

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7007710号
(P7007710)

(45)発行日 令和4年1月25日(2022.1.25)

(24)登録日 令和4年1月12日(2022.1.12)

(51)Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z ZNA
C 1 2 Q 1/6827 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6827 Z
C 1 2 Q 1/6879 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6879 Z

請求項の数 6 (全 21 頁)

(21)出願番号 特願2017-219660(P2017-219660)	(73)特許権者 501168814
(22)出願日 平成29年11月15日(2017.11.15)	国立研究開発法人水産研究・教育機構
(65)公開番号 特開2019-88234(P2019-88234A)	神奈川県横浜市神奈川区新浦島町一丁目1番地25
(43)公開日 令和1年6月13日(2019.6.13)	(74)代理人 110000084
審査請求日 令和2年8月13日(2020.8.13)	特許業務法人アルガ特許事務所
(出願人による申告)平成28年度、農林水産省、国際漁業資源評価調査・情報提供委託事業、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 藤原 篤志
	神奈川県横浜市西区みなとみらい2-3-3 国立研究開発法人水産研究・教育機構内
	(72)発明者 秋田 鉄也
	神奈川県横浜市西区みなとみらい2-3-3 国立研究開発法人水産研究・教育機構内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】クロマグロの遺伝的性判別マーカーおよび遺伝的性判別方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

クロマグロ被検体のゲノムDNAを含有する試料の、配列番号1で表される塩基配列の501番目の塩基、561および562番目の塩基、564番目の塩基、595番目の塩基、644番目の塩基、769番目の塩基、770番目の塩基、789番目の塩基、1198番目の塩基、1200番目の塩基、1213番目の塩基、1275番目の塩基、1280番目の塩基、1338番目の塩基、1344番目の塩基、1416~1423番目の塩基、1472番目の塩基、1493番目の塩基、1866番目の塩基、1867番目の塩基、1899番目の塩基、1913番目の塩基、2583番目の塩基、2588番目の塩基、2589番目の塩基、2611番目の塩基、2622番目の塩基、2634番目の塩基、2643番目の塩基、2687番目の塩基、2693番目の塩基、2752番目の塩基、2753番目の塩基、2756番目の塩基、2801番目の塩基、2817番目の塩基、2855番目の塩基、2874番目の塩基、2901番目の塩基、3057番目の塩基、3093番目の塩基、3139番目の塩基、3146番目の塩基、3148番目の塩基、3196番目の塩基、3199番目の塩基、3249番目の塩基、3251番目の塩基、3368番目の塩基、3404番目の塩基、3407番目の塩基、3426番目の塩基、3433番目の塩基、3442番目の塩基、3470番目の塩基、3479番目の塩基、3545番目の塩基、3546番目の塩基、3735番目の塩基、3756番目の塩基、3769番目の塩基、3788番目の塩基、6256番目の塩基、6312番目の塩基、6455番目の塩基、6585番目の塩基、6781番目の塩基、6879番目の

塩基、6930番目の塩基、6933番目の塩基、6940番目の塩基、6941番目の塩基、6987番目の塩基並びに7014番目の塩基の位置に存在するDNA多型からなる群から選択される1以上のDNA多型を検出する、クロマグロの性判別方法。

【請求項2】

さらに、前記DNA多型が下記表に示される雌の遺伝子型を有する場合にクロマグロ被検体が雌であると判別し、前記DNA多型が下記表に示される雄の遺伝子型を有する場合にクロマグロ被検体が雄であると判別するものである、請求項1記載の方法。

【表1】

多型番号	配列番号1中の塩基番号	雌遺伝子型	雄遺伝子型
1	501	A/A	A/T
2	561-562	TG/TG	TG/T
3	564	T/T	T/TC
4	595	A/A	A/G
5	644	T/T	T/C
6	769	C/C	C/T
7	770	A/A	A/G
8	789	A/A	A/G
9	1198	G/G	G/T
10	1200	T/T	T/G
11	1213	C/C	C/T
12	1275	C/C	C/T
13	1280	C/C	C/A
14	1338	T/T	T/C
15	1344	T/T	T/G
16	1416-1423	GTAATGTA/ GTAATGTA	GTAATGTA/ G
17	1472	C/C	C/T
18	1493	T/T	T/C
19	1866	A/A	A/C
20	1867	G/G	G/C
21	1899	C/C	C/T
22	1913	G/G	G/C
23	2583	T/T	T/C
24	2588	G/G	G/A
25	2589	C/C	C/T
26	2611	C/C	C/T
27	2622	G/G	G/A
28	2634	G/G	G/A
29	2643	G/G	G/C
30	2687	G/G	G/A
31	2693	G/G	G/A
32	2752	A/A	A/ATGGTC
33	2753	A/A	A/G
34	2756	T/T	T/C
35	2801	A/A	A/G
36	2817	C/C	C/T
37	2855	G/G	G/T
38	2874	A/A	A/G
39	2901	G/G	G/T
40	3057	G/G	G/C

多型番号	配列番号1中の塩基番号	雌遺伝子型	雄遺伝子型
41	3093	T/T	T/C
42	3139	G/G	G/A
43	3146	A/A	A/T
44	3148	A/A	A/G
45	3196	C/C	C/T
46	3199	T/T	T/A
47	3249	C/C	C/T
48	3251	G/G	G/A
49	3368	G/G	G/T
50	3404	A/A	A/GAGAT
51	3407	T/T	T/A
52	3426	G/G	G/C
53	3433	A/A	A/C
54	3442	T/T	T/A
55	3470	A/A	A/G
56	3479	C/C	C/T
57	3545	C/C	C/T
58	3546	A/A	A/G
59	3735	C/C	C/T
60	3756	A/A	A/G
61	3769	C/C	C/T
62	3788	C/C	C/T
63	6256	C/C	C/A
64	6312	A/A	A/G
65	6455	C/C	C/T
66	6585	T/T	T/C
67	6781	C/C	C/A
68	6879	A/A	A/G
69	6930	T/T	T/C
70	6933	A/A	A/G
71	6940	C/C	C/T
72	6941	G/G	G/A
73	6987	C/C	C/T
74	7014	T/T	T/A

【請求項 3】

前記 DNA 多型の検出を PCR により行うものである、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

配列番号 1 で表される塩基配列の 5 0 1 番目の塩基、5 6 1 および 5 6 2 番目の塩基、5 6 4 番目の塩基、5 9 5 番目の塩基、6 4 4 番目の塩基、7 6 9 番目の塩基、7 7 0 番目の塩基、7 8 9 番目の塩基、1 1 9 8 番目の塩基、1 2 0 0 番目の塩基、1 2 1 3 番目の塩基、1 2 7 5 番目の塩基、1 2 8 0 番目の塩基、1 3 3 8 番目の塩基、1 3 4 4 番目の塩基、1 4 1 6 ~ 1 4 2 3 番目の塩基、1 4 7 2 番目の塩基、1 4 9 3 番目の塩基、1 8 6 6 番目の塩基、1 8 6 7 番目の塩基、1 8 9 9 番目の塩基、1 9 1 3 番目の塩基、2 5 8 3 番目の塩基、2 5 8 8 番目の塩基、2 5 8 9 番目の塩基、2 6 1 1 番目の塩基、2 6 2 2 番目の塩基、2 6 3 4 番目の塩基、2 6 4 3 番目の塩基、2 6 8 7 番目の塩基、2 6 9 3 番目の塩基、2 7 5 2 番目の塩基、2 7 5 3 番目の塩基、2 7 5 6 番目の塩基、2 8 0 1 番目の塩基、2 8 1 7 番目の塩基、2 8 5 5 番目の塩基、2 8 7 4 番目の塩基、2 9 0 1 番目の塩基、3 0 5 7 番目の塩基、3 0 9 3 番目の塩基、3 1 3 9 番目の塩基、3 1 4 6 番目の塩基、3 1 4 8 番目の塩基、3 1 9 6 番目の塩基、3 1 9 9 番目の塩基、3 2 4 9 番目の塩基、3 2 5 1 番目の塩基、3 3 6 8 番目の塩基、3 4 0 4 番目の塩基、3 4 0 7 番目の塩基、3 4 2 6 番目の塩基、3 4 3 3 番目の塩基、3 4 4 2 番目の塩基、3 4 7 0 番目の塩基、3 4 7 9 番目の塩基、3 5 4 5 番目の塩基、3 5 4 6 番目の塩基、3 7 3 5 番目の塩基、3 7 5 6 番目の塩基、3 7 6 9 番目の塩基、3 7 8 8 番目の塩基、6 2 5 6 番目の塩基、6 3 1 2 番目の塩基、6 4 5 5 番目の塩基、6 5 8 5 番目の塩基、6 7 8 1 番目の塩基、6 8 7 9 番目の塩基、6 9 3 0 番目の塩基、6 9 3 3 番目の塩基、6 9 4 0 番目の塩基、6 9 4 1 番目の塩基、6 9 8 7 番目の塩基並びに 7 0 1 4 番目の塩基の位置に存在する DNA 多型からなる群から選択される 1 以上の DNA 多型を含む領域を増幅することができる、クロマグロの性判別用プライマー。

【請求項 5】

配列番号 1 で表される塩基配列の 5 0 1 番目の塩基、5 6 1 および 5 6 2 番目の塩基、5 6 4 番目の塩基、5 9 5 番目の塩基、6 4 4 番目の塩基、7 6 9 番目の塩基、7 7 0 番目の塩基、7 8 9 番目の塩基、1 1 9 8 番目の塩基、1 2 0 0 番目の塩基、1 2 1 3 番目の塩基、1 2 7 5 番目の塩基、1 2 8 0 番目の塩基、1 3 3 8 番目の塩基、1 3 4 4 番目の塩基、1 4 1 6 ~ 1 4 2 3 番目の塩基、1 4 7 2 番目の塩基、1 4 9 3 番目の塩基、1 8 6 6 番目の塩基、1 8 6 7 番目の塩基、1 8 9 9 番目の塩基、1 9 1 3 番目の塩基、2 5 8 3 番目の塩基、2 5 8 8 番目の塩基、2 5 8 9 番目の塩基、2 6 1 1 番目の塩基、2 6 2 2 番目の塩基、2 6 3 4 番目の塩基、2 6 4 3 番目の塩基、2 6 8 7 番目の塩基、2 6 9 3 番目の塩基、2 7 5 2 番目の塩基、2 7 5 3 番目の塩基、2 7 5 6 番目の塩基、2 8 0 1 番目の塩基、2 8 1 7 番目の塩基、2 8 5 5 番目の塩基、2 8 7 4 番目の塩基、2 9 0 1 番目の塩基、3 0 5 7 番目の塩基、3 0 9 3 番目の塩基、3 1 3 9 番目の塩基、3 1 4 6 番目の塩基、3 1 4 8 番目の塩基、3 1 9 6 番目の塩基、3 1 9 9 番目の塩基、3 2 4 9 番目の塩基、3 2 5 1 番目の塩基、3 3 6 8 番目の塩基、3 4 0 4 番目の塩基、3 4 0 7 番目の塩基、3 4 2 6 番目の塩基、3 4 3 3 番目の塩基、3 4 4 2 番目の塩基、3 4 7 0 番目の塩基、3 4 7 9 番目の塩基、3 5 4 5 番目の塩基、3 5 4 6 番目の塩基、3 7 3 5 番目の塩基、3 7 5 6 番目の塩基、3 7 6 9 番目の塩基、3 7 8 8 番目の塩基、6 2 5 6 番目の塩基、6 3 1 2 番目の塩基、6 4 5 5 番目の塩基、6 5 8 5 番目の塩基、6 7 8 1 番目の塩基、6 8 7 9 番目の塩基、6 9 3 0 番目の塩基、6 9 3 3 番目の塩基、6 9 4 0 番目の塩基、6 9 4 1 番目の塩基、6 9 8 7 番目の塩基並びに 7 0 1 4 番目の塩基の位置に存在する DNA 多型からなる群から選択される 1 以上の DNA 多型を検出することができる、クロマグロの性判別用プローブ。

【請求項 6】

請求項 4 記載のプライマーおよび / または請求項 5 記載のプローブを含む、クロマグロの性判別用キット。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】**【0001】**

本発明は、クロマグロの性別特異的なDNA多型を含む遺伝的性判別マーカーおよび当該DNA多型を検出するクロマグロの遺伝的性判別方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

日本は世界最大のマグロ消費国であることから、マグロ類の資源管理や持続的利用に関して国際的な責任を負っている。資源管理施策の立案には、漁獲物や資源調査サンプルから取得された各種の生物情報を必要とし、体長、年齢、種等のデータとともに、性別データは重要な情報の1つである。

10

【0003】

現在、クロマグロ(*Thunnus orientalis*)の性判別は、生殖腺の目視あるいは組織学的切片観察という古典的な手法により行われている。しかし、これらの手法には、1)生殖腺が発達していない稚仔魚および若齢個体、並びに市場流通する内臓処理済み個体の性判別には利用できない、2)検査に労力と時間がかかる、3)個体を生かした状態で性判別することが困難である、という欠点がある。そのため、クロマグロ資源調査サンプルの大部分で性別データが欠損したままとなり、クロマグロ生活史における時間的・空間的な移動・分布と性別との関連性は全く分かっていない。また、近年のマグロ養殖では、天然ヨコワから人工種苗への転換が進められているが、飼育個体を生かした状態で性判別することが困難であるため、養成中の親魚群が産卵に適した性比で構成されているかどうかを調べることも出来ない。このような理由から、クロマグロの簡便で高精度な性判別方法の開発が望まれている。

20

【0004】

これまでに、継代F3世代のクロマグロの雄特異的な6塩基のDNA欠失領域を用いてクロマグロの性判別を行う方法が知られている(非特許文献1)。

【先行技術文献】**【非特許文献】****【0005】**

【非特許文献1】Agawa Y. et al. Identification of male sex linked DNA sequence of the cultured Pacific Bluefin tuna *Thunnus orientalis*. Fisheries science. 2015, 81(1), 113-121.

30

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

しかしながら、当該領域を利用したクロマグロの性判別は、特定の経代F3世代における成功率は94%と高いものの、天然魚では成功率が39%と低く、天然魚を含むクロマグロの性判別方法として利用できる十分な精度を有していない。一般に、少数の親から作出された経代群や家系においては、天然集団に殆ど見つからないような低頻度のDNA多型が偶然広まってしまうことがある。当該領域は、経代飼育の過程において、ごく一部の雄個体が持つY染色体上の塩基配列がその子孫である経代群に広まったものであると考えられる。

40

【0007】

よって、本発明の課題は、簡便で精度の高いクロマグロの遺伝的性判別方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】**【0008】**

そこで、本発明者らは、上記課題を解決するために、天然クロマグロ31個体の全ゲノムリシーケンス解析により塩基配列を網羅的に探索した結果、クロマグロゲノム配列のスキップ64番中に、性別特異的なDNA多型を複数見出した。また、当該DNA多型の存在する領域は、非特許文献1で用いる領域とは異なる領域であることを見出した。

50

本発明者らは、かかる知見に基づきさらに検討した結果、当該DNA多型を用いることで、クロマグロの遺伝的性を簡便にかつ高い精度で判別できることを見出し、本発明を完成した。

【0009】

すなわち、本発明は、次の〔1〕～〔7〕を提供するものである。

〔1〕配列番号1で表される塩基配列の501番目の塩基、561および562番目の塩基、564番目の塩基、595番目の塩基、644番目の塩基、769番目の塩基、770番目の塩基、789番目の塩基、1198番目の塩基、1200番目の塩基、1213番目の塩基、1275番目の塩基、1280番目の塩基、1338番目の塩基、1344番目の塩基、1416～1423番目の塩基、1472番目の塩基、1493番目の塩基、1866番目の塩基、1867番目の塩基、1899番目の塩基、1913番目の塩基、2583番目の塩基、2588番目の塩基、2589番目の塩基、2611番目の塩基、2622番目の塩基、2634番目の塩基、2643番目の塩基、2687番目の塩基、2693番目の塩基、2752番目の塩基、2753番目の塩基、2756番目の塩基、2801番目の塩基、2817番目の塩基、2855番目の塩基、2874番目の塩基、2901番目の塩基、3057番目の塩基、3093番目の塩基、3139番目の塩基、3146番目の塩基、3148番目の塩基、3196番目の塩基、3199番目の塩基、3249番目の塩基、3251番目の塩基、3368番目の塩基、3404番目の塩基、3407番目の塩基、3426番目の塩基、3433番目の塩基、3442番目の塩基、3470番目の塩基、3479番目の塩基、3545番目の塩基、3546番目の塩基、3735番目の塩基、3756番目の塩基、3769番目の塩基、3788番目の塩基、6256番目の塩基、6312番目の塩基、6455番目の塩基、6585番目の塩基、6781番目の塩基、6879番目の塩基、6930番目の塩基、6933番目の塩基、6940番目の塩基、6941番目の塩基、6987番目の塩基並びに7014番目の塩基の位置に存在するDNA多型からなる群から選択される1以上のDNA多型を含む、クロマグロの性判別マーカー。

10

20

〔2〕クロマグロ被検体のゲノムDNAを含有する試料の、配列番号1で表される塩基配列の501番目の塩基、561および562番目の塩基、564番目の塩基、595番目の塩基、644番目の塩基、769番目の塩基、770番目の塩基、789番目の塩基、1198番目の塩基、1200番目の塩基、1213番目の塩基、1275番目の塩基、1280番目の塩基、1338番目の塩基、1344番目の塩基、1416～1423番目の塩基、1472番目の塩基、1493番目の塩基、1866番目の塩基、1867番目の塩基、1899番目の塩基、1913番目の塩基、2583番目の塩基、2588番目の塩基、2589番目の塩基、2611番目の塩基、2622番目の塩基、2634番目の塩基、2643番目の塩基、2687番目の塩基、2693番目の塩基、2752番目の塩基、2753番目の塩基、2756番目の塩基、2801番目の塩基、2817番目の塩基、2855番目の塩基、2874番目の塩基、2901番目の塩基、3057番目の塩基、3093番目の塩基、3139番目の塩基、3146番目の塩基、3148番目の塩基、3196番目の塩基、3199番目の塩基、3249番目の塩基、3251番目の塩基、3368番目の塩基、3404番目の塩基、3407番目の塩基、3426番目の塩基、3433番目の塩基、3442番目の塩基、3470番目の塩基、3479番目の塩基、3545番目の塩基、3546番目の塩基、3735番目の塩基、3756番目の塩基、3769番目の塩基、3788番目の塩基、6256番目の塩基、6312番目の塩基、6455番目の塩基、6585番目の塩基、6781番目の塩基、6879番目の塩基、6930番目の塩基、6933番目の塩基、6940番目の塩基、6941番目の塩基、6987番目の塩基並びに7014番目の塩基の位置に存在するDNA多型からなる群から選択される1以上のDNA多型を検出する、クロマグロの性判別方法。

30

40

〔3〕さらに、前記DNA多型が下記表に示される雌の遺伝子型を有する場合にクロマグロ被検体が雌であると判別し、前記DNA多型が下記表に示される雄の遺伝子型を有する場合にクロマグロ被検体が雄であると判別するものである、上記〔2〕記載の方法。

50

【 0 0 1 0 】

【 表 1 】

多型番号	配列番号1中の塩基番号	雌遺伝子型	雄遺伝子型
1	501	A/A	A/T
2	561-562	TG/TG	TG/T
3	564	T/T	T/TCC
4	595	A/A	A/G
5	644	T/T	T/C
6	769	C/C	C/T
7	770	A/A	A/G
8	789	A/A	A/G
9	1198	G/G	G/T
10	1200	T/T	T/G
11	1213	C/C	C/T
12	1275	C/C	C/T
13	1280	C/C	C/A
14	1338	T/T	T/C
15	1344	T/T	T/G
16	1416-1423	GTAATGTA/ GTAATGTA	GTAATGTA/ G
17	1472	C/C	C/T
18	1493	T/T	T/C
19	1866	A/A	A/C
20	1867	G/G	G/C
21	1899	C/C	C/T
22	1913	G/G	G/C
23	2583	T/T	T/C
24	2588	G/G	G/A
25	2589	C/C	C/T
26	2611	C/C	C/T
27	2622	G/G	G/A
28	2634	G/G	G/A
29	2643	G/G	G/C
30	2687	G/G	G/A
31	2693	G/G	G/A
32	2752	A/A	A/ATGGTC
33	2753	A/A	A/G
34	2756	T/T	T/C
35	2801	A/A	A/G
36	2817	C/C	C/T
37	2855	G/G	G/T
38	2874	A/A	A/G
39	2901	G/G	G/T
40	3057	G/G	G/C

多型番号	配列番号1中の塩基番号	雌遺伝子型	雄遺伝子型
41	3093	T/T	T/C
42	3139	G/G	G/A
43	3146	A/A	A/T
44	3148	A/A	A/G
45	3196	C/C	C/T
46	3199	T/T	T/A
47	3249	C/C	C/T
48	3251	G/G	G/A
49	3368	G/G	G/T
50	3404	A/A	A/GAGAT
51	3407	T/T	T/A
52	3426	G/G	G/C
53	3433	A/A	A/C
54	3442	T/T	T/A
55	3470	A/A	A/G
56	3479	C/C	C/T
57	3545	C/C	C/T
58	3546	A/A	A/G
59	3735	C/C	C/T
60	3756	A/A	A/G
61	3769	C/C	C/T
62	3788	C/C	C/T
63	6256	C/C	C/A
64	6312	A/A	A/G
65	6455	C/C	C/T
66	6585	T/T	T/C
67	6781	C/C	C/A
68	6879	A/A	A/G
69	6930	T/T	T/C
70	6933	A/A	A/G
71	6940	C/C	C/T
72	6941	G/G	G/A
73	6987	C/C	C/T
74	7014	T/T	T/A

【 0 0 1 1 】

〔 4 〕 前記 DNA 多型の検出を PCR により行うものである、〔 2 〕 または 〔 3 〕 記載の方法。

〔 5 〕 配列番号 1 で表される塩基配列の 5 0 1 番目の塩基、5 6 1 および 5 6 2 番目の塩基、5 6 4 番目の塩基、5 9 5 番目の塩基、6 4 4 番目の塩基、7 6 9 番目の塩基、7 7 0 番目の塩基、7 8 9 番目の塩基、1 1 9 8 番目の塩基、1 2 0 0 番目の塩基、1 2 1 3 番目の塩基、1 2 7 5 番目の塩基、1 2 8 0 番目の塩基、1 3 3 8 番目の塩基、1 3 4 4

番目の塩基、1416～1423番目の塩基、1472番目の塩基、1493番目の塩基、1866番目の塩基、1867番目の塩基、1899番目の塩基、1913番目の塩基、2583番目の塩基、2588番目の塩基、2589番目の塩基、2611番目の塩基、2622番目の塩基、2634番目の塩基、2643番目の塩基、2687番目の塩基、2693番目の塩基、2752番目の塩基、2753番目の塩基、2756番目の塩基、2801番目の塩基、2817番目の塩基、2855番目の塩基、2874番目の塩基、2901番目の塩基、3057番目の塩基、3093番目の塩基、3139番目の塩基、3146番目の塩基、3148番目の塩基、3196番目の塩基、3199番目の塩基、3249番目の塩基、3251番目の塩基、3368番目の塩基、3404番目の塩基、3407番目の塩基、3426番目の塩基、3433番目の塩基、3442番目の塩基、3470番目の塩基、3479番目の塩基、3545番目の塩基、3546番目の塩基、3735番目の塩基、3756番目の塩基、3769番目の塩基、3788番目の塩基、6256番目の塩基、6312番目の塩基、6455番目の塩基、6585番目の塩基、6781番目の塩基、6879番目の塩基、6930番目の塩基、6933番目の塩基、6940番目の塩基、6941番目の塩基、6987番目の塩基並びに7014番目の塩基の位置に存在するDNA多型からなる群から選択される1以上のDNA多型を含む領域を増幅することができる、クロマグロの性判別用プライマー。

10

〔6〕配列番号1で表される塩基配列の501番目の塩基、561および562番目の塩基、564番目の塩基、595番目の塩基、644番目の塩基、769番目の塩基、770番目の塩基、789番目の塩基、1198番目の塩基、1200番目の塩基、1213番目の塩基、1275番目の塩基、1280番目の塩基、1338番目の塩基、1344番目の塩基、1416～1423番目の塩基、1472番目の塩基、1493番目の塩基、1866番目の塩基、1867番目の塩基、1899番目の塩基、1913番目の塩基、2583番目の塩基、2588番目の塩基、2589番目の塩基、2611番目の塩基、2622番目の塩基、2634番目の塩基、2643番目の塩基、2687番目の塩基、2693番目の塩基、2752番目の塩基、2753番目の塩基、2756番目の塩基、2801番目の塩基、2817番目の塩基、2855番目の塩基、2874番目の塩基、2901番目の塩基、3057番目の塩基、3093番目の塩基、3139番目の塩基、3146番目の塩基、3148番目の塩基、3196番目の塩基、3199番目の塩基、3249番目の塩基、3251番目の塩基、3368番目の塩基、3404番目の塩基、3407番目の塩基、3426番目の塩基、3433番目の塩基、3442番目の塩基、3470番目の塩基、3479番目の塩基、3545番目の塩基、3546番目の塩基、3735番目の塩基、3756番目の塩基、3769番目の塩基、3788番目の塩基、6256番目の塩基、6312番目の塩基、6455番目の塩基、6585番目の塩基、6781番目の塩基、6879番目の塩基、6930番目の塩基、6933番目の塩基、6940番目の塩基、6941番目の塩基、6987番目の塩基並びに7014番目の塩基の位置に存在するDNA多型からなる群から選択される1以上のDNA多型を検出することができる、クロマグロの性判別用プローブ。

20

30

〔7〕〔5〕記載のプライマーおよび/または〔6〕記載のプローブを含む、クロマグロの性判別用キット。

40

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、クロマグロの遺伝的性の判別を可能とするDNA多型を含む性判別マーカー、当該DNA多型を検出するクロマグロの性判別方法、当該方法に利用するプライマー、プローブおよびキットが提供される。本発明によれば、天然魚および養殖魚を含むクロマグロ由来の細胞、組織、体表粘液といった試料を用いて、クロマグロの性別を簡便かつ高い精度で判別することができる。これにより、漁獲物もしくは資源調査サンプルから、または個体を生かしたまま採取したサンプルから、性別データを簡便かつ高い精度で取得できるようになり、クロマグロの生態の解明や人工種苗生産のための親魚養成の計画的な実施に資することができる。

50

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】天然クロマグロ31個体の領域1の塩基配列（配列番号1の1309～1458番目の塩基からなる配列に相当する塩基配列）のアライメント結果を示す図である。REFは、参照配列（配列番号1の1309～1458番目の塩基からなる配列）を示す。ホモ接合型の個体はコンセンサス配列を、ヘテロ接合型の個体（一部の雌と全ての雄）は対立遺伝子1が参照配列と完全一致するため、対立遺伝子2の塩基配列のみを示す。塩基配列中のドットは、参照配列と同一の塩基を、ハイフンは欠失を示す。塩基配列中の矢印および四角は、雄に特異的または極めて特異性が高い一塩基多型および欠失領域を示す。アライメント下部の黒矢印は、上記一塩基多型および欠失領域に基づいて設計した雄特異的なY3__F1プライマー（配列番号2）およびY3__R1プライマー（配列番号3）を示す。白抜き矢印は、雌雄で共通した配列から設計した雌雄共通のY3__DEL__F2プライマー（配列番号8）およびY3__DEL__R1プライマー（配列番号9）を示す。

10

【図2】天然クロマグロ31個体の領域2の塩基配列（配列番号1の3059～3288番目の塩基からなる配列に相当する塩基配列）のアライメント結果を示す図である。REFは、参照配列（配列番号1の3059～3288番目の塩基からなる配列）を示す。ホモ接合型の個体はコンセンサス配列を、ヘテロ接合型の個体（一部の雌と全ての雄）は対立遺伝子1が参照配列と完全一致かほぼ同一であるため、対立遺伝子2の塩基配列のみを示す。塩基配列中のドットは、参照配列と同一の塩基を示す。塩基配列中の矢印は、雄に特異的または極めて特異性が高い一塩基多型を示す。アライメント下部の黒矢印は、上記一塩基多型に基づいて設計した雄特異的なY2__F1プライマー（配列番号6）およびY2__R2プライマー（配列番号7）を示す。

20

【図3】雄特異的プライマーを用いたPCRおよびアガロース電気泳動の結果を示す図である。図3aは領域1の、図3bは領域2の結果を示す。

【図4】領域1の雄特異的欠失領域を対象としたPCRおよびマイクロチップ電気泳動の結果を示す図である。

【図5】領域1の雄特異的欠失領域を対象としたPCRおよびマイクロチップ電気泳動の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

30

本明細書における塩基配列（ヌクレオチド配列）、核酸などの略号による表示は、IUPAC-IUB規定（IUPAC IUB communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138:9 37, 1984）、「塩基配列またはアミノ酸配列を含む明細書等の作製のためのガイドライン」（特許庁編）などの、当該分野で慣用される記号で記載されている。本明細書において「デオキシリボ核酸（DNA）」は、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖という各1本鎖DNAを包含する。

【0015】

また、本明細書において、「ヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」は、核酸と同義であって、DNA、およびRNAの両方を含むものとする。当該DNAには、cDNA、ゲノムDNAおよび合成DNAのいずれもが含まれる。また当該RNAには、total RNA、mRNA、rRNAおよび合成のRNAのいずれもが含まれる。また、「ヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」は2本鎖であっても1本鎖であってもよく、ある配列を有する「ヌクレオチド」（または「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド」）といった場合、特に言及しない限り、これに相補的な配列を有する「ヌクレオチド」（または「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド」）も包括的に意味するものとする。

40

【0016】

本明細書において「DNA多型」とは、個体間でゲノムDNA塩基配列上の特定部位の塩基配列が異なり、その頻度が集団の1%以上であるものを指し、具体的には、クロマグロ雌雄間でゲノムDNA塩基配列上の特定部位の塩基配列が異なるものを指す。当該多型

50

としては置換、欠失、重複、挿入、逆位等が挙げられる。特に、1個の塩基が他の塩基に置換されたことによる多型を一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) という。以下、DNA多型の遺伝子型を対立遺伝子1 / 対立遺伝子2のように表すことがある。例えば、A / Aのように両対立遺伝子が同じ場合、遺伝子型はホモ接合型であり、A / Tのように両対立遺伝子が異なる場合、遺伝子型はヘテロ接合型である。本明細書において「DNA多型」は、対立遺伝子1、対立遺伝子2およびそれらの相補鎖のいずれをも含むものである。

【0017】

本明細書において「クロマグロ」は、*Thunnus orientalis*を指す。クロマグロの染色体数は1組24本であり、ゲノムサイズは約8億塩基対である。このうち、クロマグロゲノム配列のスキファールド64番に含まれる約7.5 kbのゲノムDNAの塩基配列を配列番号1に示す。「スキファールド」とは、ゲノム解析により得られた多数の断片的な配列を用いてゲノム配列を構築した結果まとめられた配列のことを指す。なお、配列番号1の塩基配列は雌の塩基配列である。配列番号1の422番目から3595番目、3735番目から3788番目、6240番目から6642番目、および6698番目から7197番目は、それぞれ、組換えが強く抑制された連鎖不平衡ブロックを形成している。本明細書において、配列番号1で表される塩基配列中、1309～1458番目の塩基からなる配列を領域1、3059～3288番目の塩基からなる配列を領域2と称する。

【0018】

本発明は、クロマグロのゲノムDNAの配列番号1で表される塩基配列における特定のDNA多型がクロマグロの遺伝的性と強く相関しており、当該DNA多型を性判別マーカーとして検出することによって、クロマグロの遺伝的性を簡便にかつ高精度に判別できるという事実の発見に基づいて完成されている。ここで、「遺伝的性」とは、遺伝によって決まる性別のことをいい、以下、単に「性」あるいは「性別」ともいう。

【0019】

本発明において、クロマグロの性判別の指標として、すなわち性判別マーカーとして用いられるDNA多型には、以下の表2に示す(1)～(74)のDNA多型が含まれる。各DNA多型は全て、雌の遺伝子型がホモ接合型であり、雄の遺伝子型がヘテロ接合型である。

【0020】

10

20

30

【表 2】

多型番号	配列番号1中の塩基番号	雌遺伝子型	雄遺伝子型
1	501	A/A	A/T
2	561-562	TG/TG	TG/T
3	564	T/T	T/TCC
4	595	A/A	A/G
5	644	T/T	T/C
6	769	C/C	C/T
7	770	A/A	A/G
8	789	A/A	A/G
9	1198	G/G	G/T
10	1200	T/T	T/G
11	1213	C/C	C/T
12	1275	C/C	C/T
13	1280	C/C	C/A
14	1338	T/T	T/C
15	1344	T/T	T/G
16	1416-1423	GTAATGTA/ GTAATGTA	GTAATGTA/ G
17	1472	C/C	C/T
18	1493	T/T	T/C
19	1866	A/A	A/C
20	1867	G/G	G/C
21	1899	C/C	C/T
22	1913	G/G	G/C
23	2583	T/T	T/C
24	2588	G/G	G/A
25	2589	C/C	C/T
26	2611	C/C	C/T
27	2622	G/G	G/A
28	2634	G/G	G/A
29	2643	G/G	G/C
30	2687	G/G	G/A
31	2693	G/G	G/A
32	2752	A/A	A/ATGGTC
33	2753	A/A	A/G
34	2756	T/T	T/C
35	2801	A/A	A/G
36	2817	C/C	C/T
37	2855	G/G	G/T
38	2874	A/A	A/G
39	2901	G/G	G/T
40	3057	G/G	G/C

多型番号	配列番号1中の塩基番号	雌遺伝子型	雄遺伝子型
41	3093	T/T	T/C
42	3139	G/G	G/A
43	3146	A/A	A/T
44	3148	A/A	A/G
45	3196	C/C	C/T
46	3199	T/T	T/A
47	3249	C/C	C/T
48	3251	G/G	G/A
49	3368	G/G	G/T
50	3404	A/A	A/GAGAT
51	3407	T/T	T/A
52	3426	G/G	G/C
53	3433	A/A	A/C
54	3442	T/T	T/A
55	3470	A/A	A/G
56	3479	C/C	C/T
57	3545	C/C	C/T
58	3546	A/A	A/G
59	3735	C/C	C/T
60	3756	A/A	A/G
61	3769	C/C	C/T
62	3788	C/C	C/T
63	6256	C/C	C/A
64	6312	A/A	A/G
65	6455	C/C	C/T
66	6585	T/T	T/C
67	6781	C/C	C/A
68	6879	A/A	A/G
69	6930	T/T	T/C
70	6933	A/A	A/G
71	6940	C/C	C/T
72	6941	G/G	G/A
73	6987	C/C	C/T
74	7014	T/T	T/A

【0021】

性判別マーカーとして用いられるDNA多型の性判別率は、93%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、さらに好ましくは100%である。ここで、性判別率とは、後記実施例で示す性判別率を指す。具体的には、表2の(1)~(74)のDNA多型のうち、(1)、(4)~(13)、(15)、(16)、(23)~(31)、(35)~(43)、(45)~(47)、(49)、(54)~(57)、(59)~(63)、(65)~(67)および(71)~(74)のDNA多型からなる群より

選択される1以上のDNA多型を性判別マーカーとして用いることが、性判別の精度の観点から好ましい。また、性判別の実施のしやすさの観点からは、(16)のDNA多型が好ましい。なお、表2の(1)~(74)のDNA多型のうち、(1)~(58)のDNA多型、(59)~(62)のDNA多型、(63)~(66)のDNA多型、および(67)~(74)のDNA多型は、それぞれ、連鎖不平衡ブロックに含まれている。本発明においては、上記のDNA多型のうち、1つのDNA多型のみを性判別の指標として用いてもよいし、2以上のDNA多型を組み合わせることで性判別の指標として用いてもよい。2以上のDNA多型を組み合わせることで性判別の精度はより高まるため好ましい。

【0022】

また、配列番号1で表される塩基配列の部分塩基配列であって、表2の(1)~(74)のDNA多型からなる群より選択される1以上のDNA多型を含む連続する塩基配列からなる部分塩基配列を含むオリゴまたはポリヌクレオチドあるいはその相補鎖を、性判別マーカーとして用いることもできる。このとき、DNA多型部位の塩基は、配列番号1で表される塩基配列に含まれる対立遺伝子1の塩基であってもよいし、対立遺伝子2の塩基であってもよく、検出の目的に応じて適宜選択できる。これらのオリゴまたはポリヌクレオチドあるいはそれらの相補鎖の長さ(塩基長)は、クロマグロゲノム上で特異的に認識される長さであればよく、その限りにおいて特に制限されない。通常約10~1000塩基であり、好ましくは約20~500塩基であり、より好ましくは約20~100塩基である。

【0023】

本発明のクロマグロの性判別方法について、以下に詳述する。

本発明の方法は、クロマグロ被検体由来のゲノムDNAを含有する試料において、表2のDNA多型の1以上を検出するものである。ここで「DNA多型の検出」とは、DNA多型部位の塩基を検出、同定すること、DNA多型部位の雄特異的対立遺伝子を検出すること、および/またはDNA多型の遺伝子型がホモ接合型であるかヘテロ接合型であるかを検出することを含む。検出結果に応じて、被検体が雌であるか雄であるかを判別する。被検体の性別は、表2に記載の所定のDNA多型部位で検出される塩基、雄特異的対立遺伝子および/または遺伝子型の情報に基づいて判断できる。例えば、表2の(1)のDNA多型は、配列番号1で表される塩基配列の501番目の塩基に存在する一塩基多型であり、雌の遺伝子型はA/Aのホモ接合型であり、雄の遺伝子型はA/Tのヘテロ接合型である。配列番号1で表される塩基配列の501番目の塩基としてAのみが検出されれば、試料が由来する被検体は雌であり、AおよびTが検出されれば、被検体は雄であると判別できる。あるいは、当該一塩基多型部位の雄特異的対立遺伝子であるTアレルが検出されなければ、試料が由来する被検体は雌であり、Tアレルが検出されれば、雄であると判別できる。あるいは、当該一塩基多型部位の遺伝子型がA/Aのホモ接合型であれば、試料が由来する被検体は雌であり、A/Tのヘテロ接合型であれば、雄であると判別できる。表2の(2)~(74)のDNA多型を用いた場合も、表2に基づき、同様に判別できる。

【0024】

本発明の方法においては、より具体的には、まず、クロマグロ被検体よりDNAを含有する試料を採取する。クロマグロ被検体は、天然魚であってもよいし、養殖魚であってもよい。クロマグロ被検体より採取されるDNA含有試料としては、特に制限されないが、例えば、各種細胞、組織、これらに由来する培養細胞などを例示できる。また、ヒレ、筋肉、内臓、体表粘液等を例示することができる。次に、必要に応じて当該試料に含まれるゲノムDNAを抽出する。DNA含有試料からのゲノムDNAの抽出は、公知の方法を用いて行うことができる。ゲノムDNAの抽出法としては、例えば、フェノール法、CTAB法、アルカリSDS法等が挙げられる。ゲノムDNAは、粗抽出物をそのまま使用してもよいし、必要に応じて、公知の方法により精製してもよい。ゲノムDNA抽出のための試薬やキットは市販されており、これを用いてもよい。

【0025】

次いで、性判別の指標として用いられるDNA多型を検出する。DNA多型の検出は、公知の方法を用いて行うことができる。DNA多型の検出法としては、例えば、PCR-SSP、PCR-SSCP、PCR-RLFP、PCR-SSO、PCR-ASP、TaqMan PCR法、サイクリングプローブ法、モレキュラービーコン法、HRM法、DOL法、TDI法、ダイレクトシーケンス法、SNaPshot、dHPLC、インベーター法、Sniper法、マイクロアレイ法、MALDI-TOF/MS法などを用いた方法が挙げられる。こうした方法は、当業者に周知である（例えば、野島博編、「ゲノム創薬の最前線」、p44-54、羊土社、2001を参照）。DNA多型検出のための試薬やキットも市販されており、これを用いてもよい。DNA多型の検出法は、これらに限定されるものではなく、他の公知の方法を利用してもよい。また、これらの方法を単独で用いても、2以上の方法を組み合わせて用いてもよい。

10

【0026】

本発明の方法において、性判別の指標として用いられるDNA多型を検出する場合、当該検出のためのプライマー、プローブ等は、当該DNA多型を特異的に検出するように設計されることが好ましい。本発明の方法で性判別の指標として用いられるDNA多型は、全て配列番号1で表される塩基配列上に存在する。当業者は、配列番号1で表される塩基配列および表2のDNA多型部位の各対立遺伝子の情報に基づき、増幅サイズ、プライマーの塩基長、GC含有率、Tm値、検出原理等を考慮して、検出すべきDNA多型のための適切なプライマーやプローブを設計することができる。

20

【0027】

本発明のクロマグロの性判別方法は、単独で実施しても、他の性判別方法と組み合わせて行ってもよい。他の性判別方法としては、生殖腺の目視、組織学的切片観察等が挙げられる。

【0028】

後記実施例では、本発明の方法の好適な実施形態の一つとして、PCR-SSPを用いた方法を示す。PCR-SSPは、3'末端が目的のDNA多型部位となるように設計したプライマーを用いてPCRを行い、プライマーの3'末端が鋳型DNAと相補的であるか否かによってPCRによる増幅効率に著しい差があることを利用して、当該DNA多型を検出する方法である。具体的には、ゲノムDNAを鋳型とし、3'末端が目的のDNA多型の対立遺伝子の塩基配列となるように設計されたプライマーを用いて、当該DNA多型部位を含む約50~1000bp、好ましくは約100~500bpの領域をPCRで増幅し、次いで電気泳動を行う。所望のサイズのバンドが見られる場合には、当該対立遺伝子が存在すると判断でき、バンドが見られない場合には、当該対立遺伝子が存在しないと判断することができる。本発明の性判別マーカーは、全て、雌の場合に遺伝子型がホモ接合型であり、雄の場合に遺伝子型がヘテロ接合型であることから、雄特異的な対立遺伝子を検出対象として、所望のサイズのバンドが見られる場合には雄、バンドが見られない場合には雌と判断することができる。このとき、バンドが見られないことがPCRの失敗に起因するものでないと示すため、コントロールとして、雌雄の別なく存在する遺伝子やDNA配列を同時にPCR増幅してもよい。このような例として、ミトコンドリアのCOI遺伝子、ND4遺伝子等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。PCR増幅に用いるプライマーは、目的とするDNA多型に応じて適宜設計され、プライマーの塩基長は、通常15~50塩基であり、好ましくは15~35塩基である。当該プライマーは、目的のDNA断片を増幅できる限りにおいて、鋳型のDNA配列と1~数個、好ましくは1~5個、さらに好ましくは1~3個のミスマッチを有していてもよい。

30

40

【0029】

また、後記実施例では、本発明の方法の好適な実施形態の一つとして、PCRを用いた方法を示す。当該方法は、目的のDNA多型が塩基の欠失や挿入である場合に適用でき、目的のDNA多型を挟むように設計したプライマーを用いてPCRを行い、増幅サイズの違いに基づいて当該DNA多型を検出する方法である。具体的には、ゲノムDNAを鋳型

50

とし、目的のDNA多型部位の上流および下流に設計されたプライマーを用いて、当該DNA多型部位を含む約50～1000bp、好ましくは約100～500bp、より好ましくは約100～300bpの領域をPCRで増幅し、次いで電気泳動を行う。本発明の性判別マーカーは、全て、雌の場合に遺伝子型がホモ接合型であり、雄の場合に遺伝子型がヘテロ接合型であることから、雌雄共通のバンドのみが見られる場合には雌と判別でき、雌雄共通のバンドと当該バンドより欠失あるいは挿入領域に相当する塩基長分が短いあるいは長い雄特異的なバンドが見られる場合には雄と判別できる。PCR増幅に用いるプライマーは、目的とするDNA多型に応じて適宜設計され、プライマーの塩基長は、通常15～50塩基であり、好ましくは15～35塩基である。当該プライマーは、目的のDNA断片を増幅できる限りにおいて、鋳型のDNA配列と1～数個、好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～3個のミスマッチを有していてもよい。

10

【0030】

本発明の方法は、リアルタイムPCR検出法、例えばTaqMan PCR法によっても簡便に実施することができる。具体的には、ゲノムDNA（鋳型）、5'末端が蛍光色素で、3'末端がクエンチャー（消光物質）でそれぞれ標識されたプローブ、当該プローブとハイブリダイズする領域を含むゲノムDNAの部分配列を増幅するように設計されたプライマー、およびDNAポリメラーゼとともにPCRを行う。反応中、プローブは鋳型DNAとハイブリダイズし、同時にPCRプライマーからの伸長反応が起こる。伸長反応が進むと、DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により鋳型DNAとハイブリダイズしたプローブが切断されるため、プローブの蛍光色素が遊離してクエンチャーの影響を受けなくなり、蛍光が検出される。鋳型の増幅により、蛍光強度は指数関数的に増大する。標識からの蛍光の強度を測定することで、DNA多型を検出する。

20

プライマーおよびプローブは、目的とするDNA多型に応じて適宜設計される。当該プライマーは、その塩基長が通常約15～50塩基であり、好ましくは約15～35塩基である。目的のDNA断片を増幅できる限りにおいて、鋳型のDNA配列と1～数個、好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～3個のミスマッチを有していてもよい。当該プローブは、その塩基長が通常約15～50塩基であり、好ましくは約15～35塩基であり、5'末端がFITCやVICなどの蛍光色素で、3'末端がTAMRAなどのクエンチャー（消光物質）でそれぞれ標識されている。目的のDNA多型を含む領域と特異的にハイブリダイズできる限りにおいて、鋳型のDNA配列と1～数個、好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～3個のミスマッチを有していてもよい。また、目的のDNA多型のそれぞれの対立遺伝子について、異なるレポーター蛍光色素で標識されたプローブを用いることで、DNA多型の両対立遺伝子を1度に検出することもできる。本発明の方法で使用され得るプローブとしては、配列番号1で表される塩基配列の部分配列であって、目的のDNA多型部位の対立遺伝子の塩基を含み、かつその塩基長が通常約15～50塩基であり、好ましくは約15～35塩基である塩基配列からなるオリゴヌクレオチドまたはその相補鎖が例示される。

30

【0031】

本発明は、PCR法を採用する本発明判別（検出）方法において用いられるDNA多型検出用プライマーまたはプローブとしてのオリゴヌクレオチドをも提供する。当該オリゴヌクレオチドは、DNA多型を含む特定配列部分を特異的に増幅できるまたはDNA多型を含む特定配列部分に特異的にハイブリダイズできるものである限り特に制限はない。該オリゴヌクレオチドは配列番号1で表される塩基配列および表2のDNA多型の各対立遺伝子の情報に基づいて常法に従って適宜合成、構築することができる。

40

【0032】

その合成は、より具体的には通常のスホルミアナイト法、リン酸トリエステル法などの化学合成法によることもでき、また市販されている自動オリゴヌクレオチド合成装置などを使用して合成することもできる。二本鎖断片は、化学合成した一本鎖生成物とその相補鎖を合成し、両者を適当な条件下でアニーリングさせるか、または適当なプライマー配列とDNAポリメラーゼとを用いて、上記一本鎖生成物に相補鎖を付加させることによ

50

て、得ることができる。

【0033】

PCRで用いられるDNA増幅用のプライマー対として好適なものは、目的のDNA多型部位を含む約50～1000bp、好ましくは約100～500bpの領域を増幅できるように設計されたオリゴヌクレオチド対である。このようなプライマー対としては、目的のDNA多型部位を挟むように設計されたオリゴヌクレオチド対や、少なくとも一方のプライマーの3'末端がDNA多型部位となるように設計されたオリゴヌクレオチド対が例示される。当該プライマーは、通常約10～50個、好ましくは約15～35塩基の連続した塩基配列を有するものが例示される。

DNA多型を検出するためのプローブとして好適なものは、目的のDNA多型の対立遺伝子を含む約10～50塩基、好ましくは約15～35塩基の配列を有するオリゴヌクレオチドまたはその相補鎖が例示される。当該プローブは、5'末端がFITCやVICのような蛍光色素で標識されていてもよく、3'の末端がTAMRAのようなクエンチャー物質で標識されていてもよい。また、オリゴヌクレオチド中にRNA部位を有していてもよい。

10

【0034】

プライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドの好適なものとしては、表2の(1)～(74)のDNA多型から選択される1以上のDNA多型を含む領域を増幅できるプライマーを挙げることができる。その具体例としては、後記実施例に示される配列番号2、3、6および7で示されるフォワードプライマーおよびリバースプライマーを挙げることができる。

20

また、プローブとしては、表2の(1)～(74)のDNA多型から選択される1以上のDNA多型を検出できるものを挙げることができる。

【0035】

本発明判定(検出)方法は、試料中のDNA多型の検出のための試薬キットを利用することによって、より簡便に実施することができる。本発明はかかる判定用キットをも提供する。

【0036】

本発明キットの一つは、表2の(1)～(74)のDNA多型から選択される1以上のDNA多型を含む領域を増幅できるプライマーおよび/または当該DNA多型を検出できるプローブを含む。

30

【0037】

本発明キットにおける他の成分としては、標識剤、PCR法に必須な試薬(例えば、TaqDNAポリメラーゼ、dNTPなど)を例示することができる。標識剤としては、放射性同位元素、発光物質、蛍光物質などの化学修飾物質などが挙げられ、DNA断片自身が予め該標識剤でコンジュゲートされていてもよい。更に当該キットには、測定の実施の便益のために適当な反応希釈液、標準抗体、緩衝液、洗浄剤、反応停止液、制限酵素などが含まれていてもよい。

【実施例】

【0038】

次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

40

【0039】

実施例1 クロマグロの性別特異的な塩基配列の同定

天然クロマグロ成魚の雌16個体および雄15個体(生殖腺による性別判別済み)の全ゲノムリシーケンスデータと新たに作成したクロマグロドラフトゲノム配列を用いて変異解析を実施し、性別特異的な複数のDNA多型を見出した。当該DNA多型が存在するスキップフォルド64番の約7.5kbのゲノム領域の配列を配列番号1に示す。また、配列番号1で表される塩基配列中の各DNA多型の位置、雌の遺伝子型、雄の遺伝子型、性別判別率を表3に示す。各DNA多型の遺伝子型は、雌においてはホモ接合型であり、雄におい

50

てはヘテロ接合型である。性判別率は、データの取得できた個体数における、雌または雄特異的遺伝子型を有する個体数の割合である。各DNA多型は、その性判別率が93.5%以上と高く、性判別マーカーとして有用である。

さらに、スキャフォールド64番のゲノム配列をHaploview(v4.2)を用い、LD-based partitioning algorithmで解析したところ、配列番号1の422番目から3595番目、3735番目から3788番目、6240番目から6642番目、および6698番目から7197番目の領域が、それぞれ、連鎖不平衡ブロックであることが明らかとなった。

【0040】

【表3】

多型番号	配列番号1中の塩基番号	雌	雄	性判別成功率
1	501	AA	AT	100.0
2	561-562	TG/TG	TG/T	96.8
3	564	T/T	T/TCC	96.8
4	595	AA	AG	100.0
5	644	T/T	T/C	100.0
6	769	CC	C/T	100.0
7	770	AA	AG	100.0
8	789	AA	AG	100.0
9	1198	GG	GT	100.0
10	1200	T/T	T/G	100.0
11	1213	CC	C/T	100.0
12	1275	CC	C/T	100.0
13	1280	CC	C/A	100.0
14	1338	T/T	T/C	93.5
15	1344	T/T	T/G	100.0
16	1416-1423	GTAATGTA/ GTAATGTA	GTAATGTA/ G	100.0
17	1472	CC	C/T	96.8
18	1493	T/T	T/C	96.8
19	1866	AA	AC	96.7
20	1867	GG	GC	96.8
21	1899	CC	C/T	96.8
22	1913	GG	GC	96.8
23	2583	T/T	T/C	100.0
24	2588	GG	G/A	100.0
25	2589	CC	C/T	100.0
26	2611	CC	C/T	100.0
27	2622	GG	G/A	100.0
28	2634	GG	G/A	100.0
29	2643	GG	GC	100.0
30	2687	GG	G/A	100.0
31	2693	GG	G/A	100.0
32	2752	AA	A/ATGGTC	96.8
33	2753	AA	AG	96.8
34	2756	T/T	T/C	96.8
35	2801	AA	AG	100.0
36	2817	CC	C/T	100.0
37	2855	GG	GT	100.0
38	2874	AA	AG	100.0
39	2901	GG	GT	100.0
40	3057	GG	GC	100.0

多型番号	配列番号1中の塩基番号	雌	雄	性判別成功率
41	3093	T/T	T/C	100.0
42	3139	GG	G/A	100.0
43	3146	AA	AT	100.0
44	3148	AA	AG	93.5
45	3196	CC	C/T	100.0
46	3199	T/T	T/A	100.0
47	3249	CC	C/T	100.0
48	3251	GG	G/A	93.5
49	3368	GG	GT	100.0
50	3404	AA	AGAGAT	96.8
51	3407	T/T	T/A	96.8
52	3426	GG	GC	96.8
53	3433	AA	AC	96.8
54	3442	T/T	T/A	100.0
55	3470	AA	AG	100.0
56	3479	CC	C/T	100.0
57	3545	CC	C/T	100.0
58	3546	AA	AG	96.8
59	3735	CC	C/T	100.0
60	3756	AA	AG	100.0
61	3769	CC	C/T	100.0
62	3788	CC	C/T	100.0
63	6256	CC	C/A	100.0
64	6312	AA	AG	96.8
65	6455	CC	C/T	100.0
66	6585	T/T	T/C	100.0
67	6781	CC	C/A	100.0
68	6879	AA	AG	96.8
69	6930	T/T	T/C	96.8
70	6933	AA	AG	96.8
71	6940	CC	C/T	100.0
72	6941	GG	G/A	100.0
73	6987	CC	C/T	100.0
74	7014	T/T	T/A	100.0

【0041】

配列番号1で表される塩基配列中の2領域、具体的には配列番号1で表される塩基配列の1309~1458番目の塩基(150塩基)からなる領域1と、配列番号1で表され

る塩基配列の3059～3288番目の塩基(230塩基)からなる領域2について、リ
シーケンス解析に用いた雌16個体、雄15個体、計31個体の塩基配列をアライメント
した結果を、それぞれ図1および2に示す。アライメント中の矢印または四角で示される
各DNA多型は、雄に特異的または極めて特異性の高い変異であることが明らかとなつた
。

【0042】

実施例2 雄特異的プライマーを用いたPCRおよびアガロース電気泳動による性別判別方
法：領域1

領域1には、雄に特異的または極めて特異性の高い変異として、配列番号1で表される
塩基配列の1338および1344番目(領域1の30および36番目に相当)の塩基に
位置する一塩基多型と、1417～1423番目(領域1の109～115番目に相当)
の塩基の欠失が存在する。したがって、クロマグロ被検体のゲノムDNAを鋳型とし、こ
れらの変異に基づいて設計した表4に示す雄特異的プライマーであるY3__F1プライマ
ー(配列番号2)およびY3__R1プライマー(配列番号3)を用いたPCR増幅および
ゲル電気泳動によって、113bpのDNA断片の増幅が認められた場合に被検体の遺伝
的性は雄であると判定でき、DNA断片の増幅が認められなかった場合に被検体の遺伝
的性は雌であると判定することができる。ここで、Y3__F1プライマーの3'末端および
3'末端から7塩基目は一塩基多型の雄特異的対立遺伝子の塩基を有し、Y3__R1プ
ライマーは欠失領域の上流および下流の配列を有する。

そこで、天然クロマグロの雌4個体と雄4個体(生殖腺による性別判別済み)について、
Y3__F1プライマーおよびY3__R1プライマーによるPCRを行い、増幅産物をゲル
電気泳動した。陰性対照として、塩基配列を確認済の雌個体を用い、陽性対照として、塩
基配列を確認済の雄個体を用いた。また、ネガティブコントロール(NTC)として、D
NAなしでPCRを行った。具体的な方法は、以下の通りである。各個体より、筋肉をハ
サミ等を用いて採取し、TNE S・Urea 6M溶液(10mM Tris-HCl、
125mM NaCl、10mM EDTA、0.5% SDS、6M Urea)中で
プロテアーゼ処理を行い、自動DNA抽出装置(Maxwell RSCシステム、Ma
xwell RSC Blood DNA kit、プロメガ株式会社製)を用いてゲノ
ムDNAを調製した。このゲノムDNA(最終濃度0.5ng/μl)を鋳型とし、Pr
imeSTAR GXL kit(タカラバイオ株式会社製)とY3__F1プライマーお
よびY3__R1プライマー(最終濃度各0.4μM)を用いて、Proflex PCR
システム(アプライドバイオシステムズ製)によりPCR反応(98 10秒、60
15秒、68 15秒の反応を35サイクル)を行い、得られたPCR増幅産物を3%ア
ガロースゲルにアプライし、100Vで20分間、電気泳動を行った。なお、人為的ミス
でPCR増幅に失敗し、雄個体から113bpのDNA断片が増幅されずに、雌と誤判定
されてしまう偽陰性を防止するため、内部陽性対照としてミトコンドリアDNAのND4
遺伝子(268bp)を、表4に示すND4__FプライマーおよびND4__Rプライマー
(最終濃度各0.05μM)を用いた以外は上述の条件に従って、PCRにて増幅した。

【0043】

【表4】

標的	フォワードプライマー	配列 番号	リバースプライマー	配列 番号
領域1	Y3_F1 TGCACCTGTAACCTACTAACCG	2	Y3_R1 CCTTTTCTGGCCTCTTTACAT	3
ND4遺伝子	ND4_F ACAGACCCGTTGTCACTCC	4	ND4_R TCCCTGCATTAAACGCTCT	5
領域2	Y2_F1 GCAGACAAAAAGCCATTTCG	6	Y2_R2 CTGATGWCCTCTGTAACACAATCAT	7
雌雄共通	Y3_DEL_F2 CAGAAATCACCAGTGCACC	8	Y3_DEL_R1 GGATATTATTAGGAAACCTTTTCTCG	9

【0044】

結果を図3 aに示す。113bpのDNA断片は、雌個体(レーン1~4)および陰性対照には認められず、雄個体(レーン5~8)および陽性対照に特異的に認められた。また、内部陽性対照であるND遺伝子由来の268bpの増幅産物は全てのレーンで確認された。これらの結果は、被験体の性判別に成功したことを示している。以上の結果は、天然クロマグロの雌39個体、雄48個体(生殖腺による性判別済み)においても再現されたため、領域1に含まれるDNA多型を指標とするクロマグロの性判別方法が有効であることが明らかとなった。

【0045】

実施例3 雄特異的プライマーを用いたPCRおよびアガロース電気泳動による性判別方法：領域2

領域2には、雄に特異的または極めて特異性が高い変異として、配列番号1で表される塩基配列の3093、3139、3146、3148、3196、3199、3249、3251番目(領域2の35、81、88、90、138、141、191、193番目)の塩基に位置する一塩基多型が存在する。したがって、クロマグロ被験体のゲノムDNAを鋳型とし、これらの変異に基づいて設計した表4に示す雄特異的プライマーであるY2__F1プライマー(配列番号6)およびY2__R2プライマー(配列番号7)を用いたPCR増幅およびゲル電気泳動によって、143bpのDNA断片の増幅が認められた場合に被験体の遺伝的性は雄であると判定でき、DNA断片の増幅が認められなかった場合に被験体の遺伝的性は雌であると判定することができる。ここで、Y2__F1プライマーの3'末端並びに3'末端から3および10塩基目は一塩基多型の雄特異的対立遺伝子の塩基を有し、Y2__R2プライマーの5'末端から7塩基目は雌雄共通の低頻度多型(A/T)に対応する塩基Wを、3'末端から2および4塩基目は一塩基多型の雄特異的対立遺伝子の塩基を有する。

そこで、天然クロマグロの雌4個体と雄4個体(生殖腺による性判別済み)について、Y2__F1プライマーおよびY2__R2プライマーを用いた以外は実施例2と同様にして、PCRおよび電気泳動を行った。

【0046】

結果を図3 bに示す。143bpのDNA断片は、雌個体(レーン1~4)および陰性対照には認められず、雄個体(レーン5~8)および陽性対照に特異的に認められた。また、内部陽性対象であるND遺伝子由来の268bpの増幅産物は全てのレーンで確認された。これらの結果は、被験体の性判別に成功したことを示している。以上の結果は、天然クロマグロの雌39個体、雄48個体(生殖腺による性判別済み)においても再現されたため、領域2に含まれるDNA多型を指標とするクロマグロの性判別方法が有効であることが明らかとなった。

【0047】

実施例4 雄特異的欠失領域を対象としたPCRおよびマイクロチップ電気泳動による性判別方法：領域1

領域1には、雄に特異的な変異として、配列番号1で表される塩基配列の1417~1423番目(領域1の109~115番目)の連続7塩基の欠失が存在する。したがって、クロマグロ被験体のゲノムDNAを鋳型とし、この欠失領域を含むDNA断片を増幅するように設計した表2に示す雌雄共通プライマーであるY3__DEL__F2プライマー(配列番号8)およびY3__DEL__R1プライマー(配列番号9)を用いたPCRによって、149bpの雌雄共通DNA断片のみが認められた場合に被験体の遺伝的性は雌であると判定でき、149bpの雌雄共通DNA断片と7塩基短い142bpの雄特異的欠失型DNA断片が認められた場合に被験体の遺伝的性は雄であると判定することができる。

そこで、天然クロマグロの雌4個体と雄4個体(生殖腺による性判別済み)について、Y3__DEL__F2プライマーおよびY3__DEL__R1プライマーを用いたPCRを行い、増幅産物をマイクロチップ電気泳動装置を用いて電気泳動した。マイクロチップ電気泳動は、通常のアガロースゲル電気泳動よりも分解能が高いため、たった7塩基の長さの違うDNA断片を明確に区別することができる。陰性対照として、塩基配列を確認済の雌

10

20

30

40

50

個体を用い、陽性対照として、塩基配列を確認済の雄個体を用いた。また、ネガティブコントロール（NTC）として、DNAなしでPCRを行った。具体的な方法は、以下の通りである。各個体より、実施例2と同様にしてゲノムDNAを調製した。このゲノムDNA（最終濃度0.5ng/μl）を鋳型とし、PrimeSTAR GXL kit（タカラバイオ株式会社製）とY3_DEL_F2プライマーおよびY3_DEL_R1プライマーを用いて、Proflex PCR システム（アプライドバイオシステムズ製）によりPCR反応（98 10秒、60 15秒、68 15秒の反応を35サイクル）を行い、得られたPCR増幅産物をマイクロチップ電気泳動装置（MultiNA DNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置、DNA-500キット、島津製作所製）を用いて電気泳動した。

10

【0048】

結果を図4に示す。149bpの雌雄共通DNA断片は、全検査個体（レーン1～8）、陰性対照および陽性対照に認められた。一方、142bpの雄特異的欠失型DNA断片は、雄個体（レーン5～8）および陽性対照に特異的に認められた。これらの結果は、被験体の性判別に成功したことを示している。なお、本実施例では、目的とする149bpと142bpのDNA断片の他に、約180bpのDNA断片が雄特異的に認められた。このDNA断片は、上記雌雄共通プライマーによる目的外のPCR増幅産物であるが、雄特異的かつ安定して認められるDNA断片であり、性判別において支障はない。以上の結果は、天然クロマグロの雌39個体、雄48個体（生殖腺による性判別済み）においても再現されたため、領域1の上記DNA多型を指標とするクロマグロの性判別方法が有効であることが明らかとなった。

20

【0049】

実施例5 雄特異的欠失領域を対象としたPCRおよびマイクロチップ電気泳動による性判別方法：領域1

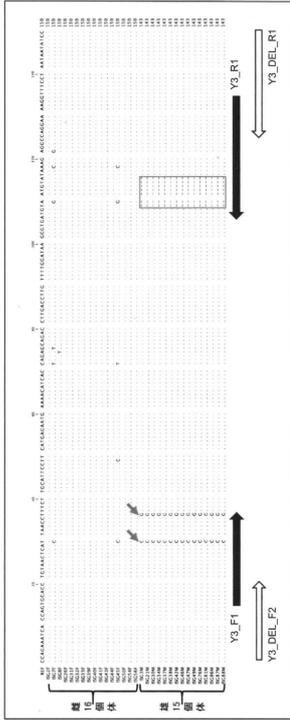
養殖クロマグロの雌6個体と雄4個体（生殖腺による性判別済み）について、体表粘液サンプルを用いた以外は実施例4と同様にして、PCRおよびマイクロチップ電気泳動を行った。体表粘液サンプルは、魚体の体表を綿棒で擦って採取した。体表粘液の付着した綿部のみをTNE S・Urea 6M溶液中でプロテアーゼ処理を行い、自動DNA抽出装置（前述）を用いてゲノムDNAを調製した。

【0050】

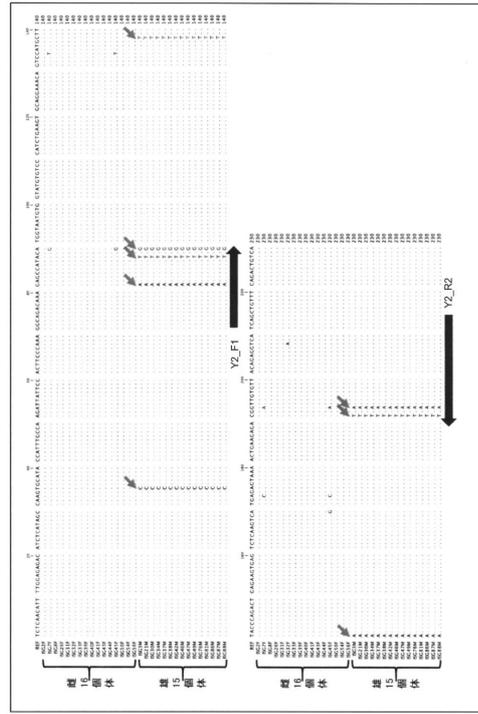
結果を図5に示す。149bpの雌雄共通DNA断片は、全個体（レーン1～10）に認められた。一方、142bpの雄特異的欠失型DNA断片は、雄個体（レーン2、4、8および10）に特異的に認められた。これらの結果は、被験体の性判別に成功したことを示している。本実施例で用いたクロマグロ個体は、継代F2世代の養殖魚であることから、領域1の上記DNA多型を指標とするクロマグロの性判別方法は、天然魚だけでなく養殖魚でも有効であることが明らかとなった。また、本実施例で用いた試料はクロマグロ個体の体表粘液サンプルであることから、個体より採取したサンプルを用いることで、個体を生かしたままの性判別が可能であることが明らかとなった。

30

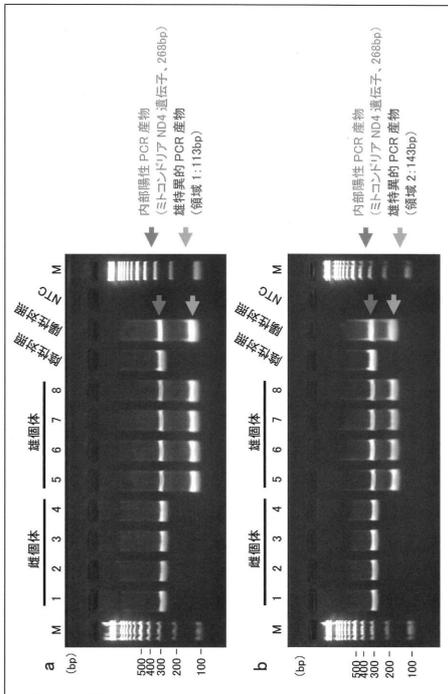
【 図 1 】



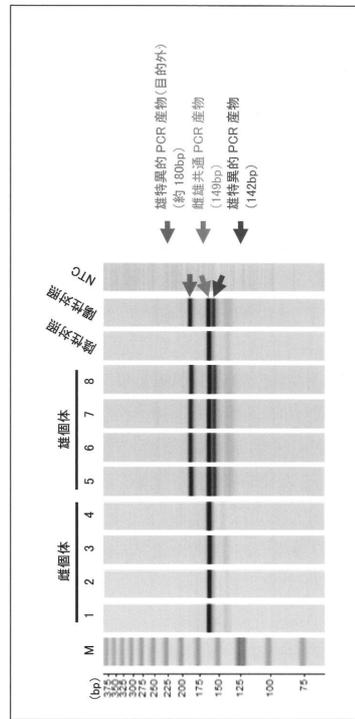
【 図 2 】



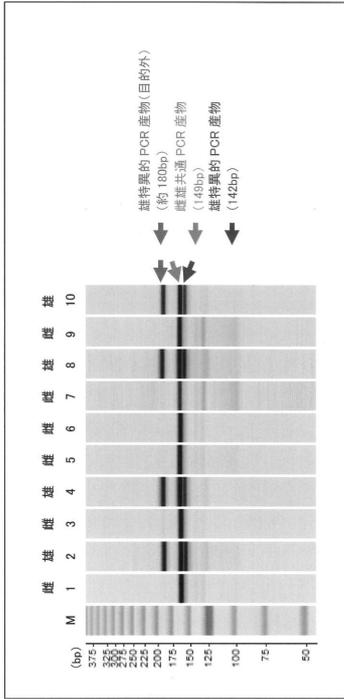
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

0007007710000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 鈴木 伸明

神奈川県横浜市西区みなとみらい2 - 3 - 3 国立研究開発法人水産研究・教育機構内

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 Nippon Suisan Gakkaishi, 2011, Vol.77, No.4,p.639 646

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

C 1 2 N 1 5 / 1 1

C 1 2 Q 1 / 6 8 2 7

C 1 2 Q 1 / 6 8 7 9

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

P u b M e d