

## 兵庫県神戸市北区藍那産カスミサンショウウオ

### *Hynobius nebulosus* Temminck et Schlegel の遺伝子解析

谷 良夫\* ・ Stephanie Hoelker\*

Morphological observation and Gene analysis of the salamander  
(*Hynobius nebulosus* Temminck et Schlegel)  
collected from Japan : Hyogo, Kobe, Aina

Yoshio Tani\* and Stephanie Hoelker\*

**Abstract :** We made morphological observations and did Gene analysis of the salamanders (*Hynobius Tschudi*) collected from Japan : Hyogo, Kobe, Aina. They were identified as *H. nebulosus* by morphological observation, but difficult to identify as *H. nebulosus* genetically. The group of Kobe Aina also includes an individual from Japan : Wakayama, Gobo, identified as *H. nebulosus*. There's a possibility that this group of Kobe Aina could be a cryptic species.

#### はじめに

今回、私たちは兵庫県神戸市北区の溜め池でカスミサンショウウオ5個体を捕獲した。カスミサンショウウオかどうか、種の確認とともに、採集した個体の遺伝的な特性を解明するために遺伝子解析を行った。兵庫県立尼崎小田高等学校はSSH（スーパーサイエンスハイスクール）の指定を受けているので、田崎渚、福嶋直人、北浦大樹、小阪田悠生、今村拓未、大塚輝人、田中健太、入江祐樹の8生徒でサンショウウオ班を編成し、一連の研究活動を実施した。その研究結果を基にカスミサンショウウオの遺伝子解析を報告する。

国際塩基配列データベース（INSD; International Nucleotide Sequence Database）上には多数の両生綱（Amphibia Gray）、有尾目（Caudata Scopoli）、サンショウウオ科（Hynobiidae Cope）、サンショウウオ属（*Hynobius* Tschudi）のデータがあり、カスミサンショウウオ *H. nebulosus* Temminck et Schlegel についてはミトコンドリアDNAのチトクロムb（cytochrome b）

や調節領域（control region）などが登録されている（Lai & Lue 2008 ; Matsui *et al.* 2007）。トウキョウサンショウウオ *H. tokyoensis* TagoではミトコンドリアDNAの解析データを用いて各地の個体群の特性が論じられている（吉澤ほか 2005 ; Matsui *et al.* 2007）。

#### 材料と方法

2013年3月17日兵庫県神戸市北区山田町藍那の溜め池で、カスミサンショウウオと思われる5個体を捕獲した。体は茶褐色で多数の小斑があり、尾には黄条がある。尾部の先端を3mm切り取り、エタノールに保存し、持ち帰った。また学校に卵塊を1つ持ち帰り、孵化させ飼育した（図1）。飼育個体については脱皮によって脱落した皮膚片を用いて解析に使用した（150001個体、表1）。

国際塩基配列データベースよりカスミサンショウウオのミトコンドリアDNAデータHM036356（アクセッション番号）をダウンロードし、Primer 3（v. 0.4.0）によりミトコンドリアDNAのチトクロムb領域前半に対しプライマーセット（HNCY1F ; 5'-TGATGCCACTGCAATTAGACCAAAAACT-3', HNCY3R ; 5'-CTTTATCCACAGAAAATCCGCCTCAGAT-3'）を設計し

\* 兵庫県立尼崎小田高等学校

Hyogo Prefectural Amagasaki-Oda High School

2016年3月30日受理

た。チトクロム b 領域後半に対しプライマーセット (HNCY2F ; 5'-GGACAAATATCCTTCTGAGGGGCTA CTG-3', HNCY4R ; 5'-CGATTCGATAAATGGTTG TTCAACTGG-3') を設計した。調節領域に対しプライマーセット (HN12S353F ; 5'-ATAACTGAGTCTGC CCTCATCTGTAGGT-3', HN12S1041R ; 5'-AAAATT TGTGCCTGATATCTGCTCCTTA-3') を設計し、北海道システムサイエンス社に DNA 合成を委託した。

PCR 反応液は 10  $\mu$ M プライマーを各 2  $\mu$ L (2 $\times$ 2  $\mu$ L = 4  $\mu$ L), 2 $\times$ PCR Buffer for KOD FX Neo 10  $\mu$ L, KOD FX Neo (1 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 鋳型 DNA 溶液 2  $\mu$ L, 2mM dNTPs 3.5  $\mu$ L をよく攪拌し計 20  $\mu$ L 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 $^{\circ}$ C 4 分間初期加熱した後, 94 $^{\circ}$ C 15 秒の熱変性・55 $^{\circ}$ C から 60 $^{\circ}$ C 15 秒のアニーリング・68 $^{\circ}$ C 30 秒の伸長反応を 38 から 45 サイクル行った後, 68 $^{\circ}$ C 7 分間伸長反応を行い, 10 $^{\circ}$ 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。

切り出したバンドを 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 MEGA6 ; MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS 6 (Tamura *et al.* 2013) でアラインメントし, 上流と下流から解読したデータが完全に一致する部分を解析に用いた。The 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, MEGA 6 を用いて系統樹の作成を行った。

## 結果

カスミサンショウウオを採集した溜め池は南向きの斜面に東西につくられた林道の下ったところにあり, 全長約 10m, 3 点で測定した平均水面幅 59.7cm, 平均水深 15.8cm, 2013 年 3 月 17 日 午前 10 時 20 分時点で平均水温 7.6 $^{\circ}$ C であった。COD は 17ppm であった。採集した 5 個体は体色が暗褐色で, すべての個体の尾の上下の縁に黄色の条線が見られた。体長は物差しを軽く当てて測定し, 平均体長は 9.9cm (標準偏差 0.742cm) 平均尾長は 4.6cm (標準偏差 0.652cm) であった。性別は尾の付け根の生殖器の盛り上がりで判断し, 雄 2 個体, 雌 2 個体, 不明 1 個体であった (表 1)。

2016 年 2 月現在, 3 個体を飼育している。現在飼育している個体にも採集個体と同様の黄色の条線が見ら

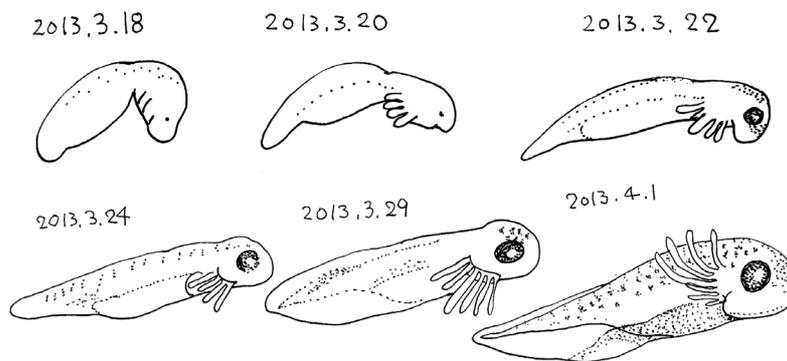


図 1 孵化前の個体のスケッチ

表 1 兵庫県神戸市藍那で捕獲したカスミサンショウウオの解析個体

Voucher	L	TL	sex	situation	source	AC No. (CYT1, CYT2, CR)
130072	10.0	4.0	F	collected	tail	LC125127, LC125132, LC125183
130073	10.0	5.0	M	collected	tail	LC125128, LC125133, LC125184
130074	9.5	4.0	M	collected	tail	LC125129, LC125134, LC125185
130075	11.0	5.5	F	collected	tail	LC125130, LC125135, LC125186
130076	9.0	4.5	-	collected	tail	LC125131, LC125136, LC125187
150001	3.0	1.0	-	grown	skin	—, LC125137, LC125188

Voucher : 標本番号, L : 頭胴長 (cm), TL : 尾長 (cm), sex : 性別 (F : 雌, M : 雄, - : 不明), source : DNA 抽出箇所, AC No. : 国際塩基配列データベースのアクセス番号 (CYT1 : チトクロム b 前半領域, CYT2 : チトクロム b 後半領域, CR : 調節領域 図 2)

れる。飼育個体の背面は黄褐色、体側は淡灰色である。飼育個体の背面には黒色の顆粒が点在し、また淡白色の顆粒が背面および体側に点在している。肋条は13本である。これらの特徴はカスミサンショウウオの特徴と同じである（中村・上野 1963；高田・大谷 2011）。チトクロムb前半（CYT1：514bp）と調節領域（CR：550bp）では解析個体（以後、Kobe Ainaとする）6個体（採集5，飼育1，表1）の塩基配列はすべて一致した。チトクロムb後半（CYT2：480bp）では個体番号130072以外すべて一致した。個体番号130072は他個体と比べて1塩基が異なっていた。

解析した3領域（CYT1:514bp, CYT2:480bp, CR:550bp, 図2）について、データベースを検索し、日本産サンショウウオ属のデータと比較した（それぞれ、図3,

4, 5）。各図の作成に用いた個々の個体間の遺伝距離の平均値（MEGA6 tool：Overall Mean Distance）は、CYT1では0.0849（標準誤差0.0173），CYT2では0.1370（標準誤差0.0132），CRでは0.0469（標準誤差0.0094）であった。調節領域（CR），チトクロムb前半領域（CYT1），チトクロムb後半領域（CYT2）の順に値が大きくなっていった。

チトクロムb前半の解析結果（CYT1）をもとに分子系統樹を作製した（図3）。日本産サンショウウオ属3種（トウホクサンショウウオ *H. lichenatus* Boulenger, トウキョウサンショウウオ, オオイタサンショウウオ *H. dunni* Tago）と Kobe Aina の4つのグループに分れた（分岐率97%以上, 395bp）。DQ652232（アクセッション番号）は100%の分岐率で Kobe Aina のグルー

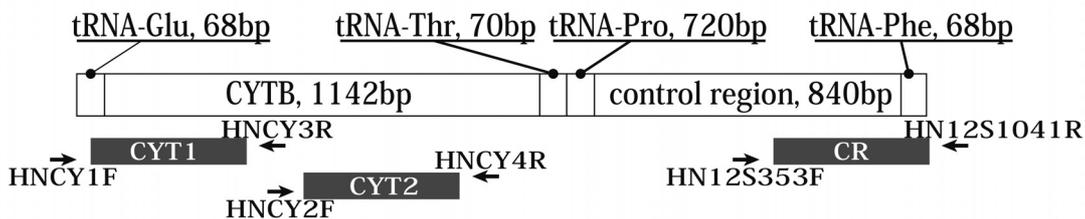


図2 塩基配列解読領域

プライマーセット HNCY1F/HNCY3R により **CYT1** 領域を、プライマーセット HNCY2F/HNCY4R により **CYT2** 領域を、プライマーセット HN12S353F/HN12S1041R により **CR** 領域をそれぞれ増幅・解読した。

表2 チトクロムb前半領域（CYT1）における兵庫県神戸市藍那産 Kobe Aina と日本産サンショウウオ属3種のグループ内平均遺伝距離

	d	SE
Kobe Aina, DQ652232	0.0043	<u>0.0020</u>
<i>H. lichenatus</i> トウホクサンショウウオ	0.0129	<u>0.0062</u>
<i>H. dunni</i> オオイタサンショウウオ	0.0043	<u>0.0026</u>
<i>H. tokyoensis</i> トウキョウサンショウウオ	0.0057	<u>0.0031</u>

d はグループ内平均遺伝距離（MEGA6 tool：Within Group Mean Distance），SE（アンダーライン）は標準誤差を示す。DQ652232 は Kobe Aina と同じグループに入れて処理した（以下、表3～5も同じ）。

表3 チトクロムb前半領域（CYT1）における兵庫県神戸市藍那産 Kobe Aina と日本産サンショウウオ属3種のグループ間平均遺伝距離

		1	2	3	4
1	Kobe Aina, DQ652232		<u>0.0235</u>	<u>0.0300</u>	<u>0.0237</u>
2	<i>H. lichenatus</i> トウホクサンショウウオ	0.1022		<u>0.0265</u>	<u>0.0207</u>
3	<i>H. dunni</i> オオイタサンショウウオ	0.1307	0.1108		<u>0.0272</u>
4	<i>H. tokyoensis</i> トウキョウサンショウウオ	0.0986	0.0894	0.1177	

表の右斜め下部分の数値はグループ間平均遺伝距離（MEGA6 tool：Between Group Mean Distance），表の右斜め上部分のアンダーラインの数値は標準誤差を示す。

表4 チトクロムb後半領域 (CYT2) における兵庫県神戸市藍那産 Kobe Aina と日本産サンショウウオ属6種のグループ内平均遺伝距離

group	d	SE
Kobe Aina, DQ652232	0.0076	<u>0.0021</u>
<i>H. nebulosus</i> カスミサンショウウオ	0.0466	<u>0.0069</u>
<i>H. lichenatus</i> トウホクサンショウウオ	0.0460	<u>0.0084</u>
<i>H. tokyoensis</i> トウキョウサンショウウオ	0.0102	<u>0.0038</u>
<i>H. retardatus</i> エゾサンショウウオ	0.0022	<u>0.0021</u>
<i>H. kimurae</i> ヒダサンショウウオ	0.0627	<u>0.0104</u>
<i>H. nigrescens</i> クロサンショウウオ	0.0224	<u>0.0057</u>

d は グループ内平均遺伝距離 (MEGA6 tool : Within Group Mean Distance), SE (アンダーライン) は標準誤差を示す。

表5 チトクロムb後半領域 (CYT2) における兵庫県神戸市藍那産 Kobe Aina と日本産サンショウウオ属6種のグループ間平均遺伝距離

	group	1	2	3	4	5	6	7
1	Kobe Aina, DQ652232		<u>0.0165</u>	<u>0.0174</u>	<u>0.0195</u>	<u>0.0246</u>	<u>0.0225</u>	<u>0.0191</u>
2	<i>H. nebulosus</i> カスミサンショウウオ	0.1229		<u>0.0166</u>	<u>0.0185</u>	<u>0.0262</u>	<u>0.0240</u>	<u>0.0197</u>
3	<i>H. lichenatus</i> トウホクサンショウウオ	0.1276	0.1381		<u>0.0216</u>	<u>0.0256</u>	<u>0.0228</u>	<u>0.0190</u>
4	<i>H. tokyoensis</i> トウキョウサンショウウオ	0.1345	0.1403	0.1692		<u>0.0239</u>	<u>0.0249</u>	<u>0.0190</u>
5	<i>H. retardatus</i> エゾサンショウウオ	0.1893	0.2139	0.2058	0.1738		<u>0.0227</u>	<u>0.0247</u>
6	<i>H. kimurae</i> ヒダサンショウウオ	0.1811	0.1962	0.1913	0.1972	0.1780		<u>0.0232</u>
7	<i>H. nigrescens</i> クロサンショウウオ	0.1371	0.1524	0.1403	0.1312	0.1787	0.1851	

表の右斜め下部分の数値はグループ間平均遺伝距離 (MEGA6 tool : Between Group Mean Distance), 表の右斜め上部分のアンダーラインの数値は標準誤差を示す。

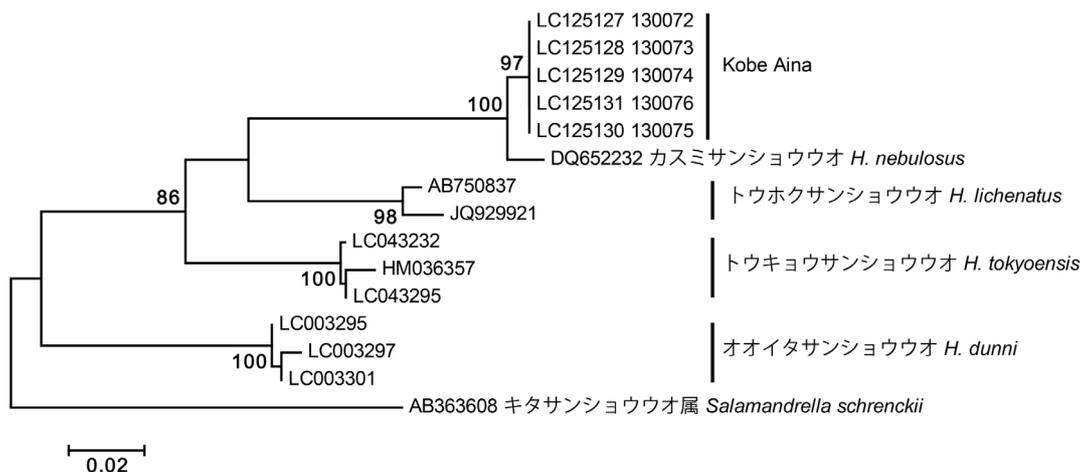


図3 チトクロムb前半 (CYT1) の Maximum Likelihood (ML) 法による系統樹

キタサンショウウオ属の1種 *Salamandrella schrenckii* Strauch を外群として用いた。枝の値は1000回繰り返したブーティストストラップ値 (%)。85%未満のブーティストストラップ値は表示していない。解析した塩基長は395bp。

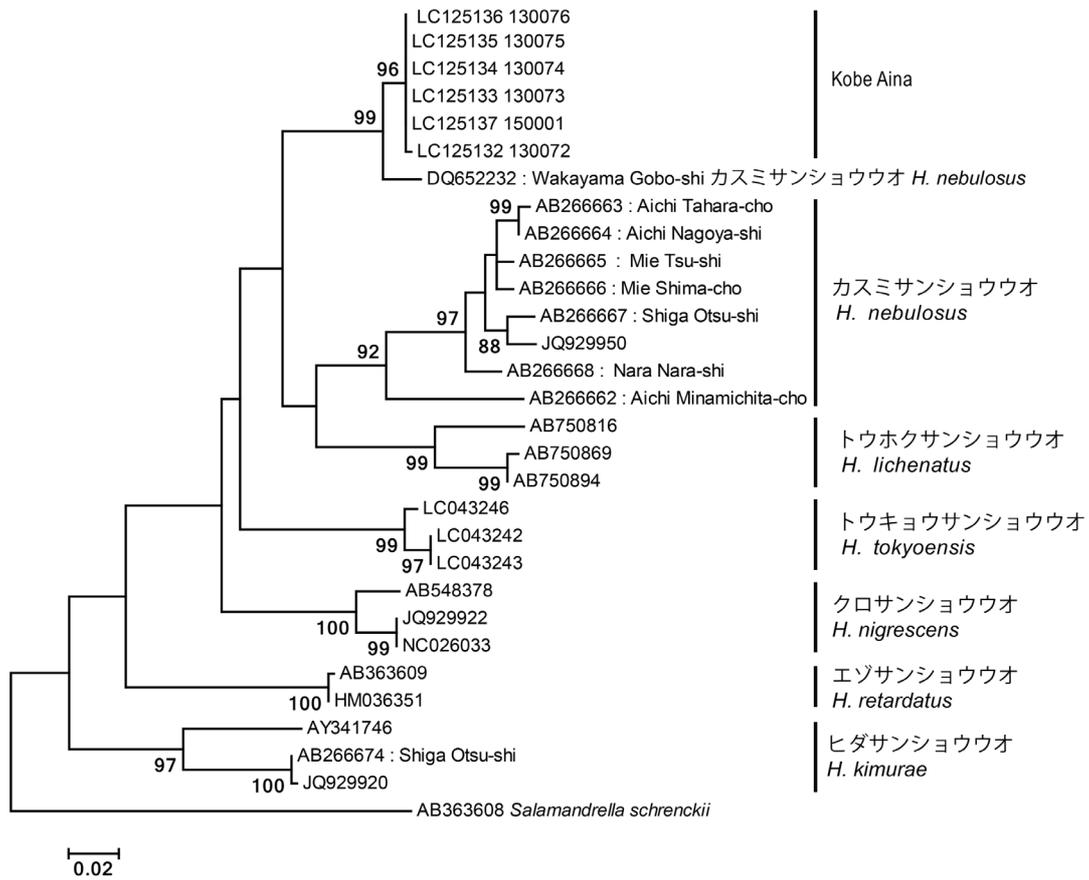


図4 チトクロムb後半 (CYT2) の ML 法による系統樹

キタサンショウウオ属の1種 *Salamandrella schrenckii* を外群として用いた。枝の値は1000回繰り返したブーストストラップ値 (%)。85% 未満のブートストラップ値は表示していない。解析した塩基長は 461bp。

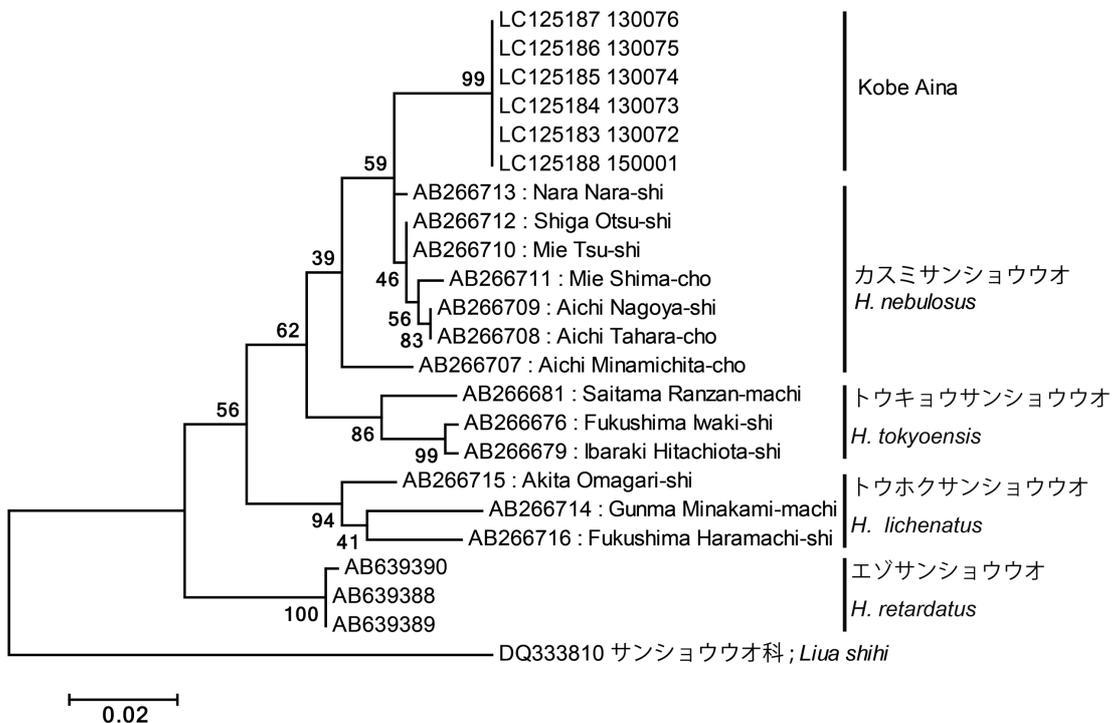


図5 調節領域 (CR) のML法による系統樹

サンショウウオ科の1種 *Liua shihi* を外群として用いた。枝の値は 1000回繰り返したブートストラップ値 (%)。解析した塩基長は 448bp。

プに入った。DQ652232 は和歌山県御坊市（北緯33° 53′，東経135° 08′）海拔100mで採集された個体から解析されたデータである（Lai & Lue 2008, 図6）。図3でグループ分けされた4つのグループのグループ内平均遺伝距離（MEGA6 tool：Within Group Mean Distance）およびグループ間平均遺伝距離（MEGA6 tool：Between Group Mean Distance）を求めた（表2, 表3）。図3をもとに、DQ652232 は Kobe Aina と同じグループに入れて処理した。Kobe Aina グループは日本産サンショウオ属3種のグループと0.0894から0.1307の遺伝距離を示した（表3）

チトクロムb後半の解析結果（CYT2）をもとに分子系統樹を作製した（図4）。日本産サンショウオ属6種（カスミサンショウオ, トウホクサンショウオ, クロサンショウオ *H. nigrescens* Stejneger, トウキョウサンショウオ, エゾサンショウオ *H. retardatus* Dunn, ヒダサンショウオ *H. kimurae* Dunn）とKobe Aina の7つのグループに分れた（分岐率99%以上, 461bp）。DQ652232 は99%の分岐率で Kobe Aina のグループに入った。この Kobe Aina を含むグループは DQ652232 以外のカスミサンショウオと別グループを形成した。図4でグループ分けされた7つ

のグループのグループ内平均遺伝距離（Within Group Mean Distance）およびグループ間平均遺伝距離（Between Group Mean Distance）を求めた（表4, 表5）。図4をもとに、DQ652232 は Kobe Aina と同じグループに入れて処理した。Kobe Aina グループは日本産サンショウオ属6種のグループと0.1229から0.1972の遺伝距離を示した（表5）。

調節領域の解析結果（CR）をもとに分子系統樹を作製した（図5）。日本産サンショウオ属3種（トウキョウサンショウオ, トウホクサンショウオ, エゾサンショウオ）と Kobe Aina はグループ（分岐率85%以上）を形成したが、カスミサンショウオのデータは、その他4グループに対してグループを形成しなかった（図5）。

### 考 察

Kobe Aina は形態的にはカスミサンショウオと推定できたが、遺伝子解析による裏付けは困難であった。一般的にはミトコンドリア DNA の調節領域はチトクロムb領域よりも変異が大きいといわれている（小池・松井 2003）。しかし今回解析したミトコンドリア DNA のチトクロムbおよび調節領域付近の3領域（CYT1,

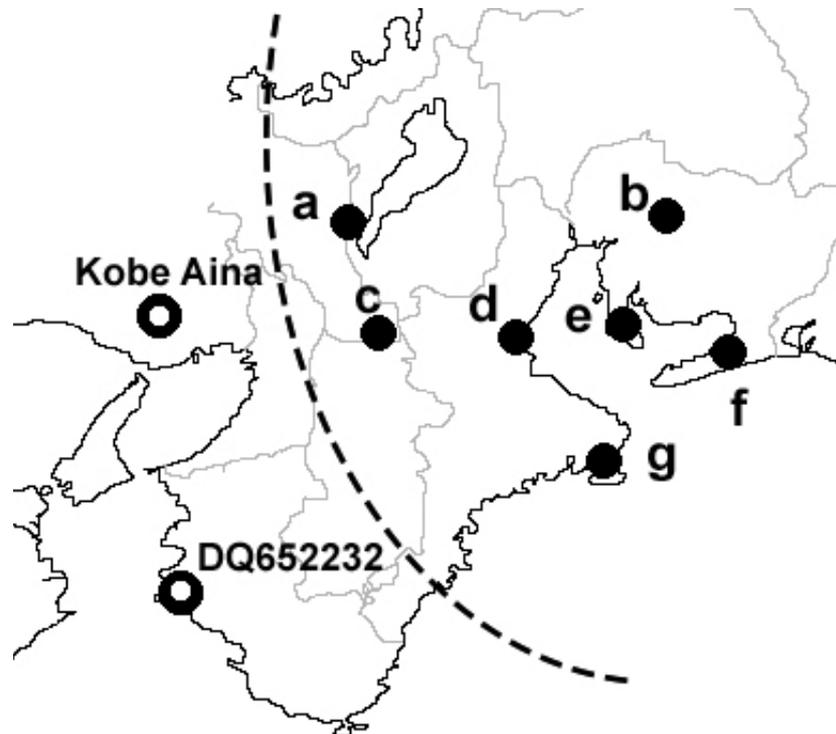


図6 Kobe Aina の採集場所と先行研究におけるカスミサンショウオの採集場所

●は、チトクロムb後半領域の塩基配列 AB266662-AB266668 および、調節領域の塩基配列 AB266707-AB266713 が解析された個体（a~g）の採集場所を示す。○は、チトクロムbの塩基配列 DQ652232 が解析された個体および Kobe Aina の採集場所を示す。破線は二つのグループの分布を矛盾なく分ける境界を示す。 a: AB266667; AB266712. b: AB266664; AB266709. c: AB266668; AB266713. d: AB266665; AB266710. e: AB266662; AB266707. f: AB266663; AB266708. g: AB266666; AB266711.

CYT2, CR 図 2) では, CR 領域 (調節領域) の平均遺伝距離 (Overall Mean Distance) が一番小さかった。カスミサンショウウオが CR 領域の解析 (図 5) の際にグループを形成しなかったのは, CR 領域の変異が小さいためではないかと考えられる。ただしこの調節領域においてもトウキョウサンショウウオ, トウホクサンショウウオ, エゾサンショウウオの 3 種はグループを形成した (図 5)。

チトクロム b の 2 領域 (CYT1, CYT2) の解析において, DQ652232 を含む Kobe Aina グループは DQ652232 を除くカスミサンショウウオとは同一グループを形成せず, 他の日本産サンショウウオ属 6 種 (トウホクサンショウウオ, クロサンショウウオ, トウキョウサンショウウオ, エゾサンショウウオ, ヒダサンショウウオ, オオイタサンショウウオ) と同様に別グループを形成した (図 3, 図 4, 図 5)。カスミサンショウウオを含む日本産サンショウウオ属 7 種と Kobe Aina グループとのグループ間平均遺伝距離 (Between Group Mean Distance) は 0.0894~0.1972 であった。Kobe Aina グループは日本産サンショウウオ属 7 種と同等に一定のグループ間平均遺伝距離を保った (表 3, 表 5)。Kobe Aina グループと DQ652232 を除くカスミサンショウウオグループとの距離がとりたてて短いわけではなかったのである。

DQ652232 を含む Kobe Aina グループ と, データベース上のその他のカスミサンショウウオのグループの, 地理的分布を矛盾なく説明することができる境界線を図 6 に示した。この境界線は Nishioka *et al.* (1993) が日本産ツチガエルを, 近畿地方中央部を境に, 東西の 2 群に分けた境界線と一致する。松井 (2005) は, カスミサンショウウオは形態だけでなく遺伝的にも変異に富み, 九州から中国西部にかけての一群と, それ以外 (分布境界は島根県内) は遺伝的分化が進んでおり, 後者内部でも中国山地産の特異な体色を持つ集団がほかと (アロザイム分析の結果得られている遺伝距離をもとに) 区別され, 複数の独立種を含むものと考えられる, と述べている。今回我々が解析した DQ652232 を含む Kobe Aina グループは, このような, 現在はカスミサンショウウオと分類されている集団に内在する複数の独立種のひとつである可能性が示される。

今後は Recombination activating protein 1 (RAG1) などの核 DNA の解析もあわせて進める必要があると

思われる。また, 兵庫県下の中高校生と連携を広げ, より広範囲な地域の調査を実施し, 小型サンショウウオ類の分布および集団構造を解明していきたい。

## 謝 辞

遺伝子解析のご指導をいただいた兵庫教育大学 笠原恵准教授に感謝の意を表す。

## 引用文献

- 小池裕子・松井正文. 2003. 進化速度と分析領域. 生物進化と保全遺伝学. *in* 小池裕子・松井正文編. 保全遺伝学, 28~39. 東京大学出版会, 東京.
- Lai J. S. and K. Y. Lue. 2008. Two new *Hynobius* (Caudata : Hynobiidae) salamanders from Taiwan. *Herpetologica*, **64** : 63-80.
- 松井正文. 2005. 両生類の地理的変異. 種分化と動物地理. *in* 増田隆一・阿部永編. 動物地理の自然史-分布と多様性の進化学-, 63~77. 北海道大学図書刊行会, 札幌.
- Matsui M., A. Tominaga, T. Hayashi, Y. Misawa and S. Tanabe. 2007. Phylogenetic relationships and phylogeography of *Hynobius tokyoensis* (Amphibia : Caudata) using complete sequences of cytochrome b and control region genes of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44** : 204-216.
- 中村健児・上野俊一. 1963. 原色日本両生爬虫類図鑑. 保育社の原色図鑑30. 214pp. 保育社, 大阪.
- Nishioka M., Y. Kodama, M. Sumida and M. Ryuzaki. 1993. Systematic Evolution of 40 Populations of *Rana rugosa* Distributed in Japan Elucidated by Electrophoresis. *Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol.*, Hiroshima Univ, **12**: 83-131.
- 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 and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, **30** : 2725-2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197 PMID: 24132122.
- 吉澤 賢治・道越 祐一・本間 久英. 2005. トウキョウサンショウウオの mtDNA D-loop 領域遺伝子解析. *爬虫両棲類学会報*, **2** : 123-129.