

Title	脳の興奮・抑制バランスを調節する分子メカニズムの解明
Sub Title	Molecular mechanisms to control brain excitation/inhibition balance
Author	山崎, 世和(Yamasaki, Tokiwa)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2020
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>脳の神経細胞をつなぐシナプスには興奮性と抑制性があり、そのバランスが適切に調節されることで脳が正常に機能することができる。本研究プロジェクトでは、シナプス接着分子Neurologin (NL) に着目し、NLによる興奮・抑制バランス制御の分子機構解明を目指し研究を展開している。NLにはNL1からNL4の4つの遺伝子が存在し、NL1は興奮性、NL2, NL4は抑制性、NL3は両方のシナプスを制御することが知られているが、これらの興奮・抑制を制御する分子機構については不明である。申請者は本研究計画の初年度に当たる2018年度において、申請者が独自に発見した抑制性シナプス制御因子GARLHが興奮性のNL1を含む全てのNLに結合することを見出した。さらに興奮性にのみ局在すると言われていたNL1がGARLHの結合によって抑制性シナプスにも局在することを明らかにした。一方で、NLを興奮性シナプスに局在させる分子機構については未だ不明なままであった。よって、本研究の2年目である2019年度は、この「興奮性スイッチ」の分子機構解明を目指し、研究を展開した。</p> <p>初年度の研究において、全体のNL1のうち抑制性となるGARLH結合型は非常に少なく、大部分がGARLHと結合していないことを明らかにしていた。これは通常状態の脳ではNL1のほとんどが興奮型であることを強く示唆する。よって申請者はNL1の結合因子の同定によって「興奮性スイッチ」に関わる分子を同定することができると考え、NL1タンパク質複合体の免疫沈降を行った。抗NL1抗体を用いた免疫沈降は効率が悪かったため、申請者はHAタグをNL1の遺伝子領域にKnockinしたマウスを用いた抗HA抗体の免疫沈降を行い、脳Lysate中のNL1を全て回収・精製することに成功した。そして質量分析によってNL1の結合因子の候補遺伝子を複数同定することにも成功した。現在はこれらの候補遺伝子について、それぞれNL1との結合と局在制御について検討を行っている。</p> <p>In the brain, neurons are connected and interact through synapses, which contains excitatory and inhibitory. The balance of excitatory and inhibitory must be regulated for proper brain functions. In this study, we are investigating molecular mechanisms regulating excitatory/ inhibitory balance by focusing on Neurologin (NL) family, one of the essential synaptic adhesion protein groups. NL family contains 4 genes, NL1-NL4. NL1 and NL2/4 regulate excitatory and inhibitory synapses respectively, while NL3 is involved in both. However, the molecular mechanisms to switch NLs between excitatory and inhibitory synapses are unclear.</p> <p>In the first year of this project, we found that GABAA receptor-binding protein GARLH, which is essential for inhibitory synaptic functions, binds all NLs including excitatory NL1. Furthermore, we revealed that GARLH-binding localizes NL1 to inhibitory synapses, though NL1 was believed to be the excitatory synapse-specific molecule. These data showed that GARLH-binding is the switch to localize NLs to inhibitory synapses. However, it is still unclear what brings NLs to excitatory synapses. Therefore, in this year, the second year of this project, we investigated molecular mechanisms to regulate NLs' localization at excitatory synapses.</p> <p>In the first year, we found that only a small population of NL1 binding to GARLH and majority do not in the normal brain, suggesting that almost all NL1 is GARLH-free "excitatory form". So we expected that immunoprecipitation of NL1 could co-purified the components of "excitatory switch". Because precipitation-efficiency of anti-HA antibodies were not enough for analysis, we used HA-knockin mice in whose genome HA-tag is inserted at endogenous NL1 gene locus. Using anti-HA antibody, we immunopurified all NL1 included in soluble brain lysates, and analyzed the resulting precipitant by mass spectrometry, then we identified several candidates as NL1 binding proteins in the brain. Now we are investigating whether these candidates can bind to NL1 and regulates its localization.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2019000007-20190323

研究代表者	所属	医学部基礎教室	職名	助教(有期・医学部)	補助額	500 (特B)千円
	氏名	山崎 世和	氏名 (英語)	Tokiwa Yamasaki		
研究課題 (日本語)						
脳の興奮・抑制バランスを調節する分子メカニズムの解明						
研究課題 (英訳)						
Molecular mechanisms to control brain excitation/inhibition balance						
1. 研究成果実績の概要						
<p>脳の神経細胞をつなぐシナプスには興奮性と抑制性があり、そのバランスが適切に調節されることで脳が正常に機能することができる。本研究プロジェクトでは、シナプス接着分子 Neuroligin(NL)に着目し、NL による興奮・抑制バランス制御の分子機構解明を目指し研究を展開している。</p> <p>NL には NL1 から NL4 の 4 つの遺伝子が存在し、NL1 は興奮性、NL2, NL4 は抑制性、NL3 は両方のシナプスを制御することが知られているが、これらの興奮・抑制を制御する分子機構については不明である。申請者は本研究計画の初年度に当たる 2018 年度において、申請者が独自に発見した抑制性シナプス制御因子 GARLH が興奮性の NL1 を含む全ての NL に結合することを見出した。さらに興奮性のみ局在すると言われていた NL1 が GARLH の結合によって抑制性シナプスにも局在することを明らかにした。一方で、NL を興奮性シナプスに局在させる分子機構については未だ不明なままであった。よって、本研究の2年目である 2019 年度は、この「興奮性スイッチ」の分子機構解明を目指し、研究を展開した。</p> <p>初年度の研究において、全体の NL1 のうち抑制性となる GARLH 結合型は非常に少なく、大部分が GARLH と結合していないことを明らかにしていた。これは通常状態の脳では NL1 のほとんどが興奮型であることを強く示唆する。よって申請者は NL1 の結合因子の同定によって「興奮性スイッチ」に関わる分子を同定することができると考え、NL1 タンパク質複合体の免疫沈降を行った。抗 NL1 抗体を用いた免疫沈降は効率が悪かったため、申請者は HA タグを NL1 の遺伝子領域に Knockin したマウスを用いた抗 HA 抗体の免疫沈降を行い、脳 Lysate 中の NL1 を全て回収・精製することに成功した。そして質量分析によって NL1 の結合因子の候補遺伝子を複数同定することにも成功した。現在はこれらの候補遺伝子について、それぞれ NL1 との結合と局在制御について検討を行っている。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>In the brain, neurons are connected and interact through synapses, which contains excitatory and inhibitory. The balance of excitatory and inhibitory must be regulated for proper brain functions. In this study, we are investigating molecular mechanisms regulating excitatory/ inhibitory balance by focusing on Neuroligin (NL) family, one of the essential synaptic adhesion protein groups. NL family contains 4 genes, NL1-NL4. NL1 and NL2/4 regulate excitatory and inhibitory synapses respectively, while NL3 is involved in both. However, the molecular mechanisms to switch NLs between excitatory and inhibitory synapses are unclear.</p> <p>In the first year of this project, we found that GABAA receptor-binding protein GARLH, which is essential for inhibitory synaptic functions, binds all NLs including excitatory NL1. Furthermore, we revealed that GARLH-binding localizes NL1 to inhibitory synapses, though NL1 was believed to be the excitatory synapse-specific molecule. These data showed that GARLH-binding is the switch to localize NLs to inhibitory synapses. However, it is still unclear what brings NLs to excitatory synapses. Therefore, in this year, the second year of this project, we investigated molecular mechanisms to regulate NLs' localization at excitatory synapses.</p> <p>In the first year, we found that only a small population of NL1 binding to GARLH and majority do not in the normal brain, suggesting that almost all NL1 is GARLH-free "excitatory form". So we expected that immunoprecipitation of NL1 could co-purified the components of "excitatory switch". Because precipitation-efficiency of anti-HA antibodies were not enough for analysis, we used HA-knockin mice in whose genome HA-tag is inserted at endogenous NL1 gene locus. Using anti-HA antibody, we immunopurified all NL1 included in soluble brain lysates, and analyzed the resulting precipitant by mass spectrometry, then we identified several candidates as NL1 binding proteins in the brain. Now we are investigating whether these candidates can bind to NL1 and regulates its localization.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
山崎 世和	GABAA 受容体結合因子 GARLH4 によるシナプス接着分子の局在制御	第 18 回 生命科学研究会	2019 年 6 月 28 日			