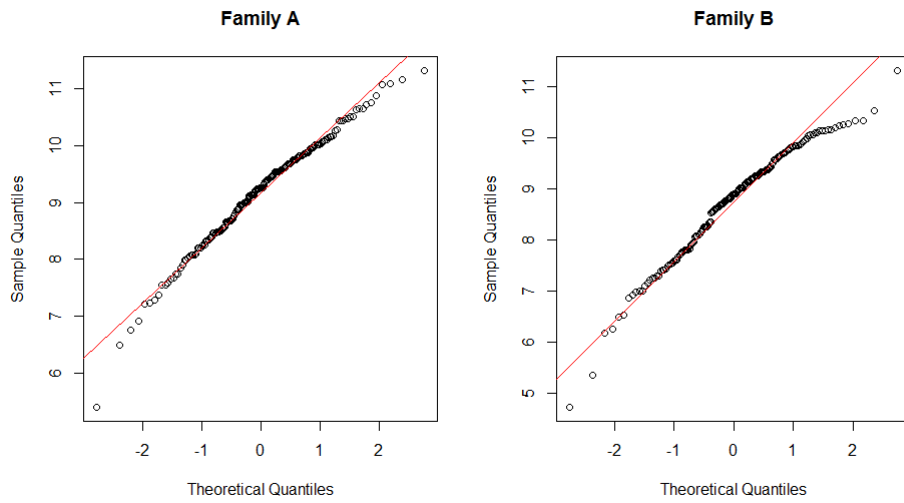
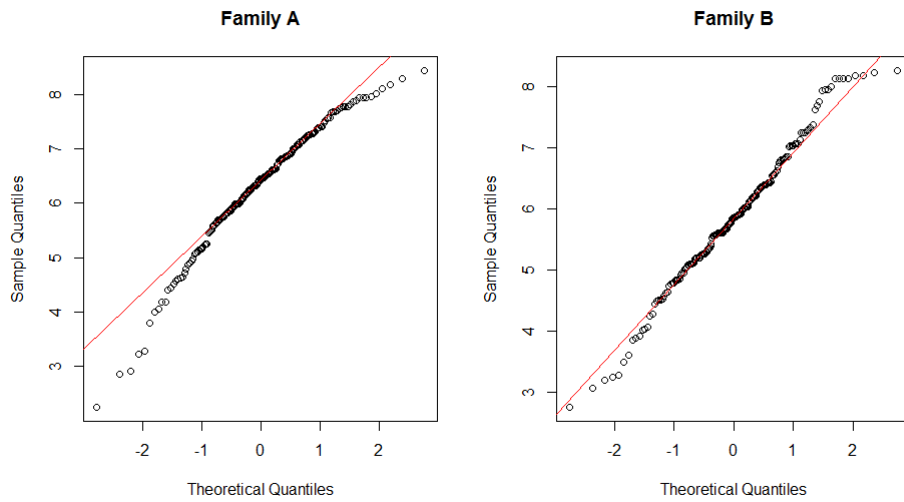


Figure 9 続き

(A) 冬季における体長の増加量 (WLe , cm)



(B) 夏季における体長の増加量 (SLe , cm)



(C) 雨季における体長の増加量 (RLe , cm)

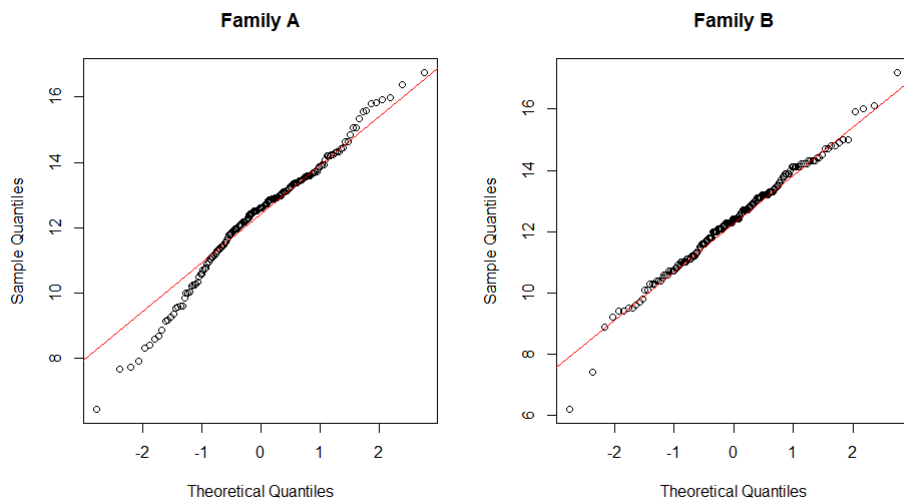
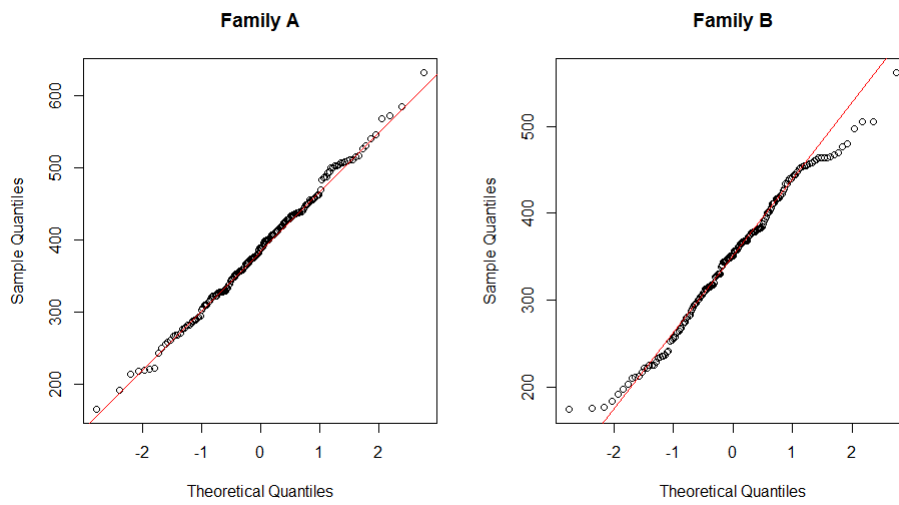
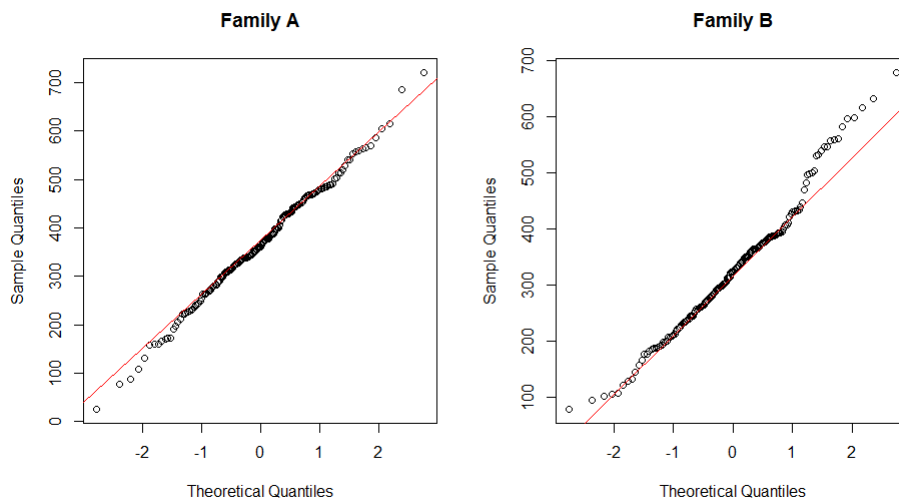


Figure 10 F_1 雑種ハタ 2 家系の各成長形質の分布を示す正規確率プロット

(D) 冬季における体重の増加量 (WWe, g)



(E) 夏季における体重の増加量 (SWe, g)



(F) 雨季における体重の増加量 (WWe, g)

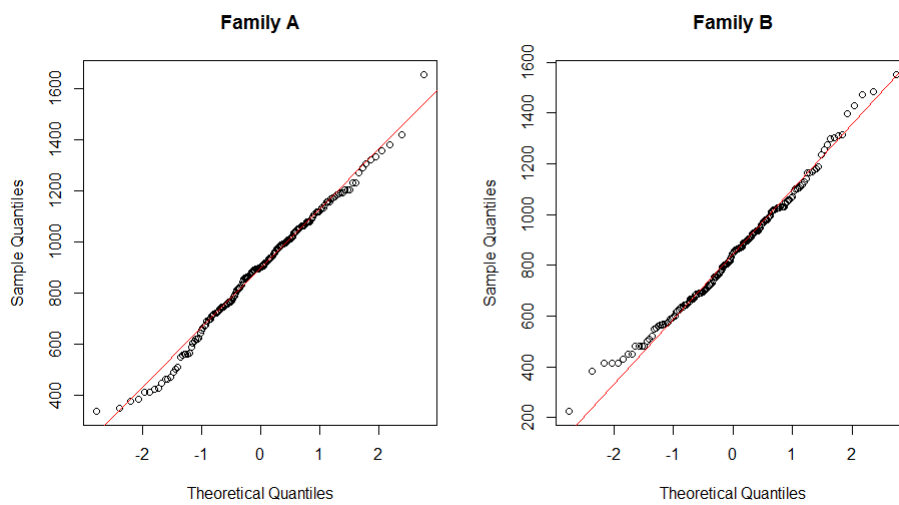


Figure 10 続き

Table 9 F₁ 雑種ハタ 2 家系の成長関連形質の表現型値

形質	家系 A (178 尾)					家系 B (168 尾)				
	中央値	最大値	最小値	四分位範囲	<i>P</i> 値	中央値	最大値	最小値	四分位範囲	<i>P</i> 値
体長の増加量										
冬季 (<i>WLe</i>)	9.26	11.32	5.40	1.40	0.0203*	8.88	11.31	4.72	1.57	0.0007*
夏季 (<i>SLe</i>)	6.44	8.44	2.25	2.02	0.0001*	5.85	8.27	2.75	1.45	0.1637
雨季 (<i>RLe</i>)	12.60	16.76	6.43	4.00	0.0034*	12.40	17.20	6.20	2.13	0.1550
体重の増加量										
冬季 (<i>WWe</i>)	389.16	632.14	164.90	150.75	0.9775	350.65	562.27	174.02	118.99	0.0661
夏季 (<i>SWe</i>)	360.58	721.29	24.83	313.30	0.9047	324.31	678.85	79.19	142.26	0.0121*
雨季 (<i>RWe</i>)	900.35	1654.84	338.24	573.04	0.3466	846.60	1552.61	224.24	345.45	0.2516

体長および体重はそれぞれ cm、g 単位で示す。*P* 値は Shapiro–Wilk 検定により各表現型データの正規性を検定した結果であり、正規分布からの逸脱が認められた表現型データはアスタリスクを表記した ($P < 0.05$)。

Table 10 各成長関連形質間におけるピアソンの積率相関係数

形質	家系 A (178 尾)					家系 B (168 尾)				
	<i>SLe</i>	<i>RLe</i>	<i>WWe</i>	<i>SWe</i>	<i>RWe</i>	<i>SLe</i>	<i>RLe</i>	<i>WWe</i>	<i>SWe</i>	<i>RWe</i>
体長の増加量										
冬季 (<i>WLe</i>)	0.533	0.563	0.866	0.647	0.680	0.599	0.610	0.903	0.653	0.722
夏季 (<i>SLe</i>)		0.560	0.620	0.905	0.700		0.641	0.701	0.938	0.752
雨季 (<i>RLe</i>)			0.709	0.676	0.874			0.684	0.676	0.861
体重の増加量										
冬季 (<i>WWe</i>)				0.747	0.798				0.745	0.813
夏季 (<i>SWe</i>)					0.779					0.811
雨季 (<i>RWe</i>)										

有意水準 1%での相関関係を示す。

Table 11 飼育試験期間中の環境要因

月	水温 (°C)	塩分濃度 (g L ⁻¹)	pH	溶存酸素量
2013 年				
8 月	27.9 ± 0.4	28.2 ± 2.2	7.94 ± 0.23	4.10 ± 0.98
9 月	28.4 ± 0.6	27.5 ± 3.3	8.03 ± 0.18	4.13 ± 0.74
10 月	28.0 ± 0.2	29.6 ± 0.5	8.39 ± 0.28	5.28 ± 0.68
11 月	28.4 ± 0.5	28.3 ± 1.7	8.32 ± 0.57	3.73 ± 0.10
12 月	27.3 ± 0.5	30.0 ± 0.0	8.17 ± 0.25	5.20 ± 0.18
2014 年				
1 月	27.0 ± 0.6	32.6 ± 1.1	8.50 ± 0.09	5.00 ± 0.55
2 月	27.7 ± 0.5	34.5 ± 0.6	8.26 ± 0.08	4.60 ± 0.59
3 月	28.2 ± 0.4	34.5 ± 0.6	8.18 ± 0.07	4.83 ± 0.48
4 月	29.6 ± 0.5	33.0 ± 0.8	8.05 ± 0.11	3.70 ± 0.49
5 月	29.9 ± 0.3	32.7 ± 0.8	7.87 ± 0.08	4.32 ± 0.48
6 月	29.3 ± 0.4	30.3 ± 0.6	8.07 ± 0.02	5.17 ± 1.00
7 月	28.8 ± 0.4	29.8 ± 1.3	8.29 ± 0.13	5.25 ± 0.60
8 月	28.3 ± 0.5	28.5 ± 2.1	8.19 ± 0.59	5.30 ± 0.14
9 月	28.4 ± 0.5	27.0 ± 0.8	7.66 ± 0.13	4.80 ± 0.49
10 月	28.7 ± 0.4	25.8 ± 2.2	7.90 ± 0.41	4.70 ± 1.16
季節				
冬季	27.9 ± 0.7	30.1 ± 3.1	8.26 ± 0.21	4.75 ± 0.57
夏季	28.8 ± 1.1	33.7 ± 1.0*	8.09 ± 0.17	4.36 ± 0.49
雨季	28.6 ± 0.6	28.8 ± 2.0	8.04 ± 0.23	4.78 ± 0.50

Table 12 F₁ 雑種ハタ家系 A の各季節における成長関連形質の QTL 解析結果

由来する親魚種	QTL 名	LOD 値 (表現型分散 (%))						
		体長の増加量			体重の増加量			
		冬季	夏季	雨季	冬季	夏季	雨季	
アカマダラハタ	qTL8t, qBW8t	/	/	6.26 (11.8)		6.19 (11.0)	/	5.91 (11.2)
	qTL10t, qBW10t	/	/	6.69 (12.7)		5.73 (10.1)	/	6.11 (11.6)
	qTL13t, qBW13t	8.05 (18.8)	2.78 (6.9)	4.64 (8.6)		8.65 (15.9)	3.89 (9.5)	5.02 (9.4)
	qTL19t, qBW19t	/	/	4.71 (8.7)		3.39 (5.8)	/	3.86 (7.1)
	qTL8:10t, qBW8:10t	/	/	6.21 (11.7)		5.72 (10.1)	/	5.74 (10.9)
タマカイ	qBW3g	/	/	/		2.87 (7.1)	/	2.77 (6.9)
	qBW10g	/	/	/		/	2.80 (7.0)	/

QTL 解析の結果、5%ゲノムワイドで有意であると認められた QTL を示し、QTL が検出されなかった際には“/”と表記した。相互関係が認められた QTL ペアは“:”を用いて QTL:QTL と表記した。QTL 名は第 2 章 Table 6 にて記したものを使用した。

Table 13 F₁ 雑種ハタ家系 A における QTL アレルの成長率への効果

由来する親魚種	QTL 名	最近傍に位置する マーカー	日間成長率 (SGR)					
			QTL アレルを保有する魚			QTL アレルを保有しない魚		
			冬季	夏季	雨季 (2年目)	冬季	夏季	雨季 (2年目)
アカマダラハタ	qBW8t	Ebr01086FRA	0.900	0.535	0.378	0.877	0.532	0.375
	qBW10t	Ebr00814FRA	0.894	0.525	0.376	0.882	0.544	0.377
	qBW13t	Ebr00509FRA	0.911*	0.545*	0.380	0.863	0.522	0.372
	qBW19t	Ebr01150FRA	0.902*	0.543	0.386*	0.878	0.526	0.368
タマカイ	qBW3g	EawSTR12DB	0.898	0.534	0.382	0.877	0.534	0.370
	qBW10g	EfuSTR339DB	0.893	0.553*	0.379	0.883	0.513	0.374
アカマダラハタ、 タマカイ	qBW13t, qBW19t, qBW10g	Ebr00509FRA, Ebr01150FRA, EfuSTR339DB	0.925*	0.582*	0.386	0.858	0.497	0.361

QTL 名は第 2 章 Table 6 にて記したものを使用した。

Table 14 F₁ 雑種ハタ家系 B の各季節における成長関連形質の QTL 解析結果

由来する親魚種	QTL の位置 (連鎖群、(cM))	最近傍に位置する マーカー (cM)	家系 A における QTL 名	LOD 値 (表現型分散 (%))					
				体長の増加量			体重の増加量		
				冬季	夏季	雨季	冬季	夏季	雨季
アカマダラハタ	Efu_LG3 (30.0)	EfuSTR0040DB (31.5)		4.65 (11.3)	/	/	/	/	/
	Efu_LG8 (1.8)	Ebr00822FRA (1.8)	qTL8t, qBW8t	/	/	/	2.54 (6.7)	/	/
	Efu_LG8 (35.0)	Ebr00786FRA (32.7)		4.76 (11.6)	/	/	/	/	/
	Efu_LG3 (30.0) :Efu_LG8 (35.0)			2.79 (6.6)	/	/	/	/	/
タマカイ	Ela_LG10 (18.1)	Ebr01032FRA (18.1)	qBW10g	/	3.23 (8.4)	/	/	3.61 (9.4)	2.16 (5.7)

QTL 解析の結果、5%エクスペリメントワイドで有意であると認められた QTL を示し、QTL が検出されなかった際には“/”と表記した。相互関係が認められた QTL ペアは“:”を用いて QTL:QTL と表記した。QTL 名は第 2 章 Table 6 にて記したものを使用した。

Table 15 F₁ 雑種ハタ家系 B における QTL アレルの成長率への効果

由来する親魚種	家系 A における QTL 名	最近傍に位置する マーカー	日間成長率 (SGR)					
			QTL アレルを保有する魚			QTL アレルを保有しない魚		
			冬季	夏季	雨季 (2年目)	冬季	夏季	雨季 (2年目)
アカマダラハタ	qBW8t	Ebr00822FRA	0.862	0.527	0.392	0.845	0.510	0.386
タマカイ	qBW10g	Ebr01032FRA	0.863	0.545*	0.392	0.846	0.497	0.388

QTL 名は第 2 章 Table 6 にて記したものをを使用した。

総合考察

本研究では、アカマダラハタ雌とタマカイ雄の種間交雑により得られた F₁ 雑種ハタを 416 個の単純反復配列 (SSR) マーカーを用いて解析し、アカマダラハタ (雌) とタマカイ (雄) の連鎖地図を作製した。これらの地図の連鎖群数は 24 であり、両魚種のハプロイド染色体数に一致したが (Guo *et al.* 2014)、タマカイ (雄) の連鎖地図では配置されたマーカー数が少なく、遺伝的距離の合計が 1,000 cM に満たない地図であった。両魚種に共通して配置された SSR マーカーから遺伝的距離の合計の雌雄比が 1.28:1 と算出されたことから、ハタ類における配偶子形成時の減数分裂機構に起因する雄の低い組換え率が影響していると予想された。連鎖地図内の独立したマーカー座によって算出した隣接する 2 つのマーカー座間の平均遺伝距離はアカマダラハタ (雌) とタマカイ (雄) でそれぞれ 4.6 cM、5.6 cM であり、推定ゲノムカバー率は 83.2% および 73.7% であった。他魚種において、同質の連鎖地図を用いた解析により、成長関連形質に関与する QTL が検出されていることから (Liu *et al.* 2014; Wang *et al.* 2012)、本研究で作製した連鎖地図を用いて QTL 解析を行うことで、成長関連形質の QTL を大まかに推定できると考えられた。しかしながら、QTL の詳細な位置を特定し、形質を司る責任遺伝子を同定するためには、SNP マーカーに基づく、より解像度の高い連鎖地図の作製が必要である。

F₁ 雑種ハタ家系 A の解析により体長、体重および肥満度に関与する合計 7 つの QTL が 6 つの連鎖群、すなわちアカマダラハタ (雌) 連鎖地図の連鎖群 8、10、13 および 19 とタマカイ (雄) 連鎖地図の連鎖群 3 および 10 に特定された。各 QTL の表現型に対する寄与率は 6.3–12.1% であったことから、雑種ハタにおける成長関連形質は小さな効果を持つ複数の QTL により支配されているものと推測された。家系 A とは異なる雌親から作出した F₁ 雑種ハタ半兄弟家系 B を用いて QTL を検証した結果、アカマダラハタ (雌) 連鎖地図の連鎖群 8 およびタマカイ (雄) 連鎖地図の連鎖群 10 上の家系 A と同じ位置に体重に関与する QTL が検出された。これにより、2 つの QTL は他家系においてもそ

の有効性が認められた。また、家系 B において検出されなかった QTL に関しても、クエ F₁ 集団を用いた先行研究において検出されている連鎖群と一致しているものがあった (Kessuwan *et al.* 2016)。サケ科魚類において、QTL が近縁種間では保存されている事例も報告されていることから (Reid *et al.* 2005)、本研究で検出された 7 つの QTL はゲノム情報を利用したハタ類の選抜育種の実施に役立つものと期待される。

成長関連形質は温度や塩分濃度のような環境要因に影響されることが知られており、本研究で解析した F₁ 雑種ハタは熱帯域に分類されるタイ国において作出、飼育された。タイ気象局の報告書に基づき、体長および体重のデータを 3 つの異なる季節、すなわち冬季、夏季、雨季に分け、QTL と環境要因との関連性を評価した。各季節における成長関連形質の QTL 解析を行った結果、6 つの連鎖群で検出された QTL は季節間で異なる特徴を示した。特に、タマカイ (雄) 連鎖地図の連鎖群 10 に特定された QTL は、家系 A では夏季においてのみ検出され、家系 B でも夏季において最も高い LOD 値で検出された。また、QTL アレルの効果を検証した結果、家系 A、B ともに、タマカイ (雄) 連鎖地図の連鎖群 10 に特定された QTL アレルを保有する魚は、保有していない魚に比べ、夏季において有意に高い成長率を示した。飼育期間中に計測した環境要因の中で、夏季における塩分濃度のみが他の季節に比べ有意に高かった。カワマスでは浸透圧調節機能障害に起因するストレスに関連する 2 つの QTL が異なる連鎖群に特定されており、それらが成長に関与する QTL と同じ位置であったことが報告されている (Sauvage *et al.* 2012)。これらのことから、タマカイ (雄) 連鎖地図の連鎖群 10 に特定された成長関連形質に関与する QTL は環境ストレス、特に高塩分濃度に対する耐性付与に関連していると予想された。しかしながら、本研究では飼育試験の性質上、環境要因と魚の年齢による影響とを区別することができなかったため、今後、季節特異的に検出された QTL から年齢による影響を取り除く必要がある。今後の詳細な解析により、本研究にて検出された QTL の機能的な説明がされ、ハタ類の成長関連形質に関与するゲノム構造が明らかになるものと期待する。

アカマダラハタ雌とタマカイ雄から作出される雑種ハタでは、雑種強勢による高成長が F_1 世代で確認できるため、商業生産には F_1 が用いられている。しかしながら、同日に作出し、同一環境下で飼育した雑種ハタであっても、アカマダラハタ雌親が違うことにより、家系間および家系内の個体間でその成長に差が生じることが確認されている (Figures 2 and 3)。このことから、雑種ハタを作出する際に使用した親魚が雑種ハタの成長に影響を与えており、雑種ハタの作出に優良な親魚を使用することでより早く成長する雑種ハタ種苗が作出できるものと予想された。本研究では、 F_1 雑種ハタを解析することでアカマダラハタ雌親由来、タマカイ雄親由来の QTL を特定した。また、それらの QTL アレルをすべて保有している魚はまったく保有していない魚よりも 3 カ月早く出荷サイズに到達していたことを確認した。本研究で特定した QTL を用いて、より早く成長する F_1 雑種ハタを開発する育種方針を Figure 11 に示した。具体的には、本研究で検出されたアカマダラハタ雌親由来の 4 つの QTL アレルとタマカイ雄親由来の 2 つの QTL アレルをそれぞれの魚種においてホモ化させ、QTL アレルをホモ化させた魚をそれぞれの魚種の親魚として用いて、 F_1 雑種ハタを作出する。このように、遺伝マーカーを用いてそれぞれの親魚種に対して MAS 育種を行い、遺伝的に選抜した親魚から作出された F_1 雑種ハタは、無選別の親魚から作出された従来の F_1 雑種ハタよりも早く成長するであろうと期待される。

タイ水産局クラビ沿岸漁業研究開発センターでは、本研究で QTL 解析に使用した F_1 雑種ハタの親魚であるアカマダラハタ雌個体とタマカイ雄個体を含むそれぞれ 181 尾、29 尾の親魚集団の遺伝的構成を確認しており (Amphai *et al.* personal communication)、本研究で使用した親魚と似た遺伝的構成をもつ個体を確認している。現在、未受精卵を得る技術が確立していないため、タマカイの MAS 育種を行うことは難しいが、アカマダラハタにおいては Figure 11 に示した育種計画を実施する準備をしている。本研究の成果が日本およびタイ国における今後の水産増養殖の発展に寄与することを願い、本論文を締め括る。

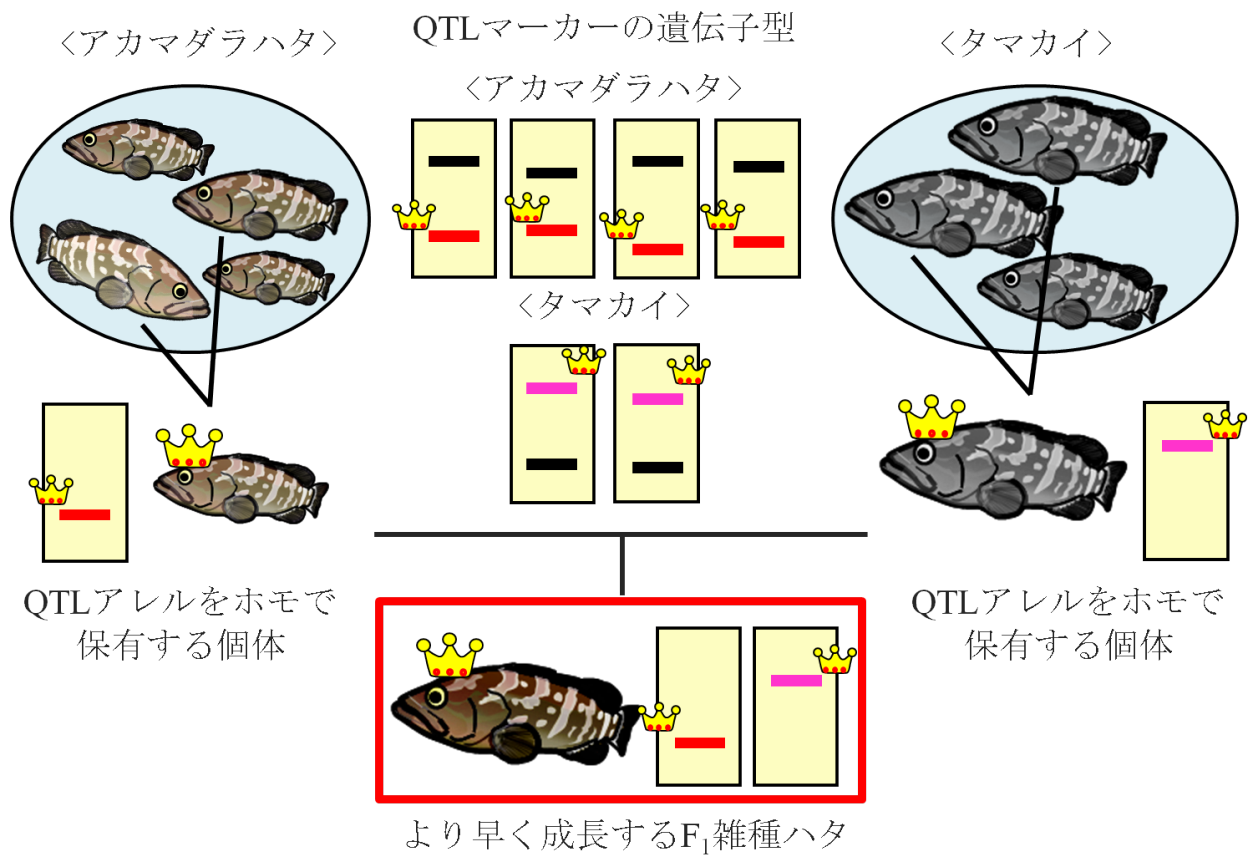


Figure 11 早く成長する F₁雑種ハタ作出に向けた今後の育種方針

謝辞

本研究を遂行するにあたり、熱心なご指導を頂きました本学 坂本崇教授に厚くお礼を申し上げます。研究遂行に際して、終始適切なお指導、御助言、常に惜しまぬ協力とご支援を頂きました本学 岡本信明教授、廣野育生教授、佐野元彦教授、近藤秀裕准教授および水産総合研究センター増養殖研究所 尾崎照遵博士に深く感謝致します。

本研究を遂行する場および貴重なサンプルを提供して頂きましたタイ水産局クラブ 沿岸漁業研究開発センター Paiboon 所長に心より感謝致します。異国での研究遂行にご協力頂いた同センターの Patcharee 研究員、Amphai 研究員をはじめとする職員の皆様、諸先輩方ならびに後輩方に深く感謝致します。

最後に博士号取得に向け、これまで常に支えてくれた家族に心より感謝致します。

参考文献

- Ankra-Badu G.A., Shriner D., Bihan-Duval E.L., Mignon-Grasteau S., Pitel F., Beaumont C., Duclos M.J., Simon J., Porter T.E., Vignal A., Cogburn L.A., Allison D.B., Yi N. & Aggrey S.E. (2010) Mapping main, epistatic and sex-specific QTL for body composition in a chicken population divergently selected for low or high growth rate. *BMC Genomics* **11**, 107.
- Barbará T., Palma-Silva C., Paggi G.M., Bered F., Fay M.F. & Lexer C. (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: Potential and limitations. *Molecular Ecology* **16**, 3759–3767.
- Bartley D.M., Rana K. & Immink A.J. (2001) The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **10**, 325–337.
- Birchler J.A., Yao H. & Chudalayandi S. (2006) Unraveling the genetic basis of hybrid vigor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 12957–12958.
- Broman K.W., Wu H., Sen S. & Churchill G.A. (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* **19**, 889–890.
- Carlborg Ö., Kerje S., Schütz K., Jacobsson L., Jensen P. & Andersson L. (2003) A global search reveals epistatic interaction between QTL for early growth in the chicken. *Genome Research* **13**, 413–421.

- Ch'ng C.L. & Senoo S. (2008) Egg and larval development of a new hybrid grouper, tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus* x giant grouper *E. lanceolatus*. *Aquaculture Science* **56**, 505–512.
- Churchill G.A. & Doerge R.W. (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* **138**, 963–971.
- Coimbra M.R.M., Kobayashi K., Koretsugu S., Hasegawa O., Ohara E., Ozaki A., Sakamoto T., Naruse K. & Okamoto N. (2003) A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* **220**, 203–218.
- Cui Y., Wang H., Qiu X., Liu H. & Yang R. (2015) Bayesian analysis for genetic architectures of body weights and morphological traits using distorted markers in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Marine Biotechnology* **17**, 693–702.
- Danzmann R.G. (2006) Linkage analysis package for outcrossed families with male or female exchange of the mapping parent, version 2.3. University of Guelph, Ontario.
- Davey J.W., Hohenlohe P.A., Etter P.D., Boone J.Q., Catchen J.M. & Blaxter M.L. (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics* **12**, 499-510.
- Doerge R.W. (2002) Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nature Reviews Genetics* **3**, 43–52.
- Dor L., Shirak A., Gorshkov S., Band M.R., Korol A., Ronin Y., Curzon A., Hulata G., Seroussi

- E. & Ron M. (2014) Construction of a microsatellite-based linkage map for the white grouper (*Epinephelus aeneus*). *G3* **4**, 1455–1464.
- Epifanio J. & Nielsen J. (2001) The role of hybridization in the distribution, conservation and management of aquatic species. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **10**, 245–251.
- Fuji K., Hasegawa O., Honda K., Kumasaka K., Sakamoto T. & Okamoto N. (2007) Marker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* **272**, 291–295.
- Fulton T.W. (1902) Rate of growth of seas fishes. *Scientific Investigations* Fishery Division of Scotland, 1–22.
- Guimarães E.P., Ruane J., Scherf B.D., Sonnino A. & Dargie J.D. (2007) Marker-assisted Selection: Current Status and Future Perspectives in Crops, Livestock, Forestry and Fish. FAO, Rome.
- Guo M., Wang S., Su Y., Zhou Y., Liu M. & Wang J. (2014) Molecular cytogenetic analysis of *Epinephelus bruneus* and *Epinephelus moara* (Perciformes, Epinephelidae). *PeerJ* **2**, e412.
- Hadjipavlou G. & Bishop S.C. (2008) Age-dependent quantitative trait loci affecting growth traits in Scottish Blackface sheep. *Animal Genetics* **40**, 165–175.
- Harikrishnan R., Balasundaram C. & Heo M-S. (2011) Fish health aspects in grouper aquaculture. *Aquaculture* **320**, 1–21.

- Heemstra P.C. & Randall J.E. (1993) Groupers of the world: (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae): An annotated and illustrated catalogue of the grouper, rockcod, hind, coral grouper and lyretail species: known to date. *FAO Fisheries Synopsis* **125**, 1–382.
- Ishikawa A. (2009) Mapping an overdominant quantitative trait locus for heterosis of body weight in mice. *Journal of Heredity* **100**, 501–504.
- James C.M., Al-Thobaiti S.A., Rasem B.M. & Carlos M.H. (1999) Potential of grouper hybrid (*Epinephelus fuscoguttatus* x *E. polyphkadion*) for aquaculture. *Naga, the ICLARM Quarterly* **22**, 19–23.
- Kessuwan K (2015) QTL analysis of growth-related traits in kelp grouper *Epinephelus bruneus* and tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus* for selective breeding program. Tokyo University of Marine Science and Technology. Doctoral dissertation.
- Kessuwan K., Kubota S., Liu Q., Sano M., Okamoto N., Sakamoto T., Yamashita H., Nakamura Y. & Ozaki A. (2016) Detection of growth-related quantitative trait loci and high-resolution genetic linkage map using simple sequence repeat markers in the kelp grouper (*Epinephelus bruneus*). *Marine Biotechnology* **18**, 57–84.
- Kohno H., Ordonio-Aguilar R.S., Ohno A. & Taki Y. (1997) Why is grouper larval rearing difficult?: an approach from the development of the feeding apparatus in early stage larvae of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Ichthyological Research* **44**, 267–274.
- Koral A., Shirak A., Cnaani A. & Hallerman E.M. (2007) Detection and analysis of quantitative trait loci (QTL) for economic traits in aquatic species. In: Liu Z. (Ed.), *Aquaculture Genome*

Technologies, Blackwell publishing, Oxford, 169–197.

Kubota S., Liu Q., Kessuwan K., Okamoto N., Sakamoto T., Nakamura Y., Shigenobu Y., Sugaya T., Sano M., Uji S., Nomura K. & Ozaki A. (2014) High-throughput simple sequence repeat (SSR) markers development for the kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) and cross-species amplifications for Epinephelinae species. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **5**, 117–130.

Liu F., Sun F., Xia J.H., Li J., Fu G.H., Lin G., Tu R.J., Wan Z.Y., Quek D. & 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.

Liu Q (2013) QTL analysis of growth related traits and comparative genome analysis based on the genetic linkage map of kelp grouper *Epinephelus bruneus*. Tokyo University of Marine Science and Technology. Doctoral dissertation.

Liu Z.J. & Cordes F.J. (2004) DNA marker technology and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* **238**, 1–37.

Loukovitis D., Sarropoulou E., Batargias C., Apostolidis A.P., Kotoulas G., Tsigenopoulos C.S. & Chatziplis D. (2012) Quantitative trait loci for body growth and sex determination in the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* L. *Animal Genetics* **43**, 753–759.

Luin M., Fui C.F. & Senoo S. (2013) Sexual maturation and gonad development in tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) x giant grouper (*E. lanceolatus*) hybrid. *Journal of Aquaculture Research & Development* **5**, 213.

Mackay T.F.C. (1996) The nature of quantitative genetic variation revisited: lessons from *Drosophila bristles*. *BioEssays* **18**, 113–121.

Mackay T.F.C. (2001) The genetic architecture of quantitative traits. *Annual Review of Genetics* **35**, 303–339.

Manly K.F., Cudmore R.H.Jr. & Meer J.M. (2001) Map Mnager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome* **12**, 930–932.

Marte C.L. (2003) Larviculture of marine species in Southeast Asia: current research and industry prospects. *Aquaculture* **227**, 293–304.

Massault C., Bovenhuis H., Haley C. & Koning D.J. (2008) QTL mapping designs for aquaculture. *Aquaculture* **285**, 23–29.

Moghadam H.K., Poissant J., Fotherby H., Haidle L., Ferguson M.M. & 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**, 647–661.

O'Malley K.G., McClelland E.K. & Naish K.A. (2010) Clock genes localize to quantitative trait loci for stage-specific growth in juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Journal of Heredity* **101**, 628–632.

Othman A.R., Kawamura G., Senoo S. & Fui C.F. (2015) Effects of different salinities on

growth, feeding performance and plasma cortisol level in hybrid TGGG (tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* x giant grouper, *Epinephelus lanceolatus*) juveniles. *International Research Journal of Biological Sciences* **4**, 15–20.

Petersen E.H., Chinh D.T.M., Diu N.T., Phuoc V.V., Phuong T.H., Dung N.V., Dat N.K., Giang P.T. & Glencross B.D. (2013) Bioeconomics of grouper, Serranidae: Ephinephelinae, culture in Vietnam. *Reviews in Fisheries Science* **21**, 49–57.

Pierre S., Gaillard S., Prévot-D'Alvise N., Aubert J., Rostaing-Capaillon O., Leung-Tack D. & Grillasca J-P. (2008) Grouper aquaculture: Asian success and Mediterranean trials. *Aquatic Conservation* **18**, 297–308.

Pomeroy R.S. (2002) The status of grouper culture in Southeast Asia. *SPC Live Reef Fish Information Bulletin* **10**, 22–26.

Poormohammad Kiani S., Maury P., Nouri L., Ykhlef N., Grieu P. & Sarrafi A. (2009) QTL analysis of yield-related traits in sunflower under different water treatments. *Plant Breeding* **128**, 363–373.

Presti R.L., Lisa C. & Stasio L.D. (2009) Molecular genetics in aquaculture. *Italian Journal of Animal Science* **8**, 299–313.

Rachmansyah, Usman, Palinggi N.N. & Williams K. (2009) Formulated feed for tiger grouper grow-out. *Asia-Pacific Marine Finfish Aquaculture Network Magazine* **April-June**, 30–35.

Rahimnejad S., Bang I.C., Park J-Y., Sade A., Choi J. & Lee S-M. (2015) Effects of dietary

- protein and lipid levels on growth performance, feed utilization and body composition of juvenile hybrid grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* × *E. lanceolatus*. *Aquaculture* **446**, 283–289.
- Reid D.P., Szanto A., Glebe B., Danzmann R. & Ferguson M. (2005) QTL for body weight and condition factor in Atlantic salmon (*Salmo salar*): comparative analysis with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Journal of Heredity* **94**, 166-172.
- Sadovy Y.J., Donaldson T.J., Graham T.R., McGilvray F., Muldoon G.J., Phillips M.J., Rimmer M.A., Smith A. & Yeeting B. (2003) While stocks last: the live reef food fish trade. *Asian Development Bank*, Manila, Philippines, 147.
- Sakamoto T., Danzmann R.G., Gharbi K., Howard P., Ozaki A., Khoo S.K., Woram R.A., Okamoto N., Ferguson M.M., Holm L., Guyomard R. & Hoyheim B. (2000) A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterization by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics* **155**, 1331–1345.
- Sauvage C., Vagner M., Derôme N., Audet C. & Bernatchez L. (2012) Coding gene SNP mapping reveals QTL linked to growth and stress response in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *G3* **6**, 707–720.
- Semel Y., Nissenbaum J., Menda N., Zinder M., Krieger U., Issman N., Pleban T., Lippman Z., Gur A. & Zamir D. (2006) Overdominant quantitative trait loci for yield and fitness in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 12981–12986.

- Senoo S. (2010) Consideration of artificial egg collection technique on Fish IV (Fish culture in Southeast Asia 80). *Aquanet Magazine* **204**, 64–67.
- Shang L., Wang Y., Cai S., Wang X., Li Y., Abduweli A. & Hua J. (2016) Partial dominance, overdominance, epistasis and QTL by environment interactions contribute to heterosis in two upland cotton hybrids. *G3* **6**, 499–507.
- Shapawi R., Ebi I., Yong A.S.K. & Ng W.K. (2014) Optimizing the growth performance of brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsk.) by varying the proportion of dietary protein and lipid level. *Animal Feed Science and Technology* **191**, 98–105.
- Singer A., Perlman H., Yan Y., Walker C., Corley-Smith G., Brandhorst B. & Postlethwait J. (2002) Sex-specific recombination rates in zebrafish (*Danio rerio*). *Genetics* **160**, 649–657.
- Song W., Pang R., Niu Y., Gao F., Zhao Y., Zhang J., Sun J., Shao C., Liao X., Wang L., Tian Y. & Chen S. (2012) Construction of high-density genetic linkage maps and mapping of growth-related quantitative trait loci in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *PLoS One* **7**, e50404.
- Souza L.M., Gazaffi R., Mantello C.C., Silva C.C., Garcia D. Guen V.L., Cardoso S.E.A. Garcia A.A.F. & Souza A.P. (2013) QTL mapping of growth-related traits in a full-sib family of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) evaluated in a sub-tropical climate. *PLoS One* **8**, e61238.
- Sun Y., Guo C-Y., Wang D-D., Li X.F., Xiao L., Zhang X., You X., Shi Q., Hu G-J., Fang C., Lin H-R. & Zhang Y. (2016) Transcriptome analysis reveals the molecular mechanisms

underlying growth superiority in a novel grouper hybrid (*Epinephelus fuscogutatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂). *BMC Genetics* **17**, 24.

Tang J., Yan J., Ma X., Teng W., Wu W., Dai J., Dhillon B.S., Melchinger A.E. & Li J. (2010) Dissection of the genetic basis of heterosis in an elite maize hybrid by QTL mapping in an immortalized F2 population. *Theoretical and Applied Genetics* **120**, 333–340.

Tong J. & Sun X. (2015) Genetic and genomic analyses for economically important traits and their applications in molecular breeding of cultured fish. *Science China Life Sciences* **58**, 178–186.

鵜飼保雄 (2000) ゲノムレベルの遺伝解析 MAP と QTL. 東京大学出版会, 東京.

鵜飼保雄 (2002) 量的形質の遺伝解析. 医学出版, 東京.

Varsamos S., Nebel C. & Charmantier G. (2005) Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **141**, 401–429.

Voorrips R.E. (2002) MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity* **93**, 77–78.

Wang C.M., Lo L.C., Zhu Z.Y. & 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.

- Wang J., He A., Ma Y. & Wang C. (2012) Genetic map construction and quantitative trait locus (QTL) analysis on growth-related traits in common carp (*Cyprinus carpio L.*). *African Journal of Biotechnology* **11**, 7874–7884.
- Wang L., Wan Z.Y., Bai B., Huang S.Q., Chua E., Lee M., Pang H.Y., Wen Y.F., Liu P., Liu F., Sun F., Lin G., Ye B.Q. & Yue G.H. (2015) Construction of a high-density linkage map and fine mapping of QTL for growth in Asian seabass. *Scientific Reports* **5**, 16358.
- Wang W., Hu Y., Ma Y., Xu L., Guan J. & 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.
- Wringe B.F., Devlin R.H., Ferguson M.M., Moghadam H.K., Sakhrani D. & Danzmann R.G. (2010) Growth-related quantitative trait loci in domestic and wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genetics* **11**, 63.
- Xu S. (2008) Quantitative trait locus mapping can benefit from segregation distortion. *Genetics* **180**, 2201-2208.
- Xu Y., Zhu L., Huang N. & McCouch S.R. (1997) Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F₂, backcross, doubled haploid and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa L.*). *Molecular Genetics and Genomics* **253**, 535-545.
- Yang R., Yi N. & Xu S. (2006) Box-Cox transformation for QTL mapping. *Genetica* **128**, 133–143.

You X., Shu L., Li S., Chen J., Luo J., Lu J., Mu Q., Bai J., Xia Q., Chen Q., Cai Y., Zhang H., Chen G., Lin H., Zhang Y. & Shi Q. (2013) Construction of high-density genetic linkage maps for orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* using multiplexed shotgun genotyping. *BMC Genetics* **14**, 113.

Yu H., You X., Li J., Liu H., Meng Z., Xiao L., Zhang H., Lin H.R., Zhang Y. & Shi Q. (2016) Genome-wide mapping of growth-related quantitative trait loci in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) using double digest restriction-site associated DNA sequencing (ddRADseq). *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 501.

Yue G.H. (2014) Recent advances of genome mapping and marker-assisted selection in aquaculture. *Fish and Fisheries* **15**, 376–396.