

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15891

研究課題名(和文)動物の行動・認知機能を生成する脳内細胞集団の同定とその神経生理機能の実験的検証

研究課題名(英文)Identification of cell clusters in the brain generating behavior and cognition and experimental validation of their neurophysiological functions

研究代表者

田路 矩之 (Toji, Noriyuki)

北海道大学・理学研究院・特別研究員 (PD)

研究者番号：20866371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、脳内細胞群が、どのように個体の行動・認知を細胞集団単位で制御しているのかを明らかにすることである。そのために、ソングバードの音声生成回路(ソングシステム)に、どのような細胞集団が存在するのかを網羅的に明らかにし、各々の細胞集団が音声発声学習・生成にいかに関与しているのか、系統比較的に検証した。ソングシステムに存在するすべての神経・非神経細胞種に着目した種間比較の結果、HVCとRAの両方の興奮性投射ニューロンにおいて、種特異的な遺伝子発現が蓄積されている有意な差異を始めて見いだした。この結果は、興奮性投射ニューロンが歌構造の形成に主な役割を担っていることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果はソングバードのさえずりにおいて種ごとに特徴的な構造が、すべての細胞タイプによってコードされているのではなく、興奮性投射ニューロンによって主に制御されていることを示している。また本成果は行動の進化と神経回路の分化の関係性について、重要な示唆を提供する。行動を制御する神経回路の分化速度が回路内を構成する細胞タイプによって均一ではなく、一部の細胞タイプの先行する分化によって行動の進化が促されるということ意味する。この概念はソングバードのみならず、種を超えて広く拡張可能であり、今後このような現象が他の動物の行動を制御する神経回路でも発見されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify how cell groups in the brain regulate individual behavior and cognition on a cell population basis. To this end, we comprehensively clarified what cell populations exist in the song control circuit (song system) in songbirds and systematically and comparatively examined how each cell population is involved in the learning and production of vocalizations. In an interspecies comparison focusing on all neuronal and non-neuronal cell types in the song system, we found for the first time significant differences in the accumulation of species-specific gene expression in excitatory projection neurons in both HVCs and RAs. This result suggests that excitatory projection neurons play a major role in the formation of song structure.

研究分野：分子神経行動学

キーワード：動物行動 ソングバード 神経科学 single cell RNA-seq 細胞機能行動学

1. 研究開始当初の背景

脳内にはさまざまな神経・非神経細胞が存在し、個々の細胞集団ごとに動物の認知・行動における役割に特異性をもつ。例えば海馬背側 C1 野に存在する場所細胞は自己の位置情報の認知に重要な役割を担っている (O'Keefe & Dostrovsky, 1971)。このような例は、各々の細胞集団を同定し、その細胞機能を明らかにすることが、個体の認知・行動形成メカニズムの理解に重要であることを意味する。しかしながら、このような細胞集団ごとの、神経機能の特異性・多様性に関する知見は、未だ十分に明らかにされていない。例えばヒト言語機能においては、ウェルニッケ・ブローカ野など、複数の脳領域が制御に関与していることが明らかになっているが、これら言語野にどのような細胞がどのように局在し、各々の細胞タイプが言語機能にどのように関わっているのかは、大部分が未解明である。これは、多くの行動・認知形成メカニズムにおいて、それを制御する脳領域が広範にわたっていること、また複数の行動・認知を制御する神経回路が一つの脳領域に混在していることで、細胞集団と行動・認知形成との紐づけが困難であることが一因である。

そこで研究代表者は、さえずり学習行動を行う鳴禽類ソングバードの脳領域に着目した。ソングバードは他個体の歌を手本とし、練習を重ねることで自らの歌を習得する [図 1]。さえずりを制御する脳領域ソングシステムは、他の領域と解剖学的に区別された歌神経核群によって構成される [図 2]。これら歌神経核群は発声学習・行動形成に特化し、その他の行動 (飛翔、採餌等) の制御に関与しない。ゆえに歌神経核を構成する細胞集団は、発声学習・行動に関する特化した機能を有していると考えられる。すなわち、ソングバードのさえずり学習・行動は、脳内細胞集団と行動・認知の関係性を解明する上で、優れたモデルとなる。

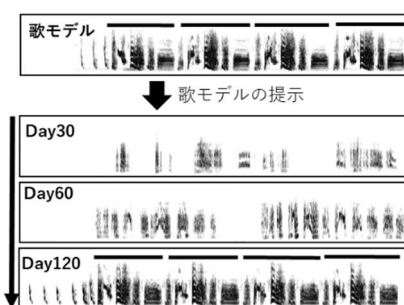


図1. キンカチョウの発声学習

孵化後 20 日頃から提示された歌モデルを記憶し、反復発声練習によって歌モデルに近づけていく。

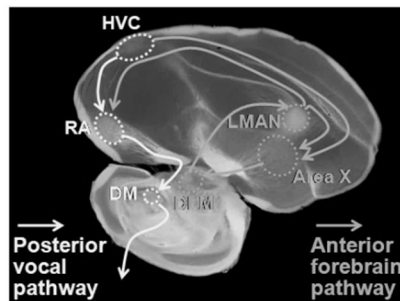


図2. ソングシステム

発声行動に関わる Posterior vocal pathway と発声学習に関わる Anterior forebrain pathway から成る。それぞれの神経回路は、歌神経核とその連絡によって構成される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脳内細胞群が、どのように個体の行動・認知を細胞集団単位で制御しているのかを明らかにすることである。そのために、ソングバードのソングシステムに、どのような細胞集団が存在するのかを網羅的に明らかにし、各々の細胞集団が音声発声学習・生成にいかに関与しているのかを検証する。

本研究の独自性は、遺伝子発現プロファイルを元に細胞集団を未知のサブタイプにまで詳細に分類し、それら細胞集団サブタイプと個体レベルの行動の関係性を、網羅的に明らかにしようとする点である。脳内細胞集団は細胞間接着因子や神経分泌物質によって神経回路の構築や細胞間の相互作用、神経系の発達などを制御していると考えられる。これら分子の発現情報を用いることで、従来、神経発火パターンや神経伝達物質によって分類された細胞集団を、さらにそのサブタイプにまで細分類することが可能となる。

3. 研究の方法

本研究では、ソングバードの近縁種 4 種 (キンカチョウ、カノコスズメ、サクラスズメ、ジュウシマツ) を用いて実験を行った [図 3]。これらの種は系統的に近縁で解析基盤を統一可能でありながら、歌が大きく異なり、歌の違いを生ずる細胞タイプの同定が容易に行える。本研究ではターゲット領域として、ソングシステムの内、運動制御経路を構成し、音素時系列パターンと音素音響特性の学習・制御に関わっている歌神経核 (HVC と RA) にフォーカスした。神経核 HVC と RA は、哺乳類運動野の第 2/3 層と 5 層に非常に近い遺伝子発現をもっている脳部位であることが近年報告されている (Pfenning et al., 2014)。

若鳥、成鳥において歌神経核 HVC, RA を構成する細胞集団を同定するため、単一細胞網羅的遺伝子発現解析 (single cell RNA-seq) を行った。取得した遺伝子発現プロファイルを元に次元圧縮法によるクラスタリングを行い、性質の近い細胞同士を近くにプロットすることで、どのようなタイプの細胞がどれだけの割合で存在するのかを可視化した。どの細胞タイプが種間で量

的・質的に異なっているのかを解析することで、さえずりと各細胞タイプとの関連を推定した。

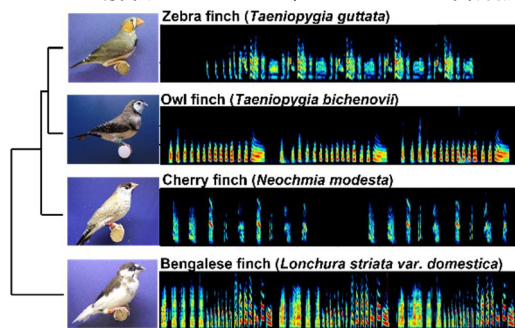


図 3. 解析に用いたソングバートの系統とその歌

4. 研究成果

Single cell RNA-seq 解析により、歌神経核 HVC および RA に存在するすべての細胞タイプを同定した[図 4]。

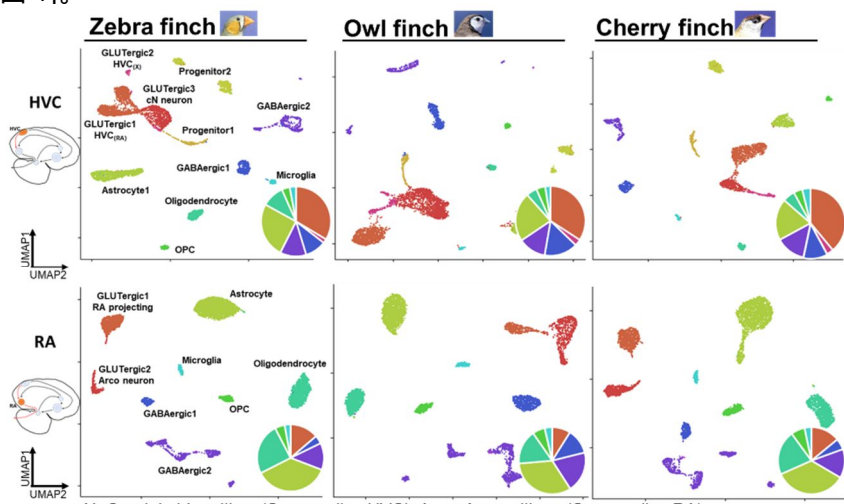


図 4. Single cell RNA-seq 解析結果の UMAP プロット
cN: Caudal nidopallium (Surrounding HVC), Arco: Arcopallium, (Surrounding RA)

当初の予定に反し、グルタミン作動性の興奮性ニューロンにおいては、これまで報告されていた細胞タイプをより細分化するような知見は得られなかったが、GABA 作動性の抑制性ニューロンにおいては、6~7種のサブタイプを同定した。

4種に共通してソングシステムに存在するすべての神経・非神経細胞種に着目した種間比較の結果、HVC と RA の両方の興奮性投射ニューロンにおいて、他の細胞種と比較して種特異的に遺伝子発現が蓄積されている有意な差異を始めて見いだした[図 5]。

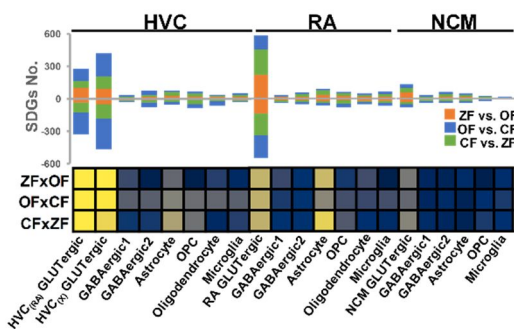


図 5. 各細胞タイプにおける種差遺伝子数とトランスクリプトームの類似度

興奮性投射ニューロンの種間差発現遺伝子は、イオンチャネルと神経伝達物質/調節物質受容体に選択的に富んでいた。この結果は、興奮性投射ニューロンが歌構造の形成に主な役割を担っていること、形成にはチャネル/神経伝達物質を介した神経発火特性の制御が関与していることを示唆する。また、幼鳥と成鳥を比較した結果、種特異的な転写シグネチャーは、さえずり学習が始まる前の幼鳥においても存在することが明らかになった。これは学習可能な歌の構造が種によって先天的に違う、というこれまでの報告を支持し、その神経分子基盤を示唆するものであった。

今後は興奮性投射ニューロンの遺伝子発現を人為的に改変することで、歌行動・学習にどのような変化が生じるのかを明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asogwa Norman Chinweike, Toji Noriyuki, He Ziwei, Shao Chengru, Shibata Yukino, Tatsumoto Shoji, Ishikawa Hiroe, Go Yasuhiro, Wada Kazuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Nicotinic acetylcholine receptors in a songbird brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cne.25314	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8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 TOJI Noriyuki, SHIBATA Yukino, TATSUMOTO Shoji, ISHIKAWA Hiroe, GO Yasuhiro, WADA Kazuhiro
2. 発表標題 Neural molecular mechanisms of the song speciation in songbirds
3. 学会等名 NEURO2022 第45回日本神経科学学会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田路矩之、柴田ゆき野、辰本荘司、石川裕恵、郷康広、和多和宏
2. 発表標題 鳴禽類の歌学習において学習可能性を象徴する細胞タイプ特異的のトランスクリプトームシグネチャー
3. 学会等名 日本遺伝学会 第94回大会（札幌）シングルセル解析による生命動態システム研究の新展開（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Noriyuki Toji, Yukino Shibata, Shoji Tatsumoto, Yasuhiro Go, Kazuhiro Wada
2. 発表標題 Transcriptomic signatures in glutamatergic projecting neurons reveal species-specific vocal learnability in songbirds
3. 学会等名 Neuroscience 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田路矩之、柴田ゆき野、辰本将司、石川裕恵、郷康広、和多和宏
2. 発表標題 鳴禽類の歌行動進化の神経分子メカニズム
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会（オンライン米子開催）サテライトシンポジウム「K1 非モデル生物を材料とした神経行動学のイマとミライ」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 TOJI Noriyuki, SHIBATA Yukino, TATSUMOTO Shoji, ISHIKAWA Hiroe, GO Yasuhiro, WADA Kazuhiro
2. 発表標題 Neural molecular mechanisms of the evolution of species-specific song in songbirds
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第43回札幌オンライン大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田路矩之、辰本将司、石川裕恵、郷康広、和多和宏
2. 発表標題 シングルセル解析データの種間比較から見る個性創発の普遍的神経分子基盤
3. 学会等名 新学術領域研究「個性」創発脳 第5回領域会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田路矩之、辰本将司、石川裕恵、郷康広、和多和宏
2. 発表標題 種特異的な階層性をもつソングバードの さえずりを生成する脳内細胞タイプの解析
3. 学会等名 【共創言語進化】第7回領域全体会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田路矩之、柴田ゆき野、辰本将司、石川裕恵、郷康広、和多和宏
2. 発表標題 鳴禽類ソングバードの歌を生成する神経回路 を用いた行動進化の神経分子基盤の解析
3. 学会等名 日本動物学会第65回北海道支部大会
4. 発表年 2021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