

オオサンショウウオの遺伝的多様性について

1. 会議名 第2回木津川上流部会（平成17年8月20日）
2. 委員名 西野委員
3. 内容 貯水池の出現により前深瀬川流域の地域個体群が絶滅してしまう、あるいは分断されることによって遺伝的多様性には影響があるのではないかという質問に対する回答

西野委員の質問（オオサンショウウオの遺伝的多様性）に対する回答

1. 「第2回木津川上流部会」での質問に対する回答

質問1： 「DNAに差異がなかった」と報告されているが、同じ生物でも遺伝子が全く同じであることはあり得ない。したがって、分析については、「どの部位」を「どのように分析」したのか、その違いがないということは何なにか、どういう意味があるのかを説明して欲しい。

回答1： 個別に説明した内容

オオサンショウウオの遺伝子構造解析は、前深瀬川水系産（9個体）と地理的に離れた赤目滝川産（2個体）、兵庫県養父町建屋川産（3個体）、岐阜県各務ヶ原市木曾川産（1個体）について京都大学で検討していただいている。分析方法は、次のとおりです。

- (1) RAPD 法による分析・・・全DNA（核DNA+ミトコンドリアDNA）
- (2) PCRダイレクトシーケンス法による分析・・・ミトコンドリアDNA
- (3) 高頻度反復配列（VNTRs）を用いた多型検出法・・・核DNA

分析の結果、

- (1) RAPD 法による分析では、遺伝子配列が基本的には個体レベルでパターンの違いが見られましたが、木曾川産の個体が他と大きく異なることが示されました。
- (2) PCRダイレクトシーケンス法による分析では、ミトコンドリアDNA全体の約16%に相当する塩基配列（タンパク質をコードとする2遺伝子、調節領域、2種類のrRNA(ribosome RNA)遺伝子、5種類のtRNA(transfer RNA)遺伝子の合計10遺伝子領域断片、2,611塩基対）について調査しましたが、近畿地方（3河川）の個体の塩基配列に差は見られませんでした。確認された差は、木曾川の個体においてわずか1塩基（タンパク質をコードとするCytochrome b遺伝子および調節領域の両方で差異）異なるというものでした。
- (3) 高頻度反復配列（VNTRs）を用いた多型検出法では、ゲノムDNAから繰り返し配列が含まれる可能性のある領域を単離して塩基配列を決定し、そこからプライマーを設計しました。実際にプライマー設計が可能であったのは307クローン中18クローンで、そのうちPCR法により増幅され電気泳動によって明確なバンドが見られたのは、8個のプライマーセットであり、近畿地方（3河川）の個体と木曾川の個体間で増幅断片の長さによる差異が検出されました。

このことから、近畿地方の個体（3河川）についてはメスの先祖系統は同一であることが示され、先祖集団から分化後それほど時間が経過していない可能性が高いと考えられます。現在、調べ得る範囲内で遺伝的多様性が見つからないため、貯水池の分断による遺伝的多様性への影響はきわめて小さいと考えられます。

なお、前深瀬川水系産9個体の捕獲位置は、別紙のとおりです。

2. 「メール」による質問に対する回答（ご指導いただいた専門家による回答です）

質問 2： 先日ご説明いただいたオオサンショウウオの遺伝子調査結果ですが、専門家に確認したところ、ミトコンドリア DNA は母系で進化速度が遅いため、種の地理的、歴史的変遷を知るにはよいが、個体群の遺伝的多様性を知るには十分ではないとのこと。そのため、近畿地方の個体群間に遺伝的多様性があるかどうかを確認するには、進化速度の速い核 DNA についての比較が不可欠です。

回答 2： 上記の見解は、専門家の意見をかなりの間違えて捉えていると考えられます。細胞中の DNA は核とオーガネラ（ミトコンドリア、植物の葉緑体など）に見られますが、ここで問題としている核とミトコンドリアを比べると、理論的には、前者は2倍性（雄親と雌親由来）なのに対し、後者は半数性（雌親由来）なので、後者のほうが遺伝的浮動を起こし易く、また遺伝子流動しにくいので、個々の集団内の遺伝子内容を単一化し、集団間の分化を引き起こし易いこととなります。つまり、種としての多様性を引き起こし易くするわけです。

ミトコンドリア DNA と一口に言っても、その内部には異なる遺伝子が含まれ、チトクローム b やコントロール領域は進化速度が高いとされています。このように、整理しておかないといけないのは、DNA の領域ごとの進化速度の違いに関する点です。

核 DNA にも同様の問題があるのです。核 DNA はおおまかに二つに分けられます。一つ目は核遺伝子とよばれる進化速度の遅い領域（エクソン）、もう一つは遺伝子をコードしておらず進化速度の速い領域（イントロン、偽遺伝子、高頻度反復配列）です。一般に、前者の進化速度は、ミトコンドリア DNA の進化速度の 1/5-1/10 程度の遅さであることが知られています。

次に核 DNA の中では比較的進化速度の速い後者についてですが、イントロン、偽遺伝子の進化速度は、ミトコンドリア DNA 全体と比べて、進化速度はやや遅いかほぼ同じくらいであることが知られています。そして、残り的高頻度反復配列の進化速度が、ミトコンドリア DNA の進化速度より速いのです。ここが専門家の言いたかったことでしょう。

このように、近縁な集団間の遺伝的変異を調査する上では、核 DNA の高頻度反復配列が最も優れた遺伝的マーカーであり、ミトコンドリア DNA のチトクローム b やコントロール領域はそれに次ぐことは確かです。

質問 3： 先日のご説明では、核 DNA（（3）の高頻度反復配列）について、近畿地方の3河川（前深瀬川、赤目滝川、および建屋川）の河川間、個体間で違いがあったかどうかがよくわかりませんでした。それがわからないと、遺伝的多様性への影響が評価できません。

回答 3： 上述のように、理想的には核 DNA の高頻度反復配列を調べるのが最良の道です。しかし、これはそう簡単なことではありません。高頻度反復配列を調べるためには、その領域を吊り出すためのプライマーの設計が必要です。しかし、その開発は非常に困難であり、外国産のイモリやサンショウウオで開発されたものが使えないどころか、外国産のイモリの近縁な2種間でも使えません。このために、分子生態学の雑誌には、ある種にだけ使えるプライマーを開発した、という記事が採用されている段階なのはご存知かと思えます。事情はオオサンショウウオに限りません。脊椎動物で有効なプライマーが

が開発されている種は、まだ数えるほどでしょう。このように、高頻度反復配列領域のプライマーは種特異性が非常に高く、結果を得るための予備的実験として、高頻度反復配列の周辺部（プライマーの設計部位）の塩基配列を調べなければならないのです。このプライマーの設計部の塩基配列を調べるには、大腸菌等に DNA を取り込ませ、大腸菌を増やすことにより DNA を増幅させるなどの処理が必要であり、特別の施設下でしか行うことができません。機構では京都大学に委託して数年間、これに取り組みましたが、成功には至りませんでした。

すなわち、核 DNA の高頻度反復配列については、近畿地方の 3 河川（前深瀬川、赤目滝川、および建屋川）の河川間、個体間の違いはつかめていません。しかし、そのことで、遺伝的多様性への影響が評価できないというのは極論でしょう。そのレベルで日本産のどれだけの種で調査が行われているのでしょうか。

質問 4： 核 DNA について、近畿の河川間（前深瀬川の 2 河川間についても、あわせて検討をお願いします）、個体間で違いがあったのかどうか、あったとしたらどの程度の違いなのか、またそれらの河川間、個体間で遺伝的距離が計算可能と思われるので、その結果をお知らせいただくようお願いします。

回答 4： 上述のように、核 DNA についての研究はできていませんから、結果はありません。なお、オオサンショウウオの高頻度反復配列解析は、世界中のどこでもなされていません。ただ、核 DNA だけを問題とするなら、簡便法はあります。塩基配列の内容は無視して、制限酵素断片の長さを調べる方法です。これができれば、ご質問にも容易に答えられるかも知れませんが、残念ながら、これも駄目なのです。その理由は、その解析にはかなりの量の綺麗な DNA が必要なのです。ところが、オオサンショウウオは特別天然記念物で文化財保護法で保護されており、個体を殺したり、大きな傷を負わせることができません。文化庁の許可がでないのです。この問題は上記高頻度反復配列解析が成功しなかった一つの理由でもあります。

ついでに、ランニングコストに関する問題も説明しておきましょう。ここでは近縁な集団間の遺伝的変異を調査する際に遺伝的マーカーとして有効と考えられるミトコンドリア DNA と、核 DNA の高頻度反復配列に話を絞ります。

これまで、生物の遺伝的多様性の調査の多くでは、ミトコンドリア DNA の配列が用いられてきました。この理由には次のことが挙げられます。(1)ミトコンドリア DNA は、進化速度が比較的早い。(2)ミトコンドリア DNA は、一つの細胞中に数多く含まれているため、核 DNA の調査よりも必要とされる組織の量が少量です。(3)さらに近縁種を含む多くの動物群でよく調べられておりプライマーとよばれる既知の塩基配列の情報を得やすい。(1)～(3)の理由により、結果を得るまでにかかる時間的、金銭的成本は当然少なくてすみます。

一方、核 DNA の高頻度反復配列を調べる際に考えられる時間的、金銭的成本はミトコンドリア DNA の調査にくらべ非常に大きなものとなります。なぜなら、前述のように、高頻度反復配列領域のプライマー設計には多大な時間的、金銭的成本がかかるためです。よって高頻度反復配列は、理論的には優れたマーカーでも、現実的には極めて調査しに

くいのです。

ミトコンドリア DNA を用いて個体群内、個体群間の変異を調査した研究は、有尾類を含む多くの動物群で多数報告されており、種によっては、個体群間はもちろん個体群内でも、大きな変異が見られます。これらの結果は、ミトコンドリア DNA が個体群の遺伝的多様性を知る上で有効な遺伝的マーカーの一つであること示すものと考えます。

こうした点を総合的に考えると、ミトコンドリア DNA に基づく遺伝的多様性の調査が最も現実的なものとなります。今回のオオサンショウウオの調査結果では、ミトコンドリア DNA の塩基配列の変異は個体群内では全く見られず、個体群間でもわずか数塩基の違いというものでしたが、これらの結果は、ミトコンドリア DNA による調査方法に問題があることを示すものではなく、オオサンショウウオの遺伝的特性をしめすものと考えられます。オオサンショウウオの遺伝的多様性が、他の有尾類に比べ、著しく低いという報告は中国、アメリカでも報告されています。

遺伝子多様性調査の前深瀬川流域 9 個体捕獲地点

