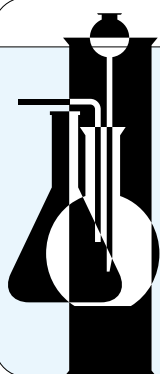


実験講座



グリオキサル固定法

免疫組織化学染色における問題解決へのアプローチ

今野 幸太郎

Key words : 免疫組織化学法, 組織固定, グルタミン酸受容体, シナプス

ホルムアルデヒドは世界的なスタンダード固定液として組織学や組織化学の研究に長年使用されてきたが、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あった。本稿ではジアルデヒドであるグリオキサルを主成分とした固定液の染色性に及ぼす改善効果¹⁾について紹介する。

I. アルデヒド系固定液の組織染色における問題点

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ある。タンパク質の漏出や腐敗を防ぐ目的で、免疫組織化学法を行う際には組織や細胞を化学的に固定する必要がある。固定液は、タンパク質やペプチドに架橋を形成するアルデヒド系固定液と脱水凝固沈殿させる有機溶剤系に大きく分類される。

アルデヒド系固定液はホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドが主成分である。ホルムアルデヒドは、化学式 CH_2O で表記される炭素原子1個のモノアルデヒドであり、ホルムアルデヒド固定液は重合したパラホルムアルデヒドを脱重合して4%重量比の水溶液として使用するため、“4% PFA”や40%ホルムアルデヒド水溶液を10倍希釈したものを“10%ホルマリン”と呼び、最も標準的な化学固定液として世界中で使用されている。

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る。特に、神経情報伝達の間隙となるシナプス後部やシナプス間隙、軸索初節などの特殊な部位には、イオンチャネルや受容体およ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だとなって、免疫組織化学による分子検出が困難になっていた。渡辺らのグループは、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共に、ホルマリン固定脳組織においてタンパク質分解酵素であるペプシンを用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た²⁾。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であった。

グリオキサルはアルデヒド基を2個有するジアルデヒドで、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、ほとんどなかった。2018年、ゲッティンゲン大学のRichterらにより、培養細胞の染色の際にグリオキサルはホルマリンよりも架橋能が高く、細胞形態の保存に

Glyoxal fixation: an approach to solve immunohistochemical problem

Konno Kohtaro : 北海道大学大学院医学研究院解剖学分野解剖発生学教室 (〒060-8638 北海道札幌市北区北15条西7丁目)

0370-9531/02/¥500/論文/JCOPY

優れ、シグナル強度が高くなることが報告された³⁾。筆者ら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ル固定によって解決できるかどうか検討した。

II. グリオキサル固定液の調製

はじめに、Richter らが報告したグリオキサル効果を確認するために、PFA 固定組織で通常の免疫組織化学法で検出可能なプレシナプス 4 分子と、検出が困難なポストシナプス 4 分子(図 1A: イオンチャンネル型グルタミン酸受容体 GluA2, イオンチャンネル型 GABA 受容体 GABA_AR α 1, 興奮性シナプス足場タンパク質 PSD-95, 抑制性シナプス足場タンパク質 gephyrin)を指標にして、マウス小脳組織を用いて最適なグリオキサル固定液の組成および染色法を検討した。

グリオキサル固定液は、Richter らが報告した 3% グリオキサル/0.8% 酢酸/20% エタノール混合液(GAAE)に加え、3% グリオキサル(G), 3% グリオキサル/0.8% 酢酸(GAA), 3% グリオキサル/20% エタノール混合液(GE)を用意し、5N NaOH を用いて pH はすべて 4 に調整した。この pH 調整はグリオキサル固定による効果を得るためには必須である。PFA 固定組織で検出可能な分子はすべてのグリオキサル固定液において PFA と比較して染色性の有意な増強が認められた。

一方、PFA 固定組織で検出が困難な分子は、いずれのグリオキサル固定液においても強いシグナルが得られ、特にエタノールを含まない 3% グリオキサルおよび 3% グリオキサル/0.8% 酢酸混合液が最も有効であることが明らかになった(図 1A)。しかし、3% グリオキサル/0.8% 酢酸で固定した切片は軟らかく、試験管内で浮遊させて免疫染色を行っている最中にしばしば変形や破損が認められた。これは酢酸が入っていない 3% グリオキサル固定液でより顕著であった。そこで、グリオキサールの濃度を 9%, 酢酸の濃度を 8% まで上げることによって、染色強度を低下させることなく組織を硬化させることができた。最終的に 9% グリオキサル/8% 酢酸混合液

(GAA)を標準的固定液として採用することにした。更に、一次抗体や二次抗体の希釈バッファー(PBS)には、界面活性剤である 0.1% TritonTM X-100 の添加(PBS-T)が必須であることも明らかになった(図 1B)。

III. 抗原露出法が不要

グリオキサル固定による免疫組織化学の質的向上は、特にイオンチャンネル型グルタミン酸受容体(iGluR)とその補助サブユニット(膜貫通 AMPA 受容体調節性タンパク質 TARP), 電位依存性イオンチャンネル(Na_v1.x, K_v1.1, Ca_v2.1), イオンチャンネルの足場タンパク質(PSD-95 タンパク質ファミリー, gephyrin, ankyrin-G), シナプス接着分子(Cbln, Neuroligin, Neurexin)において顕著であった。これらの分子はすべて、特殊な神経細胞区画(シナプス後部, シナプス間隙, 軸索初節, ランビエ絞輪)に密集し、PFA 固定脳組織を用いた通常の免疫組織化学ではほとんど検出することはできず、特殊な抗原露出法を行う必要があった。

光学顕微鏡レベルでのペプシン前処理や電子顕微鏡レベルでの包埋後免疫電顕法などの抗原曝露技術は、このような特殊なコンパートメントにおける分子局在を明らかにすることに貢献してきた。一方、ペプシン前処理は、デルタ型グルタミン酸受容体 GluD1 や電位依存性カルシウムチャンネル Ca_v2.1 には無効であり、これらの分子検出には未固定組織から新鮮凍結切片を作製し、免疫組織化学法を行う前に 4% PFA で短時間固定することでシグナルを検出することができた^{4,5)}。Fritschy らは、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体や GABA_A 受容体を検出するために、ホルムアルデヒド固定の際にマイクロ波照射を使用した⁶⁾。Lorincz と Nusser は低濃度/低 pH プロトコルを用いたホルムアルデヒド固定により、樹状突起上の電位依存性ナトリウムチャンネル Na_v の検出に成功した⁷⁾。このように、これらの抗原露出法は、PFA 固定組織を使用する際の問題克服のために行われてきた。グリオキサル固定法を採用することにより、そのような抗原露出法が不要になったことは驚くべきことであった。

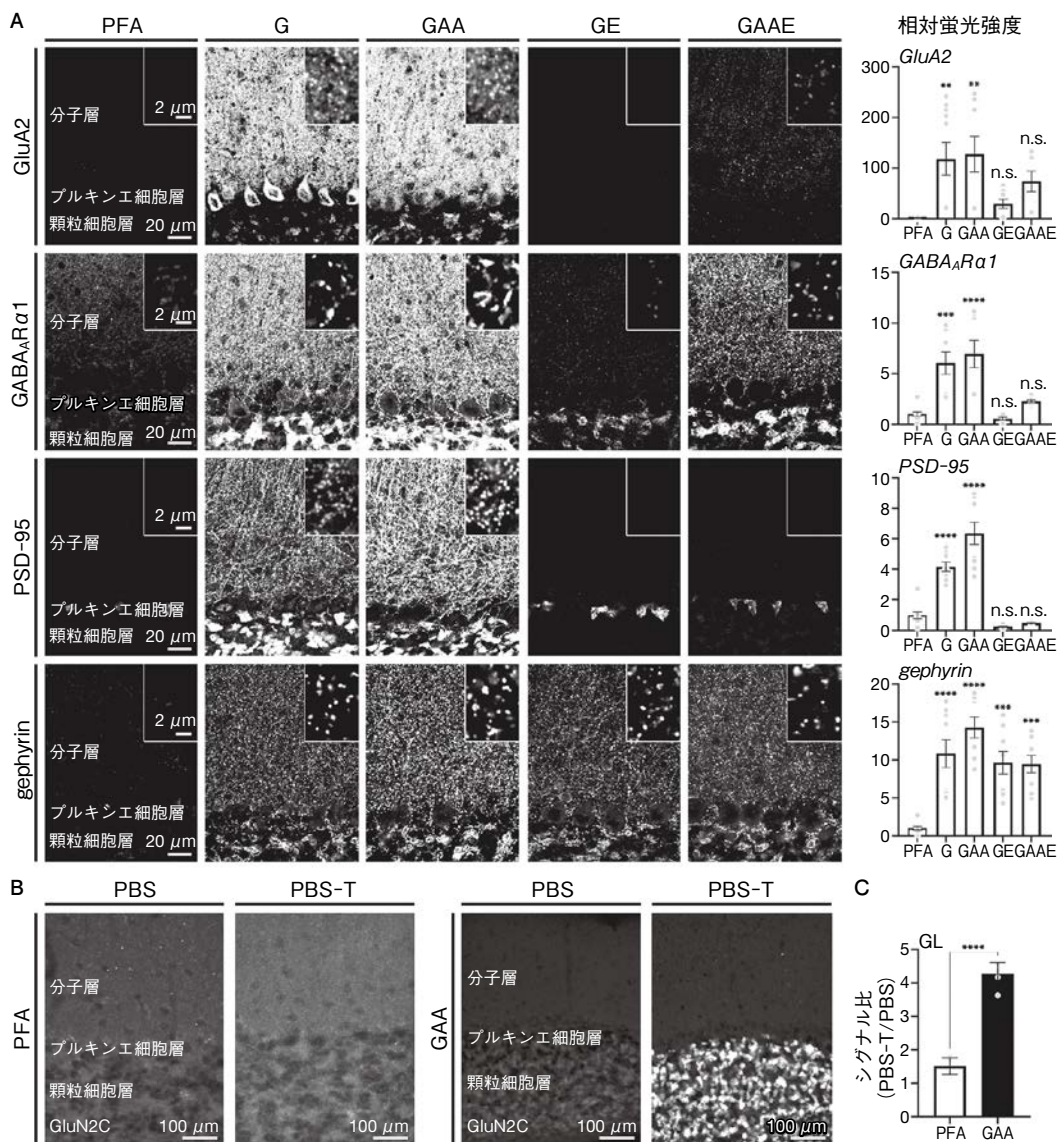


図 1 小脳皮質におけるシナプス後部分子の免疫蛍光シグナルの変化

- A. PFA または組成の異なるグリオキサールで固定した組織における GluA2, GABA_ARα1, PSD-95, gephyrin の免疫蛍光染色。挿入図は分子層の高倍率画像。ヒストグラムは各グリオキサール固定液中の平均相対蛍光強度を PFA と比較した。
- B. PFA あるいは GAA で固定したマウス小脳切片におけるイオンチャンネル型グルタミン酸受容体 GluN2C の免疫蛍光染色。GAA 固定切片における染色性は、PBS に 0.1% Triton™ X-100 を添加 (PBS-T) することで顕著に改善するが、PFA 固定切片では、PBS-T を使用しても顆粒細胞層に特異的なシグナルは観察されない。
- C. PFA 固定または GAA 固定における顆粒細胞層の平均シグナル比 (PBS-T/PBS) を示すヒストグラム

IV. 抗体浸透性の促進効果

イオンチャンネル型グルタミン酸受容体の一つである AMPA 受容体は、ペプシン前処理によって切片表面を削り抗原を露出することで、PFA 固

定切片上でシグナルを検出することができる。小脳のプルキンエ細胞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。プルキンエ細胞マーカーのカルピンジン、登上線維終末マーカーの小胞型グルタミン酸トランスポー

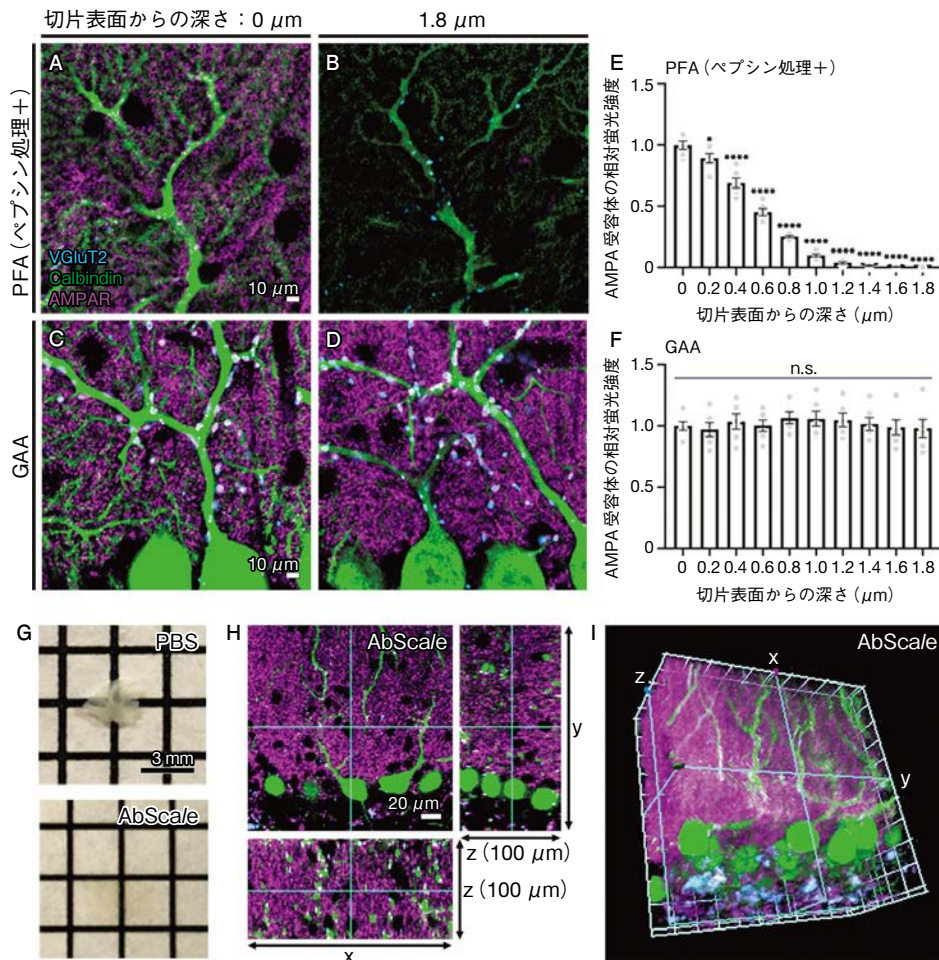


図 2 GAA 固定によるマウス小脳皮質における AMPAR の深部 z 軸イメージング

A-D. ペプシン処理を行った PFA 固定切片 (A, B), GAA 固定切片 (C, D) における calbindin, AMPA 受容体 (AMPA), VGluT2 の切片表層 (A, C) および 1.8 μm 深層 (B, D) での染色像
 E, F. PFA 固定 (E) または GAA 固定 (F) 切片の z 軸 (深さ 0–1.8 μm) に沿った AMPA 受容体の平均蛍光強度を示すヒストグラム。表層の平均相対強度を 1.0 とし、深部における統計的に有意な減少を * ($p < 0.05$) と **** ($p < 0.0001$) で示す。
 G. GAA で固定した 100 μm 厚の小脳切片に AbScale 法を適用した切片の画像
 H, I. z 軸に沿って 1 μm ステップで合計 100 枚画像を取得し、重ね合わせた画像 (H) と 3D 再構成画像 (I)

ター 2 (VGluT2), AMPA 受容体に対する抗体で免疫染色を行い、切片の表層から深層にかけて 0.2 μm 間隔で画像を取得した。

ペプシン処理を施した PFA 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 までにはほぼ検出不能となるのに対して (図 2A, B, E), グリオキサル固定切片では、より深い層まで検出可能であることが明らかになった (図 2C, D, F)。更に、厚さ 100 μm のグリオキサル固定

切片を作製し、組織透明法 AbScale 法を用いて、カルビンジン, AMPA 受容体, VGluT2 の染色を行った (図 2G-I)。AbScale 法によって厚さ 100 μm のグリオキサル切片はほとんど透明になることを確認後 (図 2G), この切片において 1 μm 間隔で 100 枚画像を取得した結果、どの深さにおいても AMPA 受容体のシグナルを検出することができた (図 2H, I)。これは、抗体のアクセス性がグリオキサル固定によって促進し、AbScale 法と組み

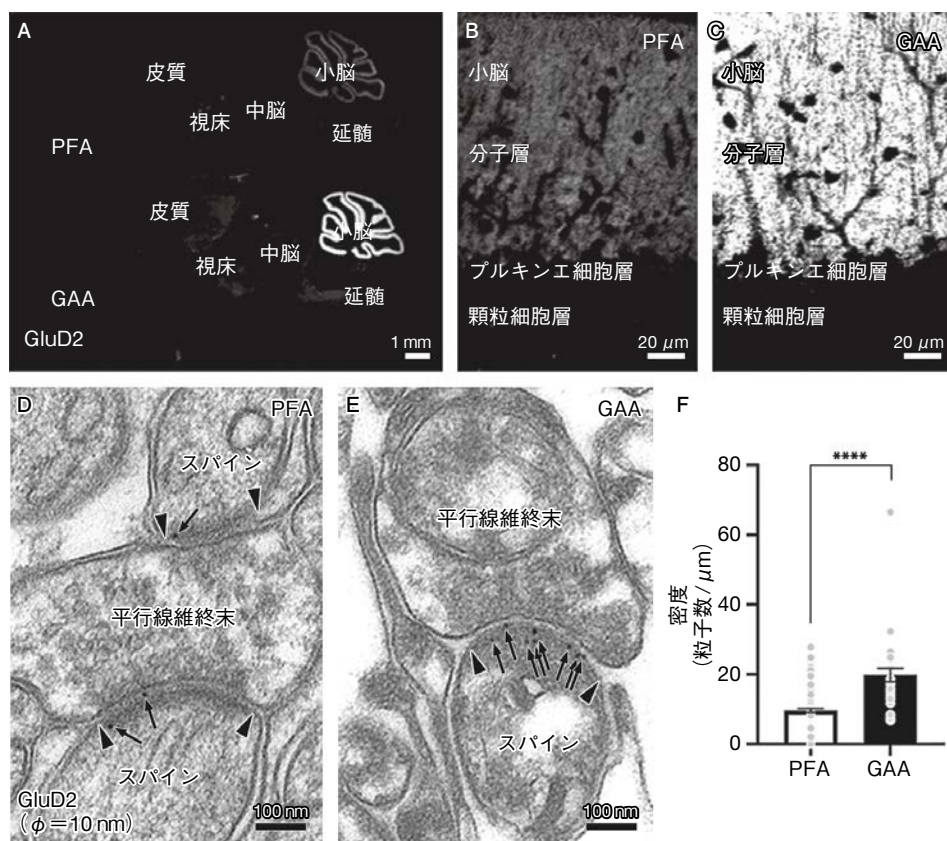


図 3 パラフィンブロック包埋、包埋後免疫電顕法への応用

- A. 矢状断パラフィン切片における GluD2 の免疫染色画像。PFA (上) と GAA (下) で固定した脳を同じパラフィンブロックに包埋し、両方の切片を同じスライドガラスにマウント後、同じ抗体溶液を滴下して免疫反応を行った。
- B, C. A から取得した小脳皮質の拡大画像 (B : PFA, C : GAA)
- D, E. PFA (D) または GAA (E) 固定サンプルにおける GluD2 ($\phi=10$ nm) の包埋後免疫電顕画像。矢印と矢頭はそれぞれ GluD2 の免疫反応とシナプス後肥厚部の端を示す。
- F. シナプス後膜 1 μ m 当たりの GluD2 免疫反応粒子の平均密度を示すヒストグラム

合わせることで更に改善されたことを示している。この結果は、免疫組織化学で検出可能な分子の組み合わせが増え、同一あるいは隣接するコンパートメントに局在する複数の分子の空間的關係をより正確かつ効率的に解析できることを物語っている。

V. パラフィン切片や電子顕微鏡解析への応用

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のシナプス後部には、イオンチャネル型グルタミン酸受容体の一つである GluD2 が豊富に発現する。PFA 固定組織とグリオキサール固定組織を用いて、マウス矢状断の

ラフィン切片を作製し、GluD2 の蛍光免疫染色を行った (図 3A-C)。小脳低倍像 (図 3A) および高倍像 (図 3B, C) においてグリオキサール固定 (図 3A, C) は PFA 固定 (図 3A, 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た。

続いて固定脳を Lowicryl 樹脂に包埋後、超薄切片を作製し、プルキンエ細胞スパインと平行線維シナプスにおける GluD2 の反応性の比較を、電子顕微鏡を用いて解析した (図 3D-F)。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 3D・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肥厚部が認められる。金粒

子で標識された GluD2 はシナプス後膜に選択的に局在し(図 3D, E 矢印), シナプス後膜 1 μm 当たりの 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 PFA 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た。

VI. 一次抗体特異性の再評価

続いて, PFA 固定切片ではこれまで検出には不向きと判断されてきた一次抗体の再評価を行った。PFA 固定組織では特異的な染色を示さなかった Neuroligin-1 (NL1) 抗体について, グリオキサル固定切片を用いて検討した。NL1 は, シナプス前部のニューレキシンと相互作用するシナプス後部細胞接着タンパク質の主要なメンバーの一つである。タンパク質の様々な領域に対して作製した 8 種類の NL1 抗体は, PFA 固定した野生型マウス脳切片と *NLGN1* 遺伝子欠損マウス脳切片において抗原曝露法を用いても差が認められなかったため, 過去にすべて役に立たないと判断していた。しかし, グリオキサル固定を用いると, NL1 の細胞内 C 末端領域に対する 1 つの抗体で, 野生型では大脳皮質や海馬, 線条体といった広い脳領域に点状の反応が認められるのに対して, *NLGN1* 遺伝子欠損マウスではその反応が消失する特異抗体を見いだすことができた。NL1 抗体以外にも, 市販の GABA_AR γ 2 抗体や作製した GABA_BR2 抗体にも特徴的なシグナルが現れ, その特異性は siRNA を介したノックダウンの標識の減少または欠如によって証明することができた。

VII. 様々な分子カテゴリーに対するシグナル増強効果

最後に, 脳内で機能する様々な分子をカテゴリー別に検討した。検討した分子は, イオンチャネル型受容体 (GluA2, GluA3, GluK2, GluN1, GluN2B, GluN2C, GluD1, GluD2, GABA_AR α 1, GABA_AR γ 2), 電位依存性イオンチャネル (Na_v1.1-1.9, K_v1.1, Ca_v2.1), AMPA 受容体の補助サブユニット (TARP- γ 2, TARP- γ 8), 受容体とイオンチャネルの足場タンパク質 (Shank2, Homer-1, gephyrin, ankyrin-G, PSD-95, SAP-102), 代謝受容体および関連分子 (mGluR1, GABA_BR2,

mAChR1, D1R, IP₃R1, PLC β 1), 小胞輸送体 (VGluT1, VGluT2, VGluT3, VIAAT, VACHT, VMAT2), 膜輸送体 (GLAST, GAT1, GlyT2, CHT, DAT, NET, HTT), シナプス小胞関連/active zone タンパク質 (bassoon, CAST, synapsin-1), シナプス接着分子 (Cbln1, Cbln3, Nrnx1a, NL1, NL2, NL3), 神経ペプチド (somatostatin, VIP), 細胞質 Ca²⁺ 結合タンパク質 (calbindin, calretinin, parvalbumin), グリアマーカータンパク質 (Iba1, GFAP, CNPase) の全 57 分子である。

全体として, 57 分子中 50 分子 (88%) で, グリオキサル固定による有意なシグナル増強が観察された。Iba1 は GAA 固定によってシグナル増強が認められたが, バックグラウンドも増強していたため除外した。グリオキサル固定組織におけるシグナルレベルは, mGluR1, mAChR1, synapsin-1, VIP, parvalbumin の 5 分子については PFA 固定組織と同等であり, somatostatin については有意に低かった。GluN1, GluD1, GluD2, PSD-95, NL1, NL2, NL3 はノックアウトマウス脳において染色性の消失を確認しており, 染色シグナルの特異性が確認された。更に, マウス脳切片で得られたグリオキサル固定による改善効果は, 霊長類のマーモセット脳でも有効であることが判明した。

これらの結果は, グリオキサル固定が様々なカテゴリーの分子や実験動物を用いる神経科学研究に広く有用であることを示している。

おわりに

グリオキサル固定による有意なシグナル増強は, 幾つかの分子では認められず, Iba1 の染色ではシグナルレベルとノイズレベルの両方が増加した。グリオキサル固定によるシグナル強度の差は, 分子種に依存するのか, あるいは同一分子内のエピトープによって異なるのかは目下不明である。神経細胞やシナプスの電子顕微鏡画像の画質に関しては, グリオキサル固定よりも PFA 固定のほうが優れている。したがって, 一次抗体を初めて検討する免疫組織化学では, PFA とグリオキサールの並行使用を強く推奨する。

ヒトの組織標本は、病理学的検査のために 10%ホルマリンに浸漬して固定され、パラフィンブロックやパラフィン切片として長期間保存される。今回の検討によってパラフィン切片においてもグリオキサール固定による染色性の改善効果が明らかになった。グリオキサールの細胞への浸透性と固定性の速さ、およびマーマーモセット脳への同様の改善効果は、剖検されたヒト試料にグリオキサール固定を用いることで、免疫染色の感度と特異性が向上し、病理診断や医学研究に貢献することが十分期待される。更に、グリオキサール固定が神経以外の組織や臓器にも有効であれば、生命科学 research 全般に広く貢献することも期待される。

●文 献

- 1) Konno K, Yamasaki M, Miyazaki T, Watanabe M : *Sci Adv.* **9** : eadf7084, 2023
- 2) Watanabe M, Fukaya M, Sakimura K et al : *Eur J Neurosci.* **10** : 478-487, 1998
- 3) Richter KN, Revelo NH, Seitz KJ et al : *EMBO J.* **37** : 139-159, 2018
- 4) Konno K, Matsuda K, Nakamoto C et al : *J Neurosci.* **34** : 7412-7424, 2014
- 5) Miyazaki T, Yamasaki M, Hashimoto K et al : *J Neurosci.* **32** : 1311-1328, 2012
- 6) Fritschy JM, Weinmann O, Wenzel A, Benke D : *J Comp Neurol.* **390** : 194-210, 1998
- 7) Lorincz A, Nusser Z : *Science.* **328** : 906-909, 2010