

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 12 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25290063

研究課題名(和文) 発声行動依存的な脳内エピジェネティクス動態と学習臨界期制御機構の解明

研究課題名(英文) Epigenetics regulation for vocal learning in songbirds

研究代表者

和多 和宏 (Wada, Kazuhiro)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70451408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：鳴禽類の囀りはヒトの言語獲得と同様に、学習臨界期をもつ発声学習によって獲得される。しかし、その発声学習臨界期を制御する神経メカニズムの理解は進んでいない。本研究では、鳴禽類の一種zebra finchを用いて、学習臨界期中の発声練習を阻害することで、正常個体で学習臨界期が終了している成鳥時においても発声学習能していることを見出した。この日齢非依存的な発声学習能は、哺乳類運動野第5層に相当する神経細胞において誘導される70個にも上る神経活動依存的な遺伝子群の発現誘導能と強い相関が見られた。その発現誘導能がいかに制御されるか、DNAメチル化、ヒストン修飾制御の観点からの検証実験が必要である。

研究成果の概要(英文)：Birdsong, like human speech, is acquired through vocal learning during a critical period. However, the neural mechanisms regulating the vocal learning period remain elusive. Here we show that the zebra finch generated highly plastic song even as adult, caused by inhibition of vocal practice during the critical period. This preserved vocal plasticity was accompanied by juvenile-like intense induction of singing activity-driven genes in the projection neurons of a telencephalic output nucleus of vocal motor circuit. Strikingly, singing-inhibited birds normally learned tutor song at adulthood, although they had similar expression of age-dependent genes as intact adults. These results indicate that the vocal learning period is age-independently modulated by the inducibility of activity-driven genes for modifying of synaptic plasticity to reduce vocal variability.

研究分野：行動神経科学

キーワード：発声学習 学習臨界期 ソングバード 自発的行動 自発的学習 遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

動物の行動は、個体発達どの時期に、どれだけの長さで、どれだけの回数生成されるかによって、学習効率や環境適応度に大きな違いが生じる。同じように見える行動でもその行動が生成される時期・文脈依存的にその後の個体レベルでの行動発達に異なる意味をもつ。このような動物個体を取り巻く外部・内部環境の情報を遺伝子発現に還元する『脳内エピジェネティクス制御機構』がその後の遺伝子発現修飾を介して、神経回路形成・機能特性変化に影響を与え、個体レベルの学習達成度や行動表現型に影響を与えていると考えている。しかし、その神経分子基盤は十分に明らかにされていない。

鳴禽類ソングバードの発声学習は、ヒトの言語獲得と同様に「感覚運動学習」を根幹とし、その学習に最も適した時期、「学習臨界期(適応期)」をもつ[図 1]。他個体から音声パターンを聞き、それを鋳型として記憶し、実際に声を出し聴覚フィードバックにより自らの音声を修正する。これを繰り返すことにより徐々に記憶した音声パターンへ近づけていく(感覚運動学習期)。

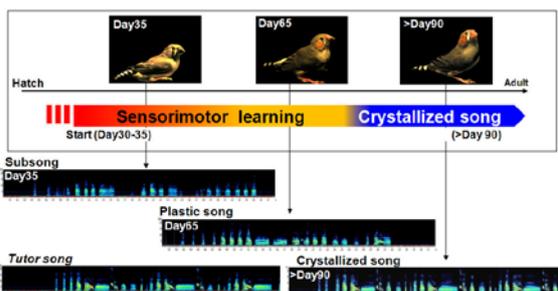


図 1: ソングバードの音声発声学習とその学習臨界期

つまり、自らの発声行動経験なしに音声パターンを学ぶという発声学習は成立しない。さらに、この学習臨界期間中の発声行動が、「いつ・どのように・どれだけ」生成されるかにより、その後に獲得される音声パターンの類似度や固定化までの期間が、同家族由来の兄弟間でも大きな違いが生じる[図 2]。つまり、「行動生成の質・量・時期」をモニターし、それを脳内遺伝子発現制御に還元するメカニズムが存在すると考えられる。

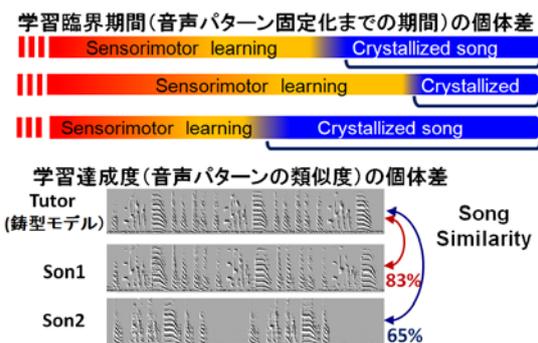


図 2: 学習臨界期間・学習達成度の個体差

このソングバードの自発的な発声行動によって、神経活動依存的にエピジェネティクス制御に関わる遺伝子群が、発声学習・生成に特化した神経回路ソングシステムに発現誘導されることを明らかにしてきた(Wada et al. PNAS 2006)。

さらに我々が現在同定しているこれらエピジェネティクス制御関連遺伝子が、学習に重要な大脳皮質-基底核-視床経路と運動制御経路が統合される神経核 RA において、音声発声学習臨界期に限定して、発声行動依存的に高く発現誘導されることが明らかになってきた。これは発声学習臨界期間制御に重要な脳部位である神経核 RA で、臨界期特異的なエピジェネティクス制御がなされていることを強く示唆する。また実際に、この神経核 RA において、音声発声学習臨界期中と後で DNA メチル化状態が変化するゲノム領域が存在し、その近傍に発声行動依存的かつ学習臨界期特異的に発現誘導される遺伝子群が存在していた。

これらのデータより、動物が自発的に生成する発声行動によって誘導されるエピジェネティクス関連遺伝子群が脳内エピジェネティクス状態を修飾改変し、その結果、個体レベルでの発声学習効率・学習戦略・学習臨界期間制御といった発声行動表現型発達に還元される神経ゲノム制御機構が存在するのではないかと考えた。この考えに至った。

2. 研究の目的

本研究は、動物が生成する『行動』が脳内のエピジェネティクス動態にいかに関わり、その後の遺伝子発現を介して個体の行動発達にどのような影響を与えるのか検証することを目的とした。

感覚運動学習は、動物自ら行動を生成することではじめて獲得される学習様式がある。その行動によって脳内では神経活動依存的な遺伝子発現が誘導され、神経可塑性などの神経回路の機能特性の変化が起こる。「行動生成の時期・質・量」をモニターし、それを脳内遺伝子発現制御に還元する神経分子メカニズムが発声学習とその学習臨界期制御にいかに関わるのであろうか？

本研究では、音声発声学習能とその学習臨界期をもつ鳴禽類ソングバードを動物モデルと用いて、動物が自発的に生成する行動そのものによって、その行動発達を支えるゲノム情報の読み出しにフィードバックを加える『行動依存的エピジェネティクス』ゲノム制御機構を明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

本研究では、動物が生成する行動と直結するエピジェネティクス動態の相互関係を明らかにしていくために、次の 2 点にフォーカスした研究を進めた。

(I): 『音声発声学習臨界期特異的かつ、発声行動依存的にエピジェネティクス修飾を

受ける遺伝子、及びゲノム領域の同定』。このために、発声行動の有無、学習臨界期間中・後の個体脳サンプルより、レーザーマイクロダイセクション法により微小脳部位のRNA・メチル化 DNA の選択的抽出・増幅、及び次世代シーケンシング技術・解析とを結びつけた研究を施行した。

(II)：『脳内エピジェネティクス状態の人工改変によって、個体レベルの行動発達に影響を与えうるのか否かの実験的検証』。これまでに独自開発してきたウイルス発現系を応用利用し、脳内のソングシステム神経核特異的なエピジェネティクス制御関連遺伝子群の発現改変を進めた。以上の実験系を相補的に施行することで『発声行動と脳内エピジェネティクスとの相互作用』の理解を進めることを目指した。

#### 4. 研究成果

(1) 「学習臨界期間中の自発的発声行動阻害による発声行動可塑性の持続」

ソングバードの一種 zebra finch (キンカチョウ) では、学習臨界期中に一日に平均約1,000回以上の自発的な発声練習を行い、自らの発声パターンを学習獲得していく (Ohgushi et al., 2015)。今回ソングバードの発声行動を持続的に阻害する方法を独自開発し、学習臨界期間中の自発的発声行動を阻害した。この阻害によって、正常個体における発声行動量の約1%に相当する発声経験しか得ることができない個体を作成することに成功した。この発声経験阻害個体は、正常個体が発声パターンが固定化する孵化後100日前後においても、サブソングのような未成熟な発声パターンの可塑性を示した [図3]。

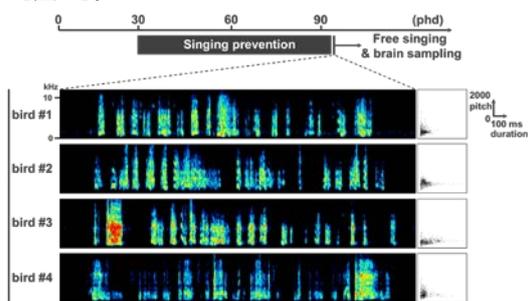


図3：学習臨界期間中の自発的発声行動阻害による発声行動可塑性

驚くべきことに、この発声経験阻害個体は、正常発達個体では学習臨界期が終了し、発声学習能がなくなる成鳥時になっても発声学習能を維持していることが明らかになった [図4]。

この結果は、学習臨界期中の発声行動学習の可塑性変化は age(日齢)に依存するのではなく、自発的な発声行動量に依存することを意味する。

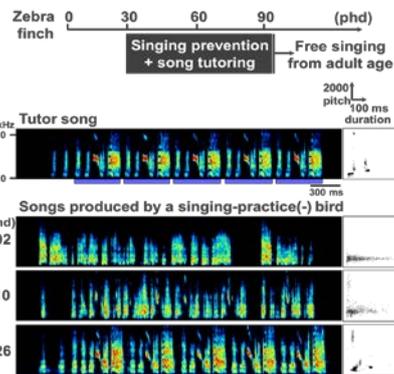


図4：自発的発声行動阻害個体の成鳥時における発声学習能

(2) 自発的な発声行動量依存的に発現制御を受ける遺伝子群の網羅的探索

(1)の結果を踏まえ、自発的な発声行動量に相関し、ageによって制御を受けない遺伝子群のゲノムワイドな探索を行った。そのために、学習臨界期間中・後、及び発声行動阻害個体(成鳥)の発声運動回路のHVC, RA歌神経核をレーザーマイクロダイセクション法により選択的にサンプリングし、RNA-seqを施行した [図5]。

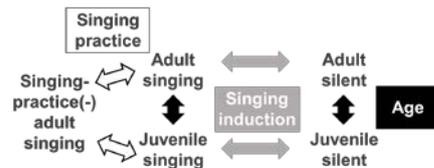


図5：自発的な発声行動量依存的に発現制御を受ける遺伝子群同定のためのサンプリング

このサンプリングをもとに実施した RNA-seq データをもとに共発現解析法を行ったところ、歌神経核 RA において70個の遺伝子群が自発的な発声行動量に相関し、ageによって制御を受けない遺伝子群として同定された [図6]。これら遺伝子群の発現制御は、発声行動によって発現誘導される一方で、学習臨界期中の発声経験の蓄積によってその誘導率が減少される。

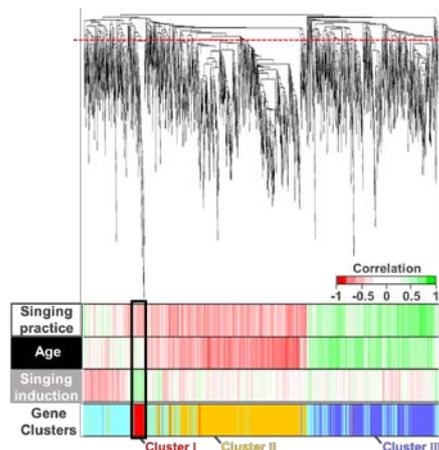


図6：自発的な発声行動量依存的に発現制御

を受ける遺伝子群(cluster I genes)

実際に *in-situ* hybridization 法によって上記 cluster I gene 群に属する 13 個の遺伝子の脳内ソングシステムにおける発現パターンを検証したところ、歌神経核 RA を主とする発声運動回路で発声学習可塑性が高い時期に強く発現誘導されることが明らかになった[図 7]。

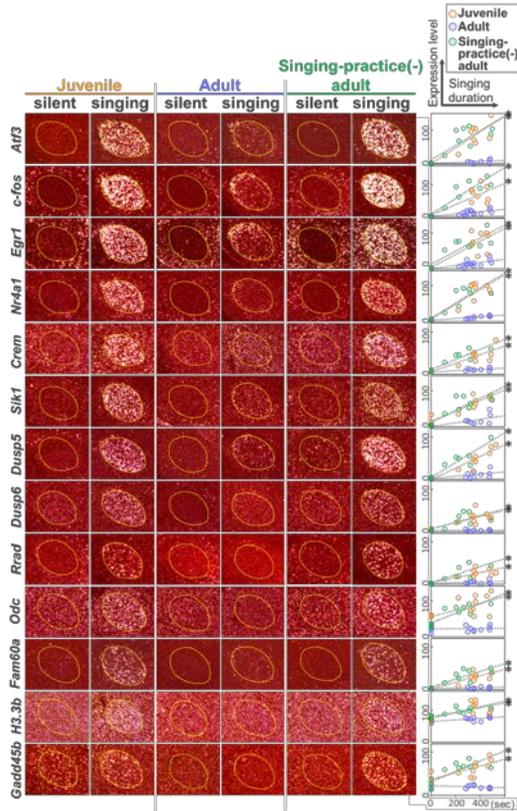


図 7: 歌神経核 RA において発声行動量依存的に発現制御を受ける遺伝子群

これらの結果は、自発的発声行動量依存的かつ age 非依存的遺伝子発現制御が発声学習可塑性の神経分子基盤となっている可能性を強く示唆する。

実際、これらの遺伝子群が共発現誘導される歌神経核 RA の投射ニューロンにおいて、学習臨界期中の発声経験依存的にスパイン密度が減少することを確認した(図 8)。

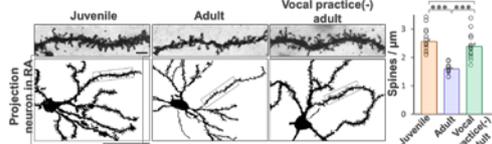


図 8: 歌神経核 RA 投射ニューロンにおいて発声行動量依存的にスパイン密度が減少する

(3) 音声発声学習臨界期特異的かつ、発声行動依存的に DNA メチル化制御を受けるゲノム領域の同定

次に、前述の自発的な発声行動量依存的に発現制御を受ける遺伝子群(Arc, ATF3, Egr1,

c-fos, Sik1)の転写開始点上流 1,500bp におけるゲノム DNA メチル化状態を発声学習臨界期中の juvenile (図 9 オレンジ色)と adult(図 9 色)から歌神経核 RA を抽出し、抗 DNA メチル化抗体によってゲノム DNA を免疫沈降する MeDIP 法を施行した。その結果、Arc 遺伝子の転写開始点上流 1,000bp 付近で DNA メチル化の違いに有意傾向を確認したが、その他の今回着目したゲノム領域においては有意差を検出しなかった。

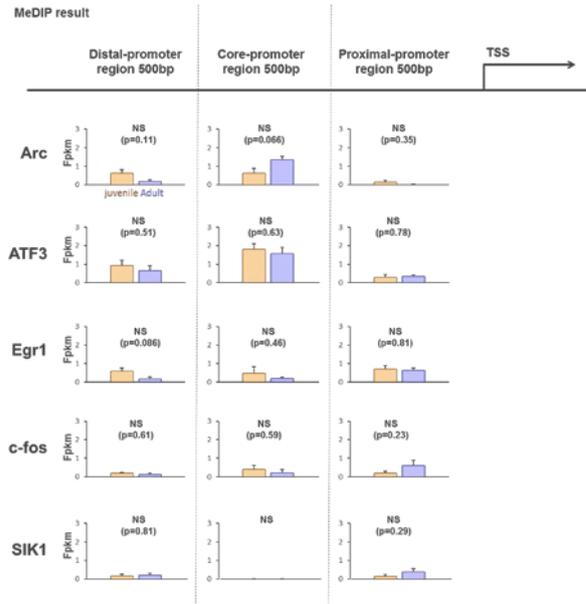


図 9: 発声学習臨界期中・後の歌神経核 RA 構成細胞のゲノム DNA メチル化変化

この結果の解釈には、以下の 3 つが考えられる。(1) 発声行動量依存的に発現制御される遺伝子群は DNA メチル化による発現調節を受けるのではなく、ヒストン化学修飾等による制御を受ける可能性、(2) DNA メチル化修飾がゲノム上の転写開始点付近ではなく、エンハンサー領域で起こっている可能性、(3) 歌神経核内の種々の細胞タイプ(興奮性投射ニューロン、抑制性介在ニューロン、グリア細胞等)が混在したゲノム DNA を用いた MeDIP 法を施行したためによる検出感度の低下、である。今後これらの可能性をさらに検証していくことが必要である。

(4) 脳内エピジェネティクス状態の人工変化による、個体レベルの行動発達への影響の有無を検証する実験

これまでにソングシステムを構成する歌神経核において、アデノ随伴ウイルスセロタイプ 9 (AAV9) が遺伝子発現誘導が可能であることを今年度当研究室で独自に明らかにしてきた。この AAV9 を用い、DNA 脱メチル化反応を促進する酵素である TET の触媒ドメインのみを発現するプラスミドを構築した。その後、培養細胞 HEK293T での脱メチル化能を確認後、実際にソングバード脳内へ AAV-TET ウイルスとしてインジェクションを行った(図 10)。

発現持続期間は 2 か月以上安定した発現を

確認しており、ソングバードの学習臨界期をカバーするのに十分であった。しかし、感染細胞数（率）がまだ十分な感染力価に達しておらず、現在さらなる改良を進めている。

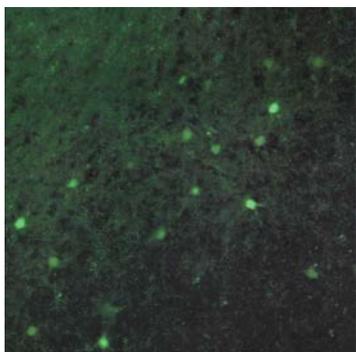


図 10: ソングバード脳内神経細胞における DNA 脱メチル化誘導を目指した AAV-TET 感染細胞

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 8 件）

- ① Yamaguchi S, Hayase S, Aoki N, Takehara A, Ishigohoka J, Matsushima T, Wada K, Homma KJ.  
Sex Differences in Brain Thyroid Hormone Levels during Early Post-Hatching Development in Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*).  
*PLoS One* 査読有 vol.12, 2017, e0169643.  
doi: 10.1371/journal.pone.0169643.
- ② Sato D, Mori C, Sawai A, Wada K.  
Familial bias and auditory feedback regulation of vocal babbling patterns during early song development.  
*Scientific Reports* 査読有 vol.6, 2016, 30323.  
doi: 10.1038/srep30323.
- ③ Imai R, Sawai A, Hayase S, Furukawa H, Asogwa CN, Sanchez M, Wang H, Mori C, Wada K.  
A quantitative method for analyzing species-specific vocal sequence pattern and its developmental dynamics.  
*Journal of Neurosci Methods* 査読有 vol.271, 2016, 25-33.  
doi: 10.1016/j.jneumeth.2016.06.023.
- ④ Ohgushi E, Mori C, Wada K.  
Diurnal oscillation of vocal development associated with clustered singing by juvenile songbirds.  
*Journal of Experimental Biology* 査読有 vol.218, 2015, 2260-2268.  
doi:10.1242/jeb.115105

- ⑤ Mori C, Wada K  
Audition-Independent Vocal Crystallization Associated with Intrinsic Developmental Gene Expression Dynamics.  
*Journal of Neuroscience* 査読有 vol.35, 2015, 878-889.  
doi:10.1523/JNEUROSCI.1804-14.2015
  - ⑥ Liu WC, Wada K, Jarvis ED, Nottebohm F  
Rudimentary substrates for vocal learning in a suboscine.  
*Nature Communication* 査読有 vol.4, 2013, 2082.  
doi: 10.1038/ncomms3082.
  - ⑦ Jarvis ED, Yu J, Rivas MV, Horita H, Feenders G, Whitney O, Jarvis S, Jarvis ER, Kubikova L, Puck AE, Siang-Bakshi C, Martin S, McElroy M, Hara E, Howard J, Mouritsen H, Chen CC, Wada K.  
A global view of the functional molecular organization of the avian cerebrum: Mirror images and functional columns.  
*Journal of Comparative Neurology* 査読有 vol.521, 2013, 3614-3665.  
doi: 10.1002/cne.23404.
  - ⑧ Wada K, Hayase S, Imai R, Mori C, Kobayashi M, Liu WC, Takahashi M, Okanoya K  
Differential androgen receptor expression and DNA methylation state in striatum song nucleus Area X between wild and domesticated songbird strains.  
*Eur J Neurosci* 査読有 vol.38, 2013, 2600-2610.  
doi: 10.1111/ejn.12258.
- 〔学会発表〕（計 12 件）
- ① Hayase S, Wada K, Accumulation of vocal experience regulates the critical period of vocal learning in songbirds、NIPS International Symposium、2016 年 12 月 6 日、生理学研究所（愛知県・岡崎市）
  - ② Hayase S, Ohgushi E, Kobayashi M, Wada K, Accumulation of vocal experience regulates the critical period of vocal learning in songbirds、Society for Neuroscience meeting、2016 年 11 月 14 日、サンディエゴ（アメリカ合衆国）
  - ③ 和多和宏、発声による脳内遺伝子発現コントロール：行動と進化を結ぶエピジェネティクス、日本進化学会、2016 年 8 月 25 日、東京工業大学（東京都・目黒区）
  - ④ 早瀬 晋、大串 恵理、小林 雅比古、和多和宏、自発的な発声経験により制御され

るソングバードの発声学習臨界期と脳内遺伝子発現制御、日本神経科学会、2016年7月20日、横浜国際コンベンションセンター（神奈川県・横浜市）

- ⑤ Sato D, Wada K, Familial genetic bias in vocal babbling pattern at early song development、Society for Neuroscience meeting、2015年10月18日、ワシントンDC（アメリカ合衆国）
- ⑥ 森千紘、和多和宏、Audition-Independent Vocal Crystallization Associated with Intrinsic Developmental Gene Expression Dynamics、日本神経科学会、2015年7月28日、神戸コンベンションセンター（兵庫県・神戸市）
- ⑦ Hayase S, Ohgushi E, Kobayashi M, Wada K、Experience-dependent regulation of singing-driven gene expression in the song system during the critical period of vocal learning、Society for Neuroscience meeting、2014年11月19日、ワシントンDC（アメリカ合衆国）
- ⑧ 和多和宏、発声行動依存的遺伝子発現動態変化と発声学習臨界期制御、記憶回路研究会、2014年10月8-9日、生理学研究所（愛知県・岡崎市）
- ⑨ Wada K、A neuronal constraint and learnability of a species-specific vocal pattern in songbirds、Cold Spring Harbor Asia Conference, Neurobiology: Diverse Species & Conserved Principles、2014年9月15-19日、蘇州（中華人民共和国）
- ⑩ Hayase S, Ohgushi E, Kobayashi M, Wada K、Regulation of singing-driven gene expression in the song system during the critical period for vocal learning、International Congress of Neuroethology(ICN) 2014、2014年7月31日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）
- ⑪ Mori C, Wada K、Robustness of developmental gene expression dynamics for vocal learning、International Congress of Neuroethology(ICN) 2014、2014年7月29日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）
- ⑫ 早瀬晋、大串恵理、小林雅比古、和多和宏、ソングバード歌発達における学習臨界期中の脳内遺伝子発現誘導率制御、日本神経科学会、2013年6月22日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

〔図書〕（計4件）

- ① Shigeno S, Murakami Y & Nomura T 編著、Brain Evolution by Design: From Neural Origin to Cognitive Architecture、Springer、2017、273-289
- ② Spengler D & Binder E 編著、Epigenetics and Neuroendocrinology: Clinical Focus on Psychiatry Volume1、Springer、2016、233-241
- ③ 尾崎まみこ、藍浩之、定本久世、村田芳博、吉村和也 編著 日本比較生理生化学会編 研究者が教える動物実験 第3巻、共立出版、2015、126-131
- ④ Ogawa H & Oka K 編著、Methods in Neuroethological Research、Springer、2013、133-149

〔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

<http://www.wada-lab.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和多 和宏 (WADA KAZUHIRO)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：70451408

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岡戸 晴生 (OKADO HARUO)

東京都医学総合研究所・神経細胞分化・副参事研究員

研究者番号：60221842

峯田 克彦 (MINETA KATSUHIKO)

北海道大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号：40374615

(4) 研究協力者

なし