総 説

遺伝情報をいかに形態学的にとらえるか

—In situ ハイブリダイゼーション法をはじめとする
分子細胞化学の進歩と内分泌学研究への応用—

京都府立医科大学第一解剖学教室

河 田 光 博

An Attempt to Detect Genetic Information by Means of Molecular Cytochemistry

Mitsuhiro Kawata

Department of Anatomy, Kyoto Prefectural University of Medicine
Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan

In situ hybridization is a histochemical technique that attracts many cell biologists and others interested in developmental biology, virology, genetics and neuroendocrinology. This method gives us the precise localization and identification of individual cells which contain specific nucleic acid sequences, in a similar manner to the immunohistochemistry of cells which have a particular protein. There has been a wide range of applications for this technique. One of the most important and significant applications of in situ hybridization is the demonstration of specific mRNA in particular cells. This is quite valuable in heterogeneous tissue such as that of the hypothalamus with a various types of different cells. The combination with the immunohistochemistry enables us to study the dynamics of peptides or proteins in a certain tissue or cell. In this mini-review the logic and methodology of molecular cytochemistry, particularly in situ hybridization, with its application in the endocrinological field was presented.

Key words : in situ hybridization, gene expression, molecular cytochemistry, mRNA
c-fos-jun

はじめに

——研究は受動的行為ではなく、常に能動的であり、攻撃的ですらあり続ける——

間断なく変化する外部環境に対応してわれわれの生体は、内部環境を保持しようとする複雑な調節機構を有している。このような生物現象は、イオンチャンネルのような分子レベルのものから、個体として機能表現されるものにいたるまで、すべていわば細胞社会という形態の上に成り立って

いる。ホルモンをはじめとする細胞間情報伝達物質は、その生化学的特性からタンパク質、脂質、アミノ酸などに分類される。これらの物質の生成反応や受容機構においては、タンパク質がその中心的役割を担っているが、タンパク質の種類を決める遺伝情報はDNAの分子構造による。つまり、三つの塩基の組合せによってタンパク質のアミノ酸配列が決定される訳である。したがって、塩基の一次配列構造が、生体において繰り広げられる諸現象の最も根幹的な働きを有していると言っても過言ではない。

内分泌学研究の歴史において、形態学が果たしてきた役割は測りしれないものがある。遺伝情報を視覚的にとらえることは、人類の長年の夢であった。いま、形態学はその古典的記載主義的立場から飛び出し、遺伝子や分子の機能に還元して解析されるようになった。本項では、in situ ハイブリダイゼーション法を中心に、分子細胞化学がどのような形で内分泌学研究に応用できるのか述べる。

In situ ハイブリダイゼーション法の基本原理

特定の遺伝子の発現は、遺伝子を作るDNAの二重らせん間の水素結合がはずれ、RNAポリメラーゼの作用によって一次転写産物hnRNAと呼ばれる核酸が5'→3'に向かって転写されること

図1. In situ ハイブリダイゼーション法の原理を示す模式図。

から始まる。生じた hnRNA からアミノ酸をコードしないイントロンの部分が取り除かれたのち、mRNA は核膜孔を通して細胞質内へ移動する。リボゾーム上で mRNA は5'→3' に向かって翻訳と呼ばれるアミノ酸の縮合を行い、ペプチドやタンパク質が合成されるが、翻訳を終えた mRNA は直ちに分解される。In situ ハイブリダイゼーションは、これらの過程のなかで、細胞質内で翻訳が行われるまでの mRNA を、それと相補的塩基配列を有するプローブを用いて検出する(図1)。mRNA の寿命(half-life)は mRNA の種類そのものによって異なり、短いもので30分、長いものでは約10時間にもおよぶとされる。

In situ ハイブリダイゼーション法の歴史

In situ ハイブリダイゼーション法とは、細胞内あるいは染色体上の特異的な核酸(DNA, RNA)の局在を顕微鏡下で明らかにする方法である。つまり、ホモジュネートによる核酸の抽出操作を行わず、組織細胞形態を保ちながら in situ で核酸分布を可視化する手法である。

この方法は、Pardue と彼女の協同研究者¹⁶⁾や John らのグループ⁸⁾によって、1969年に発表され、Drosophila と Xenopus におけるサテライト DNA や5S リボゾーム遺伝子の細胞内における分布が示された。In situ hybridization という用語は、Pardue らによって案出されたものである¹⁶⁾。Histo hybridization, hybridization histochemistry, 分子雑種法という語を用いる研究者もいるが、in situ hybridization という用語が国際的に最もひろく用いられている。なお、in situ は、欧米の研究者によっても発音法が分かれ、それぞれ半々の学者が[in situ]と[in saitu]と発音している。私見を述べるならば、やはり前者がより好ましいとおもわれる。

Brahic と Haase¹⁾は、Pardue らが用いた方法に改良を加え、感度と特異性の高い手法を用いて細胞に感染したウイルス核酸の同定に成功した。これらの研究はラジオアイソトープ(RI)によって標識したプローブを用いて行われたものであるが、Singer と Ward¹⁸⁾は RI を用いない方法を考案した。彼らは、用いるプローブをビオチン化し、酵素組織化学的に標的となるアクチンの核酸の局在を明らかにした。組織細胞内に存在する特定の mRNA の分布を最初に観察したのは、Roberts ら³⁾である。彼らは、下垂体前葉におけるプロオピオメラノコルチン(POMC) mRNA を cDNA プローブを用いて形態学的に証明した。その後、塩基配列をデザインでき、しかも簡便に作成できる合成オリゴヌクレオチドをプローブに用いる方法が注目を集めるようになり、さまざまな領域でペプチドや受容体 mRNA の検索が進んでいる⁹⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾。さらに、mRNA とプローブのハイブリッド形成の量を切片上で計測し、画像解析装置を用いて定量的に mRNA の変動をとらえる試みもなされている⁷⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾。

In situ ハイブリダイゼーション法の特徴

特定の目的とする組織をホモジェナイズし、抽出した核酸の存在ならびにその定量解析を行う方法としてノーザンあるいはサザンブロット法がある。これらの方法では、組織の単位体積当りに対して、目的とする核酸が一定量以上存在しなければ検出できない。とくに細胞が不均一に分布するような組織では、空間的な検索が必要であることは言うまでもない。つまり、多数の細胞からなる組織において少数の細胞しか遺伝子発現していないような場合では、上述の手法を用いて目的とする核酸を検出することはきわめて困難である。さらに、どの細胞が、どの程度の量の mRNA を有しているのかを知ることはきわめて重要な情報であり、in situ ハイブリダイゼーション法の最

大の特色はこの点にあると言ってもよい。

In situ ハイブリダイゼーション法で用いられるプローブとしては、cDNA、cRNA、オリゴヌクレオチドの三種類がある。cDNA は特異性、cRNA は感度、オリゴヌクレオチドは塩基配列のデザインが可能な点など、それぞれの特徴を有する。標識方法としては、RI を用いるものと非 RI 物質を使用するものに大別される。前者は後者にくらべ高感度であり、数 pmol の量でも検出が可能であり、しかもオートラジオグラフィー法を行えば、切片上での銀粒子数と mRNA 量とに強い相関性があるため、細胞レベルで mRNA 量の動態を解析することができる。また後者は、感度に難点があるものの細胞内局在性に優れ、複雑な形状を有する細胞での検索に適している。

現在までにホルモンをはじめ、受容体やイオンチャンネル、細胞内シグナル伝達に關与する二次、三次メッセンジャー物質などがつぎつぎとクローニングされ、それらの遺伝子の塩基配列が明らかにされている。そしてこれらの情報は、整理登録され EMBL や GenBank、DDBJ などのデータベースとしてまとめられている。合成オリゴヌクレオチドをプローブとして使用する場合、このデータベースを利用して塩基配列をデザインすることが可能である。とくに、遺伝子スーパーファミリー群を作っているような系では、類似の mRNA とハイブリッドを形成しないことが必須であり、相同性の低い部分を利用して選択的かつ特異的なプローブの作成が、研究成果の精度を上げることになる。

図2. 脱水時における下垂体後葉のバソプレシン免疫反応。正常状態 (A) にくらべ脱水時 (B) では著しいバソプレシン免疫陽性反応の低下がみられる。

In situ ハイブリダイゼーション法の応用

1. 免疫組織化学法との併用²⁰⁾

免疫組織化学法は、抗原性を有する物質の局在を特異抗体を用いて切片上で検索する方法である。特定物質の mRNA を in situ ハイブリダイゼーション法で、またその遺伝子産物であるペプチドやタンパク質を免疫組織化学法を用いて証明することによって、両者の同一組織・細胞内での分布局在の比較が可能となる。同一切片上でこの二つの異なる方法を施す手法と、薄切した隣接切片をそれぞれ別の手技で染め出す方法が案出されている。

前者の方法では、まず免疫組織化学法を行い、ひき続いて in situ ハイブリダイゼーション法を施行しなければならない。なぜなら、逆の手順で行えば、ハイブリダイゼーションの操作によって抗原性の失活が生じるからである。また免疫組織化学法反応溶液に、RNase の阻害剤を添加しておく必要があることはす論をまたない。

Guitteny ら⁴⁾は、薄切された連続切片を用い、in situ ハイブリダイゼーション法と免疫組織化学法の両者を下垂体後葉ホルモン系への研究に応用した。隣接切接片上でのハイブリダイゼーションシグナルと免疫陽性反応をくらべた結果、両者に著しい相関性を有する細胞群と、相関性のみられない細胞群を認めた。すなわち、ある細胞はシグナル数が多いにもかかわらず免疫反応が弱陽性であり、別の細胞はシグナル数が少ないのに反し強陽性の免疫反応を呈した。つまり、特定の刺激

図3. 脱水時における視床下部室傍核のバソプレシン免疫反応。正常状態 (A) にくらべ脱水時 (B) では著しいバソプレシン免疫陽性反応の低下がみられる。

によってその産生が亢進した場合においても、このような神経内分泌系の細胞では終末からの放出が産生を上まわれれば、結果的に免疫組織化学的には反応産物の低下という形になるのである (図2, 3, 4)。このことから、in situ ハイブリダイゼーション法と免疫組織化学法を組み合わせることによって、より物質の動態変化の機能的側面がとらえられることになる。

2. 異なる物質の mRNA の共存

免疫組織化学法によって、複数のホルモンや情報伝達物質が同一細胞内に共存していることが示されている。このことから、mRNA レベルにおいても同様の事象が認められるか否かの検索が行われている。たとえ、物質として同一細胞内に共存していても、特定の物質を取り込んだ結果として共存しているのか、あるいは実際に異なる物質が同一細胞内で産生されているのが問題となるからである。

Fischer-Colbrie ら²⁾は、副腎髄質のニューロペプチド Y、エンケファリン、クロモグラニン (A, B) のそれぞれの mRNA の変動を、自律神経刺激およびホルモン刺激下で観察した。その結果、エンケファリンとニューロペプチド Y の mRNA は、内臓神経刺激によって著しく増加するにもかかわらず、クロモグラニン mRNA には変化がないことが示された。逆に、下垂体摘出によってクロモグラニン mRNA は有意に減少するのに対し、エンケファリンとニューロペプチド Y の両者の mRNA には変化がなかった。

図4. 脱水時における視床下部室傍核のバソプレシン mRNA. 正常状態 (A) にくらべ脱水時 (B) では著しいバソプレシン mRNA の増加がみられる。

ハソプレシンニューロンは、その大細胞性群においてダイノルフィンを共有している。Sherman¹⁷⁾らは、浸透圧刺激によってハソプレシンとダイノルフィンのそれぞれの前駆体 mRNA の動きを観察し、両者が同時に強制的に変動することを明らかにした。

このように、共存する物質の mRNA の動態はさまざまであり、現在のところこの調節機構についての統一された見解はない。

3. 電子顕微鏡的観察への応用

In situ ハイブリダイゼーション法を電子顕微鏡レベルに応用しようという試みもさかんに行われている。⁵⁾ エポキシ樹脂に試料を包埋し、ハイブリダイゼーション反応を行ったのち、超薄切し電子顕微鏡的に観察する方法が開発された。感度の問題もあり、オートラジオグラフィー法による電顕観察が最も成功している。多くの場合、特定の物質の mRNA は、予想される部位に局限して存在している。つまり、粗面小胞周辺に標識物質の集積が認められている。このほか、核膜周囲にもシグナルが観察されている。

4. 神経内分泌系における mRNA の輸送

mRNA が神経細胞の軸索内を輸送されるという驚くべき知見が多くの研究室で認められてきたため⁴⁾、本項を設け概説する。

脊椎動物の神経系—神経内分泌細胞も含め—においては、いわばセントラルドグマとして次のことが一般的に確立されている。神経細胞体の延長である樹状突起内には、タンパク合成に必要なリボソームや mRNA が認められているが、軸索は元来、これらの産生物質を輸送する特殊に分化した突起であるとされてきた。ところが近年、後葉ホルモンのハソプレシンやオキシトシンの mRNA が軸索終末の集積部位である下垂体後葉に証明された。視床下部下垂体系を切断したり、軸索内輸送を阻害するコルヒチンの投与によって、下垂体後葉内の mRNA が消失することから、視床下部の細胞体で作られた mRNA が軸索内を輸送され、後葉にまで運ばれることが明らかになった。このことは、神経細胞の極性を考察する上で、きわめて示唆に富んだ事実といえよう。

遺伝子発現調節への c-fos, jun の役割

細胞への刺激がどのような形で遺伝子につたえられるのか、現在のところ三つの様式が明らかにされている¹⁸⁾。第一は、ステロイドホルモンをはじめとするような脂溶性物質は、細胞膜を単純拡散によって通過し、細胞内の受容体と結合したのち、その複合体が目標となる遺伝子と結合して転写をおこさせるものである。第二は、二次メッセンジャーを介するもので、この二次メッセンジャーが直接遺伝子の転写を調節するものである。第三は、二次メッセンジャーが核内の特定のガン遺伝子 (c-fos, c-jun) に作用し、転写因子の合成を行った後、この転写因子が再び核内に戻り、目標となる遺伝子の転写を調節するものである。したがって c-fos や c-jun の発現産物を見れば、ある特定の遺伝子発現を間接的に証明しようと言えよう。細胞に加えられた刺激は直ちに c-fos と c-jun の mRNA の産生となり、1~2時間のうちに細胞質中でその翻訳物質をつくり、再び核内でダイマーを形成し AP-1 結合部位に結合して、特定の遺伝子の発現をおこさせる (図5)。この FOS-JUN の発現タンパクダイマーの半減期も約2時間であり、この系は即時型の遺伝子転写調節に関与していると言える。FOS-JUN はその蛋白の一部がラセン状を呈し、しかもロイシンが規則的に配

列し、ロイシン・ジッパーと呼ばれ結合している。このダイマーが DNA 上の TGACTCA 部位に強い結合能を持っていることが近年明らかとなった。このような proto-oncogene は、二次メッセンジャーと目的遺伝子の間に介在する三次メッセンジャーとして、近年注目を集めており、これらの発現タンパクやその mRNA の変動をみることは、遺伝子発現機構解明の大きな機能形態学的手がかりとなりうる⁶⁾。

図5. c-fos, jun による遺伝子転写調節を示す模式図。

お わ り に

In situ ハイブリダイゼーション法を中心に、形態学の領域で活性に研究されている項目を概説した。紙面の都合上、多くの知見を割愛したが、いままで、“静的”とされてきた形態学に時間という“動的”な側面が加えられてきており、学問のボーダーレス化とあいまって、より本質的な展開が期待できると言えよう。

文 献

- 1) Brahic M. and Haase A.T.: Detection of viral sequences of low reiteration frequency by

- in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 6125–6129,
- 2) Fischer-Colbrie R., Iacangelo A. and Eiden L.E.: Neural and humoral factors separately regulate neuropeptide Y, enkephalin, and chromogranin A and B mRNA levels in rat adrenal medulla. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 3240–3244, 1988.
 - 3) Gee C.E. and Roberts J.L.: Laboratory methods for in situ hybridization histochemistry: A technique for the study of gene expression in single cells. *DNA*, 2: 155–161, 1983.
 - 4) Guitteny A.-F., Bohlen P. and Bloch B.: Analysis of vasopressin gene expression by in situ hybridization and immunohistochemistry in semi-thin sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 36: 1373–1378, 1988.
 - 5) Guitteny A.-F. and Bloch B.: Ultrastructural detection of the vasopressin messenger RNA in the normal and Brattleboro rat. *Histochemistry*, 92: 277–281, 1989.
 - 6) Hamamura M., Nunez D., Leng G., Emson P.C. and Kiyama H.: c-fos may be a common transcription factor within the hypothalamic neural circuits involved in osmoregulation. *Mol. Brain Res.* (in press)
 - 7) Harbuz M., Russell J.A., Sumner B.E.H., Kawata M. and Lightman S.L.: Rapid changes in the content of proenkephalin A and corticotrophin releasing hormone mRNAs in the paraventricular nucleus during morphine withdrawal in urethane-anaesthetized rats. *Mol. Brain Res.*, 9: 285–291, 1991.
 - 8) John H.A., Birnstiel M.L. and Jones K.W.: RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223: 582–587, 1969.
 - 9) Kawata M., McCabe J.T. and Pfaff D.W.: In situ hybridization histochemistry with oxytocin synthetic oligonucleotide: Strategy for making the probe and its application. *Brain Res. Bull.*, 20: 693–697, 1988.
 - 10) Kawata M., McCabe J.T., Harrington C., Chikaraishi D. and Pfaff D.W.: In situ hybridization analysis of osmotic stimulus-induced changes in ribosomal RNA in rat supraoptic nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 270: 528–536, 1988.
 - 11) Kawata M., Yuri K. and Kumamoto K.: In situ hybridization histochemistry with oligodeoxynucleotide probe as a tool for the detection of neuropeptide mRNAs. *Acta histochem. Cytochem.*, 23: 307–325, 1990.
 - 12) Kawata M., Yuri K. and Sano Y.: Localization and regulation of mRNAs in the nervous tissue as revealed by in situ hybridization. *Comp. Biochem. Physiol.*, 98C: 41–50, 1991.
 - 13) Lewis M.E., Sherman T.G. and Watson S.J.: In situ hybridization histochemistry with synthetic oligonucleotides: Strategies and methods. *Peptides*, 6(Suppl. 2): 75–87, 1985.
 - 14) Mohr E., Fehr S. and Richter D.: Axonal transport of neuropeptide encoding mRNAs within the hypothalamo-hypophyseal tract of rats. *EMBO J.*, 10: 2419–2424, 1991.
 - 15) Morgan J.I. and Curran T.: Stimulus-transcription coupling in neurons: role of

- cellular immediate-early genes. *Trends in Neurosci.*, 12: 459–462, 1989.
- 16) Pardue M.L. and Gall J.G.: Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 64: 600–604, 1969.
 - 17) Sherman T.G., McKelvy J.F. and Watson S.J.: Vasopressin mRNA regulation in individual hypothalamic nuclei: a Northern and in situ hybridization analysis. *J. Neurosci.* 6: 1685–1694, 1986.
 - 18) Singer R.H. and Ward D.C.: Actin gene expression visualized in chicken muscle culture by using in situ hybridization with a biotinated nucleotide analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 7331–7335, 1982.
 - 19) Sumner B.E.H., Kawata M. and Russell J.A.: Does acute, intense stimulation of oxytocin neurones in the supraoptic nucleus increase their content of oxytocin mRNA? *Brain Res.*, 489: 283–290, 1989.
 - 20) Watts A.G. and Swanson L.W.: Combination of in situ hybridization with immunohistochemistry and retrograde tract-tracing. In: Conn M, *Methods in Neuroscience*, vol 1 Gene probes. San Diego: Academic Press, 1989: 127–136.