

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06751

研究課題名(和文)発声学習能における新たに同定したペプチド断片の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of novel neuropeptides in vocal learning ability

研究代表者

戸張 靖子 (Tobari, Yasuko)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：90453919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：鳴禽類キンカチョウはヒトと同様に発声学習能を示す。ヒトで言語能力や社会性との関連が推測される遺伝子Aのオルソログの複数のcDNAをキンカチョウ脳よりクローニングした。遺伝子AのmRNAは、キンカチョウの発声を制御する2つの大脳の神経核(HVCとRA)で発現が検出された。一方で、発声学習を制御する脳領域(LMAN)では、雌で発現レベルが高く雄では発現レベルが非常に低いという雌雄差がみられた。mRNA発現に発達変化はみられなかった。HVCとRAの組織から、遺伝子AのcDNAから推測された成熟ペプチドを検出した。今後、これらペプチドをHVCやRAに投与して発声への影響を解析する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子Aはタンパク質の一次構造から糖転移酵素として機能することが推測されていたが、限定切断されて短いペプチド断片としても機能するのではないかと予想された。キンカチョウはヒトと同様に発声学習能を持ち、学習により獲得された音声を制御するための特別な神経回路(歌制御核)が大脳に存在する。本研究では、このペプチドが歌制御核に存在すること、そのペプチドをコードするmRNAは歌い始める30日齢から歌が完成した後の120日齢まで一定して歌制御核で発現量が高いことが明らかになった。これらの結果は、学習性の発声の制御にこのペプチドの関与を示唆するものであり、言語野においてもこのペプチドが機能を持つかもしれない。

研究成果の概要(英文)：The zebra finch, a species of songbird, displays vocal learning abilities similar to humans. The cDNA of gene A, which is presumed to be associated with language and social skills in humans, was cloned from the brain of the zebra finch. We found that gene A mRNA were expressed in song nuclei which is responsible for producing the learned vocalizations (HVC and the robust nucleus of the arcopallium) and showed sexually dimorphic expression pattern in the song nucleus that controls vocal learning (Lateral magnocellular nucleus of the anterior nidopallium). Mature peptides deduced from the cDNA of gene A were detected in HVC and RA tissues by LC-MS/MS. These results suggest that the gene A product is involved in the control of learned vocalization.

研究分野：行動神経内分泌

キーワード：鳴禽類 神経ペプチド 歌制御系 発声学習 求愛歌

## 1. 研究開始当初の背景

発声学習能とは模倣を通して新しい音声パターンを学習し発声する能力であり、ヒトの言語獲得に必要な能力の1つである。ヒト以外で音声学習をおこなう動物は非常に少ない。哺乳類ではクジラ目とコウモリの一部、アフリカゾウ、鳥類では、オウム目、アマツバメ目ハチドリ類、そしてスズメ目鳴禽類において発声学習能が確認されている。

ウィリアムズ症候群(Williams-Beuren syndrome; WS)は、ヒトの7番染色体長腕の微細欠失症候群で神経発達障害である。WSを有する人は、知能低下が見られる一方で、言語・音楽能力は比較的高く、多弁であり、度を越した社交性(超社交性)を示す。WSの染色体欠失領域にコードされるWS関連遺伝子は、言語能力との関連が推測されているが、実証的なデータの報告はない。

申請者はWS関連遺伝子の一つであるA遺伝子のオルソログを、発声学習能を示す鳴禽類、キンカチョウの脳から部分的にクローニングし、脳内発現を解析した。その結果、ヒトの言語野に相当する、学習性の音声の発声に不可欠なキンカチョウの歌制御神経核、HVCとRAにおいて遺伝子Aの高発現を検出した。またA遺伝子産物から限定切断される2つのペプチドが予想できた。これらのデータは、A遺伝子やその遺伝子産物が学習性の音声の発声に関与している可能性を示していた。これらの背景から、A遺伝子がコードする2種類のペプチドが、キンカチョウの歌制御系に作用し、キンカチョウの歌学習や発声行動に変化を与えると仮説をたてた。

## 2. 研究の目的

発声学習過程中のキンカチョウにおいて歌制御系のA遺伝子やその遺伝子産物の発現変化を解析し、A遺伝子がコードすると考えられるペプチドの同定とペプチドを投与された個体の歌制御系の形態や歌の音響特性の変化を解析することで、発声学習や学習により獲得した発声におけるA遺伝子やその遺伝子産物の役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) キンカチョウ遺伝子AのcDNAを同定し、その配列をもとに作製したRNAプローブを用いて、*in situ* ハイブリダイゼーション法で遺伝子発現解析をおこなった。また、キンカチョウの歌発達段階をおって、歌制御系のA遺伝子の発現の定量化を行うことにより、A遺伝子発現が、歌学習時期特異的な発現なのか、または恒常的な発現なのかを明らかにした。キンカチョウの発声学習過程は、親の歌をひたすら聞いて覚える時期(感覚学習期: 孵化後20日から65日)までと、覚えた歌を自分で繰り返し歌って完成させる時期(感覚運動学習期: 孵化後35日から90日)の2つの学習過程を経て歌が完成する。感覚学習期、感覚運動学習期と学習完了期の脳でA遺伝子発現を比較解析した。

(2) 遺伝子Aは、イヌの家畜化に関連するとの報告もあったので、ジウシマツとその野生種のコシジロキンパラにおいてA遺伝子をクローニングし、*in situ* ハイブリダイゼーション法にてA遺伝子の脳内発現を解析した。

### (3) 歌制御系内のA遺伝子産物の成熟ペプチドの同定と局在解析

キンカチョウのA遺伝子のcDNAから推測されたアミノ酸配列から、A遺伝子産物が糖転移酵素として機能することが予測される一方で、複数のペプチド断片が翻訳後に切断されることも予測された。申請者は後者の予測に基づいて、マイクロパンチ法でキンカチョウの歌制御核HVCとRAから脳組織を採取し、A遺伝子がコードするペプチド断片をLC-MS/MSで単離を試みた。

(4) ウサギにペプチド断片の免疫を行い、ポリクローナル抗血清を作製し、ELISAを用いて力価と特異性を検査した。ペプチド断片の脳内分布からその機能を推測するために、その抗血清を用いてキンカチョウの灌流固定脳切片を対象に、免疫組織化学をおこなった。

## 4. 研究成果

(1) キンカチョウ遺伝子AのORFをクローニングしたところ、2つのバリエーションがみつかった。qPCRにて脳領域毎に発現を調べた。遺伝子AのmRNAは、大脳、間脳、中脳、小脳、延髄・橋のすべての領域に発現が確認されたが、その中でも小脳での発現が高く、間脳や中脳での発現が低かった。その2つのバリエーションの共通の配列をもとに作製したRNAプローブを用いて、*in situ* ハイブリダイゼーション法を行ったところ、HVCやRAでmRNAの発現が検出された。また、キンカチョウの歌発達段階をおって、歌制御系のA遺伝子の発現の定量化を行った。A遺伝子の発現は、歌学習開始時期から歌の額数完了時期に一貫して、HVCやRAに発現していた。

(2) ジュウシマツとその野生種のコシジロキンパラにおいて A 遺伝子をクローニングしたところ ORF の配列に違いはなかった。また *in situ* ハイブリダイゼーション法にて A 遺伝子の脳内発現を解析したところ、分布パターンも発現量には違いは見られなかった。

(3) 歌制御系内の A 遺伝子産物の成熟ペプチドの同定と局在解析

キンカチョウの A 遺伝子の cDNA から推測されたアミノ酸配列から、A 遺伝子産物が糖転移酵素として機能することが予測される一方で、複数のペプチド断片が翻訳後に切断されることも予測された。申請者は後者の予測に基づいて、mRNA の発現が高かった HVC と RA からマイクロパンチ法で脳組織を採取し、A 遺伝子がコードするペプチド断片を LC-MSMS で単離し、その一次構造を決定した。その結果、実際に YPGLKVVRNQ と PYNNNIGFYT の 2 種類のペプチド断片が成熟ペプチドとして HVC と RA 内に存在するというデータを得た。

(4) ウサギにペプチド断片の免疫を行い、ポリクローナル抗血清を作製した。YPGLKVVRNQ に対する抗血清を ELISA を用いて力価と特異性を検査した。その抗血清を用いてキンカチョウの灌流固定脳切片を対象に、免疫組織化学をおこなったところ、特異的なシグナルが検出できなかった。引き続き、PYNNNIGFYT に対する抗血清を用いた実験を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 M Nakai, J Ito, A Suyama, A Kageyama, Y Tobar, N Kashiwazaki	4. 巻 91
2. 論文標題 Phospholipase C (PLC ) versus postacrosomal sheath WW domain binding protein (PAWP): Which molecule will survive as a sperm factor?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13345	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 Tobar Y, Tsuitusi K	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of social information on the release and expression of gonadotropin-inhibitory hormone in birds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2019.00243	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 Tobar Yasuko, Theofanopoulou Constantina, Mori Chihiro, Sato Yoshimi, Marutani Momoka, Fujioka Sayaka, Konno Norifumi, Suzuki Kenta, Furutani Akari, Hakataya Shiomi, Yao Cheng Te, Yang En Yun, Tsai Chia Ren, Tang Pin Chi, Chen Chih Feng, Boeckx Cedric, Jarvis Erich D., Okanoya Kazuo	4. 巻 21
2. 論文標題 Oxytocin variation and brain region specific gene expression in a domesticated avian species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes, Brain and Behavior	6. 最初と最後の頁 e12780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gbb.12780	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 Tobar Yasuko, Aleksandrova Yana, Fukahori Yoko, Tsutsui Kazuyoshi, Meddle Simone L.	4. 巻 64
2. 論文標題 Gonadotropin-inhibitory hormone as a regulator of social interactions in vertebrates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 100954 ~ 100954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yfrne.2021.100954	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 Tobari Yasuko, Masuzawa Ami, Harada Norika, Suzuki Kenta, Meddle Simone L.	4. 巻 414
2. 論文標題 Noradrenergic alpha-2A receptor activation suppresses courtship vocalization in male Japanese quail	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 113513 ~ 113513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2021.113513	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 戸張靖子、吉岡絵里、本果菜穂
2. 発表標題 拘束ストレスによる26RFa遺伝子の脳内発現変化
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸張靖子、森千紘、岡ノ谷一夫
2. 発表標題 ジュウシマツの野生原種と家禽種間でのメソトシン神経系の比較
3. 学会等名 第44回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 濱崎堇、増澤杏実、戸張靖子
2. 発表標題 雄ウズラの求愛発声頻度と時間構造にノルアドレナリンが与える影響
3. 学会等名 動物学会関東支部第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸張靖子, 佐藤芳美, 丸谷桃花, 藤岡明香, 神作宜男, 鈴木研太, 岡ノ谷一夫
2. 発表標題 鳴禽類の野生原種と家禽種におけるメソトシンmRNA発現細胞の脳内分布
3. 学会等名 第90回日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増澤杏実, 原田倫圭, 戸張靖子
2. 発表標題 2A アドレナリン受容体を介する雄ウズラの 求愛発声抑制のメカニズム
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 草野玲奈, 戸張靖子
2. 発表標題 野生および家禽ジュウシマツにおける受容体遺伝子 X 群の脳内発現比較
3. 学会等名 日本動物学会関東支部第72回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸張靖子, 増澤杏実, 原田倫圭
2. 発表標題 中脳発声中枢におけるノルアドレナリン 2A受容体系による雄ウズラの求愛発声の制御
3. 学会等名 第45回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸張靖子, 増澤杏実, 原田倫圭
2. 発表標題 ノルアドレナリン 2A受容体の活性化による雄ウズラの求愛発声の抑制
3. 学会等名 日本動物学会第92回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 H Eda-Fujiwara, Y Tobar i	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 424
3. 書名 Neuroendocrine Regulation of Animal Vocalization-Courtship vocalizations in nonsongbirds: Auditory and neuroendocrine mechanisms in intersexual communication	

1. 著者名 戸張靖子 分担執筆	4. 発行年 2019年
2. 出版社 朝倉出版	5. 総ページ数 464
3. 書名 生き物と音の事典	

〔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
---------	---------