

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05346

研究課題名(和文)モリアオガエル泡巣(卵塊)の精密解析：泡立ち機能成分の同定・最適化

研究課題名(英文)Precise analysis of foam nests of the Japanese forest green tree frog, *Rhacophorus arboreus*

研究代表者

茂里 康 (Shigeri, Yasushi)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90357187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、モリアオガエルが産卵時に形成する泡巣の特異的な性質・謎に注目した。そこで質量分析法・次世代シーケンサー等の解析手法を駆使したところ、泡巣中に少なくとも22種類の新規タンパク質が存在し、それらのアミノ酸・遺伝子配列の解読に成功した。相同性検索の結果、22種類のタンパク質は、「受精・抗ストレス・抗炎症関連」、「抗菌・抗ウイルス関連」、「保湿・潤滑・細胞保護・構造体維持関連」に類似・分類できる事が判明した。また還元剤を用いた実験から、泡巣の形成にはジスルフィド結合が重要な働きを担っている事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モリアオガエルは日本固有の両生類であり、岩手県八幡平市「大揚沼モリアオガエル及び繁殖地」に代表されるように、地域によっては国指定の天然記念物である。本研究課題で同定した22種類のタンパク質等から、保湿効果や美白作用効果を持つ生体材料が見つければ、日本社会に対するインパクトは大きい。また化粧品以外でも、石油系ゼロの界面活性剤などサステナブルな素材が求められている。例えば、自然に優しいバイオサーファクタントは、工業用の洗剤、農業用の抗菌剤、バイオレメディエーション等への使用が期待できる。またペプチド・タンパク質系のバイオサーファクタントは遺伝子工学技術を用いれば、大量生産も夢では無い。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we focused on the unique properties and mysteries of the foam nests formed by the Japanese forest green tree frog, *Rhacophorus arboreus*. Using mass spectrometry, next-generation sequencing, and other analytical methods, we could identify at least 22 novel proteins in the foam nests and successfully reveal their amino acids and gene sequences. The homology search revealed that the 22 proteins could be classified into three groups, as follows. (i) fertilization, anti-stress, and anti-inflammation, (ii) anti-bacterial, and anti-viral, (iii) moisturizing, lubrication, cell protection and structure maintenance. In addition, experiments using reducing agents revealed that disulfide bonds played an important role in the formation of foam nests.

研究分野：生化学、分析化学

キーワード：モリアオガエル 泡巣 タンパク質 ジスルフィド結合 酸化 還元

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カエルは、陸上・水中の異なる生活環境を行き来する事から、他の生物の攻撃に曝され易い。その様な環境にも関わらず逞しく生き続けているため、特殊な能力を保持していると考えられて来た。そこで研究代表者は2015年に、当時両生類で唯一ゲノム解析が終了していたネッタイツメガエル皮膚を用い、質量分析法とゲノム解析データとのマッチングを実施し、12種類の新規分泌ペプチド(Pxt-1~12)の単離に成功した(FEBS J., 282, 102-113, 2015)。これらの内3種類のペプチド(Pxt-2, -5, -12)は、両親媒性アルファヘリックス形成ペプチドであった。特にPxt-5とreverse Pxt-5(Pxt-5の逆配列)は、最も強い表面張力低下能、いわゆる泡形成能を示し、高濃度ではミセル構造を呈した。生物学的性質として、Pxt-5は強い溶血活性を、reverse Pxt-5はヒト培養皮膚細胞 HaCaT に対し、炎症マーカー(IL-8)及びストレスマーカー(HMOX-1)の強い発現誘導作用を示した。またPxt-5は精巣に、Pxt-12は筋肉にも発現していた(J. Biochem., 159, 619-629, 2016, 特許第6338899号)。またナノディスクはHDL粒子を人工的に再構築したディスク状の形態を持つナノ粒子であり、DDSのキャリアとして利用する事も試みられている。さらにPxt-5ペプチドは、ナノディスクとして機能する事を発見した(J. Oleo Sci., 67, 1035-1041, 2018, 特許第6528060号)。現在詳細な構造解析を実施し、作用機構の追求を継続的に実施している。また関連研究分野として、クマパチ(*Xylocopa appendiculata*)や日本最大級のアリのアギトアリ(*Odontomachus monticola*)の毒腺から新規ペプチドを単離し、その生理活性を解明した(J. Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 23, 29, 2017, Toxins, 11, E50, 2019)。一方その後、カエル由来の泡に強い興味を抱き、カエルの泡と言えばまず思いつく、日本の梅雨の風物詩の一つであるモリアオガエル泡巣の研究に着手した。

2. 研究の目的

日本固有種であるモリアオガエルは、アオガエル属としては世界の北限に生息し、各都道府県で準絶滅・絶滅危惧種に指定されている。モリアオガエルは非繁殖期には主に森林(樹上)に生息するが、繁殖期には生息地付近の湖沼に集まる。モリアオガエルの際立った特徴は、その産卵形態である。メスは、水面にせり出した木の枝に卵塊(泡巣)を生みつける。メスの輸卵管から分泌された分泌液を泡立てて作る泡巣にメスは産卵し、抱接しているオスはその卵塊に対して同時に精子を注入し受精が完了する。泡巣の中には数百個の卵が詰まり、日時の経過と共に泡巣表面が乾燥し、シート状の殻に変化する。殻のおかげで泡巣の内部は一定温度・一定湿度の泡状に保たれ、約一週間後に孵化する。孵化したオタマジャクシは、泡巣を餌として泡巣中で成熟する。泡巣の謎は、その泡状形体を一ヶ月もの長期間保持する事である。つまり泡巣は、シェルター・孵卵器・保育器・ゆりかご・母乳でもある。その後オタマジャクシの分解液により泡巣は崩壊し、オタマジャクシは水面に落下し、水中生活後成熟し、カエルとして森に戻る。

研究代表者らはモリアオガエルが産卵時に形成する泡巣(滋賀県大津市比叡平で採集)の特異的な性質・謎に注目した。(i)泡巣の主要構成成分は何なのか?(ii)泡巣に微生物等の感染・侵入を防ぐ、特殊能力が備わっているのか?(iii)なぜ長期間、泡巣として泡状形体を保持しているのか?(iv)泡巣の保湿・恒温・酸素供給を維持している機能の源泉は?そこで生化学的手法・質量分析法・次世代シーケンサー等の解析手法を駆使する事にした。

3 . 研究の方法

生化学的手法(精製・アミノ酸分析・エドマン分解法)・質量分析法(ESI-MS/MS, MALDI-MS)・次世代シーケンサー(RNAseq, RT-PCR)の解析手法を用いた。

4 . 研究成果

生化学的手法・質量分析法・次世代シーケンサー等の解析手法を駆使したところ、泡巣中に少なくとも 22 種類の新規タンパク質が存在し、それらのアミノ酸・遺伝子配列の解読に成功した(論文リスト 1 及び新聞発表 1)。相同性検索の結果、22 種類のタンパク質は、「受精・抗ストレス・抗炎症関連」(活性酸素分解酵素・色素タンパク質・プロテアーゼインヒビター等)、「抗菌・抗ウイルス関連」(抗菌タンパク質・RNA 分解酵素等)、「保湿・潤滑・細胞保護・構造体維持関連」(卵黄膜外層膜タンパク質・ムチン・糖タンパク質・糖タンパク質結合蛋白質・ケラチン結合蛋白質等)に類似・分類できる事が判明した。また還元剤を用いた実験から、泡巣の形成にはジスルフィド結合(R-S-S-R' 結合)が重要な働きを担っている事を明らかにした。またモリアオガエル泡巣を産生する輸卵管に発現している遺伝子を解析する際に副次的に、まだ未解明であったミトコンドリア DNA の配列決定も行い報告した(論文リスト 2)。

論文リスト

(1)Shigeri, Y., Nakata, M., Kubota, H., Tomari, N., Yamamoto, Y., Uegaki, K., Haramoto, Y., Bumb, C., Tanaka, Y., Kinumi, T., and Inagaki, H. (2021) Identification of novel proteins in foam nests of the Japanese forest green tree frog, *Rhacophorus arboreus*. *Zool. Sci.*, 38, 8-19

(2)Inagaki, H., Haramoto, Y., Kubota, H., and Shigeri, Y. (2020) Complete mitochondrial genome sequence of Japanese forest green tree frog (*Rhacophorus arboreus*). *Mitochondrial DNA Part B*, 5, 3365-3366

新聞発表

(1)モリアオガエルの泡巣、新物質の宝庫 タンパク質 22 種発見(2021 年 2 月 3 日読売新聞夕刊)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tani, N., Kazuma, K., Ohtsuka, Y., Shigeri, Y., Masuko, K., Konno, K., and Inagaki, H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Mass spectrometry analysis and biological characterization of the venom and venom sac components of the predatory ant <i>Odontomachus monticola</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 E50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins11010050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Akizuki, K., Kinumi, T., Ono, A., Senga, Y., Osawa, J., Shigeri, Y., Ishida, A., Kameshita, I., and Sueyoshi, N.	4. 巻 668
2. 論文標題 Autoactivation of C-terminally truncated Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK)I delta via CaMK kinase-independent autophosphorylation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arch. Biochem. Biophys	6. 最初と最後の頁 29-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2019.05.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ikeda, Y., Taira, T., Sakai, K., Sakai, H., Shigeri, Y., Imura, T.	4. 巻 67
2. 論文標題 Lipid nanodisc formation using Pxt-5 peptide isolated from amphibian (<i>Xenopus tropicalis</i>) skin, and its altered form, modify-Pxt-5.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Oleo Sci.	6. 最初と最後の頁 1035-1041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5650/jos.ess18051.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Inagaki, H., Haramoto, Y., Kubota, H., and Shigeri, Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 Complete mitochondrial genome sequence of Japanese forest green tree frog (<i>Rhacophorus arboreus</i>).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mitochondrial DNA Part B	6. 最初と最後の頁 3365-3366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/23802359.2020.1820396.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shigeri, Y., Nakata, M., Kubota, H., Tomari, N., Yamamoto, Y., Uegaki, K., Haramoto, Y., Bumb, C., Tanaka, Y., Kinumi, T., and Inagaki, H.	4. 巻 38
2. 論文標題 Identification of novel proteins in foam nests of the Japanese forest green tree frog, <i>Rhacophorus arboreus</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Zool Sci.	6. 最初と最後の頁 8-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs200113.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 谷直紀、数馬恒平、大塚幸雄、茂里康、増子恵一、紺野勝弘、稲垣英利
2. 発表標題 アリ毒液成分の総合的理解を目指した毒液成分の網羅的解析。毒生物が産生する『トキシン』の織りなす多元的世界
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤仁、仲谷美里、植田早紀、櫻村明理、乾優依子、秋月一駿、茂里康、石田敦彦、亀下勇、末吉紀行
2. 発表標題 Hierarchical phosphorylationを介したプロテインホスファターゼ1H (PPM1H)の活性制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤仁、仲谷美里、植田早紀、櫻村明理、乾優依子、秋月一駿、茂里康、石田敦彦、亀下勇、末吉紀行
2. 発表標題 Mg ²⁺ /Mn ²⁺ 依存性プロテインホスファターゼ1H (PPM1H)のリン酸化による機能制御。
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋月一駿、絹見朋也、小野彩夏、千賀由佳子、大澤仁、茂里康、石田敦彦、亀下勇、末吉紀行
2. 発表標題 C末欠損型Ca ²⁺ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK) I のCaMK キナーゼ非依存的な自己活性化メカニズム。
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷直紀、数馬恒平、大塚幸雄、茂里康、増子恵一、紺野勝弘、稲垣英利
2. 発表標題 アギトアリ毒液成分のペプチドーム及びプロテオーム解析
3. 学会等名 第三回京都市体質量分析研究会シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 井村知弘、茂里康、遠藤明、平敏彰。界面活性ペプチドから短時間で形成する巨大ナノディスク。	発明者 井村知弘、茂里康、 遠藤明、平敏彰	権利者 産業技術総合研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、6528060	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 両生類ネッタイツメガエル皮膚由来機能性ペプチド	発明者 茂里康、萩原義久、 渡部邦彦、井村知 弘、原本悦和、伊藤	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6338899	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上垣 浩一 (Uegaki Koichi) (00356544)	近畿大学・農学部・教授 (34419)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	絹見 朋也 (Kinumi Tomoya) (90293125)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・計量標準総合センター・主任研究員 (82626)	
研究分担者	稲垣 英利 (Inagaki Hidetoshi) (90344126)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関