

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380109

研究課題名(和文)トラフグのフグ毒センシングに関する行動・分子生物学的研究

研究課題名(英文) Behavioral and molecular biology of sensing mechanism for tetrodotoxin in Takifugu rubripes

研究代表者

阪倉 良孝 (SAKAKURA, Yoshitaka)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号：20325682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：フグに対するフグ毒の生態学的意義の解明の一環として、トラフグ稚魚のフグ毒の知覚・摂取と脳内作用を詳細に調べた。まず、Y字迷路水槽内でフグ毒に対する行動を調べ、毒の取り込みを免疫組織化学により調べた結果、トラフグ稚魚はフグ毒を嗅覚で感知して摂取し、取り込んだフグ毒が肝臓、皮膚、および脳と感覚器(眼、嗅覚器)に速やかに移行されることを明らかにした。フグ毒を感知した個体の脳内遺伝子発現を次世代シーケンサーで調べたところ、トラフグはフグ毒を嗅覚受容体で感知し、次に食欲が促進されてフグ毒の摂取を開始し、脳内に直接作用して報酬系が活発化されるという経路が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate ecological meanings of tetrodotoxin (TTX) for pufferfish, sensing, ingestion and mode of action in the brain of TTX were investigated using non-toxic hatchery-reared Takifugu rubripes. Behavioral analysis by Y-maze test revealed that a pufferfish senses TTX by olfaction and ingests orally, and TTX was immediately distributed into liver, skin and central nervous system (brain, eye and olfactory organ). Gene expression analysis in the brain of pufferfish which sensed TTX was conducted using a next generation sequencer. As a result, genes involving odorant receptors, feeding-stimulating peptides and reward-system upregulated, which supports the findings of behavioral and physiological observations.

研究分野：水産増殖学

キーワード：水産学 行動学 生理活性 脳・神経 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

「フグが何故毒を持つのか？」という問いは、永く海洋生物学・水産生物学の研究者の興味を引きつけて離さない研究課題となっており、現在に至っている。

フグ毒 (TTX) に関する研究は、まず、我が国の重要な水産資源であり固有の食文化を支えるトラフグを中心として、その安全な利用の観点から、多くの疫学的調査に端を発した。近年はフグ毒の疫学研究に加えて、TTX のフグに対する生理活性とその蓄積機構に関する生理・生化学的な研究が進展している。その結果、トラフグの TTX 蓄積は TTX 保有ベントスの摂餌に起因することと、無毒の飼餌料で飼育したトラフグからは TTX が全く検出されないことが明らかになった (Noguchi et al. 2005)。また、TTX 投与が養殖トラフグの免疫機能を賦活化すること (Noguchi et al. 2005) や、TTX 結合タンパク (Yotsu-Yamashita et al. 2002) や TTX 耐性遺伝子 (Venkatesh et al. 2005) がトラフグで同定されるなどの知見が得られている。これらの知見は、「TTX はフグの生命維持には必須の分子ではない」こと、すなわち「フグは毒無しで生きられる」ことを示す一方、「フグは TTX を体内に取り込むることにより独自の生体内恒常性を維持する」ことをも示唆するものである。

研究代表者は、激減したトラフグ資源回復のための種苗放流とトラフグ稚魚の行動特性に関する研究 (H19~H20, H21~H23 基盤研究(C)) を通じて、これまで TTX は脊椎動物の血液脳関門を通過できないとされていた TTX が、「天然トラフグの中枢神経 (脳、嗅神経、視神経) から TTX が検出」され、「無毒のトラフグ稚魚に TTX を投与すると速やかに中枢神経に取り込まれて情動反応が変化し、天然魚と同じ行動特性を示すようになる」ことを見いだした。そこで、「TTX が、トラフグ稚魚の生体防御機能のみならず、捕食者回避行動に関わる高次行動のニューロトランスミッターを修飾する分子として機能する」という仮説に辿り着いた。

そこで、この仮説を検証するための作業仮説として、「トラフグがどのように TTX を感知して摂取し、取り込まれた TTX が中枢神経のどの部位に作用するか」を解明すれば、フグ毒と情動行動の間にある関係をより深く、かつ正確に理解出来るとの結論に至った。

2. 研究の目的

トラフグがどのように TTX を感知して摂取し、中枢神経のどの部位に作用し、その結果として行動をどのように変化させるのか、を行動学と分子生物学の手法を組み合わせることを目的とした。そして TTX がトラフグ生体内でどのような生理機能をもち、そのことが本種の行動・生態・進化にどのような意義を有するかを理解することを最終目標とした。

3. 研究の方法

【実験 1】トラフグの TTX センシング: 予備実験をもとに、「トラフグの TTX センシングは嗅覚である」ことを立証する行動実験を実施する。Y 字迷路水槽に TTX 含有とそうでないアガロースゲルを置き、無毒トラフグ人工種苗の誘引試験を実施した。ここで、嗅覚を遮断した個体とそうでない個体を設け、繰り返し検証した。さらに、TTX を摂取した個体の TTX 体内動態を TTX モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的手法により調べた。

【実験 2】TTX センシングおよび TTX 動態の責任遺伝子スクリーニング: 無毒人工種苗を 1 尾収容した水槽に TTX 含有担体を投入して TTX に対する誘引試験を行い、1 時間の観察中にフグ毒を摂取し続けた個体と反応しなかった個体とに分けた。トラフグゲノムデータベース上の推定転写産物をもとに作製したマイクロアレイチップを用いて、嗅上皮と脳に存在する全 RNA の遺伝子発現解析を行い、フグ毒誘引個体に特徴的な発現を示す遺伝子を調べた。

【実験 3】リアルタイム PCR と in situ ハイブリダイゼーションによる責任遺伝子の脳内および感覚器官での発現状況: TTX を鼻に滴下した個体と経口投与した個体について経時的なサンプリングを実施した。このサンプルを、実験 2 で予測された TTX センシング関連遺伝子についてリアルタイム PCR による発現解析をし、嗅覚器官と脳内での遺伝子発現の動態を精査するとともに、特定できた遺伝子の細胞レベルでの発現を in situ ハイブリダイゼーションによって解析する。

【実験 4】TTX 知覚および取り込みの際のトラフグ脳内の遺伝子発現変動: 新鮮海水に浸漬した個体とフグ毒添加海水に浸漬して嗅覚を刺激した個体について、次世代シーケンサーを用いて嗅上皮と脳からそれぞれ全 mRNA をシーケンスした後、目的遺伝子の mRNA のコピー数を計数して比較し、TTX の知覚と蓄積により発現の変動する遺伝子を調べた。同様の操作を、生理食塩水またはフグ毒を投与した個体に対しても実施した。

4. 研究成果

【実験 1】

トラフグ稚魚に無手術、擬手術または嗅覚遮断手術を施して Y 字迷路水槽内で TTX に対する行動を比較した。無手術個体と擬手術個体は TTX に誘引されたが、嗅覚を遮断すると誘引反応が消失した (図 1)。このことから、フグは嗅覚で TTX を知覚することが初めて明らかになった (業績 6)。

TTX を摂取した無毒人工種苗は天然稚魚と同様に、肝組織、表皮基底細胞、脳 (特に視蓋、小脳、延髄)、視神経および嗅上皮に TTX を蓄積した。

以上より、トラフグ稚魚は TTX を嗅覚で知覚し、摂餌行動によって取り込んだ TTX が脳および感覚器 (眼、嗅覚器) に移行されるこ

とが分かった(業績4)

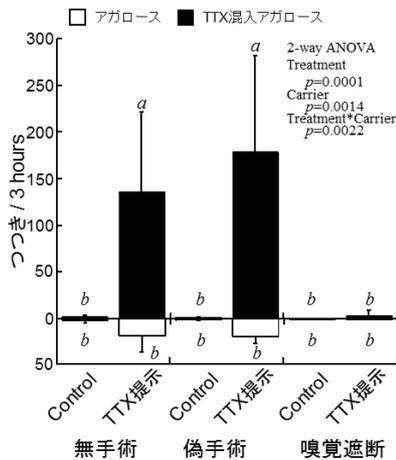


図1 無毒トラフグ稚魚に対して TTX 混入アガロース担体を提示したときの誘引・取り込みの行動観察の結果。嗅覚を遮断した個体からはフグ毒に対する誘引性が消失する(業績6)

【実験2】

嗅上皮では、TTX 誘引個体は非誘引個体と比べて嗅覚受容体 OR (2 種)、V1R (1 種) および V2R (2 種) の発現が高く (1.6-3.3 倍)、OR の一部 (3 種) の発現が低かった (1/2.7-2/3 倍)。これらの嗅覚受容体の発現パターンの違いが、TTX に対する誘引行動の発現に関与していると考えられる。TTX 誘引個体の脳内では、摂食亢進に加え摂食抑制に関わる神経ペプチドの発現も高かった。これらのことから、トラフグ稚魚は摂食抑制系が機能し始めてもフグ毒を取り込み続けると考えた。

【実験3】

対照区では TTX 耐性 Na チャネル遺伝子の 1 種の発現量は時間が経過しても変化しなかったが、TTX 刺激区では刺激直後から発現量が上昇し、15 分後にピークに達した後、漸減した。嗅覚トランスダクション遺伝子 4 種および TTX 摂取を促す遺伝子 2 種は、時間経過に伴い発現量が変動するものもみられたが、発現パターンは試験区間で同様であった。以上より、トラフグ稚魚は TTX を嗅覚で感知すると、TTX 耐性 Na チャネルを発現させ、その脳内蓄積に備えることが推察されたが、TTX の感知および摂取に関連する遺伝子は現時点では特定できなかった。また、in situ ハイブリダイゼーションでもノイズが多く、標的遺伝子の発現を確認することが出来なかった。

【実験4】

TTX を嗅がせた個体については、TTX の刺激により嗅上皮中の OR 嗅覚受容体 1 種が海水浸漬個体と比べて発現が 1/4 に低下した。脳では、TTX の刺激により摂食亢進性神経ペプチドの受容体 1 種の発現が海水浸漬個体と比べて 1.5 倍増加し、摂食抑制性神経ペプチ

ド 2 種の発現が 1/5-1/2 に低下したことから、トラフグ稚魚はフグ毒を感知すると食欲が促進されると考えた。

TTX の投与により嗅上皮では嗅覚受容体の OR (6 種) と V2R (1 種) が発現変動し、嗅覚系が再編成されることが示された。脳では、TTX の投与により脳内モノアミンの放出に関わるシナプス小胞モノアミントランスポーターの発現が 1.5-2.0 倍増加し、ドーパミンの放出を促進するカンナビノイド受容体の発現が 1.5 倍増加したことから、報酬系に關与するドーパミンが分泌されたと考えている。

以上の結果から、トラフグ稚魚のフグ毒の知覚は、嗅覚器にフグ毒が直接作用して嗅覚受容体の発現パターンが再編成されることによって起こると考えられる。トラフグ稚魚はフグ毒を知覚すると食欲が促進されフグ毒の摂取を開始し、摂食抑制系が機能してもフグ毒を要求し続け、脳内に直接作用して報酬系が活発化することから、フグは進化の過程でフグ毒を報酬として認識することで、フグ毒を積極的に体内に取り込むようになったという新しい仮説が導き出された。

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 6 件)

山根 晃・吉田 歩・山崎英樹・崎山一孝・河端雄毅・阪倉良孝 (2015) トラフグ人工種苗の成長に伴う行動と食性の変化. 水産増殖 印刷中 (査読あり)

阪倉良孝 (2015) 書評「毒魚の自然史 - 毒の謎を追う」. 魚類学雑誌 62(1), 74-75. (査読なし)

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. (査読あり)

Okita, K., Takatani, T., Nakayasu, J., Yamazaki, H., Sakiyama, K., Ikeda, K., Arakawa, O., Sakakura, Y. (2013) Comparison of the localization of tetrodotoxin between wild pufferfish *Takifugu rubripes* juveniles and hatchery-reared juveniles with tetrodotoxin administration. *Toxicon* 71, 128-133. (査読あり)

谷口香織・高尾秀樹・新名真也・山中祐二・岡田幸長・中島梨花・王俊杰・辰野竜平・阪倉良孝・高谷智祐・荒川修・野口玉雄 (2013) 天然トラフグ肝臓の毒性

分布. 食品衛生学雑誌 54(4), 277-281.
(査読あり)

Okita, K., Yamazaki, H., Sakiyama, K., Yamane, H., Niina, S., Takatani, T., Arakawa, O., Sakakura, Y. (2013) Puffer smells tetrodotoxin. Ichthyological Research 60(4), 386-389. (査読あり)

〔学会発表〕(計 9 件)

Sakakura, Y., Yamane, H., Yamazaki, H., Sakiyama, K. Evaluation of Fish Quality for Release in the Hatchery-Reared Tiger Puffer Juveniles. 11th Korea-Japan, Japan-Korea Joint Symposium for Aquaculture, October 31- November 1, 2014, Kunsan, Korea.

沖田光玄・佐藤根妃奈・陳盈光・木下滋晴・浅川修一・山崎英樹・崎山一孝・高谷智裕・荒川修・阪倉良孝：フグ毒を投与したトラフグ人工種苗の嗅上皮および脳のトランスクリプトーム解析. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 平成 26 年 9 月 19-22 日, 九州大学, 福岡

沖田光玄・平野 雪・木下滋晴・小島大輔・山崎英樹・崎山一孝・高谷智裕・荒川 修・阪倉良孝：トラフグ稚魚のフグ毒感知, 摂取, および脳内蓄積に関連する遺伝子の発現. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 平成 26 年 3 月 27-31 日 北海道大学函館キャンパス, 北海道
糸井史朗・吉川沙織・朝比奈 潔・鈴木美和・石塚健人・瀧本成美・光岡涼子・横山直人・出竹歩美・高柳智江・江口美帆・小久保翔太・高梨志保里・三浦 愛・河根三雄・水藤勝喜・辰野竜平・高谷智裕・荒川 修・阪倉良孝・杉田治男：フグの仔魚は母親由来の TTX によって守られている. 平成 26 年度日本水産学会春季大会, 平成 26 年 3 月 27-31 日 北海道大学函館キャンパス, 北海道

Okita, K., Gotoh, K., Kondo, H., Hirono, I., Hirano, Y., Kaneko, G., Kinoshita, S., Ojima, D., Yamazaki, H., Sakiyama, K., Tatsuno, R., Yamane, H., Niina, S., Takatani, T., Arakawa, O., Sakakura, Y. Search for the genes which associate with TTX sensing of tiger puffer *Takifugu rubripes* by microarray. 9th East China Sea Conference ~International Conference on the Marine Biodiversity and Environmental Fisheries Science of the East China Sea~, September 29 – October 1, 2013, Keelung, Taiwan.

山根晃・沖田光玄・高谷智裕・阪倉良孝・山崎英樹・崎山一孝：トラフグ稚魚の塩分選択性. 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 平成 25 年 3 月 26-30 日 東京海洋大学, 東京

沖田光玄・後藤完奈・近藤秀裕・廣野育生・平野雪・金子元・木下滋晴・小島大

輔・山崎英樹・崎山一孝・辰野竜平・山根晃・新名真也・高谷智裕・荒川修・阪倉良孝：トラフグのフグ毒感知に関わる遺伝子のマイクロアレイ解析による探索. 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 平成 25 年 3 月 26-30 日 東京海洋大学, 東京

Okita, K., Yamasaki, H., Sakiyama, K., Yamane, H., Niina, S., Takatani, T., Arakawa, O. & Sakakura, Y. Puffers smell tetrodotoxin. 10th Japan-Korea, Korea-Japan Joint Symposium on Aquaculture 2012, December 8-9, 2012, Nagasaki, Japan.

Yamane, H., Okita, K., Sakiyama, K., Yamasaki, H., Takatani, T. & Sakakura, Y. Salinity selectivity of tiger puffer juveniles. 10th Japan-Korea, Korea- Japan Joint Symposium on Aquaculture 2012, December 8-9, 2012, Nagasaki, Japan

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

阪倉 良孝 (SAKAKURA, Yoshitaka)
長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授
研究者番号：20325682

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

木下 滋晴 (KINOSHITA, Shigeharu)
東京大学・農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：40401179

高谷 智裕 (TAKATANI, Tomohiro)
長崎大学・水産・環境科学総合研究科 (水産)
・教授
研究者番号：90304972