

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18974

研究課題名(和文) 視床後腹側核におけるCblnを介したGluD1のシナプス回路制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis for GluD1-Cbln1 signaling in synaptic transmission in thalamic neurons of the ventral posteromedial nucleus

研究代表者

今野 幸太郎 (Konno, Kotaro)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：20599641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：視床後腹側核においてGluD1mRNAは視床皮質ニューロンに発現していた。タンパクレベルでは、GluD1はVGluT2陽性終末と視床皮質ニューロンとの間に形成される非対称性シナプスのシナプス後膜に限局した局在を示した。GluD1遺伝子欠損マウスの三叉神経核由来の神経終末において単位長さ当たりの終末ボタン数の増加が認められた。以上の結果は小脳のGluD1とGluD2に対して、視床後腹側核におけるGluD1はシナプス形成に対して抑制的に働く可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：We selected the ventral posterior nucleus (VP), a brain region with high level expression of GluD1. GluD1 mRNA was expressed highly in relay neurons, and its immunoreactivity was selectively concentrated at specific synapses formed between glutamatergic neurons in the trigeminal nucleus and relay neurons in the VP. In addition, most VP-targeting neurons expressed Cbln1 mRNA, a ligand for GluD1. To pursue a role of the interaction of GluD1 and Cbln1 in the VP, we analyzed changes in terminals of trigeminal nucleus in wild-type, GluD1-KO, and Cbln1-KO mice by immunofluorescence. In GluD1-knockout and Cbln1-knockout mice, the density of glutamatergic terminals were strikingly increased. These results suggest that GluD1 and Cbln1 interaction plays a inhibitory role in synaptic connectivity between glutamatergic neurons in the trigeminal nucleus and relay neurons in the VP.

研究分野：神経解剖学

キーワード：glutamate receptor

## 1. 研究開始当初の背景

神経伝達物質の一つであるグルタミン酸は、シナプス可塑性の誘発作用を介して記憶や学習などの高次脳機能や、シナプス回路発達の中心的役割を担っている。デルタ型グルタミン酸受容体は  $\delta 1$  型 (GluD1) および  $\delta 2$  型サブユニット (GluD2) により構成されている。GluD1 は大脳皮質 (認知に関与)・海馬 (記憶) 線条体 (認知と運動制御) 視床 (知覚) 扁桃体と分界条床核 (情動) 小脳皮質 (運動学習と協調運動) など高次脳機能領域に豊富に発現する。小脳において GluD1 mRNA は介在細胞選択的に発現し、GluD1 タンパクは平行線維-介在細胞シナプスに選択的に局在する。さらに GluD1 遺伝子欠損マウスの小脳におけるシナプス回路解析から、GluD1 も GluD2 と同様にシナプス回路の形成制御に関与することを明らかにしてきた (Konno et al. 2014. J Neurosci 34: 7412-7424, 2014)。GluD1 をコードするヒトの遺伝子研究から、GluD1 は双極性障害や大うつ、統合失調症や自閉症スペクトラムといった精神神経疾患との関連性が数多く報告されている。さらに GluD1 遺伝子欠損マウスは、攻撃性の亢進、社会的行動性の異常、低不安様行動といった情動異常性や、高周波数の聴覚障害、痛覚閾値の低下といった知覚障害を示すことが報告されている。GluD1 も GluD2 と同様に Cbln1 やそのファミリータンパク質である Cbln2 あるいは Cbln4 を介してシナプス形成の維持に関与することが *in vitro* の研究により報告されている。以上のことから高次脳機能領域において GluD1 は Cbln ファミリーを介したシナプス伝達強度の制御やシナプス分子基盤の構築に関与している可能性があるが、小脳外における GluD1 のシナプス局在やシナプス形成機構は不明であり、*in vivo* における GluD1 と Cbln ファミリーとの関連性についても不明である。

## 2. 研究の目的

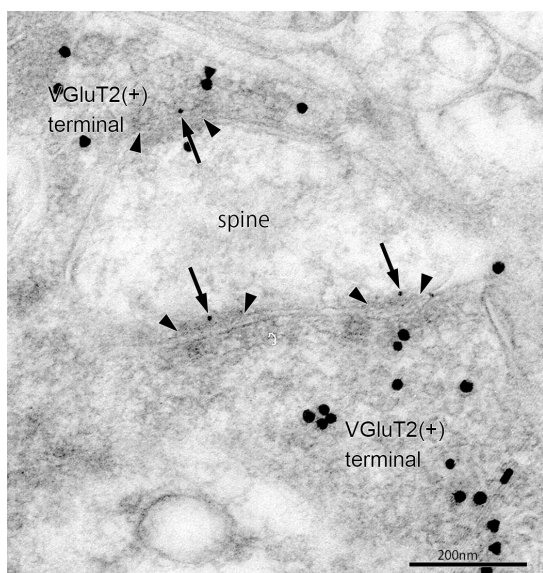
GluD1 はデルタ型グルタミン酸受容体に属する。GluD1 は高次脳機能領域に豊富に存在し、小脳ではシナプス回路の形成制御に関与することを近年報告した。GluD1 遺伝子欠損マウスは、情動異常や聴覚異常、痛覚閾値の低下など様々な表現系を示す。そのような表現系は高次脳機能領域における GluD1 の機能を示唆していると考えられるが、小脳外における分子局在や神経回路基盤構築への関与は不明である。さらに GluD1 はタンパク質である Cbln1 を介してシナプス形成の維持に関与することが *in vitro* の研究により報告されているが、*in vivo* における局在や機能は不明な点が多い。本研究は、知覚伝導路の中継核の一つである視床後腹側核に着目し、GluD1/Cbln1 の関与する神経回路基盤およびその機能解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

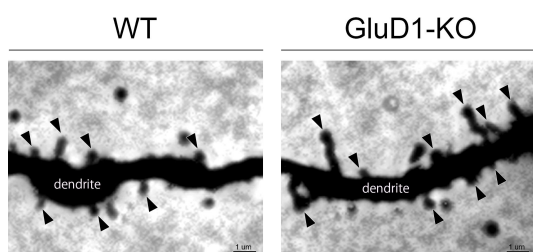
GluD1 および Cbln1 のシナプスにおける局在解析は、蛍光抗体法および包埋後免疫電顕法を用いて同定した。視床後腹側核へ投射する神経核は逆行性神経トレーサーを用いて同定した。さらに、逆行性に標識された細胞の神経化学的特性を *fluorescence in situ hybridization* を組み合わせて検証した。また、GluD1 遺伝子欠損マウスおよび Cbln1 遺伝子欠損マウスを用いてシナプス形成における機能を検証するためにゴルジ染色法および通常電顕法を用いて視床後腹側核ニューロンの形態解析を行った。さらに、GluD1 遺伝子欠損マウスおよび Cbln1 遺伝子欠損マウスを用いて三叉神経核脊髄路核由来の神経線維における単位長さ当たりの終末ボタンを測定するために順行性神経トレーサーを三叉神経核脊髄路核に注入し、視床後腹側核において解析を行った。

## 4. 研究成果

初めに蛍光抗体法および包埋後免疫電顕法を用いて視床後腹側核における GluD1 の局在を検討した。その結果、GluD1 は vesicular glutamate transporter (VGluT) 2 陽性グルタミン酸作動性神経終末と視床皮質ニューロンとの間に形成される非対称性シナプスのシナプス後膜に局限した局在を示した(下図、矢印: GluD1 の免疫反応、矢頭: 非対称性シナプス、spine: 視床後腹側核神経のスパイン)



また、GluD1 と Cbln1 の免疫染色を行った結果、GluD1 と Cbln1 は近接して局在することが明らかとなった。逆行性神経トレーサーを用いて GluD1 に入力する VGluT2 陽性神経終末の由来を検討した結果、三叉神経主知覚核・脊髄路核・中脳路核において逆行性に標識された神経細胞が認められ、その標識細胞は VGluT2 mRNA および Cbln1 mRNA を発現することが明らかとなった。GluD1 遺伝子欠損マウスを用いて、視床皮質ニューロンの形態解析を行った結果、GluD1 遺伝子欠損マウスにおいて視床皮質ニューロンのスパイン様突起の伸長(下図、矢頭: スパイン様突起、



dendrite: 樹状突起)と非対称性シナプス数の増加が認められた。

さらに、三叉神経脊髄路核に逆行性神経トレーサーを注入し三叉神経核脊髄路核由来の神経線維における単位長さ当たりの終末ボタンを測定した結果、GluD1 遺伝子欠損マウスにおいて単位長さ当たりの終末ボタンの増加が認められた。Cbln1 遺伝子欠損マウスにおいても同様の表現型が認められた。以上の結果は小脳の GluD1 と GluD2 に対して、視床後腹側核における GluD1 はシナプス形成に対して抑制的に働く可能性を示唆する。GluD1 遺伝子欠損マウスおよび Cbln1 遺伝子欠損マウスにおけるスパイン様突起の伸長と非対称性シナプス数の増加が終末ボタンの増加の表現型とどのような関係を有するのか、今後の検討課題である。

## 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 4 件 )

1. Ageta-Ishihara N, Konno K, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Watanabe M, Kinoshita M, CDC42EP4, a perisynaptic scaffold protein in Bergmann glia, is required for glutamatergic tripartite synapse configuration. *Neurochem Int.*, 査読有, S0197-0186, 2018, 30442-30444.

doi: 10.1016/j.neuint.2018.01.003.

2. Uesaka N, Abe M, Konno K, Yamazaki M, Sakoori K, Watanabe T, Kao TH, Mikuni T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M, Retrograde Signaling from Progranulin to Sort1 Counteracts Synapse Elimination in the Developing Cerebellum. *Neuron*, 査読有, 97, 2018, 796-805.

doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.018.

3. Kumamoto H, Yamaguchi T, Konno K, Izumi T, Yoshida T, Ohmura Y, Watanabe M, Yoshioka M, Repeated fluvoxamine treatment recovers early postnatal stress-induced hypersociability-like behavior in adult rats. *J Pharmacol Sci.*, 査読有, 136, 2018, 1-8.

doi: 10.1016/j.jphs.2017.12.002

4. Takahashi-Iwanaga H, Kimura S, Konno K, Watanabe M, Iwanaga T. Intrarenal signaling mediated by CCK plays a role in salt intake-induced natriuresis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 313, 2017, F20-F29.

doi: 10.1152/ajprenal.00539.2016.

5. Otsuka S, Konno K, Abe M, Motohashi J, Kohda K, Sakimura K, Watanabe M, Yuzaki M, Roles of Cbln1 in Non-Motor Functions of Mice. *J Neurosci.*, 査読有, 36, 2016, 11801-11816. \*S.O. and K.K. contributed equally to this work.

doi: 10.1523/JNEUROSCI.0322-16.2016

〔学会発表〕(計2件)

1. Kohtarou Konno, Kenji Sakimura, Masahiko Watanabe, Extracerebellar localization of glutamate receptor GluD2. 第8回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム、2018年2月10-11日、新潟大学(新潟県新潟市)

2. 宮本哲慎、今野幸太郎、西川晃司、崎村建司、柚崎通介、渡辺雅彦、マウス視床後腹側核におけるグルタミン酸受容体 GluD1 の局在および機能解析、第122回日本解剖学会総会・全国集会、2017年03月28-30日、長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市)

〔図書〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今野 幸太郎 (KONNO Kohtarou)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号: 20599641

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )