

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14795

研究課題名（和文）温泉ガエルの進化生態学

研究課題名（英文）Ecology and evolution of hot-spring frogs

研究代表者

小巻 翔平（Komaki, Shohei）

岩手医科大学・いわて東北メディカル・メガバンク機構・特命助教

研究者番号：90789629

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：温泉に生息する珍しい特徴をもつカジガエルに注目し、行動観察と遺伝子発現解析により過酷な高温環境での生息を可能にする背景を追究した。行動観察の結果、幼生および成体ともに低水温を好む傾向が示唆された。また遺伝子発現解析からは、高水温下では転写や翻訳の抑制、タンパク質分解といった抑制的な反応に關与する遺伝子の発現が変動していた。これらの結果から、一時的には高水温に耐えうるが、温度選択行動により長期的な高温ストレスを回避することで温泉での生息を実現している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温泉に生息するリュウキュウカジガエルの幼生は最高で46℃の水域で発見されており、これは報告されている世界中のどの両生類よりも高温である。源泉付近は70℃を超える熱湯であり、極限的な生息環境といえる。このような環境で集団が維持できる要因を知ることが生物の環境適応の可能性を理解することにつながる進化生態学的意義をもつ。本研究で得られた知見はその一助となるだろう。また、両生類における温度ストレスに注目した遺伝子発現解析は研究例が少なく、本研究のような高温ストレスを扱った研究は他に例がない。本研究で得られたデータや知見は両生類と熱ストレスの関係を理解するための基盤となる。

研究成果の概要（英文）：In this research, I focused on Buergeria frogs, a genus with an extraordinary characteristic of inhabiting hot springs, and studied underlying mechanisms that enable them to live in harsh, high-temperature environments through observational and transcriptome studies. Behavioral observations revealed that both tadpoles and adults prefer lower water temperatures for inhabiting and breeding. Gene expression analyses showed that genes involved in suppressive functions, such as global transcription and translation suppression and protein degradation, were differentially expressed in response to heat stress. These results suggest that while they can temporarily tolerate high thermal stress, they also can avoid long-term stress by temperature-selective behavior, making it possible to survive in hot spring environments.

研究分野：生態学

キーワード：両生類 熱ストレス 遺伝子発現 繁殖行動

### 1. 研究開始当初の背景

屋久島の南方に口之島という火山島がある。口之島はトカラ列島に属し、琉球列島の最北の島とみなされる。口之島の南岸付近にはセランマ温泉と呼ばれる天然温泉があり(図1)、林の中で熱湯が湧いている。口之島はリュウキュウカジガエルの分布最北端でもあり、トカラ列島に自然分布する唯一の両生類である(図2)。本種はセランマ温泉周辺にも生息しており、オタマジャクシ(幼生)は40℃を超える水域にも見られる。幼生が観察された水域の最高温度は46℃にも達し、報告されている世界中のどの両生類よりも高温である。



図1. セランマ温泉



図2. 抱接中のリュウキュウカジガエル

### 2. 研究の目的

本研究課題では、リュウキュウカジガエルが過酷な高温環境に生息するという珍しい現象の理解を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 温度選択

温泉に生息する本種は高温を好んでいるのかを調査するため、野外および室内での観察を行った。まず幼生の温泉中での分布を明らかにするため、温泉の複数の地点で25cm四方の調査区を設定し、水温と幼生の密度を測定した(図3)。得られた水温と密度の関係を線形回帰分析により評価した。

さらに幼生の分布は産卵場所にも影響を受けることから、成体オスの出現場所の水温や成体メスの繁殖水温の選択も調査した。繁殖期の夜間に温泉内あるいはその周辺20cm以内に存在する成体オスを探索し、水温を測定した。一方で野外での産卵行動の観察は困難であったため、温泉周辺で成体メスおよびオスを採集し、室内での行動観察に用いた。行動観察では小型の蚊帳の中に25℃、30℃、35℃に水温を維持した水場を用意し、昼夜赤外線カメラで行動を観察、毎朝産卵の有無を確認した(図4)。



図3. 幼生の密度調査



図4. 産卵行動の観察

#### (2) 捕食者

幼生が捕食者の生存できない高水温環境に生息することで、被食リスクが低下している可能性がある。そこで温泉中での捕食者となりうる生物の存在および分布を、(1) 幼生の温度選択調査とあわせて実施した。

#### (3) 遺伝子発現解析

温泉での生息を可能にする遺伝的基盤を明らかにするため、RNA-seq および遺伝子発現解析に

より特徴的な遺伝子を探索した。解析にはセランマ温泉で採集したリュウキュウカジカガエル (*Buergeria japonica*)、岩手県矢巾町で採集したカジカガエル (*Buergeria buergeri*) を用いた。幼生を室温と高温に水温を維持した2群に分け、両者の遺伝子発現を比較した。またすでに取得済みの、台湾の花蓮で採集した *Buergeria otai* (当時はリュウキュウカジカガエルに属する) より得られた RNA-seq データも解析に用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 温度選択

幼生の密度調査は54地点で実施した。先行研究と同じく幼生は40℃以上の水域でも観察されたが、個体密度は水温が低いほど高くなる傾向が見られた(図5)。成体オスは温泉中あるいはその周辺に見られたが、37℃を超える水域やその周辺を避けるように分布していた(図6)。

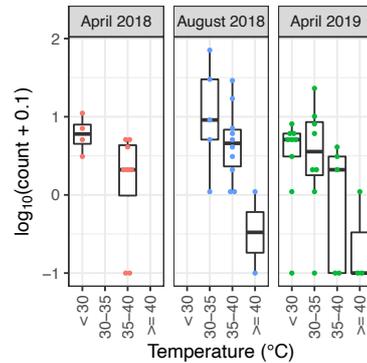


図5. 水温ごとの幼生の密度

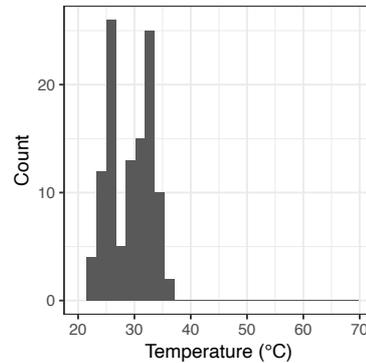


図6. 成体オスの水温ごとの頻度

また成体メスは25℃の水場での産卵回数が最も多く(5回)、ついで30℃で多かった(2回)。35℃では産卵が行われなかった。また夜間は25℃の水場により多くの個体が集まっていた(図7)。セランマ温泉では狭い範囲内でも源泉からの距離や流路によって水温が異なる。そのような環境下において、本種の幼生や成体は温度の高い致死的な水域を避けることで、温泉での生息を実現していると考えられる。

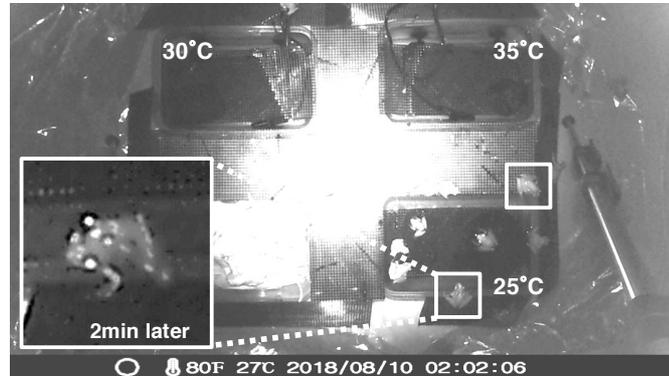


図7. 産卵行動の様子

##### (2) 捕食者

温泉内では捕食者であるヤゴが見つかった。30℃以上の水域には分布していなかったが、観察個体数が少なかったため解析は行っていない。今後追加調査を実現できれば、捕食者と幼生の分布について議論が可能になる。

##### (3) 遺伝子発現解析

リュウキュウカジカガエルの近縁種 (*Buergeria otai*) より得られたデータを先行して解析した。発現差解析およびエンリッチメント解析の結果、高温下では転写・翻訳抑制やタンパク質分解に関連する遺伝子の発現が顕著に変動していることが示唆された(図8)。この解析結果と上記の行動観察の結果をあわせると、本種は高水温を避ける行動をとり、一方で高温に晒された場合は一過性の抑制的な応答により耐え忍んでいると考えられる。長期的な高温ストレス下で幼生が生存し正常に発生できるのか、どのような遺伝子発現変動を示すのかを明らかにできれば、温泉での生息を実現する背景について理解が進むと期待される。

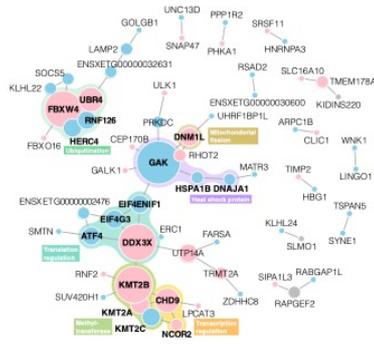


図8. 発現変動が見られた遺伝子に基づく Protein-protein interaction network

リュウキュウカジカガエルやカジカガエルの幼生から得られた RNA-seq データの解析は継続中である。今後すでに得られている *Buergeria otai* も含めた種間比較を実施する。

さらに、複数の種で温度耐性の実験を行ったところ、リュウキュウカジカガエル以外でも高い温度耐性が観察された。実際に水田や浅い水たまりに産卵する種では幼生は高温に晒されるはずである。そのため今回見られた遺伝子発現変化は広くカエル類で見られる可能性が高い。高温ストレス下での遺伝子発現変化はいまだ報告例がないため、本研究で得られた結果は今後カエルと温度ストレスの関係を理解するうえでの有用な知見となりうる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Komaki Shohei	4. 巻 accepted
2. 論文標題 Widespread misperception about a major East Asian biogeographic boundary exposed through bibliographic survey and biogeographic meta-analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biogeography	6. 最初と最後の頁 accepted
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Komaki Shohei, Sutoh Yoichi, Kobayashi Kensuke, Saito Shigeru, Saito Claire T., Igawa Takeshi, Lau Quintin	4. 巻 10
2. 論文標題 Hot spring frogs ( <i>Buergeria japonica</i> ) prefer cooler water to hot water	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 9466 ~ 9473
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ece3.6637	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 Komaki Shohei, Sutoh Yoichi, Kobayashi Kensuke, Saito Shigeru, Saito Claire T., Igawa Takeshi, Lau Quintin	4. 巻 10
2. 論文標題 Hot spring frogs ( <i>Buergeria japonica</i> ) prefer cooler water to hot water	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 9466 ~ 9473
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ece3.6637	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 Wang Ying-Han, Hsiao Yu-Wei, Lee Ko-Huan, Tseng Hui-Yun, Lin Yen-Po, Komaki Shohei, Lin Si-Min	4. 巻 111
2. 論文標題 Renaming a new <i>Buergeria</i> species from Taiwan - correction of a nomenclatural act not available to ICZN	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Conservation Quarterly	6. 最初と最後の頁 4-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.29738/NCQ	査読の有無 無
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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shohei Komaki
2. 発表標題 Ecology and evolution of hot spring frogs
3. 学会等名 The 9th World Congress of Herpetology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小巻翔平
2. 発表標題 温泉ガエルの生態学
3. 学会等名 コホート・生体試料支援プラットフォーム 若手支援研究成果発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小巻翔平
2. 発表標題 琉球列島の生物地理区境界
3. 学会等名 第64回日本生態学会東北地区会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小巻翔平
2. 発表標題 温泉ガエルの生態学
3. 学会等名 第4回ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
その他の国・地域	National Taiwan Normal University	National Museum of Natural Science	Endemic Species Research Institute	
オーストラリア	Macquarie University			