



Title	凍結転写法のin situハイブリダイゼーション法への応用
Author(s)	前田, 隆史
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3128977
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	前田 隆史
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第13076号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	凍結転写法のin situハイブリダイゼーション法への応用
論文審査委員	(主査) 教授 潤端 孟 (副査) 教授 重永 凱男 助教授 石田 武 助教授 脇坂 聰

論文内容の要旨

In situハイブリダイゼーション (ISH) 法は組織中の遺伝子発現の局在を明らかにするのに非常に有効な方法であり、医学、生物学の分野で広範囲に活用されている。しかしながら、従来のISH法は技術的にも複雑で、さらに、骨、軟骨などの硬組織を標本とした場合、プローブの細胞外基質への非特異的結合によりバックグラウンドシグナルが増加するという問題点があった。バックグラウンドシグナルの増加を防ぐためにはハイブリダイゼーションを高温で行ったり、あるいはハイブリダイゼーション後の洗浄を激しく行ったりすればよいが、従来のスライドグラスを用いた方法でこの様な操作を行うと切片が傷ついたり、しばしば切片がスライドグラスから剥離してしまうなどの問題があった。

最近、McGrathらによって、凍結転写法が報告された。これは凍結切片を従来のスライドグラスの代わりにニトロセルロース膜上に解凍しながら転写した後、免疫組織化学的検出を行う方法で、膜タンパク質などの検出を高感度に行うことができる。この方法はタンパク質を対象としたものであったが、著者は核酸もニトロセルロース膜に強く吸着する点に着目し、凍結転写法をISH法に応用することで従来のISH法の問題点を克服した新しいISH法が開発できるのではないかと考え検討した。

まず、ニトロセルロース膜とスライドグラスの凍結切片の結合性を比較した。マウス18日齢胎仔の後肢の凍結切片をそれぞれに転写あるいはマウントした後55°C、65°C、75°Cの各温度のハイブリ液中で12時間インキュベートし試料の剥離状態を調べた。スライドグラスにマウントした切片では65°Cで60%、75°Cで90%の試料が剥離したのに対して、ニトロセルロース膜に転写した切片では75°Cが10%が剥離したにすぎなかった。この結果、ニトロセルロース膜はスライドグラスに比べて高い温度でも切片の保持が良好であることが明らかになった。

次に、凍結転写法を応用した本研究の方法と従来の方法の検出感度を比較した。ラット14日齢胎仔頭部の前頭断の凍結切片をニトロセルロース膜あるいはスライドグラスに転写あるいはマウントして、それぞれラットII型コラーゲンに対するプローブを用いてII型コラーゲン遺伝子の発現を調べた。遺伝子の発現はジゴキシジエニン標識核酸検出キットを用いて検出し、メッケル軟骨における特異的シグナルの強さとその周辺組織のバックグラウンドシグナルの強さとの比率(シグナル・ノイズ比)を画像解析ソフトで定量的に解析した。本研究の方法では検出反応開始10分以内に明らかなシグナル・ノイズ比の上昇が見られたが、従来の方法では明らかなシグナル・ノイズ比の上昇は反応1時間後まで得られなかった。さらに、同様の試料を用いて異なる濃度のプローブとともにハイブリダイゼーションを

行い検出反応を1時間行った。本研究の方法では30ng/mlのプローブ量で十分に高いシグナル・ノイズ比が得られたの対して、従来の方法では十分に高いシグナル・ノイズ比を得るのに300ng/mlのプローブ量が必要であった。これらの結果より、凍結転写法を応用した方法は従来の方法に比べて少なくとも10倍以上感度が高いことが明らかになった。

本研究によって凍結転写法が *in situ* ハイブリダイゼーション法に応用可能であることが判明した。凍結切片を転写する支持体として用いたニトロセルロース膜は、RNAを膜表面に吸着するため特異的シグナルは上昇し、凍結転写法を応用した *in situ* ハイブリダイゼーション法は従来の方法と比較して高感度を有することが明らかになった。また、ニトロセルロース膜は、従来のスライドグラスに比べて組織切片の保持が良好なため、従来の方法より高い温度でハイブリダイゼーション、およびプローブの洗浄を行うことが可能になった。その結果、従来の方法ではバックグラウンドシグナルを減少させるために必要であった RNaseA 处理などの操作を本研究の方法では省くことができ、実験操作が簡便になった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、従来の非放射性標識プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法の問題点であった実験手法の複雑さや、検出感度の低さなどを解決するために、より実用的な新しい方法の開発を目的としたものである。

本研究の結果、凍結転写法を応用した新しい方法により、従来に比べて簡便に、発現の微弱な遺伝子を検出することが可能になった。

よって、本研究は種々の遺伝子発現の解析に必要不可欠である、簡便で高感度の新しい *in situ* ハイブリダイゼーション法を開発した優れた業績であり、博士（歯学）の学位請求に十分値するものと認める。