

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	<a href="https://doi.org/10.11501/3128977">https://doi.org/10.11501/3128977</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

博士論文

凍結転写法の in situ

ハイブリダイゼーション法への応用

1997年3月

大阪大学大学院歯学研究科 歯学臨床系専攻（歯科放射線学）

前 田 隆 史

凍結転写法の in situ

ハイブリダイゼーション法への応用

## 緒 言

In situ ハイブリダイゼーション法は組織における特定の遺伝子発現の局在を調べるために非常に有効な方法であり、医学、生物学の分野で広範に活用されている<sup>1, 2)</sup>。特に、個体発生、形態形成の制御に関わる特定の遺伝子の機能を明らかにするためには、その遺伝子の部位特異的および時期特異的な発現パターンを調べることが必須である。しかしながら、in situ ハイブリダイゼーション法は実験手法としては複雑であり、誰もが簡単に行えるとは言い難い。同方法は多くの操作手順を含み、実験中にRNA分解酵素 (Ribonuclease ; RNase) により組織切片中のメッセンジャーRNA (mRNA) が分解されないように細心の注意をはらって実験する必要がある、技術的にも熟練を要する。また、実験操作中に組織切片の断面から可溶性のmRNAが溶液中に漏出するため、発現の微弱的な遺伝子ではシグナルの検出が困難である。さらに、歯科医学領域で取り扱うことの多い骨、軟骨などを含む硬組織を試料とした場合、組織切片がスライドガラスから剥離しやすい、プローブが豊富な細胞外基質に非特異的に結合してしまうためにバックグラウンドシグナルが増大しやすい、などの問題点がある。したがって、軟組織だけでなく硬組織においても遺伝子の発現状態を正確に把握するためには、これらの問題点を解決したin situ ハイブリダイゼーション法が必要とされる。

一般的に、in situ ハイブリダイゼーション法は方法論上、<sup>35</sup>Sなどの放射性同位元素標識プローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、オートラジオグラフィでシグナ

ルを検出する方法<sup>3, 4)</sup>と、抗原性を持つ物質（例えばジゴキシジェニン、ビオチン等）で標識したプローブを用いて免疫組織化学的にシグナルを検出する方法<sup>5~7)</sup>とに大別できる。非放射性標識プローブを用いた方法は、放射性標識プローブを用いた方法に比べて、RI廃棄物を生じないこと、RI施設を必要としないこと、高い解像度の結果が短時間で得られることなどの利点がある<sup>8)</sup>。しかしながら、検出感度という点に関しては、放射性標識プローブを用いた方法と同程度であるという報告<sup>9, 10)</sup>もあるが、一般的には低いといわれている<sup>4)</sup>。したがって、高い解像度で、しかも検出感度の高いin situ ハイブリダイゼーション法を開発することができれば、非放射性標識プローブを用いた方法で、微弱な遺伝子発現を容易に検出することが可能になると思われる。

最近、タンパク質の免疫組織化学的方法の一つとして凍結転写法が開発された<sup>11)</sup>。これは凍結切片をニトロセルロース膜へ転写した後、免疫組織化学的検出を行う方法である。この方法では、タンパク質がニトロセルロース膜に直接吸着するため、実験操作中に可溶性タンパク質が切片から溶液中に漏出するのを防ぐことができる。その結果、従来の免疫組織化学的方法では検出が困難であった受容体タンパク質を高感度に検出することが可能になった。また、通常の組織化学的染色を行った後、ニトロセルロース膜をキシレン等の有機溶媒に浸漬して透明にすることで、組織切片を光学顕微鏡下で観察することができる。この方法はタンパク質を対象としたものであるが、ノーザンハイブリダイゼーション法の例からも明らかのように、核酸もニトロセルロース膜に強い吸着性を持っているので、この凍結転写法をin situ ハイブリダイゼーション法に応用するこ

とで、従来の方法よりも高感度にin situ ハイブリダイゼーションを行えるのではないかと考えられる。

そこで、本研究では凍結転写法をin situ ハイブリダイゼーション法に応用するために、ニトロセルロース膜の材質やハイブリダイゼーション、洗浄の条件などの実験条件の検討を行った。また、従来の方法との検出感度の比較を行った。その結果、従来の方法の問題点を解決した、簡便で応用範囲が広い、新しいin situ ハイブリダイゼーション法が開発できた。

## 材 料 と 方 法

### 1. 材料および試薬

ニトロセルロース膜はSchleicher and Schuell 社 (Keene, NH, USA) より購入した。シランコートスライドガラスは松浪ガラス (大阪) より購入した。ジゴキシジェニン (Digoxigenin ; DIG) 標識核酸検出キットはBoehringer Mannheim 社 (Germany) より購入した。その他の試薬は特級のをSigma Chemical 社 (St. Louis, MO, USA) あるいは和光純薬工業 (大阪) より購入した。

### 2. 凍結切片の作製

妊娠14日齢のマウスおよび妊娠16日齢のラット (日本動物、大阪) よりネンブタール麻酔下で胎仔を取り出し、その四肢、頭部を試料とした。試料は0.1Mリン酸緩衝液 (PB, pH 7.4) で希釈した4%パラホルムアルデヒド (PFA) 溶液で2時間浸漬固定した後、O.C.T コンパウンド (Miles, Elkhart, IN, USA) に包埋し、厚さ5  $\mu$ mの凍結切片を作製した。

### 3. In situ ハイブリダイゼーション

#### 1) プロープの作製

ハイブリダイゼーションプロープはDIG-UTPで標識したRNAプロープを用いた。RNA

プローブは、あらかじめin vitro で転写可能なプラスミドに組込まれたcDNAを適当な制限酵素で直線状にした後、RNAポリメラーゼ (Promega, Madison, WI, USA) を用いて転写して作製した。ラットI型コラーゲンRNAプローブは、ラット $\alpha 2$  (I) 鎖のC-プロペプチドをコードする部分のcDNA<sup>1 2)</sup> のPst I 消化断片をpGEM-4にサブクローニングしたものをを用いて作製した。ラットII型コラーゲンRNAプローブは、ラット $\alpha 1$  (II) 鎖のN-プロペプチドをコードする部分のcDNA<sup>1 3)</sup> のPst I 消化断片 (550bp) をpGEM-4にサブクローニングしたものをを用いて作製した。ラットIX型コラーゲンRNAプローブは、ラット $\alpha 1$  (IX) 鎖のエクソン6および7をコードするcDNA<sup>1 4)</sup> をpBluescriptにサブクローニングしたものをを用いて作製した。ラットX型コラーゲンRNAプローブは、ラット $\alpha 1$  (X) 鎖のNC1部分をコードするcDNA<sup>1 5)</sup> をpBluescriptにサブクローニングしたものをを用いて作製した。ラットアグリカンRNAプローブはラットアグリカンのC端部分をコードするcDNAのPst I 消化断片 (870bp) をpGEM-3Zにサブクローニングしたものの<sup>1 6)</sup> を用いて作製した。なお、ラットII型コラーゲンcDNA およびラットアグリカンcDNA はY. Yamada 博士 (National Institute of Dental Research) より供与された。

## 2) 凍結転写法を応用したin situ ハイブリダイゼーション法

約10×70 mm の大きさに切ったニトロセルロース膜を0.1M塩化カルシウム溶液中で90℃で10分間処理した後に風乾し、クリップでスライドガラスに固定した。凍結切片をニトロセルロース膜上に通常のスライドガラスに対するのと同様の方法で転写し、ドライ



ヤーで完全に乾燥させた後に切片の前処理を行った。すなわち10  $\mu$ g/mlのプロテアーゼ Kで20分間処理し、その後4%PFA溶液で10分間再固定した。一部の実験においては、切片をさらに0.2N 塩酸で10分間処理した後に無水酢酸にて10分間アセチル化を行った。前処理された切片をドライヤーで完全に乾燥させた後にニトロセルロース膜の切片以外の部分をトリミングし、25mm径マルチウェルプレート (Corning, NY, USA) に移して以後の実験操作を行った。切片をハイブリダイゼーション溶液 [10mM トリス-塩酸緩衝液 (Tris-HCl, pH 7.6) 、1×デンハルト液<sup>17)</sup>、10%硫酸デキストラン、600mM 塩化ナトリウム、0.25%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 、1mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 、200  $\mu$ g/ml トランスファーRNA (tRNA) を含む50%ホルムアミド溶液] 中で65℃、3時間プレハイブリダイゼーションを行った後、同溶液を交換しDIG標識プローブを加え65℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、ニトロセルロース膜を新しいマルチウェルプレートに移して洗浄を行った。まず、2×標準クエン酸ナトリウム溶液 (SSC) を含む50%ホルムアミド溶液中で65℃、10分間×3回、続いて0.2×SSCを含む50%ホルムアミド溶液中で65℃、15分間×2回洗浄した。一部の実験においては、切片をさらに20  $\mu$ g/mlのRNaseAで20分間処理した後2×SSCで50℃、15分間×2回洗浄した。洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシジェニン抗体 (AP標識抗DIG抗体) と反応させ、4-ニトロブルーテトラゾリウムクロライド (NBT) および5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸 (BCIP) を基質として発色反応を行いシグナルを検出した。検出反応終了後、水洗、風乾したニトロセルロース膜をキシ

レンに浸漬して透明にし、パーマウント (Fisher Scientific, NJ, USA) で封入した。

### 3) 従来のin situ ハイブリダイゼーション法

凍結切片をシランコートされたスライドガラスにマウントした後、ニトロセルロース膜を用いたin situ ハイブリダイゼーション法と以下の点以外は同じ方法で行った。すなわち、0.2N塩酸と無水酢酸による切片の前処理、洗浄時のRNaseA処理は必ず行い、ハイブリダイゼーションと洗浄の温度を65℃ではなく50℃で行った。

### 4. シグナルの定量解析

実験で得られた画像をコンピューターに取り込み、画像解析ソフトウェアNIH Image Software (ver. 1.55) でメッセル軟骨におけるII型コラーゲン遺伝子発現の特異的シグナルの強さとその周辺組織の非特異的シグナル (バックグラウンドシグナル) の強さを測定した。その比をシグナル・ノイズ比として定量解析した。

### 5. 転写した凍結切片の組織解像度の評価

マウス14日齢胎仔の後肢の凍結切片をポアサイズ0.2、0.05、0.025  $\mu\text{m}$ の各ニトロセルロース膜にそれぞれ転写して風乾した。続いて、切片を0.1%ヌクレアーファーストレッドで染色して十分に水洗した後に風乾した。キシレンに浸漬して透明にしたニトロセルロース膜を封入し、光学顕微鏡で観察して組織の解像度を調べた。

## 結 果

### 1. 種々のポアサイズのニトロセルロース膜へ転写した凍結切片の組織解像度の比較

ポアサイズ0.2、0.05、0.025  $\mu\text{m}$ の各ニトロセルロース膜に転写された凍結切片を0.1%ヌクレアーファーストレッドで染色して、十分に水洗した後に風乾した。キシレンに浸漬して透明にしたニトロセルロース膜を封入後、光学顕微鏡で観察して組織の解像度を比較した(図1)。ニトロセルロース膜に転写されたいずれの切片も、組織・細胞構造が比較的良好に保たれていた。特に0.05、0.025  $\mu\text{m}$ のポアサイズのニトロセルロース膜に転写された切片では、0.2  $\mu\text{m}$ のポアサイズのニトロセルロース膜に転写された切片よりも解像度が優れていた。したがって、ポアサイズ0.05  $\mu\text{m}$ 以下のニトロセルロース膜を用いた場合、転写された凍結切片内の個々の細胞の観察が高解像度で可能なことが明らかになった。

### 2. 凍結切片のニトロセルロース膜あるいはシランコートスライドガラスへの結合性の比較

マウス14日齢胎仔の後肢の凍結切片をニトロセルロース膜に転写、あるいはシランコートスライドガラスにマウントして風乾した。続いて、切片を55 $^{\circ}\text{C}$ 、65 $^{\circ}\text{C}$ 、75 $^{\circ}\text{C}$ 、の各ハイブリダイゼーション液中で12時間インキュベートした後、切片を0.1%ヌクレアー

ファーストレッドで染色して剥離した切片の枚数を調べた（表1）。シランコートスライドガラスにマウントした凍結切片では、55℃でのインキュベーションでは剥離した切片は無かったが、65℃では10切片のうち6切片が、75℃では10切片のうち9切片がそれぞれ剥離した。一方、ニトロセルロース膜に転写した凍結切片では、55℃、65℃の各温度でのインキュベーションでは剥離した切片は無く、75℃で10切片のうち1切片が剥離しただけであった。したがって、ニトロセルロース膜はシランコートスライドガラスに比べて、切片の保持が高温でも優れており、従来のin situ ハイブリダイゼーション法より高い温度でハイブリダイゼーションなどの実験操作が行えることが分かった。

### 3. 凍結転写法を応用したin situ ハイブリダイゼーション法の条件の決定

従来のin situ ハイブリダイゼーション法では、プローブの組織切片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大するのを防ぐために、ハイブリダイゼーション前に切片を0.2N 塩酸で処理したり<sup>18)</sup>、無水酢酸でアセチル化したり<sup>19, 20)</sup>することが通常行われる。また、RNAプローブを用いた場合には、ハイブリダイゼーション後に切片をRNaseAで処理して標的mRNAとハイブリッドを形成したもの以外のプローブを分解して取り除く必要がある<sup>21)</sup>。これらの実験操作は煩雑であると同時に過剰なRNaseA処理は特異的なシグナルも減少させる。一方、RNAプローブを用いたノーザンハイブリダイゼーション法では、in situ ハイブリダイゼーション法よりも高い温度でハイブリダイゼーションや洗浄を行うので上記のような実験操作は通常行う必要がない。そこで、

凍結転写法を応用したin situ ハイブリダイゼーション法における上記の実験操作の必要性を検討した。

マウス14日齢胎仔の後肢をニトロセルロース膜に転写したものを試料として、塩酸処理を省く群、塩酸処理とアセチル化を省く群、塩酸処理、アセチル化およびRNaseA処理の全てを省く群、これらの処理を全て行う群、の4群についてそれぞれII型コラーゲンmRNAに対するプローブを用いてin situ ハイブリダイゼーションを行った(図2)。その結果、凍結転写法を応用したin situ ハイブリダイゼーション法では、塩酸処理、アセチル化およびRNaseA処理の有無に関わらずバックグラウンドシグナルがほとんど検出されないことが判明した。また、RNaseA処理を行わない方が、行った場合に比べて強い特異的シグナルが得られることも明らかになった(図2C)。

#### 4. 凍結転写法を応用したin situ ハイブリダイゼーション法と従来の方法との検出感度の比較

次に、本研究の方法と従来の方法との検出感度の比較を、メッケル軟骨におけるII型コラーゲン遺伝子の発現の強さを指標として行った。ラット16日齢胎仔の頭部の前頭断の凍結切片をニトロセルロース膜に転写、あるいはシランコートスライドガラスにマウントした。続いて、II型コラーゲンmRNAに対するプローブを用いてそれぞれin situ ハイブリダイゼーションを行い、シグナル検出反応を経時的に停止してメッケル軟骨におけるII型コラーゲン遺伝子の発現の強さを比較した(図3)。

凍結転写法を応用したin situ ハイブリダイゼーション法では、検出反応開始10分以内に明らかなシグナルが得られたが（図3A）、従来の方法では、明らかなシグナルは検出反応開始1時間前後まで得られなかった（図3B）。さらに、この実験で得られた画像をコンピューターに取り込み、画像解析ソフトでメッセル軟骨におけるII型コラーゲン遺伝子発現の特異的シグナルの強さと周囲組織のバックグラウンドシグナルの強さの比をシグナル・ノイズ比として定量的に解析した（図4）。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・ノイズ比の上昇がみられ、30分で平衡状態に達したが、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開始1時間前後までみられなかった。

また、同じ切片で種々の濃度のII型コラーゲンmRNAに対するプローブを用いてin situ ハイブリダイゼーションを行った後、同じ条件でシグナル検出反応を1時間行い、メッセル軟骨におけるII型コラーゲン遺伝子の発現のシグナル・ノイズ比とプローブ濃度の関係を本研究の方法と従来の方法とで比較した（図5）。凍結転写法を応用した本研究の方法では30ng/mlのプローブ濃度で十分に高いシグナル・ノイズ比が得られたが、従来の方法では、同程度に高いシグナル・ノイズ比を得るのに300ng/mlのプローブ濃度が必要であることが明らかになった。

## 5. 凍結転写法を応用したin situ ハイブリダイゼーション法による種々のコラーゲン遺伝子の発現の検出

これまでの実験で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、高感度に、しかも簡便に特定遺伝子の発現を検出できることが明らかになった。そこで、実際に本方法を用いてマウス14日齢胎仔の後肢における種々のコラーゲン遺伝子の発現を検出した。II、X型コラーゲン遺伝子の発現については、検出反応終了後に風乾したニトロセルロース膜を実体顕微鏡で観察した(図6)。Sandellらの報告<sup>22)</sup>にあるように、II型コラーゲン遺伝子の発現は全ての軟骨組織に検出され(図6A)、X型コラーゲン遺伝子の発現は骨幹部の骨髄に近接したいわゆる肥大軟骨層に検出された(図6B)。I、IX型コラーゲン遺伝子の発現については、キシレンに浸漬して透明にしたニトロセルロース膜を封入して光学顕微鏡で観察した(図7)。これもSandellらの報告<sup>22)</sup>にあるように、I型コラーゲン遺伝子の発現は軟骨以外の組織全域、特に骨組織に強く検出され(図7A)、IX型コラーゲン遺伝子の発現は軟骨組織全域に検出された(図7B)。

## 考 察

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、比較的良好に組織構造の解像度を保ったまま、従来のスライドガラスより強固に組織切片を吸着した。したがって、凍結転写法を応用したin situ ハイブリダイゼーション法では、従来の方法よりも厳しい条件下でハイブリダイゼーション、あるいは洗浄操作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とされている切片の塩酸処理、アセチル化、およびハイブリダイゼーション後のRNaseA処理などの操作を省いても高感度に特定の遺伝子の発現を検出できた。また、本方法による遺伝子発現の検出感度は、シグナル検出時間、あるいはプローブ濃度とシグナル・ノイズ比の関係の解析などの結果より、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示された。

細胞や組織内で免疫組織化学的手法により、あるタンパク質の局在が明らかになった場合、そのタンパク質が産生された場所を知るためには、そのタンパク質のmRNAの局在をin situ ハイブリダイゼーション法で明らかにする必要がある。また、多種の細胞より構成される組織において個々の細胞の遺伝子の発現状態を明らかにするためにin situ ハイブリダイゼーション法は非常に有効である。しかしながら、mRNAが局所に存在していてもその発現が微弱な場合、シグナルの検出が困難であることが多い。この問題点



を解決するために、in situ ハイブリダイゼーション法の検出感度を増大させるための様々な改良が行われてきた。従来より報告されている改良法を大別すると、ハイブリダイゼーションの効率を改善して検出感度を増大させようとする方法と、標的mRNAにハイブリダイズした標識プローブの検出法を改良して検出感度を増大させようとする方法がある。前者の例では、切片をプロテアーゼKで前処理してプローブの組織内への浸透性を高める方法<sup>23)</sup>が報告されている。後者の例では、化学発光を利用して検出する方法<sup>24)</sup>やストレプトアビジン-ビオチン反応を利用して検出する方法<sup>25)</sup>などが報告されている。また、De BlockらはAPase反応を行う基質溶液中に高分子のポリビニルアルコールを添加することによって反応生成物の拡散を防ぎ、検出感度が20倍増大したと報告している<sup>26)</sup>。

本研究では、従来の改良点とは異なり、標的mRNAの切片からの漏出を減少させることにより検出感度の増大を試みた。従来の免疫組織化学的方法やin situ ハイブリダイゼーション法では、可溶性のタンパク質やRNAが実験操作中に組織切片から漏出することは避けられない。これら標的物質の組織切片からの漏出が検出感度の減少をもたらすと報告されている<sup>27, 28)</sup>。最近McGrathらは、従来のスライドガラスを用いた免疫組織化学的方法では検出が困難であった上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) やHer-2などの膜タンパク質が凍結転写法を用いると高感度に検出することができると報告している<sup>11)</sup>。この結果は、凍結転写法をin situ ハイブリダイゼーション法に応用した場合でも標的mRNAを高感度に検出できる可能性があることを示唆している。実際に応用を試みた結果、従来のin situ ハイブリダイゼーション法に比べて標的mRNAを高感度に検出するこ

とが可能であった。検出感度が増大した理由として次の二つのものが考えられる。まず一つめの理由として組織切片を保持する支持体のRNAの吸着容量の違いが考えられる。従来のin situ ハイブリダイゼーション法では組織切片の支持体としてスライドガラスを用いるが、スライドガラス自身はタンパク質やRNAを吸着しないので、スライドガラスの表面をポリ-L-リジン<sup>29)</sup> や3-アミノプロピルトリエトキシシラン<sup>30)</sup> で処理しておく必要がある。しかしながら、タンパク質は表面処理剤の極性や官能基を介して間接的にスライドガラスと結合するだけであるため、組織切片の保持力は弱く、また、RNAもスライドガラスと直接的に結合することなく組織切片中に存在しているため、実験操作過程での組織切片中からのRNAの漏出を防ぐことはできない。これに対して、ニトロセルロース膜は多孔性の構造を持ち、直接的にタンパク質やRNAを膜表面に強固に吸着するため、凍結転写法によって転写された組織切片では、組織切片中からのRNAの漏出を減少させることができる。したがって、標的mRNAを組織切片中に多く保持することが可能になった。

さらに、二つめの理由としてRNaseA処理を省くことができる点が考えられる。

RNaseA処理はRNAプローブを用いた場合に、余剰のプローブを分解してバックグラウンドシグナルを減少させるために、従来のin situ ハイブリダイゼーション法においてハイブリダイゼーション後に行われる。しかしながら、プローブの一部だけが標的mRNAに結合してハイブリッドを形成しているような場合、同処理によって結合していない部分のプローブが除去され、特異的シグナルも同時に減少する(図8)。凍結転写法を応

用したin situ ハイブリダイゼーション法では、前述したとおり組織切片がニトロセルロース膜表面に強固に吸着するため、従来の方法では切片がスライドガラスから剥離するために不可能であった高温（例えば65℃）でのハイブリダイゼーションや、激しく振盪しながらのプロブの洗浄を行うことができるので、RNaseA処理を省略してもバックグラウンドシグナルはほとんどみられない。したがって、RNaseA処理の省略により、特異的シグナルの減少を防ぐことが可能になった。すなわち、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、従来の改良点とは異なる理由で感度が増大しているので、従来報告されている感度を増大させるための手段と組み合わせることによって、さらに感度を増大することが可能であると考えられる。

また、本研究の方法では、通常バックグラウンドシグナルを減少させるために行われる、切片の塩酸処理およびアセチル化などの操作を省くことができる点や、ハイブリダイゼーション以後の操作をマルチウェルプレートで行える点などから、従来の方法より実験手法が簡便になった。しかも、従来の方法では、スライドガラス上にマウントした組織切片中のRNAが、RNaseにより分解されないように細心の注意を必要としたが、本研究の方法では、一度ニトロセルロース膜上に転写された組織切片中のRNAは膜上に良好に固相化されるため、RNaseによる分解が起こりにくく、実験中にあまりRNaseの汚染を考慮する必要がない。

これまで、凍結転写法を応用したin situ ハイブリダイゼーション法の優れている点についていくつか述べてきたが、問題点もある。まず、スライドガラスにマウントした組

織では容易に行える対比染色が、ニトロセルロース膜に転写した組織ではシグナル検出反応後に行うことが困難である点である。この点に関しては、シグナル検出反応前に通常よりも希釈した染色液で染色することによって解決できる。また、解像度に関しては、従来の方法に比べるとやや劣るが細胞レベルでの観察は十分可能である。解像度はニトロセルロース膜のポアサイズの大きさに影響されるが、現在市販されているものでは0.02  $\mu\text{m}$ のポアサイズが最小であり、現時点では細胞内における遺伝子発現部位の観察には適さない。

本方法は、支持体であるニトロセルロース膜の大きさを自由に変えることができるので、大きな組織全体を切片としてin situハイブリダイゼーションを行うことも可能である。また、最近では、組織内で目的とする遺伝子をPCRで増幅した後に検出するin situ PCRという新しい技術が開発されたが、PCRの過程で急激な温度変化と高温にさらされるため組織切片がスライドガラスから剥離しやすいという問題がある。しかしながら、本方法では、組織切片が膜に固相化され、しかも高温でも良好に保持されるのでin situ PCRにも十分応用できると考えられる。

本研究の結果、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in situ ハイブリダイゼーション法と比べて特定遺伝子の検出を高感度に、しかも簡便に行えることが判明した。

## 結 論

本研究の方法は、従来のin situ ハイブリダイゼーション法と比べて10倍以上の検出感度を示した。また、本研究の方法では、ニトロセルロース膜に転写された組織切片が膜と強く結合するので、従来の方法よりも高温でハイブリダイゼーションやプローブの洗浄が可能になり、従来の方法で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塩酸処理、アセチル化およびRNaseA処理などの操作が必要なくなったために実験操作を簡略化できた。以上より、凍結転写法が、in situ ハイブリダイゼーション法に応用できることが判明した。

## 文 献

- 1) Gall, J. G. and Paudue, M. (1969) : Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63, 378-383.
- 2) John, H. A., Birnstiel, M. L. and Jones, K. W. (1969) : RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223, 582-587.
- 3) 澤井高志 (1992) : アイソトープによるISHとその病理学への応用, 学際企画, 東京, 平成4.
- 4) 中根一穂 編 (1991) : In situハイブリダイゼーション手法, 学際企画, 東京, 64-87, 平成2.
- 5) Singer, R. H., Lawrence, J. B. and Villnave, C. (1986) : Optimization of in situ hybridization using isotopic and non-isotopic detection methods. *Bio Techniques*, 4, 230-250.
- 6) Yamada, H., Aida, T., Taguchi, K. and Asano, G. (1989) : Localization of type III procollagen mRNA in areas of liver fibrosis by in situ hybridization. *Acta Pathol. Jpn.*, 39, 719-724.
- 7) Koji, T. and Brenner, R. M. (1993) : Localization of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rhesus monkey uterus by nonradioactive in situ hybridization with digoxigenin-labeled oligodeoxynucleotides. *Endocrinology*, 132, 382-392.

- 8) 高橋謙治, 熊本賢三, 久保俊一 (1993) : ジゴキシゲニン標識DNAプローブを用いたin situ ハイブリダイゼーション法. *細胞*, 25, 466-469, 平成5.
- 9) Denijn, M., de Weger, R. A., Berends, M. J. H., Compier-Spies, P. I., Jansx, H. and van Unnik, J. A. M. (1990) : Detection of calcitonin-encoding mRNA by radioactive and non-radioactive in situ hybridization: Improved colorimetric detection and cellular localization of mRNA in thyroid sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 38, 351-358.
- 10) Unger, E. R., Hammer, M. L. and Chenggis, M. L. (1991) : Comparison of 35S and biotin labels for in situ hybridization: Use of an HPV model system. *J. Histochem. Cytochem.*, 39, 145-150.
- 11) McGrath, C. M., Grudzien, J. L., Decker, D. A. and Robbins, T. O. (1991) : Cytometrically coherent transfer of receptor proteins on microporous membranes. *BioTechniques*, 11, 352-361.
- 12) Genovese, C., Rowe, D. and Kream, B. (1984) : Construction of DNA sequences complementary to rat alpha 1 and alpha 2 collagen mRNA and their use in studying the regulation of type I collagen synthesis by 1.25-dihydroxyvitamine D. *Biochemistry*, 23, 6210-6216.
- 13) Kohno, K., George, R. M. and Yamada, Y. (1984) : Isolation and characterization of a cDNA clone for the amino terminal portion of the pro-alpha 1 (II) chain of cartilage collagen. *J. Biol. Chem.*, 259, 13668-13673.

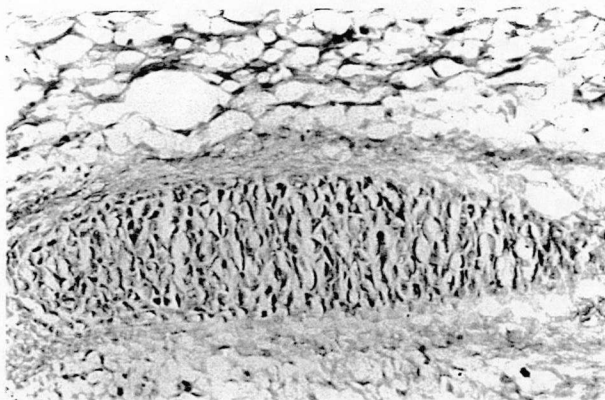
- 14) Ting, K., Petropulos, L. A., Iwatsuki, M. and Nishimura, I. (1993) : Altered cartilage phenotype expressed during intramembranous bone formation. *J. Bone Miner. Res.*, 8, 1377-1387.
- 15) Chung, K. S., Park, H. H., Ting, K., Takita, H., Apte, S. S., Kuboki, Y. and Nishimura, I. (1995) : Modulated expression of type X collagen in Meckel's cartilage with different developmental fate. *Dev. Biol.*, 170, 387-395.
- 16) Doege, K., Fernandez, P., Hassel, J. R., Sasaki, M. and Yamada, Y. (1986) : Partial cDNA sequence encoding a globular domain at the c-terminus of the rat cartilage proteoglycan. *J. Biol. Chem.*, 261, 8108-8111.
- 17) Denhardt, D. T. (1966) : A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 641-646.
- 18) Lewis, M. E., Sherman, T. G., Burke, S., Akil, H., Davis, L. G., Arentzen, R. and Watson, S. J. (1986) : Detection of proopiomelanocortin mRNA by in situ hybridization with an oligonucleotide probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 5419-5423.
- 19) Bradley, D. J., Young, W. S. and Weinberger, C. (1989) : Differential expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7250-7254.



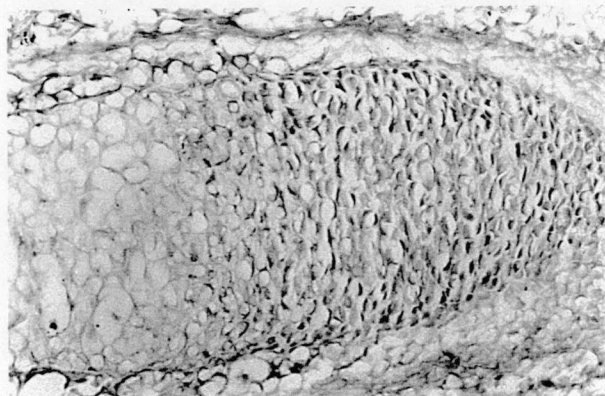
- 20) Kanz, L., Mielke, R., Lory, G. W. and Fauser, A. A. (1988) : Detection of messenger RNAs within single hemopoietic cells by in situ hybridization on small slide areas. *Exp. Hematol.*, 16, 394-399.
- 21) Hirota, S., Ito, A., Morii, E., Wanaka, A., Tohyama, M., Kitamura, Y. and Nomura, S. (1992) : Localization of mRNA for c-kit receptor and its ligand in the brain of adult rats: An analysis using in situ hybridization. *Mol. Brain Res.*, 15, 47-54.
- 22) Sandell, L. J., Sugai, J. V. and Trippel, S. B. (1994) : Expressions of collagens I, II, X and IX aggrecan mRNAs by bovine growth plate chondrocytes in situ. *J. Orthop. Res.*, 12, 1-14.
- 23) Koji, T., Moriuchi, T. and Nakane, P. K. (1988) : Improved tissue preparation for in situ localization of specific mRNA using non-radioactive DNA probes: Effects of proteinase digestion and probe size on signal detection in frozen and paraffin sections of rat pituitary glands. *Acta Histochem. Cytochem.*, 21, 187-200.
- 24) Bronstein, I. and Voyata, J. C. (1989) : Chemiluminescent detection of herpes simplex virus DNA in blot and in situ hybridization assays. *Clin. Chem.*, 35, 1856-1857.
- 25) Dix, D. J. and Eisenberg, B. R. (1988) : In situ hybridization and immunocytochemistry in serial sections of rabbit skeletal muscle to detect myosin expression. *J. Histochem. Cytochem.*, 36, 1519-1526.

- 26) De Block, M. and Debrouwer, D. (1993) : RNA-RNA in situ hybridization using digoxigenin-labeled probes: The use of high-molecular-weight polyvinyl alcohol in the alkaline phosphatase indoxyl-nitroblue tetrazolium reaction. *Anal. Biochem.*, 215, 86-89.
- 27) Lawrence, J. B. and Singer, R. H. (1985) : Quantitative analysis of in situ hybridization methods for the detection of actin gene expression. *Nucleic Acid Res.*, 13, 1777-1799.
- 28) Robinson, G. (1982) : *Theory and practice of histological technique*. (Bancroft, J. D. and Stevens, A., editor). Churchill Livingstone., New York, 18, 407-427.
- 29) Huang, W. M., Gibson, S. J., Facer, P., Gu, J. and Polak, J. M. (1983) : Improved section adhesion for immunocytochemistry using high molecular weight polymers of L-lysine as a slide coating. *Histochemistry*, 77, 275-279.
- 30) Rentrop, M., Knapp, B., Winter, H. and Schweizer, J. (1986) : Aminoalkylsilane-treated glass slides as support for in situ hybridization of keratin cDNAs to frozen tissue sections under varying fixation and pretreatment conditions. *Histochem. J.*, 18, 271-276.

0.2 $\mu$ m



0.05 $\mu$ m



0.025 $\mu$ m

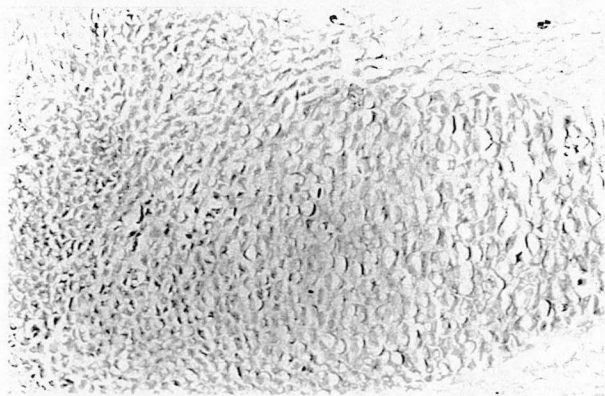


図1 種々のポアサイズのリトセロース膜に転写した凍結切片の組織解像度

マウス14日齡胎仔の後肢の凍結切片をポアサイズ0.2, 0.05, 0.025  $\mu$ mの各リトセロース膜に転写後、0.1%ヌクレアーファーストレッドで染色した。(倍率:  $\times$  100)

支持体	インキュベーション温度 (°C)		
	55	65	75
ニトロセルロース膜	0 / 10	0 / 10	1 / 10
スライドガラス	0 / 10	6 / 10	9 / 10

表1 凍結切片のニトロセルロース膜あるいはシランコートスライドガラスへの結合性の比較

マウス14日齢胎仔の後肢の凍結切片をニトロセルロース膜に転写、あるいはシランコートスライドガラスにマウントした後、55, 65, 75°Cの各温度のハイブリダイゼーション液中で12時間インキュベートした。インキュベート後、0.1%ヌクレアーファーストレッドで染色して切片の状態を観察した。それぞれ10切片のうち剥離した切片の枚数を示す。

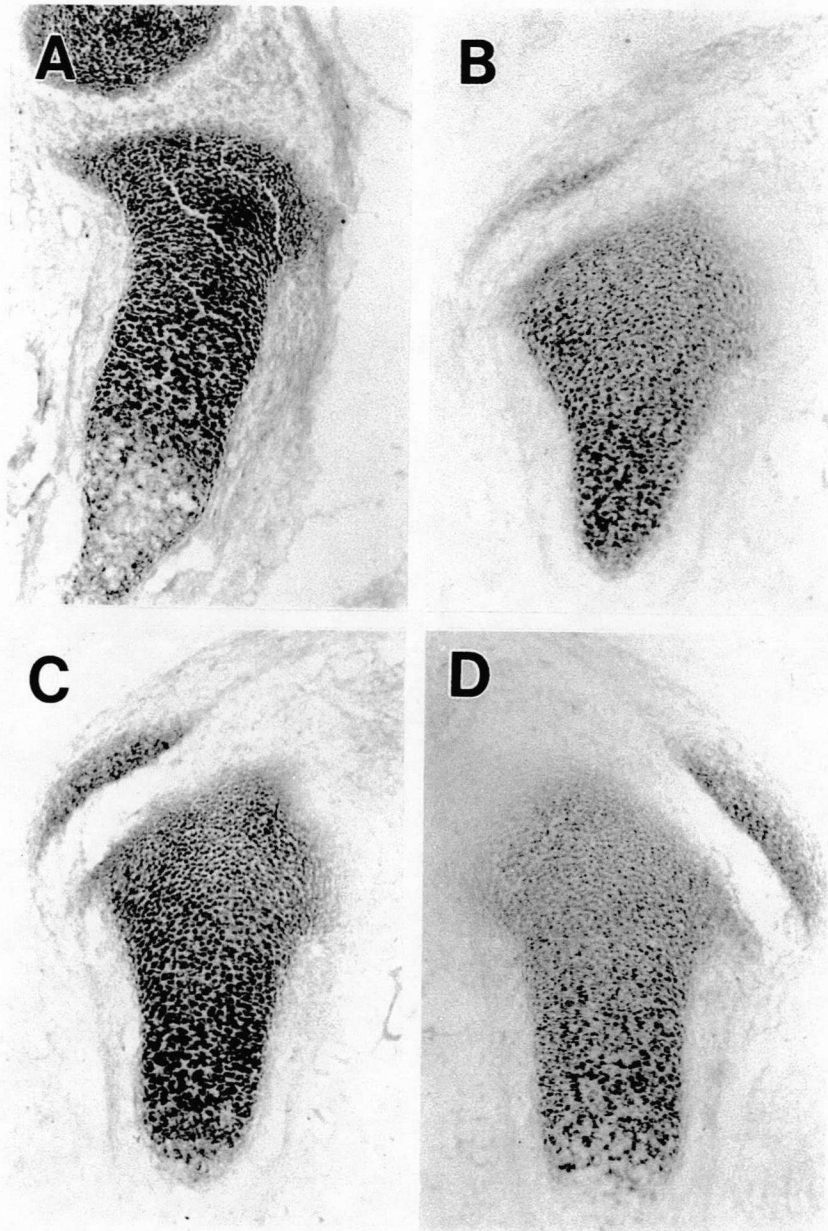


図2 塩酸処理、アセチル化およびRNaseA処理の特異的シグナルやバックグラウンドシグナルに及ぼす影響

マウス14日齢胎仔の後肢の凍結切片をニトロセルロース膜に転写した後、II型コラーゲンmRNAに対するプローブを用いてin situ ハイブリダイゼーションを行った。

(A) は塩酸処理を省いたもの、(B) は塩酸処理とアセチル化を省いたもの、(C) は塩酸処理、アセチル化およびRNaseA処理を省いたもの、(D) はこれらの全ての処理を行ったものを示す。(倍率：×100)

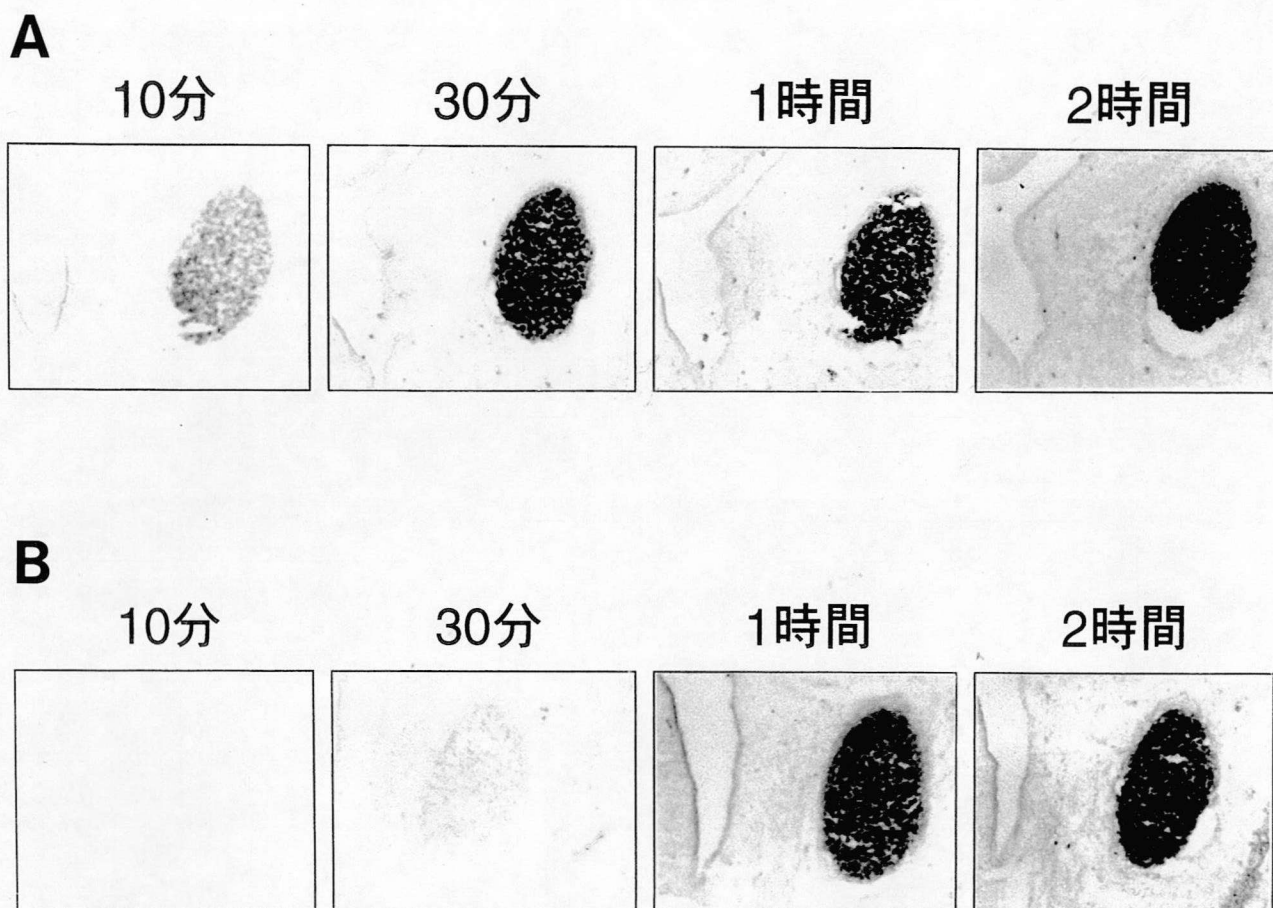


図3 凍結転写法を応用した方法と従来の方法との検出感度の比較

ラット16日齢胎仔の頭部の凍結切片をニトロセルロース膜に転写、あるいはシランコートスライドガラスにマウントした後、II型コラーゲンmRNAに対するプローブを用いてin situ ハイブリダイゼーションを行った。シグナル検出反応を10分後、30分後、1時間後、2時間後の各時点で停止してメッケル軟骨におけるシグナルの強さを比較した。(A)は本研究の方法でin situ ハイブリダイゼーションを行った場合のシグナルの経時的変化、(B)は従来の方法で行った場合のシグナルの経時的変化を示す。(倍率：×100)

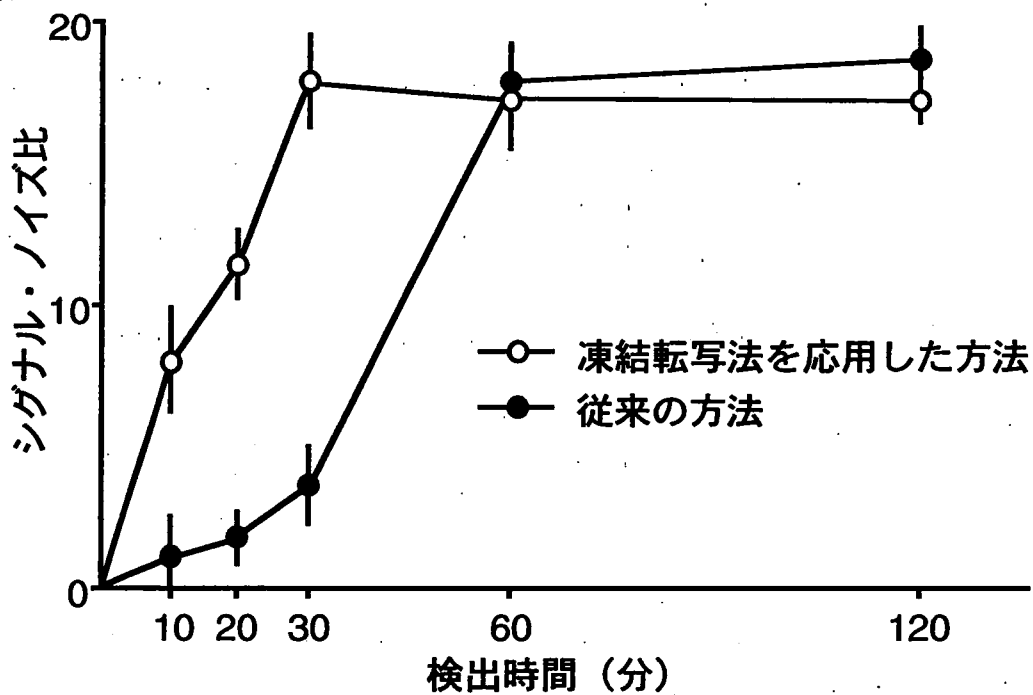


図4 シグナル検出時間とシグナル・ノイズ比の関係

ラット16日齢胎仔の頭部の凍結切片をニトロセルロース膜に転写、あるいはシランコートスライドガラスにマウントした後、II型コラーゲンmRNAに対するプローブを用いてin situ ハイブリダイゼーションを行った。シグナル検出反応を10分後、30分後、1時間後、2時間後の各時点で停止した。メッケル軟骨におけるII型コラーゲン遺伝子発現の特異的シグナルの強さとその周辺組織の非特異的シグナル（バックグラウンドシグナル）の強さの比をシグナル・ノイズ比として画像解析ソフトウェアで定量化した。各値は3点の平均値と標準偏差を示す。

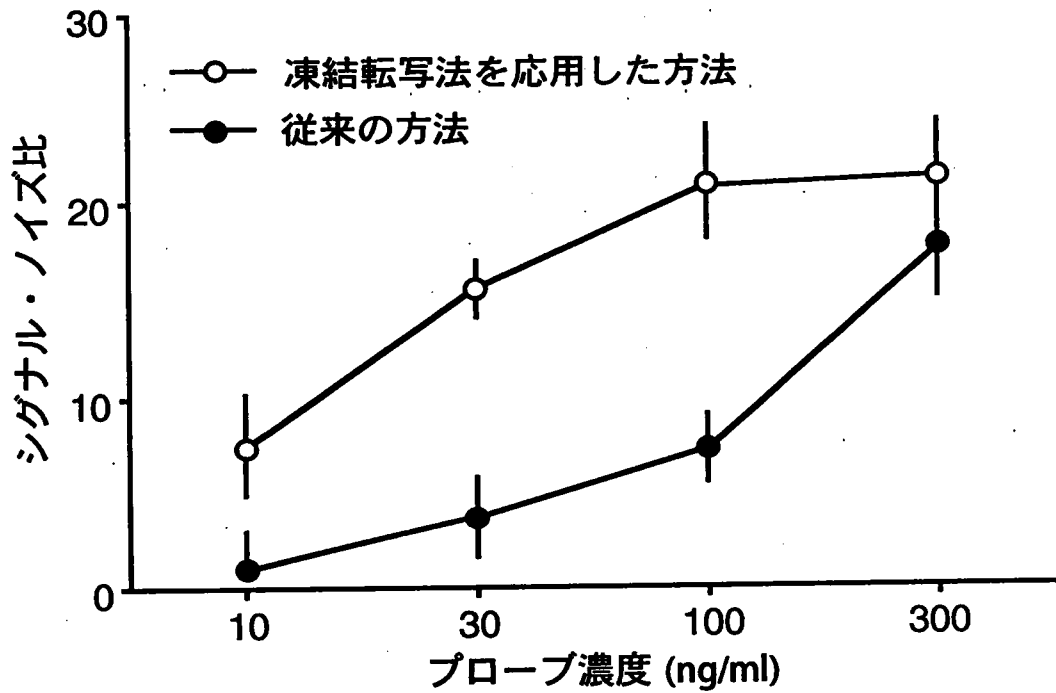


図5 プローブの濃度とシグナル・ノイズ比の関係

ラット16日齢胎仔の頭部の凍結切片をニトロセルロース膜に転写、あるいはシランコートスライドガラスにマウントした後、種々の濃度のII型コラーゲンmRNAに対するプローブを用いてin situ ハイブリダイゼーションを行い、シグナル検出反応を1時間で停止した。メッケル軟骨におけるII型コラーゲン遺伝子発現の特異的シグナルの強さとその周辺組織の非特異的シグナル（バックグラウンドシグナル）の強さの比をシグナル・ノイズ比として画像解析ソフトウェアで定量化した。各値は3点の平均値と標準偏差を示す。



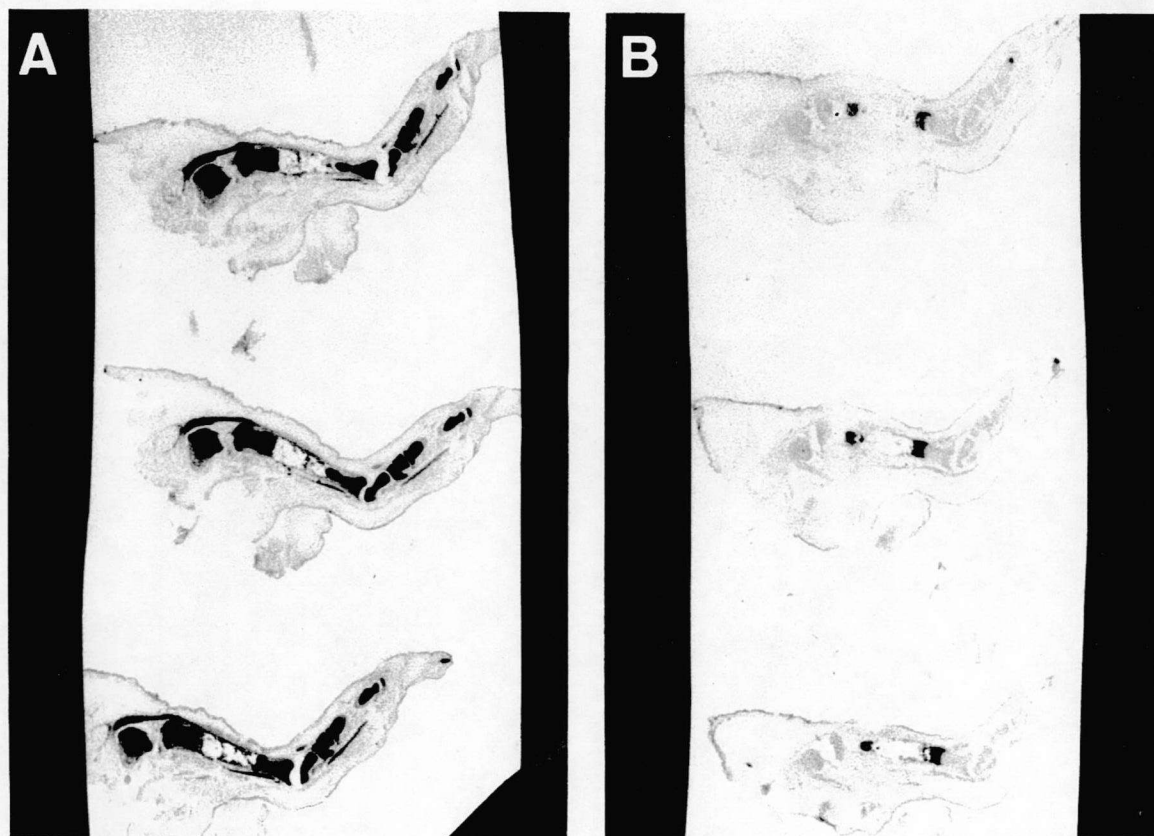


図6 マウス14日齢胎仔の肢芽におけるII型、X型コラーゲン遺伝子の発現

マウス14日齢胎仔の後肢の凍結切片をニトロセルロース膜に転写した後、II型コラーゲン (A) あるいはX型コラーゲンmRNA (B) に対するプローブを用いてin situ ハイブリダイゼーションを行った。検出反応終了後に風乾したニトロセルロース膜を実体顕微鏡で観察したものを示す。

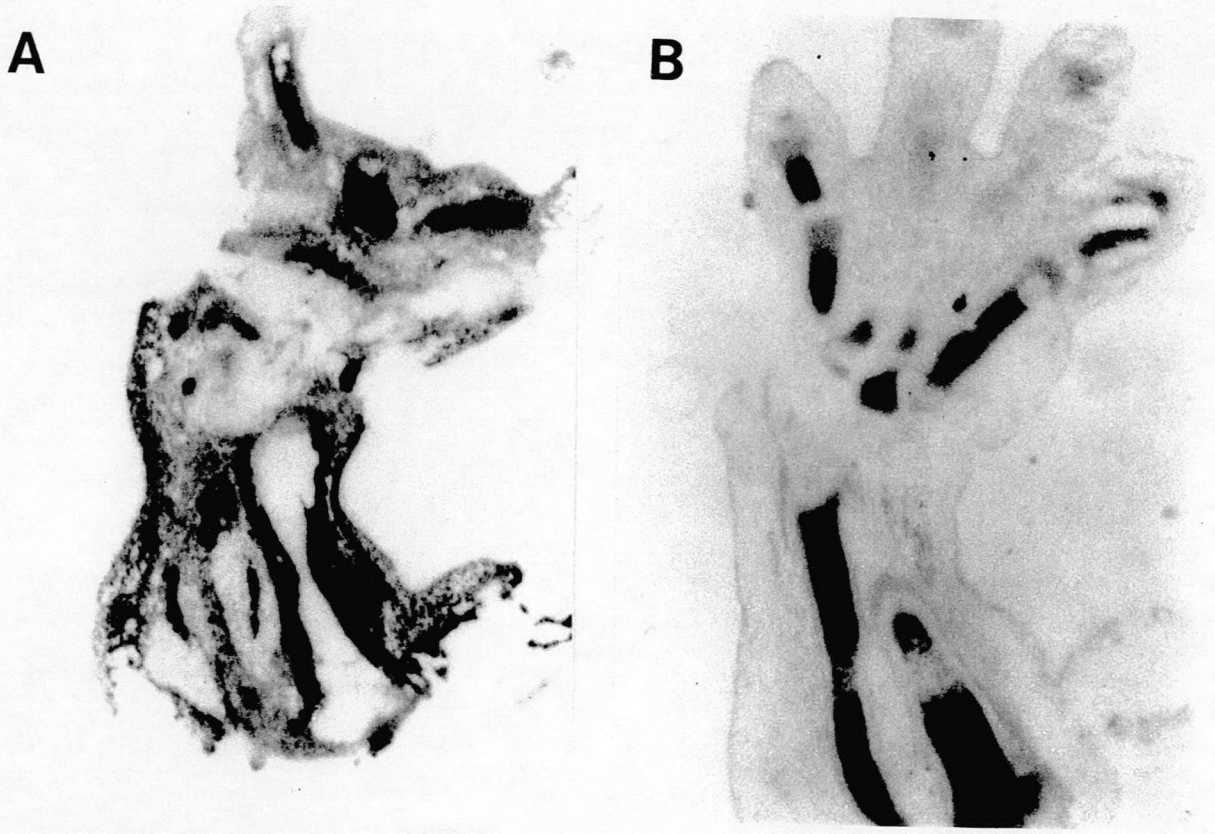


図7 マウス14日齢胎仔の肢芽におけるI型、IX型コラーゲン遺伝子の発現

マウス14日齢胎仔の後肢の凍結切片をニトロセルロース膜に転写した後、I型コラーゲン (A) あるいはIX型コラーゲンmRNA (B) に対するプローブを用いてin situ ハイブリダイゼーションを行った。(倍率: ×40)

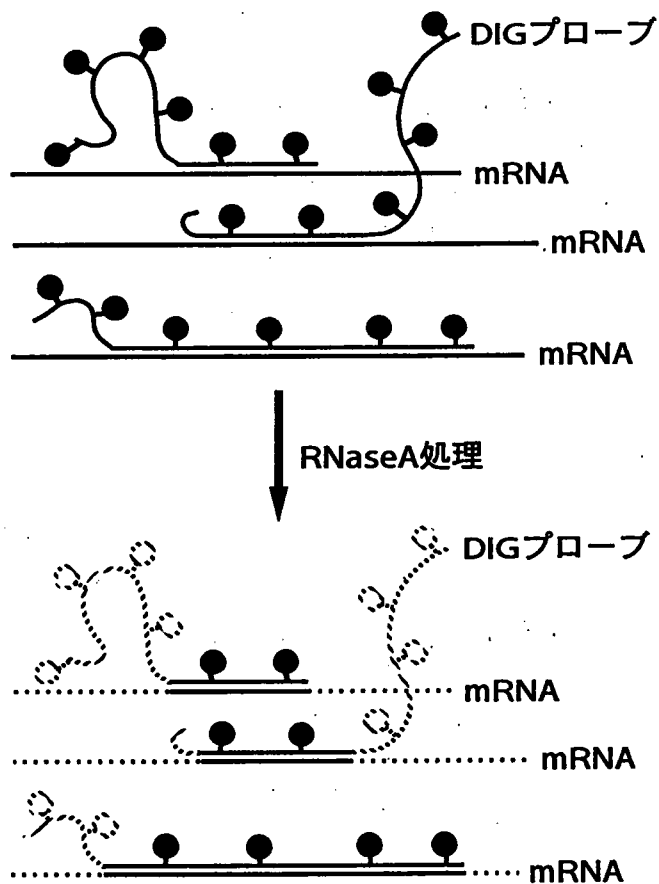


図8 RNaseA処理による特異的シグナル減少の機構

プローブの一部だけが標的mRNAに結合してハイブリッドを形成しているような場合、RNaseA処理によって結合していない部分のプローブが除去され、特異的シグナルが減少することを示す。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、御指導と後校閲を賜りました歯科放射線学講座、淵端孟教授ならびに口腔解剖学第一講座、栗栖浩二郎教授に深く感謝いたします。また、本研究課題を与えてくださり、終始御懇切なる御指導と御教示を頂いた口腔解剖学第一講座、岩本容泰講師に心から謝意を表します。さらに、貴重な御援助、御助言を頂いた口腔解剖学第一講座、脇坂聡助教授、歯科矯正学講座、山下和夫博士に深謝いたします。

最後に、本研究を進めるにあたり、特別の御配慮を頂いた歯科放射線学講座ならびに口腔解剖学第一講座の皆様は厚くお礼申し上げます。