

Elucidation of the genetic characteristics of *Hynobius setouchi* inhabiting
Akashi Kaikyo National Government Park - Kobe Area in Kobe City

神戸市あいな里山公園に生息する
セトウチサンショウウオ *Hynobius setouchi* の遺伝的特性の解明

Kamakura Atomu, Shintani Tsubame

(Hyogo Prefectural Amagasaki-Oda High School Science Research Department Biology Group)

鎌倉 亜斗夢, 新谷 翼芽
(兵庫県立尼崎小田高校 科学研究部 生物班)

Abstract

The population of *Hynobius setouchi* in Akashi Kaikyo National Government Park - Kobe Area (Aina Satoyama Park) had a haplotype diversity (h) \pm standard deviation (SD) of 0.667 ± 0.113 and a nucleotide diversity (π) \pm standard deviation (SD) of 0.00447 ± 0.00111 . This population was presumed to be a population with a relatively small haplotype diversity (h) and a relatively large base diversity (π). It was inferred that, the population of Aina Satoyama Park is a valuable population with high genetic diversity. In the past a small population isolated from a large population due to a bottleneck that has been stabilized and has maintained a small population for a long period of time.

要旨

国営明石海峡公園神戸地区あいな里山公園のセトウチサンショウウオの個体群はハプロタイプ多様度(h) \pm 標準偏差(SD)は 0.667 ± 0.113 、塩基多様度(π) \pm 標準偏差(SD)は 0.00447 ± 0.00111 であり、ハプロタイプ多様度(h)が比較的小さく塩基多様度(π)が比較的大きい集団であると推定された。このことからあいな里山公園の個体群はボトルネックにより過去に大きな集団から隔離された後に、長い期間、安定的して小集団を維持続けてきたと考えられた。よってあいな里山公園のセトウチサンショウウオ個体群は遺伝的多様性の高い貴重な個体群であると推察された。

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)。

MATSUI *et al.* (2019) はミトコンドリアDNA(以後mtDNAとする)のシトクロムb(以後cytbとする)の塩基配列解析から作成した系統樹においてセトウチサンショウウオが1つのクレード(2Ab)を形成することを示した。このクレード2Abには85-100%で分岐する3つのクレード(本報告ではA2b1a, A2b1b, A2b2とする)が存在した。クレードA2b2は岡山県産個体および香川県産個体から構成された。クレードA2b1aは兵庫県産個体、大阪府産個体、和歌山県産個体および徳島県産個体から構成された。またクレード

ド A2b1b は徳島県産個体および岡山県産個体から構成された。兵庫県では姫路市の 1 個体および神戸市名谷の 4 個体がクレード A2b1a に属した。岡山県岡山市北区建部町下神目ではクレード A2b1b に属する個体 (KUHE OU0285: Holotype) とクレード A2b2 に属する個体 (KUHE OU0287: Paratype) が採集された。SUGAWARA *et al.*. (2016) はトウキョウサンショウウオ *H. tokyoensis* 46 個体群 815 個体について *cytb* 領域および核 DNA のマイクロサテライト領域の塩基配列を解読し、トウキョウサンショウウオの地域間の遺伝的差異や遺伝的多様性を示した。

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 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。今回はこのあいな里山公園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を目的とした。

方法

2013 年 3 月および 2018 年 6 月にあいな里山公園 (神戸市北区山田町) でサンプルを採集し (2018 年 6 月については、あいな里山公園の許可を得て実施した)、尾の一部を切除し、組織脱水溶液 A (エース) (和光純薬工業) 中に保管した。DNA エキストラクター FM キット (和光純薬工業) を用いて粗全 DNA を抽出した。ミトコンドリア DNA の *cytb* 後半領域 850bp に対し設計されたプライマーセットを用いて PCR 法による DNA 増幅を行った。PCR 反応溶液は、Tks Gflex DNA Polymerase (TAKARA) 0.5 unit, 鋳型 DNA 1 μ L, 各プライマー 5 pmol, 2 \times Gflex PCR Buffer (Mg²⁺, dNTP plus) 10 μ L, に滅菌蒸留水を加え、全量を 20 μ L とした。94 $^{\circ}$ C で 2 分の熱変性後、98 $^{\circ}$ C で 10 秒の熱変性、55 $^{\circ}$ C で 15 秒のアニーリング、68 $^{\circ}$ C で 25 秒の伸張反応のサイクルを 40 回繰り返す。最後に 68 $^{\circ}$ C で 7 分間の伸張反応を行った。サーマルサイクラーは PC-708 (ASTEC 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 の増幅バンドを確認し、調整後、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し、塩基配列を決定した。決定した塩基配列は日本 DNA データバンク (DDBJ) に登録した。

解析データは MEGA6 ; MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS 6 (Tamura *et al.* 2013) でアラインメントし、DnaSP ver. 5.10.01 (Rozas J. *et al.* 2009) を用いてハプロタイプを決定し、遺伝的多様性の指標であるハプロタイプ多様度 h と塩基多様度 π を求めた。

結果

解析を行った 16 個体から 5 つのハプロタイプが確認された (表 1)。すべてのハプロタイプはクレード A2b1a に属した。ハプロタイプ多様度 (h) \pm 標準偏差 (SD) は 0.667 ± 0.113 、塩基多様度 (π) \pm 標準偏差 (SD) は 0.00447 ± 0.00111 であった。

考察

セトウチサンショウウオのハプロタイプ多様度 (h) および塩基多様度 (π) についてはあまり報告がないので、便宜的に、SUGAWARA *et al.* (2016) のトウキョウサンショウウオについての報告と比較して考察することにした。ハプロタイプ多様度 (h) および塩基多様度 (π) について、あいな里山公園のセトウチサンショウウオの値の上下 2 SE (標準誤差) の範囲に、比較したトウキョウサンショウウオの値の上下 2 SE (標準誤差) の範囲がかからなければ有意な差があると判断した。トウキョウサンショウウオ 45 地点の個体群の中でと比較すると、あいな里山公園より有意にハプロタイプ多様度 (h) が大きい地点は 6 地点、これに対しあいな里山公園より有意にハプロタイプ多様度 (h) が小さい地点は 31 地点であった (図 1)。またあいな里山公園より有意に塩基多様度 (π) が大きい地点は 24 地点、これに対しあいな里山公園より有意に塩基多様度 (π) が小さい地点は 16 地点であった (図 2)。このデータをもとに分散図を作成するとあいな里山公園の個体群はハプロタイプ多様度 (h) が比較的小さく、塩基多様度 (π) が比較的大きいグループに属することが推測された (図 3 領域 c)。

井鷲・陶山 (2013) はハプロタイプ多様度 (h) と塩基多様度 (π) の散布図 (図 3) を 4 領域に分け、それ

それぞれの領域について個体群の歴史を以下のように考察した。ハプロタイプ多様度(h)と塩基多様度(π)の違いをどのレベルでとらえるかが問題にはなるが、図3 a 領域にはハプロタイプ多様度(h)および塩基多様度(π)が比較的小さい、最近ボトルネックが起こった個体群が属す。図3 b 領域にはハプロタイプ多様度(h)が比較的大きく塩基多様度(π)が比較的小さい、ボトルネック後の急速な個体群の成長と突然変異が蓄積した個体群が属す。図3 c 領域にはハプロタイプ多様度(h)が比較的小さく塩基多様度(π)が比較的大きい、ボトルネックにより多様性を失った長い進化的歴史を持つ個体群が属す。図3 d 領域にはハプロタイプ多様度(h)および塩基多様度(π)がともに比較的大きい、ボトルネックを経験していない長い進化的歴史を持つ大きくて安定した個体群が属す。これに従うと、あいな里山公園の個体群は図3のc領域に属し、過去に大きな集団から隔離された小集団が安定的して長い期間小集団を維持続けてきたと推察された。よってあいな里山公園のセトウチサンショウウオ個体群は遺伝的多様性の高い貴重な個体群であると推察された。

今回はトウキョウサンショウウオのデータ(SUGAWARA *et al.*, 2016)を用いて考察したが、今後は他の近隣地域の個体群も遺伝的に解析し、データを増やし、セトウチサンショウウオのデータを用いて研究していきたい。また保全活動を行っている方々と研究成果を共有し、生物多様性の保全に貢献していきたい。

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).
- 井鷲裕司・陶山佳久. 2013 生態学者が書いた DNA の本-メンデルの法則から遺伝情報の読み方まで, 113-114. 文一総合出版, 東京.
- 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.
- ROZAS J. LIBRADO P. SANCHEZ-DELBARRIO J. C. MESSEGUER X. ROZAS R.. 2009. DnaSP 5.10.00. Universitat de Barcelona, Spain.
- 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.
- 高橋鉄美. 2020 ひょうごのレッドリスト展 : ひとく通信 ハーモニー, 106, 2-3. 兵庫県立人と自然の博物館, 三田.
- Sugawara H., T. Kusano, F. Hayashi. 2016. Fine-Scale genetic differentiation in a Salamander *Hynobius tokyoensis* living in fragmented urban habitats in and around Tokyo, Japan. *Zoological Science*, 33(5):476-484.

謝辞

京都大学大学院准教授 西川完途氏, 兵庫教育大学准教授 笠原恵氏, 首都大学東京助教 草野保氏にご指導いただいた. サンプル採集にあたっては国営明石海峡公園神戸地区管理センター 高畑正氏, 高橋真理子氏, 兵庫・水辺ネットワーク 大嶋範行氏・安井幸男氏, 埼玉県立川の博物館 藤田宏之氏にご尽力ご指導いただいた. 平成 28・29・30・31・令和 2 年度神戸市公園緑化協会神戸みどりの夢基金, 2018 年度公益財団法人武田科学振興財団 (Takeda Science Foundation) 中学校・高等学校理科教育振興助成より助成を受けた. 皆様に感謝いたします.

Table 1. Decoding results of the cytb region (850 bp) of mtDNA

表 1. mtDNA の cytb 領域(850bp) の解読結果

Collection date	Haplotype name					Total population
	Hap_1	Hap_2	Hap_3	Hap_4	Hap_5	
Mar. 17, 2013	0	0	3	0	1	4
June 23, 2018	2	1	6	3	0	12

The numbers in the table represent the number of individuals.

表の中の数字は個体数を表す.

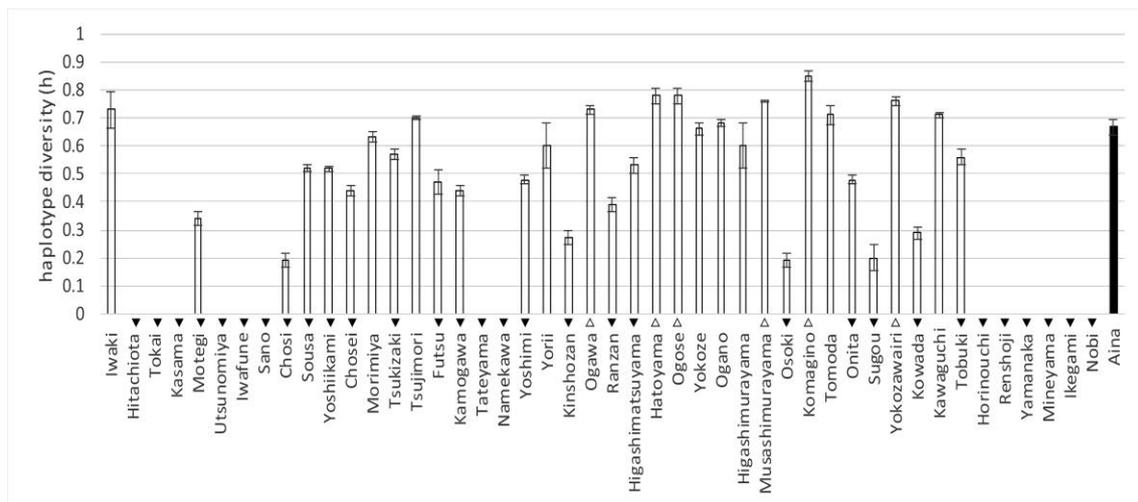


Fig.1 Haplotype diversity (h) of *Hynobius tokyoensis* (46 population : □) and *H. setouchi* (Yamada-cho, Kobe : ■).

The horizontal axis indicates the collection site. The error bar is $\pm 2SD$. Data for *H. tokyoensis* are quoted from SUGAWARA *et al.* (2016). White triangles(Δ) are populations that show significantly larger values than the *H. setouchi* (Yamada-cho, Kobe City: ■). Black inverted triangles(\blacktriangledown) are populations that show significantly larger values than the *H. setouchi* (Yamada-cho, Kobe City: ■).

図 1. トウキョウサンショウウオ 46 個体群(□)とセトウチサンショウウオ (神戸市山田町あいな里山公園 : ■) のハプロタイプ多様度(h)

横軸は採集地を示す. エラーバーは $\pm 2SD$. トウキョウサンショウウオのデータ(□)は SUGAWARA *et al.* (2016) より引用. 白三角形(Δ)はセトウチサンショウウオ (神戸市山田町 : ■) に比べて有意に大きい値を示す個体群. 黒三角形(\blacktriangledown)はセトウチサンショウウオ (神戸市山田町 : ■) に比べて有意に小さい値を示す個体群.

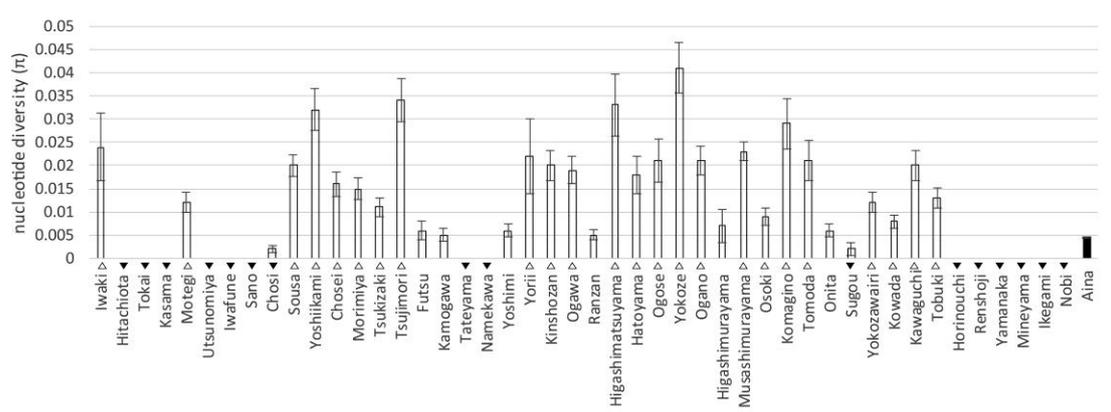


Fig.2 Nucleotide diversity (π) of *Hynobius tokyoens* (46 population: □) and *H. setouchi* (Yamada-cho, Kobe: ■).

The horizontal axis indicates the collection site. The error bar is $\pm 2SD$. Data of *H. tokyoens* are quoted from SUGAWARA *et al.* (2016). White triangles(△) are populations that show significantly larger values than the *H. setouchi* (Yamada-cho, Kobe City: ■). Black inverted triangles(▼) are populations that show significantly larger values than the *H. setouchi* (Yamada-cho, Kobe City: ■).

図2. 46 個体群のトウキョウサンショウウオ(□)とセトウチサンショウウオ(神戸市山田町あいな里山公園: ■)の塩基多様度(π)

横軸は採集地を示す。エラーバーは $\pm 2SD$ 。トウキョウサンショウウオのデータ(□)はSUGAWARA *et al.* (2016)より引用。白三角形(△)はセトウチサンショウウオ(神戸市山田町: ■)に比べて有意に大きい値を示す個体群。黒三角形(▼)はセトウチサンショウウオ(■)に比べて有意に小さい値を示す個体群。

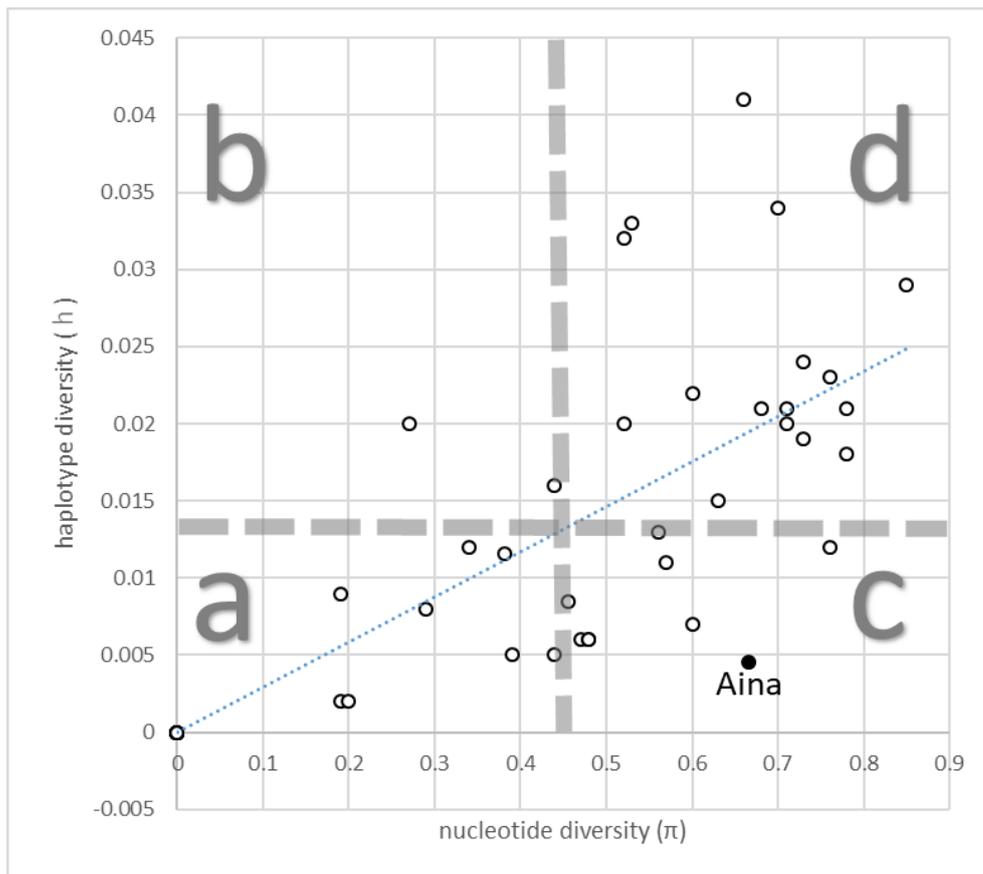


Fig. 3. Scatter plot of haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π).

The upward sloping diagonal line is a linear approximation curve. Graph region a is where haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) are relatively small. Graph region b is where haplotype diversity (h) is relatively large and nucleotide diversity (π) is relatively small. Graph region c is where haplotype diversity (h) is relatively small and nucleotide diversity (π) is relatively large. Graph region d is where haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) are relatively large. Open circles(\circ) indicate the data of *H. toyokoens* quoted from SUGAWARA *et al.* (2016), and a closed circle(\bullet) indicates the data of *H. setouchi* (Yamada-cho, Kobe City).

図3. ハプロタイプ多様度(h)と塩基多様度(π)の散布図

斜め上向きの直線は線形近似曲線。a はハプロタイプ多様度(h)および塩基多様度(π)が比較的小さい領域、bはハプロタイプ多様度(h)が比較的大きく、塩基多様度(π)が比較的小さい領域、cはハプロタイプ多様度(h)が比較的小さく、塩基多様度(π)が比較的大きい領域、d はハプロタイプ多様度(h)および塩基多様度(π)が比較的大きい領域を示す。白丸(\circ)は SUGAWARA *et al.* (2016)より引用したトウキョウサンショウウオのデータ、黒丸(\bullet)はセトウチサンショウウオ(神戸市山田町)のデータを示す。