

トラフグの高成長に関する 遺伝学的および分子生物学的研究

東京大学大学院農学生命科学研究科

水圏生物科学専攻 博士後期課程

古 川 聡 史

2009

目 次

序 論	1
謝 辞	11
省略記号	12
第 1 章 ゲノムデータベースを用いたマイクロサテライトマーカーの作製	15
第 1 節 ゲノムデータベースからのマイクロサテライト座の抽出 およびその分布	17
第 2 節 プライマーの設計および PCR	20
第 3 節 考察	24
第 2 章 トラフグ家系の作出	26
第 1 節 F_1 世代の作出	27
第 2 節 F_1 世代雄魚から凍結精子の作製	30
第 3 節 戻し交配世代の作出	33
第 4 節 考察	35
第 3 章 連鎖地図の作製および仔魚期における体長の QTL 解析	36
第 1 節 F_1 世代のマーカー座の遺伝子型決定および連鎖解析	39
第 2 節 戻し交配世代を用いた仔魚期における体長の QTL 解析	42
第 3 節 考察	46
第 4 章 仔魚期における成長と関連遺伝子の解析	47
第 1 節 インスリン様成長因子遺伝子の cDNA クローニング	48
第 2 節 インスリン様成長因子遺伝子のイントロンおよび上流領域の解析	55
第 3 節 成長関連遺伝子の発現量解析	58
第 4 節 考察	61
第 5 章 総括的考察	63
参考文献	66
図 表	79

序 論

2000 年 6 月、国際ヒトゲノム解読コンソーシアムおよびセレラ・ジェノミクス社により、ヒトゲノムの概要配列の解読完了が宣言された。そして 2001 年 2 月に、ヒトの遺伝子の総数が 3 – 4 万個であることなど、概要配列を解析した結果に関する論文が発表された (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter et al., 2001)。さらにその後、ヒトゲノムの完全解読を目指して解析が続けられた結果、決定した領域が約 2850 Mb、99.999%以上の精度のヒトゲノム完成版に関する論文 (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004) が発表された。この中で、2001 年の概要版の論文と大きく異なる点は、確定されたヒトの遺伝子数が約 2 – 2.5 万個と 2001 年に発表された概要版よりも 1 万個も少なくなっていることである。その理由として、配列の高精度化、cDNA 情報の充実、他生物種のゲノム解析による遺伝子同定技術の蓄積、などが挙げられる (服部, 2005)。このようなヒトゲノムの解読は、医学や生物学の進歩に大きな影響を及ぼしている。また、ヒト以外の様々な生物のゲノムについても、ヒトのモデル系として、あるいはその生物特有の現象を支配する分子機構を知ることが目的として精力的な研究がなされてきており、既に脊椎動物だけでもトラフグ *Takifugu rubripes* (Aparicio et al., 2002)、マウス *Mus musculus* (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002)、イヌ *Canis familiaris* (Kirkness et al., 2003)、ラット *Rattus norvegicus* (Gibbs et al., 2004)、ミドリフグ *Tetraodon nigroviridis* (Jaillon et al., 2004)、ニワトリ *Gallus gallus* (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004)、メダカ *Oryzias latipes* (Kasahara et al., 2007)、チンパンジー (The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium, 2005) で概要配列が発表されている。

上記のようなモデル生物でゲノム解析が進められる中、脊椎動物でヒトに続き 2 番目に概要配列が発表されたのはトラフグであった。これは非繰り返し配列の約 90%をカバ

一するものである（池田および渡部, 2004）。このようにトラフグで解析が進められたのは、トラフグのゲノムが脊椎動物ゲノムのモデルとして優れた特徴を有しているためである。その特徴とは、まずトラフグのゲノムサイズは約 400 Mb とヒトの約 8 分の 1 でありながら、ほぼ同数の遺伝子を持つことである（Brenner et al., 1993）。これは、トラフグゲノムには繰り返し配列が少なく、遺伝子間領域やイントロンが短いことなどに起因する。トラフグゲノムはコンパクトな構造をしているため、ヒトゲノムに比して転写調節領域が遺伝子の近傍に存在する傾向にあり、その解析に有利である。また、トラフグの転写調節領域がマウス（Aparicio et al, 1995; Kammandel et al., 1999）およびラット（Venkatesh et al., 1997）などの哺乳類においても機能することが示されており、このこともトラフグゲノムのモデルとしての優れた特徴である。

一方、トラフグは我が国および近隣の諸国において水産上重要な魚種の 1 つである。フグ類の中でも最高級の食材とされ、我が国では古くから食されてきた。Fig. 0-1（農林水産省統計部, 2008 を元に作成）はフグ類全般の漁獲高および養殖の生産高を示したものである。天然の漁獲高については 1995 年以降のデータしかないが、概ね右肩下がり推移しており、これは乱獲や環境破壊が要因であると考えられている。一方、養殖フグ類の 1980 年代以前の生産量は年間 100 トン以下しかなかったのにも関わらず、1980 年代頃から急激に増加し、1997 年には 5961 トンを記録している。この養殖の生産高の推移の背景は青木（1999）によると以下の通りである。トラフグ養殖は 1934 年に山口県で 2～3 ヶ月の短期間飼育、すなわち蓄養が行われたのが始まりであった。本格的な養殖の開始は 1964 年に山口県水産種苗センター（現山口県内海栽培漁業センター）での種苗生産開始であると考えられるが、当初は天然魚の漁獲量が高かったためそれほど普及しなかった。1980 年代頃から天然魚の減少とともに養殖の生産高が急激に増加した。また、Table 0-1（農林水産省統計部, 2008 を元に作成）は 2002 年から 2006 年にかけての我が国のブリ類、マダイ、ヒラメおよびフグ類の海面養殖生産量および生産額を

示したものである。現在、日本国内においてフグ類の養殖が行われているのは、ほぼトラフグ1種である（望月，私信）ことから、この表におけるフグ類はトラフグの養殖量と置き換えて考えてもよいと考えられる。トラフグの養殖生産量はブリ類、マダイおよびヒラメに続く4位であるが、生産額ベースならば、トラフグはブリ類、マダイに次ぐ3位となり、単価が高いことがわかる。この表を元に計算すると、フグ類、ブリ類、マダイおよびヒラメの2002年から2006年の間の平均キロ単価は、それぞれ2592円、724円、695円および1530円である。このように、トラフグは天然の漁獲高が減少しており、養殖魚の単価が非常に高く、養殖生産量・額が多いことから、トラフグの養殖は今後ますます重要になってくると考えられる。

我が国のトラフグ養殖は、1990年代中盤までは順調に発展を続けて来たが、1990年代後半から鈍化しつつある（Fig. 0-1）。これは、次のような問題による。第一に、成長するまでに時間がかかるため、その間に寄生虫の蔓延による大量斃死が起こることである。これまで、トラフグの鰓虫 *Heterobothrium okamotoi*（Ogawa, 1991）の駆除のためにホルマリンが使用されてきたが、環境への影響や食品衛生上の問題から、その使用が困難になったことも、この問題に拍車をかけている。第二に、近年は諸外国からの輸入量が急激に増加し、国内の養殖産業を圧迫していることが挙げられる。以上の諸問題を解決するために、遺伝的に優良な形質をもつ品種の確立が望まれている。また、輸出元の各国においても養殖による環境への影響が懸念されているため、品種改良によって効率の良く安定した養殖を行うことは、我が国のみならず世界規模で見ても緊要な課題である。

このようなトラフグの養殖の現状を踏まえ、民間養殖業者では、成長速度や耐病性を指標とした選抜育種が行われている。高成長系と目される系統が確立されつつあるが（以下高成長系と略記；三星および白須，私信）、その遺伝的背景は明らかではなく、系統も完全なものではない。植物や陸上家畜動物では古くから選抜育種が行われてきたの

に対して、トラフグ養殖の歴史はたかだか数十年程度と浅く、世代時間も 2 - 3 年と比較的長いため、古典的な選抜育種のみで系統を確立するためには多大な時間と労力を要することが予測される。トラフグゲノムの解読は本来脊椎動物のゲノムのモデル系としての利用を目的としたもので、食資源としてのフグ類に着目したものではなかったが、このゲノムの概要配列の情報を利用することで育種にかかる時間や労力を低減することができると考えられる。本研究ではゲノム配列情報を利用して、この高成長系に関与している遺伝子を明らかにし、系統を完全なものとすることを目指した。

しかしながら、DNA の塩基配列が明らかになっているだけでは、それを育種に直接生かすことはできない。なぜなら、塩基配列からはゲノム中に存在する遺伝子数やコードするタンパク質のアミノ酸配列がわかるだけで、タンパク質の機能や、発現する環境条件、タイミング、量、組織、細胞内局在などについてはわからないからである。育種への応用には、これらの情報を知る必要がある。そのためには量的形質遺伝子座 (quantitative trait loci, QTL) 解析を行うことにより、目的の形質を支配する遺伝子座の染色体上の位置を絞り込み、当該遺伝子を同定する必要がある。量的形質とは、イネのウルチとモチ、エンドウの種子の丸粒と皺粒などの質的形質に対して用いられる用語で、成長度、耐病性、産卵時期、肉質など数値で表される形質のことである。育種において重要な形質はほぼこれにあてはまるが、量的形質には複数の遺伝子座がかかわっていることが多いので、遺伝子座を同定するためには、ゲノムの地図である連鎖地図を作製し、それを基に統計遺伝学的手法で解析する必要がある。

連鎖地図とは、染色体上の各領域の相対的位置を示した地図で、遺伝子座の距離が遠くなるほど両者の間で組換えが起こる確率が増すことを利用して作製する。連鎖地図を用いた QTL 解析を行うことにより様々な性質に関与する遺伝子座の染色体上の位置を明らかにするのに役立つことから、品種改良に大きく役立つと期待されている。連鎖地図の作製には、DNA マーカーが有用である。DNA マーカーとは個体間で多型を示す部

分で、遺伝子と同様にメンデル遺伝する。ゲノム上に多数存在し、形質をマッピングするのに比べると DNA マーカーをマッピングすることが容易なことから、ゲノム上の目印として連鎖地図の作製に大いに役立つ。実際に DNA マーカーを利用した連鎖地図は、遺伝学のモデル生物であるゼブラフィッシュ *Danio rerio* (Knapik et al., 1998; Shimoda et al., 1999) およびメダカ (Wada et al., 1995; Ohtsuka et al., 1999; Naruse et al., 2000) で作製されているのみならず、産業的な応用を目指してニジマス *Oncorhynchus mykiss* (Sakamoto et al., 2000; Nichols et al., 2003; Guyomard et al., 2006)、ティラピア *Oreochromis niloticus* および *O. aureus* (Kocher et al., 1998; Lee et al., 2005) を始め様々な魚種で精力的に作製されていることから、トラフグにおいても連鎖地図作製は有用であると考えられる。本研究では、ゲノムデータベースを活用することで従来よりも作製に要する作業工程を大幅に短縮できるというトラフグの利点に着目し、高い多型性を示す DNA マーカーの 1 つであるマイクロサテライト (microsatellite, MS) マーカーを用いることとした。

近年は、産業的有用形質に関与する遺伝子 (遺伝子座ではなく遺伝子そのもの) の同定のために、ある程度の密度で DNA マーカーがマッピングされた連鎖地図が構築された段階で、いくつかの遺伝子に候補を絞りその遺伝子内部あるいはごく近傍の多型を DNA マーカーとして利用して QTL 解析を行い、そのマーカーと目的の形質の連鎖関係を調べるという方法がよく取られる。例えば、ティラピアの性決定に anti-Müllerian hormone (Amh) と doublesex/Mab-3-related transcription factor family A2 (Dmrta2) の各遺伝子が連鎖しているという例 (Shirak et al., 2006) や、ニジマスの産卵時期に clock 遺伝子が連鎖しているという例 (Leder et al., 2006) などが報告されている。

本研究の標的であるトラフグの高成長に関与している遺伝子の候補の 1 つとして有力なのがインスリン様成長因子 (insulin-like growth factor, IGF) である。IGF は脊椎動物に特異的なタンパク質で、成長や分化、生殖などを制御することが知られているが、イ

ヌにおいて、IGF-1 のイントロン内の一塩基多型が体サイズに大きな影響があることが示された (Sutter et al., 2007)。その他、ヒト (Woods et al., 1996) やマウス (Baker et al., 1993) においても IGF-1 の欠失が成長を強く遅滞させることから、体サイズ決定に有力な候補遺伝子として知られている。トラフグにおいては IGF-2 のアミノ酸配列が報告されているのみで (DDBJ/EMBL/GenBank accession no. CAA17123)、IGF-1 のアミノ酸配列および mRNA の塩基配列は明らかになっていないが、他生物種でこのように体サイズに大きな影響を及ぼしていることから、高成長の候補遺伝子として考慮すべきである。

QTL 解析などにより、育種に有用な形質と連鎖する DNA マーカー座あるいは実際に形質に直接関与している遺伝子が明らかになった場合、マーカーアシスト選抜 (マーカー利用選抜; marker-assisted selection, MAS) が可能になり、育種の飛躍的進歩が期待できる。MAS とは、育種において有用な形質と連鎖した DNA マーカー座の遺伝子型をもつ個体を選抜することにより、QTL 遺伝子型を間接的に選抜する方法のことである (鵜飼, 2002)。MAS の利点には次のようなものが挙げられる。まず、多産性の魚類では発育の初期において、鰭の一部などを採取して遺伝子型を調べることで優良な形質をもつ個体を残して間引くことが可能になり、効率の良い養殖が可能になる。また、複数の優良な形質をもった系統をかけ合わせる場合 (高成長系統と耐病性系統の組合せなど)、次世代の中で両方の形質をもった個体を選び出すのが容易になる。さらに、肉質のように動物を殺さねば計測できないような形質や、耐病性のように攻撃試験などが必要で判別に手間を要する形質などに基づく選抜にも有効である (Hayes et al., 2007)。

以上のような背景の下、本研究では、高成長系トラフグに関与している遺伝子を明らかにすることを目的として、MS マーカーの開発、連鎖地図の作製と QTL 解析などに基づく遺伝学的解析、および候補遺伝子の cDNA クローニングと発現解析などに基づく分子生物学的解析の 2 方向からのアプローチを試みた。

第 1 章では、公開されているフグゲノムデータベース v3.0 を対象に MS を抽出する

ためのコンピュータープログラムを作成した。本データベースは scaffold と呼ばれる数百から百万 bp 程度のゲノム配列の断片からなるが、本研究ではデータベース v3.0 の scaffold 1 - 25 につき、MS 遺伝子座の分布を調べた。その結果、2 塩基リピートの MS の密度に scaffold 間で約 2 倍の差があった。また、リピート回数の少ない MS は各 scaffold に多く存在したが、リピート回数が多くなるに従って MS の数が減少することも明らかになった。Scaffold 1 - 25 に含まれる 2 - 5 塩基を単位とする MS は異なるリピート数のものも含めて計 408 個で、平均して 74.5 kb に 1 つの MS 座があることがわかった。この割合でトラフグゲノム中に MS 座が分布すると仮定すると、トラフグのゲノムサイズは約 400 Mb であることから、5000 個以上の MS 座があると推測される。

次に、抽出した MS の隣接領域にプライマーを設計し、2003 年 2 月に山口県下関市の南風泊漁港に水揚げされた対馬産天然トラフグの中、ランダムに選んだ 4 個体の肝臓から調製したゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。さらに、アガロースゲルおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動により、抽出した MS の DNA マーカーとしての有効性を調べた。その結果、検討した 251 MS 座のうち約 60% の 148 座において個体間で多型を示し、その有効性が認められた。

第 2 章では、トラフグ家系の作出を行った。まず、民間から供与された高成長系雄と福井県産天然雌魚の卵で人工授精し、受精卵を海水中で強く曝気して孵化させて F₁ 世代を得た。飼育は受精卵の段階から東京大学で行い、水温は 20°C に保った。孵化後はシオミズツボウムシ、ブラインシュリンプおよび固形ペレットを成長段階に応じて飽食給餌した。1 cm 前後の F₁ 生体および 3 cm まで成長した死亡個体の計 69 個体をエタノールで固定し、連鎖地図作製用試料とした。次に、3 年以上飼育して成熟間近の F₁ 雄魚 1 個体の飼育水温を 3 ヶ月かけて 20°C から 12°C まで下げ、この温度でさらに 2 ヶ月間飼育を続けた。次に、2 ヶ月かけて水温を 12°C から 16°C まで上昇させた後、この温度で飼育を続けて催熟を試みたところ、排精が認められたので、ペレット法により凍結精

子を計 650 粒調製した。凍結精子に海水を滴下して顕微鏡下で観察したところ、精子の高い遊泳活性がみられた。さらに、その凍結精子を用いて 2008 年に熊本産天然雌魚との戻し交配 (backcross, BC) を行い、BC 世代を得た。得られた BC 世代は F_1 と同様の方法で飼育した。

第 3 章では、連鎖地図の作製および仔魚期における高成長の QTL 解析を行った。MS マーカーおよび F_1 世代個体から抽出した DNA を用いて PCR で各 MS 座の DNA 断片のサイズから遺伝子型を決定し、各 MS 座間の独立性の検定および組換え価の推定を行った。その結果、雌で 23 の連鎖群 (linkage group, LG) 上に 88 の MS マーカー、雄で 14 の LG 上に 59 の MS マーカーを含む連鎖地図が作製できた。他の脊椎動物と同様に、雌雄間で組換え率に違いがある領域がみられた。また、同一染色体上でタンデムにクラスターを形成していると報告された速筋ミオシン重鎖遺伝子 (*MYH*) の *MYH_{M86}* と *MYH_{M939}* および *MYH_{M2126}* と *MYH_{M1646}* の近傍に存在するマーカーそれぞれ、*fms86* と *M939ms2* および *M2126ms2* と *M1646ms1* は、異なる LG 内で緊密に連鎖していた。

次に、BC 世代を用いて簡易的な QTL 解析法の 1 つであるバルク法で高成長に関連している遺伝子座の探索を行った。まず BC 世代の孵化 38 日後の仔魚期の 70 個体を採取し、全長および体高を測定した。全長および体高の平均および標準偏差はそれぞれ 9.40 ± 1.22 mm および 2.69 ± 0.37 mm であった。次に、採取した 70 個体につき 12 の MS マーカーにおける遺伝子型を決定した。その中、全長が最大の 10 個体の long (Ln) 群と最小の 10 個体の short (Sh) 群および体高が最大の 10 個体の high (Hi) 群と最小の 10 個体の low (Lw) 群を選び出し、4 群の対立遺伝子の頻度が集団全体における対立遺伝子の頻度から有意にずれていないかどうかを検定した。その結果、予想に反して Sh 群および Lw 群において高成長系雄に由来する MS マーカー座がそれぞれ 1 つずつ連鎖不平衡を示したが、成長度の高い群では連鎖不平衡は認められず、高成長と連鎖する遺伝子座の同定には至らなかった。今後はさらに多くの MS 座を抽出して連鎖解析を行う必

要があると考えられる。

第4章では、仔魚期における成長と関連遺伝子の解析を行った。東京大学で飼育していた3歳齢のトラフグの各組織より、全RNAを抽出してcDNAを合成した。このcDNAを鋳型に2種類のIGF、IGF-1およびIGF-2のcDNAクローニングを行った。その結果、IGF-1については全翻訳領域の182アミノ酸残基をコードするcDNA 2536 bp（ポリAテール含む）を得た。決定した塩基配列とゲノムデータベースから抽出された配列の間で翻訳領域中に1箇所のミスセンス変異がみられ、非翻訳領域でも2塩基の置換および2箇所の欠失がみられた。演繹アミノ酸配列は、既報のオオクチバス *Micropterus salmoides* およびボラ *Mugil cephalus* のIGF-1とそれぞれ86%および85%のアミノ酸同一率を示した。IGF-2については212アミノ酸残基をコードするcDNA 760 bpを得た。既報のトラフグIGF-2の配列と合わせ全翻訳領域の塩基配列が明らかになったが、3'末端のポリAテールまでの配列は決定できなかった。演繹アミノ酸配列では既報のIGF-2の配列との間で1残基の置換がみられた。

次に、F₁世代作出に使用した親世代2個体、F₁世代のBC用精子提供雄親およびBC作出に使用した雌親の間で、イヌでIGF-1の発現量の調節により体サイズを制御すると報告されたIGF-1のイントロン1に変異があるかどうかを調べた。しかしながら、決定した493 bpのイントロン領域につき4個体間で多型はみられなかった。

次に、BC世代トラフグのLn群とSh群およびHi群とLw群につき、リアルタイムPCRによりIGF-1およびIGF-2各遺伝子のmRNA蓄積量を比較した。その結果、IGF-1ではLn群のmRNA蓄積量はSh群のその約1.4倍（ $P < 0.005$ ）、Hi群のmRNA蓄積量はSh群のその約1.3倍（ $P < 0.05$ ）と、いずれも有意に高かった。一方、IGF-2では各群間で発現量に有意な差はなかった（ $P > 0.05$ ）。これらの結果から、トラフグにおいてもIGF-1の発現量増加により高成長が誘導されることが示唆された。

最後に、第5章で以上の結果を総括し、将来の研究の展望について考察した。

なお、本研究で得られた成果の一部は以下の通り公表済みである。

Furukawa, S., Takeshima, H., Otaka, T., Mitsuboshi, T., Shirasu, K., Ikeda, D., Kaneko, G., Nishida, M. and Watabe, S. (2004) Isolation of microsatellite markers by *in silico* screening implicated for genetic linkage mapping in Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. *Fish. Sci.*, **70**, 620-628.

謝 辞

本研究は東京大学大学院 渡部終五教授の御指導、御鞭撻の下に行われたものであり、ここに深甚なる感謝の意を表します。

本研究の計画の立案、要所における考察などにおいて数多くのご助言をいただいた東京大学大学院 木下滋晴博士および金子元博士、中央水産研究所 武島弘彦博士ならびに北里大学 池田大介講師に深く謝意を表します。なお、金子元博士にはトラフグ仔魚飼育用のワムシもご提供いただいたことにも感謝申し上げます。

本論文の作成にあたっては、東京大学大学院 西田睦教授、鈴木譲教授、松永茂樹教授、ならびに落合芳博准教授には多くのご助言をいただきました。衷心より御礼申し上げます。

トラフグ親魚の調達および人工授精の際には、株式会社河久の望月俊孝氏、下関市立下関水族館の土井啓行氏、長崎種苗株式会社の中川英敏氏、有限会社田脇水産の田脇誠一氏、日本水産株式会社大分海洋研究センターの三星亨氏、大高太郎氏、白須邦夫所長、ならびに東京大学大学院の古川清博士、菊地潔博士および水野直樹氏には大変お世話になりました。心より感謝いたします。

東京大学 黒須洋平氏には、トラフグの飼育やリアルタイム PCR など多くの点で協力いただきました。深く感謝申し上げます。東京大学大学院水圏生物工学研究室および水産化学研究室内の皆様には平素より大変お世話になりました。特に中谷操子博士にはお世話になりました。皆様にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究は私を最後まで見守ってくれた両親、義理の両親ならびに古川美穂博士の物心両面での支えがなければ成しえなかったものです。この場を借りて御礼申し上げます。

省略記号

本論文では以下の省略記号を用いた。

AFLP: amplified fragment length polymorphism

APS: ammonium persulfate

BC: backcross

bp: base pair

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BPB: bromophenol blue

cDNA: complementary DNA

cM: centi-morgan

DDBJ: DNA Data Bank of Japan

DNA: deoxyribonucleic acid

DNase: deoxyribonuclease

dNTP: deoxyribonucleotide 5'-triphosphate

dT: deoxythymidine

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid

EMBL: European Molecular Biology Laboratory

GH: growth hormone

GnRH: gonadotropin-releasing hormone

hCG: human chorionic gonadotropin

IGF: insulin-like growth factor

IGFBP: insulin-like growth factor binding protein

JGI: Joint Genome Institute

kb: kilo base

LB: Luria-Bertani

LG: linkage group

MAS: marker-assisted selection

Mb: mega base

mRNA: messenger ribonucleic acid

MS: microsatellite

MYH: myosin heavy chain

NCBI: National Center for Biotechnology Information

Perl: Practical Extraction and Report Language

PCR: polymerase chain reaction

QTL: quantitative trait loci

RACE: rapid amplification of cDNA ends

RAPD: random amplified polymorphic DNA

RFLP: restriction fragment length polymorphism

RNA: ribonucleic acid

RNase: ribonuclease

rRNA: ribosomal ribonucleic acid

SDS: sodium dodecyl sulfate

SNP: single nucleotide polymorphism

SSR: simple sequence repeat

STR: short tandem repeat

TBE: tris-borate, EDTA

TEMED: *N, N, N', N'* -tetramethylethylenediamine

T_m: melting temperature

Tris: tris (hydroxymethyl) aminomethane

UTR: untranslated region

第1章 ゲノムデータベースを用いたマイクロサテライトマーカーの作製

連鎖地図とは、染色体上の各領域の相対的位置を示した地図で、遺伝子座の距離が遠くなるほど両者の間で乗換えが起こる確率が増すことを利用して作製する。連鎖地図は様々な性質に関与する遺伝子座の染色体上の位置を明らかにするのに役立つことから、品種改良に大きく役立つと期待されている。当初、連鎖地図はトマトのわい性と果形の間やイネの稈先色とモチ性の間などの異なる形質の連鎖関係を調べることで作製されていたが（鵜飼, 2000）、形質の多型が乏しいためこの方法は極めて長い時間と手間を必要とした。

しかし、1980年代にゲノムの多型を利用したDNAマーカーが利用されるようになると、連鎖地図作製の研究が著しく進展した。それは以下の1)から5)の理由による。1) 多型数が多い。2) 同時分離座数が多い、すなわち形質に基づく連鎖地図の作製では様々な形質について異なる対立遺伝子をもつ複合検定システムを作らねばならなかったのに、同時に解析できる分離座の数が限られていたのに対し、DNAマーカーでは同時に数百マーカーについて分離を調べることができる。3) 共有性分離をする、すなわちヘテロ個体とホモ個体の区別が可能である。4) 多型判定の精度が高い、すなわちDNAマーカーは飼育環境や他遺伝子座の作用などの分離比の判定を乱す要因の影響を受けない。5) 検定効率が高い、すなわち形質の場合その発現時期まで調査を待つ必要があったが、DNAマーカーの分離の場合は幼個体での検定が可能である。

現在では、制限断片長多型（restriction fragment length polymorphism, RFLP）、random amplified polymorphic DNA（RAPD）、増幅断片長多型（amplified fragment length polymorphism, AFLP）、MSなどがマーカーとしてよく利用されている。この中で、特に有用なのがMSマーカーである。MSはshort tandem repeat (STR) や simple sequence repeat (SSR) などとも呼ばれ、(CT)_n、(CA)_n、(GTG)_nのような2-6塩基の繰り返し単

位が、タンデムに十数回から数百回程度反復する配列のことである (Beckmann et al., 1992)。植物から脊椎動物に至るまで真核生物に普遍的にみられ、半数ゲノムあたり 10^4 - 10^5 個のオーダーで存在する。ゲノムの複製の際に slippage による複製ミスが起こり、その反復回数に多型が生じる。MS 多型はヘテロ性が高いこと、一般に遺伝子座あたりの対立遺伝子数が多いこと (20 以上)、染色体上に広く分布するためゲノム全体にわたる解析ができること、PCR により容易に検出が可能であること、共優性であるためホモ接合とヘテロ接合の判別できることという利点を持つ (鶴飼, 2000)。一方、MS マーカーの開発にはゲノムライブラリーを用いたスクリーニングが必要なため、多大な時間と労力がかかる。しかしながら、トラフグではゲノムの概要配列が公開されているため、開発に繁雑な作業工程を要するという MS マーカーの弱点を克服し、この有用なマーカーを容易に作製することができる。

トラフグの染色体組数は $2n = 44$ であることが核型分析より明らかになっており (Miyaki et al., 1995)、全染色体をカバーする連鎖地図を作製するためには、少なくとも 44 個以上のマーカーが必要である。

そこで、本章ではまず MS 座を抽出するコンピュータープログラムを作製し、フグゲノムデータベースの scaffold 1 - 200 に対して実行した。Scaffold 1 - 25 については、MS の分布傾向を詳細に調べた。次に、抽出した MS 座の隣接領域にプライマーを設計し、トラフグの DNA を用いて PCR を行った。その産物を電気泳動に供することで、増幅の特異性を確認し、連鎖地図作製に適したマーカーを選別した。

第1節 ゲノムデータベースからのマイクロサテライト座の抽出およびその分布

本節では、文字列処理に適したプログラミング言語 Perl を用いて、トラフグゲノムデータベースから MS 領域を抽出するプログラムを作製した。ゲノムデータベースの scaffold は番号の小さいものの方が長くなっており、番号の小さいものから順に解析した方が得られる情報量が多い。そこで、まずゲノムデータベースの最初の scaffold である 1 - 200 につき、作製したプログラムを用いて MS 座およびその隣接領域を抽出した。次に、scaffold 1 - 25 を対象に MS の分布傾向を調べた。

方 法

データのダウンロードおよびインストール

ActiveState のホームページ (<http://www.activestate.com/>) より Perl の言語処理系をダウンロードし、コンピューター（使用オペレーティングシステム: Windows XP）にインストールした。JGI のフグゲノムデータベースサイト JGI *Fugu* v 3.0 (<http://genome.jgi-psf.org/fugu6/fugu6.home.html>) より scaffold 1 - 200 の塩基配列をダウンロードし、各 scaffold の配列を並べて FASTA 形式で保存した。その際、ファイルを 4 個に分け、scaffold 番号 1 - 25（計 15233195 bp）、26 - 50（計 10437867 bp）、51 - 75（計 9317248 bp）、76 - 100（計 8552192 bp）、101 - 125（計 8045354 bp）、126 - 150（計 7510004 bp）、151 - 175（計 7164005 bp）および 176 - 200（計 6763510 bp）をそれぞれ別々に保存した。

プログラムの作製および実行

Scaffold 1 - 25 の MS 領域の分布を重点的に調べるため、まず scaffold 1 - 25 を対象に 2 塩基単位 5 回以上のリピートを抽出するプログラムを作製した (Fig. 1-1, program A)。続いて、scaffold 1 - 200 を対象に、MS 領域とその上流および下流の隣接する領域を抽出するプログラムを作製した。MS を次のような条件を満たす配列として検索を行った。

- 1) 2 塩基単位 23 回以上のリピート (Fig. 1-1, program B)、
- 2) 3 塩基単位 15 回以上のリピート (Fig. 1-1, program C)、
- 3) 4 塩基単位 15 回以上のリピート (Fig. 1-1, program D)、
- 4) 5 塩基単位 6 回以上のリピート (Fig. 1-1, program E)。

これらのプログラムを実行し、MS 領域の抽出を試みた。

結 果

対象とした全ての scaffold から、MS 領域が抽出された。その結果の一部を Fig. 1-2 に示した。

Scaffold 1 - 25 を対象にした 2 塩基単位の MS の分布調査の結果、以下のことが明らかとなった。1) 約 80% の MS は 5 から 13 回のリピートという繰り返し回数の少ないものであった (Fig. 1-3A)、2) 繰り返し回数が増加するにしたがって MS 領域の数は急激に減少した (Fig. 1-3B)、3) 60 回以上の繰り返し回数をもつ MS 領域はなかった (Fig. 1-3A および B)。また、scaffold 間で MS 領域の数を比較した結果、scaffold 9 が最も密度が高く、1、5 の順に続き、14 が最も低いことが明らかになった (Fig. 1-3C)。Scaffold 9 の MS の密度は、scaffold 14 の約 2.8 倍であった。

Scaffold 1 - 25 を対象に 2、3、4 および 5 塩基単位のリピートを検索したところ、方法の項で示した 1) - 4) の条件を満たす MS 領域がそれぞれ 280、20、74 および 34 個抽出された (Table 1-1)。280 個の 2 塩基単位リピートのうち、CA/GT、GA/CT およ

び TA リポートがそれぞれ 255 個 (91%)、12 個 (4.3%) および 13 個 (4.6%) であった (Table 1-1)。

第2節 プライマーの設計および PCR

MS 多型の検出は、その前後の領域にプライマーを設計し、PCR による増幅断片長を比較することで行う。しかし、データベースを元に作製した完全に配列の一致するプライマーでも、増幅がみられなかったり非特異的な増幅が多くみられたりすることがある。このようなプライマー対は多型解析に用いることができない。そこで本節では、プライマーを設計し PCR を行い、その後アガロースゲルおよびポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行うことで、連鎖解析に使用できるプライマー対を選別した。

方 法

プライマーの設計

第1節で抽出した配列を参考に、MS 遺伝子座を増幅するプライマー対を各 scaffold に1つずつ設計した。ただし、Takagi et al. (2003) の報告した MS マーカーが属する scaffold にはプライマーの設計を行わなかった。これらマーカー座が属する scaffold は、マーカー座をトラフグゲノムデータベース JGI *Fugu* v3.0 内の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) サーチ (Altschul et al., 1990) による相同性検索に供することで明らかにした。

プライマーの設計にはソフトウェア Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) を用い、プライマーの melting temperature (T_m) およびプライマーの長さがそれぞれ 60°C 前後および 20 塩基前後になるようにした。データベースから予測される増幅断片サイズは scaffold 1 - 25 では 100 - 300 bp になるようにした。それ以外の scaffold では、以後1回の電気泳動で2つのマーカーを同時に解析できるように、予測

増幅断片サイズの小さなもの（150 bp 前後）と大きなもの（320 bp 前後）をバランスよく設計した。また、Oligo calculator (http://www.genosys.jp/whatsnew/active/active_manual.html) により各プライマーの配列を解析し、プライマーダイマーの形成が「No」で、かつ 2 次構造の形成が 6 段階中最も低い「None」、2 番目に低い「Very weak」、3 番目に低い「Weak」または 4 番目に低い「Moderate」になるものを選別した。さらに、プライマーを設計した領域をトラフグゲノムデータベース JGI *Fugu* v3.0 内の BLAST サーチによる相同性検索に供し、プライマーを設計した領域が他の領域と相同性を示さないことを確認するとともに、scaffold 内でのプライマー設計領域の位置を調べた。

試料および DNA の抽出

山口県下関市の南風泊漁港に水揚げされた対馬産の天然トラフグ 4 個体の肝臓を DNA 抽出用の試料として用いた。試料は研究室に到着するまで 4°C で保存し、到着後は 100%エタノール中に 4°C で保存した。保存した試料の約 3 mm 角からフェノール・クロロホルム法で DNA を抽出し、PCR に用いる鋳型 DNA 試料とした。

PCR

トラフグの MS 座を増幅するため、作製したプライマー対を用いて PCR を行った。先に調製した鋳型 DNA 2 μ L、フォワードプライマー 10 pmol、その対となるリバープライマー 10 pmol、10 \times *Tth* 緩衝液 2 μ L、2.5 mM dNTP 混合液 1.6 μ L、5 U/ μ l *Tth* DNA polymerase (Roche Diagnostic, Penzberg, Germany) 0.1 μ L に滅菌水を加えて計 20 μ L として反応を行った。PCR は 94°C、5 分間の熱変性の後、94°C で 30 秒間、60°C で 30 秒間および 72°C で 30 秒間のサイクルを 30 回行った。最後に 72°C で 40 分間保持し、反応を終了した。最後の伸長反応を 40 分間と長く設定したのは、DNA ポリメラーゼのターミナルデオキシトランスフェラーゼ活性による 3'末端のチミジン 5'-三リン酸の付加反

応を完全に進行させるためである。また、Takagi et al. (2003) の報告した MS 座についても同様の解析を行った。

電気泳動

前項の増幅産物 20 μ L のうち、10 μ L をアガロースゲル電気泳動に、残りの 10 μ L をポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。アガロースゲルは常法によって 2% に調製し、エチジウムブロマイド染色によりバンドの観察を行った。

一方、ポリアクリルアミドゲルはアクリルアミドの終濃度が 10% となるように調製した。すなわち、44.4% アクリルアミド溶液 4.5 mL、10 \times TBE 緩衝液 (890 mM Tris, 890 mM ホウ酸、20 mM EDTA) 2 mL、10% 過硫酸アンモニウム (ammonium persulfate, APS) 溶液 200 μ L に純水 13.3 mL を加え、全量を 20 mL とした。最後に、テトラメチルエチレンジアミン (*N, N, N', N'*-tetramethylethylenediamine, TEMED) 20 μ L を加え重合を開始させた。これをゲル枠に流し込み、ゲルを作製した。泳動は、15 mA の定電流で泳動マーカーとして用いたブロモフェノールブルー (bromophenol blue, BPB) がゲル下端に至るまで行い、アガロースゲルと同様にエチジウムブロマイド染色によりバンドの観察を行った。

結 果

プライマーの設計

Takagi et al. (2003) の報告した MS マーカー Tru-1、5、7、8、9、12、15、18 および 19 は、データベース JGI *Fugu* v3.0 の scaffold 番号ではそれぞれ 1125、2239、285、47、79、36、227、9 および 164 に対応していた。従って、設計の対象とした scaffold 1 - 200

のうち、scaffold 36、79 および 164 ではプライマーを新たに設計しなかった。ただし、scaffold 9 については Takagi et al. (2003) の報告の前に既に設計を行っていた。最終的に、scaffold 1 – 200 を中心に計 251 対のプライマー対を設計、合成した。プライマー名は各 MS 座名にフォワードおよびリバースを示す F および R を付したものとし、各プライマーの配列を他の情報とともに Appendix 1 に記した。さらに各マーカー座についての情報を Appendix 2 にまとめた。

PCR および電気泳動

アガロースおよびポリアクリルアミド電気泳動の結果、同じ MS 座を対象に行った PCR でも様々なサイズのバンドが観察され、これらは MS の増幅断片長多型であると考えられた。電気泳動パターンの一部を Fig. 1-4 および 1-5 に示した。電気泳動で明瞭なバンドが観察され、非特異的な増幅がなく、かつ多型を示すという条件を満たした MS 座は、251 個のうち 148 個であった。これら MS 座は Appendix 2 に示した。以後の実験では、これらの MS 座を MS マーカーとして用いた。

第3節 考 察

バイオインフォマティクス的手法を用いて、トラフグ MS の分布傾向を調べた研究はこれまでに Edwards et al. (1998) および Takagi et al. (2003) によってなされている。しかし、これらは古いバージョンのデータを用いて行った解析であり、バージョン 3 のデータによるトラフグゲノムの解析は本研究が最初である。本章の解析により、2 塩基リピートの MS の密度に scaffold 間で約 2 倍の差があることが明らかになった (Fig. 1-3C)。また、ほとんどの MS はリピート回数の少ないものであり、リピート回数が多くなるに従って、MS 領域の数は急激に減少することも明らかになった (Fig. 1-3B)。この結果は、古いバージョンのデータを用いて解析を行って得られた既報の結果と概ね一致するものであった (Edwards et al., 1998; Takagi et al., 2003)。現在は、v4.0 のデータベースが公開されているが、同様の方法で解析が可能であると考えられる。

Scaffold 1 - 25 に含まれる 2、3、4、5 塩基単位 MS は計 408 個であった (Table 1-1)。Scaffold 1 - 25 の全長が 15.2 Mb であることから、平均して 74.5 kb に 1 つの MS 座があることになる。この割合でトラフグゲノム内に MS 座が分布すると仮定すると、ゲノム全体では少なくとも 5000 個以上の MS 座があると推測される。ゼブラフィッシュでは 2000 個の MS マーカーを用いて連鎖地図が作製され (Shimoda et al., 1999)、ポジショナルクローニングが行われているため、トラフグのゲノムも同様の解析を行うのに十分な数の MS を含んでいると考えられる。また、ゼブラフィッシュでは 1 cM は 740 kb に相当するので (Shimoda et al., 1999)、トラフグでもほぼ同等であると考えた場合、トラフグでは 0.1 cM に 1 マーカーという非常に高密度な MS に基づく連鎖地図を作製することも理論上可能である。

本研究で新規に設計した MS を増幅するプライマー対および Takagi et al. (2003) の設計したプライマー対のうち、ゲル電気泳動により対象の MS 座を適切に増幅したと判断

されたのは、251 対のうち 148 対であった。本章の解析により、設計したプライマー組のうち、約 40%は連鎖解析に適さないものが含まれることが示されたため、今後は必要なプライマーの 2 倍程度の数を目安に設計する必要があると考えられる。

第2章 トラフグ家系の作出

魚類は、哺乳類や鳥類などの高等哺乳類と比べ、はるかに多くの子を一度に産む。これは、遺伝学的実験を行う上で大きなメリットである。トラフグもその例外ではなく、1尾の成熟した雌は数百 g の卵を一度に産む。1 g 中には約 1000 粒の卵が含まれているので、一度に 10 万粒以上の両親を同じくする同胞を得ることが可能である。

また、トラフグは我が国において完全養殖に成功しており、種苗生産、成育、性成熟、人工授精という生活環を全て人為的に追うことが可能である。トラフグは 12°C の低水温に馴化させた後、再び水温を 16°C に水温を上げると性成熟が誘導される。性成熟した段階で、雄にはヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin, hCG) を、雌には gonadotropin-releasing hormone (GnRH) を投与することで排精および排卵がそれぞれ誘導される (三星, 私信)。hCG および GnRH の利用可能な市販品として、それぞれ動物用プベローゲン (エール薬品株式会社, 東京) および Ovaplant (サケ GnRH の合成類似化合物を含む; Syndel Laboratories Ltd., Qualicum Beach, BC, Canada) などが挙げられる。さらに、大西洋サケ *Salmo salar* (Stoss and Refstie, 1983) と同様に、フグ類では凍結精子の作製方法が確立されているため (Gwo et al., 1993)、親魚死亡後の人工授精や遠隔地での人工授精が可能である。このようなトラフグの遺伝学的解析における優位性を生かし、本章では連鎖地図作製および QTL 解析を行うために、雄トラフグと天然の雌トラフグを交配させ、F₁ 世代および BC 世代を作出した。

第1節 F₁世代の作出

BC 世代を得るためには、まず異なる系統のトラフグの親同士 (P 世代) をかけ合わせて F₁ 世代を得て、さらに F₁ を成熟させて BC して BC 世代を得る必要がある。そこで、本節では高成長系と天然魚をかけ合わせて、F₁ の作出を試みた。

方 法

採卵および人工授精

2003 年 5 月、富山県産の雌トラフグ (体重約 4.9 kg) を静岡県浜松市の東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所に運搬した。運搬した雌トラフグの腹腔内に gonadotropin-releasing hormone (GnRH) を投与して催熟を試みたところ、数日後に放卵がみられた。そこで、高成長系トラフグの凍結精子を用いて人工授精を行い、F₁ 世代トラフグの作出を行った。凍結精子はペレット法 (Stoss and Refstie, 1983) により作製したものを日本水産株式会社大分海洋研究センターから提供していただいた。

人工授精は以下の手順で行った。まず、雌から卵を搾り出し、乾いた容器の中に集めた (乾導法)。次に、液体窒素中で保存しておいた凍結精子 1 粒に対し海水 1 mL を加え、50 mL のチューブ中で 5 秒間激しく攪拌して解凍した。直ちに、卵 1 g につき、解凍させた凍結精子 1 粒を含む海水を加え、卵同士が付着しないよう穏やかに攪拌しながら媒精した。1 分後にさらに海水を加え、その後、凍結精子の希釈液中に含まれているジメチルスルホキシドを除くために 3 回水換えを行って卵を洗浄した。

受精卵および仔魚の飼育

受精卵は東京大学農学部 7 号館 A 棟の地下飼育室に運搬した後、海水中で激しくエアレーションを行うことで攪拌し、卵同士が互いに付着しないよう留意しながら孵化させた。孵化後は水槽に移し、成長段階に従ってシオミズツボウムシ（金子元博士提供）、ブラインシュリンプ（ミヤコ化学株式会社, 東京）を与えて飼育した。餌は、常に飼育水中に肉眼で確認できるような状態、すなわち飽食給餌を保つようにした。飼育水温は常に 20°C に保った。

稚魚期以降の飼育

稚魚の全長が 1 cm 程度になった段階から、固形ペレットのおとひめ（丸紅日清飼料株式会社, 東京）を与え、その後成長段階に従ってえづけーるおよびグルメール（中部飼料株式会社, 愛知）を与えながら飼育を続けた。飼育水温は、2007 年 1 月までは 20°C に保った。

DNA の抽出

人工授精により得られたトラフグのうち飼育中に死亡した個体を 100%エタノール中 4°C で保存し、DNA 抽出用の試料とした。一方、精子および卵を採取した親トラフグ、飼育中のトラフグについても胸鰭の一部を切り取り、100%エタノール中 4°C で保存し、DNA 抽出用の試料とした。保存した組織を用いて、その一部および全体から、フェノール・クロロホルム法で DNA を抽出した。

結 果

F₁ および P 世代からの DNA 抽出

死亡した 59 個体および飼育中の 10 個体の F₁ 世代トラフグ、計 69 個体から DNA を抽出した。雄および雌の P 世代トラフグからも同様に DNA を抽出した。これらを F₁ および P 世代の DNA 試料として、以後の実験に用いた。

成長経過

2007 年 1 月の段階で 1 個体の雄が生存していたが、それまでに P 世代の雌含め他の個体は死亡した。以後、この生き残った個体から BC 世代作出のための F₁ 世代の精子を提供することとした (Fig. 2-1)。以後、この個体を BC 用精子提供親と呼ぶ。

第2節 F₁世代から凍結精子の作製

先述の通り、トラフグでは精子の凍結保存法が確立されており、親魚死亡後の人工授精や遠隔地での人工授精が可能である。前節で育成した F₁ 魚の凍結精子を作製しておけば、遠隔地で獲れた性成熟した雌と交配して BC 世代を作出することが可能であるのみならず、現在飼育中の個体が死亡後もさらに別の交配に用いることが可能であるなど、便利な点が多い。そこで本節では、BC 用精子提供親を催熟させて精子を採取し、凍結精子を得ることを試みた。

方 法

飼育水温制御による性成熟の誘導

2007 年 1 月から 4 月までの 3 ヶ月かけて飼育水温を 12°C まで下げ、本章第 1 節で得た 3 歳齢の BC 用精子提供親をその温度に 2 ヶ月間馴化させた。さらにその後 6 月から 8 月までの 2 ヶ月で徐々に水温を 16°C まで上昇させた後、その温度で馴化させることで性成熟の誘導を試みた。水温の変化を Fig. 2-2 に示した。

トラフグからの精子の回収

トラフグから精子や卵を得る場合、通常は温度制御によって性成熟を誘導した後、腹部触診（望月，私信）またはカニューレション（三星，私信）により雌雄の判別を行い、性に応じたホルモン処理を行う。本研究では 10 月に触診を行った段階で BC 用精子提供親の排精が確認された。そこで、ホルモン処理は行わずに精子を回収し、それをを用いて凍結精子を調製することとした。

精子の回収は Fig. 2-3 の要領で行った。すなわち、まず 650 ppm の 2-フェノキシエタノールで魚を麻酔し、海水から取り出した。精子は海水に触れると活性化し 1 分ほど活発に動いた後速やかに活性を失うので、精子が海水に触れぬように体表をタオルで拭いた。さらに、下腹部を押して精子を搾り出し 15 mL ファルコンチューブに集めた。糞尿や血液が混じると活性が低下するので混じらないように留意した。回収した精子は、凍結まで 4°C で保存した。

なお、この個体からの DNA を得るため、胸鰭の一部を切り取り 100%エタノール中に保存した。

ペレット法による精子の凍結

精子はペレット法 (Fig. 2-3; Stoss and Refstie, 1983) により凍結させた。まず凍結に先立ち、あらかじめ熱湯を入れた 96 穴丸底タイタープレートドライアイスに押し付けて窪みを作っておいた。次に、回収した精液を 10%のジメチルスルホキシドを含む海産魚用リンゲル液 (組成は Fig. 2-3 を参照) で 4 倍に希釈した。希釈後すぐに、マルチペットプラス 4981 (Eppendorf, Hamburg, Germany) を用いて、ドライアイスの窪みの上に速やかに希釈液を 50 μ L ずつ滴下していった。ドライアイス上に 3 分放置した後、ペレット状に凍結した精子を錐で穴を開けたファルコンチューブに回収した。回収した凍結精子は液体窒素中に保存した。

活性の確認

液体窒素中に保存中の凍結精子のペレットを 1 つ取り出し、スライドガラス上に置いた。ペレットにピペットで海水を滴下して融解および活性化させ、顕微鏡下で動いている精子の割合を速やかに目測した。

結 果

凍結精子の作製およびその活性

2007年10月19日に150ペレット、10月26日に500ペレットの凍結精子を調製した。
10月19日に調製したものは凍結の10分後と10月26日に、10月26日に調製したものは凍結直後にそれぞれ活性を確認したところ、共に高い活性を有していた (Table 2-1)。
これをBC作出に用いることとした。

第3節 戻し交配世代の作出

通常、QTL 解析を行う際は、BC 世代もしくは F_2 世代を作出し、それを分離世代として用いるのが一般的である。しかし、第2章第1節で用いた天然の雌 P 世代魚は飼育中に死亡してしまったので、戻し交配することができなくなってしまった。そこで、本節では何の選抜もかかっていない天然の雌魚であれば分離世代が得られるであろうという前提で、第2節で得た凍結精子を使って人工授精をして BC 世代の作出を行った。

方 法

採卵および人工授精

2008 年 4 月 12 日に熊本県上天草市近海の定置網にて捕獲された雌トラフグを F_1 とかけあわせるための親魚として用いた（以後、この個体を BC 雌親と呼ぶ）。親魚は既に排卵していたので、約 20 g の卵を搾り出し、第2節で得たトラフグの凍結精子を用いて第1節と同じ方法で人工授精を行った。作業は上天草市龍ヶ岳町大道港の岸壁で行った。受精作業終了後、BC 雌親個体から DNA 抽出用に胸鰭の一部を切り取り、100%エタノール中に保存した。

受精卵および仔魚の飼育

受精 5 時間後、受精卵の一部をカルノア液 [メタノール：氷酢酸 = 3 : 1 (v/v) で混ぜた混合液] で染色したところ、卵割が確認されたので、梱包して東京大学に持ち帰った。東京大学に到着後は第1節と同様の方法で飼育した。

稚魚期以降の飼育

稚魚の全長が 1 cm 程度になった段階から、固形ペレットのおとひめ（丸紅日清飼料株式会社, 東京）与えて飼育した。

成長度の測定

4 月 22 日（孵化 3 日後）から 5 月 21 日まで、1–6 日間隔で飼育水槽から 3 個体を取り出し、全長を測定した。

結 果

仔魚の体長

4 月 12 日に受精させた卵は 4 月 19 日（受精 7 日後）に孵化した。孵化直後の全長 3 mm から約 1 ヶ月で 2 倍の 6 mm にまで成長した（Fig. 2-4）。

第4節 考 察

本章では、まず人工授精により F_1 世代を作出し、それを成熟させて凍結精子を調製した。さらに調製した凍結精子を用いて BC 世代を作出した。

F_1 トラフグは 1 トン水槽 1 基で飼育した。 F_1 トラフグは 1 尾しか成熟させることができなかったが、1 トン水槽でのトラフグ親魚の飼育は 2–3 尾が限界であること（三星，私信）を考えると、大きな失敗ではなかったと考えられる。また、第 2 節では、成熟した雄の F_1 個体から得た精子から凍結精子を 650 ペレット調製し、それは解凍後も高い活性を有していた。凍結精子は半永久的に保存が可能であり、1 ペレットの凍結精子で 1 g の未受精卵（約 1000 個）を受精できることから（三星，私信）、現在保存中の凍結精子から 65 万個の受精卵を得ることができることができる計算となる。QTL 解析には多くても 200 個体程度の個体があれば解析に十分であり、それ以上個体数を増やしても精度は上がらない（鵜飼，2000）ことから、今後新たに交配実験をするのにおいても十分な精子の量が確保できたと考えられる。

BC 世代仔魚については、5 月 4 日付近で成長度が急激に変化しており、さらに 5 月 21 日から 27 日にかけても急激な成長がみられる。これは、仔魚の餌の変化が原因であると考えられる。すなわち、孵化直後の仔魚は卵黄の栄養分で生活するが、4 月 25 日（孵化 6 日後）にワムシを摂餌しているのを肉眼で確認、5 月 2 日（孵化 13 日後）からワムシとブラインシュリンプを併用するようになり、5 月 20 日（孵化 31 日後）からはペレット餌も併用するようになったからであると考えられる。以上より、トラフグの初期飼育には適切な餌の種類、サイズを選択が重要であることが明らかとなった。

第3章 連鎖地図の作製および仔魚期における体長の QTL 解析

第1章で述べたように、染色体上の各領域の相対的位置を示した地図である連鎖地図は、品種改良に大きく役立つと期待されている。DNA マーカーがその作製に用いられるようになると、連鎖地図作製の研究が急速に進展した。連鎖地図は、ウシ *Bos taurus* (Kappes et al., 1997)、ブタ *Sus scrofa domesticus* (Ellegren et al., 1994)、ヒツジ *Ovis aries* (Crawford et al., 1995)、ニワトリ (Groenen et al., 1998) などの家畜動物において作製され、大きな成果をあげてきた。魚類においては、サケ科魚類で産業的応用を見据えた連鎖地図作製が精力的に行われている。例えば、ニジマス (Sakamoto et al., 2000; Nichols et al., 2003; Guyomard et al., 2008)、ギンザケ *O. kisutch* (McClelland and Naish, 2008)、大西洋サケ (Gilbey et al., 2004; Moen et al., 2008)、ブラウントラウト *S. trutta* (Gharbi et al., 2006)、アークティックチャー *Salvelinus alpinus* (Woram et al., 2004) などが挙げられる。その他に、ティラピア (Kocher et al., 1998; Lee et al., 2005)、チャネルキャットフィッシュ *Ictalurus punctatus* (Waldbieser et al., 2001; Liu et al., 2003)、ヒラメ *Paralichthys olivaceus* (Coimbra et al., 2003, Kang et al., 2008)、グッピー *Poecilia reticulata* (Khoo et al., 2003)、アユ *Plecoglossus altivelis* (Watanabe et al., 2004)、スズキ類 *Dicentrarchus labrax* (Chistiakov et al., 2005)、ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* (Morishima et al., 2008) など多数の魚種で連鎖地図が作製されている。

このような DNA マーカーに基づく連鎖地図を利用した QTL 解析により、サケ科魚類で、温度耐性 (Jackson et al., 1998)、伝染性脾臓壊死症抵抗性 (Ozaki et al., 2001)、産卵期と体重 (O'Malley et al., 2003)、産卵時期 (Leder et al., 2006)、体表の模様や体型 (Boulding et al., 2008) など産業的に重要な形質に関わる遺伝子座が同定されているほか、ティラピアの性 (Shirak et al., 2006) やアカメ類 *Lates calcarifer* の成長度 (Wang et al., 2006) に関わる QTL 解析が行われている。また、無脊椎動物においても、マガキ

Crassostrea gigas (Hubert and Hedgecock, 2004.) やアワビ類 *Haliotis rubra* (Baranski et al., 2006) で連鎖地図が作製され、*H. rubra* で成長度に関する QTL 解析がなされている (Baranski et al., 2008)。このことから、脊椎動物のみならず幅広い生物種において連鎖地図の作製やそれに基づく QTL 解析が産業上有用であることが窺われる。

またトラフグは、数少ない全ゲノムの概要配列が公開されている魚種の 1 つである。しかしながら、最新版のデータベースである v4.0 でさえ 7213 個の scaffold からなり (<http://www.fugu-sg.org/>)、それらの染色体上の位置関係は明らかでない。連鎖地図作製によりその位置関係を明らかにすることができれば、ゲノム情報の解析が進んでいるメダカ (Wada et al., 1995; Ohtsuka et al., 1999; Naruse et al., 2000; Kasahara et al., 2007)、ゼブラフィッシュ (Knapik et al., 1998; Postlethwait et al. 1998; Shimoda et al., 1999; Postlethwait et al., 2000; Woods et al., 2000; Postlethwait, 2006) および近縁のミドリフグ (Jaillon et al., 2004) と比較することで重要な基礎生物学的知見となり得る。

自殖家系および純系が存在する生物種では、連鎖地図は以下のように作製する。まず、遺伝的に異なった個体間で交配を行って F_1 世代を作る。 F_1 での遺伝子型は全て両親のハプロタイプを受け継ぐヘテロ接合型になってしまうため、次にこれを自殖して F_2 世代を作るか、親世代と交配させることで BC 集団を作る。このような交配集団の各個体において DNA マーカー座間の独立性の検定および組換え価の推定を行うことによってマーカー間の連鎖関係を明らかにする。連鎖関係が認められたマーカー間を次々とつなげていくことにより、同一染色体上に存在するマーカーが 1 つの連鎖群として構築され、最終的には染色体に対応した数の連鎖群ができ上がる。

トラフグは他殖性生物であり、また遺伝的多様性に富んだ天然魚の入手も可能であることから、ヘテロ接合のマーカー座を多くもつ個体同士を交配することができる。このような場合には、戻し交配を想定したシュードテストクロス法 (Grattapaglia and Sederoff, 1994) により効率良く連鎖地図を作製することができる。これは、主に植物において連

連鎖地図を作製するのに利用される方法である (Jones et al., 2002a, b; Alm et al., 2003)。本法では F_1 世代で連鎖地図を作製することが可能であるため、世代の作出に要する期間を短縮できることが最大の利点である。

成長速度や耐病性といった量的形質の決定には、多くの遺伝子が関わっていると考えられており、またこれらの形質は環境の影響を受けやすい。そのため、かつて QTL の同定は困難であったが、上述のように様々な DNA マーカーが開発されたこと、区間マッピング法 (interval mapping; Lander and Botstein, 1989) などの効率的な理論が開発されたこと、また MAPMAKER (Lander et al., 1987) などの解析ソフトが充実してきたことで、QTL 解析は従来よりも容易に行えるようになりつつある。これらの技術はトラフグの高成長に関わる QTL 解析においても非常に有効であると考えられる。

そこで、本章では第 2 章第 1 節で得た F_1 世代および第 2 章第 3 節で得た BC 世代を用いて、まず連鎖地図を作製し、続いて QTL 解析を行った。

第 1 節 F₁ 世代のマーカー座の遺伝子型決定および連鎖解析

GeneScan は DNA シークエンサー ABI PRISM 3100 (Applied Biosystemes, Foster City, CA, USA) のキャピラリーを用いて電気泳動を行い、蛍光標識したプライマーを用いて行った PCR の産物の断片長を 1 bp 単位という非常に高い分解能で解析できるソフトウェアである。また、サンプルに用いる蛍光色も 6-FAM (青)、VIC (緑)、NED (黄) および PET (赤) の 4 色があり、これらを 16 本のキャピラリーで泳動することによりハイスループットな解析が可能で、MS マーカー座の遺伝子型決定に非常に適している。本節では、BC 世代作出に先立ち、GeneScan を用いて第 2 章第 1 節で得た F₁ 世代由来の遺伝子型を基に連鎖地図を作製した。

なお、トラフグでは既に連鎖地図が報告されているが (Kai et al., 2005)、MS マーカー座の増幅断片のサイズが大きいものが多く含まれている。例えば、マーカー座 f198 では 498 bp、f270 では 597 bp などである。GeneScan により解析できる断片の長さは最大で 500 bp であるため、これらのマーカーは使用に適さない。本節では第 1 章第 2 節で設計した 148 個の MS マーカーを用いた。

方 法

試料

第 2 章第 1 節で得た F₁ トラフグ個体 69 個体および P 世代の 2 個体から抽出した DNA を用いた。

PCR および遺伝子型の決定

Appendix 2 中で印を付した 148 マーカーを解析に用いた。鋳型 DNA 1 μ L、2.5 pmol の蛍光標識したフォワードプライマー、その対となる 2.5 pmol の非標識リバースプライマー、10 \times *Tth* 緩衝液 0.5 μ L、2.5 mM dNTP 混合液 0.4 μ L、5 U/ μ L *Tth* DNA polymerase (Roche) 0.025 μ L に滅菌水を加えて計 5 μ L として反応を行った。PCR は第 1 章第 2 節の方法で行った。PCR 産物の蛍光色素およびサイズ (第 1 章第 2 節「方法」参照) の異なるもの同士を混合し、ABI PRISM 3100 にて電気泳動を行った。ソフトウェア GeneScan Analysis および Genotyper (Applied Biosystems) を用いて解析を行い、それぞれの個体につき、各 MS マーカー座の DNA 断片のサイズから遺伝子型の決定を行った。

連鎖解析

遺伝子型を決定したマーカー座間の独立性の検定および組換え価の推定には、ソフトウェア MAPL (鵜飼ら, 1995) を用いた。F₁ 世代でのマーカー型の分離を BC 型の分離パターンに置き換えて解析し、雄親および雌親の配偶子に由来する連鎖地図を別々に作製した。また、シュードテストクロス法ではマーカー型のどちらが母親型 (F₁ の祖母) または父親方 (F₁ の祖父) であるかを区別することができないので、多型のうちの片方を母親型にした場合と父親型にした場合の両方のデータを作製して、同時に解析を行うことで連鎖関係を推定した。

結 果

連鎖地図

各マーカー座の遺伝子型を決定し、雌および雄でそれぞれ 23 の linkage group (LG)

上に 88 マーカー、14 の LG 上に 59 マーカーをマップして連鎖地図を作製した (Fig. 3-1)。LG2 における *fms49* と *fms13* の間の距離が雌では 37.6 cM であるのに対し、雄では 17.4 cM になっているというように、雌雄間で組換え率に違いがある領域がみられた。また、雌の LG1 の *fms65-2* および *fms167* 周辺や、LG4 の *fms80*、*fms61-2* および *fms145* 周辺で連鎖不平衡 (linkage disequilibrium) がみられた。すなわち、各マーカー座における対立遺伝子の出現頻度がメンデルの法則で予測される頻度から有意にずれていた。

Ikeda et al. (2007) によって、scaffold 86 と 939 および scaffold 2126 と 1646 の組み合わせでそれぞれ *MYH* がタンデムにクラスターを形成していると推察されたが、その近傍に設計したマーカー *fms86* と *M939ms2* および *M2126ms2* と *M1646ms1* はそれぞれ LG14 および LG26 内で緊密に連鎖していた (Fig. 3-2)。また、*MYH_{M1034}* および *MYH_{M2528}* も同様にクラスターを形成していると推察されていることから (Ikeda et al., 2007)、*MYH_{M1034}* の近傍にマーカー *M1034ms1* を設計し雌連鎖地図上にマッピングしたが (Fig.3-2B)、*MYH_{M2528}* の存在する scaffold2528 内に MS マーカーを設計できなかったの、これら *MYH* の連鎖地図上での位置関係を明らかにすることはできなかった。

第2節 戻し交配世代を用いた仔魚期における体長の QTL 解析

QTL 解析の方法の 1 つとして、Mitchelmore et al. (1991) によりバルク法 (bulk segregant analysis) が提案されている。これは、分離世代集団において目的の形質について両極端な値を示す個体群を選択し、片方の群にだけ特異的に出現するマーカーを探すことでその形質に関与する遺伝子座を探索するという方法である。この方法は、形質に関与する QTL が比較的少数でないと使えないものの、短期間に形質と連鎖するマーカーを見つけられ、さらに、連鎖地図が構築されている生物では、連鎖が検出されたマーカーの近傍のマーカーとあわせて追加実験を行うことで遺伝子座をマップできるという長所をもつ。本章ではこの方法で、第2章第3節で得た BC 世代の仔魚を用いて、仔魚期における全長および体高の形質と連鎖するマーカーを探索した。

また、本節では MS マーカー座の PCR 産物を QIAxcel (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて電気泳動した。QIAxcel は 3 – 5 bp の差を認識する機種で GeneScan (Applied Biosystems) に比べると分解能はやや落ちるが、コストの安さと泳動時間の短さの点で優れるためである。

方 法

試料

第2章第3節で得た BC 世代トラフグにつき、5月27日（孵化38日後）に全長と体高 (Fig. 3-3A 参照) を測定後、液体窒素で直ちに凍結した。この試料を BC 世代試料とし、使用まで -80°C で保存した。この BC 個体 63 個体に加えて、P 世代 2 個体、BC 用精子提供親および BC 雌親を解析に用いた。BC 世代トラフグの DNA は ISOGEN (ニッ

ポンジーン, 東京) を用いて抽出した。通常のフェノール・クロロホルム法ではなくこの方法を用いたのは、第 4 章で用いる messenger RNA (mRNA) と本章で用いる DNA を 1 つの試料から同時に抽出するためである。トラフグ 1 個体につき 1 mL の ISOGEN を加え、ペレットペッスル(アズワン, 大阪)で試料をすり潰した。以後の操作は ISOGEN 付属の説明書に従った。P 世代については第 2 章第 1 節で抽出した DNA を用い、BC 用精子提供親および BC 雌親についてはそれぞれ第 2 章第 2 節および第 2 章第 3 節で回収した鰭の一部からフェノール・クロロホルム法で抽出した DNA を用いた。

PCR および遺伝子型の決定

今回 QIAxcel で用いたゲルカートリッジ、DNA サイズマーカーおよびアラインメントマーカーは分解能を優先しており、低分子の解析に特化しているため 500bp 以下の断片しか解析できない。本節でも、本章第 1 節と同様に増幅断片サイズで 500 bp が多く含まれる Kai et al. (2007) の MS マーカーは用いなかった。しかし、既報の連鎖地図を参照しながら、各 LG を満遍なくカバーできるようなマーカーを Appendix 2 で印を付した中から選んで用いた。PCR は、本章第 1 節の方法で行った。ただし、反応液は計 10 μ L、最後の伸長反応は 72°C で 7 分間保持した。PCR 産物を QIAxcel による電気泳動に供した。ゲルカートリッジ、DNA サイズマーカーおよびアラインメントマーカーには、それぞれ QIAxcel DNA High Resolution Kit、QX DNA Size Marker 25 – 450 bp および QX Alignment Marker 15 bp/500 bp (全て Qiagen) を用いた。その他の操作は付属の説明書に従った。電気泳動の結果に基づき、それぞれの個体につき、各 MS マーカー座の DNA 断片のサイズから遺伝子型の決定を行った。

遺伝子型の分離比の検証

遺伝子型を決定した各マーカー座につき、高成長系 P 世代 (BC 世代の祖父) 由来の

対立遺伝子および P 世代天然魚（BC 世代の祖母）由来の対立遺伝子をもつ個体の数をそれぞれ調べた。各マーカー座の対立遺伝子の出現頻度につき、メンデルの法則から予測される比率から有意にずれているものを χ^2 検定により検証した。また、解析を行った 63 個体を、最も体長の大きい 12 個体（Long, Ln 群）と小さい 12 個体（Short, Sh 群）および体高の大きい 12 個体（High, Hi 群）と小さい 11 個体（Low, Lw 群）の 4 群に分けて、それぞれについて対立遺伝子の出現頻度を調べた。この場合、解析した全個体における対立遺伝子の出現頻度から予測される頻度で各群で対立遺伝子をもつ個体が出るかどうかを χ^2 検定により検証した。

結 果

5 月 27 日（孵化 38 日後）の試料凍結時に測定した体長および体高の平均はそれぞれ 9.40 mm および 2.69 mm、標準偏差はそれぞれ 1.22 mm および 0.37 mm であった（Table 3-1）。さらに、体長と体高の関係を調べたところ、相関係数 $R = 0.80$ と両者には強い相関関係があった（Fig. 3-3B）。

マーカー座の遺伝子型の決定

解析に供した 42 マーカー座のうち、10 のマーカー座で遺伝子型を決定した（Table 3-2）

遺伝子型の分離比の検証

バルク法による QTL 解析の結果、マーカー座 fms16 でメンデルの法則から予測される各対立遺伝子の頻度からの有意なずれが認められた（Table 3-2）。また、Lw 群の

fms68-2 および Hi 群の fms193 で BC 集団全体の対立遺伝子頻度から予測される出現個体数からの有意なずれが認められた。

第3節 考察

第1節で作製した連鎖地図 (Fig. 3-1) において、雄より雌の方が組換え価が大きくなる現象がみられた。雌雄で組換え率に違いがみられる現象は、ニジマス (Sakamoto et al., 2000)、ヒラメ (Coimbra et al., 2003) およびグッピー (Khoo et al., 2003) などの魚類のみならず、ヒト (Dib et al., 1996)、マウス (Dietrich et al., 1996)、ウシ (Barendse et al., 1994) およびブタ (Ellegren et al., 1994) でも報告されていることから、脊椎動物に普遍的であると考えられる。減数分裂時に多価の染色体対合が起こる割合が雌よりも雄で高く、これによって乗換えが抑制されるため、組換え価に差が出るものと推測されている (Sakamoto et al., 2000)。また、一部の領域で連鎖不平衡がみられた。この原因として、片方の対立遺伝子が致死あるいは生存に不利な遺伝子 (座) と連鎖している、ヌル対立遺伝子 (null allele) が存在している、または PCR による非特異的増幅を誤ってマーカー座の増幅産物として認識しているなどが考えられる。

バルク法による QTL 解析の結果、Sh および Lw の各群で全個体の対立遺伝子頻度から予測される値からの有意なずれがみられた。しかしながら、Sh および Lw 群という体サイズの小さな群で高成長タイプの対立遺伝子が有意に多く出現するという、予想と全く逆の結果であった。これは、本研究で使用した高成長系がごく限られた餌の種類や給餌回数、飼育密度、温度などの飼育条件でのみ高成長形質を示すもので、その条件を満たさない場合は天然魚より成長度が劣るという可能性が考えられる。しかし、今回解析したマーカーは全ての LG をカバーしていない上に、1 つの LG あたりのマーカー数も多くないので、同一 LG 上でも離れた位置に QTL が存在していた場合検出し切れていない可能性がある。今後はさらに多くのマーカーについて遺伝子型の決定を進める必要がある。

第4章 仔魚期における成長と関連遺伝子の解析

近年は、産業的有用形質に関与する遺伝子（遺伝子座ではなく遺伝子そのもの）の同定のために、ある程度の密度で DNA マーカーがマッピングされた連鎖地図が構築された段階で、いくつかの遺伝子に候補を絞りその遺伝子内部あるいはごく近傍の多型を DNA マーカーとして利用して QTL 解析を行い、そのマーカーと目的の形質の連鎖関係を調べるという方法がよく取られる（Leder et al., 2006; Shirak et al., 2006）。

そこで本章では、ある程度成長に影響を及ぼしていると推測される候補遺伝子に的を絞るため、IGF-1 および IGF-2 に注目した。IGF の機能は種間でよく保存されており、生物の代謝に重要な役割を果たす。先述のように、近年イヌにおいて IGF-1 の変異がその体サイズに大きな影響を及ぼすことが示されている上に（Sutter et al., 2007）、ヒト（Woods et al., 1996）やマウス（Baker et al., 1993）においても、IGF-1 の欠失が成長を遅滞させることが知られていることから、トラフグでも IGF が体サイズに大きな影響を及ぼす高成長の候補遺伝子の 1 つの可能性が考えられる。しかしながら、トラフグでは IGF-2 のアミノ酸配列が報告されているのみで（Accession No. CAA17123）、IGF-1 の cDNA 塩基配列やアミノ酸配列は明らかとなっていない。また、イヌにおいては、大型犬では血中 IGF-1 の濃度が小型犬に比べて高いことが報告されている（Sutter et al., 2007）ほか、魚類においても IGF-1 の発現誘導あるいは投与が成長を刺激したという報告がある（McCormick et al., 1992; Kajimura et al., 2001）

本章では、IGF-1 および IGF-2 の cDNA のクローニングおよび全長の塩基配列の決定を試み、さらに BC 世代の中で成長の良いものと悪いものの間で発現量を比較した。

第1節 インスリン様成長因子遺伝子の cDNA クローニング

IGF-1 および IGF-2 の機能は種間でよく保存されており、生物の代謝に重要な役割を果たす。先述のように、近年イヌにおいて IGF-1 のイントロンの配列の変異がその体サイズに大きな影響を及ぼすことが示された (Sutter et al., 2007)。もし高成長形質が体サイズと連動しているのならば、同様の塩基の変異がトラフグにおいても高成長に影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこで、本節ではトラフグの IGF-1 およびそのアイソフォームである IGF-2 のエキソン・イントロン構造を明らかにするために、両 cDNA 全長の塩基配列の決定を試みた。

方 法

試料

東京大学農学部 7 号館地下飼育室で飼育していた 3 歳齢のトラフグ雄個体を用いた。肝臓、脾臓、眼、腸上部、腸下部、速筋、遅筋、心臓、胆嚢、精巣、眼筋および腎臓を採取し、直ちに液体窒素で凍結した。試料は使用まで -80°C で保存した。

全 RNA の抽出

各組織試料に対して、約 5 倍量の ISOGEN を加えた後、ホモジナイザーで組織を破碎した。以後の操作は付属の説明書に従った。抽出した RNA 溶液のうち 1 μ L を 49 μ L の滅菌水に加え、分光光度計を用いて 260 nm の吸光度を測定し、全 RNA 量を求めた。

1st strand cDNA の合成

1 試料につき 5 µg の RNA を用いて cDNA の合成を行った。すなわち、RNA 5 µg に 50 µM GeneRacer Oligo dT primer [5'- GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC GGC ATG ACA GTG (T)₂₄ -3'] を 1 µL、10 mM dNTP を 1 µL 加え、滅菌水を加えて 13 µL にした反応液を 65°C で 5 分間処理した後、氷上に 1 分間置いた。続いて、この反応液に 5 × 1st strand 緩衝液 [250mM Tris-HCl (室温 pH 8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl₂] を 4 µL、0.1 mM dithiothreitol (DTT) を 1 µL、SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を 1 µL (200 U) および RNase OUT (RNase 阻害剤; Invitrogen) 1 µL (40 U) を加え、50°C で 60 分間逆転写反応を行った後、70°C で 15 分間処理し逆転写酵素を失活させた。得られた溶液に、1 µL (2 U) の RNase H (Invitrogen) を加え、37°C で 20 分間保温し、RNA-DNA ハイブリッドの RNA 鎖を分解した。

IGF-1 および IGF-2 遺伝子の cDNA クローニング

IGF-1 についてはヒト IGF-1 のアミノ酸配列 (Heijmans et al., 2008; Accession No. NM_001127598) を、IGF-2 については登録されていたトラフグ IGF-2 のアミノ酸配列 (Accession No. CAA17123) をそれぞれプローブとして、フグゲノムデータベース v4.0 に対して BLAST サーチを行った。その結果、相同性を示した scaffold の配列を参考に IGF-1 および IGF-2 を増幅するプライマー対それぞれ s21_f1 と s21_r2 および s119_f1 と s119_r1 (Table 4-1) を設計した。

PCR は、滅菌水で 50 倍希釈した各組織由来の 1st strand cDNA 1 µL に、3.75 pmol の各フォワードプライマー、3.75 pmol の各リバースプライマー、10 × *Ex Taq* 緩衝液 1.5 µL、2.5 mM dNTP 1.2 µL、*Ex Taq* DNA polymerase (タカラバイオ, 滋賀) 0.08 µL (0.4 U) に滅菌水を加えて 15 µL とした系で行った。混合液を 94°C で 5 分間熱変性させた後、94°C で 30 秒間、56°C で 30 秒間および 72°C で 1 分間のサイクルを 30 回行った。最後に 72°C で 5 分間保持し、反応を終了させた。

サブクローニング

PCR 産物を pGEM-T Vector Systems (Promega, Madison, WI, USA) を用いて、プラスミドベクター pGEM-T Vector に挿入した。操作は付属の説明書に従った。次に、このベクターにより大腸菌コンピテントセル JM109 を形質転換させた。方法は木下 (2002) に従った。

プラスミド DNA の精製

形質転換が確認された菌体を 5 mL のアンピシリンを含む液体 Luria-Bertani (LB) 培地に移し、37°C で一晩培養した。その後、GenElute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) によりプラスミド DNA を抽出した。操作は付属の説明書に従った。

塩基配列の決定

ベクターのマルチクローニングサイト中の配列 P1 および P5 を利用して、組み込んだ DNA 断片を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) により蛍光標識し、同社製の DNA シークエンサー ABI PRISM 3100 で塩基配列を決定した。操作はいずれも付属の説明書に従った。塩基配列の解析にはコンピュータープログラム BioEdit (Hall, 1999) および Chromas Lite (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) を用いた。

IGF-1 および IGF-2 遺伝子の 3' RACE

決定した IGF-1 および IGF-2 の塩基配列の演繹アミノ酸配列がそれぞれ他生物種の IGF-1 および既報のトラフグ IGF-2 の配列と高い同一率を示すあるいは一致することを確認したのち、3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) を試みた。PCR のフォロー

ドプライマーには、IGF-1 および IGF-2 に対してそれぞれ s21_f1 および s119_f1 を用い、リバープライマーには両遺伝子に対して GeneRacer 3' RACE Primer を用いた。PCR は、滅菌水で 50 倍希釈した各組織由来の 1st strand cDNA 1 μ L に、3.75 pmol の各フォワードプライマー、3.75 pmol のリバープライマー、10 \times *Ex Taq* 緩衝液 1.5 μ L、2.5 mM dNTP 1.2 μ L、*Ex Taq* DNA polymerase 0.08 μ L (0.4 U) に滅菌水を加えて 15 μ L とした系で行った。混合液を 94°C で 5 分間熱変性させた後、94°C で 30 秒間、58°C で 30 秒間および 72°C で 75 秒間のサイクルを 30 回行った。最後に 72°C で 5 分間保持し、反応を終了させた。

次に、得られた PCR 産物を 100 倍に希釈したものを鋳型 DNA として nested PCR を行った。Nested PCR のフォワードプライマーには、IGF-1 および IGF-2 に対してそれぞれ s21_f2 および s119_f2 を用いた。リバープライマーには両遺伝子に対して GeneRacer 3' RACE Nested Primer を用いた。反応液の組成、PCR サイクルは上記と同じものを用いた。得られた PCR 産物を cDNA クローニングと同様の方法でサブクローン化し、塩基配列を決定した。

IGF-1 については一度のシーケンシングで全長を決定することができなかったため、プラスミド DNA を鋳型にしたプライマーウォーキングで全長を決定した。なお、本項で用いたプライマーの配列は Table 4-1 に記した。

IGF-1 および IGF-2 遺伝子の 5' RACE

3' RACE 時の nested PCR で両 IGF に明瞭な増幅産物が得られた心臓、精巣、速筋、遅筋および眼由来の RNA について、GeneRacer Kit (Invitrogen) を用いて 5' 末端にアダプター配列をもつ完全長 cDNA を合成した。操作は付属の説明書に従った。PCR は、滅菌水でこれを 50 倍希釈したものを鋳型として 1 μ L 用い、3.75 pmol の各フォワードプライマー、3.75 pmol のリバープライマー、10 \times *Ex Taq* 緩衝液 1.5 μ L、2.5 mM dNTP

1.2 μ L、*Ex Taq* DNA polymerase 0.08 μ L (0.4 U) に滅菌水を加えて 15 μ L とした系で行った。フォワードプライマーには両遺伝子に対して GeneRacer 5' RACE Primer、リバープライマーには IGF-1 および IGF-2 に対してそれぞれ s21_r2 および s119-5race_r2 を用いた。混合液を 94°C で 5 分間熱変性させた後、94°C で 30 秒間、60°C で 30 秒間および 72°C で 75 秒間のサイクルを 30 回行った。最後に 72°C で 5 分間保持し、反応を終了させた。

次に、得られた PCR 産物を 100 倍に希釈したものを鋳型 DNA として nested PCR を行った。Nested PCR のフォワードプライマーには両遺伝子に対して GeneRacer 5' RACE Nested Primer、リバープライマーには IGF-1 および IGF-2 に対してそれぞれ s21_r1 および s119-5race_r1 を用いた。反応液の組成、PCR サイクルは上記と同じものを用いた。得られた PCR 産物を cDNA クローニングと同様の方法でサブクローン化し、塩基配列を決定した。なお、本項で用いたプライマーの配列は Table 4-1 に記した。

相同性検索

決定した塩基配列から演繹されたアミノ酸配列は、BLAST サーチを用いて DDBJ/EMBL/GenBank に登録されている配列とフグゲノムデータベース v4.0 を対象とした相同配列検索、およびドメイン検索 Conserved Domain Database (CDD; Marchler-Bauer et al., 2005) に供した。さらに、両 IGF の演繹アミノ酸配列を Clustal W (Thompson et al., 1994) で比較した。

結 果

データベース探索

ヒト IGF-1 およびトラフグ IGF-2 のアミノ酸配列をプローブとした BLAST サーチの結果、IGF-1、IGF-2 はそれぞれ scaffold_21 および scaffold_119 にコードされていることが明らかになった。これらの配列を参考に cDNA クローニング用のプライマーを設計した (Table 4-1)。

IGF-1 遺伝子の塩基配列およびその演繹アミノ酸配列

cDNA クローニング、3'および5' RACE の結果、182 アミノ酸残基をコードする cDNA 2536 bp の塩基配列を決定した (Fig. 4-1)。5'末端側は GeneRacer のアダプター配列に達し、3'末端側はポリアデニレーションシグナルおよびポリ A テールの配列が得られたことから、IGF-1 遺伝子の全長の塩基配列が決定されたと考えられた。5'非翻訳領域 (untranslated region, UTR) は 107 bp であったのに対し、3' UTR は 1877 bp (ポリ A テール含む) と非常に長かった。決定した配列とゲノムデータベースの間で翻訳領域内において 1 箇所のミスセンス置換があり、データベースでのトレオニンがアラニンに置換していた。さらに、UTR でも 2 塩基の置換および 2 箇所のギャップがみられた。演繹アミノ酸配列は、既報のオオクチバス (Accession No. DQ666526)、およびボラ (Accession No. AY427954) の IGF-1 とそれぞれ 86%および 85%のアミノ酸同一率を示した。

IGF-2 遺伝子の塩基配列およびその演繹アミノ酸配列

cDNA クローニングおよび5' RACE の結果、212 アミノ酸残基をコードする cDNA 760 bp の塩基配列を決定した (Fig. 4-2)。5'末端側は GeneRacer のアダプター配列に達したことから、IGF-2 遺伝子の5'末端の塩基配列が決定されたと考えられた。5' UTR は 124 bp であった。一方、3' RACE では PCR 産物が得られず cDNA の3'末端の配列を決定することができなかったが、トラフグゲノムデータベースの配列によると、読取り枠の3'末端まではあと 12 bp (3 アミノ酸残基をコード) であった。また、得られた塩基配列

の翻訳領域とトラフグゲノムデータベースの配列との間で 2 bp の塩基置換がみられ、そのうち 1 つはサイレント変異であったが、もう 1 つはミスセンス変異で演繹アミノ酸配列レベルでも既報のトラフグ IGF-2 の配列との間で置換がみられた。

IGF-1 と IGF-2 の演繹アミノ酸配列の比較

ドメイン検索の結果、両 IGF とも N 末端側に IGF binding protein (IGFBP) binding surface、Type1 IGF- and insulin-receptor binding surface および Type2 IGF-receptor binding surface を含む IGF に特有の保存されたアミノ酸配列を有していることが明らかとなった (Fig. 4-3)。両者のアミノ酸同一率は 24%であったが、これら binding surface でのアミノ酸残基はよく保存されていた。

第2節 インスリン様成長因子遺伝子のイントロンの解析

本節では、第1節で得られた cDNA の配列を用いて、IGF-1 および IGF-2 のエキソン・イントロン構造を明らかにし、続いて IGF-1 のイントロン1の塩基配列を高成長系統および天然魚間で比較した。

方 法

エキソン・イントロン構造の解析

トラフグゲノムデータベースで IGF-1 および IGF-2 がコードされている領域のゲノム配列を調べ、コンピュータープログラム Spidey (Wheelan, et al. 2001; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Ostell/Spidey/>) でエキソン・イントロン構造を解析した。IGF-1 につき、イントロン1を増幅するプライマーを設計した (Table 4-2)。

試料

P 世代2個体、BC 用精子提供親および BC 雌親 (Fig. 2-1 参照) の計4個体から抽出したゲノム DNA を用いた。

PCR および塩基配列解析

PCR は、各試料の DNA 1 μ L に、10 pmol のフォワードプライマー IGF1_intron1_f46、10 pmol のリバースプライマー IGF1_intron1_r1339、10 \times Ex Taq 緩衝液 2 μ L、2.5 mM dNTP 1.6 μ L、Ex Taq DNA polymerase 0.1 μ L (0.5 U) に滅菌水を加えて 20 μ L とした系で行った。混合液を 94°C で 5 分間熱変性させた後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間および

72°C で 1.5 分間のサイクルを 30 回行った。最後に 72°C で 5 分間保持し、反応を終了させた。

次に、得られた PCR 産物を 100 倍に希釈したものを鋳型 DNA として nested PCR を行った。Nested PCR のフォワードプライマーには IGF1_intron1_f56 を、リバースプライマーには IGF1_intron1_r1308 を用いた。他の反応液の組成、PCR サイクルは上記と同じとした。

得られた PCR 産物に含まれる余剰プライマーおよび dNTP を分解するため、ExoSAP-IT (USB, Cleveland, Ohio, USA) で処理した。すなわち、PCR 産物に滅菌水 4 µL および ExoSAP-IT 0.2 µL を加え、37°C で 30 分保持した後 80°C で 15 分保持し、反応を終了した。プライマー IGF1_intron1_f56 および IGF1_intron1_f301 を用いて、処理後の PCR 産物を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) により、蛍光標識した。その後は、本章第 1 節と同様の方法で塩基配列を決定した。なお、本節で用いたプライマーの配列は Table 4-2 に記した。

結 果

IGF-1 および IGF-2 のエクソン・イントロン構造

IGF-1 は 5 つのエクソンと 4 つのイントロンからなること、および IGF-2 は少なくとも 4 つのエクソンと 3 つのイントロンをもつことが明らかになった (Fig. 4-4)。IGF-1 については、エクソン 1 およびエクソン 5 は大部分が UTR であった。IGF-2 については、3' RACE が完了していないのでエクソン 4 の正確な長さは不明であり、さらに 5 個以上のエクソン (エクソン 5 以降は全て UTR からなる) および 4 個以上のイントロンが存在する可能性もある。

IGF-1 イントロン 1 の塩基配列解析

解析した 4 個体において IGF-1 イントロン 1 の部分塩基配列 493 bp を決定した。4 個体由来の配列とトラフゲノムデータベースの相当する領域を比較したが (Fig. 4-5)、5 つの配列間に多型はみられなかった。

第3節 成長関連遺伝子の発現量解析

リアルタイムPCRを行う際の逆転写反応にはオリゴdTプライマーを用いることが以前は推奨されていた。これには、ribosomal RNA (rRNA) を逆転写しないのでリアルタイムPCRにおけるバックグラウンドノイズの低減に効果的であるという利点があったが、逆転写反応が mRNA の3'末端からに限られるので、mRNA の5'末端付近の配列に相補的な cDNA を得にくいという欠点があり、プライマーを設計できる領域に制限があった。現在では、ランダムプライマーとオリゴdTプライマーの混合物を用いることが推奨されている。そこで、本節の逆転写反応には、これらプライマーミックス、逆転写酵素および RNase インヒビターを含むキットである High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) を用いた。

方 法

試料

第2章第3節で得た BC 世代トラフグ個体 71 個体のうち、最も体長の大きい 10 個体 (Ln 群) と小さい 10 個体 (Sh 群) および体高の大きい 10 個体 (Hi 群) と小さい 10 個体 (Lw 群) を解析に用いた。Ln、Sh、Hi および Lw 各群の全長および体高の平均±標準偏差は、 11.4 ± 0.70 mm、 7.8 ± 0.23 mm、 3.2 ± 0.13 mm および 2.1 ± 0.083 mm であった。これらの個体から ISOGEN を用いて全 RNA を抽出した。まず、トラフグ 1 個体につき 1 mL の ISOGEN を加え、ペレットペッスル (アズワン) で試料をホモジナイズした。以後の操作は ISOGEN 付属の説明書に従った。さらに、本章第1節と同様の方法で抽出した RNA 量を求めた。

RNA の精製および 1st strand cDNA の合成

1 試料につき 10 – 40 µg の RNA を用い、抽出した RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて精製した。ゲノム DNA を分解するため、工程中のカラム上で、RNase-Free DNase set (Qiagen) で処理した。カラム上での DNase 処理を含めた全ての操作はキット付属の説明書に従った。次に、1 試料につき 2 µg の精製 RNA を用い、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) によりリアルタイム PCR 用の 1st strand cDNA を合成した。操作は付属の説明書に従った。

定量的リアルタイム PCR 用のプライマーの設計

IGF-1 および IGF-2 につき、定量的リアルタイム PCR に用いるプライマーを設計した。それぞれの遺伝子につき複数組のプライマー対を設計し、付属の説明書に従い増幅効率を確認した。

定量的リアルタイム PCR

SYBR *Premix Ex Taq* II (タカラバイオ) を用いて、IGF-1 および IGF-2 の各遺伝子の mRNA 蓄積量を調べた。PCR は滅菌水で 50 倍に希釈した 1st strand cDNA 3 µL に、10 µM フォワードプライマー溶液 0.8 µL、10 µM リバースプライマー溶液 0.8 µL (Table 4-3)、SYBR *Premix Ex Taq* II 10µL、ROX Reference dye 0.4µL および滅菌水 5 µL を加えて混合した系で行い。条件は付属の説明書に従い決定した。内部標準には、β-アクチン遺伝子 (Venkatesh et al., 1996) を用いた。

統計解析

リアルタイム PCR で mRNA 蓄積量を調べた各遺伝子につき、Ln 群–Sh 群および Hi 群–Lw 群の間で発現量の差の有無を t 検定で解析した。

結 果

プライマー

IGF-1、IGF-2 および内部標準の β アクチンの各遺伝子につき、増幅効率のほぼ等しいプライマー対を得た (Table 4-3)。

定量的リアルタイム PCR

IGF-1 では、Ln 群の mRNA 蓄積量は Sh 群の約 1.4 倍と有意に高かった (t 検定, $P < 0.005$; Fig. 4-6A)。同様に Hi 群の mRNA 蓄積量は Sh 群の約 1.3 倍と有意に高かった (t 検定, $P < 0.05$; Fig. 4-6A)。

しかしながら、IGF-2 では、Ln 群–Sh 群および Hi 群–Lw 群の間で発現量に有意な差はなかった (t 検定, $P > 0.05$; Fig. 4-6B)。

第4節 考 察

第1節で得られた IGF-1 の演繹アミノ酸配列とフグゲノムデータベースから演繹されたアミノ酸配列の間で塩基置換がみられ (Fig. 4-1)、データベースのアラニンがトレオニンに変化していた。IGF-1 は複数クローンを解析したことから、PCR あるいはサブクローニングの際の複製エラーである可能性は低い。今回解析した個体あるいはデータベース構築に用いられた個体で偶然生じていた single nucleotide polymorphism (SNP) か、データベースの精度の低さに由来するものであるかのいずれかであると考えられる。同様に IGF-2 の演繹アミノ酸配列とフグゲノムデータベースおよび既報のトラフグ IGF-2 の配列に置換がみられた (Fig. 4-2)。IGF-2 については1クローンしか配列解析をやっていないので、これが PCR あるいはサブクローニングの際の複製エラーである可能性が高い。しかしながら、このミスセンス変異が共に疎水性アミノ酸であるバリンからフェニルアラニンへの置換であること、他生物との比較で相同性の高いドメインの領域として検索されなかったことから、SNP の可能性も高い。IGF-1、IGF-2 の両方につき、塩基配列解析に供するクローン数およびトラフグの個体数を増やして検証する必要がある。また、IGF-2 で3' RACE で PCR 産物が得られなかった原因としては、3' UTR が極端に長く通常の PCR 条件では増幅ができなかったという可能性、あるいはプライマーとの相性がよくなかった可能性が考えられる。

第3節では、孵化38日後のトラフグ仔魚の全長および体高と、IGF-1 および IGF-2 の発現量の相関を調べた。その結果、IGF-2 と全長、体高の間に有意な相関はなかったが、IGF-1 については、Ln 群 (全長の上位 14%) および Hi 群 (体高の上位 14%) ではそれぞれ、Sh 群 (全長の下位 14%) および Lw (体高の下位 14%) に比して、有意に発現量が多くなっていた (それぞれ $P < 0.005$ および $P < 0.05$; Fig. 4-6) ことから、IGF-1 がトラフグの仔魚期における成長と強く関連していることが示された。この結果からは、

IGF-1 の増加により高成長が誘導された可能性と、高成長の結果 IGF-1 の発現が誘導された可能性が考えられる。しかし、ティラピア類 *O. mossambicus* (Kajimura et al., 2001) およびギンザケ (McCormick et al., 1992) において、IGF-1 の発現誘導あるいは投与が成長を刺激したという報告があることから、トラフグにおいても IGF-1 の発現量増加により成長が誘導された可能性が高い。イヌの体サイズと IGF-1 の関連についての知見 (Sutter et al., 2007) もこのことを支持する。

IGF-1 の発現量と高成長の関連が第 3 節で示されたが、IGF-1 のイントロン 1 における高成長系と天然魚の間で配列には差異が認められなかった (Fig. 4-5)。したがって、今回みられた成長度の差をもたらした IGF-1 の発現量の差は、第 2 節で配列を決定した部分以外のイントロンか 5' 調節領域の変異、もしくは IGF-1 が含まれるカスケードである growth hormone (GH) -IGF-1 axis (reviewed by Duan, 1997) の上流に存在する他の遺伝子の制御領域に存在する変異に起因するということが示唆される。

第5章 総括的考察

トラフグは、Brenner et al. (1993) がコンパクトなゲノム構造をもつ脊椎動物ゲノムのモデル生物として提唱して以来、世界的に大きな注目を浴び、精力的なゲノムの解析がなされた。そしてゲノム配列の公開以後、それを用いた研究が多くなされている。しかし、それらは進化学や分子生物学など基礎的な学問分野でゲノム比較のためのツールとしてトラフグを用いたものが多く、食資源としてのトラフグに着目し、養殖への応用をも視野に入れた研究例はそれほど多くない (Kai et al., 2005 など)。これは、トラフグの完全養殖が初めて世界で成功したのが日本であり、飼育実験を必要とする研究は事実上、日本および中国など世界でも限定された地域でしか行うことができないからである。そのような意味で本研究は世界でも独自性の高い研究であると言える。

本研究では、まず、第1章でMS座の数を *in silico* スクリーニングによって調べた。その結果、トラフグのゲノムにはポジショナルクローニングを行うのに十分な密度でMS座があることが明らかになった (Table 1-1)。さらに、それを利用して連鎖地図作製のためのMSマーカーを148個設計した (Appendix 1 および 2)。

第2章では、凍結精子による人工授精により高成長系と天然魚を交配し、さらにそれを成熟させて、F₁世代の凍結精子を作製した。得た凍結精子を用いてさらに天然魚との交配を行い、BC世代を得た (Fig. 2-1)。

第3章では、まずトラフグの連鎖地図を作製した。続いて、バルク法に基づくQTL解析を行ったが、高成長に関与している遺伝子座を発見することはできなかった (Table 3-2)。さらに多くのマーカーを解析することが必要であると考えられる。

近年、ある程度連鎖地図が構築できた段階で候補遺伝子を絞り、遺伝子を直に連鎖地図上にマッピングしていく方法がとられることが多いので、第4章ではそれを目指し、IGF-1 および IGF-2 に関する基礎的知見を集めることを目的に実験を行った。まず、

IGF-1 および IGF-2 の cDNA クローニングおよび塩基配列の決定 (Fig. 4-1 および 4-2) を行い、IGF-1 についてはイントロン 1 の塩基配列解析を行った。しかしながら、IGF-1 のイントロン 1 における高成長系と天然魚の間で配列には差異が認められなかった (Fig. 4-5)。一方、リアルタイム PCR によりトラフグの仔魚期 (孵化後 38 日目) における体サイズと IGF-1 の間に強い相関があることが示された (Fig. 4-6)。したがって、今回みられた成長度の差をもたらした IGF-1 の発現量の差は、第 2 節で配列を決定した部分以外のイントロンか 5'調節領域の変異、もしくは IGF-1 が含まれるカスケードである GH-IGF-1 axis (reviewed by Duan, 1997) の上流に存在する他の遺伝子の制御領域に存在する変異に起因するということが示唆される。

今後の方向性として、まず GH-IGF-1 axis に存在する他の遺伝子の発現と体サイズの相関を調べるのが有効であろう。さらに、トラフグでは、ゲノムデータベースが利用可能であるという強みがあることから、これら遺伝子の近傍に容易にマーカーを設計することができる。これらマーカーと体サイズについての QTL 解析を進め、連鎖地図上にこれら遺伝子をマッピングしていくというのが、高成長関連遺伝子の同定に最も近い選択肢であると考えられる。しかしながら、今回得られた IGF-1 の発現量の差が系統に由来するものではなく、環境に起因するものである場合、これらの方法はあまり意味がない。旧来通りゲノム全体にわたる DNA マーカーを用いた QTL 解析も平行して進めることも重要である。

関連遺伝子座および遺伝子の同定に成功した場合、MAS による効率的な育種のみならず次のようなことが可能になると考えられる。トラフグは肝臓、卵巣および血液中にテトロドトキシンと呼ばれる強力な神経毒をもち、調理の際は通常の調理師免許以外にフグ調理師の免許が必要であることから、加工技術をもった人材や場所は非常に限られている。現在、全国のトラフグの約 70%が取り扱われる山口県下関市で海底トンネルの排水を利用した陸上養殖が試みられている (望月ら, 2007)。海底の砂による濾過で寄生

虫もいないとされている上に、年中水温が安定しているので、安全で効率の良い飼育が可能である。これに加えて、MAS による優良系統の固定が実現すれば、ある種のブランド化が可能であると考えられる。このブランドでは、遺伝子型診断を用いた偽装対策やトレーサビリティが可能なので、消費者の食の安心を求める需要にも応えられる。安く、おいしく、安全なトラフグが実現可能であると考えられる。

本研究の成果が今後の水産増養殖業ならびに生物学の発展に貢献することを願い、本論文を締め括る。

参考文献

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.
- 青木義雄 (1999) ふぐの文化. 成山堂書店, 東京.
- Aparicio, S., Chapman, J., Stupka, E., Putnam, N., Chia, J. M., Dehal, P., Christoffels, A., Rash, S., Hoon, S., Smit, A., Gelpke, M. D., Roach, J., Oh, T., Ho, I. Y., Wong, M., Detter, C., Verhoef, F., Predki, P., Tay, A., Lucas, S. et al. (2002) Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science*, **297**, 1301-1310.
- Aparicio, S., Morrison, A., Gould, A., Gilthorpe, J., Chaudhuri, C., Rigby, P., Krumlauf, R. and Brenner, S. (1995) Detecting conserved regulatory elements with the model genome of the Japanese puffer fish, *Fugu rubripes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 1684-1688.
- Baker, J., Liu, J. P., Robertson, E. J. and Efstratiadis, A. (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, **75**, 73-82.
- Baranski, M., Loughnan, S., Austin, C. M. and Robinson, N. (2006) A microsatellite linkage map of the blacklip abalone, *Haliotis rubra*. *Anim. Genet.*, **37**, 563-570.
- Baranski, M., Rourke, M., Loughnan, S., Hayes, B., Austin, C. and Robinson, N. (2008) Detection of QTL for growth rate in the blacklip abalone (*Haliotis rubra* Leach) using selective DNA pooling. *Anim. Genet.*, **39**, 606-614.
- Barendse, W., Armitage, S. M., Kossarek, L. M., Shalom, A., Kirkpatrick, B. W., Ryan, A. M., Clayton, D., Li, L., Neibergs, H. L., Zhang, N., Grosse, W. M., Weiss, J., Creighton, P., McCarthy, F., Ron, M., Teale, A. J., Fries, R., McGraw, R. A., Moore, S. S., Georges, M. et al. (1994) A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat. Genet.*, **6**, 227-235.

- Beckmann, J. S. and Weber, J. L. (1992) Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, **12**, 627-631.
- Boulding, E. G., Culling, M., Glebe, B., Berg, P. R., Lien, S. and Moen, T. (2008) Conservation genomics of Atlantic salmon: SNPs associated with QTLs for adaptive traits in parr from four trans-Atlantic backcrosses. *Heredity*, **101**, 381-391.
- Brenner, S., Elgar, G., Sandford, R., Macrae, A., Venkatesh, B. and Aparicio, S. (1993) Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature*, **366**, 265-268.
- Chistiakov, D. A., Hellemans, B., Haley, C. S., Law, A. S., Tsigenopoulos, C. S., Kotoulas, G., Bertotto, D., Libertini, A. and Volckaert, F. A. (2005) A microsatellite linkage map of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Genetics*, **170**, 1821-1826.
- Coimbra, M. R. M., Kobayashi, K., Koretsugu, S., Hasegawa, O., Ohara, E., Ozaki, A., Sakamoto, T., Naruse, K. and Okamoto, N. (2003) A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **220**, 203-218.
- Crawford, A. M., Dodds, K. G., Ede, A. J., Pierson, C. A., Montfomery, G. W. Garmonsway, H. G., Beattie, A. E., Davies, K., Maddox, J. F., Kappes, S. M., Stone, R. T., Nguyen, T. C., Penty, J. M., Lord, E. A., Broom, J. E., Buitkamp, J., Schwaiger, W., Epplen, J. T., Matthew, P., Matthews et al. (1995) An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics*, **140**, 703-724.
- Dib, C., Faure, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J. and Weissenbach, J. (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*, **380**, 152-154.
- Dietrich, W. F., Miller, J., Steen, R., Merchant, M. A., Damron-Boles, D., Husain, Z., Dredge, R.,

- Daly, M. J., Ingalls, K. A. and O'Connor, T. J. (1996) A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature*, **380**, 149-152.
- Duan, C. (1997) The insulin-like growth factor system and its biological actions in fish. *Am. Zool.*, **37**, 491-503.
- Edwards, Y. J., Elgar, G., Clark, M. S. and Bishop, M. J. (1998) The identification and characterization of microsatellites in the compact genome of the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*: perspectives in functional and comparative genomic analyses. *J. Mol. Biol.*, **278**, 843-854.
- Ellegren, H., Chowdhary, B. P., Johansson, M., Marklund, L., Fredholm, M., Gustavsson, I. and Andersson, L. (1994) A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of genetic recombination. *Genetics*, **137**, 1089-1100.
- Gharbi, K., Gautier, A., Danzmann, R. G., Gharbi, S., Sakamoto, T., Hoyheim, B., Taggart, J. B., Cairney, M., Powell, R., Krieg, F., Okamoto, N., Ferguson, M. M., Holm, L. E. and Guyomard, R. (2006) A linkage map for brown trout (*Salmo trutta*): chromosome homeologies and comparative genome organization with other salmonid fish. *Genetics*, **172**, 2405-2419.
- Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Metzker, M. L., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Scherer, S., Scott, G., Steffen, D., Worley, K. C., Burch, P. E., Okwuonu, G., Hines, S., Lewis, L., DeRamo, C., Delgado, O., Dugan-Rocha, S., Miner, G., Morgan, M., Hawes, A., Gill, R. et al. (2004) Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, **428**, 493-521.
- Gilbey, J., Verspoor, E., McLay, A. and Houlihan, D. (2004) A microsatellite linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Anim. Genet.*, **35**, 98-105.
- Grattapaglia, D. and Sederoff, R. (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and

- Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, **137**, 1121-1137.
- Groenen, M. A., Crooijmans, R. P., Veenendaal, A., Cheng, H. H., Siwek, M. and van der Poel, J. J. (1998) A comprehensive microsatellite linkage map of the chicken genome. *Genomics*, **49**, 265-274.
- Guyomard, R., Mauger, S., Tabet-Canale, K., Martineau, S., Genet, C., Krieg, F. and Quillet, E. (2006) A type I and type II microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with presumptive coverage of all chromosome arms. *BMC Genomics*, **7**, 302-314.
- Gwo, J. C., Kurokura, H. and Hirano, R. (1993) Cryopreservation of spermatozoa from rainbow trout, common carp, and marine puffer. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 777-782.
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **41**, 95-98.
- 服部正平 (2005) ヒトゲノム完成版の解析. *蛋白質 核酸 酵素*, **50**, 162-168.
- Hayes, B., Baranski, M., Goddard, M. E. and Robinson, N. (2007) Optimisation of marker assisted selection for abalone breeding programs. *Aquaculture*, **265**, 61-69.
- Heijmans, B. T., Tobi, E. W., Stein, A. D., Putter, H., Blauw, G. J., Susser, E. S., Slagboom, P. E. and Lumey, L. H. (2008) Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 17046-17049.
- Hubert, S. and Hedgecock, D. (2004) Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, **168**, 351-362.
- 池田大介, 渡部終五 (2004) トラフグのゲノム解析. *蛋白質 核酸 酵素*, **49**, 2235-2241.
- Ikeda, D., Ono, Y., Snell, P., Edwards, Y. J., Elgar, G. and Watabe, S. (2007) Divergent evolution

- of the myosin heavy chain gene family in fish and tetrapods: evidence from comparative genomic analysis. *Physiol. Genomics*, **32**, 1-15.
- International Chicken Genome Sequencing Consortium (2004) Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, **432**, 695-716.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, **431**, 931-945.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860-921.
- Jackson, T.R., Ferguson, M. M., Danzmann, R. G., Fishback, A. G., Ihssen, P. E. and Crease, T. J. (1998) Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Heredity*, **80**, 143-151.
- Jaillon, O., Aury, J. M., Brunet, F., Petit, J. L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., Bouneau, L., Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Bernot, A., Nicaud, S., Jaffe, D., Fisher, S., Lutfalla, G., Dossat, C., Segurens, B., Dasilva, C., Salanoubat, M., Levy, M., Boudet, N. et al. (2004) Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature*, **431**, 946-957.
- Jones, E. S., Dupal, M. P., Kolliker, R., Drayton, M. C. and Forster, J. W. (2002) Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor. Appl. Genet.*, **102**, 405-415.
- Jones, E. S., Mahoney, N. L., Hayward, M. D., Armstead, I. P., Jones, J. G., Humphreys, M. O., King, I. P., Kishida, T., Yamada, T., Balfourier, F., Charmet, G. and Forster, J. W. (2002) An enhanced molecular marker based genetic map of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) reveals comparative relationships with other Poaceae genomes. *Genome*, **45**,

282-295.

- Kai, W., Kikuchi, K., Fujita, M., Suetake, H., Fujiwara, A., Yoshiura, Y., Ototake, M., Venkatesh, B., Miyaki, K. and Suzuki, Y. (2005) A genetic linkage map for the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Genetics*, **171**, 227-238.
- Kajimura, S., Uchida, K., Yada, T., Riley, L. G., Byatt, J. C., Collier, R. J., Aida, K., Hirano, T. and Grau, E. G. (2001) Stimulation of insulin-like growth factor-I production by recombinant bovine growth hormone in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiol. Biochem.*, **25**, 221-230.
- Kammandel, B., Chowdhury, K., Stoykova, A., Aparicio, S., Brenner, S. and Gruss, P. (1999) Distinct *cis*-essential modules direct the time-space pattern of the Pax6 gene activity. *Dev. Biol.*, **205**, 79-97.
- Kang, J. H., Kim, W. J. and Lee, W. J. (2008) Genetic linkage map of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Int. J. Biol. Sci.*, **10**, 143-149.
- Kappes, S. M., Keele, J. W., Stone, R. T., McGraw, R. A., Sonstegard, T. S., Smith, T. P., Lopez-Corrales, N. L. and Beattie, C. W. (1997) A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.*, **7**, 235-249.
- Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan, B., Yamada, T., Nagayasu, Y., Doi, K., Kasai, Y., Jindo, T., Kobayashi, D., Shimada, A., Toyoda, A., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Sasaki, T., Shimizu, A., Asakawa, S., Shimizu, N. et al. (2007) The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*, **447**, 714-719.
- Khoo, G., Lim, M. H., Suresh, H., Gan, D. K., Lim, K. F., Chen, F., Chan, W. K., Lim, T. M. and Phang, V. P. (2003) Genetic linkage maps of the guppy (*Poecilia reticulata*): assignment of RAPD markers to multipoint linkage groups. *Mar. Biotechnol.*, **5**, 279-293.

木下滋晴 (2002) 珪藻 *Chaetoceros compressum* の熱ストレス応答に関する分子生物学的研究. 東京大学博士論文.

Kirkness, E. F., Bafna, V., Halpern, A. L., Levy, S., Remington, K., Rusch, D. B., Delcher, A. L., Pop, M., Wang, W., Fraser, C. M. and Venter, J. C. (2003) The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science*, **301**, 1898-1903.

Knapik, E. W., Goodman, A., Ekker, M., Chevrette, M., Delgado, J., Neuhauss, S., Shimoda, N., Driever, W., Fishman, M. C. and Jacob, H. J. (1998) A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nat. Genet.*, **18**, 338-343.

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

Lander, E. S. and Botstein, D. (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, **121**, 185-199.

Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M. J., Lincoln, S. E. and Newburg, L. (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, **1**, 174-181.

Leder, E. H., Danzmann, R. G. and Ferguson, M. M. (2006) The candidate gene, clock, localizes to a strong spawning time quantitative trait locus region in rainbow trout. *J. Hered.*, **97**, 74-80.

Lee, B. Y., Lee, W. J., Streelman, J. T., Carleton, K. L., Howe, A. E., Hulata, G., Slettan, A., Stern, J. E., Terai, Y. and Kocher, T. D. (2005) A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis spp.*). *Genetics*, **170**, 237-244.

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

- resource family. *Genetics*, **165**, 687-694.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Cherukuri, P. F., DeWeese-Scott, C., Geer, L. Y., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Shoemaker, B. A., Simonyan, V., Song, J. S., Thiessen, P. A. et al. (2005) CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res.*, **33**, D192-196.
- McClelland, E. K. and Naish, K. A. (2008) A genetic linkage map for coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Anim. Genet.*, **39**, 169-179.
- McCormick, S. D., Kelley, K. M., Young, G., Nishioka, R. S. and Bern, H. A. (1992) Stimulation of coho salmon growth by insulin-like growth factor I. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **86**, 398-406.
- Mitchelmore, R. W., Paran, I. and Kesseli, R. V. (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 9828-9832.
- Miyaki, K., Tabeta, O. and Kayano, H. (1995) Karyotypes in six species of pufferfishes genus *Takifugu* (Tetraodontidae, Tetraodontiformes). *Fish. Sci.*, **61**, 594-598.
- 望月俊孝, 瀬崎啓次郎, 池田大介, 渡部終五 (2007) 余剰地下海水を利用したトラフグの陸上養殖 – I. 飼育施設および水質の概要. 2007 年度日本水産学会春季大会講演要旨集 251.
- Moen, T., Hayes, B., Baranski, M., Berg, P. R., Kjolglum, S., Koop, B. F., Davidson, W. S., Omholt, S. W. and Lien, S. (2008) A linkage map of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) based on EST-derived SNP markers. *BMC Genomics*, **9**, 223-236.
- Morishima, K., Nakayama, I. and Arai, K. (2008) Genetic linkage map of the loach *Misgurnus*

- anguillicaudatus* (Teleostei: Cobitidae). *Genetica*, **132**, 227-241.
- Mouse Genome Sequencing Consortium (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, **420**, 520-562.
- Naruse, K., Fukamachi, S., Mitani, H., Kondo, M., Matsuoka, T., Kondo, S., Hanamura, N., Morita, Y., Hasegawa, K., Nishigaki, R., Shimada, A., Wada, H., Kusakabe, T., Suzuki, N., Kinoshita, M., Kanamori, A., Terado, T., Kimura, H., Nonaka, M. and Shima, A. (2000) A detailed linkage map of medaka, *Oryzias latipes*: comparative genomics and genome evolution. *Genetics*, **154**, 1773-1784.
- Nichols, K. M., Young, W. P., Danzmann, R. G., Robison, B. D., Rexroad, C., Noakes, M., Phillips, R. B., Bentzen, P., Spies, I., Knudsen, K., Allendorf, F. W., Cunningham, B. M., Brunelli, J., Zhang, H., Ristow, S., Drew, R., Brown, K. H., Wheeler, P. A. and Thorgaard, G. H. (2003) A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Genet.*, **34**, 102-115.
- 農林水産省統計部 (2008) 漁業・養殖業生産統計年報. 農林水産統計.
- Ogawa, K. (1991) Redescription of *Heterobothrium tetrodonis* (Goto, 1894) (Monogenea: Diclidophoridae) and other related new species from puffers of the genus *Takifugu* (Teleostei: Tetraodontidae). *Jpn. J. Parasitol.*, **40**, 388-396.
- O'Malley, K. G., Sakamoto, T., Danzmann, R. G. and Ferguson, M. M. (2003) Quantitative trait loci for spawning date and body weight in rainbow trout: testing for across ancestrally duplicated chromosomes. *J. Hered.*, **94**, 273-284.
- Ohtsuka, M., Makino, S., Yoda, K., Wada, H., Naruse, K., Mitani, H., Shima, A., Ozato, K., Kimura, M. and Inoko, H. (1999) Construction of a linkage map of the medaka (*Oryzias latipes*) and mapping of the Da mutant locus defective in dorsoventral patterning. *Genome Res.*, **9**, 1277-1287.

- Ozaki, A., Sakamoto, T., Khoo, S., Nakamura, K., Coimbra, M. R., Akutsu, T. and Okamoto, N. (2001) Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Genet. Genomics*, **265**, 23-31.
- Postlethwait, J. H. (2006) The zebrafish genome: a review and msx gene case study. *Genome Dyn.*, **2**, 183-197.
- Postlethwait, J. H., Woods, I. G., Ngo-Hazelett, P., Yan, Y. L., Kelly, P. D., Chu, F., Huang, H., Hill-Force, A. and Talbot, W. S. (2000) Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res.*, **10**, 1890-1902.
- Postlethwait, J. H., Yan, Y. L., Gates, M. A., Horne, S., Amores, A., Brownlie, A., Donovan, A., Egan, E. S., Force, A., Gong, Z., Goutel, C., Fritz, A., Kelsh, R., Knapik, E., Liao, E., Paw, B., Ransom, D., Singer, A., Thomson, M., Abduljabbar, T. S. et al. (1998) Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat. Genet.*, **18**, 345-349.
- Sakamoto, T., Danzmann, R. G., Gharbi, K., Howard, P., Ozaki, A., Khoo, S. K., Woram, R. A., Okamoto, N., Ferguson, M. M., Holm, L. E., Guyomard, R. and Hoyheim, B. (2000) A microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) characterized by large sex-specific differences in recombination rates. *Genetics*, **155**, 1331-1345.
- Shimoda, N., Knapik, E. W., Ziniti, J., Sim, C., Yamada, E., Kaplan, S., Jackson, D., de Sauvage, F., Jacob, H. and Fishman, M. C. (1999) Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. *Genomics*, **58**, 219-32.
- Shirak, A., Seroussi, E., Cnaani, A., Howe, A. E., Domokhovsky, R., Zilberman, N., Kocher, T. D., Hulata, G. and Ron, M. (2006) Amh and Dmrt2 genes map to tilapia (*Oreochromis spp.*) linkage group 23 within quantitative trait locus regions for sex determination. *Genetics*, **174**, 1573-81.

- Stoss, J. and Refstie, T. (1983) Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture*, **30**, 229-236.
- Sutter, N. B., Bustamante, C. D., Chase, K., Gray, M. M., Zhao, K., Zhu, L., Padhukasahasram, B., Karlins, E., Davis, S., Jones, P. G., Quignon, P., Johnson, G. S., Parker, H. G., Fretwell, N., Mosher, D. S., Lawler, D. F., Satyaraj, E., Nordborg, M., Lark, K. G., Wayne, R. K. and Ostrander, E. A. (2007) A single IGF1 allele is a major determinant of small size in dogs. *Science*, **316**, 112-5.
- Takagi, M., Sato, J., Monbayashi, C., Aoki, K., Tsuji, T., Hatanaka, H., Takahashi, H. and Sakai, H. (2003) Evaluation of microsatellites identified in the tiger puffer *Takifugu rubripes* DNA database. *Fish. Sci.*, **69**, 1083-1093.
- The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium (2005) Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature*, **437**, 69-87.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-80.
- 鵜飼保雄, 大澤良, 斉藤彰, 林武司 (1995) DNA 多型連鎖地図作成と QTL 解析のための コンピューター・プログラム MAPL. *Breed. Sci.*, **45**, 139-42.
- 鵜飼保雄 (2000) ゲノムレベルの遺伝解析 -MAP と QTL-. 東京大学出版会, 東京.
- 鵜飼保雄 (2002) 量的形質の遺伝解析. 医学出版, 東京.
- Venkatesh, B., Tay, B. H., Elgar, G. and Brenner, S. (1996) Isolation, characterization and evolution of nine pufferfish (*Fugu rubripes*) actin genes. *J. Mol. Biol.* **259**, 655-665.
- Venkatesh, B., Si-Hoe, S. L., Murphy, D. and Brenner, S. (1997) Transgenic rats reveal functional conservation of regulatory controls between the Fugu isotocin and rat

- oxytocin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 12462-12466.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M. et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304-1351.
- Wada, H., Naruse, K., Shimada, A. and Shima, A. (1995) Genetic linkage map of a fish, the Japanese medaka *Oryzias latipes*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **4**, 269-274.
- Waldbieser, G. C., Bosworth, B. G., Nonneman, D. J. and Wolters, W. R. (2001) A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Genetics*, **158**, 727-734.
- Wang, C. M., Lo, L. C., Zhu, Z. Y. and Yue, G. H. (2006) A genome scan for quantitative trait loci affecting growth-related traits in an F1 family of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *BMC Genomics*, **7**, 274-286.
- Watanabe, T., Fujita, H., Yamasaki, K., Seki, S. and Taniguchi, N. (2004) Preliminary study on linkage mapping based on microsatellite DNA and AFLP markers using homozygous clonal fish in ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Mar. Biotechnol.*, **6**, 327-334.
- Wheelan, S. J., Church, D. M. and Ostell, J. M. (2001) Spidey: a tool for mRNA-to-genomic alignments. *Genome Res.*, **11**, 1952-1957.
- Woods, I. G., Kelly, P. D., Chu, F., Ngo-Hazelett, P., Yan, Y. L., Huang, H., Postlethwait, J. H. and Talbot, W. S. (2000) A comparative map of the zebrafish genome. *Genome Res.*, **10**, 1903-1914.
- Woods, K. A., Camacho-Hubner, C., Savage, M. O. and Clark, A. J. (1996) Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N. Engl. J. Med.*, **335**, 1363-1367.

Woram, R. A., McGowan, C., Stout, J. A., Gharbi, K., Ferguson, M. M., Hoyheim, B., Davidson, E. A., Davidson, W. S., Rexroad, C. and Danzmann, R. G. (2004) A genetic linkage map for Arctic char (*Salvelinus alpinus*): evidence for higher recombination rates and segregation distortion in hybrid versus pure strain mapping parents. *Genome*, **47**, 304-315.

Table 0-1. Culture production and its price of Japanese fish

Year	Yellowtail species		Red seabream		Japanese flounder		Fugu species	
	Amount	Price	Amount	Price	Amount	Price	Amount	Price
2002	162	113,615	72	57,459	6	9,950	5	13,210
2003	158	122,535	83	51,620	6	9,319	4	12,016
2004	150	109,300	81	50,717	5	7,077	4	10,816
2005	160	105,467	77	48,872	5	6,952	4	10,281
2006	155	117,437	71.1	58,276	4.6	7,399	4.4	9,144
2007	157.9	-	67	-	4.6	-	4.2	-

Amount, thousand tons; price, million yen.

Table 1-1. The number of microsatellite loci in the pufferfish *Takifugu rubripes* predicted to be polymorphic based on repeat frequency

Scaffold No.	Dinucleotide			Tri- nucleotide	Tetra- nucleotide	Penta- nucleotide	Total
	CA/GT	GA/CT	TA				
1	34	2		1	3	5	45
2	18			2	4	3	27
3	7		1	1	1		10
4	8	1	1	1	1	1	13
5	13	1		1	3	2	20
6	8				3		11
7	7					2	9
8	10	1			7	2	20
9	17				7	2	26
10	8	1		2	6		17
11	11	1		2	2		16
12	11				1	1	13
13	10	1	1		4		16
14	6	1			1	2	10
15	10			2	9	2	23
16	6			4	3	2	15
17	6		3		1		10
18	3		2		2		7
19	7		1	1	2		11
20	11	2		1	2	1	17
21	13		2		2		17
22	8		1	1	2	1	13
23	6	1				2	9
24	6		1		7	4	18
25	11			1	1	2	15
Total	255	12	13	20	74	34	408

Table 2-1. Number of frozen sperm pellet and their activity

Freezing date	No. of pellets	Activity on Oct 19	Activity on Oct 26
October 19, 2007	150	100%	100%
October 26, 2007	500	-	100%

Table 3-1. Total body length and body height data of backcross generation larvae at 38 days after hatching of the pufferfish *Takifugu rubripes*

Individual No.	Total body length (mm)	Body height (mm)	Individual No.	Total body length (mm)	Body height (mm)
1	8.2	-	37	7.7	2.2
2	9.9	-	38	10.0	2.8
3	-	-	39	10.5	2.8
4	10.0	2.7	40	8.1	2.3
5	8.3	2.0	41	10.2	2.5
6	10.0	3.2	42	10.4	3.0
7	11.0	3.2	43	10.7	3.1
8	10.0	3.0	44	10.0	2.8
9	-	-	45	9.5	2.7
10	9.1	2.8	46	10.5	2.8
11	8.0	2.7	47	9.2	2.8
12	9.0	2.3	48	9.0	2.5
13	8.1	3.0	49	10.5	3.0
14	9.0	2.5	50	8.0	2.4
15	9.5	2.8	51	7.4	2.1
16	9.8	3.0	52	11.5	3.3
17	8.4	2.5	53	10.0	2.9
18	10.0	3.0	54	8.2	2.1
19	11.0	3.1	55	8.0	2.0
20	9.0	2.7	56	9.3	2.9
21	8.7	2.8	57	10.0	2.7
22	7.7	2.0	58	8.0	2.2
23	7.9	2.3	59	8.2	2.5
24	7.4	-	60	9.8	2.8
25	8.4	2.8	61	9.7	3.0
26	8.0	2.5	62	11.1	3.0
27	9.2	3.0	63	12.0	3.5
28	9.0	2.3	64	9.1	2.4
29	10.3	3.0	65	11.0	3.0
30	8.8	2.9	66	13.3	3.2
31	9.0	2.5	67	8.4	2.2
32	11.2	3.3	68	11.0	2.8
33	8.2	2.1	69	9.0	2.3
34	8.4	2.4	70	8.1	2.0
35	10.0	2.8	71	10.0	2.8
36	11.0	3.2			

Dashes indicate missing data.

Table 3-2. Allele frequency of microsatellite marker loci for four groups of backcross generation of larvae at 38 days after hatching of the pufferfish *Takifugu rubripes*

Group Name	Number of allele	Locus										
		fms01	fms02	fms04	fms13	fms16	fms68-2	fms89	fms158	fms168	fms193	Tru-9
All samples analyzed	Fast-growth allele	27	32	30	35	41 ^a	32	26	36	27	30	34
	Wild type allele	35	30	32	27	20 ^a	30	36	25	25	31	26
Ln	Fast-growth allele	2	6	5	8	10	4	3	5	4	4	5
	Wild type allele	10	6	7	4	2	8	9	6	7	7	7
Sh	Fast-growth allele	7	5	5	7	8	8	8	7	6	10 ^b	9
	Wild type allele	5	7	7	5	4	4	4	5	5	2 ^b	2
Hi	Fast-growth allele	3	5	6	8	10	6	2	6	4	3	5
	Wild type allele	9	7	6	4	2	6	10	5	6	8	7
Lw	Fast-growth allele	7	7	4	7	9	9 ^b	7	6	8	8	7
	Wild type allele	4	4	7	4	2	2 ^b	4	5	2	3	3

^a Significantly deviated from Mendelian inheritance (χ^2 -test, $P < 0.05$)

^b Significantly deviated from the value estimated from allele frequency in all the samples analyzed (χ^2 -test, $P < 0.05$)

Table 4-1. Nucleotide sequences of primers used for cDNA cloning and RACE of IGF-1 and IGF-2 for the pufferfish *Takifugu rubripes*

Primer name	Sequence (5'-3')	Gene	Experiment
s21_f1	CACACCCTCTCGCTACTGCT	IGF-1	cDNA cloning
s21_r2	GCATTGCCTCGACTTGAGTT	IGF-1	cDNA cloning and 5'RACE
s119-f1	TGGAGACCCAGCACAGAAAC	IGF-2	cDNA cloning
s119-r1	GATGTAGCTGTCCGTGGTGA	IGF-2	cDNA cloning
GeneRacer 3' RACE Primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	Both	3' RACE
GeneRacer 3' RACE Nested Primer	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG	Both	3' RACE
s21_f2	CTGTGGCGTCTGGAGATGTA	IGF-1	3' RACE
s119_f2	CTTCGTTTTGCCACACCTG	IGF-2	3' RACE
s21_3race_f1	CCAGCGACTTGAGAGGAGAG	IGF-2	3' RACE and primer walking
s21_3race_f2	TGTTTAAGCGTTTGATGAGGG	IGF-2	3' RACE and primer walking
s21_3race_f3	TTCATCCTTCAAGGAAGTGC	IGF-2	3' RACE and primer walking
s21_3race_f4	TGTTTAAGCGTTTGATGAGG	IGF-2	3' RACE and primer walking
s21_3race_f5	GCTTAGCTGCTGAGACACAA	IGF-2	3' RACE and primer walking
s21_3race_f6	CCGAGTGGAGTCATTATGCT	IGF-2	3' RACE and primer walking
s21_3race_f7	CCTGAGGTCTAAGTCTAAAAGC	IGF-2	3' RACE and primer walking
s21_3race_f8	CAGAACACGCTTTCTCCTGT	IGF-2	3' RACE and primer walking
s21_3race_f9	AGAAGTGGGTCAGTCAGCGGA	IGF-2	3' RACE and primer walking
s21_3race_f10	ACTCAAAGTGCATTTGGCTG	IGF-2	3' RACE and primer walking
s21_3race_f11	TTCGTGGCGCGTGGTCCGAA	IGF-2	3' RACE and primer walking
s21_3race_f12	CCTGCGGAGACCCGAAATAG	IGF-2	3' RACE and primer walking
s21_3race_f13	CGTGAATGAGAGTTGTGTAAC	IGF-2	3' RACE and primer walking
s21_3race_f14	CATCAACAGTTCTGAGAAGC	IGF-2	3' RACE and primer walking
GeneRacer 5' RACE Primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	Both	5' RACE
GeneRacer 5' RACE Nested Primer	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA	Both	5' RACE
s21_r1	TACATCTCCAGACGCCACAG	IGF-1	5' RACE
s119-5race_r2	CAGGTGTGGCAAAACGAAG	IGF-2	5' RACE
s119-5race_r1	GTTTCTGTGCTGGGTCTCCA	IGF-2	5' RACE

RACE, rapid amplification of cDNA ends;

IGF, insulin-like growth factor

Table 4-2. Nucleotide sequences of primers used for DNA sequencing of IGF-1 intron1 of the pufferfish *Takifugu rubripes*

Primer name	Sequence (5'-3')	Experiment
IGF1_intron1_f46	GGGGATGTCTAGCGCTCTTT	Initial PCR
IGF1_intron1_f56	AGCGCTCTTTCCTTTCAGTG	Nested PCR
IGF1_intron1_r1339	GAGTCAGGGTGAGGATGCAC	Initial PCR
IGF1_intron1_r1308	GAGGGTGTGGCTACAGGAGA	Nested PCR
IGF1_intron1_f301	GTCCTGGTGATTTCTCTATT	Sequencing

Table 4-3. Nucleotide sequences of primers used for real-time PCR

Primer name	Sequence (5'-3')	Gene
Actin F	CGCCGCACTCGTTGTTG	β -actin
Actin R	CTCCAGCAAATCCGGCTTT	β -actin
IGF1_1052F	CCTTGAGGTTTGTGGAGGTATCA	IGF-1
IGF1_1117R	TCCTAGCGAAGGAGCATAATGAC	IGF-1
IGF2_108F	GACTACTGCCAGCTGACATGGA	IGF-2
IGF_172R	GCAGGTGTGGCAAAACGAA	IGF-2

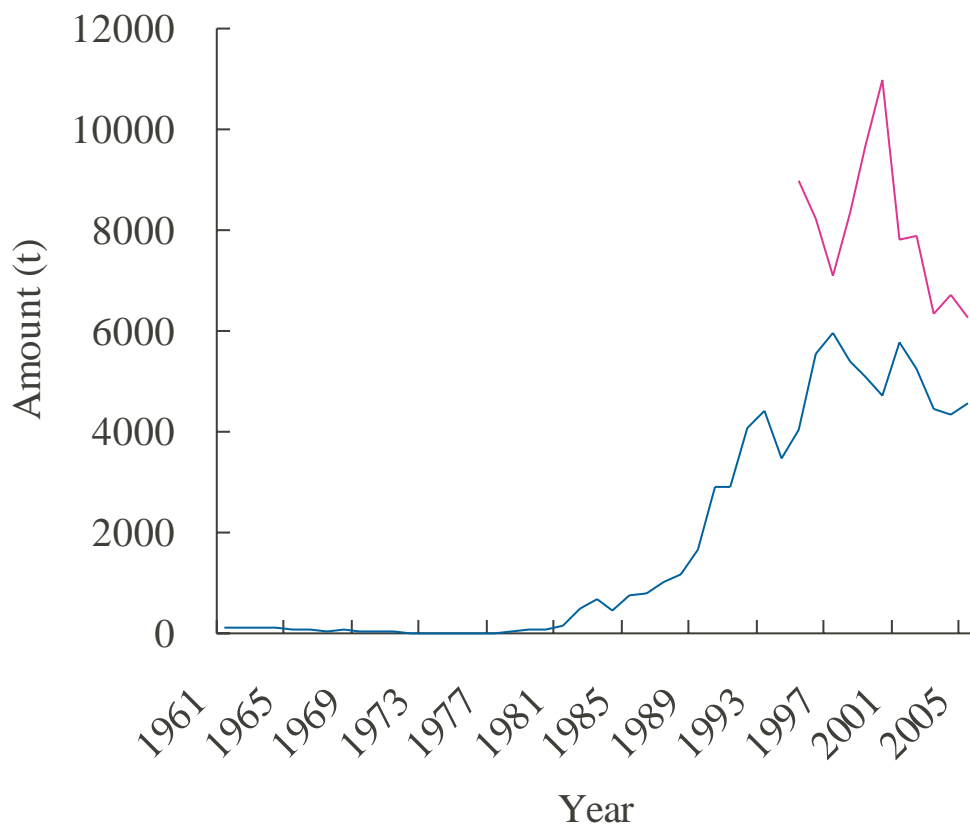


Fig. 0-1. Changes in catch (red line) and cultured production (blue) of fugu species in Japan. This graph was made based on Statistics by Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan.

```

Program A
$a = AGCT;
open(FILE, "scaffold_X.txt" ) or die "$!" ;
@file = <FILE>
close(FILE);
chomp(@file);
$file = join( ' ', @file);
while($file = ~/([a][a])\1{4,}/g){
print "$&\n" ;
}

```

```

Program B
$a = AGCTagct;
open(FILE, "file.txt" ) or die "$!" ;
@file = <FILE>
close(FILE);
chomp(@file);
$file = join( ' ', @file);
while($file = ~
/>scaffold_\d+|. {75}([a][a])\1{22, }. {75}/g){
print "$&\n" ;
}

```

```

Program C
$a = AGCTagct;
open(FILE, "file.txt" ) or die "$!" ;
@file = <FILE>
close(FILE);
chomp(@file);
$file = join( ' ', @file);
while($file = ~
/>scaffold_\d+|. {75}([a][a][a])\1{14, }. {75}/g){
print "$&\n" ;
}

```

```

Program D
$a = AGCTagct;
open(FILE, "file.txt" ) or die "$!" ;
@file = <FILE>
close(FILE);
chomp(@file);
$file = join( ' ', @file);
while($file = ~
/>scaffold_\d+|. {75}([a][a][a][a])\1{14, }. {75}/
g){
print "$&\n" ;
}

```

```

Program E
$a = AGCTagct;
open(FILE, "file.txt" ) or die "$!" ;
@file = <FILE>
close(FILE);
chomp(@file);
$file = join( ' ', @file);
while($file = ~
/>scaffold_\d+|. {75}([a][a][a][a][a])\1{5,
}. {75}/g){
print "$&\n" ;
}

```

Fig. 1-1. Program scripts used for extraction of microsatellite loci from the pufferfish *Takifugu rubripes*. In Program A, nucleotide sequence data should be downloaded and saved as a file name 'scaffold_X.txt' for each scaffold. The scaffold number should be input to 'X' in this sentence and program script. In Programs B, C, D and E, nucleotide sequence data should be ordered and saved in FASTA format, and corresponding file names should be input at the underlined file name in the program scripts. Programs A to E are written in the script language Perl.

Fig. 1-2. Partial sequences containing microsatellite loci of the pufferfish *Takifugu rubripes* and their flanking regions extracted by a computer program shown in Figure 1-1, program B.

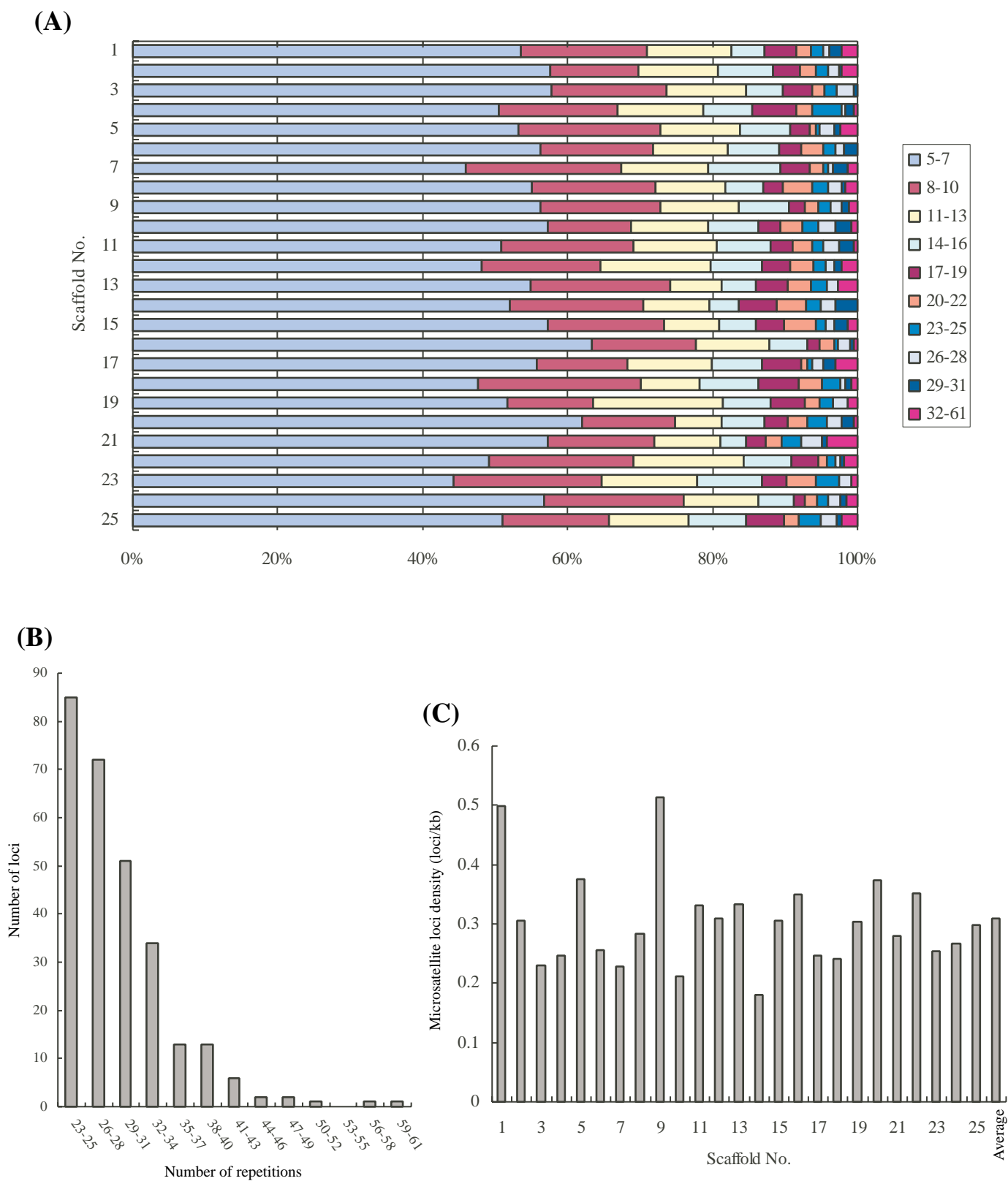


Fig. 1-3. Bar charts showing the ratio of microsatellite loci grouped by their number of repetitions for the pufferfish *Takifugu rubripes* genome database v3.0. Bar charts represent total distribution (A), the numbers of microsatellite loci containing 23 or more repeats (B), and microsatellite loci density (C). Microsatellite loci density was calculated by the following formula: [the number of microsatellite loci extracted by the search] / [scaffold length (kb)].

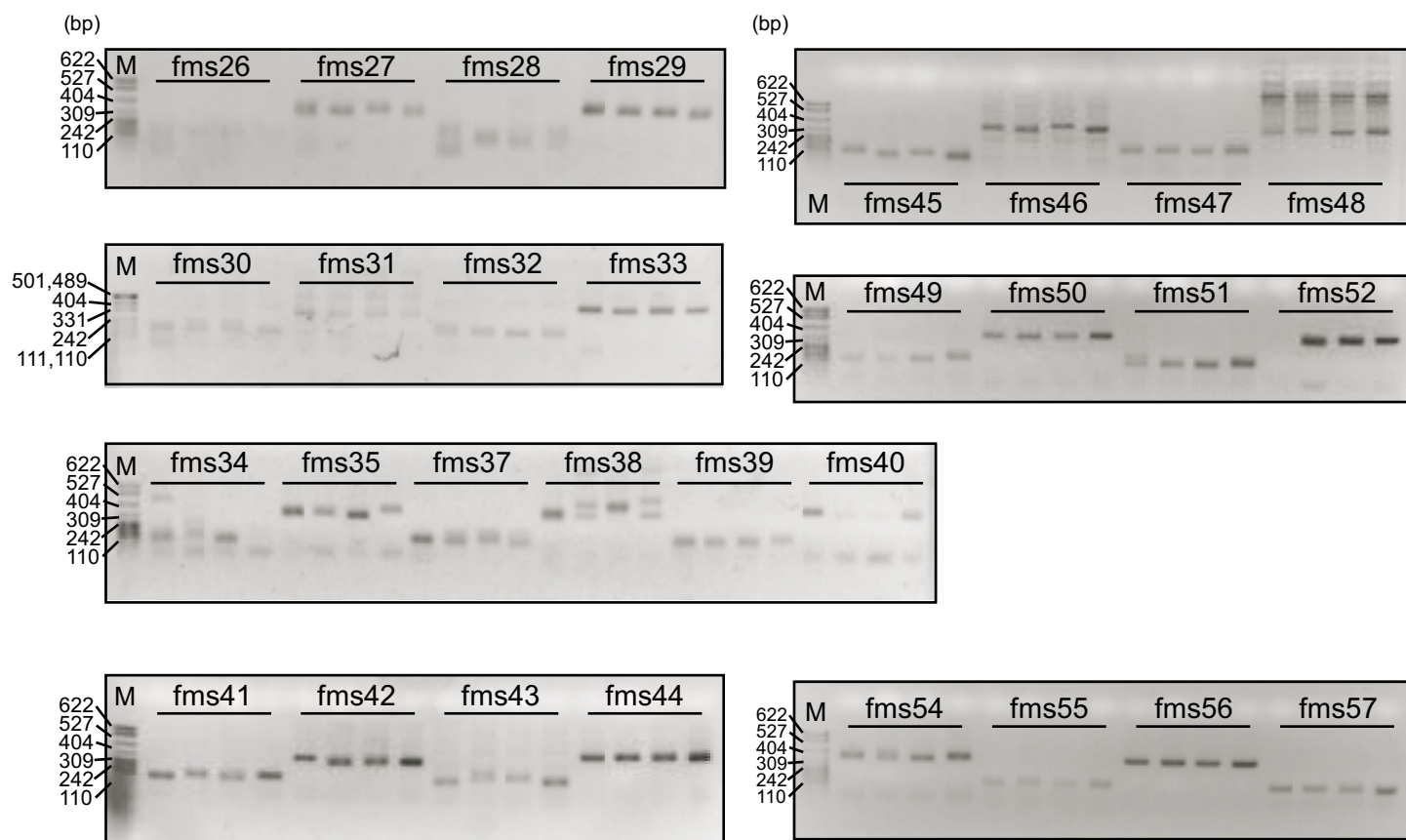


Fig. 1-4. Agarose gel electrophoresis patterns of PCR products from the pufferfish *Takifugu rubripes*. M, Marker.

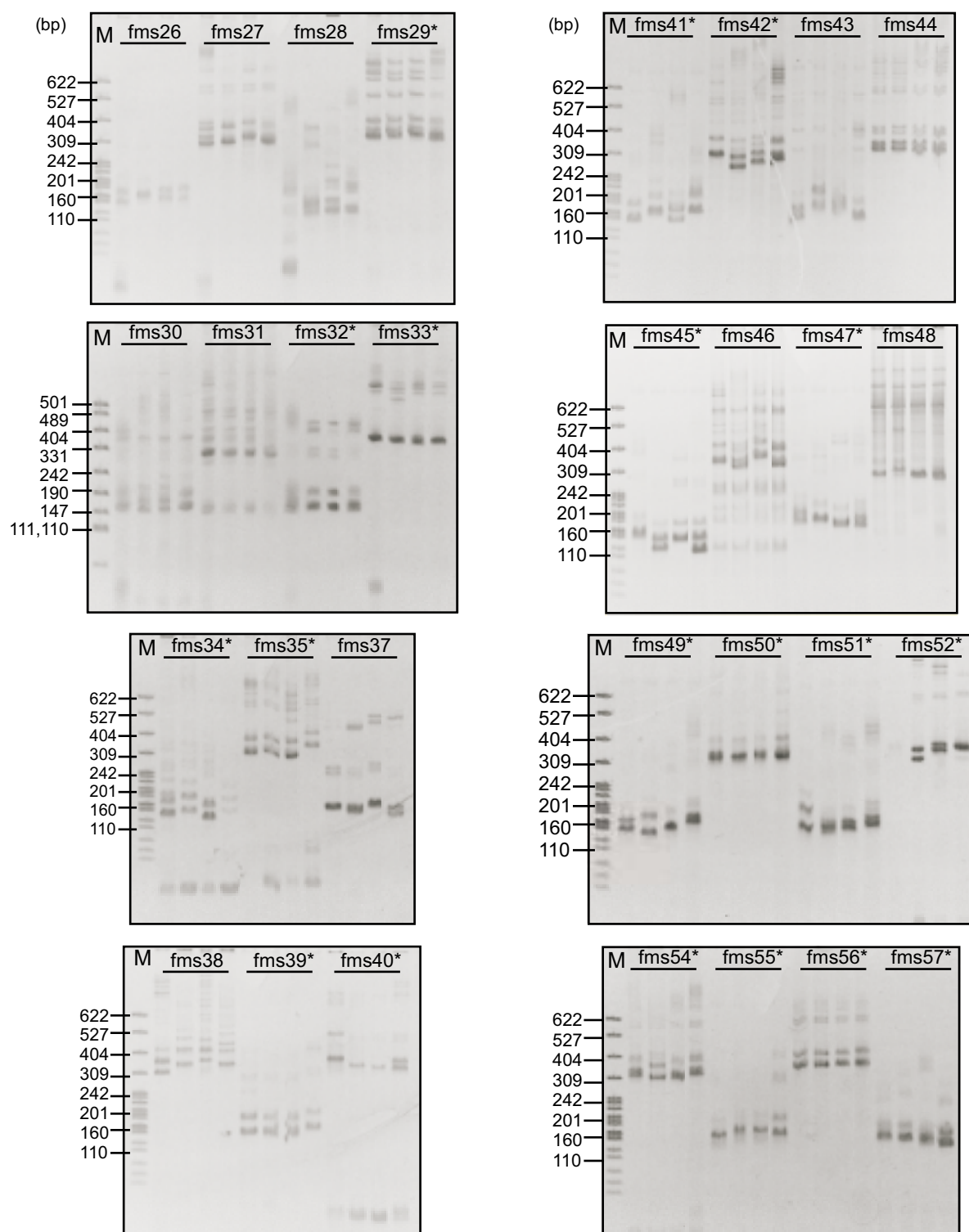


Fig. 1-5. Polyacrylamide gel electrophoresis patterns of PCR products from the pufferfish *Takifugu rubripes*. Microsatellite loci marked with asterisks are supposed to be properly amplified. M, Marker.

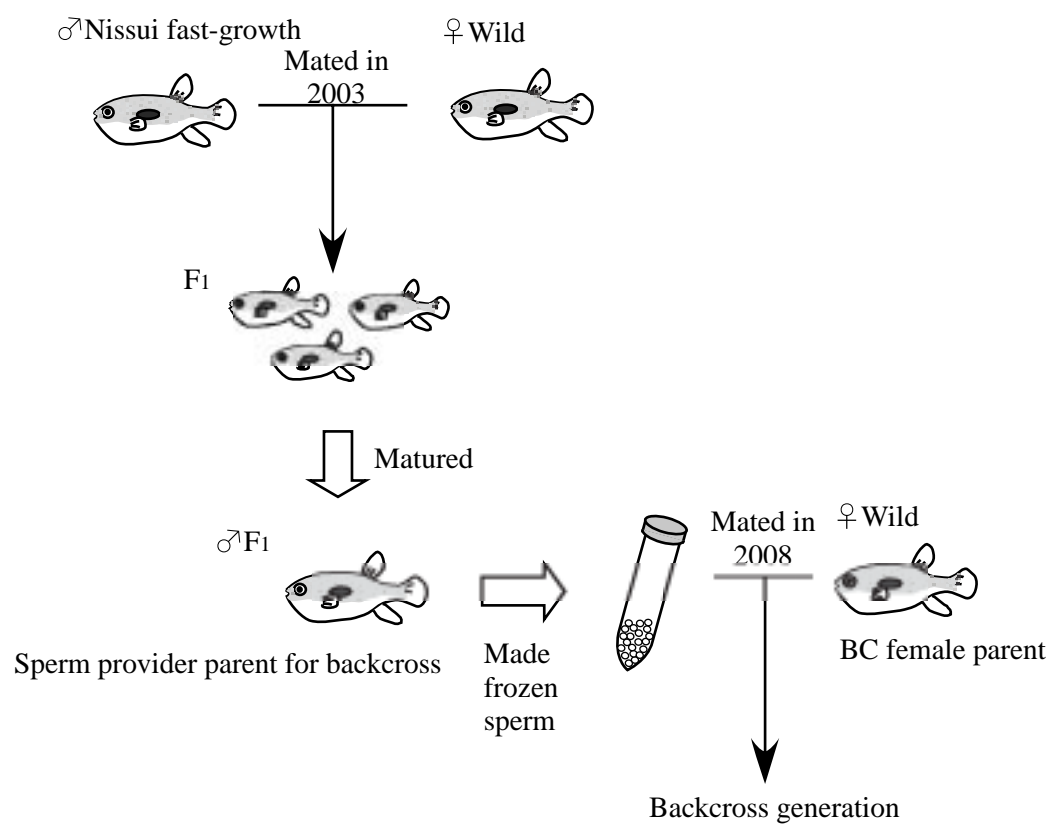


Fig. 2-1. Generated pedigree used for this study by artificial fertilization.

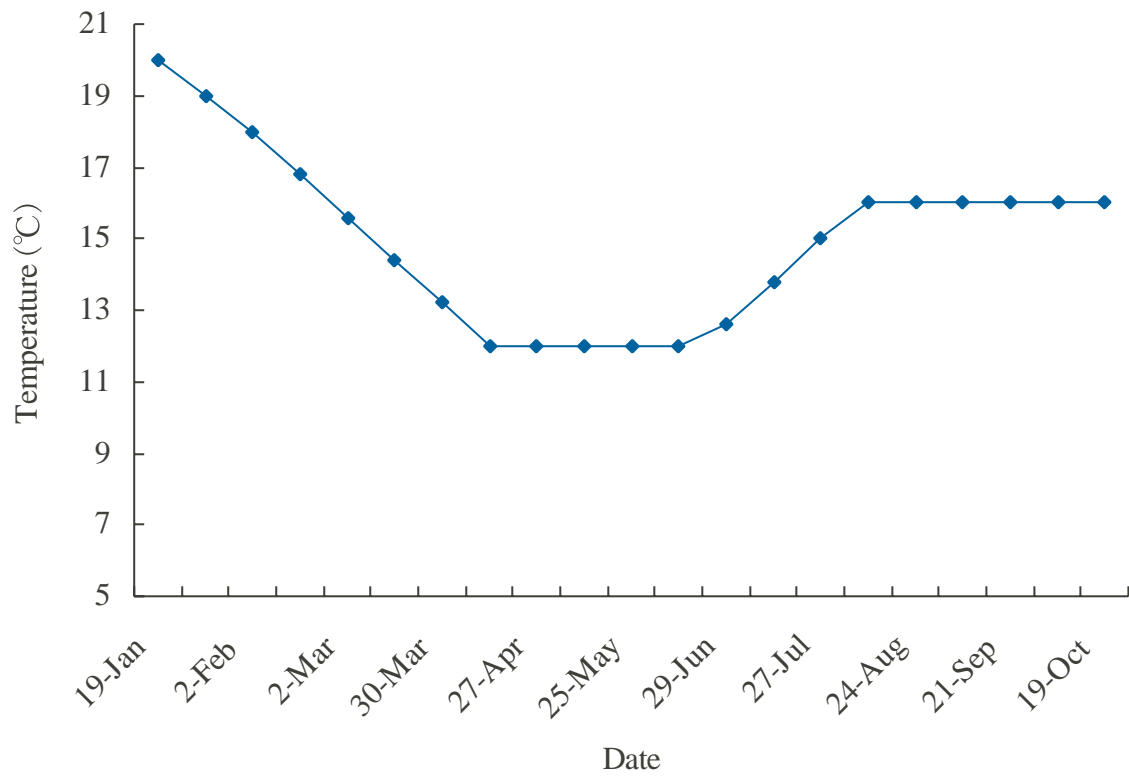
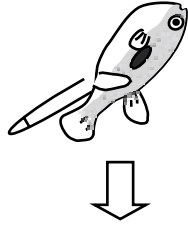
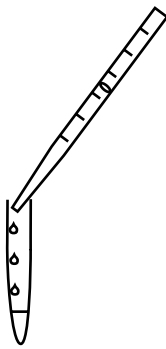


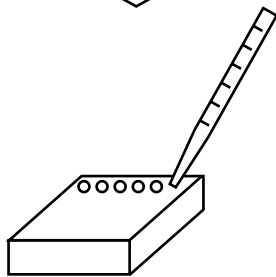
Fig. 2-2. Temperature profile of fugu breeding tank for sexual maturation of the pufferfish *Takifugu rubripes*. This procedure was conducted in 2007.



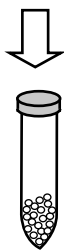
1. Anesthetize fish with 2-phenoxyethanol.
2. Take the fish out of the water and wipe out the sea water to prevent sperm from touching sea water.
3. Collect sperm in Falcon tube by pushing the lower abdomen of the fish.



4. Add Ringer's solution containing dimethyl sulfoxide (DMSO) to the sperm collected at the ratio of Ringer : sperm = 3 : 1.
Composition of Ringer's solution: DMSO 10% (v/v), 141 mM NaCl, 5.23 mM KCl, 1.13 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.79 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 11.9 mM NaHCO_3 0.1%, 5.55 mM Glucose, 4.90 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.



5. Instill the solution by 50 μL on dry ice using automatic dispenser, and freeze them in pellet form.



6. Collect the pellets in the Falcon tube, and store in liquid nitrogen.

Fig. 2-3. Methods for collecting sperm from fish and freezing sperm by the pellet method.

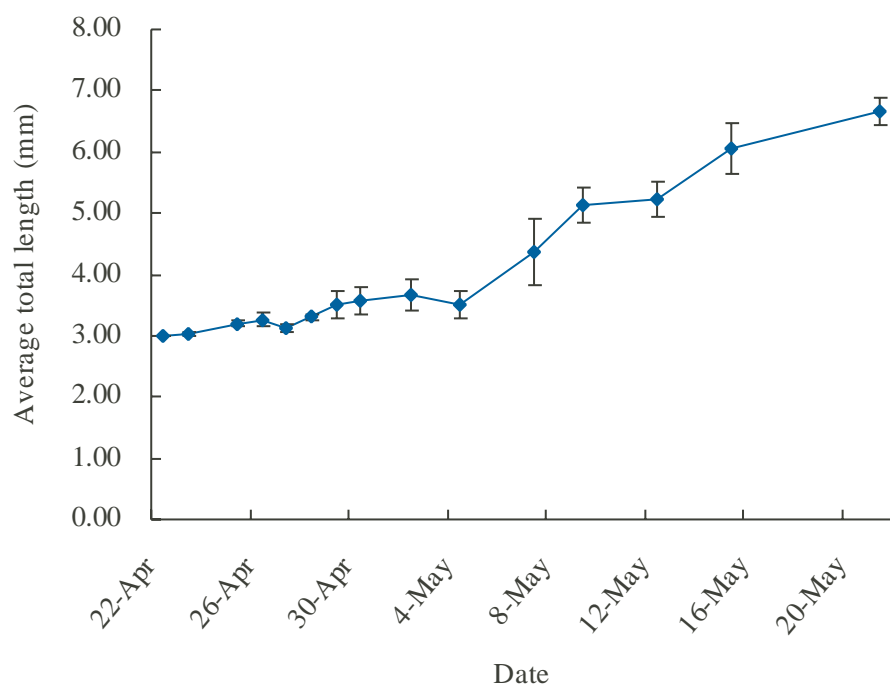


Fig. 2-4. Average total body length of BC generation larvae of the pufferfish *Takifugu rubripes* hatched in April 19, 2008. Total length was measured for 3 individuals, and means \pm standard errors are represented.

A

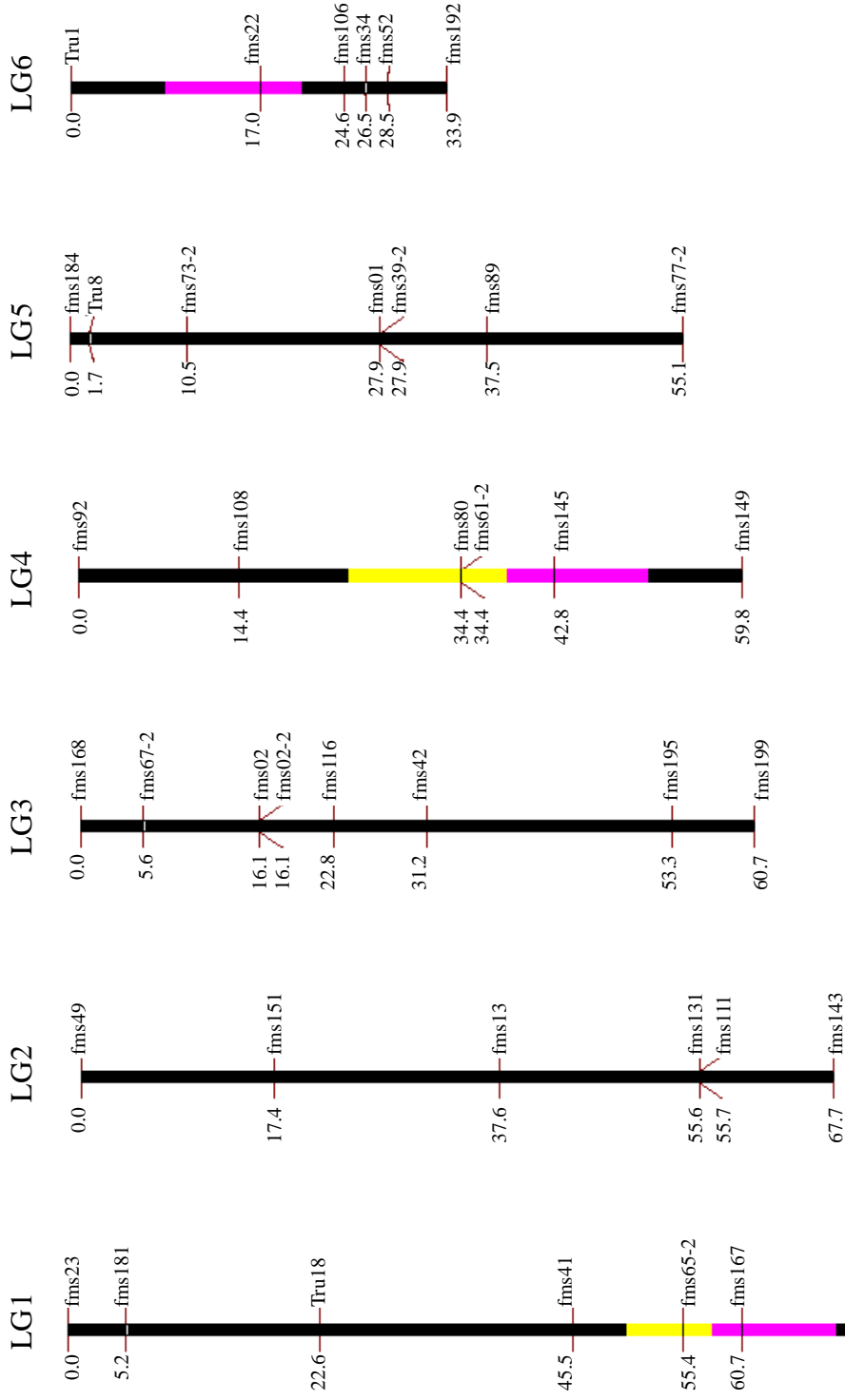
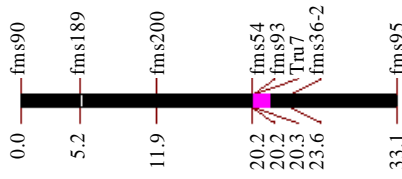


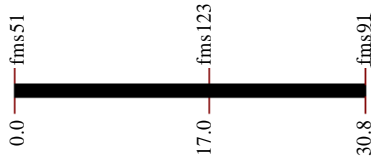
Fig. 3-1 Female (A) and male (B) linkage map of the pufferfish *Takifugu rubripes*. Genetic distance (in cM) between markers is shown on left side of linkage group. Pink and yellow regions indicate areas where linkage disequilibrium was observed ($P < 0.01$ and 0.05 , respectively).

A (continued)

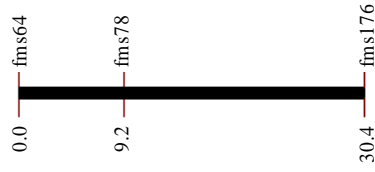
LG7



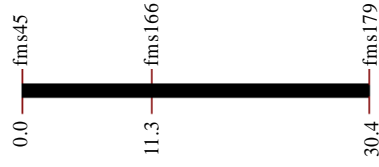
LG8



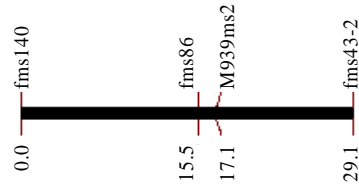
LG9



LG10



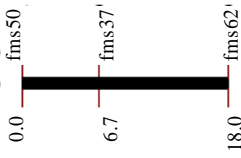
LG11



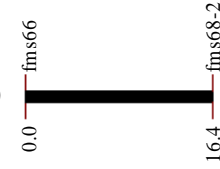
LG12



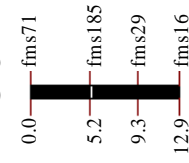
LG13



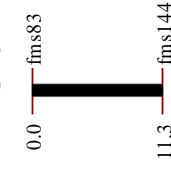
LG14



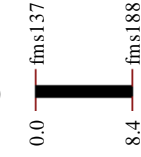
LG15



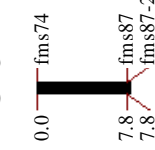
LG16



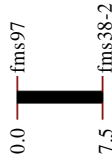
LG17



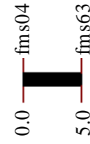
LG18



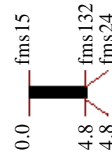
LG19



LG20



LG21



LG22

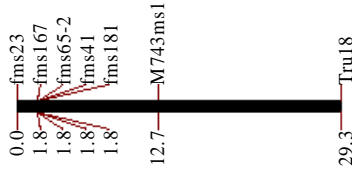


LG23



B

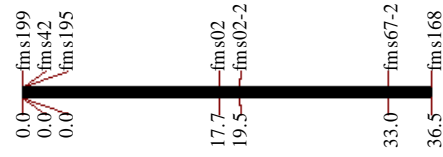
LG1



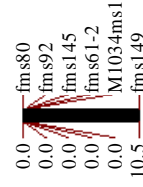
LG2



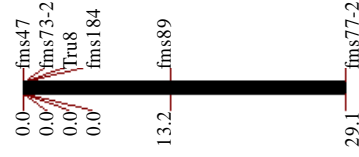
LG3



LG4



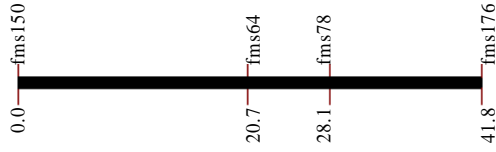
LG5



LG7



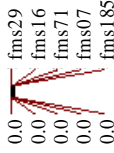
LG9



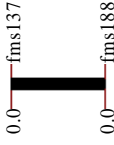
LG11



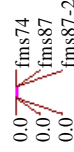
LG15



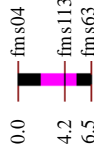
LG17



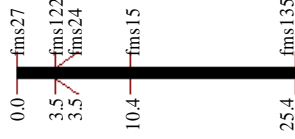
LG18



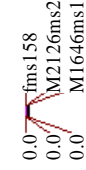
LG20



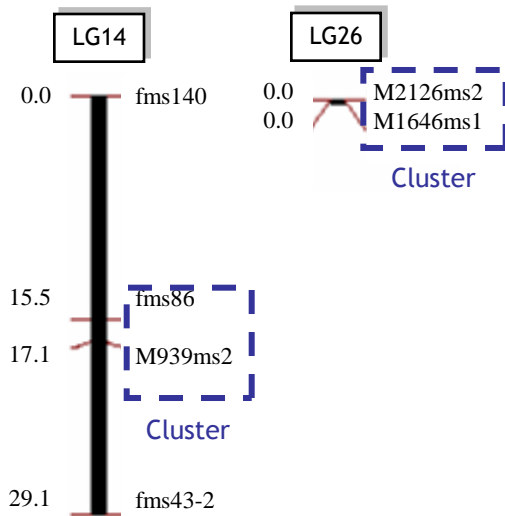
LG21



LG23



Female



Male

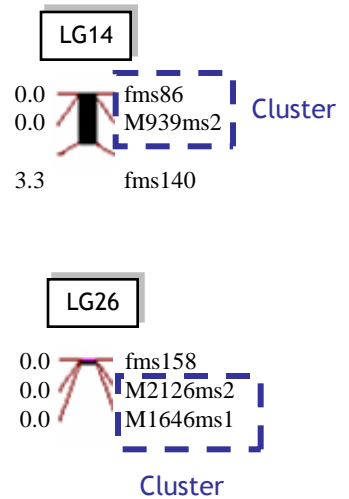
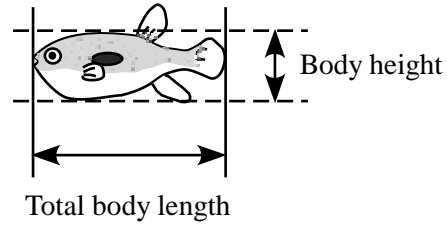


Fig. 3-2. Enlarged figure for linkage groups which contain clusters of myosin heavy chain genes of the pufferfish *Takifugu rubripes*.

(A)



(B)

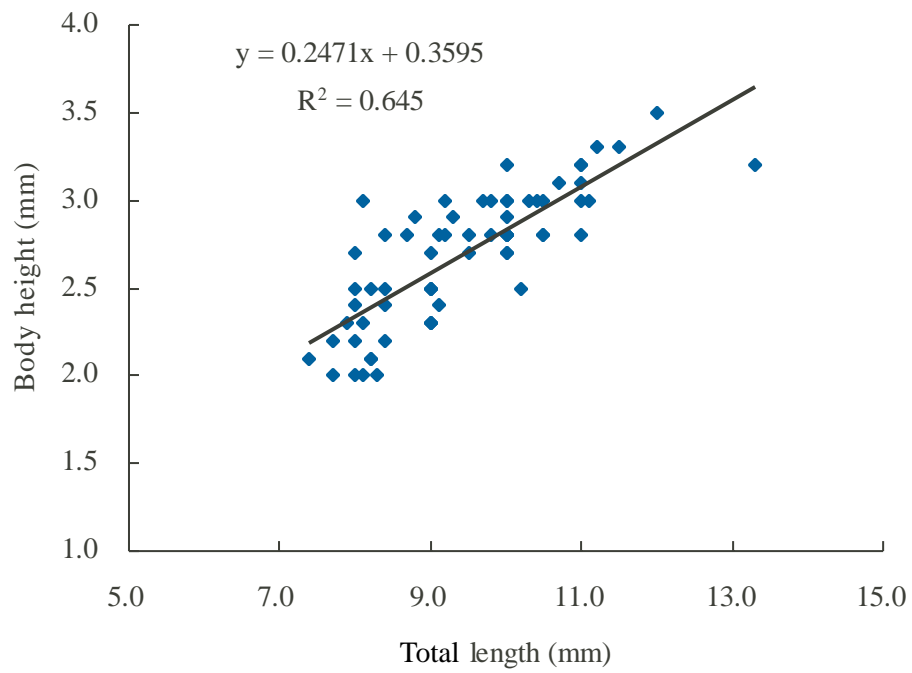


Fig. 3-3. Growth process of backcross generation larvae of the pufferfish *Takifugu rubripes*. (A) Definition of total length and body height. (B) Relationship between total body length and body height of larvae at 38 days after hatching.

ATATTGAGATGTGACATTGCCCGCATCTCATCTCTTTCTCCCCGATTTTAAATGACTTC	
AAACAAGTTCATTTTCGCCGGGTTTTGTCTTGCGGAGACCCGTGGGG	107
ATG TCT AGC GCT CTT TCC TTT CAG TGG CAT TTA TGT GAT GTC TTC	152
M S S A L S F Q W H L C D V F	15
AAG AGT GCA ATG TGC TGT ATC TCC TGT AGC CAC ACC CTC TCG CTA	197
K S A M T C I S C S H A T S L	30
CTG CTG TGC ATC CTC ACC CTG ACT CCG ACG GGA ACA GGG GCG GGC	242
L L C I L T L T F T G A T G G A G	45
CCA GAG ACC CTG TGC GGG GCG GAG CTG GTC GAC ACG CTG CAG TTT	287
P E T L C G G A E L V D T L Q F	60
GTA TGT GGA GAG AGA GGC TTT TAT TTC AGT AAA CCA ACA GGC TAT	332
V C G E R G F Y F S K P T G Y	75
GGC ACC AAC GCA CGG CGC TCA CGC GGC ATC GTG GAA GAG TGC TGC	377
G T N A R S R G I V E C C	90
TTC CAA AGC TGC GAC CTG TGG CGT CTG GAG ATG TAC TGC GCT CCC	422
F Q S C D L W R L E M Y C A P	105
GCC AAG ACG AAC AAG CCC CGC ACG CAG CGC CAC ACA GAC AAG ACG	467
A K T N A P R T Q R H T D K T	120
AGA GCG CCT AAG GCC GGT GGC ACA GGG CAC AAA GCG GAC AAG GGC	512
R A P K A G G T G A H K A D K G	135
GCG GAG CGC GGG GCG GCA CAG CAG CCA GAT AAG G ACA AAA AAC AAA	557
A E R G A A Q P D K T A K N K	150
AGG AGA CCT TTA TCT GGA CAT AGT CAT TCA TCC TTC AAG GAA GTG	602
R R P L S G H S H S S F K E V	165
CAT CAG AAA AAC TCA AGT CGA GGC AAT GCG GGT GGC AGA AAT TAC	647
H Q K N S S R G N A G G G A R N Y	180
AGA ATG TAG	656
R M *	182
GCGAGGAGCGAATGGACAAATGCCAGCGACTTGAGAGGAGAGAAGGGAGTGGCCTTACC	716
TGGTACCCTGTGGAATGGTTCACCTGTAAAACAAAAGGCTAACAATGCCCCGAAAAGCTC	776
TTCACAATGATTGAAACAGGAGAGCTACCTATTGTTT-AAGCGTTTGATGAGGGATCTTGT	836
TATTATTTTATACACTGCACCATTCATACTGGGAGGAATCTTTGTTAATGCAATGTAA	896
AAGACTAGCTTAGCTGCTGAGACACAAACAAGAGCTTAATGTCACCTCCATATGGGGGG	956
CTGCAGCAGGGGGCTCCAGGTGGGACAAATCCATCTGGGTGTAGCCAATCAGAGAGCTG	1016
CAAGCTGGCTTTGCAAACTAATGGTCCACCTTGTTCCCTTGAGGTTTGTGGAGGTATCAGC	1076
CCTTTGACCCCGAGTGGAGTCATTATGCTCCTTCGCTAGGACAGGATGTTCTGTCAGAG	1136
TCGCGCATAACAGTAAAAATTAACTCGTTTTTATGCTTTATATCCCTTCATTGACTGAG	1196
TGCAGCATCGGT-CATCTATTCGGAGTCCTTAAAGGTTTGAGTCCAACCTCAAATCCCCC	1256
TGAGCTTGAGGAAGTGTGGGGCCCTGAGGTCTAAGTCTAAAAGCCATAGACTTCTCAAA	1316
CGACATATCAGAGCCGATTAGAAGGAACAGCAAGTCCCGCAGAACACGCTTTCTCCTGT	1376
TTTCTAAACAGGGAGTCCAATAAACCAGAACTAGGCTGAATTATTGCATTTGGCCAGG	1436
CAGCACATGGTACGTGTGCGGTTGTCAGAAGTGGGTCACTCAGCGGACTCAAAGTGCATT	1496
TGGCTGGAGGGGTAGAGACAAATCAAACAGTCCCAATCAGGCAAGATGTTTGTGCTCTGC	1556
ATCGTTTTTCACATGGCACCACCGCGGCCAAATTAGATTTTTGTCAACAGTCCAGTGGCG	1616
GTGATTGAGCTCAGATTTGAGCGGAGGGCCACGTTCAAGGTTGGCCACTAGTTGTGAAA	1676
GTTTAGCCACAGCAAGTCAACAAGCGCTTTACAGGCCACCCATTGGCGAGTATCAGCTCG	1736
GGTTAAACGTTGCTATCACGGCCACAATAACATGTCCGCTAGATATCAGCTTTAATGA	1796
CCTCGGTTTGTCTTCTGGTCAGTTTAAGATGCCCAAGATTGCTCCTACATCTGGTGG	1856
CTTACCACGCCATTACGGTTCGTGGCGCGTGGTCCGAAGACCACCCAAAACACATGCGG	1916
ACTCCGCGCTGCCGTCATGCCCTCGACCAAATGGCAGGTCCCTGCGGAGACCCGAAAT	1976
AGGGCATGCATGTAACAGTACACAAGCACACATGCAAGGCAACAGCGTGAATGAGAGTT	2036
GTGTAACCGCGAGCAAGGATCAAGCACACATCAACAGTTCTGAGAAGCCCTGGCATGAGG	2096
GCTGGCAGTCACGACTGTTTGTCTGGCTTCCGTGTTGATTTACAATCATTTTATCCAC	2156
GATCATCCCGAGACATCTCATCTCTATCTCTGCTCTCTCTCTGTGTATAACCAAACAA	2216
TATTTCCATTTTATGTTAACCTTTGCATTACTATCATTCATTGTACACGATGGTTTCATAT	2276
AGCCAACTCTATTAAGAATCCTATCCACTGTATAATGGTGCTATTTTGTAGTTTGTTA	2336
TTGCAAGCGATGGCTAAGATGGACAGATGGCAGGGCTTACATTGGAGGTCTTCCCTTTTG	2396
CACAGCCTTGTGGCCACCATTTTAAATAGTATTTTTTATTTGTAAGCTGTTTCAGTAACAT	2456
AGGTACAGTAAGTGAGTATCTGTGTGAAATCTGTGAATGCATGGAGTTTAACAAAAAA	2516
AAAAAAAAAAAAAAAA	2533

Fig. 4-1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of cDNA encoding IGF-1 of the pufferfish *Takifugu rubripes*. The regions without amino acid sequences indicate untranslated regions (UTR). Polyadenylation signal is underlined. Red letters indicate nucleotide positions where variation is observed compared with the Fugu genome database v4.0, and the letters above or below indicate an amino acid or nucleotides in the sequence of the database.

GTCGCCTGGTTTGGGACAGCCTCTCATAACATCATCTCTGTAGCCGCATCAACTGGGAAAC		
TAACTTACCTGCAACCCCTCCGACCAAATCTCACCCCCATCGTTGTGACTACTGCCAGC	124	
TGAC		
ATG GAG ACC CAG CAC AGA AAC GCA GCC CCT TCG TTT TGC CAC ACC	169	
M E T Q H R N A A P S F C H T	15	
TGC CGG AGA ACG GAG ATC AGC ATA ATG AAG GTC AAA AAG ATG TCC	214	
C R R T E I S I M K V K K M S	30	
TCG TCC AGC CAC GCG CTG CTC TTT GCG CTG GCT CTG ACG CTC TAC	259	
S S S H A L L F A L A L T L Y	45	
GTT GTG GAA GTA ACC TCG ATA GAG ACG CTG TGT GGG GGT GAG CTG	304	
V V E V T S I E T L C G G E L	60	
GTG GAC GCG CTG CAG TTC GTC TGC GAG GAC AGG GGC TTC TAT TTC	349	
V D A L Q F V C E D R G F Y F	75	
AGT AGG CCA ACC AGC AGG GGC AGC AGC CGG CGC ACC CAG AAC CGT	394	
S R P T S R G S S R R T Q N R	90	
GGG ATC GTA GAG GAG TGT TGT TTC CGT AGC TGT GAC CTC AAA CTG	439	
G I V E E C C F R S C D L K L	105	
ATG GAG CAG TAC TGT GCC AAA CCC GCC AAG TCT GAA AGG GAC GTG	484	
M E Q Y C A K P A K S E R D V	120	
TCG GCC ACC TCC ^T CTG CAG GTC ATC CCC GTG ATG CCC GCG GTG AAA	529	
S A T S L Q V I P V M P A V K	135	
CAG GAA ^G TCC ^F CCG AGG AAG CAG CAT GTG ACC GTG AAG CAT TCC AAA	574	
Q E ^V P R K Q H V T V K H S K	150	
TAC GAG GTG TGG CAG AGG AAG GCG GCC CAG CGG CTC CGG AGG GGT	619	
Y E V W Q R K A A Q R L R R G	165	
GTC CCC GCC ATT CTG AGG GCC AAA AAG TTC AGA AGG CAA GCG GAG	664	
V P A I L R A K K F R R Q A E	180	
AAG ATC AAA GCG CAG GAG CAG ACC GTC TTC CAC AGG CCC CTG ATC	709	
K I K A Q E Q T V F H R P L I	195	
AGC CTG CCC AGC AAA CTG CCC CCT GTT TTG <u>CTC ACC ACG GAC AGC</u>	754	
S L P S K L P P V L <u>L T T D S</u>	210	
<u>TAC ATC</u> (AAC CAC AAA TGA)	760 (772)	
<u>Y I</u> (N H K *)	212 (215)	

Fig. 4-2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of cDNA encoding IGF-2 of the pufferfish *Takifugu rubripes*. The region without amino acid sequence indicates an untranslated region. The sequence in parenthesis is supplemented by Fugu genome database. Primer sequence is underlined. Red letters indicate nucleotide or amino acid positions where variation is observed compared with the Fugu genome database v4.0, and the letters above or below indicate an amino acid or nucleotides in the database.

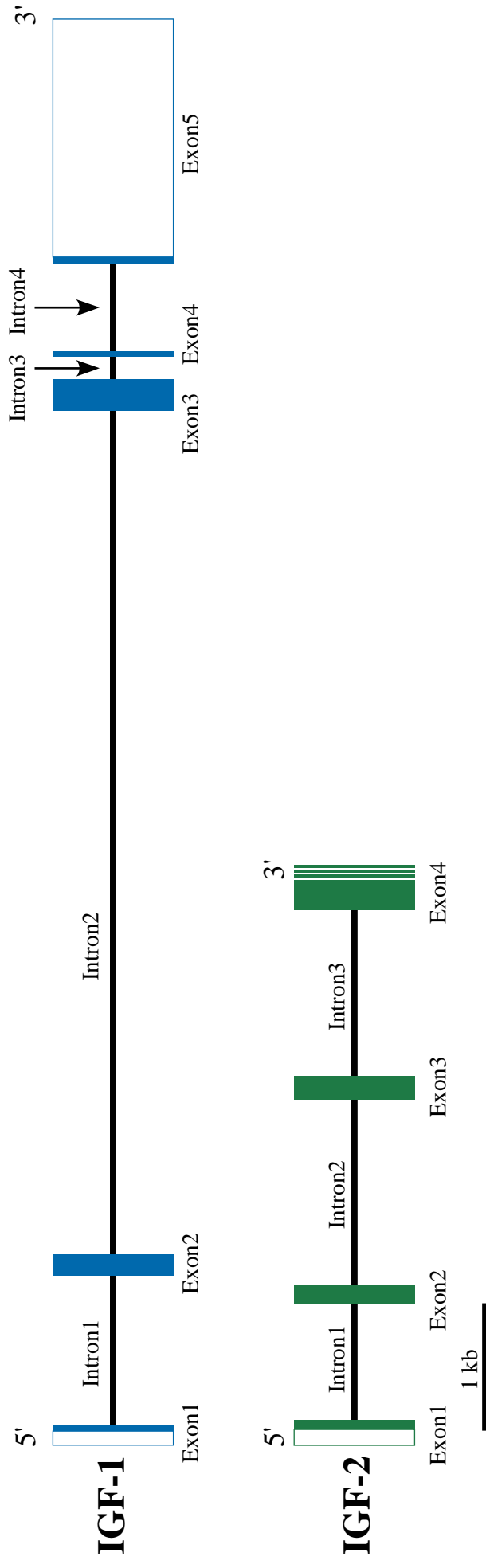


Fig. 4-4. Exon-intron structures of IGF-1 and IGF-2 from the pufferfish *Takifugu rubripes*. Exons are represented by filled boxes (translated regions) or open boxes (untranslated regions) and introns by solid lines. 3' end of exon4 in IGF-2 is unknown, which is indicated by dashed line.

F1	TTATCAGCTCCACTTGCTCTCTTTGCACAGCATCCTGGATTAGTTTTAAACGGCGAAATG	60
W1	TTATCAGCTCCACTTGCTCTCTTTGCACAGCATCCTGGATTAGTTTTAAACGGCGAAATG	60
W2	TTATCAGCTCCACTTGCTCTCTTTGCACAGCATCCTGGATTAGTTTTAAACGGCGAAATG	60
H1	TTATCAGCTCCACTTGCTCTCTTTGCACAGCATCCTGGATTAGTTTTAAACGGCGAAATG	60
Database	TTATCAGCTCCACTTGCTCTCTTTGCACAGCATCCTGGATTAGTTTTAAACGGCGAAATG	60

F1	AAAGCGCATTACACAGCTTTTATTCATAATTGACAGCCTTTGCATGCGCGACCAAATGATT	120
W1	AAAGCGCATTACACAGCTTTTATTCATAATTGACAGCCTTTGCATGCGCGACCAAATGATT	120
W2	AAAGCGCATTACACAGCTTTTATTCATAATTGACAGCCTTTGCATGCGCGACCAAATGATT	120
H1	AAAGCGCATTACACAGCTTTTATTCATAATTGACAGCCTTTGCATGCGCGACCAAATGATT	120
Database	AAAGCGCATTACACAGCTTTTATTCATAATTGACAGCCTTTGCATGCGCGACCAAATGATT	120

F1	TATACAGATTTTAAACAGTTTGATCTGGTGGTGAATAATTGCTCTGCATGTCCTGGTGATT	180
W1	TATACAGATTTTAAACAGTTTGATCTGGTGGTGAATAATTGCTCTGCATGTCCTGGTGATT	180
W2	TATACAGATTTTAAACAGTTTGATCTGGTGGTGAATAATTGCTCTGCATGTCCTGGTGATT	180
H1	TATACAGATTTTAAACAGTTTGATCTGGTGGTGAATAATTGCTCTGCATGTCCTGGTGATT	180
Database	TATACAGATTTTAAACAGTTTGATCTGGTGGTGAATAATTGCTCTGCATGTCCTGGTGATT	180

F1	TCTCTATTTAGCTAATAGCAGAAAGATGCTCTCTCGACGGTTTTAGGGGACTTTTCTTTT	240
W1	TCTCTATTTAGCTAATAGCAGAAAGATGCTCTCTCGACGGTTTTAGGGGACTTTTCTTTT	240
W2	TCTCTATTTAGCTAATAGCAGAAAGATGCTCTCTCGACGGTTTTAGGGGACTTTTCTTTT	240
H1	TCTCTATTTAGCTAATAGCAGAAAGATGCTCTCTCGACGGTTTTAGGGGACTTTTCTTTT	240
Database	TCTCTATTTAGCTAATAGCAGAAAGATGCTCTCTCGACGGTTTTAGGGGACTTTTCTTTT	240

F1	GGGAAGTCCTGAATCGTGCGTGACTTTGACGGTTTTCCATCCTCGGAGTTTGCGCGCTCT	300
W1	GGGAAGTCCTGAATCGTGCGTGACTTTGACGGTTTTCCATCCTCGGAGTTTGCGCGCTCT	300
W2	GGGAAGTCCTGAATCGTGCGTGACTTTGACGGTTTTCCATCCTCGGAGTTTGCGCGCTCT	300
H1	GGGAAGTCCTGAATCGTGCGTGACTTTGACGGTTTTCCATCCTCGGAGTTTGCGCGCTCT	300
Database	GGGAAGTCCTGAATCGTGCGTGACTTTGACGGTTTTCCATCCTCGGAGTTTGCGCGCTCT	300

F1	GCGCTCTTTTTCAACAGAAAGTCCAAGTGTGAGAGCCATTACTGCTGAGTCTGCAATATT	360
W1	GCGCTCTTTTTCAACAGAAAGTCCAAGTGTGAGAGCCATTACTGCTGAGTCTGCAATATT	360
W2	GCGCTCTTTTTCAACAGAAAGTCCAAGTGTGAGAGCCATTACTGCTGAGTCTGCAATATT	360
H1	GCGCTCTTTTTCAACAGAAAGTCCAAGTGTGAGAGCCATTACTGCTGAGTCTGCAATATT	360
Database	GCGCTCTTTTTCAACAGAAAGTCCAAGTGTGAGAGCCATTACTGCTGAGTCTGCAATATT	360

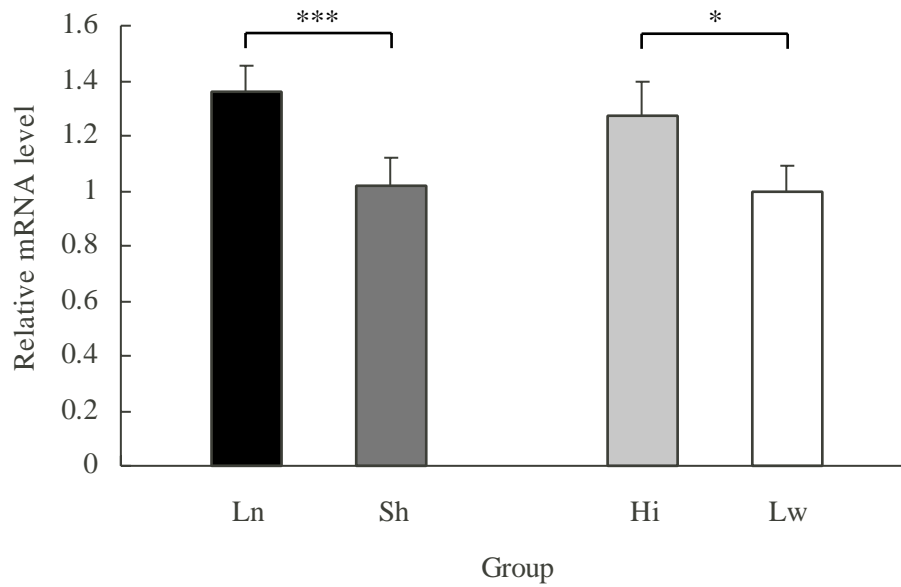
F1	TAGGGCTTAAATGTCTAAACCAAGGCTGTGGGCCGATGGGAGCCCGGGATGAAATGCGTG	420
W1	TAGGGCTTAAATGTCTAAACCAAGGCTGTGGGCCGATGGGAGCCCGGGATGAAATGCGTG	420
W2	TAGGGCTTAAATGTCTAAACCAAGGCTGTGGGCCGATGGGAGCCCGGGATGAAATGCGTG	420
H1	TAGGGCTTAAATGTCTAAACCAAGGCTGTGGGCCGATGGGAGCCCGGGATGAAATGCGTG	420
Database	TAGGGCTTAAATGTCTAAACCAAGGCTGTGGGCCGATGGGAGCCCGGGATGAAATGCGTG	420

F1	TATCGGCACCGTGCGCTGGAGCTTCTACTGCAGATGGAGAGGGTCCTGCGTTTCTTCTTT	480
W1	TATCGGCACCGTGCGCTGGAGCTTCTACTGCAGATGGAGAGGGTCCTGCGTTTCTTCTTT	480
W2	TATCGGCACCGTGCGCTGGAGCTTCTACTGCAGATGGAGAGGGTCCTGCGTTTCTTCTTT	480
H1	TATCGGCACCGTGCGCTGGAGCTTCTACTGCAGATGGAGAGGGTCCTGCGTTTCTTCTTT	480
Database	TATCGGCACCGTGCGCTGGAGCTTCTACTGCAGATGGAGAGGGTCCTGCGTTTCTTCTTT	480

F1	TTTTGCGTATTTG	493
W1	TTTTGCGTATTTG	493
W2	TTTTGCGTATTTG	493
H1	TTTTGCGTATTTG	493
Database	TTTTGCGTATTTG	493

Fig. 4-5. Alignment of a partial nucleotide sequence of IGF-1 intron1 derived from 4 fish and genome database. Asterisks are placed below nucleotides that are identical in 5 sequences. No nucleotide variation is observed. F, fast-growth male; W1, female in P generation; W2, female parent for backcross; H1, sperm provider parent for backcross (see Fig. 2-1).

(A) IGF-1



(B) IGF-2

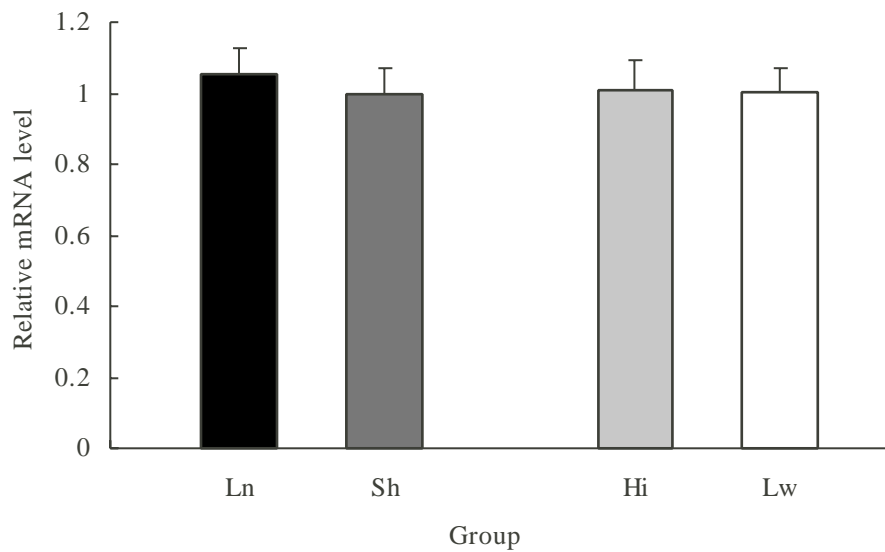


Fig. 4-6. Differences in IGF-1 (A) and IGF-2 (B) mRNA expression levels among four groups of the pufferfish *Takifugu rubripes*. Groups Ln, Sh, Hi and Lw consist of 10 individuals each of the longest, shortest, highest and lowest 10 individuals in the backcross population, respectively. The relative mRNA levels were determined using those of the β -actin gene as the internal control. Bars represent means \pm SD. Student's *t*-test was employed for statical comparison (* $P < 0.05$, *** $P < 0.005$).

Appendix 1. Profiles of primers used for amplifying microsatellite loci

Name	Sequence (5'-3')	Length	Tm	GC	Secondary structure	Primer dimer
fms01F	AGCCTTGAAGAAGCTCTGCC	20	64.88	55.00%	Weak	NO
fms01R	GCTTCTGTGTCCCGAGAATG	20	64.75	55.00%	Weak	NO
fms02F	GTGCAGGACTACGATACTCAGGA	25	67.30	52.00%	Weak	NO
fms02R	ACTTCTCTGACTGCTGGGTC	20	61.05	55.00%	Weak	NO
fms02-2F	AACGCACATGCTCTCTCTCA	20	63.84	50.00%	None	NO
fms02-2R	GATCCTCGGTGAGAAACCTC	20	62.58	55.00%	Weak	NO
fms03F	TGCCTTGCGCTGAAGTTTCA	20	69.14	50.00%	Very weak	NO
fms03R	GAGTCCTTGAAAACAGCATCA	20	60.42	45.00%	Very weak	NO
fms04F	GGAACCGCAAAGTGAACAGA	20	65.10	50.00%	None	NO
fms04R	AAGACGTAATAATGGCCCGC	20	64.67	50.00%	None	NO
fms05F	TTCCACCAGCCGACACATGA	20	70.17	55.00%	None	NO
fms05R	GAGATTCTGCACCCACCTG	20	66.96	60.00%	None	NO
fms05-2F	CCAAACCTCCAGTCAAAGACAC	23	67.70	52.17%	Weak	NO
fms05-2R	AAGTGCTGCCAGGCATTTAC	20	63.99	50.00%	Weak	NO
fms06F	GCCTAAAGTGATCTCTGCTC	20	58.17	50.00%	None	NO
fms06R	CAGCCTTCCCAACTATCTTC	20	60.23	50.00%	None	NO
fms07F	TGCGTGCTCTTGGAATTTGG	20	66.12	50.00%	None	NO
fms07R	CAGCCTCTCTGTTCTGTAGG	20	59.18	55.00%	Weak	NO
fms08F	GGCAGGGGAAAGGAATTTGTATGTC	25	69.71	48.00%	None	NO
fms08R	AAGTATCTGTCAGCAGGATG	20	56.78	45.00%	Weak	NO
fms09F	TGTGTTAATTCATTGGGAGG	20	59.79	40.00%	None	NO
fms09R	GTTGTGCAACTGCATCGTAT	20	61.19	45.00%	Weak	NO
fms10F	GGCATCACACATCACCCTCT	20	65.09	55.00%	None	NO
fms10R	CACAAAGTTGACAATACTGG	20	55.50	40.00%	Very weak	NO
fms11F	AGCTGTTGATCGTGAGGGAA	20	64.75	50.00%	None	NO
fms11R	GCCATGAAAACAGTCTACAC	20	57.11	45.00%	None	NO
fms12F	CAACATTTGCCAGGAACAGT	20	62.53	45.00%	None	NO
fms12R	CATCGATCAAAGACCCACACA	20	65.89	50.00%	None	NO
fms13F	TCCTCCATTATCCCAGTTGGT	21	64.23	47.62%	Weak	NO
fms13R	GGATCATTATAAGATGGTGC	20	55.87	40.00%	Very weak	NO
fms14F	GACCTTGACCAAAGTTGACCT	22	63.10	45.45%	Very weak	NO
fms14R	CAATCCAGGCTTCTGAGTTCTT	22	63.44	45.45%	Weak	NO
fms15F	CTGGCATAACTGATTAGGCTGT	22	61.93	45.45%	None	NO
fms15R	ATAGCTGACAGCACGGGAAC	20	64.14	55.00%	Weak	NO
fms16F	AACGATGACAAATGCAAGCAG	21	64.95	42.86%	None	NO
fms16R	CTGGTGCAAACATGAGGAGTT	21	63.99	47.62%	Very weak	NO
fms17F	GACTTAATATGGGCGACTGTG	21	60.93	47.62%	None	NO
fms17R	GGAGTTCCCTATCATTTCTGC	21	61.37	47.62%	None	NO
fms18F	GCTCGCAAGGAAATTGTAGC	20	63.63	50.00%	Weak	NO
fms18R	CACATCGTTTCCTGCAGCTA	20	63.93	50.00%	None	NO
fms19F	CCACTTGGGTGTTTACTGAG	20	59.61	50.00%	Weak	NO
fms19R	TGCTTAAACTGGGGCTGTCT	20	63.61	50.00%	None	NO
fms20F	CAGGTGCTTCTTGTGAATGAC	21	62.29	47.62%	Very weak	NO
fms20R	AAGTGTTATGGTGGGGACAG	20	61.25	50.00%	Very weak	NO
fms21F	TCTGCAGACTCTGGACATCA	20	62.33	50.00%	Weak	NO
fms21R	AACACCACCTGCCTGTTTGT	20	64.40	50.00%	Weak	NO
fms22F	GACGACCATGAACGCAACAT	20	65.94	50.00%	Very weak	NO
fms22R	TCCTGGAGGCAGAAAGAGAA	20	63.95	50.00%	Weak	NO
fms23F	CCAGATGGCTCATTTATGGCA	20	65.82	50.00%	Weak	NO
fms23R	AAATGTGCAGTTCCCACCTTTG	21	63.73	42.86%	Weak	NO

Name	Sequence (5'-3')	Length	Tm	GC	Secondary structure	Primer dimer
fms24F	TTAGAAGCACTCGCTGTCAG	20	60.92	50.00%	Weak	NO
fms24R	GGCGAGAAACAATGCAAGA	19	63.92	47.37%	None	NO
fms25F	CATTATGGTCACCTCAGCACA	21	63.55	47.62%	None	NO
fms25R	ACACATTTCTATTTTCGGATCACA	23	62.02	34.78%	None	NO
fms26F	CAGCAAGCTGCAGCAAGAG	19	65.27	57.89%	Weak	NO
fms26R	CACCAAAACACTGACGCTGA	20	65.00	50.00%	None	NO
fms27F	AATTCTCCCATCAGGTAGCC	20	61.78	50.00%	None	NO
fms27R	CCTCTCAGCGAGTAATGCAA	20	63.04	50.00%	Weak	NO
fms28F	CACTCTGCCACATGGTATGG	20	64.06	55.00%	Weak	NO
fms28R	TGCTGGAAGATGCACAACAT	20	64.35	45.00%	Weak	NO
fms29F	AACAGTCACCCATGAAAACG	20	62.39	45.00%	Very weak	NO
fms29R	AGTGGTGTCTGGGGATTTGTA	20	64.09	50.00%	None	NO
fms30F	ATCTGCCCCATGCTGCTG	19	65.25	57.89%	None	NO
fms30R	GGTGTATGTCAATCTGTGTGAGC	23	63.31	47.83%	Very weak	NO
fms31F	CGCGACTACAGGAAATCCA	19	63.77	52.63%	None	NO
fms31R	GCTCAGGAAGGTGAGACCAC	20	63.89	60.00%	Moderate	NO
fms32F	ACACCGCTCAATGCAAACCTC	20	65.14	50.00%	None	NO
fms32R	AATGTGGCGGCTACTTTTCAG	20	63.97	50.00%	None	NO
fms33F	CCCTGCTGGCTTCCATATT	19	63.82	52.63%	Weak	NO
fms33R	TGCACGAGGGGATTATGAGT	20	64.35	50.00%	None	NO
fms34F	GACGAGTACGACCATGCAGA	20	63.96	55.00%	None	NO
fms34R	GTGGTCTGGATCAGCCAAAT	20	63.86	50.00%	Weak	NO
fms35F	GCCTCACACAAAAATTGTTCC	21	63.14	42.86%	Weak	NO
fms35R	CTGTCACTTGCTCAGCGTTT	20	63.20	50.00%	Weak	NO
fms37F	ACTGCCCTCGTGCTCTGTTTC	20	64.28	55.00%	None	NO
fms37R	GTTCAAGCTCAACGGAAAGC	20	63.74	50.00%	Weak	NO
fms38F	AAGTGGTGGTAGGCATGGAG	20	63.86	55.00%	None	NO
fms38R	GGATGTTGTGGCGTTTCTTT	20	63.73	45.00%	None	NO
fms39F	CCCCGAGAATACAGTGCATA	20	62.41	50.00%	None	NO
fms39R	CATTTGAGCCACCATGTGTT	20	63.41	45.00%	Weak	NO
fms40F	CCTCCACAGACAAAATGACCA	20	63.65	50.00%	None	NO
fms40R	AATCCGATGAAGAGCATTCG	20	63.95	45.00%	Weak	NO
fms41F	GCAGCAAAAACGATCCCTTA	20	63.82	45.00%	None	NO
fms41R	TTGAGGGGATCACTGACAAA	20	63.11	45.00%	Very weak	NO
fms42F	TGCAGTAACCCAGTGTTCCA	20	64.18	50.00%	Very weak	NO
fms42R	CCCAGGAGATAGAAGCCACA	20	64.08	55.00%	None	NO
fms43F	GTGCCCACAAAGATGGAAAT	20	63.60	45.00%	Weak	NO
fms43R	TCCTTGGCAGAGTCAGTCCT	20	64.00	55.00%	None	NO
fms44F	GGCGTTATCAATCAGCAACA	20	63.55	45.00%	Very weak	NO
fms44R	CTGCCCTAGCGTTAGCATCC	19	62.44	57.89%	Weak	NO
fms45F	CAGCCTGATCAGAGATCCAA	20	62.99	50.00%	Moderate	NO
fms45R	TGCACGCAGAATGAGTATTTT	21	62.71	42.86%	Very weak	NO
fms46F	TAAAGAAGGGCCGTCACAAC	20	63.84	50.00%	None	NO
fms46R	ACAGAGAGAGCCGAAGAAGC	20	62.77	55.00%	None	NO
fms47F	TCGCAGATGAGAACAGAAATCC	21	64.24	47.62%	Very weak	NO
fms47R	CACATGAGGCGTACTTGAACC	21	64.36	52.38%	None	NO
fms48F	GCTCTGCACTGAGGGAGATT	20	63.51	55.00%	Weak	NO
fms48R	ATCTGCAGAGGTGGAGCTG	19	63.28	57.89%	Weak	NO
fms49F	ATGGCAAAGCATCGTTCTGT	20	64.49	45.00%	Very weak	NO
fms49R	ATGCCCATGTGTGTATCTGG	20	63.28	50.00%	Weak	NO
fms50F	TCATCTGGATGCTCATTTGC	20	63.80	45.00%	Very weak	NO
fms50R	CATCAGAGTGTGCCATCACC	20	64.38	55.00%	Weak	NO
fms51F	CTGCAGTGTGGATTTCTTGA	20	63.93	50.00%	Weak	NO
fms51R	CCACAGTTGCATGCAGTTTA	20	62.32	45.00%	None	NO

(to be continued)

Name	Sequence (5' - 3')	Length	Tm	GC	Secondary structure	Primer dimer
fms52F	AGCACCTCACACTCGGGTAG	20	64.27	60.00%	Weak	NO
fms52R	GAGCCCTTAACACCCAAACA	20	63.71	50.00%	None	NO
fms54F	CAAATGTGTGAGGGCAGTTC	20	63.15	50.00%	None	NO
fms54R	CATTTCCAAGCGTGTCTCCT	20	64.10	50.00%	None	NO
fms55F	CACTGTCAATGTGGGACTGG	20	64.21	55.00%	Weak	NO
fms55R	TCTGGGAGAGCGTGAGATTT	20	63.85	50.00%	Very weak	NO
fms56F	TGCAAAGTGAGGACATCTGG	20	63.93	50.00%	None	NO
fms56R	TCAGCCTTGACATTTTACG	20	63.66	45.00%	None	NO
fms57F	CCAGCACAGGCACTTCAGAT	20	65.44	55.00%	None	NO
fms57R	ATTCTGAGCATCCGCATTGT	20	64.50	45.00%	None	NO
fms58F	TGGGTCCAGGTAAAAAGTCC	20	62.61	50.00%	None	NO
fms58R	AAATGAATGCACACCACAGC	20	63.57	45.00%	None	NO
fms59F	CACGTAACCCTGCACTGTCT	20	62.80	55.00%	None	NO
fms59R	CTGGACCTGCAGGATGTTTT	20	63.97	50.00%	Weak	NO
fms60F	AGTGAAAGTGGCGAGCTGAG	20	64.64	55.00%	None	NO
fms60R	GGTCTGTGATCTGCAGGATG	20	63.41	55.00%	Weak	NO
fms61F	TCGTGCTCGCAGACTGTATC	20	64.24	55.00%	None	NO
fms61R	TGCTGTGACCCTAATGCAAG	20	63.79	50.00%	Weak	NO
fms62F	TGTGTGCACCCTTTATGAGG	20	63.53	50.00%	Weak	NO
fms62R	AGGGGCTGGTGGATTAAATG	20	64.68	50.00%	None	NO
fms63F	CCTGTGGTGGGAAACAGAAG	20	64.46	55.00%	Moderate	NO
fms63R	GAACGTACCAGCAGCACTGA	20	64.10	55.00%	Weak	NO
fms64F	AAGGTAAAGTGCCGCCTCAT	20	64.60	50.00%	Weak	NO
fms64R	CCAGTTTGCATCCACTCTGAT	21	63.99	47.62%	Weak	NO
fms65F	AGTGATATGCCAGCCATGTG	20	63.56	50.00%	Very weak	NO
fms65R	CAGCCTAGGGGCATAAACAA	20	63.69	50.00%	Moderate	NO
fms66F	TTAATTGGACGTTGGCTTGC	20	64.66	45.00%	None	NO
fms66R	CACAAACAGGCTCGCACATA	20	64.83	50.00%	None	NO
fms67F	ACTCTCTGCTTGTGCCCACT	20	64.04	55.00%	None	NO
fms67R	AAGAACGGCGGATGTTACAC	20	63.74	50.00%	Very weak	NO
fms68F	GTTTTCCTTTGTGGTAGCC	20	62.44	50.00%	Weak	NO
fms68R	TGGGTGGTAGGAAACTGGA	20	64.18	50.00%	None	NO
fms69F	GAGCAACAATGGGATCATCA	20	63.52	45.00%	Very weak	NO
fms69R	TCAAGCCCTCACAGACTGAA	20	63.66	50.00%	Very weak	NO
fms70F	CTTTCTTCATGGGTGACGTG	20	63.13	50.00%	Very weak	NO
fms70R	CCCTTGTGATGGGTGCTACT	20	63.86	55.00%	Moderate	NO
fms71F	TGGCAACCATAACCTCATCAA	20	63.90	45.00%	Weak	NO
fms71R	GCCGTTAATTATCAGGGATCA	21	62.44	42.86%	Very weak	NO
fms72F	AAAACCATCCAGCACTCCAA	20	64.33	45.00%	None	NO
fms72R	TTGCAGCGATAAAAGGGAAG	20	63.92	45.00%	None	NO
fms73F	CCTGAAGACACAAGGGATGG	20	64.47	55.00%	Weak	NO
fms73R	CAGTCAGCATCCTCACAACG	20	64.62	55.00%	None	NO
fms74F	AAGCATCCCTGCCAGTAAGA	20	63.60	50.00%	Weak	NO
fms74R	CCGAGGAGCGACATTTAAAC	20	63.36	50.00%	None	NO
fms75F	GGCTTTACCGAGGTGTTGAG	20	63.48	55.00%	None	NO
fms75R	TGGAATCTGTGCCCTCATCT	20	64.63	50.00%	None	NO
fms76F	AGGGTCATTGGAAGGTCGT	20	64.51	50.00%	None	NO
fms76R	CTTTCTTTGAACGCCACCTC	20	63.60	50.00%	Very weak	NO
fms77F	GCACCCCTCCCATTATAGGT	20	63.65	55.00%	Weak	NO
fms77R	AAACGAGGCCTGAGTGAAAG	20	63.24	50.00%	None	NO
fms78F	GCGCCACAATGTGTTGATTG	20	67.43	50.00%	Weak	NO
fms78R	GATGGGGGAGCAGGATTATT	20	63.75	50.00%	None	NO
fms80F	GAGCGGAAGTGCAAATCTGT	20	64.25	50.00%	None	NO
fms80R	AGAGGAGACCAAAGGTTGGA	20	62.58	50.00%	Moderate	NO

Name	Sequence (5' - 3')	Length	Tm	GC	Secondary structure	Primer dimer
fms81F	CAGGATACAGCGACCTCTCC	20	63.74	60.00%	Weak	NO
fms81R	GACAAACCGCTGACAGGAAT	20	64.00	50.00%	None	NO
fms82F	CAACAACAGACGCAGTTTTGA	21	63.81	42.86%	Very weak	NO
fms82R	TCATGCCAAAGTGTTTCACAG	21	63.67	42.86%	Weak	NO
fms83F	GCTTCACCCCTCTTCCTGTGA	20	64.37	55.00%	Moderate	NO
fms83R	CCAAACAGTGAGGGGAGTGT	20	63.99	55.00%	Very weak	NO
fms84F	TTGGTTGCCGATGGATCATA	20	66.04	45.00%	Very weak	NO
fms84R	TGACACAACCTTCATGAGCA	20	63.05	45.00%	Very weak	NO
fms85F	CATGTCAGCGGTGCTAGAAA	20	63.93	50.00%	Weak	NO
fms85R	TAACATGCACCCATTCAACG	20	64.28	45.00%	Very weak	NO
fms86F	ACAACATTGCGCTTCCTTCT	20	63.63	45.00%	None	NO
fms86R	GCAACGCTACAGCAGCATAA	20	63.95	50.00%	Weak	NO
fms87F	ACCATTTGGCACTCCCTTCTC	20	65.28	55.00%	None	NO
fms87R	GGCCAAGTGGGTGGACTAT	19	63.73	57.89%	Weak	NO
fms88F	GTGAGATGGAGCCGACTCTG	20	65.07	60.00%	Weak	NO
fms88R	CGATGTGAAGGTGATGGAAG	20	63.12	50.00%	None	NO
fms89F	CGTCATGATCCAACACAAGA	20	62.23	45.00%	None	NO
fms89R	CGCACACATACACGAGTTCA	20	63.50	50.00%	None	NO
fms90F	CACGTAAACGAGCAACCAGA	20	63.80	50.00%	None	NO
fms90R	ACCTCCCTGTCCTGATTGTG	20	63.99	55.00%	None	NO
fms91F	AGACATTTCATCCCCTGAAGC	21	63.00	47.62%	Weak	NO
fms91R	GCCATGCGAAGGAATCTTTA	20	63.82	45.00%	Very weak	NO
fms92F	TGACTGAACCCCTCACTCAT	20	62.19	50.00%	Very weak	NO
fms92R	CTGTCCGATTGGGTTTTCTG	20	64.31	50.00%	None	NO
fms93F	CACGCAATTCTTGAGTGCAT	20	63.82	45.00%	Weak	NO
fms93R	GGCAGGTAGTCCGTCATCAA	20	65.00	55.00%	None	NO
fms94F	TTCACTCAGCGAGACAGACG	20	64.50	55.00%	Weak	NO
fms94R	GAGACGAGAGGCAGAAGCAC	20	64.29	60.00%	None	NO
fms95F	TGTGCTTCAAAACAGTGATGC	21	63.83	42.86%	Very weak	NO
fms95R	TGCACTGAGTGAAATGTCCA	20	63.05	45.00%	Weak	NO
fms96F	TTGTGACCTCGTAGGCTGGT	20	64.63	55.00%	Weak	NO
fms96R	GCACAATTAAGCACCCCACT	20	63.74	50.00%	None	NO
fms97F	TCACTCACAGACCGGAATCA	20	64.48	50.00%	None	NO
fms97R	TGTGATCATAAGAAGCGCTGA	21	63.43	42.86%	Very weak	NO
fms98F	CATCTGAAGTCCAGGCCAGT	20	64.25	55.00%	Weak	NO
fms98R	GTGCAGCACAGTGGCTATAA	20	61.47	50.00%	Weak	NO
fms99F	CCCATCTGTTAGCAGCCACT	20	64.11	55.00%	Weak	NO
fms99R	TCAATGGACTTGCAAAGACAG	21	62.79	42.86%	Very weak	NO
fms100F	AACATGCGACAGAACTGACTG	21	62.94	47.62%	Weak	NO
fms100R	TCCACAGCCAATGTTAATGG	20	63.26	45.00%	Weak	NO
fms101F	TTTTGTGTCCGTGAGACCTG	20	63.79	50.0%	Weak	NO
fms101R	AATCACCTGCAAAGGCATTC	20	63.85	45.0%	Weak	NO
fms102F	TGACGCGTTAGTCTGACAGG	20	64.08	55.0%	Weak	NO
fms102R	TCGACCTGTGGAGAAGAACC	20	64.24	55.0%	None	NO
fms103F	CAAAGCTAATGCAGGCTCAG	20	62.58	50.0%	Weak	NO
fms103R	CTTCCGCCTCTAAACCTCCT	20	63.42	55.0%	None	NO
fms104F	CGACAGCCAGAGTCAGTCAA	20	64.36	55.0%	Weak	NO
fms104R	GTCACAAATTGCCGAAACCT	20	63.73	45.0%	None	NO
fms105F	TGCTGCCAGTGAAGAAAATG	20	63.91	45.0%	None	NO
fms105R	AAACTGCACACAGCGACTCC	20	65.45	55.0%	Weak	NO
fms106F	TCTACGGCGGACATCTCTTC	20	64.23	55.0%	None	NO
fms106R	CTCCGCGCTCTAAAAGTCAG	20	63.96	55.0%	None	NO
fms107F	CGCTCGACTGATGATGAATG	20	64.45	50.0%	None	NO
fms107R	AGAGCCCCAGGTGTCTGTTA	20	63.61	55.0%	Weak	NO

(to be continued)

Name	Sequence (5'-3')	Length	Tm	GC	Secondary structure	Primer dimer
fms108F	TGTGAAAGTCTCCTTGGCTTG	21	64.21	47.6%	Very weak	NO
fms108R	AGGAGTGGAAGTGGTGTGG	20	63.99	55.0%	None	NO
fms109F	TTATTCCTGCTGTCATTGC	20	62.54	45.0%	None	NO
fms109R	CACCTCCATACATTTTCGCTTC	21	63.25	47.6%	None	NO
fms110F	CGTCAGCACGTTAACAGGAA	20	63.80	50.0%	Weak	NO
fms110R	CCAGTGAGCTGACTCCCTACA	21	64.38	57.1%	Weak	NO
fms111F	CCACAGGGCAGATCAAATAG	20	62.02	50.0%	None	NO
fms111R	AATCGGTGTTTTCCAGAATG	20	63.58	45.0%	Very weak	NO
fms112F	TTTTTCAGAAGGACTGCAGGA	20	62.50	45.0%	Weak	NO
fms112R	TAAACGAGCCCAGCTTCATT	20	63.48	45.0%	Weak	NO
fms113F	AAGGCTGCCCTCAAACTGT	20	64.87	50.0%	Weak	NO
fms113R	AACGAGACGGGAATTCAGA	20	63.46	45.0%	None	NO
fms114F	TTCTCCACCGAGTCCAGAAG	20	64.35	55.0%	Weak	NO
fms114R	CGGATAAGAGGTTTGCTGCT	20	63.14	50.0%	None	NO
fms115F	GAGAATGGATGACACATTCCAG	22	63.24	45.5%	Moderate	NO
fms115R	AGGGTGGAAATGAATTGTGG	20	63.45	45.0%	None	NO
fms116F	CTTTCACAAATGCTGCCTGA	20	63.91	45.0%	Very weak	NO
fms116R	GCTCTGGGTTTCCTGTGAAGA	20	64.37	55.0%	Very weak	NO
fms117F	CAATGCAGTGGAGCAGTGAG	20	64.76	55.0%	Weak	NO
fms117R	TCACCCTTTGATCCAAGTCC	20	63.83	50.0%	Very weak	NO
fms118F	ACTGGACCCTGTGTTGCTCT	20	63.77	55.0%	None	NO
fms118R	CCTCAGTGGTGCCAGTGTA	20	63.81	55.0%	None	NO
fms119F	TGACCCAAGTGGTGATCAGA	20	64.34	50.0%	Weak	NO
fms119R	GCAGACGACTCGGACAACATA	20	63.05	55.0%	None	NO
fms120F	AGCCAGTGCCCTTCTTGTTA	20	63.61	50.0%	None	NO
fms120R	TAGGTTGTGGAGGTGGAGGA	20	64.47	55.0%	None	NO
fms121F	CACCAGACAGGCTCAGGAAT	20	64.25	55.0%	None	NO
fms121R	AAACATGGGCATTAGGTGGA	20	63.94	45.0%	None	NO
fms122F	TCTTTAATGCCCTGGTACG	20	63.57	50.0%	None	NO
fms122R	CGTGATCTTTGCCTTTCAGAG	21	63.72	47.6%	Very weak	NO
fms123F	AAAGAAACGGCAGGTTGATG	20	63.84	45.0%	Very weak	NO
fms123R	TGGTCTGTGGAGCTTTAGGC	20	64.23	55.0%	None	NO
fms124F	GTGTGTGATTTCTGGCAACG	20	64.21	50.0%	None	NO
fms124R	TTCAGAGGACAGACGAAGAGC	21	63.63	52.4%	Very weak	NO
fms125F	ACGCTCTTTTCCCTGTTCCAA	20	63.60	45.0%	None	NO
fms125R	CCACGGATCAATCACCATTT	20	64.45	45.0%	None	NO
fms126F	AGGAAGCACAACTGCAGACA	20	63.71	50.0%	Weak	NO
fms126R	GAGTGCATCCACAGGGAGTT	20	64.15	55.0%	Weak	NO
fms127F	TCCTGTCCGCTCCCAGTAAT	20	65.72	55.0%	Weak	NO
fms127R	GCATTACCAGTTTCCACCTCA	21	63.73	47.6%	None	NO
fms128F	AGAGGCCCTCCCTTCCAGTAG	20	63.53	60.0%	Weak	NO
fms128R	GCAGAGCCTATCAATTTGTCTG	21	63.50	47.6%	None	NO
fms129F	CTCCAGATCAGCCTTTTCCTG	20	63.83	55.0%	Weak	NO
fms129R	TTTCTCTGCTTCCACGCTTC	20	64.47	50.0%	None	NO
fms130F	GGGAGATGAGGGGTCTTTGT	20	64.14	55.0%	Very weak	NO
fms130R	CAACTTCACGTTCTGCTCCA	20	64.06	50.0%	Very weak	NO
fms131F	TGCTCAGCTCATTTTCAGCAA	20	64.83	45.0%	Moderate	NO
fms131R	GTTCCCTTGCAAGAAACAAT	20	62.75	45.0%	Very weak	NO
fms132F	ACCTGGAGGAACCTGTCAGA	20	63.73	55.0%	Weak	NO
fms132R	GGTGGCCAGAATGCAAGTAG	20	64.47	55.0%	None	NO
fms133F	CAGGAGTGTGGAGAACAGCA	20	64.22	55.0%	Very weak	NO
fms133R	TGTTTGCTGAGCTCTAATGTGG	22	64.10	45.5%	None	NO
fms134F	CAGCAACACTTTCAGGTCCA	20	63.93	50.0%	None	NO
fms134R	CACGTTGTGGAACATTCTATCG	22	64.08	45.5%	Weak	NO

Name	Sequence (5' - 3')	Length	Tm	GC	Secondary structure	Primer dimer
fms135F	TCACAACAGACCTGGGAACCTT	21	63.49	47.6%	None	NO
fms135R	ATGAATCACACCGAGGATCG	20	64.88	50.0%	Weak	NO
fms136F	GAGCCGCGTTTCTTTCTCTC	20	65.22	55.0%	Weak	NO
fms136R	TTGATTTGGAGCCAGAGGAC	20	64.09	50.0%	None	NO
fms137F	GGTGCGGTGTGACAGATTTG	20	66.61	55.0%	None	NO
fms137R	GCTCCTCTCTTTGTTGGCTTT	21	63.57	47.6%	None	NO
fms138F	CACAGCAGGAAGCCACAGTA	20	64.08	55.0%	None	NO
fms138R	ATTCTCGCCATCATCGCTAC	20	63.99	50.0%	None	NO
fms139F	TTGACCAAATGGATGCTGAC	20	63.53	45.0%	None	NO
fms139R	TGTCGGTAGCACAAGAAGGA	20	63.41	50.0%	Very weak	NO
fms140F	ATAAGGGAGCGCCGATAGTT	20	63.55	50.0%	None	NO
fms140R	CCGTCACACCTGAATCTGTC	20	63.28	55.0%	Very weak	NO
fms141F	ATTTGGGTCACGAGAGGTCA	20	64.49	50.0%	None	NO
fms141R	ATCTGGCCTTTTGTGATGG	20	63.70	45.0%	Very weak	NO
fms142F	CAGCGTCCAGCAACACTTTTA	20	63.93	50.0%	None	NO
fms142R	GGAGAGGCAACAGCAAAATC	20	63.61	50.0%	None	NO
fms143F	GTCTGGCTCCAGGTGAATGT	20	64.15	55.0%	Weak	NO
fms143R	GGGATAGAAGGATGCCCAAG	20	64.45	55.0%	Moderate	NO
fms144F	AGCTCCTGCACACAGATGAA	20	63.70	50.0%	Weak	NO
fms144R	ATGTAGGTCACGGCAGGAAC	20	63.88	55.0%	None	NO
fms145F	GTCCCCGACCTCCTTGTAAT	20	63.89	55.0%	Weak	NO
fms145R	TGCACAGTGGGTTCAGGTTA	20	64.18	50.0%	None	NO
fms146F	TCCTGTGTCTCTCGCTCCT	20	64.13	55.0%	None	NO
fms146R	CCCATGAGTCCCTGTCTCTG	20	64.77	60.0%	Weak	NO
fms147F	GCACAAAAGGGCATGGTCA	20	68.06	50.0%	None	NO
fms147R	TGCTGCTTATGGATTGTGGT	20	63.05	45.0%	None	NO
fms148F	CTTCCTCTTTGGCTCCCAT	20	64.22	50.0%	Weak	NO
fms148R	GGCGTATTTGTTCTGGCTTC	20	63.38	50.0%	None	NO
fms149F	CTGGAGTCCACAGTGGGTTT	20	63.99	55.0%	Weak	NO
fms149R	TCGAGATCAAAAAGGGCTGAC	20	64.22	50.0%	Very weak	NO
fms150F	CGAAGAAGCCTGATTAGAGTAGC	23	62.19	47.8%	None	NO
fms150R	GGAAAGCGTGGTCTTCTTCTT	21	63.45	47.6%	Very weak	NO
fms151F	TTGTAGAGGGAGCAGCCAAT	20	63.60	50.0%	Very weak	NO
fms151R	AATCTGCATGCGACAATCTG	20	63.81	45.0%	None	NO
fms152F	GGTTCCATTCTTCGGTTCAA	20	63.69	45.0%	None	NO
fms152R	CCAACAGCCGAGTTACAGGT	20	63.99	55.0%	Very weak	NO
fms153F	GCTGAGCTCCAGTGACACAA	20	64.39	55.0%	Weak	NO
fms153R	AAAACACAAGCGGGAAGAGA	20	63.60	45.0%	None	NO
fms154F	TGTGTCTCCTCTGCACCATC	20	64.11	55.0%	Weak	NO
fms154R	CCTCGTTCATCTTCCTGAGC	20	63.85	55.0%	Weak	NO
fms155F	TTGCTACGACTTGCCAACAC	20	63.82	50.0%	Very weak	NO
fms155R	TTCTCTTGTGCAACCCCTCTG	20	63.01	50.0%	None	NO
fms156F	CAGGATGCACCAAAAGACAA	20	63.65	45.0%	None	NO
fms156R	GGACCTCAGCTGCATCTCTC	20	64.16	60.0%	None	NO
fms157F	TTGCTTCACAGCTCCCAGAT	20	64.88	50.0%	Weak	NO
fms157R	CAGACTGGATGCAGAGGTCA	20	64.22	55.0%	Weak	NO
fms158F	TGCTGCTTTCTTTAGCGTCTC	21	63.52	47.6%	Weak	NO
fms158R	TGATGATGGCTTTCAAGTGC	20	63.80	45.0%	Very weak	NO
fms159F	GAACCATTTACCAGGGCATT	20	62.41	45.0%	None	NO
fms159R	AGCTTCCGGAGGGTAAACAT	20	63.54	50.0%	None	NO
fms160F	TGGACGTGTGTGTTTGACCT	20	64.24	50.0%	None	NO
fms160R	CCATTCTGCAGAGGTGGAAT	20	63.97	50.0%	Weak	NO
fms161F	AGACGATCGGGAGAAAGGAT	20	63.77	50.0%	Very weak	NO
fms161R	TCGTCATCAAGCACGTACA	20	62.95	45.0%	Weak	NO

(to be continued)

Name	Sequence (5'-3')	Length	Tm	GC	Secondary structure	Primer dimer
fms162F	TTGGAAGCATTTGGAAGGAAC	20	63.82	45.0%	None	NO
fms162R	TTCTGTCAAAGAAGGACCAC	20	64.09	50.0%	Moderate	NO
fms163F	AATCAGCACAGGACCGAGAT	20	63.63	50.0%	Very weak	NO
fms163R	CAGTGCACCAGCAGCTTATC	20	63.58	55.0%	Weak	NO
fms165F	TCTCCCATCCTTGTGTGTCA	20	64.34	50.0%	None	NO
fms165R	CACAGAGGCAGGCACAGATA	20	64.08	55.0%	None	NO
fms166F	GTTGCGCTTCCTTTGTTTGA	20	65.05	45.0%	None	NO
fms166R	ACTCCACACAAGCGAAAACC	20	64.00	50.0%	None	NO
fms167F	AAGGGACCTCAAGAGACCTG	20	62.20	55.0%	Weak	NO
fms167R	ACAAGTCTGTTTGTGACACG	20	63.70	50.0%	Weak	NO
fms168F	ATAACGGGCTTGGAGGCTAT	20	63.44	50.0%	None	NO
fms168R	CACCAACGTTTGTACCTTG	20	64.05	50.0%	None	NO
fms169F	CATCAGAGGGCTGTTGAGGT	20	64.25	55.0%	Weak	NO
fms169R	GACAGTAAAGGCAGGGCTGT	20	63.14	55.0%	Moderate	NO
fms170F	GGAATCTTTGGGATCAGCAG	20	63.45	50.0%	Very weak	NO
fms170R	GGGGTTGCCTCAATCACTTA	20	63.70	50.0%	Very weak	NO
fms171F	AGTCACACCCAGATTGCACA	20	64.38	50.0%	None	NO
fms171R	TGCTGAATCGATCTGTCTGC	20	64.22	50.0%	None	NO
fms172F	ACTGTGGCTGAGGGTCAATC	20	64.15	55.0%	Very weak	NO
fms172R	CGCAGTATTGTGGACGTGTT	20	63.57	50.0%	None	NO
fms173F	GCAGCTGGGTACATCAACAA	20	63.68	50.0%	None	NO
fms173R	TGACACAATGCGTGCACATC	20	67.14	50.0%	Weak	NO
fms174F	AAGCTCTGCCTCCAATTCTG	20	63.36	50.0%	None	NO
fms174R	CAGGAGGGCAAACAAACCTA	20	63.81	50.0%	Weak	NO
fms175F	AGCAGTGGGAAGCATAGAA	20	63.60	50.0%	None	NO
fms175R	GCAACCCAAAGCAAAAACAC	20	64.21	45.0%	None	NO
fms176F	AGGTTTCTCTGCAGGCAGTC	20	63.51	55.0%	Weak	NO
fms176R	AGGCCCATGAGAATACCACA	20	64.22	50.0%	None	NO
fms177F	TCATCTGTCTGCTGGTGGAG	20	64.22	55.0%	None	NO
fms177R	CCATCTGTGCACTGTGGAAT	20	63.69	50.0%	Weak	NO
fms178F	TGGGACACATTTCACTGCAT	20	64.07	45.0%	Weak	NO
fms178R	CATGCATGTTTACGCCCTGAG	20	64.17	50.0%	None	NO
fms179F	GTTTCTGAGTCCGCAAAAGG	20	63.60	50.0%	None	NO
fms179R	CATATTGGAATCCAGCTACGG	21	63.01	47.6%	Weak	NO
fms180F	TCCCTCATTTCAATGCACAC	20	63.53	45.0%	Very weak	NO
fms180R	ACGTGCACAAGCAGTAGTGG	20	63.98	55.0%	Weak	NO
fms181F	TTGAACCCATGACCTTCACA	20	64.04	45.0%	Weak	NO
fms181R	ATCAGGCTGCTGCAAAACAT	20	64.62	45.0%	Weak	NO
fms182F	CAGGACGCTTGTGAATCAC	20	63.29	50.0%	None	NO
fms182R	GACAAATGGGAGCTCGTCTC	20	63.74	55.0%	Weak	NO
fms183F	ATTTGTCTCTCTGGTGTGGA	20	64.36	50.0%	Weak	NO
fms183R	CAAAGAGGTTTCAGGCTGGAG	20	63.83	55.0%	None	NO
fms184F	CCTTCCTGTCTTGTCAACCTG	21	63.60	52.38%	None	NO
fms184R	TCTTTTCCTGCATCGCTTCT	20	63.84	45.00%	None	NO
fms185F	GGAGTGGAGACAGGAGATGG	20	63.73	60.0%	None	NO
fms185R	CTCCGTCACAAGTTCCCAAG	20	64.59	55.0%	None	NO
fms186F	ATCCCTATCCTGCAGCCTTT	20	63.66	50.0%	None	NO
fms186R	CTGGAAAATTATGGGCCTTG	20	62.98	45.0%	None	NO
fms187F	GCGGTAATGTTCCAGCAAGT	20	63.87	50.0%	None	NO
fms187R	CGTGCGTGTGTGTGTATGTG	20	65.05	55.0%	None	NO
fms188F	AGGCTGAGTGATGCTCCAGT	20	64.04	55.0%	Weak	NO
fms188R	GCCGTGTGTGACTAAGTGCT	20	62.96	55.0%	None	NO
fms189F	GCTCCAGCTCCTCATAACTGA	21	63.38	52.4%	Weak	NO
fms189R	TGCACTGGAGACACAAGGTT	20	63.43	50.0%	None	NO

Name	Sequence (5'-3')	Length	Tm	GC	Secondary structure	Primer dimer
fms190F	GTCAAGCACATCTTGCCTTC	20	63.45	50.0%	Moderate	NO
fms190R	TCACCGACGGGAATAGTCAT	20	64.22	50.0%	Weak	NO
fms191F	ATAACCCCGAGGTCAGTGTG	20	63.73	55.0%	Weak	NO
fms191R	CCTTGCTTGGTTCTTCATGC	20	64.33	50.0%	None	NO
fms192F	GGACGGAAGATGAACAGGAG	20	63.59	55.0%	None	NO
fms192R	CAGAATCTGGCACAGTTTGG	20	63.27	50.0%	Weak	NO
fms193F	ACCCATTTTCACAGCCACCTA	20	64.22	50.0%	None	NO
fms193R	CTGGCTGGCAGACCTAATTC	20	63.60	55.0%	Weak	NO
fms194F	CTGTTATCAGCATCAGCACCA	21	63.81	47.6%	Weak	NO
fms194R	GTGCTGATCAGGCGATTATG	20	63.17	50.0%	Very weak	NO
fms195F	CCTCAGGTTAAGGCTGCACT	20	63.25	55.0%	Weak	NO
fms195R	CGGCTAACGTGTCTGATGTG	20	64.33	55.0%	None	NO
fms196F	GCCACTCACGTGTTGTGATT	20	63.72	50.0%	Moderate	NO
fms196R	TAAGTGCCACCTTTCTGTGC	20	62.80	50.0%	Weak	NO
fms197F	GAACGTGACTACCGGACCAC	20	64.40	60.0%	Weak	NO
fms197R	GACGAAGAGAGGATGGAGGA	20	63.33	55.0%	None	NO
fms198F	CATCGCCTACAGAAGCAACA	20	63.93	50.0%	None	NO
fms198R	CATGGAGACGGAACACTG	20	63.13	50.0%	None	NO
fms199F	TTAAAGACGCCAGAGGAGA	20	63.70	50.0%	None	NO
fms199R	GAACGATGAGCGTGATCTGA	20	64.09	50.0%	Weak	NO
fms200F	GTCCCACTCGGTCTTTACGA	20	63.97	55.0%	Weak	NO
fms200R	GCCTCCCATGTTGCTTTATG	20	64.19	50.0%	Very weak	NO
M939_ms1f	TCACACCCATAACCACAGCA	20	65.13	50.00%	None	NO
M939_ms1r	GCATTTTCTAAAGGGAATCTGC	22	62.58	40.91%	Weak	NO
M939_ms2f	CAATGAGTGTCCTCTTTGAC	20	57.14	45.00%	Weak	NO
M939_ms2r	TGGTTCCGATCCATCCATTA	20	64.91	45.00%	Weak	NO
M743_ms1f	CTGCAATCTGCCTCCTTCCT	20	65.61	55.00%	Weak	NO
M743_ms1r	GCACATCTGCAAACCAAAGA	20	63.80	45.00%	Weak	NO
M743_ms2f	GGGGCCAAGACTCACTAACC	20	64.63	60.00%	None	NO
M743_ms2r	CGTAGACGTGCACAGATCCT	20	62.92	55.00%	None	NO
M1034_ms1f	TGCCCATAAATACCTCACAGC	21	63.61	47.62%	None	NO
M1034_ms1r	AACACTGTGCCCTCCATCAAAC	21	63.89	47.62%	None	NO
M1034_ms2f	GAGGGAGCAGGGAGAGAAAT	20	63.53	55.00%	None	NO
M1034_ms2r	CCCACACCAGACACAAGAGA	20	63.94	55.00%	None	NO
M2126_ms1f	AACCCCTGTTCCCTGAGCTTT	20	63.78	50.00%	Very weak	NO
M2126_ms1r	GGAAGGGAATAGGCTGTGTG	20	63.35	55.00%	None	NO
M2126_ms2f	CAACATTCACTCTGTGGAGG	20	60.75	50.00%	Very weak	NO
M2126_ms2r	GACACCCGAACCAGATCAAC	20	64.39	55.00%	None	NO
M1646_ms1f	GGCAAGCCCGTATATTTTCA	20	63.47	45.00%	None	NO
M1646_ms1r	CCAGTCAGACGGTGTGTTT	20	65.04	55.00%	None	NO
M1646_ms2f	GACCATGCAGGTTTGTCTTT	20	63.86	45.00%	Weak	NO
M1646_ms2r	AATGGACAAGGGCAAGAGTG	20	63.97	50.00%	None	NO
M454_ms1f	TCAGCGCTAATCCCTGATTC	20	64.08	50.00%	Moderate	NO
M454_ms1r	AGGTTAGCTGCGCAAAACAT	20	63.52	45.00%	Very weak	NO
M454_ms2f	TCCCACGTGTTTCATCAGACT	20	63.28	50.00%	None	NO
M454_ms2r	GAGTGGGGATTGACAGAGGA	20	64.11	55.00%	None	NO
M1876_ms1f	TTGATGAAGTCCTGGCTGTG	20	63.93	50.00%	None	NO
M1876_ms1r	TGATTGGTTAGGCATGGTGGA	20	63.90	45.00%	None	NO
M1876_ms2f	GCTGTACACCCCAATTCCAC	20	64.11	55.00%	None	NO
M1876_ms2r	CAGTGATATAGAGGCAGCTGTAA	24	63.15	45.83%	Weak	NO
M1876_ms3f	CAACCCAGCTGACCTCAAGT	20	64.25	55.00%	None	NO
M1876_ms3r	ATAATGTGTGCAGGCCAATG	20	63.30	45.00%	None	NO
M1876_ms4f	CCAACACAACCAGCCTCATT	20	64.86	50.00%	None	NO
M1876_ms4r	ACAGGGATCTGTGTGGGTGT	20	64.43	55.00%	Moderate	NO

(to be continued)

Name	Sequence (5'-3')	Length	Tm	GC	Secondary structure	Primer dimer
M1876_ms5f	TCACCATGACTATTGTTCACCA	22	62.79	40.91%	Very weak	NO
M1876_ms5r	TGACAGTTTCCCATTACCTGTG	22	63.60	45.45%	Moderate	NO
M1876_ms6f	TGAACAAGCAGCCATTGAAC	20	63.80	45.00%	None	NO
M1876_ms6r	CTCCTCAGAAAGCCAAGGTG	20	63.83	55.00%	Weak	NO
M1876_ms7f	AAGCCAGGCTAAACTTCTTGG	21	63.33	47.62%	Weak	NO
M1876_ms7r	TCCATGCAAAGACCCACATA	20	63.90	45.00%	Very weak	NO
fms26-2F	GAGCCTGTCTGCATGATAACC	21	63.51	52.38%	None	NO
fms26-2R	CCACATTCCCACAATTTCATC	20	62.60	45.00%	None	NO
fms28-2F	GATCGGCTTTTGCAGATGTA	20	62.68	45.00%	Very weak	NO
fms28-2R	AGGCCATAGTCAAAGGCTCTA	21	61.66	47.62%	Moderate	NO
fms30-2F	TTGGACACAATGAGAGGAAGG	21	63.96	47.62%	Very weak	NO
fms30-2R	ACCAGCCAAAATGGAGAATG	20	63.70	45.00%	Weak	NO
fms31-2F	CGGAGCCAAAACCTCTTTAAC	21	63.54	47.62%	Weak	NO
fms31-2R	CCCACCACCATTGTCTACAG	20	62.87	55.00%	None	NO
fms36-2F	GATAGTTGGGGATTGGCTGA	20	63.70	50.00%	None	NO
fms36-2R	GGCTGTCCGACACCTGTTAG	20	64.63	60.00%	Very weak	NO
fms38-2F	GTCCGTGTGAGCATGTGAGT	20	64.01	55.00%	None	NO
fms38-2R	CCACGGGAAGAAAATGACAG	20	64.31	50.00%	None	NO
fms39-2F	CCCCCTTAGTGACCACAACA	20	64.71	55.00%	None	NO
fms39-2R	CTCTCGGGCAGTAATGGACA	20	65.09	55.00%	None	NO
fms43-2F	TCCATCAAGGCAAACCTACCC	20	63.70	50.00%	None	NO
fms43-2R	TGCCAGAGTGTGAGCTAAGG	20	63.16	55.00%	None	NO
fms44-2F	TCGGGGACAAAGCGTAAATA	20	64.03	45.00%	None	NO
fms44-2R	AGACGGAGCTCTGTGTGGTT	20	63.91	55.00%	Very weak	NO
fms46-2F	TCCTCCCAGTTCACCCTAGA	20	63.57	55.00%	None	NO
fms46-2R	GTAGGTCGGCTCTGATGCAC	20	64.79	60.00%	None	NO
fms48-2F	CAGGTGATGGCGTGAATAAA	20	63.39	45.00%	None	NO
fms48-2R	TGTTCAATTCTGAGGCTGGTCT	21	63.74	47.62%	Very weak	NO
fms60-2F	TCGTGTTAGAGGGGGAAGTG	20	63.95	55.00%	None	NO
fms60-2R	GAGTGTGACTGCTGCCGTGTC	20	63.88	60.00%	Weak	NO
fms61-2F	CATCCGTCCATCCAAGAATC	20	64.20	50.00%	None	NO
fms61-2R	GGTTGTTTGTACGCCGTCT	20	63.75	50.00%	None	NO
fms65-2F	AAACCTGGCCACAAC TTCAT	20	63.25	45.00%	None	NO
fms65-2R	CCTCGCATCCAATCAGAAAC	20	64.46	50.00%	None	NO
fms67-2F	CTGCCCCGGACATACATATT	20	63.35	50.00%	None	NO
fms67-2R	TTCAGGTGCTTCAGCCTCTT	20	63.99	50.00%	Weak	NO
fms68-2F	GGGGACACCAACAGTGACA	19	64.80	57.89%	Weak	NO
fms68-2R	GAATGGCAAACAGGACCACT	20	63.87	50.00%	Weak	NO
fms73-2F	CCACTGGAGAAGGACAAACC	20	63.46	55.00%	None	NO
fms73-2R	CAGGCACACACAGAAGATCG	20	64.62	55.00%	None	NO
fms75-2F	CAGAAGCAGGGGACTGTGA	19	64.20	57.89%	Weak	NO
fms75-2R	TCCGTCCATTGAAACAGTCA	20	64.17	45.00%	Very weak	NO
fms77-2F	GTCACCCGGCACAATAGAAC	20	64.24	55.00%	None	NO
fms77-2R	GTGTAACCTGCTCTGCATCG	20	63.44	55.00%	Weak	NO
fms81-2F	AATGCAGCAGCAGAATGAGA	20	63.69	45.00%	Weak	NO
fms81-2R	CGCTGTACATCCTCATCTCG	20	63.41	55.00%	None	NO
fms85-2F	CGTCATCGCAAATGAGTTGT	20	63.68	45.00%	Weak	NO
fms85-2R	TCATGTGAGGTTTGGGATGA	20	64.03	45.00%	Weak	NO
fms87-2F	TCTGCGCTGTCCAAGACTTA	20	63.68	50.00%	Weak	NO
fms87-2R	ATGGAGGAAAGCGAGCTACA	20	63.73	50.00%	None	NO
fms88-2F	GAGCTCAGCCATTCAACCTC	20	63.88	55.00%	Weak	NO
fms88-2R	CTGGCCAGACATAAACAGCA	20	63.79	50.00%	Weak	NO
fms94-2F	TTCACTCAGCGAGACAGACG	20	64.50	55.00%	Weak	NO
fms94-2R	GAGACGAGAGGCAGAAGCAC	20	64.29	60.00%	None	NO

Name	Sequence (5'-3')	Length	Tm	GC	Secondary structure	Primer dimer
fms98-2F	ATATGCTTTGGGCCTGTTTG	20	63.59	45.00%	None	NO
fms98-2R	CGCCGAGCAAATGGTAATA	19	63.39	47.37%	None	NO
fms99-2F	CCCTCACTTGCACCAAACT	20	63.98	50.00%	Very weak	NO
fms99-2R	GTGGAAATCGTGCATTGTTG	20	63.92	45.00%	None	NO

Appendix 2. Profiles of microsatellite loci analyzed in this study

Locus name	*Scaffold number	*Scaffold length (bp)	*Locus start	*Locus end	*Repeat frequency	*Length	**PCR product
fms01	1	1145486	136035	136198	(GT) ₃₂	164	Yes
fms02	2	1043389	144626	144771	(GT) ₂₃	146	Yes
fms02-2	2	1043389	377884	378043	(CA) ₄₀	160	Yes
fms03	3	760841	141472	141792	(TATC) ₄₂	321	
fms04	4	720216	303968	304138	(GAT) ₁₈	171	Yes
fms05	5	655186	4341	4496	(CA) ₄₂	156	Yes
fms05-2	5	655186	40853	41049	(GT) ₃₂	197	
fms06	6	653640	261746	261966	(AGAT) ₃₃	221	
fms07	7	657455	193589	193761	(CA) ₄₂	173	Yes
fms08	8	621831	224413	224565	(CA) ₃₂	153	Yes
fms09	9	615413	435822	436030	(AGGGA) ₂₂	209	
fms10	10	619658	594506	594681	(CA) ₅₀	176	
fms11	11	576252	350392	350593	(GAT) ₂₀	202	Yes
fms12	12	590959	173444	173606	(CA) ₃₂	163	Yes
fms13	13	559755	307118	307308	(TGTA) ₂₄	191	Yes
fms14	14	540696	222724	222874	(TAGA) ₁₆	151	
fms15	15	512708	17691	17907	(AC) ₄₆	217	Yes
fms16	16	536780	63455	63655	(GATA) ₂₀	201	Yes
fms17	17	522975	333540	333812	(TCTA) ₄₀	273	
fms18	18	516161	229409	229598	(GT) ₃₅	190	
fms19	19	496079	106275	106445	(GT) ₂₄ (GC) ₃ (GT) ₁₂	171	Yes
fms20	20	501255	60651	60786	(CA) ₃₄	136	
fms21	21	511503	53992	54170	(GT) ₃₂	179	
fms22	22	468438	228906	229060	(GT) ₃₅	155	Yes
fms23	23	479410	238593	238766	(GT) ₁₄ (GG)(GT) ₂₈ (GA)(GT) ₃	174	Yes
fms24	24	468089	154488	154651	(CATC) ₁₉	164	Yes
fms25	25	459020	351428	351629	(GATA) ₁₉	202	
fms26	26	467868	262652	262805	(GT) ₂₉ (GC)(GT) ₅	154	
fms27	27	435220	314887	315207	(CA) ₃₅	321	Yes
fms28	28	411074	127447	127599	(CA) ₃₂	153	
fms29	29	447646	177951	178270	(CT) ₂₆	320	Yes
fms30	30	441934	254666	254822	(CA) ₄₄	157	
fms31	31	440027	62428	62747	(GT) ₃₅	320	
fms32	32	432920	39378	39525	(GT) ₂₄ (GCCTGCT)(GT) ₂	148	Yes
fms33	33	423600	64707	65056	(AGTC) ₉ (TGCC) ₁₆	350	Yes
fms34	34	414273	81197	81356	(CA) ₄₃	160	Yes
fms35	35	426783	38109	38443	(GT) ₃₈	335	Yes
fms37	37	420973	417983	418125	(GAT) ₁₆	143	Yes
fms38	38	409205	164856	165188	(GT) ₃₈	333	
fms39	39	402666	65947	66094	(CA) ₂₆	148	
fms40	40	415412	112365	112702	(TAA) ₂₂	338	Yes
fms41	41	408141	192281	192435	(CA) ₂₆ (TA)(CA) ₆	155	Yes
fms42	42	409298	155442	155767	(GT) ₄₉	326	Yes
fms43	43	409953	22508	22656	(GT) ₃₂ (GG)(GT) ₁₀	149	
fms44	44	407909	288900	289225	(GT) ₃₃	326	
fms45	45	407321	25162	25320	(GT) ₃₈	159	Yes
fms46	46	408091	3585	3915	(GT) ₂₅	331	
fms47	47	388383	7232	7389	(GT) ₂₉	158	Yes
fms48	48	410757	71456	71778	(TA) ₃₀	323	
fms49	49	394151	15279	15435	(CA) ₂₇	157	Yes
fms50	50	388193	50496	50847	(CT) ₄₇	352	Yes
fms51	51	375886	230982	231141	(CA) ₃₁	160	Yes

*All information was based on genome database v3.0.

**Yes in this column means that this locus satisfied the following conditions:

- 1) Obvious bands were observed in gel electrophoresis without non-specific amplification, and
- 2) showing polymorphism.

Locus name	*Scaffold number	*Scaffold length (bp)	*Locus start	*Locus end	*Repeat frequency	*Length	**PCR product
fms52	52	384750	243686	244017	(CAAA) ₁₅	332	Yes
fms54	54	392206	43795	44122	(CA) ₃₂	328	Yes
fms55	55	395588	186809	186958	(GT) ₂₆	150	Yes
fms56	56	362557	333283	333614	(GT) ₂₇	332	Yes
fms57	57	383289	179864	180021	(CA) ₃₆	158	
fms58	58	366207	70822	71148	(GT) ₃₂	327	
fms59	59	382113	116624	116777	(GT) ₃₈	154	
fms60	60	383052	83772	84132	(GT) ₃₈	361	
fms61	61	407508	218719	218872	(CA) ₄₉	154	
fms62	62	384140	41178	41512	(GT) ₃₆	335	Yes
fms63	63	339305	90203	90426	(GT) ₃₄	224	Yes
fms64	64	381887	103331	103673	(TATC) ₁₉	343	Yes
fms65	65	368280	142731	142887	(GT) ₃₂	157	
fms66	66	378798	146642	146964	(GT) ₃₀	323	Yes
fms67	67	375742	65842	65980	(TCA) ₁₈	139	
fms68	68	351008	120163	120493	(CA) ₆₁	331	
fms69	69	349824	70180	70327	(CA) ₂ CT(CA) ₂ CT(CA) ₃₇	148	
fms70	70	356346	333017	333337	(CA) ₂₇	321	Yes
fms71	71	356318	103674	103827	CGG(CG) ₆ (CA) ₂₃	154	Yes
fms72	72	356900	232533	232857	(AC) ₂₄	325	Yes
fms73	73	356275	309491	309624	(CA) ₃₀	134	
fms74	74	363171	12838	13164	(GT) ₄₃	327	Yes
fms75	75	356358	5411	5533	(CA) ₂₄	123	
fms76	76	353754	132790	133126	(GT) ₂₂	337	Yes
fms77	77	342086	18287	18437	(CA) ₂₃	151	
fms78	78	348182	340939	341269	(TTA) ₂₃ (TTG) ₅ (TTA) ₉	331	Yes
fms80	80	345970	11876	12027	(GT) ₂₀	152	Yes
fms81	81	345741	244005	244384	(GT) ₄₅	380	
fms82	82	345898	29786	29904	(GT) ₂₃	119	Yes
fms83	83	347574	307979	308304	(CA) ₂₅	326	Yes
fms84	84	325222	24843	25001	(GT) ₂₂	159	Yes
fms85	85	345224	90126	90450	(GA) ₃₈	325	
fms86	86	344395	2690	3009	(CA) ₃₁ (TACATACGCACG)(CA) ₁₅	320	Yes
fms87	87	350902	10119	10278	(CA) ₃₀	160	Yes
fms88	88	344990	90807	90921	(GT) ₂₃	115	
fms89	89	340004	193302	193620	(AATC) ₁₁ (ATCT) ₁₇	319	Yes
fms90	90	337637	15962	16115	(CA) ₂₀	154	Yes
fms91	91	339437	184580	184921	(CA) ₂₃	342	Yes
fms92	92	345898	57172	57328	(CA) ₃₁	157	Yes
fms93	93	339608	317088	317437	(GCA) ₃₅	350	Yes
fms94	94	331194	178654	178789	(GT) ₂₂	136	
fms95	95	344054	284644	284975	(TGGA) ₁₅ (CGGA) ₃ TGGAGGGA (CGGA) ₂ (CAGA)(TGGA) ₂	332	Yes
fms96	96	332315	236416	236516	(AC) ₄₆	101	
fms97	97	334034	249358	249682	(TG) ₃₁	325	
fms98	98	337273	32308	32451	(TG) ₂₅ (CG) ₂ (TG) ₇	144	
fms99	99	334656	21471	21806	(AT) ₂₁	336	
fms100	100	334853	77953	78083	(AC) ₃₀	131	Yes
Tru-1F	1125	78547	11592	11699	(GT) ₂₆	108	Yes
Tru-5F	2239	42292	9749	9922	(AC) ₁₇	174	
Tru-7F	285	221542	209818	210012	(AC) ₁₇	195	Yes
Tru-8F	47	388383	187804	187933	(AC) ₂₂	130	Yes
Tru-9F	79	361291	223670	223780	(GT) ₂₁	111	Yes
Tru-12F	36	416069	278219	278415	(AC) ₂₁	197	
Tru-15F	227	240797	16839	16983	(AC) ₃₉	145	Yes
Tru-18F	9	615413	369580	369786	(AC) ₂₅	207	Yes

(to be continued)

Locus name	*Scaffold number	*Scaffold length (bp)	*Locus start	*Locus end	*Repeat frequency	*Length	**PCR product
Tru-19F	164	272855	243790	244000	(AC) ₂₂	211	Yes
fms101	101	330565	5617	5772	(GT) ₇ (ATGTATG)(GT) ₂₁	156	
fms102	102	331430	124019	124383	(CA) ₂₁	365	
fms103	103	334037	32327	32454	(GA) ₃₈	128	
fms104	104	328265	69377	69703	(GT) ₂₆	327	
fms105	105	304014	18264	18379	(CA) ₂₀	116	
fms106	106	326960	88835	89189	(GT) ₃₆	355	Yes
fms107	107	325231	2820	2947	(AC) ₃₁	128	
fms108	108	321818	233734	234072	(GT) ₂₀	339	
fms109	109	322262	27918	28045	(AC) ₂₅	128	Yes
fms110	110	307776	65085	65438	(GT) ₂₉	354	
fms111	111	313063	166990	167099	(CA) ₂₃	110	Yes
fms112	112	320034	32332	32658	(GT) ₁₇ (GT) ₂₅ (GA) ₉	327	
fms113	113	358679	104105	104237	(GT) ₂₂ (GC) ₃ (GT) ₇	133	Yes
fms114	114	320108	38056	38405	(CA) ₃₆	350	Yes
fms115	115	340426	90289	90437	(CA) ₂₀	149	
fms116	116	320058	22098	22419	(GT) ₃₄	320	Yes
fms117	117	314467	106610	106758	(CA) ₂₄	149	Yes
fms118	118	324515	37149	37503	(CA) ₂₂	355	Yes
fms119	119	318176	70404	70563	(GT) ₃₂	160	Yes
fms120	120	319131	50197	50534	(GT) ₂₈ (GC)(GT) ₁₁	338	
fms121	121	320709	38528	38676	(CA) ₃₃	149	
fms122	122	300233	148058	148380	(AC) ₂₃	323	
fms123	123	316877	70361	70497	(CA) ₂₆	137	Yes
fms124	124	314446	76313	76642	(CA) ₃₀	330	Yes
fms125	125	312184	5738	5897	(CA) ₂₁	160	Yes
fms126	126	341450	29549	29898	(GT) ₂₆ (GT) ₁₅	350	
fms127	127	305641	77654	77811	(GT) ₂₄	158	Yes
fms128	128	319632	56099	56425	(CA) ₂₃	327	
fms129	129	307865	59805	59964	(CA) ₃₃	160	
fms130	130	312109	39757	40076	(CA) ₃₂	320	
fms131	131	298455	242535	242693	(CT) ₂₈	159	Yes
fms132	132	320759	1799	2123	(CT) ₄₇	333	Yes
fms133	133	290669	117074	117219	(CA) ₂₂	146	Yes
fms134	134	307465	5074	5413	(GT) ₃₄	340	Yes
fms135	135	305286	27622	27763	(GT) ₂₅	142	Yes
fms136	136	309930	2090	2428	(CA) ₂₅	339	
fms137	137	296511	72505	72638	(TG) ₂₆	134	Yes
fms138	138	308355	44626	44952	(GT) ₁₀ (GT) ₂₂	327	
fms139	139	306513	45839	45969	(TG) ₃₇	131	Yes
fms140	140	300607	60919	61250	(CA) ₂₇	332	Yes
fms141	141	296643	144078	144230	(CA) ₂₇	153	
fms142	142	312885	166554	166899	(GT) ₃₉	346	
fms143	143	238428	113275	113429	(CA) ₃₇	155	Yes
fms144	144	299881	3720	4071	(GT) ₃₁	352	Yes
fms145	145	307110	98864	98992	(GT) ₃₂	129	Yes
fms146	146	297244	2687	3010	(GT) ₃₉	324	Yes
fms147	147	280990	37600	37758	(TG) ₅₃	159	
fms148	148	291438	73943	74295	(GT) ₂₀	353	
fms149	149	292657	24440	24560	(AC) ₃₅	121	Yes
fms150	150	261481	80616	80986	(TG) ₁₀ (CGTGTGTTGCG)(GT) ₃₂	358	Yes
fms151	151	292624	77756	77879	(TG) ₂₁	124	Yes
fms152	152	296070	77748	78071	(TG) ₃₆	324	
fms153	153	267659	6551	6697	(TG) ₂₀	147	Yes
fms154	154	297939	172844	173197	(TG) ₂₆	354	Yes
fms155	155	291812	70031	70186	(CA) ₅₂	156	
fms156	156	290301	165696	166072	(GT) ₃₉	377	

Locus name	*Scaffold number	*Scaffold length (bp)	*Locus start	*Locus end	*Repeat frequency	*Length	**PCR product
fms157	157	291768	187340	187714	(A) ₁₅ (A) ₁₇ (TG) ₂₅	375	Yes
fms158	158	293201	133814	133961	(GT) ₂₂	148	Yes
fms159	159	294242	20229	20362	(AC) ₂₀	134	
fms160	160	291046	167136	167471	(CA) ₃₄	336	
fms161	161	273104	262002	262310	(CA) ₁₀ (TA)(CA) ₂₄	309	Yes
fms162	162	286769	37653	37811	(TG) ₃₃	159	
fms163	163	283678	26158	26503	(AC) ₆ (AT) ₂₉	346	
fms165	165	287603	13852	14004	(GT) ₂₁	153	Yes
fms166	166	288479	1523	1842	(CA) ₂₈	320	Yes
fms167	167	297357	41973	42122	(TG) ₂₆	150	Yes
fms168	168	286167	2666	2998	(CA) ₂₀	350	Yes
fms169	169	285082	142140	142291	(AC) ₂₇ (TC) ₁₀	152	
fms170	170	294984	14360	14709	(GT) ₄₆	350	
fms171	171	280371	109306	109440	(GT) ₂₇	135	
fms172	172	282900	132511	132883	(CA) ₄₉	373	Yes
fms173	173	278165	1380	1482	(AC) ₂₀	103	
fms174	174	279757	118577	118918	(CA) ₂₆	342	Yes
fms175	175	280072	132633	132750	(TG) ₂₈	118	
fms176	176	271437	225361	225491	(CA) ₂₆	131	Yes
fms177	177	270514	254057	254365	(CA) ₃₇	309	
fms178	178	293396	57841	57995	(GT) ₂₀	155	Yes
fms179	179	273116	84352	84681	(CA) ₂₅	330	Yes
fms180	180	275913	160817	160927	(GT) ₂₃	111	Yes
fms181	181	270101	19078	19416	(TG) ₂₃	339	Yes
fms182	182	278059	201424	201579	(GT) ₂₈	156	Yes
fms183	183	271581	211509	211886	(AC) ₃₉	378	Yes
fms184	184	263172	19911	20036	(AC) ₂₃	126	Yes
fms185	185	271472	89309	89636	(AC) ₃₅	328	Yes
fms186	186	281117	26576	26921	(GT) ₃₁	346	
fms187	187	282373	277877	278160	(GT) ₃₂	284	
fms188	188	274023	201421	201545	(GT) ₂₂	125	Yes
fms189	189	261281	132523	132827	(GT) ₃₃	305	Yes
fms190	190	263610	215772	215899	(ATT) ₂₄	128	Yes
fms191	191	269741	107358	107646	(GT) ₃₀	289	Yes
fms192	192	273489	163048	163177	(GT) ₃₄	130	Yes
fms193	193	267915	81168	81459	(GT) ₃₇	292	Yes
fms194	194	264375	39266	39365	(CA) ₂₀	100	
fms195	195	259251	26214	26505	(GT) ₄₂	292	Yes
fms196	196	306111	208423	208544	(AC) ₂₃	122	Yes
fms197	197	239275	21638	21949	(GT) ₂₄	312	
fms198	198	257443	76935	77051	(GT) ₂₁	117	
fms199	199	263220	55314	55623	(GT) ₂₁	310	Yes
fms200	200	261525	220272	220414	(TC) ₂₃	143	Yes
M939 ms1	939	94564	36252	36413	(TG) ₃₉	162	
M939 ms2	939	94564	36151	36497	(TG) ₃₉	347	Yes
M743 ms1	743	129373	58649	58790	(GT) ₂₄	142	Yes
M743 ms2	743	129373	58502	58847	(GT) ₂₄	346	
M1034 ms1	1034	85536	19393	19572	(TG) ₃₃ (CG)(TG) ₁₂	180	Yes
M1034 ms2	1034	85536	19276	19615	(TG) ₃₃ (CG)(TG) ₁₂	340	
M2126 ms1	2126	33268	24708	24851	(CT) ₁₇ (CA) ₁₂ (G)(CA) ₆	144	
M2126 ms2	2126	33268	24590	24934	(CT) ₁₇ (CA) ₁₂ (G)(CA) ₆	345	Yes
M1646 ms1	1646	47273	4206	4352	(GT) ₂₂	147	Yes
M1646 ms2	1646	47273	4082	4424	(GT) ₂₂	343	
M454 ms1	454	176598	38781	38948	(CA) ₂₂	168	
M454 ms2	454	176598	38665	39007	(CA) ₂₂	343	Yes
M1876 ms1	1876	47148	17817	17967	(CA) ₂ (CACG) ₈ (CA) ₂₂	151	
M1876 ms2	1876	47148	17772	18095	(CA) ₂ (CACG) ₈ (CA) ₂₂	324	Yes

(to be continued)

[illegible]