TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo University of Marine Science and Technology (東京海洋大学)

DNAマーカーを用いたヒラメの分子育種学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-03-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 藤, 加菜子 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/710

DNAマーカーを用いたヒラメの分子育種学的研究

平成17年度

(2005)

東京海洋大学附属図書館
200690162
寄贈

東京水産大学大学院

水産学研究科

資源育成学専攻

藤　加菜子

目次

博士論文内容の要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1

緒論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3

第１章　DNA マーカーを用いた連鎖解析による有用経済形質関連遺伝子座の推定 ・・ 5

第１節　ヒラメ白化関連遺伝子座の推定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 15

第２節　ヒラメのリンホシスチス病抵抗性遺伝子座の推定・・・・・・・・・・・・・・ 33

付記　ヒラメ遺伝子の相同染色体組換えの特徴と分子育種への応用・・・・・・・ 65

第２章　マーカーアシスト浸透交雑によるヒラメリンホシスチス病抵抗性系統の作出・ 71

第３章　DNA マーカーの汎用化を目指したアクア DNA ブックの開発 ・・・・・・・ 79

要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・101

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・103

〔課程博士〕

博士論文内容の要旨

(2,000 字程度)

報告番号	課博第 号	氏 名	藤 加菜子

(要 旨)

論文題目:「DNA マーカーを用いたヒラメの分子育種学的研究」

我が国の漁業生産に占める養殖生産は、生産量で約 20%、生産額で約 30%に達している。世界的に見ても、養殖生産量は漁業生産量の約 35%を占め、中国では 68%に達しており、食糧資源としての養殖生産に掛かる期待の大きさが伺われる。しかし、現在の養殖生産で使われている種苗は野生種とほぼ同じであり、家畜・家禽のように野生種を人為的に選抜育種し、改良して生産性を高めたものはほとんどない。言いかえれば、養殖種苗には家畜・家禽と同じように生産性を改良できる可能性があると言える。選抜育種はその有効な手段ではあるが、育種目標を達成するのに長い年月を有するのが一般的であり、また、表現型を頼りにする育種であるために、外観からその表現型が分からない病気に対する抵抗性を育種目標とする場合には、特に育種戦略が立てにくい。近年開発された分子生物学的手法を取り入れた連鎖解析に基づく DNA マーカー選抜は、表現型と連鎖する DNA マーカーを原因遺伝子と見なして行う遺伝子型選抜であり、選抜効率を飛躍的に高めるものである。

本研究では、食用魚として価値が高く、栽培漁業・養殖対象種として日本をはじめとするアジア諸国における水産業の中で重要な魚種とされているヒラメを対象として、DNA マーカーを用いた分子育種学的研究を行い、有用経済形質を付加した新たな系統の確立を試みた。また、DNA マーカーの利用を汎用化するものとして、DNA マーカーを紙にプリントし、常温保存が可能な一冊の本として流通させるアクア DNA ブックを開発した。

<u>DNA マーカーを用いた連鎖解析による有用経済形質関連遺伝子座の推定</u>

分子生物学的手法を用いた先端的育種は、生産者の所得向上と消費者に良質で安い農畜産物を供給することを目的とし、栽培植物や家畜・家禽で近年盛んに行われている。その方法は、DNA マーカーを用いた連鎖解析によって有用経済形質を支配する遺伝子座(原因遺伝子座)を推定し、原因遺伝子座と連鎖する DNA マーカーを遺伝指標として、親魚選抜や交雑による育種を行うものである。ここでは、分子育種学的手法の水産業への応用を目指し、養殖現場で問題視されている、体色異常の一種である白化とウイルス性のリンホシスチス病(LD)抵抗性、という二つの遺伝形質を支配する遺伝子座について、DNA マーカーの一種であるマイクロサテライト(MS)マーカーを用いた連鎖解析により座位の推定を試みた。白化に関しては、戻し交配家系((白化♀×正常♂)×正常♂)を用いて解析を行い、複数の遺伝子座が関与していることを明らかにした。LD に関しては、戻し交配家系((抵抗性系統♀×感受性系統♂)×感受性系統♂)を用いて解析を行い、1 つの遺伝子座が LD 抵抗性に強く関与していることを明らかにした。

マーカーアシスト浸透交雑による LD 抵抗性系統の作出

病気に対する抵抗性は、体型などと異なり、その表現型を外観から判断することが難しい。そのために育種目標としては、最も優先度が高いものの一つとされているにもかかわらず、家畜・家禽においても育種が成功した例はほとんどない。本章では、連鎖解析で得られた LD 抵抗性遺伝子座(LD-R)と連鎖する MS マーカーを用いたマーカーアシスト浸透交雑（MAI）による LD 抵抗性系統の作出を試みた。はじめに、LD-R と連鎖する MS マーカーを用い、LD-R を有すると推定した♀親魚を選抜した。次に、この♀親魚と商品として高い評価を得ている民間種苗生産会社の種苗生産用♂親魚を交配し、LD-R を有する新たな系統の作出を行った。この系統のヒラメと同種苗生産会社の市販用ヒラメとを民間養殖場にて比較試験した。その結果、MAI によって得たヒラメは、成長・色彩ともに市販ヒラメと遜色なく、LD 抵抗性に優れていた。本結果は MAI の有効性を示すものである。本手法を用いれば、複数の有用形質を併せ持ち、それ以外の形質においては遺伝的多様性に富んだ系統を作出していくことが可能であり、新しい水産育種を後押しするものであると考える。

DNA マーカーの汎用化を目指したアクア DNA ブックの開発

本研究で DNA マーカー(MS マーカー)の分子育種における有用性が確かめられたが、MS マーカーの使用にあたっての問題点もある。MS マーカーの使用では、データーベース上に公開された MS マーカー情報を基に、研究者が自分の研究目的にあったマーカーを選び出し、合成を委託する、という手順を取るのが一般的である。しかし、これらの情報は公開・非公開に関わらず、整備されていないのが実情であり、それを正確に読み取り使いこなすには多大な労力と時間を要する。そこで、MS マーカーの情報について記載するだけではなく、MS マーカーそのものも紙にプリントし、一冊の本として常温保存出来るシステムとしてのアクア DNA ブックの開発を試みた。DNA ブックの基本概念は理化学研究所によって開発されたもので、アクア DNA ブックはこの概念を用いてオリゴプライマーを紙にプリントしたところに特徴がある。本ブックは MS マーカーの情報を一覧できるという理由で、実験設計を容易化するばかりでなく、プリントされた MS マーカーは提供履歴を同じくするので、得られたデーターの共有化にもつながり、汎用性の高いものである。本ブックを構成している MS マーカーは、個体識別、親子判別、集団解析、系群判別などあらゆる遺伝学的調査研究に有用であり、様々な研究者にとって利用価値の高いものである。本ブックには試みとして魚病診断用プライマーも掲載されているが、将来的には、多くの魚種で開発された DNA マーカーを掲載した DNA ブックや、国内未侵入の魚病診断用プライマーを網羅した DNA ブックなどへの応用が可能である。

本研究で得られたヒラメの分子育種学的知見や DNA マーカーの汎用化を目指したアクア DNA ブックの開発は、分子遺伝育種をはじめとする様々な研究の推進と産業の活性化に役立つものであると考える。

緒論

人類は野生植物の栽培植物化と野生動物の家畜化に成功して以来、ある形質が親から子孫へ伝えられるという、生物の遺伝的特性を利用して、人為的選抜育種による作物の選抜や家畜の改良を積極的に行ってきた。このような歴史的背景の中で遺伝学（genetics）が生まれた。また、遺伝の仕組みを解明し、育種に生かそうとする考えの下、遺伝学の中から統計遺伝学（statistical genetics）や分子遺伝学（molecular genetics）が派生した。更に、DNA マーカーが開発され、これらの考え方や技術が選抜育種に応用されるようになった。従来の選抜育種は、表現型を頼りにする育種であるために、外観からその表現型が分からない形質を育種目標にする場合には育種戦略が立てにくい。しかし、DNA マーカーを用いた選抜育種（分子育種）は、目で見えない形質を、目で見ることができる DNA マーカーの情報に置き換えて、選抜し、形質を固定することが出来るという特長がある。従来の選抜方法にこの分子育種法を加えることで、農畜産分野の品種改良はさらに進展した。しかし、従来、野生種を対象として増養殖生産を進めてきた水産分野では、農畜産物に比べ、従来からの方法による選抜育種自体が立ち遅れており、分子育種法を取り入れて育種効率の向上を果たした例は、著者の知る限りない。

我が国の漁業生産に占める養殖生産は、生産量で約20%、生産額で約30%に達している。世界的に見ても、養殖生産量は漁業生産量の約35%を占め、中国では68%に達しており（平成15年　漁業・養殖業生産統計年報*）、食糧資源としての養殖生産に掛かる期待の大きさが伺われる。そこで、分子育種を取り入れた選抜育種によって、水産育種の育種効率を高

めるために、本研究に取り組んだ。

本研究では、食用魚として価値が高く、栽培漁業・養殖対象種として日本をはじめとするアジア諸国における水産業の中で重要な魚種とされているヒラメを対象種とし、ヒラメDNAマーカーを用いた、有用経済形質に関与する遺伝子座の推定及び、その結果を基に、有用経済形質を付加した新たな系統の確立を試みた。また、分子育種をはじめとする様々な遺伝学的調査・研究に有用なDNAマーカーの利用を汎用化することを考え、DNAマーカーを紙にプリントし、常温保存が可能な一冊の本として流通させるアクア DNA ブックを開発した。

---

*: 平成15年　漁業・養殖業生産統計年報, 2005. 農林水産省統計部 p34-37, p243.

第１章

DNA マーカーを用いた連鎖解析による

有用経済形質関連遺伝子座の推定

メンデルの法則の再発見以後、動植物の遺伝育種による品種改良、特に経済形質（肉質、一腹子数、産卵時期、抗病性など）と呼ばれる産業上重要な表現形質を制御することは、この研究分野において最終目標となっている。しかし、経済形質の多くは多数の遺伝子座が関与すると同時に環境の影響を受けるため、変異が連続的な量的形質（quantitative trait; QT）を示すのが一般的である。これらの QT を支配する遺伝子座（quantitative trait locus; QTL）の推定及び発現機構の解明には多くの困難が伴うため、古くからその重要性が認識されてきたが進展はほとんどなかった。しかし 1980 年代後半の DNA マーカーの登場は、この研究事情を一変させた。現在広く使われているマイクロサテライトと呼ばれる DNA マーカーは、ゲノム上に広く散在する塩基の繰り返し配列の配列数の違いに基づく DNA 多型を検出できるもので、1 組の交配親に由来する家系において親子間の遺伝情報が得られるマーカー座は数百以上に及ぶ。このことを利用して、全染色体領域をカバーできる詳細な連鎖地図が作製されるようになった。これが基盤となり、連鎖地図に基づいて QTL の位置と遺伝効果を推定する解析（QTL 解析）が行われるようになり、着実に成果をあげつつある。現在、QTL 解析はモデル生物から家畜まで幅広く行われており、様々な形質に関与する遺伝子座を推定した報告がある （Table 1, Table 2）。

有用経済形質関連遺伝子座の推定は、品種改良や育種効率の向上へとつながる。すなわち、ひとたび QTL が推定されると、QTL 近傍にある DNA マーカーが QTL と連鎖して親子間を遺伝する性質を利用して、QTL を有する親を DNA マーカーを指標に選抜することが出来、有用な QT が固定された子孫を得ることが出来る。更に、この QT を他の有用形質をもつ系へ導入することで新たに、複数の有用形質を合わせ持つ系統を作出することも可能である。従来の選抜育種は、表現型のみに着目して行っていたために、保持させたい有用形質を、確実に保持させることができなかったり、長年同じ親を使い続けてきたために、遺伝的偏りが生じたりしていた。しかし、DNA マーカーを用いた育種を行えば、持たせたい有用形質を確実に保持させ、なおかつその他の形質においては多様性をもった集団を作

出することができる。

そこで、本章では、DNA マーカーの一種であるマイクロサテライト（MS）マーカーを用いて、ヒラメ養殖において問題視されている、白化（体色異常）と、ウイルス病の一種であるリンホシスチス病（LD）について、それらの形質に関与する遺伝子座の推定を、連鎖解析によって行った。

文献

Al-Chaarani, G. R., Gentzbittel, L., Wedzony, M., Sarrafi, A., 2005. Identification of QTLs for germination and seedling development in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Science 169, 221-227.

Beh, K., J., Hulme, D., J., Callaghan, M., J., Leish, Z., Lenane, I., Windon, R., G., Maddox , J., F., 2002. A genome scan for quantitative trait loci affecting resistance to *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. Animal Genetics 33, 97-106.

Bolek, Y., El-Zik, K., M., Pepper, A., E., Bell, A., A., Magill, C., W., Thaxton, P., E., Reddy, O., U., K., 2005. Mapping of verticillium wilt resistance genes in cotton. Plant Scince 168, 1581-1590.

Cnaani, A., Hallerman, E.M., Ron, M., Weller, J.I., Indelman, M., Kashi, Y., Gall, G.A.E., Hulata, G., 2003. Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F2 tilapia hybrid. Aquaculture 223, 117–128.

Danzmann, R.G., Jackson, T.R., Ferguson, M.M., 1999. Epistasis in allelic expression at upper temperature tolerance QTL in rainbow trout. Aquaculture 173, 45 – 58.

Dong, Y., Kamiuten, H., Yang, Z., Lin, D., Ogawa, T., Luo, L., Matsuo, H., 2006. Mapping of quantitative trait loci for gibberellic acid response at rice (Oryza sativa L.) seedling stage. Plant Science 170, 12-17.

Elouafi, I., Nachit, M. M., Martin, L. M., 2001. Identification of a microsatellite on chromosome 7B showing a strong linkage with yellow pigment in durum wheat (Triticum turgidum L. var. durum).

Fuji. K., Kobayashi. K., Hasegawa, O., Sakamoto, T., Okamoto, N., 2006. Identification

of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), Aquaculture in press.

Hara, T., Nagase, T., Kuwada, T., Tokuhara, T., Ozaki, A., Sakamto, T., Okamoto, N., 2004. A genetic linkage map of amago salmon (*Oncorhynchus masou ishikawae*) and mapping of two QTL associated with smoltification. 29th International Conference on Animal Genetics by ISAG. Association between Markers and Traits: Tokyo Japan. Sept 14.

Ikeobi, C., O., N., Woolliams, J., A., Morrice, D., R., Law, A., Windsor, D., Burt, D., W., Hocking, P., M., 2002. Quantitative trait loci affecting fatness in the chicken. Animal Genetics 33, 428-435.

Jackson, T.R., Danzmann, R.G., Ferguson, M.M., Fishback, A.G., Ihssen, P.E., O'Connel. M., Crease, T.J., 1998. Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families. Heredity 80, 143–151.

Khatkar, M., S., Thomson, P., C., Tammen, I., Radsma, H., W., 2004. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. genet. Sel. Evol. 36, 163-190.

Khoo, S.K., Ozaki, A., Nakamura, F., Arakawa, T., Ichimoto, S., Nickolov, R., Sakamoto. T., Akutsu, T., Mochizuki, M., Denda, I., Okamoto, N., 2004. Identification of a novel chromosomal region associated with infectious hematopoietic necrosis (IHN) resistance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fish Pathology 39, 95–101.

Koning, D., J., d., Harlizius, B., Rattink, A., P., Groenen, M., A., Brascamp, E., W., van Arendonk, J., A., v., 2001. Detection and characterization of quantitative trait loci for meat quality traits in pigs. J. Anim. Sci. 79, 2812-2819.

Mizoshita, K., Watanabe, T., Hayashi, H., Kubota, C., Yamakuchi, H., Todoroki, J., Sugimoto, Y., 2004. Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a half-sib family of purebred Japanese Black (Wagyu) cattle. J. Animal Sci. 82, 3415-3420.

Moen, T., Agresti, J.J., Cnaani, A., Moses, H., Famula, T.R., Hulata, G., Gall, G.A.E., May, B., 2004. A genome scan of a four-way tilapia cross supports the existence of a quantitative trait locus for cold tolerance on linkage group 23. Aquaculture Research 35, 893–904.

Nakamura, K., Ozaki, A., Akutsu, T., Iwai, K., Sakamoto, T., Yoshizaki, G., Okamoto, N., 2001. Genetic mapping of the dominant albino locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Molecular Genetics and Genomics 265, 687–693.

Nichols, K.M., Bartholomew, J., Thorgaard, G.H., 2003, Mapping multiple genetic loci associated with *Ceratomyxa Shasta* resistance in *Oncorhynchus mykiss*. Diseases of Aquatic Organisms 56, 145–154.

Ozaki, A., Sakamoto, T., Khoo, S., Nakamura, K., Coimbra, M.R.M., Akutsu, T., 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.

Ozaki, A., De, Leon, F.G., Glebe, B., Ferguson, M.M., T. Woo, P.T.K., Danzmann, R.G., 2003. Identification of QTL for resistance to (*Cryptobia salmositica*) infection in ATLANTIC SALMON (*Salmo salar*): A model for pathogen resistance QTL. the VIIIth International Symposium Genetics in Aquaculture by ISGA, Genes and genome mapping and manipulations: Puerto Varas, Chile. Nov. 11.

Perry, G.M., Danzmann, R.G., Ferguson, M.M., Gibson, J.P., 2001. Quantitative trait

loci for upper thermal tolerance in outbred strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Heredity, 86, 333–341.

Reinsch, N., Thomsen, H., Xu, N., Brink, M., Looft, C., Kalm, E., Brockmann, G. A., Grupe, S., Kuhn, C., Schwerin, M., Leyhe, B., Hiendleder, s., Erhardt, G., Medjugorac, I., Russ, I., Forster, M., Reents, R., Averdunk, G., 1999. A QTL for the degree of spotting in cattle shows synteny with the KIT locus on chromosome 6. J. Hered. 90, 629-634.

Rodriguez, M. F., LaPatra, S., Williams, S., Famula, T., May, B., 2004. Genetic markers associated with resistance to infectious hematopoietic necrosis in rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) backcrosses. Aquaculture 241, 93-115.

Robison, B.D., Wheeler, P.A., Sundin, K., Sikka, P., Thorgaard, G.H., 2001. Composite interval mapping reveals a major locus influencing embryonic development rate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The Journal of Heredity 92, 16–22.

Sakamoto, T., Danzmann, R.G., Okamoto, N., Ferguson, M.M., Ihssen, P.B., 1999. Linkage analysis of quantitative trait loci associated with spawning time in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 173, 33–43.

Somorjai, I.M.L., Danzmann, R.G., Ferguson, M.M., 2003. Distribution of temperature tolerance quantitative trait loci in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and inferred homologies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Genetics 165, 1443–56.

Turner, A., S., Bradburne, R., P., Fish, L., Snape, J., W., 2004. New quantitative trait loci influencing grain texture and protein content in bread wheat. Journal of Cereal Science 40, 51-60.

Wilkie, P., J., Paszek, A., A., Beattie, C., W., Alexander, L., J., Wheeler, M., B., Schook, L., B., 1999. A genomic scan of porcine reproductive traits reveals possible

quantitative trait loci (QTLs) for number of corpora lutea. Mammalian Genome 10, 1432-1777.

Yonash, N., Bacon, L.D., Witter, R. L., Cheng, H. H., 1999. High resolution mapping and identification of new quantitative trait loci (QTL) affecting susceptibility to Marek's disease. Anim. Genet. 30, 126-135.

Zhi-Hong, Z., Li, S., Wei, L., Wei, C., Ying-Guo, Z., 2005. A major QTL conferring cold tolerance at the early seedling stage using recombinant inbred lines of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Science 168, 527-534.

Zimmerman, A. M., Wheeler, P. A., Ristow, S. S., Thorgaard, G. H., 2005. Composite interval mapping reveals three QTL associated with pyloric caeca number in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 247, 85-95.

Table 1. Mapping of economically important traits in domestic animals and crops

Species	Phenotype	References
Wheat	Yellow pigment content	Elouafi *et al.* (2001)
	Protein content and grain texture	Turner *et al.* (2004)
Rice	Conferring cold tolerance	Zhi-Hong *et al.* (2005)
	Gibberellic acid response	Dong *et al.* (2006)
Cotton	Verticillium wilt resistance	Bolek *et al.* (2005)
Sunflower	Germination and seeding development	Al-Chaarani *et al.* (2005)
Pig	Number of corpora lutea	Wilkie *et al.* (1999)
	Meat quality	Koning *et al.* (2001)
Chicken	Marek's disease	Yonash *et al.* (1999)
	Fatness	Ikeobi *et al.* (2002)
Cattle	Milk production	Khatkar *et al.* (2004)
	Growth and carcass traits	Mizoshita *et al.* (2004)
	The degree of spotting	Reinsch *et al.* (1999)
Sheep	Resistance to *Trichostrongylus colubriformis*	Beh *et al.* (2002)

Table2 Mapping of economically important traits in aquaculture fishes

Fish	Phenotype	References
Rainbow trout	Infection pancreatic necrosis (IPN) resistance	Ozaki *et al.* (2001)
(*Oncorhynchus mykiss*)	Infection hematopoietic necrosis (IHN) resistance	Khoo *et al.* (2004)
		Rodriguez *et al.* (2004)
	Myxospoea (Ceratomyxa shasta) resistance	Nichols *et al.* (2003)
	Upper temparature tolerance	Jackson *et al.* (1998)
		Danzmann *et al.* (1999)
		Perry *et al.* (2001)
		Somorjai *et al.* (2003)
	Spawning time	Sakamoto *et al.* (1999)
	Early deveropment of embrios	Robison *et al.* (2001)
	Dominant albino	Nakamura *et al.* (2001)
	Number of pyloric caeca	Zimmerman *et al.* (2005)
Amago salmon	Osmotic reguretion	Hara *et al.* (2004)
(*Oncorhynchus masou ishikawae*)		
Atlantic salmon	Cryptobiosis resistance	Ozaki *et al.* (2003)
(*Salmo salar*)		
Arctic char	Upper temperature tolerance	Somorjai *et al.* (2003)
(*Salvelinus alpinus*)		
Thilapia	Lower temperature tolerance	Cnaani *et al.* (2003)
(*Oreochromis niloticus*)		Moen *et al.* (2004)
Japanese flounder	Lymphocystis disease (LD) resistance	Fuji *et al.* (2006)
(*Paralichthys olivaceus*)		

第１節

ヒラメ白化関連遺伝子座の推定

1. はじめに

ヒラメの体色異常は、他の異体類同様、天然個体、飼育個体を問わず、しばしば見られる (Seikai, 1997; Bolker and Hill, 2000)。その中でも、本来黒褐色であるはずの有眼側の体色が一部白色になる白化 (pseudo albinism) は商品価値の低下をまねくため、養殖産業上、解決すべき大きな問題の一つである。日本では、1980 年代頃から体色異常を引き起こす原因の解明と有効な防除策についての研究が進められ、主に、種苗生産時の餌料や栄養、飼育環境に着目した研究が多く報告され (Seikai, 1997)、改善が進められた。しかし、白化には複数の遺伝子の関与が示唆されており (Tabata, 1991)、また、白化になりやすい系統、なりにくい系統の存在も知られている。そこで、本章では、選抜育種による白化個体出現率の抑制を目指し、DNA マーカーを用いた QTL 解析によって、白化に関連する遺伝子座の推定を行った。

2. 材料及び方法

2-1 解析家系

解析家系として戻し交配家系を作出した。その作出には、白化個体出現率の高い系統、KP-C と、白化個体出現率の低い系統、KP-A を用いた。これらの系統は、表現型に基づいた選抜によって、神奈川県水産技術センターにて継代飼育されてきた。KP-C の平均白化個体出現率は 77.8%であり、KP-A の平均白化個体出現率は 19.1%であった (Table 1)。KP-C 雌個体 （白化） と KP-A 雄個体 （正常） を交配し、F1 (KP-CA) 集団を作出した。KP-CA 集団中の雌個体 （白化） と親である KP-A 雄個体を戻し交配し、戻し交配集団 (KP-CAA) を作出した (Fig. 1)。

戻し交配集団 (KP-CAA) の受精卵を 100L 水槽に収容し、70L の海水で平均水温 15.5℃で止水飼育した。受精 3 日後、500L 水槽に移し、流水飼育した。水温は 15.5℃から 22.5℃の範囲で飼育した。孵化後 25 日目までは、餌料としてワムシ *Brachionus plicatilis* を与え、15 日目から 60 日目までは、アルテミア *Artemia salina* を与え、30 日以降は市販の配合飼料を与えた。

2-2 白化面積占有率 （表現型） の判定

戻し交配集団 (KP-CAA) 238 個体の表現型値の判定を、孵化後 3 ヶ月目に行った。始めに、有眼側体表面の撮影を実体顕微鏡に取り付けたデジタルカメラ (Canon, IXY DIGITAL 200a) によって撮影した。次に、これらをコンピューターに取り込み、画像解析ソフト (Adobe Photoshop 6.0, Adobe Systems, San Jose, CA) で個体ごとに有眼側体表面積と白化部位の面積を測定し、白化面積占有率を算出した （白化面積占有率(%)＝白化部位の面積／有眼側体表面積 x100)。なお、背鰭、尻鰭、尾鰭は、肉眼では白化の有無の判別が困難なため測定対象に含めなかった。

2-3 マーカー分離型の判定

表現型の判定を行った戻し交配魚の尾鰭を 1cm 角の大きさで採取し、100 mM NaCl、20 mM Tris-HCl (pH8.0)、100 mM EDTA、1.0% SDS、100 μg/ml Proteinase K を含む消化溶液を 600μl 加え、37℃で一晩静置した。フェノール/クロロホルム(1:1)抽出を 1 回行った後、エタノール沈殿にて染色体 DNA を析出させた。回収した DNA は 70%エタノールで洗浄、乾燥後、TE 溶液 (0.01 M Tris-HCl pH 7.4, 2.5 mM EDTA pH 8.0) 50μl に溶解した。

本解析にはヒラメマイクロサテライト (MS) マーカーを用い、2.5 pmol forward primer と[γ-^{33}P]ATP、T4 polynucleotide kinase によって標識した 0.17 pmol reverse primer、0.175 mM each dNTP、 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、 50 mM KCl、 1.5 mM $MgCl_2$、 1% BSA、 0.25 U *Taq* DNA polymerase (Takara Bio)、50ng のテンプレート DNA を含む 11μl の溶液で、Gene Amp PCR System 9600 thermal cycler (Perkin-Elmer) にて、PCR を行った。PCR 反応は、95℃, 2分→ (95℃, 30秒→各プライマーの Tm (℃), 1分→72℃, 1分)x35 サイクル) →72℃, 3分とした。反応後、等量の Loading dye (95% formamide, 10 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue and xylene cyanol) とよく撹拌し、PCR 産物を熱変性によって 1 本鎖にし、6%アクリルアミドゲルにて電気泳動を行った。その後、1 時間乾燥させたゲルを、Imaging Plate (IP)に 3～12 時間感光させ、放射線の感光像が記憶された IP を Bio-image Analyzer (BAS1000, Fuji Photo Films, Japan) で読み取り、コンピューターで映像化し、マーカーによって増幅されたアリルの分離パターン (マーカー分離型) を判定した。

2-4 連鎖解析

ヒラメ遺伝子連鎖地図 (unpublished) に基づき、全ての連鎖群 (LG) において効率よく関連遺伝子座を探索できるように 76 個の MS マーカーを選び出した。それらのマーカーを用いて、戻し交配魚 44 個体とその両親および祖母のマーカー分離型の情報を収集し、各マーカー間の連鎖検定と組換え価の推定を Map Manager QT2968k (Manly and Olson,

1999）を用いて行った。

2-5 QTL 解析

解析は 3 段階に分けて行った。第 1 段階では、表現型の判定において極端に白化面積占有率が異なっていた戻し交配個体（白化面積占有率の高かった個体と低かった個体）のマーカー分離型の情報を収集して、χ^2検定により表現型とマーカー分離型との対応関係を調べた。第 2 段階では、解析個体数を 238 個体に増やし、第 1 段階の検定で有意であったマーカー（$p<0.05$）に加えて、同じ連鎖群上に位置する MS マーカーを用いてマーカー分離型の情報を収集し、表現型とマーカー分離型との対応関係を調べた。第 3 段階では、第 2 段階の結果、有意だったマーカーが属する連鎖群において Interval mapping 法を、Map Manage QT2968k (Manly and Olson, 1999) の Interval mapping algorithms を用いて試みた。この方法は、マーカー座位だけではなく、隣接するマーカーの情報を基に、連鎖群上の全ての座位で QTL の検出を試みる QTL 解析のための統計的手法である。また、結果の有意性を同ソフトウェアの、解析によって得られた結果がどの程度高いかを評価する検定法である、Permutation test (Churchill and Doerge, 1994) によって閾値（LRS 値）を求めた。その際、有意水準 0.63 の閾値を Suggestive、0.05 の閾値を Significant、0.001 の閾値を Highly significant と評価した (Lander and Kruglyak, 1995)。

3. 結果

3-1 白化面積占有率の判定

戻し交配家系KP-CAAの、体表の白化面積占有率の分布を度数分布表にて示した (Fig. 2)。

実際のソフトを用いた解析には、白化面積占有率を標準化し ((各データ値－各解析家系の総データの平均値)÷標準偏差)、その値を表現型値としたものを用いた。解析家系中の表現型値がマイナスを示した個体 (正常個体) は 59.7%であり、表現型値がプラスを示した個体 (白化個体) は 40.3%であった。

3-2 連鎖解析

連鎖解析に使用した 76 個の MS マーカーのうち、48 個の MS マーカーが戻し交配家系 KP-CAA にマップされた。残りの MS マーカーは本解析家系において多型が確認されなかった。また、LG19 に関しては、ヒラメ遺伝子連鎖地図 (unpublished) LG19 上の MS マーカー全てに多型が見られなかったため、解析を進めることができなかった。

3-3 QTL 解析

第 1 段階において、χ^2検定により戻し交配家系 KP-CAA 集団 (n=44) における表現型と 48 個の MS マーカーによるマーカー分離型との対応関係を調べた結果、6 マーカー座において有意な結果 ($p<0.05$; 自由度 1, $\chi^2=3.84$) が得られた (Table 2)。

そこで、第 2 段階で解析個体数を 238 個体に増やし、第 1 段階で有意であった MS マーカーと同じ連鎖群上に位置する MS マーカーを用いてマーカー分離型の情報を収集し、表現型とマーカー分離型との対応関係を調べた (Table 2)。その結果、5 連鎖群に属する 16 個のマーカー (LG1; *Poli130TUF, Poli9-67TUF, Poli100TUF,* LG5; *Poi9TUF, Poli43TUF, Poli169TUF, Poli226TUF, Poli15-1TUF, Poli215TUF, Poli236TUF, Poli151TUF,* LG6; *Poli143TUF,* LG8; *Poli167TUF,* LG24; *Poli178TUF, Poli183TUF, Poli198TUF*) を白化関連遺伝子座との連鎖候補マーカーとして見出した (Table 3)。これらのマーカーが連鎖する

QTLは白化形質の1～14%を説明するものであった。

第3段階において、第2段階で候補となったマーカーが属する連鎖群毎にInterval mapping法によってQTLの位置を推定し、Permutation testによって有意性を評価した。その結果、2連鎖群に属する11個のマーカー（LG5; *Poi9TUF, Poli43TUF, Poli169TUF, Poli226TUF, Poli15-1TUF, Poli215TUF, Poli236TUF, Poli151TUF,* LG24; *Poli178TUF, Poli183TUF, Poli198TUF*）がHighly significant level、Significant levelを示した（Table 4, Fig. 3)。LG5に推定された白化関連遺伝子座をpseudo-albinism-1 (PA-1）とし、LG24に推定された遺伝子座をPA-2とした（Fig. 3, Fig. 4)。LG5に属し、PA-1と最も強い連鎖関係にあったマーカーは*Poli215TUF*と*Poli15-1TUF*で、これは白化形質の14%を説明するものであった。また、LG24に属し、PA-2と最も強い連鎖関係にあったマーカーは*Poli183TUF*で、これは白化形質の6%を説明するものであった（Table 3)。

4. 考察

本研究において、２つの主要白化関連遺伝子座、PA-1 と PA-2 が推定された。PA-1 は LG5 上に推定され、PA-2 は LG24 上に推定された。PA-1 と最も強い連鎖関係にあったマーカーは *Poli215TUF* と *Poli15-1* (P=8.7×10^{-10}) であった。また、PA-2 と最も強い連鎖関係にあったマーカーは *Poli183TUF* (P=6.8×10^{-5}) であった。

本研究で利用した遺伝子連鎖地図 (unpublished) は、217 個の MS マーカーがマップされているが、本解析家系では、LG19 上に多型が認められるマーカーがなく、LG19 に関しては解析を進めることができなかったことより、解析に十分なマーカー数であった、とは言いがたい。現在、このような現象を解消し、より詳細な解析を進めるために、1000 個程度の MS マーカーよりなる遺伝子連鎖地図の詳細化を進めている。詳細化された連鎖地図を用いれば、LG19 上に、またその他の LG 上にも、新たな白化関連 QTL が検出される可能性がある。また、すでに見つかっている PA-1、PA-2 についても原因遺伝子とより強く連鎖するマーカー （原因遺伝子により近いマーカー） が得られるものと期待できる。近年、有眼側体表の白化のメカニズム解明が、正常個体と体色異常個体の体色発現機構の比較により、進められている。その結果、外部及び内部形態の左右相称化 （正常な異体類は左右不相称を示す） によるものである、という見解が示されている (Seikai, 1997)。別の研究で、左右不相称化を支配する遺伝子の存在が示唆されている (Hashimoto *et. al.*, 2002)。本研究で推定された白化関連遺伝子座と左右不相称化に関与する遺伝子との関連は非常に興味深い。今後、両者の関係を調べ、更なる詳細な解析を進めることは、白化に関する原因遺伝子を特定する一つの手段であろう。

しかし、本研究で QTL 解析を行った目的は、DNA マーカーを用いた選抜育種によって白化個体出現率を抑制することにある。そのために必要なのは、いくつもの小さい QTL を検出することではなく、目的形質を支配する主要な QTL を検出し、その情報を育種に応用

していくことである。本研究では、２つの主要白化関連遺伝子座が推定された。それぞれの遺伝子座と強く連鎖しているDNAマーカーは、マーカー選抜育種に有効なマーカーであると考える。

文献

Bolker, J., A., Hill, C., R., 2000. Review paper; Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. J. Fish Biol. 56, 1029-1052.

Churchill, G. A., Doerge, R. W., 1994. Empirical threashold values for quantitative trait mapping. Genetics 138, 963-971.

Hashimoto, H., Mizuta, A., Okada, N., Suzuki, T., Tagawa, M., Tabata, K., Yokoyama, Y., Sakaguchi, M., Tanaka, M., Toyohara, H., 2002. Isolation and characterization of a Japanese flounder clonal line, reversed, which exhibits reversal of metamorphic left-right asymmetry. Mech. Develop. 111, 17-24.

Lander, E. and Kruglyak, L., 1995. Genetic dissection of complex traits: reporting linkage results. Nature Genetics 11, 241-247.

Manly, K.F., Olson, J.M., 1999. Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. Mamm. Genome 10, 327-334.

Seikai, T., 1997. Mechanism of abnormal pigmentation. Biology and Stock Enhancement of Japanese flounder. Koseisha-Koseikaku, Tokyo, 63-82pp, (in Japanese).

Tabata, K., 1991. Genetic factory on the Albinism of Hirame *Paralichthys olivaceus*. Suisan Zoshoku 39, 29-35.

Table 1. Ratio of pseudo albinism observed at Kanagawa Prefectural Fisheries Technology Center

Strain name / Year	KP-A	KP-C	KP-CA (F1 hybrid of KP-C × KP-A)
1998	19.0*	-	-
2000	3.7	69.4	-
2001	23.9	97.6	-
2002	16.0	70.1	59.0
2003	5.2	-	-
Average	19.1	77.8	59.0

$$\text{*Percent ratio (\%)} = \frac{\text{Number of pseudo-albinism}}{\text{Total number of each strain fish}} \times 100$$

Table 2. Microsatellite markers typed in KP-CAA backcross families

LG[a]	Number of markers typed at Stage 1[b]	Number of markers with $p<0.05$[c]	Number of markers typed at Stage 2
1	3	1	4
2	2	0	0
3	2	0	0
4	4	0	0
5	1	1	8
6	2	0	0
7	2	0	0
8	2	1	7
9	3	0	0
10	3	1	5
11	2	0	0
12	2	0	0
13	3	0	0
14	1	0	0
15	1	0	0
16	2	1	2
17	2	0	0
18	1	0	0
20	2	0	0
21	2	0	0
22	1	0	0
23	3	0	0
24	2	1	5
Total	48	6	37

a; Linkage group names were according to the Japanese flounder genetic linkage map generation2 (unpublished).

b; Number of markers typed at stage 1; 22 pseudo-albinism and 22 normal individuals from the KP-CAA were typed at 48 marker loci.

c; Loci producing χ^2distribution statistic with $p<0.05$ at stage 1.

Table 3. QTL affecting pseudo albinism in the experimental family

LG[a]	Marker	P value
1	*Poli130TUF*	0.034
	Poli9-67TUF	0.003
	Poli100TUF	0.028
5	*Poli9TUF*	2.6×10^{-9}
	Poli43TUF	2.6×10^{-9}
	Poli169TUF	2.6×10^{-9}
	Poli226TUF	2.6×10^{-9}
	Poli15-1TUF	8.7×10^{-10}
	Poli215TUF	8.7×10^{-10}
	Poli236TUF	1.2×10^{-7}
	Poli151TUF	3.6×10^{-5}
6	*Poli143TUF*	0.014
8	*Poli167TUF*	0.046
24	*Poli178TUF*	3.0×10^{-4}
	Poli183TUF	6.8×10^{-5}
	Poli198TUF	0.001

Map Manager QT2968k software was used for this analysis ($P<0.05$, 238 informative progeny, Additive regression model with no control for other QTL).

a; Linkage groups were designated according to the Japanese flounder genetic linkage map generation 2 (unpublished).

Table 4. Results of interval mapping in the experimental family

LG[a]	Marker	LRS[b]	%[c]	Add[d]
1	*Poli130TUF*	4.5*[e]	1	0.27
	Poli9-67TUF	9.0*	3	0.38
	Poli100TUF	4.8*	2	0.28
5	*Poli9TUF*	35.4***	13	0.75
	Poli43TUF	35.4***	13	0.75
	Poli169TUF	35.4***	13	0.75
	Poli226TUF	35.4***	13	0.75
	Poli15-1TUF	37.6***	14	0.77
	Poli215TUF	37.6***	14	0.77
	Poli236TUF	28.0***	11	0.68
	Poli151TUF	17.1***	7	0.53
6	*Poli143TUF*	6.1*	2	0.32
24	*Poli178TUF*	13.1 **	5	0.47
	Poli183TUF	15.9**	6	0.52
	Poli198TUF	11.2**	4	0.44

a; Linkage groups were designated according to the Japanese flounder genetic linkage map generation 2 (unpublished).

b; LRS, Likelihood ratio statistic for the association of the trait with this locus.

c; Phenotypic trait variation explained by QTL.

d; Additive regression coefficient for the association.

e; The threshold values of the permutation test, which are labeled Suggestive (shown as single(*)asterisk at this table), significant (shown as double(**)asterisks) and highly significant (shown as triple(***) asterisks), are taken from the guidelines of Lander and Kruglyak (1995).

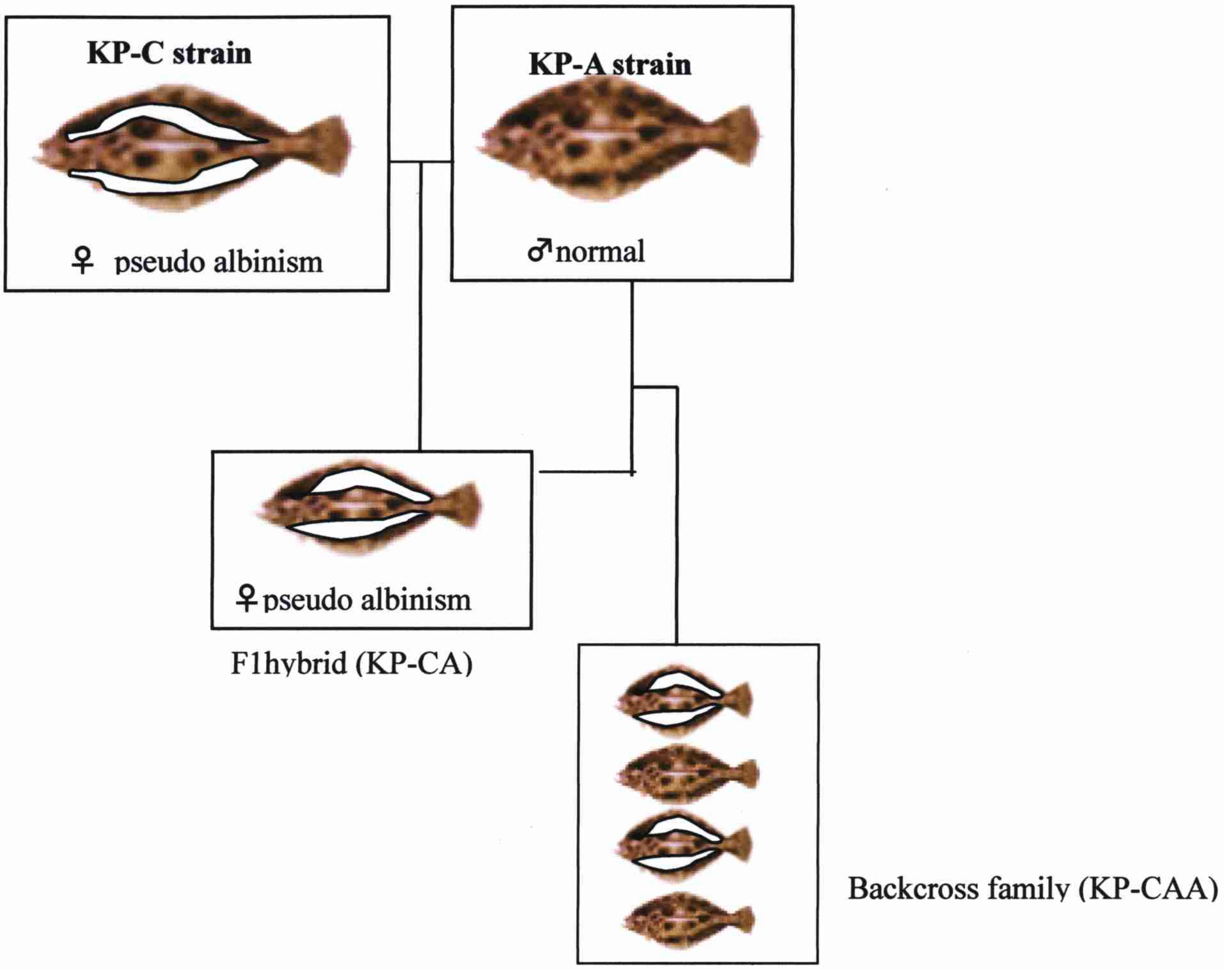


Fig. 1. Schematic representation of the experimental population 1 used in this study.

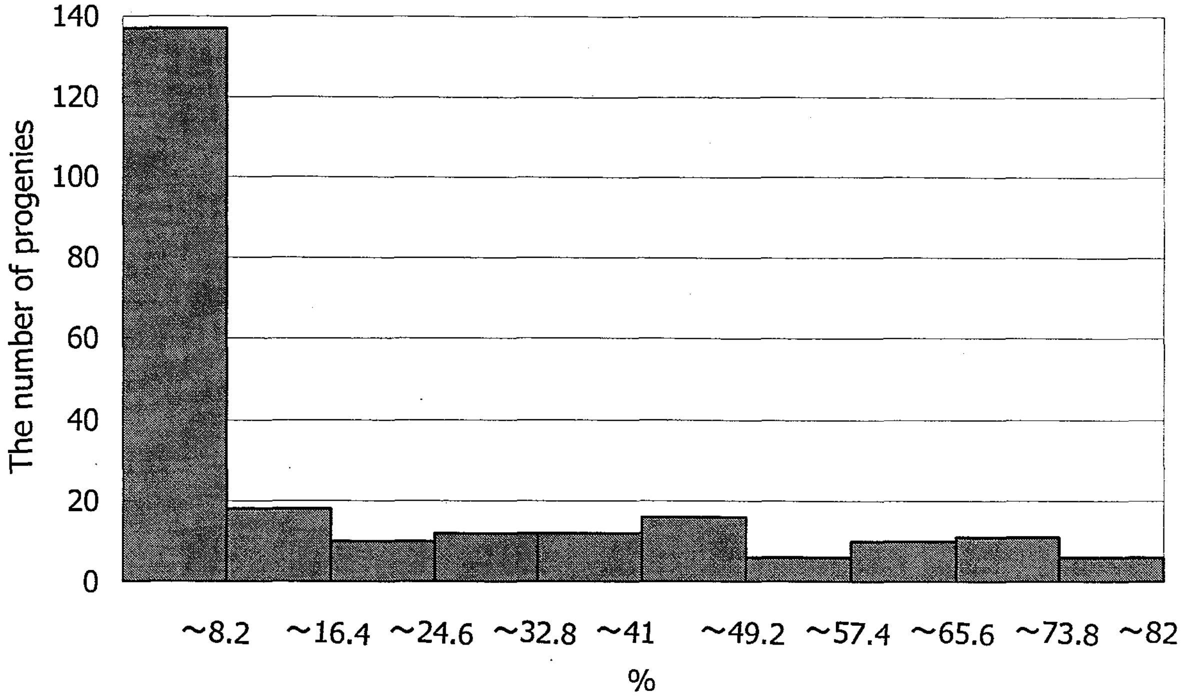


Fig. 2. Histograms for the ratio of pseudo albinism area in the KP-CAA backcross family.

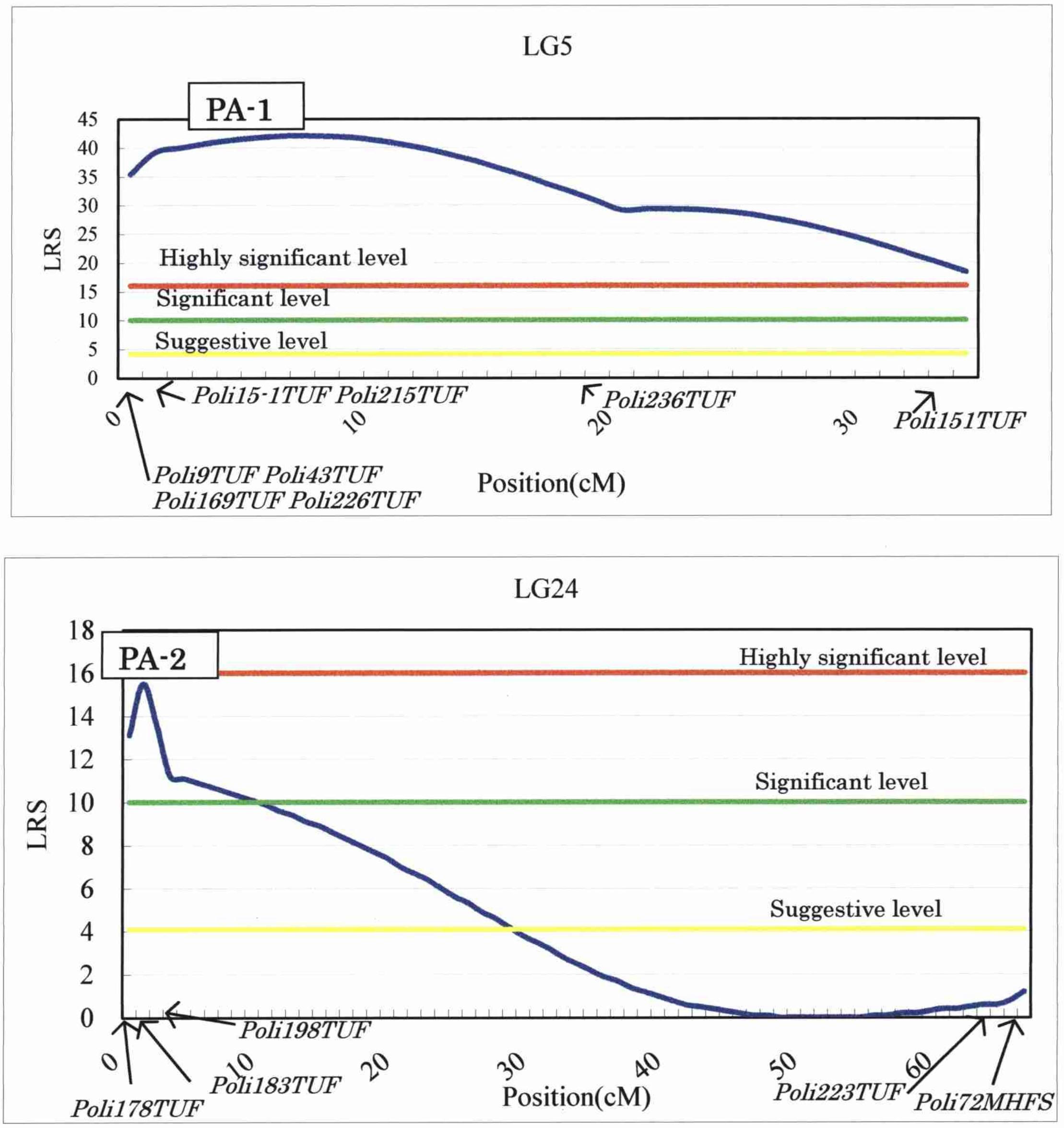


Fig. 3. Evidence for QTL affecting pseudo albinism. Test statistics curves following interval mapping analysis of the Japanese flounder linkage group 5 and 24 in KP-CAA. Significant QTL are identified by name, and their most likely positions.

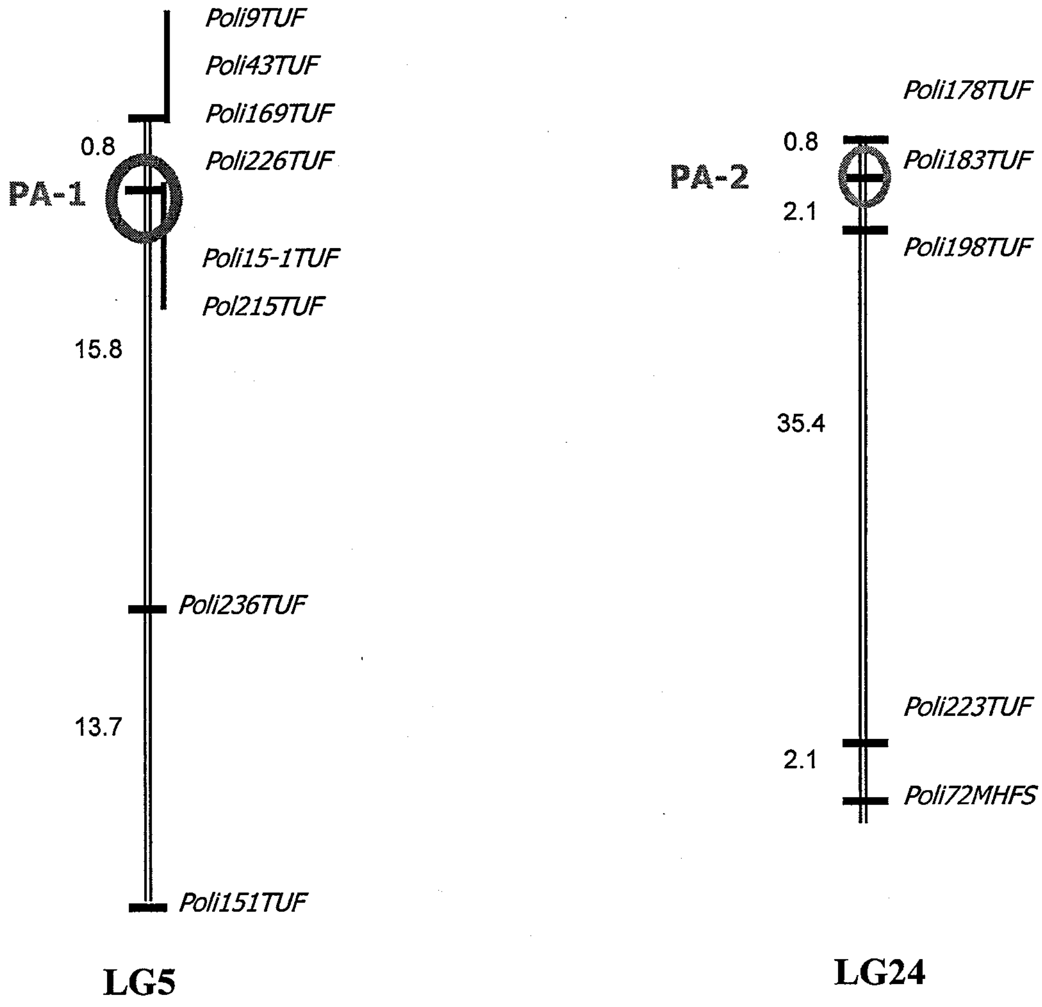


Fig. 4. Location of significant QTL affecting pseudo albinism in KP-CAA. Markers are shown on the right of each linkage group. Numerical values on the left are the genetic distances estimated in this QTL mapping study. QTL affecting pseudo albinism is named PA-1 on LG5 and PA-2 on LG24. A bold ellipse indicates the approximate position of significant QTL.

第2節

ヒラメのリンホシスチス病抵抗性遺伝子座の推定

Fuji, K., Kobayashi, K., Hasegawa, O., Coimbra, M.R.M., Sakamoto, T., Okamoto' T., Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture 2006

Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Kanako Fuji[a], Kazunobu Kobayashi[a], Osamu Hasegawa[b], Maria Raquel Moura Coimbra[c], Takashi Sakamoto[a], Nobuaki Okamoto[a,*]

[a] *Faculty of Marine Science, Tokyo University of Marine Science and Technology, Konan 4, Minato, Tokyo 108-8477, Japan*

[b] *Kanagawa Prefectural Fisheries Research Institute, Miura, Kanagawa 238-0237, Japan*

[c] *Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900 Recife-PE, Brazil*

*Corresponding author. Tel: +81-3-5463-0547; fax: +81-3-5463-0552

e-mail: nokamoto@s.kaiyodai.ac.jp (N. Okamoto)

Abstract

Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) is an economically important fish as a food, and has been widely cultured in Asian countries such as Japan, Korea and China. We chose to study lymphocystis disease (LD) because it has become widely spread in these countries and seriously damaged fish farms. LD is an Iridovirus-induced infection. Japanese flounder affected with LD develop characteristically hypertrophied cells, called lymphocystis cells, on skin, fins and/or mouth. Fish with lymphocystis cells lose commercial value because they are ugly. Lymphocystis cells on the mouth prevent proper feeding and in the worst case can lead to starvation. The disease is thus costly to farmers. There are presently no treatment for LD nor commercially available vaccines. In this study, we tried to identify the LD-resistance locus (LD-R) by linkage analysis because it may facilitate the effort for the establishment of LD-resistance strains.

We used 50 microsatellite markers to search for a locus associated with resistance to LD in Japanese flounder. Linkage tests were conducted in a backcross progeny (n=136) produced by the crossing a susceptible male with a (susceptible × resistant) hybrid female.

One major locus for LD-R was detected on linkage group (LG) 15 of the Japanese flounder genetic linkage map. On LG15, a microsatellite marker (Poli.9-8TUF)

explained 50% of the total phenotypic variation in the 136 individuals screened. Therefore, it can be considered as a candidate locus for marker-assisted breeding in order to enhance selective efficiency for LD resistance.

Keywords: linkage analysis, microsatellite marker, disease resistance, Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, marker-assisted breeding

1. Introduction

Recently developed techniques in molecular biology have made it possible to dissect some traits genetically. Genetic linkage maps based on DNA markers are an important tool in these techniques. The use of DNA markers facilitates the eventual positional cloning of the functional genes contributing to the quantitative trait (Collins, 1992). Marker-assisted selection (MAS) and/or marker-assisted gene introgression (MAI) using DNA markers can improve breeding programs for domestic animals and food crops. A number of studies have contributed to breeding programs by identifying loci influencing quantitative traits in domesticated animals (e.g., pig and cattle) and food crops (e.g., wheat and rice) (Andersson et al., 1994; Georges et al., 1995; Elouafi et al., 2001; Kwon et al., 2001).

To identify individual loci controlling traits of economic significance to fisheries, it is presently necessary to construct a genetic linkage map based on molecular markers at a large number of sites in the genome. The first microsatellite linkage map of rainbow trout was constructed by Sakamoto et al. (2000) and a more detailed map was produced by Nichols et al. (2003). It is the most comprehensive map for aquaculture species, consists of a total 1,359 markers, mainly of AFLP and microsatellites markers with some variable number of tandem repeats (VNTR) and structure genes. Atlantic

salmon map has been made recently available (Moen et al., 2004; Gilbey et al., 2004). High quality microsatellite linkage maps of channel catfish, tilapia and Japanese flounder are also constructed (Kocher et al., 1998; McConnell et al., 2000; Waldbieser et al., 2001; Liu et al., 2003; Coimbra et al., 2003; Lee et al., 2005). The linkage maps of shrimps are characteristically created with AFLP markers as high frequency and extended length of simple sequence repeats make the isolation of microsatellite markers difficult in this species (Moore et al., 1999; Wilson et al., 2002; Li et al., 2003). The map of common carp has been constructed with microsatellites and random amplification of polymorphic DNA (RAPD) markers by Sun and Liang (2004). One publication shows two types of genetic linkage maps, one male and one female, for two species of yellowtail constructed using F_1 population of an intercross between *Seriola quinqueradiata* and *S. lalandi* (Ohara et al., 2005). This approach shows interesting results with a wide variation of DNA polymorphisms.

These linkage maps have facilitated the analysis of quantitative trait locus (QTL) that control complex traits such as disease resistance, growth, fecundity etc. In rainbow trout, quantitative trait regions associated with resistance to two viral diseases, infectious pancreatic necrosis (IPN) and infectious hematopoietic necrosis (IHN), and one parasitic disease, myxosporea, were mapped (Ozaki et al., 2001; Nichols et al., 2003;

Khoo et al., 2004). In addition, regions related to upper temperature tolerance, spawning time, early development of embryos as well as dominant albino were reported (Jackson et al., 1998; Danzmann et al., 1999; Sakamoto et al., 1999; Fishback et al., 2000; Perry et al., 2001; Robison et al., 2001; Nakamura et al., 2001; Somorjai et al., 2003). QTL for upper temperature tolerance in Arctic char, lower temperature tolerance in tilapia and cold tolerance in common carp were also mapped (Somorjai et al., 2003; Cnaani et al., 2003; Moen et al., 2004; Sun and Liang, 2004).

Japanese flounder is an economically important fish as a food and recently culture of Japanese flounder has become popular in Asian countries such as Japan, Korea and China. However, in these countries, the Japanese flounder aquaculture industry has many problems such as disease (Muroga et al., 1996) and color abnormalities (Venizelos and Benetti, 1999). In this study, we investigated lymphocystis disease (LD) because this disease is widely distributed over many countries and causes serious damage to fish farms. LD is a viral infection due to lymphocystis disease virus (LDV) belonging to the Iridovirus family. It has spread worldwide, and has been identified in at least 96 species of teleosts belonging to 32 families and 6 orders (Nigrelli et al., 1965; Lawler et al., 1977). Japanese flounder affected with LD develop characteristically hypertrophied cells called lymphocystis cells, on skin, fins and/or mouth. Affected fish

lose commercial value due to tumor-like nodules that have accumulated lymphocystis cells. Lymphocystis cells on the mouth interfere with feeding, and sometimes lead to starvation. The disease is thus costly to farmers. There are presently no medicines for LD or commercially available vaccines. The purpose of this study was to identify LD-resistant locus that could aid in marker-assisted breeding of LD-resistant Japanese flounder.

2. Materials and methods

2.1. Japanese flounder family

An LD-resistant line (KP-B) and an LD-susceptible line (KP-A) have been reared at Kanagawa Prefectural Fisheries Research Institute in Japan. Both lines were phenotypically selected for four generations during the past ten years. A fish affected with LD is shown in Fig.1. In 1998, a KP-B (LD-resistant) female was crossed with a KP-A (LD-susceptible) male to produce an F_1 hybrid family (KP-BA). A female of a family KP-BA that was not infected with LDV was backcrossed to the susceptible sire (KP-A) to generate a backcross family termed KP-BAA in 2000.

2.2. LD-resistance test (Phenotypic measurements)

An LD-resistance test was performed using 136 progeny of the KP-BAA backcross family. Fish were reared with UV-treated water (4×10000 μW/cm^2, UV125, Hanovia) until the infectivity trials because ordinary rearing water is contaminated with LDV. This treatment completely protected the fish against LD. The LD-resistance test was carried out from February to May in 2001, during which time the progeny of KP-BAA were exposed to LDV-contaminated water. Fish were kept in a five-ton tank with running water. Water temperature was 14°C- 20°C during this experiment. We also

tested 47 progeny of the F_1 hybrid family (KP-BA) from December 1998 to May 1999 using the same method used for the backcross family.

The phenotypes were scored as either LD (+) (fish that developed lymphocystis cells on skin, fins and/or mouth) or LD (-) (fish without lymphocystis cells on skin, fins or mouth). The KP-BAA backcross family was scored in May 2001, and the KP-BA F1 family was scored in May 1999.

2.3. Microsatellite analysis

DNA was extracted from blood tissues of the backcross progeny. Tissues were digested in 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH8.0), 100 mM EDTA, with a final concentration of 0.5% SDS and 100 μg/ml of protease K. After protein digestion, the aqueous phase was extracted twice with phenol, twice with phenol/ chloroform/ isoamyl alcohol, and once with chloroform. DNA was precipitated using ethanol; pellets were washed in 70% ethanol, dried and resuspended in TE (0.01 M Tris-HCl pH 7.4, 2.5 mM EDTA pH 8.0).

Fifty microsatellite markers were tested in a 25 μl reaction volume containing 5 pmol of unlabeled primer and 0.17 pmol of end-labeled with [γ-^{33}P]ATP using T4 polynucleotide kinase, plus 0.175 mM of each dNTP, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM

KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1% BSA, 0.25 U of *Taq* DNA polymerase and 50 ng template DNA. A specific annealing temperature was used for each microsatellite marker. The PCR program consisted of an initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 35 cycles consisting of 1 min at the annealing temperature, 1min at 72°C, 30s at 95°C, and final extension of 3min at 72°C.

The amplification products were mixed with 20 μl of loading buffer (95% formamide, 10 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue and xylene cyanol), denatured for 10 min at 95°C and quickly cooled on ice. Two microliters of each sample were loaded onto a 6% polyacrylamide gel (19:1 ratio acrylamide: bisacrylamide). After electrophoresis, gels were dried on a standard gel drier for 80 min and exposed to photo-imaging plates overnight. The imaging plates were scanned with a Bio-image Analyzer (BAS1000, Fuji Photo Films, Japan).

2.4. Genetic linkage analysis

First, we analyzed 42 individuals from the KP-BAA progeny (21 fish of LD (+)/ 21 fish of LD (-)) using 50 microsatellite markers. Those markers were selected from each linkage group of the genetic linkage map of Japanese flounder (Coimbra et al., 2003). The linkage map distances between the genotypes of KP-BAA progeny at each marker

locus and phenotypic values for LD (+) and LD (-) were calculated using Map Manager QT (Manly and Olson, 1999). In the second step, the suggestive markers ($P<0.001$) detected in the first step were typed in the KP-BAA population (n=136; 75 fish of LD (+) and 61 fish of LD (-)).

3. Results

3.1. Phenotypic variation of LD-resistance in Japanese flounder

In May 1999 and in May 2001, we confirmed that LD was present not only in the tanks holding the F_1 and Backcross progeny but also other tanks (data not shown). In the KP-BA F_1 hybrid family, 24 fish (51.1%) were LD (+) and 23 fish (48.9%) were LD (-). In the KP-BAA backcross family, 75 fish (55.2%) were LD (+) and 61 fish (44.9%) were LD (-). The phenotypic variance in both F1 and Backcross was approximately 1:1.

3.2. Genetic linkage locus for LD-resistance

Initially, 42 individuals of the KP-BAA family were analyzed at 44 loci spaced throughout the Japanese flounder genomes. The results are shown in Table 1. Among 50 microsatellite markers used, six markers were non-polymorphic regarding the maternal (KP-B) specific bands. As a result, one highly significant locus associated with LD resistance was detected (Fig. 2). The locus peak, designated as the lymphocystis disease resistant locus (LD-R), was located close to the markers *Poli.9-8TUF*, *Poli.9-35TUF*, and *Poli.121TUF* on LG 15. This QTL explained 31% of the total phenotypic variation in the 42 individuals screened (Table 1).

The linkage-group location of these loci was confirmed by screening 136

individuals from the KP-BAA family. The locus peak, designated LD-R, was identified by significant LOD scores for three markers: *Poli.9-8TUF*, *Poli.9-35TUF* and *Poli.121TUF* (Table 2). The distance between *Poli.9-8TUF* and the LD-R locus was 14.7 cM as estimated from the KP-BAA backcross family's linkage map (Fig. 3). This locus explained 50% of the total phenotypic variation in the 136 individuals screened (Table 2).

It is worth mentioning that when 42 fish were tested, the KP-B allele (showing a 147bp band for *Poli9-8TUF*) was inherited at the LD-R locus by 86.4% (19/22) of the healthy (LD-) progeny, and by 30% (6/20) of the progeny affected with LD (LD+). Also, when 136 fish were tested, the KP-B allele was inherited by 88.5% (54/61) of the healthy (LD-) progeny and by 17.3% (13/75) of the progeny affected with LD (LD+) (Table 3). The dam from KP-B that was used to produce the F1 family and the dam from KP-BA that was used to make a backcross were heterozygous at the LD-R locus (Fig. 2).

4. Discussion

Our results imply that the LD-resistance is inherited as a dominant trait that follows Mendelian inheritance. In the F_1 experiment, the number of LD (+) and LD (-) fish were 51.1% and 48.9%, respectively, and in the Backcross experiment, the numbers were 55.2% and 44.9%, respectively. The phenotypic variance in both F_1 and Backcross was about 1:1. The value of 1:1 is reasonable because both of the dams used in these experiments were heterozygous at the LD-resistant locus. The inherited allele from the LD-resistant KP-B family exhibited a dominant effect in the KP-BAA backcross progeny on LD-resistance as a heterozygote (Fig.2).

We identified one significant locus that was associated with LD-resistance in Japanese flounder. The mechanism underlying resistance can frequently be explained by the presence or absence of certain molecules in the host which are critical for infection, recognition or elimination of the pathogen. A typical example is the association between the major histocompatibility complex (MHC) and disease resistance. Thus, in the case of chickens, MHC haplotypes B21 and B19 affect susceptibility to Marek's disease virus (Hepkema et al., 1993). In Japanese flounder, a microsatellite marker designed by MHC class I cluster gene sequences was found to be unlinked to LG15 (data not shown). However, other MHC class genes are not mapped on this linkage map, and the next step

will be to determine the locations of other MHC class genes as clarifying differences in MHC haplotypes may explain LD-resistance. Within fish, NK (natural killer)-like cells are referred to as nonspecific cytotoxic cells (NCC) and are presumed to protect against viruses and tumor growth (Jaso-Friedmann et al., 2001). However, the locus associated with NK-like activity is unlinked to MHC class I and II in rainbow trout (Zimmerman et al., 2004). In Japanese flounder, some other immune response-related genes were isolated by expressed sequenced tags (EST) (Nam et al., 2003). Further study to investigate possible relationships between these immune related genes and LD-R are needed. Identification of functional genes by positional cloning is a final goal of our study because the isolated genes can be used for marker-assisted breeding, i.e., for gene-assisted selection. However, the genetic distance between the LD-R locus and the nearest DNA marker is not close enough yet for positional cloning.

Microsatellite markers offer many advantages; they show high levels of allelic variance and co-dominance which facilitates genome mapping of domesticated species. In previous studies, we have mapped 236 microsatellite loci for Japanese flounder. Completion of a high-density linkage map of Japanese flounder will be required before positional cloning of the LD-R gene can do achieved.

Acknowledgement

This study was supported by grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan (No.15380134), and from the Japanese Fisheries Agency.

References

Andersson, L., Haley, C.S., Ellegren, H., Knott, S.A., Johansson, M., Andersson, K., Andersson-Eklund, L., Edfors-Lilja, I., Fredholm, M., Hansson, I., Hakansson, J., Lundstrom, K., 1994. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. Science 263, 1771-1774.

Cnaani, A., Hallerman, E.M., Ron, M., Weller, J.I., Indelman, M., Kashi, Y., Gall, G.A.E., Hulata, G., 2003, Detection of a chromosomal region with two quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F_2 tilapia hybrid. Aquaculture 223, 117-128.

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.

Collins, F.S., 1992. Positional cloning; Let's not call it reverse anymore. Nat. Genet. 1, 3-6.

Danzmann, R.G., Jackson, T.R., Ferguson, M.M., 1999, Epistasis in allelic expression at upper temperature tolerance QTL in rainbow trout. Aquaculture 173, 45-58.

Elouafi, I., Nachit, M.M., Martin, L.M., 2001. Identification of a microsatellite on chromosome 7B showing a strong linkage with yellow pigment in durum wheat

(*Triticum turgidum* L. var. durum). Hereditas 135, 255-261.

Fishback, A.G.., Danzmann, R.G.., Ferguson. M.M., 2000. Microsatellite allelic heterogeneity among hatchery rainbow trout maturing in different seasons. J. Fish Biol. 57, 1367-1380.

Georges, M., Nielsen, D., Mackinnon, M., Mishra, A., Okimoto, R., Pasquino, A.T., Sargeant, L.S., Sorensen, A., Steele, M.R., Zhao, X., Womack, J.E., Hoeschele, I., 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. Genetics 139, 907-920.

Gilbey, J., Verspoor, E., McLay, A., Houlihan, D., 2004. A microsatellite linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*). Anim. Genet. 35, 98-105.

Hepkema, B.G.., Blankert, J.J., Albers, G.A., Tilanus, M.G., Egberts, E. van der Zijpp AJ, Hensen, E.J., 1993. Mapping of susceptibility to Marek's disease within the major histocompatibility (B) complex by refined typing of White Leghorn chickens. Anim. Genet. 24, 283-287.

Jackson, T.R., Ferguson, M.M., Danzmann, R.G.., Fishback, A.G.., Ihssen, P.E., O'connell, M., Crease, T.J., 1998. Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families. Heredity 80, 143-151.

Jaso-Friedmann, L., Leary, J.H.3[rd]., Evans, D.L., 2001. The non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1): molecular organization and signaling properties. Dev. Comp. Immunol. 25, 701-711.

Khoo, S.K., Ozaki, A., Nakamura, F., Arakawa, T., Ishimoto, S., Nickolov, R., Sakamoto, T., Akutsu, T., Mochizuki, M., Denda, I., Okamoto, N., 2004. Identification of a novel chromosomal region associated with infectious hematopoietic necrosis (IHN) resistance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fish Pathol. 39, 95-101.

Kocher, T.D., Lee, W.J., Sobolewska, H., Penman, D., McAndrew, B., 1998. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). Genetics 148, 1225-1232.

Kwon, Y.S., Eun, M.Y., Sohn, J.K., 2001. Marker-assisted selection for identification of plant regeneration ability of seed-derived calli in rice (*Oryza sativa* L.). Mol. Cells 12, 103-106.

Lawler, A.R., Ogle, J.T., Donnes, C., 1977. *Dascyllus* spp.: new hosts for lymphocystis, and a list of recent hosts. J. Wildl. Dis. 13, 307-312.

Lee, B.Y., Lee, W.J., Streelman, J.T., Carleton, K.L., Howe, A.E., Hulata, G., Slettan, A., Stern, J.E., Terai, Y., Kocher, T.D., 2005. A second-generation genetic linkage map of

tilapia (*Oreochromis* spp.). Genetics 170, 237-244.

Li, Y., Byrne, K., Miggiano, E., Whan, V., Moore, S., Keys, S., Crocos, P., Preton, N., Lehnert, S., 2003. Genetic mapping of the Kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers. Aquaculture 219, 143-156.

Liu, Z., Karsi, A., Li, P., Cao, D., Dunham, R., 2003. An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family. Genetics 165, 687-694.

Manly, K.F., Olson, J.M., 1999. Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QT. Mamm. Genome 10, 327-334.

McConnell, S.K.J., Beynon, C., Leamon, J., Skibinski, D.O.F., 2000. Microsatellite marker based genetic linkage maps of *Oreochromis aureus* and *O. niloticus* (Cichlidae): extensive linkage group segment homologies revealed. Anim. Genet. 31, 214-218.

Moen, T., Agresti, J.J., Cnaani, A., Moses, H., Famula, T.R., Hulata, G., Gall, G.A.E., May, B., 2004. A genome scan of a four-way tilapia cross supports the existence of a quantitative trait locus for cold tolerance on linkage group 23. Aquaculture Res. 35, 893-904.

Moen, T., Hoyheim, G., Munck, H., Gomes-Raya, L., 2004. A linkage map of Atlantic

salmon (*Salmo salar*) reveals an uncommonly large difference in recombination rate between the sexes. Anim. Genet. 35, 81-92.

Moore, S.S., Whan, V., Davis, G.P., Byrne, K., Hetzel, D.J.S., Preston, N., 1999. The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Aquaculture 173, 19-32.

Muroga, K., Egusa, S., 1996. Introduction to Fish Diseases. Koseisha-Koseikaku, Tokyo, 177pp.

Nakamura, K., Ozaki, A., Akutsu, T., Iwai, K., Sakamoto, T., Yoshizaki, G., Okamoto, N., 2001. Genetic mapping of dominant albino locus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mol. Gent. Genomics 265, 687-693.

Nam, B.H., Hirono, I., Aoki, T., 2003. Bulk isolation of immune response-related genes by expressed sequenced tags of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* leucocytes stimulated with Con A/PMA. Fish Shellfish Immunol. 14, 467-476.

Nichols, K. M., Bartholomew, J., Thorgaard G. H., 2003. Mapping multiple loci associated with *Ceratomyxa shasta* resistance in *Oncorhynchus mykiss.* Dis. Aquat. Org. 56, 145-154.

Nichols, K.M., Young, W.P., Danzmann, R.G., Robison, B.D., Rexroad, C., Noakes, M., Phillips, R.B., Bentzen, P., Spies, I., Kundsen, K., Allendorf, F.W., Cunningham,

B.M., Brunell, J., Zhang, H., Ristow, S., Drew, R., Brown, K.H., Wheeler, P.A., Thorgaard, G.H., 2003. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Anim. Genet. 34, 102-115.

Nigrelli, R.F., Ruggieri, G.D., 1965. Studies on virus disease of fishes. Spontaneous and experimentally induced cellular hypertrophy (lymphocystis disease) in fishes of the New York Aquarium, with a report of new cases and an annotated bibliography (1874-1965). Zoologica 50, 83-96.

Ohara, E., Nishimura, T., Nagakura, Y., Sakamoto, T., Mushiake, K., Okamoto, N., 2005. Genetics linkage map of two yellowtails (*Seriola quinqueradiata* and *S. lalandi*). Aquaculture 244, 41-48.

Ozaki, A., Sakamoto, T., Khoo, S.K., Nakamura, K., Coimbra, M.R.M., Akutsu, T., Okamoto, N., 2001. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mol. Genet. Genomics 265, 23-31.

Perry, G.M., Danzmann, R.G., Ferguson, M.M., Gibson, J.P., 2001, Quantitative trait loci for upper thermal tolerance in outbred strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Heredity 86, 333-341.

Robison, B.D., Wheeler, P.A., Sundin, K., Sikka, P., Thorgaard, G.H., 2001, Composite

interval mapping reveals a major locus influencing embryonic development rate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Heredity 92, 16-22.

Sakamoto, T., Danzmann, R.G., Okamoto, N., Ferguson, M.M., Ihssen, P.E., 1999. Linkage analysis of quantitative trait loci associated with spawning time in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 173, 33-43.

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., 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.

Somorjai, I.M.L., Danzmann, R.G., Ferguson, M.M., 2003, Distribution of temperature tolerance quantitative trait loci in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and inferred homologies in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*). Genetics 165, 1443-56.

Sun, X., Liang, L., 2004. A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio L.*) and mapping of a locus associated with cold tolerance. Aquaculture 238, 165-172.

Venizelos. A., Benetti, D.D., 1999. Pigment abnormalities in flatfish. Aquaculture 176, 181-188.

Waldbieser, G.C., Bosworth, B.G., Nonneman, D.J., Wholters, W.R., 2001. A microsatellite-based genetics linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus*.

Genetics 158, 727-734.

Wilson, K., Li, Y., Whan, V., Lehnert, S., Byrne, K., Moore, S., Pongsomboon, S., Tassanakajon, A., Rosenberg, G., Ballment, E., Fayazi, Z., Swan, J., Kenway, M., Benzie, J., 2002. Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture 204, 297-309.

Zimmerman, A.M., Evenhuis, J.P., Thorgaard, G.H., Ristow, S.S., 2004. A single major chromosomal region controls natural killer cell-like activity in rainbow trout. Immunogenetics 55, 825-35.

Fig. 1. Affected fish showing tumor-like nodules that have accumulated lymphocystis cells.

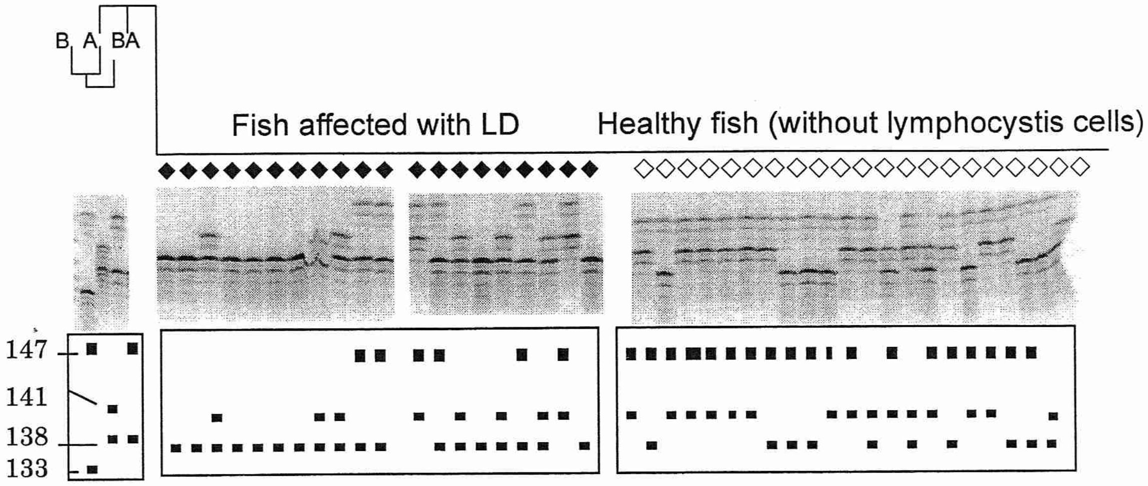


Fig. 2. Autoradiograph of one marker (*Poli.9-8TUF*) associated with LD-resistance on LG15. The upper band (147 bp) from B (KP-B, a resistant strain) was confirmed to be responsible for LD-resistance.

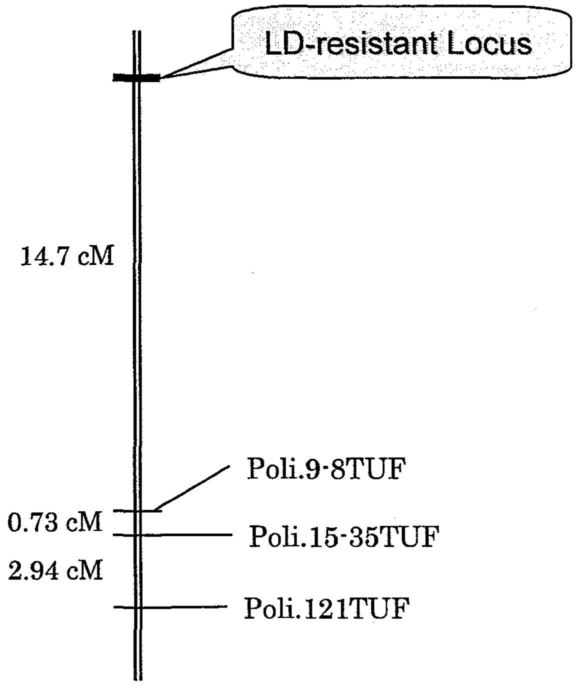


Fig. 3. Linkage map on LG15 in the KP-BAA backcross progeny.

Table 1. Linkage data for LD-resistant locus in the KP-BAA backcross family

LG[a]	Marker locus	DDBJ accession No.	LOD score	Contribution (%)[b]	*P*
1	*Poli.6TUF*	AB037979	0.17	0	0.38
	Poli.9-22TUF	AB086477,AB086478	0.04	0	0.66
	Poli.9-67TUF	AB086447,AB086448	0.00	0	0.98
2	*Poli.23TUF*	AB037985	0.04	0	0.69
3	*Poli.13TUF*	AB037982	0.20	0	0.33
	Poli.138TUF	AB086531,AB086532	0.30	1	0.24
4	*Poli.128TUF*	AB086519,AB086520	0.59	4	0.10
	Poli.148TUF	AB086551,AB086552	0.09	0	0.51
	Poli-RC35-TUF	AB032370	0.02	0	0.79
	Poli.156TUF	AB086563,AB086564	0.02	0	0.75
5	*Poli.9TUF*	AB037980	0.17	0	0.37
	Poli.151TUF	AB086557,AB086558	0.00	0	0.83
6	*Poli.190TUF*	AB086603,AB086604	0.35	1	0.21
7	*Poli.18-55TUF*	AB086489,AB086490	0.54	3	0.12
	Poli.117TUF	AB037992	0.52	3	0.12
8	*Poli.202TUF*	AB086617,AB086618	0.17	0	0.37
	Poli.136TUF	AB086529,AB086530	0.17	0	0.37
9	*Poli.182TUF*	AB086595,AB086596	0.39	2	0.18
	Poli.129TUF	AB086521,AB086522	0.39	2	0.18
	Poli.163TUF	AB086571,AB086572	0.22	0	0.32
10	*Poli.144TUF*	AB086543,AB086544	1.04	9	0.03
11	*Poli.176TUF*	AB086587,AB086588	0.17	0	0.37
12	*Poli.179TUF*	AB218007,AB218008	0.11	0	0.49
	Poli.149TUF	AB086553,AB086554	0.09	0	0.51
	Poli.1TUF	AB037977	0.17	0	0.36
13	*Poli.175TUF*	AB086585,AB086586	0.17	0	0.38
	Poli.145TUF	AB086545,AB086546	0.17	0	0.36
14	*Poli-RC47-TUF*	AB030938	0.07	0	0.58
	Poli.141TUF	AB086537,AB086538	0.07	0	0.58
15	*Poli.9-8TUF*	AB037989	3.64	31	**4.30×10^{-5}**
	Poli-RC15-35TUF	AB086451,AB086452	3.64	31	**4.30×10^{-5}**
	Poli.121TUF	AB037993	3.64	31	**4.30×10^{-5}**

16	*Poli.199TUF*	AB086613,AB086614	0.00	0	1.00
17	*Poli.9-38TUF*	AB086479,AB086480	0.09	0	0.54
19	*Poli.108TUF*	AB086501,AB086502	0.52	3	0.12
20	*Poli.123TUF*	AB037994	0.00	0	0.98
21	*Poli.113TUF*	AB086509,AB086510	0.11	0	0.49
22	*Poli.2TUF*	AB037978	0.09	0	0.51
23	*Poli.174TUF*	AB086583,AB086584	0.02	0	0.77
24	*Poli.139TUF*	AB086533,AB086534	0.09	0	0.54
26	*Poli.150TUF*	AB086555,AB086556	0.17	0	0.37
	Poli.122TUF	AB086513,AB086514	0.17	0	0.37
27	*Poli.124TUF*	AB086515,AB086516	0.69	5	0.07
28	*Poli.146TUF*	AB086547,AB086548	0.04	0	0.69

The data were obtained using phenotypic measurements and the Map Manager QT Backcross statistic (42 informative progeny).

[a] LG, linkage group.

[b] Percentage of the total trait variance that would be explained by a locus at this locus.

Table 2. Single-locus associations for putative locus for LD-resistance

Number of progeny	Marker locus	LOD score	Contribution (%)[a]	*P*
42(20 LD+ / 22 LD-)	*Poli.9-8TUF*	3.64	31	4.3×10^{-5}
	Poli.15-35TUF	3.64	31	4.3×10^{-5}
	Poli.121TUF	3.64	31	4.3×10^{-5}
136(75 LD+ / 61 LD-)	*Poli.9-8TUF*	20.54	50	2.2×10^{-22}
	Poli.15-35TUF	19.24	48	4.6×10^{-21}
	Poli.121TUF	15.27	40	4.8×10^{-17}

The data were obtained using phenotypic measurement and the Map Manager QT Backcross Statistic.

[a] Percentage of the total trait variance that would be explained by a locus at this locus.

Table 3. Phenotypes and genotypes of the KP-BAA progeny at putative locus for LD

Number of progeny	Marker locus (LG15)	Phenotypes / Genotypes	
		LD− 147bp-inherited : 147bp-not inherited	LD+ 147bp-inherited : 147bp-not inherited
42(20 LD+ / 22 LD-)	*Poli.9-8TUF*	19:3	6:14
	Poli.15-35TUF	19:3	6:14
	Poli.121TUF	19:3	6:14
136(75 LD+ / 61 LD-)	*Poli.9-8TUF*	54:7	13:62
	Poli.15-35TUF	53:8	13:62
	Poli.121TUF	52:9	16:59

付記

ヒラメ遺伝子の相同染色体組換えの特徴と分子育種への応用

本章、第1節及び第2節では、DNAマーカーを用いた有用経済形質関連遺伝子座の推定を行った。その結果、主要な白化関連遺伝子座（PA-1, PA-2）をLG5とLG24上に、また、リンホシスチス病抵抗性遺伝子座（LD-R）をLG15上に見出した。これらの遺伝子座は全て、連鎖群上でセントロメアから遠い側に位置した（Fig. 1)。ここでは、この結果を分子育種に応用するための戦略を補足する。

ヒラメでは、全ての連鎖群において、雌では、セントロメアに近い側で減数分裂時の染色体組換えを起こしやすく、セントロメアから遠い側で組換えを起こしにくいという特徴があることがわかっている。逆に雄では、セントロメアに近い側で組換えをおこしにくく、セントロメアから遠い領域では組換えを起こしやすいという特徴があることがわかっている（Fig. 2; Fuji *et. al.* 2003)。組換えを起こしにくいということは、配偶子がつくられる際に、DNAマーカー座とDNAマーカー座同士、またはDNAマーカー座とゲノムDNAの機能単位であるシストロンの遺伝子座同士の連鎖関係が崩れにくい、ということを意味している。逆に組換えを起こしやすいということは、配偶子がつくられる際に、DNAマーカー座とDNAマーカー座同士、またはDNAマーカー座とシストロンの遺伝子座同士の連鎖関係が崩れやすい、ということを意味している。

DNAマーカーを用いた選抜育種は、DNAマーカーを用いた連鎖解析によって有用経済形質を支配する遺伝子座（原因遺伝子座）を推定し、原因遺伝子座と連鎖するDNAマーカーを遺伝指標として、親魚選抜や交雑による育種を行うものである。言い換えれば、有用経済形質を支配する遺伝子座の情報とそれと連鎖するDNAマーカーの遺伝情報（アレル情報）に置き換えて、そのアレル情報をもとに選抜する。したがって、原因遺伝子座とDNAマーカー座間で組換えが起きると、目で見ているマーカー座で正しく選抜できても、実際の遺伝子座は伴っていない、という状況が生じる。つまり、組換え率が高いほど、選抜効率が悪くなる。しかし、逆に、組換え率が低ければ、目で見えるマーカー座で、実際の遺伝子座を正しく導くことが出来、育種効果が高くなる。すなわち、このヒラメの性に

よる組換え領域の差を利用すれば、マーカー選抜育種に高い効果が期待できる、と言える。支配する遺伝子座が、雌で組換えが起こりにくい領域にある形質に関しては、雌の組換え特性を利用することで、実際の遺伝子座とマーカー座間の組換えを最小限に抑えることができる。逆に支配する遺伝子座が雄で組換えが起こりにくい領域にある形質に関しては雄の組換え特性を利用することで、実際の遺伝子座とマーカー座間の組換えを最小限に抑えることができる。本研究で特定された 3 つの遺伝子座は全てセントロメアから遠い側に位置していた。この領域は雄に比べ雌では組換えが起こりにくい。そこで、その遺伝子座を持つ（LD 抵抗性遺伝子座など、付加したい形質に関与する遺伝子座の場合)、あるいは持たない（白化関連遺伝子座など、取り除きたい形質に関与する遺伝子座の場合）雌を、DNA マーカーを用いて選び、その雌を次世代の育種に用いることで、育種効果が格段にあがると考えられる。この考えを応用して、第 2 章ではマーカーアシスト浸透交雑によるリンホシスチス病抵抗性系統の作出を試みた。

文献

Fuji, K., Kobayashi, K., Okamoto, N., Mizuta, A., Hasegawa, O., Coimbra, M. R. M., Sakamoto, T. 2003. Sex specific differences in recombination on chromosomal region in Japanese flounder. International Conference of Genetics In Aquaculture Ⅷ, Chili.

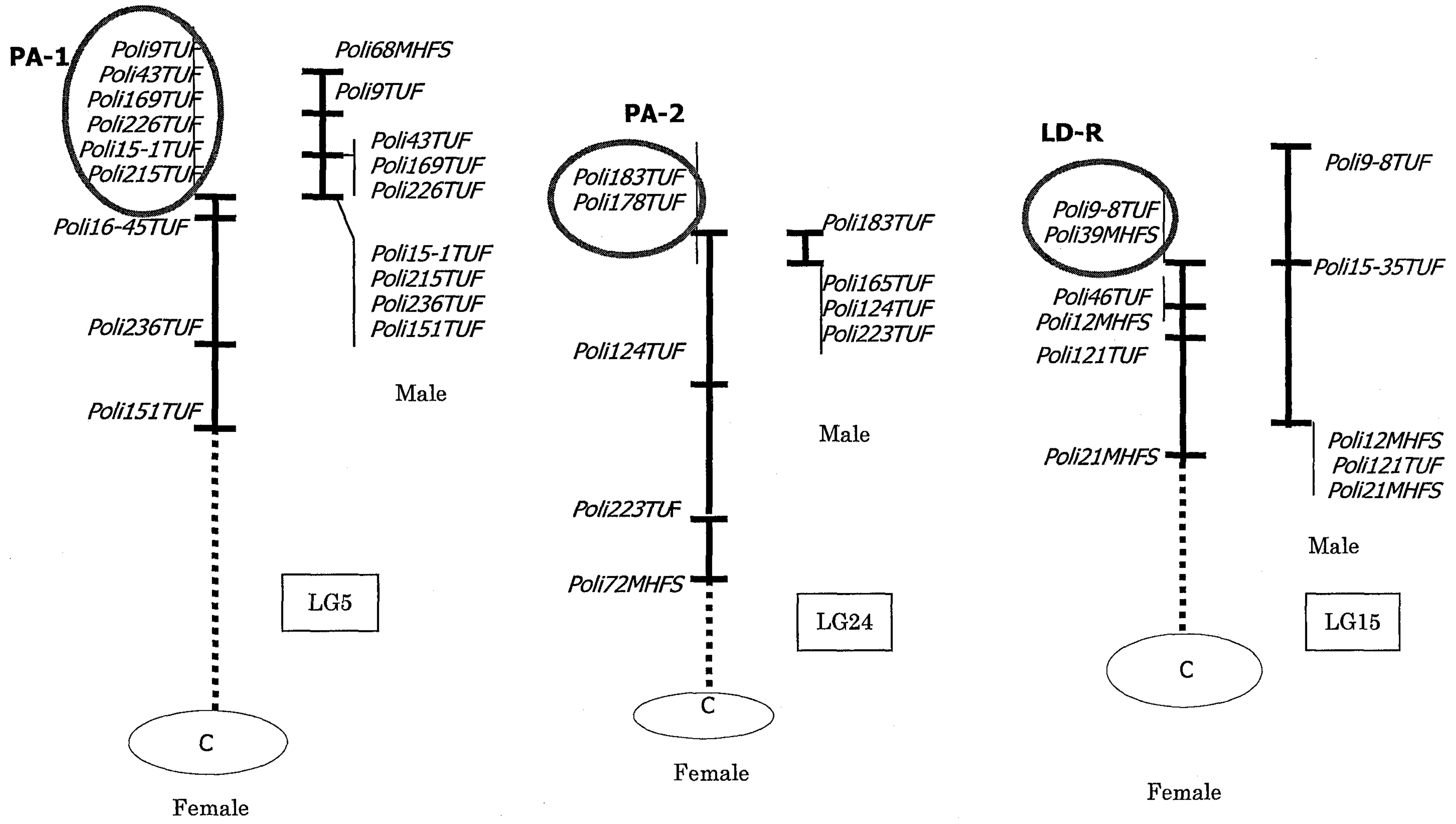


Fig. 1. Genetic linkage map (LG5, LG24, LG15) constructed from F1 hybrid, A2 family. Bold ellipses indicate the approximate position of PA-1, PA2, and LD-R, which are responsible for economically important traits link to pseudo albinism and to lymphocystis disease resistance.

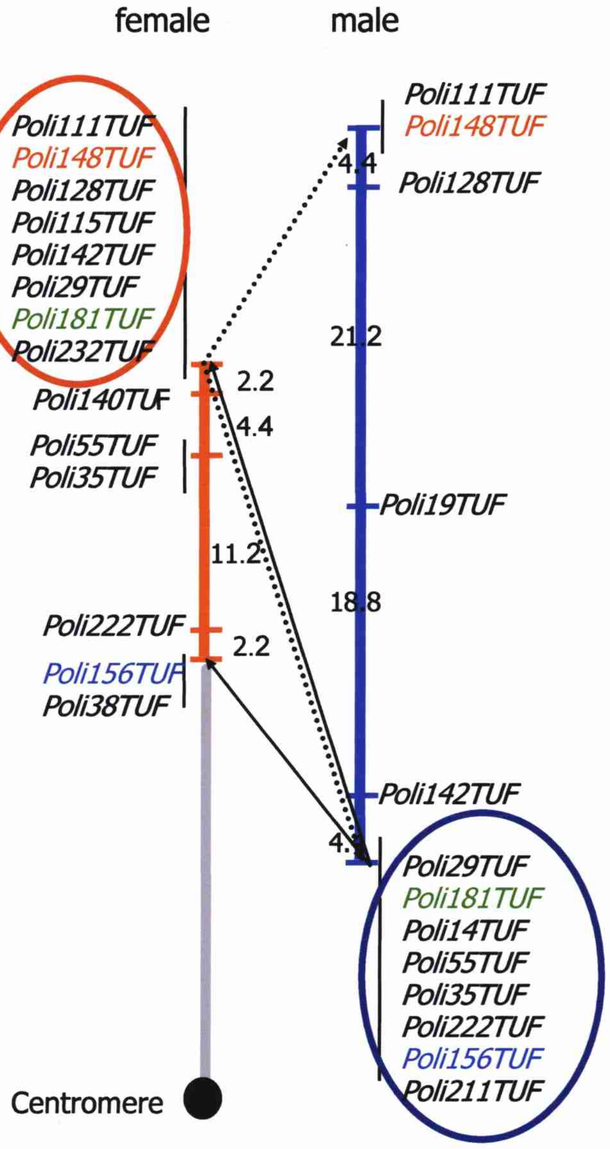


Fig. 2. Genetic linkage map (LG4) constructed from F1 hybrid, A2 family.

第2章

マーカーアシスト浸透交雑によるヒラメリンホシスチス病抵抗性系統の作出

1. はじめに

病気に対する抵抗性は、体型のように外観から容易に判断できる形質とは異なり、その表現型を外観から判断することが難しい。そのために、育種目標としては、最も優先度が高いものの一つとされているにもかかわらず、家畜・家禽においても抗病性育種を目指した研究は多数あるが、育種に成功した例は著者の知る限りない。

そこで、DNA マーカーを用いた分子育種の手法を用いた抗病性系統の確立を目指し、本章では、第 1 章の連鎖解析で得られたリンホシスチス病（LD）抵抗性遺伝子座と連鎖する MS マーカーを用いたマーカーアシスト浸透交雑（Marker assisted gene introgression; MAI）による LD 抵抗性系統の作出を試みた。

2. 材料及び方法

2-1 マーカーアシスト浸透交雑（MAI）によるリンホシスチス病（LD）抵抗性を有する新しい系統の作出

神奈川県水産技術センターにおいて継代飼育されてきた親魚候補から、第 1 章の結果に基づき、リンホシスチス病抵抗性（LD-R）遺伝子座と連鎖する MS マーカー(Poli9-8TUF)を用い、LD-R を有すると推定した、つまり、KP-B 系統の 147bp のサイズのアレルを有する雌を選抜し、これを雌親魚とした。2004 年 4 月に、商品として高い評価を得ている民間種苗生産会社の種苗生産用雄親魚にこの雌親魚を交配し、LD-R を有する新たな商品を目指した系統（LD-R ヒラメ）の作出を行った（MAI）(Fig. 1-a, b)。LD-R ヒラメの作出、及び平均体長 6cm までの飼育は民間種苗生産会社にて行った。同時期に、同種苗生産会社の種苗生産用親魚を用いて市販用ヒラメを作出した（対照ヒラメ；LD-R を有さない）。

2-2 飼育試験

2004 年 7 月、作出した LD-R ヒラメの中から 26250 尾を三重県内の A 養魚場に、平均体長 6cm で出荷した。更に、2004 年 8 月、対照ヒラメの中の 22000 尾を A 養魚場に、平均体長 6cm で出荷し、LD-R ヒラメと対照ヒラメの飼育試験を行った。両区は隣り合う飼育槽に収容し、A 養魚場の飼育方法に従って飼育した。

3. 結果

LD-R ヒラメは、成長・色彩ともに対照ヒラメと遜色なく、LD 抵抗性に優れていた。対照ヒラメで 4.5%の LD 発症個体が確認されたが、LDR ヒラメでの発症率は 0%であった (P=6.0 × 10^{-267}; χ^2 test) (Table 1)。

4. 考察

DNA マーカーを用いた選抜育種による本試験は、ヒラメ育種における初の試みである。本試験では特に、両者の LD 抵抗性と養殖特性に着目した。

LD 抵抗性に関して、LD-R ヒラメは 0%の発症率であり、対照ヒラメは 4.5%の発症率を示した。日本の養殖場における LD の発症率は、年・場所毎に大きく変化し、前年に高い発症率が確認された養殖場において、翌年、全く発症が見られないことがある。A 養殖場においても、これまでに、その傾向が確認されている。本試験期間中の、A 養殖場における LD の発症は、例年に比べて非常に少なく、本試験での対照ヒラメの LD 発症率は 4.5%にとどまり、A 養魚場のその他の集団においても同様の低い発症率にとどまった。しかし、低い割合であっても、対照ヒラメ、その他の飼育群に確実に発症が確認されたのに対し、LD-R ヒラメは 0%の発症率であった。この結果は、LD-R ヒラメの有用性を示すのに充分なものであったと考える。

養殖特性に関して、LD-R ヒラメは、成長・色彩ともに対照ヒラメと遜色なかった。しかし、ハンドリング時の対応、体型、色などにおける、養殖業者による段階評価は最高レベルに至っていない (Fig. 2)。

今後、商品化するにあたり、改善課題は残されているが、本試験で LD 抵抗性に大きな差が見られたことは、MAI の有効性を示すものであり、今後の水産育種の新しい方向性を示し、その成果を確証するものであったと考える。

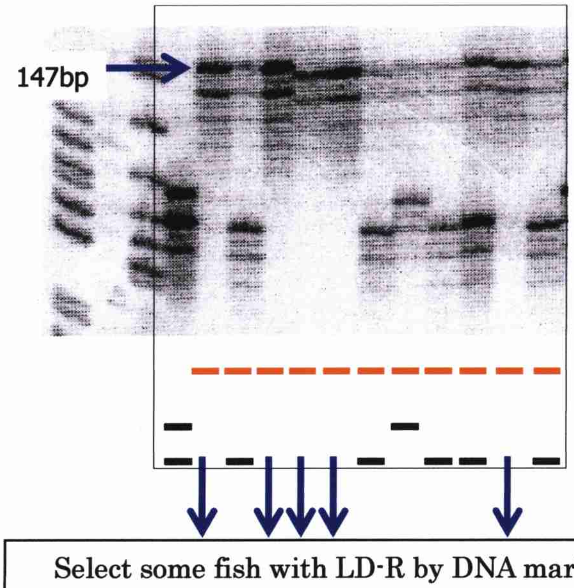
なお、本種苗 (LD-R ヒラメと対照ヒラメ) は、2004 年 11 月に宮城県内の B 養殖場に LD-R ヒラメ 5250 尾と対照ヒラメ 10300 尾、2005 年 8 月に三重県内の C 養殖場に LD-R ヒラメ 3500 尾と対照ヒラメ 1800 尾収容し、LD の発症を比較したが、今までのところ、両養魚場とも、どちらのヒラメにも LD の発症が認められていないことを付記する。

Table 1. The results of the field test for LD resistance of Japanese flounder produced by marker assisted gene introgression

A-fish farm	Genetic (allele) information (Poli.9-8TUF on *LG*15)			Number of LD fish (Cumulative mortality)	Total number of tested fish	Rearing period (fish size)
	Parents		Progeny			
	Male	Female				
LD-Resistant	--	++	+-	0* (0%)	26250	2004.7-2005.11 (7cm-30cm)
LD-Susceptible	--	--	--	1000*[a] (4.5%)	22000	

(*P=6.0 × 10^{-267}; $\chi 2$ test)

[a]; At least, 1000 fish were counted.



Select some fish with LD-R by DNA marker

Select a female

Breed with a male, which was bred at a commercial company (without LD-R)

Fig.1-a. How to make LD-R strain.

Fig.1-b. Fish of LD-R strain.

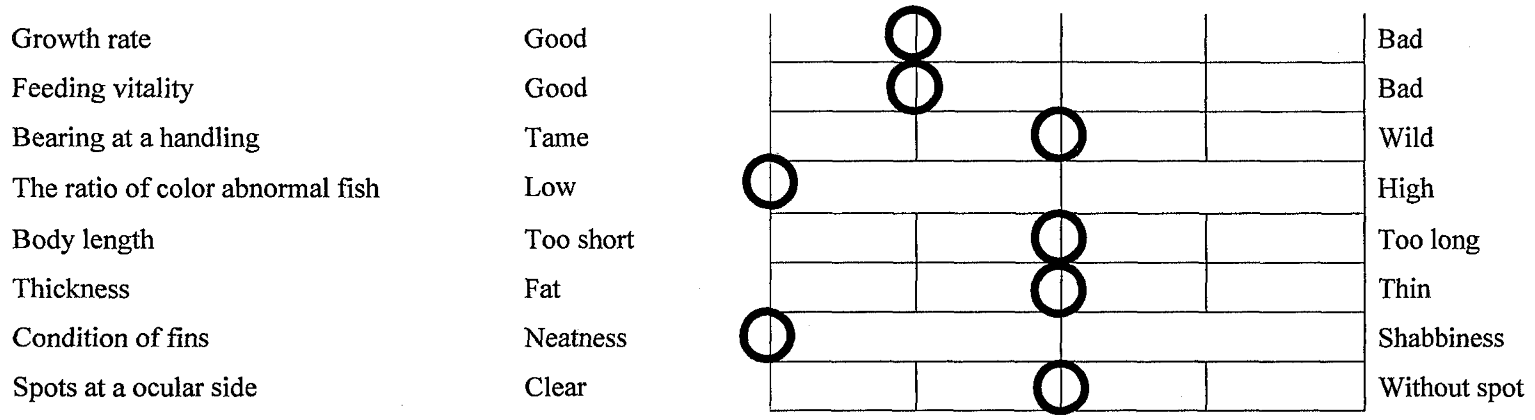


Fig. 2. Estimation of LD-R strain compared with usual commercial flounder at the A-fish farm.

第３章

DNA マーカーの汎用化を目指したアクア DNA ブックの開発

DNA マーカーの開発は、遺伝学的調査研究を大きく進展させた。特に、DNA マーカーを用いた遺伝子連鎖地図（以下、連鎖地図と呼称する）とそれを利用した連鎖解析（QTL 解析等）は、動・植物に求められてきた経済形質に関与する遺伝子座の連鎖地図上での位置決めを可能にし、有用遺伝子の単離、及び有用遺伝子を持つ品種の確立などに大きく貢献してきた。更に、DNA マーカーの中でもマイクロサテライト(MS)マーカーは、様々な生物のゲノム全体に広く散在していること及び多型性に富んでいることから、個体識別、親子判別、系統維持、集団解析、系群判別、経済形質の連鎖解析やマーカー選抜育種、未知遺伝子の単離など遺伝子解析にも広く用いられ、あらゆる遺伝学的調査研究に適しているとされる。これまで魚類において MS マーカーを用いた連鎖地図の作製は数種において報告されている（Table 1）。しかし、これらの情報は、公開・非公開にかかわらず整理されていないのが実情である。また、MS マーカーの使用では、データーベース上に公開された MS マーカー情報を基に、研究者が自分の研究目的にあったマーカーを選び出し、合成を委託する、という手順を取るのが一般的であり、初心者にとっては必ずしも取り付きやすいものではない。そこで、DNA マーカーの汎用化を目指し、MS マーカーの情報だけではなく、MS マーカーを紙にプリントし、一冊の本として常温保存出来るシステムとして、アクア DNA ブックの開発を試みた。

DNA ブックの基本概念は理化学研究所によって開発されたもので、アクア DNA ブックはこの概念を用いてオリゴプライマーを紙にプリントしたところに特徴がある。本ブックは MS マーカーの情報を一覧できるという点、また本ブックに掲載したヒラメの MS マーカーが、遺伝子連鎖地図上にマップされている、すなわち、ゲノム上の位置が確定されているため、ゲノム上の位置情報がない MS マーカーに比べ格段に質の高い情報を提供できるという点において、実験設計を容易化するばかりでなく、プリントされた MS マーカーは提供履歴を同じくするので、得られたデーターの共有化にもつながり、汎用性の高いものである。更に、本ブックには試みとして魚病診断用プライマーも掲載され

ているが、将来的には、多くの魚種で開発されDNAマーカーを掲載したDNAブックや、国内未侵入の魚病診断用プライマーを網羅したDNAブックなどへの応用が可能である。

文献

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.

Gilbey, J., Verspoor, E., McLay, A., Houlihan, D., 2004, A microsatellite linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Animal Genetics* 35, 98-105.

Kocher, T.D., Lee, W.J., Sobolewska, H., Penman, D., McAndrew, B., 1998, A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). Genetics 148, 1225-1232.

Li, Y., Byrne, K., Miggiano, E., Whan, V., Moore, S., Keys, S., Crocos, P., Preton, N., Lehnert, S., 2003, Genetic mapping of the Kuruma prawn *Penaeus japonicus* using AFLP markers. Aquaculture, 219, 143-156.

Liu, Z., Karsi, A., Li, P., Cao, D., Dunham, R., 2003, An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family. Genetics 165, 687-694.

May, B., Johnson, K.R., 1990, In: O'Brien SJ (eds) *Composite linkage map of salmonid fishes, Genetic Maps, 5th ed. Cold* Spring Harbor Press. New York, 4; 151-159.

McConnell, S.K.J., Beynon, C., Leamon, J., Skibinski, D.O.F., 2000, Microsatellite marker based genetic linkage maps of *Oreochromis aureus* and *O. niloticus* (Cichlidae): extensive linkage group segment homologies revealed. Animal Genetics, 31, 214-218.

Moen, T., Hoyheim, G., Munck, H., Gomes-Raya, L., 2004, A linkage map of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals an uncommonly large difference in recombination rate

between the sexes. *Animal Genetics* 35, 81-92.

Moore, S.S., Whan, V., Davis, G.P., Byrne, K., Hetzel, D.J.S., Preston, N., 1999, The development and application of genetic markers for the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Aquaculture, 173, 19-32.

Nichols, K.M., Young, W.P., Danzmann, R.G., Robison, B.D., Rexroad, C., Noakes, M., Phillips, R.B., Bentzen, P., Spies, I., Kundsen, K., Allendorf, F.W., Cunningham, B.M., Brunell, J., Zhang, H., Ristow, S., Drew, R., Brown, K.H., Wheeler, P.A., Thorgaard, G.H., 2003, A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Animal Genetics 34, 102-115.

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

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., 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.

Sun, X., Liang, L., 2004, A genetic linkage map of common carp *(Cyprinus carpio L.)* and mapping of a locus associated with cold tolerance. Aquaculture 238, 165-172.

Waldbieser, G.C., Bosworth, B.G., Nonneman, D.J., Wolters, W.R., 2001, A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Genetics 158, 727-734.

Wilson, K., Li, Y., Whan, V., Lehnert, S., Byrne, K., Moore, S., Pongsomboon, S., Tassanakajon, A., Rosenberg, G., Ballment, E., Fayazi, Z., Swan, J., Kenway, M., Benzie, J., 2002, Genetic mapping of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*.

Aquaculture 204, 297-309.

Young, W.P., Wheeller, P.A., Coryell, V.H., Keim, P., Thorgaard, G.H., 1998, A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. *Genetics* 148, 839-850.

Table 1. Genetics linkage map for aquaculture fishes

Fish and shellfish	Kinds of molecular markers	Total number of markers	References
Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)	Allozyme	54	May and Johnson.(1990)
	AFLP	475	Young *et al.(*1998)
	Microsatellite	208	Sakamoto *et al.* (2000)
	AFLP, Microsatellite, VNTR, SINE, Structure gene	1359	Nichols *et al.* (2003)
Atlantic salmon (*Salmo salar*)	AFLP, Microsatelllite	527	Moen *et al.* (2004)
	Microsatellite	64	Gilbey *et al.* (2004)
Amago salmon (*Oncorhynchus masou ishikawae*)	Microsatellite	123	Nagase (Unpublished)
Channel catfish (*Ictalurus punctatus*)	Microsatellite, EST, Structure gene	293	Waldbieser *et al.* (2001)
	AFLP	418	Liu *et al.* (2003)
Thilapia (*Oreochromis niloticus*)	AFLP, Microsatellite	162	Kocher *et al.* (1998)
(*Oreochromis aureus*)	Microsatellite	28	McConnell *et al.* (2000)
Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)	AFLP, Microsatellite	463	Coimbra *et al.* (2003)
Kuruma prawn (*Penaeus japonicus*)	AFLP	129	Moore *et al.* (1999)
	AFLP	251	Li *et al.* (2003)
Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)	AFLP	116	Wilson *et al.* (2002)
Common carp (*Cyprinus carpio L.*)	Microsatellite, RAPD	268	Sun and Liang (2004)
Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), Gold-striped amberjack (*Seriola lalandi*)	Microsatellite	200	Ohara *et al.* (2005)

A new method for DNA primers distribution: AQUA DNABook

Kanako Fuji[a], Nobuaki Okamoto[a], Osamu Hasegawa[b], Jun Kawai[c], Yoshihide Hayashizaki[c]

[a]Department of Marine Biosciences, Tokyo University of Marine Science and Technology, Konan 4-5-7, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan

[b]Kanagawa Prefectural Fisheries Technology Center, Jyogashima, Misaki-cho, Miura-shi, Kanagawa 238-0237, Japan

[c]RIKEN Genomic Sciences Center (GSC), RIKEN Yokohama Institute, Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

Corresponding author.

Nobuaki Okamoto

Tel.: +81-3-5463-0547; fax: +81-3-5463-0552.

E-mail address: nokamoto@s.kaiyodai.ac.jp

Abstract

We propose a new method of primers distribution. Primers are printed directly onto the page of books and delivered to users along with relevant information. Primers are spotted onto water-soluble paper, and readers can easily use the primers from the sheet and amplify them directly using PCR. DNA sheets can withstand various conditions that may be experienced during bookbinding and delivery such as high temperature and humidity. A book designated as "AQUA DNABook" is the first trial for printing DNA primers on sheets. This book contains 218 primers for microsatellites on a Japanese flounder linkage map and 24 primers for disease diagnosis. This edition was distributed to selected institutions in Japan for research use. We are planning to publish the second edition of Aqua DNABook for worldwide use.

1. Introduction

The idea for the DNABook^{TM} came into when it was thinking about plans for RIKEN mouse genome encyclopedia project. The RIKEN mouse genome encyclopedia project aimed at collating the entire set of mouse full-length cDNAs, and RIKEN started thinking about the problems associated with storing the numerous clones as the project proceeded. Basically, the idea of the DNABook^{TM} was originated from superimposed images of a computer hard disk and hard copy printed matter. The DNABook^{TM} of RIKEN MOUSE GENOME ENCYCLOPEDIA and RIKEN HUMAN cDNA ENCYCLOPEDIA (Kawai et al 2003, Hayashizaki et al 2004) was published for this conception. We believe that the idea of the DNABook^{TM} is also useful for researchers in fisheries field.

In the last few years molecular biological methods became important tools for investigations in a fisheries field. Above all, PCR is valuable tools for detecting various levels of genetic polymorphism, e.g. genetic diversity in population analysis, breeding programs by identifying loci influencing quantitative traits and diagnosis of diseases. The DNABook^{TM} support researchers working in such fields, because it is the portable and paper product DNA bank and can keep on their desks, not in a freezer.

The AQUA DNABook is the first trial for printing not only DNA but also PCR

primers. It is constructed with two main parts. One is microsatellite markers on a genetic linkage map of Japanese flounder on the basis of Coimbra et al. (2003), and the other is primers for detecting of pathogenic microorganisms. In the part of later, the information about diseases and references are prepared. The aim of publication of this book is to conduct a field test of the AQUA DNABook^{TM}. Therefore, this book was written in Japanese and provided for selected Japanese Institutions for research use. We have a plan to publish the second edition of the AQUA DNABook for worldwide use.

2. Materials and methods

2-1 Microsatellite markers of Japanese flounder

Two hundred eighteen primers for microsatellites in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, were isolated and identified from a partial genomic library enriched for CA repeat following the protocol described by Coimbra *et al.* (2003). Positive controls used for effectiveness of the primers were genomic DNA extracted from the blood of Japanese flounder stocked in Kanagawa prefectural research center.

2-2 Primers for detecting pathogenic microorganisms

In this book, 19 diseases were presented (Table 1). Twenty four primers including nested PCR for pathogenic microorganisms were synthesized based on the literatures that have been already published. In bacterial diseases, DNA for the positive control was extracted from the bacteria purchased from ATCC (American Type Culture Collection). In viral and parasitic diseases, DNA or RNA for the positive control was extracted from viruses or parasites that were kindly provided from prefectural or national fisheries research centers in Japan. The amplified fragments of DNA were separated by an agarose gel electrophoresis, and cloned into a home-made T-tailed pBluescript II SK (−) vector.

2-3 DNA preparation for printing and spotting

Plasmid DNA containing target sequences of 19 pathogenic microorganisms was purified using a Qiagen Spin Miniprep Kit (Qiagen). Purified DNA was dissolved at a concentration of 20ng/μl in TE (10mM Tris-HCl at pH 8.0, 1mM EDTA). 218 primers for microsatellite sequences of Japanese flounder and 24 primers for detecting pathogenic microorganisms were chemically synthesized by Invitrogen. DNA was dissolved in TE, and DNA concentration was adjusted to 40μM. A DNA printer developed in RIKEN was used for DNA- spotting on the 120 MDP sheets (Mishima Paper Co.). 0.13μl of each DNA solution was taken by the disposable 384-pin replicator (Genetix) attached to the DNA printer and placed on the paper (each spot contains 2.6 ng plasmid DNA or 5 pmol primer DNA).

3. Results

The AQUA DNABook (40 x 30 cm, hard cover) is constructed with 7 chapters: ① General explanation of the DNABook™, ②Basic introduction of microsatellites and primers for disease diagnosis, ③Notes for use of the AQUA DNABook, ④Information concerning DNA sheets, ⑤General protocol for using the AQUA DNABook, ⑥ Detailed information of diseases, detailed protocol for using primers, and listing the references, ⑦DNA sheets spotted with primers for use. The volume of this book was 50 pages for instructions plus 36 sheets for microsatellites and 10 sheets for disease diagnosis, and one extra of genetic linkage map of Japanese flounder.

DNA sheets spotted with primers were printed in the relevant scientific articles and/or brief information of the contents. Researchers who are interested in the enclosed primer can immediately apply primers from the sheet to their research, showing in Figure 1 and 2.

Figure 1 is a sample page of which Japanese flounder microsatellites are spotted. In this page and the next, the way to use microsatellites is shown with a protocol. PCR is performed in a 25 μl solution containing 0.75 units of KOD-Plus DNA polymerase (TOYOBO), 1× KOD-Plus buffer (TOYOBO), 2.5 mM of $MgCl_2$, 0.2 mM of dNTP, a bit of the page where area was spotted microsatellite primer pairs (about 5 pmol), 50 ng

of genomic DNA, and 0.5% bovine serum albumin. Thermal cycling is consisted of an initial denaturation at 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 1 min, 60 °C for 30 sec, 68 °C for 2 min and a final extension of 2 min at 68 °C. PCR products are electrophoresed in a 3% agarose gel. We designed PCR primers for all DNA samples as fragment size of the products shows around 100bp to 300bp. Fig. 2 indicates a sample page that primers for diagnosing diseases were spotted. A method of using this page for PCR is the same as mentioned above. PCR products are electrophoresed in a 2% agarose gel. Fragment size detected for each microorganism is shown at the page of detailed information of diseases.

Figure 3 showed the results of PCR amplification, using primers from the DNA sheet. We tested all Japanese flounder microsatellite markers spotted on DNA sheets. 86.7% of these markers were successfully amplified. Representative results from 12 of the 218 markers are shown in Fig. 3-a. And 24 disease diagnosis markers were checked for PCR, and 95.8% of these markers were successfully amplified. The results are shown in Fig. 3-b.

4. Discussion

Our results indicated that almost all primers could be applied from DNA sheets. Although we tested these primer's availability, success of PCR amplifies was not perfect. One of the reasons we speculated is to be unified a temperature of PCR steps and a concentration of PCR mixture. Improvement of these points is needed.

We have tested the tolerance of DNA sheets to temperature, high pressure, humidity, and rubbing stress, however, it is still not equivalent to the full range of situations and conditions. In order to improve this book, users' contributions to examine the practical use of DNA sheets by using DNA amplification are requested. After summarizing users' results, the data will be reported in a separate paper.

We propose that in future this technology could be used as one way of distributing physical resources to biological communities, because AQUA DNABook can offers several advantages; (1) Origo DNA (primers) is stable in printed form and this character allow bookbinding and shipment by courier. And it makes easier to stock primers in room temperature. (2) Researchers can easily use primers to PCR, cutting from a DNA sheet within a short time. (3) As both scientific information and physical primers concerning researchers' interest can be obtained simultaneously, they can start an experiment and research immediately.

Also in fisheries field, AQUA DNABook can be applied to a variety of situations. (1) Collection of microsatellite markers of different species that were reported all over the world is useful for research of population analysis and/or genetic diversity of the population. According to researchers' purpose, they can easily use microsatellite markers for their target species. (2) AQUA DNABook is useful from the viewpoint of prevention of epidemics. Researchers often get into troubles when they have to confront with unknown disease. In those cases, if diagnostic primers for all diseases that recognized in the world would be collected in a book, they can diagnose the diseases smoothly, using the book that binds both disease information and the physical primers for disease diagnosis. It must become a reliable tool.

References

Kawai, J., Hayashizaki, Y., 2003, DNA Book, Genome Res. 13, 1448-1495.

Hayashizaki, Y. and Kawai, J., 2004, A new approach to the distribution and storage of genetic resources, Nature Review Genetics, 5, 223-228

Coimbra, M.R.M., Kobayashi, K., Koretsugu S., Hasegawa O., Ohara, E., Ozaki, A., Sakamoto, S., Naruse, K., Okamoto, N., 2003, A genetic linkage map of the Japanese flounder, Paralichthys olivaceus, Aquaculture 220, 203-218.

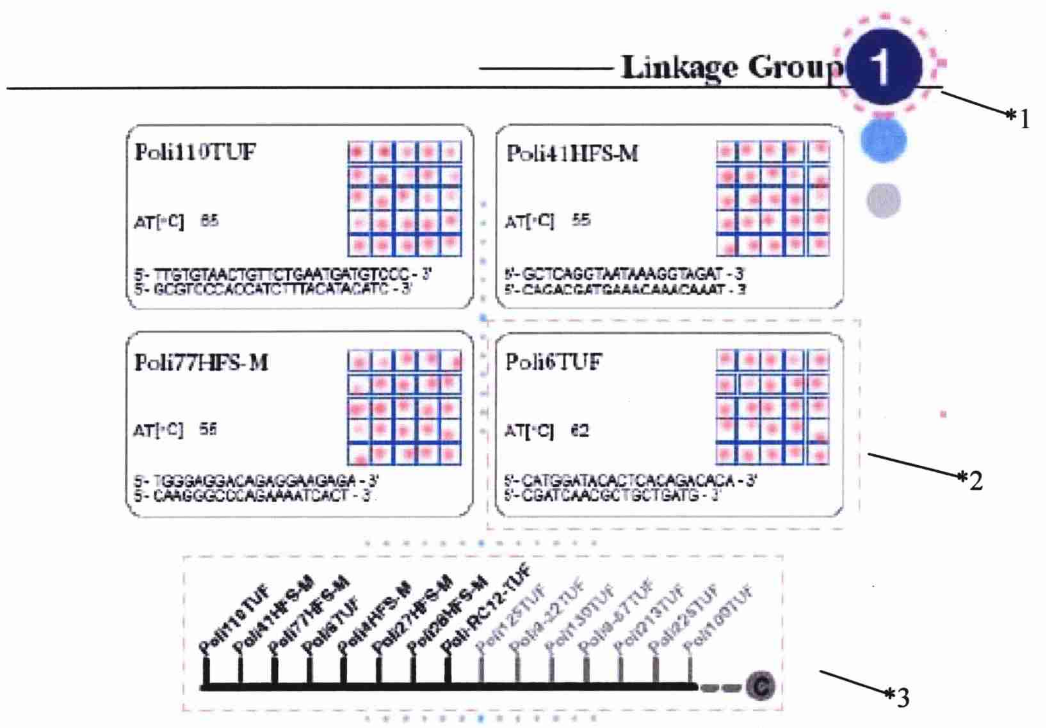


Fig. 1. A sample page of Japanese flounder microsatellite markers. Half of the markers in a page are shown in this figure. Chromosomal location of the printed markers can be known by a genetic linkage map shown in the figure. Researchers can test one primer pair for 25 times. Primer's information is also printed. Detailed information of the primers including a PCR-protocol is shown in a different section.

*1: Group number of a genetic linkage map of Japanese flounder (Coimbra et al., 2003)

*2: In one box, information of the primer is printed and physical primers for 25 times-use are spotted.

*3: A part of the genetic linkage map. C shows a position of centromere and the markers plotted in this page are shown by bold letters.

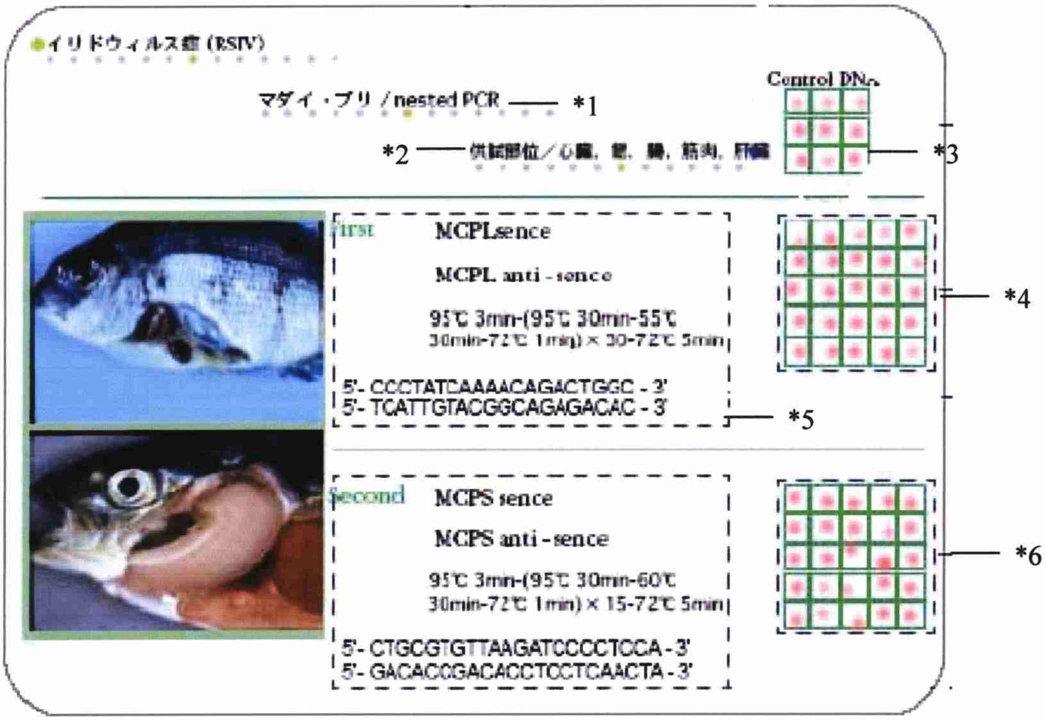


Fig. 2. A sample page of diagnostic primers. Two diseases are appeared in a page. This is a half of the contents. Researchers can test one disease for 25 times. Nine of the positive control DNA are also spotted. Information about diseases, fish species susceptible, tissues or organs that should be tested are printed and physical primers for diagnosis are plotted. Detailed information about diseases and PCR-protocols are bound in a reference section.

*1: Name of fish species susceptible to the pathogens.

*2: Main tissues or organs that should be tested for diagnosis.

*3: Positive control DNA.

*4: Diagnostic primers.

*5: Information of the primers.

*6: The second primers (when nested PCR is needed, we can use these primers).

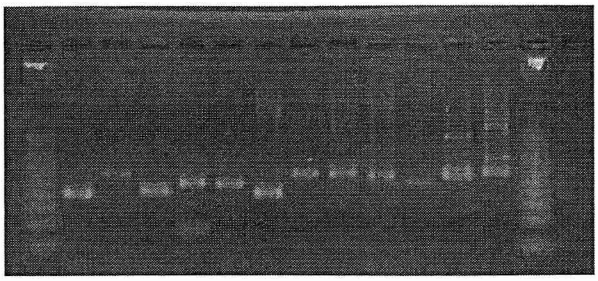


Fig. 3(a)

Fig. 3(b)

Results of PCR amplification.

(a) Microsatellite markers of Japanese flounders. Amplification of 12 markers (*Poli161TUF, Poli191TUF, Poli9-48TUF, Poli138TUF, Poli24MHFS, Poli146TUF, Poli128TUF, Poli115TUF, Poli19TUF, Poli142TUF, Poli140TUF, Poli-RC35TUF*) are shown as representative.

(b) Disease diagnostic markers. Results of diagnostic primers are shown in turn from left side; penaeid acute viremia 1st primer, penaeid acute viremia 2nd, red sea bream iridoviral disease 1st, red sea bream iridoviral disease 2nd, lymphosististis disease, Oncorhynchus masou virus disease, carp herpesviral disease, viral nervous necrosis, infectious hematopoietic necrosis, YAV 1st, YAV 2nd, pseudotuberculosis, vibriosis, vibriosis, furunculosis 1st, furunculosis 2nd, *pseudomonas* infection, bacterial coldwater disease 1st, bacterial coldwater disease 2nd, bacterial kidney disease, perkinsosis 1st, perkinsosis 2nd, kudoosis amami 1st, kudoosis amami 2nd.

Table 1. A list of the diseases printed in AQUA DNABook

Causative agents of diseases		Disease names	Fishes susceptible
DNA viruses	Penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV)	Penaeid acute viremia	Prawn
	Red sea bream iridovirus (RSIV)	Red sea bream iridovirus disease	Red sea bream, Yellowtail
	Lymphocystis disease virus (LDV)	Lymphocystis disease	Japanese flounder, Red sea bream
	Oncorhynchus masou virus (OMV)	*Oncorhynchus masou* virus disease	Salmonid fish
	Koi herpes virus (KHV)	Koi herpesvirus disease	Carp
RNA viruses	Striped jack nervous necrosis virus (SJNNV)	Viral nervous necrosis	Yellow jack,
	Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)	Infectious hematopoietic necrosis	Rinbow trout
	Infectious pancreatic necrosis virus(IPNV)	Infectious pancreatic necrosis	Rinbow trout
	Aqua birnavirus (YAV)	Yellowtail ascites virus disease	Yellowtail
Bacteria	*Pasteurella piscicida*	Pseudotuberculosis	Yellowtail
	Vibrio anguillarum	Vibriosis	Japanese flounder, Yellowtail
	Flavobacterium columnare	Columnaris disease	Carp, Eel
	Aeromonas salmonicida	Furunculosis	Salmonid fish
	Pseudomonas plecoglossicida	*Pseudomonas* disease	Ayu fish
	Flavobacterium psychrophilum	Coldwater disease	Ayu fish
	Edwardsiella tarda	Edwardsiellosis	Eel, Japanese flounder
	Renibacterium salmoninarum	Bacterial kidney disease	Salmonid fish
Parasites	*Perkinusus* spp	*Perkinsus* protozoan infection	Short-necked clam
	Kudoa amaiensis	Kudoosis amami	Yellowtail

要約

本研究では、食用魚として価値が高く、栽培漁業・養殖対象種として日本をはじめとするアジア諸国における水産業の中で重要な魚種とされているヒラメを対象として、DNA マーカーを用いた分子育種学的研究を行い、有用経済形質を付加した新たな系統の確立を試みた。また、DNA マーカーの利用を汎用化するものとして、DNA マーカーを紙にプリントし、常温保存が可能な一冊の本として流通させるアクア DNA ブックを開発した。

DNA マーカーを用いた連鎖解析による有用経済形質関連遺伝子座の推定

養殖現場で問題視されている、体色異常の一種である白化と、ウイルス性のリンホシスチス病(LD)抵抗性、という二つの遺伝形質を支配する遺伝子座について、DNA マーカーの一種であるマイクロサテライト(MS)マーカーを用いた連鎖解析による推定を試みた。

白化に関しては、戻し交配家系（(白化♀×正常♂）×正常♂）を用いて解析を行った結果、2 つの領域で有意な候補遺伝子群(PA-1; LG5, PA-2; LG24)を特定した。また、LD に関しては、戻し交配家系（(抵抗性系統♀×感受性系統♂）×感受性系統♂）を用いて解析を行った結果、1 つの遺伝子座(LD-R; LG15)が LD 抵抗性に強く関与していることが明らかになった。

マーカーアシスト浸透交雑による LD 抵抗性系統の作出

連鎖解析で得られた LD 抵抗性遺伝子座(LD-R)と連鎖する MS マーカーを用いたマーカーアシスト浸透交雑（MAI）による LD 抵抗性品種（系統）の作出を試みた。先に特定した、LD 抵抗性遺伝子座(LD-R)と連鎖する MS マーカーを用い、LD-R を有すると推定した♀親魚と商品として高い評価を得ている民間種苗会社の種苗生産用♂親魚を交配して LD-R ヒラメを作出した。また、同種苗生産会社の市販用ヒラメを対照ヒラメとした。民間養殖場にて両ヒラメの比

較試験した。その結果、LD-R ヒラメは、成長・色彩ともに市販ヒラメと遜色なく、LD 抵抗性に優れていた。本結果は MAI の有効性を示すものである。

<u>DNA マーカーの汎用化を目指したアクア DNA ブックの開発</u>

本研究で DNA マーカー(MS マーカー)の分子育種における有用性が確かめられた。そこで、MS マーカーの利用の汎用化を目指してアクア DNA ブックを開発した。アクア DNA ブックは、MS マーカーの情報だけではなく、MS マーカーも紙にプリントし、一冊の本として常温保存出来るシステムである。本ブックには試みとして魚病診断用プライマーも掲載されている。本ブックは理化学研究所によって開発された DNA ブックの基本概念をもとに、オリゴプライマーを紙にプリントした初の試みであり、将来的には、多くの魚種で開発され DNA マーカーを掲載した DNA ブックや、国内未侵入の魚病診断用プライマーを網羅した DNA ブックなどへの応用が可能である。

本研究で得られたヒラメの分子育種学的知見と、DNA マーカーの汎用化を目指したアクア DNA ブックの開発は、分子遺伝育種をはじめとする様々な研究の推進と産業の活性化に役立つものであると考える。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に携わる機会を与えられ終始御懇篤な御指導と御助言を賜り、また本論文の御校閲を頂きました　東京海洋大学海洋科学部海洋生物資源学科水族生理学研究室　岡本信明教授に謹んで深謝の意を表します。

同大学水族病理学研究室　坂本崇助教授および水族生理学研究室　吉崎悟朗助教授には多大な御指導と御鞭撻を賜るとともに、本論文の取り纏めに際し種々の貴重な御助言を賜りましたことをここに感謝いたします。同大学院先端魚類防疫学研究室　舞田正志助教授には研究生活を始めるにあたり多くの御助言をいただきましたことをここに感謝いたします。

また、神奈川県水産技術センター栽培技術部　長谷川理主任研究員には本研究におけるあらゆる面で御便宜をはかっていただき、多くの御助言も賜りました。また、同　木村トヨ子さん、熊谷民生さん、池田武男さん、金子栄一さんを始めとする職員の皆様にも惜しみないご協力と深遠なるご配慮を賜りましたことを、併せてここに深謝いたします。さらに(独)理化学研究所横浜 GM センター　林崎良英博士、河合純博士、中村光江氏、小関恵子氏、谷川直樹氏を始めとする研究員の方々、(独)水産総合センター養殖研究所生産技術部　岡内正典氏、(株)日清マリンテック　熊坂清弘氏、本多数充氏を始めとする職員の方々にも多くの御便宜を図っていただきましたことに感謝の意を表します。

(独)水産総合センター養殖研究所生産技術部　尾崎照遵博士、Van Andel Research Institute　二見邦彦博士、Universidade Federal Rural de Pernambuco　M.R.M. Coimbra 博士、東京海洋大学水族生理学研究室　大原恵理子博士、 小林一展氏には本研究を進めるうえで終始御指導を頂くとともに、論文の取り纏めに際し有益な御助言を賜りました。ここに深い感謝の意を表します。また、同大学水族生理学研究室での研究生活において、常に協力を惜しまず、研究全般に渡って御助言、御支援を頂いた水族生理学研究室、水族病

理学研究室の関係者各位に御礼申し上げます。

最後に、罪もなく命を奪ってしまった多くのヒラメに深謝するとともに、研究生活を常に支えてくれた友人と、両親、姉をはじめとする家族に心より感謝いたします。