

論文の内容の要旨

氏名：上田紘之

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：琉球列島におけるフグ毒保有魚類の毒化に及ぼす *Planocera* 属ヒラムシの影響に関する研究

第1章 緒言

Tetrodotoxin (TTX) は電位依存性ナトリウムチャネルの特異的な阻害剤として働く強力な神経毒である。フグ類が TTX を保有していることは広く知られているが、フグ類だけでなく種々の海産底生生物や陸上動物からも検出されており、扁形動物では *Planocera* 属や *Stylochoplana* 属のヒラムシ類および *Bipalium* 属のコウガイビルが TTX を保有していることが報告されている。特に *Planocera* 属のヒラムシでは、非常に高濃度の TTX を保有することが報告されているが、ヒラムシ類に着目した TTX の動態やフグ類などの高次捕食者との関係については、研究例が乏しい。

所属研究室の最近の研究により、日本列島近海の TTX 保有生物の毒化に対するオオツノヒラムシ *Planocera multitentaculata* の関与が明らかにされてきた。オオツノヒラムシがクサフグ *Takifugu alboplumbeus* やツムギハゼ *Yongeichthys criniger*、オキナワフグ *Chelonodon patoca* などの毒化に関与していることが示唆されていることから考えても、TTX を保有するヒラムシ類が水産資源の毒化に与える影響は無視できない。しかしながら、琉球列島周辺海域ではオオツノヒラムシの成体、もしくはそれに匹敵する量の TTX を保有するヒラムシ類はこれまでに発見されておらず、TTX 保有魚類の毒化経路には不明な点が多く残されていた。

そこで本研究では、沖縄本島近海で見出された *Planocera* 属様ヒラムシを対象に、その TTX の保有状況および TTX 保有魚類の毒化に及ぼす影響について解明することを目指した。

第2章 沖縄本島近海で採取された TTX 保有ヒラムシ

本研究では、沖縄本島名護沖の水深約 10 m で *Planocera* 属様ヒラムシ 2 個体を採取した (図 1)。当該ヒラムシ 2 個体を公定法による TTX 抽出に供し、LC-MS/MS 分析に供したところ、TTX 標品と一致するピークを示すクロマトグラムが得られた (図 2)。これら *Planocera* 属様ヒラムシは、半透明の胴体部に褐色の網状の模様と赤褐色の斑点を有し、2 本の円錐形の触角およびその基部に眼点を有していた。これらの外見的特徴は、既報の *Planocera heda* の記載内容と一致したが、*P. heda* の標本が残されておらず、種同定には至っていない。

続いて、当該ヒラムシの系統学的地位を明らかにするために、核ゲノムにコードされる 28S rRNA 遺伝子の部分塩基配列およびミトコンドリア DNA の

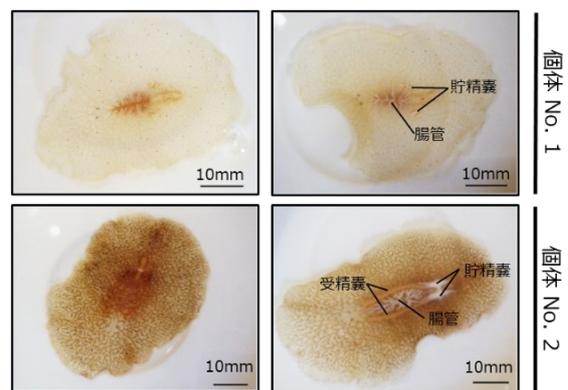


図 1. 沖縄本島近海で採取された *Planocera* 属様ヒラムシの背側 (左側) および腹側 (右側) の外部形態.

全塩基配列を決定し、既報のヒラムシ類のそれらと比較した。TTX を保有していないとされるオキヒラムシ *Planocera pellucida* を含めて、コードされる遺伝子の配置を *Planocera* 属ヒラムシ間で比較したところ、オキヒラムシは tRNA-Gln 遺伝子の配置が他の TTX を保有する *Planocera* 属ヒラムシのそれと異なっていた。また、ミトコンドリア DNA の全塩基配列を用いて系統解析を行った結果、TTX 保有能を持つオオツノヒラムシ、ツノヒラムシおよび *Planocera* 属様ヒラムシが同一のクラスタを形成し、オキヒラムシはその外部に配置された。このことから、TTX 保有能を持つヒラムシ類が *Planocera* 属の特定のクラスタに集中しており、オオツノヒラムシ、ツノヒラムシおよび *Planocera* 属様ヒラムシ（以降、*Planocera* sp. と表記）の共通祖先が TTX 保有能を獲得した可能性が示唆された。さらに、cytochrome c oxidase subunit I 遺伝子の部分塩基配列を用いた系統解析により、ニュージーランドのウミフクロウ *Pleurobranchaea maculata* の毒化に関与する *Stylochoplana* sp. とされるヒラムシが *Planocera* 属である可能性が示唆された。

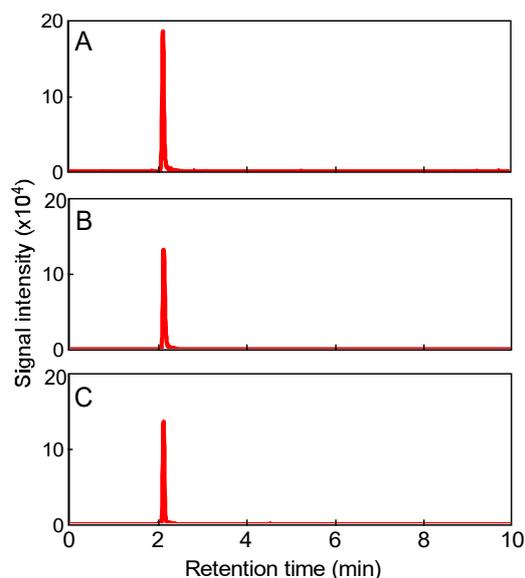


図 2. MRM モードで得られた LC-MS/MS のクロマトグラム (m/z 320 > 302). A は個体 No. 1 の抽出物、B は個体 No. 2 の抽出物、C は 25 ng/mL の TTX 標品のクロマトグラムを示す。

第 3 章 TTX 保有生物の毒化に *Planocera* sp. の果たす役割

沖縄本島で発見された TTX を保有する *Planocera* sp. が系統的にオオツノヒラムシおよびツノヒラムシと近縁であることが明らかとなった。本章では、*Planocera* sp. が琉球列島近海の TTX 保有魚類の毒化に対して果たす役割を明らかにするため、TTX および 5,6,11-trideoxyTTX を含む TTX 類縁化合物を他の *Planocera* 属ヒラムシ（オオツノヒラムシ、ツノヒラムシおよびオキヒラムシ）のそれらと比較した。その結果、沖縄本島で発見された *Planocera* sp. の TTX、5,6,11-trideoxyTTX、dideoxyTTXs、deoxyTTXs および 11-norTTX-6(S)-ol は、オオツノヒラムシと同様のクロマトグラムパターンを示した。

そこで、育成した無毒のクサフグに対してオオツノヒラムシの卵板を与えて毒化させ、琉球列島近海の野生のクサフグの TTX および TTX 類縁化合物のパターンと比較したところ、類似したパターンが認められた。これにより沖縄本島で発見された *Planocera* sp. が、琉球列島近海において TTX 保有魚類の TTX 供給源となっていることに加え、TTX 保有魚類の毒化をオオツノヒラムシで再現できる可能性が示唆された。

続いて、オキナワフグおよびツムギハゼについても同様にオオツノヒラムシの卵板を与えた後、TTX および 5,6,11-trideoxyTTX を含む TTX 類縁化合物を検出したところ、オキナワフグではオオツノヒラムシの TTX 類縁化合物組成をある程度反映したのに対し、ツムギハゼでは deoxyTTXs 以外の TTX 類縁化合物組成に卵板給餌前後で大きな変化は見られなかった。野生のツムギハゼでは、TTX および TTX 類縁化合物の組成が採取された水域によって大きく異なることが報告されており、生息環境下の TTX 保有生物の TTX および TTX 類縁化合物の組成に大きく影響されることが示唆されていたが、この仮説を支持しない結果が示された。

第4章 TTX 保有ヒラムシの毒化に関する要因の探索

沖縄本島で発見された *Planocera* sp.が、琉球列島近海においてオオツノヒラムシと同様、TTX の供給者としての役割を果たしている可能性が示唆されたが、TTX 保有ヒラムシの毒化機構や生態に関する知見はいまだに不明な点が多く残されている。本章では、オオツノヒラムシの毒化にかかわる要因を明らかにすることを目的とした。まず、オオツノヒラムシを個体識別するため 1 個体ずつ隔離・識別して長期的に飼育した。この飼育個体から定期的に少量の組織を切出して TTX を測定することで、同一個体の TTX の量と濃度を継続的に推定した。その結果、自然界で採取された個体群と同様の変動を示し、産卵によって TTX が卵塊へ供給されていることが示された。

続いて、神奈川県三浦郡および茨城県ひたちなか市において幼体期のオオツノヒラムシを採取し、無毒環境下で無毒の餌のみを与える飼育実験を行って TTX および 5,6,11-trideoxyTTX を定量した。その結果、幼体期から無毒環境下で無毒の餌のみを与えて飼育しても、TTX および 5,6,11-trideoxyTTX は大幅に増加することが示された。これにより、オオツノヒラムシは他の TTX 保有生物とは異なり、餌生物から TTX を獲得することなく体内で TTX およびその類縁化合物を蓄積することができる機構を有していることが示唆された。

第5章 総括

琉球列島近海において新たに発見された TTX 保有ヒラムシは、系統解析により *Planocera* 属であることが明らかとなり、その関連種を含む分類群が多様なヒラムシ類の中で TTX 蓄積能を有する分類群である可能性が示唆された。また、この *Planocera* sp.が保有する TTX 量はオオツノヒラムシに匹敵することが明らかとなった。オオツノヒラムシの TTX 量の季節変動と比較しても、産卵期には大量の TTX を保有する可能性がある。資源量によっては琉球列島近海の TTX 保有生物に対する TTX の供給者として重要な地位にあることが示唆される。海洋環境における TTX 循環において、オオツノヒラムシと同様の役割を果たしている可能性が高く、オオツノヒラムシをモデル生物としたシミュレーションにより、新たに発見されたヒラムシ *Planocera* sp.が TTX 保有魚の毒化に関与している可能性が示唆された。オオツノヒラムシにおいては、その体内に毒化機構を有していることが示唆されていることから、琉球列島近海の *Planocera* sp.においても体内にオオツノヒラムシと同様な TTX 蓄積機構を有している可能性は否定できない。

今後、海水温上昇によるオオツノヒラムシや *Planocera* sp.の生息域の拡大や資源量の増加によって、海洋生物の毒化事例の増加が考えられることから、低次生物群と高次生物群の TTX 循環において当該ヒラムシが果たす役割について、より詳細な調査が望まれるところである。