

ラット網膜におけるソマトスタチン mRNA 陽性細胞の局在

山口 克宏*, Vinod P. Gaur**

*東北大学医学部眼科学教室, **ウェークフォレスト大学医学部解剖学教室

要 約

ラット網膜においてソマトスタチンの mRNA を標的とし、これと相補的な³²P 標識 mRNA オリゴマーを hybridize させ、オートラジオグラフィーにより hybridization の形成された部位を可視化する in situ hybridization を行い、ソマトスタチン mRNA 陽性細胞を網膜内顆粒層最内層、内顆粒層最外層、神経節細胞層に認めた。ラット網膜では、これらの細胞がソマトスタチン産生細胞であることが明らかとなった。神経組織細胞における mRNA の発現は、神経組織のダイナミックな生理活性状態を直接反映している。In situ hybridization 組織化学法は、細胞の活動状態を遺伝子発現のレベルで検出する方法であり、神経網膜の機能を解明する目的で今後さまざまな実験系に応用できると考えられた。(日眼会誌 96:85-89, 1992)

キーワード: ソマトスタチン, mRNA, In situ hybridization, 網膜

Localization of Somatostatin mRNA in the Rat Retina Detected by in situ Hybridization Histochemistry

Katsuhiro Yamaguchi* and Vinod P. Gaur**

*Department of Ophthalmology, School of Medicine, Tohoku University

**Department of Neurobiology and Anatomy, The Bowman Gray School of Medicine, Wake Forest University

Abstract

In order to determine the localization of the mRNA encoding somatostatin in the rat retina, we studied Sprague-Dawley rats by in situ hybridization histochemistry. Radiolabelled oligodeoxyribonucleotides complementary for rat somatostatin mRNA were used in this study. Among the layers of the retina, we found specific labelling in the soma of some cells in the innermost and outermost laminae of the innervated layer and in the ganglion cell layer. These results indicate the major site of somatostatin synthesis within the rat retina. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96:85-89, 1992)

Key words: Somatostatin, mRNA, In situ hybridization, Retina

I 緒 言

ソマトスタチンは網膜に存在する代表的神経ペプチドであり、網膜神経回路網における神経伝達物質とし

て作動していると考えられている¹⁾⁻⁸⁾。これまで神経網膜機構を解析する方法のひとつとして、神経活性物質に対する免疫組織化学的研究が進められて来た。しかし、ラットの網膜におけるソマトスタチン免疫組織

別刷請求先: 980 仙台市青葉区星陵町1-1 東北大学医学部眼科学教室 山口 克宏

(平成3年1月29日受付, 平成3年4月30日改訂受理)

Reprint requests to: Katsuhiro Yamaguchi, M.D. Department of Ophthalmology, School of Medicine, Tohoku University.

1-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980, Japan

(Received January 29, 1991 and accepted in revised form April 30, 1991)

化学陽性細胞の存在部位に関しては、報告者による違いが見られ見解の一致を得ていない^{9)~11)}。すなわちラット網膜におけるソマトスタチンの分布に関して、Kirsh ら⁹⁾は神経節細胞層、内顆粒層最内層、内顆粒層最外層にソマトスタチン免疫組織化学陽性細胞が存在し、内顆粒層最外層の細胞は水平細胞であると報告した。Lin ら¹⁰⁾は、外顆粒層にソマトスタチン陽性細胞を認め、Sagar ら¹¹⁾は神経節細胞層と内顆粒層最内層にソマトスタチン陽性細胞が存在し、内顆粒層最外層には存在しないと報告した。このように細胞内のソマトスタチンを検出する免疫組織化学法の報告結果の違いが見られることから、その遺伝子を発現する細胞の局在を調べることが必要と考えられた。最近、既知の塩基配列を有する標的核酸に対して、相補的な塩基配列を有し、放射性同位元素で標識されたプローブ核酸を組織切片上や細胞標本上で hybridize させ、形成された分子雑種にオートラジオグラフィを行うことにより、標的核酸の存在を示す in situ hybridization 法が開発され、特異的遺伝子の存在を組織切片上に観察することが可能となった。今回、ラット網膜のソマトスタチン産生細胞の存在部位を明らかにする目的で、ソマトスタチン mRNA に対する in situ hybridization 法を行った。

II 方 法

1. 凍結切片の作製

実験には12時間明/12時間暗の室内灯下で飼育された体重200gの雄ラット (Sprague-Dawley strain) を4匹使用した。実験動物を sodium pentobarbital の腹腔内注射で麻酔後開胸し、約200mlの緩衝4%パラホルムアルデヒド溶液で心臓から灌流固定を行った。灌流固定後直ちに両眼球を摘出し、30分浸漬固定した。前眼部を除去し、さらに2時間浸漬固定した。次いでリン酸緩衝溶液、5%ショ糖溶液で組織を洗った後、30%ショ糖溶液に4℃で12時間漬潤し、OCT compound に凍結包埋した。以上に使用した各溶液には、混入 RNase の活性を抑える目的で、RNase 阻害剤である diethylpyrocarbonate (DEP: Sigma, St Louis) を、0.02%濃度で加えた。生体からの RNase の混入を防ぐために、ゴム手袋を着けた上で凍結切片の作製を cryostat を用いて行った。切片の厚さは、10 μ m とし、3-aminopropyl triethoxysilane 処理したスライドガラスに載せ、室温で30分乾燥した後、-70℃で保存した。

2. プローブ核酸の作製

プロソマトスタチン mRNA の核酸配列よりソマトスタチン 28 の12~19番アミノ酸をコードする塩基配列に対して、相補的塩基配列23mer (5' TTCTTGCAGCCAGCTTTGCGTTC 3') を Applied Biosystems Automated DNA Synthesizer により合成し、プローブ核酸とした。プローブ核酸の5'末端に、T 4 polynucleotide kinase のもとで、(γ -³²P)ATP を反応させ放射性同位元素 (³²P) 標識プローブ核酸を作製した。³²P 標識プローブ核酸の放射活性が10⁷cpm/ μ g 以上であることを確認し、標識を行った翌日に in situ hybridization を行った¹²⁾。

3. In situ hybridization

乾燥保存しておいた切片を0.02%DEPを含むリン酸緩衝液で洗浄し、はじめに pre-hybridization を行った。Pre-hybridization 溶液は、12×standard saline citrate (SSC), 10 mM EDTA, 4×Denhardt's, 100 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.2% sodium dodecyl sulfate, 200 μ g/ml denatured salmon testis DNA を含む一定量の溶液を用意し、これを2分間沸騰浴し、さらに急冷処理した後、等量の50%deionized formamide を加えて作製した。溶液をスライドガラスの組織の上に掛け、42℃で2時間 pre-hybridize させた。Pre-hybridization 後、組織を0.33 M ammonium acetate を含む50%, 70%, 95%, 100%エタノールで脱水し、30分間乾燥させた。Hybridization 溶液は、12×SSC, 10 mM EDTA, 4×Denhardt's, 100 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.2% sodium dodecyl sulfate, 200 μ g/ml denatured salmon testis DNA を含む一定量の溶液を用意し、これにプローブ核酸溶液を加え、100℃で5分間沸騰浴を行った後、等量の50%formamide を加えて作製した。作製後、直ちにスライドガラス上の組織に hybridization 溶液をビベッティングし、カバーガラスで覆い、42℃で24時間 hybridize させた。hybridization は乾燥を防ぐために湿箱中で行った。Hybridization 後、4×SSC 中でカバーガラスをはずし、37℃で4×SSC に2時間、2×SSC および0.1×SSC に2分間漬けて洗った。その後、スライドガラスを50%, 70%, 95%, 100%エタノールで脱水し、乾燥させた。次に、スライドガラスを液化した感光乳剤 (Kodak NTB 2) に浸しゆっくりと引き上げ、乾燥してから暗箱に入れ、4℃で6日間露出した。露出後、暗室で Kodak D-19 および Kodafix を用い現像した。最後に、組織切片をトルイジンブルー染色した。コン

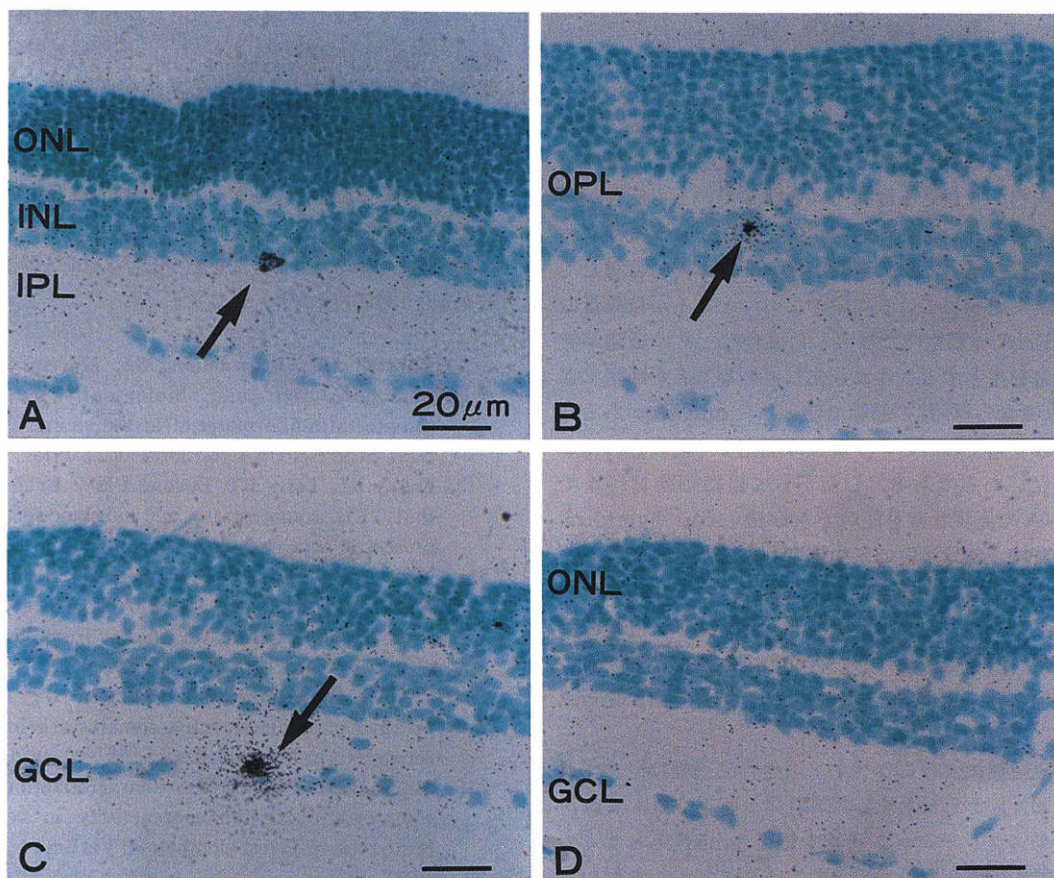


図1 ソマトスタチン mRNA に対する in situ hybridization 組織化学.

A: 内顆粒層最内層の陽性細胞 (矢印). ($\times 400$)

B: 内顆粒層最外層の陽性細胞 (矢印). ($\times 500$)

C: 神経節細胞層の陽性細胞 (矢印). ($\times 500$)

D: コントロール切片では、バックグラウンドのみ見られる. ($\times 500$)

(ONL: 外顆粒層, OPL: 外網状層, INL: 内顆粒層, IPL: 内網状層, GCL: 神経節細胞層)

コントロールは、プローベ核酸溶液を加えずに同様の過程を処理したものと、RNAase 処理したものの2つについて検討した。

III 結 果

ラット網膜においてソマトスタチンの mRNA を標的としてこれと相補的な ^{32}P 標識 mRNA oligomer を hybridize させ、オートラジオグラフィーにより hybridization された部位を可視化することにより、ソマトスタチン mRNA の存在部位が示された。高濃度の silver grain が内顆粒層最内層 (図1 A)、内顆粒層最外層 (図1 B) と神経節細胞層 (図1 C) に認められ、

コントロール切片 (図1 D) ではバックグラウンドしか認められなかったことから、これらは in situ hybridization 陽性細胞であると判断された。神経線維層や、外顆粒層には陽性細胞は認められなかった。オートラジオグラフィーで出現した silver grain は、個々の細胞により濃淡の差として違いが見られ、ソマトスタチン mRNA 発現の差を反映していると考えられた。実験結果に動物の個体差によるばらつきは認められなかった。これまで飛程の大きい ^{32}P は、解像度の関係上光顕レベルでの同定には適さないと考えられていたが、細胞密度の高い内顆粒層でも陽性細胞の同定が可能であった。

IV 考 按

厳密には特異蛋白を細胞内で検出したことをもって、その細胞が特異蛋白を産生したと断定することはできない。その理由は、他の細胞で産生された蛋白をその細胞が取り込み細胞内に蓄積している可能性があるからである。また細胞内の蛋白量は、合成や取り込みと消費の差引として細胞がその時点までに蓄積してきた結果を示しているにすぎない。ところが特異蛋白の mRNA を細胞内で検出した場合は、その細胞が特異蛋白を産生するように分化していることが断定できる。なぜならば、他の細胞で作られた mRNA がある細胞に取り込まれるという現象は現在まで観察されたことがないからである。したがって組織細胞レベルで mRNA の発現状態を証明できる *in situ hybridization* 法は、特異蛋白の産生細胞を厳密な意味で明らかにすることができる。この方法により、ラット網膜におけるソマトスタチン mRNA 陽性細胞は、内顆粒層最内層、内顆粒層最外層、神経節細胞層に存在することが示され、Kirsh ら⁹⁾の報告を支持する結果が得られた。

神経組織におけるペプチドの生合成過程は、まず遺伝子 DNA から mRNA の前駆体へ転写され、これが核内でスプライシング過程を経て、mRNA となって細胞質に出る。次いで mRNA はリボゾームで翻訳され、巨大分子の前駆体ペプチドが産生される。この前駆体は細胞質中で複数の蛋白質分解酵素によるプロセッシングを受けて、目的の生理活性をもつペプチドに分解される。したがって、神経組織細胞における mRNA の発現は、神経組織のダイナミックな生理活性状態を直接反映しているが、mRNA の発現は必ずしも細胞内の最終産物の存在とは関係がなく、逆に最終産物の存在は mRNA の発現を意味していない。今回行った *in situ hybridization* 組織化学の結果では、網膜内ソマトスタチン mRNA 陽性細胞密度は、過去の免疫組織化学の報告で示されたソマトスタチン蛋白陽性細胞密度と較べて明らかに少なかった。したがって、この結果は網膜内ソマトスタチンの mRNA と蛋白の分布に時間的および空間的な隔たりが存在することを示唆していると考えられる。

In situ hybridization 組織化学法は、細胞の活動状態を遺伝子発現のレベルで検出する方法である。³²P を用いた今回の *in situ hybridization* では、陽性細胞の同定が細胞密度の高い網膜内顆粒層でも可能であ

り、今後さまざまな実験系に応用できると考えられた。網膜の神経機能を解明するために、細胞内の神経伝達物質の存在を検出する免疫組織化学法に加えて、*in situ hybridization* 組織化学が重要な役割を担うと考えられる。さらに、この両方法を組み合わせることは、遺伝子発現—生理活性物質—神経機能の流れの解析に有用であると考えられる。

稿を終えるにあたり御校閲を賜りました東北大学眼科学教室玉井 信教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Rorstad OP, Brownstein MJ, Martin JB: Immunoreactive and biologically active somatostatin-like material in the retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 3019—3023, 1979.
- 2) Eskay RL, Long RT, Luvone PM: Evidence that TRH, somatostatin, and substance P are present in neurosecretory elements of the vertebrate retina. *Brain Res* 196: 554—559, 1980.
- 3) Marshak DW, Reeve JR, Shively JE, et al: Structure of somatostatin isolated from bovine retina. *J Neurochem* 41: 601—606, 1983.
- 4) Shapiro B, Kronheim S, Pimstone B: The presence of immunoreactive somatostatin in rat retina. *Horm Metabol Res* 11: 79—80, 1979.
- 5) Marshak D, Yamada T: Characterization of somatostatin-like immunoreactivity in vertebrate retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 112—115, 1984.
- 6) Rorstad OP, Brownstein MJ, Hoyte KM, et al: Immunoreactive and biologically active somatostatin-like material in human retina. *Brain Res* 199: 488—492, 1980.
- 7) Sagar SM, Rorstad OP, Landis D, et al: Somatostatin immunocytochemistry in the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 316—322, 1982.
- 8) Sagar SM: Somatostatin-like immunoreactive material in the rabbit retina: Immunohistochemical staining using monoclonal antibodies. *J Comp Neurol* 266: 291—299, 1987.
- 9) Kirsh B, Leonhardt H: Demonstration of somatostatin-like activity in retinal cells of the rat. *Cell Tissue Res* 204: 127—140, 1979.
- 10) Lin C-T, Li H-T, Wu J-Y: Immunocytochemical localization of L-glutamate decarboxylase, gamma-aminobutyric acid transaminase, cystein sulfinic acid decarboxylase, aspartate aminotransferase and somatostatin in rat retina. *Brain Res* 270: 273—283, 1983.
- 11) Sagar SM, Marshall PE, Landis D: Im-

munoreactive somatostatin in the rat retina :
Light microscopic immunocytochemistry and
chromatographic characterization. Brain Res
336 : 235—242, 1985.

In situ hybridization using ^{32}P labelled
oligodeoxyribonucleotide for cellular localiza-
tion of mRNA in neuronal and endocrine tissue.
Histochem 89 : 467—479, 1988.

12) **Preistley JV, Hynes MA, Han VKM, et al :**
