

**バイオイメーシングによる
アセチルコリン合成酵素の細胞内機能解析**

(課題番号 15500257)

平成 15 年度～平成 16 年度科学研究補助金

基盤研究(C)(2)研究成果報告書

平成 17 年 3 月

研究代表者 松尾 明典

(滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・助手)

バイオイメージングによる アセチルコリン合成酵素の細胞内機能解析

(課題番号 15500257)

平成 15 年度～平成 16 年度科学研究補助金（基盤研究（C）（2））研究成果報告書

滋賀医科大学附属図書館



2004011584

平成 17 年 3 月

研究代表者 松尾 明典

(滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・助手)

はしがき

アセチルコリンは神経伝達物質として最も古典的な生理活性因子であり、生体内に広く分布し様々な重要な機能を果たしている。中でも高次機能において中心的な役割を果たしていることは周知の事実であり、その機能障害はアルツハイマー病の中心症状を作り出している。さらに、末梢神経においては自律神経系の神経伝達物質であり、筋肉終板の情報伝達を担っている。また非神経系では、胎盤、精子などに含まれている。アセチルコリンの合成を担う酵素は従来、1種類（cChAT）のみと見なされてきていたが、本申請者らの研究グループによって第2の合成酵素（pChAT）が発見された。この新規酵素はcChATのスプライスバリエーションで、末梢組織に優勢な分布がある他、酵素学的な特性や細胞内局在においても既知酵素との相違が明確になりつつある。本研究では、pChATの特異的な機能を、pChATとcChATの細胞内動態を比較検討することを通じて解明することを目指し、以下のような成果をあげた。

研究組織

研究代表者： 松尾 明典 (滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・助手)
研究分担者： 斎藤 尚亮 (神戸大学・バイオシグナル研究センター・教授)
研究分担者： 相見 良成 (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：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	1,900	0	1,900
平成 16 年度	1,600	0	1,600
総 計	3,500	0	3,500

研究発表

(1) 学会誌等

1. Matsuo A., Bellier JP., Hisano T., Aimi Y., Yasuhara O., Tooyama I., Saito N., Kimura H. (2005) Rat choline acetyltransferase of the peripheral type differs from that of the common type in intracellular translocation. *Neurochem Int.* 46, 423-33.
2. Yasuhara O., Aimi Y., Shibano A., Matsuo A., Bellier JP., Park M., Tooyama I., Kimura H. (2004) Innervation of rat iris by trigeminal and ciliary neurons expressing pChAT, a novel splice variant of choline acetyltransferase. *J Comp Neurol.* 472, 232-45.
3. Akiguchi I., Tomimoto H., Wakita H., Kawamoto Y., Matsuo A., Ohnishi K., Watanabe T., Budka H. (2004) Topographical and cytopathological lesion analysis of the white matter in Binswanger's disease brains. *Acta Neuropathol (Berl).* 107, 563-70.
4. Tomimoto H., Lin J-Xi., Matsuo A., Ihara M., Ohtani R., Shibata M., Miki Y., Shibasaki H. (2004). Different mechanisms of corpus callosum atrophy in Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neurol.* 251,398-406.
5. 遠山育夫, 松尾明典, 安原 治. (2004) 孤発性 Alzheimer 病の遺伝的因子, 日本臨床, 62 巻増刊号 1, 46-51.
6. Yasuhara O., Tooyama I., Aimi Y., Bellier JP., Hisano T., Matsuo A., Park M., Kimura H. (2003) Demonstration of cholinergic ganglion cells in rat retina: expression of an alternative splice variant of choline acetyltransferase. *J Neurosci.* 23, 2872-81.
7. Kanayama H., Yasuhara O., Matsuo A., Tooyama I., Aimi Y., Bellier J.-P., Nagy J., I., Fukui K., Kimura H. (2003). Expression of a splice variant of choline acetyltransferase in magnocellular neurons of the tuberomammillary nucleus of rat. *Neuroscience* 118, 243-51.
8. Iwami M., Tooyama I., Kinoshita A., Matsuo A., Oomura Y., Sasaki K., Kimura H., (2003) Demonstration of Fibroblast Growth Factor Receptor-1 in Rat Adrenal Gland as Revealed by Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction and Immunohistochemistry". *Acta Histochem. Cytochem.* 36, 353-359.

(2) 口頭発表

1. 松尾明典, Jean Pierre Bellier, 久野 正, 相見良成, 安原 治, 遠山育夫, 齋藤尚亮, 木村 宏, 2 つのタイプのコリンアセチル基転移酵素の細胞内動態の差異 Differences in intracellular translocation between two types of choline acetyltransferase of the rat. 第 27 回日本神経科学大会 2004 年 9 月 大阪
2. 安原 治, 相見良成, 松尾明典, Jean-Pierre Bellier, Mohamed Elnasharty, 遠山育夫, 木村 宏, ラット眼組織のコリン神経支配: 新規アセチルコリン合成酵素 pChAT による再評価 Re-evaluation of cholinergic innervation of rat ocular tissues using choline acetyltransferase of a peripheral type as a marker. 第 27 回日本神経科学大会 2004 年 9 月 大阪
3. Matsuo A. Two types of rat choline acetyltransferase differ in intracellular translocation. 9th International Symposium at MNRC In Celebration of the 30th Anniversary of SUMS 2004 年 8 月 大津
4. 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総会 2004 年 10 月 鹿児島
5. Aimi Y., Yasuhara O., Matsuo A., Tooyama I., Kimura H., Cholinergic extrinsic afferents of the gut. 16th International Congress of the IFAA August, 2004 Kyoto, Japan
6. 花田桂司, J.P. Bellier, 松尾明典, 相見良成, 安原 治, 遠山育夫, 木村 宏, ラットエックリン汗腺における pChAT 含有神経線維の局在 第 79 回日本解剖学会近畿支部学術集会 2003 年 11 月 大阪
7. 相見良成, 中島恭二, ベリエ ジャンピエール, 松尾明典, 安原 治, 遠山育夫, 木村 宏, 消化管第一次求心性感覚路における pChAT 陽性神経の形態学的証明. 第 2 回日本 Neurogastroenterology (神経消化器病) 学会 2003 年 10 月 大阪
8. Bellier JP., Aimi Y., Matsuo A., Yasuhara O., Tooyama I., Kimura H., Purification of pChAT, a

novel splice variant of choline acetyltransferase, from porcine small intestine. 第46回日本神経化学会 2003年9月 新潟

9. 相見良成, 中島恭二, Bellier Jean-Pierre, 松尾明典, 安原 治, 遠山育夫, 木村 宏, ラット後根神経節の内臓求心性神経における末梢型コリン合成酵素 第26回日本神経科学大会 2003年7月 名古屋
10. Kanayama H., Yasuhara O., Matsuo A., Tooyama I., Aimi Y., Bellier JP., Nagy JI., Fukui K., Kimura H., Expression of a splice variant of choline acetyltransferase in magnocellular neurons of the tuberomammillary nucleus of rat. 6th IBRO World Congress of Neuroscience. July, 2003 Prague, CZECH
11. Bellier JP., Aimi Y., Park M., Elnasharty M., Minasch P., Hisano T., Matsuo A., Yasuhara O., Tooyama I., Kimura H., Purification of pChAT, a novel splice variant of choline acetyltransferase, from porcine intestine. Enteric Nervous System 2003, An international conference devoted to studies of the enteric nervous system. July, 2003 Banff, Alberta, Canada
12. Aimi Y., Nakajima K., Bellier JP., Matsuo A., Yasuhara O., Tooyama I., Kimura H., pChAT positive primary afferent neurons in the dorsal root ganglia project to the digestive tract of rats. Enteric Nervous System 2003, An international conference devoted to studies of the enteric nervous system. July, 2003 Banff, Alberta, Canada

研究成果概要

本研究代表者らは、「バイオイメージングによるアセチルコリン合成酵素の細胞内機能解析」のために、平成 15 年度より文部科学省科学研究補助金基盤研究(C)(2)を 2 年間にわたりうけ、以下のような成果をあげた。

1) pChAT-GFP, cChAT-GFP 安定発現細胞株の確立

培養細胞系で GFP 融合 pChAT および cChAT を設計、発現させることに成功した。CHO、COS-K1 および HEK-293 で発現状況を検討した結果、凝塊を生じない HEK-293 細胞がもっとも観察に適していた。一時的発現に続いて、pChAT-GFP、cChAT-GFP の安定発現株の確立にも成功した。アセチルコリン合成酵素活性については、cChAT-GFP で十分な活性を有していることを確認し、設計したコンストラクトがアセチルコリン合成能を保有しうることが証明された。酵素活性が低いと予想された pChAT では、pChAT-GFP の酵素活性も低値であるが、コファクターによって賦活される可能性があり、いくつかの候補について検証中である。標識する蛍光物質の種類および位置についても検討を加え、GFP を反対側に融合した GFP-pChAT, GFP-cChAT の発現にも成功した。多重観察に備えて、長波長蛍光を発する HcRed 融合タンパクによる一時発現にも成功した。

2) 細胞内移行の観察

1) で確立した細胞系を、共焦点レーザー走査顕微鏡下で観察した結果、生細胞において、pChAT は、細胞質優位に発現していること、また cChAT は、細胞質および核内に分布していることを見出した。さらに、核外移行阻害剤処理により、pChAT が核内に移行しうることを見出した。リン酸化阻害剤 (PKC 阻害剤) により、pChAT が核内に移行することも発見し、リン酸化が pChAT の細胞内動態に影響していることを初めて指摘した。pChAT と cChAT の細胞内分布は、定常状態のみならず、リン酸化阻害剤処理でも差異があり、pChAT が cChAT とは異なる機能を果たしている可能性が示唆された。

以上、1) 2) の結果は、論文 1 および口頭発表 1 として公開済みである。

3) PC12 細胞内における発現

非神経系細胞 HEK293 において得られた知見が、神経系細胞である PC12 でも同様であるかを検討した。その結果、pChAT-GFP は、PC12 細胞内で発現させても、細胞質優位であり、また cChAT-GFP は、細胞質および核内で観察された。したがって、pChAT, cChAT の細胞内分布は、細胞種の影響を受けないものと考えられた。PC12 においても cChAT-GFP 安定発現株を分離済みであり、今後 pChAT-GFP 安定株も確立して、比較検討を進める予定である。

4) 今後の展望

本研究の結果、pChAT の刺激に応じた核内移行が明らかになり、また、cChAT も定常状態で核内に存在していることが明らかになり、pChAT および cChAT の核内での機能を今後検索する必要があるものと思われた。また、PC12 細胞系を用いて、細胞分化における pChAT の役割も検討していく予定である。