

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07067

研究課題名(和文) 履歴依存的な神経応答修飾によるさえずり配列の符号化

研究課題名(英文) Encoding of syllable sequence by context dependent response modulation in auditory neurons

研究代表者

荒木 亮 (Araki, Makoto)

沖縄科学技術大学院大学・臨界期の神経メカニズム研究ユニット・研究員

研究者番号：60649078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：キンカチョウの幼鳥は、成鳥がさえずる音節とその配列を聞き覚えることで自身の歌を身につける。歌の音節配列の情報は、それぞれ音節の音響学的特徴と歌のリズムに応答するLF・HF神経の活動に重ねて表現されていると予測したが、これらの神経は形態学的に同定されていない。そこで、LF・HF神経の聴覚応答を記録後、細胞内に直接トレーサーを導入し、三次元蛍光画像から細胞形態モデルを作成した。さらに、LF・HF神経が存在する聴覚野出力層の神経に蛍光タンパクを発現させ、これらの形態モデルと聴覚応答を確認した細胞の形態モデルとを比較することで、LF・HF神経の形態学的な特徴を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞間のシナプスを介した情報伝達や神経細胞内での情報の統合・発火活動は細胞の形態と強く結びついている。本研究では、活動記録によって神経機能の同定を行った細胞の形態的特徴を大規模な神経形態学的な分類群と比較することでその特異な点を明らかにする、という古典的な形態同定手法を脳サンプルを透明化し大規模光学切片を得ることで大規模化・効率化した点で特色がある。同手法を用いて機能同定された細胞種間の空間的配置を明らかにすることで、明確な細胞層構造を持たないような脳領域において局所神経回路の推定に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Juvenile zebra finches learn song syllables and those sequence from adult conspecifics, but how the syllable sequence is encoded in neural activity is not yet understood. Output layer of primary auditory area (L3) has longer temporal integration period than input layer and has small number of neurons sensitive to order of syllables makes it good candidate area for the sequence encoding. I focused on LF and HF neurons which encode syllable sound morphology and song tempo, respectively, and hypothesized that the sequence information is co-expressed in their neural activity. These neurons have yet identified morphologically, therefore, I constructed morphological models of LF and HF neurons by loading tracer directly to the cells after confirming their characteristic auditory responses. Morphological character of LF and HF neurons were compared to morphological models obtained from population of L3 neurons expressed fluorescent proteins to clarify their morphological identity.

研究分野：電気生理学

キーワード：形態学的細胞同定 脳透明化手法 光シート蛍光顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

鳴鳥であるキンカチョウの幼鳥は、成鳥のさえずりを聞き覚え・まねることで後天的に自身の歌を獲得する(文献1)。キンカチョウのさえずりは数種類の音節を定型的な配列で繰り返す特徴的な構造を持つ。そのため、歌の認識・記憶・模倣の過程では音節配列の情報が神経活動へと変換(符号化)され処理されると考えられるが、その神経機構は明らかでない。

先行研究からキンカチョウの一次聴覚野の出力層(L3)では、入力層と比べ聴覚情報の時間的統合期間が長く、特定の音節の組み合わせに強い応答を示す神経が少数存在することが知られている(文献2, 3)。さらに、音節の音響学的特徴と歌のリズムに選択的な応答を示す神経(それぞれLF神経・HF神経)が発見されており(文献4)、これらの知見から一次聴覚野出力層で音節配列情報の符号化が行われている可能性が考えられる。

歌の聴覚情報処理における機能的意義が推定されるLF・HF神経は、音節配列情報の符号化則を検討する良い対象であるが、形態学的に同定されていない。そのため、異なる聴覚入力を受けると同種の神経細胞なのか、形態学的に異なる異種の神経なのか明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、LF・HF神経に着目し、下記の点を明らかにすることを目的とした。

- (1) LF・HF神経の応答が音節の配列に応じて応答が修飾され、その聴覚応答に音節配列の情報が符号化されるか、そうであればその符号化則はどのようなものか?
- (2) LF・HF神経は形態学的特徴とL3内の局所神経回路網における位置付け。

3. 研究の方法

- (1) L3に存在するLF・HF神経の聴覚刺激に対する膜電位応答を、麻酔下のキンカチョウから細胞内記録法を用いて記録する。もし音刺激に含まれる音節の配列の違いに応じてこれら神経細胞の応答が変化(修飾される)のであれば、逆相関法(文献5)で求められる細胞の応答特性が刺激の配列に応じて異なるはずである。その違いから、LF・HF神経が符号化する音節の音響学的特性・歌のリズムに加えて、配列情報が符号化されている可能性を検討する。

- (2) 方法1で聴覚応答を記録したLF・HF神経に細胞内記録用微小ガラス管電極を介して直接トレーサーを導入し、脳透明化手法と光シート顕微鏡とを組み合わせた大規模三次元蛍光画像を取得する(文献6, 7)。並行してアデノ随伴ウイルスベクターの注入により比較的少数のL3神経に蛍光タンパク質を発現・透明化処理を行なった脳サンプルを作成し、細胞内記録と同様に光シート顕微鏡で三次元蛍光画像を取得する。これら三次元画像データからLF・HF神経の形態モデル、及びL3領域を構成する神経細胞の形態モデルを作成し、それらの形態学的特徴を比較することで、LF・HF神経の形態学的に同定し、細胞種相互の空間配置や他領域への投射の有無等から、LF・HF神経を含む局所神経回路網の推定を試みる(図1)。

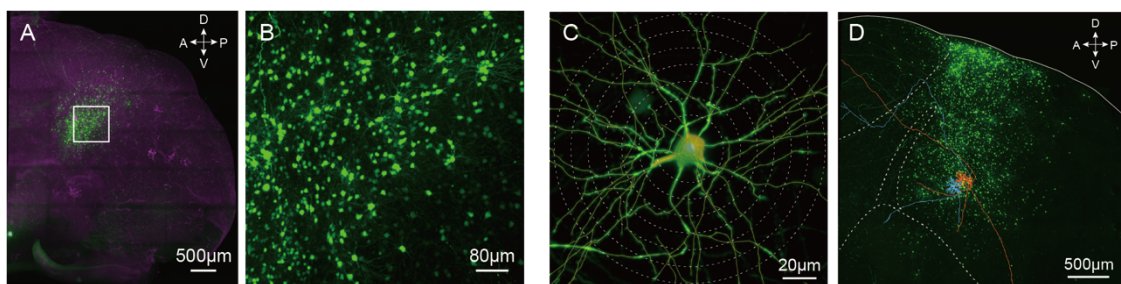


図1. 透明化脳三次元蛍光画像からの細胞形態モデルの作成

A. 蛍光タンパクをコードしたアデノ随伴ウイルスを注入により、緑色蛍光タンパク(GFP)を発現したL3神経細胞と細胞核染色との三次元蛍光画像(A-P:前後軸、D-V:背腹軸)。**B.** A白枠内の拡大画像。**C.** 蛍光輝度を元で作成した細胞体の多面体モデル(半透明赤色)と樹状突起モデル(半透明黄色線)。細胞体を中心とする同心円(破線)を横断する神経突起の数を同心円半径毎に計測し樹状突起の広がり数値化する(ショール解析)。**D.** 神経細胞から伸びる軸索を三次元蛍光画像中で追跡、投射パターンをモデル化。2つのL3神経(赤、青)が二次聴覚野(左上)と大脳後方・腹側に同時に軸索を伸ばしている。

当初、上記の方法1を主に用いて研究を行う予定であった。しかし、太い血管が走行するL3領域の組織が不安定な点に加え、ガラス微小管作成機の故障により作成可能な電極形状が変化するなどしたため、逆相関法を適用するために十分な刺激-応答データを取得するために十分な

時間記録を維持することが非常に困難であった。そこで、短期間の細胞内記録であっても実行可能な方法 2 に注力し、LF・HF 神経の形態学的同定と連関する局所神経回路網の推定を目指した。

4. 研究成果

- (1) LF・HF 神経は歌の音節やリズムに対して異なる興奮性入力を受け、形態学的特徴も異なる。歌刺激に対する LF・HF 神経の興奮性入力はそれぞれ持続的・一過性であり、入力の違いが発火応答の違いを生じている (図 2A-D)。また、それぞれ異なる形態学的特徴を持つ異なる細胞腫である (図 2E, F)。特に HF 神経は多くの場合近傍の細胞が同時に染色される。このことから、HF 神経はギャップ結合を介して複数の神経細胞が電気的に接続した局所回路を形成していると予想される。

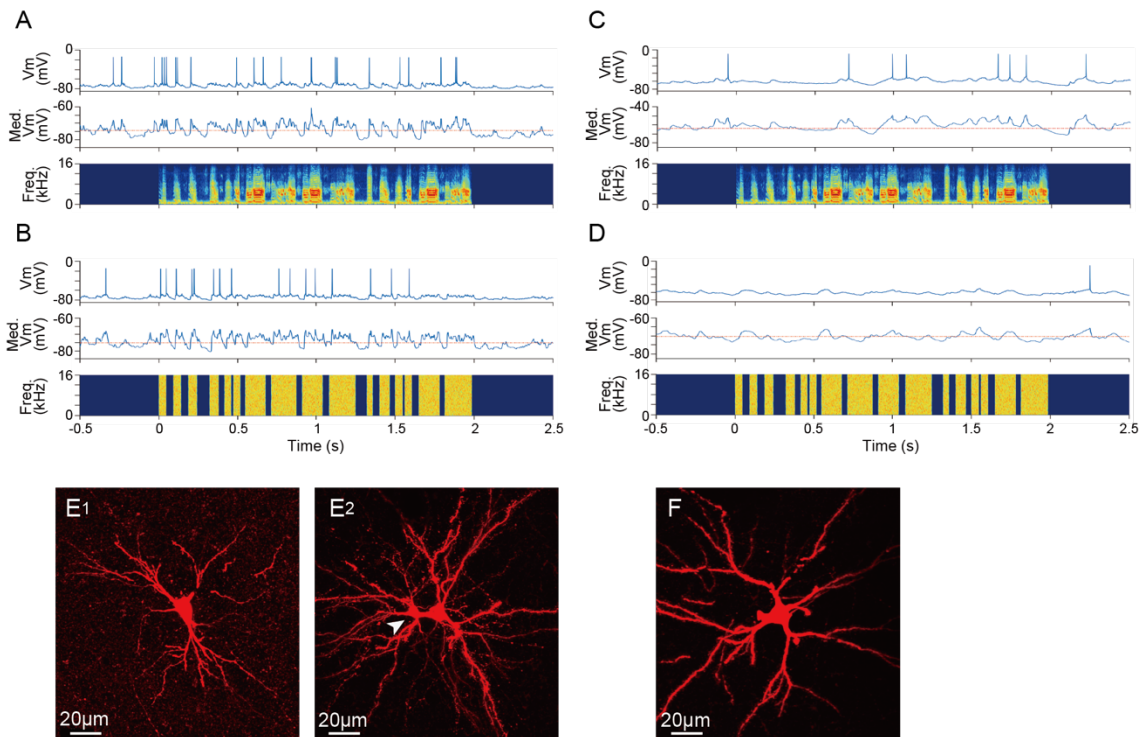


図 2. **A-D**. 聴覚刺激に対する膜電位応答 (上段) と聴覚刺激の周波数成分をヒートマップで表したサウンドスペクトログラム (下段)。域値下の応答に着目するためメディアンフィルターを用いて膜電位応答からスパイク活動を除去したトレースを示した (中段)。HF 神経 (A-B) は歌刺激 (A) と歌のリズムを模した白色ノイズ配列 (B) に対して持続的な興奮性入力を受け、音節と同期した発火応答を示す。一方、LF 神経 (C-D) は、歌刺激の少数の音節に対して一過性に興奮性入力を受け発火応答を示すが (C)、歌のリズムを模した白色ノイズ配列には応答を示さない (D)。**E-F**. 予備的に作成した脳切片中の LF・HF 神経の共焦点蛍光顕微鏡画像。HF 神経 (E1, E2) は三角錐型の細胞体を持ちそれぞれ頂点から樹状突起を伸ばす。また、ギャップ結合を介して細胞質を接続していると考えられる近傍細胞が多くの場合同時に染色された (E2 矢頭)。一方、LF 神経は HF 神経と比べ大きな細胞体を持ち、細胞近傍での樹状突起分枝が少ない。

- (2) L3 を構成する神経細胞の樹状突起多寡・投射パターンは細胞体の大きさと緩やかな相関を持つ

蛍光タンパクを発現させた L3 神経細胞形態モデルを作成し、細胞体の形状・樹状突起の伸展パターン・軸索投射の有無により形態学的な細胞分類が可能か検討した結果、大型の細胞は複数の脳領域へ軸索投射を持つ一方、中型・小型の細胞は単一の投射先あるいは長く伸ばした軸索を持たなかった。また、細胞体の大きな細胞程遠方の樹状突起数が大きく、細胞体のサイズと樹状突起の伸展に緩やかな正の相関が見られた。

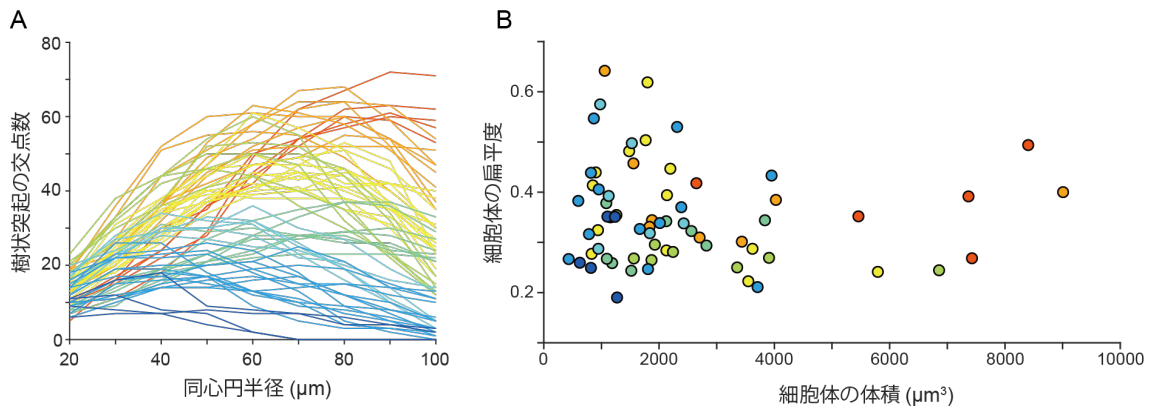


図 3. L3 神経の樹状突起の伸展パターンと細胞体形状との関係

A. 細胞体を中心とした同心円を横切る樹状突起の交点の数。各トレースはそれぞれ一つの神経細胞に相当し、遠方の樹状突起密度が高い波形クラスター（赤）から低い波形クラスター（青）へと色分けした。**B.** 細胞体の体積と扁平度の散布図。細胞の樹状突起伸展パターンが A. の波形クラスターと同様に色分けした。細胞体のサイズは、大きく小型・中型・大型に別れ、細胞体のサイズが大きい神経程樹状突起の分枝が遠方まで伸長する。また、小型の細胞では扁平度の高い細胞と低い細胞に分かれる。軸索投射モデルでは、大型の細胞 ($>5000\mu\text{m}^3$) にのみ複数の異なる領域へ投射を伸ばした細胞があるが、中型・小型の細胞 ($<5000\mu\text{m}^3$) は単一の軸索投射先を持つか、短い軸索しか持たなかった。

(3) HF 神経は聴覚野出力層における中程度の細胞体・樹状突起密度をもった神経である

HF 神経様の応答を記録後、トレーサー導入し、脳透明化処理・トレーサーの蛍光ラベル化を行ったサンプルの三次元蛍光画像から蛍光タンパク発現サンプルと同様に細胞形態モデルを作成した。HF 神経の形態モデルデータを聴覚野出力層神経のモデル群と比較すると、HF 神経が中程度の細胞体・樹状突起密度をもった神経に相当することが示された。

聴覚野出力層は、脳切片上の銀染色像より、細胞体の大きさと樹状突起の形状の異なる大まかに 4 種類の神経細胞で構成されている（文献 8）。しかし、それらの間に特定の分布構造は見られず、聴覚野出力層内の局所神経回路網の構成は明らかではない。4 種類の細胞種内にも形態学的多様性があり、それぞれ神経機能と密接に関係した形態的特徴を備えていると予想される。実際、歌のリズムをもった幅広い音刺激に応答する HF 神経は近傍の細胞とギャップ結合で電気的に接続しており、幅広い周波数域帯域を持つ音声入力に複数の神経細胞で協調して応答していると考えられる。本研究ではウイルスベクターを用いた細胞ラベル化と脳透明化手法・光シート顕微鏡を組み合わせることにより、多くの細胞の形態情報を効率よく収集する手法が確立できた。機能的同定を細胞内記録法によって行なった細胞の形態モデルをより多く収集し、細胞形態からどの程度の精度で細胞機能が予測可能かどうか、明らかにすることが今後の課題である。もし、細胞形態から細胞機能を十分予測可能であれば、細胞種相互の空間配置情報から局所神経回路の構造を推定するモデルを導出可能になると期待される。

逆相関法を用いて神経応答から刺激情報を読み取るには、多数の刺激-応答の記録を必要とするが、それに十分なデータを得られる期間記録を維持することが難しかった。微小ガラス管電極の電極抵抗を変更せず、頸部を極力細く変更することで記録の安定性が改善したことから、呼吸や拍動に伴って脳領域が揺れ動くことが不安定化の原因の一つとして考えられる。細胞内記録用電極を微小ガラス電極から、より細く柔軟な物性を持つクオートナノピペット（文献 9）などに変更することで、同領域からの細胞内記録実験の効率が向上する可能性がある。

<引用文献>

- ① Konishi M, Birdsong: from behavior to neuron. *Annu Rev Neurosci*, 8, 1985, 125-170
- ② Sen K, Theunissen FE, Doupe AJ, Feature analysis of natural sounds in the songbird auditory forebrain. *J Neurophysiol*, 86(3), 2001, 1445-1458
- ③ Lewicki MS, Arthur BJ, Hierarchical organization of auditory temporal context sensitivity. *J Neurosci*, 16(21), 1996, 6987-6998
- ④ Araki M, Bandi MM, Yazaki-Sugiyama Y, Mind the gap: Neural coding of species identity in birdsong prosody. *Science*, 354(6317), 2016, 1282-1287.
- ⑤ Theunissen FE, Sen K, Doupe AJ, Spectral-temporal receptive fields of nonlinear auditory neurons obtained using natural sounds. *J Neurosci*, 20(6), 2000, 2315-2331.

- ⑥ Chung K, Wallace J, Kim SY, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, Mirzabekov JJ, Zalocusky KA, Mattis J, Denisin AK, Pak S, Bernstein H, Ramakrishnan C, Grosenick L, Gradinaru V, Deisseroth K, Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*, 497(7449), 2013, 332-337.
- ⑦ Eberle AL, Selchow O, Thaler M, Zeidler D, Kirmse R, Mission (im)possible - mapping the brain becomes a reality. *Microscopy*, 64(1), 2015, 45-55.
- ⑧ Fortune ES, Margoliash D, Cytoarchitectonic organization and morphology of cells of the field L complex in male zebra finches (*Taenopygia guttata*). *J Comp Neurol*, 325(3), 1992, 388-404.
- ⑨ Jayant K, Wenzel M, Bando Y, Hamm JP, Mandriota N, Rabinowitz JH, Plante IJ, Owen JS, Sahin O, Shepard KL, Yuste R. Flexible Nanopipettes for Minimally Invasive Intracellular Electrophysiology In Vivo. *Cell Rep*, 26(1), 2019, 266-278.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Araki, M.; Yazaki-Sugiyama, Y.
2. 発表標題 Morphological identification of zebra finch primary auditory neurons for parallel encoding of individually unique and species-specific song features
3. 学会等名 Society for Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Araki and Yoko Yazaki-Sugiyama
2. 発表標題 Intracellular and morphological bases for neural activities used to detect song temporal patterns in the primary auditory forebrain of zebra finches
3. 学会等名 日本神経科学学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makoto Araki and Yoko Yazaki-Sugiyama
2. 発表標題 Morphological identification of zebra finch auditory cortical neurons for parallel information processing in song learning
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------