ミトコンドリア DNA の塩基配列から推測した日本産ニシンの 集団構造と個体群動態史

藤田 智也,¹ 北田 修一,^{1*} 原田 靖子,¹ 石田ゆきの,¹ 佐野 祥子,¹
大場 沙織,¹ 菅谷 琢磨,² 浜崎 活幸,¹ 岸野 洋久³

(2016 年 8 月 1 日受付, 2016 年 11 月 16 日受理, 2017 年 1 月 31 日 J-STAGE 早期公開)

¹東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科, ²(国研)水産研究・教育機構瀬戸内海区水産研究所,

³東京大学大学院農学生命科学研究科

Population structure and demographic history of Pacific herring *Clupea pallasii* around Japan
inferred from mitochondrial DNA sequences

TOMONARI FUJITA,¹ SHUICHI KITADA,^{1*} YASUKO HARADA,¹ YUKINO ISHIDA,¹ SHOKO SANO,¹
SAORI OBA,¹ TAKUMA SUGAYA,² KATSUYUKI HAMASAKI¹ AND HIROHISA KISHINO³

¹Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato, Tokyo 108–8477, ²National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, Japan Fisheries Research and Education Agency, Hatsukaichi, Hiroshima 739–0452, ³Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo 113–8657, Japan

Using the mitochondrial DNA control region sequences of 549 bp for 618 Pacific herring from 16 spatiotemporal samples collected at nine spawning sites in the Hokkaido and Tohoku areas of Japan during the spawning period between 2003 and 2014, we estimated the contemporary population structure and demographic history of the Japanese herring. Neighbor-joining unrooted phylogenetic trees based on the empirical Bayes pairwise F_{ST} values showed three large clusters consisting of six local samples in Hokkaido, Lake Obuchi-numa, and Miyako Bay/Matsushima Bay in Tohoku. Hokkaido samples had higher genetic diversity than Honshu samples. The haplotype frequency of Miyako Bay after the Great Tohoku earthquake was substantially different to that before the earthquake, but similar to that of Lake Obuchi-numa. Our demographic analyses inferred that the effective population size (N_e) has expanded since at least ~600 kyr ago in Hokkaido but is stable in Honshu, but a rapid and simultaneous decrease in N_e has occurred since ~20 kyr ago in Japanese herring, corresponding to the warming after the Last Glacial Maximum.

キーワード : Last Glacial Maximum, 温暖化, 系統地理, 進化, ニシン, 東日本大震災

太平洋ニシン *Clupea pallasii* (以下, ニシンという) はアメリカ西岸からカナダ, ロシア, 日本, 韓国, 中国にかけて広く分布し, 2009–2013 年の漁獲量は北西太平洋 25–45 万トン, 北東太平洋約 5 万トンで推移する世界的に重要な水産対象種である (FAO Fish Stat J. Software for fishery statistical time series. <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>, 2015 年 2 月 12 日)。日本では, 北海道・サハリン系群が 1897 年には 100 万トン程漁獲されていたが, この群が姿を

消したとされる 1950 年代後半以降は漁獲量が激減した。¹⁾ 現在は, 北海道沿岸では石狩湾, 能取湖, 風連湖, 厚岸湖, 湧洞沼, 本州太平洋沿岸では青森県尾駁沼, 岩手県宮古湾, 宮城県松島湾・万石浦などの地域群 (以下便宜的に地域性ニシンという) が漁獲されており,²⁾ 2014 年の漁獲量は北海道で 4,572 t, 青森県 2 t, 岩手県 4 t, 鳥取県 22 t, 島根県 8 t の合計 4,608 t と最盛期のおよそ 1/200 となっている。³⁾

日本周辺のニシンは, 比較的高塩分の沿岸域で産卵す

る海洋型集団と汽水性の湖沼や内湾で産卵する湖沼型集団に分けられている。¹⁾ 日本産ニシンの遺伝的集団構造については、アイソザイムを用いた研究が1990年代から行われた。^{4,5)} 小林ら⁴⁾は、石狩湾、万石浦と能取湖、サロマ湖、風連湖、湧洞沼及び尾駈沼のニシンは、遺伝的に異なるグループを形成することを初めて示した。Kijima *et al.*⁵⁾は、稚内抜海、雄武、風連湖及び尾駈沼の標本と、宮古湾、万石浦、宮城県七ヶ浜、福島県原釜、茨城県酒沼の標本は2つのグループに分かれ、後者では酒沼の独立性が高いことを見出すとともに、万石浦の親魚から生産された人工種苗の対立遺伝子（以下、アレルという）頻度は野生親魚と異なることを報告している。堀田ら⁶⁾は、風連湖、野付、厚岸湖のグループと湧洞沼は、遺伝的に離れていることを示した。2000年代には、マイクロサテライト（以下、*msat* という）を用いて、石狩湾、サロマ湖、能取湖、厚岸湖、湧洞沼、噴火湾、尾駈沼、宮古湾、松島湾、隠岐の集団解析が行われ、^{7,8)} 人工種苗の遺伝的変異性や種苗放流が野生集団に与える影響が評価された。^{7,9)} これにより、日本産の地域性ニシンは、北海道、尾駈沼、宮古湾・松島湾の3つの大きなクラスターに分かれること、北海道集団は本州集団に比べて遺伝的多様性が高いこと、及び厚岸と宮古の放流種苗は野生集団と多様性やアレル頻度において差がないことが明らかになった。

一方、北太平洋の分布域全体を見渡した研究では、アラスカ湾以南の北東太平洋とアジア・ベーリングの2グループに大別されることが、小林¹⁾によってアイソザイムを用いて初めて明らかにされた。最近のミトコンドリアDNA（以下、*mtDNA* という）を用いた研究は、系統地理と個体群動態史に焦点を当てている。Liu *et al.*¹⁰⁾は、調節領域（CR）の塩基配列557 bp ($n=935$)を解析し、北太平洋のニシンは大きな3つの *haplotype lineage* から成り、アラスカ半島を境にベーリング海から黄海までの日本周辺の集団は一つの *lineage* に属することを見出した。そして、これらはおよそ100万年前に分岐し、更新世期の複数の氷河期を経験したにもかかわらず、集団は拡大してきたと推定した。Liu *et al.*¹¹⁾は北海道石狩湾、オホーツク、厚岸及び島根県の標本を含む北太平洋10標本について *mtDNA*-CRの塩基配列463 bp ($n=342$)を解析し、Liu *et al.*¹⁰⁾の3つの *haplotype lineage* を確認するとともに、これらの *lineage* では集団の拡大が起きたと推察している。また、*msat* を用いて、小林ら⁴⁾がアイソザイムで報告したアラスカ湾以南の北米沿岸とアジア・ベーリング海の2つのグループを追認している。

以上のように、日本沿岸の地域性ニシンの集団研究は、アイソザイムと *msat* を用いた先行研究があるものの、*mtDNA* の塩基配列データは1例¹¹⁾のみであり、か

つ日本沿岸の標本も石狩湾、オホーツク、厚岸、島根県に限られており、分布域全体を網羅する詳細な研究は行われていない。また、2011年3月11日、マグニチュード9.0という未曾有の東日本大震災が発生し、¹²⁾ 津波は北海道から沖縄まで広範囲に及び、¹³⁾ 特に関東・東北の太平洋沿岸部は甚大な被害を受けた。ニシンは潮間帯や亜潮間帯に繁茂するアマモ、コンブ等の水生植物や海底に卵を産みつける。¹⁾ 東北地方沿岸のニシンの産卵盛期は2月から3月であることから、甚大な津波により受精卵が産卵基質とともに消失し、また、震災以降にニシンが産卵回遊してきたとしても産卵基質が無く、ニシンの再生産は深刻な影響を受けたと思われる。

本研究では、これまで研究室に蓄積してきた2003年から2007年の間に採集した石狩湾、サロマ湖、能取湖、厚岸湖、湧洞沼、噴火湾、尾駈沼、宮古湾及び松島湾の標本に加え、震災後の2013年及び2014年に厚岸湖、尾駈沼、宮古湾から新たに標本を採集した。これらの標本について、*mtDNA*-CRの塩基配列を決定して、日本産ニシンの遺伝的多様性、集団構造及び個体群動態史を推定するとともに、東日本大震災が地域集団に与えた影響についても若干の考察を加えた。

材料と方法

供試魚 2003年から2014年の間に北海道の石狩湾（IK）、サロマ湖（SR）、能取湖（NT）、厚岸湖（AK）、湧洞沼（YD）、噴火湾（FK）、青森県尾駈沼（OB）、岩手県宮古湾（MY）及び宮城県松島湾（MT）で産卵期に刺網または定置網により漁獲された野生魚、及び厚岸で放流され産卵回帰した放流魚（AKH）を用いた（Table 1, Fig. 1）。全ての放流魚は耳石に化学標識されており、これにより放流魚と野生魚を識別した。また、小林¹⁾及び菅野²⁾にしたがって、各標本を産卵場のタイプによって海洋型と湖沼型に分けた。耳石による年齢査定を行い、2歳以上の成熟した618個体を用いた。このうちAK13、OB14及びMY13は、震災後の2013年と2014年に採集された標本である。標本から筋肉を採取し、DNA抽出に供するまで99.5%エタノール中で保存した。

DNA増幅と塩基配列決定 DNA抽出はフェノール・クロロフォルム法またはQuickGene-Mini80（WAKO）により行った。PCR反応による、*mtDNA*-CRの増幅には、プライマー12S-CP 5'-TCCTAGGGCTCGTCTTAACATCT-3'及びCytb-CP 5'-TGTAATCCGAGATCGGAGGTT-3'を用いた。PCR反応にはGeneAmp PCR System 2700 Thermal Cycler（Applied Biosystems）を使用した。PCR反応液は1個体あたり滅菌蒸留水を17.4 μ L、10 $\times$ Ex *Taq* Bufferを2.5 μ L、dNTP Mixtureを2.0 μ L、10 pmol/ μ L

Table 1 Sampling information and diversity indices of the mtDNA control region for the Pacific herring

Sampling location	Abb.	Date of collection		Spawning type	<i>n</i>	Diversity indices				
		Year	Month			<i>nh</i>	<i>uh</i>	<i>hr</i>	<i>h</i>	π
Hokkaido										
Ishikari Bay	IK	2006	Feb.–Mar.	S	41	15	3	11.97	0.916	0.00961
Lake Saroma	SR	2006	Apr.	B	32	15	6	13.37	0.891	0.00962
Lake Noto	NT	2006	May	B	31	14	4	12.74	0.912	0.00878
Lake Akkeshi	AK03	2003	Apr.	B	30	13	0	12.00	0.929	0.00979
	AK06	2006	Mar.–May	B	31	15	5	13.68	0.905	0.00991
	AKH*	2006	Mar.–May	B	33	14	2	12.53	0.939	0.01037
	AK13	2013	Apr.–May	B	53	17	2	11.68	0.902	0.00888
Lake Yudo-numa	YD	2003	Apr.–May	B	30	17	10	16.00	0.929	0.00863
Funka Bay	FK	2003	Mar.–June	S	30	22	16	21.00	0.968	0.01907
Mean						15.8	5.3	13.89	0.921	0.01052
Honshu										
Lake Obuchi-numa	OB0405	2004	Mar.	B	30	6	0	5.00	0.648	0.00552
		2005	Mar.							
	OB07	2007	Feb.	B	34	10	1	8.51	0.843	0.00649
	OB14	2014	Mar.	B	80	9	0	6.26	0.775	0.00668
Miyako Bay	MY0405	2004	Mar.	S	30	8	0	7.00	0.857	0.00825
		2005	Jan.–Apr.							
	MY07	2007	Feb.–Mar.	S	36	9	1	7.62	0.862	0.00801
	MY13	2013	Jan.–Apr.	S	67	10	1	6.75	0.688	0.00594
Matsushima Bay	MT	2005	Feb.	S	30	6	0	5.00	0.805	0.00768
Mean						8.3	0.4	6.59	0.783	0.00694

Spawning type, spawning ground in blackish lagoons (B) and seawater (S); *n*, number of individuals sequenced; *nh*, number of haplotypes; *uh*, number of unique haplotypes; *hr*, haplotype richness; *h*, haplotype diversity; π , nucleotide diversity.

* hatchery-reared fish returned to spawning

Fig. 1 Sampling sites of the Pacific herring. Ishikari Bay (IK), Lake Saroma (SR), Lake Noto (NT), Lake Akkeshi (AK), Lake Yudo-numa (YD), Funka Bay (FK), Lake Obuchi-numa (OB), Miyako Bay (MY) and Matsushima Bay (MT) (see Table 1).

のプライマーを $0.5 \mu\text{L}$ ずつ, Takara Ex Taq polymerase (TAKARA) を $0.125 \mu\text{L}$ に, 希釈した DNA 溶液を $2 \mu\text{L}$ 加えた全量 $25 \mu\text{L}$ とした。PCR 条件は 94°C で 1 分の熱変性後, 94°C で 30 秒間, 56°C で 30 秒間, 72°C で 3 分間を 35 サイクルとした。PCR 産物は Exo-SAP-IT (USB corp.) により精製した。精製物をテンプレート DNA とし, GeneAmp PCR System 2700 Thermal Cycler (Applied Biosystems) を使用しサイクルシーケンスを行った。サイクルシーケンスには上記のプライマー Cytb-CP 及び Cytb-E 5'-CCTGAAG-TAGGAACCAGATG-3' を用いた。サイクルシーケンス反応液は 1 個体あたり, 滅菌蒸留水を $15.8 \mu\text{L}$, BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) を $1.5 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{M}$ プライマー Cytb-CP 及び Cytb-E を $0.32 \mu\text{L}$ ずつ, テンプレート DNA を $3 \mu\text{L}$ 加えた全量 $20 \mu\text{L}$ とした。サイクルシーケンスの反応温度条件は, 96°C 1 分間の熱変性後, 96°C 10 秒間, 50°C 5 秒間, 60°C 4 分間を 25 サイクルとした。シーケンス産物を ABI 3100 及び ABI 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems) を使用して各個体の塩基配列を得た。ClustalX¹⁴⁾を用いてアライ

ンメントを行い, mtDNA-CR の塩基配列 551 bp を決定した。2つのサイトでギャップ (挿入または欠失) が見られたため, これらを除いて, DnaSP ver. 5.10¹⁵⁾によりハプロタイプを定義した。その塩基配列を, 日本DNA データバンク (DDBJ) に登録した (LC029928-LC030003)。

遺伝的多様性と集団構造 ハプロタイプ数, ハプロタイプ多様度及び塩基多様度¹⁶⁾を DnaSP ver. 5.10 により推定した。ハプロタイプリッチネスは最小標本数を $n=30$ として CONTRIB¹⁷⁾を用いて計算した。ハプロタイプ頻度の標本間の均一性検定には Genepop ver. 4.2¹⁸⁾を用い, Exact test を行った (5,000 dememorization number, 100 batches, and 5,000 iterations)。R パッケージ FinePop の EBFST 関数を用いて標本間のペアワイズ F_{ST} を経験ベイズ法¹⁹⁾により推定し, 近隣結合 (NJ) 樹²⁰⁾を FigTree 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) で作成した。Median-joining 法に基づくハプロタイプネットワークを Network 4.613²¹⁾を用いて描いた。

個体群動態史 Arlequin 3.5²²⁾を用いて Tajima's D ²³⁾と Fu's F_S ²⁴⁾を求め, ハプロタイプのミスマッチ分布²⁵⁾を推定した。後に結果で示すように, 本州では宮古湾の震災後のハプロタイプ頻度分布が尾駈沼に近づいていたが (Figs. 2, 3), ハプロタイプ頻度においては差がなく, 厚岸の放流魚 (AKH) も厚岸の野生魚と差がなかったため (Table 2), この計算においては, Table 1 の 16 標本それぞれと, 北海道全体 (IK, SR, NT, AK03, AKH, AK06, AK13, YD 及び FK) 及び本州全体 (OB0405, OB07, OB14, MY0405, MY07, MY13 及び MT) の塩基配列をプールして行った。Tajima's D と Fu's F_S は, 有意な負の値をとった場合, 集団の拡大を示唆する。ミスマッチ分布はすべての個体間の塩基配列差異の頻度分布で, 10,000 回のブートストラップによって集団拡大モデル (sudden expansion model) へのあてはまりを SSD (Sum of squared deviation) によって判断した。得られた τ の推定値とその 95% 信頼区間から, 集団の拡大が始まって以降の年数 (t) を $t = \tau/2u$ ²⁵⁾によって計算した。ここで, u は, DNA 配列全体の突然変異率で, 1 塩基当たり突然変異率 $\mu \times$ 塩基数 k で計算した。突然変異率は, ニシンの先行研究で推定された mtDNA-CR の divergence rate 0.0159/百万年¹⁰⁾ ($\mu = 0.00795/\text{site}/\text{百万年}$) を用いた。すなわち, $t = \tau/(0.0159 \times 549)$ 百万年である。

有効集団サイズ (N_e) の時間変化を Bayesian Skyline Analysis²⁶⁾によって推測した。これにより, 集団内の過去の個体群動態の視覚化が可能になる。計算には BEAST 2.4.0²⁷⁾を用い, Bayesian Skyline Plot (BSP) を生成した。野生集団の N_e の変化を推定するこの計算においては, 放流魚の標本は除いた。また, 東日本大震

災の影響を受けたと考えられる宮古湾の震災後の標本 (MY13) を計算から除いた。これは, 直近の震災の影響を排除することにより, 500-800 年ごとに東北太平洋沿岸で繰り返している大地震の進化時間スケールでの影響が見えるかも知れないと考えたからである。ここでは, 北海道, 尾駈沼, 宮古湾・松島湾の塩基配列に基づき Bayesian Skyline Plot (BSP) を生成した。塩基置換モデルは HKY²⁸⁾とし, $\mu = 0.00795/\text{百万年}$ ¹⁰⁾, MCMC は 10^8 回, burn-in は 10^7 回で計算を行い, MCMC 50,000 回毎に結果をサンプリングした。Tracer1.6 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>) によって BSP を描画した。

結 果

日本の代表的な産卵場で採集された 16 標本 618 個体の mtDNA-CR 549 bp の塩基配列を決定し, 76 のハプロタイプ ($nh=76$) を得た。ハプロタイプ頻度は, 電子付録 (Appendix Table) に示した。遺伝的多様性は, ハプロタイプ数 (Welch t -test, $t=6.7988$, $p=0.0000$), ユニークハプロタイプ数 ($t=2.9656$, $p=0.0174$), ハプロタイプリッチネス ($t=6.5944$, $p=0.0000$), ハプロタイプ多様度 ($t=2.7718$, $p=0.0242$), 塩基多様度 ($t=3.0927$, $p=0.0113$) とすべての多様度で本州よりも北海道が高かった (Table 1)。宮古湾では, 東日本大震災後にハプロタイプ多様度 ($t=2.7588$, $p=0.0029$) 及び塩基多様度 ($t=2.7588$, $p=0.0029$) とともに有意に減少したが, 厚岸湖及び尾駈沼では震災前後で有意差は認められなかった。厚岸湖, 尾駈沼及び宮古湾において, 震災前の異なる年の標本間では, ハプロタイプ頻度に差がなかった (Table 2)。そのため, 以降の解析には標本をプールした AK03+AK06, OB0405+OB07, MY0405+MY07 を用いた。厚岸湖, 尾駈沼のハプロタイプ頻度は, 震災前後で有意な差は無かった (Table 2)。これに対し, 宮古湾については, 震災後の標本 (MY13) のハプロタイプ頻度の分布は, 震災前の標本 (MY0405+MY07) よりも尾駈沼の震災前の標本 (OB0405+OB07) に類似した (Fig. 2)。すべての標本の組み合わせのペアワイズ F_{ST} ± 標準偏差は 0.0133 ± 0.0050 で, NJ 樹では, 北海道が一つの大きなクラスターを形成し, 宮古湾・松島湾が隣接し, 尾駈沼は離れて位置した (Table 3, Fig. 3)。厚岸湖及び尾駈沼の震災後の標本はそれぞれの震災前の標本に隣接し, 厚岸の放流魚は親魚集団から分岐した。一方, 宮古湾の震災後の標本 (MY13) は, 宮古湾の震災前の標本から遠く離れ, 尾駈沼の標本内に含まれた。

ハプロタイプ間の類縁関係を示すネットワークでは, 全ての標本が主要ハプロタイプ H_5, H_7 及び H_9 を共有した (Fig. 4, 電子付録 Appendix Table)。また,

Table 2 *P*-values for the pairwise difference tests of the Pacific herring haplotype frequencies

	IK	SR	NT	AK03	AK06	AKH	AK13	YD	FK	OB0405	OB07	OB14	MY0405	MY07	MY13
SR	0.1616														
NT	0.1390	0.6269													
AK03	0.3354	0.0332	0.0227												
AK06	0.0005	0.0062	0.0015	0.2133											
AKH	0.0354	0.0065	0.0030	0.8812	0.5763										
AK13	0.0093	0.0982	0.0568	0.2195	0.2927	0.0342									
YD	0.0085	0.0390	0.1622	0.0056	0.0001	0.0042	0.0018								
FK	0.0119	0.0670	0.1983	0.1291	0.0079	0.0254	0.0096	0.1851							
OB0405	0.0058	0.0012	0.0118	0.0224	0.0000	0.0015	0.0023	0.0075	0.0164						
OB07	0.0068	0.0031	0.0100	0.0942	0.0001	0.0105	0.0597	0.0141	0.0807	0.3888					
OB14	0.0001	0.0001	0.0000	0.0018	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.9587	0.4552				
MY0405	0.2148	0.0509	0.0790	0.1861	0.0007	0.2679	0.0237	0.0155	0.0890	0.0468	0.0509	0.0071			
MY07	0.0239	0.0031	0.0092	0.1085	0.0000	0.1117	0.0044	0.0019	0.0237	0.1161	0.1180	0.0095	0.9286		
MY13	0.0000	0.0000	0.0000	0.0003	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.9844	0.1031	0.7301	0.0027	0.0031	
MT	0.0584	0.0004	0.0092	0.0949	0.0004	0.0659	0.0012	0.0046	0.0189	0.2259	0.1081	0.0513	0.6133	0.8312	0.0607

Bold values indicate significant differences after Bonferroni correction ($p=0.005$).

Fig. 2 Temporal changes in mtDNA control region haplotype frequencies of the Pacific herring in Lake Akkeshi (AK), Lake Obuchi-numa (OB) and Miyako Bay (MY) before (upper) and after (lower) the Great Tohoku earthquake.

噴火湾固有の16のマイナーハプロタイプからなるクラスターが見られた。北海道固有のハプロタイプは62(噴火湾固有の16を含む)、本州固有のハプロタイプは3であり、本州は北海道に比べ固有ハプロタイプが少なかった。Tajima's *D*は北海道の9標本中5標本(SR, NT, AK06, YD, 及びFK)で負の値をとったが、有意

ではなかった。一方、本州ではOB07を除いた全標本で正の値をとったが、いずれも有意ではなかった(Table 4)。標本をプールした結果も同様であった。一方、Fu's *FS*は、北海道のすべての標本で負の値をとり、湧洞沼と噴火湾で有意であった。これに対し、本州では2007年の尾駁沼(OB07)を除いたすべての標本で正の値をとったが、有意ではなかった。北海道全体では有意な負の値をとり、本州全体は正の値であったが有意ではなかった。

ミスマッチ分布は、北海道ではunimodalの傾向を示し、SSDは集団拡大モデルへのあてはまりを支持した(Table 4)。噴火湾は塩基置換数の最大が22で、モードも13と他と比べ大きい。本州では、北海道に比べ塩基置換数0, 4, 5及び6の頻度が大きく、2, 3及び7で頻度の低下が認められた(Fig. 5)。震災後の尾駁沼(OB14)と宮古湾(MY13)、及び松島湾(MT)では、集団拡大モデルは棄却された。北海道と本州をまとめた場合もこの傾向は変わらない。震災前後を比較すると、厚岸湖と尾駁沼では、震災前後で同様の分布を示した。一方、震災後の宮古湾(MY13)は、震災前のそれよりも尾駁沼の分布と類似した。集団の拡大が始まってからの年数(95%信頼区間)は、北海道全体では87(38–138)万年前程度と推定された。本州では拡大モデルは支持されなかったが、推定された拡大時期は71(16–121)万年前で、北海道より17万年ほど新しい。

Bayesian Skyline Analysisの有効標本数は、すべてのパラメータで、北海道の野生魚で ≥ 346 、尾駁沼 ≥ 458 、宮古湾・松島湾では $\geq 1,177$ であった。BSPは、北海道の野生魚は100万年ほど前から緩やかに拡大していたがおよそ60万年前から40万年ほど前まで急拡

Table 3 Empirical Bayes pairwise F_{ST} estimates inferred from the Pacific herring mtDNA control region haplotype frequencies

	IK	SR	NT	AK03+06	AKH	AK13	YD	FK	OB0405+07	OB14	MY0405+07	MY13
SR	0.00891											
NT	0.00944	0.00893										
AK03+06	0.01027	0.01167	0.01277									
AKH	0.00936	0.01114	0.01108	0.00724								
AK13	0.01042	0.00932	0.00983	0.00770	0.00937							
YD	0.01055	0.01076	0.00902	0.01358	0.01138	0.01190						
FK	0.01034	0.01069	0.00944	0.01111	0.01001	0.00990	0.00972					
OB0405+07	0.01789	0.01914	0.01457	0.02023	0.01746	0.01892	0.01354	0.01449				
OB14	0.01674	0.01806	0.01366	0.01896	0.01653	0.01798	0.01335	0.01460	0.00470			
MY0405+07	0.01124	0.01196	0.01045	0.01368	0.00997	0.01175	0.01155	0.01072	0.01185	0.01171		
MY13	0.02347	0.02708	0.01987	0.02916	0.02552	0.02789	0.01786	0.02120	0.00790	0.00749	0.01819	
MT	0.01239	0.01478	0.01166	0.01527	0.01182	0.01470	0.01150	0.01194	0.00920	0.00882	0.00763	0.01331

Fig. 3 Neighbor-joining tree based on the empirical Bayes pairwise F_{ST} values between the Pacific herring populations inferred from mtDNA control region haplotype frequencies. Sample abbreviations are given in Table 1.

大し、その後も拡大が続いていたが、5 万年ほど前から減少が始まり、特に 2 万年ほど前から減少が加速したことを描き出した。現在の N_e は 120 万尾程度（世代時間 $T=2.5$ として 300 万/2.5）と推定された（Fig. 6a）。一方、尾駿沼と宮古湾・松島湾では、少なくとも 15–20 万年ほど前から集団サイズは安定していたが、北海道同様、約 5 万年前から徐々に減少が始まり、2 万年ほど前から減少が際立っている（Fig. 6b, c）。現在の N_e は、

尾駿沼で約 4 万尾（= 10 万/2.5）、宮古湾・松島湾では更に小さく約 6,000 尾（= 1.5 万/2.5）程度と推定された。

考 察

産卵期に収集した日本産ニシン 16 標本 618 個体について mtDNA-CR の塩基配列 549 bp を決定し、遺伝的多様性・集団構造の時空間変化及び個体群動態史を推定した。北海道の遺伝的多様性は本州のそれより有意に高い。北海道の集団が一つの大きなクラスターを形成したが、噴火湾は固有の 16 のハプロタイプを有し異質性が際立っている。宮古湾と松島湾は遺伝的に近く、尾駿沼はこれらとは異質であった。厚岸湖の放流魚は野生魚と遺伝的多様性において遜色なかった。これらの結果は、msat の先行研究の結果⁷⁻⁹⁾とよく一致した。宮古湾では震災前後の標本間でハプロタイプ頻度に有意な差が見られ、震災後標本のそれは尾駿沼に類似していた。BSP は、北海道では更新世の後期のおよそ 60 万年前から 40 万年前にかけて集団が急拡大したが、2 万年ほど前から減少していると推測した。集団サイズが安定していた本州でも 2 万年ほど前から北海道と同調して急減が起こっており、宮古湾・松島湾では集団サイズが極端に縮小していることが初めて推定された。

北海道では、噴火湾、湧洞沼及び北海道全体では Fu's F_S で有意な負の値をとり、集団の拡大が示唆された。異質性が強い噴火湾を除いて計算すると、北海道で集団の拡大が始まったのはおよそ 87 万年前（ $t=0.8721$ 百万年）、すなわち更新世期の後期と推定した。これは、Liu *et al.*¹⁰⁾ の北太平洋の集団の拡大時期 63–94 万年前とはほぼ一致する。噴火湾については、拡大が始まった時期が他より早く約 150 万年前と推定され、マイナーであるが固有のハプロタイプが一つのクラスターを形成し、遺伝的多様度も他に比べ高かった。小林²⁹⁾ は噴火湾のニシンは近年漁獲され始めたと述べ、標識放流調査

Fig. 4 Median-joining network of 76 haplotypes detected in the mtDNA control region sequences of the Pacific herring. Size of the node corresponds to the haplotype frequency; the minimum size of the node shows one individual. Individual node names, median vectors and mutation positions are not shown for simplicity.

Table 4 Tajima's D , Fu's F_S values and summary of the mismatch distribution analysis under the sudden expansion model for the Pacific herring

Sample	D	F_S	SSD	τ (95%CI)	t (95%CI)
Hokkaido					
IK	0.287	-1.213	0.011	7.721 (2.939–11.846)	0.885 (0.337–1.357)
SR	0.829	-2.250	0.017	8.287 (2.875–12.941)	0.949 (0.329–1.483)
NT	-0.282	-2.181	0.012	5.998 (2.619–8.801)	0.687 (0.300–1.008)
AK03	0.055	-0.994	0.019	8.049 (3.193–12.199)	0.922 (0.366–1.398)
AK06	-0.167	-2.234	0.024	9.406 (3.094–14.131)	1.078 (0.354–1.619)
AKH	0.023	-1.080	0.016	8.121 (3.463–12.270)	0.930 (0.397–1.406)
AK13	0.018	-1.970	0.012	8.244 (2.244–12.867)	0.944 (0.257–1.474)
YD	-0.646	-5.567	0.012	5.367 (2.770–7.227)	0.615 (0.317–0.828)
FK	-0.206	-5.808	0.009	13.014 (7.518–17.135)	1.491 (0.861–1.963)
Hokkaido pooled	-1.260	-24.540	0.005	7.592 (3.342–12.002)	0.870 (0.383–1.375)
Honshu					
OB0405	0.008	2.027	0.101	6.174 (0.164–11.553)	0.707 (0.019–1.324)
OB07	-0.088	-0.273	0.032	5.342 (1.264–9.441)	0.612 (0.145–1.082)
OB14	0.847	2.627	0.054	6.199 (1.164–10.568)	0.710 (0.133–1.211)
MY0405	0.671	1.980	0.031	7.143 (2.029–11.375)	0.818 (0.232–1.303)
MY07	0.463	1.472	0.029	6.631 (2.266–10.750)	0.759 (0.260–1.232)
MY13	0.119	0.982	0.080	6.266 (0.563–11.252)	0.718 (0.064–1.289)
MT	0.948	3.529	0.064	6.250 (1.887–10.215)	0.716 (0.216–1.170)
Honshu pooled	0.991	2.231	0.045	6.172 (1.391–10.545)	0.707 (0.159–1.208)

D , Tajima's D ; F_S , Fu's F_S ; SSD, sum of squared deviation from the sudden expansion model; τ , time since the population expansion; t , absolute time (million years) since the population expansion

Bold values indicate significant differences ($p=0.005$).

Fig. 5 Observed mismatch distributions (bars) and expected mismatch distributions (lines with open circles) under the sudden expansion model of mtDNA control region sequences of the Pacific herring for 16 local samples and pooled Hokkaido and Honshu samples.

結果³⁰⁾は噴火湾周辺海域の固有の地域群についてはこれまで知られていない新規系群の可能性が高いと推察している。msat による先行研究でも、この噴火湾標本の異質性が指摘されているが、⁸⁾ 由来等の詳細は明らかではない。

一方、本州では集団の拡大は支持されなかった。東北太平洋側の大地震は、500–800 年の間隔で繰り返しているという。³¹⁾ 本州の遺伝的多様性が北海道に比べて低いことや、宮古湾・松島湾で集団サイズが極端に縮小しているのは、このことと関係していることを示唆する。東日本大震災では、宮古湾の最大津波高は、39.7 m³²⁾に達し、甚大な被害を与えた。震災後の宮古湾では、ハプロタイプ頻度やミスマッチ分布が震災前の宮古湾と異なり、尾駸沼のそれと類似した。ペアワイズ F_{ST} の値は 0.0133 ± 0.0050 と小さく、産卵場のエコタイプ（湖沼型・海洋型）にかかわらず集団間の交流が大きいことを示している。これらの結果から、宮古湾のニシン集団が壊滅し、尾駸沼から宮古湾に定常的に産卵来遊した個体にはば置き換わった可能性が考えられる。過去の標識放流では、宮古湾で放流した個体が翌年の産卵期に他の産卵場で成熟した状態で回収されている事例³³⁾も報告さ

れている。産卵場間の交流と集団構造維持のメカニズムを明らかにするためには、集団の遺伝的混合や有効集団サイズ等について、マイクロサテライトを用い詳しく検討する必要がある。

Liu *et al.*¹⁰⁾ の BSP は、北太平洋の 3 つの mtDNA-CR haplotype lineage 全てにおいて集団の拡大が現在まで続いていることを示し、北太平洋のニシンは約 100 万年前に分岐し、分布域を南にシフトしながら更新世期の低温期を生き抜き集団を拡大させてきたと推定している。本研究の BSP では、日本のニシン集団は、北海道では 60–40 万年前に急拡大したが 2 万年前辺りから集団サイズが急減していること、また、尾駸沼、宮古湾・松島湾では少なくとも 15–20 万年前から安定していたが、北海道と同様に 2 万年前辺りから集団サイズの縮小が著しいことを初めて推定した。Jouzel *et al.*³⁴⁾ がアイスコアから推定した南極の気温の長期変動によれば、60–40 万年前は寒暖を繰り返し 40 万年前にかけて南極の気温が大きく上昇している。その後も寒冷期と温暖期を繰り返し、約 2 万 1,000 年前の最終氷期 (Last Glacial Maximum, LGM) までに 4 回の温暖期があった。LGM 以降は、南極の気温は現在まで上昇している。本研究で

Fig. 6 Bayesian skyline plots showing changes in the population size ($N_e \times T$) inferred with BEAST2 on mtDNA control region sequences for (a) Hokkaido, (b) Lake Obuchi-numa, and (c) Miyako and Matsushima Bays. N_e =effective population size, T =generation time. Bold lines show the median estimates with light lines for the 95% upper and lower highest posterior density limits. The y-axis is plotted on a logarithmic scale.

推定した 60–40 万年前の拡大と 2 万年前からの減少は、南極の気温の長期変動とよく一致している。かつては最大で 500 t の漁獲を記録した茨城県酒沼のニシンが太平洋側の分布の南限であり、1970 年代前半まで数 10 トンの漁獲があったが現在産卵来遊は見られず、松島湾・万石浦周辺が本州太平洋側の南限となっている。²⁹⁾ 北太平洋全体から見れば、日本のニシンは南限を含む縁辺部の集団である。この縁辺部の集団がおよそ 2 万年前から減少に転じているのは、LGM 以降の気温上昇に加え、近年の地球温暖化が影響しているのかも知れない。

このように、BSP により集団サイズの時間変化の考察が可能になる。これに対し、Grant *et al.*³⁵⁾ 及び

Grant³⁶⁾ は、正確ではない突然変異率を用いると、更新世は氷河期を繰り返した生息環境の厳しい時期にもかかわらず、そこを集団の拡大時期と誤って推定すると BSP の適用に注意喚起している。本研究では、Liu *et al.*¹⁰⁾ がタイセイヨウニシン *Clupea harengus* とニシンの分岐年と遺伝的距離から推定した突然変異率 ($\mu = 0.00795$ /塩基/百万年) を用いた。Grant *et al.*³⁵⁾ は、気温とニシン集団の成長の相関を仮定したシミュレーションから推定した $\mu = 0.083$ /塩基/百万年を用いた場合、BSP での Liu *et al.*¹⁰⁾ のニシンの拡大時期は LGM の後に推定されると主張している。一方、Liu *et al.*¹⁰⁾ は、10 倍大きい $\mu = 0.095$ も使った結果も提示しており、集団の拡大傾向が変わらないことから、更新世の気候変動はニシン集団に負の影響を与えなかったと結論している。また、BSP を用いた最近の研究は、カリフォルニアのサワラ *Scomberomorus concolor* ($n = 231$, $nh = 212$) や、³⁷⁾ ブラジル大西洋岸の森林に生息する淡水魚 *Hollandichthys multifasciatus* ($n = 182$, $nh = 70$)、³⁸⁾ 地中海と黒海のココゼ *Scorpaena porcus* ($n = 175$, $nh = 64$)³⁹⁾ でも、LGM 以降に集団が拡大したと結論している。本研究では、40 万年前の南極の気温上昇期に日本の集団は急拡大したこと、また、LGM 以降の温暖期と一致して減少に転じていることから、Liu *et al.*¹⁰⁾ の突然変異率は妥当と考えられる。なお、10 倍大きい突然変異率を使った場合、時間スケール (横軸) が 10 分の 1 になるが集団サイズ (縦軸) のスケールは同じで、温暖期に入ってから減少傾向は変わらない (figure not shown)。また、Niwa *et al.*⁴⁰⁾ は、卓越年級群が発生した場合には、再生産に成功した特定の親のハプロタイプが優占し、ハプロタイプ頻度は世代毎に大きく変わり得ると考え (reproductive skew)、マイワシの mtDNA-CR の塩基配列データ ($n = 106$, $nh = 101$) のサブセット ($nh = 51$) を用いてこれを考慮した coalescent (合体) モデルのあてはめを検討した。そのモデルが伝統的な合体モデルに比べてデータを良く説明したことから、海産魚類等でしばしば見られるいわゆる star-like なハプロタイプネットワークは、集団の拡大ではなく reproductive skew によって起きたと結論している。これに対し、本研究では、ハプロタイプ頻度は、宮古湾では大震災の前後で大きく変化した震災前は安定しており、厚岸湖及び尾駈沼でもこの 10 年安定している (Fig. 2)。これらから、日本産ニシンは、更新世に北太平洋から南下して拡大してきたが、LGM 以降の温暖期に減少に転じ、最近の地球温暖化に伴って急減していると結論した。

謝 辞

標本採集や年齢査定にご協力いただいた水産総合研究センター (当時) の岩本昭雄氏、大河内裕之氏、村上直

人氏, 中川亨氏, 市川卓博士, 長倉義智氏に深謝します。本研究は, 科研費基盤研究 (B) 15380133, 22380110 (SK) 及び16H02788 (HK) によって行われた。

文 献

- 小林時正. 太平洋ニシンの集団遺伝学的特性と種内分化に関する研究. 遠洋水研報 1993; **30**: 1-77.
- 菅野泰次. 日本周辺海域に分布するニシンの系統群とその生態. 栽培技術開発研究 1983; **12**: 59-69.
- 漁業・養殖業生産統計年報 (2016), 農林水産省, 東京. 2016
- Kobayashi T, Iwata M, Numachi K. Genetic divergence among local spawning populations of Pacific herring in the vicinity of northern Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1990; **56**: 1045-1052 (in Japanese with English abstract).
- Kijima A, Nakajima M, Fujio Y. Genetic differentiation among localities in the natural Pacific herring around Japan and genetic characterization of the artificial seeds compared with the natural population. *Tohoku Journal of Agricultural Research* 1992; **42**: 83-93.
- Hotta T, Matsuishi T, Sakano H, Kanno Y. Population structure of Pacific herring *Clupea pallasii* in the eastern Hokkaido waters. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1999; **65**: 655-660 (in Japanese with English abstract).
- Sugaya T, Sato M, Yokoyama E, Nemoto Y, Fujita T, Okouchi H, Hamasaki K, Kitada S. Population genetic structure and variability of Pacific herring *Clupea pallasii* in the stocking area along the Pacific coast of northern Japan. *Fish. Sci.* 2008; **74**: 579-588.
- 根本雄太, 菅谷琢磨, 大河内裕之, 北門利英, 浜崎活幸, 北田修一. マイクロサテライト DNA 変異から推定した日本沿岸における太平洋ニシンの集団構造. 水産育種 2008; **37**: 51-59.
- Kitada S, Shishidou H, Sugaya T, Kitakado T, Hamasaki K, Kishino H. Genetic effects of long-term stock enhancement programs. *Aquaculture* 2009; **290**: 69-79.
- Liu JX, Tatarenkov A, Beacham TD, Gorbachev V, Wildess S, Avise JC. Effects of Pleistocene climatic fluctuations on the phylogeographic and demographic histories of Pacific herring (*Clupea pallasii*). *Mol. Ecol.* 2011; **20**: 3879-3893.
- Liu M, Lin L, Gao TX, Yanagimoto T, Sakurai Y, Grant WS. What maintains the central north Pacific genetic discontinuity in Pacific herring? *PLOS ONE* 2012; **7**: e50340.
- Sato M, Ishikawa T, Ujihara N, Yoshida S, Fujita M, Mochizuki M, Asada A. Displacement above the hypocenter of the 2011 Tohoku-Oki earthquake. *Science* 2011; **332**: 1395.
- 平成 23 年 (2011 年) 東北地方太平洋沖地震調査報告. 気象庁, 東京, 2011.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997; **25**: 4876-4882.
- Librado P, Rozas J. DnaSP ver5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 2009; **25**: 1451-1452.
- Nei M. Molecular evolutionary genetics. Columbia University, New York, 1987.
- Petit RJ, El Mousadik A, Pons O. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Cons. Biol.* 1998; **12**: 844-855.
- Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 1995; **86**: 248-249.
- Kitada S, Kitakado T, Kishino H. Empirical Bayes inference of FST and its distribution in the genome. *Genetics* 2007; **177**: 861-873.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; **4**: 406-425.
- Bandelt HJ, Forster JP, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 1999; **16**: 37-48.
- Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver3.5: a new series of programs to perform population genetics analysis under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 2010; **10**: 564-567.
- Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 1989; **123**: 585-595.
- Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 1997; **147**: 915-925.
- Rogers AR, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 1992; **9**: 552-569.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.* 2005; **22**: 1185-1192.
- Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, Suchard MA, Rambaut A, Drummond AJ. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* 2014; **10**: e1003537.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano TA. Man's place in Hominoidea as inferred from molecular clocks of DNA. *J. Mol. Evol.* 1987; **26**: 132-147.
- 小林時正. 北海道におけるニシン漁業と資源研究 (総説). 北海道水産試験場研究報告 2002; **62**: 1-8.
- Okouchi H, Nakagawa M. Estimation of population structure of herring caught around Funka Bay, based on tag recapture data. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2012; **78**: 8-14 (in Japanese with English abstract).
- Sawai Y, Namegaya Y, Okamura Y, Satake K, Shishikura M. Challenges of anticipating the 2011 Tohoku earthquake and tsunami using coastal geology. *Geophys. Res. Lett.* 2012; **39**: L21309.
- Mori N, Takahashi T, Yasuda T, Yanagisawa H. Survey of 2011 Tohoku earthquake tsunami inundation and run-up. *Geophys. Res. Lett.* 2011; **38**: L00G14.
- Okouchi H, Yamane Y, Aritaki M. Migration ecology of herring *Clupea pallasii* after spawning in Miyako Bay and homing in the following year. *Nippon Suisan Gakkaishi* 2008; **74**: 389-394 (in Japanese with English abstract).
- Jouzel J, et al. (2007). Orbital and millennial Antarctic climate variability over the past 800,000 years. *Science* 2007; **317**: 793-796.
- Grant WS, Liu M, Gao T, Yanagimoto T. Limits of Bayesian skyline plot analysis of mtDNA sequences to infer historical demographies in Pacific herring (and other species). *Mol. Phylogenet. Evol.* 2012; **65**: 203-212.
- Grant WS. Problems and cautions with sequence mis-

- match analysis and Bayesian skyline plots to infer historical demography. *J. Hered.* 2015; **106**: 333–346.
- 37) Domínguez-López M, Díaz-Jaimes P, Uribe-Alcocer M, Quiñonez-Velázquez C. Post-glacial population expansion of the Monterey Spanish mackerel *Scomberomorus concolor* in the Gulf of California. *J. Fish Biol.* 2015; **86**: 1153–1162.
- 38) Thomaz AT, Malabarba LR, Bonatto SL, Knowles LL. Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. *J. Biogeogr.* 2015; **42**: 2389–2401.
- 39) Boissin E, Micu D, Goff J, Neglia V, Bat L, Todorova V, Panayotova M, Kruschel C, Macic V, Milchakova N, Keskin Ç, Anastasopoulou A, Nasto I, Zane L, Planes S. Contemporary genetic structure and postglacial demographic history of the black scorpionfish, *Scorpaena porcus*, in the Mediterranean and the Black Seas. *Mol. Ecol.* 2016; **25**: 2195–2209.
- 40) Niwa HS, Nashida K, Yanagimoto T. Reproductive skew in Japanese sardine inferred from DNA sequences. *ICES J. Mar. Sci.* 2016; doi: 10.1093/icesjms/fsw070.