

細胞生物学や病理学における mRNA の 検出法とその応用

新潟大学医学部腎研究施設病理形態学部門（主任：木原 達教授）

山 本 格

Methods for mRNA Detection and Their Application
in Cell Biology and Pathology

Tadashi YAMAMOTO

*Department of Pathology, Institute of Nephrology,
Niigata University School of Medicine
(Director: Itaru KIHARA)*

By molecular biology new important proteins and peptides have been cloned. Detection, localization and quantitation of these proteins and peptides in cells, tissues or organs are aimed in cell biology or pathology. Immunological techniques using antibodies as probes have been employed for this purpose, however, antibodies against the newly-discovered substances are often unavailable. To solve the problem, methods to detect mRNA using nucleic acids as probes are recently devised. This review introduces two representative techniques to detect mRNA in total cellular RNA extracted from cell or tissue samples and to localize mRNA in tissue sections. Ribonuclease (RNase) protection assay is more simple, sensitive and quantitative than Northern blot analysis for detection of mRNA in total cellular RNA samples. In addition, expression of several different mRNAs can be examined in a single sample by this method using multiple probes. In situ hybridization is a method to localize mRNA in cells in tissue sections. As their applications presented are expression of mRNA for cytokines and growth factors in glomeruli of rats with experimental glomerulonephritis and localization of mRNA for type A atrial natriuretic peptide receptor in glomeruli.

Key words: mRNA, Ribonuclease protection assay, In situ hybridization

メッセンジャー RNA

Reprint requests to: Tadashi YAMAMOTO,
Department of Pathology, Institute of
Nephrology, Niigata University School
of Medicine, Asahimachi-dori 1,
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部腎研究施設病理形態学部門
山 本 格

はじめに

近年の分子生物学の進歩により生物学的に重要な蛋白質が次々に核酸レベルでクローニングされ、その構造が明らかになっている。細胞生物学や病理学の研究においてこのような蛋白質の組織分布、細胞局在、それらの時間的変化などを知ることは重要である。そのためには、これまではその蛋白質を精製してそれに対して抗体を作製し、それをプローブとして用いた免疫学的手法が主に行われてきた。しかし、新しく核酸レベルでクローニングされた蛋白質に対する抗体がすぐに手に入ることは少ない。そこでクローニングされた核酸またはその塩基配列から核酸を合成しそれらをプローブに用いて mRNA を検出する方法が工夫されている。本稿ではそれらの方法を概説しその応用例を紹介する。

mRNA 検出法と免疫学的検出法 (表 1)

さまざまな生体物質の有無が抗体を用いた免疫学的検出法で抗原として検出されてきた。この方法は組織標本上の抗原を検出する免疫組織化学法とウエスタンブロット法のように組織抽出液中の抗原を検出する方法に大別される。免疫学的検出法は抗体が市販されていれば入手しやすく、手法が簡単で確立しており、蛋白質以外の糖や脂質なども検出できるなどの利点がある。しかし、分子生物学的にクローニングされた新しい蛋白質に対する抗体の入手は難しいし、最近次々と発見されているサイトカインなどのように微量しか作られず、作られても細胞内に貯蔵されないですぐに放出されるようなものは免疫学的手法では検出ににくい。また、ホルモンなどでは免疫学的手法で検出された部位がその産生部位ではなく

受容体と結合しているものを検出している場合もある。

このような免疫学的検出法の難点を克服する方法として核酸をプローブに用いて組織標本や組織抽出液中の mRNA を検出する方法がいくつか工夫されてきた。それらは免疫学的検出法の難点を補ってはいるが蛋白質の産生細胞しか分からず、また、必ずしも mRNA 量が産生される蛋白質の量をしめすとは限らないことに注意せねばならない。

核酸プローブと mRNA 検出法

mRNA を検出するにはその mRNA に相補的に結合する核酸をラジオアイソトープなどで標識したものをプローブに用いる。このような mRNA に相補的に結合する塩基配列の核酸プローブをアンチセンスプローブと呼ぶ (mRNA と同じ塩基配列で mRNA に結合できない核酸プローブはセンスプローブと呼び、しばしばコントロールプローブとして使われる)。核酸プローブには DNA, RNA, 合成オリゴヌクレオチドがあるがそれぞれの特長を表 2 に掲げた。これらの中で mRNA の検出には RNA プローブが最も適していると考えられる。

核酸プローブの標識物質としては放射線物質として ^3H , ^{32}P , ^{35}S , 非放射線物質としては biotin, 蛍光色素, digoxigenin などが主に使われている。一般的には放射線物質標識プローブの方が非放射線物質標識プローブより検出感度が良く、広く使われている。しかし、使用方法、場所、期間など制約も多いことや、非放射線物質を標識したプローブを使う方法の検出感度が最近良くなってきたため非放射線物質を標識したプローブを用いる方法が徐々に普及し始めている。

核酸プローブを用いて組織や細胞の mRNA を検出

表 1 抗原検出法と mRNA 検出法の比較

	抗原の検出	mRNA の検出
主な検出方法	免疫組織化学 ウエスタンブロット法など	In Situ Hybridization ノーザンブロット法など
プローブ 特異性	抗体 高い	DNA, RNA, oligonucleotides 高い～やや低い
検出方法の容易性	容易	やや難易
プローブ獲得の容易性	容易～やや難易	比較的容易
その他の利点	蛋白以外の糖質、脂質も可 細胞内外の分布を見れる	蛋白産生細胞を同定できる 新しく cDNA クローニングされたものも検出見れる
その他の不利な点	抗原の存在部位がその産生 部位とは限らない	検出感度がやや低い 蛋白質の産生細胞しか分からない 蛋白質の産生量とは必ずしも相関しない

表 2 各種核酸プローブの特長

プローブ	利 点	難 点
DNA	プローブの入手が容易 プローブが安定である	二本鎖のため互いに競合する プローブの変性が必要
合成 オリゴヌクレオチド	プローブを合成できる 一本鎖で安定である 組織の浸透性が良い	標識法に限られている ハイブリッドが不安定
RNA	一本鎖で安定である ハイブリッドが安定 非特異的結合を除ける	サブクローニングが必要

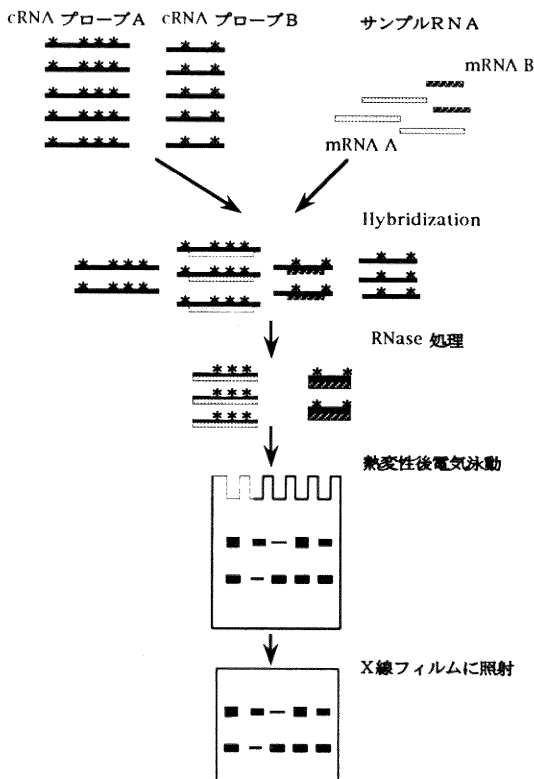


図 1 RNase Protection Assay

する方法には組織や細胞から RNA を抽出しその中の mRNA を検出する方法と組織標本上の mRNA を検出する方法に大別される。ノーザンブロット法は前者の代表的な方法で組織や細胞から抽出した RNA をゲル電気泳動し、それをニトロセルロース膜などの支持膜に転写しそれを核酸プローブで検出する方法で免疫学的手法のウェスタンブロット法に相似する。しかし、最近それよ

り感度良く mRNA を検出する方法として ribonuclease (RNase) protection assay 法が開発された¹⁾。この方法は液相で mRNA と標識 RNA プローブを結合 (ハイブリダイズ) させ、二本鎖 RNA を作製し、結合しなかった一本鎖の標識 RNA プローブを RNase で分解し、二本鎖を形成したため RNase で分解されなかった標識 RNA プローブをゲル電気泳動後、ゲルを乾燥しオートラジオグラフィーで検出するものである (図 1)。また、組織標本上の mRNA を標識核酸プローブを用いて検出する方法が In situ hybridization (ISH) 法である²⁾³⁾。

RNase protection assay 法とその応用

ノーザンブロット法に比較して RNase protection assay 法が優れているのは検出感度が高いばかりでなく、一つの RNA サンプルでいくつかの mRNA を同時に検出できたり、その量を定量することも可能であることである。いくつかの mRNA を同時に検出するには RNA プローブの長さを変えたものを用意しなければならない。

図 2 に私どもが検索した例を示す。これはヒトのメサンギウム増殖性糸球体腎炎の動物モデルである抗 Thy-1 腎炎⁴⁾ を惹起したラットから経時的に糸球体を単離し、そこから RNA を抽出しそのなかの各種サイトカイン、増殖因子などの mRNA の発現を ³²P 標識 RNA プローブを用いた RNase protection assay 法で検出したオートラジオグラフィーの写真である。抗 Thy-1 腎炎はラットの糸球体メサンギウム細胞に Thy-1 抗原があることを利用し、ラットにウサギ抗ラット胸腺細胞抗体 (ATS) やマウス抗ラット Thy-1 モノクローナル抗体 (OX-7) を投与して作製している。これらの抗体を投与後 1 時間 (1h), 1 日 (1d), 4 日 (4d), 10 日 (10d) 後の糸球体のサイトカイン、増殖因子 mRNA の発現パターンは両モデルでほとんど同じで IL-1β は

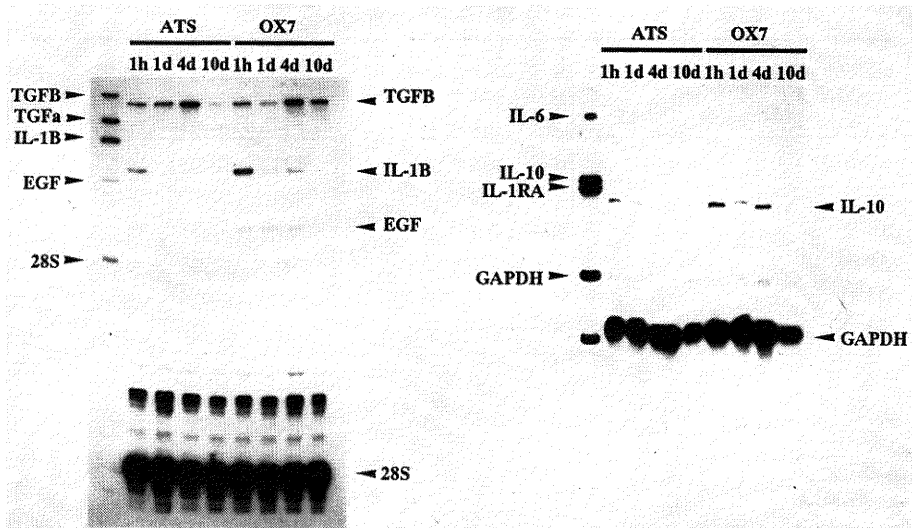


図2 RNase protection assay で Thy-1 腎炎の糸球体から検出されたサイトカインの増殖因子の mRNA (写真は左端のプロープのバンド)

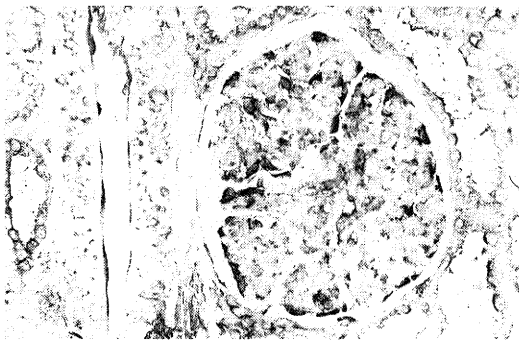


図3 Digoxigenin 標識 RNA プロープを用いた In situ hybridization 法で糸球体上皮細胞に検出された type A 心房性ナトリウム利尿ペプチド受容体

1h>>4d, IL-10 は 1h=4d>1d, PDGF は 4d>1d, TGFβ は 4d>1h>10d/1d, EGF は 1h=1d=4d の順に mRNA の発現量が多いのが分かる。

In situ hybridization 法とその応用

組織標本上で mRNA を検出する方法が In situ hybridization 法で、核酸プロープの標識には放射性同位元素では ³⁵S が良く使われる。その理由は ³²P ではエネルギーが強すぎて放射線がプロープ結合部位周囲に飛び散り、細胞局在が分かりにくいし、³H ではエネルギーが弱く暴露時間が長くなるためである。使用に制限

の多い放射性同位元素に替わり、最近では放射性同位元素を用いないプロープが使われるようになってきている。以前は感度が放射性同位元素標識プロープに劣っていたが最近感度の良いものが開発されている。その中で私も digoxigenin 標識プロープを好んで用いている。図3はそれを用いて糸球体での心房性ナトリウム利尿ペプチドのA型受容体サブタイプの発現を調べたものである。これまで心房性ナトリウム利尿ペプチドは腎糸球体に結合し、糸球体での cGMP 合成を促進し、糸球体濾過を促進することが分かっていたが、糸球体を構成する3種類の細胞、糸球体上皮細胞、メサンギウム細胞、糸球体内皮細胞のうちどの細胞に作用するのか明らかではなかった。また、心房性ナトリウム利尿ペプチドの受容体には3種類のサブタイプがあり、そのうちの生物活性の無いC型受容体は糸球体上皮細胞にあるが、生物活性のあるA, B受容体のいずれが糸球体にあるのか、あるならどの細胞にあるのかは分かっていた。私どもの In situ hybridization 法の結果から糸球体上皮細胞には心房性ナトリウム利尿ペプチドのA型受容体があることが示され、この細胞が糸球体の濾過調節に関与していることが明らかになった⁵⁾。

む す び

細胞生物学や病理学において近年普及している mRNA の検出法のうち、RNA を細胞や組織から抽出してその

中の mRNA を検出する方法として RNase protection assay, 組織標本上で mRNA を検出する方法として In situ hybridization 法を紹介し, その応用例を示した. 原稿枚数の制限もあり詳細は省かざるをえなかった. このような手法をご自身の研究に用いたい方は私どもの研究室を訪ねていただければ幸いである.

参 考 文 献

- 1) **Mapping of RNA with ribonuclease and radiolabeled RNA probes.** In *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd edition, pp.7.71~7.78, edited by C. Nolan, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
 - 2) *In Situ Hybridization, Principle and Practice*, edited by J.M. Polak and J.O'D. McGee, Oxford Science Publications, Oxford, 1990.
 - 3) **Fleming, K.A., Evans, M., Claire Ryley, K., Franklin, D., Lovell-Badge, H. and Morey, A.L.:** Optimization of non-isotopic in situ hybridization on formalin-fixed, paraffin-embedded material using digoxigenin-labelled probes and transgenic tissues. *J. Pathol.* **167**: 9~17, 1992.
 - 4) **Yamamoto, T. and Wilson, C.B.:** Quantitative and qualitative studies of antibody-induced mesangial cell damage in the rat. *Kidney International* **32**: 514~525, 1987.
 - 5) **Yamamoto, T., Feng, L., Mizuno, T., Hirose, S., Kawasaki, K., Yaoita, E., Kihara, I. and Wilson, C.B.:** Expression of mRNA for natriuretic peptide receptor subtypes in bovine kidney. *Am. J. Physiol.* (in press).
-