

平成 17 年度
自然公園等施設整備委託
サンショウウオ遺伝子分析調査

平成 18 年 2 月
株式会社 環境管理センター・神奈川営業所

目次

1．目的と実施期間	頁
(1) 目的	2
(2) 実施期間	2
2．調査内容	
(1) 国内のサンショウウオ類の遺伝子分析に関する文献及びデータの収集	
調査方法	2
調査結果	2
(2) 丹沢大山及び周辺地域に生息するヒダサンショウウオの 遺伝子配列の解析調査	
調査方法	5
調査結果	7
3．考察	9
4．まとめ	9
5．文献リスト	10
6．資料	11

1. 目的と実施期間

(1) 目的

丹沢大山地域には、ヒダサンショウウオ(*Hynobius kimurae*)とハコネサンショウウオ(*Onychodactylus japonicus*)の2種の小型サンショウウオ(Hynobiidae)が生息している(山崎ら, 1997)。今のところ、両種とも、種レベルでは比較的多くの個体数が維持されており、直ちに絶滅するとは考えられない。しかし、様々な人間活動の影響により、各地で個体数が減少してきているのも事実である(環境庁, 1982)。神奈川県においても、両種とも減少傾向が見られ、将来的な絶滅が心配されており、ヒダサンショウウオは希少種、ハコネサンショウウオは減少種というカテゴリーに分類されている(神奈川県, 1995)。特に、神奈川県産(今のところ丹沢大山地域のみ)のヒダサンショウウオは、もともと分布域が狭く個体数も少なかったこと(山崎ら, 1997)、本種における分布域の東限の個体群の一つでもあることから(環境庁, 1982)、保全する意味の高い個体群であると考えられる。アロザイムによる本種の生物地理学的研究では、本種は主に3つのグループから成り、その一つである東部グループの分布域は、全分布域に対して比較的狭く、遺伝的に最も離れている(Matsui et al., 2000)。この研究には、丹沢大山地域の標本は含まれていないが、地理的な関係からは、東部グループに含まれると考えられる。ただし、丹沢大山地域の個体群は、東京都や山梨県の産地に生息する個体群(湯本, 2000; 草野ら, 2001)と分布が連続していない可能性もあることから(山崎ら, 1997)、丹沢大山と周辺地域の個体群の遺伝的な関係について、改めて調査しなおすことは、本種の保全を考える上でも重要であると考えられる。そこで、丹沢大山および周辺地域に生息するヒダサンショウウオについて、保全遺伝学的な視点からの調査を試みた。

(2) 実施期間

平成 17 年 12 月 5 日より平成 18 年 2 月 20 日。

2. 調査内容

(1) 国内のサンショウウオ類の遺伝子分析に関する文献及びデータの収集

調査方法

書籍(文献リスト参照)、遺伝子データベース(The Entrez Nucleotide Database)、科学技術データベース(JOIS)等により、本調査に必要な情報を収集した。

調査結果

日本産サンショウウオ類の種数 (松井, 2005)

国内に生息するサンショウウオ類(有尾目, Urodela)のほとんどは、サンショウウオ科

(Hynobiidae)に属し、3属(*Hynobius*, *Onychodactylus*, *Salamandrella*) 18種が知られている。このうち 16 種がサンショウウオ属(*Hynobius*)であり、ヒダサンショウウオ(*Hynobius kimurae*)は本属に属する。他に、オオサンショウウオ科(Cryptobranchidae)の 1 属 1 種、イモリ科(Salamandridae)の 2 属(*Cynops*, *Echinotriton*) 3 種を加え、計 22 種が日本産有尾目である。

遺伝子配列のデータベース登録状況 (2005 年 12 月 13 日)

国内のサンショウウオ類の多くの種では、遺伝子レベルでの調査は、近年始まったばかりである。したがって、データベースで検索される件数も、まだ少ない。ただし、遺伝子レベルでの調査は急速な伸びの期待できる分野であるため、数年以内に、膨大なデータが国際的な遺伝子データベースに登録される可能性がある。The Entrez Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>)による検索を行ったところ、外国産を含めたサンショウウオ属(*Hynobius*)で 132 件、調査対象であるヒダサンショウウオ(*Hynobius kimurae*)で 4 件が登録されていた。日本に生息する多くのサンショウウオは、主にサンショウウオ属に属するが、外国産を含めて 132 件というのはかなり少ない印象を受ける。登録された領域の中では、ミトコンドリア遺伝子のシトクロムbや rRNA 領域の部分配列などの件数が目立つ。

他に、日本を代表する生物でもあるオオサンショウウオ(*Andrias japonicus*)で 7 件、キタサンショウウオ(*Salamandrella keyserlingii*)で 94 件、ハコネサンショウウオ(*Onychodactylus japonicus*)で 2 件、シリケンイモリ(*Cynops ensicauda*)で 2 件、イモリ(*Cynops pyrrhogaster*)で 128 件が登録されており、イボイモリ(*Echinotriton andersoni*)では、登録されてなかった。

オオサンショウウオについては、ミトコンドリア遺伝子の全長(16,298 bp)が登録されている(AB208679, NC_007446)。オオサンショウウオの件数が少ないのは、国の特別天然記念物であるため、標本採集の許可が難しいためと考えられる。キタサンショウウオは国内では北海道に生息するが、シベリアやサハリンにも生息する広域分布種である。そのため、ロシアの研究者による生物地理学的研究があり、件数が多くなっている。ハコネサンショウウオの件数が少ないのは本属の種数が少なく、海外にも研究者が少ないためだろう。イモリの件数が多いのは、本種が優れた実験動物であるためで、様々な遺伝子が登録されている。

ヒダサンショウウオの遺伝子配列の検索結果

1: AB201705

Hynobius kimurae mitochondrial gene for 16S rRNA, partial equence,
specimen_voucher: KUHE-unnumbered

2: AB201670

Hynobius kimurae mitochondrial gene for 12S rRNA, partial sequence,
specimen_voucher: KUHE-unnumbered

3: AY341765

Hynobius kimurae tyrosinase (Tyr) gene, exon 1 and partial cds

4: AY341746

Hynobius kimurae cytochrome b (Cytb) gene, partial cds; mitochondrial

以上、本調査計画の条件を満たすデータは検索されなかった。

ヒダサンショウウオの遺伝学的研究

ヒダサンショウウオについては、アロザイムによる生物地理学的研究が行われており、すでに全分布域における遺伝的關係についての知見がある(Matsui et al., 2000)。これによると、ヒダサンショウウオでは、関東西部から愛知県にかけて分布する東部グループが、他の個体群と遺伝的に離れており、中央グループと西部グループもやや遺伝的に離れている。この研究には神奈川県産の標本は含まれていないが、地理的な関係から東部グループに属すると考えられる。

ヒダサンショウウオには、外見による区別が困難な近縁種としてブチサンショウウオ (*Hynobius naevius*)と、近年記載されたアカイシサンショウウオ (*Hynobius katoi*)がいる。これらの種の特徴には、かなりの連続性が認められることから同種とする考えもあるが、アロザイムによる比較では、これらの遺伝的距離は、明らかに別種であるトウキョウサンショウウオとの距離に匹敵することから、それぞれ独立した種であると考えられる(Matsui et al., 2004)。

遺伝的多様性調査手法の選択

ヒダサンショウウオには、すでに全分布域におけるアロザイムの調査があるが(Matsui et al., 2000)、アロザイムの調査手法には高い技術レベルと多大な努力が要求されるため、神奈川県に生息する個体群の遺伝的な位置について、同じ手法で改めて検討を加えるのは難しい。また、神奈川県ではヒダサンショウウオは希少種として位置付けられており、非致死的手法による調査を選択することが望ましい(松井, 2005)。そのため、微量な試料で調査可能な遺伝子レベルでの調査手法が適している(松井, 2005)。

遺伝子の対象領域

遺伝子レベルで地域個体群間の変異を検出するためには、ミトコンドリア遺伝子の D-loop 領域の解析が適当であると考えられるが(小池・松井, 2003; 松井, 2005)、サンショウウオ属でのそれについては、近年ようやく研究が行われるようになったばかりである(吉澤ら, 2005; 道越ら, 2005; 林・草野, 2006a, b)。ヒダサンショウウオと同属のトウキョウサンショウウオの場合、D-loop 領域の全長は約 800 塩基あるが、このうちドメイン (HV2 領域)と呼ばれる領域が比較的変異に富んでいる(林・草野, 2006a, b)。

(2) 丹沢大山及び周辺地域に生息するヒダサンショウウオの遺伝子配列の解析調査

調査方法

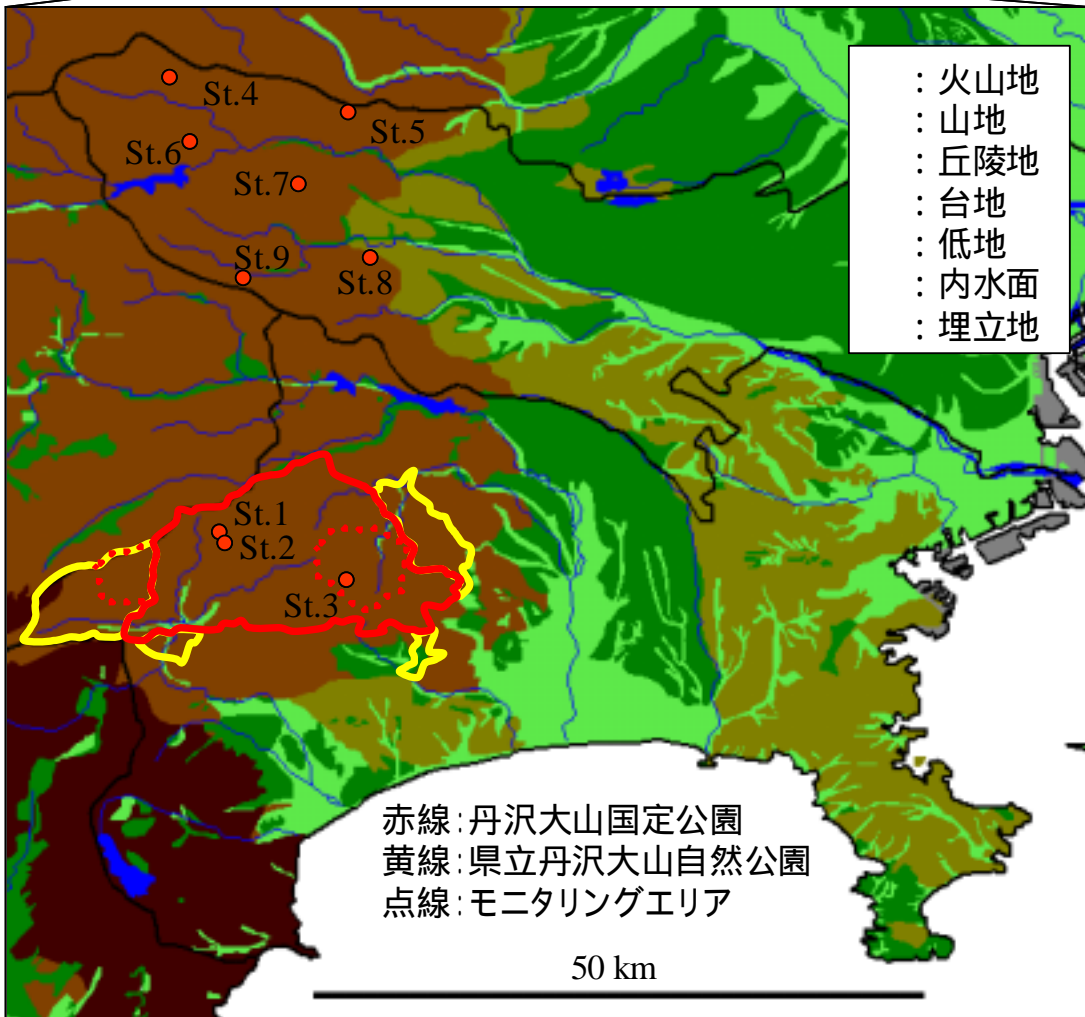
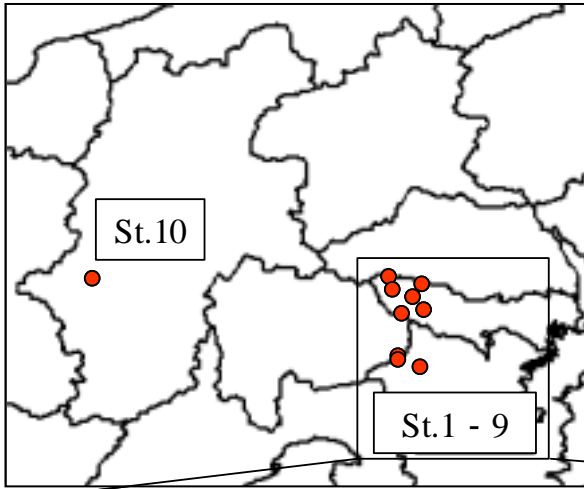
丹沢大山及び周辺地域で採集されたヒダサンショウウオの、尾部先端(約 3 mm)を切り取り、これを遺伝子配列解析用の標本とした。採集地点を表1及び図 1 に示した。位置情報は、GARMIN HANDY GPS にて取得した。標本採集の済んだ個体は、採集場所に放した。標本は、ガラスバイアル中にエタノール(>99.5 %)浸で保存した。標本の取り扱いには、使い捨ての注射針とカミソリを用い、汚染しないように配慮した。遺伝子の抽出には DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, 69504)を用い、キット付属のマニュアル通りに作業した。PCR 及びシーケンスは、タカラバイオ株式会社・ドラゴンジェノミクスセンターに委託した。ヒダサンショウウオの D-loop 領域全長の増幅は可能であるが、遺伝子の構造的な解析の難しさとコスト的な理由により、D-loop 領域の 3' 端にある比較的変異に富む領域のみ解析対象とした(林・草野, 2006a, b)。PCR には、5'-CCT AAA TCT GAA CTA ACG GTG AG-3'(P1)、5'-CCA AAC CTT TAT GTT TCT GAG AT-3'(P2)のプライマーセットを用いた。これをテンプレートとして、P1、P2 及び 5'-GTG CTG TGC TTT AAT TAA GCT AC-3'(P3)、5'-TTT TTT TAC CTA TTG AAT TAT C-3'(P4)の各プライマーでシーケンスを行い、P3-P4 間の解析を試みた。波形データの処理及び、遺伝子配列の解析には、MEGA3(Kumar et al., 2004)を用いた。

表1. 標本リスト

標本 番号	標本名	地点 番号	地点名	緯度	経度	採集日
				(WGS84)		
丹沢大山地域						
1	549	1	コリバラモ沢	35° 29' 11"	139° 05' 13"	2005年11月2日
2	550	1	コリバラモ沢	35° 29' 11"	139° 05' 13"	2005年11月26日
3	551	1	コリバラモ沢	35° 29' 11"	139° 05' 13"	2005年11月26日
4	552	1	コリバラモ沢	35° 29' 11"	139° 05' 13"	2005年11月30日
5	553	1	コリバラモ沢	35° 29' 11"	139° 05' 13"	2005年11月30日
6	548	2	本棚沢	35° 28' 36"	139° 05' 31"	2005年11月2日
7	554	3	境沢	35° 26' 05"	139° 11' 30"	2005年11月12日
8	555	3	境沢	35° 26' 05"	139° 11' 30"	2005年11月12日
9	556	3	境沢	35° 26' 05"	139° 11' 30"	2005年11月12日
奥多摩地域						
10	561	4	カロー谷	35° 51' 42"	139° 02' 47"	2005年11月17日
11	560	5	高水山	35° 49' 57"	139° 11' 35"	2005年11月14日
12	558	6	小中沢	35° 48' 31"	139° 03' 42"	2005年11月16日
13	557	7	養沢川	35° 46' 23"	139° 09' 07"	2005年11月10日
14	559	8	多奈沢	35° 42' 47"	139° 12' 44"	2005年12月3日
15	304	9	甲武トンネル	35° 41' 47"	139° 06' 26"	2001年7月 —
木曽福島						
16	564	10	権現沢	35° 51' 17"	137° 41' 10"	2005年12月24日
17	565	10	権現沢	35° 51' 17"	137° 41' 10"	2005年12月24日

図1. 調査地点

- 1: コリバラモ沢
- 2: 本棚沢
- 3: 境沢
- 4: カロー谷
- 5: 高水山
- 6: 小中沢
- 7: 養沢川
- 8: 多奈沢
- 9: 甲武トンネル
- 10: 権現沢



国土地理院作製「地球地図日本」及び、国土調査による1/50,000土地分類基本調査(地形分類図)を使用し国土交通省国土調査課が作成した「全国土地分類図」を利用した。

調査結果

本調査により、丹沢大山地域3地点から9個体、奥多摩地域6地点から6個体、木曽福島1地点から2個体のヒダサンショウウオについて、ミトコンドリア遺伝子の塩基配列が得られた。P1による波形は比較的良好であったが、他の波形は、解析可能な範囲が狭く、部分的に利用した。P3-P4間の領域を317 bpにアライメントしたとき、トランジション7個所、トランスバージョン6個所、合わせて13個所の置換、そして4個所のギャップがあり、計17個所の変異サイトが認められた(表2)。丹沢大山地域内の9個体の遺伝子配列には、変異が認められなかった(ハプロタイプ E1)。それに対し、奥多摩地域からは、3種類のハプロタイプが認められた(E2, E3, E4)。木曽福島の2個体は、同じ配列であった(C1)。各地域のハプロタイプは異なり、本調査では、計5種類のハプロタイプが確認された。丹沢大山地域のハプロタイプは、奥多摩地域のものと比較し、数塩基異なっていた。同属であるトウキョウサンショウウオのデータも加えて解析したUPGMA法(Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean: 非加重結合法)による系統樹を図2に示した。各枝には1,000回試行のブートストラップ値(%)を記した。丹沢大山地域と奥多摩地域の遺伝的距離は近いが、224-G/Aの1塩基の置換により区別された(表2)。両地域とは異なるグループに属する木曽福島産(Matsui et al., 1999)との遺伝的距離は離れており、トウキョウサンショウウオで知られている南北間の差異(林・草野, 2006a, b)以上であった(図2)。

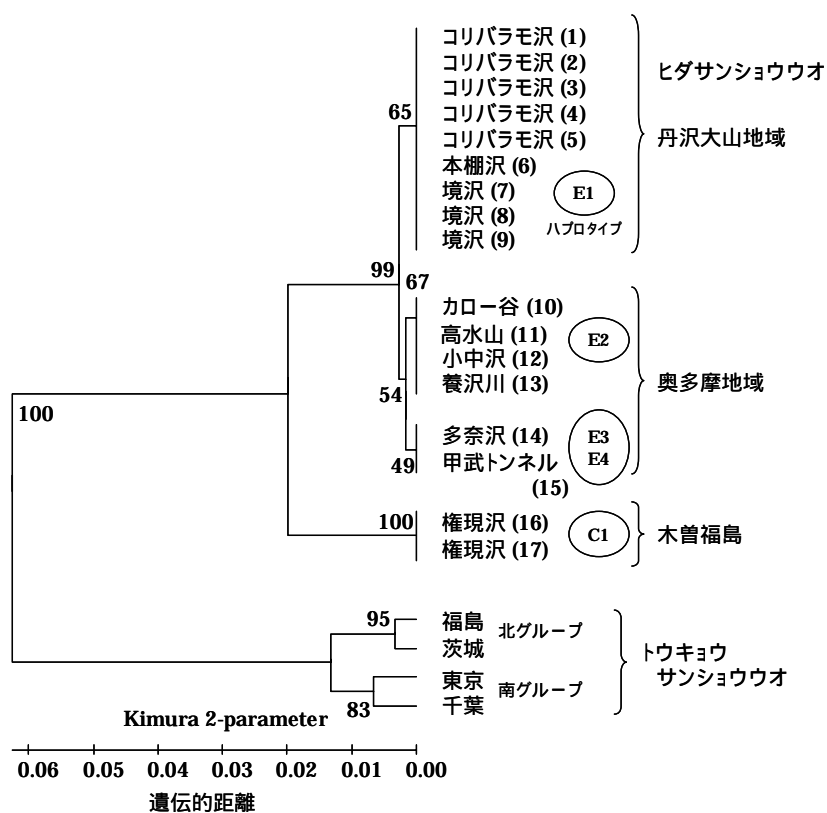


図2. 丹沢大山及び周辺地域のヒダサンショウウオの系統関係

表2 . ヒダサンショウウオの各ハプロタイプの遺伝子配列(317 bp にアライメント)

E1	AAT ATT CTA TTT TTG TTT CTC CCC CCG GAG CTT GTT TAT TTA AGA TTC	(48)
E2	...	(48)
E3	...	(48)
E4	...	(48)
C1	...	(48)
E1	CAA CTT TGG AAC ATG AGT TAA ACT TTT ATT TTA AGG TTA ACC CCC CTA	(96)
E2	...	(96)
E3	...	(96)
E4	... -	(95)
C1	...	(96)
E1	CCC CCC ATT ATT AAT CTA ATC AGT ACT TTT ATC TTT TTT TGG CCA ACC	(144)
E2	...	(144)
E3	...	(144)
E4	...	(143)
C1	...	(144)
E1	CCC AAA GCA AAA GAA ATA TTT TAT GAA CTT ACG AAA C-T GGA ATA ACA	(191)
E2 -	(191)
E3 -	(191)
E4 -	(190)
C1G .T .C	(192)
E1	ATA TTT TTT TTA TTA AAT ATA TTA AAG GAA TGT GAA TAA AGA TAT TAT	(239)
E2A	(239)
E3A	(239)
E4A	(238)
C1AC A .C .TA	(240)
E1	TTT T-A TAG GTA CTA ACA TAC CCT ATA ATA CAA A-T TTA GTG AAA TAA	(285)
E2- .A -	(285)
E3T -	(286)
E4T -	(285)
C1-G .G .A .T	(287)

表2 . (続き)

E1	TAT	TTA	TAG	TAT	GTA	TAC	TAT	AAG	TTT	AT	(314)
E2	(314)
E3	(315)
E4	(314)
C1	..A	(316)

3. 考察

丹沢大山地域で採集されたヒダサンショウウオの、ミトコンドリア遺伝子に基づく系統解析の結果、本地域の個体群が、同じ東部グループに属するものの、近隣の奥多摩地域の個体群とは、遺伝的に区別可能であることが示唆された。サンショウウオ類の遺伝的多様性を守るためには、地域個体群レベルでの保全が極めて重要であると考えられており、丹沢大山地域の個体群の持つ重要性が改めて強調された。また、このような遺伝子レベルでの差は、生物地理学的な考察を行う上でも重要である。今回解析された領域が、わずか 290 塩基にすぎないことから、全ゲノム中には、より膨大な生物地理学的情報が記録されており、それらは本種の起源や、丹沢大山地域の個体群の生い立ちについて知る手がかりになると予想される。したがって、丹沢大山地域での遺伝的固有性を守るため、何らかの保全対策を講じる価値は高いと考えられた。

遺伝的多様性は、個体群の健全さを計る尺度としても重要であると考えられている。丹沢大山地域では、奥多摩地域よりも標本数が多いにもかかわらず、多型が認められなかった。このことについては標本数よりも地点数が少なかったことが関係している可能性がある。一般的に、サンショウウオでは繁殖成功の年変動が大きく、運良く生き残った特定の雌が、複数年産卵することにより個体群が維持されていると考えられる上に(草野・川上, 1999)、移動性も極めて乏しいため(草野・川上, 1999)、同じ地点では、特定のハプロタイプが優占するケースが多いのではないかと考えられる。本調査では、調査した地点数や標本数が少なかったため、丹沢大山地域においても、複数のハプロタイプが存在する可能性は大いにある。したがって、遺伝的多様性の現状を把握するためにも、地点数を増やしての調査継続が望まれる。

4. まとめ

ヒダサンショウウオは、神奈川県下では丹沢大山地域の一部のみに分布が限られ、個体数も比較的少ないため、希少種として位置付けられている。本調査において、丹沢大山地域の個体群は、近隣の奥多摩地域の個体群と、遺伝子レベルで区別可能であることが示唆された。このことは、本個体群が、遺伝子レベルでの固有性を持つことを示唆しており、保全すべき価値の高い個体群であることを示している。したがって、丹沢大山地域における本種の保全と、遺伝子レベルでのより詳細な調査が望まれる。

5. 文献リスト

- 林 義雄・草野 保(2006a) ミトコンドリア遺伝子 D-loop HV2 領域に基づくトウキョウサンショウウオの地域間変異. 日本爬虫両棲類学報. (印刷中)
- 林 義雄・草野 保(2006b) ミトコンドリア遺伝子 D-loop 領域に基づくトウキョウサンショウウオの遺伝的多様性 日本爬虫両棲類学会 第 44 回大会. 日本爬虫両棲類学報. (印刷中)
- 神奈川県(1995) 神奈川県レッドデータ生物調査報告書. 神奈川県立博物館調査研究報告 自然科学 第 7 号. 神奈川県レッドデータ生物調査団編.
- 環境庁(1982) 日本の重要な両生類・は虫類の分布(全国版), 第 2 回自然環境保全基礎調査(緑の国勢調査)動物分布調査(両生類・は虫類)報告書. 環境庁編.
- 小池裕子・松井正文(2003) 保全遺伝学. 328pp, 東京大学出版会, 東京.
- Kumar, S., Tamura, K., and Nei M.(2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- 草野 保・川上洋一(1999) トウキョウサンショウウオは生き残れるか? 東京都多摩地区における生息状況調査報告書 . トウキョウサンショウウオ研究会, 69pp, 東京.
- 草野 保・植田健仁・初芝伸吾(2001) 東京におけるヒダサンショウウオとハコネサンショウウオの生息分布. 爬虫両棲類学会報. 2001:1-7
- Matsui, M., Misawa, Y., Nishikawa, K. and Tanabe, S.(2000) Allozymic variation of *Hynobius kimurae* Dunn (Amphibia, Caudata). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 125:115-125
- Matsui, M., Kokuryo, Y., Misawa, Y., and Nishikawa, K.(2004) A new species of salamander of the genus *Hynobius* from central Honshu, Japan (Amphibia, Urodela). *Zoological Science* 21:661-669
- 松井正文(2005) これからの両棲類学. 316pp, 裳華房, 東京.
- 道越祐一・岩本俊孝・井野郁男・佐藤眞一(2005) 日本産サンショウウオ類の mtDNA D-loop 領域における PCR 用ユニバーサルプライマーの開発. 爬虫両棲類学会報 2005:130-138
- 山崎 泰・石原龍雄・梶野 稔・北垣憲仁(1997) 丹沢のサンショウウオ類. 丹沢大山自然環境総合調査報告書. 神奈川県環境部. :480-493
- 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 Dloop 領域遺伝子解析. 爬虫両棲類学会報 2005:123-129
- 湯本光子(2000) 山梨県の両生類の分布について. 千葉中央博自然誌研究報告特別号. (3):23-32

6. 資料

表3. 解析に利用した全遺伝子配列

ヒダサンショウウオ (ハプロタイプ:E1, E2, E3, E4, C1)

トウキョウサンショウウオ (福島、茨城、東京、千葉)(林・草野, 2006a)

E1	AAT	ATT	CTA	TTT	TTG	TTT	CTC	CCC	CCG	GAG	CTT	GTT	TAT	TTA	AGA	TTC
E2
E3
E4
C1
Fuk	T..
Iba	T..
Tok	T..
Chi	T..
E1	CAA	CTT	TGG	AAC	ATG	AGT	TAA	ACT	TTT	ATT	TTA	AGG	TTA	ACC	CCC	CTA
E2
E3
E4
C1
Fuk	T..	.A.
Iba	T..	.A.
Tok	...	A..	T..	.A.
Chi	...	A..	T..	.C.
E1	CCC	CCC	ATT	ATT	AAT	CTA	ATC	AGT	ACT	TTT	ATC	TTT	TTT	TGG	CCA	ACC
E2
E3
E4
C1
Fuk	C..	C..
Iba	C..
Tok	C..T.	...
Chi	C..T.	...

表3.(続き)

E1	CCC	AAA	GCA	AAA	GAA	ATA	TTT	TAT	GAA	CTT	ACG	AAA	C-T	GGA	ATA	ACA
E2	-
E3	-
E4	-
C1G	.TC
FukC	.AT	-	.A
IbaC	.AT	-	.A
Tok-C	.AT	-	.A
Chi-C	.AT	-	.A

E1	ATA	TTT	TTT	TTA	TTA	AAT	ATA	TTA	AAG	GAA	TGT	GAA	TAA	AGA	TAT	TAT
E2A
E3A
E4A
C1AC	A..	C..	.TA
FukAA	G..	A..	.AA	A.-G	CGC .TA
IbaAA	G..	A..	.AA	A.-G	CGC .TA
TokA	CA	G..	A..	.AA	A..G	CGC .TA
ChiA	CA	G..	A..	.AA	A..	CGC	.TA

E1	TTT	T-A	TAG	GTA	CTA	ACA	TAC	CCT	ATA	ATA	CAA	A-T	TTA	GTG	AAA	TAA
E2-A	-
E3T	-
E4T	-
C1-GGAT
FukTT	G.A	.CC	C.AAT	..-G	.CG
IbaTT	G.A	.CC	C.AAT	..-G	.CG
TokTT	G.A	.CC	..GAAT	..TG	.TG
ChiTT	G.A	..CAAT	..TG	.TG

表3.(続き)

E1	TAT	TTA	TAG	TAT	GTA	TAC	TAT	AAG	TTT	AT
E2
E3
E4
C1	..A
Fuk	..A	...	C..	.G.G.
Iba	..AG.G.
Tok	..AG.G.
Chi	..AG.G.
