

神戸市に生息するカスミ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
科学研究部生物班 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。日本産有尾目はキタサンショウウオ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 2011)。本種は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。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)。昨年度は本助成を受けて核 DNA の解析手法の開発を試みた結果、ragl (recombination activating protein 1) 領域と slitrk1 (SLIT and NTRK-like protein 1-like protein) 領域が有効である可能性を示すことができた。

神戸市に生息するカスミサンショウウオの特性を解明するためには近隣地域に生息するカスミサンショウウオと比較することが必要である。今年度神戸高校 SSH 事業咲いテクプログラムで近隣の兵庫県下の高校に呼びかけ、地元で採集したカスミサンショウウオのミトコンドリア DNA の遺伝子解析を行った(図 1)。さらに本研究ではこの時のサンプルを用いて、核 DNA の ragl 領域について解析を行った。

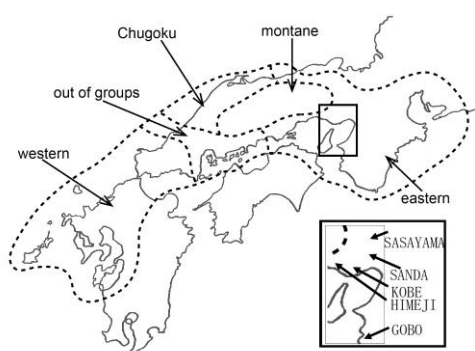


図 1. アロザイム解析によるカスミサンショウウオの4グループ分の地理的分布 (MATSUI *et al.* 2006 の図を改変。) 四角の枠内に篠山市・三田市・姫路市・神戸市・御坊市の位置を示す。

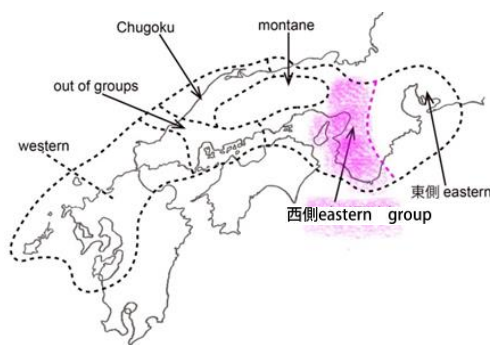


図 2 西側 eastern group グループの分布可能性が示唆される地域 (MATSUI *et al.* 2006 の図を改変。)

カスミサンショウウオが産卵に出て来る水源は推定が難しい。地元の人々は経験的に把握しているが、カスミサンショウウオが出現する時期は1月～3月に限られ、ほかの時期は観察が難しいため、近年は地理情報システム (GIS: Geographic Information System) などのデータを用いた分布地

域の推定などが行われ、ある程度成果を上げている(三好・夏原 2003)。水源と関係が深く、環境条件を反映して生息する種が変異し、さまざまな環境に広く分布する生物としてコケ類・地衣類があげられる。このコケ類・地衣類を指標としてカスミサンショウウオの出現する水源を推測する可能性を検討するため、今年度はまず本校および周辺のコケ類・地衣類の分類を行った。コケ類・地衣類はどの都市公園にもみられるため、将来的にはこれらの分布を指標とした神戸市内の各公園の環境評価などの可能性も考えられる。

2. 方法

兵庫県三田市(神戸学大学附属高校採集)・篠山市(篠山鳳鳴高校採集)・姫路市(姫路飾磨高校採集)の3地点で採集されたサンプルからDNA抽出を行い、核DNAのragl領域について解析を行った。昨年度助成を受けて開発したプライマーHNRAG113F(5'-TTATCACCCATTTGAATGGAAACCTCCT-3')およびHNRAG1934R(5'-ATCAGGGTTCTTGAAAACCTCCCTATC-3')を北海道システムサイエンス社に委託して合成した。KOD FX Neo(TOYOBO)を用いてマニュアルに従ってPCR法によるDNA増幅を行った。サーマルサイクラーはPC-708(ASTECH社)を用いた。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。

本校内および本校周辺に生息するコケ類・地衣類を採集し、文献(中村ほか 2002、岩月 2001)を用いて同定を試みた。微細構造の観察には光学顕微鏡(図7)および走査型電子顕微鏡(卓上顕微鏡 Miniscope® TM3030:日立ハイテクノロジーズ、図8・9・10・11)を用いた。

3. 結果

ミトコンドリアDNAのcytb領域の解析結果では兵庫県および和歌山県の個体は同一グループを形成し、東側のeastern groupとは明らかに別グループを形成した(図3)。これに対し核DNAのragl領域について解析を行った解析では同一グループを形成しなかった。(図4)。

本校および周辺では地衣類3種が観察された(図6)。またコケ類5種が観察された(図6・7・8・9・10・11)。

4. 考察

ミトコンドリアDNAではグループ化が見られたのに、核DNAのragl領域の解析では異なる結果が見られた。両者は矛盾する。今後のさらなる解析に期待したい。核DNAの解析により雑種第1代(F1)などの雑種鑑定を行うことができる。安価で効率的なRFLP法などの開発にも取り組み、生殖的隔離などの検証を行いたい。

神戸市内に生息するカスミサンショウウオの遺伝的特性を知るには他地域との比較が不可欠である。市内の詳細な分布調査と共に、近隣都市との連携を進め、保全活動を進める必要があると思われる。調査地域を広げ、個体数を増やし、広域にわたる詳細な調査を実施するために私たちにできる方法として、市内・県内の高校生物部間の連携が考えられる。今後さらに力を入れて取り組んでいきたい。

モグラ類の地中の巣の所在を探索するためにナガエノスギタケ *Hebeloma radicosum* が有効であるように(相良 1998)、カスミサンショウウオの産卵する止水性環境を好む生物が存在する可能性は否定できない。出現時期が限られたカスミサンショウウオの分布を推定する補助的データとして、今後とも地衣類・コケ類の分布調査を並行して行っていきたい。今回試みた限りでは、地衣類の分類は私たちには難しすぎて手におえそうにないので、まずはコケ類の分類に専念した方がよいと

思われる。光学顕微鏡は葉の縁の歯を確認するのに有効であった。また各細胞の形状が確認するのに有効であった(図7)。電子顕微鏡像は葉の縁の歯の詳細な形状および広範囲な分布などを確認するのに有効であった(図8・9)。ただし表面の凹凸のみの観察になるので細胞の形状などは難しい。コケ類の分類もかなりの難しいので、最初は網羅的なコケ類全体の形態分類に取り組み、その後はよく考察し、できるだけ対象を絞り、目的から外れないように、慎重に進めていきたい。また同時に DNA バーコーディングなどの遺伝子解析による分類も進めたい。

最終目的はカスミサンショウウオの分布の解明であるが、神戸市の公園に特化したコケ類啓発パンフレットなどを作成し、多くの市民が参加して行えるコケ観察活動を広げていくことは、カスミサンショウウオを含めた生物多様性の保全に有効であると思われる。今後も継続していきたい。

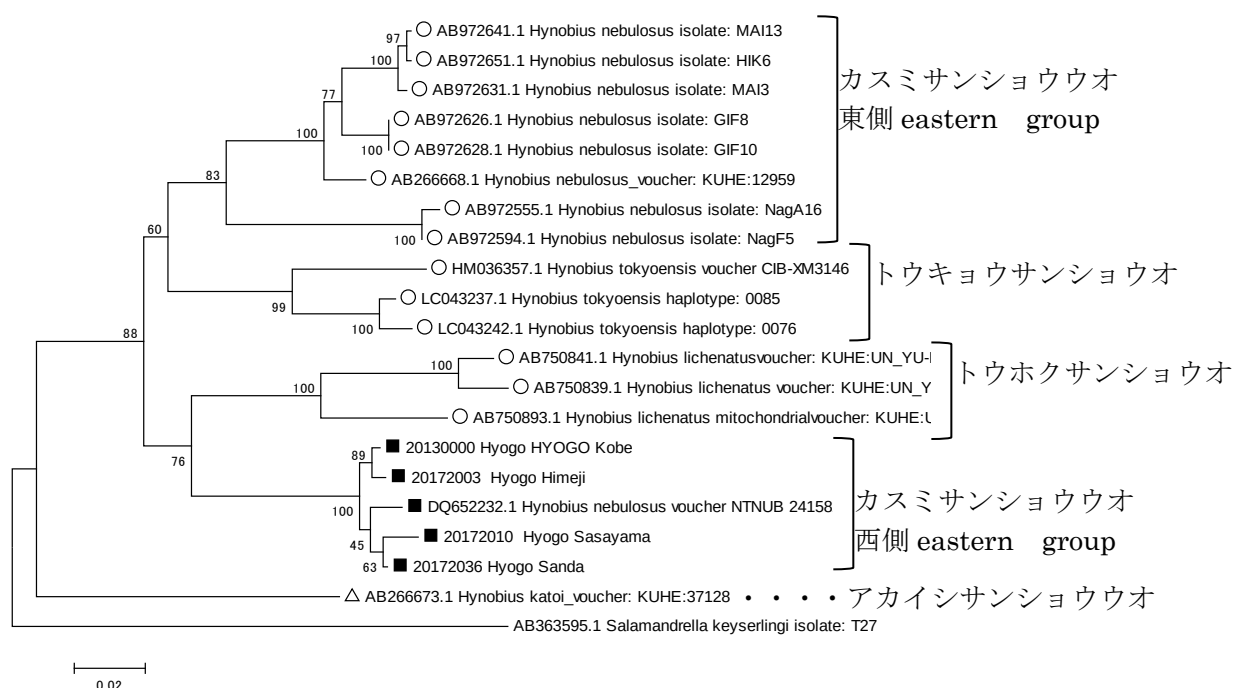


図3. 木村の2変数法・ML法によるミトコンドリアDNAのcytb領域に対する系統樹 812 bp, 1000回。■は兵庫県産個体, ○は止水性サンショウウオ, △は流水性サンショウウオ。

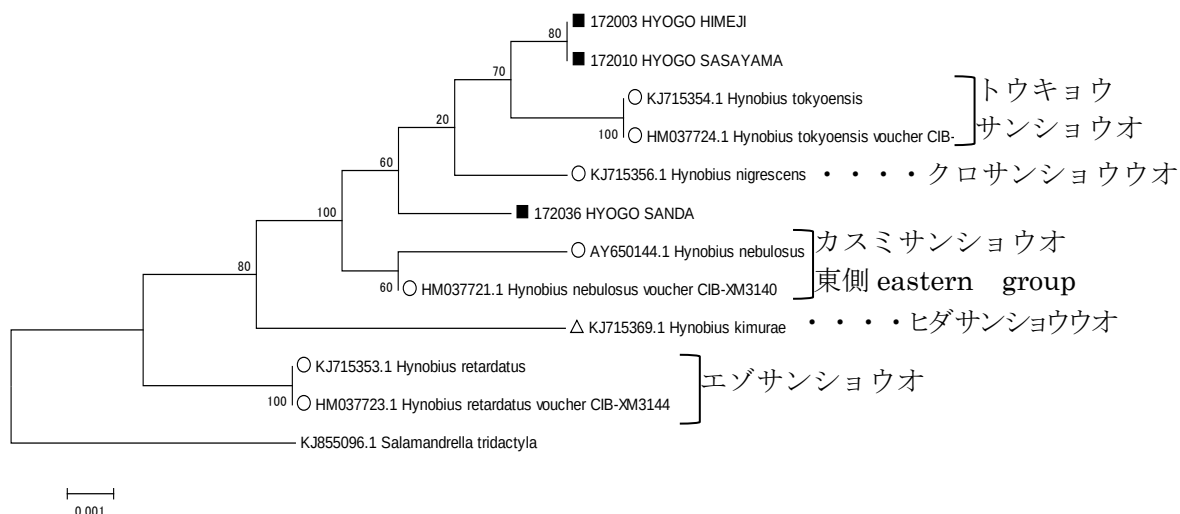


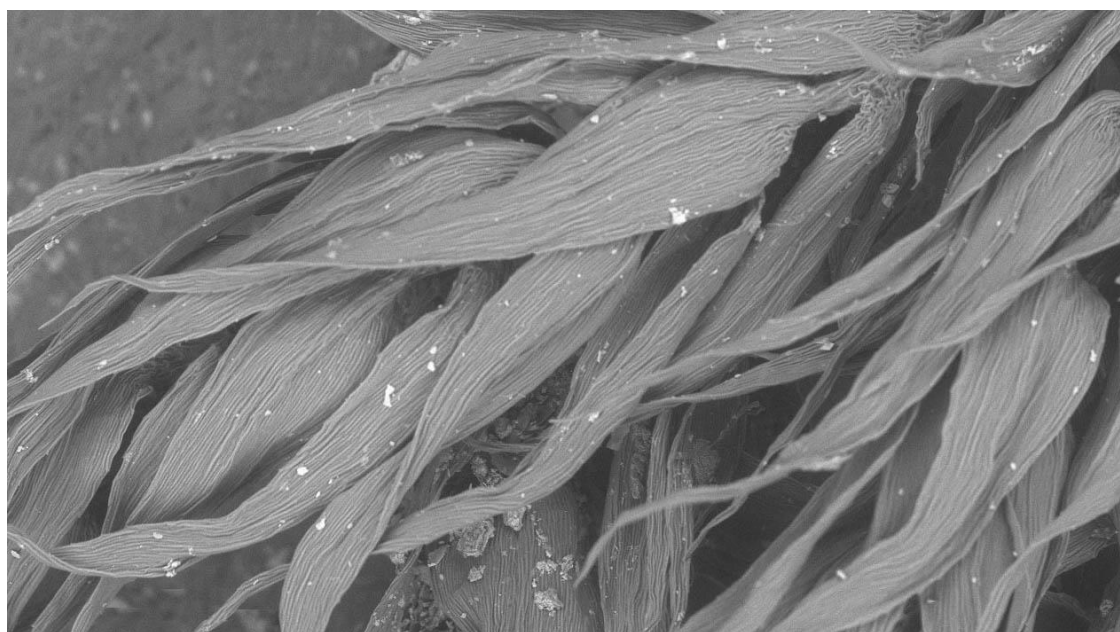
図4. 木村の2変数法・ML法による核DNAのragI領域に対する系統樹 826 bp, 1000回。■は兵庫県産個体, ○は止水性サンショウウオ, △は流水性サンショウウオ。

地衣類		
		
a. カロプラーカ・フラボヴィレスケンス <i>Caloplaca flavovirescens</i>	b. ロウソクゴケ <i>Candelaria concolor</i>	c. レプラゴケ(不完全地衣類) <i>Lepraria sp.</i>
コケ類		
		
d. ヒナノハイゴケ <i>Venturiella sinensis</i>	e. ネジクチゴケ <i>Barbula unguiculata</i>	f. カガミゴケ <i>Brotherella henonii</i>
		
g. ツクシナギゴケ <i>Enhynchium savatieri</i>	h. ゼニゴケ <i>Marchantia polymorpha</i> 葉状体から伸びた雌器床と雄器床(左図)、 無性芽器の中の無性芽(右図)。	

図 6. 兵庫県立尼崎小田高等学校および周辺のコケ類・地衣類

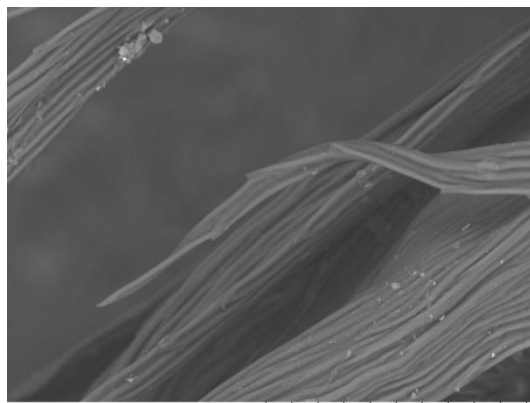


図 7. カガミゴケ *Brotherella henonii* の葉の光学顕微鏡写真



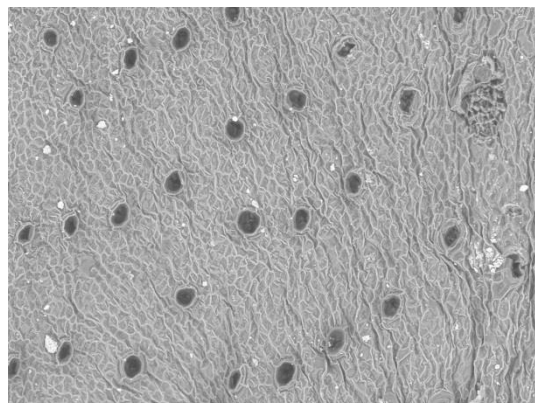
Miniscope 2018/02/28 NL D4.6 x120 500 μm

図 8. カガミゴケ *Brotherella henonii* の葉の走査型電子顕微鏡写真



Miniscope 2018/02/28 NL D4.3 x800 100 μm

図 9. カガミゴケ *Brotherella henonii* の葉先端と、縁の歯



Miniscope 2018/02/28 NL D5.0 x180 500 μm

図 10. ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* の葉状体の気室孔



Miniscope 2018/02/28 NL D5.3 x40 2 mm

図 11. ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* の葉状体の雌器床

5. 文献

- 岩月 善之助. 2001. 日本の野生植物—コケ. 355. 平凡社, 東京.
- MATSUI M., K. NISHIKAWA, T. UTSUNOMIYA & S. TANABE. 2006. Geographic allozyme variation in the Japanese clouded salamander, *Hynobius nebulosus* (Amphibia: Urodela). *Biological Journal of the Linnean Society*, 89 : 311-330.
- 三好文・夏原由博. 2003. 大阪府と滋賀県におけるカスミサンショウウオの生息地の連続性の評価: ランドスケープ研究, 66(5), . 617-620.
- 中村俊彦・古木達郎・原田浩. 2002. 野外観察ハンドブック 校庭のコケ. 190pp. 全国農村教育協会, 東京.
- 相良直彦. 1998. きのを手がかりとしたモグラ類の営巣生態の調査法. *哺乳類科学* 38: 271-292.
- 高田榮一・大谷勉. 2011. 原色爬虫類・両生類検索図鑑. 292pp. 北隆館, 東京.
- TAMURA K., G. STECHER, D. PETERSON, A. FILIPSKI, & S. KUMAR. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30 : 2725-2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197 PMID: 24132122.
- Tani, Y. and Hoelker, S. 2016. Morphological observation and Gene analysis of the salamander (*Hynobius nebulosus* Temminck et Schlegel) collected from Japan : Hyogo, Kobe, Aina. *Hyogo biology* 15, 79-85

6. 謝辞

ご指導をいただいた兵庫教育大学准教授 笠原恵氏並びに神戸女子学院大学講師 阪口正樹氏に感謝いたします。今年度神戸高校 SSH 事業咲いテクプログラムの一環としてカスミサンショウウオのサンプル採集・DNA抽出・PCR法によるDNA抽出ならびにデータ処理を一緒にして下さった共同研究者の兵庫県立篠山鳳鳴高校・兵庫県立三田祥雲館高校・神戸学院大学附属高等学校・姫路市立飾磨高等学校・兵庫県立三木高等学校の生物部員の顧問および部員の皆様に感謝いたします。電子顕微鏡の貸し出しおよび操作方法のご指導をいただいた日立ハイテクノロジーズ 寺田大平様ならびにスタッフの皆様に感謝いたします。