

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2018～2022

課題番号：18KK0205

研究課題名（和文）ヒキガエル利用からホタル利用へ：毒源を変化させたヘビ類の進化過程の探求

研究課題名（英文）From toads to fireflies: Exploring the evolutionary transitional process of the prey-toxin resource in snakes

研究代表者

森 哲 (Mori, Akira)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：80271005

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000 円

研究成果の概要（和文）：中国に分布するミゾクビヤマカガシ種群の分子系統解析の結果、これらは大きく7つのクレードに分けられ、このうち1種を新種記載した。これらの顎腺毒成分から毒源動物を推定したところ、ほとんどをヒキガエルに依存する種、ほとんどホタルに依存する種、および、両者に依存する種が存在することが明らかになった。しかし、捕食に関わる頭骨形態は必ずしも主要な毒源の摂食に適応した様相をしておらず、毒餌利用と捕食形態は呼応していないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

毒を持つ餌を食べて、その毒を自分の防御に再利用することが知られている動物は多くの分類群で知られている。ヤマカガシ属のヘビ類は顎腺という特殊な器官に餌から取り入れた毒を蓄積するが、進化の過程で毒源をヒキガエルからホタルへと大きく変化させた。このように餌源を分類学的にも生態学的にも大きくかけ離れた動物群に移行させた例は他の生物では知られていない。本研究は、そのような突飛な移行がどのような過程を経て進んできたかを理解する手がかりを提供する。

研究成果の概要（英文）：Our molecular phylogenetic analysis revealed the presence of seven clades in the *Rhabdophis nuchalis* species group, and we described a new species in them. Based on the chemical characteristics of the nuchal gland fluids of these species, we found that some species mostly depend on toads as toxin source, others mostly depend on fireflies, and the others depend on both toads and fireflies. However, trophic skull morphology of them does not necessarily show features adapted to swallow the animals of the main toxin sources, indicating that dependency of toxin source on specific prey animals has not necessarily evolved along with the adaptive trophic morphology for them.

研究分野：動物行動学

キーワード：防御行動 ホタル毒 顎腺 進化 爬虫類

### 1. 研究開始当初の背景

頸腺はアジア産のヤマカガシ属ヘビ類のみが持つ、頸部皮下にある特殊な器官で、防御のための毒が蓄積されている (Nakamura, 1935; Smith, 1938; Mori et al., 2012)。この毒成分はヘビ自身が生合成するのではなく、ヘビの餌が持っている毒に由来する。日本に分布するヤマカガシ (*Rhabdophis tigrinus*) では、ヒキガエルを食べて、その皮膚毒の主成分であるブファジエノライド類 (BD) を頸腺に蓄積している (Hutchingson et al., 2007)。一方、中国に分布するミミズ食のヤマカガシ類 (ミゾクビヤマカガシ種群) では、頸腺毒はホタルの幼虫が持つ毒に由来することが申請者らの研究で明らかになってきた。分子系統学的分析に基づくと、前者がより祖先的と推察され、毒源とする餌をヒキガエルからホタルへ移行する進化が起こったと考えられる (Takeuchi et al., 2018)。すなわち、毒源が、両生類から昆虫という分類学的にも生態学的にも遠くかけ離れた動物群の間で移行する進化が起こったと考えられる。BD を毒として保有する動物は、ヤマカガシ類を除くと、現在知られている限りヒキガエルとホタルのみである。ホタル毒の利用に移行した祖先種は、ヒキガエル以外では唯一無二の BD 源であるホタルをどうやって毒源として認知し、利用するようになったのか。より広く言えば、捕食者による餌毒の二次的利用がどのようなメカニズムや要因で多様化するのかはまったくの謎であった。

### 2. 研究の目的

ヒキガエルとホタルが持つ BD 類の間には総じて分子量に違いがあり、前者は比較的 low molecular weight (LMW) の BD を、後者は高分子の BD を持つことが明らかになっていた。そこで、この違いに着目したところ、主食がミミズと考えられるヤマカガシ類 5 種のあいだで、毒源としてのヒキガエルやホタルへの依存度が異なる可能性が示唆された。さらに、広域分布種のミゾクビヤマカガシ (*R. nuchalis*) においては、種内における依存度の変異が存在する可能性もあることがわかった。すなわち、これらの近縁種や種内変異は、毒源をヒキガエルからホタルへ移行させた微小進化の様々な過程を反映させた状態を見せていることが考えられた (図 1)。

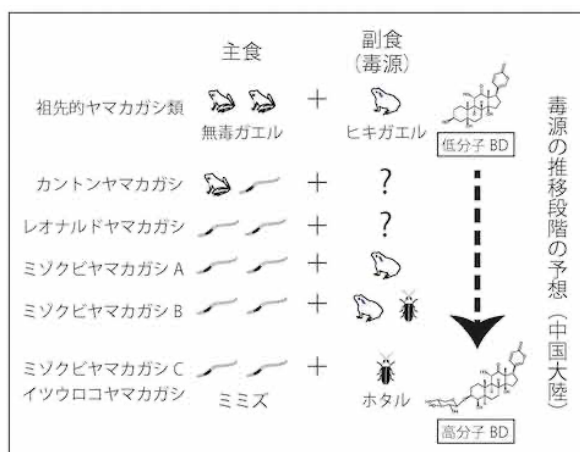


図 1：食性セットと毒餌利用の推移の想定図

本研究では、近縁種間および個体群間比較の手法を用いることにより、ヒキガエルからホタルへの毒源の移行がどのような行動的、形態的形質の変化を伴いながら進行していったかを解明し、その橋渡しとなったと考えられる化学的要因を探求することを目的とした。

### 3. 研究の方法

毒源の推移過程を推定し、それに関わる至近的要因や関連する行動学的、形態学的形質の微小進化過程を明らかにするために、中国に生息するミミズ食のヤマカガシ類 3 種、すなわち、ミゾクビヤマカガシ、イツウロコヤマカガシ (*R. pentasupralabialis*)、および、レオナルドヤマカガシ (*R. leonardi*) を主な対象として以下の 5 つの項目を調べた。また、比較対象として、カエル類を主食とし、ヒキガエルから毒を得ている日本産のヤマカガシも適宜使用した。

#### (1) 分子系統関係の解明

中国に広域分布するミゾクビヤマカガシ種群の採集地点数を増やすとともに、解析に用いる遺伝子座を増やすことでより解像度の高い分子系統樹を作成し、ミゾクビヤマカガシを含む中国産種の個体群間の系統関係を明らかにする。

#### (2) 食性と嗜好性の解明

野外で採集したヘビの胃内容物を強制嘔吐法で調べ食性を明らかにするとともに、無毒ガエル、ヒキガエル、ミミズ、ホタル幼虫に対する嗜好性の度合いを飼育下での行動実験により評価

する。また、これらに対する捕食行動を飼育下で観察し、ミミズやホタル幼虫摂餌への適応の度合いを比較する。

### (3) 毒成分の分析

未分析の種の頸腺毒成分を NMR（核磁気共鳴装置）を用いて分析する。特に広域分布するミゾクビヤマカガシ種群の毒成分の地理的変異のパターンを解明する。また、各地域で採集した潜在的な毒源となりうるホタル類の毒分析も実施する。

### (4) 餌動物に共通する化学成分の特定

ヘビ類は一般に嗅覚によって食べるべき餌を認知する。このため、餌資源を変える際の橋渡しとなった至近要因として、共通の化学物質の存在が考えられる。そこで、餌として利用されているミミズ、ヒキガエル、ホタルの体表成分を採取し、液体クロマトグラフおよびガスクロマトグラフ質量分析計を用いて共通する化学成分の存在を調べる。また、物質が特定できた場合は、行動実験によりヘビによる選好性を調べる。

### (5) 頭骨要素の比較

ヘビ類は摂餌の際に使える四肢がなく、また、相対的に大きな餌を丸呑みにするため、餌とする動物をうまく捕食できるように、頭骨の形態や歯の形状や数が餌のタイプに合わせて適応している。カエルを食べるヘビ類とミミズを食べるヘビ類とでは、これらの形質が大きく異なることが知られているので、各種の頭骨要素を比較し、餌の依存度に並行した捕食形態の推移が存在するかどうかを調べる。

## 4. 研究成果

研究期間は 2019 年度から 2021 年度であったが、2019 年度末から世界的規模で生じた COVID-19 感染拡大のため海外渡航が制限され、中国での調査がほとんど実施できない状況となった。そのため、研究期間を 2022 年度まで延長したものの、計画の遂行には大きく影響し、計画内容の一部変更も余儀なくされ、最終的に得られた成果は当初の見込みを下回るものとなった。しかしながら、以下に記すような新たな発見もあり、今後新たに探究すべき課題も見出された。

### (1) 分子系統関係の解明

これまでイツウロコヤマカガシとされていた集団は 3 つのクレードに分けられることが明らかになり、このうち四川省のシンゴウを中心に分布するクレードはチフンヤマカガシ (*R. chiwen*) として新種記載した。また、レオナルドヤマカガシとミゾクビヤマカガシもそれぞれ 2 つの明確なクレードに分けられることが明らかになった。また、系統樹に基づくと、これらの 4 つの種の中ではミゾクビヤマカガシが最も初期に分化したことが推定されたが、残りの 3 種の間の分岐順序については十分な信頼度で推定することはできなかった。

### (2) 食性と嗜好性の解明

中国での野外調査がほとんど実施できなかったため、強制嘔吐法による食性データの集積は少数に留まった。嗜好性実験においては、様々なホタル類に対するチフンヤマカガシの反応を比較した。その結果、本種は BD を持つマドボタル亜科の匂い物質のみを好み、BR を持たないホタル亜科の匂いには反応しないことがわかった。また、チフンヤマカガシを用いてミミズとホタル幼虫の捕食行動を比較したところ、相対的に同じ大きさのミミズに比べてホタル幼虫の捕食には時間がかかり（図 2）、本種はホタル幼虫への捕食にはあまり適応していないことが推察された。

### (3) 毒成分の分析

3 地点から採集したレオナルドヤマカガシの頸腺毒に含まれる BD の特性を調べたところ、いずれにおいても、ヒキガエルとホタルの両方から毒を得ていること

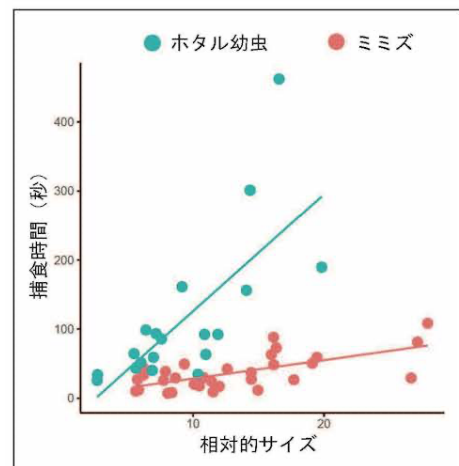


図 2：チフンヤマカガシにおけるホタル幼虫とミミズの捕食時間

が推定された。2地点から採集したイツウロコヤマカガシにおいては、ヒキガエルとホタルの両方から毒を得ている個体が若干いたものの、ホタルのみから毒を得ている個体が2/3を占めた。チフンヤマカガシではほとんどの個体がホタル毒のみを持っていたが、BDを全く持っていない個体も少数検出された。一方、ミゾクビヤマカガシは5地点から採集され、ホタルの毒のみ、またはホタルとヒキガエルの両方の毒を持つ個体も少数いたものの、大多数はヒキガエル毒のみを持っていた。

#### (4) 餌動物に共通する化学成分の特定

中国での実験が実施できなかったため、ヒキガエルとホタルに共通する化学成分の特定には至らなかった。しかしながら、日本産のヤマカガシを用いてヒキガエル認知の主要因となっている化学物質の特定を試みたところ、BDの前駆物質であるコレステロール類が最有力物質として検出された。

#### (5) 頭骨要素の比較

マイクロCTスキャンにより、チフンヤマカガシ、ミゾクビヤマカガシ、レオナルドヤマカガシ、およびヤマカガシの頭骨と歯列の形態を撮影し、比較した結果、レオナルドヤマカガシがカエル主食であるヤマカガシに最も類似していること、チフンヤマカガシがミミズ食に最も適応していると考えられる細長い頭骨と小さな歯を持つこと、ミゾクビヤマカガシはこれらの中間的形態を示すことが明らかになった(図3)。

#### (6) まとめと今後の展望

今回の結果から、これまで3種と見なされてきた中国産のミゾクビヤマカガシ種群は少なくとも7つのクレードからなることが明らかとなった。このうち1つはチフンヤマカガシとして新種記載したが、残りの6つのクレードに関しても今後さらなる分類学的再検討が必要である。

7つのクレードのうち、最も初期に分岐した種はミゾクビヤマカガシからなる2つのクレードである。毒分析の結果、本種は毒源をヒキガエルに大きく依存していることが推察され、これはヒキガエル依存からホタル依存に毒源を移行する過渡期の祖先種の形質を反映していると考えられることができる。しかしながら、頭骨および歯の形態は、ホタル毒への依存度がミゾクビヤマカガシよりも高いと推定されたレオナルドヤマカガシの方がカエル食に適応した様相を示しており、系統的位置、毒源への依存度、および、捕食関連形態の3つの形質は必ずしも予想通りの整合性を示していない。今後、分子系統関係をさらに解像度高く解析して信頼度を高めるとともに、採集地点数および個体数を増やすことによって毒成分および食性のデータを充実させ、さらには頭骨形態の詳細な分析を実施することにより、毒源の移行と捕食形態の進化がどの程度歩調を合わせて進化してきたのかを解明していく必要がある。

一方、ホタル毒への依存度が最も高かったのはチフンヤマカガシであり、その頭骨と歯の形態がカエル食のヤマカガシから最も異なっていたこととも整合する。しかしながら、捕食行動の比較結果からは、ホタル幼虫の捕食が効率的であるとは解釈できない。チフンヤマカガシは細長い体型のミミズを捕食するのに適応した形態と行動を進化させているものの、マドボタル幼虫のような特殊な形態をした獲物を呑み込むことには十分に適応していないのかもしれない(図4)。

今回の研究では、ヒキガエル毒利用からホタル毒利用への橋渡しとなった化学的要因については明らかにすることはできなかった。現在、この移行にはミミズ食が重要な仲介となったと推察している。すなわち、ヒキガエルからホタルへの毒源の移行は、「カエル主食でヒキガエル毒利用」→「ミミズ主食でヒキガエル毒利用」→「ミミズ主食でヒキガエル毒とホタル毒の両方を

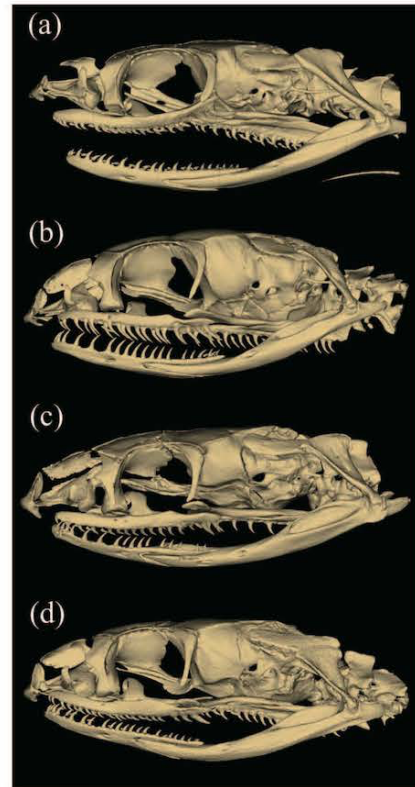


図3：ヤマカガシ属4種の頭骨の側面図  
(a) ヤマカガシ、(b) レオナルドヤマカガシ、  
(c) ミゾクビヤマカガシ、(d) チフンヤマカガシ



図4：マドボタル幼虫捕食に失敗するチフンヤマカガシ

利用」→「ミミズ主食でホタル毒利用」という過程を経て進化してきたというシナリオを考えている。今後は、ミミズ食への適応がホタル利用のきっかけになったという仮説をもとに、マドボタル幼虫とミミズとの生息微環境の類似性を検証するとともに、両者に共通の匂い物質の検出、および、ミミズとマドボタル幼虫の捕食に適応した頭骨や歯の形態のさらなる分析などを試みる予定である。

<引用文献>

- Hutchinson, D. A., A. Mori, A. H. Savitzky, G. M. Burghardt, X. Wu, J. Meinwald, and F. C. Schroeder. 2007. Dietary sequestration of defensive steroids in nuchal glands of the Asian snake *Rhabdophis tigrinus*. PNAS 104(7): 2265-2270.
- Mori, A., G. M. Burghardt, A. H. Savitzky, K. A. Roberts, D. A. Hutchinson, and R. C. Goris. 2012. Nuchal glands: A novel defensive system in snakes. Chemoecology 22:187-198.
- Nakamura, K. 1935. On a new integumental poison gland found in the nuchal region of a snake, *Natrix tigrina*. Mem. College Sci. Kyoto Imperial Univ. Ser. B. 10: 229-240, 1 pl.
- Smith, M. A. 1938. The nucho-dorsal glands of snakes. Proc. Zool. Soc. Lond. Ser. B. 100: 575-583.
- Takeuchi, H., A. H. Savitzky, L. Ding, A. de Silva, I. Das, T. T. Nguyen, T.-S. Tsai, T. Jono, G.-X. Zhu, D. Mahaulpatha, Y. Tang, and A. Mori. 2018. Evolution of nuchal glands, unusual defensive organs of Asian natricine snakes (Serpentes: Colubridae), inferred from a molecular phylogeny. Ecol. Evol. 8:10219-10232.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Zhu Guangxiang, Yang Shijun, Savitzky Alan H., Cheng Yuqi, Mori Akira, Ding Li, Rao Dingqi, Wang Qin	4. 巻 166
2. 論文標題 Cryptic diversity and phylogeography of the <i>Rhabdophis nuchalis</i> group (Squamata: Colubridae)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Phylogenetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 107325 ~ 107325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ympev.2021.107325	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
1. 著者名 Fukuda Masaya, Ujiie Rinako, Inoue Takato, Chen Qin, Cao Chengquan, Ding Li, Mori Naoki, Mori Akira	4. 巻 68
2. 論文標題 Do predators prefer toxic animals? A case of chemical discrimination by an Asian snake that sequesters firefly toxins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Zoology	6. 最初と最後の頁 627 ~ 634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cz/zoab102	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
1. 著者名 Piao, Y., Chen, Z., Wu, Y., Shi, S., Takeuchi, H., Jono, T., Fukuda, M., Mori, A., Tang, Y., Chen, Q., and Ding, L.	4. 巻 11
2. 論文標題 A New Species of the Genus <i>Rhabdophis</i> Fitzinger, 1843 (Squamata: Colubridae) in Southwestern Sichuan, China	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Asian Herpetological Research	6. 最初と最後の頁 95-107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.16373/j.cnki.ahr.190068	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
1. 著者名 Fukuda, M. and Mori, A.	4. 巻 40
2. 論文標題 Does an Asian natricine snake, <i>Rhabdophis tigrinus</i> , have chemical preference for a skin toxin of toads?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Herpetology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5358/hsj.40.1	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 Tatsuya Yoshida, Rinako Ujiie, Alan H. Savitzky, Teppei Jono, Takato Inoue, Naoko Yoshinaga, Shunsuke Aburaya, Wataru Aoki, Hirohiko Takeuchi, Li Ding, Qin Chen, Chengquan Cao, Tein-Shun Tsai, Anslém de Silva, Dharshani Mahaulpatha, Tao Thien Nguyen, Yezhong Tang, Naoki Mori, and Akira Mori	4. 巻 117
2. 論文標題 Dramatic dietary shift maintains sequestered toxins in chemically defended snakes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 5964-5969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1919065117/-/DCSupplementa	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20件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 福田将矢、井上貴斗、森直樹、森哲
2. 発表標題 ヤマカガシにおける「毒源生物」の化学認知に関する研究
3. 学会等名 第40回日本動物行動学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaya Fukuda, Qin Chen, Akira Mori
2. 発表標題 How predators recognize toxic animals as a toxin source: A case of chemical discrimination by an Asian snake that sequesters firefly toxins
3. 学会等名 International Conference on Herpetological Biodiversity and Conservation in Eurasian Countries (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田将矢、Jian-Song Shi, Alan H. Savitzky, Qin Chen, 森哲
2. 発表標題 毒源が変われば形態も変わる? -食性の異なるヤマカガシ属における頭部形態の変化
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田達哉、氏家里奈子、井上貴斗、城野哲平、福田将矢、森哲、森直樹
2. 発表標題 ヤマカガシ属ヘビの食性変化に伴う毒源のシフト
3. 学会等名 第62回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fukuda M., Mori A., and Chen Q.
2. 発表標題 Does an Asian natricine snake recognize fireflies that have cardiac steroidal toxins?
3. 学会等名 The 36th International Ethological Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki MORI and Akira MORI
2. 発表標題 Unexpected origins of defensive compounds in animals
3. 学会等名 The 10th Conference of Asia-Pacific Association of Chemical Ecologists (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukuda M., Mori A., and Chen Q.
2. 発表標題 Toads or fireflies? Which do Asian natricine snakes prefer as a source of steroidal toxins?
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 福田将矢・井上貴斗・Alan Savitsky・Piao Yige・城野哲平・Chen Qin・森直樹・森哲
2. 発表標題 中国産ヤマカガシ類の頸腺毒の由来および頭部の形態変化に関する考察
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 氏家 里奈子、竹内 寛彦、城野 哲平、チェン チン、ディン リー、タン イェチョン、ツァイ テインシュン、ツァオ チェンチャン、アラン サビツキー、油屋 駿介、青木 航、吉永 直子、森 哲、森 直樹
2. 発表標題 ヤマカガシ属ヘビ <i>Rhabdophis pentasupralabialis</i> が蓄積する毒性ステロイド bufadienolide の由来
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019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
研究分担者	森 直樹  (Mori Naoki)  (30293913)	京都大学・農学研究科・教授   (14301)	
研究分担者	城野 哲平  (Jono Teppei)  (70711951)	広島修道大学・人間環境学部・助教   (35404)	
研究分担者	竹内 寛彦  (Takeuchi Hirohiko)  (40726444)	日本大学・生物資源科学部・助教   (32665)	

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	江頭 幸士郎  (Eto Koshiro)  (10738826)	北九州市立自然史・歴史博物館・自然史課・学芸員    (87101)	

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			
中国	成都生物研究所	梁山師範大学		
米国	ユタ州立大学			