

博士論文

トラフグ早熟形質の遺伝基盤とゲノム予測の可能性

2021 年

東京大学大学院 農学生命科学研究科

水圏生物科学専攻

吉 川 壮 太

目次

	頁
序論	1
第1章. 早熟系統の遺伝的および内分泌的特徴	6
第2章. 養殖用親魚集団の遺伝的構造解析	22
第3章. QTL 解析による遺伝機構の解明	32
第4章. ゲノム予測によるゲノミックセレクション法の有効性	45
総合考察	57
論文の内容の要旨	62
謝辞	67
引用文献	68
図表・スクリプト	

序論

近年の世界人口の爆発的増加に伴い、タンパク源としての水産資源に対する期待は高まっている。特に、天然資源は減少が続いていることから養殖業の重要性が増している。養殖業の発展には、1970年代以降に種苗生産技術が開発され、人工授精で作出された人工種苗の安定供給が可能となったことが大きく貢献した。現在では、世界的に主要な養殖対象種であるコイ類、ティラピア類などの生産量の75%が人工種苗に由来する (Houston *et al.*, 2020)。我が国の主要な養殖魚種であるマダイ *Pagrus major* やヒラメ *Paralichthys olivaceus* においても、ほぼ全量で人工種苗が利用されている (宮下, 2014)。一方、種苗生産技術が確立してからの歴史が浅いブリ *Seriola quinqueradiata* やクロマグロ *Thunnus orientalis* においては、ほとんどが野生の幼魚を利用した天然種苗に依存しており、人工種苗の導入は緒に就いたばかりである (森島, 2018; Higuchi *et al.*, 2019)。

安定的に人工種苗が供給されるようになった魚種の一部では、家畜動物に倣って育種化による生産効率の向上が図られている。一方で、農畜産物とは異なり、養殖魚は育種の歴史が浅いため、育種化された種であっても遺伝的にも外見的にもほとんど野生個体と変わらない。そのため、養殖魚の多くはいまだに野生集団の持つ遺伝的多様性が維持されており、農畜産物と比べると一般的に選抜育種の効果が大きい。実際に、乳牛や作物の遺伝的改良量が年間0.3–1.2%程度であるのに対し (Buch *et al.*, 2012; Hill, 2016; Li *et al.*, 2018)、養殖魚類では世代あたり10%を超える改良量が得られている (Gjedrem and Rye, 2018)。サケ科魚類では早くから近代的な選抜育種の導入が進められ、北欧諸国や南米などで目覚ましい成果が得られている。組織化された大規模選抜育種の歴史が最も古いタイセイヨウサケ *Salmo salar* では、すでに10世代以上の選抜が行われており、成長率は野生個体の2倍以上に改良されている (Thodesen *et al.*, 1999; Glover *et al.*, 2009; Solberg *et al.*, 2013)。最近では、生産量のほぼ全量で遺伝的に改良された系統が利用されている (Gjedrem, 2016)。また、ナイルティラピア *Oreochromis niloticus* でも選抜育種の導入が進んでおり、GIFT (genetically improved farmed tilapia) と名付けられた系統では最初の5世代で出荷時の

体重が 88%増加している (Bentsen *et al.*, 2003)。当該系統は中国、バングラデシュ、スリランカなどで利用率が高く、生産量の 80%以上を占める (Ponzoni *et al.*, 2010)。これらの魚種では 1980 年代から導入された BLUP (best linear unbiased predictor, 最良線形不偏予測) 法による家系選抜の導入が育種化の鍵を握った (Gjedrem, 2010)。BLUP 法は畜産分野で発展した選抜法で、環境要因を考慮しつつ家系の血縁情報に基づいて個体の遺伝的能力 (育種価: breeding value, BV) を予測し、予測育種価 (estimated breeding value, EBV) を算出する方法である。この EBV を指標として親個体を選抜する。BLUP 法では複数の血縁個体から得た情報を利用しつつ、環境から受ける影響を僅少化できるため、集団が持つ遺伝的能力を正確に予測することができる (和田, 2008)。上記 2 魚種では、BLUP 法の導入に成功したことで生産量が飛躍的に増加し、2010 年代以降には年間 300 万トン以上に達している (Gjedrem and Rye, 2018; Yáñez *et al.*, 2020)。現在では他の養殖対象種においても BLUP 法が導入され、成長率の向上や餌料転換効率の改善、成熟年齢の制御など様々な遺伝的改良に成功している (Crandell and Gall, 1993; Castillo-Juárez *et al.*, 2007; Ponzoni *et al.*, 2008; Gjedrem *et al.*, 2012)。

我が国では世界に先駆けて海産魚の人工種苗生産に成功し (平野, 1967; 原田, 1969)、それに続いて種苗生産や養殖技術に関する先駆的な研究が積み重ねられてきた (日野, 1994; 熊井・村田, 2000)。その結果、日本の国内は言うまでもなく、世界の魚食嗜好の一部を海産魚へと転換させるほど海産魚養殖産業は発展した。しかし現在、飼餌料価格や原油の高騰に伴う生産コストの上昇などが原因で養殖業が停滞していることに加え、輸入水産物の急増が漁家経営を強く圧迫している。そのため、選抜育種による生産性の向上が求められている。ところが、我が国における選抜育種への取り組みは著しく遅れていると言って過言ではない。実際、養殖の現場で選抜育種と言え、体長や体重などの見た目を指標に選抜する古典的な表現型選抜を指すことが多く、選抜に際して血統情報が利用されることは稀である。さらに、近親交配の回避策として系統間交配や野生親魚の導入が行われたりするなど、厳密な系統管理がなされないことがほとんどであった。そのため、表現型選抜を試みたとしても、厳密な系統化がなされないまま交配が繰り返されることとなり、系統の創出と喪失が繰り返されてきた (水産研究・教育機構, 2013)。日本の主

要な対象魚種の一つであるトラフグ *Takifugu rubripes* においても、厳密な系統管理は行われていないまま表現型選抜が試行されてきた。そのため、生産者が「優良系統は3世代で喪失する」と述べるように、本種でも系統の創出と喪失が繰り返されることが問題となっている。本種の完全養殖技術は1990年代に確立され（宮木ら, 1992; 中田ら, 1997; 松山ら, 1997）、養殖種苗のほとんどで人工種苗が利用されている。これまでに表現型選抜によりいくつかの「系統」が作出されており、現在でも高成長性や耐病性を持つとされる複数の「系統」が流通している。また、本種は筋肉の高価値もさることながら発達した精巢（白子）が珍重されるため、精巢重量も選抜対象であり、最近では「精巢が発達しやすい系統（早熟系統）」が好んで利用されている。しかし、これらの系統でも系統間交配や野生親魚の導入が行われているため厳密には系統化されておらず、系統の喪失が懸念されている。

これまで系統を維持するには実際の交配記録をもとにした正確な血統情報が不可欠であった。しかし、近年ではマイクロサテライトや一塩基多型（single nucleotide polymorphism, SNP）などの遺伝マーカーを利用することにより、実際の交配記録がなくても、後代個体の解析から血縁関係の推定が可能になった。これにより、血縁関係が曖昧なまま継代されてきた養殖集団においても、遺伝マーカーの利用による血統情報の推定・修正や系統管理が可能となってきた（Hosoya *et al.*, 2018; Moses *et al.*, 2020）。

また、遺伝マーカーの開発は血縁関係の推定だけではなく、選抜育種技術そのものにおいても飛躍的な進歩をもたらした。最初に成果を上げたのが、表現型と連鎖する遺伝マーカーを指標として優良個体を選抜するマーカーアシスト選抜（marker assisted selection, MAS）である。MASは対象形質の遺伝機構が単純で、個体差をもたらす遺伝子座（quantitative trait locus, QTL）の影響力が大きい場合に威力を発揮する。例えば、ヒラメのリンホシスチス症耐性では寄与率が50%と影響力が大きいQTLが見つかり、このマーカーを利用したMASによる耐性系統が作出されて、市場に流通している（Fuji *et al.*, 2006; Fuji *et al.*, 2007）。また、タイセイヨウサケの伝染性膀胱壊死症においても耐性を決定する3つのQTLが特定され、MASで作出された耐病性系統が養殖産業に大きく貢献している（Moen *et al.*, 2015）。しかし、産業上重要な形質の多くは、効果が

小さい多数の遺伝子に支配される多因子形質であり、MAS の効果は著しく限定的である (Wright, 1968; Morton, 1998; Massault *et al.*, 2008)。

MAS の次に成果を上げたのがゲノミックセレクション (genomic selection, GS) 法である。この方法は対象形質が多因子形質である場合に有効である (Meuwissen *et al.*, 2001; Houston *et al.*, 2020)。GS 法では BLUP 法で用いた血縁情報をゲノム多型情報に置き換える。解析集団の表現型データと遺伝子型データを用いて線形回帰モデル (予測モデル) を構築し、この予測モデルに選抜候補の遺伝子型データを代入することで対象形質に関する候補個体の遺伝的能力 (ゲノム推定育種価: genomic estimated breeding value, GEBV) を予測 (ゲノム予測) する。GS 法は BLUP 法では捉えられなかったきょうだい間の能力差を捉えられるため、家系内選抜が可能であり、BLUP 法よりも予測正確度に優れる (Houston *et al.*, 2020)。本手法はすでに乳牛の泌乳量の改良や (Hayes *et al.*, 2009; García-Ruiz *et al.*, 2016)、トウモロコシ *Zea mays* L. やソバ *Fagopyrum esculentum* の収穫性向上で成果を上げている (Massman *et al.*, 2013; Yabe *et al.*, 2018)。水産分野でも 2010 年代後半よりタイセイヨウサケをはじめ様々な魚種で導入が進められている (Ødegård *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2015; Barria *et al.*, 2018)。GS 法には、正確な血縁情報が無く BLUP 法では扱えなかったような集団でも親魚候補の遺伝的能力の予測が可能であるという利点もある。これは GS 法で利用するゲノム多型情報が血縁情報を反映するからである。これらの特徴から、前述の養殖トラフグのような既存の養殖集団に対しても、直ちに GS 法による選抜育種が導入可能であると期待される。すなわち、優良な形質を示しつつも正確な血統情報が無いために喪失が危ぶまれる既存の系統でも、大量の遺伝マーカーを利用することで血統情報を推定することができる。そのため、遺伝的健全性を保てるような交配を行って遺伝的に救済し、さらなる遺伝的改良が図れる可能性が高い。この救済が可能になれば、系統の喪失が危ぶまれる多くの既存系統を活用した選抜育種を行えるため、養殖生産の向上に直結すると期待される。

そこで本研究では、大量の遺伝マーカーによるトラフグの「早熟系統」の遺伝的救済が可能であるか実証することを目的とした。初めに、当該系統に見られる早熟性が遺伝形質であることが検証されていなかったため、第 1 章において早熟系統に属する個体を用いて後代検定を実施し、

早熟性が真に遺伝形質であるかを確認した。また、GS法による選抜育種を行うには、親魚個体の血縁関係を明らかにしておく必要がある。そこで、第2章において、長崎県で流通する養殖トラフグ親魚の遺伝的類縁関係を明らかにし、早熟系統を含む親魚集団の遺伝構造の把握と遺伝的多様性の把握を試みた。MASやGSを実行する際には、対象形質の遺伝機構や遺伝率を明らかにし、適切な選抜計画を策定することが不可欠である。そこで、第3章において、早熟形質の遺伝基盤を明らかにし、当該形質に適した選抜育種法を選定することを目的として、早熟系統を創始とする近交集団を作出してQTL解析を行った。これにより早熟形質が多因子形質であることが明らかになったことから、第4章において、実際に養殖場で飼育される養殖集団を解析魚として、早熟形質のゲノム予測を試み、GS法による選抜育種が可能であるかを実証した。以上の結果から、大量の遺伝マーカーの利用により、正確な血統情報がないために喪失が危ぶまれる多くの既存系統を救済し、選抜育種を継続できるかを実証することを目的とした。

第1章. 早熟系統の遺伝的および内分泌的特徴

1-1. 背景

トラフグは、東アジア地域を中心に盛んに養殖されている重要な養殖対象魚種の一つである (Wang *et al.*, 2016; Hamasaki *et al.*, 2017)。我が国では 1990 年代に種苗生産技術や成熟誘導・人工授精技術が開発され (宮木ら, 1992; 中田ら, 1997; 松山ら, 1997)、それ以降は年間 4,000 トン程度の養殖生産量を維持している (農林水産省統計情報: <https://www.maff.go.jp/j/tokei/index.html>)。特に長崎県では本種の養殖生産が盛んで、国内生産量の 51.2% (2019 年) を占める。本種においては、これまでに表現型選抜によりいくつかの「系統」が作出されてきたが、生産者が「優良系統は 3 世代で喪失する」と述べるように、系統の創出と喪失が繰り返されてきた。

トラフグでは成熟した精巢(白子)が珍味とされる。その価格は筋肉部の約 3 倍となる約 10,000 円/kg で取引されるため (Hamasaki *et al.*, 2013)、精巢の大きさが重要な経済的形質として認知されている。通常、西日本沿岸で養殖されるトラフグの精巢が商業的な取引サイズ (100 g 以上) に達するのは、産卵期の約 2 ヶ月前 (1-2 月) である (藤田, 1962; 服部ら, 2012)。しかし、一部の系統において 12 月初旬 (鍋物商材として最需要期) には 100 g を超える早熟現象が認められ、生産者の間では早熟系統 (本研究において A 系統と呼ぶ) として認知されていた。A 系統はその経済的価値の高さから、長崎県で流通する主要な系統の一つとして好んで利用されている。しかし、この形質が本当に遺伝的形質であるのかどうか科学的な検証はされていなかった。

トラフグにおいては生殖腺の発達と体サイズの相互関係は不明である。多くの動物において、生殖腺と体の大きさ、特に体重は正の相互関係にあることが報告されており、アロメトリーが成立することが知られている (Kenagy and Trombulak, 1986; Oikawa *et al.*, 1992; Gage, 1994; Jonsson *et al.*, 1996; Fairbairn, 1997)。したがって、A 系統に見られる早熟性は体サイズの大型化の副産物である可能性が考えられる。一方で、多くの養殖対象魚種では早熟現象が成長に負の影響を与えるとされており (Okuzawa, 2002; Taranger *et al.*, 2009)、トラフグにおいても早熟系統の選抜が体サイズに悪影響を及ぼすことも想定される。

真骨魚類では生殖生理学の研究が盛んに行われており、オスの成熟における雄性ホルモンの重要性が認識されている (Miura and Miura, 2003; Schulz *et al.*, 2010)。例えば、11-ケトテストステロン (11-KT) は、ニホンウナギ *Anguilla japonica* の精巣において、精原細胞の増殖と精子形成を誘導することが知られている (Miura *et al.*, 1991)。トラフグでは卵成熟におけるステロイドホルモンの役割についていくらかの報告があるが (Matsuyama *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2009)、精巣発達に関連する性ホルモンの関与については明らかにされていない。早熟なオス個体が精巣発達以前に血中ステロイドホルモンに特徴的なパターンを示すならば、これらのホルモンを早熟系統の指標として用いることが可能となり、早熟形質の選抜に利用されることが期待される。すなわち、精巣重量を秤量するために個体を犠牲にする必要がなくなり、さらには飼育の早い段階で優良個体を選抜することが可能となる。例えば、マスノスケ *Oncorhynchus tshawytscha* の早熟個体は、最終成熟の 8 ヶ月前に血中 11-KT の濃度が高くなることで予測できる (Larsen *et al.*, 2004)。同様に、雄性ホルモンの濃度は、サクラマス *Oncorhynchus masou* (Ota *et al.*, 1999)、アマゴ *Oncorhynchus masou rhodurus* (Ueda *et al.*, 1983) およびタイセイヨウオヒョウ *Hippoglossus hippoglossus* (Norberg *et al.*, 2001) などで早熟個体のスクリーニングに利用されている。

本章は、まず、A 系統に見られる早熟性が遺伝形質であることを確認するために、複数の母系半きょうだい集団を用いた後代検定を行った。また、A 系統に見られる早熟性が体サイズの大型化の副産物でないこと、早熟性の選抜により成長に負の影響が及ばないことを確認するために、これらの半きょうだい集団間で精巣重量と体重の相関関係を比較した。さらに、血中ステロイドホルモンによる早熟性の予測が可能であることを検証するために、A 系統および野生オスに由来する個体間で血中エストラジオール-17 β (E2)、11-KT、テストステロン (T) の濃度を経時的に比較した。

1—2. 材料および方法

以後の章を含め、すべての実験は、長崎県総合水産試験場（長崎水試）の魚類実験委員会の承認（#NPIF-0001）を得て、長崎水試が定めた魚類実験ガイドラインに沿って実施した。本研究においては、「系統」を共通の祖先に由来すると考えられる親魚群と定義した。

1—2—1. 供試魚の作出

2011年（検定1）から2014年（検定4）まで年1回、長崎水試で後代検定を行った。すべての検定で、1個体のメスに3個体のオスを交配することで、複数の母系半きょうだい集団を作出して実験に供した（Fig. 1.1）。それぞれの検定では、長崎水試または長崎県内の民間種苗生産機関で飼育されていた野生個体（野生親魚）および人工授精で生産された個体（人工親魚）を親魚として用いた（Table 1.1, Fig. 1.2）。オスの人工親魚については、長崎県内で流通している主要な系統のうち、A系統とB系統に属する個体を使用した（第2章も参照）。なお、メスは精巢を持たないため早熟性の表現型選抜を行うことができない。そのため、本研究ではオス親魚からの遺伝効果のみに着目した。また、各検定ともメス親魚にはA系統以外に属する個体を用い、個体の重複はなかった。

検定1では、A系統に属する個体（A1）、B系統に属する個体（B1）、および野生親魚（W1）の3個体のオスから後代を得て精巢重量と体サイズを比較した。検定2では、A1の子（A2）、B系統の別個体（B2）、野生親魚（W2）の3個体のオス親魚から後代を得て、検定1と同様の比較を行った。もしA系統に見られる早熟形質が遺伝形質であれば、A1とその子であるA2から得た後代はどちらも他の後代に比べて精巢が早く発達することが期待される。検定3と4では、A2を再度使用するとともに、A2と父親が共通する半きょうだい（A3またはA4、いずれもA1の子）と野生親魚（W3またはW4）をオス親魚として用いた。この2つの後代検定では、野生親魚との比較によりA系統の優位性を評価しつつ、A系統に由来する親魚間で遺伝的能力に差があるかを確認した。

すべての供試魚は人工授精で作出した。1個体のメスから得た未授精卵を3つの小群に分け、

各小群を3個体のオスのいずれかと授精させた (Fig. 1. 1)。媒精後の受精卵は、宮木ら (1998) に倣って 0.05%タンニン酸 (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪府大阪市) で 15 秒間処理して付着性を除去したうえで、後代ごとに 1 kl の卵管理水槽に移した。ふ化後は後代ごとに 2 kl 水槽に移して初期飼育を行い (30–33 日間)、その後、8 kl のコンクリート製角型水槽に移して 2 次飼育を行った。飼育方法は宮木ら (1998) に準じ、発達段階に応じて、栄養強化を施した L 型ワムシ、アルテミアノウプリウス幼生および市販の配合飼料 (ラブ・ラァバ, 林兼産業株式会社, 山口県下関市) を与えた。飼育水槽には紫外線殺菌海水を供給し、水温は、初期飼育中は 21.0°C に加温調整し、以後は自然水温とした (17.1–28.9°C)。また、飼育期間中は、おおよそ 1 か月おきに合計 4–5 回ずつ間引きをして飼育密度を調整した。

1–2–2. 同一環境飼育

供試魚の平均標準体長が約 15 cm を超えた時点 (検定 1: 5.4 月齢; 検定 2: 4.9 月齢; 検定 3: 6.3 月齢; 検定 4: 7.0 月齢) で、全個体に個体識別用の Passive Integrated Transponder (PIT) タグ (Bio Mark, アイダホ州ボイシ, アメリカ合衆国) を背筋部に埋設したうえで、一つの水槽に混合した。混合時の個体数、平均標準体長、体重を Table 1. 2 にまとめた。同一環境飼育中は最大収容密度が 6 kg/kl を超えないように、成長に応じて水槽容量を順次スケールアップした。飼育は、標準的な出荷サイズである約 1 kg に達する 2 年目の 12 月初旬まで行った。終了時の月齢はそれぞれ、検定 1 では 20.5 月齢、検定 2 では 20.1 月齢、検定 3 では 21.1 月齢、検定 4 では 21.7 月齢だった。供試魚は市販の配合飼料 (黒潮, 株式会社ヒガシマル, 鹿児島県日置市) を週 3–5 回、一日あたり 1–3 回に分けて飽食給餌した。また、飼育水には紫外線殺菌海水を用い、水温管理は行わなかった (12.7–27.8°C)。飼育期間を通して大量へい死は発生しなかったが、検定 4 でのみ *Heterobothrium okamotoi* (Ogawa, 1991) による寄生虫症が原因と考えられるへい死が発生し、他の検定よりも生残率が低かった (48.8–86.3%, Fig. 1. 3)。

1–2–3. 表現型の取得

供試魚を 2-フェノキシエタノール (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪府大阪市) の過剰投

与 (≥ 600 ppm) で安楽死させてから標準体長と体重を測定し、直ちに開腹して精巢を摘出して精巢重量を測定した。また、体重と生殖腺重量から生殖腺指数 [GSI = $100 \times$ 生殖腺重量 (g) / 体重 (g)] を算出した。なお、各後代検定で供試魚の一部を次世代作出用の親魚候補としてランダムに残し、サンプリングから除外した。後代検定終了時にサンプリングした個体数は、Table 1.3 にまとめた。

1-2-4. 血中性ステロイドホルモンの測定

早熟系統に特徴的な血中性ステロイドホルモン動態が認められるかを調べるため、検定 3 で生産した A2 と W3 の後代の一部を用いて、別途、飼育実験を行った。実験を通じてそれぞれの後代ごとに 1 基の水槽で飼育した。供試魚が 32 日齢に達した時点でそれぞれを 2 kl 水槽に移して実験を開始した。2.7 月齢に達した時点で 1,050 個体ずつを 8 kl コンクリート製角形水槽に移した。その後、おおよそ 1 か月おきに 3 回の間引きを行って飼育密度を調整した。6.9 月齢で各後代が 145 個体ずつになる様に個体数を調整し、その後、7.3 月齢から 28.6 月齢にかけて経時的に毎回 5-10 個体をサンプリングしてオス個体の E2、11-KT および T を測定した。供試魚には週に 3-5 回、市販の配合飼料（黒潮，株式会社ヒガシマル，鹿児島県日置市）を一日あたり 1-3 回に分けて飽食給餌した。各水槽には紫外線処理海水を自然水温で供給した（12.0-26.6°C）。サンプリング時には 2-フェノキシエタノール (≥ 600 ppm) の過剰投与で安楽死させた後に標準体長、体重を測定し、開腹して目視で性判別した。オス個体は肝動脈からヘパリン処理した 5 ml シリンジ (21 G) で採血し、血液サンプルを直ちに氷上に移した。続けて、精巢を摘出して重量を測定し、GSI を算出した。その後、血液サンプルは $644 \times g$ 、4°C で 5 分間遠心分離し、血漿を取得して分析まで -30°C で保存した。分析直前に血漿サンプルからジエチルエーテル（富士フィルム和光純薬株式会社，大阪府大阪市）を用いてステロイドホルモンを抽出し、市販の酵素免疫抗体法 (enzyme immunoassay, EIA) キット (Cayman Chemical, ミシガン州アナーバー, アメリカ合衆国) を用いて E2、11-KT および T の血中濃度を測定した。

1—2—5. 統計解析

統計解析には R (R 3.4.4) を用いた (R Core Team, 2018)。はじめに、後代検定ごとに以下の一般化線形モデル (generalized linear model, GLM) を用いて精巣重量に対する父性効果を評価した (Script 1.1)。すなわち、モデル 1 とモデル 2 は残差の分布にガウス分布を仮定し、モデル 3 と 4 では残差の分布にガンマ分布を仮定した。また、モデル 1 とモデル 3 は固定効果として父性効果を仮定し、モデル 2 と 4 では固定効果を仮定しなかった。

モデル 1 : 精巣重量 = 平均値 + 父性効果 + 残差 (父性効果あり、ガウス分布)

モデル 2 : 精巣重量 = 平均値 + 残差 (父性効果なし、ガウス分布)

モデル 3 : 精巣重量 = 平均値 + 父性効果 + 残差 (父性効果あり、ガンマ分布)

モデル 4 : 精巣重量 = 平均値 + 残差 (父性効果なし、ガンマ分布)

各モデルについて *glm* 関数を用いて赤池情報量規準 (Akaike's information criterion, AIC) と Akaike weight (w) (Akaike, 1973; Burnham and Anderson, 2002) を算出し、最も高い w を持つモデルを最良モデルとして選択した。2 つ以上のモデルが $w \geq 0.4$ であった場合、自由度が最も小さいモデルを最良とした。さらに自由度にも差がない場合は、AIC 値が最小のモデルを選択した。ガンマ分布とガウス分布のリンク関数には、それぞれ *Inverse* と *Identity* を用いた。父性効果ありモデルが選択された場合は、*emmeans* パッケージ (ver. 1.3.4) の *lsmeans* 関数を用いて、各父親の効果の最小二乗平均と 95%信頼区間を推定し、Tukey の post-hoc pair-wise 比較で有意差検定を行った ($P < 0.05$) (Lenth, 2019)。なお、本章の文中で 95%信頼区間とともに記載される平均値は、特に注釈のない限り最小二乗平均を表している。標準体長、体重および GSI についても同様に、GLM のモデル比較によって父性効果を評価した。

次に、精巣の大型化が体サイズの大型化の副次的な結果か、あるいは体サイズの大型化と独立しているかを精査するために、各後代検定で精巣重量と体重の関連性を以下の GLM のモデル比較で調べた (Script 1.2)。なお、体重には精巣重量が含まれるため、ここでは補正体重 (体重から精巣重量を除いた値) を用いた。すなわち、モデル 1 とモデル 2 は残差の分布にガウス分布を

仮定し、モデル 3 と 4 では残差の分布にガンマ分布を仮定した。また、モデル 1 とモデル 3 は固定効果として補正体重と父性効果ならびに両者の交互作用を仮定し、モデル 2 と 4 では交互作用を仮定しなかった。なお、右辺の平均値項は省略した。

モデル 1： 精巣重量 = 補正体重 × 父性効果 + 残差 (交互作用あり、ガウス分布)

モデル 2： 精巣重量 = 補正体重 + 父性効果 + 残差 (交互作用なし、ガウス分布)

モデル 3： 精巣重量 = 補正体重 × 父性効果 + 残差 (交互作用あり、ガンマ分布)

モデル 4： 精巣重量 = 補正体重 + 父性効果 + 残差 (交互作用なし、ガンマ分布)

モデル選択後に交互作用項なしのモデル (モデル 2 あるいはモデル 4) が支持された場合は、後代間で補正体重と精巣重量の回帰直線の傾きに有意差はなく、両者の相関は後代間で変わらないことを示す。このモデルが採用された場合には、父性効果を Tukey の post-hoc pair-wise 法で比較した ($P < 0.05$)。交互作用がある場合は、回帰直線の傾きに有意差があることを示す。この場合、傾きに対して考察を行う。

最後に、A2 と W3 の後代間で体サイズ、精巣重量ならびに血中性ステロイドホルモン濃度の経時変化を比較し、GLM で父性効果の有意性を検定した (Script 1. 3)。固定効果として父性効果、月齢、ならびに父性効果と月齢の交互作用項を考慮した。すなわち、モデル 1 とモデル 2 は残差の分布にガウス分布を仮定し、モデル 3 と 4 では残差の分布にガンマ分布を仮定した。また、モデル 1 とモデル 3 は固定効果として月齢と父性効果ならびに両者の交互作用を仮定し、モデル 2 と 4 では交互作用を仮定しなかった。ここでも右辺の平均値項は省略した。

モデル 1： 測定値 = 月齢 × 父性効果 + 残差 (交互作用あり、ガウス分布)

モデル 2： 測定値 = 月齢 + 父性効果 + 残差 (交互作用なし、ガウス分布)

モデル 3： 測定値 = 月齢 × 父性効果 + 残差 (交互作用あり、ガンマ分布)

モデル 4： 測定値 = 月齢 + 父性効果 + 残差 (交互作用なし、ガンマ分布)

モデル選択の結果、交互作用項を含むモデルが支持されなかった場合、各測定値の経時変化のパターンは2つの後代間で差が無いと言える。前述のとおり *lsmeans* 関数を用いた *pair-wise* 比較による *post-hoc* テストを行い、試験期間を通じた父性効果について有意差検定を行った ($P < 0.05$)。一方、交互作用項を含むモデルが支持された場合には、父性効果は月齢ごとに異なると言える。このときは月齢ごとに父性効果を有意差検定した ($P < 0.05$)。

1—3. 結果

1—3—1. 後代検定

4回の後代検定を実施し、A系統の早熟性が遺伝形質であるかを調べた (Table 1. 4)。各後代の表現型の実測値と GLM で推定した 95%信頼区間を Fig. 1. 4-7 に示した。

検定 1 および検定 2 では、A 系統、B 系統、野生親魚に属するオス親魚に由来する 3 つの母系半きょうだい集団を作出し、精巣重量に対する父性効果の有無を調べた。その結果、いずれの検定でも父性効果を含むモデルが支持された (Table 1. 5)。検定 1 では、A1 の後代は平均精巣重量 (95%信頼区間) が 148.0 g (130.1–165.8 g) と大きく、B1 の後代 (60.8 g, 33.1–88.6 g, $P < 0.0001$) および W1 の後代 (92.1 g, 69.5–114.8 g, $P < 0.0004$) に対し、早熟性が顕著であった (Fig. 1. 6a)。検定 2 においても、A2 の後代は精巣重量が 108.5 g (94.1–122.9 g) と 100g を超えており、B2 の後代 (25.7 g, 9.1–42.3 g, $P < 0.0001$) および W2 の後代 (35.8 g, 19.7–51.9 g, $P < 0.0001$) を大きく上回った (Fig. 1. 6b)。父性効果を含むモデルは、標準体長、体重および GSI の各形質においても支持され、A 系統に属するオス親魚は精巣重量だけではなく、体サイズにおいても他系統よりも大きいことが示された (Table 1. 4, Fig. 1. 4, 5, 7)。

検定 3 と検定 4 では、A 系統内の複数のオス親魚と野生親魚について各親由来の後代間で精巣重量と標準体長ならびに体重を比較した。これらの後代検定においても、すべての形質について父性効果ありのモデルが支持された。検定 3 では、オス親魚として A2 および A2 の半きょうだい (A3)、野生親魚 (W3) を用いた。A2 の後代の精巣重量は 116.9 g (105.1–128.7 g) であったのに対し、W3 の後代は 38.6 g (26.5–50.7 g) で、改めて野生親魚に対する A2 の優位性が示された ($P < 0.0001$) (Fig. 1. 6c)。一方、A3 の後代の精巣重量 (56.0 g, 41.8–70.2 g) は、W3 の後代との間に有意差は認められず ($P = 0.1582$)、A2 の後代よりも有意に小さかった ($P < 0.0001$)。検定 4 では、A3 の全きょうだいである A4 を比較に用いた。その結果、A2 の後代が 116.8 g (103.7–129.9 g)、A4 の後代が 84.6 g (71.5–97.7 g)、W4 の後代が 25.1 g (10.4–39.8 g) であり、A2 および A4 の後代はどちらも W4 の後代よりも精巣重量が大きかった (A2–W4: $P < 0.0001$; A4–W4: $P < 0.0001$) (Fig. 1. 6d)。また、A2 の後代は、検定 1 および 2 と同様に、標準体長、体

重および GSI においても他の親魚の後代よりも大きかった (Table 1. 4; Fig. 1. 4, 5, 7)。

次に、早熟形質が体サイズ増大の副産物であるかどうかを検討するために、父性効果と補正体重に加えてそれらの交互作用が含まれるモデルと含まれないモデルとの間でモデル選択を行った。検定 1、2 および 3 では、交互作用項なしのモデルが支持され、精巣重量と補正体重の相関は後代間で差が無いことが示唆された (Table 1. 6)。検定 4 では、交互作用を含むモデル 1 が最も高い w を示したが、交互作用を含まないモデル 2 も w が 0.4 以上であった。このため、ここではより自由度が小さいモデル 2 を選択した。なお、いずれの検定でも、2 つの形質の間の相関係数 (直線の傾き) は正の値をとった (検定 1: $r=0.13$; 検定 2: $r=0.10$; 検定 3: $r=0.17$; 検定 4: $r=0.17$) (Table 1. 7; Fig. 1. 8)。

選択されたモデルを用いて、補正体重の効果を排除して後代間の精巣重量 (95%信頼区間) を比較した (Table 1. 8)。検定 1 では、A1 の後代の精巣重量 (127.8–155.6 g) は、B1 の後代 (30.3–73.4 g, $P<0.0001$) および W1 の後代 (90.0–126.3 g, $P=0.0131$) よりも有意に大きかった。検定 2 では、A2 の後代 (78.8–109.2 g) は、B2 の後代 (20.5–52.7 g, $P<0.0001$) および W2 の後代 (28.6–58.8 g, $P=0.0001$) よりも有意に大きく、A 系統の優位性が再確認された。検定 3 および 4 においても A2 の後代が他よりも優れていた。すなわち、検定 3 では A2 の後代 (90.7–113.2 g) は、A3 の後代 (40.0–64.6 g, $P<0.0001$) および W3 の後代 (45.0–69.0 g, $P<0.0001$) よりも大きく、検定 4 においても A2 の後代 (91.8–112.3 g) が A4 の後代 (61.8–82.0 g, $P<0.0001$) および W4 の後代 (46.1–73.4 g, $P<0.0001$) を有意に上回った。なお、ここで採用したモデルでは A4 と W4 の後代間では差が認められなかった ($P=0.4003$)。

1—3—2. ステロイドホルモンの経時変化

4 回の後代検定の結果より、A 系統の早熟性が繰り返し確認された。次に、早熟性の指標として血中性ステロイドホルモン濃度が利用可能であるか検討するため、A2 と W3 から作出した後代を用いて 11-KT、T、E2 の血中濃度の経時変化を比較した。GLM 解析の結果、父性効果と月齢の間の交互作用は、各性ステロイドに加えて精巣重量と GSI でも支持されたが、標準体長お

よび体重では支持されなかった (Table 1. 9)。各後代における月齢間の有意水準を Table 1. 10–16 にまとめた。

まず、この期間における精巣および体サイズの発達を両後代間で比較した。サンプリングした各後代のオス個体数は、最少で 2 個体 (A2: 28.6 月齢)、最大で 8 個体 (W3: 19.0 月齢) であった (Fig. 1. 9)。飼育期間を通して精巣重量が最大となったのは、A2 の後代では 26.1 月齢で W3 の後代では 24.0 月齢であった。精巣重量が最大となった月齢における平均値 (95%信頼区間) は、A2 の後代では 219.3 g (142.7–471.7 g)、W3 の後代では 163.1 g (111.5–304.9 g) であり、A2 の後代の方が大きい傾向にあったものの両者に有意差は認められなかった ($P = 1.0000$) (Fig. 1. 9a)。2 つの後代間の有意差は、19.0 月齢 (10 月上旬) から認められ、19.0 月齢 (A2: 4.7 g, 3.2–8.8 g; W3: 1.4 g, 1.1–2.1 g, $P = 0.0001$) から 21.1 月齢 (A2: 138.9 g, 94.8–259.7 g; W3: 34.3 g, 23.4–64.1 g, $P = 0.0021$) までは、A2 の後代が W3 の後代よりも有意に精巣重量が大きかったが、この差は後に消失した。また、GSI にも同様の傾向が観察された (Fig. 1. 9b)。両後代とも、24.0 月齢においてすべてのオス個体が成熟し、触診により精液が総排泄腔から流出した。標準体長と体重の GLM 解析では、交互作用項なしのモデルが支持され (Table 1. 9)、これら 2 つ表現型の増加パターンは後代間で差が無かったと言えた。一方で、飼育期間を通して A2 の後代は W3 の後代よりも常に大きかった ($P < 0.0001$) (Fig. 1. 9c, d)。

血中ステロイドにおいては、後代間で精巣重量と GSI に有意差が現れた 19.0 月齢の約 6 か月前からすでに血中 E2 濃度 (95%信頼区間) に差が認められた。13.4 月齢 (A2: 45.0 pg/ml, 34.1–66.1 pg/ml; W3: 24.7 pg/ml, 19.2–34.5 pg/ml, $P = 0.0081$) から 18.1 月齢 (A2: 100.3 pg/ml, 79.6–135.7 pg/ml, W3: 44.3 pg/ml, 33.6–65.1 pg/ml, $P = 0.0012$) までは、A2 の後代が W3 の後代よりも有意に高かった (Fig. 1. 10a)。しかし、E2 濃度の差は後代間で精巣重量と GSI に差が現れた 19.0 月齢に消失した後、20.0 月齢では反転傾向を示し、22.1 月齢においては W3 の後代が A2 の後代よりも有意に高かった (A2: 109.4 pg/ml, 83.0–160.5 pg/ml; W3: 256.4 pg/ml, 194.6–375.9 pg/ml, $P = 0.0012$)。血中 E2 濃度のピークは A2 の後代が 24.0 月齢、W3 の後代が 22.1 月齢であった。一方、血中 11-KT および T においては、精巣が増大し始めた時期に有意差が認められた (Fig. 1.

10b, c)。両後代間の 11-KT 濃度の有意差は、19.0 月齢 (A2: 303.0 pg/ml, 231.5–437.6 pg/ml; W3: 163.9 pg/ml, 134.6–209.5 pg/ml, $P=0.0010$)、20.0 月齢 (A2: 371.7 pg/ml, 284.1–536.8 pg/ml; W3: 213.2 pg/ml, 163.1–308.2 pg/ml, $P = 0.0185$) および 20.5 月齢 (A2: 370.4 pg/ml, 290.7–511.8 pg/ml; W3: 250.6 pg/ml, 200.4–334.4 pg/ml, $P = 0.0415$) で観察された。血中 T 濃度の有意差は 20.0 月齢 (A2: 1,166.9 pg/ml, 848.2–1,869.2 pg/ml; W3: 603.1 pg/ml, 438.4–966.2 pg/ml, $P = 0.0251$) および 20.5 月齢 (A2: 1,368.0 pg/ml, 1,024.6–2,061.9 pg/ml; W3: 774.6 pg/ml, 592.4–1,117.3 pg/ml, $P = 0.0184$) で認められた。これらの雄性ホルモンの血中濃度は、両後代とも 24.0 月齢で最大となった。なお、すべてのステロイドホルモン濃度は GSI が最大になった 24.0 月齢以降に減少に転じた。

1-4. 考察

本章では、長崎県内で流通している特定のトラフグ系統（A 系統）に見られる早熟現象が、遺伝的形質であるかどうかを後代検定により検証した。あわせて、早熟形質が体サイズ依存的であるかを検討した。また、トラフグオスの精巣発達に関連する血中性ステロイド濃度について経時的に追跡し、早熟性の指標となり得るかを検証した。

後代検定 1 と 2 では、A 系統、B 系統および野生親魚に由来する後代の早熟性を比較した。検定 1 では、A1 の後代は、他の 2 つの後代と比較して精巣の発達が早いことが確認され、検定 2 では A1 の子である A2 に由来する後代の早熟性が確認された。これらの結果から、A 系統の早熟性が遺伝形質であることが示唆された。A2 の後代に見られた早熟性は検定 3、4 においても再確認された。また、検定 3 および 4 で A 系統内の複数個体の後代を評価したところ、A2 とその異母きょうだいである A3 および A4 の間で、後代の早熟性に差が認められた。すなわち、A4 の後代の精巣重量は A2 の後代と野生親魚である W4 の後代の中間であり、また、A3 の後代の精巣重量は W3 の後代と差が無かった。これらの表現型のばらつきから、この形質が主に相加的遺伝効果に支配されていることが示唆された。一方で、それぞれの後代検定は実施した年が異なり、環境条件（例えば水温）の変動があったことから、このばらつきは遺伝子型と環境間の相互作用（genotype by environment-interactions, G×E）が原因で生じたことも考えられた。本研究では、G×E がトラフグの早熟性にどれほどの影響を及ぼすのかを評価することはできない。しかし、タイセイヨウサケ（Wild *et al.*, 1994）やニジマス *Oncorhynchus mykiss*（Kause *et al.*, 2003）などのサケ科魚類では、成熟が G×E の影響を受けていることが報告されている。また、これらの研究では、選抜育種プログラムの検討段階で G×E の関与を評価することの重要性が言及されている。今後は、トラフグの早熟性に対する G×E の影響に関する研究が望まれる。

生殖腺重量と体サイズの間に見られる正の相関は多くの動物で報告されている（Kenagy and Trombulak, 1986; Oikawa *et al.*, 1992; Gage, 1994; Jonsson *et al.*, 1996; Fairbairn, 1997）。一方で、ニジマス（McClure *et al.*, 2007）、タイセイヨウオヒョウ（Immsland and Jonassen, 2005）、マスノスケ（Campbell *et al.*, 2003）などのいくつかの養殖魚種では、生殖腺の早期発達が成長に悪影響を及

ぼすことが知られている。今回のトラフグの後代検定では、精巣重量と補正体重の間に正の相関が観察され、両者の相関係数には集団間で差が認められなかった。しかし、補正体重の影響を除外した後も A 系統の後代は他系統や野生個体の後代に比べて精巣が大きいことが示された。この結果は、A 系統で見られる早熟性は体重の大型化に付随する形質ではなく、体サイズに依存しないことを示している。また、精巣重量の増加に着目して選抜を行えば間接的に体重を改良できる可能性も示唆する。多くの養殖魚種にとって、成長性は最も優先される育種対象形質である。育種の取り組みが遅れているトラフグにおいても、体サイズの改良は重要である。今後、早熟性の遺伝率および精巣重量と体重の遺伝相関を明らかにし、これらの形質に対する同時選抜の可能性を検証する研究が求められる。

本研究で注目したトラフグの早熟性はオスでのみ評価可能な形質であり、メスから表現型値を取得することはできない。乳牛や豚では泌乳量や産仔数などのメスに特異的な形質においても、後代検定によりエリートオスの選抜が行われている (Avalos and Smith, 1987; Georges *et al.*, 1995)。トラフグでも同様に、早熟に関するメス親の遺伝的能力を後代検定で評価することは可能と考えられるが、それには多大な労力が要求される。そのため、養殖現場では父側の遺伝的能力を重視した表現型選抜が行われている (第 2 章も参照)。本研究で実施した後代検定においては、早熟系統を含む複数のオスを非早熟系統のメスと交配することにより、早熟性に及ぼす母性の効果を各検定内で僅少化できるようにした。また、検定 2、3 および 4 においては、それぞれ別のメス個体を利用している。このような実験系において A2 の優位性が繰り返し確認されたことから、早熟性に対する父性の遺伝効果の存在は明らかである。一方、早熟性が相加的遺伝形質であることも示唆されたため、後代は両親のいずれからも遺伝的影響を受けると考えられる。BLUP 法や GS 法では表現型の有無に関わらず個体の育種価が推定可能であり、上述した家畜の泌乳量や産仔数においても、両性の推定育種価も利用した選抜が行われている (García-Ruiz *et al.*, 2016; Vitezica *et al.*, 2016)。トラフグ早熟形質においても、今後は両親の育種価を指標とした選抜を行うことで選抜効率を向上できると考えられる。

現在のところ、精巣重量の評価は開腹して精巣を摘出する以外に方法がなく、評価した個体を

そのまま親魚として利用することはできない。そこで、血中ステロイドによって早熟性が予測可能なかを検討した。A 系統と野生親魚の後代間には、体サイズの発達パターンや血中ステロイド濃度の経時変化に明瞭な差が認められた。興味深いことに、精巣の増大時期よりも早い時期に雌性ステロイドである E2 濃度に差がみられ、A 系統の後代は野生親魚の後代よりも高い値を示した。真骨魚類においては、E2 は主要な雌性ホルモンの一つとされるが (Devlin and Nagahama, 2002)、オス個体でも低濃度で存在することが知られている (Miura *et al.*, 1999; Chaves-Pozo *et al.*, 2007; Shahjahan *et al.*, 2010)。オスにおける E2 の詳細な機能は明らかになっていないが、ヨーロッパヘダイ *Sparus auratus* に E2 を投与すると、精巣内での細胞増殖、脂質代謝、細胞伝達など、生物学的过程に関与する様々な遺伝子の発現が誘導される (Pinto *et al.*, 2006)。さらにニホンウナギでは、*in vivo* および *in vitro* の実験により E2 は精巣幹細胞の再生産を制御していることが明らかになっている (Miura *et al.*, 1999)。トラフグの近縁種であるクサフグ *Takifugu alboplumbeus* のオスでは、未成熟期における血中 E2 濃度が成熟期よりも高く、E2 が精巣発達において重要な機能を持っていると推測されている (Hamasaki *et al.*, 2013)。これらのことから、トラフグにおいても、精巣発達時期の約 6 ヶ月前の高い血中 E2 濃度が、早熟性の指標となる可能性が示された。今後、個体レベルで E2 の血中濃度を経時的に追跡したり、精巣発達開始前に E2 を投与したりすることにより、本種の精巣発達における E2 の作用機序を明らかにしたいと考えている。

真骨魚類における主要な雄性ホルモンである 11-KT は、ニホンウナギ (Miura *et al.*, 1991)、イトウ *Hucho perryi* (Amer *et al.*, 2001)、キングヨ *Carassius auratus* (Kobayashi *et al.*, 1991)、ブリ (Higuchi *et al.*, 2017) などにおいて、精原細胞の増殖や精子形成への関与が報告されている。本研究の結果はこれらの先行研究と一致しており、トラフグにおいても精巣の最終的な発達と 11-KT 濃度の上昇が同期して観察された。雄性ホルモンの一つである T も、11-KT と同時期に血中濃度の上昇が認められた。T は、11-KT と類似した作用機序を有することに加え (Rodríguez *et al.*, 2000; de Waal *et al.*, 2008; Le Gac *et al.*, 2008)、E2 の前駆体の一つであることも報告されている (Tanaka *et al.*, 1992; Nagahama and Yamashita, 2008)。また、ウロハゼ *Glossogobius olivaceus* やマイワシ *Sardinops melanostictus* のオスでは成熟期においても 11-KT は検出されないことから、T

が精巣発達に寄与していると考えられている (Asahina *et al.*, 1985; Matsuyama *et al.*, 1991)。本研究では、血中 T 濃度は 11-KT よりも増加が顕著であったことから、トラフグの精巣発達においても 11-KT よりも T の方が重要な役割を担っている可能性が考えられた。これらの雄性ホルモン濃度の上昇は、春季発動 (精巣の発達と精子形成の開始) の引き金になっていることが考えられるが、その詳細な作用機序は不明である。トラフグの早熟現象を理解するには、順遺伝学的解析による責任遺伝子の同定や GnRH 経路などの内分泌系に着目した研究により精巣発達のメカニズムを解明する必要がある。

以上のとおり、本章において、A 系統で見られる早熟性が相加的な遺伝的効果に支配された遺伝形質であること、体サイズ依存的ではないこと、早熟性が内分泌の挙動で予測可能であることが示された。

第2章. 養殖用親魚集団の遺伝的構造解析

2-1. 背景

トラフグは完全養殖技術が確立した1990年代以降、種苗生産機関への技術普及が進められた(中田, 2001)。現在では、年間700万個体程度の養殖用人工種苗が販売されている(特定非営利活動法人アクアカルチャーネットワーク, ACN レポート第51号: <http://www.acn-npo.org/index.html>)。養殖用人工種苗の生産には、主に野生親魚のメスと人工親魚のオスが用いられてきた。野生のメスが用いられたのは、近親交配を回避することに加え、天然海域で漁獲されたメス個体から体サイズが大きいものを選別することで採卵量が確保できるといったコスト的な理由による。最近では一部の種苗生産機関において、積極的に人工親魚同士の交配も行われている。人工親魚の作出過程では生産機関独自の選抜が行われており、日本の代表的な養殖魚種であるマダイやヒラメと同様に(Murata *et al.*, 1996; 澤山・高木, 2012)、養殖場における飼育情報を得て好成績の個体を買戻して親魚に利用することが多い。すなわち、養殖トラフグにおける選抜育種では少数エリートの表現型選抜が主流となっている。これまでに、高成長性や耐病性を持つとされる複数の「系統」が作出されている。一方で、評判の良い養殖集団は他の種苗生産機関由来であっても積極的に親魚として導入されており、親魚間の類縁関係が不明確なまま交配されることもあって、厳密な系統管理は行われていない。そのため、数世代のうちにその優位性が失われてしまうことが繰り返されてきた。したがって、A系統を含め、長崎県内で利用されている既存の系統を遺伝的に救済し、選抜育種を続けていくためには、親魚集団全体で親魚間の遺伝的類縁関係を明らかにする必要がある。

本章では、A系統を含む長崎県内の親魚集団内における個体間の類縁関係を明らかにするために、集団遺伝学的解析を行った。解析には長崎県内で養殖用種苗生産のために保有されているトラフグ親魚集団を用い、マイクロサテライトマーカーを用いて遺伝構造を解析した。併せて、種苗生産機関が記録する各親魚の血統情報の聞き取り調査も行い、遺伝解析の結果との比較からその正確性を検証した。

2-2. 材料および方法

2-2-1. 解析魚の収集

2015年および2016年に、養殖用種苗生産の親魚として長崎県内の民間種苗生産機関で飼育されていたトラフグを用いた。鱗または精液として提供された材料を、99.5%エタノールに浸漬し、解析まで-30℃で保存した。同時に、各解析魚の由来（野生魚か人工魚か？もし人工魚ならいずれかの系統に属するか？など）と、実際に市販種苗の生産に利用されているか否かについて、民間種苗生産機関へ聞き取り調査を行った。収集したトラフグが人工魚だった場合は、当該個体の両親に野生魚が用いられていたかを確認した。

2-2-2. マイクロサテライト多型解析

ゲノムDNAはDNeasy Blood and Tissue KIT (Qiagen, Qiagen, ハイデン, ドイツ) を用いてメーカーのプロトコルに従って抽出した。抽出したDNAを鋳型としてPCRによりマイクロサテライト座を増幅した。使用した13プライマーセットの情報をTable 2.1にまとめた。これらのマーカーはKai *et al.* (2011) で設計されたもので、そのうち11セットは当該研究で報告されている。PCR反応液は以下の条件で調製した。すなわち、1 μL の10 \times PCR Buffer (タカラバイオ株式会社, 滋賀県草津市)、0.9 μL のdNTP Mixture (各2 mM, タカラバイオ株式会社, 滋賀県草津市)、0.05 μL のForward primer (10 pmol/ μL)、0.5 μL のReverse primer (10 pmol/ μL)、1.25 μL の蛍光標識M13 primer (10 pmol/ μL , Thermo Fisher Scientific, マサチューセッツ州ウォルサム, アメリカ合衆国)、0.04 μL のr-Taq DNA Polymerase (5 U/ μL , タカラバイオ株式会社, 滋賀県草津市) を含むプレミックスに2.5 μL のDNAテンプレート(およそ10 ng/ μL)を加え、滅菌蒸留水で合計10 μL とした。この反応液をiCycler (Bio-Rad, カリフォルニア州ハーキュリーズ, アメリカ合衆国)を用いて以下の条件のPCRに付した。94℃、3分間の熱変性反応を行った後に、94℃で10秒間、59℃で30秒間の増幅反応を37サイクル行い、最後に59℃で3分間の最終伸長反応を行った。PCR産物をABI 3130 (Applied Biosystems, カリフォルニア州フォスターシティ, アメリカ合衆国)による電気泳動に付し、得られた波形データをGene Mapper Software 4.0 (Applied

Biosystems, カリフォルニア州フォスターシティ, アメリカ合衆国) で可視化して遺伝子型を決定した。

2-2-3. 遺伝解析

最初に、各系統と野生親魚群について遺伝的多様性を評価した。平均アレル数 (MNA)、有効アレル数 (ENA)、ヘテロ接合度の期待値 (He) および観測値 (Ho)、近交係数 (Fis) の算出には GenAlEx 6.51b2 (Peakall and Smouse, 2012) を用いた。また、アレリックリッチネス (AR) を FSTAT 2.9.4 (Goudet, 2003)、多型情報量 (PIC) を CERVUS (Kalinowski *et al.*, 2007) でそれぞれ算出した。これらに加えて集団の有効な大きさ (Ne) を NeEstimator 2.1 (Do *et al.*, 2014) を用いて推定した。推定には、Linkage disequilibrium (LD) 法 (Waples and Do, 2008) と Molecular coancestry (MC) 法 (Nomura, 2008) を用いた。LD 法では最少アレル頻度を 5% とし、ランダムモデルを用いた。

次に、集団内ならびに集団間の遺伝的異質性を検討するために Arlequin 3.5.2 (Excoffier and Lischer, 2010) を用いて分子分散分析 (AMOVA) を行った。10,000 回の permutation test を行って異質性を検定した。また、FSTAT 2.9.4 で pairwise $wcFst$ (Weir and Cockerham, 1984) を算出して集団間の分化の程度を評価した。10,000 回の permutation test を試行し、帰無仮説 ($wcFst=0$) を片側 5% の有意水準 (ボンフェローニ補正後) で評価した (Rice, 1989)。さらに、個体間の遺伝的類似性を GenAlEx 6.51b2 を用いた主座標分析 (Principal Coordinate Analysis, PCoA) で評価した。解析個体間の距離には codominant genotypic distance を用い、分析には distance-standardized option を用いた。また、個体間の遺伝的類縁関係について、Populations 1.2.31 (Langella, 1999) を用いて算出した遺伝距離 (Nei's Da) (Nei *et al.*, 1983) をもとに、FigTree 1.4.4 (Rambaut, 2012) を用いて近隣結合法 (NJ 法) により推定した。

最後に、集団の遺伝的構造を STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) を用いて推定した。祖先集団数 (K) を 1 から 10 まで変化させながら、各 K について Markov chain Monte Carlo 法を独立に 10 ラン試行した (総反復数: 80,000 回、burn-in: 30,000 回)。出力結果を Structure Harvester

(Earl and vonHoldt, 2012) に入力して ΔK (Evanno *et al.*, 2005) を算出した。各個体の祖先集団に対する帰属率を CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson and Rosenberg, 2007) で推定し、DISTRUCT 1.1 (Rosenberg, 2004) で可視化した。

2-3. 結果

2-3-1. 解析魚の履歴

収集した 56 個体について、系統情報などの履歴に関する聞き取り結果を Table 2. 2 にまとめた。56 個体のうち、オスは 34 個体、メスは 22 個体であった。オスはすべて人工魚で、メスは半数以上 (15/22 個体) が野生魚であった。人工魚の由来として、3 つの系統 (A-C 系統) が挙げられ、その内訳は、A 系統が 8 個体、B 系統が 23 個体、C 系統が 10 個体であった。人工親魚について両親を確認した結果、人工魚同士の交配によるものと、野生魚メスと人工魚オスの交配によるものが存在しており、野生魚同士の交配によるものは認められなかった。

2-3-2. 系統内の遺伝的多様性

解析に用いた 13 マイクロサテライト座のうち 12 座で多型が得られた (Table 2. 3-14)。12 座の多型情報を用いて算出した遺伝統計量を、系統および野生親魚ごとにまとめた結果を Table 2. 15 に示した。また、マーカーごとの要約結果を Table 2. 16 にまとめた。各マイクロサテライト座におけるアレル頻度の最大値は、野生親魚が 10.0-30.0% と最も低く、A 系統が 31.3-50.0%、B 系統が 15.2-52.2%、C 系統が 25.0-55.0% であった。有効アレル数 (ENA) は野生親魚で最も高く (10.76)、次いで B 系統 (6.62)、A 系統 (4.47)、C 系統 (3.86) の順で高かった。ヘテロ接合度の期待値 (He) は、野生親魚が 0.90 と最も高く、次いで B 系統 (0.83)、A 系統 (0.77)、C 系統 (0.73) の順となった。いずれの統計量でも野生親魚がもっとも遺伝的多様性が高く、A 系統と C 系統が B 系統よりもやや低いという結果が示された。

アレル数を個体数 (6 個体) によって標準化したアレルリッチネス (AR) は野生親魚 (8.54)、B 系統 (6.51)、A 系統 (5.94) の順に高く、最も低い C 系統は野生親魚の半分程度 (4.73) であった。特定のマーカー座において子の持つ 2 つのアレルがどちらの親に由来するか特定できる確率を示す多型情報量 (PIC) は、野生親魚が 0.89 と最も高く、次いで B 系統 (0.82)、A 系統 (0.74)、C 系統 (0.69) の順となった。実際に行われた交配と任意交配とのずれを表す近交係数 (Fis) は、野生親魚 (0.04) と B 系統 (-0.03) は 0 に近かったが、A 系統は -0.16、C 系統は

-0.13 であった。いずれの統計量でも野生親魚がもっとも遺伝的多様性が高く、A 系統と C 系統が B 系統よりもやや低いという結果が示された。

有効親魚数 (N_e , 95%信頼区間) は LD 法と MC 法のいずれでも野生親魚が最大となり (LD 法: 342.2, 59.0-∞; MC 法: 66.5, 4.9-207.3)、A 系統 (LD 法: 20.3, 9.0-253.1; MC 法: 15.1, 3.9-36.9)、B 系統 (LD 法: 9.5, 7.8-11.6; MC 法: 10.4, 7.2-14.2) および C 系統 (LD 法: 25.5, 11.5-309.4; MC 法: 11.3, 4.1-22.0) を大きく上回った。有効親魚数に関しても野生親魚がもっとも多かったが、B 系統が A 系統、C 系統よりも少ない傾向にあった。

2-3-3. 集団の分化

初めに、AMOVA 分析により解析魚全体にどの程度の遺伝的分化が生じているかを検討した。その結果、集団 (各系統および野生親魚) 間に遺伝的分化が生じており ($P < 0.001$)、全体の分散の 6.63% が集団間の差で説明された (Table 2. 17)。次に 2 集団間の pairwise wcF_{st} を求めて遺伝的分化の程度を推定した結果、すべての組合せで遺伝的分化が認められた (ボンフェローニ補正済み $P < 0.05$)。集団の組合せをみたところ、C 系統と他の 3 集団間にみられる分化 (0.074-0.098) が、他の 3 集団間で検出された値 (0.041-0.054) よりも高かった (Table 2. 18)。

2-3-4. 主座標分析

多型性が確認できた 12 遺伝子座の遺伝子型情報を用いて主座標分析を行った (Fig. 2. 1)。第 1 主座標 (寄与率 = 12.4%) では、B 系統と C 系統とが大きく分かれ、A 系統と野生親魚は B 系統寄りの値を示した。第 2 主座標 (9.3%) では野生親魚と B 系統の分散が大きく、両集団が分かれる傾向にあった。一方、第 3 主座標 (8.4%) においては、B 系統内での分散が最も大きく、A 系統と C 系統とが類似した分布を示した。また、第 3 主座標では野生親魚と B 系統の一部とが分かれる傾向にあった。

2-3-5. 遺伝距離にもとづく類縁関係

個体間の遺伝距離 D_a に基づく類縁関係においても、C 系統が他の系統や野生親魚から遺伝的

に独立している傾向が示された (Fig. 2.2)。また、B 系統も野生親魚から独立する傾向にあった。B 系統のうち全きょうだいである 6 番、31 番、32 番、50 番の 4 個体は単一クラスターを形成したが、B 系統のメインのクラスターよりも野生親魚に近縁であることが示された。一方、A 系統の多くの個体は B 系統に含まれた。また、42 番 (B 系統) や 48 番 (A 系統) など、遺伝距離で推定された類縁関係が聞き取った血縁情報と整合しない個体が出現した。

2-3-6. STRUCTURE 解析

STRUCTURE 解析の結果、 ΔK の値からは親魚集団が 3 つの遺伝子プールで構成される ($K=3$) と仮定するのが尤もらしいと考えられた (Fig. 2.3)。 $K=2-7$ とした場合に各個体がどの遺伝子プールに属するかを可視化し、集団構造を精査した (Fig. 2.4)。 $K=2$ を仮定した場合、B 系統と C 系統を主とする 2 つの集団に大別され、A 系統と野生親魚はこの 2 系統が混交する集団であると推定された。 $K=3$ においては B 系統、C 系統および野生親魚がそれぞれメインの集団を構成し、A 系統は B 系統、C 系統、野生集団が混合して形成された集団であると推定された。 $K=4$ 以上でも C 系統、野生親魚および B 系統が、それぞれほぼ単一の祖先集団であることが示された一方で、 $K=6$ 以上を仮定した場合に A 系統で優占する祖先集団の存在が推定された。遺伝距離から推定した類縁関係で本来の系統と異なる C 系統とクラスターを形成した 42 番 (B 系統) と 48 番 (A 系統) は、STRUCTURE 解析でも K の値に関わらず C 系統と同じ集団に属すると推定された。

2-4. 考察

本章では、A 系統を含む長崎県内の親魚集団内における個体間の類縁関係を明らかにするために、民間種苗生産機関で保有されているトラフグ親魚集団の遺伝構造解析を行った。

解析魚収集の際に行った聞き取り調査により、人工親魚の所属系統として 3 つの系統が挙げられた。これらに野生親魚を加えた 4 集団で AMOVA 解析を行ったところ、分化した集団が存在することが示された。2 集団間の遺伝的分化の程度 (*pairwise weFst*) でもすべての組み合わせで遺伝的分化が支持された。これらの結果から、長崎県内の親魚集団には遺伝的に分化した系統が存在することが示された。しかし、主座標分析、遺伝的類縁解析ならびに STRUCTURE 解析では B 系統、C 系統の独立性が支持されたものの、A 系統はいずれの解析結果でも他の系統からの独立性が弱く、野生親魚の導入や他の系統との系統間交配が行われていることが推測された。実際に、A 系統として入手した 8 個体のうち 4 個体はメス親が野生魚であり、B 系統 (4/23 個体)、C 系統 (1/8 個体、不明の 2 個体を除く) に比べて出現率が高かった。A 系統の解析魚中にメスが含まれなかったことも踏まえると、A 系統ではメス親魚は維持されていない可能性も考えられた。A 系統は、2000 年代に 1 ペアの野生個体から得た人工魚同士を近親交配して作出した 1 個体のエリートオス (第 1 章における A1 に相当) と、少数のメスとの交配で作出した遺伝的多様性の少ない集団から造成されている (中田久博士, 私信)。そのため、近親交配の回避を目的として野生親魚や他の系統との交配が行われ、結果的に、A 系統は遺伝的独立性が弱い集団となったと推察された。本章で収集した A 系統の解析魚は少なく、A 系統の全体像が明らかになったとは言えないが、系統外からの遺伝子流入が継続すれば、今後、本系統の遺伝的独立性と特徴的な形質 (早熟性) が失われる可能性が高いと考えられた。

B 系統と C 系統は、野生親魚から独立しており、系統化が認められた。B 系統は A、C 系統に比べて *AR* および *PIC* が高く、*Fis* がゼロに近かったことから、遺伝的多様性が比較的に高く保たれていると言えた。また、STRUCTURE 解析 ($K = 4-7$) から、系統内に複数の分集団を含む可能性が支持された。これらの結果から、B 系統は系統化が進みつつも、近親交配を避けるための操作が機能していると考えられた。しかし、B 系統の N_e は 10 個体程度と少なかったことか

ら、今後の選抜方法次第では遺伝的多様性が急激に減少する可能性も示された。一方で、C 系統は各種の多様性の指標が系統間で最小となり、遺伝的多様性が最も低かった。遺伝距離 D_a から推定した遺伝的類縁関係においても、単一のクラスターが形成され、少なくとも今回の解析に用いた個体は近縁な個体で構成され、近交が進んでいると考えられた。以上の結果から、B 系統と C 系統は、親魚間の血縁距離をもとに近親交配を回避しつつ、遺伝的多様性を増やすような交配計画を策定すべきと言えた。

本章で提供を受けた親魚検体のうち、オスはすべてが人工魚であった。その内訳は、野生魚メスと人工魚オスの交配に由来する個体が 9 個体であったのに対し、人工魚同士の交配で得られた個体は 23 個体と多かった（両親が不明だった個体は 2 個体）。オスに人工親魚が多いのは、オスがメスよりも人工魚の導入で得られるメリットが大きいからと考えられる。すなわち、トラフグのオスはメスよりも 1 年短い 2 歳で成熟することに加え（中田ら, 1997）、メスに比べて複数個体との交配が容易であることから後代検定が行いやすいため（Gjedrem and Robinson, 2014）、エリート個体の選抜が容易である。一方で、メス親魚には野生個体が多く利用されており（15/22 個体）、その背景には、前述したように野生魚の方が採卵量を多く確保できるというコスト的な理由が考えられる。また、種苗生産業者と養殖業者の近親交配に対する忌避感から人工親魚同士の交配を避ける意図もあるようである。しかし、近年のトラフグ天然資源は減少傾向にあり（松村, 2007; 堀井・片町, 2012）、メスでも人工親魚の利用が増えるものと考えられる。今後は人工魚同士の交配が主流となることで近親交配の可能性が高くなることから、系統管理の重要性がこれまで以上に高くなると予想された。

以上の通り、系統管理の重要性を指摘したが、遺伝的類縁解析と STRUCTURE 解析において、当該親魚集団では系統情報の誤記録や個体の取り違えが頻繁に起きている可能性も明らかになった。例えば、系統解析において、17 番と 49 番は人工魚同士の交配により作出されたにも関わらず野生親魚集団とクラスターを形成し、一方で 40 番は野生魚であるのに B 系統内に配置された。また、42 番 (B 系統) や 48 番 (A 系統) は C 系統のクラスター内に出現したが、STRUCTURE 解析でも C 系統と同じ祖先に由来することが支持された。種苗生産機関が親魚候補として養殖

業者から養殖魚を買い戻す際には、活魚輸送業者や仲卸業者が関与することもあり個体の記録ミスや混入を完全に排除するのは困難である。また、種苗生産機関の一部では外部標識が用いられているが、標識の脱落等による個体の取り違えが起きる可能性もある。このような場合、記録や標識だけではなく、遺伝マーカーを利用した遺伝的類縁関係にもとづく系統管理の併用が有効である（和田, 2012）。本研究により、10 セット程度のマイクロサテライトマーカーで系統管理が可能であることが示された。今後は親魚候補の導入と同時にゲノムを採取して DNA 多型標識を行い、遺伝履歴を把握して親魚管理の厳格化や交配計画の策定に利用する必要があるだろう。

以上、本章において長崎県内で用いられている親魚集団の遺伝的類縁関係を明らかにした。また、早熟系統（A 系統）は野生親魚や他系統との交配が頻繁に行われており、今後も系統外からの遺伝的流入が継続すれば、早熟性を喪失してしまう可能性が高いことが明らかになった。そこで次章において、早熟性の固定と選抜育種の方針を決定するために、早熟性の遺伝機構の解明を試みた。

第3章. QTL解析による遺伝機構の解明

3-1. 背景

第1章の後代検定により、養殖トラフグに見られる早熟性が遺伝形質であることを明らかにした。また、第2章において長崎県内の養殖用親魚集団の遺伝的構造を調べたところ、A系統は他の系統（B系統、C系統）から遺伝的に独立した分集団を形成しておらず、野生魚との交配が繰り返されていることから系統の喪失が危惧された。本章では、早熟系統の遺伝的救済のため、当該系統の固定化とそれに適した選抜育種法を選定することを目的として、早熟形質の遺伝機構の解明を試みた。

近年のゲノム解析技術の発展とともに、量的形質の遺伝基盤を明らかにする手法として、様々な生物でQTL解析や全ゲノム関連解析（genome wide association analysis, GWAS）が利用可能となった（Lander and Botstein, 1989; Miles and Wayne, 2008; Kingsmore *et al.*, 2008）。これらの手法は、ゲノムワイドに配置した遺伝マーカーを利用して、対象とする表現型に個体差（種間差なども含む）をもたらすQTLの「染色体上の数、位置、影響力」といった遺伝機構を明らかにするものであり、近年の遺伝学や遺伝育種学の発展を支える強力な解析ツールとなっている（Korte and Farlow, 2013）。

QTL解析は、特徴的な表現型を示す個体を平均的な個体と交配して得た第1世代（ F_1 ）やその次世代（交配第2世代（ F_2 ）や戻し交配世代）などの近交集団を用いて、目的とする表現型と遺伝マーカーとの連鎖関係から効率よくQTLを検出する手法である（Wang *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2007）。解析は200個体程度から可能であり（van Ooijen, 1992）、連鎖不平衡（linkage disequilibrium, LD）ブロックが大きければマーカー数も要求されないため、解析コストに優れた手法である。魚類は多産で近交集団が利用しやすいこともあり（Hallerman and Beckmann, 1988）、これまでに、QTL解析によって耐病性遺伝子座や性決定遺伝子座などの有用遺伝子座が報告されてきた（Liu and Cordes, 2004; Fuji *et al.*, 2007; Kai *et al.*, 2011; Moen *et al.*, 2015; Robledo *et al.*, 2018）。一方、GWASは全ゲノム上に配置した多数の遺伝マーカーのアレル頻度を、異なる表現

型を持つ多様な個体、品種、系統間などで比較することで QTL を探索する (Hirschhorn and Daly, 2005)。解像度を上げるため、解析には LD ブロックの小さい集団を利用する点で QTL 解析と大きく異なる。近年の SNP ジェノタイピング技術の発展もあり、サケ科魚類を代表として様々な形質の責任遺伝子座が報告されている (Sodeland *et al.*, 2013; Horn *et al.*, 2020)。成熟関連形質では、タイセイヨウサケを対象とした GWAS によって、9 番染色体上の *six6* や 25 番染色体上の *vgll3* が成熟年齢に強い効果を持つことが明らかとなっており (Ayllon *et al.*, 2015; Barson *et al.*, 2015; Sinclair-Waters *et al.*, 2020)、これらの遺伝子座はマスノスケ、ギンザケ *Oncorhynchus kisutch* といった他のサケ科魚類でも影響力を持つことが確認されている (Waters *et al.*, 2020)。さらに、検出された QTL はその他の効果の弱い QTL と密接に関連していることが示され、タイセイヨウサケの成熟年齢が複雑な遺伝機構に支配されていることが明らかにされている (Sinclair-Waters *et al.*, 2020)。また、ニジマスではオスの成熟年齢に関する QTL が体重に関する QTL と重複していることから、これらの形質が同一遺伝子座の影響下にあることが示唆されている (Martyniuk *et al.*, 2003)。

QTL 解析と GWAS はそれぞれメリットとデメリットがあり、状況に応じて使い分けられる (細谷・菊池, 2016)。QTL 解析は、極端な表現型を示す系統や個体が確認されており、かつ、人工的な 1 対 1 交配ができる場合には試験が容易である。ただし、検出される QTL の効果は創始個体の遺伝的背景に左右され、また、LD ブロックが大きいことから QTL 検出の解像度も低い。一方、GWAS は 1 対 1 交配技術が確立していなくても実施可能であり、集団全体で LD ブロックが小さいことから高い解像度が得られる。しかし、必要となるサンプル数とマーカー数が多いため解析コストが高い。トラフグの早熟形質に関しては、第 1 章において遺伝的に早熟な個体 (A2) が得られており、かつ、人工授精による 1 対 1 交配が容易である。そこで、本章では QTL 解析を採用し、A2 と B 系統由来のメス個体を祖父母として F₂ 集団を作出して早熟性と体サイズに関する QTL 解析に付した。

3-2. 材料および方法

3-2-1. 解析集団作出のための交配

第1章で用いた A2 個体を祖父、B 系統から得たメス個体 (B3) を祖母とする全きょうだい集団を作出して解析に用いた (Table 3. 1)。祖父母である A2 と B3 の交配は 2012 年 3 月に長崎県の民間種苗生産機関で行われた。得られた第 1 世代 (F₁) を受精卵の状態ですべて長崎水試に移送して成熟するまで飼育した。F₁ 集団の中からオス 2 個体 (S1, S2) とメス 2 個体 (D1, D2) を無作為に抽出し、2015 年 4 月に人工授精による総当たり交配を行って第 2 世代 (F₂) となる 4 つの全きょうだい集団を作出した (集団 1-4, Table 3. 2)。ゲノム解析用の DNA を得るため、交配に用いた親魚 (A2, S1, S2, D1, D2) の鱗組織を採取し、99.5%エタノールに浸漬して-30°Cで保存した。ただし、民間種苗生産機関が保有する B3 個体からはゲノム解析用の組織を入手できなかった。

3-2-2. 同一環境飼育

F₂ 世代の 4 つの全きょうだい集団は、標準体長が平均でおよそ 16 cm に達した 2015 年 9 月まで (6 月齢) は集団ごとに飼育し、それ以降は同一水槽で混合飼育した。混合にあたっては各集団から 120 個体を無作為に抽出し、背筋部に PIT タグ (Bio Mark, アイダホ州ボイシ, アメリカ合衆国) を埋設して個体識別した。Table 3. 2 に同一環境飼育開始時の平均標準体長と体重を示した。2016 年 12 月に生残したすべてのオス個体 (21 月齢) をサンプリングして標準体長、体重、精巣重量を測定し、GSI を算出した。ゲノム解析用の DNA を得るため、サンプリング個体から尾鱗の一部を採取し、DNA 抽出まで-30°Cで 99.5%エタノール中に保存した。解析集団の飼育とサンプリングは第 1 章に準じて行った。なお、各集団の生存率は 78.3-87.5%の範囲であった。

3-2-3. ジェノタイピング

DNA の抽出は第 2 章に準じて行った。各個体から得た DNA を GRAS-Di (Genotyping by Random Amplicon Sequencing, Direct) 法 (Hosoya *et al.*, 2019) に供し、得られた一塩基多型 (SNP) を後の解析に用いた。GRAS-Di 解析用のライブラリ作製およびシーケンシングはユーロフィンジェ

ノミクス株式会社（東京都大田区）に委託した。2つのライブラリプール（それぞれ100検体と98検体）をHiSeq 2500（Illumina, カリフォルニア州サンディエゴ, アメリカ合衆国）で1レーンずつ流し、リード長100bp（ペアエンド）の条件でシーケンスした。得られたシーケンス情報はFASTQファイル形式で公共データベースであるDDBJに登録した（DDBJ: DRA010711, Table 3.3）。

各解析魚のジェノタイピングは以下の手順で行った（Script 3.1-3）。まず、トリミングしたリードをトラフグ参照ゲノム配列（FUGU5/fr3）（Kai *et al.*, 2011）にマッピングした。トリミングはTrimmomatic-0.36（Bolger *et al.*, 2014）を用いて、以下のパラメータで実施した：ILLUMINACLIP NexteraPE-PE.fa:2:30:10、SLIDINGWINDOW:30:20、AVGQUAL:20、MINLEN:80。マッピングはBWA v 0.7.17 ソフトウェア（Li, 2013）のBWA-memを用いて、デフォルトの条件で行った。出力されたSAMファイルをSamtools v1.9（Li *et al.*, 2009）のviewコマンドに付して、ペアエンドの両側のリードがリファレンスに対して一意的にマッピングされたリードペアのみを残して、BAMファイルに変換した。次に、出力された個々のBAMファイルをSamtools v1.9のmergeコマンドを用いて結合したうえで、Freebayes v 1.3.1-17（Garrison and Marth, 2012）に付し、以下の設定でジョイントジェノタイピングを行った：--min-mapping-quality 10、--use-best-n-alleles 4、--min-alternate-fraction 0.2。最後に、vcftools v 1.17（Danecek *et al.*, 2011）を用いて、配列挿入と欠失（insertion and deletion, InDels）および低品質なSNP（ジェノタイピング率 < 0.8、ジェノタイプクオリティ < 20、最小アレル頻度 < 0.1、多型数 ≠ 2、被覆深度 < 5、および平均被覆深度 > 500）を除外して、以降の解析に用いた。

3-2-4. 遺伝解析

はじめに、ジェノタイプデータをもとにPLINK 2.0（Chang *et al.*, 2015）のpcaフラグを用いて主成分分析（PCA）を行った。得られた結果と個体識別情報に基づく親子関係との整合性を確認して、ジェノタイプデータの有効性を検証した。次に、アレルの継承パターン（A2またはB3のいずれに由来するか）が判別可能なSNPを有効SNP（effective SNP）として抽出し（Script 3.4）、

遺伝的連鎖地図の構築と QTL 解析 (Script 3.5) に供した。なお、本研究では B3 (祖母) のジェノタイプデータが得られなかったため、A2 (祖父) の遺伝子型がホモ接合であり、かつ、4 個体の F₁ 親魚 (S1, S2, D1, D2) の遺伝子型がヘテロ接合である SNP を有効 SNP として扱った。加えて、以下の基準に当てはまる SNP を以降の解析に用いた。すなわち、(1) 染色体物理地図上の位置が明確であり、(2) 全個体の 98%以上でジェノタイプングされ、かつ、(3) Hardy-Weinberg 平衡から極端に逸脱 ($P < 10^{-8}$) していない SNP を用いた。ただし、19 番染色体上の SNP に関しては (3) の基準を除外した。これは、トラフグの 19 番染色体が性染色体であり (Kikuchi *et al.*, 2007; Kamiya *et al.*, 2012)、オスだけを用いた今回の解析では性決定遺伝子と連鎖する SNP は理論的に Hardy-Weinberg 平衡から乖離するためである。SNP 間の遺伝距離は、R/qtl に実装されている *est.map* 関数で算出した (Broman *et al.*, 2003)。その際、Kosambi のマップ関数を用いた。また、隣接する 2 つの SNP 間の遺伝距離が 50 cM よりも大きかった場合、ジェノタイプングミスの可能性を考慮して染色体の長腕遠位端側に位置する SNP を除外した。

得られた連鎖地図を利用してインターバルマッピング法による QTL 解析を行った。解析には R/qtl パッケージの *scanone* 関数を用い、ステップサイズを 1 cM とした。同一環境飼育前に飼育環境から受けた影響を考慮して、飼育水槽の違いを相加的共変量として解析モデルに加えた。正規分布に従わない表現型は *nqrnk* 関数を用いて正規分位数に変換した。QTL の有意水準は 1,000 回の permutation test で決定した。permutation test で対数オッズ (log of odds, LOD) 値が上位 5% となる LOD 値をゲノムワイド有意水準 ($\alpha=0.05$) とし、この値を超える遺伝子座を有意な QTL ($P < 0.05$) とした。また、Kirschner *et al.* (2012) を参考に、上位 68%を超える LOD 値を示した遺伝子座を示唆的な QTL ($P < 0.68 = 1 - 0.95^{22}$) とした。これは 22 本の染色体を持つトラフグにおいて、少なくとも 1 本の染色体に QTL が見つかる確率で、染色体ワイド有意水準に相当する (Brockmann *et al.*, 1998; van Ooijen, 1999)。QTL の 95%信用区間は *bayesint* 関数を用いて算出した。表現型分散に対する各 QTL の寄与率 (phenotypic variation explained, PVE) (%) は、*fitqtl* 関数を用いて Haley-Knott 回帰分析で多重 QTL モデルをフィッティングした後に、drop-one-term 分析を行って推定した。また、有意な QTL については、*effectplot* 関数を用いて各遺伝子座

の QTL の効果を算出した。その際、*sim.geno* 関数を用いて、step=1、n.draw=128、の条件でジェノタイプインピュテーションを行った。なお、QTL 解析に用いた表現型と遺伝子型および SNP 座の情報は、Table 3. 4, 5 に示した。

3-2-5. 候補遺伝子の探索

A2 に由来する早熟性と体サイズの大型化をもたらした候補遺伝子を探索するため、まず、UCSC Table Browser (<https://genome.ucsc.edu>, アクセス日：2020 年 9 月 1 日) に登録されているトラフグ参照ゲノム配列 (Fugu5/fr3) から有意な QTL の 95%信用区間に含まれる遺伝子を検索し、Ensembl 形式のリストを取得した。このリストに含まれる遺伝子について、NCBI Entrez Gene データベース (Maglott *et al.*, 2005: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, アクセス日：2020 年 9 月 1 日) を用いて各遺伝子の機能を確認し、体サイズおよび性成熟に関連する遺伝子を列挙した。また、魚類の精巣発達への関与が示唆される性腺刺激ホルモン (濾胞刺激ホルモン β サブユニット, *fshb*; 黄体形成ホルモン β サブユニット, *lhb*; 両者で共通する α サブユニット, *cga*) (Schulz *et al.*, 2010; Vance, 2018)、ステロイド代謝酵素 (steroidogenic acute regulatory protein, *star*; cytochrome P450-11A2, *cyp11a2*; cytochrome P450-17A1, *cyp17a1*; 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, *hsd3b*) (Kobayashi *et al.*, 1998; Kusakabe *et al.*, 2006)、インスリン様成長因子 (*igf1*, *igf2*) (Le Gac *et al.*, 1996; Higuchi *et al.*, 2017)、サケ科魚類の産卵回帰年齢に関連する vestigial-like family member 3 (*vgl3*)、homeobox protein SIX6 α (*six6*)、transcription enhancer factor-1 (*tead3*) (Ayllon *et al.*, 2015; Barson *et al.*, 2015; Christensen *et al.*, 2017; Sinclair-Waters *et al.*, 2020) についても、トラフグ参照配列上の位置を調べた。

3-3. 結果

3-3-1. 表現型の評価

解析に用いたオス個体の個体数、標準体長、体重、精巣重量および GSI の平均値を Table 3. 6 にまとめた。体重については正規分布が支持された (Shapiro-Wilk 検定, $P = 0.790$) が、標準体長、精巣重量および GSI については支持されなかった (標準体長: $P = 0.038$; 精巣重量: $P < 0.001$; GSI: $P < 0.001$)。

3-3-2. ジェノタイピング

GRAS-Di 法に付した 5 個体の親魚 (A2, S1, S2, D1, D2) と 193 個体の F₂ 解析集団から、それぞれ 2,420 万リードおよび 9.05 億リードが得られた (Table 3. 3)。トリミングの結果、平均で 81.1%のリードが残った。これらのリードを参照配列にマッピングしてジェノタイピングしたところ、633,818 座の変異が検出された。これらの変異をクオリティフィルタリングした結果、最終的に 21,938 座の高品質 SNP が得られた。

3-3-3. 集団構造解析

取得した約 2.2 万 SNP 座のジェノタイプデータを PCA 解析に付し、個体間の遺伝的類似性を解析した (Fig. 3. 1)。各個体の第 1 主成分と第 2 主成分の主成分スコアをプロットしたところ、創始個体である A2 が分布の中心に配置され、F₁ 親魚 4 個体は主成分 1 と 2 の座標軸方向にそれぞれ分かれて配置された。交配関係にある F₁ 親魚ペアの中間に F₂ 集団が配置され、4 つの全きょうだいがそれぞれ単一クラスターを形成した。これらの分布は PIT タグに基づく個体識別情報と整合していた。

3-3-4. 連鎖地図の構築

約 2.2 万 SNP 座のうち、祖父母のアレル伝達パターンが判明した有効 SNP は 2,491 座であった。これらのうち、連鎖地図作製に用いる SNP 座を以下の基準で順次選抜した: (1) 染色体物理地図上の位置が明確であるもの (2,057 座)、(2) 全個体の 98%以上でジェノタイピングされた

もの (1,527 座)、(3) Hardy-Weinberg 平衡から逸脱 ($P < 10^{-8}$) していないもの (1,429 座)。これらの SNP 座からさらに、隣接する SNP 間の遺伝距離が 50 cM 以上となった 6 座の SNP を除外した。以上の操作で最終的に残った 1,423 座のジェノタイプデータを用いて連鎖地図を構築した (Table 3. 7, Fig. 3. 2)。連鎖地図の総長は 1,949.2 cM であり、最長が 1 番染色体の 167.4 cM、最短が 18 番染色体の 46.3 cM であった。染色体ごとにみると、平均 64.7 個の SNP が配置された。最も SNP 数が多かったのは 14 番染色体であり、その数は 127 個 (1.7 SNP/cM) であった。一方、最も SNP 数が少なかったのは 18 番染色体であり、その数は 14 個 (0.3 SNP/cM) であった。

3-3-5. QTL 解析

標準体長、体重、精巣重量、GSI の各形質において 1,000 回の permutation test で得た LOD 値のゲノムワイド有意水準 ($P < 0.05$) は、LOD = 3.8–4.0 であった。全形質で 14 番染色体に有意な QTL が検出され、形質間で 95%信用区間が重複していた (Table 3. 8, Fig. 3. 3)。いずれの形質でも、予想通り、A2 由来のアレルを多く持つ個体ほど表現型値が大きかった (Fig. 3. 4–6)。しかし、各 QTL の寄与率 (PVE) は 4.8–6.4%程度と小さかった。

精巣重量と GSI では、上記の QTL 以外に 1 番、8 番、19 番染色体上に示唆的な QTL が検出され、それらは形質間で共有されていた。標準体長と体重では 14 番染色体上の QTL に加えて 21 番染色体に有意な QTL が、また、5 番、8 番、19 番、20 番染色体にそれぞれ一つずつの示唆的な QTL が共有されていた。21 番染色体上の有意な QTL においては、14 番染色体上の QTL と同様に、A2 由来のアレルを多く持つ個体ほど表現型値が大きいものの (Fig. 3. 5, 6)、各 QTL の PVE は 7.0–10.5%と小さかった。体重に関してのみ、これらに加えて 6 番染色体上に示唆的な QTL が検出された。

3-3-6. 候補遺伝子の探索

精巣重量および体サイズに関連して有意な QTL が検出された 14 番および 21 番染色体について、これらの QTL の 95%信用区間に存在する表現型関連遺伝子をトラフグ参照ゲノム配列 (FUGU5/fr3) から抽出した (Table 3. 9)。14 番染色体上の QTL については、fibroblast growth

factor 18a (*fgf18a*) と growth differentiation factor 9 (*gdf9*) などが候補として挙げられた。また、21 番染色体上の QTL については、bone morphogenetic protein 3 (*bmp3*) と fibroblast growth factor 5 (*fgf5*) などが挙げられた。14 番染色体上 QTL の信用区間 (232 遺伝子) と 21 番染色体 QTL の信用区間 (125 遺伝子) から得たすべてのタンパク質コード遺伝子は Table 3. 10 に列挙した。

上記に加え、候補遺伝子アプローチとして、魚類の精巣発達に関連する可能性のある 13 個の遺伝子について、ゲノム上の位置を確認したところ、*vgl13* と *hsd3b1* が 1 番染色体上の精巣重量に影響する示唆的な QTL の 95%信用区間内に位置していたが、その他 11 個の遺伝子はどの QTL 領域とも重複していなかった (Table 3. 11)。また、これらの遺伝子に加え、14 番染色体の QTL の 95%信用区間内で検出された *gdf9* との関連が知られる bone morphogenetic protein 15 (*bmp15*) (Hanrahan *et al.*, 2004; Halm *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2020) について、FUGU5/fr3 上の位置を検索した。*bmp15* はトラフグ参照配列上の 8 番染色体に位置しており、精巣重量と関連する示唆的な QTL の 95%信用区間に含まれていた。

3-4. 考察

A 系統に見られた早熟性の遺伝機構を解明するため、第 1 章において遺伝的な早熟性が確認された A2 を祖父とする F₂ 解析集団を作出して QTL 解析を行った。その結果、14 番染色体上に精巣重量と連鎖する有意な QTL が認められた。この QTL において、A2 由来のアレルを多く持つ個体ほど精巣重量が大きかった。この結果は、第 1 章の結果と同様に、早熟形質が相加的な遺伝形質であることを示す。また、14 番染色体上の QTL に加えて 3 つの示唆的な QTL が検出された。しかし、検出されたすべての QTL は PVE が小さく、合計でも 19% 程度であった。本研究では解析魚数が 200 程度と少なかったことから、Beavis 効果 (Beavis, 1994; Beavis, 1998; Xu, 2003) によって PVE が過大評価されている可能性もある。そのため、上記 4 つの QTL の真の影響力はさらに小さいと考えられる。したがって、A 系統に見られた早熟形質は少数の強力な遺伝子で支配されるのではなく、効果の小さい多数の遺伝子の影響を受ける多因子形質であると考えられた。14 番染色体上には標準体長と体重と連鎖する QTL も存在した。これらの QTL は精巣重量と連鎖する QTL と 95% 信用区間が重複していた。また、標準体長と体重でも当該 QTL において、A2 由来のアレルを多く持つ個体ほど表現型値が大きかった。これは A2 が属する早熟系統 (A 系統) が、精巣重量のみならず体重でも B 系統よりも優れていたという第 1 章の結果と一致していた。以上の結果は、精巣重量と体重が、少なくとも部分的に共通した遺伝機構に支配されることを示唆しており、これらの形質は同時に遺伝的改良が可能であると考えられた。

トラフグとは異なり、一部の養殖対象種においては、早熟現象は肉質の低下と成長停滞などをもたらすネガティブな形質として捉えられる場合がある (Taranger *et al.*, 2009)。例えば、タイセイヨウサケでは、早熟個体の出現により年間 1.1-2.4 億ドル (2002 年) の経済的損失があったと試算されている (McClure *et al.*, 2007)。ヨーロッパスズキ *Dicentrarchus labrax* (Carrillo *et al.*, 1995; Felip *et al.*, 2006)、タイセイヨウオヒョウ (Weltzien *et al.*, 2003)、ヨーロッパヘダイ (Gines *et al.*, 2003) などでも早熟現象が問題視される。これらの魚種では環境コントロール (日長や水温) や給餌制限などによる早熟性の回避が試みられている (Taranger *et al.*, 2009)。一方で、サケ科魚類では選抜育種による晩熟化が進められており、体サイズの改良に顕著な効果が得られている

(Gjedrem, 2000)。このうち、タイセイヨウサケでは早熟現象に関する遺伝機構の一端が明らかにされている。22 万 SNP 座と 57 の野生集団に由来する 1,404 個体を用いた GWAS により、25 番染色体上の *vgll3* の成熟年齢に対する強い効果 (PVE = 39%) が明らかになった (Barson *et al.*, 2015)。*vgll3* は器官のサイズ調節を制御する Hippo シグナル伝達 (Zhao *et al.*, 2011) を抑制する。タイセイヨウサケで見つかった当該遺伝子上の変異は、セルトリ細胞での細胞増殖を抑えてオスの成熟開始を遅らせると考えられている (Kjærner-Semb *et al.*, 2018)。また、Sinclair-Waters *et al.* (2020) は規模を拡大した GWAS (11,166 個体, 51 万 SNP 座) により、*vgll3* 以外にも *six6* や効果が小さい多数の QTL (116 SNP 座, PVE = 78%) を同定しており、サケ科魚類の成熟年齢が複雑な遺伝機構によって支配されることを示した。トラフグの精巣発達においても、第 1 染色体上の示唆的な QTL 領域中に *vgll3* が見つかった。本種の早熟化は同一成熟期間内における精巣の発達開始時期に関するものであり、サケ科魚類の成熟年齢に関する早熟化とは異なる現象と考えられるが、同じ遺伝子の関与が示唆された。しかし、トラフグの早熟性における当該 QTL の効果は小さく (PVE = 3.14%)、サケ科魚類の成熟年齢とは遺伝機構が異なると考えられた。

14 番染色体上の QTL 領域には成熟と成長の両方に関わる *gdf9* や成長に関わる *fgf18a* などが見つかった。また、21 番染色体上には成長に関わる *bmp3*、*fgf5* などが見つかった。これらのうち、transforming growth factor β (TGF β) スーパーファミリーに属する GDF9 は、脊椎動物の卵母細胞の特異的成長因子として知られている (McPherron and Lee, 1993 ; McGrath *et al.*, 1995)。GDF9 はステロイドホルモンの制御因子としての働きを持ち、エストラジオールやプロゲステロンを抑制する一方で雄性ホルモンを亢進する (Solovyeva *et al.*, 2000 ; Vitt *et al.*, 2000 ; Spicer *et al.*, 2006 ; Orisaka *et al.*, 2009)。また、精巣内の体細胞 (ライディッチ細胞やセルトリ細胞) または生殖細胞に作用して精子形成を促進する (He *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2020)。第 1 章において、A2 の後代は精巣が発達し始める約 6 か月前の血中 E2 濃度が野生親魚の後代よりも高かったこと、ヨーロッパヘダイやニホンウナギでは E2 投与が精巣内での細胞増殖や精巣幹細胞の再生産に関与することから (Miura *et al.*, 1999; Pinto *et al.*, 2006)、E2 がトラフグの早熟形質において重要な機能を果たす可能性を指摘した。E2 は、T またはエストロン (E1) を前駆物質とし

て合成されるが、その合成経路は魚種によって異なる (Nyuji *et al.*, 2020)。GDF9 と E2 の機能を考え合わせると、A 系統で早熟性を示す個体は *gdf9* や近傍の調節領域に生じた変異によって E2 への抑制効果が弱まり、2 つの合成経路のいずれかまたは両方において E2 合成が促されて早熟化した可能性が考えられた (Fig. 3.7)。ゼブラフィッシュ *Danio rerio* では、*gdf9* の機能をノックアウトしてもアロマターゼの発現量に変化しない (Chen *et al.*, 2017)。一方で、ブリでは *gdf9* ではないものの、E1 から E2 を合成する代謝酵素遺伝子に雌特異的な変異が存在する。この変異の有無により E2 の合成量に差が生じ、生殖腺の性が決まる (Koyama *et al.*, 2019)。トラフグの E2 合成における GDF9 の関与について詳細な作用機序は不明であるが、今後は *gdf9* 近傍の配列に対してゲノム編集技術によるアレル置換等を行い、E2 合成の調節機能の変化と早熟性への影響を明らかにする必要がある。

GDF9 と同じく TGF β スーパーファミリーに属し、GDF9 と密接な関係を持つ BMP15 が 8 番染色体上の示唆的な QTL の 95%信用区間内に見つかった。BMP15 は GDF9 と共同してプロゲステロンの産生を抑制することで卵巣の機能を低下させるが (Otsuka *et al.*, 2011)、walking catfish *Clarias batrachus* の精巣では単独でも機能し、E2 合成を補強して精原細胞の増殖を促進する (Yadav and Lal, 2017)。すなわち、A 系統では、GDF9 に加え、BMP15 やその近傍の領域に生じた変異によって E2 合成が亢進されて早熟化した可能性が考えられる。これらの遺伝子の他に 14 番や 21 番染色体上で見つかった BMP3、並びに、fibroblast growth factor (FGF) ファミリーに属する FGF5 および FGF18 α は、細胞増殖や胚発生、骨形成などの生物学的な成長プロセスにおいて重要な役割を果たすタンパク質として知られている (Clase *et al.*, 2000; Daluiski *et al.*, 2001; Haque *et al.*, 2007)。特に 14 番染色体上の QTL は標準体長や体重にも影響していたことから、この遺伝子座が多面発現 (pleiotropy) することで A 系統に体サイズと精巣重量の両方の増大をもたらした可能性が考えられた。この他、候補遺伝子アプローチで上述の *vgll3* に加えて *hsd3b1* が第 1 染色体上の示唆的な QTL 領域に見つかっている。A 系統に見られた早熟性および高成長性は、上記のような多数の遺伝子が複合的に作用して生じたと考えられた。

以上の通り、本研究において早熟性や高成長性に関わる QTL がいくつか見つかったが、いず

れも PVE は低く、これらの形質は多因子形質であると考えられた。したがって、当該 QTL を用いた MAS による早熟系統の選抜育種は効果的ではなく、大規模集団を利用した選抜育種が適していると言えた。そこで次章では、早熟形質を対象とした GS 法導入の可能性を検証した。

第4章. ゲノム予測によるゲノミックセレクション法の有効性

4-1. 背景

第3章において、トラフグの早熟形質が多因子形質であることを明らかにした。本章では、トラフグの早熟系統を遺伝的に救済しながら、さらなる遺伝的改良が図れる手法として、A2 個体の後代を含むトラフグ養殖集団を対象とした GS 法の導入について検討した。

これまで、多因子形質において効力を発揮する選抜育種法として BLUP 法を用いた選抜が行われてきた(佐々木, 2007)。BLUP 法は遺伝率が低い形質でも効率よく選抜が可能である。また、後代検定を必要としないこと、飼育期間の早い段階で優良個体の選抜ができること、肉質や脂質含量など出荷時にしか測定できない表現型についても予測の対象となることなどのメリットがある。最近では大量の遺伝マーカーが容易に入手可能となったことから、BLUP 法で利用した血縁情報の代わりにジェノタイプデータを用いる GS 法が実践されている (Meuwissen *et al.*, 2001; Houston *et al.*, 2020)。GS 法では解析集団から得た表現型データとゲノム多型情報から予測モデルを構築し、候補個体の GEBV をゲノム予測して GEBV を選抜の指標とする。多型情報を利用するため、全きょうだい集団内の個体差も変量効果として扱えることから、BLUP 法より正確性に優れる。また、ゲノム情報は血縁情報を反映するため、BLUP 法では扱えないような正確な血統情報が残されていない集団であっても原理的には予測可能である。このため、早熟系統を含めたいくつかの系統が存在しながらも厳密な系統管理が行われていなかった養殖トラフグにおいても、既存集団に対して直ちに GS 法が導入できることが期待された。

本章では、GS 法によるトラフグ早熟系統の遺伝的救済と選抜育種の可能性を検討するために、長崎県内の養殖場から解析魚を収集して当該形質のゲノム予測を試みた。解析には A2 の後代を含む複数の全きょうだい集団に由来する 501 個体を用い、GBLUP 法による GEBV の推定を行った。なお、本章ではデータバンク上に公開されているシーケンスデータ (Sato *et al.*, 2019) も再解析して用いた。

4-2. 材料および方法

4-2-1. 解析集団の収集および表現型値の取得

2016年12月頃に長崎県内で海面養殖されたトラフグ(2歳魚)を10生簀から100個体ずつ購入した(Fig.4.1)。これらは第2章で明らかにした3系統による系統間交配または野生魚との交配で作出されており、その一部にA2の後代が含まれていた。なお、記録上では各生簀はほぼ1つの全きょうだいで構成されていた。サンプリングは2016年11月30日から12月15日までの5日に分けて行った(Table 4.1)。その際、1から3生簀ごとに購入魚を一度プールし、半数は解析魚として体サイズと生殖腺重量を測定し、さらに鱭の一部を取得した。鱭組織はDNA抽出まで -30°C で99.5%エタノール中に保存した。残りは次世代作出用の親魚候補として長崎水試の陸上水槽に搬入した。最終的に解析魚は501個体、親魚候補は499個体となった。親魚候補については、搬入直後に死亡した4個体を除く495個体について個体識別したうえで鱭の一部を取得してジェノタイプデータを得た。ただし、これらの個体については表現型値を取得していないため、以降の解析には利用しなかった。

4-2-2. ライブラリ調製およびシーケンス

ジェノタイプデータの取得にはAmpliseq法を用い、得られたSNPを後の遺伝解析に供した。解析魚501個体と親魚候補495個体のゲノムをシーケンスした。まず、DNeasy Blood and Tissue Kit(Qiagen, ハイデン, ドイツ)を用いて、製品マニュアルに従って鱭組織からゲノムDNAを抽出した。これを共同研究者が以下の手順でAmpliSeq法に付してリードデータを取得した(Sato *et al.*, 2019)。最初に、custom Ampliseq primer pool(Life Technologies, カリフォルニア州カールスバッド, アメリカ合衆国)を用いたfirst PCRを行った。PCR反応液は以下の条件で調製した。すなわち、 $10\ \mu\text{L}$ の2×Multiplex PCR Buffer(Multiplex PCR Assay Kit ver.2, タカラバイオ株式会社, 滋賀県草津市)、 $9\ \mu\text{L}$ の2×Ampliseq primer pool、 $0.2\ \mu\text{L}$ のMultiplex PCR Enzyme Mix(タカラバイオ株式会社, 滋賀県草津市)を含むプレミックスに40 ngの鋳型DNAを加え、滅菌蒸留水で合計 $20.2\ \mu\text{L}$ とした。この反応液をiCycler(Bio-Rad, カリフォルニア州ハーキュリーズ, ア

アメリカ合衆国)を用いて以下の条件の PCR に付した。すなわち、94°C、1 分間の熱変性反応を行った後に、94°Cで 30 秒間、60°Cで 4 分間の増幅反応を 20 サイクル行い、最後に 72°Cで 10 分間の最終伸長反応を行った。PCR 産物は USER enzyme (New England Biolabs Inc., マサチューセッツ州イプスウィッチ, アメリカ合衆国) で 37°C、1 時間処理してプライマーを消化した後に、1.8 倍量の Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Inc., カリフォルニア州ブレア, アメリカ合衆国) で精製した。続いて、PCR 産物の 3'-末端を修復してから dA を付加し、Illumina 用の NEBNext アダプターをライゲーションした。プライマー消化からアダプターライゲーションまでは NEBNext Ultra Library prep kit for Illumina (New England Biolabs Inc., マサチューセッツ州イプスウィッチ, アメリカ合衆国) を用いて、マニュアルに従って実施した。アダプターライゲーション産物は 1.4 倍量の Agencourt AMPure XP を用いて再度精製し、インデックスプライマーを用いた second PCR に付した。なお、このインデックスプライマーには、Meyer and Kircher (2010) を参照してカスタムデザインした 8 bp の dual index に P7/P5 アダプター (株式会社ファスマック, 神奈川県厚木市) を付加したものをを用いた。second PCR 反応液は以下の条件で調製した。すなわち、10 μ L の NEBNext Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix (New England Biolabs Inc., マサチューセッツ州イプスウィッチ, アメリカ合衆国)、2 μ L ずつのインデックスプライマー (10 μ M) を含むプレミックスに 6 μ L の精製アダプターライゲーション産物を加え、滅菌蒸留水で合計 20 μ L とした。この反応液を 98°C、30 秒間の熱変性反応を行った後に、98°Cで 10 秒間、65°Cで 75 秒間の増幅反応を 7 サイクル行い、最後に 65°Cで 6 分間の最終伸長反応を行った。生成物は 1.1 倍量の Agencourt AMPure XP を用いて精製し、最終産物とした。解析個体群を 326 個体、326 個体、305 個体、39 個体からなる 4 グループに分割し、得られた最終産物を等量ずつ混合することで、4 つの DNA プールを作製した。ライブラリの濃度は NEBNext Ultra Quant Kit (New England Biolabs Inc., マサチューセッツ州イプスウィッチ, アメリカ合衆国)を用いた qPCR 法で定量し、終濃度が 8.5 pM となるように TE (pH8.0) で調製した。シーケンスにあたっては PhiX control V3 (Illumina, カリフォルニア州サンディエゴ, アメリカ合衆国) を 1.2 pM となるように混合し、300 個体以上の個体を含む 3 つのライブラリについては Miseq Reagent Kit v2 (300 サイクル,

Illumina, カリフォルニア州サンディエゴ, アメリカ合衆国) を、39 個体しか含まない 1 つのライブラリについては同 kit v2 nano を用いて Illumina Miseq (Illumina, カリフォルニア州サンディエゴ, アメリカ合衆国) でシーケンスした。なお、シーケンスはペアエンド 150 bp の条件で行った。ライブラリプールのうち 326 個体からなる 2 つのプールは Sato *et al.* (2019) で用いられ、公共データベースに FASTQ ファイルがアーカイブされている (DDBJ: DRA007457–DRA007464)。残りの 2 プールについては別途登録した (DDBJ: DRA011515)。以降の解析には、解析魚集団のみを用いた。

4-2-3. ジェノタイピング

得られたリードを用いて以下の手順でジェノタイピングを行った (Script 4. 1–3)。まず、FASTQ ファイルに対して、Trimmomatic-0.36 (Bolger *et al.*, 2014) を用いてリードのクオリティトリミングを行った。トリミングは以下のパラメータで実施した: ILLUMINACLIP TruSeq3-PE-2.fa:2:30:10、SLIDINGWINDOW:30:20、AVGQUAL:20。トリミングしたのちに、ペアエンドの両側が残ったリードをトラフグ参照ゲノム配列 (FUGU5/f3) (Kai *et al.*, 2011) に BWA-mem (BWA v0.7.17, Li, 2013) を用いて、デフォルトの条件でマッピングした。出力された SAM ファイルを Samtools v1.9 (Li *et al.*, 2009) で BAM ファイルに変換した。その際、参照ゲノム上の位置をもとにリードの並び替え (samtools sort) とペア情報の修正 (samtools fixmate) を行った。多型の判定には、まず、GATK v4.1.4 (McKenna *et al.*, 2010) の HaplotypeCaller と GenotypeGVCFs を用いて多型の有無にかかわらず 1 塩基ごとに配列を決定した。得られたジェノタイプデータから、vcftools v1.17 (Danecek *et al.*, 2011) を用いて、InDels、低品質な SNP (ジェノタイピング率 < 0.6、最小アレル頻度 < 0.01、ジェノタイプクオリティ < 30 および被覆深度 < 5)、ならびに塩基情報が欠測したサイトを除外した。ここまで個体ごとにジェノタイピングされた VCF ファイルを、bcftools 1.9 (Li *et al.*, 2009) を用いてマージした。その際、アレル数が 2 つのサイトのみを抽出した。最後に、LinkImpute 1.1.4 (Money *et al.*, 2015) を用いて欠測値を補完した。

4-2-4. 集団構造解析

解析集団の遺伝的類縁関係を把握するため、補完済みのジェノタイプデータを用いて集団構造解析を行った。まず、ADMIXTURE 1.3.0 (Alexander *et al.*, 2009) で集団数と各個体の帰属率を推定した。その際、集団数 (K) を 1 から 20 まで変化させながら各 K について 5 分割の交差検定を行って、最も信頼できる K を推定した (Script 4. 4)。次に、R の *hclust* 関数 (R Core Team, 2018) と *ggtree* パッケージ (Yu *et al.*, 2018) を用いて、個体間の遺伝的類似性をユークリッド距離として推定し、Ward 法により系統樹として表した (Script 4. 5)。また、*cutree* 関数を用いて、得られた系統樹を ADMIXTURE 解析により推定された祖先集団数と同数のクラスター (血縁クラスター) に分割し、ADMIXTURE 解析との間で各個体の所属する集団を比較した。

4-2-5. ゲノムワイド関連解析 (GWAS)

前章では、トラフグ近交集団を用いた QTL 解析により、早熟性や体サイズが多因子形質であることを明らかにした。本章では GWAS を用いて当該形質の遺伝機構を確認した (Script 4. 6)。精巣重量および GSI の解析にはオス個体 (235 個体) のみを用いた。GWAS は R のパッケージ *rrBLUP* の *GWAS* 関数を用い (Endelman, 2011)、主成分分析の結果と実現血縁行列を用いて家系構造の影響を取り除く PK モデル (Yu *et al.*, 2006) を採用した。主成分分析の結果については、寄与率の上位 10 成分をモデルに含めるように設定した。なお、主成分分析は同関数の内部で自動的に計算された。また、実現血縁行列は *A.mat* 関数で作成した。この他、各個体の測定日 (測定日の影響に加えて、生簀の違いによる環境効果の影響を含む) も固定効果に含めた。解析に利用する SNP 座は最小アレル頻度 5% 以上に限定した。有意水準はボンフェローニ補正し、 $\alpha = 8.956 \times 10^{-6}$ ($= 0.05/5583$ SNPs) とした。

4-2-6. 遺伝率の推定とゲノム予測

遺伝率の推定とゲノム予測には GBLUP 法を採用した (Script 4. 6)。計算には *rrBLUP* の *kin.blup* 関数を用いた。実現血縁行列は *A.mat* 関数で作成した。また、それぞれの個体の測定日を固定効果として指定した。精巣重量および GSI の予測にはオス個体のみ用いた。得られた分散成分か

ら狭義の遺伝率を $h^2 = \sigma_A^2 / (\sigma_A^2 + \sigma_E^2)$ の式により推定した。ここで、 σ_A^2 は相加的遺伝分散、 σ_E^2 は環境分散を表す。用いたモデルの予測正確度 (prediction accuracy) を評価するため、以下の手順で 10 分割の交差検定を行った (Tsai *et al.*, 2015; Hosoya *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2020)。まず、501 個体 (精巢重量および GSI は 235 個体) を無作為に 10 セットに分割した。このうちの 1 セットは評価集団として表現型を NA としてマスクし、全個体のデータを GBLUP 法に付した。このとき、GEBV の予測モデルは残りの 9 セット (テスト集団) で構築され、評価集団についてもこの予測モデルを利用して GEBV が得られる。次に、モデル構築に用いなかった評価集団の観察値と GEBV の相関係数 (Pearson's r) を算出した。この相関係数を狭義の遺伝率の平方根で除した値が予測正確度と定義される。上記のステップを、評価集団を 1 セットずつ変えながら 10 ステップ繰り返し、予測正確度の平均と標準誤差を算出した。

4-3. 結果

4-3-1. 表現型の評価

全 501 個体の性別、標準体長、体重、精巣重量および GSI の平均値を Table 4.1 にまとめ、個体ごとの測定値を Table 4.2 に示した。また、各個体におけるシーケンス時のライブラリプール情報も Table 4.2 に示した。標準体長の平均 (\pm 標準偏差) は 31.9 (1.87) cm、体重の平均は 1,076.5 (175.5) g であった。精巣重量は最大 190.2 g から最小 0.6 g まで大きなばらつきが認められた。

4-3-2. 選抜対象形質の検討

選抜育種の実行には適切な選抜対象形質を選択する必要がある。そこで、精巣重量と GSI のどちらが対象形質として適しているかを検討した (Fig. 4.2)。両形質の表現型値と体重との間の相関 (Spearman's rank correlation, ρ) を調べたところ、どちらも中程度の正の相関を示した (精巣重量: $\rho = 0.6913$, $P < 0.001$; GSI: $\rho = 0.5950$, $P < 0.001$)。次に、実際の選抜を想定し、それぞれの形質で上位 100 個体 (抽出群、全体の 42.6%) を抽出して再解析した。精巣重量では中程度の正の相関が維持されたが ($\rho = 0.4622$, $P < 0.001$)、GSI では有意な相関が認められなかった ($\rho = 0.0789$, $P = 0.435$)。精巣重量の抽出群のうち 5 個体は体重が 1 kg 未満となり、最小個体は 958 g であった。一方、GSI の抽出群では 9 個体が体重 1 kg 未満であり、最小個体は 830 g で前者に比べて小型の個体が含まれる傾向にあった。

4-3-3. ジェノタイピング

解析魚 501 個体について合計で 2,367 万リード (平均 47,238 リード) が得られた。トリミングの結果、平均で 95.9% のリードが残った。これらのリードを参照配列にマッピングしてジェノタイピングしたところ、6,636 座の変異が検出された。これらの変異をクオリティフィルタリングした結果、最終的に 5,583 座の SNP が得られた。この 5,583 座について欠測値を補完して以下の解析に用いた。

4-3-4. 集団構造解析

取得した 5,5583 SNP 座のジェノタイプデータをもとに、ADMIXTURE 解析および遺伝的類縁解析を行った。ADMIXTURE 解析における交差検証で推定誤差が $K = 11$ 以上でほぼ横這いとなったことから、最適な集団数を 11 とした (Fig. 4. 3)。全 501 個体についての各集団への帰属率を可視化したところ、ほとんどの個体が単一の集団に帰属したが、一部の個体は複数の集団に由来することが明らかとなった (Fig. 4. 4)。遺伝的類縁解析においては、解析魚集団は大きく 3 つのクラスターに分けられた。ADMIXTURE 解析の結果に合わせて 11 の血縁クラスターに分割したところ、各血縁クラスターは ADMIXTURE 解析の結果とほぼ一致していた。血縁クラスター ID3 は、ADMIXTURE 解析において複数の集団に由来することが支持された個体で構成されていた。

各個体は測定日ごとに指定した生簀 (全きょうだい集団) からサンプリングされているため、各測定日に扱った生簀の数と出現する血縁クラスターの数との間には対応関係がある。例えば、11 月 30 日は 1 生簀からサンプリングしたため、その日の測定魚は 1 つの血縁クラスターで構成されるはずである。そこで、各個体の測定日と遺伝的類縁解析で推定された血縁クラスターをプロットして対応関係を確認した (Fig. 4. 5)。その結果、各測定日に取り扱った生簀の数と血縁クラスターの数はおおむね一致していた。一方で、すべての測定日において、扱った生簀の数よりも出現した血縁クラスターの数の方が多かった。なお、養殖業者からの聞き取り調査の結果から、ID4、8、9 は A2 の後代であり、また、ID4、9 とクラスターを形成した ID11 は A2 の全きょうだい個体の後代であると推察された。

4-3-5. GWAS

体長、体重、精巣重量、GSI の各形質について GWAS を行ったが、すべての形質で有意水準 ($5.05 = -\log_{10} (0.05/5583)$) を超える SNP 座は認められなかった (Fig. 4. 6)。有意水準以下ながらも関連性が示唆される SNP 座が、標準体長および体重に関しては 9 番染色体 (体長: $-\log_{10}(P) = 3.54$; 体重: 4.06) と 14 番染色体 (体長: 2.99; 体重: 3.58) などに、精巣重量および GSI に関し

ては 7 番染色体（精巣重量: 3.30; GSI: 3.53）と 20 番染色体（精巣重量: 3.20; GSI: 2.66）などにそれぞれ見つかった。

4-3-6. 遺伝率の推定とゲノム予測

解析魚 501 個体から取得した表現型とジェノタイプデータを用いて GBLUP 法によるゲノム予測を行い、各個体の GEBV と遺伝率を推定した（Table 4.3、Fig. 4.7-8）。遺伝率は標準体長で最大となり（ $h^2=0.44$ ）、次いで GSI（0.34）、体長（0.33）、精巣重量（0.30）の順となった。すべての表現型において観察値と GEBV の間に強い正の相関が認められた（標準体長: $r=0.65$; 体重: $r=0.58$; 精巣重量: $r=0.72$; GSI: $r=0.76$ ）。10 分割の交差検定で求めた予測正確度（標準誤差）は、標準体長が 0.58（0.00）、体重が 0.50（0.01）、精巣重量が 0.62（0.01）、GSI が 0.61（0.01）といずれの形質でも高かった。

4-4. 考察

本章では、遺伝的に早熟である A2 の後代を含む既存の養殖トラフグ集団を用いて、早熟形質のゲノム予測が可能であるか検証した。まず、GWAS により標準体長、体重、精巣重量および GSI と関連する SNP 座を探索した。その結果、すべての形質で有意水準を超える SNP 座は認められなかった。第 3 章で行った QTL 解析に加え、GWAS においても影響力の強いゲノム領域が見つからなかったことから、早熟性や体サイズに関する形質が多因子形質であることが強く支持され、個々の遺伝子の効果に注目する MAS は適していないことが改めて確認された。

続いて、当該集団に対する GS 法の利用可能性を検証した。GBLUP 法により推定した各形質の遺伝率 (h^2) は 0.30–0.44、予測正確度 (acc) は 0.50–0.62 であった。これは、成長形質を対象としたゲノム予測が行われている他の養殖魚であるタイセイヨウサケ (体重: $h^2=0.60$; $acc=0.70$) (Tsai *et al.*, 2015)、コイ *Cyprinus carpio* (標準体長: $h^2=0.33$; $acc=0.71$) (Palaiokostas *et al.*, 2018)、ナイルティラピア (体重: $h^2=0.36$; $acc=0.60$) (Yoshida *et al.*, 2019) と同等で、トラフグの早熟性や体サイズにおいても正確性の高い予測が可能であると言えた。解析集団と選抜候補が近い血縁関係にある場合、解析集団で構築した予測モデルを用いて選抜候補から高い正確度で選抜可能である (Dactwyler *et al.*, 2013)。魚類は産仔数が多いため、解析集団と同一の集団から多数の親魚候補を得られる。本研究においても、500 個体程度を親魚候補として保持しており、今後、本章で構築した予測モデルを親魚候補集団に適用することで効果的な選抜が行えると期待される。

GS 法は大量の遺伝マーカーを必要とするが、実際に必要な数は、解析集団の集団構造に大きく依存する。畜産動物では、産仔数が少なく血縁個体が少ないため、予測正確度を確保するためには数十万座の SNP が必要とされる (Fan *et al.*, 2010)。一方、上述の通り、魚介類の多くは多産であるために解析集団内には近縁個体が多い。そのため、1,000 から 5,000 座程度の SNP でも十分に高い予測正確度を得られる (Ødegård *et al.*, 2014; Zenger *et al.*, 2019; Kriaridou *et al.*, 2020)。本章においても約 5,600 座の SNP を用いて高い予測正確度を得られた。第 2 章で明らかにした通り、トラフグ親魚には複数の系統が存在し、これらを系統間交配または野生魚と交配して市販種

苗を生産している。当該集団も同様に血縁関係にある複数の全きょうだい集団を混合して解析集団としたことにより、高い予測正確度が得られたと考えられた。

実際にトラフグの早熟形質を改良する場合、出荷時期（12月）における精巣重量と GSI のどちらを選抜指標とすべきかを事前に決定しておく必要がある。ゲノム予測で得られた遺伝率および予測正確度は両形質でも高かったことから、いずれの形質でも GS 法による選抜が可能であると考えられた。しかし、精巣重量および GSI の抽出群（上位 100 個体）に注目したところ、精巣重量の抽出群に比べて GSI の抽出群には体重が小さい個体が多く含まれる傾向にあった。また、各抽出群において、対象形質の表現型値と体重との間で相関を調べたところ、精巣重量の抽出群では中程度の正の相関を示したが、GSI の抽出群では相関が認められなかった。これらの結果は、GSI を対象形質とした場合は体重が小さい個体が選抜される可能性が高いことを示唆する。そのため、トラフグ早熟形質の選抜には精巣重量を用いた方が良いと考えられた。また、精巣重量の抽出群では精巣重量と体重との間に正の相関があったことから、精巣重量を選抜の対象形質とすることで、間接的に体重の同時改良も実現できると期待された。

本章で収集した解析魚は、記録上では、各生簀はほぼ一つの全きょうだい集団で構成されることになっていた。遺伝マーカーを用いた遺伝構造解析においても、1 生簀がほぼ一つの血縁クラスターで構成されることが確認された。本研究が示す通り、GS 法では、ジェノタイプデータから個体間の血縁関係を推定できるため、正確な血縁情報が無くても効果的な選抜が可能であり、また、近交を回避した交配を計画することもできる。以上の結果からも、GS 法はトラフグのような厳密な系統管理が行われていない養殖集団に対して効果的な選抜法であると言えた。一方で、いくつかの血縁クラスターが複数の測定日に出現しており、一つの生簀に複数の全きょうだい集団が混合されていたことも明らかになった。この結果は、種苗生産や海面飼育の過程で複数系統が混合された可能性を示している。混合がどの時点で行われたのかは不明であるが、養殖業者から買い戻した個体を親魚とする場合に血縁情報の誤りの原因となりうるため、第 2 章と同様に、遺伝マーカーを用いた系統把握が重要であることが確認された。

本章では、トラフグの早熟形質や体サイズにおいてゲノム予測が可能であることを明らかに

した。また、正確な血縁情報のない養殖集団においてゲノム情報から遺伝構造を推定することにより、過度な近交を回避しながらGS法による選抜育種が行える可能性を示した。すなわち、GS法の利用により、喪失が危ぶまれる既存の系統を遺伝的に救済し、さらなる遺伝的改良の実行が可能であることが示された。

総合考察

優れた表現型を示しつつも厳密な系統管理がなされなかったがために消失した系統は多い。これまで、このような系統は表現型に悪影響を与えることなく救済することはできなかった。しかし、近年のジェノタイピング技術の発展により、大量の遺伝マーカーを利用することで、当該系統を遺伝的に救済し、さらなる遺伝的改良を図れると期待された。本研究では、この可能性を実証するため、トラフグの「早熟系統」に注目し、遺伝マーカーを用いて当該系統と他の系統との類縁関係を推定するとともに、早熟形質の遺伝機構を明らかにして、GS法による早熟系統の選抜育種の可能性を検討した。まず、第1章において、トラフグに認められる早熟性が遺伝形質であることを後代検定で明らかにした。第2章では、長崎県内の親魚集団を集団遺伝学的解析に付して親魚間の類縁関係を明らかにした。その結果、各系統を維持していくには、遺伝マーカーを利用した厳密な系統管理法の導入と早熟形質の固定化が急務であることが示された。続いて、第3章におけるQTL解析により、当該形質が効果の弱い多数の遺伝子に支配される多因子形質であることを明らかにし、当該形質の選抜育種にはMASよりもGS法が適していることを示した。最後に、第4章において、厳密な系統管理が行われていないトラフグ養殖集団を対象として早熟形質のゲノム予測を試み、GS法の有効性を示した。GS法では、ジェノタイプデータから個体間の血縁関係を推定できるため、正確な系統情報が無くても、効果的な選抜が可能である。また、近交を回避した交配を計画することもできる。以上の結果から、大量の遺伝マーカーを用いることで、正確な血統情報がない既存の養殖集団の救済と遺伝的改良が可能であることを示した。この遺伝的救済により、系統の喪失が危ぶまれる多くの魚種で「既存系統を活用した選抜育種」が可能となり、養殖生産の向上に直結すると期待された。

養殖集団における遺伝的多様性の減少は、初期生残率や成長率の低下、産仔数の減少など、当該集団の重要形質に遺伝的劣化（近交弱勢）をもたらすことが知られている（Gjerde *et al.*, 1983; Su *et al.*, 1996; Gallardo *et al.*, 2004; Fesshaye *et al.*, 2007）。また、アレルの組合せが減少することにより遺伝的改良の停滞も生じる（Bulmer, 1971; Van Grevenhof *et al.*, 2012）。そのため、出来る

限り選抜集団の遺伝的多様性を高く維持することが望まれる。しかし、選抜育種は集団の中から優良な個体の子孫のみを残していく作業であるため、遺伝的多様性の減少は避けられない。すなわち、選抜育種を行うには、対象集団の遺伝的多様性を事前に把握し、育種目標（世代あたりの改良量）と選抜圧を決定することが重要である。第2章で遺伝構造を明らかにしたトラフグ親魚集団には複数の系統が存在しており、主要3系統の有効集団サイズ (N_e) は10から25個体程度と推定された。また、第4章でゲノム予測を行った解析魚は当該親魚集団から作出された10個体程度の全きょうだい集団に由来しており、有効親魚サイズは20個体以下であると考えられた。これらの値は先行してBLUP法やGS法が導入されて育種化が進んだタイセイヨウサケ ($N_e = 13-79$; Säisä *et al.*, 2003) やナイルティラピア ($N_e = 64-111$; Ponzoni *et al.*, 2010) の推定値と比べても小さく、数世代後には系統の維持が困難になることが懸念される。そのため、今後、ゲノム予測の結果を利用して選抜集団を作出する際は、種苗生産機関が保有する各系統の親魚を混合して有効集団サイズを確保するなど、継続した選抜育種が行える交配方法を検討する必要がある。GS法は遺伝率の高い形質では特定の家系に属する個体が選抜されやすいが、その過程で分集団や個体間の遺伝距離が推定できる。そのため、各分集団から優れた個体を選抜（家系内選抜）して、分集団間でファクトリアルな交配を行ったり、遺伝距離の遠い個体同士を交配したりすることで、遺伝的多様性の低下速度を抑えることが可能になる (Nirea *et al.*, 2012; 野村, 2017)。また、遺伝的多様性が著しく低下した場合に、無選抜集団からGS法で選抜した優良個体を選抜集団に導入することで改良の停滞を最少にしながら選抜集団の維持を図る方法も提案されている (Hosoya *et al.*, 2018)。第4章で得た親魚候補から創出する予定の選抜系統においても、これらの方法を利用することで、遺伝的多様性の確保と遺伝的改良の両立が図れると期待される。

BLUP法による選抜育種が行われる家畜動物や一部の養殖種においては、近交を回避しながら選抜の効果を最大限にする交配方法が提案されており、主にシミュレーション研究でその有効性が示されている (和田, 2008; 野村, 2017)。例えば、optimum contribution selection (OCS) は親として用いる個体間の血縁関係 (共祖係数) から後代の平均近交係数が最小となる交配をシミュレートし、遺伝的改良量を最大にする交配を決定する選抜手法である (Meuwissen, 1997)。近年

は血縁関係の把握にジェノタイピングデータを利用することにより、より正確で効率的な交配の提案が可能となっている (Nielsen *et al.*, 2011; Sonesson *et al.*, 2012)。また、後代の評価と選抜候補の選抜を繰り返し行うことにより目標形質にとって有利なアレルを蓄積する recurrent selection (RS) と呼ばれる選抜手法においても、ゲノム予測との組み合わせにより近交回避と遺伝的改良が両立できる (Bijma *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2020)。OCS や RS のシミュレーションのためには FISHBOOSTEL などのソフトウェアや (Sonesson and Meuwissen, 2015)、AlphaSimR や optiSel といった R パッケージが公開されており (Wellmann, 2019; Gaynor *et al.*, 2020)、選抜候補のジェノタイピングデータや育種価を入力することにより、近交係数の上昇を制御しながら遺伝的獲得量を最大にする交配の組み合わせを容易に決定できる。また、これらの選抜手法では選抜候補の様々な優良形質を同時に考慮することも可能で、複数形質の同時選抜が可能である (Meuwissen, 1997; 和田, 2008; Lin *et al.*, 2020)。

MAS や GS 法といったゲノム育種には大量の遺伝マーカーの取得が不可欠である。そのため、これらの選抜法の導入を検討する際には、費用対効果に優れたジェノタイピング法を選択することが重要となる。また、魚類の GS 法においては、当面、世代が異なる集団で繰り返しゲノム予測を行っていく必要があることから (Sonesson and Meuwissen, 2009)、世代間で同じ SNP 座を利用できることが好ましい。一般的に、農畜産物の遺伝育種研究におけるジェノタイピングには、ハンドリングが容易で再現性が高い SNP アレイが利用される (Robledo *et al.*, 2018)。しかし、SNP アレイの設計には多額の費用が必要となるため、養殖対象種における利用例はタイセイヨウサケなどの一部の魚種に限られている。これらの魚種では、養殖規模が巨大で SNP アレイの開発費用に対するコスト回収が可能であった。また、すでに育種化が進んでいて遺伝子流入がないために、取得する SNP 座が固定されることに支障がなかった。このような理由で、SNP アレイの利用に踏み切ることができたと言える。一方、本研究では、トラフグの SNP アレイが開発されていないことから、次世代シーケンサーベースのジェノタイピング手法を採用した。第 4 章で用いた Ampliseq 法は既知の SNP 座を標的とした multiplex PCR により SNP 多型を取得する手法であり、サンプル数と SNP 数を自由に設計できる。そのため、安定性と費用対効果に優れた

手法であると言える (Sato *et al.*, 2019)。実際、本研究においても、一頭体当たり 4,000 円程度の費用で、トラフグ養殖集団の複数ライブラリプールからゲノム予測に十分な約 5,600 座の SNP 座が得られた。Ampliseq 法は SNP アレイと同様に事前に SNP 座を決定しておく必要があり、そのためには高品質の全ゲノム情報が不可欠となる。我が国における養殖対象魚においてはトラフグ (Kai *et al.*, 2011) のほか、クロマグロ (Nakamura *et al.*, 2013; Suda *et al.*, 2019)、ヒラメ (Wei *et al.*, 2017)、ブリ (Yasuike *et al.*, 2018)、マダイ (Ga-Hee *et al.*, 2018) などの重要魚種において全ゲノム配列の公開が相次いでおり、これらの魚種では Ampliseq 法が効果的なジェノタイプングツールとして選択肢となり得る。一方、全ゲノム情報が得られていない魚種では、RAD-seq 法 (Baird *et al.*, 2008; Peterson *et al.*, 2012; Andrews *et al.*, 2016) や第 3 章で利用した GRAS-Di 法の導入が検討可能である。GRAS-Di 法はランダムプライマーを用いたジェノタイプング技術で、シンプルなライブラリ調製でゲノムワイドに増幅したアンプリコンから数千から数万 SNP 座の多型情報が得られる (Hosoya *et al.*, 2019)。また、RAD-seq 法よりも再現性が高いため (Enoki and Takeuchi, 2018; Miki *et al.*, 2020)、データ出力が安定的でサイズセレクションやクオリティフィルタリングといった通常なら煩雑になりがちなバイオインフォマティクスが容易であるなどの利点がある。GRAS-Di 法は RAD-seq 法に比べて利用実績が乏しいが、今後は効果的なジェノタイプング法として普及していくと考えられる。RAD-seq 法と GRAS-Di 法には全ゲノム情報が必須ではないため、非モデル生物であってもゲノムワイドな遺伝解析が可能となる (Hosoya *et al.*, 2019; Ikeda *et al.*, 2020; Ito *et al.*, 2020; Miki *et al.*, 2020)。しかし、パラログな SNP 座をより正確に区別してジェノタイプングするには、参照配列の利用が望ましい。近年の DNA 解析技術の発展により、生物種を問わず全ゲノム規模の配列情報の取得が容易となっており (佐藤・木下, 2020)、予備的な解析で選抜育種の効果が期待されるのであれば全ゲノム参照配列の構築を検討すべきである。また、最初に GRAS-Di 法で得たジェノタイプデータで遺伝構造解析や GWAS などを行い、GS 法が効果的と判断された場合には参照配列を構築して GRAS-Di 法の解析精度を高めたり、Ampliseq 法に移行したりするなど、ジェノタイプング法を組み合わせることも効果的である。一方で、これらのジェノタイプング技術で得られた大量のデータを養殖現場で実際に活用できる

かどうかは、選抜を行う機関の解析能力に依存する。畜産業における家畜改良センターや農業における次世代作物開発研究センター（農業・食品産業技術総合研究機構）のような解析支援体制が整っていない養殖業においては、現状では、このような解析を実施できるのは、限られた研究室だけであり、民間企業や地方水産試験場では実施が困難である。集団遺伝学の分野では大量の遺伝マーカーを扱う解析パイプラインが公開されており、多型の検出から各種の集団遺伝学的解析を一貫して処理することが可能となっている（Catchen *et al.*, 2013; Faircloth, 2016）。水産育種においても同様のパイプラインが構築され、バイオインフォマティクス処理における負担が軽減されれば、産業の現場に近い民間企業や地方水産試験場レベルでの選抜育種の導入を推進できると期待される。ゲノム解析技術は目覚ましく発展しており、コストの削減や新技術の導入が日進月歩で進行している。それぞれのジェノタイピング技術の原理やメリット・デメリットをよく把握し、目的に沿った解析手法を選択することが重要である。

以上のとおり、本研究では、大量の遺伝マーカーを用いることで、正確な血統情報がない既存の養殖集団の遺伝的救済とさらなる選抜育種が可能であることを示した。ジェノタイピング法に加えてシーケンス技術の発展も目覚ましく、中立遺伝マーカー以外にもより多くのゲノム情報が容易に取得可能となっている。今後はこれらの高度ゲノム情報を取り入れることで選抜育種法が発展することで、既存の集団や、新たな養殖集団でも育種化が進み、養殖業の生産効率が飛躍的に向上していくと期待される。

論文の内容の要旨

世界人口の爆発的増加に伴い、タンパク源としての水産資源の重要性が増している。特に、天然資源が減少し続けるなかで養殖生産に対する期待は大きく、世界的な養殖生産量は増加の一途にある。そのような背景のもと、生産性向上技術として選抜育種が注目されている。例えば、ノルウェーなどの北欧諸国では、家系選抜やゲノム育種などの先端的な選抜技術を導入したことによって、タイセイヨウサケ *Salmo salar* などの養殖生産量が急増している。一方、我が国では世界に先駆けて多くの養殖技術が確立されてきたものの、選抜育種への注目度は低かった。これまでも種苗生産業者が独自に選抜に取り組む例はあったが、そこでは養殖場での飼育成績をもとに優良個体を選抜する表現型選抜が行われており、多くの場合で近親交配の回避策として野生親魚の導入も併用された。そのため、厳密な系統管理がなされている例は稀で、系統の創出と喪失が繰り返される状況にあった。

日本を含む東アジア地域で盛んに養殖されているトラフグ *Takifugu rubripes* においても、厳密な系統管理は行われてこなかった。本種の完全養殖技術は 1990 年代に確立され、これまでに表現型選抜によりいくつかの「系統」が作出されており、現在でも高成長性や耐病性を持つとされる複数の「系統」が存在している。しかしながら生産者が「優良系統は 3 世代で喪失する」と述べるように、系統確立に成功しているとは言い難かった。本種は筋肉の高価値もさることながら、発達した精巢（白子）が珍重されるため、精巢重量も選抜対象であり、「精巢が発達しやすい系統（早熟系統）」の存在が知られている。しかし、この「早熟系統」においても厳密な家系管理はなされておらず、系統の喪失が危惧されていた。このため、当該系統の血縁構造の把握や、優良形質の固定とさらなる改良が望まれている。

選抜育種の実行にあたっては、まず、対象形質の遺伝性を確認することが第一歩となる。つぎに、厳密な家系管理の下で優良個体（あるいは家系）の選抜を実施する。選抜においては、家系集団を用いて対象形質の遺伝機構や遺伝率を明らかにし、適切な育種目標と選抜方法を決定して遺伝的改良を目指すことになる。厳密な家系管理や家系集団の利用には正確な血統情報が必

須であったが、遺伝マーカーを利用することで、血統情報に誤りがあっても、集団構造や個体間の血縁関係を推定して補正することが可能である。また、遺伝マーカーの取得が容易になったことから、短期間で数千個体から数万のマーカー情報を取得して遺伝機構の解明や選抜に利用することも可能となった。すなわち、大量の遺伝マーカーを用いることで、すでに血統情報が曖昧なまま系統化を進めてしまった養殖集団に対しても、様々な形質で遺伝的改良を達成し得ると考えられる。そこで、本研究では、トラフグの「早熟系統」に注目し、遺伝マーカーを利用して当該系統と他の系統との血縁関係を推定しながら早熟形質の遺伝機構を明らかにしたうえで、早熟系統に適した選抜育種法を検討した。これにより、「既存の養殖集団に対する選抜育種」の達成を目指した。

第1章. 早熟系統の遺伝的および内分泌的特徴

本章では、トラフグの「早熟系統 (A 系統)」に見られる早熟性が真に遺伝形質であることを確認するために、A 系統、非早熟系統 (B 系統) および野生魚に由来するオス個体を、B 系統のメス個体と交配した母系半きょうだい集団を作出して後代検定を行った。その結果、A 系統に見られる早熟性が相加的遺伝効果に支配される遺伝形質であることを確認した。また、A 系統の早熟現象は、体サイズ依存的ではないことも明らかにした。次に、A 系統のオス個体と野生オス個体に由来する母系半きょうだい集団間で血中性ステロイド濃度を経時的に比較したところ、A 系統由来の集団の方が、精巣発達開始の約 6 か月前の時点で、血中エストラジール 17- β (E2) 濃度が有意に高いことが判明した。このため、A 系統の早熟性は、E2 を介した内分泌メカニズムでコントロールされていると考えられた。

第2章. 養殖用親魚集団の遺伝的構造解析

選抜育種を行うには厳密な家系管理が要求されるが、トラフグ種苗生産においては買い戻した養殖個体や野生個体が親魚に繰り返し導入されていることから血統情報は不確実性が高く、「系統」内の遺伝的多様性や血縁度も不明であった。そこで本章では、A 系統を含む養殖用親魚集団の遺伝的類縁関係を把握することを目的として、長崎県内の種苗生産機関が保有する親魚

の DNA サンプルを収集して遺伝構造解析を行った。また、種苗生産機関が記録する各親魚の血統情報の聞き取り調査も行い、遺伝解析の結果との比較からその正確性を検証した。聞き取り調査の結果、収集した 56 個体の親魚には 3 系統（A-C 系統）の人工生産魚と野生魚が含まれていることがわかった。12 座のマイクロサテライトマーカーを用いて主座標分析、血縁解析ならびに STRUCTURE 解析を行ったところ、B 系統と C 系統の独立性が支持されたものの、A 系統は他の系統からの独立性が弱く、野生親魚を含む他の系統との系統間交配が頻繁に行われていることが推測された。このため、系統外からの遺伝的流入が今後も継続すれば、A 系統の特徴的な表現型（早熟性）が失われる可能性が高いと考えられた。また、遺伝解析の結果と聞き取り調査の結果が一致しない個体が散見され、血統情報の誤りが確認されたことから、遺伝マーカーを用いた系統管理の必要性が示された。

第 3 章. QTL 解析による遺伝機構の解明

早熟形質の固定とさらなる遺伝的改良のためには早熟性の遺伝機構を解明し、当該形質に適した選抜育種法を選定する必要がある。そこで本章では、第 1 章の後代検定において早熟性が確認された個体を祖父とする近交家系を作出し、一塩基多型 (SNP) を用いたゲノムワイド QTL 解析を行った。その結果、14 番染色体上に弱いながらも精巣重量に有意な影響力を持つ QTL が認められた。当該 QTL 領域内には雌性ホルモンの抑制機能を持つ *gdj9* が存在した。第 1 章の結果を考え合わせると、*gdj9* の発現や機能に影響を与えるような変異が E2 の合成を亢進することにより早熟化する機構の存在が推測された。また、標準体長および体重においても有意な影響力を持つ QTL が 14 番染色体上と 21 番染色体上に認められ、14 番染色体上の QTL は精巣重量と 95% 信用区間が重なっていた。この結果は、精巣重量と体サイズは一部で同じ遺伝子座の影響を受けられるものの、異なる遺伝機構に支配されることを示しており、第 1 章の早熟現象が体サイズ依存的ではないという結果と整合していた。また、これらのほかにも、精巣重量および体サイズに関連した複数の示唆的な QTL が検出された。しかし、検出されたすべての QTL の効果は 0.7–10.5% 程度と小さく、A 系統に認められる早熟性と体サイズは、いずれも効果の小さな多数の遺伝子に

支配される多因子形質であることが判明した。

第4章. ゲノム予測によるゲノミックセレクション法の有効性

前章においてA系統に見られる早熟形質が多因子形質であることが明らかとなった。そこで、早熟形質の固定とさらなる遺伝的改良に適した選抜法として、多因子形質の選抜に実績のあるゲノミックセレクション (GS) 法の有効性を検証した。解析魚には長崎県内で海面養殖された10 集団程度の全きょうだいからなる 501 個体を用いた。Ampliseq 法で判定した 5,583SNP 座の多型情報を用いて、標準体長、体重、精巣重量 (オスのみ)、生殖腺体指数 (GSI, オスのみ) に関するゲノムワイド関連解析を行ったが、全ての形質において有意水準 ($-\log_{10}(P) = 5.05$) を超える SNP 座は認められず、早熟性や体サイズが多因子形質であることが改めて支持された。続いて、同じデータを用いて GBLUP 法によるゲノム予測を行い、各個体のゲノム予測育種値 (genomic estimated breeding value, GEBV) を算出した。各表現型について観察値と GEBV の間で相関解析を行ったところ、すべてに中程度の正の相関が認められた ($r = 0.58-0.76$)。10 分割の交差検証で算出された予測正確度は、精巣重量が 0.62、GSI が 0.61、標準体長が 0.58、体重が 0.50 といずれも高い値を示した。これらの結果から、トラフグの早熟形質ならびに体サイズ形質は GS 法による改良が可能であることが示された。

本研究では、初めに、トラフグ A 系統に認められる早熟性が遺伝形質であることを後代検定で明らかにした。また、長崎県内の親魚集団には A 系統を含む複数の系統が存在しているものの、系統管理が不十分であり、遺伝マーカーなどを利用した厳密な管理法の導入と早熟形質の早急な固定化が必要であることを示した。さらに、QTL 解析により早熟形質が効果の弱い多数の遺伝子に支配される多因子形質であることを明らかにした。最後に、実際の養殖集団を用いて、早熟個体の選抜に対して GS 法が有効であることを確認した。以上の結果から、大量の遺伝マーカーを用いることで、正確な血統情報がない既存の養殖集団に対しても選抜育種が可能であることを示した。本研究で得られた知見が、トラフグのみならず、これまで表現型選抜が成功せず、系統の創出と喪失を繰り返してきた既存の養殖集団における選抜育種の導入に活用されること

が期待される。

謝辞

本研究の遂行および論文執筆にあたり、終始丁寧なご指導ご鞭撻ならびにご校閲を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所教授の菊池潔博士に深甚なる謝意を表す。

本論文のご校閲を賜り、有益なご教示をいただきました東京大学大学院農学生命科学研究科教授の浅川修一博士、同准教授の大久保範聡博士、渡邊壯一博士、近畿大学農学部水産学科准教授の中田久博士に厚く御礼を申し上げます。中田久博士におかれては、長崎県総合水産試験場在職時より本研究の設計、解析魚の作出などにおいてもご協力、ご指導を賜り、重ねて感謝申し上げます。

研究遂行に際して適切なご指導ならびに度重なるご校閲を賜り、親身になってご助言をいただいた東京大学大学院農学生命科学研究科附属水産実験所助教の細谷将博士に心より御礼申し上げます。本研究は、細谷将博士のお力添えなしには成し遂げられなかったものであり、重ねて拝謝申し上げます。また、Ampliseq 法の実施にあたり、ご助言とご協力をいただいた同実験所特任研究員佐藤茉菜博士に厚く御礼申し上げます。研究遂行に多大なご協力を頂いた同実験所の学生、卒業生、職員の皆様に対し心から感謝の意を表す。

本研究のサンプル提供にご協力いただくとともに、採卵や飼育方法にご助言を賜った長崎県種苗生産技術研究会会員の皆様に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えていただくとともに、解析魚の飼育やサンプリングにご協力いただいた元長崎県総合水産試験場長の藤井明彦博士、同長嶋寛治氏ならびに同試験場の宮木廉夫博士、山田敏之博士、濱崎将臣博士、長崎県庁水産部の門村和志博士に心から感謝申し上げます。

最後に、これまで温かく見守ってくれた妻と母に深く感謝申し上げます。

引用文献

- Akaike H (1973) Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov BN, Csaki F (eds), Second international symposium on information theory, Akademiai Kiado, Budapest, pp 267–281
- Alexander DH, Novembre J, Lange K (2009) Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, 19: 1655–1664
- Amer MA, Miura T, Miura C, Yamauchi K (2001) Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen *Hucho perryi*. *Biology of Reproduction*, 65: 1057–1066
- Andrews KR, Good JM, Miller MR, Luikart G, Hohenlohe PA (2016) Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17: 81–92
- Asahina K, Suzuki K, Aida K, Hibiya T, Tamaoki BI (1985) Relationship between the structures and steroidogenic functions of the testes of the urohaze-goby (*Glossogobius olivaceus*). *General and Comparative Endocrinology*, 57: 281–292
- Avalos E, Smith C (1987) Genetic improvement of litter size in pigs. *Animal Science*, 44: 153–163
- Ayllon F, Kjærner-Semb E, Furmanek T, Wennevik V, Solberg MF, Dahle G, Taranger JG, Glover KA, Almén MS, Rubin CJ, Edvardsen RB, Wargelius A (2015) The *vgll3* locus controls age at maturity in wild and domesticated atlantic salmon (*Salmo salar* L.) males. *PLoS Genetics*, 11: e1005628
- Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, Selker EU, Cresko WA, Johnson EA (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, 3: e3376

- Barria A, Christensen KA, Yoshida GM, Correa K, Jedlicki A, Lhorente JP, Davidson WS, Yáñez JM (2018) Genomic predictions and genome-wide association study of resistance against *Piscirickettsia salmonis* in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) using ddRAD sequencing. *G3: GENES, GENOMES, GENETICS*, 8: 1183–1194
- Barson N, Aykanat T, Hindar K, Baranski M, Bolstad GH, Fiske, Jacq C, Jensen AJ, Johnston SE, Karlsson S, Kent M, Moen T, Niemelä E, Nome T, Næsje TF, Orell P, Romakkaniemi A, Sægvog H, Urdal K, Erkinaro J, Lien S, Primmer CR (2015) Sex-dependent dominance at a single locus maintains variation in age at maturity in salmon. *Nature*, 528: 405–408
- Beavis WD (1994) The power and deceit of QTL experiments: lessons from comparative QTL studies. *Proceedings of the Forty-Ninth Annual Corn and Sorghum Industry Research Conference, ASTA, Washington DC*, pp 250–266
- Beavis WD (1998) QTL analyses: power, precision, and accuracy. In: Paterson A H, (eds) *Molecular dissection of complex traits*, CRC Press, New York, pp 145–162
- Bentsen HB, Eknath AE, Rye M, Thodesen J, Gjerde, B (2003) Genetic improvement of farmed tilapias: response to selection for growth performance in the GIFT project. *International Association for Genetics in Aquaculture*, pp 68
- Bijma P, Wientjes YC, Calus MP (2020) Breeding top genotypes and accelerating response to recurrent selection by selecting parents with greater gametic variance. *Genetics*, 214: 91–107
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30: 2114–2120

- Brockmann GA, Haley CS, Renne U, Knott SA, Schwerin M (1998) Quantitative trait loci affecting body weight and fatness from a mouse line selected for extreme high growth. *Genetics*, 150: 369–381
- Broman KW, Wu H, Sen Ś, Churchill GA (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 19: 889–890
- Buch L, Sørensen M, Berg P, Pedersen L, Sørensen A (2012) Genomic selection strategies in dairy cattle: Strong positive interaction between use of genotypic information and intensive use of young bulls on genetic gain. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 129: 138–151
- Bulmer MG (1971) The effect of selection on genetic variability. *The American Naturalist*, 105: 201–211
- Burnham KP, Anderson DR (2002) Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach, 2nd edn. Springer, New York
- Campbell B, Dickey JT, Swanson P (2003) Endocrine changes during onset of puberty in male spring Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Biology of Reproduction*, 69: 2109–2117
- Carrillo M, Zanuy S, Prat F, Cerda J, Ramos J, Mañanós E, Bromage N (1995) Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In: Bromage NR, Roberts RJ (eds) Broodstock management and egg and larval quality, Blackwell Science, Oxford, pp 138–168
- Castillo-Juárez H, Casares JCQ, Campos-Montes G, Villela CC, Ortega AM, Montaldo HH (2007) Heritability for body weight at harvest size in the Pacific white shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*, from a multi-environment experiment using univariate and multivariate animal models. *Aquaculture*, 273: 42–49
- Catchen J, Hohenlohe P, Bassham S, Amores A, Cresko W (2013) Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, 22: 3124–3140

- Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ (2015) Second-generation PLINK: Rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience*, 4: 7
- Chaves-Pozo E, Liarte S, Vargas-Chacoff L, García-López A, Mulero V, Mesequer J, Mancera JM, García-Ayala A (2007) 17 β -estradiol triggers postspawning in spermatogenically active gilthead seabream (*Sparus aurata* L) males. *Biology of Reproduction*, 76: 142–148
- Chen W, Liu L, Ge W (2017) Expression analysis of growth differentiation factor 9 (*Gdf9/gdf9*), anti-müllerian hormone (*Amh/amh*) and aromatase (*Cyp19a1a/cyp19a1a*) during gonadal differentiation of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biology of Reproduction*, 96: 401–413
- Christensen KI, Gutierrez AP, Lubieniecki KP, Davidson WS (2017) TEAD3, implicated by association to grilising in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 479: 571–578
- 中田久, 松山倫也, 池田義弘, 松浦修平 (1997) トラフグ養成親魚からの採卵技法の開発. 日本水産学会誌, 63: 728–733
- 中田久 (2001) トラフグおよびブリの親魚養成と採卵技術に関する研究. 博士論文, 九州大学
- Clase KL, Mitchell PJ, Ward PJ, Dorman CM, Johnson SE, Hannon K (2000) FGF5 stimulates expansion of connective tissue fibroblasts and inhibits skeletal muscle development in the limb. *Developmental Dynamics*, 219: 368–380
- Crandell PA, Gall GAE (1993) The genetics of body weight and its effect on early maturity based on individually tagged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 117: 77–93

- Daetwyler HD, Calus MPL, Pong-Wong R, de los Campos G, Hickey JM (2013) Genomic prediction in animals and plants: Simulation of data, validation, reporting, and benchmarking. *Genetics*, 193: 347–365
- Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, Stevenson SL, Cox K, Rosen V, Lyons KM (2001) Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nature Genetics*, 27: 84–88
- Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, Handsaker RE, Lunter G, Marth GT, Sherry ST, McVean G, Durbin R (2011) The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27:2156–2158
- de Waal PP, Wang DS, Nijenhuis WA, Schulz RW, Bogerd J (2008) Functional characterization and expression analysis of the androgen receptor in zebrafish (*Danio rerio*) testis. *Reproduction*, 136: 225–234
- Devlin RH, Nagahama Y (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191–364
- Do C, Waples RS, Peel D, Macbeth GM, Tillett BJ, Ovenden JR (2014) NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*, 14: 209–214
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4: 359–361
- Endelman, JB (2011) Ridge regression and other kernels for genomic selection with R package rrBLUP. *The Plant Genome*, 4

- Enoki H, Takeuchi Y (2018) New genotyping technology, GRAS-Di, using next generation sequencer. Proceedings of the Plant and Animal genome conference XXVI, San Diego, CA
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611–2620
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564–567
- Fairbairn DJ (1997) Allometry for sexual size dimorphism: Pattern and process in the coevolution of body size in males and females. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 28: 659–687
- Faircloth BC (2016) PHYLUCES is a software package for the analysis of conserved genomic loci. *Bioinformatics*, 32: 786–788
- Fan B, Du ZQ, Gorbach DM, Rothschild MF (2010) Development and application of high-density SNP arrays in genomic studies of domestic animals. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23: 833–847
- Felip A, Zanuy S, Carrillo M (2006) Comparative analysis of growth performance and sperm motility between precocious and non-precocious males in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture*, 256: 570–578
- Fessehaye Y, Komen H, Rezk MA, van Arendonk JAM, Bovenhuis H (2007) Effects of inbreeding on survival, body weight and fluctuating asymmetry (FA) in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 264: 27–35

- Fuji K, Kobayashi K, Hasegawa O, Coimbra MR, Sakamoto T, Okamoto N (2006) Identification of a single major genetic locus controlling the resistance to lymphocystis disease in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 254: 203–210
- Fuji K, Hasegawa O, Honda K, Kumasaka K, Sakamoto T, Okamoto N (2007) Marker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 272: 291–295
- 藤田矢郎 (1962) 日本産主要フグ類の生活史と養殖に関する研究. 長崎水試論文集, 2: 1–121
- Ga-Hee S, Younhee S, Myunghee J, Ji-man H, Sangmin L, Sathiyamoorthy S, Eun-Soo N, Eun-Ha S, Eun-Hee P, Youn PJ, Young-Ok K, Kwnag-Min C, Bo-Hye N, Chan-Il P (2018) First draft genome for red sea bream of family *Sparidae*. *Frontiers in Genetics*, 9: 643
- Gallardo JA, García X, Lhorente JP, Neira R (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
- Gage MJG (1994) Associations between body size, mating pattern, testis size, and sperm lengths across butterflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 258: 247–254
- García-Ruiz A, Cole JB, VanRaden PM, Wiggans GR, Ruiz-López FJ, Van Tassell CP (2016) Changes in Holstein cattle from genomic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113: E3995–E4004
- Garrison E, Marth G (2012) Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. arXiv: 1207.3907, preprint

Gaynor RC, Gorjanc G, Hickey JM (2020) AlphaSimR: an R-package for breeding program simulations. Biorxiv, preprint

Georges M, Nielsen D, Mackinnon M, Mishra A, Okimoto R, Pasquino AT, Sargeant LS, Sorensen A, Steele MR, Zhao X (1995) Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics*, 139: 907–920

Gines R, Afonso JM, Arguello A, Zamorano MJ, Lopez JL (2003) Growth in adult gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) as a result of interference in sexual maturation by different photoperiod regimes. *Aquaculture Research*, 34: 73–83

Gjedrem T (2000) Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquaculture Research*, 31: 25–33

Gjedrem T (2010) The first family-based breeding program in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 2: 2–15

Gjedrem T, Robinson N, Rye M (2012) The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: a review. *Aquaculture*, 350–353: 117–129

Gjedrem T, Robinson N (2014) Advances by selective breeding for aquatic species: a review. *Aquaculture Sciences*, 5: 1152–1158

Gjedrem T (2016) The benefit of using selective breeding for aquatic species. *Annals of Aquaculture and Research*, 3: 1021

Gjedrem T, Rye M (2018) Selection response in fish and shellfish: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10: 168–179

- Gjerde B, Gunnes K, Gjedrem T (1983) Effect of inbreeding on survival and growth in rainbow trout. *Aquaculture*, 34: 327–332
- Glover KA, Otterå H, Olsen RE, Slinde E, Taranger GL, Skaala Ø (2009) A comparison of farmed, wild and hybrid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared under farming conditions. *Aquaculture*, 286: 203–210
- Goudet J (2003) Fstat (ver. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Guimarães EP, Ruane J, Scherf BD, Sonnino A, Dargie JD (2007) Marker assisted selection: Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. FAO, Rome
- Guo QY, Gao ZZ, Zhao L, He JP, Dong CS (2013) Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), ALK5, and claudin-11 in adult alpaca testis. *Acta Histochemicaica*, 115: 16–21
- Hallerman EH, Beckmann S (1988) DNA-level polymorphism as a tool in fisheries science. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45: 1075–1087
- Halm S, Ibañez AL, Tyler CR, Prat F (2008) Molecular characterisation of growth differentiation factor 9 (*gdf9*) and bone morphogenetic protein 15 (*bmp15*) and their patterns of gene expression during the ovarian reproductive cycle in the European sea bass. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 291: 95–103
- Hamasaki M, Takeuchi Y, Miyaki K, Yoshizaki G (2013) Gonadal development and fertility of triploid grass puffer *Takifugu niphobles* induced by cold shock treatment. *Marine Biotechnology*, 15: 133–144

- Hamasaki M, Takeuchi Y, Yazawa R, Yoshikawa S, Kadomura K, Yamada T, Miyaki K, Kikuchi K, Yoshizaki G (2017) Production of tiger puffer *Takifugu rubripes* offspring from triploid grass puffer *Takifugu niphobles* parents. *Marine Biotechnology*, 19: 579–591
- Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM (2004) Mutations in the genes for oocyte derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in cambridge and belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 70: 900–909
- Haque T, Nakada S, Hamdy RC (2007) A review of FGF18: Its expression, signaling pathways and possible functions during embryogenesis and post-natal development. *Histology and Histopathology*, 22: 97–105
- 原田輝雄 (1969) 1-3. 採卵用親魚. *日本水産学会誌*, 35: 570–573
- 服部亘宏, 宮下盛, 澤田好史 (2012) トラフグ雄の優先生産. In 長島裕二ら, *フグ研究とトラフグ生産技術の最前線*, 恒星社厚生閣, 東京, pp 57–68
- Hayes BJ, Bowman PJ, Chamberlain AJ, Goddard ME (2009) Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *Journal of Dairy Science*, 92: 433–443
- He Z, Wu Y, Xie J, Wang T, Zhang L, Zhang W (2012) Growth differentiation factor 9 (Gdf9) was localized in the female as well as male germ cells in a protogynous hermaphroditic teleost fish, ricefield eel *Monopterus albus*. *General and Comparative Endocrinology*, 178: 355–362

Higuchi K, Gen K, Izumida D, Kazeto Y, Hotta T, Takashi T, Aono H, Soyano K (2017) Changes in plasma steroid levels and gene expression of pituitary gonadotropins, testicular steroidogenesis-related proteins and insulin-like growth factors during spermatogenesis of the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fisheries Science*, 83: 35–46

Higuchi K, Kazeto Y, Ozaki Y, Yamaguchi Y, Shimada Y, Ina Y, Soma S, Sakakura Y, Goto R, Matsubara T, Nishiki I, Iwasaki Y, Yasuike M, Nakamura Y, Matsuura A, Masuma S, Sakuma T, Yamamoto T, Masaoka T, Kobayashi T, Fujiwara A, Gen K (2019) Targeted mutagenesis of the ryanodine receptor by Platinum TALENs causes slow swimming behaviour in Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Scientific Reports*, 9: 13871

Hill WG (2016) Is continued genetic improvement of livestock sustainable? *Genetics*, 202: 877–881

日野明德 (1994) 種苗生産. 日本水産学会出版委員会編, 水産学シリーズ 100 号・現代の水産学, 恒星社厚生閣, 東京, pp 124–131

平野礼次郎 (1967) クロダイ. In: 川本信之, 養魚学各論, 恒星社厚生閣, 東京, pp 494–514

Hirschhorn J, Daly M (2005) Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews Genetics*, 6: 95–108

Horn SS, Ruyter B, Meuwissen TH, Moghadam H, Hillestad B, Sonesson AK (2020) GWAS identifies genetic variants associated with omega-3 fatty acid composition of Atlantic salmon fillets. *Aquaculture*, 514: 734494

堀井豊充, 片町太輔 (2012) トラフグの資源. In 長島裕二ら, フグ研究とトラフグ生産技術の最前線, 恒星社厚生閣, 東京, pp 34–45

細谷将, 菊池潔 (2016) 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. 水産育種, 46: 1–14

Hosoya S, Kikuchi K, Nagashima H, Onodera J, Sugimoto K, Satoh K, Matsuzaki K, Yasugi M, Nagano AJ, Kumagayi A, Ueda K, Kurokawa T (2018) Assessment of genetic diversity in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) populations with no family records using ddRAD-seq. BMC Research Notes, 11: 548

Hosoya S, Hirase S, Kikuchi K, Nanjo K, Nakamura Y, Kohno H, Sano M (2019) Random PCR-based genotyping by sequencing technology GRAS-Di (genotyping by random amplicon sequencing, direct) reveals genetic structure of mangrove fishes. Molecular Ecology Resources, 19: 1153–1163

Houston RD, Bean TP, Macqueen DJ, Gundappa MK, Jin YH, Jenkins TL, Selly SLC, Martin SAM, Stevens JR, Santos EM, Davie A, Robledo D (2020) Harnessing genomics to fast-track genetic improvement in aquaculture. Nature Review Genetics, 21: 389–409

Ikeda H, Yakubov V, Barkalov V, Sato K, Fujii N (2020) East Asian origin of the widespread alpine snow-bed herb, *Primula cuneifolia* (Primulaceae), in the northern Pacific region. Journal of Biogeography, 47: 2181–2193

Imsland AK, Jonassen TM (2005) The relation between age at first maturity and growth in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) reared at four different light regimes. Aquaculture Research, 36: 1–7

Ito H, Nakajima N, Onuma M, Murayama M (2020) Genetic diversity and genetic structure of the wild Tsushima leopard cat from genome-wide analysis. Animals, 10: 1375

- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23: 1801–1806
- Jonsson N, Jonsson B, Fleming IA (1996) Does early growth cause a phenotypically plastic response in egg production of Atlantic salmon? *Functional Ecology*, 10: 89–96
- Kai W, Kikuchi K, Tohari S, Chew AK, Tay A, Fujiwara A, Hosoya S, Suetake H, Naruse K, Brenner S, Suzuki Y, Venkatesh B (2011) Integration of the genetic map and genome assembly of fugu facilitates insights into distinct features of genome evolution in teleosts and mammals. *Genome Biology and Evolution*, 3: 424–442
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099–1106
- Kamiya T, Kai W, Tasumi S, Oka A, Matsunaga T, Mizuno N, Fujita M, Suetake H, Suzuki S, Hosoya S, Tohari S, Brenner S, Miyadai T, Venkatesh B, Suzuki Y, Kikuchi K (2012) A trans-species missense SNP in *Amhr2* is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). *PLoS Genetics*, 8: e1002798
- Kause A, Ritola O, Paananen T, Mantysaari E, Eskelinen U (2003) Selection against early maturity in large rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: the quantitative genetics of sexual dimorphism and genotype-by-environment interactions. *Aquaculture*, 228: 53–68
- Kenagy GJ, Trombulak SC (1986) Size and function of mammalian testes in relation to body size. *Journal of Mammalogy*, 67: 1–22

- Kikuchi K, Kai W, Hosokawa A, Mizuno N, Suetake H, Asahina K, Suzuki Y (2007) The sex-determining locus in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Genetics*, 175: 2039–2042
- Kingsmore S, Lindquist I, Mudge J, Gessler DG, Beavis WD (2008) Genome-wide association studies: progress and potential for drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7: 221–230
- Kirschner J, Weber D, Neuschl C, Franke A, Böttger M, Zielke L, Powalsky E, Groth M, Shagin D, Petzold A, Hartmann N, Englert C, Brockmann GA, Platzer M, Cellerino A, Reichwald K (2012) Mapping of quantitative trait loci controlling lifespan in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*—a new vertebrate model for age research. *Aging Cell*, 11: 252–261
- Kjærner-Semb E, Ayllon F, Kleppe L, Sørhus E, Skaftnesmo K, Furmanek T, Segafredo FT, Thorsen A, Fjellidal PG, Hansen T, Taranger GL, Andersson E, Schulz RW, Wargelius A, Edvardsen RB (2018) *Vgll3* and the Hippo pathway are regulated in Sertoli cells upon entry and during puberty in Atlantic salmon testis. *Scientific Report*, 8: 1912
- Kobayashi M, Aida K, Stacey NE (1991) Induction of testis development by implantation of 11-ketotestosterone in female goldfish. *Zoological Science*, 8: 389–393
- Kobayashi T, Nakamura M, Kajiura-Kobayashi H, Young G, Nagahama Y (1998) Immunolocalization of steroidogenic enzymes (P450_{scc}, P450_{c17}, P450_{arom}, and 3 β -HSD) in immature and mature testes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell and Tissue Research*, 292: 573–577
- Korte A, Farlow A (2013) The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods*, 9: 29

- Koyama T, Nakamoto M, Morishima K, Yamashita R, Yamashita T, Sasaki K, Kuruma Y, Mizuno N, Suzuki M, Okada Y, Ieda R, Uchino T, Tasumi S, Hosoya S, Uno S, Koyama J, Toyoda A, Kikuchi K, Sakamoto T (2019) A SNP in a steroidogenic enzyme is associated with phenotypic sex in *Seriola* fishes. *Current Biology*, 29: 1901–1909
- Kriaridou C, Tsairidou S, Houston RD, Robledo D (2020) Genomic prediction using low density marker panels in aquaculture: Performance across species, traits, and genotyping platforms. *Frontiers in Genetics*, 11: 124
- 熊井英水, 村田修 (2000) 第 1 章 海産魚類養殖業の現状と課題. In: 熊井英水, 最新海産魚の養殖, 湊文社, 東京, pp 2–49
- Kusakabe M, Nakamura I, Evans J, Swanson P, Young G (2006). Changes in mRNAs encoding steroidogenic acute regulatory protein, steroidogenic enzymes and receptors for gonadotropins during spermatogenesis in rainbow trout testes. *Journal of Endocrinology*, 189: 541–554
- Lander ES, Botstein D (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121: 185–199
- Langella M (1999) Populations 1.2.31. Available from <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>
- Larsen DA, Beckman BR, Cooper KA, Barrett D, Johnston M, Swanson P, Dickhoff WW (2004) Assessment of high rates of precocious male maturation in a spring Chinook salmon supplementation hatchery program. *Transactions of the American Fisheries Society*, 133: 98–120
- Le Gac F, Loir M, Le Bail PY, Ollitrault M (1996) Insulin-like growth factor (IGF-I) mRNA and IGF-I receptor in trout testis and in isolated spermatogenic and Sertoli cells. *Molecular Reproduction and Development*, 44: 23–35

- Le Gac F, Lareyre JJ, Montfort J, Esquerré D, Houlgatte R (2008) Transcriptional analysis of spermatogenesis regulation by sex steroids in trout. *Cybium*, (Suppl. 32): 119–121
- Lee KH, Yamaguchi A, Rashid H, Kadomura K, Yasumoto S, Matsuyama M (2009) Estradiol-17 β treatment induces intersexual gonadal development in the pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Zoological Science*, 26: 639–645
- Lenth R (2019) emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means. R package version 1.3.4
Available from <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R (2009) The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25: 2078–2079
- Li H (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv 1303: 3997, preprint
- Li H, Rasheed A, Hickey LT, He Z (2018) Fast-forwarding genetic gain. *Trends in Plant Science*, 23: 184–186
- Lin Z, Hosoya S, Sato M, Mizuno N, Kobayashi Y, Itou T, Kikuchi K (2020) Genomic selection for heterobothriosis resistance concurrent with body size in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Scientific Reports*, 10: 19976
- Liu ZJ, Cordes JF (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 242: 735–736
- Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T (2005) Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Research*, 33: D54–D58

- Martyniuk CJ, Perry GML, Moghadam HK, Ferguson MM, Danzmann RG (2003) The genetic architecture of correlations among growth-related traits and male age at maturation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish Biology*, 63: 746–764
- Massault C, Bovenhuis H, Haley C, de Koning DJ (2008) QTL mapping designs for aquaculture. *Aquaculture*, 285: 23–29
- Massman JM, Jung HJG, Bernardo R (2013) Genomewide selection versus marker-assisted recurrent selection to improve grain yield and stover-quality traits for cellulosic ethanol in maize. *Crop Science*, 53: 58–66
- 松村靖治 (2007) 有明海におけるトラフグの放流技術と放流効果に関する研究. 博士論文, 京都大学
- Matsuyama M, Adachi S, Nagahama Y, Kitajima C, Matsuura S (1991) Testicular development and serum levels of gonadal steroids during the annual reproductive cycle of captive Japanese sardine. *Japanese Journal of Ichthyology*, 37: 381–390
- 松山倫也, 中田久, 池田義弘, 田中宏之, 松浦修平 (1997) 各種ホルモン投与方法により誘起された養成トラフグの成熟、排卵過程. *水産増殖*, 40: 67–73
- Matsuyama M, Sasaki A, Nakagawa K, Kobayashi T, Nagahama Y, Chuda H (2001) Maturation-inducing hormone of the tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Tetraodontidae, Teleostei): Biosynthesis of steroids by the ovaries and the relative effectiveness of steroid metabolites for germinal vesicle breakdown *in vitro*. *Zoological Science*, 18: 225–234

- McClure CA, Hammell KL, Moore M, Dohoo IR, Burnley H (2007) Risk factors for early sexual maturation in Atlantic salmon in seawater farms in New Brunswick and Nova Scotia, Canada. *Aquaculture*, 272: 370–379
- McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ (1995) Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Molecular Endocrinology*, 9: 131–136
- McKenna AH, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA (2010) The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20: 1297–1303
- McPherron AC, Lee SJ (1993) GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor- β superfamily containing a novel pattern of cysteines. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 3444–3449
- Meuwissen THE (1997) Maximizing the response of selection with a predefined rate of inbreeding. *Journal of Animal Science*, 75: 934–940
- Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*, 157: 1819–1829
- Meyer M, Kircher M (2010) Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harbor Protocols*
- Miki Y, Yoshida K, Enoki H, Komura S, Suzuki K, Inamori M, Nishijima R, Takumi S (2020) GRAS-Di system facilitates high-density genetic map construction and QTL identification in recombinant inbred lines of the wheat progenitor *Aegilops tauschii*. *Scientific Reports*, 10: 21455
- Miles C, Wayne M (2008) Quantitative trait locus (QTL) analysis. *Nature Education*, 1: 208

Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y (1991) Hormonal induction of all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88: 5774–5778

Miura T, Miura C, Ohta T, Nader MR, Todo T, Yamauchi K (1999) Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. Biochemical and Biophysical Research Communications, 264: 230–234

Miura T, Miura C (2003) Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. Fish Physiology and Biochemistry, 28: 181–186

宮木廉夫, 立原一憲, 蛭子亮制, 塚島康生, 松村靖治, 藤田矢郎, 林田豪介, 多部田修 (1992) ホルモン処理によるトラフグ天然親魚の成熟促進. 水産増殖, 40: 439–442

宮木廉夫, 中田久, 渡邊孝裕, 水田浩二, 塚島康生, 吉田範秋, 多部田修 (1998) タンニン酸処理によって粘着性を除去したトラフグ卵のふ化について. 水産増殖, 46: 97–100

宮下盛 (2014) 日本の種苗生産のこれまでとこれから. 月間養殖ビジネス 2014 年 3 月号臨時増刊号 2014 年版よくわかる! 種苗生産と育種, 緑書房, 東京, pp 12–15

Moen T, Torgersen J, Santi N, Davidson WS, Baranski M, Ødegård J, Kjøglum S, Velle B, Kent M, Lubieniecki KP, Isdal E, Lien S (2015) Epithelial cadherin determines resistance to infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon. Genetics, 200: 1313–1326

Money D, Gardner K, Migicovsky Z, Schwaninger H, Zhong GY, Myles S (2015) LinkImpute: Fast and accurate genotype imputation for nonmodel organisms. G3: GENES, GENOMES, GENETICS, 5: 2383–2390

Morton NE (1998) Significance levels in complex inheritance. *The American Journal of Human Genetics*, 62: 690–697

Moses M, Mtolera MSP, Chauka LJ, Lopes Pinto FA, de Koning DJ, Houston RD, Palaiokostas CI (2020) Characterizing the genetic structure of introduced Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) strains in Tanzania using double digest RAD sequencing. *Aquaculture International*, 28: 477–492

森島輝 (2018) 選抜育種の積極的な導入に向けて: 「経験則」から「データによる予測」へ. *水産育種*, 48: 69–71

Murata O, Harada T, Miyashita S, Izumi K, Maeda S, Kato K, Kumai H (1996) Selective breeding for growth in red sea bream. *Fisheries Science*, 62: 845–849

Nagahama Y, Yamashita M (2008) Regulation of oocyte maturation in fish. *Development Growth and Differentiation*, 50: S195–S219

Nakamura Y, Mori K, Saitoh K, Oshima K, Mekuchi M, Sugaya T, Shigenobu Y, Ojima N, Muta S, Fujiwara A, Yasuike M, Oohara I, Hirakawa H, Chowdhury VS, Kobayashi T, Nakajima K, Sano M, Wada T, Tashiro K, Ikeo K, Hattori M, Kuhara S, Gojobori T, Inouye K (2013) Evolutionary changes of multiple visual pigment genes in the complete genome of Pacific bluefin tuna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110: 11061–11066

Nei M, Tajima F, Tateno Y (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 19: 153–170

Nielsen HM, Sonesson AK, Meuwissen THE (2011) Optimum contribution selection using traditional best linear unbiased prediction and genomic breeding values in aquaculture breeding schemes. *Journal of Animal Science*, 89: 630–8

- Nirea KG, Sonesson AK, Woolliams JA, Meuwissen THE (2012) Effect of non-random mating on genomic and BLUP selection schemes. *Genetics Selection Evolution*, 44: 11
- Nomura T (2008) Estimation of effective number of breeders from molecular coancestry of single cohort sample. *Evolutionary Applications*, 1: 462–474
- 野村哲郎 (2017) 動物集団の遺伝的多様性の管理と保全. In 祝前博明ら, 動物遺伝育種学, 朝倉書店, 東京, pp 166–181
- Norberg B, Weltzien FA, Karlsten Ø, Holm JC (2001) Effects of photoperiod on sexual maturation and somatic growth in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 129: 357–365
- Nyuji M, Hongo Y, Yoneda M, Nakamura M (2020) Transcriptome characterization of BPG axis and expression profiles of ovarian steroidogenesis-related genes in the Japanese sardine. *BMC Genomics*, 21: 1–18
- Ødegård J, Moen T, Santi N, Korsvoll SA, Kjøglum S, Meuwisse THE (2014) Genomic prediction in an admixed population of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Frontiers in Genetics*, 5: 402
- Ogawa K (1991) Redescription of *Heterobothrium tetrodonis* (Goto, 1894) (Monogenea: Diclidophoridae) and other related new species from puffers on the genus *Takifugu* (Teleostea: Tetraodontidae). *Japanese Society of Parasitology*, 40: 388–396
- Oikawa S, Takemori M, Itazawa Y (1992) Relative growth of organs and parts of a marine teleost, the porgy, *Pagrus major*, with special reference to metabolism-size relationships. *Japanese Journal of Ichthyology*, 39: 243–249

- Okuzawa K (2002) Puberty in teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26: 31–41
- Orisaka M, Jiang JY, Orisaka S, Kotsuji F, Tsang BK (2009) Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis. *Endocrinology*, 150: 2740–2748
- Ota Y, Ando H, Ueda H, Urano A (1999) Differences in seasonal expression of neurohypophysial hormone genes in ordinary and precocious male masu salmon. *General and Comparative Endocrinology*, 116: 40–48
- Otsuka F, McTavish KJ and Shimasaki S (2011) Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Molecular Reproduction and Development*, 78: 9–21
- Palaiokostas C, Kocour M, Prechal M, Houston RD (2018) Accuracy of genomic evaluations of juvenile growth rate in common carp (*Cyprinus carpio*) using genotyping by sequencing. *Frontiers in Genetics*, 9: 82
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539
- Peterson BK, Weber JN, Kay EH, Fisher HS, Hoekstra HE (2012) Double digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS ONE*, 7: e37135
- Pinto PIS, Teodosio HR, Galay-Borgos M, Power DM, Sweeney GE (2006) Identification of estrogen-responsive genes in the testis of sea bream (*Sparus auratus*) using suppression subtractive hybridization. *Molecular Reproduction and Development*, 73: 318–329

- Ponzoni RW, Nguyen NH, Khaw HL, Ninh NH (2008) Accounting for genotype by environment interaction in economic appraisal of genetic improvement programs in common carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 285: 47–55
- Ponzoni RW, Khaw HL, Nguyen NH, Hamzah A (2010) Inbreeding and effective population size in the Malaysian nucleus of the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 302: 42–48
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959
- R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria, Available from <https://www.R-project.org/>
- Rambaut A (2012). FigTree v1.4. Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223–225
- Robledo D, Palaiokostas C, Bargelloni L, Martínez P, Houston R (2018) Applications of genotyping by sequencing in aquaculture breeding and genetics. *Reviews in Aquaculture*, 10: 670–682
- Rodríguez L, Begtashi I, Zanuy S, Carrillo M (2000) Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: Effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) at puberty. *Fish Physiology and Biochemistry*, 23: 141–150
- Rosenberg NA (2004) Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4: 137–138

- Säisä M, Koljonen ML, Tähtinen J (2003) Genetic changes in Atlantic salmon stocks since historical times and the effective population size of a long-term captive breeding programme. *Conservation Genetics*, 4: 613–627
- 佐々木義之 (2007) 第2章 BLUP法の歴史. In 佐々木義之 変量効果の推定とBLUP法. 京都大学出版会, 京都, pp 33–46
- Sato M, Hosoya S, Yoshikawa S, Ohki S, Kobayashi Y, Itou T, Kikuchi K (2019) A highly flexible and repeatable genotyping method for aquaculture studies based on target amplicon sequencing using next-generation sequencing technology. *Scientific Reports*, 9: 1–9
- 佐藤淳, 木下豪太 (2020) 次世代シーケンス時代における哺乳類学～初学者への誘い～. *哺乳類科学*, 60: 307–319
- 澤山英太郎, 高木基裕 (2012) マイクロサテライト DNA マーカーを用いた養殖ヒラメ親魚群の遺伝的評価. *水産育種*, 41: 69–73
- Schulz RW, de França LR, Lareyre JJ, LeGac F, Chiarini-Garcia H, Nobrega HR, Miura T (2010) Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 390–411
- Shahjahan M, Hamabata T, Motohashi E, Doi H, Ando H (2010) Differential expression of three types of gonadotropin-releasing hormone genes during the spawning season in grass puffer, *Takifugu niphobles*. *General and Comparative Endocrinology*, 167: 153–163
- Sinclair-Waters M, Ødegård J, Korsvoll SA, Moen T, Lien S, Primmer CR, Barson NJ (2020) Beyond large-effect loci: large-scale GWAS reveals a mixed large-effect and polygenic architecture for age at maturity of Atlantic salmon. *Genetics Selection Evolution*, 52: s12711-020-0529-8

- Sodeland M, Gaarder M, Moen T, Thomassen M, Kjølglum S, Kent M, Lien S (2013) Genome-wide association testing reveals quantitative trait loci for fillet texture and fat content in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 408–409: 169–174
- Solberg MF, Skaala O, Nilsen F, Glover KA (2013) Does domestication cause changes in growth reaction norms? A study of farmed, wild and hybrid Atlantic salmon families exposed to environmental stress. *PLoS ONE*, 8 e54469
- Solovyeva EV, Hayashi M, Margi K, Barkats C, Klein C, Amsterdam A, Hsueh AJW, Tsafri A (2000) Growth differentiation factor-9 stimulates rat theca-interstitial cell androgen biosynthesis. *Biology of Reproduction*, 63: 1214–1218
- Sonesson AK, Meuwissen THE (2009) Testing strategies for genomic selection in aquaculture breeding programs. *Genetics Selection Evolution*, 41: 37
- Sonesson AK, Woolliams JA, Meuwissen THE (2012) Genomic selection requires genomic control of inbreeding. *Genetics Selection Evolution*, 44: 1–10
- Sonesson AK, Meuwissen THE (2015) FISHBOOSTSEL- a tool to select parents and assign mating pairs and mating groups in aquaculture breeding. *Manual of FISHBOOSTSEL*
- Spicer LJ, Aad PY, Allen D, Mazerbourg S, Hsueh, AJ (2006) Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. *Journal of Endocrinology*, 189: 329–339
- Su GS, Liljedahl LE, Gall GAE (1996) Effects of inbreeding on growth and reproductive traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 142: 139–148

- Suda A, Nishiki I, Iwasaki Y, Matsuura A, Akita T, Suzuki N, Fujiwara A (2019) Improvement of the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) reference genome and development of male-specific DNA markers. *Scientific Reports*, 9: 14450
- Tanaka M, Telecky TM, Fukada S, Adachi S, Chen S, Nagahama Y (1992) Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding P-450 aromatase (P450arom) from a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary; relationship between the amount of P450arom mRNA and the production of oestradiol-17 β in the ovary. *Journal of Molecular Endocrinology*, 8: 53–61
- Taranger GL, Carrillo M, Schulz RW, Fontaine P, Zanuy S, Felip A, Weltzien FA, Dufour S, Karlsen Ø, Norberg B, Andersson E, Hansen T (2009) Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165: 483–515
- Thodesen J, Grisdale-Helland B, Helland SJ, Gjerde B (1999) Feed intake, growth and feed utilization of offspring from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 180: 237–246
- Tsai HY, Hamilton A, Tinch AE, Guy DR, Gharbi K, Stear MJ, Matika O, Bishop SC, Houston RD (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
- Ueda H, Nagahama Y, Tashiro F, Crim LW (1983) Some endocrine aspects of precocious sexual maturation in the amago salmon *Oncorhynchus rhodurus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 49: 587–596
- van Ooijen JW (1992) Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theoretical and Applied Genetics*, 84: 803–811
- van Ooijen JW (1999) LOD significance thresholds for QTL analysis in experimental populations of diploid species. *Heredity*, 83: 613–624

- Vance LT (2018) Facing the challenges of neuropeptide gene knockouts: Why do they not inhibit reproduction in adult teleost fish? *Frontiers in Neuroscience*, 12: 302
- Van Grevenhof EM, Van Arendonk JA, Bijma P (2012) Response to genomic selection: The Bulmer effect and the potential of genomic selection when the number of phenotypic records is limiting. *Genetics Selection Evolution*, 44: 26
- Vitezica ZG, Varona L, Elsen JM, Misztal I, Herring W, Legarra A (2016) Genomic BLUP including additive and dominant variation in purebreds and F1 crossbreds, with an application in pigs. *Genetics Selection Evolution*, 48: 1–8
- Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJW (2000) Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biology of Reproduction*, 62: 370–377
- 和田克彦 (2008) 水産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
- 和田克彦 (2012) 水産動物における親の遺伝的能力評価法. *水産育種*, 41: 87–96
- Wang CM, Lo LC, Zhu ZY, Yue GH (2006) A genome scan for quantitative trait loci affecting growth-related traits in an F₁ family of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *BMC Genomics*, 7: 274
- Wang QL, Zhang HT, Ren YQ, Zhou Q (2016) Comparison of growth parameters of tiger puffer *Takifugu rubripes* from two culture systems in China. *Aquaculture*, 453: 49–53
- Waples RS, Do C (2008) *ldne*: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources*, 8: 753–756

- Waters CD, Clemento A, Aykanat T, Garza JC, Naish KA, Narum S, Primmer CR (2020) Heterogeneous genetic basis of age at maturity in salmonid fishes. *BioRxiv*, preprint
- Wei X, Xu Z, Wang G, Hou J, Ma X, Liu H, Liu J, Chen B, Luo M, Xie B, Li R, Ruan J, Liu X (2017) pBACode: a random-barcode-based high-throughput approach for BAC paired-end sequencing and physical clone mapping. *Nucleic Acids Research*, 45: e52
- Weir BS, Cockerham C (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370
- Wellmann R (2019) Optimum contribution selection for animal breeding and conservation: the R package optiSel. *BMC Bioinformatics*, 20: 1–13
- Weltzien FA, Karlsen Ø, Norberg B (2003) Growth patterns and plasma levels of testosterone, 11-ketotestosterone, and IGF-1 in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) from juvenile stages throughout sexual development. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28: 227–228
- Wild V, Simianer H, Gjøen HM, Gjerde B (1994) Genetic parameters and genotype environment interaction for early sexual maturity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 128: 51–65
- Wright S (1968) *Evolution and the genetics of populations. Vol 1: Genetic and biometric foundations* University of Chicago Press, Chicago
- Xu S (2003) Theoretical basis of the Beavis effect. *Genetics*, 165: 2259–2268
- Yabe S, Hara T, Ueno M, Enoki H, Kimura T, Nishimura S, Yasui Y, Ohsawa R, Iwata H (2018) Potential of genomic selection in mass selection breeding of an allogamous crop: An empirical study to increase yield of common buckwheat. *Frontiers in Plant Science*, 9: 276

- Yadav H, Lal B (2017) BMP15 in catfish testis: Cellular distribution, seasonal variation, and its role in steroidogenesis. *Steroids*, 125: 114–123
- Yan T, Zhang S, Zhang Q, Deng F, Cai Y, He J, Ma Z, He L, Luo J, Yang D, He Z (2020) Expression patterns and oestradiol regulation of growth differentiation factor 9 in *Schizothorax prenanti*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 248–249: 110470
- Yasuike M, Iwasaki Y, Nishiki I, Nakamura Y, Matsuura A, Yoshida K, Noda T, Andoh T, Fujiwara A (2018) The yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) genome and transcriptome atlas of the digestive tract. *DNA Research*, 25: 547–560
- Yoshida GM, Lhorente JP, Correa K, Soto J, Salas D, Yáñez JM (2019) Genome-wide association study and cost-efficient genomic predictions for growth and fillet yield in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *G3: GENES, GENOMES, GENETICS*, 9: 2597–2607
- Yu G, Lam TTY, Zhu H, Guan Y (2018) Two methods for mapping and visualizing associated data on phylogeny using ggtree. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 3041–3043
- Yu H, Wang Y, Wang M, Liu Y, Cheng J, Zhang O (2020) Growth differentiation factor 9 (*gdf9*) and bone morphogenetic protein 15 (*bmp15*) are potential intraovarian regulators of steroidogenesis in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *General and Comparative Endocrinology*, 297: 113547
- Yu J, Pressoir G, Briggs WH, Vroh Bi I, Yamasaki M, Doebley JF, McMullen MD, Gaut BS, Nielsen DM, Holland JB, Kresovich S, Buckler ES (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics*, 38: 203–208
- Yáñez JM, Joshi R, Yoshida GM (2020) Genomics to accelerate genetic improvement in tilapia. *Animal Genetics*, 51: 658–67

Zenger KR, Khatkar MS, Jones DB, Khalilisamani N, Jerry DR, Raadsma, HW (2019) Genomic selection in aquaculture: Application, limitations and opportunities with special reference to marine shrimp and pearl oysters. *Frontiers in Genetics*, 9: 693

Zhao B, Tumaneng K, Guan KL (2011) The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nature Cell Biology*, 13: 877–83

第1章 図表・スクリプト

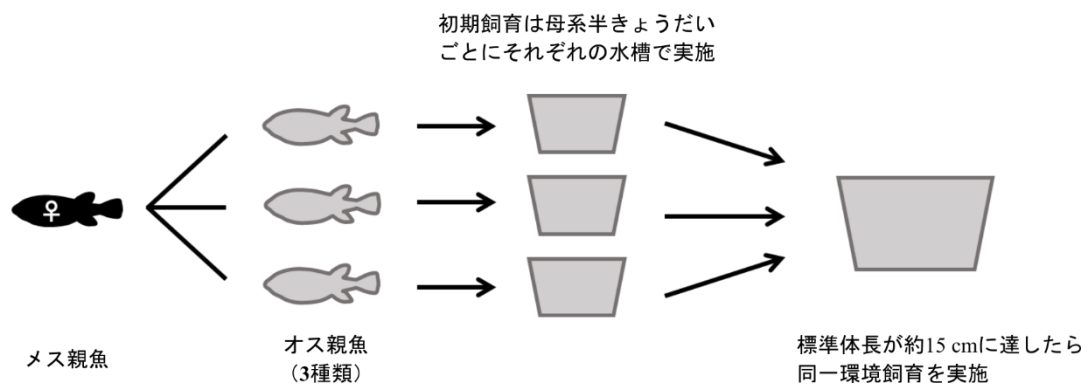


Fig. 1.1 後代検定における交配と飼育方法の概要。オス個体は灰色で、メス個体は黒色で示した。各検定では1個体のメス親魚に対して3個体のオス親魚を交配した。初期飼育は母系半きょうだいに個別に行い、標準体長が平均15 cm程度に達した時点で同一水槽に混合して同一環境飼育を開始した。混合時には各個体に個体識別を施した。

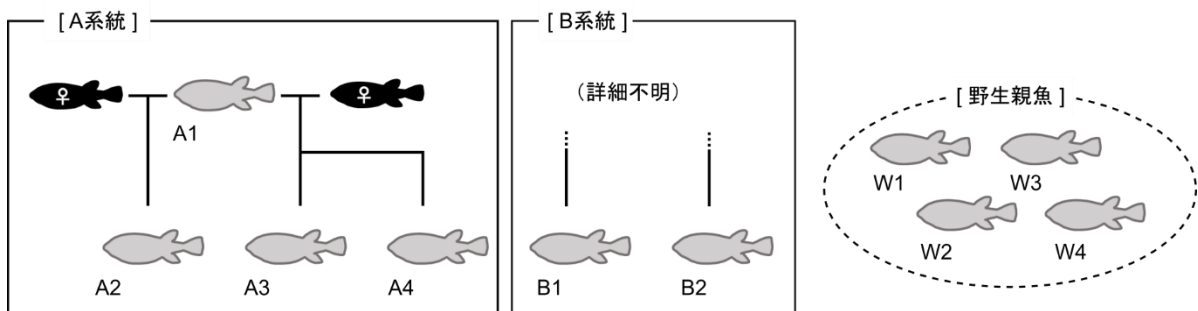


Fig. 1.2 後代検定で用いた親魚の血縁関係の模式図。オス個体は灰色で、メス個体は黒色で示した。各後代検定で用いたオス親魚は以下の通り。検定1：A1、B1、W1、検定2：A2、B2、W2、検定3：A2、A3、W3、検定4：A2、A4、W4。検定1と2ではB系統のメス個体、検定3では系統不明のメス個体、検定4では野生のメス個体をそれぞれ交配に使用した。なお、検定1と2で用いたB系統のメス個体とB1、B2との血縁関係は不明。

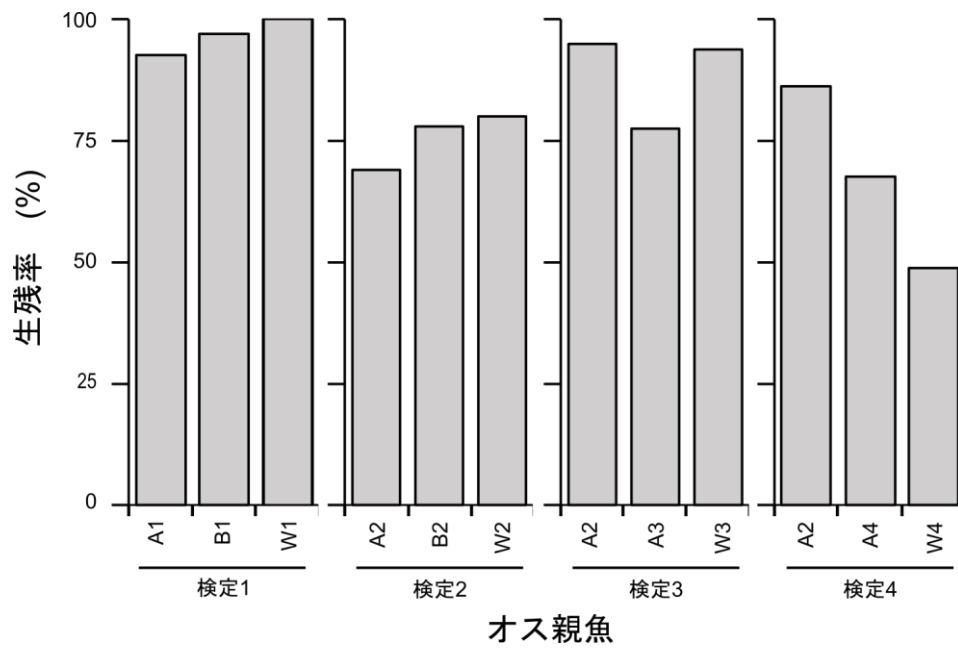


Fig. 1.3 各後代検定における生残率。

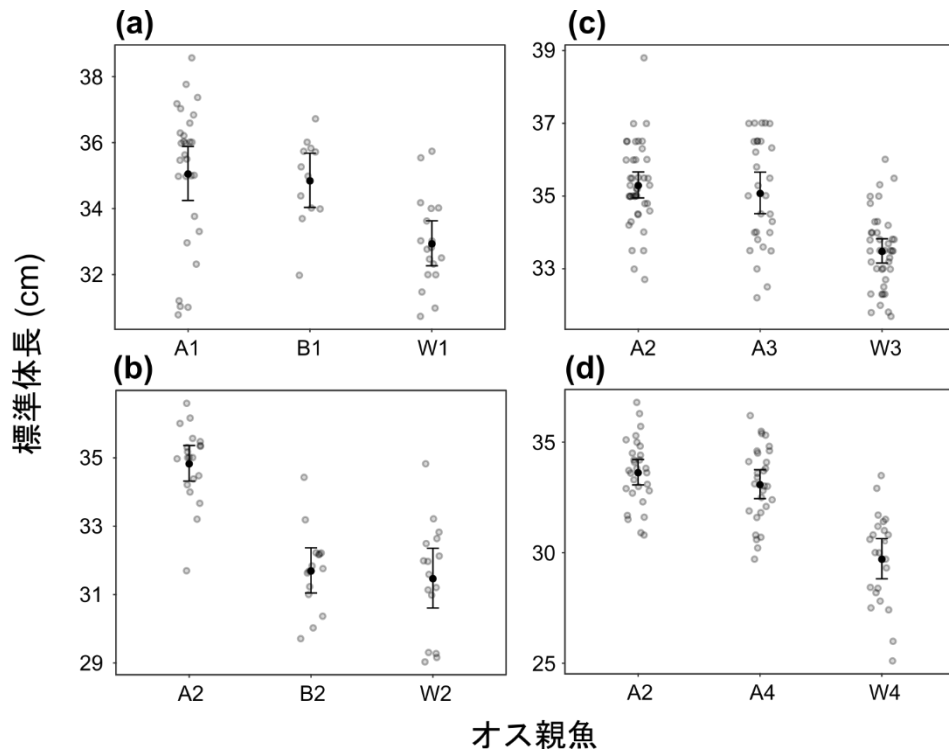


Fig. 1.4 各後代検定における標準体長の最小二乗平均（黒丸; ●）および95%信頼区間（ひげ）。灰色の丸（●）は精巣重量の実測値をプロットしたもの。（a）検定1、（b）検定2、（c）検定3、（d）検定4。

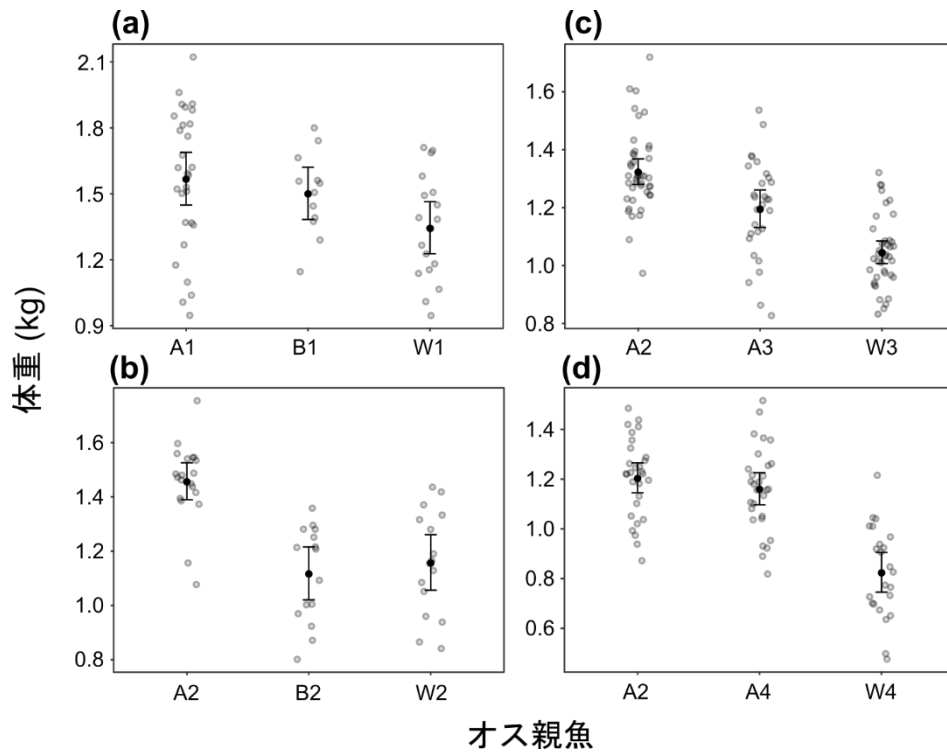


Fig. 1.5 各後代検定における体重の最小二乗平均（黒丸; ●）および95%信頼区間（ひげ）。灰色の丸（●）は精巣重量の実測値をプロットしたもの。（a）検定1、（b）検定2、（c）検定3、（d）検定4。

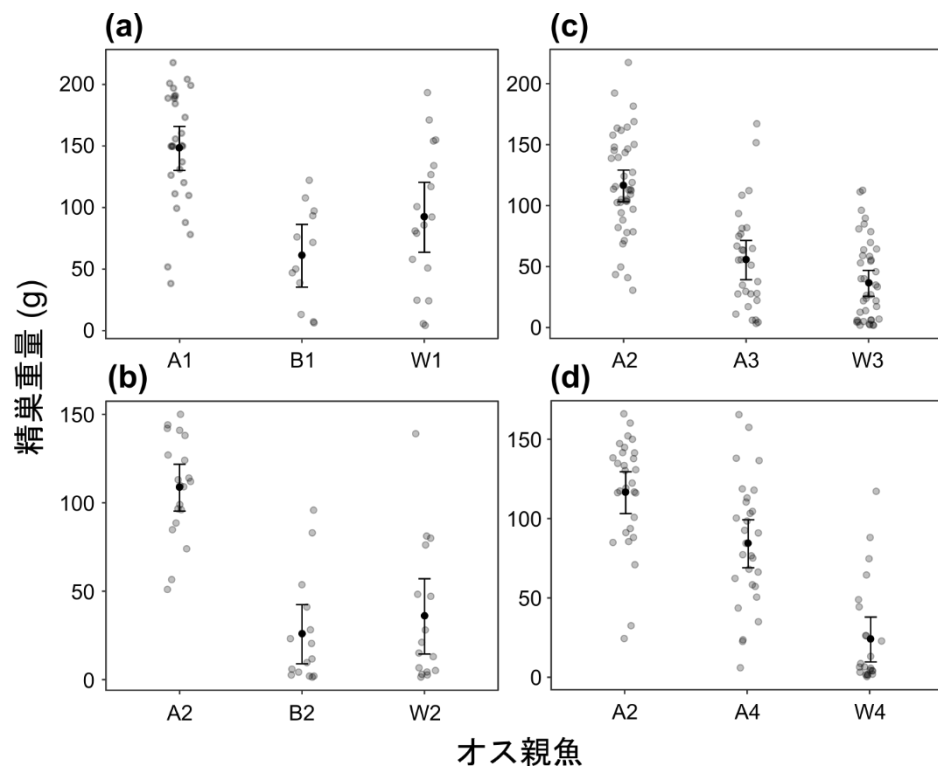


Fig. 1.6 各後代検定における精巣重量の最小二乗平均（黒丸; ●）および95%信頼区間（ひげ）。灰色の丸（●）は精巣重量の実測値をプロットしたもの。（a）検定1、（b）検定2、（c）検定3、（d）検定4。

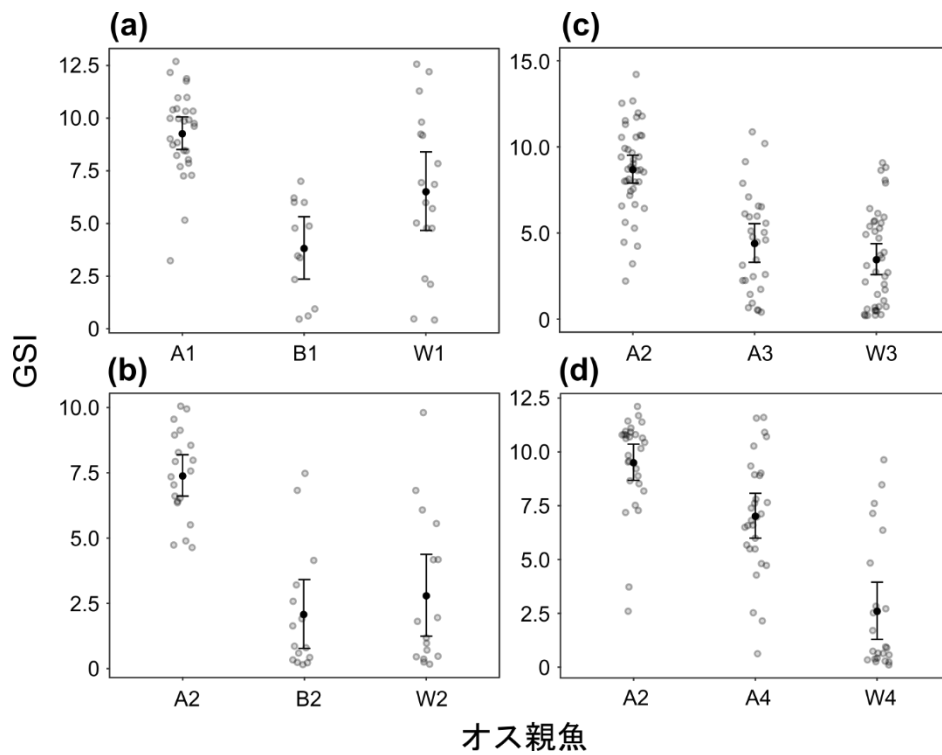


Fig. 1.7 各後代検定における GSI の最小二乗平均 (黒丸; ●) および 95%信頼区間 (ひげ)。灰色の丸 (●) は精巣重量の実測値をプロットしたもの。(a) 検定 1、(b) 検定 2、(c) 検定 3、(d) 検定 4。

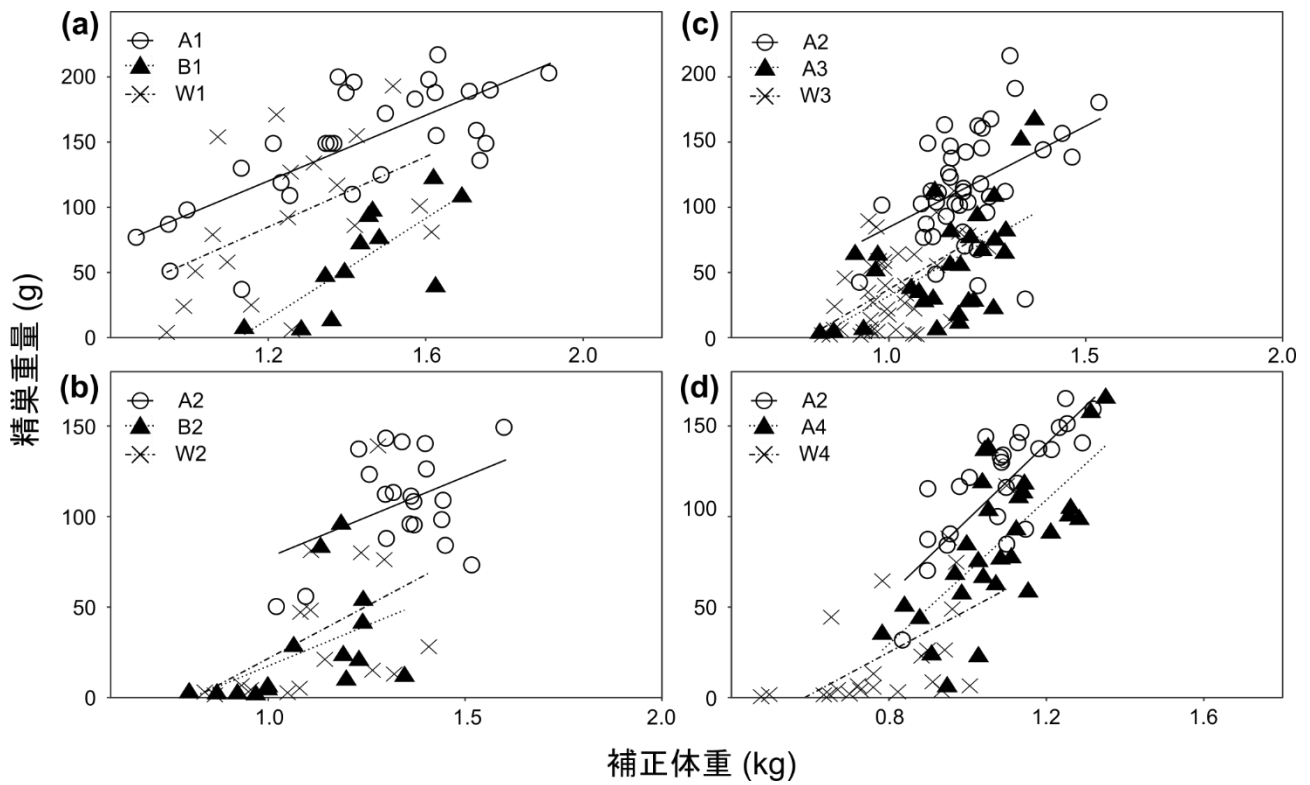


Fig. 1.8 各後代検定における補正体重（体重から精巣重量を除いた値、X 軸）と精巣重量（Y 軸）の散布図。(a) 検定 1、(b) 検定 2、(c) 検定 3、(d) 検定 4。白丸 (○)、ばつ (×) および黒三角 (▲) は各オス親魚に由来する後代を示す。実線、点線および一点鎖線は各集団の回帰直線を示す。

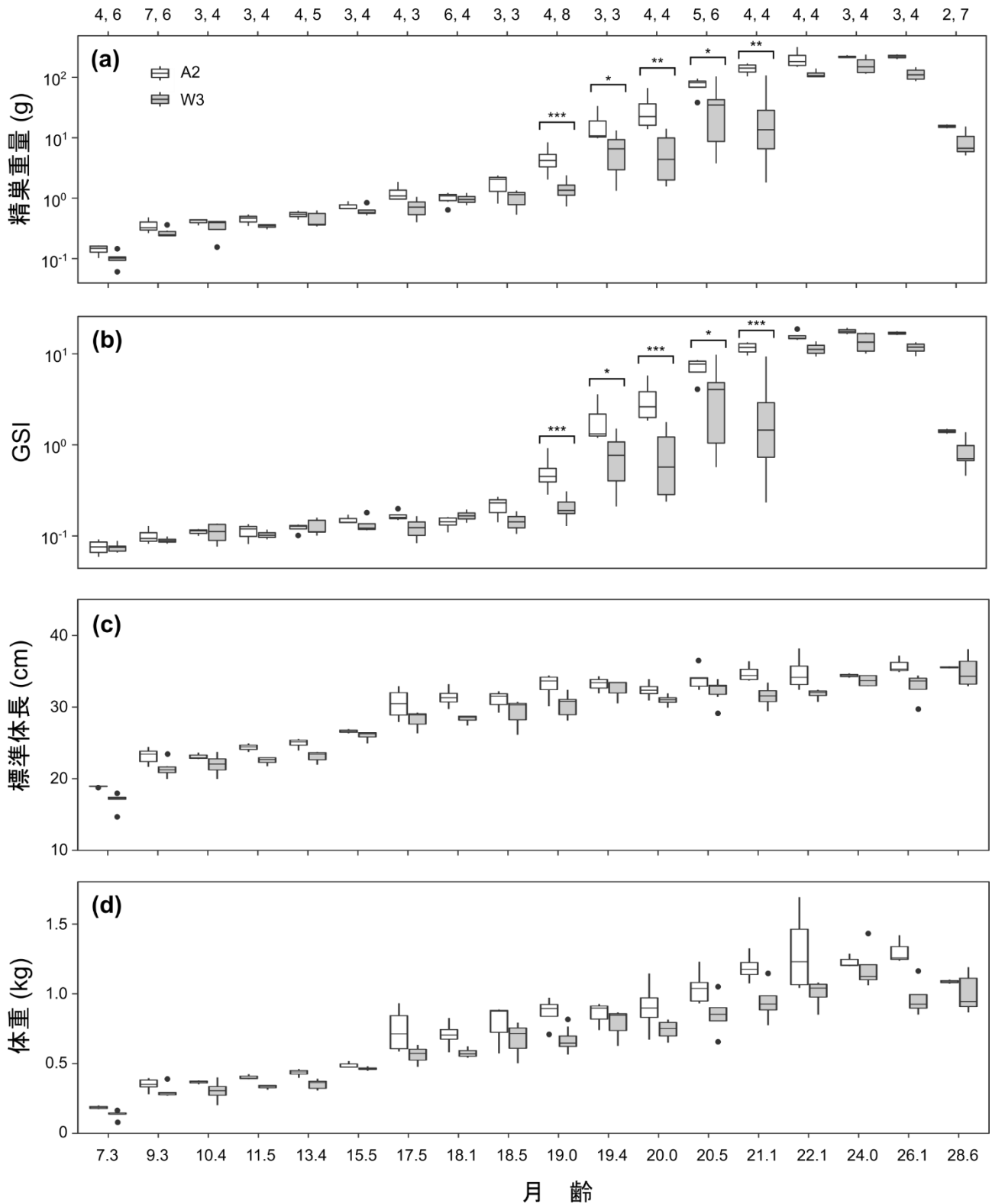


Fig. 1.9 A2 と W3 に由来する後代の精巢重量 (a)、GSI (b)、標準体長 (c) および体重 (d) の経時変化。(a) と (b) の Y 軸は指数で表示した。箱は第 1 から第 3 までの四分位数を、箱中の水平線は中央値を示している。ひげの長さは四分位数の 1.5 倍の範囲とし、外れ値を黒丸 (●) で示した。図の枠外上部に、各サンプリングにおけるサンプル数 (左; A2、右; W3) を表示した。(a) と (b) におけるアスタリスクはそれぞれの形質で 2 集団間に有意差が認められたことを表す ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$)。なお、標準体長 (c) と体重 (d) においては 2 集団間に有意差は認められなかった。

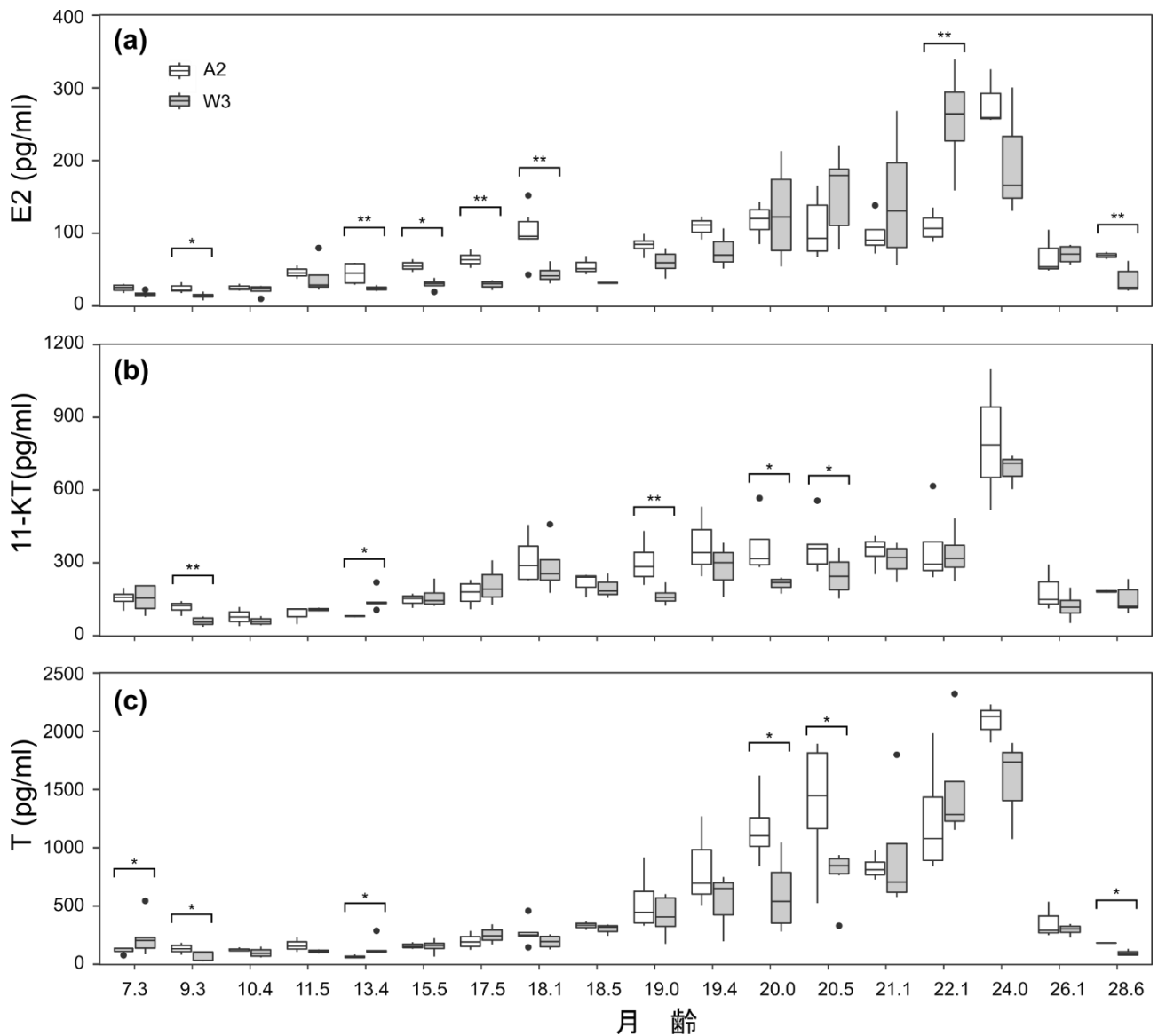


Fig. 1.10 A2 と W3 に由来する後代のエストラジオール-17 β (E2) (a)、11-ケトテストステロン (11-KT) (b) およびテストステロン (T) (c) の血中濃度の経時変化。箱は第1から第3までの四分位数を、箱中の水平線は中央値を示している。ひげの長さは四分位数の1.5倍の範囲とし、外れ値を黒丸 (●) で示す。アスタリスクは2集団間に有意差が認められたことを表す (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。

Table 1.1 後代検定に用いた親魚

検定名 (実施年)	略称	性別	系統	保有機関 / 漁獲場所	備考
検定 1 (2011 年)	H1	メス	B 系統	種苗生産機関 B 社	
	A1	オス	A 系統	種苗生産機関 A 社	
	B1	オス	B 系統	種苗生産機関 B 社	
	W1	オス	野生魚	福井県敦賀湾で漁獲	
検定 2 (2012 年)	H2	メス	B 系統	種苗生産機関 B 社	
	A2	オス	A 系統	長崎県総合水産試験場	A1 の子
	B2	オス	B 系統	種苗生産機関 B 社	
	W2	オス	野生魚	福井県敦賀湾で漁獲	
検定 3 (2013 年)	H3	メス	不明	種苗生産機関 C 社	
	A2	オス	A 系統	—	検定 2 で使用
	A3	オス	A 系統	長崎県総合水産試験場	A2 の半きょうだい
	W3	オス	野生魚	福井県敦賀湾で漁獲	
検定 4 (2014 年)	H4	メス	野生魚	福井県敦賀湾で漁獲	
	A2	オス	A 系統	—	検定 2, 3 で使用
	A4	オス	A 系統	長崎県総合水産試験場	A2 の半きょうだい
	W4	オス	野生魚	福井県敦賀湾で漁獲	

親魚の系統は種苗生産機関からの聞き取りによる。

Table 1.2 同一環境飼育開始時における各後代検定の供試魚数 (*n*)、標準体長および体重

検定名	オス親魚	<i>n</i>	標準体長 (mm)*	体重 (g)*
検定 1	A1	81	148.4 ± 6.2	87.8 ± 11.3
	B1	32	147.7 ± 8.1	96.7 ± 14.3
	W1	32	147.6 ± 6.2	94.7 ± 13.2
検定 2	A2	100	153.3 ± 5.2	103.5 ± 10.3
	B2	50	141.1 ± 8.4	89.2 ± 14.7
	W2	50	136.5 ± 9.3	86.7 ± 16.3
検定 3	A2	100	172.8 ± 5.0	155.1 ± 13.1
	A3	80	172.3 ± 7.6	152.9 ± 17.7
	W3	80	168.6 ± 4.7	144.2 ± 11.7
検定 4	A2	80	164.7 ± 5.9	121.0 ± 13.4
	A4	80	161.6 ± 7.6	114.4 ± 15.5
	W4	80	152.9 ± 7.3	99.4 ± 12.8

* 平均値 ± 標準偏差

Table 1.3 後代検定終了時における生残魚の性別、個体数 (n)、標準体長および体重

検定名	性別	n	標準体長 (cm)*			体重 (kg)*	
検定 1	オス	59	34.4	±	2.0	1.49	± 0.28
	メス	44	34.9	±	1.6	1.46	± 0.21
検定 2	オス	51	32.9	±	2.1	1.26	± 0.23
	メス	50	33.7	±	2.3	1.28	± 0.24
検定 3	オス	111	34.6	±	1.5	1.19	± 0.19
	メス	102	35.0	±	2.0	1.18	± 0.21
検定 4	オス	81	32.3	±	2.4	1.08	± 0.23
	メス	71	32.6	±	2.0	1.04	± 0.18

* 平均値 ± 標準偏差

Table 1.4 各後代検定におけるサンプリング月齢、個体数 (*n*)、標準体長、体重、精巣重量および GSI

検定名	月齢	オス親魚	<i>n</i>	標準体長		体重		精巣重量		GSI*	
				(cm)*		(kg)*		(g)*			
検定 1	20.5	A1	29	35.1	± 2.2 ^a	1.57	± 0.31 ^a	148.0	± 46.9 ^a	9.3	± 2.0 ^a
		B1	12	34.9	± 1.3 ^a	1.50	± 0.19 ^{ab}	60.8	± 40.0 ^b	3.8	± 2.3 ^c
		W1	18	33.0	± 1.4 ^b	1.35	± 0.24 ^b	92.1	± 57.1 ^b	6.5	± 3.7 ^b
検定 2	20.1	A2	20	34.8	± 1.1 ^a	1.46	± 0.15 ^a	108.5	± 28.3 ^a	7.4	± 1.7 ^a
		B2	15	31.7	± 1.2 ^b	1.12	± 0.18 ^b	25.7	± 30.2 ^b	2.1	± 2.4 ^b
		W2	16	31.5	± 1.6 ^b	1.16	± 0.19 ^b	35.8	± 39.9 ^b	2.8	± 2.9 ^b
検定 3	21.1	A2	42	35.3	± 1.1 ^a	1.32	± 0.14 ^a	116.9	± 41.6 ^a	8.7	± 2.6 ^a
		A3	29	35.1	± 1.5 ^a	1.20	± 0.17 ^b	56.0	± 42.3 ^b	4.4	± 2.9 ^b
		W3	40	33.5	± 1.0 ^b	1.05	± 0.12 ^c	38.6	± 33.3 ^b	3.5	± 2.8 ^b
検定 4	21.7	A2	29	33.6	± 1.5 ^a	1.21	± 0.16 ^a	116.8	± 34.6 ^a	9.5	± 2.2 ^a
		A4	29	33.1	± 1.7 ^a	1.16	± 0.17 ^a	84.6	± 39.7 ^b	7.0	± 2.7 ^b
		W4	23	29.7	± 2.1 ^b	0.83	± 0.18 ^b	25.1	± 32.6 ^c	2.6	± 3.1 ^c

* 平均値 ± 標準偏差

上付きのアルファベットは有意差の有無を示し ($P < 0.05$)、後代間でアルファベットを共有する場合、当該後代間には有意差が無かったことを示す。

Table 1.5 各後代検定のモデルにより算出した赤池情報量規準 (AIC)、最小 AIC との差 (Δ AIC)、Akaike weight (w) および自由度 (df)

検定名	モデル	df	標準体長			体重			精巣重量			GSI		
			AIC	Δ AIC	w	AIC	Δ AIC	w	AIC	Δ AIC	w	AIC	Δ AIC	w
検定 1	モデル 1	4	241.3	0.0	0.54	833.6	0.0	0.56	631.7	0.0	1.00	290.4	0.0	1.00
	モデル 2	2	252.5	11.3	0.00	837.1	3.4	0.10	654.1	22.4	0.00	315.9	25.5	0.00
	モデル 3	4	241.6	0.3	0.46	834.9	1.3	0.29	656.1	24.4	0.00	323.7	33.3	0.00
	モデル 4	2	253.0	11.7	0.00	838.3	4.6	0.05	667.1	35.4	0.00	336.5	46.1	0.00
検定 2	モデル 1	4	412.9	0.0	0.69	673.4	0.0	0.95	505.9	0.0	0.83	236.4	0.0	0.97
	モデル 2	2	456.4	43.5	0.00	702.1	28.7	0.00	547.1	41.2	0.00	271.2	34.8	0.00
	モデル 3	4	414.5	1.6	0.31	679.2	5.7	0.05	509.1	3.1	0.17	243.1	6.7	0.03
	モデル 4	2	456.5	43.7	0.00	704.1	30.6	0.00	525.9	20.0	0.00	257.8	21.3	0.00
検定 3	モデル 1	4	363.0	0.9	0.39	1421.8	1.1	0.37	1133.3	0.0	0.99	545.8	0.0	1.00
	モデル 2	2	402.7	40.6	0.00	1477.8	57.1	0.00	1196.5	63.2	0.00	604.3	58.4	0.00
	モデル 3	4	362.1	0.0	0.61	1420.7	0.0	0.63	1143.0	9.7	0.01	577.4	31.5	0.00
	モデル 4	2	402.4	40.3	0.00	1477.0	56.3	0.00	1176.0	42.7	0.00	604.4	58.6	0.00
検定 4	モデル 1	4	327.2	0.0	0.87	1066.5	0.0	0.99	815.4	0.0	1.00	393.6	0.0	1.00
	モデル 2	2	375.7	48.5	0.00	1116.6	50.1	0.00	870.7	55.3	0.00	450.1	56.5	0.00
	モデル 3	4	331.0	3.7	0.13	1076.5	10.0	0.01	843.7	28.3	0.00	441.0	47.4	0.00
	モデル 4	2	378.7	51.5	0.00	1124.6	58.1	0.00	874.7	59.4	0.00	468.9	75.3	0.00

モデル 1: 精巣重量 = 平均値 + 父性効果 + 残差 (父性効果あり、ガウス分布)

モデル 2: 精巣重量 = 平均値 + 残差 (父性効果なし、ガウス分布)

モデル 3: 精巣重量 = 平均値 + 父性効果 + 残差 (父性効果あり、ガンマ分布)

モデル 4: 精巣重量 = 平均値 + 残差 (父性効果なし、ガンマ分布)

太字は各検定の中で最も w が高いモデルを示す。

Table 1.6 精巣重量と補正体重の相関を検討したモデルで算出された赤池情報量規準 (AIC)、最小 AIC との差 (Δ AIC)、Akaike weight (w) および自由度 (df)

検定名	モデル	df	AIC	Δ AIC	w
検定 1	モデル 1	7	605.0	3.2	0.17
	モデル 2	5	601.8	0.0	0.83
	モデル 3	7	646.0	44.2	0.00
	モデル 4	5	649.2	47.4	0.00
検定 2	モデル 1	7	499.6	3.8	0.13
	モデル 2	5	495.8	0.0	0.84
	モデル 3	7	502.5	6.7	0.03
	モデル 4	5	507.7	11.9	0.00
検定 3	モデル 1	7	1105.8	3.9	0.13
	モデル 2	5	1101.9	0.0	0.87
	モデル 3	7	1123.5	21.6	0.00
	モデル 4	5	1135.6	33.8	0.00
検定 4	モデル 1	7	766.3	0.0	0.54
	モデル 2	5	766.6	0.3	0.46^a
	モデル 3	7	817.1	50.8	0.00
	モデル 4	5	833.9	67.6	0.00

モデル 1: 精巣重量 = 平均値 + 補正体重 \times 父性効果 + 残差 (交互作用あり、ガウス分布)

モデル 2: 精巣重量 = 平均値 + 補正体重 + 父性効果 + 残差 (交互作用なし、ガウス分布)

モデル 3: 精巣重量 = 平均値 + 補正体重 \times 父性効果 + 残差 (交互作用あり、ガンマ分布)

モデル 4: 精巣重量 = 平均値 + 補正体重 + 父性効果 + 残差 (交互作用なし、ガンマ分布)

太字は各検定の中で最も w が高いものを示す。

^a 検定 4 においてはモデル 1 とモデル 2 の w が大きかった (≥ 0.4) ため、 df の小さいモデル 2 を選択した。

Table 1.7 一般化線形モデルで推定された、精巣重量に及ぼす補正体重の影響と父性効果

検定名	共変量名	推定値	標準誤差	<i>t</i>	<i>P</i>
検定 1	切片	-41.8	31.0	-1.346	0.1838
	補正体重	0.13	0.02	6.276	<0.0001
	父性効果 (B1)	-89.9	13.0	-6.928	<0.0001
	父性効果 (W1)	-33.6	11.9	-2.824	0.0066
検定 2	切片	-25.6	38.3	-0.668	0.5075
	補正体重	0.10	0.03	3.555	0.0009
	父性効果 (B2)	-57.3	12.4	-4.636	<0.0001
	父性効果 (W2)	-50.3	11.7	-4.281	<0.0001
検定 3	切片	-84.5	33.3	-2.539	0.0125
	補正体重	0.17	0.03	6.127	<0.0001
	父性効果 (A3)	-49.7	8.3	-5.955	<0.0001
	父性効果 (W3)	-45.0	9.2	-4.880	<0.0001
検定 4	切片	-70.1	23.3	-3.002	0.0036
	補正体重	0.17	0.02	8.191	<0.0001
	父性効果 (A4)	-30.2	7.0	-4.336	<0.0001
	父性効果 (W4)	-42.3	9.5	-4.432	<0.0001

父性効果の推定値は A1 後代 (検定 1) あるいは A2 後代 (検定 2-4) と各後代の最小二乗平均値との差。

Table 1.8 精巢重量の最小二乗平均および95%信頼区間

検定名	オス親魚	精巢重量 (g)		
		平均	95% 信頼区間	有意差*
検定 1	A1	141.7	127.8-155.6	a
	B1	51.8	30.3-73.4	c
	W1	108.2	90.0-126.3	b
検定 2	A2	94.0	78.8-109.2	a
	B2	36.6	20.5-52.7	b
	W2	43.7	28.6-58.8	b
検定 3	A2	102.0	90.7-113.2	a
	A3	52.3	40.0-64.6	b
	W3	57.0	45.0-69.0	b
検定 4	A2	102.1	91.8-112.3	a
	A4	71.9	61.8-82.0	b
	W4	59.8	46.1-73.4	b

* 異なるアルファベットは後代間における有意差 ($P < 0.05$)を示す。アルファベットを共有する後代間には有意差が認められなかった。

Table 1.9 標準体長、体重、精巣重量、GSI および血中性ステロイドホルモン（エストラジオール-17 β （E2）、11-ケトテストステロン（11-KT）、テストステロン（T））濃度の経時変化を検討したモデルで算出された赤池情報量規準（AIC）、最小 AIC との差（ Δ AIC）、Akaike weight (w) および自由度（ df ）

モデル	df		標準 体長	体重	精巣 重量	GSI	E2	11-KT	T
モデル 1	37	AIC	568.0	1893.8	1393.6	565.0	1512.3	1786.1	2102.6
		Δ AIC	21.1	74.2	763.0	533.4	178.8	103.5	216.7
		w	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
モデル 2	20	AIC	549.1	1887.3	1459.4	627.0	1552.2	1776.1	2109.1
		Δ AIC	2.2	67.8	828.7	595.4	218.8	93.4	223.1
		w	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
モデル 3	37	AIC	558.8	1823.7	630.7	31.6	1333.5	1682.7	1885.9
		Δ AIC	11.9	4.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		w	0.00	0.11	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
モデル 4	20	AIC	546.9	1819.5	657.5	54.9	1382.7	1693.9	1898.7
		Δ AIC	0.0	0.0	26.8	23.2	49.2	11.2	12.8
		w	0.75	0.89	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

モデル 1： 測定値 = 平均値 + 月齢 \times 父性効果 + 残差（交互作用あり、ガウス分布）

モデル 2： 測定値 = 平均値 + 月齢 + 父性効果 + 残差（交互作用なし、ガウス分布）

モデル 3： 測定値 = 平均値 + 月齢 \times 父性効果 + 残差（交互作用あり、ガンマ分布）

モデル 4： 測定値 = 平均値 + 月齢 + 父性効果 + 残差（交互作用なし、ガンマ分布）

太字は各検定の中で最も w が高いモデルを示す。

Table 1. 10 早熟系統および野生親魚に由来する後代の精巣重量の経時変化（最小二乗平均および95%信頼区間）

月齢	精巣重量 (g)					
	A2 後代			W3 後代		
	平均	95% 信頼区間	有意差*	平均	95% 信頼区間	有意差*
7.3	0.1	0.1 - 0.3	a	0.1	0.1 - 0.2	a
9.3	0.4	0.3 - 0.5	ab	0.3	0.2 - 0.4	ab
10.4	0.4	0.3 - 0.9	abcd	0.3	0.2 - 0.6	abc
11.5	0.5	0.3 - 1.0	abcd	0.3	0.2 - 0.6	abc
13.4	0.5	0.4 - 1.0	abc	0.5	0.3 - 0.8	bc
15.5	0.7	0.5 - 1.6	abcde	0.6	0.4 - 1.2	bc
17.5	1.3	0.9 - 2.3	cd	0.7	0.5 - 1.6	bcd
18.1	1.0	0.7 - 1.6	bc	1.0	0.7 - 1.8	c
18.5	1.8	1.1 - 3.8	cdefg	1.0	0.7 - 2.2	cd
19	4.7	3.2 - 8.8	def	1.4	1.1 - 2.1	c
19.4	18.0	11.7 - 38.8	fghi	7.0	4.6 - 15.1	def
20	31.6	21.6 - 59.1	gh	6.7	4.5 - 12.4	de
20.5	73.7	52.0 - 126.1	hi	37.8	27.4 - 60.9	ef
21.1	138.9	94.8 - 259.5	hi	34.3	23.4 - 64.1	efg
22.1	207.1	141.4 - 386.9	i	113.2	77.3 - 211.6	fg
24	217.7	141.6 - 469.8	i	163.3	111.5 - 305.1	g
26.1	219.1	142.6 - 472.9	i	113.1	77.2 - 211.4	fg
28.6	15.5	9.3 - 45.1	efghi	8.6	6.4 - 13.3	d

* 異なるアルファベットは後代間における有意差 ($P < 0.05$) を示す。アルファベットを共有する後代間には有意差が認められなかった。

Table 1. 11 早熟系統および野生親魚に由来する後代の GSI の経時変化（最小二乗平均および 95%信頼区間）

月齢	GSI					
	A2 後代			W3 後代		
	平均	95% 信頼区間	有意差*	平均	95% 信頼区間	有意差*
7.3	0.1	0.1 - 0.1	a	0.1	0.1 - 0.1	a
9.3	0.1	0.1 - 0.1	a	0.1	0.1 - 0.1	ab
10.4	0.1	0.1 - 0.2	ab	0.1	0.1 - 0.2	ab
11.5	0.1	0.1 - 0.2	ab	0.1	0.1 - 0.2	ab
13.4	0.1	0.1 - 0.2	a	0.1	0.1 - 0.2	ab
15.5	0.2	0.1 - 0.3	ab	0.1	0.1 - 0.2	ab
17.5	0.2	0.1 - 0.3	ab	0.1	0.1 - 0.2	ab
18.1	0.1	0.1 - 0.2	a	0.2	0.1 - 0.3	ab
18.5	0.2	0.1 - 0.4	ab	0.1	0.1 - 0.3	abc
19	0.5	0.4 - 0.9	bc	0.2	0.2 - 0.3	b
19.4	2.0	1.4 - 3.8	cd	0.8	0.6 - 1.5	cdef
20	3.2	2.3 - 5.4	d	0.8	0.6 - 1.4	cde
20.5	7.0	5.1 - 10.8	de	4.0	3.0 - 5.9	f
21.1	11.6	8.3 - 19.2	de	3.1	2.2 - 5.2	dfg
22.1	15.5	11.1 - 25.8	e	11.3	8.1 - 18.8	gh
24	17.6	12.1 - 32.6	e	13.6	9.7 - 22.5	h
26.1	16.7	11.4 - 30.9	e	11.6	8.3 - 19.2	gh
28.6	1.4	0.9 - 3.2	cde	0.9	0.7 - 1.2	e

* 異なるアルファベットは後代間における有意差 ($P < 0.05$) を示す。アルファベットを共有する後代間には有意差が認められなかった。

Table 1. 12 早熟系統および野生親魚に由来する後代の E2 濃度の経時変化（最小二乗平均および 95% 信頼区間）

月齢	E2 濃度 (pg/ml)					
	A2 後代			W3 後代		
	平均	95% 信頼区間	有意差*	平均	95% 信頼区間	有意差*
7.3	25.1	19.0 - 36.8	ab	16.8	13.3 - 22.7	a
9.3	24.6	19.8 - 32.4	a	14.5	11.3 - 20.2	a
10.4	25.7	18.8 - 40.7	abc	22.2	16.8 - 32.6	ab
11.5	46.6	34.1 - 73.8	abcde	40.3	30.6 - 59.2	bc
13.4	45.0	34.1 - 66.1	abcd	24.7	19.2 - 34.5	ab
15.5	55.6	40.7 - 88.1	bcde	30.3	23.0 - 44.5	abc
17.5	64.6	49.0 - 94.9	cde	29.7	21.7 - 46.9	abc
18.1	100.3	79.6 - 135.6	de	44.3	33.6 - 65.1	bc
18.5	54.9	40.1 - 86.8	bcde	32.1	23.4 - 50.8	abc
19	83.9	63.6 - 123.1	de	60.3	49.2 - 77.8	c
19.4	108.8	79.5 - 172.1	def	76.2	55.7 - 120.6	cde
20	117.4	89.0 - 172.3	ef	128.2	97.2 - 188.1	def
20.5	108.2	84.2 - 151.4	de	156.2	123.9 - 211.1	def
21.1	98.1	74.4 - 144.1	de	146.6	111.2 - 215.3	def
22.1	109.4	83.0 - 160.6	def	256.5	194.5 - 376.5	f
24	280.0	204.7 - 443.1	f	199.0	145.5 - 315.0	df
26.1	69.4	50.7 - 109.8	cde	71.2	54.0 - 104.5	ce
28.6	69.7	48.1 - 127.0	cdef	36.0	29.0 - 47.5	bc

* 異なるアルファベットは後代間における有意差 ($P < 0.05$) を示す。アルファベットを共有する後代間には有意差が認められなかった。

Table 1.13 早熟系統および野生親魚に由来する後代の 11-KT 濃度の経時変化（最小二乗平均および 95% 信頼区間）

月齢	11-KT 濃度 (pg/ml)					
	A2 後代			W3 後代		
	平均	95% 信頼区間	有意差*	平均	95% 信頼区間	有意差*
7.3	154.9	118.4 - 223.6	abc	158.2	126.4 - 211.2	abc
9.3	119.0	96.5 - 155.0	ab	59.9	46.9 - 82.6	d
10.4	79.3	58.5 - 122.9	ab	61.0	46.6 - 88.1	d
11.5	90.2	66.6 - 139.9	ab	108.9	83.2 - 157.2	ad
13.4	81.8	62.5 - 118.1	a	147.2	115.4 - 203.0	abc
15.5	147.9	109.1 - 229.3	abc	162.7	124.5 - 235.0	abce
17.5	175.8	134.4 - 253.9	abc	210.7	155.5 - 326.7	abce
18.1	312.6	249.8 - 417.4	c	287.3	219.7 - 414.9	bcef
18.5	217.5	160.5 - 337.3	bc	199.5	147.3 - 309.4	abce
19	303.0	231.7 - 437.6	c	163.9	134.7 - 209.5	abc
19.4	373.5	275.6 - 579.2	cd	281.7	207.9 - 436.9	bcef
20	371.7	284.3 - 536.8	cd	213.4	163.2 - 308.1	abce
20.5	371.0	291.0 - 511.8	cd	250.5	200.2 - 334.5	abce
21.1	349.5	267.3 - 504.8	cd	312.4	238.9 - 451.2	bef
22.1	361.8	276.7 - 522.5	cd	336.9	257.6 - 486.5	ef
24	800.2	590.5 - 1240.8	d	684.9	505.4 - 1062.1	f
26.1	186.0	137.3 - 288.4	abc	122.4	93.6 - 176.7	acd
28.6	183.3	127.7 - 324.4	abcd	151.9	123.2 - 197.9	ac

* 異なるアルファベットは後代間における有意差 ($P < 0.05$) を示す。アルファベットを共有する後代間には有意差が認められなかった。

Table 1. 14 早熟系統および野生親魚に由来する後代の T 濃度の経時変化（最小二乗平均および 95% 信頼区間）

月齢	T 濃度 (pg/ml)					
	A2 後代			W3 後代		
	平均	95% 信頼区間	有意差*	平均	95% 信頼区間	有意差*
7.3	124.0	90.2 - 198.7	abc	234.6	179.5 - 338.5	abc
9.3	137.2	106.8 - 191.6	ab	76.7	57.4 - 115.6	d
10.4	127.8	89.1 - 225.8	abcd	102.5	74.5 - 164.2	ad
11.5	166.9	116.4 - 294.9	abcd	112.3	81.6 - 179.9	ad
13.4	67.9	49.4 - 108.8	a	145.5	108.9 - 219.2	ad
15.5	161.2	112.4 - 284.9	abcd	156.4	113.7 - 250.6	abd
17.5	200.9	146.0 - 321.8	abcd	255.0	177.8 - 450.6	abcef
18.1	273.1	209.0 - 394.0	bcd	196.4	142.7 - 314.6	abcde
18.5	335.2	233.8 - 592.2	bcde	303.8	211.8 - 536.7	abcef
19	536.5	389.9 - 859.5	de	423.1	334.3 - 576.2	bcef
19.4	826.0	576.1 - 1459.4	ef	533.8	372.2 - 943.0	cefg
20	1167.1	848.3 - 1869.9	ef	603.0	438.3 - 966.2	efg
20.5	1368.7	1024.3 - 2061.8	ef	774.3	592.5 - 1117.1	fg
21.1	833.6	605.9 - 1335.5	ef	947.5	688.7 - 1518.1	fg
22.1	1246.5	906.0 - 1997.0	ef	1511.3	1098.4 - 2421.2	g
24	2085.2	1454.2 - 3684.0	f	1569.6	1094.6 - 2773.1	g
26.1	361.0	251.8 - 637.8	cde	298.1	216.7 - 477.6	abcef
28.6	185.8	121.3 - 396.7	abcdef	97.8	76.2 - 136.6	d

* 異なるアルファベットは後代間における有意差 ($P < 0.05$) を示す。アルファベットを共有する後代間には有意差が認められなかった。

Table 1.15 早熟系統および野生親魚に由来する後代の標準体長の経時変化（最小二乗平均および95%信頼区間）

月齢	オス親魚	標準体長 (cm)		
		平均	95%信頼区間	有意差*
7.3	A2	18.2	17.7 - 18.8	a
	W3	17.5	17.0 - 18.0	
9.3	A2	22.9	22.3 - 23.5	b
	W3	21.8	21.2 - 22.4	
10.4	A2	23.2	22.3 - 24.0	bc
	W3	22.0	21.3 - 22.8	
11.5	A2	24.1	23.2 - 25.0	bc
	W3	22.8	22.1 - 23.7	
13.4	A2	24.7	23.9 - 25.5	c
	W3	23.4	22.7 - 24.1	
15.5	A2	27.2	26.2 - 28.3	d
	W3	25.7	24.8 - 26.6	
17.5	A2	30.4	29.3 - 31.5	e
	W3	28.4	27.5 - 29.5	
18.1	A2	31.0	30.1 - 32.0	e
	W3	29.0	28.2 - 29.9	
18.5	A2	31.1	29.9 - 32.4	ef
	W3	29.1	28.0 - 30.2	
19	A2	32.7	31.8 - 33.8	efg
	W3	30.5	29.7 - 31.4	
19.4	A2	34.1	32.8 - 35.6	fghi
	W3	31.7	30.6 - 33.0	
20	A2	32.9	31.8 - 34.1	efgh
	W3	30.6	29.6 - 31.7	
20.5	A2	34.5	33.4 - 35.6	gh
	W3	32.0	31.1 - 32.9	
21.1	A2	34.4	33.3 - 35.7	ghi
	W3	32.0	30.9 - 33.1	
22.1	A2	34.6	33.4 - 35.9	ghi
	W3	32.1	31.1 - 33.2	
24	A2	35.6	34.3 - 37.0	hi
	W3	33.0	31.8 - 34.2	
26.1	A2	35.7	34.4 - 37.2	hi
	W3	33.1	32.0 - 34.3	
28.6	A2	37.4	36.1 - 38.8	i
	W3	34.5	33.5 - 35.6	

各月齢内での後代間の有意差は認められず、両後代の標準体長の変化傾向は等しいことが示唆された。

* 異なるアルファベットは後代の区別なしに月齢間における有意差 ($P < 0.05$) が認められたことを示す。アルファベットを共有する月齢間には有意差が認められなかった。

Table 1. 16 早熟系統および野生親魚に由来する後代の体重の経時変化（最小二乗平均および95%信頼区間）

月齢	オス親魚	体重 (g)		
		平均	95%信頼区間	有意差*
7.3	A2	159.1	145.7 - 175.2	a
	W3	153.7	141.2 - 168.6	
9.3	A2	340.5	314.8 - 370.9	b
	W3	316.6	294.1 - 342.7	
10.4	A2	347.0	312.0 - 390.9	b
	W3	322.1	291.7 - 359.5	
11.5	A2	382.1	343.3 - 430.7	bc
	W3	352.1	319.0 - 392.9	
13.4	A2	409.9	372.7 - 455.4	bc
	W3	375.7	344.2 - 413.5	
15.5	A2	506.6	454.5 - 572.3	c
	W3	455.3	412.8 - 507.6	
17.5	A2	706.0	633.5 - 797.4	de
	W3	610.2	554.2 - 678.7	
18.1	A2	695.4	634.7 - 768.9	d
	W3	602.2	554.8 - 658.4	
18.5	A2	787.4	699.1 - 901.2	def
	W3	670.0	604.3 - 751.7	
19	A2	825.6	753.5 - 912.9	de
	W3	697.4	646.5 - 757.1	
19.4	A2	897.0	795.4 - 1028.3	defg
	W3	747.7	674.7 - 838.4	
20	A2	902.9	812.5 - 1015.9	ef
	W3	751.8	686.8 - 830.4	
20.5	A2	1055.9	960.8 - 1171.9	fgh
	W3	855.0	790.1 - 931.5	
21.1	A2	1197.8	1074.5 - 1353.0	ghi
	W3	945.7	863.9 - 1044.6	
22.1	A2	1304.4	1168.9 - 1475.5	hi
	W3	1011.0	923.4 - 1116.9	
24	A2	1402.2	1242.7 - 1608.7	i
	W3	1068.7	971.1 - 1188.1	
26.1	A2	1279.8	1136.0 - 1465.3	hi
	W3	996.1	905.2 - 1107.4	
28.6	A2	1238.0	1101.4 - 1413.2	hi
	W3	970.6	890.0 - 1067.2	

各月齢内での後代間の有意差は認められず、両後代の体重の変化傾向は等しいことが示唆された。

* 異なるアルファベットは後代の区別なしに月齢間における有意差 ($P < 0.05$) が認められたことを示す。アルファベットを共有する月齢間には有意差が認められなかった。

```

library(lme4);library(lsmmeans)

DIR="PROJECT_name"
FILE="samplefile.csv"

data <- read.csv(FILE, sep=";", header = T )

#####for SL
SL_1 <- glm(SL~sire,data=Male,family=gaussian)
SL_2 <- glm(SL~1,data=Male,family=gaussian)
SL_3 <- glm(SL~sire,data=Male,family=Gamma)
SL_4 <- glm(SL~1,data=Male,family=Gamma)
AIC_SL <- AIC(SL_1,SL_2,SL_3,SL_4)
AIC_SL[order(AIC_SL$AIC),]

#select lowest AIC model
SL <- SL_X
summary(SL)
anova(SL, test="LRT")
(lslSL <- lsmmeans(SL,pairwise~sire,test="tukey"))

#####test for BW
BW_1 <- glm(BW~sire,data=Male,family=gaussian)
BW_2 <- glm(BW~1,data=Male,family=gaussian)
BW_3 <- glm(BW~sire,data=Male,family=Gamma)
BW_4 <- glm(BW~1,data=Male,family=Gamma)
AIC_BW <- AIC(BW_1,BW_2,BW_3,BW_4)
AIC_BW[order(AIC_BW$AIC),]

#select lowest AIC model
BW <- BW_X
anova(BW, test="LRT")
summary(BW)
(lslBW <- lsmmeans(BW,pairwise~sire,test="tukey"))

#####test for TW
TW_1 <- glm(TW~sire,data=Male,family=gaussian)
TW_2 <- glm(TW~1,data=Male,family=gaussian)
TW_3 <- glm(TW~sire,data=Male,family=Gamma)
TW_4 <- glm(TW~1,data=Male,family=Gamma)
AIC_TW <- AIC(TW_1,TW_2,TW_3,TW_4)
AIC_TW[order(AIC_TW$AIC),]

#select lowest AIC model
TW <- TW_X
summary(TW)
anova(TW, test="LRT")
(lslTW <- lsmmeans(TW,pairwise~sire,test="tukey"))

#test for GSI
GSI_1 <- glm(GSI~sire,data=Male,family=gaussian)
GSI_2 <- glm(GSI~1,data=Male,family=gaussian)
GSI_3 <- glm(GSI~sire,data=Male,family=Gamma)
GSI_4 <- glm(GSI~1,data=Male,family=Gamma)
AIC_GSI <- AIC(GSI_1,GSI_2,GSI_3,GSI_4)
AIC_GSI[order(AIC_GSI$AIC),]

#select lowest AIC model
GSI <- GSI_X
summary(GSI)
anova(GSI, test="LRT")
(lslGSI <- lsmmeans(GSI,pairwise~sire,test="tukey"))

```

Script 1.1 各検定で取得した表現型値に対する父性効果の影響を、一般化線形モデルを用いて評価した際に用いた R スクリプト。

```
library(lme4);library(lsmmeans)

DIR="PROJECT_name"
FILE="samplefile.csv"

data <- read.csv(FILE, sep=";", header = T)

#set corrected body weight (CBW)
data[10] <- (data$BW - data$TW)/1000
colnames(data)[10] <- "CBW"

GLM_1 <- glm(TW~sire*CBW,data=male,family = gaussian)
GLM_2 <- glm(TW~sire+CBW,data=male,family = gaussian)
GLM_3 <- glm(TW~sire*CBW,data=male,family = Gamma)
GLM_4 <- glm(TW~sire+CBW,data=male,family = Gamma)
AIC_male <- AIC(GLM_1,GLM_2,GLM_3,GLM_4)
AIC_male[order(AIC_male$AIC),]
stepAIC(GLM1)

#select lowest AIC model
GLM <- GLM_X
summary(GLM)
lsmmeans(GLM, pairwise ~ sire, test="Tukey")
```

Script 1.2 各検定で取得した精巢重量と補正体重（体重から精巢重量を除いた値, CBW）の関連性を、一般化線形モデルを用いて調べた R スクリプト。


```

library(lme4);library(lsmmeans)

DIR="PROJECT_name"
FILE="samplefile.csv"

data <- read.csv(FILE, sep= ",", header = T)

#####for BW and SL
#these traits were not supported the significance of the interaction between sire and AOM (age of months)

PHENO_1 <- glm(PHENO~sire*AOM, data=data, family=gaussian)
PHENO_2 <- glm(PHENO~sire+AOM, data=data, family=gaussian)
PHENO_3 <- glm(PHENO~sire*AOM, data=data, family=Gamma)
PHENO_4 <- glm(PHENO~sire+AOM, data=data, family=Gamma)
AIC_PHENO <- AIC(PHENO_1,PHENO_2,PHENO_3,PHENO_4)
AIC_PHENO[order(AIC_PHENO$AIC),]

#select lowest AIC model
PHENO <- PHENO_X
#significance of the interaction between sire and AOM was not supported.
#differences in PHENO would be same between A2 and W3.

#test significance of each factor
anova( PHENO, test="LRT")

#test for sire effect using lsmmeans
(lspHENO1 <- lsmmeans( PHENO, pairwise ~ sire, adjust="tukey"))
#test for AOM using lsmmeans
(lspHENO2 <- lsmmeans( PHENO, pairwise ~ AOM, adjust="tukey"))

# lettering significant differences
(lspHENO3 <- lsmmeans( PHENO, ~ sire|AOM))
cld(lspHENO3, by="sire",sort=F)

#####for TW, GSI and steroids
#these traits were supported the significance of the interaction between sire and AOM

PHENO_1 <- glm(PHENO~sire*AOM, data=data2, family=Gamma)
PHENO_2 <- glm(PHENO~sire+AOM, data=data2, family=Gamma)
PHENO_3 <- glm(PHENO~sire*AOM, data=data2, family=gaussian)
PHENO_4 <- glm(PHENO~sire+AOM, data=data2, family=gaussian)
AIC_PHENO <- AIC(PHENO_1,PHENO_2,PHENO_3,PHENO_4)
AIC_PHENO[order(AIC_PHENO$AIC),]

#select lowest AIC model
PHENO <- PHENO_X

#significant test
(lspHENO <- lsmmeans( PHENO, pairwise ~ sire|AOM, adjust="Tukey"))

#lettering significant differences
(lspHENO3 <- lsmmeans( PHENO, ~ sire|AOM))
cld(lspHENO3, by="sire",sort=F)
cld(lspHENO3, by="AOM",sort=F)

```

Script 1.3 A2 と W3 の後代間で体サイズ、精巣重量ならびに血中性ステロイドホルモンの経時変化を比較し、一般化線形モデルを用いて父性効果の有意性を検定した R スクリプト。

第 2 章 图表

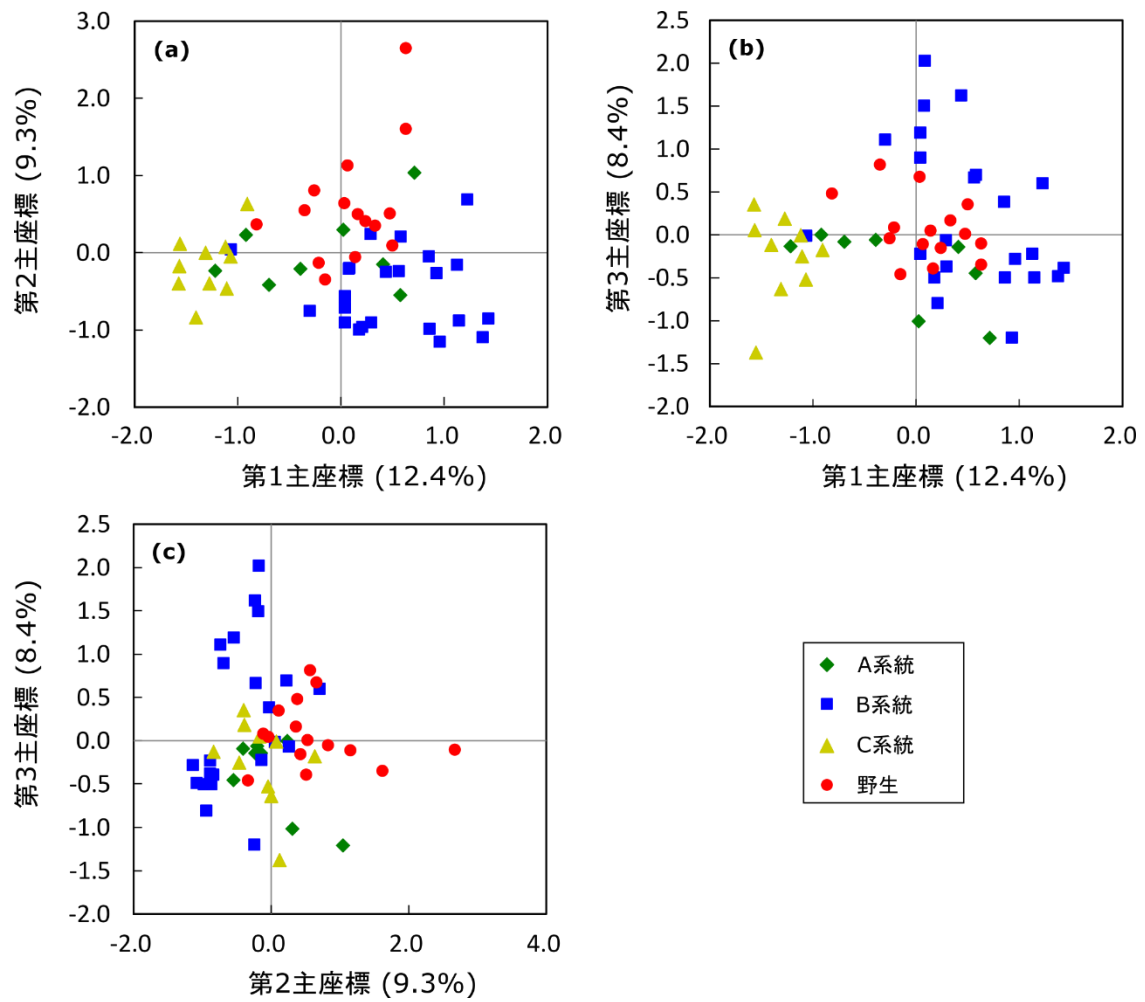


Fig. 2.1 56 サンプルを用いて行った主座標分析の結果。各主座標の寄与率は軸ラベルの括弧内に示した。

(a) 第1主座標×第2主座標、 (b) 第1主座標×第3主座標、 (c) 第2主座標×第3主座標。

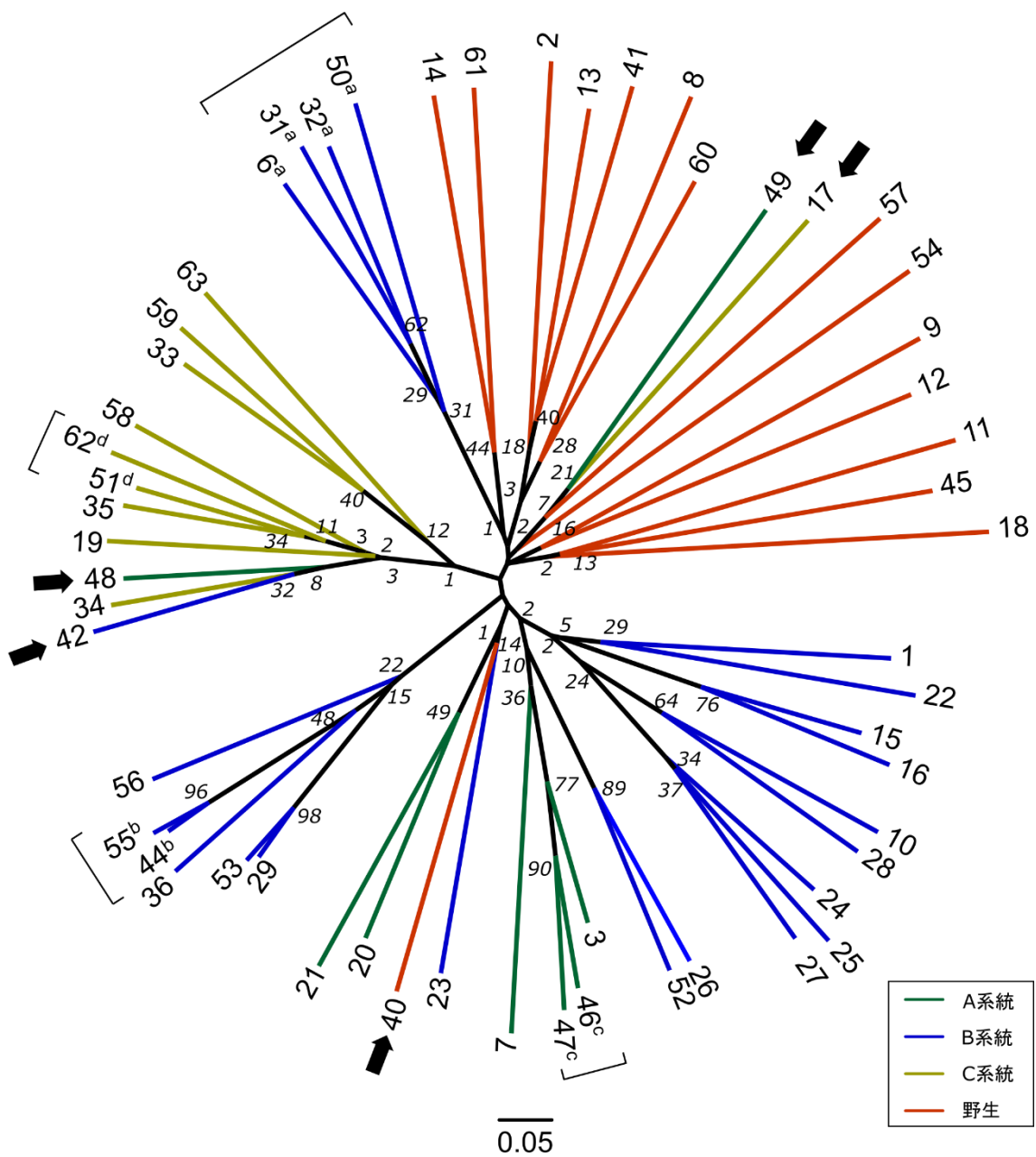


Fig. 2.2 遺伝距離 D_a を用いて近隣結合法により算出した系統樹。サンプル番号は外周に付記した。ブランチの中ほどに斜体で示した数値は各ノードにおけるブートストラップ値 (%) を示す。上付きのアルファベットを共有する個体間は全きょうだいであることを表す。矢印は聞き取り調査で得た系統情報と遺伝解析の結果が整合しない個体を示す。

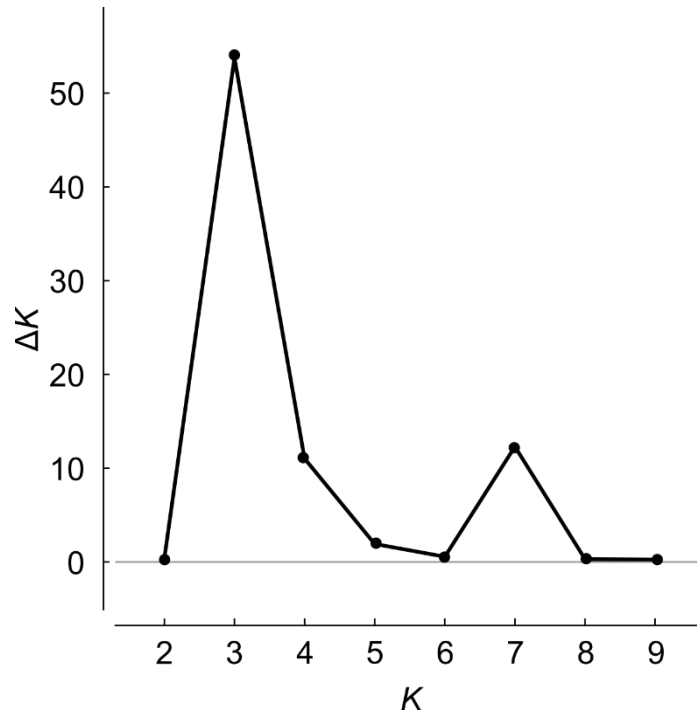


Fig. 2.3 Evanno *et al.* (2005) の方法により推定された祖先集団数 (K) の信頼度 (ΔK)。 ΔK の値が大きいほど K の信頼性が高い。

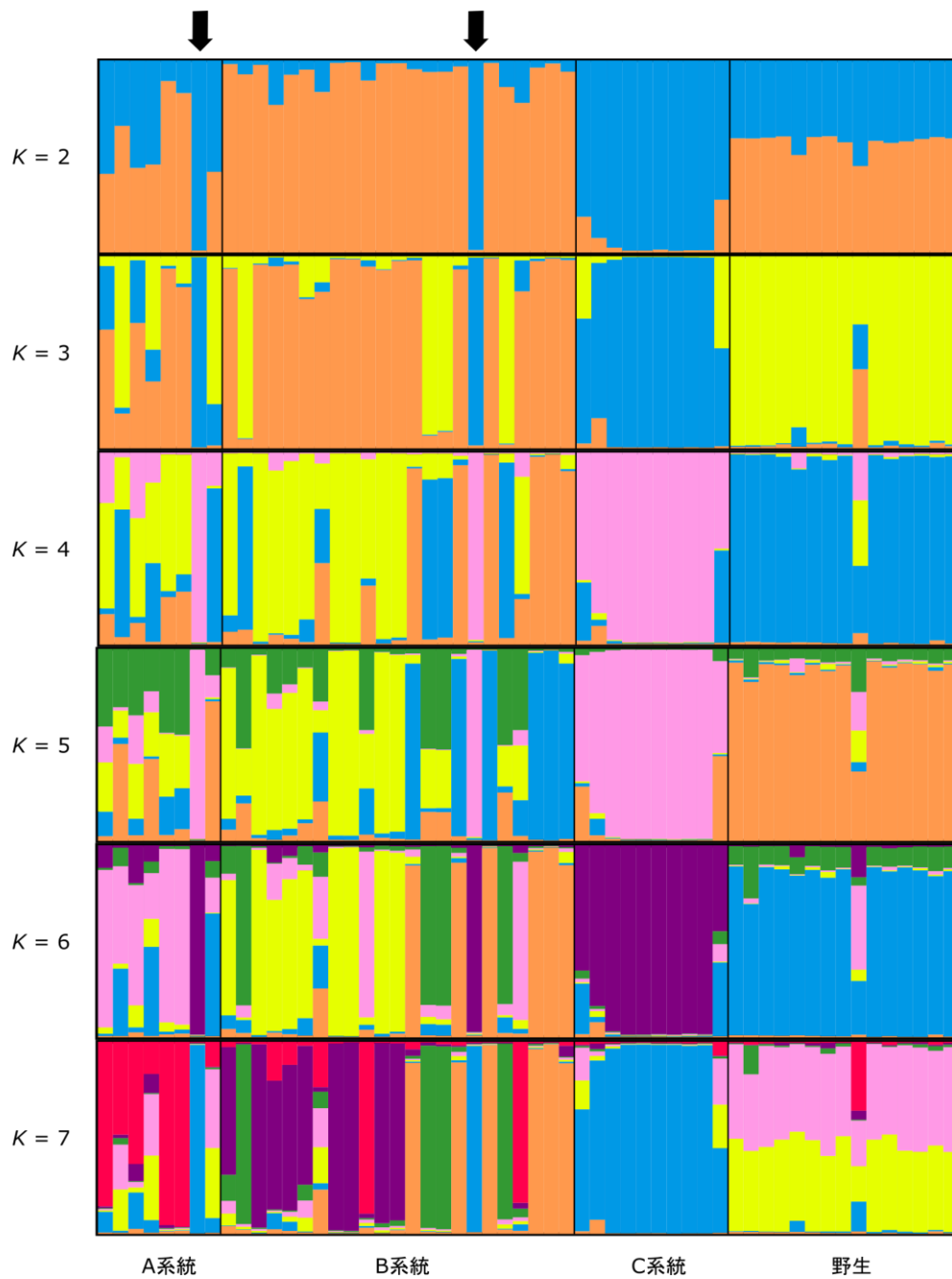


Fig. 2.4 STRUCTURE 解析による各系統の集団構造。縦線一本が 1 個体を表しており、それぞれの祖先集団数 (K) ごとに想定された祖先が異なる色で示されている。矢印は A 系統内 (48 番) および B 系統内 (42 番) にそれぞれ出現した、C 系統と同じ集団に属すると考えられる個体を示す。

Table 2.1 遺伝解析に用いたマイクロサテライトマーカー

マーカー名	フォワードプライマー (5'-3')	リバースプライマー (5'-3')	参照配列 (FUGU5/fr3) 上の位置	
			染色体番号	5'末端からの距離 (bp)
f1029 ^a	gcctttattcaccaggcagt	ggcaggtagacagaacttgg	1	1,637,578
f502	tgcaaggaagagtcggccattatcg	cggggacgcggggactttaga	2	637,167
f207	ttgcctctgtgacgtatgga	agatttgaccctccctcc	4	1,222,737
f1254 ^b	ccatcctcccagactgactc	gtgctggaaggagggttt	5	9,305,623
f1280	tagcccatcagggtctttgg	tctcgtgactgcacctaaa	6	1,389,013
f182	ataccataactgtcatcatt	tactattaacctgcctctc	7	1,948,820
f1077	ctgaaagggaaaagcagcaa	cacgtcagaagctgcgatta	9	23,970
f1173	ctcaacctgccacaaaaa	tggcagaataattgggggta	9	1,825,689
f1273	gcattgcacacaaaact	gaaaagggtcagtgcagcag	11	1,684,711
f1227 ^b	gcatgccaggaatcctca	catgcaatcccactcctct	11	2,376,429
f1097	caggccactgcattcatcta	tggcaacagcaaaaactgac	19	8,599,642
f784	actggcttctcctccagtga	cagcagatggctcgtgaata	19	8,805,051
f665	cccgtatgtgacaaccaatg	ggaaaagtgcgcaaagtta	20	8,818,107

^a 本研究で多型が得られなかったマーカー

^b Kai *et al.* (2011) には含まれていないマーカー

Table 2.2 遺伝的構造解析に用いたトラフグ親魚

サンプル 番号	性別	系統名 ^a	両親の情報 ^b	市販種苗の 生産への利用	備考
1	メス	B 系統	A/A	○	
2	メス	野生	-	○	
3	オス	A 系統	A/A	○	
6	オス	B 系統	W/A	○	#31, 32, 50 の全きょうだい
7	オス	A 系統	W/A	○	
8	メス	野生	-	○	
9	メス	野生	-	○	
10	オス	B 系統	A/A	○	
11	メス	野生	-	○	
12	メス	野生	-	○	
13	メス	野生	-	○	
14	メス	野生	-	○	
15	オス	B 系統	A/A	○	
16	オス	B 系統	A/A	○	
17	オス	C 系統	A/A	○	
18	メス	野生	-	○	
19	メス	C 系統	A/A	○	
20	オス	A 系統	A/A	○	
21	オス	A 系統	A/A	○	
22	メス	B 系統	A/A	○	
23	メス	B 系統	A/A	○	
24	オス	B 系統	A/A	○	
25	オス	B 系統	A/A	○	
26	メス	B 系統	A/A	○	
27	オス	B 系統	A/A	○	
28	メス	B 系統	A/A	×	
29	オス	B 系統	A/A	○	
31	オス	B 系統	W/A	○	#6, 32, 50 の全きょうだい
32	オス	B 系統	W/A	○	#6, 31, 50 の全きょうだい
33	オス	C 系統	A/A	○	
34	オス	C 系統	A/A	○	
35	オス	C 系統	A/A	○	
36	オス	B 系統	A/A	○	
40	メス	野生	-	○	
41	メス	野生	-	○	
42	オス	B 系統	A/A	○	
44	オス	B 系統	A/A	×	#55 の全きょうだい
45	メス	野生	-	○	

^a 人工魚の場合はその系統名を、野生魚の場合は「野生」と記録した。

^b 両親のいずれかが野生魚の場合は W/A とし、人工魚どうしの場合は A/A と記録した。

Table 2.2 (続き) 血縁解析に用いたトラフグ親魚

サンプル 番号	性別	系統名 ^a	両親の情報 ^b	市販種苗の 生産への利用	備考
46	オス	A 系統	W/A	○	#47 の全きょうだい
47	オス	A 系統	W/A	×	#46 の全きょうだい
48	オス	A 系統	W/A	○	
49	オス	A 系統	A/A	○	
50	オス	B 系統	W/A	○	#6, 31, 32 の全きょうだい
51	オス	C 系統	A/A	×	#62 の全きょうだい
52	メス	B 系統	A/A	○	
53	オス	B 系統	A/A	○	
54	メス	野生	-	○	
55	オス	B 系統	A/A	○	#44 の全きょうだい
56	オス	B 系統	A/A	○	
57	メス	野生	-	○	
58	オス	C 系統	不明	○	
59	オス	C 系統	不明	○	
60	メス	野生	-	○	
61	メス	野生	-	○	
62	オス	C 系統	A/A	○	#51 の全きょうだい
63	オス	C 系統	W/A	○	

^a 人工魚の場合はその系統名を、野生魚の場合は「野生」と記録した。

^b 両親のいずれかが野生魚の場合は W/A とし、人工魚どうしの場合は A/A と記録した。

Table 2.3 f1227 マーカーで検出された多型

アレルサイズ (bp)	アレル出現頻度 (%)			
	A 系統	B 系統	C 系統	野生
205	31.3	4.3	20.0	6.7
207	0.0	4.3	0.0	0.0
217	6.3	8.7	25.0	23.3
225	6.3	0.0	0.0	0.0
227	0.0	2.2	0.0	0.0
229	0.0	2.2	0.0	3.3
231	0.0	0.0	0.0	3.3
233	31.3	19.6	30.0	0.0
237	6.3	6.5	0.0	0.0
243	0.0	0.0	0.0	3.3
245	0.0	0.0	0.0	10.0
247	0.0	0.0	0.0	10.0
251	0.0	0.0	0.0	3.3
253	12.5	4.3	20.0	6.7
255	0.0	4.3	0.0	23.3
257	6.3	28.3	5.0	6.7
259	0.0	10.9	0.0	0.0
261	0.0	2.2	0.0	0.0
263	0.0	2.2	0.0	0.0
アレル数	7	13	5	11
アレル総数	16	46	20	30
判定不能個体数	0	0	0	0

Table 2.4 f1273 マーカーで検出された多型

アレルサイズ (bp)	アレル出現頻度 (%)			
	A 系統	B 系統	C 系統	野生
153	0.0	0.0	0.0	6.7
155	0.0	0.0	0.0	3.3
159	0.0	0.0	0.0	3.3
163	12.5	13.0	5.0	3.3
167	0.0	4.3	0.0	0.0
169	6.3	0.0	0.0	3.3
173	0.0	10.9	0.0	10.0
175	12.5	19.6	50.0	6.7
177	6.3	2.2	15.0	6.7
181	0.0	0.0	5.0	3.3
187	0.0	2.2	0.0	10.0
189	0.0	0.0	0.0	3.3
191	0.0	6.5	0.0	0.0
193	50.0	23.9	0.0	3.3
195	6.3	4.3	25.0	3.3
197	0.0	0.0	0.0	6.7
199	6.3	8.7	0.0	6.7
203	0.0	4.3	0.0	20.0
アレル数	7	11	5	16
アレル総数	16	46	20	30
判定不能個体数	0	0	0	0

Table 2.5 f665 マーカーで検出された多型

アレルサイズ (bp)	アレル出現頻度 (%)			
	A 系統	B 系統	C 系統	野生
237	0.0	13.0	5.0	3.3
245	6.3	0.0	5.0	13.3
255	0.0	8.7	0.0	0.0
257	6.3	19.6	15.0	3.3
259	0.0	2.2	15.0	6.7
261	0.0	0.0	0.0	3.3
263	12.5	15.2	5.0	10.0
265	37.5	32.6	35.0	20.0
267	0.0	0.0	0.0	3.3
269	0.0	0.0	0.0	3.3
271	0.0	0.0	5.0	6.7
273	0.0	0.0	0.0	10.0
275	31.3	8.7	15.0	6.7
279	0.0	0.0	0.0	3.3
283	6.3	0.0	0.0	6.7
アレル数	6	7	8	14
アレル総数	16	46	20	30
判定不能個体数	0	0	0	0

Table 2.6 f182 マーカーで検出された多型

アレルサイズ (bp)	アレル出現頻度 (%)			
	A 系統	B 系統	C 系統	野生
290	0.0	0.0	0.0	6.7
292	6.3	6.5	0.0	0.0
294	12.5	17.4	0.0	0.0
296	0.0	6.5	0.0	6.7
298	0.0	0.0	5.0	10.0
300	0.0	8.7	15.0	10.0
302	31.3	6.5	20.0	3.3
308	12.5	10.9	0.0	16.7
310	12.5	17.4	0.0	10.0
312	0.0	15.2	0.0	6.7
314	0.0	0.0	5.0	6.7
316	25.0	10.9	55.0	10.0
318	0.0	0.0	0.0	3.3
320	0.0	0.0	0.0	6.7
326	0.0	0.0	0.0	3.3
アレル数	6	9	5	13
アレル総数	16	46	20	30
判定不能個体数	0	0	0	0

Table 2.7 f1254 マーカーで検出された多型

アレルサイズ (bp)	アレル出現頻度 (%)			
	A 系統	B 系統	C 系統	野生
178	0.0	2.2	20.0	3.3
186	0.0	0.0	0.0	10.0
190	0.0	13.0	0.0	3.3
192	0.0	0.0	0.0	3.3
194	12.5	0.0	0.0	10.0
196	12.5	0.0	0.0	3.3
198	0.0	10.9	5.0	3.3
200	0.0	8.7	0.0	0.0
202	6.3	0.0	25.0	26.7
204	6.3	10.9	0.0	3.3
206	25.0	52.2	15.0	16.7
208	0.0	0.0	0.0	6.7
210	0.0	0.0	0.0	3.3
214	37.5	2.2	35.0	6.7
アレル数	6	7	5	13
アレル総数	16	46	20	30
判定不能個体数	0	0	0	0

Table 2.8 f1077 マーカーで検出された多型

アレルサイズ (bp)	アレル出現頻度 (%)			
	A 系統	B 系統	C 系統	野生
186	0.0	0.0	0.0	6.7
190	0.0	0.0	5.0	0.0
196	0.0	0.0	0.0	6.7
200	0.0	17.4	0.0	3.3
204	0.0	6.5	0.0	6.7
206	0.0	8.7	0.0	3.3
208	0.0	0.0	5.0	0.0
210	0.0	0.0	10.0	0.0
212	0.0	0.0	0.0	3.3
214	18.8	6.5	5.0	10.0
216	6.3	0.0	0.0	6.7
220	0.0	2.2	0.0	6.7
222	31.3	0.0	0.0	3.3
224	6.3	2.2	35.0	6.7
226	0.0	6.5	0.0	0.0
228	0.0	15.2	0.0	10.0
230	6.3	4.3	0.0	0.0
234	0.0	0.0	0.0	3.3
236	6.3	15.2	40.0	13.3
240	0.0	0.0	0.0	6.7
242	12.5	4.3	0.0	0.0
246	0.0	2.2	0.0	0.0
250	0.0	0.0	0.0	3.3
252	0.0	2.2	0.0	0.0
274	12.5	6.5	0.0	0.0
アレル数	8	14	6	16
アレル総数	16	46	20	30
判定不能個体数	0	0	0	0

Table 2.9 f502 マーカーで検出された多型

アレルサイズ (bp)	アレル出現頻度 (%)			
	A 系統	B 系統	C 系統	野生
432	0.0	6.8	0.0	0.0
434	0.0	2.3	0.0	0.0
436	0.0	9.1	0.0	3.8
438	0.0	0.0	0.0	3.8
442	0.0	0.0	0.0	7.7
444	16.7	15.9	5.0	3.8
446	8.3	18.2	0.0	3.8
448	33.3	4.5	5.0	11.5
450	16.7	18.2	35.0	3.8
452	8.3	2.3	0.0	0.0
454	0.0	0.0	0.0	3.8
456	0.0	11.4	15.0	7.7
458	8.3	0.0	0.0	3.8
460	8.3	0.0	5.0	11.5
462	0.0	2.3	30.0	3.8
464	0.0	4.5	0.0	7.7
466	0.0	2.3	0.0	7.7
468	0.0	0.0	0.0	3.8
470	0.0	2.3	0.0	0.0
474	0.0	0.0	5.0	0.0
476	0.0	0.0	0.0	3.8
480	0.0	0.0	0.0	3.8
486	0.0	0.0	0.0	3.8
アレル数	7	13	7	18
アレル総数	12	44	20	26
判定不能個体数	2	1	0	2

Table 2.10 f1097 マーカーで検出された多型

アレルサイズ (bp)	アレル出現頻度 (%)			
	A 系統	B 系統	C 系統	野生
216	0.0	0.0	0.0	3.3
220	0.0	0.0	0.0	6.7
222	12.5	0.0	45.0	20.0
224	43.8	30.4	30.0	16.7
226	31.3	32.6	5.0	30.0
230	0.0	4.3	0.0	10.0
232	0.0	8.7	0.0	0.0
234	0.0	10.9	0.0	6.7
236	6.3	2.2	0.0	0.0
240	0.0	0.0	0.0	6.7
242	0.0	8.7	0.0	0.0
252	6.3	2.2	20.0	0.0
アレル数	5	8	4	8
アレル総数	16	46	20	30
判定不能個体数	0	0	0	0

Table 2.11 f784 マーカーで検出された多型

アレルサイズ (bp)	アレル出現頻度 (%)			
	A 系統	B 系統	C 系統	野生
204	0.0	2.2	0.0	0.0
206	0.0	15.2	0.0	3.3
212	0.0	6.5	0.0	3.3
216	0.0	8.7	0.0	3.3
224	0.0	8.7	0.0	0.0
228	0.0	2.2	0.0	0.0
230	6.3	0.0	0.0	10.0
234	0.0	0.0	0.0	3.3
238	0.0	0.0	0.0	3.3
240	6.3	2.2	20.0	3.3
242	0.0	0.0	0.0	3.3
244	6.3	13.0	0.0	10.0
246	0.0	0.0	0.0	3.3
252	0.0	0.0	0.0	3.3
254	31.3	6.5	30.0	3.3
258	0.0	0.0	0.0	6.7
266	0.0	0.0	0.0	3.3
272	0.0	0.0	0.0	6.7
274	0.0	0.0	0.0	3.3
278	0.0	0.0	0.0	3.3
282	18.8	15.2	45.0	6.7
286	0.0	0.0	0.0	3.3
300	0.0	13.0	0.0	3.3
304	0.0	0.0	0.0	3.3
336	0.0	0.0	0.0	3.3
338	0.0	0.0	5.0	0.0
378	0.0	6.5	0.0	0.0
380	0.0	0.0	0.0	3.3
384	31.3	0.0	0.0	0.0
アレル数	6	12	4	23
アレル総数	16	46	20	30
判定不能個体数	0	0	0	0

Table 2.12 f207 マーカーで検出された多型

アレルサイズ (bp)	アレル出現頻度 (%)			
	A 系統	B 系統	C 系統	野生
156	12.5	2.2	20.0	0.0
160	0.0	0.0	0.0	3.3
168	37.5	8.7	25.0	10.0
170	0.0	13.0	0.0	3.3
172	0.0	2.2	25.0	3.3
174	12.5	13.0	0.0	3.3
176	0.0	17.4	5.0	13.3
178	0.0	0.0	0.0	3.3
182	0.0	4.3	0.0	10.0
186	0.0	0.0	0.0	10.0
188	0.0	0.0	0.0	10.0
190	0.0	2.2	0.0	0.0
192	18.8	0.0	0.0	6.7
194	6.3	32.6	20.0	3.3
200	6.3	2.2	0.0	10.0
202	6.3	2.2	0.0	0.0
204	0.0	0.0	5.0	3.3
206	0.0	0.0	0.0	6.7
アレル数	7	11	6	15
アレル総数	16	46	20	30
判定不能個体数	0	0	0	0

Table 2.13 f1173 マーカーで検出された多型

アレルサイズ (bp)	アレル出現頻度 (%)			
	A 系統	B 系統	C 系統	野生
211	0.0	10.9	0.0	3.3
213	0.0	2.2	5.0	13.3
215	0.0	0.0	5.0	3.3
217	0.0	8.7	0.0	0.0
219	6.3	0.0	0.0	10.0
221	12.5	0.0	0.0	13.3
225	0.0	2.2	15.0	6.7
227	18.8	0.0	0.0	6.7
229	6.3	4.3	0.0	3.3
231	0.0	0.0	0.0	3.3
233	31.3	26.1	10.0	0.0
235	0.0	0.0	0.0	3.3
237	0.0	8.7	0.0	0.0
241	0.0	6.5	0.0	6.7
243	6.3	0.0	0.0	6.7
251	0.0	2.2	0.0	0.0
253	0.0	2.2	0.0	3.3
255	0.0	13.0	0.0	6.7
261	6.3	6.5	35.0	3.3
265	0.0	6.5	0.0	0.0
269	0.0	0.0	0.0	3.3
275	0.0	0.0	0.0	3.3
283	6.3	0.0	30.0	0.0
291	6.3	0.0	0.0	0.0
アレル数	9	13	6	17
アレル総数	16	46	20	30
判定不能個体数	0	0	0	0

Table 2. 14 f1280 マーカーで検出された多型

アレルサイズ (bp)	アレル出現頻度 (%)			
	A 系統	B 系統	C 系統	野生
212	16.7	0.0	5.0	15.4
214	0.0	18.4	5.0	15.4
216	33.3	2.6	20.0	3.8
218	0.0	0.0	0.0	3.8
220	0.0	5.3	0.0	0.0
222	0.0	2.6	0.0	3.8
224	8.3	26.3	0.0	11.5
226	8.3	23.7	20.0	7.7
232	0.0	0.0	20.0	3.8
234	16.7	7.9	25.0	26.9
240	0.0	2.6	0.0	0.0
244	0.0	7.9	5.0	7.7
246	16.7	2.6	0.0	0.0
アレル数	6	10	7	10
アレル総数	12	38	20	26
判定不能個体数	2	4	0	2

Table 2.15 各系統および野生親の個体数 (n) および遺伝的多様性の指標

系統名	n	NA	MNA	ENA	Ho	He	$AR(6)$	PIC	DHWE	Fis	Ne (95%信頼区間)	
											LD	MC
A 系統	8	80	6.67	4.47	0.90	0.77	5.94	0.74	0	-0.16	20.3 (9.0 – 253.1)	15.1 (3.9 – 36.9)
B 系統	23	128	10.67	6.62	0.86	0.83	6.51	0.82	3	-0.03	9.5 (7.8 – 11.6)	10.4 (7.2 – 14.2)
C 系統	10	68	5.67	3.86	0.83	0.73	4.73	0.69	2	-0.13	25.5 (11.5 – 309.4)	11.3 (4.1 – 22.0)
野生	15	174	14.50	10.76	0.86	0.90	8.54	0.89	0	0.04	342.2 (59.0 – ∞)	66.5 (4.9 – 207.3)

NA : アレル出現数

MNA : 平均アレル数

ENA : 有効アレル数

AR : アレリックリッチネスの平均値 (基準サンプル数は 6 個体)

PIC : 多型情報含有量

Ho : ヘテロ接合度の観測値

He : ヘテロ接合度の予測値

DHWE: ハーディ・ワインベルク平衡から逸脱したマイクロサテライト座の数 (ボンフェローニ補正後, $P < 0.05$)

Fis : 各集団内の近交係数

LD: Linkage disequilibrium 法の random モデル、最小アレル頻度 5% の条件で算出した有効親魚数

MC: Molecular coancestry 法で算出した有効親魚数

Table 2. 16 12 マイクロサテライトマーカーで得られた多型情報の要約

マーカー	A 系統				B 系統				C 系統				野生			
	NA	Ho	He	Fis	NA	Ho	He	Fis	NA	Ho	He	Fis	NA	Ho	He	Fis
f1227	7	1.00	0.77	-0.29	13	0.74	0.85*	0.13	5	1.00	0.77*	-0.31	11	0.60	0.85	0.30
f1273	7	0.63	0.70	0.11	11	0.87	0.86	-0.01	5	0.60	0.66	0.09	16	0.87	0.91	0.05
f665	6	0.88	0.73	-0.19	7	0.83	0.80*	-0.03	8	0.90	0.80	-0.13	14	0.87	0.90	0.03
f182	6	1.00	0.79	-0.27	9	1.00	0.87	-0.15	5	0.70	0.63	-0.11	13	0.80	0.91	0.12
f1254	6	1.00	0.76	-0.32	7	0.74	0.68*	-0.09	5	0.90	0.75	-0.20	13	0.87	0.86	0.00
f1077	8	1.00	0.82	-0.22	14	0.96	0.89	-0.07	6	1.00	0.70*	-0.43	16	0.93	0.92	-0.01
f502	7	1.00	0.81	-0.24	13	0.77	0.88	0.12	7	0.90	0.76	-0.19	18	0.92	0.93	0.01
f1097	5	0.88	0.69	-0.27	8	0.83	0.77	-0.07	4	0.50	0.67	0.25	8	0.80	0.82	0.02
f784	6	0.63	0.76	0.18	12	0.87	0.89	0.02	4	0.50	0.67	0.25	23	0.80	0.95	0.15
f207	7	0.75	0.78	0.04	11	0.83	0.82	-0.01	6	1.00	0.79	-0.27	15	1.00	0.92	-0.09
f1173	9	1.00	0.83	-0.21	13	0.96	0.87	-0.10	6	1.00	0.75	-0.33	17	1.00	0.92	-0.08
f1280	6	1.00	0.79	-0.26	10	0.95	0.82	-0.15	7	1.00	0.81	-0.23	10	0.85	0.85	0.00
平均	6.7	0.90	0.77	-0.16	10.7	0.86	0.83	-0.03	5.7	0.83	0.73	-0.13	14.5	0.86	0.89	0.04

NA: アレル出現数

Ho: ヘテロ接合度の観測値

He: ヘテロ接合度の予測値

Fis: 各集団内の近交係数

*ハーディ・ワインベルグ平衡からの逸脱を示す (ボンフェローニ補正後, $P < 0.05$) 。

Table 2. 17 3系統および野生親魚間の分子分散分析 (AMOVA) の結果

変数	<i>df</i>	平方和	分散成分	分散 (%)
集団間	3	36.542	0.301	6.63***
集団内の個体間	52	219.592	-0.018	-0.40
個体間	56	238.500	4.259	93.76**
計	111	494.634	4.542	

表中のアスタリスクは 10,000 回の permutation test で有意差が認められたことを示す (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$) 。

Table 2. 18 3 系統および野生親魚間の遺伝的分化度 (pairwise *wcFst*)

系統名	A 系統	B 系統	C 系統	野生
A 系統	—	0.0018**	0.0096**	0.0096**
B 系統	0.054	—	0.0006***	0.0006***
C 系統	0.074	0.098	—	0.0006***
野生	0.048	0.041	0.074	—

主対角線の下側に *wcFst* を、上側にボンフェローニ補正後の *P* 値を示す。表中のアスタリスクは 10,000 回の permutation test で有意差が認められたことを示す (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)。

第3章 図表・スクリプト

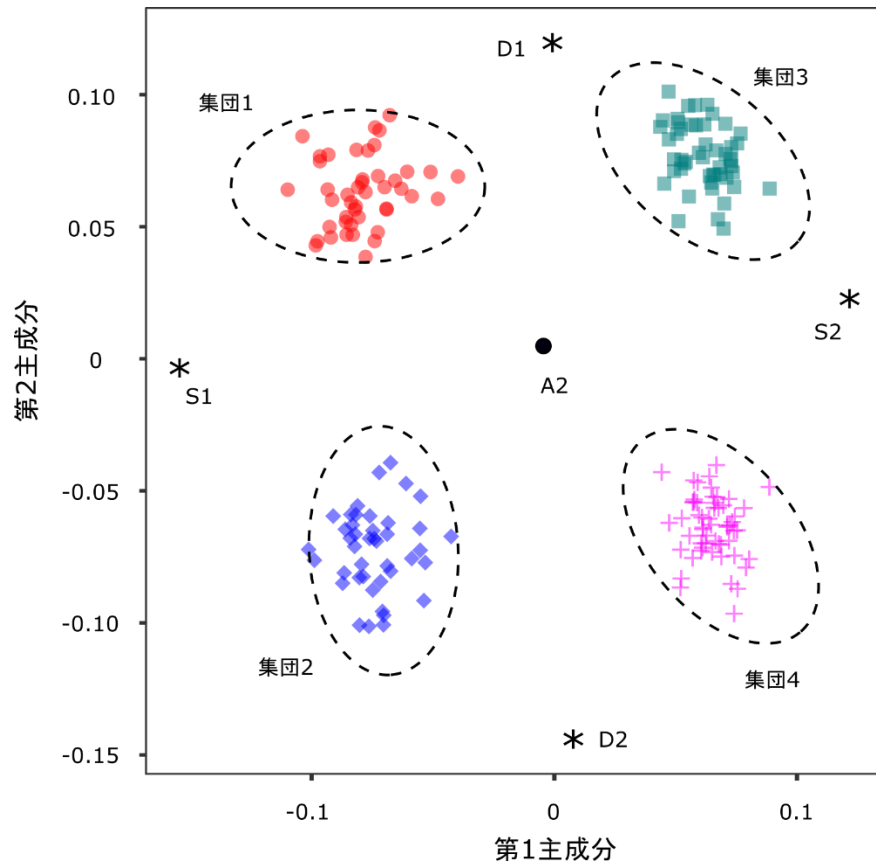


Fig. 3.1 解析集団を用いた主成分分析の結果。各個体の第1主成分スコア（横軸）と第2主成分スコア（縦軸）をプロットした。祖父（A2：●）、F₁親魚（S1、S2、D1、D2：*）、F₂解析個体のうち集団1（●）、集団2（◆）、集団3（■）、集団4（+）をそれぞれプロットの色と種類を分けて表示した。破線の楕円はPITタグで判別した各集団のまとまりを示す。

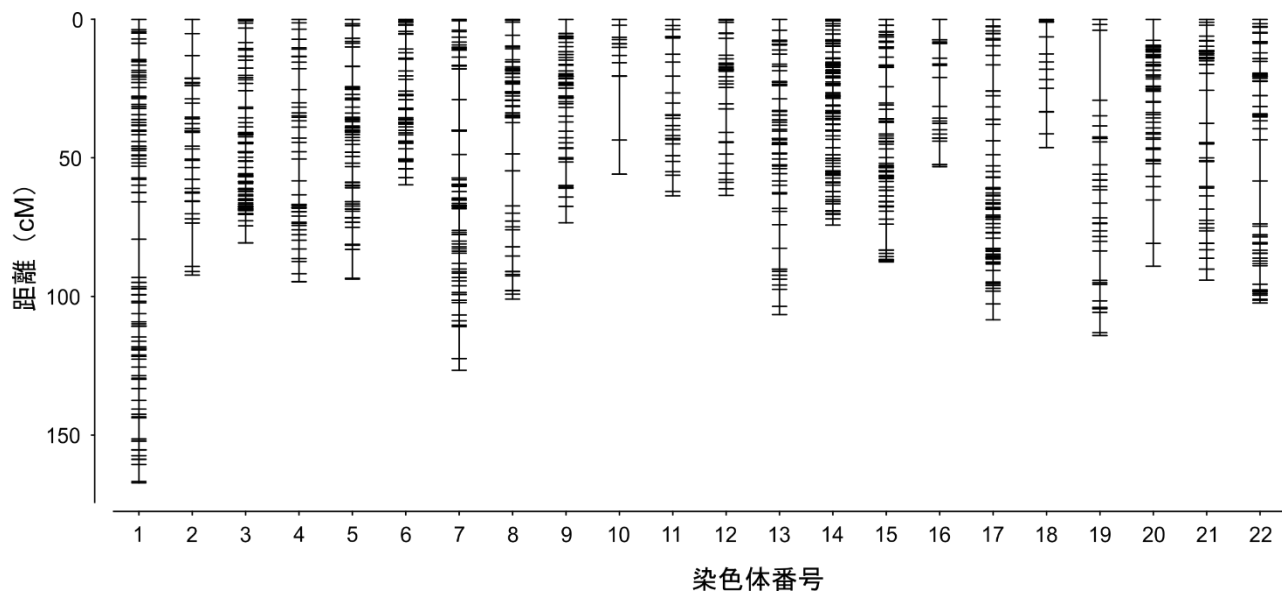


Fig. 3.2 1,423 SNP 座を用いたトラフグの連鎖地図。横軸は染色体番号を、縦軸は連鎖地図の距離 (cM) を示し。また、連鎖地図上の水平の線は各 SNP 座の位置を示す。

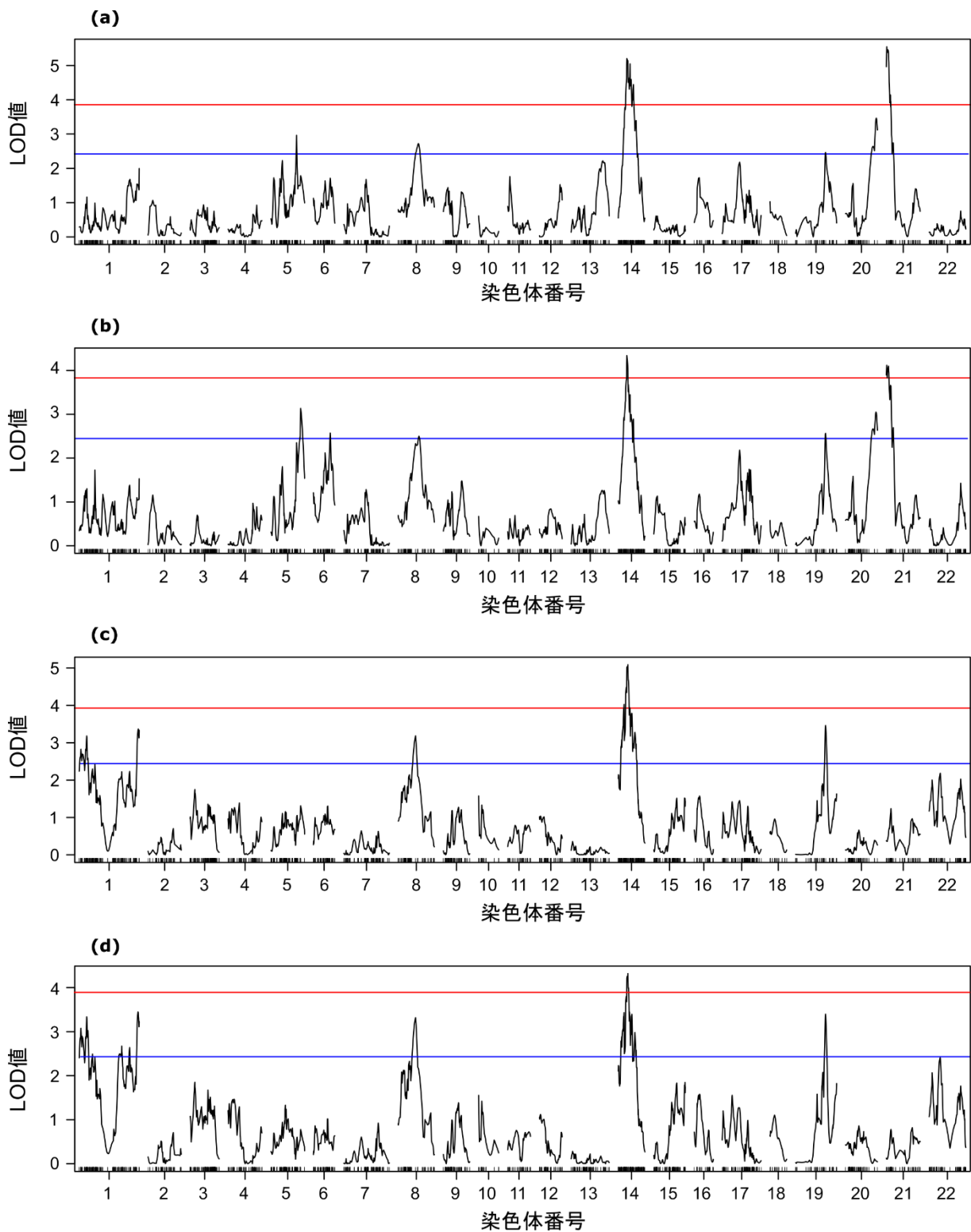


Fig. 3.3 QTL 解析の結果。横軸に染色体番号、縦軸に表現型との連鎖の強さを示す対数オッズ (LOD) 値を示し、上から標準体長 (a)、体重 (b)、精巣重量 (c)、GSI (d) の結果を示す。赤色と青色の実線はそれぞれ 1,000 回の permutation test の結果で有意 ($\alpha = 0.05$)、示唆的 ($\alpha = 0.68$) な水準に相当する LOD 値を示す。

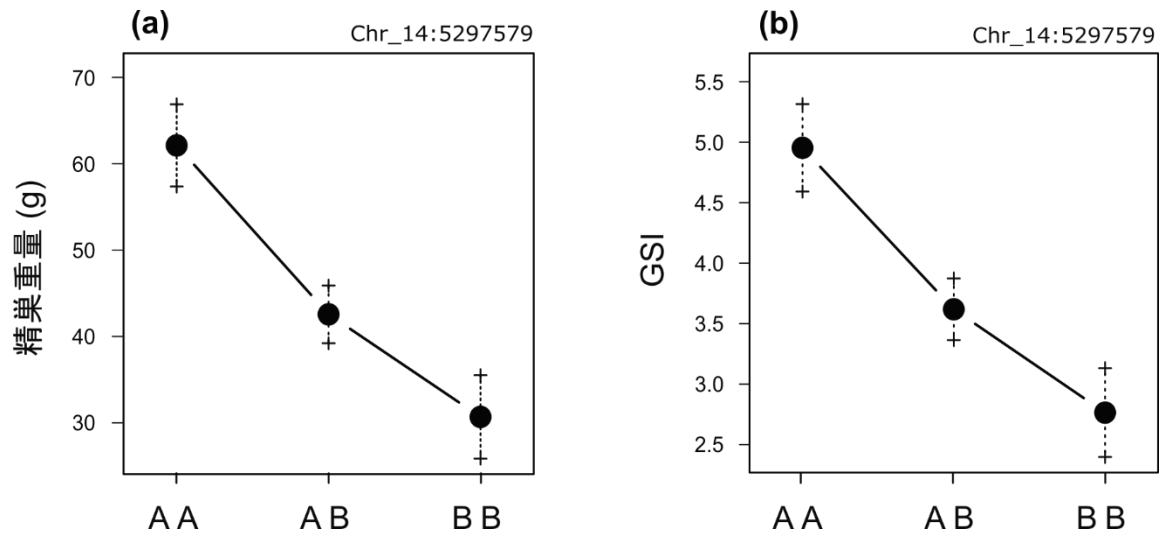


Fig. 3.4 14番染色体上のゲノムワイド有意水準を超えた QTL が精巣重量 (a) および GSI (b) に及ぼす効果。X 軸に示した AA は祖父 (A2) 由来のアレルをホモ接合型で持つこと、BB は祖母 (B2) 由来のアレルをホモ接合型で持つことを表し、AB は両者のアレルをヘテロ接合型で持つことを表す。各遺伝子型の平均値は黒丸 (●) で、標準偏差を十字 (+) および点線で示す。

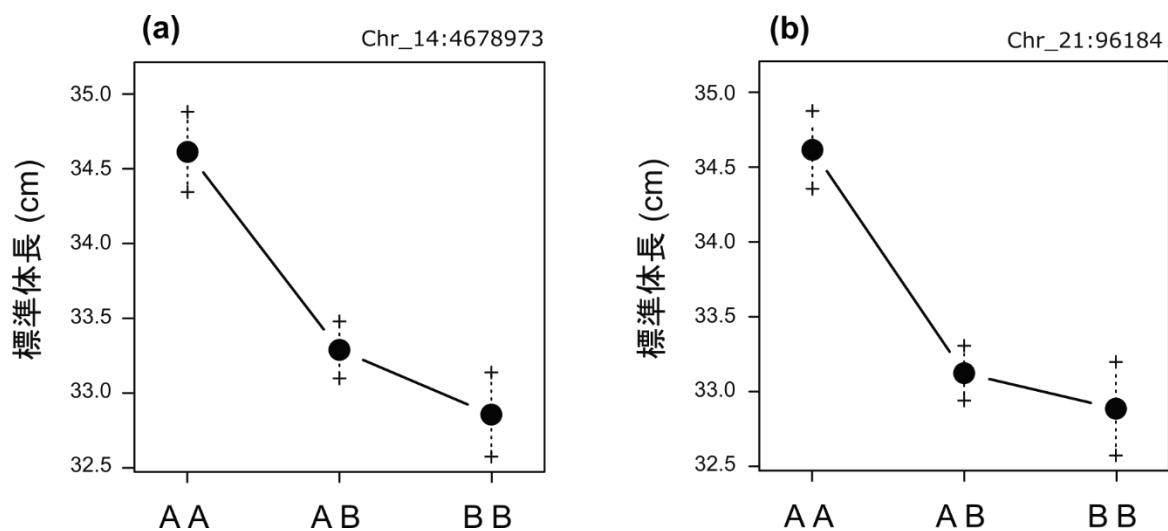


Fig. 3.5 ゲノムワイド有意水準を超えた QTL が標準体長に及ぼす効果。(a) 14 番染色体上の QTL、(b) 21 番染色体上の QTL。X 軸に示した AA は祖父 (A2) 由来のアレルをホモ接合型で持つこと、BB は祖母 (B2) 由来のアレルをホモ接合型で持つことを表し、AB は両者のアレルをヘテロ接合型で持つことを表す。各遺伝子型の平均値は黒丸 (●) で、標準偏差を十字 (+) および点線で示す。

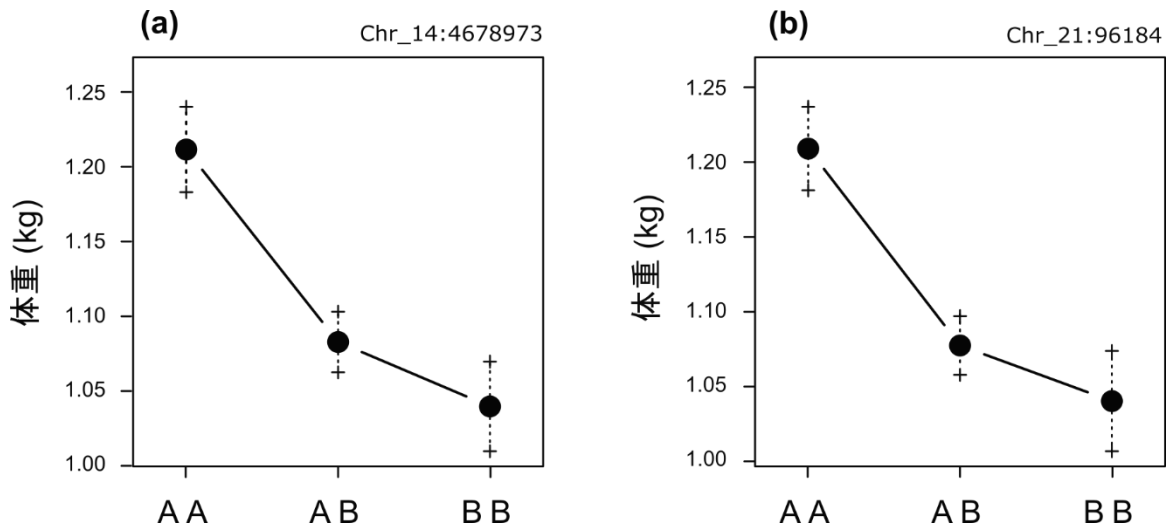
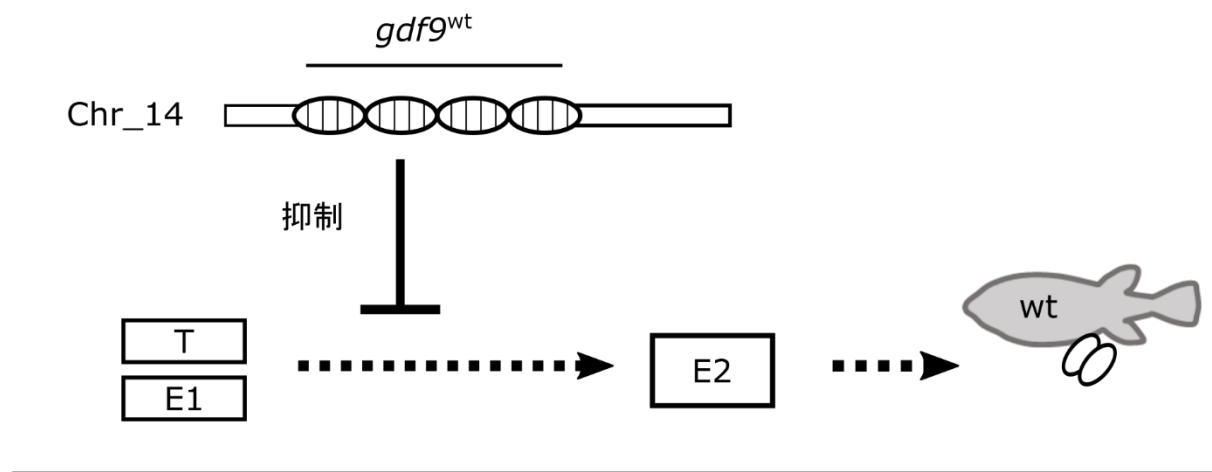


Fig. 3.6 ゲノムワイド有意水準を超えた QTL が体重に及ぼす効果。(a) 14 番染色体上の QTL、(b) 21 番染色体上の QTL。X 軸に示した AA は祖父 (A2) 由来のアレルをホモ接合型で持つこと、BB は祖母 (B2) 由来のアレルをホモ接合型で持つことを表し、AB は両者のアレルをヘテロ接合型で持つことを表す。各遺伝子型の平均値は黒丸 (●) で、標準偏差を十字 (+) および点線で示す。

(a)



(b)

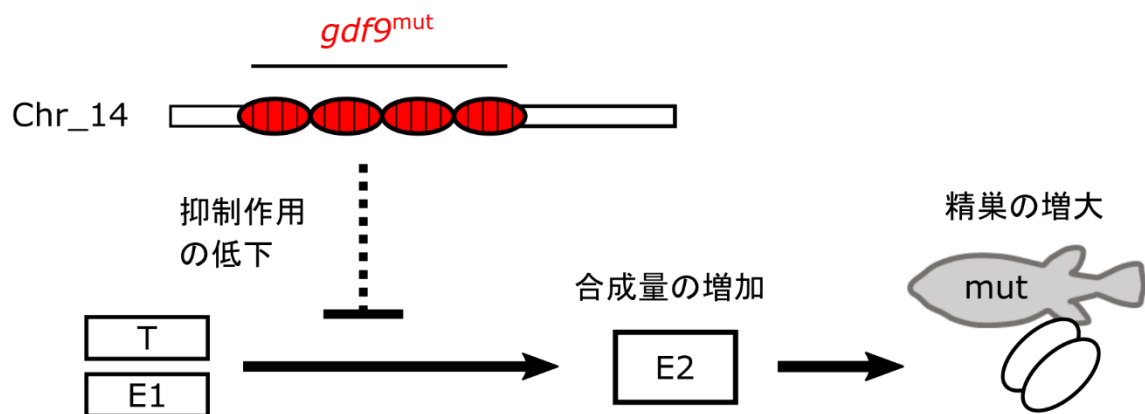


Fig. 3.7 本研究で考察した精巣の発達メカニズム。野生型 (wt) を (a) に、変異型 (mut) を (b) に示す。野生型では *gdf9* の影響を受けてテストステロン (T) またはエストロン (E1) からエストラジオール 17-β (E2) の合成が抑制されている。変異型では *gdf9* 内または調節領域に生じた変異により、E2 抑制作用が低下する。その結果、変異型を持つ早熟個体では E2 の合成量が増加して精巣重量が増大したと推察された。また、示唆的な QTL 領域に見つかった 8 番染色体上の *BMP15* による E2 合成の補強も考えられた。

Table 3.1 本研究で解析用集団の作出に用いた親魚

個体 ID	タグ 番号	性別	系統情報	交配情報			体重 (kg)
				目的	年月日	年齢	
A2	46632	オス	A 系統 (早熟系統)	F ₁ 世代作出	2012/3/30	2	1.8
B3	—	メス	B 系統			4	3.7
S1	39947	オス	F ₁ 集団から無作為抽出	F ₂ 世代作出	2015/4/7	3	3.3
S2	39931	オス	同上			3	2.5
D1	39979	メス	同上			3	2.4
D2	39983	メス	同上			3	2.8

Table 3.2 F₂世代解析集団の同一環境飼育開始時における供試魚数 (*n*)、標準体長および体重

集団名	オス親	メス親	<i>n</i>	標準体長 (cm) ^a	体重 (g) ^a
集団 1	S1	D1	120	16.4 ± 1.1	132.6 ± 23.6
集団 2	S2	D1	120	16.3 ± 1.0	134.7 ± 20.9
集団 3	S1	D2	120	17.0 ± 0.8	145.2 ± 18.7
集団 4	S2	D2	120	16.0 ± 1.1	129.7 ± 23.0

^a 平均値 ± 標準偏差

Table 3.3 GRAS-Di 法により得られた各個体のリード数およびクオリティスコア

番号 ^a	サンプル名 ^b	世代	レーン	リード数	%Q30 ^c	AQ ^d
1	01743	F ₂	2	4,974,384	92.99	35.32
2	02888	F ₂	1	4,436,680	93.48	35.42
3	03733	F ₂	1	4,626,430	93.40	35.40
4	04494	F ₂	1	5,034,848	93.30	35.37
5	05152	F ₂	1	4,271,040	92.89	35.29
6	06281	F ₂	1	4,405,334	93.88	35.46
7	06407	F ₂	2	4,281,558	93.02	35.28
8	06857	F ₂	2	4,195,428	93.86	35.47
9	06949	F ₂	2	5,005,592	93.31	35.36
10	07021	F ₂	2	4,600,788	93.53	35.40
11	07093	F ₂	2	4,696,360	93.46	35.39
12	07273	F ₂	2	5,175,242	93.04	35.32
13	07545	F ₂	1	4,945,404	93.50	35.41
14	13266	F ₂	2	4,905,462	93.37	35.40
15	13291	F ₂	1	4,372,706	93.33	35.38
16	20400	F ₂	1	4,863,872	93.29	35.37
17	22023	F ₂	1	4,086,600	93.63	35.41
18	27502	F ₂	1	4,589,576	93.73	35.43
19	39931	F ₁ 親魚 (S2)	2	5,179,352	93.39	35.41
20	39947	F ₁ 親魚 (S1)	2	5,272,786	92.99	35.32
21	39974	F ₂	1	4,428,154	94.07	35.50
22	39979	F ₁ 親魚 (D1)	2	5,232,058	93.11	35.34
23	39983	F ₁ 親魚 (D2)	2	4,082,882	92.62	35.22
24	39986	F ₂	2	4,802,026	93.78	35.45
25	40060	F ₂	1	4,279,214	93.70	35.43
26	46564	F ₂	2	4,448,116	93.00	35.31
27	46632	祖父 (A2)	2	4,432,952	93.21	35.33
28	51310	F ₂	2	5,019,770	93.42	35.38
29	51377	F ₂	1	5,313,492	93.67	35.41
30	52213	F ₂	2	5,365,444	93.41	35.40

^a 「番号」行は DDBJ に登録した FASTQ ファイルの「Sample name」と一致

^b 「サンプル名」行はジェノタイピングで用いたスクリプト中の「SampleNames.txt」と一致

^c クオリティスコア Q30 (エラー率 0.1%) 以上でベースコールされた塩基の割合

^d クオリティスコアの平均

Table 3.3 (続き) GRAS-Di 法により得られた各個体のリード数およびクオリティスコア

番号 ^a	サンプル名 ^b	世代	レーン	リード数	%Q30 ^c	AQ ^d
31	52501	F ₂	2	4,745,364	93.29	35.35
32	53068	F ₂	2	4,389,562	92.66	35.23
33	53249	F ₂	1	4,449,536	93.54	35.43
34	53483	F ₂	1	5,295,090	93.74	35.43
35	53484	F ₂	1	4,103,426	93.67	35.45
36	53491	F ₂	2	5,508,906	93.04	35.32
37	53493	F ₂	1	4,784,770	93.81	35.49
38	53494	F ₂	1	4,934,900	93.62	35.40
39	53496	F ₂	2	4,338,394	93.79	35.46
40	53502	F ₂	2	4,740,282	93.23	35.38
41	53504	F ₂	1	4,650,450	94.01	35.50
42	53507	F ₂	2	4,844,524	93.47	35.43
43	53508	F ₂	2	3,903,244	93.18	35.32
44	53510	F ₂	1	4,225,988	93.00	35.30
45	53512	F ₂	2	4,922,118	93.10	35.35
46	53514	F ₂	1	5,181,996	93.89	35.47
47	53518	F ₂	1	4,178,196	93.66	35.40
48	53519	F ₂	2	4,267,624	92.95	35.31
49	53528	F ₂	1	4,851,614	93.17	35.34
50	53539	F ₂	2	4,235,528	93.31	35.38
51	53540	F ₂	2	4,516,706	93.25	35.39
52	53542	F ₂	1	5,057,184	93.61	35.41
53	53558	F ₂	1	4,714,414	94.10	35.51
54	53561	F ₂	1	4,329,074	94.23	35.54
55	53563	F ₂	1	4,504,598	93.95	35.47
56	53571	F ₂	1	4,179,400	93.88	35.47
57	53576	F ₂	2	5,103,568	93.68	35.47
58	53584	F ₂	1	4,937,672	93.57	35.42
59	53594	F ₂	2	5,196,906	93.29	35.35
60	53611	F ₂	1	5,004,674	93.48	35.41

^a 「番号」行は DDBJ に登録した FASTQ ファイルの「Sample name」と一致

^b 「サンプル名」行はジェノタイピングで用いたスクリプト中の「SampleNames.txt」と一致

^c クオリティスコア Q30 (エラー率 0.1%) 以上でベースコールされた塩基の割合

^d クオリティスコアの平均

Table 3.3 (続き) GRAS-Di 法により得られた各個体のリード数およびクオリティスコア

番号 ^a	サンプル名 ^b	世代	レーン	リード数	%Q30 ^c	AQ ^d
61	53612	F ₂	2	4,677,966	93.56	35.41
62	53614	F ₂	1	4,041,784	92.61	35.22
63	53628	F ₂	1	4,076,620	93.68	35.47
64	53639	F ₂	2	5,527,850	93.25	35.38
65	53641	F ₂	1	4,442,602	94.00	35.50
66	53644	F ₂	2	5,680,832	92.95	35.31
67	53654	F ₂	2	4,734,460	93.54	35.40
68	53660	F ₂	2	5,215,764	93.16	35.35
69	53664	F ₂	2	3,691,872	92.21	35.13
70	53665	F ₂	2	4,497,824	93.19	35.37
71	53667	F ₂	1	4,331,524	93.06	35.32
72	53668	F ₂	2	5,061,044	92.99	35.31
73	53669	F ₂	2	3,634,778	93.41	35.38
74	53674	F ₂	2	5,195,048	93.03	35.32
75	53678	F ₂	2	5,130,052	92.95	35.31
76	56881	F ₂	2	5,834,654	92.96	35.30
77	56909	F ₂	1	4,065,980	93.22	35.34
78	56921	F ₂	2	4,578,148	92.72	35.25
79	56928	F ₂	1	5,215,274	93.36	35.38
80	56935	F ₂	1	4,137,780	94.35	35.57
81	56996	F ₂	2	4,453,306	94.03	35.51
82	57001	F ₂	2	5,292,288	93.21	35.36
83	57030	F ₂	2	4,895,282	93.48	35.43
84	57045	F ₂	1	5,075,748	93.68	35.45
85	57066	F ₂	2	4,996,722	93.32	35.40
86	57078	F ₂	1	4,063,844	92.71	35.23
87	57084	F ₂	1	4,110,398	93.78	35.49
88	57220	F ₂	1	4,611,494	93.60	35.44
89	57245	F ₂	2	3,884,670	92.50	35.18
90	57271	F ₂	1	4,885,066	93.29	35.34

^a 「番号」行は DDBJ に登録した FASTQ ファイルの「Sample name」と一致

^b 「サンプル名」行はジェノタイピングで用いたスクリプト中の「SampleNames.txt」と一致

^c クオリティスコア Q30 (エラー率 0.1%) 以上でベースコールされた塩基の割合

^d クオリティスコアの平均

Table 3.3 (続き) GRAS-Di 法により得られた各個体のリード数およびクオリティスコア

番号 ^a	サンプル名 ^b	世代	レーン	リード数	%Q30 ^c	AQ ^d
91	57272	F ₂	1	4,299,242	93.07	35.30
92	57336	F ₂	2	3,561,340	93.27	35.39
93	57342	F ₂	1	4,925,228	93.46	35.41
94	57410	F ₂	1	4,862,136	93.24	35.36
95	57517	F ₂	2	5,078,156	93.26	35.37
96	57554	F ₂	2	4,739,834	93.30	35.39
97	57641	F ₂	1	4,124,170	93.44	35.39
98	57683	F ₂	2	4,448,122	92.53	35.21
99	57707	F ₂	2	4,340,690	93.21	35.34
100	57736	F ₂	2	4,543,362	93.45	35.39
101	57778	F ₂	2	5,027,970	93.19	35.37
102	57884	F ₂	1	5,193,340	93.51	35.42
103	57885	F ₂	2	4,860,622	93.57	35.45
104	57916	F ₂	1	5,256,952	93.27	35.37
105	57925	F ₂	1	4,458,548	93.59	35.40
106	58028	F ₂	2	3,857,410	92.85	35.28
107	58069	F ₂	1	4,529,342	93.50	35.42
108	58131	F ₂	1	4,968,414	93.70	35.43
109	58226	F ₂	2	5,421,502	93.68	35.44
110	58267	F ₂	2	3,995,676	92.78	35.26
111	58303	F ₂	2	5,062,910	92.91	35.30
112	58405	F ₂	1	5,281,556	93.65	35.44
113	58409	F ₂	1	4,002,670	93.31	35.39
114	58456	F ₂	2	5,431,590	93.30	35.35
115	58513	F ₂	1	5,060,186	93.39	35.39
116	58554	F ₂	2	5,474,736	93.33	35.36
117	58606	F ₂	1	5,031,788	93.76	35.47
118	58638	F ₂	2	4,891,166	93.68	35.44
119	58642	F ₂	2	4,257,544	93.07	35.35
120	58752	F ₂	2	5,270,686	93.65	35.46

^a 「番号」行は DDBJ に登録した FASTQ ファイルの「Sample name」と一致

^b 「サンプル名」行はジェノタイピングで用いたスクリプト中の「SampleNames.txt」と一致

^c クオリティスコア Q30 (エラー率 0.1%) 以上でベースコールされた塩基の割合

^d クオリティスコアの平均

Table 3.3 (続き) GRAS-Di 法により得られた各個体のリード数およびクオリティスコア

番号 ^a	サンプル名 ^b	世代	レーン	リード数	%Q30 ^c	AQ ^d
121	58771	F ₂	1	4,134,802	93.87	35.46
122	58815	F ₂	2	4,777,360	93.44	35.43
123	58910	F ₂	2	5,158,232	93.24	35.38
124	59180	F ₂	1	4,403,296	94.08	35.51
125	59196	F ₂	1	4,891,260	93.52	35.42
126	59257	F ₂	1	4,585,724	93.86	35.50
127	59300	F ₂	2	4,877,856	93.32	35.35
128	59323	F ₂	1	5,252,664	93.89	35.50
129	59349	F ₂	1	4,678,598	93.88	35.47
130	59411	F ₂	2	4,756,854	93.43	35.38
131	70988	F ₂	1	4,792,960	93.14	35.31
132	73272	F ₂	1	4,688,556	93.59	35.44
133	74699	F ₂	1	4,254,326	93.71	35.43
134	77044	F ₂	2	4,883,426	93.12	35.32
135	77276	F ₂	1	4,806,954	93.58	35.40
136	77525	F ₂	2	5,126,286	93.50	35.43
137	77672	F ₂	1	4,532,342	93.57	35.44
138	77931	F ₂	1	4,548,822	93.41	35.38
139	78008	F ₂	2	3,989,108	92.74	35.28
140	78271	F ₂	1	4,741,212	92.90	35.29
141	78329	F ₂	2	4,638,296	93.08	35.32
142	78725	F ₂	1	4,369,356	93.31	35.34
143	78997	F ₂	2	4,798,080	93.35	35.35
144	79156	F ₂	2	5,244,356	93.24	35.37
145	79259	F ₂	2	5,406,482	92.99	35.32
146	79548	F ₂	1	4,473,704	93.13	35.32
147	79642	F ₂	1	4,836,260	93.88	35.49
148	79667	F ₂	2	4,816,138	93.68	35.47
149	80119	F ₂	1	4,259,836	93.24	35.35
150	80379	F ₂	1	5,357,142	93.72	35.42

^a 「番号」行は DDBJ に登録した FASTQ ファイルの「Sample name」と一致

^b 「サンプル名」行はジェノタイピングで用いたスクリプト中の「SampleNames.txt」と一

^c クオリティスコア Q30 (エラー率 0.1%) 以上でベースコールされた塩基の割合

^d クオリティスコアの平均

Table 3.3 (続き) GRAS-Di 法により得られた各個体のリード数およびクオリティスコア

番号 ^a	サンプル名 ^b	世代	レーン	リード数	%Q30 ^c	AQ ^d
151	80387	F ₂	1	4,356,350	94.00	35.49
152	80557	F ₂	1	4,784,802	93.52	35.42
153	80644	F ₂	2	4,683,788	93.82	35.47
154	80650	F ₂	1	4,434,724	93.70	35.46
155	80677	F ₂	1	5,004,280	93.25	35.36
156	80703	F ₂	2	4,409,766	93.83	35.47
157	80730	F ₂	2	4,973,938	93.43	35.38
158	80757	F ₂	1	4,765,872	93.78	35.44
159	80772	F ₂	1	4,597,342	94.28	35.54
160	80787	F ₂	2	4,696,494	93.58	35.40
161	80836	F ₂	1	3,598,426	93.11	35.33
162	80986	F ₂	2	4,903,090	93.63	35.43
163	81013	F ₂	1	4,884,986	92.80	35.27
164	81041	F ₂	2	4,816,624	93.25	35.38
165	81169	F ₂	1	4,506,670	93.67	35.46
166	81184	F ₂	1	4,025,530	93.36	35.39
167	81257	F ₂	1	4,742,464	94.22	35.53
168	81312	F ₂	2	4,590,072	93.76	35.45
169	81406	F ₂	1	4,338,766	93.63	35.40
170	81408	F ₂	1	4,696,162	93.24	35.35
171	81528	F ₂	2	5,267,310	93.10	35.31
172	81541	F ₂	2	4,626,982	93.57	35.45
173	81618	F ₂	1	4,506,034	93.72	35.42
174	81623	F ₂	1	4,623,966	94.10	35.55
175	81669	F ₂	2	5,206,824	93.30	35.38
176	81781	F ₂	1	4,616,152	93.97	35.53
177	81797	F ₂	1	5,088,936	93.70	35.42
178	81984	F ₂	2	3,781,690	92.90	35.29
179	82048	F ₂	2	4,916,644	93.94	35.49
180	82064	F ₂	1	4,864,706	93.69	35.46

^a 「番号」行は DDBJ に登録した FASTQ ファイルの「Sample name」と一致

^b 「サンプル名」行はジェノタイピングで用いたスクリプト中の「SampleNames.txt」と一致

^c クオリティスコア Q30 (エラー率 0.1%) 以上でベースコールされた塩基の割合

^d クオリティスコアの平均

Table 3.3 (続き) GRAS-Di 法により得られた各個体のリード数およびクオリティスコア

番号 ^a	サンプル名 ^b	世代	レーン	リード数	%Q30 ^c	AQ ^d
181	82081	F ₂	1	5,533,906	93.77	35.44
182	82125	F ₂	2	4,980,372	92.56	35.23
183	82206	F ₂	1	4,025,056	93.28	35.37
184	82216	F ₂	1	5,008,236	93.79	35.44
185	82218	F ₂	2	4,183,016	93.47	35.44
186	82231	F ₂	1	4,666,442	93.33	35.38
187	82273	F ₂	2	5,167,640	93.41	35.37
188	82305	F ₂	1	5,066,284	93.82	35.44
189	82397	F ₂	1	3,928,084	93.17	35.33
190	82450	F ₂	2	4,272,942	93.28	35.35
191	82466	F ₂	2	4,864,452	93.19	35.36
192	82490	F ₂	1	5,089,090	93.25	35.36
193	82491	F ₂	2	5,086,012	92.73	35.27
194	82502	F ₂	2	4,690,370	92.80	35.26
195	87604	F ₂	1	3,373,634	92.94	35.27
196	95011	F ₂	2	4,582,166	93.60	35.41
197	97523	F ₂	2	4,645,444	92.72	35.27
198	98185	F ₂	1	4,894,246	93.38	35.38
平均				4,692,747	93.40	35.39

^a 「番号」行は DDBJ に登録した FASTQ ファイルの「Sample name」と一致

^b 「サンプル名」行はジェノタイピングで用いたスクリプト中の「SampleNames.txt」と一致

^c クオリティスコア Q30 (エラー率 0.1%) 以上でベースコールされた塩基の割合

^d クオリティスコアの平均

Table 3.4 QTL 解析に供試した F₂ 集団の表現型

タグ#	集 団	レーン	標準体長 (cm)	体重 (g)	精巢重量 (g)	GSI	タグ#	集 団	レーン	標準体長 (cm)	体重 (g)	精巢重量 (g)	GSI
01743	2	1	36.6	1294	34.7	2.7	53542	2	2	34.3	1150	20.1	1.7
02888	1	2	34	1192	16	1.3	53558	2	2	32.5	1064	7.7	0.7
03733	4	2	35.8	1326	87.2	6.6	53561	1	2	32	1014	51.9	5.1
04494	4	2	33.5	1076	36.5	3.4	53563	3	2	33.6	1114	81.7	7.3
05152	4	2	32.1	1012	5.3	0.5	53571	4	2	34.3	1222	73.2	6
06281	4	2	33.5	1020	11.4	1.1	53576	1	1	37	1514	136.9	9
06407	1	1	32	870	12.3	1.4	53584	1	2	34.3	1090	39.3	3.6
06857	4	1	28.8	712	4.4	0.6	53594	3	1	29.3	822	34.6	4.2
06949	2	1	28.6	606	3.6	0.6	53611	1	2	33.5	1186	41	3.5
07021	2	1	34.4	1146	13.2	1.2	53612	1	1	28.6	694	22.2	3.2
07093	1	1	35.8	1410	111.5	7.9	53614	3	2	33.7	1066	23.7	2.2
07273	3	1	32	914	14.6	1.6	53628	3	2	35.5	1202	42.5	3.5
07545	1	2	33.2	1036	67.2	6.5	53639	3	1	34.6	1110	6.8	0.6
13266	1	1	34.1	1206	95.9	8	53641	3	2	32	898	19.8	2.2
13291	2	2	33.5	1142	64.5	5.6	53644	1	1	30.8	802	5	0.6
20400	3	2	31.9	980	59.4	6.1	53654	3	1	36.4	1392	85	6.1
22023	1	2	33.6	1260	146.9	11.7	53660	2	1	33.4	1236	77.4	6.3
27502	1	2	33	1008	76.3	7.6	53664	2	1	38.9	1628	117.3	7.2
39974	1	2	35.9	1226	28.2	2.3	53665	3	1	29.3	732	8.6	1.2
39986	2	1	31.2	880	15.2	1.7	53667	3	2	34.5	1090	67.4	6.2
40060	1	2	31.6	1056	68.2	6.5	53668	2	1	35.3	1296	27.1	2.1
46564	2	1	33.5	1224	54.6	4.5	53669	4	1	29	734	5.1	0.7
51310	4	1	28.9	758	8.3	1.1	53674	1	1	36.7	1454	104.9	7.2
51377	3	2	34.6	1158	68.1	5.9	53678	2	1	35.6	1326	82.8	6.2
52213	2	1	34.8	1252	30.3	2.4	56881	3	1	33.9	1134	81.2	7.2
52501	4	1	32.8	1036	11.4	1.1	56909	3	2	30.9	930	47.4	5.1
53068	4	1	30.5	832	7.1	0.9	56921	1	1	35.5	1216	20	1.6
53249	4	2	32.7	976	9.3	1	56928	4	2	35.2	1274	65.5	5.1
53483	1	2	34.9	1204	92.4	7.7	56935	2	2	33.6	1130	80.6	7.1
53484	2	2	34.2	1086	5.5	0.5	56996	3	1	34.9	1358	115	8.5
53491	3	1	34.9	1284	77.6	6	57001	1	1	35.9	1288	21.4	1.7
53493	2	2	36.3	1424	28.6	2	57030	4	1	33	998	35	3.5
53494	1	2	36.2	1232	31.3	2.5	57045	4	2	34.3	1132	43.7	3.9
53496	3	1	31.7	864	5.4	0.6	57066	1	1	35.8	1236	53.2	4.3
53502	1	1	36.6	1316	129.8	9.9	57078	4	2	32	998	5.5	0.6
53504	3	2	32.5	1050	84.7	8.1	57084	4	2	34.9	1148	27.9	2.4
53507	1	1	37.3	1560	157.9	10.1	57220	4	2	33.2	954	7.5	0.8
53508	3	1	29.3	680	2.1	0.3	57245	2	1	37.2	1518	49.2	3.2
53510	2	2	32	1010	6.3	0.6	57271	3	2	35.2	1284	107.5	8.4
53512	2	1	34.4	1314	39	3	57272	4	2	34.4	1192	13.4	1.1
53514	1	2	34.3	1206	103.8	8.6	57336	3	1	35	1280	56	4.4
53518	2	2	32.2	904	15.9	1.8	57342	4	2	34.7	1282	72.1	5.6
53519	2	1	34.7	1532	104.6	6.8	57410	3	2	32.7	1066	59.7	5.6
53528	1	2	32	946	12.7	1.3	57517	2	1	34.2	1288	96.7	7.5
53539	2	1	37.2	1436	94.1	6.6	57554	3	1	36	1432	125.7	8.8
53540	3	1	33.5	1068	66.1	6.2	57641	4	2	34.7	1174	20.1	1.7

Table 3.4 (続き) QTL 解析に供試した F₂ 集団の表現型

タグ#	集 団	レーン	標準体長 (cm)	体重 (g)	精巢重量 (g)	GSI	タグ#	集 団	レーン	標準体長 (cm)	体重 (g)	精巢重量 (g)	GSI
57683	4	1	34	1268	72.6	5.7	79156	4	1	29.9	1014	24.3	2.4
57707	4	1	32.5	960	36.7	3.8	79259	4	1	34.8	1258	24.3	1.9
57736	1	1	36.4	1334	69.7	5.2	79548	3	2	31.7	940	42.9	4.6
57778	4	1	35.7	1150	33	2.9	79642	3	2	33	1082	57.5	5.3
57884	1	2	34.5	1226	39.9	3.3	79667	2	1	37.2	1344	32.8	2.4
57885	4	1	30.6	872	33.7	3.9	80119	1	2	34.4	1006	21.3	2.1
57916	3	2	34.6	1138	47.2	4.1	80379	3	2	34	1092	51.3	4.7
57925	4	2	35.2	1414	58.2	4.1	80387	3	2	33.1	1100	24.1	2.2
58028	1	1	36	1456	95.8	6.6	80557	2	2	33.2	1244	35.1	2.8
58069	4	2	33.7	1246	63	5.1	80644	3	1	30.6	888	9	1
58131	4	2	30.4	892	2.8	0.3	80650	3	2	34.3	1066	70.9	6.7
58226	4	1	37.2	1522	43.2	2.8	80677	1	2	32.8	942	10.7	1.1
58267	4	1	30.6	830	11.2	1.3	80703	2	1	36.9	1478	72.2	4.9
58303	1	1	35.3	1106	0.4	0.04	80730	3	1	28.8	668	4.3	0.6
58405	4	2	32.7	994	16.8	1.7	80757	3	2	34	1062	44.5	4.2
58409	3	2	35.4	1274	131.1	10.3	80772	2	2	33.8	1096	6.9	0.6
58456	4	1	30.4	708	3.5	0.5	80787	1	1	30.9	822	4.6	0.6
58513	1	2	33.4	1020	27.4	2.7	80836	3	2	33.7	1158	45.5	3.9
58554	2	1	32.7	932	35.1	3.8	80986	1	1	33.4	1090	12.4	1.1
58606	4	2	33.5	1166	64.8	5.6	81013	3	2	33.6	1192	75.3	6.3
58638	4	1	37.8	1544	45.6	3	81041	2	1	34	1208	15.9	1.3
58642	1	1	30.7	764	4.3	0.6	81169	1	2	31.9	908	6.6	0.7
58752	4	1	33.7	1100	17.2	1.6	81184	3	2	33	1182	114.3	9.7
58771	2	2	35.6	1318	28.1	2.1	81257	2	2	34	1084	79.8	7.4
58815	4	1	29.4	748	3.4	0.5	81312	3	1	34.5	1096	60.1	5.5
58910	1	1	37.3	1316	64.5	4.9	81406	3	2	33	1138	43.4	3.8
59180	4	2	35.3	1126	23.3	2.1	81408	2	2	35.4	1302	101.8	7.8
59196	1	2	32.5	996	9.5	1	81528	3	1	32	970	23.9	2.5
59257	1	2	31.3	1028	41.1	4	81541	1	1	32.4	1200	48.2	4
59300	4	1	25.5	490	1.6	0.3	81618	3	2	32.1	1042	28.8	2.8
59323	4	2	33	1080	49.9	4.6	81623	3	2	31.7	860	21.5	2.5
59349	3	2	33.6	1064	50.4	4.7	81669	2	1	36.2	1344	93.3	6.9
59411	4	1	30.6	914	2.8	0.3	81781	4	2	34	1146	18.7	1.6
70988	4	2	33	1138	60.8	5.3	81797	3	2	34.5	1142	64.7	5.7
73272	4	2	34.5	1210	60.9	5	81984	2	1	35.8	1368	91.2	6.7
74699	3	2	32.7	1112	70.1	6.3	82048	1	1	33.5	1212	81.4	6.7
77044	4	1	29.2	614	1.2	0.2	82064	3	2	34.4	1140	24.8	2.2
77276	4	2	31.5	1066	5.7	0.5	82081	2	2	33.4	1106	56.8	5.1
77525	4	1	31.5	896	4.4	0.5	82125	3	1	32.3	978	69.8	7.1
77672	4	2	33.5	1104	24.4	2.2	82206	2	2	33.6	1160	58.5	5
77931	4	2	32.4	896	4.2	0.5	82216	1	2	32.3	966	55.6	5.8
78008	4	1	30.5	798	3.3	0.4	82218	1	1	30	758	3.5	0.5
78271	4	2	33.9	1286	36	2.8	82231	1	2	32.9	1010	4.6	0.5
78329	4	1	35.2	1276	72.3	5.7	82273	2	1	30.7	822	11.8	1.4
78725	4	2	36.8	1532	110	7.2	82305	3	2	34.2	1100	28.5	2.6
78997	4	1	28.9	706	2.7	0.4	82397	3	2	31.7	944	39.5	4.2

Table 3.4 (続き) QTL 解析に供試した F₂ 集団の表現型

タグ#	集 団	レーン	標準体長 (cm)	体重 (g)	精巣重量 (g)	GSI
82450	3	1	33.5	1236	56.5	4.6
82466	2	1	33	1058	67.6	6.4
82490	2	2	32.4	880	18.7	2.1
82491	1	1	36.1	1398	61.9	4.4
82502	2	1	31.2	806	13.8	1.7
87604	4	2	31.4	982	43.1	4.4
95011	4	1	35.3	1352	78	5.8
97523	2	1	36	1358	49.1	3.6
98185	2	2	35.2	1144	7.4	0.6

Table 3.5 QTL 解析に用いた有効 SNP 座

No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名
1	1	167394_A	46	1	6026331_A	91	1	17092091_G
2	1	456654_C	47	1	6077217_C	92	1	17115207_C
3	1	503538_T	48	1	6077261_T	93	1	17142621_T
4	1	503561_T	49	1	6090817_C	94	1	17572124_G
5	1	583696_C	50	1	6137883_C	95	1	17780382_T
6	1	583747_A	51	1	6251551_A	96	1	18072354_T
7	1	732383_C	52	1	6351008_G	97	1	18147872_C
8	1	828185_C	53	1	6363928_A	98	1	18977781_A
9	1	828188_G	54	1	6388578_G	99	1	19475434_T
10	1	1537780_T	55	1	6427944_T	100	1	19939111_G
11	1	1538409_G	56	1	6607914_C	101	1	20481250_G
12	1	1542269_C	57	1	7346471_A	102	1	20791639_A
13	1	1542337_G	58	1	7522675_A	103	1	20916904_C
14	1	1599096_T	59	1	7784882_T	104	1	21477264_A
15	1	1789905_G	60	1	8160070_A	105	1	21477272_C
16	1	1890742_A	61	1	8185833_C	106	1	21519106_A
17	1	2171704_A	62	1	8869309_C	107	1	21519150_C
18	1	2224147_A	63	1	9263695_G	108	1	21743051_A
19	1	2311686_A	64	1	9357725_C	109	1	21743056_T
20	1	2481631_C	65	1	9796456_A	110	1	21743084_T
21	1	2611034_G	66	1	9796547_G	111	1	21743170_A
22	1	2664508_C	67	1	10219497_T	112	1	22030916_T
23	1	2664553_C	68	1	10898730_T	113	1	22069338_A
24	1	2823980_A	69	1	11329482_A	114	1	22069499_T
25	1	3162675_C	70	1	11445468_G	115	1	22141679_T
26	1	3162721_A	71	1	11520665_G	116	1	22807065_T
27	1	3229465_C	72	1	12410225_C	117	1	22900548_A
28	1	3241278_C	73	1	12410297_T	118	2	118440_G
29	1	3275027_C	74	1	12788686_T	119	2	676695_C
30	1	3533023_A	75	1	12977491_A	120	2	1014815_G
31	1	3607977_G	76	1	13711504_A	121	2	1663514_A
32	1	3637275_T	77	1	14146602_G	122	2	1703156_T
33	1	3845489_C	78	1	14466327_C	123	2	1805383_C
34	1	4073439_C	79	1	14749455_C	124	2	1805396_T
35	1	4073455_T	80	1	14766830_G	125	2	1805472_C
36	1	4098855_T	81	1	14769864_A	126	2	1928964_C
37	1	4125173_T	82	1	14769990_C	127	2	1929013_A
38	1	4288170_A	83	1	14771298_G	128	2	1929020_G
39	1	4586114_A	84	1	15726663_C	129	2	2186342_C
40	1	4586162_T	85	1	16137211_A	130	2	2378815_A
41	1	5284845_T	86	1	16166576_G	131	2	2440725_C
42	1	5290567_T	87	1	16166800_T	132	2	2786373_C
43	1	5648307_G	88	1	16236990_G	133	2	3249454_G
44	1	5731022_A	89	1	16462130_C	134	2	4197311_T
45	1	6010479_T	90	1	16721188_G	135	2	4228918_C

Table 3.5 (続き) QTL 解析に用いた有効 SNP 座

No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名
136	2	4229803_T	181	3	4469278_C	226	3	10043223_T
137	2	5020166_G	182	3	5252721_G	227	3	10051286_C
138	2	5174325_T	183	3	6419829_C	228	3	10126996_A
139	2	5655001_C	184	3	6656043_G	229	3	10133613_G
140	2	5881639_T	185	3	7240173_C	230	3	10184912_A
141	2	5882705_G	186	3	7312143_C	231	3	10200781_T
142	2	6130215_A	187	3	7484588_G	232	3	10248811_G
143	2	6164422_A	188	3	7529478_C	233	3	10363135_T
144	2	7035179_C	189	3	7607268_G	234	3	10363175_T
145	2	7128764_C	190	3	7607276_A	235	3	10422875_G
146	2	7746606_T	191	3	7746713_C	236	3	10432552_G
147	2	7748561_A	192	3	7779249_C	237	3	10432641_A
148	2	8230737_A	193	3	7834071_A	238	3	10478940_G
149	2	8672154_A	194	3	7834165_T	239	3	10479001_C
150	2	8690102_G	195	3	7842894_C	240	3	10498900_C
151	2	9335953_T	196	3	7991715_A	241	3	10573081_T
152	2	9423710_A	197	3	8421450_A	242	3	10597245_G
153	2	9445400_G	198	3	8705815_G	243	3	10597255_A
154	2	9647589_G	199	3	8728122_A	244	3	10739796_T
155	2	9647778_C	200	3	8766708_C	245	3	10828678_C
156	2	9647832_C	201	3	8793827_A	246	3	10828705_G
157	2	10012110_G	202	3	8863618_T	247	3	10828852_T
158	2	10285450_T	203	3	8930870_C	248	3	10830920_A
159	2	10410961_G	204	3	9455898_G	249	3	10850933_T
160	2	10761220_T	205	3	9500389_A	250	3	10850937_T
161	2	10926114_T	206	3	9531923_A	251	3	11003142_C
162	2	10991091_T	207	3	9590293_T	252	3	11007825_T
163	3	14650_G	208	3	9593112_T	253	3	11007839_T
164	3	14663_C	209	3	9593166_T	254	3	11067873_A
165	3	14683_C	210	3	9593196_G	255	3	11243191_C
166	3	196863_G	211	3	9596635_G	256	3	11292107_G
167	3	196917_C	212	3	9683472_C	257	3	11378386_C
168	3	293581_T	213	3	9868790_C	258	3	11400376_A
169	3	335872_G	214	3	9868797_G	259	3	11430583_C
170	3	1053316_G	215	3	9868855_A	260	3	11447411_T
171	3	1208523_T	216	3	9868866_C	261	3	11472903_G
172	3	1289972_T	217	3	9868888_G	262	3	11477876_T
173	3	1426254_C	218	3	9899063_A	263	3	11522021_T
174	3	1426264_A	219	3	10001543_G	264	3	11524034_C
175	3	1452511_C	220	3	10001723_C	265	3	11529882_T
176	3	1756185_A	221	3	10026375_T	266	3	11540975_G
177	3	1756220_A	222	3	10034471_G	267	3	11553840_G
178	3	3012619_T	223	3	10040251_G	268	3	11564493_C
179	3	3380049_G	224	3	10043135_C	269	3	11608708_G
180	3	3485300_A	225	3	10043161_A	270	3	11622486_C

Table 3.5 (続き) QTL 解析に用いた有効 SNP 座

No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名
271	3	11632861_C	316	4	10732191_C	361	5	4315801_A
272	3	11673656_T	317	4	10906459_A	362	5	4335158_C
273	3	11680095_T	318	4	10956980_C	363	5	4372187_G
274	3	11879143_G	319	4	11013825_A	364	5	4518793_G
275	3	11883576_G	320	4	11196339_C	365	5	4781544_T
276	3	11883580_C	321	4	11603316_G	366	5	4814764_A
277	3	11891047_G	322	4	11630400_G	367	5	4815971_T
278	3	11891063_T	323	4	11718486_C	368	5	4897152_T
279	3	12028587_A	324	4	11999268_G	369	5	5001819_C
280	3	12071249_A	325	4	12222889_C	370	5	5005967_T
281	3	12434193_A	326	4	12270753_G	371	5	5005974_T
282	3	12434272_C	327	4	12673907_G	372	5	5249570_T
283	4	338231_G	328	4	13068388_T	373	5	5312008_T
284	4	347889_T	329	4	13346957_G	374	5	5395118_G
285	4	347988_C	330	4	13543072_G	375	5	5453485_C
286	4	464580_A	331	4	13573499_C	376	5	5799145_A
287	4	648974_C	332	4	13573510_A	377	5	5851997_G
288	4	734695_C	333	5	55517_A	378	5	6104258_G
289	4	892669_T	334	5	159653_T	379	5	6126045_C
290	4	892710_T	335	5	169341_C	380	5	6270021_G
291	4	892763_G	336	5	218188_T	381	5	6270111_A
292	4	1011347_A	337	5	1126477_T	382	5	6480575_T
293	4	1423221_C	338	5	1126503_G	383	5	7004488_T
294	4	3862277_A	339	5	1302724_G	384	5	7004522_T
295	4	3867520_T	340	5	1325349_G	385	5	7245141_T
296	4	4619564_A	341	5	1603156_C	386	5	8013072_C
297	4	5703807_T	342	5	1603188_T	387	5	8028984_T
298	4	5807904_T	343	5	2418660_T	388	5	8138039_G
299	4	5900552_G	344	5	2418672_G	389	5	8214577_G
300	4	6282045_C	345	5	2862476_C	390	5	8651979_G
301	4	6284273_A	346	5	2867127_T	391	5	8701130_A
302	4	6863719_A	347	5	3036692_C	392	5	9251771_G
303	4	6983338_T	348	5	3267009_C	393	5	9251999_C
304	4	7884990_T	349	5	3267049_T	394	5	9316049_A
305	4	8286220_G	350	5	3289040_G	395	5	9469832_A
306	4	9706446_A	351	5	3393383_A	396	5	9478301_C
307	4	10113734_C	352	5	3613984_T	397	5	9561710_G
308	4	10473493_T	353	5	3710815_T	398	5	9574901_T
309	4	10488401_C	354	5	3783623_T	399	5	9592634_T
310	4	10516073_A	355	5	3790098_C	400	5	9792828_G
311	4	10516743_T	356	5	3915470_T	401	5	10219766_A
312	4	10691064_C	357	5	4036566_T	402	5	10254462_G
313	4	10691351_G	358	5	4149848_T	403	5	10445350_A
314	4	10730835_A	359	5	4160658_T	404	5	10445390_C
315	4	10731878_A	360	5	4270324_C	405	5	10445502_G

Table 3.5 (続き) QTL 解析に用いた有効 SNP 座

No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名
406	5	10483507_T	451	6	7248637_G	496	7	2640523_G
407	5	10920102_A	452	6	7266817_A	497	7	2647093_T
408	5	10920131_A	453	6	7336753_A	498	7	2649565_C
409	5	10926767_A	454	6	7390238_T	499	7	2663512_A
410	5	10926903_A	455	6	7442387_G	500	7	3101173_G
411	5	10926928_G	456	6	7452738_T	501	7	3116785_A
412	5	10927015_G	457	6	7542440_A	502	7	3265824_A
413	5	11221461_C	458	6	7582277_T	503	7	3464166_C
414	5	11831161_C	459	6	7629222_C	504	7	3487808_T
415	5	11959201_A	460	6	7676775_G	505	7	3544481_T
416	6	258754_G	461	6	7684727_A	506	7	3544597_G
417	6	266816_C	462	6	7686560_C	507	7	3603772_T
418	6	594533_T	463	6	7825169_G	508	7	3751445_T
419	6	620201_C	464	6	7845149_C	509	7	3870824_T
420	6	737619_G	465	6	7862418_T	510	7	3873183_C
421	6	827734_G	466	6	7887927_A	511	7	3883149_G
422	6	1401175_C	467	6	8013734_G	512	7	3891260_C
423	6	1524579_T	468	6	8206056_C	513	7	3891463_G
424	6	1690782_A	469	6	8206075_G	514	7	3906661_A
425	6	3320583_A	470	6	8499067_A	515	7	4128146_A
426	6	3403367_T	471	6	8703971_C	516	7	4226548_C
427	6	3624947_G	472	7	428262_C	517	7	4384696_C
428	6	3624964_A	473	7	428304_G	518	7	4647780_T
429	6	4464604_A	474	7	792230_G	519	7	4683124_T
430	6	5016910_A	475	7	1074286_T	520	7	4779533_C
431	6	5240961_A	476	7	1142028_C	521	7	4832891_C
432	6	5505381_G	477	7	1195860_G	522	7	4888701_T
433	6	5638457_C	478	7	1423351_A	523	7	4888739_G
434	6	5647936_A	479	7	1526009_T	524	7	4965262_G
435	6	5662707_C	480	7	1589570_C	525	7	5037873_T
436	6	5686623_A	481	7	1708633_T	526	7	5104867_A
437	6	5686900_A	482	7	2019424_G	527	7	5133916_A
438	6	5686924_T	483	7	2019527_A	528	7	5133999_G
439	6	5686936_C	484	7	2172615_G	529	7	6125237_A
440	6	5813104_C	485	7	2252134_T	530	7	6165649_G
441	6	6098672_A	486	7	2259882_G	531	7	6283839_G
442	6	6118188_C	487	7	2259915_G	532	7	6291467_G
443	6	6125942_G	488	7	2370751_G	533	7	6747234_A
444	6	6665314_C	489	7	2385917_C	534	7	7046176_T
445	6	6751747_T	490	7	2410619_T	535	7	7328120_A
446	6	6758453_C	491	7	2503541_T	536	7	7624594_T
447	6	6777313_T	492	7	2503563_A	537	7	8089632_C
448	6	6777322_A	493	7	2516434_C	538	7	8484622_G
449	6	6974744_T	494	7	2640339_T	539	7	9635034_C
450	6	7064930_C	495	7	2640484_A	540	7	9779511_T

Table 3.5 (続き) QTL 解析に用いた有効 SNP 座

No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名
541	7	9841634_C	586	8	7097131_G	631	8	13608957_G
542	7	9955295_C	587	8	7177613_T	632	8	13608969_T
543	7	10163387_C	588	8	7233669_A	633	8	13779349_T
544	7	10190609_A	589	8	7289951_T	634	8	14067560_T
545	7	10302845_T	590	8	7290863_T	635	9	15436_C
546	7	10783859_C	591	8	7418775_A	636	9	348630_C
547	7	11037434_T	592	8	8042314_C	637	9	357318_G
548	7	11037562_G	593	8	8097162_A	638	9	514190_T
549	7	11510160_T	594	8	8116783_C	639	9	581857_G
550	7	11510179_A	595	8	8118431_T	640	9	590164_C
551	7	11510184_G	596	8	8187810_C	641	9	712338_C
552	7	11580902_T	597	8	8187948_G	642	9	837363_T
553	7	12144326_A	598	8	8191498_C	643	9	1068934_G
554	7	12404455_G	599	8	8265933_G	644	9	1291009_C
555	7	12687912_T	600	8	8299333_T	645	9	1358195_T
556	7	12754391_G	601	8	8478901_G	646	9	1360654_C
557	7	13763560_T	602	8	8592878_C	647	9	1465336_C
558	7	13763653_G	603	8	8679096_C	648	9	1465345_G
559	7	14247707_A	604	8	8687411_C	649	9	1573671_T
560	8	2331295_C	605	8	8839690_T	650	9	1574769_C
561	8	2493817_A	606	8	8857033_G	651	9	1574838_C
562	8	2542407_C	607	8	8954383_A	652	9	1574844_C
563	8	2542470_G	608	8	9368276_G	653	9	1624991_A
564	8	4250963_T	609	8	9736507_T	654	9	1662590_T
565	8	5013774_T	610	8	10121156_T	655	9	1690211_G
566	8	5023483_T	611	8	10144522_C	656	9	1837770_G
567	8	5063536_T	612	8	10270428_G	657	9	1837847_C
568	8	5671865_G	613	8	10424583_A	658	9	1905170_C
569	8	5858887_T	614	8	10433766_C	659	9	1967020_C
570	8	5859610_C	615	8	10555358_T	660	9	1967033_C
571	8	6044690_G	616	8	10856529_A	661	9	2041155_C
572	8	6321400_A	617	8	10884793_T	662	9	2049394_C
573	8	6414168_C	618	8	10898080_A	663	9	2105289_G
574	8	6569764_A	619	8	10920029_C	664	9	2105497_C
575	8	6592223_C	620	8	11328790_C	665	9	2105547_G
576	8	6592291_G	621	8	11434029_G	666	9	2309999_A
577	8	6592370_G	622	8	11961306_C	667	9	2352659_A
578	8	6601368_T	623	8	12060303_T	668	9	2378101_G
579	8	6704052_A	624	8	12200124_C	669	9	2530978_C
580	8	6908721_T	625	8	12452074_A	670	9	2568552_A
581	8	7016605_C	626	8	12452240_C	671	9	2572487_T
582	8	7021251_C	627	8	12968007_A	672	9	2639214_C
583	8	7021302_G	628	8	12968023_A	673	9	2639227_T
584	8	7026340_G	629	8	13038972_A	674	9	3049328_G
585	8	7060102_G	630	8	13053067_G	675	9	3083866_T

Table 3.5 (続き) QTL 解析に用いた有効 SNP 座

No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名
676	9	3462340_C	721	11	2449964_A	766	12	4830733_A
677	9	3484592_G	722	11	2568624_G	767	12	5144039_A
678	9	3484645_C	723	11	2724495_C	768	12	5600289_T
679	9	3594028_G	724	11	4172456_T	769	12	6292603_C
680	9	5261426_A	725	11	4697483_T	770	12	6541241_C
681	9	5591122_G	726	11	5170186_T	771	12	6541285_C
682	9	5800819_C	727	11	5674248_T	772	12	6613863_T
683	9	6112128_C	728	11	5856842_G	773	12	7490096_C
684	9	7205383_C	729	11	6420956_T	774	12	7786056_G
685	9	7597805_G	730	11	6429003_G	775	12	7825161_T
686	9	7944886_G	731	11	6485573_T	776	12	8506905_G
687	9	8139867_C	732	11	6893390_T	777	12	8983278_G
688	9	8658870_A	733	11	7196366_A	778	12	9284530_T
689	9	8933241_G	734	11	7278489_T	779	12	9672184_A
690	9	8933520_A	735	11	7960298_A	780	12	9875017_G
691	9	9941843_G	736	11	8099380_T	781	12	10120414_A
692	9	10103582_A	737	11	8135477_T	782	12	10571827_A
693	9	10588116_A	738	11	8322009_C	783	13	20292_G
694	9	11821272_G	739	11	9244556_T	784	13	178634_A
695	9	11834229_A	740	11	9608279_C	785	13	197597_A
696	9	11970397_A	741	11	9855928_A	786	13	197783_G
697	9	11994637_G	742	11	9971830_T	787	13	289267_C
698	9	12218912_G	743	11	10595117_C	788	13	448666_C
699	9	12550467_A	744	11	10782214_G	789	13	448675_A
700	9	12927906_G	745	12	908445_T	790	13	459101_T
701	9	13543487_A	746	12	1303762_A	791	13	465921_G
702	10	60245_A	747	12	1362524_G	792	13	469726_C
703	10	371427_C	748	12	1362678_A	793	13	709890_A
704	10	1012922_T	749	12	2102537_T	794	13	710149_A
705	10	1063526_A	750	12	2129504_G	795	13	922778_C
706	10	2706516_T	751	12	2192953_C	796	13	1056981_G
707	10	2769470_A	752	12	2731078_T	797	13	1057029_T
708	10	3213506_C	753	12	3045554_C	798	13	1319596_G
709	10	3934723_G	754	12	3182446_T	799	13	1550593_C
710	10	4147785_T	755	12	3384010_T	800	13	1550631_C
711	10	4741332_T	756	12	3677980_A	801	13	1550645_C
712	10	4741353_G	757	12	3678054_T	802	13	1556611_T
713	10	4764733_T	758	12	4022845_G	803	13	1615002_C
714	10	7280160_A	759	12	4322220_A	804	13	1618922_G
715	10	8524994_T	760	12	4324946_C	805	13	1789510_A
716	10	8548096_T	761	12	4324996_C	806	13	1807668_G
717	11	484064_G	762	12	4325010_T	807	13	2414412_C
718	11	750624_G	763	12	4325042_G	808	13	2703523_A
719	11	1083343_T	764	12	4356924_G	809	13	2794056_G
720	11	2257512_T	765	12	4648561_T	810	13	2826213_T

Table 3.5 (続き) QTL 解析に用いた有効 SNP 座

No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名
811	13	2943807_G	856	13	15744861_C	901	14	3494780_G
812	13	2943896_C	857	13	16626425_A	902	14	3891363_G
813	13	4474267_T	858	13	16886081_T	903	14	4139210_G
814	13	4507102_A	859	14	36758_A	904	14	4144150_G
815	13	4809241_A	860	14	43375_T	905	14	4458016_T
816	13	4960198_G	861	14	200150_C	906	14	4460268_T
817	13	4994547_G	862	14	200165_G	907	14	4464031_A
818	13	5042182_C	863	14	276539_G	908	14	4515646_A
819	13	5422346_C	864	14	456388_T	909	14	4543921_C
820	13	5439516_T	865	14	537877_C	910	14	4643393_T
821	13	5563875_C	866	14	604150_C	911	14	4678973_A
822	13	5604985_A	867	14	617558_T	912	14	5126946_G
823	13	5709725_A	868	14	617580_T	913	14	5297579_G
824	13	5850760_G	869	14	1009204_G	914	14	5589866_T
825	13	5911432_T	870	14	1050740_T	915	14	5656159_T
826	13	6012816_C	871	14	1112651_C	916	14	5724687_C
827	13	6150164_T	872	14	1117063_C	917	14	5728400_A
828	13	6150180_C	873	14	1209620_A	918	14	5830700_A
829	13	6253689_C	874	14	1211863_T	919	14	5913580_C
830	13	6253696_A	875	14	1298199_T	920	14	5926988_G
831	13	6727976_G	876	14	1298412_G	921	14	5969353_G
832	13	7379055_G	877	14	1362769_G	922	14	6071451_A
833	13	7513088_C	878	14	1367924_G	923	14	6071522_C
834	13	7604809_T	879	14	1368002_G	924	14	6092567_G
835	13	8416844_A	880	14	1618948_C	925	14	6623215_G
836	13	8749881_T	881	14	2038042_A	926	14	6686868_G
837	13	8947884_G	882	14	2191162_C	927	14	6708260_T
838	13	9186571_T	883	14	2439312_G	928	14	6807024_A
839	13	9769360_C	884	14	2452672_G	929	14	6887148_T
840	13	9769432_T	885	14	2624645_C	930	14	6942214_G
841	13	10543893_A	886	14	2781685_C	931	14	6958963_C
842	13	10862566_T	887	14	2891345_A	932	14	6958975_A
843	13	11642522_G	888	14	2891880_G	933	14	7013363_T
844	13	11643324_A	889	14	2955493_T	934	14	7013408_C
845	13	12981203_A	890	14	2999879_C	935	14	7014785_G
846	13	13192075_C	891	14	2999898_A	936	14	7117458_G
847	13	14049554_G	892	14	2999946_C	937	14	7166765_G
848	13	14644373_G	893	14	3019861_A	938	14	7166834_T
849	13	15361419_G	894	14	3185595_G	939	14	7449874_C
850	13	15361481_G	895	14	3185647_G	940	14	7516783_A
851	13	15365057_G	896	14	3239088_T	941	14	7536319_T
852	13	15386229_C	897	14	3262018_G	942	14	7536336_A
853	13	15409018_C	898	14	3417718_T	943	14	7598231_T
854	13	15426922_G	899	14	3455938_G	944	14	7663637_T
855	13	15535556_A	900	14	3494549_A	945	14	7880098_G

Table 3.5 (続き) QTL 解析に用いた有効 SNP 座

No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名
946	14	7885317_T	991	15	1347012_C	1036	15	8904322_G
947	14	7938417_G	992	15	2762178_T	1037	15	9022768_G
948	14	7971171_T	993	15	2804955_G	1038	15	9022871_A
949	14	8097345_A	994	15	3094400_A	1039	15	9081404_A
950	14	8379422_A	995	15	3094501_A	1040	15	9081458_C
951	14	8477056_T	996	15	3178194_C	1041	15	9101160_C
952	14	8673309_G	997	15	3178251_C	1042	15	9209135_C
953	14	8812719_G	998	15	3178283_A	1043	15	9209248_T
954	14	8988054_T	999	15	3910754_T	1044	15	9223892_A
955	14	8988679_C	1000	15	3934639_C	1045	15	9310152_T
956	14	9008111_T	1001	15	4167063_A	1046	15	9400622_G
957	14	9060531_T	1002	15	4167078_G	1047	15	9400642_C
958	14	9093419_G	1003	15	4167083_A	1048	15	9400851_G
959	14	9317516_G	1004	15	4317787_C	1049	15	9467564_T
960	14	9463802_T	1005	15	4723827_G	1050	15	9475239_C
961	14	9525272_A	1006	15	5090208_A	1051	15	9574302_T
962	14	9610171_T	1007	15	5186177_A	1052	15	9621863_G
963	14	9719875_T	1008	15	5282674_A	1053	15	9664243_T
964	14	9721996_G	1009	15	5289133_A	1054	15	9664248_G
965	14	10152234_C	1010	15	5333928_G	1055	15	9744620_G
966	14	10391414_A	1011	15	5696770_A	1056	15	10028676_T
967	14	10463217_T	1012	15	6047430_A	1057	15	10098586_G
968	14	10701944_C	1013	15	6211112_G	1058	15	10154884_A
969	14	10989205_T	1014	15	6306746_T	1059	15	10292560_A
970	14	10989446_T	1015	15	6400455_G	1060	15	10292763_G
971	14	11144546_C	1016	15	6718355_A	1061	15	10326396_A
972	14	11166877_A	1017	15	6718362_A	1062	15	10460608_T
973	14	11554396_C	1018	15	6727459_A	1063	15	10670822_G
974	14	11555042_A	1019	15	7078074_G	1064	15	10699016_C
975	14	11698451_T	1020	15	7134445_A	1065	15	11007272_T
976	14	11905787_A	1021	15	7134452_A	1066	15	11101598_T
977	14	11944317_T	1022	15	7641613_A	1067	15	11101606_T
978	14	11944359_T	1023	15	7644231_C	1068	15	11217560_T
979	14	11994226_G	1024	15	7765954_T	1069	15	11299356_G
980	14	12145236_T	1025	15	7868271_G	1070	15	11353283_G
981	14	12145250_T	1026	15	7868282_G	1071	15	11393212_A
982	14	12155947_T	1027	15	8110610_T	1072	15	11393454_C
983	14	12193046_T	1028	15	8118122_G	1073	15	11464615_A
984	14	12219142_A	1029	15	8118332_C	1074	15	11488220_C
985	14	12277952_T	1030	15	8118339_G	1075	16	2464475_C
986	15	634902_A	1031	15	8188055_A	1076	16	3480613_A
987	15	873731_T	1032	15	8376558_A	1077	16	3594965_T
988	15	873805_C	1033	15	8556845_G	1078	16	3711627_T
989	15	1346680_A	1034	15	8579294_C	1079	16	3855500_T
990	15	1346694_C	1035	15	8721144_T	1080	16	4056329_G

Table 3.5 (続き) QTL 解析に用いた有効 SNP 座

No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名
1081	16	4056343_G	1126	17	6995517_A	1171	17	10339371_C
1082	16	4876125_A	1127	17	7085445_T	1172	17	10562755_C
1083	16	5234866_C	1128	17	7140775_G	1173	17	10570498_T
1084	16	5397905_T	1129	17	7140781_G	1174	17	10570553_C
1085	16	6119867_C	1130	17	7234828_T	1175	17	10574631_C
1086	16	7649582_T	1131	17	7370918_G	1176	17	10578433_A
1087	16	8179142_C	1132	17	7391750_T	1177	17	10673901_T
1088	16	8616407_A	1133	17	7426779_A	1178	17	10791077_G
1089	16	8714841_G	1134	17	7542548_C	1179	17	10883850_C
1090	16	8863251_C	1135	17	7753923_C	1180	17	10931105_A
1091	16	9071704_C	1136	17	7845018_G	1181	17	10983903_T
1092	16	9308743_A	1137	17	7845056_T	1182	17	11092217_A
1093	16	9326074_C	1138	17	7899131_T	1183	17	11123951_A
1094	16	9499303_C	1139	17	7904713_G	1184	18	155735_G
1095	16	10151804_T	1140	17	8076529_C	1185	18	333662_G
1096	16	10151828_C	1141	17	8110720_A	1186	18	368799_C
1097	16	10151869_T	1142	17	8137134_A	1187	18	368828_A
1098	16	10225884_T	1143	17	8199143_T	1188	18	1782370_C
1099	17	157661_A	1144	17	8472744_C	1189	18	2582276_A
1100	17	817328_T	1145	17	8587055_C	1190	18	3003421_T
1101	17	881951_C	1146	17	8593427_G	1191	18	3438863_C
1102	17	1022031_A	1147	17	8593485_G	1192	18	3950378_A
1103	17	1170052_T	1148	17	8619256_G	1193	18	4256073_C
1104	17	1173621_T	1149	17	8707702_G	1194	18	5725485_T
1105	17	1551404_G	1150	17	8738391_C	1195	18	5743138_A
1106	17	1611755_T	1151	17	8844191_T	1196	18	6387754_G
1107	17	1722915_G	1152	17	8864674_A	1197	18	6949124_C
1108	17	1722930_A	1153	17	8948696_T	1198	19	315916_G
1109	17	1946976_C	1154	17	9311427_T	1199	19	315933_C
1110	17	2134943_C	1155	17	9322717_C	1200	19	315959_C
1111	17	2756035_C	1156	17	9335711_G	1201	19	1437876_T
1112	17	2783019_A	1157	17	9335735_T	1202	19	3255176_G
1113	17	2988640_G	1158	17	9431771_C	1203	19	3255359_C
1114	17	3482006_C	1159	17	9536231_A	1204	19	3436092_C
1115	17	3625704_A	1160	17	9658415_T	1205	19	3495463_G
1116	17	4995577_C	1161	17	9686397_G	1206	19	3495548_G
1117	17	4995638_T	1162	17	9840209_G	1207	19	3517606_G
1118	17	5086288_T	1163	17	9873168_G	1208	19	3964714_G
1119	17	5215666_T	1164	17	9908939_C	1209	19	4918293_C
1120	17	5424156_A	1165	17	9908960_T	1210	19	5571035_C
1121	17	5476406_C	1166	17	9990897_C	1211	19	6181022_T
1122	17	5696343_T	1167	17	10079517_T	1212	19	6198608_A
1123	17	6150019_G	1168	17	10225369_G	1213	19	6473656_A
1124	17	6512276_A	1169	17	10265282_A	1214	19	6558230_G
1125	17	6530010_G	1170	17	10293921_A	1215	19	7199237_G

Table 3.5 (続き) QTL 解析に用いた有効 SNP 座

No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名
1216	19	8758662_T	1261	20	2120886_A	1306	21	1738120_T
1217	19	9317766_T	1262	20	2121040_T	1307	21	2231550_C
1218	19	9464170_T	1263	20	2260266_A	1308	21	2714953_A
1219	19	9705438_A	1264	20	2289070_T	1309	21	2910702_C
1220	19	9881476_A	1265	20	2293811_C	1310	21	2955683_T
1221	19	10046159_G	1266	20	2293914_A	1311	21	3088187_C
1222	19	10727069_C	1267	20	2294099_T	1312	21	3088198_C
1223	19	11717971_C	1268	20	2607035_T	1313	21	3105082_C
1224	19	11854359_T	1269	20	2669239_T	1314	21	3221816_T
1225	19	11868259_C	1270	20	2760617_T	1315	21	3323610_G
1226	19	12470904_C	1271	20	2806253_C	1316	21	3323723_T
1227	19	12705379_T	1272	20	2837401_G	1317	21	3323738_G
1228	19	12789735_G	1273	20	3164505_T	1318	21	3565309_C
1229	19	13030007_A	1274	20	3999636_C	1319	21	3696585_G
1230	19	13147206_A	1275	20	3999690_C	1320	21	3783730_G
1231	19	13670178_G	1276	20	4025708_A	1321	21	3783791_C
1232	19	13783061_G	1277	20	4586167_C	1322	21	4009509_A
1233	19	13783068_G	1278	20	4760184_G	1323	21	4076923_T
1234	20	107282_C	1279	20	5137118_G	1324	21	4077304_A
1235	20	352812_T	1280	20	5551024_C	1325	21	4077319_T
1236	20	354424_C	1281	20	5593418_G	1326	21	4364401_A
1237	20	473891_C	1282	20	5666449_C	1327	21	4457297_G
1238	20	474068_A	1283	20	5794269_C	1328	21	5161455_A
1239	20	479466_C	1284	20	6314490_C	1329	21	6125503_C
1240	20	495356_T	1285	20	6440097_G	1330	21	7318916_A
1241	20	521218_T	1286	20	6992102_G	1331	21	7332216_C
1242	20	748608_T	1287	20	7192868_T	1332	21	7505689_C
1243	20	951874_T	1288	20	7646928_T	1333	21	7505881_A
1244	20	951886_A	1289	20	7678886_C	1334	21	7637356_C
1245	20	951967_G	1290	20	7691564_C	1335	21	9403237_C
1246	20	1041285_G	1291	20	8489365_C	1336	21	9589392_A
1247	20	1041788_T	1292	20	8489370_A	1337	21	9631101_C
1248	20	1050554_C	1293	20	8894577_A	1338	21	10329961_G
1249	20	1130579_G	1294	20	8999843_C	1339	21	10526658_T
1250	20	1187906_C	1295	20	10053462_G	1340	21	11423059_G
1251	20	1475069_G	1296	20	10937854_A	1341	21	11731992_C
1252	20	1475097_A	1297	20	12076849_A	1342	21	11974236_T
1253	20	1475889_C	1298	20	13312894_T	1343	21	12207071_A
1254	20	1516276_T	1299	21	54618_C	1344	21	12375641_C
1255	20	1528887_G	1300	21	96184_T	1345	21	12455967_C
1256	20	1672716_A	1301	21	149371_A	1346	21	12907116_A
1257	20	1853639_T	1302	21	529298_T	1347	21	12937393_G
1258	20	1915248_T	1303	21	747596_G	1348	21	12939403_A
1259	20	1985118_C	1304	21	747676_C	1349	21	13028317_A
1260	20	2030876_G	1305	21	1174837_G	1350	21	14097710_C

Table 3.5 (続き) QTL 解析に用いた有効 SNP 座

No.	染色体 番号	SNP 名	No.	染色体 番号	SNP 名
1351	21	14161950_T	1396	22	8493867_G
1352	21	14278486_G	1397	22	8601818_G
1353	21	14381937_A	1398	22	8686716_A
1354	21	14788484_G	1399	22	9100706_G
1355	22	83009_A	1400	22	9100832_C
1356	22	259113_A	1401	22	9129860_T
1357	22	401023_A	1402	22	9226746_G
1358	22	401159_C	1403	22	9449988_C
1359	22	537340_T	1404	22	9470286_G
1360	22	596026_T	1405	22	9470331_T
1361	22	596031_C	1406	22	9659793_A
1362	22	792893_G	1407	22	9768074_A
1363	22	797725_A	1408	22	9809079_A
1364	22	926909_T	1409	22	9914858_G
1365	22	926956_G	1410	22	10003034_C
1366	22	1511306_A	1411	22	10087986_C
1367	22	1626019_A	1412	22	10176674_G
1368	22	1650713_T	1413	22	10521579_T
1369	22	1710963_G	1414	22	10861018_T
1370	22	2092987_T	1415	22	10861169_G
1371	22	2110867_C	1416	22	10878931_G
1372	22	2113935_A	1417	22	10909529_A
1373	22	2179906_C	1418	22	10969700_T
1374	22	2179973_T	1419	22	10994980_G
1375	22	2544997_C	1420	22	11083783_A
1376	22	2641477_C	1421	22	11304164_T
1377	22	2644757_T	1422	22	11342780_A
1378	22	2644910_C	1423	22	11419316_A
1379	22	2662291_A			
1380	22	2768861_T			
1381	22	2780292_G			
1382	22	2962433_C			
1383	22	2972386_G			
1384	22	6644947_T			
1385	22	6661042_T			
1386	22	7390383_A			
1387	22	7681171_A			
1388	22	7712041_C			
1389	22	7712293_G			
1390	22	7712313_T			
1391	22	7712347_T			
1392	22	7734515_C			
1393	22	7761809_A			
1394	22	8020429_G			
1395	22	8493797_T			

Table 3.6 QTL 解析に用いた F₂ 集団のオス個体の個体数 (*n*)、標準体長、体重、精巣重量および GSI

集団名	<i>n</i>	標準体長 (cm) ^a	体重 (g) ^a	精巣重量 (g) ^a	GSI ^a
集団 1	45	33.8 ± 2.1	1128.4 ± 209.1	51.3 ± 43.2	4.2 ± 3.1
集団 2	50	33.2 ± 1.8	1071.4 ± 166.5	52.8 ± 32.3	4.7 ± 2.5
集団 3	42	34.3 ± 2.0	1189.0 ± 215.7	46.3 ± 33.5	3.7 ± 2.4
集団 4	56	32.8 ± 2.5	1056.3 ± 231.5	30.5 ± 27.4	2.6 ± 2.0

^a 平均値 ± 標準偏差

Table 3.7 1,423 SNP 座を用いて構築した連鎖地図の概要

染色体 番号	SNP 数	全長 (cM)	SNP 間の 平均間隔 (cM)	SNP 間の 最大間隔 (cM)
1	117	167.4	1.44	13.80
2	45	92.3	2.10	15.70
3	120	80.7	0.68	6.19
4	50	94.7	1.93	7.86
5	83	93.8	1.14	10.45
6	56	59.7	1.09	5.37
7	88	126.7	1.46	11.50
8	75	101.0	1.37	12.65
9	67	73.5	1.11	8.45
10	15	55.9	3.99	23.12
11	28	63.7	2.36	6.10
12	38	63.5	1.72	8.48
13	76	106.6	1.42	8.51
14	127	74.3	0.59	3.06
15	89	87.6	1.00	9.37
16	24	53.2	2.31	10.48
17	85	108.5	1.29	9.39
18	14	46.3	3.56	8.39
19	36	114.2	3.26	25.29
20	65	89.1	1.39	15.69
21	56	94.2	1.71	11.88
22	69	102.4	1.51	15.53
合計/平均	1,423	1949.2	1.75	11.24

Table 3.8 標準体長、体重、精巣重量および GSI における QTL 解析の結果

形質	染色体 番号	位置 (cM)	SNP 名	LOD ^a	95% 信用区間		PVE ^b (%)	相加的 効果 ^c	優性 効果 ^d
					地図上の距離 (cM)	物理的距離 (Mb)			
標準体長	5	71.5	Chr_5:10219766	2.96	2.3-93.5	0.22-11.83	5.02	-0.55	-0.77
	8	56.0	Chr_8:10920029	2.72	31.4-97.9	8.95-13.61	1.03	0.19	-0.38
	14	23.9	Chr_14:4678973	5.20	21.0-43.3	4.14-7.89	6.42	0.81	0.15
	19	83.6	Chr_19:10727069	2.46	3.9-113.1	0.32-13.67	3.45	1.08	-0.33
	20	86.0	Chr_20:13312894	3.47	65.2-89.1	10.94-13.31	3.13	-0.69	-0.10
	21	1.0	Chr_21:96184	5.55	0.0-7.6	0.05-0.75	10.50	0.84	0.78
体重	5	83.1	Chr_5:11221461	3.13	29.0-93.8	3.79-12.00	8.37	-84.05	-35.2
	6	46.7	Chr_6:7686560	2.57	0.0-57.1	0.26-8.50	4.94	-27.02	92.33
	8	58.0	Chr_8:10920029	2.50	27.6-91.0	8.48-12.97	0.69	18.10	-30.04
	14	23.9	Chr_14:4678973	4.34	15.5-42.1	2.44-7.88	5.37	72.50	13.62
	19	83.6	Chr_19:10727069	2.56	58.0-113.1	6.20-13.67	3.63	87.10	-6.98
	20	85.0	Chr_20:12076849	3.05	65.2-89.1	10.94-13.31	3.21	-67.42	-11.99
	21	1.0	Chr_21:96184	4.12	0.0-13.7	0.05-3.70	7.00	74.96	45.83
精巣重量	1	165.0	Chr_1:22807065	3.37	0.0-167.4	0.17-22.90	3.14	8.27	-7.36
	8	48.6	Chr_8:10856529	3.18	9.6-67.3	5.01-11.33	4.69	8.99	4.32
	14	26.7	Chr_14:5297579	5.09	13.9-40.0	2.04-7.45	5.90	12.16	3.38
	19	83.6	Chr_19:10727069	3.46	71.7-114.2	8.76-13.78	5.67	30.87	-20.92
GSI	1	164.0	Chr_1:22807065	3.55	0.0-167.4	0.17-22.90	3.51	0.68	-0.51
	8	48.6	Chr_8:10856529	3.37	9.6-67.3	5.01-11.33	5.25	0.69	0.45
	14	26.7	Chr_14:5297579	4.33	8.7-48.9	1.30-7.97	4.75	0.82	0.21
	19	83.6	Chr_19:10727069	3.40	60.3-114.2	6.47-13.78	5.94	2.48	-1.83

ゲノムワイド水準で有意な QTL ($P < 0.05$) は太字で示している。

^a 対数オッズ (log of odds, LOD)

^b 表現型分散に対する寄与率 (Phenotypic variation explained, PVE)

^c A2 (祖父) 由来のアレルの、B2 (祖母) のアレルに対する相加的効果

^d A2 由来のアレルの、B2 のアレルに対する優性効果

Table 3.9 14 番染色体と 21 番染色体上の QTL の 95%信用区間内に位置した性成熟および成長に関連する遺伝子リスト

シンボル	遺伝子名	参照配列 (FUGU5/fr3) 上の位置		
		染色体番号	始点 (bp)	終点 (bp)
<i>fgf18a</i>	fibroblast growth factor 18 α	14	3,853,641	3,860,411
<i>egr1</i>	early growth response 1		4,874,273	4,876,497
<i>gdf9</i>	growth differentiation factor 9		5,076,125	5,077,830
<i>nsdhl</i>	NAD (P) dependent steroid dehydrogenase-like		5,547,754	5,555,054
zgc:194246	(精子形成への関与が示唆)		7,117,506	7,117,891
<i>aplnra</i>	apelin receptor α	21	478,116	482,532
<i>rflna</i>	refilin A		1,672,644	1,676,320
<i>hmgcra</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase α		1,826,045	1,831,799
<i>isl1</i>	ISL LIM homeobox 1		2,098,453	2,101,832
<i>kazald3</i>	kazal-type serine peptidase inhibitor domain 3		2,361,875	2,363,662
<i>bmp3</i>	bone morphogenetic protein 3		3,173,690	3,177,233
<i>fgf5</i>	fibroblast growth factor 5		3,218,096	3,222,777
<i>bmp2k</i>	BMP2 inducible kinase		3,366,678	3,381,803

Table 3. 10 14 番染色体と 21 番染色体上の QTL の 95%信用区間内に存在した遺伝子リスト

染色体番号	シンボル	遺伝子名
14	<i>ccdc88b</i>	coiled-coil domain containing 88b
14	<i>rom1b</i>	retinal outer segment membrane protein 1b
14	RF01684	
14	<i>SCYL1</i>	SCY1-like, kinase-like 1
14	<i>ints5</i>	integrator complex subunit 5
14	<i>ganab</i>	glucosidase, alpha; neutral ab
14	si:ch211-114c17.1	
14	<i>ubxn1</i>	UBX Domain Protein 1
14	<i>ehd1a</i>	EH-domain containing 1a
14	<i>map1lc3cl</i>	microtubule-associated protein 1 light chain 3 gamma, like
14	si:ch211-168f7.5	
14	<i>ttc9c</i>	tetratricopeptide repeat domain 9c
14	<i>dpf2l</i>	D4, zinc and double PHD fingers family 2, like
14	<i>zdhhc24</i>	zinc finger DHHC-type containing 24
14	<i>pola2</i>	polymerase (DNA directed), alpha 2
14	si:dkey-34115.1	
14	si:ch1073-303k11.2	
14	<i>SLC16A2</i>	solute carrier family 16 member 2
14	<i>f8</i>	coagulation factor VIII, procoagulant component
14	<i>pmt</i>	phosphoethanolamine methyltransferase
14	<i>mid2</i>	midline 2
14	<i>tsc22d3</i>	TSC22 domain family, member 3
14	<i>pcdh11</i>	protocadherin 11
14	<i>klhl4</i>	kelch-like family member 4
14	<i>eef1g</i>	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma
14	<i>polr2gl</i>	RNA polymerase II subunit g
14	si:ch211-175m2.5	
14	si:ch73-380n15.2	
14	<i>chrb3b</i>	cholinergic receptor nicotinic beta 3 subunit b
14	<i>CHRNA6</i>	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 6
14	<i>chrb2l</i>	cholinergic receptor, nicotinic, beta 5b
14	<i>ankrd13d</i>	ankyrin repeat domain 13 family, member d
14	<i>kdm2ab</i>	lysine (K)-specific demethylase 2Ab
14	<i>stx3</i>	syntaxin 3A

Table 3. 10 (続き) 14 番染色体と 21 番染色体上の QTL の 95%信用区間内に存在した遺伝子リスト

染色体番号	シンボル	遺伝子名
14	<i>ran</i>	RAN, member RAS oncogene family
14	<i>NDUFS8</i>	NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit S8a
14	<i>tbc1d10c</i>	TBC1 domain family, member 10C
14	<i>rad9a</i>	RAD9 checkpoint clamp component A
14	<i>p2rx3a</i>	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 3a
14	<i>ssrp1a</i>	structure specific recognition protein 1a
14	<i>clef1</i>	cardiotrophin-like cytokine factor 1
14	<i>slc43a1a</i>	solute carrier family 43 member 1a
14	<i>med19a</i>	mediator complex subunit 19a
14	si:dkey-6i22.5	
14	<i>txm2a</i>	thioredoxin-related transmembrane protein 2a
14	<i>zdhhc5b</i>	zinc finger DHHC-type palmitoyltransferase 5b
14	<i>clp1</i>	cleavage factor polyribonucleotide kinase subunit 1
14	<i>rtn4rl2b</i>	reticulon 4 receptor-like 2b
14	<i>smtnl1</i>	smoothelin-like 1
14	<i>CTNND1</i>	catenin (cadherin-associated protein), delta 1
14	<i>cryba1l2</i>	crystallin, beta a1, like 2
14	<i>crybb1l1</i>	crystallin, beta b1, like 1
14	<i>cabp2b</i>	calcium binding protein 2b
14	<i>mif</i>	macrophage migration inhibitory factor
14	<i>PPP2R2C (1 of many)</i>	protein phosphatase 2, regulatory subunit b, gamma a
14	<i>wfs1b</i>	wolfram syndrome 1b (wolframin)
14	<i>jakmip1</i>	janus kinase and microtubule interacting protein 1
14	<i>KCNIP1</i>	Kv channel interacting protein 1 a
14	<i>hrh2a</i>	histamine receptor H2a
14	<i>DOCK2</i>	dedicator of cytokinesis 2
14	<i>TRPC7</i>	transient receptor potential cation channel, subfamily c, member 7a
14	<i>DIAPH1</i>	diaphanous related formin 1
14	<i>pcdh1g32</i>	protocadherin 1 gamma 32
14	<i>pcdh2ab1</i>	protocadherin 2 alpha b 1
14	<i>pcdh2aa15 (1 of many)</i>	protocadherin 2 alpha a 15
14	si:ch73-379j16.2 (1 of many)	
14	<i>pcdhb</i>	protocadherin b
14	si:ch73-233f7.1	

Table 3. 10 (続き) 14 番染色体と 21 番染色体上の QTL の 95%信用区間内に存在した遺伝子リスト

染色体番号	シンボル	遺伝子名
14	<i>RF00006</i>	
14	<i>fgf18a</i>	fibroblast growth factor 18a
14	<i>fbxw11a</i>	F-box and WD repeat domain containing 11a
14	<i>etf1a</i>	eukaryotic translation termination factor 1a
14	<i>spock1</i>	SPARC (osteonectin), cwcv and kazal like domains proteoglycan 1
14	<i>bicc2</i>	bicaudal c homolog 2
14	<i>CHRNA9 (1 of many)</i>	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 9a
14	<i>ube2ka</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2Ka (UBC1 homolog, yeast)
14	<i>klb</i>	klotho beta
14	<i>tlr1</i>	toll-like receptor 1
14	<i>ints10</i>	integrator complex subunit 10
14	<i>slc25a51b</i>	solute carrier family 25 member 51b
14	<i>grhpra</i>	glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase a
14	<i>tomm5</i>	translocase of outer mitochondrial membrane 5 homolog
14	si:ch211-203d1.3	
14	<i>mrpl18</i>	mitochondrial ribosomal protein L18
14	<i>tcirg1b</i>	T cell immune regulator 1, ATPase H ⁺ transporting V0 subunit a3b
14	<i>prpf19</i>	pre-mRNA processing factor 19
14	si:dkey-74k8.3	
14	<i>rnf20</i>	ring finger protein 20, e3 ubiquitin protein ligase
14	<i>aldob</i>	aldolase b, fructose-bisphosphate
14	<i>tmco6</i>	transmembrane and coiled-coil domains 6
14	<i>arsia</i>	arylsulfatase family, member Ia
14	<i>cdx1a</i>	caudal type homeobox 1a
14	<i>pdgfrb</i>	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
14	<i>csf1ra</i>	colony stimulating factor 1 receptor, a
14	<i>hmgxb3</i>	HMG box domain containing 3
14	<i>SLC35A4</i>	solute carrier family 35 member a4
14	si:dkey-201i24.3	
14	<i>cd74a</i>	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain a
14	<i>ndst1a</i>	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1a
14	<i>rbm22</i>	RNA binding motif protein 22
14	<i>myoz3a</i>	myozenin 3a
14	<i>arl3l2</i>	ADP ribosylation factor like GTPase 3, like 2

Table 3. 10 (続き) 14 番染色体と 21 番染色体上の QTL の 95%信用区間内に存在した遺伝子リスト

染色体番号	シンボル	遺伝子名
14	<i>rgs14a</i>	regulator of G protein signaling 14a
14	<i>a2d1AR</i>	adrenergic, alpha-2d-, receptor a
14	si:ch211-199b20.3	
14	<i>cnot6b</i>	CCR4-NOT transcription complex, subunit 6b
14	<i>ADAMTS2</i>	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 2
14	<i>gfpt2</i>	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2
14	<i>mapk9</i>	mitogen-activated protein kinase 9
14	<i>RASGEF1C</i>	RasGEF Domain Family Member 1c
14	<i>tmem126a</i>	transmembrane protein 126a
14	<i>clk4a</i>	CDC-like kinase 4a
14	<i>rack1</i>	receptor for activated C kinase 1
14	<i>nme5</i>	NME/NM23 family member 5
14	<i>hnmpaba</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/Ba
14	<i>phykpl</i>	5-phosphohydroxy-L-lysine phospho-lyase
14	<i>FAM53C (1 of many)</i>	family with sequence similarity 53 member c
14	<i>spon2a</i>	spondin 2a, extracellular matrix protein
14	<i>kdm3b</i>	lysine (K)-specific demethylase 3B
14	<i>reep2</i>	receptor accessory protein 2
14	<i>egr1</i>	early growth response 1
14	<i>adra1bb</i>	adrenoceptor alpha 1Bb
14	<i>FABP6 (1 of many)</i>	atty acid binding protein 6, ileal (gastrotropin)
14	<i>ccnjl</i>	cyclin J-like
14	<i>c1qtnf2</i>	C1q and TNF related 2
14	<i>slu7</i>	SLU7 homolog, splicing factor
14	<i>nsd1a</i>	nuclear receptor binding SET domain protein 1a
14	si:ch1073-44g3.1	
14	<i>atp5po</i>	ATP synthase peripheral stalk subunit OSCP
14	<i>sfxn1</i>	sideroflexin 1
14	<i>atp7a</i>	ATPase copper transporting alpha
14	<i>fbxl3l</i>	F-box and leucine-rich repeat protein 3, like
14	<i>atp10b</i>	ATPase phospholipid transporting 10b
14	<i>gabrb2</i>	gamma-aminobutyric acid type a receptor subunit beta2a
14	<i>gabrb6a</i>	gamma-aminobutyric acid type a receptor subunit alpha6a
14	<i>nudcd2</i>	NudC domain containing 2

Table 3. 10 (続き) 14 番染色体と 21 番染色体上の QTL の 95%信用区間内に存在した遺伝子リスト

染色体番号	シンボル	遺伝子名
14	<i>sept8b</i>	septin 8b
14	<i>gdf9</i>	growth differentiation factor 9
14	<i>uqcrq</i>	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII
14	<i>hspa4b</i>	heat shock protein 4b
14	<i>gnpdal</i>	glucosamine-6-phosphate deaminase 1
14	<i>ndfip1</i>	Nedd4 family interacting protein 1
14	<i>fgf1a</i>	fibroblast growth factor 1a
14	<i>nr3c1</i>	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1
14	<i>kctd16a</i>	potassium channel tetramerization domain containing 16a
14	<i>fgf16</i>	fibroblast growth factor 16
14	<i>zdhhc15b</i>	zinc finger DHHC-type palmitoyltransferase 15b
14	<i>uprt</i>	uracil phosphoribosyltransferase (FUR1) homolog
14	<i>abcb7</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 7
14	<i>nexmifb</i>	neurite extension and migration factor b
14	<i>rlim</i>	ring finger protein, LIM domain interacting
14	<i>glod5</i>	glyoxalase domain containing 5
14	si:ch211-153b23.3	
14	<i>prps1a</i>	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1a
14	<i>zgc:66447</i>	
14	<i>znf711</i>	zinc finger protein 711
14	<i>kctd12b</i>	potassium channel tetramerisation domain containing 12b
14	<i>rhogc</i>	ras homolog gene family, member Gc
14	<i>OGT</i>	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase, tandem duplicate 1
14	<i>nsdhl</i>	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like
14	<i>cetn2</i>	centrin, EF-hand protein, 2
14	<i>fut11</i>	fucosyltransferase 11 (alpha (1,3) fucosyltransferase)
14	<i>plp1a</i>	proteolipid protein 1a
14	<i>rab9b</i>	RAB9B, member RAS oncogene family
14	<i>pcdh20</i>	protocadherin 20
14	si:dkey-27i16.2	
14	<i>nlg3a</i>	neuroligin 3a
14	<i>vma21</i>	vacuolar ATPase assembly factor VMA21
14	<i>mntnr1c</i>	melatonin receptor 1c
14	<i>neur11b</i>	neuralized E3 ubiquitin protein ligase 1b

Table 3. 10 (続き) 14 番染色体と 21 番染色体上の QTL の 95%信用区間内に存在した遺伝子リスト

染色体番号	シンボル	遺伝子名
14	<i>dusp1</i>	dual specificity phosphatase 1
14	<i>ergic1</i>	endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment 1
14	<i>flt4</i>	fms related receptor tyrosine kinase 4
14	<i>trim105</i>	tripartite motif containing 105
14	<i>npy7r</i>	neuropeptide Y receptor Y7
14	<i>prelid1a</i>	PRELI domain containing 1a
14	<i>mx3</i>	MAX dimerization protein 3
14	<i>fam193b</i>	family with sequence similarity 193 member b
14	<i>DDX41</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 41
14	<i>atoh1b</i>	atonal bHLH transcription factor 1b
14	<i>unc5a</i>	unc-5 netrin receptor a
14	<i>pdlim7</i>	PDZ and LIM domain 7
14	<i>cltb</i>	clathrin, light chain B
14	<i>higd2a</i>	HIG1 hypoxia inducible domain family, member 2a
14	<i>ankhd1</i>	ankyrin repeat and KH domain containing 1
14	<i>hnrmph1</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein h1
14	<i>rufy1</i>	RUN and FYVE domain containing 1
14	<i>hbegfa</i>	heparin-binding EGF-like growth factor a
14	<i>rmnd5b</i>	required for meiotic nuclear division 5 homolog b
14	<i>n4bp3</i>	NEDD4 binding protein 3
14	<i>anxa6</i>	annexin a6
14	<i>tnip1</i>	TNFAIP3 interacting protein 1
14	<i>gpx3</i>	glutathione peroxidase 3
14	<i>dctn4</i>	dynactin 4
14	<i>tspan17</i>	tetraspanin 17
14	<i>MCHR2</i>	melanin-concentrating hormone receptor 2
14	<i>ctnna1</i>	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1
14	<i>lrrtm2</i>	leucine rich repeat transmembrane neuronal 2
14	<i>sncb</i>	synuclein, beta
14	<i>rnf44</i>	ring finger protein 44
14	<i>faf2</i>	Fas associated factor family member 2
14	<i>pin4</i>	protein (peptidylprolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting, 4 (parvulin)
14	<i>nek12</i>	NIMA-related kinase 12
14	<i>DRD1 (1 of many)</i>	dopamine receptor D1b

Table 3. 10 (続き) 14 番染色体と 21 番染色体上の QTL の 95%信用区間内に存在した遺伝子リスト

染色体番号	シンボル	遺伝子名
14	<i>cpeb4a</i>	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4a
14	<i>stc2</i>	stanniocalcin 2a
14	<i>nkx2.5</i>	NK2 homeobox 5
14	<i>bnip1a</i>	BCL2 interacting protein 1a
14	<i>rpl26l1</i>	Ribosomal protein L26 like
14	<i>rpl26</i>	Ribosomal protein L26
14	<i>ppp2r2ca</i>	protein phosphatase 2, regulatory subunit b, gamma a
14	<i>GPR151</i>	G protein-coupled receptor 151
14	<i>adam19b</i>	ADAM metallopeptidase domain 19b
14	<i>thg1l</i>	tRNA-histidine guanylyltransferase 1-like
14	<i>lsm11</i>	LSM11, U7 small nuclear RNA associated
14	<i>clint1a</i>	clathrin interactor 1a
14	<i>EBF1 (1 of many)</i>	EBF transcription factor 1a
14	<i>IL-12 p40</i>	IL-12: Interleukin-12
14	<i>adrb2a</i>	adrenoceptor beta 2, surface a
14	<i>sh3tc2</i>	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2
14	<i>ablim3</i>	actin binding LIM protein family, member 3
14	<i>afap11a</i>	actin filament associated protein 1-like 1a
14	<i>gabrp</i>	gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit pi
14	<i>foxi3b</i>	forkhead box I3b
14	<i>zgc:194246</i>	
14	<i>wnt8</i>	wingless-type MMTV integration site family, member 8a
14	<i>tmsb2</i>	thymosin beta 2
14	<i>gria1a</i>	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1a
14	<i>lonrf1</i>	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 1
14	<i>itk</i>	IL2 inducible T cell kinase
14	<i>cyfip2</i>	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2
14	<i>hmmr</i>	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)
21	<i>TTC28</i>	tetratricopeptide repeat domain 28
21	<i>PITPNB (1 of many)</i>	phosphatidylinositol transfer protein, beta
21	<i>mn1b</i>	meningioma 1b
21	<i>zgc:153044</i>	
21	<i>pcf7l1b</i>	transcription factor 7 like 1b
21	<i>ube2d4</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 4 (putative)

Table 3. 10 (続き) 14 番染色体と 21 番染色体上の QTL の 95%信用区間内に存在した遺伝子リスト

染色体番号	シンボル	遺伝子名
21	<i>dbnlb</i>	drebrin-like b
21	<i>arid5a</i>	AT rich interactive domain 5a (MRF1-like)
21	<i>gins4</i>	GIN5 complex subunit 4 (Sld5 homolog)
21	<i>polr3d</i>	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D
21	<i>GPAT4</i>	glycerol-3-phosphate acyltransferase 4
21	<i>inpp5l</i>	inositol polyphosphate-5-phosphatase L
21	<i>nkx6-3</i>	NK6 homeobox 3
21	<i>kdm2ba</i>	lysine (K)-specific demethylase 2Ba
21	<i>orai1a</i>	ORAI calcium release-activated calcium modulator 1a
21	<i>aplnra</i>	apelin receptor a
21	<i>tbc1d10aa</i>	TBC1 domain family, member 10Aa
21	<i>sf3a1</i>	splicing factor 3a, subunit 1
21	<i>slc7a4</i>	solute carrier family 7 member 4
21	<i>dgcr6</i>	DiGeorge syndrome critical region gene 6
21	<i>RASAL1</i>	RAS protein activator like 1a (GAP1 like)
21	<i>DTX1</i>	deltex 1, E3 ubiquitin ligase
21	<i>unm_hu7912</i>	un-named hu7912
21	<i>syn1</i>	synapsin I
21	<i>vgl14l</i>	vestigial like 4 like
21	<i>slc20a1a</i>	solute carrier family 20 member 1a
21	<i>gapvd1</i>	GTPase activating protein and VPS9 domains 1
21	<i>mvb12bb</i>	multivesicular body subunit 12Bb
21	<i>lmx1bb</i>	LIM homeobox transcription factor 1, beta b
21	<i>zbtb34</i>	zinc finger and BTB domain containing 34
21	<i>angptl2b</i>	angiopoietin-like 2b
21	<i>hmcn2</i>	hemicentin 2
21	<i>ncs1a</i>	neuronal calcium sensor 1a
21	<i>zgc:154046</i>	
21	<i>IER5L (1 of many)</i>	immediate early response 5-like
21	<i>ASB6</i>	ankyrin repeat and SOCS box containing 6
21	<i>si:dkeyp-14d3.1</i>	
21	<i>slc15a4</i>	solute carrier family 15 member 4
21	<i>glt1d1</i>	glycosyltransferase 1 domain containing 1
21	<i>TMEM132D</i>	transmembrane protein 132D

Table 3. 10 (続き) 14 番染色体と 21 番染色体上の QTL の 95%信用区間内に存在した遺伝子リスト

染色体番号	シンボル	遺伝子名
21	<i>fzd10</i>	frizzled class receptor 10
21	<i>piwil1</i>	piwi-like RNA-mediated gene silencing 1
21	<i>rimbp2</i>	RIMS binding protein 2
21	<i>stx2b</i>	syntaxin 2b
21	<i>adgrd1</i>	adhesion G protein-coupled receptor d1
21	<i>ulk1a</i>	unc-51 like autophagy activating kinase 1a
21	<i>ep400</i>	E1A binding protein p400
21	<i>ncor2</i>	nuclear receptor corepressor 2
21	<i>rflna</i>	refilin a
21	<i>APBA1</i>	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family a, member 1a
21	<i>fam189a2</i>	family with sequence similarity 189 member a2
21	<i>tjp2b</i>	tight junction protein 2b (zona occludens 2)
21	<i>fxn</i>	frataxin
21	<i>hmgcra</i>	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase a
21	<i>gcnt4a</i>	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 4a
21	<i>arrdc1a</i>	arrestin domain containing 1a
21	<i>nelfb</i>	negative elongation factor complex member b
21	<i>arid3c</i>	AT rich interactive domain 3C (BRIGHT-like)
21	<i>pias2</i>	protein inhibitor of activated STAT, 2
21	<i>mrpl41</i>	mitochondrial ribosomal protein L41
21	<i>dph7</i>	diphthamide biosynthesis 7
21	<i>sub1b</i>	SUB1 regulator of transcription b
21	<i>npr3</i>	natriuretic peptide receptor 3
21	<i>isl1</i>	ISL LIM homeobox 1
21	<i>chk2</i>	checkpoint kinase 2
21	<i>gstt2</i>	glutathione S-transferase theta 2
21	<i>BRD3 (1 of many)</i>	bromodomain containing 3a
21	<i>qsox2</i>	quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 2
21	<i>barhl1a</i>	BarH-like homeobox 1a
21	<i>ddx31</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 31
21	<i>ak8</i>	adenylate kinase 8
21	<i>tsc1a</i>	TSC complex subunit 1a
21	<i>dok2</i>	docking protein 2
21	<i>kazald3</i>	Kazal-type serine peptidase inhibitor domain 3

Table 3. 10 (続き) 14 番染色体と 21 番染色体上の QTL の 95%信用区間内に存在した遺伝子リスト

染色体番号	シンボル	遺伝子名
21	<i>ZMIZ2 (1 of many)</i>	zinc finger, MIZ-type containing 2
21	<i>ogdha</i>	oxoglutarate dehydrogenase a
21	<i>adam9</i>	ADAM metallopeptidase domain 9
21	<i>ercc6l</i>	excision repair cross-complementation group 6-like
21	<i>nudt18</i>	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 18
21	si:ch211-87m7.2	
21	<i>spina</i>	spindlin a
21	<i>mak16</i>	MAK16 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
21	<i>srp19</i>	signal recognition particle 19
21	<i>tnksb</i>	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase b
21	<i>idua</i>	alpha-L-iduronidase
21	<i>vamp5</i>	vesicle-associated membrane protein 5
21	<i>vamp8</i>	vesicle-associated membrane protein 8 (endobrevin)
21	<i>ncaph</i>	non-SMC condensin I complex, subunit h
21	<i>tacr1</i>	tachykinin receptor 1a
21	zgc:110329	
21	si:ch211-48m9.1	
21	<i>ogfod2</i>	2-oxoglutarate and iron-dependent oxygenase domain containing 2
21	zgc:113436	
21	<i>abcb9</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 9
21	zgc:114173	
21	<i>ppp3cca</i>	protein phosphatase 3, catalytic subunit, gamma isozyme, a
21	<i>adam28</i>	ADAM metallopeptidase domain 28
21	<i>tcima</i>	transcriptional and immune response regulator a
21	<i>zmat4a</i>	zinc finger, matrin-type 4a
21	<i>sfrp1a</i>	secreted frizzled-related protein 1a
21	<i>lox12b</i>	lysyl oxidase-like 2b
21	<i>cyb561a3a</i>	cytochrome b561 family, member A3a
21	<i>hdr</i>	hematopoietic death receptor
21	<i>unc5db</i>	unc-5 netrin receptor Db
21	<i>RASGEF1B</i>	RasGEF domain family, member 1Ba
21	<i>bmp3</i>	bone morphogenetic protein 3
21	<i>cfap299</i>	cilia and flagella associated protein 299
21	<i>fgf5</i>	fibroblast growth factor 5

Table 3. 10 (続き) 14 番染色体と 21 番染色体上の QTL の 95%信用区間内に存在した遺伝子リスト

染色体番号	シンボル	遺伝子名
21	<i>prdm8b</i>	PR domain containing 8b
21	<i>antxr2a</i>	ANTXR cell adhesion molecule 2a
21	<i>paqr3a</i>	progesterin and adipoQ receptor family member IIIa
21	<i>bmp2k</i>	BMP2 inducible kinase
21	<i>anxa3a</i>	annexin A3a
21	<i>mrpl1</i>	mitochondrial ribosomal protein L16
21	<i>cnot6l</i>	CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like
21	<i>cxcl13</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 13
21	<i>fam102aa</i>	family with sequence similarity 102 member Aa
21	<i>zdhhc12a</i>	zinc finger DHHC-type palmitoyltransferase 12a
21	si:ch211-51h9.7	
21	<i>odf2b</i>	outer dense fiber of sperm tails 2b
21	<i>gle1</i>	GLE1 RNA export mediator
21	<i>ptgesl</i>	prostaglandin E synthase 2-like
21	si:ch211-251j10.3	
21	<i>smarcb1a</i>	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1a
21	<i>GPR21</i>	probable G-protein coupled receptor 21 i

Table 3. 11 精巢発達に関連すると考えられる遺伝子のトラフグ参照配列上の位置

シンボル	遺伝子名	参照配列 (FUGU5/fr3) 上の位置		
		染色体番号	始点 (bp)	終点 (bp)
<i>vgl3</i>	vestigial-like family member 3	1	17,736,719	17,738,405
<i>hsd3b1</i>	3-β hydroxysteroid dehydrogenase 1	1	21,565,222	21,566,609
<i>cga</i>	gonadotropin common α	2	5,677,530	5,678,219
<i>six6a</i>	homeobox protein SIX6α	2	6,714,071	6,715,458
<i>tead3</i>	transcription enhancer factor-1	3	8,259,332	8,269,094
<i>lhb</i>	luteinizing hormone β	4	6,727,748	6,728,565
<i>cyp17a1</i>	cytochrome P450-17A1	4	1,244,261	1,247,854
<i>hsd3b7</i>	3β-hydroxysteroid dehydrogenase 7	5	11,268,586	11,273,043
<i>bmp15</i>	bone morphogenetic protein 15	8	11,231,564	11,233,422
<i>cyp11a2</i>	cytochrome P450-11A2	9	8,938,081	8,940,517
<i>igf2</i>	insulin-like growth factors 2	9	7,560,948	7,565,245
<i>fshb</i>	follicle-stimulating hormone β	13	9,818,529	9,819,000
<i>igf1</i>	insulin-like growth factors 1	18	2,863,863	2,873,037
<i>star</i>	steroidogenic acute regulatory protein	HE591882*	67,137	69,443

精巢重量に関連する QTL の 95%信用区間内に配置された遺伝子は太字で示した。

* 染色体上の位置が不明なスキヤフォールド


```
#!/bin/bash
#sh ~/CODES/TRIM.sh 1&>~/project_name/TRIM.log 2&>~/project_name/TRIM.err

WD=/home/user1/project_name
FASTQ=${WD}/fastq/
TRIMO=/opt/software/Trimmomatic -0.38/
SAMPLES=${WD}/SampleNames.txt #Table 3-6 中の「サンプル名」行と一致
THRED=6

R1=R1_001.fastq.gz
R2=R2_001.fastq.gz

mkdir ${WD}/TRIM
TRIMED=${WD}/TRIM

for i in `cat ${SAMPLES}`
do
mkdir ${TRIMED}/${i}
TRIM=${TRIMED}/${i}
java -jar ${TRIMO}/trimmomatic -0.38.jar PE -threads ${THRED} -trimlog ${TRIM}/${i}_trim.log ¥
${FASTQ}/${i}/${i}_*_${R1} ${FASTQ}/${i}/${i}_*_${R2} ¥
${TRIM}/${i}_paired_R1.fq.gz ${TRIM}/${i}_unpaired_R1.fq.gz ¥
${TRIM}/${i}_paired_R2.fq.gz ${TRIM}/${i}_unpaired_R2.fq.gz ¥
ILLUMINACLIP:${TRIMO}/adapters/ NexteraPE -PE.fa:2:30:10 SLIDINGWINDOW:30:20 AVGQUAL:20 MINLEN:80
done
```

Script 3.1 GRAS-Di 法で得られたリードのトリミングに用いたスクリプト。

```

#!/bin/bash
#sh ./CODES/BWA-mem.sh 1&>~/project_name/BWA -mem.log 2&>~/project_name/BWA -mem.err

PROJECT=project_name
WD=/home/user1/${PROJECT}
REF=${WD}/REF/fugu5_chromosomes.fa #FUGU5/fr3 fasta sequence file
TRIMED=${WD}/TRIM
SAMPLES=${WD}/SampleNames.txt #Table 3-6 中の「サンプル名」行と一致
THRED=6

bwa index ${REF}
samtools faidx ${REF}

mkdir ${WD}/BWA

for i in `cat ${SAMPLES}`
do
mkdir ${WD}/BWA/${i}
TRIM=${TRIMED}/${i}
BWA=${WD}/BWA/${i}
bwa mem -t ${THRED} -M ${REF} ${TRIM}/${i}_paired_R1.fq.gz ${TRIM}/${i}_paired_R2.fq.gz ¥
-R "@RG¥ID:"${i}"¥SM:"${i}"¥PL:Illumina" | samtools view -F 2316 -b -@ ${THRED} > ${BWA}/${i}.bam
samtools sort -@ 8 ${BWA}/${i}.bam -o ${BWA}/${i}_sorted.bam
samtools index ${BWA}/${i}_sorted.bam
rm ${BWA}/${i}.bam
done

```

Script 3.2 トリミングしたリードを参照配列（FUGU/5fr3）にマッピングした際に用いたスクリプト。

```

#!/bin/bash
#sh ./CODES/Freebayse.sh 1&>~/ project_name /Freebayse.log 2&>~/ project_name /Freebayse.err

PROJECT=project_name
WD=/home/user1/${PROJECT}
REF=${WD}/REF/fugu5_chromosomes.fa #FUGU5/fr3 fasta sequence file
TRIMED=${WD}/TRIM
SAMPLES=${WD}/SampleNames.txt #Table 3-6 中の「サンプル名」行と一致
THRED=6

mkdir ${WD}/Freebayes
FB=${WD}/Freebayes
BWA=${WD}/BWA

for i in `cat ${SAMPLES}`
do
ls ${BWA}/${i}/${i}*bam >> ${PROJECT}/${PROJECT}_bam.list
done

samtools merge -@12 ${FB}/${PROJECT}_sorted.bam -b ${PROJECT}/${PROJECT}_bam.list
samtools index -@12 ${FB}/${PROJECT}_sorted.bam

cd /opt/software/freebayes/scripts
./freebayes -parallel <(. /fast a_generate_regions.py ${REF}.fai 100000) 12 ¥
-f ${REF} ${FB}/${PROJECT}_sorted.bam --min-mapping-quality 10 ¥
--use-best-n-alleles 4 --min-alternate-count 2 --min-alternate-fraction 0.2 ¥
> ${FB}/${PROJECT}_sorted.merged.FB.vcf
bgzip ${FB}/${PROJECT}_sorted.merged.FB.vcf
tabix -p vcf ${FB}/${PROJECT}_sorted.merged.FB.vcf.gz

vcftools --gzvcf ${FB}/${PROJECT}_sorted.merged.FB.vcf.gz ¥
--minQ 20 --maf 0.01 --minDP 5 --max-meanDP 500 --remove-indels ¥
--min-alleles 2 --max-alleles 2 --max-missing 0.8 --recode ¥
--out ${FB}/${PROJECT}_sorted.merged.FB.filtered

```

Script 3.3 マッピングされた個々の BAM ファイルを結合し、ジェノタイピングを行った際に用いたスクリプト。

```

WD=/home/user1/${PROJECT}
FB=${WD}/${PROJECT}
vcftools=/opt/software/vcftools-0.1.16/src/cpp/vcftools
plink=/opt/software/plink-1.07-x86_64/plink

#親魚の個体番号の確認: A2; 46632, S1; 39947, S2; 39931, D1; 39979, D2; 39983
#親魚 5 個体を抽出して 012 形式に変換
vcftools --vcf ${FB}/${PROJECT}_sorted.merged.FB.filtered.recode.vcf ¥
--indv 39947 --indv 39931 --indv 39979 --indv 39983 --indv 46632 --012 --out ${FB}/${PROJECT}_sorted.merged.FB.filtered.recode.vcf_parents

#出力されたファイルの行と列を入れ替える
cd ${FB}
sed -n 1p ${PROJECT}_sorted.merged.FB.filtered.recode.vcf_parents.012 | sed -e "s/¥t/¥n/g" > S1.012
sed -n 2p ${PROJECT}_sorted.merged.FB.filtered.recode.vcf_parents.012 | sed -e "s/¥t/¥n/g" > S2.012
sed -n 3p ${PROJECT}_sorted.merged.FB.filtered.recode.vcf_parents.012 | sed -e "s/¥t/¥n/g" > D1.012
sed -n 4p ${PROJECT}_sorted.merged.FB.filtered.recode.vcf_parents.012 | sed -e "s/¥t/¥n/g" > D2.012
sed -n 5p ${PROJECT}_sorted.merged.FB.filtered.recode.vcf_parents.012 | sed -e "s/¥t/¥n/g" > A2.012

#これらに SNP position を加える
cp ${PROJECT}_sorted.merged.FB.filtered.recode.vcf_parents.012.pos 012.pos
sed -i '1s/^/Chrom¥tpos¥n/' 012.pos
paste 012.pos S1.012 S2.012 D1.012 D2.012 A2.012 > SNPlist.012

#A2 は 0 または 2 (ホモ型) で、S1, S2, D1, D2 は 1 (ヘテロ型) となる SNP を抽出する
#A2 のジェノタイプが 0 または 2 (ホモ型) の SNP 座
awk '{if($7==2) print $0}' SNPlist.012 > grandpa_2.list
awk '{if($7==0) print $0}' SNPlist.012 > grandpa_0.list

#A2 のジェノタイプが 2 (または 0) の SNP 座では父母のジェノタイプが 0 (または 2) になることはないのですべて除外
cat grandpa_2.list | grep -v -w "0" > grandpa_2_filtered.list
cat grandpa_0.list | grep -v -w "2" > grandpa_0_filtered.list

#S1, S2, D1, D2 のジェノタイプが全て 1 である SNP を抽出
awk '{if($3==1 && $4==1 && $5==1 && $6 ==1) print $0}' grandpa_2_filtered.list > grandpa_2_parents1.list
awk '{if($3==1 && $4==1 && $5==1 && $6 ==1) print $0}' grandpa_0_filtered.list > grandpa_0_parents1.list

#A2 のジェノタイプが 0 または 2 で、S1, S2, D1, D2 のすべてが 1 となるファイルを結合 (SNP リスト)
cat grandpa_0_parents1.list grandpa_2_parents1.list | cut -f1,2 | sort -g > grandpa_02.list

#SNP リストに残った SNP 座を抽出
vcftools --vcf ${FB}/${PROJECT}_sorted.merged.FB.filtered.recode.vcf --plink --chrom-map ~/CODES/Chrom.map ¥
--positions ${FB}/grandpa_02.list --out ${PLINK}/${PROJECT}_sorted.merged.FB.filtered.recode_grandpa_02.vcf

```

Script 3.4 連鎖地図作製に有効な SNP を選抜した際に用いたスクリプト。祖父 (A2) の遺伝子型がホモであり、かつ、F₁ 親魚 (S1, S2, D1, D2) の遺伝子型がヘテロ接合である SNP を選抜した。

```
#####QTL analysis
library("qtl")

DIR="PROJECT_name"
FILE="samplefile.csv"

data <- read.cross(dir=DIR, file=FILE, format="csv", estimate.map = F)
pheno <- data$pheno

##### Normality test
shapiro.test(pheno$SL)
shapiro.test(pheno$BW)
shapiro.test(pheno$GW)
shapiro.test(pheno$GSI)
#SL, GW and GSI skew, but BW do not significantly differ from normal distribution
#SL, GW and GSI are transformed using nqrnk after calc.genoprob step

##### QTL analysis with covariance
est <- est.map(data, map.function="kosambi")
map <- replace.map(data, est)
plot.map(map)
cal <- calc.genoprob(map, step=1)

##### transform skew data
cal_trans <- transformPheno(cal, pheno.col = c(3,5,6), transf=nqrnk)

#####qtl analysis for BW
#####genome scan with covariant
BW <- scanone(cal, pheno=4, addcov = cal$pheno$FAM)

summary(BW, threshold=2)
permBW <- scanone(cal, pheno=4, n.perm = 1000, addcov = cal$pheno$FAM)

summary(BW, perm=permBW, alpha=0.05)
summary(BW, perm=permBW, alpha=0.677)
summary(permBW, alpha=0.05)
summary(permBW, alpha=0.677)

plot(BW)
abline(h = summary(permBW, alpha = 0.05))
abline(h = summary(permBW, alpha = 0.677), lty = 2 )

##### multiple QTL analysis
bayesint(BW, chr=5, expandtomarkers = TRUE)
bayesint(BW, chr=6, expandtomarkers = TRUE)
bayesint(BW, chr=8, expandtomarkers = TRUE)
bayesint(BW, chr=14, expandtomarkers = TRUE)
bayesint(BW, chr=19, expandtomarkers = TRUE)
bayesint(BW, chr=20, expandtomarkers = TRUE)
bayesint(BW, chr=21, expandtomarkers = TRUE)

q <- c(5, 6, 8, 14, 19, 20, 21)
p <- c(83.05, 46.73, 58, 23.91, 83.59, 85, 1.04)
qtl <- makeqtl(cal, q, p, what="prob")
fit <- fitqtl(cal, pheno.col = 4, qtl, method = "hk", get.est=T)

summary(fit)

sim <- sim.geno(cal_trans, n.draws = 128, step =1)

mar1 <- find.marker(cal_trans, 14, 23.91)
mar2 <- find.marker(cal_trans, 21, 1.04)

output1 <- effectplot(sim, pheno.col="BW", mar1)
output2 <- effectplot(sim, pheno.col="BW", mar2)
```

Script 3.5 QTL 解析に用いた R スクリプト。解析には F₂ 集団の表現型値 (Table 3.4) および Script 3.4 で選抜した SNP 座から、(1) 染色体物理地図上の位置が明確であり、(2) 全個体の 98% 以上でジェノタイプピングされ、かつ、(3) Hardy-Weinberg 平衡から極端に逸脱 ($P < 10^{-8}$) していない SNP 座におけるジェノタイプデータを用いた。

```

#####qtl analysis for SL
####genome scan with covariant
SL <- scanone(cal_trans, pheno=3, addcov = cal_trans$pheno$FAM)

summary(SL, threshold=2)
permSL <- scanone(cal_trans, pheno=3, n.perm = 1000, addcov = cal_trans$pheno$FAM)

summary(SL, perm=permSL, alpha=0.05)
summary(SL, perm=permSL, alpha=0.677)
summary(permSL, alpha=0.05)
summary(permSL, alpha=0.677)

plot(SL)
abline(h = summary(permSL, alpha = 0.05))
abline(h = summary(permSL, alpha = 0.677),lty = 2 )

##### multiple QTL analysis
bayesint(SL, chr=5, expandtomarkers = TRUE)
bayesint(SL, chr=8, expandtomarkers = TRUE)
bayesint(SL, chr=14, expandtomarkers = TRUE)
bayesint(SL, chr=19, expandtomarkers = TRUE)
bayesint(SL, chr=20, expandtomarkers = TRUE)
bayesint(SL, chr=21, expandtomarkers = TRUE)

q <- c(5, 8, 14, 19, 20, 21)
p <- c(71.52, 56, 23.91, 83.59, 86, 1.04)
qtl <- makeqtl(cal_trans, q, p, what="prob")
fit <- fitqtl(cal_trans, pheno.col = 3, qtl, method = "hk", get.est=T)

summary(fit)

mar1 <- find.marker(cal_trans, 14, 23.91)
mar2 <- find.marker(cal_trans, 21, 1.04)

output1 <- effectplot(sim , pheno.col="SL", mar1)
output2 <- effectplot(sim , pheno.col="SL", mar2)

#####qtl analysis for GW
####genome scan with covariant
GW <- scanone(cal_trans, pheno=5, addcov = cal_trans$pheno$FAM)

summary(GW, threshold=2)
permGW <- scanone(cal_trans, pheno=5, n.perm = 1000, addcov = cal_trans$pheno$FAM)

summary(GW, perm=permGW, alpha=0.05)
summary(GW, perm=permGW, alpha=0.677)
summary(permGW, alpha=0.05)
summary(permGW, alpha=0.677)

plot(GW)
abline(h = summary(permGW, alpha = 0.05))
abline(h = summary(permGW, alpha = 0.677),lty = 2 )

##### multiple QTL analysis
bayesint(GW, chr=1, expandtomarkers = TRUE)
bayesint(GW, chr=8, expandtomarkers = TRUE)
bayesint(GW, chr=14, expandtomarkers = TRUE)
bayesint(GW, chr=19, expandtomarkers = TRUE)

q <- c(1, 8, 14, 19)
p <- c(165, 48.6, 26.7, 83.6)
qtl <- makeqtl(cal_trans, q, p, what="prob")
fit <- fitqtl(cal_trans, pheno.col = 5, qtl, method = "hk", get.est=T)

summary(fit)

mar3 <- find.marker(cal_trans, 14, 26.75)

output3 <- effectplot(sim , pheno.col="GW", mar3)

```

Script 3.5 (続き)

```
#####qtl analysis for GSI
####genome scan with covariant
GSI <- scanone(cal_trans, pheno=6, addcov = cal_trans$pheno$FAM)

summary(GSI, threshold=2)
permGSI <- scanone(cal_trans, pheno=6, n.perm = 1000, addcov = cal_trans$pheno$FAM)

summary(GSI, perm=permGSI, alpha=0.05)
summary(GSI, perm=permGSI, alpha=0.677)
summary(permGSI, alpha=0.05)
summary(permGSI, alpha=0.677)

plot(GSI)
abline(h = summary(permGSI, alpha = 0.05))
abline(h = summary(permGSI, alpha = 0.677), lty = 2 )

##### multiple QTL analysis
bayesint(GSI, chr=1, expandtomarkers = TRUE)
bayesint(GSI, chr=8, expandtomarkers = TRUE)
bayesint(GSI, chr=14, expandtomarkers = TRUE)
bayesint(GSI, chr=19, expandtomarkers = TRUE)

q <- c(1, 8, 14, 19)
p <- c(165,48.6,26.7,83.6)
qtl <- makeqtl(cal_trans, q, p, what="prob")
fit <- fitqtl(cal_trans, pheno.col = 6, qtl, method = "hk", get.est=T)

summary(fit)

mar3 <- find.marker(cal_trans, 14, 26.75)

output3 <- effectplot(sim , pheno.col="GSI", mar3)
```

Script 3.5 (続き)

第4章 図表・スクリプト

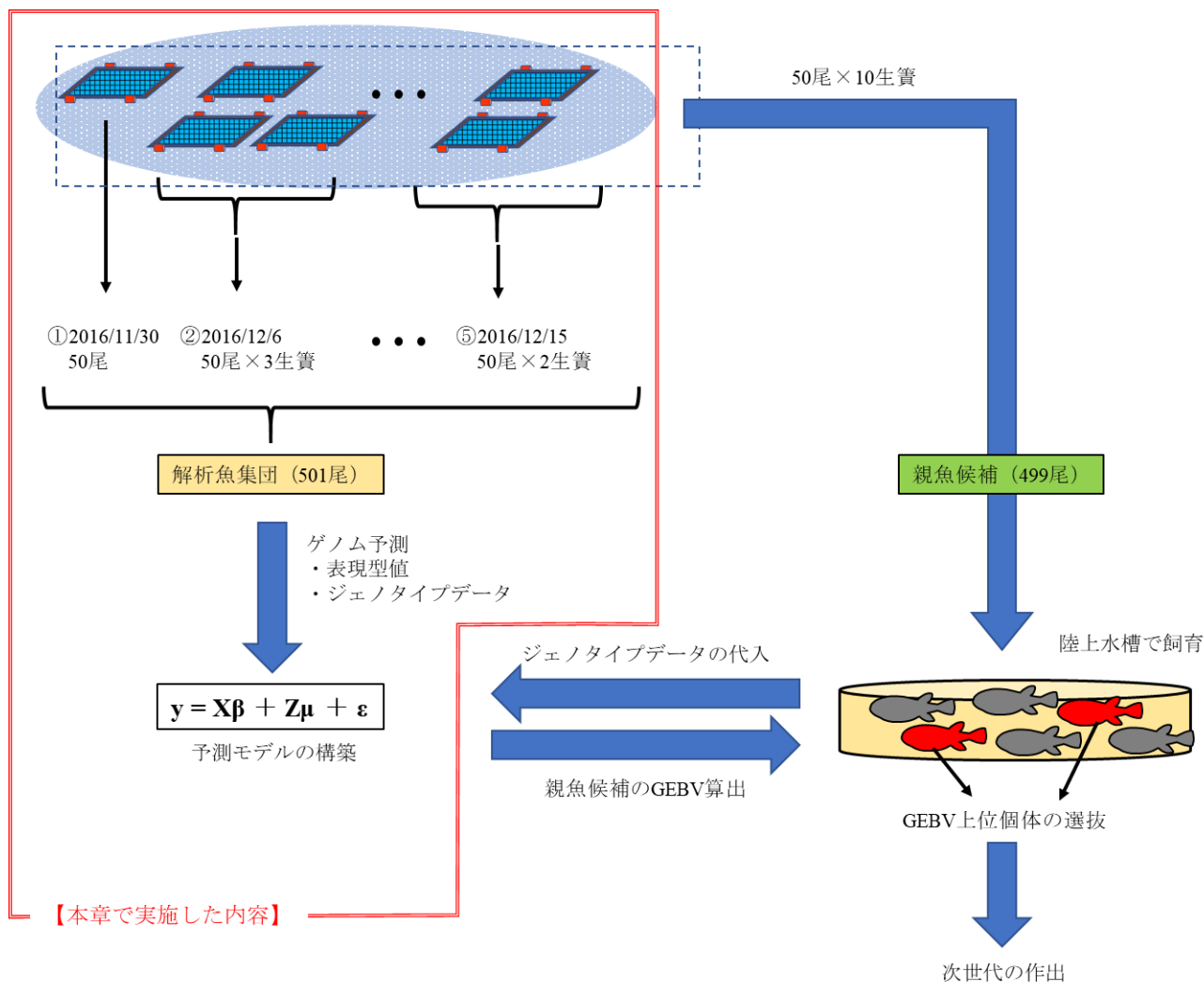


Fig. 4.1 本章の実験をもとに作成したゲノミックセレクション法の概略図。赤枠で囲った部分が本章の実験で行った内容を示す。解析魚として10生簀（1生簀がほぼ1つの全きょうだい集団で構成される）から各100個体を収集した。このうち499個体は親魚候補として残り、残り501個体を解析魚として直ちにサンプリングして表現型値と鱭組織を取得した。解析魚から取得した表現型およびジェノタイプデータをもとにGBLUP法によるゲノム予測を行った。親魚候補は鱭組織を採取した後、陸上水槽に搬入して飼育した。親魚候補から選抜を行う場合、取得したジェノタイプデータを解析魚集団で構築した予測モデルに代入し、各個体のGEBVを予測して選抜する。

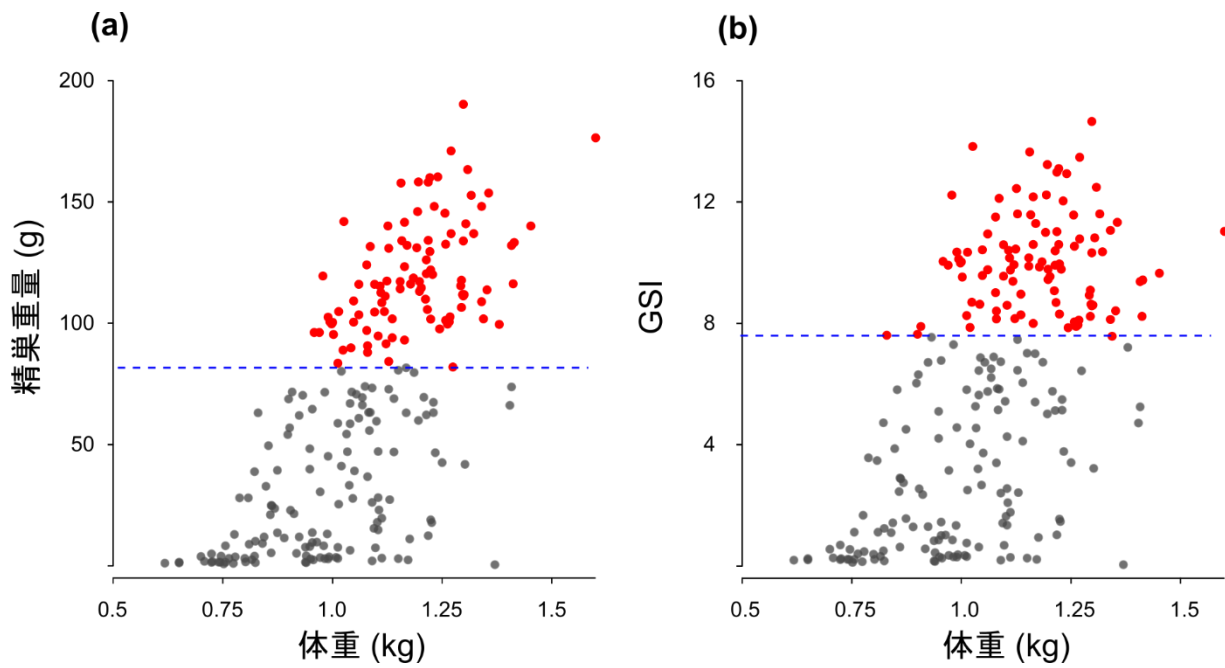


Fig. 4.2 解析魚集団における各個体の体重と精巣重量 (a) および体重と GSI (b) の関係。図中の青破線は精巣重量 (a) および GSI (b) の上位 100 個体とそれ以下を分ける基準を示し、基準を超えた個体を赤で示した。両形質の上位 100 個体を抽出して体重との相関 (Spearman's rank correlation, ρ) を調べたところ、精巣重量では中程度の正の相関を示したが ($\rho = 0.4622, P < 0.001$)、GSI では有意な相関が認められなかった ($\rho = 0.0789, P = 0.435$)。

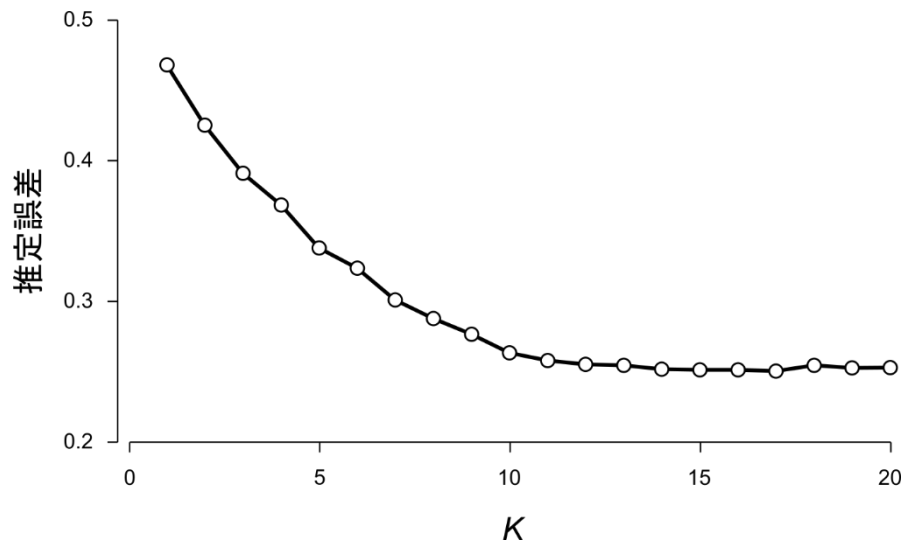


Fig. 4.3 ADMIXTURE 解析における交差検定の結果。横軸に祖先集団数 (K) を示し、縦軸にそれぞれの K において 5 分割の交差検定を行って推定した集団数の推定誤差を示した。推定誤差は K が 11 以上で横ばいとなった。

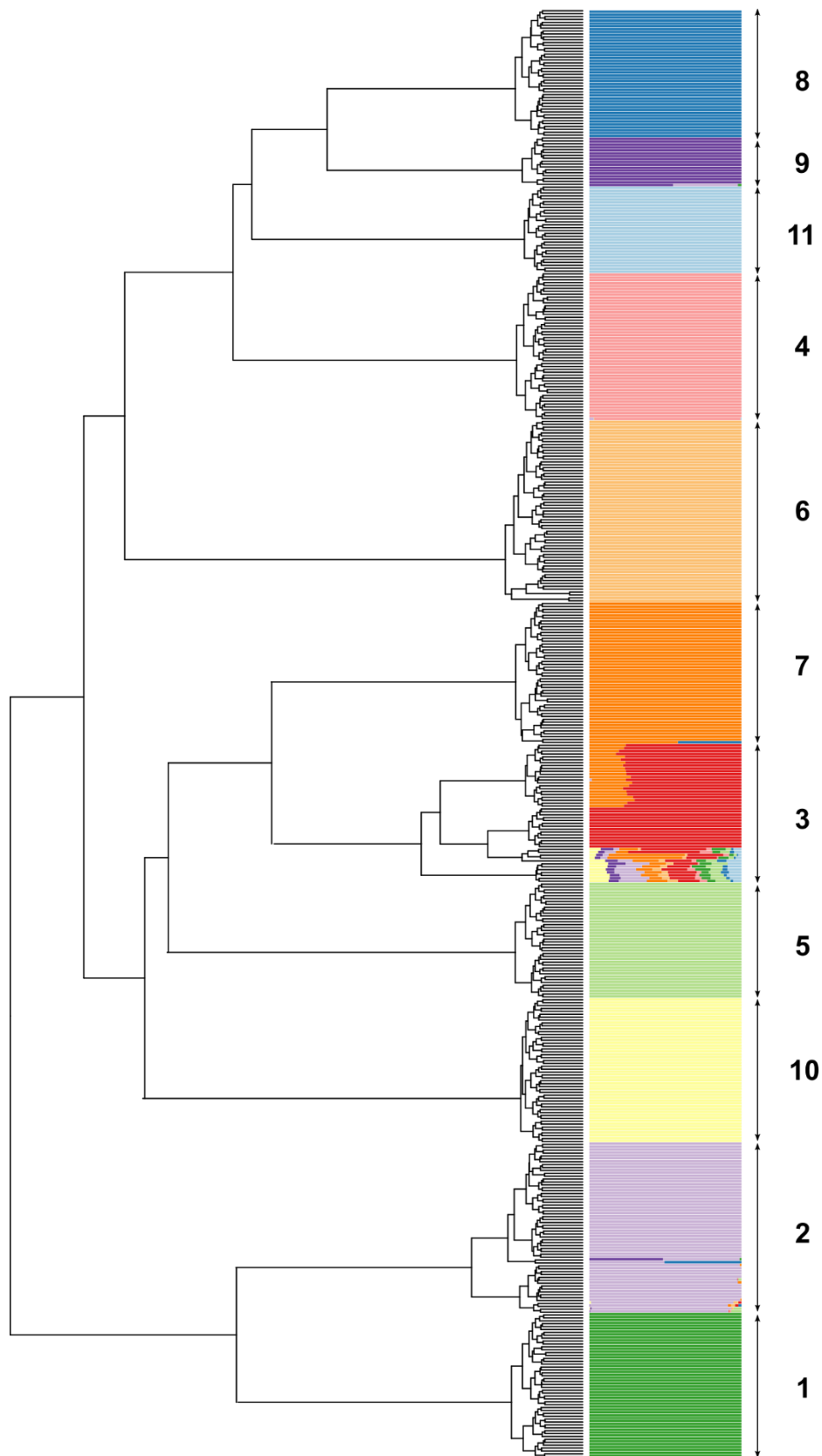


Fig. 4.4 解析魚の遺伝的集団構造。左側の系統樹は個体間のユークリッド距離にもとづく遺伝的類縁関係を示し、右側のバーは ADMIXTURE 解析で推定された 11 集団に対する各個体の帰属率を示す。右端に示した数字は類縁関係をもとに推定した血縁クラスターID (Fig.4.5 と対応する) を示す。このうち、ID4、8、9 は 養殖業者からの聞き取り調査から A2 個体の後代であると推察された。

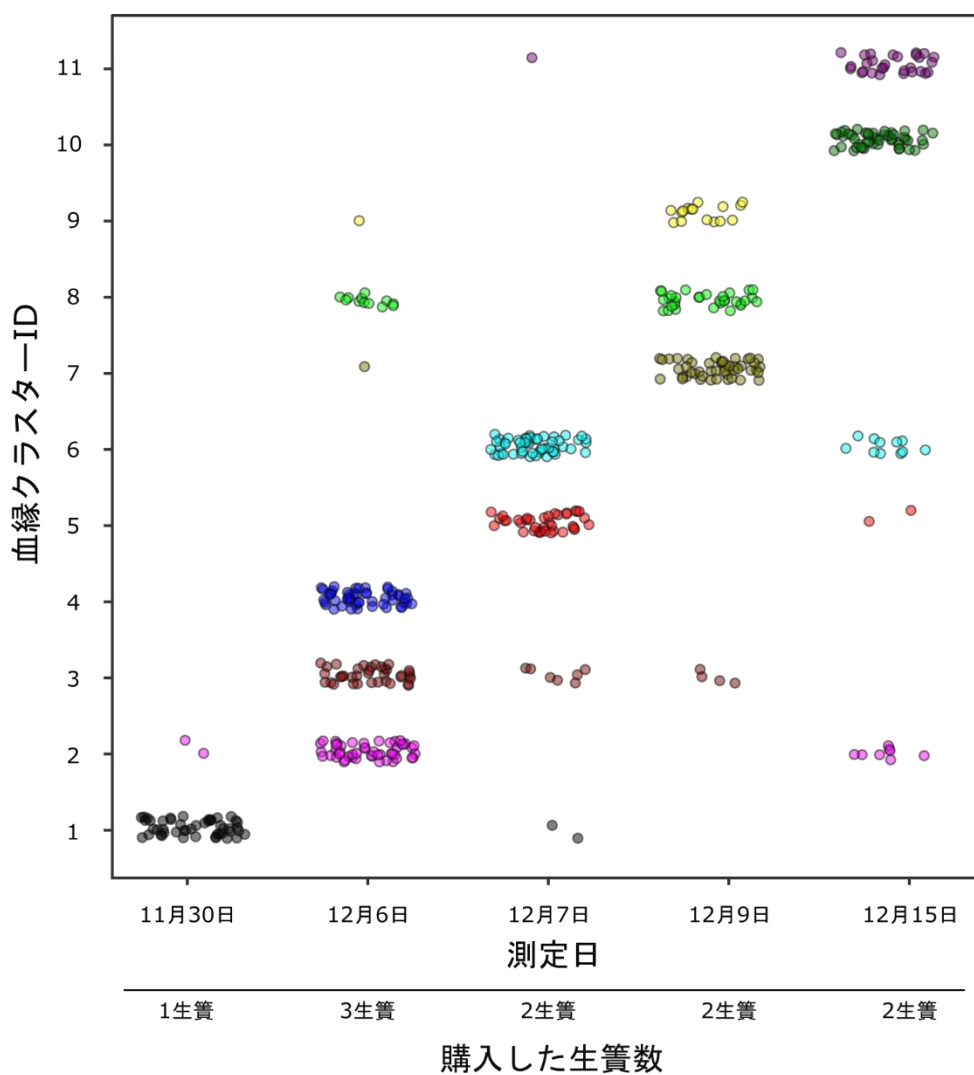


Fig. 4.5 各解析個体の測定日と血縁クラスターの対応関係。11月30日に1生簣、12月6日に3生簣、12月7日、9日、15日に2生簣ずつ購入した。各測定日の購入した生簣数（全きょうだいの数）と血縁クラスター数はおおむね一致したが、12月6日、9日および15日などでは、扱った生簣数よりも多い血縁クラスターが出現した。

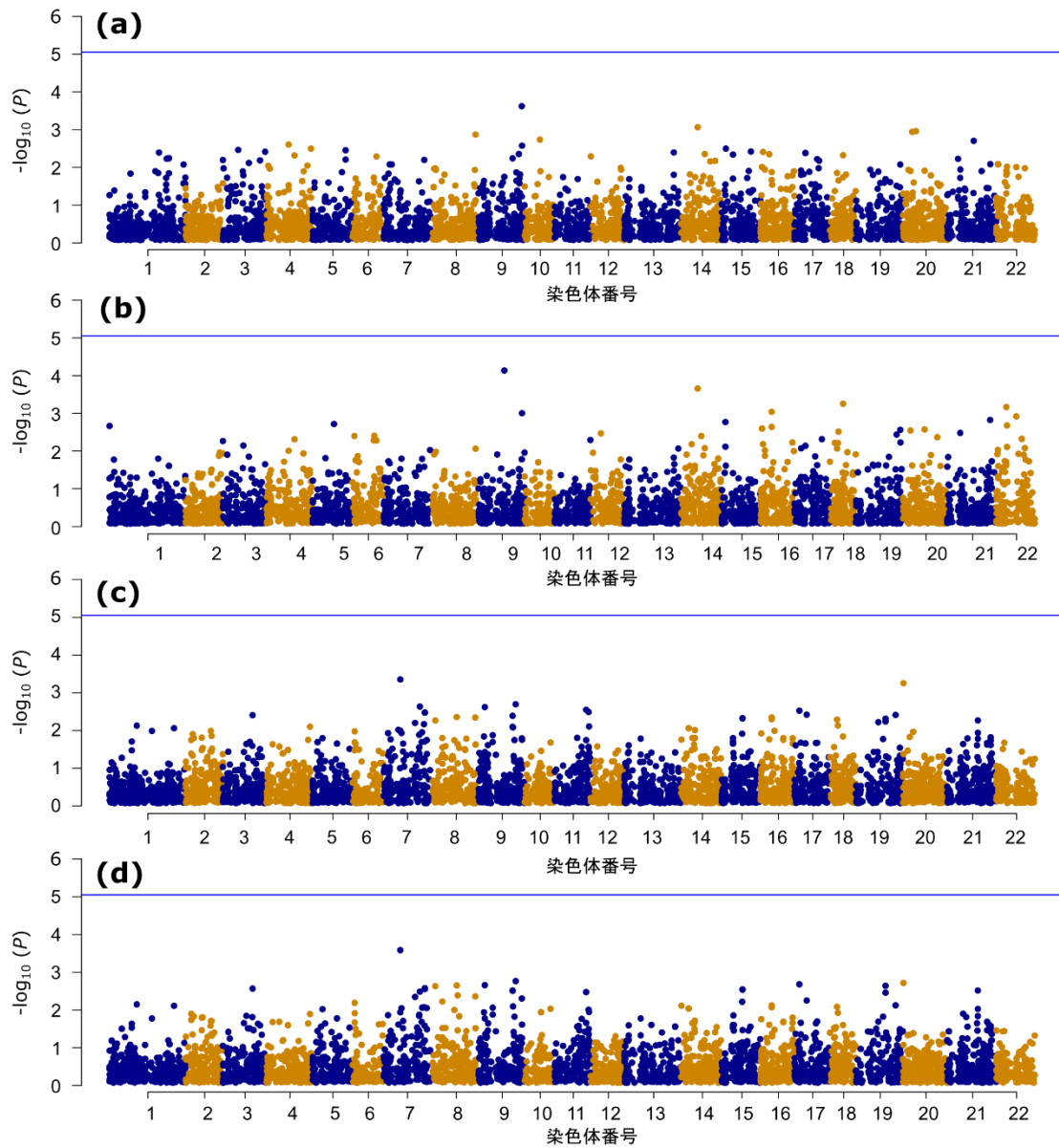


Fig. 4.6 ゲノムワイド関連解析 (GWAS) の結果。それぞれ、標準体長 (a)、体重 (b)、精巣重量 (c) および GSI (d) の結果を示す。各 SNP をトラフグの染色体 (22 本) 上の位置順に横軸に配し、各形質との関連性の強さ ($-\log_{10}(P)$) を縦軸に示した。図中の青い水平線は有意水準 (ボンフェローニ補正後の有意水準 ($5.05 = -\log_{10}(0.05/5583)$)) を示す。

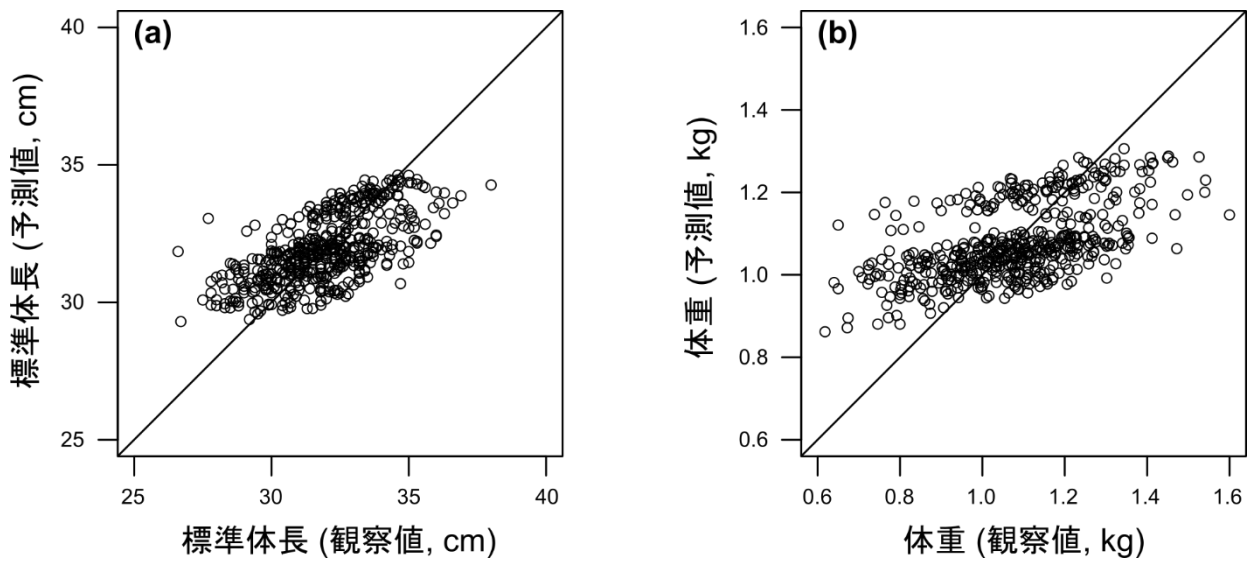


Fig. 4.7 標準体長 (a) および体重 (b) の観察値と GBLUP 法で予測した予測値 (GEBV) の相関。いずれも正の相関が認められた (標準体長: $r = 0.65$; 体重: $r = 0.58$)。図中の斜実線は観測値と予測値が一致する点を結んだもの ($y = x$)。

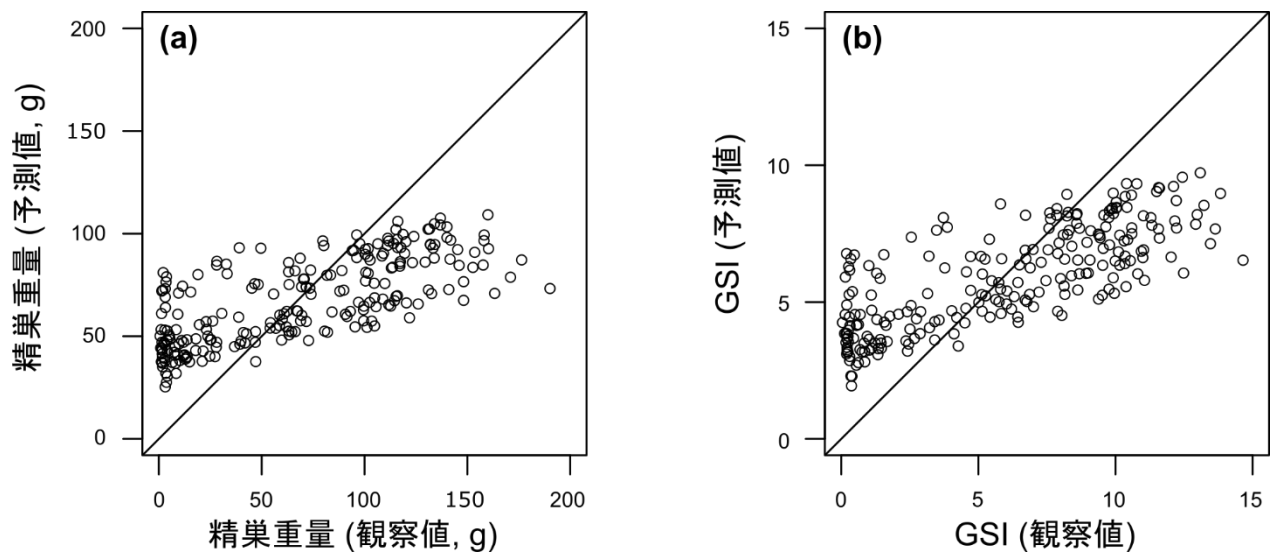


Fig. 4.8 オス個体における精巣重量 (a) および GSI (b) の観察値と GBLUP 法で予測した予測値 (GEBV) の相関。いずれも正の関係が認められた (精巣重量: $r=0.72$; GSI: $r=0.76$)。図中の斜実線は観察値と予測値が一致する点を結んだもの ($y=x$)。

Table 4.1 解析魚の雌雄別表現型値

測定日	生簀数	性別	<i>n</i>	標準体長 (cm) ^a	体重 (g) ^a	生殖腺重量 (g) ^a	GSI ^a
2016/11/30	1	オス	27	30.9 ± 1.5	999.5 ± 208.0	50.3 ± 47.1	4.4 ± 3.7
		メス	23	32.1 ± 2.3	1091.4 ± 214.7	5.2 ± 1.5	0.5 ± 0.1
2016/12/6	3	オス	68	31.3 ± 1.4	1060.2 ± 128.2	57.2 ± 45.4	5.2 ± 4.0
		メス	83	31.3 ± 1.7	1040.9 ± 137.2	8.3 ± 5.1	0.8 ± 0.4
2016/12/7	2	オス	43	31.6 ± 2.1	1054.9 ± 215.1	70.3 ± 53.8	6.1 ± 4.2
		メス	56	32.3 ± 2.0	1077.6 ± 209.4	10.4 ± 5.8	0.9 ± 0.4
		両性 ^b	1	32.0	1010.0	—	—
2016/12/9	2	オス	37	32.1 ± 1.7	1147.3 ± 150.2	99.0 ± 43.7	8.5 ± 3.3
		メス	59	33.4 ± 1.7	1161.1 ± 143.8	13.3 ± 5.5	1.1 ± 0.4
		両性 ^b	4	33.5 ± 2.4	1236.5 ± 208.7	—	—
2016/12/15	2	オス	63	31.9 ± 1.5	1074.2 ± 187.8	66.7 ± 53.0	5.7 ± 4.4
		メス	35	31.8 ± 1.9	1032.2 ± 153.0	7.1 ± 4.2	0.7 ± 0.3
		両性 ^b	2	33.7 ± 0.1	1174.0 ± 141.4	—	—
計	10	オス	238	31.6 ± 1.7	1069.6 ± 178.4	67.6 ± 50.8	5.9 ± 4.2
		メス	256	32.1 ± 2.0	1080.0 ± 172.2	9.4 ± 5.6	0.8 ± 0.4

^a 平均値 ± 標準偏差^b 両性生殖腺を持った個体

Table 4.2 ゲノムワイド関連解析およびゲノム予測に用いた解析魚の表現型値、性別および測定日

プール	ID	標準体長 (cm)	BW (g)	GW (g)	GSI	性別	測定日
1	S1	28.7	788	28.1	3.57	M	16_11_30
1	S2	32.4	1150	80.6	7.01	M	16_11_30
1	S3	29	800	3.1	0.39	F	16_11_30
1	S4	33.7	1350	8.9	0.66	F	16_11_30
1	S5	30.9	1040	58.6	5.63	M	16_11_30
1	S6	29.2	924	4.2	0.45	F	16_11_30
1	S7	32.7	1230	63.2	5.14	M	16_11_30
1	S8	31	1040	67	6.44	M	16_11_30
1	S9	31.5	1034	47	4.55	M	16_11_30
1	S10	33.2	1178	6.2	0.53	F	16_11_30
1	S11	32	1270	171	13.46	M	16_11_30
1	S12	33.4	1256	5.8	0.46	F	16_11_30
1	S13	31.3	1000	4.3	0.43	F	16_11_30
1	S14	34.2	1274	82	6.44	M	16_11_30
1	S15	30.9	802	1.7	0.21	M	16_11_30
1	S16	36	1248	6.8	0.54	F	16_11_30
1	S17	28.5	800	4	0.50	F	16_11_30
1	S18	31.4	1224	121.9	9.96	M	16_11_30
1	S19	33.7	1226	5.1	0.42	F	16_11_30
1	S20	29.8	776	13	1.68	M	16_11_30
1	S21	32.5	1340	148.2	11.06	M	16_11_30
1	S22	28.7	756	8.4	1.11	M	16_11_30
1	S23	30.8	874	13.7	1.57	M	16_11_30
1	S24	31.8	996	4.7	0.47	F	16_11_30
1	S25	35.6	1468	6.2	0.42	F	16_11_30
1	S26	36	1354	7.3	0.54	F	16_11_30
1	S27	31.2	986	4.9	0.50	F	16_11_30
1	S28	32.3	1128	72.8	6.45	M	16_11_30
1	S29	35.2	1354	6.5	0.48	F	16_11_30
1	S30	31.5	1108	5	0.45	F	16_11_30
1	S31	29.9	800	3.1	0.39	M	16_11_30
1	S32	32.5	1086	63.3	5.83	M	16_11_30
1	S33	30.2	924	62	6.71	M	16_11_30
1	S34	29.9	824	1.4	0.17	M	16_11_30
1	S35	33.2	1212	109.9	9.07	M	16_12_6
1	S36	33.4	1090	8.1	0.74	F	16_12_6
1	S37	32	1060	3.4	0.32	F	16_12_6
1	S38	31	1082	8.1	0.75	F	16_12_6
1	S39	33.5	1214	62.2	5.12	M	16_12_6
1	S40	32.1	1026	10.8	1.05	F	16_12_9

Table 4.2 (続き) ゲノムワイド関連解析およびゲノム予測に用いた解析魚の表現型値、性別および測定日

プール	ID	標準体長 (cm)	BW (g)	GW (g)	GSI	性別	測定日
1	S41	33.6	1140	18.2	1.60	F	16_12_9
1	S42	35.3	1248	10.6	0.85	F	16_12_9
1	S43	34.4	1268	10	0.79	F	16_12_9
1	S44	32.1	1104	13.4	1.21	F	16_12_9
1	S45	30.6	1088	NA	NA	M	16_12_9
1	S46	34.4	1202	5.7	0.47	F	16_12_9
1	S47	32	1054	6.7	0.64	F	16_12_9
1	S48	32.1	1164	123.3	10.59	M	16_12_9
1	S49	31.6	1096	104.7	9.55	M	16_12_9
1	S50	28	820	5.2	0.63	F	16_12_6
1	S51	31.2	860	24.9	2.90	M	16_12_9
1	S52	35	1270	7	0.55	F	16_12_9
1	S53	30.5	990	102.5	10.35	M	16_12_9
1	S54	32.8	1096	17.4	1.59	F	16_12_9
1	S55	34.2	1202	114.6	9.53	M	16_12_9
1	S56	35.1	1262	13.3	1.05	F	16_12_9
1	S57	34.2	1472	7.1	0.48	F	16_11_30
1	S58	33	1302	41.9	3.22	M	16_11_30
1	S59	30.2	938	1.6	0.17	M	16_11_30
1	S60	30.7	974	4.3	0.44	F	16_11_30
1	S61	27.8	650	1.6	0.25	M	16_11_30
1	S62	31.8	1296	111.8	8.63	M	16_11_30
1	S63	30.2	862	3.6	0.42	F	16_11_30
1	S64	29.4	746	4.1	0.55	M	16_11_30
1	S65	31.2	1022	4.7	0.46	F	16_11_30
1	S66	31.5	1070	5	0.47	F	16_11_30
1	S67	28.6	804	3.5	0.44	F	16_11_30
1	S68	29.8	824	10.2	1.24	M	16_11_30
1	S69	31.8	994	3.4	0.34	F	16_11_30
1	S70	29.8	858	21.1	2.46	M	16_11_30
1	S71	29.9	856	3.9	0.46	F	16_11_30
1	S72	30.5	1012	58.8	5.81	M	16_11_30
1	S73	33.5	1178	116.1	9.86	M	16_12_6
1	S74	31.7	894	3.6	0.40	F	16_12_6
1	S75	31	980	7.1	0.72	F	16_12_6
1	S76	29	1072	3.9	0.36	F	16_12_6
1	S77	32	1032	6.5	0.63	F	16_12_6
1	S78	29.5	982	3	0.31	M	16_12_6
1	S79	31.5	924	5.1	0.55	F	16_12_6
1	S80	29.5	1016	NA	NA	M	16_12_6

Table 4.2 (続き) ゲノムワイド関連解析およびゲノム予測に用いた解析魚の表現型値、性別および測定日

プール	ID	標準体長 (cm)	BW (g)	GW (g)	GSI	性別	測定日
1	S81	32.5	1108	115.3	10.41	M	16_12_6
1	S82	30.5	1058	3.8	0.36	F	16_12_6
1	S83	30.3	948	48.3	5.09	M	16_12_6
1	S84	30.7	1176	11.1	0.94	M	16_12_6
1	S85	32.5	1016	10.4	1.02	F	16_12_6
1	S86	30.7	992	7.2	0.73	F	16_12_6
1	S87	31.4	1254	5.4	0.43	F	16_12_6
1	S88	32.7	1262	99.6	7.89	M	16_12_6
1	S89	28.2	772	1.8	0.23	F	16_12_6
1	S90	30.2	904	5.5	0.61	F	16_12_6
1	S91	30	882	3.6	0.41	F	16_12_6
1	S92	30.7	1048	109.2	10.42	M	16_12_6
1	S93	30	1106	23.1	2.09	M	16_12_6
1	S94	29.8	1008	3.9	0.39	F	16_12_6
1	S95	31	964	9.8	1.02	M	16_12_6
1	S96	28.3	878	5	0.57	F	16_12_6
1	S97	31	958	96.2	10.04	M	16_12_6
1	S98	26.7	850	4	0.47	F	16_12_6
1	S99	29.9	1048	100.4	9.58	M	16_12_6
1	S100	32.7	926	5.9	0.64	F	16_12_6
1	S101	32.7	1078	124	11.50	M	16_12_6
1	S102	30.5	1012	7.7	0.76	M	16_12_6
1	S103	34.2	1330	5.2	0.39	F	16_12_6
1	S104	31.3	1062	7.3	0.69	F	16_12_6
1	S105	29.8	830	63.1	7.60	M	16_12_6
1	S106	30	940	7.3	0.78	F	16_12_6
1	S107	31.7	1140	18.3	1.61	F	16_12_6
1	S108	32.7	1090	9.6	0.88	F	16_12_6
1	S109	31.7	1094	15.5	1.42	M	16_12_6
1	S110	28.6	878	4	0.46	F	16_12_6
1	S111	32.8	1208	19.7	1.63	F	16_12_6
1	S112	31.5	1082	63.3	5.85	M	16_12_6
1	S113	31.1	1046	27.9	2.67	M	16_12_6
1	S114	29.7	944	3.6	0.38	F	16_12_6
1	S115	33.5	1146	4.4	0.38	F	16_12_6
1	S116	32.5	1112	108.5	9.76	M	16_12_6
1	S117	31.2	1164	4.6	0.40	F	16_12_6
1	S118	32.3	1136	4.9	0.43	F	16_12_6
1	S119	32.3	1214	126.1	10.39	M	16_12_6
1	S120	33	1226	17.9	1.46	M	16_12_6

Table 4.2 (続き) ゲノムワイド関連解析およびゲノム予測に用いた解析魚の表現型値、性別および測定日

プール	ID	標準体長 (cm)	BW (g)	GW (g)	GSI	性別	測定日
1	S121	31.7	1198	113.1	9.44	M	16_12_6
1	S122	31.2	854	49.6	5.81	M	16_12_6
1	S123	31.8	1112	19.7	1.77	M	16_12_6
1	S124	30.7	1032	4.9	0.47	F	16_12_6
1	S125	30.2	1078	97.1	9.01	M	16_12_6
1	S126	32.2	1000	100.3	10.03	M	16_12_6
1	S127	29.7	810	9	1.11	M	16_12_6
1	S128	30.5	984	3.6	0.37	F	16_12_6
1	S130	35.2	1168	9.3	0.80	F	16_12_6
1	S131	35	1348	23.5	1.74	F	16_12_6
1	S132	32.1	972	7.1	0.73	F	16_12_6
1	S133	32.2	1132	5.2	0.46	F	16_12_6
1	S134	31	972	3.4	0.35	M	16_12_6
1	S135	33	1092	9.2	0.84	F	16_12_6
1	S136	32.6	1140	5.3	0.46	F	16_12_6
1	S137	32.7	1126	140.1	12.44	M	16_12_6
1	S138	32	1258	101.2	8.04	M	16_12_6
1	S139	30.3	950	8.3	0.87	F	16_12_6
1	S140	31	1172	2.5	0.21	M	16_12_6
1	S141	32.5	1228	10.6	0.86	F	16_12_6
1	S142	29.9	916	11	1.20	F	16_12_6
1	S144	32	1098	7.5	0.68	M	16_12_6
1	S145	30.1	976	3.7	0.38	F	16_12_6
1	S146	33.3	1194	146	12.23	M	16_12_6
1	S147	31.2	954	9.6	1.01	M	16_12_6
1	S148	34.8	1214	9.7	0.80	F	16_12_6
1	S149	31.1	876	7.2	0.82	F	16_12_6
1	S150	31	904	23	2.54	M	16_12_6
1	S151	29.3	938	14.6	1.56	F	16_12_6
1	S152	31.2	1072	3.8	0.35	F	16_12_6
1	S153	31.8	972	7.5	0.77	F	16_12_6
1	S154	30.5	1014	25.4	2.50	M	16_12_6
1	S155	30	816	5.4	0.66	F	16_12_6
1	S157	32	1150	3	0.26	M	16_12_6
1	S159	32.5	1114	12.7	1.14	F	16_12_6
1	S160	30	918	5.2	0.57	M	16_12_6
1	S161	32.7	1208	69.5	5.75	M	16_12_6
1	S162	29.5	1080	90.7	8.40	M	16_12_9
1	S163	30.7	1090	73.4	6.73	M	16_12_6
1	S164	29	708	1.9	0.27	M	16_12_6

Table 4.2 (続き) ゲノムワイド関連解析およびゲノム予測に用いた解析魚の表現型値、性別および測定日

プール	ID	標準体長 (cm)	BW (g)	GW (g)	GSI	性別	測定日
1	S165	32	954	7.4	0.78	F	16_12_6
1	S166	33.4	1266	100.6	7.95	M	16_12_6
1	S167	34.7	1326	24.4	1.84	F	16_12_9
1	S168	29	912	3.1	0.34	F	16_12_6
1	S169	34.7	1302	15.7	1.21	F	16_12_9
1	S170	33.5	1058	10.7	1.01	F	16_12_6
1	S171	31.8	1140	46.9	4.11	M	16_12_6
1	S172	28.8	768	4.2	0.55	F	16_12_6
1	S173	32.7	1230	67.5	5.49	M	16_12_9
1	S174	33.2	1316	152.7	11.60	M	16_12_9
1	S175	31.7	1096	116	10.58	M	16_12_6
1	S176	32.3	1212	15.3	1.26	F	16_12_6
1	S177	31.6	1208	5.1	0.42	F	16_12_6
1	S178	30.6	1086	6.4	0.59	F	16_12_6
1	S179	32.5	1080	36.8	3.41	M	16_12_6
1	S180	31.4	1080	88	8.15	M	16_12_6
1	S181	32.2	1148	4.3	0.37	F	16_12_6
1	S182	32.7	1138	16.9	1.49	F	16_12_6
1	S183	32.3	1202	9.1	0.76	F	16_12_6
1	S184	32.4	1130	15.9	1.41	F	16_12_6
1	S185	33.7	1168	63.1	5.40	M	16_12_6
1	S186	30.7	978	119.5	12.22	M	16_12_6
1	S187	34	1268	102.7	8.10	M	16_12_6
1	S188	32.7	1186	13.4	1.13	F	16_12_6
1	S189	32.6	1304	141	10.81	M	16_12_6
1	S190	30.7	1046	3.9	0.37	F	16_12_6
1	S191	28.7	640	4.1	0.64	F	16_12_6
1	S192	31.7	1308	22.4	1.71	F	16_12_6
1	S193	31	1102	5.2	0.47	F	16_12_6
1	S194	31.5	1064	13.8	1.30	F	16_12_6
1	S195	30.5	912	10.1	1.11	F	16_12_9
1	S196	29	848	32.8	3.87	M	16_12_6
1	S197	32.2	1072	10.5	0.98	F	16_12_6
1	S198	31	866	4.8	0.55	F	16_12_6
1	S199	31	1034	7.6	0.74	F	16_12_6
1	S200	34.5	1258	8.7	0.69	F	16_12_6
1	S201	28.3	908	71.7	7.90	M	16_12_6
1	S202	33.5	1194	17	1.42	F	16_12_7
1	S203	34.6	1404	66.2	4.72	M	16_12_7
1	S204	35.2	1094	9.8	0.90	F	16_12_7

Table 4.2 (続き) ゲノムワイド関連解析およびゲノム予測に用いた解析魚の表現型値、性別および測定日

プール	ID	標準体長 (cm)	BW (g)	GW (g)	GSI	性別	測定日
1	S205	33	1072	16	1.49	F	16_12_7
1	S206	33.4	1198	117.2	9.78	M	16_12_7
1	S207	32	1124	117.4	10.44	M	16_12_7
1	S208	30.3	796	4.1	0.52	F	16_12_7
1	S209	30.6	846	4.9	0.58	F	16_12_7
1	S210	32.2	1042	10.6	1.02	F	16_12_7
1	S211	33.3	1206	NA	NA	F	16_12_7
1	S212	33	990	45.2	4.57	M	16_12_7
1	S213	33.4	1164	10.3	0.88	F	16_12_7
1	S214	34.5	1146	21.7	1.89	F	16_12_7
1	S215	30.2	846	4.4	0.52	F	16_12_7
1	S216	30.6	1060	103.5	9.76	M	16_12_7
1	S217	32.4	984	9	0.91	F	16_12_7
1	S218	28.8	700	3.9	0.56	M	16_12_7
1	S219	30	790	5.6	0.71	F	16_12_7
1	S220	34.3	1382	11.4	0.82	F	16_12_7
1	S221	35.5	1450	18.5	1.28	F	16_12_7
1	S222	27.8	618	1.2	0.19	M	16_12_7
1	S223	32.2	954	13.8	1.45	M	16_12_7
1	S224	31.3	994	100.5	10.11	M	16_12_7
1	S225	31.5	980	8.4	0.86	M	16_12_7
1	S226	33.6	1194	12.2	1.02	F	16_12_7
1	S227	34.2	1254	13.6	1.08	F	16_12_7
1	S228	31	906	5.3	0.58	F	16_12_7
1	S229	35.6	1388	20.4	1.47	F	16_12_7
1	S230	32.7	1104	94.8	8.59	M	16_12_7
1	S231	32.2	950	NA	NA	F	16_12_7
1	S232	31.6	990	4.7	0.47	F	16_12_7
1	S233	31.5	1122	11.6	1.03	F	16_12_7
1	S234	27.5	674	3.7	0.55	F	16_12_7
1	S235	30.9	1060	116	10.94	M	16_12_9
1	S236	32.7	1144	7.9	0.69	F	16_12_7
1	S237	32.7	1218	158.1	12.98	M	16_12_7
1	S238	33.9	1256	145.3	11.57	M	16_12_7
1	S239	33	1318	14.5	1.10	F	16_12_7
1	S240	31.2	902	4.4	0.49	F	16_12_7
1	S241	31.4	1012	9.5	0.94	F	16_12_7
1	S242	33.4	1028	7.9	0.77	F	16_12_7
1	S243	31.7	960	7.5	0.78	F	16_12_7
1	S244	31	982	71.6	7.29	M	16_12_7

Table 4.2 (続き) ゲノムワイド関連解析およびゲノム予測に用いた解析魚の表現型値、性別および測定日

プール	ID	標準体長 (cm)	BW (g)	GW (g)	GSI	性別	測定日
1	S245	33.4	1100	5.8	0.53	F	16_12_7
1	S246	33.2	1034	5.2	0.50	F	16_12_9
1	S247	33.7	1298	133.9	10.32	M	16_12_7
1	S248	35.3	1312	10.9	0.83	F	16_12_7
1	S249	29.4	902	56.9	6.31	M	16_12_7
1	S250	33.8	1234	46.6	3.78	M	16_12_7
1	S251	30.1	1002	95.4	9.52	M	16_12_7
1	S252	31	948	8.1	0.85	M	16_12_7
1	S253	33.7	1322	136.9	10.36	M	16_12_15
1	S254	29.9	942	4.3	0.46	F	16_12_7
1	S255	29.1	738	4	0.54	F	16_12_7
1	S256	31.4	1070	10.3	0.96	F	16_12_7
1	S257	29.4	872	NA	NA	F	16_12_7
1	S258	32	1010	NA	NA	pseudoM	16_12_7
1	S259	33.2	1104	47.1	4.27	M	16_12_7
1	S260	35.1	1414	133.3	9.43	M	16_12_7
1	S261	29.3	772	4.7	0.61	F	16_12_7
1	S262	33.2	1080	9.4	0.87	F	16_12_7
1	S263	29.4	834	5.3	0.64	F	16_12_7
1	S264	34.6	1344	22	1.64	F	16_12_7
1	S265	32.2	954	64.6	6.77	M	16_12_7
1	S266	32.5	1240	160.3	12.93	M	16_12_7
1	S267	31.8	1206	NA	NA	M	16_12_9
1	S268	32.3	1184	9.3	0.79	F	16_12_7
1	S269	31.9	1100	59.7	5.43	M	16_12_7
1	S270	32.4	1158	18.6	1.61	F	16_12_9
1	S271	35.3	1526	9.4	0.62	F	16_12_7
1	S272	30.9	874	39.4	4.51	M	16_12_7
1	S273	27.7	764	3.1	0.41	M	16_12_7
1	S274	31.4	1082	17.5	1.62	F	16_12_7
1	S275	28.6	744	1.6	0.22	M	16_12_7
1	S276	32.7	1176	8.6	0.73	F	16_12_7
1	S277	33.9	1408	73.8	5.24	M	16_12_7
1	S278	36	1462	23.1	1.58	F	16_12_7
1	S279	34.1	1334	10.9	0.82	F	16_12_7
1	S280	33.2	1118	104.9	9.38	M	16_12_7
1	S281	35.1	1324	18.4	1.39	F	16_12_7
1	S282	26.6	650	1.3	0.20	M	16_12_7
1	S283	33.4	1194	15.5	1.30	F	16_12_7
1	S284	31.2	974	6.5	0.67	F	16_12_7

Table 4.2 (続き) ゲノムワイド関連解析およびゲノム予測に用いた解析魚の表現型値、性別および測定日

プール	ID	標準体長 (cm)	BW (g)	GW (g)	GSI	性別	測定日
1	S285	33.1	1044	9.1	0.87	F	16_12_7
1	S287	33	1234	21.2	1.72	F	16_12_7
1	S288	31.5	1068	69.4	6.50	M	16_12_7
1	S289	33.4	1164	14.2	1.22	F	16_12_7
1	S290	30.1	844	12	1.42	M	16_12_7
1	S291	30.3	862	24.8	2.88	M	16_12_7
1	S292	28.3	672	2.6	0.39	F	16_12_7
1	S293	31.6	1020	41.1	4.03	M	16_12_7
1	S294	31.6	1068	66.3	6.21	M	16_12_7
1	S295	34.6	1452	140.1	9.65	M	16_12_7
1	S296	30.9	934	6.8	0.73	F	16_12_7
1	S297	29.3	864	3.8	0.44	F	16_12_7
1	S298	34	1298	190.2	14.65	M	16_12_7
1	S299	34.3	1322	20.5	1.55	F	16_12_7
1	S300	29.6	948	39.9	4.21	M	16_12_7
1	S301	31	1032	54.3	5.26	M	16_12_7
1	S302	31.5	1110	112.7	10.15	M	16_12_9
1	S303	36.1	1370	0.6	0.04	M	16_12_9
1	S304	32.4	1078	20.8	1.93	F	16_12_9
1	S305	33.3	1176	7.8	0.66	F	16_12_9
1	S306	32.3	1064	14.6	1.37	F	16_12_9
1	S307	32.3	1216	105.6	8.68	M	16_12_9
1	S308	32.9	1168	81.7	6.99	M	16_12_9
1	S309	34.7	1206	0.4	0.03	pseudoM	16_12_9
1	S310	32.6	1352	113.7	8.41	M	16_12_9
1	S311	36.9	1412	11.8	0.84	F	16_12_9
1	S312	36.6	1498	24.2	1.62	F	16_12_9
1	S314	34.3	1306	10.4	0.80	F	16_12_9
1	S315	36.3	1540	0.5	0.03	pseudoM	16_12_9
1	S316	33.2	1258	132.6	10.54	M	16_12_9
1	S317	35	1210	18.4	1.52	F	16_12_9
1	S318	31.9	1004	11.6	1.16	F	16_12_9
1	S319	30.4	932	70.3	7.54	M	16_12_9
1	S320	31.8	1010	NA	NA	F	16_12_9
1	S321	33.2	1170	8.9	0.76	F	16_12_9
1	S322	33.8	1090	9	0.83	F	16_12_9
1	S324	32.1	1086	14.7	1.35	F	16_12_9
1	S325	30.8	1080	9	0.83	F	16_12_9
1	S327	32.5	1140	68.9	6.04	M	16_12_9
1	S328	32.6	1048	14.7	1.40	F	16_12_9

Table 4.2 (続き) ゲノムワイド関連解析およびゲノム予測に用いた解析魚の表現型値、性別および測定日

プール	ID	標準体長 (cm)	BW (g)	GW (g)	GSI	性別	測定日
1	S329	30.7	942	8.2	0.87	F	16_12_9
1	S330	34.8	1272	8.7	0.68	F	16_12_9
1	S331	31.8	1060	60.9	5.75	M	16_12_9
1	S332	32.3	1154	117.2	10.16	M	16_12_9
1	S335	32.3	1074	74	6.89	M	16_12_9
1	S336	33.2	1110	16.6	1.50	F	16_12_9
2	S337	35.8	1600	176.4	11.03	M	16_12_9
2	S338	31.3	1086	NA	NA	pseudoM	16_12_9
2	S339	33.7	1164	17.1	1.47	F	16_12_9
2	S340	33.9	1232	148.2	12.03	M	16_12_9
2	S341	33.8	1276	12.2	0.96	F	16_12_9
2	S342	30.4	1016	7.5	0.74	F	16_12_9
2	S343	38	1542	14.8	0.96	F	16_12_9
2	S344	31.8	1114	NA	NA	pseudoM	16_12_9
2	S345	31.8	1156	157.7	13.64	M	16_12_9
2	S346	31.9	1034	13.3	1.29	F	16_12_9
2	S347	33	1136	18.9	1.66	F	16_12_9
2	S348	35.9	1236	NA	NA	F	16_12_9
2	S349	32.8	1128	22	1.95	F	16_12_9
2	S350	30.4	910	6.8	0.75	F	16_12_9
2	S351	33.4	1356	153.6	11.33	M	16_12_9
2	S352	31.9	1164	93.1	8.00	M	16_12_9
2	S353	30.6	1128	84.2	7.46	M	16_12_9
2	S354	34.3	1154	6.9	0.60	F	16_12_9
2	S355	32.3	1186	15.7	1.32	F	16_12_9
2	S356	32.6	1156	21.3	1.84	F	16_12_9
2	S357	32.8	1296	11.6	0.90	F	16_12_9
2	S358	29.2	998	99.7	9.99	M	16_12_9
2	S359	30.7	906	9.6	1.06	F	16_12_9
2	S360	28.8	840	9.2	1.10	M	16_12_9
2	S361	36.3	1382	15.2	1.10	F	16_12_9
2	S362	34.8	1324	20.1	1.52	F	16_12_9
2	S363	33.2	1108	8.3	0.75	F	16_12_9
2	S364	34.7	1172	17.8	1.52	F	16_12_9
2	S365	32.3	1150	13.7	1.19	F	16_12_9
2	S366	31.7	1042	89.9	8.63	M	16_12_9
2	S367	33.6	1036	5.7	0.55	F	16_12_9
2	S368	33.5	1172	14.6	1.25	F	16_12_9
2	S369	29.6	924	12	1.30	M	16_12_9
2	S370	31.4	1196	60	5.02	M	16_12_15

Table 4.2 (続き) ゲノムワイド関連解析およびゲノム予測に用いた解析魚の表現型値、性別および測定日

プール	ID	標準体長 (cm)	BW (g)	GW (g)	GSI	性別	測定日
2	S371	32	1250	42.6	3.41	M	16_12_15
2	S372	29.9	860	5.4	0.63	M	16_12_15
2	S373	32.2	1292	115.4	8.93	M	16_12_15
2	S377	30.2	1014	104.9	10.35	M	16_12_15
2	S378	30.6	822	3.5	0.43	F	16_12_15
2	S379	31.6	1098	9.7	0.88	F	16_12_15
2	S380	31.5	1044	71.7	6.87	M	16_12_15
2	S381	30.2	816	2.6	0.32	M	16_12_15
2	S382	31.2	1122	91.5	8.16	M	16_12_15
2	S383	28.8	772	2.9	0.38	F	16_12_15
2	S384	30	756	1.6	0.21	M	16_12_15
2	S386	29.3	1014	4	0.39	F	16_12_15
2	S387	30.6	1018	NA	NA	F	16_12_15
2	S388	29.5	774	1.1	0.14	M	16_12_15
2	S389	31.7	890	11.5	1.29	M	16_12_15
2	S390	32.9	1380	99.5	7.21	M	16_12_15
2	S391	31	1028	4.9	0.48	F	16_12_15
2	S392	30.4	940	1.4	0.15	M	16_12_15
2	S393	28.7	832	4.1	0.49	F	16_12_15
2	S394	28.5	914	NA	NA	F	16_12_15
2	S395	31.5	1102	18	1.63	M	16_12_15
2	S396	32	1192	9.1	0.76	F	16_12_15
2	S397	31.5	1038	33.2	3.20	M	16_12_15
2	S398	28.9	722	5.2	0.72	F	16_12_15
2	S399	30.7	990	2.9	0.29	M	16_12_15
2	S400	33	1340	108.9	8.13	M	16_12_15
2	S401	31.2	1028	4.6	0.45	F	16_12_15
2	S402	31	1170	132.1	11.29	M	16_12_15
2	S403	33.2	1112	3.2	0.29	M	16_12_15
2	S404	29.6	826	3.8	0.46	F	16_12_15
2	S405	32.7	1084	55.8	5.15	M	16_12_15
2	S406	30.4	822	4.1	0.50	M	16_12_15
2	S407	30.9	1010	5.2	0.51	F	16_12_15
2	S408	31.8	940	4.2	0.45	M	16_12_15
2	S409	33.7	1294	117.7	9.10	M	16_12_15
2	S410	27.8	740	1.6	0.22	M	16_12_15
2	S411	31.8	1192	131.1	11.00	M	16_12_15
2	S412	31.9	1214	120.4	9.92	M	16_12_15
2	S414	30.7	898	54.1	6.02	M	16_12_15
2	S415	32.6	1288	16.4	1.27	F	16_12_15

Table 4.2 (続き) ゲノムワイド関連解析およびゲノム予測に用いた解析魚の表現型値、性別および測定日

プール	ID	標準体長 (cm)	BW (g)	GW (g)	GSI	性別	測定日
2	S416	28.2	724	1.5	0.21	M	16_12_15
2	S417	34.7	1344	101.8	7.57	M	16_12_15
2	S418	33.8	994	5.5	0.55	F	16_12_15
2	S419	29.9	724	5	0.69	M	16_12_15
2	S420	35	1186	8	0.67	F	16_12_15
2	S422	33.4	1110	6.1	0.55	F	16_12_15
2	S423	30.2	808	28.1	3.48	M	16_12_15
2	S424	34.2	1128	130.9	11.60	M	16_12_15
2	S425	32.7	1224	101.7	8.31	M	16_12_15
2	S426	32.5	1110	5.4	0.49	F	16_12_15
2	S427	33.6	1076	4.9	0.46	F	16_12_15
2	S428	32	988	6	0.61	F	16_12_15
2	S429	33.7	1266	10.1	0.80	F	16_12_15
2	S430	34	1300	111.8	8.60	M	16_12_15
2	S431	32	1042	6.6	0.63	F	16_12_15
2	S432	34.6	1178	9.2	0.78	F	16_12_15
2	S433	33.8	1274	NA	NA	pseudoM	16_12_15
2	S434	34.6	1104	28.2	2.55	M	16_12_15
2	S435	33	1218	134.2	11.02	M	16_12_15
2	S436	33.6	1156	5.4	0.47	F	16_12_15
2	S437	32.9	1090	2.1	0.19	M	16_12_15
2	S438	31	970	96.2	9.92	M	16_12_15
2	S439	34.4	1228	120.1	9.78	M	16_12_15
2	S440	32	1078	24.4	2.26	F	16_12_15
2	S441	32.5	1270	136.9	10.78	M	16_12_15
2	S442	33.3	1068	6	0.56	F	16_12_15
2	S443	31.9	1154	114.1	9.89	M	16_12_15
2	S444	32.9	1298	111.3	8.57	M	16_12_15
2	S445	32.2	1050	39.1	3.72	M	16_12_15
2	S446	32.6	1186	79.7	6.72	M	16_12_15
2	S447	32.5	922	6.6	0.72	F	16_12_15
2	S448	31.5	1008	3.5	0.35	M	16_12_15
2	S449	33	1014	NA	NA	F	16_12_15
2	S450	34.4	1282	10.2	0.80	F	16_12_15
2	S451	30.7	1020	80.2	7.86	M	16_12_15
2	S452	33.4	1246	11.6	0.93	F	16_12_15
2	S453	30.7	778	3.7	0.48	M	16_12_15
2	S454	33.5	1222	160	13.09	M	16_12_15
2	S455	32.2	1026	141.9	13.83	M	16_12_15
2	S456	33.2	1170	7.1	0.61	F	16_12_15

Table 4.2 (続き) ゲノムワイド関連解析およびゲノム予測に用いた解析魚の表現型値、性別および測定日

プール	ID	標準体長 (cm)	BW (g)	GW (g)	GSI	性別	測定日
2	S457	32.3	1224	19	1.55	M	16_12_15
2	S458	35	1412	116.2	8.23	M	16_12_15
2	S459	32.5	1094	5.5	0.50	F	16_12_15
2	S460	31.6	1158	134	11.57	M	16_12_15
2	S461	32	1184	118.7	10.03	M	16_12_15
2	S462	32.6	1120	111.2	9.93	M	16_12_15
2	S463	32	1012	3.1	0.31	M	16_12_15
2	S464	31.4	900	68.7	7.63	M	16_12_15
2	S465	31.5	1086	131.6	12.12	M	16_12_15
2	S466	33.6	1074	NA	NA	pseudoM	16_12_15
2	S467	34.1	1294	106.5	8.23	M	16_12_15
2	S468	34	1244	97.7	7.85	M	16_12_15
2	S471	31.3	964	6.4	0.66	F	16_12_9
2	S484	35	1382	27.7	2.00	F	16_12_9
2	S486	31.8	1054	70.7	6.71	M	16_12_9
2	S490	34.7	1308	163.3	12.48	M	16_12_9
3	S881	33	1040	12.5	1.20	F	16_12_6
3	S882	30	1002	4.8	0.48	F	16_12_6
3	S883	29.5	1000	5.5	0.55	F	16_12_6
3	S884	33	1218	12.5	1.03	M	16_12_6
3	S885	29.5	938	7.8	0.83	M	16_12_6
3	S886	31.5	1024	89	8.69	M	16_12_6
3	S887	29	804	6.1	0.76	F	16_12_6
3	S888	28	972	30.6	3.15	M	16_12_6
3	S889	32.5	1130	27.3	2.42	M	16_12_6
3	S890	29.8	950	2.9	0.31	M	16_12_6
3	S891	28.5	822	38.8	4.72	M	16_12_6
3	S892	31	1070	4.9	0.46	F	16_12_6
3	S893	31	1128	10	0.89	F	16_12_6
3	S894	32	1112	7.7	0.69	F	16_12_6
3	S895	30.8	938	20.1	2.14	F	16_12_6
3	S896	31.5	1088	17.7	1.63	F	16_12_6
3	S897	29.8	988	13.2	1.34	M	16_12_6
3	S898	32.2	1040	6.5	0.63	M	16_12_6
3	S899	30.7	912	21.5	2.36	M	16_12_6
3	S900	30.5	992	3.7	0.37	M	16_12_6
3	S901	32	1090	26.2	2.40	M	16_12_6
3	S902	31.2	1012	83.5	8.25	M	16_12_6
3	S903	34.4	1230	25	2.03	F	16_12_6
3	S904	32.4	1136	94	8.27	M	16_12_6

Table 4.2 (続き) ゲノムワイド関連解析およびゲノム予測に用いた解析魚の表現型値、性別および測定日

プール	ID	標準体長 (cm)	BW (g)	GW (g)	GSI	性別	測定日
3	S905	31.2	1064	14.2	1.33	F	16_12_6
3	S906	28	726	1.8	0.25	M	16_12_7
3	S908	31	1148	5.9	0.51	F	16_12_7
3	S911	33.2	1136	101.8	8.96	M	16_12_9
3	S912	33.7	1184	14.7	1.24	F	16_12_9
4	S1009	32	1054	6.5	0.62	F	16_12_6
4	S1010	32.6	1104	14.9	1.35	M	16_12_7
4	S1011	30.2	792	3.7	0.47	F	16_12_7
4	S1012	33.7	1408	132	9.38	M	16_12_7
4	S1013	32.2	1196	158.2	13.23	M	16_12_7
4	S1014	33.6	1162	13.4	1.15	F	16_12_9
4	S1015	32.4	958	4.9	0.51	F	16_12_9
4	S1016	33.2	1222	129.5	10.60	M	16_12_9
4	S1017	33.2	1164	141.6	12.16	M	16_12_9
4	S1018	35.3	1412	23.4	1.66	F	16_12_9
4	S1019	30	890	5.1	0.57	F	16_12_15
4	S1020	30.1	868	23.8	2.74	M	16_12_15
4	S1021	28.5	732	4	0.55	F	16_12_15
4	S1022	29.7	752	0.9	0.12	M	16_12_15
4	S1023	31.8	956	2.5	0.26	M	16_12_15
4	S1024	32.5	962	4.7	0.49	F	16_12_15

Table 4.3 GBLUP 法により推定した各表現型の狭義の遺伝率、観察値と予測値の相関係数、および、交差検定で算出した予測正確度

表現型	遺伝率	相関係数 ^a	予測正確度 (\pm SE) ^b
標準体長	0.44	0.65	0.58 \pm 0.00
体重	0.33	0.58	0.50 \pm 0.01
精巣重量	0.30	0.72	0.62 \pm 0.01
GSI	0.34	0.76	0.61 \pm 0.01

^a 解析魚集団における観察値と GEBV の相関

^b 予測能力（上記の相関係数）を狭義の遺伝率の平方根で除した値

```

#!/bin/bash
#sh TRIM.sh 1&>TRIM.log 2&>TRIM.err

PROJECT=project_name
DIR=/home/user1/${PROJECT}
CODES=${DIR}/CODES
REF=${WD}/REF/fugu5_chromosomes.fa      #FUGU5/fr3 fasta sequence file
SAMPLES=${DIR}/Sample.Name.list
TRIMMO=/opt/software/Trimmomatic -0.38/trimmomatic -0.38.jar
mkdir ${DIR}/TRIM/
mkdir ${DIR}/BWA/

FIRST=POOL_1
SECOND= POOL_2
THRID= POOL_3
FOURTH= POOL_4

for k in POOL_1 POOL_2 POOL_3 POOL_4
do

for i in `cat ${CODES}/${k}.list`
do

time=$(date)
echo Trimming_$(i) ${time}
FASTQ=${DIR}/FASTQ/${k}/${i}
mkdir ${DIR}/TRIM/${i}
TRIM=${DIR}/TRIM/${i}

java -jar ${TRIMMO} ¥
PE -threads 32 ¥
${FASTQ}/*_R1_*.gz ${FASTQ}/*_R2_*.gz ¥
${TRIM}/${S}${i}_paired_R1.fq.gz" ${TRIM}/${S}${i}_unpaired_R1.fq.gz" ¥
${TRIM}/${S}${i}_paired_R2.fq.gz" ${TRIM}/${S}${i}_unpaired_R2.fq.gz" ¥
ILLUMINACLIP:/opt/software/Trimmomatic -0.38/adapters/TruSeq2 -PE.fa:2:30:10 SLIDINGWINDOW:30:20 AVGQUAL:20

mkdir ${DIR}/BWA/${i}
BWA=${DIR}/BWA/${i}

bwa mem -t 32 -M ${REF} ${TRIM}/${S}${i}_paired_R1.fq.gz" ${TRIM}/${S}${i}_paired_R2.fq.gz" -R "@RG ¥ID:S"${i}"¥tSM:S"${i}"¥tPL:Illumina" >
${BWA}/${i}.sam"
samtools view -b -@ 32 -o ${BWA}/${i}.bam" ${BWA}/${i}.sam"
samtools sort -n -@ 32 -o ${BWA}/${i}_namesort.bam" ${BWA}/${i}.bam
samtools fixmate -@ 32 -m ${BWA}/${i}_namesort.bam" ${BWA}/${i}_fixmate.bam
samtools sort -@ 32 -o ${BWA}/${S}${i}_sorted.bam" ${BWA}/${i}_fixmate.bam
samtools index ${BWA}/${S}${i}_sorted.bam

rm ${BWA}/${i}.sam
rm ${BWA}/${i}.bam
rm ${BWA}/${i}_namesort.bam
rm ${BWA}/${i}_fixmate.bam

done

done

```

Script 4.1 Ampliseq 法で得られたリードのトリミングおよび参照ゲノム配列 (FUGU/5fr3) にマッピングした際に用いたスクリプト。出力された SAM ファイルは BAM ファイルに変換し、併せてリードの並び替えとペア情報の修正を行った。


```

#!/bin/bash
#sh GATK_parallel.sh 1&>GATK_parallel.log 2&>GATK_parallel.err

PROJECT=project_name
DIR=/home/user1/${PROJECT}
SAMPLES=${DIR}/Sample.Name.list
mkdir ${DIR}/GATK/

echo "START -----"

REF=${DIR}/REF/fugu5_chromosomes.fa      #FUGU5/fr3 fasta sequence file
BWA=${DIR}/BWA
GATK=${DIR}/GATK
gatk=/opt/software/gatk-4.1.4.0/gatk

### Use gnu-parallel to use multiple cores
cd ${DIR}
cat ./CODES/bam.list | parallel --verbose -j 8 "${gatk} HaplotypeCaller ¥
--output-mode EMIT_ALL_CONFIDENT_SITES ¥
-ERC BP_RESOLUTION ¥
-stand-call-conf 30 ¥
-R ${REF} ¥
-l ${DIR}/BWA/{}S{}_sorted.bam ¥
-O ${DIR}/GATK/S{}_GATK.vcf.gz"

cat Sample.Name.list | parallel --verbose -j 8 "${gatk} ¥GenotypeGVCFs ¥
-all-sites true ¥
-R ${REF} ¥
--variant ${DIR}/GATK/{}_GATK.vcf.gz¥
-O ${DIR}/GATK/{}_GATK_EMITALL.vcf.gz"

rm ${DIR}/GATK/*_GATK.vcf.gz
rm ${DIR}/GATK/*_GATK.vcf.gz.tbi

cat Sample.Name.list | parallel --verbose -j 32 "vcftools ¥
--gzvcf ${DIR}/GATK/{}_GATK_EMITALL.vcf.gz--minDP 5 --minQ 30 --remove-indels ¥
--recode --stdout | grep -F -v "./" > ${DIR}/GATK/{}_GATK_filtered.recode.vcf"

rm ${DIR}/GATK/*_GATK_EMITALL.vcf.gz
rm ${DIR}/GATK/*_GATK_EMITALL.vcf.gz.tbi

cat Sample.Name.list | parallel --verbose -j 32 "bgzip ${DIR}/GATK/{}_GATK_filtered.recode.vcf"
cat Sample.Name.list | parallel --verbose -j 32 "tabix ${DIR}/GATK/{}_GATK_filtered.recode.vcf.gz"

cat Sample.Name.list | parallel --verbose -j 32 ¥
"zcat ${DIR}/GATK/S{}_GATK_filtered.recode.vcf.gz | sed-e 's/AD,Number=R/AD,Number=¥/g' > ${DIR}/GATK/S{}_GATK_filtered.corrected.vcf"
cat Sample.Name.list | parallel --verbose -j 32 "bgzip ${DIR}/GATK/S{}_GATK_filtered.corrected.vcf"
cat Sample.Name.list | parallel --verbose -j 32 "tabix -p vcf ${DIR}/GATK/S{}_GATK_filtered.corrected.vcf.gz"

rm ${DIR}/GATK/*_GATK_filtered.recode.vcf.gz
rm ${DIR}/GATK/*_GATK_filtered.recode.vcf.gz.tbi

echo "FINISH -----"

mkdir ${DIR}/JOINT/
JOI=${DIR}/JOINT

ls ${GATK}/*.corrected.vcf.gz | sort -V > ${JOI}/GATK.vcf.list

bcftools merge -l ${JOI}/GATK.vcf.list | bcftools view -m2 -M2 -v snps -q 0.01:minor -Q 0.4:minor -Oz -o ${JOI}/Merged.vcf.gz
tabix -p vcf ${JOI}/Merged.vcf.gz

```

Script 4.2 マッピングされたリードを多型の判定したスクリプト。多型の有無にかかわらず 1 塩基毎に配列を決定した。得られた VCF ファイルは配列挿入と欠失、低品質な SNP、ならびに塩基情報が欠測したサイトを除外した。最後にアレル数が 2 つのサイトのみを抽出してマージした。

```

PROJECT=project_name
DIR=/home/user1/ ${PROJECT}
GATK=${DIR}/GATK
JOI=${DIR}/JOINT

vcftools --gzvcf ${JOI}/Merged.vcf.gz --maf 0.01 --remove-indels --max-missing 0.6 ¥
--recode --out ${JOI}/Merged.filtered

bgzip ${JOI}/Merged.filtered.recode.vcf;tabix -p vcf ${JOI}/Merged.filtered.record.vcf.gz
bcftools sort ${JOI}/Merged.filtered.record.vcf.gz -Oz -o ${JOI}/Merged.filtered.sorted.vcf.gz;tabix -p vcf ${JOI}/Merged.filtered.sorted.vcf.gz

vcftools --gzvcf ${JOI}/Merged.filtered.sorted.vcf.gz --plink --chrom-map ~/CODES/Chrom.map --out ${JOI}/Merged.filtered.sorted
plink --noweb --file ${JOI}/Merged.filtered.sorted --make-bed --out ${JOI}/Merged.filtered.sorted

mkdir ${DIR}/SHUF
SHUF=${DIR}/SHUF
FILE=Merged.filtered.sorted.imputed

#sudo update-alternatives --config java
java -jar /opt/software/LinkImpute.jar -q ${JOI}/Merged.filtered.sorted.ped ${SHUF}/${FILE}.ped
cp ${JOI}/Merged.filtered.sorted.map ${SHUF}/${FILE}.map
awk '{print $2}' ${SHUF}/${FILE}.map > ${SHUF}/${FILE}.SNPs

plink --noweb --file ${SHUF}/${FILE} --make-bed --out ${DIR}/${FILE}
plink --noweb --bfile ${DIR}/${FILE} --recodeA --out ${DIR}/${FILE}

sed -n 1p ${DIR}/${FILE}.raw | cut -d" " -f1,7- | sed -e "s/FID/g" > ${DIR}/${FILE}.head
sed "1d" ${DIR}/${FILE}.raw | cut -d" " -f1,7- | sort -V > ${DIR}/${FILE}.geno
cat ${DIR}/${FILE}.head ${DIR}/${FILE}.geno > ${DIR}/${FILE}.final.raw

```

Script 4.3 全個体の変異データをマージした後に低品質 SNP を除去し、欠測アレルを補完した際に用いたスクリプト。生成したインピュテーションファイルは PLINK と bash コマンドにより、rrBLUP 用のインプットファイルに変換した。

```
DIR=project_name
GATK=${DIR}/GATK

FILE=file_name_imputed

cd /${DIR}
mkdir ADMIXTURE
ADM=${DIR}/ADMIXTURE
cd ${ADM}

awk '{ $1=0; print $0 }' $FILE.bim > $FILE.bim.tmp
mv $FILE.bim.tmp $FILE.bim

for i in {1..20}
do
  admixture --cv $FILE.bed -j8 $i > log${i}.out
done

grep "CV" *out | awk '{ print $3,$4 }' | sed -e 's/(//;s/)//;s/://;s/K=//' > $FILE.cv.error

awk '{ split($1,name, "."); print $1,name[2] }' ${FILE}.nosex > $FILE.list
```

Script 4.4 ADMIXTURE 解析に用いたスクリプト。解析には Script 4.3 で生成したインピュテーション後のファイル (Merged.filtered.sorted.imputed.*) を用いた。共通祖先数 (K) を 1–20 の範囲で指定し、5 分割の交差検証 (デフォルト設定) を行った。

```

library(adegenet);library(ggtree)

# read data
WDIR=paste("Project_name", sep="")
setwd(WDIR)

INFILE=paste("sample_genotype.raw", sep="")
geno <- read.table(INFILE, header=T, check.names =F)
pheno <- read.table("sample.pheno", sep="¥t", header=T)

SID <- as.character(pheno$SID)
DATE <- as.character(pheno$DATE)

geno <- cbind(SID,DATE,geno)

# file convert
locus <- geno[, -c(1, 2)]
geno1 <- df2genind(locus, ploidy = 2, ind.names = SID, sep="")

# calculate genetic distance
###euclidean distance
D_euc <- dist(geno1, method = "euclidean",
              diag = FALSE, upper = FALSE, p = 2 )

# Make Dendrogram
# method = ward.D
h1 <- hclust(D_euc, method="ward.D")

tree <- ggtree(h1)
tree <- tree[["data"]]

p <- ggtree(tree)

```

Script 4.5 解析魚の血縁解析に用いた R スクリプト。解析には Script 4.3 で生成したインピュテーション後のファイル (Merged.filtered.sorted.imputed.final.raw) を用いた。dist 関数により個体間のユークリッド遺伝距離を算出し、ggtree パッケージを用いて血縁関係を可視化した。

```

library(rrBLUP);library(ggplot2) ;library(pcaMethods);library(qqman);library(glmnet)

#####
###Phenotype
#####
WDIR=paste("Project_name ", sep="")
setwd(WDIR)

pheno3 <- read.table(" sample.pheno", sep="¥t", header=T)
pheno3$GW[pheno3$SEX!=1] <- NA #mask phenotypes (GW) of females
pheno3$GSI[pheno3$SEX!=1] <- NA #mask phenotypes (GSI) of females

#####
###genotype
#####
INFILE=paste(" genotype .raw", sep="")
geno <- read.table(INFILE)
geno <- as.matrix(geno) -1 #convert 0/1/2 -> -1/0/1

#####
###SNP information (name and position)
#####
SNPname <- read.csv("SNPname.txt", sep=" ¥t", header=T)

#####
###run GWAS for phenotype X
#####
y <- data.frame(pheno3[,c(1,2,9)]) # chose SID, (phenodata), DATE
y <- na.omit(y, y[,2]) # remove missing elements

# select samples with ids contained in rownames
gt.wp <- geno[rownames(geno) %in% y$SID,]

# merge Chromosome_number,pos,genotype for GWAS
gt.wp <- rbind(t(SNPname),gt.wp)

#make distance matrix
amat <- A.mat(gt.wp[,c(1,2),], shrink = T)

#make g file for GWAS
g <- data.frame(colnames(gt.wp),t(gt.wp))
rownames(g) <- 1:nrow(g)
colnames(g) <- c("marker", "chrom", "pos", rownames(gt.wp)[ -c(1,2),])

# prepare phenotypic value for GWAS
p <- data.frame(y[,c(1,2,3)])
colnames(p) <- c("gid", "y", "DATE")

# GWAS with Q (population structure) + K (kinship relatedness)
# minor allele frequencuy is set as 0.05
# including fixed effect as sampling date
gwa <- GWAS(p, g, fixed = "DATE", K = amat, n.P C = 10, min.MAF = 0.05, plot = F)

# replace -log P = 0 with NA
gwa$y[gwa$y == 0] <- NA

# draw manhattan plot
mht_SL <- data.frame(SNP = gwa$marker, CHR = gwa$chrom, BP = gwa$pos, P=10^(-gwa$y))
mht_SL <- na.omit(mht_SL)
manhattan(mht_SL,col = c("blue4", "orange3"), ylim = c(0,6), suggestiveline = -log10(0.05/5583))

# draw qq plot
qq(mht_SL$P)

# there are no significant SNP

```

Script 4.6 ゲノムワイド関連解析 (GWAS) および BLUP 法によりゲノム予測を行った R スクリプト。解析には、解析魚 501 個体の表現型データ (Table 4.2) と Script 4.3 で生成したインピュテーション後のファイルを用いた。GWAS およびゲノム予測のいずれにおいても固定効果として測定日 (DATE) をモデル中に含めた。GWAS には PK モデルを採用し、主成分には寄与率の上位 10 成分を含めた。また、最小アレル頻度は 5% 以上とした。ゲノム予測は 10 分割の交差検定を 10 ステップ繰り返し、狭義の遺伝率から予測正確度を算出した。

```
#####
##run GS for phenotype X
#####
# build a model with GBLUP
# including fixed effect as sampling date
GBLUP_SL <- kin.blup(pheno3, K=amat,geno="SID", pheno="phenotype X", fixed="DATE")

# heritability
(h2_GBLUP_PHENO <- GBLUP_PHENO$Vg/(GBLUP_PHENO$Vg+GBLUP_PHENO$Ve))

# compare the observed value and predicted value
gPHENO.wp <- pred_PHENO[pred_PHENO$SID %in% y$SID,]

plot(gPHENO.wp$PHENO,gPHENO.wp$GEBV_PHENO)
abline(0,1)

# cross validation, ten -fold
n.fold = 10
SID = y$SID
id <- 1:length(SID) %% n.fold + 1

Pacc <- c()
for(j in 1:10){
  print(j)
  pheno_test <- pheno3[pheno3$SID %in% SID,]
  # rearrange randomly
  cv.id <- sample(id)
  pheno_test <- cbind(pheno_test,cv.id)

  cor <- c()
  for(i in 1:n.fold){
    print(i)
    train.pheno <- subset(pheno_test, cv.id != i)
    valid.pheno <- subset(pheno_test, cv.id == i)
    train.GBLUP_PHENO <- kin.blup(train.pheno,K=amat,geno="SID" , pheno="PHENO", fixed="DATE")
    GEBV_PHENO = train.GBLUP_PHENO$pred
    GEBV_PHENO = GEBV_PHENO[rownames(GEBV_PHENO) %in% valid.pheno$SID]
    pred_PHENO <- data.frame( PHENO=valid.pheno$ PHENO, GEBV_PHENO)
    cor <- c(cor, cor(pred_PHENO$GEBV_PHENO,pred_PHENO$PHENO))
  }

  # calculate prediction ability
  mean_Pabi <- mean(cor)
  sd_Pabi <- sd(cor)

  # calculate prediction accuracy
  Pacc <- c(Pacc,mean_Pabi/sqrt(h2_GBLUP_ PHENO))
  rm(pheno_test)
}

cor
Pacc
```

Script 4.6 (続き)