

## 単一ニューロンの mRNA 解析

都 筑 馨 介・小 澤 滯 司

(群馬大学医学部第二生理学教室)

### I. はじめに

生理学的機能が生ずるためには、必ず構造を必要とする。構造とは、顕微鏡を使って観察できる狭義の形態学的構造ばかりでなく、生物を構成する分子レベルからの構造を意味する。現在の科学では構造がどのようにして生じたかということについてはわからないことが多いが、構造を構成する個々の要素についての知見は深まっており、各要素間の相互関係も徐々に明らかになりつつある。

端的な例は遺伝子である。核酸が遺伝物質であることが分かってから半世紀もたたないうちに、個々の細胞が、個体を形成するために必要な遺伝情報をそっくり保有していることが明らかになった。例えば分化した乳腺上皮細胞の染色体 DNA は完全な個体を作るために必要な遺伝情報を一式もっている。ヒトの染色体には、塩基として A, C, G, T をもつ 4 種類のデオキシリボヌクレオチドがポリマーを形成し、総数  $3 \times 10^9$  塩基対 (bp) の二本鎖 DNA として遺伝情報が貯蔵されている。この染色体上に、約  $10^5$  種類の遺伝子がコードされている。

分化した細胞においては、この  $10^5$  種類の遺伝子の発現様式の違いが、その細胞の特性の大枠を決めている。このうち、一つの細胞に同時に mRNA として発現している遺伝子は約  $10^4$  種類であるといわれている。そして、どの細胞で、どの遺伝子が、どれだけの量発現するかによって、その細胞の特性が現れてくる。

逆に、細胞の機能の差異は発現している mRNA の種類と量に反映されている、とも考えられる。本稿では、この単一細胞レベルで発現している mRNA を解析する手法について述

べる。

単一ニューロンに発現している mRNA を解析できるのであろうか。ニューロンは通常のサイズのもので細胞体の直径が  $10 \sim 20 \mu\text{m}$ 、大型のものでも  $100 \mu\text{m}$  以下である。仮に一辺が  $10 \mu\text{m}$  の立方体、ないしは直径  $12.5 \mu\text{m}$  の球状のニューロンを考えてみると、その重さは  $1 \text{ ng}$  前後であると推測される。RNA が重量比で 1% 存在し、mRNA の存在比を RNA の 5% とすると、細胞あたり  $0.5 \text{ pg}$  の mRNA が存在する。すなわち、一個の細胞に、平均 2000 塩基 (base) の mRNA が、 $5 \times 10^5$  個存在することになる。一個の細胞には  $10^4$  種類の mRNA が発現し、それらが均等に発現しているならば各 50 コピーずつの mRNA が発現していることになる。これは次に述べる RT-PCR 法を用いて検出可能な量である。しかし、検出可能限界に近いレンジにあるので、慎重な計画のもとに、綿密な実験を行う必要がある。

### II. RT-PCR 法

組織中にどの種類の mRNA がどれだけ発現しているかを調べる方法として、最も一般的なのはノーザンプロット法である。この方法は、RNA を電気泳動し、ナイロン膜にトランスファーする。そして、知りたい mRNA に特異的に結合する放射性同位元素などで標識されたプローブをハイブリダイズする。この方法により、発現している mRNA の種類と量がわかるばかりでなく、RNA を電気泳動によって分離するので、mRNA の長さについての情報も得ることができる。しかし、ノーザンプロット法は多量の試料を必要とする。mRNA の発現量によるが、 $10 \sim 20 \mu\text{g}$  の RNA を一回の電気泳

動に必要とする。このために必要な試料は、グアニジン酸性フェノール法<sup>4)</sup>で RNA を調製した場合、組織量として 1~10 mg が必要となる。mRNA の長さに関する情報が不要なら、試料を節約できる RNase 保護アッセイ法を適用できるが、それでも、 $10^3$  個の細胞が必要である。

Polymerase Chain Reaction (PCR) 法<sup>13)</sup> は DNA の一部を大幅に増幅する方法である。二本の合成 DNA プライマーを増幅したい DNA 断片を挟むように設計する。一本は目的とする部分の上流におくフォワードプライマー(センスプライマー)で、センス鎖の配列の一部をもつ。他の一本は目的とする部分の下流におくりバースプライマー(アンチセンスプライマー)でセンス鎖に相補的な配列を持つ。PCR によって増幅されるのはフォワードプライマーとリバースプライマーに挟まれた部分で、標準的には 100~1000 bp を増幅する。スタート物質である鋳型 DNA, DNA 合成の基質となる dATP, dCTP, dGTP, dTTP の 4 種のデオキシリボヌクレオチド(dNTPs), 耐熱性 DNA 合成酵素を加えて、PCR 装置で反応させ、増幅する。最初に必要なスタート物質は、ごく微量でもよく、液層に一分子あれば増幅可能であり、一個の細胞に 4 分子しか存在しない染色体 DNA の断片でも、電気泳動で十分検出可能なレンジにまで増幅できる。また、増幅産物を再びスタート物質として用いれば無限に増幅産物を得ることができる。しかし、標準的な PCR では  $10^4$  分子以上のスタート物質を用いて行われる。

スタート物質として用いる DNA は、RNA を逆転写して合成した cDNA でもよい。この逆転写反応(reverse transcription, RT)に引き続き PCR を行う方法を RT-PCR 法という。原理的には、液層に一分子の cDNA があれば、無限に増幅できるわけで、この方法を用いれば、単一細胞に発現している mRNA を検出することも不可能ではない。

単一細胞に発現している mRNA を回収するためにパッチ電極を用いるのがパッチクランプ RT-PCR 法である<sup>10,18,19)</sup>。図 1 にその概略を

記す。パッチ電極に回収した mRNA をスタート物質として、逆転写反応により第一鎖 cDNA を合成し、PCR 法によりその特定部分を増幅する。この方法を用いると、単一細胞に発現している mRNA を解析できるばかりでなく、通常ホールセル・パッチクランプ記録を行って単一ニューロンの機能を解析した上で、その細胞に発現している mRNA を検索することができる。

### Ⅲ. ホールセル記録

パッチクランプ RT-PCR 法を行う場合のホールセル記録において、注意を払うべき点を述べる。

#### A. 標本

RNA は細胞の状態に非常に影響される。細胞の状態が悪いときは、mRNA の発現が少ない。筆者らは分散培養したラット海馬ニューロンと PC12 培養株細胞、ラット海馬、小脳、大脳皮質の急性スライス標本についてパッチクランプ RT-PCR 法の経験がある。いずれの場合も、単層培養細胞や 200~400  $\mu\text{m}$  前後の薄切スライスを用い、顕微鏡下に個々の細胞を直視し、ホールセル記録を行っている。

培養ニューロン、培養株細胞を対象とする場合は倒立位相差顕微鏡を用い、細胞に厚みがある細胞を選び、細胞質に空胞を生じていたり、細胞膜が歪んだ細胞は避ける。

スライス標本を用いる場合は、手早く脳を取り出し、できるだけ樹状突起を痛めないようにスライス面を合わせ、堂阪 Microslicer DTK-1000 などを用いて薄切スライスを作る。スライサーの刃がブレると標本の状態は著しく悪くなる。Zeiss Axioskop FS などの鏡筒上下式の正立顕微鏡で、ノマルスキー微分干渉下に細胞を観察し、立体感のあるどっしりとした細胞を選び、膨化した細胞や組織から浮かび上がった細胞は避ける。

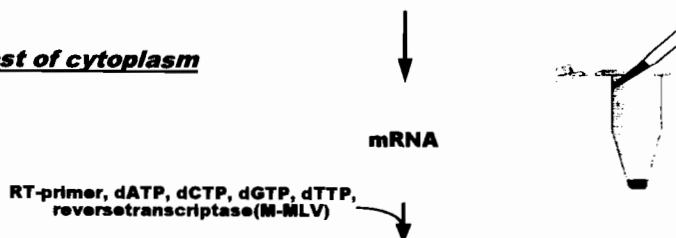
いずれの場合も、電気生理学的に、静止電位、膜抵抗、膜容量を測定しておき細胞の状態の目

## Patch clamp RT-PCR

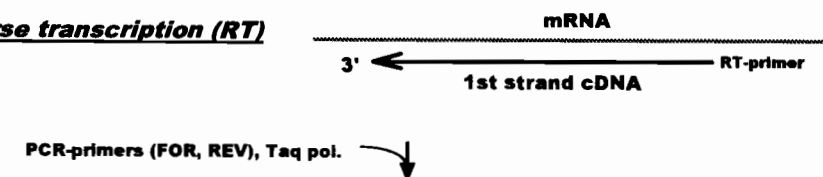
### A. Patch clamp

Whole-cell patch clamp recording

### B. Harvest of cytoplasm



### C. Reverse transcription (RT)



### D. Polymerase chain reaction (PCR)

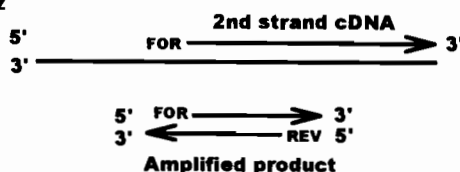


図1 パッチクランプ RT-PCR 法

パッチクランプ RT-PCR 法の手順を記す。(A)まず、ホールセルパッチクランプ記録を行う。(B)次に、パッチ電極内に mRNA を含む細胞質を吸引し、これを電極内液ごとマイクロチューブに移す。(C)逆転写プライマー、基質となるデオキシリボヌクレオチド、逆転写酵素を混ぜ、逆転写反応により mRNA に相補的な第一鎖 cDNA を合成する。(D)PCR プライマー、耐熱性 DNA 合成酵素を加えて、遺伝子増幅反応を行う。最初のサイクルでは、第一鎖 cDNA に FOR プライマーがアニールし第二鎖 cDNA ができる。次のサイクルで、この第一鎖 cDNA と第二鎖 cDNA をスタート物質にして増幅された遺伝子産物ができ、以後のサイクルでは、第一鎖 cDNA、第二鎖 cDNA、増幅された産物をスタート物質にして FOR と REV 両プライマーに挟まれた部分が、指数関数的に増幅されていく。

安とする。パッチ電極内液に後述の KCl 電極内液や K-gluconate 電極内液を用いた場合は静止電位は  $-40$  から  $-70$  mV となる。膜抵抗と膜容量は、大型のニューロンで  $300\sim 500$  M $\Omega$ ,  $20\sim 50$  pF 程度である。

### B. 電極内液

以下の 3 種類の電極内液を電気生理学的に何を観察したいかによって使い分けている。これ

らの電極内液の間で、少量の RNA をスタート物質にした RT-PCR 反応の効率に差は認められていない。

- (1) KCl 電極内液 (140 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA, pH 7.2).

ホールセルパッチクランプに用いる古典的な電極内液。

- (2) CsCl 電極内液 (140 mM CsCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA, pH 7.2).

外向きのカリウム電流をブロックしたボルテージクランプの実験に用いる。GABA<sub>B</sub> レセプターを介する応答もブロックされる。チャネル電流の膜電位依存性の解析などの場合に用いる。

- (3) K-gluconate 電極内液 (145 mM K-gluconate, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 0.2 mM EGTA, pH 7.2).

カレントクランプの実験に用いる。スパイク発火頻度を観察する場合は Cl<sup>-</sup> 濃度と二価イオンキレート剤濃度が低いこの溶液を用いる。また、GABA<sub>A</sub> 受容体チャネルなどを介する Cl<sup>-</sup> 電流の関与を制限したい場合もこの溶液を用いる。

電極内液を作製するのに用いる試薬、水、容器、pH電極等は、DNA や RNA が混入しないように注意する。特にプラスミド DNA を扱っている研究室では注意が必要である。筆者らは調製した液を、フィルターを通してからオートクレープしている。しかし、これらの操作では、RNA 分解酵素(リボヌクレアーゼ, RNase)を除去できないので、水、試薬は RNase free のものを用いる<sup>19)</sup>。RNase は混入しやすく、不活化しにくく、除きにくい酵素なので、注意深く試薬を調製する。

### C. 電極ホルダー

筆者らはパッチクランプアンプとして List の EPC-7 を使用している。RT-PCR 専用電極ホルダーを 1 組用意し、清潔に使っている。電極内液に浸す銀線に対しては、電極内液同様の諸注意を払い、Ag/AgCl コートは塩化銀粉末を坩堝で熱して融解し、銀線を浸すことにより行っている。

ガラス管は洗浄し滅菌したものを用いる。ガラス電極は Sutter 社の P97 などのプレーを用いて、開口部の大きいもの (1 μm 以上、KCl パッチ電極内液を用いた場合、3 MΩ 以下の電極抵抗のもの) を作製する。電極内液は一定量を後部より詰める。この量は後述の逆転写反応の液量が 10 μL となるように調節する。

### D. 細胞質 mRNA の回収

電気生理学的記録を終了後、電極内を陰圧にし、顕微鏡下で観察しながら丁寧に細胞質を電極内に回収する。細胞が徐々に痩せ、電極にオルガネラなどの細胞質成分が吸いこまれていくのが観察される。しばしば、核が電極開口部に栓をしてしまい細胞質の回収に失敗する。

細胞質を吸引し終わったら、ホルダーから電極を外し、マイクロチューブに細胞質を含む電極内液を移す。Monyer らはガスボンベにパッチ電極を取り付け、電極内液をマイクロチューブに移している<sup>12)</sup>。筆者らは、注射筒にパッチ電極を繋ぎ、ガラス電極の先端部をマイクロチューブの内壁につけて折り、陽圧により完全に電極内の液を排出している (図 1 参照)。

## IV. 逆転写反応

このステップで、PCR のスタート物質となる第一鎖 cDNA を合成する。逆転写酵素 (RNA 依存性 DNA 合成酵素) がその主役をなす。逆転写酵素は、RNA と DNA のハイブリッドを認識し、そこを起点に第一鎖 cDNA を合成する。そこで、まずランダムヘキサマー (dN6) などの逆転写プライマーとなる合成 DNA を加え、RNA と DNA のハイブリッドを作らせ、次に逆転写酵素を働かせる。

### A. 逆転写プライマー

合成 DNA としてランダムヘキサマー (dN6) を用いると、全ての RNA について第一鎖 cDNA を作る事ができる。cDNA を後述するマルチプレックス RT-PCR に用いる場合は dN6 を使う。

dN6 は、6 量体の合成 DNA で、AAAAAA, AAAAAC, AAAAAG, AAAAAT, . . . , TTTTGT, TTTTGT の 4<sup>6</sup>=4096 種類の配列を含む。これは、mRNA を含むあらゆる RNA と衝突し、会合したり離れたりを繰り返している。RNA に dN6 が会合した RNA と DNA のハイブリッドに逆転写酵素が結合すると、基質を取り込み、RNA の配列に相補的な DNA が逆転

写酵素と共に伸長していく。ある程度以上 DNA 鎖が伸びれば、ハイブリッドは安定化し、逆転写反応の温度では、解離しなくなる。

dN6 は少ない方が長い cDNA ができるが、収量が下がる。数百 bp の増幅産物を得られればよいのであれば、dN6 が過剰であっても、収量が多い条件を選んだ方がよい。

また、PCR の際に使うリバースプライマーなどの配列特異的な合成 DNA を使うと、作る cDNA の種類を選ぶことができる。しかし、逆転写プライマーが長いと、逆転写反応の温度での非特異結合が起こり、スミアな PCR 産物が得られてしまうこともある。

## B. 逆転写酵素

逆転写酵素に Superscript II などの Molony Leukemia Virus 由来の酵素を使う。反応にはジスルフィド結合を防止するジチオスレイトール (DTT) などの還元剤が必須である。この酵素は脆弱な酵素で、熱により容易に失活する。37℃で30分で酵素活性は半減すると考えられている。また、バッチによる差があるので、何らかの方法で、自分の研究室で逆転写酵素の活性を調べる方法を用意しておく。

Superscript II はタンパク量あたりの活性が低く、高濃度で用いると PCR を阻害する。DTT も酸化してしまうと PCR の阻害物質となる。いずれも通常の濃度レンジでは、PCR に影響を与えない。

反応温度を37℃ではなく、42~55℃で行うほうが、RNA の高次構造が緩み、cDNA ができやすいという考え方もあるが、筆者らの経験では37℃で反応させたほうが、cDNA の収量が多い。

## C. 逆転写反応の実際

マイクロチューブに予め、最終濃度 5  $\mu$ M の逆転写プライマーと最終濃度 0.5 mM の基質となる dNTPs を入れておく。そこへ、細胞質を含む電極内液を移し、最終濃度 10 mM の DTT と 100 U の Superscript II を加える。また、

RNase を阻害するために、RNase inhibitor を 20 U 加える。10  $\mu$ L の反応系で37℃ 1時間反応させ、第一鎖 cDNA を合成する。

## V. 遺伝子増幅

PCR 法では、二本鎖 DNA を熱変性して二本の一本鎖 DNA とし、温度を冷やして大過剰に加えてあるプライマーをアニールさせ、次に耐熱性ポリメラーゼの働きやすい温度にして、伸長し二本の二本鎖 DNA を合成するというサイクルを、何度も何度も繰り返して、標的遺伝子の一部分を増幅する。

標準的な PCR と単一細胞からの RT-PCR が異なる点は、後者ではスタート物質量が極端に少ないことである。本実験では1分子でも液層中に DNA が存在すれば、検出するような実験系を組む。スタート物質量が少ない場合は、PCR 装置の不安定さや PCR 反応前の Taq ポリメラーゼの活性など、標準的な PCR には影響を与えない小さな擾乱が増幅効率に大きく影響を与える。また、通常40サイクル以上の多サイクルの PCR を行うので、手袋に付着した DNA や、ピペットにエアロゾルとして吸い込まれた程度の微量の DNA も増幅してしまう。このテンプレートの混入は、正しく実験系をセットアップすれば確実に除ける。また、DNA や RNA を持ち込まない実験区域を用意する必要がある。

### A. PCR 装置

PCR 装置は温度を上げて、一定時間ホールドし、温度を下げて一定時間ホールドし、これを繰り返すだけの装置であるが、PCR 装置にコンピュータを接続し、各サイクルごとの運転状況をモニターしてみると、マシン毎のばらつきも、試行毎のばらつきもあることがわかる。筆者らは、宝酒造の TP2000 などの PCR 装置を用いて、以下の点をチェックしている。(1) 温度ディスプレイは正しい温度(誤差 1℃以内)を表示しているか。(2) オーバーシュート 0.5℃、アンダーシュートが 2℃の規格内にあ

るか。(3) 各サイクルあたりの所用時間がばらついていないか。

また、増幅反応のモニターとして、10分子のプラスミド DNA および、10 pg の脳 cDNA をスタート物質に PCR を行い、電気泳動上でバンドが検知できること、テンプレートがなければバンドが検知できないことを頻繁に確認している。

## B. PCR チューブ

筆者らは Perkin Elmer の Gene Amp reaction tube などの容量 0.5 mL の並厚の PCR チューブを用いて 100  $\mu$ L の反応系で PCR を行っている。その理由は、最初の条件設定をこのチューブを用いて行ったためである。各温度サイクルの温度と時間の条件は、DNA とプライマーだけによって決まるのではなく、チューブの形状と、反応量も大きな影響を与える。例えば、薄手のチューブを使った場合、並厚の PCR チューブで設定した温度サイクルの条件では、標的遺伝子の増幅効率が落ち、非特異産物が増す。それは、薄手のチューブでは熱のまわりが速すぎて、耐熱性ポリメラーゼが失活しやすくなり、また伸長反応の時間が長すぎて非特異産物が増すためである。逆に、薄手のチューブで設定した条件では、並厚のチューブでは全く増幅されないことがある。実際に用いるチューブと反応量にあわせて条件を設定する必要がある。

近年、容量 0.2 mL の薄手の PCR チューブが利用されるようになり、Perkin Elmer 9600 など、このチューブ用の PCR 装置が広く普及した。筆者らも RI 区域で PCR を行うときにこのチューブを使っているが、各温度サイクルの時間を半分に減らし、良好な結果を得ている。ただ、このチューブは小さくて取り扱いくく、後述するマニュアル法によるホットスタート PCR が事実上不可能であるという欠点がある。

また、熱変性、プライマーのアニール、合成された DNA 鎖の伸長をそれぞれ独自の温度で

行う 3 サイクル PCR を行うか、アニールと伸長を同じ温度で行う、2 サイクル PCR を行うかも好みにより、2 サイクル PCR が 3 サイクル PCR に勝るものでもない。

## C. PCR プライマー

PCR 法においては、熱変性-プライマーのアニール-DNA 鎖の伸長という 1 サイクルで最大 2 倍に遺伝子は増幅される。実際には、増幅効率の高いプライマーを用いても 1.6 倍前後の増幅効率である。プライマーが悪いと、増幅効率が悪かったり、非特異的産物が生じたり、場合によっては全く増幅されないこともある。プライマーが悪いといった場合、配列が悪い場合と、化学物質としての品質が悪い場合の二つの場合が考えられる。

まず、プライマーの配列を設計するにあたっての注意点を述べる。PCR は、標準的な 25~30 サイクルより多くのサイクル数(40 サイクル以上)行う。スタート物質量が少ない条件下で多サイクルの PCR を行うと、プライマーの 3' 端同士がアニールし、プライマーダイマーが生じやすい。また、鋳型 DNA が少ない場合は、通常のアニール温度ではプライマーが DNA に十分に結合していない<sup>14)</sup>。筆者らは、標準的な PCR を行う場合には、(プライマーのアニール温度と、増幅産物の解離温度の 7 : 3 の内分点より 15°C 低い温度)でアニールさせているが、10 分子レベルでは、それよりも 5°C 低い温度でアニールさせているので、プライマーダイマーはますます生じやすくなる。このプライマーダイマーは、高効率で増殖し、激しくプライマーを消費し、増幅産物を減らす。そこで、Gibbs の自由エネルギーを調べ、できるだけ 3' の  $\Delta G$  の不安定なところを選び、プライマー相互の 3' 端に相補的な配列を持たないように注意して設計している。

プライマーが DNA にアニールする温度と、二本鎖 DNA が熱変性によって解離する温度が 25°C 以上離れていると、熱変性によって解離した DNA にプライマーがアニールする前に既に

増幅されている相補鎖の DNA が結合してしまい、増幅効率が下がる。この点で、増幅産物の長さは短いもののほうが有利である。

同じ配列のプライマーであっても化学物質としての品質が悪い場合がある。極端な場合では、外注したプライマーで様々なサイズの混じったものが送られてきたこともある。増幅がうまくいかない場合は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) や、陰イオン交換カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を行って分析し、品質が悪い場合は再合成する。

プライマーの量は PCR に大きく影響を与える。増幅産物を増すために、プライマーを多くすると、プライマーダイマーが生じやすくなる。プライマーダイマーが生じると、できる増幅産物の量は減る。結局のところ、プライマーの量は実験的に決めていくしかないが、筆者らは、 $0.1\sim 0.2\ \mu\text{M}$  の濃度で PCR プライマーを用いている。

#### D. 耐熱性 DNA ポリメラーゼ

PCR 法が広く使用されるようになったのは二本鎖 DNA が熱変性によって解離する温度でも失活しない耐熱性 DNA ポリメラーゼが発見され、利用できるようになったことによる<sup>15)</sup>。古細菌から精製された、Taq DNA polymerase は  $94^\circ\text{C}$  で 30 分処理しても、活性の半分は残っている。現在は、遺伝子工学的に大腸菌で作られたリコンビナントの Taq polymerase が高品質で安価に手に入る。

Taq polymerase は、DNA と DNA のハイブリッドを認識し、3' 末端がひっこんでいる場合、これを埋めるように相補鎖を伸長する強力な DNA 合成酵素で、 $70\sim 80^\circ\text{C}$  で最大活性を示す。この温度では 1 秒間に 100 塩基以上を合成するので、数十秒あれば PCR 産物を伸長させるのに十分であるばかりでなく何度も回転して利用される。 $55^\circ\text{C}$  でも、1 秒間に 20 塩基以上を合成するので、アニール温度が  $55^\circ\text{C}$  以上の場合には、アニールと伸長を同じ温度で行う 2 サイクル PCR も可能である。この強力な DNA 合成

能を利用して、少量のスタート物質でおこなう PCR は、ほとんどが Taq polymerase を用いて行われている。

Taq polymerase を使う場合の問題点は、室温でも無視できない活性が残っていることである。室温では、プライマーと鋳型 DNA、またプライマー相互は非特異的に結合している。ここへ Taq polymerase が作用すると、非特異的な DNA 合成産物ができてしまう。そこで、温度を上げて、非特異的な結合が解消された状態から PCR が開始するような実験法 (ホットスタート法) が、少量のスタート物質を用いた場合に有効である<sup>5)</sup>。なお、 $4^\circ\text{C}$  では、Taq polymerase はほとんど DNA 合成活性がない。

また、Taq polymerase は、間違った塩基を取り込んだ場合にこれを修復する機能を欠き、かつ PCR 産物の末端に一個デオキシリボヌクレオチド (主として dA) を付加する活性をもっている。これは、増幅産物をクローニングする場合には計算に入れておく必要がある。

#### E. PCR 法の実際

逆転写反応後、反応バッファー (最終濃度  $50\ \text{mM}\ \text{KCl}$ ,  $1.5\ \text{mM}\ \text{MgCl}_2$ ,  $10\ \text{mM}\ \text{Tris-HCl}$ ,  $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$  gelatin,  $\text{pH}\ 8.3$ )、耐熱性 DNA 合成酵素 (Ampli Taq polymerase, 2.5 U) を反応チューブに加える。基質となる dNTPs は逆転写反応から持ち込まれる。別のチューブに最終濃度  $0.1\ \mu\text{M}$  のフォワードプライマーとリバースプライマーを混ぜておく。これらを合わせると  $100\ \mu\text{L}$  となるようにしておく。

PCR 装置を  $94^\circ\text{C}$  とし、スタート物質である逆転写反応産物等を加えたチューブを暖め、蒸発を防ぐためのミネラルオイルを重畳する。1 分間暖めてから、プライマーを加え、さらに 2 分間  $94^\circ\text{C}$  に保持してから、40 サイクルの 3 サイクル PCR を行っている。

40 サイクルの PCR を行っても、単一細胞レベルでは十分な量の増幅産物を得るのは難しい。そこで、この増幅産物を泳動分離し、フラグメントを切り出して精製し、 $10\ \text{mM}\ \text{Tris}$ ,

0.1 mM EDTA, pH 8.3 に溶解する。これをスタート物質として、再 PCR し解析に用いている。

回収したフラグメントの再 PCR は至適レンジが広いので、ホットスタートする必要もなく、PCR 装置の調子もさほど気にせず25サイクルの PCR を行えば制限酵素解析に十分な量の遺伝子増幅産物を得ることができる。

## VI. PCR 産物の解析

### A. ゲル電気泳動解析

筆者らは、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動して解析している。200~1000 bp の長さのものなら、0.5×TBE バッファー<sup>16)</sup> 中で1.5%アガロースで分離する。アガロースは、0.5 μg/mL の臭化エチジウムを含む。50~100 V で10~60分泳動し、波長 254 nm の紫外線を出すトランスイルミネーター上で検察し、ポラロイド写真を撮る。この場合、二本鎖 DNA は 2 ng から検出可能で増幅産物が750塩基の場合、約  $3 \times 10^9$  分子あれば検出できる。

図2に単一細胞に発現している AMPA 型グルタミン酸受容体遺伝子を示す。PCR プライマーは図3に示した4種類の遺伝子(GluR1-GluR4)を同時に増幅するものを用いた。KCl 電極内液を用いて、培養海馬ニューロンにパッチクランプを行い、逆転写反応を 10 μL の反応系で行った後、ホットスタート法で、100 μL の反応系で40サイクルの PCR を行い、15 μL を電気泳動した。レーン1は実験開始前のコントロールで細胞を吸わずに電極内液をチューブに加えた。レーン2, 3, 4が単一細胞から検出した遺伝子増幅産物である。レーン5はこれら3個の細胞を回収した後、細胞を吸わずに電極内液をチューブに加えたコントロールである。細胞を回収しない場合はバンドが見られないことから、これらのバンドはニューロン由来のものであることがわかる。レーン6は同一の PCR プライマーを用いてラット脳の cDNA を増幅したものである。

バンドを回収する場合には、波長 254 nm の

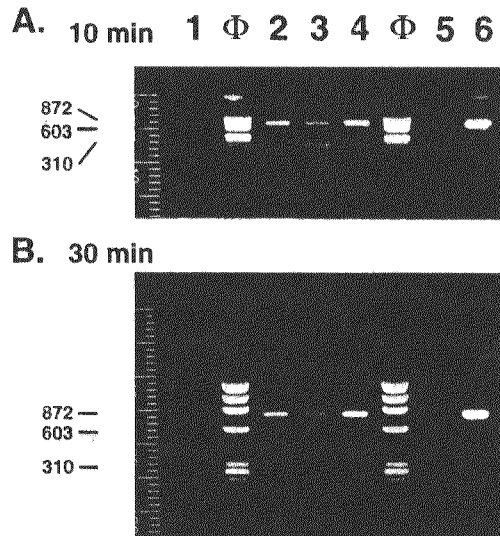


図2 PCR 産物の電気泳動

単一細胞に発現している AMPA 受容体 mRNA をパッチクランプ RT-PCR 法により検出した。標本はラット培養海馬ニューロンで、パッチ電極には KCl 電極内液を用いた。100 μL スケールで40サイクルの PCR を行い、15 μL を電気泳動した。1は電極内液のみをチューブに加えたコントロール。2, 3, 4が単一ニューロンからの PCR 産物である。3は細胞質の回収が不十分であったが、弱いバンドが得られた。しかし、いったんバンドが得られれば、これを切り出して再増幅することにより無限に増幅産物を得ることができる。5は細胞外液のみを回収したもの。6はラット前脳 cDNA を増幅した陽性コントロール。Φは分子量マーカーの Φx174 RF, DNA, HaeIII digest (250 ng)。(A)は、100 V で10分間電気泳動したものである。50 bp 近辺のところにプライマーダイマーが見られた。(B)は、更に20分間電気泳動したもので、増幅産物の長さは約 750 bp であることが認められた。

紫外線をあてた DNA は傷害されているので、電気泳動をもう一度行う。ハンドヘルドの装置で 360 nm の紫外線をあて、メス刃でバンドを含む部分のゲルを切り出す。増幅されたフラグメントをゲルから回収し、再 PCR に用いる。

### B. 制限酵素解析

PCR 法では、フォワード、リバースの両プライマーによって増幅される、原則として既知の1種類の遺伝子を増幅する。しかし、近縁の複数の cDNA を同時に増幅する PCR プライ



写酵素と共に伸長していく。ある程度以上 DNA 鎖が伸びれば、ハイブリッドは安定化し、逆転写反応の温度では、解離しなくなる。

dN6 は少ない方が長い cDNA ができるが、収量が下がる。数百 bp の増幅産物を得られればよいのであれば、dN6 が過剰であっても、収量が多い条件を選んだ方がよい。

また、PCR の際に使うリバースプライマーなどの配列特異的な合成 DNA を使うと、作る cDNA の種類を選ぶことができる。しかし、逆転写プライマーが長いと、逆転写反応の温度での非特異結合が起こり、スミアな PCR 産物が得られてしまうこともある。

## B. 逆転写酵素

逆転写酵素に Superscript II などの Molony Leukemia Virus 由来の酵素を使う。反応にはジスルフィド結合を防止するジチオスレイトール (DTT) などの還元剤が必須である。この酵素は脆弱な酵素で、熱により容易に失活する。37℃で30分で酵素活性は半減すると考えられている。また、バッチによる差があるので、何らかの方法で、自分の研究室で逆転写酵素の活性を調べる方法を用意しておく。

Superscript II はタンパク量あたりの活性が低く、高濃度で用いると PCR を阻害する。DTT も酸化してしまうと PCR の阻害物質となる。いずれも通常の濃度レンジでは、PCR に影響を与えない。

反応温度を37℃ではなく、42~55℃で行うほうが、RNA の高次構造が緩み、cDNA ができやすいという考え方もあるが、筆者らの経験では37℃で反応させたほうが、cDNA の収量が多い。

## C. 逆転写反応の実際

マイクロチューブに予め、最終濃度 5  $\mu$ M の逆転写プライマーと最終濃度 0.5 mM の基質となる dNTPs を入れておく。そこへ、細胞質を含む電極内液を移し、最終濃度 10 mM の DTT と 100 U の Superscript II を加える。また、

RNase を阻害するために、RNase inhibitor を 20 U 加える。10  $\mu$ L の反応系で37℃ 1時間反応させ、第一鎖 cDNA を合成する。

## V. 遺伝子増幅

PCR 法では、二本鎖 DNA を熱変性して二本の一本鎖 DNA とし、温度を冷やして大過剰に加えてあるプライマーをアニールさせ、次に耐熱性ポリメラーゼの働きやすい温度にして、伸長し二本の二本鎖 DNA を合成するというサイクルを、何度も何度も繰り返して、標的遺伝子の一部分を増幅する。

標準的な PCR と単一細胞からの RT-PCR が異なる点は、後者ではスタート物質量が極端に少ないことである。本実験では1分子でも液層中に DNA が存在すれば、検出するような実験系を組む。スタート物質量が少ない場合は、PCR 装置の不安定さや PCR 反応前の Taq ポリメラーゼの活性など、標準的な PCR には影響を与えない小さな擾乱が増幅効率に大きく影響を与える。また、通常40サイクル以上の多サイクルの PCR を行うので、手袋に付着した DNA や、ピペットにエアロゾルとして吸い込まれた程度の微量の DNA も増幅してしまう。このテンプレートの混入は、正しく実験系をセットアップすれば確実に除ける。また、DNA や RNA を持ち込まない実験区域を用意する必要がある。

## A. PCR 装置

PCR 装置は温度を上げて、一定時間ホールドし、温度を下げて一定時間ホールドし、これを繰り返すだけの装置であるが、PCR 装置にコンピュータを接続し、各サイクルごとの運転状況をモニターしてみると、マシン毎のばらつきも、試行毎のばらつきもあることがわかる。筆者らは、宝酒造の TP 2000 などの PCR 装置を用いて、以下の点をチェックしている。(1) 温度ディスプレイは正しい温度(誤差1℃以内)を表示しているか。(2) オーバーシュート 0.5℃、アンダーシュートが2℃の規格内にあ

るか。(3) 各サイクルあたりの所用時間がばらついていないか。

また、増幅反応のモニターとして、10分子のプラスミド DNA および、10 pg の脳 cDNA をスタート物質に PCR を行い、電気泳動上でバンドが検知できること、テンプレートがなければバンドが検知できないことを頻繁に確認している。

## B. PCR チューブ

筆者らは Perkin Elmer の Gene Amp reaction tube などの容量 0.5 mL の並厚の PCR チューブを用いて 100  $\mu$ L の反応系で PCR を行っている。その理由は、最初の条件設定をこのチューブを用いて行ったためである。各温度サイクルの温度と時間の条件は、DNA とプライマーだけによって決まるのではなく、チューブの形状と、反応量も大きな影響を与える。例えば、薄手のチューブを使った場合、並厚の PCR チューブで設定した温度サイクルの条件では、標的遺伝子の増幅効率が落ち、非特異産物が増す。それは、薄手のチューブでは熱のまわりが速すぎて、耐熱性ポリメラーゼが失活しやすくなり、また伸長反応の時間が長すぎて非特異産物が増すためである。逆に、薄手のチューブで設定した条件では、並厚のチューブでは全く増幅されないことがある。実際に用いるチューブと反応量にあわせて条件を設定する必要がある。

近年、容量 0.2 mL の薄手の PCR チューブが利用されるようになり、Perkin Elmer 9600 など、このチューブ用の PCR 装置が広く普及した。筆者らも RI 区域で PCR を行うときにこのチューブを使っているが、各温度サイクルの時間を半分に減らし、良好な結果を得ている。ただ、このチューブは小さくて取り扱いくく、後述するマニュアル法によるホットスタート PCR が事実上不可能であるという欠点がある。

また、熱変性、プライマーのアニール、合成された DNA 鎖の伸長をそれぞれ独自の温度で

行う 3 サイクル PCR を行うか、アニールと伸長を同じ温度で行う、2 サイクル PCR を行うかも好みにより、2 サイクル PCR が 3 サイクル PCR に勝るものでもない。

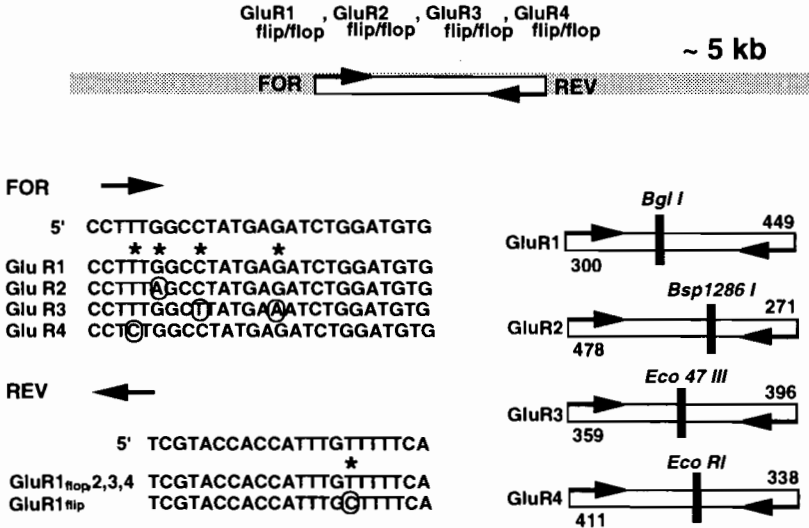
## C. PCR プライマー

PCR 法においては、熱変性-プライマーのアニール-DNA 鎖の伸長という 1 サイクルで最大 2 倍に遺伝子は増幅される。実際には、増幅効率の高いプライマーを用いても 1.6 倍前後の増幅効率である。プライマーが悪いと、増幅効率が悪かったり、非特異的産物が生じたり、場合によっては全く増幅されないこともある。プライマーが悪いといった場合、配列が悪い場合と、化学物質としての品質が悪い場合の二つの場合が考えられる。

まず、プライマーの配列を設計するにあたっての注意点を述べる。PCR は、標準的な 25~30 サイクルより多くのサイクル数(40 サイクル以上)行う。スタート物質量が少ない条件下で多サイクルの PCR を行うと、プライマーの 3' 端同士がアニールし、プライマーダイマーが生じやすい。また、鋳型 DNA が少ない場合は、通常のアニール温度ではプライマーが DNA に十分に結合していない<sup>14)</sup>。筆者らは、標準的な PCR を行う場合には、(プライマーのアニール温度と、増幅産物の解離温度の 7 : 3 の内分点より 15℃ 低い温度)でアニールさせているが、10 分子レベルでは、それよりも 5℃ 低い温度でアニールさせているので、プライマーダイマーはますます生じやすくなる。このプライマーダイマーは、高効率で増殖し、激しくプライマーを消費し、増幅産物を減らす。そこで、Gibbs の自由エネルギーを調べ、できるだけ 3' の  $\Delta G$  の不安定なところを選び、プライマー相互の 3' 端に相補的な配列を持たないように注意して設計している。

プライマーが DNA にアニールする温度と、二本鎖 DNA が熱変性によって解離する温度が 25℃ 以上離れていると、熱変性によって解離した DNA にプライマーがアニールする前に既に

**A. AMPA receptor subunits**



**B. Cultured hippocampal neurons**

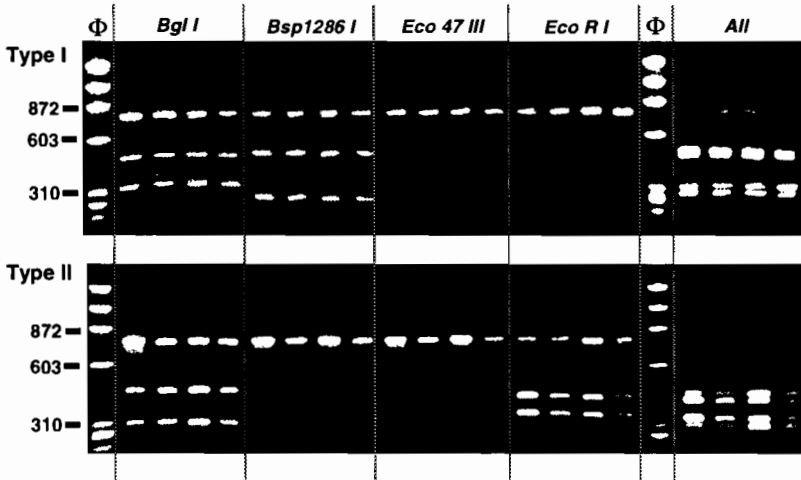


図3 制限酵素解析

複数の cDNA を同時に増幅する PCR プライマーを用いれば複数種の遺伝子を解析できる。(A)約5000塩基の長さをもつ AMPA 受容体 mRNA は GluR 1, GluR 2, GluR 3, GluR 4 の4種からなり、それぞれにスプライシングバリエントである flip 型と flop 型がある。これらを差のない効率で増幅する mismatches を含むプライマーを用いて増幅した。増幅された産物が、GluR 1-GluR 4 のいずれであるかは制限酵素解析により調べた。例えば、約 750 bp の増幅産物が GluR 1 mRNA 由来であるなら、制限酵素 Bgl I によって、300 bp と 449 bp の二つのフラグメントに切断される。(B)培養海馬標本には2種類の AMPA 受容体の特異的に発現しているニューロンが存在する。ひとつは、外向き整流特性を示し、Ca<sup>2+</sup> 不透過性の Type I AMPA 受容体を発現している Type I 細胞である。ここに、4 個の Type I 細胞を示すが、いずれの細胞でも、GluR 1-GluR 4 のうち GluR 1 と GluR 2 を発現していた。一方、内向き整流特性を示し、高い Ca<sup>2+</sup> 透過性を示す Type II AMPA 受容体を発現している 4 個の Type II 細胞では、いずれも GluR 2 が検出されず、GluR 1 と GluR 4 を発現していた。

マーを用いれば複数種の遺伝子を解析できる。図3にその実験例を示す。AMPA受容体 mRNA は GluR1, GluR2, GluR3, GluR4 の4種類からなる。これらは近縁の遺伝子で、4種を等しい効率で増幅するプライマーを設計することにより、増幅された PCR 産物が GluR1-GluR4 のいずれであるかを、それらを特異的に消化する制限酵素で処理することによって調べることができる(図3A参照)。

AMPA受容体はサブユニットの構成により整流特性と  $\text{Ca}^{2+}$  透過性が決定される。GluR1-GluR4の発現実験では GluR2 を含むサブユニット構成を持つ AMPA 受容体は  $\text{Ca}^{2+}$  不透過性であり外向き整流特性を示す。一方、GluR2 を含まない AMPA 受容体は高い  $\text{Ca}^{2+}$  透過性を持ち強い内向き整流特性を示す<sup>7)</sup>。また、ラット海馬には  $\text{Ca}^{2+}$  透過性の異なる AMPA 受容体を選択的に発現しているニューロンが存在する。ひとつは  $\text{Ca}^{2+}$  不透過性で外向き整流特性を示す AMPA 受容体(Type I 受容体)を発現している Type I 細胞で、もう一つは高い  $\text{Ca}^{2+}$  透過性と内向き整流特性とを示す AMPA 受容体(Type II 受容体)を発現している Type II 細胞である<sup>8,9,17)</sup>。そこで、電気生理学的性質の異なる AMPA 受容体を発現しているこれらの海馬ニューロンにパッチクランプ RT-PCR 法を行い、AMPA 受容体のサブユニット構成の差異を調べた。図3Bの上段に電気生理学的に同定された4個の Type I 細胞の制限酵素解析の結果を示すが、いずれも Type I 細胞は GluR2 を発現していた。一方、図3Bの下段に示した4個の Type II 細胞では、いずれも GluR2 が検出されなかった<sup>1)</sup>。

### C. サザンブロット解析

アガロースゲル電気泳動では、上述したように、二本鎖 DNA は 2 ng から検出可能である。しかし、これをナイロンメンブランにブロットし放射性同位元素で標識したプローブをハイブリダイズさせれば、その数百倍少量の DNA を検出することができる。また、PCR によって

増幅された産物が、目的とする遺伝子であるかどうかは、その遺伝子に特異的に結合する標識プローブを用いて確認できる。図4の最下段は後述するマルチプレックス PCR 法によって得た増幅産物の確認にサザンブロット解析を行ったものである。

## VII. パッチクランプ RT-マルチプレックス PCR 法

個々のニューロンに発現している遺伝子をタンパク質レベルで調べる方法として、免疫組織化学法が広く用いられている。それぞれのタンパク質について免疫する動物の種類を変えて、複数の遺伝子の発現を見ることは可能だが、二次抗体の標識物質の制限もあって、現実には3種類までしか可能でない。

PCR 法でも、原則としては一組のプライマーによって増幅される遺伝子を増幅する。しかし、マルチプレックス PCR を行うと、少量のサンプルから同時に多種類の遺伝子を増幅できる。筆者らは、この方法を単一細胞レベルに発展させ、パッチクランプ RT-PCR 法と組み合わせたパッチクランプ RT-マルチプレックス PCR 法を開発した<sup>2)</sup>。

### A. マルチプレックス PCR 法

デュシャンヌ型筋ジストロフィーはX染色体上の遺伝子の変異によって起こるが、変異の起こりうる部位は9カ所以上あり、広い範囲にわたっている。これらを一本のチューブで同時に解析できれば、試薬の調製や電気泳動を簡便に行うことができ、迅速に診断することができる。そこで、PCR の際に18本のプライマーを同時に用いて、一本のチューブで9種の遺伝子断片を同時に増幅した。これがマルチプレックス PCR 法である<sup>3)</sup>。

スタート物質が十分ある場合には、サンプルを9本に分けて、それぞれ一種類の遺伝子断片を増幅するプライマーを加えて PCR を行ってもよい。しかし、スタート物質が少ない場合はサンプルを分けてしまうとチューブ間のばらつ

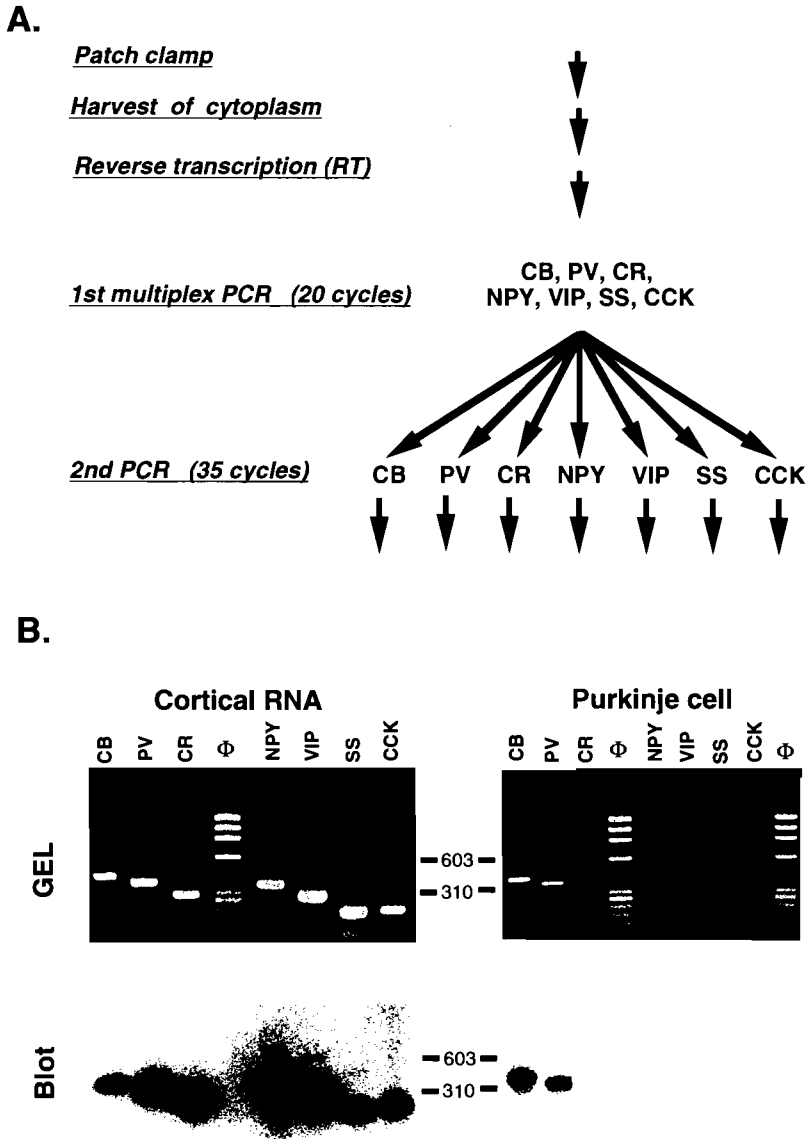


図4 パッチクランプ RT-マルチプレックス PCR

少量の RNA から同時に他種類の遺伝子を検出するために RT-マルチプレックス PCR を行った。ランダムプライマーを用いて逆転写し、カルシウム結合タンパク 3 種(カルビンジン(CB), パルブアルブミン(PV), カルレチニン(CR)), 神経ペプチド 4 種(ニューロペプチド Y, (NPY), バゾアクティブ・インテスティナル・ポリペプチド(VIP), ソマトスタチン(SS), コレシストキニン(CCK))を増幅するプライマーを加え、20サイクルの第一次 PCR を行った。次に、この PCR 産物を 7 本に分け、それぞれ一種類の遺伝子を増幅するプライマーを用いて 35 サイクルの第二次 PCR を行い、電気泳動した。(A)ラット大脳皮質 RNA 0.5 ng を用いたコントロール実験。上段はゲル電気泳動、下段はゲルをナイロン膜にプロットし、これら 7 種類の  $^{32}\text{P}$  標識プローブを混合してハイブリダイズしたもの。これら 7 種類の mRNA は大脳皮質で発現していることが知られており、0.5 ng 程度の少量の RNA を鋳型にしてもマルチプレックス PCR が機能することがわかる。(B)小脳プルキンエ細胞にパッチクランプ RT-マルチプレックス PCR を行った。このプルキンエ細胞からはカルシウム結合タンパク 2 種(CB, PV)のみが検出された。

きが生じる。筆者らの経験でも、鋳型 RNA が 100 分子以下のレンジでは、サンプルを分けるのは危険である。このレンジでは、マルチプレックス PCR 法を行わないと再現性よく少量のサンプルから多数の種類の種類遺伝子を増幅できない。単一細胞レベル程度の量の遺伝子は、まさにこのマルチプレックス PCR 法の対象となる。

### B. RT-マルチプレックス PCR のプライマー

逆転写反応の際に用いるプライマーは、PCR のスタート物質となる cDNA が多種類にわたるので、上述の dN6 を用いる。

PCR に用いるプライマーは、マルチプレックス PCR の場合でも、上述のパッチクランプ RT-PCR のプライマー同様、高効率に遺伝子を増幅するプライマーを用いた。しかし、プライマーの種類が多くなると、プライマー相互の 3' 端に相補的な配列をもたないものを設計することは事実上不可能である。この場合、40 サイクル以上の PCR を行うとプライマーダイマーが生じるのは避けられず、単一細胞レベルのスタート物質では一回の PCR で増幅産物を得ることはできない。そこで、筆者らは、PCR を 2 回に分け、第 1 次 PCR でサンプルを分けることができる程度までマルチプレックス PCR 法で増幅し、第 2 次 PCR で目的とする遺伝子を解析可能な量まで増幅した。

第一次 PCR の反応後、LTI の Glass MAX spin cartridge システムを用いて、プライマーダイマーと未反応のプライマーを除いた。これは 200 bp 以上の長さの DNA はヨウ化ナトリウム存在下で酸化ケイ素に結合するのに対し、短いプライマーダイマーや未反応のプライマーは酸化ケイ素に結合しないという性質を利用したものである。

### C. パッチクランプ RT-マルチプレックス PCR 法の実際

筆者らは、単一ニューロンに発現するカルシ

ウム結合タンパク 3 種(カルビンジン(CB), パルブアルブミン(PV), カルレチニン(CR)), 神経ペプチド 4 種(ニューロペプチド Y(NPY), バゾアクティブ・インテスティナル・ポリペプチド(VIP), ソマトスタチン(SS), コレシストキニン(CCK))の mRNA をパッチクランプ・マルチプレックス RT-PCR 法によって調べた。図 4 に筆者らの行った方法を示す。mRNA を含む細胞質を回収して逆転写反応を行った。まず 7 種類の種類遺伝子を増幅する 14 本のプライマーを同時に用いて、20 サイクルのマルチプレックス PCR を行った。次いで、PCR 産物を精製して 7 本のチューブに分注し、それぞれに 1 種類の種類プライマーを加えて 35 サイクルの再 PCR を行った。目的のものが増幅されていることはサザンブロットによって確認した。図に示した小脳プルキンエ細胞ではカルシウム結合タンパクであるカルビンジンとパルブアルブミンを同時に発現していることがわかった。

## VII おわりに

本稿では、単一細胞レベルで mRNA を解析する実験技術として、パッチクランプ RT-PCR 法を紹介した。本稿で紹介しなかった単一細胞での mRNA 解析法として、アンチセンス RNA 法<sup>11)</sup>と RACE 法<sup>6)</sup>があり、どちらの方法も欠点もあるが、パッチクランプ RT-PCR 法にないユニークな特徴を持っており、本法を補完する方法として発展していくと考えられる<sup>18)</sup>。

中枢神経系では、多種類の興奮性ニューロン、抑制性ニューロンが混在し、これらは神経回路網のなかでユニークな特性をもっている。従来、これらのニューロンの機能的特性の解析は電気生理学的手法によって行われてきたが、パッチクランプ RT-PCR 法をはじめとする単一細胞の mRNA の測定法の開発により、細胞の機能的特性の分子的基盤をさわめて直接的な形で調べることが可能となった。今後は、単一細胞の mRNA 解析を脳機能の解明に役立てていきたい。

最後に、生理学実験と分子生物学実験の違い

についての感想を述べてみたい。歴史的に、生理学者は実験器具を工夫し、実験技術を磨いて、新しい世界を開いてきた。しかし、しばしば生理学者の実験では、「私が熟達した実験技術を駆使して、この実験条件で行う限り…という結果を得る」という留保条件がつくことが多い。一方、分子生物学では、実験は誰がやっても同一の結果が得られるべきである考えられていて、それを可能にするために莫大なエネルギーが使われている。多くの分子生物学者は生理学に夢を感じつつも、時にはデータの信憑性に疑いをもつことがある。筆者らは生理学者として、分子生物学的手法を利用するだけでなく、分子生物学的な発想法も生理学の研究に導入していきたいと考えている。

#### 文 献

- Bochet, P., Audinat, E., Lambolez, B., Crépel, F., Rossier, J., Iino, M., Tsuzuki, K. & Ozawa, S. (1994) Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of a glutamate-gated channel. *Neuron* **12**, 383-388.
- Cauli, B., Audinat, E., Lambolez, B., Angulo, M. C., Ropert, N., Tsuzuki, K., Hestrin, S. & Rossier, J. (1997) Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci* **17**, 3894-3906
- Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E. & Caskey C. T. (1990) Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. in "PCR protocols" eds. M. A. Innis, D. H. Geffand, J. J. Sninsky & T. J. White, Academic press, San Diego, CA, pp 272-281.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Chou, Q., Russell, M., Birch, D. E., Raymond, J. & Bloch, W. (1992) Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1717-1723.
- Dulac, C. & Axel, R. (1995) A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* **83**, 195-206.
- Hollmann, M., Hartley, M. & Heinemann S. (1991)  $Ca^{2+}$  permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* **252**, 851-853.
- Iino, M., Ozawa, S. & Tsuzuki K. (1990) Permeation of calcium through excitatory amino acid receptor channels in cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol. Lond.* **424**, 151-165.
- Isa, T., Itazawa, S., Iino, M., Tsuzuki, K. & Ozawa S. (1996) Distribution of neurones expressing inwardly rectifying and  $Ca^{2+}$ -permeable AMPA receptors in rat hippocampal slices. *J. Physiol. Lond.* **491**, 3, 719-733.
- Lambolez, B., Audinat, E., Bochet, P. & Rossier, J. (1995) Patch-clamp recording and RT-PCR on single cells. in "NEUROMETHODS 26, Patch-clamp application and protocols" eds. A. A. Boulton, G. B. Baker & W. Walz, Humana press, Totowa, NJ, pp 193-231.
- Mackler, S. A. & Eberwine, J. H. (1993) Diversity of glutamate receptor subunit mRNA expression within live hippocampal CA1 neurons. *Mol. Pharmacol.* **44**, 308-315.
- Monyer, H. & Jonas, P. (1995) Polymerase chain reaction analysis of ion channel expression in single neurons of brain slices. in "Single-channel recording, second edition", eds. B. Sakmann & E. Neher, Plenum, New York, NY, pp 357-373.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Rychlik, W., Spencer, W. J. & Rhoads, R. E. (1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6409-6412.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis T. (1989) "Molecular cloning, second edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY
- 都筑馨介 (1996) AMPA 型受容体とカルシウム透過性, *精神神経薬理*, **18**, 453-457.
- 都筑馨介, 小澤壽司 (1996) パッチクランプと単一細胞 RT-PCR 法, 岡田泰伸編, パッチクランプ実験技術法, 吉岡書店, 京都, pp 167-172.
- 都筑馨介 (1997) パッチクランプ RT-PCR 法, 吉川和明編, ニューロサイエンスラボマニユアル 2 神経生物学のための遺伝子導入発現研究法, Springer-Verlag 東京, 東京, pp 224-237.