

令和 3 年 4 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02520

研究課題名(和文) 音声発声学習におけるミラーニューロンの機能発現の実験的検証

研究課題名(英文) Function of vocal-auditory mirror neuron for vocal learning in songbirds

研究代表者

和多 和宏 (Wada, Kazuhiro)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：70451408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、鳴禽類キンカチョウを用い、発声学習臨界期中に発声-聴覚ミラー応答を示すHVC(X)投射神経細胞の神経機能を調べました。HVC(X)神経細胞選択的除去を受けた幼鳥は、歌モデルの音素音響特性を学習することができず、その時系列配列も不安定で一貫性に欠ける歌を発達されることが分かりました。一方、同様の実験を発声学習後の成鳥で実施すると、学習した歌の構造には影響が見られませんでした。これらから、皮質から基底核への入力、歌の構造の音響的および時間的な側面を学習するのに重要であるが、既に学習した歌唱パターンの維持に寄与する発声の揺らぎを生成するのには重要ではないことが示されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発声学習は、ヒトの言語や楽器、スポーツの習得と同様、感覚や知覚入力と運動機能出力の協調による「感覚運動学習」の一つの学習形態である。ソングバードの歌学習と同様に、言語や楽器、スポーツなどの習得にも今回注目した大脳皮質-基底核-視床ループ神経回路や大脳皮質-基底核投射神経細胞が重要な役割を担っていることが推測されている。さらに、パーキンソン病などの運動制御疾患がこれらの神経回路異常と関係していることが明らかになってきている。ソングバード脳内の神経回路を構成する細胞群に注目することで、他の動物モデルでは研究することが難しい発声学習や感覚運動学習の学習臨界期の研究を進めることができると考えている。

研究成果の概要(英文)：We leveraged the zebra finch, a songbird, as an animal model to explore the function of the connectivity between cortex-like (HVC) and basal ganglia (area X), connected by HVC (X) projection neurons with temporally precise firing during singing. By specifically ablating HVC (X) neurons, juvenile zebra finches failed to copy tutored syllable acoustics and developed temporally unstable songs with less sequence consistency. In contrast, HVC(X)-ablated adults did not alter their learned song structure, but generated acoustic fluctuations and responded to auditory feedback disruption by the introduction of song deterioration, as did normal adults. These results indicate that the corticobasal ganglia input is important for learning the acoustic and temporal aspects of song structure, but not for generating vocal fluctuations that contribute to the maintenance of an already learned vocal pattern.

研究分野：行動神経科学

キーワード：発声学習 ソングバード 大脳基底核 アデノ随伴ウイルス 時系列制御 学習臨界期 ミラーニューロン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

ミラーニューロンは、ある行動を自身が行っているときと、それを他者が行っているのを観察しているときに、同様に活動するニューロンである。1996年に Rizzolatti らによってマカクザルにミラーニューロンの存在が報告されて以来、ミラーニューロンが、共感性形成のみならず、他者行動・意図の理解・模倣といった社会性学習、言語発達などの活動に関わる可能性が示唆されている (Gallese et al., 1996)。また、その機能異常が、自閉症・吃音など、社会性認知障害や他者とのコミュニケーション障害に関わっているとされる様々な仮説が提唱されている。しかし、ミラーニューロンが、個体発達過程でどのように発達し、ミラーニューロンとしての機能を獲得していくのか、さらにはどのような局面で、個体レベルの神経機能に関わっているのか、ほとんど明らかにされていない。このような現状において、2008年に霊長類以外の動物種として、鳴禽類ソングバード脳内で発声学習と生成に関わる神経回路ソングシステムでミラーニューロンが存在することが報告された (Prather et al. 2008)。ソングバードは発声学習臨界期中に、同種他個体との社会的接触を通して音声パターンを歌モデルとして記憶し、発声練習を繰り返すことにより、歌を学習する。ソングバードのミラーニューロンは、トリが歌っているときにも、そのトリに同種他個体の類似した歌を聴かせたときにも同様に活動する vocal-auditory (発声-聴覚)ミラーニューロンであった。また、このミラーニューロンは、高次発声中枢神経核 HVC から大脳基底核 Area X への投射ニューロンとして同定された。大脳基底核 Area X は皮質-基底核-視床ループの一部であり発声学習に重要な神経核である。進化的に離れた霊長類と鳴禽類で独立にミラーニューロンをもつことになった理由として、『他個体が行う行為を学ぶ模倣学習を可能にする根源的な神経基盤として、ミラーニューロンがもつ神経機能発達が不可欠である』との考えに至った。以上を踏まえ、発声学習・生成・認知における発声-聴覚ミラーニューロンの神経機能とその発達メカニズムの検証実験を実施した。

## 2. 研究の目的

本研究目的は、音声コミュニケーション発達過程におけるミラーニューロンの機能発達メカニズムとその機能異常がいかに個体レベルの発声行動・個体間コミュニケーション異常に影響を与えるのか、否かを実験的に検証することである。マカクザル脳内でミラーニューロンの存在が報告されて以来、他者行動の理解や模倣、言語学習など様々な活動に関わる可能性が示唆されている。しかし、ミラーニューロンが、実際にどのような局面でその神経機能を発揮するのか、個体レベルで未だ明らかにされていない。また、ミラーニューロンの自己と他者の行動の両方に応答する反応特性が、どのように発達してくるのか、学習・認知機能に関しても様々な仮説が提唱されているに過ぎず、実験的には十分な検証が行われていない。

この現状を踏まえ、本研究では霊長類以外でミラーニューロンをもち、音声発声学習能をもつ鳴禽類ソングバードを動物モデルとして用いる。『発声-聴覚応答を示すミラーニューロンの反応特性が音声発声学習過程でどのようにして発達し、個体レベルにおける学習行動・認知機能をもつのか?』ミラーニューロン研究において、これまで困難であった分子生物学・神経行動学手法を用い、ミラーニューロンの神経機能研究を推進できる意義をもつ。そのために、これまでに当研究室で独自に開発してきたミラーニューロン選択的遺伝子操作技術を応用利用し、ミラーニューロンの機能発達メカニズムとその発達異常によって引き起こされる発声学習・行動異常を実験的に検証していく先導的研究を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、ソングバードの歌神経核 HVC 内の発声-聴覚応答ミラーニューロン [HVC(x)ニューロン] を対象として、これまでに当研究室で開発してきたアデノ随伴ウイルスセロタイプ 9 (AAV9) による神経タイプ選択的遺伝子操作技術を応用した。これによりソングバード脳内におけるミラーニューロン選択的な細胞破壊を発声学習開始前に行うことにより発声-聴覚ミラーニューロンの発声学習、及び学習臨界期制御への関わりを明らかにすることを試みた。また、発声学習終了後の成鳥時に同様の遺伝子操作を行うことにより、発声パターン維持・個体間コミュニケーション形成に関わるミラーニューロンの神経機能を検証した。以上の実験により、発声-聴覚ミラーニューロンが発声学習発達と他個体との社会認知行動に果たす神経機能を明らかにする研究を進めた。

HVC(x)ニューロン選択的細胞死誘導においては、この神経細胞が、歌神経核 HVC から基底核歌神経核 Area X に投射している解剖学的特性を利用した。具体的にはアデノ随伴ウイルス AAV9 による組換え酵素 Cre を Area X に注入し、神経軸索逆行性に HVC(x)ニューロンに発現させ、別 AAV9 に導入した flex システムによって Diphtheria toxin A (dtA) と Constitutive active Caspase 3 (CaspE266) を同時に誘導することにより、ソングバード HVC(x)ニューロンで非常に高効率に細胞死を誘導できる方法を確立した。HVC(x)ニューロン選択的細胞除去を行った後、各個体の音声ファイルを 2 4 時間連続的に録音し、発声学習行動表現型の解析に用いた。そのため

に、当研究室で独自開発してきた音響特性解析法(Ohgushi et al., 2015)と時系列解析法(Imai et al., 2016)を用い、発声パターンが学習モデルからの学習度、発声パターンの安定性等の定量的解析を実施した。

#### 4. 研究成果

結果(1) まず、発声学習臨界期が終了し、歌学習を終えた成鳥における皮質-基底核投射ニューロンである HVC(x)ニューロンの学習獲得した発声パターンの生成・維持に関わる神経機能を検証した。成鳥の HVC(x)ニューロンのみを選択的に除去するとその後、1～2か月にわたり学習した歌パターンは音素音響特性・時系列配列共に有意な変化が起こらず、そのまま維持された。また、内耳除去によって聴覚フィードバックを阻害した際に起こる歌の変化も正常個体と同じように起こることが明らかになった。

結果(2)(1)と同様に皮質-基底核投射ニューロンである HVC(x)ニューロンの選択的除去を発声学習臨界期前の幼鳥に行った。その結果、成鳥群またコントロール群に比べ、歌提示モデルに対して学習した音素数の低下、音素間ギャップの不均一性、また音素配列の不安定化が有意に高くなることが明らかになった。その結果、成鳥になってもキンカチョウ本来の歌パターンでさえすることができない上、異常な繰り返しが多い歪な歌パターンを作る個体が出現するようになった。

以上の新規知見は、皮質-基底核投射ニューロンが発声学習時には重要であるが、学習後の運動パターンの維持には重要な役割をもっていないこと初めて示す結果であり、Sanchez-Valpuesta et al., PNAS 2019 に論文として発表した。

上記の新規知見をもとに、鳴禽類ソングバードの脳皮質-基底核投射神経 HVC(x)細胞の発声学習制御機能をさらに明らかにすべく、キンカチョウよりもさらに複雑な歌を生成し、発声-聴覚応答特性が強く観察されるジュウシマツにおいて同様の HVC(x)ニューロン選択的細胞死誘導実験を行い、音声-聴覚ミラーニューロン機能の検証を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 7件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sanchez-Valpuesta Miguel, Suzuki Yumeno, Shibata Yukino, Toji Noriyuki, Ji Yu, Afrin Nasiba, Asogwa Chinweike Norman, Kojima Ippei, Mizuguchi Daisuke, Kojima Satoshi, Okanoya Kazuo, Okado Haruo, Kobayashi Kenta, Wada Kazuhiro	4. 巻 116
2. 論文標題 Corticobasal ganglia projecting neurons are required for juvenile vocal learning but not for adult vocal plasticity in songbirds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 22833 ~ 22843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1913575116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Wang Hongdi, Sawai Azusa, Toji Noriyuki, Sugioka Rintaro, Shibata Yukino, Suzuki Yuika, Ji Yu, Hayase Shin, Akama Satoru, Sese Jun, Wada Kazuhiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Transcriptional regulatory divergence underpinning species-specific learned vocalization in songbirds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3000476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3000476	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 -
1. 著者名 Hayase Shin, Wang Hongdi, Ohgushi Eri, Kobayashi Masahiko, Mori Chihiro, Horita Haruhito, Mineta Katsuhiko, Liu Wan-chun, Wada Kazuhiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Vocal practice regulates singing activity-dependent genes underlying age-independent vocal learning in songbirds	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e2006537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.2006537	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 該当する
1. 著者名 Asogwa Norman C., Mori Chihiro, Sanchez-Valpuesta Miguel, Hayase Shin, Wada Kazuhiro	4. 巻 526
2. 論文標題 Inter- and intra-specific differences in muscarinic acetylcholine receptor expression in the neural pathways for vocal learning in songbirds	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 2856 ~ 2869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24532	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayase Shin, Wada Kazuhiro	4. 巻 48
2. 論文標題 Singing activity-driven Arc expression associated with vocal acoustic plasticity in juvenile songbird	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1728 ~ 1742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.14057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori Chihiro, Liu Wan-chun, Wada Kazuhiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Recurrent development of song idiosyncrasy without auditory inputs in the canary, an open-ended vocal learner	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-27046-4	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 該当する

1. 著者名 James Logan S., Sun Herie, Wada Kazuhiro, Sakata Jon T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Statistical learning for vocal sequence acquisition in a songbird	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58983-8	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 該当する

1. 著者名 James Logan S., Davies Ronald, Mori Chihiro, Wada Kazuhiro, Sakata Jon T.	4. 巻 80
2. 論文標題 Manipulations of sensory experiences during development reveal mechanisms underlying vocal learning biases in zebra finches	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Neurobiology	6. 最初と最後の頁 132 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dneu.22754	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tramacere Antonella, Wada Kazuhiro, Okanoya Kazuo, Iriki Atsushi, Ferrari Pier F.	4. 巻 409
2. 論文標題 Auditory-Motor Matching in Vocal Recognition and Imitative Learning	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 222 ~ 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2019.01.056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Iwamoto Masashi, Shibata Yukino, Kawasaki Junna, Kojima Shohei, Li Yung-Tsung, Iwami Shingo, Muramatsu Masamichi, Wu Hui-Lin, Wada Kazuhiro, Tomonaga Keizo, Watashi Koichi, Horie Masayuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Identification of novel avian and mammalian deltaviruses provides new insights into deltavirus evolution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virus Evolution	6. 最初と最後の頁 veab003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ve/veab003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Yu Ji, Miguel Sanchez-Valpuesta, Kazuhiro Wada
2. 発表標題 Regulation of repetitive syllable sequence by the excitatory and inhibitory balance in the basal ganglia song nucleus in songbirds
3. 学会等名 Society for Neuroscience meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hongdi Wang, Azusa Sawai
2. 発表標題 Transcriptional regulatory divergence underpinning species-specific learned vocalization in songbirds
3. 学会等名 Society for Neuroscience meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chinwake N. Asogwa, Kazuhiro Wada
2. 発表標題 Inter- and intra-specific differences of muscarinic acetylcholine receptor expression in the neural pathways for vocal learning in songbirds
3. 学会等名 Japan Songbird Workshop 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hongdi Wang, Kazuhiro Wada
2. 発表標題 Regulatory divergence of gene transcription for species-specific song production in songbirds
3. 学会等名 Japan Songbird Workshop 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和多和宏
2. 発表標題 鳴禽類ソングバードの歌学習個体差をつくる生得的学習バイアス
3. 学会等名 日本進化学会 第20回大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sanchez Miguel-Valpuesta, Yukino SHibata, Asogwa Chinweike Norman, and Kazuhiro Wada
2. 発表標題 Cell-type specific investigation of corticalstriatal premotor neurons in song learning
3. 学会等名 Society for Neuroscience meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和多和宏
2. 発表標題 鳴禽類ソングバードにおける自発的発声学習行動によって駆動される脳内遺伝子発現動態と神経回路成熟
3. 学会等名 日本解剖学会 第124回総会（招待講演）
4. 発表年 2019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			
韓国	Korea Brain Research Institute			
カナダ	McGill University			
サウジアラビア	King Abdullah University			
米国	Colgate University			