

---

組織特異的な ChAT mRNA スプライス異型発現の  
**in situ FRET** 法による検討

---

(研究課題番号： 14580727)

平成 14 年度～平成 15 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 16 年 3 月

研究代表者 相見 良成

(滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・助手)

組織特異的な **ChAT mRNA** スプライス異型発現の  
**in situ FRET** 法による検討

(研究課題番号： 14580727)

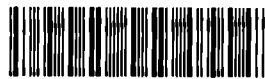
平成 14 年度～平成 15 年度科学研究費補助金

(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成 16 年 3 月

研究代表者 相見 良成  
(滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・助手)

滋賀医科大学附属図書館



2003009178

# 目次

研究組織及び研究経費 .....	2
研究発表 .....	3
学会誌等.....	3
口頭発表.....	5
研究成果 .....	7
研究成果概要.....	7
主要論文.....	10

## 研究組織

研究代表者： 相見 良成

(滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・助手)

研究分担者： 松尾 明典

(滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・助手)

## 研究経費

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14年度	1,700	0	1,700
平成15年度	1,800	0	1,800
総計	3,500	0	3,500

## 研究発表

### (1) 学会誌等

Expression of a splice variant of choline acetyltransferase in magnocellular neurons of the tuberomammillary nucleus of rat.

H. Kanayama, O. Yasuhara, A. Matsuo, I. Tooyama, Y. Aimi, J. P. Bellier, J. I. Nagy, K. Fukui and H. Kimura

*Neuroscience* 118: 243-51 (2003)

Evidence that two forms of choline acetyltransferase are differentially expressed in subclasses of enteric neurons.

R. Chiocchetti, D. P. Poole, H. Kimura, Y. Aimi, H. L. Robbins, P. Castelucci and J. B. Furness

*Cell Tissue Res* 311: 11-22 (2003)

Demonstration of cholinergic ganglion cells in rat retina: expression of an alternative splice variant of choline acetyltransferase.

O. Yasuhara, I. Tooyama, Y. Aimi, J. P. Bellier, T. Hisano, A. Matsuo, M. Park and H. Kimura

*J Neurosci* 23: 2872-81 (2003)

Innervation of rat iris by trigeminal and ciliary neurons expressing pChAT, a novel splice variant of choline acetyltransferase.

O. Yasuhara, Y. Aimi, A. Shibano, A. Matsuo, J. P. Bellier, M. Park, I. Tooyama and H. Kimura

*J Comp Neurol* 472: 232-45 (2004)

消化管の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

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

*消化管運動 印刷中 (2004)*

Localization and origins of choline acetyltransferase of a peripheral type  
(pChAT) immunoreactive nerve fibers in the rat nasal mucosa.

A. Shibano, Y. Aimi, O. Yasuhara, A. Matsuo, J. P. Bellier, I. Tooyama, H.  
Kitano and H. Kimura

*in preparation*

Demonstration of cholinergic neurons in dorsal root ganglia of the rat.

Y. Aimi, J. P. Bellier, A. Matsuo, I. Tooyama, O. Yasuhara and H.

Kimura  
*in preparation*

## (2) 口頭発表

pChAT positive primary afferent neurons in the dorsal root ganglia project to the digestive tract of rats.

Y. Aimi, K. Nakajima, J. P. Bellier, A. Matsuo, O. Yasuhara, I. Tooyama and H. Kimura.

Enteric Nervous System 2003 Banff, CANADA. (2003)

ラット翼口蓋神経節からの新しいコリンアセチル基転位酵素バリエーション(pChAT2)のクローニング.

久野 正, 遠山育夫, 豊田健一郎, ジャン-ピエール・ベリエ, 相見良成, 安原 治, 木村 宏.

第26回神経科学大会 名古屋. (2003)

Purification of pChAT, a novel splice variant of choline acetyltransferase, from porcine intestine.

J. P. Bellier, Y. Aimi, M. Park, M. A. Elnasharty, P. Minnasch, T. Hisano, A. Matsuo, O. Yasuhara, I. Tooyama and H. Kimura.

Enteric Nervous System 2003 Banff, CANADA. (2003)

Purification of pChAT, a novel splice variant of choline acetyltransferase, from porcine small intestine.

J. P. Bellier, Y. Aimi, A. Matsuo, O. Yasuhara, I. Tooyama and H. Kimura.

第46回日本神経化学会 新潟市. (2003)

Cholinergic Nerves in Mammalian Cornea as Demonstrated by pChAT Immunohistochemistry.

M. A. Elnasharty, K. Kawamoto, J. P. Bellier, Y. Aimi, I. Tooyama, O.

Yasuhara and H. Kimura.

第 44 回日本組織細胞化学会 東京. (2003)

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.

相見良成, 中島恭二, ジャン-ピエール・ベリエ, 松尾明典, 安原 治,  
遠山育夫, 木村 宏.

第 26 回神経科学大会 名古屋. (2003)

消化管の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.

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.

第 2 回日本 Neurogastroenterology 学会 大阪. (2003)

Expression of a splice variant of choline acetyltransferase in magnocellular neurons of the tuberomammillary nucleus of rat.

H. Kanayama, O. Yasuhara, A. Matsuo, I. Tooyama, Y. Aimi, J. P. Bellier, J. I. Nagy, K. Fukui and H. Kimura.

6th IBRO World Congress of Neuroscience Prague, CZECH. (2003)



# 研究成果

## 研究成果概要

本研究代表者らは、「組織特異的な ChAT mRNA スプライス異型発現の in situ FRET 法による検討」のため、平成 14 年度・科学研究費補助金・基盤研究 (C) (2) (研究課題番号: 14580727) をうけ、研究期間の 2 年間に以下の成果を挙げた。

## 研究背景

本研究の目的は、我々が新規に見いだしたコリン合成酵素のスプライス異型 (peripheral type of choline acetyltransferase: pChAT) を対象にして mRNA スプライシング異型の局在を弁別検出するため、蛍光共鳴エネルギー転移現象 (Fluorescence Resonance Energy Transfer: FRET) を応用した組織化学法、すなわち「in situ FRET 法」を確立し、組織特異的な ChAT mRNA スプライス異型の発現パターンを形態学的に明らかにすることであった。この目的に沿い、以下の検討を行った。

### 1. 基礎となるデータのタンパク質レベルでの検討

初めに最適の研究材料となる対象臓器の選定のため、いくつかの臓器における pChAT の発現をタンパク質レベル (免疫組織化学法、ウエスタンブロット法) で検討した。その結果、研究に適した組織として (1) 脊髄後根神経節 (pChAT の発現のみを認め他の異型はみられない)、(2) 腸管神経節 (神経節内で pChAT および cChAT が隣接する異なった神経細胞で独立して見られる) の 2 つの神経組織の候補を得た。これらの検討を通じて得られたデータはいくつかの論文として報告した (主要論文参照)。

### 2. 試験管レベルでの pChAT に対する FRET 法の確立

#### 1) ハイブリダイゼーションプローブのデザイン

本研究の目的は単一の遺伝子より生じる mRNA のいくつかのスプライス異型の弁別観察である。従って本研究で FRET に供する 2 つのハイブリダイゼーションプローブの塩基配列は、スプライスにより接合される ChAT mRNA の 2 つのエクソンの接合部の塩基配列により制約を受ける。すなわち接合部から上流のエクソンの 3' 領域と下流のエクソンの 5' 領域に対するプローブを作製する必要がある。通常の in situ hybridization 法におけるプローブの様に塩基配列を自由に選択することは出来ない。そこで手始めに pChAT のスプライス様式であるエクソン 5 と 10 の接合部に対する長さや方向の異なるいくつかのプローブを作製し検討した。上流プローブの 3' 端を FITC で、下流プロー

ブの5'端を LC640 という蛍光色素で標識した。適切な FRET 現象を惹起させるためには両プローブの蛍光標識間の距離が問題になるが、1塩基のギャップでデザインを試みた。デザインの妥当性を評価するための両プローブのハイブリダイズの相手として、クローニングにより得られた pChAT の全長を組み込んだプラスミドを用いた。

## 2) ライトサイクラーによる FRET の確認と定量 PCR

ドットハイブリダイゼーションに蛍光顕微鏡を組み合わせた方法、スペクトロフルオロメーターを用いた方法、定量 PCR 用サーマルサイクラー (ライトサイクラー) を用いる方法などでプローブの検定をおこなった。これらのなかで、ライトサイクラーを用いた方法で FRET 現象が正しく起こっていることが確認できた。従来より知られるエクソンの欠落の無い ChAT mRNA (cChAT) では FRET は生じず、スプライス異型間の分別検出が可能であることが示唆された。さらにプラスミドを用いた場合、FRET 現象の程度はプラスミドの初期量と相関することが判り、試験管レベルでは pChAT の mRNA が定量可能であることが示された。

## 3) 組織内 pChAT 発現の量的評価

そこで次に、タンパク質レベルでの検討から pChAT の発現量が多いと推察された後根神経節(DRG)を対象に、組織中の pChAT mRNA の発現をライトサイクラーを用いて検討した。しかしながら、この結果からは DRG の pChAT mRNA は少量であり、安定した検出が困難であるということが示唆された。当初の研究計画では、初めにこれまでの検討で見いだされた pChAT (6から9エクソンを欠く)、cChAT (欠落エクソンなし)、それにその他の組み合わせでエクソンを欠くスプライス異型、これらのそれぞれに特異的なハイブリダイゼーションプローブを作製し、各スプライス異型の「試験管」レベルでの「分別」検出を試みることにしていた。しかしながら、想定以上に pChAT mRNA の発現量が低いことが判明したため、他の異型との「分別」に先だって、最終目標の形態観察に重点を置いてターゲットを絞り、まずは pChAT の FRET による形態観察の可能性を検討することとした。

## 3. pChAT mRNA の FRET 法による検出 (in situ FRET)

ラット DRG を対象に pChAT mRNA の組織内分布の FRET による検出を試みた。従来の in situ hybridization 法に準じてラットを灌流固定し DRG を摘出、クライオスタットによる薄切標本とした。上記の検討から得られた FRET 用のハイブリダイゼーションプローブのペアを DRG と反応させ通常の蛍光顕微鏡下で観察した。通常の蛍光顕微鏡による観察では、そもそものシグナルの弱さや蛍光フィルターの分離能の低さから FRET による蛍光の観察は困難であったが、研究の途上で新規に導入された共焦点レーザー顕微鏡によって特定波長の蛍光形態観察、さらにはそれと同時に組織標本上の蛍光の分光分析が可能となった。すなわち、励起された蛍光から特定の波長の蛍光のみを分離して単一の画像とすること、さらに標本の特定の位置の蛍光シグナルを分光してスペクトロフルオログラムとして解析することが可能となった。

FITC と LC640 の組み合わせでの FRET により生じる蛍光は 640nm 付近にピークを有する。この波長の近傍の蛍光画像では、陽性構造が pChAT 免疫組織化学法で陽性を示す小型から中型の神経と類似した分布を示すことが示唆されたが、形態解析に十分な満足いく画像は得られなかった。しかしながら蛍光スペクトルの解析では画像中の陽性と思われる部分で 640nm の蛍光の明瞭なピークが認められ、組織中でも FRET は正しく起こり、pChAT に対する「in situ FRET 法」の基礎的な条件は捕捉できたものと考えた。そこで引き続き、プローブのハイブリダイゼーションやレーザー顕微鏡の設定などの諸条件の改良を試みている。この様な試みの一つとして、当初の計画になかった「in situ FRET 法」と「PCR 法」を組み合わせた新たな方法の開発を試みた。

#### 4. in situ PCR-FRET 法の試み

上記の如く、「in situ FRET 法」のみでは十分な感度が得られないことが考えられたため、「in situ FRET 法」に「PCR 法」を組み合わせる方法を試行した。まず初めに組織の中で、通常の試験管内での RT-PCR 法と同様に mRNA から cDNA への転写反応を行い、次に pChAT に対する PCR プライマーを用いて組織中で PCR を行った。同時に、増幅された pChAT mRNA のシグナル、すなわち PCR 産物に対してハイブリダイゼーションプローブを反応させ、反応終了後に共焦点レーザー顕微鏡下で FRET を観察した。実際にはこれらの反応を 1 ステップの操作で行うために、組織反応用のサーマルサイクラー（オムニスライド）上で、市販のワンステップ RT-PCR キットに FRET プローブをあらかじめ混入して RT-PCR 反応を行った。本報告書の作成段階では、十分な結果は得られていないが、共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光スペクトルの分析では FRET のシグナルが生じていることが確認できた。

#### 今後の展望

これまでの検討では当初の目的であった、ChAT のスプライス異型の分別形態観察には至っていないものの、pChAT の「in situ FRET 法」の基礎部分の確立ができ、さらに PCR 法との組み合わせ法も有望であることから、さらなる条件改良によって当初目標の達成は可能と考えている。今後は本研究で得られた方法や知見が、「スプライシング機構を通じた生体調節機構」のさらなる理解への道を拓くものとする。