

口腔粘膜細胞からの total RNA 抽出法の検討

初谷真奈
木村雅浩

要旨

口腔粘膜細胞から total RNA を抽出するための条件検討を行った。一般的な、グアニジンチオシアネートを用いた方法よりも、SDS を用いた方法のほうが total RNA の抽出に適しており、この際、proteinase K の添加が必要であることを明らかにした。また競合的 RT-PCR の結果、ブラシで口腔粘膜細胞を剥離して採取した方が、口腔洗浄液から採取した口腔粘膜細胞よりも β -actin を増幅するのに適していることがわかった。これらの結果から、口腔粘膜細胞から total RNA を抽出するには、ブラシによる口腔粘膜細胞の採取と SDS による抽出が適していることがわかった。

緒言

個々の細胞の核の中に収められている染色体 DNA には、約2万2千個の遺伝子の存在が想定されている(1)。これら遺伝子は単に形質の遺伝をつかさどるものではなく、個々の細胞、生命体の機能や形態を決定づける因子として機能している。一方で、多くの疾患は、環境的要因と遺伝子的要因が関連して発症することが知られている。したがって、臨床診断、疾患の治療について研究する上で、疾患の成立機序と遺伝子との関連性について明らかにすることの意義は多い。

疾患と遺伝子の関連性を明らかにする上で、遺伝子の質的異常と量的異常について考える必要がある。質的異常とは、遺伝子の配列異常によって、正常なたんぱく質の発現ができなくなることといえる。たとえば甲状腺では、アミノ酸のチロシンとヨウ素からなるホルモンであるサイロキシンを合成分泌している。そのために、甲状腺には、甲状腺へのヨウ素の取り込みをおこなうナトリウム-ヨウ素シンポーターが特異的に存在している。このナトリウム-ヨウ素シンポーターの遺伝子異常により、正常な輸送たんぱく質が合成できなくなるために、甲状腺ヨウ素濃縮障害を起こすことが報告されている(2-4)。

このような疾患関連遺伝子の同定のためには遺伝子配列の異常を確認する必要がある。遺伝子は組織特異的に発現しているので、通常はゲノムから遺伝子配列を確認する。しかしながら、ゲノムにある遺伝子はイントロンを含んでおり、その解析に非常に手間がかかる。たとえば、血液凝固因子の一つである factor IX は、ゲノム上でイントロンに分断された8個のエクソンからなり、その長さは34 kb に及ぶ。ところが、コーディング領域に限れば、約1.4 kb であり、現在のシーケンス技術であれば2回のシーケンスで全配列を読み取ることが可能である。

このように、コーディング領域だけを効率よく読み取るためには mRNA が必要となる。しかし

ながら、ナトリウム-ヨウ素シンポーターのような組織特異的に発現している遺伝子の解析のためには、その組織を一部採取する必要がある。したがって、侵襲性が高く、患者への負担も大きくなるのが問題となる。

しかしながら、Sarkar らは組織特異的に発現している遺伝子でも、RT-PCR によって他の組織から検出できることを報告している(5)。彼ら報告では、1分子でも mRNA の発現があれば、PCR を繰り返すことで配列の確認ができることを示唆している。

そこで我々は、DNA 診断でよく利用される口腔粘膜細胞に注目した。口腔粘膜細胞は非侵襲的に口腔洗浄の洗浄液、頬の内側をブラシで擦ることによって容易に剥離・採取できる。しかしながら、口腔粘膜細胞からの total RNA 抽出に関する報告は極めて少ない(6-10)。なぜならば、唾液には多くの ribonuclease が含まれているため、RNA が分解されやすいからである。これらの報告では、口腔粘膜細胞の採取方法、total RNA の抽出方法に関して詳細な検討がなされていない。我々の最終目標は、異所性に発現したわずかな mRNA を増幅して遺伝子診断に応用することである。したがって、よりよい条件下での total RNA の抽出が必要である。そこで、今回我々は口腔粘膜細胞の採取および total RNA 抽出条件の検討を行った。

実験方法

口腔粘膜細胞の採取—口腔洗浄法

スポーツ飲料水であるゲータレード(サントリーフーズ株式会社)15 ml を口に含み、30 秒間頬の内側を軽くかむことで口腔粘膜細胞を剥離させ、その口腔洗浄液を50 ml の遠心チューブに回収した。同様のことをもう一度行い、第二の口腔洗浄液も同じ50 ml の遠心チューブに回収した。この50 ml のチューブを3500 rpm で10 秒間、4 °Cで遠心し、上清を除いたものを実験試料として用いた。

口腔粘膜細胞の採取—ブラシ法

適量のゲータレードでうがいを行った後、頬の内側を5 分間、ナイロン製の荒い毛でできたブラシ(Medical Packaging Corp.)でブラッシングし、口腔粘膜を採取した。口腔粘膜が付着したブラシは予め50 ml の遠心チューブに入れておいた30 ml のゲータレードに懸濁した。この50 ml のチューブを3500 rpm で10 秒間、4 °Cで遠心し、上清を除いたものを実験試料として用いた。

培養細胞の調製

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を内皮細胞 Basal Medium(EBM)に hEGF(ヒト上皮細胞成長因子)、Hydrocortizone(副腎皮質ホルモン)、BBE(牛の脳から抽出したたんぱく質)、FBS(子牛の血清)、Gentamicin/Amphotericin-B(抗生物質)、Penicillin/Streptomycin(抗生物質)を加えた培養液で37 °C、CO₂ 5.0 %に設定したインキュベーター内で細胞がコンフルエントのなるまで直径6cm の dish を用いて培養した。また、培養細胞の dish からアスピレータを用いて培養液を完全に除去した後、dish に PBS (137 mM NaCl、8.1 mM Na₂HPO₄、2.68 mM KCl、1.47 mM KH₂PO₄、pH 7.4) を2 ml

加えた。PBS を dish 全体になじませた後、アスピレータを用いて PBS を完全に除去した。その後、1 ml の ISOGEN(株式会社ニッポンジーン)を dish に加えてヒト臍帯静脈血管内皮細胞を剥離し、ISOGEN による totalRNA 抽出のための実験試料とした。

ISOGEN による totalRNA の抽出

口腔粘膜細胞またはヒト臍帯静脈血管内皮細胞に ISOGEN を1 ml 加えてよく懸濁した。次に、マイクロチューブにクロロホルムを200 μ l 加え、15秒間穏やかに転倒混和し、マイクロチューブを12000 rpm、15 分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心した。中間層が混入しないように上清を新しいマイクロチューブに回収した。回収した上清にイソプロパノールを500 μ l 加え、室温に15分間静置した後、マイクロチューブを12000 rpm、10 分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心した。上清を取り除き、1 ml の70 % エタノールを加え、12000 rpm、5 分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心した。上清を除き、風乾した後、DEPC 処理水を10 μ l 加え、これを実験試料とした。

10%SDS による total RNA の抽出

試料に溶解液を450 μ l 加えて懸濁し、10 % SDS を100 μ l 加えて細胞を破壊した。Proteinase K(タカラバイオ株式会社)を2.5 μ l 加え、37 $^{\circ}$ Cで15 分間保温した。2 M 酢酸 Na(pH 4.0)を50 μ l、水飽和フェノールを500 μ l、クロロホルム-イソアミルアルコールを100 μ l 添加し、泡立たないように注意して10 分間転倒混和し、12000 rpm、10 分間、室温で遠心した。上清を新しいマイクロチューブに回収し、グリコーゲン(Invitrogen Corp.)を0.5 μ l、イソプロパノールを500 μ l 加えて混和した後、-20 $^{\circ}$ Cに1 時間放置した。200 μ l の70 %エタノールを加えて、13000 rpm、5 分間、4 $^{\circ}$ Cで遠心し、上清を取り除き風乾した。これを実験試料とした。

競合的 RT-PCR

TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0(タカラバイオ株式会社)の説明書にしたがって、RT-PCR を行った。逆転写反応は、30 $^{\circ}$ C 10 分間、42 $^{\circ}$ C 15 分間、99 $^{\circ}$ C 5 分間、5 $^{\circ}$ C 5 分間の温度条件で1 サイクル行った。また、競合的 PCR はコンペピターとして、human β -actin DNA Competitor を用いて、94 $^{\circ}$ Cで15 秒間、68 $^{\circ}$ Cで30 秒間の条件を35 サイクルの条件で競合的 PCR 反応を行った。

変性アガロースゲル電気泳動-total RNA の電気泳動

DEPC 処理水に溶かした total RNA 2.4 μ l に、1.0 μ l の0.20 M MOPS 緩衝液(0.20 M MOPS、0.050 M 酢酸ナトリウム、0.010 M EDTA、pH 7.0)、5.0 μ l のホルムアミド、1.6 μ l のホルムアルデヒドを加え、65 $^{\circ}$ Cで5分間加熱後、氷水で3分間急冷した。泳動用の dye solution(50 %グリセリン、1.0 mM EDTA、0.1 % BTB、5.0 % エチジウムブロマイド)1.1 μ l を加えた。その全量を変性アガロースゲル (0.3 % アガロース、0.01 M MOPS、1.8 % ホルムアミド) にアプライし、0.020 M MOPS 緩衝溶液で電気泳動した。

RT-PCR 産物の電気泳動

RT-PCR 産物のうち10 μ l をアガロースゲル(2.0 % アガロース、25 mM トリス塩基、24.25 mM ホウ酸、1.0 mM EDTA、 2.0×10^{-5} % エチジウムブロマイド、pH 8.2) にアプライし、TBE 緩衝溶液(25 mM トリス塩基、24.25 mM ホウ酸、1.0 mM EDTA、pH 8.2) で電気泳動した。

実験試薬

実験に供した試薬は、キット薬品工業株式会社および八洲薬品株式会社から購入したものを使用した。

結果と考察

組織からの total RNA の抽出法には、グアニジンチオシアネートのタンパク変性作用を利用して、ribonuclease を不活化することで抽出する方法と、SDS のタンパク変性作用を利用して total RNA を抽出する方法がある。最近、各試薬業者から total RNA 抽出 kit が販売されている。その多くはグアニジンチオシアネートを用いており、抽出後の total RNA の精製方法として、フェノールを用いたものや特殊な RNA 吸着性の樹脂からなるカラムを利用したものが多い。まずは、市販されている total RNA 抽出 kit の一つである ISOGEN を用いて、口腔粘膜細胞からの total RNA の抽出を試みた。

ISOGEN(株式会社ニッポンジーン)とは、フェノールとグアニジンチオシアネートを含む RNA 抽出試薬で、ヒト、動物、植物及び細菌からの RNA を抽出することができる。液層分離による方法を用いており、同一試料から DNA 及びタンパク質を単離することが可能である。一連の操作で RNA、DNA、タンパク質を単離できるので、貴重な試料の分析に有効であり、また、操作が簡単なので、試料数が多い場合にも便利であるとされている。

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞および口腔粘膜細胞を試料として、ISOGEN で抽出した total RNA は変性アガロースゲル電気泳動法により、18SrRNA、28SrRNA を確認することによって、その成否

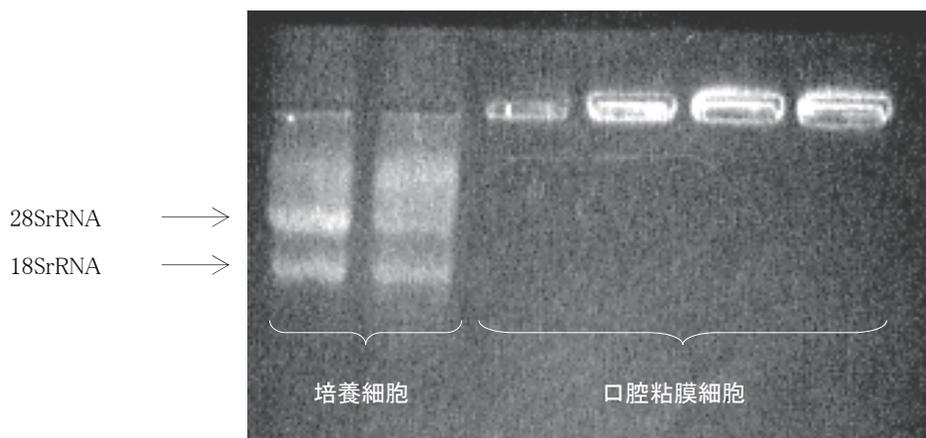


図1 培養細胞、口腔粘膜細胞からの total RNA の抽出

を検討した。図1に示したように、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞から抽出した total RNA では、18SrRNA、28SrRNA が確認できた。しかしながら、口腔洗浄法で採取した口腔粘膜細胞では18SrRNA、28SrRNA が確認できなかった。

このような、組織からの total RNA の抽出では、抽出試薬に比べて細胞数が多いとグアニジンチオシアネートによって変性したたんぱく質に巻き込まれて上手く抽出できないことがある。そこで、口腔粘膜細胞の量を減らして total RNA の抽出を試みたが、同様の結果となった。よって細胞数は関係していないと考えられた。

唾液や汗、腭臓などは ribonuclease が多量に含まれており、RNA が分解されやすいことが知られている。口腔洗浄法での口腔粘膜細胞の採取では唾液が多く混入し、total RNA の抽出に影響を与えた可能性が考えられた。そこで、ブラシ法で口腔粘膜を採取することで、唾液の混入を極力避けた条件で total RNA の抽出を行ってみたが、これも同様に18SrRNA、28SrRNA が確認できなかった。

そこで、口腔洗浄法で口腔粘膜細胞を採取する際に使用したゲータレードの成分により、抽出が阻害されているかどうか検討するために、ゲータレードにかえて生理食塩水を用いて口腔粘膜細胞を採取した。しかしながら、18SrRNA、28SrRNA が確認できなかった。これらのことから、口腔粘膜の採取法よりも ISOGEN に問題があるのではないかと考え、口腔粘膜細胞に ISOGEN を加えた時の口腔粘膜細胞の状態を顕微鏡で観察した。

その結果、細胞が変形しているものの核までは破壊されていない(図2)。口腔は重層扁平上皮からなるため、基底側にある細胞が徐々に内腔側に移動して最上面に位置するようになる。このような表層の細胞は一部角質化され、表皮として外界からの刺激物に対して体を防御する役割を担っている。そのため、ISOGEN では十分に口腔粘膜細胞を破壊できなかったと考えられた。

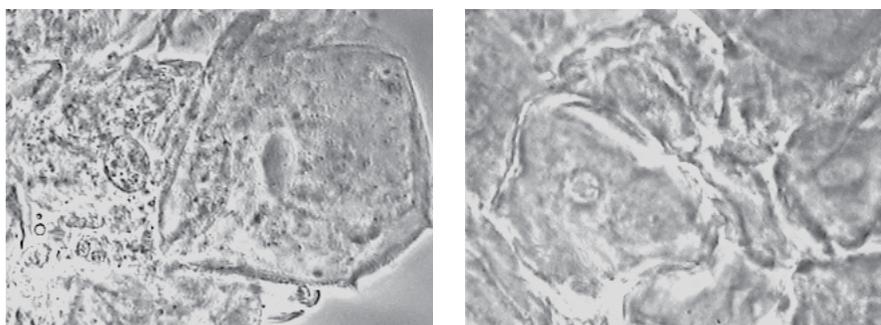


図2 ISOGEN の口腔粘膜細胞に対する影響

左図は、口腔洗浄法で採取した口腔粘膜細胞の顕微鏡像。右図は採取した口腔粘膜細胞に ISOGEN を加えた時の顕微鏡

しかしながら、Spivack らは ISOGEN と同様にグアニジンチオシアネートを主体としたキアゲン社から販売されている RNeasy という RNA 抽出 kit で、口腔粘膜細胞からの total RNA 抽出の成功

例について報告している(8)。これは kit 間の格差によるものか、その他の成分の違いによるものかはわからない。ただ、RNeasy は RNA の精製に RNA 吸着カラムを用いているのに対して、ISOGEN は DNA と RNA の水飽和フェノールへの溶解性の違いによって精製する方式をとっているため、これが何らかの影響を与えている可能性も考えられた。

次に、もう一つのメジャーな total RNA 抽出方法である SDS を使った方法で total RNA の抽出を試みた。図3に示したように、2つの口腔粘膜の採取方法ともに変性アガロースゲル電気泳動法により、18SrRNA、28SrRNA を確認することができた。18SrRNA、28SrRNA を示すバンドは、ブラシ法で口腔粘膜を採取した方が口腔洗浄法よりも濃い結果となった。

今回行った SDS 法による抽出と同様な方法を用いて、Zhong らは培養細胞から total RNA の抽出に成功している(11)。我々の方法は分子生物学実験プロトコール I を参考にして改変した方法であるが(12)、これらの方法に共通しているのは、SDS で細胞を破壊する際に、タンパク質分解酵素の一つである proteinase K を添加している点である。proteinase K は SDS とともに37°C程度で加温すると ribonuclease を分解・不活化することが知られている。実際に、proteinase K の total RNA 抽出に対する影響を検討してみたところ、図4に示したように proteinase K を添加しない場合は、変性アガロースゲル電気泳動法により、18SrRNA、28SrRNA を確認することができなかった。このことから、proteinase K は、口腔粘膜細胞から total RNA を抽出するのに有効であると考えられた。

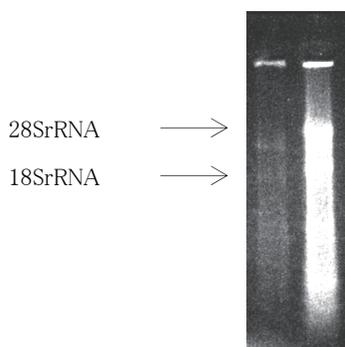


図3 SDS法で抽出した total RNA の変性アガロースゲル電気泳動像

レーン左は口腔洗浄法で採取した口腔粘膜細胞から抽出した total RNA。レーン右はブラシ法で採取した total RNA。

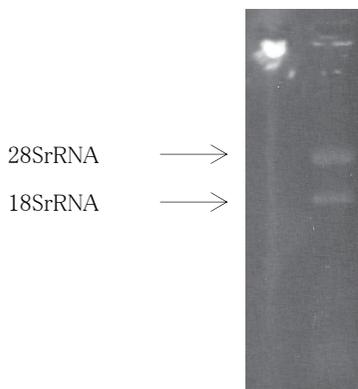


図4 SDS法での total RNA の抽出における proteinase K の効果に関する検討

レーン左はブラシ法で採取した口腔粘膜細胞から proteinase K なしの条件で抽出した total RNA。レーン右はブラシ法で採取した口腔粘膜細胞から proteinase K 添加した条件で抽出した total RNA

一方、Michalczyk らは、一般にプラスミド抽出法の一つであるアルカリ SDS 法で proteinase K を添加しないで口腔粘膜細胞から total RNA の抽出を報告している(6)。この方法では、アルカリとして、水酸化ナトリウムを添加することで細胞を破壊し、アルカリのたんぱく質変性作用を利用して ribonuclease を不活化する。いずれにしても、ribonuclease を不活化し、たんぱく質を変性・分解することが口腔粘膜細胞からの total RNA の抽出に必要である可能性があると考えられた。

SDS 法で抽出した total RNA が RT-PCR に適応可能かを検討するために、ハウスキーピング遺伝子の一つである β -actin の競合的 RT-PCR を行った。その結果、ブラシ法で採取した口腔粘膜細胞で β -actin の成熟 mRNA の増幅がみられた。しかしながら、口腔洗浄法で採取した口腔粘膜細胞では、 β -actin の成熟 mRNA の増幅がみられなかった(図5)。

今回、 β -actin の増幅に用いたプライマーは β -actin の成熟 mRNA をテンプレートとして増幅した場合、275 bp の大きさで β -actin が増幅される。また、ゲノム DNA が混入した場合、これをテンプレートとして PCR が行われると 370 bp の大きさでゲノム β -actin が増幅される。また、コンペピター（人工的に作った β -actin のテンプレートである。）が増幅されると 340 bp の大きさのバンドが得られる。つまり、出現したバンドの大きさから mRNA、ゲノム DNA のどちらかが増幅したのかが

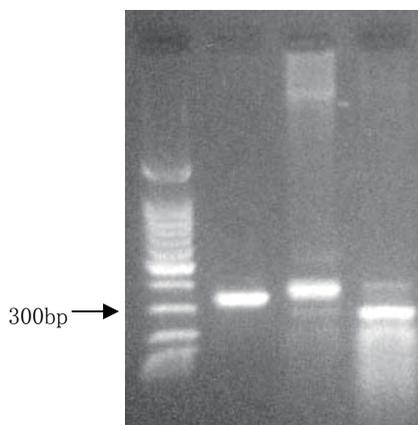


図5 β -actin の競合的 RT-PCR 後のアガロース電気泳動像
レーン左から、分子量マーカ(100bp ラダー)、テンプレートとしてコンペピターのみを入れたもの、口腔洗浄法で採取した口腔粘膜細胞から SDS 法で抽出した total RNA をテンプレートとして競合的 RT-PCR を行ったもの、ブラシ法で採取した口腔粘膜細胞から SDS 法で抽出した total RNA をテンプレートとして競合的 RT-PCR を行ったものを示す。

分かり、ゲノム DNA が抽出した total RNA に混入しているかどうかを判断できる。

図5を見ると、口腔洗浄法とブラシでの採取方法で出現するバンドが異なっていた。コンペピターと比較すると、口腔粘膜洗浄法では 370 bp にバンド出現していた。したがって、混入したゲノム DNA が増幅したものと考えられた。

一方、ブラシ法では、275 bp にバンドが現れたことより、 β -actin の成熟 mRNA が増幅したと考えられた。

口腔洗浄法はブラシ法よりも抽出量が少ないものの、total RNA を抽出することができていた。しかしながら、ほとんど RT-PCR によって、 β -actin の成熟 mRNA を増幅することができなかった。Spivack らは口腔粘膜洗浄法では、total RNA が抽出できなかったと報告している(8)。また、Michalczyk らは口腔洗浄法で RT-PCR による mRNA の増幅に成功したと報告しているが、実際

には頬の内側を歯ブラシで擦った後に口腔洗浄を行い、さらにブラシについた口腔粘膜細胞もあわせて採取する方式をとっている(6)。したがって、現在のところ口腔洗浄法のみで、total RNAを抽出してRT-PCRに成功した報告はない。

このような結果になった要因として、口腔洗浄法ではブラシ法よりも唾液の混入が多くなることが原因の一つに考えられる。また、口腔洗浄法では表層の角質化した細胞を剥離するだけで、viableな細胞を採取できない可能性がある。実際に、Michalczykらは口腔粘膜細胞を採取し、その30分後に再び採取した時のほうがviableな細胞の割合が約2倍程度増加することを報告している(6)。

我々は本報告において、Zhongらが報告したproteinase Kを用いたtotal RNAの抽出は培養細胞だけでなく、口腔粘膜細胞でも有効であることを明らかにした(11)。また、口腔洗浄法、ブラシ法により採取した口腔粘膜細胞がRT-PCRに利用できるかどうか比較検討した報告はなかったが、RT-PCRに利用するためにはブラシ法による口腔粘膜細胞の採取が適していることも明らかにした。

謝辞

本実験は、平成18年度大阪樟蔭女子大学特別研究助成費によって行われた。本実験に協力して頂いた、柿原美智子さん、金川由美子さん、山本かおりさん、大場有希子さん、澤田泰子さんに感謝いたします。

参考文献

1. (2004) Nature 431(7011), 931-945
2. Fujiwara, H., Tatsumi, K., Miki, K., Harada, T., Miyai, K., Takai, S., and Amino, N. (1997) Nat Genet 16(2), 124-125
3. Fujiwara, H., Tatsumi, K., Miki, K., Harada, T., Okada, S., Nose, O., Kodama, S., and Amino, N. (1998) J Clin Endocrinol Metab 83(8), 2940-2943
4. Fujiwara, H., Tatsumi, K., Tanaka, S., Kimura, M., Nose, O., and Amino, N. (2000) Thyroid 10(6), 471-474
5. Sarkar, G., and Sommer, S. S. (1989) Science 244(4902), 331-334
6. Michalczyk, A., Varigos, G., Smith, L., and Ackland, M. L. (2004) Biotechniques 37(2), 262-264, 266-269
7. Spira, A., Beane, J., Schembri, F., Liu, G., Ding, C., Gilman, S., Yang, X., Cantor, C., and Brody, J. S. (2004) Biotechniques 36(3), 484-487
8. Spivack, S. D., Hurteau, G. J., Jain, R., Kumar, S. V., Aldous, K. M., Gierthy, J. F., and Kaminsky, L. S. (2004) Cancer Res 64(18), 6805-6813
9. Han, W., Pentecost, B. T., Pietropaolo, R. L., Fasco, M. J., and Spivack, S. D. (2005) Mol Carcinog 44(3), 202-211
10. Kumar, S. V., Jain, R., Mokhiber, K., Venezia, A., Sheehan, A., and Spivack, S. D. (2005) Cancer Detect Prev 29(6), 552-561
11. Zhong, L., Batt, D. B., and Carmichael, G. G. (1994) Biotechniques 16(1), 56-57
12. 分子生物学実験プロトコール. I Current protocols コンパクト版 Frederick M. Ausubel [ほか編] 西郷薫, 佐野弓子共訳 丸善 1997年6月