

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640002

研究課題名(和文) マウス音声コミュニケーションの神経生物学的基盤の解析

研究課題名(英文) Analysis on the neural basis for vocal communication in the mouse

研究代表者

大隅 典子 (Osumi, Noriko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00220343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：齧歯類の生後期にみられる超音波発声(USV)は、母子間のコミュニケーションツールであると考えられている。本研究では、父親マウスの加齢により仔マウスUSVが減少すること、Pax6変異により、父加齢の影響が前倒しに生じること、この影響はゲノムレベルの変異というよりも、エピゲノム変異であることを見出した。また、Pax6の発現が雄性生殖細胞系列において認められ、精子形成過程においてダイナミックな局在変化が認められることを明らかにした。さらに、加齢やPax6変異により、雄性生殖細胞系列である精母細胞や精子において特異的なヒストン修飾の変化が生じる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Ultrasonic vocalization (USV) is a tool for communication between mother and pups in rodents. We found in mice that paternal aging induced decrease in USV of offspring and a mutation in Pax6 gene accelerates this phenomenon. The decrease of USV in F1 generation was canceled if F2 generation is obtained from young F1 father, suggesting the phenomena is epigenetic rather than genetic. We also revealed specific expression of Pax6 in the male germ line cells with dynamic localization patterns during spermatogenesis. In addition, we observed differential changes in histone methylation profiles in spermatocytes and sperm derived from aged or Pax6 mutant testes. Our findings imply that epigenetic changes may underly transgenerational influence on behavior of the offspring.

研究分野：神経科学

キーワード：超音波発声 Pax6 加齢 精母細胞 精子 エピゲノム ヒストン修飾

## 1. 研究開始当初の背景

音声コミュニケーションは、人間の言葉だけでなく、クジラや鳴禽などの動物でも行われることが知られている。近年、齧歯類でも超音波音域の音声コミュニケーション (ultrasonic vocalization; USV) があることがわかるようになり、とくに遺伝子改変マウスは自閉症患者における音声コミュニケーション障害のモデルとしても着目されつつある。

申請者らは長年、脳の発生の鍵因子としてもっとも精力的に研究されている転写制御因子 Pax6 の機能解析を行ってきたが、自閉症等の発達障害への関与に興味を持つに至った。PAX6 遺伝子はもともと WAGR (Wilms tumor, Aniridia, Genital ridge defects, mental Retardation) 症候群という発達障害患者で欠損している染色体 11p12-p14 領域の探索から、無虹彩症の原因遺伝子 AN2 として同定が進んだものである。同時期にマウスでは小眼症 (*Small eye*; *Sey*) の責任遺伝子が探索され、Pax6 遺伝子がクローニングされた。Pax6 は、大脳皮質、海馬、扁桃体、嗅球、視床、小脳の形成に関わり、脳幹および脊髄の体性運動神経細胞を誘導する (総説 Osumi et al., Stem Cells, 2008 参照)。

これまでに申請者は吉川 (BSI) らと共同で自閉症 DNA サンプルの再シーケンスを行い、自閉症患者に特異的な新しいミスセンス変異を PAX6 遺伝子内に見出した (Maekawa et al., Neurosci Lett, 2009)。また、自然発症 Pax6 変異ラットを用い行動解析を行い、このラットが社会性の異常 (攻撃性の増加、引きこもり傾向)、興味の減少、恐怖条件付け記憶の低下、感覚運動ゲート機構を示すプレパルス抑制 (PPI) の低下に加え、幼若ラットが母ラットから隔離されるときに発する USV の低下を認めた (Umeda et al., PLoS ONE, 2010)。

一方、Pax6 は転写制御因子として他の遺伝子の発現制御に関わることから、申請者は Pax6 標的因子の網羅的探索も行って来た (Arai et al., J Neurosci, 2005; Numayama-Tsuruta et al., BMC Dev Biol, 2010; Kikkawa et al., in prep)。その結果、Pax6 の下流因子として、Nlg3 や Ube3a 等、上記の自閉症関連因子が多数存在することを見出したが、さらに興味深いことに、2011年7月の報告では、言語機能に関係することが知られる Foxp2 も Pax6 によって発現が制御される因子として浮かび上がってきた (Coutinho et al., Genome Res, 2011)。FOXP2 は元々、言語機能に異常のある KE ファミリーという大家系の解析から見出された遺伝子であり、鳴禽の歌学習に関わることが知られ、Foxp2 の遺伝子改変マウスでは USV の異常がある。

そこで、Pax6 の変異に着目することにより、音声コミュニケーションを成立させるための遺伝的プログラムの一端が明らかになることが期待されると考えられた。

## 2. 研究の目的

言語は人間らしさを特徴付けるものであり、動物の音声コミュニケーションはヒトの発話の神経基盤を理解する上で有益なモデルといえる。申請者は、神経発生に重要な転写制御因子 Pax6 の機能が失われたラットにおいて、USV の異常を見出しており、小脳や脳幹部における Pax6 の発現領域から、Pax6 が関わる神経生物学的基盤が USV の成立に関わる可能性が考えられた。そこで、本研究では、Pax6 の変異によりマウスでも USV の異常を呈するかどうかを確認し、USV の異常をもたらす神経生物学的基盤を (2) 形態学的ならびに (3) 生理学的に明らかにすることを当初の目的とした

## 3. 研究の方法

(1) 音声コミュニケーションの指標として、母子分離により生後1週間程度の間齧歯類が発する USV の測定を行った。具体的には、3ヶ月齢、6-8ヶ月齢、12ヶ月齢以上の野生型および自然発症 Pax6 変異雄マウスと、3ヶ月齢の野生型雌マウスを交配し、得られた仔マウスが生後6日目に、母子分離を行い、発する USV を USV 測定装置により自動的に計測し、5分間の USV 数を測定した。

(2) 野生型マウス精巣における Pax6 の発現について、免疫染色を用いて解析し、ImageJ を用いてデジタル定量を行った。精母細胞のマーカーである p63 を指標にして精子形成の各段階の Pax6 局在変化を解析するとともに、XY body のマーカーである H2A との共同在の様態変化も定量的に解析した。

(3) エピゲノム変化の解析のために、各種ヒストンメチル化抗体を用いて精巣の免疫染色を行い、精母細胞のマーカーである p63 を指標にして ImageJ を用いてデジタル定量を行った。さらに精子については Western blot 法を用いて定量解析を行った。

## 4. 研究成果

当初の計画では、Pax6 の発現領域を元にして、領域特異的 Pax6 ノックアウトマウスを作製し、USV の神経生物学的基盤の解明を目的としたが、Pax6 の変異は USV の減少に十分ではなく、父親マウスの高齢化による仔マウスの USV の減少に対して相加的に影響するという興味深い現象を見出した (図1)。若齢 (3ヶ月齢) の Pax6 変異の雄マウスから得られた Pax6 変異マウスは、野生型マウスと同程度の USV を示したが、中等齢 (6-8ヶ月齢) の Pax6 変異の雄マウスから得られた Pax6 変異マウスは、同腹の野生型マウスと比較して有意に USV の減少を示した。興味深いことに、高齢の野生型の雄マウス (12ヶ月齢以上) と

*Pax6* 変異の雌マウス (3ヶ月齢) を交配して得られた *Pax6* 変異マウスは、野生型マウスと同程度の USV を示した。このことから、転写制御因子 *Pax6* は父親マウスの加齢に伴う変化を修飾することにより、仔マウスの USV に影響を及ぼすことが示唆された。

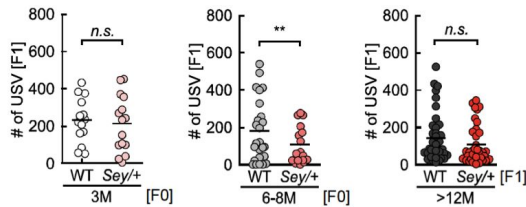


図 1

次に、このような F1 世代に継承される父加齢の影響が F2 世代にも引き継がれるかどうか、F1 の雄が若齢 (3ヶ月) の時点で若齢の雌と交配して得られた F2 世代仔マウスの USV を測定したところ、野生型の高齢父 F0 マウスに由来する場合でも、*Pax6* 変異の中等齢マウスに由来する場合でも、F2 世代では USV 数の減少が認められなかった。このことは、父加齢による仔マウスの USV 数の減少が、ゲノム変異というよりもエピゲノム変異によって生じている可能性を示唆する。

なぜ、*Pax6* 変異と父加齢が相加的效果をもたらすのかについて検討するため、*Pax6* の精巣における発現を調べたところ、*Pax6* は精粗細胞および精母細胞において発現し、核内において精子形成の段階に沿ってダイナミックに変化していることがわかった (図 2)。さらに興味深いことに、*Pax6* の局在はステージ V-VIII において XY-body にとくに集積して認められた。この知見は国際誌 *Journal of Anatomy* に発表した (雑誌論文)。

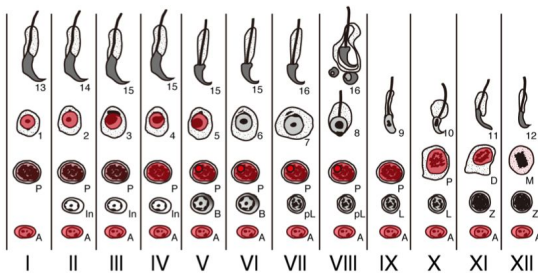


図 2

さらに、転写制御因子である *Pax6* の下流分子に *Jmj* ファミリー等のヒストン脱メチル化酵素が存在するという知見をもとに、精母細胞における主要なヒストンのメチル化修飾について免疫染色を施した組織切片を用いてデジタル定量解析を行った。その結果、野生型精巣ならびに *Pax6* 変異精巣において共通して上昇が認められるヒストンメチル化修飾を明らかにした。この上昇は、精子においても認められた。今後、精母細胞の定量に関して内在コントロールを取ることに

より、より厳密な解析を行うとともに、精子における特異的なヒストンメチル化の上昇についての再現性を確かめることが必要と考えられるが、この精子におけるヒストン修飾は仔マウス群の USV 数と良い相関性を示したため、次世代の行動の特質に関わりうる予測マーカーとして特許出願を行った (特願 2014-233823: 予測マーカー)。

今後、次世代に継承されるエピゲノムのメカニズムを明らかにするためには、どのような遺伝子がこのヒストン修飾の標的となっているのか、ChIP-seq 解析等により追求することが必要である。

本研究を遂行する間に画期的な成果が得られたため、当初の計画の方向とはやや異なる方向に進展した。その結果、*Pax6* 変異という遺伝的要因と父親の加齢という環境要因の相互作用による次世代の行動への影響というパラダイムに関して、ヒストン修飾というエピゲノムのメカニズムが関わることを世界で初めて明らかにすることができた。

## 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 4 件)

Kimura R, Yoshizaki K, Osumi N: Dynamic expression patterns of *Pax6* during spermatogenesis in the mouse. *J Anat*, in press, 2015, 査読有

Suzuki J, Sakurai K, Yamazaki M, Abe N, Inada H, Sakimura K, Katori Y, Osumi N: Horizontal basal cell-specific deletion of *Pax6* impedes recovery of the olfactory neuroepithelium following severe injury. *Stem Cells Dev*, in press, 2015, 査読有

Osumi N, Guo N, Matsumata M, Yoshizaki K: Neurogenesis and sensorimotor gating: bridging a microphenotype and an endophenotype. *Curr Mol Med*, 15, 129-137, 2015, 査読有

Guo N, Yoshizaki K, Kimura R, Suto F, Yanagawa Y, Osumi N: A sensitive period for GABAergic interneurons in the dentate gyrus in modulating sensorimotor gating. *J Neurosci*, 33(15), 6691-6704, 2013, 査読有

[学会発表] (計 17 件)

木村龍一、吉崎嘉一、小池航平、稲田仁、大隅典子: 次世代の発達に影響を及ぼす雄性生殖細胞系列のエピゲノム変異. 第4回東北脳科学ウィンタースクール. 2015年2月21日. 遠刈田・宮城蔵王ロイヤルホテル.

Kimura R, Yoshizaki K, Koike K, Valter T, Inada H, Osumi N: *Pax6*

haploinsufficiency affects maternal separation-induced ultrasonic vocalization by advanced paternal age in the offspring. Neuroscience 2015, 2014年11月19日. Washington DC (米国).

Osumi N: Brain development and mental diseases: genetic and epigenetic mechanisms. NIH-Japan-JSPS Symposium (招待講演), 2014年10月23日 Bethesda (米国).

Koike K, Kimura R, Yoshizaki K, Inada H, Valter T, Osumi N: Paternal aging affected penetrance of USV deficit in Pax6 mutant mouse pups. NIH-Japan-JSPS Symposium, 2014年10月23日. Bethesda (米国).

大隅典子、木村龍一、吉崎嘉二、稲田仁: 次世代継承エピゲノムメカニズムに基づく発達障害の動物モデル. 第37回日本神経科学大会(招待講演)2014年9月13日. 横浜・パシフィコ横浜.

木村龍一、吉崎嘉二、小池航平、稲田仁、大隅典子: 父親の Pax6 変異は加齢による仔の音声コミュニケーション障害の影響を早期に生じさせる. 第37回日本神経科学大会. 2014年9月12日. 横浜・パシフィコ横浜.

大隅典子: 次世代継承エピゲノム現象と先天異常. 第54回日本先天異常学会学術集会(招待講演). 2014年7月26日. 相模原・麻布大学.

木村龍一、吉崎嘉二、稲田仁、大隅典子: 父親の高齢化がマウスの自閉症様行動に及ぼす影響の解析. 第3回東北脳科学ウィンタースクール. 2014年2月15日. 大崎・鳴子温泉幸雲閣.

岡田将平、大隅典子、勝山裕: 一次体性感覚野と一次運動野の境界付近における分子発現の違いによる領域分け. 第3回東北脳科学ウィンタースクール. 2014年2月15日. 大崎・鳴子温泉幸雲閣.

大隅典子: 脳のカタチと働きから心は分子でどこまで理解できるか. 第36回日本分子生物学会年会(招待講演). 2013年12月6日. 神戸・神戸国際会議場.

吉崎嘉二、木村龍一、稲田仁、大隅典子: Pax6 欠損は父親の高齢化による自閉症様行動の発症を促進させる. 第36回日本分子生物学会年会. 2013年12月5日. 神戸・神戸国際会議場.

Yoshizaki K, Kimura R, Inada H, Osumi N: Paternal aging decreases pup's mother calls in the mouse with acceleration by Pax6 haploinsufficiency: insight on genetic and epigenetic influence. The Networked Brain: SfN Satellite Meeting. 2013年11月7日~8日. San Diego (米国).

Osumi N: Advantages to model biological traits in animals to

understand mechanisms of psychiatric diseases. 日独六大学コンソーシアムシンポジウム(招待講演)2013年9月13日. Gottingen (ドイツ).

Osumi N: Endophenotypes and microendophenotypes: Bridging animal models to psychiatric diseases. 11<sup>th</sup> World Congress of Biological Psychiatry (招待講演). 2013年6月27日. 京都・国立京都国際会館.

Yoshizaki K, Wakita H, Osumi N: Influence of chronic subcortical ischemia on anhedonia-like behavior in mice. 11<sup>th</sup> World Congress of Biological Psychiatry. 2013年6月24日. 京都・国立京都国際会館.

吉崎嘉二、木村龍一、大隅典子: Pax6 modulates predisposition of autism by advanced paternal age in mouse. 第36回日本神経科学大会. 2013年6月22日. 京都・国立京都国際会館.

Kimura R, Yoshizaki K, Sugiyama T, Suzuki J, Nakamura R, Osumi N: Pax6 のヘテロ変異がマウス超音波発声に及ぼす影響. 第36回日本神経科学大会. 2013年6月22日. 京都・国立京都国際会館.

大隅典子: 心の病の神経発達仮説. 東京都医学総合研究所セミナー(招待講演). 2013年4月19日. 世田谷・東京都医学総合研究所

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 予測マーカー

発明者: 大隅典子 吉崎嘉一

権利者: 大隅典子 吉崎嘉一

種類: 特許

番号: 特願 2014-233823

出願年月日: 2014年11月18日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

マウスの超音波発声に対する遺伝および環境要因の相互作用

<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2013/0>

[6/press20130619-03.html](http://6/press20130619-03.html)

関連記事が科学新聞 2013 年 6 月 21 日 1 面に掲載

高校への出前授業や市民向けの講演の中にも研究成果を多数盛り込んだ。

「脳のカタチと働き～心は分子でどこまで理解できるか」:

<https://www.youtube.com/watch?v=PuW6zBkVbrM>

東北大学サイエンスカフェ第 84 回: ことばが生まれる! ~ 神経生物学から起源を探る ~

<https://www.youtube.com/watch?v=kYi9npJkXB0>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大隅 典子 (OSUMI, Noriko)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 00220343

### (2) 研究分担者

稲田 仁 (INADA, Hitoshi)  
東北大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 60419893

### (3) 研究分担者

吉崎 嘉一 (YOSHIZAKI, Kaichi)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 50393161