

## 論文内容の要旨

論文題目 神経成長因子による受容体 TrkA の軸索輸送制御機構

氏名 野村真未

### 【序論】

胚発生に伴う神経回路形成において、神経軸索の標的組織やその中継組織から分泌される多様な神経栄養因子が重要な役割を果たしている。これらの神経栄養因子を細胞内へ受容し、標的組織へ神経軸索を到達した神経細胞が選択的に生存することで、適切な神経回路が形成されると考えられている。このような神経栄養因子受容機構を研究するモデルとして知覚神経細胞がよく知られている。主に、神経栄養因子の一つである神経成長因子 (Nerve Growth Factor; NGF) を、神経軸索先端で細胞膜上の受容体 TrkA との結合により受容する。その後、細胞内を軸索輸送で細胞体へ運ばれる。一方、新たな TrkA を供給する軸索先端への輸送も存在する。このような軸索輸送は、TrkA および NGF を含む膜小胞と結合するモータータンパク質の微小管上の移動によるが、この制御機構はほとんどわかっていない。本研究では、このような軸索輸送制御のしくみを解明するため、知覚神経細胞様の性質を持つラット褐色細胞種由来細胞株 (pheochromocytoma cell line; PC12 細胞) に蛍光タンパク質で標識した TrkA を発現させ、NGF 投与に伴う TrkA 軸索輸送の挙動変化を追跡した。さらに、蛍光標識した NGF を用いて NGF と結合している TrkA と結合していない TrkA を区別してその挙動を追跡することで、NGF 結合による TrkA の活性化が受容体の軸索輸送へ及ぼす影響を検討した。

## 【結果と考察】

### 1. 蛍光 NGF の PC12 細胞への受容と取り込み

PC12 細胞は、NGF の作用によって、神経軸索様突起を持つ細胞へ分化することが知られている。このような NGF 応答性を持つ PC12 細胞へ、蛍光標識した NGF (Cy3.5NGF) を投与し、NGF が膜表面の受容体に結合した後に細胞内へ取り込まれる様子を観察した。蛍光 NGF 投与後 10 分程で、細胞内に蛍光 NGF 由来の明るい蛍光輝点の形成が確認された (図 1A,B)。膜表面における受容体と NGF の結合を解離する酸性培養液の投与後もこれらの蛍光輝点は失われないことから、これらの輝点はエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた蛍光 NGF を含む膜小胞と考えられた。これらの輝点は、細胞体方向から突起先端方向 (順行方向) への輸送 (図 1C-a) と、

軸索様突起の先端方向から細胞体方向 (逆行方向) への輸送 (図 1C-b) が観察された。順行方向への輸送は約 44%、逆行方向への輸送は 56%であった。各々の方向で輸送される蛍光 NGF の速度を定量し、これらの速度をヒストグラムに示した (図 1D,E)。これらの速度分布を定量的に解析するために、得られたヒストグラムを複数のガウス分布でフィッティングした。その結果、順行性輸送では  $0.5\mu\text{m}/\text{sec}$  (60%)、 $1.2\mu\text{m}/\text{sec}$  (30%)、 $2.1\mu\text{m}/\text{sec}$  (10%) にピーク値を持つ分布が見られ (図 1D)、逆行性輸送では、 $0.5\mu\text{m}/\text{sec}$  (67%)、 $1.1\mu\text{m}/\text{sec}$  (22%)、 $1.7\mu\text{m}/\text{sec}$  (11%) にピーク値を持つ分布が見られた (図 1E)。細胞内で輸送されている各々の蛍光 NGF 含有小胞を軌跡上のある点から追跡した結果を図 1F および G に示した。その結果、順行性輸送、逆行性輸送ともに、速度の遅い成分 ( $0.1\text{--}0.3\mu\text{m}/\text{sec}$ ) と速い成分 ( $0.4\text{--}1.0\mu\text{m}/\text{sec}$ ) が混在していることがわかった。

### 2. 蛍光標識した TrkA 受容体の NGF 受容に伴う挙動変化

TrkA は NGF の高親和性受容体として知られる一回膜貫通型膜タンパク質である。この TrkA 遺伝子の C 末端に蛍光タンパク質 (monomeric super enhanced green fluorescent protein ;mSEGFP) をつなげて PC12 細胞に発現させることで、TrkA のふるまいを観察した。PC12 細胞へ導入した TrkA-EGFP は細胞膜全体に発現し、突起先端部では細胞内で凝集している様子が観察された (図 2A)。細胞内で観察される TrkA-EGFP 輝点の運動には、蛍光 NGF の観察と同様に方向性がみられた (図 2B,C)。

NGF 投与前の PC12 細胞内の TrkA 輝点の移動は、その約 78%が順行性輸送、約 22%が逆行

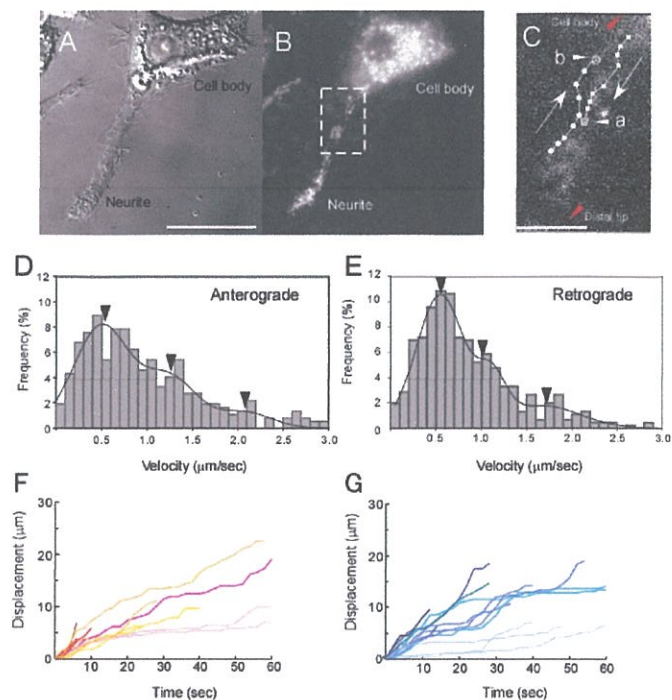


図 1. 蛍光 NGF の PC12 細胞への取り込み

A. PC12 細胞の微分干渉像, B. 蛍光 NGF を取り込ませた PC12 細胞の蛍光像, スケールバー,  $20\mu\text{m}$ . C, B で示した囲み部分で細胞内輸送される Cy3.5NGF の軌跡. a 順行性, b 逆行性, スケールバー,  $10\mu\text{m}$ . D, F. 順行性輸送される NGF の速度分布と移動距離 E, G. 逆行性輸送される NGF の速度分布と移動距離

性輸送であった。これら TrkA-EGFP の細胞内輸送の NGF の投与に伴う変化を検討した。NGF 投与前と、投与 30 分後における順行性および逆行性 TrkA-EGFP 輸送の速度を定量し、各々の速度分布をヒストグラムに示した。NGF 投与前の速度分布において、順行性輸送では、 $0.4\mu\text{m}/\text{sec}$  (63%) と  $1.1\mu\text{m}/\text{sec}$  (37%) にピーク値を持つ分布がみられた (図 2D)。逆行性輸送では、 $0.4\mu\text{m}/\text{sec}$  (70%) と  $1.3\mu\text{m}/\text{sec}$  (30%) にピーク値を持つ分布がみられた (図 2E)。

NGF 投与後に細胞内で観察される TrkA-EGFP 輝点数は、投与前に比べて、順行性、逆行性ともに約 1.5 倍増加した。これらの約 37% は順行性輸送、約 63% は逆行輸送であった。NGF 投与後、順行性輸送では  $0.6\mu\text{m}/\text{sec}$  (70%) と  $1.4\mu\text{m}/\text{sec}$  (30%) にピーク値を持つ速度分布がみられた (図 2F)。逆行性輸送

では、 $0.5\mu\text{m}/\text{sec}$  (56%)、 $1.2\mu\text{m}/\text{sec}$  (32%)、 $1.8\mu\text{m}/\text{sec}$  (12%) にピーク値を持つ分布がみられた (図 2G)。このように、NGF 投与後には、順行性、逆行性いずれの方向においても投与前と比較して速い輸送速度の成分が増加する事が示された。TrkA は NGF との結合により細胞質ドメインの自己リン酸化が起こる、この過程は可逆的阻害剤 K252a によって阻害される。上記の TrkA-EGFP 輸送の速度変化と TrkA リン酸化の関係を検討するため、このリン酸化阻害剤存在下で NGF の投与を行った。その結果、阻害剤存在下では順行性、逆行性ともに、NGF 投与前後で TrkA-EGFP の輸送速度変化はほとんどみられなかった。以上の結果から、順行性、逆行性いずれの方向においても、細胞内 TrkA の輸送は NGF 投与に伴う TrkA の活性化によって促進される可能性が示唆された。

### 3. 蛍光 NGF と共局在する TrkA および共局在しない TrkA の細胞内挙動の比較

受容体 TrkA は NGF との結合に伴う細胞質ドメインの活性化により、Akt や MAPK といった細胞内シグナル伝達分子を活性化することが知られている。では、NGF による細胞内 TrkA 輸送の制御は、TrkA の活性化に伴う細胞内シグナル応答による細胞内全体での制御なのだろうか。あるいは NGF および TrkA を含む個々の膜小胞での個別制御なのだろうか。このことを検討するため、蛍光 NGF と結合する TrkA と、結合しない TrkA の細胞内輸送速度を比較した。図 4A および B に、蛍光 NGF 投与 30 分後における TrkA-EGFP 発現 PC12 の Cy3.5 および GFP の蛍光像を示した。このような蛍光観察から、蛍光 NGF と共局在する TrkA と共局在しない TrkA を区別し、TrkA-EGFP の輸送速度を定量した。順行性輸送では、観察した TrkA-EGFP の約 37% が蛍

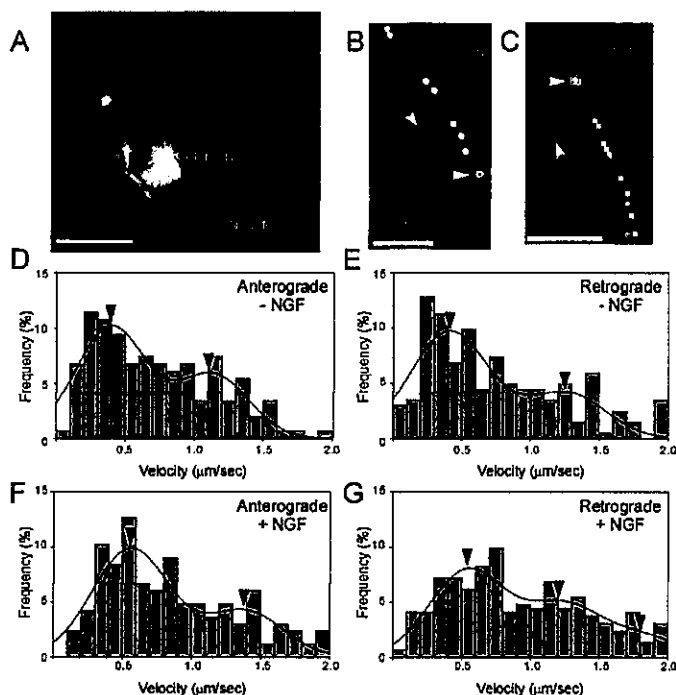


図 2. PC12 細胞で発現させた TrkA-mSEGFP の NGF 投与前後での挙動変化

A. TrkA-mSEGFP を発現した PC12 細胞の全体像、スケールバー、 $20\mu\text{m}$ . B, C. PC12 細胞の突起部分でみられた細胞内輸送の軌跡。順行性 (B) と逆行性 (C)、白丸: 始点、矢印: 終点。スケールバー、 $5\mu\text{m}$ . D, F. 順行性輸送される TrkA の速度分布、NGF 投与前 (D) と投与後 (F)。E, G. 逆行性輸送される TrkA の速度分布、NGF 投与前 (E) と投与後 (G)。

光 NGF と共局在し、逆行性輸送ではその割合は約 67%であった。順行性輸送では、蛍光 NGF と共局在していない TrkA-EGFP の輸送速度は  $0.3\mu\text{m}/\text{sec}$  (81%)と  $1.1\mu\text{m}/\text{sec}$  (19%)にピーク値を持つ分布となった (図 4C)。一方、共局在する TrkA-EGFP の輸送速度は、 $0.5\mu\text{m}/\text{sec}$  (62%)と、 $1.5\mu\text{m}/\text{sec}$  (38%)にピーク値を持つ分布となった (図 4E)。逆行性輸送では、蛍光 NGF と共局在していない TrkA-EGFP の輸送速度では  $0.2\mu\text{m}/\text{sec}$  (79%)と  $1.0\mu\text{m}/\text{sec}$  (21%)にピーク値を持つ分布がみられた (図 4D)。一方、蛍光 NGF と共局在する TrkA-EGFP では、 $0.5\mu\text{m}/\text{sec}$  (77%)と、 $1.2\mu\text{m}/\text{sec}$  (23%)にピーク値を持つ速度分布がみられた (図 4F)。以上の結果から、NGF と共局在していない TrkA と比較して、NGF と共局在する TrkA の細胞内輸送速度の増大が示唆された。このことは、TrkA を含む膜小胞の細胞内輸送が、TrkA の活性化状態によって制御されている可能性を示している。

以上に述べたような、NGF 投与に

伴う TrkA 含有膜小胞の輸送が、リガンドを伴う場合に促進されるような制御を可能とする仕組みには、TrkA の活性化に伴って TrkA を含む膜小胞をモータータンパク質に連結させたり、モーターの運動活性を制御したりする能力が要求される。G タンパク質の一種 Rab5 は、リン酸化した TrkA と特異的に結合することが知られているが (Wu *et al.*, 2007)、同じグループに属する Rab タンパク質の中には、ダイニンやキネシンと膜小胞の結合に関与しているものがあり、また、モータータンパク質活性の制御に関与する可能性も示唆されている (Lippe *et al.*, 2001; Matanis *et al.*, 2002; Ascano *et al.*, 2009)。このような Rab タンパク質の機能が、TrkA の活性化状態に基づいた膜小胞輸送の制御にも関係する可能性は大いにあると考えている。

このように、同じ種類の膜タンパク質を含む膜小胞の輸送制御機構についての研究は、神経回路の維持や形成など、さまざまな受容体の輸送が関与する記憶・学習の解明にも重要であると考えられる。今後、*in vitro* 実験系で TrkA 軸索輸送を再構築することにより、分子機構を解明したいと考えている。

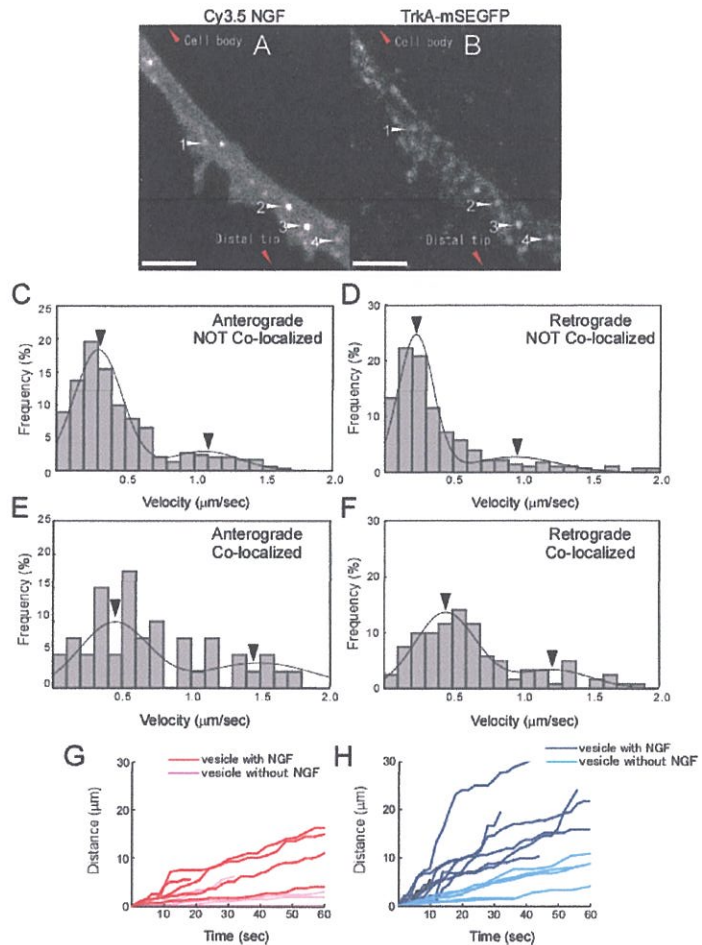


図 3. TrkA-mSEGFP と蛍光 NGF の共局在と輸送速度

A. TrkA-mSEGFP を発現させた PC12 細胞へ蛍光 NGF (0.8nM) を投与したときの Cy3.5 蛍光像, B. A と同じ細胞の GFP 蛍光像, スケールバー,  $10\mu\text{m}$ . C, E. 順行性輸送される TrkA の速度分布, Cy3.5 NGF と共局在していないもの (C) と共局在しているもの (E). D, F. 逆行性輸送される TrkA の速度分布, Cy3.5 NGF と共局在していない TrkA (D) と今日局在している TrkA (F). G, H. 順行性輸送される TrkA の単位時間当たりの移動距離, 順行性輸送 (G) と逆行性輸送 (H), 赤・青: 共局在, ピンク・水色: 非共局在