

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20700278
研究課題名（和文）：
音声時系列分節化を支える神経細胞集団の同期的活動
研究課題名（英文）：
Synchronous neural activities associated with the segmentation of sound sequences
研究代表者：
西川 淳 (Nishikawa Jun)
独立行政法人理化学研究所・生物言語研究チーム・基礎科学特別研究員
研究者番号：20392061

研究成果の概要（和文）：

言語を支える重要な機能の一つに「音声時系列の分節化」があるが、その神経機構はほとんど明らかにされていない。本研究では、複数の神経細胞が同期的に活動することによって神経回路全体の状態遷移が生じ、その結果として音声時系列の分節化が実現されるという仮説の実験的検証を行った。時系列発声を持つジュウシマツという小鳥を動物モデルとして用い、時系列処理の中核である HVC から同時に複数の神経活動を記録した。得られた多点スパイクデータに対して相互相関解析を行ったところ、時系列文脈に応じて神経活動の同期・非同期が切り替わることが明らかとなった。この結果は、音声時系列の分節化過程に神経細胞同士の同期的活動が関わっていることを強く示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Segmentation of sound sequences is an important ability for language acquisition. However, its neural mechanism has not been revealed yet. In this study, we hypothesize that synchronized activities among neurons leads typical state transition dynamics for segmentation. Here, we verify this hypothesis by recording multi-neuronal activities simultaneously from HVC, which is a responsible brain area for sequential processing in Bengalese finches. Through cross-correlation analysis between multiple spike train data, we revealed that population activity in HVC makes transition among synchronous and de-synchronous states according to song sequences. This result indicated that synchronous neural activities are involved in segmentation of complex sequences.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：同期的活動, 時系列分節化, 小鳥の歌, ジュウシマツ, HVC, 多点同時記録

1. 研究の背景

脳内において情報がどのような神経活動として表現されているかという情報表現の問題は、脳の情報処理原理を理解するために大変重要であるにも関わらず、未解決問題として残っている。この問題は、脳の情報処理を手本とした次世代情報処理装置を開発するためには決して避けて通れない重要な課題である。ノーベル賞を受賞したヒューベルとヴィーゼルの特徴抽出ニューロンの発見以来、特定の情報はニューロンのスパイク頻度（平均発火率）で表現されていると考えられてきた。しかし近年、平均発火率だけではなくスパイクの時間的なタイミングにも情報が表現されている可能性が指摘され始めている (Fujii et al., 1996)。特に行動の性質が切り替わる瞬間に、複数のニューロンがタイミングを合わせて同期的に発火することが報告されている (Riehle et al., 1997)。この実験に着想を得て、複数の活動パターンを記憶させた神経細胞ネットワークに同期入力を与えて強制的に同期的活動を引き起こすと、予め記憶しているパターン間で状態遷移が生じ、それらのパターン系列を想起できるというモデルが提案されている (Aoki & Aoyagi, 2009)。これらの研究結果は、一般に同期的活動が神経活動パターン間の状態遷移を生じさせ得ることを示唆している。

音声時系列を分節化する能力は、ヒト言語を支える重要な下位機能の一つであるが、その神経機構はほとんど明らかにされていない。申請者が所属する研究室において、ヒトが連続音声を分節化している時の脳波を記録したところ、分節化されるまとまり（チャンク）の区切りにおいて特徴的な陰性電位が生じることを発見した (Abla et al., 2008)。脳波の誘発電位は、多数のニューロン群が同期的に活動したときに生じると考えられているため、この実験結果はチャンクの区切りにおいて多数のニューロン群で同期的活動が生じていたことを示唆する。ヒトと同様に分節化された音声を持つジュウシマツを用いれば、これを直接検証することができると考えられる。

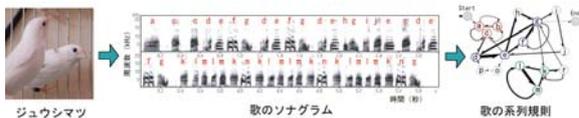


図1：ジュウシマツ（左の写真）の歌は複数の音要素から構成されている（中央のソナグラム）。その音要素時系列は、有限状態文法で記述できる複雑な系列規則を持っている（右の図）。

2. 研究の目的

本研究では、複数の神経細胞が同期的に活動

することによって神経回路全体の状態遷移が生じ、その結果として出力である音声時系列の分節化が生じるという仮説（図2）を提案し、ジュウシマツを用いた実験的検証を行う。ジュウシマツ HVC からシリコンプローブを用いて多点同時記録を行い、複数のニューロン活動の間の同期性を解析することを通じて、局所回路内のネットワークダイナミクスを可視化する。そのネットワーク活動と歌の時系列規則との関係を詳細に解析することを通じて、複数ニューロンの同期的活動と音声時系列分節化との関係を明らかにする。

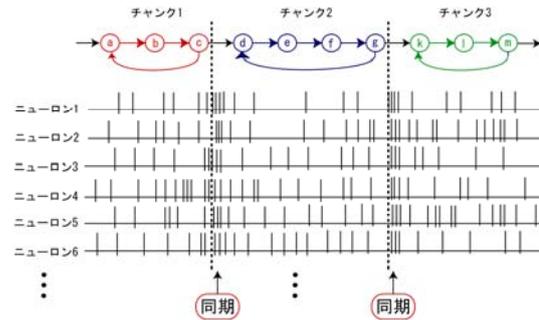


図2：分節化される瞬間（チャンクの切れ目）において、複数のニューロン間での同期活動が生じることで、チャンク間遷移を実現しているという仮説の模式図。

3. 研究の方法

近隣のペットショップで購入し、理化学研究所の鳥飼育施設で飼育された180日齢以上の雄のジュウシマツを用いた。全ての実験操作は、理化学研究所における動物倫理委員会において承認された手順で行った。

実験に先立って鳥ごとに録音しておいた歌を音響解析ソフト SASLab で編集し、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。

神経活動の記録に先立って、鳥に10%ウレタンを0.04 ml ずつ4~7回に分けて20分おきに皮下注入し、合計0.16~0.28 mlで麻酔を施した。鳥をステレオ固定装置(Narishige, Tokyo, Japan)に設置した手作りステージに拘束し、イヤーパーと嘴ホルダーで嘴の先端が水平面から45°になるように固定した。キシロカインジェルを鳥の頭部に塗布し、羽を取り除いた後、皮膚を切開して頭蓋を露出させた。特注の三点固定器(Narishige, Tokyo, Japan)を頭蓋前部にデンタルセメントで固定した。HVC直上(Y点から外側へ2.0 mm、前側へ0.5 mm)の頭蓋に小さな穴をあけ、32-ch シリコンプローブ電極 a8x4-2mm100-200-413 (NeuroNexus Technologies, Ann Arbor, MI, USA)を脳表面にセットした。

鳥を固定器ごと防電防磁の防音箱 AC-3(Industrial Acoustics)に入れ、マイクとスピーカーを鳥から 0.3 m の位置に設置した上で、油圧式マイクロポジショナー

SM-25C(Narishige, Tokyo, Japan)を用いて電極の位置を微調整し、シリコンプローブ上に配置された $8 \times 4 = 32$ 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 4 の電極配置参照)。電極から計測された信号は、多点同時記録システム MAP (Plexon Inc., Dallas, TX, USA) とデータ取得ソフト RASPUTIN (Plexon Inc., Dallas, TX, USA) を用いて、1000~2000 倍に増幅、100 Hz ~ 8 kHz でフィルタリングされ、サンプリング周波数 40 kHz でデジタル変換され、記録用コンピュータへ保存した。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。音刺激の音圧は約 70 dB になるように調整した。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 4 s に合わせた。刺激間間隔は 2~3 s でランダム変化させ、それぞれの刺激につき、150 試行の呈示を行った。

神経活動記録が終了した後、電気刺激装置 DS8000 (World Precision Instruments, FL, USA) を用いて $20 \mu\text{A}$ の直流電流を 15 s 流すことでマイクロリージョンを行い、記録位置に印をつけた。その後、20%ネンブタール 0.11 ml を皮下注入して麻酔をかけ、PBS と 4%パラホルムアルデヒド溶液で経心臓的に灌流を行い、脳を固定した。固定された脳は、マイクロスライサーを用いて $50 \mu\text{m}$ にスライスされ、標準的なプロトコルに従ってクレジルバイオレットで染色することによって各記録点の位置を同定した。

記録されたデータは、スパイクソーティングソフト Offline Sorter (Plexon Inc., Dallas, TX, USA) を用いて、シングルユニットとマルチユニットとノイズ波形に分類された。スパイク波形の振幅が電位変動全体の 4 SD を越えており、各波形データに対して主成分分析(PCA)を行った際に PC1,2,3 で張られる空間においてクラスターが統計的に有意に分離(MANOVA, $P < 0.05$) し、1.5 ms 以下の Inter-Spike Interval (ISI) が 0.01%以下 (不応期があるかどうか) であるものを、シングルユニット(single neuron)とした。4 SD を越えており、クラスターも分離しているが、1.5 ms 以下の ISI が 0.01%以上である場合には、マルチユニット (3~5 neuron cluster) とし、それ以外はノイズ波形と判断した。次に、10 ms のビンごとにスパイク数を数え、150 試行分のデータを重ね合わせることで、各刺激に対する PSTH (Peri-Stimulus Time Histogram) を作成した。

各ニューロンペア間の機能的結合を見積もるために、多点スパイクデータ解析ソフト NeuroExplorer (Nex Technologies, Littleton,

MA, USA) を用いて相互相関解析を行った。ニューロン A のスパイク列 に対するニューロン B のスパイク列 の相互相関関数(raw Cross-Correlation Histogram: raw CCH)から、刺激にロックした発火率変動に起因する「刺激性相関」を取り除くため、片方のニューロンを試行間シャッフルして相互相関関数を計算し、shuffled Cross-Correlation Histogram (shuffled CCH) を求めた。最後に、raw CCH から shuffled CCH を差し引くことにより、Shuffle corrected Cross-Correlation Histogram (SCCH) が得られた。統計的に有意な機能的結合を見積もるため、shuffled CCH において異なるシャッフルを 100 回行い、ビンごとに 4.42 SD の閾値を設定した。

全てのニューロンペアについて SCCH を計算し、統計的に有意な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 \pm 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。

4. 研究成果

4-1. HVC からの多点同時記録

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。しかし、発火率変動でみる限り、特定の系列の時にだけ発火し、それ以外は全く発火しないといった堅い応答特性ではなく、歌全体に対して個々のニューロンごとに少しずつ異なるパターンで発火している。以上の聴覚応答特性は、著者等の先行研究の知見と一致する(Nishikawa et al, 2008)。以下では、14 個のシングルユニットと 9 個のマルチユニットを同時記録できた際の機能的ネットワークについて解析する。

4-2. 各ニューロンペアにおける機能的結合

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 ($n = 253$ pairs)。それぞれの SCCH は、自発活動として Silent 刺激呈示中の神経活動 ($4 \text{ s} \times 150$ trials)、自分の歌に対する聴覚応答として BOS 刺激呈示中の神経活動 ($4 \text{ s} \times 150$ trials)、不自然な歌に対する聴覚応答として REV 刺激呈示中の神経活動 ($4 \text{ s} \times 150$ trials) から計算された。

こうした解析の結果、機能的結合の音刺激に対する変化には様々なタイプがあることが分かった(図3)。音刺激に対して、ほとんど機能的結合を変化させない例が、図3の一段目(23b→31a ペア)である。0~4 ms の時間遅れで23b→31a という機能的結合が音刺激に依存せずに存在している。

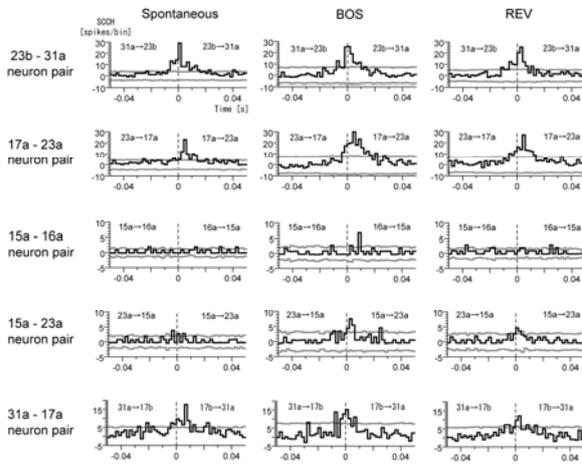


図3： 様々なタイプの機能的結合の代表例。刺激によって強くなるタイプ、弱くなるタイプ、変わらないタイプの3種類がある。

二段目の17a-23aペアについても、5~6 ms の時間遅れで17a→23a という機能的結合が音刺激に依存せずに存在している。しかし、BOSやREVを聞いた際には、その周辺で緩やかなピークが重なっている。これは、音刺激に応じた共通入力成分であると考えられる。これに対して、音刺激に依存して有意なピークが変化する場合も多々見られた。例えば、三段目の15a-16aペアや四段目の15a-23aペアでは、それぞれ8~10 ms, 2~4 ms の時間遅れで16a→15a, 15a→23a という機能的結合が、BOS呈示時に選択的に見られた。逆に五段目の31a-17bペアでは、自発発火において6~8 ms の時間遅れで17b→31a という機能的結合が存在するが、BOSやREVの呈示時には明確なピークが消えてしまった。以上のように、HVCニューロンペアにおいては、音刺激に対して機能的結合を変化させないもの、強めるもの、弱めるものという3タイプが全て存在することが分かった。

4-3. HVC 局所回路における機能的ネットワーク

ペアごとのSCCHから、統計的に有意な(基準については実験方法の章を参照。)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4)。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4の左上の図は、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、図4の機能的ネットワークの図は全て、鉛直方向に引き伸ばして表示した。

図4の右上の図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4の左下はBOSを聞いている時の機能的ネットワークであり、図4の右下はREVを聞いている時のネットワークである。これらを比べてみると、三条件ともに少しずつ異なるが、BOS提示時の機能的結合の数がREVや自発発火と比べて少ないのが分かる。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、その鳥にとって特別な聴覚刺激(すなわちBOS)を聞いている時のみ土台が崩れて特別なネットワークの状態に移行すると考えることができる。

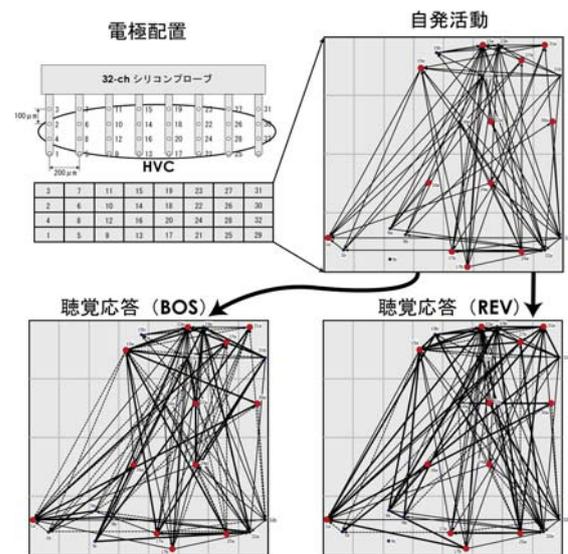


図4： 多数のHVCニューロンから構成される機能的ネットワークと音刺激に対するネットワーク構造の変化。大きな丸がシングルユニットで、小さな丸がマルチユニットである。

5. 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、Mooneyのグループが行った研究が良く知られている(Mooney & Prather, 2005)。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局所回路のミ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。こうしたミ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期待される。

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3件)

- K. Katahira, J. Nishikawa, K. Okanoya, and M. Okada, "Extracting state transition dynamics from multiple spike trains using hidden Markov models with correlated Poisson distribution," *Neural Computation*, (in press). (査読あり)
- 西川淳, "機能的ネットワークの可視化によって探る時系列処理を司る局所神経回路メカニズム," *生物物理*, Vol. 50, No. 3, pp. 134-135, (2010). (査読あり)
- 西川淳, 高橋美樹, 加藤真樹, 岡ノ谷一夫, "言語起源研究のためのモデル動物: ジュウシマツ," *生体の科学*, Vol. 61, No. 1, pp. 30-40, (2010). (査読なし)

[学会発表] (計1件)

- 西川淳, 岡ノ谷一夫, "ジュウシマツ脳神経核HVCにおける聴覚刺激依存的な機能的結合," *脳と心のメカニズム 第10回夏のワークショップ*, 札幌, 8月9日, (2009). (poster presentation)

[その他]

- ホームページ:
<http://www013.upp.so-net.ne.jp/nisikawa/>
http://researchmap.jp/jun_nishikawa/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

- 西川 淳 (Nishikawa Jun)
独立行政法人理化学研究所・
生物言語研究チーム・基礎科学特別研究員
研究者番号: 20392061