論文審査の結果の要旨

氏名　野村真未

本論文は４章からなり、第１章は序論、第２章は実験で用いた材料と方法、第３章は培養細胞を用いて蛍光NGF（蛍光標識した神経成長因子）とその受容体TrkAの同時観察からNGF投与に伴う細胞内での受容体TrkAの振る舞い変化を、そして第４章はNGF投与に伴う受容体TrkAの振る舞いの変化におけるメカニズムについて述べられている。

まず第１章では、細胞内輸送とはどのような現象か、どのような仕組みで起こっているのか、さらに論文提出者の研究に至るまでの背景が書かれている。

細胞がその形態や機能を維持し続けるためには、細胞内で新たに合成された様々なタンパク質が、細胞膜や核、ミトコンドリアなど、各々の目的地へ適切に輸送されることが必要である。このような必要性に応じて、キネシンやダイニン、ミオシンなどのモータータンパク質は、荷物であるタンパク質を伴って、細胞骨格であるマイクロフィラメントや微小管の上を移動する。運ばれる荷物の輸送先は、荷物がどのモータータンパク質と結合するかによって決定されると考えられているが、どのような選択性によって結合が行われているのかはほとんど不明である。

神経細胞の軸索でも、細胞内輸送は重要な働きをしている。細胞体で新たに合成したタンパク質や細胞内小器官を順行性輸送によって軸索先端へ輸送するとともに、軸索の先端部で取り込んだ神経栄養因子などを逆行性輸送によって細胞体へ輸送することが知

られている。神経細胞の標的組織や中継組織から分泌される神経栄養因子の一つに、神経成長因子（Nerve Growth Factor: NGF）があり、神経細胞膜上で受容体TrkAと結合する。TrkAと結合することによって、TrkA-NGF複合体として軸索先端部で細胞内へ取り込まれ、細胞体へ輸送される。一方で、NGFとの結合のために細胞体から軸索先端へTrkAが供給されているので、神経軸索内では順方向と逆方向の双方向のTrkA輸送が同時に存在しているが、その制御機構はほとんどわかっていない。そこで、論文提出者は、受容体TrkAとリガンドNGFをそれぞれ異なる色で蛍光標識し、細胞内でのそれぞれの振る舞いの同時観察を行った。これにより、NGFと結合しているTrkAと結合していないTrkAを区別してTrkAの挙動を解析し、細胞内におけるTrkAの輸送制御について検討した。

第２章では、実験で用いた材料と方法について述べており、細胞培養、蛍光標識の方法、培養細胞への遺伝子導入、顕微鏡を用いた観察、データの解析方法で構成されている。

第３章ではまず、培養細胞を用いて蛍光標識した受容体TrkAの発現とその機能を蛍光標識したNGFとの１細胞あたりの結合量により検討した結果が述べられている。

蛍光標識したTrkAを培養細胞へ発現させると、これまでに報告されているように細胞膜全体に一様に発現がみられた。そこで、未標識のNGFと同等の生理活性を有することを確認した蛍光標識NGF（Cy3.5-NGF）と培養細胞に発現している蛍光TrkAとの１細

胞あたりの結合量の定量を試みた。その結果、1細胞あたりの蛍光TrkA発現量が多い細胞ほど、結合するCy3.5-NGF由来の蛍光量も多い傾向がみられた。

次に、PC12細胞に内在するTrkAの細胞内輸送を、Cy3.5-NGFのふるまいから観察した。順行方向（軸索末端に向かう方向）に輸送されるNGF-TrkA複合体量が比較的多く、逆行輸送されるものは全体の約3割であった。複合体の輸送速度は逆行方向、順行方向でほとんど差が見られなかった。またいずれの輸送方向においても、いくつかの峰をもつ速度分布がみられた。

また、TrkA-GFPの振る舞いをNGF投与前から観察し、NGF投与にともなう変化を観察した。細胞内へ取り込まれたCy3.5-NGFで観察された結果と同様に、いくつかの峰をもつ分布を示し、方向別で輸送速度の差はほとんど見られなかった。興味深いことに、NGF投与後の輸送速度は、順行、逆行いずれの方向も、NGF投与前の輸送速度よりも有意に速くなっていることが本研究により初めて示された。

TrkAはNGFとの結合に伴い、その細胞質ドメインに存在するチロシンがリン酸化されることから、NGF投与に伴うTrkA輸送速度の増大へのTrkAリン酸化の関与を、リン酸化阻害剤（K252a）を用いることで検討した。その結果、リン酸化阻害剤存在下ではNGF投与に伴う蛍光TrkAの軸索輸送速度の促進は認められないことが明らかとなった。

これらの結果から、NGFが受容体と結合することによって細胞内全体に伝播する細胞内情報伝達の結果である可能性と、NGFの結合が、個々の受容体の輸送を制御する可能性が考えられる。これらの可能性は、受容体をNGFと結合するものとしないものに弁別

し、その輸送速度を比較することによって検証可能である。そこで本研究ではCy3.5-NGFを、蛍光TrkAを発現するPC12細胞へ投与し、Cy3.5-NGFとともに存在する蛍光TrkAと、Cy3.5-NGFを伴わない蛍光TrkAを区別して観察を行った。この結果、順行方向、逆行方向のいずれの方向に向かう細胞内輸送においても、NGFを伴うTrkAの輸送速度が、NGFを伴わないTrkAの輸送速度よりも顕著に速いことが明らかとなった。この結果をさらに確認する目的で、個々の蛍光TrkA由来の蛍光輝点について、NGFと共局在するものと共局在しないものについて、その細胞内輸送の軌跡を追跡した。その結果、順行性、逆行性いずれの移動方向においても、NGFと共局在する蛍光TrkAの蛍光輝点がより速く輸送されること、さらにこの傾向は順行性よりも逆行性の細胞内輸送で顕著に見られることが明らかとなった。

本論文において、NGF受容体TrkAは、NGFの投与によって細胞内輸送速度が増大すること、さらにこの輸送速度の増大は、NGFとの結合によって個々のTrkAにおいて個別に制御された結果である可能性が示唆された。リガンドとの結合によって受容体自体の細胞内輸送が制御を受けるという結果はきわめて新しい。

第4章では、論文提出者の全体を通しての考察と今後の展望が書かれている。これまでに蛍光タンパク質で標識したTrkAの軸索輸送を観察したいくつかの報告があるが、TrkAの軸索輸送速度がNGF依存的に変化することは、本研究において初めて見出されたことである。そして、TrkAリン酸化阻害剤K252a存在下ではNGF投与前後で蛍光TrkAの軸索輸送速度に変化が見られなかったことから、本研究では、TrkA軸索輸送速

度の増加にはTrkAのリン酸化が重要であるという結論に至った。

これまでの受容体TrkAやリガンドNGFの蛍光観察ではどちらか一方のみの細胞内での振る舞いを観察している研究のみであった。しかし本研究では、1細胞における受容体TrkAとリガンドNGFの同時観察実験系を構築したことで、従来の方法では成し得なかったNGFと結合したTrkAと結合していないTrkAとを区別して観察することに成功した。この観察系により、TrkAの軸索輸送速度がNGFを伴うTrkAで有意に増加していることが明らかになった。この結果から、NGFと結合するTrkAの輸送速度の増大は、NGFと結合した個々の受容体TrkAにおいてローカルに制御されていることが示唆された。

NGFと結合したTrkAを含む膜小胞の細胞内輸送は、細胞内の微小管上を移動するモータータンパク質によって行われている。TrkAを含む膜小胞には、ダイニンやキネシン等のモータータンパク質が、いくつかのアダプタータンパク質を介して結合している。NGFと結合した受容体TrkAの細胞内ドメインを特異的に認識するアダプタータンパク質としてRab5が知られている。しかし、個々の膜小胞がどのモータータンパク質と結合するか、またモータータンパク質の活性をどのように制御しているかはほとんどわかっていない。いまだ明らかとなっていないアダプター分子がこのようなモータータンパク質の活性制御に関与している可能性がすでに示唆されている。このことから、受容体のリン酸化に依存して、微小管モータータンパク質の運動活性を制御する機構の解明が期待される。

なお、本論文における受容体 TrkA の蛍光標識、細胞の蛍光顕微鏡観察は北海道大学永井健治教授、谷知己准教授（現 Marine Biological Laboratory）との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。