

令和元年6月6日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04552

研究課題名(和文) 海洋生態系にフグ毒ループは存在するのか フグ毒と海洋生物のミッシングリンクを解く

研究課題名(英文) Studies on TTX loop in marine ecosystem - an enigma of missing links 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) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、クサフグがヒガンフグの有毒卵を摂餌することを明らかにした。この結果は、フグ毒保有魚類がその体内に保有するフグ毒を効率よく摂取する手段として近縁種の有毒卵を摂餌していることを示唆する。また、ツムギハゼやオキナワフグなどのフグ毒保有魚類は、多量のフグ毒を保有するオオツノヒラムシを摂餌することを明らかにした。以上の結果は、高次捕食者間でフグ毒が循環することで、フグ毒保有生物が高濃度のフグ毒を保有できることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでフグ毒は、細菌を生産者とする食物連鎖(網)を通じてフグの体内に蓄積されると考えられていた。一方、細菌が生産するフグ毒の量が少ないことから、フグが持つ毒量を説明できないとの指摘があった。本研究の成果は、フグ毒を保有する高次捕食者間でフグ毒をやり取りしている事例を複数報告し、フグ毒がこれら高次捕食者間で循環していることを提案した。本研究の成果は、未解明な部分が多く残されていたフグの毒化機構に新たな考え方を導入することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We revealed the presence of numerous Takifugu pardalis eggs in the intestinal contents of another pufferfish, Takifugu niphobles, suggesting that T. niphobles ingested the toxic eggs of another pufferfish T. pardalis to toxify themselves more efficiently. Additionally, the toxic goby Yongeichthys criniger and the milkspotted pufferfish Chelonodon patoca fed on the toxic flatworm Planocera multitentaculata. These results suggest that concentrated TTX is pooled in the TTX loop among the TTX-bearing organisms, which are the predators at higher trophic levels in the food web.

研究分野：水産化学

キーワード：フグ毒 テトロドトキシン TTXループ オオツノヒラムシ ツノヒラムシ属

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでフグが持つフグ毒 TTX の生物学的意義について明らかにした研究は少なかった。近年、我々は、「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。その中で、*Takifugu* 属のメスでは肝臓に蓄積した TTX を卵巣に送り込み、ふ化したばかりの仔魚の体表を取り囲むように TTX を局在させることで、その生活史上外敵に対して最も弱い時期を乗り越えることを可能にしていることを報告した (Itoi *et al.*, 2014)。*Takifugu* 属のフグは、少なくとも外敵からわが子を守るために TTX を使用しているのは確実であると思われる。

一方で、フグの毒化機構についても不明な点が多く残されている。これまでの研究で、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保有されていることが明らかになっていることに加え、これら生物から単離された *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)。そのため 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る。事実、配合飼料のみを与えた養殖トラフグは毒化しないことに加え、この無毒トラフグに TTX を含む餌を与えると速やかに毒化することが報告されている (Noguchi *et al.*, 2006)。しかし、この TTX を生合成するとされる *Vibrio* 属細菌の海洋細菌全体に占める割合は、ごくわずかで、0.1%にも満たない (Shiina *et al.*, 2006)。フグが積極的に TTX を摂取・蓄積したとしても、その量はたかが知れているのである。したがって、食物連鎖を通じた生物濃縮のみでは、フグが持っている TTX 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。

2. 研究の目的

我々がこれまで実施してきた研究の中で、天然クサフグにおける TTX の組織局在およびその季節的な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消化管内から直径 1 mm 程度の卵が多数検出された。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。ヒガンフグの卵巣には高濃度の TTX が蓄積されていることが知られていることから、クサフグが効率よく TTX を摂取するためにヒガンフグの卵を摂餌しているとの仮説を立てた。本研究では、この現象の意義解明に向けて再現性を確認するとともに、同様な現象がフグ毒保有生物間で起きているのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) フグ科魚類の異種間有毒卵摂餌

Takifugu 属のクサフグーヒガンフグ種間での有毒卵摂餌が観察されたことから、この再現性を確認するため、三浦半島近海でクサフグを採取し、有毒卵摂餌の有無を検証した。試料の消化管内容物中に卵があるか、卵が見つかった場合にはその消化管内容物中に占める割合、そしてその卵の毒量を LC-MSMS 分析により調べた。卵の種判別は、DNA 分析により実施した。また、この現象を実験的に確認するため、無毒のトラフグ種苗に有毒卵を与える飼育実験を実施した。トラフグ組織中の毒量は LC-MSMS 分析により定量した。

(2) フグ毒保有生物の毒化に関わる餌生物の探索

関東南岸で体長 10~20 mm 程度のクサフグ稚魚を採取し、次世代シーケンシング (NGS) 分析により、その消化管内容物中の生物種組成を調べた。また、先島諸島の西表島および石垣島でオキナワフグやツムギハゼなどの有毒生物の消化管内容物組成を NGS 分析により調べた。これら分析により明らかとなった生物種特異的な検出法を開発した。この他、フグの効率的な毒化に貢献し得る海洋生物の探索を行った。

(3) 有毒生物摂餌による毒化

クサフグの稚魚および若魚の無毒個体に、有毒生物を与える飼育実験により、毒化について調べた。餌生物やクサフグ組織中の毒量は LC-MSMS 分析により定量した。

4. 研究成果

(1) フグ科魚類の異種間有毒卵摂餌

クサフグによるヒガンフグ卵の摂餌の再現性を確認するため、3月~4月に複数年にわたりクサフグを採取して消化管内容物を調べた。その結果、毎年ヒガンフグの産卵期には、クサフグの消化管内容物中にヒガンフグ卵が認められた。この現象は三浦半島の相模湾側のみならず、東京湾の千葉県側、愛知県沿岸など、複数の箇所でも認められた。この有毒卵摂餌がフグの効率的な毒化に寄与していることを明らかにするため、無毒のトラフグ種苗 (全長 100 mm 程度) に有毒卵を与える飼育実験を行った。その結果、トラフグは積極的に有毒卵を摂餌するとともに、一度の摂餌後速やかに毒化することが明らかとなった。有毒卵を摂餌したトラフグの組織ごとに TTX の局在を調べた結果、皮膚に最も多くの TTX が局在し、肝臓、消化管と続いた。また、有毒卵摂餌後 2 日後には皮膚に TTX が蓄積していることも明らかとなった。これらの結果は、クサフグが効率よく TTX を摂取するためにヒガンフグの有毒卵を摂餌していることを示すとともに、高次捕食者間で TTX を循環させる TTX ループが存在することを示している。また、一般にトラフグは、皮膚には TTX を保有していないことが知られており、フグ料理でも提供されている。一方で、本研究の結果から、少なくともふ化直後から全長 100 mm 程度までの個体では、皮膚に毒を局在させていることが明らかとなった。今後、食品衛生の観点からも、

どの成長段階で皮膚に TTX を局在させなくなるのかを明らかにする必要がある。

(2) フグ毒保有魚類の毒化に関わる餌生物の探索

関東南岸で体長 10~20 mm 程度のクサフグ稚魚を採取し、その消化管内容物中の生物種組成を調べるために COI 遺伝子を対象とする NGS 分析に供した結果、オオツノヒラムシの COI と完全に一致する配列が一定数得られた。この現象は複数年にわたり観察された。また、オオツノヒラムシの COI 遺伝子を特異的に増幅できる PCR 法を開発した。沿岸部で採取したクサフグの成魚・若魚の消化管内容物から抽出した全 DNA を鋳型に当該 PCR を実施した結果、オオツノヒラムシの COI 遺伝子の DNA 断片と同サイズの増幅断片が増幅され、塩基配列からもオオツノヒラムシの COI 配列であることが確認された。これらの結果は、クサフグが生涯を通してオオツノヒラムシの幼生や成体を摂餌して効率よく TTX を摂取していることを示唆すると同時に、フグの毒化にはオオツノヒラムシの保有する TTX が重要であることを示唆している。

先島諸島の西表島および石垣島でオキナワフグやツムギハゼなどの有毒生物の消化管内容物組成を NGS 分析により調べた結果、オオツノヒラムシの COI 遺伝子と一致する DNA 断片が高い頻度で検出された。また、オキナワフグの消化管内容物からはツムギハゼの COI 遺伝子と一致する DNA 断片が多数検出されており、ここでも高次捕食者間で TTX を循環させる TTX ループが存在することが示された。

これらフグ毒保有魚類の毒化には、オオツノヒラムシ、あるいはこれにきわめて近縁なヒラムシ類が関与していることが示唆された。本研究を実施する中で、沖縄本島の近海で形態的特徴がツノヒラムシ属のヒラムシに近いものが採取された。このヒラムシにおける TTX 保有の有無を LC-MS/MS 分析により調べた結果、きわめて高濃度の TTX を保有することが明らかとなった。また、分子系統解析の結果、このヒラムシは、ツノヒラムシ属に分類されることが明らかとなった。以上の結果は、高濃度のフグ毒を保有する未知のヒラムシが存在することを示唆しており、今後研究を進める必要があることを示している。

(3) 有毒生物摂餌による毒化

無毒のクサフグの若魚にオオツノヒラムシの成体の半身を与えたところ、積極的に摂餌し、速やかに TTX を体内に蓄積することが明らかとなった。また、オオツノヒラムシの幼生をクサフグの稚魚に与えたところ、積極的に摂餌して速やかに毒化した。これらの結果は、上述の自然界におけるクサフグのオオツノヒラムシに対する捕食を実験室内で再現可能なことを示すとともに、クサフグが常にオオツノヒラムシを摂餌している可能性を示唆する。

このように、これまでのフグ毒研究で得られている研究成果について考える中で、フグ毒の摂取を目的とした独自の食物連鎖（網）が存在することが示唆された。つまり、古典的な食物連鎖に加えて「フグ毒ループ」が加わることを示すことができたものと考えている。上述の通り、フグがもつ毒の量は、古典的な食物連鎖による生物濃縮のみでは説明できないと考える研究者がいることは事実である。しかしながら、TTX を保有するフグ種間で、そしてその他フグ毒保有生物間で TTX の受け渡しが行われているとすれば、大量のフグ毒がフグを含む比較的高次の消費者間で受け渡しされ、海洋細菌が生産・供給する TTX が量的にはわずかであったとしても、フグのもつフグ毒の量を説明することは可能であろう。また、このような視点で考えると、同種のフグであっても生息海域の違いによって TTX 保有量が大きく異なることも説明可能であるかもしれない。

< 引用文献 >

- Itoi et al.: Larval pufferfish protected by maternal tetrodotoxin. *Toxicon* **78**, 35–40 (2014)
- Noguchi et al.: *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in intestines of the puffer *Fugu vermicularis vermicularis*. *Mar. Biol.* **94**, 625–630 (1987)
- Noguchi et al.: TTX accumulation in pufferfish. *Comp. Biochem. Physiol. D* **1**, 145–152 (2006)
- Okita et al.: Puffer smells tetrodotoxin. *Ichthyol. Res.* **60**, 386–389 (2013)
- Shiina et al.: Molecular identification of intestinal microflora in *Takifugu niphobles*. *Comp. Biochem. Physiol. D* **1**, 128–132 (2006)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 3 件)

1. 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*. *Scientific Reports* **8**, 12302 (10 pages) (10.1038/s41598-018-30696-z) 査読有
2. 糸井史朗 (2018) テトロドトキシンの生物学的意義とフグ毒中毒 . *モダンメディア* **64**, 241–249 (http://www.eiken.co.jp/modern_media/backnumber/pdf/2018_07/001.pdf) 査読無
3. Itoi S, Suzuki M, Asahina K, Sawayama E, Nishikubo J, Oyama H, Takei M, Shiibashi N, Takatani T, Arakawa O, Sugita H (2018) Role of maternal tetrodotoxin in survival of larval pufferfish. *Toxicon*

- 148, 95–100 (10.1016/j.toxicon.2018.04.014) 査読有
4. Ueda H, Itoi S, Sugita H (2018) TTX-bearing planocercid flatworm (Platyhelminthes: Acotylea) in the Ryukyu Islands, Japan. *Marine Drugs* **16**, 37 (11 pages) (10.3390/md16010037) 査読有
 5. Okita K, Tan E, Satone H, Kinoshita S, Asakawa S, Ojima D, Yamazaki H, Sakiyama K, Takatani T, Arakawa O, Hagiwara A, Sakakura Y (2017) Transcriptome analysis of tetrodotoxin sensing and tetrodotoxin action in the central nervous system of tiger puffer *Takifugu rubripes* juveniles. *Fisheries Science* **83**, 401–412 (10.1007/s12562-017-1079-z) 査読有
 6. Sakakura Y, Takatani T, Nakayasu J, Yamazaki H, Sakiyama K (2017) Administration of tetrodotoxin protects artificially-raised juvenile tiger puffer *Takifugu rubripes* from predators. *Fisheries Science* **83**, 191–198 (10.1007/s12562-016-1046-0) 査読有
 7. Tsunashima T, Hagiya M, Yamada R, Koito T, Tsuyuki N, Izawa S, Kosoba K, Itoi S, Sugita H (2017) A molecular framework for the taxonomy and systematics of Japanese marine turbellarian flatworms (Platyhelminthes, Polycladida). *Aquatic Biology* **26**, 159–167 (10.3354/ab00682) 査読有
 8. Yamada R, Tsunashima T, Takei M, Sato T, Wajima Y, Kawase M, Oshikiri S, Kajitani Y, Kosoba K, Ueda H, Abe K, Itoi S, Sugita H (2017) Seasonal changes in the tetrodotoxin content of the flatworm *Planocera multitentaculata*. *Marine Drugs* **15**, 56 (10 pages) (10.3390/md15030056) 査読有
 9. Itoi S, Ishizuka K, Mitsuoka R, Takimoto N, Yokoyama N, Detake A, Takayanagi C, Yoshikawa S, Sugita H (2016) Seasonal changes in the tetrodotoxin content of the pufferfish *Takifugu niphobles*. *Toxicon* **114**, 53–58 (10.1016/j.toxicon.2016.02.020) 査読有
 10. Itoi S, Kozaki A, Komori K, Tsunashima T, Noguchi S, Kawane M, Sugita H (2015) Toxic *Takifugu pardalis* eggs found in *Takifugu niphobles* gut: implications for TTX accumulation in the pufferfish. *Toxicon* **108**, 141–146 (10.1016/j.toxicon.2015.10.009) 査読有

[学会発表](計33件)

1. 米澤遼、五十嵐洋治、吉武和敏、木下滋晴、糸井史朗、杉田治男、浅川修一：フグ毒テトロトキシンを保有するヒラムシの消化管のメタゲノム解析。平成31年度日本水産学会春季大会、2019年
2. 糸井史朗：TTX保有生物におけるTTXの獲得ルートと役割。マリンケミカルバイオロジー研究会2019(招待講演)2019年
3. 糸井史朗：フグはフグ毒をどこから獲得し、何に使うのか？第63回日本放線菌学会学術講演会(招待講演)2018年
4. 吉敷綾乃、上田紘之、糸井史朗、杉田治男：オオツノヒラムシの産卵期におけるTTX保有量の変化。平成30年度日本水産学会秋季大会、2018年
5. 糸井史朗、尾山輝、杉田治男：トラフグ属魚類の毒化に関わるオオツノヒラムシの影響。日本水産増殖学会第17回大会、2018年
6. 佐々木壮太、寺島武寿、沖田光玄、平井慈恵、高谷智裕、荒川修：トラフグ初期発育段階におけるフグ毒の獲得。平成30年度日本水産学会春季大会、2018年
7. Tatsuno R, Gao W, Yoshikawa H, Takahashi H, Fukuda T, Furushita M, Nishihara GN, Takatani T, Arakawa O: Tetrodotoxin dynamics in the pufferfish *Takifugu rubripes* changes depending of its liver development. JSFS 85th Anniversary-Commemorative Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, 2017年
8. Gao W, Kanahara Y, Tatsuno R, Yoshikawa H, Soyano K, Takatani T, Arakawa O: Tetrodotoxin-specific toxin uptake and maturation-associated toxin accumulation in the pufferfish *Takifugu pardalis*. JSFS 85th Anniversary-Commemorative Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, 2017年
9. Ueda H, Yamada R, Takei M, Abe M, Itoi S, Sugita H: Effects of sexual maturation on the toxicity of the toxic flatworm *Planocera multitentaculata*. JSFS 85th Anniversary-Commemorative Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, 2017年
10. Itoi S, Takei M, Yamada R, Sugita H: Toxication process of *Takifugu* pufferfish: detection of TTX-bearing organisms in intestinal contents of pufferfish. JSFS 85th Anniversary-Commemorative Symposium “Fisheries Science for Future Generations”, 2017年
11. 山田理子、武井美月、和嶋良己、糸井史朗、杉田治男：オオツノヒラムシを中心とする環境中におけるTTXの動態。平成29年度日本水産学会春季大会、2017年
12. Yamada R, Tsunashima T, Kajitani Y, Itoi S, Sugita H: 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, 2016年
13. 武井美月、出頭孝浩、山田理子、糸井史朗、杉田治男：有毒 *Planocera* 属ヒラムシ摂餌におけるクサフグの毒化。平成28年度日本水産学会秋季大会、2016年
14. 山田理子、綱島忠相、梶谷雄介、糸井史朗、杉田治男：オオツノヒラムシにおけるTTX保有量の季節変化。平成28年度日本水産学会秋季大会、2016年
15. Itoi S, Kozaki A, Komori K, Tsunashima T, Noguchi S, Kawane M, Sugita H: Toxication of the *Takifugu* pufferfish via a TTX loop consisting of TTX-bearing organisms. The 7th Fisheries Congress in Busan, Korea, 2016年

16. Yamada R, Tsunashima T, Okuhara K, Itoi S, Sugita H: Toxicification of the larval pufferfish *Takifugu niphobles* by the larval flatworm *Planocera multitentaculata*. The 7th Fisheries Congress in Busan, Korea, 2016 年
17. 山田理子、網島忠相、梶谷雄介、糸井史朗、杉田治男：分子生物学的手法による有毒ヒラムシ *Planocera* 属の検出法の開発．平成 28 年度日本水産学会春季大会、2016 年
18. 網島忠相、山田理子、梶谷雄介、萩谷盛雄、糸井史朗、杉田治男：ミトコンドリアゲノムコードの COI 遺伝子領域に基づく多岐腸類の分子系統解析．平成 28 年度日本水産学会春季大会、2016 年
19. 山田理子、網島忠相、奥原和也、糸井史朗、杉田治男：*Planocera* 属幼生がクサフグ稚魚の毒化に及ぼす影響．平成 27 年度日本水産学会秋季大会、2015 年
20. 糸井史朗：フグにおける TTX の生物学的役割．新学術領域「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

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：杉田 治男

ローマ字氏名：(SUGITA, Haruo)

所属研究機関名：日本大学

部局名：生物資源科学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：5 0 1 3 9 0 5 2

研究分担者氏名：鈴木 美和

ローマ字氏名：(SUZUKI, Miwa)

所属研究機関名：日本大学

部局名：生物資源科学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：7 0 4 0 9 0 6 9

研究分担者氏名：高谷 智裕

ローマ字氏名：(TAKATANI, Tomohiro)

所属研究機関名：長崎大学

部局名：水産・環境科学総合研究科 (水産)

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：9 0 3 0 4 9 7 2

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。