

学位論文題名

Physiological study on imprinting and homing related olfactory functions in salmon

(サケの母川記銘・回帰に關与する嗅覚機能に關する生理学的研究)

学位論文内容の要旨

サケが繁殖のために生まれた河川(母川)に回帰する母川回帰機構に關しては、1950年代から研究されており、降河回遊中の稚幼魚が河川水中のニオイを記憶(母川記銘)し、親魚がそのニオイを想起して母川を選択して回帰する(母川回帰)と言う嗅覚仮説が広く受け入れられている。しかし、稚幼魚がどのようなニオイをどのように記銘され、親魚が記銘されたニオイをどのように想起して選択するかに關しては、ほとんど解明されていない。近年の研究により、サケの母川識別には河川水中のニオイ物質の中で、河川に固有のアミノ酸の種類と濃度(アミノ酸組成)が重要な役割を果たす事が、電気生理学的実験により明らかになってきている。

本研究の目的は、我が国に生息する4種類の太平洋サケ(サクラマス:*Oncorhynchus masou*; ベニザケ:*O. nerka*; シロザケ:*O. keta*; カラフトマス:*O. gorbusha*)、およびベニザケの陸封型であるヒメマス(*O. nerka*)を用いて、河川水のアミノ酸組成の変化がサケの稚幼魚の母川記銘および親魚の母川選択行動に与える影響を解明することであり、アミノ酸組成を変化させた人工河川水に対する選択行動実験、人工記銘実験、および嗅覚応答の電気生理学的実験を行った。

(1) 母川のアミノ酸組成が4種類の太平洋サケ親魚の母川選択行動に与える影響

母川のアミノ酸組成が、4種の太平洋サケ(サクラマス・ベニザケ・シロザケ・カラフトマス)成熟雄親魚の母川選択行動に与える影響を明らかにする目的で実験を行った。選択行動実験は、各親魚を洞爺湖臨湖実験所に運搬し、Y字水路を用いて行った。Y字水路上流部のどちらか一方から、それぞれの実験魚が捕獲された河川(サクラマス:尻別川; ベニザケ:美々川; シロザケ:長流川; カラフトマス; 猿別川)のアミノ酸組成を再構成した濃縮人工アミノ酸母川水(人工母川水)、または混合水(洞爺湖水と飼育水の混合)を滴下して、実験魚の人工母川水に対する選択性を調べた。

実験の結果、3種類の太平洋サケ(サクラマス・ベニザケ・シロザケ)は、Y字水路への遡上率(53.3%・64.4%・63.6%)は高くないが、人工母川水に対して統計的に有意な選択性(81.3%・75.9%・85.7%)を示した( $P < 0.05$ )。一方、カラフトマスは、遡上率(77.1%)は高いが、人工母川水に対する選択性(59.3%)は他魚種に比べ低く、有意な選択性は示さなかった。この実験により、河川水中のアミノ酸組成が、サクラマス・ベニザケ・シロザケには母川を選択する指標となるニオイ成分となるが、カラフトマスは河川水のアミノ酸組成を選択しないことが明らかになった。太平洋サケは、魚種間で遡上率および母川水に対する選択性に違いがあり、サケの進化と関連している可能性が示唆された。

## (2) 母川に含まれるアミノ酸組成の変化がシロザケの母川選択行動に与える影響

母川に含まれるアミノ酸組成の変化が、長流川に回帰したシロザケ雄親魚の母川選択行動に与える影響を明らかにする目的で、Y字水路における人工河川水に対する選択行動実験および嗅神経応答 (EEG) 測定による電気生理学的実験を行った。人工河川水として、長流川河川水のアミノ酸組成を再構築した人工長流川水、長流川河川水のアミノ酸の中で最も高濃度なグルタミン酸 (Glu) を除いた人工 Glu-長流川水、他の人工河川水として人工支笏湖孵化場水を実験水として用い、以下の組み合わせで解析した：①人工長流川水と混合水、②人工長流川水と人工支笏湖孵化場水、③人工長流川水と人工 Glu-長流川水、④人工 Glu-長流川水と混合水。また、③の組み合わせについて EEG の測定を行った。

人工河川水に対する選択性を調べた結果、①と②の場合は人工長流川水に対して、また④の場合は人工 Glu-長流川水に対して、有意な選択性を示した ( $P < 0.05$ )。しかし、③の場合、Glu の有無は人工河川水の実験水に対する選択性に影響を及ぼさなかった。また、③の組み合わせにおいて実験水に対するシロザケの EEG を測定した結果、人工長流川水と人工 Glu-長流川水の間には有意な差が見られなかったが、交差順応試験では Glu の有無により完全に交差順応することはなかった。これは、実験水間で互いに順応していない成分があるためであり、この成分は Glu であると考えられた。この実験により、シロザケは人工河川水の Glu の有無は識別できるが、選択行動には影響がないことが明らかになった。シロザケが、母川水を選択する時のニオイ物質となるアミノ酸組成は、1種類のアミノ酸の有無には影響されないアミノ酸組成である可能性が示唆された。

## (3) 人工アミノ酸河川水を用いたヒメマス幼魚の母川記銘および成熟親魚の母川選択実験

人為的に変化させたアミノ酸組成を母川のニオイ物質としてヒメマス幼魚に記銘させ、記銘できる時期、および記銘に要する期間を明らかにする目的で実験を行った。実験には洞爺湖実験所産のスモルト期 (4~6月) 前後のヒメマス1歳魚を用いた。実験水は飼育水において未検出のプロリン (Pro:①) および既検出のGlu:②を、ともに $10^6$  Mの濃度で飼育水に添加して、人工記銘河川水とした。2005年3月~7月に人工記銘河川水①に各月2週間曝露した記銘実験 (a)、および2006年5月に人工記銘河川水①・②に1時間・6時間・1日・7日・14日間曝露した記銘実験 (b) を行った。曝露後、2005~2007年6月と10月に記銘群 (a) と (b) の人工記銘河川水に対する嗅電位 (EOG) を測定し、飼育水で飼育した対照群と比較した。さらに (a) では、2007年10月に成熟した雄親魚を用いて人工記銘河川水①に対する選択行動実験を行った。

(a) 実験の結果、人工記銘河川水①記銘群は一般に母川記銘時期とされる4~6月記銘群およびスモルト期前の3月記銘群間で、対照群に比較して有意に高いEOGが測定された ( $P < 0.05$ )。しかし、スモルト期後である7月記銘群では、対照群との有意差は観察されなかった。さらに、成熟雄親魚を用いた選択行動実験においても、3~6月記銘群が人工記銘河川水①を有意に選択した ( $P < 0.05$ )。以上の結果、ヒメマスの記銘時期はスモルト期およびその前であることが明らかになった。

(b) 実験の結果、14日間人工記銘河川水①・②に記銘した群の人工記銘河川水に対する応答強度は対照群のものと比較して、有意に大きくなった ( $P < 0.05$ )。7日間記銘群においても同様の傾向が認められたが、個体差が大きかった。一方、他の実験群1時間、6時間、1日間記銘群と対照群間における人工記銘河川水に対する応答性に有意差は認められなかった。従って、母川記銘にかかる期間は14日間必要であることが明らかになった。

本研究の結果、サケは河川水のアミノ酸組成を母川記銘・回帰の際の母川のニオイ物質の指標としていることが解明された。しかし、どの程度のアミノ酸組成の変化がサケの母川記銘・回帰に影響するか、また魚種による河川水のアミノ酸の識別能力の差異については、今後の課題として残された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 田 宏  
副 査 教 授 山 羽 悦 郎  
副 査 教 授 東 正 剛  
副 査 准教授 工 藤 秀 明 (大学院水産科学研究院)  
副 査 教 授 庄 司 隆 行 (東海大学連合大学院  
海洋学研究科)

学 位 論 文 題 名

## Physiological study on imprinting and homing related olfactory functions in salmon

(サケの母川記銘・回帰に関与する嗅覚機能に関する生理学的研究)

サケが繁殖のために生まれた河川(母川)に回帰する母川回帰機構に関しては、1950年代から研究されており、降河回遊中の稚幼魚が河川水中のニオイを記憶(母川記銘)し、親魚がそのニオイを想起して母川を選択して回帰する(母川回帰)と言う嗅覚仮説が広く受け入れられている。しかし、稚幼魚がどのようなニオイをどのように記銘し、親魚が記銘されたニオイをどのように想起して選択するかに関しては、ほとんど解明されていない。本研究は、我が国に生息する4種類の太平洋サケ(サクラマス：*Oncorhynchus masou*；ベニザケ：*O. nerka*；シロザケ：*O. keta*；カラフトマス：*O. gorbuscha*)、およびベニザケの湖沼型であるヒメマス(*O. nerka*)を用いて、河川水のアミノ酸組成の変化がサケの稚幼魚の母川記銘および親魚の母川選択行動に与える影響を解明する目的で、アミノ酸組成を変化させた人工河川水に対する選択行動実験、人工記銘実験、および嗅覚応答の電気生理学的実験を行った。

(1) 母川のアミノ酸組成が4種類の太平洋サケ親魚の母川選択行動に与える影響

母川のアミノ酸組成が、4種の太平洋サケ(サクラマス・ベニザケ・シロザケ・カラフトマス)成熟雄親魚の母川選択行動に与える影響を明らかにする目的で、Y字水路を用いた選択行動実験を行った。各親魚を洞爺臨湖実験所に運搬し、Y字水路上流部のどちらか一方から、それぞれの実験魚が捕獲された河川(サクラマス：尻別川；ベニザケ：美々川；シロザケ：長流川；カラフトマス；猿別川)のアミノ酸組成を再構成した濃縮人工アミノ酸母川水(人工母川水)、または混合水(洞爺湖水と飼育水の混合)を滴下して、実験魚の人工母川水に対する選択性を調べた。その結果、サクラマス・ベニザケ・シロザケは、Y字水路への遡上率は高くないが、人工母川水に対

して統計的に有意な選択性を示した。一方、カラフトマスは、遡上率は高いが、人工母川水に対する選択性は他魚種に比べ低く、有意な選択性は示さなかった。この実験により、河川水中のアミノ酸組成が、サクラマス・ベニザケ・シロザケには母川を選択する指標となるニオイ成分となるが、カラフトマスは河川水のアミノ酸組成を選択しないことが明らかになり、太平洋サケは、魚種間で遡上率および母川水に対する選択性に違いがあり、サケの進化と関連している可能性が議論された。

### (2) 母川に含まれるアミノ酸組成の変化がシロザケの母川選択行動に与える影響

母川に含まれるアミノ酸組成の変化が、長流川に回帰したシロザケ雄親魚の母川選択行動に与える影響を明らかにする目的で、Y字水路における人工長流川水と人工長流川水からグルタミン酸 (Glu) を除いた人工 Glu-長流川水の組み合わせの選択行動実験、および嗅神経応答測定による電気生理学的験を行った。その結果、Gluの有無は人工河川水の実験に選択性に影響を及ぼさなかった。また、嗅神経応答を測定した結果、人工長流川水と人工 Glu-長流川水の間には有意な差が見られなかったが、交差順応試験では Gluの有無により完全に交差順応することはなかった。この実験により、シロザケは人工河川水の Gluの有無は識別できるが、選択行動には影響がないこと明らかになり、シロザケが母川水を選択する時のニオイ物質となるアミノ酸組成は、1種類のアミノ酸の有無には影響されないアミノ酸組成である可能性が示唆された。

### (3) 人工アミノ酸河川水を用いたヒメマス幼魚の母川記銘および成熟親魚の母川選択実験

人為的に変化させたアミノ酸組成を母川のニオイ物質としてヒメマス幼魚に記銘させ、記銘できる時期、および記銘に要する期間を明らかにする目的で、洞爺湖実験所産のスマルト期 (4~6月) 前後のヒメマス1歳魚を用いて、実験水として飼育水において未検出のプロリン (Pro:①) および既検出のGlu:②を飼育水に添加して、人工記銘河川水①に各月2週間曝露した記銘実験 (a)、および人工記銘河川水①・②に1時間・6時間・1日・7日・14日間曝露した記銘実験 (b) を行った。曝露後 (a) と (b) の人工記銘河川水に対する嗅電位 (EOG) を測定し、飼育水で飼育した対照群と比較した。さらに (a) では、成熟した雄親魚を用いて人工記銘河川水①に対する選択行動実験を行った。(a) 実験の結果、人工記銘河川水①記銘群は一般に母川記銘時期とされる4~6月記銘群およびスマルト期前の3月記銘群間で、対照群と比較して有意に高いEOGが測定された。しかし、スマルト期後である7月記銘群では、対照群との有意差は観察されなかった。さらに、成熟雄親魚を用いた選択行動実験においても、3~6月記銘群が人工記銘河川水①を有意に選択した。(b) 実験の結果、14日間人工記銘河川水①・②に記銘した群の人工記銘河川水に対する応答強度は対照群のものと比較して、有意に大きくなった。一方、他の実験群1時間、6時間、1日間記銘群と対照群間における人工記銘河川水に対する応答性に有意差は認められなかった。以上の結果、ヒメマスの記銘時期はスマルト期およびその前であり、母川記銘にかかる期間は14日間必要であることが明らかになった。

本研究の結果、サケは母川記銘・回帰の際に河川水のアミノ酸組成を母川のニオイ物質の指標としていることが解明された。しかし、どの程度のアミノ酸組成の変化がサケの母川記銘・回帰に影響するか、また魚種による河川水のアミノ酸の識別能力の差異については、今

後の課題として残された。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。