

135. 発声の脳内分子機構の解明

新村 毅

Key words : 発声, 行動, ニワトリ, RNA-seq,
ゲノムワイド関連解析

自然科学研究機構 基礎生物学研究所
光情報研究部門

緒言

ヒトなどの哺乳類に留まらず、鳥類から魚類に至るまで、多くの動物は、音声を用いてコミュニケーションを行っている。そのため、発声の破綻は、その個体が生存する上で重大な損害をもたらす、ヒトにおいても発声障害は大きな社会的問題となっている。動物行動学者であるコンラート・ローレンツらがノーベル賞を受賞した1973年以降、動物の多様な発声は多くの研究者を魅了し続け、基本的な性質の理解が進んだ。しかしながら、これまで、その分子機構については明らかにされてこなかった。

動物の中では、ヒト・クジラ・鳴禽類 (Song birds) は例外的に発声を学習することができるものの、イヌの「ワンワン」やカエルの「ゲコゲコ」のように、ほとんどの動物は学習をしなくとも種特有な発声形態を獲得することができる。この生まれながらに備わる発声能力のことを先天的発声と言うが、マウスを含め、この先天的発声の分子メカニズムはいかなる生物においても明らかにされていない。そこで本研究課題では、先天的発声を理解する上で有用なモデルであるニワトリの「コケッコウ」(Crowing)を用いて、集団レベル、個体レベル、遺伝子発現レベル、ゲノムレベルの各階層におけるメカニズムを明らかにし、先天的発声の制御機構の全容を解明することを目的とした。

方法、結果および考察

1. 集団レベルにおける制御機構¹⁾

先天的発声は、単純な発声形態であるものの、それを用いて動物達がどのようにコミュニケーションを行っているかは十分に明らかにされていない。例えば、「ニワトリは朝に一齐に鳴き始める」(Fig. 1A)ということは良く知られた現象であるが、一見、無秩序に鳴き交わしているように見える。しかしながら、上位個体はCrowingの回数が多いなど、各個体は社会的順位(つつきの順位)に厳密に従って行動していることが示唆される結果が得られていた(Fig. 1B)。さらに、我々は、繰り返される鳴き交わしの観察の中で、最上位個体が1日のうち最初にCrowingを始め(97.6 ± 2.9%; Fig. 1C)、その後、社会的順位が高い個体から順にCrowingを開始することを発見した(Fig. 1D-E)。最上位個体のCrowingの時刻は、日ごとに異なるものの、最上位個体の各日のCrowing時刻と下位個体のCrowing時刻は強く相関していた(Fig. 1F)。このことから、最上位個体が集団内のCrowingのタイミングを決定していることが示唆された。

これらの結果と共に、下位個体の点灯前のCrowing回数は、上位個体よりも少ないという結果が得られた(1位 vs. 3, 4位, $P < 0.05$)。しかしながら、光および音刺激によって誘導されるCrowing回数には、順位間に有意差はなく、下位個体も最上位個体と同等にCrowingを行っていた。このことは、下位個体はCrowingする能力を有している、すなわち、上位個体の存在によって、下位個体の自発的なCrowingが抑制されていることを示唆するものであった。事実、恒薄明条件下における2位個体のCrowingのフリーランニング周期は1位個体よりも早いという結果が、3グループ中2グループにおいて得られ、このことは2位個体が1位個体よりも早くCrowingできることを支持するものであった。また、Crowingのフリーランニング周期は最上位個体に依存的であるものの、体温のフリーランニング周期は順位間で異なっていた。これらの結果から、下位個体はCrowingする能力を有しているものの、最上位個体がいる場合は、最上位個体がCrowingを開始するのを毎朝辛抱強く待っていることが示唆された。

以上のことから、最上位個体は朝を告げる優先権を有しており、下位個体は最上位個体が Crowding を開始するのを毎朝辛抱強く待っていると結論づけられた。

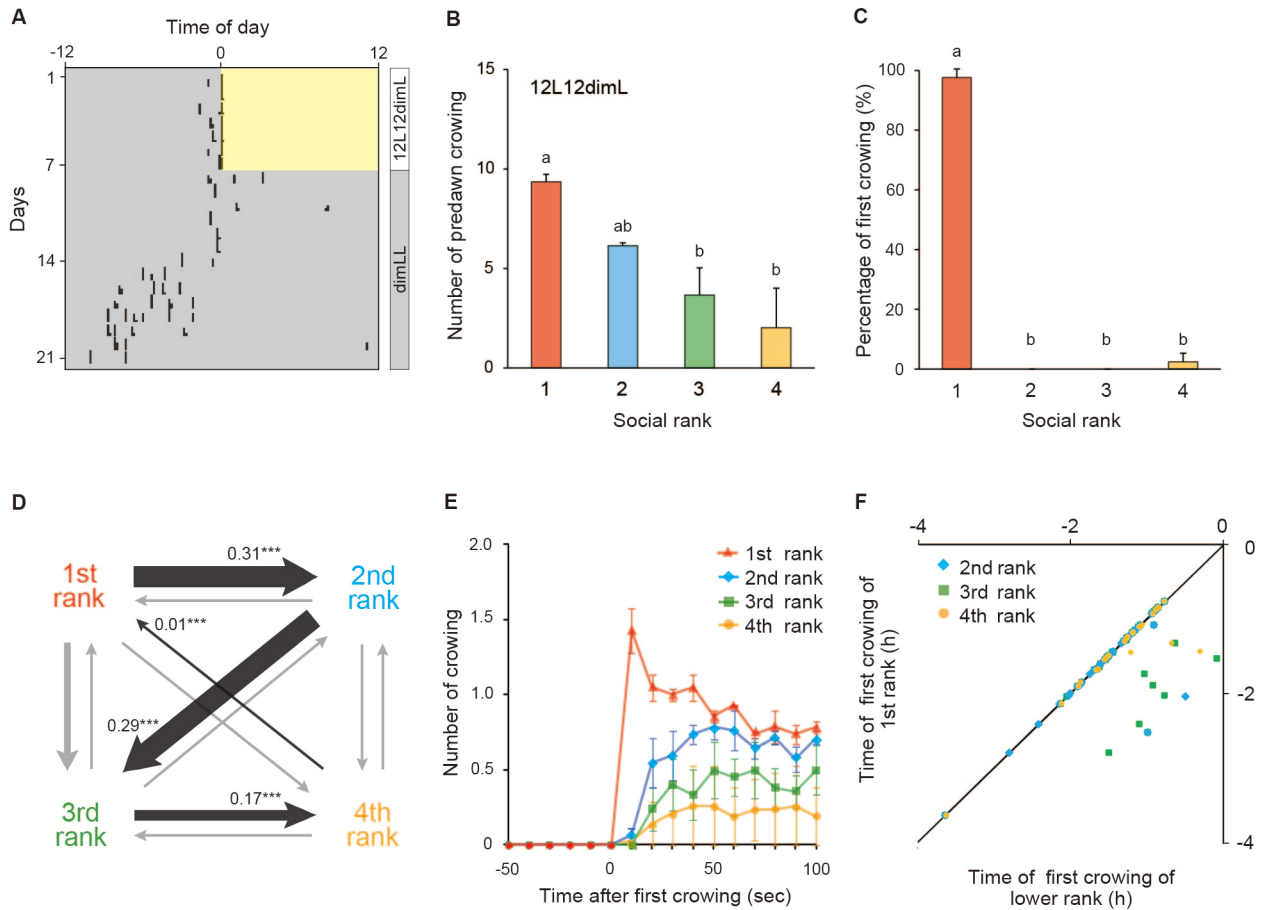


Fig. 1. The top-ranking rooster in a group announces the break of dawn. A) Representative actogram of crowding behavior under 12 hour light:12 hour dim light (12L12dimL) and constant dim light (dimLL) conditions. The light and dim light periods are indicated by yellow and gray backgrounds, respectively. B) Higher-ranking roosters crowed more frequently than lower-ranking roosters under the 12L12dimL condition ($F_{3,8} = 6.8$, $P < 0.05$, ANOVA, Tukey-Kramer's test; mean + SEM, $n = 3$). Different characters indicate significant differences. C) The first-ranking rooster started to crow first every morning ($F_{3,8} = 827.3$, $P < 0.01$, ANOVA, Tukey-Kramer's test; mean + SEM, $n = 3$). D) Transition diagram of crowding order between social ranks showed that roosters start to crow in descending order of social rank. The proportion of the transition in relation to the whole is indicated by line weight. Significantly increased transitions are shown by dark gray lines, with their proportion and significance ($***P < 0.001$), and the other transitions are shown by light gray lines. E) Lower-ranking roosters immediately followed the first-ranking rooster's predawn crowding (mean \pm SEM, $n = 3$). F) A strong positive correlation was observed between the timing of first crowding of the top-ranking rooster and those of its subordinates (1st and 2nd rank: $R = 0.98$, $P < 0.01$; 1st and 3rd rank: $R = 0.85$, $P < 0.01$; 1st and 4th rank: $R = 0.78$, $P < 0.01$, Pearson's correlation). Time 0 indicates light-onset time.

2. 個体レベルにおける制御機構²⁾

雄鶏の Crowing は、古くから朝を告げるものとして利用されており、今では誰もが「鶏は朝に鳴く」という現象を知っている。しかしながら、それが内因性の概日時計によって支配されているのか、あるいは外因性の光や音によって制御されているのかは明らかにされていない。

Crowing のリズムの解析から、Crowing は明暗条件下においては点灯前から発現しており、恒薄明条件下では 24 時間より短い周期 (23.7 ± 0.1 時間) で自由継続するという結果を得た (Fig. 2A, B)。また、光および音刺激が Crowing におよぼす影響を検討した結果から、Crowing 回数は照度および音圧の上昇に伴って増加することが明らかとなった (Fig. 2C)。しかしながら、いずれの物理的刺激を提示した場合においても、ZT0 を発現のピークとした時刻依存的な変化が認められた (Fig. 2D)。これらのことから、光および音によっても Crowing が誘導されるものの、その誘導も内因性の概日時計によって制御されていることが示唆された。

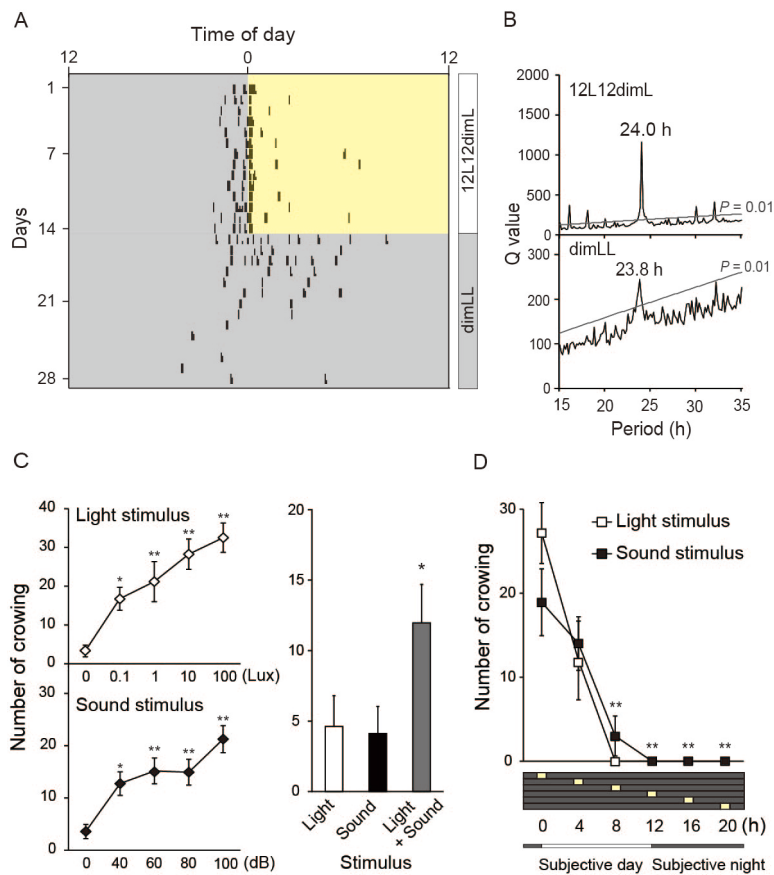


Fig. 2. Regulation of morning crowing of roosters.

A) Representative crowing record of a rooster kept under 12-h light:12-h dim light (12L12dimL) cycles and constant dim light (dimLL) conditions. The light and dim light periods are indicated by yellow and grey backgrounds, respectively. B) Periodogram analysis of crowing under 12L12dimL and dimLL conditions. C) Light and sound stimuli induced crowing in a dose-dependent manner ($F_{4,55} = 9.6$ [light stimulus, $P < 0.01$], $F_{4,55} = 7.9$ [sound stimulus, $P < 0.01$], ANOVA; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. 0 lux or 0 dB, Dunnett's test; mean \pm SE, $n = 12$). Light (0.1 lux) and sound (60 dB) stimuli exhibited additive effects with regard to induction of crowing ($F_{2,18} = 4.7$ [$P < 0.05$], ANOVA; * $P < 0.05$, vs. 0.1 lux and 60 dB, Tukey-Kramer's test; mean \pm SE, $n = 8$). D) External stimulus (light or sound)-induced crowing was observed during early subjective day ($F_{5,30} = 16.6$ [light stimulus, $P < 0.01$], $F_{5,30} = 10.2$ [sound stimulus, $P < 0.01$], ANOVA; ** $P < 0.01$, vs. time 0, Dunnett's test; mean \pm SE, $n = 4-12$).

3. 遺伝子発現レベルにおける制御機構

ヒトの学習性発声のモデルとしては鳴禽類 (Song birds) が用いられてきたものの、学習性発声を制御する神経核は多数存在し、複雑なネットワークを形成している。現在の科学技術では、これを分子レベルで明らかにすることは困難であるため、発声の分子機構は明らかにされていない。しかしながら、ニワトリの先天的発声は、1つの神経核によって制御されていることが過去の研究で明らかにされている。また、Crowing のモチベーション (頻度) はテストステロン依存的で、雌鶏は Crowing を示さないが、雄鶏は示す。我々は、さらに、テストステロン投与により雛においても Crowing が誘起されることを確認している。このような Crowing を示す個体と示さない個体の Crowing 中枢部位における遺伝子発現を、次世代シーケンサー (RNA-seq) およびバイオインフォマティクスを用いて網羅的に比較解析し、共通して発現増加する遺伝子を抽出した。それと同時に、これらの遺伝子機能の立証のため、*in vivo* RNAi による脳内の遺伝子発現を抑制する方法を確立した³⁾。

4. ゲノムレベルにおける制御機構

超音波の発声を示すマウスとは異なり、ニワトリの発声はヒト可聴域にあるため、表現型の解析が容易である。また、名古屋大学に中核的拠点があるナショナルバイオリソースプロジェクト (ニワトリ・ウズラ) では、正常な Crowing を示す高度近交系系統 (GSP) のみならず、特殊な発声パターンを示す沖縄県指定天然記念物の日本鶏 (Chan) が維持されている。興味深いことに、この Chan と GSP を交配して F1 を作出した結果、F1 は全個体特殊な Crowing を示し、さらに、F1 のオスを GSP のメスに戻し交配したところ、正常な Crowing と特殊な Crowing を示す個体が得られた。したがって、1つの遺伝子によって発声のパターンが制御されていることが示唆された。この家系を用いて、QTL・SNP 解析によるゲノムワイド関連解析を実施した結果、発声パターンの制御遺伝子が存在する領域を約 3 Mb に絞り込むことができた。

共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋大学の吉村 崇教授および大橋将星氏である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Shimmura, T., Ohashi, S. & Yoshimura, T. : The highest-ranking rooster has priority to announce the break of dawn. *Sci. Rep.*, **5** : 11683, 2015.
- 2) Shimmura, T. & Yoshimura, T. : Circadian clock determines the timing of rooster crowing. *Curr. Biol.*, **23** : R231-R233, 2013.
- 3) Nakane, Y., Shimmura, T., Abe, H. & Yoshimura, T. : Intrinsic photosensitivity of a deep brain photoreceptor. *Curr. Biol.*, **24** : R596-R597, 2014.