



Tokyo Gakugei University Repository

東京学芸大学リポジトリ

<http://ir.u-gakugei.ac.jp/>

Title	トウキョウサンショウウオ (Hynobius tokyoensis) の mtDNA CR 領域に見られる poly ( T ) 領域の問題( fulltext )
Author(s)	吉澤,賢治; 本間,久英; 道越,祐一; 中田,正隆
Citation	東京学芸大学紀要. 自然科学系, 61: 47-50
Issue Date	2009-09-00
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2309/107113">http://hdl.handle.net/2309/107113</a>
Publisher	東京学芸大学学術情報委員会
Rights	

## トウキョウサンショウウオ (*Hynobius tokyoensis*) の mtDNA CR 領域に見られる poly (T) 領域の問題

吉澤 賢治\*・本間 久英\*・道越 祐一\*\*・中田 正隆\*

宇宙地球科学分野

(2009年5月20日受理)

YOSHIZAWA, K., HONMA, H., MICHIGOSHI, Y. and NAKATA, M.: Problems related to a poly(T) domain in the mtDNA CR genes of *Hynobius tokyoensis*. Bull. Tokyo Gakugei Univ. Division of Natur. Sci., 61: 47-50. (2009) ISSN 1880-4330

### Abstract

The authors discuss issues related to the nucleotide polymorphism in Tokyo salamander (*Hynobius tokyoensis*). The authors have mainly analyzed the CR genes of mtDNA (Yoshizawa et al., 2004; 2005). On the basis of the analytical results, an extremely low frequency of mutation was observed in the CR genes. On the other hand, the existence of a poly (T) domain in the CR genes was confirmed in the CR genes of *Hynobius dunni* (Michigoshi et al., 2005). Because of the slippage caused by a poly (T) domain, the analysis of the entire CR genes was impossible. Despite recent technical progress, there is generally no method of evasion from the poly (T) problem. On the basis of phylogenetic analyses on the CR genes without the poly (T) domain and cyt b genes of the Tokyo salamander (unpublished data), both genes have a certain consistency between the geographical distance and the hereditary distance. Therefore, the authors concluded that the absence of the poly (T) domain has only a negligible influence on the interpretation of the polymorphism of the CR genes.

(In Japanese)

**Key words:** トウキョウサンショウウオ (*Hynobius tokyoensis*), mtDNA, CR 領域, Poly T

*Department of Astronomy and Earth Science, Tokyo Gakugei University, 4-1-1 Nukuikita-machi, Koganei-shi, Tokyo 184-8501, Japan*

**要旨:** 筆者等はトウキョウサンショウウオ (*Hynobius tokyoensis*) の種内変異の多様性について研究している。これまで、主にミトコンドリア DNA の CR 領域の遺伝子を解析してきた (吉澤ほか, 2004: 2005)。解析結果から、CR 領域の遺伝子からは極めて低い変異しか検出されなかった。一方、CR 領域の遺伝子に於けるポリ T 領域の存在は、オオイタサンショウウオ (*Hynobius dunni*) (道越ほか, 2005) の CR 領域遺伝子においても確認された。ポリ T 領域による蛍光標識のスリップ現象 (slippage) により、CR 領域の遺伝子を全域で解析することは不可能だった。現在、ポリ T 領域の問題は不可避な問題である。本種のポリ T 領域部分を除いた CR 領域とチトクローム b (未発表データ) に関する系統樹の解析に基づく両遺伝子には地理的距離と遺伝間距離との間に相関性が認められる。従って、ポリ T 領域を省いても、CR 領域の遺伝子の変異に関する解釈に大きな影響は無いものと考えられる。

---

\* 東京学芸大学 (184-8501 小金井市貫井北町 4-1-1)  
\*\* 現在横浜国立大学大学院博士課程在籍

## 1. はじめに

エコロジカルシステム概念に基づく生物多様性の意義は現在では広く認められる様になった。2008年5月20日には、「生物多様性基本法案」が可決され、絶滅危惧種等の生物種の保全のあり方に対する新たな認識が我々に求められている。これら生物多様性の程度を把握するための方法として、遺伝的手法が広く用いられていることは周知のことである。

日本産小型有尾類(田子, 1931)の一種であるトウキョウサンショウウオ(*Hynobius tokyoensis*)は群馬県を除く関東地方と福島県南東部(佐藤, 1943)に分布するが、その生息範囲は局所的な分布を示している。このことはアライグマなどの帰化動物による捕食もさることながら、主に開発によって本種の生息地の破壊に伴うハビタットロス(habitat loss)、あるいは繁殖地として水域を必要とする本種の環境要因などが複雑に関係しているが、現状ではこうした局所分布によって個体群間の遺伝的交流が分断されることを意味するものである。吉澤ほか(2004, 2005)は本種の種内多型を詳細なオーダーで検出し、種内分化・分散の様子を探る目的で、本種のmtDNA CR領域(またはD-loop領域、以後はCR領域と表記する)のDNA解析を行った。

mtDNAを用いることで遺伝的多様性の検出は可能であるため、*Hynobius*属に関する知見は徐々に蓄積されつつある(吉澤ほか, 2004; 2005; 道越ほか, 2005; 林・草野, 2006; Matsui et al., 2007)。しかし、筆者らが進めてきたmtDNA解析の中で、いくつかの問題点が確認されている。そのもっとも大きな問題点の一つがPoly T領域(また、その相補配列としてのPoly A領域を含むが、以降はまとめてPoly T領域と表記する)と称されるホモポリマー領域である。この領域はT(チミン)が10数塩基以上連続配列している。Poly T領域の存在は、オオイトサンショウウオ(*Hynobius dunni*)において報告されている(道越ほか, 2005)。問題はこれらPoly T領域がサイクルシーケンス(Cycle Sequence)で蛍光色素(ddNTPs)の標識の際にスリッページ(slippage)と呼ばれる現象を起こすことであり、Poly T領域直下からシーケンスデータが取れないため、多くの場合、T(あるいはA)の配列数を正確に決定することは困難である。今回は、このPoly T領域の扱い方、とらえ方から本種のmtDNA CR領域の分析に関する検証をおこなったので報告する。

## 2. 方法

遺伝子解析の有用な手法であるPCR法(Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1985, 1988)において日本産有尾類の中で特に、*Hynobius*属および*Andrias*属のCR領域上流域の検出に対して効果的に増幅するForward Primer HDL-F1(5'-GGC ACC CAA AGC CAA AAT TC-3')が開発されており(道越ほか, 2005)、本種に適用しても極めて高い増幅が可能であった。筆者らは、このHDL-F1に改良を加え、本種を専門的に標的としたForward Primer HTL-F1(5'-GGC CTC CAA AGC CAG AAT TCT-3')を設計し、さらにReverse PrimerとしてHTL-R12(5'-ACC GTT AGT TCA GAT TTA GG-3')を新たに設計した。これらHTL-F1およびHTL-R12はおよそ800bpあるとされるCR領域の前半部分(およそ300bp)を増幅可能とし、残りの後半部分に関してはForward Primer HTL-N4n(5'-TGA TAG CAA GGT GCA CTT GG-3')をおよびReverse Primer HTL-R41(5'-TAA GGC TAG GAC CAA ACC-3')を設計・開発した。しかし、CR領域の上流から、およそ3百数十bp付近にはT(チミン)が10数個ほど連続配列しているPoly T領域が本種にも存在することが明らかとなった。シーケンスデータではPoly T領域を超えた所で急激にシーケンスデータのバックグラウンドが高まり、解析ができなくなる(図1)。Poly T領域が存在する限り、この現象は不可避なものであり、現状のシーケンスではその部位の解析が困難である。そこでPoly T領域の解析は断念しPoly T領域をはずしたサイクルシーケンス用Primerを新たに開発した。これはPoly T領域の連続するT(チミン)上で標識を開始するようにしたものであり、それぞれ前半部分はHTL-R41より得られた配列から設計したCR領域前半用のHTL-R12TT(5'-AAA AAA AAA AAA AAC TAC-3')および後半部分はHTL-F1より得られた配列から設計したHTL-N4nTT(5'-TTT TTT TTT TTT TGT GAA CTC-3')を開発した。塩基配列はDNA Sequencer Model 3130(PE Applied Bio systems社)により行い、得られた塩基配列の配列データとシグナル情報を解析した。

## 3. 結果

Poly T領域は図1に示した通り、個体(図1. AとB)によって連続数に相違が生じる可能性がある。しかしその数の決定はPoly T領域直下からのバックグラウンドによるシグナルの乱れによって解析できなかった。ここで解析が可能となったのはCR領域上流域の300bpおよび

下流域の 463bp ~ 467bp とそれに続く tRNA<sup>phe</sup>6bp であった。これら下流域の塩基数の差異は挿入あるいは欠失によることが確認され, 最大で 4bp の差異が確認された。これにより mtDNA CR 領域は中部の一部領域を除いた計 763 ~ 767bp の解析が可能となった。

#### 4. 考察

これまで一般的には mtDNA の遺伝子変異の検出には CR 領域がもっとも適していると考えられてきた。その根拠は, 遺伝子をコードしない塩基置換の例外的な速さと種内多型を示すことによる (McMillan & Palumbi, 1997; Lunt et al., 1998) ものである。しかし, 一方で, ある種の脊椎動物ではこの領域の進化速度が遅いという結果 (Tang et al., 2006; Burbrink et al., 2000; Ujvari et al., 2005; Brehm et al., 2003; Roukoni and Kvist, 2002; Zink and Weckstein, 2003) も報告されており, 有尾類でも同様の報告 (Samuels et al., 2005; Steinfartz et al., 2000) がある。本種においては CR 領域と cyt b 領域に関する研究があ

り, 遺伝子の進化 (変異) 速度は CR 領域よりも cyt b 領域の方が早いという興味深い結果が得られている (Matsui et al., 2007)。従って, 本種において, CR 領域のみならず cyt b 領域の DNA 解析結果も報告する予定である (吉澤ほか, 準備中)。

本種の mtDNA CR 領域の Poly T 領域におけるダイレクトシーケンス法での T の配列数決定はスリッページ現象により困難である。この領域における T の数には若干の変異が含まれる可能性が示唆されており (図 1), 変異サイトの検出を中心に据える筆者等の一連の研究に於いては注目すべき領域であることは事実である。しかし, これまでにデータとして得られた CR 領域および cyt b 領域の総計 1865bp での現在行なわれている生物学的な系統解析では地理的距離と遺伝的距離に一定の整合性がみられている (未発表)。従って Poly T 領域を解析対象外としても系統解析の解釈に与える影響は少ないと結論づけられる。本種を含めた *Hynobius* 属 (*Hynobiidae*) に関しては種内変異を多検体で行った例 (例えば, 林・草野, 2006, Matsui et al., 2007) は現状では十分である

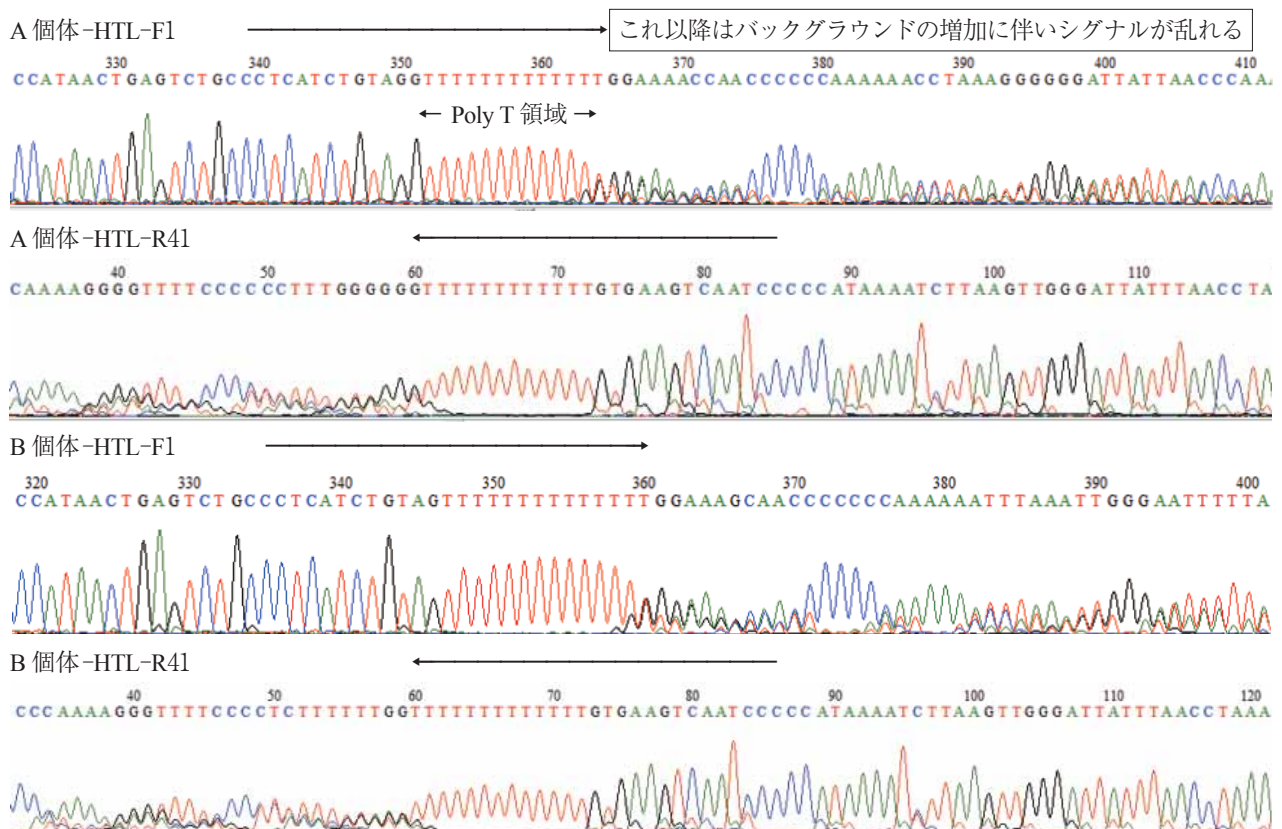


図 1. A 個体および B 個体のシーケンスデータ

HTL-F1 による CR 上流側で A は T の塩基数が 13bp に対し B は 14bp を有す。また HTL-R41 による CR 下流側では A は T の塩基数が 12bp であるのに対し B では 13bp となる。いずれの場合も Poly T 領域 (A の 353bp ~ 364bp と 61bp ~ 72bp および B の 347bp ~ 360bp および 60bp ~ 72bp) をこえるとシグナルが乱れて解読できない。図中の矢印は PCR の伸長方向を示す。

とは言えない。しかし日本国内で多様な種分化を示す *Hynobius* 属の進化や分散の傾向をより詳細に検討する上では多検体での種内多型の検出に加え、他種における種内変異との比較・検討は不可欠であろう。

本研究で得られた結果は、本種の関東地方での分散・拡散の傾向を検討する上で重要になると考える。さらに IUCN で保護すべき野生生物として登録されている本種に於いて保全に関わる重要な資料・情報を提供しうるのである。さらに次世代シーケンサーなど新たな技術の登場でこれら Poly T などのホモポリマー領域の解読が簡便に行われる可能性は十分高く、今後の研究に期待したい。

## 謝 辞

本研究を進める上で実験施設の使用および技術的なアドバイスを頂いた東京学芸大学・生命化学分野の原田和雄教授、東京学芸大学・環境科学分野の藤本光一郎准教授および終始、尽力を頂いた吉澤享氏に厚くお礼を申し上げます。

## 引用文献

- Brehm, A., Harris, D. J., Alves, C., Jesus, J., Thomarat, F., Vicente, L., 2003. Structure and evolution of the mitochondrial DNA complete control region in the lizard *Lacertadugesii* (Lacertidae, Sauria). *J. Mol. Evol.* 56, 46–53.
- Burbrink, F. T., Lawson, R., Slowinski, J.B., 2000. Mitochondrial DNA phylogeography of the polytypic North American rat snake (*Elaphe obsoleta*): a critique of the subspecies concept. *Evolution* 54, 2107–2118.
- 林義雄・草野保 (2006) : 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. 両生類学会報 2006 (1) : 1–9.
- Lunt, D. H., Whipple, L. E. and Hymann, B. C. 1998. Mitochondrial DNA variable number tandem repeat (VNTRs): Utility and problems in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 7: 1441–1455
- Matsui, M., Tominaga, A., Hayashi, T., Misawa, Y. and Tanabe, S. (2007): Phylogenetic relationship and phylogeography of *Hynobius tokyoensis* (*Amphibia: Caudata*) using complete sequences of cytochrome b and control region genes of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44, 204–216.
- McMillan, W. O. and Palumbi, S. R. 1997. Rapid rate of control region evolution in Pacific butterflyfishes (Chaetodontidae). *J. Mol. Evol.* 45: 473–484.
- 道越祐一・岩本俊考・井野郁男・佐藤真一 (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. 両生類学会報 2005 (2) : 130–138.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335–350.
- Roukoniemi, M. and Kvist, L. 2002. Structure and evolution of the avian mitochondrial control region. *Mol. Phylogen. Evol.* 23, 422–432.
- Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. 1985. Enzy-Matic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350–1354.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R. H., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. 1988. Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–494.
- Samuels, A. K., Weisrock, D. W., Smith, J. J., France, K. J., Walker, J. A., Putta, S. and Voss, S. R., 2005. Transcriptional and phylogenetic analysis of *Wve* complete ambystomatid salamander mitochondrial genomes. *Gene* 349, 43–53.
- 佐藤井岐雄 (1943) : 「日本産有尾類總説」. 日本出版社, p63–74
- Steinfartz, S., Veith, M. and Tautz, D., 2000. Mitochondrial sequence analysis of *Salamandra* taxa suggested old splits of major lineages and postglacial recolonizations of Central Europe from distinct source populations of *Salamandra salamandra*. *Mol. Ecol.* 9, 397–410
- 田子勝彌 (1931) 「蝾螈と山椒魚」. 丸善株式会社. p114–120
- Tang, Q. G., Liu, H. Z., Mayden, R. and Xiong, B. X., 2006. Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome b gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes). *Mol. Phylogen. Evol.* 39, 347–357.
- Ujvari, B., Madsen, T. and Olsson, M., 2005. Discrepancy in mitochondrial and nuclear polymorphism in meadow vipers (*Vipera ursinii*) questions the unambiguous use of mtDNA in conservation studies. *Amphibia-Reptilia* 26, 287–292.
- 吉澤賢治・道越祐一・本間久英 (2004) : トウキョウサンショウウオのミトコンドリア DNA 遺伝子解析. 東京学芸大学紀要 第四部門, 56, 97–100
- 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 mtDNA D-loop 領域遺伝子解析. 両生類学会報 2005 (2) : 123–129.
- Zink, R. M. and Weckstein, J. D., 2003. Recent evolutionary history of the Fox Sparrows (Genus: *Passerella*). *The Auk* 120, 522–527.