

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580241

研究課題名(和文) サケ類における母川刷込関連脳領域の解明：嗅神経一次投射領域の神経解剖学的解析

研究課題名(英文) Study on the olfactory imprinting-related brain regions in anadromous salmon: Neuroanatomical analysis for the primary olfactory projected regions in salmon brain.

研究代表者

工藤 秀明 (Kudo, Hideaki)

北海道大学・水産科学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40289575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円、(間接経費) 1,320,000円

研究成果の概要(和文)：サケ属魚類の母川刷込関連脳領域を解明するため蛍光トレーサーを用いた神経解剖学的手法により、嗅神経一次投射領域を可視化し、嗅球における嗅細胞の軸索の投射部位を明らかにした。嗅細胞の細胞型の同定のために嗅覚指標タンパクとグルタチオン S-トランスフェラーゼを細胞マーカーとした免疫組織化学的手法により線毛性嗅細胞と微絨毛性嗅細胞を識別できた。併せてニオイ受容関連二次メッセンジャーカスケードに関わる嗅覚型 Gタンパク サブユニット(Golf)の共焦点レーザー顕微鏡観察による免疫組織化学的解析を行い、サケ属魚類ではじめて同分子の嗅神経系における発現を確認した。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the imprinting-related brain regions in anadromous salmon (*Oncorhynchus* spp.), we visualized the primary olfactory projected regions in salmon brain by neuroanatomical techniques using Dil fluorescent tracer. In order to distinguish the type of the olfactory receptor cells which constitutes each primary olfactory projection, we analyzed immunohistochemically as olfactory receptor cell markers taking notice of the olfactory marker protein (OMP) and glutathione S-transferase pi (GST). This method was able to distinguish ciliated and microvillus olfactory receptor cells. In addition, the localization of G protein alpha subunit olf (Golf) in regard of a olfaction-related second messenger cascade was immunohistochemically analyzed using the confocal laser scanning microscope, and had expression of Golf identified for the first time in the salmon olfactory system.

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：サケ 母川回帰 嗅神経系 母川刷込 嗅球

1. 研究開始当初の背景

遡河回遊魚であるサケ属魚類（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 (*Oncorhynchus keta*) が回帰・遡上している。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 (*O. kisutch*) 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。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。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）にニオイ受容を行なう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の情報は非常に不足している。近年、サケ類において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。

サケ類の嗅神経系は鼻窩の底部に嗅房といわれるニオイ受容器官が存在し、放射状に配列する数枚の嗅板で構成されている。嗅板上には感覚上皮である嗅上皮が存在し、化学受容ニューロンである嗅細胞が分布している。各々の嗅細胞は一本の軸索を脳へ投射し、嗅球の糸球体層で高次のニューロンである僧帽細胞の樹上突起とシナプスしている。最近、我々の研究グループはシロザケの生活史に伴う嗅房形成過程、特に嗅房における嗅板数の変化を解析し、哺乳類などとは異なり体サイズの変化に同調して成魚まで発達することをはじめ明らかにしている（シロザケ成魚：約18枚）。特に嗅房において新生嗅板が吻側基部より形成されることにより嗅板数を増加していくことは、刷込み期の少ない嗅板（シロザケ稚魚：約5枚）のみが母川水と触れていることを意味する。北米の研究グループでは、刷込まれた母川水の情報（細胞更新に伴う情報の継承は不明ながら）嗅細胞レベルで遡上時まで保持されるという「末梢性嗅覚刷込み仮説」も提唱されており、母川水に触れた嗅板内の嗅細胞の脳への軸索投射領域と、刷込み以降に新生される嗅板の嗅細胞のそれとを神経解剖学的に比較することにより、母川刷込時にすでに有していた神経回路を明らかにすることが可能となる。中

枢レベルで母川刷込みを解析することは、詳細な刷込み時期や回帰時の想起時期の同定に繋がるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、サケ類の母川刷込に強く関わる脳領域を明らかにするために、サケ類の降海時および母川遡上時の各嗅板からの嗅細胞軸索を可視化により、嗅球における嗅神経一次投射領域とその構成嗅細胞の型を神経解剖学的に解析するものである。

3. 研究の方法

(1) 嗅神経一次投射領域の可視化：浮上後まもなく降海し、遡上は産卵期に近いシロザケを用い、母川刷込時にすでに形成されている嗅神経系の神経回路を明らかにすることを目的として、シロザケ幼稚魚の嗅神経系一次投射領域を、カルボシアニン系蛍光色素の一種である 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin perchlorate (DiI) により死後標識し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて神経解剖学的に解析した。

(2) 嗅神経一次投射を構成する嗅細胞型：シロザケの降海前幼稚魚および外洋索餌回遊中の未成熟成魚を用いて、サケ属魚類の嗅細胞分子マーカーとして有用な嗅覚指標タンパク (olfactory marker protein: OMP) とグルタチオン S-トランスフェラーゼ π (GST) およびニオイ受容関連二次メッセンジャーカスケードに関わる嗅覚型 G タンパク α サブユニット (Golf) に関する嗅神経系でのタンパク発現を共焦点レーザー顕微鏡観察による免疫組織化学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 共焦点レーザー顕微鏡による観察では、嗅球の DiI 標識終末部位は吻側正中側部、背側外側部、外側部、腹側外側部の4領域に大別できた。嗅神経束の背側部から DiI を挿入した場合、上述の4領域のうち腹側外側部に蛍光は認められなかった。嗅球内の各 DiI 標識終末部位では、明瞭な糸球体構造は確認されなかった。本研究によって、シロザケ幼稚魚の嗅神経一次投射領域が明瞭に可視化され、4領域に大別することができた。これらの投射領域は、ニジマス成魚での嗅神経指標分子の免疫組織化学的解析により報告されている領域と対応していた。また、DiI 標識終末部位において糸球体構造が確認されなかったことから、サケ属魚類では、嗅神経軸索末端にマウス (*Mus musculus*) やゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) のような明瞭な糸球体を形成

せずに僧帽細胞樹状突起とシナプス結合している可能性が示された。

(2) 幼稚魚において GST, OMP が嗅上皮の嗅細胞と基底下の嗅神経束で局在が認められ, GST 免疫陽性嗅細胞は核周辺部の位置が高いものと低いもの双方が確認されたが, OMP 免疫陽性嗅細胞は核周辺部の位置が高いものが中心に観察された。これは嗅細胞の細胞型の違いまたは嗅細胞の成熟度の違いによるものと考えられた。嗅上皮自由表面上の線毛と樹状突起先端に Gaolf 免疫陽性反応が認められ, サケ科魚類では初めて確認された。未成熟成魚は幼稚魚と比べ, 両嗅細胞分子マーカーの免疫陽性反応を示す嗅細胞の密度が低かった。これは嗅房の発達・大型化に伴い, 嗅上皮構成細胞(含む非嗅細胞)が増加することに起因していると考えられた。

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 11 件)

1. Koshino Y, Kudo H, Kaeriyama M (2013) Stable isotope evidence indicates the incorporation into Japanese catchments of marine-derived nutrients transported by spawning Pacific Salmon. *Freshwater Biology*, **58**: 1864-1877. [査読有]
2. 秦 玉雪, 永井愛梨, 工藤秀明, 帰山雅秀 (2013) 遊楽部川のサケ *Oncorhynchus keta* における野生魚と孵化場魚の安定同位体比について. *日本水産学会誌*, **79**: 872-874. [査読有]
3. 隼野寛史, 宮腰靖之, 真野修一, 田村亮一, 工藤秀明, 帰山雅秀 (2013) 網走湖産シラウオの漁獲量および資源変動機構. *日本水産学会誌*, **79**: 372-382. [査読有]
4. 隼野寛史, 田村亮一, 小出展久, 成 基百, 工藤秀明, 帰山雅秀 (2013) 網走湖におけるシラウオ卵の分布特性. *日本水産学会誌*, **79**: 166-174. [査読有]
5. Kudo H, Koshino Y, Eto A, Kaeriyama M (2012) Cost-effective accurate estimates of adult chum salmon, *Oncorhynchus keta*, abundance in a Japanese river using a radio-controlled helicopter. *Fisheries Research*, **119-120**: 94-98. [査読有]
6. Kaeriyama M, Seo H, Kudo H, Nagata M (2012) Perspectives on wild and hatchery salmon interactions at sea, potential climate effects on Japanese chum salmon, and the need for sustainable salmon fishery management

reform in Japan. *Environmental Biology of Fishes*, **94**: 165-177. [査読有]

7. 山田綾, 越野陽介, 工藤秀明, 阿部周一, 荒井克俊, 帰山雅秀 (2012) ミトコンドリア DNA 分析によるカラフトマス集団構造の年級群間比較. *日本水産学会誌*, **78**: 973-975. [査読有]
8. 永井愛梨, 山田綾, 秦玉雪, Edpalina RR, 工藤秀明, 阿部周一, 帰山雅秀 (2012) ミトコンドリア DNA 分析に基づく本州日本海シロザケ *Oncorhynchus keta* 集団に及ぼす移植放流の遺伝的影響. *水産育種*, **42**: 33-40. [査読有]
9. Kogura Y, Seeb JE, Azuma N, Kudo H, Abe S, Kaeriyama M (2011) The genetic population structure of lacustrine sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, in Japan as the endangered species. *Environmental Biology of Fishes*, **92**: 539-550. [査読有]
10. Seo H, Kudo H, Kaeriyama M (2011) Long-term climate-related changes in somatic growth and population dynamics of Hokkaido chum salmon. *Environmental Biology of Fishes*, **90**: 131-142. [査読有]
11. Endo T, Todo T, Lokman PM, Kudo H, Ijiri S, Adachi S, Yamauchi K (2011) Androgens and very low density lipoprotein are essential for the growth of previtellogenic oocytes from Japanese eel, *Anguilla japonica*, in vitro. *Biology of Reproduction*, **84**: 816-825. [査読有]

[学会発表](計 10 件)

1. 薄 健太・工藤秀明・越野陽介・伴 真俊・市村政樹・足立伸次 本邦のサケ属魚類 4 種における背隆起の形態比較 平成 26 年度日本水産学会春季大会 2014 年 3 月 30 日 函館
2. 瓜生大輔・越野陽介・工藤秀明・市村政樹・山崎忠仁・西山易男・桜井泰憲 河川生活期におけるサケ野生魚とふ化場魚の生息場所選択と食性に関する研究 平成 26 年度日本水産学会春季大会 2014 年 3 月 29 日 函館
3. 薄 健太・工藤秀明・越野陽介・伴 真俊・市村政樹・足立伸次 本邦のサケ属魚類 4 種における背隆起に関する比較解剖学的研究 第 7 回サケ学研究会 2013 年 12 月 22 日 札幌
4. 薄 健太・工藤秀明・井尻成保・都木靖彰・足立伸次・今野久仁彦・帰山雅秀 カラフトマス雄の第二性徴として発達する背隆起に関する組織化学的および生化学的研究 平成 25 年度日本水産学会春季大会 2013 年 3 月 27 日 東京
5. 薄 健太・工藤秀明・井尻成保・市村政樹・都木靖彰・帰山雅秀 カラフトマス雄における背隆起の生化学的性状および雄性ホルモンとの関連 第 6 回サケ学研究会 2012 年 12 月 8 日 函館

6. 内 彩香・工藤秀明・虎尾 充・藤原 真・
齊藤寿彦・帰山雅秀初夏の北太平洋西部東
経 155 度線周辺海域で検出された日本系カ
ラフトマスの耳石標識 第 6 回サケ学研究
会 2012 年 12 月 8 日 函館
7. Kudo H, Eto A, Mochida K, Kaeriyama M.
Expression of thyroid hormone receptor in the
salmon olfactory epithelium. *XVI International
Symposium on Olfaction and Taste* 2012 年 6
月 26 日スウェーデンストックホルム市
8. 薄 健太・工藤秀明・市村政樹・帰山雅秀
カラフトマスの第二次性徴として発現する
背隆起に関する解剖学的研究 平成24年度
日本水産学会春季大会 2012年3月28日 東
京
9. 工藤秀明 母川回帰に関わる嗅覚研究の
現状と今後の展望 第5回サケ学研究会(招
待講演) 2011年12月17日 札幌
10. 薄 健太・工藤秀明・市村政樹・帰山雅秀
カラフトマス雄にみられる背隆起の形成
第5回サケ学研究会 2011年12月17日 札幌

〔図書〕(計 1 件)

工藤秀明 サケの第二次性徴 背中の盛り
上がりの中身は? サケ学大全(帰山雅秀ほ
か編)北海道大学出版会 p. 109-112.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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