

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年3月20日(20.03.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/041937 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/071790
- (22) 国際出願日: 2013年8月12日(12.08.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-200031 2012年9月12日(12.09.2012) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東京海洋大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO UNIVERSITY OF MARINE SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1088477 東京都港区港南4-5-7 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 岡本 信明(OKAMOTO Nobuaki); 〒1088477 東京都港区港南4-5-7 国立大学法人東京海洋大学内 Tokyo (JP). 坂本 崇(SAKAMOTO Takashi); 〒1088477 東京都港区港南4-5-7 国立大学法人東京海洋大学内 Tokyo (JP). 長谷川 理(HASEGAWA Osamu); 〒2380237 神奈川県三浦市三崎町城ヶ島養老子 神奈川県水産技術センター内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 下田 昭, 外(SHIMODA Akira et al.); 〒1040031 東京都中央区京橋3-3-4 京橋日英ビル4階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

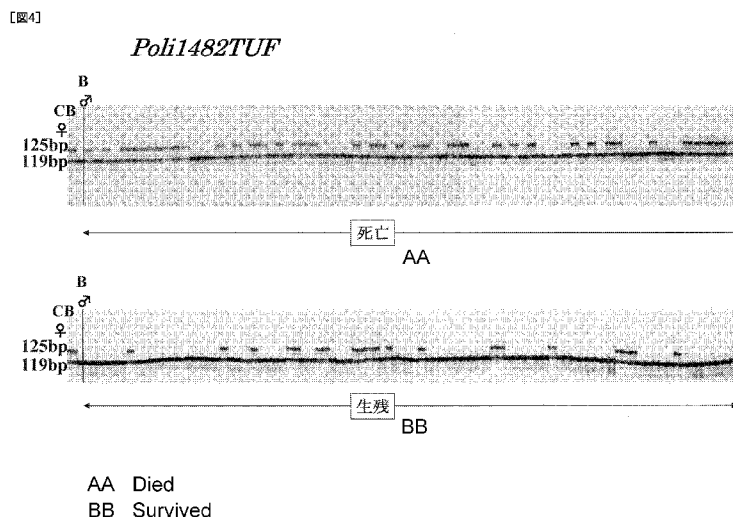
添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING HYPOXIA-TOLERANT FLOUNDER

(54) 発明の名称: 低酸素耐性ヒラメの識別方法



(57) Abstract: [Problem] To objectively ascertain the relationship between differences in the hypoxia tolerance of flounder and genetic factors, and using this lineage of fish, to develop a DNA marker associated with the appearance source of the hypoxia tolerance by quantitative trait analysis (QTL method) of hypoxia tolerance, and develop a method for identifying hypoxia-tolerant flounder using this marker. [Solution] A method for identifying whether flounder is hypoxia-tolerant, the method comprising a step for amplifying a sequence that includes a microsatellite sequence that is the sequence of a microsatellite region, or a portion thereof, of the following a) or b) of DNA extracted from the flounder, the eggs thereof, or a processed product of the same. a) 809th through 1158th bases of base sequence No. 1 and b) 507th through 788th bases of base sequence No. 1.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2014/041937 A1



- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

【課題】 ヒラメの低酸素に対する抵抗性の相違と遺伝要因との関係を客観的に明らかにするとともに、これら系統魚を用いて、低酸素の耐性に関する量的形質解析(QTL法)により低酸素耐性の出現原因と関連するDNAマーカーとそのマーカーを用いて低酸素耐性のヒラメを識別する方法を開発する。【解決手段】 ヒラメ、その卵又はそれらの加工品から抽出したDNAについて、下記a)又はb)のいずれかのマイクロサテライト領域の配列若しくはその一部であってマイクロサテライト配列を含む配列を増幅する工程から成るヒラメが低酸素耐性であるか否かを識別する方法である。 a) 配列番号1の809~1158番目の塩基配列 b) 配列番号1の507~788番目の塩基配列

明 細 書

発明の名称：低酸素耐性ヒラメの識別方法

技術分野

[0001] この発明は、ヒラメが低酸素耐性であるか否かを識別する方法及びそのためのDNAマーカーに関する。

背景技術

[0002] 従来からヒラメの飼育は、仔魚から成魚まで、海水をポンプで陸上の飼育施設に揚水して、行われている。

このため、夏季の高水温期には、飼育水中の溶存酸素の減少により酸欠やこれらに起因した疾病被害がしばしば発生し、産業的に深刻な被害が生じている。

このため、ヒラメの飼育施設では、飼育密度を低く抑えたり、酸欠を防止するために液体酸素施設や酸素発生器などを設置し、飼育水の溶存酸素濃度の確保を図っている。しかし、これらの対策は、施設の維持や液化酸素などに多額の費用を要し、生産コストを上げる一因となっている。

ニジマスについては、低酸素耐性形質が遺伝することが確かめられている（非特許文献1）。

またヒラメの遺伝子連鎖地図は公開されている（非特許文献2）。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：水産増殖 Vol.50, No.3, Page.369-374 (2002)

非特許文献2：BMC Genomics 2010, 11:554

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本願発明は、ヒラメの低酸素に対する抵抗性の相違と遺伝要因との関係を客観的に明らかにするとともに、これら系統魚を用いて、低酸素の耐性に関する量的形質解析（QTL法）により低酸素耐性の出現原因と関連するDN

A マーカーとそのマーカーを用いて低酸素耐性のヒラメを識別する方法を開発して、ヒラメの増養殖事業の発展に貢献することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、長期に亘ってヒラメの養殖研究を行っており、低酸素耐性のあるヒラメを選抜飼育してきた。発明者らは、酸欠により死亡したヒラメを調べた結果、飼育系統によりその死亡率が異なることに気が付いた。そのため、選抜飼育してきた低酸素耐性のある系統と抵抗性のない系統のヒラメを交配し、更に戻し交配により低酸素耐性に遺伝性があることを確認した。

本発明者らは、鋭意検討の結果、ヒラメの低酸素耐性の出現要因と関連する遺伝子が確認できる特定のマイクロサテライトマーカー（MS マーカー）を見出し、このマーカーを用いて低酸素耐性のヒラメを識別する方法を開発した。これらのDNA マーカーを活用し、親魚群から低酸素に対して耐性を有するヒラメを選抜することにより、低酸素の飼育環境における斃死被害を抑制することができる。

[0006] 即ち、本発明は、下記工程から成る低酸素耐性ヒラメの識別方法である。

1) ヒラメ、その卵又はそれらの加工品から抽出したDNA について、下記 a) 又は b) のいずれかのマイクロサテライト領域の配列若しくはその一部であってマイクロサテライト配列を含む配列を増幅する工程、

a) 配列番号 1 の 809~1158 番目の塩基配列 (PolI1482TUF: Genbank accession No. DQ889045)

b) 配列番号 1 の 507~788 番目の塩基配列

2) 別途継代飼育の結果、低酸素耐性と認められる系統のヒラメについて、上記 1) の工程を実施する工程、及び

3) 1) と 2) の工程の増幅結果を比較し、これらが一致する場合に、ヒラメが低酸素耐性であると識別する工程

[0007] また本発明は、下記いずれかのマイクロサテライト領域の配列若しくはその一部であってマイクロサテライト配列を含む配列から成るヒラメが低酸素耐性であるか否かを識別するためのDNA マーカーである。

a) 配列番号 1 の809～1158番目の塩基配列

b) 配列番号 1 の507～788番目の塩基配列

また本発明は、下記いずれかの配列若しくはその一部であってマイクロサテライト配列を含む配列を増幅するためのPCR用プライマーである。

a) 配列番号 1 の809～1158番目の塩基配列

b) 配列番号 1 の507～788番目の塩基配列

また本発明は、ヒラメが低酸素耐性であるか否かを識別するための診断キットであって、上記のPCR用プライマーを含むキットである。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]配列番号 1 の塩基配列を示す図である。太字はマイクロサテライト領域を示し、下線は実施例で用いたプライマーを示す。

[図2]実施例で使用したヒラメの戻し交配家系の作出を示す図である。B系統は低酸素に弱い系統、C系統は低酸素に強い系統、CB系統は両系統間において交配したハイブリット系統、CBB系統は戻し交配家系を示す。

[図3]ヒラメの各系統の低酸素に対する抵抗性（累積死亡率）を比較した図である。横軸は経過時間（時間）、DOは酸素濃度（mg/l）を示す。

[図4]戻し交配家系（CBB系統）におけるMSマーカー（Poli1482TUF）の検出を示す図である。

[図5]戻し交配家系（CBB系統）におけるMSマーカー（Poli Hypoxia-1 TUF）の検出を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0009] 本発明は、DNAマーカーとこのマーカーを用いて低酸素耐性のヒラメを識別する方法を提供する。

発明者らは、ヒラメの遺伝子連鎖地図（非特許文献2）に見出された約1300のマイクロサテライトマーカーを調べた結果、遺伝子連鎖群LG24に存在する下記2つのマイクロサテライト領域が、ヒラメの低酸素耐性の出現に関連していることを見出した（後述の実施例参照）。

本発明のDNAマーカーは、下記いずれかのマイクロサテライト領域の配

列若しくはその一部であってマイクロサテライト配列を含む配列から成る。

a) 配列番号1 (図1) の809~1158番目の塩基配列(PoLi1482TUF: Genbank accession No.DQ889045) このマイクロサテライト領域においては、配列番号1の965~1000番に、C T Tの反復配列(マイクロサテライト配列と考えられる。)が見出される。なお、このマイクロサテライト領域には、配列番号1の809~1158番目の塩基配列に反復単位(C T T)が1又は複数増減したものと反復配列の一部に1個から数個の塩基が、欠失、置換又は付加されたものも含まれる。

b) 配列番号1 (図1) の507~788番目の塩基配列(以下「PoLi Hypoxia-1 TUF」と呼ぶ。)

このマイクロサテライト領域においては、配列番号1の629~750番目にC Aの反復配列(マイクロサテライト配列と考えられる。)が見出される。なお、このマイクロサテライト領域には、配列番号1の507~788番目の塩基配列に反復単位(C A)が1又は複数増減したものと反復配列の一部に1個から数個の塩基が、欠失、置換又は付加されたものも含まれる。

[0010] 本発明のヒラメが低酸素耐性であるか否かを識別する方法は下記工程から成る。

工程1)

ヒラメ、その卵又はそれらの加工品からDNAを抽出し、上記いずれかのDNAマーカー(マイクロサテライト領域の配列)又はその一部であってマイクロサテライト配列を含む配列を増幅する。

この増幅(PCR反応)に用いるプライマーとしては、上記マイクロサテライト領域のマイクロサテライト配列を増幅できるものであればよく、上記のマイクロサテライト領域の塩基配列と、好ましくはストリンジентな条件で、特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであれば限定されない。ここで特異的にハイブリダイズするとは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジентな条件下において、他のタンパク質をコードするDNAとクロスハイブリダイゼーションを有意に生じないこと

を意味する。ストリンジェントな条件は、例えば、60℃、6×SSCの条件である。

[0011] このようなプライマーは、例えば、配列番号1の塩基配列のうち、マイクロサテライト領域のマイクロサテライト配列を挟む塩基配列から成るオリゴヌクレオチドを用いることができる。このようなオリゴヌクレオチドは、例えば、下記a-1)の塩基配列から成るオリゴヌクレオチド、及びa-2)の塩基配列から成るオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチド、又はこれらに相補的な配列の2つのオリゴヌクレオチド

a-1) 配列番号1の1~964番目の塩基配列のうち連続する少なくとも18個の塩基配列

a-2) 配列番号1の1001~1303番目の塩基配列のうち連続する少なくとも18個の塩基配列

又は下記b-1)の塩基配列から成るオリゴヌクレオチド、及びb-2)の塩基配列から成るオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチド、又はこれらに相補的な配列の2つのオリゴヌクレオチドである。

b-1) 配列番号1の1~628番目の塩基配列のうち連続する少なくとも18個の塩基配列

b-2) 配列番号1の751~1030番目の塩基配列のうち連続する少なくとも18個の塩基配列

これらプライマーは好ましくは18~25個、より好ましくは20~25個の塩基から成るオリゴヌクレオチドである。

[0012] 上記a) Poli1482TUFのマイクロサテライト領域については、例えば、下記(1)の2つのオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとして用いてPCR反応を行うことができる。

(1) 5'-CATGTTGGTCTGAGACGATGAACTC-3' (配列番号2)の3'側末端から連続する少なくとも18個の塩基から成るオリゴヌクレオチド、及び5'-TAGATCCTGTTGTTTTCTGCTCG-3' (配列番号3)の3'側末端から連続する少なくとも18個、好ましくは少なくとも20個、より好ましくはこの配列全ての塩基

から成るオリゴヌクレオチド、又はこれらに相補的な配列の2つのオリゴヌクレオチド

このPCRプライマーを用いたPCR産物のゲル電気泳動において119bpのバンドは低酸素耐性のヒラメに多く見出されることから（後述の実施例1及び図4参照）、低酸素耐性アレルに固有のものといえる。

[0013] また、b) 配列番号1の507~788番目の塩基配列については、例えば、下記(2)の2つのオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとして用いてPCR反応を行うことができる。

(2) 5'-CTCACTGTTCTGAAGCTTCTCT-3' (配列番号4)の3'側末端から連続する少なくとも18個の塩基から成るオリゴヌクレオチド、及び5'-CGTCTGAGTCGGAATCCTTCTG-3' (配列番号5)の3'側末端から連続する少なくとも18個、好ましくは少なくとも20個、より好ましくはこの配列全ての塩基から成るオリゴヌクレオチド、又はこれらに相補的な配列の2つのオリゴヌクレオチド

このPCRプライマーを用いたPCR産物のゲル電気泳動において217bpのバンドは低酸素耐性のヒラメに多く見出されることから（後述の実施例1及び図5参照）、低酸素耐性アレルに固有のものといえる。

[0014] 工程2)

下記の高水温期（低酸素状態）においても死亡率が低く、低酸素耐性と認められる系統のヒラメを、継代飼育する。この継代飼育は通常2世代程度行う。このヒラメに対して、上記工程1)と同様にマイクロサテライト領域の配列又はその一部であってマイクロサテライト配列を含む配列を増幅する。

[0015] 工程3)

1)と2)の工程の増幅結果を比較し、これらが一致する場合に、ヒラメが低酸素耐性であると識別する。一致しない場合は、ヒラメが低酸素耐性ではないと識別する。

[0016] 本発明のDNAマーカーを用いてヒラメが低酸素耐性であるか否かを識別するための診断キットは、上記PCR用プライマーから成り、更に、熱耐性

DNAポリメラーゼ（Taqポリメラーゼなど）や検出のため増幅産物に対合させるプローブを含んでもよい。更に、このキットは、その他の消耗試薬として、例えば、デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)、バッファー等を含んでもよい。

[0017] 低酸素状態での酸欠や疾病被害による死亡を未然に防ぐため、本発明の方法を利用することにより、例えば以下のようにして、低酸素耐性のヒラメの生産が可能になる。

(1) 個体別に低酸素耐性の確認を本発明のDNAマーカーで行い、抵抗性個体のみを選別飼育する。

(2) 低酸素耐性の確認を本発明のDNAマーカーで行い、抵抗性の親魚を選抜し、その子孫に低酸素耐性を付与する。この場合、低酸素耐性の確認を本発明のDNAマーカーで行った抵抗性の親魚と他系統の抵抗性のない親魚との交配より作出された子孫に低酸素耐性を付与することも含まれる。

実施例

[0018] 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。

飼育例1

解析家系として戻し交配家系を作出した(図2)。神奈川県水産技術センターで飼育・維持されている低酸素耐性系統(C系統)と低酸素非耐性系統(B系統)を人為交配させ、F1(CB系統)を作出し、CB雌個体とB雄個体(低酸素耐性系統)を戻し交配し、戻し交配家系(CBB系統)を作出した。

CBB戻し交配家系167個体の表現型の判定は1歳魚で行った。これらをすべて水温25℃で飼育し、試験前日に絶食させた。1000L水槽に800Lの海水を入れ、これにCBB家系167尾を収容した。水温を25℃に保ちながら、注水による酸素供給をなくすため注水を停止させて、さらに酸素供給器を停止させて、試験を開始した。これにより、水中の酸素はヒラメの呼吸により消費され、酸素濃度は時間とともに減少する。CBB戻し交

配家系の約半分が死亡した時点で試験を終了した。死亡個体順に、番号を付け、それぞれの死亡時間を記録した。酸素濃度（DO）は試験開始から30分ごとに測定した。

結果を図3に示す。この結果、試験開始約5.75時間後には、B系統はすべての供試魚が死亡したのに対して、C系統及びCB系統においては、殆どの供試魚が生残しており、低酸素の耐性に対する相違に、遺伝要因が関与していることを確認した。

[0019] 実施例1

本実施例では、MSマーカーと低酸素耐性の連鎖について、QTL解析を行った。

飼育例1で表現型の判定を行った戻し交配家系の各個体（167個体）の尾鱗を1cm角の大きさで採取し、lysis buffer [125mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH7.5)、10mMEDTA (Ph8.0)], Proteinase K (20mg/ml) (Takara) 5 μ l、10%SDS 50 μ lを含む消化溶液を500 μ l加え、37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。PCI (phenol : chloroform : isoamylalcohol = 25 : 24 : 1) を等量加えてよく混和し、遠心分離 (12000rpm、25 $^{\circ}$ C、10分)、上清を新しいチューブに移した。さらに、CIA (chloroform : isoamylalcohol=24 : 1) を等量加えて転倒混和した後、遠心分離 (12000rpm、25 $^{\circ}$ C、5分)、上清を新しいチューブに移した。そこへ3M酢酸ナトリウムを1/10量、続いて2-propanolを等量加え、転倒混和した。遠心分離 (15000rpm、4 $^{\circ}$ C、10分) を行い、DNAペレットが析出していることを確認した後、上清を捨てた。70%エタノールを1ml加えて転倒混和することでDNAペレットおよびチューブの壁面を洗い、その後遠心分離 (15000rpm、4 $^{\circ}$ C、5分) を行って上澄みを捨て、5分程度の風乾を行った。風乾の後、TE buffer [10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)] を50 μ l加えてDNAの溶解を行った。

[0020] このようにして得た各DNAを用いて、MSマーカー型のQTL解析を行った。QTL解析は解析ソフトMap Manager QTXb20 (Mammalian Genome 12: 930-932 (2001)等) を用いて行った。QTL解析の結果は、ロッドスコア(LOD score)で

表され、ロッドスコアが3.0以上の場合、MSマーカーと低酸素耐性とが有意に連鎖していると考えられる。

PCR法は、10×PCR reaction buffer (Mg²⁺)、2.5Mm dNTP、1%BSA、5U Taq DNA polymerase (Takara: Ex-Tag) 50ng のテンプレートDNAを含む11μlの溶液で、GeneAmpPCRSytem9700 (AppliedBiosystems) にて、初期変性95°C 3分間行った後、変性95°C 30秒、アニーリング62°C 1分、伸長72°C 1分を1サイクルとして30サイクル、最終伸長を72°C 5分間行い、12°Cに急冷することでPCRを行った。PCR反応後、得られたPCR産物に等量のLoading dyeを加え、95°C 5分間熱変性によって1本鎖にし、6%変性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った。電気泳動後、ガラス板をバイオイメージングスキャナー (FLA-9000; FUJIFILM) 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レルの分離パターン (マーカー型) を判定した。

[0021] QTL解析は2段階に分けて行った。

第1段階：

ヒラメ遺伝子連鎖地図 (非特許文献2) に基づき、全ての連鎖群において効率よく関連遺伝子座を探索できるように140個のMSマーカーを選び出した。このMSマーカーを用い、実験初期に死亡した個体 (44個体) と最後死亡した個体 (44個体) の合計88個体とその両親および祖母のマーカー型の情報を収集して、表現型 (死亡・生残) とマーカー型の対応関係を調べた (結果は示さない)。

第2段階：

解析個体数を全個体である167個体 (死亡75個体、生残92個体) に増やし、第1段階の検定で有意であった7種のMSマーカー ($p < 0.05$) とその同一連鎖群上に位置する近傍のMSマーカー (Poli Hypoxia-1 TUF) を用いた。Poli Hypoxia-1 TUF以外のMSマーカーは既報告のMSマーカーである (非特許文献2)。各MSマーカーの判定のために用いるPCR用プライマーとして、表1に示す各プライマーを用いた。forward primerの5'側に蛍光標識 (TET) した。これらのMSマーカーを用いて、表現型とマーカー型との対応関係を調

べた。表現型は死亡・生残と各個体の死亡時間の2つを用いた。

[0022] 結果を表1に示す。表中、死亡欄及び生残欄は、低酸素耐性のバンドを示した個体の割合を示す。

[表1]

連鎖群	マーカー名	プライマー配列	LOD score	死亡	生残
3	Poli54TUF	F: GTCACGGTCCATCCAGAAAC (配列番号6)	0.09	28/75	39/92
		R: GAAGTGTGCGTCAAGAGAAGG (配列番号7)			
4	Poli867TUF	F: GTATCCAGTTGGTCTCATAAACCC (配列番号8)	1.15	41/75	66/92
		R: CATCCTGCACACAATGGATAACAG (配列番号9)			
7	Poli117TUF	F: CAGTGATGAATGCACCCAGTCATAC (配列番号10)	0.43	28/75	25/92
		R: TCTGTACCGAAGAAGTGAGGGTGTG (配列番号11)			
10	Poli1851TUF	F: CCTCATAAATGTTGCTGCAGCTCT (配列番号12)	0.85	48/75	45/92
		R: AGCTTCTCCTGCAGCCTCCTT (配列番号13)			
17	Poli1080TUF	F: TCAGCCAAAATGTCCTCACTCTGT (配列番号14)	0.02	40/75	50/92
		R: ACCTGCCAGAGGAGTTCAGGCT (配列番号15)			
	Poli72MHFS	F: CGTCCTTTCCTTTGTCTCG (配列番号16)	0.43	35/75	53/92
		R: ACCATGATTCTCCTTTCCTC (配列番号17)			
24	Poli1482TUF	F: CATGTTGGTCTGAGACGATGAACTC (配列番号2)	4.12	35/75	72/92
		R: TAGATCCTGTGTGTTTTCTGCTCG (配列番号3)			
	Poli Hypoxia -1 TUF	F: CTCACTGTTCTGAAGCTTCTCT (配列番号4)	4.12	35/75	72/92
		R: CGTCTGAGTCGGAATCCTTCTG (配列番号5)			

Poli 1482 TUF及びPoli Hypoxia-1 TUFのMSマーカーを用いた場合には、ロッドスコア(LOD score)が3.0以上であり、これらのMSマーカーが、ヒラメの低酸素耐性を識別するために有効であることを示している。

[0023] また、図4と5に、Poli 1482 TUF及びPoli Hypoxia-1 TUFのMSマーカーを用いた検出結果を示す。図4 (Poli 1482 TUF) において、119bpのバンドは低酸素耐性のヒラメ、125bpのバンドは非低酸素耐性のヒラメに帰属すると考えられる。図5 (Poli Hypoxia-1 TUF) において、217bpのバンドは低酸素耐性のヒラメ、215bpのバンドは非低酸素耐性のヒラメに帰属すると考えられる。

請求の範囲

[請求項1]

下記工程から成る低酸素耐性ヒラメの識別方法。

1) ヒラメ、その卵又はそれらの加工品から抽出したDNAについて、下記a)又はb)のいずれかのマイクロサテライト領域の配列若しくはその一部であってマイクロサテライト配列を含む配列を増幅する工程、

a) 配列番号1の809～1158番目の塩基配列

b) 配列番号1の507～788番目の塩基配列

2) 別途継代飼育の結果、低酸素耐性と認められる系統のヒラメについて、上記1)の工程を実施する工程、及び

3) 1)と2)の工程の増幅結果を比較し、これらが一致する場合に、ヒラメが低酸素耐性であると識別する工程

[請求項2]

下記工程から成る低酸素耐性ヒラメの識別方法。

1) ヒラメ、その卵又はその加工品から抽出したDNAについて、下記a-1)の塩基配列から成るオリゴヌクレオチド、及びa-2)の塩基配列から成るオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチド、又はこれらに相補的な配列の2つのオリゴヌクレオチド

a-1) 配列番号1の1～964番目の塩基配列のうち連続する少なくとも18個の塩基配列

a-2) 配列番号1の1001～1303番目の塩基配列のうち連続する少なくとも18個の塩基配列

又は下記b-1)の塩基配列から成るオリゴヌクレオチド、及びb-2)の塩基配列から成るオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチド、又はこれらに相補的な配列の2つのオリゴヌクレオチド

b-1) 配列番号1の1～628番目の塩基配列のうち連続する少なくとも18個の塩基配列

b-2) 配列番号1の751～1030番目の塩基配列のうち連続する少なくとも18個の塩基配列

をプライマーとして用いてPCR反応を行う工程、

2) 別途継代飼育の結果、低酸素耐性と認められる系統のヒラメについて、上記1)の工程を実施する工程、及び

3) 1)と2)の工程の増幅結果を比較し、これらが一致する場合に、ヒラメが低酸素耐性であると識別する工程

[請求項3]

前記プライマーが、(1)又は(2)の2つのオリゴヌクレオチドである請求項2の方法。

(1) 5'-CATGTTGGTCTGAGACGATGAACTC-3' (配列番号2)の3'側末端から連続する少なくとも18個の塩基から成るオリゴヌクレオチド、及び5'-TAGATCCTGTTGTTTTCTGCTCG-3' (配列番号3)の3'側末端から連続する少なくとも18個の塩基から成るオリゴヌクレオチド、又はこれらに相補的な配列の2つのオリゴヌクレオチド

(2) 5'-CTCACTGTTCTGAAGCTTCTCT-3' (配列番号4)の3'側末端から連続する少なくとも18個の塩基から成るオリゴヌクレオチド、及び5'-CGTCTGAGTCGGAATCCTTCTG-3' (配列番号5)の3'側末端から連続する少なくとも18個の塩基から成るオリゴヌクレオチド、又はこれらに相補的な配列の2つのオリゴヌクレオチド

[請求項4]

工程2)の増幅結果が、(1)の2つのオリゴヌクレオチドであるプライマーを用いた場合、PCR産物のゲル電気泳動において119bpのバンドがあることであり、(2)の2つのオリゴヌクレオチドであるプライマーを用いた場合、PCR産物のゲル電気泳動において217bpのバンドがあることである、請求項3に記載の方法。

[請求項5]

下記いずれかのマイクロサテライト領域の配列若しくはその一部であってマイクロサテライト配列を含む配列から成るヒラメが低酸素耐性であるか否かを識別するためのDNAマーカー。

a) 配列番号1の809~1158番目の塩基配列

b) 配列番号1の507~788番目の塩基配列

[請求項6]

下記いずれかの配列若しくはその一部であってマイクロサテライト配

列を含む配列を増幅するためのPCR用プライマー。

a) 配列番号1の809~1158番目の塩基配列

b) 配列番号1の507~788番目の塩基配列

[請求項7]

下記a-1)の塩基配列から成るオリゴヌクレオチド、及びa-2)の塩基配列から成るオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチド、又はこれらに相補的な配列の2つのオリゴヌクレオチド

a-1) 配列番号1の1~964番目の塩基配列のうち連続する少なくとも18個の塩基配列

a-2) 配列番号1の1001~1303番目の塩基配列のうち連続する少なくとも18個の塩基配列

又は下記b-1)の塩基配列から成るオリゴヌクレオチド、及びb-2)の塩基配列から成るオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチド、又はこれらに相補的な配列の2つのオリゴヌクレオチド

b-1) 配列番号1の1~628番目の塩基配列のうち連続する少なくとも18個の塩基配列

b-2) 配列番号1の751~1030番目の塩基配列のうち連続する少なくとも18個の塩基配列

から成る請求項6に記載のPCR用プライマー。

[請求項8]

下記いずれかの請求項6に記載のPCR用プライマー。

(1) 5'-CATGTTGGTCTGAGACGATGAACTC-3' (配列番号2)の3'側末端から連続する少なくとも18個の塩基から成るオリゴヌクレオチド、及び5'-TAGATCCTGTTGTTTTCTGCTCG-3' (配列番号3)の3'側末端から連続する少なくとも18個の塩基から成るオリゴヌクレオチド、又はこれらに相補的な配列の2つのオリゴヌクレオチド

(2) 5'-CTCACTGTTCTGAAGCTTCTCT-3' (配列番号4)の3'側末端から連続する少なくとも18個の塩基から成るオリゴヌクレオチド、及び5'-CGTCTGAGTCGGAATCCTTCTG-3' (配列番号5)の3'側末端から連続する少なくとも18個の塩基から成るオリゴヌクレオチド、又はこ

れらに相補的な配列の2つのオリゴヌクレオチド

[請求項9]

ヒラメが低酸素耐性であるか否かを識別するための診断キットであって、請求項6～8のいずれか一項に記載のPCR用プライマーを含むキット。

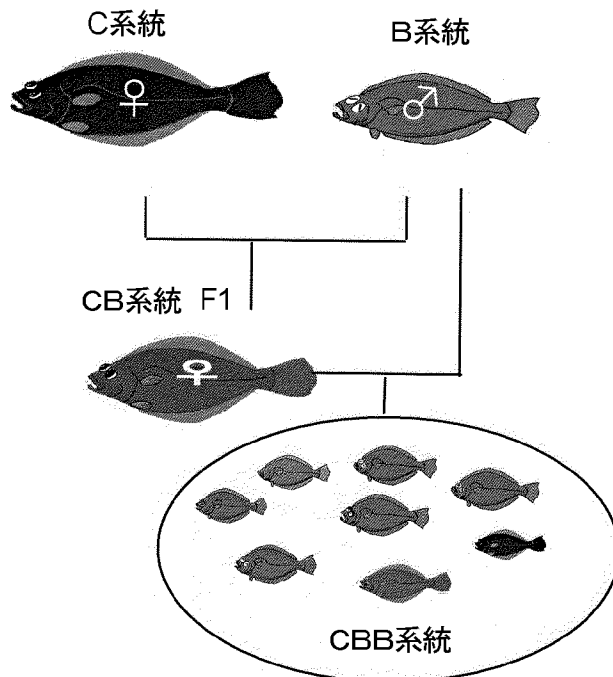
[図1]

LOCUS E44V8AA01_(single)_contig_122568 1303 bp DNA linear UNA
 FEATURES Location/Qualifiers
 ORIGIN

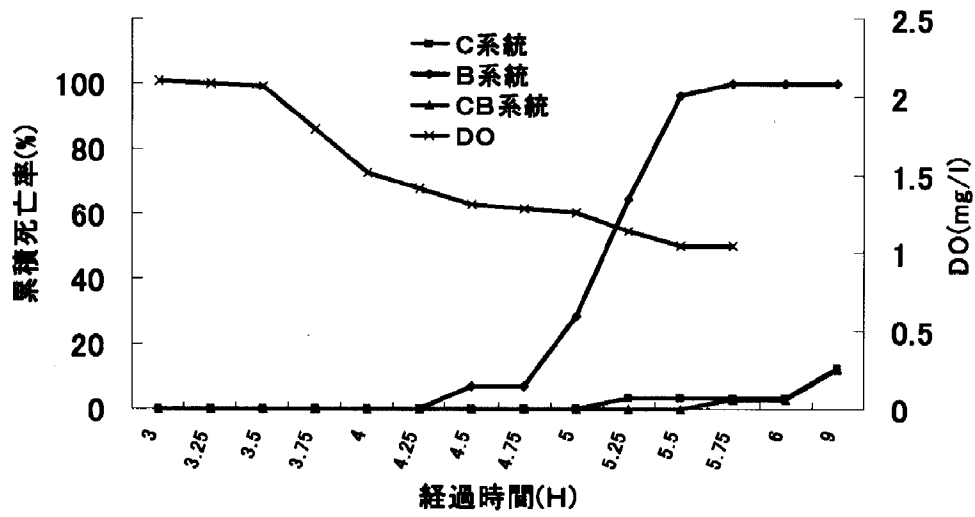
1 TCTGAGGTTT CTATTGATCT GTTCATTCT ATTAATTAGA AATTCTCTGA AGTTCCATGT
 61 GTCAGAATTC TGTCACCTTA ACGATAAAAT CAACTTTATC ACTAAAACAC AAAGTGACTC
 121 TCTGCAGCTC AGCGCCCACG TGTGTTCACT GGAGGAAGTG CAGGAGAAAC TTTCTTTAAA
 181 AAGGGAAAAG TTCCACTTGG TGAGTTTGTG TTTATTATTA TTCGCTCTTT ATATTATTGA
 241 CTATTTGTGA TTTTCATGTGG TTTTTTTATT GGTGCTGAAG GTTCAACAAA CATTAAACC
 301 TTTTAAATCC TGACAACAAA AGAAATAAGT TGATTTAAAA GTTCAAATA AAAATGTGAC
 361 ACTTTGAATT CTCTCTGGTC TCTACACACG TGAACACATG ATTCTCTCTG GTCTCTACAC
 421 ACGTGAACAC ATGATTCTCT CTGGTCTCTA CACACGTGAA CACATGATGA CCTGTCTCAC
 481 CTCACGTTC ACTCTTTAGT TTTCTTCTCA CTGTTCTGAA GCTTCTCTAC GATCTTCCTC
 541 TCGTGTCTG CAGGGTTTGG TCTGTTGGTG TTGTCACCTG CCTCCTCTTT TGTTCGTGCT
 601 TTACGAGTCG AACCCCTCTGC AACACAAACA CACACACATC ATGAAACACA CACATTATGA
 661 AACACACACA TCATGAAACA CACACATCAT GAAACACACA CATCATGAAA CACACACATC
 721 ATGAAACACA CACATCATGA AACACACACA TCATTAGACA GTTTATCAGA AGGATTCCGA
 781 CTCAGACGTC CCGTGACGCA GGAGAAACAC CCGTTTCCTC ACCTGAGTAT TTATCGCTCA
 841 GATTGTAATA TTCATATCCA TCATAAATACT CGTCTTCAAA GCTGGAGGGT TTCAGGTTCT
 901 TCACGTCCAC GTGACTCATG TTGGTCTGAG ACGATGAACT CAGTTTGATA AGAGCTGCAG
 961 AAAACTTCTT CTCTCTCTTC TTCTTCTTCT TCTTCTCTTT TTTTCCGAGC AGGAAAACAA
 1021 CAGGATCTAT TTTCTGCTCT GTTCTCTGAG TCTTTATAAC GGAACATTC AGCTCCTCCT
 1081 CCACACTCAC TCCTCCTTTC ATAACACTC ATAAGTTCCT CTCTCCTCT TTTTCTCCT
 1141 CCTCTTTTTC CTCCCTCCTCT TTTTCTTCT CCTCTCTTC CTCTCCCCT TTTTTCATGC
 1201 TGTAAAGTGT GCATCAGCTC TGAGAGGAAT TTTTCCAAA TCTGTGATTG ATCATTAAAA
 1261 TCTGGACGTT TCGGACGTGT TGTATTTGTT GTTGTGTTTT TTT

//

[図2]

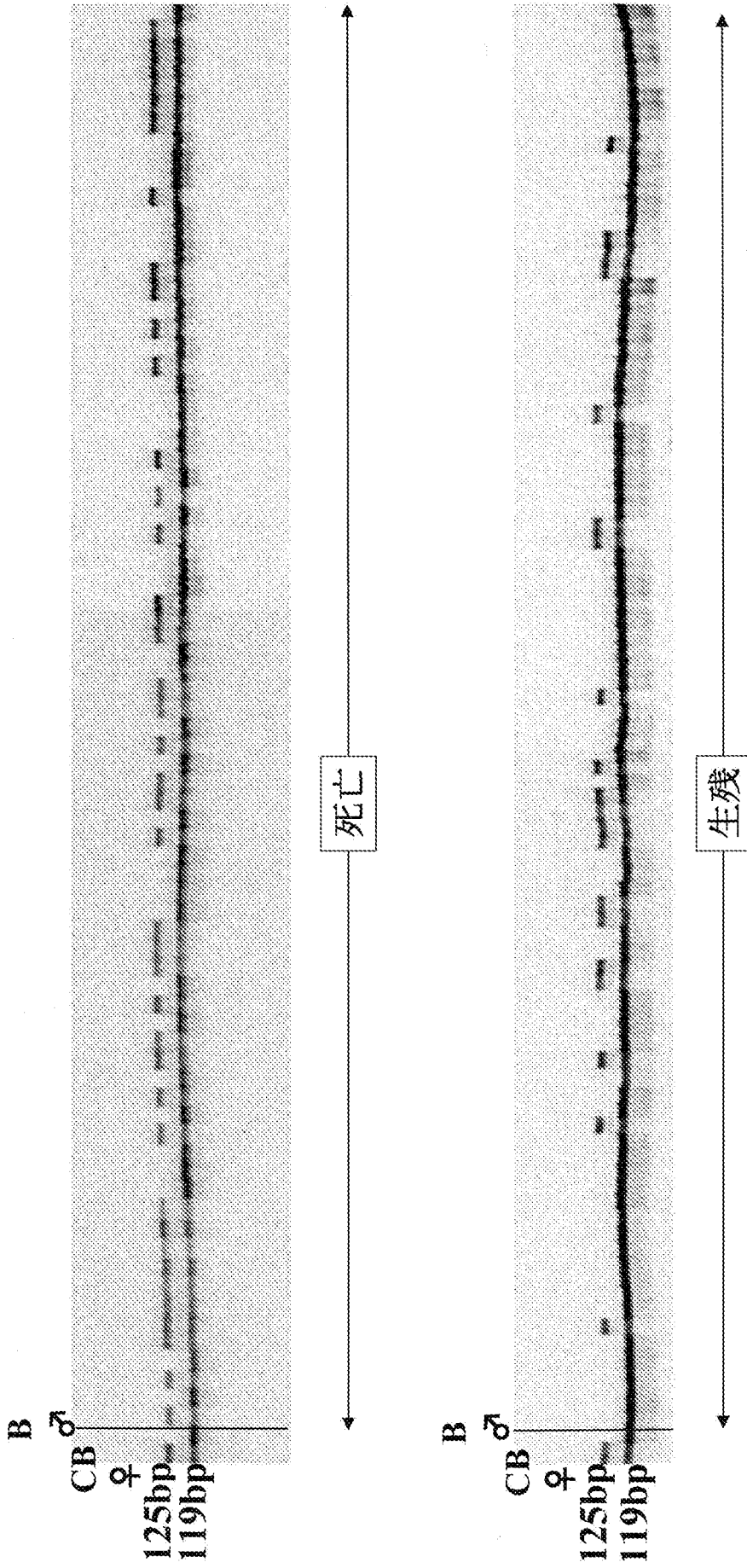


[図3]



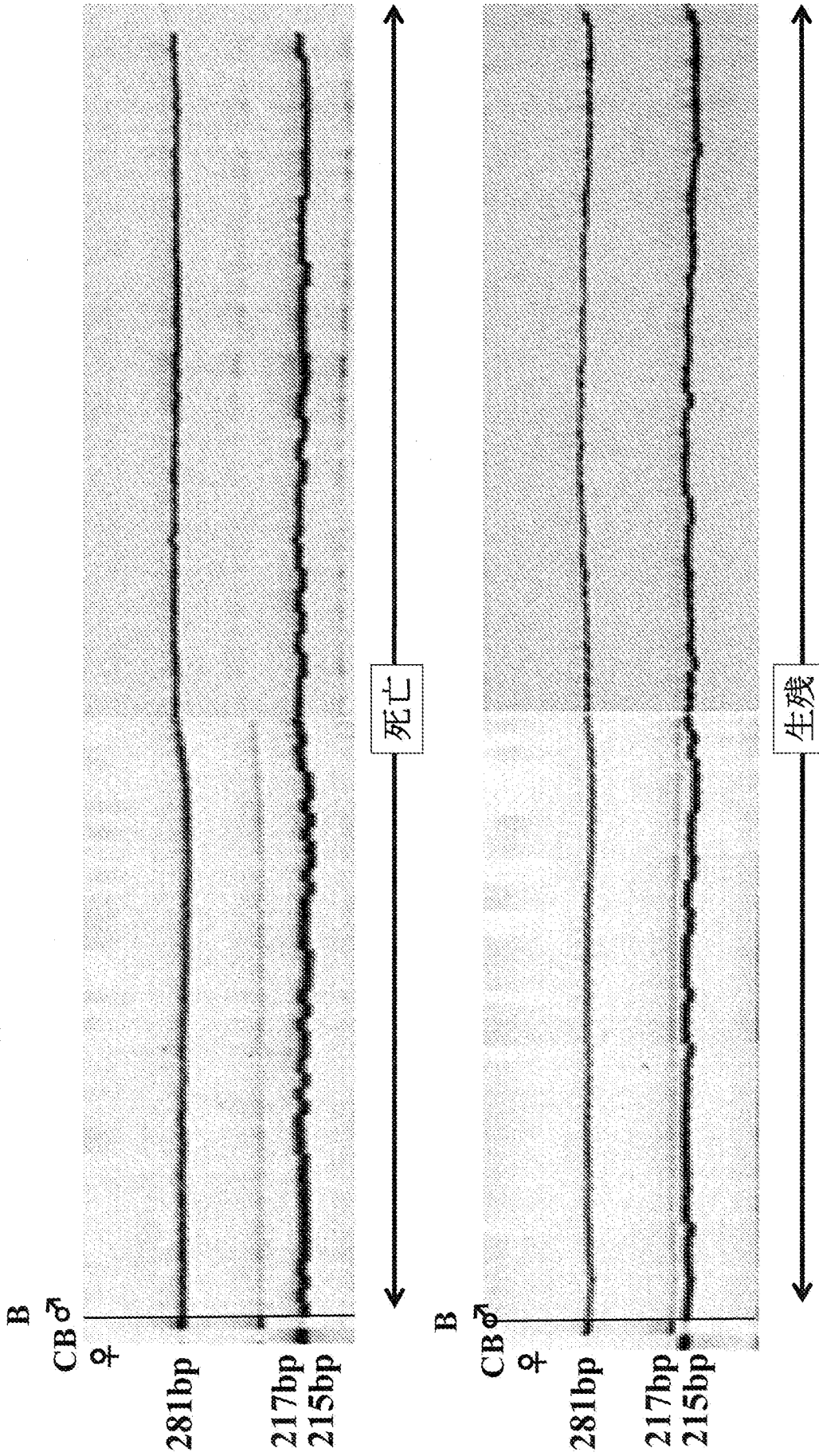
[図4]

Poli1482TUF



[図5]

Poli Hypoxia-1 TUF



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/071790

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q1/68, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Database Genbank[online], Accession No.	6-8
Y	DQ889045, Definition:Paralichthys olivaceus	6-8
A	microsatellite Poli1482TUF sequence, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ889045> 07-NOV-2006 uploaded, [10-SEP-2013 retrieved]	1-5, 9
Y	SANCHEZ C. C. et al., A second generation genetic linkage map of Japanese flounder (Paralichthys olivaceus), BMC Genomics, 2010, 11:554, pages1-11	6-8
A	JP 2010-124797 A (Tokyo University of Marine Science and Technology), 10 June 2010 (10.06.2010), (Family: none)	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 13 September, 2013 (13.09.13)	Date of mailing of the international search report 24 September, 2013 (24.09.13)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/071790

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-081155 A (Japan Science and Technology Corp.), 18 March 2004 (18.03.2004), (Family: none)	1-9
A	Hyuma KUDO et al., "Estimation of Heritability of Tolerance to Low-oxygen Water in Rainbow Trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)", SUISANZOSHOKU, 2002, vol.50, no.3, pages 369 to 374	1-9
P,A	WENG X. et al., "Hirame no Teisanso Taisei Keishitsu ni Kansuru Bunshi Idengakuteki Kenkyu", Heisei 24 Nendo The Japanese Society of Fisheries Science Shuki Taikai Koen Yoshishu, 14 September 2012 (14.09.2012), page 56, 542	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X - Y - A	Database Genbank[online], Accession No. DQ889045, Definition:Paralichthys olivaceus microsatellite Poli1482TUF sequence, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ889045> 07-NOV-2006 uploaded, [10-SEP-2013 retrieved]	6-8 - 6-8 - 1-5, 9
Y - A	SANCHEZ C. C. et al., A second generation genetic linkage map of Japanese flounder (Paralichthys olivaceus), BMC Genomics, 2010, 11:554, pages1-11	6-8 - 1-5, 9
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 13.09.2013	国際調査報告の発送日 24.09.2013	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 北村 悠美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 4501

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2010-124797 A (国立大学法人東京海洋大学) 2010.06.10, (ファミリーなし)	1-9
A	JP 2004-081155 A (科学技術振興事業団) 2004.03.18, (ファミリーなし)	1-9
A	工藤飛雄馬 他, ニジマス (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) における低酸素耐性形質の遺伝率の推定について, SUI SANZOSHOKU, 2002, Vol. 50, No. 3, p. 369-374	1-9
P, A	WENG X. 他, ヒラメの低酸素耐性形質に関する分子遺伝学的研究, 平成 24 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 2012.09.14, p. 56, 542	1-9