

鳥類歌制御神経核 HVC 局所回路における機能的ネットワーク Functional networks in the songbird brain nucleus HVC microcircuit

西川淳 (PY), 岡ノ谷一夫

Jun Nishikawa (PY) and Kazuo Okanoya

独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター 生物言語研究チーム

j_kohaku@sc5.so-net.ne.jp, okanoya@brain.riken.jp

Abstract — Songbirds have a specialized set of discrete brain nuclei for song production. Past studies revealed the inter-nuclei interaction and their hierarchical organization for song production. Although the multi-neuronal interactions within the single nucleus are important to decipher the information coding of the song, simultaneous recording from a local circuit has not been reported. It has been difficult to record multi-neuronal activities from a tiny brain area of about several hundreds of microns. In this study, we simultaneously recorded many well-isolated single units with silicon electrodes from a tiny brain area HVC in Bengalese finches. Neural responses to song stimuli and their correlated dynamics between neuronal ensembles were analyzed. Functional connectivity within HVC was extracted based on their crosscorrelograms. As a result, we obtained a functional network induced by the song stimulation. The auditory response to BOS and that to reverse playback of BOS have different network states although spontaneous activity already has a basal functional network.

Keywords — Functional networks, Simultaneous multi-neuronal recording, Microcircuit, Songbirds.

1. はじめに

小鳥の歌は、複雑な時系列の生成・学習の良いモデルとなり得ることから、その神経機構に関する研究が盛んに行われている[1, 2]。これまでの研究により、歌の制御と学習を担う脳領域間の大まかな情報の流れ[3]や、各領域の機能的役割分担[4,5]などについて多くのことが解明されてきた。歌の神経表象を解明するためには、こうした知見に加えて各領域内部における複数ニューロン間相互作用を明らかにする必要がある。しかし、各領域における神経細胞集団内の相互作用については、ほとんど明らかにされていない。これは、数百 μm 程しかない小さな神経核の局所神経回路内に、複数の記録点を集めることが技術的に困難だったことが一因となっている。

本研究では、微小領域に記録点を規則的に集めることのできる 32-ch シリコンプローブを用いて、ジュウシマツにおいて歌の時系列情報を担うと考えられている神経核 HVC から同時に多数のニューロン活動を記録する。得られたデータから全てのニューロンペアにおける相互相関を計算することによってジュウシマツ HVC における機能的ネットワークを抽出し、歌

刺激に対する機能的ネットワークの構造変化を解析することで、複雑な時系列学習を司る局所神経回路メカニズムの解明を目指す。

2. 実験方法

実験には、180日齢以上の雄のジュウシマツを用いた。実験に先立って鳥ごとに録音しておいた歌を編集し、そのまま再生する BOS (Bird's Own Song) 刺激、その逆再生である REV (Reversed playback song) 刺激を作成した。ウレタン麻酔を施したジュウシマツをステレオ固定器に固定し、32-ch シリコンプローブを HVC へ刺入した後、 $8 \times 4 = 32$ 個の記録点 (縦に $100 \mu\text{m}$ ごとに 4 箇所、横に $200 \mu\text{m}$ ごとに 8 箇所の記録点がある) から多数のニューロン活動を細胞外記録した (図 1A)。電極から計測された信号に対してスパイクソーティングを行い、多数のシングルユニットとマルチユニットを得た。神経活動の記録と同時に音刺激の呈示を行い、それぞれの音刺激に対する聴覚応答を記録した。BOS, REV, 無音刺激 (Silent) をランダムな順番で呈示した。各刺激の持続時間は約 2 s であり、刺激間隔は 2~3 s でランダムに変化させた。

計測された全てのニューロンペアごとに、Shuffle corrected Cross-Correlation Histogram (SCCH) を計算し、機能的結合を次の基準で抽出した。-50 ms から 50 ms の間でピークが一つだけあり、ピークの振幅が 4.42 SD 以上であり、ピーク幅が 10 ms 以下であり、時間遅れが 10 ms 以下であるものを統計的に有意な機能的結合とみなした。こうして抽出された統計的に有意な機能的結合を時間遅れの土に応じた有向グラフによって表現し、機能的ネットワークを抽出した (図 1B, C, D)。

3. 結果

麻酔下のジュウシマツ HVC から 32-ch シリコンプローブを用いて多点同時記録を行ったところ、一度に 10~20 個のシングルユニットを記録することに成功した。それぞれのニューロンは、歌刺激に対して選択的な応答を示した。ここで同時記録された 14 個のシングルユニットと 9 個のマルチユニットについて、全てのペアごとに SCCH を計算して機能的結合を調べた ($n = 253 \text{ pairs}$)。ペアごとの SCCH から、統計的に有意な機能的結合を抽出し、同時記録された全てのユニット間の相互作用を有向グラフとして表現した (図 1B, C, D)。

この有向グラフは、HVC局所神経回路における機能的ネットワークを表現している。図1Bは自発発火状態における機能的ネットワークであるが、既に多数のニューロンが相互に結合した複雑なネットワーク構造を持っている。1aや23aのように、他のニューロンと比べて多くの結合を持つハブが存在する。これに対して、図1CはBOSを聞いている時の機能的ネットワークであり、図1DはREVを聞いている時のネットワークである。自発発火と比べて新しく出来た結合は太い実線で、消えた結合は点線で示した。B,C,Dを比べてみると、BOS提示時に自発発火やREVと比べて機能的結合の数が少なくなっている。さらに、BOSとREVでは、新しく出来る結合が異なっている。以上の結果は、HVC局所回路には自発発火の段階で既に土台となるネットワークが存在するが、聴覚刺激の種類に応じて別々のネットワークの状態に移行することを示唆している。

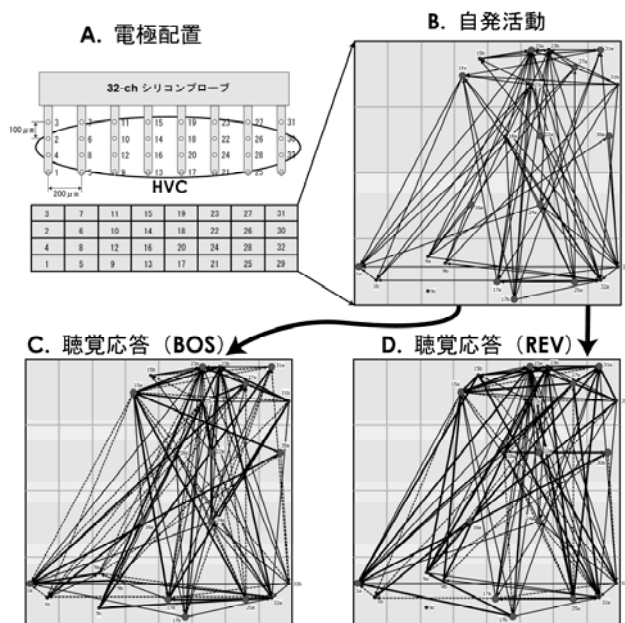


図1. 多数のHVCニューロンから構成される機能的ネットワークと音刺激に対するネットワーク構造の変化。大きな丸がシングルユニットで、小さな丸がマルチユニットである。Aは、32chの記録点とHVCとの大まかな位置関係を模式的に示したものである。記録点の右隣には記録点番号を付してある。このように記録範囲が水平方向に大きく、鉛直方向に小さいため、B,C,Dにおける機能的ネットワークは、鉛直方向に引き伸ばして表示した。歌の刺激前から複雑な機能的ネットワークが既に存在するが(B), BOS提示時(C)とREV提示時(D)において異なるネットワーク状態へと遷移していることが示唆される。自発活動を基準にして、新しく出来た結合を太い実線、消えた結合を点線で示してある。

4. まとめと考察

微小領域に記録点を配置することのできるシリコンプローブを用いることにより、麻酔下のジュウシマツHVCから多数のニューロン活動を同時に記録した。筆者等の知る限り、小鳥の歌制御系にある単一の神経核内から3つ以上のニューロン活動を同時に記録した研究は報告されていない。さらに、得られたスパイクデータから相互相関関数をもとにして機能的ネットワークを抽出し、このネットワークが歌刺激に応じて変化することを明らかにした。

HVC内の局所回路についての知見としては、Duke大学のMooneyのグループが行った研究が良く知られている[6, 7]。彼らは、HVC内の異なる2ニューロンから同時に細胞内記録を行い、それぞれのニューロンタイプも同定した上で、結合をシナプス電流のレベルで明らかにした。これはHVC局所回路のマイクロな構造を調べる上で大変重要な成果ではあるが、多数のニューロン間の相互作用や機能的ネットワークのマクロな構造についての知見を得ることはできない。

Mooney等に代表されるようなマイクロな回路構造を明らかにするための研究と、本研究に代表されるようなマクロな回路構造を明らかにするための研究を相補的に進めていくことによって、歌の生成と学習を可能にする局所神経回路メカニズムの解明へ近づくことができると思われる。

参考文献

- [1] H.P. Zeigler and P. Marler (ed.) (2004) "Behavioral Neurobiology of Birdsong," Ann. N. Y. Acad. Sci., **1016**, (2004).
- [2] 西川淳, 岡ノ谷一夫 (2007) "小鳥の複雑な歌系列生成と学習を支える神経機構," 日本神経回路学会誌, **14**, 79-93.
- [3] V.A. Smith et al. (2006) "Computational inference of neural information flow networks," PLoS Comput. Biol., **2**, e161.
- [4] R.H.R. Hahnloser et al. (2002) "An ultra-sparse code underlies the generation of neural sequences in a songbird," Nature, **419**, 65-70.
- [5] A. Leonardo and M.S. Fee (2005) "Ensemble Coding of Vocal Control in Birdsong," J. Neurosci., **25**, 652-661.
- [6] R. Mooney and J.F. Prather (2005) "The HVC microcircuit: the synaptic basis for interactions between song motor and vocal plasticity pathways," J. Neurosci., **25**, 1952-1964.
- [7] M.J. Rosen and R. Mooney (2006) "Synaptic interactions underlying song-selectivity in the avian nucleus HVC revealed by dual intracellular recordings," J. Neurophysiol., **95**, 1158-1175.