

—基礎研究から学ぶ—

2. 組織細胞化学シリーズ (若手研究者へのヒント)

非放射性同位元素標識プローブを用いた in situ hybridization 法 (4)

三嶋 拓也¹ 羅 善順² 竹下 俊行³ 瀧澤 俊広¹¹日本医科大学大学院医学研究科分子解剖学²ハルビン医科大学附属第一病院・循環器内科学, 中国³日本医科大学大学院医学研究科女性生殖発達病態学

2. Histochemistry Series

In Situ Hybridization Using Non-radioisotope labeled RNA Probes (4)

Takuya Mishima¹, Shan-shun Luo², Toshiyuki Takeshita³ and Toshihiro Takizawa¹¹Department of Molecular Medicine and Anatomy, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School²Department of Cardiology, First Clinical College of Harbin Medical University, China³Division of Reproductive Medicine, Perinatology and Gynecologic Oncology, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School

Abstract

In situ hybridization is a powerful method directed toward obtaining spatial and temporal information concerning the expression and distribution of RNA molecules (e.g., messenger RNA and microRNA) in vivo. In this technical note, we describe procedures for in situ hybridization with non-radioisotope labeled RNA probes, especially a digoxigenin-labeled RNA probe.

(日本医科大学医学会雑誌 2010; 6: 23-29)

Key words: in situ hybridization, digoxigenin, RNA

はじめに

生体内の生体分子の局在解析には免疫組織化学が有効ですが、必ずしも、生体分子が局在している細胞が産生細胞とは限りません (例: ホルモン)。生体分子を発現している細胞・組織・臓器を確認するためには messenger RNA (mRNA) の発現の検討が要求されます。In situ hybridization (ISH) 法は、組織・臓器での遺伝子発現を可視化する組織化学法です。そのため、組織切片を用いる方法と、胚などを用いた方法 (ホールマウント ISH 法) の 2 種類が存在します。

今回、筆者らの経験を元に、検出プローブは最も感度がよいと考えられる RNA プローブを用い、標識には非放射性同位元素標識 [ジゴキシゲニン (digoxigenin, DIG) 標識] を用いた方法を、組織切片の作製から可視化までの技術について、“若手研究者へのヒント”としてその基本技術について解説します。最後に、最近注目を集めている低分子 RNA である microRNA の ISH 検出法について触れます。

Correspondence to Toshihiro Takizawa, Department of Molecular Medicine and Anatomy, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan

E-mail: t-takizawa@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>)

データベースの活用：検出しようとする 遺伝子のシグナルを予測してみる

(1) National Center for Biotechnology Information サイト中の UniGene データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>) にて、検出しようとする遺伝子を検索します。

(2) 各臓器における遺伝子発現頻度を示す一覧 (EST Profile) より、対象とする臓器での発現、ポジティブコントロールとする臓器、テンプレート作製時の RT-PCR に使用する total RNA などを含めて検討します。

(3) 対象臓器でのクローニング頻度 (クローニング個数/総クローニング個数) が検出の目安になります。ただし、少ないクローニング頻度であっても、特定の細胞に発現が限局している場合には ISH で検出の可能性がります。

プローブの作製

(1) プローブの種類：mRNA に対する ISH で使用する代表的な検出プローブとしては、DNA, RNA, locked nucleic acid (LNA) があります。RNA との結合力は、LNA>RNA>DNA の順となります。mRNA をターゲットとした場合は、cRNA プローブを用いた研究が圧倒的に多く、microRNA を始めとした small RNA をターゲットとした場合は、LNA が第一選択となります。LNA は、リボ核酸の 2'位の酸素原子と 4'位の炭素原子がメチレンを介して架橋した 2つの環状構造をもつ人工核酸で、LNA を含むオリゴヌクレオチドは相補的な DNA や RNA に高い結合親和性を示します。

(2) プローブの選択：検出プローブの可視化に使用する非放射性物質 (non-R1) 標識物質として horseradish peroxidase (HRP) などの酵素組織化学的方法、Alexa などの蛍光色素、biotin, DIG や T-T dimer などの免疫組織化学的方法が知られています。DIG (抗原) をプローブに標識し、抗 DIG 抗体を用いてその抗体に標識した酵素 (アルカリ性フォスファターゼ, HRP など) の反応 (発色) でその局在を可視化します。DIG はジキタリス植物よりのみ得られる物質で、熱などに強い抵抗性を示し (融点は 222°C)、ハイブリダイゼーション反応に利用されています (Roche Applied Science DIG 説明書集; <http://www.roche-applied-science.com/DIG>)。放射性物質

(R1) 標識物質として放射性同位元素 (R1; 35S, 32P-UTP など) の選択肢があります。Non-R1 標識は、R1 標識と比較して、解像力が優れています。また、半減期がないため、安定して長期間の利用が可能です。

(3) プローブの配列決定：検出したい遺伝子の mRNA 配列の reference sequence (RefSeq) を NCBI データベース上から取得し、タンパク質非翻訳領域 (5',3'-untranslated region, 5',3'-UTR), タンパク質翻訳領域、ならびにエキソン-エキソン接合部を把握します。複数の転写物変異体 (transcript variant) が存在する場合は、対象とする臓器、細胞に優位に発現している変異体を RT-PCR 法で把握しておきます。プローブ選択の位置としては、5',3'-UTR であれば特異配列が得られる可能性が高いと考えられます。翻訳領域に設定する場合、蛋白質への転写という意味での確度が高くなる一方で、類似配列をもつほかの遺伝子が存在する可能性も高くなります。また、エキソン-エキソン接合部をまたぐ配列設定の方が良いという考えもありますが、中に単一エクソンのみで構成される mRNA もあります。いずれの箇所から選択した場合も、NCBI/BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) でターゲット以外の遺伝子で類似配列を有しているものがないかどうかを確認する事が重要です。また、どの程度の一致率をもって相似とするかに関して筆者らは、7割以下の類似を許容範囲と考えています。ただし、例えば、全体として7割の一致率を持つ500塩基 (nt) のプローブに100 nt以上の100%一致を含んで全体として7割になっている場合は、プローブの特異性に問題があり、除外するようにしています。また、プローブ長の設定は、研究者によって様々です。例えば、配列特異性と、組織浸透性の観点から200~300 nt、シグナル強度とのバランスから400~800 nt、上記のデザインの箇所に触れた観点から、全翻訳領域 (150~3,000 nt を超えるもの) まで報告があります。

(4) RNA 転写用テンプレートの作製：ターゲット遺伝子が発現している臓器、培養細胞などより RT-PCR にてデザインプローブ箇所を DNA 合成酵素 (DNA polymerase) で増幅し、汎用プラスミドベクター (pBlueScript, pcDNA3 など) あるいは、TA クローニング用ベクター (pGEM, TOPO など) へ挿入、クローニングを行った上で、制限酵素処理 (リニアライズ)、RNA 合成酵素 (RNA polymerase) 反応にて、プローブを作製します。高増幅が特徴である Taq 好熱菌 *Thermus aquaticus* 由来系 DNA polymerase では、経験上 0.5~1% 程度の確率で RefSeq, ならびに Single Nucleotide Polymorphism

(SNP) データベースとも一致しない誤増幅,あるいは未登録 SNP と思われる配列が認められます。正確性が特徴である非 Taq 系 DNA polymerase (*Pyrococcus* sp. KOD1 由来など)では, Ref Seq との非常に良い一致を見ますが, プライマーのアニールング特異度が低いことによると思われるエクストラバンド,あるいはスミアな電気泳動結果となることも少なくありません。しかし, プラスミドクローンができれば, 実験遂行上は問題ありません。また, これらの非 Taq 系 DNA polymerase では, TA クローニングができないことに注意してください。クローニングの方法に関しては割愛します。

(5) RNA polymerase の選択: 多くの汎用ベクターには, マルチクローニングサイト (MCS) を挟んで, T7, T3, Sp6 の3つのうちのいずれかの RNA polymerase 結合配列が含まれます。筆者らは T7 RNA polymerase をアンチセンス用のプローブ作製に用いています。筆者らの使用経験では, Sp6 は転写,あるいは DIG ラベリング効率が落ちます (42°C での反応を勧めるプロトコールもありますが, いずれにしても, T3, T7 と比較すると最低3倍以上は効率が落ちます)。また, T3 を使用の際, バックグラウンドが高くなる場合もあり, 注意が必要です。

(6) プローブの標識: 作製したプラスミドを用いて, 1) 制限酵素処理 (リニアライズ), 2) 精製, 3) DIG ラベリング反応, 4) 精製を行います。プラスミドは環状の DNA であり, 挿入した PCR 配列に近い場所に位置する制限酵素でワンカットしたのち, 反対側に位置する RNA polymerase と DIG-ウリジン-5'-三リン酸 (DIG-UTP) を含んだリボヌクレオシド三リン酸 (NTP) を用いて, 必要な配列の RNA を合成します。このリニアライズがないと非常に長い RNA が合成されることとなります。精製に入る前に, 完全離断していることを電気泳動にて確認することが大切です。DIG ラベリング反応は DIG RNA labeling Kit (Roche 社) を使用しています。

(7) DIG 標識効率の確認: 1) ニトロセルロースメンブレンやナイロンメンブレンに 100 倍, 1,000 倍, 10,000 倍に希釈した RNA プローブと標識されたコントロール用 RNA の希釈系列を 1 μ L 滴下, 2) ベーキングや UV クロスリンクにより, 滴下したプローブを固定, 3) ブロッキングの後, 抗体反応, 4) nitro-blue tetrazolium chloride / 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphatase *p*-Toluidine salt (NBT/BCIP) 発色 (室温, 一晩 [約 12 時間]) を行います。可視化に, より検出感度の高い化学発光を用い, 短時間で確認す

ることができますが, ISH で実際に使用する発色系列 (anti-DIG 抗体, 検出バッファー, NBT/BCIP) がきちんと機能するかを確認する意味でも, それらを用います。NBT/BCIP 発色においても, 一晩の反応で 0.1 pg までの検出は安定的に可能ですし, 現実的に作製したプローブが 10 ng/ μ L 以上 (1,000 倍希釈で 10 pg) で検出されない場合, プローブの再検討が必要です。

固定とパラフィン切片の作製

4% パラフォルムアルデヒド (PFA) で室温, 一晩固定した後, 通常の脱水およびパラフィン包埋を行います。4%PFA は, 使用当日に作製します (古い固定液は固定効果が失活します)¹。50 mL の 4%PFA-PBS の作製法は, 2 g の PFA 粉末をビーカーに直接計り取り, 50 mL の PBS を加え, 70°C のウォーターバス (恒温水槽) 中で攪拌しながら溶解します。通常は, 10 分程度で, クリアに溶解可能です。溶解後, 室温まで冷まし使用します。作製中, 70°C 以上に温度を上げると, PFA が失活し固定効果が失われます。また, 長時間の 70°C での放置も望ましくありません。PBS で固定液を作製する場合 (PFA を溶解させる場合), 水酸化ナトリウムの添加は必要ありません。固定時間は一晩行います。免疫染色用の固定時間としては過固定となります (筆者らは室温, 2 時間固定を標準固定としています), 組織切片内 RNA の保持, さらには ISH の実手技上で必須の工程である proteinase K 処理の際, 固定が弱いと, 組織切片が過度に破壊されたり, スライドガラスより剥がれ失うことを避けるためには, ある程度十分な固定を行うことが大切です。固定に際して, 大きな組織・臓器の場合は, 固定液にジャブ漬けすることなく, カミソリ刃でスライスして (2~3 mm の厚さ) 浸漬固定, または, 灌流固定した後, スライスして浸漬固定の追加を行い, 均一に固定することが大切です¹。

パラフィン切片作製のミクロトームは, RNase に汚染されていないように気をつけます。刃はできればデイスポのものを用い, あらかじめ滅菌しておくといいです。薄切道具類 (ピンセット, 筆, ガラス類) は専用にします。また, 切片をスライドに取る容器は乾熱滅菌をしたものを用い, 水は蒸留水を使います。5~10 μ m 厚の切片を作製します。貼り付けた切片の乾燥が不十分の場合, 操作途中でスライドガラスから剥がれてしまう場合があります。特に ISH の場合には, ハイブリダイズしたりする熱処理の過程や組織切片を高温で洗浄したりする過程がありますので, スライドコー

ティング剤には留意する必要があります。筆者らは、切片を回収するスライドに MAS コートスライド（アミノシランよりも強力な接着性があり、熱処理、アルカリ処理への耐性に優れています）を使用しています。

ISH プロトコール 1 : mRNA の検出

(1) 前処置

- 1) Phosphate buffered saline (PBS) 洗浄
5分×3回
- 2) Proteinase K (10 µg/mL) 処理
15分×1回, 37°C
- 3) PBS 洗浄
5分×3回
- 4) 4% PFA-PBS 再固定
5分×1回
- 5) PBS 洗浄
5分×3回
- 6) アセチル化処理
10分×1回
- 7) PBS 洗浄
5分×3回

(2) ハイブリダイゼーション

- 1) プレハイブリダイゼーション
1時間, 60°C
- 2) ハイブリダイゼーション
一晩, 60°C

(3) 洗浄

- 1) 4× standard saline citrate (SSC)
5分×4回, 60°C
- 2) リボスクレアーゼ A (RNase A, 20 µg/mL) 処理
30分×1回, 37°C
- 3) 1× SSC
5分×3回, 60°C
- 4) 0.5× SSC
15分×2回, 60°C
- 5) 0.5× SSC
5分×1回, 60°C

(4) DIG 検出反応 (発現の可視化)

- 1) PBS 洗浄
5分×3回
- 2) ブロッキング
30分×1回
- 3) アルカリ性フォスファターゼ標識抗 DIG Fab 抗体 (Roche 社) : 100 mU/mL の抗体濃度で反応
30分, 37°C または 1時間, 室温
- 4) PBST (PBS+0.2% Tween20) 洗浄
5分×3回
- 5) 基質を除いた発色液で洗浄
10分×1回
- 6) NBT/BCIP 反応 : 暗所で数時間から一晩, 室温で反応させます。途中で検鏡しながら発色具合を確認します。

i. Roche 社 BM Purple (NBT/BCIP ready-to-use solution) 反応液を使用します。スライドあたり 200~300 µL 滴下します。反応産物は、青紫色の沈殿物と

なります。

ii. i の代わりに Roche 社 DIG Nucleic Acid Detection Kit を使用することもあります。キット中の NBT/BCIP ストック液を発色液で 50 倍希釈し、スライドあたり 200~300 µL 滴下します。反応産物は、茶褐色の沈殿物となります。

注 : 内因性アルカリ性フォスファターゼの抑制が必要な際は、反応液に levamisole (1 mM) を添加して使用します。

7) マウント : ゲルマウント剤で封入し、カバーガラスで封入し、マニキュアなどで縁をシールします。NBT/BCIP の反応産物は、キシレンを含む封入剤で封入すると発色沈殿が結晶化するため水系封入剤を使用します。

プロトコールのポイント

(1) 試薬は RNase free 試薬を使用しますが、diethyl pyrocarbonate (DEPC) 処理水を用いて溶解はしていません。

(2) Proteinase K 処理 (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0) : 細胞内の核酸を取り囲む蛋白質を消化して、プローブの到達を容易にする目的で行います。1~30 µg/mL, 1~30 分, 室温または 37°C で行います。予備実験として、proteinase K の濃度、または反応時間をふり、形態を保持しながら、発現シグナルが十分得られる条件を検討します。

(3) 塩酸処理 : 小腸組織を対象とした際は、内因性 (組織中に存在する) アルカリ性フォスファターゼ活性を抑制するために、アセチル化処理の前に、塩酸処理 (0.2N HCl) を行います²⁾。

(4) アセチル化処理 : 0.1 M triethanolamine (TEA)-0.25% acetic anhydride 混合液中にスライドガラスを浸し、プローブと組織切片中の有機化合物の電気的結合の抑制 (非特異的反応抑制) を行います。

(5) プレハイブリダイゼーション : 切片をハイブリダイゼーション溶液に馴染ませる目的で行われます。

(6) ハイブリダイゼーション : 組成は以下のごとくです。

ストック液の組成 (-20°C 保存)	最終濃度
脱イオン化ホルムアミド	25 mL 50%
50% 硫酸デキストラン	10 mL 10%
50×Denhardt 液	1 mL 1×
20×SSC (pH 7.0)	10 mL 4×
蒸留水	1.5 mL
合計	47.5 mL

ハイブリダイゼーション液の組成	最終濃度
上記ストック液	95 μ L
酵母 RNA ストック液 (10 mg/mL)	5 μ L 500 μ g/mL
10~30 ng/ μ L プローブ原液	1 μ L 100~300 ng/mL
合計	101 μ L/スライド

プローブは、100~300 ng/mL 程度の濃度で使用しています。1,000 nt の RNA プローブを、100 ng/mL の濃度で、100 μ L のハイブリダイゼーション液に溶解させたものとします。分子量は約 20 万。100 μ L 中には約 3.0×10^{10} の分子が存在することになります。分子一個が占める溶液の体積は約 $1.5 \mu\text{m}^3$ となります。一本鎖 RNA の塩基間の距離を 0.34 nm としますと、1,000 nt の RNA は、長さが 0.34 μm となります。直径は 2 nm となります。人に例えると、身長 170 cm の人が、 7.5 m^3 の空間を占拠して、網を張るイメージに例えることができます。10 歩ほど歩けば、隣り合う人に接触できる距離です。

RNA に高次構造をとらせないように、脱イオン化したホルムアミドを使用することが大切です。古くなりイオン化したホルムアミドは黄色みを帯びます。Dextran Sulfate は、Chemicon 社の 50% 溶液 (平均分子量 >500,000) を使用しています。これは、ハイブリダイゼーションの反応速度を早めます。非特異的結合の抑制のために Denhardt 液、酵母 RNA (transfer RNA) を加えます。硫酸デキストランは非常に粘稠性が高いため、65°C の恒温水槽で温めてから分注します。スライドグラスに、ハイブリダイゼーション液をかけた後は、カバーガラスをかけて、そのカバーガラス周囲を DPX マウント溶液 (BioChemika 社) でシールします。シールすることにより、湿箱が不要になります。カバーにパラフィルムを使用される場合は、湿箱が必要で、また、パラフィルムの耐熱性は 60°C ですので、ハイブリダイゼーションさせる温度がそれに限定されます。

(7) ハイブリダイゼーションの温度: RNA プローブを用いた場合の melting 温度 (T_m) は以下の式から算出されます³。ISH の至適温度は、それよりも 16~32°C 低いところが適当であるとされています⁴。

$$T_m = 79.8 + 18.5 \log (\text{molarity of monovalent cations}) + 0.58 (\%GC) + 0.0012 (\%GC)^2 - 820 / (\text{length of probe}) - 0.35 (\%formamide)$$

(8) RNase 処理: バックグラウンドと真の陽性シグナルの見極めが重要になります。

(9) ハイブリダイゼーション後の洗浄: この過程

で、組織に非特異的結合しているプローブを分解し、発色時のバックグラウンドを抑えるために、RNase A を使用しています。RNase A 処理を行う場合、まずはハイブリダイゼーション液に使用した濃度の SSC 洗浄液、あるいは、それよりもやや濃度の低い SSC 洗浄液にて切片からハイブリダイゼーション液を取り除きます。RNase A 処理を行ったものでは、SSC 洗浄液にホルムアミドを加えないで行っていません。RNase A を用いない場合は、なるべく高温でハイブリダイゼーションを行い、SSC 洗浄を強め (低いイオン強度) に、かつ長めに行います。一般に、ハイブリダイゼーション温度と SSC 洗浄温度は同一温度で行います。

(10) DIG 検出反応: NBT/BCIP 反応は、BM Purple (Roche 社)、または DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche 社) を用いています。抗体反応後の洗浄には PBST を使用しています。PBST を使用すると、発色液の切片への乗りがよくなります。

MicroRNA の検出

MicroRNA は、約 22 塩基の非コード RNA であり新しい転写後遺伝子発現調節経路として注目を集めています。最近、われわれは、ヒト胎盤に発現している microRNA に興味を持ち、ヒト胎盤の small RNA ライブラリー解析から胎盤特異的 microRNA の同定とその発現解析を進めています⁵。胎盤絨毛組織は、中心部が中胚葉由来の間質である結合組織、間質細胞、胎児血管より成る芯と、それを覆う栄養膜由来の上皮層 (基底膜を介して芯と接する栄養膜細胞層と最表面で母体血に直接接する栄養膜合体層) より構成されています⁶。どの細胞にどの microRNA が発現しているか、LNA プローブを用いて、絨毛組織をホルムマウント法の *in situ hybridization* にて解析しました (プロトコールは下記参照)^{5,7}。

図 1 は、倫理委員会の承認を得て妊婦さんより採取した満期産胎盤における microRNA, MIR122A の発現を、ISH で解析した画像です。4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) の蛍光核染色と組み合わせるため、NBT/BCIP を赤の擬似カラーで表示してあります。MIR122A の局在を示すシグナル (矢印) は、絨毛栄養膜だけでなく、絨毛内の間質細胞にも陽性に観察されます。ISH による先端の形態学的解析により microRNA を発現している細胞を同定することは、さらに microRNA の機能解析を進めるうえにおいて、非常に有用な解析アプローチ法であ

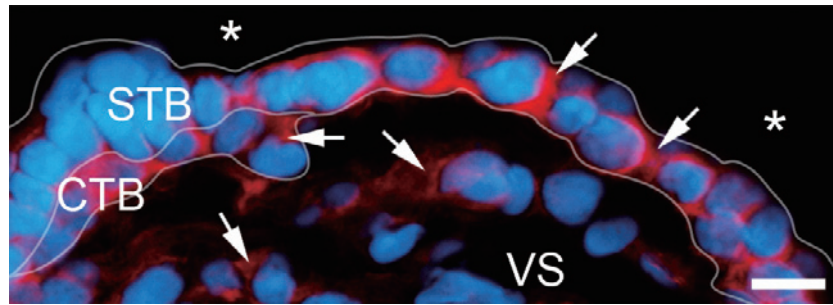


図1 In situ hybridization法によるヒト満期産胎盤におけるmicroRNA, *MIR122A* の発現解析. DAPI 蛍光核染色 (青) と組み合わせるため, *MIR122A* の局在を示す NBT/BCIP 反応産物を赤の擬似カラーで示してあります. 絨毛栄養膜の栄養膜合体層 (STB) とラングハンス細胞層 (CTB) の輪郭は白線で示してあります. * は絨毛間腔. *MIR122A* の局在を示すシグナル (赤) は, 絨毛栄養膜 (STB, CTB) だけでなく, 絨毛内の間質 (VS) の細胞にも陽性に観察されます (矢印). スケールバー 10 μ m.

ると考えられます.

ISH プロトコール 2: ホールマウント法を用いた microRNA の検出

(1) 固定と前処置 (反応は 2 mL マイクロチューブで行います)

- 1) 4% PFA-PBS 固定 一晩, 4°C
- 2) メタノール脱水: 脱水後, -20°C で保存可能です.
25% 特級メタノール (MeOH) in PBST (PBS+0.1% Tween20) 30分×1回, 室温
- 50% MeOH in PBST 30分×1回, 室温
- 75% MeOH in PBST 30分×1回, 室温
- 100% MeOH 30分×1回, 室温
- 3) 水和処理
75% MeOH in PBST 5分×1回, 室温
- 50% MeOH in PBST 5分×1回, 室温
- 25% MeOH in PBST 5分×1回, 室温
- 100% PBST 5分×4回, 室温
- 4) Proteinase K (10 μ g/mL) 処理 45分×1回, 37°C
- 5) 4% PFA-PBS 再固定 20分×1回
- 6) PBST 洗浄 5分×3回
- 7) 蒸留水洗浄 5分×1回
- 8) アセチル化処理 10分×1回
- 9) 蒸留水洗浄 5分×1回
- 10) PBST 洗浄 5分×5回

(2) ハイブリダイゼーション

- 1) プレハイブリダイゼーション 2時間, 55°C

予測される LAN プローブの T_m 値より 20~25°C 低い温度でハイブリダイゼーションを行います.

ハイブリダイゼーション液 (HB) は H7782 (シグマ社) を使用しています.

- 2) ハイブリダイゼーション 一晩, 55°C
DIG-labeled LNA probe (エキシコン社) の濃度: 10 nM

(3) 洗浄

- 1) HB による洗浄 15分×1回, 55°C
- 2) 75% HB/25% 2×SSCT (SSC+0.1% Tween-20) 15分×1回, 55°C
- 3) 50% HB/50% 2×SSCT 15分×1回, 55°C
- 4) 25% HB/75% 2×SSCT 15分×1回, 55°C
- 5) 2×SSCT 15分×1回, 55°C
- 6) 0.2×SSCT 15分×2回, 55°C
- 7) 75% 0.2×SSCT/25% PBST 10分×1回, 室温
- 8) 50% 0.2×SSCT/50% PBST 10分×1回, 室温
- 9) 25% 0.2×SSCT/75% PBST 10分×1回, 室温
- 10) PBST 10分×1回, 室温

(4) DIG 検出反応 (発現の可視化)

- 1) ブロッキング 60分×1回, 室温
- 2) アルカリ性フォスファターゼ
標識抗 DIG Fab 抗体 (Roche 社):
75 mU/mL の抗体濃度で反応 一晩, 4°C
- 3) TBSTL (TBS+0.1% Tween20+2 mM levamisole)
洗浄 60分×6回, 室温
- 4) TBST 洗浄 2日間, 4°C
- 5) 基質を除いた発色液で洗浄 5分×3回

発色液の組成：100 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂,
100 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH9.5

6) NBT/BCIP 反応：暗所で数時間から一晩，室温：途中，肉眼で発色具合を確認

7) 1 mM EDTA を含んだ PBST で

反応の停止 5分×2回

8) クリオスタット包埋とクリオスタット切片 (5 μm 厚) の作製

i. 5% 蔗糖-PBS 10分

ii. 10% 蔗糖-PBS 10分

iii. 15% 蔗糖-PBS 10分

iv. 20% 蔗糖-PBS 10分

v. OCT コンパウンド包埋と液体窒素凍結

vi. クリオスタット切片作製

9) PBS 洗浄 5分×3回

10) DAPI 染色 (核染色) 10分×1回

11) PBS 洗浄 5分×3回

12) 蒸留水洗浄 5分×2回

13) 封入：Pristine Mount (ファルマ社) を滴下し，加熱せず，カバーガラスをかけます。

注：ハイブリダイゼーションや洗浄は，振盪させながら行います。

あとがき

ISH 法に関しては，多くの総説，成書が出版されており，併わせて御参照いただきたい⁷⁻¹³。筆者らの経験に基づく，総説，成書の方法に記載されていない，行間にあるミソ，“技術ポイント”について触れました。若手研究者の皆様のお役にたてれば幸いです。

謝辞：研究遂行に協力をいただいた日本医科大学大学院医学研究科分子解剖学，女性生殖発達病態学の教員・技術員の方々に深謝いたします。また，本研究の一部は，文部科学省科学研究費補助金，私立大学戦略的研究基盤形成支援事業の補助を受けた。

文 献

1. 瀧澤俊広：基礎研究から学ぶ 2. 組織細胞化学シリーズ (若手研究者へのヒント) 光学免疫組織化学の基礎：固定と凍結切片を用いた蛍光免疫組織化学 (1). 日医大医会誌 2009; 5: 136-140.
2. Kiyama H, Emson PC: An in situ hybridization histochemistry method for the use of alkaline phosphatase-labeled oligonucleotide probes in small intestine. J Histochem Cytochem 1991; 39: 1377-1384.
3. Brown C: In situ hybridization with riboprobes: an overview for veterinary pathologists. Veterinary Pathology 1998; 35: 159-167.
4. 小路武彦：分子組織細胞化学の最近の進歩. 解剖学雑誌 1999; 74: 399-409.
5. Luo S-S, Ishibashi O, Ishikawa G, Ishikawa T, Katayama A, Mishima T, Takizawa T, Shigihara T, Goto T, Izumi A, Ohkuchi A, Matsubara S, Takeshita T, Takizawa T: Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. Biol Reprod 2009; 81: 717-729.
6. 瀧澤俊広, 石川 源, 竹下俊行, 松原茂樹：胎盤の構造と機能 (マクロ, ミクロの形態と関連機能). 臨床検査 2007; 51: 1643-1649.
7. Kloosterman WP, Wienholds E, Bruijn ED, Kauppinen S, Plasterk RH: In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. Nat Methods 2006; 3: 27-29.
8. 小路武彦：In situ hybridization 技法. 1998; pp 1-220, 学際企画 東京.
9. 石渡俊行, 西海けい子, 川原清子, 浅野伍朗：組織標本上での messenger RNA 発現細胞検出 Digoxigenin labeled probe を用いた in situ hybridization (ISH) 法の技術と留意点. J Nippon Med Sch 2000; 67: 38-41.
10. 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 (日本組織細胞化学会編), 2008; pp 35-49, 学際企画 東京.
11. 金井正美, 川上速人, 原健士朗, 金井克晃：ホルマウント in situ ハイブリダイゼーション法. 組織細胞化学 (日本組織細胞化学会編), 2008; pp 51-58, 学際企画 東京.
12. 鶴尾吉宏, 上山敬司, 伊藤隆雄：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 (日本組織細胞化学会編), 2009; pp 53-68, 学際企画 東京.
13. 大内淑代, 野地澄晴：ホルマウント in situ ハイブリダイゼーション法. 組織細胞化学 (日本組織細胞化学会編), 2009; pp 69-81, 学際企画 東京.

(受付：2010年1月5日)

(受理：2010年1月14日)