

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660177

研究課題名(和文) フグ毒はフグ毒保有生物間で融通されているのか？

研究課題名(英文) Are TTX circulated among TTX-bearing organisms?

研究代表者

糸井 史朗 (ITOI, Shiro)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：30385992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：クサフグの腸内容物中から検出された多数の卵からTTXが検出され、これはDNA分析によりヒガンフグの卵であることが明らかとなった。有毒卵を無毒トラフグの幼魚に与える飼育実験を実施した結果、有毒卵を摂餌した個体が速やかに毒化することが明らかとなった。これとは別に、石垣島および西表島で採取したオキナワフグ稚魚の腸内容物を次世代シーケンサ分析に供した結果、ツムギハゼの配列が多く検出された。これらの結果は、クサフグおよびオキナワフグが食物網における高次の捕食者からなるTTXループを介して、それぞれヒガンフグの卵およびツムギハゼを摂餌することで効率的に毒化していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The presence of numerous *Takifugu pardalis* eggs in the intestinal contents of another pufferfish, *T. niphobles*. The identity of *T. pardalis* being determined by direct sequencing for mitochondrial DNA. LC-MS/MS analysis revealed that the peak detected in the egg samples corresponded to TTX. Toxication experiments in recirculating aquaria demonstrated that cultured *T. rubripes* quickly became toxic upon being fed toxic *T. rubripes* eggs. Additionally, next generation sequencing analysis revealed that the sequence of toxic goby *Yongeichthys criniger* was detected from juveniles of the pufferfish *Chelonodon patoca*. These results suggest that *T. niphobles* and *C. patoca* ingested the toxic eggs of another pufferfish *T. pardalis* and toxic goby, respectively, to toxify themselves more efficiently via a TTX loop consisting of TTX-bearing organisms at a higher trophic level in the food web.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：フグ毒 テトロドトキシン (TTX) TTXループ クサフグ ヒガンフグ トラフグ

## 1. 研究開始当初の背景

猛毒テトロドトキシン (TTX) を有するフグは、我々日本人にとって、その毒の危険性があるがゆえに神秘的で、食欲や知的好奇心を掻き立てる生物の一種である。フグを食用とする国は世界的に少なく、わが国でも江戸時代まではフグ食は法的に禁じられていた。その昔、フグが危険な生物であることは、科学的な裏付けのない時代においても経験的に認められていたのである。1907年にこのフグ毒の実体が TTX であることが明らかにされ、1964年に日米の3グループが同時に TTX の化学構造を明らかにした。しかしながら、TTX の獲得経路およびその生物学的意義については不明な点が多く残されていた。その理由としては、フグ食文化を持つ国がきわめて限定されることに加え、フグ食文化を持つわが国においては、食品としての観点から疫学的・公衆衛生学的研究が主として行われてきたことが挙げられる。

その後の研究で、TTX はフグ科魚類以外に、ヒモムシやヒラムシ、ヒョウモンダコ、小型巻貝類、甲殻類、ツムギハゼ、両生類など広範な動物群でその保有が報告されており、*Vibrio* 属などの海洋細菌がその生合成を行うことが知られている (Noguchi *et al.*, 1987)。そして TTX は、これら細菌群によって生合成された後、食物連鎖を通じてフグなどに蓄積されるとの考え方が一般化しつつあった。事実、配合飼料のみを与えた養殖トラフグは毒化しない (Noguchi *et al.*, 2006)。一方、この TTX を生合成するとされる *Vibrio* 属などの細菌が海洋細菌全体に占める割合は、ごくごくわずかで、0.1%にも満たないことが報告されている (Shiina *et al.*, 2006)。フグが積極的に TTX を摂餌・蓄積したとしても、その量はたかが知れているとの考えもある。したがって、生態系も含めてフグの毒化機構については不明な部分が多く残されており、食物連鎖を通じた生物濃縮のみでは、フグが持っている膨大な TTX の量を説明できない、との指摘には明確な答えを示すには至っていなかった。

申請者は、これまで「フグは毒を何に使うのか？」との問いに答えるべく研究を進めてきた。その研究テーマの1つとして、天然クサフグにおける TTX の局在組織およびその季節的な TTX の量的変化について調べていたところ、3~4月に採取したクサフグの腸管内から直径1mm程度の多量の卵が検出された。DNA分析によりこの卵は、クサフグの近縁種であるヒガンフグの卵であることが判明した。この現象をもとに、「フグ毒はフグ毒保有生物間で融通されているのでは？」との発想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、「フグ毒はフグ毒保有生物間

で融通されているのか？」と題するテーマで、フグを中心とした TTX のやり取りについて明らかにすべく研究活動に取り組んだ。

これまでの研究から、状況証拠としては、フグを含む TTX 保有生物の捕食対象生物である巻貝類などに TTX が存在し、食物連鎖をさかのぼると、その行きつく先が海洋細菌であった。その細菌も条件が合えば人工的な培地中でも TTX を生産することが確かめられ、この考え方には客観性がある。一方で、細菌が生合成した TTX がフグ毒保有生物に蓄積される過程が見出されていないことも事実であった。

本研究の着想は、計画立案時に遂行中の研究の中で、定点を設けて毎月クサフグを採取して調査していたところ、3~4月に採取された個体の腸管内から多量のヒガンフグの卵が検出されたことにある。この時期は、申請者が定点に設定した海域におけるヒガンフグの産卵期と合致した。ヒガンフグが卵巣にきわめて多量の TTX を蓄積していることから (Noguchi *et al.*, 2006)、クサフグによるヒガンフグの卵の摂餌は、TTX を獲得するためと考えることには合理性があった。

そこで本研究では、フグの TTX 獲得経路の一端を明らかにするとともに、ある程度量的に限られた TTX を TTX 保有生物間で融通し合っている可能性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、海洋細菌から始まるとされる古典的食物連鎖とは異なるルートでフグ類が TTX を獲得していることを明らかにし、同種であっても生息する海域によって毒性が異なるフグの謎を解明するため、以下の通り研究を遂行した。

(1) 天然海域における *Takifugu* 属の異種間卵摂餌

神奈川県三浦半島周辺海域で観察されたクサフグ成魚—ヒガンフグ卵間の *Takifugu* 属における同属異種の有毒卵を摂餌の普遍性を明らかにするため、複数年にわたってこの現象が認められるのか確認するとともに、神奈川県三浦半島とは異なる海域で採取した試料の分析を試みた。採取した個体の腸内容物中に卵があるか否か確認し、卵が見つかった場合にはその腸内容物中に占める割合を算出した。また、その卵の毒量を定量するため LC-MS/MS 分析により標準標品と比較して行った。腸内で見つかった卵の種別別は、ミトコンドリア DNA の部分塩基配列を対象とする系統解析により実施した。

## (2) 有毒卵摂餌に伴うトラフグ幼魚の毒化

これまでクサフグで観察された同属異種の受精卵を摂餌する行動を実験室レベルで再現するため、無毒個体が容易に入手可能な

トラフグをモデル魚として毒化実験を実施した。まず、体長 50 mm、100 mm および 150 mm 程度の個体を対象にトラフグの有毒卵を与えて毒化の有無を調べた。トラフグの有毒卵は、(財)愛知県水産振興基金栽培漁業部で飼育中の履歴の明らかな天然由来の個体から採卵したものをを用いた。有毒卵の TTX 濃度をあらかじめ測定しておき、飼育実験で与えた毒量を見積もった。有毒卵を与えたトラフグ個体は、一定期間後、組織別に TTX の抽出を行い、各組織の TTX 量を定量した。TTX 濃度の定量は、LC-MS/MS 分析により標準標品と比較して行った。

#### (3) 天然海域における *Takifugu* 属稚魚の毒化に関わる餌生物の探索

これまでの申請者の予備的研究により、クサフグの稚魚は相模湾沿岸域においては、ふ化後 1~2 か月のうちにその体内にかなりの量の TTX を蓄積することが見出されていることから、体長 10~20 mm 程度のクサフグ稚魚を採取してその腸内容物を調べた。腸内容物を次世代シーケンサ分析に供し、TTX 獲得源の候補となり得る生物を探索した。

### 4. 研究成果

#### (1) クサフグ成魚によるヒガンフグ卵の摂餌

クサフグの成魚によるヒガンフグの受精卵の摂餌が恒常的に観察されるのか確認するため、ヒガンフグの産卵期にクサフグを採取し、腸内容物組成を調べるとともに、この時期のクサフグの各種組織における TTX の局在を LC-MS/MS 分析により調べた。その結果、ヒガンフグの産卵期に採取したクサフグの成魚の腸管内から、個体により量の多少はあるものの、高い確率で卵が検出された。ミトコンドリア DNA にコードされる cytochrome *b* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子を含む部分塩基配列を対象に、この卵の種判別を実施した結果、ヒガンフグの卵であることが確認された。また、予備的研究から数えると、この現象は少なくとも 4 年間にわたって観察された。なお、クサフグの腸管内から回収されたヒガンフグの卵を人工海水に収容してエアレーションしたところ、発生が進んでふ化したことから、クサフグはヒガンフグの受精卵を摂餌していると判断した。

このクサフグの成魚がヒガンフグの受精卵を摂餌する現象は、神奈川県三浦半島のみならず、愛知県沿岸で採取したクサフグからも同様にヒガンフグの卵が検出されたことから、両種が同所的に生息している海域では同様な関係が存在していることが明らかとなった。

#### (2) 有毒卵を摂餌したクサフグ体内における TTX の局在

関東南岸において、ヒガンフグの産卵期である 3 月に採取したクサフグの成魚の組織に

蓄積される TTX の量を LC-MS/MS 分析により定量した結果、TTX は、メスでは他の組織よりも皮膚および卵巣に有意に多く蓄積され、次いで肝臓に多く蓄積されていた。一方、オスでは皮膚に最も多く TTX が蓄積されており、次いで肝臓に多く蓄積されていた。これらクサフグ体内における TTX の局在のパターンおよび雌雄差は、クサフグの産卵期特有のもので、少なくとも 3 年間にわたって同様なパターンが観察された。

#### (3) 無毒トラフグ幼魚を用いた毒化実験

トラフグ属魚類にみられる近縁種間での有毒卵摂餌の目的が、捕食者による効率的な TTX の摂取にあるとの仮説を立てた。この仮説を証明するために無毒のトラフグ幼魚に有毒卵を与える飼育実験を実施した。有毒卵を与えたトラフグ幼魚の毒化の程度や TTX の組織局在について LC-MS/MS 分析により調べた。その結果、有毒卵を摂餌したトラフグ幼魚は速やかに毒化し、有毒卵を摂餌した 2 日後までには皮膚、肝臓および腸管の順に TTX が蓄積・分布していることが確認された。この毒化した個体の毒量は、体サイズの大型化とともに増大していたことから、個体サイズに依存して体内に蓄積できる毒量が決まっている可能性が示唆された。なお、配合飼料のみを与え、有毒卵を摂餌していないトラフグの幼魚については、肝臓や皮膚を含むいずれの組織からも TTX は検出されなかった。

#### (4) クサフグ稚魚の毒化に関わる餌生物の探索

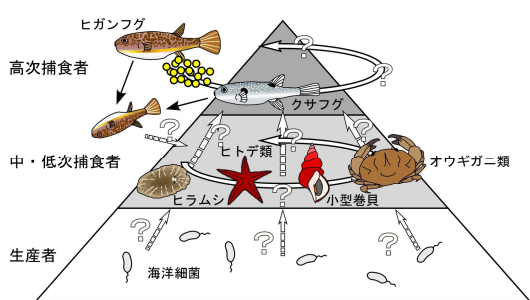
天然クサフグの稚魚を相模湾に面する漁港で採取し、LC-MS/MS 分析により保有する TTX 量を調べた。その結果、比較的多くの TTX を保有していることが明らかとなり、餌生物から TTX を摂取・蓄積していることが示唆された。この TTX の供給源となり得る生物を探索するため、腸管内容物から全 DNA を抽出し、ミトコンドリアゲノムにコードされる cytochrome-*c* oxidase subunit I (COI) 遺伝子を対象とするメタゲノム解析を行うべく、次世代シーケンサ分析に供した。その結果、個体差はあるものの、天然クサフグ稚魚の腸管内容物からオオツノヒラムシの COI 遺伝子の塩基配列と一致する DNA 断片が高頻度に検出され、オオツノヒラムシを摂餌して効率よく TTX を獲得していることが示唆された。

#### (5) まとめ

天然由来のクサフグおよびトラフグの受精卵およびふ化後の仔稚魚について、1 個体(粒)あたりの TTX 量は、受精直後が最も高く、ふ化後には 1 桁から 2 桁程度 TTX 量が減少することが明らかとなっている (Itoi *et al.*, 2014)。つまり、クサフグの成魚は、猛毒の卵巣をもつとされるヒガンフグの産卵のタイミングを狙って TTX を効率よく獲得していると考えられる。この現象は、これまで海

洋細菌が TTX を産生し、その TTX が食物連鎖を通じて最も上位の捕食者であるフグに蓄積されるとの説が常識となりつつあるフグ毒研究に、新たな考え方を吹き込む一助となるであろう。つまり、本研究により、トラフグ属の近縁種間で TTX の受け渡しが行われる TTX ループの一端が明らかになったものと考えることができる(図)。

また、フグがわが子を守るために TTX を保有しているとの考え方 (Itoi *et al.*, 2014) は説得力があるが、トラフグ属の異種間の関係でみれば TTX の保有は、外敵を誘引してしまう両刃の剣になり得る。さらに、本研究で得られた成果は、フグが生態系のトップに君臨し、ほぼ外敵が皆無であるにもかかわらず、その個体数が爆発的に増加していない理由を説明できるようになることが期待される。



図・高次捕食者間の TTX ループ・クサフグがヒガンフグの卵を TTX の摂取を目的に摂餌していることが示唆された。

#### <引用文献>

1. Itoi S, Yoshikawa S, Asahina K, Suzuki M, Ishizuka K, Takimoto N, Mitsuoka R, Yokoyama N, Detake A, Takayanagi C, Eguchi M, Tatsuno R, Kawane M, Kokubo S, Takanashi S, Miura A, Suitoh K, Takatani T, Arakawa O, Sakakura Y, Sugita H (2014) Larval pufferfish protected by maternal tetrodotoxin. *Toxicon* **78**, 35-40
2. Noguchi T, Hwang DF, Arakawa O, Sugita H, Deguchi Y, Shida Y, Hashimoto K (1987) *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in intestines of the puffer *Fugu vermicularis vermicularis*. *Marine Biology* **94**, 625-630
3. Noguchi T, Arakawa O, Takatani T (2006) TTX accumulation in pufferfish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D* **1**, 145-152
4. Shiina A, Itoi S, Washio S, Sugita H (2006) Molecular identification of intestinal microflora in *Takifugu niphobles*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D* **1**, 128-132

#### 5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計3件)

1. Riko Yamada, Tadasuke Tsunashima, Mitsuki Takei, Tatsunori Sato, Yoshiki Wajima, Makoto Kawase, Shotaro Oshikiri, Yusuke Kajitani, Keita Kosoba, Hiroyuki Ueda, Koko Abe, Shiro Itoi, Haruo Sugita (2017) Seasonal changes in the tetrodotoxin content of the flatworm *Planocera multitentaculata*. *Marine Drugs* **15**, 56 (査読有)  
DOI: 10.3390/md15030056
2. Shiro Itoi, Kento Ishizuka, Ryoko Mitsuoka, Narumi Takimoto, Naoto Yokoyama, Ayumi Detake, Chie Takayanagi, Saori Yoshikawa, Haruo Sugita (2016) Seasonal changes in the tetrodotoxin content of the pufferfish *Takifugu niphobles*. *Toxicon* **114**, 53-58 (査読有)  
DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.02.020
3. Shiro Itoi, Ao Kozaki, Keitaro Komori, Tadasuke Tsunashima, Shunsuke Noguchi, Mitsuo Kawane, Haruo Sugita (2015) Toxic *Takifugu pardalis* eggs found in *T. niphobles* gut: implications for TTX accumulation in the pufferfish. *Toxicon* **108**, 141-146 (査読有)  
DOI: 10.1016/j.toxicon.2015.10.009

(学会発表)(計6件)

1. Riko Yamada, Tadasuke Tsunashima, Yusuke Kajitani, Shiro Itoi, Haruo Sugita: Seasonal changes in TTX content of the toxic flatworm *Planocera multitentaculata*. The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan. 17 November 2016. Okinawa, Japan
2. Riko Yamada, Tadasuke Tsunashima, Kazuya Okuhara, Shiro Itoi, Haruo Sugita: Toxication of the larval pufferfish *Takifugu niphobles* by the larval flatworm *Planocera multitentaculata*. The 7th World Fisheries Congress in Busan, Korea (WFC2016). 23 May 2016. Busan, Korea
3. Shiro Itoi, Ao Kozaki, Keitaro Komori, Tadasuke Tsunashima, Shunsuke Noguchi, Mitsuo Kawane, Haruo Sugita: Toxication of the *Takifugu* pufferfish via a TTX loop consisting of TTX-bearing organisms. The 7th World Fisheries Congress in Busan, Korea (WFC2016). 23 May 2016. Busan, Korea
4. 糸井史朗：フグにおける TTX の生物学的役割．新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー」地区ミニシンポジウム(招待講演)．2015年5月14日．名古屋大学野

依記念物質科学研究館（愛知県名古屋市）

5. 網島忠相、伊澤心、山田理子、糸井史朗、萩谷盛雄、杉田治男：TTX を保有する多岐腸目ヒラムシ類の系統分類．平成 26 年度日本水産学会秋季大会．2014 年 9 月 20 日．九州大学（福岡県福岡市）

6. Tadasuke Tsunashima, Morio Hagiya, Nobuyuki Tsuyuki, Shiro Itoi, Haruo Sugita: A molecular framework for the taxonomy of the marine turbellarian flatworms (Platyhelminthes, Polycladida). The 10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC2014). 06 May 2014. Taipei, Taiwan

〔その他〕

ホームページ等

1. 日本大学生物資源科学部 海洋生物資源科学科ホームページ

オオツノヒラムシにおけるフグ毒の季節変化（プレスリリース）

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~kaiyo/wp/press-release/20170313-2/>

フグ毒はフグの仲間で融通されている（プレスリリース）

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~kaiyo/wp/press-release/20151113-2/>

2. 日本大学生物資源科学部ホームページ  
ニュース「大学院修了生 山田理子さんの論文の一部が科学雑誌の表紙を飾りました！」  
<http://www.brs.nihon-u.ac.jp/news01/7982.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

糸井 史朗（ITOI, Shiro）

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：30385992

- (2) 研究分担者 なし

- (3) 連携研究者 なし

- (4) 研究協力者

萩谷 盛雄（HAGIYA, Morio）

日本大学・生物資源科学部・研究員

網島 忠相（TSUNASHIMA, Tadasuke）

日本大学大学院・生物資源科学研究科・大学院生

山田 理子（YAMADA, Riko）

日本大学大学院・生物資源科学研究科・大学院生

上田 紘之（UEDA, Hiroyuki）

日本大学大学院・生物資源科学研究科・大学院生

阿部 江子（ABE, Koko）

日本大学・生物資源科学部・実習助手

河根 三雄（KAWANE, Mitsuo）

（財）愛知県水産業振興基金栽培漁業部