

平成 22 年 3 月 15 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 年 ～ 2008 年

課題番号：19700308

研究課題名（和文）

歌行動スイッチングに対応した神経活動パターンシフトの観察

研究課題名（英文）

The observation of neuronal activity corresponding to song action on songbird

研究代表者 福田 諭 (Fukuda Satoshi)

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：50425641

研究成果の概要：

本研究は、鳥類鳴禽類の歌生成システムにおける、大脳領域 HVC の内在的なリズムと、その自発的神経細胞発火パターンが外部からの入力によりどのようにシフトするかを目的とした。自身の歌を外部スピーカーにより聞かせることにより、細胞内カルシウム濃度を上昇させる細胞と、下降させる 2 種類の細胞が観察された。自身の歌に対する聴覚応答の他に、何も聞かせていない状態においても細胞の自発的な活動が観察されており、聴覚応答に対して神経細胞の活動がシフトすることが確認された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 ・ 神経科学一般

キーワード：HVC, カルシウムイメージング、2光子励起顕微鏡、ジュウシマツ、聴覚刺激、自発発火、in vivo、鳴禽類

1. 研究開始当初の背景

鳥類の鳴禽類は、なわばり防衛や求愛の際に歌をうたう。その歌は、ある種の鳴禽類において、複雑に歌の要素の回数や順番を変えながらうたわれる。そこでそのような鳴禽類の中樞神経系には、歌をうたう際に歌要素のきりかえ（スイッチング）を制御する何らかの特異的な機構が存在することが推定されてきた。しかし、その実態は不明であった。

生理学的また解剖学的な研究から、鳴禽類の脳領域の中でも、HVC という領域がさえざる能力の最高中枢であることが判明している。近年、急性スライスに対する微小電極法と細胞外電極法により、HVC 内に 1.5-10 Hz ほどの内在的なリズムが発見された (Solis and Perkel, 2005)。この 1.5 Hz から 10 Hz というリズムは、この報告で使われたキンカチョウという鳥において、歌が切

り替わるポイント（これをシラブルと言ひ、歌における単位の一つである。）で歌を区切った場合のおおよその周波数と良く対応している。そのため、HVC は歌における基本周期を作り出す場所として、より重要視されることとなった。

2. 研究の目的

本研究は、鳥類鳴禽類の歌生成システムにおける、大脳領域 HVC の内在的リズム発生機構と、その自発的神経細胞発火パターンが外部からの入力によりどのようにシフトするかを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 使用した動物

実験動物は、鳴禽類のジュウシマツを用いた。動物実験は、理化学研究所で制定されている動物実験倫理ガイドラインに従っている。

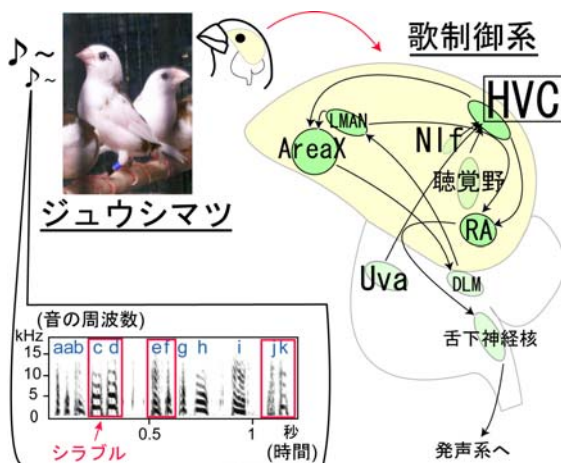


図1 HVC の位置と使用した動物

鳴禽類であるジュウシマツの歌は哺乳類大脳の領野のように役割分担された歌制御系（右上図、緑色で示す）によって学習・維持される。歌を縦軸に音の周波数、横軸に時間を取って表す（左下図）と、いくつかの小節からなっていることが解る。無音区間で区切る場合を音素といい、同じ音素に記号を振っていく（図内アルファベット小文字で示す）と、必ずある音素の後に別の音素が歌われる場合がある。このような場合は一つの単位と考え、その単位をシラブルと言う。鳴禽類の一部は、このシラブルの順番を複雑に組み合わせて歌ひ、その順番は状態遷移図として表すことが可能である。

(2) スライスカルシウムイメージング

雄の成体のジュウシマツをケタミン、キシラジンで麻酔し、断頭、2分以内に脳を摘出

した。とりだした脳を、氷冷した低カルシウム高マグネシウム ACSF (NaCl 125(mM); KCl 3; NaH₂PO₄ 1.25; D-Glucose 10; NaHCO₃ 25; L-ascorbic acid 0.4; MgCl₂ 5; CaCl₂ 0.1 (osmolarity 320 mosmol/l, pH7.4 95%CO₂-5%O₂ バブリング時)) 内で整形した。整形した脳を接着剤（超速瞬間ゼロタイムハイスピード（セメダイン社））で台に取り付け、低カルシウム高マグネシウム ACSF 内でビプラトーム（DTK-1000（堂阪イーエム社）または VT1200S(Leica 社)）で 400μm の厚さにサジタル方向にスライスした。スライス切片はスタンダード ACSF 内 (NaCl 125(mM); KCl 3; NaH₂PO₄ 1.25; D-Glucose 10; NaHCO₃ 25; L-ascorbic acid 0.4; MgCl₂ 1.3; CaCl₂ 2) で 30 分から 40 分ほど 37°C でインキュベートし、その後実験に用いるまで室温に置いた。本研究内では、実験中の条件も全て室温である。

カルシウム蛍光色素は、Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OGB-1; Invitrogen 社) を用いた。これを多細胞ボラス投与法で負荷した。具体的には、ガラスピペット内の投与用バッファーに OGB-1 を最終的に 10 mM になるように溶かし、そのガラスピペットをスライス内に刺入し、時間を置いて繰り返し空圧式ピコポンプ PV830 (WPI 社) により圧注することで細胞に負荷した。

カルシウム蛍光は、正立顕微鏡 BX51WI (OLYMPUS 社)、ニポウ式走査共焦点ユニット CSU22 (横河電機社)、冷却 CCD カメラ ORCA-ER (浜松ホトニクス社)、AQUACOSMOS システム (ver. 2. 6, 浜松ホトニクス社) を用い共焦点顕微鏡画像として取得した。

(3) in vivo カルシウムイメージング

麻酔はウレタンを用いた。その後、本実験のために設計、特注した脳固定装置（ナリシゲ社）を使用して個体頭部を固定した。左の HVC 上部の頭蓋を取り除き、急性スライス実験時と同様に多細胞ボラス投与法により OGB-1 を負荷した。その後、除去した頭蓋部にはカバーガラス切り取って嵌め込み、ティシュー・テッククリオモールド 3 号（サクラファインテックジャパン社）の深さを約 1/3 に加工したものをプールとしてエポキシ樹脂により頭蓋に取り付けた。観察には 2 光子顕微鏡 FV1000-MPE (OLYMPUS 社) を使用した。

4. 研究成果

HVC 領域の脳内微小回路を細胞レベルで直接観察するため、ジュウシマツの大脳を急性スライス化し、そのスライス上の HVC 領域を共焦点顕微鏡を用いたカルシウムイメージング法により観察した。カルシウムイメ

ージング法に用いられるカルシウム蛍光指示薬は、個体の出生直後を除くと脳細胞に負荷することが極めて難しいことが一般に知られているが、様々な負荷条件を検討し、カルシウム蛍光色素 OGB-1 を多細胞ポーラス投与法で負荷することができた。その結果、いっさいの薬物を投与せず、ただ灌流しているのみの状態で、脳細胞の自発的な 10 秒程度のカルシウム反応を検出することができた。これは HVC 内部の微小回路のみで活動を作り出していることを示唆している。10 秒という単位は、これまで HVC 領域で報告されてきたリズムとは全く違う長いスケールでの反応で、新しい知見となった。個体の歌にあてはめると、10 秒というのは、おおよそ 1 回のうたの長さに対応するスケールである。観察された自発的カルシウム反応は立ち上がり速い神経細胞様反応と、10 秒より長く緩やかなグリア細胞様反応の二種類があった。(図 2)

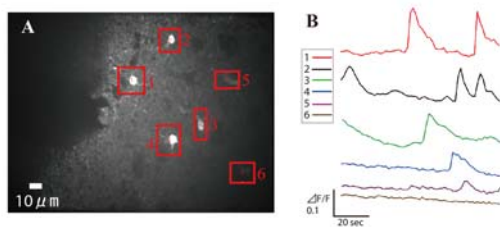


図 2 急性スライスでの HVC カルシウムイメージング

A; OGB-1 負荷によるイメージング画像
B; A の光量変化解析。おおよそ 10 秒ほどの自発的カルシウム反応が観察された。No.1 (赤), 2 (黒) の細胞では立ち上がりの早い反応, No.3 (緑), 4 (青) の細胞では緩やかな反応が観察される。

より生体に近く、また個体外部からの音刺激による観察を行うため、*in vivo* での脳内微小回路の活動を試みた。その結果、麻酔下で頭部を固定した個体の HVC 領域の脳細胞の活動を、2 光子励起顕微鏡を用いたカルシウムイメージング法により観察することに成功した。(図 3)

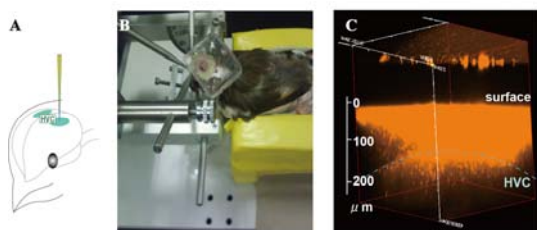


図 3 *in vivo* イメージングの実際
A; 左の HVC に多細胞ポーラス投与法に

より OGB-1 を負荷した。(実際は脳部位を固定し、個体は麻酔されて眠っている。) B; 頭蓋上にプールを作り、水浸の対物レンズにより観察した。写真ではイヤーパーがついているが、実験時には外している。C; OGB-1 蛍光を立体画像化し、深さ方向で見た図。脳表面より 200 μ m を越えて観察できている。

自身の歌を外部スピーカーにより聞かせることにより、細胞内カルシウム濃度を上昇させる細胞と、下降させる 2 種類の細胞が観察された。特に細胞内カルシウム濃度下降は、HVC 内の局所回路において聴覚刺激に対し、興奮性だけでなく、抑制性の入力があり、複雑な情報処理がなされていることを示唆している。また、HVC 領域は細胞がクラスタリングしていることからギャップジャンクションによる情報処理機構が疑われていたが、隣接した細胞で常にカルシウム濃度が同時に変化ことは観察されなかった。これは、少なくとも通常時においては、ギャップジャンクションが無い、あったとしても開いてはいないことを示唆している。

この自身の歌に対する聴覚応答の他に、何も聞かせていない状態においても細胞の自発的な活動も観察されており、自身の歌の聴覚応答に対して神経細胞の活動がシフトすることが確認された。(図 4)

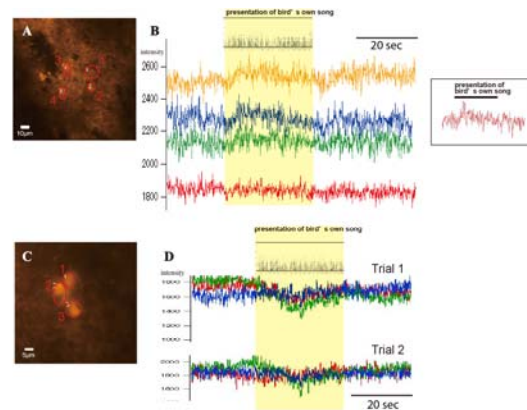


図 4 *in vivo* カルシウムイメージング
A; 点在している細胞のイメージング
B; A の光量変化解析。No.2 (緑), 3 (青), 4 (黄) の細胞はその個体自身の歌に対して細胞内カルシウム濃度を上昇させた。Inset は No.3 の細胞の 4 試行の平均。No.1 (赤) の細胞は反応していない。
C; クラスタリングしている細胞のイメージング
D; C の光量変化解析。No.2 (緑), 3 (青) の細胞はその個体自身の歌に対して細胞内カルシウム濃度を減少させた。No.1 (赤) の細胞は 2 試行めでは反応していない。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

福田諭、加藤真樹、岡ノ谷一夫

「成体鳥類歌制御系神経核 HVC における自発的な 10 秒程度のカルシウム応答」

第 31 回日本神経科学大会

2008 年 7 月 11 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 諭 (Fukuda Satoshi)

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： 50425641

(4) 研究協力者

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

加藤 真樹 (Katou Masaki)

慶應義塾大学・社会(科)学研究科・助教

研究者番号： 80345016

岡ノ谷 一夫 (Okanoya Kazuo)

独立行政法人理化学研究所・生物言語研究チーム・チームリーダー

研究者番号： 30211121