

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640097

研究課題名(和文) Allelic imbalanceによる行動表現型のゲノム拘束性と可塑性の検証

研究課題名(英文) Genomic constrain and plasticity of vocal phenotypes by regulation of allelic imbalance

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、『遺伝要因』を父・母由来別のゲノム情報として分別し、生育過程における『環境要因』を介して学習行動において脳部位特異的にいかに表象されているかを遺伝子発現レベルで明らかにすることを目的として研究を進めてきた。この目的のために、種特異的な囀りパターンを学習によって獲得する鳴禽類ソングバードの異種間ハイブリッド個体を用い、音声発声学習過程における発声行動表現型と脳内遺伝子発現に着目した研究を進めた。その結果、種特異的SNPsを同定し、脳内で種特異的な発現制御を受ける遺伝子群を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Both nature and nurture influence the learning process. Birdsong is a learned vocal behavior that is regulated by species-specific genetic constraints and individual hearing experience. However, how and when genetic and environmental instructions contribute to modulate vocal learning is not well known. In this study, we developed hybrid songbirds, whose parental species sing different species-specific songs. The hybrid songbirds showed the full-spectrum of variability of song features of parental species. Based on this behavioral data, we further performed next-generation sequence (RNA-seq) from two brain areas related to regulation of song patterns. Then, we found species-specific SNPs and genes which were differently regulated in the brain areas between two parental species and hybrids. We are further working on the studying the allelic imbalance of the species-specifically regulated genes.

研究分野：行動神経生物学

 キーワード：発声学習 対立遺伝子不均衡 ソングバード ハイブリッド 種特異的遺伝子発現 個体差 環境要因  
 遺伝要因

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトを含めた多くの動物種が個体発達過程で獲得する行動や認知能力の多くが父と母から受け継ぐ「遺伝要因」とその個体が生育する「環境要因」の両方からの影響を受容している。しかし、「遺伝要因」に関しては、父・母由来の両方のゲノムアレルから常に1:1比で読み出さえているのではなく、臓器特異的に、また発達段階特異的に、多くのアレルで父方・母方からの読み出しの比率が異なることが明らかになってきた。対立遺伝子不均衡 (Allelic imbalance) と呼ばれる現象である。しかし、「対立遺伝子不均衡による遺伝子発現制御によって個体発達過程での行動表現型の学習がいかに関係を受けるのか?」、また逆に「生育環境要因によっていかに対立遺伝子不均衡が影響を受け、遺伝子発現制御に関わっているのか?」等、「父・母」由来を考慮にいれた「遺伝要因」と「環境要因」との相互関係を検証した研究は国内外共にほとんどなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、『遺伝要因』を父・母由来別のゲノム情報として分別し、それが生育過程における『環境要因』を介して獲得される行動において、脳部位特異的な遺伝子発現制御に関わっているのかを明らかにすることを目的とした。そのために、種特異的な囀りパターンを学習する鳴禽類ソングバードの交雑種ハイブリッド個体を用い、音声発声学習過程における発声行動表現型(音声発達変化・学習戦略・固定化した発声パターン等)の形成に着目した。これと同時に、発声学習に重要な神経回路である皮質-基底核-視床ループ回路を構成する脳部位に発現している遺伝子群を種特異的一塩基多型 (SNP) を用い、父母アレルのどちらに由来するかゲノムワイドに測定することを試みた。これにより、行動パターンの学習獲得に「父方」と「母方」由来の遺伝要因の読み出しの『質 (父母アレルからの発現比)』と『量 (アレル発現総量)』が脳部位特異的に、かつ個体発達過程でいかに制御されているのか実験的検証を試みた。

## 3. 研究の方法

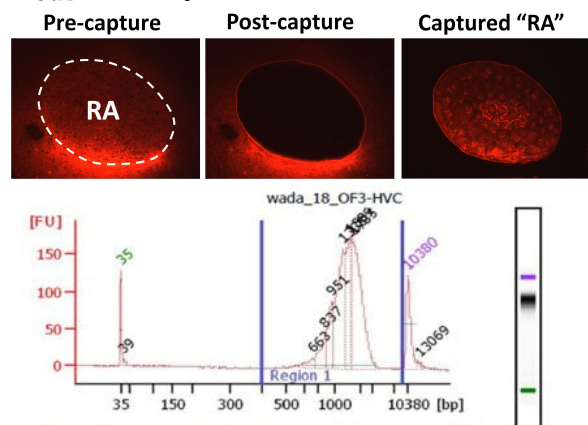
種特異的な囀りパターンを学習によって獲得する鳴禽類ソングバード2種との異種間交配によって得られるハイブリッド個体を動物モデルとして用い、歌パターンの学習環境をコントロールした。これをもとに獲得される発声行動表現型(音声発達変化・固定化した発声パターン等)を記録・解析した。同時に、種特異的 SNP を利用し、発声学習・生成に関係する歌神経核に発現する遺伝子群が父・母アレルのどちらに由来するかゲノムワイドに測定すべく、次世代シーケンス解析を行った。これらの実験により、生育環境にตอบสนองして、「父方」と「母方」由来の遺伝要因の

読み出しの『質 (父母アレルからの発現比)』と『量 (アレル発現総量)』が脳部位特異的にいかに制御されているのか明らかにする実験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ハイブリッド・ソングバード歌運動制御神経核 HVC・RA からの RNA 抽出・cDNA 増幅

音声発声学習・生成のために機能特化した神経回路ソングシステムにおいて発現制御を受ける遺伝子群を RNA-seq によって網羅的にかつ、定量的に同定することを目指した。脳サプリングに使用した個体は、発声学習環境をコントロールした上で、表出される発声行動表現型(音声発達変化・学習戦略・固定化した発声パターン等)の解析を施行した。その後、発声学習・生成に重要な神経核である HVC, RA 部位においてレーザー・マイクロダイセクション法によりサプリングした微小脳部位からの RNA 抽出を行い増幅を行った。微量 RNA からの増幅には、Quartz-seq 法を用い、非常に高品質な cDNA の増幅を確認できた[図 1]。この実験手法の確立により、微小脳部位から安価に大量のサプリングが可能となった。



【図1】歌神経核RAにおけるレーザー・マイクロダイセクションとQuartz-seqによって増幅されたCDNAのサイズ分布の実例

### (2) 次世代シーケンス技術によるハイブリッド個体脳内の遺伝子発現情報の収集

脳で発現している全トランスクリプトーム情報をレファレンス配列として用いるために、親種ソングバード2種各5個体分の全脳 RNA を個体別にアダプターを付加し、HiSeq2500、1レーン分(計2レーン)の100bp pair-end RNA-seq を実施した。その結果、個体あたり平均リード数で 71,680,526 reads(min:64,787,626 ~ max:93,969,226)の情報を得た。

さらに、脳部位特異的な遺伝子発現情報を得るため、親種2種と雄・雌ペアを入れ替えた2タイプのハイブリッド個体(各4個体分)から上記で述べたレーザー・マイクロダイセクション法によりサプリングした HVC、

RA 部位でそれぞれ 1 レーン分(計 2 レーン)の RNA-seq を実施した。その結果、各個体の脳部位ごとに平均リード数 : 102,012,395 reads(min:45,311,458 ~ max:274,719,866) の情報を得た。この次世代シーケンスには、文部科学省科学研究費新学術領域研究「ゲノム支援」からの支援をいただいた。

### (3) 脳内発現遺伝子群の種特異的 SNPs の抽出

脳内発現遺伝子群の種特異的 SNPs の抽出のため、得られた RNA-seq 情報を用い、瀬々潤博士(産総研)との共同研究によって以下のシーケンス解析を進めた。まず脳内発現遺伝子群の種特異的 SNPs の同定を施行した。親種 2 種(5 個体分)の全脳 mRNA の RNA-seq 情報と、現在公開されている zebra finch genome 情報から、当研究室で使用しているソングバード 2 種の種特異的 SNP 情報を反映した pseudo genome 配列を新たに構築することができた。以下に、種特異的 SNP の解析結果の一例を示す[図 2]。

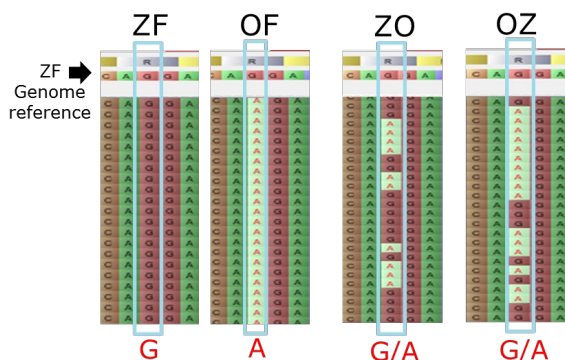


図2: 種特異的SNPの例

Glutamate receptor ionotropic, kainate 1 (GRIK1) アレルでの親種 (ZF, OF) で見られた種特異的SNP と同じアレル上のハイブリッド個体(ZO, OZ)における転写産物中にみられたSNP。

### (4) 種特異的 SNPs 情報を用いたハイブリッド個体の脳内発現遺伝子群の Allelic imbalance 比率解析

上記の種特異的 SNP 情報を用いて、瀬々研究室で開発された Homeoroq 解析によってハイブリッド各個体の HVC・RA 脳領域において発現が確認された遺伝子群の Allelic imbalance 比率の詳細を現在解析中である。

特に、発声運動制御脳部位における種特異的な遺伝子発現制御を受ける遺伝子群から解析を進めており、神経核 HVC, RA において、ハイブリッド個体の親種 2 種間で、種特異的な遺伝子発現量の違いを示す遺伝子群を同定できている。[図 3]。

現在、HVC 領域で 652 遺伝子、RA 領域で 955 遺伝子を RNA-seq による発現解析から親種 2 種で発現制御差を示す遺伝子候補として抽出した[図 4]。

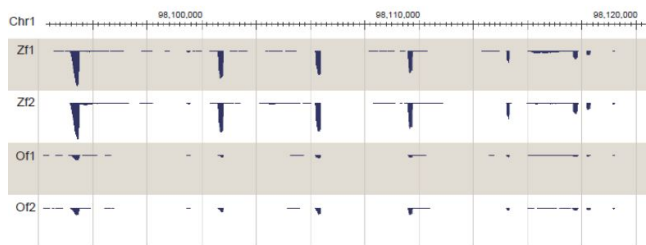


図3: 種特異的発現制御を受ける遺伝子の例

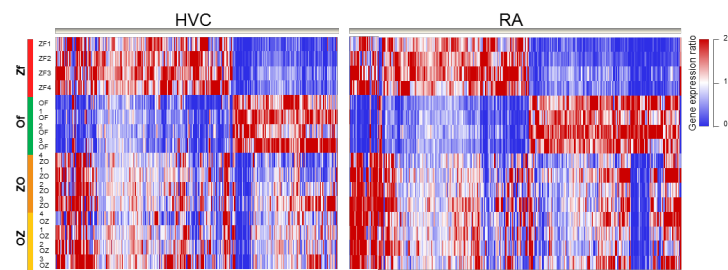


図 4: 歌運動制御領域で種特異的発現制御をうける遺伝子群の親種 2 種とハイブリッド個体での発現情報

現在、上記の候補遺伝子群における実際の脳内での発現量の違いを検証するために in-situ hybridization を実施している。

また、ハイブリッド個体の脳内発現遺伝子群の Allelic imbalance 比率解析からは当初の予測と合致するような脳部位特異的、また遺伝子座特異的な Allelic imbalance を示す例が同定されはじめています[図 5]。

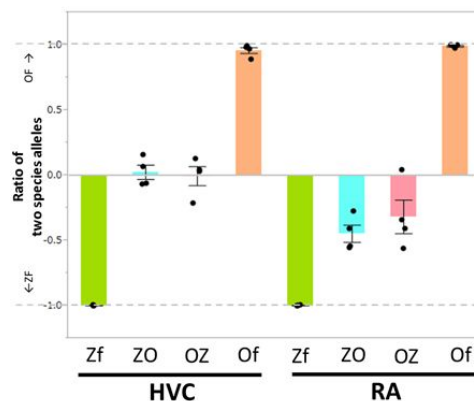


図5: 図2で示した GRIK1 アレル上の SNP における脳内 allelic imbalance 発現の例を示す。ハイブリッド個体 (ZO, OZ 共に) 神経核 HVC ではアレルバイアスが見られないが、RA では親種 ZF へのバイアスが見られた。

以上の解析を今後さらに進め、ハイブリッド個体が獲得した発声行動表現型と相関を示す種特異的遺伝子群の探索を進める。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Mori C, Wada K. Songbird: a unique animal model for studying the molecular basis of

disorders of vocal development and communication. *Experimental Animals*. 査読有 64:221-230, 2015  
DOI: 10.1538/expanim.15-0008.

Mori C, Wada K. Audition-Independent Vocal Crystallization Associated with Intrinsic Developmental Gene Expression Dynamics. *J Neurosci* 査読有 35, 2015, 878-889  
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1804-14.2015

Ohgushi E, Mori C, Wada K. Diurnal oscillation of vocal development associated with clustered singing by juvenile songbirds. *J Exp Biol* 査読有 218, 2015, 2260-2268.  
DOI:10.1242/jeb.115105.

Liu WC, Wada K, Jarvis ED, Nottebohm F. Rudimentary substrates for vocal learning in a suboscine. *Nature Communication* 査読有 4, 2013, 2082  
DOI: 10.1038/ncomms3082.

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 38, 2013, 2600-2610  
DOI: 10.1111/ejn.12258.

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. *J Comp Neurol*. 査読有 521, 2013, 3614-3665  
DOI: 10.1002/cne.23404.

〔学会発表〕(計10件)

澤井梓、和和多宏、鳴禽類交雑種の歌学習の個体差に与える学習バイアス、日本動物行動学会、2015年11月20日、東京海洋大学(東京都・港区)

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、シカゴ(アメリカ)

森千紘、和和多宏、Audition-Independent Vocal Crystallization Associated with

Intrinsic Developmental Gene Expression Dynamics 聴覚に依存しない発声パターン固定化のメカニズム、日本神経科学学会、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)

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)

和和多宏、学習によって獲得されるソングバード発声行動表現型可塑性：自らの行動によって駆動される『種としての拘束と個としての自由』、第7回若手Evo-Devo青年の会：「変動する環境と発生への衝撃」、2014年10月11日~10月12日、遺伝学研究所(静岡県・三島市)

和和多宏、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：「個体内記憶回路の同定とその機能解析による学習記憶制御基盤の統合的理解」、2014年10月8日~10月9日、生理学研究所(愛知県・岡崎市)

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日~9月19日、蘇州(中国)

和和多宏、鳴禽類ソングバードを用いた音声コミュニケーション障害の神経行動学的研究、日本実験動物科学技術 さっぽろ2014(第61回日本実験動物学会総会・第48回日本実験動物技術者協会総会)、2014年5月15日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

Chihiro Mori, Kazuhiro Wada. Active and passive vocal crystallization associated with developmental gene expression dynamics、Cold Spring Harbor Laboratory meeting、2014年3月5日~3月8日、ニューヨーク(アメリカ)

早瀬晋、大串恵理、小林雅比古、和和多宏、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06月22日、京都国立京都国際会館(京都府・京都市)

〔図書〕(計2件)

尾崎まみこ、村田芳博、藍浩之、定本久

世、吉村和也、神崎亮平（日本比較生理生化学会編）、共立出版、「研究者が教える動物実験 第3巻」、2015、222（126-131）

Ogawa H & Oka K 他、Springer 出版、Methods in Neuroethological Research、2013、175

#### 【産業財産権】

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

#### 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

該当者なし

(3)連携研究者

峯田 克彦（MINETA, Katsuhiko）

北海道大学・大学院情報科学研究科・准教授

授

研究者番号：40374615