

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12702

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16226

研究課題名(和文) 集団生活における個体間相互作用の差が幼生の発達と社会的選好性に及ぼす影響について

研究課題名(英文) The Effects of Differential Individual Interactions in Group Life on Larval Development and Social Preferences

研究代表者

長谷 和子 (Hase, Kazuko)

総合研究大学院大学・統合進化科学研究センター・客員研究員

研究者番号：40756433

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)：本研究課題は4年間に渡り、ヤマアカガエル(*Rana ornativentris*)、ニホンヒキガエル(*Bufo japonicus*)、そしてミヤコヒキガエル(*Bufo gargarizans miyakonis*)を対象に、集団生活が個体の発達に及ぼす影響について、個体間相互作用の違いに注目した研究を実施した。*R. ornativentris*は血縁者識別とサイズ識別の両方が重要な上に可塑性もあること、*B. japonicus*では水環境による群れのリスクを、*B. g. gargariozans*は群サイズ(数量)を認識することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物からヒトまで、「群れ」は多くの生物種で観察されるが、どんな相手と群れるのか、社会的選好性についての基本的な法則性の理解は進んでいない。「誰を仲間にすべきか」は人間社会においても大きな問題である。本研究は、両生類の幼生を対象に、群れを作る際のルールと学習の影響を調べることで、「集団生活の維持メカニズム」について学術的に新たな知見を提供した。社会的にも、「仲間とはなにか」「私たちはなぜ集団を作るのか」という一般的な問いに対し一つの見解を提供する意味において、その意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This four-year research project focused on the effects of group living on ontogeny in the Japanese mountain frog (*Rana ornativentris*), the Japanese common toad (*Bufo japonicus*), and the Miyako toad (*Bufo gargarizans miyakonis*), with a focus on differences in individual interactions.

In *R. ornativentris*, kin and size discrimination are essential to grouping behavior, and learning induces plasticity. In *B. japonicus*, the risk of grouping due to the water environment was revealed.

In addition, I found that in *B. g. gargariozans*, numerical quantity is more important than size-assortative for the grouping behavior.

研究分野：進化的行動生態学

キーワード：両生類 集団生活 社会性 発達 個体間相互作用 種内関係 血縁認識

1. 研究開始当初の背景

両生類は幼生期に集団生活を通し社会性を示す種が多く存在する。アカガエル (*Rana*) やヒキガエル (*Bufo*) では成長における表現型可塑性も高く、個体群密度により体サイズや成長速度が変化し、血縁者識別は学習で強化される。これは、集団生活における個体間相互作用による影響であると考えられる。個体間相互作用を介して構築される「種内関係」は、集団生活における「利益とコスト」の視点からみると、その価値が変動する。これまでの研究により、両生類の幼生には血縁認識を持つ種がいること、および集団サイズや種内関係によって群れ行動や発達速度に差が生じることが分かっていた。本研究では、両生類の幼生の群れのルール（群れる相手を選ぶ法則性）について、種内および種間関係に着目し、個体間相互作用の差を設けることにより、発達による可塑性・学習効果の検出を目指した。

2. 研究の目的

本研究は、生活史の異なる両生類を用いて、集団生活の維持メカニズムにおける「個体間相互作用」が幼生の発達と社会的選好性に及ぼす影響を解明することを目的に、飼育環境の条件に差を与えたグループを用意し、個体の発達（発生段階と体サイズ）および社会的選好性（群れる際のルール）の差を比較した。特に、血縁者識別とサイズ識別の関わりに注目し、分子生態学的手法も積極的に取り入れながら、認知科学も射程に入れた行動生態学の枠を超えた研究を展開した。本研究により、種内関係の変化が集団生活の維持に及ぼす影響の一般理解を目指した。

3. 研究の方法

材料はヤマアカガエル (*Rana ornativentris*)、ニホンヒキガエル (*Bufo japonicus*)、そしてミヤコヒキガエル (*Bufo gargarizans miyakonis*) の3種とした。最初に、各動物種の繁殖行動ならび幼生の行動についてフィールドワークによる調査を行い、次に飼育実験ならびに行動実験（社会的選好性の定量化）を行った。本研究で採用した行動実験は選択テスト (Binary choice test) で、解析にはフリーソフト (UMAtTracker) を使用した。また、必要に応じて分子生態学的手法による遺伝的背景の検証を行った。調べた遺伝子座は系統解析のための mtDNA (CytB 領域)、中立マーカーとして SNP (一塩基多型) とマイクロサテライト領域、そして免疫遺伝子 (主要組織適合性複合体 (MHC) クラス II 遺伝子) のハプロタイプの4種類で、遺伝子型を決定後、飼育実験の結果と合わせて解析に用いた。

4. 研究成果

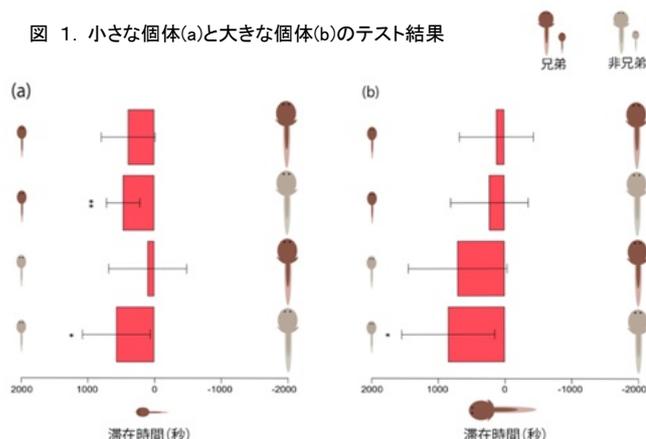
本研究課題を通し、両生類の幼生における社会性について、ヤマアカガエル (*Rana ornativentris*) の社会性に関する2つの発見(1)(2)、都市部のニホンヒキガエル (*Bufo japonicus*) の集団生活における環境リスクの報告(3)、そしてミヤコヒキガエル (*Bufo gargarizans miyakonis*) における数量認識能と発達が群泳に及ぼす影響(4)、という4つのテーマにおいて重要な知見を得ることができた。以下に各項目の詳細を示す：

(1) 幼生がサイズと血縁関係、双方を認識している証拠の発見

ヒトを含め多くの動物が群れを作って生活している。群れることによって、捕食者に襲われる危険性を減少できるなどの利益が生じるが、その一方で、群れが大きくなると餌などの限られた資源をめぐって、個体間に競争が起きる。個体の発達に差があれば、群れている利益とコストにも

違いが生まれることが予想される。小さな個体は群れることで捕食者から逃れる利益があるが、群れた結果、餌の奪い合いなどの競争が血縁者間で起こるのは好ましくないだろう。大きな個体は、血縁関係にある小さな個体との競争を避けるために、血縁関係にない小さな個体と群れることを好むかもしれない。つまり、オタマジャクシの発達段階により「群れの方のルール」は変わることが予測される。この仮説を検証するため、総研大 (神奈川県葉山町) 周辺に生息するヤマアカガエルの6つの卵塊を収集し、温度条件を調整

図 1. 小さな個体(a)と大きな個体(b)のテスト結果



することで発達段階の異なる2つのグループ（冷温に置いて発生を遅らせた小さな個体グループと、常温で通常時期に発生させた大きな個体グループ）を用意した。この二つのグループを用いて、選好性を調べる選択テストを行った。選択テストでは、水槽を三つに区切り中心部に観察対象である試験個体（大きな個体、または小さな個体）を入れ、水槽の左右に二匹の刺激個体を配置し、どちら側に長く滞在するかトラッキングソフトにより計測した。刺激個体の組み合わせ、サイズと血縁関係（同じ卵塊由来か否か）から四パターンある。選択テストは小さな個体グループで全106テスト、大きな個体グループで全86テストを実施した。実験の結果、大小どちらの試験個体も、小さな刺激個体を選ぶ時間の方が長く、大きな刺激個体を避ける傾向があることがわかった（図1）。また、血縁関係を考慮すると、大きな試験個体と小さな試験個体の間で、違いがあった。小さな試験個体では相手との血縁関係に関係なく大きな刺激個体よりも、小さな刺激個体を好みました（図1a）。一方、刺激個体が両方、非血縁である場合、大きな個体は、大きな刺激個体よりも小さな刺激個体を好んだ（図3b, 最下部）。このような結果は、小さな刺激個体が血縁個体である場合にはみられなかった（図1右, 上から二つ目）。このことから、大きな個体は、血縁関係にある小さな個体と群れる傾向を持たないことが言える。本研究により、ヤマアカガエルのオタマジャクシは相手のサイズと同時に血縁関係も考慮できることと、発達に伴って社会的選好性（群れる相手の好み）が変化することが分かった。小さなオタマジャクシ同士が群れることは捕食者から身を守ることができるという利益に繋がると考えられます。一方、大きなオタマジャクシが小さな血縁者への選好性を持たないという性質は、血縁者間での餌をめぐる競争を減らす効果があると考えられる。

(2) 学習による血縁者識別の可塑性の確認

総研大（神奈川県葉山町）周辺に生息するヤマアカガエルの5つの卵塊を収集し、これらの卵塊を用いて、1つの卵塊から孵化した幼生だけで構成された「兄弟だけの育ち」の水槽と、半数は別の卵塊由来の幼生の「非兄弟と混ざった育ち」の水槽を作り、さらにそれぞれの水槽の水温を調整し発達段階の異なる小さな幼生（発達初期の体長平均 $30.8 \pm 0.33\text{mm}$ の個体）と大きな幼生（発達後期の体長平均 $53.9 \pm 0.56\text{mm}$ の個体）のグループを用意した。この4グループの幼生個体を用いて、選好性を調べる選択テストを行った。テストは、刺激個体にサイズ差がない組み合わせ2つ（小さな兄弟/非兄弟のどちらを好むか、大きな兄弟/非兄弟とどちらを好むか）と、刺激個体のサイズ差がある組み合わせ1つ（小さな非兄弟/大きな非兄弟のどちらを好むか）という計3パターンについて、大きな幼生と小さな幼生の両グループを試験個体として行った。具体的には、水槽のポリエチレンネットで区切った両端の区画に刺激個体を配置し、中央に試験個体を入れて、どちら側に長く滞在するのかわかるかを、試験個体の動きを80分間撮影し、トラッキングソフトを使って解析した。刺激個体の組み合わせで3パターンのテストを、大小それぞれの幼生グループで、「兄弟だけの育ち」から115個体、「非兄弟と混ざった育ち」から132個体から取得された位置データを用いて、どちらの刺激個体を選ぶ時間の方が長いのか（選好性）算出した。

結果、両側の刺激個体のサイズに差がないときに統計的に有意な血縁者への選好性が検出されたのは、「非兄弟と混ざった育ち」の小さな幼生グループが試験個体で、刺激個体として小さな兄弟と非兄弟と比較したテストのみだった（図2）。小さな幼生グループでも、大きな兄弟/非兄弟に対しては、育ちに関わらず好みの傾向は見られなかった。大きな幼生グループで

図2. 小さな刺激個体に対する選択テストの結果

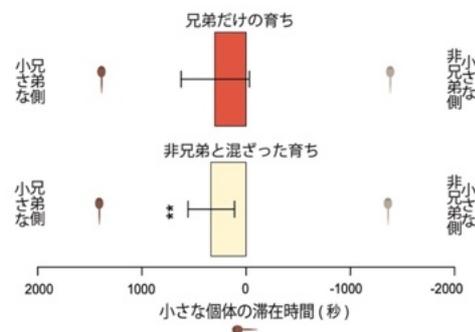
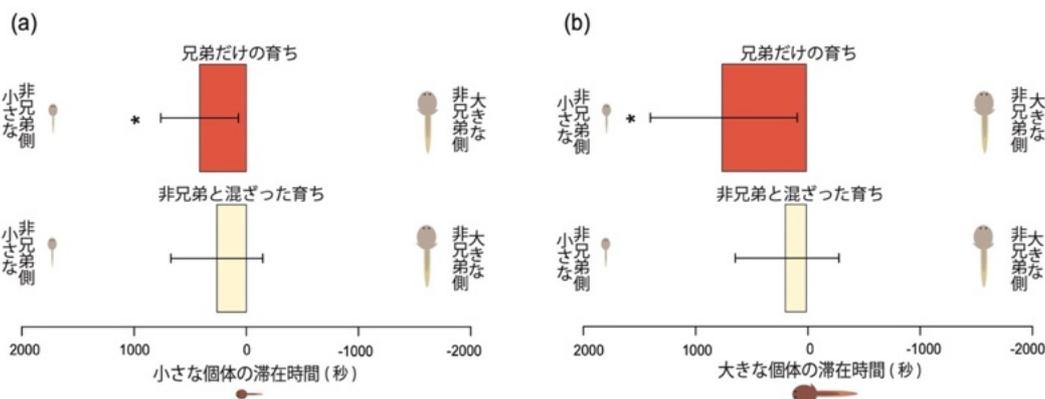


図3. 小さな非兄弟と大きな非兄弟での選択テストの結果



は、小さな兄弟/非兄弟、大きな兄弟/非兄弟、どちらについても好みの傾向は観察されなかった。これらの結果から、ヤマアカガエルのオタマジャクシでは、非兄弟と兄弟の両方の「匂い」を経験・学習したとき、かつ発達段階が初期の小さな個体へのみ、血縁者識別が見られることがわかった。血縁者識別をする近縁種を対象に血縁認識能を調べたこれまでの研究では、全ての研究において、オタマジャクシが兄弟だけで育ったときに血縁者への選好性がみられた。しかし本研究では予測に反して、ヤマアカガエルでは、兄弟だけで育ったときではなく、非兄弟と混ざって育ったときのみ、血縁者への選好性が確認された。このことは、学習過程において、非血縁者の存在が血縁認識を強めた可能性を示唆する。このような例は珍しく、両生類では初めての発見である。また、小さな非兄弟と大きな非兄弟のどちらを好むかについて調べた結果では、大小どちらの幼生グループについても、「兄弟だけの育ち」では小さな非兄弟を好む傾向が見られ、「非兄弟と混ざった育ち」ではこの傾向が見られなかった(図3)。この結果より、では、「知っている匂い」の同種他個体に対しても血縁者同様に警戒を解いており、学習効果が種内競争の調整に役立っていると考えられる。

(3) ニホンヒキガエル (*Bufo japonicus*) の集団生活における水環境のリスク

現在、世界規模で両生類の減少が進んでおり、病原菌の蔓延が事態をさらに深刻化している。このため、両生類の微生物叢と病原菌の相互作用の研究が盛んに行われるようになった。水環境で成長する両生類の幼生にとって、水質や環境微生物の組成は重要であろう。都市の池は、地方の池と変わらない生物多様性を保持しており、パブリックヘルスの点においても重要視されている。本研究では、東京のヒキガエル(東京大学駒場キャンパスの集団)を対象に、水環境が幼生の成長(発達速度と生存率)に与える影響を、3つの集団サイズについて飼育実験を行って比較し検証した。幼生の飼育水として、池の水(一二郎池, 図4a)と水道水を用いた。双方の水は水質検査を行い、池の水の微生物相を調べるため、16S-rRNA gene targeted amplicon sequencing を行った(図4b)。2021年2月に一二郎池で採取した *Bufo japonicus* の卵塊(観察されたのは1つのみ)から孵化した幼生を、水道水と池の水を使用して、集団サイズ N=1(12 コンテナ), N=2(6 コンテナ), N=15(4 コンテナ)に分け、水道水グループと池の水グループを50日間同18°Cで飼育し、幼生の成長を毎日モニタリングし、死亡と発生ステージ(前肢の出現, 後肢の出現, 変態完了(幼ガエル))までの日数と幼ガエルの体重および体長を記録した。また、遺伝子型の違いによる幼生の

図4. 一二郎池(a)とその微生物相(b)

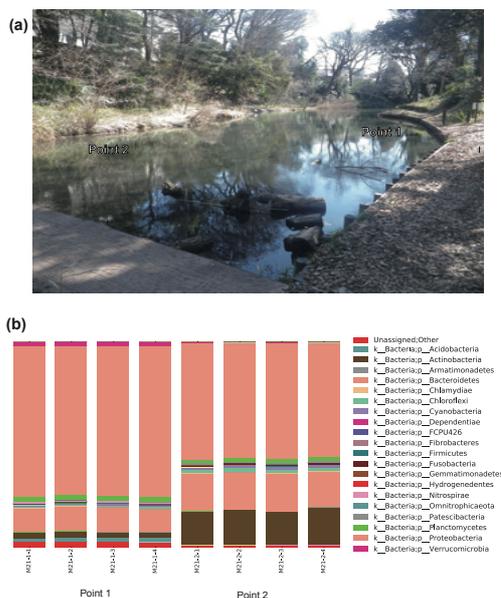
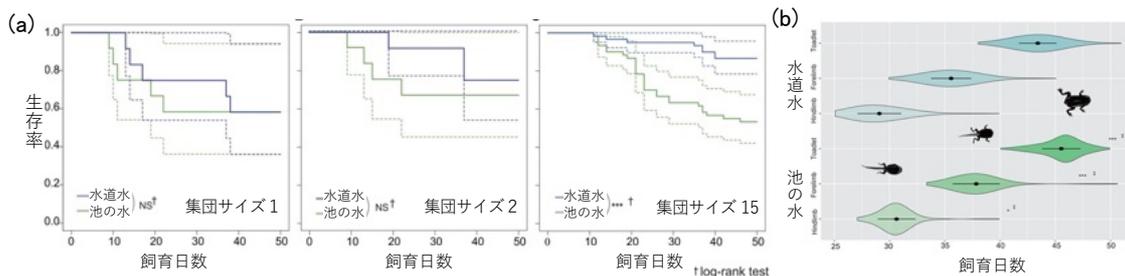


図5. 集団ごとの幼生の生存分析の結果(Kaplan-Meier Curve)(a)と、発達にかかった日数(b)

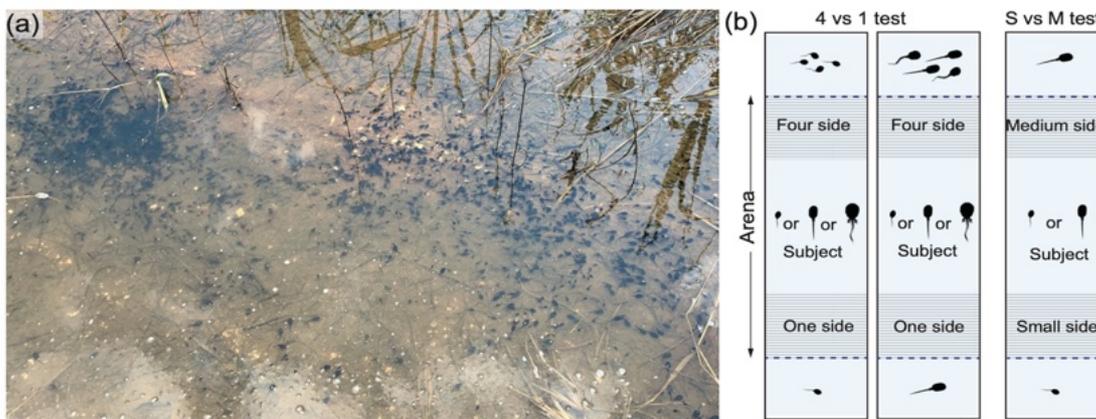


成長への影響を調べるため、MHCクラスII 遺伝子(190bp)とマイクロサテライト遺伝子(4座)の多型解析を行い、生存個体と死亡個体間で比較を行った。結果、幼生の生存率は全ての集団サイズで水道水の方が高く、集団サイズ15の時に池の水と水道水のグループで有意な差があった(図5a)。幼生の成長への遺伝子型による影響(allelic pattern)はどちらの水グループにも見られず、幼ガエルの体重および体長にも差はなかった。また、興味深い事に、池の水で育った幼生は、水道水グループに比べ、発生に日数がかかった(前肢の出現+1.5日, 後肢の出現+2.2日, 変態完了+2.2日, 図5b)。池の水からは Proteobacteria を含む21種の微生物が検出されているが、幼生の死亡要因については特定できなかった。水質検査では池の水では水道水より3倍高いBODが検出されており、酸素濃度は幼生の発生速度に影響したと考えられる。

(4) 群泳ルールにおける数量認識能と発達（サイズ）の影響

沖縄県南大東諸島に人為移入されたミヤコヒキガエル (*Bufo gargarizans miyakonis*) を研究対象とし (図 6a), 島内の繁殖池で群泳する幼生を必要最低限の個体数サンプリングし, Grouping する際のルールについて, 数量認識とサイズ認識について, 発達段階の異なる 3 グループの幼生を用いて行動実験による検証を行った. 行動実験は 2 種類の選択テスト-群泳選好 (Schooling preference) を測る「4 vs 1 テスト」及びサイズ識別 (Size preference) を測る「S vs M テスト」を実施した (図 6b). ポリプロピレン製水槽 (サイズ: 260×90mm、深さ 45mm、刺激域: 45×90mm、深さ 45mm) に水温 24°C の水道水 0.6L を入れ, ポリエチレンネットで仕切られた刺激域を

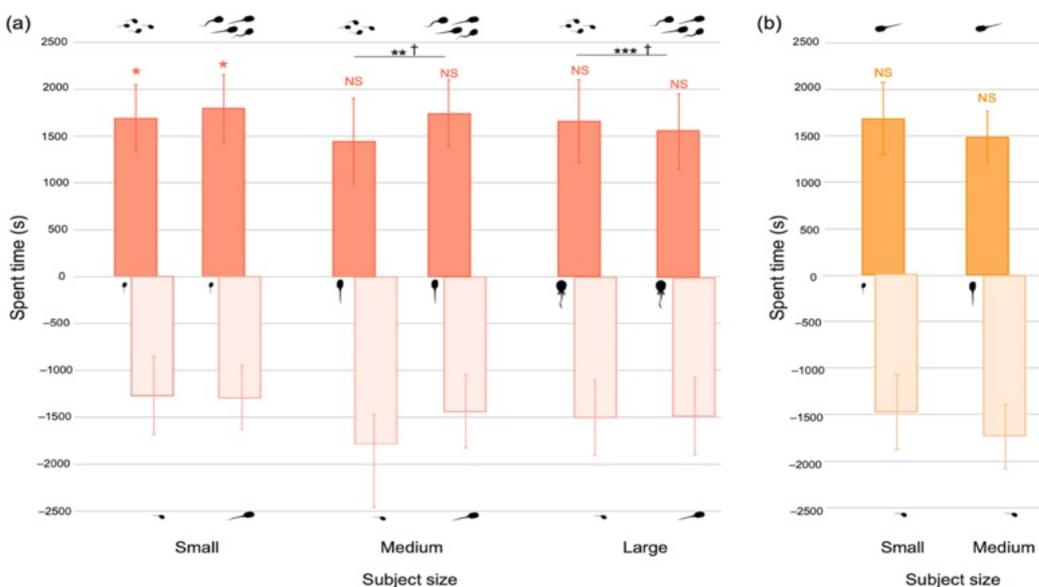
図 6. ミヤコヒキガエルの幼生の群れ(a)と実験の概略図(b)



除いた面積を実験アリーナとする. 試験個体をアリーナ中央に静かに入れ 35 分間ビデオ撮影し, 上下の刺激個体を入れ替え再度撮影した. データ解析は (1) および (2) と同様に行った. 幼生のグループは Small (発達初期, 体長 [mean±SD] =15.54±1.70 mm), Medium (発達中機, 体長 =28.60±2.71mm), Large (発達後期, 体長=36.45±1.47mm) の 3 段階を用意し, 合計 80 個体について選択テストを行った.

4 vs 1 テストの結果, **Small グループのみ数量の大きい方 (1 より 4) を優位に選好した** (図 7a). この傾向は刺激個体の発達段階に影響されなかった. 他方, S vs M テストでは, 発達段階に関わらず傾向が認められなかった (図 7b). 統計解析の結果から, グループサイズに対する選好性 (1 より 4 を好む時間) は, 刺激個体の発達段階 (GLMM: $p < 0.001$) および刺激個体と試験個体の発達段階 (サイズ) の交互作用の影響を受けることも分かった (GLMM: $p < 0.001$). ただし, S vs M テストでは有意な選好性が認められなかったことからわかるように, *B. g. miyakonis* はグループサイズに偏りのない時は刺激個体の発達段階を識別しない (size discrimination がない). 本研究により, *B. g. miyakonis* には**数量を認識する能力があり, grouping の際にその能力を発揮している**ことが分かった. 同時に, **発達が進むと数量を識別する能力を発揮しなくなる (ontogenetic shift)** ことも分かった.

図 7. 「4 vs 1 テスト」の結果(a)と「S vs M テスト」の結果(b)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 2件）

1. 著者名 Kazuko Hase	4. 巻 2023June
2. 論文標題 Grouping rule in tadpole: is the numerical quantity or size-assortative more critical?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Research Square Platform LLC (preprint)	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21203/rs.3.rs-2993044/v1	査読の有無 無
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 長谷和子	4. 巻 1
2. 論文標題 南・北大東島で観察されたミヤコヒキガエル繁殖個体の体長差	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 爬虫両生類学会報	6. 最初と最後の頁 43-47
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 -
1. 著者名 長谷和子, 高柳真世, 橋本浩史, 小川裕子, 古橋保志	4. 巻 2
2. 論文標題 東京都におけるニホンヒキガエルの移入とカエル合戦の現状について	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 爬虫両生類学会報	6. 最初と最後の頁 215-223
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 -
1. 著者名 Kazuko Hase, Nobuuki Kutsukake	4. 巻 25
2. 論文標題 Plasticity for the kin and conspecific preferences in the frog tadpoles (<i>Rana ornativentris</i>)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Animal Cognition	6. 最初と最後の頁 1653-1664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10071-022-01661-1	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kazuko Hase	4. 巻 1
2. 論文標題 Microflora influence: The aquatic environment changes grouping risk and development speed of toad tadpoles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fevo.2022.917067	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 Kazuko Hase, Nobuuki Kutsukake	4. 巻 154
2. 論文標題 Developmental effects on behavioural response for social preferences in frog tadpoles, <i>Rana ornativentris</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Animal Behaviour	6. 最初と最後の頁 7-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anbehav.2019.06.001	査読の有無 有
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9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 長谷和子
2. 発表標題 生物集団と社会性
3. 学会等名 中島義道主催・哲学塾カント (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷和子*, 高柳真世, 橋本浩史, 小川裕子, 古橋保志
2. 発表標題 東京ヒキガエルの繁殖状況: 西日本亜種の侵入と局所個体群絶滅の危機
3. 学会等名 第70回日本生態学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 嶋田正和, 辻和希, 河田雅圭, 長谷和子, 松浦健二
2. 発表標題 自由集会W11: 「種の保存のための進化」の誤解をどう正すか?: 検定教科書、教養書、学会、SNS
3. 学会等名 第70回日本生態学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長谷和子
2. 発表標題 Effects of microflora of water and population size on larval survival and developmental speed
3. 学会等名 第37回個体群生態学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷和子
2. 発表標題 社会性と集団多型: オタマジャクシの血縁者識別に及ぼす環境と学習の影響
3. 学会等名 第69回日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 kazuko Hase, Nobuyuki Kutsukake
2. 発表標題 Knowing kin and non-kin: self-referent phenotype matching and conspecific preference in frog tadpole
3. 学会等名 第68回日本生態学会大会オンライン大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷和子, 野村康之, 永野惇, 寺井洋平
2. 発表標題 RAD-Seq を用いたヤマアカガエル (<i>Rana ornativentris</i>) の SNP 検出と遺伝構造の解析
3. 学会等名 第 21 回日本進化学会北海道大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷和子
2. 発表標題 血縁認識をめぐる問題
3. 学会等名 第13回生物学基礎論研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuko Hase
2. 発表標題 A report for the ontogeny of schooling behavior in homo- and heterogeneous tadpole groups
3. 学会等名 SWARM2019, Okinawa, Japan (Poster) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 長谷和子 (分担執筆, AZ Relief 伊部朝香編)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 緑書房	5. 総ページ数 152
3. 書名 はっけん! オタマジャクシ	

〔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
---------	---------