

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570115

研究課題名(和文)ヘビ類における頸背腺の進化：形態・行動・生理からの統合的アプローチ

研究課題名(英文)Evolution of the nuchal glands in snakes: Synthesis from morphology, ethology and physiology

研究代表者

森 哲 (Mori, Akira)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80271005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：頸背腺は15種のヘビ類のみが持つ特殊な防御器官である。そのうちの1種であるヤマカガシは、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、頸背腺を持つ種と近縁種の系統関係を明らかにし、頸背腺に依存した防御システムに関連する一連の形態的、生理的、行動的、生態的形質がどのように進化してきたのかを推定した。さらに、頸背腺の進化的喪失が2度に渡って独立に生じたことを明らかにし、その進化的要因についての新たな仮説を提唱した。

研究成果の概要(英文)：Nucho-dorsal glands are unique organs that have been reported in only 15 species of snakes. *Rhabdophis tigrinus*, one of the species that have the glands, 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.

I clarified phylogenetic relationships among species that have the nucho-dorsal glands and related species, and inferred the evolutionary process of the defensive system depending on the glands, which involves a suite of correlated features of morphology, physiology, behavior, and ecology. In addition, the obtained phylogenetic tree suggested that the evolutionary loss of the glands have independently occurred twice, for which I proposed a hypothesis of the evolutionary factors that have caused the loss of the glands.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 生物多様性&#8226;分類

キーワード：進化 行動学 爬虫類学 防御行動

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など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。後者の例としては、幼虫世代に食べた植物から有毒成分を取り込むチョウ類や、内臓に猛毒を持っているフグ類などが有名である。これらの例では、餌から取り込んだ毒成分は通常、体内の既存の臓器や筋肉中などに蓄積される。

近年、我々は日本に生息するナミヘビ科のヤマカガシが、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）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。ヤマカガシは口腔内の通常の毒腺とは独立に、頸部背面に「頸腺」と呼ばれる特殊な器官を持ち、ヒキガエルから取り入れた毒成分はここに蓄えられる。さらに、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。したがって、ヤマカガシは、脊椎動物の中でも非常に特異的な頸腺という器官を進化させることによって、形態的、行動的、および、化学的形質を総合した防御システムを持つに至ったと考えられる。しかしながら、この特異的な器官や、一連の関連する形質がどのような過程を経て進化してきたのかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

頸腺は 1935 年に日本産のヤマカガシにおいて初めて報告されたもので、3 年後、近縁の 9 種でも類似の器官が確認され、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、頸背腺は現在でも、全世界に生息する約 3000 種のヘビ類の中で、アジアに分布するユウダ亜科の 3 属(ヤマカガシ属 *Rhabdophis*、ハブモドキ属 *Macropisthodon*、ハナカガシ属 *Balanophis*) に含まれる 15 種のみで確認されているにすぎない。また、ヤマカガシ属とハブモドキ属には頸背腺を持たないとされる種も報告されている。本研究では、DNA による分子系統学的分析を行なうことにより、これらの種間の系統関係を明らかにし、頸背腺の起源と進化を論ずるための基礎資料をまず作成する。

次に、頸背腺に関連した形態的、生理的、行動的形質の有無や程度を上記の 3 属の種（頸背腺を持つ種と持たない種を含む）で明らかにする。具体的には、頸背腺の相対的サイズ（頸部のみに位置するか、頸部から胴体後部にかけて存在するか）、頸背腺の組織学的形状、頸背腺成分の化学的組成、ヒキガエル食への依存度と嗜好性、ヒキガエル毒成分の体内への蓄積と再利用の有無、および、頸背腺に依存した防御行動の有無と程度を解明、定量化する。これらの形質を系統樹上に

載せることによって、ヒキガエル毒に依存した防御システムがどのような過程を経て進化してきたのか、それは一度のみか、それとも複数回生じたのか、頸背腺を持たない種は二次的に失ったのか、もしそうなら、どのような生態的要因が原因で消失し、関連する行動や生理的特性はどのように保持または消失しているのかを明らかにする。

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の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ィーを用いて化学分析を行い、プファジエノライドの有無を確認した。

4. 研究成果

系統樹の作成においては、マレーシア、ベトナム、中国、台湾、および、スリランカを訪問し、合計 11 種の関係種ならびに約 10 種の近縁種のサンプルを入手した。これらと既存のデータを合わせ、アジア産ユウダ亜科の分子系統樹を推定した。この結果、ヤマカガシ属は単系統性を示し、また、ハナカガシ属はヤマカガシ属に最も近縁となった。ハブモドキ属に関しては、頸背腺を持たない 1 種しか入手できなかったが、本種の系統的位置は、ヤマカガシ属やハナカガシ属とは大きく離れることがわかった。ハブモドキ属には本種以外に頸背腺を持つ 3 種が存在するので、今後これらの DNA サンプルを入手して、ハブモドキ属全体の系統学的位置づけを解明することが必要である。

得られた系統樹に基づいて、ヤマカガシ属での頸背腺を持つ種と持たない種との関係を見ると、頸腺の喪失が2回生じていることが最節約法により推定された(図1)。すなわち、台湾固有のスウィンホニーヤマカガシ(*Rhabdophis swinhonis*)と東南アジアに分布するハラブチャヤマカガシ(*R. chrysargos*)においては、もともと持っていた頸腺が進化の段階で失われたと推察される。

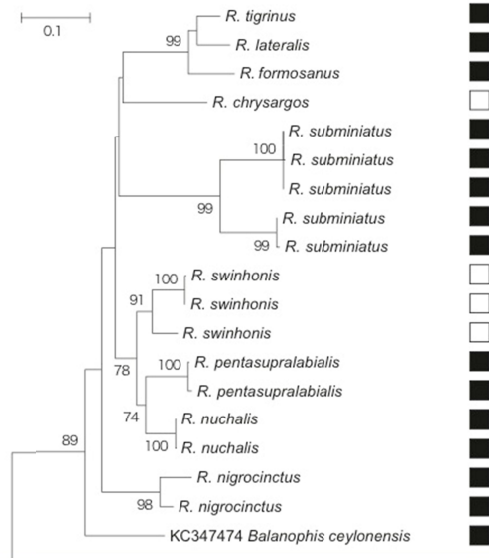


図1. 頸背腺を持つ2属の系統関係。黒は頸背腺を持つ種を、白は持たない種を示す

一方、頸部だけでなく胴体背面全体に腺構造を持つ種は、ヤマカガシ属のミゾクビヤマカガシのグループ(*R. nuchalis* group)とハブモドキ属のハイロハブモドキ(*Macropisthodon plumbicolor*)で報告されていた。今回の系統樹に基づく、ミゾクビヤマカガシのグループ(*R. nuchalis* および *R. pentasupralabialis*)は、頸部にだけ腺構造を持つ種から新たに進化してきたことが推察された。ハイロハブモドキに関してはDNAサンプルが未入手であるが、ヤマカガシ属とは系統的に離れていることが予測され、胴体全体への腺構造の延長という進化は、ヤマカガシ属とハブモドキ属で独立に2度生じた可能性が高い。実際、ミゾクビヤマカガシとハイロハブモドキの頸背腺の形状や位置などを解剖により詳細に確認したところ、両者の間ではそのサイズや数、皮下での相対的な位置などが明瞭に異なることが明らかになった(図2および図3)。したがって、頸腺から頸背腺への進化は、何らかの生態的要因によって独立に2系統で生じたと推察される。

ヤマカガシ属およびハナカガシ属以外のユウダ亜科では、頸腺に関連した特異的な防御ディスプレイである「首曲げ」や「首打ちつけ」などはまったく観察されなかった。また、ハブモドキ属においても、頸腺を持たないハブモドキ(*Macropisthodon rudis*)はこ

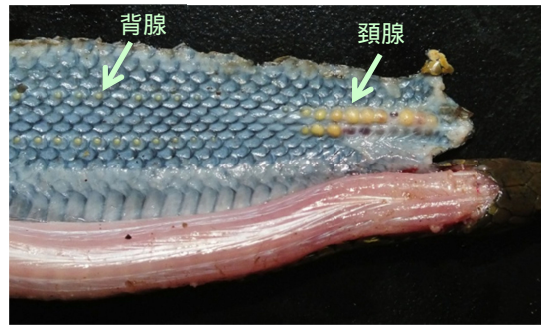


図2. ミゾクビヤマカガシ(*Rhabdophis nuchalis*)の頸腺と背腺

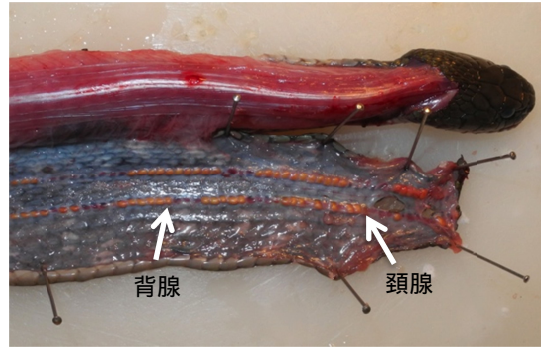


図3. ハイロハブモドキ(*Macropisthodon plumbicolor*)の頸腺と背腺

れらの防御ディスプレイは示さなかった。しかしながら、本種のヒキガエルに対する嗜好性は非常に高いことが実験的に示され、頸腺とそれに付随した防御ディスプレイが進化する前にヒキガエル食への進化が生じていたことがうかがわれた。

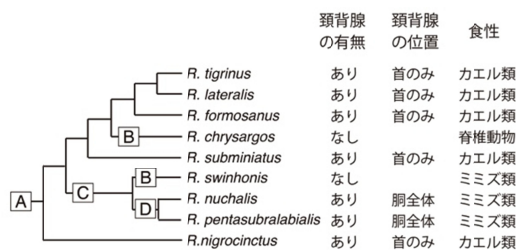
頸背腺を持つ種の食性に関しては、定量的な分析に基づく資料は日本産のヤマカガシ以外はほとんどないが、主にカエル食であり、ヒキガエルを食べる種も多いとされている。しかしながら、頸背腺を消失したと考えられるスウィンホニーヤマカガシとハラブチャヤマカガシは、文献上の情報によると、前者はミズ食、後者は脊椎動物一般を広く食べるとされている。このカエル食から他の動物食への変化が、頸背腺の喪失の原因となっているかどうかを追求することは、非常に興味深い研究課題である。

さらに、スウィンホニーヤマカガシについては、今回の研究の過程において、頸腺を持つ個体が一部存在することが明らかになってきた。それらの頸腺分泌物の化学分析はまだ完了していないが、これらの個体は頸腺に何らかの毒を持っている可能性が高い。実際、今回得られた分子系統樹(図1)は、スウィンホニーヤマカガシが2つの系統に分かれることを示唆しており、頸腺を喪失する前後の形質を比較するのに最適な対象となるかもしれない。すなわち、これらの2系統のスウィンホニーヤマカガシの食性、防御行動、ヒキガエル毒への生理的耐性、および、頸部背面皮下の微細構造などを詳細に比較する

ことにより、頸腺の進化的喪失における関連形質の変化の過程を解明することが可能かもしれない。

一方、胴体全体へ伸長した頸背腺を持つミゾクビヤマカガシのグループにおいても食性の違いが見られる。すなわち、カエルやヒキガエルは食べず、主にミミズ食とされている。本グループの2種 (*R. nuchalis* および *R. pentasupralabialis*) からは頸背腺の分泌液を採取済みであり、現在化学分析を執行中である。現段階での知見では、ミミズがヒキガエルの毒成分であるプファジエノライドを持つという事実は無く、仮にミゾクビヤマカガシのグループがミミズから何らかの毒を取り込んで再利用しているとすれば、これまで報告されていないまったく新しい化学物質である可能性も高い。

以上をまとめると、頸背腺の進化に関して以下のような仮説が提唱できる(図4)。まず、



A: 頸腺の起源 B: 頸腺の喪失
C: ミミズ食への変化 D: 頸背腺の進化

図4. 現段階におけるヤマカガシ属 (*Rhabdophis*) の系統関係、および、頸背腺に関連する形質の進化の推定

ヒキガエル毒の再利用による頸背腺に依存した防御システムの進化に先立って、ヒキガエル毒への生理的耐性を伴うヒキガエル食への適応が生じた。次に、頸部の背面に頸腺が進化するとともに、これを効果的に利用するための防御ディスプレイが進化した。食性がカエル食からミミズ食などに変化するのに合わせて、一方では頸腺の喪失が起こり、他方では、胴体背面全体への伸長である頸背腺が進化した。後者においては、ヒキガエル毒に変わって、ミミズ毒を再利用する生理的メカニズムが進化した。今後、これらの仮説を検証していくためには、さらなる種数の追加による比較研究や詳細な化学成分分析などが必要である。また、頸腺の進化発生学的な視点からの研究も期待される。実際、頸腺は陸上脊椎動物の中で唯一中胚葉起源の皮膚腺として知られるが、その進化発生学的起源はまったくの謎である。頸腺の進化過程の探求は、新規な器官が進化する発生遺伝学的メカニズムを解明する一助となると考えられる。

本研究の成果は、統合システムとしての防御器官がどのような過程を経て進化するかを示す興味深い事例を提示するものである。さらに、本研究は、一旦確立した防御システ

ムが喪失するときに、それに付随する生理的、生態的、行動的特性がどのように維持または消失していくのかを追求していくための理想的な研究対象を提供する。本研究で得られた成果は、餌毒の再利用による化学的防御システムの進化過程を理解していく上での、新たな視点の発想や展開につながるものと期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Kojima, Y. and A. Mori. 2014. Home range and movements of *Rhabdophis tigrinus* in a mountain habitat of Kyoto, Japan. *Current Herpetology* 33(1): 8-20. DOI 10.5358/hsj.33.8 査読有

Hutchinson, D. A., A. H. Savitzky, G. M. Burghardt, C. Nguyen, J. Meinwald, F. C. Schroeder, and A. Mori. 2013. Chemical defense of an Asian snake reflects local availability of toxic prey and hatchling diet. *Journal of Zoology*. 289(4): 270-278. DOI 10.1111/jzo.12004 査読有

Hutchinson, D. A., A. H. Savitzky, A. Mori, G. M. Burghardt, J. Meinwald, and F. C. Schroeder. 2012. Chemical investigations of defensive steroid sequestration by the Asian snake *Rhabdophis tigrinus*. *Chemoecology* 22: 199-206. DOI 10.1007/s00049-011-0078-2 査読有

Mori, A., G. M. Burghardt, A. H. Savitzky, K. A. Roberts, D. A. Hutchinson, and R. C. Goris. 2012. Nuchal glands: A novel defensive system in snakes. *Chemoecology* 22: 187-198. DOI 10.1007/s00049-011-0086-2 査読有

Savitzky, A. H., A. Mori, D. A. Hutchinson, R. A. Saporito, G. M. Burghardt, H. B. Lillywhite, and J. Meinwald. 2012. Sequestered defensive toxins in tetrapod vertebrates: principles, patterns, and prospects for future studies. *Chemoecology* 22: 141-158. DOI 10.1007/s00049-012-0112-z 査読有

Takeuchi, H. and A. Mori. 2012. Antipredator displays and prey chemical preference of an Asian natricine snake, *Macropisthodon rudis* (Squamata: Colubridae). *Current Herpetology* 31(1): 47-53. DOI 10.5358/hsj.31.47 査読有

[学会発表](計15件)

Takeuchi, H. and A. Mori. Evolution of the nuchal glands and their related behaviors based on a molecular phylogeny of the Asian natricine snakes (Serpentes: Colubridae). International Symposium for Biodiversity and Evolution Project of Excellent Graduate Schools. 2013年12月13日. 京都大学理学研究科. 京都市

森哲、ゴードン・バーグハート. ヤマカガシの防御行動はヒキガエル食の影響を受けるか? 日本爬虫両棲類学会第52回大会. 2013年11月2日. 東海大学札幌キャンパス. 札幌市

Takeuchi H. and A. Mori. Evolution of nuchal glands based on molecular phylogenetic approach. The 6th Snake Ecology Group Meeting. 2013年6月22日. やんばる学びの森. 沖縄県国頭村

Mori, A. Evolutionary relationships between snakes and amphibians: A snake utilizing toads not only for food but also for defense. The 5th Asian Herpetological Conference. 2012年6月2日. Eighteen Steps Island Hotel. 成都, 中国

Kojima, Y. and A. Mori. Do female Japanese water snakes forage for toads to protect their offspring with toxins? Joint Meeting of the Animal Behavior Society and the International Ethological Conference. 2011年7月28日. インディアナ大学. ブルーミントン. アメリカ

Kojima, Y. and A. Mori. Seasonal change and sexual difference in habitat use of a Japanese snake *Rhabdophis tigrinus*: Does the necessity for toxins lead females to the forest? Joint Meeting of the Ichthyologists and Herpetologists. 2011年7月9日. ヒルトンミネアポリスホテル. ミネアポリス. アメリカ

森哲. ヘビが持つ第2の毒器官の機能: ヤマカガシによるヒキガエル毒の再利用 日本動物学会近畿支部発表会. 2011年4月25日. 京都大学理学研究科. 京都市.

[図書](計1件)

阿形清和・森哲. (監修・分担執筆) 2012. 生き物たちのつづれ織り: 多様性と普遍性が彩る生物模様(上・下). 京都大学学術出版会. 237pp. & 234pp. 京都

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

(2) 研究分担者

鳥羽 通久 (Michihisa Toriba)
日本蛇族学術研究所
研究者番号: 40109856

(3) 研究協力者

竹内 寛彦 (Hirohiko Takeuchi)
京都大学・大学院理学研究科・ポスドク

児島 庸介 (Yosuke Kojima)
京都大学・大学院理学研究科・ポスドク

(4) 海外研究協力者

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・ラジャラタ大学・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