

研究種目：基盤研究 (A) (2)

研究期間：2007～2009

課題番号：19208029

研究課題名 (和文) 鳥類における果実の熟れ具合認識機構の解明

研究課題名 (英文) Study how do birds reorganize fruits maturation.

研究代表者

杉田 昭栄 (SUGITA SHOEI)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：50154472

研究成果の概要 (和文)：

果実の成熟にともない糖度含量、軟化さらに果色が増加し、酸度は減少し、収穫時以降は軟化のみ増加し、糖度や果色また酸度は平衡状態となった。この収穫前頃から、カラス等が飛来して果実をつついてるのが、観察された。鳥が果実の熟成の時期を見分けることができるのは、嗅覚や視覚の発達が考えられる。そこで、まずはカラスとヒヨドリの嗅覚系の特性を調べた。その結果、脳全体に対する嗅球のしめる割合が極めて小さく、一般には左右独立して存在する嗅球が完全に左右癒合していたことから、カラスとヒヨドリの嗅覚はあまり発達していないことが示唆された。次に視覚系の特性を調べた。カラスの神経節細胞は 300 万個を超えるとともに、神経節細胞の高密度域が 2 箇所あったこのことは、視覚が極めて発達していることを示していた。また、網膜周辺に進むにつれ少なくなっていた。視細胞の油球は赤、青、黄、緑、透明のものが見られ、その分布割合は均衡していた。ヒヨドリの神経節細胞の分布傾向はカラスのそれと類似していたが、油球は緑・黄緑系の油球が周囲を占めていた。学習行動によってカラスの各種波長への感受性を調べたところ、短波長に対して最も高い感受性を持っていることが示唆された。さらに、カラスの網膜には、4 種類の色覚に関わる錐体オプシンがあり、その内のひとつは紫外線に感受性を有していた。鳥が果実の熟成段階を何で判別しているのか調べるため、熟成段階の異なる果物をカラスに提示し、選択された果実に共通する特徴を調べた。その結果、カラスは果実の熟成段階を判別するために糖度や硬度を手がかりにせず、果実の色、すなわち果皮の光反射を手がかりにしていた。

研究成果の概要 (英文)：

Birds start to bite the fruit when glucose content was maxed and surface of fruit was getting soft. Some birds make an injury on the surface of fruit to make it soft. It was suggested that factors inducing bird fruit bite were not only color and glucose content of fruit. We have investigated also possibility of smell sense of birds. The ratio of olfactory bulb to whole brain in crow and bulbul was very small. Both sides of olfactory bulb in the crow and bulbul were fused although those of many animals were independent. Therefore, the smell sense of birds may not be developed. Furthermore, avian vision properties were investigated. The population of ganglion cell of crow retina is more than 3,000,000 and there are two high populations in the retina. Density of ganglion cell was going low at the peripheral area of the retina. Oil droplets of the photoreceptor cell were found in 5 types such as red, yellow, blue, green and transparent. Those were located in same proportion in the retina. Oil droplets of starling were found also in five types and green or yellow-green types were predominant. Crow had high sensitivity in short wavelength. There were four types of opsin in crow's retina and one of them had high sensitivity in UV. Therefore, UV wavelength may be important for crow's vision and it is suggested that birds have very high sensitivity of color. We compared the characters of fruits chosen by birds. As a result, they may refer to some light wavelength reflected from the surface of fruit without sugar content and hardness.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	12,300,000	3,690,000	15,990,000
2008年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
2009年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
総計	34,800,000	10,440,000	45,240,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境農学

キーワード：カラス、ヒヨドリ、視覚、油球、オプシン、果実熟成、嗅覚、嗅上皮、光波長、果皮、糖度

### 1. 研究開始当初の背景

報告者は、これまでカラスの研究をしていたため、鳥害の相談を受けることが多い。特に、カラス、ムクドリ、ヒヨドリの果実への被害が訴えられ、その額も無視できない（農林水産省2002年集計、被害額96億円/年）。農家の訴えでは、理由は分からないが的確に熟れの時期を判断して、トリは果実を食べに来るというのである。この熟れ具合を鳥類は、いったいどのような方法で認識するのか今のところ解明されていない。もし、その機構が解明されれば、農業生産物への鳥害を防ぐ方法の大きな前進が期待できると考え本研究課題を考えるに至った。

鳥類の視覚機能の研究は、1980年代から網膜の吸収波長とそれらに呼応する視物質の研究が展開され、トリはヒトが感じない波長域の光も感じるということが報告されている（Woretel et al., J. Comp. Physiol., A. 160:151-154, 1987）。つまり、ヒトが青・緑・赤の光三原色で色を認識しているのに対し、トリは、紫外線・近紫外線域をも感受し、それを加えた四原色で色を認識すると考えられる（Burkhart, D. J. Comp. Physiol., A. 164:787-796, 1989.）。さらに、鳥には油球という視細胞に透明、緑、黄、赤などの球状の細胞内構造物が見られ（Okano et al, Biochem, 28:8848-8856, 1989.）、それぞれの油球は色調に近い波長の光を選択的に通すが、各種油球の成分比もトリの種により異なり、色覚認知には種の特異性があると考えられる。しかし、鳥の種による得意光波長認識特性と果実の熟れ具合に伴い放たれる光波長特性の変化の関係は分かっていない。

一方、嗅覚についても無視できない。トリが匂いを感知しているという報告には、繁殖期に尾脂腺の匂いを識別する（Hagelin et al., Proc., R. Soc. Lond. B., 270:1323-1330, 2003）などが見られる。しかし、機能面、特に果実への採食行動（食害）

解明に嗅覚から焦点を絞った研究は申請者の知る限り国内、国外とも見られない。

### 2. 研究の目的

(1) 果実の糖密度の変化を確認する。(2) 鳥類の嗅覚系の発達を中枢神経である嗅球の発達を解剖学的に明らかにする。(3) 鳥類の網膜構造および神経節細胞の分布について明らかにする。(4) 鳥類の網膜各種油球の構成について明らかにする。(5) 鳥類の視物質の吸収波長の特異性を明らかにする。(6) 熟れた果実の色調の変化を明らかにする。(7) 6で得られた色調を人工的に再現した色調に対する鳥類の反応を見る。(8) 果実の熟成変化とその光反射特性、特に紫外線、赤外線の変化を明らかにする。(9) 10の結果とカラス、ムクドリおよびヒヨドリの色覚特性との関係を解析する。

### 3. 研究の方法

嗅上皮および嗅球の組織構造を、電子顕微鏡および光学顕微鏡で観察することで解剖学的な嗅覚系の発達程度を明らかにする。さらに、免疫組織化学染色とin situ ハイブリダイゼーション法で嗅球を構成するニューロン群の組織化学的特性を明らかにする。

新鮮網膜を採取し、伸展標本を作製、細胞質染色を施す。単位面積当たりの細胞数を数え、網膜神経節細胞の算出をする。また、網膜中心部、腹側部、背側部など各部位の神経節細胞密度の分布の相異を明らかにする。パラフィン切片を作成後、網膜の細胞配列の特徴を見る。

カラス、ムクドリ、ヒヨドリそれぞれの網膜に発現するすべての視物質 (opsin) cDNAを網羅的にクローニングし、opsin レパートリを分子生物学的に明らかにし、視細胞の遺伝子発現パターンを調べる。

鳥類と哺乳類の中間透光体（角膜、レンズ、ガラス体）の光透過率を分光光度計を用いて測定する。また、鳥類と哺乳類の角膜組織微

細構造を電子顕微鏡を用いて比較する。

鳥類に各熟成段階の果実を提示し、その選択性を行動学的に解析する。その後、選択された果実の硬度や糖度、光反射率などを調べ、共通する特徴を見出す。

#### 4. 研究成果

##### (1) 鳥類による食害の調査と対策の試み (食害行動)

宇都宮大学附属農場において、平成19年度から食害と鳥の行動を調査し、果実の状態と食行動について観察を行った。果実の成熟にともない糖度含量、軟化さらに果色が増加し、酸度は減少し、収穫時以降は軟化のみ増加し、糖度や果色また酸度は平衡状態となった。この収穫前頃から、カラス等が飛来して果実をつついてるのが、観察された。また収穫前より、果実に加害して、傷をつけて過熟を早め、その後軟化したら再飛来して加害しているのが観察された。一方、多くはないものの未熟の青い柿を傷つける行為がみられた。それを、注意深く観察すると、傷をつけることにより果実の軟化と熟成様現象を促進させるような行動と考えられた。

##### (2) ハシブトカラスとヒヨドリ の鼻腔および嗅球の形態学的特性 (嗅覚の可能性)

カラスとヒヨドリ の嗅覚系に関して、①嗅覚機能を有するトリでは嗅上皮が形成されている後鼻甲介が鼻腔内に認められない、②脳全体に対する嗅球の占める割合が極めて小さく、一般には左右独立して存在する嗅球が肉眼的にも組織 (化学) 的にも完全に左右癒合している (図1)、③左右の嗅神経はそれぞれ嗅球の左半分および右半分に投射し、それぞれ嗅神経層と糸球体層を形成している、④嗅球に結合するレクチンの種類は (嗅覚を有する) 他の動物に比べ少ない、などの特性が明らかとなった。

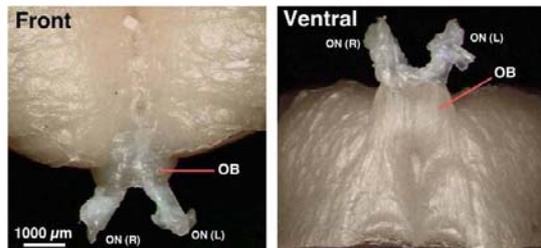


図1. 癒合する嗅球

##### (3) ハシブトカラス網膜の神経節細胞および油球 (色覚の検討1)

ハシブトカラスの網膜の神経節細胞の分布および細胞数について調べた。神経節細胞は、網膜中心部で密度が最も高く、20000/mm<sup>2</sup>以上であった。このような密度の高いところは、背側一後方にもみられた。このことから、

視覚の感度の高いところが2箇所あることが分かった。一方、油球についてみると、赤、青、黄、緑、透明のものが見られ、その分布割合は均衡していた (図2)。また、中心部でその分布密度は高く、網膜周囲にいくにしたがって少なくなるとともに、油球の大きさが大きくなっていった。ヒヨドリも油球の数的な分布状態はカラスのそれと同様であったが、油球の色の割合がことなっていた。つまり、カラスが比較的各種均等になっていたのに対し、ヒヨドリは黄、黄緑、緑系が多くを占めていた。

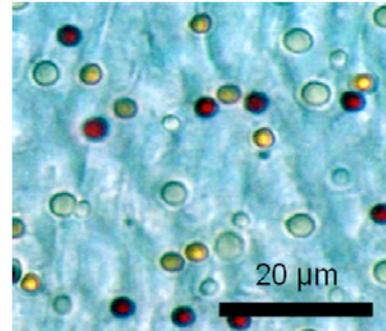


図2. カラスの油球

##### (4) ハシブトカラスにおけるオプシン遺伝子群の cDNA クローニング (色覚の検討2)

ハシブトカラスの光受容の分子的基盤を解明するため、オプシン遺伝子群の網羅的 cDNA クローニングを試みた。その結果、ハシブトカラスの網膜から、明暗視に関与するロドプシン、ならびに、色覚に関わる4種類の錐体オプシン (紫外線感受性オプシン、青色光感受性オプシン、緑色光感受性オプシン、赤色光感受性オプシン) の cDNA 全長塩基配列が決定された。このほかにも vertebrate ancient long オプシン、メラノプシン、ピノプシンという3種類の新規オプシンの部分塩基配列が決定された。よって、ハシブトカラスは少なくとも8種類のオプシン遺伝子を持ち、我々ヒトが考えている以上に複雑な光受容システムを持つことが明らかになった。

##### (5) カラスの中間透光体の光透過性と角膜の超微細構造について (色覚の検討3)

###### ① 鳥類と哺乳類の各種中間透光体における光透過率の比較

分光光度計を用いて各種動物の新鮮な左側眼球の角膜、レンズ、ガラス体の光透過率を測定し、6個体の平均値を算出した。角膜では、ニワトリとカラスの光透過率は高波長から低波長になるに従い、340nm 波長付近で、ラットは300nm 波長付近で急激に低下した。ウサギのそれは380nm 波長付近からゆるやかに低下し、300nm 波長付近で急激に低下した。レンズでは、ニワトリ、カラス、ラットは300nm 波長付近で、ウサギは400nm 波長付近

で急激に低下した。ガラス体では、全ての動物で 300nm 波長付近で急激に低下した。つまり、鳥類は角膜で 340nm 以下の波長を、ラットは角膜で 300nm 以下の波長を、ウサギはレンズで 400nm 以下の波長を遮断していた。これらのことから、紫外線を認識する動物では角膜が、認識しない動物ではレンズが紫外線の透過制御機構として重要な役割を持っていることが示唆された。

#### ②鳥類と哺乳類における角膜の微細構造の特徴

角膜の微細構造をニワトリ、カラス、ラット、ウサギで比較した。角膜組織中には、ケラトサイトとよばれる角膜の透明性維持に重要な役割を果たす細胞がある。鳥類のケラトサイトの密度は、哺乳類の3分の1程度であった。また、鳥類とラットのケラトサイトの面積は  $45 \mu\text{m}^2$  で、ウサギの  $70 \mu\text{m}^2$  に比べ有意に小さかった。角膜実質の主要な構成成分である膠原線維の束を走査型電子顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて観察すると、鳥類の膠原線維の走行は規則的な配列であったのに対し、哺乳類のそれは不規則的であった。鳥類の膠原線維の層板の厚さは  $1.5 \mu\text{m}$  であったのに対し、哺乳類のそれは  $1.0 \mu\text{m}$  で、有意に厚かった。また鳥類の層板は哺乳類に比べ有意に少なかった。膠原線維の走行と層板の厚さの違いが角膜における光透過率の違いを生み出す一因であることが示唆された。

#### (6) ハシボトガラスの光波長に対する学習速度の検討 (色覚の検討4)

ハシボトガラスの各種光波長への感受性に相異があるかどうかを調べるために、6色の光波長を用いて弁別学習が成立する速度を比較した。使用した光波長は 365nm (紫外線1)、375nm (紫外線2)、465nm (青) 555nm (緑)、585nm (黄)、695nm (赤) とし、これらの光を放つ発光ダイオードを用いた。各光波長に対して、それぞれカラスを3羽使用した。紫外線1、紫外線2、青のそれぞれには差がなかったのが短波長グループとして、また同様に黄と赤の間にも差がなかったのが長波長グループとしてまとめた。最も早かったのは短波長グループ (9羽の平均値は4.67日)、次いで長波長グループ (6羽の平均値は6.33日)、中間波長グループ (3羽の平均値は9.17日) の順に続いた。これらの結果からカラスは他の昼行性の鳥と同様、短波長に対して最も高い感受性を持っていることが示唆された。

#### (7) 果実の熟成に伴う糖度・硬度・果皮の光反射およびカラスによる嗜好性の変化 (色覚と果実の関係)

ビワ、ブドウ、ナシ、カキ、リンゴの5種の果実について、異なる3-4段階の熟成段階 (それぞれ未熟、準未熟、熟、過熟と分類した) に分け、ハシボトガラスに選択させた。その結果、概してカラスは熟および過熟を早い順序で選択し、未熟・準未熟は後の方で選択していた。さらに各果実について、熟成に伴う糖度・硬度・果皮の光反射の変化を測定し、それをカラスによる嗜好性の変化と照らし合わせた。その結果、果実の熟成に伴い糖度は増加し、硬度は減少したが、カラスによる嗜好性の変化との間に明確な関連は確認できなかった。一方、果皮の光反射の特徴についてみると、未熟・準未熟と熟・果熟の間に違いがみられ、これがカラスによる嗜好性の変化との間に関連があると考えられた。

次に、このことを確かめるために、過熟のビワに、黄色着色 (熟に近い色) および緑着色 (未熟に近い色) を施し、カラスに選択させた。その結果、カラスは無着色をまず選択し、次に黄色着色、最後に緑着色を選択した。また、着色したビワの果皮の光反射を測定したところ、黄色着色は熟に、緑着色は未熟のビワに、その特徴が類似していた。この結果、ハシボトガラスは果実の熟成段階を判別するために糖度や硬度を手がかりにせず、果実の色、すなわち果皮の光反射を手がかりにしていること、詳しくは、波長 650-680 nm 付近の光の反射率が比較的高い果実を好み、波長 650-680 nm 付近の光の反射率が低く、波長 550 nm 付近のそれが高い果実を避けることが示唆された (図3、4)。

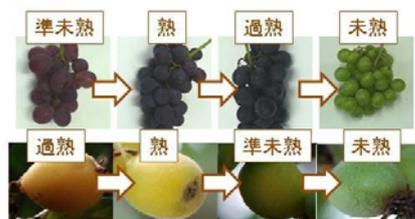


図3. 果実の選択順序

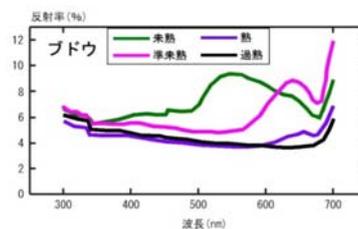


図4. ブドウ果皮の光反射率

#### 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9件) ※全て査読有

1) Tsukahara N, Tani Y, Lee E,

Kikuchi H, Endoh K, Ichikawa M, Sugita S. Microstructure Characteristics of the Cornea in Birds and Mammals. The Journal of veterinary medical science. In press. 2010. In press.

2) Rahman ML, Kuroda K, Aoyama M, Sugita S. Regional specialization of the Ganglion cell density in the retina of the Ostrich (*Struthio camelus*). Animal Science Journal. 2010. 81(1):108-115.

3) Yokosuka M, Hagiwara A, Saito TR, Aoyama M, Ichikawa M, Sugita S. Morphological and histochemical studies of the nasal cavity and fused olfactory bulb of the brown-eared bulbul, *Hypsipetes amaurotis*. Zoological Science. 2009. 26(10):713-721.

4) Yokosuka M, Hagiwara A, Saito TR, Tsukahara N, Aoyama M, Wakabayashi Y, Sugita S, Ichikawa M. Histological properties of the nasal cavity and olfactory bulb of the Japanese Jungle crow *Corvus macrorhynchos*. Chemical Senses. 2009. 34(7):581-593.

5) Rahman ML, Aoyama M, Sugita S. Ganglion cell density and oil droplet distribution in the retina of brown-eared bulbul (*Hypsipetes amaurotis*). Anatomical Science International. 2008. 83(4):239-246.

6) Rahman ML, Aoyama M, Sugita S. Regional specialization of the Tree Sparrow *Passer montanus* retina: ganglion cell density and oil droplet distribution. Ornithological Science. 2007. 6(2):95-105.

7) Rahman ML, Aoyama M, Sugita S. Number and density of retinal photoreceptor cells with emphasis on oil droplet distribution in Mallard duck (*Anas platyrhynchos var. domesticus*). Animal Science Journal. 2007. 78(6): 639-649.

8) Rahman ML, Aoyama M, Sugita S. Topography of retinal photoreceptor cells in the Jungle Crow (*Corvus macrorhynchos*) with emphasis on the distribution of oil droplets. Ornithological Science. 2007. 6(1):29-38.

9) Rahman ML, Aoyama M, Sugita S. Topography of ganglion cells in the retina of the duck (*Anas platyrhynchos var. domesticus*). Animal Science Journal. 2007. 78(3):286-292.

[学会発表] (計 15 件)

- 1) Tsukahara N, Tani Y, Lee E, Kikuchi H, Sugita S. Light transmission of cornea and microstructure of corneal stroma in birds and mammals. The 3<sup>rd</sup> Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists (Cheongij, Korea, Nov. 4-6, 2009).
- 2) Rahman ML, Yoshida K, Maeda I, Tanaka H, Sugita S. Distribution of retinal cone photoreceptor oil droplets, and identification of their carotenoids in crow (*Corvus macrorhynchos*). The 3<sup>rd</sup> Congress of Asian Association of Veterinary Anatomists (Cheongij, Korea, Nov. 4-6, 2009).
- 3) Rahman ML, Yoshida K, Maeda I, Tanaka H, Sugita S. Distribution of retinal oil droplets, and analyzing their carotenoids by saponification and HPLC methods in Jungle Crow. 39<sup>th</sup> Meeting of the Society for Neuroscience (Chicago, USA, Oct. 17-21, 2009).
- 4) Yokosuka M, Saito TR, Aoyama M, Sugita S, Ichikawa M. Morphological and histochemical studies of the nasal cavity and “fused” olfactory bulb of the brown-eared bulbul (*Hypsipetes amaurotis*). 39<sup>th</sup> Meeting of the Society for Neuroscience (Chicago, USA, Oct. 17-21, 2009).
- 5) 横須賀誠, 斎藤徹, 青山真人, 杉田昭栄, 市川真澄. ヒヨドリ *Hypsipetes amaurotis* の鼻腔および嗅球の形態学的特性. 日本味と匂学会 第 43 回大会 (北海道旭川市, 2009 年 9 月 2-4 日).
- 6) 塚原直樹, 谷優理, 菊地秀幸, 堀井幸美, 杉田昭栄. 分光光度計を用いた鳥類と哺乳類の各種中間透光体における光透過率の比較. 第 111 回日本畜産学会大会 (沖縄県琉球大学, 2009 年 9 月 28-29 日).
- 7) Bogale BA, Sugawara S, Sakano K, Tsuda S, Sugita S. Color discrimination learning and memory in Jungle Crows (*Corvus macrorhynchos*). 127<sup>th</sup> Meeting of the American Ornithologists' Union (Philadelphia, USA, Aug. 11-15, 2009).
- 8) Rahman ML, 青山真人, 杉田昭栄. A light and scanning electron microscope study of the pecten oculi of the Japanese Jungle Crow (*Corvus macrorhynchos*). 第 147 回日本獣医学会

学術集会（栃木県宇都宮市，2009年4月2-4日）。

9) 塚原直樹，谷優理，李銀玉，菊地秀幸，杉田昭栄。哺乳類と鳥類の角膜における光透過と組織的差異。第147回日本獣医学会学術集会（栃木県宇都宮市，2009年4月2-4日）。

10) 横須賀誠，萩原亜紀子，斎藤徹，塚原直樹，青山真人，杉田昭栄，市川眞澄。ハシブトガラス *Corvus macrorhynchos* の鼻腔および嗅球の形態学的特性。日本味と匂学会 第42回大会（富山県富山市2008年9月17-20日）。

11) Arai N, Sugita S, Aoyama M, Yanagisawa T, Iigo M. Molecular cloning of rhodopsin (RH1) cDNA from the retina of the jungle crow (*Corvus macrorhynchos*). Japan Taiwan Bilateral Science & Technology Symposium (Tochigi, Japan, Nov. 11-12, 2008).

12) 新井菜津美，青山真人，杉田昭栄，柳沢忠，飯郷雅之。ハシブトガラス (*Corvus macrorhynchos*) 緑色光感受性オプシン遺伝子のcDNAクローニング。日本分子生物学会第8回春季シンポジウム「躍動する分子生物学 -北の大地から-」(北海道札幌市，2008年5月26日-27日)。

13) Yokosuka M, Wakabayashi Y, Tsukahara N, Aoyama M, Sugita S, Saito T, Ichikawa M. Histological properties and lectin-binding pattern of the fused olfactory bulb in jungle crow (*Corvus macrorhynchos*). 37<sup>th</sup> Annual Meeting Society for Neuroscience (San Diego, USA, Nov. 3-7, 2007).

14) Sugita S, Rahman L. Topography of the ganglion cells, photoreceptor cells and oil droplets in the retina of some Avian species. (Lecture) The 2<sup>nd</sup> Congress of The Asian Association of Veterinary Anatomist (Bangkok, Thailand, Sep. 12-14, 2007).

15) Rahman ML, Aoyama M, Sugita S. Ganglion cell density and oil droplet distribution in the retina of the brown-eared bulbul (*Hypsipetes amaurotis*). The 2<sup>nd</sup> Congress of The Asian Association of Veterinary Anatomist (Bangkok, Thailand, Sep. 12-14, 2007).

[その他]

ホームページ等

<http://agri.mine.utsunomiya-u.ac.jp/hpj/deptj/anij/staff/sugita/sugita.htm>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者：

杉田昭栄（宇都宮大学・農学部・教授）

研究者番号：50154472

(2) 研究分担者：

八巻良和（宇都宮大学・農学部・教授）

研究者番号：30111488

志賀 徹（宇都宮大学・農学部・教授）

研究者番号：30089932

居城幸夫（宇都宮大学・農学部・教授）

研究者番号：10151416

飯郷雅之（宇都宮大学・農学部・准教授）

研究者番号：10232109

横須賀誠（日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授）

研究者番号：90280776

青山真人（宇都宮大学・農学部・助教）

研究者番号：90282384