

おわりに

最近我々は、この TRAF2 と c-IAP1/2 による TRAF3 分解システムが、NF- κ B の非標準経路の上流キナーゼである NIK (NF- κ B-inducing kinase) の分解にも関わっていることを見出した^{12,13)}。またシグナル複合体によるキナーゼ活性化システムは、CD40 受容体のファミリーである TNF 受容体や BAFF (B cell-activating factor) 受容体だけでなく、一部の TLR 受容体にも保存されたシステムであることが分ってきた。このようなシグナル複合体 (signalosome) の存在については、キナーゼシグナルに留まらず、様々なシグナル経路でその重要性が明らかになりつつある^{14,15)}。シグナル複合体上で行われるユビキチン化やリン酸化の一連の複雑な制御システムが、微妙な環境変化や外的ストレスに迅速に対応し、一つの受容体刺激からでも多様で複雑な生理応答を生み出すメカニズムだと考えられる。シグナル複合体は言わばポイント (分岐点) としての役割を担っており、その複合体上でのシグナルの時空間的な振り分けが、生命恒常性のバランス調節にとって不可欠である。

謝辞

この一連の研究は、California 大学 San Diego 校の Michael Karin 教授の研究室で行ったものである。

- 1) Mischeau, O. & Tschopp, J. (2003) *Cell*, 114, 181-190.
- 2) Gallagher, E., Enzler, T., Matsuzawa, A., Anzelon-Mills, A., Otero, D., Holzer, R., Janssen, E., Gao, M., & Karin, M. (2007) *Nat. Immunol.*, 8, 57-63.
- 3) Baud, V. & Karin, M. (2009) *Nat. Rev. Drug Discov.*, 8, 33-40.
- 4) Matsuzawa, A., Tseng, P.H., Vallabhapurapu, S., Luo, J.L., Zhang, W., Wang, H., Vignali, D.A., Gallagher, E., & Karin, M. (2008) *Science*, 321, 663-668.
- 5) Eliopoulos, A.G. (2008) *Science*, 321, 648-649.
- 6) Bishop, G.A. (2004) *Nat. Rev. Immunol.*, 4, 775-786.
- 7) Li, X., Yang, Y., & Ashwell, J.D. (2002) *Nature*, 416, 345-347.
- 8) Li, L., Thomas, R.M., Suzuki, H., De Brabander, J.K., Wang, X., & Harran, P.G. (2004) *Science*, 305, 1471-1474.
- 9) Wang, H., Matsuzawa, A., Brown, S.A., Zhou, J., Guy, C.S., Tseng, P.H., Forbes, K., Nicholson, T.P., Sheppard, P.W., Häcker, H., Karin, M., & Vignali, D.A. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105, 20197-20202.
- 10) Chen, Z.J. & Sun, L.J. (2009) *Mol. Cell*, 33, 275-286.
- 11) Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K.J., Yamaoka, S., Kawai, T., Matsuura, Y., Takeuchi, O., & Akira, S. (2006) *Nat. Immunol.*, 7, 962-970.
- 12) Vallabhapurapu, S., Matsuzawa, A., Zhang, W., Tseng, P.H.,

- Keats, J.J., Wang, H., Vignali, D.A., Bergsagel, P.L., & Karin, M. (2008) *Nat. Immunol.*, 9, 1364-1367.
- 13) Wallach, D. & Kovalenko, A. (2008) *Nat. Immunol.*, 9, 1325-1327.
- 14) Shaw, A.S. & Filbert, E.L. (2009) *Nat. Rev. Immunol.*, 9, 47-56.
- 15) Matsuzawa, A. & Ichijo, H. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, 1780, 1325-1336.

松沢 厚

(東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室)

A novel spatiotemporal regulation of kinase signaling by ubiquitination: MAP kinase is activated through translocation of the signaling complex from receptor to cytosol
Atsushi Matsuzawa (Laboratory of Cell Signaling, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

シナプスレベルから見た海馬の左右非対称性

はじめに

神経細胞間の情報伝達は主に (化学) シナプスを介して行われているが、哺乳類においては興奮性のシナプスではグルタミン酸、抑制性のシナプスでは γ アミノ酪酸 (GABA) がその主要な伝達物質である。中枢神経の大多数のシナプスは興奮性であるので、脳では神経細胞間の情報伝達の大部分はグルタミン酸が担っていることになる¹⁾。このシナプスでの情報伝達強度は一定ではなく、神経活動に依存して変化するため (シナプスの可塑性)、記憶・学習の分子メカニズムと考えられており、神経科学では研究がさかんな分野である。特に、シナプスに発現しているグルタミン酸受容体の量は、後シナプス神経細胞の興奮性を直接決定するので、シナプスでの情報伝達強度を左右する主要な因子である。シナプス形態もまた、シナプスでの情報伝達強度を決定する因子である。大きいシナプスは概して小さいシナプスより長期間安定で、形態も複雑であり、グルタミン酸受容体をたくさん発現していることが知られている²⁾。

哺乳類で空間記憶に重要である海馬は、シナプスの回路構築が単純であり、電気生理的にシナプスの可塑的变化が誘導しやすいため、脳の中でも最もよく研究が行われている部位である。解剖学的には大きく分けて歯状回 (DG)・

CA3領域・CA1領域の三つの部分から成っており、entorhinal cortex (嗅内皮質) から受けた情報を→DG顆粒細胞→CA3錐体細胞→CA1錐体細胞→と全て興奮性のシナプスを介して処理し、再び嗅内皮質に返すような回路構築を持つ (図1A)。マウスやラットでは左右の海馬が密接に連絡しており、CA1錐体細胞では、同側と反対側CA3錐体細胞からの投射がほぼ同量である³⁾ (図1A左の点線部)。CA3錐体細胞間も左右の神経連絡があるが、この稿では触れない。

1. N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 型 グルタミン酸受容体分布の左右差

最初にマウス海馬で左右差が発見されたのは、NMDA受容体の一種であるNR2Bサブユニットであり、これは、九州大学の伊藤功准教授と筆者らの共同研究で明らかになった。前述のとおり、マウス海馬CA1領域の錐体細胞は左右両方のCA3錐体細胞からほぼ等量のシナプス支配を受けている (図1A) が、このうち、同側のみ (左CA3→左CA1, 右CA3→右CA1) のシナプスを残した状態のマウスから、伊藤らはNMDA受容体成分のシナプス電流をCA1錐体細胞で記録し、左右で比較した。そして、解剖学的には放射状層と呼ばれる部分の頂上樹状突起のシナプス (図1A) では、NR2B受容体の選択的阻害剤であるRo 25-6981の作用が左側で強く、右側では弱いことを発見した。これを単純に解釈するなら、左側のシナプスの方が右側よりNR2B量が多いことになる (図1B)。そこで、伊藤は生理学研究所の重本隆一教授に電子顕微鏡でのNR2B受容体の左右の量の比較を依頼した。

一般に、シナプス分子を電顕観察する方法にはポストエンベディング (postembedding) 法を用いた金コロイド抗体による免疫標識が行われている。しかし、1. NMDA受容体に限らず、一般に膜タンパク質は可溶化が難しく、特に興奮性シナプスでは膜タンパク質は postsynaptic density (PSD) と呼ばれる不溶性タンパク質複合体に強固に埋め込まれていること、2. 抗体分子自体が大きさを持っているためシナプスに密に存在する受容体全てには結合できないことが予想されること、を理由に、正確な定量は困難なことが予想された。特に、1の問題が重大で、タンパク質の可溶化が難しければ当然抗体分子が結合できないため、免疫標識できないことになる。(ポストエンベディング法とは、シナプスを樹脂に埋めてから65nmの超薄切片を作り、その後、樹脂ごと超薄切片を抗体反応させてPSDタンパク質をむりやり標識する方法であるが、それでも樹

脂の浸透性が組織の部分部分によって異なるので、左右の海馬で受容体量を精密に比較するのは難しい。)

そこに当時 (2001年)、偶然重本研究室に異動してきた筆者がこの左右差の話聞き、古典的な生化学的手法を適応できるのではないかと考えた。前述のようにグルタミン酸シナプス複合体を構成するタンパク質 (PSDタンパク質) は可溶化しにくいので、遠心分離による細胞分画後に界面活性剤 (Triton X-100) 処理を行うと難溶性の成分としてシナプス分画を精製することができる⁴⁾。さいわい、海馬CA1放射状層はほとんどが錐体細胞の興奮性シナプスであり、介在ニューロンのシナプスは事実上無視できる。そこで、マウス海馬からCA1放射状層のみを切り出して集め、PSDタンパク質を精製すれば理論上は錐体細胞シナプスのNR2Bサブユニットの左右での比較が可能である。(ただし、文献4)では精製前のサンプル量が20-80gであった。) そこで実際、同側のCA3-CA1のみを残したマウス数十匹からCA1放射状層のみを切り出して集め、PSDタンパク質を精製してウエスタンブロッティングで左右の量を比較したところ、確かにNR2Bサブユニットは右側より左側で1.5倍バンドが濃かった (図1C)⁵⁾。なおこの時、総PSDタンパク質を基準に左右で泳動するタンパク質量を調整した。一方、反対側のCA3錐体細胞から支配を受けるCA1シナプスも加えて左右を比較すると、この差は消失することから、反対側から支配を受けるシナプスはNR2Bの量に関しては同側から支配を受けるシナプスとちょうど反対の性質を持っていると考えられる (図1B)。

2. α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メソオキサゾール-4-プロピオン酸 (AMPA) 型グルタミン酸受容体の左右差

筆者はさらに左右差を持っている分子がないか、引き続きCA3-CA1の同側シナプスタンパク質をウエスタンブロッティングで検索した。すると今度は、AMPA受容体の一種である、GluR1サブユニットが右側で約1.5倍多いことが明らかになった (図1C)。NR2B分子と同様、GluR1分子も同側と反対側シナプスが混ざった状態では差が見られなかった。そして、その他のグルタミン酸受容体サブユニットには左右差がなかった。このことから、図1Aで「NR2Bが優位でないシナプス」と表されているシナプスは、「GluR1優位なシナプス」と表記するのが妥当であろうと考えられる (図1D)³⁾。

興味深いことに、CA3-CA1シナプスの同側投射だけを比較した場合 (図1C)、これらNR2B・GluR1の二つのサ

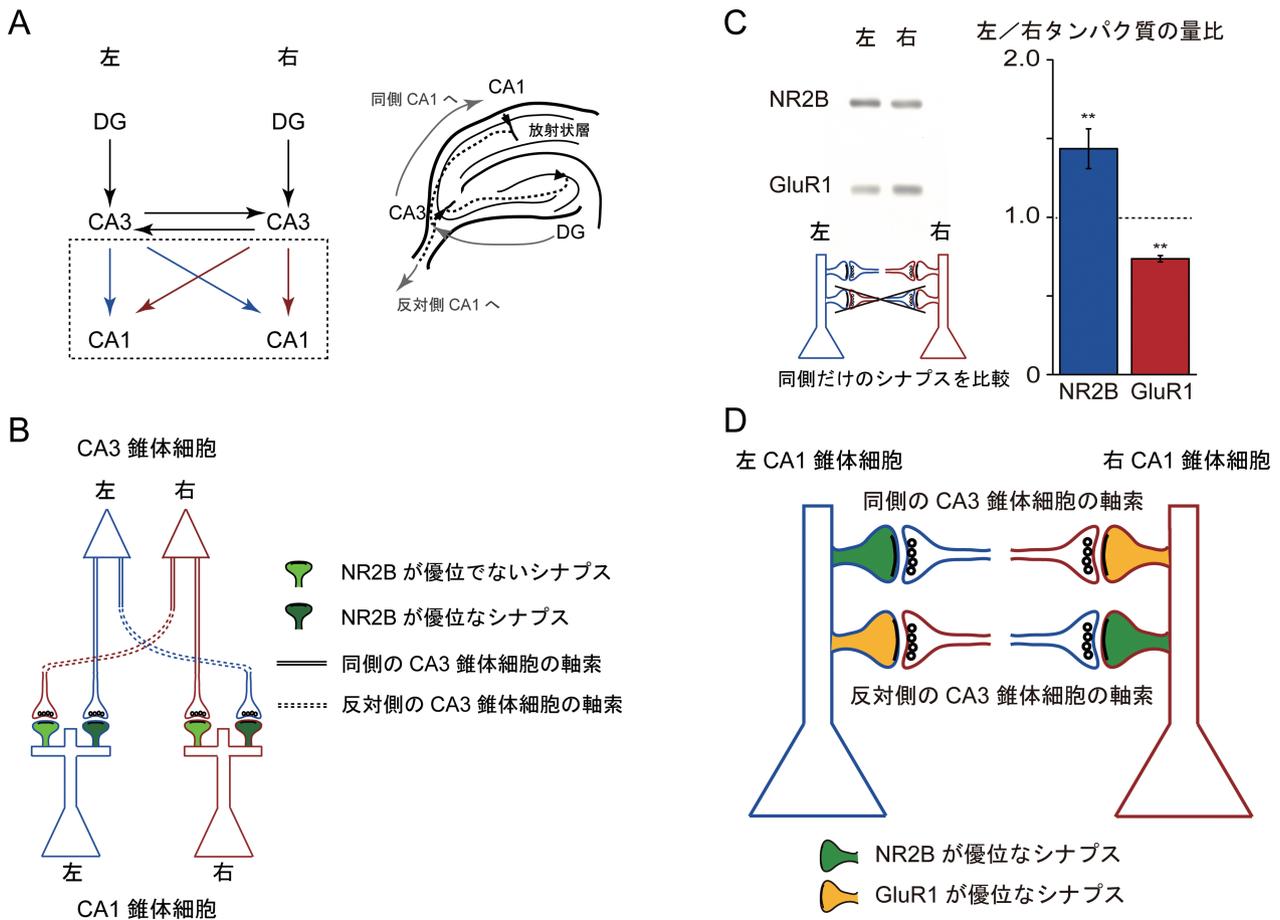


図1 マウス海馬全体での、NR2B と GluR1 サブユニットの左右非対称な分布

- A. 海馬の回路図。左、CA1 錐体細胞は両側の CA3 錐体細胞から同じくらいの投射を受けている。右、当稿で議論している CA1 頂上樹状突起シナプスは CA1 放射状層の部分に存在している。軸索は点線で示した。
- B. NR2B サブユニット分布の左右差。左 CA3 錐体細胞から支配を受ける CA1 錐体細胞のシナプスで NR2B が優位となる。
- C. マウスの海馬同側だけの CA3-CA1 シナプス（すなわち、左 CA3-左 CA1 シナプスと右 CA3-右 CA1 シナプス）で、NR2B と GluR1 サブユニットの発現を比較したウエスタンブロッティング。1 回のウエスタンブロッティングから NR2B と GluR1 の定量を同時に行っている。図では 3 回の試行から得られた平均を示した。（有意差** $p < 0.01$ ）なお、この図では 1 回あたり使用した動物は 18 匹から 26 匹の間である。
- D. GluR1 分布の非対称性。図 1A で NR2B が優位でないシナプスは GluR1 優位であることが分かった。

図2 電子顕微鏡で見た、単一シナプスレベルでの海馬の左右非対称性

- A, B. SDS-FRL 法で観察した GluR1 と NR2B の密度の逆相関関係。同じシナプスから E 面と P 面の二つのレプリカを作り、前者を GluR1 (黄)、後者を NR2B (緑) で標識して、露出されたシナプス面 (点線) と GluR1, NR2B の標識密度を測定する。なお、E 面に少数存在する黒点は NR1 分子の標識であり、これは NR1 をシナプスのマーカーとして用いたためである。
- C. SDS-FRL 法で観察した同側 CA3-CA1 シナプス。海馬の左右それぞれについて NR2B と GluR1 の逆相関関係が成立していることを示した。さらに、グラフの左上では、青い三角 (左側)、図の右下では赤い丸 (右側) が多くことから分かるように、左側のシナプスでは NR2B 優位であり、右側のシナプスでは GluR1 優位である。
- D. (上)左側、あるいは右側だけの CA3 錐体細胞軸索を GFP 標識し、その軸索とシナプスを作る CA1 頂上突起シナプスを観察する。黒く染まっているのが GFP で免疫標識された CA3 の軸索である。(中)上図のようなシナプス像を撮影し、連続超薄切片から三次元再構築したもの。左のシナプスは小さい例、右側が大きいシナプスの例であり、それぞれ左側、右側 CA3 錐体細胞から支配を受けている CA1 錐体細胞のシナプスである。(下)三次元再構築像から計算したシナプス面積と棘突起体積をグラフで示したもの。CA3 が右側にある場合、シナプス面積も棘突起体積も大きくなっている。（有意差** $p < 0.01$ ）図では 1 種類あたり 115~135 個程度のシナプスを左、右各 3 匹ずつの動物から集め、その平均値を示している。
- E. SDS-FRL 法で観察した、NR2B, NR2A, GluR1 各サブユニットの抗体標識密度とシナプス面積との関係。

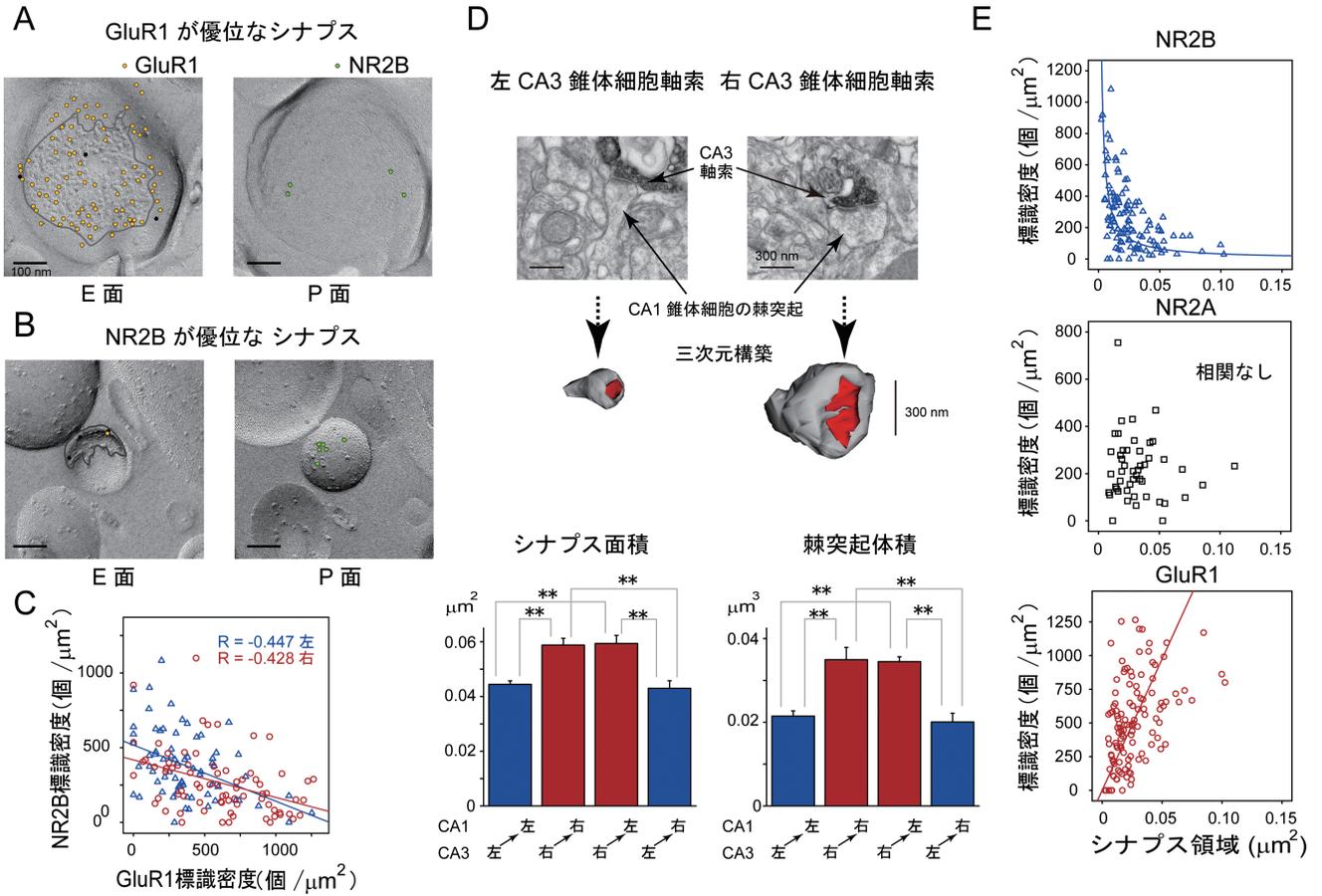


図 2

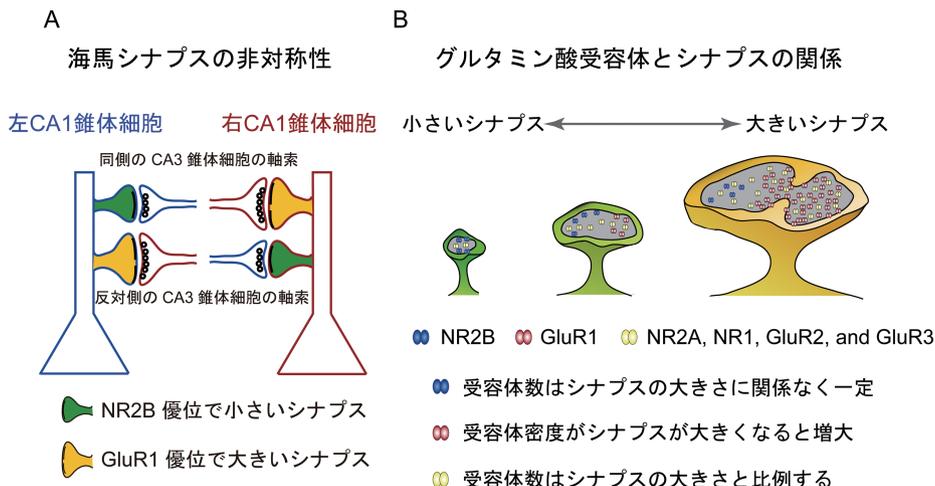


図 3 まとめ

- A. CA3-CA1 錐体細胞シナプスの左右非対称性. 後シナプスの CA1 錐体細胞が左右どちらにあるかに関係なく, シナプス前にある CA3 錐体細胞が左にある場合は CA1 錐体細胞シナプスは小さく, NR2B 密度が高い. CA3 錐体細胞が右にある場合は CA1 錐体細胞シナプスは大きく, GluR1 密度が高い.
- B. グルタミン酸受容体サブユニットとシナプス面積との法則性. シナプスと, そこに存在するグルタミン酸受容体サブユニットの密度には強い関係があり, その関係は三つに分類される.

ブユニットはそれぞれ左側・右側とお互い反対方向に1.5倍ずつ多くなっている。そこで、一つのシナプスでもこれら2分子がお互い共存しにくいのではないかと考えられる。

ちょうどこの頃、重本研究室ではSDS凍結割断標識法(SDS-FRL法)が実用段階になっていた。故・藤本和教授により始められたこの手法⁶⁾は、固定組織を高気下で凍結した後、低圧低温下で細胞膜面を割断してプラチナとカーボンでコーティングし、膜のレプリカを作る。しかる後に膜以外のタンパク質をSDS処理して洗い流してから免疫標識する。(つまり、電子顕微鏡レベルの細胞膜上ウエスタンブロットティング。)このSDS-FRL法を用いると、1. シナプス面が抗体に直接露出され、2. 同じシナプスから2面(E面とP面)のレプリカを作って別々の分子に対する抗体で標識できる。このため、従来のポストエンベディング法より感度が高いことが予想される。事実、GluR1の多いシナプスではNR2Bが少なく、NR2Bの多いシナプスではGluR1が少なく、しかも、同一シナプス上でも住み分けていることが確認できた(図2A, B, C)。さらに、左右差に関しても金標識密度の平均値を取ると、ウエスタンブロットティングの結果を追試できた³⁾(図2C)。

3. シナプス形態の左右差

電子顕微鏡でCA1錐体細胞シナプスのレプリカを観察している間に、筆者は右CA3から投射を受けるシナプス(図2A)の方が左CA3から投射を受けるシナプス(図2B)より大きいのではないかとすることに気づいた。そこで、*in vivo*で神経活動を記録しながら、左右どちらか一方だけのCA3錐体細胞に限局して、クラゲ緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現させるレンチウイルスを注入した。その後、GFPを免疫染色して、染色されたCA3軸索とシナプスを作っているCA1錐体細胞の樹状突起を三次元構築して観察した(図2D)。すると、右CA3から支配を受けるシナプスは左CA3から支配を受けるシナプスより面積で1.4倍、体積で1.7倍大きいことが分かった。すなわち、シナプスの大きさは、シナプスの前にある細胞が左右どちら側にあるかで決定されていることが明らかになった³⁾。

4. シナプスの大きさとグルタミン酸受容体の関係

これらの結果を組み合わせると、大きいシナプスにはGluR1が優位で、小さいシナプスではNR2Bが優位であることが想定される。しかし、SDS-FRL法では大きいシナプス面全体が露出されることは少ない。そこで、ポストエ

ンベディング法に戻って、各受容体を金粒子抗体で標識して三次元化再構築し、この仮説を確認した。SDS-FRL法では上記の制限から受容体の標識密度でしかデータを表せないが、それでも同様の結果であった(図2E)³⁾。

ここで筆者の現在の上司である平瀬肇(理化学研究所ユニットリーダー)が重要な指摘を行う。NR2Bサブユニットは、図2Eのように、受容体密度とシナプス面積が反比例している。それならば、シナプスあたりのNR2Bの数は一定ではないかと。これは一見、図1Cのウエスタンブロットティングのデータと矛盾する。しかし、ウエスタンブロットティングではPSDタンパク質量が同一になるように、泳動前に左右のサンプル量を合わせているため、右側でシナプス面積(すなわちPSD)が1.4倍大きい場合、左のサンプルで1.4倍多くの数のシナプスをウエスタンブロットティングで解析してしまっていることになる。つまり、ウエスタンブロットティングで測定しているのは、左右のシナプス受容体量比ではなく、受容体密度比である。左側でNR2B密度が1.5倍高いとしても、右側でシナプス面積が1.4倍広いので、それが相殺されてNR2B受容体数は左右でほぼ同じとなる。

結 論

マウス海馬の回路図をまとめると次の図のように表される(図3A)。

(1)右側CA3錐体細胞から軸索支配を受けるCA1錐体細胞シナプスは(左右どちらにあっても)、GluR1の密度が高く大きいシナプスである。一方、左側CA3錐体細胞から軸索支配を受けるCA1錐体シナプスは、NR2B密度が高く小さいシナプスである。

(2)さらに、生化学や電子顕微鏡で得られた結果をまとめると、グルタミン酸受容体とシナプス面積の間には密接な相関があり(図3B)(図2E)⁷⁾、

- 1) NR2B分子の数はシナプスの大きさに影響を受けない。すなわち、NR2B密度は小さいシナプスで大きい。
- 2) GluR1分子は密度(数/面積)がシナプス面積に比例するため、大きいシナプスではおよそ面積の二乗でサブユニット数が増える。
- 3) その他のグルタミン酸受容体(NR2Aなど)はシナプス面積が大きくなると、それに比例して数が増える。つまり受容体密度が一定である。

(1)(2)を総合すると、NR2B以外全てのサブユニットは右から支配を受けているシナプスで多いため、CA1領域では左右とも、右CA3領域からの入力の影響が左CA3領

域からの入力の影響より高いと考えられる。

前述のように、グルタミン酸受容体の量やシナプスの大きさは、シナプスの活動性と強い関係があるので、筆者らが発見した左右差は、とりもなおさず海馬の神経活動の左右差に直結していると考えている。

他の研究との比較

受容体とシナプス面積の関係については、先行研究がある。AMPA受容体はシナプス面積が大きいほど数が多く、NMDA受容体はシナプス面積の影響を受けないであろうということは形態学者^{8,9)}あるいは、生理学者²⁾たちにより示されていた。理由として、AMPA受容体はグルタミン酸によるシナプス電流を直接反映すると考えられているが、NMDA受容体はむしろシナプス可塑性誘導に重要だとされていたからである。筆者のデータは、それらの結果をおおむね追認しながら、サブユニットごとに詳細にシナプス面積と受容体の関係を導いている。

胚の発生過程では左右軸形成の研究が盛んである^{10~12)}が、脳の分子的・機能的な左右差については類似の研究はない。「分子から見た脳の左右差」という分野はまだ拓かれたばかりと言えるだろう。

- 1) 発生過程でどのような分子が働いてこのような脳の左右差を作っているのか？
 - 2) ヒト、サルのような霊長類でもこのような受容体やシナプス形態の左右差があるのかどうか？
 - 3) 受容体やシナプスの左右差が、果たしてどのように神経活動の左右差をもたらしているのか？
- など、多くの解き明かすべき問題がある。筆者は今後、これらの問題に答えていきたいと考えている。

あとがき

今から思うと、当たり前のことを長年かけて示したに過ぎないように感じます。しかし当時は、微妙な差しか出ない実験のため五里霧中で、ときに垣間見える光にも確信が持てない状態でした。深く考えずにNR2B定量を引き受けてしまったから困難さに気づいたとき、GluR1の差のSDS-FRL法での追試、理研異動後も週末に電顕を見るために理研・生理研間を高速道路で往復しているときなど、ずっと薄氷を踏むようでした。続けてこれたのは、単に脳の非対称性がきれいに思えたからです。

ここでは⁹⁾、生化学・形態学・生理学と、今まで三つのラボで学んできた手法が全て使われています。研究者としての基礎を与えて下さった中西(重忠)先生、最大限の裁

量権を下された重本先生、異動後もなかなか終結しない仕事を助けて下さった平瀬さんにこの場でお礼を申し上げます。そして、生理研技官の山田さんや前橋さんにも感謝を表したいと思います。

- 1) Somogyi, P., Tamas, G., Lujan, R., & Buhl, E.H. (1998) *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 26, 113-135.
- 2) Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., & Nakahara, H. (2003) *Trends Neurosci.*, 26, 360-368.
- 3) Shinohara, Y., Hirase, H., Watanabe, M., Itakura, M., Takahashi, M., & Shigemoto, R. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 19498-19503.
- 4) Cohen, R.S., Blomberg, F., Berzins, K., & Siekevitz, P. (1977) *J. Cell Biol.*, 74, 181-203.
- 5) Kawakami, R., Shinohara, Y., Kato, Y., Sugiyama, H., Shigemoto, R., & Ito, I. (2003) *Science*, 300, 990-994.
- 6) Fujimoto, K., Umeda, M., & Fujimoto, T. (1996) *J. Cell Sci.*, 109, 2453-2460.
- 7) Shinohara, Y. & Hirase, H. (2009) *Front Neuroanat.*, 3, 1-6.
- 8) Takumi, Y., Ramirez-Leon, V., Laake, P., Rinvik, E., & Ottersen, O.P. (1999) *Nat. Neurosci.*, 2, 618-624.
- 9) Racca, C., Stephenson, F.A., Streit, P., Roberts, J.D., & Somogyi, P. (2000) *J. Neurosci.*, 20, 2512-2522.
- 10) Meno, C., Saijoh, Y., Fujii, H., Ikeda, M., Yokoyama, T., Yokoyama, M., Toyoda, Y., & Hamada, H. (1996) *Nature*, 381, 151-155.
- 11) Supp, D.M., Witte, D.P., Potter, S.S., & Brueckner, M. (1997) *Nature*, 389, 963-966.
- 12) Hirokawa, N., Tanaka, Y., Okada, Y., & Takeda, S. (2006) *Cell*, 125, 33-45.

篠原 良章

(理化学研究所基礎科学特別研究員
平瀬研究ユニット)

Left-right asymmetry of the hippocampal synapses
Yoshiaki Shinohara (Hirase Research Unit, RIKEN Brain Science Institute, 2-1, Hirosawa, Wako, Saitama, 351-0198, Japan)

X線構造による希少糖生産酵素の単糖異性化反応機構の解析

はじめに

単糖とは、糖の基本単位で、炭素原子三つ以上からなるポリヒドロキシアルデヒド(アルドース)あるいはポリヒドロキシケトン(ケトース)である。その構造中に不斉炭素が多くあり、例えば、炭素原子六つからなるヘキソース