

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650235

研究課題名(和文) 小鳥のように鳴くマウス変異体を利用した新しい実験動物モデル

研究課題名(英文) New mouse model for an aural communication

研究代表者

内村 有邦 (UCHIMURA, Arikuni)

大阪大学・生命機能研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：20513063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：私たちがこれまでに樹立した「ヒト可聴音域で小鳥のように鳴くマウス変異体(Sng変異体)」を利用して、新しい「音声コミュニケーションの実験動物モデル」の構築に取り組んだ。本研究では、行動学や遺伝学に基づいて解析を行うことで、Sng変異体が発する音声の特徴やその機能について明らかにした。これにより、Sng変異体が示す発声行動が、音声コミュニケーションの進化を理解する上で有用なモデルになることが示された。

研究成果の概要(英文)：To establish new mouse model for an aural communication, we studied our established mutant mouse, Sng mutant, which emits human audible range vocalization after sex maturation. Our study showed that Sng mutant would be a hopeful model to understand evolution of aural communication.

研究分野：マウス遺伝学

キーワード：モデル動物

1. 研究開始当初の背景

社会行動を理解する上でコミュニケーションの理解は重要である。実験用マウス (*Mus musculus*) は、ヒトに聞こえない超音波域 (60~100kHz) の音声を利用してコミュニケーションすることが知られており (Portfors CV, 2007)、言語障害の疾患モデルや自閉症の疾患モデルなどでは、そうした超音波域の発声が減少することが知られている (Fisher et al., 2011 など)。また、音声の詳細な解析により、ヒト超音波域の音声には言語に類似した構造があることも知られる (Holy et al., 2005)。このような超音波の解析は、現在、自閉症の疾患モデルや社会性行動の解析に広く利用されている。

「ヒト可聴音域で小鳥のように鳴くマウス」は、1877年のNature誌など複数の文献で紹介されているが、遺伝する場合は稀であり、再現性が必要な実験に利用可能なマウス系統は存在しなかった。私たちは、これまで開発してきた内因的な突然変異率を操作した新規ミュータジェネシスによって、C57BL/6J系統由来で「ヒト可聴音域で小鳥のように鳴くマウス変異体 (*sng* 変異体)」を作出し、その原因遺伝子の同定にも成功した。その結果、*Sng* 変異体は単一遺伝子座劣性で遺伝し、PCRにより簡単に遺伝子型の判定も可能な新たな動物モデルとして利用可能な状況が整っている。

2. 研究の目的

私たちは世界で初めて「ヒト可聴音域で小鳥のように鳴くマウス変異体 (*Sng* 変異体)」を作製し、その原因変異の同定に成功してきた。マウスの自閉症モデルではヒトの超音波域での発声行動に異常を生じることが知られている。一方で、*Sng* 変異体は、周囲のマウスのヒト超音波域での発声行動に影響を与えることが分かっている。本研究では、*Sng* 変異体の発声行動の機能や、その発現メカニズムを明らかにすることで、これまでの「ヒト可聴音域で小鳥のように鳴くマウス変異体」を進展させ、実験用マウスを用いた新しい「音声コミュニケーションの実験動物モデル」の構築を目指す。

3. 研究の方法

音声解析などの行動学的な手法を用いた解析をベースとして、遺伝学的な手法や薬理学的な手法を組み合わせることで、*Sng* マウスの発声行動が周囲のマウスに及ぼす影響、*Sng* マウスの発声行動を生み出す遺伝的基盤や神経回路の同定、さらには、ヒト疾患との関係まで含めて包括的に解析を進めてきた。これらの解析結果を統合することで、従来までになかった「音声コミュニケーションの実験動物モデル」の構築に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) 雌の *Sng* 変異体が発する音声の解析：*Sng* 変異体は、雌雄ともに、ヒト可聴音域で小鳥の歌によく似た音を発する。これまでの研究では、主に雄の *Sng* 変異体について音声解析が進められており、新奇の雌マウスを同居させることで、発声行動の頻度が上昇し、発される音素の波形の種類のパリエーションが増加することなどが分かっていた。本研究では、雌の *Sng* 変異体が発する音声について解析した。その結果、雌の *Sng* 変異体でも、雄の *Sng* マウスと同様に新奇のマウスとの同居により、発声行動の頻度に上昇や、複雑な波形をもつ音素の出現頻度の増加が確認された。また、雌の *Sng* 変異体は、雄の *Sng* 変異体に比べて、約2倍の数の音素を発することも明らかになった。

(2) *Sng* 変異体の発する音が他の個体に及ぼす影響の解析：これまでの解析で、*Sng* 変異体と同じケージで育った同腹仔のマウスは、遺伝子型が野生型であっても、通常の野生型マウスに比べて、ヒト超音波域での発声行動が著しく減少することが明らかになっている。本研究では、*Sng* 変異体が発する音声が他の個体に及ぼす影響を、より直接的に解析するため、両端の部屋にスピーカーを内蔵させた3チャンバー実験箱を用いて、録音された *Sng* 変異体の音声を片方のスピーカーから再生した時のマウスの反応について解析した。その結果、*Sng* 変異体の発する音を再生した場合は、マウス居住ケージ内のノイズや単純な波形を持つ合成音の再生に比べて、有意にマウスの探索行動の頻度を上昇させることが明らかとなった (図1)。機能的に意味のある情報が含まれるかどうかは現時点では、明らかでないが、*Sng* 変異体が発する音声には、少なくとも、周囲のマウスの行動に変化を与える作用を持つことが示された。

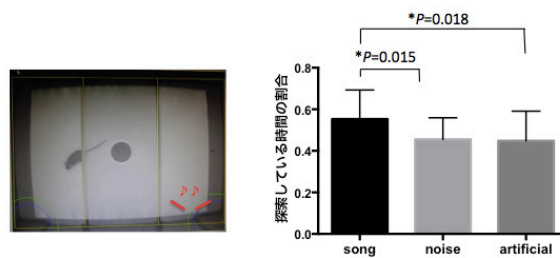


図1. *Sng*変異体の音声が発する音声が周囲のマウスに与える影響の解析。音声再生用スピーカーを内蔵させた3チャンバーボックスを用いて、3種類の音 (*Sng*変異体の音声、ケージ内のノイズ音、単純な波形をもつ合成音) を再生した結果、*Sng*変異体の音声を聞いたマウスでは、探索行動の時間が増加した。

(3) *Sng* 変異体の原因変異の同定：これまでの解析では、連鎖解析とその該当領域に含まれる遺伝子の全コーディング配列のシーケンシングにより、*sng* 変異体の原因と考えられる有力な候補遺伝子変異の同定に成功している。しかしながら、コーディング配列以外の領域 (遺伝子間領域、イントロン領域、ncRNA など) については調べられていないため、

当該変異が本当の原因変異であるかどうか不明だった。本研究では、遺伝子ターゲティング技術を利用して、同一変異をもつマウスを作製した。その結果、当該変異を持つマウスでは *Sng* 変異体と同様のヒト可聴音域での発声行動を示すことが確認された。これにより、当該変異が *Sng* 変異体の原因変異であることが明らかになった。

(4) *Sng* 変異体の発声行動を支える生理学的基盤の解明：*Sng* 変異体が発示する発声行動は、個体の性成熟期以降から開始する。発達過程に伴って、発声行動の変化を解析した結果、鳴き始め当初は、単純な波形を持つ音に終止するがその後 1~2 週間のうちに、様々な波形を持つ音を発するようになることが明らかになった。また、聴覚遮断の実験により、これらの音声の発達には、聴覚によるフィードバックが重要である可能性が示唆された。

このような発声行動を支える神経活動の基盤を明らかにするため、*c-fos* 遺伝子等の最初期遺伝子を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。ヒト可聴音域での発声行動を示す *Sng* 変異体と野生型マウスを比較をした結果、*Sng* 変異体では、複数の脳領域において *c-fos* 遺伝子の発現上昇が認められた。このことは、*Sng* 変異体の発声行動を支える神経回路が存在することを示唆する結果であり、音声コミュニケーションの進化の過程を捉える上で重要な知見になるものと考えられる。

(5) *Sng* 変異体の発声行動とヒト疾患の関係：*Sng* 変異体に対して、複数の薬剤を投与して、発声行動に影響を及ぼすかどうか解析した。そのうちの 1 種の薬剤では、発声行動の顕著な減少が認められた。今後、より詳細な解析により、その薬剤の投与では、その薬剤が発声行動に特異的に作用したのかどうか、明らかにしていきたい。

また、統合失調症様の表現型を示す遺伝子改変マウスとの交配により、両方の変異を併せ持つマウスを作製し、*Sng* 変異体の発声行動に影響がでるかどうかが解析した。しかしながら、今回の解析では、その発声行動に明確な差を認めることはできなかった。

(6) 本研究の成果のまとめ：本研究ではマウスを用いた新しい「音声コミュニケーションの実験動物モデル」の構築に取り組んだ。発される音声の特徴やその機能が明確になったことで、*Sng* 変異体が発示する発声行動が、音声コミュニケーションの進化過程を理解する上で重要なモデルになりうることを示された。なお、本研究で得られた結果については、現在、海外学術誌への投稿用論文として準備している状況であり、その成果に詳細については、なるべく早期に発表する予定である。

*Sng* 変異体のヒト可聴音域での発声は 55dB

以上であり、通常の飼育室で実験者が直接聴くことができる。このことは、従来までの実験用マウスにはない特徴である。今後の研究において、本研究で明らかになった *c-fos* 遺伝子の発現解析の結果と光遺伝学等の手法を組み合わせることで、発声行動をモデルとして詳細な神経回路の解析が可能になると考えられる。また、今後の研究で、*Sng* 変異体が発示する発声行動とヒトの行動との相関が明らかになれば、ヒト疾患のための創薬研究や新規の治療方法の開発などにも利用可能になると考えられる。本研究により得られた知見は、そのための基礎となるものであり、その重要性は大きいと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Tsukano H, Horie M, Bo T, Uchimura A, Hishida R, Kudoh M, Takahashi K, Takebayashi H, Shibuki K, Delineation of afrequency-organized region isolated from the mouse primary auditory cortex, Journal of Neurophysiology, 査読有, 印刷中, doi.org/10.1152/jn.00932.2014

② Uchimura A, Hara Y, Gondo Y, Nakabeppu Y, International Symposium on “ Germline Mutagenesis and Biodiversification ”, Genes & Genetic Systems, 査読有, Vol.89, pp.93-95 (2014), doi.org/10.1266/ggs.89.93

③ Kaneko R, Abe M, Hirabayashi T, Uchimura A, Sakimura K, Yanagawa Y, Yagi T, Expansion of stochastic expression repertoire by tandem duplication in mouse Protocadherin-a cluster, Scientific Reports, 査読有, Vol.4, 6263 (2014), doi.org/10.1038/srep06263

[学会発表] (計 8 件)

① 内村有邦, 樋口真弓, 水口洋平, 西野穰, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 八木健, マウス長期継代系統を用いた生殖系列突然変異率の閾値とその影響, 日本環境変異原学会 第 43 回大会, 2014 年 12 月 4-5 日, 一橋大学: 一橋講堂 (東京都)

② 内村有邦, 樋口真弓, 水口洋平, 西野穰, 豊田敦, 藤山秋佐夫, 三浦郁生, 若菜茂晴, 八木健, 長期継代マウス系統を用いた突然変異率の推定と新しい遺伝学, 日本遺伝学会第 86 回大会, 2014 年 9 月 17-19 日, 長浜バイオ大学 (滋賀県)

③八木健、樋口真弓、水口洋平、豊田敦、藤山秋佐夫、三浦郁生、若菜茂晴、内村有邦、シンギングマウス (*sng* 変異体) が示す新規ヒト可聴音域発声行動、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 10-13 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

④有賀理瑛、井之上幸範、木津川尚史、内村有邦、八木健、Mutator マウスの継代から産まれた「ヒト可聴音域で鳴くマウス」、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 10-13 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑤ Arikuni Uchimura, New genetics by using long-term breeding mutator mouse lines, RIKEN GSC Tanabata Meeting, 2014 年 7 月 11 日、理研横浜キャンパス (神奈川県)

⑥ Arikuni Uchimura, Mayumi Higuchi, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Ikuo Miura, Shigeharu Wakana, Takeshi Yagi, DNA replication errors that fuel genetic and phenotypic diversities in mammals, International Symposium on “ Germline Mutagenesis and Biodiversification” , 2014 年 3 月 21 日、九州大学 (福岡県)

⑦八木健、内村有邦、井之上幸範、樋口真弓、日高裕子、涌井菜央、吉岡芳親、石川征司、楯谷一郎、仲川涼子、岡ノ谷一夫、三浦郁生、若菜茂晴、ヒト可聴音域で発声行動を示す新規変異マウスの解析、日本遺伝学会第 84 回大会、2012 年 9 月 24-26 日、九州大学 (福岡県)

[その他]

ホームページ

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/yagi/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内村有邦 (UCHIMURA, Arikuni)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：20513063