

発声行動機構研究チーム

Laboratory for Vocal Behavior Mechanisms

チームリーダー HESSLER, Neal A.

発声行動の学習は、人間にとって非常に重要である。スズメ目鳴禽類に属する鳥（ソングバード）は、人間とともにこの学習の能力を共有する数少ない動物である。当研究チームでは、複雑な学習によって習得する行動の一例として鳥の歌（囀り）学習を研究し、歌学習を行わせる神経回路網と処理機構の特性を明らかにすることを目指している。人間が言語を習得するのがそうであるように、多くの種の鳥が幼若時に最もやすく歌を学習する。我々は解剖学および生理学的手法を用いて、発声学習の臨界期と学習後の歌の保持機構を、細胞・分子レベルで研究する。さらに発声学習の研究に加えて、鳥が歌を使ってコミュニケーションをしている際の社会的情報が、その鳥の脳の活動および行動に強く影響を及ぼす機構についても解明する。

1. 歌の学習と保持に関わる神経機構

(1) 鳥の歌学習におけるシナプス機構 (Wang (張田), Hessler)

発声中枢 RA は感覚情報と運動情報を統合しており、歌制御中枢に重要な位置を示している。NMDA 受容体は臨界期の歌学習に重要な役割を担うことがすでに知られている。鳥の歌学習期における RA ニューロンへの入力線維終末の放出確率の変化を調べるために、我々は鳥の脳スライスを用いて、RA への 2 つの入力経路にそれぞれ電気刺激し、分離された NMDA 受容体を介する興奮性シナプス後電流 (EPSC) を記録した。NMDA 受容体の open channel blocker である MK-801 を投与した後、EPSC 減衰率を連続的に測定することによって、シナプス前終末からの伝達物質の放出確率を調べた。成鳥の場合は、LMAN 入力経路では NMDA の放出確率はおよそ HVC 入力経路の半分程度である。さらに、学習臨界期の幼鳥では LMAN 入力経路による放出確率は成鳥の 2 倍であったことが分かった。本年度は、RA ニューロンへの入力線維シナプス前終末の放出確率の相違を定量化し、歌学習期のシナプス可塑性との関連性について調べてきた。さらに、鳥の歌運動中枢である RA における歌学習期中のシナプス前終末の可塑性を、歌学習の行動と直接にリンクすることを試みる。まず、我々は歌学習期に手本となる歌を聴いた経験のある幼鳥と、ない幼鳥におけるシナプス前終末の可塑性について調べる。

(2) 成鳥の歌保持における神経細胞新生の機能 (渡辺, Hessler)

鳴禽類の成鳥では、脳内歌制御核 HVC において新生した神経細胞の追加と共に細胞の入替えが起きているといわれ、歌保持との関連が指摘されている。しかし神経細胞の入替えを直接示す証拠は少なく、神経細胞新生の機能については良く分かっていない。我々はこれを明らかにする手がかりとして、まず新生神経細胞が作られる場所と、ターゲットとなる脳内歌制御核 HVC へ移動していくルートを

調べた。BrdU 注入により標識された新生細胞は、標識後数時間で側脳室中心に集中して見られた後、終脳の表面に沿って HVC 表面に達し、数日後にその一部が HVC 内に入った。また、TUNEL 法によって HVC 内での細胞死が起きていることをつきとめ、神経細胞の入替えが行われている可能性を直接確認した。さらに、鳴禽類で近縁ながら歌の可塑性が高いジュウシマツと可塑性が低いキンカチョウで HVC 内の細胞を比較したところ、新生細胞数だけでなく、細胞死数もジュウシマツの方が多いことが明らかになった。

2. コミュニケーションとしての歌の神経機構

(1) 歌をもちいたコミュニケーションにおけるコリン作動性ニューロンの機能 (小柴*, George, Hessler)

これまでの研究では、鳴禽の前脳 (anterior forebrain: AF) に存在するいくつかの領域で、歌を囀ることに関連したニューロンの活動が、囀りを行うときの社会的行動文脈に依って著しく変化することを示してきた。この前脳基底核回路では、メスに対する歌「directed song」を囀るときより、単独におかれたときに発する歌「undirected song」を囀るときの方が、はるかに活動量が多い。この変化の起源を探るために、我々は、囀りに依存して発現する遺伝子について、視床および中脳神経核における発現を調べた。その結果、2 つの神経核、中脳脚間核および視床手綱核正中での遺伝子発現が、前脳基底核での発現に対して逆のパターンを示すことを見いだした。すなわち、これらの神経核のある領域で、「directed song」を囀った後の方が、「undirected song」の後より遺伝子発現量が多い。このように、コリン作動性による賦活化は、メスに向かって囀るという強く喚起された行動の間、逆に減少する前脳基底核ニューロンの活動と、相互に関連していると考えられる。

(2) 歌を用いたコミュニケーションにおけるドーパミン系の機能 (柳原, Hessler)

鳴禽が囀りを行っている際に、前脳基底核は社会的要因や動機づけレベルに依存して、脳内のある特定の領域から修飾を受けている可能性がある。哺乳類における報酬に関連した行動に対するドーパミンの役割を考慮に入れ、我々はドーパミンが前脳基底核において見られる社会的文脈に依存した活動の修飾を制御するか否かを検討を開始している。ここでは、行動中のキンカチョウオスの中脳ドーパミン産生細胞の起始核である腹側被蓋野 (VTA) から単一神経活動を記録し、メスのキンカチョウに向けられた歌「directed song」と単独で囀られた歌「undirected song」を囀る異なる 2 つの行動文脈の間で神経活動に差が見られるかどうか調べた。この系における前脳基底核に対する修飾入力源としてのドーパミンの役割と一致して、社会的文脈に依存した活動を示す 2 つの異なるタイプの VTA ニューロンを見

いだした。ひとつの VTA ニューロン群は「directed song」中に一過的な発火の上昇を示したが、「undirected song」中には発火の変化は見られなかった。これに対し、別の VTA ニューロン群は正反対の活動パターンを示した。すなわち、「directed song」中に発火を停止したのに対し、「undirected song」中には持続的な発火を示した。

* ジュニア・リサーチ・アソシエイト

Learning to vocalize is crucially important to humans. Songbirds are among the few animals that share this ability. This lab studies song learning as an example of a complex learned behavior, and aims to characterize the neural networks and processing mechanisms that allow this learning. As is true for human speech, birdsong in many species is most easily learned when the animal is very young. We use anatomical and physiological techniques to investigate the cellular and molecular basis of this critical period of vocal learning and song maintenance. In addition to studies on vocal learning, we study the way in which social information strongly influences brain activity and behavior during song communication.

1. Neural mechanisms of song learning and maintenance

(1) Synaptic mechanisms of song learning

One nucleus in the songbird forebrain, RA, is a critical location for integration of sensory and motor signals during song learning. Previous studies had suggested an important role for postsynaptic NMDA receptors during the song memorization or song practicing period. We are testing, using anatomical and physiological methods, whether presynaptic properties may also change during song learning. We recorded isolated NMDA-receptor mediated epscs in response to stimulation of inputs from LMAN and HVC to RA neurons. After addition of the open-channel blocker MK-801, transmitter release probability was determined by measuring the rate at which successive epscs decreased in size. We found that the release probability of adult LMAN synapses was about 40% lower than of young LMAN synapses. For inputs from both LMAN and HVC, synapses remaining after block of NMDA receptor NR2B subunits had a lower release probability. Furthermore, we have found that there is a consistent decrease in the relative amount of NR2B subunits during the period of song learning, by labelling with receptor antibodies. Thus, maturation of synapses by postsynaptic addition of NR2A subunits occurs concurrently with decreased presynaptic release probability.

(2) Function of neurogenesis in adult song maintenance

In adult songbirds, new neuron addition and likely replacement occur in the HVC, a forebrain song control nucleus. Such neurogenesis is thought to be related to adult song maintenance and plasticity, however, the detailed function is still unclear. To address this issue, we first confirmed the site of neurogenesis and the route of migration of new neurons by injection of the cell birth marker, bromodeoxyuridine (BrdU). The BrdU-labeled cells appeared in a cluster in the ventricular zone within 3-4 hrs after injection, and migrated along the ventricular wall into HVC after several days. We then stained apoptotic cells in HVC by the TUNEL method to test for neuronal replacement. Greater numbers of both BrdU-labeled and apoptotic cells were seen in bengalese finches, whose adult song shows

more plasticity, than in zebra finches.

2. Neural mechanisms of song as communication

(1) Cholinergic function in song communication

Previous work had shown that singing-related activity in several anterior forebrain (AF) areas is strikingly modulated by the social context in which a bird sings. In this basal-ganglia circuit, there is much more activity when a bird sings while alone (undirected) than when singing to another bird (directed). To investigate possible sources of this modulation, we are examining singing-related immediate early gene (IEG) expression in diencephalon and midbrain nuclei. We have found that there is an opposite pattern of IEG expression in two areas, the interpeduncular nucleus (IPN) and medial habenula, compared to AF nuclei. Expression is higher after directed compared to undirected singing. Furthermore, we found higher levels of expression after directed singing in the nearby dopaminergic nucleus VTA. In order to determine the circuit that is modulated during courtship, and how it can affect cortical brain activity, we are combining IEG expression with labels for specific neuron types, such as dopaminergic neurons or interneurons.

(2) Dopaminergic function in song communication

During singing, the AF could receive a selective modulatory input dependent on social factors or motivational level. Given the role of dopamine in other systems in reward processes, we have begun to test whether this transmitter may mediate the social modulation of forebrain activity. We recorded activity of neurons in the midbrain dopaminergic nucleus VTA while birds sang both directed and undirected songs. Consistent with a role of dopamine as a source of forebrain modulation in this system, we have found two distinct types of VTA neurons whose activity is consistently dependent on social context. One population phasically increased its firing during directed singing, but was not changed during undirected singing. Another population of neurons fired in an opposite pattern: they ceased firing during directed singing, but fired tonically during undirected singing.

Research Subjects and Members Laboratory for Vocal Behavior Mechanisms

1. Synaptic mechanisms of song learning
2. Function of neurogenesis in song learning and maintenance
3. Cholinergic function during song communication
4. Dopaminergic function during song communication

Laboratory Head

Dr. Neal A. HESSLER

Research Scientists

Dr. Jian WANG (Yuki HARUTA)

Dr. Aiko WATANABE

Dr. Shin YANAGIHARA

Dr. Isabelle GEORGE

Technical Staff I

Ms. Erina HARA
Ms. Keiko ASAI

Assistants

Ms. Mariko IWASAKI

Junior Research Associates

Ms. Mamiko KOSHIBA (Tokyo Univ. Agric. Technol.)

□ 頭 発 表 **Oral Presentations**

(国際会議等)

Wang J. and Hessler N. A.: "Regulation of presynaptic function in a songbird motor control nucleus", 33rd Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience (Neuroscience 2003), New Orleans, USA, Nov. (2003).

Watanabe A., Li R., Kimura T., and Sakaguchi H.: "The deafened-induced protein kinase C increase by the error signal from a basal ganglia-forebrain circuit in the Bengalese finch song control nuclei", 33rd Ann. Meet. of

Soc. for Neuroscience (Neuroscience 2003), New Orleans, USA, Nov. (2003).

Yanagihara S. and Hessler N. A.: "Neuronal activity of midbrain ventral tegmental area(VTA) neurons in singing birds is modulated by social context", Cold Spring Harbor Laboratory Meet. on Computational & Systems Neuroscience, Cold Spring Harbor, USA, Mar. (2004).

(国内会議)

小柴満美子, 渡辺愛子, 養王田正文, Hessler N. A.: "Modulation of singing-related gene expression by social context in midbrain cholinergic nuclei", 第 26 回日本神経科学大会, 名古屋, 7 月 (2003).

王健, Hessler N. A.: "Regulation of presynaptic function in a songbird motor control nucleus", 第 26 回日本神経科学大会, 名古屋, 7 月 (2003).

渡辺愛子, 小柴満美子, Hessler N. A.: "鳴禽類の成鳥の脳内歌制御核における神経細胞新生の機能", 日本動物学会第 74 回大会, 函館, 9 月 (2003).