

ヒトおよびサル脳の新規アセチルコリン合成酵素pChATの
遺伝子構造と脳機能回路

(研究課題番号 16300111)

平成16年度～平成18年度科学研究費補助金

(基盤研究(B))

研究成果報告書

平成19年3月

研究代表者 遠山 育夫

(滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教授)

ヒトおよびサル脳の新規アセチルコリン合成酵素 pChAT の
遺伝子構造と脳機能回路

目次

第1章 はしがき

第2章 研究組織と研究経費

第3章 研究発表

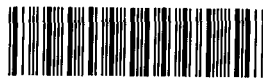
1. 原著
2. 総説
3. 口頭発表 (国際学会、国内学会)
4. 出版物
5. 工業所有権の出願・取得状況

第4章 研究成果の概要

1. ヒトおよびサルの ChAT サブタイプの遺伝子構造
2. ChAT サブタイプの解剖学的局在
3. ChAT サブタイプの機能的意義
4. 今後の課題と展望

第5章 論文

滋賀医科大学附属図書館



2006014480

第一章 はしがき

コリンアセチル基転移酵素 (ChAT) は、コリン作動性神経の神経伝達物質であるアセチルコリンの合成酵素である。ChATは、これまで1種類であると考えられていた。しかし、多くのChAT抗体が末梢コリン神経を検出できないという事実をヒントに、我々は、ラットの翼口蓋神経節から新しいChATサブタイプを発見し、pChATと命名した (Tooyama and Kimura, 2000)。その後これまでにpChATが、多くの動物の末梢コリン神経系に分布することをRT-PCR法、免疫組織化学法、酵素活性測定により証明してきた (J Neuroscience 2003ほか、参考文献を参照)。当初、pChATは末梢神経系にのみ発現していると予想されたが、pChAT抗体を作製してラット脳を検索したところ、視床下部の隆起乳頭体核に細胞体を持ち大脳皮質に投射するニューロンがpChATを含有することを見出した (Neuroscience 2003)。すなわち哺乳動物の脳にもChATサブタイプが複数個存在する可能性が高い。コリン神経は、学習・記憶などの高次脳機能を担うことから、大脳皮質に広く投射する新しいコリン神経系の発見は重要と考える。そこで、本研究では、ヒトおよび霊長類を対象に、ヒトおよびサルChATサブタイプの遺伝子構造を明らかにするとともに、その機能的意義を探るために、ヒトおよびサルにおけるChATサブタイプの神経回路についての解剖学的研究を行った。

参考文献

- 1) I Tooyama and H Kimura: A protein encoded by an alternative splice variant of choline acetyltransferase mRNA is localized preferentially in peripheral nerve cells and fibers. J Chem Neuroanat 17: 217-226, 2000.
- 2) K Nakajima, I Tooyama, O Yasuhara, Y Aimi, H Kimura: Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase of a peripheral type (pChAT) in the enteric nervous system of rats. J Chem Neuroanat 18: 31-40, 2000.
- 3) H Kanayama, O Yasuhara, A Matsuo, I Tooyama, Y Aimi, J-P Bellier, JI Nagy, K Fukui, H Kimura: Expression of a splice variant of choline acetyltransferase in magnocellular neurons of the tuberomammillary nucleus of rat. Neuroscience 118: 24-251, 2003.
- 4) O. Yasuhara, I Tooyama, Y-Aimi, J-P Bellier, T Hisano, A Matsuo, M Park, H Kimura: Demonstration of cholinergic ganglion cells in rat retina; expression of an alternative splice variant of choline acetyltransferase. J Neurosci 23: 2872-2881, 2003.

第二章 研究組織と研究経費

研究組織

研究代表者： 遠山育夫 (滋賀医科大学分子神経科学研究センター・教授)
研究分担者： 木村 宏 (滋賀医科大学分子神経科学研究センター・教授)
研究分担者： 松尾明典 (滋賀医科大学分子神経科学研究センター・助手)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	4,300	0	4,300
平成17年度	2,700	0	2,700
平成18年度	2,200	0	2,200
総計	9,200	0	9,200

第三章 研究発表

(1) 原著論文

1. A Brehmer, F SchrodL, W Neuuber, I Tooyama, H Kimura: Coexpression pattern of two variants of choline acetyltransferase and neuronal nitric oxide synthase in myenteric neurons of porcine ileum. *J Chem Neuroanat* 27: 33-41, 2004.
2. O Yasuhara, Y Aimi, A Shibano, A Matsuo, JP Bellier, M Park, I Tooyama, H Kimura: Innervation of rat iris by trigeminal and ciliary neurons expressing pChAT, a novel splice variant of choline acetyltransferase. *J Comp Neurol* 472: 232-245, 2004.
3. A Casini, A Pinna, I Tooyama, H Kimura, G Di Chiara, TG Renda: Fate of (D-Ala²)-deltorphin-I-like immunoreactive neurons in 6-hydroxydopamine lesioned rat brain. *Eur J Histochem* 48: 135-140, 2004.
4. A Matsuo, JP Bellier, T Hisano, Y Aimi, O Yasuhara, I Tooyama, N Saito, H Kimura: Rat choline acetyltransferase of the peripheral type differs from that of the common type in untracellular translocation. *Neurochem International* 46:423-433, 2005.
5. Okano H, Bamba H, Hisa Y, Makino S, Ando S, Tammiya G, Goto S, Kaji R, Tooyama I: Immunohistochemical study of TAFII250 in the rat laryngeal nervous system. *Histochem Histopathol* 20: 1049-1035, 2005.
6. Abdelalim EM, Takada T, Toyoda F, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Tooyama I, Torii R: In vitro expression of natriuretic peptides in cardiomyocytes differentiated from monkey embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 340: 689-695, 2006.
7. Toyoda K, Okano H, Bamba H, Hisa Y, Oomura Y, Imamura T, Furukawa S, Tooyama I: Comparison of FGF1 (aFGF) Expression between the Dorsal Motor Nucleus of Vagus and the Hypoglossal Nucleus of Rat. *Acta Histochem Cytochem* 39: 1-7, 2006.
8. Abdelalim EM, Takada T, Torii R, Tooyama I: Molecular Cloning of BNP from Heart and Its Immunohistochemical Localization in the Hypothalamus of Monkey. *Peptides* 27: 1886-1893, 2006.
9. Okano H, Toyoda K, Bamba H, Hisa Y, Oomura Y, Imamura T, Furukawa S, Kimura H, Tooyama I: Localization of fibroblast growth factor-1 (FGF1) in cholinergic neurons innervating the rat larynx. *J Histochem Cytochem* 54: 1061-1067, 2006.

10. Kimura S, Bellier J-P, Matsuo A, Tooyama I, Kimura H: The production of antibodies that distinguish rat choline acetyltransferase from its splice variant product of a peripheral type. *Neurochem International* 50: 251-255, 2007.
11. Abdelalim EM, Osman, AHK, Takada T, Torii R, Tooyama I: Immunohistochemical mapping of NPR-A in the brainstem of *Macaca Fascicularis*. *Neuroscience* (in press).

(2) 総説

遠山育夫、岩見美香、豊田健一郎、相見良成：高次脳機能発達と神経栄養因子 *Clinical Neuroscience* 22, p293-296, 2004.

(3) 口頭発表

国際学会

1. I Tooyama, Y Aimi, O Yasuhara, H kimura: The molecular structure and cellular distribution of a novel subtype of choline acetyltransferase (pChAT). 16th International congress of the IFAA (International Federation of Associations of Anatomists). Kyoto, August 22-27, 2004.
2. H Oknao, K Toyoda, H Bamba, Y Hisa, Y Oomura, T Imamura, S Furukawa, H Kimura, I Tooyama: Localization of fibroblast growth factor-1 (FGF1) in cholinergic neurons innervating the rat larynx. The 2006 Annual Meeting of the Histochemical Society held jointly with the Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry (第7回日米組織細胞化学会), Waikoloa, Hawaii, August 23-27, 2006.

国内学会

1. 木村新、遠山育夫、松尾明典、ジャンピエールベリエ、相見良成、安原治、木村宏：2種のアセチルコリン合成酵素（cChAT と pChAT）を免疫組織化学法で見分けるための新しい cChAT 抗体の開発 第45回日本組織細胞化学会 鹿児島 2004年10月29日-30日。
2. Essam Abdelalim, Tatsuyuki Takada, Ryuzo Torii, Ikuo Tooyama: Molecular Cloning of Brain Natriuretic Peptide from Heart and its Immunohistochemical Localization in Hypothalamus of Monkey. 第46回日本組織細胞化学会総会 京都 2005年10月1日—2日。

3. Song Yang, 木村新、ジャンピエールベリエ、安原治、木村宏、鳥居隆三、遠山育夫：
ニホンザルにおける共通型コリンアセチル基転移酵素（cChAT）の遺伝子構造 第 28
回日本神経科学大会（Neuro2005） 横浜 2005年7月26日-28日。
4. 佐藤晴久、小西吉裕、遠山育夫 中枢神経系に強く発現する新しい TFG 遺伝子サブタ
イプ 第 32 回日本脳科学会 千葉 2005年6月3日-4日
5. 佐藤晴久、小西吉裕、遠山育夫 アルツハイマー病の側頭葉皮質に検出された補体
C1qB 鎖の新しいバリエーション遺伝子 第 47 回日本神経学会総会 東京 2006年5月11
日-13日
6. 加藤智子、小西吉裕、下浜俊、辻輝之、赤津裕康、遠山育夫 アルツハイマー病脳組
織における α 1-chimaerin タンパク質の発現について 第 33 回日本脳科学会 旭川
2006年6月2日-3日

（4）出版物

遠山育夫： 分子遺伝学の基礎 神経内科学テキスト（飯島節、工藤文夫編集）改
訂第2版 南江堂 2005年（分担執筆） p28 - p37

（5）研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

第四章 研究成果

本研究補助金が授与された3年間に、1)サルおよびヒトのChATサブタイプの遺伝子構造、2)ChATサブタイプの解剖学的局在(とくにサル脳において)、3)ChATサブタイプの機能的意義について検討を行い、次のような研究成果が得られた。

1. サルおよびヒトのChATサブタイプの遺伝子構造

当初は、脳からChATサブタイプをクローニングすることを試みていたが、死後剖検までの時間がかかるため、その間にmRNAをはじめとする遺伝子構造が傷つく。従って、ChATサブタイプ遺伝子をクローニングすることは、困難を極めた。そのような中、胎盤にChATサブタイプが多く含まれるという報告(Pfeil et al. Histochem Cell Biol, 2004 注1参照)があった。そこで倫理委員会の承認を得て、ヒト胎盤からのクローニングを試みた。その結果、胎盤から新規のChATサブタイプをクローニングすることに成功した。サルのChAT遺伝子の配列の一部は、2005年7月26日-28日に横浜市で開催された第28回日本神経科学大会(Neuro2005)で発表した(注2参照)。これまでの結果をラットでのChAT遺伝子構造を例に模式的にまとめると図1のようなヒトのChATサブタイプ遺伝子の配列は未発表であるが、胎盤から得られたヒトのChATサブタイプの遺伝子構造の一部を図2に示す。

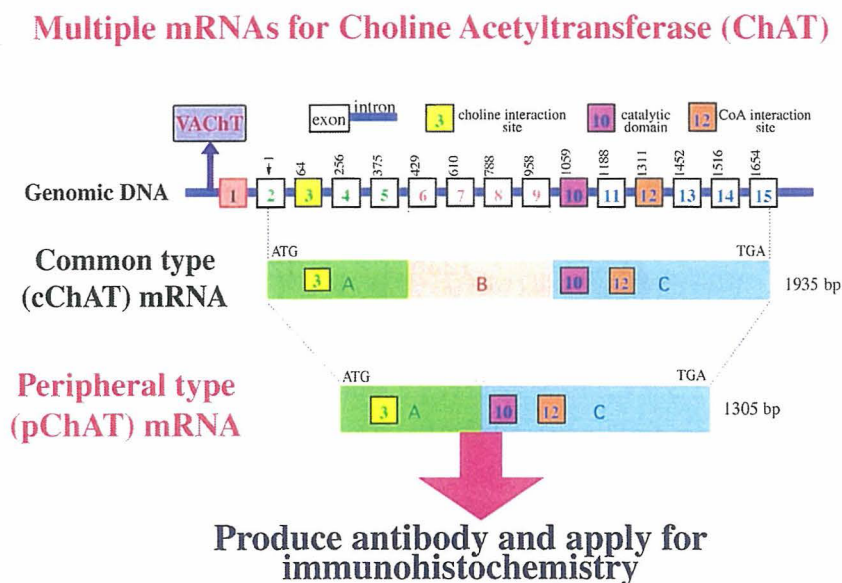


図1 従来のChATと末梢型ChATのmRNAの配列

注1) Pfeil U, Vollerthun R, Kummer W, Lips KS: Expression of the cholinergic gene locus in the rat placenta. Histochem Cell Biol. 122: 121-130, 2004.

注2) Yang S, Kimura S, Bellier JP, Yasuhara O, Kimura H, Torii R, Tooyama I: Cloning of monkey choline acetyltransferase (ChAT) from the striatum of Japanese macaque. Neurosci Res. 52 (Supple), p122, 2005.

図2 既報のヒト ChAT (human ChAT) と

ヒト胎盤から cloning されたヒト ChAT バリエント (Sequence #4)

	915	925	935	945	955	965
human ChAT	.CTACAAGGC	CCTGCTGGAC	AGCCACTCCA	TCCCCACTGA	CTGTGCCAAA	GGCCAGCTGT
Sequence #4	.CTACAAGGC	CCTGCTGGAC	AGCCACTCCA	TCCCCACTGA	CTGTGCCAAA	GGCCAGCTGT
	975	985	995	1005	1015	1025
human ChAT	CAGGGCAGCC	CCTTTGCATG	AAGCAATACT	ATGGGCTCTT	CTCCTCCTAC	CGGCTCCCCG
Sequence #4	CAGGGCAGCC	CCTTTGCATG	AAGCAATACT	ATGGGCTCTT	CTCCTCCTAC	CGGCTCCCCG
	1035	1045	1055	1065	1075	1085
human ChAT	GCCATACCCA	GGACACGCTG	GTGGCTCAGA	ACAGCAGCAT	CATGCCGGAG	CCTGAGCACG
Sequence #4	GCCATACCCA	GGACACGCTG	GTGGCTCAGA	ACAGCA....
	1095	1105	1115	1125	1135	1145
human ChAT	TCATCGTAGC	CTGCTGCAAT	CAGTTCTTTG	TCTTGGATGT	TGTCATTAAT	TTCCGCCGTC
Sequence #4
	1155	1165	1175	1185	1195	1205
human ChAT	TCAGTGAGGG	GGATCTGTTC	ACTCAGTTGA	GAAAGATAGT	CAAAATGGCT	TCCAACGAGG
Sequence #4
	1215	1225	1235	1245	1255	1265
human ChAT	ACGAGCGTTT	GCCTCCAATT	GGCCTGCTGA	CGTCTGACGG	GAGGAGCGAG	TGGGCCGAGG
Sequence #4
	1275	1285	1295	1305	1315	1325
human ChAT	CCAGGACGGT	CCTCGTGAAA	GACTCCACCA	ACCGGGACTC	GCTGGACATG	ATTGAGCGCT
Sequence #4
	1335	1345	1355	1365	1375	1385
human ChAT	GCATCTGCCT	TGTATGCCTG	GACGCGCCAG	GAGGCGTGGA	GCTCAGCGAC	ACCCACAGGG
Sequence #4
	1395	1405	1415	1425	1435	1445
human ChAT	CACTCCAGCT	CCTTCACGGC	GGAGGCTACA	GCAAGAACGG	GGCCAATCGC	TGGTACGACA
Sequence #4

	1455	1465	1475	1485	1495	1505
human ChAT	AGTCCCTGCA	GTTTGTGGTG	GGCCGAGACG	GCACCTGCGG	TGTGGTGTGC	GAACACTCCC
Sequence #4
	1515	1525	1535	1545	1555	1565
human ChAT	CATTCGATGG	CATCGTCCTG	GTGCAGTGCA	CTGAGCATCT	GCTCAAGCAC	GTGACGCAGA
Sequence #4TGCAGTGCA	CTGAGCATCT	GCTCAAGCAC	GTGACGCAGA
	1575	1585	1595	1605	1615	1625
human ChAT	GCAGCAGGAA	GCTGATCCGA	GCAGACTCCG	TCAGCGAGCT	CCCCGCCCCC	CGGAGGCTGC
Sequence #4	GCAGCAGGAA	GCTGATCCGA	GCAGACTCCG	TCAGCGAGCT	CCCCGCCCCC	CGGAGGCTGC
	1635	1645	1655	1665	1675	1685
human ChAT	GGTGGAAATG	CTCCCCGAA	ATTCAAGGCC	ACTTA..		
Sequence #4	GGTGGAAATG	CTCCCCGAA	ATTCAAGGCC	ACTTA..		

2. ChAT サブタイプの解剖学的局在

ChAT サブタイプの解剖学的局在を調べる上で、それぞれのサブタイプに特異的に反応する抗体を作成する必要があった。pChAT は、もともとはコリン神経を豊富に持つ副交感神経節であるラット翼口蓋神経節から見いだされた新たな ChAT のスプライシング異型であり、cChAT の mRNA と比較して、エクソン 6 から 9 を欠いている。(図 1)。

pChAT に特異的と考えられるエクソン 5 と 10 の接合部分のペプチドをウサギに免疫し、pChAT に対する特異抗体を得た。この抗体は末梢の神経組織のコリン神経を良好に染色する一方で、中枢のコリン神経は認識しないという際だった特徴を示し、作業仮説は正しいものと考えられた。このようにして pChAT 特異抗体を得たので、次に cChAT 特異抗体の作成にとりかかった。cChAT にあって pChAT にはない exon 7 と exon 8 の領域を発現ベクターに組み込んで、大腸菌にリコンビナントタンパクを作らせた。このリコンビナントタンパクに対する抗体を作成したところ、cChAT 特異的な抗体を得ることができた。こうして pChAT あるいは cChAT に特異的に反応する抗体を得ることができた。これらの成果の詳細は、原著論文 10 で報告した。

cChAT や pChAT の特異抗体を用いて、主としてサルとラットの脳で ChAT サブタイプの局在を検討した。その結果、ChAT は極めて多くの領域に局在していたが、pChAT は極めて限られた領域にのみ存在していた。これらの研究成果は、原著論文 1, 2, 3, 6, 8, 11 などに報告した。新しい発見としては、cChAT はサルの脳幹部で natriuretic peptide 受容体とよく共存していることを見出した (Neuroscience, in press)。Natriuretic peptide は cardiovascular のホメオスタシスに関与していることから、cChAT も Natriuretic peptide を介して心血管系の機能に関与している可能性が考えられる。

3. ChAT サブタイプの機能的意義

ヒト細胞を含む各種培養細胞に Green Fluorescent Protein (GFP) のタグをつけた cChAT および pChAT 遺伝子を導入し、おのこのサブタイプ蛋白の細胞内局在を検討した。その結果、cChAT は細胞質と核の両方に検出されたのに対し、pChAT は核のみに検出された。細胞質から核へのタンパクの移動を阻害する leptomycin B で処理を行うと、cChAT の細胞内局在には変化がなかったが、pChAT は細胞質に検出されるようになった。この結果は、cChAT と pChAT の細胞内局在が異なっており、pChAT は細胞質から核に移動することを示している。こうした細胞内局在の違いから、pChAT は cChAT と異なる機能をもつ可能性が高い。おそらく pChAT は転写因子のように核内で何らかの機能を発揮しているものと火投げられた。この研究の詳細は、原著論文 4 に報告した。

pChAT が核内でどのような機能をもつのか明らかにすることが、今後の課題である。そこで、いくつかの転写因子と ChAT サブタイプとの共存関係を調べてみた。その結果、興味あることに、末梢神経系において pChAT は転写因子 TAF1 や神経栄養因子 FGF1 とよく共存していた。pChAT タンパクは、核内で TAF1 や FGF1 と相互作用をしている可能性があり、今後、pChAT の新たな機能を探る上で、重要であると考えられる。これらの研究成果は、原著論文 5, 7, 9 に報告した。

4. 今後の課題と展望

本研究の結果、ヒトやサルにも ChAT バリエーションが存在することが明らかになった。その局在の検討や培養細胞からの実験などから、ChAT バリエーションは神経伝達物質アセチルコリンを合成するだけでなく、核内において転写因子と相互作用するなど、新たな機能をもつ可能性が示唆された。神経軸索損傷などの病態モデルでも、cChAT と pChAT が損傷後に異なる反応を示すことが明らかになりつつある。脳ではコリン神経系は学習・記憶に深く関わっていることが知られており、今後、アルツハイマー病をはじめとするヒト疾患で、ChAT バリエーションがどのような働きをしているのか、検討していく予定である。

おわりにこの研究の遂行に科学研究費補助金の果たした役割は大きい。深く感謝いたします。