

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

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^{1、2)}。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り、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 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グラスから剥離し 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、³⁵S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ーでシグナ ルを検出する方法^{3、4)} 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^{5~7)} 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⁸⁾。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^{9、10)} もあるが、一般的に は低いといわれている⁴⁾。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¹¹⁾。 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なように、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グラスは松浪ガラス(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ものを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5µm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) プローブの作製

ハイブリダイゼーションプローブはDIG-UTPで標識したRNAプローブを用いた。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α2(I)鎖のC-プロ ペプチドをコードする部分のcDNA¹²⁾のPst I 消化断片をpGEM-4にサブクローニングし たものを用いて作製した。ラットII型コラーゲンRNAプローブは、ラットα1 (II) 鎖の N-プロペプチドをコードする部分のcDNA¹³⁾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α1 (IX) 鎖のエクソン6および7をコードするcDNA¹⁴⁾をpBluescriptにサブクローニ ングしたものを用いて作製した。ラットX型コラーゲンRNAプローブは、ラットα1(X) 鎖のNC1部分をコードするcDNA¹⁵⁾をpBluescriptにサブクローニングしたものを用いて 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¹⁶⁾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グラスに固定した。凍結切片をニ トロセルロース膜上に通常のスライドグ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10µg/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¹⁷⁾、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)、200µg/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20µg/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

-6-

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グ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ーNIH Image Software (ver. 1.55) で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 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、0.025µm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。 種々のボ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、0.025µm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、0.025µm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、0.2µm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0.05µm以下のニトロセルロース 腹を用いた場合、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グラスへの結合性 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 ートスライドグラスにマウントして風乾した。続いて、切片を55℃、65℃、75℃、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

-8-

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 イドグ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グラスに比 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¹⁸⁾、無水酢酸でアセチル化したり^{19,20)} 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²¹⁾。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グラスにマウ 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 ケル軟骨における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²²⁾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²²⁾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)。

. .

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、従来のスライドグ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

-13-

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²³⁾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²⁴⁾ 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25)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²⁶⁾。 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^{27、28)}。最近McGrathらは、従来のスライドグ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¹¹⁾。 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を髙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グラスを 用いるが、スライドグラス自身はタンパク質やRNAを吸着しないので、スライドグラス の表面をポリ-L-リジン²⁹⁾ や3-アミノプロピルトリエトキシシラン³⁰⁾ 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 スライドグ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 ライドグ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グラスから剥離する 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 しながらのプロー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、スライドグ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、スライドグ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 0.02μm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グ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。 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。

- 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.
- 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) : Modurated 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 propiomelanocortin 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 protenase 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 immnocytochemistry 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) : Aminoalkysilane-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.



図1 種々のポアサイズのニトロセルロース膜に転写した凍結切片の組織解像度 マウス14日齢胎仔の後肢の凍結切片をポアサイズ0.2,0.05,0.025µmの各ニトロセ ルロース膜に転写後、0.1%ヌクレアーファーストレッドで染色した。(倍率:× 100)

	インキュベーション温度 (℃)		
X 17 14	55	65	75
ニトロセルロー ス膜	0 / 10	0 / 10	1 / 10
スライドグ 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グラスへの結合性 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 コートスライドグラスにマウントした後、55,65,75℃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 コートスライドグ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 コートスライドグ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 アーで定量化した。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 コートスライドグ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ーで定量化した。各値は3 点の平均値と標準偏差を示す。

-29-



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。

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、渕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に厚くお礼申し上げます。