

神経細胞mRNAスプライシングの 人工制御法による脳機能解析

(課題番号：10480212)

平成10年～平成12年度科学研究費補助金

基盤研究(B)(2) 研究成果報告書

平成13年 3月

研究代表者 安原 治

(滋賀医科大学分子神経科学研究センター・助教授)

神経細胞 mRNA スプライシングの人工制御法による脳機能解析

(課題番号 10480212)

平成10年～平成12年度科学研究費補助金

基盤研究 (B) (2)

研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 安原 治

(滋賀医科大学分子神経科学研究センター・助教授)

滋賀医科大学附属図書館



2000018435

目 次

1. 研究組織及び研究経費	2
2. 研究発表		
(1) 学会誌等	3
(2) 口答発表	4
3. 研究成果		
(1) 研究成果概要	6
(2) 主要論文	8

研究組織及び研究経費

(1) 研究組織

研究代表者：安原 治（滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・助教授）

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）

遠山育夫（滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教授）

木村 宏（滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教授）

(2) 研究経費

平成10年度 4,800 千円

平成11年度 4,300 千円

平成12年度 3,000 千円

計 12,100 千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Aisaka, A., Aimi, Y., Yasuhara, O., Tooyama, I., Kimura, H., Shimada, M., Two modes of corticospinal reinnervation occur close to spinal targets following unilateral lesion of the motor cortex in neonatal hamsters. *Neuroscience* 90 (1999) 53-67.
2. Tooyama, I., Nishimura, T., Nakagawa, E., Morita, H., Uemura, S., Aimi, Y., Yasuhara, O., Kimura, H., Microglial reaction and neuronal death in the hippocampus of rat models of epilepsy. *Neuropathology* 19 (1999) 203-208.
3. Nakanishi, Y., Tooyama, I., Yasuhara, O., Aimi, Y., Kitajima, K., Kimura, H., Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase of a peripheral type in the rat larynx. *J. Chem. Neuroanat* 17 (1999) 21-32.
4. Nakagawa, E., Aimi, Y., Yasuhara, O., Tooyama, I., Shimada, M., McGeer, P.L., Kimura, H., Enhancement of progenitor cell division in the dentate gyrus triggered by initial limbic seizures in rat models of epilepsy. *Epilepsia* 41 (2000)10-18.
5. Nakajima, K., Tooyama, I., Yasuhara, O., Aimi, Y., Kimura, H., Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase of a peripheral type (pChAT) in the enteric nervous system of rats. *J. Chem. Neuroanat.* 18 (2000) 31-40.

(2) 口答発表

1. Kimura, H., Aste, N., Nakajima, K., Aimi, Y., Yasuhara, O., Tooyama, I.: Peripheral type choline acetyltransferase: molecular neuroanatomy. XV Congress of the International Federation of Associations of Anatomists (4th International Malpighi Symposium), Rome, Italy, 1999.
2. Yasuhara, O., Tooyama, I., Aimi, Y., Bellier, J.-P., Aste, N., Kimura, H.: Retinal ganglion cells of the rat express an alternative splice variant of choline acetyltransferase. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience USA, New Orleans, U.S.A., 2000.
3. Hirouchi, M., Aoki, Y., Itoh, Y., Oka, M., Yasuhara, O., Tooyama, I., Kimura, H.: Reversal by NS-7, a neuroprotective agent, of decrease in mRNA expression for cAMP responsive element binding protein after middle cerebral artery occlusion in rats. 30th Annual Meeting of Society for Neuroscience USA, New Orleans, U.S.A., 2000.
4. 安原 治、遠山育夫、相見良成、木村 宏：網膜神経節細胞の一部はコリン作動性である。第22回日本神経科学大会（大阪）1999。
5. 相見良成、遠山育夫、安原 治、木村 宏：ラット後根神経節における末梢型コリンアセチルトランスフェラーゼの免疫組織化学。第22回日本神経科学大会（大阪）1999。
6. 挟間玄以、安原 治、遠山育夫、相見良成、木村 宏：正常マウス脳ミクログリアは IgG を産生する。第22回日本神経科学大会（大阪）1999。
7. 佐藤晴久、遠山育夫、安原 治、木村 宏：アルツハイマー病患者剖検脳の固定薄切標本を用いた補体 C1q の mRNA 解析。第40回日本神経学会総会（東京）1999。
8. 相見良成、遠山育夫、安原 治、木村 宏：一次知覚神経における末梢型コリン合成酵素(pChAT)の免疫組織化学。第105回日本解剖学会総会（横浜）2000。

9. 深尾繁治、遠山育夫、相見良成、安原 治、木村 宏：ラット上頸神経節脳内移植後のコリンアセチル基転移酵素含有神経の免疫組織化学的研究。第15回神経組織の成長、再生、移植研究会学術集会（岡山）、2000。
10. 中島恭二、遠山育夫、相見良成、安原 治、木村 宏：ラット腸管神経系における末梢型コリン合成酵素の免疫組織化学的検討。第23回日本神経科学大会（横浜）2000。
11. 松尾明典、金山秀彦、相見良成、安原 治、遠山育夫、岡部英俊、木村 宏：隆起乳頭体核にコリン作動性ニューロンが存在する。第23回日本神経科学大会（横浜）2000。
12. 佐藤晴久、安原 治、遠山育夫：アルツハイマー病と非神経疾患対照例の側頭葉固定薄切標本を用いたタウ遺伝子の選択的スプライシングの解析。第41回日本神経学会総会（松本）2000。
13. 遠山育夫、安原 治、鹿毛真人、秋口一郎、松本禎之：運動ニューロン疾患の脊髄における酸性線維芽細胞成長因子(aFGF)について。第41回日本神経学会総会（松本）2000。
14. 安原 治、遠山育夫、相見良成、ジャンピエール・ベリエ、木村 宏：ラット虹彩におけるコリン神経支配：末梢型アセチルコリン合成酵素を用いた検討。第41回日本組織細胞化学会総会（高知）2000。
15. 相見良成、二宮孝文、遠山育夫、安原 治、木村 宏：培養後根神経節におけるアセチルコリン合成能の証明。第106回日本解剖学会総会（高知）2001（予定）。
16. 松尾明典、安原 治、遠山育夫、岡部英俊、木村 宏：コリンアセチル基転移酵素のスプライス・バリエント pChAT の脳内分布。第42回日本神経学会総会（東京）2001（予定）。

研究成果概要

本研究代表者らは、「神経細胞 mRNA の選択的スプライシングの解析とその人工制御法の確立」のため、平成10年度文部省科学研究費補助金 (B) をうけ、研究期間の3年間に以下の成果を挙げた。

1. 神経細胞 mRNA の選択的スプライシングの解析

(1) タウタンパク：タウタンパクには選択的スプライシングによりチュブリン結合ドメインがそれぞれ3個または4個の3リピートタウと4リピートタウがあり、微小管重合促進能に差がある。固定薄切切片からの mRNA 解析によって、ヒトの非神経疾患の脳皮質では3リピートタウが主体であるのに対し、アルツハイマー病脳皮質では4リピートタウの比率が上昇することを明らかにした (口答発表12)。

(2) コリンアセチル基転移酵素 (ChAT)：最近、本研究者らはアセチルコリンの合成酵素であるコリンアセチル基転移酵素 (ChAT) に選択的スプライシングによる亜型が存在することを明らかにし、この亜型(pChAT)に対する特異抗体を作製した。この抗体を用いてラットの全身の神経系を免疫組織化学的に検討したところ、pChAT は末梢のコリン神経に優位に発現していることが判明した。特に末梢臓器として喉頭、腸管、虹彩を詳細に検討したところ、従来の ChAT 抗体では検出出来なかった副交感神経が鮮やかに描出された。また、従来、コリン作動性と考えられていなかった一次感覚神経系においても pChAT 陽性細胞を認め、コリン作動性一次感覚神経系の存在を示唆した。さらに、pChAT 陽性神経は中枢神経系にも存在することを明らかにした。すなわち、網膜神経節細胞と一部の視床下部ニューロンである。これら新しく同定された pChAT 陽性神経含有組織について RT-PCR 解析を行い、pChAT 型 mRNA の発現を確認した。以上の成果は従来のわれわれのコリン神経の理解に対して見直しを迫るものであると言える (口答発表1、2、4、5、8、9、10、11、14、15、16、論文発表3、5、および数篇投稿準備中)。

2. 神経細胞 mRNA の選択的スプライシングの人工制御

上記のデータをもとに、ラット網膜を対象として ChAT を pChAT へ人工的に変換する方法の確立を試みた。網膜における ChAT の発現を対象に選んだ理由は、(1) 網膜へのアプローチが容易であること、(2) pChAT 抗体を保有しているため、ChAT から pChAT への分子変換が比較的容易に検出可能であると考えられること、(3) 上記解析によって、アマクリン細胞が ChAT を含有し、神経節細胞が pChAT を含有することが明らかとなり、2種類の細胞による ChAT 分子種の使い分けが明らかとなったこと、などである。pChAT 型 mRNA は ChAT mRNA のエクソン6-9を欠如する。したがって、

第5イントロンと第6エクソン接合部 (I5-E6 接合部)、I6-E7 接合部、I7-E8 接合部、I8-E9 接合部に対して、それぞれ20塩基のホスホロチオエート・アンチセンスオリゴヌクレオチド (S-アンチセンスオリゴ) を作製し、ラットの眼球内に投与した。このうち、I7-E8 接合部に対する S-アンチセンスオリゴによって、一部のアマクリン細胞が pChAT 陽性となり、RT-PCR によっても pChAT 型 mRNA の発現亢進の可能性が示唆された。以上の所見はスプライシング変換に対する S-アンチセンスオリゴの有用性を示唆するものであるが、通常型の ChAT の発現は免疫組織化学的にも RT-PCR でも殆ど変化が認められず、今後精密な定量的解析が必要である。

3. 今後の展望

pChAT の発見は従来のコリン神経に対するわれわれの理解に新しい知見をもたらした。今後は pChAT の酵素学的特性を明らかにすると共にジーンターゲティングなどの方法により、pChAT の機能的意義を明らかにしていきたい。さらに、S-アンチセンスオリゴを用いたスプライシング変換法は、今回、その可能性を示唆することが出来たとは言え、未だ有用性を示すには至っていない。今後さらに技術的改変の積み重ねが必要である。