

研究成果報告書

脳の左右差がつくられ、維持されるしくみ

Mechanisms for the generation and maintenance of brain asymmetry

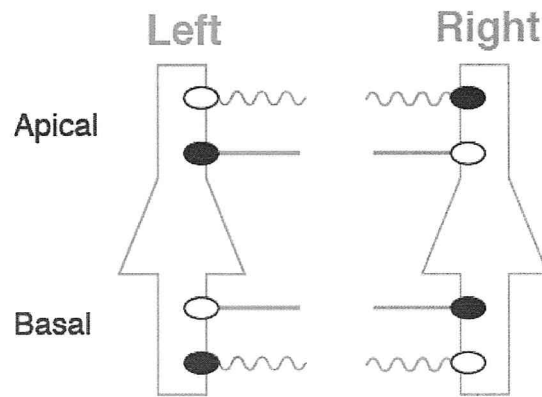
(日本生理学会)

代表研究者	九州大学	伊藤 功	Kyushu University	Isao Ito
協同研究者	九州大学	川上良介	Kyushu University	Ryosuke Kawakami

Asymmetrical hemispheric specialization is a fundamental concept of brain science and has been described mainly in higher-order functions of the brain. Recently we have found that synaptic distribution of NMDA receptor NR2B subunits in mouse hippocampus is asymmetrical between the left and right, and between the apical and basal dendrites of single neurons. These asymmetrical allocations of NR2B subunits differentiate the properties of NMDA receptors and synaptic plasticity between the left and right hippocampus. Our findings show that asymmetries are involved even in a basic structure and function of simple neuronal network. In order to elucidate molecular mechanisms for the generation and maintenance of hippocampal asymmetry, we have tried two distinct approaches in the present study. One is the experiment using a mutant mouse strain (iv mouse) that shows abnormalities in the left-right asymmetry of internal organs. The other one is organotypic co-culture system composed of micro slices prepared from the CA1 and CA3 areas of mouse hippocampus. We found that iv mutation resulted in the loss of left-right asymmetry of hippocampal circuitry, whereas apical-basal asymmetry of single neuron remained intact. Our results indicate that mechanisms for the generation of left-right asymmetry differ between endodermal tissues (internal organs) and ectodermal tissues (such as the brain), and that at least two types of information (left-right of the brain, apical-basal of the neuron) are required for the establishment of brain asymmetry.

研究目的

脳の高次機能に見られる左右の非対称性（ラテラリティ）は、脳科学の基本概念の一つとして広く受け入れられている。しかし意外にも、脳の側性化のメカニズムや脳機能におけるそ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。その原因は、*in vitro* の実験で脳の左右を示す指標が明らかでなかったことにあり、それが分子レベルの研究を困難にしていた。近年我々は、マウス海馬の神経回路において NMDA 受容体 NR2B サブユニットの非対称な分布に基づく構造的・機能的非対称性を発見した (Fig. 1)。これにより、左右の非対称性は脳の高次機能にのみ見られるわけではなく、比較的単純な神経回路の基本的な機能と構造においても脳は非対称であることが分子レベルで明らかになった。また、我々が明らかにした海馬神経回路の非対称性は *in vitro* 実験の指標となり得る。本研究では、この指標を活用することによって、脳の左右差はいつ、どのようにしてできあがるのか、成獣の脳における左右差の維持にはどのような神経細胞の性質が関与しているのか、などを分子レベルで明らかにすることを目的として実験を行った。



(Fig. 1)

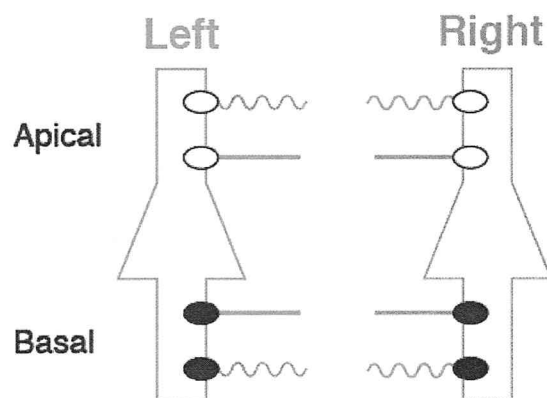
Fig. 1. Schematic diagram illustrating hippocampal asymmetry. Left and right pyramidal neurons and their axons are colored red and blue, respectively. Closed and open circles represent NR2B-dominant and NR2B-non-dominant synapses, respectively. Straight and wavy lines represent inputs from the ipsilateral and contralateral CA3 pyramidal neurons, respectively. Apical; apical dendrites. Basal; basal dendrites.

(図の横幅は 6.5cm をお願いします)

研究経過

1. 内臓逆位の *iv* マウスを用いた解析

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、nodal の発現が胚の左側で高まることから始まることが知られている。*iv* マウスはこの繊毛運動を引き起こすモーター蛋白 (dynein) 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* マウスからは内臓逆位と正位のマウスが



(Fig. 2)

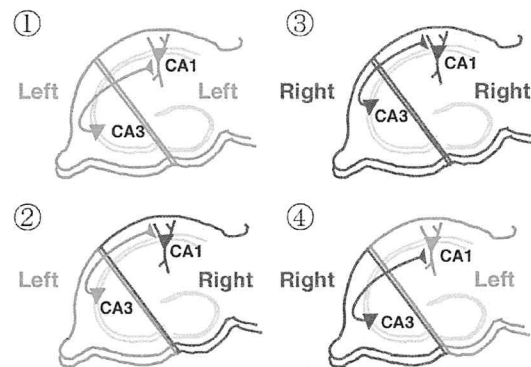
1対1の確率で生まれる。我々は、iv マウスから作成した海馬スライスをを用い、シナプス NMDA 受容体応答の Ro25-6981 感受性 (NR2B サブユニットの選択的阻害剤) およびシナプス可塑性 (LTP) の生後発達などを指標として、iv 変異が海馬神経回路の非対称性に及ぼす変化を解析した。その結果、内臓正位、逆位ともに iv マウスでは、海馬神経回路の左右の非対称性が消失していることが明らかになった (Fig. 2、 Fig. 1 の通常マウスと比較のこと)。しかし、iv マウスにおいても神経細胞の上下の非対称性は正常であった。

Fig. 2. Schematic diagram showing iv mouse hippocampus. Note that left-right asymmetry of the circuitry is lost. The others are the same as those in Fig. 1.

(図の横幅は 6.5cm をお願いします)

2. 海馬スライスの組み合わせ培養系を用いた研究

スライスの組み合わせ培養系とは、左右の海馬から作成したスライスを、CA1 野を含む領域と CA3 野を含む領域に切断し、これらを再び組み合わせて培養することによって CA3 錐体細胞と CA1 錐体細胞の間にシナプスを形成させるものである (Fig. 3)。たとえば、Fig. 3 ①のように左 CA1+左 CA3 を組み合わせることで同側入力シナプスの解析が、Fig. 3 ②のように右 CA1+左 CA3 の組み合わせでは反対側入力シナプスの解析が可能となる。そこで、出生後のマウス海馬を用いて組み合わせ培養を行い、シナプス NMDA 受容体応答の Ro25-6981 感受性を指標として非対称な神経回路が再生されるかどうかを検討する。神経回路が正常に再生されれば、それは出生後の動物の海馬神経細胞も非対称な神経回路を再生するのに必要なシグナルを持っていることが示唆され、さらにそのシグナルはシナプス前細胞が持っているのか、あるいはシナプス後細胞が持っているのかも明らかにすることができると思われる。我々は、本研究期間において、生後 4-6 日のマウス海馬を用いて 3 週間以上の組み合わせ培養が可能な技術を確認した。また機能し得るシナプスが再生されていることを生理学的に確認した。



(Fig. 3)

Fig. 3. Schematic diagrams of hippocampal organotypic co-cultures.

(図の横幅は 6.5cm をお願いします)

考察

iv マウスの結果から、内胚葉系の組織 (内臓) と外胚葉系の組織 (脳) では左右差の形成機構が異なっていることが示唆された。また、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、異なる 2 種類の位置情報のうち、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、脳の左右差の意義を行動学的に解析す

る際、最適の特性を持った実験動物であると思われる。

海馬スライスの組み合わせ培養系に関しては、培養法の確立と機能性シナプスの再性が可能であることの確認に留まったが、本実験系の可能性と発展性を実験を通じて確認で来たことは大きな収穫であったと考えている。

研究発表

口頭発表

1. 伊藤 功；「脳の左右差—分子レベルからのアプローチ」、第48回日本神経化学会大会、招待講演、(福岡、2005)

誌上発表

2. Y. Wu, R. Kawakami, Y. Shinohara, M. Fukaya, K. Sakimura, M. Mishina, M. Watanabe, I. Ito, R. Shigemoto; "Target-cell-specific left-right asymmetry of NMDA receptor content in Schaffer collateral synapses in ϵ 1/NR2A knock-out mice" J. Neuroscience, 25(40); 9213-9226, 2005.