

平成21年 4月15日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18208017

研究課題名（和文） サケの嗅覚機能を指標とした母川水識別機構に関する研究

研究課題名（英文） Studies on discriminating mechanisms of natal stream odorants by salmon olfactory function

研究代表者

上田 宏 (UEDA HIROSHI)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授

研究者番号：00160177

研究成果の概要：我国の重要な水産資源であるシロザケ・サクラマス・ベニザケ（ヒメマス）は、生まれた川（母川）を降河する時に、母川固有の溶存遊離アミノ酸（DFAA）組成を母川水のニオイ成分として記憶し、数年後に成熟した時に、嗅覚により DAFF 組成を識別して高い確率で母川を選択したが、カラフトマスは選択しなかった。また、DFAA は主に河床の付着微生物の集合体であるバイオフィルムが産生し、流域・季節・年変動の少ない DFAA 組成が存在した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	22,400,000	6,720,000	29,120,000
2007年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2008年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
年度			
年度			
総計	36,700,000	11,010,000	47,710,000

研究分野：魚類生理学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：太平洋サケ、嗅覚機能、母川記憶、母川回帰、溶存遊離アミノ酸、バイオフィルム、ニオイ受容体、嗅上皮 DNA チップ

## 1. 研究開始当初の背景

我国で再生産している太平洋サケ（シロザケ・カラフトマス・サクラマス・ベニザケ）は、親魚が繁殖のため生まれた川（母川）に高い確率で回帰する優れた母川回帰性を利用した人工孵化放流事業により資源が増産されてきた。サケの母川回帰は、稚幼魚が母川水のニオイを記憶して降河し、北洋における索餌回遊により成長した親魚が繁殖のため、降河時に記憶した母川水のニオイを頼りに母川を識別して回帰する「嗅覚仮説」が提唱されてきた。しかし、母川のどのようなニオイ成分を、サケがどのように嗅覚機能を用いて記憶・識別して回帰するかに関しては多くの謎が残されていた。

## 2. 研究の目的

我国の重要な水産資源である4種の太平洋サケが、嗅覚機能により母川水のニオイ成分を記憶・識別する機構を比較解析し、そのニオイ成分を産生する環境要因を特定することにより、サケの安定回帰・資源増産に役立つ知見を提供する。

- (1) 4種の太平洋サケの母川記憶・識別機構およびサケの母川回帰率の解析。
- (2) 河川水の溶存遊離アミノ酸（DFAA）の起源および流域・季節・年変動の解析。
- (3) 河川水および海水のアミノ酸およびそれ以外のニオイ成分の解析。
- (4) サケ嗅上皮 cDNA マイクロアレイによる嗅覚関連遺伝子の解析。

### 3. 研究の方法

(1) 4種の太平洋サケの母川記憶・識別機構およびサケの進化と母川回帰率の解析

①電気生理学的な嗅覚応答実験：長流川に回帰したシロザケと洞爺臨湖実験所のヒメマスを用いて、人工アミノ酸母川水に対する嗅覚応答を電気生理学的に調べた。

②Y字水路を用いた選択行動実験：各母川に回帰した4種類の太平洋サケと洞爺臨湖実験所のヒメマスを用いて、Y字水路における人工アミノ酸母川水と他の人工アミノ酸河川水に対する選択性を調べた。

③ニオイ受容体遺伝子(OR)およびサケ母川記憶関連遺伝子(SOIG)の分子生物学的解析：シロザケとヒメマスのORおよびSOIGの降河・遡上時の発現量変化を調べた。

④母川回帰率の解析：タグ標識個体と耳石温度標識個体の母川回帰率のデータを調べた。

(2) 河川水のDFAAの起源と季節変化の解析

①DFAAの起源：豊平川の河床の付着性微生物が産生するDFAAを培養実験により調べた。

②DFAAの流域・季節・年変動の解析：天塩川の上流から河口に7地点を設定して、DFAA組成・濃度の流域・季節・年変動を調べた。

(3) 河川水および海水のアミノ酸およびそれ以外のニオイ成分の解析

①電子味識別システムによる分析：水中に溶解しているアミノ酸以外のニオイ物質を電子味識別システムにより調べた。

②海水のDFAA分析：海水のDFAAを測定し、河川水のDFAAとの差異を調べた。

(4) サケ嗅上皮cDNAマイクロアレイによる嗅覚関連遺伝子の解析：シロザケ嗅上皮cDNAマイクロアレイを作製して、母川記憶関連遺伝子の網羅的解析を試みた。

### 4. 研究成果

(1) 4種の太平洋サケの母川記憶・識別機構およびサケの母川回帰率の解析

①電気生理学的な嗅覚応答実験：長流川に回帰したシロザケを用いて、長流川のDFAAの中で最も濃度が高いグルタミン酸(G)を除いた人工G-長流川水と人工長流川水に対する交差順応を調べたところ、完全順応することはなく、シロザケは河川水中のGの有無を識別していた(図1)。

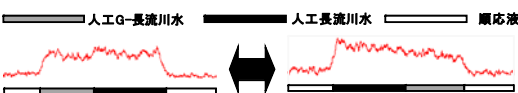


図1. 長流川のシロザケの人工長流川水中のグルタミン酸の有無に対する電気生理学的交差順応嗅覚応答。

洞爺臨湖実験所のヒメマス1歳魚を用いて、スモルト期(海水適応能を獲得して降河行動を行い母川記憶する時期)前中後期の2005年3-7月に1μMプロリン(P)を2週間暴露し、非成熟期と成熟期にPに対する嗅電位を測

定した。3-6月に暴露すると成熟に関係なく、対照群に比べて有意に嗅電位が高くなったが、7月に暴露しても変化なかった。ヒメマスがニオイを記憶できるのはスモルト期間中とその前であった(図2)。

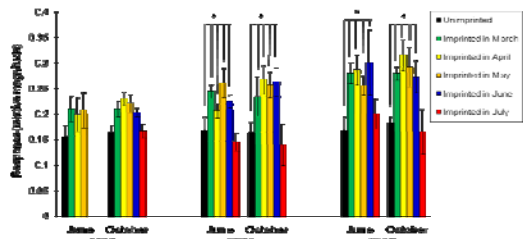


図2. スモルト期前中後期にプロリンを記憶させたヒメマスの電気生理学的嗅覚応答実験。\* $p < 0.05$  by one way ANOVA.

②Y字水路を用いた選択行動実験：長流川に回帰したシロザケを用いて、人工長流川水・人工G-長流川水・支笏湖孵化場水(アミノ酸濃度が長流川水の約4倍)・洞爺湖水の選択性を調べた。人工長流川水と人工G-長流川水を有意に選択したが、人工長流川水と人工G-長流川水間には有意差はなく、Gの有無は母川水選択性に影響しなかった(図3)。

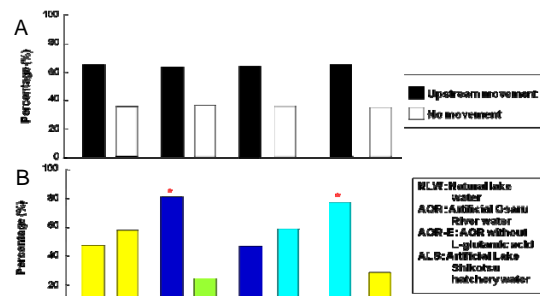


図3. 長流川の成熟シロザケ雄のY字水路における選択行動。(A) Y字水路を遡上した割合。(B) 遡上した個体中、各河川水を選択した割合。\* $p < 0.05$  by chi-square test.

4種類の成熟太平洋サケ雄魚が回帰した河川水のDFAAを分析し、そのDFAAの組成・濃度で作成した人工アミノ酸母川水に対する選択行動を調べたところ、カラフトマス以外のサクラマス・ベニザケ・シロザケは有意に人工アミノ酸河川水を選択した(図4)。

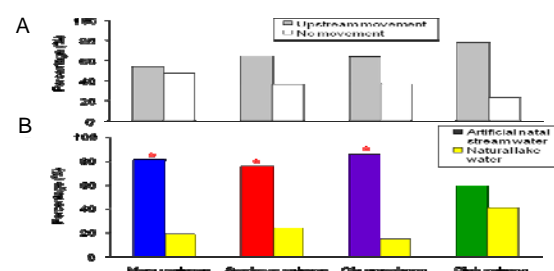


図4. 4種類の成熟サケ雄のY字水路における選択行動。(A) Y字水路を遡上した割合。(B) 遡上した個体中、人工アミノ酸母川水を選択した割合。\* $p < 0.05$  by chi-square test.

Pを記録させた成熟ヒメマスのPへの選択性を調べたところ、スモルト期前中に記録させたヒメマスは有意にPを選択したが、スモルト期後に記録させた成熟魚は選択しなかった(図5)。

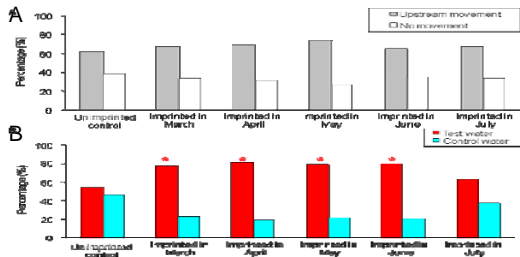


図5. 1歳魚の3-7月にプロリンに暴露した成熟ヒメマスのプロリンに対するY字水路における選択行動。(A) Y字水路を遡上した割合。(B) 遡上した個体中、プロリン添加水を選択した割合。\* $p < 0.05$  by chi-square test.

③ORとSOIGの分子生物学的解析: ヒメマスOR(LSSOR1)の母川記録時(スモルト期)とシロザケのOR(CSOR1)の母川回帰時の発現量変動をリアルタイムPCRにより解析したところ、LSSOR1は母川記録時に、CSOR1は母川回帰時に発現量が増加した(図6)。

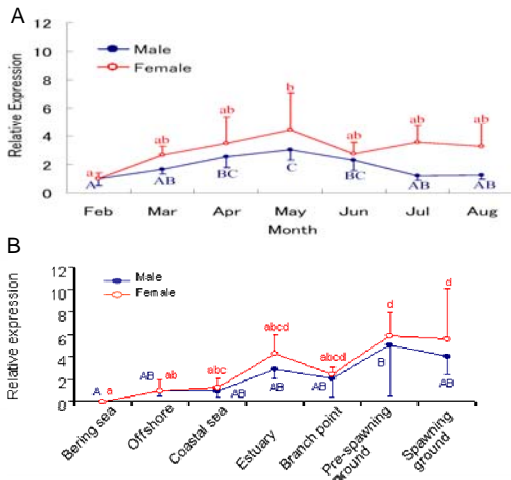


図6. ヒメマスとシロザケのニオイ受容体遺伝子(OR)の母川記録時(スモルト期:A)および母川回帰時(B)の変化。 $p < 0.05$  by one-way ANOVA.

シロザケSOIGの降河回遊および母川回帰に伴う発現量変動をリアルタイムPCRにより解析したところ、SOIGは降河回遊および母川回帰に伴い発現量が増加した(図7)。

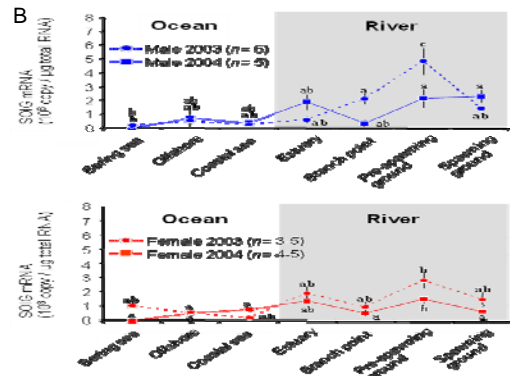
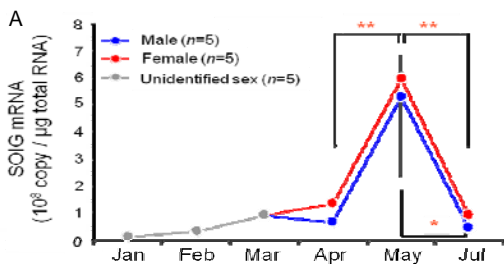


図7. シロザケの母川記録関連遺伝子(SOIG)の降河回遊(A)および母川回帰(B)に伴う発現量の変化。 $p < 0.05$  by one-way ANOVA.

④母川回帰率の解析: 鱗切り標識または耳石温度標識して放流した標識魚が、放流河川に回帰した標識魚の数から算出される値を、単純に母川回帰率として算出した結果、4種の太平洋サケの母川回帰率は、カラフトマスが0.28%、シロザケが0.58%、ベニザケが0.2%、サクラマスが0.48%となった。河川で確認した標識魚数に基づく今回の母川回帰率は、放流魚の生残率や回帰魚への漁獲圧等により大きく年変動することを考慮しなければならず、4種の太平洋サケの母川回帰率を正確に把握するためには、耳石温度標識等を活用した今後の研究が期待される。

以上の結果、カラフトマス以外の太平洋サケは、稚幼魚期の限られた時期に母川水中のDFAA組成を記録し、成熟期にそのDFAA組成を頼りに母川回帰することが明らかになった。シロザケの場合、母川水を識別するにはDFAA組成の1種類のアミノ酸の有無には影響されないこと、およびヒメマスの場合、母川水中のDFAA組成を記録するのはスモルト期前中期であり、記録には2週間必要であった。さらに、ニオイ受容体遺伝子およびサケ母川回帰関連遺伝子が母川記録時と回帰時にその発現量が増加することが明らかになった。

(2)河川水のDFAAの起源および流域・季節・年変動の解析

①DFAAの起源の解析: 豊平川河床に礫岩切片を沈めてバイオフィーム(様々な細菌・藻類・原生動物などの微生物の共同体)を形成させ、24時間の培養実験を行った。その結果、バイオフィームは24時間で $812.87 \pm 247.12$  nMのDFAAを産生し、その組成は豊平川のDFAA組成とほぼ同じであることが判明した(図8)。一方、珪藻5種類・緑藻1種類を分離し、3週間の単藻培養を行った結果、付着藻類が産生するDFAAは、藻類の種

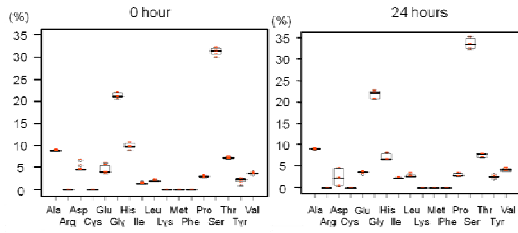


図8. 豊平川のバイオフィルムの開始時 (0 hour) と24時間培養後(24 hours) 溶存遊離アミノ酸組成.

類により異なるが、0.01~0.11nM/10 ng Chlorophyll a と非常に微量の DFAA しか産生しなかった。

②DFAA の流域・季節・年変動の解析：天塩川の源流部から河口域までの流域生態系が異なる7地点において2004年から2008年の5・8・10・12月に、河川水の DFAA 濃度・組成を分析した結果、DFAA 濃度は流域間の違いは比較的小さく、DFAA 組成は季節・年変動が認められたアミノ酸もあったが、全般的な主要アミノ酸組成は比較的安定していることが判明した。(図9)。

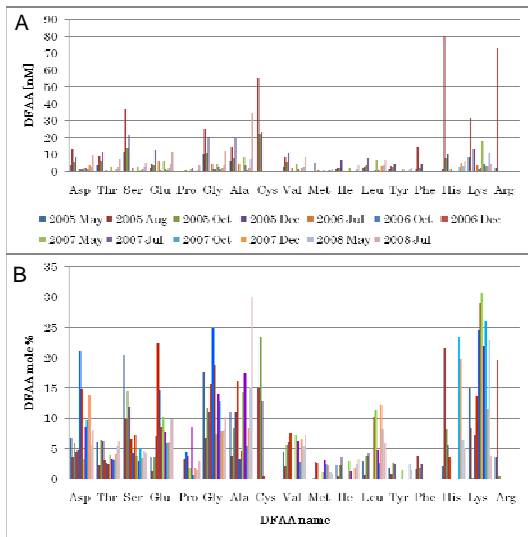


図9. 2005年5月から2008年7月までの天塩川の中流域の美深橋(農耕地)における溶存遊離アミノ酸の濃度(A)と組成(B).

以上の結果、河川水の DFAA は主にバイオフィルムにより産生され、流域・季節・年により大きな変動を示さない DFAA 組成があることが明らかになった。流域・季節・年により変動しない河川に特有の DFAA 組成を、サケの嗅覚機能がどのように識別するか、またバイオフィルムがどのように DFAA を産生するかを調べる必要がある。

(3) 河川水および海水のアミノ酸およびそれ以外のニオイ成分の解析

①電子味識別システムによる分析：天塩川の源流部から河口域までの流域生態系が異なる

る7地点の河川水を電子味識別システムによりニオイ成分の分析を行ったところ、流域生態系の変化により水質は定性的に変化した(図10)。しかし、河川水を定性的に変化させるニオイ成分の特定はできなかった。

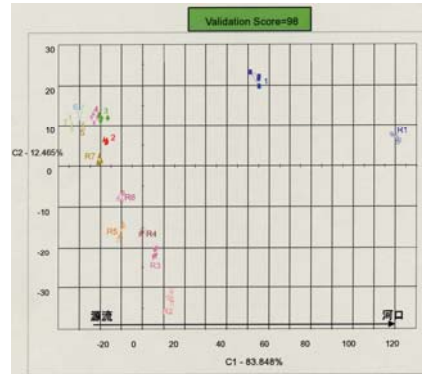


図10. 電子味分析システムによる天塩川上流部から河口部までの判別分析.

②海水の DFAA 分析：石狩湾において海水を採集し、種々の処理方法を用いて DFAA 濃度と組成を分析した結果、河川水と同様に測定ができることが判明した(図11)。

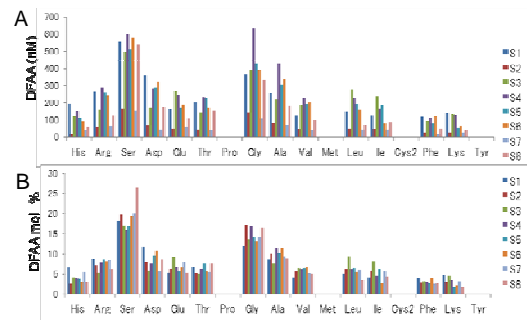


図11. 種々の処理方法(S1~S9)を用いた石狩湾の海水の溶存遊離アミノ酸の濃度と組成.

以上の結果、電子味識別システムは定性的な河川水中のニオイ成分の分析に有効であったが、ニオイ成分の分析は出来なかった。また、海水中の DFAA も河川水と同様に分析可能であることが判明し、日本ウナギやトラフグのような産卵場ニオイ成分分析が期待される。

(4) サケ嗅上皮 cDNA マイクロアレイによる嗅覚関連遺伝子の網羅的解析

シロザケ嗅上皮のcDNAを用いて、母川記銘・回帰に関連する遺伝子を検索するための、発現解析型cDNAマイクロアレイを作製した(図12)。プローブcDNAの電気泳動の結果、および遺伝子重複率が40%であったことより作製されたcDNAマイクロアレイには約650種類のcDNAが搭載されていると考えられた。シロザケ稚魚嗅上皮のcDNAを用いて、降河行動にともなう嗅覚系の遺伝子変動の解析を行い、変

動の大きかった遺伝子の機能と働きを調べたところ、マイクロアレイ上の25の遺伝子で大きな変化(亢進・低下)が見られた。



図1 2. 作成したシロザケ嗅上皮 cDNA マイクロアレイ。スポットは濃度、大きさともに均一で、正確なシグナル検出が可能である。Cy3 と Cy5 シグナルの相関係数は0.93であり、セルフハイブリダイゼーションの実験系が機能している。

以上の結果、作成したシロザケ嗅上皮 cDNA マイクロアレイは、サケの母川記録・回帰に関与する遺伝子の網羅的解析に応え得るだけの品質であり、今後の解析が期待される。

#### 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19件)

1. Ileva, N. Y., Shibata, H., Satoh, F., Sasa, K. and Ueda, H.: Relationship between the riverine nitrate-nitrogen concentration and the land use in the Teshio River watershed, North Japan. Sustainability Science, in press. 査読有
2. Makiguchi, Y. and Ueda, H.: Effects of external and surgically implanted dummy radio transmitters on mortality, swimming performance and physiological status of juvenile masu salmon *Oncorhynchus masou*. Journal of Fish Biology, 74, 304-311 (2009). 査読有
3. Makiguchi, Y., Nii, H., Nakao, K. and Ueda, H.: Migratory behaviour of adult chum salmon, *Oncorhynchus keta*, in a reconstructed reach of the Shibetsu River, Japan. Fisheries Management and Ecology, 15, 425-433 (2008). 査読有
4. Yamamoto, Y., Woody, C. A., Shoji, T. and Ueda, H.: Olfactory nerve response of masu salmon (*Oncorhynchus masou* Brevoort) and rainbow trout (*O. mykiss* Walbaum) to clove oil and MS-222. Aquaculture Research 39, 1019-1027 (2008). 査読有
5. Westring, C. G., Ando, H., Kitahashi, T., Bhandarim R. K., Ueda, H., Urano, A., Dores, R. M., Anna A. Sher, A. A. and Danielson, P. B.: Seasonal changes in CRF-I and urotensin I transcript levels in masu salmon: Correlation with cortisol secretion during spawning. General and Comparative Endocrinology 155, 126-140 (2008). 査読有
6. Makiguchi, Y., Nii, H., Nakao, K. and Ueda, H.: Effects of the reconstruction in the Shibetsu River on upstream migration behaviour of chum salmon assessed by EMG radio telemetry. Cybium, 32 (2), 309 (2008). 査読有
7. Yamamoto, Y., Ishizawa, S. and Ueda, H.: Effects of amino acid mixtures on upstream selective movement of four Pacific salmon. Cybium, 32 (2), 57-58 (2008). 査読有
8. 上田 宏 (著), 郭金泉, 沈曼雯 (編譯): 鮭科魚類的械洄期歸母川. 科學發展, 411, 52-57, 台湾(2007). 査読無
9. Hino H., Iwai, T., Yamashita, M. and Ueda, H.: Identification of an olfactory imprinting-related gene in the lacustrine sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. Aquaculture, 273, 200-208 (2007). 査読有
10. Morinishi, F., Shiga, T., Suzuki, N. and Ueda, H.: Cloning and characterization of an odorant receptor in five Pacific salmon. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 148, 329-336 (2007). 査読有
11. 上田 宏: サケの感覚機能と母川回帰. バイオメカニズム学会誌, 31(3), 123-129 (2007). 査読有
12. Mingist, M., Ushikoshi, S. and Ueda, H.: *In vivo* and *in vitro* effects of Rhizopus extract on body growth and steroid hormone production in masu salmon, *Oncorhynchus masou* Brevoort. Aquaculture Research, 38, 708-717 (2007). 査読有
13. Mingist, M., Kitani, T., Koide, N. and Ueda, H.: Relationship between eyed-egg percentage and levels of cortisol and thyroid hormone in masu salmon *Oncorhynchus masou*. Journal of Fish Biology, 70, 1045-1056 (2007). 査読有
14. Makiguchi, Y., Nii, H., Nakao, K. and Ueda, H.: Upstream migration of adult chum and pink salmon in the Shibetsu River. Hydrobiologia, 582, 43-53 (2007). 査読有
15. 上田 宏: サケの回遊と資源. 学術月報, 59(9), 654-658(2006). 査読無
16. 上田 宏: サケの母川回帰機構に関する生理学研究. 海洋と生物, 162, 28(1), 3-12 (2006). 査読無
17. Sandahl, J. F., Miyasaka, G., Koide, N. and Ueda, H.: Olfactory inhibition and recovery in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) following copper exposure. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, 63, 1840-1847 (2006). 査読有
18. 新居久也, 村上一夫, 米田隆夫, 上田 宏: シンヤモ *Spirinchus lanceolattus* の遡上河川における産卵場所と物理環境条件の関係. 日本水産学会誌, 72, 390-400 (2006). 査読有
19. Akita, M., Makiguchi, Y., Nii, H., Nakao, K., Sandahl, J. F. and Ueda, H.: Upstream migration of chum salmon through a restored segment of the Shibetsu River. Ecology of Freshwater Fish, 15, 125-130 (2006). 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. Ueda, H.: Imprinting and homing mechanisms in Pacific salmon: from behavior to molecular approaches (Plenary Lecture). International Conference on Novel Updates in Reproductive Biology and Comparative Endocrinology. University of Hyderabad, India, January 19-21, 2009.
2. Ueda, H.: Biotelemetry researches on mechanisms of salmon homing migration (Oral). 5<sup>th</sup> World Fisheries Congress. Yokohama, Japan, October 20-25, 2008.
3. Ueda, H.: Neuroendocrinological mechanisms of homing migration of salmon (Oral). 6<sup>th</sup> International Symposium on Fish Endocrinology, Calgary, Canada, June 22-26, 2008.
4. Ueda, H., Kozu, Y., Miles, N.G. and Hino, H.: Neurobiological mechanisms of imprinting and homing abilities in salmon (Invited). The 6th Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE), North Bengal University, Siliguri, West Bengal, India, December 10-14, 2007.
5. Ueda, H., Yamamoto, Y. and Hino, H.: Physiological mechanisms of imprinting and homing migration of salmon (Invited). Okazaki Biology Conference (OBC 6) on Marine Biology, Okazaki Conference Center and Toba Hotel International, Japan, December 3-8, 2007.
6. Ueda, H.: Recent biotelemetry researches on mechanism of salmon migration (Oral). Japan-China Biologging Science Symposium, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei, China, November 6-7, 2007.
7. Ueda, H.: Mechanisms of olfactory imprinting and homing ability in Pacific salmon (Oral). American Fisheries Society 137<sup>th</sup> Annual Meeting, San Francisco, USA, September 2-6, 2007.
8. Ueda, H., Hino, H., Yamamoto, Y. and Morinishi, F.: Olfactory functions related with salmon homing migration (Oral). Symposium on the Physiology of Olfaction and Chemosensory Communication in Fish: From Mechanisms to Behavior. VII International Congress on the Biology of Fish. The Fairmont Hotel, St. John's, Newfoundland, Canada, July 18-22, 2006.
9. Ueda, H.: Tracking and Observing North West Pacific Ocean (Invited). Ocean Tracking Workshop. Dalhousie University, Halifax, Canada, June 27-28, 2006.
10. Ueda, H.: Evolutionary strategies for salmon homing migration (Invited). Ecology of Stream Fish: State of the Art and Future Prospects II. University of Leon, Spain, June 12-16, 2006.

[図書] (計 5 件)

1. 上田 宏: 魚類の回遊メカニズム. “海洋生命系のダイナミクス” (塚本勝巳編), 東海大学出版会, 印刷中
2. 上田 宏, 柴田英昭, 門谷 茂: 流域環境と水産資源の関係—天塩川プロジェクト. “森川海のつながりと河口・沿岸域の生物生産” (山下洋, 田中 克編), 恒星社厚生閣, pp89-98 (2009)
3. Ueda, H., Yamamoto, Y. and Hino, H.: Physiological mechanisms of homing ability in sockeye salmon: from behavior to molecules using a lacustrine model. In “Sockeye Salmon Evolution, Ecology, and Management” (ed. Woody, C.A.), Am. Fish. Soc. Symp., 54, 5-16 (2007).
4. 上田 宏: 生まれた故郷に帰れないサケ—サケの母川回帰の危機. “海の環境100の危機” (東京大学海洋研究所DOBIS編集委員会編), 東京書籍, pp. 20-21 (2006)
5. 上田 宏: 1. フィールド科学とは, pp. 1-3, 2-3. 水の安全性, pp. 21-24, 3-5. サケから見た水圏環境, pp. 75-89. “フィールド科学への招待” (北海道大学北方生物圏フィールド科学センター編), 三共出版 (2006).

[その他]

ホームページ:

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~k15499/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上田 宏 (UEDA HIROSHI)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授

研究者番号: 00160177

### (2) 研究分担者

柴田 英昭 (SHIBATA HIDEAKI)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・准教授

研究者番号: 70281798

安住 薫 (AZUMI KAORU)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号: 90221720

伴 真俊 (BAN MASATOSHI)

独立行政法人水産総合研究センターさけますセンター・主任研究員

研究者番号: 80425462

### (3) 連携研究者

山本 雄三 (YAMAMOTO YUZO)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・学術研究員

研究者番号: 60532405