

平成21年6月4日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19300114

研究課題名（和文） 海馬シナプスの左右差の生理的意義

研究課題名（英文） Physiological significance of left-right asymmetry of hippocampal synapse

研究代表者

重本 隆一（SHIGEMOTO RYUICHI）

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・教授

研究者番号：20221294

研究成果の概要：

(1) 方法の確立

本研究ではまず、同側の神経線維の作るシナプスのみを調べるために、腹側海馬交連（VHC）をあらかじめ切断したマウスを作製した。このような動物から用意されたCA1領野のスライスから電気生理学的記録を行うとともに、シナプス蛋白質を精製しNMDA受容体の反応やサブユニットの定量を行った。また同様の動物から電子顕微鏡用の超薄切片を作成し定量的金標識法により個々のシナプスでのNMDA受容体の定量を行った。

(2) グルタミン酸受容体の左右非対称性

我々は既に NMDA 受容体サブユニット NR2B の左右のシナプスにおける局在の違いについて、postembedding 法で解析し、錐体細胞のシナプス特異的に非対称性が存在し、介在神経細胞のシナプス是对称的であることを明らかにしていた（Wu et al., J Neurosci., 2005）。本研究ではシナプス全体としての左右差を明らかにするために、まずはシナプスに局在する蛋白質のうち量的な非対称性があるものを検索した結果、AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR1 サブユニットに NR2B とは反対方向の左右非対称性がある事を定量的な Western blot で明らかにした（Shinohara et al., PNAS, 2008）。その他のグルタミン酸受容体サブユニットには左右非対称性は認められなかった。

(3) 個々のシナプスにおけるNR2BとGluR1密度の逆相関

当部門では、定量的な免疫電子顕微鏡法として凍結切断レプリカ免疫標識法の開発を進めている。すでにAMPA受容体については1チャンネルを1つの金粒子で検出できる事を示しており（Tanaka et al., J Neurosci., 2005; Masugi-Tokita et al., J Neurosci., 2007）、NMDA受容体についても定量的な解析を進めた結果、NR2BとGluR1ではシナプスにおける密度に明確な逆相関が存在する事を明らかにした（Shinohara et al., PNAS, 2008）。

(4) シナプス形態の左右非対称性

また、我々は錐体細胞がシナプスを形成するスパインの構造自体に対応するシナプス間で大きな左右差が存在することを発見した（Shinohara et al., PNAS, 2008）。右側より入力を受けるシナプスの方が左側より入力を受けるシナプスよりも大きなスパインとシナプス面積を持っており、perforated synapseやmushroom型スパインの頻度が有意に高い。

(5) その他のシナプス蛋白質の総量の左右非対称性

NR2B と GluR1 以外で、CA1 によく発現しているイオノトロピック型グルタミン酸受容体、すなわち NR1, NR2A, GluR2, GluR3 については、シナプス密度に左右非対称性は存在しないものの、これらの量はシナプス面積に比例していることが明らかになり、右側より入力を受けるシナプスの方が面積が大きい事を反映して、総量としてはこれらのシナプスでより多く発現していることが明らかになった。これはほとんどの PSD 蛋白質にシナプスに含まれる総量としての非対称性が存在する事を示唆している。同様の理由により、NR2B に関しては総量としての左右非対称性は打ち消されていることが明らかになった。逆に GluR1 の非対称性は強調されており総量で 2 倍以上の差があった。

(6) シナプス左右非対称性の生理的意義

上記のようなグルタミン酸受容体やシナプス形態の左右非対称性の生理的意義を調べるためにマウス脳を左右で分断し、右の海馬を主に使うマウスと左の海馬を主に使うマウスの間で空間学習能を調べたところ、右は正常と差がなかったが左では障害が認められた。この結果はマウスでもヒトと同じように空間学習機能は右脳優位であることを示している。これは、右海馬シナプスに長期増強現象の結果増大する GluR1 が密度が高いことと一致する結果である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

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

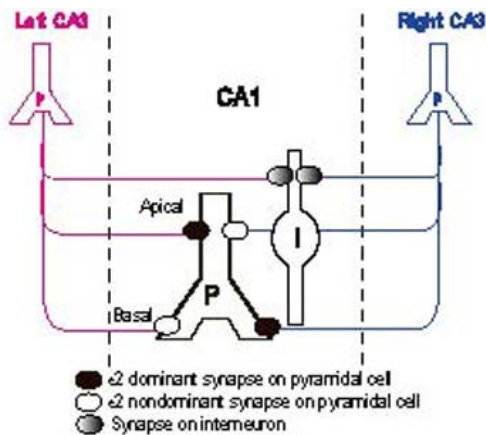
キーワード： 海馬、グルタミン酸受容体、左右差、記憶、シナプス、スパイン、NR2B、GluR1

1. 研究開始当初の背景

我々は、マウス海馬の CA1 錐体細胞シナプスにおいて、NMDA 受容体サブユニット NR2B が左右非対称に分布していることを、機能的および形態学的方法により見出した (図 1、Kawakami, Shinohara et al., Science 2003; Wu et al., J Neurosci. 2005)。この驚くべき発見は、脳の左右差について初めて分子実体を明らかにしたものであった。しかしながら、この左右差が果たして人間でよく知

られている、脳の高次機能の左右差と関連があるのかどうか、あるいはその他の何らかの意味があるのかどうかは不明である。従って子の左右非対称性の生理的意義を解明するために、海馬シナプスに存在する左右非対称性は NR2B だけの特殊な現象なのか、それとも他にも多くの左右非対称性が存在し、より一般的な現象として生理的意義の認められるものなのかをまず明らかにする必要があった。

図1) 海馬の錐体細胞特異的な NMDA 受容体 NR2B サブユニット左右非対称性配置モデル



右の CA3 錐体細胞から入力する神経線維(青)は両側の CA1 錐体細胞の基底突起に NR2B の多いシナプス(黒丸)を形成し、頂上突起に NR2B の少ないシナプス(白丸)を形成する。反対に左の CA3 錐体細胞から入力する神経線維(赤)は両側の CA1 錐体細胞の基底突起に NR2B の少ないシナプスを形成し、頂上突起に NR2B の多いシナプスを形成する。CA1 の介在神経細胞上のシナプスについては、このような NR2B の左右非対称性局在は認められない。

(Wu et al., J Neurosci. 2005 より)

2. 研究の目的

したがって本研究課題では、この海馬シナプス左右差の全体像とその生理的意義を明らかにすることを目的とした。ヒトにおいては様々な脳の高次機能の左右非対称性(Laterality)の存在が知られているが、それを生み出す分子機構に関してはほとんど明らかになっていない。一方、ヒト以外の動物においては、体軸の左右を決めるメカニズムに関して近年大きな進歩が認められるが、これらはほとんどが内臓系の左右差に関するものであり、脳の左右差についてはその存在自体についてもほとんど調べられていないのが実情である。われわれの発見は脳の左右差の起源と意義についての理解を進める

突破口となる可能性がある。当初、海馬シナプスの左右差は単に NR2B 分子だけの非常に特異な現象であって生理的には大きな意味がないのではないか、という懸念が他の研究者らからも寄せられたが、その後の我々の研究によってこの非対称性(あるいは逆の非対称性)が NR2B 分子にとどまらず GluR1 などの複数の分子局在に見られることが明らかとなった(図2 Shinohara et al., PNAS, 2008)。さらに驚くべきことに、これらの分子局在のみならずシナプス自体の形態が左右の対応するシナプスで大きく異なることが明らかになった。これらの結果は、NR2B 局在の左右差が1.5倍という、いわば僅かな差のようでありながら結果的にシナプス機能の大きな違いとして現れている可能性を示し、これがヒトにおける高次機能の左右非対称性にも繋がっていく可能性を示すものである。そこで本研究課題では、まずシナプス全体としてみた場合の左右差についてさらに系統的に調べ、次にその生理的意義を明らかにすることを目的とした。

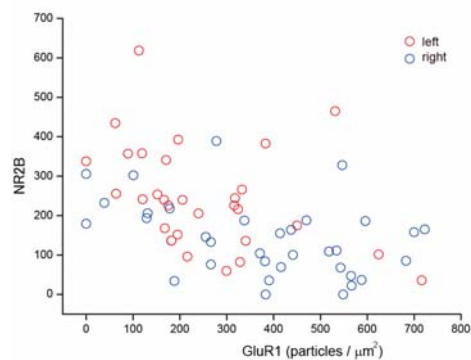


図2) GluR1 には NR2B とは逆の左右差が存在する

個々の点は SDS レプリカ免疫標識法で得られた CA1 の stratum radiatum における一つのシナプスにおける GluR1 と NR2B の密度を示す。GluR1 と NR2B の密度には逆相関が存在し、GluR1 は右側で、NR2B は左側でシナプス内密度が高いことが分かる。

3. 研究の方法

(1) 生化学的実験

シナプス全体としての左右差を明らかにするために、まずはシナプスに局在する蛋白質のうち特異的な抗体が入手できるものについて量的な非対称性があるものを検索した。VHCT を行った海馬の放射状層から左右別々に Schaffer collateral シナプスからの PSD 画分を調整し、定量的な Western blot 解析を行った。これらの生化学的実験は主に研究分担者の篠原良章が担当して行った。

(2) 形態学的実験

当部門では、定量的な免疫電子顕微鏡法として凍結割断レプリカ免疫標識法の開発を進めている。すでに AMPA 受容体については 1 チャネルを 1 つの金粒子で検出できる事を示しており (Tanaka et al., J Neurosci., 2005; Masugi-Tokita et al., J Neurosci., 2006)、NMDA 受容体についても定量的な解析を進めている。(1) の生化学的実験で量的非対称が認められたものを中心にシナプスでの数と密度の定量を行い、左右間や基底および頂上樹状突起間での分布の差異を検討した。標的分子によっては細胞膜蛋白でないものもあり、レプリカ標識ができない場合は、postembedding 法によって定量することを試みた。また、我々は錐体細胞がシナプスを形成するスパインの構造自体に対応するシナプス間で大きな左右差が存在することを発見した (図 3)。

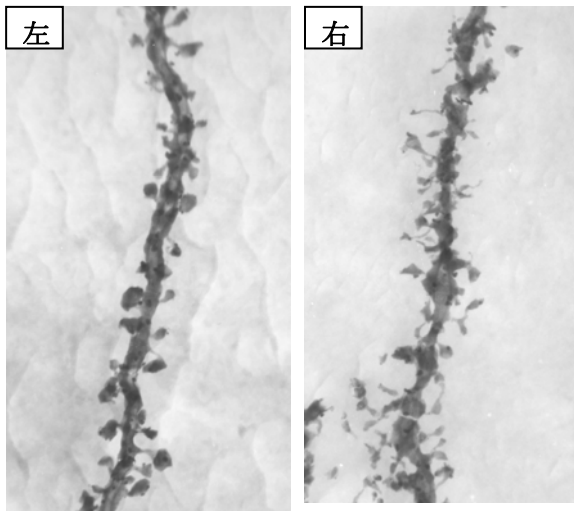


図 3) 同側 CA3 錐体細胞から入力を受ける左 CA1 放射状層における錐体細胞樹状突起スパイン形態および右 CA1 放射状層における錐体細胞樹状突起スパイン形態

ゴルジ染色法を施した標本を生理学研究所超高压電子顕微鏡で撮影した。左海馬においては、同側入力を放射状層でうける錐体細胞のスパインはマッシュルーム状のヘッドの大きなものが多いのに対し、右海馬において同側入力を放射状層でうける錐体細胞のスパインはネックが長く細いものが多い。

このようなスパインの微細構造の解析には従来の電子顕微鏡法と共に生理学研究所の超高压電子顕微鏡による断層撮影像解析法が有効であった。なお以上の形態学的実験は主に代表者の研究室にて行った。

(3) 行動実験

本課題の最終的な目的はシナプスの左右非対称性の生理的な意義に迫る事である。このためには、この左右非対称性が動物個体でどのようなインパクトを持っているのかを明らかにする必要がある。つまりトップダウンアプローチで用いる 2 種のミュータント、あるいはボトムアップアプローチから浮かび上がってくるノックアウトマウスを使った行動実験によって、シナプスの左右差に対応するフェノタイプを見つけ出す事が必要である。まずは、海馬が重要な役割を持つことがよく知られている空間学習に関する行動実験を行った。

4. 研究成果

海馬 CA1 シナプスにおいて NR2B の他にも AMPA 受容体の GluR1 サブユニットで NR2B と逆の左右非対称性があることやシナプス自体の大きさやスパインの形状に非対称性があることが分かり、大きなシナプスほど GluR1 密度が高く NR2B 密度が低いことが確認された。さらにこの性質が果たして NR2B の密度の違いによって生じたものなのか、独立に生じたものなのかを調べるために、CA1 特異的に NR2B を欠損させたマウスにおいて、

シナプスの大きさを調べた結果、全体的にスパインが拡大しており、しかも左右差がなくなっていることが明らかになった。

また、これらの左右差の生理的意義を明らかにするために、左右の脳半球を分離したマウスにおいて、右目のみによる空間学習と左目のみによる空間学習をバーンズ迷路を用いた行動実験によって比較したところ、左目からの視覚情報と右脳海馬を主に使って学習する場合の方が逆の場合よりも空間学習に優れていることを発見した(図4)。これは、ヒトでよく知られている、空間記憶の右脳優位と一致する結果であり極めて興味深

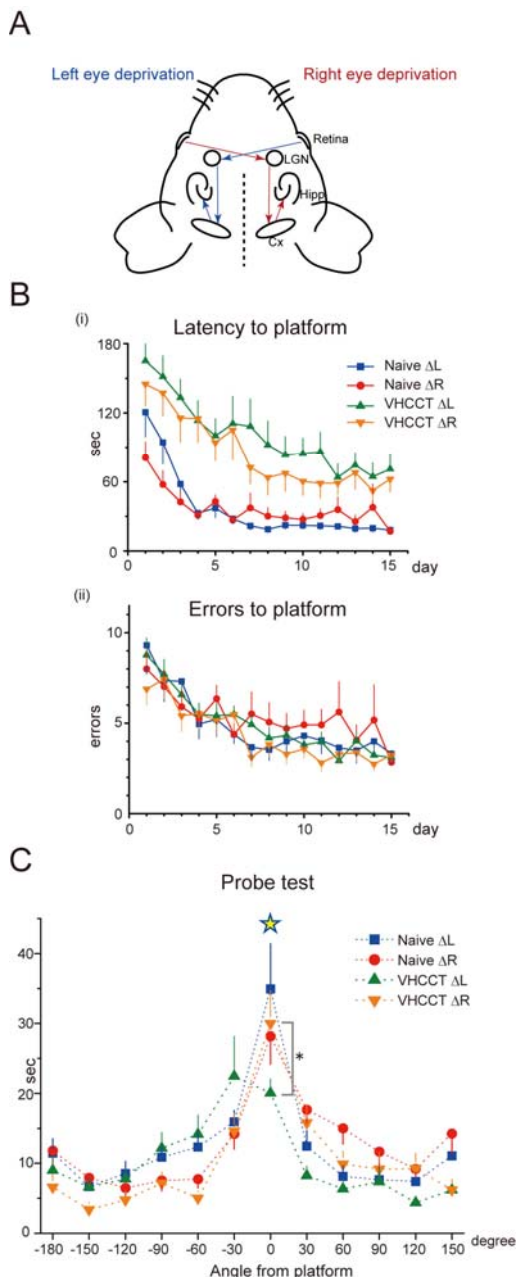


図4 空間学習能は右脳優位である

い。今後は左右非対称性が失われた変異マウスで空間学習の右脳優位性がはたしてなくなっているかどうかを調べる。

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2件)

① Kawakami R, Dobi A, Shigemoto R, Ito I, Right isomerism of the brain in inversus viscerum mutant mice, PLoS ONE, 3, e1945, 2008, 査読有

② Shinohara Y, Hirase H, Watanabe M, Itakura M, Takahashi M, Shigemoto R, Left-right asymmetry of the hippocampal synapses with differential subunit allocation of glutamate receptors, roc. Natl. Aca. Sci. USA, 105, 19498-19503, 2008, 査読有

[学会発表] (計5件)

① 重本隆一、海馬シナプスの左右差、第113回日本解剖学会総会・全国学術集会、2008年3月27日、由布市

② Ryuichi Shigemoto、Left-right asymmetry of hippocampal synapses、IBRO International Workshop、2008年1月23日~26日、Debrecen, Hungary

③ Y. SHINOHARA、Left-right functional difference of the mouse hippocampus、Neuroscience 2007、2007年11月5日、San Diego, U.S.A.

④ 篠原良章、海馬錐体細胞の左右非対称性、第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第17回日本神経回路学会大会合同大会、2007年9月12日、横浜市

⑤ 重本隆一、意識の維持とグルタミン酸受容体の関わり、日本麻酔科学会第54回学術集会、2007年5月31日、札幌市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重本 隆一 (SHIGEMOTO RYUICHI)

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・教授
研究者番号: 20221294

(2) 研究分担者

篠原 良章 (SHINOHARA YOSHIAKI)

独立行政法人理化学研究所・平瀬ユニット・研究員

研究者番号：10425423
(～平成19年度まで)

(3)連携研究者
なし