

IF-FISH 法を利用した mRNA と翻訳ペプチドの同時可視化

¹東京大学・定量生命科学研究所、²東京大学・大学院新領域創成科学研究科、³JST さきがけ、⁴徳島大学・先端酵素学研究所

元起 寧那^{1,2}、泊 幸秀^{1,2}、小林 穂高^{1,3,4}

Detecting mRNAs and translated peptides with IF-FISH

¹Institute for Quantitative Biosciences, The University of Tokyo, ²Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, ³JST PRESTO, ⁴Institute of Advanced Medical Sciences, Tokushima University

Neina Motoki^{1,2}, Yukihide Tomari^{1,2}, Hotaka Kobayashi^{1,3,4}

(投稿日 2023/11/30、再投稿日 2024/4/24、受理日 2024/4/24)

キーワード：IF-FISH、mRNA、翻訳、細胞内 1 分子イメージング

概要

IF-FISH 法とは、免疫蛍光染色 (immunofluorescence, IF) と蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (fluorescence in situ hybridization, FISH) を同時に行うことで、細胞内の蛋白質と核酸の両方を検出する手法である。本プロトコールでは、IF-FISH 法により mRNA と翻訳ペプチドを 1 分子感度で可視化することで、細胞内の mRNA 一つ一つの翻訳活性を in situ イメージングする手法について紹介する。

イントロダクション

はじめに、本手法の原理について簡単に説明したい。本手法は人工的なレポーター mRNA を利用したものであり、1 種類の mRNA に対して 40 種類ほどの蛍光プローブをハイブリダイズする single-molecule FISH (smFISH) (文献 1,2) により、mRNA を 1 分子感度で検出することができる。また、このレポーター mRNA の翻訳領域には、酵母由来の GCN4 エピトープが 20 回ほど反復した SunTag ペプチド (文献 3) がコードされており、GCN4 抗体を用いた IF により、翻訳ペプチドを 1 分子感度で検出することができる。GCN4 エピトープはフォールディングを必要としないため、mRNA から合成されてリボソームから出てきたばかりの翻訳ペプチドを検出することができ、この mRNA 上に観察される SunTag シグナルが翻訳活性にあたる (文献 4,5)。こうした原理により、mRNA を smFISH で、翻訳ペプチドを IF で、それぞれ 1 分子感度で可視化することで、細胞内の mRNA 一つ一つの翻訳活性を in situ イメージングすることができる。本プロトコールでは、レポーター mRNA を発現するヒト由来の U2OS 細胞 (文献 5) を例に、IF-FISH 法により mRNA と翻訳ペプチドを可視化する具体的な手順をまとめる。なお、U2OS 細胞は培養が容易で接着性も高く、RNA イメージングの領域でよく使用されているが、本プロトコールは他の細胞にも広く転用することができる。

装置・器具・試薬

装置

- ・ボルテックス
- ・インキュベーター
- ・シェーカー

器具

*滅菌処理したものが望ましい

- ・24 ウェルプレート
- ・カバーガラス (0.17 mm)
- ・パラフィルム
- ・10 cm ディッシュ
- ・15 cm ディッシュ
- ・キムワイプ
- ・ピンセット
- ・スライドガラス

試薬

*RNase フリーのもので望ましい

- ・パラホルムアルデヒド (PFA) (有害性あり)
- ・リン酸緩衝液 (PBS)
- ・Triton X-100
- ・水
- ・Saline-sodium citrate 緩衝液 (SSC)
- ・ホルムアミド (有害性あり)
- ・ウシ血清アルブミン (BSA)
- ・RNase inhibitor (Thermo Fisher, AM2696 を推奨)
- ・tRNA
- ・デキストラン硫酸ナトリウム (Merck, D8906 を推奨)
- ・smFISH プローブ (文献 5)
- ・一次抗体 (文献 5)
- ・二次抗体 (文献 5)
- ・マウンティング溶液 (Thermo Fisher, P36971 を推奨)

実験手順

- 1) 細胞の固定と透過処理
- 2) プリハイブリダイゼーション
- 3) ハイブリダイゼーションと一次抗体処理
- 4) 二次抗体処理
- 5) マウンティング

実験の詳細

1) 細胞の固定と透過処理

IF-FISH を行うための事前準備として、レポーターmRNA を発現する U2OS 細胞をカバーガラスに接着させておく。U2OS 細胞の場合、24 ウェルプレートにカバーガラスを 1 枚ずつ入れ、細胞懸濁液を加えれば、数時間でカバーガラスに接着する。接着性が低い細胞を使用する場合は、カバーガラスをコラーゲン処理することを推奨する。細胞がカバーガラスに接着したら、まず、細胞を固定する。具体的には、24 ウェルプレートから培地を除き、4% PFA を加え、室温で 10 分間インキュベートする。この時、IF-FISH の効率が低下する原因になるため、固定時間が長くなり過ぎないように注意する。固定が終わったら、細胞を 1×PBS で 3 回洗う。次に、細胞の透過処理を行う。具体的には、24 ウェルプレートから 1×PBS を除き、0.1% Triton X-100 を加え、室温で 10 分間インキュベートする。透過処理が終わったら、細胞を 1×PBS で 3 回洗う。

以上の作業中に、IF-FISH 用のチャンバーを準備しておく。IF-FISH に使用する試薬は smFISH プロブをはじめ高額なものが多い。そこで、我々は試薬の使用量を減らすため、そのまま 24 ウェルプレート内で IF-FISH するのではなく、自作のチャンバー上に IF-FISH 溶液を少量滴下し、その上に反転させたカバーガラスを乗せている (図 1)。この方法だと、試薬の使用量を 1/5 ほどに節約することができる。IF-FISH 用のチャンバーは以下のようにして、プリハイブリダイゼーション用と、ハイブリダイゼーション用に 2 つ準備している。

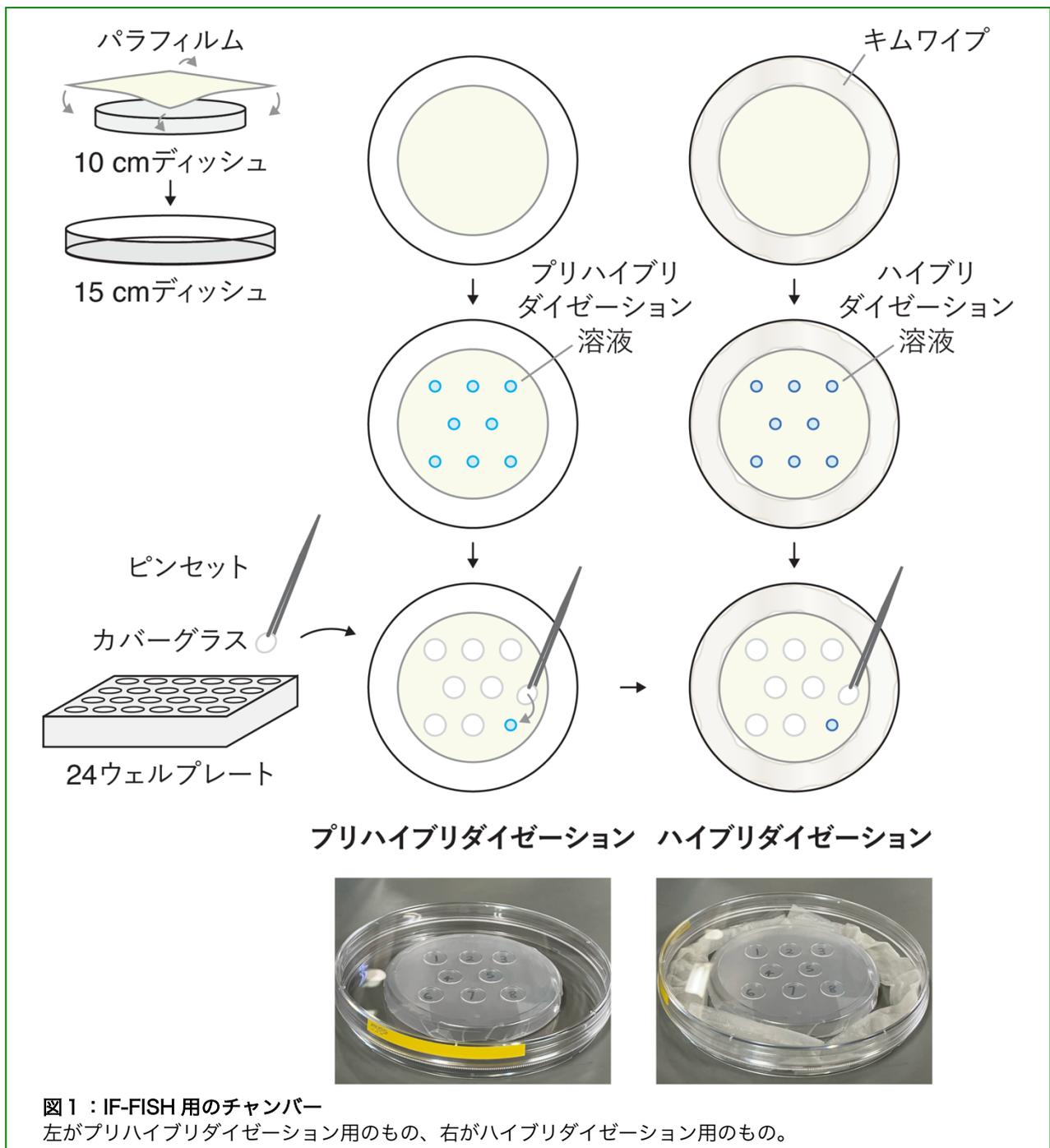
1. まず、10 cm ディッシュの蓋をパラフィルムで覆う。パラフィルムの表面が平らになるよう四隅を均等に引っ張り、蓋にしっかり固定する。
2. 次に、パラフィルムで覆った 10 cm ディッシュの蓋を、15 cm ディッシュの中央に置く。プリハイブリダイゼーション用はこれで完成である (図 1 左)。
3. さらに、ハイブリダイゼーション用については、15 cm ディッシュの隙間に水で浸したキムワイプを敷きつめる (図 1 右)。プリハイブリダイゼーションは室温で 30 分間の処理である一方、ハイブリダイゼーションは 37°C で 3 時間の処理となる。そのため、この一手間を惜しむと、ハイブリダイゼーション溶液が蒸発してしまい、ムラのある染色結果となる。

2) プリハイブリダイゼーション

次に、細胞をプリハイブリダイゼーション溶液で平衡化する。具体的には、まず、RNase フリーの水を用いて、以下の組成になるようにプリハイブリダイゼーション溶液を調製する。

1. 2×SSC
2. 10%ホルムアミド
3. 0.5% BSA
4. RNase inhibitor (我々は、Thermo Fisher AM2696 を、40 U/mL で使用)

溶液が調製できたら、準備したチャンバー (プリハイブリダイゼーション用) の上にプリハイブリダイゼーション溶液を 50 μ L ずつ滴下する (図 1 左)。この時、細胞が不均



一に処理される原因になるため、気泡が入らないよう注意する。次に、24 ウェルプレート内のカバーガラスをピンセットで持ち上げ、カバーガラスの端をキムワイプに軽く触れさせて余分な水分を除く。そして、カバーガラスの細胞側が下になるように反転させ、滴下したプリハイブリダイゼーション溶液の上に乗せる。ここでもやはり、細胞が不均一に処理されることを避けるべく、気泡が入らないよう注意する。最後に、15 cm ディッシュの蓋を被せて、室温で 30 分間インキュベートする。この段階では、蛍光標識された試薬は入っていないため、我々は特に遮光していない。

3) ハイブリダイゼーションと一次抗体処理

続いて、レポーターmRNA に smFISH プローブをハイブリダイズさせ、同時に、翻訳ペプチド (SunTag) を一次抗体でラベルする。具体的には、まず、RNase フリーの水を用いて、以下の組成になるようにハイブリダイゼーション溶液を調製する。なお、デキストラン硫酸ナトリウムは粘性が非常に高く、溶液を均一に混ぜる上で厄介な試薬である。そこで、我々は 1 – 7 までを調製し均一に混ぜてから、そこにデキストラン硫酸ナトリウムを加え、最後にボルテックスを十分かけるようにしている。ハイブリダイゼーション溶液が均一に混ざっていないと、smFISH プローブや一次抗体が均一に行き渡らず、ムラのある染色結果となる。なお、smFISH プローブは蛍光標識されているため、手早く作業し、光に長時間あてないように注意する。

1. 2×SSC
2. 10%ホルムアミド
3. 0.05% BSA
4. RNase inhibitor (我々は、Thermo Fisher AM2696 を、40 U/mL で使用)
5. 1 mg/mL tRNA
6. 50 nM smFISH プローブ
7. 一次抗体 (1/100 希釈)
8. 10%デキストラン硫酸ナトリウム

溶液が調製できたら、準備したチャンバー (ハイブリダイゼーション用) の上にハイブリダイゼーション溶液を 50 μ L ずつ滴下する (図 1 右)。この時、細胞が不均一に処理される原因になるため、気泡が入らないよう注意する。次に、プリハイブリダイゼーション溶液上のカバーガラスをピンセットで持ち上げ、カバーガラスの端をキムワイプに軽く触れさせて余分な水分を除く。そして、カバーガラスの細胞側が下になる向きのまま、滴下したハイブリダイゼーション溶液の上に乗せる。ここでもやはり、細胞が不均一に処理されることを避けるべく、気泡が入らないよう注意する。最後に、15 cm ディッシュの蓋を被せて、37°C で 3 時間インキュベートする。この時、インキュベーターが遮光できない仕様である場合は、チャンバーをアルミホイルなどで覆い遮光する。なお、このタイミングで、次の手順で使用する 2×SSC, 10%ホルムアミド溶液を調製し、37°C インキュベートに入れて温めておくと、以降の実験がスムーズに進む。

4) 二次抗体処理

続いて、翻訳ペプチド (SunTag) に結合させた一次抗体を、蛍光標識した二次抗体で可視化する。具体的には、まず、温めておいた 2×SSC, 10%ホルムアミド溶液 (以下、SSC ホルムアミド溶液) で細胞を 3 回洗う。参考までに、我々の方法を以下に紹介する。

1. 新しい 24 ウェルプレートに、SSC ホルムアミド溶液を分注する。
2. ハイブリダイゼーション溶液上のカバーガラスをピンセットで持ち上げ、カバーガラスを細胞側が上になるように反転させ、24 ウェルプレート内の SSC ホルムアミド溶液に浸す。
3. 24 ウェルプレート内で、SSC ホルムアミド溶液で細胞を 2 回洗う。

細胞の洗浄が終わったら、次に、蛍光標識した二次抗体を SSC ホルムアミド溶液で 1/1000 希釈し、二次抗体溶液を調製する。そして、24 ウェルプレートから SSC ホルムアミド溶液を除き、二次抗体溶液を加える。最後に、24 ウェルプレートの蓋を被せて、37°Cで 30 分間インキュベートする。ハイブリダイゼーションの時と同様に、インキュベーターが遮光できない仕様である場合は、24 ウェルプレートをアルミホイルなどで覆い遮光する。

5) マウンティング

最後に、mRNA と翻訳ペプチドを可視化した細胞をマウンティング溶液で封入し、蛍光イメージング用のスライドを作成する。具体的には、まず、二次抗体処理した細胞を 2 ×SSC で 3 回洗う。なお、我々は洗浄の効率を高めることを目的に、3 回目の洗浄については遮光した状態でシェーカーに乗せ、10 分間ほど穏やかに攪拌している。細胞の洗浄が終わったら、次に、スライドガラスの上にマウンティング溶液を 15 μ L ずつ滴下する。続いて、24 ウェルプレート内のカバーガラスをピンセットで持ち上げ、カバーガラスの端をキムワイプに軽く触れさせて余分な水分を除く。そして、カバーガラスの細胞側が下になるように反転させ、滴下したマウンティング溶液の上に乗せる。ここでもやはり、気泡が入らないように注意する。最後に、そのスライドを遮光した状態で一晩置き、マウンティング溶液を硬化させれば、蛍光イメージング用のスライドの完成である。このスライドを蛍光顕微鏡にセットすれば、mRNA と翻訳ペプチドがそれぞれ 1 分子感度で可視化された細胞をその目で見る事ができる (図 2)。

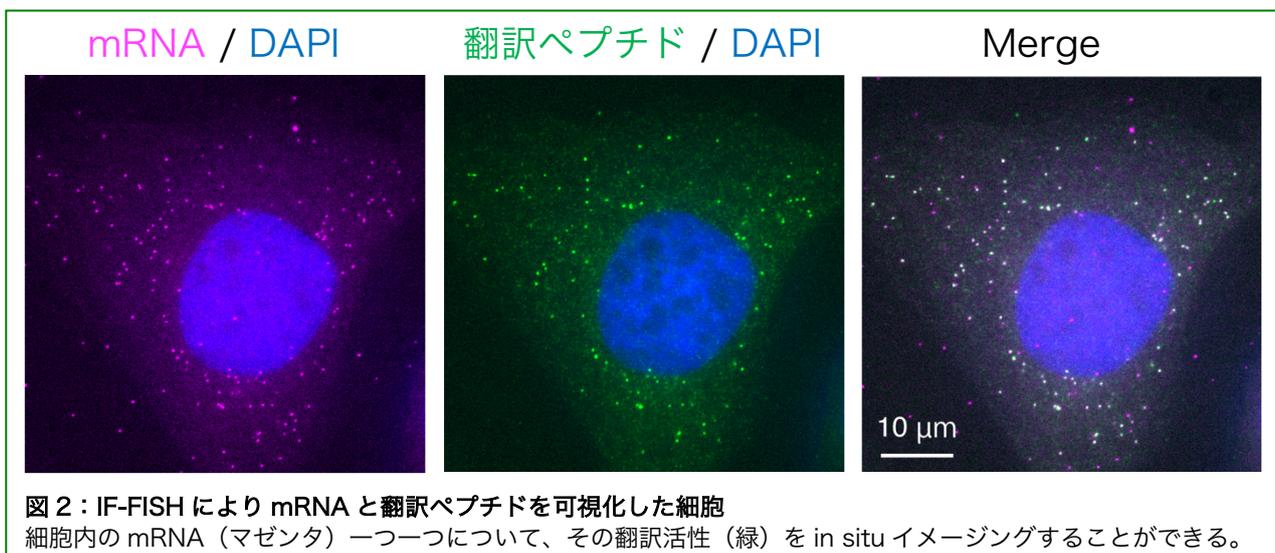


図 2 : IF-FISH により mRNA と翻訳ペプチドを可視化した細胞
細胞内の mRNA (マゼンタ) 一つ一つについて、その翻訳活性 (緑) を in situ イメージングすることができる。

工夫とコツ

カバーガラスの取り扱い

カバーガラスは厚さ 0.17 mm のものを使用する。カバーガラスをピンセットで持ち上げる際は、カバーガラスが割れないように優しく掴む。カバーガラスを思うように持ち上げられない時、イライラして無理やり持ち上げようとすると、高確率で割れる。カバーガラスの取扱いは、心を穏やかに保つことがコツである。

細胞の取り扱い

細胞は乾燥すると構造が壊れてしまう。IF-FISH の手順には、古い溶液を除き、新しい溶液を加える、といった作業が多々あるが、いずれの手順も手早く行う。例えば我々は、左手で古い溶液を除き、右手で新しい溶液を加えるようにしている。IF-FISH の手順には、カバーガラスの端をキムワイプに軽く触れさせて余分な水分を除く作業があるが、これも入念に行うのではなく手早く行う。

また、細胞がカバーガラスから剥がれる原因になるため、細胞に強い力がかかることも避けたい。細胞を PBS などですすぐ際、あるいは新しい溶液を加える際は、穏やかに溶液を加えるようにする。例えば我々は、ウェルの壁づたいに溶液をゆっくり加えるようにしている。

RNA の取り扱い

RNA は分解されやすい物質であるため、IF-FISH を行う際は RNase のコンタミネーションが起こらないよう注意する。IF-FISH に使用する一連の試薬は RNase フリーのものを使用することが望ましい。また、IF-FISH の一連の作業は、素手ではなくグローブをして行う。

蛍光標識試薬の取り扱い

IF-FISH では、smFISH プローブと二次抗体が蛍光標識されている。これらの試薬自体、これらの試薬を加えた溶液、これらの試薬で処理した細胞などは、蛍光の褪色を防ぐために、光に長時間あてないよう注意する。作成した蛍光イメージング用のスライドも、蛍光顕微鏡で観察するまでは遮光しておく。

実験の安全

PFA は、GHS 分類における物理化学的危険性は指摘されていないが、健康有害性および環境有害性がある。また、ホルムアミドについても、GHS 分類における物理化学的危険性および環境有害性は指摘されていないが、健康有害性があり、消防法における危険物第四類引火性液体第三石油類 水溶性液体にもあたる。そのため、IF-FISH を安全に行うためには、各研究室の責任のもとに、各研究室の実験環境を踏まえて適切にリスクアセスメントを行う必要がある。

文献

- 1) K Femino, A. M. et al., *Science*, **280**, 585–590 (1998).
- 2) Raj, A. et al., *Nat. Methods*, **5**, 877–879 (2008).
- 3) Tanenbaum, M. E. et al., *Cell*, **159**, 635–646 (2014).
- 4) Wu, B. et al., *Science*, **352**, 1430–1435 (2016).
- 5) Kobayashi, H. & Singer, R. H., *Nat. Commun.*, **13**, 1435 (2022).



このコンテンツはクリエイティブ・コモンズ 表示 - 非営利 - 改変禁止 4.0 国際 ライセンスの下に提供されています。

© 日本蛋白質科学会 2014 Licensed under クリエイティブ・コモンズ 表示 - 非営利 - 改変禁止 4.0 国際 ライセンス