

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21681024

研究課題名（和文）行動の進化を探る：種特異的発声行動の分子基盤の抽出と検証

研究課題名（英文）Molecular Neuroethological Approach for Understanding Species-Specific Learned Vocal Patterns

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、「行動の進化」を中心課題に据え、種特異的行動発現に関わる分子基盤の抽出とその神経分子機能としての行動表現型への影響を実験的に検証することを目的とした。そのために、鳴禽類ソングバードの囀り行動とその発声パターンを生成する脳内神経回路に焦点を据えた研究を行い、(1) アジア圏に生息するソングバード 10 種の分子系統樹作成及び、その発声パターンの種特異的表現型抽出、(2) 新規発声パターン解析法の確立、(3) ソングバード DNA アレイによるソングシステムにおける種特異的脳内発現を示す遺伝子群の抽出、(4) ウイルス発現系による外来遺伝子の発現方法の確立を施行した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we tried to elucidate molecular basis for evolution of behavior, especially in species-specific learned vocal patterns in songbirds. For the purpose, we focused on the relationship of genes which had species-specific regulation in song system and species-specific song patterns. So far, we performed to construct a molecular phylogenetic tree and extract species-specific song features with a novel song analysis method. Furthermore, we succeeded to elucidate genes which had which had species-specific expression patterns and levels in song system among 10 Asian songbird species using DNA microarray. Now, we are trying to adult adeno-associate virus expression system into songbird brain to over- or down- regulation of genes which are regulated with species-specific manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4800000	1440000	6240000
2010 年度	4300000	1290000	5590000
2011 年度	4200000	1260000	5460000
2012 年度	0	0	0
2013 年度	0	0	0
総計	13300000	3990000	17290000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：音声発声学習・ソングバード・遺伝子発現・神経伝達物質受容体

1. 研究開始当初の背景  
動物行動は、個体が出す動的な生体情報

として、生命現象を理解する上で欠かせない  
研究対象である。また、行動形成は形態形

成と並び、自然界における生物多様性をつくる大きな要因でもある。「動物がもつ種特異的行動はどのように進化し、生成されているのか？」この「行動の進化」を巡る問いは1960年代より確立された Ethology(動物行動学)の中心命題の一つでもある。

動物行動学研究の初期から注目されてきた動物たちとその行動(例えば、ハイロガンと刷り込み行動など)は、生物多様性・種特異性・生得的行動プログラムを考える上で示唆に富むものであった。しかし、動物行動の生成原理を十分に解明してきたとは言えない。これは遺伝・ゲノム情報の決定的な欠落、および *in vivo* 遺伝子改変技術の不備により、記述的な研究に終始せざるを得なかったためである。また逆に、従来から実験動物・分子生物学モデル動物として扱われてきた動物種は遺伝子・ゲノム情報、遺伝子改変技術が整備されている一方で、考察できる動物行動様式は、モデル動物が表出することができる範囲に限らざるを得ない。生物が生成する多様な行動様式の理解は、細胞生物学で力を発揮してきたモデル動物の研究だけでは限界にきている。事実、本研究提案で対象とする「学習によって獲得される発声行動(Learned vocalization)」は、非常に限られた動物(4種の哺乳類、ヒト・クジラ類・コウモリ類・ゾウ類と3種の鳥類、オウム目・ハチドリ目・スズメ目鳴禽類ソングバード)のみで確認されている。チンパンジーやアカゲザルでさえも、その発声行動は生得的な発声に頼っており学習によって獲得していないことが明らかにされている。その一方で、世界中に3000種以上存在するといわれるソングバードが種特異的な多様な発声パターンをもった行動を生成・進化させている。

我々は、これまでに、種特異的発声パターンをもつソングバード6種で、神経興奮・可塑性制御に関わる遺伝子群が脳内のソングシステムを構成する神経核内で種特異的な発現パターンを保持していることを明らかにしてきた。これはソングバード各種で、同じソングシステムをもっているにもかかわらず、その回路を構成する分子群が種特異的な発現パターンに保持されるように制御されていることを示している。つまり、行動を司る神経回路上で異なる動物種間で異なる遺伝子発現パターンをもっていることを示す結果を蓄積してきた。

## 2. 研究の目的

各々の動物種がもつ種特異的行動が進化の過程でどのような分子基盤を背景に形成されてきたのか?本研究では、種特異的行動発現に関わる分子基盤の抽出と実験によるゲノムレベルと行動レベルの両面からの検証を行うことを目的とした。

研究戦略として、鳴禽類ソングバードの轉(さえず)り行動とその発声パターンを生成する脳内神経回路にフォーカスした。ソングバードの轉り行動は、轉り学習・生成に特化した神経回路(ソングシステム)によって可能となる[図1A]。この神経回路はソングバードの全ての種で保存されている。しかし、そこから生成される轉り行動は、種特異的な発声パターン(時系列構造、発声持続時間、音素数など)をもっている。同じようにワイヤーリングしているように見える神経回路から種特異的な発声行動として異なるアウトプットが可能なのである[図1B]。ゲノム上の遺伝情報による遺伝子発現機序が種特異的な神経回路の性質を決めていると考えられる。この種特異的な行動表現型とそれを可能としている神経分子基盤の機能との進化を実験的に検証することを目指した。

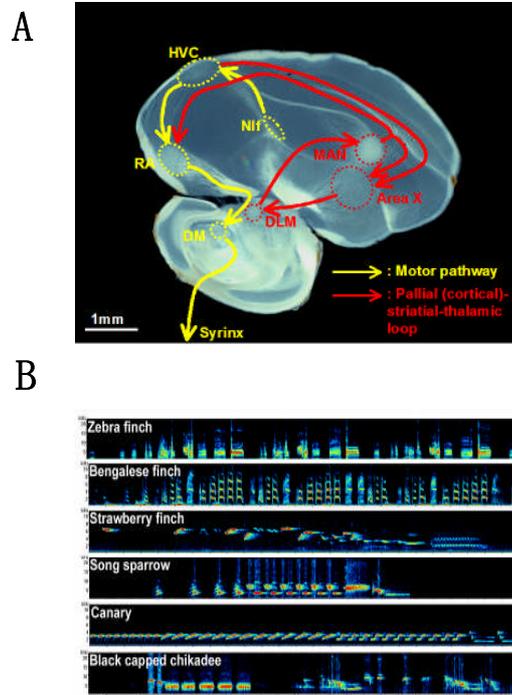


図 1B 鳴禽類のソングシステムとそこから生成される種特異的発声パターン

## 3. 研究の方法

本研究では、種特異的行動発現に関わる分子基盤の抽出と実験によるゲノムレベルと行動レベルの両面からの検証を行うために、以下の5つのステップに沿った研究を進めた。

- (1) ソングバード種間の分子系統樹の作成
- (2) 各個体からの発声パターンの収集・解析による轉りの種特異的行動表現型の抽出
- (3) 独自に開発してきた完全長 cDNA アレイ及び Oligo アレイを用いた脳内遺伝子発現の網羅的ハイスループット解析および実際の脳内発現レベルの検証

- (4) 囀りの種特異的行動表現型と神経核内遺伝子発現レベルとの相関関係を基にした候補遺伝子群の抽出
- (5) ウイルス発現系を用いた脳内遺伝子改変に伴う発声行動への影響を検証

4. 研究成果

(1) ソングバード種間の分子系統樹の作成  
 アジア・オセアニア圏に生息し、かつ日本で入手が可能な 10 種のソングバードを対象とした。分子系統樹の作成には、ミトコンドリア DNA のチトクローム b や Hackett *et al.* (Science 320, 1763-7 2008) で採用された遺伝子群を用いた[図 2]。

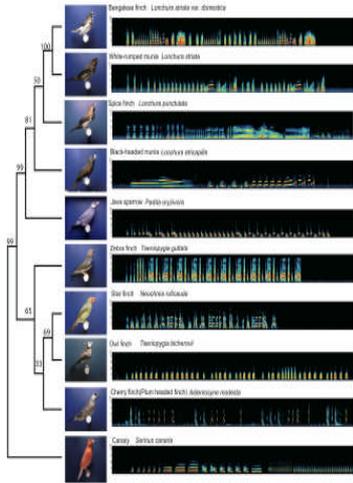


図 2 : 10 種のソングバードの典型的な発声パターンと系統樹

(2) 各個体からの発声パターンの収集解析による囀りの種特異的表現型の抽出。  
 音素 (Syllable) 表現型群と時系列配列 (Sequence) 表現型群の 2 つのパラメータグループを設定し、種特異的な発声行動表現型を抽出した。この際に新規音声パターン解析法として Syllable Similarity Matrix (SSM) 法を確立し、任意の動物種[図 3A]・発達過程[図 3B]での生成音声パターンを視覚化・数値化することを可能とした。

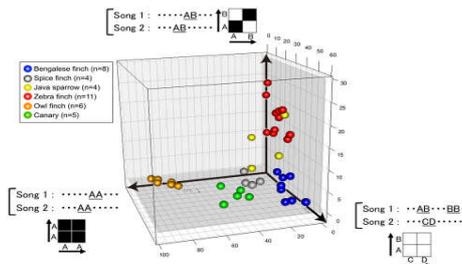


図 3A: SSM 法により、6 種のソングバードの種特異的発声パターンを数値化・分類したグラフ

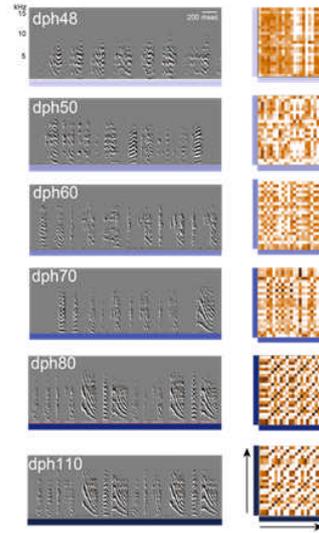


図 3B : SSM 法により、キンカチョウの囀り発達パターンの変化を視覚化したもの

(3) 脳内ソングシステムにおける種特異的遺伝子発現を示す遺伝子群の網羅的ハイスループット解析のための DNA アレイの利用。

これにより特に神経伝達・修飾物質受容体群 (グルタミン酸受容体・セロトニン受容体・ドーパミン受容体等) が脳内神経核特異的かつ動物種特異的な発現レベルの調節制御が行われていることが明らかになってきた[図 4]。

現在、更にその発現レベルと種特異的発声行動表現型との相関関係を検証する解析を進めている。

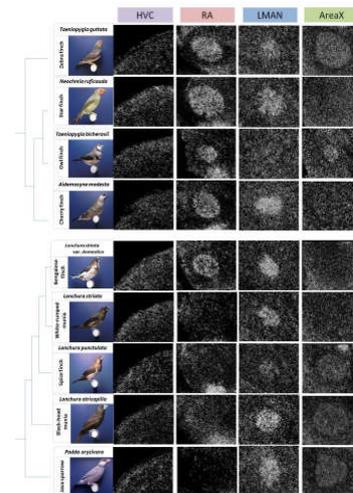


図 4: ソングシステムで種特異的遺伝子発現を示す遺伝子群

(4) ウイルス発現系を用いた脳内遺伝子改変に伴う発声行動への影響を検証  
 これまでに種々のウイルスタイプとプロモーターの組み合わせによるソングバード脳内での発現率・細胞タイプの検証を行ってきた。この結果、アデノ随伴ウイルスを用いることによってソングバード脳内の神経細胞に動物種に関わらず選択的に遺伝子導入することが可能であることを明らかにすることができた[図 5]。現在、上記の種差をもつグルタミン酸受容体をこのウイルス発現系により過剰発現させ発声学習・発声パターンへの影響を検証している。

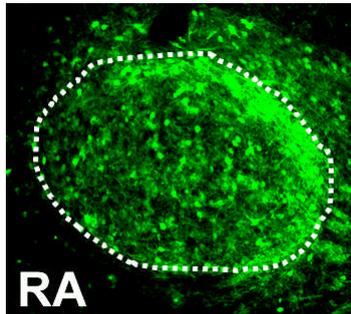


図 5: アデノ随伴ウイルスによるソングシステム内の RA 神経核での GFP 遺伝子発現

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Chen C, Wada K, Jarvis, ED.  
 Radioactive *in situ* Hybridization for Detecting Diverse Gene Expression Patterns in Tissue. *Journal of Visualized Experiments* 査読有 Vol. 62, 2012, e3764.
- ② 森千紘, 和多和宏  
 ヒト以外の動物にことばはあるか: ヒトの言語とソングバードの囀り  
 JOHNS 査読無 Vol. 27, 2011, 1161-1168
- ③ 堀田悠人, 和多和宏  
 聴覚入力による音声パターン学習・維持の神経機構: 学習で獲得された発声パターンはいかに維持されるか?  
 実験医学 査読無 Vol.29,2011,544-550
- ④ Kubikova L, Wada K, Jarvis ED.  
 Dopamine receptors in a songbird brain.  
*Journal of Comparative Neurology* 査読有 2010, Vol.518:741-69
- ⑤ Horita H, Wada K, Rivas MV, Hara E, Jarvis

ED.

The *dusp1* Immediate Early Gene is Regulated by Natural Stimuli Predominantly in Sensory Input Neurons  
*Journal of Comparative Neurology* 査読有 2010, Vol.518, 2873-2901

- ⑥ 今井礼夢, 森千紘, 和多和宏  
 ソングバードの囀りを制御する神経回路・遺伝子  
*生物の科学 遺伝* 査読無 2010, Vol.64:40-47
- ⑦ Liu WC, Wada K, Nottebohm F.  
 Variable food begging calls are harbingers of vocal learning.  
*PLoS ONE*. 査読有 2009 Vol.16, e5929.

[学会発表] (計 20 件)

- ① 小林雅比古・今井礼夢・森千紘・Wan-chun Liu・和多和宏、発声行動依存的に誘導されるエピジェネティックな脳内遺伝子発現調節が音声発声学習の臨界期制御に関与する、日本エピジェネティクス研究会、2011年5月19日、熊本 KKR ホテル熊本
- ② 森千紘・和多和宏、聴覚入力阻害による囀りパターン固定化への影響、日本動物心理学会・日本動物行動学会・応用動物行動学会・日本家畜管理学会合同大会、2011年9月8日、東京 慶應義塾大学三田キャンパス
- ③ 森千紘・和多和宏、小鳥の囀り学習過程における種特異的な囀りパターンの発達変化、日本神経科学会 第34回大会、2011年9月16日、横浜 パシフィコ横浜
- ④ 今井礼夢・和多和宏、小鳥の囀り学習過程における種特異的な囀りパターンの発達変化、日本神経科学会 第34回大会、2011年9月16日、横浜 パシフィコ横浜
- ⑤ 和多和宏、発声学習臨界期における多段階発現制御機構とエピジェネティクス動態、日本動物学会 第82回大会、2011年9月21日、旭川 大雪クリスタルホール
- ⑥ 森千紘・和多和宏、小鳥のさえざりパターンにおける種特異的拘束、日本動物学会 第82回大会、2011年9月21日、旭川 大雪クリスタルホール
- ⑦ 生田麻実・森千紘・和多和宏、ホルモン投与による囀り行動の制御とその囀り発達への影、日本動物学会 第82回大会、2011年9月21日、旭川 大雪クリスタル

ホール

- ⑧ 大串恵理・和多和宏、囀り学習臨界期中の囀り頻度は囀り日内発達に影響を与える、日本動物学会 第82回大会、2011年9月21日、旭川大雪クリスタルホール
- ⑨ 和多和宏、神経行動科学から考える「生まれと育ち」、ASCON、2011年11月3日、諏訪市 かたくら諏訪湖ホテル
- ⑩ Mori C, Liu W-C, Wada K、Deafening before critical period of vocal learning causes delayed stabilization of vocal patter, Society for Neuroscience、2011年11月12日、Washington DC Convention Center、USA
- ⑪ Imai R, Wada K、Restricted learning of heterospecific song in zebra finch, Society for Neuroscience、2011年11月12日、Washington DC Convention Center、USA
- ⑫ Kobayashi M, Imai R, Mori C, Ohgushi E, Horita H, Liu W-C, Wada K、Epigenetic gene expression dynamics induced by singing regulate a critical period of vocal learning, Society for Neuroscience、2011年11月12日、Washington DC Convention Center、USA
- ⑬ 小林雅比古・和多和宏、発声行動依存的に誘導されるエピジェネティクス関連遺伝子ヒストン H3.3 の学習臨界期間における脳内発現変化、日本エピジェネティクス研究会、2010年5月29日、鳥取米子市文化ホール
- ⑭ Horita H, Kobayashi M, Jarvis E, Oka K, Wada K、Specialized motor-driven *dusp1* expression in song nuclei of vocal learning birds, Society for Neuroscience、2010年11月15日、San Diego Convention Center ,USA
- ⑮ Mori C, Wada K、Deafening before critical period for vocal learning affects gene expression pattern in song nuclei of songbird, Society for Neuroscience、2010年11月15日、San Diego Convention Center ,USA
- ⑯ Imai R, Ohgushui E, Wada K、Differential expression pattern of singing induced Egr family through sensorimotor period of song learning, Society for Neuroscience、2010年11月15日、San Diego Convention Center ,USA

- ⑰ 和多和宏、神経行動科学から考える「生まれと育ち」、脳と心のメカニズム (第11回冬のワークショップ)、2011年1月12日、留寿都 ルフツリゾートホテル
- ⑱ 森千紘・和多和宏、Auditory deprivation affects gene expression in vocal related pathway in songbird、日本分子生物学会、2009年12月11日、横浜 パシフィコ横浜
- ⑲ 今井礼夢・和多和宏、Multiple regulation of Egr family expression for vocal learning in songbird、日本分子生物学会、2009年12月11日、横浜 パシフィコ横浜
- ⑳ 堀田悠人・Jarvis ED・岡浩太郎・和多和宏、Immediate Early Gene *dusp1* is Regulated by Natural Behavior in the Primary Sensory Areas and Vocal Areas of Birds、日本分子生物学会、2009年12月11日、横浜 パシフィコ横浜

〔図書〕 (計1件)

- ① 小出剛・山元大輔編著、行動遺伝学入門：動物とヒトの“こころ”の科学、裳華房、2011)、81-94

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.wada-lab.org/>

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

なし

(3) 連携研究者

なし