

製品データ No. 167

蛍光 Nissl 染色試薬, NeuroTrace™ 640/660, を用いた神経細胞の検出: マウス脳における
 ϵ - サルコグリカン発現細胞の同定

2005 年 2 月

データの提供: 国立精神・神経センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部
今村道博先生

目的

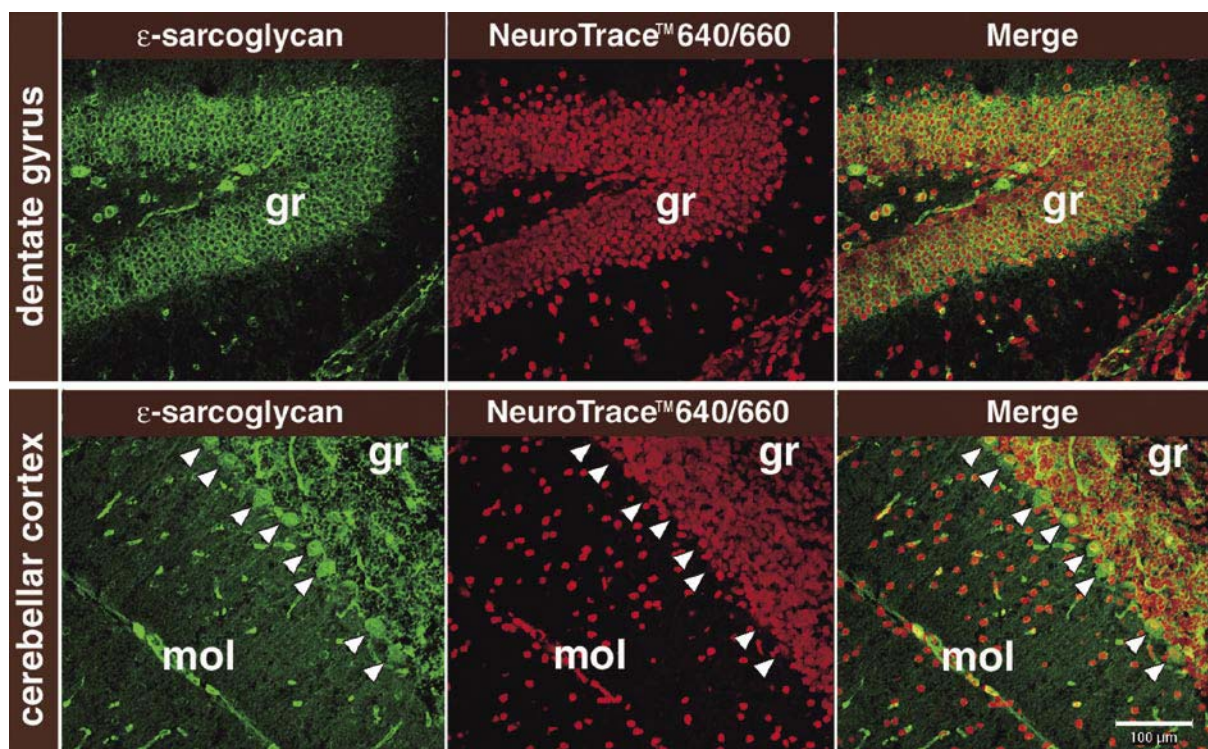
ϵ - サルコグリカン (ϵ -SG) 遺伝子における loss-of-function タイプの変異はミオクロナス - ジストニア症候群 (myoclonus-dystonia syndrome; M-D) を生じるため¹、 ϵ -SG は中枢神経系において重要な機能を果たすものと考えられる。この分子の機能を解明するためには、まず、 ϵ -SG の脳内分布を調べ、発現細胞を同定することが重要となる。しかしながら、これまで、中枢神経系における ϵ -SG の局在については全く情報が得られていなかった。そこで我々はこれを明らかにする目的で抗 ϵ -SG 抗体を作製し、局在を解析した²。本稿では、この解析において神経細胞の染色試薬として用いた NeuroTrace™ 640/660 を取り上げ、その有用性について述べる。

方法

C57BL/6J (6 週齢) マウスの脳より 14 μ m の矢状断切片をつくり、スライドガラス上で 30 分 ~ 1 時間程度風乾させた後、アセトン (-20 °C) 中で 5 分間固定した。固定後、切片からアセトンをとばし、Phosphate-buffered saline (PBS) 中で平衡化した。アフィニティー精製した抗 ϵ -SG ウサギ抗体を 2% カゼイン溶液で希釈し、4 °C、overnight で反応させ、PBS で洗った後、Alexa Fluor® 488 ラベルの抗ウサギ IgG (600 倍希釈, Molecular Probes) を室温で 30 分間反応させた。蛍光抗体染色の全行程を終えた後に、切片を PBS でよく洗い、ここに PBS で 100-300 倍に希釈した NeuroTrace™ 640/660 を脳切片が十分に浸る程度 (本解析では約 300 μ l) 滴下し、室温で 20 分反応させた。切片を PBS で数回洗った後、蛍光退色保護剤の存在下、染色像を共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SP、ライカ) で観察、記録した (図 1 ϵ -SG : 488 nm / 505-550 nm、NeuroTrace™ 640/660 : 647 nm / 667-800 nm)。

結果

ϵ -SG は脳全体に広く分布していたが、特に嗅球、海馬、橋、大脳皮質、小脳皮質に強く発現していることが示された²。特に海馬では CA 領域の錐体細胞、歯状回の果粒細胞、小脳ではプルキンエ細胞と果粒細胞に強い染色性が認められた (図 1)。NeuroTrace™ で染色されず、 ϵ -SG が発現する構造も認められたが、これは毛細血管を形成する内皮細胞であり、 ϵ -SG が毛細血管に存在するという報告とよく一致していた。

図 1. 抗 ϵ -SG 抗体と NeuroTrace™ 640/660 を用いたマウス脳切片の二重染色像

ϵ -SG はマウスの脳全体に広く分布していたが、本稿では歯状回 (dentate gyrus) と小脳上皮 (cerebellar cortex) の染色像のみを示した。図中、果粒層は (gr)、分子層は (mol) で示した。また、矢頭はプルキンエ細胞を示している。

結論

ϵ -SG に対する特異抗体と NeuroTrace™ 640/660 との蛍光二重染色により、中枢神経系では ϵ -SG が神経細胞に発現していることが明らかになった²。

本件のように特定の分子の局在を多重染色により解析する場合には、実験時間の短縮やマーカー分子の選択性の拡大など、その操作性や感度の面から考えて NeuroTrace™ 640/660 を用いるメリットがあると思われる。

コメント

同様な神経細胞のマーカーとしては神経細胞の核に特異的に存在する NeuN (neuron-specific nuclear protein) に対する抗体も用いられるが、この場合、蛍光二重染色を行なおうとすれば抗 NeuN 抗体と解析の対象分子に対する抗体の動物種を変えなければならない。また、抗原抗体反応を 2 回繰り返すことになるため (個人的には二重染色を行なう場合は抗原抗体反応を続けて 2 回行なう方がより良い結果が得られるという印象を持っている)、必然的に時間的な問題が生じる。これらのことからすれば NeuroTrace™ を用いる方がより簡便だと言える。

今回の解析で使用した NeuroTrace™ 640/660 は名前の数字から分かるように長波長の蛍光であるため、これに対応する励起光源と検出装置が必要となる。従って通常の蛍光顕微鏡を用いた場合には接眼レンズを通して (自らの眼で) 観察することはできない。このような理由からすれば通常はより短波長側の蛍光を発する NeuroTrace™ を用いるのが好ましい。ちなみに、我々は NeuroTrace™ 530/615 による染色も行なったが、何の問題もなく鮮明な結果を得ることができた。

使用説明書にはマウス脳凍結切片の染色方法が記載されており、その中で BSA (bovine serum albumin)、

ノンファットドライミルク、ウマ血清は NeuroTrace™ の蛍光を消してしまうので使用しないように注意している。その代わりに 0.5% の fish skin ゼラチンを無害なブロッキング試薬として挙げているのだが、我々は特にブロッキングを行わなかった。これは個々のケースによるものと思われる。しかしながら試薬の反応条件（希釈倍率、反応時間、反応温度など）についてはやはり事前に調整する方が好ましい。

文献

- 1 Zimprich, A., Grabowski, M., Asmus, F., Naumann, M., Berg, D., Bertram, M., Scheidtmann, K., Kern, P., Winkelmann, J., Muller-Myhsok, B. et al. (2001) Mutations in the gene encoding ϵ -sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome. Nat. Genet., 29, 66-69.
- 2 Nishiyama, A., Endo, T., Takeda, S. and Imamura, M. (2004) Identification and characterization of ϵ -sarcoglycans in the central nervous system. Brain Res. Mol. Brain Res., 125, 1-12.

製品情報

製品名	カタログ番号	サイズ
NeuroTrace™ 640 /660 deep-red fluorescent Nissl stain *solution in DMSO*	N-21483	1 ml
NeuroTrace™ 530 /615 red fluorescent Nissl stain *solution in DMSO*	N-21482	1 ml
Alexa Fluor® 488 anti-rabbit IgG	www.lifetechnologies.com をご覧ください	

価格については、ウェブをご覧ください。

研究用에만使用できます。診断目的およびその手続き上での使用は出来ません。

記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。

標準販売条件はこちらをご覧ください。www.lifetechnologies.com/TC

The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.

© 2012, Life Technologies Japan Ltd. All rights reserved. Printed in Japan.

ライフテクノロジーズジャパン株式会社

本社：〒108-0023 東京都港区芝浦 4-2-8

TEL.03 (6832) 9300 FAX.03 (6832) 9580

www.lifetechnologies.com

大阪：〒564-0052 大阪府吹田市広芝町 10-28

TEL.06 (6339) 8165 FAX.06 (6339) 8138

