

機能を探る Quantum dot multiple staining Functional Investigation Using Quantum Dot Multiple Staining

伊 東 丈 夫
Johbu Itoh

^a 東海大学医学部教育・研究支援センター細胞科学部門

要 旨 近年、医学・生物学分野においてもナノクリスタル Quantum dot (Qdot) の利点を活用した様々な報告がなされている。Qdot は硫化カドミウム、セレン化カドミウム、塩化銅などの発光性ナノ粒子（直径数 nm の半導体素材）のうちセレン化カドミウムからなる新しい蛍光プローブである。利点は、ナノクリスタルの粒子サイズに依存して発光波長が決定されるので、1 種類の励起波長で複数の蛍光が得られることである。そしてこの蛍光は、極めて明るく退色が遅いなど卓越した光安定性を示す。ここでは、Qdot とスペクトル解析法（蛍光シグナル間のクロストークや、自家蛍光を除去）を活用した下垂体細胞におけるホルモンとその転写因子の免疫組織細胞化学（多重染色）機能解析への応用について紹介する。

キーワード：免疫組織化学，量子ドット，レーザ共焦点顕微鏡，スペクトル解析，多重シグナル検出

1. はじめに

近年、特定遺伝子解析、遺伝子治療、テーラーメイド医療などポストゲノム研究の中でも Bio-Imaging（画像）による解析は改めて注目されている。その主流を成しているのが、蛍光試薬を用いる方法で、免疫組織細胞化学「蛍光抗体法」を始めとし、DNA マイクロアレイ蛍光プローブ法など生体分子の検出に汎用されている。場（時間軸をふくめた）の概念を包括した target の細胞内局在やその分子動態を時間的、空間的挙動を可視化する解析技術が求められており、GFP (Green Fluorescent Protein) に代表される蛍光タンパク質が幅広く活用され、さらには標的分子の動態をより正確にモニタリングする手法が求められている。

そのような要求を満たす手法として、医学・生物学分野においてもナノクリスタル Quantum dot (Qdot) の様々な利点を活用した報告がなされている。Qdot は硫化カドミウム、セレン化カドミウム、塩化銅などの発光性ナノ粒子（直径数 nm の半導体素材）のうちセレン化カドミウムからなる新しい蛍光プローブである。利点は、ナノクリスタルの粒子サイズに依存して発光波長が決定されるので、1 種類の励起波長で複数の極めて明るく退色が遅いなど卓越した光安定性を示す蛍光が得られることである。ここでは、Qdot とスペクトル解析法（蛍光シグナル間のクロストークや、自家蛍光を除去）を活用した下垂体細胞におけるホルモンとその転写因子

の免疫組織細胞化学（多重染色）機能解析への応用について紹介する。

2. Quantum dot (Qdot)

本項で紹介するナノクリスタル Quantum dot (Qdot) はセレン化カドミウムからなる新しい蛍光プローブである^{1~6)}。従来の蛍光色素とは異なる利点は、ナノクリスタルの粒子サイズに依存して発光波長が決定されるので、1 種類の励起波長で複数の異なる蛍光波長が得られることである。そしてこの蛍光は、卓越した光安定性（長時間の検出が可能）、退色が遅い（生きた細胞での経時変化観察に有利）、極めて明るい蛍光（感度の向上）、定量的な検出、検出波長の分布がシャープ（波長の重なりが少ない）、複数の蛍光標識を同時に解析可能、ストークシフトが長い（自家蛍光の影響を受けにくい）などである。生細胞にも Qdot は応用可能なため、in vivo, in vitro, macro, micro, confocal, ultrastructure など一連の解析へと応用可能である。

2.1 Quantum dot (Qdot) の蛍光特性

従来の蛍光色素とは全く異なる。

図 1 は、Qd 605 を 4 本の異なるレーザ光で励起したときの、それぞれの蛍光画像とそのスペクトル (a-d) で e は、まとめたものである。

図 2 は、1 本のレーザ光 (488 nm) で、5 種類の Qdot を励起した例である。このように Qdot は通常の蛍光色素の様な最大吸収ピークは持たず、励起エネルギーが高い（波長が短い）ほど、蛍光発光効率はよい。すなわち、蛍光波長より短い波長であれば、1 つの励起光で複数の Qdot を励起することが可能である (図 2)。

^a 〒 259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143 番地
TEL: 0463-93-1121 内線 2581; FAX: 0463-91-1370
E-mail: itohj@is.icc.u-tokai.ac.jp
2008 年 5 月 30 日受付

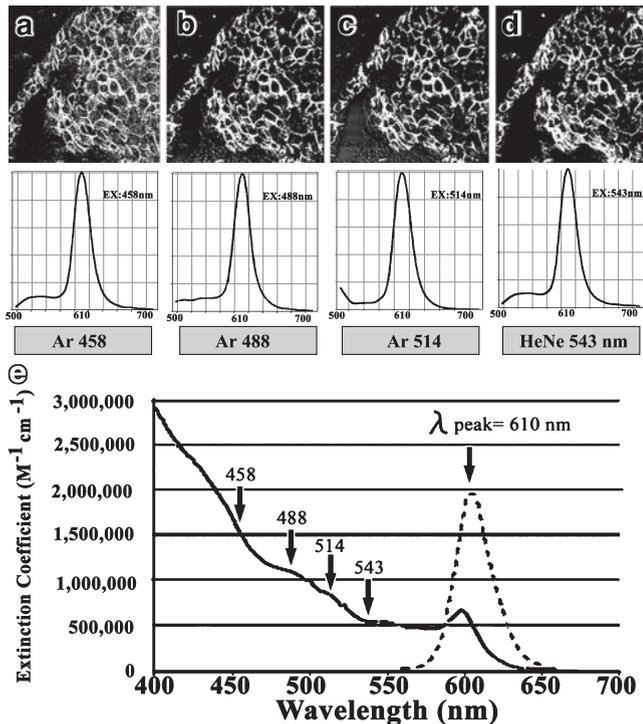


図1 Qdotの吸収特性と蛍光特性

3. 共焦点レーザー顕微鏡のスペクトル解析

蛍光シグナルを、スペクトル解析し、任意のシグナルだけを抽出する解析方法である。META システム (カール・ツァイス社)⁷⁾ を例に紹介する。

3.1 原理

マルチスペクトルディテクタ (META ディテクタ) は 10.7 nm の範囲を検出するフォトマルチプライヤー (PMT) を 32 個並べた構造になっている (図 3a)。

図 3b の各蛍光スペクトルは META SYSTEM で取得したものである。

4. Qdot の実例

4.1 酵素抗体法と、Qdot 蛍光抗体法の検出感度の比較

ヒト乳がんにおける Human epidermal growth factor receptor (HER) 2 と Epidermal growth factor receptor (EGFR) のパラフィン切片 2 重染色標本における検出感度 (図 4)。酵素抗体法では、弱陽性シグナルしか得られなかった HER-2, EGFR の染色標本の発色系を、Qdot に変えることにより、明瞭な陽性シグナルとして検出できた。図 4a, b, d, e, は、シングル染色, 図 4c, f は、2 重染色標本の観察である。両者は異なる抗原賦活化処理 [HER-2 (クエン酸緩衝液), EGFR (Protease K 溶液)] が必要で 2 重染色はとても煩雑をきわめ、両者の強いシグナルを得ることは、困難な場合が多い。検出系を Qdot に変更すると、抗原賦活化処理の煩雑さは同様であるが、Qdot のメリットが生かされシグナル強度が増強された。

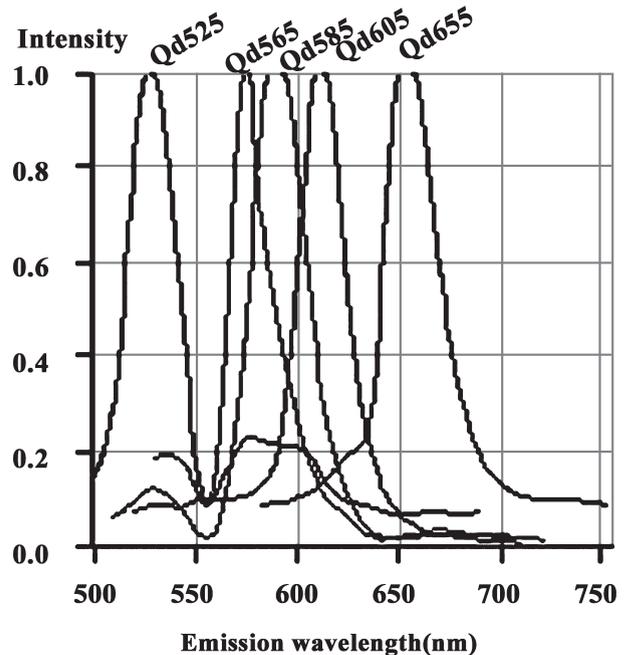


図2 各種 Qdot 蛍光スペクトル^{5,8,9)} 励起波長 (488 nm)

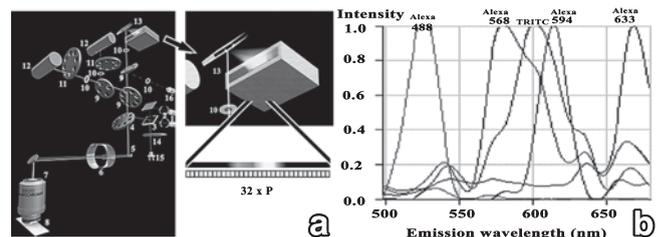


図3 META SYSTEM 光学系

4.2 Qdot と META analysis で、複数のシグナル分離・検出例
ヒト、下垂体、GH 産生腺腫における GH, ACTH, Pit1, NuroD1, 核染色の 5 重染色への応用 (図 6, 7)。

GH 産生腺腫において、GH, ACTH を産生する細胞は、散見される。GH に関与する転写因子の pituitary specific transcription factor (Pit1) 1, ACTH 産生に関与する NuroD1 (POMC 遺伝子転写活性に関与) を、同時に染色し、核染色をも試みた。GH 陽性 (産生) 細胞の核は、Pit1 陽性, ACTH 陽性 (産生) 細胞の核は、NuroD1 陽性, GH & ACTH 陽性細胞の核は、Pit1, NuroD1 共に陽性であった。細胞の機能を考える上で、多重染色の意味は、大きいと考えられる (図 7 白矢印)。

Qdot 免疫染色プロトコール (5 重染色)

- ①脱パラフィン: キシレン × 3 → エタノール × 4
- ②抗原の賦活化処理: Autoclave 121°C 5 min in Citra Plus Reagent (Biogenex)
- ③洗浄: PBS(-) 3 min × 2
- ④ブロッッキング: PBS(-)-BSA (1% or 3%) 20 min
- ⑤1次抗体: ACTH (mouse monoclonal, 1:200) + Pit-1 (rabbit polyclonal, 1:100) + NeuroD1 (goat polyclonal, 1:50) + biotin-

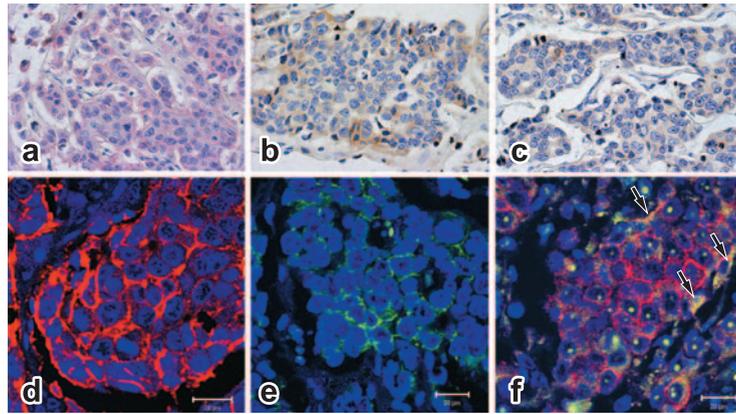


図4 酵素抗体法と、Qdot 蛍光抗体法の検出感度の比較 Bars=20 $\mu\text{m}^{9,10}$ 。

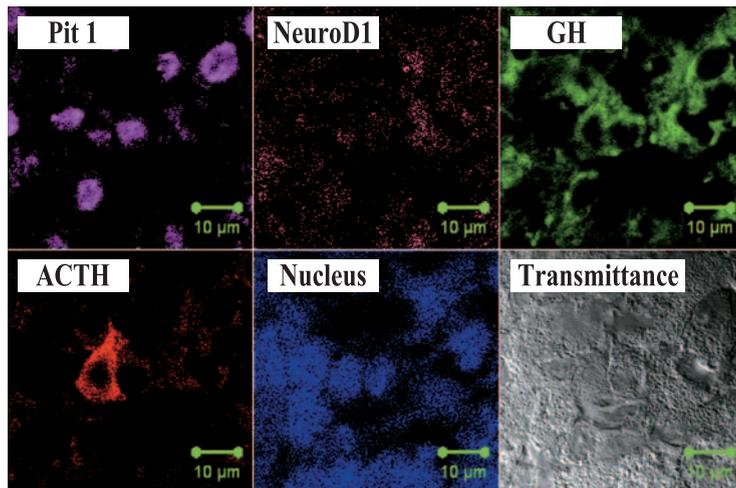


図6 ヒト下垂体における5重染色への応用

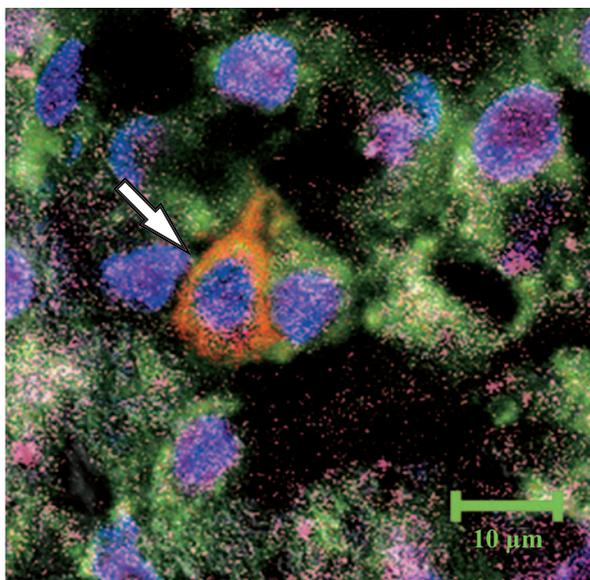


図7 ヒト下垂体 GH 産生腺腫
Multiple hormones and multiple transcription factors (GH-Pit1, ACTH-NeuroD1), GH: SAQd585, Pit1: Qd605, ACTH: Qd 565, NeuroD1: Qd655 Nuclear staining: TOTO-3

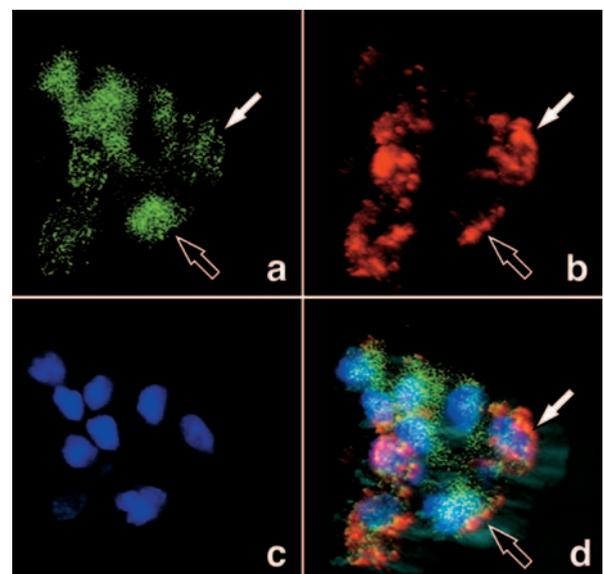


図8 ラット下垂体におけるホルモンと遺伝子レベルでの解析
a : GH mRNA (Qd565) b : GH protein (Qd655)

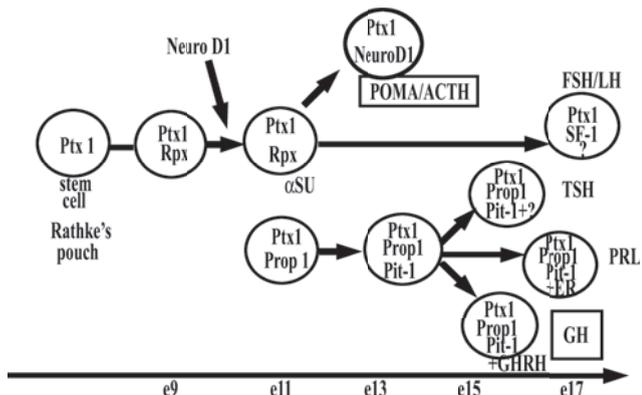


図5 ラットにおける胎生期下垂体細胞の分化と関与する因子. ラトケ嚢において幹細胞 stem cell が出現し、最初に α subunit が出現する. Ptx-1 がすべてのホルモンに関与する. Prop-1, Pit-1 に固有の因子が作用して TSH, PRL, GH 細胞に分化する. POMC ACTH には NeuroD1, FSH_LH 系には Steroidgenic factor-1 (SF-1) およびいくつかの候補が挙げられている¹¹⁾.

nylate GH (rabbit polyclonal, 1:400) 全て mix. 4°C Overnight

- ⑥洗浄 : PBS(-) 5 min × 3
- ⑦ブロッキング : PBS(-)-BSA (1% or 3%) 10 min
- ⑧2次抗体 : anti-mouse IgG conjugated Qd565 (1:200) + anti-rabbit IgG conjugated Qd605 (1:200) + anti-goat IgG conjugated Qd655 (1:200) + Streptavidin Conjugate Qd 585 (1:400) 全て Mix. 90 min
- ⑨洗浄 : PBS(-) 5 min × 3
- ⑩核染色および封入 : TOTO-3 (1 ul) /DABCO (1000 ul) → 4°C 暗室
- ⑪観察 : 封入後 30 分してから.

4.3 機能解析例

In situ hybridization (ISH) : mRNA, 免疫組織化学 (IHC) : protein の同時観察により細胞機能を解析した (図 8).

メッセンジャーレベル, 蛋白レベルの同時解析により, 黒矢印 : GHmRNA > GH (protein), 白矢印 : GHmRNA < GH (protein) と細胞個々によりその発現状態が異なることが判明した. このことは, 形態情報から機能を読み取る重要な手段と成りうることを示唆している.

5. まとめ

Qdot の優れた機能を活用し, さらには, 新しい解析方法を試みることにより, 従来は推測の域を出なかつたさまざまな生命現象を, 機能面からも可視化・解析することが可能となった. 今後さらに多方面での機能解析に 응용が拡大するものと思われる. 本手法が, 広範囲に 응용され, 発展することを期待したい.

文 献

- 1) Tokumasu, F. and Dvorak, J.: Development and application of quantum dots for immunocytochemistry of human erythrocytes. *J. Microscopy.*, 211, 256 (2003)
- 2) Jayne M. Ness, Rizwan S. Kevin A. Roth, *et al.*: Combined Tyramide Signal Amplification and Quantum Dots for Sensitive and Photostable Immunofluorescence Detection, *J.H.C.*, 51, 981-987 (2003)
- 3) Dickinson, M.E., Simbuerger, E., Fraser, S.E. *et al.*: *J. Biomed Opt.*, 8, 329 (2003)
- 4) Liang Zhu, Simon Ang and Wen-Tso-Liu: Quantum Dots as a Novel Immunofluorescent Detection System for Cryptosporidium parvum and Giardia lamblia. *AEM*, 70, 597-598 (2004)
- 5) Qdot™ Streptavidin Conjugates User Manual; Cat. # 1000-1, Cat. # 1001-1, Cat. # 1002-1, Cat. # 1003-1, Cat. # 1004-1, Cat. # 1005-1, Quantum Dot Corporation CA USA
- 6) Li Wenhun, Xie Haiyan, Xie Zhixiong, *et al.*: Exploring the mechanism of competence development in Escherichia coli using quantum dots as fluorescent probes. *JBBM*, 58, 59-66 (2004)
- 7) カールツァイス社 META 説明書
- 8) 伊東丈夫: “共焦点レーザー顕微鏡によるナノクリスタル3次元スペクトル解析” 組織細胞化学 2004, 学際企画, 東京, 2004, pp. 289-296
- 9) 伊東丈夫: “共焦点レーザー顕微鏡によるナノクリスタル3次元スペクトル解析” 組織細胞化学 2006, 学際企画, 東京, 2006, pp. 25-34
- 10) Itoh, J. and Osamura, R.Y.: Quantum dots for multicolor tumor pathology and multispectral imaging. *Methods Mol Biol.*, 374, 29-42 (2007)
- 11) 山王直子, 長村義之: 分子病理学からみた間脳下垂体腫瘍. *J. Nippon Med. Sch.*, 68(1), 69-73 (2001)