

形態科学を基盤とした遺伝子発現解析法 —*in situ* hybridization 法を中心に—

Methods for the Analysis of Gene Expression Based on Morphological Science —Focusing on *in situ* Hybridization Method—

日野真一郎, Narantsog Choijookhuu, 菱川 善隆
Shin-ichiro Hino, Narantsog Choijookhuu and Yoshitaka Hishikawa

宮崎大学医学部解剖学講座組織細胞化学分野

要 旨 遺伝子が持つ本来の役割を知るためには、転写レベルでの調節、翻訳レベルでの調節、分解速度、細胞内局在を個々の細胞で見極めることが重要であり、タンパク質および核酸の両者の発現動態を総合的に検討することが不可欠である。これらを検出する方法として、免疫組織化学は抗原抗体反応を用いて細胞内におけるタンパク質の発現や局在を検出するものであり、*in situ* hybridization 法は組織切片上で特異的な塩基配列を持つ核酸分子を視覚化することにより、個々の細胞レベルの *in situ* (本来存在する場所) で検出する方法ある。本解説では、*in situ* hybridization 法に焦点を絞り、mRNA を可視化する必要性と基本原理を述べた後に、評価の仕方と応用例について説明する。

キーワード：遺伝子発現, *in situ* hybridization, 免疫組織化学, タンパク質, mRNA

1. はじめに

30 億塩基対からなるヒトゲノムシーケンスの解読により、ヒトゲノム中の遺伝子は 3 万個程度であることが明らかとなった。この暗号の解読により得られた情報に基づき、いかにそれらを利用し活用していくかが重要な課題である。ポストゲノムシーケンス時代に入り、ゲノム中のすべての遺伝子の網羅的発現解析が盛んに行われるようになった。たとえば、DNA マイクロアレイと呼ばれる網羅的な遺伝子発現解析では、スライドガラス上に多数の cDNA クローンや合成オリゴ DNA を整列化し、核酸の hybridization により遺伝子 (mRNA) の発現レベルを定性的に解析することで、ターゲット遺伝子のスクリーニングや mRNA の発現プロファイルを知ることができる。このような手法は、癌をはじめとする疾患研究において画期的なストラテジーであり、新規ターゲットの同定や診断法開発のための有効な手段であることは間違いない。しかしながら、このような手法により得られたターゲット遺伝子の組織内の発現部位や細胞内局在などの性状が不明な場合には、やはり生命の最小単位である個々の細胞での遺伝子発現解析が必須となる。すなわち、遺伝子を個々にとらえる時代から遺伝子機能の網羅的解析の時代へと移り変わったとしても、最終的に個々の細胞での役割を解明しな

ければ、遺伝子により引き起こされる精巧で多彩な生命現象を理解したことにはならない。

培養細胞を用いた生化学的あるいは分子細胞学的解析により、多くの遺伝子産物の機能が明らかとなり、複雑なシグナリングパスウェイのネットワークが次々と明らかになった。培養細胞内で起こる総論的理解が進み、次に生体内での組織・細胞レベルでの各論的理解に移行していることは言うまでもない。このような網羅的解析が可能な時代であるからこそ、免疫組織化学的手法や *in situ* hybridization 法などによる個々の細胞における特定物質の発現解析の質が要求されている (図 1)。免疫組織化学的手法は細胞内における遺伝子発現をタンパク質レベルで解析する手法であり、*in situ* hybridization 法は組織切片上で特定遺伝子の mRNA の局在や発現量を明らかにする方法である^{1,2)}。タンパク質レベルでの解析における問題点は、分泌性タンパク質や常に分解をうけているタンパク質、あるいは細胞内に取り込まれるタンパク質の場合、可視化されたタンパク質の局在や発現量が、必ずしもその時点での、その細胞での合成を示しているわけではない点が挙げられる。また、タンパク質の固定操作により検出結果が左右される可能性も指摘されている。特定物質の発現制御機構を知るためには、転写レベルでの調節、翻訳レベルでの調節、分解速度、細胞内局在に変化、さらには検出法の限界を含めて見極めることが重要であり、タンパク質および mRNA の両者の発現動態を総合的に考察することが、遺伝子が持つ本来の役割を知る必須事項である。

本解説では、種々の遺伝子発現解析のうち、*in situ* hybrid-

〒 889-1692 宮崎市清武町木原 5200
TEL: 0985-85-1783; FAX: 0985-85-9851
E-mail: shin16@med.miyazaki-u.ac.jp
2015 年 1 月 28 日受付

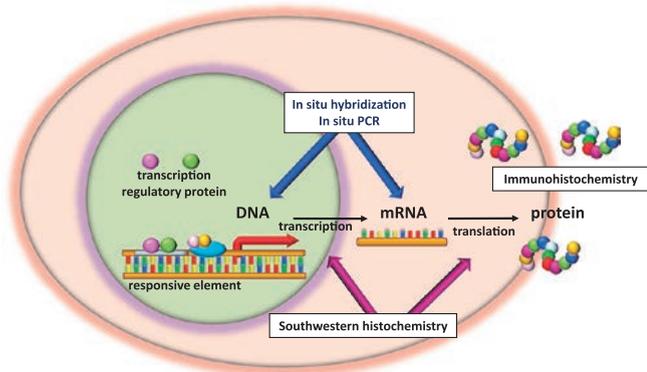


図1 分子組織細胞化学方法論. 組織・細胞レベルでの DNA や RNA などの核酸分子の検出法としては *in situ* hybridization 法や *in situ* PCR が有用.

ization 法に焦点を絞り, *in situ* hybridization 法の必要性と基本原理を述べた後に, 解析方法ならびに評価の仕方およびの応用例について説明する.

2. *in situ* hybridization 法による可視化の必要性

in situ hybridization 法による解析の対象は DNA と RNA である. DNA を対象にした *in situ* hybridization 法では, 特定の遺伝子 DNA のコピー数の増減や存在位置などに生じた異常を検出することが可能である. がんや先天性異常における遺伝子の増減や微細構造異常の検査は臨床的意義が非常に高い. また DNA ウイルスゲノム保持細胞の検出や進化系統の相同性の解析にも有用である.

RNA を対象にした *in situ* hybridization 法は, 組織・細胞特異的に発現する遺伝子の状態を明らかにする上で必須の方法論である. 細胞は個々の形態や極性などの多様性により特殊な機能を発揮することを可能にしているが, ウェスタンブロットや RT-PCR 法などの解析法は細胞あるいは組織全体の平均値であり, 個々の細胞の性状はわからない. そのため, 各細胞がもつ固有の機能や周囲の細胞との相互作用を解明するためには, どの細胞がどこで特定の遺伝子を合成し, どのような細胞にあるいは自分自身に働きかけるかを切片上で明らかにしなくてはならない.

遺伝情報は DNA → (転写) → mRNA → (翻訳) → タンパク質の順に伝達される. 最終生産物であるタンパク質を検出する方法に免疫組織化学があるが, 原理的欠点が存在している. 自身の細胞内で機能するタンパク質は細胞質の遊離リソソームで翻訳をうけるが, 膜タンパク質あるいは細胞外分泌タンパク質は, 粗面小胞体上のリソソームで翻訳され小胞体内とゴルジ内で修飾・加工された後に細胞膜上や細胞外に分泌されて機能する. この場合, 免疫組織化学を用いて最終生産物であるタンパク質の局在を明らかにしても, 実際の産生細胞を確認するためには mRNA の発現検討が必要である. 合成されたタンパク質は, ユビキチン・プロテアソーム系あるいはオートファジー・リソソーム分解系により翻訳後に分

解を受ける場合もあり, タンパク質の発現レベルと転写レベルが相関しない場合がある. また, タンパク質の固定操作による抗原部位の立体障害やマスキングなどにより検出結果が左右される可能性がある. 抗原賦活法や好感度ポリマー試薬の開発, ホルマリン固定に抵抗性の抗原を認識する抗体の開発などが進んではきているが, 個々の細胞における遺伝子発現の制御機構を知る上では, 免疫組織化学によるタンパク質の可視化ならびに *in situ* hybridization 法による mRNA の可視化による総合的な検討が不可欠である.

3. *in situ* hybridization 法の基本原理

DNA の塩基はアデニン (A), グアニン (G), チミン (T), シトシン (C) の 4 種類から構成されている. DNA と RNA とは 4 つの塩基のうちの 1 つが異なっており, RNA は T のかわりのウラシル (U) をもつ. 核酸塩基間においては, A は T あるいは U と, G は C と相補的に結合し, それぞれ二本および三本の水素結合により複合体を形成する. これらの核酸分子の水素結合は, 加熱や変性剤により 1 本鎖化するが, 少しずつ温度を下げることで, 一本鎖化した 2 本の核酸分子が相補的な塩基間で再度二本鎖化される. この核酸塩基間の水素結合の hybridization (雑種形成あるいは分子交雑) 能を利用して, 特定の遺伝子の局在を組織切片上で検出する方法

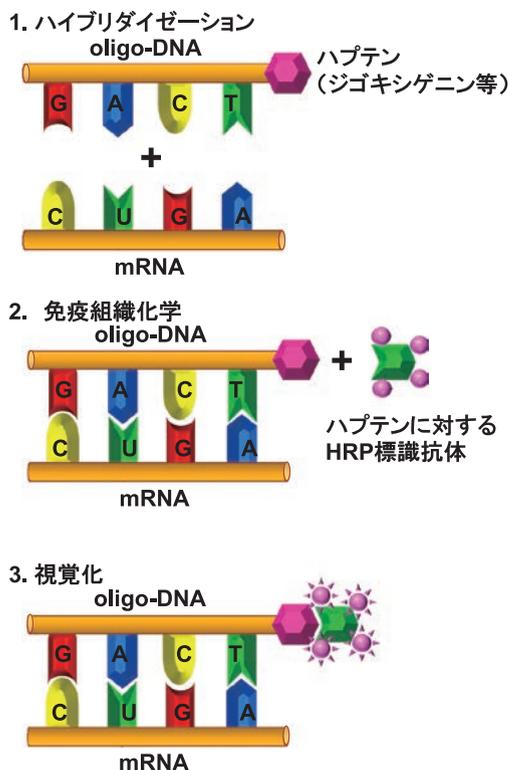


図2 免疫組織化学的 *in situ* hybridization 法の原理. 標的とする mRNA に相補的な核酸配列をもつオリゴ DNA を合成し, その末端をジゴキシゲニンなどのハプテンで標識しプローブとする. 組織切片上で *in situ* (本来存在する場所) 雑種形成を行わせて, 最終的に HRP 標識などの抗ハプテン抗体を用いて免疫組織化学的に可視化する.

論が *in situ* hybridization 法である¹⁻³⁾。非放射性合成オリゴ DNA プローブを用いた特異的 mRNA の検出法を (図 2) に示した。はじめに、標的とする mRNA に相補的な核酸配列をもつオリゴ DNA プローブ (探索子) を合成する。その末端をジゴキシンゲンなどの非放射性標識物質 (ハプテン) で標識し、細胞標本上あるいは組織切片上で *in situ* (本来存在する場所) hybridization 反応を起こさせる。最後に、過剰なプローブ核酸を至適な条件で洗浄し、最終的に horseradish peroxidase (HRP) などの酵素や蛍光色素で標識した抗ハプテン抗体を用いて免疫組織化学的に視覚化するものである。

4. *in situ* hybridization 法による解析

4.1 試料の選択

- (1) 培養細胞：新鮮な細胞を用いるため RNA の保存量が良好で細胞単位での発現量の測定が可能である。一方、細胞膜で全体が覆われているので、細胞内へのプローブの浸透性が低く、RNA の露出操作に注意が必要である。
- (2) 凍結切片：未固定凍結切片、固定後の凍結切片 (既固定凍結切片) を用いることができる。未固定凍結切片では細胞内へのプローブの浸透性が既固定凍結切片に比べ良好であるが、既固定凍結切片のほうが RNA の保存度が高く、長期保存が可能であり、形態の保存状態も良い。
- (3) パラフィン切片および樹脂包埋切片：(1)、(2) の試料に比較して、形態の保存状態が良好で高解像力が得られ、ブロックの保存も簡単であるが、検出感度が若干下がる点に注意が必要である。樹脂包埋切片の場合プローブの浸透性に難がある。

4.2 標識の選択

プローブの種類には cDNA, RNA, 合成オリゴ DNA など様々なものがあり、それぞれ利点と欠点がある。調整が最も簡便なのは合成オリゴ DNA プローブで、外注すれば比較的安価に入手できる。RNA プローブはプロモーターの下流に組み込んだ cDNA から RNA ポリメラーゼにより得ることができ、RNA-RNA の雑種形成の安定性が若干高い。ただし、DNA と比較して組織成分への非特異的吸着がみられる傾向があり、それらを除去するために RNase を用いなければならないという問題がある。

最良なプローブの塩基配列を知る明確な指標はない。長いパルンドローム配列は避けること、5' 或いは 3' 端の untranslated region に相補的な配列は避けたほうが無難である。ホモロジー検索により標的分子と高い相同性を持つ他の分子がないこと、核酸の二次構造予測によりループ構造を取らないことを確認する必要がある。少なくとも 3 ヶ所の配列を選択してプローブを作製するのは、實際上、選択した箇所によりプローブのシグナル検出能力に明らかな差が認められるためである。さらに、既にノザンプロット法などで用いている部分から適当な配列を抽出するのも一つの方法である。

プローブの雑種形成の安定性を検討することが最も大切となる。具体的にはプローブの長さで % GC (GC 含量数 / プロー

ブ塩基数 × 100) が指標となる。通常、合成オリゴ DNA プローブは 45 塩基数を基本としており、GC 含量は 60% 前後 (GC 含量数として 27 個程度) を目安としている。このプローブの雑種形成の安定性は、いわゆる融解温度 (Tm 値) で表され、合成オリゴ DNA プローブ (45 塩基数) のように比較的短い核酸を利用する場合は次の式を用いて計算する。

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log [\text{溶液中の塩濃度}] + 0.41 X (\text{GC 含量} : \%) - 675 / \text{塩基数} - 0.61 X (\text{ホルムアミド濃度} : \%)$$

Tm 値は塩濃度、GC 含量、ホルムアミド濃度により変化する。そこでより厳しい条件、すなわちより相補性が高い雑種しか存在できないような条件を “stringency が高い” といひ、より特異的な雑種形成を得る上で必要とされる。高温、低塩濃度、高濃度のホルムアミド存在下などの条件が相当する。実際には、Tm-15°C から Tm-30°C で 15 ~ 20 時間ハイブリダイゼーションを行うのが通例である。

後述する RNA 保存度の評価にも有用なプローブである 28S rRNA に対する合成オリゴ DNA プローブ⁴⁾ (5'-TGCTAC TACCACCAAGATCTGCACCTGCGGCGGC-3') の Tm 値を、通常我々が用いている hybridization 溶液での条件 (塩濃度は 0.6 M, ホルムアミド濃度は 40%) で計算すると、28S rRNA プローブの塩基数は 34, % GC は $21/34 \times 100 = 62$ から Tm 値は 59 となり、Tm-20 は 39°C となり、我々の用いている hybridization 反応温度である 37°C ~ 42°C の範囲となる。

このように、プローブの設定においては、hybridization に用いる温度 (37°C ~ 42°C) に対応して、配列の GC 含量をまず考慮すべきである。全体に GC 含量が多い場合や少ない場合には、hybridization 溶液に使うホルムアミド濃度や塩濃度を変える必要がある。

4.3 プローブの評価

in situ hybridization 法を行う前に、実際に作製したプローブがどの程度の標識率かを dot-blot hybridization 法¹⁾ を用いて検討する必要がある。これは標識化されたプローブ核酸をニトロセルロースフィルター上に dot 状に貼り付け、免疫組織化学的な染色を行うことでハプテンの存在とその量を確認することができる。また、雑種形成能力についても dot-blot hybridization 法にて検討できる。詳細な実験方法に関しては他書¹²⁾ を参照していただきたい。

4.4 試料の固定と切片作成

細胞・組織形態の保持と標的である核酸分子の不動化のために固定を行う。DNA および RNA の固定法としては、アルコールや酸を用いて周囲のタンパク質を変性させるタンパク質凝固系の固定法とアルデヒドを利用して核酸分子と周囲のタンパク質を架橋する架橋系の固定法がある。エタノール/酢酸 (3 : 1 (v/v)) 混液などは DNA を対象にする場合に有効である。一般に RNA を対象にする場合は、4% パラホルムアルデヒド (4% PFA) (表 1) の利用が最も有効である。自壊の激しい組織や神経組織には 0.1 ~ 0.2% のグルタルア

表1 4% PFA/PBS 作製法

- 800 ~ 850 ml の蒸留水を 50 ~ 60°C に温める
- 40 (g) PFA (粉末) を加え、保温・攪拌しながら 1N NaOH を数滴加える
注) 1N NaOH は多くても 1~2 ml. 30 分以内に完全に溶ける
注) アルカリ条件下では、ホルムアルデヒドは酸化還元反応によりギ酸とメタノールに変化するので不必要に NaOH を加えすぎない
- 溶解後はただちに氷冷 (アルデヒドの酸化還元反応の反応速度が低下する)
- 100 ml の 10XPBS を加え pH を 7.4 に調整後、1000 ml にメスアップする
- 4°C で保存 (1 ヶ月以内で使い捨てる)

表2 細胞の培養とスライドガラスの作成

- 10% 牛胎児血清 (FBS) 添加ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を使い、37°C、CO₂ 5% の条件下で培養
- トリプシン EDTA 溶液を用いて細胞を培養皿から剥離し、遠心後上清を捨て、新しい培地で細胞をサスペンド
- シランコートスライド (表4) 上に直接、あるいはチャンバースライド (Lab-Tek II) に細胞と培養液を入れ 24 時間 37°C で培養

表3 培養細胞のスライドガラスへの固定

- チャンバースライドを用いた場合は、培養液を捨てチャンバースライド部分を剥がす
- 洗浄: 無血清培地 (DMEM) で洗浄 (37°C, 2 回)
- 洗浄: PBS で洗浄 (室温, 1 回)
- 固定: 4% PFA/PBS で固定 (室温, 15 分)
- 洗浄: PBS で洗浄 (室温, 5 分, 3 回)
- 洗浄: DDW で洗浄 (室温, 1 回)
- 風乾: ドライヤー (温風) で完全に乾燥 (2 時間以上)
- 乾燥: インキュベーターで乾燥 (45°C, 3 時間~一晩)
- 保存: RNase フリーのスライドケースに入れ、テープなどで密封 -80°C 保存
注) 使用時には 2 時間ほどケースを密封したまま室温に戻す

ルデヒド (GA) が形態保持に有効であるが、強度の固定は組織内へのプローブの浸透性が低下するとともに、雑種形成の効率が低下することに注意しなければならない。

4% PFA/PBS を用いた培養細胞の固定法を (表2, 表3) に示す。ドライヤーでの風乾とインキュベーターでの処理により、完全に細胞をガラス面に焼き付けることが非常に重要である。この方法で固定されたスライド標本は、HE 染色やメチルグリーン/ピロニン Y 染色、免疫染色に用いることができる。4% PFA/PBS を用いた組織の浸漬固定では、組織を迅速に挫滅しないように切除し、室温で一晩 (17 ~ 24 時間) 固定する。固定時には水平振盪器を用いてゆっくり振盪させて、組織内に固定液をよく浸漬する。切片の厚さはプローブが浸透できる最大限が理想であり、凍結切片では 13 μm まで、パラフィン切片では 5 ~ 6 μm とし、シランコートスライド (表4) に捨てる。

4.5 RNA 保存量の評価

mRNA の検出で最も重要なことは RNA の保存量である。

表4 シランコートスライド作成法

- 3-アミノプロピルトリエトキシシラン (Sigma A-3648) をアセトンで 2% (v/v) に希釈する
- スライドガラスを上記溶液に浸漬する (室温, 10 秒)
- アセトンに浸漬する (室温, 1 分, 2 回)
- ドラフト内で風乾する
注) 操作はドラフト内で行う。
注) 乾燥した後、パラフィルムに包んで保存する。

表5 脱パラフィン

- パラフィン切片を 60°C で 30 分 ~ 1 時間インキュベーション
- トルエン・エタノールに浸漬 (各 5 分), PBS に浸漬 (5 分, 3 回)
- 100% ~ 70% エタノール処理
- PBS 浸漬
注) パラフィンに溶けているプラスチックを完全に溶解させるために、キシレンの代わりにトルエンを用いる。不完全な脱パラフィン操作では微細な染色ムラが生じることがある。

表6 メチルグリーン・ピロニン Y 染色法

- 脱パラ操作後、PBS, DDW で洗浄
- 切片の周囲を軽く拭いてメチルグリーン・ピロニン Y 液 (武藤化学) を、切片全体を覆うように滴下する。その後室温で 30 ~ 60 分間反応させる
- 蒸留水でさっと洗浄する (1 秒間)
- 60°C で完全に乾燥させる (約 30 分)
- キシレンにスライドを浸漬し封入する

組織の大きさや固定時間、固定方法により RNA 保存量に違いが生じる可能性があることから、必ず目的とする試料の RNA 保存状態を確認しておくことが必須である。mRNA の検出の成否は RNA の保存量に依存しており、特に組織の過固定などにより RNA の保存状態が不良の場合がある。RNA 保存量の検出法であるメチルグリーン/ピロニン Y 染色 (武藤化学, 表6) は非常に簡便であり、特異性および定量性に関する信頼性は高い。これは、メチルグリーンで DNA を青色に染色し、ピロニン Y で RNA をピンク色に染色するものであり、RNA 保存量における一次スクリーニングとしては非常に優れている。培養細胞 (MCF-7) の細胞質が (図3)、骨芽細胞や骨髄系細胞 (図5) のようにジョッキングピンクに染色されており、RNA が保存されていると考えられる。しかし RNA の保存度が高いことが必ずしも *in situ* hybridization 法によるシグナル検出レベルの高さを反映しない場合もある。例えばグルタルアルデヒドなどで強力に固定された組織では、確かに RNA の保存度は高いがその雑種形成能力は極端に低くなる。この染色法は、雑種形成能力まで評価できるものではなく、実際の *in situ* hybridization 法においては 28S rRNA 検出系を用いた組織切片上での RNA 保存評価システム⁴⁾ による検討が必須である。28S rRNA は核小体で 45S rRNA 前駆体分子からスプライスされて生じるもので、その量は全 RNA 量の半量程度を占める。したがってこの RNA が検出できなければ

ば標的とする mRNA を検出することは不可能である。しかもこの配列部位について多様な生物種で遺伝的に完全に保存されており、例えばゼブラフィッシュでも使うことができる非常にユニークな配列である。毎回 28S rRNA 検出系を陽性コントロールとして用い、タンパク質分解酵素処理などの前処理条件の至適化（図 3、図 4）や試料間での特定の遺伝子発現程度を比較検討する際にも大変有用である^{5~7)}。

5. 実際の *in situ* hybridization 法の操作手順

5.1 スライドの準備

結果の再現性を担保するために、アンチセンス用 2 枚、センス用 2 枚、陽性コントロールである 28S rRNA 検出用に 1 枚の合計 5 枚を 1 セットとして準備する。

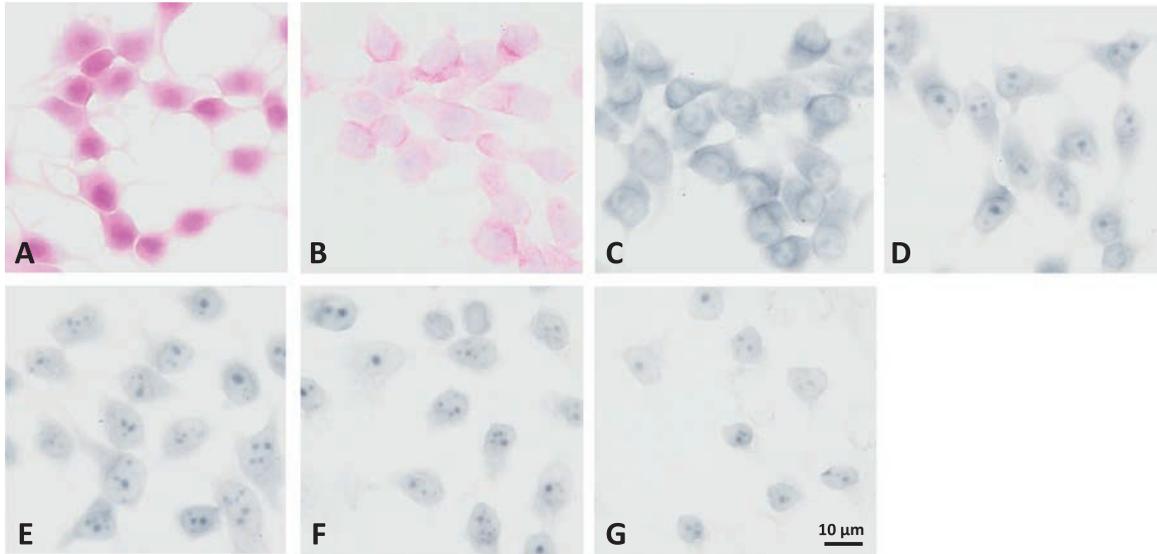


図 3 乳ガン由来培養細胞株 (MCF-7) の染色と 28S rRNA プローブを用いた mRNA 検出系. (A) ヘマトキシリン・エオジン染色. (B) メチルグリーン・ピロニン Y 染色. (C-G) プロテイナーゼ K 処理. 4% PFA/PBS MCF-7 培養細胞切片における RNA の保存度を 28S rRNA 染色にて検討したもの. 0.2% Triton X-100/PBS に室温で 10 分浸漬後に、PK 濃度を 0 ~ 5 µg/ml で条件設定を行った. (C) PK 濃度 0 µg/ml, (D) PK 濃度 0.5 µg/ml, (E) PK 濃度 1 µg/ml, (F) PK 濃度 2 µg/ml, (G) PK 濃度 5 µg/ml. PK 濃度が 0 µg/ml で mRNA が黒色の呈色として細胞質に強く認められる. PK 濃度が 0.5 ~ 1 µg/ml では核小体は強く呈色するが、PK 濃度 0 µg/ml に比べ細胞質の染色性は低下している. PK 濃度が 1 µg/ml ~ は濃度依存的に細胞質の形態が破壊されている.

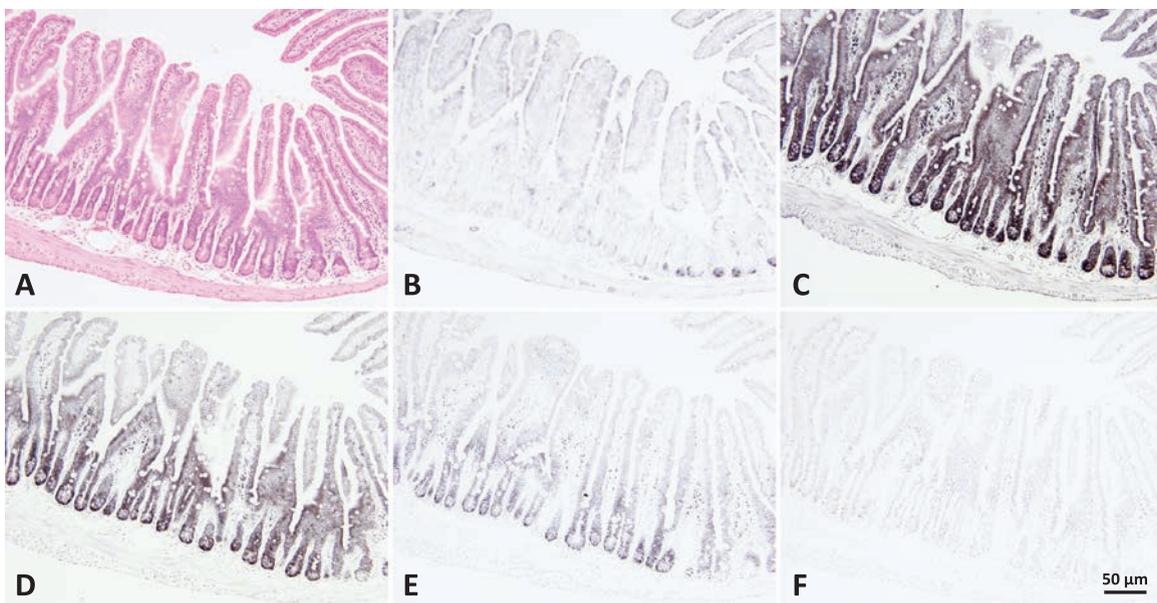


図 4 組織パラフィン切片 (マウス小腸) 28S rRNA プローブを用いた mRNA 検出系. (A) ヘマトキシリン・エオジン染色. (B-F) 4% PFA/PBS 固定マウス小腸パラフィン切片における RNA の保存度を 28S rRNA 染色にて検討したもの. (B) PK 濃度 0 µg/ml, (C) PK 濃度 25 µg/ml, (D) PK 濃度 50 µg/ml, (E) PK 濃度 100 µg/ml, (F) PK 濃度 200 µg/ml で条件設定を行った. PK 濃度が 25 µg/ml で mRNA が黒色の呈色として最も強く認められる. 0.2% Triton X-100/PBS 処理は行っていない.

5.2 塩酸処理

0.2N 塩酸で20分処理を行う。核酸と静電的に親和性のあるRNaseやヒストン様塩基性タンパク質を標本から除去する一種の除タンパク質操作である。この処理により特に塩基性タンパク質に由来するプローブ核酸との静電的非特異的反応を下げるができる。

5.3 タンパク質分解酵素処理

除タンパク質操作の一つで標的核酸を露出させることを目的とする必須の処理である。良好なシグナルを得ることができるかどうかの、最大のポイントの一つである。私たちはプロテイナーゼK (PK) を使用している。PBSに溶解して1-200 µg/ml, 37°C, 15分処理する。

混入が疑われるRNaseやDNaseをあらかじめ自己消化させるために、酵素液を使用30分前から37°Cでプレインキュベーションする。固定状態や試料の種類、臓器によりタンパク質分解酵素処理の至適条件が異なるので、28S rRNAシグナルを指標として至適化する。培養細胞では0-5 µg/ml, 小腸や大腸では10-20 µg/ml, 肝臓では50-100 µg/ml, 精巣, 腎臓, 大脳, 小脳を目安に検討している。PKは、0.1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/mlの濃度で予め-20°Cでストックしておき、使用時にアイスボックスのクラッシュアイス上で融解する。凍結、融解により活性低下が生じるため一回の実験ごとに必ず使い捨てる。

5.4 後固定

4% PFA/PBSで室温、5分浸漬する。この処理により緩んだ組織を再固定し、以降の操作過程におけるRNAの流出を

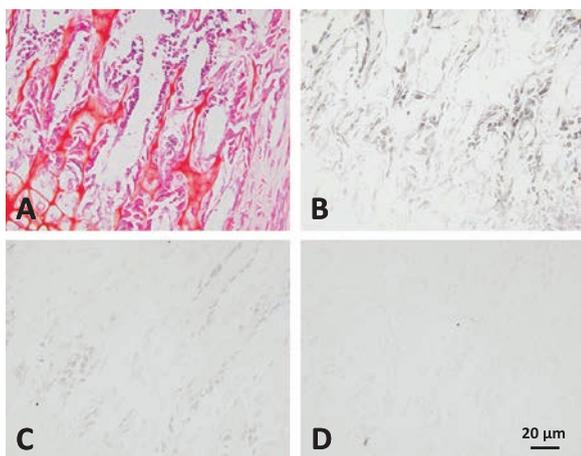


図5 4% PFA/PBS組織パラフィン切片(9日齢マウス大腿骨)28S rRNAプローブおよびI型コラーゲンプローブを用いたmRNA検出系。(A)メチルグリーン・ピロニンY染色。強い赤で軟骨基質および骨基質が観察される。骨基質周囲の骨芽細胞および骨髄系の細胞質がショッキングピンクに染まりRNAは良く保存されている。(B)28S rRNAアンチセンスプローブにより、骨基質周囲の骨芽細胞および骨髄系のmRNAが黒色の呈色として認められる。(C)I型コラーゲンアンチセンスプローブにより骨基質に近接する骨芽細胞にのみシグナルを認める。(D)I型コラーゲンセンスプローブによる陰性対照。シグナル/ノイズ比により特異性が認められる。0.2% Triton X-100/PBS処理は行っていない。

抑える。スライド全体が浸かるように染色壺いっぱいまで4% PFA/PBSを入れておく。4°Cで保存している4% PFA/PBSを実験開始時に室温に戻しておくことも重要である。その後PBSで5分、3回洗浄する。

5.5 反応性アルデヒドの中和

2 mg/ml グリシン/PBSで室温、15分、2回浸漬する。これにより残存する反応性アルデヒドを中和する。最初の処理では染色壺いっぱいまで満たし完全にアルデヒドを中和する。2回目の処理は半分程度で十分である。

5.6 プレハイブリダイゼーション

一般的には40%ホルムアミド/4 X SSCに室温で30分以上浸漬する。前述のようにホルムアミドは脱イオン化して用いる。最近の遺伝子解析用試薬では脱イオン化が必要ないものもあるが、一度開けると不活性気体で封じないかぎりイオン化が進むので要注意である。脱イオン化に使われたレジンは黄色に変色するので、色が変わっていないレジンが残っていることを確認することが重要である。

5.7 ハイブリダイゼーション

hybridization溶液の組成については(表8)を参照されたい。ホルムアミド濃度、硫酸デキストラン濃度及びプローブ濃度は状況により適切な濃度を用いる。合成オリゴDNAをプローブとして用いる場合でも、分子内に相補的配列があることが

表7 *in situ* hybridization法プロトコール

1. 除タンパク: 0.2 N 塩酸 (室温, 20分) 後 DDW で洗浄後 PBS (室温 5分)
2. (0.2% Triton X-100/PBS に室温, 10分浸漬, 必須ではない)
3. 除タンパク: プロテイナーゼ K/PBS 処理 (10 ~ 200 µg/ml, 37°C, 15分)
4. 洗浄: PBS で洗浄 (室温, 5分, 3回)
5. 後固定: 4% PFA/PBS で後固定 (室温, 5分)
6. アルデヒドの中和: PBS で洗浄後, 2 mg/ml グリシン/PBS に浸漬 (室温, 15分, 2回)
7. プレハイブリダイゼーション: DDW で洗浄後, 40%脱イオン化ホルムアミド/4 X SSC に浸漬
8. ハイブリダイゼーション: hybridization 溶液 (25 µl) を添加し, よく混ぜ合わせる。モイストチャンバー内にて 37 ~ 42°C で一晚反応させる。プローブ濃度は通常 1 ~ 2 µg/ml.
9. 洗浄: 2 X SSC や 50%ホルムアミド/2 X SSC で洗浄する (37°C, 1時間, 5回)
10. 洗浄: 2 X SSC (室温, 15分, 2回), その後 PBS で洗浄
11. ブロッキング反応
ブロッキング溶液: 500 µg/ml 正常ヒツジ IgG/5% BSA/100 µg/ml サケ精巢 DNA/100 µg/ml 酵母 tRNA/PBS を添加 (30 ~ 35 µl). (室温, 1時間)
12. 抗体反応
ジゴキシンゲン標識の場合: HRP 標識ニープポリクロナル抗体 (抗ジゴキシンゲン抗体) を 5% BSA/100 µg/ml サケ精巢 DNA/100 µg/ml 酵母 tRNA/PBS) 溶液で 200 倍希釈抗体を添加 (30 ~ 35 µl) (室温, 一晚)
13. 洗浄: 0.075% Brij 35/PBS (室温, 15分, 4回) 後, PBS で洗浄
14. 発色: 0.5 mg/ml 3,3'-ジアミノペンジジン 4塩酸 (DAB)/0.025% CoCl₂/0.02% NiSO₄(NH₄)₂SO₄/0.01% H₂O₂/0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 溶液に浸漬 (5 ~ 7分発色)
15. 洗浄・脱水・封入

表 8 hybridization 溶液の組成 (200 μ l) (40%ホルムアミドの場合)

| | |
|--|------|
| 1 M Tris/HCl (pH 7.4) | 2.0 |
| 5 M NaCl | 24.0 |
| 0.2 M EDTA (pH 7.4) | 1.0 |
| 脱イオン化ホルムアミド | 80.0 |
| 100 X Denhardt 溶液 | 2.0 |
| 10 mg/ml 酵母 tRNA | 5.0 |
| 10 mg/ml サケ精巢 DNA | 2.5 |
| 50%硫酸デキストラン | 40.0 |
| 50 μ g/ml プローブ (最終濃度 1 μ g/ml の場合) | 4.0 |
| 10 mM Tris/HCl-1 mM EDTA (pH 7.4) | 39.5 |
| 計 200.0 (μ l) | |

表 9 モイストチャンバーの作製法

1. モイストチャンバーに相当量の 40%ホルムアミド/4 X SSC を入れる (この場合のホルムアミドは脱イオン化したものを使用する必要はない)。
2. キムタオルをしわにならないように敷く。
3. 40%ホルムアミド/4 X SSC 溶液をキムタオルとなじませて、その上にパラフィルムの内側を敷く。

予想されるので、使用前に一本鎖化操作として、5~7分間沸騰浴を行い氷水で急冷してから用いる。一切片あたり 20~30 μ l の hybridization 溶液を添加する。切片は、モイストチャンバー (表 9) 内 (hybridization 溶液に用いるホルムアミド濃度と同じ濃度の溶液で飽和) にて 37~42°C で一晩反応させる。

hybridization 溶液には硫酸デキストランが入っているので溶液自体が非常に粘稠であり、ピペットチップの先を使ってよく混ぜ合わせる (少なくとも 30 回以上混ぜている)。この操作を丁寧にしないと染色ムラや結果の再現性に大きく影響する。モイストチャンバーの周囲をマスキングテープで密閉し、反応液の乾燥防止処置を行う。

5.8 洗浄

水平振盪器を用いて 2 X SSC や 50%ホルムアミド/2 X SSC などで、37°C ~ 42°C で 1 時間ずつ 5 回洗浄する。洗浄温度は Tm 値により可変だが、基本は 37°C である。未反応のプローブを組織標本から除去し相補性の低い雑種形成を解離させ、結果として非特異的呈色を減少させるために、洗浄操作は重要である。

hybridization に用いた条件よりもやや stringency が高い条件で洗浄を行う。具体的にはホルムアミド濃度を 40% から 50% に上げる、塩濃度を 0.5 X SSC に下げるなどの条件を用いて洗浄する。この際に表面活性剤である 0.075% Brij 35 を添加して洗浄すると効率が上がるがある。最終的に 2 X SSC 及び PBS で洗浄してホルムアミドを除く。尚、洗浄につかうホルムアミドは hybridization に使う高価なものである必要はなく試薬特級 (Wako 068-00426) で十分である。また脱イオン化も必要ない。洗浄条件の設定は、最初は塩濃度を高めに設定し、2 X SSC (37°C, 1 時間, 5 回洗浄) から次第に低下させて非特異的の反応を落とすしていく方がよい。

5.9 免疫組織化学

私たちは酵素抗体法直接法を日常的に行っており、標識酵素としては HRP を使用している。この過程は通常の免疫組織化学であり、シグナルの検出法には多様な選択が可能であり、直接法と間接法が可能であるし、また蛍光抗体法も酵素抗体法も可能である。我々はチミン二量体法の場合には HRP 標識マウス抗チミン二量体モノクローナル抗体 (協和メデックス) を用いて検出しており、ジゴキシゲニンの場合にも HRP 標識ヒツジ抗ジゴキシゲニン抗体 (ロッシュ) を利用している。

いずれにせよ、一本鎖 RNA 単独に比して mRNA-DNA 雑種形成は安定ではあるが、RNase や DNase の混入に配慮してそれらの酵素活性の阻害効果を期待し、抗体溶液に酵母 tRNA とサケ精巢 DNA を添加するとともに BSA も精製レベルの高いものを使用している。DAB を用いての発色時間は 5 分から 7 分で行い、反応時間を延ばす事は非特異的の反応を増強するだけであり意味をなさない。

6. 結果の評価

陽性シグナルの検出はアンチセンスプローブとセンスプローブのシグナルとの比較、即ちシグナル/ノイズ比を検討することで目的とする mRNA の発現を評価する。得られた結果の評価には、対照プローブ (陰性対照) によるシグナルの特異性の検定が必要とする。実験上ではセンス鎖が一般的に用いられる。しかし、センス鎖も遺伝子によっては転写が起こっている可能性もあり完全な対照プローブとはいえない。そこで、塩基配列特異性を示すには、アンチセンスプローブと同じ配列を持つ標識されていないオリゴ DNA の過剰量存在下 (例えばモル比で 50-100 倍量) でシグナルにおよぼす影響を確認する必要がある。同一でない DNA の存在下では呈色に変化がないことを示す競合阻害実験、同時に過剰量の非標識センスプローブを添加してシグナルの消失を確認する中和実験も行う。また、シグナルが RNA 由来であって、DNA 或いはタンパク質との反応によるものではないことを確認するために、RNase (100 μ g/ml, 37°C, 60 分間) 処理でシグナルが消失し、DNase 処理で影響を受けないことを確認する必要がある。

最近の画像解析システムの発展により定量的解析が容易になっている。ただし、同一の条件下で行った実験スライドを用いることと、アンチセンスプローブ、センスプローブ、28S プローブそれぞれについてのデジタル画像を取込む条件を同一にして画像解析を行うことは当然のことである。

7. トラブルシューティング

以下によく遭遇するトラブルについて (表 10) に改善策をまとめた。

シランコートスライドなどを使っていて切片が脱落する理由としては、基本的には、パラフィンブロックの問題の可能性が大である。マウスなどの実験動物の場合には、組織の固定

表 10 トラブルシューティング

| トラブル | 考えられる原因 | 解決のための処置 |
|-------|--|---|
| 切片の脱落 | スライドの不適切 coating の不適切 パラフィンブロックの問題 PK の過剰処理 | 高品質のガラスを使用 シランコート パラフィンの選択, 固定液, 固定時間を再確認 パラフィン包埋過程でのエタノール・キシレン溶液の確認 至適濃度の設定 |
| 呈色しない | 発色液, 標識酵素の失活 標識抗体の失活 RNA の保存度の低下 洗浄条件の不適切 プローブ核酸の純度が低い プローブ核酸の標識率が低い 除タンパク操作の不適切 | 残存液での活性確認 陽性対照, dot-blot hybridization 法による再検討 固定液の再調整, 固定時間の再確認, 試薬の再調整 洗浄液の再調整, 陽性対照, Stringency の検討 dot-blot hybridization 法による再検討 dot-blot hybridization 法による再検討 試薬の再調整, 至適条件の再検討 |

液, 固定時間を再確認する必要がある, その後のパラフィン包埋過程でのエタノール・キシレン溶液の確認も必要である. 遊離した部分は非特異的に強く染色されるので注意が必要である.

呈色が見られない原因はプローブ自身に問題があることが多く, dot-blot hybridization 法などによる確認が必要となる.

8. *in situ* hybridization 法の具体例

(1) 培養細胞を用いた例 (図 3)

細胞培養とスライドガラスの作成法は (表 2) の手順で行い, シランコートスライド (表 4) 上で乳ガン由来培養細胞株 (MCF-7) を 24 時間 37°C で培養した. スライドガラスへの固定は (表 3) に従って行い, RNase フリーのスライドケースに入れテープで密封し -80°C で保存した. 実験時には, -80°C のフリーザーよりケースを取り出し, 密封したまま約 2 時間室温に戻した後に, PBS 浸漬 5 分を 3 回行った. 0.2N 塩酸で 20 分処理を行い, 塩酸が切片上に残らないように DDW を染色壺の上部まで入れて洗浄し PBS に浸漬した. 続いて, 0.2% Triton X-100/PBS に室温で 10 分振盪後に PBS に浸漬し, 以降は *in situ* hybridization 法の操作手順 5.3 タンパク質分解酵素処理のステップからの手順に従って処理を行った.

注) プローブの組織中の浸透性を上げる処理として, 0.2% Triton X-100/PBS に室温で 10 分浸漬すると良好な結果が得られる場合がある. 特にパラフィン切片を使用する場合には有効なことがあるが, 必須の条件ではない. 表面活性剤であるので, 過剰処理は形態の破壊につながり非特異的呈色を生じる可能性があることを考慮する. MCF-7 培養細胞においては, Triton 有無して事前に条件検討を行ったところ, Triton 処理を行った方が良好なシグナルを得ることができた.

(2) パラフィン切片を用いた例 (図 4, 図 5)

組織を迅速に取出し 4% PFA/PBS (表 1) で一晩固定. 固定時には水平振盪器を用いてゆっくり振盪させて, 組織内に固定液をよく浸漬させた. 9 日齢マウス大腿骨に対し EDTA 等に

よる脱灰処理を行わず, マウス小腸と同様の過程でパラフィンブロックを作成し, 5 μ m の厚さの切片をシランコートスライドに拾い伸展乾燥後保存した. 実験時には, トルエンを用いた脱パラフィン (表 5) 後, PBS 浸漬 5 分を 3 回, 以降は操作手順 5.2 塩酸処理のステップからの手順に従って行った.

9. *in situ* hybridization 法の応用

数コピーレベルの極微量しかない核酸を, 通常の *in situ* hybridization 法で検出することは困難である. そこで, 標的とする DNA や mRNA (逆転写により cDNA にしておく) を PCR により増幅しておき, その後 *in situ* hybridization 法で検出する *in situ* PCR 法が開発された. *in situ* hybridization 法の細胞個々のレベルで視覚化するという優れた特徴に, PCR 法のもつ極微量の遺伝子を増幅するという高感度性を加えることにより, 細胞単位での極微量な遺伝子局在を視覚化する方法論として利用されている⁷⁻⁹⁾. 検出しようとする標的核酸の増幅法の違いから直接法と間接法に分けられる. 直接法では, 増幅する際にジゴキシゲニンや FluorX や Cy-3 などの蛍光標識した塩基を加えておいて, 増幅しながら同時に標識を行い可視化する. 間接法は, PCR で特定の遺伝子を増幅した後に, 増幅された領域に特異的なプローブをもちいて *in situ* hybridization 法を用いて検出する方法である. しかし, *in situ* PCR 法は非常に高感度な遺伝子検出法であるが, PCR により増幅される核酸の特異性が保証されなければならない. 標的核酸を特異的に増幅させるためのプライマーの設計や増幅条件の決定などの実験条件の設定が容易ではなく, 実験系の再現性や信頼性については慎重に吟味する必要がある.

microRNA (miRNA) は 19-23 塩基からなる 1 本鎖 RNA 分子で, 一般に mRNA の 3'UTR と相補的に結合することで mRNA の分解を促進し, 翻訳後発現調節に関与する. この miRNA の視覚化のために *in situ* hybridization 法による検討が行われている. miRNA には長いプローブを設計することができず, その配列に自由度がなく特異的な検出が困難と予想されてきたが, オリゴ DNA に LNA (locked nucleic acid,

人工的な修飾の入った核酸)を組み込むことにより Tm 値を上げたり反応条件を検討するなどして、陰性対照との間で差のあるシグナルを得ることに成功した例が報告されている。

特定の物質の機能を解析するために、small interfering RNA (siRNA) を用いた mRNA の破壊によって、配列特異的に遺伝子発現を抑制する手法が用いられている。siRNA を細胞内に導入する種々の手技が開発されているが、遺伝子導入効率の高さや処理の限局性、簡便性及び安全性の面から *in vivo* エレクトロポレーション法が注目されてきている¹⁰⁾。エレクトロポレーション法では、電気パルスにより細胞膜に一過性に穿孔を開けて目的とする DNA 等を細胞内に直接導入するもので、様々な生体組織や培養細胞において、電圧、パルス時間、パルス回数を変えることにより容易に遺伝子導入効率の至適化が可能となっている。このエレクトロポレーション法を用いて、エストロゲン受容体 β (ER β) の siRNA を導入し、エストロゲン応答エレメントを持つ Na⁺/H⁺ 交換輸送体-3 (NHE3) の発現変化を解析した例を紹介する。妊娠後期マウス大腸の一部に ER β の mRNA の発現が見られる(図 6)。マウスを麻酔下で開腹し、ER β が発現している妊娠マウス大腸の管腔に ER β の siRNA を注入後、NEPA21 導入

装置(ネッパジーン社)を用いて3回の poring pulse (細胞膜に穿孔させる電気パルス, 40 V, 30 msec, 50 msec 間隔)、続いて3回の transfer pulse (核酸等を細胞内へ移動させる電気パルス, 10 V, 50 msec, 50 msec 間隔)にて遺伝子導入を行った。導入後24時間後の同部位では、ER β の発現抑制と同時に NHE3 発現の顕著な減少を認め、腸管での ER β の新たな生理学的役割が明らかとなった(図 6)¹¹⁾。 *in vivo* エレクトロポレーション法による特定遺伝子の発現制御と形態科学を基盤とした解析を行うことで、より詳細な特定分子の生体内での機能が明らかになることが期待される。

おわりに

本稿では、*in situ* hybridization 法による RNA の検出法に焦点をしばり、基本的な原理と操作方法について解説した。RNA のみならず DNA およびタンパク質、さらには糖質や脂質の性状について形態科学を基盤に解明することは、多様で多才な細胞の本来の「顔」を知ることにつながる。遺伝子導入法や解析ツールとしての顕微鏡も進化しており、さらなる遺伝子解析法の進展が期待される。

文 献

- 1) 小路武彦(編): *In situ* hybridization 技法, 学際企画, 東京, (1998)
- 2) Koji, T. (ed.): *Molecular Histochemical Techniques* (Springer Lab Manuals), Springer-Verlag, Heidelberg, (2000)
- 3) 菱川善隆, 小路武彦: *In situ* ハイブリダイゼーションの基礎と応用, 組織細胞化学 2010 (日本組織細胞化学会編), 学際企画, 東京, 47-60 (2010)
- 4) Yoshii, A., Koji, T., Ohsawa, N., et al.: *In situ* localization of ribosomal RNAs is a reliable reference for hybridizable RNA in tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 43, 321-327 (1995)
- 5) Koji, T. and Nakane, P.K.: Localization *in situ* of specific mRNA using thymine-thymine dimerized DNA probes: Sensitive and reliable non-radioactive *in situ* hybridization. *Acta Pathol. Jpn.*, 40, 793-807 (1990)
- 6) Tamaru, N., Hishikawa, Y., Ejima, K., et al.: Estrogen receptor-associated expression of keratinocyte growth factor and its possible role in the inhibition of apoptosis in human breast cancer. *Lab. Invest.*, 84, 1460-1471 (2004)
- 7) 菱川善隆, 小路武彦: *in situ* PCR 法, 細胞. 33, 196-199 (2001)
- 8) Hishikawa, Y., An, S., Yamamoto-Fukuda, T., et al.: Improvement of *in situ* PCR by optimization of PCR cycle number and proteinase K concentration: localization of X chromosome-linked phosphoglycerate kinase-1 gene in mouse reproductive organs. *Acta Histochem. Cytochem.*, 42, 15-21 (2009)
- 9) Yamamoto-Fukuda, T., Hishikawa, Y., Shibata, Y., et al.: Pathogenesis of middle ear cholesteatoma; a new model of experimentally induced cholesteatoma in Mongolian Gerbils. *Am. J. Pathol.*, 176, 2602-2606 (2010)
- 10) Nakamura, H. and Funahashi, J.: Electroporation: Past, present and future. *Develop. Growth Differ.*, 55, 15-19 (2013)
- 11) Chojookhuu, N., Sato, Y., Nishino, T., et al.: Estrogen-dependent regulation of sodium/hydrogen exchanger-3 (NHE3) expression via estrogen receptor β in proximal colon of pregnant mice. *Histochem. Cell Biol.*, 137, 575-587 (2012)

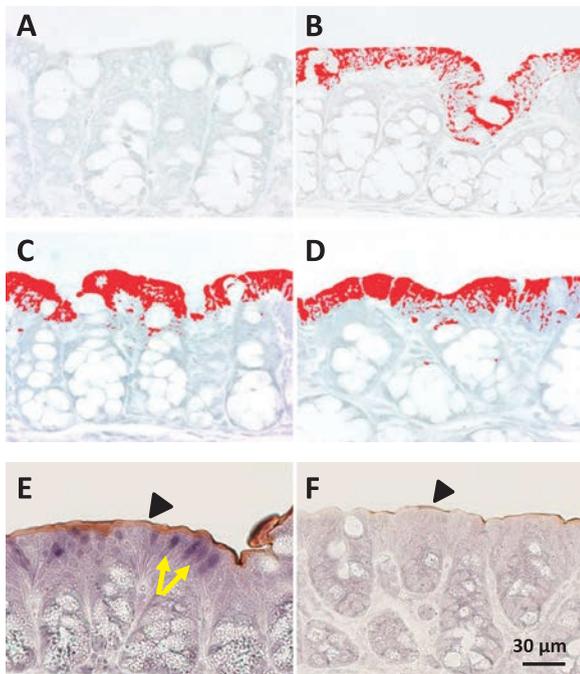


図 6 *in vivo* エレクトロポレーション法による ER β siRNA 導入マウス大腸での Na⁺/H⁺ 交換輸送体-3 (NHE3) 発現の変化(文献 11 より改変)。(A-D) ER β アンチセンスプローブを用いて *in situ* hybridization を行い、画像処理システムを用いて ER β の mRNA の発現を解析したもの。(A) 妊娠マウス大腸 5 日、(B) 妊娠 10 日、(C) 妊娠 15 日、(D) 妊娠 18 日、妊娠マウスの後期にかけて大腸の一部に ER β の mRNA の発現が見られる。(E, F) ER β 抗体と NHE3 抗体を用いた免疫組織化学による二重染色像。ER β siRNA 導入大腸 (F) では上皮細胞に発現していた ER β 陽性細胞(矢印)が消失し、ER β により制御される NHE3(矢頭)も発現が減少した。