

兵庫県南東部産セトウチサンショウウオ *Hynobius setouchi* と  
ヤマトサンショウウオ *H. vandenburghi* の種判別 DNA マーカーの開発  
(兵庫県立尼崎小田高等学校)  
鈴木 一誠

## 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、各地域で小型サンショウウオ類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。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。

旧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 (MATSUI 2006, 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* が瀬戸内海沿岸に分布し、淀川水系を挟んで大阪側にヤマトサンショウウオ *H. vandenburghi* が分布する。

セトウチサンショウウオとヤマトサンショウウオは分布が隣接しているが、一般人には形態による種判別は困難を極める。DNA抽出・PCR法によるDNA増幅・塩基配列の解読などを行えばDNA系統解析による種判別は可能であるが、ある程度の専門的な設備と技術と費用と日数がかかり、市民活動の範囲を超えている。このためRFLP法などの塩基配列の解読を行わない種判別法を開発する必要性に迫られている。また近年、コロナウィルスのPCR検査などの需要もあって、PCR法の新しい試薬が販売された。

今回は最新試薬(PrimeSTAR® GXL Premix Fast, Dye plus, TAKARA)を用いて、両種を判別するRFLP法を開発し、時間を短く、手間を少なく、費用も少なく多量の個体を解析できる解析手法開発の先駆けとなることを目的とした。

## 2. 材料と方法

### 2.1. DNA マーカーの開発

本校が保管する兵庫県南東部産セトウチサンショウウオの解読済みミトコンドリア(mt)DNAチトクロムb(cytb)領域データ(75個体、16ハプロタイプ)とデータベースのヤマトサンショウウオ(13ハプロタイプ)のデータを用いて制限酵素の認識部位を検索した。検索にはNEBcutter V2.0(<https://nc2.neb.com/NEBcutter2/>)を利用した。その結果、制限酵素RsaIを候補として選んだ。この酵素はセトウチサンショウウオの該当領域を162番目

と 321 番目の塩基 2 か所で切断するが、 ヤマトサンショウウオの該当領域は切断しなかった(表 1). 酵素処理の結果予測は、 634 塩基対(bp)の PCR 産物を 366bp, 160bp, 120bp に切断するものと予想された.

表 1. Cytb 領域の切断予想

種名	採集地	種名_ハプロタイプ_アクセッションナンバーもしくは標本番号	RsaI処理予測(切断部位)
セトウチサンショウウオ	兵庫県三田市	HS H1 FS 180021	2cutter (162,321)
		HS H2 FS 180024	
		HS H3 FS 180025	
	兵庫県淡路市	HS H4 NA 180013	
		HS H5 NA 180014	
		HS H6 NA 180015	
		HS H7 NA 180017	
		HS H8 NA 180057	
		HS H9 NA 180074	
	兵庫県神戸市	HS H10 YK 130072	
		HS H11 YK 130075	
		HS H12 YK 180033	
		HS H13 YK 180045	
		HS H14 YK 180046	
		HS H15 YK 180077	
		HS H16 YK 180092	
ヤマトサンショウウオ	愛知県田原市	HV H1 LC436435.1 KUHE:24863	0cutter
	滋賀県日野町	HV H2 LC436436.1 KUHE:T2655	
	京都府南山城村	HV H3 LC436437.1 KUHE:9300	
	奈良県生駒市	HV H4 LC436438.1 KUHE:26462	
	大阪府阪南市	HV H5 LC436439.1 KUHE:18553	
	愛知県名古屋市	HV H6 LC436440.1 KUHE:8078	
	愛知県知多市	HV H7 LC436441.1 KUHE:9241	
	岐阜県岐阜市	HV H8 LC485189.1 2017-Gifu-A	
	滋賀県長浜市	HV H9 LC495184.1 tobakami9	
	滋賀県彦根市	HV H10 LC495185.1 kouzin1	
		HV H11 LC495187.1 kouzin9	
		HV H12 LC495188.1 kouzin6	
		HV H13 LC495189.1 kouzin11	

PCR 法に用いるプライマーはセトウチサンショウウオ YK\_180044(兵庫県神戸市産)のデータを用いて、 Primer3 v.0.4.0(<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)を利用して、設計した(表 2).

表 2.

プライマー名	塩基配列	塩基長	Tm
HNCYF043F	5'-CTGCCTGATTGCACAAATTGTTACAGGAC-3'	29mer	69.89°C
HNCYR686R	5'-CTGGGTCACCTAGAAGGTTAGGGGAAAGT-3'	29mer	68.83°C

## 2.2. PCR 法による DNA 増幅と制限酵素処理

DNA ポリメラーゼは PrimeSTAR® GXL Premix Fast, Dye plus を用いた。この酵素は最新の高速酵素で、一般のホットスタート(94°C, 1分)や PCR 後の調整(68°C, 7分)も不要である(表 3)。制限酵素処理は 17 時間とした。使用した DNA 抽出液の標本番号は 180076(神戸市産, ハプロタイプ H13 型, 図 1 の 3・4 レーン)および 180131(三田市産, ハプロタイプ H1 型, 図 1 の 1・2 レーン)であった。

表 3. PCR 溶液組成(a), PCR 条件(b), 酵素処理溶液組成(c)

溶液名	体積
PrimeSTAR GXL Premix Fast, Dye plus (2X)	10.0 $\mu$ l
HNCYF043F(10 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
HNCYR686R(10 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l
DNA抽出液	1.0 $\mu$ l
蒸留水	8.5 $\mu$ l
合計	20.0 $\mu$ l

(a)

ステップ	サイクル	温度	時間
1	35	98°C	10秒
		62°C	5秒
		68°C	5秒
2	1	10°C	$\infty$

(b)

溶液名	体積( $\mu$ L)
10X CutSmart Buffer	0.6 $\mu$ l
制限酵素RsaI	1.0 $\mu$ l
PCR産物	3.0 $\mu$ l
蒸留水	2.4 $\mu$ l
合計	6.0 $\mu$ l

(c)

## 3. 結果

実験の結果, PCR 法による DNA 増幅は成功し, さらに制限酵素の切断も予想と矛盾しない結果が得られた(図 1)。PCR 法による DNA 増幅に要した時間は約 1 時間であった。

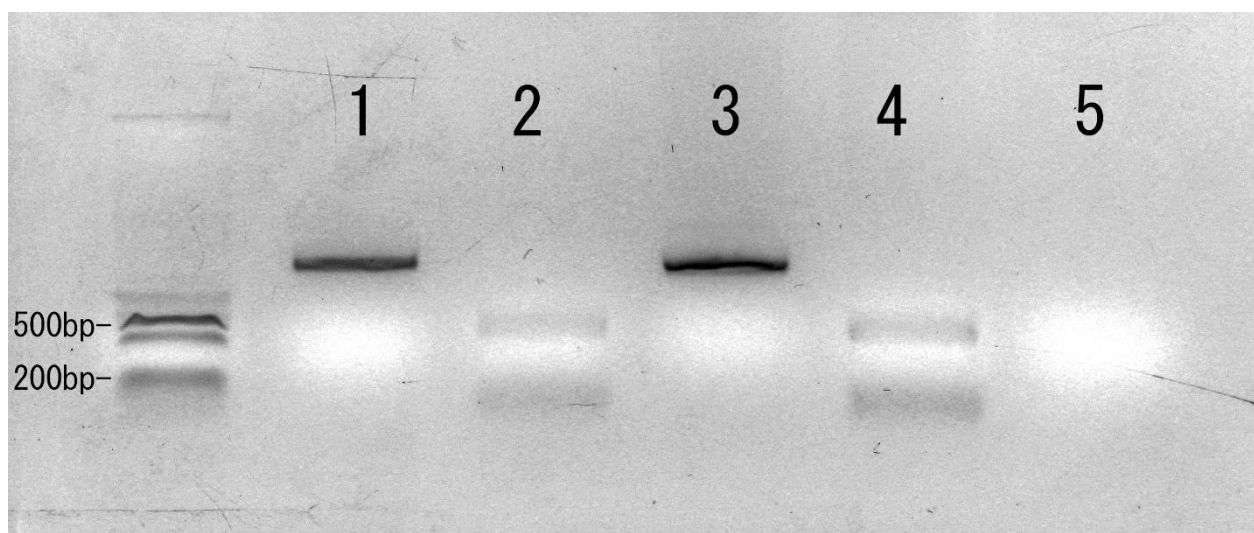


図 1. PCR 産物および制限酵素処理産物の電気泳動像。 レーン 1 およびレーン 3 は PCR

産物， レーン 2 およびレーン 4 は制限酵素処理産物， 5 は PCR 法のネガティブコントロール． レーン 1 およびレーン 2 は標本番号 180076(神戸市産， ハプロタイプ H13 型)， レーン 3 およびレーン 4 は標本番号 180131(三田市産， ハプロタイプ H1 型)のサンプルを用いた．

#### 4. 考察

図 1. の PCR 産物レーン 1 およびレーン 3 は 634bp の予想と矛盾しなかった． 制限酵素処理産物レーン 2 およびレーン 4 の長いほうのバンドは 366bp と対応していると思われ， 短いほうのバンドは 160bp および 120bp が重なっていると思われた． これも予想と矛盾しなかった． 今回はヤマトサンショウウオのサンプルは手に入らなかったので検証できなかったが， また機会を得て検証したい．

#### 5. 参考文献

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.

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.

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京都大学 准教授西川完途氏ならびに兵庫教育大学教授 笠原恵氏ならびに埼玉県立川の博物館 藤田宏之氏に感謝いたします． 現地調査実施に際して， 国営明石海峡公園神戸地区あいな里山公園旧職員 高畑正氏・高橋真理子氏および兵庫・水辺のネットワーク 大嶋範行氏にご尽力いただいた． 平成 28・29・30・31・令和 2・3・4 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．