

神戸市に生息するセトウチサンショウウオの分布と遺伝的特性の解明

—兵庫県内他地域との比較—

(環境DNAを用いたセトウチサンショウウオの分布の推定)

原田 侑季 (兵庫県立尼崎小田高校 サンショウウオ研究班)

はじめに

カスミサンショウウオ *Hynobius nebulosus* は長年、愛知県以西に1種のみが生息するとされていた(松井 2005, MATSUI 2006, 青木 2011, TANI and HOELKER 2016)。2019年2月, DNAの塩基配列や形態・成体の比較により, 9種に分けるのが妥当とする論文が発表された。兵庫県では, このうちセトウチサンショウウオ *H. setouchi* が瀬戸内海沿岸に, ヒバサンショウウオ *H. utsunomiyaorum* が宍粟市に, サンインサンショウウオ *H. setoi* が新温泉町に生息することがわかっている (MATSUI 2019, 高橋 2020)。国営明石海峡公園神戸地区あいな里山公園においては, NPOの兵庫・水辺ネットワークなどの里山保全活動により, セトウチサンショウウオの生息が毎年確認されている。また一般市民対象の観察会なども開催されている。

9種の中の1種であるヤマトサンショウウオ *H. vandenburghi* の環境DNAの検出方法が報告された (SAKAI 2019)。環境DNAとは自然界に生息している生体から剥がれ落ちた状態で自然界中に漂っているDNAを指し, これを解析することによりその場所に生息している生物を推定することができる。今回は神戸市に生息するセトウチサンショウウオの分布と遺伝的特性の解明し, 兵庫県内他地域との比較するために有効であると推測される環境DNAの検出方法を研究するために, 「ヤマトサンショウウオの環境DNAの検出と同様の方法でセトウチサンショウウオの分布が推定できる。」という仮説を立てて, これを検証することを目的とした。

方法

2019年12月19日(木)にあいな里山公園相談ヶ辻付近の池で採水したサンプルを持ち帰り(サンプルA5, A8, A9, A10, A11)さらにセトウチサンショウウオが生息していないことが確実な本校プールでも採水した(サンプルB)。採水したサンプルをゲ

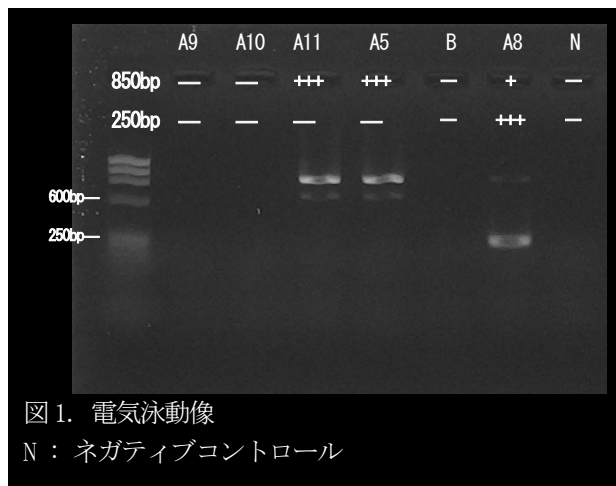


表1. 検出結果

サンプル名	採水場所	増幅産物	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目
A5	あいな里山公園	約250bp	—	—	—	—	—
		約850bp	+++	+++	+++	+++	+++
A8	あいな里山公園	約250bp	—	+++	+++	+++	+++
		約850bp	+++	+	+	+	+
A9	あいな里山公園	約250bp	—	—	—	—	—
		約850bp	+++	—	—	—	—
A10	あいな里山公園	約250bp	—	—	—	—	—
		約850bp	—	—	—	—	—
A11	あいな里山公園	約250bp	—	—	—	—	—
		約850bp	—	+++	—	—	—
B	尼崎小田高校プール	約250bp	—	—	—	—	—
		約850bp	—	—	—	—	—

+++ : 顕著なバンド, ++ : バンド, + : 薄いバンドを示す。

ラスフィルターでろ過し、ろ物から DNA 抽出キット (DN easy) を用い、環境 DNA サンプルを抽出した (源ら 2019)。

このサンプルを用いてミトコンドリア DNA の 12S 領域に対する PCR 法による DNA 増幅を行った。条件は 95°C2 分、その後 98°C10 秒・62°C15 秒・68°C15 秒、55 サイクルであった (SAKAI 2019)。DNA ポリメラーゼは Tks Gflex™ (TAKARA) を用いた。2%アガロースゲル電気泳動によりバンドの有無を確認した。電気泳動で確認した約 250bp のバンドと約 850bp のバンドは北海道システムサイエンスに業者委託して塩基配列を解読した。

## 結果

PCR 条件はいろいろ試してみたが、SAKAI ら (2019) に従った条件 (95°C2 分、その後 98°C10 秒・62°C15 秒・68°C15 秒、55 サイクル) が最もスミアやノイズと思われるバンドが少なかった。A8 からは約 250bp のバンドと約 850bp のバンドが得られた。その他の A5, A9, A11 からは約 850bp のバンドのみが得られた。あいな里山公園の池 A10 および尼崎小田高等学校のプールで採水した B からは目的のバンドが検出されなかった (表 1, 図 1)。塩基配列を解読した約 250bp のバンドと約 850bp バンドはともに、ノイズが激しく、特定の塩基配列を反映したものではなく、配列の解読は全くできなかった (図 2)。

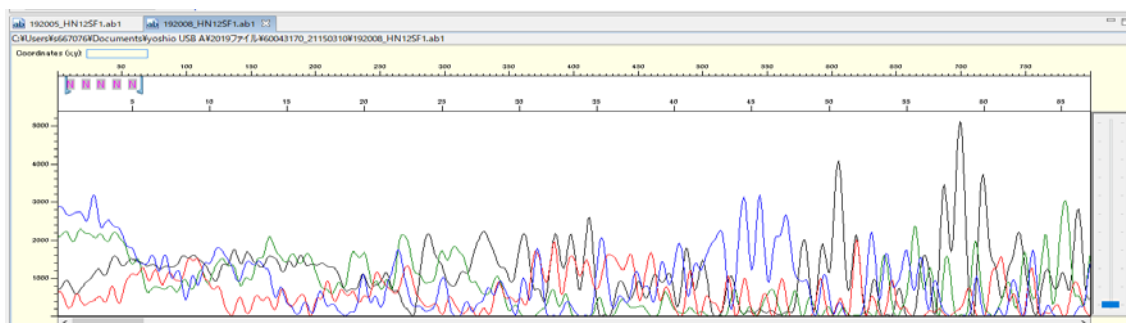


図 2. 約 250bp のバンドのシーケンス結果

## 考察

先行研究においてはミトコンドリア DNA の 12S 領域の PCR 法による DNA 増幅の結果、238bp (AC:LC485185) のバンドが得られた。よって今回得られた約 250bp のバンドは該当するバンドの可能性が高かったが、約 850bp のバンドは該当しなかった。また先行研究によれば環境 DNA の検出では同一サンプルの PCR 法による DNA 増幅を 5 回行ったうち、5 回すべてにおいて検出されなくても陽性であると判断し、ヤマトサンショウウオの調査が実施された。同様に判断すれば、今回の実験では A8 では 5 回中 4 回において約 250bp のバンドが検出され、セトウチサンショウウオの分布が推定されるとの判断が可能であると考えられたが、その他のサンプルについては分布を推定することは難しかった。

今回得られた約 250bp と約 850bp のバンドの塩基配列の解読を行った結果、ノイズが多く、特定の 12S 領域の配列は解読できなかった。約 250bp のバンドについてもサンショウウオの環境 DNA を増幅したバンドとは断定できなかった。

これらのことから、ヤマトサンショウウオと同様の方法でセトウチサンショウウオの環境 DNA を検出することは、成功しなかった。よって仮説を肯定することはできなかった。しかし、今回の実験だけで仮説を否定することも難しいと考えられた。

今後は再度 PCR 条件を検討し、より最適な条件を見つけていく必要があると思われる。またセトウチサンショウウオの成体から抽出した DNA サンプルで 12S 領域が増幅されるかどうか確認する必要があると思われる。またプライマーの塩基配列の検討なども行っていく必要があると思われる。今後の継続的な研究が期待された。

## 参考文献

- 青木玄・松井正文・西川完途・田邊真吾・大川博志. 2011. ミトコンドリア DNA に基づくカスミサンショウウオの遺伝的変異. 爬虫両棲類学会報 2011 : 67(発表要旨).
- MATSUI M., H. Okawa, K. Nishikawa, G. Aoki, K. Eto, N. Yoshikawa, S. Tanabe, Y. Misawa, A. Tominaga. 2019. Systematics of the Widely Distributed Japanese Clouded Salamander, *Hynobius nebulosus* (Amphibia: Caudata: Hynobiidae), and Its Closest Relatives, *Current Herpetology*, 38(1):32-90.
- 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.
- 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.
- 源利文, 近藤倫生, 清野聡子, 高原輝彦, 土居秀幸, 中村圭吾, 宮正樹, 山中裕樹, 佐土哲也, 山本哲史. 2019. 環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver. 2.1. 一般社団法人環境 DNA 学会
- 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.
- 高橋鉄美. 2020 ひょうごのレッドリスト展 : ひととはく通信 ハーモニー, 106 , 2-3. 兵庫県立人と自然の博物館, 三田.
- SAKAI Y., A. Kusakabe, K. Tsuchida, Y. Tsuzuku, S. Okada, T. Kitamura, S. Tomita, T. Mukai, M. Tagami, M. Takagi, Y. Yaoi, T. Minamoto. 2019. Discovery of an unrecorded population of Yamato salamander (*Hynobius vandenburghi*) by GIS and eDNA analysis. *Environmental DNA*, 1 : 281-289.