

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390051

研究課題名（和文）ヒト末梢型コリン神経系の機能形態学的研究

研究課題名（英文）Functional morphologic study of the peripheral cholinergic nervous system in human.

研究代表者

木村 宏 (KIMURA HIROSHI)

滋賀医科大学・名誉教授

研究者番号：40079736

研究成果の概要（和文）：神経伝達物質の一つアセチルコリンの合成酵素には cChAT と pChAT の 2 種があり、pChAT は実験動物では末梢コリン神経系の他、神経堤由来の神経細胞（第一次感覚神経・交感神経節後神経・腸管壁内神経）に分布することを証明してきた。本研究は、ヒトにも pChAT が存在するかを検証することを目的とし、タンパク精製と抗体作成を行った結果、ヒト pChAT 含有神経細胞を初めて形態学的に立証することに成功した。

研究成果の概要（英文）：We have previously demonstrated that the neurotransmitter acetylcholine is synthesized by two enzymes, cChAT and pChAT. The pChAT occurs not only in peripheral cholinergic neurons but also in neuronal crest derived neurons (primary sensory, postganglionic sympathetic and intramural enteric neurons) of experimental animals. The present study aims at examining whether pChAT is also present in humans. Using protein purification and antibody production methods, we have firstly succeeded to visualize neurons containing human pChAT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	8,900,000	2,670,000	11,570,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：解剖学一般（含組織学・発生学）6901・S（細胞組織化学）

キーワード：末梢型コリンアセチル基転移酵素、アセチルコリン、腸管神経系、アミノ酸配列、抗体作成、免疫組織化学、神経伝達物質

1. 研究開始当初の背景

(1) アセチルコリン (ACh) は最初に同定された化学的神経伝達物質で、無脊椎動物から霊長類にいたる動物界に広汎に分布する神経機能調節のキープレイヤーである。ACh は動物体内の神経細胞でコ

リンアセチル基転移酵素 (ChAT) によってコリンとアセチルCoA から合成されることが明らかとなったのは約 60 年前にさかのぼる。その後、ChAT タンパクの抽出・精製の努力が重ねられ、

精製ChATに対する抗体作成の試みが激しい研究競争のもとに進められた。1978年、本研究者らは、作成に成功したChAT抗体を用いて免疫組織化学と呼ばれる細胞染色法を開発し、その結果、世界に先駆けて哺乳類の脳内ACh含有神経を顕微鏡下に観察することができた。この成功を契機として、各種のChAT抗体が世界各国の研究機関で作成され、ChATタンパク構造分析とその遺伝子解析にとって大きな武器となった。ChATのmRNA遺伝子構造は1990年前半に概ねが明らかにされ、動物種により若干の相違はあるものの、相同とみなされる種類のmRNAから作られるものと考えられるようになった。換言すれば、ChATタンパクは一種類しかないと信じられるようになった訳である。

- (2) しかしながら、本研究者には「ChATタンパクとそのmRNAは一種類しかない」という教義的な見解に対し大きな疑問を感じていた。その理由は、ChAT抗体作成のパイオニアとしての本研究者に対し、世界各国で作られた各種ChAT抗体の正当性検証の依頼があり、比較検討する機会を得たことに基づくものである。筆者が正当と判定した抗体は、いずれも中枢（脳と脊髄）神経系のACh神経を明瞭に認識（染色）することができた。しかし、本研究者が作成したものを含め、いずれの抗体も、生理学的薬理的にACh神経が高密度に分布するとされる腸管壁内神経叢の細胞を明瞭に染めることはできなかった。また、ウエスタンブロット法というタンパク分子量の目安をつかむ技術で検査しても、約64kDaとほぼ相同と思われるタンパクが中枢にはあるが、腸管など末梢には極め

て少ないかほとんどなかった。このため、「ChATは一種のみ」ではなく、末梢(periphery)に特有な化学構造の異なるChATすなわち「pChAT」が存在するのではないかという作業仮説を立てた。

- (3) 上記の仮説をもとに、末梢ACh神経細胞だけが密集するラット翼口蓋神経節の遺伝子解析を試みた。pChATが存在するとしても、既知のChATとは何らかの近縁関係にあるのではと考え、ChAT・mRNA配列のうち何種類もの上流プライマーと下流プライマーを鋳型としてランダムに組み合わせ、逆転写ポリメラーゼ鎖反応(RT-PCR)を行った。その結果、cChAT抗体で多くの神経細胞が染まる脳線条体には存在せず、翼口蓋神経節には存在するPCR増幅mRNAが、唯一の組合せプライマーで検出された。この組合せプライマーの構造から、翼口蓋神経節に特異的なmRNAはChATゲノムのうち4つのエクソン(4から9)が欠けた構造であることが分かった。この構造はオルタナティブスプライシングによって生成したもので、エクソン5の3'端とエクソン10の5'端が部分的に結合したものであることが判明した。
- (4) 判明したpChAT・mRNAの構造をもとに、pChATに特異的な組換えペプチドを製造し、このペプチドでウサギを免疫しpChAT抗体を入手した。このpChAT抗体を用いてラット神経系を免疫組織化学で染色したところ、翼口蓋神経節はもちろん腸管神経系など末梢ACh神経細胞があるとされる組織や臓器に豊富な陽性細胞が観察されたが、脳線条体には陽性反応は皆無であった。この

分子神経科学的な知見を論文公表し、引き続き各種の哺乳類についても検索した。マウス・モルモット・イヌ・ネコ・ウシ・ブタなど調べた哺乳動物において例外なく、pChAT陽性の神経細胞が末梢ACh神経組織に存在することが確認された。また、既知のACh神経ばかりではなく、従来はACh神経細胞がないとされた第一次感覚神経細胞や交感神経節後神経細胞にも豊富な陽性細胞が認められた。これら2種の組織は腸管神経叢と同様、神経発生の際に神経堤から作られるという共通性がある。

2. 研究の目的

- (1) 以上のような事実をもとに考察を進めると、ACh神経には2種あり、一定の機能分担によって生体制御のキープレイヤーとして活躍するのではという、全く新しい神経機序の可能性が浮かんでくる。
- (2) しかし残念なことに、上述のように作成したラットpChATに対する抗体ではヒト末梢組織を染めることができなかった。このため、ヒトにおいてpChATが本当に機能しているかなど医学的な有用性を論じるには決定的な不備があった。従って、本研究ではヒトpChATの存否を検証することを最大の目標とした。
- (3) もし、ヒトpChATの存在が確認されれば、そのタンパク構造の特徴を把握し、ヒトpChATを特異的に認識する抗体の作成に挑戦することを究極の目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 本研究の遂行にはヒト組織を材料にするのが必須である。そこで、本研究者

が所属する大学医学部の病理剖検組織（小腸と大腸の一部、および脊髄神経節）を遺族の許可を得て入手した。また、産科で得られた胎盤（廃棄処分の組織）を入手した。

- (2) ヒト組織をすり潰し、遠心器で分離した上清を硫酸分画（35-45%）したものを出発材料とし、イオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを用い、ChAT活性（ACh産生能）を指標として分離精製した。ラットの場合、pChATはcChATに比べChAT活性が1/100程度であることを参考にし、高活性のタンパクを排除することで、精製を進めるという手法をとった。このため、通常ChAT活性測定方法を改良し、高感度測定法を開発した。
- (3) pChAT純品という完全精製には至らなかったが、約1万倍の精製品を100 μ gほど入手できた。上記3種材料のうち、腸管が最良の部分精製品を得るのに適していることが分かった。
- (4) この部分精製品をマウスに注射し、ポリクローナル抗血清を作成した。この抗血清を用いて、ヒトpChATに特異的な免疫認識エピトープの推定を試み、候補となる数種類のオリゴペプチドを人工合成した。
- (5) 人工合成オリゴペプチドを抗原として別のマウスを免疫し、モノクローナル抗体の作成を行った。得られたモノクローナル抗体は、免疫組織化学には無力であったが、ウエスタンブロットには有効で、ヒトpChATの分子量の推定とヒトpChAT特異的エピトープの絞込みに活用できた。

- (6) さらに大量の抗血清を作成するため、最優秀なオリゴペプチドを抗原としてウサギを免疫し、pChAT抗体を作成した。

4. 研究成果

- (1) ヒト腸管を材料にしてpChATタンパクを部分精製した。この精製品をウエスタンブロットで分析した結果、分子量は約50kDaで、ラットpChATの分子量に近似していた。このデータから、ヒトpChATもラットの場合と同様にmRNAの選択的スプライシングによって製造されたものと推測された。
- (2) この選択的スプライシングがラットと同じく、エクソン6からエクソン9に至る一連の配列がスキップされた可能性が考えられた。この可能性をもとに、ヒトChATゲノムの配列を参考に、ヒトpChAT・mRNAの構造を推定し、ヒトpChATに特異的なエピトープ候補を選出し、数種のオリゴペプチドを人工合成した。
- (3) この作業と平行して、ヒトpChATタンパクの部分精製品を抗原として、マウスを免疫しポリクローナル抗血清を作成した。この抗血清を免疫組織化学に適用し、ヒト腸管を染色したところ、陽性神経細胞が豊富に観察され、ヒトpChATが存在するという可能性が高まった。
- (4) ヒトpChATタンパクの構造をさらに深く把握するため、上述した数種のオリゴペプチドとヒトpChATに対するマウス抗血清との反応性を検討した。驚いたことに、いずれのオリゴペプチドも抗血清とは反応しなかった。この謎を解くのに約半年ほどが費やさ

れたが、試行錯誤の結果、ヒトpChATタンパクはラットpChATタンパクとは異なり、ループ状の立体構造をもつのではないかという仮説にたどりついた。この仮説をもとに、ループ形成で新たに作られるアミノ酸配列を推論し、6種類の候補オリゴペプチドを人工合成した。このうち1種類のオリゴペプチドがマウス抗血清によって強く認識されることが判明したが、残りのオリゴペプチドは全く反応しなかった。

- (5) ヒト腸管から得られたpChAT部分精製品に対するマウスモノクローナル抗体は、ヒト腸管を免疫組織化学的に検出する能力は低かったものの、上記のループ形成によるオリゴペプチドとは強く反応した。この事実から、ヒトにはアミノ酸配列がループ形成したpChATタンパクが存在する可能性が更に高まった。
- (6) ヒトpChATに対するマウス抗血清を用い、ヒト腸管の粗精製標品を材料として免疫沈降法による解析を行った。その結果、ヒトpChAT抗体が結合する腸管由来タンパクが低レベルながらもChAT活性、すなわちACh産生能を持つことが証明できた。この結果、ヒトpChATが確かに存在することが立証された。
- (7) マウスで作った抗血清の量は少なく、モノクローナル抗体は免疫組織化学には適していないため、もっと大量の抗血清を入手できるウサギを免疫することを試み続けている。この報告書を作成している現在、ウサギの抗体価は徐々に高まりつつあり、世界中の研究者仲間に配布できる準備が整いつつあ

- る。
- (8) 今後の課題として、ヒト pChAT タンパクについてその立体構造の全貌を明らかにすることが重要である。その詳細が明らかになれば、cChAT と pChAT がどのように 2 種の ACh 神経において役割分担をし、両者で総合的な神経統御に貢献しているのかを理解できると考えられる。
- (9) 結論として、本研究で目標とした命題、すなわち、ヒトにも pChAT が存在することが証明され、さらにヒト特異的な pChAT 抗体の作成も達成できたといえる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Bellier JP, Kimura H, Peripheral type of choline acetyltransferase: Biological and evolutionary implications for novel mechanisms in cholinergic system. J Chem Neuroanat. 2011、査読有
- ② D'Este L, Casini A, Kimura S, Bellier JP, Ito E, Kimura H, Renda TG. Immunohistochemical demonstration of cholinergic structures in central ganglia of the slug (*Limax maximus*, *Limax valentianus*). Neurochem Int. Vol. 58(5), 605-611, 2011, 査読有
- ③ Casini A, Vivacqua G, Pontieri FE, Kimura H, Bellier JP, D'Este L, Renda TG, Choline acetyltransferase of the common type immunoreactivity in the rat brain following different heroin treatments: a pilot study, J Chem

Neuroanat, Vol. 41(2), 111-121, 2011, 査読有

- ④ Matsuo A, Bellier JP, Nishimura M, Yasuhara O, Saito N, Kimura H, Nuclear choline acetyltransferase activates transcription of a high-affinity choline transporter, J Biol Chem, Vol. 286(7), 5836-5845, 2011, 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 宏 (KIMURA HIROSHI)

滋賀医科大学・名誉教授

研究者番号：40079736