

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15606

研究課題名（和文）フグ毒保有ヒラムシの着生誘引に関わる化学コミュニケーションの探索

研究課題名（英文）Studies on tetrodotoxin origin in toxic flatworm: exploration of chemical cue for larval settlement and metamorphosis

研究代表者

周防 玲 (SUO, Rei)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：20846050

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）：高濃度のフグ毒テトロドトキシン（TTX）を保有する有毒ヒラムシは、TTXの起源を探るうえで重要な生物種である。しかしながら、このような有毒ヒラムシの生活史に関する知見は乏しく、特に孵化幼生がどのような成長過程をたどって着底・変態するかは明らかになっていない。本研究では、有毒ヒラムシの発生初期の生活史に関する知見を得るべく、人工飼育下で孵化幼生の着底・変態を制御する手法の確立を目指した。種々の飼育実験をおこなう過程で、孵化幼生の成長に関する知見を深めるとともに、有毒ヒラムシのTTX関連化合物の保有状況を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フグ毒テトロドトキシン（TTX）は最も強力な自然毒の1つであり、数多くの海洋生物に含まれている。食料資源の安全性担保のためには、生態系におけるTTXの起源を明らかにする必要がある。本研究では高濃度のTTXを保有するヒラムシに焦点を当て、TTX関連化合物の保有状況、ならびに発生初期の生活史に関する知見を深めることができた。本研究成果は、海洋生物におけるTTXの起源解明の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Marine polyclad toxic flatworms constantly contain high concentrations of TTX, and are thought to be one of the animals responsible for the presence of TTX in some marine organisms. The larval development during the planktonic phase and the transition to the benthic juvenile of toxic flatworms has not been well-studied yet. The aim of this project was to identify chemical factors that may have effects on larval settlement and metamorphosis of the flatworm in order to establish an artificial rearing method for the flatworm larvae. We provided insight into the growth of flatworm larvae. In addition, TTX and several analogues such as 5,6,11-trideoxyTTX, monodeoxyTTXs, dideoxyTTXs, and 11-norTTX-6(S)-ol were identified from toxic flatworm extracts using high-resolution liquid chromatography-mass spectrometry.

研究分野：海洋天然物化学

キーワード：テトロドトキシン フグ毒 着底・変態 ヒラムシ 共生微生物

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

フグ毒テトロドトキシン（TTX）の化学構造が解明されてから半世紀が経ち、これまでその化学的性状や標的分子などが明らかにされてきた（文献1）。一方で生態系における TTX の真の生産者に関しては、バクテリアが有力候補との見解もあるが、決定的な証拠は未だ得られていない。TTX を保有している海洋生物は、ツムギハゼ、ウモレオウギガニ、スベスベマンジュウガニ、ヒョウモンダコ、ボウシュウボラ（巻貝）など多種にわたる（文献2）。それらの中でも、申請者らはフグの毒化機構の解明の端緒として、フグの摂餌対象かつフグ毒保有量の多い扁形動物門のオオツノヒラムシに注目している。これまでの研究成果から、オオツノヒラムシは高濃度の TTX を保有すると同時にフグの摂餌対象でもあり、生活史のすべてのステージでフグの毒化に関与することが強く示唆されている（文献3-5）。

以上のように、オオツノヒラムシが TTX の授受に関わっていることが示唆されるものの、TTX の真の生産者がオオツノヒラムシなどの有毒ヒラムシ類であるかは断定できない。次なる課題は、オオツノヒラムシなどの有毒ヒラムシが TTX の真の生産者であるのか、あるいはより低次の生物が真の生産者であるのかを検証することであり、そのためには人工の無毒給餌下で生活史を循環させた仔オオツノヒラムシの TTX 保有状況を調べるのが最も近道であると考えた。しかしながら、所属研究室で行ってきた現状の飼育方法では、親個体の卵から孵化したオオツノヒラムシの幼生が着底・変態しないという問題に直面していた。さらに自然環境下での産卵期間は期間が短く、幼生の入手機会が限られていた。

## 2. 研究の目的

申請者らは神奈川県葉山沿岸にてオオツノヒラムシ幼体を採取し、人工飼育下で飼育することにより、孵化幼生を得ることに成功した。また、産卵水温を制御することで本来の産卵期よりも長く幼生を得て、継続的に研究に取り組める体制を整えた。そこで、これまで得られた知見をもとに、人工飼育下で孵化幼生の着底・変態を制御する手法を確立したいと考えた。本研究では人工飼育下によるオオツノヒラムシ生活史の循環を目指すべく、オオツノヒラムシ孵化幼生の着底・変態因子の探索を目的とした。

## 3. 研究の方法

### （1）有毒ヒラムシにおける TTX 関連化合物の分析

これまでわが国で TTX を含むヒラムシとして知られているのはツノヒラムシ属（オオツノヒラムシとツノヒラムシ）のみであり、TTX 関連化合物の保有状況は不明であった。そこでこれらの有毒ヒラムシに TTX 関連化合物が含まれているのかを確かめるため、日本沿岸海域でオオツノヒラムシおよびツノヒラムシを採取し、高分解能の質量分析装置（LCMS）を用いて組成分析をおこなった。また、これと並行して種々の日本沿岸に生息するヒラムシにおける TTX 保有状況を調査した。

### （2）オオツノヒラムシの採集および孵化幼生の飼育実験

神奈川県葉山沿岸および茨城県大洗沿岸に生息するオオツノヒラムシを採集し、人工海水中で飼育し卵板を得た。卵板は小型のプラスチックケースに移動・孵化させ、オオツノヒラムシの幼生を得た。飼育海水、餌の種類など種々の飼育条件にて孵化幼生を飼育し、着底・変態が誘起される条件を探索した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 有毒ヒラムシにおける TTX 関連化合物の分析

LC-MS を用いて、日本沿岸海域に生息するオオツノヒラムシなどのツノヒラムシ属に含まれる TTX 類の分析をおこなった。その結果、TTX のほかに 5,6,11-trideoxyTTX、monodeoxyTTXs、dideoxyTTXs、11-norTTX-6(S)-ol などの主要な関連化合物が含まれていることを明らかにし、*Planocera* 属におけるフグ毒関連化合物のプロファイルデータを集積した (図 1)。

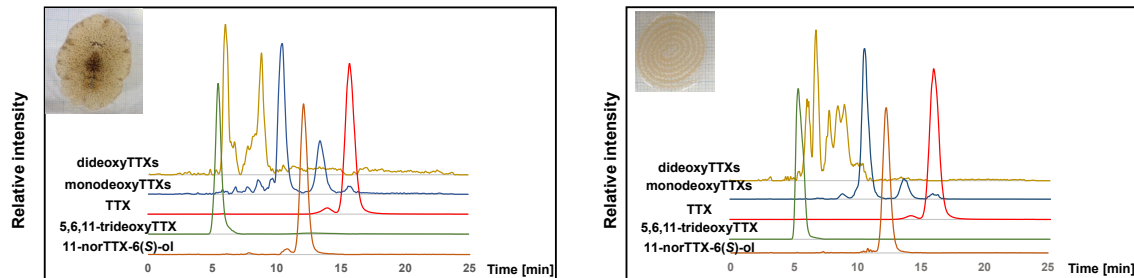


図 1 オオツノヒラムシ成体と卵板に含まれる TTX とその関連成分

また、神奈川県葉山沿岸で採取した種々のヒラムシの系統解析 (28S rRNA 遺伝子) および抽出液の LC-MS 分析をおこない、TTX を保有するヒラムシの探索を実施した。その結果、吸盤亜目に属するミスジホソヒラムシ *Prosthiosomum trilineatum* から TTX およびその関連化合物を検出した。

扁形動物門渦虫綱ヒラムシ目に属するヒラムシは腹面の吸盤の有無によって、吸盤亜目・無吸盤亜目に分類することができる。これまで TTX を保有するのは、無吸盤亜目ヒラムシの中でもツノヒラムシ属に含まれる特定の系統と考えられていたが、本研究では、初めて吸盤亜目ヒラムシから TTX 類を検出した (図 2)。

日本列島沿岸には 150 種を超えるヒラムシが生息するとされている。本結果は、ヒラムシにおける TTX の分布はこれまでの想定より広い可能性を示唆するものとなった。すなわち、探索海域を拡大することにより、今後も有毒ヒラムシの発見が期待されると考えられる。

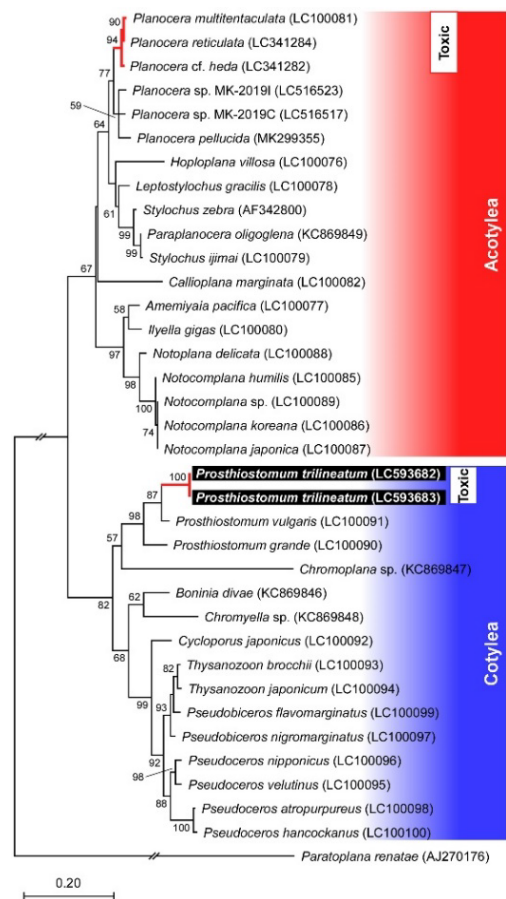


図 2 28S rDNA 遺伝子の塩基配列に基づき、最尤法によって構築された無吸盤亜目・吸盤亜目の系統樹

##### (2) オオツノヒラムシの採集および孵化幼生の飼育実験

人工海水を用いた飼育実験にて得られたオオツノヒラムシ卵板を水温制御しながら飼育し、孵化幼生を得た。採餌は成長において重要な因子と考えられるものの、オオツノヒラムシ幼生がどのような餌を摂餌するかは不明であった。そこで孵化幼生の餌を探すべく、成体と同様に貝類や甲殻類を与えて、成長の様子を観察した。しかしながら、貝類や甲殻類を摂餌する様子は観察

されず、体サイズは大きくならないまま 1 週間程度で幼生が死滅した。飼育水を人工海水から天然海水に変更したが、2 週間程度まで生存は確認されるものの、それ以降は死滅した。オオツノヒラムシは幼生時の栄養要求性が不明であるため、引き続き餌生物の探索に取り組む必要がある。

これと並行して、オオツノヒラムシの生息海域において、水深別に水循環可能な特製容器を浸漬し、バイオフィルムを養生した。養生したバイオフィルムと幼生を同じ飼育容器に入れ、成長の様子を観察したところ、2 週間程度が経過した際に容器内にヒラムシと思われる幼体が数匹観察された。28S rRNA 遺伝子の塩基配列を増幅した結果、ウスヒラムシ *Notocomplana humilis* の幼体であった。飼育開始時にバイオフィルム水中に幼体は確認されなかったことから、バイオフィルム容器にウスヒラムシの卵板あるいは幼生が混入していたと考えられる。

今回検討した条件において、孵化幼生の着底・変態する様子は観察されなかった。引き続き、種々の条件検討による飼育を試みると同時に、着底直後と考えられる幼体をフィールドで探索することにより、着底・変態などに関する条件を探っていきたいと考えている。

#### 引用文献

文献 1 : Makarova, M., Rycek, L., Hajicek, J., Baidilov, D., Hudlicky, T., 2019. Tetrodotoxin: History, biology, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 58, 18338–18387.

文献 2 : Bane, V., Lehane, M., Dikshit, M., O'Riordan, A., Furey, A., 2014, Tetrodotoxin: Chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxins* 6, 693–755.

文献 3 : Itoi, S., Ueda, H., Yamada, R., Takei, M., Sato, T., Oshikiri, S., Wajima, Y., Ogata, R., Oyama, H., Shitto, T., Okuhara, K., Tsunashima, T., Sawayama, E., Sugita, H., 2018. Including planocercid flatworms in the diet effectively toxifies the pufferfish, *Takifugu niphobles*. *Sci. Rep.* 8, 12302.

文献 4 : Okabe, T., Oyama, H., Kashitani, M., Ishimaru, Y., Suo, R., Sugita, H., Itoi, S., 2019. Toxic flatworm egg plates serve as a possible source of tetrodotoxin for pufferfish. *Toxins* 11, 402.

文献 5 : Itoi, S., Sato, T., Takei, M., Yamada, R., Ogata, R., Oyama, H., Teranishi, S., Kishiki, A., Wada, T., Noguchi, K., Abe, M., Okabe, T., Akagi, H., Kashitani, M., Suo, R., Koito, T., Takatani, T., Arakawa, O., Sugita, H., 2020. The planocercid flatworm is a main supplier of toxin to tetrodotoxin-bearing fish juveniles. *Chemosphere* 249, 126217.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Okabe Taiki, Saito Rion, Yamamoto Kohei, Watanabe Riku, Kaneko Yoshiki, Yanaoka Mutsumi, Furukoshi Seika, Yasukawa Shino, Ito Masaaki, Oyama Hikaru, Suo Rei, Suzuki Miwa, Takatani Tomohiro, Arakawa Osamu, Sugita Haruo, Itoi Shiro	4. 巻 237
2. 論文標題 The role of toxic planocercid flatworm larvae on tetrodotoxin accumulation in marine bivalves	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aquatic Toxicology	6. 最初と最後の頁 105908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aquatox.2021.105908	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 Suo Rei, Kashitani Maho, Oyama Hikaru, Adachi Masaatsu, Nakahigashi Ryota, Sakakibara Ryo, Nishikawa Toshio, Sugita Haruo, Itoi Shiro	4. 巻 19
2. 論文標題 First Detection of Tetrodotoxins in the Cotylean Flatworm Prosthlostomum trilineatum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/md19010040	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 Ito Masaaki, Furukawa Risako, Yasukawa Shino, Sato Masaya, Oyama Hikaru, Okabe Taiki, Suo Rei, Sugita Haruo, Takatani Tomohiro, Arakawa Osamu, Adachi Masaatsu, Nishikawa Toshio, Itoi Shiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Local Differences in the Toxin Amount and Composition of Tetrodotoxin and Related Compounds in Pufferfish ( <i>Chelonodon patoca</i> ) and Toxic Goby ( <i>Yongeichthys criniger</i> ) Juveniles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 150 ~ 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins14020150	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 Suo Rei, Tanaka Makoto, Oyama Hikaru, Kojima Yuki, Yui Kentaro, Sakakibara Ryo, Nakahigashi Ryota, Adachi Masaatsu, Nishikawa Toshio, Sugita Haruo, Itoi Shiro	4. 巻 216
2. 論文標題 Tetrodotoxins in the flatworm <i>Planocera multitentaculata</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxicon	6. 最初と最後の頁 169 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxicon.2022.07.001	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 -

1. 著者名 Oyama Hikaru, Ito Masaaki, Suo Rei, Goto-Inoue Naoko, Morisasa Mizuki, Mori Tsukasa, Sugita Haruo, Mori Tetsushi, Nakahigashi Ryota, Adachi Masaatsu, Nishikawa Toshio, Itoi Shiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Changes in Tissue Distribution of Tetrodotoxin and Its Analogues in Association with Maturation in the Toxic Flatworm, <i>Planocera multitentaculata</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1158 ~ 1167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10126-022-10179-z	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10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 伊藤正晟・古川理紗子・尾山 輝・安川詩乃・佐藤雅哉・周防 玲・杉田治男・高谷智裕・荒川 修・糸井史朗
2. 発表標題 ツムギハゼおよびオキナワフグのTTXおよび類縁化合物に関する研究
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾山 輝・岡部泰基・周防 玲・杉田治男・安立昌篤・西川俊夫・糸井史朗
2. 発表標題 フグ毒保有生物オオツノヒラムシの産卵生態に及ぼす水温の影響
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤正晟・古川理紗子・尾山 輝・安川詩乃・岡部泰基・佐藤雅哉・周防 玲・杉田治男・高谷智裕・荒川 修・安立昌篤・西川俊夫・糸井史朗
2. 発表標題 ツムギハゼおよびオキナワフグにおける毒化機構の種差に関する研究
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安川詩乃・伊藤正晟・尾山 輝・藤田雪乃・岡部泰基・小木曾正造・渡部雪菜・松原 創・鈴木信雄・平山 真・高谷智裕・荒川 修・杉田治男・周防 玲・糸井史朗
2. 発表標題 日本近海域に生息する二枚貝類のフグ毒保有状況
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中真誠・尾山 輝・小島雄基・由井健太郎・杉田治男・榊原 良・中東亮太・西川俊夫・安立昌篤・周防 玲・糸井史朗
2. 発表標題 ヒラムシ含有 TTX アナログの種間差に関する研究
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅野真希・石崎智大・友納大我・白井響子・木原聖人・伊藤正晟・安川詩乃・尾山 輝・周防 玲・杉田治男・糸井史朗
2. 発表標題 クサフグの産卵期における TTX 保有量の変化について
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾山 輝・周防 玲・杉田治男・糸井史朗
2. 発表標題 オオツノヒラムシの卵の発生に及ぼす海水温の影響
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤正晟、安川詩乃、尾山 輝、白井響子、周防 玲、杉田治男、安立昌篤、西川俊夫、糸井史朗
2. 発表標題 沖縄本島におけるクサフグ稚魚の毒性に関する研究
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 周防 玲
2. 発表標題 Marine Natural Products Discovered through Cell-based Assays
3. 学会等名 International Congress on Pure & Applied Chemistry Kota Kinabalu 2022 (ICPAC KK 2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 周防 玲
2. 発表標題 海洋生物からのモニトリ研究
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>吸盤垂目ヒラムシに、高濃度のフグ毒が含まれていることを発見  <a href="http://www.msr-nihon-university.org/2021/01/22/">http://www.msr-nihon-university.org/2021/01/22/</a></p> <p>オオツノヒラムシは保有するフグ毒の役割を性成熟に伴い変化させている  <a href="http://www.msr-nihon-university.org/wp-content/uploads/2022/11/20221108_PR.pdf">http://www.msr-nihon-university.org/wp-content/uploads/2022/11/20221108_PR.pdf</a></p> <p>オオツノヒラムシPlanocera multitentaculataに含まれるフグ毒関連成分を同定  <a href="http://www.msr-nihon-university.org/wp-content/uploads/2022/08/20220810-PressRelease_suo.pdf">http://www.msr-nihon-university.org/wp-content/uploads/2022/08/20220810-PressRelease_suo.pdf</a></p>
---



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