

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23688023

研究課題名(和文) フグは毒を何に使うのか? ~クサフグ組織中のテトロドキシンの動態から探る~

研究課題名(英文) What does pufferfish use the poison for? -Investigating based on the localization of TTX in the pufferfish Takifugu niphobles

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) 18,000,000円

研究成果の概要(和文)：クサフグの体内における1個体あたりの総毒量の季節変化を調べたところ、総毒量は雌雄ともに産卵期に高く、メスよりもオスで高かった。同様に、TTX局在の季節変化は、産卵期にメスでは卵巣に、オスでは肝臓と皮膚に局在するTTX量が多かった。トラフグ属の仔魚が予期せぬ方法で母親由来のTTXを利用していた。捕食者として用いた全ての種の稚魚がフグの仔魚を喰えたものの即座に吐き出した。フグの仔魚は、捕食者の致死量には及ばない程度のTTXを体表に局在させることで捕食を逃れていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Seasonal changes in the total amount of TTX per individual and the localization of TTX in the body were observed in the pufferfish Takifugu niphobles. The total amount of TTX per individual was higher in the spawning period than in the ordinary period, and in males than in females. In the spawning period, TTX was localized in the ovary of female and in the liver and skin of males. This study demonstrate an unexpected use of maternal TTX in the early larval stages of the Takifugu pufferfish. Predatory fishes promptly spit the pufferfish larvae (T. niphobles and T. rubripes) out upon ingestion. A small amount of TTX is primarily localized in the skin of the larvae, apparently for protection.

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ן TTX クサフグ トラフグ

1. 研究開始当初の背景

(1) フグ毒テトロドトキシン (TTX) はフグ科魚類のみならず、ヒモムシやスベスベマンジュウガニ、ツムギハゼ、アカハライモリなど比較的広範な動物群が保有することが明らかとなり、*Vibrio alginolyticus* などの海洋細菌がその生合成を行うことが報告されている (Noguchi *et al.*, 1987)。そしてフグ毒は、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が蓄積す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が報告されており (Noguchi *et al.*, 2006)、この考え方には客観性がある。一方、このフグ毒を生合成するとされる細菌である *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%にも満たないことが報告されている (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。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いる。

(2) フグの毒化機構に関しては不明な点が多く、「なぜフグはフグ毒を持つのか？」との命題については、明確な答えは見出されていない。TTX はフグにおいてフェロモン作用を有するとの報告、フグは遊泳能力が低いために生体防御のために TTX を持つとの説もあるが、いずれも推測の域を出ない。このような状況の下、申請者が行ってきた研究の中で、クサフグの産卵期の成熟個体では、雌雄間で TTX の組織分布が異なることが明らかとなってきた。さらには、同一組織を比較しても雌雄間で明らかに TTX の局在が異なることが分かってきた。申請者は、この雌雄間における TTX の局在の違いが上述の命題を解き明かす鍵となると考えるに至った。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、抗 TTX モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色による TTX の局在の確

認、および質量分析計 (LC-MS/MS) による毒量の定量を主たる分析ツールとして以下に示す研究テーマに力点を置いてフグ毒の生物学的意義を明らかにすることを主たる目的とした。

(2) 本研究の出発点が産卵期の成熟個体における TTX 分布の雌雄差であることから、まず、抗 TTX モノクローナル抗体を用いる免疫組織染色により TTX の検出を行うとともに、同一個体の毒量を LC-MS/MS 分析により定量することから着手した。続いて、同様の手法で、最も時間と手間を要すると思われるフグ体内における TTX の動態の季節変化および個体の総毒量の変化について調べた。さらに、フグが外敵から身を守るために TTX を保有しているのであれば、最もその効果が要求される仔魚期における TTX の局在および使用方法について、トラフグおよびクサフグを対象に調べた。

3. 研究の方法

(1) 季節変化に伴う天然クサフグにおける TTX の局在変化

2010年11月から2012年5月にかけて神奈川県横須賀市長井の定点でクサフグを採取した。採取したクサフグを皮膚、筋肉、肝臓、腸、生殖腺およびその他組織に分け、公定法により TTX を抽出した。これを LC-MS/MS 分析に供し、各組織中の TTX 量について調べた。

(2) トラフグ属仔魚を被食者とする捕食実験

江の島周辺海域で産卵に訪れたクサフグを捕獲し、人工授精によって受精卵を得た。これを実験室内にてふ化させ、被食者として用いた。捕食者には、クサフグの産卵期に産卵場付近のタイドプールで全長 20~30 mm 程度のメジナ、イソギンポ、アゴハゼおよびハオコゼなどを採取して用いた。

天然親魚由来のトラフグ仔魚は、(財)愛知県水産振興基金栽培漁業部より提供していただいた。トラフグ仔魚を被食者とする捕食実験には、ヒラメおよびスズキを捕食者

として使用した。

(3) 胚発生および孵化仔魚における TTX の局在

クサフグを対象に、胚発生時の TTX 局在変化および孵化仔魚の成長に伴う TTX の生体内での動態を調べた。TTX の組織内分布を調べる手法としては、抗 TTX 抗体を用いる免疫組織学的手法によりその局在を明らかにし、LC-MS/MS 分析によりその毒量を定量した。また、トラフグについても天然親魚由来の受精卵および胚発生過程試料について調べた。

4. 研究成果

(1) 季節変化に伴う天然クサフグにおける TTX の局在変化

2010 年 11 月から 2012 年 5 月にかけて神奈川県横須賀市長井の定点でクサフグを採取し、LC-MS/MS 分析により各組織中の TTX 量の変化および TTX の局在変化について調べた。その結果、雌雄ともに産卵期に体内に蓄積している TTX 量が多いことが明らかとなった。オスでは年間を通して皮膚に TTX を高濃度に局在させていた。一方、メスでは産卵期に卵巣に TTX が局在する傾向にあり、オスに比べると皮膚への局在は低かった。また、1 個体あたりの TTX 量、すなわち総毒量は、いずれの時期でもメスよりもオスで高かった。さらに、各組織における TTX の分布にも雌雄差が認められた。例えば、一般にクサフグの卵巣は猛毒、精巣は無毒～弱毒とされるが、これは生殖腺が確認できれば、その成長段階を問わず、卵巣で TTX 濃度が高かった。猛毒とされる肝臓では、年間を通じてメスよりもオスでその TTX 量が高かった。

(2) クサフグおよびトラフグ仔魚の生存戦略

江の島周辺海域で産卵に訪れたクサフグを捕獲し、人工授精によって受精卵を得た。これをふ化させ、クサフグの産卵場付近で採取した全長 20～30 mm 程度のメジナ、イソギンポ、アゴハゼおよびハオコゼなどを捕食者と

する捕食実験に供した。その結果、クサフグのふ化仔魚はすべての捕食者の口腔に一旦は取り込まれるものの、即座に吐き出された。対象の被食者として用いたメダカ仔魚およびアルテミアの成体は吐き出されることなく、飲み込まれた。同様に、トラフグのふ化直後の仔魚をヒラメおよびスズキの幼魚に与える捕食実験を実施したが、トラフグ仔魚は飲み込まれることなくすべて吐き出されて生残した (図 1、表 1)。捕食者によるフグ仔魚の吐

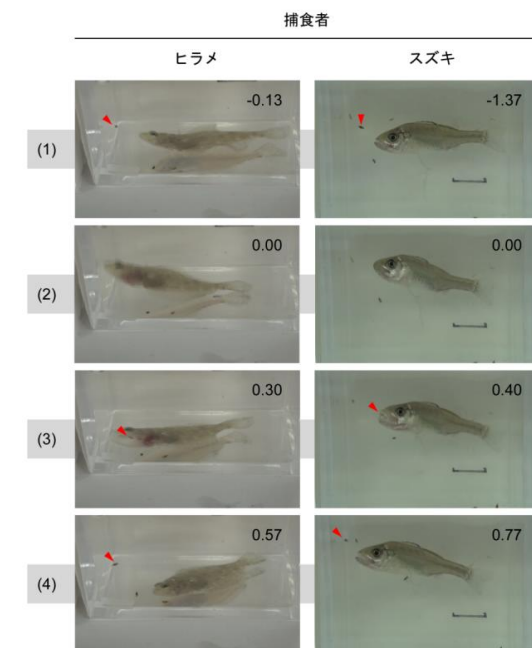


図 1. トラフグ仔魚を対象とした捕食実験。トラフグ仔魚は被食者として用い、捕食者にはヒラメおよびスズキを用いた。(1) 捕食前;(2) トラフグ仔魚が捕食者の口腔に導入された瞬間;(3) および (4) 捕食された仔魚 (矢じり) が、直後に吐き出される過程。各パネル右上の数値は、捕食された瞬間を 0.00 秒とした場合の経過時間を表す。Itoi et al. (2014) を一部改変。

表 1. フグの仔魚、卵および無毒生物に対する捕食者の反応*

捕食者	n	被食者の生残率 (%)			
		TTX 保有魚		無毒生物	
		トラフグ仔魚	クサフグ卵	メダカ仔魚	Artemia 成体
ヒラメ	25	100	-**	-	-
スズキ	45	100	-	-	-
イソギンポ	5	-	-	100	0
メジナ	6	-	-	100	0
アゴハゼ	6	-	-	100	0
メジナ	14	-	100	-	-

* Itoi et al. (2014) より引用。

** 試験せず。

き出し行動が生じるメカニズムを明らかにするため、クサフグおよびトラフグ仔魚をパラフィン包埋し、抗 TTX モノクローナル抗体を用いる免疫組織染色に供した。その結果、クサフグおよびトラフグ仔魚ともに、体表の粘液細胞に陽性反応が観察された (図 2)。これ

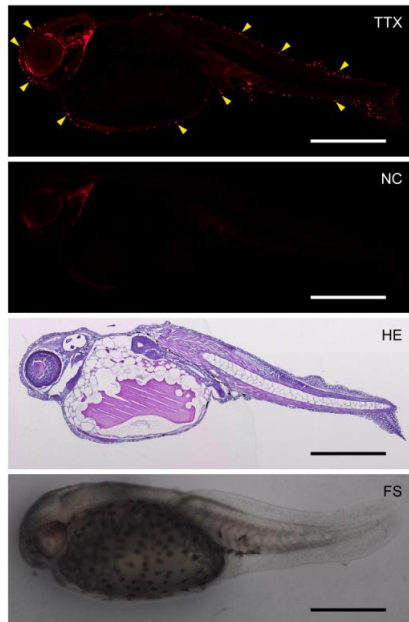


図 2. トラフグ仔魚における TTX の局在. TTX, 抗 TTX 抗体で処理した仔魚; NC, 陰性コントロール; HE, ヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色; FS, ホルマリン固定の仔魚. 抗 TTX 抗体の陽性反応は、赤色を呈している (矢じり). 陰性コントロールは、抗 TTX 抗体の代わりにマウス IgG で処理した. HE 染色で組織構造を観察した. スケールバーは 0.5 mm. Itoi et al. (2014) より引用.

ら仔魚の有する TTX 量を調べたところ、きわめて微量であった。これらの結果は、トラフグ属の仔魚は、母親が卵巣に蓄積した TTX を体表にまとうことで、自らの TTX の保有を捕食者に提示し、生活史の中で最も弱い時期の生残率を高めていることを示唆する。

(3) クサフグ腸内のヒガンフグ卵

2012 年 3 月のクサフグ腸内から、直径 1 mm 程度の卵が大量に検出された。これら卵のミトコンドリア DNA を対象とする系統解析を実施したところ、ヒガンフグの当該配列と一致した。これらヒガンフグ卵を LC-MS/MS 分析に供したところ、TTX が検出された。この結果は、クサフグがヒガンフグ卵を摂餌することで TTX を獲得していることを示唆するが、

今後の検討課題とする。

(4) 母親由来 TTX の発生に伴う局在変化

フグの母体内で卵巣を通して卵中に蓄積された TTX がふ化仔魚の体表に局在する経過を明らかにするため、未受精卵および卵発生過程の試料を対象に、抗 TTX モノクローナル抗体を用いる免疫化学組織染色に供した。その結果、クサフグおよびトラフグともに未受精卵および受精直後の卵では、弱いながらも卵黄部分でシグナルが観察され、TTX が卵中の特定部分には局在していないことが示唆された。その後、発生が進むと、ふ化直前には皮膚に TTX が局在した。すなわち、胚発生に伴い、卵黄から外肺葉に相当する部分に母親由来の TTX が局在するようになり、最終的には皮膚に局在することが示唆される。

<引用文献>

- ① Noguchi T et al.: *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in intestines of the puffer *Fugu vermicularis vermicularis*. *Mar. Biol.* **94**: 625-630 (1987)
- ② Noguchi T et al.: TTX accumulation in pufferfish. *Comp. Biochem. Physiol. D* **1**: 145-152 (2006)
- ③ Shiina A 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 3 件)

- ① 糸井史朗, 2014. フグは毒を何に使うのか? ~トラフグ属の生存戦略~. 化学と生物 **52**, 403-406. 査読有
<https://katosei.jsbba.or.jp/index.php?aid=176>
- ② 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. 査読有
DOI: 10.1016/j.toxicon.2013.11.003
- ③ Itoi, S., Yoshikawa, S., Tatsuno, R., Suzuki, M., Asahina, K., Yamamoto, S., Takanashi, S., Takatani, T., Arakawa, O., Sakakura, Y., Sugita, H., 2012. Difference in the localization of tetrodotoxin between the female and male pufferfish *Takifugu niphobles*, during spawning. *Toxicon* 60, 1000–1004. 査読有
DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.07.006
- [学会発表] (計 10 件)
- ① 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～分子標的と活性制御～」, 2015 年 5 月 14 日, 名古屋大学 (名古屋)
- ② 綱島忠相、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)
- ③ 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.: Maternal TTX in the pufferfish babies contribute to beneficial strategies for increasing the survival of egg and larvae. The 10th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC2014), 06 May 2014, Taipei, Taiwan
- ④ 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, 2014 年 3 月 28 日, 北海道大学水産学部 (函館)
- ⑤ Itoi, S., Uchida, J., Ishizuka, K., Takimoto, N., Mitsuoka, R., Takanashi, S., Noguchi, S., Ishikawa, K., Okamura, T., Komori, K., Tamai, M., Domeki, S., Sugita, H.: A possible process of tetrodotoxin accumulation in marine pufferfish of the genus *Takifugu*. 10th International Marine Biotechnology Conference (IMBC2013), 12 Nov. 2013, Brisbane, Australia
- ⑥ 糸井史朗、石塚健人、瀧本成美、光岡涼子、横山直人、高梨志保里、野口俊輔、杉田治男: クサフグは同属の有毒卵からも TTX を摂取する. 第 15 回マリンバイオテクノロジー学会大会, 2013 年 6 月 1 日, 沖縄県市町村自治会館 (那覇市)
- ⑦ 糸井史朗、石塚健人、瀧本成美、横山直人、光岡涼子、高梨志保里、野口俊輔、杉田治男: クサフグ腸内容物から検出された卵の種同定および毒性について. 平成 24 年度日本水産学会秋季大会, 2012 年 9 月 16 日, 水産大学校 (下関)
- ⑧ Itoi, S., Kokubo, S., Yoshikawa, S., Suzuki, M., Asahina, K., Sugita, H.: Distribution of TTX gland like structure in the body surface of the pufferfish *Takifugu niphobles*. The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC2012), 14 Jul. 2012, CUL-PORT, Kochi
- ⑨ Itoi, S., Yoshikawa, S., Tatsuno, R., Detake, A., Takayanagi, C., Eguchi, M., Suzuki, M., Asahina, K., Kokubo, S., Takanashi, S., Miura, A., Kawane, M., Suitoh, K., Takatani, T., Arakawa, O., Sakakura, Y., Sugita, H.: Distribution of tetrodotoxin in the larvae of the genus *Takifugu* pufferfish. 6th World Fisheries Congress (WFC2012), 08 May 2012, Edinburgh, UK
- ⑩ 吉川沙織、辰野竜平、小久保翔太、出竹歩

美、高柳智江、河根三雄、水藤勝喜、高谷智裕、荒川修、阪倉良孝、糸井史朗、鈴木美和、朝比奈潔、杉田治男：クサフグおよびトラフグの仔稚魚における TTX の局在。平成 23 年度日本水産学会秋季大会，2011 年 9 月 28 日，長崎大学（長崎）

〔図書〕（計 1 件）

- ① 糸井史朗，2014. 海洋生物の毒（水族館と海の生き物たち 杉田治男編）恒星社厚生閣，139-145.

〔その他〕

- ① 糸井史朗：フグは毒を何に使うのか？平成 26 年度 水産・海洋学講座（第 2 回），2015 年 2 月 27 日，下田市民文化会館（静岡県下田市）
- ② 新聞等

USA Today

Online 版：Even baby puffer fish may be poison to predators (<http://www.usatoday.com/story/news/nation/2013/12/24/pufferfish-poison-japan/4051565/>)

印刷版：Even baby puffer fish are poison to predators (2013 年 12 月 26 日発行)

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) 連携研究者

荒川 修 (ARAKAWA, Osamu)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科・教授

研究者番号：40232037

高谷 智裕 (TAKATANI, Tomohiro)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科・教授

研究者番号：90304972

阪倉 良孝 (SAKAKURA, Yoshitaka)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科・教授

研究者番号：20325682

朝比奈 潔 (ASAHINA, Kiyoshi)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：10147671

鈴木 美和 (SUZUKI, Miwa)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：70409069

杉田 治男 (SUGITA, Haruo)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：50139052

(3) 研究協力者

河根 三雄 (KAWANE, Mitsuo)

(財) 愛知県水産業振興基金栽培漁業部