

学 位 論 文 題 名

Studies on the differential expression of motor-driven *duspl* in avian neural pathways for learned vocalization

（鳥類の発声学習・生成に関わる神経回路における最初期遺伝子 *duspl* の
特異的発現に関する研究）

学位論文内容の要旨

本研究では、発声学習・生成に関わる脳領野の進化と機能について実験的検証を行い、考察することを目的とした。第一・第二章においては、分子レベルでの領野の進化について、第三章にて行動レベルでの領野の機能について論じる。

発声学習(Vocal learning)は、聴覚情報の入力、発声動作の出力、聴覚フィードバックによる発声動作の調節により成立する複雑な行動形質である。現在調べられている限りでは、ヒト、イルカ・クジラ類、コウモリ類、ゾウ類の哺乳類 4 系統、鳴禽類(ソングバード類)、オウム類、ハミングバード類の鳥類 3 系統のみがこの行動形質をもつ。この発声学習能の獲得は収斂進化によるものであると考えられている。このような発声学習をする動物種は、終脳に発声パターンの学習・生成に関わる複数の領野をもつ。特に発声学習能をもつ鳥類 3 系統において、発声学習能は進化上独立して獲得されたにも関わらず、その神経基盤である終脳領野 song nuclei には解剖学的位置・投射・機能に多くの共通性が存在する。Song nuclei は、その周辺の脳領野から分化して発声学習・生成に特化した機能をもつに至ったと考えられている。本研究では、song nuclei に特異的な発現制御を受ける遺伝子の発現パターンを解析することで、発声学習能の収斂進化の分子基盤に関して新たな知見が得られると考えた。発声によって発現量が上がる遺伝子探索の結果、学習された音声パターンの発声(singing)によって song nuclei 特異的に発現誘導される最初期遺伝子 *dual specificity phosphatase1* (*duspl*)が発見された。本研究では *Duspl* の脳内発現パターンを詳細に調べ、発声学習・生成の脳内神経基盤である song nuclei 中の細胞群に特異的発現される遺伝子の機能とその発現制御の進化について考察した。また、発声学習後の発声パターン維持における song nuclei の役割についてあわせて考察した。

第一章では、*duspl* の発現誘導が発声学習能をもつ鳥類種に特異的なものなのかを明らかにするために、種を超えて保存される終脳領野である感覚野（視覚・聴覚・体性感覚野）に着目した。その結果、発声学習能をもつソングバード類 zebra finch（キンカチョウ）の一次感覚野、及び一次感覚野に神経投射をもつ視床・脳幹の部位において、各々の感覚刺激による *duspl* 発現誘導が観察された。発声学習能をもつ別系統種であるオウム類 budgerigar（セキセイインコ）、発声学習能をもたない種である ring dove（ジュズカケバト）においても同様の結果が観察されたことから、一次感覚野における *duspl* の発現誘導は、鳥類で保存されていることが示唆された。また、哺乳類マウスにおいても、大脳皮質の入力層である第 IV 層、及び視床の第 IV 層に投射をもつ部位において *duspl* が発現誘導されていた。これらの結果から、感覚野における *duspl* 発現が、鳥類だけでなく、哺乳類でも共通の遺伝子発現形質であることが考えられる。これらの結果は、次章で検討する song nuclei 特異的な *duspl* 発現制御が鳥類に限定されるものでなく、ヒトを含めた哺乳類の、発声学習・生成を可能とする神経回路にも共通するメカニズムである可能性を示唆する。

第二章では、発声学習・生成を可能とする神経回路の収斂進化に関わる分子基盤に関して検討するために、発声行動によって誘導される *duspl* の発現パターンを詳細に調べた。最初にソングバード類 zebra finch において、singing によって全ての song nuclei 特異的に *duspl* が発現誘導される

ことを示した。このような脳内発現パターンをもつ遺伝子の存在を明らかにしたのは本研究が初めてである。さらに、発声学習中の個体群、及び聴覚フィードバックを阻害した個体群においても song nuclei での *dup1* の発現量に差がないことから、*dup1* は発声パターンの学習・維持に関与していないこと、*dup1* の発現誘導は発声パターンの知覚によるものではなく発声という運動に依存するものであることを明らかにした。ソングバードと進化系統樹上独立して発声学習能を獲得したと考えられている2系統、オウム類 budgerigar, ハミングバード類 sombre hummingbird (ウスグロハチドリ) においても同様に、singing による song nuclei 特異的な *dup1* の発現パターンが観察された。これに対して、発声学習能をもたない近縁種の生得的な発声によっては *dup1* の発現誘導は起こらなかった。これらの結果から、進化上独立した系統でありながら、発声学習能をもつ動物種のみ共通して song nuclei 特異的な *dup1* 発現制御がおこなわれていることが明らかになった。この *dup1* の song nuclei 部位特異的な発現制御に関わる配列を探索するため、発声学習能をもつ10種、それをもたない7種のゲノム上の *dup1* 遺伝子上流の配列を調べた。結果、開始コドン近傍の転写因子の結合部位が存在する配列では、発声学習能の有無によらず、鳥類種間で大きな違いが見られず、種を超えて共通した活動依存的な転写因子結合配列がみられた。これに対して、開始コドン上流 0.5~1.5kb のゲノム領域で、発声学習能をもつ種であるソングバードやオウムには、その近縁の発声学習能をもたない種である suboscine (亜鳴禽類) には存在しない 2-50 塩基の繰り返し配列が数多く挿入されていることが明らかになった。この配列の相違が、実際に *dup1* の song nuclei 特異的な発現制御に必要な十分であるかを実験的に証明する必要があるが、発声学習能をもつ種の song nuclei 特異的な *dup1* 発現に寄与している可能性が考えられる。

第三章では、発声学習後の発声パターン維持における song nuclei の役割に着目し、第二章で用いた聴覚除去した鳥の発声パターン変化を詳細に解析した。聴覚除去した鳥は聴覚フィードバック喪失によって学習された発声パターンの維持ができなくなり、発声パターンが経時変化することが知られている。この変化は「音素の音響構造変化」と「音素の時系列配列変化」の2つに大別される。これまでは前者に関して注目した研究が多く、その変化は、大脳皮質(外套)－基底核－視床の外側ループからの出力の有無に大きく依存することが知られていた。実際に、外側ループを構成する song nuclei である Lateral Magnocellular nucleus of the Anterior Nidopallium (LMAN) を破壊することで、聴覚除去による「音素の音響構造の変化」が起こらなくなることが明らかになっている。本研究では新たに、後者の「音素の時系列配列変化」が LMAN 損傷による外側ループの遮断の影響を受けないことを示した。さらに、大脳皮質(外套)－基底核－視床の内側ループから運動制御系への出力にあたる Medial MAN (MMAN) を破壊し、内側ループを遮断しても、「音素の時系列配列変化」に影響はないことを示した。これらの結果から、音素の時系列配列は、外側の大脳皮質(外套)－基底核－視床ループに依存する「音素の音響構造変化」と異なり、内側・外側のループ以外の神経回路により制御されていることが示唆された。

以上、本研究では *dup1* の感覚刺激依存的な一次感覚野での発現誘導は広く他の種でもみられること、それに対して発声による *dup1* の発現誘導は発声学習能をもつ鳥類種の song nuclei に特異的であることを明らかにした。Song nuclei では、神経細胞の活動レベルが発声行動生成時のみならず自発発火レベルでも他の領域よりも著しく高く、それに伴う過剰な活動依存的遺伝子発現を抑える機構をもつことが細胞死を防ぐために重要と思われる。*Dup1* は Ca^{2+} の細胞内流入や過剰なグルタミン酸受容などの細胞ストレスに反応し、mitogen-activated protein kinase (MAPK) を介してその下流の転写因子や apoptosis 誘導遺伝子などの発現を抑えることが知られている。発声学習能の進化には、song nuclei での高レベルの神経活動を可能にするために、song nuclei 特異的な遺伝子発現調節機構を制御する *dup1* のような遺伝子が重要であると考えられる。また同時に、song nuclei の機能、特に発声学習後の発声パターンの変化時における大脳皮質(外套)－基底核－視床ループの役割について新たな知見を得た。

学位論文審査の要旨

主査	准教授	和多和宏
副査	教授	松島俊也
副査	教授	水波誠
副査	教授	岡浩太郎(慶應義塾大学大学院理工学研究科)

学位論文題名

Studies on the differential expression of motor-driven duspl in avian neural pathways for learned vocalization

(鳥類の発声学習・生成に関わる神経回路における最初期遺伝子dusplの

特異的発現に関する研究)

本研究では、発声学習・生成に関わる脳領野の進化と機能について実験的検証を行い、考察することが目的とされた。発声学習(Vocal learning)は、聴覚情報の入力、発声動作の出力、聴覚フィードバックによる発声動作の調節により成立する複雑な行動形質である。現在調べられている限りでは、ヒト、イルカ・クジラ類、コウモリ類、ゾウ類の哺乳類4系統、鳴禽類(ソングバード類)、オウム類、ハミングバード類の鳥類3系統のみがこの行動形質をもつ。この発声学習能の獲得は収斂進化によるものであると考えられている。このような発声学習をする動物種は、終脳に発声パターンの学習・生成に関わる複数の領野をもつ。特に発声学習能をもつ鳥類3系統において、発声学習能は進化上独立して獲得されたにも関わらず、その神経基盤である終脳領野 song nuclei には解剖学的位置・投射・機能に多くの共通性が存在する。Song nuclei は、その周辺の脳領野から分化して発声学習・生成に特化した機能をもつに至ったと考えられている。本研究では、song nuclei に特異的な発現制御を受ける遺伝子の発現パターンを解析することで、発声学習能の収斂進化の分子基盤に関して新たな知見が得られると考えの下、発声によって発現量が上がる遺伝子探索の結果、学習された音声パターンの発声(singing)によって song nuclei 特異的に発現誘導される最初期遺伝子 dual specificity phosphatase1 (duspl) を発見した。本研究では Duspl の脳内発現パターンを詳細に調べ、発声学習・生成の脳内神経基盤である song nuclei 中の細胞群に特異的発現される遺伝子の機能とその発現制御の進化について考察し、

また、発声学習後の発声パターン維持における song nuclei の役割についてあわせて考察した。

第一章では、*dusp1* の発現誘導が発声学習能をもつ鳥類種に特異的なものなのかを明らかにするために、種を超えて保存される終脳領野である感覚野（視覚・聴覚・体性感覚野）に着目した。その結果、発声学習能をもつソングバード類 zebra finch（キンカチョウ）、オウム類 budgerigar（セキセイインコ）、発声学習能をもたない種である ring dove（ジュズカケバト）の一次感覚野、及び一次感覚野に神経投射をもつ視床・脳幹の部位において、各々の感覚刺激による *dusp1* 発現誘導が観察された。また、哺乳類マウスにおいても、大脳皮質の入力層である第 IV 層、及び視床の第 IV 層に投射をもつ部位において *dusp1* が発現誘導されていた。これらの結果から、感覚野における *dusp1* 発現が、鳥類だけでなく、哺乳類でも共通の遺伝子発現形質であることが考えられる。次に、第二章において、発声学習・生成を可能とする神経回路の収斂進化に関わる分子基盤に関して検討するために、発声行動によって誘導される *dusp1* の発現パターンを詳細に調べた。最初にソングバード類 zebra finch において、singing によって全ての song nuclei 特異的に *dusp1* が発現誘導されることを示した。このような脳内発現パターンをもつ遺伝子の存在を明らかにしたのは本研究が初めてである。ソングバードと進化系統樹上独立して発声学習能を獲得したと考えられている 2 系統、オウム類 budgerigar、ハミングバード類 sombre hummingbird（ウスグロハチドリ）においても同様に、singing による song nuclei 特異的な *dusp1* の発現パターンが観察された。これに対して、発声学習能をもたない近縁種の生得的な発声によっては *dusp1* の発現誘導は起こらなかった。これらの結果から、進化上独立した系統でありながら、発声学習能をもつ動物種のみにも共通して song nuclei 特異的な *dusp1* 発現制御がおこなわれていることが明らかになった。この *dusp1* の song nuclei 部位特異的な発現制御に関わる配列を探索するため、発声学習能をもつ 10 種、それをもたない 7 種のゲノム上の *dusp1* 遺伝子上流の配列を調べた。結果、開始コドン近傍の転写因子の結合部位が存在する配列では、発声学習能の有無によらず、鳥類種間で大きな違いが見られず、種を超えて共通した活動依存的な転写因子結合配列がみられた。これに対して、開始コドン上流 0.5~1.5kb のゲノム領域で、発声学習能をもつ種であるソングバードやオウムには、その近縁の発声学習能をもたない種である suboscine（亜鳴禽類）には存在しない 2-50 塩基の繰り返し配列が数多く挿入されていることが明らかになった。この配列の相違が、実際に *dusp1* の song nuclei 特異的な発現制御に必要十分であるかを実験的に証明する必要があるが、発声学習能をもつ種の song nuclei 特異的な *dusp1* 発現に寄与している可能性が考えられる。第三章では、発声学習後の発声パターン維持における song nuclei の役割に着目し、第二章で用いた聴覚除去した鳥の発声パターン変化を詳細に解析した。聴覚除去した鳥は聴覚フィードバック喪失によって学習された発声パターンの維持ができなくなり、発声パターンが経時変化することが知られている。この変化は「音素の音響構造変化」と「音素の時系列配列変化」の 2 つに大別される。これまでは前者に関して注目した研究が多く、その変化は、大脳皮質(外套)－基底核－視床の外側ループからの出力の有無に大きく依存することが知られていた。実際に、外側ループを構成する song nuclei である Lateral Magnocellular nucleus of the Anterior Nidopallium (LMAN) を破壊することで、聴覚除去による「音素の音響構造の変化」が起こらなくなることが明らかになっている。本研究では新たに、後者の「音素の時系列配列変化」が LMAN 損傷による外側ループの遮断の影響を受けないことを示した。さらに、大脳皮質(外套)－基底核－視床の内側ループから運動制御系への出力にあたる Medial MAN (MMAN) を破壊し、内側ループを遮断しても、「音素の時系列配列変化」に影響はないことを示した。これらの結果から、音素の時系列配列は、外側の大脳皮質(外套)－基底核－視床ループに依存する「音素の音響構造変化」と異なり、内側・外側のループ以外の神経回路により制御されていることが示唆された。

本研究から得られた知見は、発声学習・生成回路での遺伝子発現調節機構の制御機構の解明、及び、それら回路の機能、特に、大脳皮質(外套)－基底核－視床ループの機能の解明に大きく貢献するものである。

よって、著者は北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。