

【学位論文審査の要旨】

1 研究の目的

神経細胞は軸索と樹状突起という2種類の突起を持ち、それらを介して回路を形成することにより、記憶・学習・意識など様々な高度な脳機能を可能にしている。即ち、軸索、樹状突起という神経突起の形成と維持はヒトがヒトらしく行動するために必須の過程である。軸索・樹状突起の形成については多くの研究が行われ、突起の伸長や方向、そして、他の神経細胞との相互作用には細胞骨格構造が重要な働きをしていることが判明している。一方、突起の伸長には突起の軸となる細胞骨格構造に加え、突起を囲む細胞表面も拡大することになる。細胞表面の拡大には細胞膜成分の供給が必要であるが、突起の伸展に伴う細胞膜の増大の仕組みについては驚く程研究が遅れている。細胞内での膜成分は小胞輸送として運ばれている。輸送小胞はモータータンパク質により、細胞骨格をレールとして輸送されている。本学位論文研究では、細胞内で膜成分を輸送する小胞輸送に関連する因子 **LMTK1** について、細胞骨格成分である微小管やアクチンフィラメントとどのように相互作用をするかを細胞生物学的に検証した。

2 研究の方法と結果

LMTK1A は神経細胞で高発現する新規のプロテインキナーゼである。N末側のシステイン残基のパルミトイル化によりリサイクリングエンドソームに結合して、それらの細胞内輸送をネガティブに制御していることが、先行研究により示されている。しかし、キナーゼ活性の検出が難しく、細胞内における基質は勿論のこと、キナーゼ活性が **LMTK1A** の輸送制御においてどのような役割を果たしているか研究が行われていなかった。

まず、**LMTK1A** の基質や相互作用する因子を見つけるために、マウス脳の膜分画から免疫沈降法で **LMTK1** を単離して、結合してくるタンパク質を検索した。結合タンパク質を質量分析法により数多く同定した。それらの中から結合特異性の高いいくつかを選んで、培養細胞過剰発現系により、相互作用を検討したが、強い結合を示すものがなかった。同定された結合タンパク質の中には相互作用するものがあるに違いないと思われたが、全てを検討するためには膨大な時間と労力を必要とするため、この方法による検討をあきらめることとした。

次に、**LMTK1A** のキナーゼ不活性型 **D206V** 変異体（キナーゼ活性に必要な **Asp206** の **Val** への変異体）を培養細胞へ発現させて細胞骨格との関連について調べた。ここでは、神経系の培養細胞である **Neuro2A** を用いた。**Neuro2A** でも野生型 **LMTK1A** が核近傍で **Rab11** やトランスフェリン受容体など（リサイクリングエンドソームのマーカー）と共局在することが確認された。核近傍への集積は微小管重合阻害剤であるノコダゾール処理により抑制されたことより、**LMTK1A** の結合したエンドソームが微小管に依存して核近傍に集まること示された。微小管との結合を超高分解能蛍光顕微鏡で観

察したところ、野生型 LMTK1A のほとんど全てが微小管上に存在し、不活性型 LMTK1A は微小管から離れて存在するものが見られた。不活性型 LMTK1A を Neuro2A 細胞に過剰発現させた時には、微小管の主な分布が細胞の中心から周辺へと変化していた。この原因として微小管形成中心である γ チューブリンの核に対する位置が LMTK1A の活性によって変化することが考えられた。

不活性型 LMTK1A は細胞周囲にも存在した。特に突起部分を観察すると、微小管の存在が見られない突起の先端側に不活性型 LMTK1A が存在していた。この局在をより明確にするために、別の神経系由来の PC12 細胞を用いて調べた。PC12 細胞は神経成長因子 (NGF) で処理すると、神経突起を伸長させる。野生型と不活性型の LMTK1A を発現させた PC12 細胞を NGF で処理し、LMTK1A とアクチンフィラメントの関連を調べた。野生型 LMTK1A は神経突起のシャフト (微小管が主に存在する) に存在していたのに対して、不活性型 LMTK1A はアクチンフィラメントが主に存在する神経突起の先端側に多く存在していた。PC12 細胞を用いて、LMTK1A の神経突起伸長に対する影響を調べた結果、野生型 LMTK1A は突起の伸長を抑制し、不活性型 LMTK1A は突起の伸長を促進していることを見つけた。

3 審査の結果

本学位論文では、LMTK1A という哺乳動物の神経細胞で発現する新規キナーゼのキナーゼ活性に依存した細胞骨格との相互作用について新たな知見を得た。LMTK1A は小胞輸送を制御する因子であることはすでに明らかとなっていたが、それが小胞輸送の軌道として働く細胞骨格とどのような関係があるか、また、不活性型の LMTK1A が小胞輸送を促進するという特徴的な性質を示していたが、それがどのような仕組みであるかは全く判っていなかった。本研究では神経系由来の培養細胞を用いて、LMTK1A が結合するリサイクリングエンドソームの核近傍への輸送が微小管依存的であること、微小管への結合はキナーゼ活性に依存して、野生型 LMTK1A は微小管上に存在するのに対して、不活性型 LMTK1A は微小管と離れて存在することを初めて見つけた。微小管との相互作用とは逆に、不活性型 LMTK1A はアクチンフィラメントに対して高いアフィニティーを持ち、微小管への結合とは対照的であり、非常に興味ある結果である。もう一つの重要な発見は、小胞輸送に関わる因子が細胞骨格構造を変えたというものである。輸送小胞は微小管やアクチンフィラメントの上を輸送されており、微小管やアクチンフィラメントなど細胞骨格がエンドソームなどの小胞の分布に影響を与えるという報告は数多く見られるが、小胞輸送に関わる因子が細胞骨格の分布などに影響を与えるという例は多くはない。本研究では、LMTK1A のキナーゼ活性に依存して、細胞内の微小管の分布が微小管形成中心から放射状に伸びたパターンから細胞周囲に多くなるというパターンに変化していた。微小管を構成するチューブリンなどの量によるものではなく、微小管の分布を決定している微小管形成中心 (MTOC) の核に対する位置を変

えていることも明らかにした。現時点では、LMTK1A のキナーゼ活性がどのようにして、微小管形成中心の位置を変えるのか、また、位置が変わった微小管形成中心がどのようにして、細胞内微小管の分布を変えるかについては判っていないが、これはこれまであまり例がない貴重な発見である。LMTK1A の神経機能としては、軸索や樹状突起の伸長抑制である。本研究はその仕組みについて回答を与えるものである。これまでは LMTK1A は軸索内における微小管に沿った小胞輸送の輸送距離や頻度を抑制することによって突起の伸長を抑えていると考えられていたが、本研究により、輸送小胞が微小管からアクチンフィラメントへと軌道を変更する反応も LMTK1A は抑制していることが判明した。

4 最終試験の結果

本学の学位規定にしたがって、試験および試問を行った。公開の場で論文内容の審査会を行い、生命科学専攻教員による質疑応答を行った。また、論文審査委員により本論文および関連分野の試問を行った。その結果、専門分野及び外国語についても十分な学力を有することを認め、合格と判定した。