Optimal Conditions for Detection of Calcitonin mRNA by In Situ Hybridization (ISH) Method Using a Non-radioactive Probe in the Rat Thyroid Gland

Takayuki NAKAJIMA, Kazushige OGAWA, and Kazuyuki TANIGUCHI

*Department of Veterinary Anatomy, Faculty of Agriculture, Iwate University,
3-18-8 Ueda, Morioka-shi, Iwate 020, Japan*

(Received 15 February 1994/Accepted 21 April 1994)

Optimal conditions for detection of calcitonin mRNA were examined by in situ hybridization (ISH) method using a non-radioactive probe in the rat thyroid gland. An oligonucleotide complementary to rat calcitonin mRNA was synthesized with a DNA synthesizer, labelled at 3'-end by using digoxigenin-11-deoxyuridine triphosphate (dUTP) and terminal transferase (Boehringer Mannheim), and used as a probe. Hybrid chains formed by probe and calcitonin mRNA were visualized by anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate, nitroblue tetrazolium (NBT) and X-phosphate (Boehringer Mannheim). To determine the optimal conditions for ISH, relations between tissue fixation and proteinase K treatment, and between hybridization temperature and time were mainly surveyed in the present study. As for the relation between tissue fixation and proteinase K treatment, good results were obtained in sections fixed by immersion in 10% formalin at 4°C for 2 hr, and digested with 1 µg/ml proteinase K at 37°C for 20 min. Under this condition, the most intense signals were obtained after hybridization at 37°C overnight. Alternative application of ISH and immunostaining to each of the adjacent sections revealed a small number of cells which were immunonegative but displayed hybridization signals. —KEY WORDS: calcitonin mRNA, in situ hybridization, non-radioactive probe, oligonucleotide, thyroid gland

非放射性プローブを用いた in situ hybridization (ISH) 法による カルシトニン mRNA 検出の最適条件の検討

中島 崇行・小川 和重・谷口 和之

岩手大学農学部家畜解剖学教室

In situ hybridization (ISH) 法は、細胞内の messenger RNA (mRNA) を直接検出できるため、免疫組織化学の短所を補う有効な手段として、近年広く用いられるようになった。ISH に用いられるプローブの種類としては、ベクターを用いて作製した complementary DNA (cDNA) と complementary RNA (cRNA) および、合成オリゴヌクレオチドの 3 つが挙げられる [2, 3, 13, 20]。このうち、cDNA と cRNA の作製には

複雑な遺伝子操作が必要とされるため、これらをプローブとして用いるためには各種の設備と技術的熟練が要求される。これに対し、オリゴヌクレオチドをプローブとする場合は、DNA 合成機で特異性の高い領域を選択して容易に合成できるため、オリゴヌクレオチドを作製する DNA 合成機と若干の設備が必要なだけであり、しかもオリゴヌクレオチドには長鎖のプローブよりも組織への浸透性が優れているという利点がある。

Table 1. Procedures of in situ hybridization

Step	Procedure
1. Oligonucleotide synthesis	synthesize an oligonucleotide with a 381A DNA synthesizer
2. Oligonucleotide labelling	label 3'-end of oligonucleotide with digoxigenin-11-dUTP and terminal transferase
3. Pretreatment	① fix in 4% paraformaldehyde-0.1M PB (pH7.2) for 15 min at 4°C ② incubate in 0.1M tris HCl (pH8.0) and 50mM EDTA (pH8.0) containing 0, 1, 5, or 10µg/ml proteinase K for 20 min at 37°C ③ postfix in 4% paraformaldehyde-0.1M PB (pH7.2) for 15 min at 4°C ④ rinse in 0.01M PBS two times ⑤ incubate in 0.01M PBS containing 2mg/ml glycine for 20 min at RT ⑥ incubate in 0.1M tris HCl (pH8.0) containing 0.25% acetic anhydride for 15 min at RT ⑦ rinse in 2×SSC
4. Prehybridization	incubate for 1 hr at RT
5. Hybridization	incubate for 2, 6 hr or overnight at 20, 37, or 50°C
6. Immunological detection	detect specific hybrids with anti-digoxigenin alkaline phosphatase conjugate

RT : room temperature

また、プローブの標識法としては、これまで放射性標識法が主体であり、施設や実験条件などで厳しい制約を受けていたが、近年、biotin-11-deoxyuridine triphosphate (dUTP) や、digoxigenin-11-dUTP をオリゴヌクレオチドに標識したプローブを用いた非放射性 ISH 法[4,7,8]が開発され、一般の実験室でも比較的容易に ISH を行えるようになってきた。しかし、用いる組織やプローブの種類によっては、その最適条件が必ずしも一定とはならないので、組織の固定条件、組織切片の処理、hybridization の温度と時間など様々な点において、いまだ改良の余地が残されている。

そこで本研究では、digoxigenin-11-dUTP と、ラットのカルシトニン mRNA に相補的な合成オリゴヌクレオチドを用い、種々の条件下で非放射性 ISH 法のための最適条件を検討した。

材料および方法

1. 材料：4 ヶ月齢の Wistar-Imamichi 系ラット(財団法人動物繁殖研究所より購入)の雄 5 例、雌 2 例を用いた。ラットは、室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、照明12時間明暗条件下で飼育し、ラット・ハムスター用ペレット MF20(オリエンタル酵母社製)と水を自由摂取させた。

ラットはエーテル麻酔下で10% formalin または、4% paraformaldehyde-0.1M phosphate buffer (PB) (pH7.2) で灌流固定後、甲状腺を摘出した。さらに、組織を10% formalin で 4°C 、2、4、6 時間または一晩、あるいは4% paraformaldehyde-0.1 M PB (pH7.2) で 4°C 、2 時間浸漬固定をした後、30% sucrose-0.1M PB に 4°C で一晩浸漬した。組織はクリオスタットで $4\ \mu\text{m}$ の凍結切片を作製し、ゼラチン処理したスライドグラスに伸展した。その後、隣接する切片に、それぞれカルシトニンに対する抗血清を用いた免疫染色と、カルシトニン mRNA に相補的なオリゴヌ

Table 2. Contents of buffers and solutions used in the present study

Solution (final contents)	Contents or steps of preparation
1. Tailing reaction solution	Tailing buffer (5×potassium cacodylate/tris buffer pH6.6) 4μℓ CoCl ₂ solution (5μM) 6μℓ Deoxyadenosinetriphosphate (dATP) solution (50μM) 2μℓ Digoxigenin-11-dUTP solution (1μM) 2.5μℓ Terminal transferase (50units/μℓ) 1μℓ 15.5μℓ
2. TE buffer	Final concentration of 10mM tris HCl (pH8.0), 1mM EDTA
3. Prehybridization solution (50% deionized formamide, 4×SSC, 1×Denhardt's solution, 125μg/ml salmon sperm DNA, 250μg/ml yeast tRNA, 1mM tris HCl (pH7.4), 1mM EDTA, 10% dextran sulfate]	Deionized formamide 500μℓ 20×SSC 200μℓ 50×Denhardt's solution 20μℓ 5mg/ml salmon sperm DNA 25μℓ 10mg/ml yeast tRNA 25μℓ H ₂ O 10μℓ 0.1M tris HCl (pH7.4) 10μℓ 0.1M EDTA 10μℓ 50% dextran sulfate 200μℓ 1,000μℓ
4. Hybridization solution	Adjust the concentration of probe to 250ng/ml with prehybridization solution
5. 50×Denhardt's solution	1% bovine serum albumin, 1% Ficoll 400, 1% polyvinylpyrrolidone
6. Deionized formamide	① Add 5g of ion exchange resin (AG 501-X8) (BIO RAD) to 100ml formamide ② Stir for 1 hr ③ Filter through filter paper
7. Salmon sperm DNA	① Dissolve 5mg/ml of salmon sperm DNA (Wako) in sterilized water for 2~4 hr ② Add aliquot of phenol-saturated tris HCl (pH8.0) and mix thoroughly ③ Centrifuge at 12,000g for 20 min to separate the supernatant ④ Add aliquot of a mixture of phenol, chloroform and isoamyl alcohol (25:24:1) and mix thoroughly ⑤ Centrifuge at 12,000g for 20 min to separate the supernatant ⑥ Precipitate deproteinized DNA by adding 2 volumes of 100% ethanol and 1/10 volumes of 3M sodium acetate ⑦ Collect DNA by centrifugation ⑧ Add cold 70% ethanol ⑨ Collect DNA by centrifugation ⑩ Adjust the concentration of deproteinized DNA to 5mg/ml with sterilized water
8. 20×SSC	Final concentration of 3M NaCl, 0.3M sodium citrate
9. 4×SSC, 2×SSC, 1×SSC, 0.5×SSC	Dilute 20×SSC 5 times, 10 times, 20 times, or 40 times, respectively, with sterilized water.
10. Buffer-1	Final concentration of 0.1M tris HCl (pH7.5), 0.15M NaCl
11. Buffer-2	Final concentration of 0.1M tris HCl (pH9.5), 0.1M NaCl, 50mM MgCl ₂
12. Buffer-3	Final concentration of 10mM tris HCl (pH8.0), 1mM EDTA
13. color-substrate solution	Buffer-2 containing 335μg/ml NBT (Boehringer Mannheim), 174μg/ml X-phosphate (Boehringer Mannheim), 240mg/ml levamisol

クレオチドを用いた ISH を行った。

2. ISH: ISH の概略および使用した溶液、緩衝液の組成は Table 1, Table 2 に示した。詳しい手順は以下の通りである。なお、浸漬固定から ISH の操作の間に用いた溶液または器具には、滅菌処理を施した。

①オリゴヌクレオチドの合成: 本研究では69baseのオリゴヌクレオチド-5' [TTTGAGC TC (GTTGAG-GTCTTGTGTGTACGTGCCCAGCATGCAGGT ACTCAGATTCCCACA) GAATTCAAA] 3'-を381A DNA Synthesizer (Applied Biosystems, U.S.A.) で合成した。()内の塩基配列がカルシトニン mRNA の第7~57番目の塩基配列に対し相補的となっている。

②オリゴヌクレオチドの標識反応: 合成したオリゴヌクレオチドを digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Germany) と terminal transferase を用いて、3'末端を非放射性標識し、プローブとした。標識反応は、Boehringer Mannheim 社 (Germany) 製の DNA Tailing Kit を用いて行った。オリゴヌクレオチド 1 μ g に対し、tailing reaction buffer (Table 2-①) を加え、さらに水を加えて全量を20 μ l とし、これを37°Cで10時間インキュベート後、標識されたプローブをエタノール沈澱により回収した。プローブは、使用時に TE buffer (Table 2-②) に溶解した。

③ Pretreatment: 切片の固定、細胞内の mRNA の露出、プローブの非特異的結合防止のために以下のように pretreatment を行った。まず、切片を室温に戻し、4% paraformaldehyde-0.1M PB (pH7.2) で4°C、15分間切片を固定し、0, 1, 5 または10 μ g/ml proteinase K (Sigma, U.S.A.) を含む0.1M tris-HCl (pH8.0)-50mM EDTA (pH 8.0) で37°C、20分間インキュベートして mRNA を露出させ、再び4% paraformaldehyde-0.1M PB (pH7.2) で4°C、15分間後固定した後、0.01M phosphate-buffered saline (PBS) で2回リンスした。次に、2 mg/ml glycine を含む0.01M PBS を室温で20分間反応させて proteinase K の反応を阻害し、さらに、0.25%無水酢酸を含む0.1M tris-HCl (pH8.0) を室温で15分間適用して、プローブが塩基性タンパク質に非特異的に吸着するのを防ぎ、最後に2 $\times$ SSC (Table 2-⑨) でリンスした。

④ Prehybridization: プローブが非特異的に結合する部位をあらかじめブロックするために prehybridization を行った。これは pretreatment 後、切片に prehybridization 液 (Table 2-③) を100 μ l 滴下し、室温で1時

間インキュベートすることによって行った。

⑤ Hybridization: プローブと、ターゲットの mRNA との間でハイブリッドを形成させるために hybridization を行った。Prehybridization 後、切片を2 $\times$ SSC でリンスし、その後、切片に hybridization 液 (Table 2-④) を30 μ l 滴下して、切片をパラフィルムでおおい、20, 37, または50°Cで2, 6時間または一晩インキュベートした。

⑥ Post-hybridization: 非特異的に結合したプローブを取り除くために、post-hybridization を行った。これは、hybridization の後、4 $\times$ SSC (Table 2-⑤) で切片をカバーしたパラフィルムを取り除き、次に、切片を2 $\times$ SSC で室温、1時間、1 $\times$ SSC (Table 2-⑥) で室温、1時間、0.5 $\times$ SSC (Table 2-⑦) で37°C、30分間、0.5 $\times$ SSC で室温、30分間、各々リンスして行った。

⑦ Immunological detection: プローブに標識した digoxigenin を抗 digoxigenin 抗体を用いて検出するために、immunological detection を行った。まず、post-hybridization の後、Buffer-1 (Table 2-⑧) で1分間リンスし、2% normal goat serum-0.3% triton X を含んだ Buffer-1 で30分間インキュベート、次いで Buffer-1 で1分間リンスした後、1/500 anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate (Boehringer Mannheim, Germany)-1% normal goat serum を含む Buffer-1 を各スライドグラスに100 μ l 滴下し、室温で3時間、または4°Cで一晩インキュベートした。その後、Buffer-1 で10分間、2回リンス、Buffer-2 (Table 2-⑨) で10分間リンスした後、各スライドグラスに color-substrate solution (Table 2-⑩) を300 μ l 滴下し、室温、暗所で20~30分間インキュベートし、発色させた。発色後、Buffer-3 (Table 2-⑪) で反応を止め、Permunt (Fisher, U.S.A.) で封入した。

3. 免疫染色: ISH 法を行った切片の隣接切片に抗ヒト・カルシトニン血清 (Incstar, U.S.A.) を用いた ABC 法により免疫染色を施した。免疫染色は別報 [16] に記載した方法によって行った。

成 績

1. 固定法と proteinase K 処理の検討: 固定と proteinase K 濃度の最適条件をシグナル強度と組織形態の保存の面から検討した結果は、シグナル強度については Table 3 に、組織形態の保存については Table

Table 3. Strength of the signal

Fixation	Time	Proteinase K ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
		0	1	5	10
4% paraformaldehyde-0.1M PB	2 hr	# (+)	## (+)	## (-)	×
10% formalin	2 hr	# ($\pm$)	## ($\pm$)	## ($\pm$)	## ($\pm$)
10% formalin	4 hr	+ (+)	# (+)	# (+)	## ($\pm$)
10% formalin	6 hr	+ (+)	# (+)	# (+)	## (-)
10% formalin	overnight	+ ($\pm$)	+ (+)	# (+)	# (+)

: intense + : moderate + : weak $\pm$: faint - : negative
 × : torn off () : background staining

Table 4. Preservation of the morphology

Fixation	Time	Proteinase K ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
		0	1	5	10
4% paraformaldehyde-0.1M PB	2 hr	○	○	-	-
10% formalin	2 hr	○	○	×	-
10% formaline	4 hr	○	○	×	-
10% formalin	6 hr	○	○	×	-
10% formalin	overnight	○	○	○	-

○ : good × : bad - : torn off

4 に示した。固定液は、10% formalin と 4% paraformaldehyde-0.1M PB (pH7.2) を用いたが、前者と後者ではシグナル強度と組織形態の保存の面ではほとんど相違が認められず、また後者で長時間固定すると、切片がほとんど剥がれ落ちてしまったため、Table 3、Table 4 では後者の結果は 2 時間の固定の場合だけを記載した。シグナル強度については、固定時間が短ければ、非特異的反応の程度が低く抑えられ、高濃度の proteinase K 処理をしたものと同様、低濃度の proteinase K 処理によっても十分に強いシグナルが得られた。これに対し、固定時間が長くなると、高濃度の proteinase K 処理をしなければ強いシグナルは得られなかった。また、組織形態の保存については、0 および 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の proteinase K 処理を施した場合では全ての固定条件下で組織形態の保存は良好であった。5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の proteinase K で処理を施した場合は、組織形態の損傷が著しく、また 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の proteinase K 処理を施した場合には、全ての固定条件下で切片はス

ライドグラスから剥がれ落ちてしまった。以上の結果から、今回の実験では 10% formalin、4℃ で 2 時間の固定をし、その後、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の proteinase K 処理を施すのがシグナル強度と組織形態の保存のバランスにおいて最適条件であると認められた。

2. Hybridization の温度と時間の検討：Hybridization の温度と時間は、固定と proteinase K 処理において最適と認められた条件、すなわち 10% formalin、4℃、2 時間の固定、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinase K 処理の条件下で検討した。この結果は、Table 5 に示した。Hybridization の温度が 20, 37, 50℃ のいずれの場合でも、hybridization の時間が長くなればなるほどそのシグナルの強さが増加した。この温度と時間の組合せでは 37℃ で一晩インキュベートした場合に最も強いシグナルが得られた。

3. ISH と免疫染色の比較：隣接切片にそれぞれ ISH と免疫染色を行うと、ISH のシグナルと免疫反応はともに甲状腺の傍濾胞細胞に認められた (Fig. 1 ~ 4)。

強拡大で観察すると、隣接切片で同一細胞に免疫反応と ISH のシグナルが認められる場合が大部分であったが、免疫反応は陰性であるのに ISH のシグナルを示す細胞が少数存在した。

考 察

ISH 法は、ある物質の組織内分布を遺伝子レベルで調べるために開発された技法であるが、この ISH 法を放射性物質で標識したプローブを用いる代わりに、非放射性物質で標識したプローブを用いて行うことにより、一般の実験室で ISH 法を行うことが可能となった。放射性プローブの代わりに非放射性プローブを用いた場合の利点としては、①プローブの半減期を考慮する必要がない、②操作に必要な日数が短い、③細胞レベルでの解析が可能である、④ RI 施設を必要としない、などが挙げられる [7]。

本研究では、広範な応用の可能性を有しながら、いまだその技法が確立していない非放射性 ISH 法において、合成オリゴヌクレオチドをプローブとして行う場合の最適条件を、主として固定法と proteinase K 処理の関係および、hybridization の温度と時間の関係について検討した。

今回得られた結果では、固定時間を長くした場合、強いシグナルを得るには、高濃度の proteinase K 処理が必要であった。これは、細胞内の mRNA とそれを取り巻くタンパク質が長時間の固定によって強く架橋されたため、低濃度の proteinase K 処理では十分に細胞内の mRNA が露出されず、従ってプローブと mRNA をハイブリダイズさせるために、高濃度の proteinase K 処理が必要となったと考えられる。Proteinase K 処理について、Pringle ら [19] は、その最適条件は組織や固定時間によって異なると報告している。これに関して、Farquharson ら [4] は、ラットの下垂体に分布する pro-opiomelanocortin (POMC) mRNA に相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いた ISH では、10μg/ml の proteinase K 処理を行った場合、下垂体の前葉と中葉の両者で強いシグナルが認められたが、proteinase K 処理を行わなかった場合では、中葉のみに弱いシグナルが認められたと報告している。この報告は、本研究における固定時間と proteinase K 処理の関係についての結果と一致した。また、固定液の種類については、シグナル強度と組織形態の保存の面では、一般に、ISH 法で推奨されている4% paraformaldehyde-0.1M PB

Table 5. Effects of hybridization temperature and time on the strength of the signal

Time	Temperature		
	20°C	37°C	50°C
2 hr	±	+	+
6 hr	+	+/+	+
overnight	+	+	+/+
+ : intense + : moderate + : weak ± : faint - : negative			

(pH7.4) と10% formalin の両者でほぼ同様の結果が得られたが、前者では切片がスライドガラスから剥離し易い傾向があり、また、後者の方が作製が容易であるなどの理由から、本研究では10% formalin による固定を最適とした。

Hybridization の温度は、一般に melting temperature (Tm) 値を指標として設定されている。Tm 値とは、溶液中の2本鎖の核酸のうち、その半数が1本に解離する温度であり、次の式で示される。

$$Tm = 81.5^{\circ}C + 16.6 \log M + 0.41 \times (\% GC) - 500/n - 0.61 \times (\% \text{ formamide})$$

M = 溶液中の塩濃度 (mol/liter)
% GC = プローブ中の G/C (グアニン/シトシン) 塩基対の占める割合
n = プローブの長さを塩基数で表したもの
% formamide = 溶液中の formamide の占める割合——[11]

塩は、核酸の磷酸の陰イオン同士が反発するのを防ぐため、塩濃度が増加すると、ハイブリダイゼーション時に形成された2本鎖のハイブリッド分子の安定性が増加する[4,15]。また、プローブの% GCが多ければ、形成された2本鎖の安定性が増すことになる。これは、2本鎖を形成する際に、2対の水素結合によるアデニン (A) とチミン (T) または、アデニン (A) とウラシル (U) の結合よりも、3対の水素結合による安定なグアニン (G) とシトシン (C) の結合が多くなるからである。% GC については、プローブの塩基配列におけるその割合が1%増加することにより、Tm 値が0.41℃ずつ上昇するといわれている[4,15]。一方、プローブの長さも2本鎖の安定性に関連しており、プローブの長さが長いほど2本鎖の安定性は増すが、ISH 法では、プローブが長すぎると組織への浸透性が悪くなるといわれている [4]。また、高温による組織形態の損傷が起

こらない程度の低い温度でハイブリダイゼーションを行うため、ハイブリダイゼーション溶液に formamide を加えるが、これには、核酸間の水素結合を阻害する作用があり、この作用によって、比較的低温でもプローブと標的 mRNA 以外の核酸との非特異的結合を抑制することができる [4, 15]。Formamide の T_m 値への影響として、ハイブリダイゼーション溶液中の formamide 濃度が 1% 増加することに T_m 値は、 0.61°C 低下するといわれている [4, 15]。

今回の実験では、 $M=0.4$, % GC=53, $n=51$ (相補的な部位として), % formamide=50 であるので、これらの値を上述の式にあてはめると、 $T_m \approx 54.4$ となる。一般に ISH は、この T_m 値よりも $15\sim 20^\circ\text{C}$ 程度低い温度で行うとよいとされているが [2, 19], 本研究の結果では、 37°C で最も強い反応が認められたため、この理論値と実際の ISH の最適温度はほぼ一致した。

一方、ハイブリダイゼーションの時間については、インキュベートの時間が長くなればなるほど、ISH のシグナルの強さが増加したことから、ISH の反応は概ね時間依存性であることが認められた。

本研究における隣接切片での比較において、ISH のシグナルは認められるが、免疫染色の反応は認められない細胞がいくつか存在した。これは、免疫染色では抗原物質が細胞内に貯留していなければその細胞を検出できないのに対し、ISH 法では、抗原物質が細胞内に貯留していない場合でも、それを合成する mRNA が存在すれば、その細胞を検出することができるためであると考えられる。今回のこの結果は、ISH 法が免疫染色の欠点を補いうる方法であることを示している。また、ISH 法の利点としては、この他に、アミノ酸配列がきわめて類似したサブタイプが存在する物質の中から、特定のサブタイプを持つ細胞を検出できるということが挙げられる。免疫染色では、特定の物質の抗原と、抗体の間の抗原抗体反応をその検出原理とするが、ある物質のサブタイプの各アミノ酸配列が類似する場合には、各サブタイプを認識する特異抗体をそれぞれ別々に作製するのは困難である。従って、免疫染色では高純度のモノクローナル抗体を用いない限り、ある物質の各サブタイプを持つ細胞を別々に検出することはほとんど不可能である。しかし、このような物質でも、各サブタイプを合成する mRNA の塩基配列を比較すると、その配列にかなりの相違が認められる。Noguchi ら [17] は、アミノ酸配列がきわめて類似している α -CGRP と β -CGRP のラットの脊髄神経節に

おける局在を、ISH による mRNA の検出によって、間接的に明らかにした。 α -CGRP と β -CGRP を構成するアミノ酸配列のうち、互いに異なるアミノ酸の数は、ラットでは、わずかに 1 個であるが、Noguchi らが用いた α -CGRP プローブと β -CGRP プローブは、54.3% という相同性の低いものであった。従って、彼らはこれらのプローブを用い、従来の免疫染色ではほとんど不可能なサブタイプの区別を細胞レベルで明らかにすることができた。このように、各サブタイプに対応する mRNA の特有な塩基配列部位に相補的なプローブを用いれば、それぞれのサブタイプに対する特異的なシグナルを得ることができる。これは、ハイブリダイゼーションにおける T_m 値は、プローブと mRNA 間の非相補的塩基数が 1% 増加することに、プローブの長さが 20base 以下の場合、 5°C , 150base 以上の場合 1°C 低下することと関係する [12]。すなわち、プローブと標的 mRNA 間の T_m 値を指標として設定した温度で hybridization を行えば、プローブと標的 mRNA 以外の核酸間では、わずかに存在する相補的部位のみで形成された 2 本鎖が、高い温度のため解離し易くなり、安定した 2 本鎖を形成することが不可能となるためである。また、仮に不安定な 2 本鎖、すなわち非特異的結合がわずかに起こったとしても、安定な 2 本鎖、すなわち特異的結合のみが残る低塩濃度と高温の条件下で post-hybridization を行えば、 T_m 値の関係から特異的結合のみが残ることになる。以上より、今回我々が検討した非放射性 ISH 法は、一般の実験室で実施が可能のため、免疫組織化学法同様、日常業務レベルでの検査法として、重要な手法になりうるということが明かとなった。しかも、ISH 法は免疫染色の欠点を補うことができるため、今回我々が示したような最適条件下で ISH 法を行えば、従来の免疫染色による研究では得られなかった、新知見を得ることができると考えられる。

要 約

ラットの甲状腺におけるカルシトニン mRNA を検出する際の最適条件を、非放射性 in situ hybridization (ISH) 法によって検討した。本研究では、ラットのカルシトニン mRNA に相補的な合成オリゴヌクレオチドを DNA 合成機で合成し、この 3' 末端を digoxigenin-11-deoxyuridine triphosphate (dUTP) で非放射性に標識し、プローブとした。また、プローブとカルシト

ニン mRNA によって形成された 2 本鎖のハイブリッドは、アルカリ性フォスファターゼ標識抗 digoxigenin 抗体と nitroblue tetrazolium, X-phosphate (Boehringer Mannheim 社) を用いて検出した。本研究では、ISH の最適条件として、主に、固定法と proteinase K 処理の関係、および、hybridization の温度と時間の関係の 2 つを取り上げた。固定法と proteinase K 処理の関係では、10% formalin, 4°C, 2 時間の固定で、かつ 1 µg/ml proteinase K, 37°C, 20 分の処理を行ったものがシグナル強度と組織形態の保存のバランスにおいて最適であった。この条件下で hybridization の温度時間の最適条件を検討すると、37°C で一晩インキュベートした場合に最も強いシグナルが得られた。また、隣接切片にそれぞれ、ISH と免疫染色を行ったところ、隣接切片で同一細胞に ISH のシグナルと免疫反応が認められる場合が大部分であったが、免疫反応は陰性であるのに、ISH のシグナルを示す細胞が少数存在した。

本研究を実施するに当たり、オリゴヌクレオチドの合成等でご協力を頂きました岩手大学農学部附属細胞育種実験施設の堤賢一教授に深く感謝致します。

文 献

- [1] Alwine, J. C., Kemp, D. J., and Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5,350-5,354.
- [2] Baldino, F., Jr., Chesselet, M.-F., and Lewis, M. E. (1989). High-resolution in situ hybridization histochemistry. *Methods Enzymol.*, **168**, 761-777.
- [3] Bloch, B., Popovici, T., Le Guellec, D., Normand, E., Chouham, S., Guitteny, A. F., and Bohlen, P. (1986). In situ hybridization histochemistry for the analysis of gene expression in the endocrine and central nervous system tissues: a 3-year experience. *J. Neurosci. Res.*, **16**, 183-200.
- [4] Cox, K. H., Deleon, D. V., Angerer, L. M., and Angerer, R. C. (1984). Detection of mRNAs in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev. Biol.*, **101**, 485-502.
- [5] Farquharson, M., Harvie, R., and McNicol, A. M. (1990). Detection of messenger RNA using a digoxigenin end labelled oligodeoxynucleotide probe. *J. Clin. Pathol.*, **43**, 424-428.
- [6] Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13.
- [7] Gebeyhu, G., Rao, P. Y., SooChan, P., Simms, D. A., and Klevan, L. (1987). Novel biotinylated nucleotide-analogs for labeling and colorimetric detection of DNA. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 4,513-4,534.
- [8] Guitteny, A.-F., Fouque, B., Mougin, C., Teoule, R., and Bloch, B. (1988). Histological detection of messenger RNAs with biotinylated synthetic oligonucleotide probes. *J. Histochem. Cytochem.*, **36**, 563-571.
- [9] Guitteny, A.-F., Fouque, B., Teoule, R., and Bloch, B. (1989). Vasopressin gene expression in the normal and Brattleboro rat: a histological analysis in semi-thin sections with biotinylated oligonucleotide probes. *J. Histochem. Cytochem.*, **37**, 1479-1487.
- [10] Harvie, R., Elvin, P., McArdle, C., Morten, J. E. N., and McNicol, A. M. (1991). Detection of mRNA for ribosomal phosphoprotein P2 in normal colon and colonic tumours by in situ hybridization. *J. Pathol.*, **164**, 67-73.
- [11] Iijima, K., Sato, M., Kojima, N., and Ohtomo, K. (1992). Immunocytochemical and in situ hybridization evidence for the coexistence of GABA and tyrosine hydroxylase in the rat locus ceruleus. **234**, 593-604.
- [12] Kendall, C. H., Roberts, P. A., Pringle, J. H., and Lauder, I. (1991). The expression of parathyroid hormone messenger RNA in normal and abnormal parathyroid tissue. *J. Pathol.*, **165**, 111-118.
- [13] Larsson, L.-I. and Hougaard, D. M. (1993). Sensitive detection of rat gastrin mRNA by in situ hybridization with chemically biotinylated oligonucleotides: validation, quantitation, and double-staining studies. *J. Histochem. Cytochem.*, **41**, 157-163.
- [14] Martinez-Montero, J. C., Herrington, C. S., Stickland, J., Sawyer, H., Evans, M., Flannery, D. M., and McGee, J. O'D. (1991). Model system for optimising mRNA non-isotopic in situ hybridization: riboprobe detection of lysozyme mRNA in archival gut biopsy specimens. *J. Clin. Pathol.*, **44**, 835-839.
- [15] Meinkoth, J. and Wahl, G. (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.*, **138**, 267-284.
- [16] Mikami, S., Chiba, S., Hojo, H., Taniguchi, K., Kubokawa, K., and Ishii, S. (1988). Immunocytochemical studies on the pituitary pars distalis of the Japanese long-fingered bat, *Miniopterus schreibersii fuliginosus*. *Cell Tissue Res.*, **251**, 291-299.
- [17] Noguchi, K., Senba, E., Morita, Y., Sato, M., and Tohyama, M. (1990). Co-expression of α -CGRP and β -CGRP mRNAs in the rat dorsal root ganglion cells. *Neurosci. Lett.*, **108**, 1-5.
- [18] Pringle, J. H., Primrose, L., Kind, C. N., Talbot, I. C., and Lauder, I. (1989). In situ hybridization demonstration of poly-adenylated RNA sequences in formalin-fixed paraffin sections using a biotinylated oligonucleotide poly d(T) probe. *J. Pathol.*, **158**, 279-286.
- [19] Pringle, J. H., Ruprai, A. K., Primrose, L., Keyte, J., Potter, L., Close, P., and Lauder, I. (1990). In situ hybridization of immunoglobulin light chain mRNA in paraffin sections using biotinylated or hapten-labelled oligonucleotide probes. *J. Pathol.*, **162**, 197-207.
- [20] Schmitz, G. G., Walter, T., Seibl, R., and Kessler, C. (1991). Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal. Biochem.*, **192**, 222-231.
- [21] Shorrock, K., Roberts, P., Pringle, J. H., and Lauder, I. (1991). Demonstration of insulin and glucagon mRNA in routinely fixed and processed pancreatic tissue by in situ hybridization. *J. Pathol.*, **165**,

- 105-110.
- [22] Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517.
- [23] Springer, J. E., Robbins, E., Gwag, B. J., Lewis, M. E., and Baldino, F., Jr. (1991). Non-radioactive detection of nerve growth factor receptor (NGFR) mRNA in rat brain using in situ hybridization histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, **39**, 231-234.
- [24] Suzuki, T., Sasano, H., Sawai, T., Mason, J. I., and Nagura, H. (1992). Immunohistochemistry and in situ hybridization of P-450_{17 α} (17 α -hydroxylase/17, 20-lyase). *J. Histochem. Cytochem.*, **40**, 903-908.
- [25] Trembleau, A., Roche, D., and Calas, A. (1993). Combination of non-radioactive and radioactive in situ hybridization with immunohistochemistry: a new method allowing the simultaneous detection of two mRNAs and one antigen in the same brain tissue section. *J. Histochem. Cytochem.*, **41**, 489-498.
- [26] Yu, S.-M. and Gorovsky, M. A. (1986). In situ dot blots: quantitation of mRNA in intact cells. *Nucl. Acids Res.*, **14**, 7597-7615.

Explanation of Figures

Fig. 1. Calcitonin-immunoreactive cells in the rat thyroid gland $\times 150$

Fig. 2. Adjacent section of Fig. 1 displaying hybridization signal $\times 150$

Fig. 3. High magnification of Fig. 1 $\times 300$

Fig. 4. High magnification of Fig. 2 $\times 300$ In Figs. 3

and 4, arrows indicate calcitonin-immunopositive and hybridization signal-displaying cells, and arrowheads indicate calcitonin-immunonegative but hybridization signal-displaying cells, respectively, in adjacent two sections.

Fig.1.	Fig.2.
Fig.3.	Fig.4.