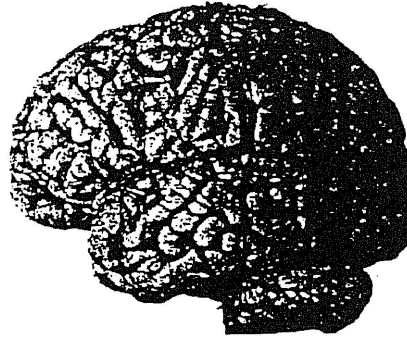


新潟大学脳研究所病態神経科学部門
分子神経病理学分野
市川 富夫

脳

ニューロン (神経細胞)

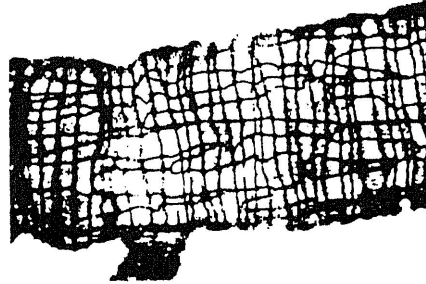
脳は1,000億ものニューロンからなり、
一個のニューロンは他の約1,000個から
の情報を受けている。



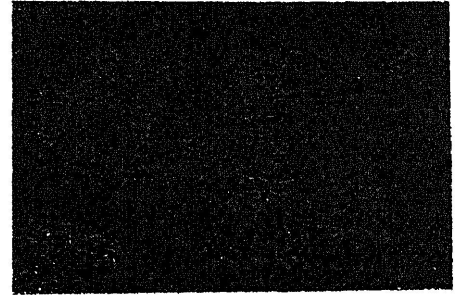
私たちの脳は1.4kg程あり神経細胞は1,000億からなりそれ以上の数のグリア細胞により囲まれ支持され栄養を与えられている。私達はこの豊富な神経細胞を生涯かけても1割程度しか使うことしかできません。これらの神経細胞は数ミリの場所の違いでそれぞれの働き機能、放出している物質が違います。それらの分子レベルでの検索にISH法は重要である。



鍍銀血管染色



鍍銀血管染色の拡大



鍍銀血管染色の拡大

血管のみが染め出されています。灰白質は特に黒く多くの血管がニューロンやグリアに酸素や栄養を運搬するためです。拡大ではレチクリンが網状に染色されている。



Bodian 染色

多くの線維により構成されている。



ゴルジ染色

樹状突起にスパインが見えます。1,000から1万個あり入力シグナルを受け取る場所。



炭酸銀染色

色々な形をしたグリア細胞が見られる。



GFAP

(glial fibrillary acidic protein)

免疫酵素抗体法：
15年前頃より盛んに行われてきた。

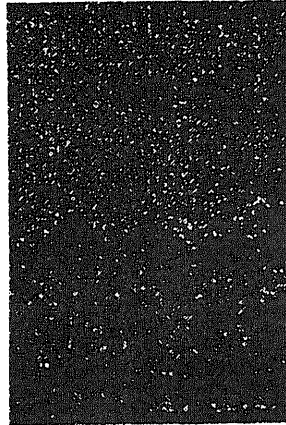
In situ hybridization (ISH) 法

組織上の個々の細胞の mRNA の発現を検出

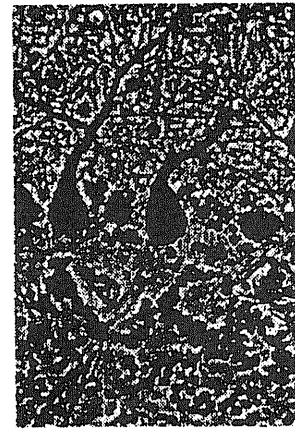
in situ hybridization (ISH) 法

4PF 固定	30分
PBS (1) (2) (3)	
2mg/ml グリシン PBS	20分
アセチレンジン 0.25% 含む無酢酸 / 0.1M Tris [®] pH 7.5	10分
2 × SSC	3回 5分
プレハイブリダイゼーション	1時間
ハイブリダイゼーション	一晚
洗い (1) (2) (3)	
脱水 風乾	

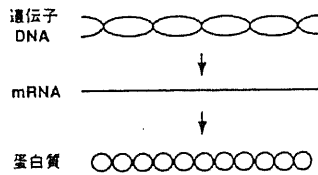
- 1) フィルムにはさむ (オートラジオグラフィ)
- 2) Kodak NTB-2 乳剤で dipping



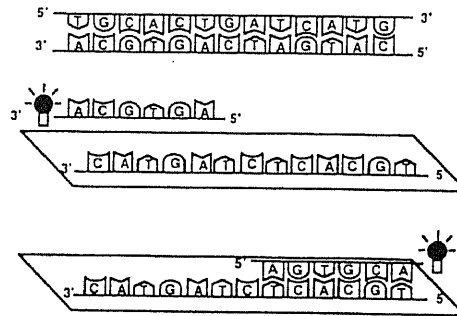
ISH 法プルキニエ細胞の胞体に mRNA の発現がある。



免疫酵素抗体法プルキニエ細胞の樹状突起と軸索も染色された。



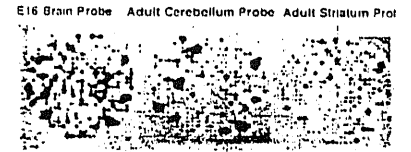
ISH 法は染色体、細胞あるいは組織切片の形態を保存した状態で、特異的な核酸配列を検出する技術です。ISH 法により遺伝子 DNA、RNA、タンパク質では発現レベルと顕微鏡的な形態学の空間的な情報とを関連づける。



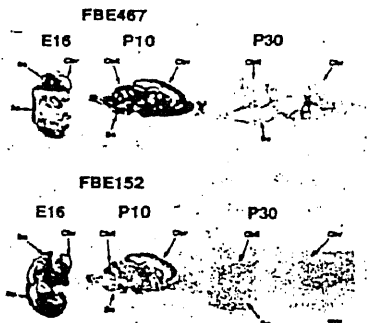
3' 末端にラベルを入れスライドガラス上の組織にのせる A ⇔ T, G ⇔ C が相対的に結合する。

ラット胎児に発現する mRNA

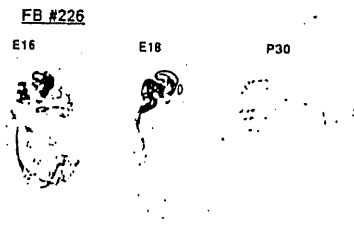
Differential Screening 法でみつけた胎生期における脳選択的クローンで ISH を試みる。



胎生 16 日に豊富に発現しているクローンを拾う。



胎生 16 日、脳、脊髄に mRNA が発現している。生後 10 日大脳皮質、小脳に mRNA 発現している。



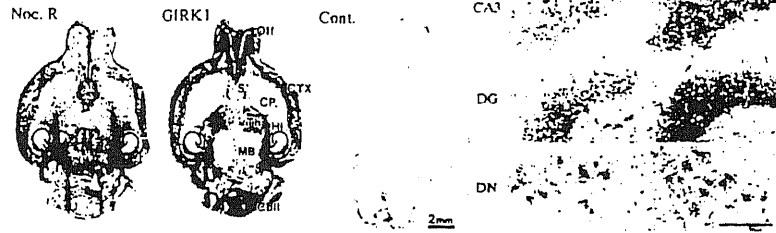
胎生 16、18 日で脳、脊髄に mRNA が発現している生後 30 日で殆どなくなる。



胎生 16 日の大脳皮質、目、脊髄節、腸管節に発現している。

情動、快、不快の発現メカニズム

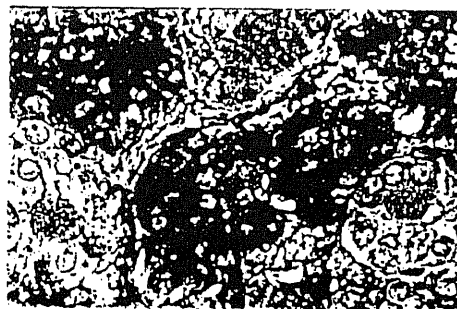
嬉しい、悲しいなどの感情は脳で作られる。脳内でいくつかのモルヒネ様物質が作られる。その物質をオピオイドと総称。



喜びや悲しみなどの感情は脳で作られることは間違いないでしょうが、どのようなメカニズムで感情が生み出されるのか殆どわかっていません。オピオイドと総称されるモルヒネ様の生理作用をする物質、その作用が重要なものの一つであると考えられています。最近「脳内革命」というベストセラー本の中にも脳内モルヒネの重要性を紹介しています。この中で言っている脳内モルヒネとは正確にはいくつかある内因性オピオイドのことです。オピオイドはオピオイド受容体という特定の部位に作用することがわかってきていますが、私達はこのオピオイド受容体の機能を研究している過程でオピオイド受容体が機能するときGタンパク質で活性化されるカリウムチャンネル(GIRK)と共役することを電気生理学的実験から見いだしました。さらにオピオイド受容体とGIRKチャンネルのmRNAが脳内の神経細胞で共存していることをISH法で明らかにすることができました。

非 RI in situ hybridization 法
(Oligo colour kit)

4% PFA 固定	30分
塩酸	10分
トライトン 10分プロテイナーゼ K/TE	10分
グリシン/PBS	10分
酢酸	20℃5分
ハイブリバッファ/ホルムアミド等量 プローブ (蛍光標識オリゴヌクレオチド)	90℃3分, 37℃2時間
洗い (1) (2) (3)	
ブロッキング	
アルカリホスファターゼ標識抗蛍光抗体	30分
発色基質 NBT/BCP	4時間~24時間



まとめ

in situ hybridization 法の利点 (特徴)

1. 組織切片上で mRNA の検出ができる
2. 産生細胞の同定に良い
3. 新規遺伝子についての解析が可能

* 遺伝子や遺伝子産物の組織上での検出は遺伝子の役割、機能状態の解明に重要である。

* 病理学では Biopsies 中のウイルス DNA 検出ができる。

* 抗体を作ることなく新規遺伝子で組織上での細胞同定ができる。

馮雪蓮、片桐尚、市川富夫、熊西敏郎：松果体に於ける NSE, NNE mRNA 発現の解析。
第 17 回上信越神経病理懇談会（前橋）1991（北関東医学 42（3）：315, 1992）

Usui, H., Katagiri, T., Yoshida, Y., Nishiyama, A., Ichikawa, T., Kuwano, R., Takahashi, Y., Kumanishi, T. : In situ hybridization histochemistry of Spot 35 protein, a calcium-binding protein, in the rat brain. *Mol. Chem. Neuropathol.* 15 : 207-216, 1991

馮雪蓮、片桐尚、市川富夫、熊西敏郎：松果体に於ける NSE, NNE 発現の研究：In situ hybridization による解析。第 33 回日本神経病理学会抄録（新潟）p59, 1992

熊西敏郎：脳特異蛋白の in situ hybridization について。シンポジウム“軽度～重度脳虚血とその治療的手段—脳細胞機能、代謝、分子構築の観点から—”（下地恒毅、文部省総合研究（A））（新潟）1992

Katagiri, T., Feng, X., Ichikawa, T., Usui, H., Takahashi, Y., Kumanishi, T. : Neuron-specific enolase (NSE) and non-neuronal enolase (NNE) mRNAs are co-expressed in neurons of the rat cerebellum : In situ hybridization histochemistry. 14th International Society for Neurochemistry (Montpellier, France) 1993 (*J. Neurochem.* 61 (Supplement) : S40, 1993)

Feng, X., Katagiri, T., Ichikawa, T., Takahashi, Y., Kumanishi, T. : NSE and NNE mRNA expression in rat pineal gland. *Gene Expression in the Central Nervous System, 2nd Stanford Int. Neurosci. Symposium (Beijing, China)*, Abstract p51, 1993

Katagiri, T., Feng, X., Ichikawa, T., Usui, H., Takahashi, Y., Kumanishi, T. : Neuron-specific enolase (NSE) and non-neuronal enolase (NNE) mRNAs are co-expressed in neurons of the rat cerebellum : in situ hybridization histochemistry. *Mol. Brain Res.* 19 : 1-8, 1993

Ikeda, K., Kobayashi, T., Ichikawa, T., Usui, H., Kumanishi, T. : Functional couplings of the δ - and the κ -opioid receptors with the G-protein-activated K^+ channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208 (1) : 302-308, 1995

Kobayashi, T., Ikeda, K., Ichikawa, T., Abe, S., Togashi, S., Kumanishi, T. : Molecular cloning of a mouse G-protein-activated K^+ channel (mGIRK 1) and distinct distributions of three GIRK (GIRK 1, 2 and 3) mRNAs in mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208 (3) : 1166-1173, 1995

韓 蓉蓉、小林一雄、張 淑靖、熊西敏郎、土屋陽子、長藤寿昭、武藤 厚、杉山昌一、松居 徹：ラット虚血脳における NOS（一酸化窒素合成酵素）mRNA の分布。第 36 回日本神経病理学会抄録（東京）p73, 1995

薄井 宏、市川富夫、熊西敏郎：胎生期ラット脳に選択的に発現する遺伝子群の単離と解析第 36 回日本神経病理学会抄録（東京）p94, 1995

小林 徹、池田和隆、市川富夫、阿部 聰、富樫俊二、熊西敏郎：マウス G 蛋白質活性型 K^+ チャネル mRNA の脳内分布；サブタイプ間にみられる相異。第 36 回日本神経病理学会抄録（東京）p294, 1995

小林 徹、池田和隆、市川富夫、富樫俊二、熊西敏郎： μ -、 δ -、 κ -オピオイド受容体に対するシグマリガンドの効果。第 19 回日本神経科学大会抄録集（神戸）p76, 1996 (*Neurosci. Res. Supplement* 20 : S52, 1996)

薄井 宏、市川富夫、宮崎義孝、永井正一、熊西敏郎：ラット脳の発達過程において発現が変動する mRNA 群の cDNA クローニング。第 19 回日本分子生物学会・第 69 回日本生化学会合同年会（札幌）p192, 1996

Kobayashi, T., Ikeda, K., Ichikawa, T., Togashi, S., Kumanishi, T. : Effects of sigma ligands on the cloned μ -、 δ - and κ -opioid receptors co-expressed with G-protein-activated K^+ (GIRK) channel in *Xenopus* oocytes. *Br. J. Pharmacol.* 119 : 73-80, 1996

Kumanishi, T., Han, R.-R., Kobayashi, K., Zhang, S.-J., Ichikawa, T., Tsuchiya, Y., Matsui, T., Ogura, T., Esumi, H. : Analysis of distributions of nitric oxide synthase mRNAs in the normal rat brain by in situ hybridization histochemistry. In : *Molecular Neurobiology and Brain Ischemia*, K. Shimoji (Ed.) Springer, pp 61-73, 1996

Ikeda, K., Kobayashi, T., Ichikawa, T., Usui, H., Abe, S., Kumanishi, T. : Comparison of the three mouse G-protein-activated K^+ (GIRK) channels and functional couplings of the opioid receptors with the GIRK1 channel. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 801 : 95-109, 1996

Muratake, T., Hayashi, S., Ichikawa, T., Kumanishi, T., Ichimura, Y., Kuwano, R., Minoshima, S., Shimizu, N., Takahashi, Y. : Structure, 5'-upstream sequence and chromosomal assignment of the human 14. 3. 3 η chain gene in relation to the effects of methamphetamine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 801 : 64-75, 1996

Usui, H., Ichikawa, T., Miyazaki, Y., Nagai, S., Kumanishi, T. : Isolation of cDNA clones of the rat mRNAs expressed preferentially in the prenatal stages of brain development. *Dev. Brain Res.* in press

薄井 宏、鷺山和雄、市川富夫、森井 研、田村哲郎、田中隆一、熊西敏郎：胎生期脳選択的遺伝子群の単離とヒト脳腫瘍における発現解析。第 38 回日本神経病理学会総会学術研究会抄録（東京）p????, 1997

馮雪蓮、市川富夫、薄井 宏、鷺山和雄、小林一雄、熊西敏郎：生後発達期ラット松果体における NSE、NNE mRNA 発現の変化。第 38 回日本神経病理学会総会学術研究会抄録（東京）p???, 1997