

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

林 義雄¹・草野 保²

¹ 192-0154 東京都八王子市下恩方町323-1 (株)環境管理センター・環境基礎研究所

² 192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1 首都大学東京・理工学研究科・生命科学

Local genetic variation of the salamander, *Hynobius tokyoensis*, based
on the mitochondrial D-loop HV2 region

By Yoshio Hayashi¹ and Tamotsu Kusano²

¹ *The Institute of Basic Environmental Research, Environ Control Center Co., Ltd.,
323-1 Shimo-ongata-machi, Hachioji-shi, Tokyo 192-0154, Japan*

² *Department of Biological Sciences, Graduate School of Science and Engineering,
Tokyo Metropolitan University, 1-1 Minami-osawa, Hachioji-shi, Tokyo 192-0397, Japan*

Abstract: *Hynobius tokyoensis* is a pond-breeding salamander which is endemic to the Kanto district and southern Fukushima prefecture in Japan. To examine genetic differentiation of this salamander, the hyper-variable region 2 (HV2) of the mitochondrial D-loop was sequenced and compared among 66 individuals derived from 37 localities. A total of 20 haplotypes were detected in this study. Six of 21 variant positions in this region were found in the repeat sequences. The phylogenetic analysis indicated that this species was clearly divided into two major groups: a northern and a southern population. The dominant haplotypes were different among local populations within each major group. These results suggest that in order to protect and to preserve the genetic diversity of this species, each local population should be protected as far as possible.

はじめに

トウキョウサンショウウオ (*Hynobius tokyoensis* Tago, 1931) は、福島県南部から群馬県を除く関東地方にかけて分布する小型の止水性サンショウウオである。本種は、近縁種であるカスミサンショウウオ (*H. nebulosus* Temminck and Schlegel, 1838) の亜種とされた時期もあったが(中村・上野, 1963; 環境庁, 1982), 最近のアイソザイムに基づく系統解析の結果からは、独立種であるとされた。また、本種の愛知県産個体群とされてきたものは、カスミサンショウウオに所属すると考えられた (Matsui, 1987; Matsui

et al., 2001)。

本種は、海岸付近から低山地にかけて生息するが、丘陵地に最も多い(環境庁, 1982; 伊原, 2001)。特に、雑木林や水田といった、里山環境に適した生活史を持つ。そのため、圃場整備に伴う用水路の人工化、後継者不足による圃場の荒廃と乾燥化、大規模な都市開発などにより急速に生息地が消失しつつある(金田・大野, 1998; 草野・川上, 1999)。生息地の消失は、特に東京都下で深刻であり、そのため東京個体群は、絶滅のおそれのある地域個体群としてレッドデータブックにリストアップされた(環境庁,

1991). 現在, かなりの個体数が維持されていると考えられる千葉県においても, 生息環境の改変により著しく減少する恐れがあることから, 重要な保護動物に指定されている(千葉県, 2000). また, 里山を代表する生物として人々に親しまれ, 多くの個人や団体が, 本種の保護活動に力を入れている(草野・川上, 1999).

このような背景から, 開発に伴う補償措置として, 本種の保全のための飼育と移植が提起されている(斎藤, 2003). 一方で, 善意からと考えられるが, 自然分布域を無視した移植が行われた可能性の高い生息場所があることも報告されている(金田・大野, 1998). そこで, 本種の保全を考える上でも, 地域個体群の絶滅や移植により生物地理学的情報が失われる前に, 本種の遺伝的構造を明らかにすることが必要であると考えられる. 本種の遺伝学的な研究としては, これまでアイソザイムによる検討があるが(Matsui, 1987; Matsui et al., 2001), 今後は, 取扱いが容易で非致死的な試料採取が可能な遺伝子解析による方法も必要と考えられる. そこで, 本研究では, 種内変異の存在が期待できる領域の一つであるミトコンドリア遺伝子 D-loop HV2 領域(松井・小池, 2003)の解析を試みた.

材料及び方法

本種の主な分布域から遺伝子解析用の試料を採集した(表1). 系統解析の外群として, ヒダサンショウウオ(*H. kimurae*)とツシマサンショウウオ(*H. tsuensis*)の飼育個体についても, 1個体ずつ用いた. 各地点で, 主に1個体の標本を用いたが, 東京都の2地点と千葉県の1地点のみ10個体ずつ用いた. これら3地点については, 解析後にハプロタイプ多様度 ($h = n(1 - \sum x_i^2) / (n-1) : n$ = 標本数, x_i = ハプロタイプ頻度) を算出した. 現地にて, 採集した成体の尾部先端約

3 mm を解剖用ハサミで切断し, エタノール (>99.5%) 中に保存した. 成体が採集できなかった一部の地点では, 分析に幼生を用いた. 試料は流水でよく洗い, 火炎処理したピンセットとカミソリを用いて約1 mm を切り出し, 遺伝子の抽出を行った. 遺伝子の抽出, PCR産物の精製, シーケンス反応には, DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, 69504), QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, 28104), ThermoSequenase Cy5.5 Terminator Sequencing Kit (Amersham, US79840) の各キットを用い, それぞれ付属のマニュアルに従って作業した. HV2 領域の増幅のため, 以下のプライマーを用いた: 5'-TTT TTT TAC CTA TTG AAT TAT C-3' (Forward), 5'-GCG CTA CGC TTT AAT TAA GCT AC-3' (Reverse). これにより増幅される領域は, シベリアサンショウウオ(*Ranodon sibiricus*) (Accession No. AJ419960) の16111-16418, 1-6 bp に相当する. また, プライマーの設計には, 本登録データの配列を参考にした. PCR では, TaKaRa Ex Taq (TAKARA, RR001A) を用い, アニーリング温度33°C, 30サイクルで増幅した. シーケンサーは, GeneRapid (AmershamBiosciences) を用い, 上記キットによる一般的な手順に従って作業した. 系統解析には, CLUSTAL W (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-j.html>) と njplot (<http://biom3.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>) を用いた. ハプロタイプ名は, 最初に発見された県名の頭文字(東京都のみ M) と発見順位で整理したため, 分布や系統関係とは無関係である.

結果

本調査により, 福島県南部を含む関東地方の37地点より, トウキョウサンショウウオのミトコンドリア遺伝子 D-loop HV2 領域の配列を決定し, 20種類のハプロタイプが確認された(表2). このうち, ハプロタイプ M1

表1. トウキョウサンショウウオの標本採集地.
Table 1. Sample locality of *H. tokyoensis*.

地点番号 St.	地名 Locality	採集年 Year of collection
福島県/Fukushima Pref.		
1	いわき市大久町山田/Yamada, Ohisa-machi, Iwaki-shi	2004
茨城県/Ibaraki Pref.		
2	北茨城市関本町富士ヶ丘/Fujigaoka, Sekimoto-cho, Kitaibaraki-shi	2004
3	常陸太田市新宿町(西山公園)/Shinjyuku-cho, Hitachiota-shi	2005
4	常陸太田市新宿町(大田二高裏)/Shinjyuku-cho, Hitachiota-shi	2005
5	ひたちなか市中根/Nakane, Hitachinaka-shi	2005
栃木県/Tochigi Pref.		
6	佐野市(万福寺)/Sano-shi	2005
7	栃木市志鳥町/Shitori-cho, Tochigi-shi	2005
8	岩舟町小野寺/Onodera, Iwafune-shi	2005
9	藤岡町太田和三森山/Sanmoriyama, Otawa, Fujioka-machi	2005
埼玉県/Saitama Pref.		
10	小川町下里/Shimosato, Ogawa-machi	2004
11	鳩山町/Hatoyama-cho	2002
12	越生町古池/Koike, Ogose-machi	2002
13	越生町箕和田/Minowada, Ogose-machi	2002
14	越生町芹が沢/Serigasawa, Ogose-machi	2002
15	越生町小寺/Kodera, Ogose-machi	2002
16	越生町上野/Ueno, Ogose-machi	2002
17	越生町戸神/Togami, Ogose-machi	2002
18	越生町/Daiman, Ogose-machi	2002
東京都/Tokyo Met.		
19	青梅市小曾木3丁目/3 Kosogi, Oume-shi	2000
20	青梅市小曾木木野下/Kinoshita, Oume-shi	2002
21	瑞穂町/Mizuho-cho	2002
22	青梅市大荷田/Onita, Oume-shi	2001
23	日の出町羽生/Habu, Hinode-machi	2005
24	あきる野市三内/Sannai, Akiruno-shi	2004
25	八王子市戸吹町/Tobuki-cho, Hachiouji-shi	2004
26	八王子市上川町/Kamikawa-cho, Hachiouji-shi	2004
27	八王子市堀の内/Horinouchi, Hachiouji-shi	2001
千葉県/Chiba Pref.		
28	岬町/Misaki-machi	2002
29	市原市石神/Ishigami, Ichihara-shi	2004
30	君津市豊英/Houei, Kimitsu-shi	2004
31	鴨川市金束/Kozuka, Kamogawa-shi	2004
神奈川県/Kanagawa Pref.		
32	県横須賀市山中町/Yamanaka-cho, Yokosuka-shi	2004
33	横須賀市木古庭/Kikoniwa, Yokosuka-shi	2003
34	神奈川県横須賀市池上/Ikegami, Yokosuka-shi	2003
35	葉山町下山口/Shimoyamaguchi, Hayama-cho	2003
36	横須賀市芦名/Ashina, Yokosuka-shi	2003
37	横須賀市松前川/Matsumaegawa, Yokosuka-shi	2003

表 2. トウキョウサンショウウオの mtDNA D-loop HV2 領域の変異部位。
 Table 2. Variable nucleotide positions of the mtDNA D-loop HV2 region of *H. tokyoensis*.

Haplotype	Nucleotide position in aligned 319 bp																											
	52	76	80	114	139	152	157	169	212	222	232	236	251	255	259	270	275	284	287	295	297	bp						
F1	C	T	A	C	C	AAAA	A	T	T	AAAA	G	TTATTTTT	C	A	C	A	TTTT	G	CG	C	GTGT	313						
II	C	T	A	A	C	AAAA	A	T	T	AAAA	G	TTATTTTT	C	A	C	A	TTTT	G	CG	T	GTGT	313						
I2	C	T	A	A	C	AAAA	A	A	T	AAAA	G	TTATTTTT	T	A	C	A	TTTT	G	CG	C	GTGT	313						
I3	C	T	A	A	C	AAAA	A	A	T	AAAA	G	TTATTTTT	T	A	C	A	TTTT	G	TG	C	GTGT	313						
I4	C	T	A	A	C	AAAA	A	A	T	AAAA	G	TTATTTTT	C	A	C	A	TTTT	G	CG	C	GTGT	314						
T1	A	T	C	A	T	AAA	A	T	C	AAAA	G	TTTTTTTT	T	A	T	A	TTTT	G	TG	T	GTGTGT	315						
S1	A	T	C	A	T	AAA	A	T	C	AAAA	G	TTATTTTT	C	G	T	A	TTTT	G	TG	T	GTGT	314						
S2	A	T	C	A	T	AAA	A	T	T	AAAA	G	TTATTTTT	A	G	T	A	TTTT	G	TG	T	GTGT	316						
S3	A	T	C	A	T	AAA	A	T	T	AAAA	G	TTATTTTT	A	G	T	A	TTTT	A	TG	C	GTGT	314						
M1	A	T	A	A	T	AAA	A	T	C	AAAA	G	TTATTTTT	C	G	T	A	TTTT	G	TG	T	GTGT	314						
M2	A	T	A	A	T	AAA	A	T	C	AAAA	G	TTATTTTT	C	G	T	A	TTTT	G	TG	T	GTGT	314						
M3	A	T	A	A	T	AAA	A	T	C	AAAA	G	TTATTTTT	T	G	T	A	TTTT	G	TG	T	GTGT	314						
M4	A	T	C	A	T	AAA	A	T	C	AAAA	G	TTATTTTT	C	G	T	T	TTTT	G	TG	T	GTGT	314						
M5	A	A	C	A	T	AAA	A	T	C	AAAA	G	TTATTTTT	C	G	T	A	TTTT	G	TG	T	GTGT	314						
C1	A	T	C	A	T	AAA	A	T	C	AAAA	A	TTATTTTT	T	A	T	A	TTTT	G	TG	T	GTGT	314						
C2	A	T	C	A	T	AAA	A	T	C	AAAA	G	TTATTTTT	T	A	T	A	TTTT	G	TG	T	GTGT	314						
C3	A	T	C	A	T	AAA	A	T	C	AAAA	A	TTATTTTT	T	A	T	A	TTTT	G	TG	T	GTGT	314						
C4	A	T	C	A	T	AAA	A	T	C	AAAA	A	TTATTTTT	T	A	T	A	TTTT	G	TG	T	GTGT	315						
C5	A	T	C	A	T	AAA	A	T	C	AAAA	G	TTATTTTT	T	A	T	A	TTTT	G	TA	T	GTGT	314						
K1	A	T	C	A	T	AAA	A	T	C	AAAA	G	TTTTTTTT	T	A	T	A	TTTT	G	TG	T	GTGTGT	315						

をデータベースに登録した (Accession No. AB233470). ハプロタイプ間の変異は4%以下であった. 塩基置換は, トランスポージョンが8ヶ所, トランジションが10ヶ所存在した. 繰り返し配列の欠失あるいは重複によるギャップが5ヶ所から認められ, 配列長は313-316 bpと異なっていた. 系統解析の結果では, 福島県南部から茨城県北部にかけての個体群 (北グループ) と, それ以外の個体群 (南グループ) との間に大きな差異が認められた (図1). 栃木県のT1および三浦半島のK1は, 系統解析の結果では独立したグループ分けはできなかったが, 他のハプロタイプにはない238A-Tの置換 (あるいは238Aの欠失) と297GTの重複などが特徴的であった.

採集地点と確認されたハプロタイプを地図上に示した (図2). 複数地点から確認されたハプロタイプや, 相同性の高いハプロタイプが比較的近い範囲に集中しており, 地

理的傾向が認められた. 例外として, 栃木県のT1と三浦半島のK1は相同性が高いが距離的には遠く離れている. また, 海を隔てた三浦半島と房総半島の両地域から, 共通のハプロタイプ (C5) が確認された. 各地域から複数のハプロタイプが確認されたが, 栃木県のみ単一のハプロタイプ (T1) が確認された. T1は, 比較的近い埼玉からも確認された. それぞれ10個体ずつの標本が得られた3地点のハプロタイプ多様度 (h) は, St.23が0.356, St.24が0.000, St.30が0.644と, 地点により開きがあった.

考 察

トウキョウサンショウウオは移動能力の乏しい生物種であり, そのため生物地理学的にも重要な遺伝情報を持つと考えられるが, 形態による比較が難しいことと, 遺伝子配列の変異に富む領域についての情報が不足していたため, 種内変異の比較は難しかった. 本研

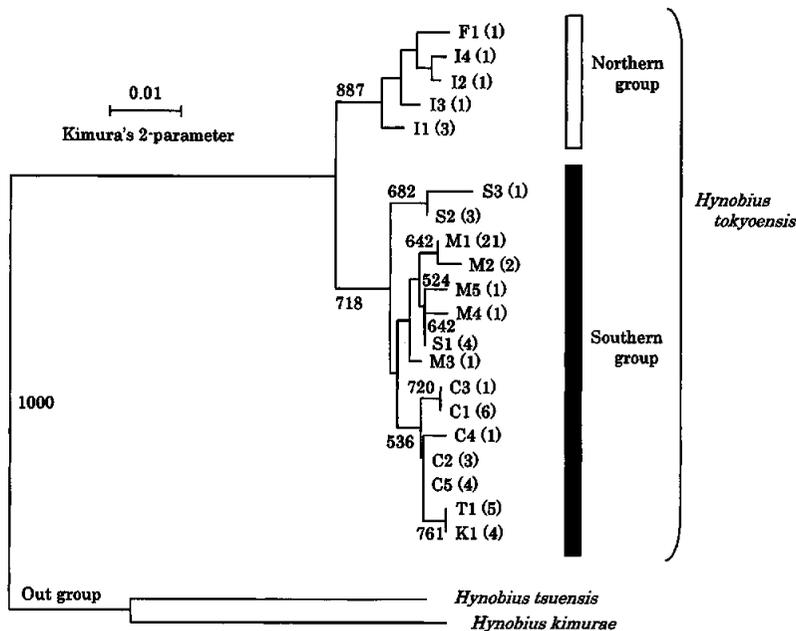


図1. ミトコンドリア遺伝子D-loop HV2領域に基づくトウキョウサンショウウオのハプロタイプの系統樹 (NJ法). ブートストラップ値 (試行1000回) を枝の隣に示す.

Fig. 1. NJ tree of haplotypes of *H. tokyoensis* based on the mtDNA HV2 region. Bootstrap values greater than 500 (1000 replicates) are shown near the nodes.

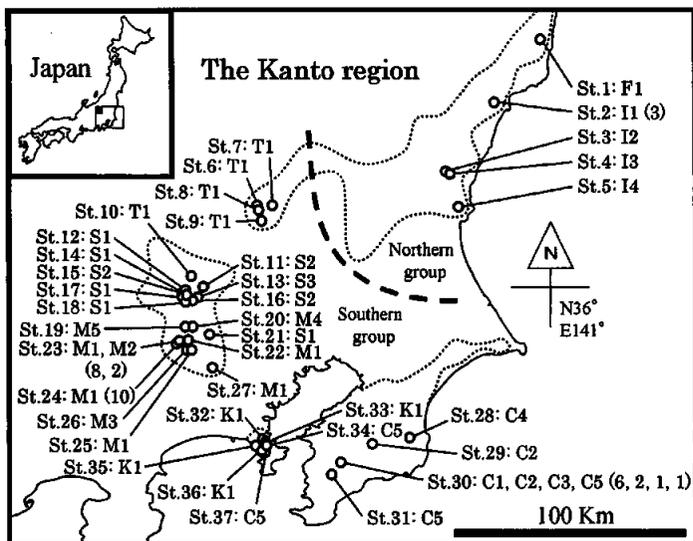


図2. トウキョウサンショウウオのハプロタイプの分布。地点名とハプロタイプを記す。破線は北グループと南グループの区分。点線は分布域。複数の標本を分析した地点の括弧内の数字は、各ハプロタイプの個体数を示す。

Fig. 2. Geographical distribution of haplotypes of *H. tokyoensis*. Stations and haplotypes are shown on the map. The broken line shows the boundary of the northern and southern groups. The dotted line shows the distribution area. At the stations where two or more samples were analyzed, figures in parentheses show the numbers of samples for each haplotype.

究では、ミトコンドリア遺伝子 D-loop HV2 領域の解析により20種類のハプロタイプが確認されたが、これにより、本種の種内変異の研究が可能となった。

系統解析の結果では、北グループと南グループで明瞭にグループ分けが可能であり、両者の分化の程度は高いと考えられた。両グループの由来については、両グループの境界付近での詳細な分布や、近縁種（特にトウホクサンショウウオ, *Hynobius lichenatus*）との遺伝的関係についての調査も必要であると考えられるため、ここでは考察しない。

北グループ内では、地点間が離れていることもあるが、いずれの地点からも異なるハプロタイプが確認された。ただし、同地点で採集された3個体 (St.2) については、すべて同じハプロタイプであったことから、北グループの地点内での多様性については、さらに調査が必要である。

三浦半島からは、K1とC5のハプロタイ

プが確認されたが、C5は房総半島からも確認されている。本種は、両棲類であることから海を渡ることはできないため、この事実は興味深い。本種同様、低移動性であるアオオサムシの赤色型亜種 *Carabus insulicola nishikawai* (Ishikawa, 1966) も房総半島南部と三浦半島南部に分布するが (石川, 1991)。両種における分布の共通点も、両半島が数万年前は陸続きであった (Kaizuka et al., 1977) という地史的要因に由来すると考えられる。一方、T1およびK1は、距離的に遠いが相同性は高い。特に、他のハプロタイプに見られない238Aの欠失と297GTの重複が、それぞれ独立に起こったのではないとすれば、古東京川 (Kaizuka et al., 1977) などの存在により分布が連絡していたという仮説も成り立つものと思われる。古東京川は、現在のT1の分布域から現在の東京湾を通り、現在の湾口から太平洋に注いでいたと考えられている。おそらく、低移動性で水場の

存在が不可欠なサンショウウオにとっては、水系の異なる地域への分散よりは、水系内での分散の方が、はるかに起こりやすかっただろう。

10個体の標本が得られた地点内のハプロタイプ多様度には、地点間で開きがあった。最も多様性の高かった千葉県のSt.30 ($h=0.644$)は、一年を通して涸れることの無い湧水の注ぐ安定した産卵場所であり、多くの個体が産卵のために訪れていた。St.23 (0.356)も、比較的安定な水場である。それに対し、最も多様性が低かった東京都のSt.24 (0.000)は、個体数は少なくないものの、雨水に頼る水溜りの多い産卵場所であるため、幼体に変態上陸する前に干上がることも多いようだ。したがって、St.27の場合、産卵場所の不安定さが遺伝的多様性の低下に関係している可能性も考えられる。遺伝的多様性の低下と、個体数の減少、すなわち絶滅との関連が多くの研究者に指摘されているが(米田, 2003), 栃木県の4地点からも、すべて同じハプロタイプが検出されているため、どの程度の個体数が維持されているのか詳細な調査が必要と考えられる。特に、本種の場合、地域的に特定のハプロタイプ(ハプロタイプグループ)が優占する傾向が認められることから、個体群の絶滅により種全体の遺伝的多様性が大きく低下する可能性がある。そのため、それぞれの個体群の保全は極めて重要であると考えられる。

本研究により、トウキョウサンショウウオのミトコンドリア遺伝子に基づく遺伝的構造について知ることができた。今回解析された領域からは、複数のハプロタイプが確認され、地理的傾向も認められたことから、今後、地史的研究や、本種の保全のために活用することができるだろう。

謝 辞

貴重な標本を提供していただいた吉澤賢治

(東京学芸大学), 伊原禎雄(奥羽大), 金田正人(三浦半島自然誌研究会), 植田健仁(北方系生物研究所), 塩谷暢生(由木の会) 諸氏に感謝いたします。倉西良一氏(千葉県立中央博物館)と鎌田貢司郎氏(千葉県君津市)には、生息地の案内と採集の協力をしていただいた。林 文男氏(首都大)には原稿を見ていただき貴重なアドバイスをいただいた。協力に感謝いたします。日の出町教育委員会からは、町指定の天然記念物であるトウキョウサンショウウオの採集許可をいただいた。また、諸手続きに関する指導もしていただき感謝いたします。調査中、様々な方々に道案内や採集の手伝いをしていただいた。これらの方々にも感謝いたします。

引用文献

- 千葉県. 2000. 千葉県の保護上重要な野生生物—千葉県レッドデータブック—(動物編).
- 伊原禎雄. 2001. トウキョウサンショウウオの分布の制限要因. 日本生物地理学会会報 56: 23-37.
- 石川良輔. 1991. オサムシを分ける錠と鍵. 八坂書房, 東京. 295 p.
- Kaizuka, S., Y. Naruse, and I. Matsuda. 1977. Recent formation and their basal topography in and around Tokyo Bay, central Japan. *Quaternary Research* 8: 32-50.
- 金田正人・大野正人. 1998. 神奈川県のとウキョウサンショウウオの分布と生息状況. 神奈川県自然誌資料 19: 1-4.
- 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.
- 環境庁. 1991. 日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック—(脊椎動物編). 環境庁編.
- 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, 東京. 69 p.
- Matsui, M. 1987. Isozyme variation in salamanders of the *nebulosus-lichenatus* complex of the genus

- Hynobius* from eastern Honshu, Japan. With a description of a new species. *Jpn. J. Herpetol* 12: 50-64.
- Matsui, M., K. Nishikawa, S. Tanabe and Y. Misawa. 2001. Systematic status of *Hynobius tokyoensis* (Amphibia: Urodela) from Aichi Prefecture, Japan: a biochemical survey. *Comp. Biochem. Physiol. B* 130: 181-189.
- 松井正文・小池裕子. 2003. 生物進化と保全遺伝学. p. 19-39. In: 小池裕子・松井正文 (eds.) 保全遺伝学. 東京大学出版会, 東京.
- 中村健児・上野俊一. 1963. 原色日本両生爬虫類図鑑. 保育社, 大阪. 214 p.
- 斎藤和久. 2003. トウキョウサンショウウオの飼育法の検討. 神奈川県環境科学センター研究報告: 67-71.
- 米田正明. 2003. 遺伝的多様性保全のためのプロジェクト. p. 59-75. 保全遺伝学. In: 小池裕子・松井正文 (eds.) 東京大学出版会, 東京.

気候温暖化と両生類の繁殖のタイミング： 東京都多摩地区における両生類個体群の一例

草野 保¹・井上 雅文²

¹ 192-0397 八王子市南大沢1-1 首都大学東京・理工学研究科・生命科学
² 612-8393 京都市伏見区下鳥羽渡瀬町35-1 株式会社京都科学

Climate warming and timing of breeding of amphibians:
A case of amphibian populations in the Tama district, Tokyo

By Tamotsu Kusano¹ and Masafumi Inoue²

¹ *Department of Biological Sciences, Graduate School of Sciences and Engineering, Tokyo Metropolitan University, Minami-ohsawa 1-1, Hatchioji-shi, Tokyo 192-0397, Japan*
² *Kyoto Kagaku Co., Ltd., 35-1 Shimotoba, Watarise-cho, Fushimi-ku, Kyoto 612-8393, Japan*

近年、地球規模での両生類の減少が危惧されているが、ここ日本でも、特に大都市近郊でのこの数十年の両生類個体群の衰退は際立っている。両生類の減少や絶滅の原因としては、人為的な環境破壊が際立つが、これ以外に酸性雨、残留農薬の拡散などとともに、地球温暖化に伴う気候の変化も上げられている (松井, 1996; Blaustein et al., 2003; Pounds and Puschendorf, 2004)。両生類の皮膚は薄く、外界からの様々な影響を受けやすい。極端な温度変化や乾燥は致命的だろう。また、彼らの繁殖活動は温度や降雨の影響を受けるために、気候の変化は個体群に深刻な影響を与える可能性がある (Blaustein et al.,

2001)。しかしながら、地球温暖化に伴う気候変動のような変化は、長期間に徐々に進行するため、その両生類個体群への影響を検出するのは容易ではない。短期間の調査では不可能で、最低でも数十年レベルの調査が必要だろう。地球温暖化の生物群集への影響が頻繁に話題に上がっている今日でも、その両生類の繁殖への影響の有無を検証した報告はまだ数少ない。

英国のカエル類3種とイモリ類3種に関して、17年間にわたり繁殖活動をモニタリングした結果、カエル類1種を除きすべての種で温暖化に伴う繁殖活動の早期化の傾向が明らかとなった (Beebee, 1995)。カエル類では