

P10-01

DiI 注入法による Bcas1 in situ hybridization 陽性細胞の形態描出

加瀬 政彦, 山下 雄司, Stefan Trifonov, 丸山 正人, 杉本 哲夫
関西医大・脳構築学

【目的】 Bcas1 (PMES2, Band83) in situ hybridization (ISH) 陽性細胞はラット脳・脊髄に散在するグリア様細胞である。小型・球状の細胞体を有し、灰白質のみならず白質にも分布するが、GFAP・S100beta・Iba1 など主要グリアマーカーを共存しない。今回 Bcas1 ISH 陽性細胞の突起を含む形態の描出を目的として DiI 注入を行った。

【方法】 成熟雌性 SD ラット脳組織を 1.5% Paraformaldehyde からなる固定液で灌流固定。切片をマクロ顕微鏡にセットした上、明視野で Bcas1 陽性細胞を同定。微小ガラス管に 0.25% DiI を充填し、先端を Bcas1 陽性細胞に刺入した。30 分後に微小ガラス管を抜去したのち DiI 蛍光を観察した。一方、未固定薄切切片を用いて Laser Micro Dissection (LMD) によって、Bcas1 ISH 陽性細胞を採取した上で、グリアマーカーなど共存物質の発現の有無を調べた。

【結果】 細胞に注入した DiI は Bcas1 ISH 陽性細胞の数本の主要突起を描出した。DiI が Bcas1 ISH 陽性産物を有する細胞質から細胞外組織へ漏出することはほとんどなかった。主要突起では突起軸からランダムに派生する突起棘を DiI で描出できた。DiI 注入細胞は、注入後 2 週間の冷蔵保存のちにも、なお強い DiI 蛍光を発した。コンフォーカル蛍光顕微鏡を用いて DiI 染色細胞の立体構築像を作製することができた。

【結論】 新規に同定された細胞の形態を詳細に描出する目的で、脳組織固定切片を用いる DiI 細胞内注入法を考案した。LMD との組み合わせが可能であり、これらを同時進行することで、未同定の細胞の形態とバイオマーカーの解明が期待できる方法と考えられる。

P10-02

FRET based molecular beacon fluorescent probe for in situ hybridization in paraffin embedded tissue

Narantsog Choijookhuu¹, Yan Xu², Takumi Ishizuka², Shin-ichiro Hino¹, Yoshitaka Hishikawa¹

¹Dept. Anatomy, Histochemistry and Cell Biology, Fac. Med., Univ. Miyazaki,
²Div. of Chemistry, Dept. Med. Sci., Fac. Med., Univ. Miyazaki

In situ hybridization (ISH) is a powerful technique used to detect specific mRNA at the cellular level. In general, a specific mRNA is detected in single section due to some limitations of detection system. In biomedical field, it is important to evaluate different mRNA expressions in the same section. Therefore, we have designed fluorescence resonance energy transfer (FRET) based molecular beacon fluorescent probes for ISH to detect multiple mRNAs simultaneously. In this study, C57BL/6J mouse uterus tissue was fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline and then embedded in paraffin. Molecular beacon fluorescent probe for ER α mRNA was labeled with Cy3 and BHQ-2 at the 3'-end and 5'-end, respectively. 28S ribosomal RNA (rRNA) probe was labeled with 6-FAM and DABCYL. Competition and neutralization assays and RNase treatment were performed as a control experiments. Digoxigenin labeled ER α mRNA and 28S rRNA probes were used as a positive control. ISH results revealed that fluorescent signal for ER α mRNA was clearly detected in luminal and glandular epithelium of the uterus. Fluorescent signal for 28S rRNA was found in cytoplasm as well as nucleolus in the same section. No staining was revealed in control experiments, such as sense probe, competition, neutralization assay and RNase treatment. The staining pattern was similar to digoxigenin labeled 28S rRNA probe in the uterus. In conclusion, FRET based molecular beacon fluorescent probe may be useful to detect the simultaneous evaluation of different mRNAs.

P10-03

蛍光 in situ PLA 法と可視光 in situ PLA 法の比較検討

秋元 義弘, 菅原 大介, 宮東 昭彦, 川上 速人
杏林大・医・解剖

In situ 近接ライゲーションアッセイ (proximity ligation assay : PLA) 法はタンパク質間の相互作用、リン酸化などのタンパク質の翻訳後修飾を観察するために近年開発された免疫組織化学的手法である。シグナルが dot として検出され、分子レベルでの局在の検出、並びに定量的な解析が可能とされる。PLA 法には蛍光法と可視光法があり、一般的に蛍光法がよく用いられている。今回、ラット、マウスの組織を用いて、蛍光法と可視光法それぞれの長所と短所を比較検討した。

蛍光法は、操作が可視光法より簡便で、反応時間によるシグナルの dot サイズのばらつきが少ない。しかし、腎臓のような自家蛍光を発する組織では、蛍光法が使えない場合がある。この場合には蛍光法に代わって可視光法を適用することにより自家蛍光の問題を解決することが可能である。可視光法の欠点は、HRP を基質とするため発色時間により dot サイズにばらつきが生じたり、核に茶褐色の非特異的染色が生ずることである。蛍光法あるいは可視光法で検出したシグナルをそれぞれ通常の蛍光顕微鏡、光学顕微鏡で観察する時、焦点面をどこに設定するかにより、シグナルの dot の分布や数にかなりのばらつきが出て、定量的な解析が困難である。この問題は、蛍光法では、レーザー顕微鏡で断面像を取得し、Z-stack により画像を重ねあわせることにより解決できる。一方、可視光法では、フルフォーカス機能を備えた顕微鏡で画像を合成することによってすべてのシグナルの dot を鮮明に観察することが可能である。

P10-04

コアタンパク質の多様性に着目した糖タンパク質の免疫組織化学的検出

菅原 大介¹, 福富 俊之², 秋元 義弘¹, 川上 速人¹

¹杏林大・医・解剖, ²杏林大・医・薬理

近年、生命現象に対するタンパク質糖鎖修飾の機能関与が注目を集める。糖鎖はタンパク質の高次構造に影響を与え、また、内在性レクチンとの相互作用を通じ、タンパク質の活性、局在などを調節する。糖鎖修飾の異常はタンパク質機能の破綻につながる。よって、糖鎖修飾の生物学的機能を理解するためには、糖鎖のみならず、タンパク質部分の差異を含めた“糖タンパク質”として、その発現分布を明らかにする必要がある。これまで、糖鎖の組織・細胞内局在、また、生命現象・疾患に伴う時空間的变化がレクチン染色により明らかにされてきた。しかし、そのタンパク質部分 (コアタンパク質) に関する情報は多く不明である。

糖タンパク質として発現分布を明らかにするためには、着目する糖鎖が付加されたコアタンパク質の同定、さらには、特定の糖鎖が付加されたコアタンパク質分子種を特異的に検出することが必要である。我々は、このような実験技術を確認し、糖タンパク質の組織・細胞分布を明らかにすることを目的に研究を進めた。本発表では、マウス腸管におけるフコシル化糖タンパク質の多様性と、その分布に関する検討結果を報告する。種々のレクチン及び抗体を用いた検討の結果、小腸・大腸上皮には様々なフコシル化糖鎖が発現し、細胞種、またその分化段階に応じて、特徴的な発現を示すことが分かり、細胞機能・分化制御への関与が示唆された。さらに、同じ糖鎖であっても細胞種・分化段階によりコアタンパク質が異なり、その機能が異なることも考えられた。フコシル化糖鎖の機能をさらに検討するため、レクチンと質量分析装置を用いたグライコプロテオミクス解析を実施し、コアタンパク質同定を進めた。同定結果をもとに、特定の糖タンパク質を in situ PLA 法により腸管組織切片上、検出することに成功した。コアタンパク質に着目した糖タンパク質の分布検討から、その機能理解が進むことが期待される。