

ハタハタ *Arctoscopus japonicus* における集団遺伝学的解析 のためのマイクロサテライト DNA マーカーの検討

Screening of microsatellite DNA markers for population genetic analysis of sailfin sandfish *Arctoscopus japonicus*

栗原寛明^{1*}・池田 実^{2*}

Hiroaki Kurihara*, Minoru Ikeda*

東北大学大学院農学研究科附属女川フィールドセンター沿岸フィールド生物生産学研究室, 宮城県牡鹿郡女川町小乗 2-10-1

Laboratory of Marine & Coastal Ecosystem Science, Onagawa Field Center, Graduate School of Tohoku University, 2-10-1, Konori, Onagawa, Oshika, Miyagi 986-2248, Japan.

*Corresponding authors, e-mail:

¹kurihara.hiroaki.p3@dc.tohoku.ac.jp; ²minoru.ikeda.a6@tohoku.ac.jp

Abstract

The sailfin sandfish *Arctoscopus japonicus* is a common demersal fish in the Sea of Japan and one of the important fishery resources in Japan and Korea. Despite the need for information on genetic population structure for resource management, population genetic studies in this species have been based on only RFLP and sequence analysis of a part of the mitochondrial DNA and classical allozyme analysis. These analyses have presented the roughly group structure of the species, but have not resolved enough to mention the fine scale genetic structure within each group. Here we screened microsatellite DNA markers suitable for fine scale population structure from previously reported papers based on fit of Hardy-Weinberg equilibrium, the presence or absence of null allele, large allele dropouts, and linkage disequilibrium. Using the resulting 10 loci selected, population genetic analyses of two sample populations belonging to different genetic groups showed relatively high heterozygosity (H_c : 0.764 and 0.755) in both sample populations, and high degree of genetic differentiation between them ($F_{ST} = 0.0709$, $R_{ST} = 0.1598$) which was consistent with predictions from previous studies. Furthermore, Bayesian clustering revealed that group attributes can be correctly estimated at the individual level. These results suggest that the 10 loci selected have the potential to make a significant contribution in future population genetic studies of this species.

Key words: Trichodontidae; short tandem repeats; genetic population structure; management unit; stock

緒言

ハタハタ *Arctoscopus japonicus* (Steindachner 1881) は、ハタハタ科 Trichodontidae ハタハタ属に分類される底生海産魚の一種である (Imamura et al. 2005; Nelson et al. 2016)。本種はオホーツク海および日本海全域、北海道の東部沿岸から宮城県

沖合の太平洋沿岸域に分布し、成長段階に応じて沖合の成育場と沿岸の産卵場を季節往來する索餌回遊生態を持つ (沖山 1970; 落合・田中 1986; Okiyama 1990; Mecklenburg 2003)。本種の遺伝的集団構造については、アロザイム (藤野・網田 1984) やミトコンドリア (mt) DNA 調節領域 (柳本 2004; Shirai et al. 2006;

白井ら 2007) を遺伝マーカーとして調べられており、本種には少なくとも 3 つの遺伝的グループが存在することが示されており、道東から道南の沿岸に産卵場を形成する北海道太平洋グループ (Southern Hokkaido: SH)、日本海側では秋田県沿岸海域と朝鮮半島東岸にそれぞれ産卵場を形成する日本西岸グループ (Western Japan: WJ) および朝鮮半島東岸グループ (Eastern Korea: EK) に大別されている (Shirai et al. 2006)。また、これらの 3 グループの中には量的形態形質や資源動態の独立性に基づいて区別される複数の系群が資源管理の単位として設定されている (沖山 1970; 小林・加賀 1981; 星野 2011)。

集団遺伝学的にみると、系群とはアリル頻度の違いで他の系群と区別でき、独立した資源動態を持った個々の集団として定義される (例えば、Moritz 1994; Fraser and Bernatchez 2001; Palsbøll et al. 2007)。ハタハタの場合、グループ内の系群間の遺伝的差異は未だに明らかにされておらず、本種のより適切な資源管理のためには、各系群の遺伝的特徴ならびに系群間の遺伝的差異について明らかにする必要がある。もし設定されている系群間に遺伝的差異が存在し、個体レベルでも系群の判別ができれば、索餌回遊時に複数の系群が混合していても、各系群に属する個体の割合を定量的に求めることができ、各系群の沖合での回遊規模を把握することにもつながることが期待される。

マイクロサテライト DNA マーカーは、突然変異率が高いためアリル数が多く、個体の判別能も高いことから (Guichoux et al. 2011)、ハタハタについて系群間の遺伝的差異の検出ならびに個体レベルでの系群判別が可能になることが期待される。ハタハタで開発されたマイクロサテライト DNA マーカーには Park et al. (2006) が報告した 12 座位がある。このうち、5 座位では遺伝子型の観察分布が Hardy-Weinberg 平衡 (以下 HWE と略する)

によって期待される分布から著しく逸脱していたが、この主要因であるラージアリルドロップアウトやヌルアリルについては考慮されておらず、集団構造解析のマーカーとしての可否をあらためて吟味する必要がある。一方、ハタハタが属する棘鱗上目 Actinopterygii を対象とした汎用性の高いマイクロサテライト DNA マーカーが報告されており (Gotoh et al. 2013)、このマーカー群も本種の集団構造解析に使用できる可能性がある。本研究では、Park et al. (2006) と Gotoh et al. (2013) が報告したプライマーセットの中からスクリーニングを行い、ハタハタの集団構造解析に適したマイクロサテライト DNA マーカーを選定することを目的とした。

材料および方法

標本集団

本研究では、Shirai et al. (2006) が mtDNA 調節領域の塩基配列分析で使用した DNA サンプルのうち、北海道太平洋グループ (SH) の厚岸および朝鮮半島東岸グループ (EK) の見島の 2 標本集団 (それぞれ 30 個体、計 60 個体) を使用した。グループ内の系群としては厚岸が釧路系群、見島が日本海西部系群であると考えられる。

マイクロサテライト DNA マーカーのスクリーニング

本研究で検討したマイクロサテライト DNA 座位とそのプライマーセットを Table S1 に示す。これまでにハタハタの集団遺伝学的解析のために Park et al. (2006) が開発したプライマーセット 8 組、Gotoh et al. (2013) の報告した棘鱗上目の汎用プライマー 11 組をスクリーニングの対象とした。Park et al. (2006) の場合は、各座位における遺伝子型の観察分布が HWE の下での期待分布から逸脱していない座位を選んだ。また、Gotoh et al. (2013)

の場合は、調査された魚類の中で先行研究 (Imamura et al. 2005; Smith and Busby 2014) にてハタハタと系統が比較的近いと推定されているカジカ科 Cottidae のカジカ *Cottus pollux* およびウラナイカジカ科 Psychrolutidae のガンコ *Dasycottus setiger* で PCR 増幅が確認された座位を選んだ。

PCR 増幅は Blacket et al. (2012) の方法 (Strategy II: Singleplex using multiple fluorophores) に従った。1 検体あたりの PCR 反応液の組成は、ゲノム DNA 0.8 μ L (約 10 ng/ μ L)、2 \times Gflex PCR Buffer 5.0 μ L、tail 配列を付加した forward プライマー 0.15 μ M、reverse プライマー 0.5 μ M、汎用蛍光付加プライマー 0.2 μ M、Tks Gflex DNA Polymerase (TaKaRa Bio Inc.) 0.2 μ L であり、超純水で総量を 10 μ L にした。PCR 反応条件は、94 $^{\circ}$ C で 1 分間の熱変性の後、98 $^{\circ}$ C で 10 秒間の熱変性、58–60 $^{\circ}$ C で 15 秒間のアニーリングおよび 68 $^{\circ}$ C で 30 秒の伸長を 38–48 回反復とした。得られた PCR 増幅産物については、GeneScan 600 LIZ size standard (Applied Biosystems) と共に SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によってキャピラリー電気泳動を行った後、GeneMapper ver. 6.0 (Applied Biosystems) を用いてジェノタイピングした。

ジェノタイピング後の遺伝子型データについて Micro-Checker ver. 2.3.3 (van Oosterhout et al. 2004) により、各座位におけるヌアルル頻度およびラージアリルドロップアウトの有無を推定した。GENEPOP ver. 4.7.5 (Raymond and Rousset 1995) を用いて、各座位の HWE との適合性を検討するため正確確率検定、座位間の連鎖不平衡 (linkage disequilibrium: 以下 LD と略する) の有無を調べるための対数尤度比検定を実施した ($\alpha = 0.05$)。どちらの検定においても p 値をマルコフ連鎖モンテカルロ (Markov Chain Monte Carlo: 以下 MCMC と略する) アルゴリズムによって推定し (Dememorization: 10,000; batch

length: 100; batch number: 10,000)、得られた p 値については多重比較検定に伴う第一種過誤を避けるために sequential Bonferroni 補正を施した (Rice 1989)。以上の解析によって、ヌアルルやラージアリルドロップアウトに伴う HWE からの逸脱が検出されず、さらに互いに LD の関係にない座位を選定した。その後、これらの座位の中立性を Excoffier et al. (2009) と Beaumont and Nichols (1996) の方法でそれぞれ検定した (F_{ST} outlier test, $\alpha = 0.05$)。Excoffier et al. (2009) の方法については Arlequin ver. 3.5.2.2 (Excoffier and Lischer 2010) を用いて実行し、100 の任意交配集団の下でのコアレセントシミュレーションを 20,000 回繰り返すことで、 F_{ST} 値の帰無分布を得た。一方、Beaumont and Nichols (1996) の方法については LOSITAN (Antao et al. 2008) を用いて行った。非中立座位の存在による F_{ST} 値の帰無分布の推定バイアスを避けるため、解析の際の初期 F_{ST} 値を 2 段階の解析によって推定し (オプション "Neutral" mean F_{ST})、無限対立遺伝子モデルとステップワイズ突然変異モデルの下で 50,000 回のシミュレーションを実行した。両方の解析において中立性が棄却された座位を中立ではない座位と判断した。

集団遺伝学的解析

スクリーニングされたマイクロサテライト DNA 座位の遺伝子型に基づき、集団遺伝学的解析を行った。厚岸と見島の標本集団間には、日本海および太平洋という海域の違いによって説明できる比較的大きな遺伝的分化が生じていることがアロザイム分析やミトコンドリア DNA 分析により示されている (藤野・網田 1984; 柳本, 2004; Shirai et al. 2006)。候補としたマイクロサテライト DNA 座位においても同様な違いが生じているかどうかを検討することで、選定した座位の有用性を判断できると考えた。遺伝的多様性を表す要約統計量としてアリル数 (n_a)、有効アリル数

(n_e , Kimura and Crow 1964)、ヘテロ接合度の期待値 (H_e)、およびヘテロ接合度の観察値 (H_o) を GeneA1Ex ver. 6.5 (Peakall and Smouse 2012) を使用し、各標本集団について求めた。標本集団間の遺伝的分化の程度を明らかにするため、Arlequin ver. 3.5.2.2によって、 F_{ST} および R_{ST} 値を算出した。 $F_{ST} > 0$ および $R_{ST} > 0$ の統計的有意性については10,000回の permutation test ($\alpha = 0.05$) によって検定した。選定した座位を用いて個体レベルで集団の属性を判別できるかどうかを検討するため、STRUCTURE ver. 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) によるベイジアンクラスタリング、および主成分分析 (principal components analysis: 以下 PCA と略する) を行った。STRUCTURE による解析では Admixture モデルを仮定した。なお、標本サイズが小さかったため、解析では事前情報として各個体が抽出された標本集団の情報を考慮した (LOCPRIOR オプション)。各個体の Admixture proportion を 1,000,000 世代の MCMC によって求めた (酔歩状態にある初期 500,000 世代については burn-in した)。最適なクラスター数 (K) を決定するため、 $K = 1-6$ を仮定し、各 K について6回の独立した解析を行うことで、 ΔK 統計量 (Evanno et al. 2005) を算出した。なお、一連の解析において α 値を MCMC によって推定し、 λ 値についてはマニュアルで推奨されている1に固定した。 ΔK の値から最適と判断された K における6回分の解析結果については CULUMPP ver. 1.1.2 (Jakobsson and Rosenberg 2007) の Greedy アルゴリズムで要約した。PCA には統計言語 R ver. 3.6.3 (R core team, 2020) のパッケージ ade4 (Dray and Dufour 2007) に含まれる dudi.pca 関数を用いた。主成分スコアについては、多変量正規分布における95%信頼区間をパッケージ ggplot2 (Wickham 2016) の stat_ellipse 関数で求め、可視化した。主成分に対する因子負荷量が0.2以上、もしくは-0.2以下であるアレルは、特に、その主成分に対する相関がある

とし、標本集団間の遺伝的差異を反映している座位を判断した。

結果

マイクロサテライト DNA 座位のスクリーニング

スクリーニングした 19 座位のマイクロサテライト DNA 座位のうち、10 座位 (*DR55*、*DR148*、*DR225*、*Orla2-91*、*Orla3-65*、*Orla5-131*、*Orla9-204*、*Orla16-32*、*Orla17-188* および *Orla21-231*) ではヌルアレル、ラージアリルドロップアウト、HWE からの逸脱および LD が検出されなかった (Table S1, Fig. 1)。一方、*Orla12-160*、*Orla20-134* および *Orla22-135* の3座位では増幅断片が得られなかった。*DR72*、*DR265* および *Orla8-113* の3座位は増幅断片が得られたものの、非特異的増幅断片が多く確認され、ジェノタイピングが出来なかった。残る座位のうち、*DR118* は厚岸において、*DR55* では両方の標本集団において遺伝子型頻度の観察値が HWE の期待値から有意に逸脱していた。また、*DR285* では変異が観察されなかった。以上の9座位 (*DR55*、*DR72*、*DR118*、*DR265*、*DR285*、*Orla8-113*、*Orla12-160*、*Orla20-134* および *Orla22-135*) は集団遺伝学的解析には不適と判断した。

スクリーニングをパスした座位における n_a の最小値は *DR148* (厚岸) の5、最大値は *Orla5-131* (見島) の30であった (Table 1)。 n_a の平均値は厚岸で12.1、見島で14.8であった。一方、 n_e の最小値は *DR225* (見島) の1.4、最大値は *Orla2-91* (見島) の22.2であった。 n_e の平均値は厚岸で7.5、見島で8.4であった。各座位における H_o は *DR148* (厚岸) で0.200と最も小さく、*Orla2-91* (見島) で1.000と最も大きかった。 H_o の平均値は厚岸と見島でそれぞれ、0.760と0.773であった。 H_e も H_o と同様に最小値は *DR148* (厚岸) で0.187、最大値は *Orla2-91* (見島) で0.955となった。 H_e の平均値は厚岸で0.764、見島で0.755であった。

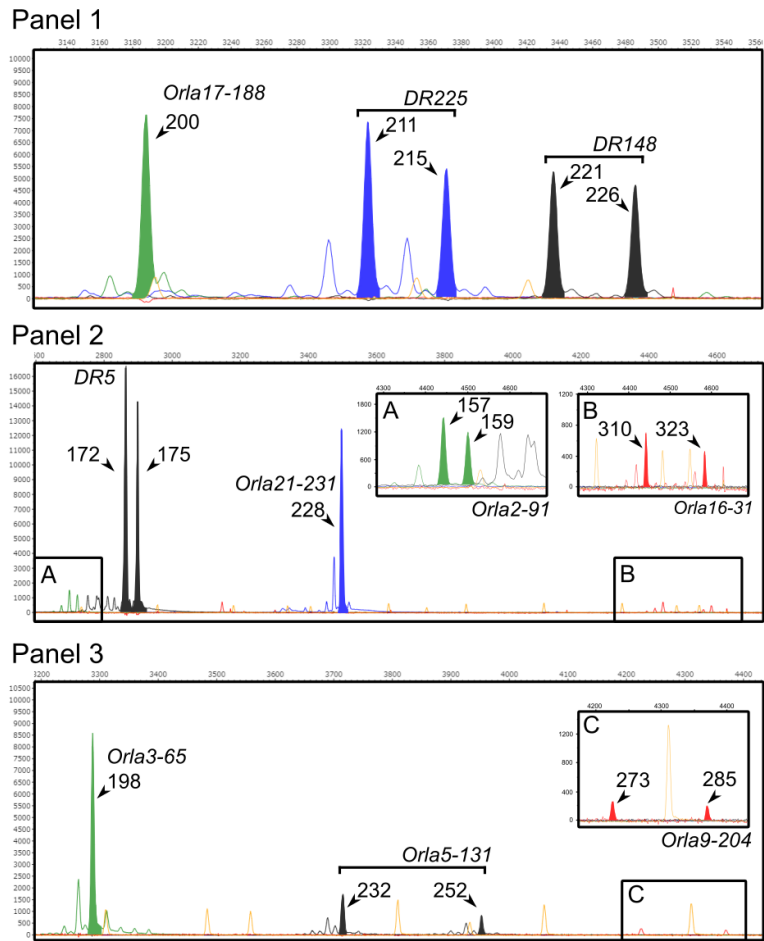


Fig. 1. Electropherogram of the 10 microsatellite DNA of the sailfin sandfish. Three or four loci were multiloaded in the fragment analysis (3 panels).

Table 1. Summary statistics of microsatellites DNA loci in two populations of the sailfin sandfish. n_a , n_e , H_o and H_e indicates the number of alleles, the effective number of alleles (Kimura and Crow, 1964), observed heterozygosity and expected heterozygosity, respectively.

Panel	Locus	Sample population					
		Akkeshi (Pacific Ocean)			Mishima (Sea of Japan)		
		n_a	n_e	H_o/H_e	n_a	n_e	H_o/H_e
1	<i>DR148</i>	5	1.2	0.200/0.187	6	1.8	0.433/0.441
	<i>DR225</i>	10	5.4	0.800/0.814	6	1.4	0.233/0.271
	<i>Orla17-188</i>	6	4.5	0.900/0.776	6	3.8	0.933/0.739
2	<i>DR5</i>	16	11.3	0.900/0.912	21	14.3	0.933/0.930
	<i>Orla16-32</i>	10	2.8	0.767/0.642	12	6.5	0.733/0.847
	<i>Orla21-231</i>	16	9.5	0.833/0.894	17	9.1	0.867/0.891
	<i>Orla2-91</i>	24	18.8	0.933/0.947	29	22.2	1.000/0.955
3	<i>Orla3-65</i>	8	4.9	0.667/0.796	10	4.5	0.833/0.778
	<i>Orla5-131</i>	18	12.9	0.900/0.923	30	16.1	0.867/0.938
	<i>Orla9-204</i>	8	3.9	0.700/0.745	11	4.1	0.900/0.756
	Mean	12.1	7.5	0.760/0.764	14.8	8.4	0.773/0.755

中立性検定の結果、*Orla2-91* と *Orla21-231* は Excoffier et al. (2009) と Beaumont and Nichols (1996) 両方の方法で中立性が棄却された ($p < 0.05$)。 *DR5*、*DR225*、および *Orla5-131* については Excoffier et al. (2009) の方法でのみ中立性が棄却された。

集団遺伝学的解析

選定されたマイクロサテライト DNA 10 座位のうち、*Orla2-91* および *Orla21-231* の 2 座位は中立性が棄却されたことから、集団遺伝学的解析におけるこれらの座位の影響を評価するため、各解析を中立な 8 座位のみのデータセットと非中立な 2 座位を含めた全 10 座位のデータセットに対して実行した。集団間の遺伝的分化に関して、算出された F_{ST} およ

び R_{ST} 値は、中立な 8 座位のデータセットでは 0.0709 と 0.1598、全 10 座位のデータセットでは 0.0533 と 0.1159 で、 F_{ST} および R_{ST} 値はどちらのデータセットにおいても有意に 0 よりも大きく ($p < 0.001$)、 R_{ST} の値が F_{ST} の値を上回った。また、全座位のデータセットよりも中立な 8 座位のデータセットの方が F_{ST} と R_{ST} ともに高い値を示した。

STRUCTURE によるベイジアンクラスタリングでは、どちらのデータセットに基づいても $K = 2$ の時に ΔK 値は最大となり (中立座位データセット: $\ln P(K) = -1938.7$, $\Delta K = 10.6$; 全座位データセット: $\ln P(K) = -2694.7$, $\Delta K = 5.1$)、2 つの遺伝的クラスターの存在が示唆された (Fig. 2a)。 $K = 2$ のときの admixture プロットに注目すると、見島の個体が帰属する

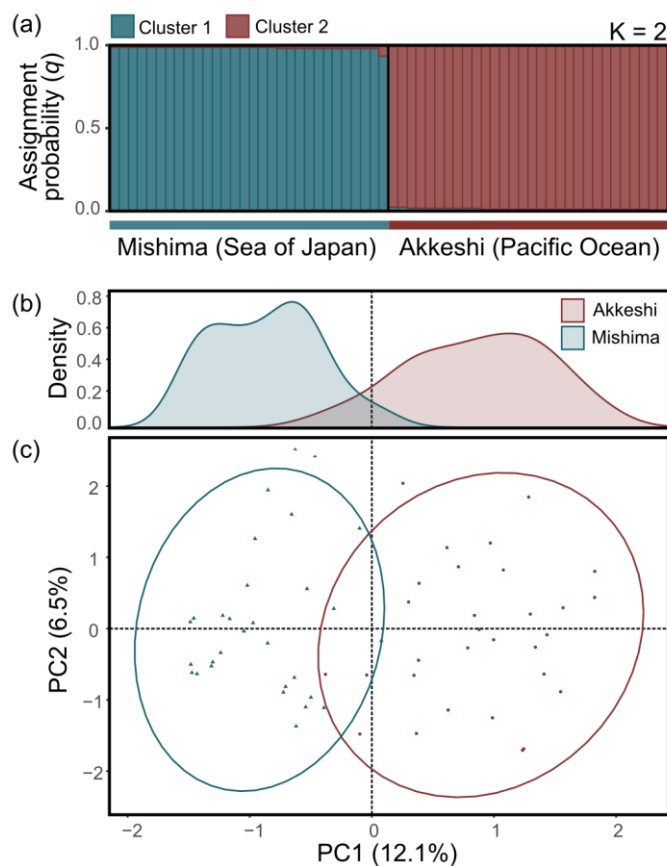


Fig. 2. (a) the result of Bayesian clustering analysis computed by STRUCTURE software under the optimal number of clusters $K = 2$ suggested by ΔK value (Evanno et al., 2005). (b) the density plot of the 1st principal component and (c) the scatter plot of the 1st and 2nd principal components. Each plot represents samples and the circles indicate 95% confidence ellipses of the populations. All these results were analyzed based on 8 neutral loci datasets.

クラスター1 と、厚岸の個体が帰属するクラスター2 に分けられた。どちらのデータセットに基づく解析でも、各個体のクラスターへの帰属を意味する q 値はいずれも 0.95 以上と高い値を示しており、2 つの標本集団の遺伝的組成が異なることが明確となった。推定されたクラスター1 のヘテロ接合度の期待値 H_e は中立座位データセットで 0.773–0.779、全座位データセットで 0.811–0.813、クラスター2 の H_e は中立座位データセットで 0.749–0.751、全座位データセットで 0.786–0.791 であった。PCA の結果、どちらのデータセットにおいても、主に第一主成分が厚岸と見島の標本集団間の違いを説明する結果となった (Fig. 2b) (第一主成分寄与率は、中立座位データセットで 12.1%、全 10 座位データセットで 10.0%)。この第一主成分における因子負荷量の絶対値は、DR225 におけるアレル 188 (以下、アレルは DR225¹⁸⁸ のように示す) で最も大きかった (中立座位データセット: 0.548; 全座位データセット: 0.535)。第一主成分に対する因子負荷量の絶対値が 0.2 を超えるアレルが含まれていたのは、Orla17-188、Orla9-204、DR148 の 3 座位で、これらのうち、DR148²²¹、Orla17-188²⁰⁰、Orla9-204²⁷⁵ は厚岸で、Orla17-188¹⁹⁸ と Orla17-188²⁰⁵、Orla9-204²⁷⁵ は見島の標本集団において頻度が高かった (Fig. 3)。以上の解析により、いずれのデータセットを用いても厚岸と見島の標本集団が遺伝的に異なることが支持された。

考察

ハタハタの遺伝的集団構造の解析において有用と思われるマイクロサテライト DNA 座位を既報 (Park et al. 2006; Gotoh et al. 2013) のプライマーセットの中から、著しい非特異的増幅産物の有無、ヌルアレルおよびラージアレルドロップアウトの有無、HWE からの逸脱の有無、さらに LD の有無によりスクリーニングした結果、10 座位を選定できた。どの

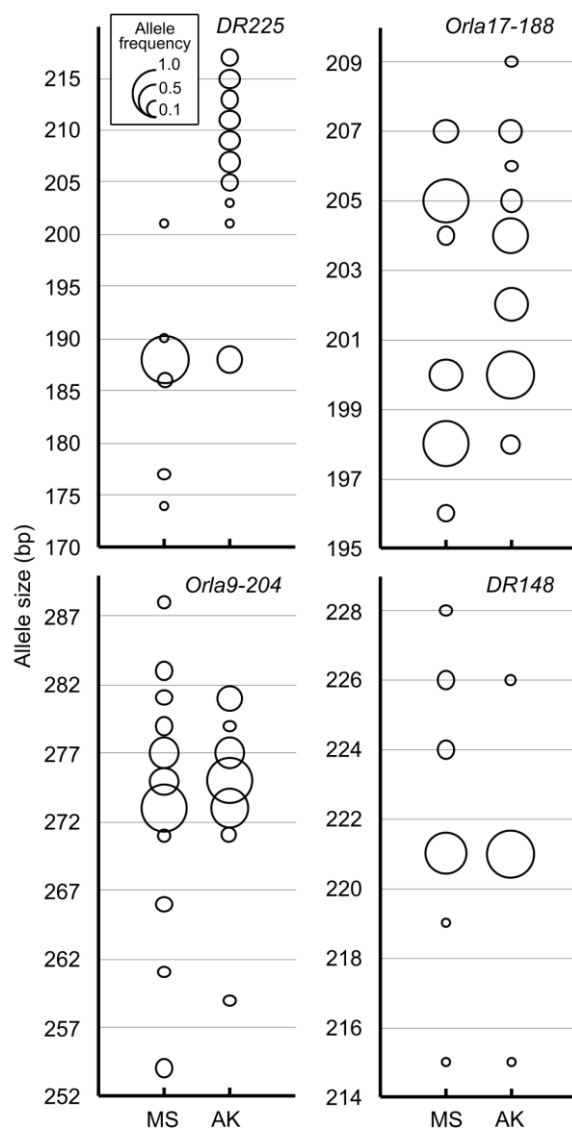


Fig. 3. Allele frequency and size distributions for the four loci with the highest contribution to the first principal component in PCA.

座位についても安定して増幅産物を検出でき、ジェノタイピングに問題はないため、今後のハタハタ資源の集団遺伝学的研究において利用可能であると考えられる。

Dewoody and Avise (2000) は海産魚 12 種で調べられたマイクロサテライトマーカー (合計 66 座位) の変異性を調べたところ、平均アレル数 (n_a) は 19.9、平均ヘテロ接合度 (H_o) は 0.77 であり、この値は淡水魚 ($n_a = 9.1$, $H_o = 0.54$) や両側回遊魚 ($n_a = 10.8$, $H_o =$

0.68) と比較して有意に大きいことを示した。この傾向は、海産魚が淡水魚や両側回遊魚と比較して有効集団サイズ (N_e) が大きいことに起因していると考えられている。今回選定された 10 座位の遺伝的多様性は、このような一般的な海産魚類の多様性と同様に比較的高かった (Table 1)。水産資源として漁獲利用されるハタハタの N_e は、上記の先行研究で検討された他の海産魚類と同様に、淡水魚や両側回遊魚と比較して大きいと予想される。したがって、これらのマイクロサテライト DNA 座位の変異性はハタハタの集団におけるゲノム全体の遺伝的多様性を偏りなく代表しているものと考えられる。

選定された 10 座位のマーカーセットに基づく集団遺伝学的解析を行った結果、厚岸と見島の標本集団は異なる遺伝的なクラスターに分けられた (Fig. 2)。また、両者は F_{ST} 値だけでなく、 R_{ST} 値についても 0 より有意に大きいことが示された。これは、両標本集団では、アレルの頻度だけでなく、アレル中のリピート数の分布にも違いが生じていることを意味している。アレル内のリピート数の分布に差異が生じていることは、集団が隔離されて以降、各集団でリピートの変異が独立して生じ、これらが集団中に蓄積されるための十分な時間が経過しているためと解釈することができる (Hardy et al. 2003)。こうした結果は、これまでに指摘されてきた北海道太平洋沿岸と日本海のアレルの観察されている大きな形態学的、集団遺伝学的差異 (沖山 1970; 小林・加賀 1981; 藤野・網田 1984; 柳本 2004; Shirai et al. 2006) と矛盾しないと考えられる。

PCA の結果、2 標本集団間の遺伝的差異をもたらしていたのは *Orla17-188*、*Orla9-204*、*DR148*、*DR225* の 4 座位であるとわかった。このうち、*Orla17-188*、*Orla9-204*、*DR148* のアレルの種類は 2 標本集団でほぼ共通で頻度が異なるという状況であったが、*DR225* では特定のアレル (*DR225¹⁸⁸*) の頻度が大きく異なる

っていた。これら 4 座位のアレル組成を調べることにより、少なくとも今回分析の対象とした北海道太平洋グループと朝鮮半島東岸グループの識別が可能であると考えられる。

個々の座位に注目すると、*Orla2-91* および *Orla21-231* は他の座位と比較して有意に F_{ST} 値が低く、どちらの方法でも中立性が棄却された。これには、これらの座位に自然選択が働いていること、または、マイクロサテライト DNA の突然変異プロセスがステップワイズであるために生じた復帰突然変異によって、非相同な同形アレルが集団中に生じ (size homoplasy)、見かけ上同じアレルが両標本集団に存在していることの 2 つの可能性が考えられる。いずれにしても、これら 2 座位を解析に含めると集団間の遺伝的差異を過小評価してしまう懸念がある。実際に、2 集団間の F_{ST} 値や R_{ST} 値は中立座位データセットよりも全座位データセットの方が低い傾向にあった。ただし、中立性検定 (F_{ST} outlier 検定) において想定されている中立な座位の F_{ST} 値の分布は Wright (1951) の Symmetrical Island Model に代表される単純化された理想集団を仮定して計算されている (Beaumont and Nichols 1996) という点に注意を払う必要がある。実際の集団構造がこのような理想的な状態から乖離していた場合、中立性検定は過誤をもたらす可能性が指摘されている (Lotterhos and Withlock 2014)。ハタハタ資源の集団遺伝学的解析に、これらの座位を含めたときの影響については、今後多くの標本集団を分析していくことで明らかになると考えられる。

本研究で選定されたマイクロサテライト DNA 座位は高い変異性を有しており、これを分析することによって本種における既報の日本海と太平洋グループ間の遺伝的差異を追認できた。ハタハタの各系群の回遊範囲に関する知見は断片的であり、未だ不明な点が残されている。たとえ産卵場ごとに集団が分化していたとしても、成育場で異なる産卵場由来

の個体が混合している可能性もあり、漁獲物の中には複数の系群の個体が含まれているかもしれない。今回選定された座位を用いて分析を行うことで、本種の回遊生態の解明や系群毎の漁獲量をより高い精度で明らかにできる可能性がある。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導ご鞭撻をいただいた白井滋教授、千葉晋教授（東京農業大学生物産業学部海洋水産学科）に深謝する。本研究における Shirai et al. (2006) で使用されたサンプルの使用については論文の著者の皆様にご理解をいただいた。感謝と敬意を表する。厚岸のサンプルは前田圭司氏（元北海道立総合研究機構水産研究本部さけます・内水面水産試験場）、上田吉幸氏（北海道立総合研究機構中央水産試験場）に提供していただいた。厚くお礼を申し上げる。本研究は 2021 年度笹川科学研究助成（研究番号：2021-4028）を受けて実施された。

引用文献

- Antao, T., Lopes, A., Lopes, R.J., Beja-Pereira, A., Luikart, G. (2008). LOSITAN: A workbench to detect molecular adaptation based on a F_{st} -outlier method. *BMC Bioinformatics* 9: 323.
- Beaumont, M. A., Nichols, R. A. (1996). Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 363: 1619–1626.
- Blacket, M. J., Robin, C., Good, R. T., Lee, S. F., Miller, A. D. (2012). Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Mol. Ecol. Resour.* 12: 456–463.
- Dewoody, J. A., Avise, J. C. (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.* 56: 461–473.
- Dray, S., Dufour, A.-B. (2007). The ade4 Package: Implementing the duality diagram for ecologists. *J. Stat. Softw.* 22: 1–20.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611–2613.
- Excoffier, L., Hofer, T., Foll, M. (2009). Detecting loci under selection in a hierarchically structured population. *Heredity* 103: 285–298.
- Excoffier, L., Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 564–567.
- Fraser, D. J., Bernatchez, L. (2001). Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Mol. Ecol.* 10: 2741–2752.
- 藤野和男・網田康男 (1984). ハタハタの種族判別. *水産育種* 9: 31–39.
- Gotoh, R. O., Tamate, S., Yokoyama, J., Tamate, H. B., Hanzawa, N. (2013). Characterization of comparative genome - derived simple sequence repeats for acanthopterygian fishes. *Mol. Ecol. Resour.* 13: 461–472.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F. et al. (2011). Current trends in microsatellite genotyping. *Mol. Ecol. Resour.* 11: 591–611.
- Hardy, O. J., Charbonnel, N., Fréville, H., Heuertz, M. (2003). Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics* 163: 1467–1482.
- 星野 昇 (2011). 北海道のハタハタ資源. 地方独立行政法人北海道立総合研究機構水産研究本部技術資料 7: 1–16.
- Imamura, H., Shirai, S. M., Yabe, M. (2005). Phylogenetic position of the family Trichodontidae (Teleostei: Perciformes), with a revised classification of the perciform suborder Cottoidei. *Ichthyol. Res.* 52: 264–274.
- Jakobsson, M., Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801–1806.
- Kimura, M., Crow, J. F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725–738.
- 小林時正・加賀吉栄 (1981). 北海道周辺海域のハタハタの産卵群の計数形質変異から推定される系群構造について. 北海道区水産研究所研究報告書 46: 69–83.
- Lotterhos, K. E., Whitlock, M. C. (2014). Evaluation of demographic history and

- neutral parameterization on the performance of F_{ST} outlier tests. *Mol. Ecol.* 23: 2178–2192.
- Mecklenburg, C. W. (2003). Family Trichodontidae Bleeker 1859—sandfishes. *Calif. Acad. Sci. Annotated Checklists Fishes* 15:1–4
- Moritz, C. (1994). Defining ‘evolutionarily significant units’ for conservation. *Trends Ecol. Evol.* 9: 373–375.
- Nelson, J. S., Grande, T. C., Wilson, M. V. (2016). *Fishes of the World*, fifth Edition. John Wiley & Sons, Hoboken.
- Okuyama, M. (1990). Contrast in reproductive style between two species of sandfishes (Family Trichodontidae). *Fish. Bull.* 88: 543–549.
- 沖山宗雄 (1970). ハタハタの資源生物学的研究 II 系統群 (予報). 日本海区水産研究所研究報告書 22: 59–69.
- 落合 明・田中 克 (1986). 新版 魚類学 (下). 恒星社厚生閣, 東京.
- Palsbøll, P., Berube, M., Allendorf, F. (2007). Identification of management units using population genetic data. *Trends Ecol. Evol.* 22: 11–16.
- Park, J. Y., Lee, S. J., Lee H. W., Lee, Y. G., Jung, S. J., Kang, Y. J. (2006). Polymerase chain reaction primers for polymorphic microsatellite loci from the Korean sandfish, *Arctoscopus japonicus*. *Mol. Ecol. Notes* 6: 674–676.
- Peakall, R., Smouse P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28: 2537–2539.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria. Available at: <http://www.r-project.org/>.
- Raymond, M., Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 3.4): population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248–249.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223–225.
- Shirai, S. M., Kuranaga, R., Sugiyama, H., Higuchi, M. (2006). Population structure of the sailfin sandfish, *Arctoscopus japonicus* (Trichodontidae), in the Sea of Japan. *Ichthyol. Res.* 53: 357–368.
- 白井 滋・後藤友明・廣瀬太郎 (2007). 2004 年 2–3 月に得られた岩手県沖のハタハタは日本海から来遊した. *魚雑* 54: 47–58.
- Smith, W. L., Busby, M. S. (2014). Phylogeny and taxonomy of sculpins, sandfishes, and snailfishes (Perciformes: Cottoidei) with comments on the phylogenetic significance of their early-life-history specializations. *Mol. Phylogenet. Evol.* 79: 332–352.
- Steindachner, F. (1881). Ichthyologische Beiträge (X). *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien.* 83: 179–219, pls 1–8.
- van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., Shipley, P. (2004). MICRO-CHEKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4: 535–538.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer, New York.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 15: 323–354.
- 柳本 卓 (2004). mtDNA の PCR-RFLP 分析によって明らかになったハタハタ集団の地理的分化. *日水誌* 70: 583–591.

Received: 30 April 2022 | Accepted: 8 July 2022 | Published: 11 July 2022