論文の内容の要旨

Roles of BMP4 Signaling in Synapse Development

（シナプス形成・維持過程における BMP4 シグナルの役割）

氏名 東 誉人

正常な神経回路が形成されるためには、神経細胞同士のつながりであるシナプスが適切に形成され、神経細胞同士が正しく配線される必要がある。発達期の脳では、多くのシナプスが形成される一方、不要なシナプスを同時に除去し、ダイナミックにシナプスの再編成を行いながら、成熟した神経回路が構築される。自閉症モデルマウスでは発達期におけるシナプス再編成の障害が認められており、シナプスの形成、除去が適切に行われる事が正常な神経回路の発達に重要であることが示唆されている。しかし、シナプスが形成、除去される際の詳細な分子機構については不明な点が多く残されている。

本研究では、シナプス構造の制御因子として骨形成因子(bone morphogenic proteins 4; BMP4)に着目した。BMP は元々、骨組織や軟骨の分化を誘導・促進する因子として同定された一群の分泌性蛋白質である。BMP4 には様々なサブタイプが存在し、BMP1 や BMP3 の例外を除いて大半が TGF-βスーパーファミリーに属する。BMP はホモまたはヘテロ二量体を形成してリガンド活性を有し、I 型 BMP 受容体 (BMPRI), II 型 BMP 受容体 (BMPRII) のヘテロ 4 量体と結合する。リガンドとの結合により活性化された受容体は転写因子である Smad や細胞骨格制御因子である LIM キナーゼ、さらに MAP キナーゼ、PI3 キナーゼ、Rho GTPase など様々なシグナル伝達経路を活性化させ、発生段階における様々な器官の誘導やパターン形成に関与することが知られている。

特にシナプス形成との関連については。これまでにショウジョウバエを用いた遺伝学的研究から、BMP4 が筋肉から逆行性に分泌され、神経筋接合部のシナプス発達を制御する事が明らかにされている。また哺乳類において BMP4 が小脳の神経回路形成に関与することがこれまでに報告されている。さらに BMP2/4 の受容体である BMPRIa/b が脳幹の神経回路の正常な発達に関与する事が報告されている。

BMP4 は成体の海馬や大脳皮質で発現している事がこれまでに確認されている。そこでまず海馬神経細胞の分散培養を作成し、BMP4 の受容体である BMPRI の発現をウェスタンブロッティングにより確認した。またショウジョウバエに神経筋接合部では神経終末に局在する BMP 受容体がリガンドを受け取っているとするこれまでの報告との関連性について、免疫染色法により BMP 受容体の海馬神経細胞内における局在を解析した。さらに機能的な BMP4 シグナル経路が海馬神経細胞に存在するかどうかを検討するため、BMP4 添加後の Smad リン酸化の程度を特異的抗体により検出した。

次に BMP4 のシナプス形成に与える影響を解析するために BMP4 のコンディショナルノックアウトマウスから作成した培養神経細胞に Cre リコンビナーゼを発現させて BMP4 の発現を特異的に欠損させ、スパインの形態に対する影響について解析した。さらに synaptophysin-EGFP の集積を指標としてシナプス前部の局在を調べ、BMP4 のシナプス形成・消失に対する影響について解析した。

また BMP4 の神経細胞内における局在を調べるため、HA タグを付加した BMP4 (BMP4-HA)を発現させ、BMP4 の神経細胞における分布について解析した。また BMP4 の分子動態を EGFP, mCherry を付加した BMP4 (BMP4-EGFP, BMP4-mCherry)を神経細胞に発現させ、ライブイメージングを行った。

さらに細胞外へ表出した BMP4 をモニターするために、Superecliptic pHluorin (SEP)タグ付きの BMP4 (BMP4-SEP)を作成し神経細胞における挙動を観察した。イメージング期間中、BMP4-SEP の急速な集積の有無を検討し、BMP4 の放出とエキソサイトーシス機構の関連性を定量化した。また、BMP4-SEP について蛍光消退色法による解析を行い、細胞外に分泌された BMP4 の膜上拡散速度について所見を得ることが出来た。

軸索には BMP4 と生化学的に強く結合する BMPRI が局在している。この受容体の存在と BMP4 の細胞膜上での集積の関連を明らかにするため、BMPRI の発現を shRNA などの操作による増減させ、それに伴う細胞膜上の BMP4 の挙動を解析した。その結果から、BMPRI による BMP4 の細胞膜上での拡散の制御機構が明確になった。

最後に synaptophysin-tagRFP-T と BMP4-SEP を培養神経細胞に発現させ、軸索膜表面の BMP4 とシナプス前部構造の動態を 5 時間にわたりタイムラプス観察した。この観察中において細胞外の BMP4 の局在と synaptophysin-tgaRFP-T によって検出されるシナプス前部構造の関係性を定量化すると、軸索膜での BMP4 の局在とシナプス前部構造の動態の間にも関連性があることが示された。

以上から、BMP4 はシナプス構造の動態を制御する分子である事、また一旦細胞外に放出された BMP4 がどのようにしてシナプスの構造的安定性を制御するのか、という疑問に対して、その分子機構の詳細を明らかにすることができた。