

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07581

研究課題名(和文) フグのフグ毒摂取は脳内報酬系で調節される

研究課題名(英文) Does pufferfish intake tetrodotoxin by brain reward system?

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：フグ毒(TTX)感知によりトラフグ稚魚の食欲が増進し、TTX添加飼料給餌が稚魚の成長を促進するという仮説を立てた。無毒のトラフグ人工種苗にTTXを嗅がせる処理を行い、リアルタイムPCRにより食欲促進ホルモンであるニューロペプチドY(NPY)の脳内での遺伝子発現量を調べた。TTXを感知した稚魚のNPY遺伝子発現量は対照のそれよりも高い傾向が見られた。次に、カゼインを主タンパク源とする飼料(対照飼料)を作製し、これにTTXを添加し35日間飼育した。その結果、対照区よりもTTX給餌区の成長が優り、仮説が概ね支持される結果となった。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that tetrodotoxin (TTX) sensing will induce appetite and administration of TTX by food will induce growth in the non-toxic artificially-raised tiger puffer juveniles. After fish were immersed in the TTX solution, gene expression of Neuro-peptide Y (NPY) was quantified by RT-PCR. Higher trend of NPY genes expression in the brain of TTX-sensed fish was detected. When fish were fed with TTX-containing diet for 35 days, fish showed significantly higher growth than control diet. These results supported our hypothesis.

研究分野：水産増殖学

キーワード：フグ毒 トラフグ 食欲 成長 遺伝子発現

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、そしてなかなか結論に達することのない大きな研究課題となって現在に至っている。

古来より日本人はフグを水産資源として利用し、世界にはない独自の食文化を形成してきた。その中で、フグ毒(TTX)は常に食の安全と安心を脅かす危険な物質であった。したがって、フグ類の安全な利用の観点から、フグ毒の疫学的調査と検出技術に関する研究に多くの努力が払われてきた。近年はこれらを発展させる形で、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きており、トラフグのTTX蓄積が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ている。これらの知見を総合して俯瞰すると、フグは毒を保有することなく生活史を完結することが出来るのであるから、TTXはフグの生命維持には必須の物質ではない、ということがいえるだろう。

一方で、TTXのフグに対する様々な生理活性から、フグはTTXを体内に取り込むことにより無毒生物とは異なる独自の生体内恒常性を維持すると考えることも出来る。そこで、研究代表者は、TTXがトラフグの行動や生態に与える影響に関する一連の研究(H19~H20基盤研究(C)、H21~23基盤研究(C))を実施した。その結果、天然トラフグ稚魚は体内にTTXを蓄積しており、無毒の人工種苗とは情動行動が異なること、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天然魚と同じ行動特性を示すようになることを明らかにした。つづいて、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)に検出され、さらに無毒の人工種苗にTTXを投与すると速やかに脳に蓄積されることを明らかにした。

平成24~26年度に採択を受けた課題(基盤研究(B))において、トラフグが餌として認識しないアガロースゲルにTTXを封入すると、これを積極的に食べるのに対して、嗅覚を遮断したトラフグ稚魚はTTXを検知できずこれを食べる行動も示さなかったことから、トラフグが嗅覚でTTXを検知して摂食行動によって体内に取り込むということを世界で初めて明らかにした。この結果を受けて、フグが取り込んだTTXが中枢神経でどのような作用をするのかを研究課題とした。フグの全ゲノム解読(Aparicio et al. 2002 Science)から、フグは一躍ポストゲノム研究の対象と

なり、性決定遺伝子が発見されるなど(Kamiya et al. 2012 PLoS One Genetics)飛躍的な研究の進展がみられている。このビッグデータを最大限活用して、TTXセンシング、TTXの組織特異的蓄積、TTXによる免疫賦活化と行動制御といったトラフグに特徴的な生体機能に関わる機能遺伝子の特定を、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析によって試みた。その結果、TTXを嗅いだ個体の嗅上皮から、嗅覚V2R経路のオドラントリセプターとその後の経路に関わる遺伝子発現が見られた。また、TTXを嗅いだ個体の脳内で摂食促進系(ニューロペプチドY)と脳内報酬系(モノアミン系報酬系)の遺伝子が多量に発現することを見いだした。一方、TTXを投与した個体の脳内では、摂食抑制関連の遺伝子発現が多いことが分かった。これらのことから、フグが摂食および脳内報酬系によってフグ毒を感知し取り込むということが強く示唆されるため、「フグは脳内報酬系の支配によってフグ毒を取り込む」という仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

「フグが、なぜ、どのようにしてフグ毒を取り込むのか」に踏み込んだ研究は、研究代表者が嚆矢となってまさに黎明の段階の研究分野である。これまでの成果より「フグは脳内報酬系の支配によってフグ毒を取り込む」という大胆な仮説を立て、本研究では、無毒の人工トラフグ種苗を主な材料に、分子生物学と組織化学の手法を駆使してこの仮説の証明に挑戦する。具体的には、フグ毒関知の経験やフグ毒経口投与が、ドーパミン系の脳内報酬系およびメラニン凝集ホルモンやニューロペプチドY等の摂食関連ホルモン系に及ぼす影響を経時的に追跡する。それにより、フグがフグ毒を取り込むことが、摂食に係る一連の生得的な行動の一環としての結果なのか、摂食とは異なる報酬系による調節経路によるものなのかを明らかにし、フグのフグ毒蓄積の進化的意義を探る。

3. 研究の方法

実験1)TTXの取り込みはフグの摂食に影響を与えるか:無毒のトラフグ人工種苗を用いて、通常の飼料とTTXを含む飼料を作製し給餌する。この時、摂餌量や成長量に変化が起こるかを定量する。

実験2)TTXの感知と摂取によるフグの脳内報酬系の変化:人工種苗を用いて、空腹状態と飽食状態の個体について、それぞれの脳からドーパミンやニューロペプチドYを定量し、報酬系の働きを数値化する。この時に、TTXを嗅がせた個体とそうでない個体を準備する。これらの個体についても脳内のドーパミンやニューロペプチドYを検出し、先の空腹・満腹個体間の比較を通じて、TTX感知や蓄積という現象がトラフグの脳内報酬系

とどのようにリンクするのかを特定する。

実験3) TTX 投与による脳内での報酬系関連物質の動態とそれらの責任遺伝子発現: TTX を経口投与したトラフグをブアン液で固定した後, 実験2で特定できた標的物質とその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とともに, 抗体を用いた免疫組織化学的手法によって中枢神経中の標的物質の分布様式を細胞レベルで詳しくし, TTX の取り込みがどの神経にどのような作用をしているのかを特定する。これらの解析から, TTX の中枢神経内の動態を調べるとともに標的神経部位の特定をする。

4. 研究成果

実験1) 市販の配合飼料を対照とし, これに TTX (3.3 MU/g feed) を添加した TTX 飼料を作製した。人工種苗(体長 44 mm, 体重 3.6 g) 120 尾を 200L 水槽 6 基に 20 尾ずつ収容し, これらを対照飼料と TTX 飼料を給餌する 2 群に分け, 28 日間の飼育実験を実施した。その結果, 28 日後には両群ともに体長 85 mm, 体重 18 g になり, 有意差は検出されなかった。このとき, 総摂餌量および同化量にも有意差は検出されなかった。これらのことから, トラフグの TTX 摂取が少なくとも毒性や負の生理的影響を与えないこと(研究発表論文)が再確認された。

市販配合飼料は主に魚粉をタンパク源としており, さらに魚類に対する摂餌誘引物質の添加や消化吸收を促進するように最適化されているため, 魚粉をベースとする市販飼料では TTX の摂餌誘引の効果がマスクされると考えられた。そこで, 研究代表者らがマダイやヒラメ稚魚に対するタウリンの摂餌誘引効果を明らかにするために使用した, 魚粉の代わりにカゼインをベースとする対照飼料を作製し, これに TTX (2.4 MU/g feed) を添加した(表1)。

表1. 試験飼料の組成

成分	%	1.2 mmφ	1.5 mmφ
		1.0 g	1.0 g
カゼイン	51.7	0.52	0.52
魚粉	10.0	0.10	0.10
オキアミミール	5.0	0.05	0.05
大豆粕	14.0	0.14	0.14
デンプン	5.0	0.05	0.05
魚油	4.5	0.05	0.05
その他	9.8	0.10	0.10
TTX (MU/g diet)		2.45	2.35

人工種苗(体長 42 mm, 体重 2.1 g) 120 尾を 200L 水槽 6 基に 20 尾ずつ収容し, これらを対照飼料と TTX 飼料を給餌する 2 群に分け, 35 日間の飼育実験を実施した。その結果, TTX 飼料を与えた稚魚の成長が対照飼料のそれよりも勝った(図1)。一方, 総摂餌量や同化量には有意差は検出されなかった。

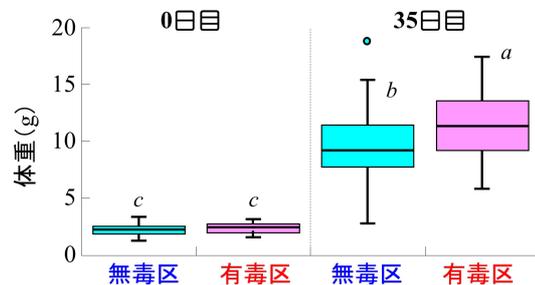


図1. カゼインベースの対照飼料(無毒区)とTTX添加飼料(有毒区)で飼育したトラフグ人工種苗の体重。カラム上のアルファベットは有意差を表す(a>b>c, Tukey HSD, p<0.05; Three-way repeated measures ANOVA with Aligned Rank Transformed Data, n=27-48, 飼料 p<0.05, 日数 p<0.01, 飼料×日数 p<0.05)。

トラフグは高ストレス下で噛み合いを起こし, 尾緒欠損率が高くなる。飼育最終日の尾緒欠損率は, TTX 給餌区の方が無毒区よりも有意に低い値であった(図2)。

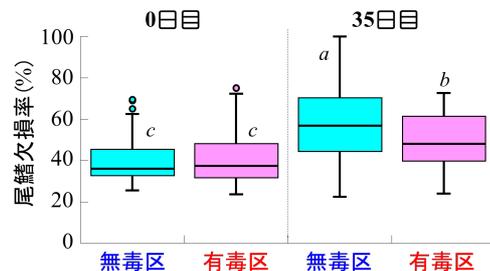


図2. カゼインベースの対照飼料(無毒区)とTTX添加飼料(有毒区)で飼育したトラフグ人工種苗の尾緒欠損率。カラム上のアルファベットは有意差を表す(a>b>c, Tukey HSD, p<0.05; Three-way repeated measures ANOVA with Aligned Rank Transformed Data, n=27-48, 飼料 p<0.05, 日数 p<0.01, 飼料×日数 p<0.05)。

以上のことから, TTX にはトラフグの成長促進効果のあることが明らかになり, さらに尾緒欠損率低下により示されるストレス軽減効果のあることが確認された。

実験2) 無毒のトラフグ人工種苗(体長 42 mm, 体重 2.0 g)を用いて, 無処理の個体(対照), 100 MU の TTX を海水に添加して TTX を嗅がせた個体(TTX 浸漬), 市販配合飼料を飽食量給餌した個体, TTX 飼料を飽食量給餌した個体の 4 群に分け, 各々の脳から RNA を抽出し, ニューロペプチド Y (NPY) 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR によって調べた。その結果, TTX 浸漬個体に NPY 発現が 10 倍以上高くなるものが見られ, 次いで TTX 飼料を摂餌した個体にも発現量の高い個体が出現した(図3)。

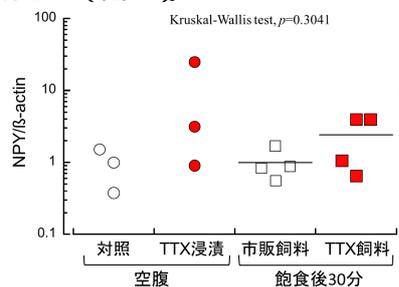


図3. TTX を感知, および給餌したときのトラフグ人工種苗の脳内 NPY 遺伝子発現量

2 年次に亘って同様の実験を行って, 同様の傾向が見られた。

なお, ドーパミン系の遺伝子についても, NPY と同様のリアルタイム PCR 測定系の構築を試みたが, 測定系を構築するには至らな

かった。

実験3) TTX 投与による脳内での報酬系関連物質の動態とそれらの責任遺伝子発現：実験1および2で得られたトラフグをブアン液で灌流固定を施した後、他魚種の NPY 抗体を用いた免疫組織化学的手法によって検出を試みたが、数種の方法で行ったところ、いずれも検出するに至らなかった。

また、*in situ* ハイブリダイゼーションも試みたが、本法でもいくつかの条件設定を試みたにも関わらず、検出に至らなかった。

以上の実験から、フグがフグ毒を取り込むことが、摂食に係る調節経路を活性化し、消化吸収効率を上げることによって成長率が高くなることが示された。さらに、TTX 摂取による稚魚のストレス低減効果が再確認された。

実験に使用したカゼイン飼料をマダイやヒラメの稚魚に給餌した場合は飼料の餌食いが劣り、摂餌誘引物質（タウリン）の添加効果を明瞭に出すことができたが、トラフグの場合は対照飼料も十分に摂餌した。したがって、TTX の添加効果を検証するにあたり、明瞭でないところがあった。この原因には、試験飼料に一部魚粉が使用されていること、また、魚油やオキアミミールを微量ながら配合していたことが影響を与えた可能性が否定できない。

今後、タンパク源を全てカゼインに置換した試験飼料を用いることで、よりクリアに検証できるものと考えている。

また、NPY 等の免疫組織化学的検出が不調で、定量 PCR による検出に切り替えたことで、実験の進捗に一部遅れが生じたが、トラフグ稚魚に対して食欲促進ホルモンである NPY 遺伝子発現の上昇が確認されたことから、本研究の仮説を支持する結果が得られていると考えた。

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 3 件)

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 action of tetrodotoxin in central nervous system of tiger puffer *Takifugu rubripes* juveniles. *Fisheries Science* 83(3), 401-412. 査読あり

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(2), 191-198. 査読あり

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的変化. *水産増殖* 63(2), 141-149. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

阪倉良孝, 佐藤はるか, 天野勝文, 高谷智裕. フグ毒添加飼料がトラフグ稚魚の成長に与える影響. 平成 30 年度日本水産学会春季大会, 平成 30 年 3 月 26-30 日 東京海洋大学, 東京

Sakakura Y. Seeking the effective method for release of hatchery-reared tiger puffer juvenile. The 11th International Workshop on the Oceanography and Fisheries Science of the East China Sea, November 10-12, 2017, Nagasaki, Japan.

Sakakura Y., Takatani T., Yamane H., Nakayasu J., Yamazaki H., Sakiyama K. Evaluation of fish quality and microhabitat for release in the hatchery-reared tiger puffer juveniles. 5th International Symposium on Stock Enhancement and Sea Ranching, 11-14 October 2015, Sydney, Australia.

Sakakura Y., Takatani T., Yamane H., Nakayasu J., Okita K., Yoshida A., Yamazaki H., Sakiyama K. Factors affecting the fear response of hatchery-reared tiger puffer *Takifugu rubripes* juveniles. American Fisheries Society Annual Meeting, August 14-21, 2015, Portland, U.S.A.

Okita K., Satone H., Tan E., Kinoshita S., Asakawa S., Yamazaki H., Sakiyama K., Takatani T., Arakawa O., Hagiwara A., Sakakura Y. Transcriptome analysis of tetrodotoxin sensing and action of tetrodotoxin in the brain of tiger puffer *Takifugu rubripes* by next-generation sequencing. American Fisheries Society Annual Meeting, August 14-21, 2015, Portland, U.S.A.

〔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 1 件)

名称：フグ毒の検査方法
発明者：荒川 修・高谷智裕・阪倉良孝・谷
口香織・高尾秀樹
権利者：長崎大学
種類：特許
番号：6099147
取得年月日：2017.3.3.
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

雑誌論文 は公益社団法人日本水産学会
より平成 29 年度日本水産学会論文賞を受賞
した。

<http://www.nagasaki-u.ac.jp/ja/about/info/news/news2611.html>

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

天野 勝文 (AMANO, Masafumi)
北里大学・海洋生命科学部・教授
研究者番号：10296428

(3)連携研究者

なし