
テクニカルノート

In situ ハイブリダイゼーション法によるmRNAの検出 ～特に脳組織を対象として～

藤永竜太郎, 柳井章江, 國分啓司, 篠田 晃

山口大学大学院医学系研究科機能神経解剖学分野(解剖学第二) 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : ジゴキシゲニン, RNAプローブ, アルカリフォスファターゼ, stringency, 組織化学

和文抄録

In situ hybridization (ISH) 法は, 組織切片, 細胞, 染色体に存在する特定の核酸シーケンスの局在を検出する方法であり, 本稿では, ジゴキシゲニン標識cRNAプローブを用いた脳凍結切片上でのmRNA検出方法について紹介する. ISH法は, 対象となる組織の形態を保持した状態でmRNA発現部位を可視化するため, 特に脳などの高度に不均一な組織を扱うときには有利である. 最初にISHを行うときは, 次に示す事項に注意するとよい: 1) 適切なプローブのデザイン, 2) 浮遊法によるハイブリダイゼーション, 3) アルカリフォスファターゼ発色系の使用, 4) stringencyの条件検討. つまり, 感度をよくするために長鎖プローブとアルカリフォスファターゼ発色系を用いた浮遊法ISHを行い, ハイブリダイゼーションの温度条件をコントロールすることで特異的かつ安定したデータが得られる. 今回紹介するISH法を基本として, 二重染色, 動物胚を用いたホールマウントISH, 電子顕微鏡への応用なども可能である.

1. はじめに

In situ hybridization (ISH) 法は, 組織切片, 細胞, 染色体を対象としてそれらに存在する特定の核酸シーケンスを検出する方法である. ここでは,

組織切片上で特定遺伝子の発現を解析する方法について概説する. 通常は, 目的遺伝子mRNAに対する相補鎖RNA (DNA) をプローブとして組織切片と反応させ, その後にいくつかの行程を経て可視化させる.

プローブの種類 (RNAまたはDNA), ラベリングの方法, 可視化の方法に関していくつかの選択肢がある. 我々の経験から感度, 解像度, 簡便さを総合的に判断して第一選択として勧めるのは, ジゴキシゲニン (DIG) -UTPでラベルした一本鎖RNAを用いて組織切片とハイブリダイズさせ, アルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体を用いて免疫反応を行い, 最終的にアルカリフォスファターゼの基質であるnitro-blue tetrazolium chloride (NBT) /5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt (BCIP) を反応させて検出する方法である¹⁻³⁾. その他, ビオチン-UTPを用いてプローブをラベルする方法, NBT/BCIP以外の発色基質を用いる方法, ペルオキシターゼ標識抗体, β -ガラクトシダーゼ標識抗体, さらに蛍光標識抗体を用いる方法などがあるが, 検出感度の劣るこれらの方法は第一選択ではない. これらは, 二重染色や電子顕微鏡での観察⁴⁾などの応用技術へ発展させる場合に必要になると考えられる. また, 動物切片の作製に関して, 感度の良さや簡便さからパラフィン包埋切片をスライドグラスに貼付けて用いるよりも凍結切片を用いた浮遊法を用いて実験を行った方が安定した結果が得られる. ここでは, 我々の教室で現在行っているISH法の実際を特に脳組織を対象として紹介する.

2. ISH法の利点と欠点

mRNAを検出する方法として、ノーザンブロットティング、逆転写酵素を用いたRT-PCR、近年では多くの研究者が定量性に優れたリアルタイムPCRを用いている。しかしながら、このような細胞集団の平均値としての解析法と比べISH法の圧倒的に有利な点は、組織をホモジェナイズすることなく形態を保持した状態で実験に使用することである。つまり、ISHは組織内での目的遺伝子の発現局在部位を細胞レベルで視覚的にかつリアルに提示することが出来る。特に、脳など高度に不均一な組織を対象とした場合は非常にパワフルな方法となる。また、ISH法では、免疫組織化学に適用できる抗体の入手が困難

な場合でも、基本的な分子生物学的な手法が備わっていれば目的遺伝子をクローニングしてプローブを作製し実験を行うことが可能である。免疫組織化学とISHのシグナル局在が一致していれば、さらにデータの信頼度は上がる²⁾(図1)。神経組織を対象とした実験では、ある目的蛋白質(ペプチド)が細胞体で翻訳された後に直ちに神経終末に運ばれていることもあり、免疫組織化学ではその物質を産生している神経細胞の特定が困難な場合がある。このような問題を解決するときにもmRNAを検出するISH法は有効である。ただし、ISH法は前述したような利点ばかりでなく欠点も存在する。まず定量性に関して、顕微鏡レベルで判断できる顕著な差は解析可能であるが³⁾、僅かな違いを扱うときは慎重にすべきである(これはISH法のみならず組織化学法一般に議論すべき部分である)。一般的にターゲットがどのような分子であれ検出目的のmRNAの細胞内局在は同様であると想像され、また解像度の問題もあり、目的mRNAの厳密な細胞内局在は議論できない。組織化学の利点の一つは標本が半永久的に保存されることであるが、ISH法で感度に優れたアルカリフォスファターゼ発色系を用いた場合、発色基質の沈殿やシグナルの減弱(消失)等の問題から半永久保存可能な標本が作製しにくい。しかしながら、これらの欠点を差し引いても、特に動物個体を用いた実験の頻度が高い分野では、形態を保持した組織切片上で遺伝子発現部位を可視化できるISHは非常に重要な技術である。

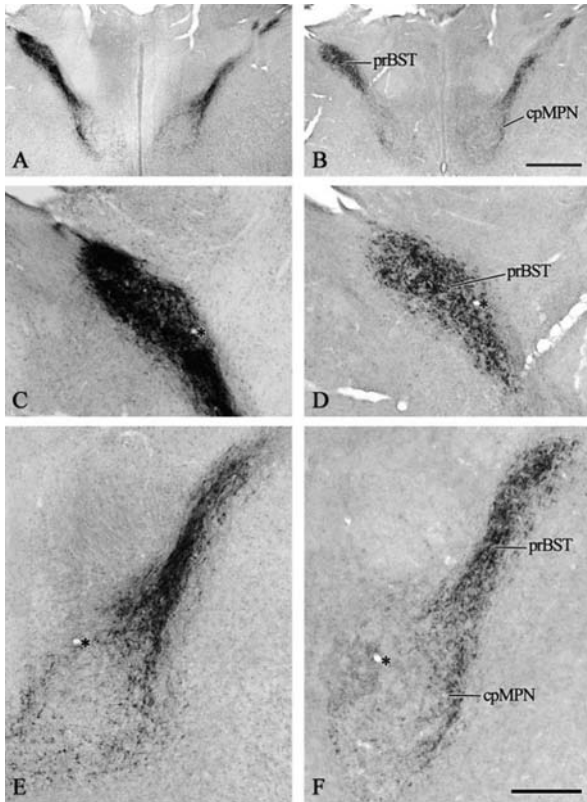


図1 成獣雄ラット脳における芳香化酵素(aromatase P450)の発現²⁾

(A) 抗aromatase P450抗体を用いた免疫組織化学。(B) Aromatase P450-mRNAに対するアンチセンスプローブを用いたin situ ハイブリダイゼーション。(C, E) Aの拡大像。(D, F) Bの拡大像。AとBは隣接切片であり発現部位が完全に一致していることに注目。Asterisksは同じ血管を示す。prBST, the principal nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis; cpMPN, the caudal periphery of the medial preoptic nucleus. bars = 400 μ m (A, B); 200 μ m (C-F)。

3. ISH法の実際

具体的なプロトコールは後述するが、各ステップにおけるいくつかの注意点について以下に記載する。基本的な分子生物学的手法や組織切片作製の詳細については省略する。

3-1 プローブのラベリング

目的遺伝子が手元に無い場合は、RT-PCRによりクローニングする。このとき、多くのバリエーションを持つmRNAをターゲットにしてそれらを区別したい場合を除き、出来るだけ全長に近い(長い)DNAをクローニングした方がよい。我々の経験でも、あるmRNAの検出を行う場合に全長に近い(又は全長)DNAをテンプレートにしてプローブを

合成した方が良好な結果を得ている。これは、ターゲットmRNAにハイブリダイズするプローブ量(DIG-UTP量)が増えることにより、結果的に感度が上がっていると思われる。プローブの作製はin vitro転写で行うためテンプレートプラスミドが必要である。プラスミドをデザインするには挿入DNA断片の上流にT7 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼのいずれかのプロモーターが必要である。さらに、in vitro転写の際にプラスミドを制限酵素で消化して直鎖状にするが、その時に使用する制限酵素はDNA末端を5'突出付着末端にするものでなければならない。ISHのネガティブコントロールはセンスプローブを用いる事が多い。以上のような事を考慮して、1) 1種類のプラスミドから2種類のRNAポリメラーゼを用いて両側からin vitro転写出来るようにデザインし、アンチセンス及びセンス(ネガティブコントロール)プローブを得るか、2) インサートDNAの挿入方向の異なる2種類のプラスミドから別々にアンチセンスプローブ、センスプローブを得る。

ラベルされたプローブは組織への浸透を促進するため、アルカリ加水分解により150 bases程度にする。

3-2 凍結切片の作製

4%パラホルムアルデヒド/0.2%ピクリン酸/0.1M PB (pH7.4)を用いて経心的に動物を灌流固定する。ピクリン酸は組織変性作用や固定作用の強化が期待されるが、それよりも固定液を黄色に着色する事が出来るため、動物に固定液がきちんと循環しているかどうか確認するのに便利である。脳を取り出して、同固定液で後固定を行った後に30% sucrose/0.1M PBで脳が沈むまで置換を行う。クリオスタットを用いて凍結切片を作製する。我々は、通常30 μ m厚の切片を作製している。切片作製の過程でどの程度RNase-freeに気を使うかについては、手早くかつ確実に動物を灌流固定できればあまり神経質になる必要はなく、mRNAの保持も十分のようである。作製した切片は、短期間であれば0.1%アジ化ナトリウムを含む0.02M PBSで低温保存可能である。長期保存のためにはクライオプロテクタントを含む溶液: 33% sucrose, 1% polyvinylpyrrolidone (K-30), 33.3% ethylene glycol/0.067M PB (pH 7.4)⁶⁾で-20 $^{\circ}$ C保存が望ましい。

3-3 ISH

我々は、24ウェルプレートを用いて浮遊法によりISHを行っている。プレートはよく洗浄されているものであれば、再利用したものであまり問題になることは無い。ハイブリダイゼーションのステップまではRNase-freeのプレートを用いる等の工夫をすればよりトラブルは回避できる。ただし、切片の前処置とハイブリダイゼーションバッファの調製に用いる溶液は全てDEPC処理をする。ISHの行程で重要な事はstringencyのコントロールである。洗浄ステップに用いるバッファにホルムアミドを用いるかどうかやバッファの塩濃度、洗浄温度によってもコントロール出来るが、他のハイブリダイゼーション実験と同様に結果に最も影響を与えるのはハイブリダイゼーションの温度であり、温度条件を探ることにより容易に解決できる実験も多い。図2は成獣雄ラット海馬を対象としてandrogen receptor (AR) -mRNAをISH法で検出した像である。ハイブリダイゼーション温度は、A) 55 $^{\circ}$ C, B) 60 $^{\circ}$ C, C) 65 $^{\circ}$ C, 及びD) センスプローブ(ネガティブコントロール)である。A) では、ARは海馬内において検出シグナル強度の領域特異性はなく、ほとんどの細胞でシグナルが検出される。しかし、ハイブリダ

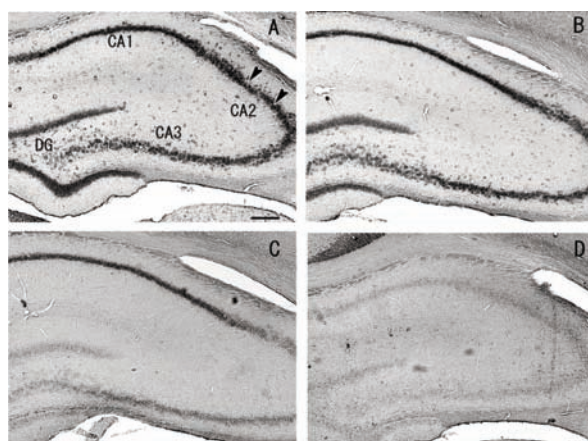


図2 In situ ハイブリダイゼーションによる成獣雄ラット海馬におけるandrogen receptor (AR) -mRNAの検出

(A) 55 $^{\circ}$ Cにてハイブリダイゼーション。(B) 60 $^{\circ}$ C。(C) 65 $^{\circ}$ C。(D) センスプローブを用いたハイブリダイゼーション(ネガティブコントロール)。Aでは、AR-mRNAはCA1-CA3の錐体細胞層や歯状回(DG)顆粒細胞層を含むほとんどすべての神経細胞にシグナルが検出されている。一方で、Cではシグナルは主にCA1領域に観察されることに注目。bar = 200 μ m。

イゼーション温度を上げることによりstringencyを高くすると検出部位はアンモン角CA1領域の錐体細胞層優位になり、他の海馬領域でのシグナルは微弱になる。このように、stringencyをコントロールすることによりシグナル強度が顕著に低下（消失）するものに関しては慎重に解釈する必要がある。AR抗体を用いた免疫組織化学では、ARは基本的にCA1領域で強く染色され、CA2、CA3領域と歯状回領域では弱い染色であることが知られている⁷⁾。つまり、この実験においては、65°Cでハイブリダイゼーションを行うことが適当であると考えられる。ターゲット分子によってはmRNAの代謝制御や翻訳後の蛋白質分解制御のために必ずしもmRNAとタンパク質の発現パターンが一致しない場合もある。ISHを行う際には適切なコントロール実験と十分なstringencyの条件検討をすることに加えて、信頼できる過去のデータや独自の周辺データを十分吟味し妥当な条件を決定することが大切である。条件が決まれば実験を繰り返すことにより信頼性の高いデータが得られる。

発色切片はゼラチン溶液でスライドガラスにマウントし風乾させる。アルカリフォスファターゼ発色系の場合、切片をアルコール系列による脱水とキシレンによる透徹を行うと標本の保存過程でシグナルの退色や発色基質の沈殿を引き起こしてしまうので、風乾後そのまま封入する。すぐに写真を撮り解析を行う場合はキシレンを溶媒としたエンテランニューのような封入剤の使用も可能であるが（画像はシャープ）、長期保存の場合は各社から入手できる水溶性封入剤が好ましい。ただし、これを用いてもペルオキシダーゼ発色のように半永久的に保存可能ではないので、少なくとも写真撮影は早めに行った方がコントラストのよいデータが取得できる。

4. ISH プロトコール

多くの試薬はロシュ・アプライド・サイエンスなどの会社で購入可能。バッファーの詳細な組成は他の文献を参照する^{1, 3)}。

DIG-UTPを用いたプローブのラベリングと調製

ラベリング反応組成は製品プロトコールに従う（DIG RNA ラベリングキット：ロシュ）。アルカリ加水分解のために、調製RNAプローブに等量の

0.2M 炭酸ナトリウム溶液（pH 10.2）を加え、60°Cでインキュベーション。

インキュベーション時間（T）は以下により計算する。

$$T = \frac{Li - Lf}{0.11 \times Li \times Lf}$$

Li = 合成プローブの長さ（kb）

Lf = 分解後のプローブの長さ（kb）

氷酢酸（最終濃度0.5%）を加えて反応を止める。エタノール沈殿により回収、電気泳動により濃度を確認後、分注して-80°Cで保存。

切片の前処置（低温で行う）

- ・ DEPC-PBS 5分 2回
- ・ 0.2N-HCl 20分
- ・ DEPC-PBS 5分 2回
- ・ 0.1M triethanolamine-HCl, pH 8.0/0.25% acetic anhydride 10分
- ・ DEPC-PBS 10分 2回

ハイブリダイゼーション

- ・ プレハイブリダイゼーション 55°C 60分
- ・ プローブの熱処理 95°C 5分
- ・ ハイブリダイゼーション 55°C 16時間
（プローブ最終濃度0.5 μg/ml）

洗浄

- ・ 50% ホルムアミド/2 × SSC 55°C 60分
- ・ wash buffer 室温 10分
- ・ RNaseA (20 μg/ml) / wash buffer 室温 10分
- ・ wash buffer 室温 10分
- ・ 50% ホルムアミド/2 × SSC 55°C 30分
- ・ 50% ホルムアミド/0.2 × SSC 55°C 30分

免疫反応

- ・ buffer2
（2% blocking reagent/buffer 1） 4°C 60分
- ・ アルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体（1：3000）/buffer2 4°C 18時間
- ・ buffer1 室温 10分 2回

発色反応

- ・ buffer3 室温 5分
- ・ NBT/BCIP（1：50）/buffer3 37°C 24時間
- ・ buffer4 室温 10分 2回

PBSで洗浄後、スライドガラスにマウントし封入・観察する。

5. おわりに

今回は、ISHの基本となる方法について紹介した。これを基本に二重染色、動物胚を用いたホールマウントISH、電子顕微鏡への応用なども可能である。ISH法を用いてmRNAを検出し組織での発現局在部位を示すことは、遺伝子発現の組織形態学的側面を写し出すだけでなく、分子機能を知るうえでも貴重な情報となるであろう。また、複数の遺伝子発現の時間的、空間的関係を解析するためにも非常に有効な手段であると考えられる。

参考文献

- 1) Fujinaga R, Kawano J, Matsuzaki Y, Kamei K, Yanai A, Sheng Z, Tanaka M, Nakahama K, Nagano M, Shinoda K. Neuroanatomical distribution of Huntingtin-associated protein 1-mRNA in the male mouse brain. *J Comp Neurol* 2004 ; 478 : 88-109.
- 2) Zhao C, Fujinaga R, Tanaka M, Yanai A, Nakahama K, Shinoda K. Region-specific expression and sex-steroidal regulation on aromatase and its mRNA in the male rat brain : Immunohistochemical and in situ hybridization analyses. *J Comp Neurol* 2007 ; 500 : 557-573.
- 3) Kawano J, Fujinaga R, Yamamoto-Hanada K, Oka Y, Tanizawa Y, Shinoda K. Wolfram syndrome 1 (Wfs1) mRNA expression in the normal mouse brain during postnatal development. *Neurosci Res* 2009 ; 64 : 213-230.
- 4) Yanai A, Fujinaga R, Kawano J, Shinoda K. In situ hybridization for electron microscopy ; with special reference to the stigmoid body. 16th International Congress of the IFAA, 2004.
- 5) Zhao C, Fujinaga R, Yanai A, Kokubu K, Takeshita Y, Watanabe Y, Shinoda K. Sex-steroidal regulation of aromatase mRNA expression in the adult male rat brain : a quantitative non-radioactive in situ hybridization study. *Cell Tissue Res* 2008 ; 332 : 381-391.
- 6) Kawano J, Tanizawa Y, Shinoda K. Wolfram syndrome 1 (Wfs1) gene expression in the normal mouse visual system. *J Comp Neurol* 2008 ; 510 : 1-23.
- 7) Islam MN, Fujinaga R, Yanai A, Jahan MR, Takeshita Y, Kokubu K, Shinoda K. Characterization of the "sporadically lurking HAP1-immunoreactive (SLH) cells" in the hippocampus, with special reference to the expression of steroid receptors, GABA and progenitor cell markers. *Neuroscience* 2012 ; 210 : 67-81.