

## 免疫反応促進試薬 *Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain を用いた内在性Rab11の検出

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

私たちが研究対象としている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。内在性Rab11の局在の検出が可能になれば、細胞生物学分野で研究が盛んな小胞輸送系、特にリサイクリングエンドソームの役割や機能の解明が飛躍的に進むと期待されます。そこで今回私たちは、免疫染色用免疫反応促進試薬「*Can Get Signal*<sup>®</sup> 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のシグナルの検出が可能かどうかについて検討しました。

### 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

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1時間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*<sup>®</sup> immunostain (Solution AまたはSolution B) あるいはブロッキング液(2% BSA/PBS)で200倍希釈し、サンプルと4℃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)

#### 5. 2次抗体反応

ブロッキング液に2次抗体を1,000倍希釈、DAPI (5 mg/ml) を50,000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<sup>®</sup> 488標識抗マウスIgG抗体 (Molecular Probes<sup>®</sup>)  
DAPI;4',6-diamino-2-phenylindole (Molecular Probes<sup>®</sup>)

#### 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 200MATを使用しました。

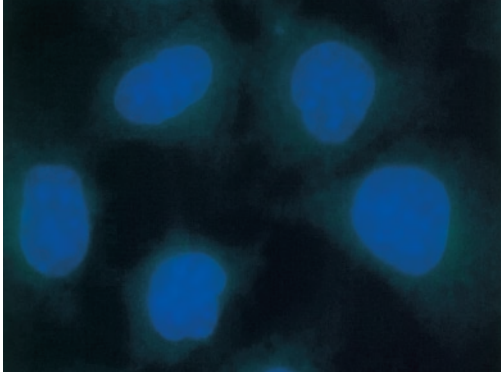
### 結果及び考察

図は、抗Rab11抗体を2% BSA/PBS (従来法)、*Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain Solution A、またはSolution Bで希釈したときのRab11の染色像を比較しています。すべて同じ条件で撮影しました。Rab11のシグナルは、従来法ではほとんど検出できませんでしたが、*Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain Solution Aを使用した場合には、細胞質に散らばったエンドソーム様構造と核周辺から伸びたチューブル様構造のシグナルが認められました。このシグナルが示す局在は、細胞に外来性に導入したRab11と同様の構造にありました (data not shown)。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。これらのことから、*Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain Solution Aにより検出が可能となったシグナルは、Rab11に特異的

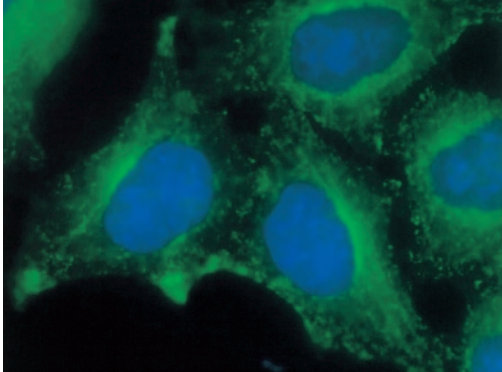
であると結論づけられました。一方、*Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain Solution Bを使用した場合には、*Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain Solution Aを使用したときと同様のシグナルが弱いながら認められました。このシグナルもRab11ノックダウン細胞では消失しました。

*Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostainを用いることによって、従来法では非常に難しかった内在性Rab11の局在を明らかにすることができました。HeLa細胞における内在性Rab11は、従来から示唆されていたエンドソーム様の局在に加えて、核周辺から伸びたチューブル様構造にも局在することが明確になりました。*Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostainは、バックグラウンドを上げることなく、従来法では検出が難しかったシグナルを増強させました。抗Rab11抗体のようにシグナル検出感度の低い他の抗体においても大きな効果が期待できると思われました。

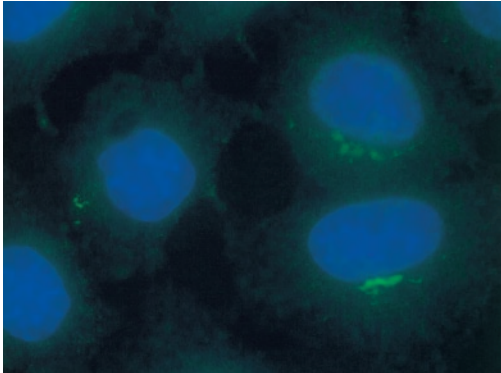
(1) BSA (従来法)



(2a) *Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain Solution A



(3) *Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain Solution B



(2b) Rab11 Knock Down

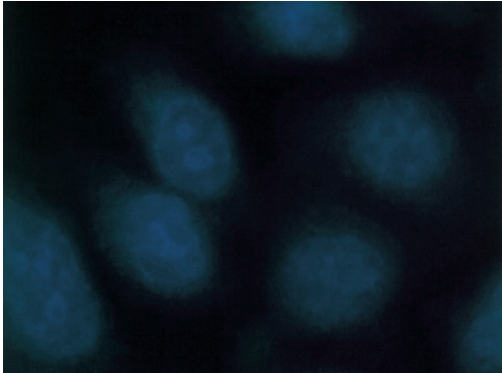


図. Rab11の検出

(1) 従来法  
従来法でRab11を染色した結果。従来法ではRab11のシグナルはほとんど検出できませんでした。

(2a) *Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain Solution Aを使用  
*Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain Solution Aを用いてRab11を染色した結果。細胞質に散らばったエンドソーム様構造と核周辺から伸びたチューブル様構造のシグナルが認められました。

(2b) siRNAを用いてRab11をノックダウンしたとき  
*Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain Solution Aを用いて検出されたシグナルはほぼ完全に消失しました。

(3) *Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain Solution Bを使用  
*Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain Solution Aと同様に、細胞質に散らばったエンドソーム様構造と核周辺から伸びたチューブル様構造のシグナルが認められたが、シグナルはSolution Aの場合に比べて極めて弱いものでした。

免疫反応促進試薬 ***Can Get Signal*<sup>®</sup> immunostain**



内容		Code No.	価格
Solution A&B	各5ml	NKB-401	¥12,000
Solution A	20ml	NKB-501	¥30,000
Solution A	(20ml × 1本) × 4	NKB-501x4	¥70,000
Solution B	20ml	NKB-601	¥30,000
Solution B	(20ml × 1本) × 4	NKB-601x4	¥70,000

※0.2%以下のノニオン系界面活性剤を含みます。

*Can Get Signal*<sup>®</sup> 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.toyoobo.co.jp/bio>をご覧ください。