
非放射性標識オリゴDNAプローブの自動合成システム開発

(0 3 5 5 7 0 0 1)

平成4年度科学研究費補助金 (試験研究(B)・(1)) 研究成果報告書

平成5年3月

研究代表者 木 村 宏

〔 滋賀医科大学
分子神経生物学研究センター
教 授 〕



研究組織

研究代表者： 木村 宏（滋賀医科大学・分子神経生物学研究センター・教授）

研究分担者： 遠山育夫（滋賀医科大学・分子神経生物学研究センター・助手）

研究経費

平成3年度 14,800千円

平成4年度 800千円

計 15,600千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Yamada, T., Kimura, H.
Regional effects of ceruletide, a cholecystokinin-8 analog, on the striatal monoaminergic systems in flld-deprived mice.
Brain Res. 540, 25-30 (1991)
2. Tooyama, I., Akiyama, H., McGeer, P.L., Hara, Y., Yasuhara, O., Kimura, H.
Acidic fibroblast growth factor-like immunoreactivity in brain of Alzheimer patients.
Neurosci. Lett. 121, 155-158 (1991)
3. Ding, W.G., Fujimura, M., Tooyama, I., Kimura, H.
Phylogenetic study of serotonin-immunoreactive structures in the pancreas of various vertebrates.
Cell Tissue Res. 263, 237-243 (1991)
4. Tooyama, I., Hara, Y., Yasuhara, O., Oomura, Y., Sasaki, K., Muto, T., Suzuki, K., Hanai, K., Kimura, H.
Production of antisera to acidic fibroblast growth factor and their application to immunohistochemical study in rat brain.
Neuroscience 40, 769-779 (1991)
5. Yamada, T., Hirayama, K., Kimura, H.
Differential responses of noradrenaline and dopamine neurons in the mouse forebrain induced by continuous parenteral infusion of haloperidol.
Eur Neurol 21, 28-33 (1991)
6. Fujimiya, M., Maeda, T., Kimura, H.
Serotonin-containing epithelial cells in rat duodenum I. Quantitative study of the distribution density.
Histochemistry. 95, 217-224 (1991)
7. Fujimiya, M., Maeda, T., Kimura, H.
Serotonin-containing epithelial cells in rat duodenum II. Quantitative study of the effect of 5HTP administration.
Histochemistry. 95, 225-229 (1991)
8. Araki, M., Kimura, H.
GABA-like immunoreactivity in the developing chick retina: differentiation of GABAergic horizontal cell and its possible contacts with photoreceptors.
J. Neurocytol. 20, 345-355 (1991)
9. Uehara-Kunugi, Y., Terai, K., Taniguchi, T., Tooyama, I., Kimura, H.
Time course of in vitro expression of NADPH-diahorase in cultured rat brain neurons: comparison with in vivo expression.
Devel. Brain Res. 59, 157-162 (1991)
10. Uemura, S., Ienaga, K., Higashiura, K., Kimura, H.
Effects of intraamygdaloid injection of taurine and valyltaurine on amygdaloid kindled seizure in rats.
Jpn. J. Psychiat. Neurol. 45, 383-385 (1991)
11. Nakamura, S., Kawamata, T., Yasuhara, O., Akiguchi, I., Kimura, J., Kimura, H.
The histochemical demonstration of monoamine oxidase-containing neuron in the human hypothalamus.
Neuroscience 44, 457-463 (1991)

12. Yasuhara, O., Tooyama, I., Akiyama, H., Akiguchi, I., Kimura, J., McGeer, P. L., Hara, Y., Kimura, H.
Reactive astrocytes express acidic fibroblast growth factor in Alzheimer's disease brain.
Dementia 2, 64-70 (1991)
13. Fujimiya, M., Kimura, H.
Effect of lateral hypothalamic area lesions on serotonin-containing epithelial cells in rat duodenum.
Brain Res. Bull. 27, 521-528 (1991)
14. Ding, W. G., Fujimura, M., Mori, A., Tooyama, I., Kimura, H.
Light and electron microscopy of neuropeptide Y-containing nerves in human liver, gallbladder, and pancreas.
Gastroenterology. 101, 1054-1059 (1991)
15. Aimi, Y., Fujimura, M., Vincent, S. R., Kimura, H.
Localization of NADPH-diaphorase-containing neurons in sensory ganglia of the rat.
J. Comparative Neurology. 306, 382-392 (1991)
16. Maeda, T., Kojima, R., Arai, R., Fujimiya, M., Kimura, H., Kitahama, K., Geffard, M.
Monoaminergic interaction in the central nervous system: a morphological analysis in the locus coeruleus of the rat.
Comp. Biochem. Physiol. 98C, 193-202 (1991)
17. Sasaki, K., Oomura, Y., Suzuki, K., Muto, T., Hanai, K., Tooyama, I., Kimura, H., Yanaigara, N.
Effect of fibro growth factor and platelet-derived growth factor on food intake in rats.
Brain Res. Bull. 27, 327-332 (1991)
18. Nakayasu, H., Mizutani, H., Hanai, K., Kimura, H., Kuriyama, K.
Monoclonal antibody to GABA binding protein, a possible GABA_B receptor
Biochem. Biophysical Res. Communications. 184, 722-726 (1992)
19. Tanaka, H., Mori, S., Kimura, H.
Developmental changes in the serotonergic innervation of hindlimb extensor motoneurons in neonatal rats.
Devel. Brain Res. 65, 1-12 (1992)
20. Vincent, S. V., Kimura, H.
Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain.
Neuroscience 46, 755-784 (1992)
21. Oomura, Y., Sasaki, K., Hanai, K., Tooyama, I., Kimura, H., Yanaigara, N.
A New brain glucosensor and its physiological significance.
Am. J. Clin. Nutr. 55, 278S-282S (1992)
22. Kimura, H.
Acidic fibroblast growth factor-like immunoreactivity in brain of Alzheimer patients.
Molecular Basis of Neuronal Connectivity. 104-106 (1992)
23. Yamamoto, A., Ienaga, K., Nakamura, K., Nishimura, N., Higashiura, Y., Kurimoto, Y., Inoue, A., Kimura, H.
First isolation of γ -1-glutamyl- γ -aminobutyric acid from bovine brains.
Neuroreport 3, 330-332 (1992)

24. Okamura, T., Aimi, Y., Kimura, H., Murakami, K., Toda, N.
Existence of renin in the endothelium of human artery.
Hypertension. 10, 49-53 (1992)
25. McGeer, P.L., Harada, N., Kimura, H., McGeer, E.G., Schulzer, M.
Prevalence of dementia amongst elderly Japanese with leprosy: apparent effect of chronic drug therapy.
Dementia 3, 146-149 (1992)
26. Abe, H., Tooyama, I., Renda, T., Erspamer, V., Kimura, H.
Production of antiserum to [D-Ala²]deltorphin 1 and its immunohistochemical application to the mouse brain.
NeuroReport 3, 669-672 (1992)
27. Kuriyama, K., Nakayasu, H., Mizutani, H., Hanai, K., Kimura, H.
Structure and function of GABA_B receptor in bovine cerebral cortex: analysis using the purified receptor and monoclonal antibody.
Pharmacology Comm. 2, 15-19 (1992)
28. Yamada, S., Kimura, H., Fujimaki, A., Strohman, R.
Expression of fibroblast growth factors in exercise-induced muscle hypertrophy with special reference to the role of muscle satellite cells.
Med. Sport Sci. 37, 67-83 (1992)
29. Fujimiya, M., McIntosh, C.H.S., Kimura, H., Kwok, Y.N.
Effect of carbachol on luminal release of somatostatin from isolated perfused rat duodenum.
Neurosci. Lett. 145, 229-233 (1992)
30. Tooyama, I., Walker, D., Yamada, T., Hanai, K., Kimura, H., McGeer, E.G., McGeer, P.L.
High molecular weight basic fibroblast growth factor-like protein is localized to a subpopulation of mesencephalic dopaminergic neurons in the rat brain.
Brain Res. 593, 274-280 (1992)
31. Uemura, S., Ienaga, K., Higashiura, K., Kimura, H.
 γ -glutamyltaurine has potent and long-lasting antiepileptic action as demonstrated by intra-amygdaloid injection in amygdala-kindled rats.
Brain Res. 594, 347-350 (1992)
32. Tago, H., Maeda, T., McGeer, P.L., Kimura, H.
Butyrylcholinesterase-rich neurons in rat brain demonstrated by a sensitive histochemical method.
J. Comp. Neurol. 325, 301-312 (1992)

(2) 口頭発表

1. 丁 維光、藤村昌樹、宮崎 信、平野正満、山本 明、森 渥視、
相見良成、木村 宏
障害肝におけるタウリンおよびNPY免疫活性の分布様式について
第13回 Gut Hormone カンファレンス
07/18-19 1991
2. 木下 隆、南 義彦、藤村昌樹、相見良成、木村 宏
ラット消化管におけるシトルリンの免疫組織化学
第13回 Gut Hormone カンファレンス
07/18-19 1991
3. 南 義彦、木下 隆、藤村昌樹、相見良成、木村 宏
消化管のNADPHジアホラーゼ含有神経はNO関連神経か？
第13回 Gut Hormone カンファレンス
07/18-19 1991
4. 宮崎 信、藤村昌樹、藤宮峯子、木村 宏
単離回腸灌流装置を用いたラット腸管PYY分泌の神経性制御に関する研究
第13回 Gut Hormone カンファレンス
07/18-19 1991
5. M Miyazaki, M Fujimura, WG Ding, H Kimura
Immunohistochemical crossreactivity of anti-PYY antisera
correlated with the immunospot test but not with radioimmunoassay
The 8th international symposium on gastrointestinal hormones
(Federal Republic of Germany)
1991
6. S Yamada¹, Y Nonomura¹, Y Atomil¹, A Fujimaki², I Tooyama³, K Hanai
H Kimura.
Localization of FGFS in the hypertrophied muscle of normal rat and
the hypertrophied muscle of MDX mouse
3rd International congress of comparative physiology and biochemis-
try (Tokyo)
1991
7. I Tooyama, O Yasuhara, A Matsuo, K Hanai, M Isobe, Y Oomura,
PL McGeer, H Kamao, H Kimura
Immunohistochemical study of fibroblast growth factor receptor in
brains of the rat and human
21st Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans, USA)
1991
8. I Tooyama, K Hanai, H Kimura, M Iwane, K Igarashi, EG McGeer,
PL McGeer
Basic fibroblast growth factor in substantia nigra dopaminergic ne-
urons in Parkinson disease.
1st IUBMB Conference, Biochemistry of Disease, (Nagoya, Japan)
1991
9. 相見良成、木村 宏、南 義彦、木下 隆、藤村昌樹
ラット消化管における一酸化窒素(NO)関連神経の組織化学
第78回日本消化器病学会総会
04/08-10 1992

- 1 0. 南 義彦、藤村昌樹、木下 隆、相見良成、木村 宏
副交感神経節および消化管神経叢におけるVIPとNADPHジアホラーゼの共存
第14回 Gut Hormone カンファレンス
07/30-31 1992
- 1 1. 丁 維光、北里 宏、藤村昌樹、木村 宏
膵臓のCGRP免疫活性について
第14回 Gut Hormone カンファレンス
07/30-31 1992
- 1 2. 宮崎 信、藤宮峯子、前田敏博、藤村昌樹、木村 宏
ラット回腸におけるPYY分泌(血行性および管腔性分泌)
第14回 Gut Hormone カンファレンス
07/30-31 1992
- 1 3. 木下 隆、藤村昌樹、南 義彦、相見良成、木村 宏
マウス胆嚢のNO神経
第14回 Gut Hormone カンファレンス
07/30-31 1992
- 1 4. 南 義彦、藤村昌樹、木下 隆、相見良成、木村 宏
NOとVIPの副交感神経系における共存
日本消化器病学会大会 第34回
10/12-14 1992
- 1 5. 木下 隆、藤村昌樹、南 義彦、相見良成、木村 宏
肝・胆・膵のNADPH・ジアホラーゼ組織化学
日本消化器病学会大会 第34回
10/12-14 1992
- 1 6. 中安博司、木村 宏、栗山欣弥
GABA受容体に対するモノクローナル抗体
第16回日本神経科学会
12/08-10 1992
- 1 7. 藤宮峯子、宮崎信、木村 宏、前田敏博
ラット回腸灌流実験によるPYY分泌の研究
第16回日本神経科学会
12/08-10 1992
- 1 8. 阿部 弘道、遠山育夫、Renda Tindaro、木村 宏
マウス鋤鼻器におけるデルトルフィンI免疫組織化学
第16回日本神経科学会
12/08-10 1992
- 1 9. 中安博司、水谷 宏、栗山欣弥、寺居和宏、花井一光、木村 宏
GABA受容体に特異的なモノクローナル抗体の作製とその性質
第35回日本神経化学会
10/20-22 1992
- 2 0. 花井一光、渡部芳徳、安原 治、遠山育夫、木村 宏
DNA合成器でビオチン標識されたプローブを用いた高感度非放射性 in situ ハイブリダイゼーション法について
第35回日本神経化学会
10/20-22 1992

- 2 1. 遠山育夫、E.G. McGeer、木村 宏
ハンチントン舞踏病における酸性線維芽細胞成長因子の免疫組織化学
第11回日本痴呆学会
11/18 1992
- 2 2. 遠山育夫、阿部 弘道、Tindaro Renda
ラット脳内 [DAla2] デルトルフィン I の免疫組織化学
第68回日本解剖学会近畿地方会
12/5 1992
- 2 3. 阿部 弘道、野々村和男、遠山育夫、木村 宏
ラット網膜における [DAla2] デルトルフィン I の免疫組織化学
第33回日本組織細胞化学会総会
11/25-26 1992
- 2 4. K Hanai, Y Watanabe, O Yasuhara, I Tooyama, H Kimura
High resolution, non-radioactive in situ hybridization
histochemistry with chemically defined biotin probes.
The First Meeting of Asian Pacific Society for Neurochemistry
(Nagoya, Japan)
1992
- 2 5. I Tooyama, H Abe, T Renda, V Erspamer, H Kimura
Immunocytochemical study of [D-Ala2] Deltorphin I in mouse brain
International symposium on substance P and related peptides
1992
- 2 6. I Tooyama, K Hanai, PL McGeer, H Kimura
28 kDa basic fibroblast growth factor-like protein is localized to
a subpopulation of midbrain dopaminergic neurons in the rat brain
The 3rd Korea-Japan Anatomical Joint Meeting (Seoul, Korea)
1992
- 2 7. H Abe, I Tooyama, H Kimura, V Erspamer, T Renda
Localizzazione Immunoistochimica Di Materiale Deltorfinico-simile Ne
ll'Encefalo Di Topo.
46 Convegno Della Societa Italiana Di Anatomia (Genova, Italy)
1992
- 2 8. T Renda, L Negri, C Casu, I Tooyama, P Melchiorri
Studio Autoradiografico Dei Recepttori Per La Deltorfina-I Nell'En
clefalo Di Ratto
46 Convegno Della Societa Italiana Di Anatomia (Genova, Italy)
1992

生体組織切片における遺伝子発現を細胞レベルで顕微鏡下に観察することができるIn situハイブリダイゼーション法は、広汎な医学分野で応用され、遺伝子制御の研究に大きく寄与している。その原理は、目的の遺伝子に特異的な相補的塩基配列をもつ一本鎖核酸を標識しておき、この標識プローブがハイブリッド結合する細胞内核酸を可視化することにある。標識プローブ核酸の作成法として信頼性が高いのは、DNA合成材でオリゴヌクレオチドを調製しその3'末端に標識物質を酵素化学的に結合する方法である。この方式の問題は、①標識物質の結合比率を制御しにくい、②プローブ配列中に標識物質を混入するなどのデザインが困難である、③酵素標識法は非常に高価である、④非放射性標識が環境問題的に望ましい、などである。本研究は、既製DNA合成機の反応原理を更に発展させ、オリゴDNAの合成過程中に標識物質を結合する一貫的な合成システムを開発するのが目的である。このシステム開発が成就すれば、実験目的に応じた異なるプローブを論理的かつ自由にデザインできるので、検出感度の向上や低コスト化が容易に実現されると思われる。

核酸ハイブリダイゼーション法は、染色体上、組織切片上あるいはメンブレン上で特異的な核酸を検出する遺伝子工学的手法の一つであり、その応用範囲は、医学、生物学をはじめとするライフサイエンス全般に極めて広範囲に及んでいる。我々の研究は、このIn situ ハイブリダイゼーション法に必須な標識プローブを、単にコンピューターに配列を入力するのみで研究者の望む通りの形で、論理的に安価に大量に信頼性高く得ることを可能とする装置を提供するものである。即ち、論理的なプローブを得られるという研究上のメリット、自由な標識が可能となることによる研究発展の可能性の拡大、経済的なコストダウン、応用分野の広さなど、この社会的意義は極めて大きいと考えられる。

現在ハイブリダイゼーション法の主流となっている標識合成オリゴヌクレオチドプローブの作製は、1)オリゴヌクレオチドの合成、2)オリゴヌクレオ

チドの標識という2つのステップに分けて行われている。1)については、既に合成装置の実用化が成されており、内外の数社から発売されている。しかし、2)については依然生物酵素を用いた標識を行うのが一般的である。本法は、従来の生物酵素を用いるのではなく、化学反応的に1)と2)のステップを同時に行うところに特色がある。化学反応をコンピューター制御にて行うため一度に大量のオリゴヌクレオチドを標識出来るため、コストを大幅に軽減できる。加えて、自動的に標識物質をオリゴヌクレオチドに組み込むことが出来、自由に目的に応じて標識部位をデザインすることが可能となるなど、従来考えられなかったハイブリダイゼーション技法にも道を開くものと考えられる。

本研究に用いられる標識プローブ合成装置はすでにあるDNA合成装置の一部を改良することにより容易に得ることができる。合成に用いられる標識ヌクレオチドの条件としては、1)安定であること、2)ハイブリダイゼーションの効率を低下させないこと、3)標識物質を高感度に検出する方法があること、であるが、基本的には既に市販されているものであり、これを改良・開発することは容易である。

DNA合成装置(アプライド・バイオシステム社、モデル391)を購入し、世界的に広く使用されている合成法を本試験研究でのシステム開発に応用できるように試みた。本研究センターで確立しているin situハイブリダイゼーションの信頼できるプローブとして、バゾプレッシンcDNAのうち30merのオリゴヌクレオチドを合成し検討材料とした。非放射性標識物質としてビオチンをとりあげた。ビオチンをcDNAに組み入れる原理として、①プロモデオキシウリジンをcDNAに組み込み合成し、その後でビオチン化プロモデオキシウリジン抗体を用いる方法、②フォトアフィニティー標識法によるビオチン化プローブの作成、③ビオチン化ATPまたはビオチン化UTPを用いてプローブをPCR法により標識する手技、④3'末端に活性化第一級アミンを結合す

る方法、⑤ 6 炭素鎖末端にアミンを導入した AH-ビオチン結合法、などを考案または検討した。①と②は自動化システムとしては実用化には不適であり、③はノーザンブロットィングなど化学的研究法にに適するプローブが容易に作製でき、さらに④と⑤は *in situ*ハイブリダイゼーションに最適のプローブが作成可能であるという実験結果を得た。とくに⑤の方法では、市販のビオチン ON という試薬を用いて、3'末端のみならず5'末端あるいはプローブ配列中の任意の核酸と置換できることが判明した。したがって、当初の目的は達成されたといえる。さらに最終年度では *in situ*ハイブリダイゼーションに適した実用的なビオチン導入量比の決定を行い、次いでバゾプレッシン以外のプローブについて応用範囲の広い安定した反応条件を確立することができた。この完成法を用いて、コリンアセチル基転移酵素の証明を行いつつある。