

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390073

研究課題名（和文）模倣学習における神経可塑性の分子機構の研究

研究課題名（英文） **The neural plasticity and operation in imitative learning process**

研究代表者

渡邊 大 (WATANABE DAI)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：90303817

研究成果の概要：

ヒトの言語のような複雑なコミュニケーションの獲得、制御の基盤となる神経回路機構についてほとんど未解明である。ヒトの言語と同様に模倣学習により原始的な構文構造をもった音声を獲得する鳥類 (songbird) の音声制御系神経回路の解析を行った。その結果、音声シーケンスを構成する音素 (コンポーネント) 情報とその構文構造の情報に関する音声制御系神経回路の神経活動表現を明らかにした。さらに songbird の分子遺伝学的手法の基盤となる技術を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2008年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
年度			
年度			
年度			
総計	12,400,000	3,720,000	16,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：音声コミュニケーション、行動シーケンス、ミラーニューロン、模倣学習

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする高等動物の多くは、コミュニティを形成して集団で行動する。これらの高等動物の行動には、外界からの刺激を受容するだけでは十分に発達せず、他の個体と接触することで獲得されるものが多く存在する。例えば、集団行動における協調的な連携やコミュニケーションは、生後の発達の過程で他の個体の行動を観察し模倣することで獲得される。視覚系、聴覚系の様々な情報の中から、手本となる他の個体の行動に関す

る情報を抽出し、自己の行動制御の神経情報へ再構築する模倣学習 (imitative learning)、さらに獲得された一連の行動シーケンスを適確に制御するメカニズムが必要である。このような高度な行動の獲得・制御の基盤となる神経機構について生物学的な側面には不明な点が多い。その理由として、従来のモデル動物では模倣学習による行動シーケンスの獲得を実験室の環境で観測することが困難であることがあげられる。したがって、強化学習など学習モデルにより説明する理論的研究を分子から行動レベルで検証するこ

とも困難であった。このような観点からヒトの言語発達と同様に模倣学習により音声コミュニケーションを獲得する *Passeriformes* に属する鳥類（スズメ目、*songbird*）は、脳研究における新たなモデル動物として注目されている。中枢神経系トランスクリプトームプロジェクト、ゲノムプロジェクトなどバイオインフォマティクスの整備も進みつつある。その一方で *songbird* における発生工学的手法はほとんど研究されておらず、マウス、ショウジョウバエ、線虫のような分子遺伝学的手法の確立が望まれてきた。また音声コミュニケーションのような社会行動は、動物個体を拘束すると大きく影響をうける。したがって活発に動き回る *songbird* の行動を制限しない脳機能計測手法が必要とされてきた。

2. 研究の目的

模倣学習により獲得されるスキルや音声言語のような複雑な行動シーケンスは、様々な動作コンポーネントの組み合わせから構成される。このような行動シーケンスが正確に発現するには、各動作コンポーネントの巧緻性ととも、それぞれの動作コンポーネントの順番、タイミング、反復回数といったシーケンス情報が獲得、制御されなければならない。したがって、運動系神経回路は、これらの行動シーケンスにおける動作コンポーネント制御、シーケンス情報制御という異なるタイプの情報を処理統合した神経活動パターンを生成し、骨格筋を制御すると考えられる。また模倣学習により獲得される行動シーケンスの獲得・維持には、視覚・聴覚など感覚系からのフィードバックが重要であることが行動学的に知られている。従って、感覚系神経回路において抽出された行動シーケンス情報に基づいて、運動系神経回路が動作コンポーネント情報、シーケンス情報を再構築すると考えられるが、その詳細は不明である。

鳥類の発声器官を制御する音声制御系神経回路は、哺乳類の運動系を構成する大脳-基底核-視床と相同な神経回路である。また哺乳類-鳥類で神経機能分子の遺伝子がよく保存されている。これらの観点から、ヒトの言語と同様に模倣学習により、複雑な音声シーケンスを獲得する鳥類 (*songbird*) は、行動シーケンス獲得・制御の神経機構を研究することで、ヒトの言語獲得・制御の基盤となる神経回路の動作原理の解明が期待できる。

本研究では、行動学的な解析における *songbird* のアドバンテージを活かした神経機能解析手法を確立することを第一の目的

とした。すなわち、*songbird* の音声コミュニケーション行動を抑制しない小型軽量の神経活動計測手法の開発を目的として研究を行った。

songbird をモデル生物として、分子から行動レベルで解析を行うためには、中枢神経系で発現する機能分子を探索するとともに、その機能を検証するために、*songbird* の中枢神経系への遺伝子導入技術を確認することは重要である。さらに時間的・空間的に制御可能な遺伝子発現技術を開発することで、神経回路の動作制御や可塑性メカニズムを解析する上で有力な手法となる。本研究の第二の目的として、*songbird* の中枢神経系での遺伝子導入法の開発を行った。

songbird の音声は、5~10 個の異なった音素コンポーネントから構成される。各音素コンポーネントの配列（シーケンス）には規則があり、有限状態文法的構文規則（finite state grammar-like syntax）にしたがう。音声制御系神経回路において、音素コンポーネント情報とシーケンス情報がどのようにコードされているかほとんど未解明である。本研究の第三の目的は、本研究で開発する神経活動計測手法により、音声制御系神経回路における音声シーケンスの音素コンポーネントとシーケンスの情報表現を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) *songbird* の音声コミュニケーション行動を抑制しない小型軽量の神経活動計測手法の開発：

効率よく単一細胞レベルの神経活動を計測するために、3つのタングステン電極を搭載した。また安定して神経活動を計測するためにそれぞれの電極のポジションを遊星ギア搭載モーターにより独立して調節できるようにした。さらに3基のモーターを固定するポリペンコ樹脂製のモーター台座、モーター軸の回転を電極の上下動に変換するチタン製シャトルシステムを作成した。次にモーターの動作をステップ動作により制御するソフトウェアを LabView により作成した。

(2) *songbird* の遺伝子導入法の開発：

pFUGW (Lois et al., Science 2002) をバックボーンとしたプラスミドベクターに human synapsin promoter などプロモーター下に GFP を発現するコンストラクトを組み込んだ。次に HEK293T cell にリン酸カルシウム法により導入し、ウイルス粒子を培地より回収した。PVDF メンブレンとショ糖遠

心密度勾配法により回収したウイルス粒子を精製し、PBS 溶液に溶解した。力価測定は、希釈したウイルスベクターを 293T cell へ導入し、染色体 DNA へ取り込まれたウイルスベクター配列を定量的 PCR により測定することで判定した。

麻酔下の songbird に対して、定位脳手術を行い、ピコスプリッターにより成体脳組織へウイルスベクター液を注入した。また、受精卵（ステージ X）の初期胚への遺伝子導入を行った。

(3) 音声シーケンス制御機構・可塑性調節機構の解析：

(1) により開発した小型神経活動計測システムにより、発声中の songbird の音声制御系神経回路（大脳領域）から神経活動計測を行った。

4. 研究成果

(1) songbird の音声コミュニケーション行動を抑制しない小型軽量の神経活動計測手法の開発：

小型神経活動計測システムのマイクロドライブの CAD による 3D イメージを図に示す（図 1）。マイクロドライブのモーターをステップ駆動により制御することで、マイクロドライブ本体の重量を増やすこと無く、200 nm 以下の精度で電極の位置を制御できるようになった。チタン製シャトルシステムの高さを 5mm 確保することで、電極が上下方向に 5 mm 可動可能となり、脳表から深部まで神経活動計測に対応できた。以上のシステムにより、総重量が 0.75~1.3 グラムとなり、songbird の音声コミュニケーション行動を抑制しないで神経活動の計測が可能となった（図 2）。

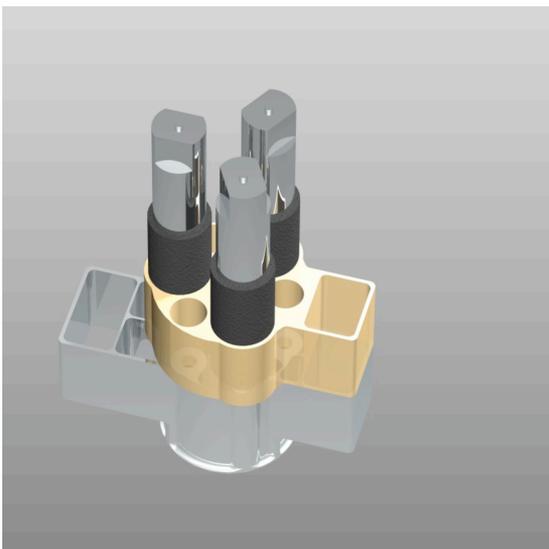


図 1 CAD によるマイクロドライブ



図 2：小型神経活動計測システム

(2) songbird の遺伝子導入法の開発：
ウイルスベクターは、生体への遺伝子導入法として確立された技術である。様々な哺乳類の神経系への遺伝子導入例が報告されている lentivirus ベクターにより songbird の成体音声制御系神経回路への遺伝子導入を行った。ヒト synapsin プロモーター等哺乳類由来のプロモーターでもマーカー遺伝子の発現が確認できた。また初期胚への遺伝子導入を行った。その結果、初期胚の遺伝子導入後に人工ふ化、育成に成功した。

(3) 発声中の songbird 個体の音声制御系神経回路より、単一細胞記録を行った。その結果、音声シーケンスの構成要素（音素コンポーネント）と構文ルール（シーケンス構造）を符号化する神経細胞が存在することを明らかにした。この神経細胞は、自己の音声を聴覚刺激として提示した際にも発声時と類似した神経活動パターンを示し、霊長類のミラーニューロンと同様の特性を持っていることを見いだした。

音声コミュニケーションのような高次の行動は、動物個体の拘束状況に強く影響される。動物個体の行動を制限しない神経活動計測システムを開発することで、従来霊長類でしか観測できなかったミラーニューロンと同様な神経活動を計測することが出来るようになった。また songbird の成体脳組織や初期胚へ遺伝子導入する技術を確認したことで、音声コミュニケーションの獲得過程である模倣学習の神経機構について、分子レベ

ルで研究可能となった。

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. Fujimoto, H., Hasegawa, T., Matsui, R., Abe, K., and Watanabe, D. The mechanisms of the motor programming for learned vocalization in songbird. In Systems Biology: the Challenge of Complexity (Springer), 83-89. (2009).
2. Wada, N., Kishimoto, Y., Watanabe, D., Kano, M., Hirano, T., Funabiki, K., and Nakanishi, S. Conditioned eyeblink learning is formed and stored without cerebellar granule cell transmission. Proc Natl Acad Sci U S A 104 (42), 16690-16695. (2007).
3. 渡邊 大. 鳥の歌から脳の仕組みを探る. 環境と健康 20 (4), 535-546. (2007).

[学会発表] (計 2 件)

1. 渡邊 大. The mechanisms of the motor programming for learned vocalization in songbird, The Uehara Memorial Foundation Symposium, 2009 年 6 月 30 日、ハイアットリージェンシー東京
2. 渡邊 大. 鳥類における音声コミュニケーション獲得制御の神経機構、電子情報通信学会非線形問題研究会、2009 年 3 月 10 日、キャンパスプラザ京都

[その他]

ホームページ等

<http://www.phy.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 大 (WATANABE DAI)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：90303817

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：