

ソングバードの囀りを制御する 神経回路・遺伝子

今井 礼夢 *Raimu Imai*

北海道大学 大学院生命科学院 博士課程

森 千紘 *Chihiro Mori*

北海道大学 大学院生命科学院 博士課程

和多 和宏 *Kazuhiro Wada*

北海道大学 大学院理学研究院 生物科学部門
生命機能学 准教授

ソングバードの^{さえずり}囀りは学習によって獲得される。その神経基盤であるソングシステムの発見以降、ソングバード研究は神経科学分野において飛躍的な進展を遂げてきた。これまでの神経生理学・分子生物学的研究によって、発声学習・生成に直結した神経回路の特性、その回路上で多段階発現制御を受ける多様な遺伝子群の存在が明らかにされてきた。これらソングバード研究の過去・現在を概説すると同時に、今後の行動遺伝学におけるソングバード研究の可能性を論じたい。

1 はじめに

——実験動物としてのソングバードとその特徴

「なぜソングバードを用いて研究しているのか」と学会でポスター発表しているとき、この問いからいつも説明を始める。ソングバードは、線虫、ショウジョウバエ、マウス等の他の実験動物のように遺伝学的手法が確立している動物ではない。「ソングバードでなければできない研究で、かつ重要な研究、そしてそれが、自分(たち)でなければできない研究がそこにあると信じているから」と言えばカッコがよいが……。もし、他の実験動物で、よりシンプルに・早く・エレガントに同じような研究ができるなら、August Kroghの言葉を借りるまでもなく、「問題解決に最も適した動物」を使って研究するだろう。

では、何が「ソングバードでなければできない研究」なのか。それは、ソングバードが音声発声学習(vocal learning)*をできる動物であるということにある。ゆえに、それに関係する研究が、ソングバードを介して展開できる。そもそも、他者が発する音声を記憶し、それを実際に自ら学習し生成するという、音声発声学習能をもつ動物種は、現在報告されているかぎりでは、哺乳類(コウモリ類、鯨・イルカ類、ゾウ類、ヒト)、鳥類(オウム・インコ類、ハチドリ類、^{めいさん}鳴禽類ソングバード)中の7つの動物群に限られる。この中で、研究室で飼育・繁殖できる動物は、鳴禽類ソングバードしかない。マウス、ラット、サルのような従来から利用されている実験動物では、生得的な発声しかできない。そのため、音声発声学習の研究はソングバードでなければ

できない研究分野なのである。さらに、ヒトの言語獲得、ソングバードの囀り学習を含む音声発声学習は、感覚運動学習を根幹として成立する。そして、個体発達過程において、効率良く学習できる期間、つまり学習臨界(適応)期をもっている。このような「学習臨界期をもつ感覚運動学習」研究は、空間認知学習や恐怖条件付けのような連合

【音声発声学習(vocal learning)】

他個体が発する音声パターンを聞き、それを記憶し、自ら発声することで同じ音声パターンを獲得していく学習。イヌが飼い主から「オスワリ」、「お手」を聞き分けるのは、音声認識識別学習であり、音声発声学習ではない(もし彼らが、「ワン」の代わりに「オスワリ」と発すれば音声発声学習ができるといえるが)。基本的にはどのような音声パターンでも発声学習ができるものではなく、何を、どのように学ぶかは、動物種特異的な制御(制限)を受けている。

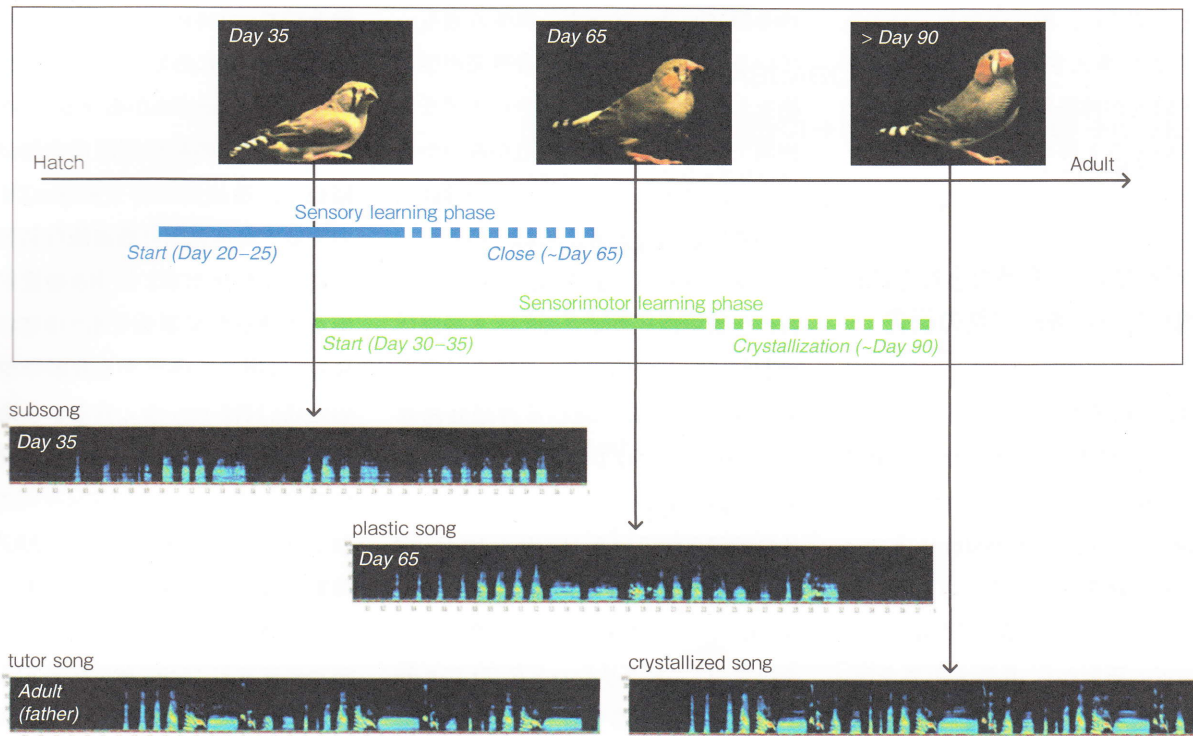


図1 ソングバードの発声学習とその学習臨界期

学習などの従来の記憶・学習研究の中でもユニークな領域になりつつある。

ソングバードは世界中に約3,500種存在し、鳥類の約半分の種を占める。その脳内には、音声発声学習と生成のために特化した神経回路（ソングシステム[後述]）を共通してもつ。しかし、そこから出力される囀りパターン、発声パターンは動物種ごとに異なる。種特異的な発声パターンをもちながら、同時に同種内では個体識別に用いられるために、一羽としてまったく同じ囀り方をする個体はいない。また、幼鳥期の一定期間にのみ学習しそれ以降囀りパターンを変えない種〔zebra finch（キンカチョウ）など〕や、毎年新しい囀りを学習する種〔canary（カナリア）など〕が存在するなど、囀り学習様式・戦略も種によって異なっている。

本稿では、このようなソングバード

がもつ「行動の共通原理と多様性」に着目し、特に囀り学習・生成に関わる神経回路・遺伝子群におけるこれまでに蓄積されてきた知見を、筆者らの研究も含め紹介していきたい。

2 ソングバードにおける囀りの研究の歴史

ソングバードの囀りの近代的な研究は、1950年代にThorpeが周波数分析器を使って野鳥の囀りを科学的に分析したことに始まる¹⁾。それまでは耳で聴くだけであった囀りの音声を、周波数と時間のグラフで視覚化することが可能となったことにより大きく前進した(図1)。それ以降、1960年代には、Marler・小西らによって、隔離実験や聴覚除去実験が行われ、ソングバー

ドの囀りが学習によって獲得されることが明らかにされた²⁾³⁾。さらに、1976年にNottebohmらにより、囀りパターン生成（発声運動制御）に関わる運動系神経回路（posterior vocal pathway）と1984年にBottjerらにより、囀りパターン学習に関わる学習系神経回路（anterior vocal pathway）が明らかにされた⁴⁾⁵⁾。多くのケースで複雑な行動に携わる脳回路は、顕微鏡下でも他の組織から分別することが難しいが、ソングシステムは例外で、容易に判別できる(図2)。神経核の連結によって構築され、脳内における神経核の位置・投射関係はソングバードの種が異なっても共通に保存されている。

2010年には、ソングバード研究で広く扱われているzebra finchの全ゲノム情報が解読された⁶⁾。この50年間で、囀り学習・行動に直結する神経回路の

発見を皮切りに、神経生理学・分子生物学手法が導入され、一挙にソングバード研究が神経科学の舞台に送り出されていくことになる。

3 ソングバードで進められている 囀りを司る神経回路の研究

鳥類と哺乳類ともに、大脳外套 (pallium), 線条体 (striatum), 淡蒼球 (pallidum), 視床 (thalamus), 中脳 (midbrain), 小脳 (cerebellum) といった中枢神経構造をもつ。さらに、神経コネクションおよび遺伝子発現パターンの最近の研究から、鳥類大脳外套は、哺乳類の大脳皮質のような層構造に対応したセグメント化された構造をもっていると考えられている⁷⁾。

これに加えて、ソングバードは囀り行動に特化した神経核によって構成さ

れる神経回路、ソングシステムをもっている (図2)。同様に、音声発声学習能をもつインコ・オウムやハチドリの間でも類似した脳内構造がみつかり、進化上独立にこれらの神経回路が獲得されたと考えられている⁸⁾。

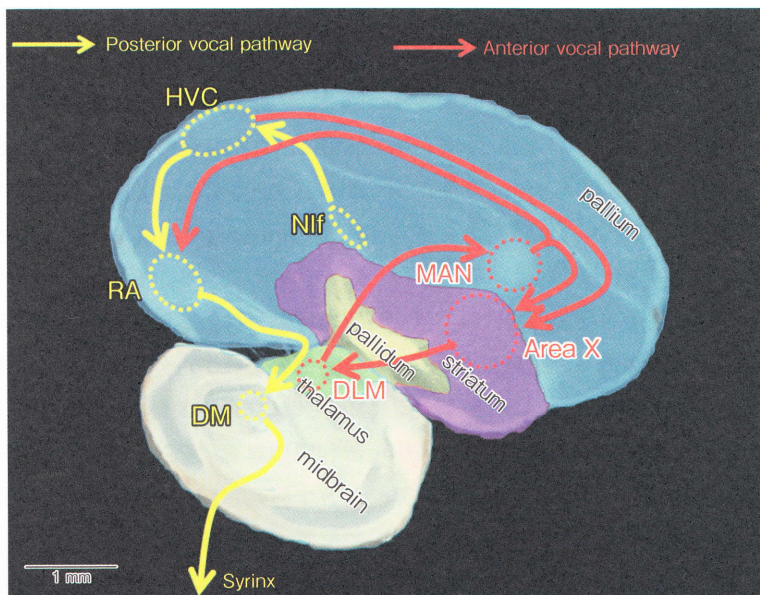
ソングバードの脳内構造は逆行・順行性色素染色や電気生理による神経活動記録によって同定されてきた。音声発声学習・生成に関わる神経回路は posterior vocal pathway, anterior vocal pathway, auditory pathway の3つが知られている (図2)。Auditory pathway (聴覚回路) は, vocal-non learner, つまり音声発声学習ができない鳥類 (ニワトリやハトなど) にも共通にみられる回路であるが, posterior vocal pathway と anterior vocal pathway は音声発声学習能をもつソングバードに特異的に存在する。

Posterior vocal pathwayは別名「運

動系回路 (motor pathway)」ともいわれ、大脳外套にある主に3つの神経核、Nif → HVC → RAからなる (図2の黄色部分)。この神経回路は中脳DMを経由し、最終的に舌下神経nXIIに出力する。発声運動の直接的な制御に関わり、Nif → HVC → RAの投射順に異なる機能的階層性をもつ。つまり、RAでは囀りを構成する音素一つ一つの生成、HVCは一つの音素から別の音素への偏移、そしてNifはさらに高次の音素集合 (チャンク) の偏移制御に関与していると考えられている (図3A)⁹⁾¹⁰⁾。たとえば、[ABCABCDEABCDE] という発声パターンを囀るソングバードがいたとすると、ABC/ABC/DE/ABC/DEと規則性のある音素集合「チャンク」生成とその偏移制御に関わっているのがNif、A → B、B → C、C → A、C → D、D → Eの「→」に関わっているのがHVC、そしてそれぞれの音素A、B、C、D、Eの生成に関わっているのがRAと考えられている (図3A)。

Anterior vocal pathwayは大脳外套前部にある神経核MAN、基底核にあるArea Xと視床下部内のDLMによってループ回路が構成されている (図2の赤色部分)。上述の運動系回路との間には、HVCからArea Xへの投射ニューロンを介した入力、LMAN (外側MAN) からRAへの出力、MMAN (内側MAN) からHVCへの出力が存在する。Anterior vocal pathwayは、哺乳類の皮質-基底核-視床下部ループに相当する。

実際、ソングバードにおいて、anterior vocal pathwayは囀り学習に関わり、囀り学習期にArea XとLMANのどちらかを破壊すると鋳型 (template) とする発声パターンに近づけることができない⁵⁾¹¹⁾。音声発声学習障害が起こる



HVC = (a letter-based name), RA = robust nucleus of the arcopallium, Nif = interfacial nucleus of the nidopallium, MAN = magnocellular nucleus of anterior nidopallium, DM = dorsal medial nucleus of the midbrain, DLM = medial nucleus of dorsolateral thalamus, Area X = Area X of the striatum.

図2 ソングシステム

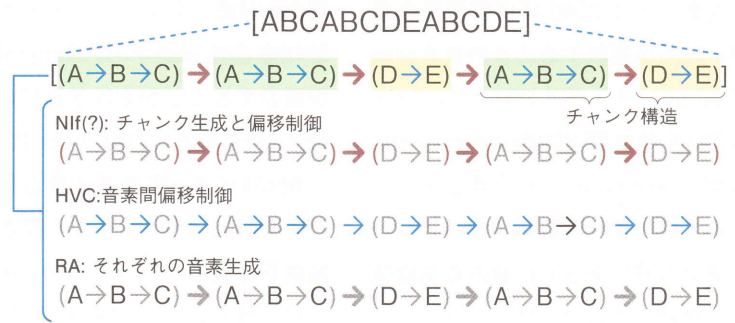
のである。さらに、この回路は毎回の発声行動が起こる前から活動を開始し、運動系回路 posterior vocal pathway へと神経情報を送る。また、学習時にはこの anterior vocal pathway 回路は運動系回路に対して、単にランダムな揺らぎを与えることで最終的に鋳型とする音声パターンに近づかせるような非効率的な方法をとるのではないことがわかってきた。最近の研究からは、anterior vocal pathway は、記憶した鋳型の音声パターンと実際の音声出力との誤差を減少させるバイアスを加えた探索 (vocal exploration) を運動系回路に与え、記憶した鋳型音声パターンに合致させていく目的指向性学習 (goal-directed learning) の実質的な実行因子として音声発声学習に寄与していることが明らかにされてきた (図3B)¹²⁾。

ただ、以上のように記述すると、いかにも囀りを司る神経回路のメカニズムが明らかになっているように思われるかもしれないが、実際はさらに複雑な制御がなされており、非常にシンプルにした説明であることを明記しておきたい。日夜、多くの研究者がこの音声の時系列構造の生成・学習メカニズムの理解に神経生理学・数理モデル等の手法を導入し、研究を進めているのが現状である。

4 ソングバードの囀りとそれに関わる遺伝子

これまで述べてきたソングシステム (それを構成する細胞群) でどのような遺伝子発現制御が行われ、囀り生成とその学習に関与しているのだろうか？

(A) Posterior vocal pathway (運動系回路)



(B) Anterior vocal pathway (学習系回路)

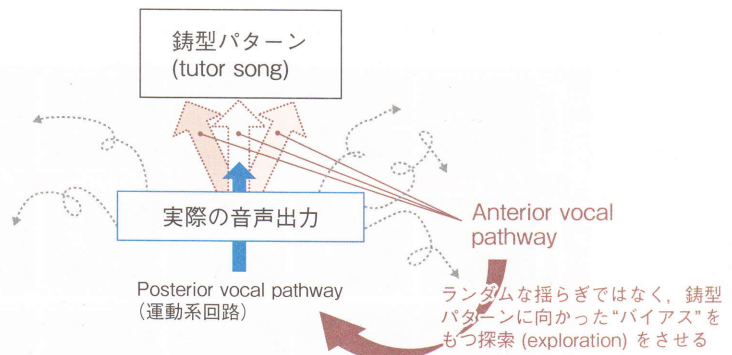


図3 Posterior vocal pathway と anterior vocal pathway の機能

ここ数年の技術革新を伴う分子生物学的手法がソングバード研究にも応用され、ソングバード脳からさまざまな遺伝子がクローニングされ、大規模完全長cDNA配列データバンク構築、およびDNAマイクロアレイ等を含む脳内遺伝子発現パターン解析^{注1)}が行われてきた^{13)~15)}。また、行動解析手法においても、従来の方法では鳥が囀るのをオンタイムで観察し、手動で録音・

解析していたが、Tchernichovskiらによって開発された音響録音・解析プログラムが広く利用され、個体発達段階を通して、すべての音声発声行動 (音素の音響的動態変化) の自動録音・解析も可能となっている¹⁶⁾。さらに、ウイルス発現系を利用したRNAi法による特定脳部位に局限した遺伝子ノックダウン実験も行われるようになってきている。この遺伝子改変とコンピュータ

注1) ソングバードのリソースデータバンクとしては次のようなものがある。

- Zebra Finch Resource page at NCBI.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/finch/>)
- Songbird Brain Transcriptome Database (完全長cDNAデータベース).
(<http://songbirdtranscriptome.net/>)
- Songbird EST database.
(http://titan.biotech.uiuc.edu/cgi-bin/ESTWebsite/estima_start?seqSet=songbird)
- Zebra Finch Expression Brain Atlas (脳内遺伝子発現プロファイル情報).
(<http://ignrhnet.ohsu.edu/finch/songbird/index.php>) (ただし、まだ本格始動はしていない)

エイドによる行動解析を融合させた研究の先駆として2007年に報告されたのが、FoxP2遺伝子のノックダウン実験であった¹⁷⁾。ヒトFOXP2は2001年に言語発話障害 (developmental verbal dyspraxia) の原因遺伝子として初めて報告された遺伝子である。ヒトとソングバードともに脳内の基底核に強く発現しており、特にソングバードではanterior vocal pathwayの基底

核Area Xにおいて学習臨界期中にその発現量が変化すること、発声行動によって転写活性が低下し、脳内mRNA量が減少することが報告されていた。実際、Area X内におけるFoxP2の発現をRNAiによって低下させると、その発声行動表現型への影響が学習臨界期初期から起こり、コントロールと比べて可変性が高い音素を生成する結果、鋳型パターンに対して不完全で不正確

な学習しかできないことが明らかにされた。

また昨年には、レンチウイルスを動物胚生殖原細胞 (PGCs) へ感染させ、ゲノムDNAへ取り込ませることによってトランスジェニック・ソングバードを作成できることが報告された¹⁸⁾。今後さらに、これらの遺伝子発現改変技術を応用し、脳部位 (細胞タイプ)・時期特異的な操作を可能にしていくこ

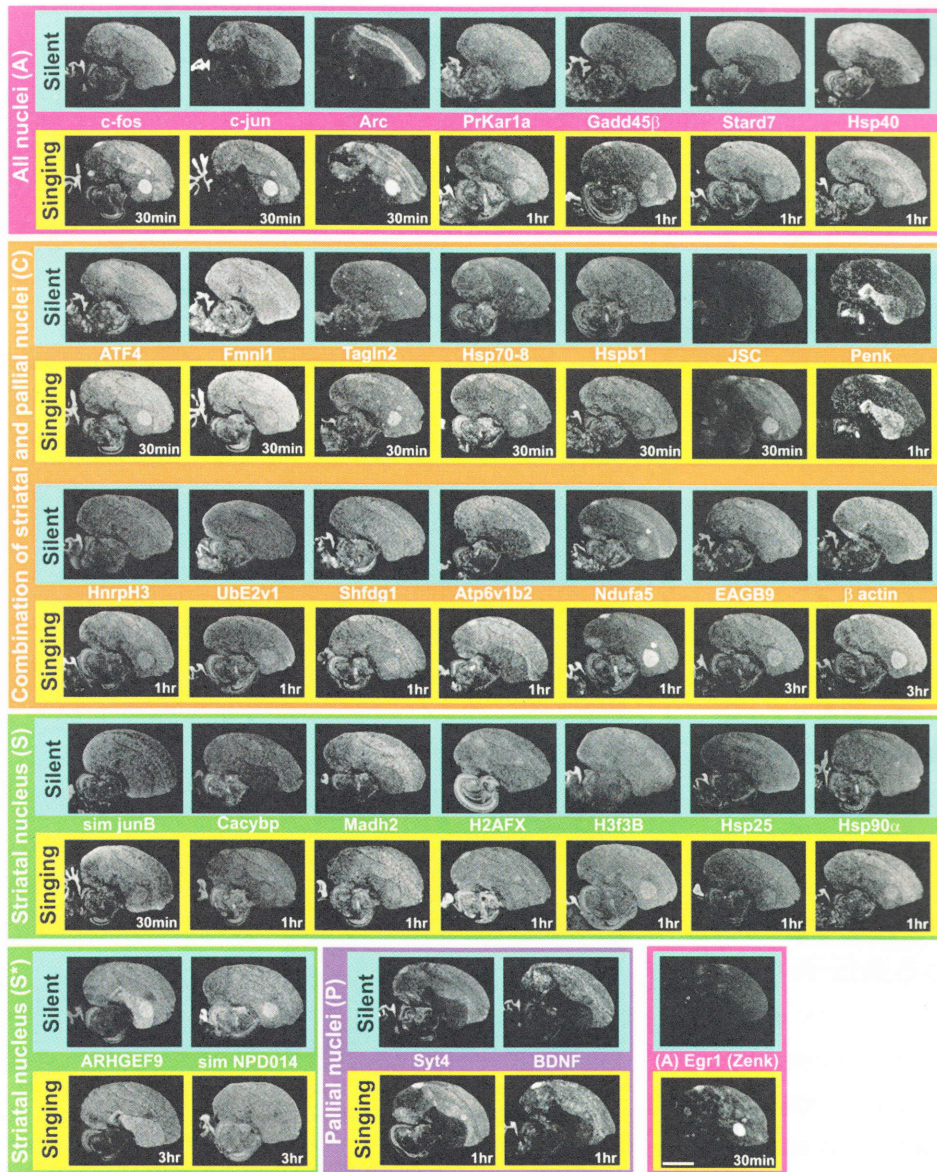


図4 囀り行動によって発現誘導される遺伝子群

とで、ソングバードが本来もっている「行動に直結した回路」の利点を生かした研究が進むと思われる。

このような特定の遺伝子の分子機能に着目した研究とともに、囀り行動・学習によって誘導される脳内で起こる多様な遺伝子群の発現動態にフォーカスした研究も精力的に行われてきた。ソングバードの囀り学習は感覚運動学習を根幹として、自然条件下で自ら「声を出す」という自発的な行動発現によって完成する。その際に神経活動依存的にさまざまな遺伝子群が脳内で発現誘導される。事実、ソングバードが囀っているとき、脳内では囀り行動による神経活動依存的に40以上の多様な遺伝子群が発現誘導されることが明らかになっている。これらの遺伝子群には、転写因子 (Egr, ATF, AP-1 family) などをはじめ、アクチンおよびアクチン結合タンパク質といった細胞骨格・アンカータンパク質 (b-actin, trangelin2, Arc など) に関わる遺伝子群や、神経伝達物質・そのシナプス間隙への放出に関わる遺伝子群 (BDNF, Proenkephalin), シャペロンおよびその結合タンパク質 (HSP25, HSP40 など), 免疫関連物質 (JSC) など多様な遺伝子が含まれていた (図4)¹⁴⁾。これらの多くがノックアウトマウスなどの研究から神経可塑性に関わる分子機能をもっていることが明らかにされてきている。また、行動の継続時間にそってソングシステム内の神経核ごとにこれら遺伝子群の mRNA 発現レベルの動態が6つのタイプに分類でき、経時的な発現制御が遺伝子群によって異なる。さらに、囀り学習中の学習臨界期内にある若鳥が囀ったときと、学習を終えた学習臨界期後の成鳥が囀ったときとでは、同じように発声行動をしてもその脳内で誘

導される遺伝子群が異なっていることがわかってきた。つまり、脳内の「特異的部位 (ソングシステム)」で、個体発達の「時期特異的 (音声発声学習臨界期間)」に、発声行動を「どれだけ (神経興奮持続時間)」行っているかを正確に反映する絶妙なる「多段階発現調節プログラム」がそれぞれの遺伝子群の発現制御のために脳内で実行されていることを意味する。この多段階発現調節機構が、脳内で実際にどのようにコントロールされているのか、またこの多段階発現調節を受ける遺伝子群によって学習効率や学習臨界期制御にどのような影響を及ぼしているのかについて、現在研究を進めている状況である。

以上の2つのアプローチ、すなわち

- (1) 1つや数個の遺伝子の脳内分子機能を回路・行動レベルで徹底的に精査していく方法
- (2) 行動によって誘導・発現制御を受ける遺伝子群の発現動態からその行動表現を支える遺伝子発現制御メカニズムを検証していく方法

は、「動物行動の遺伝的基盤」を理解するためには、お互いが相反するものではなく、共に相補するアプローチといえる。しかし、決してこれだけでは「動物行動の遺伝的基盤」を真の意味で理解できるとは大言できないのではないであろうか。では、何がさらに必要か。

5 ソングバードの行動遺伝学の展望

——系統進化要因を突破口とした取り組み

最近の次世代シーケンサーによって大量のゲノム情報の利用が可能とな

り、分子生物学的手法の加速度的な発展を期待できる現在だからこそ、今後の研究方略を再考すべき時期に来ているのではないかと考えている。これは、ソングバード研究に限ったことではないかもしれない。個人的には、ティンバーゲンの4つの質問*を意識することが最近多くなっている。動物行動学の祖であるニコ・ティンバーゲンが1960年代に発した動物行動を理解していくための指針である。その動物行動の「至近要因 (mechanism)」、 「発達要因 (development)」、 「究極要因 (function)」、 「系統進化要因 (evolution)」の4つの「なぜ」を問いていくことが、動物行動研究にとって重要であると述べている。まさに言い得て妙なる箴言、さすがニコ・ティンバーゲン。気がつけば、最近のソングバード研究は音声発声研究といいながら、“zebra finch (キンカチョウ) 研究” 化してしまっている。Zebra finch の研究であって、音声発声学習の研究とは素直にいえない。そして、これまでの神経生理学・分子生物学的研究によって飛躍的に進んだのは、至近要因と発達要因に関してであって、究極要因と系統進化要因は取り残され

【ティンバーゲンの4つの質問】

Nikolaas "Niko" Tinbergen はその論文 (Zeitschrift für Tierpsychologie, 20, 410–433 (1963)) で、動物行動を理解するためには、次の4つの「質問」を考えることの重要性を指摘した。

- (i) 至近要因：その行動がどのような生体内メカニズムによって制御・生成されているのか？
- (ii) 発達要因：その行動が動物個体の発達過程でどのように生成・獲得されてきたのか？
- (iii) 究極要因：その行動が動物個体・種が生存するためにどのような意味をもつのか？
- (iv) 系統進化要因：その行動が系統進化上どのように進化してきたのか？

たままである。ソングバード研究の行動遺伝学への将来的な貢献を考えたとき、その突破口となるのは系統進化要因に着眼した取り組みではないか、と筆者らは考えている。

発生学、生態学といった学術分野が進化化学的観点を取り入れ、evolutionary

developmental biology (Evo-Devo: 進化発生学), evolutionary ecology (Evo-Eco: 進化生態学) というさらなる新学術領域へと発展を遂げている。しかし、「行動がいかなるゲノム情報を基盤として進化してきたか」、「なぜ動物種特異的な行動が生成されるの

か」という問いにまだまだ正面から向き合えずにいる。「行動の進化」の研究は真つさらな新天地のように思える。これには問題を難しくしている複合的な理由が存在しているせいかもしれない。まず、動物行動そのものが一般的に単一の神経回路によって生成されて

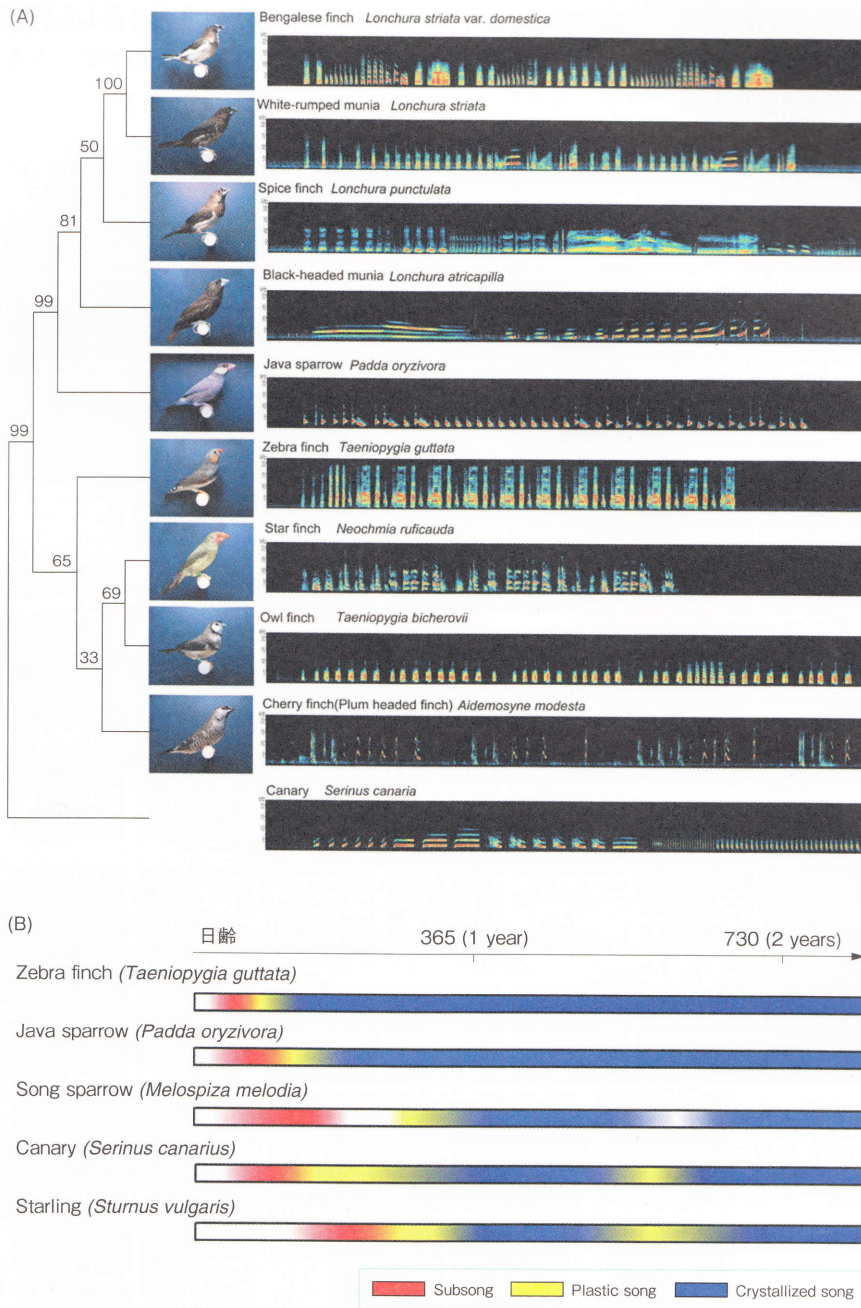


図5 ソングバード種特異的な囀りパターンと発達過程における囀り変化

いない。形の大きさ、動物の数といった目に見え、計測が容易な対象に比べて、行動表現型の計測定量化の精度によって、見えてくるもの、いえることは大きく変わる。また、既存のモデル動物間で観察できる行動比較のみでは、進化系統上であまりに遠い動物種間の行動進化を考察することを強いることになる。しかし、鳴禽類ソングバードの囀り学習・生成行動に着目した場合、これらの問題は容易に解決できる。囀り行動学習・生成のための特異的な神経回路(図2)を共通してもち、近縁種間でありながら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)を生成しているためである(図5A)。また、動物種ごとに、その発達過程における囀り変化・学習戦略も異なる(図5B)。同じようにワイアーリングしているように見える神経回路ソングシステムから、種特異的な発声行動として異なる出力が可能なのである。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。種特異的な行動表現型とその進化、それを可能としている神経分子基盤の機能進化を検証していくことがソングバード研究では可能である。

これからの「行動遺伝学」、動物行動の遺伝的基盤研究にソングバードだからこそチャレンジできるフィールドが存在していると考えるのは筆者たちがよほど楽天的なのかもしれないが、「ソングバードでなければできない研究」が必ずあると信じている。

[文 献]

- 1) Thorpe, W. H. *Nature*, **173**, 465 (1954).
- 2) Marler, P. In: Busnel, R.G., editor: *Acoustic behavior of animals*, Elsevier, Amsterdam, 1963, p. 228-243.
- 3) Konishi, M. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, **22**, 770-783 (1965).
- 4) Nottebohm, F., Stokes, T. M. & Leonard, C. M. *J. Comp. Neurol.*, **165**, 457-486 (1976).
- 5) Bottjer, S. W., Miesner, E. A. & Arnold, A. P. *Science*, **224**, 901-903 (1984).
- 6) Warren, W. C., Clayton, D. F., Ellegren, H., Arnold, A. P., Hillier, L. W. *et al. Nature*, **464**, 757-762 (2010).
- 7) The Avian Brain Nomenclature Consortium. *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 151-159 (2005).
- 8) Jarvis, E. D. In: Squire, L. R., editor: *Encyclopedia of neuroscience*, Vol. 2, Academic Press, Oxford, 2009, p. 217-225.
- 9) Hosino, T. & Okanoya, K. *Neuroreport*, **11**, 2091-2095 (2000).
- 10) Hahnloser, R. H., Kozhevnikov, A. A. & Fee, M. S. *Nature*, **419**, 65-70 (2002).
- 11) Scharff, C. & Nottebohm, F. *J. Neurosci.*, **11**, 2896-2913 (1991).
- 12) Andalman, A. S. & Fee, M. S. *PNAS*, **106**, 12518-12523 (2009).
- 13) Replogle, K., Arnold, A. P., Ball, G. F., Band, M., Bensch, S. *et al. BMC Genomics*, **9**, 131 (2008).
- 14) Wada, K., Howard, J. T., McConnell, P., Whitney, O., Lints, T. *et al. PNAS*, **103**, 15212-15217 (2006).
- 15) Li, X., Wang, X.-J., Tannenhauser, J., Podell, S., Mukherjee, P. *et al. PNAS*, **104**, 6834-6839 (2007).
- 16) Tchernichovski, O., Mitra, P. P., Lints, T. & Nottebohm, F. *et al. Science*, **291**, 2564-2569 (2001).
- 17) Haesler, S., Rochefort, C., Georgi, B., Licznarski, P., Osten, P. *et al. PLoS Biol.*, **5**, e321 (2007).
- 18) Agate, R. J., Scott, B. B., Haripal, B., Lois, C. & Nottebohm, F. *PNAS*, **106**, 17963-17967 (2009).

今井 礼夢 *Raimu Imai*

北海道大学 大学院生命科学部 博士課程

略 歴：2008年、北海道大学理学部生物科学科卒業。2010年、同大学大学院生命科学部院修士課程修了。2010年4月より同大学院博士課程在学中。

専 門：動物行動学、神経行動学、分子生物学

森 千紘 *Chihiro Mori*

北海道大学 大学院生命科学部 博士課程

略 歴：2008年、北海道大学理学部生物科学科卒業。2010年、同大学大学院生命科学部院修士課程修了。2010年4月より同大学院博士課程在学中。

専 門：神経行動学

和多 和宏 *Kazuhiro Wada*

北海道大学 大学院理学研究院 生物科学部門 生命機能学 准教授

略 歴：1998年、金沢大学医学部医学科卒業。2005年、東京医科歯科大学大学院医学系研究科博士(医学)。米国デューク大学医療センター神経生物部リサーチアシエントを経て、2007年に北海道大学大学院先端生命科学部准教授。2009年より現職。

専 門：分子神経行動学