

一次視覚路におけるアセチルコリン神経の 証明と機能解析

(課題番号 13671831)

平成13年～平成14年度科学研究費補助金

(基盤研究(C)(2))

研究成果報告書

平成15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)

一次視覚路におけるアセチルコリン神経の証明と機能解析

(課題番号 13671831)

平成13年～平成14年度科学研究費補助金

基盤研究 (C) (2)

研究成果報告書

平成15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



2002018587

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)

(2) 研究経費

平成 13 年度 1,300 千円

平成 14 年度 1,300 千円

計 2,600 千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Tooyama, I., Sato, H., Yasuhara, O., Kimura, H., Konishi, Y., Shen, Y., Walker, D.G., Beach, T.G., Sue, L.I., and Rogers, J., Correlation of the expression level of C1q mRNA and the number of C1q-positive plaques in the Alzheimer disease temporal cortex. Analysis of C1q mRNA and its protein using adjacent or nearby sections. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 12 (2001) 237-242.
2. Kimura, H., Aimi, Y., Minnasch, P., Yasuhara, O., Bellier, J.-P., Tooyama, I., Molecular mechanism in Alzheimer's disease. *Research in Legal Medicine*, 27 (2002) 161-174.
3. Tooyama, I., Bellier, J.-P., Park, M., Minnasch, P., Uemura, S., Hisano, T., Iwami, M., Aimi, Y., Yasuhara, O., Kimura, H., Morphologic study of neuronal death, glial activation, and progenitor cell division in the hippocampus of rat models of epilepsy. *Epilepsia* 43 (Suppl. 9) (2002) 39-43.
4. Kanayama, H., Yasuhara, O., Matsuo, A., Tooyama, I., Aimi, Y., Bellier, J.-P., Nagy, J.I., Fukui, K., and Kimura, H., Expression of a splice variant of choline acetyltransferase in magnocellular neurons of the tuberomammillary nucleus of rat. *Neuroscience* 118 (2003) 243-251.
5. Yasuhara, O., Tooyama, I., Aimi, Y., Bellier, J.-P., Hisano, T., Matsuo, A., Park, M., and Kimura, H., Demonstration of cholinergic ganglion cells in rat retina: expression of an alternative splice variant of choline acetyltransferase. *J. Neurosci* 23 (2003) 2872-2881.

(2) 口答発表

1. Yasuhara, O., A new insight into the central cholinergic system. The 3rd International Symposium of Molecular Neuroscience Research Center, Otsu, 2001. (Symposium)
2. Ninomiya, T., Morimoto, K., Watanabe, T., Yasuhara, O., Kimura, H., Suwaki, H., Do seizure-induced neurogenesis and neuron loss depend upon NMDA receptor activation in the kainate model of temporal lobe epilepsy? 4th Asian and Oceanian Epilepsy Congress (AOEC), Karuizawa, Japan, 2002.
3. Morita, H., Yasuhara, O., Aimi, Y., Tooyama, I., Mori, N., Kimura, H., Neuronal IgG uptake precedes hippocampal cell damage in the rat kainate model of epilepsy. 4th Asian and Oceanian Epilepsy Congress (AOEC), Karuizawa, Japan, 2002.
4. Aimi, Y., Nakajima, K., Bellier, J.-P., 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. 3rd International Society for Autonomic Neuroscience, Calgary, Canada, 2003 (発表予定)
5. Bellier, J.-P., Aimi, Y., Park, M., Elnasharty, M., Minnasch, P., Hisano, T., Matsuo, A., Yasuhara, O., Tooyama, I., Kimura, H., Purification of pChAT, a novel splice variant of choline acetyltransferase, from porcine intestine. 3rd International Society for Autonomic Neuroscience, Calgary, Canada, 2003 (発表予定)
6. Aimi, Y., Nakajima, K., Bellier, J.-P., 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, Banff, Canada, 2003 (発表予定)
7. Kanayama, H., Yasuhara, O., Matsuo, A., Tooyama, I., Aimi, Y., Bellier, J.-P., Nagy, J.I., 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, Prague, Czech 2003 (発表予定)
8. 安原 治、遠山育夫、相見良成、松尾明典、金山秀彦、木村 宏：選択

的スプライシングによる脳内アセチルコリン合成酵素の多様性。第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会（京都）2001、シンポジウム

9. Tooyama, I., Aimi, Y., Yasuhara, O., Kimura, H., Choline acetyltransferase of peripheral type: structure, function and localization. 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会（京都）2001、シンポジウム
10. 青木裕明、安原 治、森川茂広、犬伏俊郎、木村 宏：MRI を用いた新規脳保護薬 NS-7 の脳梗塞抑制作用に関する検討。第13回日本脳循環代謝学会総会（横浜）2001、一般
11. 朴真紗美、安原 治、木村 宏：ラット眼組織における末梢型アセチルコリン合成酵素の局在。第77回日本解剖学会近畿支部学術集会（高槻）2001、一般
12. 遠山育夫、安原 治、木村 宏、Patrick L. McGeer：アルツハイマー病大脳皮質における bFGF (FGF-2) のサブタイプについて。第20回日本痴呆学会 一般
13. 松尾明典、金山秀彦、相見良成、安原 治、遠山育夫、木村 宏：コリンアセチル基転移酵素のスプライス・バリエーション pChAT のラット脳内分布。第78回日本解剖学会近畿支部学術集会（京都）2002、一般
14. ベリエ・ジャンピエール、相見良成、朴真紗美、久野 正、ミナシュ・ペトラ、松尾明典、安原 治、遠山育夫、木村 宏：新規アセチルコリン合成酵素 pChAT の生化学的特性と部分精製。第25回日本神経科学・第45回日本神経化学合同大会（札幌）2002、一般
15. 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：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（名古屋）2003、一般（発表予定）
16. 久野 正、遠山育夫、豊田健一郎、ベリエ・ジャンピエール、相見良成、安原 治、木村 宏：ラット翼口蓋神経節からの新しいコリンアセチル基転移酵素バリエーション(pChAT2) のクローニング。第26回日本神経科学大会（名古屋）2003、一般（発表予定）

研究成果概要

本研究代表者は、「一次視覚路におけるアセチルコリン神経の証明と機能解析」（課題番号 13671831）のため、平成13年度科学研究費補助金（C）をうけ、研究期間の2年間に以下の成果を挙げた。

研究の背景：

末梢型コリンアセチル基転移酵素(pChAT)は、翼口蓋神経節から同定されたコリンアセチル基転移酵素(ChAT)の新規スプライスバリエントで、ChAT 遺伝子のエクソン 6-9 を欠いている。フレームシフトはなく酵素活性に重要な領域はすべて保存されている。pChAT 抗体を作製しこの抗体を用いて免疫染色をしてみると、脳のコリン神経はほとんど検出されず、翼口蓋神経節や腸管神経節などで末梢のコリン神経と思われる細胞体や神経線維が検出された。以上の結果は pChAT が末梢優位に発現することを示唆しているが、本研究では中枢神経系における pChAT 発現神経細胞集団の分布を明らかにし新しいコリン神経系の存在を示唆した。

1. コリン作動性・網膜神経節細胞の証明

網膜においては、アマクリン細胞がコリン作動性であることがほぼ確立している。一方、網膜神経節細胞は一般にコリン作動性とは考えられていない。今回、pChAT 免疫組織化学によってラット網膜に pChAT 陽性の神経節細胞が分布することが明らかとなった。さらに、逆行性トレーサーとの2重標識、ウェスタン・プロット法、RT-PCR 法、網膜と視神経を用いた ChAT 酵素活性測定等により、一部の網膜神経節細胞がコリン作動性であることを、形態学的・生化学的に証明した。pChAT の発現は明暗の条件によって変化した。したがって、一次視覚情報の伝達においてコリン作動性のメカニズムが何らかの生理的役割を果たすことが示唆された（学会誌発表 5、口頭発表 1, 8, 11）。

2. 虹彩のコリン神経支配

pChAT を指標にして虹彩のコリン神経支配について検討した。虹彩の pChAT 陽性線維は、（1）毛様体神経節由来の副交感神経節後線維と（2）三叉神経節由来の感覚神経線維から成ることが明かとなり、コリン作動性一次感覚神経系の存在を示唆した（投稿準備中、口頭発表 1, 8, 11）。

3. ラット視床下部・隆起乳頭体核における pChAT の局在

ラットの後部視床下部・隆起乳頭体核 (TMN) に pChAT 陽性神経細胞が局在することを見出し報告した。TMN 神経はヒスタミンやアデノシンデアミナーゼ(ADA)を含有し脳内に広く投射して、覚醒や学習などの高次機能に関わっていることが知られている。本研究では、ヒスタミン合成酵素 HDC やアデノシンデアミナーゼ ADA との2重染色により pChAT 陽性細胞の解析を行うとともに、逆行性トレーサーとの2重標識により、これら pChAT 陽性神経の脳皮質への投射を明らかにした。また、RT-PCR を用いて後部視床下部における pChAT mRNA の発現を確認した。以上の結果は、脳内における新しいコリン投射系の存在を示唆するものとして重要である (学会誌発表 4、口頭発表 1, 8, 11, 13)。