The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Formation of signal transduction complexes during immobile phase of NGFR movements |
| Author(s) | 柴田, 晶 カール |
| Citation | 大阪大学, 2006, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/46263 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名　柴　田　晶カール（しば　た　しょう かーる）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学　位　記　番　号　第　２０１２８　号

学位授与年月日　平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件　学位規則第４条第１項該当

医学系研究科生体統合医学専攻

学　位　論　文　名　Formation of signal transduction complexes during immobile phase of NGFR movements
（神経成長因子結合後の受容体の停滞運動と細胞内情報伝達コンプレックスの形成）

論　文　審　査　委　員　（主査）
教　授　真下　　節

（副査）
教　授　祖父江憲治　　教　授　柳田　敏雄

## 論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

神経成長因子（Nerve Growth Factor；NGF）は、生体内で神経細胞の生存および神経伝達物質の合成促進、分化や神経軸策の伸長を制御するニューロトロピンに分類されるタンパク質である。神経細胞への抗アポトーシス作用などから、脳血管性痴呆やアルツハイマー病の予防や治療への応用が期待されておりまた、痛みの発生メカニズムにも深く関与していることも近年動物の行動モデルに置いて明らかになっている。生体内で分泌された NGF は、神経細胞膜上で NGF 受容体である TrkA と p75 受容体と結合し細胞内の MAPK カスケードをはじめとする様々な情報伝達カスケードの活性化を行いながら細胞内へと取り込まれる。我々は、この過程の初期段階である細胞膜上の NGF とその受容体との運動とクラスター形成過程を可視化測定し解析することで、細胞外から細胞内への情報処理過程の時空間的性質を明らかにすることを目的として NGF の一分子観察をおこなった。

近年、光学顕微鏡技術の発展に伴いタンパク 1 分子の蛍光観察法が可能になり、分子モーターの化学・力学共役の機構や酵素の触媒反応機構などについて新規な知見がこれまでに得られてきた。また生細胞上の挙動を可視化する 1 分子可視化法により生きている細胞での 1 分子レベルの測定が可能となった。この技術により膨大な数の分子の反応の結果で得られた反応の平均値ではなく、数ナノメートルの精度において数分子よっておこる情報伝達反応の時空間的性質を測定することが可能である。

〔　方法ならびに成績　〕

蛍光色素 Cy3 で NGF の一分子標識を行い、全反射顕微鏡を用いて 1 分子単位での NGF と PC12 細胞の細胞膜上の受容体との結合過程の観察を行った。われわれの観察系では一つ一つの NGF 分子は、1 秒以上にわたって観察することでき、一秒間に 30 frame/sec の時間分解能で数十ナノメータの精度での追跡が可能であった。細胞膜上の受容体と結合した NGF 分子はブラウン運動をするが、NGF 1 分子の運動には異なる phase がみられ拡散係数が大きい mobile phase と小さい immobile phase とに分けることができた。2 種類 phase の持続時間の分布から、ブラウン運動の切り替えが繰り返し確率的におこることがわかり、また細胞膜上の部位に関係なく細胞膜全体に運動の切り替えが生じた。Cy3NGF のブラウン運動が immobile phase に移行する時に、分子の蛍光強度の階段状の増加が見られ

Cy3NGF 分子が他の分子と衝突しクラスターを形成することが観察された。このことにより分子のクラスター化形成により運動様式が切り替わることが示唆された。また、薬剤による NGF 受容体のリン酸化抑制により Cy3NGF 分子の immobile phase への移行頻度が減少することが観測された。我々は、さらに Cy3NGF-受容体の下流の細胞内情報伝達カスケードの一部である、small-G protein の Ras と Raf1 注目した。NGF が受容体に結合すると Ras は活性化され下流の分子である Raf1 を細胞内から細胞膜へ移行させ、カスケード反応を進めることが知られており、Raf1 の細胞膜への移行をモニターすることで Ras および受容体の活性化状態を測定することが可能である。PC12 細胞に GFP をラベルした Raf1（GFP-Raf）を発現させ、GFP-Raf と Cy3-NGF の同時観察を一分子レベルで行った。その結果、immobile phase にある Cy3NGF 分子と下流の細胞内情報伝達分子 GFP-Raf が細胞膜において共局在することが観察された。

〔 総　　括 〕

細胞膜上の NGF と受容体の複合体は、mobile phase と immobile phase の運動様式があり、immobile phase にある Cy3NGF 分子が細胞内情報伝達を行っていることが示唆された。クラスター形成によって Immobile phase が生じるメカニズムとしては、Cy3NGF 分子の回転拡散の抑制が考えられる。側方拡散はクラスターによる mass 効果にはほとんど影響を受けないが、回転拡散は大きく減少することが理論的に知られており回転拡散が抑制されることで細胞骨格などの細胞内の static な因子との相互反応確率があがる可能性が考えられる。

われわれの研究からは、細胞膜上の NGF による活性化は部位に特定されず繰り返し間欠的に生じ、ゆらぎがあることが明らかになった。情報伝達反応にゆらぎが生じることで小さな反応でもゆらぎが大きい場に置いては効率的に情報伝達反応が起き、局所的な下流への大きな出力が生じる可能性が考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

神経成長因子（Nerve Growth Factor；NGF）は、生体内で神経細胞の生存や分化、神経軸策の伸長に関わるタンパク質である。本研究において申請者は、細胞膜上の受容体と結合した NGF の 1 分子観察を行い、NGF によるシグナリングの時空間的特性について研究を行った。

その結果細胞膜上の NGF と受容体の複合体の運動には、運動期と停滞期があり、確率的に切り替わることを明らかにし、複合体がクラスターを形成により運動期から停滞期に移行することを発見した。そして、下流の細胞内情報伝達分子 Raf1 の活性化は、停滞期の複合体によって起こることを明らかにした。

本論文では、細胞膜上の NGF と受容体の複合体の運動状態が下流の細胞内情報伝達分子の活性化に影響することをはじめて明らかにした。これらの内容は生物物理学や分子生物学の分野に大きく貢献するものであり、博士の学位論文として十分に値するものと考えられる。