

セトウチサンショウウオの遺伝子解析による簡易種判別方法開発に向けた取り組み

兵庫県立尼崎小田高等学校

横山 優斗

1. はじめに、研究背景

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 *et al.* 2006, TANI and HOELKER 2016) が、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 (MATSUI *et al.* 2019)

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がある。このため本校昨年度の研究においては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マーカーを開発した (鈴木 2022)。

2. 目的

セトウチサンショウウオを遺伝的に解析する際にはDNA抽出のために尾などの一部をサンプルとして切除するのが一般的であるが、個体を傷つけることになる。これに対しカエルツボカビ病の検査の際にはサンショウウオ類においても体表を10回程度綿棒でこすることにより体表の病原体を採集するのが一般的である (田向 2014, Tamukai, 2010, 宇根・松井 2011)。今回、私たちはセトウチサンショウウオの種判別に必要なサンプル採集に同様の綿棒を用いたDNA採集方法が利用できるかどうかを確認した。

3. 方法

2018年4月15日淡路島で許可を得て採集し、幼生から本校において育ててきた個体 (2024年1月19日現在で体長87.3mm, 体重3.3g) の3か所から、体表を5回 (図1-B), 10回 (図1-C), 20回 (図1-D) こすった綿棒を、すぐにLysis Buffer for PCR (TAKARA) 300 μ L にプロテインキナーゼ3 μ Lを加えたものに浸し、DNA抽出を行った。このDNAサンプルからミトコンドリアDNAチトクロムb領域を増幅するプライマーセット (HNCY134F: 5'-CTTCAGCTTTCTCATCAGTAGCACACAT-3', HNCY014R: Page 2. 5'-GGTTTGTCCAATTCAAGTAAATGGTTGT -3') を用いてPCR法によるDNA増幅を試みた (図2)。図2のAは0回こすった綿棒からDNA抽出したDNA抽出液を増幅した、ネガティブコントロールである。FもH₂Oを鋳型にDNA増幅を行った、ネガティブコントロールである。Eは採集した個体 (標本番号180092 : 2018年6月23日神戸市あいな里山公園 谷良夫 採集) の尾の一部から抽出したDNA溶液を用いたポジティブコントロールである。

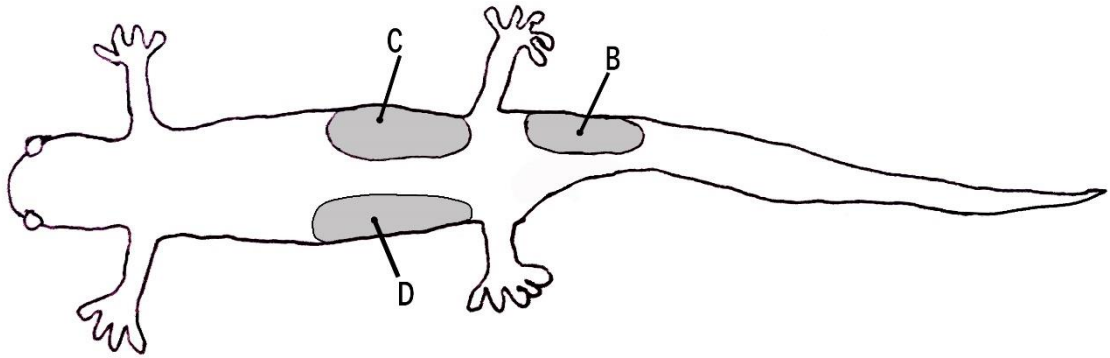


図1. サンプル採集場所. Bは5回, Cは10回, Dは20回体表を綿棒でこすり, サンプルを採集した.

4. 結果

B, C, Dからは目的のバンドは増幅されなかった. Dにはスメアが発生した(図2).

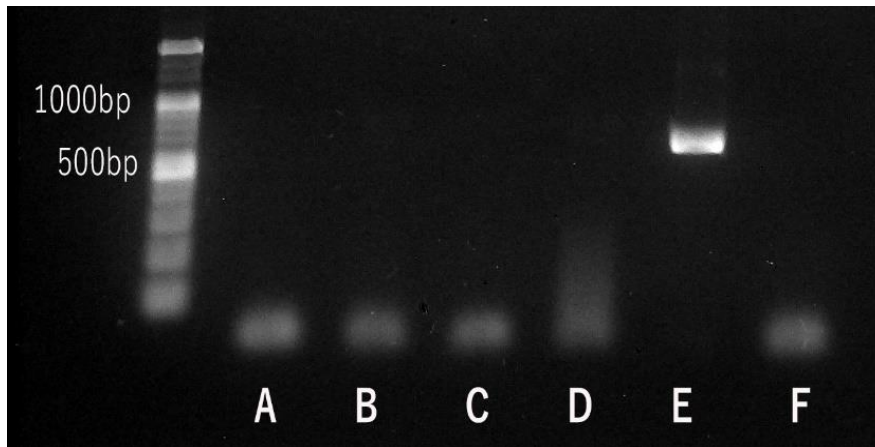


図2. DNA 増幅結果. Aは0回, Bは5回, Cは10回, Dは20回体表を綿棒でこすり, 綿棒からDNA抽出を行った. Eはポジティブコントロール(標本番号180092), Fはネガティブコントロール(H₂O).

5. 考察

里山に生息するセトウチサンショウウオは現在衰退の一途をたどり, 今後もこの傾向は続くと思われる. この貴重な生物の保全は適切な対策が施されなければ手遅れになる可能性が高い. 経済構造の変化, 農業後継者不足, 里山保全ボランティアの減少など解決すべき問題は山積している.

体表を綿棒でこすってDNAサンプルを得る試みは失敗に終わった. もし個体をあまり傷つけずに現在生息するセトウチサンショウウオの基礎的学術的なデータを収集することができれば, 多くの生態系の保全活動に取り組む人々にとって受け入れやすい調査方法となることが期待でき, セトウチサンショウウオの調査の飛躍的な広がりが期待できただけに, 残念な結果である.

6. 引用文献, 参考文献

- 宇根 ユミ, 松井 久実. 2011. カエルツボカビの日本在来種への影響とその対策. 2010年度 研究成果報告書: 科学研究費助成事業 基盤研究 (C). 日本学術振興会. (<https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-20580347/20580347seika.pdf>)
- 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.
- 鈴木 一誠. 2022. 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. 令和5年度神戸市の緑の普及・啓発に寄与する調査・研究支援(助成)報告書. (<https://www.kobe-park.or.jp/wp/wp-content/uploads/2023/04/f78933fd4fbbb227e5f2088b02d81f78-1.pdf>)
- 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
- 田向 健一. 2014. 外来性両生類におけるカエルツボカビ (*Batrachochytrium dendrobatidis*) の疫学および臨床学的研究. 麻布大学 博士(獣医学)論文 乙第 431号
- TAMUKAI K., Y. UNE, A. TOMINAGA, K. SUZUKI, K. GOKA. Treatment of spontaneous chytridiomycosis in captive amphibians using itraconazole. 2010. *J. Vet. Med. Sci.* 73: 155-159.

7. 謝辞

ご指導をいただいた京都大学 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 学芸員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・5 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.