

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440213

研究課題名(和文)ヘビ類における頸腺システムの進化：起源、多様化、そして喪失

研究課題名(英文) Evolution of the nuchal glands in snakes: origin, diversification, and secondary loss

研究代表者

森 哲 (Mori, Akira)

京都大学・理学研究科・准教授

研究者番号：80271005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヤマカガシは頸腺と呼ばれる特殊な防御器官を持ち、強い皮膚毒を持つヒキガエルを食べることによりその毒成分を取り込んでこの器官に溜める。また、特異的な防御ディスプレイを行って、その毒を効果的に捕食回避に利用する。

本研究では、合計18種のユウダ亜科のヘビが同様の防御器官を持つことを確認し、それらの形態は多様化していることを明らかにした。また、分子系統解析の結果、頸腺システムは1回だけ進化してきたことを示した。さらに、ミミス食に移行した一部のヘビでは、頸腺毒をヒキガエルではなくホタルから取り入れている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Rhabdophis tigrinus has peculiar defensive organs, called nuchal glands. This snake eats toads, which have toxic skin secretions, and sequesters the toxins to store in its glands. This species also shows peculiar defensive displays that enhance the effectiveness of the toxins for predator avoidance.

We confirmed the presence of similar organs in a total of 18 species of natricine snakes, which show diversified morphological features in the organs. Based on the molecular phylogenetic analysis, we inferred that the nuchal gland system has evolved only once in the ancestor of these species. A line of evidence we obtained suggests that some of those species, which mainly feed on earthworms, have changed the dietary source of nuchal gland toxins from toads to fireflies.

研究分野：生物学

キーワード：進化 行動学 爬虫類学 防御行動 化学防衛

1. 研究開始当初の背景

多くの動物は、捕食者から身を守るために、毒による化学的防御を行っている。化学的防御に利用される物質は、その動物自身が生成している場合と、餌から取り入れて二次的に利用している場合とがある。我々は、日本に生息するナミヘビ科のヤマカガシ (*Rhabdophis tigrinus*) が、餌であるヒキガエルの皮膚毒 (強心ステロイドの一種であるプファジエノライド類: BD) を取り入れ、自分自身の防御に役立っていることを実験的に証明した。これは、有羊膜類における餌毒の蓄積による再利用の初めての実証研究となった。しかもヤマカガシは、体内の既存の臓器や筋肉内に餌毒を単に蓄積しているのではなく、「頸腺」と呼ばれる首の背面の皮下にある特異的な器官に毒成分を蓄えるという点においても非常に特殊である。さらに、ヤマカガシは、自分の身を守る際には、独特な防御ディスプレイを行なうことにより、この頸腺を効果的に提示して捕食回避に役立っている。このように本種は、形態的、行動的、および、化学的形質を統合した特殊な対捕食者システムを持つことが明らかとなっていた。

頸腺の存在は 1935 年に日本産のヤマカガシにおいて初めて報告された。その 3 年後、近縁の 9 種でも類似の器官が確認され、頸部だけでなく胴体背面全体に腺構造を持つ種も存在することから、それらは総称して「頸背腺」と名付けられた。その後、分類体系の変更や新たな報告などがあつたが、頸背腺は全世界に生息する約 3500 種のヘビ類の中で、アジアに分布する 3 属 15 種のみで確認されているにすぎなかった。

近年、我々はこれらの種の一部の系統樹を作成した。その結果、頸部のみに存在する頸腺が胴体背面全体に伸長する進化が起こったこと、頸腺の退化が少なくとも 2 回は生じていることなどが示唆された。また、再利用されている餌毒はヒキガエルだけでなく、まったく異なる毒成分を持つミミズ類に依存する種が存在する可能性が示唆された。すなわち、頸腺は形態的、生理的に多様化する一方、別の系統では消失してしまっていることが示されたのである。

2. 研究の目的

頸背腺を持つヘビはヤマカガシ属、ハブモドキ属、ハナカガシ属の 3 属からなるが、それらの間の系統関係や近縁種との系統関係は明らかにされていない。また、ヤマカガシ属内とハブモドキ属内にはこの構造を頸部のみに持つ種、胴体全体に持つ種、持たない種が混在するが、それらの系統関係も未だ不明な部分が多い。さらに、頸腺に関与する形質の詳細が解明されているのはヤマカガシのみであり、他の種がどのような毒成分を持っているのか、付随する防御行動がどのようなものであるのか、頸腺を喪失したと考え

られる種は、体内に毒成分を蓄積する能力を残しているのか等はほとんどわかっていない。そこで、本研究では、頸腺の起源、多様化、および喪失に伴ってどのように形態的、生理的、行動的形質が変化しているのかを明らかにすることを目的とした。このために、まず、分子遺伝学的手法により近縁種を含む関係種の系統関係を明らかにした。次に、多様化や喪失に伴う関連形質の進化の解明を目指し、頸腺および頸部の微細構造、ヒキガエルやミミズに対する嗜好性ならびにこれらが持つ毒への耐性、蓄積されている毒成分、および、防御行動を種間比較した。

3. 研究の方法

頸背腺を持つ種は東南アジアから中国、南アジアにかけて分布するため、これらの国の研究者と協力し、材料の採集、行動実験、分子系統分析用 DNA サンプルの採取、および、頸背腺毒の抽出と分析を実施した。

捕獲したヘビは研究室へ持ち帰り、防御行動の定量化の実験を行った。これには、我々がこれまでに確立した方法を用い、実験ケージ内で一定の刺激を与え、その反応をビデオカメラで撮影し、映像を分析することにより、行動を比較した。

採集時にはヘビの胃内容物を強制嘔吐法により調べ、野外食性を確認した。一部の種では、飼育下において様々な餌動物の匂い刺激を提示し、その反応性の高さを評価することによってヒキガエルへの嗜好性を査定した。

これらの実験後、頸背腺から毒液を抽出し、メタノールに保存して、化学分析用サンプルとした。実験後に野外に放逐する必要がある個体に対しては、尾端を切除し、DNA 分析用サンプルとして 99% エタノールに保存した。一部の個体は標本として保管するために安楽死させ、肝臓または筋肉の一部を DNA 分析用サンプルとして採取した。また、解剖により頸背腺の詳細な構造を観察した。

分子系統樹の推定は、ミトコンドリア DNA のチトクローム b 領域と核 DNA の c-mos の塩基配列を合わせ、最尤法によって行った。頸背腺の抽出液は、高速液体クロマトグラフ質量分析計を用いて化学分析を行うことにより、プファジエノライドの有無を確認し、一部は核磁気共鳴装置によりその分子構造を決定した。

4. 研究成果

(1) 頸背腺の形態の多様性

ヤマカガシ属の全 24 種のうちの 19 種、ハブモドキ属 4 種のすべて、および 1 属 1 種であるハナカガシ属を解剖した結果、合計 18 種で頸背腺を確認した。ヤマカガシ属では 12 種が頸背腺を持ち、5 種が持たないこと、2 種においては持つ個体と持たない個体が存在する可能性があることを確認した。また、ハブモドキ属では 2 種が持ち、1 種は持つ個

体と持たない個体が存在する可能性があること、残りの1種は持たないこと、さらに、ハナカガシ属の1種は持つことを確認した。

頸背腺を持つ合計18種のうち、頸部にのみ構造物があるのは9種(ヤマカガシ属6種、ハブモドキ属2種、ハナカガシ属1種)、頸部から胴体全体の背面にまで及ぶのは8種(ヤマカガシ属7種、ハブモドキ属1種)であった。残りのヤマカガシ属1種では、標本の制約のため、頸部にあることのみ確認となった。

これらの頸背腺はすべて左右で一対になっているが、その形状からいくつかのタイプに分けられた(図1)。頸部にのみ腺を持つ種では、個々の腺が小粒状になっている嚢状タイプ(合計5種)と、体軸方向に長く伸びた非嚢状タイプ(合計4種)とに分けられた。さらに、前者のうち1種では、左右にそれぞれ2列あり、頸腺は部分的に2対になっていた(ダブル)。一方、頸部から胴体全体に渡って腺を持つ種ではすべてが嚢状で、頸部の腺と胴体の腺とが間断なく直線的に続く種(単調連続)、頸部より後方是对になった腺の幅が広がって続く種(広幅連続)、頸部と後方との間に空隙がある種(非連続)、頸部の後端で胴体部の腺と部分的に重なる種(重複連続)があった。

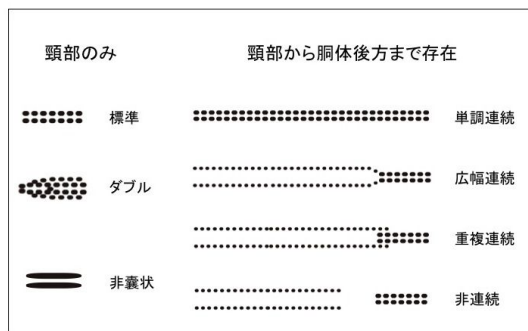


図1. 頸背腺のタイプ分けの模式図。右側の4つの図は、右が頭側を、左が尾側を示す。

(2) 系統樹

頸背腺を持つことを確認した18種のうちの17種、および、頸背腺を持たないヤマカガシ属2種とハブモドキ属1種を含むユウダ亜科の系統樹を作成した(図2)。その結果、頸背腺を持つ種はひとつのクレードにまとまることになり、頸背腺システムは一度だけ進化したと推察された。頸背腺を持たない3種はこのクレードの外に位置するので、これらの種は進化の過程で頸背腺を喪失したのではないと考えられた。一方、頸腺を持つ個体と持たない個体が混在する3種(*R. swinhonis*, *R. murudensis*, *M. flaviceps*)は、上記のクレードの中に含まれることから、一部の個体群で頸腺の喪失が進行している可能性が示唆された。

頸部から胴体後方まで腺を持つ種は2つのクレードに分けられた。このうちのひとつは

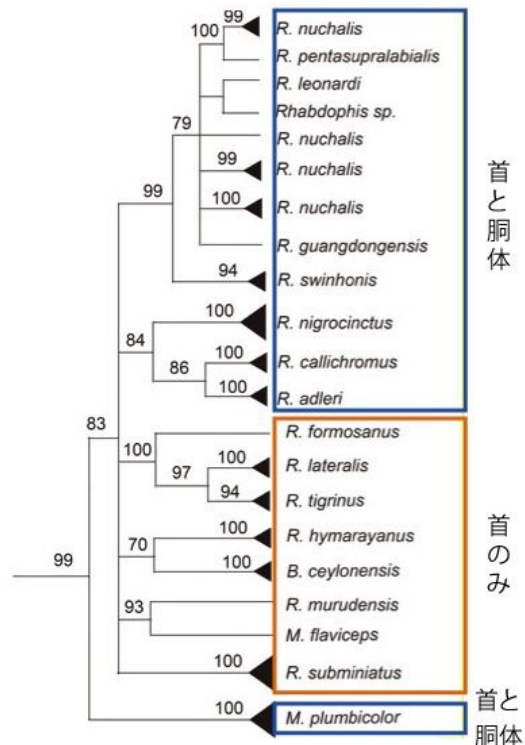


図2. 頸背腺を持つヘビ類の分子系統関係

1種のみからなり、単調連続タイプの腺を持つ唯一の種である *M. plumbicolor* を含んだ。もう一方のクレードは8種を含み、頸部より後方の腺の有無を確認できなかった *R. guangdongensis* 以外はすべて胴体後方まで腺を持つ種であった。以上のことから、頸部から胴体後方までの腺の伸長は独立して2回起こったか、胴体全体にあった腺が一旦頸部にのみ退縮する進化が起こったのち、再び胴体後方へ腺が伸長する進化が生じたかのいずれかであると推察された。

(3) 化学分析

合計12種(ヤマカガシ属10種、ハブモドキ属1種、ハナカガシ属1種)の頸背腺液を分析し、すべての種からBDを検出した。これらのBDの多くは、これまでにヤマカガシやヒキガエルで確認されたBDと同程度の分子量であったが、これまでに報告されていないタイプのBDもあった。

一方、ミミズ食とされている中国産の *R. pentasupralabialis* と *R. nuchalis* では、かなり分子量が大きいBDを含んでいる個体が存在した。そこで、これらの2種に注目し、化学物質の構造決定を行ったところ、北米産のマドボタル類で報告されているルシブファギン(BDの1種)と同一の物質とその類似物質を含んでいることが判明した(図3)。一方、これらのヘビ類と同所的に分布するミミズ類数種を分析したが、BDはまったく検出されなかった。

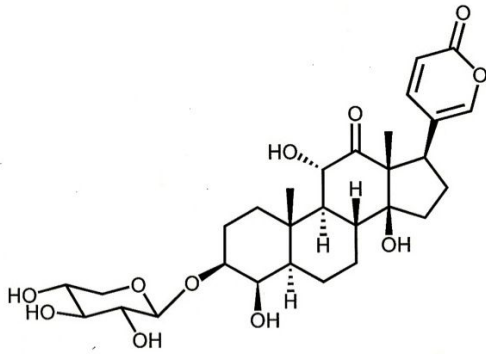


図 3. *Rhabdophis pentasupralabialis* の顎背腺液から検出された高分子のブファジエノライドの構造式

(4) 防御行動

顎腺を持つことと関連している特殊な防御ディスプレイである「首曲げ」、「首打ち付け」、「背面提示姿勢」に注目したところ、首曲げは 8 種で、首打ち付けと背面提示姿勢は 4 種で行うことを確認した。また、胴体後方まで腺を持つ 8 種のうち 3 種において、つづいた胴体をアーチ状に持ち上げて誇示する特異的なディスプレイが観察された(図 4)。この行動は、今までヘビ類では報告されていなかった反応であったため、新たに「胴持ち上げ」と名付けた。この行動は胴体背面にある腺からの毒液の噴出を促進する機能があると推察された。また、このディスプレイは、上述した、顎部から胴体後方まで腺を持つ 2 つのクレードの両方の種において観察された。



図 4. *Rhabdophis pentasupralabialis* の胴持ち上げディスプレイ

(5) 食性

中国に分布するミミズ食のヘビは、ヒキガエルの匂いへの嗜好性はやや高いものの、ヒキガエルを含むカエル類を捕食しなかった。また、ミミズ食である *R. pentasupralabialis* の胃内容物から、ミミズの他にマドボタル亜科の幼虫を複数個体発見した。さらに、本種は飼育下でマドボタル属の幼虫を食べることを確認した。

一方、台湾に分布する *R. swinhonis* は、ミミズを主食とするものの、ヒキガエルも稀に捕食していることが、胃内容物調査から明らかになった。

(6) まとめ

分子系統解析の結果から、顎背腺システムはユウダ亜科のヘビ類の中で 1 回のみ進化し、その後、胴体後方への伸長あるいは顎部のみへの退縮が何度か生じたことが示され

た。また、胴体後方まで存在する顎背腺は独立して 2 回進化したことが推察された。後者は、2 つのクレードで顎背腺の配置パターンが大きく異なることから支持される。さらに、顎部のみに腺を持つタイプでも、左右方向への倍化や、非嚢状形態への変化が生じており、多様な形態進化が進行してきたことが明らかになった。今後は、これらの進化メカニズムを解明するために遺伝発生的な分析を進めていく予定である。また、今回の分子系統樹は既存の分類体系、特に属の分類と対応しない点も少なからず見られたことから、関係種の分類の再検討も望まれる。

これまでヤマカガシで知られていた首曲げなどの特殊な防御ディスプレイは、顎背腺を持つ他の種でも観察され、これらの防御ディスプレイが顎背腺と関連して進化してきた行動であることがより強く確証された。特に、胴体を持ち上げるディスプレイは独立して進化したと考えられる 2 つのクレードの両方の種で観察され、特異的な防御行動が平行進化したことを示している。

ユウダ亜科の他種の食性と系統関係の比較から、ヤマカガシ類におけるヒキガエル食は祖先的な形質であることが示された。したがって、顎背腺を持ちミミズを主食とする種は新たに進化してきたグループであると推察される(図 2 の系統樹の上 9 つのタクソン)。これらのミミズ食のヘビのうち 2 種からは、これまでヤマカガシやヒキガエルでは報告されていなかった高分子の BD が検出された。このうち 1 種はカエル類を摂食せずホタルを食べること、近縁グループのホタルで BD を持つ種が知られていること、ミミズ類では BD は見つからなかったことから、ミミズ食のヤマカガシ類が顎腺の毒成分をミミズから取り入れている可能性は低くなり、これに対し、高分子の BD をホタルから取り入れている可能性が新たに浮上してきた。すなわち、中国産のヤマカガシ類において顎腺から顎背腺への進化が起こり、さらにその一部でカエル食からミミズ食への進化が起こったこと、このミミズ依存への食性の変化に並行して、何らかの理由でホタルも摂食するようになり、ヒキガエルに代わって、ホタルから毒成分を取り入れるように進化したことが考えられる。しかしながら、中国産のホタル類が BD を持つかどうかはまだわかっておらず、その分析は今後の課題として残っている。さらに、ホタルを捕食することによって、顎背腺に毒成分が蓄積されることを実証する実験も実施する必要がある。また、どのような至近的要因が、毒の起源をヒキガエルからホタルへ変更することを可能にしたのかなども、興味深い研究課題として新たにあげられる。

一方、ヤマカガシ属の 2 種とハブモドキ属の 1 種では、一部の個体で顎背腺の退化や消失が起こっている可能性が認められた。今後、これらの種をより詳細に調査することにより、

どのような過程で顎背腺の喪失が起こっているのかを明らかにしていく必要がある。

以上をまとめると、顎背腺システムはユウダ亜科の祖先種で1度だけ進化したが、その後、形態、行動、毒利用などの関連する形質において多様な変化が生じてきたことが明らかになった。今後はこれらの多様化の実態をより詳細に解析するとともに、多様化に関わる遺伝的メカニズムや至近的要因などを解明していくことを計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Mori, A. and G. M. Burghardt. 2017. Do tiger keelback snakes (*Rhabdophis tigrinus*) recognize how toxic they are? Journal of Comparative Psychology. (in press) 査読有

Mohammadi, S., S. S. French, L. A. Neuman-Lee, S. L. Durham, Y. Kojima, A. Mori, E. D. Brodie Jr., and A. H. Savitzky. 2017. Corticosteroid responses of snakes to toxins from toads (bufadienolides) and plants (cardenolides) reflect differences in dietary specializations. General and Comparative Endocrinology 247: 16–25. 10.1016/j.ygcen.2017.03.015 査読有

Mohammadi, S., Z. Gompert, J. Gonzalez, H. Takeuchi, A. Mori and A. H. Savitzky. 2016. Toxin-resistant isoforms of Na/K-ATPase in snakes do not closely track dietary specialization on toads. Proceedings of the Royal Society B 283(1842): 20162111. doi 10.1098/rspb.2016.2111 査読有

Mori, A., T. Jono, H. Takeuchi, and I. Das. 2016. *Rhabdophis conspicillatus* (Red-bellied keelback). Morphology. Herpetological Review. 47(3): 482–483. 査読有

Mori, A., T. Jono, H. Takeuchi, L. Ding, A. de Silva, D. Mahaulpatha & Y. Tang. 2016. Morphology of the nucho-dorsal glands and related defensive displays in three species of Asian natricine snakes. Journal of Zoology 300(1): 18–26. doi: 10.1111/jzo.12357 査読有

Mori, A., Jono, T., Ding, L., Zhu, G.-S., Wang, J., Shi, H.-T. & Tang, Y. 2016. Discovery of nucho-dorsal glands in *Rhabdophis adleri*. Current Herpetology 35(1): 53-58. doi 10.5358/hsj.35.53 査読有

Kojima, Y. and A. Mori. 2015. Active foraging for toxic prey during gestation in a snake with maternal provisioning of sequestered chemical defences. Proceedings of the Royal Society, B. 282 (Issue 1798): 20142137. doi 10.1098/rspb.2014.2137 査読有

Fernando, W. K. B. K. M., S.A.M. Kularatne, S.P.K. Wathudura, A. de Silva, A. Mori, and D. Mahaulpatha. 2014. First reported case of systemic envenoming by the Sri Lankan keelback (*Balanophis ceylonensis*). Toxicon. 93: 20-23. doi 10.1016/j.toxicon.2014.11.219 査読有

Takeuchi, H., G.-X. Zhu, L. Ding, Y. Tang, H. Ota, A. Mori, H.-S. Oh, and T. Hikida. 2014. Taxonomic validity and phylogeography of the East Eurasian natricine snake, *Rhabdophis lateralis* (Berthold, 1859) (Serpentes: Colubridae), as inferred from mitochondrial DNA sequence data. Current Herpetology 33(2): 148-153. doi 10.5358/hsj.33.148 査読有

〔学会発表〕(計12件)

城野哲平、Ding Li、Tang Yezhong、森哲、ミミズ食ヘビによる有毒の外来ミミズの回避学習。第64回日本生態学会大会。2017年3月16日 早稲田大学(東京)

Akira Mori. Exploring the nuchal glands: Unusual defensive organs of Asian snakes. The 8th International Symposium on Asian Vertebrate Species Diversity. 2016年10月24日 インドネシア(ポゴール)

Akira Mori, Teppei Jono, Hirohiko Takeuchi, Tatsuya Yoshida, Li Ding, Anslem de Silva, Tein-Shun Tsai, Tao Thien Nguyen, Dharshani Mahaulpatha, Indraneil Das, Guang-Xiang Zhu,, Yezhong Tang, Naoki Mori, Alan H. Savitzky, and Gordon M. Burghardt. Nuchal gland system: A novel defensive mechanism evolved in Asian natricine snakes. The 8th World Congress of Herpetology. 2016年8月20日 中国(杭州)

Hirohiko Takeuchi, Akira Mori, Li Ding, Anslem de Silva, Indraneil Das, Tao Thien Nguyen, Tein-Shun Tsai, Teppei Jono, Guang-Xiang Zhu, Dalshani Mahaulpatha, Yezhong Tang, and Alan H. Savitzky. Evolution of a special organ, nuchal gland, based on a molecular phylogeny of the Eurasian natricine snakes (Serpentes: Colubridae). The 8th World Congress of Herpetology. 2016年8月20日 中国(杭州)

Tatsuya Yoshida, Teppei Jono, Hirohiko Takeuchi, Naoko Yoshinaga, Li Ding, Yezhong Tang, Akira Mori, and Naoki Mori. The chemical analysis of bufadienolides in defensive glands of the Asian *Rhabdophis* snake. The 32th Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology. 2016年7月5日 イグアス(ブラジル)

森哲、城野哲平、竹内寛彦、Li Ding、Anslem de Silva、Tein-Shun Tsai、Indraneil Das、

Nguyen Thien Tao, Dharshani Mahaulpatha, Shi Hai-Tao, Yezhong Tang. アジア産ユウダ亜科ヘビ類における頸背腺の形態の多様性と進化. 日本爬虫両棲類学会第54回大会. 東邦大学 (千葉船橋市)

Akira Mori, Hirohiko Takeuchi, Teppei Jono, Tatsuya Yoshida, Li Ding, Anslem de Silva, Tein-Shun Tsai, Tao Thien Nguyen, Dharshani Mahaulpatha, Indraneil Das, Yezhong Tang, Naoki Mori, Alan H. Savitzky, and Gordon M. Burghardt. The nucho-dorsal glands of Asian natricine snakes: Correlated evolution among diet, morphology, antipredator behavior, and defensive chemistry. 34th International Ethological Conference. オーストラリア (ケアンズ)

森哲、城野哲平、竹内寛彦、Li Ding、Anslem de Silva、Dharshani Mahaulpatha、Yezhong Tang. アジア産ユウダ亜科ヘビ類3種における頸背腺と防御行動の観察. 日本爬虫両棲類学会第53回大会. 神戸山手大学 (兵庫県神戸市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 哲 (Akira Mori)

京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：80271005

(3) 連携研究者

竹内 寛彦 (Hirohiko Takeuchi)

京都大学・大学院理学研究科・ポスドク

研究者番号：40726444

(4) 研究協力者

森 直樹 (Naoki Mori)

京都大学・大学院農学研究科・教授

Alan H. Savitzky

アメリカ・ユタ州立大学・教授

Yezhong Tang

中国・成都生物研究所・教授

Li Ding

中国・成都生物研究所・准教授

Tein-shun Tsai

台湾国立ピントン科技大学・助手

Tao Thien Nguyen

ベトナム国立自然博物館・研究員

Indraneil Das

マレーシア大学ボルネオ校・教授

Anslem de Silva

スリランカ・ペラデニア大学・客員講師

Dharshani Mahaulpatha

スリランカ・スリジャヤワルダナプラ大学

・上級講師

城野 哲平 (Jono Teppei)

中国・成都生物研究所・ポスドク研究員