

神戸市に生息するサンショウウオの分布と遺伝的特性の解明

兵庫県立尼崎小田高等学校
サンショウウオ研究班 入江 祐樹

1. はじめに

神戸市は、大都市でありながら、六甲山をはじめとする緑の山々と北区や西区に広がる豊かな田園風景を有し、各地域でカスミサンショウウオ (*Hynobius nebulosus*) の繁殖が知られている。日本産有尾目を除きすべてが固有種である。小型サンショウウオ類はイモリやカエル類と異なり地域ごとの分化が著しく、一般に1種の分布域は狭い。愛知県から長崎県にかけての西日本にはカスミサンショウウオが分布する。

カスミサンショウウオは止水性の小型サンショウウオである。低地型と高地型に分けられ、低地型は水田、湿地、池沼などで産卵し、非繁殖期でも産卵場所の周囲から遠く離れず、人里付近でも生活し、さまざまな開発行為の影響を受けやすい(高田・大谷 2013)。現時点でのカスミサンショウウオの分布と遺伝的特性を記録することは今後の保全のために重要である。卵塊の採集の適期(3月)は過ぎていたので幼生の採集を試みた。

アロザイム分析により4グループの地理的分布が示されており、神戸市はこの4グループのうちの eastern group に含まれる(MATSUI *et al.* 2006, 図1)。2013年3月に本校サンショウウオ研究班が神戸市北区山田町藍那でカスミサンショウウオを採集した(個体番号 130071~76)。この個体のミトコンドリア DNA のチトクロームb領域などを遺伝子解析した結果、eastern group の東側とは異なるグループを形成した。このことから eastern group は東側と西側に分断されている可能性が示された(Tani・Hoelker 2016: 図2)。アロザイム解析は核遺伝子の解析だが、我々が行ったのはミトコンドリア DNA の解析であった。呼吸以外の遺伝形質は主に核 DNA に書き込まれている。また動物では母親から引き継ぐため父親の遺伝形質は解析不可能である。今回は核 DNA の解析を試みた。

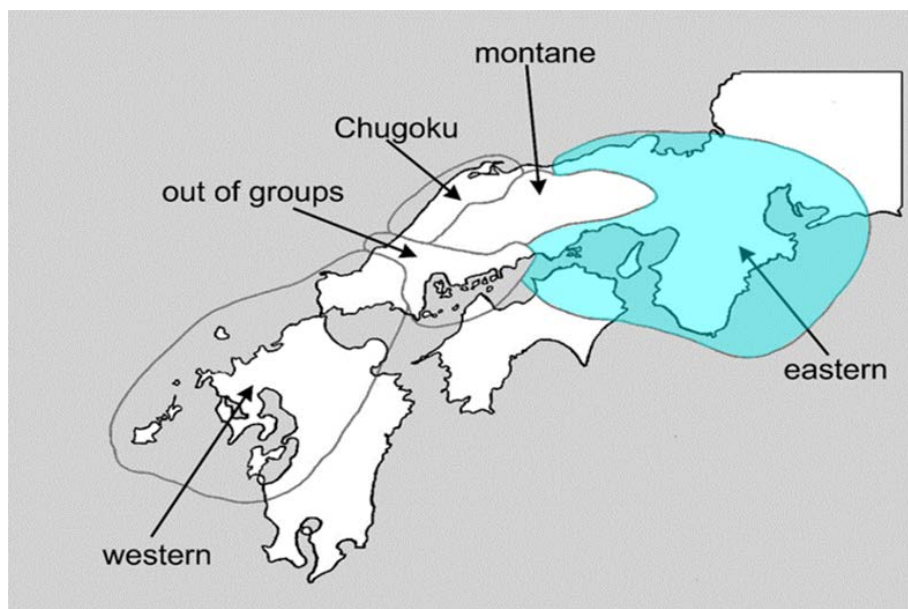


図1. カスミサンショウウオの4グループの分布地域(MATSUI *et al.* 2006の図を改変。)

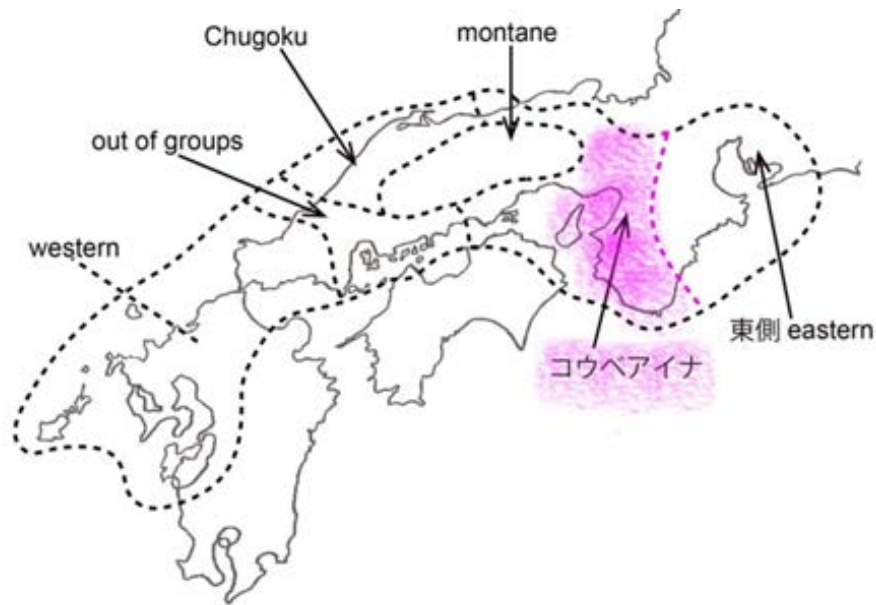


図 2. コウベアイナグループの分布可能性が示唆される地域 (MATSUI *et al.* 2006 の図を改変。)

2. 方法

2016年7月9日(土)兵庫県神戸市北区山田町藍那の溜池で、カスミサンショウウオの幼生を探索したが、発見できなかった。(図3)。

昨年度は飼育個体(個体番号150001)の脱皮塊を解析したが、今回は飼育中に死亡した2個体(個体番号160056、150058)の前あしからDNAを抽出した。ミトコンドリアDNAに加えてさらに核DNAについて遺伝子解析を行った。

国際塩基配列データベース (INSD; International Nucleotide Sequence Database) よりサンショウウオ属



図 3. 採集参加メンバー

(*Hynobius* sp.)核DNAの4領域についてデータをダウンロードし、Primer3によりプライマーを設計した(表1.)。4領域は RAG 1 (recombination activating protein 1)領域、SLITRK1 (SLIT and NTRK-like protein 1-like protein) 領域、VSP(voltage-sensor containing phosphatase)領域、HE 領域(hatching enzyme)の4領域であった。北海道システムサイエンス社にDNA合成を委託した。

| | 名称 | 塩基配列 |
|----|---------------|------------------------------|
| 1 | HN RAG113F | TTATCACCCATTTGAATGGAAACCTCCT |
| 2 | HN RAG1934R | ATCAGGGTTCTTGAAAACCTCCCCTATC |
| 3 | HTHytoHE223F | CTACGTGAAGGGGACATCGT |
| 4 | HTHytoHE1016R | TCACAGTTTGGAGGGGACTC |
| 5 | HNHnVSP236F | TCACAGCAAAAAGCCAACAG |
| 6 | HNHnVSP1056R | GGGAGTTTCAACACCTTGGA |
| 7 | HTSLITRK88F | ATCACCCACTTGACCTGAG |
| 8 | HTSLITRK1059R | ATGAAGGCTGAGCTTGGA |
| 9 | HCO2198 | TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA |
| 10 | LCO1490 | GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG |

表 1. 設計したプライマー

1~8 は核 DNA に対応するプライマー、

9・10 はミトコンドリア DNA に対する汎用プライマー。

PCR 反応液は 10 μM プライマーを各 1 μL (1 × 2 μL = 2 μL), 2 × PCR Buffer for KOD FX Neo 10 μL, KOD FX Neo (1 U/μL) 0.5 μL, 鋳型 DNA 溶液 2 μL, 2mM dNTPs 3.5 μL, 蒸留水 2 μL をよく攪拌し計 20 μL 調整した。0.2mL PCR チューブに注入し, ASTEC 製サーマルサイクラー PC-708 を用いて PCR 反応を行った。この反応液を 94°C 2 分間初期加熱した後, 98°C 10 秒の熱変性, 50~65°C 30 秒のアニーリング・68°C 45 秒の伸長反応を 35 から 43 サイクル行った後, 68°C 7 分間伸長反応を行い, 10°C で保存した。PCR 産物は 2% アガロースゲルを用いて電気泳動し DNA 増幅バンドを確認した。Roche High Pure PCR Product Purification Kit を用いて精製し, 北海道システムサイエンス社に委託して上流と下流から塩基配列を解読した。解読データは Sequence Scanner (ABI) を用いて解読結果を確認・調整し, 解析に利用するデータを作成した。作成結果を MEGA6 ; MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS 6 (TAMURA et al. 2013) でアラインメントし, National Center for Biotechnology Information (NCBI) の The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて相同性の高いデータを検索し, 系統樹の作成を行った。

3. 結果

今回遺伝子解析を行った藍那産カスミサンショウウオを今後コウバアイナと呼ぶ。またコウバアイナが属する遺伝的なグループをコウバアイナグループと呼ぶ。

飼育中に死亡した 2 個体 (160056, 150058) のミトコンドリア DNA のチトクローム b 領域解析結果は良好で, コウバアイナグループに属した (図 3)。

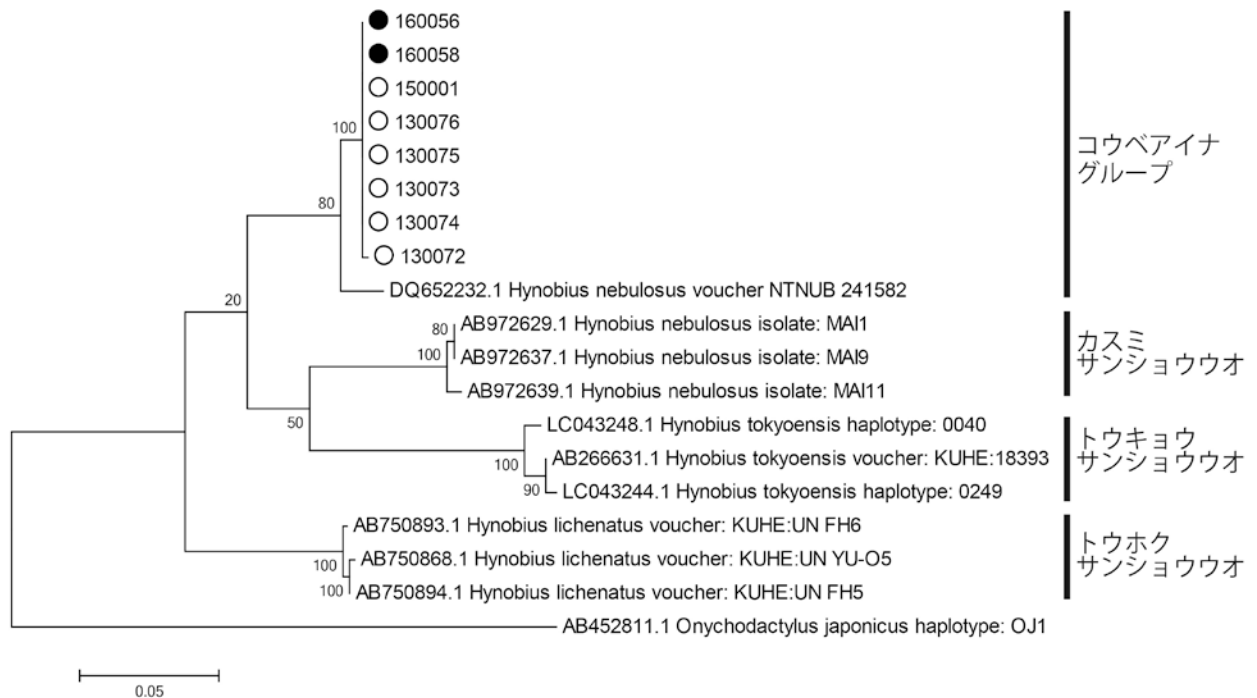


図 3. ミトコンドリア DNA チトクローム b 領域の解析結果

Maximum Likelihood 法, 458bp, 1000 回。●は今回解析した死亡飼育個体。○150001 も飼育個体 (皮膚を解析したデータ: Tani・Hoelker 2016)。○130072~130076 は 2013 年採集の藍那産成体。分岐点の数字はパーセント。

核 DNA の VSP (voltage-sensor containing phosphatase) 領域, HE 領域 (hatching enzyme) の 2 領域については PCR 法による DNA 増幅がうまく行われなかった。RAG1 (recombination activating protein 1) 領域, SLITRK1 (SLIT and NTRK-like protein 1-like protein) 領域, については DNA 増幅を行うことができた (図 4~7)。RAG1 領域 (379bp)・SLITRK1 領域 (909bp) の 2 領域については配列を決定し, 解析結果を得ることができた。RAG1 については上流側 (144bp) と下流側 (379bp: 図 4・5) で解析できる領域が分かれた。

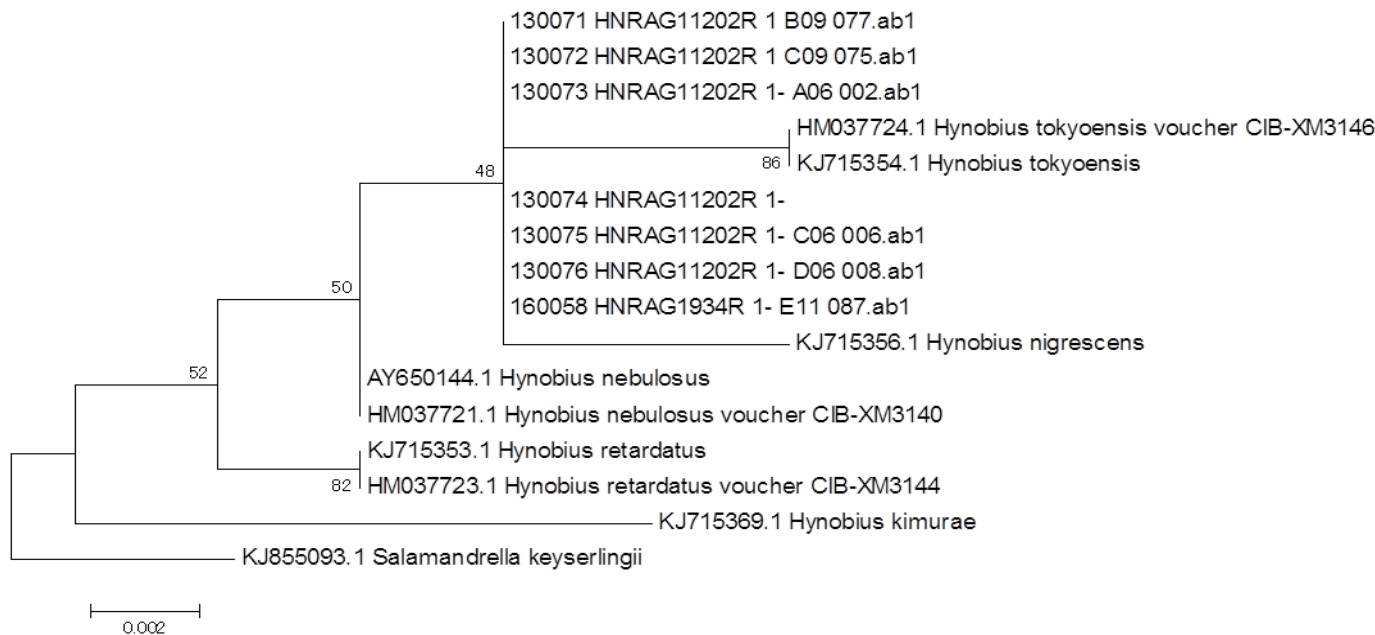


図 4. 核 DNA RAG1 領域の解析結果

Maximum Likelihood 法、379bp、1000 回。分岐点の数字はパーセント。160058 は今回解析した死亡飼育個体。130072～130076 は 2013 年の藍那産成体。

| | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 1 | 3 | 8 | 1 | 2 | 5 | 7 | 1 | 6 | 9 | 9 | 9 | 0 | 1 | 9 | 0 | 7 | 1 | 2 | 7 | 8 |
| | 3 | 6 | 1 | 5 | 3 | 7 | 1 | 5 | 4 | 8 | 3 | 5 | 8 | 7 | 0 | 1 | 3 | 5 | 1 | 9 | 7 | 9 |
| 130071_HNRAG11202R_1_B09_077.ab1 | A | G | C | G | A | G | A | C | C | G | C | A | T | T | C | A | C | A | T | G | C | T |
| 130072_HNRAG11202R_1_C09_075.ab1 | . | . | . | . | . | . | . | S | . | . | . | . | C | . | G | Y | G | . | . | . | . | . |
| 130073_HNRAG11202R_1_A06_002.ab1 | . | . | . | . | . | R | . | . | . | . | . | . | . | . | G | Y | G | . | . | . | . | . |
| 130074_HNRAG11202R_1- | . | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . | Y | Y | . | R | Y | G | . | . | . | . | . |
| 130075_HNRAG11202R_1_C06_006.ab1 | . | . | . | . | . | R | . | . | . | . | . | . | Y | . | R | Y | G | . | . | . | . | . |
| 130076_HNRAG11202R_1_D06_008.ab1 | . | . | . | . | . | . | S | . | . | . | . | . | Y | . | G | T | G | . | . | . | . | . |
| 160058_HNRAG1934R_1_E11_087.ab1 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| AY650144.1 Hynobius nebulosus | . | . | . | . | . | G | . | . | . | A | . | . | . | . | T | G | G | A | . | . | . | . |
| HM037721.1 Hynobius nebulosus voucher CIB-XM3140 | . | . | . | . | . | G | . | . | . | A | . | . | C | . | T | G | . | . | . | . | . | . |
| HM037723.1 Hynobius retardatus voucher CIB-XM3144 | . | . | . | . | . | G | . | . | A | A | G | C | C | . | R | T | G | . | . | . | . | A |
| HM037724.1 Hynobius tokyoensis voucher CIB-XM3146 | . | . | . | T | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . | . | A |
| KJ715353.1 Hynobius retardatus | . | . | . | . | . | G | . | . | A | A | G | C | C | . | G | T | G | . | . | . | . | A |
| KJ715354.1 Hynobius tokyoensis | . | . | . | T | . | A | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . | . | A |
| KJ715356.1 Hynobius nigrescens | . | . | . | . | . | G | T | . | . | . | . | . | . | T | . | T | G | . | . | . | . | A |
| KJ715369.1 Hynobius kimurae | C | A | T | . | G | . | G | T | . | A | G | C | C | . | G | T | G | . | . | . | . | A |

図 5. 核 DNA RAG1 領域の塩基配列の比較

R は A と G、S は C と G、Y は T と C の 2 重配列。上列 7 個体が今回の解析個体。下列 9 の個体はデータベースよりダウンロードしたもの。

4. 考察

幼生(オタマジャクシ)の採集がうまくいかなかったため、分布の解明を進めることができなかった。今年 3 月下旬から 4 月はじめの採集計画を作成中である。今年こそは調査地域を広げたい。

これまで行われてきたアロザイム解析の代わりに RAG1・SLITRK1 領域の解析を進めていくことができそうである。RAG1 領域は中間部分に解読困難があるので、プライマーの再設計が必要である。核 DNA の解析が行えれば雑種第 1 代 (F1) などとはしっかりと確認できるので、調査地域が広がれば生殖的隔離などの検証に役立ちそうである。安価に実施できる RFLP 法などの開発したい。

