

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6927486号  
(P6927486)

(45) 発行日 令和3年9月1日(2021.9.1)

(24) 登録日 令和3年8月10日(2021.8.10)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z N A Z
C 1 2 Q 1/6827 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6827

請求項の数 3 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2017-42793 (P2017-42793)	(73) 特許権者	504196300 国立大学法人東京海洋大学 東京都港区港南4丁目5番7号
(22) 出願日	平成29年3月7日(2017.3.7)	(73) 特許権者	501168814 国立研究開発法人水産研究・教育機構 神奈川県横浜市神奈川区新浦島町一丁目1番地25
(65) 公開番号	特開2018-143186 (P2018-143186A)	(74) 代理人	100110249 弁理士 下田 昭
(43) 公開日	平成30年9月20日(2018.9.20)	(74) 代理人	100113022 弁理士 赤尾 謙一郎
審査請求日	令和2年3月6日(2020.3.6)	(72) 発明者	坂本 崇 東京都港区港南4丁目5番7号 国立大学 法人東京海洋大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プリ類のハダムシ抵抗性検査方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プリ類から採取したDNAの、プリ連鎖群LG2上のマイクロサテライトマーカ-DNAマーカ座 Sequ0125TUFと Sequ1066TUFとの間に位置する配列番号1で示される塩基配列の860番目の塩基の一塩基多型の遺伝型を調べる段階、及び該遺伝型に基づいてプリ類のハダムシ抵抗性を判定する段階であって、該配列番号1で示される塩基配列の860番目の塩基の遺伝型が T / T 又は C / T の場合にはハダムシ抵抗性と判定する段階から成る、プリ類のハダムシ抵抗性を検査する方法。

【請求項 2】

検査の対象であるプリ類の個体からゲノムDNAを抽出し、プリ連鎖群LG2上のマイクロサテライトマーカ-DNAマーカ座 Sequ0125TUF と Sequ1066TUFとの間に位置する配列番号1で示される塩基配列の860番目の塩基の一塩基多型を含む塩基配列の外側に結合する特異的な配列を有する一対のプライマーを用いてPCR反応を行い、得られた増幅産物中の該一塩基多型の遺伝型を調べる段階、及び該遺伝型に基づいてプリ類のハダムシ抵抗性を判定する段階であって、該配列番号1で示される塩基配列の860番目の塩基の遺伝型が T / T 又は C / T の場合にはハダムシ抵抗性と判定する段階から成る、プリ類のハダムシ抵抗性を検査する方法。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載のプリ類のハダムシ抵抗性を検査する方法に使用するためのプライマーセットであって、プリ連鎖群LG2上のマイクロサテライトマーカ-DNAマーカ座 Sequ

10

20

u0125TUF と Sequ1066TUF との間に位置する配列番号1で示される塩基配列の860番目の塩基を含む領域を検出するためのプライマーであって、該塩基を含む該塩基配列中の50～100塩基の長さの領域の両端に設定された長さが15塩基以上のフォワードプライマー及びリバースプライマー又はこれらと90%以上相同のフォワードプライマー及びリバースプライマーから成るプライマーセット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、天然のブリ類のハダムシ抵抗性を検査する方法に関し、より詳細には、一塩基多型 (SNP) を利用してブリ類のハダムシ抵抗性を検査する方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

ブリ類は日本における海面養殖生産量の過半を占める重要養殖対象種である。現状のブリ養殖は天然種苗を採捕し出荷サイズまで畜養する天然資源に依存した養殖である。より安定した養殖生産のために、天然種苗に依存しない人工種苗の早期導入と、人工種苗への優良形質の付与に関する技術開発が行われている。ブリ養殖における大きな障害の一つとしてベネデニア症があげられる。ベネデニア症は単生類の寄生虫ハダムシ (Benedenia seriolae) がブリ類の体表に寄生することによって生じる。ベネデニア症は粘液過多や成長不良の原因となる他、ハダムシを排除するために魚が体を生簀の網地に擦り付けるために体表に生じる擦り傷からの二次日和見感染による大量斃死も誘引し、大きな経済的な損失をもたらしている。現在、ベネデニア症の治療法として、淡水浴、市販の駆虫薬への薬浴、駆虫薬の経口投与などの方法が用いられている (特許文献1, 2等)。

20

発明者らはブリ天然魚F<sub>1</sub>を用いたQTL (Quantitative trait locus、量的形質遺伝子座) 解析により、ベネデニア症抵抗性 (ハダムシが寄生し難い、寄生数が少ない) 形質と遺伝学的に連鎖したゲノム領域が連鎖群LG2上のマイクロサテライトDNAマーカー座 Sequ0125TUF と Sequ1066TUF の間の遺伝距離5.5 cM (センチモルガン) にあることを特定している (非特許文献1)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特開2010 124736

【特許文献2】国際公開W02008/013235

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Plos one 8, e64987 (June 2013)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

ブリ類の天然種苗からのハダムシの寄生への抵抗性を有する個体選別が可能となり遺伝的にベネデニア症抵抗性形質を持つ人工種苗が作出されれば、ブリ類養殖における感染症のリスク軽減や駆虫薬や駆虫作業に関わる労務コストの削減等の養殖効率の向上に大きく貢献できるといえる。

40

発明者らはブリ天然魚について、ベネデニア症抵抗性形質と遺伝学的に連鎖したゲノム領域が連鎖群LG2上のマイクロサテライトDNAマーカー座領域 (Sequ0125TUF と Sequ1066TUF の間) を特定したが (非特許文献1)、この領域内にどのような遺伝子が存在し、どのようなメカニズムでベネデニア症抵抗性形質が発現するかについては分かっていなかった。

そのため、本発明は、天然のブリ類のハダムシ抵抗性を検査する方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

50

本発明者らは、ブリ連鎖群LG2上のマイクロサテライトマーカ-DNAマーカ-座Sequ0125TUFとSequ1066TUFとの間に位置する塩基配列を検査した結果、ベネデニア症抵抗性遺伝子(配列番号1)を見出し(後記の実験例2)、その中に複数の一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)を見出した(後記の実施例1)。そして、天然ブリのこの一塩基多型と、別途調べた寄生虫ハダムシの体表への寄生数とを比較した結果、特定の一塩基多型を保持するブリ類においてハダムシの寄生数が減少していることを見出し(後記の実施例1)、ブリ類のハダムシ抵抗性を検査するための方法を見出した。

即ち、本発明は、ブリ類から採取したDNAの、ブリ連鎖群LG2上のマイクロサテライトマーカ-DNAマーカ-座Sequ0125TUFとSequ1066TUFとの間に位置する配列番号1で示される塩基配列の860番目の塩基の一塩基多型の遺伝型を調べる段階、及び該遺伝型に基づいてブリ類のハダムシ抵抗性を判定する段階から成る、ブリ類のハダムシ抵抗性を検査する方法である。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】ブリ類連鎖群LG2のDNAマーカ-とこの領域をカバーするBAC cloneの概要を示す地図である。二重線は、最小タイリングパスウェイを構成し、塩基配列を決定したBACクローンを示す。

【図2】実験例2で得た免疫応答関連遺伝子(配列番号1)を示す。黒三角は、アミノ酸変化を伴うSNPを示し、白三角はアミノ酸が変化しないSNPを示す。矢印は、エクソン-イントロンの境界を示す。灰色の網掛け領域は当該遺伝子の機能ドメインであるC type lectinドメインを示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明はベネデニア抵抗性形質と強く連鎖しているブリ連鎖群LG2(非特許文献1のSqu2Fに相当する。)上のマイクロサテライトマーカ-DNAマーカ-座Sequ0125TUFとSequ1066TUF(図1、非特許文献1のTable2及びTable3)との間に領域に位置するベネデニア症抵抗性遺伝子(配列番号1)の860番目の塩基の一塩基多型を用いて、ブリ類のベネデニア症抵抗性、すなわちハダムシが体表へ寄生し難いブリ類個体を識別する方法である。

本発明の方法によりベネデニア症への抵抗性を調べることができる魚類は、*Seriola*属の魚類であり、和名では、ブリ(学名:*Seriola quinqueradiata*)、ヒラマサ(学名:*Seriola lalandi*)、カンパチ(学名:*Seriola dumerili*)、ヒレナガカンパチ(学名:*Seriola rivoliana*)、アオブリ、ガンド、ガンドブリ、モジャコ、モジャッコ、イナダ、イナラ、ワラサ、コゾクラ、コズクラ、ツバイソ、フクラギ、フクラゲ、ワカナ、ショウジンゴ、ツバス、ヤズ、ハマチ、メジ、メジロ、ハナジロ、マルゴ、ワカナゴ、オオイナ、スズイナ、オオイオ、ワカシ、マサギ、ヒラサ、ヒラス、ヒラソ、テンコツ、セントク、アガユ、マヤ、外国名では、(Japanese) Amberjack、(Five ray) Yellowtailと称される魚を含む。本明細書では、これらを総称してブリ類という。

本発明の方法は、特に天然のブリ類のベネデニア症抵抗性を識別することに優れる。

ブリ類同士はゲノム配列と染色体構造の相同性が非常に高いため、この遺伝子の情報は他のブリ類にも適用できるものと推測される。

【0009】

上記一塩基多型の検出は、検査対象のブリ類の個体の一部、例えば、尾鰭、血液、腎臓、筋肉などの核が存在する組織からDNAを採取し、このDNAに含まれる一塩基多型の遺伝型を検査する。一塩基多型の検出は、一塩基多型部分の塩基配列を決定することによって行うことができる。一塩基多型部分の塩基配列の決定には、例えば、TaqMan法、ダイレクトシーケンス法、ターゲットシーケンス法、ARMS PCR法、飽和型DNA結合色素によるHRM解析、PCR制限酵素切断断片長多型による方法(PCR RFLP解析)、MALDI TOF/MSによるSNPタイピング法、DNAチップを用いた方法などを挙げることができる。

一塩基多型の検出には、例えば、ダイレクトシーケンス法を用いることができる。具体的には、上記遺伝子における一塩基多型の検出は、例えば、ブリ類からゲノムDNAを

10

20

30

40

50

抽出し、前記一塩基多型を含む塩基配列の外側に結合する特異的な配列を有する一对のPCRプライマーを用いてPCR反応を行い、得られたPCR産物を増幅に用いたPCRプライマーの内側に設計したプライマー又は増幅に用いたPCRプライマーそのものを用いてDNA塩基配列のシーケンスを行い、得られたDNAの遺伝型を識別することで行うことができる。

#### 【0010】

各方法に用いるPCRプライマーは、当該遺伝子の塩基配列（配列番号1）の860番目の塩基（C860T）を含む領域を検出するためのプライマーであって、該塩基を含む該塩基配列中の50～100塩基の長さの領域の両端に設定された長さが15塩基以上、好ましくは19～24塩基のフォワードプライマー及びリバースプライマーから成るプライマーセットである。これらの塩基配列に90%以上相同であるプライマーを使用してもよい。

このようにして、ブリ類のベネデニア症抵抗性遺伝子（配列番号1）の860番目の塩基（C860T）の一塩基多型を調べた結果、遺伝マーカーC860Tの遺伝型がT/T又はC/Tの場合、好ましくはT/Tの場合には、ベネデニア症抵抗性を有する、すなわちハダムシが寄生し難い、寄生数が少ない個体と判定し、C/Cの場合には抵抗性を持たない個体と判定することができる（スラッシュ(/)を挟む塩基は各アレルの塩基を表す。）。

#### 【実施例】

#### 【0011】

以下、実施例にて本発明を例証するが本発明を限定することを意図するものではない。

#### 実験例 1

ブリ類の連鎖群LG2のベネデニア症抵抗性領域の概要を図1に示す。本発明の一塩基多型は、連鎖群LG2のベネデニア症抵抗性領域内に位置するベネデニア症抵抗性遺伝子（配列番号1）のタンパク質翻訳領域内に存在する。発明者らはマイクロサテライトDNAマーカー座Sequ0125TUFとSequ1066TUFを用いてブリゲノムDNA断片（平均DNA断片長140.7 kb）を保持する細菌人工染色体（BAC）ライブラリーのスクリーニングを行った。DNAマーカーSequ0125TUFにより、BACクローン #013 k04、#102 l17、#028 c14、#019 k17を同定した。またSequ1066TUFにより、#101 o14、#077 f22、#078 k13、#075 e05、#114 l03を同定した。次にこれらのBACクローンの末端の塩基配列を決定し、決定した配列をもとに隣接するクローンを探索した。BACクローン末端配列による隣接クローンの探索を繰り返し、最終的に16個のベネデニア症抵抗性領域のゲノムDNAを保持するBACクローンが得られた。得られたBACクローンは図1のように整列化された。16個クローンのうち#102 l17、#013 p20、#066 e22、#090 d18、#013 a02、#070 j15、#101 o14の7個のクローン（図1で点線で囲む）により、最も少ないクローン数（最小の経路）でベネデニア症抵抗性領域がカバーされた。

この7個のBACクローンについて塩基配列のショットガンシーケンス（長いクローンを断片化し塩基配列を決定）とde novo アセンブル（参照配列なしの断片化した塩基配列の再構築）を行い、DNAマーカーSequ0125TUFとSequ1066TUF間のゲノム領域の全DNA塩基配列（約520,000 bp）を取得した（ここには示さない。）。

#### 【0012】

#### 実験例 2

実験例1で決定した連鎖群LG2ベネデニア症抵抗性ゲノム領域の塩基配列を遺伝子予測ソフトウェアGENSCAN、Augustus等を用いて解析し検討した結果、この領域には20個程度の既知の遺伝子と部分的に相同性を示す遺伝子、及びその他に10から20個程度の既知遺伝子とは相同性を示さない機能不明な遺伝子が存在することが示唆された。これらの候補遺伝子の中でC type lectin様の機能ドメインを持つ新規免疫応答関連遺伝子（配列番号1）がハダムシの寄生部位である表皮でmRNAが発現していること、免疫システムにおいて重要な機能を果たすことが知られているC type lectinドメインを持つことからベネデニア症抵抗性形質の責任遺伝子であることが示唆された。その他の候補遺伝子には免疫システムへの関与が想定され、かつ表皮で発現している遺伝子は存在しなかった。

#### 【0013】

当該新規免疫応答関連遺伝子cDNAをRT PCRにより増幅し、遺伝子のクローニングを行った。全RNAはブリ天然魚の表皮からRNeasy Mini Kit (QIAGEN社)を用いて抽出した。一本鎖cDNAへの逆転反応はoligo dT primersを用いてOminiscript RT kit (QIAGEN社)により行った。PCRはTakara Ex taq (Takara Bio社)を用いて行った。PCR条件は9 2分; 95 30秒、58 30秒、72 1分を35サイクル;その後、伸長反応72 5分とした。

Forward primerには

Squ clec 1F 5' TTCTGATTATGTCTGTTGTCCTCTG 3' (配列番号 2 )、

Squ clec 2F 5' CTA CTCTTAGCCAACCATCCTGA 3' (配列番号 3 )、

Squ clec 3F 5' CTGGATCGGAGGTTACTACTTTTCAG 3' (配列番号 4 )、

Squ clec 4F 5' ATGACTTTAAAGCCTCTTAATGTGC 3' (配列番号 5 )

10

Reverse primerには

Squ clec 5R 5' CTTTGTCTCCCAGTTGCACAGTAG 3' (配列番号 6 )、

Squ clec 6R 5' GAATGGGAAGTTCATGTTGCAG 3' (配列番号 7 )、

Squ clec 7R 5' AATGGGAAGTTCATGTTGCAG 3' (配列番号 8 )、

Squ clec 8R 5' CTCAGAGTGAAGACAGTGATTCG 3' (配列番号 9 )

を用いた。

増幅したcDNA断片はpGEM T easy vector (Promega社)にクローニングし、塩基配列のシーケンスを行った。

#### 【 0 0 1 4 】

次に5'及び3' RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法による当該新規免疫応答関連遺伝子完全長cDNAの取得を行った。RACE用cDNAはSMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech社)を用いて、上記のcDNA断片のクローニングに用いた個体と同一個体の表皮由来のRNAから合成した。5'及び3' RACE PCRはネストPCR法で行った。5'RACEでは1回目のPCRは上記のcDNA断片から設計した

20

5' CTGGATCGGAGGTTACTACTTTTCAG 3' (配列番号 1 0 )

をgene specific primerとして用い、PCR条件は94 1分; 94 30秒、55 30秒、72

2分を20サイクルとした。一回目のPCR産物1.25 µlを2回目のネストPCRに用いた。2回目のPCRは

5' TTCTGATTATGTCTGTTGTCCTCTG 3' (配列番号 1 1 )

をgene specific primerとして用い、PCR条件は94 1分; 94 30秒、55 30秒、72

2分を20サイクルとした。3'RACEでは1回目のPCRは

5' ACTGCCTGACCTGACACACGAATGG 3' (配列番号 1 2 )

をgene specific primerとして用い、PCR条件は94 1分; 94 30秒、70 30秒、72

2分を5サイクル; 94 30秒、68 30秒、72 2分を15サイクルとした。2回目のPCRは

5' ACCGTGAGCCATCTTCCCATCTCCA 3' (配列番号 1 3 )

をgene specific primerとして用い、PCR条件は94 1分; 94 30秒、68 30秒、72

2分を30サイクルとした。増幅した5'及び3' RACE産物はpGEM T easy vector (Promega社)

にクローニングし、塩基配列のシーケンスを行った。これによりC type lectin様の機能ドメインを持つ新規免疫応答関連遺伝子cDNA全長の塩基配列が得られた (図 2、配列番号 1)。

40

#### 【 0 0 1 5 】

##### 実施例 1

次に連鎖群LG2のクローニングしたベネデニア症抵抗性領域に位置する新規免疫応答関連遺伝子 (配列番号 1) について遺伝子の翻訳領域内のアミノ酸置換を伴う一塩基多型の探索を行った。

飼育している天然ブリ200尾より、ハダムシ抵抗性の高い個体 (ハダムシ寄生数が少ない個体) とハダムシ抵抗性の低い個体 (ハダムシ寄生数が多い個体) について各20尾を得た。これらのブリの尾ビレからDNeasy tissue and blood kit (QIAGEN社) を用いてゲノムDNAを抽出した。

塩基配列多型探索の基準となる参照配列にはRACE法によって得られた当該遺伝子cDNA配

50

列（配列番号1）を用いた。当該遺伝子の位置するゲノム領域（約3000bp、ここには示さない。）をprimer 5' AAATGTCAAAGCACCTATGAAACG 3'（配列番号14）、5' GCAATCGGTTGAAATATGGAGGAG 3'（配列番号15）を用いてPCRにより増幅した。PCRはTakara Ex taq（Takara Bio）を用いて行い、PCR条件は95℃ 2分；95℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 3分を35サイクル；その後、伸長反応72℃ 5分とした。当該遺伝子の塩基配列決定はダイレクトシーケンス法により行った。

【0016】

Sequencing primerには

Squ clec 9F 5' TGTTCAGTCCGGTATAAAGAGC 3'（配列番号16）  
 Squ clec 10R 5' ACATAAACAGCAACATCAGGATCAT 3'（配列番号17）  
 Squ clec 13F 5' GTGTTTCCAGTCCGGTATAAAGATC 3'（配列番号18）  
 Squ clec 14F 5' GAACTCATTAGAAGCTTGTAGCGC 3'（配列番号19）  
 Squ clec 15F 5' CTTTATTACTGTACAAGCTGCGATG 3'（配列番号20）  
 Squ clec 16F 5' TCAGCTTCATTTGAGTGCAGTATAT 3'（配列番号21）  
 Squ clec 17F 5' ATACACCAAGATCCACTGCATACTA 3'（配列番号22）  
 Squ clec 18R 5' CAAACCAGTCGATCAATAAGAGGAT 3'（配列番号23）  
 Squ clec 19R 5' GAGGGGAACAAATCATGAGAATAGG 3'（配列番号24）  
 Squ clec 20R 5' TTCATCTGCTTCTGTTCTTGTGTA 3'（配列番号25）  
 Squ clec 21R 5' ACATAAACAGCAACATCAGGATCAT 3'（配列番号26）

を用いた。

【0017】

得られた各個体の当該遺伝子の塩基配列と参照配列を比較した結果、当該遺伝子内に4個のアミノ酸置換を伴うSNP（C175A、A699C、C742A、C860T、図2に黒三角で示す。）と4個のアミノ酸置換を伴わないSNP（C204T、T705C、T807G、A861G、図2に白三角で示す。）が同定された。C175Aは当該遺伝子cDNA（配列番号1）の175番目のCがAに、A699Cは699番目のAがCに、C742Aは742番目のCがAに、C860Tは860番目のCがTに変異していた。その結果、C175Aではロイシン（L）からメチオニン（M）へ、A699Cではグルタミン酸（E）からアスパラギン酸（D）へ、C742Aではロイシン（L）からイソロイシン（I）へ、C860Tではプロリン（P）からロイシン（L）へアミノ酸が変化していた。一方、C204Tは当該遺伝子cDNA（配列番号1）の204番目のCがTに、T705Cは705番目のTがCに、T807Gは807番目のTがGに、A861Gは861番目のAがGに変異していたが、アミノ酸の変化はない。

これらのSNPのうちA699C、C742A及びC860Tは当該遺伝子の機能ドメインであると考えられるC type lectinドメイン（図2中の網掛け領域）内に位置し、アミノ酸変化によりタンパク質の生理活性に影響を与える可能性があると考えられた。

【0018】

ブリ天然魚40個体についてハダムシの寄生数と当該遺伝子内のSNPとの相関解析の結果を表1及び2に示す。

【表 1】

## A) SNPのジェノタイプとハダムシ寄生数の関係

	SNP	アミノ酸	平均	SE	個体数
C860T	C/C	P/P	200.82	21.70	11
	C/T	P/L	157.35	22.40	20
	T/T	L/L	133.11	27.52	9
C175A	C/C	L/L	148.83	18.28	24
	C/A	L/M	177.67	67.70	3
A699C	A/A	E/E	170.06	16.57	31
	A/C	E/D	132.00	56.87	4
C742A	C/C	L/L	172.04	19.93	24
	C/A	L/I	153.40	29.77	10
C204T	C/C	-	154.74	17.90	27
	T/C	-	81.00	-	1
T705C	T/T	-	170.64	20.37	22
	T/C	-	152.92	22.21	12
T807G	T/T	-	160.32	22.15	19
	T/G	-	233.25	21.83	4
A861G	A/A	-	167.20	29.76	10
	A/G	-	159.96	18.45	24
	G/G	-	173.83	40.01	6

【 0 0 1 9 】

20

【表 2】

## B) U検定によるSNPのジェノタイプとハダムシ寄生数の検定

	SNP	アミノ酸	p値
C860T	C/C vs T/T	P/P vs L/L	0.0004 *
	C/C vs C/T	P/P vs L/P	0.0802
	C/C vs C/T and T/T	P/P vs L/L and L/P	0.0408 *
C175A	C/C vs C/A	L/L vs L/M	0.2202
A699C	A/A vs A/C	E/E vs E/D	0.7966
C742A	C/C vs C/A	L/L vs L/I	0.7146
T705C	T/T vs T/C	-	0.6272
T807G	T/T vs T/G	-	0.0840
A861G	A/A vs A/G	-	0.4549
	A/G vs G/G	-	0.4179
	A/A vs G/G	-	0.5000

\*有意水準  $p < 0.05$ 

【 0 0 2 0 】

C860Tについては、SNP型C/C（アミノ酸型P/P）とSNP型T/T（アミノ酸型L/L）の比較では最も高い統計的な有意差が検出された（U検定（片側検定）、 $p = 0.0004$ ）。C860TがC/Cのジェノタイプを持つ個体群のハダムシ寄生数は平均200.82匹であったのに対し、T/T（アミノ酸型L/L）の群では平均133.11匹であり、約30%のハダムシ寄生数の減少がみられた。C860TがC/Tで片方の遺伝子座のみロイシンとなっている個体群においてもハダムシ寄生数は平均157.35匹と減少の傾向がみられた。またロイシン（L）を持つもの（SNP型：T/TとC/T、アミノ酸型：L/LとL/P）と持たないもの（SNP型：C/C、アミノ酸型：P/P）の2群比較においてもハダムシの寄生数に統計的に有意な差が検出された（U検定（片側検定）、 $P = 0.0408$ ）。

40

一方、C175A、A699C、C742A、C204T、T705C、T807G、A861GについてはSNPのジェノタイプとハダムシの寄生数との間には統計的な有意差は検出されなかった。

【 0 0 2 1 】

なお、このように、ベネデニア症抵抗性形質の責任遺伝子であることが示唆された（実験例2）新規遺伝子（配列番号1）中のSNPがベネデニア症抵抗性を示したことから、この遺伝子がベネデニア症抵抗性形質の責任遺伝子であることが示された。非特許文献1で示

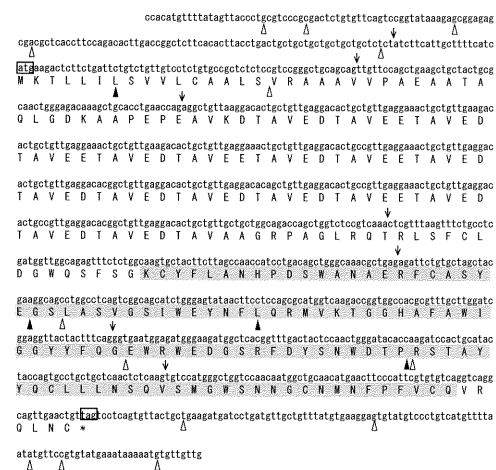
50

されたブリ連鎖群LG2ベネデニア症抵抗性QTL領域内の当該遺伝子以外の領域で同様の検査を行ってもブリのベネデニア症抵抗性を知ることはできないと考えられる。

【図1】



【図2】





【配列表】

0006927486000001.app

---

フロントページの続き

特許法第30条第2項適用 平成28年9月8日に、平成28年度公益財団法人日本水産学会秋季大会の講演予稿集に発表の「全ゲノムリシーケンス解析によるブリ*Seriola quinqueradiata*におけるベネデニア症抵抗性形質QTL領域内の塩基配列多型の探索」、平成28年9月9日に、平成28年度公益財団法人日本水産学会秋季大会において発表の「全ゲノムリシーケンス解析によるブリ*Seriola quinqueradiata*におけるベネデニア症抵抗性形質QTL領域内の塩基配列多型の探索」、平成28年12月21日に、ウェブサイト(<http://www.intlpage.org/2017/images/pdf/PAGXXV-abstracts-posters/.pdf>)に発表の「Cloning the Candidate Genes for Benedenia Disease Resistance in Japanese Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*)」、平成29年1月16日に、プラントアンドアニマルゲノム第25回大会(Plant and Animal Genome (PAG) XXV

(出願人による申告)平成27年度、ゲノム情報を利用したブリ類の短期育種技術の開発委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(72)発明者 中本 正俊

東京都港区港南4丁目5番7号 国立大学法人東京海洋大学内

(72)発明者 尾崎 照遵

三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1 国立研究開発法人水産研究・教育機構 増養殖研究所内

(72)発明者 荒木 和男

三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1 国立研究開発法人水産研究・教育機構 増養殖研究所内

(72)発明者 吉田 一範

長崎県長崎市多以良町1551-8 国立研究開発法人水産研究・教育機構 西海区水産研究所内

(72)発明者 野田 勉

長崎県長崎市多以良町1551-8 国立研究開発法人水産研究・教育機構 西海区水産研究所内

審査官 佐久 敬

(56)参考文献 PLOS ONE, 2013年, Vol.8, Issue 6, e64987

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N

C12Q

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq