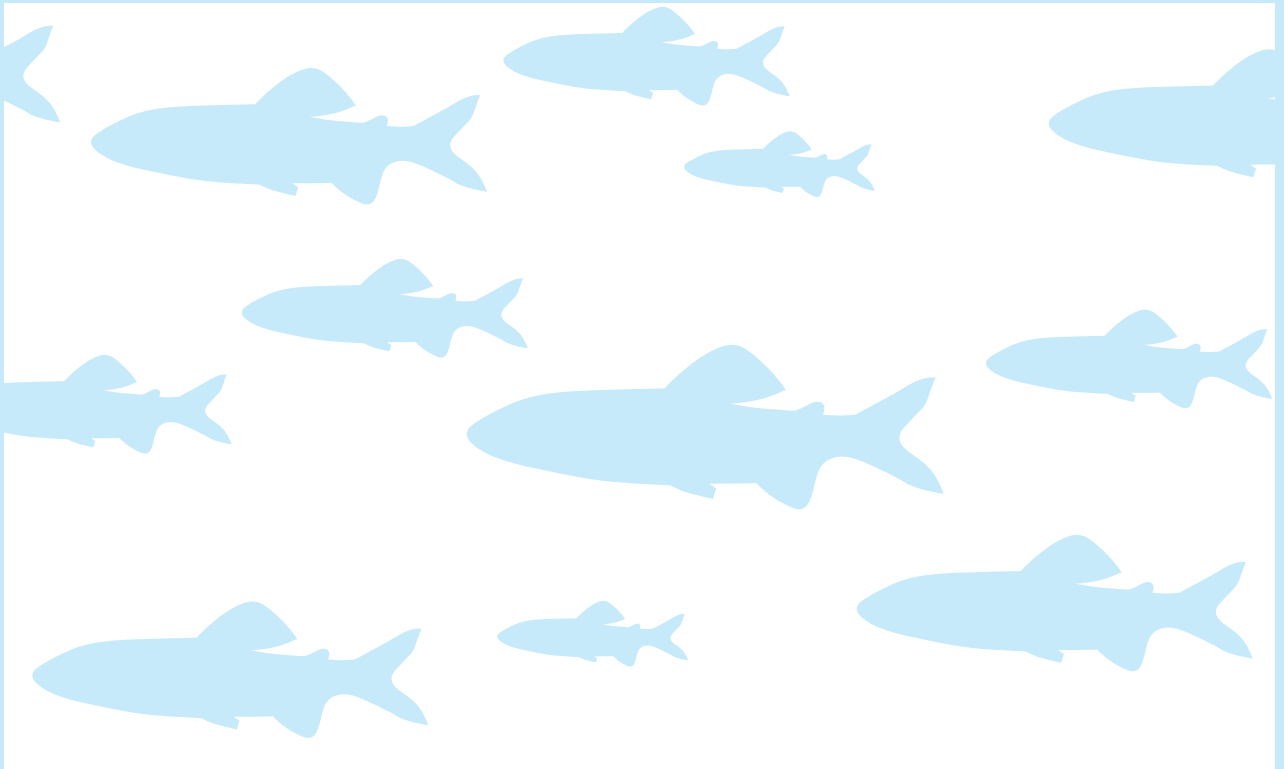


水産育種

FISH GENETICS AND BREEDING SCIENCE

Volume 46
Number 1
September 2016



水産育種研究会

The Japanese Society of Fish Genetics and Breeding Science

水産育種

第46巻1号

目次

総説

これからの水産育種：ゲノム予測による新たな育種の取り組み…………… 細谷 将・菊池 潔 …… 1

報文

東北地方太平洋沖地震直後の岩手県三陸域におけるエゾアワビ *Haliotis discus hannai* 野生集団の遺伝的

集団構造（英文）

…………… 足立賢太・奥村大志・奥村誠一・森山俊介 …… 15

天然海域における種苗生産場から流出したS型シオミズツボウムシの探索（英文）

…………… ウィルマモカ・澤山英太郎・野口大毅・高木基裕 …… 23

会員通信

第1回ブリ類ゲノムワークショップ参加報告

…………… 尾崎照遵・野村和晴 …… 31

会報 …… 35

水産育種研究会会則 …… 37

水産育種投稿要領 …… 38

平成28年9月30日

水産育種研究会

－ 総 説 －

これからの水産育種：ゲノム予測による新たな育種の取り組み

細谷 将・菊池 潔（東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所）

Trends in Aquatic Breeding: a New Approach for Breeding by Means of Genomic Prediction

Sho HOSOYA and Kiyoshi KIKUCHI

Fisheries Laboratory, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo

Abstract

Selective breeding based on genetic markers, such as microsatellite and single nucleotide polymorphism (SNP), has developed concurrently with the advances in the genotyping and sequencing technologies. Especially, the next-generation sequencers (NGS) accelerated exploitation of genome-wide SNPs and drastically changed the situation. NGS enable us genotype thousands of SNPs from hundreds of samples within a few days with less labor works and feasible analysis costs even from the species without reference genome, made practical use of genomic prediction. In this review, we outlined the basis of three genomic analysis used in selective breeding, i.e. QTL analysis, genome-wide association study (GWAS) and genomic prediction, and explained how to use those methods properly. Marker assisted selection (MAS) based on QTL analysis and/or GWAS are useful only when the target traits are under control of small number of QTLs with large effects while genomic selection (GS) based on genomic prediction is powerful even when the traits are polygenic. We also marked the importance of linkage disequilibrium (LD), the non-random association of alleles between two loci, to understand the differences among the three methods.

(accepted August 1, 2016)

はじめにーゲノム育種の進歩

ゲノム配列の取得技術が急速な進歩を見せる中、ゲノム情報を利用した選抜育種技術も歩調を合わせるように発展している。実際に、QTL (quantitative trait locus: 量的形質遺伝子座) 解析による経済形質連鎖マーカーの開発が新品種の作出につながるなど、目に見えた成果も上がっている^{1),2)}。最近では、次世代シーケンサー (next generation sequencer: NGS) の登場により、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP)、コピー数多型 (copy number variant: CNV)、挿入と欠失 (insertion and deletion: InDel) など多岐に渡る多型情報が、短時間で大量に取得できるように

なってきた。そのおかげもあり、利用できる遺伝マーカーもこれまでに比べて膨大な数となり、解析できる内容も増えている。しかし、ゲノム情報を利用した選抜育種は、先述の QTL解析や全ゲノム関連解析 (genome-wide association study: GWAS) によるマーカーアシスト選抜 (marker assisted selection: MAS) だけではない。トレンドとしては、むしろ、一つ一つの遺伝子座の効果に注目するのではなく、ゲノム予測 (genomic prediction) で評価した育種価 (個体の遺伝的能力, breeding value: BV) にもとづく選抜育種、すなわち、ゲノミックセレクション (genomic selection: GS) にシフトしている。例えば、タイセイヨウサケ

(*Salmo salar*) に代表されるサケ類の育種に成功した北欧では、個体選抜 (mass selection) から選抜指数 (selection index) 法を経て、1990年代からは BLUP (best linear unbiased prediction: 最良線形不偏予測) 法で予測した育種価を用いた選抜育種が取り組まれてきたが、後述の通り、近年では、ゲノム予測の理論研究およびその実践に大きな力が注がれている。さらに、北欧以外の地域の様々な魚介類でもゲノム予測による選抜育種が始まっている。しかし、ゲノム予測による GS が他の方法と比較して最良というわけではなく、それぞれに長所と短所とがあり、適切に使い分けが必要である。本稿では、QTL 解析と GWAS による MAS、および、ゲノム予測による GS の概要を紹介するとともに、それらの使い分けについて解説する。

1. QTL解析

1990年代に遺伝マーカーの開発が活発化して以来、様々な形質の遺伝基盤が明らかにされてきたが、最初にエポックメイキングとなった手法は、連鎖解析の一つである QTL 解析である^{3,4)}。対象とする量的形質に影響を持つ遺伝子座 (量的形質遺伝子座) の数、位置、影響力を併せて、当該形質の「遺伝機構 (genetic architecture)」と言うが、QTL 解析により、この遺伝機構を明らかにすることが出来る。QTL 解析には、表現型の異なる 2 系統 (あるいは 2 種) を交配させて得た第一世代をどちらかの系統 (種) と交配させた戻し交配 (back cross: BC) 集団か、さらに交配させた第二世代 (F_2) 集団を用いる。これらの集団では、表現型が分離するとともに、ゲノムは組換えと染色体の独立した伝達により様々な混交パターンを示す (図 1)。ゲノムの混交パターンはマイクロサテライト (microsatellite) や SNP などの遺伝マーカーを用いて多型判定 (genotyping) して調べる。表現型の分離パターンとマーカー座のアリル (allele) との関係から、表現型と強く連鎖するマーカー座を見つけ出す。このようなマーカー座の近傍に当該形質を支配する変異が存在することになる。QTL 解析による MAS は、対象形質の遺伝機構が単純で、関与する遺伝子が少ない場合に強力な効果を発揮する。例えば、ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) で同定されたリンホシスチス症 (lymphocystis disease) に対する耐性 QTL の効果は大きく、その寄与率 (phenotypic variation explained: PVE、表現型分散のうち、QTL の効果によって生じる分散の割合) は 50% に達していた⁵⁾。これほどの寄与率があれば、MAS の効率は十分に高いと言ってよく、実際に、MAS により作出された系統が市場でかなりの割合を占めるに至ってい

る。また、タイセイヨウサケの伝染性すい臓壊死症 (infectious pancreatic necrosis: IPN) に対する耐性は 1 つの QTL が遺伝分散のほぼ全てを説明するほど影響力が強く、MAS の効果が養殖産業に大きな影響をもたらしている⁶⁾。一方で、著者らが行ったトラフグ (*Takifugu rubripes*) とクサフグ (*T. niphobles*) の交雑第二世代を用いた発達初期の成長速度に関する解析では、1 つの QTL が見つかったが、その寄与率は 10% 程度と小さかった⁷⁾。この結果は、成長形質が多因子形質 (polygenic trait) であり、ほとんどの QTL は標準的な解析では検出できないほど小さな効果しか持たないことを示している (本稿では小さな効果しかもたない遺伝子座も QTL と称する)。このように、多因子形質を対象とした場合、検出される QTL の寄与率は小さく、MAS の効果が極めて限定的である。

QTL 解析が可能となったのは、全ゲノムを網羅するような遺伝マーカーが開発されたことによる。最初に広く利用されたマーカーは、マイクロサテライトである。マイクロサテライトは CA リピートなどの単純な繰り返し配列を指し、縦列型反復配列 (short tandem repeat: STR) あるいは単純反復配列 (simple sequence repeat: SSR) とも呼ばれる。このような繰り返し配列は、数千塩基に一つの頻度で存在する。マイクロサテライトは多型性に富み、それぞれのアリルが祖父母のうちどちらに由来するのかを特定するのが容易で扱いやすい。ただし、数千塩基に一つの頻度で

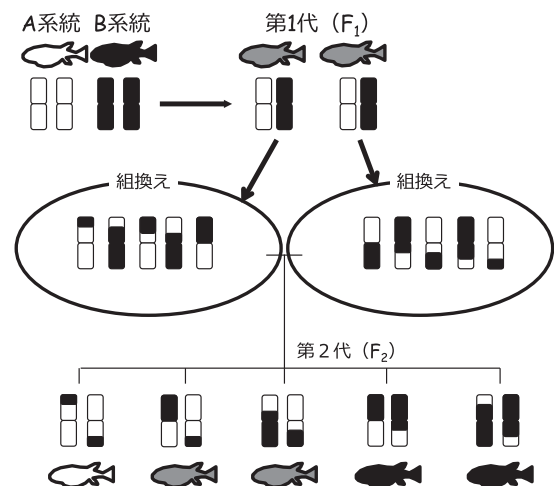


図 1. 交配によって生じる染色体の混交と表現型の分離について表した模式図。白色の A 系統と黒色の B 系統があり、それぞれの相同染色体も白色と黒色で表している。第 1 代 (F_1) は両系統の相同染色体を 1 本ずつ受け継ぎ、表現型は両系統の中間となる (相加的遺伝子効果のみを仮定)。第 1 代 (F_1) どうしを交配して第 2 代 (F_2) を得るとき、第 1 代 (F_1) の相同染色体の間でランダムに組換えが生じるため、第 2 代 (F_2) はさまざまな混交パターンを示す相同染色体のいずれかをランダムに受け継ぐ。その結果、表現型が分離する。

しか得られないため、QTL 解析の解像度は低い。一方、マイクロサテライトの次に広く用いられるようになった SNP は数百塩基に一つの頻度で存在する。最近では SNP のハイスループットなジェノタイピング法が開発されており、以前よりも飛躍的に扱いやすくなっている。特に、RAD-seq (restriction enzyme associated DNA sequencing) 法⁸⁾の登場により、参照ゲノム配列がない生物でも、一度に数百個体から数千 SNP の多型情報を得られるようになった。SNP は出現頻度が高いため、高解像度の結果が期待できる。しかし、実際には、アリルは 2 個しかないことがほとんどで、それぞれの祖父母どちらに由来するのかを特定できる遺伝子座は多くなく、期待されるほどの高解像度は得られない場合が多い (図 2)。

ここで解像度について触れているのは、QTL を利用した MAS において、解像度は出来るだけ高い方が望ましいからである。何故なら、QTL のサイズが大きい場合、当該領域に他の遺伝子も多数含まれることになり、それらの遺伝子に有害な変異がある、あるいは新たに生じたとき、あとから取り除くことが難しいからである。QTL 解析の解像度は、上述した遺伝マーカーの特性に加え、相同組換えの影響も大きい。解像度を上げるということは、大雑把に言えば、原因変異により近い位置で起きた組換え (染色体乗り換えが起きた部位) を見つけてくることと同じである。QTL 領域内により多くのマーカーを配することができれば、それだけ原因変異により近い組換えポイントを見つけれらるので解像度が増す。しかし、一個の配偶子形成において組換えが生じる回数は、真骨魚類の場合、1 染色

体あたりの 1 回程度である。したがって、狭い領域の中にいくらかマーカーを多く配しても、そこに組換えを見つかることは難しい。こういった場合、マーカーではなく、染色体数を増やす必要がある。つまり、解析個体を増やせば、QTL 解析の解像度を上げることが出来る。しかし、原因変異に行きつくには、数万個体が必要となり、実質的には原因変異の同定は困難である。一方、組換え状態の高い集団を利用することで解像度を高めようとするのが、次に紹介する GWAS である。

2. GWAS

GWAS とは、全ゲノム上に配した遺伝マーカーについて多型判定を行い、異なる表現型を持つ集団間でのアリル頻度 (または遺伝子型頻度) の偏りを調べることで、対象形質の遺伝機構を明らかにする方法である (図 3)⁹⁾。図は、ゲノムの一領域を取ってきたもので、コンセンサスの配列と、耐病性の無い 5 個体、耐病性の有る 5 個体の SNP 座のアリル型を示した模式図である (単純化のために各個体は 1 倍体とした)。「-」で示されているのは、コンセンサス配列と同じアリル型であることを示す。耐病性と無関係の遺伝子座では、耐病性の有る個体でもない個体でも、多型はランダムに出現する。一方、耐病性と関連のある遺伝子座では、耐病性の有る個体に原因アリルが多く出現する。例えば、四角で囲まれた SNP 座を見ると、耐病性の無い個体は全て A、耐病性のある個体は全て G となっており、アリル頻度と表現型との関係に偏りがある。この偏りが有意かどうかを χ^2 検定などで検定し、有意な偏りがある遺伝子座の近傍に原因変異があると判断する。GWAS が一気に広がった背景には、QTL の場合と同様に、NGS や DNA チップの普及により SNP 座の探索と多型判定が容易になってきたことがある。最近では、養殖魚においても GWAS の報告は増えており、特にタイセイヨウサケでは、成熟年齢に関わる遺伝子が同定されるなど顕著な成果が得られている^{10), 11)}。著者らが報告したトラフグの性決定遺伝子である *Amhr2* も GWAS ではないが染色体上の特定領域における関連解析 (association study) により同定されており、野生魚を用いた関連解析の強力さを実証した研究例となっている¹²⁾。GWAS で用いるのは、野生集団や多数の家系を含む集団である。このような集団は、創始集団から現在の集団に至るまで、世代を経るごとに染色体上に組換えを重ねている。したがって、解像度は極めて高いことが期待される。その代償として、目的の原因変異を見つけ出すには非常に多くのマーカー (>数万) が必要となる。以下、その理由について解説する。

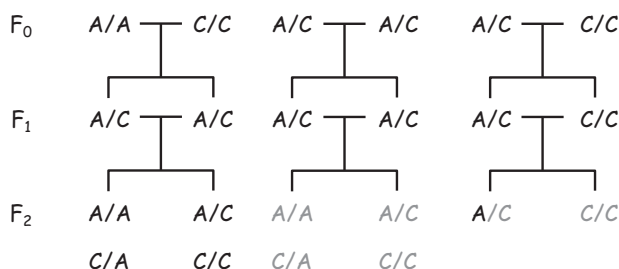


図 2. 一塩基多型 (SNP) におけるアリルの分離と有効なマーカーについての模式図。F₀ の対立遺伝子座における 2 つのアリルを / で並べている。また、F₂ においてどちらの F₀ 個体由来かを判定できるアリルを黒色で、判定できないアリルを灰色で表している。一番左のパターンでは、F₀ がそれぞれ異なるアリルのホモ接合となっているため、F₂ 個体が受け継いだアリルがどちらの F₀ 個体由来なのか必ず判定できる。したがって、このような SNP は QTL 解析には利用できる有効なマーカーである。一方、他の 2 つのパターンでは、F₂ 個体が受け継いだアリルがどちらの F₀ 由来なのかをほぼ判定できないので QTL 解析には利用できない。

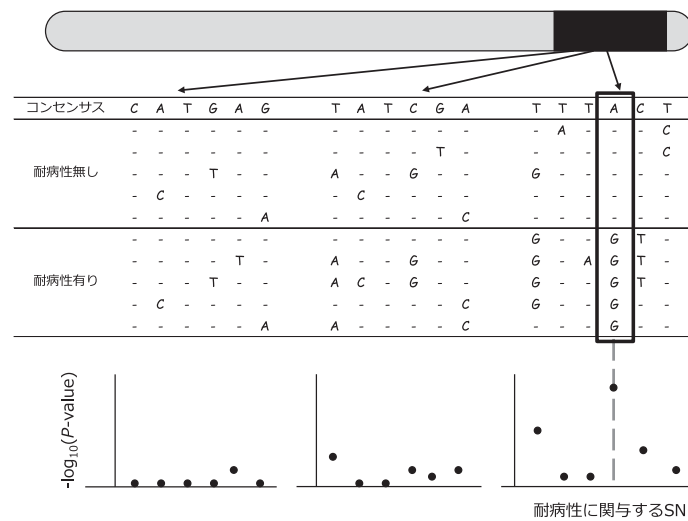


図3. 関連解析の原理について。染色体上のある一領域について表現型との関連性を解析した様子。耐病性の無い5個体、耐病性の有る5個体のSNP座をジェノタイピングし、コンセンサスの配列に対してアラインメントしている。また、「-」で示されているのは、コンセンサス配列と同じ遺伝子型であることを示す。耐病性と無関係の遺伝子座では、耐病性の有る個体でもない個体でも、多型はランダムに出現する。一方、四角で囲まれた耐病性と関連のある遺伝子座では、耐病性の無い個体は全てA、耐病性のある個体は全てGとなっており、遺伝子型と表現型との関係に偏りがある。この偏りを χ^2 検定などで有意かどうかを検定し、有意な偏りがある遺伝子座の近傍に原因変異があると判断する。

3. 連鎖不平衡

GWAS および後述するゲノム予測に必要なマーカー数は、解析集団の連鎖不平衡 (linkage disequilibrium: LD) 状態に大きく依存する。連鎖不平衡状態とは遺伝子座間のアリの組み合わせパターンがランダムではない状態のことをいう¹³⁾。隣接する遺伝子座間のアリの組み合わせパターンをハプロタイプ (haplotype) というが (図4)、長い世代を経ると、組換えのために組み合わせパターン、すなわちハプロタイプの数が増える。例えば、N 個の隣接する SNP 座では、最大 2^N 個のハプロタイプを生じることになる (1 座あたり 2 アリの場合)。しかし、ある 2 遺伝子座の間に組換え抑制が働くと (あるいは、ボトルネックなどの要因で組換えが飽和状態に達するまで起きているとはいえない歴史的状況にあると) ハプロタイプの種類と数はランダムな組み合わせによる期待値に従わなくなり、特定のハプロタイプの頻度が上昇する。このような状態を「LD 状態」、その領域を「LD ブロック (LD block)」と言う。全く組換えが生じない領域は絶対連鎖不平衡状態 (absolute LD あるいは、完全連鎖不平衡: perfect LD) となる。また、自然選択の結果、特定のハプロタイプが好まれた場合には、見かけ上、LD ブロックが広がって観察される (正確には、「選択の一掃: selective sweep」)。

LD 状態は、組換えが抑制されていない限り、世代毎に変化する (図5)。特に、遺伝的距離が遠い SNP 座間には組換えが生じやすく、世代とともに LD 状態は急速に崩壊する。一方、遺伝的距離が近い SNP

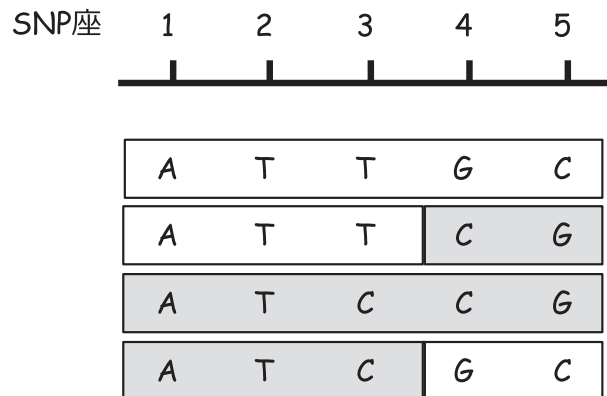


図4. ハプロタイプについて。隣接する遺伝子座間のアリの組み合わせをハプロタイプという。この図では、横に4つの染色体を並べ、5つの隣接するSNP座の遺伝子型を示している。4つの染色体はそれぞれ組み合わせが異なる4つハプロタイプである。SNP座1から3までで見ると、組み合わせは2つしかないで、ハプロタイプは2つである。同様にSNP座1と2だけに注目すると、ハプロタイプは1つである。このようにハプロタイプの数は遺伝子座間の距離が近いと少なく、遠いとき多くなる。これは、遠いと組換えが起きやすいからである。また、この例では、SNP座3と4の間で組換えがあったと仮定すると、組換えが生じる前は、2つのハプロタイプ (それぞれ、1番目と3番目の染色体のパターンと同じ) だったことになる。

座間では組換えが生じにくく、LD 状態の崩壊は緩やかである。なお、組換え抑制が働いて完全に連鎖した SNP 座間では LD 状態は世代を経てもほとんど変化しない。もっとも、集団が異なると染色体乗り換えが生じやすい位置が異なることがしばしばあり、このような場合、LD 状態は同じゲノム領域でも集団間で異なる。

LD ブロックの大きさは遺伝解析において重要な意味を持っている。遺伝マーカーの開発が難しかった頃、すなわち、マイクロサテライトマーカーを用いた QTL 解析が主流だった頃には、LD ブロックが大きいことが有利であった。何故なら、LD ブロックの中には特定のハプロタイプではほぼ固定されており、1つのマーカー座の遺伝子型が分かれば LD 内の遺伝子型が推定できるからである。すなわち、LD あたり 1つの遺伝子座が分かれば QTL 解析が可能となるわけだが、LD ブロックが大きければ大きいほど、全ゲノム中の LD ブロックの数が少なくなり、少数のマーカーで解析できるということになる。ただし、解像度を犠牲にすることとなる。一方、最近になって、NGS や DNA チップの開発によって莫大数の SNP 座を扱えるようになり、LD ブロックが小さい集団でも解析できるようになってきた。これにより、GWAS が利用可能となった。GWAS では、LD ブロックの小さい野生集団や複数の家系を含む集団を用いることで、高解像度の解析を可能とする (図6)。

ただし、GWAS で QTL を見つけて MAS を行う、という手法にも限界はある。多因子形質には不向きなのだ。ヒトの身長を例に挙げる。ヒトの身長の遺伝率 (全表現型分散に占める相加的遺伝分散の割合) は高いことが知られていた。例えば、双子を用いた解析では80%以上と見積もられている^{14), 15)}。そのため、ヒトの身長は、メンデル遺伝に近く、影響力の大きい少数の遺伝子に支配されているとはじめは考えられた。しかし、例えば、Lango Allen ら (2010) の結果では関連性の強い上位180座の QTL の効果を全て合わせても、寄与率は10%程度しか無かった¹⁶⁾。つまり、GWAS で検出されたそれぞれの QTL は目に見えた効果を持って

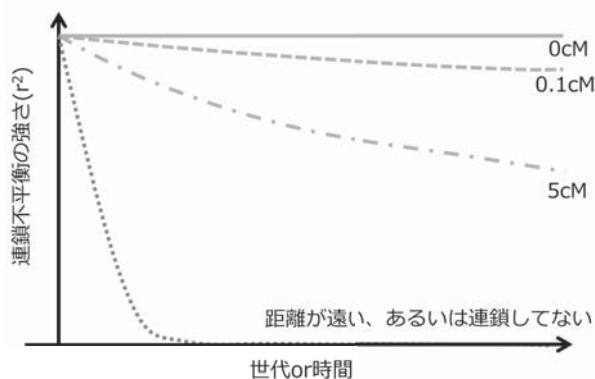


図5. 世代と連鎖不平衡 (LD) 状態の関係。LD 状態は世代を経るごとに変化する。また、その変化のスピードは、SNP 座間の遺伝的距離に依存する。組換えが起きにくく完全連鎖している SNP 座間 (0cM) では、世代を経ても組換えが生じないので、LDは強いままである ($r^2=1$)。遺伝的距離が遠くなるにしたがって、LD の崩壊スピードが速くなる。

おらず、仮に MAS を利用したとしても、効率よく身長の高いヒトをつくることはできない。ヒトの身長は今では典型的な多因子形質として知られている。

遺伝率は用いた集団によって結果が異なり得るが、Lango Allen らの GWAS の結果と遺伝率を求めた過去の研究結果との間にはそれだけでは説明できない開きがある。血縁個体の表現型から遺伝分散 (表現型のばらつきの中で遺伝により支配される部分) を推定するのをトップダウン型とすれば、QTL の効果の合計から遺伝分散を推定するのはボトムアップ型と言える。一般に、効果の大きな少数因子に支配される形質の場合は、ボトムアップ型で推定される遺伝分散がトップダウン型で推定される遺伝分散に近づくが、多因子形質の場合には両者に乖離が認められる。このような現象は、“失われた遺伝率 (missing heritability)” と呼ばれ、長く議論の対象とされてきた^{17), 18), 19)}。この議論に一つの結論を導いたのは、Yang ら (2010)²⁰⁾で、彼らは GWAS で検出された QTL 一つ一つの効果ではなく、全ての SNP 座から予測される総体的遺伝効果 (注: QTL の効果の合計ではない) に由来する分散を算出した結果、表現型分散の45%を説明できることを示した。この結果から、ヒトの身長における missing heritability の主な原因は、1) 一つ一つの QTL の効果が GWAS で検出できないほど小さいこと、2) 扱った SNP マーカーの数が十分ではなく、原因変異の多くが SNP マーカーと LD を形成していないため、それらの変異の効果が反映されていないこと、であるこ

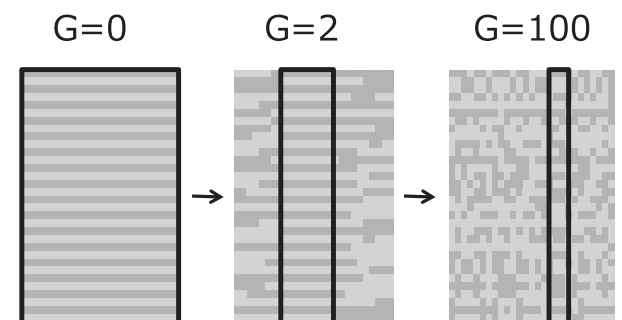


図6. 連鎖不平衡 (LD) の遷移。2つのハプロタイプからスタートした集団における LD 状態が変化する様子を模式的に表す。横に32本の染色体が並んでいると仮定する。黒枠で囲まれた領域が LD ブロック。0世代目は、領域全体が LD ブロックを形成しているが、2世代目には組換えが2回程度起こるため、LD ブロックは小さくなる。世代を経ると、さらに組換えが生じるため、LD ブロックはさらに小さくなる。QTL 解析や GWAS によって QTL を同定する場合、LD ブロックの中のどの変異が原因変異なのか区別がつかない。したがって、LD ブロックの小さい野生集団や数の家系を含む集団を用いることで、高い解像度を得られる (原因変異により近づける)。ただし、小さい LD ブロックを捉えるためには数多くの SNP が必要になる。

とが示された（詳細は Visscher ら (2010)²¹⁾）。また、同様の結論が、他の多因子形質についても得られている^{22), 23)}。このように、多因子形質に対しては、QTL 解析であろうが GWAS であろうが、MAS は不向きなのである。Yang らは missing heritability を埋めるため、さらに、ヒトの持つほとんどすべての SNP 座を用いて解析を行った²⁴⁾。その結果、ヒトの身長における表現型分散の60–70%が説明できることを示している。これらの報告により、多因子形質の場合、GWAS で得られた QTL の効果を合計するのではなく、総体的遺伝効果を用いることで、遺伝分散を比較的正確に予測できることが、広く認められることとなった。ここで言う総体的遺伝効果という用語は著者の造語で（少なくとも Google 検索では見当たらなかった）、実は育種価に他ならず、全ゲノムレベルの SNP を用いた総体的遺伝効果（＝育種価）の予測がゲノム予測である（ただし、ここで言う遺伝効果は相加的遺伝子効果）。ゲノム予測は、以下で述べるとおり、統計遺伝学を行ってきた動物遺伝育種学者がゲノム情報を積極的に取り入れたことにより発展した手法であるが、Yang ら (2015)²⁴⁾ のように、ヒトを対象とする分子遺伝学者にまでその威力が認められたわけである。今では身長だけではなく、ヒトの様々な疾患にも同様の方法を用いてリスクを推定することが提唱されている²⁵⁾。ヒトやマウスの後追いと言われがちな応用動物学者としては、なんだか誇らしい出来事である（もっとも、統計遺伝学の始祖であるフィッシャーは育種学者でしたけれど）。次節では、ゲノム予測が生まれる基礎となった BLUP 法による育種価の予測について解説する。

4. 動物遺伝育種学が行っていた最先端育種法：BLUP法

BLUP (best linear unbiased prediction: 最良線形不偏予測法) 法は変量効果の推定法の一つで、混合モデル方程式 (Henderson's mixed model equation) の解から育種価を予測する方法である²⁶⁾。行列式を扱うと敬遠されてしまうかもしれないので、ここでは数式を用いて解説しないが、実際には QTL 解析よりもよほど分かりやすい。1970年代から家畜育種に導入されて顕著な成果を上げており²⁷⁾、1990年代から水産生物においても BLUP 法による選抜育種が行われている。水産育種における BLUP 法の研究例は和田 (2007)²⁸⁾ に紹介されている。

個体の遺伝的能力である育種価は、真の値を実測できない。実測できるのは、表現型と、表現型に影響を与えるであろう、性、生産者、気温、水温、養殖場の

ある場所などのデータである。そこで、個体の育種価を知るためには、統計学的にこれらの影響を表現型から取り除いて予測値を得る必要がある。この統計手法の一つが BLUP 法である。BLUP 法では、性などの要因が与える効果を固定効果 (fixed effect)、育種価を変量効果 (random effect) として、分けて取り扱う。固定効果と変量効果については、佐々木 (2007)²⁹⁾ に詳しいので説明は省略するが、当該要因の影響が確率分布であり、かつ、予測の対象であれば変量効果とし扱い、影響が確率分布ではない、あるいは予測の対象でなければ固定効果として扱う。二つを分けて取り扱うのは、データの分布によって取り扱い方を変えなければならないという統計学的な理由からである。育種価は、いくつもの遺伝子の影響の組み合わせによるもので、確率分布する。また、予測の対象でもある。したがって、変量効果として扱う。育種価に対して推定ではなく予測という用語を用いるのは、家畜育種学では従来、固定効果に対しては推定、変量効果に対しては予測が用いられてきたことに由来する²⁹⁾。ところで、固定効果と変量効果を同時にあつかう統計モデルを混合モデルという。モデルと呼ぶのは、実測値を説明するためにどの要因を用いるかという線型方程式のデザインを行うからである。線形モデルについてもう少し詳しく説明すると、正規分布するようなデータを扱うモデルを一般線形モデル (general linear model: LM) といい、これを正規分布ではないデータに拡張したモデルを一般化線形モデル (generalized linear model: GLM) といい、先ほどの混合モデルは一般化線形混合モデル (generalized linear mixed model: GLMM) という。これらは統計学の分野で発展した方法であるが、NGS などの先端の実験技術と同様に、先端的統計手法も、今後、育種学を含む生命科学分野でどんどん取り入れられることであろう。BLUP 法の最大の特徴は、血縁情報さえあれば、表現型データの無い個体であっても育種価を予測できる点にある。このことは、選抜を行う上で、例えば、可食部の肉質や色など、出荷時にしか計測できない形質についても選抜を可能とし、また、発達段階の早い段階で親魚候補を選抜することが出来るなど、育種の実践においてそのメリットは大きい。

では、BLUP 法の B、L、U、P はそれぞれどのようなことを意味しているのか。まず、最良 (best) であるのは、真の育種価 (g) とその予測値 ($\hat{g}$) との間の誤差分散 ($E(\hat{g}-g)^2$) を最小にするという意味である。大雑把にいうと、得られた予測値と真の育種価との差が最小になるような予測値ということである。線形 (linear) であるのは、予測値が観測値の線形関数で表せられるということである。不偏 (unbiased) で

あるとは、変量効果の予測値と固定効果の推定値において、それぞれの期待値が真の値に等しいということである。期待値も統計用語であるが、常用の用語との誤解を避けるために、少し説明を加える。何度も同じ試行実験を繰り返して、ある一定の確率で同じような値が得られる状況を考える。このとき、得られた値とその確率との積を合計したものが期待値である。例えば、サイコロを転がして、それぞれの目が出た回数を試行回数で割ったものが確率で、出た目とその確率との積を合計したものが期待値である。偏りのないサイコロでの期待値は、 $(1 \times 1/6) + (2 \times 1/6) + (3 \times 1/6) + (4 \times 1/6) + (5 \times 1/6) + (6 \times 1/6) = (1+2+3+4+5+6) \times 1/6 = 3.5$ ということになる。大雑把に言うと、確率分布の平均値である。予測（あるいは推定）を行う際、サンプル次第でデータが変わり、それにともなって予測値（推定値）も変化するが、期待値が真の値と一致する（偏りが無い＝不偏である）ことが求められる。このことから、不偏である予測値（推定値）を得るような方法が重要視される。BLUP 法が登場する以前に利用された回帰最小二乗法などではフィールドデータ（厳密に管理されていない養殖場などで得たデータ）を用いると予測値に偏りが生じた。例えば、後代検定を行う場合、検定に用いるサンプルは無作為抽出されたものである必要があるが、成長初期の発達が悪いなど能力の低い個体は早い段階で取り除かれることがありえるからだ。また、飼育環境はフィールドごとに一致しない。しかし、BLUP 法は、そのような条件でも、不偏な予測値（推定値）を与える³⁰⁾。予測（prediction）は説明するまでもなく、育種価の予測を行うことを指す。このような理由で、混合モデルの変量効果の BLUP を得られることから、BLUP 法と呼ばれる。BLUP 法では主に多因子形質を扱う。また、その遺伝機構は、「極めて小さな効果を持つ無限の数の因子が関与している」と仮定する。これを Fisher の infinitesimal モデル（infinitesimal model）という。

解析集団の作り方は QTL 解析の場合と大きく異なる。理想的な解析集団は、正確な血縁情報を得るために血縁関係が無いことが分かっている多数の個体を創始世代とし、個体情報を記録しつつそれらをランダム交配して作った、家系情報をもつ「基礎集団」である。この基礎集団から、育種価をもとに選抜し、近交係数の上昇を 1%未満に抑えながら交配して次世代を作出する。「多数の個体」がどのくらいを指すかというと、進化的な潜在能力を維持できるとされる 500 個体以上だろう³¹⁾。そして、有効親魚サイズ（effective number of breeders: N_b ）をこの規模で維持するのが理想である。しかし、これはあくまで理想であって、

現実的ではない。では、どのくらいの親魚数が現実的と言えるのか。近交係数（inbreeding coefficient: F ）の集団平均は 1 世代あたり $1/(2N_b)$ 減少するので、この減少を 1%に抑えるには、 N_b を 50 尾以上に保てれば良いことになる。実際に、魚類では、 $N_b = 50-100$ 程度あれば数世代では近交弱性は生じないようだ³²⁾。これは比較的現実的な数字とも言えるが、大型海産魚では、1 つの種苗生産業者が保持する数としては容易ではないかもしれない。ちなみに、 N_b は、1 年級群あたりの実際に子を残した「有効な親魚の数」であり、親魚の数そのものではない。雄親が何千個体いても雌親が 1 個体の場合は、 $N_b = 4$ であり、100 尾の全兄弟を交配した場合、実質的に $N_b = 2$ である。また、 N_b を全ての年級群で合計すると、有効集団サイズ（effective population size: N_e ）となる。 N_b や N_e についての概念は、集団遺伝学や保全遺伝学にもとづく。ここでひとつ注意したいことは、十分に大きな N_b あるいは N_e でなければ選抜育種の効果は永続的に得られないということだ。上述のように 100 尾を創始個体とした場合でも、選抜の過程で N_b は縮小し、近交の度合いは少しずつ上昇していく。すなわち、世代を経るにつれて、集団の遺伝的多様性は減少し、選抜反応（selection response: R 、選抜後の世代の集団平均と選抜前の世代の集団平均の差）も小さくなっていく（Bulmer effect³³⁾）。そのため、過度に近交が進んだ場合には外部から親魚を導入する必要がある。

BLUP 法は表現型の類似性が解析個体間の血縁関係に基づくことを利用して予測を行うので、解析個体の家系情報が分かっていることが必須である。変量効果の分散成分に血縁関係（分子血縁行列：numerator relationship matrix、注）分子は molecular ではない）を係数として乗じる際に、この係数が間違っていたら正確な予測が出来ない。家畜の場合、解析個体の家系情報を記録するためには、出生直後に標識を付けるだけですむが、孵化仔魚のサイズが極端に小さいほとんどの魚類ではそうはいかない。仮に標識するにしても標識可能なサイズに達するまでは家系別に個別の水槽で飼育する必要がある。しかし、基礎集団を一から構築し、かつ、標識サイズまで家系別に飼育して選抜育種を行うには多大な投資を必要とする。そもそも、養殖業において家系記録を残すことは稀である。水産生物における BLUP 法の導入が畜産動物などに比べて遅れた大きな原因のひとつと考えられる。

Henderson が発見して以来、BLUP 法は最先端の選抜育種法として畜産動物の育種で広く利用され、養殖業にも徐々に浸透し始めていたが、遺伝マーカーの普及により状況が大きく変わりつつある。特に、次世代

シーケンサーの登場により、Yang ら (2015)²⁴⁾ のように、全ゲノム中の全ての LD ブロックを網羅するのに十分な数の遺伝マーカーが得られるようになり、大量の SNP 情報から全ての遺伝子の影響力の合計値を予測できるようになった。すなわち、ゲノム予測が可能となったのだ。大量の SNP 情報を利用して育種価を予測するゲノム予測は、「血縁関係」よりも表現型の類似性を正確に評価できる「ゲノムの類似性」が得られるうえ、遺伝マーカーの効果を直接評価できるため、BLUP 法よりも予測の正確度が高い。重要なことに、BLUP 法と異なり解析個体の血縁情報が必要ないため、水産生物の育種に応用しやすい。次節では、ゲノム予測の概要について説明する。

5. ゲノム予測

ゲノム予測は、基本的には BLUP 法と同様に線形モデルを考える。リッジ回帰 (ridge regression) などにより各 SNP の効果を変量効果として予測する、あるいは BLUP 法で用いた分子血縁行列の代わりに SNP 情報を用いて推定したゲノムの類似性 (実現血縁行列: realized relationship matrix) を用いて育種価を予測する genomic BLUP (ゲノミック BLUP: GBLUP) 法や、各 SNP の効果を変量効果としてベイズ統計を利用して育種価を予測する Bayes A 法や Bayes B 法など (Bayesian alphabet と総称される) がある。なお、GBLUP 法でリッジ回帰を行う方法と実現血縁行列を用いる方法は統計学的に同等である³⁴⁾。また、通常の BLUP 法で予測した育種価を予測育種価 (estimated breeding value: EBV)、GBLUP 法などゲノム情報から予測した育種価をゲノム予測育種価 (genomic estimated breeding value: GEBV) という。選抜の手順はいずれの方法でも大雑把に言えば、以下の 4 ステップで共通している (図 7)。まず、1) 集団の一部をトレーニング集団として表現型値と SNP 情報を取得し、2) BLUP 法と同様に予測モデルを立てる。次に、3) この予測モデルを利用して、親魚候補 (評価集団) の SNP 情報から個体の GEBV を予測する。4) GEBV の高い個体を親魚として選抜する。

GBLUP 法では、BLUP 法と同様に、全ての SNP の効果は等しく小さい (infinitesimal) と仮定するのが特徴である。BLUP 法の分子血縁行列を実現血縁行列に置き換えるだけなので、従来の BLUP 法を行ってきた研究者には理解しやすい。単純な家系情報から得られた分子血縁行列を用いる BLUP 法に比べ、実現血縁行列を用いる GBLUP 法は SNP 情報からアリルの共有状態 (メンデルアンサンプリング: Mendelian sampling) によるばらつきを考慮できるので、予測の

正確度が上がる³⁵⁾。メンデルアンサンプリングについてもう少し説明を加える。両親が同じ 3 兄弟 (A, B, C) の血縁係数 (coefficient of relatedness) は、どの 2 個体間 (A-B, B-C, C-A) でも同じである (父母に血縁関係が無い場合はすべて 1/2)。しかし、実際にどのアリルを受け継いだかは異なるので、兄弟間でも表現型の類似度は異なる (ばらつきが出る)。血液型を想像すると分かりやすいだろう。このようなアリルの共有状態のばらつきをメンデルアンサンプリングといい、それによって生じる表現型のばらつきをメンデルアンサンプリング効果 (Mendelian sampling term/effect) という。従姉妹やもっと血縁度の離れた個体間でも同様で、表現型の類似度は血縁度の近さではなく、祖先からどのアリルを受け継いだか、すなわちアリルの共有状態に依存する。このように、メンデルアンサンプリングを考慮すると、血縁度では区別できなかった個体間の遺伝的類似度を区別できるため、表現型の類似性がより正確に反映される。したがって、分子血縁行列よりも実現血縁行列を利用した方が、予測の正確度が上がることとなる。

一方、Bayesian alphabet 法のうち、もっとも利用されている Bayes B 法では全ゲノム上に無数に配置した SNP 座が、少なくとも一つは対象形質に影響する QTL と連鎖不平衡状態にあると仮定して、それぞれの SNP の効果を予測し、その合計値を GEBV とする。このとき、多くの SNP は効果が無く、一部の SNP のみが効果を持つことを想定している。現実的には、多くの形質で GBLUP 法のような全ての SNP が同程度の効果を持つという仮定は成り立たないだろう。Meuwissen ら (2001)³⁶⁾ のシミュレーションデータで

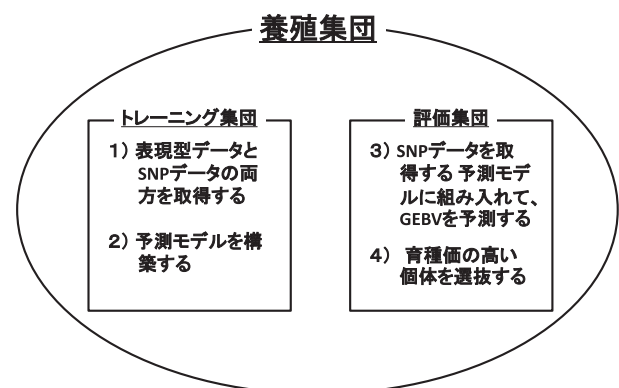


図 7. ゲノム予測の手順。手順は大きく分けて 4 つ。まず、1) 集団の一部をトレーニング集団として表現型値と SNP 情報を取得し、2) BLUP 法と同様に混合モデル方程式を立てる。次に、3) この混合モデル方程式 (予測モデル) を利用して、親魚候補 (評価集団) の SNP 情報から個体の育種価を予測する。4) 育種価の高い個体を親魚として選抜する。

も GBLUP 法の正確度が0.73だったのに対し、Bayes B 法の正確度は0.85と高かった。このように、関与する遺伝因子が比較的少ないような形質をあつかう場合は、Bayes B 法が GBLUP 法に比べて予測の正確度に優れる。一方で、体の大きさのように、関与する遺伝子の数が無数にあり、かつ、それぞれの効果が小さい多因子形質 (polygenic trait) の場合は、予測の正確度に大きな差は無いようである。

また、ゲノム予測は、BLUP 法に比べて世代あたりの近交度の上昇を抑えられる利点がある³⁵⁾。BLUP 法で予測した場合、兄弟など血縁の近い個体同士が同程度の育種価となるため、血縁の近い個体を多く選抜することになるのに対し、ゲノム予測の場合、血縁度よりもアリの共有度の情報に依存しているので、血縁の近い個体を選抜する確率が下がるからである。

最近では、さらにいくつかのゲノム予測法が報告されている。それらの違いは、QTL とその効果の分布をどのように仮定するかにある。すなわち、GBLUP 法がすべての SNP が等しく小さな効果を持つこと、あるいは Bayes B 法が一部の QTL のみが異なる大きさの効果を持つことを仮定したように、QTL とその効果の分布をどのように仮定し、最終的に GEBV をどのように予測 (回帰) するか、と言う点で異なる。LASSO (least absolute shrinkage and selection operator)、エラスティックネット (Elastic net)、ベイジアン LASSO (Bayesian LASSO)、および、再生核ヒルベルト空間回帰 (reproducing kernel Hilbert space regression) などが利用されることがある^{37), 38)}。これらの手法は、機械学習 (machine learning) という分野で発展した統計学にもとづいており、遺伝およびゲノム分野に取り入れられている³⁹⁾。

家畜育種で始まったゲノム予測は、作物育種に広がり、遅れて水産育種にも導入され始めている。遅れた理由は、主にゲノム研究の基盤整備が遅れていたことによる。しかし、NGS の登場によりこの遅れはすぐに取り戻せる状況にある。さらに、魚類育種の最大阻害要因のひとつであった家系情報取得の困難さが、格段に軽減されるという利点もあるので、ゲノム予測法は養殖セクターにおいて今後急速な広がりを見せるだろう。次に、水産育種におけるゲノム予測研究について、シミュレーションデータによるものと、実測データによるものとに分けて紹介する。

6. 水産育種におけるゲノム予測 (シミュレーションデータ)

水産育種におけるゲノム予測研究は、まず、シミュレーションデータを用いた研究が報告された。シ

ミュレーション研究の目的は、どうすれば予測の正確度 (prediction accuracy) と遺伝的獲得量 (genetic gain) を最大にしつつ近交度 (inbreeding) の上昇を抑えられるか、これらの3つの要素が BLUP と比べて優れているか、そして genotyping コストを抑えるにはどうすれば良いか、の答えを得ることである。報告数はノルウェーの研究所である Nofima によるものが多い。Nofima はタイセイヨウサケの選抜育種を先導する研究開発機関で、ヨーロッパの養殖研究で中心的な役割を果たしている。また、世界規模でも水産生物のゲノム予測に関する研究を展開しており、産業化も進めている。以下、2つ紹介する。

Sonesson と Meuwissen (2009)⁴⁰⁾ は、兄弟検定 (sib-test) を基本とした水産育種に GBLUP 法によるゲノム予測を適用した場合の予測の正確度と遺伝的獲得量の変化、および近交度の上昇傾向を、10世代に渡ってシミュレーションデータで示した。また、sib-test を行う頻度 (何世代に一回 sib-test を行うか)、マーカー密度、さらに遺伝率を変化させた場合において、これら3つのデータがどのように変化するかもシミュレーションした。なお、シミュレーションで構築した基礎集団は、各世代で選抜された雌雄100尾のランダムな1対1交配により作出された100の全兄弟家系として維持された。シミュレーションの結果、1) sib-test を行う頻度が減ると予測の正確度と遺伝的獲得量が減ること、2) sib-test をやめた次の世代で予測の正確度の低下が大きいこと、3) 予測の正確度が高いほど近交度の上昇は高いこと、4) BLUP 法に比べて近交度の上昇が小さいこと、5) マーカー密度を $0.5N_b/M$ (M : モルガン) 以上に増やしても予測の正確度はほとんど向上しないこと、6) 遺伝率が高い方が予測の正確度が高いこと、7) BLUP に比べて予測の正確度に対する遺伝率の影響が小さいこと、などを示した。

1)、2) について、sib-test をやめた次の世代で予測の正確度が著しく低下するのは、対象形質に影響力をもつ QTL と SNP マーカーとの間の LD 状態が変化したためと考えられる。特に、最初の世代で見かけ上の強い LD 状態にあった場合、次世代では組換えによって LD は解消されてしまうので、予測の正確度を著しく減じることとなる。このことは、正確な予測値を得るためには、トレーニング集団と評価集団の LD 状態が近いこと、また、両集団の血縁関係を可能な限り同じにする (別の家系をなるべく入れない) ことの重要性も示唆している。3)、4) の結果について、BLUP 法に比べてゲノム予測の方が近交度の上昇を抑えられるのは、特定の家系から選抜される傾向が強い BLUP 法に比べて、ゲノム予測では各家系から優良個

体を選抜 (within-family selection) される確率が高いためと考えられた。また、予測の正確度が向上すると、より強い Bulmer effect が働き、その結果、家系間の表現型のばらつきが減少し、within-family selection の確率が上がることも原因と考えられた。5) の結果で $0.5N_b/M$ (M : モルガン) 以上のマーカー数で予測の正確度が頭打ちになるのは、評価集団に用いた個体数が N_b に対して少ないことが原因として考えられ、評価集団の個体数を増やすことで予測の正確度を上げられると予想された。また、6)、7) の結果に関連して、予測の正確度に対する遺伝率の影響については、Neilsen ら (2009)⁴¹⁾ の報告を引用しているが、とくに遺伝率が低い場合 ($h^2 = 0.1$) で BLUP に比べて予測の正確度が向上するようだ。いずれも、他の生物種における結果と類似した結論であり、水産生物においても GBLUP 法が有効であると言えた。

Nirea ら (2012)⁴²⁾ では、GS におけるノンランダム交配と家系構造が遺伝的改良量と近交度の上昇に与える影響について報告している。より大きな遺伝的改良量を得るためには近交度の上昇は避けられない。すなわち、近交度の上昇は言わば必要悪である。しかし、長期的な選抜育種を行うには、近交度を一定以下に抑えなければならない。したがって、遺伝的改良量と近交度の上昇との間で至適なバランスを取る必要がある。BLUP 法ではノンランダム交配により、両者を好適に維持できることが報告されていたが、ゲノム予測においては報告が無かった。シミュレーション結果によると、ゲノム予測では交配デザインは両者のバランスに対する影響が小さいことが示され、かつ、いずれの条件でも、BLUP 法よりも遺伝的改良量が高く、近交度の上昇も抑えられた。一方で、1対1交配にもとづくペアワイズな家系構造よりも、複数個体との交配にもとづくファクトリアルな家系構造の方が優れていることも示された。

7. 水産育種におけるゲノム予測 (実測データ)

上述の2つの報告を含むいずれのシミュレーション結果においても、BLUP 法に対するゲノム予測の優位性が示された。そして近年、実測データを用いた研究結果も報告され始め、その優位性が実感される状況になっている。これまでのところ、3つの研究が報告され、そのうち2つは水産育種研究のモデル生物であるタイセイヨウサケで、1つはホタテガイ (*Patinopecten yessoensis*) である。

最初の報告は、Ødegård ら (2014)⁴³⁾ によるタイセイヨウサケのウミジラミ (sea lice: *Lepeophtheirus salmonis*) 耐性とフィレの色に関するゲノム予測であ

る。著者らは AquaGen などノルウェーのチームであり、ここでも水産育種の先進国ノルウェーの強さが現れている。寄生虫症を含む耐病性やフィレの色などは、評価個体から次世代を取れない侵襲的な形質 (invasive trait) であり、また、表現型評価に掛かるコストが高いため、親魚候補の表現型を必要としないゲノム予測に対する期待が特に高い形質である。本研究の結果、期待通り、1000 SNP 以上を用いたゲノム予測は BLUP 法による予測よりも正確度が高く、遺伝率の低いウオジラミ耐性 ($h^2 = 0.14$) では22万 SNP を用いた場合に正確度が17%向上し (BLUP 法 34%; GBLUP 法 50%)、遺伝率が比較的高いフィレ色 ($h^2 = 0.43$) では同じ数の SNP を用いた場合に 7%向上した (BLUP 法 36%; GBLUP 法 42%)。また、SNP 数の影響は、どちらの形質でも4000 SNP 程度でも十分に高い予測の正確度が得られた。本研究で用いられた解析集団は、ノルウェーの41河川から集められた野生魚で構成され、4つの年級群をそれぞれ4年の繁殖サイクルで7世代に渡って選抜育種していたものを1つに混合し、その後さらに2世代程度に渡って選抜を行った集団である。すなわち、血縁的に分化した4つの分集団が比較的最近に混ぜられた集団であった。そのため、集団内では大きな LD が増えた一方で小さな LD が減った状態にあり、4000程度の SNP でも比較的高い予測が可能であった。ところで、魚類よりも LD が極めて大きい畜産動物で十分な予測の正確度を得るのに数万の SNP を必要とするのにタイセイヨウサケでは1万 SNP も必要ないという結果は直感的には理解しにくい、これは分集団がいつ混ざったかでおおよそ説明できる。畜産動物の育種は起源が古く、様々な地域で分集団として維持されてきたものが古い時期に混ぜられた状態にある。したがって、分集団を混合したことによって出来た大きな LD は、野生魚に比べると極めて大きい、養殖タイセイヨウサケ集団に比べるとすでに小さくなっている。そのため、家畜集団は養殖魚集団よりも多くの SNP が必要とされることとなる。

もう一つのタイセイヨウサケの報告は Tsai ら (2015)⁴⁴⁾ で、エジンバラ大学の Roslin 研究所のチームによるものである。1つの集団から得た662個体について112000 SNP のジェノタイプングデータを利用して、当歳魚の体長と体重関する GWAS とゲノム予測 (GBLUP) を行っている。GWAS では体サイズと有意な関連を示す QTL は見つからず、予想通り polygenic な複雑形質であることが示された。一方、ゲノム予測の正確度は70%程度と高く、また、BLUP 法の58%よりも高かった。また、当該解析集団では

5000程度の SNP で予測の正確度が頭打ちになることが示された。これらの結果により、魚類においても、体サイズのような複雑形質のゲノム予測が可能であること、集団の構成によっては少ない SNP でも高い予測の正確度が得られることを実証した。

最後に紹介するホタテガイの報告は Dou ら (2016)⁴⁵⁾ で、中国のグループによるものである。本研究の特徴は、SNP 情報を SNP チップからではなく、RAD-seq 法の一つである 2d-RAD で得たことである。また、参照ゲノムを用いて *in silico* の 2d-RAD を行なって得たシミュレーションデータを用いた解析も行っている。シミュレーションデータでは、250000 SNP からなる高密度 SNP パネルと、*in silico* 2d-RAD で得た 61000 SNP からなる中密度 SNP パネル、および 5000 SNP からなる低密度 SNP パネルを用いて、遺伝率と予測法を変えて、予測の正確度を比較した。ゲノム予測は、GBLUP、Bayes A、Bayes B、ランダム回帰 BLUP (random regression BLUP)、LASSO 回帰、Bayesian LASSO の 6 種類を試した。その結果、予測の正確度は、いずれの条件でも、2d-RAD で得られる規模の中密度/低密度 SNP パネルと高密度 SNP パネルとの間で大きな差は認められなかった。このことから、2d-RAD のような *genotype-by-sequencing* 法によるジェノタイピング法によるゲノム予測が可能であることが示唆された。次に、5 家系 349 個体の殻長、殻幅、殻高からなる実測データを用いた解析を行っている。この集団は 1980 年代に日本から輸入された種苗に由来するとのことであるが、その後どのように集団を維持していたかについての詳しい記載はない。解析の結果、シミュレーションの結果には劣るものの、比較的高い予測の正確度が得られた。また、6 つのゲノム予測法のうち、GBLUP、Bayes A、Bayes B が優れていた。予測の正確度は、遺伝率、サンプルサイズ、集団構造に影響を受けるため⁴⁶⁾、普遍性のある結論とは言えないかもしれないが、GBLUP、Bayes A、Bayes B が優れていたのは、ゲノムの類似性をより正確に捉えられるからと考えられる。また、予測の正確度において実測データがシミュレーションデータに劣ったのは、実際のゲノムに存在する複雑性が原因であろうと考えられる。

いずれの報告においても、少ない SNP 数で比較的高い予測の正確度を得られていた。これは集団構造の影響が大きいと考えられる。野生集団を 10 から 20 世代に渡って交配してきた養殖集団は、集団全体では LD が小さいが、分集団内では比較的大きな LD を維持していると予想される。そのため、各分集団から十分な数の同胞個体について表現型と SNP データを得ることが出来れば、低密度 SNP でもゲノム予測が可能に

なり、反対に、各分集団から少数の個体しか得られない場合は、集団全体では LD が小さいためにより高密度の SNP 数が必要になると予想される。したがって、より正確なゲノム予測を行うには、より多くの個体について表現型と SNP データを得ることが重要となる。一方、家系構造のない集団では、 N_b が大きい場合は野生状態のときにあった小さい LD が残っているのでより多くの SNP が要求され、 N_b が小さい場合は大きな LD が構築されるので少数の SNP で十分な予測の正確度が得られると予想される。

8. ゲノム予測に関するまとめ

以上の通り、水産生物においてもゲノム予測の導入が進んでいる。メンデルアンサンプリングの影響を考慮できるため BLUP 法による予測よりも正確性に優れ、近交度の上昇を抑えられる利点がある。これは、*sib-test* を積極的に活用してきた養殖業において特に効果的である。デメリットは他の生物と同様に、ジェノタイピングコストがかかることである。おそらく、ここがゲノム予測を導入するにあたっての最大のハードルであろう。Agilent や Illumina のような SNP チップや NGS 関連の商品を扱う会社がアグリゲノミクスに力を入れ始めており、今後、単純に試薬、消耗品を含む解析コストそのものが大幅に下がると考えられるが、しばらくの間は、予測の正確度を向上させ、また、ジェノタイピングコストを下げることで解決を図る必要がある。

様々なシミュレーション結果によると、GBLUP 法と Bayes B 法が優れており、特に関与する遺伝子数が少ない場合には Bayes B 法が優れている。ただし、予測 (回帰) はモデル選択の問題であるので、どのモデルを用いるかはいくつかを試したうえで結果を見て決めることになる。予測の正確度が上がれば、近交度の上昇も速くなるが、1 対 1 交配ではなく、各親魚を複数個体と交配させるファクトリアル交配にもとづく集団を作ることで近交度の上昇も抑えられるようである。また、Sonesson と Meuwissen (2009)⁴⁰⁾ のシミュレーションでは、*sib-test* の頻度を増やすほど予測の正確度が高まった。しかし、*sib-test* を行うには、親魚候補のジェノタイプデータに加えて、トレーニング集団の表現型データとジェノタイプデータを取る必要があり、ジェノタイピングコストは上がる。これに対しては、最初の数世代は世代毎に *sib-test* を行い、途中から隔世代で行うことで、ある程度の予測の正確度を維持しながらジェノタイピングコストを下げることも可能なようである。最初の世代は大量の SNP を利用して、徐々に減らしていくという方法も考えられ

る。このように、ジェノタイピングコストを選抜育種によって得られるメリット以下に抑える工夫をする必要がある。

9. 使い分けについて

以上、内容を簡略化して、QTL 解析、GWAS、ゲノム予測という3つのゲノム情報を用いた選抜育種法について紹介した。「1. はじめに」で述べたとおり、どれか一つの方法が最良という訳ではなく、それぞれに長所と短所とがあり、適切に使い分けが必要である。以下、使い分けをまとめてみる。

MAS を行うべきか GS を行うべきかについては、対象形質の遺伝機構があらかじめ分かっていると決められない。しかし、GWAS とゲノム予測は同一の集団で可能なことから（野生集団を除く）、まずは QTL 解析を行うか行わないかの判断をすべきだろう。ヒラメのリンホシスチス症⁵⁾ やタイセイヨウサケの IPN⁶⁾ の例のように耐病性形質で遺伝率が高い場合は、効果の大きな QTL が存在する可能性が高く、MAS の効率が最も良いと考えられる。表現型が極端な系統を保持している場合は、QTL 解析を行ってみて、効果の大きい QTL が見つければ MAS を行うのが良いだろう。表現型が極端な系統を持たない場合は、感染試験で生残の良い系統と悪い系統からそれぞれ親魚を選抜して、QTL 解析用の家系を作出することとなる。しかし、それ以外のほとんどの形質は MAS の効果はほとんど期待できず、QTL 解析を行うのは効率が極めて悪いことが予想されるので、複数の親魚を用いたファクトリアルな交配集団を利用して、GWAS あるいはゲノム予測を行うべきと考えられる。このような集団を用いて GWAS とゲノム予測を行って、運よく効果の大きい QTL が見つければ MAS を、見つからなければ GS を採用することになる。ただし、MAS は、2 世代目以降の遺伝的改良が望めず、また、同時に有害な変

異も蓄積する可能性が大きい。したがって、効果の大きい QTL が見かった場合でも、効果が極めて大きい、あるいは領域を数百 kb 程度に絞り込めた場合を除いては、長期的には必ずしも効率が良くないことを理解しておくべきであろう。

10. 最後に

世界的に見て漁労と魚食の文化が大いに発展した日本と北欧ではあるが、国策としての水産業に対する取り組み方と産業的な捉え方は大きく異なった。海産魚介類の完全養殖技術が確立したのち、日本が養殖対象種の拡大と栽培漁業を通じた天然資源の涵養を目指したのに対し、北欧は畜産業と同じく効率的な養殖生産を追求した。その延長線上にあるのかも知れないが、線形モデルやベイズなど難解な統計学の知識が取り入れられた水産学分野は、日本ではもっぱら資源学か生態学だったのに対し、北欧ではそれらに加えて養殖学にも浸透し遺伝育種学が発展した。こういった事情に、日本と北欧との間で選抜育種に対する取り組みに差が生じた原因があったと考えられる。

我が国で GS を広めていくには、和田 (2007)²⁸⁾ が BLUP 法の普及に際して指摘したように、水産研究者の遺伝学と統計学的知識を底上げする必要がある。家畜育種関係者の協力を求めることは、一つの方法であろう。また、GS のメリットを受益者に理解してもらうことも重要である。BLUP 法に比べ、家系情報の記録および個体標識といった実施へのハードルは、実質的に無くなった。さらに、genotype-by-sequencing 法を用いることで、ゲノム情報のないマイナーな魚種の選抜育種も可能となった。このことは、養殖対象生物の多様性という日本養殖産業の特徴を強みに変えられるきっかけとなる。今後、育種目標の設定、交配デザインに加え、ジェノタイピングを誰がどこで実施、あるいはサポートするのかなど、産官学の協力体制を構築されることが期待される。

文 献

- 1) Fuji, K., O. Hasegawa, K. Honda, K. Kumasaka, T. Sakamoto and N. Okamoto (2007) Marker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 272: 291-295.
- 2) Moen, T., J. Torgersen, N. Santi, W.S. Davidson, M. Baranski, J. Ødegård, S. Kjøglum, B. Velle, M. Kent, K.P. Lubieniecki, E. Isdal and S. Lien (2015) Epithelial Cadherin Determines Resistance to Infectious Pancreatic Necrosis Virus in Atlantic Salmon. *Genetics*, 200:1313-1326.
- 3) Lander, E.S. and D. Botstein (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121:185-199.
- 4) Miles, C. and M. Wayne (2008) Quantitative trait locus (QTL) analysis. *Nat. Edu.*, 1:208.
- 5) Fuji, K., K. Kobayashi, O. Hasegawa, M.R.M. Coimbra, T. Sakamoto and N. Okamoto (2006) Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys*

- olivaceus*). Aquaculture, 254: 203-210.
- 6) Houston, R.D., C.S. Haley, A. Hamilton, D.R. Guy, J.C. Mota-Velasco, A.A. Gheyas, A.E. Tinch, J.B. Taggart, J.E. Bron, W.G. Starkey, B.J. McAndrew, D.W. Verner-Jeffreys, R.K. Paley, G.S.E. Rimmer, I.J. Tew and S.C. Bishop (2010) The susceptibility of Atlantic salmon fry to freshwater infectious pancreatic necrosis is largely explained by a major QTL. *Heredity*, 105:318-327.
 - 7) Hosoya, S., W. Kai, M. Fujita, K. Miyaki, H. Suetake, Y. Suzuki and K. Kikuchi (2013) The genetic architecture of growth rate in juvenile *Takifugu* species. *Evolution*, 67, 590-598.
 - 8) Baird, N.A., P.D. Etter, T.S. Atwood, M.C. Currey, A.L. Shiver, Z.A. Lewis, E.U. Selker, W.A. Cresko and E.A. Johnson (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, 3: e3376.
 - 9) Kingsmore, S.F. (2008) Genome-wide association studies: progress and potential for drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7: 221-230.
 - 10) Barson NJ, T. Aykanat, K. Hindar, M. Baranski, G.H. Bolstad, P. Fiske, C. Jacq, A.J. Jensen, S.E. Johnston, S. Karlsson, M. Kent, T. Moen, E. Niemelä, T. Nome, T.F. Næsje, P. Orell, A. Romakkaniemi, H. Sægrov, K. Urdal, J. Erkinaro, S. Lien and C.R. Primmer (2015) Sex-dependent dominance at a single locus maintains variation in age at maturity in salmon. *Nature*, 528:405-408.
 - 11) Ayllon F., E. Kjærner-Semb, T. Furmanek, V. Wennevik, M.F. Solberg, G. Dahle, G.L. Taranger, K.A. Glover, M.S. Almén, C.J. Rubin, R.B. Edvardsen and A. Wargelius (2015) The *vgl3* locus controls age at maturity in wild and domesticated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) males. *PLoS Genet*, 11: e1005628.
 - 12) Kamiya, T., W. Kai, S. Tasumi, A. Oka, T. Matsunaga, N. Mizuno, M. Fujita, H. Suetake, S. Suzuki, S. Hosoya, S. Tohari, S. Brenner, T. Miyadai, B. Venkatesh, Y. Suzuki and K. Kikuchi (2012) A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (fugu). *PLoS Genet.*, 8:e1002798
 - 13) Slatkin, M. (2008) Linkage disequilibrium – understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat. Rev., Genet.* 9:477-485.
 - 14) Silventoinen, K., S. Sammalisto, M. Perola, D.I. Boomsma, B.K. Cornes, C. Davis, L. Dunkel, M. De Lange, J.R. Harris, J.V.B. Hjelmborg, M. Luciano, N.G. Martin, J. Mortensen, L. Nisticò, N.L. Pedersen, A.Skytthe, T.D. Spector, M.A. Stazi, G. Willemsen and J. Kaprio (2003) Heritability of adult body height: A comparative study of twin cohorts in eight countries. *Twin Res.*, 6: 399-408.
 - 15) Macgregor, S., B.K. Cornes, N.G. Martin and P.M. Visscher (2006) Bias, precision and heritability of self-reported and clinically measured height in Australian twins. *Hum. Genet.*, 120:571-580.
 - 16) Lango Allen H. et. al. (2010) Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height. *Nature*, 467: 832-838.
 - 17) Maher, B. (2008) Personal genomes: The case of the missing heritability. *Nature*, 456: 18-21.
 - 18) Manolio, T.A., F.S. Collins, N.J. Cox, D.B. Goldstein, L.A. Hindorff, D.J. Hunter, M.I. McCarthy, E.M. Ramos, L.R. Cardon, A. Chakravarti, J.H. Cho, A.E. Guttmacher, A. Kong, L. Kruglyak, E. Mardis, C.N. Rotimi, M. Slatkin, D. Valle, A.S. Whittemore, M. Boehnke, A.G. Clark, E.E. Eichler, G. Gibson, J.L. Haines, T.F. Mackay, S.A. McCarroll and P.M. Visscher (2009) Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, 461:747-753.
 - 19) Bloom, J.S., I.M. Ehrenreich, W.T. Loo, T.L. Lite and L. Kruglyak (2013) Finding the sources of missing heritability in a yeast cross. *Nature*, 494:234-237.
 - 20) Yang, J., B. Benyamin, B.P. McEvoy, S. Gordon, A.K. Henders, D.R. Nyholt, P.A. Madden, A.C. Heath, N.G. Martin, G.W. Montgomery, M.E. Goddard and P.M. Visscher (2010) Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nat. Genet.*, 42:565-569.
 - 21) Visscher, P.M., J. Yang and M.E. Goddard (2010) A commentary on 'common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height' by Yang et al. (2010). *Twin Res. Human Genet.*, 13:517-524.
 - 22) International Schizophrenia Consortium, S.M. Purcell, N.R. Wray, J.L. Stone, P.M. Visscher, M.C. O'Donovan, P.F. Sullivan and P. Sklar (2009) Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature*, 460: 748-752.
 - 23) Teslovich, T.M. et al. (2010) Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*, 466:707-713.

- 24) Yang, J., A. Bakshi, Z. Zhu, G. Hemani, A.A. Vinkhuyzen, S.H. Lee, M.R. Robinson, J.R. Perry, I.M. Nolte, J.V. van Vliet-Ostaptchouk, H. Snieder, LifeLines Cohort Study, T. Esko, L. Milani, R. Mägi, A. Metspalu, A. Hamsten, P.K. Magnusson, N.L. Pedersen, E. Ingelsson, N. Soranzo, M.C. Keller, N.R. Wray, M.E. Goddard and P.M. Visscher (2015) Genetic variance estimation with imputed variants finds negligible missing heritability for human height and body mass index. *Nat. Genet.*, 47:1114-1120.
- 25) Abraham, G. and M. Inouye (2015) Genomic risk prediction of complex human disease and its clinical application. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 33:10-16.
- 26) Henderson, C.R. (1984) Applications of linear models in animal breeding. University of Guelph.
- 27) 佐々木義之 (2007) 第 2 章. BLUP 法の歴史. pp. 33-46. 「変量効果の推定と BLUP 法」佐々木義之編, 京都大学出版会, 京都.
- 28) 和田克彦 (2007) 総説－水産育種における選抜育種への BLUP 法の適用について. 水産育種, 37:7-18.
- 29) 佐々木義之 (2007) 第 1 章. 変量効果の推定, 第 2 章. BLUP 法の歴史, 第 3 章. BLUP 法の原理と特性, 第 4 章. 種々のモデルの BLUP 法. pp. 3-134. 「変量効果の推定と BLUP 法」佐々木義之編, 京都大学出版会, 京都.
- 30) Henderson, C.R. (1975) Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics*, 31:423-447.
- 31) Franklin, I.R. and R. Frankham (1998) How large must populations be to retain evolutionary potential? *Anim. Conserv.*, 1:69-70.
- 32) Gallardo, J.A., X. Garcia, J.P. Lhorente and R. Neira (2004) Inbreeding and inbreeding depression of female reproductive traits in two populations of Coho salmon selected using BLUP predictors of breeding values. *Aquaculture*, 234:111-122.
- 33) Bulmer, M.G. (1971) The effect of selection on genetic variability. *Am. Nat.*, 105:201-211.
- 34) Hayes, B.J., P.M. Visscher and M.E. Goddard (2009) Increased accuracy of artificial selection by using the realized relationship matrix. *Genet. Res.*, 91:47-60.
- 35) Daetwyler, H.D., B. Villanueva, P. Bijma, J.A. Woolliams (2007) Inbreeding in genome-wide selection. *J. Anim. Breed. Genet.*, 124:369-376.
- 36) Meuwissen, T.H.E., B.J. Hayes and M.E. Goddard (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*, 157:1819-1829.
- 37) Neves, H.H., R. Carneiro and S.A. Queiroz (2012) A comparison of statistical methods for genomic selection in a mice population. *BMC Genet.*, 13:100.
- 38) Ogutu, J.O., T. Schulz-Streeck and H. Piepho (2012) Genomic selection using regularized linear regression models: ridge regression, lasso, elastic net and their extensions. *BMC Proceedings*, 6(Suppl 2):S10.
- 39) Libbrecht, M.W. and W. S. Noble (2015) Machine learning applications in genetics and genomics. *Nat. Rev. Genet.*, 16:321-332.
- 40) Sonesson, A.K. and T.H.E. Meuwissen (2009) Testing strategies for genomic selection in aquaculture breeding programs. *Genet. Sel. Evol.*, 41:37.
- 41) Nielsen, H.M., A.K. Sonesson, H. Yazdi and T.H.E. Meuwissen (2009) Comparison of accuracy of genome-wide and BLUP breeding value estimates in sib based aquaculture breeding schemes. *Aquaculture*, 289:259-264.
- 42) Nirea, K.G., A.K. Sonesson, J.A. Woolliams and T.H.E. Meuwissen (2012) Effect of non-random mating on genomic and BLUP selection schemes. *Genet. Sel. Evol.*, 44:11.
- 43) Ødegård, J., T. Moen, N. Santi, S.A. Korsvoll, S. Kjøglum and T.H.E. Meuwissen (2014) Genomic prediction in an admixed population of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Front. Genet.*, 5:402.
- 44) Tsai, H.Y., A. Hamilton, A.E. Tinch, D.R. Guy, K. Gharbi, M.J. Stear, O. Matika, S.C. Bishop and R.D. Houston (2015) Genome wide association and genomic prediction for growth traits in juvenile farmed Atlantic salmon using a high density SNP array. *BMC Genomics*, 16:969.
- 45) Dou, J., X. Li, Q. Fu, W. Jiao, Y. Li, T. Li, Y. Wang, X. Hu, S. Wang and Z. Bao (2016) Evaluation of the 2b-RAD method for genomic selection in scallop breeding. *Sci. Rep.*, 6:19244.
- 46) Neves, H.H., R. Carneiro and S.A. Queiroz (2012) A comparison of statistical methods for genomic selection in a mice population. *BMC Genet.*, 13:100.

— Original —

The Genetic Structure of Natural Abalone *Haliotis discus hannai* Populations in Sanriku, Japan, after the 2011 off the Pacific Coast of Tohoku Earthquake

Kenta ADACHI^{1*}, Taishi OKUMURA¹, Sei-ichi OKUMURA¹
and Shunsuke MORIYAMA¹

¹ Kitasato University, School of Marine Biosciences

Abstract

The abalone *Haliotis discus hannai* is one of the major marine products in Sanriku, Aomori, Iwate, and Miyagi, Japan. In this study, we investigated the genetic structure and diversity of *H. discus hannai* populations in two different locations in Sanriku (Okirai and Touni Bays) for three consecutive years after the 2011 earthquake using nine microsatellite DNA loci and two mitochondrial DNA regions. The results showed that there are no significant differences in genetic diversity (allelic richness, expected heterozygosity, and haplotype and nucleotide diversity) or significant genetic differentiations (pairwise F_{ST}) between locations. This study revealed the gene flow in the abalone populations of Okirai and Touni Bays and their genetic diversity were maintained even after the tsunami.

(accepted May 10, 2016)

Introduction

Of the abalone species (*Haliotis discus discus*, *Haliotis discus hannai*, *Haliotis madaka*, *Haliotis gigantea*, *Haliotis diversicolor diversicolor*, and *Haliotis diversicolor aquatilis*) that inhabit the Japanese Archipelago, *H. discus discus* and *H. discus hannai* have the highest economic value in Japan, Taiwan, South Korea, and China. Sanriku, which is the Pacific coast of Northeast Japan, has been traditionally one of the most important fishery regions, where the abalone *H. discus hannai* is one of the major marine products with high market price. Therefore, the life cycle of this species has been studied. The number of eggs in *H. discus hannai* was reported to approximately 1.5×10^6 at a shell length of 100 mm¹⁾, although the number of eggs changes with growth²⁾.

This species settles at 6–7 d post-fertilization³⁾, and its dispersal ability is estimated less than about 40 km⁴⁾. Since *H. discus hannai* needs 4–5 years after fertilization for maturation⁵⁾ and was expected high mortality in early stage in natural environment, resource management, including the release of land-cultured juvenile abalone into natural waters, is of great importance and has been continuously applied in an orderly and timely manner in Sanriku.

The powerful tsunamis triggered by the Tohoku-Pacific Ocean Earthquake that occurred on March 11, 2011, had significant environmental effects on marine ecosystems, due to changes in water quality and available segment properties. A previous study on the variation of segment properties in each bay of Sanriku after the tsunami reported organic

*Corresponding author: Kenta Adachi, Kitasato University, School of Marine Biosciences, Minami-ku, Sagami-hara, Kanagawa 252-0373, Japan

contamination by measuring of the increase of chemical oxygen demand (COD) in Kamaishi and Ofunato Bay⁶). This environmental change could cause the mass die-off of abalone and change the genetic structure of natural populations. A previous study on abalone populations in Oshika Peninsula reported that the density of juveniles which decreased to 14% (8 June 2011) of that before the tsunami (9 February 2011), decreased more than that of adults after the tsunamis⁷). Thus, a strong population bottleneck possibly affected juveniles, causing a decrease in genetic diversity and changes in genetic structure, even if population size recovered subsequently. Low genetic diversity can reduce adaptability to environmental changes⁸) and increase the chances of extinction. Therefore, genetic studies are required for developing strategies for effective management of natural populations of *H. discus hannai*.

Microsatellite DNA (msDNA) and mitochondrial DNA (mtDNA) have been used as genetic markers for studying the genetic structure of natural populations. To examine the influence of tsunami on abalone nature populations, we evaluate the presence of gene flow among local populations and genetic diversity before and after the tsunami. The genetic structure for msDNA of *H. discus hannai* populations before the Tohoku-Pacific Ocean Earthquake was reported in Omoe, Taro, Kamaishi, and Hirota in Iwate Prefecture, and in the Kinkasan Island in Miyagi Prefecture^{9, 10}) (Fig. 1), but there is no information on the genetic structure of abalone populations in Okirai and Touni Bay (Iwate Prefecture) before the tsunami. However, influence of the tsunami on populations in Okirai and Touni Bay should be possible inferred from comparison to the previous reported information in other bay of Sanriku. In this study, we investigated the genetic structure of natural *H. discus hannai* populations born before the tsunami for three consecutive years (2012–2014) using msDNA and mtDNA markers to estimate the possible genetic disturbance.

Materials and methods

A total of 206 *H. discus hannai* specimens (90–130 mm in shell length) used in this study were collected by fishermen from Okirai and Touni Bays, Iwate Prefecture, in December of 2012, 2013, and 2014 (two locations × three years, six populations)

(Fig. 1). Epipodium tissues were cut, placed in 1.5-ml microcentrifuge tubes with RNAlater (Qiagen, Venlo, Netherlands), and stored at -80°C . Genomic DNA was extracted using DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen), and DNA concentration was measured by NanoDrop 2000 (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and adjusted to $1\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$ in each reaction mixture for polymerase chain reaction (PCR) amplification, adding sterilized water.

For msDNA analysis, nine loci reported by Hara & Sekino⁹), Sekino et al.¹¹), and Sekino & Hara¹²) were amplified using T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) or 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) with fluorescence primers and Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. PCR conditions were as follows: 95°C for 12 min, 32–42 cycles at 95°C for 30 s, primer annealing temperature for 1 min, and 75°C for 1 min, and a final extension at 75°C for 5–7 min. Primer sequences and annealing temperatures are presented in Table 1. PCR products were analyzed using ABI PRISM 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems) with GeneScan 400HD ROX dye Size standard (Applied Biosystems), and genotyped using Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems).

The number of alleles (A_N) as well as observed (H_O) and expected heterozygosity (H_E) were

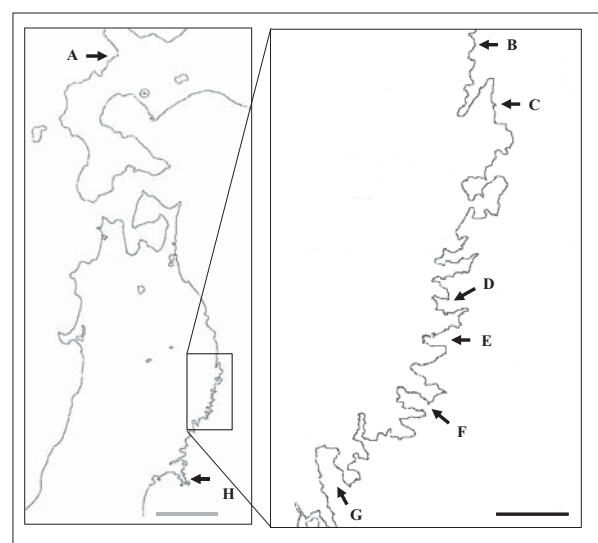


Fig. 1. Collection sites of *Haliotis discus hannai* population used in this study and in a previous study. (A) Iwanai, (B) Omoe, (C) Taro, (D) Kamaishi, (E) Touni, (F) Okirai, (G) Hirota, and (H) Kinkasan Island. Gray scale bar, 50 km; Black scale bar, 10 km.

calculated by GENEPOP 4.2¹³⁾, whereas allelic richness (A_R) and inbreeding coefficient (F_{IS}) by FSTAT 2.9.3.2¹⁴⁾. Deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) for each locus was evaluated by an exact test using the Markov chain method in ARLEQUIN 3.5.1.2¹⁵⁾.

For mtDNA analysis, the cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) and 16S rDNA genes were amplified using two primer sets, ABCOI F (TGA TCC GGC TTA GTC GGA ACT GC) and ABCOI R (GAT GTC TTG AAA TTA CGG TCG GT) for COI¹⁶⁾ and 16SAR (CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT) and 16SBR (CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T) for 16S rDNA¹⁷⁾, and Taq PCR Master Mix Kit. PCR conditions for COI were as follows: 94°C for 1 min, 35 cycles at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 7 min, whereas those for 16S rDNA were as follows: 94°C for 4 min, 36 cycles at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1.5 min, and a final extension at 72°C for 7 min¹⁸⁾. PCR products were visualized using 2% agarose electrophoresis. Excess primers and dNTPs in PCR products were removed using ExoSAP-IT (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). DNA nucleotide sequencing was performed for both strands with the same primers that used for PCR and the BigDye terminator 3.1 cycle sequencing kit (Applied

Biosystems). The labeled fragments were analyzed using ABI PRISM 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems). The number of haplotypes (N_h) and polymorphic sites (N_p), as well as haplotype (h) and nucleotide diversity (π) were calculated by DnaSP 5.10.01¹⁹⁾. The haplotype network based on COI and 16S rDNA sequences was constructed using TCS 1.21²⁰⁾. To estimate the history of population size, Tajima's D ²¹⁾ based on concatenated sequence was calculated, and mismatch distribution analysis was performed using ARLEQUIN.

To test the significance of genetic differentiation between locations, analysis of molecular variance (AMOVA)²²⁾ was conducted with ARLEQUIN based on msDNA and mtDNA data. Two groups, (Okirai 2012, 2013 and 2014] and (Touni 2012, 2013 and 2014), were compared in AMOVA. ARLEQUIN was also used for pairwise F_{ST} estimation based on both mtDNA and msDNA markers and test of their significance at $p < 0.05$ with Bonferroni correction.

Results

The genetic diversity of abalone populations from Okirai and Touni Bays in 2012, 2013, and 2014 based on nine msDNA markers is presented in Table 2. The A_R of each population ranged from 8.6 (Okirai and Touni Bays in 2013) to 9.0 (Okirai Bay in 2012

Table 1. Primers of microsatellite DNA loci used in this study

Locus	Repeat sequences (5' - 3')	Primer sequences (5' - 3')	Fluorescence label	Ta (°C)	Reference
<i>Hd 527</i>	CTCA	F: ψ TGT AAA GAC CCT CGT CAT TTG GA R: AGC AGC TGA CAC GCC GTG ATA T	NED	55	Hara and Sekino (2005) ³⁾
<i>Hd 535</i>	CTCA	F: ψ TTT AAC TCT ACA TGC CGA AG R: TAC TGT CAG TCC ACA TAG GAT	NED	58	Hara and Sekino (2005) ³⁾
<i>Hd 715</i>	CTCA	F: ψ GAA GCC CAT TTC TGG TGT CC R: CGT TCT GTT CAT ACG CAT AGT G	HEX	55	Hara and Sekino (2005) ³⁾
<i>Hd 604</i>	AAT	F: ψ GTG TCA GTT CTC CAA ACA CTT R: GAA AAG GAC TCA ACA AGC AG	6-FAM	55	Hara and Sekino (2005) ³⁾
<i>Hd 680</i>	CTCA	F: ψ CAC TTA GGG CTT TCC TCC CAC ATT R: TGA GTG GCT ATG CAA ACA ACC ATG	6-FAM	55	Hara and Sekino (2005) ³⁾
<i>Awb 062</i>	ATT	F: ψ TAC CCC TCA ATC ATA ATA TTG TAT T R: TTG TCT ACA TTC TGG TGA TAA GTC T	HEX	55	Sekino <i>et al.</i> (2005) ⁵⁾
<i>Ahdh 457</i>	CACT	F: ψ TCG TCA CTC TGA AGA CTG GGG TTT R: CAA AAT ATG GGG AGG AAG CAA A	6-FAM	60	Sekino and Hara (2007) ⁶⁾
<i>Ahdh 562</i>	TTG	F: ψ TGG TTG TGG CCT TGT CTG TTT C R: TAT AGC TGG AAT GCT CAG TGC G	HEX	60	Sekino and Hara (2007) ⁶⁾
<i>Ahdh 1147</i>	AGGCG	F: ψ TAT TTC AGC CTG ATT AAC CCT GTG R: ATG CTT ACT CAA CTT GGC ACT TAC	NED	58	Sekino and Hara (2007) ⁶⁾

Ta, annealing temperature; ψ , fluorescence label

and 2014) with no significant differences (Kruskal-Wallis test) between locations or years. The mean H_E of each population ranged from 0.657 (Touni Bay in 2013) to 0.681 (Touni Bay in 2014) also with no significant differences (Kruskal-Wallis test) between locations or years. Significant deviations from HWE were identified for two msDNA loci, *Awb062* ($F_{IS} = 0.116$, $p = 0.021$) and *Hd 535* ($F_{IS} = -0.086$, $p = 0.011$) in Okirai Bay in 2012 and 2014, respectively, and *Hd 680* ($F_{IS} = 0.317$, $p = 0.034$) in Touni Bay in 2014 (Table 2). The positive F_{IS} values of *Awb062* and *Hd 680* that showed significant deviations from HWE were caused by heterozygote deficiency or homozygote excess.

The genetic diversity of abalone populations from Okirai and Touni Bays in 2012, 2013, and 2014 based on COI (424 bp) and 16S rDNA (420 bp) is presented in Table 3. The number of haplotypes in COI and 16S rDNA was 43 and 21, respectively, and the sequences were deposited into the DNA Data Bank of Japan (DDBJ) and GenBank (LC085911–LC085953 for COI; LC085854–LC085874 for 16S rDNA). Both h and π did not show any significant differences between locations for COI, whereas they were significantly different for 16S rDNA (Kruskal-Wallis test; h : $df = 1$, $p = 0.05$; π : $df = 1$, $p = 0.05$). Additionally, h was significantly different between locations (Kruskal-Wallis test; $df = 1$, $p = 0.05$) for the concatenated sequences (844 bp). Comparisons between years within each location did not show any significant differences in mtDNA regions.

The haplotype network that revealed the relationship of 62 haplotypes is shown in Fig. 2. Six dominant haplotypes (HH1–HH6) accounted for 58.2% of all haplotypes were identified at a frequency of more than 5% in all populations (Fig. 2). HH1 was the most dominant, and 14 haplotypes were derived from HH1 with a single nucleotide substitution forming star-like phylogeny. HH2–HH5 haplotypes differed by one or two nucleotide substitutions from HH1, whereas HH6 haplotype differed by more than six nucleotide substitutions from HH1. The Tajima's D based on concatenated mtDNA sequences showed negative and significant value ($D = -1.795$; $p = 0.01$). Additionally, the mismatch distribution analysis did not show any significant deviation (Sum of Squared deviation 0.007; $p = 0.28$) from the sudden expanding model (Fig. 3), and the calculated τ value was 1.785.

The AMOVA of the Okirai (2012, 2013, and 2014)

Table 2. Six *Haliotis discus hannai* populations for each of the nine microsatellite DNA loci

Locus	Parameter	Okirai Bay			Touni Bay		
		2012	2013	2014	2012	2013	2014
		$N=36$	$N=31$	$N=40$	$N=30$	$N=29$	$N=40$
<i>Hd 527</i>	A_N	3	3	3	3	3	3
	A_R	2.8	3.0	2.7	3.0	4.0	2.7
	HWE	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	H_O	0.083	0.226	0.100	0.200	0.138	0.075
	H_E	0.082	0.210	0.097	0.186	0.134	0.074
	F_{IS}	-0.019	-0.077	-0.030	-0.077	-0.032	-0.017
<i>Hd 535</i>	A_N	15	13	17	16	14	15
	A_R	14.2	12.7	15.4	15.8	14.0	13.5
	HWE	0.067	0.081	0.011*	0.070	0.942	0.826
	H_O	0.889	0.806	0.975	0.800	0.931	0.850
	H_E	0.893	0.885	0.899	0.908	0.905	0.889
	F_{IS}	0.004	0.090	-0.086	0.121	-0.029	0.044
<i>Hd 715</i>	A_N	7	7	9	6	6	6
	A_R	6.8	6.9	8.8	6.0	6.0	6.0
	HWE	0.117	0.134	0.901	0.449	1.000	0.612
	H_O	0.583	0.419	0.650	0.500	0.483	0.600
	H_E	0.628	0.508	0.596	0.476	0.435	0.603
	F_{IS}	0.071	0.177	-0.092	-0.051	0.112	0.006
<i>Hd 604</i>	A_N	11	12	12	14	10	12
	A_R	10.5	11.9	11.1	13.9	10.0	11.0
	HWE	0.278	0.647	0.920	0.113	0.749	0.571
	H_O	0.778	0.903	0.825	0.867	0.862	0.800
	H_E	0.851	0.883	0.841	0.893	0.879	0.835
	F_{IS}	0.088	-0.024	0.020	0.030	0.020	0.043
<i>Hd 680</i>	A_N	6	5	5	5	4	4
	A_R	5.4	4.9	4.7	5.0	4.0	3.7
	HWE	0.189	0.394	0.442	0.404	0.265	0.034*
	H_O	0.500	0.710	0.625	0.633	0.655	0.400
	H_E	0.636	0.596	0.607	0.599	0.577	0.583
	F_{IS}	0.216	-0.195	-0.031	-0.059	-0.139	0.317
<i>Awb 062</i>	A_N	16	12	15	13	14	15
	A_R	15.1	11.9	13.8	12.9	14.0	13.7
	HWE	0.021*	0.233	0.114	0.064	0.81	0.067
	H_O	0.750	0.742	0.850	0.767	0.897	0.700
	H_E	0.847	0.806	0.866	0.881	0.888	0.752
	F_{IS}	0.116	0.081	0.018	0.132	-0.010	0.094
<i>Ahdh 457</i>	A_N	12	12	14	10	10	12
	A_R	11.0	11.7	11.7	9.9	10.0	11.2
	HWE	0.089	0.603	0.217	0.571	0.722	0.971
	H_O	0.639	0.645	0.600	0.567	0.655	0.775
	H_E	0.750	0.617	0.612	0.610	0.688	0.759
	F_{IS}	0.149	-0.046	0.020	0.072	0.048	-0.021
<i>Ahdh 562</i>	A_N	11	10	9	9	11	13
	A_R	10.3	9.8	8.4	8.9	11.0	11.4
	HWE	0.104	0.541	0.212	0.372	0.373	0.381
	H_O	0.639	0.645	0.675	0.700	0.586	0.675
	H_E	0.717	0.702	0.735	0.769	0.694	0.756
	F_{IS}	0.110	0.082	0.080	0.092	0.158	0.108
<i>Ahdh 1147</i>	A_N	5	5	5	4	4	5
	A_R	4.8	4.9	4.7	4.0	4.0	4.9
	HWE	0.72	0.788	0.698	0.541	0.701	0.607
	H_O	0.778	0.806	0.825	0.800	0.828	0.800
	H_E	0.720	0.739	0.760	0.733	0.717	0.882
	F_{IS}	-0.082	-0.092	-0.086	-0.093	-0.158	0.104
Mean	A_N	9.6	8.8	9.9	8.9	8.4	9.4
	A_R	9.0	8.6	9.0	8.8	8.6	8.7
	H_O	0.627	0.656	0.681	0.648	0.671	0.631
	H_E	0.680	0.661	0.668	0.673	0.657	0.681

N number of samples, A_N Number of alleles, A_R allelic richness, HWE p value for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, H_O observed heterozygosity, H_E expected heterozygosity, F_{IS} inbreeding coefficient

* $p < 0.05$ level.

Table 3. Six *Haliotis discus hannai* populations for COI (424 bp), 16S rDNA (420 bp), and concatenated mitochondrial DNA regions (844 bp).

Region	Site	Year	<i>N</i>	<i>N_h</i>	<i>N_p</i>	<i>h</i> ± SD	<i>π</i> ± SD
COI	Okirai Bay	2012	36	10	12	0.795 ± 0.045	0.0050 ± 0.0010
		2013	31	13	14	0.895 ± 0.032	0.0059 ± 0.0009
		2014	40	20	24	0.853 ± 0.052	0.0074 ± 0.0009
	Touni Bay	2012	30	17	16	0.867 ± 0.059	0.0065 ± 0.0010
		2013	29	13	13	0.921 ± 0.024	0.0072 ± 0.0008
		2014	40	22	22	0.944 ± 0.022	0.0072 ± 0.0008
16S rRNA	Okirai Bay	2012	36	5	4	0.621 ± 0.058	0.0018 ± 0.0003
		2013	31	5	4	0.589 ± 0.060	0.0017 ± 0.0003
		2014	40	6	6	0.562 ± 0.064	0.0017 ± 0.0003
	Touni Bay	2012	30	8	6	0.694 ± 0.059	0.0022 ± 0.0003
		2013	29	8	7	0.697 ± 0.062	0.0023 ± 0.0004
		2014	40	8	8	0.721 ± 0.047	0.0025 ± 0.0003
COI + 16S rRNA	Okirai Bay	2012	36	12	16	0.843 ± 0.040	0.0034 ± 0.0006
		2013	31	15	18	0.905 ± 0.032	0.0038 ± 0.0005
		2014	40	22	30	0.887 ± 0.044	0.0046 ± 0.0005
	Touni Bay	2012	30	21	22	0.931 ± 0.039	0.0044 ± 0.0005
		2013	29	16	20	0.943 ± 0.023	0.0047 ± 0.0005
		2014	40	24	30	0.965 ± 0.014	0.0049 ± 0.0004

N number of samples, *N_h* number of haplotypes, *N_p* number of polymorphic sites, *h* haplotype diversity, *π* nucleotide diversity, SD standard deviation

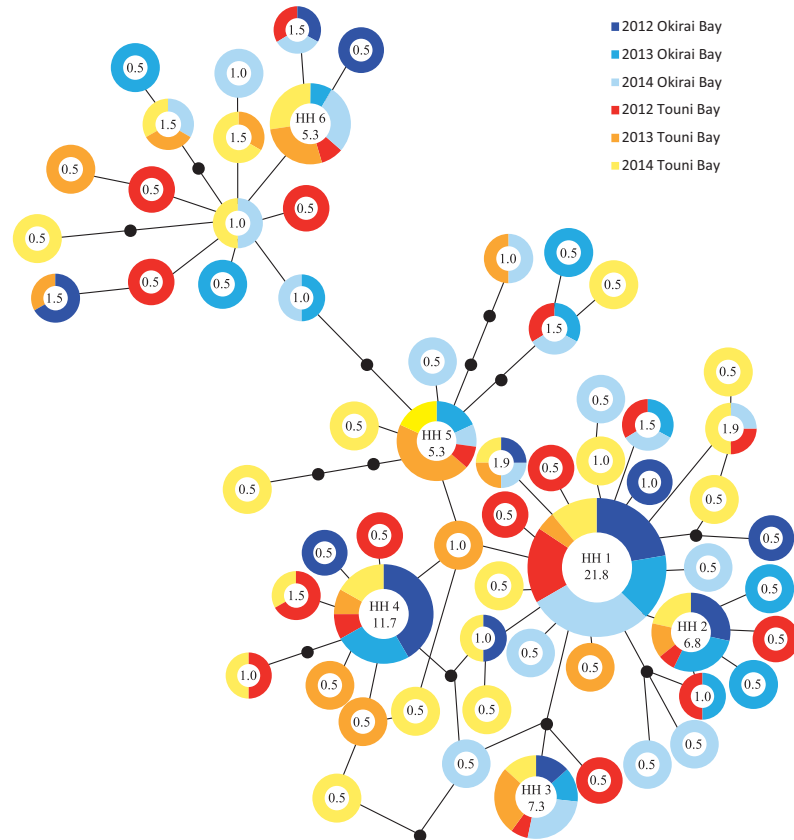


Fig. 2. The haplotype network of concatenated COI and 16S rDNA mitochondrial DNA regions in *Haliotis discus hannai*. Circles represent haplotypes. Circle size and number in each circle indicate the haplotype frequency. Black dots are hypothetical haplotypes, and each line represents one nucleotide substitution. Different shades of gray in each circle represent different populations. HH, haplotype at a frequency of more than 5% in all populations.

and Touni (2012, 2013, and 2014) groups showed no significant differences in F_{ST} values based on nine msDNA loci ($F_{ST} = 0.001$; $p = 0.295$) and concatenated mtDNA ($F_{ST} = 0.004$; $p = 0.277$). Additionally, the genetic differentiation between populations was calculated based on the pairwise F_{ST} values from msDNA loci and concatenated mtDNA sequences and showed no significant differences (Table 4).

Discussion

In this study, we investigated the genetic structure of *H. discus hannai* in two different bays of Sanriku (Okirai and Touni) for three consecutive years (2012–2014) after the 2011 off the Pacific coast of Tohoku Earthquake. All results indicated little influence of tsunami on population structure and genetic diversity of this species, and it might be due to gene flow between populations.

Our results discovered the high level of gene flow between populations from no significant genetic

differentiation among localities and genetic diversity in each population. The results of AMOVA and the pairwise F_{ST} values using msDNA and mtDNA markers revealed no significant genetic differences between populations (Table 4) similar to the results of the previous reports of absence of significant differences in pairwise F_{ST} values between populations in Taro, Kamaishi, and Hirota Bays⁹⁾, close to the area that Okirai and Touni Bays are located (Fig. 1). All of major six haplotypes in mtDNA appeared in both of Okirai and Touni, leading genetic similarity of these populations. Level of genetic diversity was similar between localities. Based on msDNA analysis, no significant differences in A_R and H_E were identified between Okirai and Touni Bays. These similarity of genetic structure and diversity of *H. discus hannai* populations in Okirai and Touni Bays might be due to high level of gene flow, though significant difference of haplotype diversity in mtDNA data between Okirai and Touni suggested that gene flow between localities was not completely unrestricted.

Level of genetic diversity in each population likely did not changed before and after the tsunami. Using data from six msDNA loci (*Hd* 535, *Hd* 527, *Hd* 715, *Hd* 604, *Hd* 680, and *Ahdh* 1147) that were common between our study and a previous report¹⁰⁾, we compared the A_R and H_E of *H. discus hannai* in Okirai ($A_R = 7.6$, $H_E = 0.630$) and Touni ($A_R = 7.3$, $H_E = 0.628$) with those of the same species in Iwanai (sampled in 2000–2002; $A_R = 8.5$, $H_E = 0.620$)¹⁰⁾, Omoe (sampled in 2004; $A_R = 8.7$, $H_E = 0.640$)¹⁰⁾, Hirota (sampled in 2000; $A_R = 9.2$, $H_E = 0.649$)¹⁰⁾, and Kinkasan Island (sampled in 2001; $A_R = 8.8$, $H_E = 0.637$)¹⁰⁾, but no differences were identified among these locations and no changes in genetic diversity before and after the tsunami.

Historical population demography inferred from

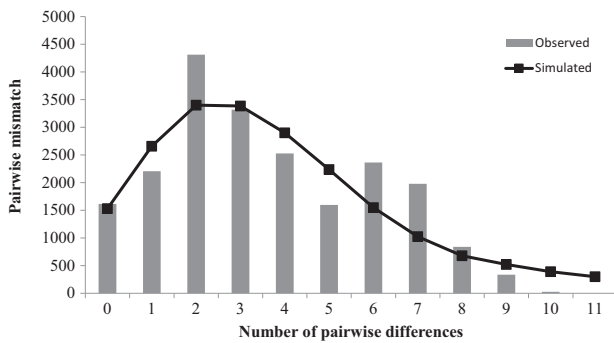


Fig. 3. Pairwise mismatch distribution diagram for concatenated mitochondrial DNA sequence for *Haliotis discus hannai* population examined in the present study. The line and bar in diagram represent the simulated distribution based on sudden expanding model and observed distribution in this study, respectively

Table 4. Pairwise F_{ST} values of six *Haliotis discus hannai* populations for microsatellite DNA loci (above diagonal) and mitochondrial DNA regions (below diagonal). No value showed significant deviation from 0 at $p < 0.05$ level.

		Okirai Bay			Touni Bay		
		2012	2013	2014	2012	2013	2014
Okirai Bay	2012	–	–0.0037	0.0294	–0.0071	0.0551	0.0092
	2013	0.0019	–	0.0000	–0.0211	0.0181	–0.0115
	2014	0.0004	0.0033	–	–0.0042	0.0093	–0.0040
Touni Bay	2012	0.0034	–0.0025	0.0008	–	0.0133	–0.0133
	2013	0.0064	0.0036	0.0005	0.0042	–	–0.0051
	2014	0.0002	0.0030	–0.0035	–0.0006	–0.0005	–

mismatch distribution analysis and haplotype genealogy shown in haplotype network did not suggest any bottleneck effect in recent. Though results of mismatch distribution analysis by ARLEQUIN indicated no significant deviation from a single population expansion in $\tau = 1.785$, the mismatch diagram apparently showed the pairwise differences was bimodal in 2 and 6 (Fig. 3), reflecting the presence of two clusters (HH1–5 haplotypes and HH6 haplotype) in the haplotype network (Fig. 2). A population expansion probably occurred twice in the past as suggested by the negative and significant Tajima's D and τ values (1.785) and the bimodality of the mismatch distribution diagram (Fig. 3). The calibration of molecular clock in marine invertebrates has been reported to be 1% per My²³, and it will be about 4% even if faster than it; therefore, the divergence of HH2 haplotype differed by one nucleotide substitution from HH1 haplotype probably occurred 0.03–0.12 My ago; the divergence of HH6 from HH1 haplotype 0.18–0.72 My ago; and the population expansion 0.09–0.36 My and 0.03–0.12 My ago was calculated according to $\tau = 2\mu t$ (τ : τ value and pairwise differences of mismatch distribution, μ : mutation rate, t : time

after divergence). These results might suggest lack of very recent population catastrophe, because we could find such demographic foot print from diversity of lineages at present. The relatively high number of eggs¹⁾ and high dispersal ability at the planktonic stage^{3,4)} might reduce the risk of changes in the genetic structure and diversity due to mass die-offs in each bay.

It suggested that population of *H. discus hannai* in Sanriku maintained natural genetic structure and diversity after the tsunami. However, considering that maturation of this species needs several years, the decrease number of juvenile individuals after the tsunami might lead to changes in the genetic diversity of the following generations, and thus annual survey should be continued.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Ken-ichi Hayashizaki for his advice on statistical analysis and Mr. Koji Ikawa for his technical assistance. This study was supported by the Tohoku Ecosystem Associated Marine Science of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology.

References

- 1) Kobayashi, T., T. Musashi, T. Endo and M. Hara (2007) Estimation of number of spawned eggs in field condition of Pacific abalone *Haliotis discus hannai*, Aquaculture Sci., 55:285–286.
- 2) Wilson, N. H. F and D. R. Schiel (1995) Reproduction in two species of abalone (*Haliotis iris* and *Haliotis rufescens*) in south New Zealand. Mar. Freshwater. Res., 46:629–637.
- 3) Takami, H., T. Kawamura and Y. Yamashita (1997) Survival and growth of postlarval abalone *Haliotis discus hannai* fed on conspecific trail mucous and/or benthic diatoms *Cocconeis scutellum* var. *parva*. Aquaculture, 152:129–138.
- 4) Miyake, Y., S. Kimura, T. Kawamura, T. Kitagawa, T. Takahashi and H. Takami (2011) Population connectivity of Ezo abalone on the northern Pacific coast of Japan in relation to the establishment of harvest refugia. Mar. Ecol. Prog. Ser., 440:137–150.
- 5) Kijima, A. (2005) Current studies on genetics and breeding science in abalone. J. Anim. Gene., 32:101–112.
- 6) Naiki, K., M. Yamada, S. Kaga, S. Watanabe, T. Kamiyama, R. Kado, T. Ogata, N. Nanba, K. Hayashizaki, Y. Yamada and T. Yamashita (2015) Spatial and temporal variation of sediment properties along the coast of the Sanriku District, Iwate Prefecture, due to the tsunami generated by the Great East Japan Earthquake in 2011. Nippon Suisan Gakkaishi, 81:447–455.
- 7) Takami, H., N.-I. Won and T. Kawamura (2013) Impacts of the 2011 mega-earthquake and tsunami on abalone *Haliotis discus hannai* and sea urchin *Strongylocentrotus nudus* populations at Oshika Peninsula, Miyagi, Japan. Fish. Oceanogr., 22:113–120.
- 8) Allendorf, F. W. (1986) Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. Zoo. Biol., 5:181–190.
- 9) Hara, M. and M. Sekino (2005) Genetic difference between Ezo-awabi *Haliotis discus hannai* and Kuro-awabi *H.*

- discus discus* populations: Microsatellite-based population analysis in Japanese abalone. Fish. Sci., 71:754-766.
- 10) Hara, M. and M. Sekino (2007) Genetic differences between hatchery stocks and natural populations in pacific abalone (*Haliotis discus*) estimated using microsatellite DNA markers. Mar. Biotech. 9:74-81.
 - 11) Sekino, M., T. Saido, T. Fujita, T. Kobayashi and H. Takami (2005) Microsatellite DNA markers of Ezo abalone (*Haliotis discus hannai*): a preliminary assessment of natural populations sampled from heavily stocked areas. Aquaculture, 243:33-47.
 - 12) Sekino, M. and M. Hara (2007) Individual assignment tests proved genetic boundaries in a species complex of Pacific abalone (genus *Haliotis*). Conserv. Genet., 8:823-841.
 - 13) Raymond, M. and F. Rousset (1995) GENEPOP: population genetics software for exact tests and ecumenicism. J. Hered., 86:248-249.
 - 14) Goudet, J. (2002) FSTAT (version 2.9.3.2): A Program to Estimate and Test gene Diversities and Fixation Indices. (<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>).
 - 15) Excoffier, L. and H. E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol. Ecol. Res., 10:564-567.
 - 16) Metz, E. C., R. Robles-Sikisaka and V. D. Vacquier (1998) Nonsynonymous substitution in abalone sperm fertilization genes exceeds substitution in introns and mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95:10676-10681.
 - 17) Kessing, B., H. Croom, A. Martin, C. McIntosh, W. O. McMillan and S. P. Palumbi. (1989) The simple fool's guide to PCR. Version 1.0. Special publication. Honolulu, Department of Zoology, University of Hawaii.
 - 18) An, H. S., Y. J. Jee, K. S. Min, B. L. Kim and S. J. Han (2005) Phylogenetic analysis of six species of pacific abalone (Haliotidae) based on DNA sequences of 16S rRNA and cytochrome *c* oxidase subunit I mitochondrial genes. Mar. Biotech., 7:373-380.
 - 19) Librado, P. and J. Rozas. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25:1451-1452.
 - 20) Clement, M., D. Posada and K. A. Crandall (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Mol. Ecol., 9:1657-1659.
 - 21) Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics., 123:585-595.
 - 22) Excoffier, L., P. E. Smouse and J. M. Quattro (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 131:479-491.
 - 23) Marko, P. B. (2002) Fossil calibration of molecular clocks and the divergence times of geminate species pairs separated by the Isthmus of Panama. Mol. Biol. Evol., 19:2005-2021.

東北地方太平洋沖地震直後の岩手県三陸域におけるエゾアワビ *Haliotis discus hannai* 野生集団の遺伝的集団構造

足立賢太・奥村大志・奥村誠一・森山俊介（北里大海洋）

東北地方太平洋沖地震による大規模津波とその後の環境変化が、エゾアワビ野生親集団の遺伝的集団構造に及ぼした影響を検討した。2012-2014年に岩手県越喜来および唐丹湾から親個体を採集した。定法により9 msDNA座および2 mtDNA領域を分析した結果、これらの海域において遺伝子流動が存在することが示唆された。また、震災後のエゾアワビの遺伝的多様性は十分保たれており、本種の幼生期における高い拡散能力と多産性は津波による遺伝的多様性低下のリスクをある程度軽減させていると考えられた。

Identification of Hatchery-cultured S-type Rotifer Escapees, *Brachionus koreanus*, in a Wild Environment: A Preliminary Study

Wilma MOKA^{1, †}, Eitaro SAWAYAMA^{2, †}, Daiki NOGUCHI³ and Motohiro TAKAGI^{4, *}

¹The United Graduate School of Agricultural Sciences, Ehime University, Ehime 790-5866, Japan.

²R&D Division, Marua Suisan Co., Ltd., Ehime 794-2410, Japan.

[†]These authors contributed equally to this work.

³Nippon Total Science, Inc., Hiroshima 720-0832, Japan.

⁴South Ehime Fisheries Research Center, Tarumi Branch, Ehime University, Ehime, 790-8566, Japan.

Abstract

Large numbers of *Brachionus* rotifers (*Brachionus plicatilis* sp. complex) have escaped from finfish hatcheries worldwide since seed production started, but little concern has been paid to the effect of these rotifer escapees in the wild and any potential genetic effect on wild rotifer stocks. In this study, we collected *Brachionus* rotifer samples from a wild environment around a finfish hatchery for one year, identified rotifer strains based on the partial sequences of mitochondrial COI, and analyzed whether these rotifers escaped from the hatchery. Large numbers of rotifers were found at a sampling site located close to the hatchery and we determined that all the rotifers belonged to *B. koreanus*. A few rotifer individuals were found at other sampling sites during four sampling periods, and all of them belonged to *B. koreanus*. Based on measurements of water temperature and salinity, one of the sampling sites may be suitable for the growth and reproduction of hatchery-cultured rotifers. These results suggest that hatchery-cultured rotifer escapees could live in a wild environment if both the environment and season are suitable.

(accepted June 29, 2016)

Introduction

Recently, large-scale releases in stock enhancement programs and escapes from aquaculture farms pose genetic risks in wild environments. Escapes of fish artificially selected for economic traits are threats to preserving the identity of wild stocks¹⁻³. *Artemia franciscana*, also known as “brine shrimp” (used as live food in finfish aquaculture), has recently been introduced to the Mediterranean region and has quickly replaced native *Artemia* species in many localities^{4, 5}. The expansion of fish farming industries may be one causes of the invasion.

A small morphotype of the *Brachionus* rotifer⁶) is widely used as the first food for aquaculture fish species⁷⁻⁹) because of its ease of use and faster growth in hatchery conditions¹⁰). Three haplotypes (types 1 to 3) of one rotifer species, *B. koreanus* (called *B. sp.* “Cayman”) have been found in hatchery strains and are commonly used in hatchery in Japan⁹). Billions of rotifers are produced and fed to larvae every day during the production seasons at hatcheries. Large numbers of unused and unfed rotifers flow out with rearing water and reach the sea when a hatchery is not equipped water treatment facilities, and possibly

*Corresponding author: Motohiro Takagi, South Ehime Fisheries Research Center, Tarumi Branch, Ehime University, Ehime, 790-8566, Japan.

Tel: (+81) 89-946-9902, E-mail: takagi@agr.ehime-u.ac.jp

very large numbers of hatchery-cultured rotifers have flown out since rotifers have been used as food for seed production of finfish. Hence, if these escapees survive and reproduce in a suitable environment, the number of hatchery strains of rotifers could increase rapidly in the wild and threaten the habitat of wild rotifers. However, there is no data on these rotifers, the most-used live food in finfish seed production, and the potential risk they present.

In this study, we collected rotifers from a wild environment around a hatchery for one year. The strains of the collected rotifers were identified strains based on the partial sequences of mitochondrial gene cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) and we determined whether these rotifers were escaped from the hatchery.

Materials and Methods

Sample Collection

Sampling was done once a month from October 2013 to September 2014. The sampling sites (Fig. 1) were around Iwagi Island, located in the Seto Inland Sea, Ehime Prefecture, Japan. Some private and governmental hatcheries are located in the Seto Inland Sea area, and also one large private company with three hatcheries (producing red sea bream and Japanese flounder around year) are located on Iwagi Island (Fig. 1). Therefore, hatchery-born rotifers could live around the island. We established four sampling sites (St.): 1) drainage outlet from a hatchery that produces and harvests rotifers every day, 2)

a small port, 3) a small pond connected to the sea, and 4) a port close to the hatchery. Water temperature and salinity were measured at each site using Eutech™ Salt 6+ (Eutech Instruments Pte. Ltd., Ayer Rajah Crescent, Singapore). Salinity was not measured for the first three months because of device failures.

Approximately 100 L of seawater was sampled and meshed using a plankton net (40 μ m) and concentrated into 100 mL. Water samples were then taken to the laboratory, and rotifers were counted under a stereomicroscope. When large numbers of rotifers were observed, 10 mL of concentrated sampled seawater was used for counting rotifers and we estimated the total number of rotifers in the 100 mL. After estimating the total number of rotifers in the sampling water, rotifer density (individuals/L) was calculated. Some plankton such as *Artemia franciscana* and Gammaridea were sampled, but species identification and density of these were not done.

Genetic Identification

DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) of COI were performed according to methods previously reported¹¹⁾. In brief, the rotifer samples were washed using sterilized seawater before DNA extraction to prevent contamination. A single rotifer was then placed into a PCR tube under a stereomicroscope with approximately 3 μ L of water and stored at -20°C for several hours until the rotifers were frozen, and then 50 μ L of chelating resin (InstaGene Matrix;

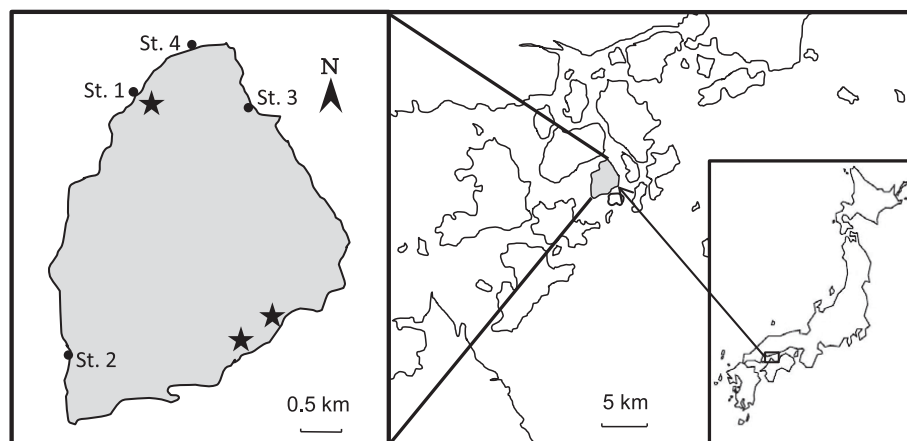


Fig. 1. Sampling locations of *Brachionus* rotifers examined. Black circles indicate each sampling site: St. 1, drainage outlet from a hatchery that produces and harvests rotifers everyday; St. 2, a small port; St. 3, a small pond connected to the sea; and St. 4, a port close to the hatchery. Black stars indicate the location of seed production facilities.

BioRad, Hercules, CA, USA) was added. Next, the tubes were placed in a thermal cycler and a program consisting of 20 min at 55°C and 8 min at 100°C was carried out according to the manufacturer's protocol. In the PCR, a total volume of 10 μ L contained 5 μ L of 2 $\times$ PCR buffer, 2 mM each of the dNTPs, 0.3 μ L each of 10 pmol forward and reverse primers, 0.2 units of KOD FX polymerase (Toyobo, Osaka, Japan), and 1 μ L of the extracted DNA. PCR reaction was done with one initial denaturing step for 2 min at 94°C, followed by 40 cycles of 10 s at 98°C, 30 s at 52°C, and 30 s at 68°C. The PCR products were purified using AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) or ExoSAP-IT® (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Cycle sequencing was performed using a BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Forest City, CA, USA) with the Rotifer COI 1490 primer. The residual fluorescent dyes were removed using a BigDye® XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems). After that, all samples were sequenced on an ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) or 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems). The partial COI sequence (534 bp) was used for the genetic analysis.

Obtained sequences were aligned using ClustalW, and the haplotype of each rotifer individual was compared with haplotypes of *B. koreanus* in GenBank (AF387285, AF387286, AY785207, AY785208, DQ314561–DQ314566, GU987062, LC004288–LC004290) using MEGA 5.1 software. A phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining (NJ) method. The algorithm of the NJ method was incorporated into the MEGA 5.1 package, using distances

corrected from multiple hits that were based on the two-parameter model of Kimura¹²⁾ and evaluated by bootstrapping on 1,000 replications.

Results

Environmental Factors

Water temperature (°C) ranged from 11.5 to 26.6 (average 19.0) at St. 1, 10.2 to 27.4 (average 18.7) at St. 2, 8.5 to 30.8 (average 19.8) at St. 3, and 10.0 to 26.8 (average 18.1) at St. 4, during the sampling period (Fig. 2). The highest water temperature was observed in August at St. 1, 2, and 4, and on July 30 at St. 3. The lowest water temperature was observed in February and March at all sampling sites. The water temperature at St. 3 was lower in fall to winter and higher in spring to summer compared with the other sampling sites. The depth of the water at St. 3 was shallow (around 1 m) and the water temperature at St. 3 was significantly more affected by weather than the other sampling sites.

Salinity (‰) ranged from 33.1 to 35.9 (average 34.4) at St. 1, 31.8 to 35.9 (average 34.3) at St. 2, 5.4 to 27.2 (average 20.5) at St. 3, and 32.0 to 36.0 (average 34.2) at St. 4, during the sampling period (Fig. 3). The salinity at St. 3 was lower during the sampling period compared with the other sampling sites. In particular, the salinity on July 11 and in August was very low because of the heavy rain and typhoon before the sampling day, respectively.

Rotifer Samplings

All rotifers collected at each sampling site are shown in Table 1. Rotifers were constantly collected

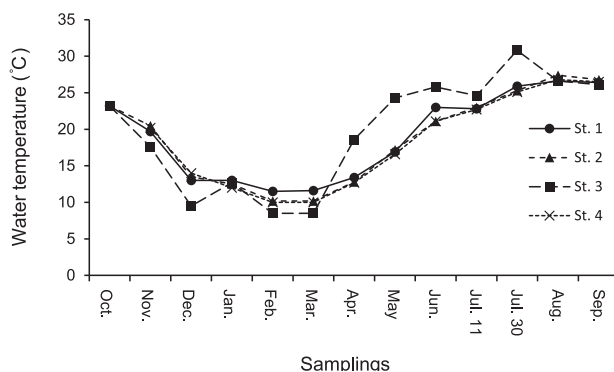


Fig. 2. Water temperature (°C) at the four sampling sites measured over one year of sampling at Iwagi Island, Ehime, Japan.

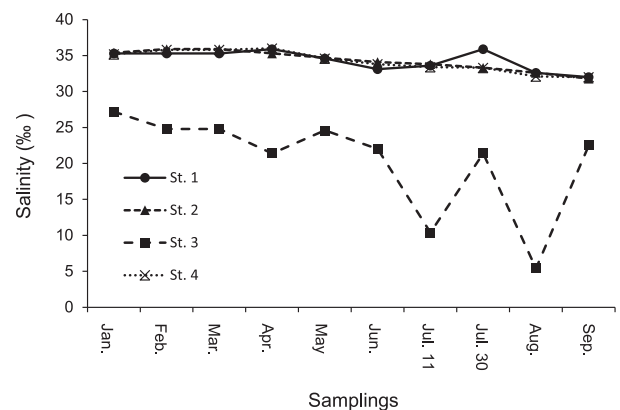


Fig. 3. Salinity (‰) at the four sampling sites measured over one year of sampling at Iwagi Island, Ehime, Japan.

Table 1. Density of rotifers (individual/L) at each sampling station by month and individual numbers used for genotyping.

	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul. 11	Jul. 30	Aug.	Sep.
St. 1	0.19 (19)	-	8.80 (31)	4.00 (20)	0.06 (6)	9.60 (22)	-	0.24 (22)	0.72 (39)	0.44 (38)	2.80 (51)	24.0 (22)	45.0 (30)
St. 2	-	-	0.03 (1)	-	-	-	-	-	-	0.03 (2)	-	0.01 (0)	-
St. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.04 (4)	-	-	-
St. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.04 (3)	0.02 (2)	-	-

Rotifer density is shown as individual/L. Number in blankets indicates number of rotifer individuals successfully genotyped using mtDNACOI. Dash indicates no rotifer found.

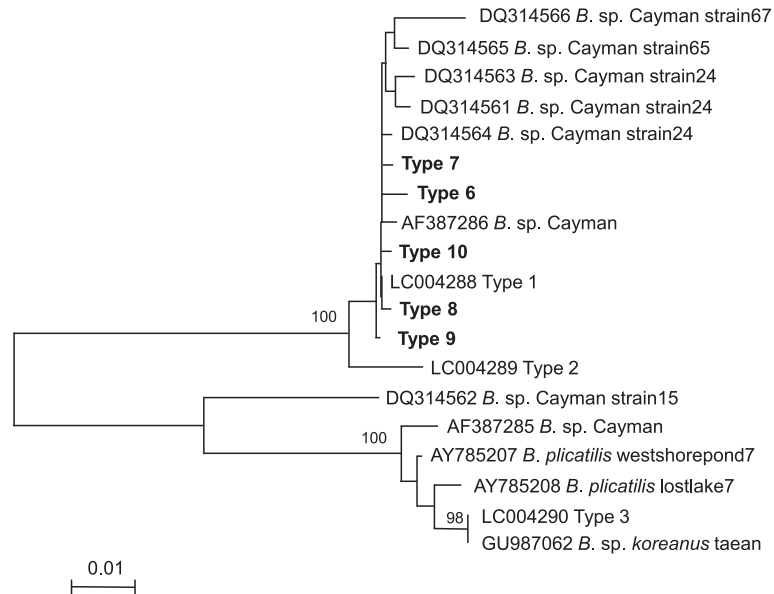


Fig. 4. Neighbor-joining dendrogram of genetic relationship among newly isolated haplotypes (types 6, 7, 8, 9, and 10) with *Brachionus koreanus* haplotypes (Cayman). Bootstrap values were calculated with 1,000 replicates and shown as a percent. Values less than 80% are not shown.

at St. 1 (drainage outlet from the hatchery). Rotifer numbers collected related to the season of seed production: no rotifer or a few rotifers were sampled in the off-seasons of seed production and large numbers of rotifers were sampled when the hatchery produced seedlings and used rotifers as food. Rotifer density of rotifer (individuals/L) ranged from 0 to 45.0 at St. 1. A few rotifer individuals were found at St. 2 in December (0.03 ind./L), on July 10 (0.03 ind./L), and in August (0.01 ind./L). Some rotifer individuals were found on July 11 at St. 3 (0.04 ind./L), and some were also found on July 11 (0.04 ind./L) and on July 30 (0.02 ind./L) at St. 4.

Genetic Identification

All rotifers collected in this study were identified as eight haplotypes belonging to *B. sp.* "Cayman" based on phylogenetic analysis using COI (Fig. 4). Newly identified haplotypes (types 6 to 10) were

closely related to type 1 (LC004288). One nucleotide substitution was observed at 506 bp (as T to C) in type 7, at 60 bp (as T to C) in type 8, at 472 bp (as T to C) in type 9, and at 247 bp (as G to T) in type 10, compared with the type 1 haplotype (LC004288). Two nucleotide substitutions were observed in type 6 at the 198 bp and 296 bp nucleotide positions as T to C compared with the type 1 haplotype (LC004288).

All rotifers collected at St. 1 were identified as seven haplotypes belonging to *B. koreanus* (Table 2). The frequency of each haplotype differed monthly. Type 1 was dominantly observed at the samplings conducted in January, February, May, and June, and on July 11, and July 30 in 2014. Type 2 was dominantly observed in the samplings conducted in October and December in 2013, and March, August, and September in 2014. Type 3 was not dominantly observed during the whole sampling period of October and December in 2013, and March, June, July 11,

July 30, and August in 2014. Haplotypes 6, 7, 8 and 9 were observed on July 11, July 11, in June, and in October 2013, respectively.

Rotifer individuals collected at St. 2 belonged to the type 3 (December 2013) and type 1 (July 11) haplotypes of *B. koreanus* (Table 2): those collected at St. 3 on July 11 belonged to the type 1 and type 10 haplotypes of *B. koreanus* (Table 2); and those collected at St. 4 on July 11 and July 30 belonged to the type 1 haplotype of *B. koreanus* (Table 2). Newly found haplotypes were deposited in GenBank (Acc. Nos. LC155443 to LC155447).

Discussion

Hatchery rotifers are normally cultured at around 25°C with 70 to 80% of diluted seawater¹³⁾. The water temperature observed in June to October at each sampling site was suitable for hatchery-cultured rotifers. Also, the salinity at St. 3 (average 20.5‰) was acceptable for hatchery-cultured rotifers. The pond at St. 3 is connected to the sea, and water in the pond is subject to tidal exchange. Therefore, hatchery-cultured rotifer escapees may land in the pond because of that tidal exchange. St. 3 is significantly affected by weather such as heavy rain and typhoon, and environmental factors such as water temperature and salinity change drastically. Fielder *et al.*¹³⁾ showed that *Brachionus* rotifers have large salinity tolerance and can survive at least 10‰ seawater after transfer to 35‰ seawater. We also observed blooms of unknown phytoplankton at St. 3 in summer (data not shown) and may serve as sufficient food for rotifer growth. Hence, the environment at St. 3 may be suitable for hatchery-cultured rotifers.

We collected approximately 100 L of seawater and

only a few individuals of *B. koreanus* were found at St. 3, possibly the most suitable environment for *Brachionus* rotifers in this study. High rotifer density (hundreds to thousands of *B. plicatilis* per liter) was observed in the river estuary during spring to summer¹⁴⁾. Gómez and Carvalho¹⁵⁾ reported that enough rotifer individuals for population genetic analysis (>40 individuals) were sampled in only 5 L of water from a small pond. Dolan and Gallegos¹⁴⁾ also showed *B. plicatilis* was constantly observed, but *B. sp.* was observed in a very short period in spring. A more effective method and determine the best sampling seasons for collecting *Brachionus koreanus* is needed.

Eight haplotypes belonging to *B. koreanus* were identified in this study. Previously, we reported that three haplotypes of rotifers (types 1, 2, and 3) are cultured at the hatchery beside St. 1⁹⁾ and also other hatcheries in Japan. Newly found haplotypes (types 6, 7, 8, and 9) were also found at St. 1, and this result suggests more than three rotifer haplotypes may be cultured at the hatchery. We sequenced over 300 rotifer individuals cultured at the hatchery and all them belonged to three haplotypes (types 1, 2 and 3) (Sawayama *et al.*, unpublished). However, the hatchery maintains large numbers of rotifers in several tanks, and unknown haplotypes of *B. koreanus* may exist. In addition, there are several hatcheries around Iwagi Island (e.g., Hakata Island, Ehime), so these newly found rotifer haplotypes may be escapees from one or more of the other hatcheries. Hwang *et al.*¹⁶⁾ reported that *B. koreanus* is distributed around the Korean peninsula. The distribution of *B. koreanus* in Japan is unclear, and further study will be needed to reveal the species identification of *Brachionus* rotifers distributed around Japan.

Table 2. Number of *Brachionus koreanus* haplotypes collected by month

	Oct.		Dec.		Jan.	Feb.	Mar.	May	Jun.	Jul. 11				Jul. 30		Aug.	Sep.
	St.1	St.1	St.2	St.1	St.1	St.1	St.1	St.1	St.1	St.1	St.2	St.3	St.4	St.1	St.4	St.1	St.1
Type 1	1	6	-	14	3	1	22	31	27	2	3	3	33	2	-	-	-
Type 2	16	24	-	6	3	18	-	5	8	-	-	-	13	-	17	30	-
Type 3	1	1	1	-	-	3	-	2	1	-	-	-	5	-	5	-	-
Type 6	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Type 7	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Type 8	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Type 9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Type 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-

Months and sampling stations where rotifer individuals were not observed are not shown (see Table 1).

Large numbers of *B. koreanus* belonging to haplotypes 1, 2, and 3 were found at St. 1. Previously, we reported⁹⁾ the hatchery-cultured *B. koreanus* belonged to haplotypes 1, 2, and 3, and this result shows that hatchery-cultured rotifers flow out to the sea. We also identified *B. koreanus* belonged to these three haplotypes in the other sampling sites, and suggested these rotifers flowed out from the hatchery and may have landed at these sampling sites because of tidal currents¹⁷⁾. If some of these escapees landed in a suitable environment for growth and reproduction, they could proliferate.

One of the new haplotypes belonging to *B. koreanus* (type 10) was found at St. 3 in the sampling on July 11. The St. 3 sampling site was the most suitable place for *Brachionus* rotifers in this study, and wild *Brachionus* rotifers may inhabit that environment. Therefore, the newly found haplotype of *B. koreanus* might be a wild rotifer. There is no population genetic study of *B. koreanus* in the wild environment of Japan, and we could not determine whether the newly found haplotype was a wild or hatchery rotifer. To confirm this distinction, large numbers of rotifers need to be sampled at the sampling site, and

a population genetic study of *B. koreanus* in Japan is required. To identify the origin of these rotifers, clonal analysis will be needed using newly developed microsatellite DNA markers (Sawayama *et al.*, unpublished).

In conclusion, large numbers of hatchery-cultured rotifers flow out every day during the seed production seasons, and some rotifer individuals possibly land in an environment suitable for their growth and reproduction. Therefore, hatchery-cultured rotifer escapees could reside in a suitable environment around the hatchery. The escapees may also be carried long distances by tidal current and land in the most suitable environment for them. Further clonal analysis using microsatellite DNA of wild *Brachionus* rotifers in the coastal areas of Japan will be important in clarifying the effect of hatchery-cultured rotifer escapees on wild rotifer stocks.

Acknowledgment

This work was financially supported by a grant from Kurita Water and Environment Foundation (13B022). We also thank Dennis Murphy for editing this manuscript.

References

- 1) Hansen, M. M., K. Møller and K. L. Møller (2010) Identifying footprints of selection in stocked brown trout populations: a spatio-temporal approach. *Molecular Ecology*, 19: 1787-1800.
- 2) Glover, K. A., G. Dahle and K. Jørstad (2011) Genetic identification of farmed and wild Atlantic cod, *Gadus morhua*, in coastal Norway. *ICES Journal of Marine Science*, 68: 901-910.
- 3) Blanco Gonzalez, E., M. Aritaki, S. Sakurai and N. Taniguchi (2013) Inference of potential genetic risks associated with large-scale releases of red sea bream in Kanagawa prefecture, Japan based on nuclear and mitochondrial DNA analysis. *Marine Biotechnology*, 15: 206-220.
- 4) Amat, F., C. Hontoria, O. Ruiz *et al.* (7 co-authors) (2005) The American brine shrimp as an exotic invasive species in the western Mediterranean. *Biological Invasions*, 7: 37-47.
- 5) Amat, F., F. Hontoria, J. C. Navarro *et al.* (5 co-authors) (2007) Biodiversity loss in the genus *Artemia* in the Western Mediterranean Region. *Limnetica*, 26: 177-194.
- 6) Mills, S., J. A. Alcántara-Rodríguez, J., Ciro-Pérez *et al.* (24 co-authors) (2016) Fifteen species in one: deciphering the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera, Monogononta) through DNA taxonomy. *Hydrobiologia*, ROTIFERA XIV: 1-20.
- 7) Hagiwara, A., W. G. Gallardo, M. Assavaaree *et al.* (5 co-authors) (2001) Live food production in Japan: recent progress and future aspects. *Aquaculture*, 200: 111-127.
- 8) Papakostas, S., S. Dooms, A. Triantafyllidis *et al.* (12 co-authors) (2005) Evaluation of DNA methodologies in identifying *Brachionus* species used in European hatcheries. *Aquaculture*, 255: 557-564.
- 9) Moka, W., E. Sawayama, D. Noguchi and M. Takagi (2016) Genetic identification of S-type rotifer *Brachionus plicatilis* sp. complex based on mtDNA COI of hatchery strains used in Japan. *Fish Genetics and Breeding*

- Science, 45: 9-17.
- 10) Koiso, M., T. Tezuka and K. Sakae (2013) Daily population growth rate of six *Brachionus plicatilis* sp. complex strain under different water temperature and salinities. *Aquaculture Science*, 61: 1-7. (in Japanese with English abstract)
 - 11) Moka, W., E. Sawayama and M. Takagi (2015) Optimization of molecular identification method by using COI region of mtDNA for small-type rotifer, *Brachionus plicatilis* sp. *Fish Genetics and Breeding Science*, 43: 69-74.
 - 12) Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 11-120.
 - 13) Fielder, D. S., G. J. Purser and S. C. Battaglene (2000) Effect of rapid changes in temperature and salinity on availability of the rotifers *Brachionus rotundiformis* and *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 189: 85-99.
 - 14) Dolan, J. R. and C. C. Gallegos (1992) Trophic role of planktonic rotifers in Rhode river estuary, spring-summer 1991. *Marine Ecology Progress Series*, 85: 187-199.
 - 15) Gómez, D. and G. R. Carvalho (2000) Sex, parthenogenesis and genetic structure of rotifers: microsatellite analysis of contemporary and resting egg bank populations. *Molecular Ecology*, 9: 203-214.
 - 16) Hwang, D. S., H. U. Dahms, H. G., Park and J. S., Lee (2013) A new intertidal *Brachionus* and intrageneric phylogenetic relationships among *Brachionus* as revealed by allometry and COI-ITS1 gene analysis. *Zoological Studies*, 52: 13.
 - 17) Japan Coast Guard (2004) Tidal current charts in Bingo Nada and Bisan Seto. No. 6232.

天然海域における種苗生産場から流出した S 型シオミズツボワムシの探索

ウィルマモカ（愛媛大院連合農）・澤山英太郎（まる阿水産）
野口大毅（日本総合科学）・高木基裕（愛媛大南水研セ）

海産魚の種苗生産が始まって以来、初期餌料として種苗生産場で培養されてきたシオミズツボワムシ (*Brachionus plicatilis* sp. complex) は飼育水と共に大量に海へ流出していると考えられるが、流出したワムシが天然海域のワムシに与える遺伝的影響については考慮されてこなかった。本研究では、種苗生産場の周辺海域で 1 年間にわたりシオミズツボワムシを採集し、ミトコンドリア DNA COI 領域の部分配列を解析することで種苗生産場に由来するものかを調べた。種苗生産場の排水溝周辺では多数の *B. koreanus* が見られ、種苗生産場から流出したものだと考えられた。また、他の採集地点では 4 回のサンプリングで数個体の *B. koreanus* が採集された。水温と塩分濃度を測定したところ、採集地点の 1 つは種苗生産場の環境に類似しており、*B. koreanus* の増殖並びに再生産が可能であることが示唆された。以上の結果から、種苗生産場から流出したワムシが生育に適した時期に、適した環境へと漂着した場合、当該環境へ定着する可能性があると考えられる。

— 会員通信 —

第1回ブリ類ゲノムワークショップ参加報告

尾崎照遵・野村和晴（増養殖研）

1st *Seriola* Genomics Workshop 07-08 January 2016,
Southwest Fisheries Science Center, La Jolla, CA

Akiyuki OZAKI and Kazuharu NOMURA

Fisheries Research and Education Agency, National Research Institute of Aquaculture

米国カリフォルニア州サンディエゴ・ラホーヤにある南西水産研究センターにて開催された第1回ブリ類ゲノムワークショップに参加したので、その概要について報告する。本会議では、近年急速に発展しつつあるブリ類のゲノム研究に関する現状について、各国あるいは各対象種における最新の情勢や今後の展望等に関する情報を共有するとともに、得られたデータのシェアや国際的な共同研究による研究推進の可能性について議論することが趣旨であった。2日間の会議中、ブリ類に関するゲノム情報の一元化に向けた検討や、育種研究及び養殖産業との関わり方について、活発な議論がなされた。参加者は、ブリ類ゲノム研究及び養殖に携わっている主要な5カ国であるア



写真1 ブリ類ゲノムワークショップ参加者の集合写真

連絡先：〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1 国立研究開発法人 水産研究・教育機構

Tel: +81-599-66-1830 (代表) Fax: +81-599-66-1962

尾崎照遵 増養殖研究所 育種研究センター ゲノム育種グループ

Tel: 0599-66-1851 (ダイヤルイン) E-mail: aozaki@affrc.go.jp

野村和晴 増養殖研究所 ウナギ種苗量産研究センター 量産基盤グループ

Tel: 0599-66-1854 (ダイヤルイン) E-mail: nomurak@fra.affrc.go.jp

アメリカ合衆国、日本、チリ、メキシコ、オーストラリアから国の機関あるいは大学に所属する研究者や養殖業者を含めた合計33名となり、私たちの予想を上回る規模のワークショップになった。(写真1・2)

発表演題は合計14題にのぼり、それぞれの国における研究の進展状況と、今後の方向性、研究を進めるうえでボトルネックとなる事項、及び必要となる機会等が示された。また一口にブリ類といっても研究対象種は国により様々で、日本はブリ (*Seriola quinqueradiata*: Q)、カンパチ (*Seriola dumerili*: D1)、アジアンヒラマサ (*Seriola aureovittata*: A) の三種、アメリカ合衆国とメキシコはカルフォルニアヒラマサ (*Seriola dorsalis*: D2) とヒレナガカンパチ (*Seriola rivoliana*: R) の二種、チリとオーストラリアは南半球ヒラマサ (*Seriola lalandi*: L) の一種を研究対象としており、個々に対象種が異なるという点で、少なくとも研究面では魚種による棲み分けが可能であり、当面の競合はなさそうな印象を受けた。この会議の中での日本の存在感は非常に大きく、ゲノム研究の進捗やハダシ抵抗性等に関する育種研究の進展度は他国を大きくリードしており、現状では他国の指針になりうるデータと経験値を有していることが、改めて各国の参加者に広く認識される機会となった(写真3)。従って、本会議では、他の参加国から日本の積極的な協力に対し、特別な期待が寄せられていることがひしひしと伝わってきた。

ゲノム情報の一元化に関しては、アイオワ州立大学のバイオインフォマティクスを専門とする Andrew Severin 氏から具体的なアイデアの提案があった。すなわち、すでに開発実績のあるトウモロコシのゲノムブラウザのプラットフォームを転用し、ブリ類のゲノムブラウザ(Jブラウザ)を構築して、ゲノム情報の一元化とオープンソース化を図るというもので、そのことにより研究対象となるブリ類のシーケンス情報の信頼性を高め、魚種毎に SNP 情報を分かり易く示したり、自分たちの研究に必要な情報を簡単に抽出したり、または新たに得られたデータを提供したりできるようなデータベース環境が実現できるということだった(写真4)。また、ゲノムブラウザの構築に当たっては、ユーザーインターフェイス(使い勝手)が非常に重要であり、この点で実績のあるプラット



写真2 発表の様子を聞くワークショップ参加者

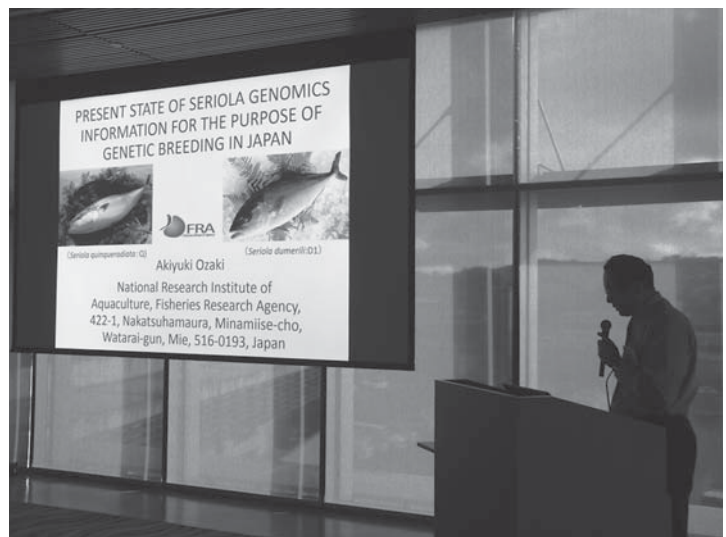


写真3 水産研究・教育機構 増養殖研究所
主任研究員 尾崎照遵による発表



写真4 ブリ類研究に必要な情報を抽出、提供できる
ブラウザ環境の提案をするアンドリュー氏

フォームに自信を持っているということだった。他の研究者もこのアイデアに対してはおおむね好意的な反応だった。この点において日本はブリ類で唯一の高密度遺伝地図や RH マップを作製していることもあり、これらはブリ類の標準的な遺伝地図になりうるため、ゲノム情報の一元化に関しては、シーケンス情報のみでなく上記の遺伝地図との統合も含めた積極的な協力が求められた。ちなみに、サケマス類における遺伝地図やゲノムプロジェクトでは、魚種毎に遺伝地図の連鎖群や分子マーカーの名称がきちんと統一されておらず、対応関係の把握に混乱をきたしている。ブリ類に関してはその教訓を活かし、先行している日本側が主導的役割を發揮して、現存のブリ及びカンパチの遺伝地図に用いている名称を標準と定めて他のブリ類との統一を図り、スムーズな情報管理が可能な基盤を整備するとともに、先行者利益を確保する必要があると考えられた。そこで、今後、もしゲノム情報の一元化に向けて協調することになった場合は、既存のブリ及びカンパチの情報を基準としたうえで連鎖群の名称等を整理することを提案し、その場で各国の同意が得られた。また日本側の情報提供の条件として、第一に水産研究・教育機構としての承認が必要であること、第二に承認を得るためのプロセスとして UJNR 増養殖会議の窓口を有効に活用すること、の2点を提案し、同意が得られた。

各国の研究進行状況としては、日本のゲノム解析や育種研究が現在のところ最も進捗しており、多くのデータや実例を積み重ねている一方で、ゲノム情報の一元的管理やオープンソース化については、バイオインフォマティクスの専門家を有し、すでにゲノムブラウザ等のプラットフォームを有している米国に有利な状況がある。SNP 情報の取得という点では、チリも多くの南半球ヒラマサの情報をすでに取得している。オーストラリアはゲノム情報の取得というよりもむしろ遺伝統計学に基づいた育種研究を展開しており、養殖対象の集団を用いた成長や肉質（脂質含量）等の経済形質に関する遺伝的パラメータの推定や基礎集団の構築（現在は F_3 世代）、等を進めている様子であった。メキシコにおいては、単独ではまだ遅れている状況ではあるが、アメリカ資本の養殖場の多くが、カルフォルニア湾に存在するため、米国と協調して研究が展開される形になることが予想される。各国の研究者もそれぞれの情報の開示と協調については慎重に議論をされる必要があるが、それにも増して、国際的共同研究として発展させ予算獲得のメリットをとる方が重要であると考えており、この協調関係は今後大きく発展することが予想された（写真5）。本会議では参加した国々が協調して共同研究を進める雰囲気が既に十分に醸成されており、仮に日本がこのコミュニティへの参加を拒否したとしても日本以外の国で粛々と進められることになることが予想された。また余談ではあるが、チリの南半球ヒラマサの育種・養殖研究に関しては、ノルウェーとの共同研究を予想していたが（共同研究者としてクレジットされているため）、それらはサケマスだけに限られており、チリ側としては JICA などを通じて、日本との協調関係を充実させていきたいとの要望をチリの研究者 Victor Martínez 氏から話をされたことを申し添えておく。

今回の会議で特徴的な点としては、研究面での要素が強い内容の会議にも関わらず、養殖産業界の参加者が多かったことである。海外での養殖研究の進め方の特徴として、養殖産業のための研究の方向性と価値を、産業界にも広く理解してもらうとともに、産業界からの要望に十分に耳を傾けることを重要視しているようであった。そのため、実際に養殖をしている民間企業からの出席者の発表やディスカッションのパートも設定されていた。米国で実際に産業種として成立しているのはヒレナガカンパチであるが、ハワイ沖の養殖利用海面には制限があり、今後の増産は米国資本でメキシコのカリフォルニア湾内や米国のカリフォルニア沖に拠点を移すことになるようである。既にそのための準備が進められており、米国内カリフォルニア沖での養殖利用海面としての許可申請にあと2、3年を要するとのことだった。またその際には生態系を考慮して、ヒレナガカンパチだけではなくカリフォルニアヒラマサも対象になるとの話である。アメリカ国内では生態系への配慮が必須であり、増産については一定の制



写真5 それぞれの情報の開示と協調について意見する
アビゲイル氏

限もあるため、アメリカ国内での将来的な生産量には上限値が設定されるであろう。養殖産業面からのブリ類研究に期待されることとして、魚病、成長あるいは低(無)魚粉飼料利用性に関する育種を期待する意見が多く述べられた。この点は日本国内のニーズと一致している。またブリのベネデニア症に関する問題は、他の国においても同様の問題となっており、金属網の沈下式生簀を使用して飼育する海外の状況においても完全には克服できない厄介な問題となっている様子である。我々の研究として紹介した、ブリのベネデニア症を育種で解決しようとする戦略には、海外の民間企業からも高い関心を集めていた。日本では、国が主導して進めた技術開発後の移転や支援先を直接民間企業に繋げる状況が作りにくく、都道府県の公的研究機関等を共同研究先に指定して普及を図ることが多いが、資本、効率、スピード感において、海外の養殖産業に遅れをとってしまう状況を自ら作り出している感否めない。研究や技術開発とは別に、これら産業界との連携の問題を解決しない限り、養殖産業面において、いずれは海外にブリ養殖産業市場を明け渡してしまうことになることに警鐘を鳴らしておくべきかもしれない。また育種事業においては、複数の系統を公的機関あるいは民間企業一社で維持することは、海外の国でも難しいと考えられているようであった。従って、日本においてもブリ類養殖に関連する複数の国内企業との協力体制を早い段階で構築し、海外の育種事業戦略に対抗する術を準備しておく必要がある。ただし、複数の企業の参入があった場合には、研究としての情報開示等で難しい側面が出てくるため、そのようなデメリットにも配慮した協力体制を模索する必要がある。

今回のワークショップ終了後、すぐに具体的な共同研究を進めるための動きがはじまった。これは日本側の研究状況の進展と、その提案に大きな影響力があった証拠でもある。共同研究案としては、まずはそれぞれの研究対象種で蓄積されているゲノムや発現遺伝子等の情報をアイオワ州立大学に集約し、ブリ類で共通する SNP 情報と、それぞれの対象種に固有の情報を整理した後、大規模な SNP カスタムチップアレイを作成し、それぞれの対象種サンプルを用いてその評価を行う、というアイデアが共有された。

全体を通じての所感

今後20年の世界の海産養殖魚の研究・養殖産業の中心はブリ類になることは間違いないであろう。ポストサーモンとして各国でブリ類の養殖が盛んになり、大西洋のアトランティックサーモンと太平洋のブリ類が世界を二分する海産養殖対象魚となると見込まれる。ブリ類のどの対象種が、世界の覇権を握ることになるかは、海面利用許可面積やそれぞれの企業の資本による影響に大きく左右されるであろう。ブリ類の国際共同研究においては、まずは手始めとして、ゲノムブラウザなどを使用してブリ類ゲノム情報の統合をして SNP アレイを作成するという具体的な内容が示された。また、その中で日本のこれまでの先行研究により得られた成果に対し、高い評価が得られたと同時に今後の国際コミュニティへの協力を強く期待されていることを感じた次第である。

会 報

平成28年度水産育種研究会総会議事録

水産育種研究会平成28年度総会が平成28年3月29日(火)に平成28年度日本水産学会春季大会開催中の東京海洋大学(第六会場)において開催され、下記について報告と提案がなされ、承認された。

1. 平成27年度事業報告案、研究会、及び会誌(45-1, 2)の発行について報告があった。また、会計報告案および会計監査報告について各担当理事、会計監査より説明があり、承認された。
2. 平成28年度事業計画案(研究会、会誌46号の発行)、予算案について各担当理事より説明がなされ、承認された。
3. 今年度は水産育種研究会主催のシンポジウムとして水産育種シンポジウムと観賞魚育種シンポジウムが開催されることとなった。
4. ホームページ上での水産育種バックナンバーの閲覧について、前年度までの会費納入者に対してパスワードを知らせることとなった。
5. 庶務幹事として栗田喜久(東北大院農)氏に、編集幹事として菊池潔(東大水実)氏に参加いただくことが提案され、承認された。

総会の後、研究会があり、下記の研究発表があった。

「これからの水産育種：ゲノム予測による新たな育種の取り組み」

細谷 将 氏(東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所)

シンポジウム開催案内

水産育種研究会シンポジウムプログラム 「親子判別法を用いた栽培漁業と水産育種への応用」

日時：平成28年11月3日(木/祝日)

場所：東北大学大学院農学研究科第10講義室(雨宮キャンパス)

主催：水産育種研究会

後援：東北大学農学部、東北マリンサイエンス拠点形成事業

開会挨拶

13:00～13:05

講演

13:05～15:05

DNA親子判別における一塩基多型(SNP)の有効性の検証

関野正志・中道礼一郎・藤原篤志・岩崎裕貴・西木一生・松原和純(水産機構中央水研)・
鈴木伸明(水産機構国際水研セ)

大規模データの親子判定の支援ソフトウェアと放流種苗の再生産シミュレーション

菅谷琢磨(水産機構瀬戸水研)

DNAマーカーを用いたガザミの種苗生産及び放流技術開発について

鈴木洋行(長崎総水試)

北海道で行っているマナマコ種苗放流とその効果調査

酒井勇一（道総研函館水試）・菅野愛美（キノックス）

DNA 血縁鑑定によるヒラメ栽培漁業の評価

池田実・安藤大樹（東北大フィールド研セ）

休憩

講演

16：00～17：30

トラフグの親子判別と育種への展望

片町太輔（水産機構瀬戸内水研）

高水温耐性ヒラメ評価法の開発と家系作出

名古屋博之・岡内正典（水産機構増養殖研）・竹内宏行（水研機構日水研）・金澤健（大分水研）・
原素之（東北大院農）

ハダムシ抵抗性を有するブリの家系作出

吉田一範・野田 勉（水産機構西海水研）

閉会

17：30

シンポジウム開催案内

第二回 観賞魚育種シンポジウム

日時：平成28年11月26日（土） 受付開始 9時30分 開会 10時

場所：愛知県弥富市 産業会館（<http://www.city.yatomi.lg.jp/shisetsu/1000906/1000912.html>）

第一部 モデル生物としての観賞魚

日本におけるグッピーのルーツ

佐藤龍星（東北大院農）

優良個体を得る確率を上げる飼育手法

尾崎照遵（水研セ増養殖研）

休 憩

キンギョを用いた突然変異誘導

岡本裕之（水研セ増養殖研）

キンギョ初期胚の発生操作と育種学的展望

山羽悦郎（北大フィールド科セ）

昼 食 休 憩

第二部 観賞魚における品種改良の試み

ニシキゴイ全雌生産技術の開発（普及への道のり）

兵藤則行（新潟内水試）

大阪らんちゅうについて－繁栄～絶滅の背景、そして復元とその課題

板谷広義（大阪らんちゅう愛好会）

愛知水試におけるキンギョの育種研究の取り組み

金田康見（愛知水試）

問い合わせ先：中嶋正道

〒981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町1-1 東北大学大学院農学研究科

Tel：022-717-8741 e-mail：masamichi.nakajima.b6@tohoku.ac.jp

水産育種研究会会則

1. 名 称

本会は、水産育種研究会と称する。

2. 目 的

本会は、水産生物の遺伝と育種に関する学術研究・情報の交流と普及を図り、その実践の促進に資することとする。

3. 事 業

本会は、その目的を達するために次の事業を行う。

- 1) 研究集会、講演会などの開催
- 2) 会誌『水産育種』の刊行
- 3) その他

4. 会 員

本会の趣旨に賛同する次のものを会員とする。

- 1) 普通会员（個人）
- 2) 団体会員（団体、機関）
- 3) 名誉会員

入会を希望する者は、所定の入会申込書の提出・会費の納入等の手続きを行うものとする。名誉会員は本会の発展に特に功績のあった個人会員のうち、会員の推薦を受け、幹事会の承認を得て総会の同意を得た者とする。

5. 会 費

会員は前納とし、年額、普通会员は3,000円、団体会員は10,000円とする。日本国外で会誌等の受領を希望する場合、会費は20%増とする。

6. 役員等

本会に次の役員等を置く。

- 1) 会長：本会は会長1名を置く。会長は本会を代表し、会務を統べる。
会長の選出は総会において行う。任期は2年とし、再任は妨げないが、連続2期までとする
- 2) 幹事：本会は庶務幹事2名、会計幹事1名、編集幹事若干名を置く。
幹事は会長の指名による。
任期は2年とし、再任を妨げない。

水産育種 投稿要領 (平成24年3月改訂)

掲載報文および著者：報文の投稿者は本研究会の会員に限る。会員以外の共著者を含むことは差し支えない。

なお、投稿論文の内容は、ほかの刊行物に発表されていないものに限る。

原稿の送付：投稿論文は Word, Excel, Powerpoint 等のソフトで作成し、E-mail で添付文書として投稿する事が望ましい。図表等容量が大きく (2MB 超) 電子メールで送付する事が困難な場合、あるいは特殊なソフトで作成した図表は、審査用図表として PDF ファイルとして提出する。また従来の郵送による方法でも論文投稿は可能とする。

投稿論文の審査：投稿論文の審査は編集委員が責任を持って担当する。訂正のある場合は、著者に連絡し訂正を求める。著者は必要な修正を行った後に、修正原稿とともに訂正箇所を明示した箇所一覧を別ファイルとして提出する。最終原稿の提出は添付ファイルとして編集事務局に電子メールで送付する。容量の大きい図表は CD、DVD 等のデジタルメディアで、修正論文ファイルとともに編集事務局に郵送する。

原稿：和文原稿は A4 版の400字詰めの横書きの原稿用紙を用いる (鉛筆書きは不可)。ワープロを使用する場合は A4 版に横書きで行間をあげ、1 ページ30行程度とする。

原稿には必ず頁番号をつける。Word であれば、「書式」タブ中の「文書のレイアウトその他」で行番号も入れることが望ましい。

英文原稿は、厚手の A4 版上質紙を用い、1 頁24行程度の 2 段送りとしてワープロで作成する。

表題・著者名：表題、著者名、所属は下記の要領で和文および英文で書く。

和文原稿の場合；

海産 2 枚貝類の種間における遺伝的距離

尾庭きよ子・木島明博 (東北大・農)

Genetic Distance between Species in Marine Bivalves

Kiyoko ONIWA and Akihiro KIJIMA

Faculty of Agriculture, Tohoku University

英文原稿の場合；

Genetic Distance between Species in Marine Bivalves

(海産 2 枚貝類の種間における遺伝的距離)

Kiyoko ONIWA and Akihiro KIJIMA

Faculty of Agriculture, Tohoku University

(尾庭きよ子・木島明博, 東北大・農)*

*可能ならば日本語の氏名・所属を記入

なお、連絡先の住所を和文または英文で代表者 1 名の郵便番号、住所 (番地まで)、所属機関名、氏名の順に本文第 1 頁の欄外に記載する。

Abstract：本文と別葉にし、英文原稿の記載要領に準じて作成する。Abstract には、表題、著者名 (Full name) を記載し、できるだけ簡潔な英文で200語程度 (1 枚以内) にまとめる。図表および文献などの引用はしない。

本文の体裁：

和文原稿の場合；本文の記載は原則として、緒言、材料と方法、結果、考察、(謝辞)、要約、文献の順に従い、見出しは左端にゴシックで記載する。ただし、緒言の見出しはつけない。小見出しをつける場合はゴシックとし、文章は 1 字空けて追い込みにする。なお、要約は和文400字程度で作成し、図表および文献などの引用はしない。

英文原稿の場合；本文の記載は原則として、「Introduction」,「Material(s) and Method(s)」,「Result(s)」,「Discussion」,「Acknowledgment」,「Reference」の順に従うものとする。小見出しをつける場合はイタリックとし、行を変えて文章を始める。英文原稿の場合にも400字程度の和文要旨を作成する。和文要旨にも表題、著者氏名、所属を記載する。

図表：原則として図表はA4版で作成する。

和文原稿の場合、図表タイトルは英文または和文で書く。図のタイトルは別紙にまとめて図の番号を明記して書き、表のタイトルは表の上に書く。

図および表はオフセット印刷をするので鮮明に濃く書き、墨入れをする。また、図には番号と著者名を記入しておく。

表は Word, Excel 等の汎用性の高いソフトで作成する。

図表の挿入位置は本文原稿中の右の欄外に赤字で指定する。

文献：本文中の関連箇所引用順に上つきで“Brown¹⁾”のようにつけ、文章での引用の場合は「・・・とされる²⁻⁵⁾。」のようにつける。

文献の項には下記に示したように作成する。

例；5) TTaniguchi, N., A. Kijima and J. Fukai (1987) High heterozygosity at gynogenetic diploids of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53: 717-720.

6) 藤尾芳久・松岡栄一・小林正裕 (1991) 貝類の成長に及ぼす遺伝的要因. 水産育種, 16: 29-32.

7) Brown, W. M. (1983) Evolution of animal mitochondrial DNA, pp.62-88, in *Evolution of Genes and Proteins*, eds. by M. Nei and R. K. Koehn, Sinauer, Sunderland Mass.

8) 藤尾芳久・木島明博 (1987) 「水産育種の基礎」水産増養殖叢書, 36, 日本水産資源保護協会, 東京, pp. 100.

著者数が多数に上る場合(概ね4名以上)、最初の3名を記載し、カッコ書きで全体の著者数を記載する。

例；6) Malausa, T., A. Gilles, E. Meglécz, *et al.* (20 co-authors) (2011) High throughput microsatellites isolation with 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *Molecular Ecology Resources*, 11: 638-644. (共著者数20名の場合、表記した3名を含めた共著者数を記載する)

各著者の報文における貢献度の記載を希望する場合は別葉とし、その旨を記述する。

印刷の費用：本研究会が負担する別刷の印刷費は50部までとし、それ以上の部数(50部単位)を希望する場合は、これに要する費用を著者負担とする。カラー写真の印刷に要した費用については著者負担とする(1頁→3万円, 2頁→5万円, 3頁→6万円)。また、英文原稿の場合の英文校閲にかかる費用は著者負担とする。PDF ファイルを希望する場合はその旨を編集委員へ申し出る。

原稿の送付先：〒041-8611

函館市港町3-1-1

北海道大学大学院水産科学研究科

荒井 克俊 宛

Email: arai@fish.hokudai.ac.jp

平成 年 月 日

水産育種研究会会長 殿

所 属：

氏 名：

印またはサイン

連絡先住所：

論文複写許諾書

以下の論文の複写許諾を水産育種研究会会長に委任いたします。

記

水産育種 第 卷 号 ページ～ ページ

論文題目：

著者は提出の際この許諾書のコピーをとり保管してください。

水産育種研究会組織

会 長	木島明博
庶務幹事	栗田喜久、中嶋正道、原 素之
会計幹事	池田 実
編集幹事	荒井克俊（主任）、阿部周一、池田 実、奥村誠一、河村功一、 菊池 潔、木島明博、古丸 明、坂本 崇、関 伸吾、高木基裕、 中山一郎、中嶋正道、西田 睦、吉崎悟朗
国際学会担当幹事	谷口順彦、和田克彦
総括幹事	藤尾芳久、山崎文雄
会計監査	中山一郎

水産育種 第46巻1号

2016年(平成28年)9月30日印刷

2016年(平成28年)9月30日発行

編集者 荒井克俊
代表者兼発行者 木島明博
発行所及び著作権者 水産育種研究会
〒986-2242 宮城県牡鹿郡女川町小乗浜字向3-1
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
TEL 0225-53-2436 FAX 0225-53-2436
印刷所：(有)西村謄写堂
〒780-0901 高知市上町1丁目6-4
TEL 088-822-0492 FAX 088-825-1888

FISH GENETICS AND BREEDING SCIENCE

Volume 46 Number 1, September 2016

CONTENTS

Review

- Trends in Aquatic Breeding: a New Approach for Breeding by Means of Genomic Prediction
S. HOSOYA and K. KIKUCHI 1

Originals

- The Genetic Structure of Natural Abalone *Haliotis discus hannai* Populations in Sanriku, Japan, after the 2011 off the Pacific Coast of Tohoku Earthquake
K. ADACHI, T. OKUMURA, S. OKUMURA and S. MORIYAMA 15
- Identification of Hatchery-cultured S-type Rotifer Escapees, *Brachionus koreanus*, in a Wild Environment: A Preliminary Study
W. MOKA, E. SAWAYAMA, D. NOGUCHI and M. TAKAGI 23

Topic

- 1st *Seriola* Genomics Workshop 07-08 January 2016, Southwest Fisheries Science Center, La Jolla, CA
A. OZAKI and K. NOMURA 31

Announcements 35

The Regulations 37

Instruction for Authors 38