

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03355

研究課題名(和文) 歌識別能力の発達を担う神経機構の解明

研究課題名(英文) Exploring the neural mechanism that regulates song preference learning in fruit flies

研究代表者

上川内 あづさ (Kamikouchi, Azusa)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：00525264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ショウジョウバエの歌識別学習を成立させる神経機構の解明を目指した。特に、抑制性神経伝達物質であるGABAに着目し、まずは分子遺伝学的手法を用いて、責任GABAニューロン候補の絞り込みを進めた。その結果、脳の片側に数個しかないGABAニューロンが、歌識別学習の成立に必須であることを発見した。また、それらのニューロンで発現する神経伝達物質の受容体の同定と機能阻害の実験から、ニューロンが受け取る神経伝達物質群の同定に成功した。さらに歌識別の神経機構における種間差の解明研究も進め、二次聴覚ニューロンの一種の応答特性が、ショウジョウバエの近縁種間で異なることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幼児は母語に触れることで、その言語が持つ音の特徴を識別する能力を発達させる。しかし、このような、特定のパターンを持つ音の識別能力がどのようにして経験に応じて発達するのか、その神経機構には不明な点が多い。近年我々が確立したショウジョウバエの歌識別学習パラダイムは、この課題に挑むための有効な実験モデルである。本研究課題ではその利点を存分に利用することで、この歌識別学習を成立させる神経機構の一端を明らかにした。さらに、歌識別を担う神経機構そのものの理解も進めた。今後、この成果をベースに次なる研究へと展開させることで、ヒトの言語発達を担うメカニズム理解の一助になると期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research project was to elucidate the neural mechanism that regulates song preference learning in *Drosophila melanogaster*. In particular, we focused on the inhibitory neurotransmitter GABA and used molecular genetic techniques to narrow down the candidate GABAergic neurons responsible for this process. As a result, we discovered that only a few GABAergic neurons in the brain are essential for the establishment of song preference learning. Through the identification and functional inhibition of neurotransmitter receptors expressed in these neurons, we successfully identified the neurotransmitter groups received by these neurons. Additionally, we investigated inter-species differences in the neural mechanism of song preference and found that the response characteristics of a type of secondary auditory neuron differ between *Drosophila melanogaster* and its close relatives.

研究分野：神経行動学

キーワード：ショウジョウバエ 歌識別学習 抑制性神経伝達物質

1. 研究開始当初の背景

幼児は母語にさらされることで、その言語が持つ音の特徴を識別する能力を発達させる (Kuhl, 2004)。このような言語発達のメカニズムは長年の謎であり、さまざまな研究がなされてきた。また、この現象を研究するための動物モデルの利用も行われている。よく使われるモデルがゼブラフィンチなどの鳴禽類の歌発達時の聴覚可塑性である。実際にゼブラフィンチを用いた研究から、幼少期の音経験がその後の歌識別に必要であることが示された (Yanagihara & Sugiyama, 2016)。

近年、このような、ヒトや鳴禽を用いた研究により、言語・歌発達のメカニズムが、現象レベルだけでなく神経回路レベルでも解明されつつある (Prather et al., 2017)。どちらの場合も、生得的な能力と、発達過程での音経験により調節される後天的な能力の両方により、音の識別能力が成熟する。しかしヒトと比べて小さい鳥類の脳ですら、その神経細胞数は莫大で脳構造も複雑であるため、神経回路レベルで全体像を理解することは難しい。さらに鳥は遺伝子操作が難しく、世代時間が長い点も、神経基盤解明の律速となっている。このような制約により、特定集団や種に固有なパターンを持つ音(言語、歌)の識別能力がどのようにして経験に応じて発達するのか、その神経機構にはいまだ不明な点が多い。

このような背景の下、近年我々は、言語学習の神経機構を解析するモデルとして、ショウジョウバエの歌識別学習パラダイムを確立した。ショウジョウバエの実験モデルとしての利点は、「豊富な分子遺伝学ツール」が整備されているだけでなく「すでに同定されて、かつ機能操作が可能な聴覚神経回路」を有している点である。そのため、歌識別能力の発達を担う神経回路機構を単一細胞レベルという高い解像度で同定できるのである。このような、数々の実験場の利点を持ち、かつヒトや鳴禽と進化的にはかけ離れたショウジョウバエでの研究を進めることで、言語・歌学習を支える神経機構の多点比較が初めて可能となり、脊椎動物とも共通する一般原理の抽出や、多様性の理解が大幅に進むことを期待した。

ショウジョウバエのオスは「求愛歌」と呼ばれる種に固有な羽音を用いて同種のメスへと求愛を行う。この求愛歌は近縁種間で異なるリズムを持ち、異種間交配を避ける一要因として機能する。ショウジョウバエの「歌識別学習」とは、幼少期(ここでは、羽化直後の若い成虫を指す)に「種に固有なリズムを持つ求愛歌(同種の歌)」を聞いた経験が成熟後のリズム識別の精度を劇的に向上させる、という現象であり、同種の歌を経験した時にだけ生じる。これは、生得的な歌パターン識別経路と、幼少期の音経験で成熟する後天的な経路とが脳内で相互作用することにより、歌識別学習が成立することを意味する。これまでの研究から私たちは、ハエの歌識別学習には抑制性神経伝達物質 GABA が必要であることを見出し、その標的ニューロンとして pC1 細胞群、およびそこで発現する GABA_A 受容体を特定した (Li et al., 2018)。鳴禽類においても、音経験に依存した歌識別精度の向上には GABA が関与することが報告されている (Yanagihara & Sugiyama, 2016)。このことは、ハエが示す歌識別学習の制御機構と、鳴禽類が持つ神経機構とが類似していることを示唆している。しかし、ショウジョウバエにおいて、GABA を介した機構がどのように歌識別学習を成立させるのかは未解明である。

2. 研究の目的

ショウジョウバエの歌識別学習を成立させる神経機構を解明する。GABA がどのように歌識別学習に関与するかを探るとともに、歌識別を担う神経機構そのものの理解も深めることを目指す。

3. 研究の方法

GABA 合成の律速酵素である Gad1 遺伝子のプロモーター配列を用いた Gal4 関連系統 (Gad1-Gal4、およびその hemidrivars) を用いて、GABA ニューロン群の機能を分子遺伝学的に制御した。掛け合わせにより得られたハエを用いて、生得的な歌識別能力が障害されるかを調べ、責任 GABA ニューロンを含む細胞群を絞り込んだ。

歌識別学習の評価は、先行研究に従った (Li et al., 2018)。メスに対して、種に固有なリズムを持つ人工求愛歌を聞かせながら育てた後、同種のリズムを持つ歌や異種のリズムを持つ歌を聞かせながらオスに求愛させ、交尾受け入れ率の経時変化を観察した。これにより、事前に歌を聞いた経験が、同種歌や異種歌への応答性をどのように変化させるかを解析した。

4. 研究成果

1. 歌識別学習を担う責任 GABA ニューロンの同定 (Imoto et al., 論文投稿準備中)
Intersection 法、と呼ばれる分子遺伝学的な手法を用いて、責任 GABA ニューロン候補の絞り込みを進めた。細胞群の分化に関わる遺伝子を発現するキイロショウジョウバエ頭部の GABA ニューロンを有力候補として、解析を進めた。幼少期に同種の歌を聴いた経験の有無により、その後の歌への応答が変化するかを調べることで、歌識別学習の有無を検討した。その結果、脳の片側に数個しかない、GABA-SL と名付けた GABA ニューロンが、歌識別学習の成立に必須であることを発見した。

2. 責任ニューロンと pC1 との接続様式の解明 (Imoto et al., 論文投稿準備中)
米国 Janelia Research Campus から公開された、キイロショウジョウバエ成虫の脳の電子顕微鏡画像データベース (<https://neuprint.janelia.org/>) を用いた解析から、同定した GABA-SL ニューロンと、メスの配偶行動を制御する pC1 ニューロンとの接続様式を明らかにした。また、他の種類のニューロンにも解析を広げ、GABA-SL ニューロンと、交尾行動や学習に関与する高次ニューロンとの接続様式も、それぞれ明らかにした。これは予期せぬ発見であったが、GABA-SL ニューロンが多様な情報を受け取って経験に応じた求愛歌の識別に関与する可能性を新たにもたらしめた。

3. 歌識別学習を制御するシグナル分子の同定 (Imoto et al., 論文投稿準備中)
ここまでの解析から、GABA-SL ニューロンが歌識別学習の成立機構において、中心的な役割を果たすことが判明した。そこで研究計画を進展させ、GABA-SL ニューロンが歌識別学習の際に受け取るシグナル分子の同定を進めた。公開されている、単一細胞の RNAseq データベースである Scope (https://scope.aertslab.org/#/FlyCellAtlas/*/welcome) を利用し、GABA-SL ニューロンで発現する、神経伝達物質の受容体を網羅同定した。発現が確認された受容体の遺伝子に関して、GABA-SL ニューロンでの発現を RNAi 法で抑制することで、GABA-SL ニューロンが受け取る神経伝達物質群の同定に成功した。

4. 歌識別システムを担うニューロンの種分化 (Ohashi et al., 2023)
ではそもそも、歌リズムの識別を担う神経機構は、どのように同種の歌リズムに適合するように調節されるのだろうか？そのヒントになるのは、歌識別の神経機構における種間差の解明研究である。そこでキイロショウジョウバエと近縁種のオナジショウジョウバエに着目した。本研究では、歌情報の処理に関わる聴覚神経回路のうち、求愛歌を最初に受容する聴感覚ニューロンと、これらの細胞群から情報を受け取る二次聴覚ニューロン的一种である AMMC-B1 ニューロン群の特性の種間比較を行った。これら 2 種類の聴覚ニューロンの軸索投射などの形態や放出する神経伝達物質には、顕著な差異は見られなかった。しかし、AMMC-B1 ニューロン群の神経応答特性には、有意な種間差が検出された。階層ベイズモデルを用いて、情報処理機構の推定を行ったところ、速すぎるリズムの音を聞いたときに AMMC-B1 ニューロン群の応答を抑制する入力、オナジショウジョウバエではキイロショウジョウバエと比較すると、強く働いている可能性が示された。このような機構により、歌リズムの識別を担う神経機構が、同種の歌リズムに適合するように調節されている可能性がある。

以上の解析により、ショウジョウバエの歌識別学習を成立させる神経機構の一端が明らかになった。さらに、歌識別を担う神経機構そのものの理解も進み、歌識別学習を成立させる機構の解明研究が今後、加速することが期待される。

(参考文献)

- Kuhl, P. K. (2004). Early language acquisition: cracking the speech code. *Nature Reviews: Neuroscience*, 5(11), 831-843. doi: 10.1038/nrn1533
- Li, X., Ishimoto, H., Kamikouchi, A. (2018). Auditory experience controls the maturation of song discrimination and sexual response in *Drosophila*. *eLife* 2018;7:e34348. doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.34348>
- Takuro S. Ohashi, Yuki Ishikawa, Takeshi Awasaki, Matthew P. Su, Yusuke Yoneyama, Nao Morimoto & Azusa Kamikouchi (2023). Evolutionary conservation and diversification of auditory neural circuits that process courtship songs in *Drosophila*. *Scientific Reports*. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-27349-7>
- Prather, J. F., Okanoya, K, Bolhuis, J. J. (2017). Brains for birds and babies: Neural parallels between birdsong and speech acquisition. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 81(B) 225-237. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.12.035
- Yanagihara, S., & Yazaki-Sugiyama, Y. (2016). Auditory experience-dependent cortical

circuit shaping for memory formation in bird song learning. *Nat. Commun.*, 7, 11946.
doi: 10.1038/ncomms11946

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ohashi Takuro S., Ishikawa Yuki, Awasaki Takeshi, Su Matthew P., Yoneyama Yusuke, Morimoto Nao, Kamikouchi Azusa	4. 巻 13
2. 論文標題 Evolutionary conservation and diversification of auditory neural circuits that process courtship songs in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-27349-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 7件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Keisuke Imoto, Ryoya Tanaka, Takuro Ohashi, Yuki Ishikawa, Azusa Kamikouchi
2. 発表標題 Identification of GABAergic neurons required for song preference learning in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 比較生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kamikouchi A, Oguri N, Ohashi T, Ishikawa Y, Horigome M
2. 発表標題 GABA attenuates song responses of fruit flies via presynaptic inhibition of auditory sensory neurons
3. 学会等名 JDRC14 (14th Japan <i>Drosophila</i> Research Conference)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Azusa Kamikouchi
2. 発表標題 How does the female fly evaluate the courtship song from a male fly?
3. 学会等名 The 23rd annual meeting of the Korean Society for Brain and Neural Sciences. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Azusa Kamikouchi
2. 発表標題 Decoding acoustic communication in flies and mosquitoes.
3. 学会等名 International webinar on Arthropod sensory organs (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Azusa Kamikouchi
2. 発表標題 Distinct sensory stimuli modify the chase strategy of the courting male fly (<i>D. melanogaster</i>).
3. 学会等名 Neuro 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Azusa Kamikouchi
2. 発表標題 Song exposure modifies the chase strategy of the courting male fly (<i>D. melanogaster</i>)
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第41回東京大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Azusa Kamikouchi
2. 発表標題 GABAergic system tunes the response to the courtship song in fruit flies. Azusa Kamikouchi.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上川内 あづさ
2. 発表標題 ショウジョウバエと蚊における、聴覚を介した配偶行動のメカニズム
3. 学会等名 第93回日本動物学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Azusa Kamikouchi
2. 発表標題 Neural mechanisms underlying song preference learning in flies
3. 学会等名 IRCN-iPlasticity International Symposium ((招待講演) (国際学会))
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Azusa Kamikouchi
2. 発表標題 Neural mechanisms underlying acoustic communication of fruit flies
3. 学会等名 Symposium of Sensory and Circadian Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Azusa Kamikouchi
2. 発表標題 Acoustic communication of fruit flies and mosquitoes
3. 学会等名 第70回日本生態学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------