寄稿

# 種名が不明なミズハタネズミ亜科系統の種の同定

Species identification of a laboratory strain belonging to the family Arvicolinae

高畑 智、伊勢村夏実、目加田和之 Satoshi Takahata, Natsumi Isemura, Kazuyuki Mekada

岡山理科大学 理学部 動物学科 Department of Zoology, Faculty of Science, Okayama University of Science

#### Summary

This study investigated the taxonomic status of a laboratory strain belonging to the family Arvicolinae for which the wild species name is unknown. This vole strain, though considered formerly a Lemming, was distinguishable from any *Lemmus* species by features of its appearance, skull and molar morphology, and conventional chromosomal pattern. Subsequently, we read the nucleotide sequence of the mitochondrial cytochrome b (*Cyb*) gene and constructed a molecular phylogenetic tree. We found that this vole strain belongs to the same clade as *Microtus guentheri*. From these results, we concluded that this strain of Arvicoline should be considered *M. guentheri*.

# はじめに

ハタネズミ属 (*Microtus*) (field vole) は哺乳 類の中でも爆発的に種分化を遂げたグループ の一つである (Corbet 1978; Musser and Carleton 1993)。これらは草食性の小型哺乳類であり、 種や属によって異なった染色体動態や社会構 造を示すことから (Borodin et al. 2012 Modi 1987; Wolff 1985 など)、大型家畜のモデル動物 として、また、細胞遺伝学的研究や社会的行動 解析などに有用であり、これまでに、いくつか のハタネズミ種が実験動物化されてきた (後藤 1979; Mallory and Dieterich 1985; Widayati et al. 2003 など)。

岡山理科大学理学部動物学科動物資源学研 究室では、"ロシアレミング"という名前で、 他の研究室から譲渡された齧歯類の系統を維 持している (Fig. 1)。外見的に、この動物は Lemmus 属 (レミング属) が属するミズハタネ ズミ亜科 (Arvicolinae) の特徴を呈しているが、 標準和名リスト (川田ら 2018) や Common name リスト上 (https://www.mammalogy.org/mammals-list; 2019年2月26日版)には、"ロシ アレミング"に該当する和名(英名)は記載さ れおらず、該当する学名は不明であった。この ような状況の中、譲渡元から、この動物のミト コンドリア DNA cytochrome b (Cytb) 遺伝子の 塩基配列の一部を解読したところ、ハタネズミ 属である Microtus guentheri (ギュンターハタネ ズミ)の配列と類似していたという情報を得た (篠原 私信)。したがって、本系統がギュンタ ーハタネズミである可能性が予想されるが、本 系統の Cytb 遺伝子の塩基配列は完全には解読

されておらず、種を確定するには不十分である。 実験動物や展示動物のような飼育動物を扱う 上で、それらが位置する分類学的、系統発生学 的な位置を明確にすることは、正確な情報提供 や付加価値向上には欠かせない。そこで、本研 究では、この種名が不明なミズハタネズミ亜科 系統動物の種の同定を目的として、外部形態や 頭骨・歯形態の観察、染色体核型解析および *Cytb* 遺伝子の全塩基配列の決定を行った。



**Fig. 1.** Appearance of the vole strain studied. The species name is unknown.

# 材料および方法

# 動物

岡山理科大学理学部動物学科にて系統維持 されているミズハタネズミ亜科動物を対象と した。外部形態および頭骨・歯形態の観察に7 個体、染色体核型解析および Cytb 遺伝子の塩 基配列の決定に3個体を用いた。本研究の全て の動物実験は、岡山理科大学の動物実験委員会

Provided by 12

CORE

によって承認され(承認番号 第実2018-10号)、 かつ実験動物の飼養及び保管並びに苦痛に関 する基準(平成25年環境省告示8第4号)お よびその他の動物実験などに関する法令など の規定を踏まえ策定された学内取扱規定など に準じて行った。

#### 外部形態および頭骨形態・歯形態の観察

動物を安楽死処置した後、外部形態の観察を 行った。続いて、頭骨標本を作製し、頭蓋骨な らびに歯形態の観察を行った。

# 染色体核型解析

動物より摘出した脾臓のリンパ球培養細胞 から常法に従って染色体核型標本を作製した。 ギムザ染色法により、染色体数のカウントと形 態の観察を行った。

#### Cytb 遺伝子の塩基配列解析

尾組織より抽出したゲノム DNA を使用した。 NCBI データベースより、*M. ochrogaster* (NC\_027945)、*M. arvalis*(NC\_038176)、*M. levis* (NC\_008064)および*M. kikuchii*(NC\_003041)

の *Cytb* 遺伝子および前後の塩基配列情報を入 手し (Folkertsma et al. 2018; Lin et al. 2002; Triant and Dewoody 2006)、種間で保存性の高い 領域を利用して以下の *Cytb* 遺伝子全長をカバ ーするプライマーを設計した。

Vcb1-f: 5'-ACTATGACCAATGACATGAAAAAATC-3' Vcb2-f: 5'-TCTCCGAGAATATCTGGGAAAAAT-3' Vcb2-f: 5'-AACAGCATTCTCATCAGTAGCC-3' Vcb2-r: 5'-CTCCGAGAATATCTGGGAAAAA-3' Vcb3-f: 5'-CCCAGATATTCTCGGAGACC-3' Vcb3-r: 5'-CATAAGGTGGGCGGGTTG-3' Vcb4-f: 5'-CCCTACATCGGCACAACACT-3' Vcb4-r: 5'-GTAAGGACAAGGAGGTCGGC-3'

本系統のゲノム DNA に対して PCR を行い、 電気泳動により得られた PCR 産物を回収し、 ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決 定した。得られた塩基配列情報を利用して MEGA7 (Kumar et al. 2016) により系統樹を作 製した。系統樹に加えたミズハタネズミ亜科種 の塩基配列情報は、*M. agrestis* (AF119271)、 M. duodecimcostatus (AY513796), M. majori (AY513814), *M. montebelli* (AF163900), *M.* oeconomus (AF163902), M. levis (U54472), M. arvalis (U54479), M. ochrogaster (AF163901), M. californicus (AF163891), M. gregalis (AF163895), Clethrionomys rutilus (AF119274), Lemmus sibiricus (KY754011), Lemmus trimucronatus (AF119276), M. dogramacii (AY513793、AY513794 および AY513795)、 *M. anatolicus* (FJ767740、FJ767741 および FJ767742), M. irani (FJ767748, FJ767749,

FJ767750 および FJ767739)、*M. socialis* (AY513829、AY513830 および AY513831) お よび *M. guentheri* (AY513804、AY513805、 AY513806、AY513807、FJ767743、FJ767744、 FJ767745、FJ767746、FJ767747、FJ767751 およ び FJ767752) とした (Conroy and Cook 1999, 2000; Galewski et al. 2006; Jaarola et al. 2004; Kryštufek et al. 2009; Liu et al. 2012; Steppan and Schenk 2017)。

## 結果

#### 外部形態および頭骨形態・歯形態の観察

本系統は、外耳が発達しており(Fig. 1)、尾 は後足よりも長く、円筒状の形態であった(尾 長:21.4 mm~24.9 mm、後足長:17.7 mm~18.5 mm)。前肢の親指の爪の形状は非 strap-shaped 型であった(Fig. 2)。頭蓋骨の骨口蓋の後端中 央には中壁があり、翼状骨間窩に向かってなだ らかに下がる形状を呈していた(Fig. 3)。大臼 歯は無歯根で、長冠歯型を呈し、咬合面には頰 側および舌側へそれぞれエナメル紋のループ を出していた。後環の前のエナメル紋の閉鎖し た三角形(T)を呈しており、下顎第一大臼歯 のT1 から T5 は閉鎖していた(Fig. 3)。



**Fig. 2.** Left front foot palm in an animal examined in this study (A) and *Lemmus lemmus* (B) (adapted from Gerrit and Miller 1896). Each of these thumbs has a strap-shaped nail (B) and a non-strap-shaped nail (A).



**Fig. 3.** (A) Palatal view of the skull of an animal examined in this study. The posterior margin of the bony palate forms a hollow bridge rising toward the skull base, separating the posterolateral pits (Arrowhead). (B) The occlusal surface of the lower molar series of an animal examined in this study. The lingual side is to the left, \* indicates the 1st molar. (C) The enamel pattern of the 1st lower molar of *Microtus guentheri* (adapted from Kryštufek and Vohralík 2005). (D) The enamel pattern of the 1st lower molar of the 1st lower molar of *Lemmus lemmus* (adapted from Gerrit and Miller 1896).

## 染色体核型解析

本系統の染色体数は、2n=52、常染色体の腕 の数は52(NFa=52)であり、アクロセントリ ック型染色体が26対と大型のアクロセントリ ック型のX染色体と小型のアクロセントリッ ク型のY染色体で構成されていた(Fig.4)。解 析した細胞を見る限り(総計50核版)、個体間 での染色体数や形態の違いは認められなかっ た。



**Fig. 4.** Conventionally stained karyotype of a male animal examined in this study.



**Fig. 5.** Complete nucleotide sequence (1,143 bp) of the cytochrome b (Cytb) gene of the animals examined in this study. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) detected in one (ID: 68a,

female) of the two analyzed animals are indicated by M (A982C) and Y (C1086T) (underlined). Both genotypes of the remaining animal (ID: 71A, male) were C/C homozygous.

## Cytb 遺伝子の塩基配列

本系統の Cytb 遺伝子の塩基数は 1,143 bp で あり、解析した 2 個体のうち、1 個体の 2 カ所 でヘテロ接合性の SNPs が認められた(それ以 外は 2 個体とも同じ配列であった)(Fig. 5)。 得られた本系統の塩基配列データとNCBIデー タベース上のミズハタネズミ亜科 4 属 17 種の 配列データを用いて分子系統樹を作成した結 果、本系統は、M. guentheriのクレードに位置 していた(Fig. 6)、特にマケドニアやギリシャ、 トルコのもの(h1、Gw1、Gw2~7)と同じク ラスターに位置していた(Fig. 7)。この結果は、 近隣接合法および最尤法のどちらを使っても 同様であった。



Fig. 6. Evolutionary relationships of taxa. Breeding 68a and 71A were the animals examined in this study. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saito and Nei 1987). The optimal tree with the sum of branch length =0.98556793 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa are clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches (Felsenstein 1985). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method (Kimura 1980) and the units are the number of base substitutions per site. The analysis involved 18 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were 1,136 positions in the final dataset.



Fig. 7. Evolutionary relationships of taxa. Breeding 68a and 71A were the animals examined in this study. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saito and Nei 1987). The optimal tree with the sum of branch length =0.3172749 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa were clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches (Felsenstein 1985). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method (Kimura 1980) and the units are the number of base substitutions per site. The analysis involved 27 nucleotide sequences. positions Codon included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were 1,137 positions in the final dataset.

# 考察

本系統の外部形態および頭骨・歯形態の検察 結果をミズハタネズミ亜科動物の属ならびに 種の分類表(Gerrit and Miller 1896; Gromov and Polyakov 1992; Krysŝtufek and Voharlik 2005)を 用いて比較したところ、レミング属特有である 「小型の外耳、尾長が後足長より短い、大型で 平らな strap-shaped 型の前肢の親指の爪の形状」 といった特徴は認められず、「尾長が後足長よ り長い、前肢の親指の爪の形状は非 strap-shaped 型」といったハタネズミ属特有の 特徴を示していた。また、頭蓋骨の観察では、 ハタネズミ属の特徴である骨口蓋の後端部の 中壁が観察されたことから、本系統はレミング 属ではなく、ハタネズミ属であると判断された。 また、本系統が示した下顎第一大臼歯の閉鎖三 角形の舌側に3個よび頰側に2個の特徴は*M. guentheri*のものと同じであった(Krysŝtufek and Voharlik 2005)。

本系統の染色体核型を文献にある Lemmus 属 ならびにM. guentheriが属する Sumeriomys 亜属 種のものと比較したところ(Table 1)、本系統 の染色体核型構成は、M. guentheriの染色体核 型(2n=54、NFa=52、アクロセントリック型 の常染色体 26 対、XY 性染色体がアクロセン トリック型で構成)と同じであった。さらに、 ミトコンドリア DNAの Cytb 遺伝子を用いた塩 基配列の解析では、本系統の Cytb 遺伝子の塩 基配列は M. guentheri のものと最も高い相同性 が認められ、分子系統樹において、M. guentheri と同じクレードに位置していた (Fig. 6)。また、 本系統はマケドニアやギリシャ、トルコのもの とクラスターを形成していたことから (Fig. 7)、 M. guentheriの集団の中でも、ギリシャ・トル コ西部産のものを由来としているのではない かと考えられた。

以上の結果から、本系統は M. guentheri 種(ギ ュンターハタネズミ) であると判断された。今 後は、新たなハタネズミ属の実験動物系統とし て、ハタネズミ系統の遺伝的多様性に貢献し、 利用価値の向上につながるものと期待される。

**Table 1.** Karyotypes of *Lemmus amurensis*, *Microtus* (subgenus *Sumeriomys*) species, and the animals examined in this study.

Species	2n	NFa	Х	Y	References
L. amurensis	50	48	А	А	Gileva 1983
M. socialis	62	60	Α	А	Kefelioğlu 1995; Kefelioğlu and Kryštufek 1999
M. anatolicus	60	58-60	А	SM/A	Kefelioğlu and Kryštufek 1999; Yavuz et al. 2009
M. dogramacii	48	46-50	М	SM/A	Kefelioğlu 1995; Kefelioğlu and Kryštufek 1999; Şekeroğlu et al. 2011
M. irani	60	58	А	А	Kryštufek et al. 2010
M. guentheri	54	52	А	А	Baydemir et al. 2011; Kefelioğlu 1995; Çolak et al. 1997
ID: 69A, male	54	52	А	А	In this study.
ID: 69B, male	54	52	А	А	In this study.

# 参考文献

- Baydemir, A.N., Albayrak, I., Gözütok, S. (2011).
  Cytogenetic study on *Microtus guentheri* (Danford and Alston, 1880) (Mammalia: Rodentia) from Turkey: constitutive heterochromatin distribution and nucleolar organizer regions. *Folia Biol*, 59: 35–40.
- Borodin, P.M., Basheva, E.A., Torgasheva, A.A.,

Dashkevich, O.A., Golenishchev, F.N., Kartavtseva, I.V., Mekada, K., Dumont B.L. (2012). Multiple independent evolutionary losses of XY pairing at meiosis in the grey voles. *Chromosome Res*, 20: 259-268.

- Çolak, E., Yiğit, N., Sözen, M., Özkurt, Ş. (1997). Distribution and taxonomic status of the genus *Microtus* (Mammalia: Rodentia) in southeastern Turkey. *Israel J Zool*, 43: 391–396.
- Conroy, C.J., Cook, J.A. (1999). MtDNA evidence for repeated pluses of speciation within Arvicoline and Muroid rodents. *J Mamm Evol*, 6: 221-245.
- Conroy, C.J., Cook, J.A. (2000). Molecular systematics of a holarctic rodent (*Microtus*, Muridae). *J Mammal*, 81: 344-359.
- Corbet, G.B. (1978). The mammals of the Palaearctic region: a taxonomic review. British Museum (Natural History) Publication, London.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Folkertsma, R., Westbury, M., Eccard, J., Hofreiter, M. (2018). The complete mitochondrial genome of the common vole, *Microtus arvalis* (Rodentia: Arvicolinae). *Mitochondrial DNA B Resour*, 3: 446-447.
- Galewski, T., Tilak, M.K., Sanchez, S., Chevret, P., Paradis, E., Douzery, E.J. (2006). The evolutionary radiation of Arvicolinae rodents (voles and lemmings): relative contribution of nuclear and mitochondrial DNA phylogenies. *BMC Evol Biol*, 6: 80.
- Gileva, E.A. (1983). A contrasted pattern of chromosome evolution in two genera of lemmings, *Lemmus* and *Dicrostonyx* (Mammalia, Rodentia). *Genetica*, 60: 173-179.
- Gerrit, S., Miller, Jr. (1896). The genera and subgenera of voles and lemmings. North American fauna: Number 12. U.S. Government Printing Office, Washington.
- 後藤信夫. (1979). ハタネズミ. pp. 283-289. 実 験動物の飼育管理と手技(今道友則 監修) (高橋和明, 信永利馬 編), ソフトサイエン ス社、東京.
- Gromov, I.M., Polyakov I.Ya. (1992). Fauna of the USSR: mammals. Vol. 3, No. 8. Vole (Microtinae). Smithonian Institute Press, Washington, D.C.
- Jaarola, M., Martínková, N., Gündüz, I., Brunhoff, C., Zima, J., Nadachowski, A., Amori, G., Bulatova, N.S., Chondropoulos, B., Fraguedakis-Tsolis, S., González-Esteban, J., José López-Fuster, M., Kandaurov, A.S., Kefelioğlu, H., da Luz Mathias, M., Villate, I., Searle, J.B. (2004). Molecular phylogeny of the speciose vole genus *Microtus* (Arvicolinae,

Rodentia) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 33: 647-663.

- 川田伸一郎, 岩佐真宏, 福井 大, 新宅勇太, 天 野雅男, 下稲葉さやか, 樽 創, 姉崎智子, 横 畑泰志. (2018). 世界哺乳類標準和名目録. *哺* 乳類科学, 58: S1-S53.
- Kefelioğlu, H. (1995). The taxonomy of the genus *Microtus* (Mammalia: Rodentia) and its distribution in Turkey. *Turk J Zool*, 19: 35–63.
- Kefelioğlu, H., Kryštufek, B. (1999). The taxonomy of *Microtus socialis* group (Rodentia: Microtinae) in Turkey, with description of a new species. *J Nat Hist*, 33: 289–303.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 16: 111-120.
- Kryštufek, B., Vohralík, V. (2005). Mammals of Turkey and Cyprus: Rodentia I: Sciuridae, Dipodidae, Gliridae, Arvilocinae. Zgodovinsko društvo za južno, Primorsko, Koper, Slovenia.
- Kryštufek, B., Bužan, E.V., Vohralík, V., Zareie, R., Özkan, B. (2009). Mitochondrial cytochrome b sequence yields new insight into the speciation of social voles in south-west Asia. *Biol J Linn Soc Lond*, 98: 121-128.
- Kryštufek, B., Vohralík, V., Zima, J., Koubínová, D., Buzan, E.V. (2010). A new subspecies of the Iranian vole, *Microtus irani* Thomas, 1921, from Turkey. *Zool Middle East*, 50: 11–20.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 33: 1870-1874.
- Lin, Y.H., Waddell, P.J., Penny, D. Pika and vole mitochondrial genomes increase support for both rodent monophyly and glires. Gene, 294: 119-129.
- Liu, S.Y., Sun, Z.Y., Liu, Y., Wang, H., Guo, P., Murphy, R.W. (2012). A new vole from Xizang, China and the molecular phylogeny of the genus *Neodon* (Cricetidae: Arvicolinae). *Zootaxa*, 3235: 1-22.
- Mallory, F.F., Dieterich, R.A. (1985). Laboratory management and pathology. pp. 647-384. *In*: Biology of new world Microtus. Special publication No. 8. (Tamarin, R.H. Ed.), The American Society of Mammalogist, Lawrence.
- Modi, W.S. (1987). Phylogenetic Analyses of chromosomal banding patterns among the Nearctic Arvicolidae (Mammalia: Rodentia). *Syst Biol*, 36: 109-136.
- Musser, G.G., Carleton, D.M. (1993). Superfamily Muroidea. pp. 894-1531. *In*: Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference. 3rd ed. Vol. 2. (Wilson, D.E., Reeder, D.M. Eds.), The Johns Hopkins University Press, Baltimore.

- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4: 406-425.
- Şekeroğlu, A., Kefelioğlu, H., Şekeroğlu, V. (2011). Cytogenetic characteristics of *Microtus dogramacii* (Mammalia: Rodentia) around Amasya, Turkey. *Turk J Zool*, 35: 593–598.
- Steppan, S.J., Schenk, J.J. (2017). Muroid rodent phylogenetics: 900-species tree reveals increasing diversification rates. *PLoS ONE*, 12: E0183070.
- Triant, D.A., Dewoody, J.A. (2006). Accelerated molecular evolution in *Microtus* (Rodentia) as assessed via complete mitochondrial genome sequences. *Genetica*, 128: 95-108.
- Widayati, D.T., Mekada, K., Oda, S., Zholnerovskaya, E., Zakiyan, S.M., Fukuta, K. (2003). Reproductive features of the Russian vole in laboratory breeding. *Exp Anim*, 52: 329-334.
- Wolff, J.O. (1985). Behavior. pp. 340-372. *In*: Biology of new world Microtus. Special publication No. 8. (Tamarin, R.H. Ed.), The American Society of Mammalogist, Lawrence.
- Yavuz, M., Öz, M., Albayrak, I. (2009) Two new locality records extend the distribution of *Microtus anatolicus* Kryštufek and Kefelioğlu, 2002 (Mammalia: Rodentia) into Antalya Province in Turkey. *North-West J Zool*, 5: 364– 369.