

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名

おはんちめぐ  
烏漢其木格

---

神経成長因子 (Nerve growth factor; NGF) や脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor; BDNF) などに代表されるニューロトロフィン類は神経細胞の生存や分化に必須の役割を果たしている。それらはニューロトロフィン受容体と呼ばれる一群の膜貫通型チロシンキナーゼを介して作用する。例えば NGF がその受容体である TrkA に結合すると細胞内領域のチロシンキナーゼが活性化し、自己リン酸化が誘導される。自己リン酸化部位には様々なアダプタータンパク質がリクルートされ、それらを介して下流の Ras-MAP キナーゼ (MAPK) 経路等が活性化する。ニューロトロフィン類はこれらの経路を通じて神経系における機能を発揮している。

申請者の所属する研究室では、以前、微生物代謝産物を対象にニューロトロフィン様の活性を示す物質のスクリーニングが行われ、その結果、分泌型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (secretory PLA<sub>2</sub>; 以下 sPLA<sub>2</sub>) が神経栄養因子と類似の作用を示すことが見出された。sPLA<sub>2</sub> はリン脂質の sn-2 位を切断し脂肪酸とリゾリン脂質を遊離する酵素であるが、神経栄養因子作用を示すことは全く知られていなかった。さらに解析が進められた結果、sPLA<sub>2</sub> の神経栄養因子作用がリゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルコリン (LPC) の産生を介したものであることがわかった。興味深いことに、このような作用が見られるのは LPC のみであり、リゾホスファチジン酸 (LPA) 等は全く神経栄養因子作用を示さなかった。

このような背景の下、本論文は NGF-TrkA 経路と sPLA<sub>2</sub>-LPC 経路との間に cross-talk があること、およびその機構を様々な実験系を用いて示したものであり、序章、結果を述べた 3 つの章、および総括と展望を記した終章からなる。

第一章ではラット副腎褐色細胞種由来の PC12 細胞を用いた解析を行っている。PC12 細胞は TrkA を発現し、NGF によって MAPK 経路の活性化などを介して交感神経様に分化する。申請者は LPC が 0.1 および 1  $\mu$ M という低濃度で NGF による MAPK の活性化 (リン酸化) を数倍上昇させることを見出した。また、NGF 存在下、MAPK の下流で転写誘導される最初期遺伝子 *c-fos* などの発現も LPC によって有意に上昇した。

NGF 刺激から MAPK 活性化に至る過程のどの段階を LPC が増強しているのかを明らかにするため、MAPK の上流因子である MEK、および NGF 受容体である TrkA の活性化を調べた。その結果、LPC はどちらの活性化も増強することが分かり、LPC が最上流に位置する TrkA の活性化を促進することで下流のシグナルも増強することが分かった。一方、LPC は上皮成長因子 (Epidermal growth factor; EGF) 等による MAPK 活性化は促進しなかった。従

って LPC は NGF-TrkA 経路特異的に作用するものと考えられた。

第二章ではもう一つのニューロトロフィンである BDNF とその受容体である TrkB に対する LPC の効果を検討している。内在的に TrkB を発現する小脳顆粒細胞の初代培養を用いて検討を行ったところ、BDNF による MAPK および TrkB のリン酸化が LPC によって促進されることがわかった。以上の結果から、LPC が BDNF-TrkB 経路を特異的に活性化すること、即ち LPC によるシグナル増強効果はニューロトロフィン-ニューロトロフィン受容体の経路に特異的に認められることが強く示唆された。

第三章では LPC がどのような機構で NGF-TrkA 経路を活性化するかを解析している。この目的のため、CHO-K1 細胞に TrkA をトランスフェクトし、NGF/LPC による MAPK のリン酸化を調べた。その結果、TrkA 発現細胞では NGF によって MAPK が活性化し、それが LPC によって増強されることが分かった。一方、EGF も EGFR 発現細胞において MAPK の活性化を誘導したが、LPC による増強は認められなかった。このことから、トランスフェクトした両受容体から MAPK に至る情報伝達過程が PC12 細胞におけるそれを再現できることが分かった。次に TrkA のどの領域が LPC に応答するのかを調べるため、TrkA と EGFR を細胞外・膜貫通・および細胞内領域に分割してそれぞれの領域を交換することでキメラ受容体を作製し、トランスフェクトした細胞の応答を調べた。その結果、TrkA の細胞外領域を持つキメラ受容体を発現させた細胞では NGF による MAPK のリン酸化が誘導され、それは LPC によって増強された。一方、EGFR の細胞外領域と TrkA の膜貫通・細胞内領域のキメラ受容体を発現する細胞では EGF による MAPK のリン酸化は誘導されたものの、LPC による増強は認められなかった。以上の結果から、LPC の作用には TrkA の細胞外領域が関与すること、膜貫通や細胞内領域は LPC による受容体の活性化促進には関与しないことが明らかとなった。

以上、本論文は LPC がニューロトロフィン-ニューロトロフィン受容体の経路を特異的に活性化する現象の発見、およびその分子機構に関する解析を行ったものであり、学術的・応用的に貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。