

学 位 論 文 題 名

Electrophysiological mechanisms of
homing migration by olfaction in salmonid fishes

(サケ科魚類の嗅覚による母川回帰に関する電気生理学的機構)

学位論文内容の要旨

両生類、爬虫類、哺乳類は一般の匂いを受容する主嗅覚器の他に、フェロモン受容に関与する鋤鼻器を持ち、前者には絨毛型嗅細胞が、後者には微絨毛型嗅細胞が受容細胞として分布している。嗅細胞が匂い物質を受容すると嗅受容器電位が生じるが、匂い物質が電気信号へ変換される嗅覚トランスダクション機構は、まだ完全には解明されていない。一方、鋤鼻器を持たない硬骨魚類の嗅上皮には絨毛型と微絨毛型嗅細胞の両者が混在している。魚類の嗅覚器はアミノ酸、胆汁酸、プロスタグランジンやステロイドなどのフェロモン候補物質を受容するが、この2種の嗅細胞が、どのようにこれらの匂い物質を受容するのか、全く不明であった。

魚類は生活史の中で、嗅覚により行動や体内の内分泌の状態が調節されている。特にサケ科魚類が生まれ育った母川の匂いの記憶や視覚を頼りに何千 km も離れた海洋から生まれ育った母川へ回帰する現象はよく知られている。しかし母川回帰とサケの嗅覚に関する電気生理学的研究報告は多くない。その理由として、冷水性大型魚であるサケの電気生理学的手法による嗅覚応答の測定が困難であることが挙げられる。特にパッチクランプ法による分離嗅細胞の匂い刺激に対する応答電流の記録の例はない。母川回帰と嗅覚機構に関して、どのような匂い物質が河川水の匂いの記憶として有効であるのか、その記憶のメカニズム、成長に伴う嗅覚機能の変化、などの問題が解明されていなかった。これまで嗅球誘起脳波の測定による、母川回帰の指標となる匂い物質に関する報告はされているが、実際にサケの嗅覚器が河川水に示す応答は全く記録されていなかった。また、嗅受容器電位の発生には細胞外の Na^+ の流入が重要な役割を果たすが、回遊に伴い様々な塩分環境に生息するサケが、その塩分濃度の変化に適応し、海水から河川へ移行する際の河川水の匂い識別を可能にする嗅覚のメカニズムについても、全く不明であった。

本研究では湖沼型個体群のヒメマス、サクラマス、ニジマスを用いて母川回帰に関係する匂い物質に対する嗅細胞の応答を嗅神経積分応答記録法とパッチクランプ法により記録解析することにより、サケ科魚類の母川回帰における嗅覚の関与と嗅覚機能の維持機構を明らかにすることを目的とした。第1章において、ヒメマス、サクラマスの河川水や湖水などの自然水に対する嗅神経積分応答を記録し、これらの魚種の嗅覚器における河川水識別能の評価を行った。被検魚は筋弛緩剤の筋肉注射で不動化し、嗅球および嗅神経束を露出させ、嗅神経束に双極タングステン電極を刺入した。鼻腔に入れたステンレスチューブを通して嗅上皮を河川水などで刺激し、得られた応答は増幅、積分したのちペンレコーダに記録した。22 尾のヒメマスと 8 尾のサクラマスから測定した結果、各自然水はそれぞれ異なる大きさに嗅神経積分応答を引き起こした。母川水に対して応答が大きくなる傾向は認められなかった。応答の大きさについて、

種差、性差および成熟度の違いによる差は認められなかった。交差順応実験では全ての自然水の組み合わせについて、2次応答が消失した組み合わせはなかった。また湖水に順応したあとの河川水に対する交差順応実験から、河川水を識別できる濃度閾値は 0.1-1.0%と示された。これらの結果はヒメマスとサクラマスは嗅覚で河川水を識別できることを示していた。嗅神経積分応答は嗅覚仮説における匂いの刷り込みの指標ではなく、河川水に含まれている匂い物質の強度を反映していることを示した。

本論文第2章において、ニジマスを用いて嗅上皮中に混在する2種類の嗅細胞（絨毛型および微絨毛型嗅細胞）を Ca^{2+} フリー液で分離し、圧力刺激装置により絨毛または微絨毛に局限して匂い刺激を与え whole-cell voltage-clamp 法により応答電流記録を行う手法を新たに開発した。この手法を用いて 44 個の絨毛型および 20 個の微絨毛型嗅細胞から、アミノ酸、フェロモン候補物質および尿に対する応答特性を記録した。その結果、絨毛型嗅細胞はアミノ酸、尿と etiocholan-3 α -ol-17-one glucuronide (ECG) に応答するが、微絨毛型嗅細胞はアミノ酸にのみ応答することが明らかとなった。またどちらの嗅細胞でも、嗅細胞ごとに応答特性が大きく異なることが示された。ECG に応答した嗅細胞はアミノ酸と尿にも応答した。魚類の代表的なフェロモンに応答する嗅細胞は発見されず、フェロモンに対する感受性を増大させるアンドロゲン処理も嗅細胞の応答特性に影響を与えなかった。以上の結果は、絨毛型嗅細胞はさまざまな匂い物質に広く応答する 'Generalist' として、微絨毛型嗅細胞は 'Specialist' として特徴付けられることを示した。この嗅細胞の多種の応答特性は河川水の匂いの違いを識別することに役立っていると考えられる。また PGFs や DHPs などの魚類の代表的なフェロモンはニジマスのフェロモンではないことが示された。

本論文第3章では、第2章と同じ手法を用いて絨毛型嗅細胞からアミノ酸混合物に対する応答を記録し、細胞内外の Na^+ および Cl^- の濃度を変化させた時の逆転電位の移動、および6種類の Cl^- チャネルブロッカーのアミノ酸応答電流に対する効果を調べた。その結果、細胞外が Na^+ フリーであっても、アミノ酸刺激により絨毛型嗅細胞で内向き応答電流が発生した。このとき、保持電位を -60mV から +40mV まで変化させることで得られた電流-電圧関係より求められた逆転電位の、細胞内外の Na^+ および Cl^- の濃度変化に伴う移動は、電流成分に Cl^- コンダクタンスが含まれていると仮定した時に予想される変化と一致した。また6種類の Cl^- チャネルブロッカーは全て、アミノ酸刺激による内向き応答電流を可逆的に阻害した。応答阻害率は嗅細胞ごとに大きく異なり、内向き応答電流の完全な阻害や自発的チャネル活動の阻害も記録された。以上の結果から、絨毛型嗅細胞のアミノ酸刺激による内向き応答電流には Cl^- の細胞外への流出による電流成分が含まれていることを明らかとなり、 Ca^{2+} 活性化 Cl^- チャネルがニジマスの嗅覚トランスダクション機構に関与していることを示した。このチャネルの存在により、ニジマスが Na^+ がほとんど含まれない淡水で生活していても、嗅細胞は細胞内から Cl^- が流出することで嗅受容器電位を発生させることが可能である。また Cl^- チャネルブロッカーは必ずしも Cl^- チャネルに特異的ではなかった。

本研究の結果から、サケ科魚類は嗅覚器で河川水の匂いの違いを識別でき、各嗅細胞の応答特性はそれぞれ大きく異なること、その応答電流成分には Cl^- コンダクタンスによる成分が含まれていることが明らかとなった。嗅細胞が多様な応答特性を持つことは、匂い物質のわずかな違いに対して個々の嗅細胞が様々な応答を示す可能性を示唆し、河川水に対して嗅細胞が示した様々な応答の総和が、嗅神経積分応答における河川水ごとに異なる応答に反映したようだ。また嗅細胞に存在する Ca^{2+} 活性化 Cl^- チャネルは、サケ科魚類の嗅覚器が回遊に伴い変化する塩分環境に適応するために役立っており、塩分環境が変化しても嗅覚機能を一定に保つことで、嗅覚による河川水識別を可能としていることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 畑 雅 一
副 査 教 授 浦 野 明 央
副 査 助 教 授 鈴 木 教 世
副 査 助 教 授 長 山 俊 樹

学 位 論 文 題 名

Electrophysiological mechanisms of homing migration by olfaction in salmonid fishes

(サケ科魚類の嗅覚による母川回帰に関する電気生理学的機構)

魚類は生活史の中で、嗅覚により行動や体内の内分泌的状态が調節されている。特にサケ科魚類が生まれ育った母川の匂いの記憶や視覚を頼りに何千kmも離れた海洋から生まれ育った母川へ回帰する現象はよく知られている。しかし、母川回帰とサケの嗅覚に関する電気生理学的研究報告は少ない。その理由として、冷水性大型魚であるサケの電気生理学的手法による嗅覚応答の測定が困難であることが挙げられる。特にパッチクランプ法による分離嗅細胞の匂い刺激に対する応答電流の記録の例はなかった。母川回帰と嗅覚機構に関して、どのような匂い物質が河川水の匂いの記憶として有効であるのか、その記憶のメカニズム、成長に伴う嗅覚機能の変化、などの問題が解明されていなかった。また、嗅受容器電位の発生には細胞外の Na^+ の流入が重要な役割を果たすが、回遊に伴い様々な塩分環境に生息するサケが、その塩分濃度の変化に適応し、海水から河川へ移行する際の河川水の匂い識別を可能にする嗅覚のメカニズムについても、全く不明であった。

著者は、湖沼型個体群サケ科魚類のヒメマス、サクラマス、ニジマスを用いて母川回帰に関係する匂い物質に対する嗅細胞の応答を嗅神経積分応答記録法とパッチクランプ法により記録解析することにより、サケ科魚類の母川回帰における嗅覚の関与と嗅覚機能の維持機構を明らかにすることを目的とした。

本論文では、始めに、ヒメマス、サクラマスの河川水や湖水などの自然水に対する嗅神経積分応答を記録し、これらの魚種の嗅覚器における河川水識別能の評価を行った。その結果、各自然水はそれぞれ異なる大きさで嗅神経積分応答を引き起こした。交差順応実験で、全ての自然水の組み合わせについて、2次応答が消失した組み合わせはなかった。また湖水に順応したあとの河川水に対する交差順応実験から、河川水を識別できる濃度閾値は0.1-1.0%と示された。これらの結果はヒメマス

とサクラマスは嗅覚で河川水を識別できることを示し、嗅神経積分応答は匂いの刷り込みの指標ではなく、河川水に含まれている匂い物質の強度を反映していることを示した。

また、ニジマスを用いて嗅上皮中に混在する2種類の嗅細胞（絨毛型および微絨毛型嗅細胞）を Ca^{2+} フリー液で分離し、圧力刺激装置により絨毛または微絨毛に局限して匂い刺激を与え whole-cell voltage-clamp 法により応答電流記録を行う手法を新たに開発した。この手法により、絨毛型および微絨毛型嗅細胞から、アミノ酸、フェロモン候補物質および尿に対する応答特性を記録した。その結果、絨毛型嗅細胞はアミノ酸、尿と etiocholan-3 α -ol-17-one glucuronide (ECG) に応答するが、微絨毛型嗅細胞はアミノ酸にのみ応答することが明らかとなった。またどちらの嗅細胞でも、嗅細胞ごとに応答特性が大きく異なることが示された。この嗅細胞の匂い物質に対する多様な応答特性は河川水の匂いの違いを Across fiber pattern として中枢において識別することに役立っていることが示された。

また、ニジマス絨毛型嗅細胞のアミノ酸混合物に対する応答を記録し、細胞内外の Na^+ および Cl^- の濃度を変化させた時の逆転電位の移動、および6種類の Cl^- チャネルブロッカーのアミノ酸応答電流に対する効果を調べた結果、細胞外が Na^+ フリーであっても、アミノ酸刺激により絨毛型嗅細胞で内向き応答電流が発生し、電流-電圧関係より求められた逆転電位の、細胞内外の Na^+ および Cl^- の濃度変化に伴う移動は、電流成分に Cl^- コンダクタンスが含まれているとした時に予想される変化と一致した。これらの結果から、絨毛型嗅細胞のアミノ酸刺激による内向き応答電流には Cl^- の細胞外への流出による電流成分が含まれていることを明らかとなり、 Ca^{2+} 活性化 Cl^- チャネルがサケ科魚類の嗅覚トランスダクション機構に関与していることを示した。このチャネルの存在によりサケ科魚類が Na^+ がほとんど含まれない淡水で生活していても、嗅細胞は細胞内から Cl^- が流出することで嗅受容器電位を発生させることが可能であることを示した。

以上、著者は、サケ科魚類の嗅覚による母川回帰行動に関して、母川回帰に関係する匂い物質に対する嗅細胞の電気的応答特性の解析や嗅覚器の異なるイオン環境への適応機構を電気生理学的手法により研究し、サケ科魚類は、母川水をその匂いの違いで他の河川水から識別できることを明らかにし、二型の嗅細胞は、匂い物質に対して多様な応答特性を示すこと、この多様な応答特性こそが、わずかな匂いの違いしかない河川水を識別すること可能にしていることを示した。さらに、嗅細胞膜には、 Ca^{2+} 活性化 Cl^- チャネルが分布することにより、サケ科魚類の回遊に伴うイオン環境変化に対して、嗅覚機能を維持することが出来ることを証明した。

これを要するに、著者は、サケ科魚類の嗅覚による母川回帰行動の電気生理学的基盤を与えたものあり、サケ科魚類の嗅覚による母川回帰行動の理解に貢献するところ大なるものがある。

よって、著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。