

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700320

研究課題名(和文) 音のパターンを記憶・想起する聴覚野メカニズム：二光子顕微鏡による解析

研究課題名(英文) Mechanism of auditory cortex to store and recall the pattern of sounds analyzed by two photon imaging

研究代表者

塚野 浩明 (Tsukano, Hiroaki)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：90624338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：和音は構成音の周波数が整数比になる音である。和音を聞くと、基音(F0)が含まれていなくともF0を知覚する。我々はこの現象の神経回路的メカニズムを解析するため、二光子イメージングとフラビン蛋白蛍光イメージングを用いてマウス一次聴覚野を観察した。その結果、一次聴覚野が、聞いた音の組合せを保持する記憶連想回路と記述できることを明らかにし、F0現象が記憶連想回路から作られる一部の成分である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Harmony is a kind of sounds whose components' frequencies are in relation of an integer ratio. Animals perceive the fundamental frequency (F0) which is the greatest common factor of harmonic sounds even if it does not exist. We observed mouse primary auditory cortex with two photon imaging and flavoprotein fluorescence imaging to investigate the neural mechanism to generate this phenomenon. As a result, it was revealed that the primary auditory cortex works as an associative memory circuit, and F0 is one of the components recalled by an associative memory circuit.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：大脳聴覚野 和音 マウス 脳機能イメージング マウス 記憶 連想

1. 研究開始当初の背景

和音とは構成音の周波数比が比較的簡単になる複合音である。和音を聞くと存在しないはずの基音 (missing F0) が聞こえてくることは良く知られている。例えば 1000+1500+2000 Hz の音を聞くと最大公約数に相当する F0 の 500 Hz も聞こえてくる。過去の様々な実験から、大脳皮質が missing F0 の認知に必要であることが判っている。しかしこの現象がどのような神経回路から起こる現象なのかは判っていなかった。この感覚はヒト、サル、ネコが持つことは知られていた。研究代表者は、マウスも missing F0 を知覚していることを 2011 年に行動実験を用いて示した。マウスは遺伝子改変技術やイメージングなど様々な方法論が使える動物であるため、マウスで和音を研究する基盤が整ったことは、聴覚機能の解明を後押しするものである。

研究代表者はフラビン蛋白蛍光イメージングを用い、マウス大脳皮質一次聴覚野を観察してきた。一次聴覚野は音の高さごとに応答する領域が並んだトノトピー構造を有する。しかし 20+25 kHz の和音を聞かせると、5 kHz の音が含まれていないにもかかわらず 5 kHz 領域にまで神経活動が及ぶことを発見した (F0 応答)。さらに構成音の周波数比が単純にならない不協和音ではこの現象が起こらないことが判った。さらに、この現象は経験依存的可塑性によってもたらされる可能性が高いことも判った。その根拠の 1 つ目は、5、20、25 kHz など倍音を含むマウスの親の鳴き声を聞く経験がないと、F0 応答が起こらなくなることである。2 つ目は 5+19+26 kHz の音に暴露しながら育てると、19+26 kHz の刺激で 5 kHz 領域の活動が起こることである。3 つ目は大脳皮質特異的 NMDA 受容体ヘテロ欠損マウスでは F0 の応答が起こらないことである。以上の事から、Hebb 学習則により獲得された何らかのメカニズムが駆動し、20、25 kHz の手掛かりを聞いただけで 5 kHz 領域にも神経活動が伝搬したと考えられる。ただし、これらはマクロイメージングを用いた実験の結果であるため、個々のニューロン F0 応答の中でどのような活動をしているか不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、F0 応答の中で個々のニューロンがどのような活動をしているか可視化し、マウス聴覚野がどのような回路として働いているのかを記述することを目的とした。

3. 研究の方法

マウスは C57BL/6 系統を用い、ウレタン麻酔下で聴覚野活動を観察した。マウス聴覚野の機能を俯瞰的に調べるためにフラビン蛋白蛍光イメージングを用いた。個々のニューロンの神経活動を可視化するために、フラビン蛋白蛍光イメージングで可視化した聴

覚野部位にカルシウム指示薬もしくは GCaMP を注入し、2/3 層から二光子イメージングを行った。

4. 研究成果

(1) F0 に応ずるニューロンを観察

マウスの 5 kHz に応ずる一次聴覚野の部位をフラビン蛋白蛍光イメージングを用いて同定する。フラビン蛋白蛍光イメージングは血管像も綺麗に取得することが可能であり、肉眼的に血管像のどこで活動が起こったか判る。そこに GCaMP3 を発現させるためのアデノ随伴ウイルスベクターをマイクロピペットで注入し、2 週間後に 5 kHz 領域の二光子カルシウムイメージングを行った。マウス聴覚野はトノトピーがあるため、5 kHz に応ずるニューロンは 20 kHz や 25 kHz には弱い応答しか示さない。しかし 20+25 kHz の和音を聞かせると、5 kHz ニューロンも同時に応ずる傾向があることが判った。この事実は、5 kHz に応ずるニューロンが、20+25 kHz にも同時に応答するために 5 kHz の F0 が聞こえてくること示している。過去のフラビンイメージングを用いた解析から、5 kHz と 19+26 kHz を交互に暴露させながら育てたマウスは 19+26 kHz の刺激音を呈示しても 19 kHz、26 kHz の領域しか活動しないにも関わらず、5+19+26 kHz の 3 つの音に同時に暴露させながら育てたマウスは 19+26 kHz の刺激音を呈示すると 5 kHz 領域にも神経活動が伝播することが判っていた。さらに大脳皮質特異的 NMDA 受容体ヘテロ欠損マウスは 20+25 kHz の和音を聞かせても 5 kHz の F0 応答が起こらなかった。以上の過去の知見から、F0 を生む回路は、音を同時にかつ繰り返し聞くことでそれらの周波数にチューニングされたニューロン同士が Hebb 則的に強化されると推測された。今回の二光子イメージングの結果はこれを裏付けるものである。

(2) 低周波和音のもたらす影響

Hebb 則で経験依存的に F0 回路が出来ることは判った。ではマウスが繰り返し暴露されているはずの音源の正体は何であろうか。最も可能性が高いものは親の鳴き声だと考えられる。過去の研究でマウスの鳴き声も倍音を持って 5 kHz 付近で鳴いていることが報告されている。よって、上述したように聴覚野が Hebb 学習則で頻繁に聞く音の組合せが強化されるのならば、5+10+15+20+25 kHz というシリーズの倍音が、それらの音にチューニングされたニューロン同士を強化し回路単位を形成していると考えられる。従って、聴覚野に一部の倍音成分の情報が入ってくればこの倍音回路が活性化され、あたかもシリーズ全ての成分を聞いたかのように (全体像を想起するかのように) 振る舞うと考えられ、この現象をフラビン蛋白蛍光イメージングで捉えていたと推測される。

この仮説が正しければ、高い音の手掛かり

からだけでなく、低い音の手かかりからも回路を賦活化出来ねばならない。そこで 4+8 kHz という低周波和音をマウスに呈示すると低周波領域を越えて 20 kHz 領域まで神経活動が伝播することが判った。一方、5+7 kHz のような低周波不協和音では低周波領域に活動が限局することが判った。即ち、低周波であっても倍音のシリーズに沿った音であれば高周波側の回路を賦活化させることが出来るのだ。このことは倍音シリーズ毎にニューロンが強化されていることを強く示す結果である。

以上のことは、一部の音を聞くと聴覚野は過去に記憶したシリーズ全体を想起する様な「補完回路」となっていることを示すものである。

(3)内側膝状体腹側核の構造

上記のプロジェクトを進めて行く上で内側膝状体に未発見の構造があることを発見した。聴覚野には前聴覚野と一次聴覚野というコア領域がある。哺乳類のコア領域は内側膝状体腹側核から投射をうけていることは古典的な事実として判っている。前聴覚野と一次聴覚野に biotinylated dextran amine を電気的に微量注入し、前聴覚野と一次聴覚野にそれぞれ投射する内側膝状体腹側核ニューロンを可視化した。その結果、前聴覚野に投射する部位は内側膝状体腹側核の内側部に限局しており、一次聴覚野に投射する部位は内側膝状体腹側核の外側部に限局していた。次に前聴覚野と一次聴覚野のそれぞれのトノトピーに沿ってトレーサーを注入すると、内側膝状体背側核内側部は内側から外側に向かって、内側膝状体腹側核外側部は背側から腹側にかけてトノトピーがあることが判った。以上の結果は、内側膝状体腹側核が 2 つのコンパートメントに分かれており、それぞれが独立したトノトピーを持ち、聴覚野への独立した投射をしていることを示すものである。この事実は、lemniscal pathway であっても内側膝状体 聴覚野は並列回路で構成されており、前聴覚野と一次聴覚野は独立した異なる情報を内側膝状体から受けていることを示している。

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 5 件)

(*corresponding author)

- (1) Manavu Tohmi, Reiko Meguro, Hiroaki Tsukano, Ryuichi Hishida, Katsuei Shibuki. (2014) The Extrageniculate Visual Pathway Generates Distinct Response Properties in the Higher Visual Areas of Mice. *Current Biology*. 24(6): 587–597. (査読有)
- (2) Kohei Yoshitake, Hiroaki Tsukano, Manavu

Tohmi, Seiji Komagata, Ryuichi Hishida, Takeshi Yagi, Katsuei Shibuki. (2013) Visual map shifts based on whisker-guided cues in the young mouse visual cortex. *Cell Reports*. 5(5): 1365–1374. (査読有)

- (3) Hiroaki Tsukano*, Masao Horie, Yuusuke Honma, Shinpei Ohga, Ryuichi Hishida, Hirohide Takebayashi, Sugata Takahashi, Katsuei Shibuki. (2013) Age-related deterioration of cortical responses to slow FM sounds in the auditory belt region of adult C57BL/6 mice. *Neurosci. Lett*. 556: 204–209. (査読有)
- (4) Yuusuke Honma, Hiroaki Tsukano, Masao Horie, Shinsuke Ohshima, Manavu Tohmi, Yamato Kubota, Kuniyuki Takahashi, Ryuichi Hishida, Sugata Takahashi, Katsuei Shibuki. (2013) Auditory cortical areas activated by slow frequency-modulated sounds in mice. *PLoS ONE*. 8(7): e68113. (査読有)
- (5) Horie Masao, Hiroaki Tsukano*, Ryuichi Hishida, Hirohide Takebayashi, Katsuei Shibuki. (2013) Dual compartments of the ventral division of the medial geniculate body projecting to the core region of the auditory cortex in C57BL/6 mice. *Neurosci Res*. 76(4): 207–212. (査読有)

[学会発表](計 24 件、一部省略)

- (1) Yoshitake Kohei, Tsukano Hiroaki, Tohmi Manavu, Hishida Ryuichi, Yagi Takeshi, Shibuki Katsuei. Whisker-guided visual map shifts and formation of ocular dominance column-like structures in mice (第 91 回日本生理学会、鹿児島、2014 年 3 月 16-18 日)
- (2) Hiroaki Tsukano, Ryuichi Hishida, Katsuei Shibuki. Properties as associative memory circuits in the primary auditory cortex of mice (第 91 回日本生理学会、鹿児島、2014 年 3 月 16-18 日)
- (3) Watanabe Tatsunori, Komagata Seiji, Tsukano Hiroaki, Hishida Ryuichi, Kohno Tatsuro, Baba Hiroshi, Shibuki Katsuei. Spinal cord imaging during post-ischemic numbness in mice(第 91 回日本生理学会、鹿児島、2014 年 3 月 16-18 日)
- (4) Maniwa Keiichi, Yamashita Haruyoshi, Tsukano Hiroaki, Hishida Ryuichi, Shibata Minoru, Endo Naoto, Shibuki Katsuei. Somatosensory cortical responses after crossing nerve transfer in mice (第 91 回日本生理学会、鹿児島、2014 年 3 月 16-18 日)
- (5) Yamagishi Tatsuya, Tsukano Hiroaki, Baba Hironori, Honma Yusuke, Ohsima Shinsuke, Kubota Yamato, Takahashi Kuniyuki, Takahashi Sugata, Shibuki Katsuei. Sound-shape association memory tested

- using a M-maze in mice(第 91 回日本生理学会、鹿児島、2014 年 3 月 16-18 日)
- (6) 塚野 浩明、大脳聴覚野の機能イメージング(第 43 回新潟大学脳研究所夏期セミナー、新潟、2013 年 07 月 26-27 日)
- (7) Katsuei Shibuki, Hiroaki Tsukano, Seiji Komagata, Ryuichi Hishida. Optical imaging of deep brain activity in mice. (第 36 回日本神経科学学会、京都、2013 年 6 月 20-23 日)
- (8) Hiroaki Tsukano, Ryuichi Hishida, Katsuei Shibuki. Harmonic sound processing in mouse primary auditory cortex revealed by in vivo two-photon calcium imaging. (第 36 回日本神経科学学会、国立京都会議場、京都、2013 年 6 月 20-23 日)
- (9) Kohei Yoshitake, Hiroaki Tsukano, Manavu Tohmi, Ryuichi Hishida, Takeshi Yagi, Katsuei Shibuki. Multiplicity of protocadherins required for cross-modal plasticity in the primary visual cortex of mice(第 36 回日本神経科学学会、京都、2013 年 6 月 20-23 日)
- (10) Ryuichi Hishida, Masao Horie, Hiroaki Tsukano, Manavu Tohmi, Hirohide Takebayashi, Katsuei Shibuki. Reduced visual acuity after blockade of feedback inhibitory projections from the parietal association area to the primary visual cortex in mice. (第 36 回日本神経科学学会、京都、2013 年 6 月 20-23 日)
- (11) Tatsunori Watanabe, Seiji Komagata, Hiroaki Tsukano, Ryuichi Hishida, Tatsuro Kohno, Hiroshi Baba, Katsuei Shibuki. Spinal mechanisms underlying post-ischemic numbness. (第 36 回日本神経科学学会、京都、2013 年 6 月 20-23 日)
- (12) Hiroaki Tsukano, Masao Horie, Ryuichi Hishida, Katsuei Shibuki. New subarea in the rostradorsal part of the primary auditory cortex in mice. (第 90 回日本生理学会大会、東京、2013 年 3 月 27-29 日)
- (13) Hiroaki Tsukano, Ryuichi Hishida, Katsuei Shibuki. Two-photon calcium imaging of harmonic sound responses in mouse primary auditory cortex.(第 35 回日本神経科学学会、愛知、2012 年 9 月 18-21 日)
- (14) Hironori Baba, Hiroaki Tsukano, Yusuke Honma, Shinsuke Ohshima, Yamato Kubota, Ryuichi Hishida, Kuniyuki Takahashi, Sugata Takahashi, Katsuei Shibuki. Biphasic ON-OFF responses in the mouse auditory cortex appeared after exposure to sustained tone bursts.(第 35 回日本神経科学学会、愛知、2012 年 9 月 18-21 日)
- (15) Masao Horie, Hiroaki Tsukano, Hirohide Takebayashi, Katsuei Shibuki. Anatomical and physiological parcellation of mouse auditory cortex using flavoprotein fluorescence imaging and immunohistochemistry for nonphosphorylated neurofilament protein. (第 35 回日本神経科学学会、愛知、2012 年 9 月 18-21 日)
- (16) Tatsunori Watanabe, Seiji Komagata, Hiroaki Tsukano, Ryuichi Hishida, Tatsuro Kohno, Hirhoshi Baba, Katsuei Shibuki. Spinal mechanism underlying post-ischemic numbness: potentiation of Somatosensory cortical responses after transient ischemia in mice.(第 35 回日本神経科学学会、愛知、2012 年 9 月 18-21 日)
- (17) Katsuei Shibuki, Hiroaki Tsukano, Seiji Komagata, Kenji Watanabe, Ryuichi Hishida. Macro-confocal imaging of mouse brain activity(第 35 回日本神経科学学会、愛知、2012 年 9 月 18-21 日)
- (18) Reiko Meguro, Manavu Tohmi, Hiroaki Tsukano, Takahiro Hirabayashi, Hirohide Takebayashi, Takeshi Yagi, Katsuei Shibuki. Abnormal appearance of retinal terminals in the dorsal lateral geniculate nucleus of the protocadherin a-deficient mice. (第 35 回日本神経科学学会、愛知、2012 年 9 月 18-21 日)
- (19) Manavu Tohmi, Reiko Meguro, Hiroaki Tsukano, Ryuichi Hishida, Katsuei Shibuki. Preferred speeds of higher visual areas determined by extrageniculate visual pathways. (第 35 回日本神経科学学会、愛知、2012 年 9 月 18-21 日)
- (20) Ryuichi Hishida, Masao Horie, Hiroaki Tsukano, Manavu Tohmi, Hirohide Takebayashi, Katsuei Shibuki. Functional analysis of inhibition mediated by feedback projections from higher association areas to the primary visual cortex in mice. (第 35 回日本神経科学学会、愛知、2012 年 9 月 18-21 日)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：脳活動の光学的画像解析法

発明者：澁木克栄、塚野浩明

権利者：国立大学法人新潟大学

番号：特願 2013-099032

産業財産権の種類：特許権

出願年月日：平成 25 年 5 月 9 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚野 浩明 (TSUKANO HIROAKI)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：90624338