

平成23年 5 月 31 日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21700440

研究課題名(和文)

マウス両側海馬の機能差の *in vivo* 生理学による解析

研究課題名(英文) Left-right asymmetry of mouse hippocampal functions

研究代表者

篠原 良章 (SHINOHARA YOSHIAKI)

独立行政法人理化学研究所・平瀬研究ユニット・基礎科学特別研究員

研究者番号： 10425423

研究成果の概要(和文)：

当研究者はマウスで左右の海馬の空間学習能力に差があることを示した。さらに、海馬の CA3-CA1 錐体細胞シナプスでどの程度の割合で左右のシナプス連絡が生じているかどうかを計測し、CA1 の層ごとに左右 CA3 の神経支配様式が異なっているということを発見した。(学術誌に投稿中)。さらに、*in vivo* 電気生理学で左右の脳波活動にどのような差があるかどうかを現在調査中(投稿準備中)である。

研究成果の概要(英文)：

We reported better performance of right hippocampus than left in spatial memory task in mice. Next, we found that ipsilateral/ contralateral ratios of CA3-CA1 axonal innervations are dependent on the locations (i.e. layer in CA1) of the synapse (submitted). We are now analyzing left-right differences of hippocampal electrophysiological activities *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：脳の左右差・海馬・哺乳類・生理学・形態学

1. 研究開始当初の背景

ヒトの脳機能には左右差があることがよく知られているが、哺乳類脳の左右差の分子的

基盤が明らかになったのは当申請者らの報告が初である (Kawakami*, Shinohara* et al., *Science* 2003) (* : 同等に貢献)。この論文で、海馬のグルタミン酸受容体のうち、NR2B サブユニットが左

右非対称性に分布することを明らかにした。さらに、次の報告で、申請者はシナプスの形状、大きさも左右の海馬で異なり、GluR1 サブユニットも左右で非対称な分布を持つことも発見している。(Shinohara† et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, (2008)) しかし、その左右差が生体にとってどのような意義を持っているのかは分かっていなかった。

そこで当研究者は in vivo 生理学および解剖学的手法を用い、生きた動物の海馬内でどのような左右差が見られるのかを回路レベルで検証することにした。まず、海馬の回路結合自体に左右差があるのかどうかを検証し、その基礎データに基づいて海馬機能の左右差を実際の脳の活動を観測できる in vivo 生理学で証明する。

2. 研究の目的

海馬で左右の脳機能がどのように違っているのかを調査するのが当研究課題の最終目的である。目標とする部位はシナプスの左右差が分かっている CA1 領域である。この目的のために2つのストラテジーを立てた。

(1) 回路レベルでの左右差の検証

解剖学的に右半球と左半球の結合が海馬 CA3-CA1 シナプスのどの部分でどのくらい起こっているかを定量的に明らかにする。そして解剖学的に海馬結合に左右差がないかどうかを探索する。

①左右の CA3 錐体細胞とも両側の CA1 錐体細胞に軸索を送っているが、例えば右 CA3 錐体細胞の方が両側海馬 CA1 錐体細胞に同等に軸索を送っており、左側 CA3 錐体細胞は同側 CA1 錐体細胞へのシナプス投射が多ければ、当然左右 CA3 錐体細胞の CA1 錐体細胞へのシナプス入力に差が生じることになる。

②さらに、海馬は前後に長いので、左右海馬のシナプス結合が海馬の背側(前部)と腹側(後部)で異なっている可能性もある。もし仮に、前後でシナプス結合の度合いが異なっており、例えば背側では CA3-CA1 の軸索投射が左右に同じくらい生じているのに、腹側では左右の軸索投射が同側優位であれば、腹側海馬の方が機能の左右差が出やすいと考えられる。なぜなら、右海馬 CA3 錐体細胞と左海馬 CA3 錐体細胞が CA1 錐体細胞に送る軸索が作るシナプスは右海馬 CA3 錐体細胞が作るシナプスの方が大きいことを当研究者自身が示しているからである。(Shinohara† et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, (2008)) このような回路結合の左右差を調べることは、海馬の左右機能を考える上で欠かせない

基礎データである。

(2) 電気生理での左右差の検証

(1) の解剖学的知見に基づいた左右海馬の機能の差の検証を in vivo 電気生理学を使った左右海馬の脳波測定で明らかにする。

海馬は動物の状態によってさまざまな脳波をとっているが、その発現に関わっていると考えられている部分は異なっている。それぞれの脳波状態で左右電位活動に差が見られるかどうかを検証する。例えば、シータ波は海馬全体で起こる活動電位のため、左右での電位活動が高い相関を持っている可能性が高いが、リップル波のように海馬錐体細胞層で局所的に見られる電位変化は、反対側の海馬まで伝わっていかない可能性がある。他に、sharp wave は CA1 錐体細胞の中でも頂上突起に特異的に見られる。

実験に用いる動物は基礎データをしっかり固めるために麻酔下の状態のものを使用した。これは将来の自由に動いている動物での左右差を観測する実験の布石としてである。

3. 研究の方法

(1) 回路レベルでの左右差の検証

通常、海馬を用いた研究は海馬背側部で行われるが、実際には海馬は長く伸びていて腹側部では機能が若干異なると言われている。そこで、軸索を逆行的に染めることができる Cholera toxin subunit B (CTB) を CA1 の背側(dorsal)および、腹側(ventral)の樹状突起に導入し、免疫染色で CA3 の染色を確認した。なお、CTB を入れた層は CA1 錐体細胞が CA3 錐体細胞からの軸索投射を受ける基底層と頂上層の2カ所である。

これによって、左右海馬のシナプス結合が海馬の背側(前部)と腹側(後部)で異なっているかどうかを検証してみた。

(2) 電気生理での左右差の検証

麻酔下の動物の両側海馬にシリコンプローブ多重電極を刺し、電気活動(フィールド電位)を記録した。

2, の目的で述べたように、脳波と動物の行動(睡眠、探索行動など)とは非常に強い相関があること今まで分かっており、動物行動の変化によって、海馬でもさまざまに脳波活動が変化する。まず、脳波活動依存的に左右の海馬活動電位相関を求めることによって、どの状態で左右海馬が協調活動しているかを見極めることにした。

電気活動の測定にシリコンプローブを用いた理由であるが、海馬の錐体細胞からどの場所(深さ)

で左右の電位を比較するかを決定するには、シリコンプローブのような多重電極を使用しないと左右の電位活動の差を詳細に比較できないからである。

4. 研究成果

(1) 行動実験を用いた両側海馬機能の差

該当する研究期間以前に申請者は行動実験で海馬の機能に左右差があるかどうかを調べる実験をしていた。すると、右海馬のみに視覚情報が入るマウスのほうが左海馬のみに視覚情報が入るマウスよりも空間学習の成績が良かった。なお、コントロール群として両側海馬に視覚情報が入るマウスも同時に使用した。驚いたことに、右海馬のみ視覚情報を受け取る動物でも、両側が働いている状態と同様に、空間記憶学習は可能であった。ただし、ラットホームにたどり着くために要する時間は長くなった。一方、上述のように、左海馬のみが視覚情報を受け取る動物では、空間認識の精度が有意に低い。このことから、海馬の空間学習機能が十分に発揮されるためには、左海馬は右海馬と協調して活動していなければならないと結論づけられる。

さらに、この結果を裏付けるために転写因子の1つである arc の発現を蛍光で観測できるマウスで、確かに片側の海馬だけに視覚情報が入っているかどうかをチェックした。

以上の結果を Hippocampus 誌に投稿して掲載された。

(2) トレーサーを用いた左右海馬シナプス結合の定量的解析

(i) 3の実験方法で記した通り、軸索を逆行的に染めることができる Cholera toxin subunit B を CA1 の背側 (dorsal) および、腹側 (ventral) の樹状突起に導入し、免疫染色で CA3 の染色を確認した。そして、逆行性に染色された海馬錐体細胞の数を CA3 領域に分けて定量した。

すると、CA1 錐体細胞基底層にトレーサーを打ち込んだ場合、反対側の CA3 錐体細胞のほうが、同側の CA3 錐体細胞より多く細胞が標識された。一方、CA1 錐体細胞頂上層にトレーサーを打ち込んだときは、同側の CA3 錐体細胞の標識のほうが多かった。以上のことから、CA1 錐体細胞は層ごとに同側あるいは反対側からの軸索投射を受ける比率が異なっていることが分かった。(投稿中) 特に注目すべきは、CA1 基底層であり、この部位にあ

るシナプスは反対側の CA3 のシナプス入力を優位に受けていることが判明した。ちなみに、左右の CA3 が両側に軸索を送っている度合いには有意な左右差は検出できなかった。

なお、CA1 錐体細胞が、腹側にある場合でも背側にある場合でも、左右の標識された CA3 錐体細胞の比率はさほど変化がなかった。

(ii) 近年、海馬に領域ごとに発現される分子マーカーの同定が進み、CA2 領域特異的に発現される分子がいくつか知られるようになった。そこで当研究者は、CA2 のマーカーとして CACNG5 を用い、(i) の解析を CA2 領域についても行ってみた。すると、CA2 - CA1 錐体細胞の軸索投射は大多数が同側性であり、特に、CA1 錐体細胞基底層へのシナプス投射が強いことが分かった。つまり、CA2, CA3 の錐体細胞は両方とも CA1 錐体細胞へ軸索投射を行うが、両側の CA1 錐体細胞に軸索投射を行うのは CA3 のほうであることが判明した。(投稿中) そこで、現在は CA2-CA1 シナプスの左右差についての調査を行っている。

(3) in vivo 電気生理学的な手法を用いた左右海馬脳波の差の測定

実験方法で記した通り、麻酔下のラットにシリコンプローブを刺入して左右同時に脳波記録の測定を行った。すると、右側海馬のシータ波出現中のガンマ波が左側海馬のガンマ波よりパワースペクトラムが大きいことが判明した。ガンマ波のパワースペクトラムはシナプス入力をそのまま反映すると考えられるので、海馬依存的な行動実験をした後で、この左右差が大きくなるか小さくなるかを現在検証中である。(投稿準備中) さらに、どのような受容体がこの左右差に関与するのかも現在検証中であり、近い将来に論文の形で発表できると考えている。

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3件)

① “Right-hemispheric dominance of spatial memory in split-brain mice.”

*Shinohara Y, Hosoya A, Yamasaki N, Ahmed H, Hattori S, Eguchi M, Yamaguchi S, Miyakawa T, Hirase H, Shigemoto R.
Hippocampus (2010 online) (査読有り)

② “Size and receptor densities of glutamatergic synapses: A viewpoint of left-right asymmetry of CA3-CA1 connections.”

*Shinohara Y, *Hirase H
Front Neuroanat. 3:10 (2009) (両名とも)

corresponding author*) on line journal (査読有り)

③「シナプスレベルから見た脳の左右非対称性」

*篠原 良章

「生化学」 2009年9月号 p. 806-811
(査読有り)

[学会発表] (計1件)

①第36回国際生理学会 (京都)

2009年7月29日

“Left-right asymmetry of hippocampal pyramidal synapses”

Shinohara Y, Hirase H, Shigemoto R

[図書] (計1件)

①「マウス錐体細胞シナプスの左右差」

篠原 良章, 重本 隆一

岩波「科学」 2009年8月号 p. 953-958

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

ラボのウェブサイトの業績リスト

<http://www.brain.riken.jp/labs/hirase/more.html>

岩波書店「科学」のバックナンバー
<http://www.iwanami.co.jp/kagaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 良章 (SHINOHARA YOSHIAKI)

独立行政法人理化学研究所・平瀬研究ユニット・
基礎科学特別研究員

10425423

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者