

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18340

研究課題名(和文) 運動系列に関わる時間制御の神経基盤

研究課題名(英文) Neural basis of timing control in motor sequence

研究代表者

濱口 航介 (Hamaguchi, Kosuke)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50415270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々が会話をする時、喉や口の筋肉は様々なタイミングで呼吸と共に制御されている。この複雑な運動は、皮質と脳幹の神経活動に依存するが、両部位の相互作用の仕組みは明らかになっていない。小鳥は複雑な歌を歌い、歌に必要な神経核が皮質から脳幹部に渡って同定されているため、皮質と脳幹部の相互作用を理解する上で有用な動物である。従来の仮説では、前運動野相当領域のチェーン状の回路で、歌のタイミングが生成されると考えられたが、本研究では、温度操作および神経回路シミュレーション、さらに歌っている最中の細胞内膜電位記録をもちいて、歌のタイミングはHVCを含んだ大域的なチェーン構造から作られていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Vocal control requires the interplay between the cortical and subcortical regions, however, their dynamical interaction during vocalization was remain elusive. Songbirds learn and sing highly complex vocal patterns and their cortical and subcortical song nuclei necessary for learning and singing were well identified. Therefore, they serve as a suitable model animal to study the interaction between cortical-subcortical regions during vocalization of learned sounds. Previous hypothesis postulated that cortical regions contain a chain like structure to generate precise timing to control the precise vocal gestures. However, we have shown that, by using peltier brain cooling, computer simulations, and intracellular recordings in singing birds, songs are the product of the cortical and subcortical chain structure instead of localized chain in the cortex.

研究分野：システム神経科学

キーワード：時間制御 synfire chain 小鳥 温度操作 細胞内膜電位記録

1. 研究開始当初の背景

小鳥の高次歌神経核 HVC は哺乳類の高次運動皮質に相当し、音素の順序を表現する投射神経を含む (Hahnloser et al., 2002; Fujimoto et al., 2012). 例えば下流の歌神経核 RA に投射する HVC_{RA} 神経は、歌の中で高々一度だけ、特定の音素のタイミングで活動する (図 1). さらに HVC の温度を局所的に冷やすと、歌が遅くなることから、HVC は順序およびタイミング制御に関わると考えられている (Long & Fee, 2008).

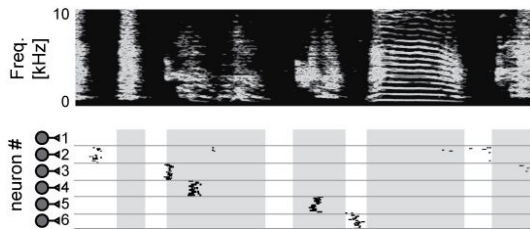


図 1: 歌っている小鳥の HVC から記録されたシーケンス様の活動電位(申請者による). 上段: 歌のソノグラム. 下段: 6つの HVC 投射神経の活動電位. 各点は活動電位.

申請者はこれまで、シーケンス様の神経活動を生み出す神経回路モデルの研究に従事してきた。このモデルは Synfire Chain と呼ばれ、階層型神経回路を同期した神経活動が伝播することで、同じ時系列を繰り返し生成できる。つまり順序・タイミング情報を安定に生成できるモデルである。この現象はモデルパラメータの変更に対して非常に頑健であることから、実際の脳においても安定であると予想されたが、上記の小鳥の研究結果が知られるまで、その存在は疑問視されていた。

順序やタイミングが、どのようにして脳内で作られているのか具体的に理解するため、申請者は米国にて小鳥の電気生理実験を行い、HVC と下流の神経核同士が Synfire Chain 様の高い正確性をもって、相互作用することを示した。それまで Synfire Chain は HVC の局所回路として存在すると信じられてきたが、この結果から、歌に関わる領野間の情報伝達も、同期発火をベースにした相互作用を

通じて行われていることが明らかになった。

これらの研究から、HVC に chain 構造が存在するのか、それとも HVC を含んだ歌神経核の連なりが作る大域的構造が chain 構造として機能するのか、が未解明の問題として挙げられるようになった (図 2)。HVC の局所神経回路が Synfire Chain として機能している証拠として、HVC の神経がシーケンス様の発火パターンを持つこと (Hahnloser et al., 2002)、バースト発火直前のシナプス活動が他のモデルで予想されるより急峻である (Long & Fee, 2010) がある。また歌のテンポが HVC の温度に依存する (Long & Fee 2008) ことから、HVC 内の局所回路が chain 状の構造を通じて歌のタイミングを制御する、と考えられている。

ところが、chain 構造は自己完結したシステ

順序とタイミングの情報はどこで作られるか?

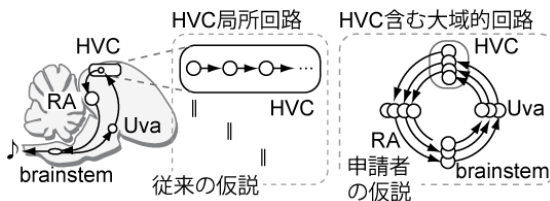


図 2: 申請者の作業仮説.

ムであるから、HVC が内在した chain 構造を通じてシーケンス様活動を生み出すとなると、呼吸や体性感覚などのフィードバックとは無関係に、高次の運動野が歌のタイミング制御を行うことになる。そのような運動制御の有効性には疑問が残る。実際に HVC の温度操作の詳細な解析からは、HVC 以外にもタイミングの制御機構が存在する可能性が示唆されており (Goldin et al., 2012)、議論は収束していなかった。

2. 研究の目的

これらを踏まえ、本研究では「HVC の神経活動は、HVC 内部で生成される活動、および視床を経た脳幹部からのフィードバックを閾値下のシナプス活動が統合することで生

成される」と仮説を立て、以下の課題の達成を目的とした。

- (1) HVC のシーケンス状神経活動を裏付けるシナプス活動を計測する。
- (2) HVC および他の歌神経核の温度操作を通じ、歌リズム・局所的な神経細胞同士の信号伝達、HVC から脳幹を通じ HVC にフィードバックする経路の信号伝達速度の定量化および比較。
- (3) 光遺伝学などの細胞選択的に神経細胞の興奮性を変化させる方法を用い、神経膜の興奮性を操作し、行動変化の定量化および比較。

3. 研究の方法

方法 1：自由行動下での細胞内膜電位記録。安定した細胞内記録を行うには、マイクロドライブの物理的安定性が重要である。自由行動下の動物において、直径 10-15 μm の神経細胞体内にガラス管を留置することは非常に難しいと考えられていた。この問題は、マイクロドライブを直接頭蓋骨に設置することで大きく改善されることが、我々の研究から分かってきた。一方の柔軟性を要求する場面として、マイクロドライブを設置する際の微小なズレ、セメントの収縮誤差などにより、マイクロドライブの電極軸が変化することが挙げられる。この現象は、手術時から慢性的に埋め込むことのできる金属電極を用いる細胞外記録ではあまり問題にならないが、実験ごとにガラス電極を交換する細胞内膜電位記録では問題となる。特に HVC のような微小な領域から記録を行う際には深刻な問題であった。そこで我々は、頭蓋骨に設置するベース部と電極を保持する部分を分離し、安定性と柔軟性を満たすマイクロドライブをデザインした。このマイクロドライブを用いると、従来考えられていたより遥かに安定した記録の取得が可能であることがわかった。実際に申請者の手技の範囲では一日に 1-3 細胞は 30 分以上の安定した細胞内膜電位記録が得られ、一動物から最大 3 週間程度は

記録が可能である。単一神経細胞の最長記録時間は 8 時間であった。本研究では、この安定性と柔軟性を兼ね備えたマイクロドライブを用いて、自由に歌う動物の細胞内膜電位を記録する。

方法 2：シナプス入力の解析。これまでの細胞外記録を用いた研究では、HVC のように非常に発火率の低い神経細胞集団の情報表現を理解することは、統計的検定力の問題からとても難しい。しかしそのような細胞でもシナプス入力数十 Hz の頻度があり、細胞内記録をもちいれば、特定の神経細胞に投射する機能的に関連した神経集団の活動を、シナプス活動として記録できる。そこで、本研究では閾値下のシナプス活動に着目する。

方法 3：温度操作。小鳥の歌は定量化しやすく、脳活動の微小な変化も行動の変化として定量化が可能である。神経活動を記録し、行動との相関を明らかにするのみならず、その神経領域の活動を操作し、行動の変化を観測することで、原因と結果の関係を明らかにするべきである。本研究では、ペルティエ素子を用いて、脳活動に操作を行う。

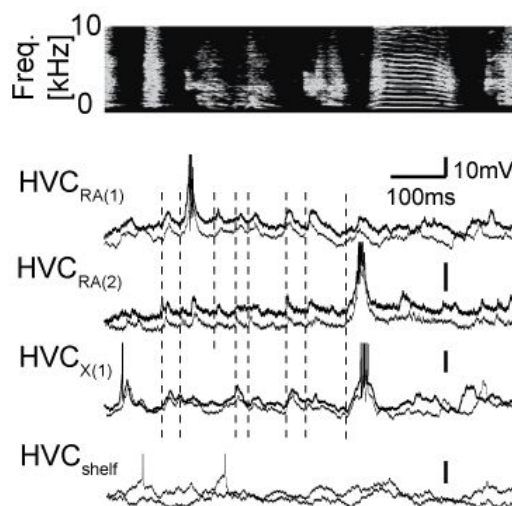


図 3：結果 1 . 異なったタイミングで発火する HVC 投射神経(HVC_{RA}, HVC_X)も、共通のシナプス入力を受ける . HVC 外部の神経 (HVC shelf) にはそのような相関は見られない.

4. 研究成果

(1) 我々は、従来の研究ではあまり着目されてこなかった、HVC 投射神経におけるシナプス活動の同期について調べた。最もシンプルな Chain モデルからは、シーケンスを作る神経細胞同士のシナプス活動には相関がないと予測されている。しかし我々の予備実験からは、異なるタイミングを表現する神経細胞も、非常に似たシナプス入力パターンを受けの事が明らかになった(図4)。しかもこの正確なシナプス入力は、音が始まる直前で多く出現しているようである。このような発火パターンは通常の HVC の活動とは異なるパターンであり、呼吸を制御する HVC 外部の神経活動を表している可能性があった。そこで、初年度は HVC 投射神経のうち、歌生成に直接関わる HVC_{RA} 投射神経から選択的に記録を行い、上記の現象が一般に成り立つかどうか調べた。ここで、HVC_{RA} 投射神経の同定は、投射先である RA に埋め込まれた刺激電極からの活動電位の逆伝播を用いた。またマイクロドライブの物理的な制限から、一度に計測できる神経の数は一つであるので、相関はトライアル平均同士の相関である、Signal Correlation を求めたところ、神経集団は強く同期したシナプス入力を受けの事が、明らかになった。

(2) 歌のタイミング生成メカニズムを理解する上で、温度依存性は重要な指標である。歌っている小鳥の HVC を小型ペルティエ素子で冷却すると歌が遅くなる。このことから、HVC には歌タイミングを制御する回路が存在する、と提案されていた。筆者らも同様に、HVC を 10°C ほど冷却すると、歌の速度が 20-30% ほど遅くなることを確かめた。しかしこの歌の温度依存性は、神経細胞のもつ温度依存性から想定されている効果(100-200%)とは大きく異なっていた。多くのイオンチャネルの時定数や神経回路のリズムがもつ温度感受性(Q₁₀)は、イカから哺乳類

まで、普遍的な値(Q₁₀=2~3)を取る。これは 10°C 冷却すると、2 倍(100%)から 3 倍(200%)速度定数が遅くなる、という意味である。これと比較すると、HVC を冷やした時、歌の Q₁₀ は我々の実測、及び過去の実験でも 1.25 程度であった。もしも HVC にチェーン構造が存在し、局所的にタイミングが生成されているなら、歌は HVC を 10°C 冷却した時に 2 倍程度遅くなるはずである。

我々は、HVC がタイミング制御に関わる神経系の一部でしかないなら、この予想よりも小さい温度依存性を説明できると考えた。なぜなら恒温動物の脳を一様に温度変化させることは難しく、もし皮質と脳幹部が共同して歌のタイミングを制御しているなら、HVC の冷却実験は歌のタイミングに関わる神経回路のごく一部しか、冷やしていない事になる。これならば、歌の速度変化が予想よりも小さかった理由を説明できる。

そこで我々はまず小鳥の神経細胞が標準的な Q₁₀ を持っている事を確認した。HVC 内部の神経同士の相互作用の時定数(シナプス入力の潜時、電気刺激から活動電位までの時間、Ca チャネルの時定数)を温度を変えながら、in vivo および in vitro のスライス電気生理で測定したところ、全て Q₁₀=2 の付近に収まった。これは HVC の神経細胞も、他の動物と同様に普遍的な温度感受性 Q₁₀(~2.0)を持っていることを示している。

(3) 我々の仮説では、HVC を冷やしたとき、HVC を通過する神経活動は 2 倍遅くなるものの、HVC を出て脳幹部に行き、視床を経由して戻ってくる経路は冷えていないため、歌の Q₁₀ は実効的に小さくなる、というものである。この仮説を試すために、左右の HVC-HVC 間の神経伝達速度を計測した。HVC を出発し、脳幹を経由して HVC に戻ってくる回路の伝播時間を計ると、HVC を 10°C 冷却することで 25% 程度の遅延が見られた。これは歌の速度の温度依存性と非常によ

く一致した。

(4) 歌のタイミングが大域的なチェーン構造から生成されるなら、HVC 以外の歌関連領域を冷やしても、歌が遅くなるはずである。この仮説を確かめるため、脳深部冷却用のペルティエ素子デバイスを開発した。脳幹からの情報を HVC に経由する視床神経核は Uva と呼ばれ、歌に必須である。この Uva を冷却したところ、やはり歌は遅くなった。これは歌のタイミングが、大域的なネットワークから生成されることをさらに支持する結果である。ただし Uva 冷却の効果は HVC の半分程度であった。これは、HVC 内部に短いチェーン構造が存在する可能性を残すものである。

(5) ここまでの温度操作の結果は大域的なチェーン構造が歌のタイミングを作る、とする仮説とよく一致した。では大域的なチェーン構造で、HVC のスパースな発火を再現できるだろうか？もし可能なら、二つのモデルで神経活動はどのような違いがあるだろうか？これを確かめるため、局所チェーンモデルと大域チェーンモデルにおける神経活動の数値シミュレーションを行った。局所モデルは、チェーン構造は HVC 内部にだけ存在し、大域モデルでは、HVC-RA-brainstem-Uva-HVC のループ構造に埋め込まれている。どちらのモデルも、スパースな活動電位を再現できた。一方でシナプス入力には大きな違いが現れた。局所モデルでは、二つの神経細胞に入力するシナプス入力に相関はなかったが、大域モデルでは高い相関が見られた。

本モデルでこのような差が生まれた理由は以下の通りである。局所チェーンモデルにおいては、シナプス入力は局所的なチェーン構造を伝播する一様な神経活動を、ランダム結合でばら撒くことによって作られる。時間的に一様に伝播する活動から、ランダムにシナプス入力をサンプリングするのだから、異なる

神経細胞同士のシナプス入力には時間相関がない。ところが大域モデルでは、4 つの神経核を順繰りに神経活動がめぐると、4 ステップに一度だけ多くの神経細胞でシナプス入力が観察され、その中のごく一部だけが発火する。他の 3 ステップではシナプス入力が少ないため、異なる神経細胞同士のシナプス入力に時間相関が生まれる。

(6) 本研究により、従来考えられていたような HVC の局所回路によって歌のタイミングが作られるのではなく、大域的なチェーン構造が重要であることが示された。これは歌のように、皮質における運動記憶の読み出しと、脳幹部における呼吸タイミング制御の両方が必要な運動制御を可能にする神経回路網であると考えられる。

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 1 件)

K. Hamaguchi, M. Tanaka, R. Mooney, "A Distributed Recurrent Network Contributes to Temporally Precise Vocalizations", *Neuron*, 91 (3), pp.680-93, 2016. [査読有]

〔学会発表〕(計 2 件)

K. Hamaguchi, Distributed encoding of vocal timing revealed by brain cooling and intracellular recordings in singing birds, *International Congress of Neuroethology (ICN2016), Satellite meeting*, Mar.29.2016, Montevideo, Uruguay (招待講演)。

K. HAMAGUCHI, M. TANAKA, R. MOONEY, Distributed mechanism of song timing generation, Program No. 629.12. 2016 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: *Society for Neuroscience (SfN)*, 2016. Online.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱口 航介 (Hamaguchi Kosuke)
京都大学大学院・医学研究科・講師
研究者番号：50415270

(2) 研究分担者

()
なし

(3) 連携研究者

()
なし

(4) 研究協力者

()

なし