

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(B)（海外学術調査）

研究期間：2017～2021

課題番号：17H04608

研究課題名（和文）「カエル糊」の適応進化の解明を目的としたフクラガエル類の自然史研究

研究課題名（英文）Natural history of rain frogs: elucidating the adaptive evolution of frog glue

研究代表者

倉林 敦 (Atsushi, Kurabayashi)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号：00327701

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,300,000円

研究成果の概要（和文）：フクラガエル属は、皮膚から分泌する「糊」によって雌雄が体を接着して交尾（抱接）する、奇妙な四足動物として知られている。我々は、60年間謎のままであったフクラガエルの糊分泌物について研究を行い、その接着力や接着持続時間などの物理的特徴と、水分・アミノ酸含有量などの化学成分、および、糊タンパク質と候補遺伝子について、新たな知見を得た。さらに、南アフリカ共和国においてフィールドワークを行い、13種のフクラガエルについて糊の接着力を測定し、フクラガエル種間で糊の接着力に差があることを明らかにした。さらに、どのような形態・生態・環境要因が種間の接着力の強さに影響しているかについて検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖時に雌雄の接着に用いられるフクラガエル糊は、そのユニークさから世界的に注目されていたが、任意のタイミングで採取ができなかったため、60年間研究が進んでいなかった。本研究では、電気刺激により任意に糊粘液を分泌させる技術を応用し、さらに、フィールドワークを組み合わせる研究を遂行することで、フクラガエル糊について多くの知見を得た。これは動物学上の長年の謎に答えを与えると同時に、カエル糊の工業利用を行う上で必要な基礎データでもある。なお、成果の一部を論文として公表したが、これは新聞4社で紹介され、社会的反響も大きかった。

研究成果の概要（英文）：The genus *Breviceps* is known as a strange tetrapod in which males and females mate by gluing their bodies together using “glue secretion” from their skin. We have studied the glue secretion, which have remained a mystery for 60 years, and have gained new knowledge on their physical characteristics such as adhesive strength and duration, chemical composition such as water and amino acid contents, and glue proteins and their candidate genes. Furthermore, fieldwork was conducted in South Africa, where the adhesive strength of glue was measured in 13 *Breviceps* species, and differences in glue adhesion between these species were found. Furthermore, which morphological and ecological factors are responsible for the strength of glue adhesion between species was examined.

研究分野：進化生物学

キーワード：生体糊 アフリカ フクラガエル 形質進化 環境要因

1. 研究開始当初の背景

フクラガエル類は、アフリカに固有のアフリカガエル類・フクラガエル科・フクラガエル属 (Afrobatrachia・Brevicipitidae・*Breviceps*) に所属する種の総称である。フクラガエルは現在 20 種が知られており、どの種も球体に近い体に短い腕を持つ。また、多くの種でメスが大きく雄が小さいという性的二型を示す。多くのカエルは交尾 (正確には抱接) の際に、オスがメスを背中から腕で抱えるが、フクラガエル類ではその特徴的な形態が故に、オスがメスを腕で抱くことができない。その代わりにフクラガエル類は、皮膚から分泌する「糊」によって雌雄が体を接着して抱接を行うという、奇妙な生態を持っている (図 1)。

フクラガエルの糊は、およそ 60 年前に発見され、フクラガエルの奇妙な生態とともに、世界的に注目されていた。しかしながら、フクラガエルの皮膚から任意のタイミングで糊分泌物を得ることができなかったため、フクラガエルの糊については研究が進んでいなかった。しかし我々は、皮膚に電気刺激を与えることで糊粘液を分泌させる方法確立した。この技術を応用し、フクラガエル糊の未解明な点を明らかにすることを構想した。特に本研究では、フクラガエル種間で糊の接着力に違いがあるのか、という疑問に着目した。ただし、これまでに日本には 2 種類のフクラガエルが輸入されていたが、ほとんどの種は南アフリカ共和国に分布し、輸入されることはまずない。また、糊の接着力に影響を与えている環境要因を知るためには、実際にフィールドでデータを取得する必要がある。そこで本研究では、南アフリカとタンザニア連合共和国 (フクラガエルの近縁属が分布する) でのフィールドワークを行い、上記の疑問点についてアプローチすることとした。また、主要な研究テーマ以外にも、フクラガエル類の自然史についてはあまり研究が進んでいない。このため、以下「目的」に記述する多様な課題についても研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、フクラガエル類に見られる生殖行動の際に用いられる「糊」という形質の起源・要因・過程など適応進化の実態を、生態学・系統学・分子遺伝学の側面から解明することを目的とした。特に、フクラガエル種間で糊粘液の接着力に差異があるか、差異がある場合はその違いを生じさせている要因は何かというこれまでに全く解明されていない疑問についてアプローチすることとした。さらに、フクラガエル糊の物理的特徴や化学成分 (特に構成蛋白質とその候補遺伝子) についての知見が乏しかったため、これらについての知見を積み上げ、将来的にフクラガエル糊の産業化に結びつけることを企図した。また、フクラガエル糊の研究過程で、オルガネラゲノム解析や、形態学的解析、繁殖研究などもあわせて実施し、未だ謎の多いフクラガエルとその近縁属の自然史について新たな知

SALAMANDRA

German Journal of Herpetology



Published by
Deutsche Gesellschaft für Herpetologie und Terrarienkunde e.V.
Salzhemmendorf, Germany

VOLUME 58 · NUMBER 1

15 FEBRUARY 2022

図 1. アメフクラガエルの糊粘液による抱接。Salamandra 誌の表紙に採択された。

見を加えることについても研究目標とした。

3. 研究の方法

フィールドワーク (図 2)

2017年度は、南アフリカ東部に産するフクラガエル類の繁殖時期にあたる11~12月にかけて、同国東部地域のクワズール・ナタール州、ムプラマンガ州、リンポポ州から20地点以上についてフィールドワークを行なった。この調査の総移動距離は5000 kmを超えた。

具体的な調査内容としては、フクラガエル類の分布調査、個体及び分子実験材料の採取、生息地の環境条件の記録である。さらに、フクラガエル種ごとに糊分泌物の接着強度測定を行なった。

同様に2018年度は、10月に南アフリカ西部の西ケープ・北ケープ州、12月に南アフリカ東部のムプラマンガ州においてフクラガエル類の調査を行なった。西ケープ州では、イチゴフクラガエル・ハイロフクラガエルを採取し、前者については、分子実験材料の採取と、糊強度実験を行なった。北ケープ州ではサバクフクラガエルを調査し、生息場所を明らかにした。なお、北ケープについては採取許可が出なかったため観察と環境要因の計測にとどめた。ムプラマンガ州においては未記載のフクラガエルの採取に成功した。

2019年度は、11月に南アフリカの西ケープ州、および、東ケープ州においてフクラガエル類の観察、採取を行なった。西ケープ州では、ジャイアントフクラガエル・ローズフクラガエル・クロフクラガエルを採取した。さらに、ケープタウンから30 kmほどの地点で、ナマクワフクラガエルを採取した。本種の分布はケープタウンから300km以北と考えられていたため、これは本種の新産地の発見となった。東ケープ州ではヘイゲンフクラガエルの採取を試みたが、成功しなかった。

研究室での研究

2020-2021年度は、コロナウィルスの世界的パンデミックの影響により、海外調査の実施が不可能であった。これに伴い、遺伝子資源の輸出許可申請も大幅に遅れ、最終的に研究期間中での取得ができなかった。このため、2017年以前に日本に輸入されていたアメフクラガエルを材料に用い、Kakehashi et al. (2022)に記載した方法で糊粘液を抽出した。乾燥重量測定機を用いて、その粘液の水分含有量を、塩酸加水分解法によりアミノ酸組成を測定した。また、糖分含有の有無をフェノール硫酸法によって検討した。さらに、フクラガエルは、背中と顎部からは糊粘液を分泌するが、腹部からは分泌しない。そこで、これら3箇所の部位の皮膚で発現しているRNAを、mRNA-Seq法により網羅的に解析し、糊タンパク質候補遺伝子の絞り込みを行なった。同じく、以前に入手していたパワーフクラガエルについて、Mitochondrial DNAの全塩基配列を解析した (Hemmi et al. 2020)。

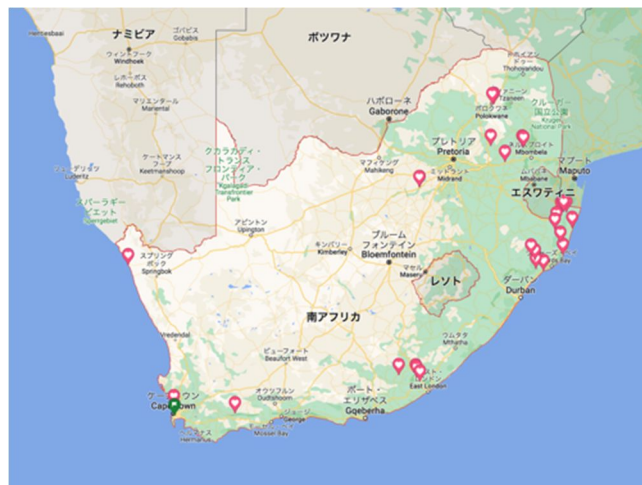


図 2. 本研究におけるフクラガエル調査地点. 2017-2019年度に調査を実施した点を赤いピンで示す。

4. 研究成果

アメフクラガエル糊粘液の成分

まず、水分量測定器を用いて、フクラガエル糊粘液の水分を調べたところ、その含有量はおよそ 65% であった。これは、日本産小型サンショウウオの糊分泌物と比較的近いものであった。また、フクラガエルの糊分泌物の主な構成物質はタンパク質であることが我々のこれまでの研究でわかっていたが、そのアミノ酸含有量が調べられたことはない。そこで、塩酸加水分解法によりアミノ酸組成を詳細に調べたところ、グリシン(モル分率 = 19.4%)とグルタミン酸(11.1%)の存在比率が高かった。グリシンとグルタミン酸の構成比が高いことは、代表的な生体糊、ニカワの構成タンパク質であるゼラチンと似ていた。さらに、ナマコやゴカイの仲間や、同じくカエルのカソリックガエルの糊分泌物と共通していた。特にカソリックガエルの糊粘液とは、グリシン・グルタミン酸以外のアミノ酸組成もよく似ていた。また、詳細な定量は行えなかったが、フェノール硫酸法により、フクラガエルの糊分泌物には糖分が含まれていることをはじめ確認した。

アメフクラガエル糊候補遺伝子の探索

フクラガエルの糊粘液は背中に多く、顎から胸部ではわずかに分泌され、腹部の皮膚からは全く分泌されない。そこで、顎-胸部と腹部の皮膚では発現が少ないもしくは発現しておらず、背中皮膚で多く発現しているタンパク質遺伝子が糊候補であると言える。そこで、これら 3 つの部位の皮膚について mRNA-Seq を行い、背中皮膚で多く発現している mRNA を探索した。その結果、腹部・顎部-胸部よりも背中皮膚で有意に多く発現している mRNA は、それぞれ 697 と 101 つであった。これらの多くが未同定、もしくは機能不明なタンパク質をコードしていた。しかし、一部には生体糊である膠の主成分であるコラーゲン(細胞外マトリクス)や、上皮細胞などから分泌される粘液の主成分のムチンと類似したタンパク質をコードしている mRNA も見られた。さらに、糊粘液中の含有量と、分子量(大きい)、重合している(SDS-PAGE において還元により複数のバンドに分離する)、質量分析と mRNA-Seq の結果から他の生体糊と類似した構造を持つ、などの条件に合致した糊タンパク質が 4 つ発見されていた。これらの糊候補タンパク質は全て背中側皮膚で発現が多かったため、糊タンパク質の本体である可能性が高まった。

アメフクラガエルの糊粘液の物理的特性

引っ張り試験機を使って、アメフクラガエルの糊粘液の接着力(剥離強度)を測定した。その結果、接着後、時間経過とともに糊の接着力は強まり、およそ 1 時間から 3 時間置いた時に最も強くなり、1 時間で 1 cm² あたり約 0.8 kg 重、3 時間では約 0.7 kg 重の接着力(面ファスナーの接着力と同じぐらいの強さ)を発揮することが明らかになった。その後、接着力は徐々に弱くなり、3 日後には接着力がなくなることがわかった。また、乾燥した場所(湿度 25%)で接着実験を行ったところ、一晩で糊粘液の接着力が失われていた。この観察は、フクラガエル糊の接着力は水分量に関係しており、自然乾燥で水分が失われると接着力が無くなることを示唆するものであった。

カエル糊、雄から出るか雌から出るか?

抱接の際に、フクラガエルのオス・メスどちらが糊を出すのかという点は、40 年議論が続いていた。特にオスとメスが違う種類の糊を出し、その両者が混ぜ合わさることでより強い接着力が生じるという仮説(エポキシ仮説)が有名であった。今回の研究では、糊の接着力や接着持続時間がオスとメスの間でほとんど変わらないことが明らかとなった。さらにオスとメスの糊を混ぜて接着実験を行った場合でも、その接着力はオス・メス単独の糊の場合と変わらなかった。この結果は、エポキシ仮説を否定するものであった。さらに現地調査の過程で、フクラガ

エルのオスが糊を出さない別種のカエルに接着していることを発見した(図3)。この観察から、オスの糊分泌物だけで抱接が行えること強く示唆された。



図 3. 他種のカエルと接着するフクラガエル
クワズール・ナタール州で発見された、糊を持たないスナガエル (*Arthroleptis stenodactylus*) と接着する雄のフクラガエル (未記載種)。

フクラガエル種間の糊粘液の接着力の違い

本研究で採取されたフクラガエル 13 種の糊粘液の接着力を比較した(図4)。種間で接着強度に有意差が見られない場合が多かった。一方で、複数の種間で接着量に有意な違いがあり、一部の種では極めて強い接着力が見られた。

フクラガエルの糊の接着力に影響を与える要因

上述のように、フクラガエル種間では糊の接着力に多様性があることが明らかとなった。この違いに影響を与えている可能性のある要因を、生息地の標高、土の硬さ、体重、体長の4つについて検討した。接着力とこれら4つの要素間で相関分析を行ったところ、標高とは相関がなかった。また、土の硬さとは有意な逆相関が見られたが、相関係数 ($r = -0.09$) からするとほぼ相関はない。体重と体長については、それぞれ有意に弱い正の相関が見られた ($r = 0.33 \cdot 0.39$)。現在、一般線形化モデルを用いて、糊粘液の接着力に影響を及ぼす要因をより詳細に解析している。

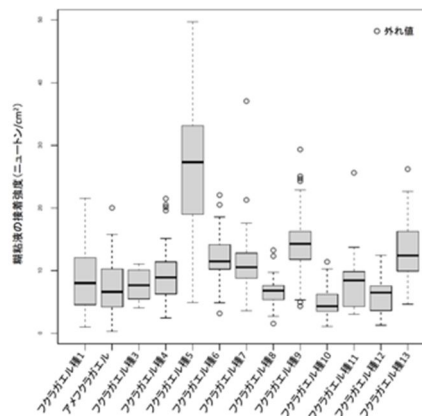


図 4. フクラガエル 13 種の糊粘液接着強度の違い。

13 種のフクラガエルの糊粘液の接着強度 (N/cm^2) を箱ひげ図で示した。未発表の種については具体的な種名を伏した。極端に強い接着力を持つ種が存在する。

フクラガエルの糊の起源と進化についての考察

フクラガエルの糊粘液の接着力は、オスの体をメスの背中にしっかりとくっつけるには、十分すぎるほどの粘着力がある(例えばアメフクラガエルの雄の平均体重は 7.4 g であり、接着力はおよそ 500 gf/cm^2)。この強い接着力は、おそらく糊粘液が捕食者に対する防衛のための機能を持っているためである。防御用の粘着性分泌物は多くの両生類から知られており、それにはフクラガエル科の *Balebreviceps hillmani* や *Callulina* spp. など含まれる。将来的に、これらの種とフクラガエル類の粘着性分泌物の起源が同じ(つまり科の共通祖先で獲得されたもの)であることが明らかになれば、フクラガエルの糊粘液は、本来捕食者への防御の役割を持っていたと証明できるだろう。一方で、今回の研究において接着力と体重・体長の間には正の相関が見られたことから、フクラガエルの糊粘液の抱接のための機能も、種の体の大きさに応じて強くなるという進化傾向があることも示唆された。

参考文献

- Hemmi et al. (2020) Exceptional enlargement of the mitochondrial genome results from distinct causes in different rain frogs (Anura: Brevicipitidae: *Breviceps*) 2020: Article ID 6540343.
- Takehashi et al. (2022) Better than mere attraction - adhesive properties of skin secretion in the common rain frog, *Breviceps adspersus*. *Salamandra* 58: 43-51.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hemmi Keitaro, Kakehashi Ryosuke, Kambayashi Chiaki, Du Preez Louis, Minter Leslie, Furuno Nobuaki, Kurabayashi Atsushi	4. 巻 2020
2. 論文標題 Exceptional Enlargement of the Mitochondrial Genome Results from Distinct Causes in Different Rain Frogs (Anura: Brevicipitidae: Breviceps)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Genomics	6. 最初と最後の頁 全12頁 (6540343)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/6540343	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 Kakehashi, R., K. Hemmi, W. Landman, N. Furuno, L. Du Preez, L. Minter & A. Kurabayashi	4. 巻 58
2. 論文標題 Better than mere attraction - adhesive properties of skin secretion in the common rain frog, Breviceps adspersus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Salamandra	6. 最初と最後の頁 43-51
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hemmi, K., R. Kakehashi, L.D. Preez, L. Minter, A. Kurabayashi
2. 発表標題 Attempt at artificial breeding and analysis of mitochondrial genomes in Breviceps frogs.
3. 学会等名 The 8th International Conference on Global Resource Conservation (国際学会)
4. 発表年 2017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	熊澤 慶伯 (Kumazawa Yoshinori) (60221941)	名古屋市立大学・大学院理学研究科・教授 (23903)	

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	森 哲 (Mori Akira) (80271005)	京都大学・理学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	土岐田 昌和 (Tokita Masakazu) (80422921)	東邦大学・理学部・講師 (32661)	
研究分担者	澤田 均 (Sawada Hitoshi) (60158946)	名古屋大学・理学研究科・教授 (13901)	

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			
南アフリカ	North West University			