

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06797

研究課題名(和文)両生類の時空間的なニッチの多様化に連動した温度感覚の進化機構

研究課題名(英文) Evolutionary mechanisms for thermal perception associated with the spatio-temporal niche diversification in amphibians

研究代表者

齋藤 茂 (Saito, Shigeru)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・助教

研究者番号：50422069

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)：日本在来の無尾両生類を対象にした比較解析を行い、繁殖期や産卵する水環境が異なる種の間で幼生が経験する温度が異なることを明らかにした。次に、高温に対する耐性および忌避行動を比較し、涼しい環境で生育する種に比べ、高温を経験する機会が多い種では幼生の高温耐性および忌避温度が高い傾向があることを示した。更に、感覚神経に発現する高温センサー分子の機能解析を行い、忌避温度が低い種ほど高温に対する活性が強いことを発見した。これらの結果から異なる温度環境に適応する進化過程において高温センサー分子の温度応答特性の変化が個体レベルの温度感覚やそれに関連する忌避行動の変化に寄与してきたことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

身近に生息する日本の両生類種の間で繁殖期や生息環境の多様化に伴い高温耐性と忌避行動が協調的に変化してきたこと、更に、温度受容のセンサー分子が温度応答行動の進化に貢献してきたことを明らかにした点に学術的な意義がある。

類似した生態的、生理的な特性を持つ種間でも微細な生息環境の棲み分けにより高温に対する適応能が異なることから、地球温暖化によって受ける影響が異なると考えられる。一方で、同じ地域でも多様な環境が維持されていれば、温度条件の異なる生息地が形成されることを意味しており、地球温暖化対策として環境の多様性を維持することの重要性が改めて示された点に社会的な意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Comparative analyses were performed using tadpoles of anuran species endemic to Japan. The range of temperatures which tadpoles experienced in their habitats differed among species according to the breeding seasons and spawning environments utilized by the species. The tadpoles grown in the warmer environments tended to show higher heat tolerance and avoidance temperatures compared to the tadpoles grown in the cooler environments. In addition, functional characterization of a heat sensor molecule, which is expressed in sensory neurons, revealed that its heat-evoked activity tended to be stronger in the species with lower heat avoidance temperatures. These results suggest that changes in the thermal responses of peripheral sensors altered thermosensation and related behavioral responses and contributed to the adaptation to diverse thermal environments in evolutionary processes.

研究分野：進化生理学

キーワード：環境適応 温度感覚 高温耐性 忌避行動 温度センサー 温度感受性TRPチャネル 両生類 幼生

1. 研究開始当初の背景

環境温度の変化は生命活動に大きな影響を与える要因であるが、地球上の多様な温度条件の地域に動物は適応してきた。異なる温度条件の環境に適応する進化過程において至適温度域や生存限界温度が動物種の間で変動するのに応じ、温度応答行動も変化してきたと考えられる。適切な温度応答行動をとるためには外界の温度を受容し、その情報に基づき行動を起こすべきか否かを判断する必要がある。そのような点を考慮すれば、異なる温度条件に適応した動物の間では温度の感じ方「温度感覚」もまた変化すると考えられる。

外界の温度は皮膚などの末梢組織に分布する感覚神経終末で受容され、脊髄を經由して脳に信号が伝わり温度感覚が生じる。幅広い動物種において感覚神経に発現する複数の Transient Receptor Potential (TRP) チャネルが温度受容の初期過程を担うセンサー分子として機能している。先行研究により動物種間で TRP チャネルの温度感受性が異なることが報告されているが、そのような差異と温度適応との関連性については未解明な状況であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、環境適応に関連した温度感覚およびそれに関連した温度応答行動の進化的変化、また、その分子基盤を解明することを目的とし、日本在来の無尾両生類の幼生を用いた比較解析を行った。両生類は繁殖に水場が必要であるが、種間で繁殖期や産卵する水場の環境が異なり、幼生が成長の過程で経験する温度条件が異なる。本研究では早春の寒冷な時期に産卵する種から盛夏の暑い時期まで産卵する種まで繁殖期が異なり、また、様々な水環境に産卵する日本在来の 5 種の無尾両生類を選び、幼生の高温耐性、忌避行動、TRP チャネルの機能特性を比較することにより、温度ニッチ選択に関連した温度感覚の進化的変化およびその分子基盤の解明を目指した研究を行った。

3. 研究の方法

日本在来の無尾両生類(ニホンアカガエル、ツチガエル、シュレーゲルアオガエル、カジカガエル、リュウキュウカジカガエル)を対象に下記の 4 つの手法を用い研究を進めた。

- (1) 生息地における野外調査
- (2) 幼生の温度応答行動の観察
- (3) 電気生理学的な手法による温度センサー分子の機能解析
- (4) 温度センサー破壊ツメガエルの温度応答行動の観察

4. 研究成果

- (1) 生息地における野外調査

リュウキュウカジカガエル(鹿児島県トカラ列島、口之島)、カジカガエル(静岡県浜松市)、ニホンアカガエルおよびシュレーゲルアオガエル(愛知県岡崎市)が生息する水場に温度ロガーを設置し、継時的な水温の計測を行った。リュウキュウカジカガエルの幼生が生息する浅い水たまりでは昼夜で水温が大きく変動し、晴天時には水温が 40 近くに達することがあった。水たまりには水温上昇時に温度勾配が形成され水温が 30 以下の場所も存在したが、38 程度の場所にも多くの幼生が確認された。

一方で、カジカガエルの幼生は山間部の涼しい清流に生息するが、幼生は川の辺縁部に滞在しており、夏期の晴天時には 30 弱の水温に暴露されることがあった。ニホンアカガエルは早春の寒冷な時期に水田や湿地などに産卵(調査地では 3 月初旬までに産卵)し、梅雨の時期に変態し上陸するため 25 を超える水温に曝されることはほとんどなかった。ニホンアカガエルの調査を行った池にはシュレーゲルアオガエルも産卵するが、産卵期は春から初夏であり、変態の時期が 1 カ月ほど遅いため水温が 25 を超えることがしばしばあった。野外調査により繁殖期や産卵に利用する水場、また、幼生が選択する微小環境の違いにより経験する温度が種間で異なることが分かった。特に、日射による水温上昇や夏期の高温は生存に大きな影響を与えられ

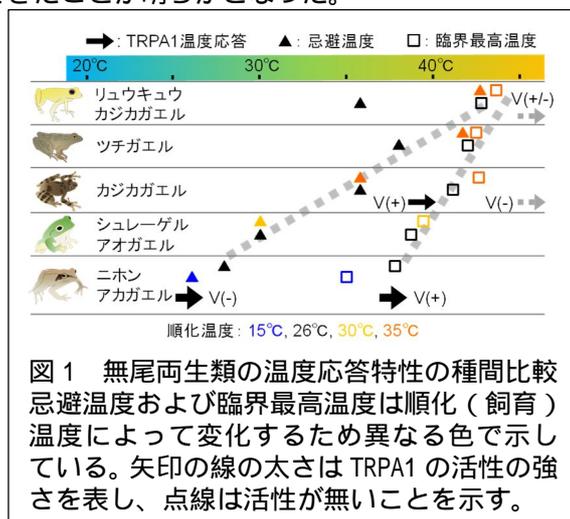
- (2) 幼生の温度応答行動の観察

そこで、高温に対する防衛的な行動である忌避行動を種間で比較した。2 つの円形のチャンバーを細い通路でつないだ容器を作製し、それぞれのチャンバーを異なる温度に設定し、オタマジ

ヤクシが各チャンバーに滞在する時間を計測し、滞在時間が有意に短くなる温度を忌避温度として決定した。その結果、忌避温度はニホンアカガエルで最も低く、シュレーゲルアオガエル、カジカガエル、ツチガエルの順で高くなっていった。ところが、リュウキュウカジカガエルの忌避温度はカジカガエルと同じ約 36 であり野外観察から予想される値より低いものだった。行動実験は幼生を 26 で飼育した後に行っていたため、飼育温度により忌避温度が変化する可能性を考慮し、幼生を 35 で一日だけ飼育した後に行動実験を行ったところ、リュウキュウカジカガエルでは幼生の忌避温度が約 43 まで大きく上昇した。同様にツチガエルにおいても 35 の順化により忌避温度が 38 から 42 まで上昇したが、一方で、カジカガエルでは 35 で順化しても忌避温度は 26 飼育と変わらなかった(図 1)。温度順化の効果も考慮すると幼生の忌避温度は生息地の温度条件から予想される順序で種間差が生じていることが分かった。

このような結果を得て、忌避温度の種差は各種が保有する高温耐性と関連するかどうかという疑問が生じたため、高温耐性の指標として臨界最高温度を決定し比較した。水温を徐々に上昇させた際の幼生の遊泳行動を観察し、正常な姿勢で泳げなくなる温度を臨界最高温度として決定し各種の幼生で比較したところ、ニホンアカガエルが最も低く、リュウキュウカジカガエルは最も高く、中間にカジカガエルが位置していた。すなわち、臨界最高温度と忌避温度は同じ順序で種の間で異なり、これら 2 つの要素が協調的に変化してきたことが明らかとなった。

一方で、忌避温度の種差は臨界最高温度の種差よりも 2.6 倍ほど大きく、忌避温度は適応した温度ニッチに合わせてより柔軟に変化する要素であることが分かった。更に興味深いことに臨界最高温度と忌避温度の関係は種間で異なっていた。ニホンアカガエルやシュレーゲルアオガエルの幼生では忌避温度は臨界最高温度よりもずっと低いのに対して、リュウキュウカジカガエルやツチガエルの幼生では忌避温度は臨界最高温度より僅かに低い温度であった。これらの結果は高温に暴露されやすい種では増強させた高温耐性能を最大限に活用するように忌避温度が設定されているのに対して、涼しい環境に適応した種では忌避温度は臨界最高温度よりもずっと低く保守的に設定されていることを示唆している。



(3) 電気生理学的な手法による温度センサー分子の機能解析

外界の温度情報の取得は行動応答に欠かせない。忌避温度の種間差の分子基盤を明らかにするために温度受容のセンサー分子の比較解析を行った。TRPA1 チャンネルは感覚神経に発現し、多くの動物種で高温によって活性化されるセンサー分子である。忌避温度がそれぞれ最低、中間、最高であったニホンアカガエル、カジカガエル、リュウキュウカジカガエルから TRPA1 を単離したところ、新規の選択的スプライシングバリエントを発見した。新規の選択的スプライシングバリエントは既知のバリエントの 277 番目に 1 つのバリン残基が挿入されるだけであった。新規の選択的スプライシングバリエントを TRPA1(V+)、既知のものを TRPA1(V-) と命名し機能解析を行った。ニホンアカガエルではどちらの選択的スプライシングバリエントも明瞭に高温刺激で活性化されたが、TRPA1(V-) が活性化され始める温度(活性化温度閾値)は約 25 であり、TRPA1(V+) の活性化温度閾値よりも 13 ほど低く、1 つのバリン残基が TRPA1 の温度応答特性に大きな影響を与えることが分かった。

一方で、カジカガエルでは TRPA1(V+) は高温に応答するが、TRPA1(V-) はほとんど応答しなかった。更にリュウキュウカジカガエルではどちらの TRPA1 選択的スプライシングバリエントも高温に対する応答性をほぼ喪失していた。TRPA1 の熱刺激に対する活性を 3 種間で比較したところ、リュウキュウカジカガエル、カジカガエル、ニホンアカガエルの順で強くなる傾向が観察された。また、ニホンアカガエルの TRPA1(V-) の活性化温度閾値はカジカガエルの TRPA1(V+) のそれよりも 13 ほど低かった(図 1)。忌避温度が低い種は高温に鋭敏に応答するために TRPA1 の活性や感受性が高く維持されていると考えられる。

もう一つの高温センサー分子である TRPV1 についてもカジカガエルとリュウキュウカジカガエルから単離し機能解析を行った。どちらの種の TRPV1 も高温刺激だけでは応答せず、高温と酸刺激を同時に加えた場合に明瞭に活性化されたが 2 種間で違いは観察できなかった。TRPV1 のチャンネル機能は維持されているのだが高温受容における役割は低下していると推察される。

(4) 温度センサー破壊ツメガエルの温度応答行動の観察

上述のような高温センサーの温度応答特性の変化が個体の行動応答に影響するかを実証的に調べるため、実験室での飼育が容易なネツタイツメガエルを用い、CRISPR/Cas9 により TRPA1 または TRPV1 遺伝子を破壊した系統を作出した。まず化学物質に対する行動応答を調べたところ、

TRPA1 遺伝子破壊ツメガエルにおいて TRPA1 のアゴニストであるシンナムアルデヒドに対する逃避(跳躍)行動が著しく低下していることが確認された。次に、温度上昇の際のカエルの跳躍行動を観察したところ、37 程度の高温域における跳躍行動が野生型個体に比べて TRPA1 遺伝子破壊個体では少ない傾向が観察された。しかし、行動解析に供した個体数が少なく予備的な段階であるため今後更なる実験を行う必要がある。また TRPV1 遺伝子破壊個体の行動実験も今後進めていく予定である。

まとめ

本研究課題では、日本在来の無尾両生類種を対象に野外調査から行動実験、更には温度センサー分子の機能解析まで生態から分子に亘る統合的な研究を行った。その結果、各種の幼生が適応した温度ニッチと連動した忌避行動および、忌避行動に欠かせない温度受容のセンサー分子の種間差が検出された。更に TRPA1 遺伝子が破壊されたネットイツメガエルを用いた行動解析により、高温センサーの機能変化が直接的に行動応答を変え得ることを示す予備的な結果も得られた。これら成果は、無尾両生類種が繁殖に利用するニッチを時空間的に違えていく進化の過程において、末梢の温度センサー分子に生じた機能変化が個体の温度感覚を変え、生息環境に適した温度応答行動を生み出してきたことを示唆している。これまで視覚、味覚などの感覚受容においてシグナル伝達の初期過程を担う受容体の機能特性の変化が環境適応に貢献してきたことは知られていたが、本研究により温度感覚においてもセンサー分子が重要な役割を担ってきたことが明らかになった。

本研究で用いた 5 種のうちリュウキュウカジカガエル以外の 4 種は日本に広く分布し、同じ地域に生息していることもあるが、時空間的に異なる環境を利用するため高温耐性や忌避行動に大きな種差が存在することが明らかとなった。近年、急速に進む地球温暖化が生物に与える影響が懸念されている。本成果は類似した分布域を持つ種の間でも生態的ニッチの棲み分けに起因し温度適応能が大きく異なることを示したものであり、気温上昇により生物が受ける影響や将来的な保全を行ううえで有用な情報となると考えている。

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 齋藤 茂	4. 巻 81
2. 論文標題 脊椎動物における温度受容機構の進化的変化と環境適応のつながり	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 低温科学	6. 最初と最後の頁 71～80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14943/lowtemsci.81.71	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 Shigeru Saito, Claire T Saito, Takeshi Igawa, Nodoka Takeda, Shohei Komaki, Toshio Ohta, and Makoto Tominaga	4. 巻 39
2. 論文標題 Evolutionary tuning of transient receptor potential ankyrin 1 underlies the variation in heat avoidance behaviors among frog species inhabiting diverse thermal niches	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 msac180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/molbev/msac180	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 齋藤茂	4. 巻 270(10)
2. 論文標題 脊椎動物の温度感受性TRPチャネルの進化的な変化と環境適応	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 869-874
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 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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 齋藤くれあ、富永真琴、齋藤 茂
2. 発表標題 両生類特異的なTRPA1選択的スプライシングバリエントの起源と機能的な進化過程
3. 学会等名 日本進化学会年大会 第24回沼津大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 茂、齋藤くれあ、井川武、小巻翔平、太田利男、富永真琴
2. 発表標題 無尾両生類における温度ニッチの多様化に応じた忌避行動および高温センサー分子の進化
3. 学会等名 日本動物学会 第93回 早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 茂、齋藤くれあ、井川武、小巻翔平、富永真琴
2. 発表標題 両生類の生態的な棲み分けに起因した温度感覚の進化的変化とその分子機構
3. 学会等名 日本進化学会第23回東京大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤くれあ、富永真琴、齋藤 茂
2. 発表標題 高温センサーTRPA 1 における両生類特異的なスプライシングバリエントの進化的な起源
3. 学会等名 日本進化学会第23回東京大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shigeru Saito, Claire T. Saito, Takeshi Igawa, Shohei Komaki, and Makoto Tominaga
2. 発表標題 The evolutionary tuning of thermal perception related to habitat selection in frogs
3. 学会等名 The 2nd AsiaEvo Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤 茂、齋藤くれあ、井川武、小巻翔平、富永真琴
2. 発表標題 両生類の生態的な棲み分けに起因した温度感覚の進化的変化とその分子機構
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤 茂、齋藤くれあ、井川武、小巻翔平、富永真琴
2. 発表標題 リュウキュウカジガエルの高温適応における温度受容システムの役割
3. 学会等名 日本進化学会第22回オンライン大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤くれあ、齋藤 茂、富永真琴
2. 発表標題 高温センサーTRPA 1 における両生類特異的なスプライシングバリエントの進化的な起源と維持機構
3. 学会等名 日本進化学会第22回オンライン大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤 茂、齋藤くれあ、井川武、小巻翔平、富永真琴
2. 発表標題 リュウキュウカジガエルの高温適応における温度受容システムの役割
3. 学会等名 日本動物学会 第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤くれあ、齋藤 茂、富永真琴
2. 発表標題 高温センサーTRPA 1 における両生類特異的なスプライシングバリエントの進化的な起源と機能的なゆらぎ
3. 学会等名 日本進化学会 第21回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

齋藤 茂のウェブサイト https://sites.google.com/view/shigeru-saito オタマジャクシは生息環境にあわせて嫌いな温度が変化する https://www.nips.ac.jp/release/2022/08/post_489.html 生息環境と連動した温度センサー分子の機能変化を解明 https://www.nips.ac.jp/release/2019/08/post_397.html
--

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
---------	---------