

## 陸封サクラマス(ビワマス)の海水不適應のメカニズム

清水 宗敬<sup>1</sup>, 藤岡 康弘<sup>2</sup>, 片岡 佳孝<sup>3</sup>

<sup>1</sup>北海道大学大学院水産科学研究院, <sup>2</sup>滋賀県琵琶湖博物館, <sup>3</sup>滋賀県水産試験場

**概要** ビワマスはサクラマスの一亜種であるが、琵琶湖水系に約 50 万年間陸封されたため、海水適應能をほとんど持たないとされている。しかし、その生理学的メカニズムは不明である。魚類の海水への適應には鰓の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (NKA) が重要な役割を担っている。NKA は機能的な  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットからなるが、近年、 $\alpha$  には  $\alpha 1a$  と  $\alpha 1b$  と呼ばれるサブタイプが存在し、それぞれ淡水型と海水型であることが示唆された。また、サケ科魚類において、成長ホルモン(GH)とコルチゾルは鰓 NKA 活性および個体の海水適應能を向上させることが知られている。本研究では鰓 NKA と内分泌系に着目し、ビワマスの海水不適應のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

滋賀県水産試験場醒井養鱒場にて飼育されていたビワマス(春に降湖)0 年魚とアマゴ(秋に降海)0 年魚、および北海道さけます・内水面水産試験場にて飼育されていたサクラマス(春に降海)1 年魚を供試魚に用いた。まず、各群の降海・降湖時期に鰓試料を定期的に採取し、NKA 活性と *nkaa1a* と *1b* mRNA 量(リアルタイム定量 PCR)を測定した。次に、降湖時期である 5 月に、ビワマスに GH とコルチゾルを単独もしくは複合投与し、鰓試料を得た。また、ホルモン投与後、70%人工海水に移行して、血中イオン濃度の変化から個体レベルの海水適應能も調べた。さらに、ビワマスとサクラマスの降湖・降海時期の血中コルチゾル量の変化を調べた。

サクラマスとアマゴはそれぞれの降海時期に鰓 NKA 活性ならびに海水型 *nkaa1b* mRNA 量を上昇させたが、ビワマスでは低値で推移し、鰓レベルで海水適應能を上昇させていないと考えられた。一方、ビワマスに GH とコルチゾルを投与したところ、鰓 NKA 活性が上昇した。そして、ホルモン投与後に 70%人工海水に移行すると、コルチゾル投与群において血中ナトリウムおよび塩素イオン濃度が有意に低値となり、個体レベルでの海水適應能の向上が認められた。さらに、サクラマスとビワマスの降海・降湖時期の血中コルチゾル量を測定した。結果、降海型のサクラマスでは内因性コルチゾルの上昇が見られたものの、ビワマスではそのようなピークは観察されなかった。

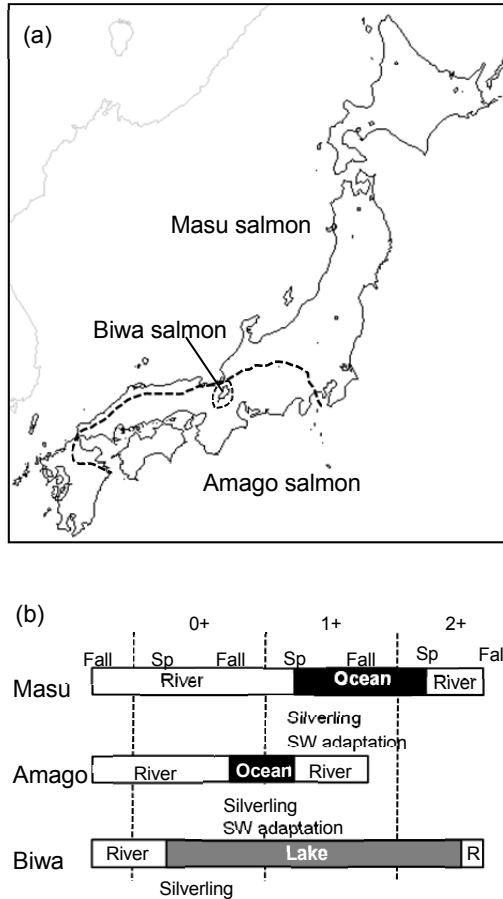
以上のことから、ビワマスが降湖時期に海水適應能を発達させないのは、ホルモン分泌系が不活性化していることが一因であると考えられた。

### 1. 研究目的

サクラマス(*Oncorhynchus masou*)は、我が国において北海道から九州南部まで分布し、各地域の環境に高度に適應した系群(サクラマス、アマゴやビワマス)を持つ(Fig. 1a)。これらは、サクラマス群と総称されており、亜種レベルに分化していると考えられている<sup>(1)</sup>。サクラマス(*Oncorhynchus masou masou*)は川で生まれた後に、北海道では通常 2 年目の春に海水適應能を獲得し降海する(Fig. 1b)。アマゴ(*Oncorhynchus masou ishikawae*)は本州南部太平洋側に生息し、本種もまた降海するが、降海

時期は 1 年目の秋から冬である。一方、ビワマス(*Oncorhynchus masou* subsp.)は琵琶湖水系のみで生息し、ユニークな生活史を持つ。すなわち、ビワマスは生まれた 1 年目の春に海ではなく湖に降り、一生を淡水域で過ごす。本種は約 50 万年間、琵琶湖に陸封されてきたと推定され<sup>(1)</sup>、そのため降湖時期においても海水適應能をほとんど発達させないとされている<sup>(2)</sup>。しかし、ビワマスが海水に適應できない生理学的メカニズムは分かっていない。

海水適應能の獲得には、鰓の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (NKA)



**Fig. 1.** Distribution (a) and life-history patterns (b) of masu, amago and Biwa salmon.

が重要であり<sup>(3,4)</sup>、遡河性サケ科魚類では降海前に活性化<sup>(3)</sup>。NKA は、鰓においては塩類細胞の側底膜上に存在し、ATP の加水分解により得られるエネルギーを使い、3つの Na イオンを細胞外に、2つの K イオンを細胞内へ輸送する<sup>(5,6)</sup>。また NKA は、機能的には  $\alpha$  と  $\beta$  の 2 つのサブユニットで構成されたヘテロ二量体構造をしている<sup>(6,7)</sup>。近年、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) において複数の  $\alpha$  サブユニットのアイソフォーム ( $\alpha 1a$ ,  $\alpha 1b$ ,  $\alpha 1c$ ,  $\alpha 2$  および  $\alpha 3$ ) が発見された<sup>(8)</sup>。そのうち、 $\alpha 1a$  と  $\alpha 1b$  は、淡水から海水へ移行するとそれぞれ減少および増加することから、淡水型および海水型と考えられている<sup>(8)</sup>。しかし、降湖時期のビワマスにおける NKA の活性ならびに  $\alpha 1$  アイソフォームの変化は不明である。

成長ホルモン (growth hormone, GH) とコルチゾルは、NKA の活性化を調節しており、遡河性サケ科魚類では降海時期になると血中量が増加する<sup>(4,11)</sup>。また、両ホルモン

を投与することにより、塩類細胞の発達および個体レベルの海水適応能が向上することが報告されている<sup>(3,4,9)</sup>。しかし、ビワマスにおいてこれらのホルモンの効果を調べた例はない。

本研究では、ビワマスが海水に適応できない生理学的メカニズムを調べることを目的として、まず降湖時期の鰓の NKA 活性および *ala* と *alb* の mRNA 量を調べた。また、サクラマスとアマゴの降海時期の NKA の変化についても調べ比較した。次に、降湖時期のビワマスに GH およびコルチゾルを投与し、鰓 NKA 活性と *ala* および *alb* mRNA 量に対する効果を調べた。また、ホルモン投与後のビワマスを人工海水に移行し、血中イオン濃度の反応から個体レベルの海水適応能を調べた。さらに、ビワマスの降湖時期の血中ホルモン量の変化を調べ、本種の海水不適応のメカニズムを考察した。

## 2. 研究方法

### 2.1 供試魚と経時サンプリング

供試魚には、滋賀県水産試験場醒井養鱒場にて飼育されたビワマスとアマゴの 0 年魚を用いた。飼育は、室内に設置された方形水槽を用い、年間を通じて 12°C の湧水をかけ流して行った。ビワマスは、3 月から 7 月まで毎月 7 個体ずつサンプリングした。まず魚を麻酔した後、鰓弁を採取した。摘出した鰓はすみやかに 0.7 ml の RNA later (Ambion, Austin, TX, USA) 中に浸し、一晩 4°C で静置した後、分析するまで -30°C で保存した。また、鰓 NKA 酵素活性用のサンプルも採取した。NKA 活性測定用の鰓サンプルは、鰓弁を 1 辺 2 mm 程度で摘出後、ドライアイスにて急速凍結させ、分析するまで -80°C で保存した。またアマゴ 0 年魚を 10 月から翌年 2 月まで毎月 7 個体ずつサンプリングし、同様に鰓試料を得た。

北海道総合研究機構水産研究本部さけます・内水面水産試験場道南支場にて放流用に飼育されていたサクラマス 1 年魚を 2 月から 6 月まで毎月 7 個体をサンプリングし、遺伝子用と酵素活性用の鰓試料を得た。

### 2.2 ホルモン投与実験

5 月に、滋賀県水産試験場醒井養鱒場にて飼育されていたビワマス (平均体長  $6.2 \pm 0.2$  cm) とアマゴ ( $6.2 \pm 0.1$  cm) の 0 年魚を用い、ホルモン投与実験を行った。投与 2 週間前に実験用水槽 8 基に各 20 個体ずつを移動し、移

動後 2、3 日目から体重 g あたり 2% の給餌を行った。ビワマスとアマゴを 4 群に分けて、それぞれブタ GH (Sigma, St. Louis, MO, USA; 8 µg/g 体重)、コルチゾル (Sigma; 40 µg/g 体重)、GH とコルチゾル (複合投与)、またはホルモン希釈溶媒のみ (対照) を腹腔内に投与し、1 および 2 日後に各群 7 個体ずつサンプリングし、鰓試料を得た。

### 2. 3 ビワマスのホルモン投与・海水移行実験

同養鱒場にて、5 月にホルモン投与後のビワマスを 70% 人工海水 (インスタントオーシャン; NAPQO, Tokyo) に移す海水移行実験を行った。まず、上の実験と同様にブタ GH、コルチゾル、GH とコルチゾル、またはホルモン希釈溶液のみを腹腔内に投与した。投与から一日後に、ビワマスを 70% 人工海水で満たした別の水槽に移した。移行から 1、2 および 3 日後に 7 個体ずつサンプリングし、鰓と血液試料を得た。

### 2. 4 血中コルチゾル量の経時変化

血中コルチゾル量を測定するため、ビワマスとサクラマスから血漿試料を得た。ビワマスは、滋賀県醒井養鱒場にて飼育された 0 年魚を用いた。サンプリングは、2、4、5 および 6 月に行った。サクラマスは、北海道さけます・内水面水産試験場道南支場の飼育池にて飼育された個体を用いた。サンプリングは、2 月から 6 月まで毎月行った。

### 2. 5 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) 活性の測定

NKA 活性は Quabins et al<sup>(10)</sup> の方法 (特異阻害剤ウアバイン存在・非存在下での ATP 分解能を比較) を一部改変して行った。NKA 活性を標準化するため蛋白定量を行い、µmol/Pi/mg/hr として表示した。

### 2. 6 Total RNA の抽出および cDNA の合成

Total RNA の抽出は、ISOGEN (Nippon gene, Tokyo) を

用いた。mRNA 定量用の cDNA は、得られた total RNA を鋳型として SuperScript VILO<sup>TM</sup> cDNA Synthesis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) により合成した。

### 2. 7 Real-Time 定量 PCR

Real-Time 定量 PCR 用の *nka ala* と *alb* のプライマーの配列を Table 1 に示す。*ala*、*alb* および *ef-1a* cDNA の増幅と蛍光シグナルの検出は、ABI PRISM 7000 もしくは 7300 Sequence Detector (Applied Biosystems) を用いて行った。手順としては、まず Micro Amp<sup>TM</sup> Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) に Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)、Forward と Reverse プライマー、テンプレート、さらに Nuclease-free water を添加した後、Micro Amp<sup>TM</sup> Optical Adhesive Film (Applied Biosystems) でシーリングした。PCR 反応は、始めに 50°C で 2 分、続いて 95°C で 10 分の反応を行った後、95°C で 15 秒の熱変性および 60°C で 1 分のアニーリングを 1 サイクルとして、40 サイクル行った。

### 2. 8 血中イオン濃度の測定

血中ナトリウムイオン濃度は、東京大学大気海洋研究所の日下部誠博士により原子吸光法により測定された。塩素イオン濃度の測定は Chloride assay kit (Biochain, Newark, CA, USA) を用いて行った。

### 2. 9 血中コルチゾル量の測定

コルチゾル量の測定は、Cortisol express EIA Kit (Cayman, Ann arbor, MI, USA) を使い行った。測定に先立ち、ジエチルエーテルを用いて血漿からステロイドホルモンの抽出を行った。コルチゾル量の測定は、同キット付属のプロトコールに従って行った。

Table 1. Primer sequences used for real-time PCR

Gene	Direction	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)
<i>nka ala</i>	Forward	CTTCGCTGCTGTTGTGATTGC	134
	Reverse	GAGCCAGGGCGGATTCTGA	
<i>nka alb</i>	Forward	GGTACATTTCAACCAACAACATT	77
	Reverse	CCATCACAGTGTTTCATTGGAT	
<i>ef-1a</i>	Forward	GAATCGGCCATGCCCGGTGAC	142
	Reverse	GGATGATGACCTGAGCGGTG	

## 2. 10 統計解析

季節変化の結果については、One-Way ANOVA を行って有意性を確認した後に、Fisher の Protected Least Significant Difference (PLSD) により群間を比較した。ホルモン投与実験および海水移行実験の結果については、まず投与したホルモンの種類 (GH とコルチゾル) ならびに時間をパラメータにした Three-Way ANOVA を行って有意性を確認し、相互作用が認められた場合、Fisher の PLSD 検

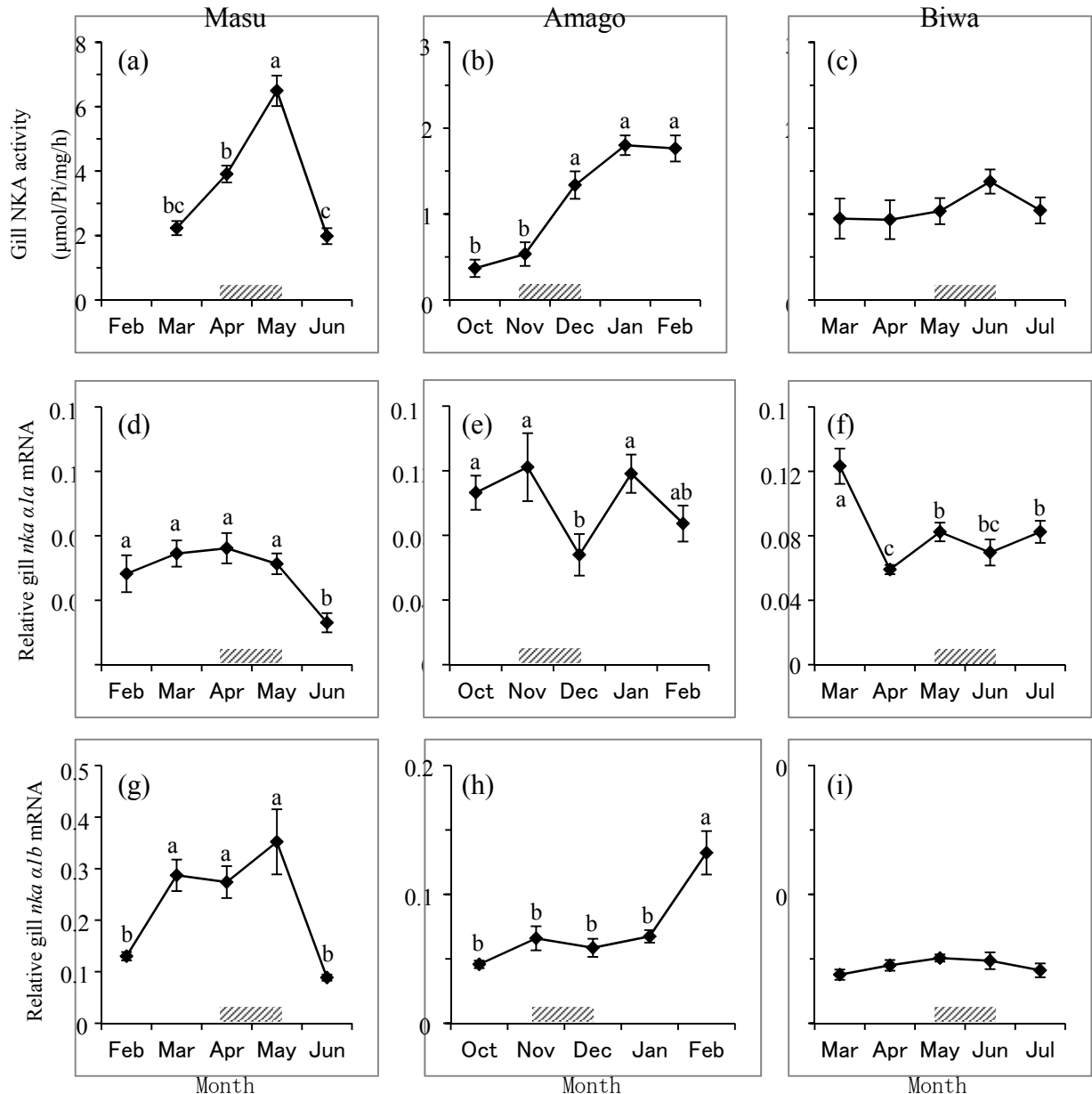
定により群間を比較した。  $P < 0.05$  において有意差の有無を判定した。

## 3. 研究結果

### 3. 1 降湖・降海時期の鰓 NKA の変化

#### 3. 1. 1 鰓 NKA 活性

サクラマスとアマゴの鰓 NKA 活性は、それぞれの降海時期である春と秋～冬に増加した (Fig. 2a, b)。一方、ビワ



**Fig. 2.** Seasonal changes in gill  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase (NKA) activity (a,b,c), and *nka*  $\alpha/a$  mRNA (d,e,f) and *nka*  $\alpha/b$  mRNA (g,h,i) in masu (a,d,g), amago (b,e,h) and Biwa (c,f,i) salmon. Values are expressed as means  $\pm$  SE ( $n = 6-7$ ). Symbols sharing the same letters are not significantly different from each other (one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test,  $P < 0.05$ ). Shaded bars indicate periods of active downstream migration in wild populations.

マスの NKA 活性は、降湖時期である春に有意な増加は確認されず、飼育期間を通じて低い値で推移した (Fig. 2c)。

### 3. 1. 2 鰓 *nka a1a* と *a1b* mRNA 量

サクラマスの鰓 *nka a1a* mRNA 量は、2月から5月まで有意な変化はなかったが、6月に減少した (Fig. 2d)。アマゴでは、12月に前後の月と比べ低い値だったが、降湖時期に変化はなかった (Fig. 2e)。ビワマスにおいては、3月に高値を示したが、その後減少し降湖時期に変化しなかった (Fig. 2f)。鰓 *nka a1b* mRNA は、サクラマスにおいて降湖時期に増加し、3月から5月にかけて高い値を見せ、その後6月に急激に減少した (Fig. 2g)。アマゴでは、1月まで低い値であったが、2月に増加した (Fig. 2h)。一方、ビワマスの鰓 *nka a1b* mRNA は、降湖時期に増加せず、飼育期間を通じて低値で推移した (Fig. 2i)。

## 3. 2 ホルモン投与実験

### 3. 2. 1 鰓 NKA 活性

アマゴおよびビワマスの鰓 NKA 活性は、ホルモン投与に反応して上昇した (Fig. 3a, b)。ビワマスでは投与1日後で、コルチゾル群および複合群において、対照群と比較して有意に高い値をみせた。また2日後では、GH群および複合群において投与1日後に確認された高い値を維持し、対照群より有意に高かった。

### 3. 2. 2 鰓 *nka a1a* と *a1b* mRNA 量

アマゴおよびビワマスの鰓 *nka a1a* mRNA は、ホルモン処理によって有意な変化は見られなかった (Fig. 3c, d)。アマゴの鰓 *nka a1b* mRNA は、投与1日後でコルチゾル群と複合群において有意に上昇し、特に複合群では2日後においても高値を示した (Fig. 3e)。ビワマスの鰓 *nka a1b* mRNA は、投与1日後においてホルモン投与群で高い傾向にあったが、有意差はなかった (Fig. 3f)。

## 3. 3 ホルモン投与・海水移行実験

### 3. 3. 1 移行後の生残

ビワマスに上述のホルモン投与を行い、翌日70%人工海水に移行したところ、移行3日後に、対照群で2尾、またGH群で1尾が死亡した。一方、コルチゾル群および複合群では死亡個体は見られなかった。

### 3. 3. 2 血中イオン濃度

血中ナトリウムイオン濃度は70%人工海水に移行した全ての群で移行1日後に増加した (Fig. 4a)。対照群およ

びGH処理群においては移行後高い値を維持した。一方、コルチゾル投与によって血中ナトリウムイオン濃度は有意に減少し、移行後3日後において対照群と比較して有意に低い値となった (Fig. 4a)。

血中塩素イオン濃度も全ての群で移行1日後に増加した (Fig. 4b)。対照群とGH群において塩素イオン濃度は、移行2日後まで増加し、3日後においても高い値を維持した。コルチゾル群でも血中塩素イオン濃度は、移行2日後まで増加したが、2および3日目で対照群と比較して有意に低い値を示した。複合群では、移行2日後から対照群と比較し有意な減少が見られ、3日後でも有意に低い値であった (Fig. 4b)。

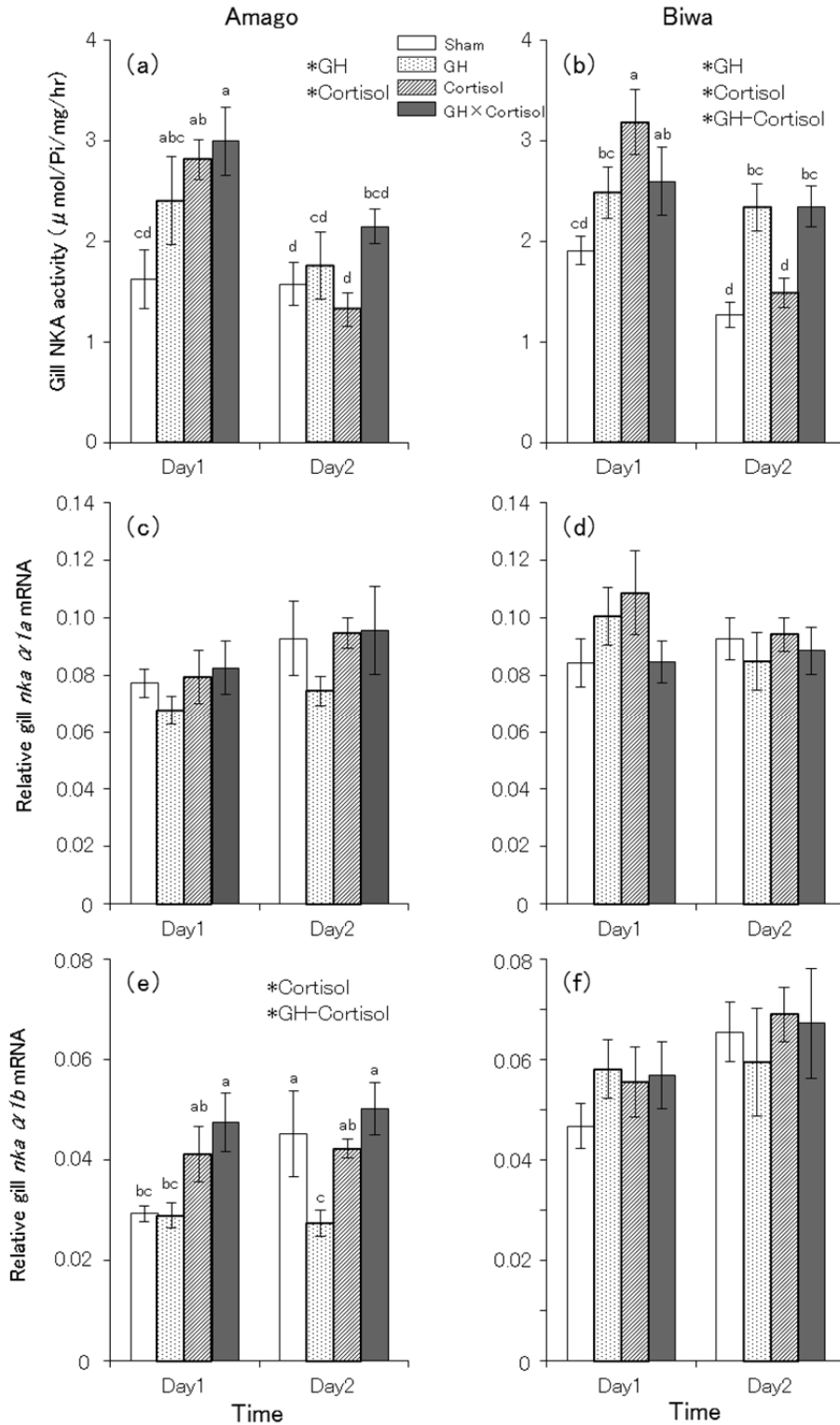
## 3. 4 血中コルチゾル量

サクラマスの血中コルチゾル量は、3月から4月に有意に増加した (Fig. 5a)。また、5月においても高い値を維持し、6月に減少する傾向が見られた。一方、ビワマスのコルチゾル量は、2月で高値だったものの4月に減少し、降湖時期において低い値で推移した (Fig. 5b)。

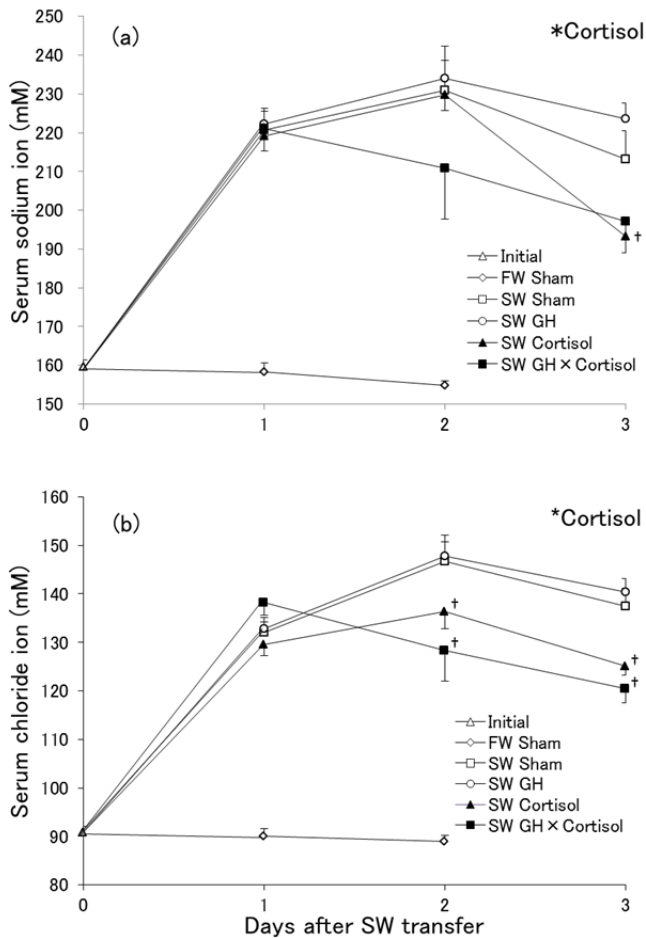
## 4. 考察

本研究において、サクラマスとアマゴは、それぞれの降湖時期である春および秋～冬に鰓 NKA 活性と *alb* mRNA 量を増加させた。このことから、降海回遊を生活史に持つサクラマスとアマゴは、淡水飼育下において遺伝子レベルで NKA を活性化させていたと考えられた。一方、ビワマスの鰓 NKA 活性と *alb* mRNA 量は、降湖時期である春においても変化せず、サクラマスと比較して低い値で推移した。このことから、降湖時期のビワマスの鰓 NKA は、タンパク質および遺伝子レベルで自発的に活性化しないことが示された。

遡河性サケ科魚類で見られる降湖時期の鰓 NKA の活性化には、GH とコルチゾルが重要である (3, 4, 9, 11)。本研究では、降湖・降海時期に NKA を活性化させないビワマスと、活性化させるアマゴに GH とコルチゾルを投与し、比較した。まずアマゴにおいて、NKA 活性はコルチゾル投与により上昇した。また、アマゴの *nka a1a* と *alb* mRNA は、コルチゾル投与により有意に増加した。一方、GH 投与群では、2つのアイソフォームに対するホルモン投与の効果は認められなかった。次にビワマスにおいて、鰓 NKA 活性は、GH とコルチゾル投与に反応して増加し



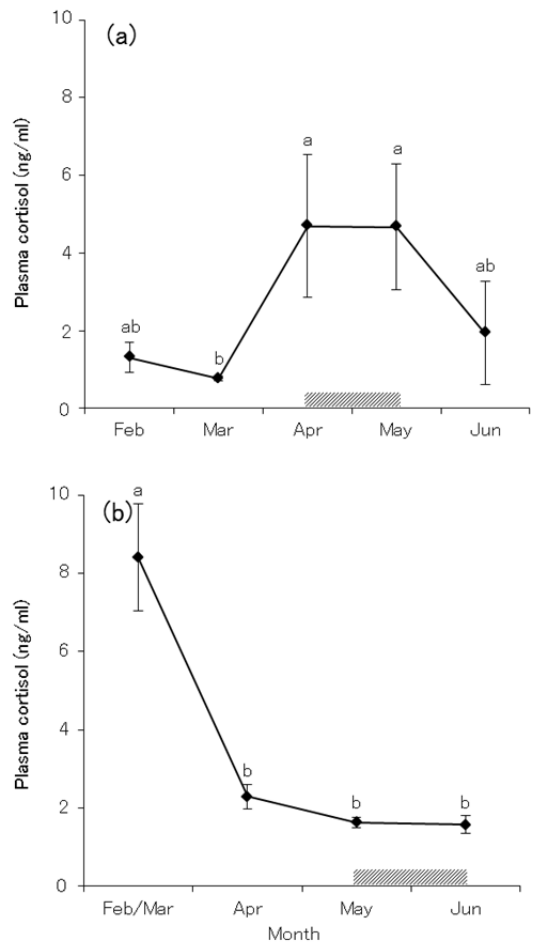
**Fig. 3.** Effects of GH and cortisol on  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (NKA) activity (a, b), and *nka*  $\alpha 1a$  mRNA (c, d) and *nka*  $\alpha 1b$  mRNA (e, f) in amago salmon (a, c, e) and Biwa salmon (b, d, f). Values are expressed as means SE (n = 6-7). Asterisks (\*) indicate overall main effect or interaction (three-way ANOVA, time effect is not shown). Symbols sharing the same letters are not significantly different from each other (one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test,  $P < 0.05$ ).



**Fig. 4.** Changes in serum sodium (a) chloride (b) ion concentrations in Biwa salmon after treatment with hormone and transfer to 70% seawater. Values are expressed as means SE (n = 6-7). Asterisks (\*) indicate overall main effect (three-way ANOVA, time effect is not shown). Crossed marks (†) at data points indicate significant differences between control (Sham) and hormone treatment groups (one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test,  $P < 0.05$ ).

た。このことから、ビワマスは外因性ホルモンの刺激があれば NKA 活性を上昇させられることが初めて示された。一方、*nka a1a* と *alb* mRNA は、ホルモン投与に反応しなかった。このことから、陸封による鰓 NKA の不活化は、タンパク質レベルよりもまず遺伝子レベルにおいて現れると考えられた。

ホルモン投与実験により、ビワマスは GH およびコルチゾルに反応して鰓 NKA 活性を上昇させられることが分かった。そこでビワマスをホルモン投与後に 70%人工海水に



**Fig. 5.** Seasonal changes in plasma cortisol concentrations in masu (a) and Biwa (b) salmon in freshwater. Feb/Mar: sampled on February 28. Values are expressed as means SE (n = 6-7). Symbols sharing the same letters are not significantly different from each other (one-way ANOVA followed by Fisher's PLSD test,  $P < 0.05$ ). Shaded bars indicate periods of active downstream migration in wild populations.

移行して、個体レベルの海水適応能を血中イオン(ナトリウムと塩素イオン)濃度により評価した。一般に、海水適応能を持つサケ科魚類を淡水から海水に移行すると、血中イオン濃度は直ちに上昇するが、その後減少して、移行前よりやや高レベルで安定する<sup>(12)</sup>。ビワマスでは、70%人工海水移行 1 日後に全ての処理群で血中イオン濃度が上昇した。しかし、コルチゾル投与によりイオン濃度の有意な減少が見られ、海水適応能が個体レベルで上昇していた。

ここまでの結果から、ビワマスの NKA 活性と海水適応能は、コルチゾル投与により向上することが分かった。このことは、ビワマスが降湖時期に外因性のコルチゾルに反応する能力を保持していることを示している。本種が降湖時期に鰓および個体レベルで海水適応能を向上させないのは、内因性のコルチゾルの分泌がこの時期に活性化しないためであることが考えられた。また結果には示さないが、本研究では、ビワマスの GH 受容体 (GHR) やコルチゾル受容体の発現解析も行った。結果、ビワマスの鰓において *ghr* mRNA 量は降湖時期に増加しないものの、コルチゾルを投与すると上昇した (Data not shown)。これらの結果から、鰓 *ghr* はホルモンに対する感受性は保持しているものの、降湖時期に内因性のコルチゾルの分泌が上昇していないために活性化しないことが示唆された。この仮説を検証するため、本研究ではさらに降湖時期のビワマスのコルチゾル量を測定し、サクラマスと比較した。その結果、サクラマスのコルチゾル量は降湖時期に増加した。一方、ビワマスでは降湖時期に増加せず低い値で推移し、内因性コルチゾルによる刺激がないことが確認された。

以上、本研究において、ビワマスは降湖時期に鰓 NKA の上昇を伴った海水適応能の向上を見せないことが分かった。しかし、外因性のホルモンの存在により NKA 活性を上昇させること、さらにコルチゾルにより個体レベルで海水適応能を向上させることが可能であると分かった。一方、降湖時期の内因性コルチゾル量は低値で推移した。これらのことから、ビワマスが降湖時期に海水適応能を発達させないのは、ホルモン分泌系が不活化していることが一因であると考えられた。

## 5. 今後の課題

本研究ではビワマスの海水不適応能の一因が内分泌系の不活性化にあることを示したが、陸封の影響はさまざまなレベルで影響を及ぼしていると考えられる。例えば、ビワマスに外因性ホルモンを投与すると鰓 NKA 活性が上昇するが、その度合いは降湖型のサクラマスに比べると低く、また mRNA レベルでは反応が見られなかった。ホルモン処理が短期間であるというのも影響していると考えられるが、*Nka alb* 遺伝子のプロモーター領域に変異が生じている可能性がある。すなわち、プロモーター領域に存在すると考えられるコルチゾル応答配列がビワマスにおいては

塩基置換が起きており、そのため反応性が弱くなっているかもしれない。現在、我々の研究グループでは、ビワマスの *Nka alb* 遺伝子のプロモーター領域の解析を行っており、陸封が遺伝子の転写レベルでどのように影響しているのかを明らかにしていく予定である。

## 6. 引用文献

- 1) Oohara, I., Okazaki, T., 1996. Genetic Relationship among Three Subspecies of *Oncorhynchus masou* Determined by Mitochondrial DNA Sequence Analysis. *Zool. Sci.* 13,189-198.
- 2) Fujioka, Y., Fushiki, S., 1989. Seasonal Changes in Hypoosmoregulatory Ability of Biwa Salmon *Oncorhynchus rhodrus* and Amago Salmon *O. rhodrus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55, 1885-1892.
- 3) McCormick, S.D., 1995. Hormonal control of gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and chloride cell function. In Cellular and Molecular approaches to Fish Ionic Regulation Ed by C. Wood, T.J. Shuttleworth, Academic Press, New York, pp 285-315
- 4) McCormick, S.D., 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *Am. Zool.* 41, 781-794.
- 5) Mobasher, A., Avila, J., Cózar-Castellano, I., Brownleader, M.D., Trevan, M., Francis, M.J.O., Lamb, J.F., Martín-Vasallo, P., 2000. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase isozyme diversity; Comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci. Rep.* 20, 51-91.
- 6) Hirose, S., Kaneko, T., Naito, N., Takei, Y., 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 136B, 593-620.
- 7) Blanco, G., Mercer, R.W., 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.-Renal Physiol.* 275, F633-F650.
- 8) Richards J.G., Semple J.W., Bystriansky J.S., Schulte P.M., 2003. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. *J. Exp. Biol.* 206, 4475-4486.
- 9) Mancera, J.M., McCormick, S.D., 2007. Role of



- prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol in teleost osmoregulation. In: Fish Osmoregulation (Baldisserotto, B., Mancera, J.M. and Kapoor, B.G., Eds.). Science Publishers, Enfield, NH, pp. 497-515.
- 10) Quabius, E.S., Balm, P.H.M., Bonga, S.E.W., 1997. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 472-482.
- 11) Hoar, W.S., 1988. The physiology of smolting salmonids. In: Fish Physiology vol. 11B (Hoar, W.S. and Randall, D., Eds.), Academic Press, Orlando, FL, pp. 275-343.
- 12) Bystriansky, J.S., Richards, J.G., Shulte, P.M., Ballantyne, J.S., 2006. Reciprocal expression of gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit isoforms  $\alpha$ a and  $\alpha$ b during seawater acclimation of three salmonid fishes that vary in their salinity tolerance. *J. Exp. Biol.* 209, 1848-1858.

## Physiological Basis of Seawater Inadaptability in a Landlocked Masu Salmon, Biwa Salmon

Munetaka Shimizu<sup>1</sup>, Yasuhiro Fujioka<sup>2</sup>, and Yoshitaka Kataoka<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University,

<sup>2</sup>Lake Biwa Museum, <sup>3</sup>Shiga Prefecture Fishery Experiment Station

### Summary

The ability of anadromous salmon to adapt to seawater is an important phenotypic trait subjected to natural selection. Landlocking of salmon relaxes selective pressures on hypo-osmoregulatory ability (seawater adaptability) and may lead to the abandonment of its physiological system. Biwa salmon is a strain/subspecies of *Oncorhynchus masou* that has been landlocked in Lake Biwa for an exceptionally long period (about 500,000 years) and has low ability to adapt to seawater. We investigated the physiological basis of its seawater inadaptability.

We first compared gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) activity of landlocked Biwa salmon (spring migrant) with those of anadromous masu (spring migrant) and amago (fall migrant) salmon during their downstream migration periods. The activity of gill NKA in masu and amago salmon increased during their migration periods while that in Biwa salmon remained low in spring, suggesting that Biwa salmon has no inherent seasonal rhythm of increased seawater adaptability. We next examined effects of exogenous growth hormone (GH) and cortisol on gill NKA activity and its subunit mRNA levels. Treatment with the exogenous hormones increased gill NKA activity both in Biwa and amago salmon, while *nka α1b*, a seawater subtype of NKA α-subunit, was unchanged in Biwa salmon. Cortisol was also improved the whole-body seawater adaptability of Biwa salmon. We further measured circulating levels of endogenous cortisol in Biwa and masu salmon during their downstream migration periods. Masu salmon showed a peak in circulating cortisol but endogenous cortisol levels remained low in Biwa salmon in spring.

The present results indicate that Biwa salmon can improve its seawater adaptability by exogenous hormonal treatment and hormone receptors are capable of responding the signals. However, secretion of endogenous hormone (cortisol) was not activated during downstream migration period, which explains, at least in part, their low ability to adapt to seawater.