

短 報
Note

# マイクロサテライト遺伝子座を利用した 日本産ハーバーシールの個体識別法

水野米利子\*・小林万里\*\*\*†・佐々木 剛\*\*\*

(令和元年5月23日受付/令和元年12月6日受理)

**要約:**近年では、糞、毛、羽などから遺伝情報が得られるようになり、銃やボーガンを使用して、遠距離から非直接的なサンプルが取れるようになった。しかし、このようなサンプルは、同一個体から複数回サンプリングしてしまう可能性があるため、遺伝子による個体識別が必要不可欠である。遺伝子を利用した個体識別は、一般的に複数のマイクロサテライト遺伝子座を使って行われる。個体識別に必要な遺伝子座とその数は、事前に既知のデータから遺伝子座ごとに重複率 ( $P_{ID}$ : probability of identity)  $P_{ID(obs)}$  を算出して決定しておくことが望ましい。しかし、サンプル数が多く手に入らない場合、得られたサンプルの範囲内で予測値を推定する方法がある。 $P_{ID}$  の予測値には、ハーディー・ワインベルグ平衡下の集団で血縁のない個体間の重複率 ( $P_{ID(theo)}$ ) と、兄弟関係にある個体間の重複率 ( $P_{ID(sib)}$ ) があり、実際の集団の重複率は、 $P_{ID(theo)}$  を下限、 $P_{ID(sib)}$  を上限と2つの予測値の間に位置するため、多くの動物では、 $P_{ID(sib)}$  の利用が推奨されている。本研究では、先行研究で集団が分かれることが示唆されているえりもと道東のハーバーシール2集団で、別個体と判明しているサンプルを基に  $P_{ID(obs)}$  と、2つの予測値を比較し、個体識別に必要な遺伝子座および遺伝子座数、予測値を算出するのに必要なサンプル数を決定した。その結果、日本のハーバーシールの  $P_{ID(obs)}$  は、 $P_{ID(theo)}$  とほぼ同等の値であり、4遺伝子座の使用で個体識別が可能であることを示した。一方で、個体識別に適した遺伝子座は、えりもと道東で異なった。さらに、日本のハーバーシールでは、20サンプルから  $P_{ID(theo)}$  を算出すれば、個体識別に有用な遺伝子座数の決定が行えることが示唆された。

**キーワード:** 個体識別,  $P_{ID}$ , 日本産ハーバーシール, ゼニガタアザラシ, *Phoca vitulina stejnegeri*

## 1. はじめに

野生生物を個体識別出来ることで、特定の個体が、いつ、どこに居るのかの情報が収集でき、その結果、対象種の縄張りや行動圏、配偶システム、群れ構造、移動・分散・定住性、人口学的研究などに繋がる<sup>1-3)</sup>。そのため、野生生物研究において個体識別は必要不可欠である<sup>1,2)</sup>。一般に、個体識別をする方法として、外見の特徴や毛皮の模様のパターンなどの自然標識を用いたり、捕獲することによってタグやマイクロチップ、入れ墨、焼印、塗料などの方法でマーキングする方法が利用されてきた<sup>2)</sup>。

近年では、捕獲が困難な動物でも、非直接的に得られる糞、毛、羽などから遺伝情報を引き出すことができるようになり、銃やボーガンを使用したバイオブシーサンプリング法の発達により、遠距離からもサンプルが取れるようになった<sup>4-7)</sup>。しかし、このようなサンプルは、同一個体を複数回サンプリングしてしまう可能性があるため、遺伝子による個体識別が必要不可欠である。遺伝子を利用した個体識別は、一般的に複数のマイクロサテライト遺伝子座を

使って行われている<sup>8-10)</sup>。個体識別にマイクロサテライト遺伝子座を利用する場合、使用する遺伝子座数は少なければ少ないほど解析にかかるコストが減る一方、遺伝子座数が少なすぎると誤判定してしまう確率が高くなる<sup>9,11,12)</sup>。また個体識別に最低限必要な遺伝子座とその数は、個体群の遺伝的多様性<sup>11,13,14)</sup>に大きく左右され、遺伝的多様性が高ければ(つまり近縁度が低いと)必要な遺伝子座数は少なく済む。また、各集団で個体識別に必要な遺伝子座が異なると考えられる<sup>9)</sup>。本来ならば、集団ごとにあらかじめ別個体だと判明しているサンプルを使い、任意で取り出した2個体と同じ遺伝子型を持つ確率(重複率: probability of identity ( $P_{ID}$ ))を算出し( $P_{ID(obs)}$ )、個体識別に最低限必要な遺伝子座および遺伝子座数を決定しておくことが重要である。その場合、サンプルとして40以上の個体の利用が好ましいとされている<sup>12)</sup>。しかし、野生生物でも特に希少な生物では、事前に別個体と判明している40以上のサンプルを手に入れることは困難であることも多い。そのような場合、得られたサンプルの範囲内で、予測重複率( $P_{ID(theo)}$ )を遺伝子座ごとに推定し<sup>11,12,15,16)</sup>、個体識別に必要な遺伝子

\* 東京農業大学大学院生物産業学専攻

\*\* NPO 法人北の海の動物センター

\*\*\* 東京農業大学農学部生物資源開発学科

† Corresponding author (E-mail: m3kobaya@nodai.ac.jp)

座とその数を決定できる<sup>11,12,15,16</sup>)。P<sub>ID</sub>の予測値は、対象集団がハーディー・ワインベルグ平衡にあることを仮定しており<sup>12,16,17</sup>、親類関係にない個体間の重複率 (P<sub>ID(theo)</sub>)<sup>12,16</sup>と、兄弟関係にある個体間の重複率 (P<sub>ID(sib)</sub>) の算出法<sup>18</sup>があり、P<sub>ID(sib)</sub>の方がP<sub>ID</sub>が高く見積もられ、必要な遺伝子座数も多くなる<sup>12,18</sup>。実際の重複率 (P<sub>ID(obs)</sub>) は、P<sub>ID(theo)</sub>とP<sub>ID(sib)</sub>の間に位置するため、多くの動物では、P<sub>ID(sib)</sub>を利用して遺伝子座を決定することが推奨されている<sup>13,19-21</sup>。

本研究の対象種であるハーバーシール (*Phoca vitulina stejnegeri*, ゼニガタアザラシ) は日本では北海道のみに生息し、先行研究からえりもと道東の遺伝的に異なる2集団に分かれる事が示唆されている<sup>22</sup>)。本種は半水生の動物で、採餌は海中で行うが、休息、出産、子育て、換毛を上陸場で行い、目的により利用する上陸場を使い分けることが知られている<sup>23-27</sup>)。そのため、各上陸場で得たサンプルの個体識別をすることで、上陸場の利用個体数の推定や利用時期、期間、上陸場間の移動等の解明ができ、本種の生態的特徴の理解につながる。

日本のハーバーシールは、乱獲や上陸場の破壊により1970年代に個体数が大きく減少し、絶滅危惧種に指定されていたが<sup>28</sup>)、その後個体数は徐々に回復し、2015年には準絶滅危惧種にダウンリストされた<sup>29</sup>)。

近年では、個体数増加に伴い漁業被害が深刻化しており、毎年漁網で混獲死亡する個体も存在している<sup>30,31</sup>)。現在、えりもと地域では、個体数調整を前提とした試験捕殺が行われており<sup>32</sup>)、順応的な管理に必要な不可欠な生息個体数の推定のためにも、遺伝子情報からの個体識別は重要である。

そこで本研究では、えりもと道東の2集団で、個体識別に必要なマイクロサテライト遺伝子座と遺伝子座数の決定を行った。一般に個体識別の信頼性はP<sub>ID</sub><0.01で担保できるとされているが<sup>12</sup>)、複数遺伝子座を使う場合、全体のP<sub>ID</sub>は各遺伝子座のP<sub>ID</sub>をかけ合わせた値になり、単独遺伝子座のP<sub>ID</sub>よりも低く抑えられる。この値を本稿では累積P<sub>ID</sub> (cumulative P<sub>ID</sub>) とする。

さらに、実測値 (P<sub>ID(obs)</sub>) と2つの予測値 (P<sub>ID(theo)</sub>・P<sub>ID(sib)</sub>) を比較することによって、どの予測値を使用するのが良いのか、また、その予測値を算出するのに何個体のサンプルが必要かを推定した。

## 2. 材料と方法

サンプルには、北海道太平洋側の漁網で混獲もしくは漂着死亡した195個体分の筋肉を使用した(えりもと (n=48)・道東 (n=146))。DNAはフェノール・クロロホルム法<sup>33</sup>)にて抽出し、PCR反応液はMizuno et al. (2018)<sup>34</sup>)と同様に作成、5'末端に蛍光標識 (FAM, TET, HEXもしくはNED) したフォワードプライマーを用いた。プライマーセットは先行研究で開発された10組 (Pvc19, Pvc78とPvc30<sup>35</sup>)、SGPV16, SGPV11とSGPV10<sup>36</sup>)、Hg3.7, Aa4とM11A<sup>37</sup>)、SGPV9<sup>38</sup>)を使用し、温度設定は各引用先に従った。

PCR産物はGeneScan-500LIZ Size Standard (Thermo Fisher Scientific社, 米国) とともにGenetic Analyzer

Table 1 PID values across 10 microsatellite loci arranged from the lowest P<sub>ID</sub> to the highest P<sub>ID</sub> for Erimo and Eastern Hokkaido.

Erimo n=48						
locus	P <sub>ID(obs)</sub>	P <sub>ID(theo)</sub>	P <sub>ID(sib)</sub>	nA	He	α (p-value)
SGPV9	0.213	0.209	0.485	3	0.63	1.000
M11A	0.232	0.247	0.537	3	0.56	1.000
SGPV11	0.280	0.266	0.541	5	0.54	1.000
Pvc78	0.259	0.291	0.555	3	0.53	1.000
Hg3.7	0.309	0.323	0.596	5	0.47	1.000
Pvc30	0.356	0.385	0.614	3	0.46	1.000
Pvc19	0.384	0.396	0.648	3	0.40	1.000
Aa4	0.450	0.444	0.664	2	0.39	1.000
SGPV10	0.458	0.470	0.685	2	0.36	1.000
SGPV16	0.483	0.485	0.715	5	0.31	1.000

Eastern Hokkaido n=146						
locus	P <sub>ID(obs)</sub>	P <sub>ID(theo)</sub>	P <sub>ID(sib)</sub>	nA	He	α (p-value)
M11A	0.191	0.202	0.480	3	0.64	1.000
Hg3.7	0.205	0.203	0.482	5	0.64	1.000
SGPV11	0.291	0.308	0.573	8	0.51	1.000
Pvc19	0.308	0.315	0.582	3	0.49	1.000
Aa4	0.359	0.370	0.609	3	0.47	1.000
Pvc30	0.368	0.377	0.627	4	0.44	1.000
SGPV9	0.384	0.379	0.632	3	0.42	1.000
Pvc78	0.425	0.426	0.654	3	0.40	0.180
SGPV16	0.488	0.500	0.724	5	0.30	1.000
SGPV10	0.750	0.750	0.868	2	0.14	1.000

nA: number of alleles.

He: expected heterozygosity for each locus.

α: adjusted p-values for HWE after Bonferroni correction.

3500 (Thermo Fisher Scientific社, 米国) でフラグメント解析を行い、GeneMapper Software v4.1 (Thermo Fisher Scientific社, 米国) でアレルサイズを決定した。

ジェノタイピングエラーやヌルアレルはMICRO-CHECKER<sup>39</sup>)、ハーディー・ワインベルグ平衡 (HWE) からの逸脱の有無はGENEPOP<sup>40</sup>) を使用して確認した。HWEの検定は集団ごとに行い、Rソフトウェア (ver.3.5.1)<sup>41</sup>) のp.adjust関数によりBonferroni<sup>42</sup>) の補正後のp値 (α: Table 1) を求め、評価した。

P<sub>ID</sub>の実測値 (P<sub>ID(obs)</sub>) は次のように計算した。2地域 (えりもと、道東) のそれぞれで、全ての個体について、総当りの組み合わせでペアを想定した。遺伝子座ごとに遺伝子型が同じになるペアをカウントし、総ペア数で割って、各遺伝子座におけるP<sub>ID(obs)</sub>とした。また、各遺伝子座のP<sub>ID(theo)</sub>とP<sub>ID(sib)</sub>を以下の式で求めた。

$$P_{ID(theo)} = \sum_i P_i^4 + \sum_{i>j} \sum_j (2P_i P_j)^2$$

$$P_{ID(sib)} = \frac{1}{4} \left( 1 + 2 \sum_i P_i^2 + 2 \left( \sum_i P_i^2 \right)^2 - \sum_i P_i^4 \right)$$

ここで、P<sub>i</sub>, P<sub>j</sub>はそれぞれi番目, j番目のアリルを表す。

さらにこれらの値を用いて、累積P<sub>ID</sub>を計算した。例えば、えりもでの単独遺伝子座P<sub>ID(obs)</sub>では、最小値はSGPV9の0.213であり、よって1遺伝子座に対応するP<sub>ID(obs)</sub>は0.213である。3遺伝子座での累積P<sub>ID(obs)</sub>は、SGPV9, M11A, SGPV11のP<sub>ID(obs)</sub>の積となり0.009まで下がる。このようにして、遺伝子座数に対応する累積P<sub>ID</sub>を計算し、その値が0.01を下回る遺伝子座数を調べた。

次に、各地域のサンプルから、n=5, 10, 20, 30, 40を100回ずつランダムサンプリングし、各遺伝子座における

$P_{ID}$  の予測値および、 $P_{ID(obs)}$  を算出した。さらに 100 回ずつ抽出したすべて中で個体識別に必要な遺伝子座数が最も多かった数を比較し、 $P_{ID}$  の予測値を利用して個体識別するには何サンプル必要なのかを検討した。

ランダムサンプリングおよび  $P_{ID}$  の計算は R ソフトウェア (ver.3.5.1)<sup>41)</sup> を用いて行った。

### 3. 結果と考察

えりもおよび道東ともに、ジェノタイプエラーおよびヌルアレル、ハーディー・ワインベルグ平衡からの逸脱は検出されなかったため (Table 1), 10 遺伝子座すべてを使用して個体識別率の算出を行った。

えりも (n=48) と道東 (n=146) で遺伝子座ごとに算出された  $P_{ID(obs)}$ ,  $P_{ID(theo)}$ ,  $P_{ID(sib)}$  と、観察されたアレル数 (nA), ヘテロ接合度の予測値 (He) を、 $P_{ID}$  の低い遺伝子座から順に Table 1 に示した。また、用いる遺伝子座数と累積  $P_{ID}$  との関係性を折れ線グラフで表したものを Fig. 1 に示す。結果、遺伝子座数の増加に伴い、えりもと道東で  $P_{ID(obs)}$  の挙動は、 $P_{ID(sib)}$  よりも  $P_{ID(theo)}$  と似た値を示し (Table 1),  $P_{ID(obs)}$  と  $P_{ID(theo)}$  のグラフは、ほぼ重複していた (Fig. 1)。えりもにおいて、累積  $P_{ID(obs)}$  が 0.01 を下回るのは 3 遺伝子座 (SGPV9, M11A, SGPV11), 累積  $P_{ID(theo)}$  が 0.01 を下回るのは 4 遺伝子座 (先ほどの 3 遺伝子座と Pvc78) を使用したときで、道東では両値ともに 0.01 を下回るのは、4 遺伝子座 (M11A, Hg3.7, SGPV11, Pvc19) を使用したときだった (Fig. 1, Table 1)。このことから、日本のハーバーシールは 4 遺伝子座の使用で個体識別が行えることを示した。他方、両地域ともに累積  $P_{ID(sibs)}$  が 0.01 以下になるには 9 遺伝子座が必要であった (Fig. 1, Table 1)。先行研究でヒグマ (*Ursus arctos*), ハイイロオオカミ (*Canis lupus*), キタケバナウオンバット (*Lasiorynus krefftii*) の野生個体を基にした比較では、 $P_{ID(obs)}$  は、 $P_{ID(theo)}$  および  $P_{ID(sibs)}$  の中間に位置し、 $P_{ID(theo)}$  では低く推定されてしまうため、 $P_{ID(sibs)}$  を用いて重複率を推定することが適しているとされ<sup>12)</sup>, 多くの陸生哺乳類でそれが適用されてきた<sup>19-21, 43, 44)</sup>。しかし、今回、日本のハーバーシールは両地

域とも、 $P_{ID(theo)}$  を用いても十分な信頼性があることが示唆された。また、個体識別に必要な遺伝子座はえりもでは SGPV9, M11A, SGPV11, PVC78, 道東では M11A, Hg3.7, SGPV11, PVC19 であり (Fig. 1, Table 1), 集団のヘテロ接合度が同等でも集団が異なると、必要な遺伝子座も異なる事が示された。

上記のことから、えりもおよび道東の両地域は、 $P_{ID(theo)}$  を使うことで必要な遺伝子座と遺伝子座数を十分推定でき

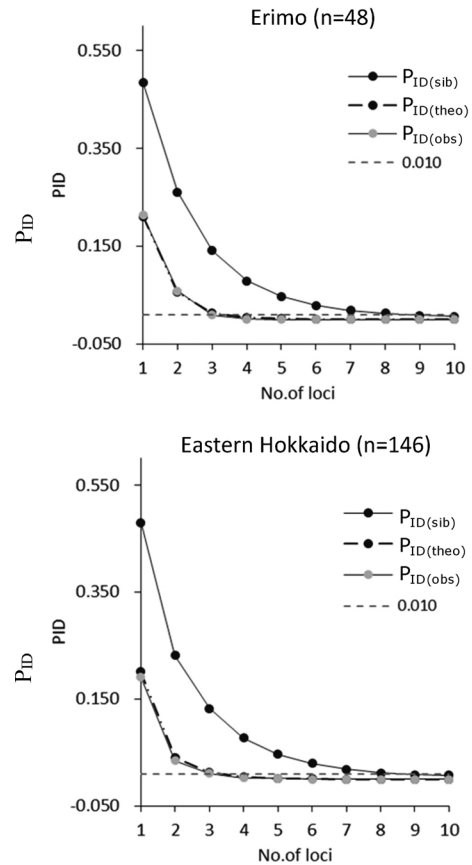


Fig. 1 Trends and relationship between the three cumulative  $P_{ID}$  values :  $P_{ID(obs)}$ ,  $P_{ID(theo)}$  and  $P_{ID(sib)}$  over 10 loci in Erimo and Eastern Hokkaido.

Table 2 Maximum number of loci required to achieve the  $P_{ID} < 0.01$ .

n	Erimo		Eastern Hokkaido	
	No. of loci ( $P_{ID(theo)}$ )	No. of loci <sup>*1</sup> ( $P_{ID(obs)}$ ) <sup>*1</sup>	No. of loci ( $P_{ID(theo)}$ )	No. of loci <sup>*1</sup> ( $P_{ID(obs)}$ ) <sup>*1</sup>
5	5 (0.008)	6 (0.000)	5 (0.009)	5 (0.000)
10	5 (0.004)	5 (0.000)	5 (0.004)	7 (0.000)
20	4 (0.007)	5 (0.005)	4 (0.009)	6 (0.005)
30	4 (0.006)	4 (0.007)	4 (0.007)	4 (0.009)
40	4 (0.005)	4 (0.003)	4 (0.007)	4 (0.008)
48 <sup>*2</sup>	4 (0.004)	3 (0.009)		
146 <sup>*2</sup>			4 (0.004)	4 (0.003)

<sup>\*1</sup> Data obtained for  $P_{ID(obs)}$  as a reference.

<sup>\*2</sup>  $P_{ID(theo)}$  and  $P_{ID(obs)}$  calculated using all samples.

ると考えられたが、推定する為に必要なサンプル数を知る必要がある。そのため、サンプル数を、5, 10, 20, 30, 40 と変えて100回ずつランダムサンプリングをした際の  $P_{ID(\text{theo})}$  の累積値が0.01 になるのに必要な遺伝子座数の最大数を Table 2 に示した。参考までに、同様に  $P_{ID(\text{obs})}$  の値と遺伝子座数も Table 2 に示した。えりもと道東で、4 遺伝子座の使用で重複率が0.01 以下になるのは、 $P_{ID(\text{obs})}$  では30 サンプルであったが、 $P_{ID(\text{theo})}$  では20 サンプルを使用したときだった。このことから、日本のハーバーシールでは20 サンプルを使用して  $P_{ID(\text{theo})}$  を算出すれば、個体識別に有用な遺伝子座の決定が行えることが示された。

**謝辞：**本研究で使用したサンプルの収集にあたりご協力いただいた北海道太平洋側の各漁業協同組合の皆様、東京農業大学の学生の皆様並びにNPO 北の海の動物センター職員の方々に厚くお礼申し上げます。また数学的なサポートをいただいた東京農業大学生物産業学部海洋水産学科の朝隈康司助教に厚くお礼申し上げます。

#### 参考文献

- 1) 上田恵介, 樋口広芳 (1988) 個体識別による鳥類の野外調査—その意義と方法—. *Strix*. **7** : 1-34.
- 2) 井上英治, 中川尚史, 南正人 (2013) 野生動物の行動観察法. 東京大学出版, 東京都.
- 3) 増田隆一 (2017) 哺乳類の生物地理学. 東京大学出版, 東京.
- 4) KALZ B, JEWGENOW K, FICKEL J (2006) Structure of an otter (*Lutra lutra*) population in Germany—results of DNA and hormone analyses from faecal samples. *Mamm Biol-Zeitschrift für Säugetierkd.* **71** : 321-335.
- 5) PIGGOTT MP, BANKS SC, STONE N, BANFFY C, TAYLOR AC (2005) Estimating population size of endangered brush-tailed rock-wallaby (*Petrogale penicillata*) colonies using faecal DNA. *Mol Ecol.* **15** : 81-91.
- 6) MURPHY MA, WAITS LP, KENDALL KC, WASSER SK, HIGBEE JA, BOGDEN R (2002) An evaluation of long-term preservation methods for brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA samples. *Conserv Genet.* **3** : 435-440.
- 7) YANNIC G, SERMIER R, AEBISCHER A, GAVRILO MV, GIRG O, MILJETEIG C, et al. (2011) Description of microsatellite markers and genotyping performances using feathers and buccal swabs for the Ivory gull (*Pagophila eburnea*). *Mol Ecol Resour.* **11** : 877-889.
- 8) VERGARA M, RUIZ-GONZÁLEZ A, LÓPEZ DE LUZURIAGA J, GÓMEZ-MOLINER BJ (2014) Individual identification and distribution assessment of otters (*Lutra lutra*) through non-invasive genetic sampling: Recovery of an endangered species in the Basque Country (Northern Spain). *Mamm Biol.* **79** : 259-267.
- 9) TABERLET P, LUIKART G (1999) Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biol J Linn Soc.* **68** : 41-55.
- 10) REED JZ, TOLLIT DJ, THOMPSON PM, AMOS W (1997) Molecular scatology : the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Mol Ecol.* **6** : 225-234.
- 11) MILLS LS, CITTA JJ, LAIR KP, SCHWARTZ MK, TALLMON DA (2000) Estimating animal abundance using noninvasive DNA sampling : promise and pitfalls. *Ecol Appl.* **10** : 283-294.
- 12) WAITS LP, LUIKART G, TABERLET P (2001) Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations : cautions and guidelines. *Mol Ecol.* **10** : 249-256.
- 13) WAITS LP, PAETKAU D (2005) Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *J Wildl Manage.* **69** : 1419-1433.
- 14) PAETKAU D (2003) An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. *Mol Ecol.* **12** : 1375-1387.
- 15) PAETKAU D, STROBECK C (1994) Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Mol Ecol.* **3** : 489-495.
- 16) HANOTTE O, BURKE T, ARMOUR JAL, JEFFREYS AJ (1991) Hypervariable minisatellite DNA sequences in the Indian peafowl *Pavo cristatus*. *Genomics.* **9** : 587-597.
- 17) DONNELLY P (1995) Nonindependence of matches at different loci in DNA profiles : quantifying the effect of close relatives on the match probability. *Heredity (Edinb).* **75** : 26-34.
- 18) EVETT IW, WEIR BS (1998) Interpreting DNA evidence : statistical genetics for forensic scientists. Sinauer Associates Inc, Sinauer, Sunderland, MA.
- 19) AZIZ MA, TOLLINGTON S, BARLOW A, GREENWOOD C, GOODRICH JM, SMITH O, et al. (2017) Using non-invasively collected genetic data to estimate density and population size of tigers in the Bangladesh Sundarbans. *Glob Ecol Conserv.* **12** : 272-282.
- 20) FRANTZ AC, POPE LC, CARPENTER PJ, ROPER TJ, WILSON GJ, DELAHAY RJ, et al. (2003) Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger (*Meles meles*) using faecal DNA. *Mol Ecol.* **12** : 1649-1661.
- 21) MORIN DJ, WAITS LP, MCNITT DC, KELLY MJ (2018) Efficient single-survey estimation of carnivore density using fecal DNA and spatial capture-recapture : a bobcat case study. *Popul Ecol.* **60** : 197-209.
- 22) NAKAGAWA E, KOBAYASHI M, SUZUKI M, TSUBOTA T (2010) Genetic variation in the harbor seal (*Phoca vitulina*) and spotted seal (*Phoca largha*) around Hokkaido, Japan, based on mitochondrial cytochrome b sequences. *Zoolog Sci.* **27** : 263-268.
- 23) BIGG M (1981) "Harbour seal." Handbook of Marine Mammals (vol 2). 1st ed. Academic Press, London, pp.1-28.
- 24) KING JE (1983) Seals of the world. Oxford University Press, London.
- 25) JEFFERSON TA, LEATHERWOOD S, WEBBER MA (1993) FAO species identification guide. Marine mammals of the world. United Nations Environment programme food and agriculture organization of the United Nations, Rome.
- 26) THOMPSON PM, MACKAY A, TOLLIT DJ, ENDERBY S, HAMMOND PS (1998) The influence of body size and sex on the characteristics of harbour seal foraging trips. *Can J Zool.* **76** : 1044-1053.
- 27) 新妻昭夫 (1986) "ゼニガタアザラシの社会生態と繁殖戦略" ゼニガタアザラシの生態と保護. 東京大学出版, 東京, pp. 59-102.
- 28) ITOO T, SHUKUNOBE K (1986) "Number and present status of the the Kuril seal." Ecology and Conservaion of Kuri seal (Zenigata azarashi no seitai to hogo). 1st ed. Tokai University Publisher, Tokyo, pp.18-58.
- 29) Ministry of the Environment (Japan) (2016) Erimo area Kuril harbor seal specified rare wildlife Management plan.
- 30) MASUBUCHI T, OHYAMA N, AIZAKI S, OKADA K, OHNO K, ISHIKAWA A, et al. (2017) Evaluation of the damage to the

- salmon set trap fishery for salmon by Kuril harbor seals in Cape Erimo, Hokkaido, Japan—first study using both seals behavior and the number of damage—. *Wildl Hum Soc.* 4 : 19-27.
- 31) KOBAYASHI M, ISHINAZAKA T, KAKUMOTO C, WAKATABE H, KOBAYASHI Y, SHIMIZU A (2002) Survey of the number of seals incidentally caught by salmon trap nets along the coastal waters of the Nossapu Cap in Nemuro Peninsula from 2002 to 2003 compared with the survey from 1982 to 1983. *Mammal Study.* 47 : 207-214.
- 32) 北海道地方環境事務所 (2018) 平成 30 年度環境省えりも地域ゼニガタアザラシ管理事業実施計画.
- 33) GREEN MR, SAMBROOK J (2012) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 34) MIZUNO M, SASAKI T, KOBAYASHI M, HANEDA T, MASUBUCHI T (2018) Mitochondrial DNA reveals secondary contact in Japanese harbour seals, the southernmost population in the western Pacific. *PLoS One.* 13 : e0191329.
- 35) COLTMAN DW, BOWEN WD, WRIGHT JM (1996) PCR primers for harbour seal (*Phoca vitulina concolour*) microsatellites amplify polymorphic loci in other pinniped species. *Mol Ecol.* 5 : 161-3.
- 36) GOODMAN SJ (1997) Dinucleotide repeat polymorphisms at seven anonymous microsatellite loci cloned from the European Harbour Seal (*Phoca vitulina*). *Anim Genet.* 28 : 310-311.
- 37) GEMMELL NJ, ALLEN PJ, GOODMAN SJ, REED JZ (1997) Inter-specific microsatellite markers for the study of pinniped populations. *Mol Ecol.* 6 : 661-666.
- 38) ALLEN PJ, AMOS W, POMEROY PP, TWISS SD (1995) Microsatellite variation in grey seals (*Halichoerus grypus*) shows evidence of genetic differentiation between two British breeding colonies. *Mol Ecol.* 4 : 653-662.
- 39) VAN OOSTERHOUT C, HUTCHINSON WF, WILLS DPM, SHIPLEY P (2004) Micro-checker : software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes.* 4 : 535-538.
- 40) RAYMOND M, ROUSSET F (1995) GENEPOP (Version 1.2) : Population genetics software for exact tests and ecumenism. *J Hered.* 86 : 248-249.
- 41) R CORE TEAM (2019) R : A language and environment for statistical computing.
- 42) RICE WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution.* 43 : 223.
- 43) OISHI T, URAGUCHI K, MASUDA R (2010) Non-invasive genetic identification of the red fox *Vulpes vulpes* in the Shiretoko National Park, eastern Hokkaido, Japan. *Mammal Study.* 35 : 201-207.
- 44) WOODS JG, PAETKAU D, LEWIS D, MCLELLAN BN, PROCTOR M, STROBECK C (1999) Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. *Wildlife Society Bulletin.* pp.616-627.

# Individual Identification of Japanese Harbour Seals Using Nuclear Microsatellite loci

By

Mariko MIZUNO\*, Mari KOBAYASHI\*\*<sup>†</sup> and Takeshi SASAKI\*\*\*

(Received May 23, 2019/Accepted December 6, 2019)

**Summary** : In recent years, genetic information has become much easier to obtain from feces, hairs and feathers, and samples can be taken remotely by using biopsy darts fitted in guns and bowgun. Individual identification based on genetic information is crucial when using these non-destructive samples to avoid duplicate collection from single individuals, which may easily happen. In general, multiple microsatellite loci are used for individual identification. It is preferable that combination and the number of loci used for the analysis are decided using known individuals by calculating the proportion of all possible pairs of individuals that have the same genotypes ( $P_{ID}$  : probability of identity). However, if one does not have enough number of samples beforehand, theoretical estimator can be calculated using available samples. Theoretical  $P_{ID}$  assumes the population is in Hardy-Weinberg equilibrium and there are equations for unrelated individuals ( $P_{ID(\text{theo})}$ ) and siblings ( $P_{ID(\text{sib})}$ ). Since the observed  $P_{ID}$  generally lies between  $P_{ID(\text{theo})}$  (lower boundary) and  $P_{ID(\text{sib})}$  (upper boundary), it is recommended to use  $P_{ID(\text{sib})}$  in many terrestrial animals. In this study, we calculated observed  $P_{ID}$  ( $P_{ID(\text{obs})}$ ) and two theoretical  $P_{ID}$ s for two genetically distinct populations of Japanese harbour seals, Erimo and eastern Hokkaido, using the samples that are known to be from different individuals. Three  $P_{ID}$ s are then compared, and combinations and numbers of loci essential for individual identification were investigated. The number of samples required for estimating  $P_{ID}$  are also investigated by picking different numbers of samples randomly for 100 times. The results of estimation indicated that  $P_{ID(\text{obs})}$  for Japanese harbour seals showed similar values to  $P_{ID(\text{theo})}$ , and that at least 4 loci are required for identification. On the other hand, the loci useful for individual identification in Erimo and Eastern Hokkaido differed. Furthermore, it was suggested that 20 samples are enough to estimate  $P_{ID(\text{theo})}$  and to detect loci useful for individual identification.

**Key words** : individual identification,  $P_{ID}$ , Japanese harbour seals, Kuril harbour seals, *Phoca vitulina stejnegeri*

---

\* Graduate School of Bio-Industry, Tokyo University of Agriculture

\*\* NPO Marine Wildlife Center of JAPAN

\*\*\* Department of Bioresource Development, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

<sup>†</sup> Corresponding author (E-mail : m3kobaya@nodai.ac.jp)