

氏名	にしだ　ともき <b>西田倫希</b>
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第474号
学位授与の日付	平成19年9月25日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学位論文題目	<b>超高压電子顕微鏡三次元トモグラフィーによる神経成長因子受容体 TrkA の局在に関する細胞生物学的研究</b> (主査)
審査委員	教授 遠藤泰久 教授 山口政光 教授 中島敏博

## 論文内容の要旨

本論文は複雑な神経回路形成や神経細胞の生存維持に重要な機能をはたす神経栄養因子受容体の細胞内局在について、超高压電子顕微鏡トモグラフィーなどを用い微細構造レベルで三次元的に明らかにしたものである。

神経栄養因子の一つ神経成長因子 (NGF)はチロシンキナーゼ型受容体 TrkA に対して高親和的に結合する。神経系培養細胞 PC12 を使った研究より TrkA がカベオラ構造に局在する可能性が示唆された。カベオラ構造は形態的には膜陥入構造として非神経細胞で主に見られるが、神経細胞ではこれまで明らかにされていない。しかし、カベオラ関連タンパクの発現が PC12 細胞だけでなく中枢および末梢神経細胞において報告されている。申請者は超高压電子顕微鏡トモグラフィーにより微細構造レベルで PC12 細胞の細胞質および膜構造での TrkA とカベオリン-1 の局在について三次元的に検討を行っている。本論文は 5 章からなり、第 1 章の序論と第 5 章の総合考察の他、内容は以下の通りである。

第 2 章では、NGF 受容体 TrkA が局在する膜構造および細胞質を微細構造レベルで明らかにするため、透過電子顕微鏡と超高压電子顕微鏡トモグラフィーにより検討を行った結果を述べている。TrkA 免疫反応は細胞膜上で円形構造として見られ、膜直下には TrkA 免疫反応を示す直径 50 nm 以下の小胞が見られた。超高压電子顕微鏡トモグラフィーによって、TrkA が局在する細胞膜にラフリングとカベオラ構造と異なる直径 50 nm 以下の小さな陥入構造があることが示された。この膜領域は光学顕微鏡レベルでは斑点状に見られたことから、TrkA はカベオラではなく脂質ラフトのような特別な膜ドメインに局在する可能性が考えられる。膜受容体の中には脂質ラフトが関連するエンドサイトーシスも報告されている。そのため、陥入構造は TrkA のエンドサイトーシスに由来し、TrkA の局在は膜脂質あるいは膜タンパクにより形成されることが示唆された。

第 3 章では、カベオラ関連タンパク質の一つであるカベオリン-1 が神経細胞においてもカベオラ構造の形成に関係しているのか、また TrkA と密接に関連するのか、超高压電子顕微鏡トモグラフィーにより検討した結果を述べている。三次元画像より TrkA は細胞膜の一部に局在し、カベオラ構造とは異なる陥入構造を形成していた。また、TrkA が局在する細胞膜直下には直径 50nm 以下の小胞が見られた。カベオリン-1 は網目様構造を呈しており、細胞膜よりも細胞質に主に見られた。カベオリン-1 が存在する細胞膜にカベオラ陥入構造は見られず、免疫反応が集まりクラス

ター化していた。脂質ラフトに局在する膜タンパク質の中にはクラスター化するものが報告されており、PC12 細胞におけるカベオリン-1 の分布と形態的に非常に類似していた。TrkA もまた細胞膜の一部に局在する点でカベオリン-1 と類似していたが、その局在およびサイズはカベオリン-1 と異なっていた。従って、分化 PC12 細胞においてカベオリン-1 は脂質ラフトとの関連性が示唆されるが、TrkA の局在には脂質ラフト以外の要因も関連している可能性が考えられた。また、クラスリン被覆小胞と TrkA 免疫反応を示した小胞のサイズは異なっていたことから TrkA の取り込みにはクラスリン依存的なエンドサイトーシスと非依存的なエンドサイトーシスも関係している可能性が示唆された。

第4章では、NGF 刺激が TrkA の動態にどのような影響を与えるのか、共焦点顕微鏡によるタイムラプスにより検討した結果について述べている。NGF 刺激直後から TrkA と細胞膜構成タンパクを含むと考えられるキナクリン蛍光を示す初期エンドソームがバリコシティーにおいて見られた。細胞体とバリコシティー内の蛍光強度は増加し続けたが、細胞体よりもバリコシティーで強いキナクリン蛍光が見られた。バリコシティーと細胞核周囲のエンドソームあるいはライソソームには TrkA を含む膜タンパク質の凝集が見られ、刺激によりこれらオルガネラの大きさが異なることを明らかにした。キナクリン標識小胞の面積はこれまで報告された測定値と一致していたことから、エンドソームに局在した TrkA は、神経突起伸長などに関連するシグナル伝達をバリコシティーおよび細胞核周囲において行っていることを示唆している。

第5章では以上の研究結果をまとめ、神経細胞における NGF 受容体の細胞内局在およびその動態について総合的に考察し、受容体 TrkA はカベオラ構造を取らない細胞膜の領域にクラスター構造をとって局在し、リガンドである NGF と結合すると、速やかに細胞内に小胞として取り込まれ、バリコシティーや細胞核周辺に移動し、更なる情報伝達機能を担う可能性を示唆している。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は神経栄養因子受容体の細胞内局在について、超高压電子顕微鏡トモグラフィーなどを用い微細構造レベルで三次元的に明らかにしたものである。神経回路形成や生存維持に重要な神経栄養因子の一つ神経成長因子 (NGF) と高親和的に結合するチロシンキナーゼ型受容体 TrkA は、細胞膜の特殊な陥入構造 (カベオラ) に局在する可能性が示唆されているが、神経細胞ではカベオラの存在が十分に明らかにされていなかった。申請者は TrkA、カベオリン-1 (カベオラ特異タンパク質)、クラスリン (細胞膜飲込み特異タンパク質) などの細胞膜タンパク質の局在する構造を、免疫細胞化学と超高压電子顕微鏡トモグラフィーにより微細構造レベルで明らかにしている。

TrkA 免疫反応は培養神経細胞 (PC12) の細胞膜上に円形構造として存在し、直径 50 nm 以下の小胞の凝集構造であることを明らかとした。TrkA が局在する細胞膜の部位にはラッフリングとカベオラ構造と異なる直径 50 nm 以下の小さな陥入構造があることが示されたことから、カベオラではなく脂質ラフトのような特殊な細胞膜領域に局在すると結論している。カベオリン-1 免疫反応は細胞膜よりも細胞質に主に局在し、網目様構造を呈していることを明らかとした。神経細胞様に分化させた PC12 細胞にカベオラ陥入構造は見られず、カベオリン-1 の分布と形態は脂質ラ

フトに局在する他の膜タンパク質のものに類似していた。しかし、TrkA とは局在する部位の大きさや形態が明らかに異なっていた。また、細胞膜の飲込みに関与するクラスリン被覆小胞と TrkA 免疫反応を示す小胞の大きさが異なることから、TrkA はクラスリン非依存的な経路で細胞内に移動する可能性が示唆された。NGF と結合した TrkA の細胞内への移動動態を明らかにするため、共焦点顕微鏡によるキナクリン蛍光のリアルタイム観察を実施した結果、NGF 刺激直後からキナクリン蛍光を示す初期エンドソームが突起の数珠状の膨らみであるバリコシティーにおいて検出され、時間経過に従い細胞体とバリコシティー内の蛍光強度が増加することから、小胞として取り込まれた TrkA が、バリコシティーや細胞核周囲に移動することを明らかにした。

以上のように、本論文は複雑な神経回路形成や神経細胞の生存維持に関わる細胞膜受容体の詳細な細胞内構造を明らかにしただけでなく、その細胞内動態をリアルタイムで可視化し、神経細胞生物学的に新しい知見を示している。また、方法論的にも超高压電子顕微鏡トモグラフィーの細胞生物学的応用の可能性を拡大している。

本論文は、申請者を筆頭著者とする下記の 2 報を基礎としており、査読制度のある学術雑誌に既に掲載されている。

1) Nishida T, Arii T, Takaoka A, Yoshimura R, Endo Y. (2007) Three-dimensional, Computer-tomographic Analysis of Membrane Proteins (TrkA, caveolin, clathrin) in PC12 Cells. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 40(3):93-99.

2) Nishida T, Jinnai H, Arii T, Yoshimura R, Endo Y. (2007) Ultrastructural localization of the neurotrophin receptor (TrkA) in cultured rat pheochromocytoma PC12 Cells: three-dimensional image analysis by high voltage electron microscopy. *Biomedical Research* 28(3): 161-167.

(参考報文)

1) 遠藤泰久、西田倫希、吉見仁志、「脳スライス培養系による神経突起バリコシティーの構造解析」、

生理学研究所年報、岡崎国立共同研究機構生理学研究所、第 24 巻、pp156-157、2003 年

2) 遠藤泰久、西田倫希、有井達夫、「神経系培養細胞における受容体などの 3 次元的構造解析」、生理学研究所年報、岡崎国立共同研究機構生理学研究所、第 26 巻、pp171-172、2005 年

3) 遠藤泰久、吉村亮一、西田倫希、有井達夫、「神経系培養細胞における受容体などの 3 次元的構造解析」、生理学研究所年報、岡崎国立共同研究機構生理学研究所、第 27 巻、pp185-186、2006 年