

機関番号：10101  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20580188  
 研究課題名（和文） 母川刷込関連時期におけるサケ類嗅上皮の細胞動態と甲状腺ホルモンレセプター発現  
 研究課題名（英文） Cell dynamics and thyroid hormone receptor expression in salmon olfactory epithelium at the natal river imprinting-related periods.  
 研究代表者  
 工藤 秀明（KUDO HIDEAKI）  
 北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授  
 研究者番号：40289575

研究成果の概要（和文）：シロザケとサクラマス之母川刷込関連時期（降海時および産卵遡上時）を含めた各発育段階における嗅上皮中の嗅細胞数を解析し、体サイズの増加に伴い増加することを明らかとした。シロザケ嗅上皮で発現している甲状腺ホルモンレセプターβ遺伝子のクローニングを行ない、その発現部位から嗅細胞の分化・成熟に強く関わることを明らかとした。また、母川刷込関連時期に特徴的な発現変化は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：We analyzed morphometric change in the quantity of olfactory receptor neurons during life history in chum and masu salmon. The number of olfactory receptor neurons is synchronized with the body size throughout its life history, including the imprinting-related periods (both downstream and upstream stages). In addition, thyroid hormone receptor beta was characterized in the olfactory epithelia of chum salmon by molecular biological and histochemical techniques.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	4,000,000	1,200,000	5,200,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：生理、母川回帰

## 1. 研究開始当初の背景

遡河回遊魚であるサケ属魚類 *Oncorhynchus* spp. (以下、サケ類) は、河川で孵化した後、種により開始の時期は異なるが降海し、外洋を索餌回遊・成長した

後に産卵のために母川回帰することが知られている。この特徴的な生態（生活史）を利用し、我が国では、人工孵化放流事業が積極的に行われ、現在では北海道をはじめとする北日本の多くの河川においてシ

ロザケが回帰・遡上している (Morita *et al.* 2006)。母川回帰の最終段階には、降海時に刷込まれたニオイの記憶を頼りに母川識別をするという「嗅覚刷込」説がギンザケを用いた嗅覚遮断-標識再放流実験により提唱されている (Wisby and Hasler 1954)。同じくギンザケ降海時の嗅覚刷込には、刷込に特異的な時期や臨界期がある可能性が示唆されている (Nevitt *et al.* 1994; Dittman *et al.* 1996)。しかしながら、サケ類の嗅覚刷込の全容は未だ不明点が多く、その中でも母川情報を刷込む降海時や母川識別を行う産卵遡上時 (以下、母川刷込関連時期) にニオイ受容器官である嗅神経系の形態および機能がどのような状態なのかについては明らかにされていない。近年、野生魚と孵化場魚との何らかの生物学的相互作用が指摘されている (Kaeriyama and Espalina 2004) なかで、母川回帰の最も鍵となる母川刷込の機構が不明なまま人工孵化放流事業を継続することは、これからの生態系ベースの水産科学の観点から問題があるものと思われる。

サケ類の降海時には、一般に細胞の代謝活性を亢進させる作用をもつホルモンとされる産生型甲状腺ホルモン (サイロキシン:  $T_4$ ) の血中濃度変化がピークやサージを示すことが知られている。河川依存度が高く幼魚で降海するギンザケやサクラマスでは、銀化変態との関連が示唆され (Dickhoff *et al.* 1978; Yamauchi *et al.* 1984)、浮上後まもなく降海するシロザケでは、中枢レベルに作用し降海行動の引き金になっているという報告もある (Iwata *et al.* 2003)。一方、嗅神経系では、サクラマスの降海期において嗅神経系の感覚上皮である嗅上皮に活性化型甲状腺ホルモンであるトリヨードサイロニン ( $T_3$ ) の高い特異的結合が見られること (Kudo *et al.* 1994)、ギンザケでの  $T_3$  投与実験では嗅上皮の細胞増殖が活性化することが示されている (Lema and Nevitt 2004)。しかしながら、この時期にサケ類の嗅上皮の細胞増殖が活性化し、細胞が増加していることを示した報告は現在のところ全くなく、同様に母川識別時の状態についても不明である。また、これまで申請者を含めたサケ類の嗅神経系の生化学的または分子生物学研究者は、母川刷込に強く関わる分子の検索を目指

して解析を行ってきたが、同時期の嗅上皮の細胞動態が分からないまま研究を展開してきており、得られる結果が刷込現象に特異的なものなのか、単に成長の過程としての細胞の増加やその活性化を反映するものなのかについては明確できない現状であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、母川刷込関連時期の嗅上皮において、細胞レベルの「数的変化が起きているのか？」もしくは「質的变化が起きているのか？」について明らかにすることを目的として、母川刷込関連時期が異なるシロザケとサクラマスの2種のサケ類を用い、同時期の嗅上皮の細胞動態、特にニオイ受容細胞である嗅細胞数の定量化を組織学的に行った。また、降海時に増加する血中甲状腺ホルモンがニオイ受容器官を標的部位としているか否かを明らかにするために上記2種のサケ類嗅上皮から甲状腺ホルモンレセプター遺伝子をクローニングし、母川刷込関連時期における発現変化と嗅上皮の細胞動態との相関の有無を明らかにした。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究材料

本研究には、以下のサケ類2種の母川刷込時 (降海時) および母川識別時 (遡上時) の個体を用いた。

①シロザケ：降海時の個体は、北海道南部の遊楽部川水系において、春に電気ショッカーにより採集される幼稚魚を用い、一部の個体は本学の海水飼育施設で飼育し降海後に相当するサンプルとした。遡上中または遡上後には同河川に産卵遡上した個体を用いた。

②サクラマス：降海時のサンプルには、同じく遊楽部川において晩冬から春にかけての1年魚幼魚のパーからスマルト個体を電気ショッカーにより採集した。遡上後の個体は春から夏に遊楽部川に遡上した成熟前の個体を用いた。

### (2) 嗅上皮における細胞動態

サケ類の嗅上皮を含む嗅房はヒダ状の複雑な立体構造を持つことから組織切片や走査電顕観察では嗅細胞数の計数は困難であることから、嗅上皮の組織学的細胞動態解析には、各嗅細胞が一本の求心性神経軸索を脳に投射していることに着目して、同軸索が束に

なり構成される嗅神経（第 I 脳神経）を用い、その中に含まれる軸索数から嗅房（嗅上皮）全体に存在する嗅細胞数を計数した。具体的には、①嗅神経組織の透過電顕試料を常法により作成し、横断面の準超薄切片の光顕観察により求心性軸索（＝嗅細胞の軸索）の占める面積を計測した。②同サンプルの超薄切片を作成し透過型電顕観察により単位面積あたりの軸索数を計数した。③2つの値から嗅細胞数を算出した。得られた嗅細胞数は、各母川刷込関連時期内の細胞数増加の動態を解析した。

(3)甲状腺ホルモンレセプター遺伝子発現  
甲状腺ホルモンレセプター (TR) 遺伝子のクローニングには、シロザケの嗅上皮を含む嗅房から魚類 TR 特異プライマーを用いてクローニングを行い、嗅上皮における主要 TR のサブタイプを明らかにした。また、遺伝子発現解析に用いるサケ類 TR 特異的 PCR プライマーと *in situ* ハイブリダイゼーションに用いるジゴキシゲニン標識 cRNA プローブを作成した。各母川刷込関連時期の個体から嗅房組織を採集し、作成したプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションと各種嗅上皮構成細胞マーカー (PCNA: 基底細胞, PGP9.5: 未成熟を含む嗅細胞, OMP: 成熟嗅細胞ほか) の局在との比較により TR 遺伝子発現細胞の同定を行った。合わせて、血清中の甲状腺ホルモン濃度も時間分解蛍光測定法により測定し、各母川刷込関連時期における TR 遺伝子発現変化と細胞動態との関係性を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 嗅上皮における細胞動態

シロザケの片側嗅房中の嗅板数は、仔魚および稚魚では 6 枚以下であったが、若魚までにおよそ 16~21 枚までに増加し、それ以降の発育段階では有意な増加を示さなかった。サクラマスにおいても、幼魚まで嗅板数が急激に増加し、未成熟魚以降において嗅板数は 12~15 枚であった。両種の未成熟魚以降において嗅板表面には二次褶曲構造の発達による表面積の増大が確認された。成熟途上魚の嗅板数はシロザケがサクラマスに比べ有意に多かった。嗅神経束横断面の大部分は嗅神経軸索の断面で占められ、未成熟魚以降の個体には 50  $\mu\text{m}$  径以上の血管および顕著な結合組織の入り込みが観察された。また、軸索断面の直径は 80-200nm であり、両魚種間で違

いは認められず、シロザケおよびサクラマス成熟途上魚の嗅神経束横断面 1  $\mu\text{m}^2$  における平均嗅神経軸索数はそれぞれ、14.5 本および 19.0 本であった。片側嗅房中の嗅細胞数は、シロザケおよびサクラマスにおいて成熟途上魚まで発育段階に伴い増加し、尾叉長の増加に伴い嗅細胞数が増加した (図 1)。母川刷込に関連する時期における嗅細胞数は、母川刷込時と推定される降海前のシロザケ稚魚の嗅細胞数は約 18 万細胞、サクラマス後期パーおよびスモルト前期では約 75 万細胞でありサクラマスの嗅細胞数がシロザケの嗅細胞数に比べ有意に多かった。一方、母川識別時と推定される母川遡上前、すなわち成熟途上魚の嗅細胞数はシロザケが 1,300~2,200 万細胞およびサクラマスが 1,200~2,300 万細胞であった。これらの嗅細胞数の結果はサケ科魚類では世界初の知見である。

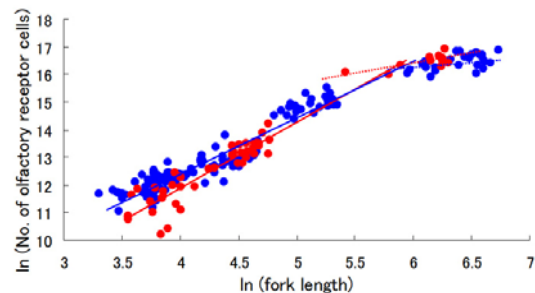


図 1 シロサケ (青) およびサクラマス (赤) における尾叉長と嗅細胞数の関係。

シロザケの嗅細胞数は、嗅板数の増加が見られない若魚以降においても尾叉長の増加に伴い増加しており、嗅板数の増加停止後も嗅細胞数が増加することが明らかとなった。両種ともに成熟途上魚以降の嗅細胞数は、嗅覚が高度に発達した哺乳類のものに匹敵し、既知の真骨魚類の嗅細胞数よりも非常に多いことが明らかとなった。若魚期以降には、各嗅板自体の体積増加に加え、嗅板表面上には、非感覚性上皮部が隆起した顕著な二次褶曲構造の形成が認められた。この褶曲の形成は嗅板周囲の水流の整流に働き、嗅板数が増加した嗅房の中でも効果的に嗅上皮部に外部環境水が触れることを示唆している。また、嗅板自体が大きくなることで、嗅上皮部分の表面積増加につながり、嗅細胞数の増加に影響を与えていると考えられた。サクラマスはシロザケに比べ正確に母川に回帰することが知られている。母川刷込時期に相当する降海前において、サクラマスがシロザケより約

4 倍多い嗅細胞数を有するという事は、末梢のニオイ受容機構の発達を示すと同時に、脳へ投射する軸索数も増えることから、嗅球をはじめとする中枢レベルの発達も推察される。サクラマスの高い母川回帰性には、末梢レベルからニオイの記憶も含めた中枢レベルまでの総合的な発達による高い嗅覚能が関与しているのかもしれない。これらのことから、サケ属魚類の嗅覚器官は真骨魚類の中では比較的発達していること、嗅板数が一定になった後も体サイズの増加に伴い嗅細胞数が増加することが明らかになった。また、生活史パターンに由来する母川刷込時および母川識別時の体サイズの違いによる嗅覚器官の発達度合は、母川回帰性などに関連している可能性を示した。

#### (2) 甲状腺ホルモンレセプター遺伝子発現

RT-PCR により未成熟シロザケ嗅房から約 420 bp の TR 様遺伝子断片が得られた。シーケンスおよび相同性検索の結果、タイセイヨウサケおよびギンザケの TR $\beta$  遺伝子とそれぞれ 96 %以上の高い相同性を示した。*in situ hybridization* の結果、シロザケ TR $\beta$  遺伝子発現を示す特異的シグナルは、嗅上皮基底層上部～中層に局在する細胞の核周囲部に観察され、嗅上皮上層および基底層下部、基底下の結合組織には認められなかった。また、センス鎖プローブを用いたコントロール反応では特異的シグナルは認められなかった。免疫組織化学の結果、PCNA 免疫陽性反応は基底細胞の核に観察された。PGP9.5 免疫陽性嗅細胞の核周囲部は基底層上部から中層において局在し、PCNA 免疫陽性細胞との近接も認められた。OMP の同核周囲部は嗅上皮中層から上層下部において認められた。TR $\beta$  遺伝子発現を示すシグナルの局在は、基底層上部における PGP9.5 免疫陽性嗅細胞の局在と重複していた。また、同シグナルは、基底層上部における一部の PCNA 免疫陽性細胞の局在とも重複していた。TR 遺伝子発現量を分析した結果、発育段階に伴う顕著な変化は認められなかった。また、OMP 遺伝子発現動態やこれまでに報告されている発育段階に伴うシロザケ嗅房における嗅板数および嗅細胞数の動態と TR 遺伝子発現量の間には明瞭な相関は認められなかった。

本研究により脊椎動物の嗅覚器官では世界で初めて TR 遺伝子の発現が確認され、シ

ロザケの嗅房が甲状腺ホルモンの標的器官の一つであることが分子生物学的に明らかとなった。増幅された cDNA クローンはタイセイヨウサケ TR $\beta$  およびギンザケ TR $\beta$  と非常に高い相同性を示し、このクローンは両魚種 TR $\beta$  のホモログであると考えられ、シロザケ TR $\beta$  と断定した。本研究では TR $\beta$  は検出されず、未成熟シロザケ嗅房では、TR $\beta$  が優勢に発現していると考えられた。TR $\beta$  遺伝子発現細胞は、嗅上皮の基底層上部から中層において、PCNA 免疫陽性基底細胞および PGP9.5 免疫陽性未成熟嗅細胞と局在性が一致していた。

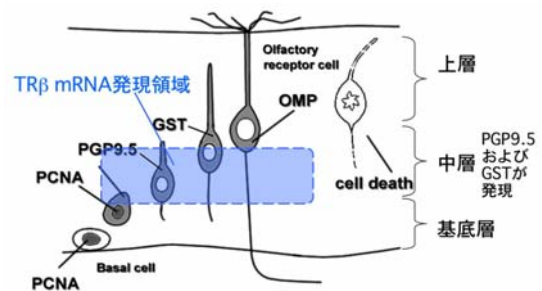


図2 シロザケ嗅上皮における TR $\beta$  遺伝子と各種嗅上皮構成細胞発現部位の模式図。

サケ属魚類においても、基底細胞から嗅細胞へ約 1 ヶ月の周期で細胞更新が行われている。これらのことから TR $\beta$  遺伝子は、基底細胞から未成熟嗅細胞への分化の途中に発現し、嗅細胞分化・成熟に関与することが明らかとなった。シロザケ TR $\beta$  遺伝子の発現量は生活史を通じて大きな変化を示さず推移した。このことは、TR $\beta$  は降海や遡上時などの母川刷込に強く関わる時期に、血中甲状腺ホルモン濃度のようにピンポイント的に発現増加を示すものではないことを示唆した。これらのことから、シロザケ嗅房において TR $\beta$  遺伝子が発現し、その発現量は発育段階に伴う顕著な変化を示さないことが明らかとなった。また、TR $\beta$  遺伝子シグナルは嗅上皮基底層上部から中層にかけての未成熟嗅細胞において発現することが確認され、甲状腺ホルモンが TR $\beta$  を介して嗅細胞の分化に関与している可能性が示された。

## 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 10 件)

- ① Kudo H, Doi Y, Fujimoto S  
(2010) Expressions of the multidrug resistance-related proteins in the rat olfactory epithelium: a possible role in the phase III xenobiotic metabolizing functions. *Neuroscience Letters*, **468**: 98-101. (査読有)
- ② Hao Z-L, Zhang X-M, Kudo H, Kaeriyama M  
(2010) Development of the retina in the cuttlefish *Sepia esculenta*. *Journal of Shellfish Research*, **29**: 463-470. (査読有)
- ③ Kudo H, Doi Y, Ueda H, Kaeriyama M  
(2009) Molecular characterization and histochemical demonstration of salmon olfactory marker protein in the olfactory epithelium of lacustrine sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, **154**: 142-150. (査読有)
- ④ Kudo H, Shinto K, Sakurai Y, Kaeriyama M  
(2009) Morphometry of olfactory lamellae and olfactory receptor neurons during the life history of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Chemical Senses*, **34**: 617-624. (査読有)
- ⑤ Yokotani R, Azuma N, Kudo H, Abe S, Kaeriyama M (2009) Genetic differentiation between early- and late-run populations of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) naturally spawned in the Yurappu River inferred from mitochondrial DNA analysis. *Fish Genetics and Breeding Science*, **39**: 1-8. (査読有)

[学会発表] (20 件)

- ① 工藤秀明ほか シロザケ嗅上皮における甲状腺ホルモン受容体  $\beta$  発現細胞と各種嗅上皮分子マーカー発現細胞の局在性の比較 日本味と匂学会第 44 回大会 2010 年 9 月 9 日 北九州国際会議場 (北九州・福岡)
- ② 工藤秀明ほか シロザケ嗅覚器官における甲状腺ホルモンレセプター遺伝子発現について 第 2 回北海道嗅覚味覚研究会 2010 年 3 月 7 日 北海道大学 (札幌・北海道)
- ③ 江藤彰洋, 工藤秀明ほか シロザケ嗅房における甲状腺ホルモンレセプターの発現 日本味と匂学会第 43 回大会 2009 年 9 月 3 日 旭

川市民文化会館 (旭川・北海道)

- ④ Shinto M, Kudo H, and Kaeriyama M. Histological development of the olfactory organs in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) during the period of their life history. 5<sup>th</sup> World Fisheries Congress 2008 年 10 月 21 日 パシフィコ横浜 (横浜・神奈川県)
- ⑤ Kudo H, Doi Y, Ueda H and Kaeriyama M. Molecular cloning and molecular histochemistry of salmon olfactory marker protein in the lacustrine sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT) XV 2008 年 7 月 22 日 Hyatt Regency (米国・サンフランシスコ)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

工藤 秀明 (KUDO HIDEAKI)  
北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授  
研究者番号 : 40289575

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し