

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* における成長特性と

成長ホルモン遺伝子の DNA 多型

清水宏美, 沖増英治*

ヒラメ成長ホルモン遺伝子に DNA 多型があること, そして成長ホルモン遺伝子のハプロタイプとゲノタイプの種類とその発現頻度の違いが体重別グループで明らかになった。ヒラメの成長ホルモン遺伝子において認められた DNA 多型は成長特性に何らかの影響を与えているのではないかと考えられる。ヒラメの成長ホルモン遺伝子における *Sau3A*I 断片多型のさらなる詳細な構造解析, ならびに RFLP と成長曲線の相関性を明らかにすることにより, マーカー選抜育種の応用に役立つと考えられる。成長ホルモンは, その成長促進活性に加えて浸透圧調節, 電解質バランス調節, 他の代謝機能等を含んでいるため, 成長ホルモン遺伝子はクローニング, シークエンスが行われ, その発現の研究が盛んに行われている遺伝子の一つである。体の大きさの違いにより成長ホルモン遺伝子多型が認められ, 遺伝マーカーとしての利用が可能になれば, マーカー選抜育種の一助になると考えられた。

キーワード: マイクロサテライト, 遺伝的変異量, *Sau3A*I, 成長ホルモン遺伝子

水産増養殖技術の発達, サケ・マス, ヒラメ, マダイ, クルマエビなど多くの水産生物の量的生産を可能にした。大量生産が可能になった養殖魚に現在求められているのは, 耐病性, 高成長, 肉質といった質的な改良, 言い換えれば, 経済形質の改良である。質的改良は“育種 (品種改良)”によって達成され, 育種は“遺伝形質”の理解によって可能となる。分子レベルのゲノム研究の中でも“QTL (Quantitative Trait Loci) 解析”と呼ばれる方法は表現型を支配する, あるいは表現型と関係する未知の遺伝子 (座) を DNA マーカーを使って探し出すことができる点で画期的なものである。QTL 解析では, 表現型と連鎖する DNA マーカーを見つけた段階で, そのマーカーを使った育種が可能となる²⁾。この方法は, 従来表現型のみを頼りにした育種からは想像もつかぬほどの効率で育種ができるもので, 魚に遺伝子を導入するのではな

〒729-0292 福山市学園町一番地三蔵 福山大学生命工学部海洋生物工学科

* Tel: +81-849-36-2111, Fax: +81-849-2459, E-mail: okimasu@ma.fuma.fukuyama-u.ac.jp

清水、沖増

く、ある集団の中で特に優れている形質を持つ魚を分子遺伝学的に解析し、その成果を使って「古典育種」の方法で品種改良しようとするもので、“マーカー選抜育種”と呼ばれている³⁾。

養殖魚の大量生産が可能となった今、消費者の養殖魚へのニーズは「安全でおいしい」といった質的レベルの高い魚へと移っている。しかし、今のところ耐病性、高成長、肉質といった優良形質の発現メカニズムが不明なために、メカニズムを利用して優良形質を固定し、品種としたものはない。しかし、それらの形質を考えると、その形質には個体ごとに幅があることに気づく。例えば、成長の良い魚も悪い魚も、ともに種としては正常で、どちらも子孫を残すことができるのである。このような形質発現の違いは個体差として理解されているもので、個体差の中には遺伝的要素が入っているものがあることは疑いのないところである。もし、わずかな血液や鱗のごく一部から採取した DNA を用いてその個体の遺伝情報（遺伝的素因）を知ることができるならば、そのような機能あるいは形質発現を決定づけている遺伝子あるいは遺伝子座を視覚的にとらえることができる。この方法では、DNA マーカーを目印にして目的とする遺伝形質のみを選択し、他の形質には多様性を持たせながら有用遺伝子（座）のみを固定することができるので、品種の実用化が期待される²⁾。このような見地から我々の研究室では、魚類を養殖する際の優良形質の一つであり、魚の効果的な養殖生産、また短期間で安定生産に寄与すると思われる高成長に着目した。

成長ホルモンは脊椎動物において成長の調製に主に影響している。その成長促進活性に加えて、ホルモンは浸透圧調節、電解質バランス調節、他の代謝機能等を含んでいるため、成長ホルモン遺伝子はクローニング、シークエンスが行われ、その発現の研究がさかんに行われている遺伝子の一つである⁴⁾。成長ホルモンは、多くの試みによって様々な魚種、アトランティックサーモン⁵⁾⁶⁾やニジマス⁷⁾⁸⁾、コイ⁹⁾、ヒラメ¹⁰⁾などの重要な養殖種において分離や解析がされるようになってきた。そして成長ホルモン遺伝子における多型も様々な魚種、例えば、ブラウトラウト¹¹⁾、チヌークサーモン¹²⁾、コホサーモン¹³⁾、ブリーク（コイ科の淡水魚）¹⁴⁾、ブリーム（タイの仲間）¹⁵⁾などで報告されている。そして成長ホルモン遺伝子の遺伝的多様性は、ウシのような家畜に共通して様々な量的特性（例えば、成長、卵の生産、乳脂肪生産、病気への抵抗力など）に関連していることがわかっている^{16) -20)}。魚では、Gross と Nilsson がアトランティックサーモンの成長ホルモン遺伝子における制限酵素断片長多型(RFLP)と体重との関連について報告している²¹⁾。これらの研究は養殖繁殖計画においてマーカー選抜育種 (MAS) の利用を可能にする有効な手段となるのではないかと考えられる。本研究では全雌発生ヒラメ *Paralichthys olivaceus* 集団における成長特性と成長ホルモン遺伝子の DNA 多型について解析を行った。

実験方法

材料 カネト水産（株）より譲与を受け本研究所で飼育した魚を使用した。遺伝的な性は雌だが、雄

ヒラメの成長ホルモン遺伝子多型

性ホルモンで精子を作るように変えた偽雄ヒラメ (Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*) と普通の雌を交配させると雌のみが生まれる (F1)。これにさらに偽雄を交配させて生まれたもの (F2) (2001年12月20日孵化) を実験魚とした。

採血 血球から DNA を抽出するため、ヘパリン (0.8mg/ml) を加えた KRP (154mM NaCl, 6mM KCl, 1mM MgCl₂, 10mM Na₂HPO₄, pH7.4) で処理したシリンジを用いてヒラメのしり鰭付近の尾静脈から血液を採血した。

血液からのゲノム DNA 抽出: DNeasy™ Tissue Kit (QIAGEN) Proteinase K をあらかじめ分注したマイクロチューブに、さらにヘパリン加 KRP で抗凝血処理した血液を添加し、PBS (NaCl, KCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, pH7.4) で全量 220μl に調製した。細胞可溶化液を添加し、完全にミックスした後、70℃で10分インキュベートした。エタノール (99.5%) を添加した後、吸着用ミニカラムに移し、洗浄液を用いて 6,000×g (8,000 rpm) で1分間の遠心洗浄を3回施した。溶出液をカラムに添加し、室温で1分間インキュベートした後 6,000×g (8,000 rpm) で1分間遠心分離して溶出した。このろ液をサンプルとした。

吸光度による純度の測定 抽出したゲノム DNA 溶液の純度を確かめるために、分光光度計 (Shimadzu UV-1200) を用いて、260nm, 280nm の吸光度を測定した。DNA 濃度と純度の算出は、DNA の濃度は 260nm の吸光度 1 = 50μg/ml として算出し、DNA の純度は 260nm / 280nm の OD 比によって算出した。

PCR: AmpliTaq Gold[®] PCR Master Mix (Applied Biosystems) AmpliTaq Gold[®] PCR Master Mix (15mM Tris/HCl (pH 8.05), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 200μM dNTP) を用いた増幅反応は、プライマー²²⁾ (PoliGH-1 : 5'-ACACTGAAGAAGACTGAACCACT-3', PoliGH-2 : 5'-ATCTTATTTGCTGACAGTAT-3') を 2μM とし、全量 50μl とした。Perkin-Elmer 9600 を用いて 95℃の4minの後、95℃で1min, 58℃で1min, そして72℃で2minを30サイクル、さらに72℃7minの増幅後、4℃で保存した。

アガロースゲル電気泳動 抽出したゲノム DNA は 0.6%アガロースゲルで、PCR 産物の DNA は 1.5%アガロースゲルで電気泳動解析した。分子量マーカーには Lambda phage DNA の Hind III 分解産物を用いた。50V の定電圧で泳動した後のゲルは、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線照射下で、デジタルカメラ (Kodak DC290 ZOOM) を用いて撮影した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 40% Acrylamide/Bis (29:1) (Acrylamide PAGE, Methylenebis-acrylamide) に、Glycerol と TBE を順次混合し、メスアップして調製した。調製したゲル溶液に N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED), 10% Ammonium Peroxodisulfate を加え、重合させた。分子量マーカーには 50 Base-Pair DNA Ladder を用いた。定電圧 100V で17時間泳動した。泳動後、ガラスプレートからゲルをはがし SYBER Gold で染色後、紫外線照射下で、デジタルカメラ (Kodak DC290 ZOOM) を用いて撮影した。

清水、沖増

ゲルからの DNA 抽出: MinElute™ Gel Extraction Kit (QIAGEN) MinElute™ Gel Extraction Kit は 1.5ml チューブにアガロースゲルから切り出したゲル (DNA バンド部分) とそのゲルの 3 倍量の Buffer QG を入れ、50℃で 10 分インキュベートしながら 2-3 分毎にボルテックスにかけて完全にゲルを溶かした。溶液の色が黄色であることを確認し、ゲルと同量のイソプロパノールを添加し混合した。新しいコレクションチューブ中の Gel Extraction カラムに移し、10,000×g (13,000 rpm) で 1 分間遠心した。この操作をさらに 2 回繰り返した。ろ液を捨ててさらにカラムを完全に乾燥するために 10,000×g (13,000 rpm) で 1 分間遠心した。カラムを新しい 1.5ml マイクロチューブにのせ、カラム中央へ Buffer EB を 30μl 添加し、室温で 1 分間インキュベートした後 10,000×g (13,000 rpm) で 1 分間遠心して溶出した。このろ液をサンプルとし、-20℃で保存した。

制限酵素切断 マイクロチューブにサンプル DNA, *Sau3A I*, 反応 Buffer を入れ滅菌蒸留水で全量 20μl にした。遠心機で底に落として ZYMOSTAT で、37℃, 60 分間インキュベートした。切断後 Loading Buffer を加えて反応を停止させ、-30℃で保存した。

データ解析 撮影したデジタル写真データを元に KODAK 1D Image Analysis Software を用いて画像解析を行った。

結果および考察

実験魚には、偽雄を使った雌性発生種苗のヒラメ集団を供した。体重別にグループ分けするため、孵化後、250 日齢のヒラメ (F2) 集団の体重と個体数のヒストグラムを Fig.1 に示した (体重 43±13g, 549 尾)。

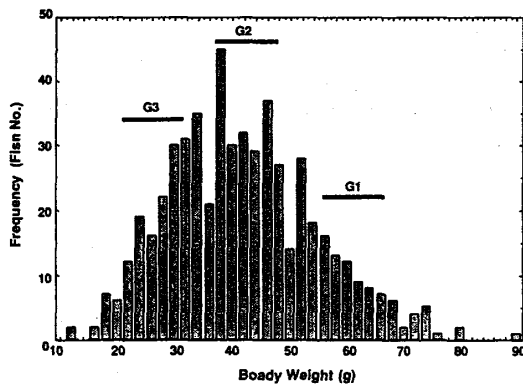


Fig.1 Frequency distribution of body weight on Japanese flounder

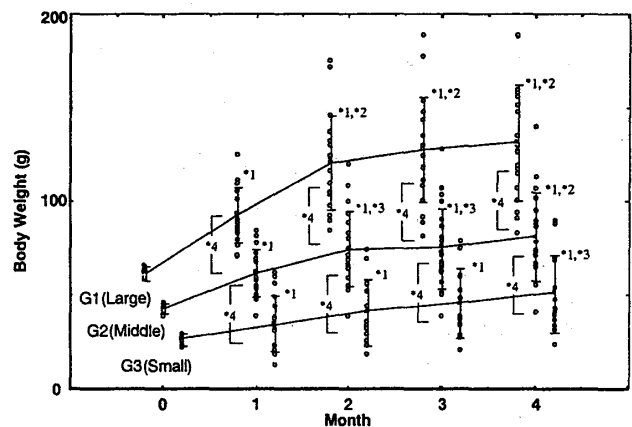


Fig. 2 Changes in body weight of Large, Middle, and Small group of Japanese flounder (n=20).

Significantly difference from the 0 month with student's t-test (*1 p<0.01).
Significantly difference from the 1 month with student's t-test (*2 p<0.01, *3 p<0.05).
Significantly difference with student's t-test (*4 p<0.01).

ヒラメの成長ホルモン遺伝子多型

この結果をもとに Large、Middle、Small の各々 20 尾ずつの有意差の認められる 3 グループに分けた。それぞれ G1 (56g 以上), G2 (37-49g), G3 (30g 以下)とした。また Fig.2 は分別後 4 ヶ月間の各グループの成長パターンを示した。11 月, 12 月, 1 月は水温の低下に伴って成長のスピードは緩やかになったが, グループ間ではいずれの月の測定時においても, 危険率 1%未満で有意差が認められた。

ゲノム DNA の抽出するために 3 グループから各々 20 尾ずつより採血を行った。抽出にはシリカゲルメンブレンを使用した QIAGEN DNeasy™ Tissue Kit を用いた。その結果, G1, G2, G3 の DNA 純度 OD 比は 1.24 ~ 2.00 とややばらつきがあるが, DNA 濃度は 14.1 ~ 140.5 $\mu\text{g/ml}$ と PCR を行うには十分量の DNA が抽出されたことが確認された。また, この DNA 溶液をアガロース電気泳動し抽出の状態を確認した。その結果, 発色されたバンドは, ほぼ同位置に均一なバンド (24.5kbp) が認められ, 3 グループとも同様に抽出されたゲノム DNA であった(Fig.3)。

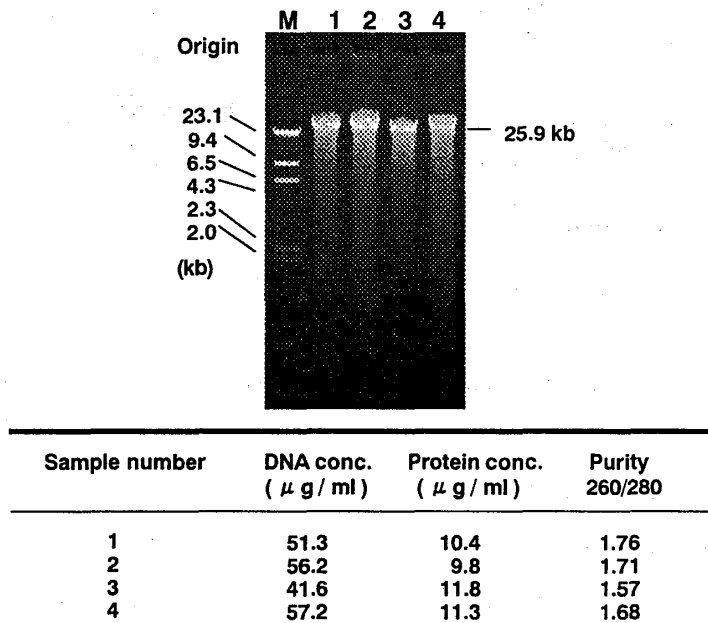


Fig. 3 Electrophoresis pattern and purity of genomic DNA extracted from blood of Japanese flounder.

The DNA was extracted from four individuals. Lane M contains *Hind* III digests of lambda phage DNase a molecular weight marker. Extracted DNA were analyzed by electrophoresis in 0.6% (v/w) agarose gels and detected by staining with ethidium bromide.

実験に供したヒラメ集団の遺伝的変異保有量を算出するため, マイクロサテライト DNA 多型解析を行った (結果は示さず)。マイクロサテライト領域は VNTR である短い塩基単位の繰り返す領域であり, その繰り返し数は, 個体ごとに極めて変異に富むと共に各遺伝子座によっても多型性の程度が異なっている。そ

のため、このように高度の多型性を有し、簡易で正確な対立遺伝子の解析が可能なマイクロサテライト法を応用することにより集団解析における遺伝マーカーとしても極めて有効である。10種のマイクロサテライト遺伝子座における平均アレル数、平均ヘテロ接合体率はグループ間に差は認められなかったが、マイクロサテライト遺伝子座ごとに見るとグループに特異的なアレル頻度の特徴が認められた。また得られたヘテロ接合体率(0.733 ~ 0.765)は、現在の放流用種苗集団に見られるヘテロ接合体率(0.800 ~ 0.900)と比較して低値であった。これらのことより、本研究で供したヒラメ集団は、遺伝的変異性が低く遺伝的に均一な集団であることが明らかになった。

ヒラメ成長ホルモン遺伝子の塩基配列よりデザインされたオリゴヌクレオチドプライマー対を用いた(Fig.4)。PCRは、ヒラメ成長ホルモン遺伝子増幅に最適と考えられる Hot start である AmpliTaq Gold[®] PCR

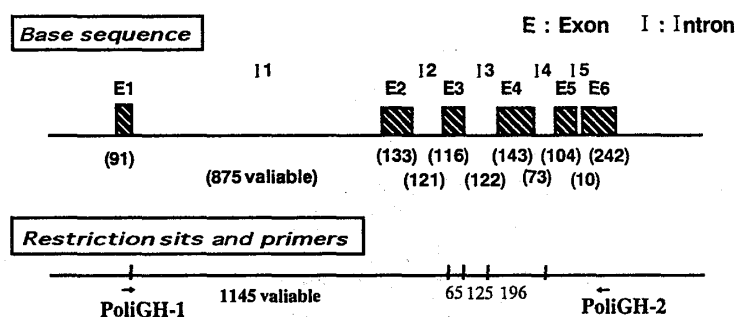


Fig.4 Structure and *Sau3A* I restriction sites $\left| \begin{array}{c} \text{GATC} \\ \text{CTAG} \end{array} \right|$ of the growth hormone gene from flounder (Tanaka *et al.*)

Master Mix (Applied Biosystems)を使用した。プライマー (Poli GH-1, Poli GH-2)、AmpliTaq Gold[®] PCR Master Mix, 滅菌蒸留水, 鋳型 DNA を PCR チューブに直接加えて全量 50 μ l とした。PCR 反応は、Perkin-Elmer 9600 を用いて 95 $^{\circ}$ C Hot start, 4min, 95 $^{\circ}$ C で 1min (denature), 58 $^{\circ}$ C で 1min (anneal), 72 $^{\circ}$ C 2 min (extend) を 35 サイクル, 72 $^{\circ}$ C 7min の伸長を施し増幅後, 4 $^{\circ}$ C で保存した (Fig.5)。次に PCR 増幅産物を制限酵素 *Sau3A* I で切断した。それぞれを 37 $^{\circ}$ C, 1 時間インキュベートし, 5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した結果, およそ 1.5kbp 付近に多型が検出された。その結果, グループ間に共通のハプロタイプが存在した。この結果を基に Fig.の多型バンドを解析したところ, 第一イントロンを含む *Sau3A* I 断片 (1,310~1,700bp) において 8 種類のハプロタイプが認められた (Fig.6)。理論的に, 8 種類のハプロタイプからは 28 種類のゲノタイプを生じるが, 本実験では, 12 種類のゲノタイプが認められた。ハプロタイプの頻度は 3 つの体重グループによって異なっていた。それぞれの頻度を元に各グループにおける発現頻度分布特徴を調べたところ, G3 は G1, G2 に比べて, 高頻度の D ハプロタイプを示し, G1, G2 とともに E ハ

ヒラメの成長ホルモン遺伝子多型

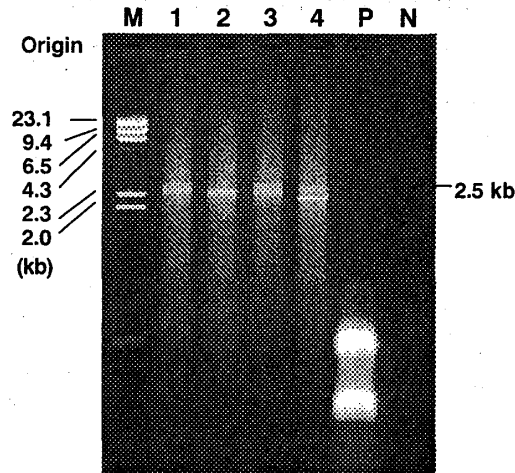


Fig.5 Hot start PCR products of growth hormone gene

Four Japanese flounder DNA were amplified under condition ("AmpliTaq Gold Master Mix") with primer Poli GH-1, Poli GH-2. Samples were amplified for 1 cycle of denature 95°C for 4 min, 30 cycles of 95°C for 1 min, 58°C for 1 min, 72°C for 2 min, and 1 cycle of 72°C for 7 min. PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.5% (v/w) agarose gels and detected by staining with SYBER[®] Gold. Lane M contains *Hind* III digests of lambda phage DNase molecular weight marker. The control lambda DNA and control primers are included to assay the ability of the PCR beads to amplify DNA (lane P). Lane N is negative control (minus template DNA).

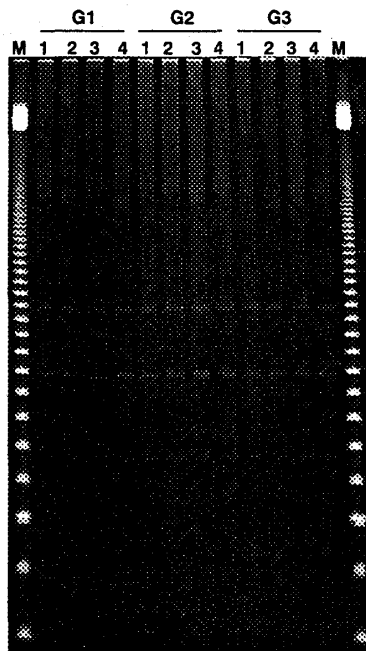


Fig.6 Banding patterns of the *Sau*3A I digested Japanese flounder GH gene segments.

Four Japanese flounder (G1, G2, G3) DNA were amplified "AmpliTaq Gold Master Mix" with primer Poli GH-1, Poli GH-2. Samples were included DNA, M buffer, and *Sau*3A I. This mixture were incubated at 37°C for 1 hour. Products were analyzed by electrophoresis in 5% (v/w) polyacrylamide gel and detected by staining with SYBER[®] Gold. Lane M contains 50bp DNA ladder.

Table.1 Distribution of haplotype and genotype frequencies among size groups

Haplotype	Group 1 (large) N=20		Group 2 (middle) N=20		Group 3 (small) N=19		Total N=39
	No.	frequencies	No.	frequencies	No.	frequencies	frequencies
A	0	0.000	1	0.025	0	0.000	0.008
B	1	0.025	0	0.000	4	0.105	0.042
C	3	0.075	0	0.000	0	0.000	0.025
D	9	0.225	7	0.175	12	0.316	0.237
E	10	0.250	11	0.275	7	0.184	0.237
F	0	0.000	3	0.075	0	0.000	0.025
G	9	0.225	10	0.250	8	0.211	0.229
H	8	0.200	8	0.200	7	0.184	0.195
Genotype	No.	frequencies	No.	frequencies	No.	frequencies	frequencies
GG	0	0.000	1	0.050	0	0.000	0.017
AD	0	0.000	1	0.050	0	0.000	0.017
BD	1	0.050	0	0.000	4	0.211	0.085
CD	2	0.100	0	0.000	0	0.000	0.034
CE	1	0.050	0	0.000	0	0.000	0.017
DE	1	0.050	6	0.300	3	0.158	0.169
DG	5	0.250	0	0.000	5	0.263	0.169
EG	2	0.100	2	0.100	0	0.000	0.068
EH	6	0.300	3	0.150	4	0.211	0.220
FG	0	0.000	2	0.100	0	0.000	0.034
FH	0	0.000	1	0.050	0	0.000	0.017
GH	2	0.100	4	0.200	3	0.158	0.153

プロタイプの発現頻度が高かった。また C ハプロタイプは G1 において, F ハプロタイプは G2 においてのみ確認されました。またゲノタイプにおいてもその頻度はグループ別に異なっており, G3 は G1, G2 に比べて, 高頻度の BD ゲノタイプを示した (Table.1)。

成長曲線の有意差検定を行ったところ, ひと月ごとの測定では3つの各グループ間の体重が危険率 1%未満で有意に異なった (Fig.3)。G1、および G2 においては, 測定開始から2ヶ月間, G3 においては1ヶ月間, 有意な体重増加が認められたが, それ以降は大きな成長は認められなかった。また G1 は G2, G3 と比較して実験初期に体重が大きく増加する傾向が認められた。秋から冬にかけての低水温期には, 各グループに顕著な成長は認められなかった。このように G1 は, 他の二グループとは異なる成長の傾向を示し, 成長に関わる何らかの因子を有するのではないかと推察される。G1 では C ハプロタイプが特徴的に発現していたことから, 成長性の高い魚を選抜するための DNA マーカーとなる可能性が示唆された。本試験において, 体重別に3グループに分けて4ヶ月間飼育したところ, G2 のなかには G1, および G3 に移行しつつある個体が出現していることから, 将来的には, 各グループの個体数を増やして中・長期的に体重増加をモニターしていく必要がある。

謝 辞

本研究を進めるにあたり御指導, 御助言を頂いた福山大学工学部海洋生物工学科 加藤征史郎教授, 同

ヒラメの成長ホルモン遺伝子多型

阪本憲司助手, 同 研究員 芦田貴行氏, ならびに雨村明倫前教授に深く感謝いたします。本研究に携わり、多大な協力を頂きました分子育種工学研究室の卒業研究生に厚く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) アクアゲノム研究の未来：海洋と生物 **138** (vol.24 no.1) (2002).
- 2) 次世代の水産バイオテクノロジー：隆島忠夫編 成山堂書店 (2000).
- 3) 岡本信明, 坂本崇：マーカー選抜育種による耐病性品種の確率を目指して遺伝子地図の作製と QTL 解析 水産増殖、**50**, 493-502 (2002).
- 4) M. Watahiki, M. Yamamoto, M. Yamakawa, M. Tanaka, and K. Nakashima : Conserved and unique amino acid residues in the domains of the growth hormones. *J. Biol. Chem.*, **264**, 312-316 (1989).
- 5) B. Johansen, O.C. Johansen, and S. Valla : The complete nucleotide sequence of the growth hormone gene from Atlantic salmon. *Gene*, **77**, 317-324 (1989).
- 6) R. Male, A.H. Nerland, J.B. Lorens, W. Tell, I. Lossius, and G.K. Totland : The complete nucleotide sequence Atlantic salmon growth hormone I gene. *Biochim. Biophys. Acta*, **1130**, 345-348 (1992).
- 7) L.B. Agellon, S.L. Davies, C.M. Lin, T.T. Chen, and D.A. Powers : Rainbow trout has two genes for growth hormone. *Mol. Reprod. Dev.* **1**, 11-17 (1998).
- 8) F. Rentier-Delrue, D. Swennen, L. Mercier, M. Lion, O. Benrubi, and J.A. Martial : Molecular cloning and characterization of two forms of trout growth hormone cDNA : Expression and secretion of tGH-II by *Escherichia coli*. *DNA (N.Y.)* **8**, 109-117 (1989).
- 9) C. Chiou, H. Chen, and W. Chang : The complete nucleotide sequence of the growth hormone gene from the common carp. *Biochem. Biophys. Acta* **1087**, 91-94 (1990).
- 10) M. Tanaka, Y. Toma, T. Ohkubo, S. Sudo, and K. Nakashima : Sequence of the flounder growth hormone encoding gene and its promoter region. *Gene* **165**, 321-322 (1995).
- 11) R. Gross, and J. Nilsson : Application of heteroduplex analysis for detecting variation within the growth hormone 2 gene in *Salmo trutta* L.(brown trout). *Heredity* **74**, 286-295 (1995).
- 12) L.K. Park, P. Moran, and D.A. Dightman : A polymorphism in intron D of the chinook salmon growth hormone 2 gene. *Anim. Genet.* **26**, 285 (1995.)
- 13) S.H. Forbes, K.L. Knudsen, T.W. North, and F.W. Allendorf : One of two growth hormone genes in soho salmon is sex-linked. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 1628-1631 (1994).
- 14) P. Schlee, H. Fuchs, J. Blusch, T. Werner, O. Rottmann, and H. Stein : Genetic polymorphism in the intron of the growth hormone gene of the bleak. *J. Fish. Biol.* **48**, 1275-1277 (1996.)
- 15) R. Gross, P. Schlee, H. Stein, and O. Rottmann : Detection of allelic variation within the growth hormone gene in common bream using heteroduplex analysis. *J. Fish Biol.* **48**, 1283-1287 (1996).

- 16) J.L. Rocha, J.F. Baker, J.E. Womack, J.O. Sanders, and J.F. Taylor : Associations between RFLPs and quantitative traits in beef cattle. *J. Anim. Sci.* **69**, 201 (1991).
- 17) S. Hoj, M. Fredholm, N.J. Larsen, and V.H. Nielsen : Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. *Anim. Genet.* **24**, 91-96 (1993).
- 18) P. Schlee, R. Graml, O. Rottmann, and F. Pirchner : Influence of growth-hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls. *J. Anim. Genet.* **111**, 253-256 (1994).
- 19) V.H. Nielsen, N.J. Larsen, and N. Agergaard : Association of DNA Polymorphism in the growth hormone gene with basalplasma growth-hormone concentration and production traits in pig. *J. Anim. Breed Genet.* **112**, 205-212 (1995).
- 20) U. Kuhnlein, L. Ni, S. Weigend, J.S. Gavora, W. FairFull, and D. Zadworry : DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene: Response to selection for disease resistance and association with egg production. *Anim. Genet* **28**, 116-123 (1997).
- 21) R. Gross, and J. Nilsson : Restriction fragment length polymorphism at the growth hormone 1 gene in Atlantic salmon(*Salmo salar* L.)and its association with weight among the offspring of a hatchery stock. *Aquaculture* **173**, 73-80 (1999).
- 22) J.H. Kang, S.J. Lee, S.R. Park, and H.Y. Ryu : DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish, Sci.* **68**, 494-498 (2002).

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (2), 17-27 (2003)

**DNA polymorphism in the growth hormone gene
and its association with body size
in the feminized seedings of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*
Hiromi Simidzu, and Eiji Okimasu***

Department of Marine Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology,
Fukuyama University,
Fukuyama, Hiroshima 729-0290, Japan

Variation within the growth hormone gene and its association with growth trait in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, was investigated. Based on microsatellite analysis, it was demonstrated that the distinct genetic divergence was not observed within the feminized seeding. Polymorphisms of various lengths were also detected by the digestion of the polymerase chain

ヒラメの成長ホルモン遺伝子多型

reaction (PCR)-amplified growth hormone gene fragment with *Sau3AI* restriction enzyme. To study the possible association between variation in the growth hormone gene fragment and body weight, 60 individuals of the feminized seedlings of three various size (large, medium, and small weight) were selected and the entire genetic structure of the growth hormone gene was analysed. Significant heterogeneity of the growth hormone gene with haplotype and genotype frequencies was detected among the different-sized groups.

Key word: microsatellite, genetic divergence, PCR, *Sau3AI*, growth hormone gene