

Title	シナプスの個性を形成する分子機構解明を目指した任意のシナプス標識・精製法の確立
Sub Title	Establishment of synapse-specific labeling and purification systems to reveal molecular mechanisms underlying properties of individual synapses
Author	山崎, 世和(Yamasaki, Tokiwa)
Publisher	福澤基金運営委員会
Publication year	2021
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>記憶や学習を含む高次の脳機能は、神経細胞が構築する複雑な神経回路によって支えられている。回路における神経細胞のつなぎ目をシナプスと呼び、神経細胞間の情報伝達であるシナプス伝達が行われている。脳には興奮性と抑制性のシナプスが存在し、さらにそれぞれが入力や構造から様々な種類に分類される。シナプスは脳が機能する上で必須な構造であり、その異常は発達障害や精神疾患など様々な脳疾患の原因となることから、シナプスの形成や機能を制御する分子メカニズムの解明が強く求められている。</p> <p>シナプスは、情報を伝達する側（プレ）と情報を受け取る側（ポスト）によって構成されている。申請者は、プレ側とポスト側の細胞を決定することで任意のシナプスを特定し、標識することが可能であると考えた。本研究では、実際にこの方法によって特定のシナプスを標識・精製可能であることを実証し、その構成因子を網羅的に同定することを目的としている。</p> <p>特定のシナプスを標識・精製するシステムの確立のため、申請者の所属する柚崎研究室で長く研究対象としている小脳プルキンエ細胞と平行線維が形成する興奮性シナプスをターゲットとした。このシナプスは、シナプスのプレ側である顆粒細胞とポスト側であるプルキンエ細胞に目的遺伝子を発現させることで標識可能と考えられたことから、それぞれの細胞で遺伝子を発現させるプロモーター、Creトランスジェニックマウスを用いた。プルキンエ細胞への遺伝子導入は、PHP.eB型のAAVにL7プロモーターを導入することで実現できた。一方で顆粒細胞への遺伝子導入は、GABRA6プロモーターやCre依存的なAAVを用いたAAVを使用しても難しく、シナプス標識に十分な遺伝子発現を得る事ができなかった。今後は、顆粒細胞への遺伝子導入を改善するために、AAV感染時期の検討とプロモーター/エンハンサーの検討を予定している。</p> <p>Higher brain functions, including memory and learning, are regulated by the complex neuronal circuits established by neurons. Connections of neurons are called synapses, where signal transmissions from neuron to neuron are performed. In the brain, there are excitatory and inhibitory synapses, which are further subdivided by their inputs and/or structures. Because synapses and their functions are essential for proper brain functions, whose disruption results in ASD and schizophrenia, it is strongly required to reveal the molecular mechanisms underlying synapse formation and functions.</p> <p>Synapses are composed of pre-side which sends information and post side which receives. We hypothesized that it is possible to label and purify the specific synapse by expressing genes specifically into pre and post neurons.</p> <p>We examined this hypothesis in the parallel fiber-Purkinje cell synapse (PF-PC synapse) because our research group studies this synapse and has a lot of technical advantages. For labeling PF-PC synapse, we tried to express marker genes into Purkinje cells and granule cells. We found that adeno-associated viruses with L7 minimal promoter express marker genes specifically in Purkinje cell. However, we couldn't express enough amounts of marker genes in granule cells though we used previously reported granule cell-specific promoter and/or transgenic mice in which Cre-recombinase is expressed specifically in cerebellar granule cells. Now we are trying to improve the gene expression in granule cells by using other promoter/enhancers and testing several AAV infection timings.</p>
Notes	申請種類：福澤基金研究補助
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO12003001-00002020-0055

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	1,500 千円
	氏名	山崎 世和	氏名(英語)	Tokiwa Yamasaki		
研究課題(日本語)						
シナプスの個性を形成する分子機構解明を目指した任意のシナプス標識・精製法の確立						
研究課題(英訳)						
Establishment of synapse-specific labeling and purification systems to reveal molecular mechanisms underlying properties of individual synapses						
研究組織						
氏名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
山崎 世和 (Tokiwa Yamasaki)		医学部・生理学(I)・助教				
桑野 志穂美 (Shihomi Kuwano)		医学部・生理学(I)・特別研究員				
1. 研究成果実績の概要						
<p>記憶や学習を含む高次の脳機能は、神経細胞が構築する複雑な神経回路によって支えられている。回路における神経細胞のつなぎ目をシナプスと呼び、神経細胞間の情報伝達であるシナプス伝達が行われている。脳には興奮性と抑制性のシナプスが存在し、さらにそれぞれが入力や構造から様々な種類に分類される。シナプスは脳が機能する上で必須な構造であり、その異常は発達障害や精神疾患など様々な脳疾患の原因となることから、シナプスの形成や機能を制御する分子メカニズムの解明が強く求められている。シナプスは、情報を伝達する側(プレ)と情報を受け取る側(ポスト)によって構成されている。申請者は、プレ側とポスト側の細胞を決定することで任意のシナプスを特定し、標識することが可能であると考えた。本研究では、実際にこの方法によって特定のシナプスを標識・精製可能であることを実証し、その構成因子を網羅的に同定することを目的としている。</p> <p>特定のシナプスを標識・精製するシステムの確立のため、申請者の所属する柚崎研究室で長く研究対象としている小脳プルキンエ細胞と平行線維が形成する興奮性シナプスをターゲットとした。このシナプスは、シナプスのプレ側である顆粒細胞とポスト側であるプルキンエ細胞に目的遺伝子を発現させることで標識可能と考えられたことから、それぞれの細胞で遺伝子を発現させるプロモーター、Creトランスジェニックマウスを用いた。プルキンエ細胞への遺伝子導入は、PHP.eB型のAAVにL7プロモーターを導入することで実現できた。一方で顆粒細胞への遺伝子導入は、GABRA6プロモーターやCre依存性のAAVを用いたAAVを使用しても難しく、シナプス標識に十分な遺伝子発現を得る事ができなかった。今後は、顆粒細胞への遺伝子導入を改善するために、AAV感染時期の検討とプロモーター/エンハンサーの検討を予定している。</p>						
2. 研究成果実績の概要(英訳)						
<p>Higher brain functions, including memory and learning, are regulated by the complex neuronal circuits established by neurons. Connections of neurons are called synapses, where signal transmissions from neuron to neuron are performed. In the brain, there are excitatory and inhibitory synapses, which are further subdivided by their inputs and/or structures. Because synapses and their functions are essential for proper brain functions, whose disruption results in ASD and schizophrenia, it is strongly required to reveal the molecular mechanisms underlying synapse formation and functions.</p> <p>Synapses are composed of pre-side which sends information and post side which receives. We hypothesized that it is possible to label and purify the specific synapse by expressing genes specifically into pre and post neurons.</p> <p>We examined this hypothesis in the parallel fiber-Purkinje cell synapse (PF-PC synapse) because our research group studies this synapse and has a lot of technical advantages. For labeling PF-PC synapse, we tried to express marker genes into Purkinje cells and granule cells. We found that adeno-associated viruses with L7 minimal promoter express marker genes specifically in Purkinje cell. However, we couldn't express enough amounts of marker genes in granule cells though we used previously reported granule cell-specific promoter and/or transgenic mice in which Cre-recombinase is expressed specifically in cerebellar granule cells. Now we are trying to improve the gene expression in granule cells by using other promoter/enhancers and testing several AAV infection timings.</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)			