

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：23201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26660096

研究課題名(和文) ツチガエルで臨む変温動物化学防御機構の完全証明

研究課題名(英文) Chemical studies on the antifeedants in the skin secretion of the ranid frog
Grandilana rugosa against predatory snakes

研究代表者

奥 直也 (Oku, Naoya)

富山県立大学・工学部・講師

研究者番号：90525388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：両生類や爬虫類は、体表の分泌腺から悪臭や毒を出して捕食者から身を守ると考えられているが、実験的に証明されていない。そこで苦味と悪臭でヘビからの捕食を防ぐと考えられるツチガエルを材料に、ヘビ捕食作用の物質的実体と考えられる苦味物質と悪臭物質の同定に取り組んだ。カエルへの影響を極力抑えた非侵襲的な体表分泌物の採取法及び新臭気捕集法“ドライヘッドスペース法”を開発し、苦味物質として rugosamarin A と命名したペプチドを、また悪臭を構成する成分の一部としてイオノン誘導体と2種のアルデヒドを同定した。

研究成果の概要(英文)：Many reptiles and amphibians secrete odor and/or toxins from their skins. These secretions have been believed to repel predators, although no experimental verification has been made. A ranid *Grandilana rugosa* is known to emit nuisance odor and bitter sweat when threatened. Moreover, the skin secretion evoked regurgitation in predator snakes when applied to the surface of prey frogs. To give a chemical verification to the odor and taste of skin secretion, responsible substances were pursued. A non-lethal procedure to collect skin secretion, as well as an efficient volatile-capturing technique named "dry headspace sampling", was established for the conservation of this endangered species. The collected skin secretion was fractionated by a sequence of chromatography guided by tasting, which resulted in the isolation of a 24-residue peptide named rugosamarin A. A GC-MS analysis of the skin volatiles identified three odorants, which partly reproduced the characteristic odor of this animal.

研究分野：天然物化学

キーワード：ツチガエル 苦味 ヘビ忌避 悪臭 ペプチド 呈味性

1. 研究開始当初の背景

両生類や爬虫類は、顆粒腺、耳下腺、頸線、排出腔腺、腋腺、鼠径腺などの分泌腺を持ち、ここから悪臭や毒を出して身を守るとされる。両生類からは神経毒アルカロイド、粘膜刺激性ペプチドが多数同定されており、ヤマカガシ頸線からも餌のヒキガエル由来強心配糖体やペプチドが同定されている。しかし、悪臭の正体を突き止めた研究は、ミシシッピニオイガメ(*Sternotherus odoratus*)の警戒臭が一連のフェニル脂肪酸であることを示した一例に止まる。彼らの多くが危険を察知すると毒腺を捕食者に提示する特有の“警戒ポーズ”を取ることで、有毒種の移入により捕食者の個体密度が減った例があることから、一般に変温動物は化学防御による捕食阻害機構を備えていると認識されている。しかし、それらの毒・悪臭が本当にそのように機能しているかは、驚くべきことに未だ実験的に証明されていない。

ツチガエル(*Grandirana rugosa*, 図1)は対馬および南西諸島を除く日本全土と中国・韓国に分布するアカガエル科の一種である。イボだらけの悪臭を発するカエルとして知られているが、他のカエルと異なりヘビに捕食されない。近年、ツチガエルの体表分泌物をヘビの餌であるニホンアカガエルに塗付すると、その個体はシマヘビの捕食を免れることが示された。更に重要なことに、ツチガエルが無毒であることをヘビへの強制食与で確認した後、実験者自らが口に含んで舌で転がすと、青臭い特異臭と共に苦味を感じたという。



図1 ツチガエル

この実験結果は(1) 体表分泌物がヘビ捕食阻害効果を有し、(2) その物質的実体は悪臭が苦味か、その両方であることを明らかにした点で画期的であった。また(3) 身近に入手できる材料を用いており、(4) 無毒であり、実験系として非常に理想的であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ツチガエル体表分泌物よりヘビ捕食阻害成分を同定することで、世界に先駆けて物質レベルでの変温動物の化学防御を証明することを目標とした。“味”または“臭気”が毒に匹敵しうる有効な生存戦略の一つであることが証明されれば、農畜林産物被害や人身被害などの原因となる害獣の環境調和型忌避剤等へも応用できる。直接的には、ヘビ忌避剤への応用が考えられる。毒ヘビによる咬傷被害は、抗毒素血清の入手が困難なアフリカおよびインドにおいて特に深刻であり、毎年多数の死者を出している。咬傷の治療には唯一抗毒素のみが有効であ

るが、製造には時間とコストが掛かる上、受傷後4時間以内に投与することが十分な治療効果を得るために重要である。また仮に入手できてもアナフィラキシーショックや血清病などで治療可能とは限らない。被害を防ぐには、ヘビによる攻撃を未然に防ぐことが最も有効であるが、現時点でヘビを効果的に駆除する忌避剤は存在しない。

ツチガエルのヘビ忌避効果は顕著であり、致死的ではないことから、本研究で得られた成果を忌避剤開発に応用できれば、熱帯発展途上国の生活環境改善および生態系の維持に大いに役立つことが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 研究材料の入手

ツチガエルは20世紀末まで日本各地の水田でごく普通に見られたが、幼生期に越冬することから、水田の冬季非湛水が普及するとともに生息数が激減している。絶滅危惧もしくは準危惧種に指定している地域もあることから、安定して試料が入手できる棲息地を発見する必要があった。また、言うまでもなく、生体が捕獲できる時期が5月から10月と限られており、研究できる期間に制約があることも考慮する必要があった。

(2) 非侵襲的体表分泌物の採取法の確立

研究対象種のサイズが比較的大きい場合、体表分泌物を得る方法は生体をポリエチレン袋に入れ、外から揉んで刺激する *hustle bag technique* や電気刺激法がある。しかし、小型種に対しては適用が難しいからか、過去の研究では一例を除き生体を犠牲にして皮膚を剥ぎ、これを抽出する方法が採られている。しかしツチガエルの絶滅が危惧される今日、非侵襲的に体表分泌物を採取する手法を確立することは、種の保存のためにも、また物質精製および悪臭成分の捕集に際し重要であったことから、重要課題として取り組んだ。

(3) 苦味成分の単離と構造決定

苦味は味覚の中で最も鋭敏であり、他の味覚が1-10 mM レベルの認知閾値(匂いの種類が識別できる限界値)を示す中、数nMでも感知されることがある。このような特徴から、忌避作用の実体が苦味成分である可能性が非常に高いことが予想された。また精製に際して官能試験で容易に含有画分を追跡でき、好都合であった。

(4) 悪臭成分の同定

カエルが匂いを発することは知られているが、その成分同定の例は数少なく、解剖により分泌腺を得て臭気成分を抽出する方法が取られている。そこで生体を殺さずに臭気成分を捕集する手法と分析機器への導入法を種々検討し、簡便に行う手法を確立した。

4. 研究成果

(1) 研究材料の入手

インターネットおよび実地調査を通じて、実施機関近郊に2か所のツチガエル生息地を発見した。また採集活動を通じて、富山では5月～7月が産卵期の最盛期であり、この時期行動が大胆となり、捕獲し易くなることを突き止めた。また捕獲した生体の維持のため、水を含ませたミズゴケを衣装ケース内に床材として敷き、ワラジムシを給餌する飼育法を確立した。

(2) 非侵襲的体表分泌物の採取法の確立

非侵襲的に体表分泌物を得るためには、カエルを拘束しつつ、物理的手段に依らない方法で刺激を与えて表皮からの分泌を促し、高い回収率で分泌物を得なければならない。これらを満たす採取法を考案した。即ち、生体を水洗後、三角コーナー用の水切りネットに入れ、シーラーを用いてパウチする。これをガラス漏斗に置き、その下は瓶で受ける(図2)。刺激法は電気刺激とし、電子工作キットを流用して装置を作製した。これを用いてカエルに電気ショックを与え、悪臭がしたら洗浄瓶で体表を洗う操作を繰り返す。こうして得た洗浄液は、苦味を有しており、ヘビ忌避成分を含むことが期待できた。また、採取作業は一頭当たり10分以内とすることで、生体を疲弊させることなく、生息地に戻すことが出来た。



図2 体表分泌物採取法

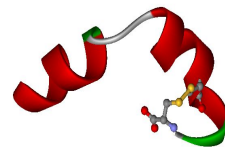
(3) 苦味成分の単離と構造決定

こうして得た体表分泌物の洗浄液は、*n*-ヘキサンで脱脂後、1-ブタノールで抽出し、これを60%メタノールとジクロロメタンで二層分配した。苦味は60%メタノール層に見られたことから、これをODSフラッシュクロマトグラフィー、Sephadex LH-20を用いたゲル濾過クロマトグラフィーで粗精製後、2段階の逆相HPLCで精製し、苦味物質を9頭のツチガエル成体(28.6-51.6 mm)から4.1 mg得た。

¹H NMR および MS スペクトルを測定したところ、当初予想していた胆汁酸ではなく、分子量 2577.5 の新規ペプチドであることが判明した。詳細な二次元 NMR スペクトルの解析から、5 残基の Leu、4 残基もしくは 3 残基の Lys、3 残基の Ser、2 残基ずつの Phe、Val、Ala、Cys、2 残基もしくは 1 残基の Ile、

1 残基ずつの Gly、Asn、Pro を持つことが分かった。構成アミノ酸に偏りがあり、シグナルの重複が激しいことから、NMR スペクトル解析のみでアミノ酸配列を出すことは難しく、プロテインシーケンサーによる配列解析に供した。その結果、Lys は 4 残基、Ile は 1 残基であり、全 24 残基中、19 残基がツチガエルから得られている既知の抗菌ペプチド gaegurin 5 と共通であることが分かった。N 末から 18 残基目と 22 残基目以降は読めなかったが、未使用のアミノ酸残基および gaegurin 5 の配列を考慮すると、C 末側 7 残基で環を巻いた“6 の字”構造を取ることが予想された。

構造を確認するため、予想配列およびジスルフィド結合を有するペプチドを合成し、ODS カラムを用いた逆相 LC-MS 分析に供した。4 残基の Lys に由来する塩基性のためにピークはテーリングし、更に界面活性のために注入量の増加に応じて保持時間が短くなるなど、挙動の制御が難しかったが、注入量を微量(20 ng)にし、多価イオンピークを指標に溶出を検出した結果、天然物と合成品の保持時間は一致したことから、予想構造が支持された。本物質をツチガエル(種小名 *rugosa*)と苦味(ラテン語「苦い」*amara*)に因み、rugosamarin



A(図3)と命名した。 図3 rugosamarin A の立体構造

(4) 悪臭成分の同定

悪臭成分の捕集のため、まずは M. H. Brodnitz らの方法に従い、体表洗浄液を減圧下、液体窒素で冷却したトラップ管に導いて揮発成分の捕集を試みた。管内を少量のクロロホルムで洗い、これを NMR や GC-MS で分析したものの、1-ブタノールや酢酸エチルなど、明らかに実験室の雰囲気から拡散した溶媒以外にめばしいものは見られなかった。

そこで体表洗浄液を微量のクロロホルムで抽出し、これを GC-MS 解析に供した。成分の分離に TC-70 キャピラリーカラムを用いたところ、ベンズアルデヒドとコレステロールが主要ピークとして得られたが、何れも期待した匂い特性を示さなかった。

また SPME (Solid-phase micro-extraction, Spelco) カートリッジを用い、電気刺激直後のカエル表皮近くの雰囲気をサンプリングしたり、あるいはカートリッジを体表分泌物そのものに浸して分析したが、芳しい結果は得られなかった。

次にカエルを逆さにした漏斗と通電したアルミ箔被覆ガラス板に閉じ込め、開口部から針金でぶら下げた筒型逆相吸着剤を、体表近傍の雰囲気に暴露した。5 頭のカエルを刺激し、一頭当たり 10 分ずつ、合計 50 分間暴露した。これをマイクロチューブ中少量の *n*-ペンタンで抽出し、GC-MS 分析に供したところ、

幾つかライブラリー中のデータに対し一致率の低いピークと共に、イオン誘導体を検出した。漸く匂い成分らしきものが得られたことに励まされ、より効率的に臭気成分をサンプリングすべく、以下の手法に改良した。即ち体表分泌物を濾紙片に吸い取り、これを筒型逆相吸着剤と共に小バイアルに密閉し、室温で暫く放置し臭気成分を吸着させた。本手法は、いわば水溶液を用いないヘッドスペース法であることから、“ドライヘッドスペース法”と名付けた(図4)。閉鎖系中で濾紙が飽和蒸気を供給することで臭気成分が吸着剤上に連続的に濃縮されるだけでなく、拘束時間の低減によりカエルへのダメージを抑えることが出来、大変好都合であった。吸着剤を *n*-pentane で抽出して分析した結果、イオン誘導体と共にアルデヒド2成分を得た。

これらの匂いを試香紙を用いて官能評価したところ、イオン誘導体がツチガエル特有の悪臭の一部を再現した。アルデヒド1成分はドクダミ様の匂いを示したが、悪臭の構成臭であるか否か判断付きかねた。これら3種の混合臭も評価したが、ツチガエルの特徴臭は再現できなかった。



図4 ドライヘッドスペース法

以上、ツチガエルから苦味物質として新規ペプチド rugosamarin A を単離すると共に、悪臭成分を GC-MS で分析し、構成成分と考えられる臭気物質を3種同定した。本研究は、カエル体表ペプチドに“呈味性”という新機能を見出した点において、意義深い。今後、rugosamarin A が実際にヘビを忌避するか確認すると共に、臭気成分の完全再現に向けて、より詳細な成分調査を進め、ツチガエルの化学防御機構の全貌を明らかにして行く予定である。

<引用文献>

- K. D. Wells. *The Ecology and Behavior of Amphibians* 2007, Univ. Chicago Press.
- A. Mori, G. M. Burghardt, A. H. Savitzky, K. A. Roberts, D. A. Hutchinson, R. C. Goris. Nuchal glands: A novel defensive system in snakes. *Chemoecol.* **2012**, *22*, 187-198. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00049-011-0086-2>
- T. Eisner, W. E. Conner, K. Hicks, K. R. Dodge, H. I. Rosenberg, T. H. Jones, M. Cohen, J. Meinwald. Stink of Stinkpot Turtle Identified: ω -Phenylalkanoic Acids. *Science* **1977**, *196*, 1347-1349. DOI: [10.1126/science.196.4296.1347](https://doi.org/10.1126/science.196.4296.1347)
- S. Burnett. Colonizing Cane Toads cause population declines in native predators: reliable anecdotal information and management implications. *Pac. Conserv. Biol.* **1997**, *3*, 56-72.

DOI: 10.1071/PC970065

A. Mori. Behavioral responses to an unpalatable prey, *Rana rugosa* (Anura: Amphibia), by new born Japanese striped snakes, *Elaphe quadrivirgata*. *Curr. Herpetol. East Asia* **1989**, 459-471.

吉村友里. くさく、まずいカエル ツチガエルの分泌物によるシマヘビからの捕食回避. *どうぶつと動物園* **2011**, 082-083.

V. C. Clark. Collecting Arthropod and amphibian secretions for chemical analyses. In: *Behavioral and Chemical Ecology*, Eds: W. Zhang and H. Liu, Nova Science Publishers, Inc., 2010, New York. ISBN: 978-1-60741-099-7

V. C. Clark, Liva Harinantenaina, Martin Zeller, William Ronto, James Rocca, Aaron T. Dossey, Daniel Rakotondravony, David G. I. Kingston, and Chris Shaw. An Endogenous Bile Acid and Dietary Sucrose from Skin Secretions of Alkaloid-Sequestering Poison Frogs. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 473-478. DOI: [10.1021/np200963r](https://doi.org/10.1021/np200963r)

J. W. Daly, T. F. Spande, H. M. Garraffo. Alkaloids from Amphibian Skin: A Tabulation of Over Eight-Hundred Compounds. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1556-1575. DOI: [10.1021/np0580560](https://doi.org/10.1021/np0580560)

B. P.C. Smith, C. R. Williams, M. J. Tyler, B. D. Williams. A survey of frog odorous secretions, their possible functions and phylogenetic significance. *Appl. Herpetol.* **2004**, *2*, 47-82. DOI: [10.1163/1570754041231587](https://doi.org/10.1163/1570754041231587)

B. P. C. Smith, M. J. Tyler, B. D. Williams, Y. Hayasaka. Chemical and Olfactory Characterization of Odorous Compounds and Their Precursors in the Parotoid Gland Secretion of the Green Tree Frog, *Litoria caerulea*. *J. Chem. Ecol.* **2003**, *29*, 2085-2100. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1025686418909>

J. M. Park, J. E. Jung, B. J. Lee. Antimicrobial Peptides from the Skin of a Korean Frog, *Rana rugosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *205*, 948-954. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2757>

M. H. Brodnitz, J. V. Pascale. Thiopropanal S-oxide: a lachrymatory factor in onions. *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*, 269-272. DOI: [10.1021/jf60174a009](https://doi.org/10.1021/jf60174a009)

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8件)

(1) N. Oku, S. Hana, M. Matsumoto, K.

Yonejima, K. Tansei, Y. Isogai, Y. Igarashi. Two new sacrolide-class oxylipins from the edible

cyanobacterium *Aphanothece sacrum*. *J. Antibiot.* **2017**, *70*, 708-709. DOI:
<https://doi.org/10.1038/ja.2017.32>

(2) Y. Yang, L. Yu, H. Komaki, **N. Oku**, Y. Igarashi. Absolute configuration of NFAT-133, an aromatic polyketide with immunosuppressive and antidiabetic activity from actinomycetes. *J. Antibiot.* **2016**, *69*, 69-7128. DOI:
<https://doi.org/10.1038/ja.2015.80>

(3) T. Ozaki, Y. Kurokawa, S. Hayashi, **N. Oku**, S. Asamizu, Y. Igarashi, H. Onaka. Insights into the Biosynthesis of Dehydroalanines in Goadsporin. *ChemBioChem*, **2016**, *17*, 218-223. DOI: 10.1002/cbic.201500541

(4) **N. Oku**, S. Matoba, Y. M. Yamazaki, R. Shimasaki, S. Miyanaga, Y. Igarashi. Complete stereochemistry and preliminary structure–activity relationship of rakicidin A, a hypoxia-selective cytotoxin from *Micromonospora* sp. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 2561–2565. DOI: 10.1021/np500276c

(5) **N. Oku**, M. Matsumoto, K. Yonejima, K. Tansai, Y. Igarashi. Sacrolide A, a new cytotoxic and antimicrobial oxylipin macrolide from an edible cyanobacterium *Aphanothece sacrum*. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2014**, *10*, 1808-1816. DOI: 10.3762/bjoc.10.190

(6) H. Akiyama, **N. Oku**, H. Kasai, Y. Shizuri, S. Matsumoto, Y. Igarashi. Metabolites from thermophilic bacteria I. *N*-Propionylanthranilic acid, a co-metabolite of the bacillamide class antibiotics and tryptophan metabolites with herbicidal activity from *Laceyella sacchari*. *J. Antibiot.* **2014**, *67*, 795-798. DOI:
10.1038/ja.2014.64

(7) **N. Oku**, K. Yonejima, T. Sugawa, Y. Igarashi. Identification of the n-1 fatty acid as an antibacterial constituent from the edible freshwater cyanobacterium *Nostoc verrucosum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, *78*,

1147-1150. DOI:

10.1080/09168451.2014.918484

(8) **N. Oku**, A. Matsumoto, T. Matsunaga, Y. Asano, H. Kasai, S. Matoba, Y. Igarashi. Two new ring-contracted congeners of rhizopodin illustrate significance of the ring moiety of macrolide toxins on the actin disassembly-mediated cytotoxicity. *Chem. Pharm. Bull.* **2014**, *62*, 294-300. DOI:
<https://doi.org/10.1248/cpb.c13-00856>

〔学会発表〕(計13件)

(1) **奥直也**、森岡静香、岩崎春香、五十嵐康弘。「唾液分泌促進作用および塩味後味を示す pellitorine の構造活性相関」日本農芸化学会 2018 年度名古屋大会 (2018.3.16, 名城大学).

(2) **N. Oku**, S. Hayashi, Y. Yamaguchi, H. Takenaka, T. Murafuji, E. Harunari, Y. Igarashi. 「A new biosurfactant as an antibacterial ingredient in a tropical edible cyanobacterium *Nostochopsis lobatus*」ICTCRED2017 (2017.10.4, Indonesia).

(3) **奥直也**、架田貴美、朴木英治、五十嵐康弘。「タテヤママリモから得られた新規抗微生物性エーテル脂質の構造」第 59 回天然有機化合物討論会 (2017.9.20~22, 札幌).

(4) 平手拓哉、**奥直也**、五十嵐康弘、磯貝泰弘。「大腸菌を宿主とした抗菌ペプチド発現系の作製」第十七回日本タンパク質科学会年会 (2017.6.20~22, 仙台).

(5) **奥直也**、林咲希、春成円十朗、五十嵐康弘、山口 裕司、竹中 裕行、村藤 俊宏。「熱帯産食用ラン藻 *Nostochopsis lobatus* から得られる抗菌物質の構造」第 19 回マリンバイオテクノロジー学会大会 (2017.6.3-4, 仙台).

(6) **奥直也**、林咲希、村藤俊宏、五十嵐康弘。「アズレンの光学特性を生かした新規 CD 励起子キラリティ試薬の開発」日本農芸化学会 2017 年度京都大会 (2017.3.19, 京都).

(7) 李丹丹、篠崎由紀子、**奥直也**、金丸凌、五十嵐康弘。「Phylogenetic diversity of metal resistant soil bacteria and exploration of a new siderophore produced by a Co²⁺-resistant bacterium of the genus *Pandoraea*」日本農薬学会第 42 回大会 (2016.3.7, 松山).

(8) 李丹丹、架田貴美、**奥直也**、清水将文、五十嵐康弘。「Isolation of haplacutine F as a potent antibiotic from *Burkholderia cepacia* MBAF1239」日本農芸化学会 2016 年度札幌大会 (2016.3.30, 札幌).

(9) 李丹丹、架田貴美、**奥直也**、清水将文、五十嵐康弘。「Antimicrobial metabolites from a Welsh Onion Rhizosphere Microbe *Burkholderia cepacia* MBAF1239」日本農薬学会第 41 回大会 (2016.3.19, 松江).

(10) H. Akiyama, **N. Oku**, C. Indanada, A. Thamchaipenft, Y. Igarashi. 「 Absolute Configuration of Linfuranones, New Polyketides from Thai Endophytic *Microbispora* sp.」 15th International Conference on Chiroptical Spectroscopy (2015.8.31-9.1, 札幌).

(11) 架田貴美、**奥直也**、朴木英治、五十嵐康弘。「未開拓薬物資源タテヤママリモからの新規抗生物質の探索」日本農芸化学会 2015 年度岡山大会 (2015.3.29, 岡山).

(12) 端紗也加、松本京、**奥直也**、丹生慶次郎、五十嵐康弘。「希少食用ラン藻スイゼンジノリ由来新規 sacrolide 類縁体の発見」日本農芸化学会 2015 年度岡山大会 (2015.3.29, 岡山).

(13) **奥直也**、岩崎春香、五十嵐康弘。「生薬“細辛(サイシン)”からの塩味惹起物質の単離と同定」日本農芸化学会 2015 年度岡山大会 (2014.5.27, 岡山).

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

奥 直也 (OKU Naoya)

富山県立大学・工学部・生物工学科

研究者番号：90525388

(2) 連携研究者

桑原 重文 (KUWAHARA Shigefumi)

東北大学・大学院農学研究科・生物産業創
成科学専攻

研究者番号：30170145