

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 a synapse labeling and purification method to reveal the molecular mechanisms underlying synaptic specificity.
Author	山崎, 世和(Yamasaki, Tokiwa)
Publisher	福澤基金運営委員会
Publication year	2022
Jtitle	福澤諭吉記念慶應義塾学事振興基金事業報告集 (2021.)
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。シナプスは神経細胞同士の繋ぎ目であり、神経細胞間の情報伝達としてシナプス伝達がおこなわれている。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さまざまな種類に分類される。シナプスは脳が機能する上で必須の構造であり、その異常は発達障害や精神疾患などさまざま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、今強く求められている。</p> <p>シナプスは情報を伝える側（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、近年、研究分担者である高野博士によって開発された分割型ビオチン化酵素（Split-TurboID）を、プレとポストにそれぞれ発現させることで、任意のシナプスを特定し、その構成因子を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構成因子を標識・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た。</p> <p>はじめに、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小脳顆粒細胞から伸びる平行線維が形成する興奮性シナプス（PF-PCシナプス）をターゲットとし、ツールの構築をおこなった。Split-TurboIDのNT側をL7プロモーター下に組み込んだAAVとCT側をCre-依存性Synプロモーター下に組み込んだAAVを作成し、マウス的小脳に感染させ、その細胞特異的な発現を確認した。今後は、PF-PCシナプスの標識の確認とそれぞれの発現量最適化を行い、シナプス構成因子の精製を予定している。</p> <p>また、小脳に存在する分子層介在神経細胞（MLI）とPCの作るシナプスについてもシナプス標識を行うため、tet-offシステムと特異的なプロモーターをAAVに組み込んだMLI特異的な発現系を作成し、MLI特異的な遺伝子発現系を確立することができた。現在は、このAAVにCT側のSplit-TurboIDを組み込んだAAVを構築をおこなっている。</p> <p>Higher brain functions, including memory and learning, are regulated by complex neuronal circuits. Synapses are the connections between neurons, and synaptic transmission is used to transmit information between neurons. There are excitatory and inhibitory synapses in the brain, which can be further classified to various types based on their input and structure. Synapses are essential for the brain to function, and their abnormalities can cause various brain disorders such as developmental disorders and psychiatric disorders.</p> <p>Synapses are composed of a transmitter (pre) and receiver (post). We hypothesized that a newly developed method by Dr. Takano (a collaborator of this project) called split-turboID can detect a specific synapse type, and label its components. In this study, we aimed to demonstrate that it is possible to label and purify the components of a specific synapse by this method, and to identify the components comprehensively.</p> <p>First, we constructed viral constructs targeting excitatory synapses formed by Purkinje cells and parallel fibers of cerebellar granule cells (PF-PC synapse), which has long been the target of research in Yuzaki lab. AAV with the NT side of Split-TurboID under the L7 promoter and AAV with the CT side under the Cre-dependent Syn promoter were generated, infected in the mouse cerebellum, and their cell-specific expression was confirmed. In the future, we plan to confirm the labeling PF-PC synapses and optimizing AAV-infection conditions, and then purify synaptic components of PF-PC synapses.</p> <p>In addition, in order to perform labeling synapses between molecular layer interneurons (MLIs) and Purkinje cells in cerebellum, we have created an MLI-specific expression system using a tet-off system and specific promoters, and have established an MLI-specific gene expression system. Currently, we are constructing an AAV that consists of the CT side of Split-TurboID into this MLI-specific AAV.</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=KO12003001-20210002-

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

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 a synapse labeling and purification method to reveal the molecular mechanisms underlying synaptic specificity.						
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				
高野 哲也 (Tetsuya Takano)		医学部・生理学(I)・特任助教				
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。シナプスは神経細胞同士の繋ぎ目であり、神経細胞間の情報伝達としてシナプス伝達がおこなわれている。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さまざまな種類に分類される。シナプスは脳が機能する上で必須の構造であり、その異常は発達障害や精神疾患などさまざま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、今強く求められている。</p> <p>シナプスは情報を伝える側(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、近年、研究分担者である高野博士によって開発された分割型ビオチン化酵素(Split-TurboID)を、プレとポストにそれぞれ発現させることで、任意のシナプスを特定し、その構成因子を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構成因子を標識・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た。</p> <p>はじめに、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小脳顆粒細胞から伸びる平行線維が形成する興奮性シナプス(PF-PC シナプス)をターゲットとし、ツールの構築をおこなった。Split-TurboID の NT 側を L7 プロモーター下に組み込んだ AAV と CT 側を Cre-依存性 Syn プロモーター下に組み込んだ AAV を作成し、マウスの小脳に感染させ、その細胞特異的な発現を確認した。今後は、PF-PC シナプスの標識の確認とそれぞれの発現量最適化を行い、シナプス構成因子の精製を予定している。</p> <p>また、小脳に存在する分子層介在神経細胞(MLI)と PC の作るシナプスについてもシナプス標識を行うため、tet-off システムと特異的なプロモーターを AAV に組み込んだ MLI 特異的な発現系を作成し、MLI 特異的な遺伝子発現系を確立することができた。現在は、この AAV に CT 側の Split-TurboID を組み込んだ AAV を構築をおこなっている。</p>						
2. 研究成果実績の概要(英訳)						
<p>Higher brain functions, including memory and learning, are regulated by complex neuronal circuits. Synapses are the connections between neurons, and synaptic transmission is used to transmit information between neurons. There are excitatory and inhibitory synapses in the brain, which can be further classified to various types based on their input and structure. Synapses are essential for the brain to function, and their abnormalities can cause various brain disorders such as developmental disorders and psychiatric disorders.</p> <p>Synapses are composed of a transmitter (pre) and receiver (post). We hypothesized that a newly developed method by Dr. Takano (a collaborator of this project) called split-turboID can detect a specific synapse type, and label its components. In this study, we aimed to demonstrate that it is possible to label and purify the components of a specific synapse by this method, and to identify the components comprehensively.</p> <p>First, we constructed viral constructs targeting excitatory synapses formed by Purkinje cells and parallel fibers of cerebellar granule cells (PF-PC synapse), which has long been the target of research in Yuzaki lab. AAV with the NT side of Split-TurboID under the L7 promoter and AAV with the CT side under the Cre-dependent Syn promoter were generated, infected in the mouse cerebellum, and their cell-specific expression was confirmed. In the future, we plan to confirm the labeling PF-PC synapses and optimizing AAV-infection conditions, and then purify synaptic components of PF-PC synapses.</p> <p>In addition, in order to perform labeling synapses between molecular layer interneurons (MLIs) and Purkinje cells in cerebellum, we have created an MLI-specific expression system using a tet-off system and specific promoters, and have established an MLI-specific gene expression system. Currently, we are constructing an AAV that consists of the CT side of Split-TurboID into this MLI-specific AAV.</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)			