

オオサンショウウオの保全は水辺を守る

—放流実現に向けた遺伝子研究—

広島県立広島国泰寺高等学校理数ゼミ生物班

1. 序論

西日本の河川にはオオサンショウウオ(大山椒魚)と呼ばれる両生類が生息している(図1)。最大の特徴はその桁外れな大きさにある。最大で150cmに及び、およそ3億6千万年前の古生代、地球上を闊歩していた巨大両生類を彷彿とさせる。まさに生きた化石と言われる所以である。現在、世界では日本、中国、アメリカのわずか三か国に3種が生き残るにすぎない。世界でも代表的な希少種のひとつとなっている。我が国では、1826年、オランダの医師、シーボルトが江戸参府の際に個体を入手し、世界の学会で初めて紹介した。それ以来、我が国の自然と文化の象徴として手厚く守られてきた。

私たちの地球は海が大半を占める水惑星である。生命体は水を背景として構成されており、水と生命は切り離す事ができない。それゆえ、水環境を守ることはすなわち、生命を守ることに等しい。私たちは、この水環境を守るために、大きく2つの方法があると考えた。一つは、水そのものを浄化する直接的な方法であり、もう一つは、河川生態系に確立した生態ピラミッドを保持する方法である。オオサンショウウオは里山の河川生態系の頂点に君臨する。それゆえ、オオサンショウウオの数にアンバランスが生じると生態ピラミッドは瞬く間に崩壊し、その結果、水環境も一変してしまう可

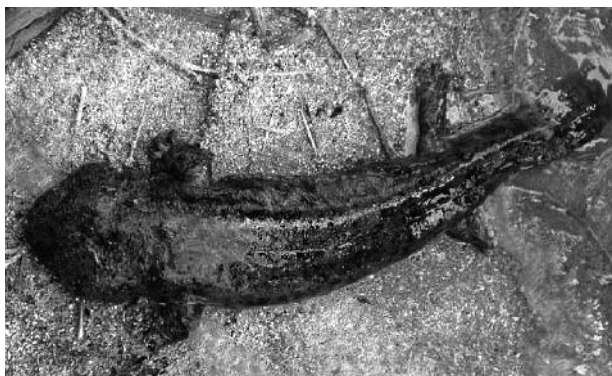


図1 オオサンショウウオ

能性がある。そこで、オオサンショウウオが減少した河川に幼生を放流し、繁殖に必要な個体数を確保して、集団が健全に生き延びる手助けをする。これによって生態ピラミッドを回復・維持し、水環境を保全できないかと考えた。

まず、放流実現のためには、オオサンショウウオが地域的にどの程度遺伝的に分化しているのか、その遺伝情報を詳しく把握し、遺伝子攪乱を防ぐことが絶対的な必要条件となる。しかし、この動物の生態や行動には謎が多く、とくに遺伝的情報は皆無に等しかった。そこで私たちは、オオサンショウウオの遺伝的地域差の解明を最終目標として遺伝子研究に取り組んだ。その結果、日本のオオサンショウウオは遺伝的地域差が極端に小さいことがわかった。この遺伝的均一性は、水環境の変化が一瞬にしてオオサンショウウオの減少を引き起こす危険性を警告している。私たちは、改めて水環境保護の重要性を知らされることとなった。一方、中国を訪れてオオサンショウウオ保全の活動を学び、アメリカの高校と協力して、アメリカオオサンショウウオの遺伝子解析にも着手した。そして最後に、私たち自身が解析した遺伝子配列をもとに遺伝子音楽を作成した。清流を彷彿とさせるその美しい遺伝子メロディーによって、オオサンショウウオを広く認知してもらい、里山河川の水環境保護の重要性について一人でも多くの人に気づいてほしいと願う。

2. 研究材料と研究方法

(1) 研究材料

遺伝子解析に用いた個体を表1に示す。広島集団については、広島大学と広島市安佐動物公園から提供を受けた。地域差解析に用いる全国33のサンプルは、日本動物園水族館協会の協力により、文化庁からの許可を得た後、各機関からの提供を受

表1 研究材料

個体名	採集場所	状態	固定・凍結日
タニガワ	広島県太田川本流	生体 (尾芽胚)	2001, 1, 11 (凍結日)
オキガワ	広島県太田川支流	ホルマリン固定	2004, 9, 21 (固定日)
ギオン	広島県太田川本流	ホルマリン固定	1980, 6, 21 (固定日)
コウザン	広島県太田川支流	ホルマリン固定	2004, 9, 6 (固定日)
ウシロヤマ	広島県太田川支流	ホルマリン固定	2004, 9, 10 (固定日)
ムシムシ	広島県太田川支流	ホルマリン固定	2005, 11, 25 (固定日)
ワカヤマ	和歌山県有田川水系	凍結冷凍	1989 (凍結日)
No. 1-33	全国7府県	尾組織のアルコール保存	2006-2007 (採取日)
アメリカ	ペンシルバニア州	凍結冷凍	2006 (凍結日)

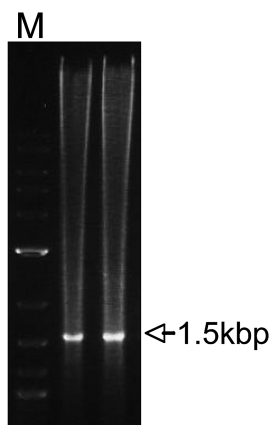


図2 XbaIで切断したDNAの電気泳動
M, 分子量マーカー

けた。そして、アメリカの個体は、共同研究校であるAAST校がライコミング大学の協力を得て入手したものである。

(2) 研究方法

a) DNAの抽出

DNAの抽出と精製において、広島の胚組織はフェノール法を用い、固定標本と各地方の組織サンプル及びアメリカの個体はカラム法（キアゲン社およびAmbion社）を用いた。

b) 遺伝子の増幅と塩基配列の決定

50-500ngのDNAを鋳型に用いて、耐熱DNA合成酵素により35サイクルのPCR増幅を行った。6%ポリアクリルアミド電気泳動で増幅断片を確認後、カラム精製を行い、ラベル反応後、当校にあるABI370を用いて塩基配列を決定した。固定標本から抽出したDNAでは、PCR装置による増幅を2回連続で行った。塩基配列は解析ソフトGenetyxで解析した。

3. 成果

(1) オオサンショウウオ遺伝子情報の基盤づくり

オオサンショウウオの遺伝的地域差の解析に向けて、マクロサテライトとして個体変異が期待される核ゲノムの反復配列の探索と、遺伝子進化の速度が一般的に核DNAよりも速いとされるミトコンドリアDNAの全塩基配列の決定に取り組んだ。

a) 反復DNA

広島集団の胚から抽出したDNA (10 μg) を13種の制限酵素を用いて切断しアガロース電気泳動を行ったところ、Xba Iの切断によって約1.5kbpの長さをもつ特に濃いバンドが検出された (図2)。その濃さのおおまかな計測からゲノム全体の約1%

を占める反復DNA配列であることが推測された。断片を切り出し、クローニングを行って塩基配列を決定したところ、258bpの配列が内部の1kbpを挟んで両端に逆向きに配置していることがわかった。さらに、その258bpの内部にはTGACATCAの8塩基パンドロームが4塩基ごとに12回繰り返す構造をとっていた (図3)。日本の他のサンショウウオヤイモリ、カエルでは同じような反復配列が電気泳動では見つからなかったことから、オオサンショウウオに特異的配列である可能性が考えられた。

Xba Repeatの構造



図3 XbaIで切断したDNAの反復構造

b) ミトコンドリアDNA

オオサンショウウオのミトコンドリアDNAの全長16298bpには、37個の遺伝子が含まれ、脊椎動物に典型的な配置パターンを示した (図4)。ただし、短いNon-coding領域が存在し、これは有尾両生類に特徴的な配列として知られている。チュウゴクオオサンショウウオの塩基配列と比較すると、各遺伝子は90.1~97.6%の相同性を示し、両者が非常に近縁であることが遺伝学的に裏付けられた。なお、本校が決定したオオサンショウウオのXba反

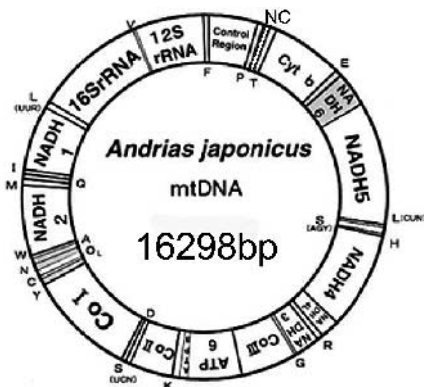


図4 オオサンショウウオのミトコンドリア遺伝子配置

NC, non-coding 領域。まず、3つの断片(8kbp、6kbp、3kbp)を増幅し、次に500bp ずつ塩基配列を決め、全体を網羅した。

復配列とミトコンドリア全ゲノム配列は、日本DNAデータバンク (DDBJ) に登録し、平成17年9月28日から世界に向けて公開されている。

(<http://getentry.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html> ; Xba反復配列,AB208678;ミトコンドリア全ゲノム配列,AB208679)。

(2) オオサンショウウオのミトコンドリア遺伝子配列における地域差の解析

ミトコンドリアの各遺伝子を増幅するプライマーを自由に設計することが可能になったことで、オオサンショウウオ地域集団の遺伝的違いを調べる研究を開始した。

a) 太田川水系の遺伝的地域差 (固定標本からのDNA抽出と遺伝子解析)

オオサンショウウオの生体組織の入手は極めて難しい状況にあるが、固定標本からDNAを抽出して、遺伝子配列を解析することができれば、将来的にサンプルの入手数が増え、しかも過去と現存するオオサンショウウオ集団の遺伝子配列を比較するこ

とができる。そこで、まず、広島県太田川のホルマリン固定標本について遺伝子解析に取り組んだ。

太田川水系の5個体の固定標本からDNAを抽出し、4つのミトコンドリア遺伝子 (ATPase8,ND3, ND6, tRNA-Ser) と1つの領域 (Non-coding領域) を増幅してアクリルアミド電気泳動した (図5)。なお、t-RNAとNon-Coding領域については増幅後、バンドを確認できなかった。

増幅できた産物の塩基配列を決定した結果、ATP8とND3においては、遺伝子バンクに登録した配列と異なる配列が増幅されていることがわかった。オオサンショウウオのミトコンドリアDNAには各遺伝子が1つずつしか存在しないことから、これらの配列は核ゲノムに由来するものと推測される。なお、それ以外の配列、すなわち、ミトコンドリア本来の遺伝子の配列には固定標本すべてにおいて差が見られなかった。

b) 広島と和歌山間の遺伝的地域差

次に、遺伝的地域差の検出に適したミトコンドリア遺伝子を探すため、広島と和歌山の集団と分布が東限に近い和歌山集団の個体を用いて両者の違いを調べた。

5つの遺伝子と一つの領域のうち、3つの遺伝子,ND5, ND6, ATP8およびD-loop領域では2集団間で塩基配列が完全に一致した。一方、ND3では1塩基、CytBでは2塩基の違いが見つかった (表2)。いずれもアミノ酸の置換は生じていない (図6)。解析した5つの遺伝子と1つの領域の総塩基数は2994塩基であり、そのうち2集団間で異なる塩基は3個、わずか0.1%と極めて変異の小さいことがわかった (表2)。

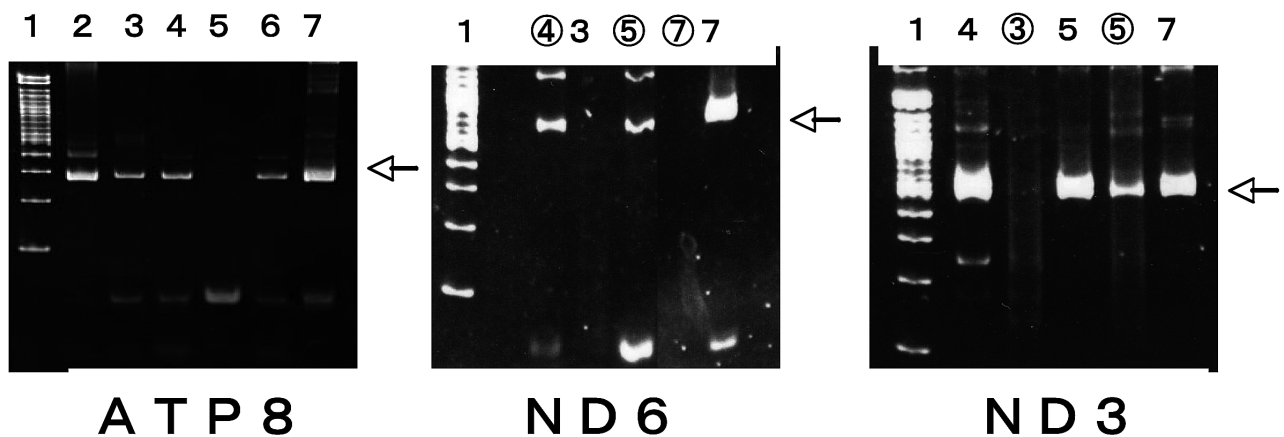


図5 固定標本のDNA増幅結果

1, 分子量マーカー; 2, タニガワ; 3, オキガワ; 4, コウザン; 5, ウシロヤマ; 6, ムシムシ; 7, ギオン ○はプライマー-S2A1, その他はプライマー-S1A2 を使用図の矢印が予想されるサイズの増幅産物を示す

表2 塩基配列の比較

遺伝子	異なる塩基数
NADH3	1/397bp
NADH5	0/397bp
NADH6	0/500bp
ATP8	0/210bp
CytB	2/957bp
D-loop	0/533bp
合計	3/2994bp (0.1%)

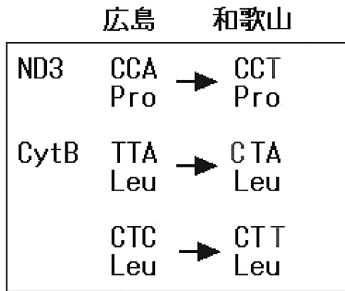


図6 異なる3つの塩基とコードするアミノ酸

c) ミトコンドリア遺伝子の地域差解析

平成18年からは、日本動物園水族館協会の協力を得て、7府県、13水系、33個体の生体サンプルが集まった(図7)。現段階において、ND3とCytBの解析結果を示す(図8、9)。

西日本の集団は鈴鹿山脈を境に大きく2つに別れ、西グループはさらに3つの異なるグループを形成し

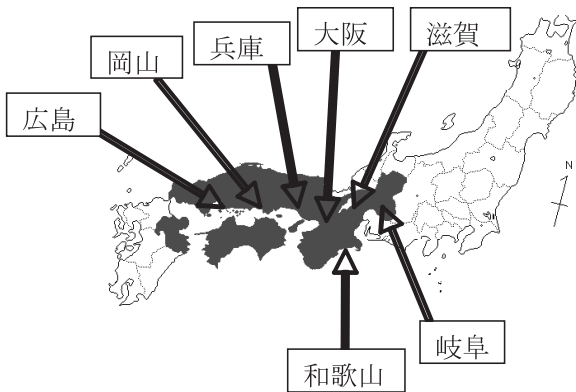


図7 解析中の地域集団

NADH3遺伝子

(NADH脱水素酵素第3サブユニット)

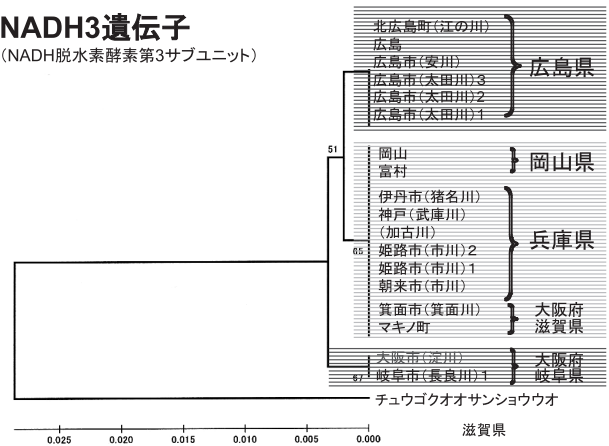


図8 ND3の解析結果

チトクロームB遺伝子

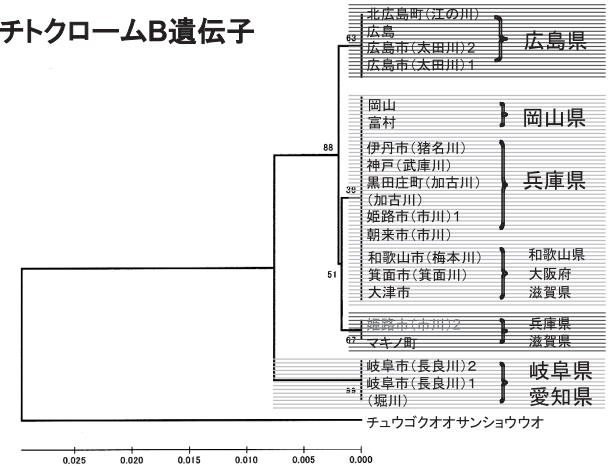


図9 チトクロームB遺伝子の解析結果

ていると推測される。人為的に移動された個体の存在も推測された(図8 大阪市、図9 姫路市)。

(3) 世界3種のオオサンショウウオの保全活動の体験と国際交流

a) アメリカオオサンショウウオ保全活動への参加
アメリカではライコミング大学の協力を受け、アメリカオオサンショウウオの生息地における保全活動に参加した。オオサンショウウオの生息地を訪問し、実際に個体の捕獲やタグ(標識)の埋め込みなど、生態調査の体験をすることができた(図10)。



図10 捕獲、タグの埋め込み、カウンター計測の様子

本校の活動に触発されたアメリカのAAST校（バーゲンカントリーアカデミー）とアメリカオオサンショウウオの遺伝子解析について共同研究がスタートした。AAST校の生徒がアメリカオオサンショウウオのDNAを抽出し、私たちが設計したプライマーを利用して遺伝子増幅に取組んだ。増幅が成功した遺伝子について、今度は私たちが塩基配列を決定した。

ミトコンドリア遺伝子の増幅と解析

増幅産物をアクリルアミド電気泳動したところ、16SrRNA遺伝子の増幅はうまくいかなかったが、12Sr遺伝子について予想通りのサイズを確認することができた（図11）。

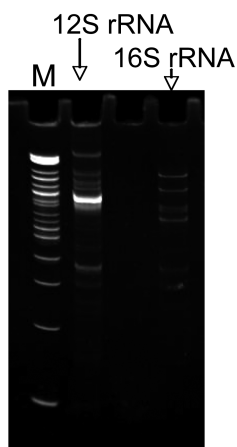


図11 アメリカオオサンショウウオの12S及び16SrRNAの増幅

そこで、得られた増幅産物の塩基配列を決定し、遺伝子バンクに既に登録されている中国や日本のオオサンショウウオの12SrRNA配列と比較して遺伝子系統樹を作成した（図12）。形態に基づいた分類通り、アメリカオオサンショウウオが日本や中国と系統学的に大きく離れることが遺伝子の配列からも支持された。次に、解析後、遺伝子バンクに登録されたアメリカオオサンショウウオの12SrRNA遺伝子の他の塩基配列と比較したところ

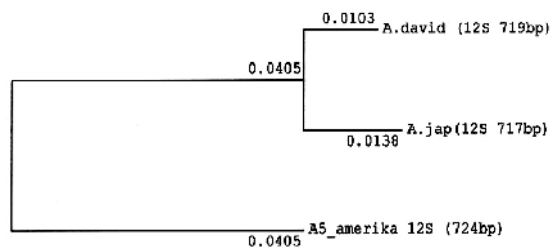


図12 中国・日本・アメリカオオサンショウウオの12SrRNAの系統関係

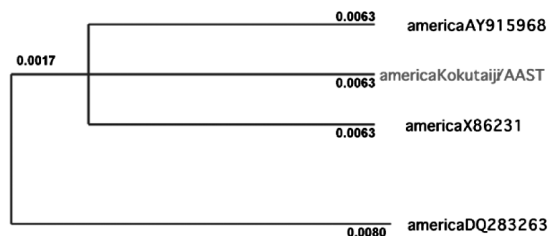


図13 アメリカオオサンショウウオの12SrRNAの系統関係

（図13）、それぞれに違いが見られた。12SrRNA遺伝子は進化速度がもっとも遅い遺伝子と考えられていることから、アメリカオオサンショウウオの場合、日本とは異なり、地域ごとの遺伝的違いはかなり大きいものと推測できる。

b) チュウゴクオオサンショウウオ

中国のオオサンショウウオについては、四川省農業科学院水産研究所の保全事業を見学し、中国科学院成都生物研究所と研究成果の交換を行うことで共同研究の連携を開始した（図14）。チュウゴクオオサンショウウオは、日本のオオサンショウウオと大きさや形態はよく似ている（図15）。その人工飼育による保全活動の難しさや問題点を教えて頂いた。中国のオオサンショウウオは、日本との進化歴史上つながりが非常に深いことから、今後、保全や研究を共同して行っていきたいと考えている。

(4) オオサンショウウオの遺伝子メロディーの作成

平成16年には、遺伝子を身近に感じ、オオサンショウウオについて多くの人に広く知ってもらいたい、そして、とくに里山の水環境に対する意識を強めてほしいという願いから、遺伝子音楽の作



図14 四川省農業科学院水産研究所と中国科学院成都生物研究所での発表の様子

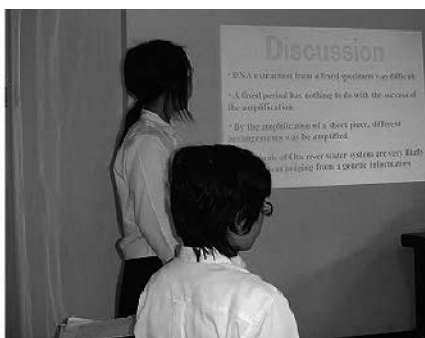


図15 人工飼育されていたチュウゴクオオサンショウウオ

成に取り組んだ。

大野乾博士（遺伝学者）が提唱した変換ルール（1986年）に基づき、私たちが決定したオオサンショウウオDNAの塩基配列を音符に変換し、そのDNAを音楽として表現した（図16,17）。曲は清流を流れる美しいメロディーに仕上がった。この試みは、朝日新聞の『天声人語』を始め多くのマスメディアにも取り上げられ、希少種オオサンショウウオについて、国民に広くアピールすることができた。

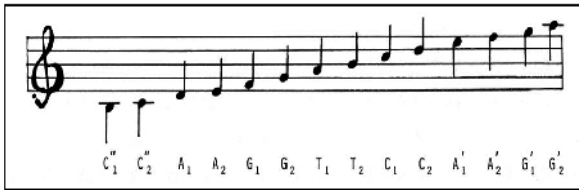


図16 A, T, C, Gの塩基を音符に変換するルール



図17 ミトコンドリアのNon-coding 領域の塩基配列を音符に表現
バイオサイエンスとインダストリー-63(3), 2005 のCDに収録

4. 考察と結論

オオサンショウウオの遺伝的地域差は極端に小さく、広島と和歌山の間ではミトコンドリア遺伝子の塩基配列の違いがわずか0.1%に過ぎなかった。これは、アメリカオオサンショウウオの結果と対照的である。日本のオオサンショウウオの遺伝的均一性は、もし河川の水環境が激変すれば、オオサンショウウオの集団は瞬間に減少の一途を辿る危険性を警告している。そして、既に過去に一度、激減を経験してボトルネック現象が生じた可能性

が高い。この結果から、私たちは、水環境の保全の重要性を改めて強く自覚させられた。一方、地域差が小さいながらも鈴鹿山脈を境に2つに分かれ、西の集団はさらに3つに分かれた。この結果は、放流がグループ間を越えてはいけなことを遺伝子攪乱の観点から警告するものと考え。今後、さらに多くの遺伝子、とくに核の遺伝子のデータも増やし、遺伝的地域差の実態を明らかにすることで、放流実現に少しでも寄与したい。最終的にオオサンショウウオが守られ、生態ピラミッドが正常に保たれることで、水環境がしっかり守られていくものと強く信じている。

最後に、私たちが作った遺伝子音楽によって、ひとりでも多くの人々がオオサンショウウオの存在を意識し、オオサンショウウオの保護には水環境の保護が重要であることに気づいてほしいと思う。また、世界各国にも絶滅危惧種・希少種は存在し、それぞれの国の自然や文化の象徴となっている例は数多い。それゆえ、「一つの希少種の保全に取り組むことは、水環境保護のモチベーションを高めると共に、生態ピラミッド本来のバランスを保ち、水環境がしっかりと守られていく」という私たちのコンセプトが、世界の水環境の保全に必ずや貢献できるものと願っている。

参考文献

- ・平成18年度スーパーサイエンスハイスクール特別枠研究実施報告書『時空を超えて挑む、オオサンショウウオ進化の4次元的ゲノム解析』 広島県立広島国泰寺高等学校理数ゼミ生物班
- ・オオサンショウウオの遺伝子解析-反復DNA、ミトコンドリアゲノム、そして遺伝子音楽- 平成16年 広島県立広島国泰寺高等学校理数ゼミ生物班
- ・オオサンショウウオの遺伝子メロディーを奏でる バイオサイエンスとインダストリー、63(3)、2005 三浦郁夫
- ・Wu, Z. (1987) Satellite DNA from the Chinese fat newt, *Pachytriton brevipes*, and related species. *Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol.*, Hiroshima Univ. 9, 213-259.
- ・Ogata M., Ohtani H., Igarashi T., Hasegawa Y., Ichikawa Y. and Miura I. (2003) Change of the heterogametic sex from male to female in the frog. *Genetics* 164(2):613-20.
- ・Zang, P., Chen, Y-Q., Liu, Y-F., Zhou H., and Qu, L-H. (2003) The complete mitochondrial genome of the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus* (Amphibia: Caudata). *Gene* 311(2003): 93-98.
- ・Ohno, S. and Ohno, M. (1986) The all pervasive principle of repetitious recurrence governs not only coding sequence construction but also human endeavor in musical composition. *Immunogenetics* 24: 71-78.
- ・大野乾(1988)生命の誕生と進化 東京大学出版会

5. 追捕

本活動は、日本動物園水族館協会（総裁 秋篠宮殿下）、広島市安佐動物公園、広島大学大学院理学研究科附属両生類研究施設（三浦郁夫准教授）の支援を受けている。また、平成18年及び平成19年

は、スーパーサイエンスハイスクールの特別枠の指定を受けている。

代表 大埜勝寛 新田理人 木内美波
指導教諭 三浦淳子 森田達己