

令和元年6月5日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26112007

研究課題名(和文) 社会学習による音声スキルの獲得と固定化を媒介する神経回路制御

研究課題名(英文) Neural circuit basis of learning and crystallization of vocal behavior

研究代表者

渡邊 大(Watanabe, Dai)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90303817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 58,300,000円

研究成果の概要(和文)：ソングバードにおける分子遺伝学的技術を確立し、生体での神経活動依存的転写因子CREB活性の操作を行った。その結果、先天的な音声である地鳴きはCREB活性の操作に影響されないが、CREB活性を抑えると社会学習により獲得される囀りの発達が障害された。以上の結果は、音声スキルの後天的な獲得にはCREBの活性化が必要であることを示唆する(Abe et al., PNAS 2015)。さらに神経活動と神経活動依存的な細胞内シグナル動態の関係を研究するための手法として内視顕微鏡を開発した。その結果、自由行動下でのCa2+イメージングによる神経活動とFRETイメージングによるERK活性の同時計測に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトは、言語のような高度な能力を模倣等の「社会学習」により獲得し、世代を超えて継承する。このように文化的に継承される能力は生後比較的短期間に獲得され、その後終生維持されることが知られているが、このような社会学習によるスキルの獲得と固定化の基盤となる神経回路機構について多くは不明である。その一因として実験室の環境下で社会学習を容易に観察できる適当な哺乳類モデル動物が存在しないことが挙げられる。ソングバードの分子遺伝学的技術を確立し、さらに自由行動下での神経活動および細胞内シグナル動態のイメージング技術を確立することによって、言語のような能力の獲得や維持に関わる神経回路機構の解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：We generated transgenic songbirds to manipulate the transcription factor CREB, which controls gene expression in an activity dependent manner. We compared song similarity to tutor birds' songs between CREB mutants and wild type. We found that the dominant negative CREB mutant transgenic birds developed songs with reduced similarity in comparison with wild type birds. In contrast, no significant difference was observed in calls between wild types and CREB transgenics. These results indicate that CREB activation is essential for the vocal learning (Abe et al., PNAS 2015).

To study the relationship between neural activity and activity-dependent intracellular signaling, we devised a novel endomicroscopy. Using this endomicroscopy, we successfully measured the neural activity and ERK activity at a single-cell resolution in a freely behaving animal.

研究分野：神経科学

キーワード：音声コミュニケーション 社会学習 大脳皮質 基底核 ソングバード イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトは、言語のような高度な音声コミュニケーションの能力を「模倣」などいわゆる「社会学習 (social learning)」により獲得し世代を超えて継承する。このように文化的に継承される能力の獲得および維持には、生後発達期に脳神経回路の機能的遷移が生じると考えられている。すなわち、社会的なインタラクションにより比較的短期間に言語の獲得が進む時期には、言語を効率よく学習するための可塑性の高い状態にあり、一旦、言語の獲得が成立すると、その制御系神経回路に機能シフトが生じ、獲得した能力は固定化され終生維持されるようになる。しかしながら、社会学習によるスキルの獲得と固定化の基盤となる神経回路機構について詳細は明らかではない。その一因として実験室の環境下で社会学習を容易に観察できる適当な哺乳類モデル動物が存在しないことが挙げられる。

一方、鳥類ではスズメ亜目 (ソングバード) がヒトと同様に模倣により「さえずり (song)」と呼ばれる複雑な音声スキルを学習する。さらにこれらの鳥類は、ヒトと同様に発達した音声制御系神経回路 (song control system) を有し、またその回路構築も哺乳類の大脳皮質-基底核-視床ループと相同であることが明らかにされてきた。したがって、これらの鳥類をモデル生物とすることで、ヒトをはじめとする哺乳類にも共通した社会学習によるスキルの獲得と固定化を媒介する神経回路の機能シフトに関する知見が得られると期待される。

ヒトやソングバードの音声コミュニケーションの能力の獲得には、聴覚を介した音声情報に加えて、成熟個体との社会的接触 (social interaction) が大きく影響する (文献 Kuhl et al., PNAS 2003; Abe and Watanabe, Nature Neuroscience 2011)。そこで研究代表者らは、社会的接触により音声学習促進を媒介する神経可塑性メカニズムを明らかにするために、社会的接触の有無と相関のある遺伝子群について解析を進めるとともに、その因果関係を研究する手法として、鳥類における分子遺伝学的な研究手法の開発を進めてきた。

さらに本研究領域では、磯村、藤山ら他の計画班と連携し、哺乳類の大脳皮質-基底核回路と比較解析することで、種を超えて保存される大脳皮質-基底核の発達と遷移の制御メカニズム、さらにオペラント学習と社会学習間での回路動作の共通点や相違点について理解が進むと期待された。

以上のように、我が国を代表する卓越した計画班員と連携して、言語のようなヒトの高度な能力の社会的伝承の根幹となるスキルの獲得と固定化を媒介する神経回路の機能シフトについて解明すべく研究を実施した。

2. 研究の目的

社会学習による音声スキルの獲得と固定化を媒介する神経回路制御の解明：

上述したように、ヒトの言語学習は、社会的環境に大きく影響されるが、そのメカニズムについて詳細は不明である。ソングバードは、ヒトの言語獲得とよく似た学習プロセスにより、複雑な音声を獲得し、またその音声制御系が哺乳類の大脳皮質-基底核-視床ループと相同であることから、ソングバードをモデル動物として、社会学習による音声スキルの獲得に関与する神経可塑性機構を明らかにすることを目的とした。

具体的には、生物種を超えて、神経活動依存的に神経可塑性制御に関与することが知られている転写因子 CREB について、分子遺伝学的な手法によりその活性を操作し、CREB の音声学習における役割について解析する。

鳥類の音声には、先天的に決定されている「地鳴き (call)」と後天的な学習によって獲得される「さえずり (song)」に分類される。そこで、改変型 CREB を発現するトランスジェニック・ソングバードを使って、それぞれの音声に対する CREB 活性の操作の影響について明らかにする。

オペラント学習と社会学習での回路動作の共通点や相違点の探索：

上記に加えて、社会的接触等の環境要因と神経可塑性の関係を明らかにするためには、社会的接触や認知行動課題実施中の個体から CREB をはじめとする神経活動依存的な細胞内シグナルの動態について計測することが重要である。そこで自由行動下での動物個体で神経活動のみならず神経可塑性に関わる細胞内シグナル分子の動態を計測するイメージング技術を開発する。

さらにイメージング技術の開発と並行して、哺乳類の大脳皮質-基底核回路制御に本アプローチを展開し、哺乳類と鳥類の間で保存されている大脳皮質-基底核制御の発達と遷移のメカニズム、オペラント学習と社会学習での回路動作の共通点や相違点を探索する。

3. 研究の方法

社会学習による音声スキルの獲得と固定化

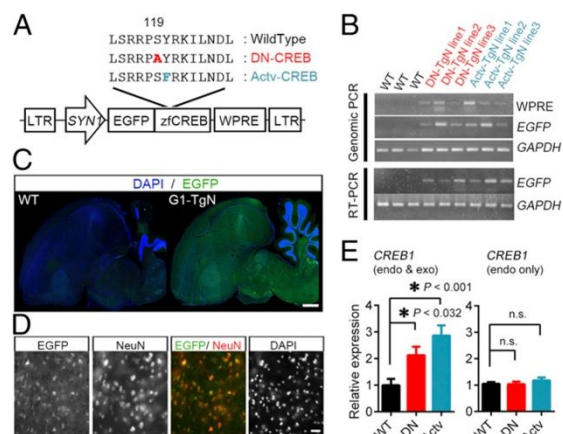


図1. トランスジェニック・ソングバードによる CREB 活性操作。

を媒介する神経回路制御の解明：
 CREB による転写制御が社会学習におよぼす影響を明らかにするために、CREB の dominant-negative (DN) 変異体および constitutively-active (Actv) 変異体を発現するトランスジェニックソングバード系統を確立した(図1)。
 シナプシン・プロモーター下で CREB 変異体を発現するレンチウイルスベクターをキンカチョウ (zebrafinch) の胚にインジェクションし、人工孵化後に PCR により geno-typing を実施した。得られた個体と野生型個体を交配し、トランスジェニックの生殖系列への伝達を確認するとともに、得られた G1 世代の個体を行動実験に使用した。

オペラント学習と社会学習での回路動作の共通点や相違点の探索：

ファイバー光学系による内視顕微鏡の開発およびイメージング用の蛍光指示タンパク質の開発を行なった。

ファイバー光学系の利点として、小型軽量であり、マウスやソングバードのような小型モデル動物の認知行動課題実施中のイメージングに適していること、計測する目的や対象に応じて光源や受光方式をフレキシブルに選択できることが挙げられる。単一細胞の精度でイメージングを実施することを目標に、レーザー、LED 等の光源に関する条件検討、および光電子増倍管、イメージセンサー等の受光方式について条件検討を行なった。

ファイバー光学系は、ファイバーコアの密度や光学的特性により空間分解能や計測感度が規定される。ファイバー光学系による内視顕微鏡で単一細胞の精度でイメージングするためのカルシウム指示タンパク質および FRET バイオセンサーおよびウイルス発現系について条件検討を行なった。

以上の内視顕微鏡イメージングの開発については、分子遺伝学が駆使できるマウスを用いて検討した。認知行動課題として、タッチパネル・プラットフォーム (小原医科産業 (株) 製) を用いた 5-選択反応時間課題 (5-choice serial reaction time task, 5-CSRTT) 視覚弁別課題による逆転学習について条件検討を行なった。

4. 研究成果

社会学習による音声スキルの獲得と固定化を媒介する神経回路制御の解明：

レンチウイルスベクターを胚 (1473 個) にインジェクションした結果、計 20 系統の CREB トランスジェニックソングバード (DN-CREB 11 系統、Actv-CREB 9 系統) を得た。これらのトランスジェニック個体を野生型個体と交配した結果、G1 世代の個体 (DN-CREB 116 個体、Actv-CREB 103 個体) が得られた。また免疫組織学的解析の結果、神経細胞特異的に CREB 変異体が発現していることが確認された (図 1C)。ソングバードで分子遺伝学的な手法により個体レベルで神経可塑性を操作した初めての試みであり、社会学習における遺伝的要因と環境要因の影響を研究する上で有用な研究手法を確立したといえる。

音声学習中に神経活動依存的な転写因子である CREB のリン酸化が亢進することから、社会的接触を媒介する神経情報と転写因子 CREB の関係について解析を進めた。オスの仮親を 2nd チューターとして音声学習を実施したところ (図 2A) 後天的な学習によって獲得される「さえざり (song)」の音韻制御については、CREB の活性化が必須であることが明らかとなった (図 2B-F)。一方、興味深いことに、先天的な「地鳴き (call)」の音韻に対しては、CREB 活性の変化が影響しない (図 3)。

以上の結果は、神経活動依存的な転写制御を担う CREB が社会学習により獲得される音声コミュニケーションの能力に重要な役割を果たしていることを示す。本トランスジェニック系統をさらに解析することで、社会学習によるスキルの獲得と固定化を媒介する神経回路機構について知見が得られると期待できる。

オペラント学習と社会学習での回路動作の

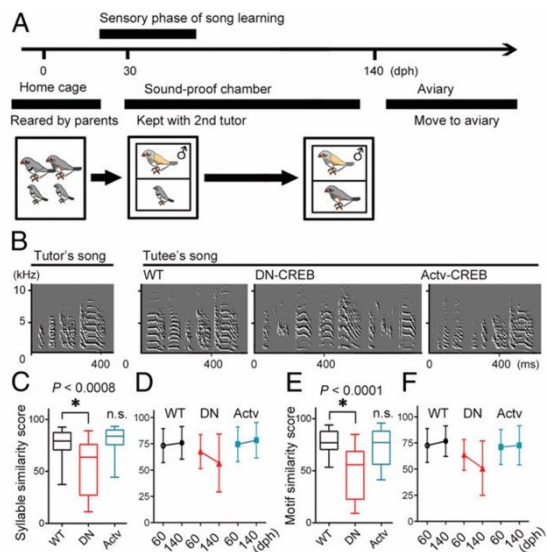


図 2. CREB 活性操作の音声学習への影響。DN-CREB 変異体を発現する個体では、手本に対する音声の similarity score が有意に低下している。

単一細胞の精度でイメージングを実施することを目標に、レーザー、LED 等の光源に関する条件検討、および光電子増倍管、イメージセンサー等の受光方式について条件検討を行なった。

ファイバーコアの密度や光学的特性により空間分解能や計測感度が規定される。ファイバー光学系による内視顕微鏡で単一細胞の精度でイメージングするためのカルシウム指示タンパク質および FRET バイオセンサーおよびウイルス発現系について条件検討を行なった。

分子遺伝学が駆使できるマウスを用いて検討した。認知行動課題として、タッチパネル・プラットフォーム (小原医科産業 (株) 製) を用いた 5-選択反応時間課題 (5-choice serial reaction time task, 5-CSRTT) 視覚弁別課題による逆転学習について条件検討を行なった。

4. 研究成果

社会学習による音声スキルの獲得と固定化を媒介する神経回路制御の解明：

レンチウイルスベクターを胚 (1473 個) にインジェクションした結果、計 20 系統の CREB トランスジェニックソングバード (DN-CREB 11 系統、Actv-CREB 9 系統) を得た。これらのトランスジェニック個体を野生型個体と交配した結果、G1 世代の個体 (DN-CREB 116 個体、Actv-CREB 103 個体) が得られた。また免疫組織学的解析の結果、神経細胞特異的に CREB 変異体が発現していることが確認された (図 1C)。ソングバードで分子遺伝学的な手法により個体レベルで神経可塑性を操作した初めての試みであり、社会学習における遺伝的要因と環境要因の影響を研究する上で有用な研究手法を確立したといえる。

音声学習中に神経活動依存的な転写因子である CREB のリン酸化が亢進することから、社会的接触を媒介する神経情報と転写因子 CREB の関係について解析を進めた。オスの仮親を 2nd チューターとして音声学習を実施したところ (図 2A) 後天的な学習によって獲得される「さえざり (song)」の音韻制御については、CREB の活性化が必須であることが明らかとなった (図 2B-F)。一方、興味深いことに、先天的な「地鳴き (call)」の音韻に対しては、CREB 活性の変化が影響しない (図 3)。

以上の結果は、神経活動依存的な転写制御を担う CREB が社会学習により獲得される音声コミュニケーションの能力に重要な役割を果たしていることを示す。本トランスジェニック系統をさらに解析することで、社会学習によるスキルの獲得と固定化を媒介する神経回路機構について知見が得られると期待できる。

オペラント学習と社会学習での回路動作の

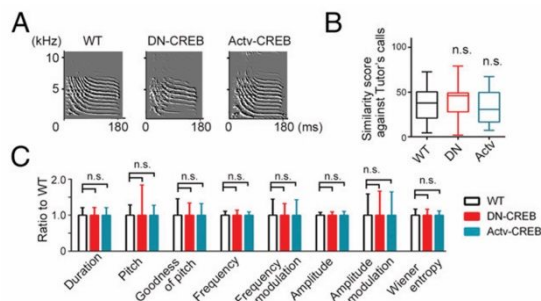


図 3. CREB 活性操作の先天的音声である「地鳴き (call)」への影響。学習により獲得される「さえざり (song)」と異なり、CREB 活性操作に影響されない。

共通点や相違点の探索：

社会的接触に關与するシグナル伝達の解析手法として、社会行動中の個体からシグナル分子の動態を計測することは有用である。そこで、CREB の上流のシグナル分子の活性を内視顕微鏡によりイメージングするために、行動実験に支障が無いような小型軽量の内視顕微鏡用のマイクロドライブの設計を行った。本顕微鏡によるイメージング技術開発は、分子遺伝学が駆使できるマウスを対象に進めた。その結果、総重量が1グラム以下のマイクロドライブの開発に成功した。

次にファイバー光学系を改良することで、脳深部から単一細胞の精度で、蛍光タンパク質 GCaMP、FRET バイオセンサーによる Ca^{2+} イメージングおよび ERK 活性イメージングを実施することに成功した（図 4）。これまでも自由行動下の動物個体でのイメージング計測に関して複数の技術が報告されているが、本技術のアドバンテージとして、多波長同時計測（例： Ca^{2+} イメージング & FRET イメージング、 Ca^{2+} イメージング & 転写活性レポーター計測）にもフレキシブルに対応できる。特に Ca^{2+} イメージングと FRET イメージングを組み合わせることで、学習中個体で神経可塑性誘導と神経情報の推移を単一細胞の精度で解析することが可能である。以上のように、社会学習の神経回路シフト・メカニズムの解析に有用な計測技術の確立に成功した。

さらに、マウスの認知行動課題としてタッチパネル・プラットフォームによる 5-CSRTT および視覚弁別による逆転学習課題についてイメージングによる神経活動計測および光遺伝学的・化学遺伝学的回路操作の条件検討を行なった。逆転学習課題の個体から内視顕微鏡イメージングを実施して、4 週間以上安定して神経活動計測することに成功した。

<引用文献>

Kuhl, P. K., Tsao, F.-M., and Liu, H.-M. (2003) Foreign-language experience in infancy: effects of short-term exposure and social interaction on phonetic learning. PNAS. 100, 9096-9101

Abe, K., and Watanabe, D. (2011) Songbirds possess the spontaneous ability to discriminate syntactic rules. Nat. Neurosci. 14, 1067-1074



図 4. (左) 社会学習や行動スキルの獲得を媒介すると想定される細胞内シグナル伝達。(中) 開発中の内視顕微鏡の光源および光学系。(右) 内視顕微鏡による蛍光イメージング像。各細胞の形が明確に確認できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

Imamura, K., Izumi, Y., Watanabe, A., Tsukita, K., Woltjen, K., Yamamoto, T., Hotta, A., Kondo, T., Kitaoka, S., Ohta, A., Tanaka, A., Watanabe, D., Morita, M., Takuma, H., Tamaoka, A., Kunath, T., Wray, S., Furuya, H., Era, T., Makioka, K., Okamoto, K., Fujisawa, T., Nishitoh, H., Homma, K., Ichijo, H., Julien, J.-P., Obata, N., Hosokawa, M., Akiyama, H., Kaneko, S., Ayaki, T., Ito, H., Kaji, R., Takahashi, R., Yamanaka, S., and Inoue, H. (2017) The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis. Science Translational Medicine. 9, eaaf3962 査読有 DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf3962

Tohyama, T., Kinoshita, M., Kobayashi, K., Isa, K., Watanabe, D., Kobayashi, K., Liu, M., and Isa, T. (2017) Contribution of propriospinal neurons to recovery of hand dexterity after corticospinal tract lesions in monkeys. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114, 604-609 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1610787114

Deguchi, Y., Harada, M., Shinohara, R., Lazarus, M., Chérasse, Y., Urade, Y., Yamada, D., Sekiguchi, M., Watanabe, D., Furuyashiki, T., and Narumiya, S. (2016) mDia and

ROCK Mediate Actin-Dependent Presynaptic Remodeling Regulating Synaptic Efficacy and Anxiety. Cell Rep. 17, 2405-2417 査読有
DOI: 10.1016/j.celrep.2016.10.088

Imamura, K., Sahara, N., Kanaan, N. M., Tsukita, K., Kondo, T., Kutoku, Y., Ohsawa, Y., Sunada, Y., Kawakami, K., Hotta, A., Yawata, S., Watanabe, D., Hasegawa, M., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y., Suhara, T., Higuchi, M., and Inoue, H. (2016) Calcium dysregulation contributes to neurodegeneration in FTLD patient iPSC-derived neurons. Sci Rep. 6, 34904 査読有
DOI: 10.1038/srep34904

Aoki, N., Yamaguchi, S., Kitajima, T., Takehara, A., Katagiri-Nakagawa, S., Matsui, R., Watanabe, D., Matsushima, T., and Homma, K. J. (2015) Critical role of the neural pathway from the intermediate medial mesopallium to the intermediate hyperpallium apicale in filial imprinting of domestic chicks (Gallus gallus domesticus). Neuroscience. 308, 115-124 査読有
DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.09.014

Abe, K., Matsui, S., and Watanabe, D. (2015) Transgenic songbirds with suppressed or enhanced activity of CREB transcription factor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112, 7599-7604 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1413484112

Hasegawa, T., Fujimoto, H., Tashiro, K., Nonomura, M., Tsuchiya, A., and Watanabe, D. (2015) A wireless neural recording system with a precision motorized microdrive for freely behaving animals. Sci Rep. 5, 7853 査読有
DOI: 10.1038/srep07853

Watakabe, A., Takaji, M., Kato, S., Kobayashi, K., Mizukami, H., Ozawa, K., Ohsawa, S., Matsui, R., Watanabe, D., and Yamamori, T. (2014) Simultaneous visualization of extrinsic and intrinsic axon collaterals in Golgi-like detail for mouse corticothalamic and corticocortical cells: a double viral infection method. Front. Neural Circuits. 8, 110 査読有
DOI: 10.3389/fncir.2014.00110

〔学会発表〕(計9件)

意思決定・意思伝達の神経回路基盤解明への生物学的アプローチ, 渡邊 大, 電気通信大学脳科学ライフサポートセンター (BLSC) セミナー, 2019年1月23日, 東京

音声スキル獲得・制御の神経回路機構, 渡邊 大, 新潟脳神経研究会, 2018年4月20日, 新潟

Activity-dependent gene regulation in vocal and skill learning. Watanabe D. Behavioral adaptation and functional recovery from pathological states, Tokyo (Japan), 18-19 December 2017.

音声スキル獲得・制御の神経回路機構, 渡邊 大, 生理研研究会「大脳皮質の機能原理を探る」, 2016年12月3-4日, 岡崎

Genetic and neural circuit basis of learned vocalization. Watanabe D. Dissecting and Understanding Mechanisms for Functional Shift of Brain Network, Kyoto (Japan), 3rd-4th March 2016.

高次脳機能を担う神経回路機構の理解に向けて, 渡邊 大, 平成28年度 京都大学脳神経外科教室同門会 Neuroscience Frontier, 2016年2月13日, 大阪

音声スキルの獲得と制御の神経機構, 渡邊 大, ライフサイエンスイノベーション推進機構セミナー, 2015年2月20日, 福井

Neural Basis of Social Learning and Vocal Communication, 渡邊 大, 第1回
Neuroscience Network in Kobe シンポジウム「分子から疾患へー基礎と臨床を繋ぐ神経
科学研究」, 2015年2月6日, 神戸

モデル生物による音声スキル獲得の神経機構へのアプローチ, 渡邊 大, 第5回札幌神
経科学研究会, 2014年7月16-17日, 札幌

〔図書〕(計1件)

ソングバードの音声学習とその神経基盤, 渡邊 大, 生体の科学, 第67巻 第1号、76-
80

〔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

<https://www.phy.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 安部 健太郎

ローマ字氏名: (ABE, kentaro)

研究協力者氏名: 松井 亮介

ローマ字氏名: (MATSUI, ryosuke)

研究協力者氏名: 濱口 航介

ローマ字氏名: (HAMAGUCHI, kosuke)

研究協力者氏名: 矢和多 智

ローマ字氏名: (YAWATA, satoshi)

研究協力者氏名: 西村 知華

ローマ字氏名: (NISHIMURA, chika)

研究協力者氏名: 西岡 忠昭

ローマ字氏名: (NISHIOKA, tadaaki)

研究協力者氏名: 八木 宏樹

ローマ字氏名: (YAGI, hiroki)

研究協力者氏名: 奥宮 太郎

ローマ字氏名: (OKUNOMIYA, taro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。