

栃木県日光市湯ノ湖のハコネサンショウウオの生態調査と種の同定

1. 研究の目的と意義

2021 年湯ノ湖でハコネサンショウウオの幼生を観察し形態の比較を行った。しかし、違いが少なく形態だけで判別することが困難だった。そこで溪流に生息するハコネサンショウウオがなぜ湖で観察できたかを明らかにする。また、2012 年以降ハコネサンショウウオが 7 種類に分割されている。栃木県はハコネサンショウウオの分布域の北限に近く、複数種生息している県にも接している。そのため湯ノ湖に生息するハコネサンショウウオについて、他のサンショウウオとの関係や分類を分子系統樹解析によって、明らかにしようとした。

2. 研究の手法

(1) 観察とサンプルの採集

日光市湯ノ湖でハコネサンショウウオの幼生を 7 月 17 日、8 月 21 日、10 月 1 日に観察した。10 月 1 日に 2 個体採集し、尾の先端を約 3mm 切り取りサンプルとした。

(2) ミトコンドリア DNA シトクロム b(mtDNA Cytb) 遺伝子の塩基配列解析

- ①キアゲン DNeasy Blood&Tissue Kit を使用して mtDNA の抽出を行った。
- ②抽出した mtDNA にプライマーと反応液を加え、リアルタイム PCR を行い mtDNA Cytb 遺伝子の塩基配列を増幅した。
- ③節約法で PCR 産物を精製しダイターミネーター法によって両端からシーケンスした。

(3) 分子系統樹の作成

NCBI のデータと決定された塩基配列を、ゲノムネットを用いて ML 法によって分析し、系統樹を作成した。

3. 結果

表 1 ハコネサンショウウオの観察

日付		体長(mm)	尾(mm)	頭胴(mm)	尾割合%
7月17日	1	41.2	19.7	21.5	92
	2	45.8	22.2	23.6	94
	3	40.5	17.9	22.6	79
	平均	42.5	19.9	22.6	88
8月21日	1	47.7	23.9	23.8	100
	2	41.0	19.6	21.4	92
	平均	44.4	21.8	22.6	96
10月1日	1	60.1	30.8	29.3	105
	2	46.2	22.6	23.6	96
	平均	53.2	26.7	26.5	100.8

(1) ハコネサンショウウオの幼生の観察

頭胴長の変化に対して尾長の変化が大きく、10 月 1 日では尾長が頭胴長の 100% に達した。指の先端に黒い爪を持っていた。体色は全体的に茶色であり、腹と指は白色であった。時間が経つにつれて体色が濃くなり白色の部分が減少した。また、10 月 1 日の個体の背中には橙色の縦線が観察できた。最も小さい個体が体長 40.5mm であり、最も大きい個体が、60.1mm であった。また、2021 年の個体は発見できなかった。

(1) 塩基配列

```
>Hakone1-Cytb-1141bp
ATGGCCACCAACTCGAAAACTCATCTCTACTAAAAATTATTAACGGATCATTATTGATTACCAACACC
CTCAAACTTATCAGCTTGATGAAATTCGGATCTTTACTTGGAGTTTGCTAATTGCCAAATTTAACTGGAT
TATTTCTTGCTATACATTATACGGCTGATACATCTTCAGCATTTTCATCTGTAGCTCATATTTGTCGTGATGT
AATTATGGTTGATTAATTCGTAATATACATGCCAATGGTGCATCATCTTTATCTGTATTATATCCACAT
CGGACGAGGCCCTTATTATGGTTTCATATATATAAGAACTTGAAATATTGGTGTATTCTTCTCTACTAG
TAATAGCTACTGCATTGTAGGATATGACTTCCATGAGGACAGATATCTTCTGAGGTGCTACAGTTATTAC
GAATTTACTATCAGCAATTCCTTATATTGGTAATTCACCTTGCAATGAATTTGAGGTGGATTTTCAGTTGATA
AAGCTACCTTAACACGATTTTTGCATTCTCTTATTCCATTCTAATTGTAGGGTAAGTATAATTAC
TTATTATTTTACATCAAACTGGCTCAAATAACCCAACAGGAATTATCTAACACAGACAAAATCCATTCCA
TCCTTATTTTTCATCAAAAGACGTTTATAGGATTTTAAATATATATACAGCTTAAATATTATCACTACTATC
ACCTAACCTGTTAGGCGACCCAGACAAATTTACCCCTGCAATCCTTTATTAACTCCCCACATTTTCAACGAG
AATGATATTTCTTATTGCTTATGCAATCCTACGATCTATTCTTAATAAAGTAGGAGGTGATTAGCTCTCTTA
GCATCAATTATAATTTAATGCTAATTCACCTATTATCATACATAAACAACGTAGTCTAATCTTCGACCAATA
ACTCAAAATTATTTCTGGCTGCTAGTATCAAATACATTAATTTAACCTGAATCGGGGCCAACAGTAGAACCC
CCCATTATTGAAATTTGGTCAAAATGCATCAACCTATACCTCTTTATTATTATTATAATACCTATACCTAGG
ATGATGAGAAAAATAAATAAATGAT

>Hakone2-Cytb-1141bp
ATGGCCACCAAACTCGAAAAACCATCTCTACTAAAAATTATTAACGGATCATTATTGATTACCAACACC
CTCAAACTTATCAGCTTGATGAAATTCGGATCTTTACTTGGAGTTTGCTAATTGCCAAATTTAACTGGAT
TATTTCTTGCTATACATTATACGGCTGATACATCTTCAGCATTTTCATCTGTAGCTCATATTTGTCGTGATGT
AATTATGGTTGATTAATTCGTAATATACATGCCAATGGTGCATCATCTTTATCTGTATTATATCCACAT
CGGACGAGGCCCTTATTATGGTTTCATATATATAAGAACTTGAAATATTGGTGTATTCTTCTCTACTAG
TAATAGCTACTGCATTGTAGGATATGACTTCCATGAGGACAGATATCTTCTGAGGTGCTACAGTTATTAC
GAATTTACTATCAGCAATTCCTTATATTGGTAATTCACCTTGCAATGAATTTGAGGTGGATTTTCAGTTGATA
AAGCTACCTTAACACGATTTTTGCATTCTCTTATTCCATTCTAATTGTAGGGTAAGTATAATTAC
TTATTATTTTACATCAAACTGGCTCAAATAACCCAACAGGAATTATCTAACACAGACAAAATCCATTCCA
TCCTTATTTTTCATCAAAAGACGTTTATAGGATTTTAAATATATATACAGCTTAAATATTATCACTACTATC
ACCTAACCTGTTAGGCGACCCAGACAAATTTACCCCTGCAATCCTTTATTAACTCCCCACATTTTCAACGAG
AATGATATTTCTTATTGCTTATGCAATCCTACGATCTATTCTTAATAAAGTAGGAGGTGATTAGCTCTCTTA
GCATCAATTATAATTTAATGCTAATTCACCTATTATCATACATAAACAACGTAGTCTAATCTTCGACCAATA
ACTCAAAATTATTTCTGGCTGCTAGTATCAAATACATTAATTTAACCTGAATCGGGGCCAACAGTAGAACCC
CCCATTATTGAAATTTGGTCAAAATGCATCAACCTATACCTCTTTATTATTATTATAATACCTATACCTAGG
ATGATGAGAAAAATAAATAAATGAT
```

図1 ハコネサンショウウオのmtDNACytbの塩基配列 (1141bp)

1141bp の 2 つの塩基配列が決定できた。それぞれ Hakone1、Hakone2 とし、2 個体の塩基配列には 4 つ違いがあった。

(2) 分子系統樹

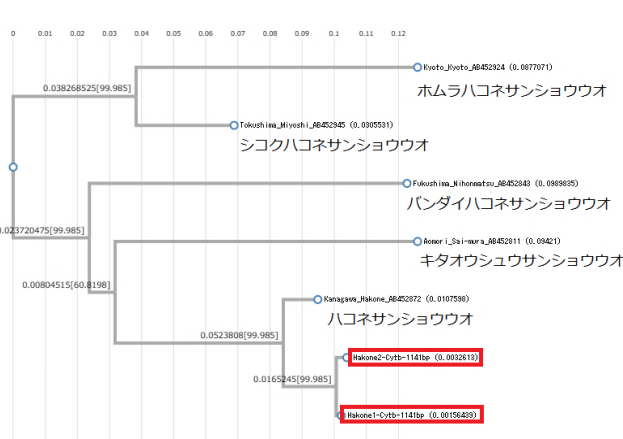


図2 ハコネサンショウウオ属 5 種を含めた分子系統樹

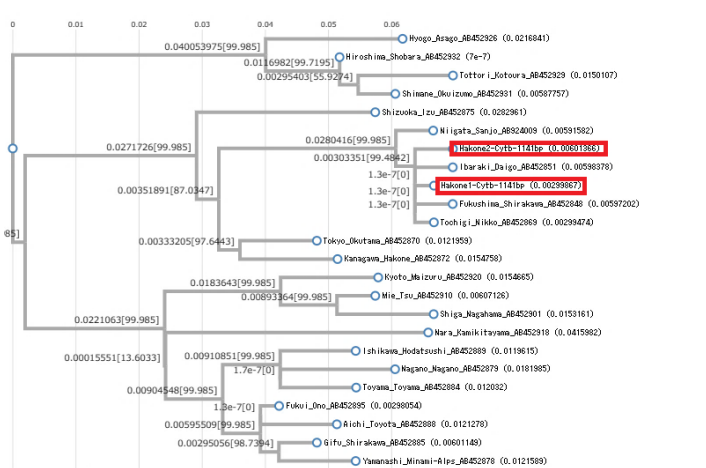


図3 ハコネサンショウウオのみの分子系統樹

ハコネサンショウウオ属 5 種を含めた分子系統樹を作成すると Hakone1 と Hakone2 は分岐率 99% でハコネサンショウウオのグループに入った。

ハコネサンショウウオ (*onychodactylus japonicus*) のみで分子系統樹を作成すると新潟県三条市、茨城県大子町、福島県白河市、栃木県日光市と同じグループに入った。

4. 考察

観察した個体の形態から孵化して 1 年ほどであると推測できる。そして、2021 年に観察した個体は発見できなかった。このことから 2 つの仮説を立てた。

① 上流で孵化し湯ノ湖に移動している。

孵化したばかりの幼生は上流から下流に移動し、孵化後ただちに急流に出ず 3 ヶ月から 4 ヶ月間は孵化場所あるいはその付近の溜りにとどまることが報告されている。(早瀬長利、山根爽一; 1982) このことや今回観察した個体はすべて成長した幼生であることから、湯ノ湖の上流である金精沢、白根沢、

五色沢で産卵されたものが湯ノ湖に移動しているのではないかと考えた。そして 2021 年の個体はさらに下流に移動したために発見できなかったと推測した。

② 湯ノ湖付近で産卵している。

湯ノ湖で卵や孵化したばかりの幼生が発見できなかった原因として、ハコネサンショウウオは 5 月～8 月に産卵し地下水脈などに卵嚢を付着するため、時期が合わず発見できなかった可能性があると考えた。

2021 年の研究で幼生の形態の比較をし、キタオウシュウサンショウウオまたはハコネサンショウウオに最も似ていると結論づけた。しかし、遺伝子解析からは湯ノ湖のハコネサンショウウオはハコネサンショウウオ (*Onychodactylus japonicus*) のグループに属し、とくに福島県、茨城県、新潟県のハコネサンショウウオに近いことが推定できた。そのため湯ノ湖で発見した幼生は、ハコネサンショウウオ (*Onychodactylus japonicus*) だと考えられる。

5. 今後の課題

5 月～8 月の雨天の夜に湯ノ湖で産卵が行われているか調査する。そして、湯ノ湖上流や下流のハコネサンショウウオについて遺伝子解析と幼生の形態を比較することで湯ノ湖のハコネサンショウウオの移動経路や産卵場所を明らかにする必要があると思う。また、他の水系で成体の形態の比較と遺伝子解析を行うことで、ハコネサンショウウオ属の分布や境界をより明確にする必要がある。

6. 参考文献

- ・「Yoshikawa, N. and Matsui, M. 2022. A New Salamander of the Genus *Onychodactylus* from Central Honshu, Japan (Amphibia, Caudata, Hynobiidae)」[https://doi.org/10.5358/hsj.41.82\(2022-5-21\)](https://doi.org/10.5358/hsj.41.82(2022-5-21))
- ・「【国立科学博物館】新種発見！深山に潜む焰色のサンショウウオ」
<https://www.sankei.com/economy/news/220303/pr12203030918-n1.html> (2022-5-21)
- ・松井正文・森哲『新 日本両生爬虫類図鑑』日本爬虫両棲類学会編 サンライズ出版 2022
- ・「ゲノムネット」<https://www.genome.jp/ja/> (2023-1-7)
- ・「National Center for Biotechnology Information」<https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (2022-10-23)
- ・「茨城県筑波山系におけるハコネサンショウウオの水中生活期の形態」
https://www.jstage.jst.go.jp/article/seitai/32/3/32_KJ00001775994/_pdf/-char/ja (2023-2-1)

謝辞

今回の研究で宇都宮大学農学部応用生命科学科教授飯郷雅之先生にご協力・ご指導いただきました。誠にありがとうございました。