九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

海馬の分子レベルでの左右差

伊藤, 功
九州大学大学院理学研究院生物科学部門 : 准教授

https://hdl.handle.net/2324/20009

出版情報：Clinical Neuroscience. 29 (6), pp.655-659, 2011-06-01. 中外医学社
バージョン：
権利関係：

海馬の分子レベルでの左右差

伊藤　功

はじめに

左右の非対称性は，脳の高次機能における基本的な特性として広く知られている．19世紀半ばに始まるヒト脳の左右差研究は，以来多くの人々の興味を引き付けてきた[1]．今日では，脳の左半球は言語や論理的思考において，右半球は音楽や直感的思考において重要な働きをすることなど，広く一般の人々にも知られている．また研究の初期には，明確な左右差を示すのはヒト脳の特徴であると考えられたが，今日では動物界に広くみられる現象であることが明らかになっている[2~6]．ところが長年にわたる研究にもかかわらず，脳の左右差をつくりあげるしくみや，脳機能における非対称性の意義に関する分子レベルからの理解はほとんど進んでいない．すなわち，左右差に関する従来の研究は巨視的レベルで脳の機能と構造の非対称性を対応付けるにとどまっていた．その原因は，*in vitro* の実験で測定可能な左右差が，機能としても物質としても知られていなかったことにあり，それが分子レベルの研究を阻む障害となってきた．近年，われわれはマウス海馬の神経回路にNMDA型グルタミン酸受容体サブユニットの非対称なシナプス分布に基づく，機能的・構造的な非対称性を見出し，分子レベルからの左右差研究に手掛かりを示した．本稿では，これまでに明らかになった海馬神経回路の非対称な性質とその意義について解説するとともに，将来の展望等について述べる．

マウス海馬の神経回路

図1Aはマウスの脳を示している．海馬を赤色で表した．海馬はヒトにおいても動物においても，新しい記憶の獲得過程において重要であることが知られている．海馬は左右脳半球に一対存在し，両側の海馬は海馬交連(ventral hippocampal commissure, VHC)と呼ばれる神経の束によって連絡されている．海馬のおおまかな神経回路を図1Bに示した．ここでは，海馬CA3錐体細胞とCA1錐体細胞によって構成される神経回路を対称としているので，それを中心に説明する．海馬CA3錐体細胞の主要な出力はSchaffer側副枝とcommissural fiber(交連線維)である．Schaffer側副枝は同側のCA1およびCA3錐体細胞にシナプスを形成する．一方，交連線維は反対側の海馬へ投射し，CA1およびCA3錐体細胞にシナプスを形成する．これらのシナプスはいずれもグルタミン酸作動性であり，神経終末から放出されるグルタミン酸を受容して機能する様々なグルタミン酸受容体がシナプス後細胞で機能している．その中の一つがNMDA型グルタミン酸受容体である．

NMDA型グルタミン酸受容体

NMDA受容体の著しい特徴は，機能的にも構造的にも極めて多様性に富んでいる点であろう[7,8]．NMDA受容体は海馬シナプスの長期増強(LTP)や長期抑制(LTD)等のシナプス可塑性の発現に重要であることが知られている．これらシナプスの可塑的性質は海馬が関与する学習や記憶の獲得に重要な特性である．また，NMDA受容体は初期発達段階でのシナプス形成にも関与し，さらに病理的な状況下において神経細胞死を誘導することも知られている．

NMDA受容体はζ1サブユニットとεサブユニットからなるヘテロオリゴマーとして機能していると考えられている．ζサブユニットはNR1サブユニット，εサブユニットはNR2サブユニットとも呼ばれる．εサブユニットには4種類の異なるサブタイプ(ε1-ε4，またはNR2A-NR2D)が存在し，それらは脳内における発現部位や発現時期が異なることから，NMDA受容体は脳内の部位により，また発達段階により異なるサブユニット構造をとり得ると考えられている．例えば，成熟マウスの海馬にはζ1，ε1およびε2サブユニットが発現しているが，ε3やε4サブユニットの発現はみられない．また，ζ1およびε2サブユ

いとう いさお　九州大学准教授/理学研究院生物科学部門
生体物理化学研究室

ニットは胎生期初期から成熟個体に至るまで発現されているが，ε1サブユニットは胎生期には発現がみられず，生後急速に発現される，いわばadult型のサブユニットである．このような事実から，NMDA受容体は脳内の部位により，また発達段階により異なるサブユニット構造をとり得ると考えられているのである．しかし残念なことに，NMDA受容体がシナプスにおいてどのようなサブユニット構造をしているのかは現在も尚明らかでない．

海馬神経回路の非対称性

われわれはシナプスにおいて実際に機能しているNMDA受容体のサブユニット構造を明らかにするとともに，NMDA受容体多様性の生理的意義を知りたいと考えて研究を開始した．このような目的の実験を行うには，性質の異なる可能性がある様々なシナプスが混在しているような状況を避け，単一な種類の入力によって構成される一種類のシナプスを対象として分析を行う必要があった．ところが，通常の海馬を用いてこの条件を満たす実験を行うことは極めて困難である．なぜなら，図2に示したように，海馬錐体細胞はその頂上樹状突起にも基底樹状突起にも同側および反対側からの入力をともに受けているので，これらのうちどちらか一方を選択的に分析することは，通常の海馬を用いる限り事実上不可能だからである．

この問題を克服するために，われわれは生きているマウスのVHCを切断することによって反対側入力を神経除去(denervation)する手術法を開発した．このような手術(ventral hippocampal commissure transection，VHCT)を受けたマウス(VHCTマウス)では，反対側入力が確かに切断され，術後5日目までにはその機能も完全に失われること，しかし同側入力シナプスは正常に機能していることが解剖学的および生理学的に確認された[9]．これによって同側入力のみからなる海馬スライスを得ることができるようになった．

われわれはVHCTマウスから調整した海馬スライスを用いて，NMDA受容体を介したシナプス後電流(NMDA EPSC)の薬理学的解析，シナプス可塑性の生後発達，NMDA受容体サブユニットの生化学的定量，ε1サブユニットのノックアウトマウスを用いた生理学的・解剖学的解析等を実施した．その結果，成熟マウスの海馬には性質の異なる2種類のシナプスが存在することがわかった．一つはNMDA受容体ε2(NR2B)サブユニットの分布が多く，シナプス可塑性の生後発達が早いシナプス(ε2-dominantシナプス)であり，もう一つはε2サブユニットの分布が少なく，シナプス可塑性の生後発達が遅いシナプス(ε2-nondominantシナプス)である．さらに，これら2種類のシナプスが海馬錐体細胞上に非対称に配置されていることが明らかになった[9,10](図3)．

図3では左海馬の錐体細胞とその軸索を赤で，右のそれらを青で示した．直線は同側入力を，波線は反対側入力を表している．黒丸でε2-dominantシナプスを，白丸でε2-nondominantシナプスを示した．通常のマウスの海馬では，これら2種類のシナプスが左右どちらの海馬においても錐体細胞の頂上樹状突起，および基底樹状突起にともに配置されているために，回路の非対称性を検出することは困難である．しかし，VHCTマウスでは反対側入力が除去されているため，同側入力によって構成されるシナプスの特性と2種類のシナプスの非対称な配置がはっきりと現れる．また，VHCTマウスと手術を行っていない通常のマウス(naïveマウス)を比較することで，反対側入力は同側入力とは逆の非対称性を持っていることもわかった．さらに，この回路は次のような特徴を持っている．まず，左錐体細胞からの入力(赤線)によって構成されるε2-dominantシナプス(黒丸)は，左右どちらの海馬においても頂上樹状突起に形成されている．一方，右錐体細胞からの入力(青線)によって構成されるε2-dominantシナプス(黒丸)は，左右どちらの海馬においても基底樹状突起に形成される．ε2-nondominant(白丸)の配置はこの逆になっている．この様子を強調するために，入力を中心にこのモデルを描き直したのが図4Bである．図4Bでは，シナプス後細胞は左右どちらの海馬に存在してもかまわないので，中央に黒で表した．左のCA3錐体細胞からの入力は，頂上樹状突起にε2-dominantシナプス(黒丸)を，基底樹状突起にε2-nondominantシナプス(白丸)を形成する．一方，右からの入力は頂上樹状突起にε2-nondominantシナプス(白丸)を，基底樹状突起にε2-dominantシナプス(黒丸)を形成する．この事実は，左右のCA3錐体細胞は海馬神経回路の形成に関連して互いに異なる性質を持っていることを示唆している．また，個々の錐体細胞の頂上樹状突起と基底樹

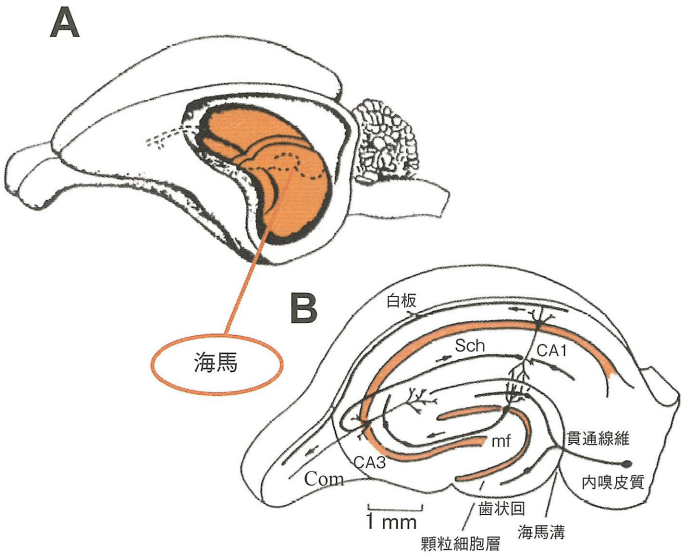

図 1　マウスの脳と海馬神経回路の模式図

A）マウス脳の模式図．海馬(赤)は左右脳半球の図のような位置に一対存在し，両側の海馬は海馬交連で繋がっている．

B）海馬の主要な神経回路を示す模式図．Sch：Schaffer 側副枝，Com：交連線維．

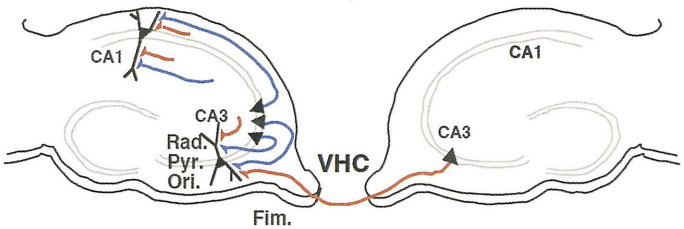

図 2　海馬錐体細胞への主要な入力

青のラインは同側入力を，赤のラインは反対側入力を示す．VHC：海馬交連，Fim：fimbria，Rad：放線層，Pyr：錐体細胞層，Ori：多形細胞層．

状突起も異なる特性を持っているに違いない．さらに，シナプス後細胞は機能特性の異なる 2 種類のシナプスの特異的な配置を手掛かりとして，入力シグナルの起源が脳の右にあるのか左にあるのかを知ることが可能であるかもしれない．

脳の左右差に異常を持つ *iv* マウス

さて，このような神経回路の非対称性はどのようにして形成されるのだろうか，また脳の高次機能にどのような意義があるのだろうか．これらに手掛かりを得るために，われわれは内臓器官の左右差に異常を持つ自然突然変異とし

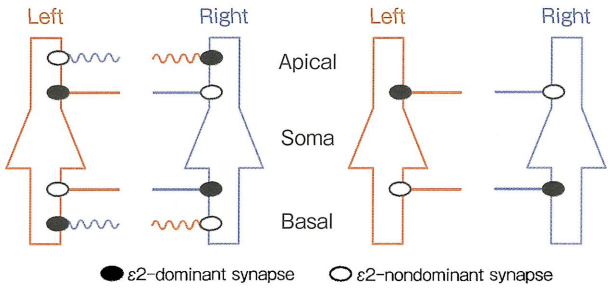

図 3　海馬神経回路の非対称性

左の錐体細胞とその軸索を赤で，右のそれらを青で示した．直線は同側入力を，波線は反対側入力を表している．Naïve：手術をしていないマウス，VHCT：VHCT マウス．Apical：頂上樹状突起，Soma：細胞体，Basal：基底樹状突起．

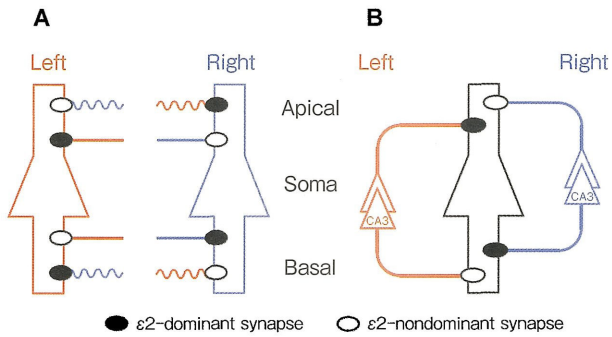

図 4　海馬神経回路の非対称性を表す 2 通りの表現

A）シナプス後細胞を中心とした表現(図 3 と同様)．

B）入力を中心とした表現．この場合，シナプス後細胞は左右どちらにあってもかまわないので，真ん中に黒で表した．この表現では同側入力，反対側入力の区別もない．その他は A と同様．

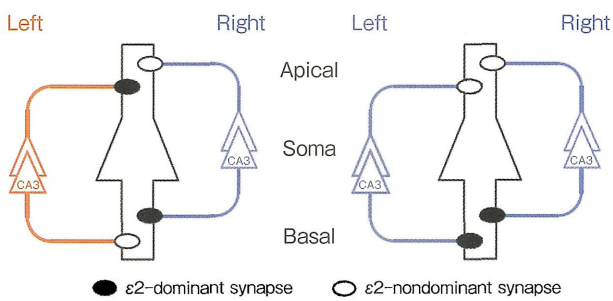

図 5　野生型マウスと *iv* マウスの海馬神経回路

iv マウスでは左脳を表す性質が消失し，両側の海馬がともに右の性質を示している．しかし，錐体細胞の上下の非対称性は維持されている．

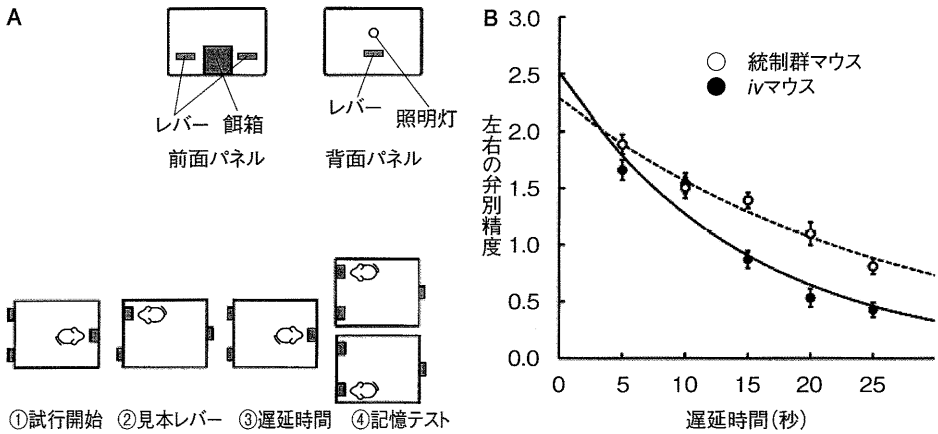

図 6　遅延非見本合わせ課題

A）遅延非見本合わせに用いた装置模式図および試行の流れ図．① マウスが背面パネルのレバーを押して課題を開始する．② マウスが前面パネルの左もしくは右のレバーを押して，その位置を記憶する．③ マウスは遅延時間中，背面パネルのレバーを押すことを要求される．④ マウスが見本レバーと逆のレバーを押すと餌を与えられる．

B）遅延非見本合わせ課題の結果．遅延時間が課されると *iv* マウスは統制群に比べてより速やかにレバー選択の精度が低下した．

て知られる *iv* マウス(inversus viscerum mutant mouse：内臓逆位マウス)に注目した．

マウス内臓器官の左右軸形成は発生初期，繊毛の回転運動によって node に発生する層流(nodal flow)の影響で，分泌性のシグナル伝達分子である nodal の発現が胚の左側で一過性に高まることから始まることが知られている[11,12]．*iv* マウスはこの繊毛運動を引きおこすモーター蛋白(Left-right dynein, *Lrd*)をコードする遺伝子に変異を持つため，繊毛が回転できず，体軸の形成機構が正常に働かない．このためホモ接合型の *iv* マウス(*iv/iv*)からは内臓逆位と正位のマウスが1対1の確率で生まれる[13~15]．われわれは，*iv* マウス海馬神経回路の特徴を，海馬シナプス NMDA EPSC の薬理学的特性，シナプス可塑性の生後発達，および ε2 サブユニットのシナプス分布等，野生型マウスの解析と同様の指標を用いて分析した．その結果驚いたことに，内臓の正位，逆位にかかわらずホモ接合型の *iv* マウスでは，海馬神経回路の左右の非対称性が消失していることが明らかになった[16](図5)．この事実は，内臓と脳では左右差の形成機構が異なっていることを示している．さらに，この非対称性の消失は両側の海馬がともに右の性質を示すように変化したためであることがわかった(右側異性，right isomerism)．図5のように，*iv* マウスでは，左右両側の CA3 錐体細胞からの入力が頂上樹状突起に ε2-nondominant シナプス(白丸)を，基底樹状突起に ε2-dominant シナプス(黒丸)を形成する．これは野生型マウスにおける右 CA3 錐体細胞の性質である．*iv* マウスでは，あたかも左海馬が失われ，両側の海馬がともに右海馬の性質を示すように変化している．しかし，*iv* マウスにおいても神経細胞の上下の非対称性は正常であることから，正常な非対称性を持つ神経回路は，脳の左右および神経細胞の上下という，少なくとも2種類の独立した位置情報に基づいて形成されると考えられる．また，2種類の非対称性要素のうち，その片方だけ(左右の非対称性のみ)が消失している *iv* マウスは，左右差の異常が脳の高次機能に及ぼす影響を解析するのに絶好のモデル動物であると思われた．

脳の左右差の異常による記憶能力の低下

そこでわれわれは，乾燥型迷路課題(Dry maze task)および遅延非見本合わせ課題(Delayed nonmatching-to-position task)を用いて，*iv* マウスの長期記憶(参照記憶)および短期記憶(作業記憶)を解析した[17]．Dry maze task では円形の試験空間の一定の場所に隠された餌の場所を覚えるようにマウスを訓練する．訓練期間の後，餌を置かない状態で同じ空間内を一定時間探索させ，餌のあった場所をどれくらい正確に覚えているか(餌のあった場所にどれくらい長く滞在するか)を評価する．訓練期間中，*iv* マウスは統制群と比較して若干餌の場所を覚えるのが遅いように思われたが，最終的には同程度に場所の記憶を獲得した．しかし，餌を与えずに探索行動を行わせた最終テストでは，餌の場所に関する *iv* マウスの記憶は統制群に比べて不正確であった．

一方，遅延非見本合わせ課題は左右に2つあるレバーの場所を記憶させるものである(図6A)．マウスが装置後方の壁に設置されたレバーを押すと課題が開始される．課題開始後，装置前方に左右どちらか一つのレバーが出現するので，マウスはレバーを押してその場所を記憶する．ある

遅延時間の後に，前方の左右２つのレバーが同時に出現する．マウスは遅延時間が始まる前に押したレバーとは反対側のレバーを押すと餌を得ることができる．*iv* マウスは統制群マウスと同程度に左右のレバーの位置を区別したが，遅延時間が長くなるに従って急速に左右位置に関する記憶は失われ，作業記憶の保持能力において劣っていた(図６B)．

脳の左右差の分子基盤をめざして

われわれはNMDA受容体に対する生理学的な興味から研究を始めた．そして偶然，海馬神経回路の非対称な性質に気づき，脳の左右差の研究分野に分け入ることになったが，われわれの結果には従来の左右差研究にはない特徴と，いくつかの重要な知見が含まれている．まず，左右の非対称性は高度な脳の機能にのみみられるのではなく，海馬のような比較的単純な脳神経回路の基本的な機能と構造の中にも，きちんと存在していることが明らかになった．次に，脳はその構造的な階層性(神経細胞，シナプス，ネットワークそして左右脳半球のような)の各レベルで，様々な非対称性を持ち得ることがわかった．また，われわれが明らかにした非対称性は，NMDA受容体ε２サブユニットのシナプス分布やNMDA受容体が関与するシナプス機能として計測することができることから，はじめて脳の非対称性に関連した *in vitro* 実験の指標が明らかになった．さらに，非対称な海馬の神経回路を構成するためには，脳の左右および神経細胞の上下という，少なくとも２種類の位置情報が必要であることが示唆された．また，左右の非対称性を生み出す機構は，内臓と脳とでは異なっていることも明らかになった．そして最後に，われわれが見出した海馬神経回路の非対称性は，少なくとも短期および長期の空間記憶において重要であり，脳の高次機能において意味のある回路特性であることが示された．

むすび

われわれは今，脳の非対称性に関する研究を分子レベルで実施するための手掛かりを得たといえるだろう．今後，脳の非対称性研究に明確な分子基盤を確立していくには，分子レベルから行動レベルまで一貫性のある研究を行う必要がある．この意味において，多くの系統が存在し，多様な実験手法が適用できるモデル動物として，マウスには大きな利点がある．その利点を生かしつつ，脳の非対称性は発生段階のいつ，どのようにしてつくられるのか．そしてそれはどのようにして維持されているのか．また，非対称性の形成機構とその維持機構は同じであるのかどうか，等を明らかにしなければならない．さらに，非対称性の形成や維持に関与する脳の左右や，神経細胞の上下を示す位置情報の実体とそのシナプス局在の解明も重要な研究課題であろう．そして，これら分子-細胞-回路レベルの研究成果に裏付けられた行動レベルの研究を実施することが重要である．

文　献

1) Springer S, Deutsch G. Left brain, right brain. 4th ed. New York : Freeman and Company ; 1993.
2) Hugdahl K, Davidson R, editors. The asymmetrical brain. Massachusetts : MIT Press ; 2003.
3) Aizawa H, Bianco IH, Hamaoka T, et al. Laterotopic representation of left-right information onto the dorso-ventral axis of a zebrafish midbrain target nucleus. Curr Biol. 2005 ; 15 : 238-43.
4) Halpern ME, Güntürkün O, Hopkins WD, et al. Lateralization of the vertebrate brain : taking the side of model systems. J Neurosci. 2005 ; 25 : 10351-7.
5) Vallortigara G. Comparative neuropsychology of the dual brain : a stroll through animals' left and right perceptual worlds. Brain Lang. 2000 ; 73 : 189-219.
6) Lamendola NP, Bever TG. Peripheral and cerebral asymmetries in the rat. Science. 1997 ; 278 : 483-6.
7) Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits : diversity, development and disease. Curr Opin Neurobiol. 2001 ; 11 : 327-35.
8) Yashiro K, Philpot BD. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP and metaplasticity. Neuropharmacology. 2008 ; 55 ; 1081-94.
9) Kawakami R, Shinohara Y, Kato Y, et al. Asymmetrical allocation of NMDA receptor ε2 subunits in hippocampal circuitry. Science. 2003 ; 300 : 990-4.
10) Wu Y, Kawakami R, Shinohara Y, et al. Target-cell-specific left-right asymmetry of NMDA receptor content in Schaffer collateral synapses in ε1/NR2A knock-out mice. J Neurosci. 2005 ; 25 : 9213-26.
11) Shiratori H, Hamada H. The left-right axis in the mouse : from origin to morphology. Development. 2006 ; 133 : 2095-104.
12) Hirokawa N, Tanaka Y, Okada Y, et al. Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. Cell. 2006 ; 125 : 33-45.
13) Supp DM, Witte DP, Potter SS, et al. Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in inversus viscerum mice. Nature. 1997 ; 389 : 963-6.
14) Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y, et al. Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. Nature. 2002 ; 418 : 96-9.
15) Layton WM. Random determination of a developmental process : reversal of normal visceral asymmetry in the mouse. J Hered. 1976 ; 67 : 336-8.
16) Kawakami R, Dobi A, Shigemoto R, et al. Right isomerism of the brain in inversus viscerum mutant mice. PLoS ONE. 2008 ; 3 : e1945.
17) Goto K, Kurashima R, Gokan H, et al. Left-right asymmetry defect in the hippocampal circuitry impairs spatial learning and working memory in *iv* mice. PLoS ONE. 2010 ; 5 : e15468.