

氏 名 LONG, Yu

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2466 号

学位授与の日付 2023 年 9 月 28 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Regulatory role of GABAergic neurons in the lateral
hypothalamic area and zona incerta in glucose metabolism

論文審査委員 主 査 富永 真琴
生理科学コース 教授
箕越 靖彦
生理科学コース 教授
西田 基宏
生理科学コース 教授
井上 啓
金沢大学 新学術創成研究機構 教授

Summary of Doctoral Thesis

Name in Full : LONG, Yu

Title : Regulatory role of GABAergic neurons in the lateral hypothalamic area and zona incerta in glucose metabolism

Glucose and energy homeostasis are vital for the maintenance of biological functions in animals. The lateral hypothalamic area (LHA) in the brain emerges as a key component involved in the regulation of food intake and peripheral metabolism. Previous investigations demonstrated that the lesion in the LHA resulted in reduced body weight and food intake. In the LHA, approximately 55% LHA neurons are GABAergic neurons encoding vesicular GABA transporter (Vgat), while approximately 45% LHA neurons are glutamatergic neurons encoding vesicular glutamate transporter 2 (Vglut2). Stimulation of LHA GABAergic neurons induced rapid binge-like eating, whereas the ablation of the neurons attenuated food consumption. In contrast, stimulation of LHA glutamatergic neurons suppressed food consumption.

The zona incerta (ZI), a brain region located in close proximity to the LHA, was described as a “zone of uncertainty”. Recent investigations have shed light on certain shared characteristics between the LHA and ZI, including involvement in attentional processes, narcolepsy, and energy homeostasis. ZI neurons are predominantly GABAergic (~85%). Stimulation of LHA and ZI (LHA/ZI) GABAergic neurons induced rapid binge-like eating regardless of caloric content. These studies underscore the potential significance of LHA/ZI GABAergic neurons, along with LHA glutamatergic neurons, in the regulation of energy homeostasis. However, their involvement in glucose metabolism remains elusive.

In the present study, I investigated the regulatory role of LHA/ZI GABAergic neurons, as well as LHA glutamatergic neurons in glucose metabolism in mice. I used

the chemogenetic method called designer receptors exclusively activated by designer drug (DREADD) to activate the neurons. Adeno-associated virus (AAV) expressing the excitatory DREADD hM3Dq was administered into the LHA/ZI region of vesicular GABA transporter (Vgat)-Cre or vesicular glutamate transporter 2 (Vglut2)-Cre knock-in mice (referred to as VgatLHA/ZI-hM3Dq or Vglut2LHA-hM3Dq mice). DREADD ligand clozapine-N-oxide (CNO) or saline was intraperitoneally injected in VgatLHA/ZI-hM3Dq and Vglut2LHA-hM3Dq mice. Chemogenetic CNO administration into VgatLHA/ZI-hM3Dq and Vglut2LHA-hM3Dq mice increased c-Fos expression in LHA/ZI GABAergic neurons and LHA glutamatergic neurons, respectively. I performed glucose tolerance test (GTT), insulin tolerance test (ITT) and pyruvate tolerance test (PTT) in these mice.

Activation of LHA/ZI GABAergic neurons reduced the blood glucose elevation during GTT, while activation of LHA glutamatergic neurons did not. Activation of LHA/ZI GABAergic neurons did not change plasma insulin concentration before and after glucose administration. Furthermore, activation of the neurons did not alter the decrease of blood glucose concentration during ITT. These results suggest that activation of LHA/ZI GABAergic neurons, but not LHA glutamatergic neurons, increases glucose tolerance during GTT, independently of changes in plasma insulin concentration and insulin action on peripheral tissues. I next performed pyruvate tolerance test (PTT). Activation of LHA/ZI GABAergic neurons decreased pyruvate-derived glucose production. These results suggest that activation of LHA/ZI GABAergic neurons suppress glucose production from pyruvate.

The results of PTT suggest that glucose production in the liver could be affected by activation of LHA/ZI GABAergic neurons. To test the possibility, I examined whether activation of LHA/ZI GABAergic neurons changes glycogen and glucose 6-phosphate (G6P) contents in the liver. Activation of LHA/ZI GABAergic neurons decreased glycogen and G6P contents in the liver at 30 min after CNO administration,

while mRNA amount of glucose 6-phosphatase (G6Pase, *g6pc*) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK, *pck1*), or the enzymatic activity of fructose 1,6-bisphosphatase (F1,6BPase) did not change. These results suggest that activation of LHA/ZI GABAergic neurons quickly suppresses glucose production in the liver without change in the gene expressions. The decrease of glycogen content in the liver is probably due to the enhancement of glycogen breakdown in the liver to maintain the basal blood glucose concentration. Consistent with this, activation of LHA/ZI GABAergic neurons temporally decreased basal blood glucose concentration at 30 min after CNO administration.

Finally, I examined 2DG uptake in the liver and other peripheral tissues during GTT. Activation of LHA/ZI GABAergic neurons tended to increase 2DG uptake in the liver at 120 min after glucose administration. 2DG uptake in the liver at 30 and 120 min or that of other peripheral tissues at 120 min did not change after glucose administration. These results suggest that glucose uptake in the liver as well as other peripheral tissues is not affected by activation of LHA/ZI GABAergic neurons.

In summary, I demonstrate that activation of LHA/ZI GABAergic neurons acutely suppresses glucose production in the liver, thereby increasing glucose tolerance after glucose administration. These findings highlight the significant role of LHA/ZI GABAergic neurons in the homeostatic regulation of glucose metabolism.

Results of the doctoral thesis defense

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 LONG, Yu

Title
論文題目 Regulatory role of GABAergic neurons in the lateral hypothalamic area and zona incerta in glucose metabolism

出願者は、外側核と直ぐ近傍の透明帯 GABA ニューロンが糖代謝にどのような調節作用を及ぼすかを調べた。外側核と透明帯 GABA ニューロンは、これを活性化すると摂食行動を強く促進することが報告されている。しかし、外側核と透明帯が肝臓や筋肉などの代謝にどのような調節作用を及ぼすかは不明である。出願者は、雄マウスを用いて外側核と透明帯のグルタミン酸ニューロンと GABA ニューロンを DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) 法によって各々活性化し、糖負荷試験 (GTT) での効果を調べた。その結果、同 GABA ニューロンを活性化すると GTT において血糖上昇が抑制された。これに対して、グルタミン酸ニューロンを活性化しても効果は無かった。また GABA ニューロンを活性化すると基礎血糖値も一過性に低下した。グルコース負荷前後の血中インスリン濃度とインスリン負荷試験 (ITT) に差は無かった。以上の実験結果から、外側核と透明帯 GABA ニューロンを活性化すると、インスリン分泌或いはインスリン作用以外の機構によって、グルコース負荷時の血糖上昇を抑制することが明らかとなった。

外側核と透明帯 GABA ニューロンがグルコース負荷時の血糖上昇を抑制する機構を調べるため、2-[¹⁴C]deoxyglucose (2DG)を用いて、GTT における組織への糖取込 (肝臓、腎臓、骨格筋、心臓、白色・褐色脂肪組織) を調べた。結果、2DG の取込みが肝臓において促進する傾向があった。他の組織に差は無かった。そこで、ピルビン酸負荷試験 (PTT) を行い糖新生に及ぼす効果を調べた。結果、同 GABA ニューロンを活性化すると PTT による血糖上昇が抑制された。肝臓において G6P 量も低下していた。肝グリコーゲン量も低下していた。グリコーゲン量が低下した理由は、血糖低下を抑制するために 2 次的に肝グリコーゲンが分解されて血中に動員されたためと考えられた。糖新生の律速酵素である glucose 6-phosphatase (G6Pase)、phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) の mRNA 量、及び fructose 1,6-bisphosphatase (F1,6-BPase) の酵素活性に差は無かった。G6Pase 及び PEPCK の酵素活性に差があるか否かは今後の研究課題である。

以上の実験結果から、外側核と透明帯の GABA ニューロンを活性化すると、肝臓において糖新生が抑制され、その結果、グルコース負荷による血糖上昇が抑制されることが明らかとなった。外側核と透明帯 GABA ニューロンは摂食直前に一過性に活性化する。このことから、同 GABA ニューロンは摂食を促進するだけで無く、肝臓での糖新生を抑制することによって摂食後の高血糖を抑制し、生体の恒常性維持に寄与することが示唆される。

本研究は、外側核と透明帯の GABA ニューロンが肝臓での糖新生を抑制することによって糖代謝に調節作用を及ぼすことを明らかにした初めての研究である。以上の研究結果及び提出論文から、全員一致で本論文が博士学位論文に相応しいと結論した。