

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560437

研究課題名(和文) フクラガエルが生殖行為に用いる「糊状物質」の特性と成分の解明および人工繁殖の試み

研究課題名(英文) Elucidation of physical properties and chemical components of glue secretion used in breeding behavior of *Breviceps* frog and attempt at its artificial breeding

研究代表者

倉林 敦 (Kurabayashi, Atsushi)

広島大学・両生類研究センター・助教

研究者番号：00327701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：フクラガエルが生殖時に用いる糊の物理的特性と化学成分、および糊候補遺伝子の探索を行った。本研究の結果、フクラガエル糊の接着強度は、およそ500g/cm²であり、その主要構成要素は蛋白質であることが分かった。さらに、糊物質候補は、他のカエルで報告されていた皮膚分泌物と似た3種の蛋白質と、1種の新規蛋白質があることが示唆された。

また、アメフクラガエルについて、人工繁殖を試みた。その結果、Amphiplexと呼ばれるゴナドトロピン誘導ホルモン作動薬とドーパミン拮抗剤が、本種の排卵を促すことを明らかにし、世界で初めて飼育下での人工的な交尾の促進と、営巣・産卵までの観察に成功した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the physical properties, chemical components, and candidate genes of the glue secretion used in the reproduction activity in *Breviceps* frogs. As the results of this study, the adhesion strength of glue secretion was about 500 g/cm², and it was found that its main constituent is protein. It was suggested that there are four candidate proteins of the frog glue: three proteins similar to a non-glue skin-secreted protein known in another frog taxon and one novel protein.

We attempted at the artificial breeding of *B. adspersus*. As the result, it was revealed that a cocktail of gonadotropin-releasing hormone agonist and dopamine antagonist, called Amphiplex, can induce the ovulation of this species. In addition, we succeeded to artificially induce their amphiplexus and observe the nesting and spawning under the captive condition for the first time.

研究分野：分子遺伝学・系統分類学

キーワード：生体機能物質 非モデル動物における生体物質の探索 人工繁殖 糊状物質 プロテオーム トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

フクラガエル属 (*Breviceps*) は、16 種が知られているが、どの種も手足が極端に短く、雌に比べ雄が小さいため、雄は腕で雌を抱けない(図1)。このため、繁殖行動時に、皮膚から糊状の物質を分泌し、この分泌物を用いて、雌雄が体を接着することで、交尾(正確には“抱接”)を行う。このフクラガエルの奇妙な生態と、糊分泌物の存在は、50 年以上前に報告され(Rose, 1962)、世界的に知られている。フクラガエル糊については、糊を分泌するのは雄なのか雌なのか、または両方なのか、といった基本的な事項についても曖昧であり(この点は 1970 年代に論争があり未解決、また、研究代表者の予備実験では雌だけが糊を出した)、現在にいたるまで、フクラガエルの糊状分泌物についての研究はほとんど行われてこなかった。このように研究が進まなかった主な理由としては、糊物質を任意のタイミングで分泌させる事が出来なかったことがあげられる。

しかし、本プロジェクトの研究代表者は、2013 年にフクラガエル属のアメフクラガエルの皮膚から人工的な刺激によって接着力を持った分泌物を得ることに成功し、この糊物質の研究の実施を可能としていた。

なおフクラガエル属は絶滅危惧種や危急種を含むが、ペットとしての人気も高く、乱獲による個体数減少が懸念される。また、繁殖生態にも不明な点が多い。また、研究代表者所属機関である、広島大学両生類研究センターでは、40 年以上に渡り、非モデル両生類の人工繁殖法を発展させてきた歴史があり、ここで培われた技術がフクラガエルに応用できると考えられた。



図1. アメフクラガエルの雌雄

2. 研究の目的

本研究では、50 年以上謎のままであった「フクラガエルの生殖用糊物質」について、生物学・物理学の特徴を解明し、さらに、糊物質の化学成分を決定することを目的とした。また、本研究では、フクラガエル類の飼育法と、人工繁殖法を確立することを目的とした。より具体的な目的は以下の ①～⑪の

(A) フクラガエル糊の生物学の特徴の解明:

糊を出す性別の確認。

粘液採取部位、および繁殖/非繁殖期で、粘液的接着力に違いはあるかの検討。

糊分泌腺の特定。

(B) 物理的特徴の調査:

接着力の測定。

接着強度の時間的変化の観察。

接着条件の検証(水中でも接着するか)、糊物質を融解しうる溶媒の特定。

(C) 糊物質の特定と候補遺伝子の探索:

糊物質は遺伝的にコードされた蛋白質かペプチドか、または他の代謝産物かについての検証。

糊物質の責任遺伝子の探索。

(D) 人工繁殖:

人工授精技術を用いたアメフクラガエル繁殖の実施。

発生様式の観察と飼育法の確立。

3. 研究の方法

(A) フクラガエル糊の生物学の特徴の解明:

TAS と呼ばれる装置をもちいて、アメフクラガエルの皮膚に電気刺激を与える事で、皮膚から糊成分を含んだ粘液を分泌させる事が出来る。この方法をもちいて、アメフクラガエルとモザンビークフクラガエル雌雄複数個体から粘液分泌を行い、40 年前から決着がついていない、糊を出すフクラガエルの性別を確認した(目的)。また、同じ手法を用いて、体のどこから糊を分泌するのか、繁殖・非繁殖期でも糊を持つのかについて調査した(目的)。さらに、皮膚の組織切片を作成し、分泌腺の観察を実施した(目的)。

(B) 物理的特徴の調査:

2 枚のアクリル板 (1cm²) と粘着フックを用いて、接着力テスターを作成した。皮膚から抽出した糊を用いて 2 枚のアクリル板を接着させ、その接着強度を引っ張り強度試験機で測定した(目的)。また、接着後、異なる経過時間毎に接着強度を測定し、接着強度の時間的変化を観察した(目的)。さらに、皮膚分泌物が液体から完全に固まる前(接着力を保持)の状態にし、プラスチックディッシュに接着させ、そこに水を加えた。この状態でディッシュを動かすことで、分泌物の塊がどのように動くかを観察し、糊が水中でも接着するかを検証した(目的)。オーストラリアの十字架ガエルは、外的から自身を守るために、皮膚から糊状の物質を分泌する。このカエルの糊は、溶媒ごとに溶けたり溶けなかったりする。十字架ガエルの糊を溶かす際に用いられた溶媒を、フクラガエル糊についてもテストした(目的)。

(C) 糊物質の特定と候補遺伝子の探索:

皮膚分泌物に含まれる物質のうち、接着力を持つ糊物質を特定するため、まず、蛋白質以外の代謝産物の可能性を検討するために、皮膚分泌物を採取し、メタノールに

融解し、ガスクロマトグラフィーで低分子の検出を行った。次に、皮膚分泌物を SDS 電気泳動し、蛋白質成分を検出した。さらに、糖分解酵素を作用させ、分泌物における糖蛋白質の存在を検討した(目的)。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で出現した蛋白質バンドを切り出し、各バンドについて、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析機(LC-MS/MS)を用いて、どのようなアミノ酸配列を持つ蛋白質が含まれているかを解析した。また、フクラガエル皮膚 mRNA を抽出し、次世代シーケンサー(illumina MiSeq)を用いて mRNA シーケンシングを行った。出力データを Torinity ソフトウェアを用いて、de novo アセンブルし、アセンブルデータから遺伝子を予測した。ここで得られた、遺伝子候補配列をリファレンスとし、Mascot 解析により、質量分析で得られたペプチド配列がどのような蛋白質の構成要素であるのかを推定するとともに、糊物質候補蛋白質の責任遺伝子の推定を行った(目的)。

(D)人工繁殖:

フクラガエル類の排卵を促進する薬剤についてはこれまでに全く知見がなかったので、抱卵しているアメフラシの雌に対して、両生類の排卵促進に用いられてきている3種のホルモン剤を注射し、その効果を観察した。また、産卵された卵に対し、精子を含む精巢懸濁液を用いて人工媒性を試みた(目的)。

さらに、日本に輸入されたフクラガエル類の飼育を継続した(目的)。

4. 研究成果

糊を出す性別:日本に輸入されたアメフラシとモザンビークフクラガエルおよび、南アフリカ現地のアメフラシを用い、雌雄どちらが糊をだすのかについて検証した。その結果、どちらの性別でも雌雄ともに皮膚から接着剤を持つ物質を分泌することが分かった。本プロジェクトを始める前の予備実験では、雌のみから接着剤の分泌が見られたが、多くの個体を用いた実験からは、明らかに両性別が糊をもつ事が明らかになった。雌雄どちらのフクラガエルが糊をもつかと言う点は、40年間にわたる謎であり、異なる意見の間で対立も見られたが、本研究によって、この問題に議論に決着がつくことになる。

粘液採取部位、および繁殖/非繁殖期で、粘液的接着剤に違いはあるかの検討:フクラガエルの体のどの部位から糊が出るのかと言う点も、これまでに明確ではなかった。本研究の結果、糊物質は、背中全体、腕の一部と、腹側の顎から胸部にかけての皮膚に分布している事が初めて示された。背中

から分泌される糊粘液は量が多く、その接着強度を測定する事が可能であったが、それ以外の部位からの分泌量は少ないため、現在までに部位間における糊分泌物の接着強度の違いは、現在の計測方法では測定できていない。また、フクラガエル糊は、繁殖期のみ(11月~1月)に見られるという見解があったが、本プロジェクトで、少なくとも日本で飼育されているアメフラシでは、繁殖期以外の4・5月(繁殖期後3-4ヶ月)後にも、皮膚から糊物質が分泌される事が明らかになった。また、繁殖期とそれ以外の時期で、糊の接着剤に大きな違いはないことも明らかになった。

糊分泌腺の特定:糊が分泌される背中および腹部皮膚について組織切片を作成し、光学顕微鏡で観察を行った。その結果、ホロクリン腺とアポクリン腺様の分泌組織が観察された。これは、Visser et al. (1998) の観察結果と一致するものであった。この2つの腺構造のどちらか、あるいは両方が、糊粘液の分泌を行っていると考えられた。

接着剤の測定:50個体以上のアメフラシを用いて、糊分泌物の接着強度を測定した。その結果、同じ個体から分泌されたものであっても、試行毎に接着剤は変化し安定せず、最大で $2\text{kg}/\text{cm}^2$ という接着剤が計測されたこともあったが、平均すると本種の糊の接着剤は、おおよそ $500\text{g}/\text{cm}^2$ であることが明らかになった(図2)。

接着剤の時間的変化:フクラガエル糊の接着剤の経時変化を初めて記録した(図2)。その結果、雄では接着後1時間、

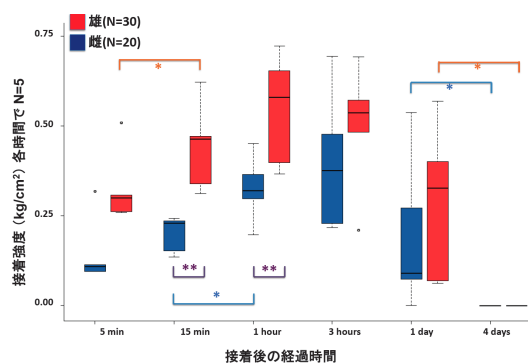


図2.アメフラシ糊の接着強度の時間的変化

雌では3時間後に接着強度が最大になり、その後1日では雌雄ともに接着強度は低下し、4日後にはほぼ接着剤がなくなることが明らかとなった。この結果は、アメフラシの抱接は3日続くと言う Wager (1965) の記述や、我々の現地での観察(接着しているペアは発見されてから3日以内に抱接が解消される)と一致したものであった。

接着条件の検証：フクラガエル糊が、金属・プラスチック・木材など、多様な材質を接着しうることを確かめた。また、生体糊分子の有用な用途と考えられているもの一つに、細胞培養時の細胞の足場がある。このような用途に用いる際には、水中でも接着力が維持されている必要がある。このため、水中でもフクラガエルの糊分泌物が接着力を持つかについて検討した。

フクラガエルの糊分泌物は、皮膚から分泌された直後は、比較的粘性の少ない白色の液体であり、皮膚の上にある限りは、分泌されてしばらくはその状態のままである。しかし、皮膚から離れ、乾燥が進むと、(量にもよるが)数十秒程度で、接着力のあるゴム様の状態になり、その後速やかに乾燥し、接着力をなくす。そこで、このゴム状の状態にある糊分泌物をプラスチックディッシュの底面に接着させ、その後、蒸留水をディッシュに注いだ。この状態で3日間観察を続けた(図3)。その結果、糊分泌物は水中であってもプラスチックに接着できること、さらに、接着は少なくとも3日間継続することが確かめられた。

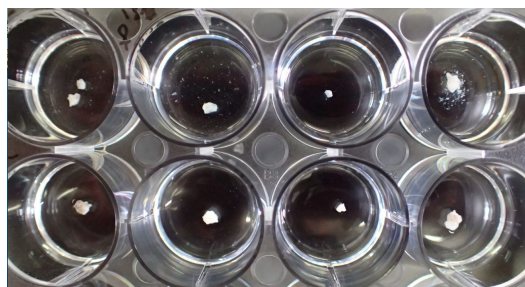


図3. 水中でのフクラガエル糊の接着力の検証

蒸留水のみの場合には3日間ディッシュ底面に接着を続け(下段)、蛋白質分解酵素を作用させると底面からはがれ、また、塊が分解され小さくなる(上段)。

糊物質を融解しうる溶媒:

フクラガエルの糊分泌物(ゴム状の状態になったもの)が以下の6種類の溶媒に溶けるかどうかを検証した。

10%酢酸・5%酢酸・10%ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)・5M塩化グアニジニウム・10mMリン酸・リン酸緩衝生理食塩水(10mMリン酸)+10mMシステイン。

糊分泌物は、酢酸とSDS溶液(前3種)には融解したが、塩化グアニジニウムとリン酸溶液(後3種)には融解しなかった。この結果は、オーストラリア産の系統的にはフクラガエルとは全く異なる、十字架ガエルの糊粘液の場合と同じであり、フクラガエルと十字架ガエルの糊は、同じ成分で出来ていることが示唆された。

糊物質の同定:

まず、アメフクラガエル皮膚から分泌された糊粘液についてガスクロマトグラフィーで分析を行った。しかし、検出範囲において、メジャーなピークは見いだされなかつ

た。この結果から、糊物質は低分子ではない、または、きわめて揮発しにくく、ガスクロマトグラフィーでは検出が難しい低分子のみが含まれていると考えられた。

次いで、糊成分が蛋白質であるかを検討するために、蛋白質分解酵素を作用させた状態で、糊物質の形状と接着の変化を観察したところ、分解酵素を作用させた場合は、糊の塊が分解されて小さくなり、さらに接着力も失われる事が分かった(図3)。この結果から、フクラガエル糊の成分には、蛋白質が含まれていることは事実となった。

糊分泌物をSDSバッファーに融解し、ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)を行った。泳動後、クマシーブリリアントブルー(CBB)染色を行ったところ、多数の蛋白質バンドが確認された。特に、200kDa以上の巨大なバンドが最もメジャーであった(図4)。この巨大なバンドは、メルカプトエタノールによる還元処理を施すと、200kDaより小さい複数のバンドに分離する。このため、還元処理前のメジャーバンドは、複数の蛋白質分子がジスルフィド(SS)結合によって重合しているものだと考えられた。

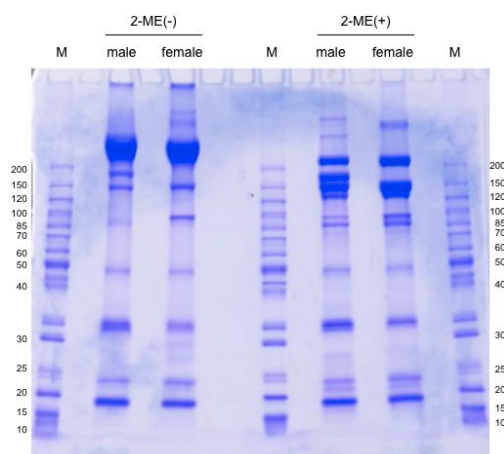


図4. 糊分泌物のSDS-PAGE

糊粘液の内容物の多くを占めている、200kDaを越えるバンドを構成する複数の蛋白質が、糊物質の主要候補であると考えられる。このため、LC-MS/MSをもちいて、還元前と還元後の主要蛋白質バンドについて、質量分析を行い、各バンドに含まれる蛋白質の部分アミノ酸配列を決定した。さらに、この情報に基づき、以下で得られたmRNA配列情報をリファレンスとし、マススコット解析を行った。その結果、これらメジャー蛋白質バンドの主要な構成要素は、原始的なカエルの仲間であるムカシカエル類のスズガエルの皮膚分泌物として知られていた、L/Dペプチジルアミノアシル異性化酵素と弱い(20~40%)アミノ酸配列相同性を持った、主に3種の蛋白質であるこ

とが明らかとなった。さらに、還元前の200kDa以上の巨大バンドには含まれるが、還元後の120kDa以上の主要バンドには含まれない、新規蛋白質が存在することが明らかとなった。

糊物質の責任遺伝子の探索：

アメフラギエルの皮膚から mRNA を抽出し、NGS シークエンシングを行い、およそ14億7千万リード(370億塩基)の配列データを得た。このデータを、7つの異なる条件(Geneモデル)下で *de novo* アセンブリした。その結果、1kbp以上のコンティグ配列が最も多く(5万7千)得られたモデルを採用した。この場合、予想された遺伝子数は69万個であった。この予想遺伝子配列を、上記のマスケット解析のリファレンス解析に用いた。また、この配列データから、4つの糊遺伝子候補の(質量解析で明らかになった部分以外の)長いアミノ酸配列が推定された。特に、4つめの120kDa以上の主要バンドには含まれない、新規蛋白質のアミノ酸配列は、グリシン残基の含量がおよそ50%で、さらにグリシン残基を含む数アミノ酸のリピートモチーフが多数含まれていることが明らかとなった。グリシンに富み、それを含んだ反復モチーフは、生体糊の代表例である、ニカワ(コラーゲン)と共通した特徴である。さらに、数アミノ酸の繰り返しモチーフは、二枚貝が附着に用いる接着蛋白質と類似している。以上の結果から、フクラガエル糊の本体は、本研究で初めて発見されたグリシンリッチな新規蛋白質であり、これとL/Dペプチジルアミノアシル異性化酵素と似た複数の蛋白質が形成している重合体が糊として機能していると考えられた。

アメフラギエルの人工繁殖:ホルモン注入法により、人工的にアメフラギエルの排卵を促すために、3種の排卵促進ホルモン剤を試した。その結果、Amphiplex と呼ばれるゴナドトロピン誘導ホルモン作動薬とドーパミン拮抗薬の混合ホルモン(Trudeau et al. 2010)が、最も効率よく排卵を促すことが明らかとなった。次いで、精巣から抽出した精子による人工媒性を試みた。しかし、受精には至らなかった。その後、飼育下において(ペットトレード個体を使用)野外調査の結果にもとづき、独自の繁殖観察装置を作成し、研究室において飼育下繁殖を試みた。その結果、世界で初めて研究室内で抱接したアメフラギエルに、地下の巣をつくらせ、産卵させることに成功した。ただし、ここで得られた卵も残念ながら発生しなかったため、胚発生の様式は観察できなかった。産卵された卵をどのように受精させるか、その方法の確立と、本種の発生様式の観察(目的)の実施が今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

逸見敬太郎・掛橋竜祐・John Malone・Louis Du Preez・Leslie Minter・倉林 敦 “フクラガエルの「糊」と「人工繁殖」と「ミトコンドリアゲノム」に関する新知見” 日本爬虫両棲類学会(琉球大学, 沖縄県中頭郡西原町, 2016年11月26-27日)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://home.hiroshima-u.ac.jp/amphibia/main/InstAmphBiol/yan_jiuto_jiao_yu.htm

6. 研究組織

(1)研究代表者

倉林 敦 (KURABAYASHI, Atsushi)

広島大学・両生類研究センター・助教

研究者番号: 00327701

(2)研究分担者

広瀬 裕一 (HIROSE, Euichi)

琉球大学・理学部・教授

研究者番号: 30241772

住田 正幸 (SUMIDA, Masayuki)

広島大学・理学研究科・教授

研究者番号: 10163057

(平成26年度末をもって退職したため、

H27・28年度は研究分担者ではない)

(3)連携研究者

浮穴 和義 (UKENA, Kazuyoshi)

広島大学・総合科学研究科・教授

研究者番号: 10304370

(4)研究協力者

澤田 均 (SAWADA, Hitoshi)

中澤 志織 (NAKAZAWA, Shiori)

逸見 敬太郎 (HEMMI, Keitaro)

ミゲル ベンセス (VENCES, Miguel)

ジョン マローン (MALONE, John)

レスリー ミンター (MINTER, Leslie)

ルイス ド プリーツ (Du PREEZ, Louis)