

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06813

研究課題名（和文）脳梁膨大後皮質におけるグルタミン酸受容体GluD2の局在および機能解析

研究課題名（英文）localization and function of glutamate receptor GluD2 in the retrosplenial granular cortex

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：グルタミン酸受容体GluD2は小脳平行線維 - プルキンエ細胞シナプス選択的に局在し、回路形成に関与するが、小脳外におけるGluD2の局在や機能は不明である。申請者は脳梁膨大後皮質（RSG）に着目し、神経解剖学的手法を用いて局在および機能解析を行った。その結果、RSGにおいてGluD2は視床前腹側核（AV）由来神経終末との非対称性シナプス後部に選択的な局在が認められた。さらに、GluD2あるいはGluD2のリガンドであるCbln1遺伝子欠損マウスのRSGにおいてAV由来の神経終末が有意に減少した。以上の結果は小脳外領域においてもGluD2/Cbln1が共同して神経回路構築に関与することを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、GluD2の欠失変異をもつ家系が相次いで報告され、これらの患者において発語障害や精神遅滞などの高次脳機能障害といった予想外の症状が認められた。高次脳機能障害は小脳外の脳部位に発現しているGluD2の機能を反映している可能性が考えられるが、過去に小脳外におけるGluD2の局在や機能を示す報告はない。今回の成果はGluD2とCbln1が小脳外においても特定の神経回路基盤構築に重要な役割を担うことを示唆する。

研究成果の概要（英文）：Little is known to date as to synaptic expression and function of glutamate receptor GluD2 outside the cerebellum. To address this issue, we examined the retrosplenial granular cortex (RSG), a cortical area that is involved in spatial memory and enriched with GluD2. By light and electron microscopy, GluD2 was concentrated at asymmetrical synapses in RSG neurons. Using anterograde and retrograde tracers, we addressed that afferents contacting GluD2-expressing synapses originated from the anteroventral thalamic nucleus (AV). Intriguingly, most RSG-targeting AV neurons expressed mRNA for Cbln1, a ligand for GluD1. Indeed, Cbln1 was clustered on RSG neurons and tightly apposed to GluD2 clusters. The density of AV afferents terminating on RSG neurons was significantly reduced in both GluD2-KO and Cbln1-KO mice. These results provide the molecular-anatomical evidence that GluD2 and Cbln1 interact to promote the formation of specific wiring between the AV and RSG.

研究分野：神経解剖学

キーワード：グルタミン酸受容体

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。

脳において GluD2 は小脳プルキンエ細胞にほぼ限局して発現する。GluD2 は小脳顆粒細胞から分泌される Cbln1 と結合することでプルキンエ細胞-平行線維シナプスの形成と維持に関わっている (Matsuda et al. *Science* 328: 363-368, 2010; Uemura et al. *Cell* 141: 1068-1079, 2010)。また、GluD2 は AMPA 受容体の発現量を調節し、シナプス応答性の制御機構に関与している (Yamasaki et al. *J Neurosci* 31:3362-3374, 2011)。すなわち、小脳における GluD2 は細胞種選択的に発現し、神経回路選択的に局在する特性を有しその回路の形成と維持、シナプス伝達の制御に重要な役割を担っている。

近年、GluD2 の欠失変異を持つ家系が相次いで報告された (Utine et al. *J Child Neurol* 28: 926-932, 2013; Hills et al. *Neurology* 81: 1378-1386, 2013)。これらの患者は、GluD2 遺伝子欠損マウスと同様に小脳性の運動失調や自発眼振を主徴とするが、発語障害や精神遅滞などの高次脳機能障害も認められる。これらの高次脳機能障害は、小脳外の脳部位に発現している GluD2 の機能を反映している可能性が考えられるが、小脳外における GluD2 の局在およびその機能は不明である。

2. 研究の目的

これまでの過去の報告において小脳外における GluD2 の局在を示す報告はない。そこで、予備検討として高感度検出系の *in situ* hybridization 法と蛍光抗体法を用いて GluD2 mRNA およびタンパクの空間分布を検討した。驚くべきことに GluD2 は小脳以外にも皮質や線条体といった高次脳機能に関与する領域にも広く分布していた。特に皮質領域では、脳梁膨大後皮質 (RSG) に強い発現が認められた。

脳梁膨大後皮質は視床前核や海馬と密に連絡しており、齧歯類やヒトの研究から脳梁膨大後皮質を含む神経回路は空間記憶学習に深く関わることが報告されている。脳梁膨大後皮質に入力する神経核の中で、視床前腹側核には GluD2 のリガンドである Cbln1 mRNA の発現が認められることから (Otsuka and Konno et al. *J Neurosci* 36:11801-11816, 2016)、視床前腹側核-脳梁膨大後皮質の神経回路基盤構築に GluD2/Cbln1 が関与していることが予想される。

本研究は、高次脳機能領域の一つである脳梁膨大後皮質に着目し、GluD2 および Cbln1 の関与する神経回路基盤およびその機能を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) GluD2/Cbln1 のシナプス局在および関与する神経回路を明らかにする。

GluD2 の細胞発現と GluD2/Cbln1 のシナプス局在を明らかにするために、まず初めに蛍光多重 *in situ* hybridization 法を用いて GluD2 mRNA 発現細胞の神経化学的特性を検証する。続いて蛍光抗体法および包埋後免疫電顕法を用いて GluD2/Cbln1 の局在を検証する。予備検討で脳梁膨大後皮質における分布を検討した結果、GluD2 は第 1 層の表層および第 2 / 3 層に豊富に認められた。また GluD2 と様々な神経終末マーカーと蛍光多重染色を行った結果、GluD2 は二型小胞性グルタミン酸トランスポーター (VGluT2) 陽性のグルタミン酸作動性神経終末と選択的に近接していた。この結果は小脳と同様に、脳梁膨大後皮質においても GluD2 は神経回路選択的に局在する特性を持つことを示している。GluD2 および Cbln1 のシナプス部における局在は active zoon 関連タンパク質やポストシナプスタンパクとの多

重染色を行うことで検証し、最終的に包埋後免疫電顕法を用いて局在を決定する。

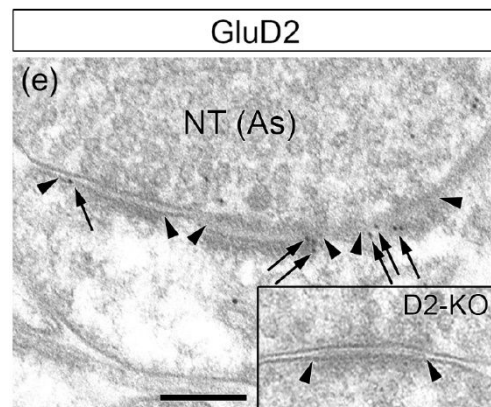
続いて脳梁膨大後皮質に逆行性神経トレーサーを注入し、視床前腹側核の逆行性に標識された細胞において VGlut2 および Cbln1 の発現があるかどうか fluorescence *in situ* hybridization を組み合わせで検証する。さらに視床前腹側核に順行性神経トレーサーを注入し、脳梁膨大後皮質において順行性に標識された神経終末は VGlut2 を発現するかどうか、GluD2 と近接するかどうか蛍光抗体法を組み合わせで検討する。

(2) シナプス形成機構に対する GluD2/Cbln1 の関与を明らかにする。

シナプス形成機構に対する GluD2/Cbln1 の関与を明らかにするために GluD2 遺伝子欠損マウスおよび Cbln1 遺伝子欠損マウスを用いて、VGlut2 陽性グルタミン酸作動性神経終末の減少が認められるかどうかを光顕レベルで定量解析する。

4. 研究成果

蛍光多重 *in situ* hybridization 法を用いて RSG における GluD2 mRNA 発現細胞の神経化学的特性を検証した結果、GluD2 はグルタミン酸作動性神経に強く発現し、GABA 作動性神経には弱いといった発現特性が認められた。続いて非対称性シナプスマーカー PSD-95 および対称性シナプスマーカー gephyrin を用いて GluD2 のシナプス局在を検討した結果、GluD2 は PSD-95 と近接して局在し、gephyrin の近傍に GluD2 シグナルは認められなかった。また、GluD2 cluster の近傍にアクティブゾーン関連タンパク質 bassoon の局在を確認した。続いて包埋後免疫電顕を用いて GluD2 の詳細な局在を検討した結果、GluD2 は非対称性シナプスのシナプス後膜に限局した局在が認められた(右図、矢印は GluD2 の免疫反応、矢頭はシナプス後肥厚部)。RSG に投射する神経核の中で視床前背側核は VGlut2(+)/VGlut1(+)細胞によって、視床前腹側核は VGlut2(+)/VGlut1(-)細胞によって構成される。そこで、VGlut1, VGlut2, GluD2 の3重蛍光染色を行った結果、GluD2 は VGlut2(+)/VGlut1(-)終末の近傍に選択的な局在が認められた。



次に GluD2 に入力する神経核を順行性・逆行性神経トレーサーを用いて検討した。RSG に逆行性神経トレーサーを注入した結果、視床前背側核や視床前腹側核に数多くの逆行性に標識された細胞が認められた。蛍光 *in situ* hybridization 法を組み合わせた結果、視床前背側核の標識細胞は VGlut1 および VGlut2 mRNA を発現し、視床前腹側核の標識細胞は VGlut2 mRNA を発現するが VGlut1 mRNA の発現はなかった。さらに視床前腹側核の標識細胞はリガンドの Cbln1 mRNA の発現が認められた。続いて視床前腹側核に順行性神経トレーサーを注入した結果、RSG において、GluD2 の局在と一致して第1層の表層と第2/3層に標識終末が認められ、標識終末は VGlut2 陽性かつ VGlut1 陰性であった。以上の結果から GluD2 は視床前腹側核由来 VGlut2(+)/VGlut1(-)グルタミン酸作動性神経終末と RSG ニューロン間の非対称性シナプス後膜に局在することが明らかとなった。

最後に GluD2 遺伝子欠損マウスあるいは Cbln1 遺伝子欠損マウスを用いて GluT1 および VGlut2 の蛍光染色を行い終末数の変化を検討した。その結果、野生型マウスと比較して GluD2 遺伝子欠損マウスおよび Cbln1 遺伝子欠損マウスにおいて VGlut2(+)/VGlut1(-)終末の有意な減少が認められた。

以上の結果から、RSGにおいて GluD2 は細胞種選択的に発現し回路選択的な局在様式を示すことが明らかとなり、Cbln1 を介して視床前腹側核-脳梁膨大後皮質の神経回路基盤構築に重要な役割を担っていることが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakamoto C, Konno K, Miyazaki T, Nakatsukasa E, Natsume R, Abe M, Kawamura M, Fukazawa Y, Shigento R, Yamasaki M, Sakimura K, Watanabe M.	4. 巻 528
2. 論文標題 Expression mapping, quantification, and complex formation of GluD1 and GluD2 glutamate receptors in adult mouse brain.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Comp Neurol.	6. 最初と最後の頁 1003-1027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24792.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Rawangwong A, Khrongyut S, Chomphoo S, Konno K, Yamasaki M, Watanabe M, Kondo H, Hipkaeo W.	4. 巻 100
2. 論文標題 Heterogeneous localization of muscarinic cholinceptor M1 in the salivary ducts of adult mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arch Oral Biol.	6. 最初と最後の頁 14-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2019.02.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Zhou L, Hossain MI, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Konno K, Kageyama S, Komatsu M, Watanabe M, Sakimura K, Takebayashi H.	4. 巻 147
2. 論文標題 Deletion of exons encoding carboxypeptidase domain of Nna1 results in Purkinje cell degeneration (pcd) phenotype.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurochem.	6. 最初と最後の頁 557-572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14591.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kaplan E, Zubedat S, Radzishevsky I, Valenta AC, Rechnitz O, Sason H, Sajrawi C, Bodner O, Konno K, Esaki K, Derdikman D, Yoshikawa T, Watanabe M, Kennedy RT, Billard JM, Avital A, Wolosker H.	4. 巻 115
2. 論文標題 ASCT1 (Slc1a4) transporter is a physiologic regulator of brain d-serine and neurodevelopment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 9628-9633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1722677115.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ageta-Ishihara N, Konno K, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Watanabe M, Kinoshita M.	4. 巻 119
2. 論文標題 CDC42EP4, a perisynaptic scaffold protein in Bergmann glia, is required for glutamatergic tripartite synapse configuration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochem Int.	6. 最初と最後の頁 190-198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2018.01.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iida I, Konno K, Natsume R, Abe M, Watanabe M, Sakimura K, Terunuma M.	4. 巻 405
2. 論文標題 A comparative analysis of kainate receptor GluK2 and GluK5 knockout mice in a pure genetic background	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Behav Brain Res .	6. 最初と最後の頁 113194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbr.2021.113194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchigashima M, Konno K, Demchak E, Cheung A, Watanabe T, Keener DG, Abe M, Le T, Sakimura K, Sasaoka T, Uemura T, Imamura Kawasaki Y, Watanabe M, Futai K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Specific Neuroligin3- Neurexin1 signaling regulates GABAergic synaptic function in mouse hippocampus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 e59545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.59545.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kakizaki T, Ohshiro T, Itakura M, Konno K, Watanabe M, Mushiake H, Yanagawa Y.	4. 巻 35
2. 論文標題 Rats deficient in the GAD65 isoform exhibit epilepsy and premature lethality	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB J .	6. 最初と最後の頁 e21224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001935R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sacai H, Sakoori K, Konno K, Nagahama K, Suzuki H, Watanabe T, Watanabe M, Uesaka N, Kano M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Autism spectrum disorder-like behavior caused by reduced excitatory synaptic transmission in pyramidal neurons of mouse prefrontal cortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 5140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18861-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki K, Kawabori M, Seki T, Takamiya S, Tateno T, Konno K, Watanabe M, Houkin K.	4. 巻 37
2. 論文標題 FTY720 Attenuates Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury by Decreasing Systemic and Local Inflammation in a Rat Spinal Cord Compression Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurotrauma.	6. 最初と最後の頁 1720-1728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/neu.2019.6905	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada J, Sato C, Konno K, Watanabe M, Jinno S.	4. 巻 40
2. 論文標題 PSA-NCAM Colocalized with Cholecystokinin-Expressing Cells in the Hippocampus Is Involved in Mediating Antidepressant Efficacy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurosci.	6. 最初と最後の頁 825-842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1779-19.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwanaga T, Konno K, Watanabe M.	4. 巻 40
2. 論文標題 Selective distribution of GLUT3-expressing nerve fibers in the lamina terminalis among the circumventricular organs of mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomed Res.	6. 最初と最後の頁 207-214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.40.207	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kohtarou Konno, Chihiro Nakamoto, Kenji Sakimura, Masanobu Kano, Masahiko Watanabe.
2. 発表標題 Expression mapping, quantification, and complex formation of GluD1 and GluD2 glutamate receptors in adult mouse brain.
3. 学会等名 IBRO2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohtarou Konno and Masahiko Watanabe.
2. 発表標題 Glyoxal fixative is effective for immunohistochemical detection of synaptic molecules in vivo.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohtarou Konno, Kenji Sakimura, Miwako Yamasaki, Masahiko Watanabe
2. 発表標題 Extracerebellar localization of glutamate receptor GluD2
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kohtarou Konno, Taisuke Miyazaki, Miwako Yamasaki, Kenji Sakimura, and Masahiko Watanabe
2. 発表標題 Expression mapping of GluD1 and GluD2 glutamate receptors in adult mouse brain
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------