

両生類『ノアの方舟』プロジェクト —両生類絶滅危惧種の飼育下繁殖による保全の試み—

住田 正幸

広島大学の両生類研究施設は、実験動物としてさまざまな利点を有する両生類を研究材料とし、生命科学上の重要な問題を解明するため、1967年に当時の学長川村智治郎教授の業績(学士院賞受賞)をもとに創設された。初代施設長西岡みどり教授は発生遺伝学の分野で世界の追随をゆるさない数々の業績を上げられた。日本で、両生類を名前に冠した専門の研究・教育機関は他に例を見ない。特に、陸上性のカエルを安定して飼育繁殖できる施設は世界的にも珍しく、最近では、この特徴を活かした研究の成果—透明ガエル「スケルピオン」作出、日本一きれいな「イシカワガエル」と生きた化石「イボイモリ」繁殖成功、新種「アマミイシカワガエル」と「サドガエル」記載—などが注目されている(図1)。当施設では現在、主に以下の4つの事業を行っている。①系統維持事業では、多種多様な両生類を研究リソースとして保存・維持して研究・教育用に提供している。また、餌用にフタホシコオロギを通年供給している(図2)。②ナショナルバイオリソースプロジェクト中核機関として、次世代モデル動物ネッタイツメガエルを繁殖維持し、研究・教育用に提供している。アフリカ原産のネッタイツメガエルは、短期間に成熟し、数千個の卵を産み、両生類で唯一全ゲノムが解明されているため、遺伝学的研究のリソースとして、両生類の中でもっとも有用といわれている。③先駆的両生類研究プロジェクトでは、両生類研究施設での長年にわたる研究実績を踏まえ「国内外の両生類絶滅危惧種の遺伝的多様性の把握とそれに基づく効率的な保全方法の確立」という研究テーマを戦略的に実施している。これまでに、絶滅危惧種かつ天然記念物である両生類について、野外の遺伝的多様性を評価しつつ飼育下繁殖に成功している。この研究を発展させることで、将来的には両生類「ノアの方舟」を目指している。④広島大学総合博物館サテライト館として、玄関ロビーを一般公開し、最新研究トピックや両生類標本などを展示している。学術的に貴重な新種の基準標本、特別天然記念物で世界最大の両生類オオサンショウウオの標本、これまでに収

集・作出された標本などが展示されている。学内外から施設見学者も多く、最近では貴賓として、秋篠宮殿下、下村脩博士、益川敏英博士をお迎えしている。

両生類絶滅危惧種の飼育下繁殖による保全の試み

近年、両生類の絶滅が国際的な問題となっているが、絶滅危惧両生類の有効な保全方法は確立されていない。両生類研究施設では、陸上性のカエルを安定して飼育維持できる設備(図2)や技術を駆使して、これらの絶滅危惧種について野外の遺伝的多様性を維持しながら、飼育下で安定して繁殖できる効率的なシステムの確立を目指している。現在、南西諸島に分布する絶滅危惧両生類(IUCNレッドリス絶滅危惧I B類および県指定天然記念物)について、野外集団の遺伝的多様性を評価しつつ、効率的な域外保全法を確立するため、飼育下繁殖を試みている。その結果、絶滅危惧種かつ天然記念物に指定されている国内産6種(イシカワガエル、アマミイシカワガエル、ホルストガエル、オットンガエル、アマミハナサキガエル、イボイモリ)の両生類(図1)について、飼育下繁殖に成功し、そのうち1種(アマミイシカワガエル)では飼育下での自然繁殖によって2代目まで得られている^{1,2)}(図3)。さらに、これらの飼育下繁殖個体を利用して、遺伝的多様性を維持した効率的な継代飼育の方策も検討している。

野外集団における遺伝的多様性の評価では、ミトコンドリアDNAの16SrRNA遺伝子とND2遺伝子の塩基配列を解析したところ、上記の絶滅危惧種においては、沖縄島と奄美大島(または徳之島)集団間の塩基置換率は、16SrRNA遺伝子で1.8~2.9%、ND2遺伝子で5.8~7.4%であり、遺伝的に大きく分化していることがわかった³⁾。また、マイクロサテライトマーカーを用いて集団構造を調べたところ、各島には、各種に固有な集団構造のあることもわかった^{4,6)}。これらのことから、遺伝的多様性を維持するためには、各島および各地域集団を個別に保全する必要があると考えられる。

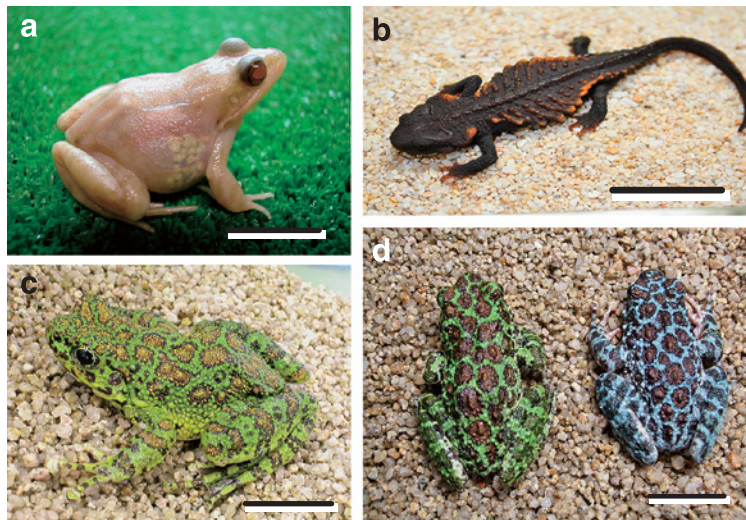


図1. 透明ガエルと絶滅危惧種（天然記念物）。a. スケルピヨン, b. イボイモリ, c. アマミイシカワガエル, d. イシカワガエル野生型と青色変異体（スケール=25 mm）。



図2. 絶滅危惧種（天然記念物）飼育室。a. 成体飼育室, b. イボイモリ繁殖槽, c. 幼生飼育温室, d. 餌用コオロギ飼育室。

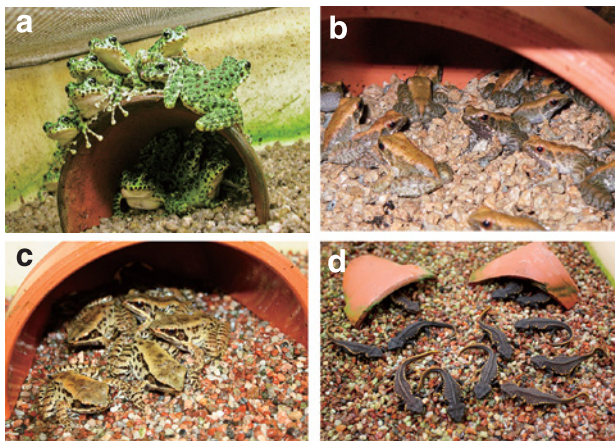


図3. 飼育下繁殖個体。a. アマミイシカワガエル, b. オットンガエル, c. ホルストガエル, d. イボイモリ。

前述の絶滅危惧種6種について、野外から採集（各県の教育委員会から許可を得て）した雌雄数ペアを用いて、人工受精法によって人工繁殖を試みた。人工受精は、ウシガエルの脳下垂体の懸濁液を腹腔に注射して排卵を誘発し、卵に精子懸濁液をかけて行った。その結果、イシカワガエルとアマミイシカワガエルでは、受精卵の30～70%が正常に変態を完了し、現在、9年齢個体およそ300匹が飼育維持されている（図3a）。さらに、アマミイシカワガエルでは、人工繁殖で生じた個体が成熟して、4年前から自然繁殖によって2代目の子孫が誕生している。現在、2年～4年齢の2代目500匹が安定して飼育維持されている。ホルストガエルとオットンガエルでは受精卵の20～60%が正常に変態を完了し、現在、4年齢個体およそ300匹が飼育維持されている（図3b, c）。アマミハナサキガエルでは受精卵の20～30%が変態を完了し、現在、1年齢個体およそ100匹が飼育維持されている。また、沖縄島と奄美大島と徳之島のイボイモリでは、雌雄数ペアを用いて、野外の産卵場所を模して作製した繁殖槽を使って、飼育下での自然繁殖を試みた（図2b）。その結果、卵は繁殖槽の水たまりのそばの傾斜に産みつけられ、それらの20～70%が変態を完了した。現在、飼育下で誕生した2年～4年齢個体およそ150匹が飼育維持されている（図3d）。なお、アマミイシカワガエルの飼育下繁殖個体（F1, F2）を用いて、各世代の遺伝的指標の変化を予測し、遺伝的多様性を維持した効率的な継代飼育の方法を確立することを目的として、シミュレータによる継代後の遺伝的多様性変化の検証を行った。その結果、親数が一定数以下の場合、MK交配（アレル共有率がもっとも低いMinimal Kinshipペアを

用いる)を行うことにより、ヘテロ接合度の減少が軽減されることがわかった⁷⁾。以上の結果、種多様性あるいは遺伝的多様性を維持するためには、各集団を効率的に保全する必要があること、人工繁殖や自然繁殖に関する成果は、野外の絶滅危惧種の保全に有効に適用できることがわかった。本研究で得られた知見は、より多くの両生類絶滅危惧種に適用可能であり、世界的な規模での両生類保全に役立つと考えられる。将来的には、これらの研究をさらに発展させて、両生類「ノア方舟」の構築を目指している。

絶滅危惧種を使った最新研究トピック

最後に、現在、当施設で絶滅危惧種かつ天然記念物の保全を目的に展開している両生類「ノア方舟」プロジェクトによるいくつかの「最新研究トピック」を紹介する。

奄美大島のイシカワガエルは沖縄とは別種—新種「アマミイシカワガエル」誕生 イシカワガエルは奄美大島と沖縄島に分布し、鹿児島県と沖縄県で天然記念物に、IUCNレッドリストで絶滅危惧IB類に指定されているが、最近、奄美西部で普通個体と区別できる大型個体の存在が報告されていた。本研究では、奄美大島と沖縄島の集団について、形態観察や遺伝子分析、交配実験を行い、島内および島間の種内分化の実態を調べた。その結果、奄美の普通と大型は遺伝的には区別できないこと、奄美と沖縄は遺伝的にも形態的にも大きく異なり、雑種致死による明確な交配後隔離が成立していることがわかった。以上のことから、両集団は別種とするのが妥当であると考えられたので、奄美集団を新種 *Odorrana splendida* 「アマミイシカワガエル」と名づけた(図1c)³⁾。

イシカワガエル青色変異個体の発見 2010年3月沖縄本島にて、通常は緑色の色彩を呈する皮膚部位が水色にかわった「青いイシカワガエル」が発見された(図1d)。本研究では、イシカワガエル青色変異体が、どのような組織学的原因によって青色を呈するのか、この形質が遺伝するかどうかを明らかにすることを目的とし、皮膚の細胞の組織学的観察と交配実験を行った。両生類の皮膚には、表層側から黒色素胞、虹色素胞、黄色色素胞の3種類の色素細胞が重なり、真皮色素細胞単位を形成している。電子顕微鏡観察の結果、イシカワガエルの青色変異個体には3種類の色素細胞のうち、黄色色素胞が存在しないことから、皮膚において黄色の発色を欠き、本来緑色になる部位が青色を呈することが明らかになった⁸⁾。また、青色の色彩の遺伝性を検証するため、現在、野生型のイシカワガエルと人工交配を行ってF1を得ている。今後、F2の分離比から遺伝形質かどうかを推定する。

絶滅危惧両生類イシカワガエルの皮膚から抗菌ペプチ

ドの単離 イシカワガエルの自然免疫システムの様態を探る目的で、本種の人工繁殖個体を用いて、皮膚に存在する抗菌ペプチドの探索を行った。まず、生化学的及び分析化学的手法による抗菌ペプチドの同定を試みた結果、9種類の抗菌ペプチドを単離・同定した。これら分子の前駆体cDNAクローニングの結果、すべての前駆体cDNAを同定することができた。また、推定される前駆体タンパク質は、シグナルペプチド・酸性スベーパー・プロセッシングサイト・抗菌ペプチドという4つのモチーフからなる共通構造を持っていることが明らかになった。さらに、同定した9種類の抗菌ペプチドを用いて、グラム陰性菌・グラム陽性菌・真菌などに対する最小発育阻止濃度を測定することで抗菌活性を評価した。その結果、これらは広範な抗菌スペクトラムを示し、各種菌に強い抗菌作用を示すものもあることがわかった⁹⁾。将来的には、抗生物質に代わるような薬剤の開発につながる可能性もある。

両生類研究施設では上述のように、絶滅危惧種の遺伝的多様性を維持しながら、安定して飼育下繁殖できるシステムを確立するとともに、これらの絶滅危惧種を活用した研究を展開している。この事業を通じて、両生類「ノア方舟」と「リソースセンター」の機能を合わせ持つ「両生類研究の世界拠点」を構築し、「両生類を用いた多様なライフサイエンス研究」の利便性向上と発展に貢献することを目指している。

謝 辞

本研究を進めるにあたって、天然記念物(絶滅危惧種)の現状変更の許可をいただいた、鹿児島県と沖縄県の教育委員会に感謝を申し上げる。採集にあたってご協力いただいた、大海昌平氏、安里龍二氏、勝連盛輝氏に深謝する。研究を分担いただいた広島大学理学研究科附属両生類研究施設進化多様性研究グループスタッフおよび学生、広島大学総合科学研究科浮穴和義准教授、県立広島大学藤井保教授および学生にも感謝を申し上げます。本研究は、文部科学省特別経費および科学研究費補助金(基盤B、基盤C)の支援をいただいている。

文 献

- 1) Sumida, M. *et al.*: *Zool. Sci.*, **28**, 834 (2011).
- 2) Igawa, T. *et al.*: *Animals*, **3**, 680 (2013).
- 3) Kuramoto, M. *et al.*: *Zootaxa*, **2767**, 25 (2011).
- 4) Sugawara, H. *et al.*: *Conserv. Genet. Resour.*, **4**, 595 (2012).
- 5) Kakehashi, R. *et al.*: *Genes Genet. Syst.*, **88**, 59 (2013).
- 6) Igawa, T. *et al.*: *Heredity*, **110**, 46 (2013).
- 7) Shintani, N. *et al.*: *Bull. Herp. Soc. Jap.*, **2012**, 78 (2012).
- 8) Shintani, N. *et al.*: *Bull. Herp. Soc. Jap.*, **2013**, 40 (2013).
- 9) Iwakoshi-Ukena, E. *et al.*: *Peptides*, **32**, 670 (2011).