

免疫反応促進試薬 *Can Get Signal*[®] immunostain を用いた免疫染色における固定法の検討

京都大学大学院 薬学研究科 生体情報制御学分野 高橋 千絵 先生

はじめに

Rab11は、細胞表面からのエンドサイトーシスやその後のリサイクリングに重要な役割を果たす低分子量GTPaseであり、主としてリサイクリングエンドソームに局在します。しかしながら、蛍光免疫染色法に適した有用な抗体がなく、内在性Rab11の局在や、細胞内での機能を詳しく調べることが阻まれてきました。前回、本誌 (vol.95 p11-12 Technical Reviewの項) において報告しましたように、免疫染色用「*Can Get Signal*[®] immunostain」を用いることによって、従来法では検出が難しかったRab11のシグナルを検出することが可能になりました。

一方、exocyst複合体は、エキソサイトーシスにおける細胞内小胞の細胞膜への繫留 (tethering) や融合 (fusion) に関与することが知られており、構成サブユニットにsec15やExo70などがあります。sec15やExo70などの細胞内局在は、その機能から主に細胞膜近傍にあると考えられてきましたが、蛍光免疫染色法に適したexocystサブユニットに対する有用な抗体はなく、不明瞭でした。生化学的解析からはRab11とsec15の直接結合が報告されています。

今回私たちは、Exo70のシグナル検出に免疫染色用「*Can Get Signal*[®] immunostain」が有用であることを確認しました。さらに、複数の固定法との組み合わせにも免疫染色用「*Can Get Signal*[®] immunostain」は有効であり、これにより、Rab11とExo70が核周辺とそこから伸びたチューブル様構造で共局在することを初めて見いだしました。

方 法

1. 細胞

カバーガラス上でHeLa細胞を培養し、48時間後固定しました。(3.へ続く)

2. Rab11のノックダウン (siRNA)

35×35 mmディッシュでHeLa細胞を培養し、24時間後にRab11aおよびRab11bに対するsiRNA、または、Exo70に対するsiRNAをトランスフェクションしました。その24時間後に細胞をカバーガラス上にまき直し、さらに48時間後 (トランスフェクションの72時間後) に細胞を固定しました。(3.へ続く)

3. 固定

〈PFA固定〉

培地を除き、37°Cに温めた4%パラホルムアルデヒド溶液で10分間浸して固定しました。PBSで3回洗浄後、50 mM塩化アンモニウム溶液で20分間クエンチングし、PBSで3回洗浄し、0.1% TritonX-100/PBSで5分間処理した後、さらにPBSで3回洗浄し、2% BSA/PBSで4°C一晩ブロッキングしました。

〈TCA固定〉

培地を除き、氷冷した10%トリクロロ酢酸で15分間浸して直ちに固定しました。PBSで3回洗浄後、0.1% TritonX-100/PBSで5分間処理した後、PBSで3回洗浄し、2% BSA/PBSで4°C一晩ブロッキングしました。

〈PFA固定+TCA固定〉

PFA固定、クエンチングを行った後、氷冷した10%トリクロロ酢酸で15分間浸して固定しました。PBSで3回洗浄後、0.1% TritonX-100/PBSで5分間処理した後、PBSで3回洗浄し、2% BSA/PBSで4°C一晩ブロッキングしました。

4. 1次抗体反応

1次抗体を *Can Get Signal*[®] immunostain (Solution A) あるいはブロッキング液 (2% BSA/PBS) で希釈 (Rab11は200倍、Exo70は10倍) し、サンプルと4°Cで一晩反応させました。反応後、PBSで3回洗浄しました。

〈1次抗体〉

抗Rab11モノクローナル抗体：マウス (BD Biosciences)

抗Exo70モノクローナル抗体：ハイブリドーマ上清 (Dr. Shu-Chan Hsu; Mount Sinai School of Medicine, New Yorkより分与していただきました)

5. 2次抗体反応

ブロッキング液で2次抗体を1,000倍希釈し、サンプルと室温で1時間反応させました。反応後、PBSで3回洗浄しました。

〈2次抗体〉

AlexaFluor® 488標識抗マウスIgG抗体 (Molecular Probes®)

AlexaFluor® 488標識抗マウスIgG2b抗体 (Molecular Probes®)

AlexaFluor® 555標識抗マウスIgG2a抗体 (Molecular Probes®)

6. 封入・観察

サンプルをFluorescent Mounting Medium (Dako) で封入し、蛍光顕微鏡観察をしました。顕微鏡はCarl Zeiss社製のAxiovert 200 MATを使用しました。

結果及び考察

図1は、細胞をPFA固定またはTCA固定し、抗Rab11抗体を2% BSA/PBS (従来法) または *Can Get Signal*® immunostain Solution A で希釈したときのRab11染色像をそれぞれ比較しています。PFA固定サンプルでは、従来法でも *Can Get Signal*® immunostain Solution A を使用した場合でもRab11のシグナルはほとんど検出できませんでした。TCA固定サンプルでは、従来法ではほとんど検出できませんでしたが、*Can Get Signal*® immunostain Solution A を使用することにより、細胞質に散らばったエンドソーム様構造と核周辺およびそこから伸びたチューブル様構造のシグナルが顕著に認められました。また、このシグナルはsiRNAを用いたRab11ノックダウン細胞ではほぼ完全に消失しました (本誌vol.95 p11-12 Technical Reviewの項参照)。

一方、同様な条件でのExo70の染色像を比較しました (図2)。PFA固定サンプルでは、従来法でほとんど検出できなかったExo70のシグナルは、*Can Get Signal*® immunostain Solution A の使用により、細胞質に散らばったエンドソーム様構造と核周辺およびそこから伸びたチューブル様構造などが顕著に認められ、Rab11シグナルと酷似していました。このシグナルはsiRNAを用いたExo70ノックダウン細胞ではほぼ完全に消失しました (data not shown)。TCA固定サンプルでは、*Can Get Signal*® immunostain Solution A によりわずかなシグナルの増加が認められました。

Rab11

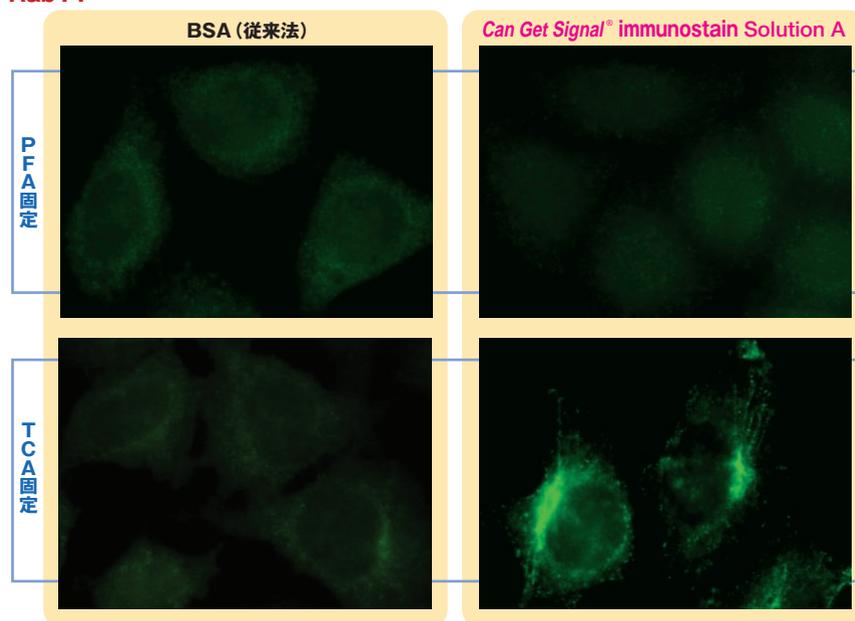


図1. 従来法と *Can Get Signal*® immunostain を用いたときのRab11染色像の比較

Exo70

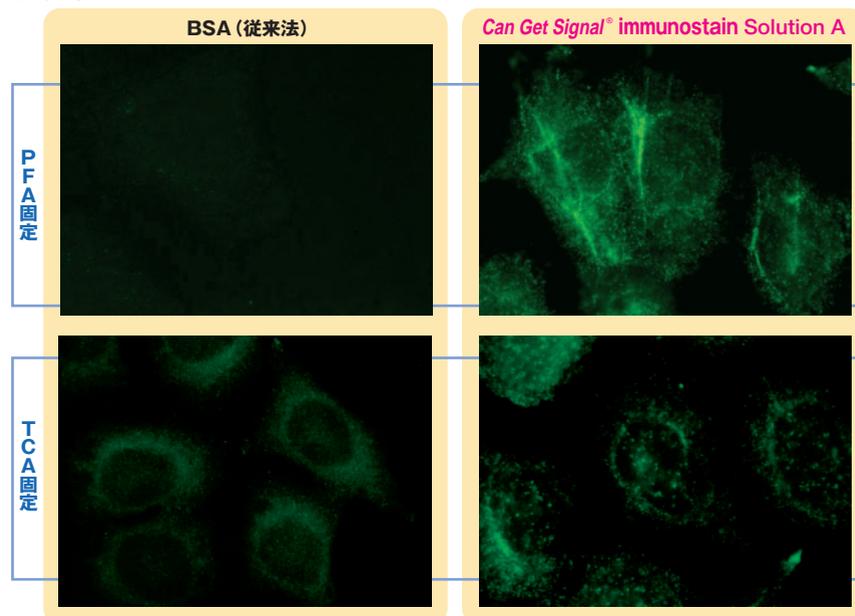


図2. 従来法と *Can Get Signal*® immunostain を用いたときのExo70染色像の比較

このように、Rab11とExo70ともにCan Get Signal® immunostain Solution Aで劇的なシグナル増加を認められました。しかしながら、両者の至適固定法が異なるため、同時に検出して共局在の有無を確認することはできませんでした。そこで、PFA固定に引き続きTCA固定を行い、同時検出が可能かどうかを検討してみました。その結果、Rab11もExo70も顕著にシグナルを検出でき、両者が核周辺とそこから伸びたチューブル様構造で共局在することが確認できました(図3)。

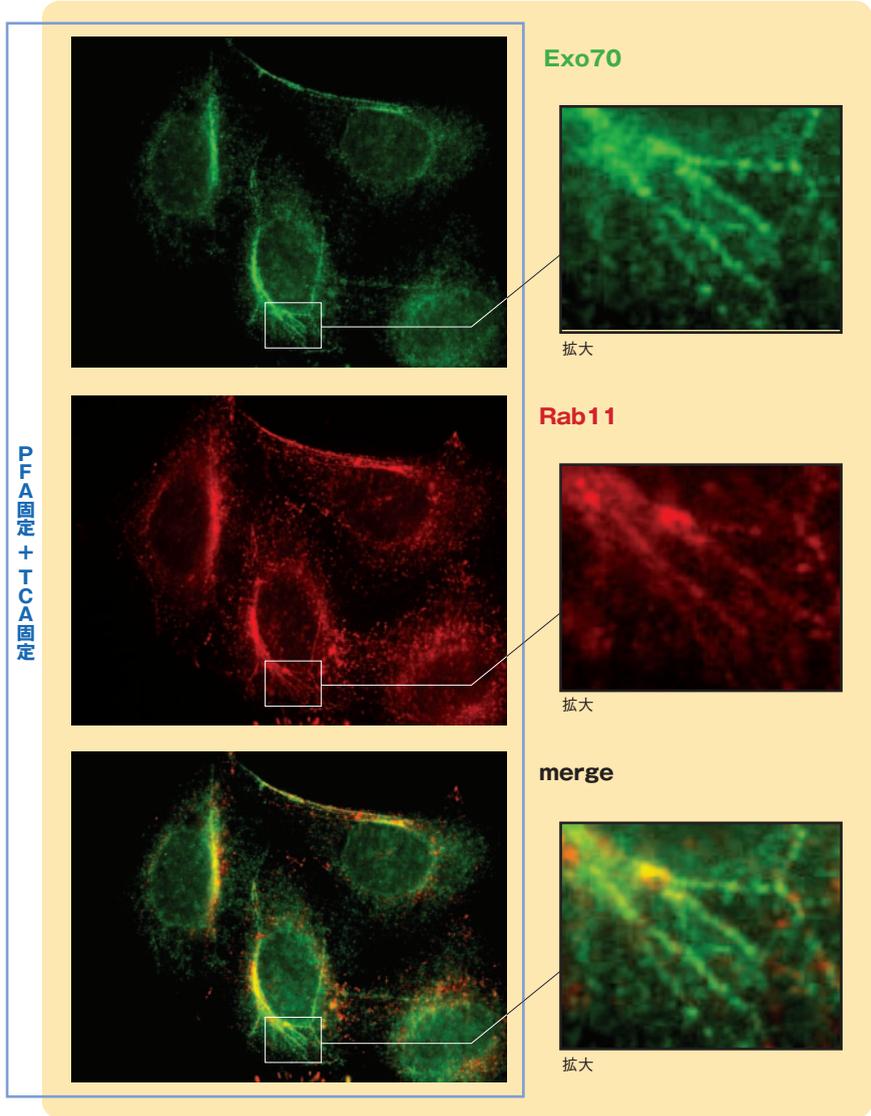


図3. PFA固定+TCA固定を行いCan Get Signal® immunostainを用いたときのRab11とExo70の共局在の検出

以上の結果から、以下のことが明らかとなりました。

- 1) Can Get Signal® immunostainは、従来法では難しかったRab11やExo70のシグナル検出を増強させ、それらの内在性局在を明らかにすることができました。
- 2) Can Get Signal® immunostainは、PFA固定にもTCA固定にも有効であることがわかりました。
- 3) PFA固定、TCA固定のように、抗体によって異なる固定法が有効な場合、PFA固定を行った後にTCA固定を施すことによって、両タンパク質のシグナルを同時に検出することが可能になりました。この場合も、Can Get Signal® immunostainは有効であり、両固定法の利点を生かしながらシグナルを増強させることができました。



■期間：2010年11月25日～2011年3月31日(ご注文分)

免疫反応促進試薬 Can Get Signal® immunostain



内容	Code No.	価格	キャンペーン価格
Solution A&B 各5ml×1本	NKB-401	¥12,000	¥8,400
Solution A 20ml×1本	NKB-501	¥30,000	¥21,000
Solution A (20ml×1本)×4	NKB-501x4	¥70,000	対象外
Solution B 20ml×1本	NKB-601	¥30,000	¥21,000
Solution B (20ml×1本)×4	NKB-601x4	¥70,000	対象外

※0.2%以下のノニオン系界面活性剤を含みます。

Can Get Signal® immunostainは、免疫組織・細胞染色などの感度と特異性を改善する機能を有するバッファーです。

使用法は、現在希釈液に用いている希釈血清やブロッキング溶液を本溶液に変更するだけです(Solution AとBは免疫反応の促進作用が異なり、両試薬ともに1次抗体および2次抗体にご使用いただけます)。

⇒詳しくは<http://www.toyobo.co.jp/bio>をご覧ください。