

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19509001

研究課題名（和文） 発声学習臨界期制御の脳内分子機序

研究課題名（英文） Molecular mechanism for critical period of vocal learning

研究代表者

和多 和宏 (WADA KAZUHIRO)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・准教授

研究者番号：70451408

研究成果の概要：

ヒト言語も鳴禽類の発声学習も、自らの声を出して、記憶した音声パターンに徐々に修正していく。音声発声学習において、発声という自発的行動が重要な意味をもつと考え、ソングバードの発声行動により誘導される遺伝子群の網羅的な同定を目指した。その結果、「発声行動依存的」+「神経回路特異的」+「学習臨期限定性」を兼ね備えた遺伝子群の同定に成功した。これら遺伝子群の発達段階・環境に即した脳内の多段階発現（時空間）制御が学習臨界期をもつ発声学習に重要な物質的基盤の一つであると考えている。

現在、これらの遺伝子群の脳内機能を検証すべく、レンチウイルス発現系を用いた異所的遺伝子発現実験を進めている。今後、音声発声学習および生成行動への影響を検証していく予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	330,000	3,730,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：学習臨界期、ソングバード、発声学習、発声行動、遺伝子発現、神経可塑性、動物行動、個体差

1. 研究開始当初の背景

昨今、言語学習に広い関心が向けられている。ヒトの場合、第一言語（母国語）は出生直後から聴覚性の学習が始まり、生後一年を過ぎて発声を開始するまでには母音弁別が

完成する (Kuhl & Meltzoff 1982)。その後数年間にわたって語彙は爆発的に増え、構文は速やかに複雑化していく。その学習には明確な臨界期が存在し、出生後に発声を聞く経験を剥奪された場合、著しい発達障害を示す。

これに対して、少年期以後の第二言語（外国語）習得はより長い時間を要し、その臨界期は思春期に至ると言われている（DeKeyser 2000）。第一言語と第二言語では、その学習機構はどのように異なっているだろうか。そもそも言語学習において、幼児と大人では何が違うのだろうか。

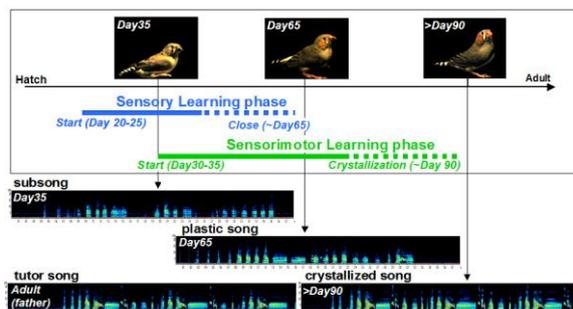
言語学習は人間の精神発達と社会適応にとって極めて重要な課題である。しかし、その言語学習における神経生物学的研究は多くの未解決問題を抱えている。研究推進を困難にしている最大の理由は、言うまでもなくヒトとその脳を対象にせざるを得ない為である。特に生体組織をサンプルする侵害性の研究が不可避な分子生物学的アプローチにとって、ヒトの言語を直接に研究することはほとんど不可能といってよい。他の認知脳科学上の課題であれば、マウスやサルなどの実験用哺乳類をモデル動物として用いることが可能であろう。しかしこれらの動物は、ヒトに近縁であっても生得的な発声行動しかない。つまり、言語学習のモデルとして利用することができないのである。

ソングバードの囀りはヒトの第一言語の学習と同様に、明確な臨界期をもつ感覚運動学習によって成立している（Konishi 1965）。学習臨界期の研究はこれまで、視覚・聴覚・体性感覚に着目した感覚学習にのみ関わるものが中心であった（Hubel & Wiese 1962, Hensch & Stryker 1996）。他方、感覚運動学習を根幹とする言語のような現象については、学習臨界期をめぐる研究がなされていない。これが言語の神経生物学的研究の推進を阻んできた第二の理由である。ヒトの言語学習の理解にとって、臨界期を備える感覚運動学習の理解が不可欠なのである。この点においても、ソングバード研究は大きな潜在性をもっている。

2. 研究の目的

上記の問題に対して本研究では、ヒト言語学習の比較動物モデルとして、鳴禽類の囀り学習を分子生物学的研究に応用する研究戦略をとった。本研究では特に、発声学習の臨界期制御に関わる分子基盤を明らかにしていくことを目的とした。

ヒトの言語習得とソングバードの囀り学習の間には、神経動物行動学的に高い共通性がある。共に感覚運動学習 (Sensorimotor Learning) を根幹とする発声学習によって成立している。他個体 (tutor) から音声パターンを聞き、その聞き取った音を、鋳型として脳内に記憶する。次に実際に声を出して、聴覚を介したフィードバックにより自分の音声を修正していく。これを繰り返すことによって、徐々に記憶した音声パターンへ近づいていくのである（した右上図）。



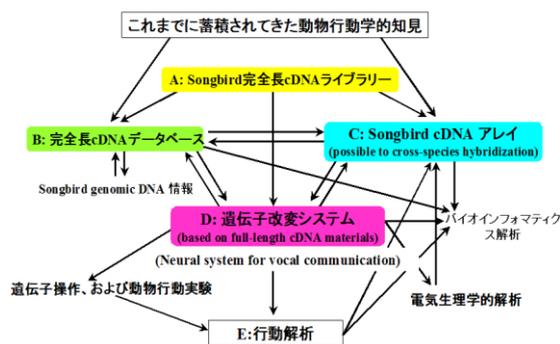
脳内には、ヒト言語野に相当する発声学習・生成に特化した神経回路が存在している (Nottebohm *et al.* 1976)。また、鳥類と哺乳類との間で、神経回路・遺伝子配列レベルで多くの相同性があることが、近年明らかになってきている (Chicken Genome Sequencing Consortium 2004)。特に、細胞レベルで見した場合、神経活動によって誘導される遺伝子発現の分子メカニズムは非常に似ていることを明らかにしてきた (Wada *et al.* 2004, 2006)。ソングバードを動物モデルとして得られた知見は、ヒトの言語習得における脳内分子基盤の理解へと還元できる。

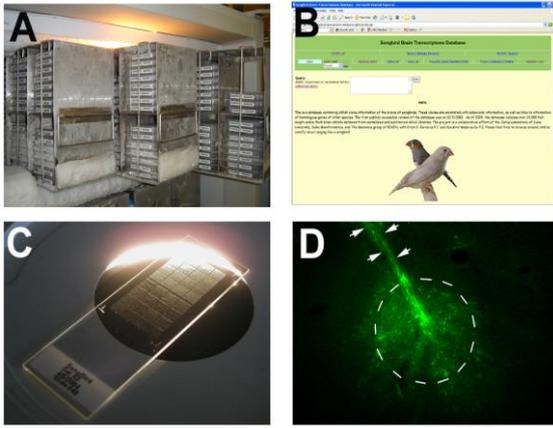
音声発声学習では「声を出す」という自発的行動が、脳内分子レベルにおいても重要な意味をもつと考え、ソングバードの発声行動により発現誘導される遺伝子群の網羅的な同定を目指した。特に、次の3点の多段階発現制御を受けている遺伝子群に着目した。つまり、感覚運動学習である発声学習が、自ら「声を出す」という能動的行為によって始めて成立する点 [(i)行動依存性]。発声学習に関わる脳内特異的神経回路において、形態的可塑性の変化を必要とする点 [(ii)神経回路特異性]。発声学習が、臨界期という個体発達において時期限定イベントである点 [(iii)学習臨界期間限定性] である。

また、本研究で同定される候補遺伝子群の発声学習への影響を実験的に検証すべく、ウイルス発現系による脳内遺伝子発現の改変を可能にする実験系の確立も目指した。

3. 研究の方法

これまでに、鳴禽類を分子生物学的研究にも十分耐えうるモデル動物に押し上げるための研究解析システム：“Songbird functional high-throughput analysis system”を構築してきた (Wada *et al.* 2006 下図)。本研究ではこの研究解析システムを最大限に利用した。





この研究システムは、完全長cDNAのマテリアル・情報を最大限に活用し、網羅的ハイブリット解析を可能とするものである。大きく4つのコンポーネントから成り立っている。(I) 鳴禽類のキンカチョウ(zebra finch)脳内に発現している遺伝子群を421万の独立クローンを包括するソングバード完全長cDNAライブラリー(上図A)。(II) 完全長cDNAシーケンス情報包括する完全長cDNAデータベースを通じた検索解析(<http://songbirdtranscriptome.net/>; 上図B)。これまで鳴禽類脳内で発現していると算定される遺伝子群の約30~40%をカバーするデータベースとなっている。(III) 遺伝子発現のハイブリット解析を目的として、Songbird18,000クローンをプリントしたソングバード完全長18K cDNAアレイの独自開発(上図C)。(IV) 動物行動への影響をみるため、ウイルス発現システムを利用した*in vivo* 遺伝子改変(上図D)である。

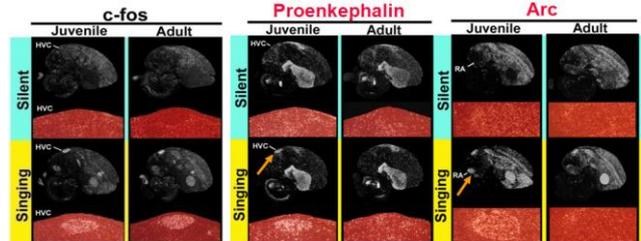
このソングバード完全長18K cDNAアレイを応用利用し、臨界期中と臨界期後の発声行動によって発現誘導効率が異なる遺伝子群の網羅的同定を行う。これを第一段階スクリーニングとする。その後、第二段階スクリーニングとして、脳内発現量を定性・定量的に選別するため*in-situ hybridization*法を併用、及びその発現パターンの時空間ダイナミクスを検証した。

上記の方法で裁定した遺伝子群の生体内における機能を検証するために、レンチウイルス発現系による遺伝子改変(遺伝子過剰発現、及び発現阻害)動物の作成を試みている。レンチウイルスは神経細胞への感染効率がよく、挿入遺伝子が感染細胞のゲノムDNAに組み込まれるために、長期にわたる発現が期待できる。

4. 研究成果

これまでに、本研究目的の一つとして挙げた、[発声行動依存性]+[神経回路特異性]+[学習臨界期間限定性]を兼ね備えた遺伝子群の同定に成功できた。Arc, proenkephalin,

Egr 遺伝子等がこのような多段階発現制御を受ける(下図)。これらの遺伝子群発声行動によって遺伝子発現が誘導されるが、発声学習臨界期中と後において、その発現誘導率が学習臨界期中に高く、学習臨界期後には低くなる。同じ発声行動によっても、どの時期にその行動を生成するかで脳内の遺伝子発現レベルが異なるのである。このような遺伝子群の発達段階・環境に即した多脳内段階発現(時空間)制御こそが出力行動の質を与える物質的基盤ではないかとする仮説を支持するものである。



上に示した学習臨界期中と後で見られた遺伝子発現の誘導率の違いが、発声学習の熟度に直接関係したかどうかを明らかにするため現在、学習臨界期間が延長される社会性隔離・聴覚除去・無声化条件の飼育した個体を用いて脳内発現量を定性・定量的な検証を行っている。

また、本研究目的の二つ目に挙げたレンチウイルス発現系に関しては、キンカチョウ脳で遺伝子導入の実績を積み上げてきた。これまでのところ安定した外部遺伝子発現が、1~3ヶ月の期間に及び、鳴禽類の学習臨界期を十分にカバーすることを確認している。現在、[発声行動依存性]+[神経回路特異性]+[学習臨界期間限定性]を兼ね備えた遺伝子群の脳内機能を検証すべく、異所的発現による音声発声学習および生成行動への影響を検証していく。

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4件)

1. Horita H, Wada K, & Jarvis ED
Early onset of deafening-induced song deterioration and differential requirements of the pallial-basal ganglia vocal pathway
European Journal of Neuroscience 28, 2519-2532. 2008 査読有
2. Feenders G, Liedvogel M, Rivas M, Zapka M, Horita H, Hara E, Wada K, Mouritsen H, & Jarvis ED
Molecular Mapping of Movement-Associated

Areas in the Avian Brain: A Motor Theory for
Vocal Learning Origin
PLoS ONE, 3:e1768. 2008 査読有

3. Liedvogel M., Feenders G., Wada K., Troje
NF., Jarvis ED., & Mouritsen H.
Lateralized activation of cluster N in the
brains of migratory songbirds.

European Journal of Neuroscience
25:1166-1173. 2007 査読有

4. 和多和宏
小鳥のさえずりと神経科学：言語発声の
分子基盤の理解に向けて
脳 **21** 10, 18-21. 2007 査読無

〔学会発表〕（計 7 件）

1. 和多和宏
「発声行動依存的に誘導される遺伝子発現ダイナミクス」
日本遺伝学会 年次大会
2008 年 9 月 4 日 名古屋

2. 今井礼夢, 和多和宏
小鳥の囀り学習における種特異的拘束
日本動物行動学会 年次大会
2008 年 9 月 24 日 金沢

3. 森千紘, 和多和宏
聴覚剥奪した小鳥の囀り発達変化
日本動物行動学会 年次大会
2008 年 9 月 25 日 金沢

4. Wada K.
「Systematic and high-throughput analysis
system for molecular neuroethological studies in
songbirds」
International Brain research Organization (IBRO)
satellite Meeting,
2007 年 7 月 21 日 Heron Island, Australia

5. 和多和宏
「ソングバードの囀りからヒトの音声コミュニケーション障害を理解する」
日本疾患モデル学会 年次大会
2007 年 9 月 1 日 筑波

6. 和多和宏
「Dynamic cascades of vocalizing-driven gene
regulation」
日本神経科学学会 年次大会
2007 年 9 月 12 日 横浜

6. 研究組織
(1) 研究代表者

和多 和宏 (WADA KAZUHIRO)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・准
教授
研究者番号 70451408

(2) 研究分担者
(なし)

(3) 連携研究者
(なし)