

### 3-2-3 細胞内の遺伝子の発現を観る (*in situ* 遺伝子発現検索法)

#### 概要

*in situ* 遺伝子発現検索法は、試料中における遺伝子発現の空間的部位を試料中にあるがままに (*in situ*) 明らかにするための方法である。試料が十分小さく透明であるか、あるいは漂白などの操作により透明化できるものであれば、免疫染色はホルマウントで (試料全体を用いて) 行うことができ、この手法は、試料の中での遺伝子発現部位について三次元的な発現パターンを一挙に得ることができる。もし試料が大きすぎたり不透明な場合は、試料から切片を調製し、これに適用すればよい。また場合によってはホルマウントに適用した後、これから切片を作製して観察してもよい。この章では学習院大学理学部で使用されている各種 *in situ* 遺伝子発現検索法のうち、**(A)** ホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション (岡本研)、**(B)** *in situ* リポーター遺伝子発現検索法 (安達研) を取り上げて解説する。

#### **(A) ホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション (アフリカツメガエルの胚を試料として)**

##### 1. はじめに

*in situ* ハイブリダイゼーションは検索したい特異的な mRNA が存在する部位を示す手法である。まず検出したい mRNA に対して相補的な標識化アンチセンスプローブを *in vitro* で合成しておき、次にこのプローブを試料に加えて試料中の mRNA にハイブリダイズさせることにより mRNA を可視化する。通常の *in situ* ハイブリダイゼーションでは、現在は非放射性プローブが用いられる。この場合プローブには市販の特異抗体で認識できる化学基質グループが標識として含まれる。こうした化学基質グループは、プローブ合成に用いられるヌクレオシド 3 リン酸の 1 つに結合している。合成の間にこれはプローブに取り込まれるが、プローブが相補的な mRNA に結合するのを防げない。こうした目的に用いられる代表的な化学基質グループはジゴキシンゲン (DIG) やフルオレッセイン (Fluorescein) である。

ホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーションのためには、大きなプローブが細胞内に透過できるようにするため、ハイブリダイゼーション反応液に界面活性剤などを加えて、試料の浸透性を上げることが必要である。ハイブリダイゼーション反応の後、試料を徹底的に洗浄してから、市販の酵素を結合した特異抗体、例えばアルカリホスファターゼ結合抗ジゴキシンゲン抗体を加える。さらに適切な基質液を添加すると、色のついた不溶性の沈殿物ができることによって、ハイブリダイゼーション反応が起きた部位を明らかにできる。すなわち、発色は酵素があった場所に生じ、それはプローブが結合した場所を示し、したがって mRNA がもともとそこに存在していたことを示すことになる。なお発色に蛍光の基質を用いること

執筆者 生命科学科 教授 岡本治正 ([harumasa.okamoto@gakushuin.ac.jp](mailto:harumasa.okamoto@gakushuin.ac.jp))  
生命科学科 助教 本郷育子 ([ikuko.hongo@gakushuin.ac.jp](mailto:ikuko.hongo@gakushuin.ac.jp))  
生命科学科 教授 安達卓 ([Takashi.Adachi-Yamada@gakushuin.ac.jp](mailto:Takashi.Adachi-Yamada@gakushuin.ac.jp))

によって、蛍光顕微鏡下で可視化することもできる。この項ではアフリカツメガエルの胚を試料として解説する。

## 2. 実験手順

実験を始める前に。

RNase の汚染がないように注意。

器具は滅菌済のものを使用。

ハイブリダイゼーションが終わる迄は手袋着用が好ましい。

プロトコールに温度の指定がない時は室温。

### ① 胚の固定

下記の液量は目安。胚の数に応じて液量、シャーレの大きさを変える。

胚を移すときは、パストゥールピペットの先を切って吸い口を広げ、滅菌したものをを用いる。

- 1) 1/2×MBS 3ml を入れた直径 35mm シャーレ (Falcon 3001) に胚を移す。(液量 3ml に対し、上限 100 ケ)
- 2) シャーレを手前に傾け、胚が被る位の液を残して 1/2×MBS を取り除き、MEMFA 3ml を入れ、5 分置く。
- 3) MEMFA 3ml を入れ換える。2 時間、ゆっくりと振盪させながら固定。又は 30 分間固定後、4°C で 12-16 時間静置。
- 4) 1×MEM 3ml に置き換える、5 分。
- 5) エタノール 3ml に置き換える、5 分×2。
- 6) エタノール 3ml に置き換える。スクリュウキャップ付ガラスバイアルにエタノールを入れ、胚を移し-20°C 保存。

### ② 水和

1) エタノール (500  $\mu$  l/1 穴) を入れた 24 穴プレートを用意し、固定した胚 (固定後、-20°C でエタノール中に 3 日間以上置いた胚 1-10 ケ/1 穴) を移す。

2) エタノール除き、メタノール (500  $\mu$  l/1 穴) を入れる。

下記の順に溶液を置き換える。ゆっくり振盪。

1. メタノール (500  $\mu$  l/1 穴) 5 分×2
2. 75% メタノール・25% PBST (650  $\mu$  l/1 穴) 5 分
3. 50% メタノール・50% PBST (650  $\mu$  l/1 穴) 5 分
4. 25% メタノール・75% PBST (650  $\mu$  l/1 穴) 5 分
5. PBST (650  $\mu$  l/1 穴) 5 分×2

### ③ 漂白

1) PBST を除き、漂白液 (650  $\mu$  l/1 穴) を入れて氷を入れた発泡スチロール内に置く。発泡スチロールごと 4-8°C に設定した incubator に入れ、12-15 時間静置 (免疫染色の場合と異なり、真っ白にする必要はない)。

- 2) PBST (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換えてゆっくりと振盪させながら洗浄、5 分 $\times$ 2。
- 3) MEMFA (650  $\mu$  l/1 穴) で 20 分間固定。ゆっくり振盪。
- 4) 2mg/ml glycine in PBS (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換える。5 分 $\times$ 2、ゆっくり振盪。
- 5) PBST (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換えてゆっくりと振盪させながら洗浄、5 分。

④ ハイブリダイゼーション (water bath を使用)

下記の液量はスクリーキャップ付ガラスバイアル(マルエム No. 2 ) 使用時の 1 バイアル当たりの量。胚の数は 1 バイアルにつき 1-10 ケ。

- 1) ガラスバイアルの口まで PBST を入れ、胚をそっとバイアルに移す。
- 2) 約 200  $\mu$  l の PBST を残して液を除き、hybridization buffer 200  $\mu$  l をバイアルの壁伝いにそっと加える (一度に全て置き換えるよりも、胚に hybridization buffer が馴染みやすい。下層は hybridization buffer、上層は PBST) 。
- 3) hybridization buffer 200  $\mu$  l に置き換える。60 $^{\circ}$ C、5 分。  
再度 hybridization buffer 200  $\mu$  l に置き換えて prehybridization。60 $^{\circ}$ C、2 時間。
- 4) probe 液 (200-500ng DIG 又は Fluorescein 標識 RNA probe/1ml hybridization buffer) 200  $\mu$  l を 85 $^{\circ}$ C で 5 分間熱処理後、氷中に 5 分置く。
- 5) 3) のバイアルから hybridization buffer を除き、4) の probe 液 200  $\mu$  l を入れて hybridization。60 $^{\circ}$ C、12 時間。

⑤ RNase 処理

RNase 廃液を洗い場に広がらないように流しの排水口に捨て、しばらく水を流す。

- 1) 2 $\times$ SSC 500  $\mu$  l に置き換えて洗浄。60 $^{\circ}$ C、5 分。
- 2) 24 穴プレートに 2 $\times$ SSC (650  $\mu$  l/1 穴) を入れ、胚を移す。  
RNase A (10  $\mu$  g/ml)  $\cdot$  RNase T1 (0.01units/ml) in 2 $\times$ SSC (500  $\mu$  l/1 穴) に置き換える。  
プレート本体と蓋の隙間をビニールテープで塞ぎ、37 $^{\circ}$ C、20 分間保温。probe により RNase の濃度を変える必要が有る。
- 3) 2 $\times$ SSC (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換えて 3 分置く。0.2 $\times$ SSC (700  $\mu$  l/1 穴) に置き換えてプレート本体と蓋の隙間を塞ぐためにビニールテープを巻き 60 $^{\circ}$ C で洗浄、15 分 $\times$ 2。
- 4) MABT (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換えて 3 分置く。
- 5) 新しい 24 穴プレートに MABT (650  $\mu$  l/1 穴) を入れ、胚を移し 3 分置く。胚を移す時はプラスチックスポイトの先を切って吸い口を広げ、切り口を軽く炙ったものを使い、使用後捨てる。RNase 処理に使った 2) のプレートも捨てる。

⑥ 抗体反応

- 1) 2% blocking reagent in MAB-Triton (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換える。1 時間ゆっくり振盪。
- 2) probe の標識物質に対する抗体を 2% blocking reagent in MAB-Triton で希釈したものを抗体液とする。

AP-抗 DIG 抗体 : 2% blocking reagent in MAB-Triton =1:2000 又は

AP-抗 Fluorescein 抗体 : 2% blocking reagent in MAB-Triton=1:10000、いずれかの

適切な抗体液 (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換える。

4°C で 0/N (又は室温で 4 時間), ゆっくり振盪。

3) 2% blocking reagent in MAB-Triton (650  $\mu$  l/1 穴) で洗浄。5 分、ゆっくり振盪。

4) MABT (650  $\mu$  l/1 穴) で 15 分  $\times$  2 + 1 時間  $\times$  5、ゆっくりと振盪させながら洗浄。4°C、0/N 洗浄は、室温で 1 時間洗浄と同等とみなす。

#### ⑦ 発色反応

1) alkaline phosphatase buffer (使用時、+ 最終濃度 2mM levamisol) (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換えてゆっくりと振盪させる、30 分間。

2) alkaline phosphatase buffer で 9 倍希釈した BM purple (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換える。アルミホイルを被せて遮光し、発色させる。

3) 十分に発色させた後、PBST (650  $\mu$  l/1 穴) で洗浄する。5 分  $\times$  2、ゆっくり振盪。

(附) 二重染色の場合 (2 種類の mRNA の可視化)

上記⑦発色反応 2) の後, 3) PBST で 5 分間洗浄し、以下の操作を行う。

・ MAB  $\cdot$  10mM EDTA に置き換えて 65°C, 10 分間処理後、氷上に置き 5 分間冷やす。

・ メタノール処理、5 分  $\times$  2。75%メタノール  $\cdot$  25% MABT、50%メタノール  $\cdot$  50% MABT, 25%メタノール  $\cdot$  75% MABT、MABT の順に液を置き換えて水和させる。

・ 2% blocking reagent in MAB-Triton に置き換えて 1 時間、ゆっくり振盪。

・ 抗体反応 (AP-抗 DIG 抗体又は AP-抗 Fluorescein 抗体) を 4°C、0/N で行う。

・ 洗浄は 1 時間  $\times$  3 + 4°C で 0/N。BCIP (20  $\mu$  l in 1ml alkaline phosphatase buffer) で発色させた後、PBST で洗浄。

4) MEMFA  $\cdot$  0.2% glutaraldehyde (650  $\mu$  l/1 穴) に置き換えてゆっくりと振盪させながら 2 時間固定。プレート本体と蓋の隙間をビニールテープで塞ぎ、4°C 保存。

5) 写真撮影時、MBS に置き換える。撮影後、MEMFA  $\cdot$  0.2% glutaraldehyde に置き換えて、プレート本体と蓋の隙間をビニールテープで塞ぎ、4°C 保存。

### 3. 試薬

● 【DEPC 処理水 1 l (0.05%)】 特に注意しない限り、以下に記載する高濃度のストック用原液の希釈に用いる。

1) 1 l 試薬瓶に MilliQ 水 1 l (瓶の目盛り使用) と攪拌子を入れる。

DEPC (Sigma diethylpirocarbonate、4°C) 500  $\mu$  l を加えて攪拌、放置。

攪拌と放置時間を合わせて 2-3 時間。(DEPC は水と混ざりにくいのでしっかりと攪拌する)

2) オートクレーブ 121°C、40 分。(DEPC を分解させる)

● 【10  $\times$  MBS 1 l】

NaCl 51.42g

KCl	0.74g
HEPES	11.92g
NaHCO <sub>3</sub>	2.02g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.02g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.78g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.60g

1 l ビーカー(+攪拌子)に MilliQ 水を約 800ml 入れ、上記の試薬を上から順に 1 種類ずつ加えて攪拌しながら溶かす(順序を変えたり、溶けないうちに次の試薬を加えると沈殿を生じることがあるので注意)。pH を 1N NaOH で 7.5 に調整し、室温に戻した gentamicin sulfate (Sigma, 4°C) 200mg を加えて攪拌、溶解。MilliQ 水で 1 l にメスアップ後、ビーカーに戻す。0.22 μm フィルター(MILLIPORE STERIVEX-GF 0.22 μm Filter Unit with Filling Bell)に通し(50ml 注射筒使用)、750ml 容器(Falcon 3028)2 ヶに分けて入れる。4°C 保存。

● 【MEMFA (用時調製) 50ml】

- 1) オートクレーブ滅菌済 50ml メスシリンダー(+攪拌子、固定液調製専用)に DEPC 処理水を約 30ml 入れ、60-65°C の水浴中で攪拌しながら温めておく。
- 2) paraformaldehyde 2g と 1N NaOH 125 μl を入れ、約 40ml になるように DEPC 処理水を加える。温めながら攪拌し、完全に溶けたら水中で冷やす。
- 3) 2) を 50ml チューブに移して DEPC 処理水を 45ml の目盛りまで加える。  
10×MEM 5ml を加え混合(使用するまで氷中保存、固定時に調製)。

● 【10×MEM 500ml】

- 1) 500ml ビーカー(+攪拌子)に MilliQ 水を約 450ml 入れ、MOPS 104.7g を加えて攪拌する。溶解後 pH7.4 に調整。
- 2) EGTA 3.80g を入れて溶かす(EGTA は pH 調整後に加えると溶けやすい)。
- 3) MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.25g を加えて溶解。MilliQ 水で 500ml にメスアップ。
- 4) pH を 7.4 に微調整後、MilliQ 水で 500ml にメスアップ。
- 5) 500ml 試薬瓶に移し、オートクレーブ 121°C、20 分。(オートクレーブ後、徐々に黄色味を帯びるが実験上問題はない)

● 【1×MEM 200ml】

250ml 容器(Falcon 3024)に 10×MEM 20ml を入れ、DEPC 処理水を容器の 200ml の目盛りまで加えて混合。これを 50ml チューブに decantation で移して使う。

● 【10×PBS 1l】

- 1) 1 l ビーカー(+攪拌子)に MilliQ 水を約 800ml 入れる。
- 2)

NaCl	80g
KCl	2.0g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(無水リン酸一水素 Na) 11.5g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(無水リン酸二水素 K) 2.0g

順に加えて溶解後、HCl で pH7.4 に調整。MilliQ 水で 1l にメスアップ。

3) 1 l 試薬瓶に移し、オートクレーブ 121°C、20 分。

● 【PBST (1×PBS・0.1% Tween20) 200ml】

250ml 容器(Falcon 3024)に 10×PBS 20ml を入れ、DEPC 処理水を容器の 200ml の目盛りまで加える。10% Tween20 2ml を入れて混合。これを 50ml チューブに decantation で移して使う。

● 【10% Tween20 10ml】

15ml チューブに Tween20 (Sigma Tween20) 1ml と DEPC 処理水 9ml を入れて混合。

● 【漂白液(用時調製) 10ml】

1) 15ml チューブに、DEPC 処理水を約 6ml 入れる。

2) 2×SSC 2.5ml、formamide 500 μl、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 333 μl を加えて、DEPC 処理水で 10ml にメスアップ。

● 【20×SSC 1 l】

1) 1 l ビーカー(+攪拌子)に MilliQ 水を約 800ml 入れる。

2) NaCl 175.3g

NaOCCOCH<sub>2</sub>C(OH)(COONa)CH<sub>2</sub>COONa・2H<sub>2</sub>O(クエン酸三 Na 二水和物) 88.2g

を順に加えて溶解後、NaOH で pH7.0 に調整。MilliQ 水で 1 l にメスアップ。

3) 1 l 試薬瓶に移し、オートクレーブ 121°C、20 分。

● 【2mg/ml glycine in PBS 1l】

1l ビーカー(+攪拌子)に DEPC 処理水を約 950ml 入れ、10×PBS 10ml を加えて攪拌し、glycine 2g を入れて溶かす。1l にメスアップ後、1l 試薬瓶に移し、オートクレーブ 121°C、20 分。

● 【hybridization buffer 50ml】

		(最終濃度)
formamide	25 ml	(50%)
20×SSC	12.5 ml	(5×)
100mg/ml tRNA	500 μl	(1mg/ml)
100mg/ml heparin	50 μl	(100 μg/ml)
50×Denhart' s solution	1.0 ml	(1×)
10% Tween20	500 μl	(0.1%)
100mg/ml CHAPS	500 μl	(0.1%)
0.5M EDTA(pH8.0)	1.0 ml	(10mM)

up to 50 ml (DEPC 処理水)

下記の手順に従い、調製する。

1) formamide (ナカライ 脱イオン化ホルムアミド分子生物学用。小分けし、 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。漂白液の調製時にも使用) : 25ml に小分けしたものを1チューブ、解凍。

2)  $20\times\text{SSC}$  12.5ml を1)のチューブに加えて混ぜる。チューブを氷中に置く。

3) 100mg/ml tRNA 500  $\mu\text{l}$  を2)に加える。

100mg/ml tRNA の調製 : tRNA (Roche109495、 $-20^{\circ}\text{C}$ ) を室温に戻してから量る。100mg をマイクロチューブに入れ、DEPC 処理水 1.0ml を加えて溶かす。 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存、薄茶色になっても使用可。

4) 100mg/ml heparin 50  $\mu\text{l}$  を2)に加える。

100mg/ml heparin の調製 : heparin (Sigma H3393、 $4^{\circ}\text{C}$ ) を室温に戻してから量る。100mg をマイクロチューブに入れ、DEPC 処理水 1.0ml を加えて溶かす。 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

5)  $50\times\text{Denhart}'\text{s}$  solution 1.0ml を2)のチューブに加える。

$50\times\text{Denhart}'\text{s}$  solution (小分け、 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存)の調製 :

(最終濃度)

polyvinylpyrrolidone (Sigma) (1%)

Ficoll 400 (Amersham) (1%)

BSA (Sigma FractionV) (1%)

200ml ビーカー(+攪拌子)に DEPC 処理水を約 150ml 入れ、polyvinylpyrrolidone 2g、Ficoll 400 2g、BSA 2g を順に加え、攪拌、溶解。DEPC 処理水で 200ml にメスアップ後ビーカーに戻す。0.22  $\mu\text{m}$  フィルターを通し、チューブへ移す。10ml ずつ 18 チューブ、残りは 1.0ml ずつマイクロチューブに小分け、 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

6) 10% Tween20 500  $\mu\text{l}$  を2)に加える。

7) 100mg/ml CHAPS 500  $\mu\text{l}$  を2)に加える。

100mg/ml CHAPS (Sigma C9426)の調製 : 1g を 15ml チューブに入れ、DEPC 処理水を加えて 10ml とし、溶解。 $4^{\circ}\text{C}$ 保存。使用頻度が低い時は、小分け、 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

8) 0.5M EDTA (pH8.0) 1.0 ml を2)に加え、DEPC 処理水で 50ml の目盛りに合わせ混ぜる。

9) 使いやすい量に小分けし、 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。使用頻度が低い時は $-80^{\circ}\text{C}$ 保存。

● 【0.5M EDTA (pH8.0) 11】

1 l ビーカー(+攪拌子)に MilliQ 水を約 800ml 入れ、EDTA  $\cdot$  2Na  $\cdot$  2H<sub>2</sub>O 186.1g を加えて、攪拌させながら NaOH で pH8.0 に合わせる。pH が 8.0 に近づくと、溶け始める。MilliQ 水で 1 l にメスアップ。1 l 試薬瓶に移し、オートクレーブ  $121^{\circ}\text{C}$ 、20 分。

● 【標識 RNA probe の合成】

Roche DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) を使用

RNA 用のオートクレーブ滅菌済 MilliQ 水を用意。

1) 1.5ml マイクロチューブに下記のを順に加え、チップ(ピペットマン)の中に

吸い込んで吐き出す操作を緩やかに繰り返して混ぜる。spin down、 $37^{\circ}\text{C}$ 、2 時間。

autoclaved MilliQ water

13  $\mu\text{l}$

10×DIG (Fluorescein) RNA labeling mixture	2 μl
10× transcription buffer	2 μl
1 μg/μl template DNA (直鎖化したもの)	1 μl
20 U/μl RNase inhibitor	1 μl
20 U/μl T7 (SP6, T3) RNA polymerase	1 μl
<hr/>	
total volume	20 μl

- 2) 10U/μl RNase-free DNase I を 2μl 加え、vortex、spin down。37°C、15 分間。
  - 3) 0.5M EDTA(pH8.0) 0.8μl を加えて vortex, spin down。4 M LiCl 2.5μl、EtOH 75μl を加え、混合。-20°C、1 時間 (O/N でも構わない)。4°C、12,000rpm、15 分間、遠心。
  - 4) 上清を除き、冷 70% EtOH 500μl を加え、vortex で激しく攪拌。ペレットがチューブの底から離れたら OK (ペレットに付いた塩を除くため。塩濃度が高いと溶けにくい)。4°C、12,000rpm、5 分間、遠心。
  - 5) 上清を除き、冷 70% EtOH 300μl を加え、攪拌せずに 4°C、12,000rpm、3 分間、遠心。
  - 6) 上清を完全にとり除く。チューブの蓋を開けた状態で、上にキムワイプを掛け、5 分間、風乾 (標識 RNA probe のペレットは乾燥させすぎると溶けにくくなるので注意)。
  - 7) DEPC 処理水 20μl に溶かす。DEPC 処理水を加えた後、ペレットの様子をよく見ながら (水分を含むと透明になる) 膨潤するのを待つ。
  - 8) カラム(Roche 11 814 427 001、50 mini Quick Spin RNA Columns、4°C)を使い、取り込まれなかった NTP を添付のプロトコールに従い取り除く。
- 【RNase A(10 μg/ml)・RNase T1(0.01units/ml) in 2×SSC(用時調製) 10ml】  
 ピペットマン本体に RNase が付着しないように、15ml チューブより径の広い 50ml チューブを使う。50ml チューブに 2×SSC を 10ml 入れ、RNase A(10mg/ml) 10 μl, RNase T1(10units/ml) 10 μl を加えて混合。
  - 【RNase A(10mg/ml) 10ml】  
 RNase A (Roche 109169、100mg、4°C)を室温に戻す。蓋を開ける時、飛散しないように気を付ける。購入した瓶に直接 TE(pH8.0) 10ml をそっと入れる。蓋を閉めて瓶をゆっくりと動かしながら溶かす。50ml チューブに移し、10 分間煮沸。室温に戻した後、マイクロチューブに小分けし、-20°C保存。
  - 【RNase T1(10 units/ml) 1ml】  
 RNase T1(Roche 109193、100,000 units/ml、4°C)を使用。内蓋に液が付いていることがあるので開けるときの気を付ける。マイクロチューブに 0.1M NaOAc(pH5.2) (オートクレーブ滅菌済 MilliQ 水で 3M NaOAc を希釈) を 990 μl 入れ、RNase T1 を 10 μl 加えて混ぜる (1000 U/ml)。10 分間、煮沸。室温に戻した後、マイクロチューブに 10 μl とり、0.1M NaOAc(pH5.2) を 990 μl 加えて混合 (10 U/ml)。小分けし、-20°C保存。1000 U/ml も同様に小分けする。なるべく凍結融解を繰り返さない。
  - 【TE(pH8.0) (10mM Tris・Cl, 1mM EDTA) 1 l】



1 l 試薬瓶に MilliQ 水を約 900ml 入れる。1M Tris · Cl (pH8.0) 10ml、0.5M EDTA (pH8.0) 2.0ml を加える。MilliQ 水を 1 l の目盛りまで入れて混合。オートクレーブ 121°C、20 分。

● 【1M Tris · Cl (pH8.0) 1l】

1 l ビーカー(+攪拌子)に MilliQ 水を約 800ml 入れ、Tris base (Sigma Trizma Base) 121.1g を加えて溶かし、HCl で pH8.0 に調整。MilliQ 水で 1 l にメスアップ。1 l 試薬瓶に移し、オートクレーブ 121°C、20 分。

● 【3M NaOAc (pH5.2) 50ml】

50ml ビーカー(+攪拌子)に MilliQ 水を約 40ml 入れ、NaOAc · 3H<sub>2</sub>O 20.4g を加えて溶かし、CH<sub>3</sub>COOH (酢酸) で pH5.2 に調整。MilliQ 水で 50ml にメスアップ。試薬瓶に移し、オートクレーブ 121°C、20 分。

● 【MABT (MAB · 0.1% Tween20) 200ml】

250ml 容器 (Falcon 3024) に MAB 200ml を入れ、10% Tween20 2.0ml を加えて混合。これを 50ml チューブに decantation で小分けしたものを使う。

● 【MAB 500ml】

500ml ビーカー(+攪拌子)に MilliQ 水を約 400ml 入れ、C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (マレイン酸) 5.8g、NaCl 4.3g、NaOH (和光, 粒状) 約 3.5g を順に加えて攪拌し、溶かす。NaOH で pH7.5 に調整し、MilliQ 水で 500ml にメスアップ。500ml 試薬瓶に移し、オートクレーブ 121°C、20 分。

● 【2% blocking reagent in MAB-Triton 500ml】

blocking reagent (Roche 096176, -20°C) を室温に戻す。500ml 試薬瓶(+攪拌子)に blocking reagent 10g を入れる。MAB を 500ml (瓶の目盛り)まで加えて軽く攪拌。この時点では溶けない。オートクレーブ 121°C、20 分。オートクレーブ滅菌後、攪拌、溶解。4°C 保存。50ml チューブに decantation で移し、用時 10% Triton を最終濃度 0.1% になるよう加えて使用する。4°C 保存。

● 【10% Triton 10ml】

15ml チューブに Triton (Sigma TritonX-100) 1ml と DEPC 処理水 9ml を入れて混合。

● 【alkaline phosphatase buffer (100mM Tris · Cl (pH9.5)、50mM MgCl<sub>2</sub>、100mM NaCl) 使用時、levamisol を加える 200ml】

1) 1M Tris · Cl (pH9.5) : 100ml ビーカー(+攪拌子)に MilliQ 水を約 80ml 入れ、Tris base (Sigma Trizma Base) 12.1g を溶かし、HCl で pH9.5 に調整後、100ml にメスアップ。100ml 試薬瓶に移し、オートクレーブ 121°C、20 分。

2) 0.5M MgCl<sub>2</sub> : MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (m. w. 203.3) 10.2g を MilliQ 水に溶かし、100ml 調製。オートクレーブ 121°C、20 分。

3) 200ml ビーカー(+攪拌子)に MilliQ 水 約 100ml を入れ、3M NaCl 6.7ml、1M Tris · Cl (pH9.5) 20ml、0.5M MgCl<sub>2</sub> 20ml の順に加えて攪拌し、MilliQ 水で 200ml にメスアップ。ビーカーに戻し、0.22 μm フィルターを通してポリプロピレン容器に入れる。使用時、チューブに必要量を移し、1M levamisol を最終濃度 2mM になるよう加える。

● 【3M NaCl 1 l】

1l ビーカーに攪拌子と NaCl 175.3g を入れ、MilliQ 水を約 950ml の目盛りまで加える。攪拌、溶解後 pH7.5 に調整。MilliQ 水で 1l にメスアップ。1 l 試薬瓶に移し、オートクレーブ 121°C、20 分。

● 【1M levamisol 1ml】 内因性アルカリフォスファターゼの阻害剤。

levamisol (Sigma (-)-Tetramisole hydrochloride) 0.241g をマイクロチューブに入れ、オートクレーブ滅菌済 MilliQ 水 1ml を加えて混ぜる。100  $\mu$ l を 9 チューブ分、残りを 10  $\mu$ l ずつ小分けし、-20°C 保存。

### 参考文献

- [1] 実験医学別冊 染色・バイオイメージング 実験ハンドブック 高田邦昭、斎藤尚亮、川上速人 編集 羊土社 (2006)
- [2] 実験医学別冊 注目のバイオ実験シリーズ 免疫染色 & *in situ* ハイブリダイゼーション 最新プロトコール 野地澄晴 編集 羊土社 (2006)

## (B) *in situ* リポーター遺伝子発現検索法 (ショウジョウバエを試料として)

### 1. はじめに

ショウジョウバエの個体において遺伝子発現を観察するため、いろいろな方法が開発されているが、ここでは、汎用されてきた 2 つの方法について解説する。

### 2. 間接蛍光抗体法による *lacZ* リポーター発現 ( $\beta$ -GAL) の検出 (翅原基の例)

エンハンサートラップ法は、Bellen *et al.* (1989) [1] によって開発された、内在性遺伝子の enhancer 活性を組織上で検出する方法である。大腸菌遺伝子 *lacZ* を minimal promoter に融合したものを、トランスポゾン P-element に入れてゲノム中へランダムに転移させ、挿入位置近傍の enhancer 活性に依存した *lacZ* 遺伝子発現を、*lacZ* 遺伝子産物  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -GAL) による X-GAL (基質) 加水分解産物の発色活性によって検出するものであった。mRNA を直接検出する *in situ* hybridization よりもはるかに簡便に、また  $\beta$ -GAL の安定性による高感度な検出ができたため急速に普及し、現在でももっとも汎用される遺伝子発現検出方法である。ただ、1 細胞レベルでの発現の精密な存否が問われたときに、X-GAL のもつ拡散性が解釈を困難にする問題が生じることから、今日では抗体により  $\beta$ -GAL 自体を検出することが多い。

### < 用意するもの >

PBS (Phosphate Buffer Saline, 1 回につき 3ml 要する)

PBT (成分は下記. 1 回につき約 3ml 要する)

固定液 (成分は下記. 1 回につき 600 $\mu$ l 要する)

1次抗体溶液（下記. 1回につき 200 $\mu$ l 要する）  
 2次抗体溶液（下記. 1回につき 200 $\mu$ l 要する）  
 先突ピンセット 2本（Fontax Taxal No.5 など）  
 解剖用ハサミ（アズワン No.13 小直両鋭など）  
 解剖皿 5枚（池本理化 ホールオベクトグラスなど）  
 透明マニキュア（100円ショップのもので OK!）  
 カバーガラス  
 スライドグラス

## < 方法 >

1. 解剖皿 5枚の各穴に PBS を 600 $\mu$ l ずつ入れる。
2. 管壁を登っている十分成長した 3令幼虫を 10匹, ピンセットでつまみ出して, PBS の入っている一つの解剖皿中に集める. ここで使うピンセットは極めて鋭利なので注意.  
先端をどこかに衝突させると二度と使えなくなるし, 足の上に落とせば怪我します!
3. ピンセットで混ぜて, 幼虫表皮に付いている餌などを洗い落とす。
4. 解剖する幼虫を一匹, 新しいPBS入りの解剖皿に移す. 黒い紙を敷くと観察し易い。
5. ビノキュラ下に移し, 解剖用ハサミで, 幼虫を約二等分になるように中央で切り, 頭側と尻側とに分ける. 成虫原基のうち翅原基は, 頭側の表皮の内側にある(図2参照)。

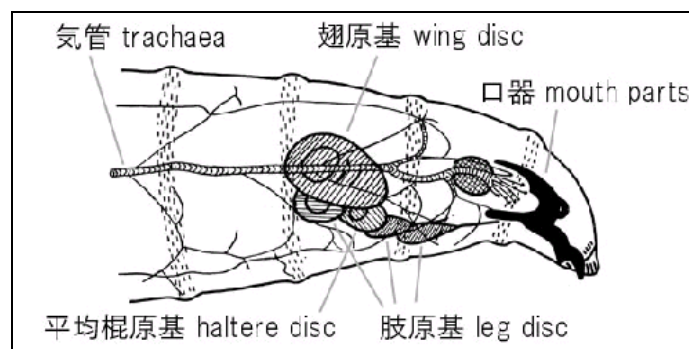


図 2. 各種の成虫原基の配置

6. 左手のピンセットで胴体を両側からそっと挟み, 右手のピンセットの片方の先端で頭から内部へ押し込み, 靴下をウラ返すように表皮を裏返す. 利き手が逆の人は左右逆。
7. 消化管（腹側に渦巻く大きな管）, 唾液腺などの各種分泌腺（口器の傍に根元がある長い袋状の器官）, 脂肪体（全身に広がる白濁した扁平な組織）などは不要で邪魔なので, ピンセットで取り除く. 必要な翅原基とその周辺組織は, 表皮に結合したままとする. この周辺組織とは, 成虫原基や気管（背側に 2本並ぶ銀色に光る太い管）, 脳中枢神経系（腹側表皮の裏側に付着, 図3）のことである。

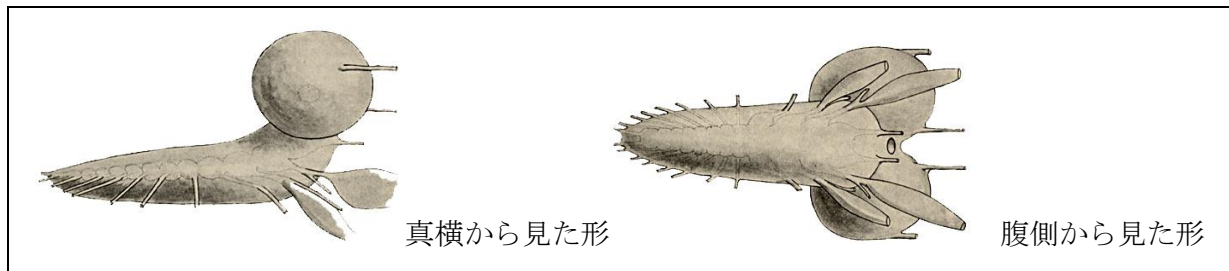


図 3. 脳中枢神経系の形態

8. 不要な組織の除去が終わったら表皮ごとピンセットでつかみ新しい PBS 中へ移す.
9. 残りの 9 個体を同様に解剖する. PBS が汚れてきたら, 新しい PBS に代える. それぞれ解剖が終わった個体は, 前に解剖が済んだ個体と同じ解剖皿に入れて, ためて置く.
10. ピペットマンで穴の中の PBS をできるだけ除去する. このとき組織を吸い込まないように注意する. 吸い込むと組織の形が破壊されてしまう.
11. 固定液 (4% パラフォルムアルデヒド, 0.1M PIPES バッファー pH6.9, 2mM EGTA, 1mM MgSO<sub>4</sub>) 600μl を穴に加え, すぐにピペッティングによってよく混ぜて (30 回程度), 約 15 分静置. 攪拌中はピペットマンを垂直に立てること. ここが最重要のポイント!
12. 固定液をなるべく除去し, 続いて PBT (0.02% TritonX-100 [界面活性剤] 入りの PBS) 600μl を加えて, ピペッティングでよく混ぜる.
13. PBT の除去 → 新しい PBT の添加 → 攪拌の操作を更に 2 回行って (合計 3 回洗って), 固定液の成分を十分に除去できたら, そのまま PBT 中に 10~15 分静置して, 組織内に滲み込んでいる残留固定液をさらに拡散・溶出させる.
14. また PBT を交換しピペッティングでよく混ぜ, 5 分静置. これをもう 1 回繰り返す.
15. 先端を切って太くしたチップで解剖した 10 個体を吸い, エッペンチューブに移す.
16. 組織を壊さないようにできるだけ PBT を除き, 1 次抗体溶液 (マウス抗  $\beta$ -GAL 抗体, Promega 製 Z3781, 200 倍希釈物, = 最終濃度約 10 μg/ml) を 200 μl 加えて, タッピング (指で弾く操作) によってよく混ぜる.
17. 37°C で 1 時間または 4°C 越夜で保温する.
18. 抗体溶液をできるだけ除去し, 続いて PBT 200μl を加え, タッピングでよく混ぜる.
19. PBT の除去 → 新しい PBT の添加 → 攪拌の操作を更に 2 回行って (合計 3 回洗って), 1 次抗体を十分に除去したら, そのまま PBT 中に 10~15 分静置して, 組織に滲み込んでいる残留 1 次抗体をさらに拡散・溶出させる.
20. また PBT を交換しピペッティングでよく混ぜ, 5 分静置. これをもう 1 回繰り返す.
21. できるだけ 1 次抗体溶液を除去し, DAPI (0.5 μg/ml) と 2 次抗体 (ロバの抗マウス immunoglobulin 抗体 Cy3 標識, Jackson ImmunoResearch 社製) の混合溶液 200 μl (5 μg/ml) を加え, タッピングしてよく混ぜて, 37°C で 1 時間または 4°C 越夜で保温.
22. 抗体溶液をできるだけ除去の後, PBT 200 μl を加え, タッピングしてよく混ぜる.

23. PBTの除去→新しいPBTの添加→攪拌の操作を更に2回行って(合計3回洗って), 1次抗体を十分除去したら, そのままPBT中に10~15分静置して, 組織にしみ込んでいる残留1次抗体をさらに拡散・溶出させる.
24. またPBTを交換しピペティングでよく混ぜ, 5分静置. これをもう1回繰り返す.
25. 以上の全過程が終了したら, 先端を切り取って入口を太くしたチップで吸い取り, PBT入りの解剖皿に移す. ピノキュラ下でピンセットを用いて, 翅原基の根元をそとつかんで摘み取り, PBTごとスライドグラス上に移す. さらにPBTだけ移して径約1cmの液滴をスライドグラス上に作る. カバーグラスをピンセットで摘み, エッジを液滴の端に置き, ゆっくりと倒して気泡を除いた後, マニキュアでカバーグラスの縁を閉じる.
26. 観察・撮影. 当研究室には現在4種の蛍光またはレーザー共焦点顕微鏡があるので, 目的に応じて使い分ける. 使用法の詳細を教員や先輩からしっかり習って壊さないこと.
- ① Leica DMRA + Deconvolution System Q550FW 翅原基などの薄い組織
  - ② Keyence BZ8000 (Deconvolution) 薄い組織や低倍率高深度タイムラプスなど
  - ③ Nikon Digital Eclipse C1 (Laser Confocal) 厚みのある組織 (3 蛍光色まで)
  - ④ Nikon Digital Eclipse C1Si (Laser Confocal) 厚みのある組織 (8 蛍光色まで)

### 3. GAL4/UAS システムによる GFP 発現の検出 (蛹タイムラプスの例)

GAL4/UAS システムは, 遺伝子を組織特異的に強制発現させる方法として, Brand and Perrimon によって 1993 年に開発されたものである[2]. ショウジョウバエに発現させても無害な出芽酵母の転写調節因子 GAL4 を, 様々な時空間的パターンをもって発現するショウジョウバエ系統をつくり, 一方で GAL4 が標的とする DNA 配列 UAS (Upstream Activation Sequence) の下流に, 発現させたい様々な遺伝子を融合したショウジョウバエ系統をつくり, 両者をかけあわせた次世代で, 遺伝子の異所的発現を再現性よく導くしくみである (図 4).

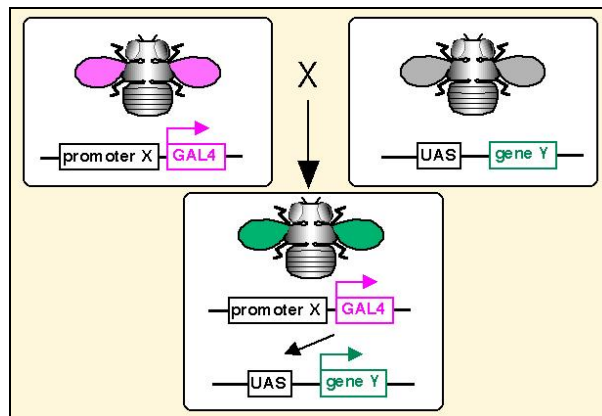


図 4. GAL4/UAS システム

このように, 動的なシステムを要素に分解して反応が起きないように保ち, それらを再構成することによって反応開始を人為的に制御する原理は, 遺伝学や生化学で繰り返して使われてきた汎用性の高い方法であるが, この GAL4/UAS システムも, それまでのショウジョウバエ



研究手法の流れを一気に変えるような、大きなインパクトがあるものであった。単に遺伝子の異所的発現の効果を観る、というだけに収まらず、生体において特定の細胞を蛍光色素で標識したり、染色体組換えと併用して遺伝的モザイクを作成したり、RNAiによって特定の時空間においてのみ遺伝子を抑制したりと、その応用はとどまるところを知らぬかのように、多岐に渡って発展した。当然、遺伝子発現の検出を簡便に行うことにも用いられ、以下では、蛹時代の5日間に、タイムラプスで遺伝子発現を追跡する方法を、例として示す。

## < 用意するもの >

PBS (Phosphate Buffer Saline, 1回につき 1ml 要する)

先突ピンセット 2本 (Fontax Taxal No.5 など)

解剖皿 2枚 (池本理化 ホールオベクトグラスなど)

両面テープ (ニチバンニスタック, 粘着力強度=普通)

綿棒

付箋紙

スライドグラス

## < 方法 >

1. 発現を調べたい GAL4 エンハンサートラップ系統と UAS-GFP 系統とを掛け合わせる。この場合の GFP は、S65T (EGFP, Bloomington #4775 等) など、発光が強いものが良い。
2. 産卵後およそ 5 日間で蛹になる。ハエの仲間は蛹になる時に幼虫の表皮から脱皮せず、幼虫表皮が硬化して外側を覆ったままとなる。その硬化を「**囲蛹殻形成 (pupariation)**」と呼び、前方の気門が角のように飛び出し、外見は蛹になったようだが、まだ内部に蛹はできていない。その後、内部で蛹の形が出来上がる段階を「**蛹化 (pupation)**」と呼ぶ。ここでは、管壁に登って蛹化しつつあるものの中で、**囲蛹殻形成直後の、まだ色が白いものを探す(これを white pupa と呼ぶが、上述のように実際にはまだ蛹 pupa ではない)**。white pupa を見つけたら、濡らした綿棒などでそっと横にずらすようにして採取する。湿らせず動かすと表皮が破れ死んでしまう。**white pupa はいともたやすく致命傷を負う。**
3. 解剖皿 2 枚の各々の穴に PBS を 500 $\mu$ l ずつ入れ、そのうちの 1 つに white pupa を移し、ピンセットでかき混ぜるなどして、表面の汚れを落とす。上述のように、white pupa はデリケートなので、ピンセットで摘むなどの刺激はできるだけ避ける。表面の汚れには時に強い自家蛍光があるので、バックを下げるためのこの洗いのステップは必須である。しかし、時間をかけると窒息死するので、素早くやる。
4. 新しい PBS に移し、さらに洗ってすぐ引き上げ、ティッシュなどで液滴を吸い取る。
5. Post-it を小さく切ったものなどを張り付けて white pupa を持ち上げ、スライドグラスに張った両面テープ上に、角度を確かめつつ慎重に着陸させる。一度降りたら動かさない。
6. 両面テープ上に横たわる white pupa をやさしく押し付け、長期に渡って傾きが変わらぬ

- ようよく張り付ける。押しすぎるとやはりすぐ死ぬ。潰れてなくても死んでいたりする。
7. Keyence BZ8000 のステージ上に蛹が下になるようにスライドグラスを置く。高深度のフォーカスを得るために、低倍接眼レンズ (Leica Fluotar 1.6 倍) を使ってズームで拡大しているが、レンズ高が低過ぎて焦点が合わないので、特注の中間リングを入れている。
  8. 撮影とタイムラプス設定の例：14 倍ズーム，露出 1 秒，10 分間隔，720 枚 (5 日間)。設定条件を入力する間に水銀ランプが ON になっており，長時間照射してしまうことがあるので気をつける。長時間照射は，褪色の懸念よりも死亡の原因になる。
  9. 失敗するとき (死亡する時) はネクロシスのため GFP が流出し，蛹内部の広範囲に不自然に広がってくるので，すぐわかる。それ以上継続しても意味がないので中止する。
  10. 5 日経過するか成虫が羽化したら終了。水銀ランプ (寿命 2000 時間) を必ず消す。

### 参考文献

- [1] H. Bellen *et al.*, *Genes Dev.*, 3 (1989) p.1288-1300.  
[2] A. Brand and N. Perrimon, *Development*, 118 (1993) p.401-415.