Osaka University Knowledge Archive

Title	非放射性物質標識プローブによる高感度 in situハイブリダイゼーション法の開発とその分子神経生物学への応用。
Author(s)	木山, 博資
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/37358
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【128】

氏名・（本籍）	木山博資（きやまひろし）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9482 号
学位授与の日付	平成3年2月4日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**非放射性物質標識プローブによる高感度 in situハイブリダイゼーション法の開発とその分子神経生物学への応用。**
論文審査委員	（主査）教授 塩谷弥兵衛 （副査）教授 遠山 正彌　教授 三木 直正

論文内容の要旨

【目　的】

近年の分子生物学の発展により，遺伝子発現を組織上で可視化することが可能となった。この方法は，in situハイブリダイゼーション法と呼ばれ目的のmRNAと相補的な塩基配列を有するプローブを用いて特定のmRNAを検出する。一般にプローブはリポーター分子として放射性物質により標識され，組織上でハイブリダイゼーションの後オートラジオグラフィーにて可視化を行っている。しかしながらオートラジオグラフィーの有する欠点として，長時間の露出，低い解像度などの問題点を有しており技術的な制約が存在している。このような欠点を克服するには，オートラジオグラフィーを用いない方法，すなわちリポーター分子として放射性物質以外の分子を用いることが必要である。

本研究は，このような背景のもとに多くの欠点を有する放射性物質標識プローブにかわる高感度の非放射性物質標識プローブを開発することを目的とし，従来の放射性物質標識による方法と比較検討した。

【方　法】

^{35}S等の放射性物質に代わるプローブのリポーター分子としてビオチンやディゴキシジェニン等の分子を用い，抗体等で免疫組織化学的に検出するいわゆる間接法，可視化のための酵素を直接プローブに結合する直接法などを試みた。間接法におけるリポーター分子は既にヌクレオチドに組み込んであるものを酵素的にオリゴヌクレオチドプローブに組み込み，抗体等の検出分子を用いて免疫組織化学的に検出した。

一方，酵素等を直接オリゴプローブに結合する方法としては，リンカーアームの先端にアミノ基1分子を有する修飾されたヌクレオチドをDNA合成機にてオリゴプローブ中に組み込んでおき，後でバイファンクショナルなクロスリンカーによりアルカリフォスファテース等の酵素分子と結合させた。これらの可視化

にはハイブリダイゼーション後特異的な基質中で呈色反応を行った。これら一連の実験にはオキシトシン，バソプレッシン，ソマトスタチン，チロシン水酸化酵素等のmRNAと相補的な塩基配列を有するプローブを用いた。また，二種のmRNA同時検出にはアルカリフォスファテース標識したオキシトシンプローブと^{35}S標識したバソプレッシンプローブを用いて行った。

【結　　果】

各種リポーター分子標識によるプローブのmRNA検出能を比較検討した結果，ビオチン等の小分子をリポーター分子としてそれを抗体等で検出し化学増幅するいわゆる間接法においては，一プローブ分子あたりに組み込まれるリポーター分子の数に比例し検出能が向上する傾向が認められた。しかしながら，一般にバックグラウンドが高くなり，コントラストの高いハイブリダイゼーション信号が得にくかった。これはプローブのリポーター分子検出のための化学増幅反応が同時にバックグラウンドも上げるためであると考えられる。一方，直接酵素を結合した直接法の中では，特にアルカリフォスファテースにより直接標識したプローブが高い解像度と低いバックグラウンドにより良好な結果を呈した。このプローブを用いることにより，従来の放射性物質標識プローブを用いる方法に比べ飛躍的に短時間で実験が行えるだけでなく，従来行うことのできなかった同一細胞上での２種のmRNAを同時に検出することが可能となった。
すなわち，アルカリフォスファテース標識したオキシトシンプローブと放射性物質標識したバソプレッシンプローブを同時にハイブリダイズし，アルカリフォスファテースの発色反応の後，乳剤によるオートラジオグラフィーをおこなった。この結果，従来の免疫組織化学では報告されていなかったオキシトシンとバソプレッシンの共存発現の例が視床下部で確認された。さらに本方法は電子顕微鏡レベルでのmRNA局在を検出することも可能であり，より広範な応用が展開できるようになった。

【総　　括】

各種非放射性物質標識プローブの中でもアルカリフォスファテースを直接オリゴヌクレオチドプローブに結合したプローブが高いmRNA検出能を有した。　本方法は従来の放射性物質を用いた方法等に比べ以下の点において優れている。

1. オートラジオグラフィーが不必要なため実験に要する時間が短縮される。
2. 高い解像度と低いバックグラウンドが得られる。
3. 放射性物質標識プローブとの併用で，２種のmRNAを同時に検出できる。
4. 間接法では得にくい定量性があり，比較定量に用いることができる。
5. 電顕レベルでのmRNAの局在の同定が行える。
6. ＲＩ施設が不要であり，ＲＩ廃棄物を生じない。

論文審査の結果の要旨

特定の遺伝子発現を組織上で可視化するin situハイブリダイゼーションは，一般に放射性物質により標識されたプローブを用い，オートラジオグラフィーにて可視化を行っている。しかしながらオートラジオグラフィーには技術的欠点，すなわち長時間の露出，低い解像度等が有り，この方法の応用範囲は制約されている。　これらの欠点を克服するため放射性物質を用いない，いわゆる非放射性物質標識によるin situハイブリダイゼーション法が求められていた。

本研究は，このような背景のもと，感度の高い非放射性物質標識プローブによるin situ ハイブリダイゼーション法を開発し，それにより従来の放射性物質標識プローブでは行うことのできなかったいくつかの新しい実験系を可能にしている。

本研究で開発された方法は，分子神経生物学の分野において有用な研究手段を提供するものであり，学位に値する論文であると考えられる。