

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

**特開2022-184558****(P2022-184558A)**

(43)公開日 令和4年12月13日(2022.12.13)

(51)Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<i>C 1 2 Q 1/6879 (2018.01)</i>	C 1 2 Q 1/6879	Z Z N A 4 B 0 6 3
<i>C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)</i>	C 1 2 Q 1/6851	Z
<i>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</i>	C 1 2 N 15/09	Z

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 27 頁)

(21)出願番号 特願2021-92491(P2021-92491)	(71)出願人 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
(22)出願日 令和3年6月1日(2021.6.1)	(74)代理人 110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(出願人による申告) 令和2年度、水産庁、「国際漁業 資源評価調査・情報提供委託事業」委託事業、産業技術 力強化法第17条の適用を受ける特許出願	(72)発明者 藤原 篤志 神奈川県横浜市神奈川区新浦島町一丁目1 番地25 国立研究開発法人水産研究・教 育機構内
	(72)発明者 中村 洋路 神奈川県横浜市神奈川区新浦島町一丁目1 番地25 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に用いる雄特異的塩基配列

## (57)【要約】

【課題】クロマグロの遺伝的性の判別に有用な性別特異的なDNA及び高精度で迅速、簡便なクロマグロの遺伝的性判別方法の提供。

【解決手段】クロマグロ被検体より採取された試料において、雄特異的DNAを検出することを含む、クロマグロの性判別方法。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

クロマグロ被検体より採取された試料において、雄特異的なDNAを検出することを含む、クロマグロの性別判別方法であって、

該DNAが以下の(a)～(d)からなる群より選択される少なくとも1種のDNAである、方法：

- (a) 配列番号1で表される塩基配列又はその部分塩基配列からなるDNA；
- (b) 配列番号1で表される塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列又は配列番号1で表される塩基配列の部分塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNA；
- (c) 配列番号1で表される塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列又は配列番号1で表される塩基配列の部分塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなるDNA；
- (d) 配列番号1で表される塩基配列又はその部分塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA。

10

## 【請求項 2】

前記検出の結果に基づいて前記被検体の雌雄を判別することをさらに含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項 3】

前記DNAが配列番号1で表される塩基配列又はその部分塩基配列からなるDNAである、請求項1又は2記載の方法。

20

## 【請求項 4】

前記検出をLAMP法により行うものである、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 5】

以下の(a)～(d)からなる群より選択される少なくとも1種のDNAである、クロマグロの雄特異的なDNA：

- (a) 配列番号1で表される塩基配列又はその部分塩基配列からなるDNA；
- (b) 配列番号1で表される塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列又は配列番号1で表される塩基配列の部分塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNA；
- (c) 配列番号1で表される塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列又は配列番号1で表される塩基配列の部分塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなるDNA；
- (d) 配列番号1で表される塩基配列又はその部分塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA。

30

## 【請求項 6】

請求項5記載のDNAを含む、クロマグロの性別判別用マーカー。

## 【請求項 7】

請求項5記載のDNAのクロマグロの性別判別のための使用。

40

## 【請求項 8】

請求項5記載のDNAを特異的に増幅することができる、クロマグロの性別判別用プライマー。

## 【請求項 9】

請求項5記載のDNAに特異的にハイブリダイズすることができる、クロマグロの性別判別用プローブ。

## 【請求項 10】

請求項8記載のプライマー及び/又は請求項9記載のプローブを含む、クロマグロの性別判別用キット。

## 【発明の詳細な説明】

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、クロマグロの遺伝的性判別に用いる雄特異的塩基配列に関する。

## 【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。

## 【0003】

現在、マグロ類の性判別は、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及び若齢個体、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、例えば、クロマグロ (*Thunnus orientalis*) 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・分布や成長特性などにおける性別の影響は分かっていない。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、マグロ類の簡便で高精度な性判別方法の開発が望まれている。

## 【0004】

本発明者らは、これまでに、ゲノム中の性別特異的なDNA多型を検出することによるマグロ類の遺伝的性判別方法を開発している(特許文献1、2)。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0005】

【特許文献1】特開2019-088234号公報

【特許文献2】特開2020-184917号公報

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

ゲノム中の性別特異的なDNA多型を検出することによるマグロ類の遺伝的性判別方法では、該DNA多型を検出するための特定の系を構築しなければならず、その実施にPCR装置、リアルタイムPCR装置などの高額機器や電気泳動などの煩雑な操作が必要であった。本発明の課題は、斯かる方法を実施できないあるいは実施が難しい調査船、漁港、養殖場などのサンプリング現場においてもクロマグロの性判別を可能とする性別特異的なDNA及び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】

## 【0007】

そこで、本発明者らは、上記課題を解決するために種々検討した結果、クロマグロゲノムに約230kbの雄特異的なDNAを初めて見出した。また、該DNAを利用することで、クロマグロの遺伝的性を高い精度で迅速、簡便に判別でき、汎用性の高い性判別方法を構築できることを見出し、本発明を完成した。

## 【0008】

すなわち、本発明は、次の〔1〕～〔10〕を提供するものである。

〔1〕クロマグロ被検体より採取された試料において、雄特異的なDNAを検出することを含む、クロマグロの性判別方法であって、

該DNAが以下の(a)～(d)からなる群より選択される少なくとも1種のDNAである、方法：

10

20

30

40

50

- ( a ) 配列番号 1 で表される塩基配列又はその部分塩基配列からなる D N A ;  
 ( b ) 配列番号 1 で表される塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列又は配列番号 1 で表される塩基配列の部分塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列からなる D N A ;  
 ( c ) 配列番号 1 で表される塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列又は配列番号 1 で表される塩基配列の部分塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなる D N A ;  
 ( d ) 配列番号 1 で表される塩基配列又はその部分塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズする D N A 。

〔 2 〕前記検出の結果に基づいて前記被検体の雌雄を判別することをさらに含む、〔 1 〕記載の方法。 10

〔 3 〕前記 D N A が配列番号 1 で表される塩基配列又はその部分塩基配列からなる D N A である、〔 1 〕又は〔 2 〕記載の方法。

〔 4 〕前記検出を L A M P 法により行うものである、〔 1 〕～〔 3 〕のいずれか 1 項記載の方法。

〔 5 〕以下の ( a ) ～ ( d ) からなる群より選択される少なくとも 1 種の D N A である、クロマグロの雄特異的な D N A :

- ( a ) 配列番号 1 で表される塩基配列又はその部分塩基配列からなる D N A ;  
 ( b ) 配列番号 1 で表される塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列又は配列番号 1 で表される塩基配列の部分塩基配列と 9 0 % 以上の同一性を有する塩基配列からなる D N A ;  
 ( c ) 配列番号 1 で表される塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列又は配列番号 1 で表される塩基配列の部分塩基配列において 1 若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなる D N A ;  
 ( d ) 配列番号 1 で表される塩基配列又はその部分塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズする D N A 。

〔 6 〕〔 5 〕記載の D N A を含む、クロマグロの性判別用マーカー。

〔 7 〕〔 5 〕記載の D N A のクロマグロの性判別のための使用。

〔 8 〕〔 5 〕記載の D N A を特異的に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。 30

〔 9 〕〔 5 〕記載の D N A に特異的にハイブリダイズすることができる、クロマグロの性判別用プローブ。

〔 1 0 〕〔 8 〕記載のプライマー及び / 又は〔 9 〕記載のプローブを含む、クロマグロの性判別用キット。

#### 【発明の効果】

##### 【 0 0 0 9 】

本発明によれば、クロマグロの雄特異的 D N A 、該 D N A を検出するクロマグロの遺伝的性判別方法、並びに該方法に利用できるプライマー、プローブ及びキットが提供される。該 D N A を性判別の指標とすれば、性別特異的 D N A 多型を指標とする従来技術と比較して、性判別の精度を損なうことなく汎用性の高い性判別方法を構築することができる。 P C R などを用いた性判別だけでなく、標的配列に高い特異性が求められるため、従来、系構築が困難であった L A M P 法を用いた性判別も可能となる。 L A M P 法は、特異性が高く、迅速かつ簡便で、実験リソースの限られる調査船、漁港、養殖場などのサンプリング現場における実施にも適している。 40

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【 0 0 1 0 】

【図 1】太平洋クロマグロ雌雄計 1 4 個体について、性判別のための P C R を行い、増幅産物をアガロースゲル電気泳動した結果を示す図である。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【 0 0 1 1 】

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）、「塩基配列又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及びアンチセンス鎖という各1本鎖DNAを包含する。

#### 【0012】

本明細書において、「ヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」は、核酸と同義であって、DNA及びRNAの両方を含むものとする。当該DNAには、cDNA、ゲノムDNA及び合成DNAのいずれもが含まれる。また当該RNAには、total RNA、mRNA、rRNA及び合成の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」及び「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」（又は「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」（又は「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。

10

#### 【0013】

本明細書において、「遺伝子」とは、ゲノムDNAを含む2本鎖DNAの他、cDNAを含む1本鎖DNA（正鎖）、当該正鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA（相補鎖）、及びこれらの断片を包含するものであって、DNAを構成する塩基の配列情報の中に、何らかの生物学的情報が含まれているものを意味する。また、本明細書で「遺伝子」とは、特に言及しない限り、調節領域、コード領域、エキソン、及びイントロンを区別することなく示すものとする。

20

#### 【0014】

本明細書において「クロマグロ」は、太平洋クロマグロ（*Thunnus orientalis*）を指す。クロマグロには、天然魚及び養殖魚のいずれもが含まれる。以下、太平洋クロマグロを単にクロマグロと記載することがある。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。

#### 【0015】

本発明者らは、後述の実施例に示すとおり、クロマグロのゲノムDNAにおいて、配列番号1で表される232647塩基の塩基配列からなるDNAが雄にのみ存在することを見出した。また、該雄特異的DNAを検出することで、クロマグロの遺伝的性を高い精度で迅速、簡便に判別できることを見出した。よって、該雄特異的DNAは、クロマグロの遺伝的性を判別するための指標（マーカー）として有用である。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。

30

#### 【0016】

本発明のクロマグロの性判別マーカー（以下、本発明のマーカーと称する）は、以下の（a）～（d）からなる群より選択される少なくとも1種のDNAを含む。

- （a）配列番号1で表される塩基配列又はその部分塩基配列からなるDNA；
- （b）配列番号1で表される塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列又は配列番号1で表される塩基配列の部分塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNA；
- （c）配列番号1で表される塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列又は配列番号1で表される塩基配列の部分塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなるDNA；
- （d）配列番号1で表される塩基配列又はその部分塩基配列の相補配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNA。

40

（a）～（d）のDNAは、雄特異的DNAである。（b）～（d）のDNAには、クロマグロの性判別マーカーとして機能する限りにおいて、（a）の変異体が含まれる。当

50

該変異体には、天然の対立遺伝子変異体や、当該分野で周知の変異誘発技術を用いて生成され得る天然に存在しない変異体が包含される。

【0017】

ここで、「雄特異的DNA」とは、その存在が雄という性別と関連づけられていることを意味し、被験体由来の試料において該DNAが検出されると該被検体が雄であると判定できるものである。

【0018】

配列番号1で表される塩基配列の部分塩基配列は、配列番号1で表される塩基配列中の連続する塩基からなる塩基配列であればよく、配列番号1で表される塩基配列のうち、好ましくは連続する50塩基以上の塩基配列であり、より好ましくは連続する50~100000塩基の塩基配列であり、さらに好ましくは連続する50~50000塩基の塩基配列であり、さらに好ましくは連続する50~10000塩基の塩基配列であり、さらに好ましくは連続する50~5000塩基の塩基配列であり、さらに好ましくは連続する50~3000塩基の塩基配列であり、さらに好ましくは連続する50~1500塩基の塩基配列であり、さらに好ましくは連続する50~1000塩基の塩基配列であり、さらに好ましくは連続する50~500塩基の塩基配列であり、さらに好ましくは連続する100~500塩基の塩基配列である。部分塩基配列の一例としては、配列番号1で表される塩基配列において遺伝子と予測された領域である9390~9818位、16389~17603位、32614~64628位、76852~77963位、82490~82919位、118954~119841位、168127~168456位、176645~176974位、186243~186572位、195859~196188位、200940~201269位、207325~207654位の塩基配列、及びそれらの部分塩基配列が挙げられる。このうち、配列番号1の32614~64628位の塩基配列からなる遺伝子は、メダカ(*Oryzias latipes*)のestrogen sulfotransferaseをコードするsult1st6遺伝子と塩基配列の同一性が高く、実際にクロマグロの近縁種であるミナマグロでestrogen sulfotransferaseの発現が確認されているため、クロマグロにおいても遺伝子として機能していると考えられる。一般的に非遺伝子領域よりも遺伝子領域の方が、また、イントロン領域よりもエキソン領域の方が、配列保存性が高いことから、配列番号1で表される塩基配列の部分塩基配列としては、配列番号1の32614~64628位の塩基配列又はその部分塩基配列が好ましく、エキソン領域である配列番号1の32614~32800位、34058~34186位、46409~46506位、46707~46833位、61282~61376位、61471~61651位、64519~64628位の塩基配列、又はそれらの部分塩基配列がより好ましい。

【0019】

配列番号1で表される塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列又は配列番号1で表される塩基配列の部分塩基配列と90%以上の同一性を有する塩基配列としては、好ましくは93%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、さらに好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上の同一性を有する塩基配列が挙げられる。塩基配列の同一性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST(Pro.Natl.Acad.Sci.USA,1993,90:5873-5877)を用いて決定することができる。このアルゴリズムBLASTに基づいて、BLASTNやBLASTXとよばれるプログラムが開発されている(J.Mol.Biol.,1990,215,p.403-410)。また、遺伝情報処理ソフトウェアGenetyxのホモロジー解析(Search homology)プログラムを用いてもよい。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(www.ncbi.nlm.nih.gov参照)。

【0020】

本明細書において、別途定義されない限り、塩基配列における塩基の欠失、置換又は付加に関して使用される「1又は数個」とは、例えば、1~120個、好ましくは1~90個、より好ましくは1~60個、さらに好ましくは1~30個、さらに好ましくは、1~10個、さらに好ましくは1~5個、さらに好ましくは1~3個、さらに好ましくは1個

10

20

30

40

50

であり得る。また本明細書において、塩基の「付加」には、配列の一末端及び両末端への1又は数個の塩基の付加が含まれる。

#### 【0021】

本明細書において、ストリンジェントな条件とは、同一性が高い塩基配列同士がハイブリダイズし、それより同一性が低い塩基配列同士がハイブリダイズしない条件をいう。「ストリンジェントな条件」とは、求める同一性の高低によって、適宜条件を変えることができる。より高ストリンジェントな条件であるほど、より同一性の高い配列のみがハイブリダイズすることになる。例えば、ストリンジェントな条件として、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition, J. Sambrook et al, 1989)に記載の条件等が挙げられる。すなわち、6 × S S C ( 1 × S S C の組成 : 0 . 1 5 M 塩化ナトリウム、0 . 0 1 5 M クエン酸ナトリウム、p H 7 . 0 )、0 . 5 % S D S、5 × デンハート及び 1 0 0 m g / m L ニシン精子 D N A を含む溶液にプローブとともに 6 5 で 8 ~ 1 6 時間恒温し、ハイブリダイズさせる条件等が挙げられる。洗浄条件としては、1 × S S C、6 0 以上が好ましく、1 × S S C、7 3 以上がより好ましい。

10

#### 【0022】

本発明のマーカースとして、( a ) ~ ( d ) からなる群より選択される1種の D N A を用いてもよく、2種以上の D N A を組み合わせ用いてもよい。本発明のマーカースは、好ましくは( a ) の D N A であり、より好ましくは配列番号 1 の 3 2 6 1 4 ~ 6 4 6 2 8 位の塩基配列又はその部分塩基配列からなる D N A であり、さらに好ましくは配列番号 1 の 3 2 6 1 4 ~ 3 2 8 0 0 位、3 4 0 5 8 ~ 3 4 1 8 6 位、4 6 4 0 9 ~ 4 6 5 0 6 位、4 6 7 0 7 ~ 4 6 8 3 3 位、6 1 2 8 2 ~ 6 1 3 7 6 位、6 1 4 7 1 ~ 6 1 6 5 1 位、及び 6 4 5 1 9 ~ 6 4 6 2 8 位の塩基配列、又はそれらの部分塩基配列からなる D N A である。

20

#### 【0023】

本発明のクロマグロの性別判定方法(以下、本発明の方法と称する)は、クロマグロ被検体より採取された試料において、上記の本発明のマーカースを検出することを含む。ここで、「マーカースの検出」とは、試料におけるマーカースの存在又は不存在を明らかにする意味である。本発明のマーカースは雄特異的なマーカースであるため、該マーカースの検出結果に基づいて、クロマグロ被検体が雄であるか雌であるかを判定することができる。具体的には、本発明のマーカースが検出されれば被験体は雄であると判定でき、検出されなければ被験体は雌であると判定できる。

30

#### 【0024】

本発明の方法に供されるクロマグロ被検体は、性別を確認したいクロマグロの個体であり、天然魚であってもよいし、養殖魚であってもよく、その生育ステージは制限されない。被検体から採取される試料としては、ゲノム D N A を含有する試料である限り特に制限されず、細胞、組織、ヒレ、筋肉、内臓、体表粘液などを例示することができる。該試料より、公知の方法によりゲノム D N A を抽出すればよい。ゲノム D N A の抽出法としては、例えば、フェノール法、C T A B 法、アルカリ S D S 法等が挙げられる。ゲノム D N A は、必要に応じて、公知の方法により精製してもよい。ゲノム D N A 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。本発明の方法は、クロマグロ被検体より試料を採取することをさらに含んでいてもよい。また、本発明の方法は、クロマグロ被検体より採取された試料からゲノム D N A を抽出することをさらに含んでいてもよい。

40

#### 【0025】

本発明のマーカースは、当該分野で通常用いられる核酸の検出方法に従って検出することができる。斯かる検出方法の例としては、P C R、リアルタイム P C R (例えば T a q M a n (登録商標) P C R)、L A M P (Loop mediated Isothermal Amplification)法、I C A N (登録商標) (Isothermal and Chimeric primer initiated Amplification of Nucleic acids)法、R C A (Rolling Circle Amplification)法、L C R (Ligase Chain Reaction)法、S D A (Strand Displacement Amplification)法、H R M (High Resolution Melting)法、サザンブロットハイブリダイゼーション、ドットブロットハイブリダイゼーション

50

ョン、スロットプロットハイブリダイゼーション、DNAチップ、DNAマイクロアレイ、ダイレクトシーケンスなどの核酸又はその増幅産物を検出する方法が挙げられる。核酸検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。核酸の検出方法は、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用いてもよい。

#### 【0026】

PCRを用いて本発明のマーカを検出する場合、試料由来のゲノムDNAを鋳型とし、本発明のマーカの全部又は一部の領域を標的としてこれを特異的に増幅するように設計したプライマーペアを用いて該領域をPCRにて増幅し、次いで増幅産物を検出すればよい。所望のサイズの増幅産物が検出される場合、被験体は雄と判別でき、増幅産物が検出されない又は増幅産物が所望のサイズではない場合、被験体は雌と判別できる。

10

#### 【0027】

PCRに用いるプライマーは、標的とする領域に応じて、GC含有率、塩基の偏り、Tm値、二次構造などを考慮して適宜設計すればよく、例えば、Primer3 (<https://primer3.ut.ee>)などのプライマー設計支援ソフトを用いて設計することができる。PCRの特異性を高めるため、設計したプライマーについて、該プライマー及び該プライマーによる増幅領域が標的領域に特異的であることを確認することが好ましい。特異的であるか否かは、例えば上述のBLASTを用いた検索によって確認することができる。

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。該プライマーは、標的領域を特異的に増幅できる限りにおいて、鋳型DNAの塩基配列と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。

20

増幅サイズとしては、約50~3000bpが好ましく、約50~1500bpがより好ましく、約50~500bpがさらに好ましい。

#### 【0028】

PCRに用いるプライマーの具体的な例としては、本発明のマーカの部分配列からなるオリゴヌクレオチド又はその相補鎖を利用することができる。該「相補鎖」とは、本発明のマーカを特異的に認識する限り、完全に相補的な配列に限られず、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列であればよい。

30

プライマーのさらに具体的な例としては、これらに限定されるものではないが、配列番号2~5のいずれかで表される塩基配列からなるプライマーが挙げられる。プライマーペアとしては、例えば、配列番号2で表される塩基配列からなるプライマー及び配列番号3で表される塩基配列からなるプライマーを含むプライマーペア、並びに配列番号4で表される塩基配列からなるプライマー及び配列番号5で表される塩基配列からなるプライマーを含むプライマーペアが挙げられる。

#### 【0029】

PCRの反応条件は、特に限定されず、使用するプライマーペアや増幅領域の長さなどに応じて最適条件を定めればよいが、例えば、以下の条件が挙げられる。

1) 2本鎖DNAの1本鎖DNAへの熱変性：通常94~98 程度で、通常10秒間~1分間程度加熱する。

40

2) アニールリング：通常50~65 程度で、通常10秒間~1分間程度加熱する。

3) DNA伸長反応：通常68~72 程度で、通常10秒間~3分間程度加熱する。

ここで、アニールリングとDNA伸長反応は分けずに同時に行うことも可能である。

上記1)~3)の反応を、通常25~40サイクル程度行うことにより、標的領域を検出可能な程度に増幅することができる。

上記のような一連の操作は、一般的にPCRに使用されるサーマルサイクラーを用いて実施することができる。

#### 【0030】

PCR増幅産物の検出には、増幅産物を特異的に認識することができる公知の手段を用

50

いることができる。例えば、得られた増幅産物を電気泳動し、二本鎖DNAにインターカレートして蛍光を発するエチジウムブロマイド、SYBR（登録商標）GreenIなどの試薬で染色し、蛍光をUV装置、蛍光プレートリーダーなどを用いて検出することで本発明のマーカを検出することができる。あるいは、増幅反応の過程で取り込まれるdNTPに、放射性同位体、蛍光物質、発光物質等の標識体を作用させ、この標識体を検出することもできる。標識したdNTPを取り込んだ増幅産物を観察する方法としては、上述した標識体を検出するための当技術分野で公知の方法であればいずれの方法でもよい。例えば、標識体として放射性同位体を用いた場合には、放射活性を、例えば液体シンチレーションカウンター、 $\beta$ -カウンター等により計測することができる。また標識体として蛍光を用いた場合には、その蛍光をUV装置、蛍光プレートリーダー等を用いて検出することができる。

10

#### 【0031】

尚、PCR増幅産物が見られないことがPCRの失敗に起因するものでないことを示すため、PCR増幅反応時に、コントロールとして、雌雄の別なく存在する遺伝子や塩基配列を同時に増幅してもよい。このような遺伝子の例として、ミトコンドリアのCOI遺伝子、ND4遺伝子などが挙げられる。

#### 【0032】

本発明のマーカは、増幅産物量をリアルタイムでモニターし解析するリアルタイムPCRによって検出することもできる。PCRの反応条件は、上述のとおりである。リアルタイムPCRは、サーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化したリアルタイムPCR専用の装置を用いて行うことができる。

20

#### 【0033】

TaqMan PCRを用いて本発明のマーカを検出する場合、試料由来のゲノムDNAを鋳型とし、本発明のマーカの全部又は一部の領域を標的としてこれを増幅するように設計したプライマーペアと、増幅領域内部に特異的にハイブリダイズするように設計したプローブであって5'末端が蛍光物質で、3'末端がクエンチャー（消光物質）で標識されたプローブを用いて、該領域をTaq DNAポリメラーゼによるPCRにて増幅し、次いで増幅に伴い発せられる蛍光を検出すればよい。蛍光が検出される場合、被験体は雄と判別でき、蛍光が検出されない場合、被験体は雌と判別できる。

#### 【0034】

TaqMan PCRに用いるプライマー、増幅サイズ、PCR反応条件は、上述のPCRの場合と同様である。

TaqMan PCRに用いるプローブは、標的とする領域に応じて適宜設計すればよい。TaqMan PCRの特異性を高めるため、設計したプローブが標的領域に特異的であることを確認することが好ましい。特異的であるか否かは、例えば上述のBLASTを用いた検索によって確認することができる。

30

プローブの塩基長は、通常15～50塩基であり、好ましくは15～35塩基である。該プライマーは、標的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DNAの塩基配列と1～数个、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。該プローブは、5'末端がFITCやVICなどの蛍光物質で、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。

40

#### 【0035】

TaqMan PCRに用いるプローブの具体的な例としては、本発明のマーカの部分配列からなるオリゴヌクレオチド又はその相補鎖の両末端に上記の標識を有するものを利用することができる。該「相補鎖」とは、本発明のマーカを特異的に認識する限り、完全に相補的な配列に限られず、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列であればよい。

#### 【0036】

TaqMan PCRにより発せられる蛍光は、UV装置、蛍光プレートリーダー等の公知の手段を用いて検出ことができ、好適には、リアルタイムPCR専用の装置を用

50

いてリアルタイムに検出することができる。

【0037】

LAMP法を用いて本発明のマーカを検出する場合、試料由来のゲノムDNAを鋳型とし、本発明のマーカの全部又は一部の領域を標的としてこれを特異的に増幅するように設計したプライマーセットを用いて該領域を増幅し、次いで増幅産物を検出すればよい。増幅産物が検出される場合、被験体は雄と判別でき、増幅産物が検出されない場合、被験体は雌と判別できる。

【0038】

LAMP法は、4種類又は6種類のプライマーからなるプライマーセットを用い、鎖置換型DNAポリメラーゼによる鎖置換反応を利用して一定温度で標的配列を増幅する方法である(国際公開第2000/028082号)。LAMP法では、標的となるDNA領域の一方の鎖の3'末端側からF3c、F2c、F1cという3つの領域を、5'末端側からB3、B3、B1という3つの領域をそれぞれ規定する。これらの領域と相補的な領域は、それぞれ、F3、F2、F1、B3c、B2c、B1cと表される。これらの領域の塩基配列に基づいて、FIP、F3プライマー、BIP、B3プライマーの4種類のプライマーを設計する。FIPは、5'末端側にF1c領域の塩基配列を、3'側にF2領域の塩基配列を含む塩基配列からなる。F3プライマーは、F3領域の塩基配列からなる。BIPは、5'末端側にB1c領域の塩基配列を、3'側にB2領域の塩基配列を含む塩基配列からなる。B3プライマーは、B3領域の塩基配列からなる。LAMP法においては、上記の4種類のプライマーにループプライマーF及びループプライマーBの2種類のプライマーを加えた6種類のプライマーを用いてもよい。ループプライマーFは、F1領域とF2領域の間の領域と相補的な塩基配列からなり、ループプライマーBは、B1領域とB2領域の間の領域と相補的な塩基配列からなる。ループプライマーを用いることで、核酸増幅の起点を増やして増幅反応を促進することができる。これらのプライマーは、Tm値、末端安定性、GC含量、二次構造、プライマー間距離などを考慮して適宜設計すればよい。プライマー間距離は、F2領域の外側からB2領域の外側までの距離(LAMP法の増幅領域)を約100~500塩基とするのが好ましく、約120~160塩基とするのがより好ましく、F2領域の5'末端からF1領域の5'末端までの距離(ループ形成領域)を40~60塩基とすることが好ましく、F2領域とF3領域の間の距離を0~60塩基とすることが好ましい。斯かるプライマーは、例えば、Primer Explorer (<http://primerexplorer.jp>)などのプライマー設計支援ソフトを用いて設計することができる。

【0039】

LAMP法に用いるプライマーの具体的な例としては、これらに限定されるものではないが、配列番号8~37のいずれかで表される塩基配列からなるプライマーが挙げられる。プライマーセットとしては、例えば、配列番号8で表される塩基配列からなるF3プライマー、配列番号9で表される塩基配列からなるB3プライマー、配列番号10で表される塩基配列からなるFIPプライマー、及び配列番号11で表される塩基配列からなるBIPプライマーを含むプライマーセット；配列番号12で表される塩基配列からなるF3プライマー、配列番号13で表される塩基配列からなるB3プライマー、配列番号14で表される塩基配列からなるFIPプライマー、及び配列番号15で表される塩基配列からなるBIPプライマーを含むプライマーセット；配列番号16で表される塩基配列からなるF3プライマー、配列番号17で表される塩基配列からなるB3プライマー、配列番号18で表される塩基配列からなるFIPプライマー、及び配列番号19で表される塩基配列からなるBIPプライマーを含むプライマーセット；配列番号20で表される塩基配列からなるF3プライマー、配列番号21で表される塩基配列からなるB3プライマー、配列番号22で表される塩基配列からなるFIPプライマー、及び配列番号23で表される塩基配列からなるBIPプライマーを含むプライマーセット；配列番号24で表される塩基配列からなるF3プライマー、配列番号25で表される塩基配列からなるB3プライマー、配列番号26で表される塩基配列からなるFIPプライマー、及び配列番号27で表

10

20

30

40

50

される塩基配列からなるB I Pプライマーを含むプライマーセット；配列番号24で表される塩基配列からなるF3プライマー、配列番号25で表される塩基配列からなるB3プライマー、配列番号26で表される塩基配列からなるF I Pプライマー、配列番号27で表される塩基配列からなるB I Pプライマー、配列番号36で表される塩基配列からなるループプライマーF、及び配列番号37で表される塩基配列からなるループプライマーBを含むプライマーセット；配列番号28で表される塩基配列からなるF3プライマー、配列番号29で表される塩基配列からなるB3プライマー、配列番号30で表される塩基配列からなるF I Pプライマー、及び配列番号31で表される塩基配列からなるB I Pプライマーを含むプライマーセット；並びに配列番号32で表される塩基配列からなるF3プライマー、配列番号33で表される塩基配列からなるB3プライマー、配列番号34で表される塩基配列からなるF I Pプライマー、及び配列番号35で表される塩基配列からなるB I Pプライマーを含むプライマーセットが挙げられる。

10

**【0040】**

LAMP法では、鋳型DNA、プライマーセット、鎖置換型DNAポリメラーゼ、基質等を混合し、約60～65の一定温度で保温することにより、核酸増幅反応が進行する。等温で増幅反応が進行するため、反応は温度を一定に維持できる装置を用いて実施することができる。該装置としては、インキュベーター、サーマルサイクラー、リアルタイムPCR装置などが挙げられる。

**【0041】**

LAMP法による増幅産物の検出には、増幅産物を特異的に認識することができる公知の手段を用いることができる。例えば、反応溶液に二本鎖DNAにインターカレートして蛍光を発するエチジウムブロマイド、SYBR Green Iなどの試薬を共存させておき、増幅反応後に反応チューブをUV装置にかざすなどして蛍光を検出することで、増幅の有無を目視で容易に確認することができる。あるいは、伸長反応の際にdNTPから遊離されるピロリン酸イオンが反応溶液中のマグネシウムイオンと結合し、ピロリン酸マグネシウムが生成し、反応溶液に白濁が生じる。よって、反応チューブ内の反応溶液の濁度を目視や簡易な測定機器で検出することで、増幅の有無を容易に確認することができる。

20

**【0042】**

サザンブロッティング法を用いて本発明のマーカを検出する場合、例えば、常法に従ってメンブレン上に試料由来のゲノムDNAを適当な制限酵素で消化したものをトランスファーし、次いで放射性同位体、蛍光物質、発光物質、酵素、ビオチン等で標識したプローブを該ゲノムDNAにハイブリダイズさせればよい。形成された標識プローブとゲノムDNAとの二重鎖から該標識に由来するシグナルを検出することにより、本発明のマーカを検出することができる。ここで、プローブとしては、本発明のマーカの全部又は一部に特異的にハイブリダイゼーションし、該マーカを検出できるプローブであることが好ましい。プローブの塩基長は、好ましくは100～5000塩基であり、より好ましくは500～1000塩基である。該プローブは、本発明のマーカと特異的にハイブリダイゼーションできる限りにおいて、鋳型DNAの塩基配列と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

**【0043】**

プローブの具体的な例としては、本発明のマーカの全部又は部分配列からなるポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド又はそれらの相補鎖を利用することができる。該「相補鎖」とは、本発明のマーカを特異的に認識する限り、完全に相補的な配列に限られず、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列であればよい。

40

**【0044】**

上記のプライマー又はプローブは、DNAあるいはRNAであることができ、合成されたものでも天然のものでもよい。該プライマー又はプローブは、通常ホスホルアミダイト法、リン酸トリエステル法などの化学合成法によって合成してもよいし、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してもよい。あるいは、クロ

50

マグロのゲノムDNAより常法に従って調製してもよい。

【0045】

前記特許文献1では、性別特異的なDNA多型という雌雄共通のゲノムDNA配列中の特定位置の特定塩基が性別別のマーカーであるため、該特定塩基を検出する必要があり、性別方法の構築に制約があった。一方、本発明のマーカーは、雄特異的なDNAであって約230kbの長さを有しており、前記特許文献1に比べて性別方法の構築の自由度がはるかに高く、汎用性が高い。

【0046】

本発明の方法によれば、雄特異的DNAを検出とすることで、性別の精度を損なうことなく、迅速、簡便にクロマグロの性を判別することができる。該DNAの検出には種々の手法を利用できるが、なかでも、LAMP法は簡易な装置での実施が可能である。また、4種類又は6種類のプライマーを使用して6領域を認識することから、増幅の特異性が極めて高い。さらに、増幅効率が高く、15分～1時間程度の反応で標的領域を検出可能な程度に増幅することができ、迅速性に優れている。高い増幅効率のため、増幅産物の量が多く、蛍光や濁度を利用して増幅の有無を容易に確認できる。また、一連の操作を反応チューブ内で完結でき、反応溶液のコンタミネーションや取り違えの可能性が低い。斯様に、LAMP法は迅速性及び簡便性に優れ、従来、設備上の理由で実施できなかったあるいは実施が難しかった施設においてもクロマグロの性別判別が可能となる。したがって、本発明の雄特異的DNAの検出には、LAMP法を用いるのが好ましい。

【0047】

本発明の方法は、単独で実施しても、他の性別方法と組み合わせて行ってもよい。他の性別方法としては、生殖腺の目視、組織学的切片観察、性別特異的DNA多型の検出などが挙げられる。

【0048】

本発明の方法は、本発明のマーカーを検出する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。該キットは、性別判別用プライマー及び/又は性別判別用プローブを含む。例えば、該キットとしては、PCRに用いる性別判別用プライマーペアを含むキット、TaqMan PCRなどに用いる性別判別用プライマーペア及び性別判別用プローブを含むキット、LAMP法に用いる性別判別用プライマーセットを含むキット、サザンブロットハイブリダイゼーションに用いる性別判別用プローブを含むキットなどが挙げられる。

【0049】

本発明のキットは、任意成分として、標識剤、PCRに必要な試薬（例えば、DNAポリメラーゼ、dNTPなど）、TaqMan PCRなどに必要な試薬（例えば、Taq DNAポリメラーゼ、dNTPなど）、LAMP法に必要な試薬（例えば、鎖置換型DNAポリメラーゼ、dNTPなど）を例示することができる。更に該キットには、測定の実施の便益のために適当な反応希釈液、緩衝液、制限酵素などが含まれていてもよい。

【実施例】

【0050】

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。

【0051】

実施例1 クロマグロの性別特異的な塩基配列の同定

太平洋クロマグロ雄1個体（生殖腺及び特許文献2の方法による性別判別済み）を材料に用いてPacific Bioロングリードシーケンスを行った。得られた塩基配列データを用いてゲノムアセンブリ作業（HGAP4によるコンティグ作成、Pilonによる配列修正、LINKSによるコンティグ連結作業）を行った結果、雌には存在しない雄特異的なDNA断片（配列番号1、配列名：M175、約230kb）が得られた。尚、雌のゲノム配列は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ)にAccession No. DDBJ: BKCK01000001～BKCK01000444として登録

10

20

30

40

50

されている。

【 0 0 5 2 】

公開データベース ( Ensemble ) のタンパク質データ ( アミノ酸配列 ) を用いて、この領域の遺伝子予測 ( Exonarate ) を行った結果、下記表 1 に示す 1 2 遺伝子が予測された。

【 0 0 5 3 】

【表 1】

No.	開始位置	終了位置	鎖	Ensembleにおけるマッチ	同一性 (%)	名称
g1	9390	9818	+	ENSTRUP00000067783	41.3	novel gene
g2	16389	17603	-	ENSTRUP00000068256	63.7	novel gene
g3	32614	64628	+	ENSORLP00000007539	83.3	sult1st6
g4	76852	77963	+	ENSTRUP00000072273	69.9	novel gene
g5	82490	82919	+	ENSTRUP00000067783	37.8	novel gene
g6	118954	119841	+	ENSORLP00000040498	83.8	novel gene
g7	168127	168456	+	ENSORLP00000044417	63.3	novel gene
g8	176645	176974	+	ENSORLP00000044417	63.3	novel gene
g9	186243	186572	+	ENSORLP00000044417	63.3	novel gene
g10	195859	196188	+	ENSORLP00000044417	62.4	novel gene
g11	200940	201269	+	ENSORLP00000044417	63.3	novel gene
g12	207325	207654	+	ENSORLP00000044417	65.1	novel gene

【 0 0 5 4 】

表 1 において、開始位置及び終了位置は、それぞれ、配列番号 1 における塩基の位置を表している。上記 1 2 遺伝子のうち、g 3 以外は転位因子に関連する遺伝子と同一性が高かった。一方、g 3 は、メダカ ( *Oryzias latipes* ) の estrogen sulfotransferase をコードする sult1st6 遺伝子と同一性が高く、これを sult1st6y 遺伝子と命名した。M 1 7 5 は、雄特異的であることから性別の指標として有用と考えられるが、一般に遺伝子領域は非遺伝子領域に比べて配列保存性が高いことを踏まえ、以下の実施例 2 ~ 6 では M 1 7 5 の sult1st6y 遺伝子の領域を指標として用いた。

【 0 0 5 5 】

実施例 2 性別解析 1

M 1 7 5 の塩基配列のうち sult1st6y 遺伝子の塩基配列を標的とし、これを PCR にて増幅するための複数のプライマーペアを設計し、クロマグロ被検体の性別解析を行った。sult1\_\_LP2F プライマー ( 配列番号 2 ) 及び sult1\_\_LP2R プライマー ( 配列番号 3 ) を用いた PCR 増幅では、1 3 5 2 b p 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、該 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。このとき、性別非特異的な 4 8 6 b p の DNA 断片も増幅するため、これにより PCR の成否を確認することができる。また、sult1Y\_\_F1 プライマー ( 配列番号 4 ) 及び sult1Y\_\_R1 プライマー ( 配列番号 5 ) を用いた PCR 増幅では、7 7 b p 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、該 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。尚、人為的ミスで PCR 増幅に失敗し、雄個体から 7 7 b p 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、ミトコンドリア DNA の ND 4 遺伝子 ( 内部陽性対照 ) の増幅用の ND 4 \_\_F プライマー ( 配列番号 6 ) 及び ND 4 \_\_R プライマー ( 配列

番号7)も作製した。これらプライマーを用いたPCR増幅では、268bpのDNA断片が増幅される。各プライマーの配列を表2に示す。表2中、5' posは、プライマーの5'末端の塩基の位置を配列番号1の塩基配列における塩基位置で示す。

【0056】

【表2】

標的	プライマー	配列 (5'→3')	配列番号	5' pos
sult1st6y	sult1_LP2F	TCCTGACCCCTCAGACCTC	2	32757
sult1st6y	sult1_LP2R	CATCTCCGTTGTGAAAGAGCA	3	34108
sult1st6y	sult1Y_F1	TCACACCTGAGCAGTCTAAGGT	4	64546
sult1st6y	sult1Y_R1	GGTCCTGAATGGTATGCTGATG	5	64622
ND4	ND4_F	ACAGACCCGTTGTCAACTCC	6	-
ND4	ND4_R	TCCCTGCATTAAACGCTCT	7	-

【0057】

具体的な試験方法は、以下のとおりである。天然太平洋クロマグロの雌4個体(図1のレーン1~4)、養殖太平洋クロマグロの雌2個体(図1のレーン5及び6)、養殖太平洋クロマグロの雄3個体(図1のレーン7、11及び12)及び天然太平洋クロマグロの雄3個体(図1のレーン8~10)からなる雄6個体及び雌6個体(生殖腺による性別別済み)の計12個体の各個体より、ハサミ等を用いて筋肉を採取し、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、Maxwell 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。該ゲノム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、sult1\_LP2Fプライマー(最終濃度0.5μM)及びsult1\_LP2Rプライマー(最終濃度0.5μM)を用いて、ProflexPCR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 30秒、68 1分のサイクルを35サイクル)を行った。得られたPCR増幅産物を2%アガロースゲルにアプライし、100Vで15分間、電気泳動を行った。

また、別の養殖太平洋クロマグロの雌1個(図1のレーン13)体及び雄1個体(図1のレーン14)(生殖腺による性別別済み)の計2個体の各個体より、上記の手法にてゲノムDNAを調製した。該ゲノム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、sult1Y\_F1プライマー(最終濃度0.4μM)及びsult1Y\_R1プライマー(最終濃度0.4μM)並びにND4\_Fプライマー(最終濃度0.05μM)及びND4\_Rプライマー(最終濃度0.05μM)を用いて、ProflexPCR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秒のサイクルを35サイクル)を行った。得られたPCR増幅産物を2%アガロースゲルにアプライし、100Vで15分間、電気泳動を行った。

【0058】

結果を図1に示す。図1のレーン1~12は、sult1\_LP2Fプライマー及びsult1\_LP2Rプライマーを用いたPCR増幅の結果を示す。1352bpのDNA断片は、雌個体(レーン1~6)には認められず、雄個体(レーン7~12)に特異的に認められた。全レーンに性別非特異的な486bpのDNA断片が認められており、PC

20

30

40

50

Rが正常に実施されたことが明らかである。また、図1のレーン13及び14は、s u l t 1 Y \_ F 1プライマー及びs u l t 1 Y \_ R 1プライマーを用いたPCR増幅の結果を示す。77bpのDNA断片は、雌個体(レーン13)には認められず、雄個体(レーン14)に特異的に認められた。全レーンにND4遺伝子由来の268bpの増幅産物が認められており、PCRが正常に実施されたことが明らかである。試験した全個体で性を正確に判別でき、今回見出されたM175を指標とすることで、クロマグロ被検体の遺伝的性を高い精度で判別できることが示された。

#### 【0059】

##### 実施例3 性判別解析2

LAMP法を用い、クロマグロの性判別解析を行った。雄特異的DNAを標的としたLAMP法による解析では、増幅産物が検出された場合に被検体の性は雄であると判別でき、増幅産物が検出されなかった場合に被検体の性は雌であると判別できる。

具体的な試験方法は、以下のとおりである。養殖太平洋クロマグロの雄1個体及び雌1個体(生殖腺及び特許文献2の方法による性判別済み)の計2個体の各個体より、実施例2と同様の手法にてゲノムDNAを調製した。該ゲノムDNA(最終濃度2ng/μL)を鋳型とし、LoopampDNA増幅試薬D及び蛍光・目視検出試薬(栄研科学株式会社製)と下記表3に示す(i)~(vii)のいずれかのプライマーセット(F3及びB3プライマーは最終濃度0.2μM、FIP及びBIPプライマーは最終濃度1.6μM)を用いて、ProflexPCRシステム(アプライドバイオシステムズ製)により反応(63 50分、95 5分)を行った。ネガティブコントロール(NTC)としてDNAなしの反応も行った。得られた増幅産物を反応チューブのまま青色LEDトランスイルミネーター(LED B-SBOX HP、オプトコード株式会社製)にかざし、蛍光を目視で確認した。尚、表3中、5'posは、プライマーの5'末端の塩基の位置を配列番号1の塩基配列における塩基位置で示す。FIP及びBIPは逆方向の2配列を合成したプライマーのため、位置情報は示していない。

#### 【0060】

10

20

【表 3】

セット	プライマー	配列 (5' → 3')	配列番号	5' pos
(i)	1_F3	TTAATTTGAGCTGCTTCTACG	8	34239
	1_B3	CCTGATTAAGGCGGAAGA	9	34462
	1_FIP	GGACACACAGTGCACCTGAAGTTCACCTTGTATTTTCCTCATCA	10	-
	1_BIP	GTCTCTCAAACCAAATGCAGATCTCATTTCATCCAGAATTGGATT	11	-
(ii)	2_F3	GCAGTATTTTCATATGCACTCATC	12	46362
	2_B3	ATTTTGCTCTCAGTTGAATGT	13	46542
	2_FIP	TAACCTCTGGGGGATCCATTTTCCTTTTCCTGAATTCATATCTTAGG	14	-
	2_BIP	ACATCTTCATTTTCAGCTTGTGCCAGATCAAGTCATACCTTGC	15	-
(iii)	3_F3	TGTATATTTGCATTAGACTGCC	16	61110
	3_B3	TCCAGTAACCTTTCACATGG	17	61323
	3_FIP	TCAACTGTGACTACTAACCACAAATAATACTACAGAGACAGACAGGA	18	-
	3_BIP	ACTGGTCTTGGAGGTACATTTCTCATACCAAGAGCCCCAC	19	-
(iv)	4_F3	CTGAGCAGTCTAAGGTGTT	20	64552
	4_B3	GCTTGAGAAGTGAATCAAACA	21	64783
	4_FIP	CCAGGAATCAATTAGAGAAGGGTCCGATTATGAAAAGCAAATGAAGGA	22	-
	4_BIP	CAGCTCTGCAAATCAAAGACGAATGGTTTTGGTTTTTCAGCTAGTGT	23	-
(v)	5_F3	CTCTCAAACCAAATGCAGAT	24	34360
	5_B3	GCTATGCTTGCCTTACAATC	25	34575
	5_FIP	GGCGGAAGAAATGAGCAGTTATGCTGACTGTGCCATTTTCAGA	26	-
	5_BIP	TGACCATAAACATTTTACTCAGCACTAACAGCTTACCCAGG	27	-
(vi)	8_F3	TGATCACATTTGTATTCTTTCGT	28	52840
	8_B3	GGTTGAGTTCATTGATAAATACG	29	53049
	8_FIP	GGAAAAAGAAAACAACATGTCGGTCTCTATTTTACAAACAAACGTCTCT	30	-
	8_BIP	TTAGAATGCCGTTTGGAGTGTGTGCGAGTTACCCTCAGAT	31	-
(vii)	9_F3	GTGATTTTGGTCCAGATACC	32	60991
	9_B3	ACTGTGACTACTAACCACAA	33	61212
	9_FIP	GTTTTCATTTGCCAGTTGGTTAAAGTCTGGTAGTTACAACCTAAAGGGT	34	-
	9_BIP	TTGCATTAGACTGCCAATACTACACAATCATACGCCTCTCTCTT	35	-

## 【0061】

結果を表 4 に示す。表 4 において、「+」は緑色の蛍光がみられたことを、「-」は蛍光がみられなかったことを表す。7 種類のプライマーセットのいずれを用いた場合でも、雄個体では標的 DNA 断片の増幅に伴う蛍光がみられた一方、雌個体では蛍光がみられなかった。よって、LAMP 法によりクロマグロの性を正確に判別できた。

## 【0062】

【表 4】

セット	NTC	雄	雌
(i)	-	+	-
(ii)	-	+	-
(iii)	-	+	-
(iv)	-	+	-
(v)	-	+	-
(vi)	-	+	-
(vii)	-	+	-

## 【0063】

## 実施例 4 性判別解析 3

表 3 に示すプライマーセットのうち、プライマー領域にイントロンよりも保存性が高いエキソンの配列を含むプライマーセット (iii) 及び (iv) を用い、LAMP 法での性判別解析を行った。実施例 3 で用いたのとは別の天然太平洋クロマグロの雄 6 個体及び雌 7 個体 (特許文献 2 の方法による性判別済み)、並びに実施例 3 で使用した養殖太平洋クロマグロ雄 1 個体及び雌 1 個体の計 15 個体の各個体より、実施例 2 と同様の手法によりゲノム DNA を調製した。該ゲノム DNA (最終濃度 1.5 ~ 3 ng /  $\mu$ L) を鋳型とし、プライマーセット (iii) 又は (iv) を用いた以外は実施例 3 と同様の手法によりクロマグロ被検体の性判別解析を行った。ネガティブコントロール (NTC) として DNA なしの反応も行った。

20

## 【0064】

結果を表 5 に示す。表 5 において、「+」は緑色の蛍光がみられたことを、「-」は蛍光がみられなかったことを表し、また、個体番号 14 及び 15 が実施例 3 で使用した個体を表す。いずれのプライマーセットを用いた場合でも、全ての雄個体では標的 DNA 断片の増幅に伴う蛍光がみられた一方、雌個体では蛍光がみられなかった。よって、LAMP 法によりクロマグロの性を正確に判別できた。尚、プライマーセット (iii) を用いた場合、プライマーセット (iv) を用いた場合よりも蛍光強度が高く、性判別能が高かった。

30

## 【0065】

【表 5】

セット	NTC	1	2	3	4	5	6	7
		雌	雌	雄	雌	雌	雄	雄
(iii)	-	-	-	+	-	-	+	+
(iv)	-	-	-	+	-	-	+	+
セット	8	9	10	11	12	13	14	15
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
(iii)	+	-	+	-	+	-	+	-
(iv)	+	-	+	-	+	-	+	-

## 【0066】

## 実施例 5 性判別解析 4

表 3 に示すプライマーセットのうち、性判別能のより高いプライマーセット (iii) を用い、LAMP 法での性判別解析を行った。実施例 3 及び 4 で用いたのとは別の天然太平洋クロマグロの雄 10 個体及び雌 11 個体 (生殖腺並びに特許文献 1 及び 2 の方法による性判別済み)、並びに実施例 3 で使用した養殖太平洋クロマグロの雄 1 個体及び雌 1 個

50

体の計 23 個体の各個体より、実施例 2 と同様の手法によりゲノム DNA を調製した。該ゲノム DNA (最終濃度 0.8 ~ 2 ng /  $\mu$ L) を鋳型とし、プライマーセット (iii) を用いた以外は実施例 3 と同様の手法によりクロマグロ被検体の性判別解析を行った。ネガティブコントロール (NTC) として DNA なしの反応も行った。

【0067】

結果を表 6 に示す。表 6 において、「+」は緑色の蛍光がみられたことを、「-」は蛍光がみられなかったことを表し、また、個体番号 23 及び 24 が実施例 3 で使用した個体を表す。全ての雄個体では標的 DNA 断片の増幅に伴う蛍光がみられた一方、雌個体では蛍光がみられなかった。よって、LAMP 法によりクロマグロの性を正確に判別できた。

【0068】

10

【表 6】

セット	NTC	1	2	3	4	5	6	7
		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雌
(iii)	-	+	-	+	-	+	-	-
セット	8	9	10	11	12	13	14	15
	雄	雄	雄	雌	雌	雌	雄	雌
(iii)	+	+	+	-	-	-	+	-
セット	16	17	18	19	20	21	22	23
	雌	雄	雄	雄	雌	雌	雄	雌
(iii)	-	+	+	+	-	-	+	-

【0069】

実施例 6 性判別解析 5

表 3 に示すプライマーセットのうち、プライマーセット (v) について、さらにループプライマー F (5 LF: CATCCCAGAATTGGATTTGTGAGT、配列番号 36) 及びループプライマー B (5 LB: AAAAAGTGCCAAAACACTACGGAGC、配列番号 37) を設計し、ループプライマーを用いる場合と用いない場合で LAMP 法での性判別解析を行った。具体的には、実施例 3 ~ 5 で用いたのとは別の天然太平洋クロマグロの雄 2 個体及び雌 2 個体 (生殖腺及び特許文献 2 の方法による性判別済み)、並びに実施例 3 で使用した養殖太平洋クロマグロの雄 1 個体及び雌 1 個体の計 6 個体の各個体より、実施例 2 と同様の手法によりゲノム DNA を調製した。該ゲノム DNA (最終濃度 0.2 ~ 2 ng /  $\mu$ L) を鋳型とし、プライマーセット (v) を用い、ループプライマーを用いない場合には反応時間 50 分とし、ループプライマーを用いる場合には各 20 pmol を反応系に添加し、反応時間を 30 分とした以外は実施例 3 と同様の手法によりクロマグロ被検体の性判別解析を行った。ネガティブコントロール (NTC) として DNA なしの反応も行った。

30

【0070】

結果を表 7 に示す。表 7 において、「+」は緑色の蛍光がみられたことを、「-」は蛍光がみられなかったことを表す。全ての雄個体では標的 DNA 断片の増幅に伴う蛍光がみられた一方、雌個体では蛍光がみられなかった。よって、LAMP 法によりクロマグロの性を正確に判別できた。また、反応時間 30 分での性判別も可能であった。

40

【0071】

【表 7】

セット(v)	NTC	1	2	3	4	5	6	6 (1/10希釈)
		雌	雄	雌	雄	雌	雄	雄
ループプライマーあり	-	-	+	-	+	-	+	+
ループプライマーなし	-	-	+	-	+	-	+	+

## 【0072】

実施例 2 ~ 6 の結果より、LAMP法を用いることでクロマグロの性を高精度で判別できることが示された。LAMP法は、等温で反応が進行するため、装置としては一定温度を維持できる装置があればよく、PCRとは異なり高価な機器が必要ない。また、増幅反応が短時間で済む。さらに、増幅反応後、反応チューブをそのままUV装置にかざして蛍光を確認するだけで、増幅の有無を容易に確認できる。斯様に、LAMP法は迅速性と簡便性に優れ、養殖場など実験リソースの限られる状況下でも精度の高い性判別が可能となる。

10

## 【0073】

## 実施例 7 プライマー

以下、本発明のクロマグロの性判別方法に用いるプライマーの設計例を挙げる。表 8 に PCRのためのプライマーペア 1 ~ 10 を、表 9 に LAMP法のためのプライマーセット 11 ~ 15 を示す。表中、5' pos は、プライマーの 5' 末端の塩基の位置を配列番号 1 の塩基配列における塩基位置で示す。FIP 及び BIP は逆方向の 2 配列を合成したプライマーのため、位置情報は示していない。

20

## 【0074】

【表 8】

ペア	プライマー	配列 (5' → 3')	配列番号	5' pos
1	2930F	TCTGACTTCCATCAGTGGAAGT	38	2930
	3180R	GAACCAAAAGAGCTGCTGTG	39	3180
2	27245F	ACCCGTGTTTCAGAGGACTT	40	27245
	27449R	ATCCACTTTGCAATGCGGT	41	27449
3	32487F	AACGGTTGGAAGTTGAAGC	42	32487
	32700R	TCTGACTGGGATGAGAGGGA	43	32700
4	74869F	CATCTCTTGCCGTTCACTC	44	74869
	75112R	GTCGATGTCTGCCAATCCAC	45	75112
5	77862F	CAGCCTCTGTCTCTTGGTGA	46	77862
	78075R	ACCATCCAAGGCTTCATCCA	47	78075
6	86547F	AGAGCTAATGGTTTGCCCT	48	86547
	86708R	AAAACCTCCACAGGCGTCAAC	49	86708
7	122214F	CAGCAGGTTAAAGGTCAT	50	122214
	122681R	GTAAGGAGGGTAAGTTGG	51	122681
8	160750F	CACGCCTGTAATCTGACTGC	52	160750
	160973R	TGTTGCGTCCAGTAATCCCT	53	160973
9	203437F	CAGAAACGTCACAGTGCACA	54	203437
	203783R	GCAGGACAACAACACTCGTT	55	203783
10	231642F	GTGTGATTGTTGTGCTTG	56	231642
	232100F	AAAGTTTCTCTGGTCAGG	57	232100

【 0 0 7 5 】

【表 9】

セット	プライマー	配列 (5' → 3')	配列番号	5' pos
11	11_F3	TGGCGAGTTGGAAAAAGCT	58	17969
	11_B3	GTGTCGTGGTGGAAAGGAC	59	18159
	11_FIP	CCGTCTCTGCAACCACACGGGGTAAAACGTCGCGCTGT	60	-
	11_BIP	GGCGGGGAAGGGGTAATAGGGAGGAGAAAACCAGAGTG	61	-
12	12_F3	GCCTCCACATACAGTCAGAC	62	87054
	12_B3	TGCGTCTCTGCCAATCAGA	63	87251
	12_FIP	TGGCGCTGGTCCTTTGTTTCAGGATGGGCCTACATGCAAACC	64	-
	12_BIP	CTAACTCCATCCCCAGTGGGCCTGTGTTGGACCATTTCT	65	-
13	13_F3	AACTCTTGAATGAGAAGGTG	66	120143
	13_B3	CATTCTGCTGGATTTAACCAG	67	120347
	13_FIP	CTGCAACTGTTCTTTTCATTTCCCTCGTCTGTACTGTACACACCA	68	-
	13_BIP	AAGCAGCTACACAAGCTCCCTCAGTTAAGGAGACAGAAGA	69	-
14	14_F3	GATACACCTGGTCTGCT	70	179679
	14_B3	GTAATGATCAGCTGTTGGAG	71	179864
	14_FIP	TGGCTCACTGTGACAGCAAATTAATGTCACACACTGTGGAA	72	-
	14_BIP	AATGGATGTAAAGGTCTCCGTTTGTGTGTGTAATTCTCACTGAGG	73	-
15	15_F3	AAACTGTTTTTACTCTTCACAG	74	228959
	15_B3	ACCAGCCCAGAAGTGATC	75	229152
	15_FIP	TGTTAGGTACTCTGTTGGACGATTATAATACTGAAAGTCTTCAGTGG	76	-
	15_BIP	CGGGAGGATGCTGTCCTAGATCGTTGCTGCCAAACATC	77	-

## 【0076】

## 参考例 1 M175 の構造の確認

M175 全体は雄特異的な配列である。一方、M175 の部分塩基配列を指標としてクロマグロの性判別方法を構築する場合、該部分塩基配列に雌のゲノム DNA と配列同一性の高い配列があると、プライマー又はプローブの設計に注意を要する。そこで、プライマーによる増幅産物の長さを 100 bp と仮定し、M175 中の任意の連続する 100 塩基以上からなる塩基配列が雌のゲノム配列と 100% マッチするか否かを BLAST により検証した。結果を表 10 に示す。

## 【0077】

【表 10-1】

開始位置	終了位置	長さ(nt)	開始位置	終了位置	長さ(nt)	開始位置	終了位置	長さ(nt)	開始位置	終了位置	長さ(nt)
247	413	167	9908	10038	131	41155	41266	112	83656	83809	154
248	415	168	9909	10167	259	41272	41468	197	83811	83929	119
313	416	104	10023	11449	1427	41298	41470	173	83813	83953	141
759	876	118	11139	11589	451	41343	41491	149	83881	84007	127
900	1022	123	11453	11740	288	41657	41773	117	83902	84067	166
1582	1708	127	11612	11835	224	41687	41821	135	83961	84095	135
1798	1952	155	11791	12129	339	41690	41830	141	84102	84233	132
1891	2001	111	12157	13119	963	41951	42058	108	84235	84387	153
1954	2097	144	12883	13120	238	42545	42674	130	84411	84521	111
2559	2715	157	13118	13418	301	44060	44164	105	84524	84631	108
2950	3162	213	13420	13539	120	47089	47191	103	84781	85065	285
3197	3303	107	14293	14421	129	47478	47591	114	85110	85319	210
3975	4223	249	14359	14478	120	47617	47744	128	85161	85334	174
3978	4314	337	14491	14607	117	47622	47761	140	85458	85736	279
3993	4359	367	14678	14794	117	47680	47819	140	85572	85799	228
4096	4382	287	14978	15083	106	48016	48127	112	85812	85965	154
4221	4392	172	15136	15281	146	48021	48155	135	86011	86121	111
4248	4410	163	15142	15289	148	48041	48218	178	86258	86410	153
4567	4787	221	15689	15803	115	48127	48250	124	86277	86411	135
4934	5061	128	19413	19563	151	51401	51547	147	87206	87317	112
5133	5264	132	19692	19890	199	52672	52773	102	88207	88309	103
5257	5383	127	19892	20184	293	55992	56124	133	88886	88988	103
5471	5581	111	20051	20219	169	56130	56248	119	89056	89168	113
5670	5774	105	20154	20273	120	56138	56249	112	91611	91726	116
5773	6219	447	20186	20792	607	56141	56273	133	92131	92267	137
5775	6373	599	20491	20793	303	56309	56411	103	92467	92582	116
6007	6469	463	20795	20991	197	56408	56511	104	92481	92610	130
6529	6857	329	20802	21060	259	56514	56733	220	92492	92614	123
6608	6897	290	21062	21336	275	56516	56806	291	92532	92659	128
6761	6935	175	21250	21378	129	56965	57152	188	92570	92676	107
6896	7025	130	21297	21415	119	57010	57183	174	92854	93006	153
6906	7149	244	21315	21444	130	57186	57353	168	92929	93065	137
7055	7286	232	21527	21655	129	57226	57357	132	93153	93309	157
7198	7346	149	21654	22173	520	57314	57449	136	93161	93358	198
7279	7428	150	22143	22293	151	57382	57492	111	93243	93452	210
7314	7436	123	22175	22304	130	58315	58470	156	93311	93465	155
7360	7500	141	22306	22690	385	58393	58539	147	93360	93499	140
7504	7626	123	22390	22705	316	58455	58559	105	93586	93701	116
7638	7744	107	22707	23010	304	58468	58567	100	93656	93776	121
7686	7817	132	22882	23053	172	58973	59129	157	93703	93804	102
7746	7862	117	23575	23707	133	59208	59375	168	93803	93952	150
7858	8039	182	23957	24113	157	59285	59389	105	93905	94024	120
7936	8461	526	23996	24129	134	59391	59554	164	94173	94285	113
8228	8491	264	24208	24377	170	63769	63886	118	94476	94591	116
8230	8729	500	24213	24383	171	66273	66438	166	94498	94623	126
8591	8856	266	24225	24436	212	66370	66677	308	94764	94882	119
8775	8937	163	39293	39395	103	66492	66699	208	95302	95427	126
8853	8972	120	39510	39619	110	79299	79425	127	95345	95528	184
8939	9068	130	39512	39670	159	79310	79436	127	95574	95675	102
8974	9075	102	39543	39694	152	81043	81166	124	95877	96007	131
8992	9151	160	39546	40045	500	82003	82129	127	96017	96185	169
9070	9241	172	39595	40086	492	82281	82460	180	96112	96275	164
9162	9368	207	40335	40485	151	82373	82482	110	96288	96429	142
9275	9560	286	40588	40716	129	82711	82875	165	96444	96561	118
9399	9568	170	40788	40893	106	82831	82989	159	96507	96634	128
9557	9679	123	40800	40905	106	82887	82992	106	96645	96766	122
9681	9845	165	40821	40920	100	83100	83220	121	96818	97092	275
9847	10012	166	40962	41073	112	83217	83331	115	97103	97240	138
9857	10025	169	41008	41108	101	83472	83639	168	97126	97368	243
9865	10030	166	41133	41236	104	83641	83776	136	97602	97909	308

【 0 0 7 8 】

【表 10-2】

開始位置	終了位置	長さ(nt)									
97960	98064	105	114963	115072	110	129021	129229	209	147794	147967	174
98107	98221	115	115183	115465	283	129236	129458	223	147828	148009	182
98237	98396	160	115271	115476	206	129624	129776	153	147952	148062	111
98260	98399	140	115803	115951	149	129763	129925	163	148058	148323	266
98424	98590	167	116046	116326	281	129927	130057	131	148304	148435	132
98463	98598	136	116052	116359	308	129949	130083	135	148325	148577	253
98617	98776	160	116833	117053	221	130119	130219	101	148570	148689	120
98657	98832	176	117344	117459	116	130284	130386	103	148685	149319	635
98712	98857	146	117390	117513	124	130641	130760	120	149255	149391	137
98956	99097	142	117560	117714	155	130813	130918	106	149318	149529	212
98982	99129	148	117750	117855	106	130920	131087	168	149523	149646	124
99108	99227	120	117959	118149	191	130968	131215	248	149644	149849	206
99131	99315	185	118032	118199	168	131599	131979	381	149847	150028	182
99230	99335	106	118340	118487	148	131676	131988	313	150025	150178	154
99601	99721	121	118555	118838	284	131990	132108	119	150180	150791	612
100274	100398	125	118939	119170	232	132076	132177	102	150817	150988	172
100596	100701	106	119154	119293	140	132091	132214	124	150912	151056	145
100703	100812	110	119172	119387	216	132216	132394	179	151086	151381	296
100730	100832	103	119389	119578	190	132255	132451	197	151458	151640	183
101076	101184	109	119485	119587	103	132748	132999	252	151689	152196	508
101363	101498	136	119642	119986	345	133001	133151	151	152192	152489	298
101696	101860	165	120084	120191	108	133262	133806	545	152485	152646	162
101972	102109	138	120213	120388	176	133823	134297	475	152646	152787	142
102278	102384	107	120448	120639	192	134342	134620	279	152782	153008	227
102681	102847	167	121266	121396	131	134610	134731	122	153004	153221	218
102954	103065	112	121398	121516	119	134615	135156	542	153223	153474	252
103125	103403	279	121484	121585	102	135159	135289	131	153539	153993	455
103514	103655	142	121499	121619	121	135371	136088	718	153995	154233	239
103828	103976	149	121934	122114	181	136090	136404	315	154170	154288	119
103831	104137	307	122229	122426	198	136406	137989	1584	154231	154581	351
104319	104441	123	122485	122645	161	137985	138185	201	154583	154950	368
104390	104587	198	122503	122685	183	138187	139929	1743	154952	155447	496
106542	106660	119	123559	123738	180	139931	141292	1362	155449	155570	122
106966	107120	155	123668	123783	116	141294	141669	376	155572	155942	371
107888	107991	104	123786	123908	123	141669	141820	152	155944	156706	763
107993	108191	199	123908	124059	152	141819	142142	324	156680	156847	168
108031	108271	241	123928	124148	221	142142	142339	198	156805	156974	170
108198	108299	102	124150	124287	138	142176	142346	171	156943	157050	108
108201	108378	178	124221	124366	146	142178	142367	190	157071	157216	146
108475	108585	111	124368	124581	214	142228	142460	233	157089	157278	190
108518	108617	100	124648	124843	196	142441	142731	291	157177	157448	272
108524	108674	151	124853	124955	103	142579	142745	167	157280	157508	229
108533	108679	147	124957	125087	131	142727	143098	372	157660	157940	281
108554	108828	275	125026	125299	274	142948	143231	284	157772	157966	195
109020	109358	339	125273	125373	101	143098	143662	565	158064	158272	209
109360	109535	176	125390	125532	143	143593	143894	302	158221	158413	193
109567	109708	142	125707	125928	222	143771	143909	139	158306	158459	154
109824	110163	340	126091	126303	213	143778	143927	150	158457	158593	137
110333	110513	181	126338	126444	107	143911	144209	299	158682	158838	157
110877	111016	140	126664	126889	226	144053	145245	1193	158685	158849	165
111323	111449	127	126960	127148	189	144875	145616	742	158851	159002	152
112045	112168	124	127150	127385	236	145247	145726	480	158999	159185	187
112881	113015	135	127218	127453	236	145538	146046	509	159298	159456	159
112888	113085	198	127387	127498	112	145854	146081	228	159458	159641	184
113363	113468	106	127744	127967	224	145898	146230	333	159643	159918	276
113690	113795	106	128070	128360	291	146026	146915	890	159936	160138	203
113937	114136	200	128084	128413	330	146834	147225	392	160140	160462	323
114289	114484	196	128362	128461	100	146948	147333	386	160495	160616	122
114335	114582	248	128590	128713	124	147116	147505	390	160562	160714	153
114676	114778	103	128802	129011	210	147504	147950	447	160713	160828	116

【 0 0 7 9 】

【表 10-3】

開始位置	終了位置	長さ(nt)									
161056	161227	172	176656	176762	107	199222	199336	115	219802	219901	100
161454	161571	118	177438	177540	103	199287	199407	121	219883	219991	109
161947	162108	162	177542	177689	148	199458	199586	129	219993	220201	209
162116	162247	132	177748	177896	149	199499	199616	118	220335	220563	229
162342	162466	125	177945	178113	169	199770	200051	282	220369	220719	351
162468	162582	115	178220	178348	129	199971	200095	125	220704	220831	128
162586	162778	193	178495	178644	150	200047	200379	333	220719	220889	171
162896	163110	215	178959	179089	131	200898	201031	134	220767	221038	272
163137	163257	121	180028	180128	101	201872	201979	108	220775	221075	301
163307	163414	108	180416	180536	121	202052	202190	139	220839	221181	343
163351	163454	104	180498	180607	110	202192	202339	148	221125	221276	152
163354	163663	310	180538	180665	128	202344	202479	136	221322	221461	140
163751	163877	127	180540	180666	127	203605	203732	128	221752	221967	216
163978	164447	470	180572	180681	110	203958	204130	173	221764	221993	230
164465	164800	336	181026	181129	104	204044	204164	121	221980	222079	100
164886	165165	280	181144	181250	107	204131	204278	148	222160	222358	199
165167	165844	678	181231	181387	157	204467	204635	169	222360	222464	105
165777	165927	151	184018	184204	187	204822	205004	183	222477	222650	174
165841	166153	313	184585	184710	126	204925	205034	110	222880	222981	102
166073	166185	113	184744	184882	139	205122	205255	134	223264	223388	125
166152	166371	220	185044	185284	241	205484	205686	203	223526	223728	203
166430	166619	190	185962	186070	109	206070	206205	136	223645	223756	112
166616	166798	183	185988	186128	141	207281	207412	132	223758	223862	105
166711	166828	118	186138	186330	193	207318	207442	125	223864	224180	317
166900	167263	364	187551	187710	160	208308	208411	104	224049	224200	152
167183	167307	125	187817	187945	129	208368	208492	125	224200	224322	123
167259	167591	333	188630	188769	140	209044	209162	119	224674	224842	169
167845	167959	115	189319	189431	113	209279	209382	104	225226	225399	174
167955	168265	311	190121	190230	110	209488	209636	149	225257	225417	161
168279	168440	162	190282	190394	113	210000	210132	133	225432	225569	138
168439	168576	138	190905	191009	105	210134	210236	103	225573	225673	101
168605	168705	101	191015	191153	139	210259	210520	262	225813	225962	150
168640	168746	107	191059	191179	121	210533	210637	105	226090	226231	142
168742	168851	110	191360	191465	106	210639	210773	135	226267	226374	108
168816	168921	106	193637	193808	172	210816	210929	114	226385	226743	359
169023	169308	286	194194	194346	153	211037	211271	235	226409	226780	372
169310	169535	226	194343	194481	139	211039	211315	277	227204	227413	210
169532	169667	136	195023	195154	132	211057	211375	319	227415	227653	239
169770	170150	381	195200	195323	124	211495	211632	138	227812	227957	146
170269	170469	201	195377	195478	102	211510	211781	272	227888	228023	136
170496	170910	415	195576	195684	109	211518	211818	301	227959	228059	101
170908	171053	146	195602	195712	111	211582	211967	386	228061	228254	194
171135	171307	173	195783	195946	164	211783	211990	208	228304	228527	224
171221	171341	121	196073	196172	100	211886	212019	134	228529	228694	166
171308	171455	148	196148	196249	102	212349	212486	138	228565	228723	159
171404	171533	130	196484	196583	100	212434	212628	195	228721	228969	249
171453	171576	124	196548	196653	106	212652	212797	146	229152	229397	246
171567	171695	129	196652	196754	103	212674	213019	346	229597	229779	183
171578	171861	284	196789	196899	111	212936	213035	100	230159	230282	124
171925	172178	254	197109	197261	153	213022	213135	114	230311	230649	339
172091	172208	118	197263	197396	134	213209	213359	151	230386	230752	367
172174	172273	100	197708	197878	171	213231	213480	250	230431	230767	337
172180	172495	316	198063	198240	178	213241	213539	299	230522	230858	337
172493	172847	355	198186	198313	128	213541	213662	122	230754	230895	142
172834	172971	138	198294	198416	123	213808	213944	137	230808	230954	147
172845	173044	200	198455	198559	105	213962	214077	116	230942	231190	249
173422	173569	148	198499	198628	130	214134	214265	132	231041	231281	241
175295	175402	108	198561	198711	151	214521	214674	154	231153	231401	249
175565	175676	112	198625	198732	108	214963	215128	166	231192	231425	234
176013	176118	106	198751	198890	140	215447	215546	100	231427	231588	162
176408	176528	121	198940	199071	132	216170	216490	321	231730	231835	106
176472	176600	129	199073	199216	144	217575	217769	195	232114	232327	214

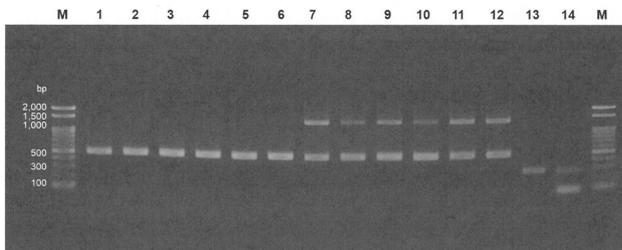
## 【0080】

表 10 中、開始位置及び終了位置は、それぞれ、雌のゲノム配列に 100% マッチする塩基配列の 5' 末端の塩基及び 3' 末端の塩基の位置を配列番号 1 における塩基位置で示したものである。表 10 に示すように、M175 には雌のゲノム配列とマッチする部分塩基配列はあるが、当業者であれば、性判別用マーカーを検出する方法の特性に応じて、M175 の全部又は適当な部分塩基配列からなる DNA をマーカーとして選択し、本発明の

クロマグロの性判別方法を実施することができる。例えば、性判別にPCRを利用する場合、表10の部分塩基配列のいずれか1つの領域を標的としてプライマーペアを設計することを回避すればよく、該部分塩基配列のいずれか1つの領域を標的としてプライマーペアの一方のプライマーを設計しても、他方のプライマーを該領域外に設計すれば、性判別可能である。例えば、性判別にTaqMan PCRを利用する場合、表10の部分塩基配列のいずれか1つの領域を標的としてプライマーペア及びプローブを設計することを回避すればよく、プローブを表10の部分塩基配列外の領域を標的として設計するなどすれば、性判別可能である。例えば、性判別にLAMP法を利用する場合、該部分塩基配列のいずれか1つの領域を標的としてプライマーセットを設計することを回避するなど、雌雄で増幅の有無の違いが生じるようにプライマーセットを設計すれば、性判別可能である。また、例えば、性判別にサザンブロットィングハイブリダイゼーションを利用する場合、該部分塩基配列のいずれか1つの領域を標的としてプローブを設計しても、ゲノムDNAを消化する際に適当な制限酵素を使用することで、性判別可能である。斯様に、M175は、適当なマーカーの検出方法を用いることで、全部又はその部分塩基配列からなるDNAを性判別マーカーとして使用することができる。該マーカーとしては、表10のいずれか1つの部分塩基配列に含まれる塩基配列からなるDNAを除くことが好ましく、M175から表10の部分塩基配列を除いた塩基配列の部分塩基配列からなるDNAがより好ましい。

10

【図1】



【配列表】

2022184558000001.app

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ08 QQ42 QR08 QR55 QR56 QR62 QS26 QS34 QX02