

多様な分子を高感度に検出できるグリオキサル固定法

～これまで解析困難であった分子発現解析やヒト組織の病理診断・医学研究への応用に期待～

ポイント

- ・従来、検出困難だった神経情報伝達分子を高感度かつワンストップで検出できる組織固定法を確立。
- ・様々なイメージング技術への応用と組み合わせが可能。
- ・モデル生物の生命科学研究からヒトの病理診断・医学研究への応用にも期待。

概要

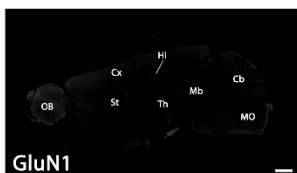
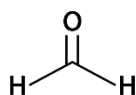
北海道大学大学院医学研究院の今野幸太郎助教、渡辺雅彦教授らの研究グループは、2価のアルデヒドであるグリオキサルを主体とした新規組織化学固定法の確立に成功しました。

免疫組織化学法は、分子の局在を調べるために世界中で広く用いられている研究手法です。タンパク質の漏出や変性を防ぐ目的で、免疫組織化学法を行う前には必ず組織や細胞を化学的に固定します。アルデヒド系固定剤の一つであるホルムアルデヒド（いわゆるホルマリン）は世界的なスタンダード固定液として、これまで組織学や組織化学の研究に長年使用されてきました。しかし、ホルマリンはタンパク質を強力に架橋し組織を収縮させる性質を持つため、固定組織への抗体の浸透やアクセスを制限し、十分な染色性が得られない状態が多々生じることが問題でした。特に、神経情報伝達の場合であるシナプスには情報を伝達するための受容体や輸送体、これらを特定の部位に集積させるための足場タンパク質などが高密度に密集しているため、ホルマリン固定組織では分子検出が困難となることが多く、その適切な検出には抗原露出のための特殊な操作や工夫が必要でした。

研究グループは、まずグリオキサルを主体とする固定液組成の最適化を行いました。次に、最適化されたグリオキサルによる固定組織を用いると、従来ホルマリン固定組織において検出困難であった分子に対しても、光学顕微鏡・電子顕微鏡レベルで高感度かつ簡便に検出できることを明らかにしました。グリオキサルを用いた染色性の向上は、げっ歯類のみならず霊長類であるマーモセット組織でも確認され、病理診断で用いられるパラフィン切片でも確認されました。今回の研究成果は、神経科学研究を大きく加速するとともに、モデル生物を用いる生命科学研究からヒト組織を用いる病理診断や医学研究への応用へも期待されます。

なお、本研究成果は、Science Advances誌で2023年7月14日（金）にオンライン公開されました。

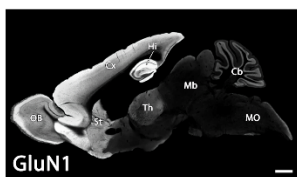
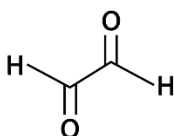
ホルムアルデヒド



GluN1

上段：ホルムアルデヒドの化学式（左）とホルマリン固定マウス脳矢状断切片を用いたイオンチャンネル型グルタミン酸受容体^{*}GluN1の染色像（右）。

グリオキサル



GluN1

下段：グリオキサールの化学式（左）とグリオキサル固定マウス脳矢状断切片を用いた GluN1 の染色像（右）。グリオキサル固定により、ホルマリン固定では検出が困難な分子が容易かつ強力に検出できるようになる。

【背景】

免疫組織化学法は、分子の局在を調べるために世界中で広く用いられている研究手法ですが、目的の分子を検出する前に、組織細胞の腐敗や構成分子の漏出を防ぐために、組織や細胞を化学的に固定する必要があります。ホルムアルデヒドは炭素原子 1 個のモノアルデヒドで、4%濃度のパラホルムアルデヒド（PFA、いわゆるホルマリン）は何十年もの間、免疫組織化学法のゴールドスタンダード固定液として世界中で使用されてきました。しかし、アルデヒド類による化学固定は抗体の抗原に対する結合親和性の低下、アルデヒド架橋によるタンパク質立体構造の変化、固定による組織収縮に伴う抗体浸透性の低下などにより、免疫組織化学的検出の感度と特異性を低下させる事態が多々生じます。特に、神経情報伝達の間となるシナプス後部やシナプス間隙、軸索初節²などの特殊な部位には、イオンチャネルや受容体及びそれらと相互作用する足場タンパク質が密集し、その過密な分子環境があたとなって、免疫組織化学による分子検出が困難になっていました。本研究グループは、1998 年に世界で初めてこのような組織化学上の問題を学術誌に発表するとともに、ホルマリン固定脳組織において抗原を露出させ、目的の分子を正しく検出するための技術開発に取り組んできました（Watanabe et al., 1998, Eur J Neurosci.）。しかし、これらの技術を適切に用いるには、分子ごとに最適な方法と条件を探すための経験・時間・労力が必要で、普及したとは言い難い状況にありました。

グリオキサールは炭素原子 2 個のアルデヒド基を 2 個有するアルデヒドで、分子検出を目的とする組織化学のための固定に用いられることは、ほとんどありませんでした。2018 年、ゲッティンゲン大学のリヒター氏らにより、培養細胞の染色の際にグリオキサールはホルマリンよりも架橋能が高く、細胞形態の保存に優れ、シグナル強度が高くなることを報告する論文が公表されました（Richter et al., 2018, EMBO J.）。本研究ではこの論文に注目し、従来のホルマリン固定組織におけるシナプス分子検出問題がグリオキサール固定によって解決できるかどうかに取り組むことにしました。

【研究手法】

初めに、リヒター氏らが報告したグリオキサール効果を確認後、ホルマリン固定組織で検出可能な分子 4 種類と検出が困難な分子 4 種類を指標にして、マウス脳組織を用いて最適なグリオキサール固定液の組成及び染色法を検討しました。次に、最適化されたグリオキサール固定を用いて、ホルマリン固定組織と比べてどの程度シグナル強度が増強するかを多種類の分子に対して検証しました。さらに、組織透明化、パラフィン切片、免疫電子顕微鏡解析、霊長類マーモセット脳組織への応用などを検討しました。

【研究成果】

グリオキサール固定液は 9%グリオキサール/8%酢酸混合液（pH=4）が、染色性及び切片強度において最も効果的であることが分かりました。さらに、この固定による効果発揮には、抗体溶液と洗浄バッファーへの界面活性剤 Triton X-100 の 0.1%添加が必須であることも明らかとなりました。

イオンチャネル型グルタミン酸受容体の一つである AMPA 受容体はタンパク分解酵素であるペプシンによって切片表面を削り抗原を露出する処理を行うことによって、初めてホルマリン固定切片上でシグナルを検出することができます。小脳のプルキンエ細胞³と登上線維の間の興奮性シナプスには多くの AMPA 受容体が局在することが知られています。プルキンエ細胞マーカーのカルビンジン、登上線維マーカーの VGluT2、AMPA 受容体に対する抗体で免疫染色を行ったところ、ホルマリン固定切片では特異的な AMPA 受容体の反応は表面から深さ 1 μm までにはほぼ消失するのに対して（図 1A, B, E）、グリオキサール固定切片ではより深い層まで検出可能であることが明らかとなりました（図 1C, D, F）。

さらに、グリオキサル固定切片において組織透明法 AbScale⁴を行うことで、100 μ m 厚の切片の全層から APMA 受容体のシグナルを検出できました (図 1G, H)。

小脳分子層においてプルキンエ細胞スパインと平行線維シナプス後部には、イオンチャネル型グルタミン酸受容体の一つである GluD2 が豊富に発現します。ホルマリン固定組織とグリオキサル固定組織を用いて、マウス矢状断のパラフィン切片を作製し、GluD2 の蛍光免疫染色を行いました (図 2A-C)。小脳低倍像 (図 2A) 及び高倍像 (図 2B, C) においてグリオキサル固定 (図 2A, C) はホルマリン固定 (図 2A, B) と比較して、小脳分子層における著明な GluD2 シグナルの増強を確認しました。

続いて免疫電顕サンプルを作製し、GluD2 の反応性の比較を行いました (図 2D, E)。平行線維終末とプルキンエ細胞スパイン間シナプスの後部は図 2D・E の矢頭間で示すように、イオンチャネル型グルタミン酸受容体や、その関連分子が密に集積したシナプス後部が認められます。金粒子で標識された GluD2 はシナプス後部に選択的に局在し (図 2D, E, 矢印)、シナプス後部 1 μ m あたりの GluD2 免疫反応を定量した結果、グリオキサル固定サンプルはホルマリン固定サンプルと比較して約 2 倍の反応性増強が認められました。

神経科学領域で機能する 57 分子の染色性を網羅的に比較した結果、ホルマリン固定切片と比較してグリオキサル固定切片では 50 分子の染色性が有意に増強しました。さらに、マウス脳切片で得られた効果は、マーモセット脳切片においても確認できました。

【今後への期待】

グリオキサル固定脳組織における顕著な効果から、今後は特殊な抗原露出法は不要となることが考えられ、様々な分子がワンストップで高感度に解析することが可能になり、神経科学研究を大きく加速することが期待されます。また、霊長類脳及びパラフィン切片においても同様の効果があったことから、グリオキサル固定法の病理診断や医学研究への応用が期待できます。さらに、神経系以外の組織や臓器においてもグリオキサル固定が有効であれば、様々なモデル生物を扱う生命科学研究に広く貢献することが期待されます。

【研究費】

本研究は、独立行政法人日本学術振興会 (JSPS) 「科学研究費助成事業」(21K06746, 20H03410, 22K06784, 21H02589) や AMED 革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト (JP17dm0207053h0004, JP14dm0207028h0003) などの支援を受けて実施しました。

論文情報

論文名 Glyoxal fixation: an approach to solve immunohistochemical problem in neuroscience research (グリオキサール固定法：免疫組織化学染色における問題解決へのアプローチ)
著者名 今野幸太郎¹、山崎美和子¹、宮崎太輔¹、渡辺雅彦¹ (¹北海道大学大学院医学研究院解剖発生学教室)
雑誌名 Science Advances
DOI 10.1126/sciadv.adf7084
公表日 2023年7月14日(金)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院医学研究院 解剖発生学教室 助教 今野幸太郎 (このこうたろう)
TEL 011-706-5030 FAX 011-706-5031 メール kotoro@med.hokudai.ac.jp
北海道大学大学院医学研究院 解剖発生学教室 教授 渡辺雅彦 (わたなべまさひこ)
TEL 011-706-5032 FAX 011-706-5031 メール watamasa@med.hokudai.ac.jp
URL <https://aande.hokkaido.university/>

配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)
TEL 011-706-2610 FAX 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

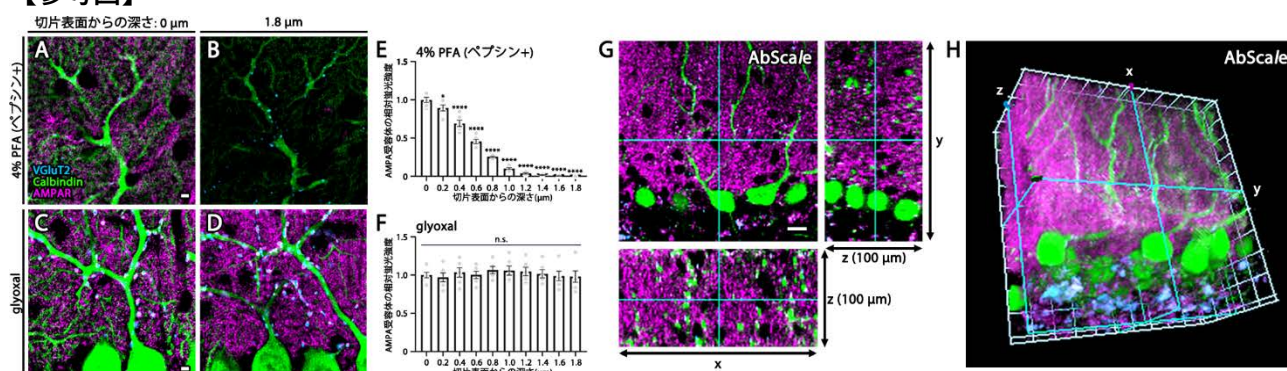


図 1. カルビンジン (緑、プルキンエ細胞マーカー)、VGluT2 (青、登上線維マーカー)、AMPA 受容体 (マゼンタ) に対する 3 重蛍光免疫染色画像。A から D はペブシン処理を施したホルマリン固定における切片の表面 (A) 及び 1.8 μm 深部 (B) の画像、グリオキサール固定切片における切片表面 (C) 及び 1.8 μm 深部 (D) の画像。E と F のグラフは切片表面の APMA 受容体の蛍光強度を 1.0 とした際の 0.2 μm ごとの深部断面における APMA 受容体の蛍光強度を示している (E: PFA 固定切片、F: グリオキサール固定切片)。G は厚さ 100 μm のグリオキサール固定切片に対して AbSca/e 法を用いて蛍光染色を行い、1 μm ごとの画像を取得し、100 枚分の画像をスタックした画像。H は G で取得した 100 枚分の画像から得られた 3D 立体再構築画像。

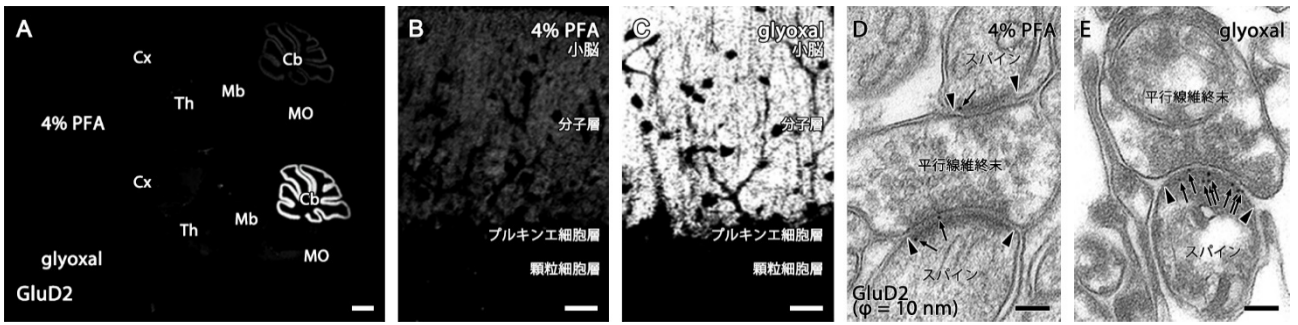


図 2. GluD2 に対する免疫染色画像。A から C は同一パラフィンに包埋したホルマリン固定切片 (A 上段、B) とグリオキサール固定切片 (A 下段、C) における GluD2 染色画像を示している。D と E は樹脂包埋後に作製したホルマリン固定切片 (D) とグリオキサール固定切片 (E) における GluD2 に対する免疫電顕画像。

【用語解説】

- * 1 イオンチャネル型グルタミン酸受容体 … 脳内で興奮性神経伝達の多くを仲介する受容体。
- * 2 軸索初節 … 神経細胞の興奮が始まる部位。
- * 3 プルキンエ細胞 … 小脳皮質の主要な出力細胞
- * 4 AbSca/e 法 … 透明化試薬 Sca/e を用いた免疫組織化学法