

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：34204

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16214

研究課題名(和文) サンショウウオが分泌する糊の化学的成分の解明および適応進化に関する研究

研究課題名(英文) A study on the component of glue secreted by salamanders and its adaptive evolution

研究代表者

掛橋 竜祐 (Kakehashi, Ryosuke)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・プロジェクト特任助教

研究者番号：50812004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、日本のサンショウウオ(サンショウウオ科)が尾から分泌する接着粘液(糊)の機能、およびその構成糊蛋白質と遺伝子の解明を目的に研究を行った。これまで3属17種のサンショウウオで人為的な糊の分泌を試みたところ、その全ての種で糊の分泌を確認できた。また、そのうち9種の糊の接着強度を測定したところ、種毎に接着強度が異なり、近縁な種間で接着強度に近い傾向が見られた。さらに、糊を含んでいるサンショウウオの尾の皮膚組織のmRNA配列を決定し、その配列を尾以外の部位の組織のものと比較した。さらに、糊の質量分析の結果と照らし合わせることで、糊候補のmRNA配列を10に絞り込んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では糊の指標の一つとして接着強度を測定し、近縁な種ほど接着強度に近い傾向があることがわかった。これは糊の機能を明らかにする上で重要なデータである。また、糊自身が新たな生体材料になる可能性がある。加えて、両生類の皮膚には抗菌ペプチドや抗ウイルス分子が含まれることが多い。このため、本研究で行ったサンショウウオ類の皮膚組織に含まれるmRNA配列の解析から、今後、新たな有用生理活性物質が単離される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：I investigated the function and the genes of glue secreted from the tail of salamanders (Family Salamandridae) distributed in Japan. I confirmed that all the 17 species I examined have glue by using an artificial secretion method. Using 9 species of them, the adhesive strength was measured, resulted in different adhesive strength among species. The adhesive strength tends to be close among closely related species. I also determined mRNA sequences from the tail of salamanders, which contain glue, and compared them with those from the other part. Combined with the mass spectrometry of glue, I narrowed the candidate mRNA sequences of glue to 10.

研究分野：多様性生物学

キーワード：サンショウウオ RNA-seq 発現量解析

1. 研究開始当初の背景

両生類では、多くの種が外敵から逃れるために、捕食者に対して有害または不快な物質を皮膚から分泌する。特に珍しい防御物質としては、接着粘液(糊粘液)がある。これまで有尾類(全 10 科)においては、北南米に分布するトラフサンショウウオ科とアメリカサンショウウオ科の一部の種のみから糊粘液の存在が報告されていた。日本においても、糊を出すサンショウウオの存在は経験的には知られていたものの、どの種が分泌するかについては報告されていない。この糊粘液は、サンショウウオが外敵に襲われた際、捕食者の動きを阻害する、落ち葉などを顔に付着させて目くらましをするといった働きを考えると考えられているが、実際にサンショウウオ糊がどのように機能するという生態学的な観察例はほとんどない。さらに、糊粘液の機能を定量する指標の一つとして接着強度があるが、サンショウウオの種によってその強さが異なることが知られている。また、接着強度の要因となる生化学的要因も解明されていない。

研究代表者は、日本産サンショウウオの皮膚に電気刺激を与えることで、人工的に糊粘液を分泌させることに初めて成功した(図 1)。糊粘液は、尾部の皮膚のみから分泌され、胴体部からは分泌されることが分かった。さらに、硬化した糊粘液を蛋白質分解酵素処理したところ、24 時間以内に分解された。このことから、糊物質の主な構成要素が蛋白質であることが示された。

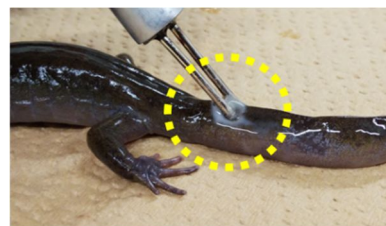


図 1. 電気刺激による糊粘液の分泌

2. 研究の目的

本研究では、サンショウウオ糊について、糊の(1)「生物学的機能」、(2)「接着力の強さと系統関係の相関」、(3)「糊蛋白質とその遺伝子」の3点を明らかにすることを目的とする。ここで得られるデータに基づき、サンショウウオ糊というユニークな形質の系統的起源と機能進化要因の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1)糊の生物学的機能: サンショウウオの皮膚に電気刺激を与えることで、人工的に糊分泌物の採取が可能である。サンショウウオが糊を持つかを明らかとするため、収集したサンプルに電気刺激を与えた。

(2)糊の接着力と系統関係との相関: アクリル板(1 cm²)2枚を人為的に採取した糊で接着し、引張試験機を用いて接着強度を測定した(図 2)。この計測値と、ミトコンドリアの cytb および cox1 遺伝子を用いて推定した系統関係に基づき、サンショウウオ科の種間系統関係と糊の接着強度の進化に相関があるかを調べた。

(3)糊物質の構成蛋白質の同定: **プロテオーム解析:** チュウゴクブチサンショウウオの生体から糊粘液を採取し、0.1% SDS/50mMTEAB 溶液に溶解し、トリプシン消化処理後に LC-MS/MS 分析を行い、糊粘液に含まれる蛋白質の部分アミノ酸配列を決定した。**トランスクリプトーム解析:** サンショウウオ科 2 属 2 種(ハコネ、クロ)について、糊粘液を出さない胴体背側皮膚と糊粘液を出す尾部皮膚それぞれから全 RNA を抽出し、cDNA ライブラリ作成後、NovaSeq 次世代シーケンサー(NGS)を用いて、トランスクリプトーム解析(mRNA-seq)を行った。RNA の種類と量を比較し、尾部皮膚のみで発現している RNA を特定した。また、尾部皮膚のみで発現している RNA のうち、2 種間で相同な配列を推定することで、両者で共通して尾部のみで発現している配列を特定した。さらに、該当 RNA から翻訳される蛋白質が、プロテオーム解析で得られた糊候補蛋白質の部分アミノ酸配列を含んでいるかを調査し、糊候補遺伝子を特定した。



図 2. 接着強度の測定方法

4. 研究成果

(1)糊の生物学的機能: 収集した日本産のサンショウウオ 3 属 17 種の全ての種で人為的な糊の分泌が確認できた。しかし、電気刺激による人為的な手法以外での糊の分泌が確認できず、生物学的機能についての知見はほとんど得られなかった。

(2)糊の接着力と系統関係との相関: 次に、3 属 9 種について、複数(各 8-21)個体を用いて糊の接着強度を、引張試験機で測定した。なお、接着強度は施行ごとに誤差が大きかったため、1 個体当たり 2-10 回の測定を行った。測定した接着強度の平均値はトウホクサンショウウオで最も高く(16.4 N/cm²)、エゾサンショウウオで最も低かった(6.2 N/cm²)。この接着強度の違いを統計的に評価するため、一般化線形混合モデル(GLMM)に基づく尤度比検定を行ったところ、糊の接着強度には種間で有意な差があることがわかった(P < 0.01)。また、同じく GLMM を用いて接着強度によるグループ分けを行ったところ、9 種のサンショウウオは 4 つのグループに分けられた。種間の系統解析の結果と比較すると、サン

シヨウウオの糊の接着強度は、単系統群で近く、近縁な種間で似た傾向があることがわかった(図3)。

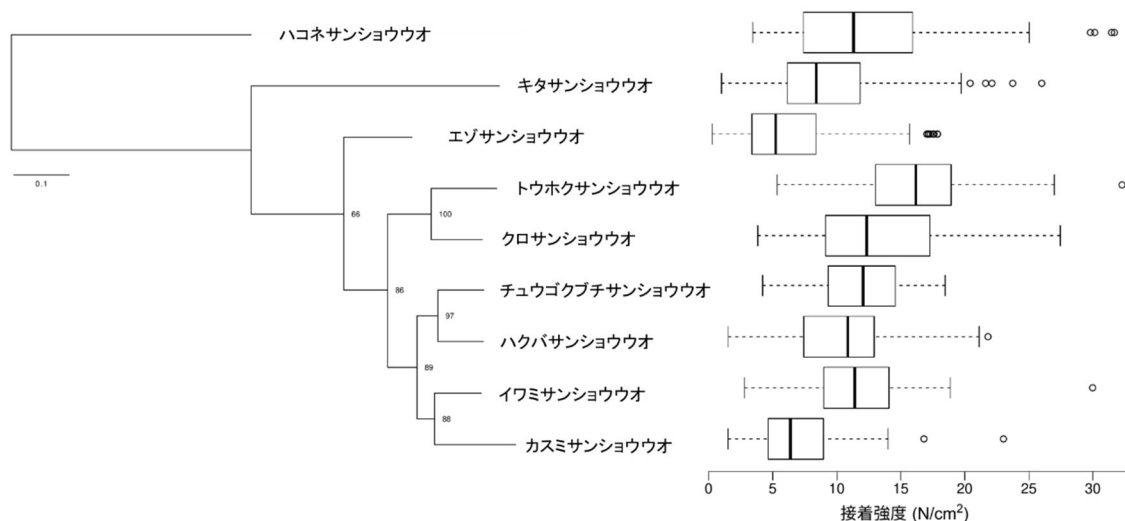


図3. ミトコンドリアの cytb と cox1 に基づく ML 系統樹と糊粘液の接着強度

(3) 糊物質の構成蛋白質の同定: サンシヨウウオ 2 種(ハコネ・クロ)各 3 個体の胴体と尾部の皮膚組織から全 RNA を抽出し、NGS を用いて両種合わせて約 12.8 億のペアエンドリード(101 bp)を得た。それらのリードをクオリティトリミングした後、種ごとに de novo アセンブリを行い、ハコネサンシヨウウオから 186229、クロサンシヨウウオから 118294 のコンティグ配列が得られた。このコンティグ配列を用いて、発現量解析により胴体で発現していないコンティグ配列を調べたところ、ハコネサンシヨウウオが 176 配列、クロサンシヨウウオが 264 配列となった。これらの配列のうち、両種で相同な配列を推定したところ、20 のコンティグ配列が両種で共通して尾部で発現していることがわかった。さらに、これらコンティグ配列から、糊粘液の質量分析から得られたペプチド配列と一致するものを同定したところ、最終的に 10 のコンティグ配列に絞り込んだ。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 掛橋竜祐・逸見敬太郎・照井滋晴・倉林敦
2. 発表標題 サンショウウオが分泌する糊の接着強度の種間比較
3. 学会等名 日本爬虫両棲類学会第60回大会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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