

修士論文

HiBiTシステムを利用した定量的免疫沈降法の開発と
エピトープタグを利用したクロマチン免疫沈降法の
至適化への応用

高知工科大学大学院 工学研究科

基盤工学専攻 生命科学コース

分子発生制御学研究室

高田拓也

指導教員

蒲池雄介教授

令和2年3月11日

目次

第1章 要旨 2

第2章 序論 3

第3章 結果 5

第4章 考察 34

第5章 材料と方法 36

第6章 謝辞 40

第7章 参考文献 41

第1章 要旨

クロマチン免疫沈降法(ChIP)は、転写因子などのタンパク質とゲノム DNA との *in vivo* における相互作用を同定する手法である。目的のタンパク質-DNA 複合体の回収は抗原抗体反応に基づいた免疫沈降法によって行われるが、親和性と特異性が高い抗体が必要とされるため適用が難しい場合がある。エピトープタグ法を用いることでこの問題は回避可能であるが、どのエピトープタグが ChIP に適しているかの評価は十分ではない。そこで、まず HiBiT システムと呼ばれる NanoLuc ルシフェラーゼの 2 断片の相補性を利用した発光定量法を利用して、免疫沈降の効率を定量的に計測する方法(HiBiT-qIP 法)を開発した。この方法では、HiBiT タグを付加したタンパク質を用いることで、免疫沈降された微量のタンパク質でも NanoLuc 活性に基づいて定量することが可能である。この方法を応用して、エピトープタグの多量体化の効果、さらに 5 種類のエピトープタグに関して回収用の抗体とビーズの組み合わせがクロマチン免疫沈降法へ与える影響の評価をおこなった。

まず、多量体化による効果を調べるために FLAG と PA タグに関して、それぞれの単量体、二量体、三量体と HiBiT タグを Sox3 転写因子に付加した。これらのタグ付き Sox3 をコードする mRNA を顕微注入したゼブラフィッシュ胚からクロマチンを調製後、各エピトープタグのモノクローナル抗体クローンあるいは抗 Sox3 ポリクローナル抗体を用いてクロマチン免疫沈降法を行った。まず、タンパク質-DNA 複合体の回収率を HiBiT-qIP 法で調べたところ、タグを多量体化することで Sox3-DNA 複合体の回収率は上昇し、抗 Sox3 抗体よりも多く回収できることがわかった。次に、ChIP で回収した DNA に対して qPCR を行い、Sox3 が核内で結合するゲノム領域の DNA と陰性コントロール領域の DNA の存在比を調べ、免疫沈降の条件ごとの ChIP 濃縮度を求めた。その結果、三量体タグを用いた場合に Sox3 が結合する DNA 断片が最も特異的に回収されることが分かった。

次に、複合体の回収に優れたエピトープタグと抗体の組み合わせを探索した。この実験では 5 種類のエピトープタグ FLAG, HA, V5, PA, Ty1 について、それぞれの三量体と HiBiT タグを付加した Sox3 を作成し、各タグのモノクローナル抗体クローン、並びに回収のための磁気ビーズの種類を組み合わせを変えてクロマチン免疫沈降法を行った。その結果、三量体タグを用いた場合は、エピトープの種類とモノクローナル抗体クローンの組合せにかかわらず Sox3-DNA 複合体の回収率が高くなることが分かった。次に、ChIP- qPCR により ChIP 濃縮度を求めたところ、三量体タグを用いた場合は、ほとんどの条件下で Sox3 が結合する DNA 断片が特異的に回収されることが分かった。しかし、同じ抗体を用いた場合でも磁気ビーズが異なると非特異的 DNA 断片の混入が上昇し ChIP 濃縮度が低下する場合があることが分かった。

以上の結果に加え、ホルムアルデヒドによる固定条件も最終的な ChIP の結果へ複雑に影響を与えることが分かったので、エピトープタグを利用して ChIP を行う際でもさまざまな条件について十分に検討することが非常に重要であると思われる。

第2章 序論

胚の発生はゲノムより読み出された遺伝情報をもとに進行する。この遺伝情報の読出しは、転写因子という転写レベルで遺伝子の発現を調節するタンパク質により厳密に制御されている。しかし、転写因子には未だに解明されていないものが多く、それぞれの転写因子がどのような役割を持って発生を制御しているのか研究がなされている。この転写因子の役割を理解するには、*in vivo* における転写因子とゲノム DNA の相互作用を調べることが重要であり、その相互作用を同定する手法として、クロマチン免疫沈降法がある[1, 2]。私は転写因子の役割の理解をより効率的に行えるように、エピトープタグを利用したクロマチン免疫沈降法の至適化を行った。

クロマチン免疫沈降法とは、転写因子がゲノム DNA のどの配列に結合しているか明らかにする手法の一つである。*in vivo* での転写因子とゲノム DNA の相互作用を解析するため、*in vitro* で行う実験よりも本来の転写因子の働きを明らかにすることが出来る。多くの研究では、目的の転写因子の DNA 結合配列を同定するための方法である qPCR や次世代シーケンシングと組み合わせた ChIP-qPCR や ChIP-seq が広く用いられている。方法の概略は、まず転写因子と DNA の複合体を固定することで複合体の安定化を行い、細胞を破碎した後に核溶解液を調製する。その後、超音波処理で DNA を断片化し、目的の転写因子に特異的な抗体が結合した磁気ビーズを用いて免疫沈降を行う。回収した転写因子-DNA 複合体を脱固定処理し、精製した DNA に対して、qPCR、Microarray、次世代シーケンサーを用いて転写因子の結合配列を解析する。これらの過程における固定時間や抗体の選択などの条件の差は、クロマチン免疫沈降法の解析結果に大きな影響を与える[3]。その中でも回収に使用される抗体は回収率と特異性への影響が大きい。転写因子によってはクロマチン免疫沈降法で使用できるような高い親和性と特異性を持つ優れた抗体が準備できない。そのような場合でも、目的の転写因子に抗原となるエピトープタグを付加する手法を用いることで、安定的にクロマチン免疫沈降法を使用した解析が可能になる[4]。

エピトープタグとは、数アミノ酸から十数アミノ酸からなる比較的短いペプチド配列で、これらの配列を特異的に認識する優れたモノクローナル抗体が準備されている場合が多い。目的タンパク質にエピトープタグを付加することにより、免疫沈降を効率的に行えることが知られている。エピトープタグはそれぞれの由来や特徴によって種類が分かれており、どのエピトープタグがクロマチン免疫沈降法に最適かはわかっていない。また、回収されるタグ付けされた転写因子は少量であることから、従来の Western Blotting などの抗原抗体反応を用いた手法では定量的に計測することが難しく、エピトープタグの比較が正確かつ効率的に行えない。そこで FLAG[5,6]、HA[7]、V5[8]、PA[9]、Ty1[10]の5種類のエピトープタグの回収を比較するために、HiBiT システムを利用した定量的免疫沈降法を開発した。

HiBiT システムとは 11 アミノ酸のペプチドタグである HiBiT と、それに結合する約 18KDa の NanoLuc® ルシフェラーゼ断片の LgBiT と基質を用いた、発光法によって目的タンパク質を検出する技術である[11]。2つのルシフェラーゼ断片の親和性は高く、安定した HiBiT-LgBiT 複合体を形成し、定量的に計測できる発光タグとして利用できる。それにより少量の HiBiT タグでも定量できるため、クロマチン免疫沈降法のプロセスをモニターすることが可能であると考えた。本研究では、まず HiBiT システムを利用して、IP の条件下で HiBiT タグが付加されたタンパク質

を定量的かつ簡便に測定できる、HiBiT-qIP 法を開発した[12]。本研究では、さらに HiBiT-qIP 法を用いて、タグ付けされた転写因子の回収に最適なエピトープタグの付加数と種類の評価をおこなった。市販のモノクローナル抗体と組み合わせてエピトープタグの組み合わせを比較したため、この研究の結果はエピトープタグを用いたクロマチン免疫沈降法に関連した実験の貴重なリソースとなる。

第3章 結果

HiBiT-qIP の開発とクロマチン免疫沈降に用いるバッファーの適合性の検討

HiBiT システムは、HiBiT タグと LgBiT の NanoLuc ルシフェラーゼが再構成したときに、基質を介した発光シグナルが得られたため、直線性と安定性に優れたタンパク質の定量検出手法である。この HiBiT タグを目的のタンパク質にタグ付けすることで、その存在量を簡便かつ正確に LgBiT と基質であるフリマジンを含んだ HiBiT 検出試薬を用いて定量化できる。このシステムを利用して、クロマチン免疫沈降法によって回収された微量のタグ付けタンパク質の回収量を定量的にモニターできる HiBiT-qIP を設計した。本研究では、このアッセイをエピトープタグと抗体の組み合わせによるクロマチン免疫沈降法の効率の比較を行うために使用した。比較するエピトープタグは FLAG、HA、V5、PA、Ty1 の 5 種類で、Sox3 転写因子の C 末端側に付加した(表 1A)。Sox3 転写因子はゼブラフィッシュにおける働きが比較的理解されていることから使用した[13]。

Epitope tag	Sequence
FLAG	DYKDDDDK
FLAGx3	DYKDDDDKGDYKDDDDKIDYKDDDDK
HA	YPYDVPDYA
HAx3	YPYDVPDYAGYPYDVPDYAGYPYDVPDYA
V5	GKPIPNPLLGLDST
V5x2	GKPIPNPLLGLDSTGGKPIPNPLLGLDST
V5x3	GKPIPNPLLGLDSTGGKPIPNPLLGLDSTGGKPIPNPLLGLDST
PA	GVAMPGAEDDVV
PAx2	GVAMPGAEDDVVGGVAMPGAEDDVV
PAx3	GVAMPGAEDDVVGGVAMPGAEDDVVTRGVAMPGAEDDVV
Ty1	EVHTNQDPLD
Ty1x2	EVHTNQDPLDAEVHTNQDPLD
Ty1x3	EVHTNQDPLDAEVHTNQDPLDTREVHTNQDPLD

表 1. 評価をおこなうエピトープタグ配列

これらのエピトープタグの単量体、二量体、三量体と HiBiT が付加した Sox3 をコードする mRNA を初めに作成した。これをゼブラフィッシュの 1 細胞期に顕微注入し、タンパク質と DNA の架橋時間、各ペプチドタグの抗体、並びに回収ビーズを変えてクロマチン免疫沈降を行い、HiBiT アッセイと ChIP-qPCR を用いてクロマチン免疫沈降されたタンパクと DNA を定量的に解析した(図 1B)。回収されたタグ付き Sox3 は HiBiT アッセイによって定量した。また、絶対定量には精製された FLAGx3 タグ付き GST タンパク質を使用した(図 1C)。

まず始めに、クロマチン免疫沈降法で回収したタグ付き Sox3 を正確に定量するためにバッファの至適化を行った。クロマチン免疫沈降法では、核溶解液を調製するときの細胞の溶解および免疫沈降後の抗体抗原複合体の解離のために必要な物質として、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を使用する。SDS はアニオン性の界面活性剤であるため、溶液中の HiBiT タグを測定する HiBiT アッセイの発光反応に影響を与えることが考えられる。そこで HiBiT アッセイでクロマチン免疫沈降におけるインプットサンプルと免疫沈降されたサンプルを定量的に解析するために、精製された GST-Ty1x2-HiBiT タンパク質を用いてクロマチン免疫沈降ならびに解離の過程で使用するバッファの組成との適合性を検討した。

まず、HiBiT アッセイに SDS が影響を及ぼすか、反応液中の SDS 濃度を変化させることで調べた。GST-Ty1x2-HiBiT の濃度にかかわらず、サンプル中の SDS 濃度が高くなるほど発光量が低くなることが分かり、さらに 0.1%以上の高い濃度になると発光が検出できなかった(図 1D)。次に、この SDS による発光量の低下を抑えるため、非イオン性界面活性剤である Triton X-100 を加えて発光量を測定した(図 1E)。SDS 濃度が 0.01%より高いとき、Triton X-100 の濃度が高くなるほど HiBiT の発光量の低下が抑えられることが分かった。これとは対照的に、SDS 濃度が 0.01%より低くなるときは Triton X-100 の濃度が高いほど HiBiT の発光量が低くなることが分かった。SDS 濃度が 0.001%以下のとき、HiBiT の発光量は大きな影響を受けず、Triton X-100 の濃度が 0.1%であると発光量の低下が少なかった。

以上の結果より、SDS 濃度が 0.001%以下でなおかつ Triton X-100 濃度が 0.1%の条件が、HiBiT アッセイの発光量の低下を抑えるのに適しており、この条件下ではクロマチン免疫沈降に用いられるバッファ中のタンパク質の量を HiBiT アッセイは定量的に解析できることが分かった。したがって、以降の HiBiT アッセイは SDS 終濃度を 0.001%で Triton X-100 終濃度を 0.1%という条件で実施した。

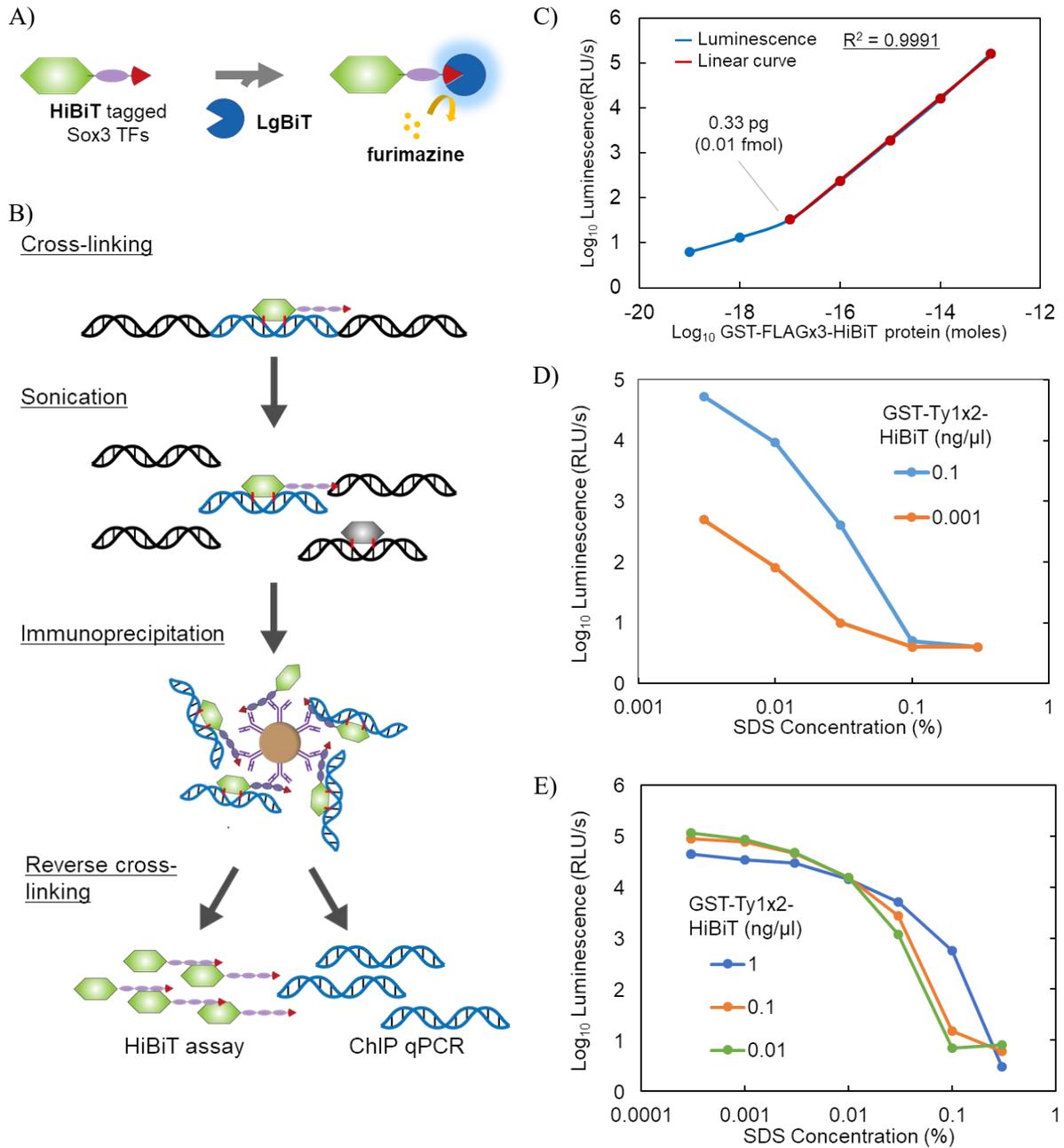


図1. HiBiTqIPの概略とHiBiTアッセイにおけるSDSによる発光量の低下とTriton X-100による低下の抑制

A) HiBiT タグを付加した Sox3 の模式図と発光様式。B) HiBiT-qIP を適用したクロマチン免疫沈降法のワークフロー。C) HiBiT アッセイにおける微量域の定量範囲とその下限。D) GST-Ty1x2-HiBiT の濃度を 0.1ng/μl と 0.001ng/μl の 2 段階、SDS の濃度を 0.3%、0.1%、0.03%、0.01%、0.003%(v/v) の 5 段階で行い発光量を解析した。E) GST-Ty1x2-HiBiT の濃度を 0.1ng/μl とし、SDS の濃度を 0.3%、0.1%、0.03%、0.01%(w/v) の 4 段階、Triton X-100 の濃度を 1%、0.1%、0.01%(v/v) の 3 段階で行い発光量を解析した。

HiBiT アッセイにホルムアルデヒド固定が与える影響の検討

HiBiT アッセイがクロマチン免疫沈降されたタンパク質を定量的に解析できるのかを調べるため、クロマチン免疫沈降される前のインプットと免疫沈降された溶出液に対して HiBiT アッセイと HiBiT ブロッキングを行った。HiBiT ブロッキングとは、メンブレン上の HiBiT タグが付加されたタンパク質に対して、LgBiT と発光基質を含む溶液を用いて検出する手法である。

本実験では、ゼブラフィッシュ胚の 1 細胞期に HA タグの三量体が付加された Sox3 転写因子をコードする mRNA を顕微注入し、70-80%エピボリー(E)の発生段階において、パラホルムアルデヒド粉末から調整した 1%ホルムアルデヒド溶液中で 15 分あるいは 30 分胚を固定した。これらの胚から核溶解液を調製後、超音波処理で DNA を断片化し、 α -HA 抗体と α -rat IgG 磁気ビーズを用いて免疫沈降を行った。固定時間が異なる 2 つのサンプルより、免疫沈降前のインプットと免疫沈降後の溶出液を脱クロスリンク処理後に HiBiT アッセイと HiBiT ブロッキングでそれぞれの Sox3-HAx3-HiBiT の量を測定した(図 2A, B)。

インプットを比較したグラフより、HiBiT ブロッキングでは固定時間が 15 分の場合よりも、30 分の場合に発光がわずかに強くなっており、Sox3-HAx3-HiBiT の量が多くなっていることが分かる。HiBiT アッセイでも固定時間が 15 分の場合より 30 分の場合に発光が強くなっており、HiBiT ブロッキングの発光の変化と同様な傾向になることが分かった。固定時間が長くなると発光が強くなる理由については、その差が大きくないことから実験過程での誤差の範囲であると考えている。次に、溶出液を比較したグラフより、HiBiT ブロッキングではインプットよりは変化が小さいが、固定時間が 30 分の場合で少し発光が強くなっていることが分かる。HiBiT アッセイでも固定時間が 30 分の場合で少し強くなっていることが分かる。以上のことから短時間のホルムアルデヒドによる固定は HiBiT タグの検出には大きな影響を与えないこと、また HiBiT アッセイと HiBiT ブロッキングはクロマチン免疫沈降されたサンプルを測定する際に同様の傾向を示すことから、いずれの手法でもクロマチン免疫沈降されたサンプルを測定することが可能であるといえる。

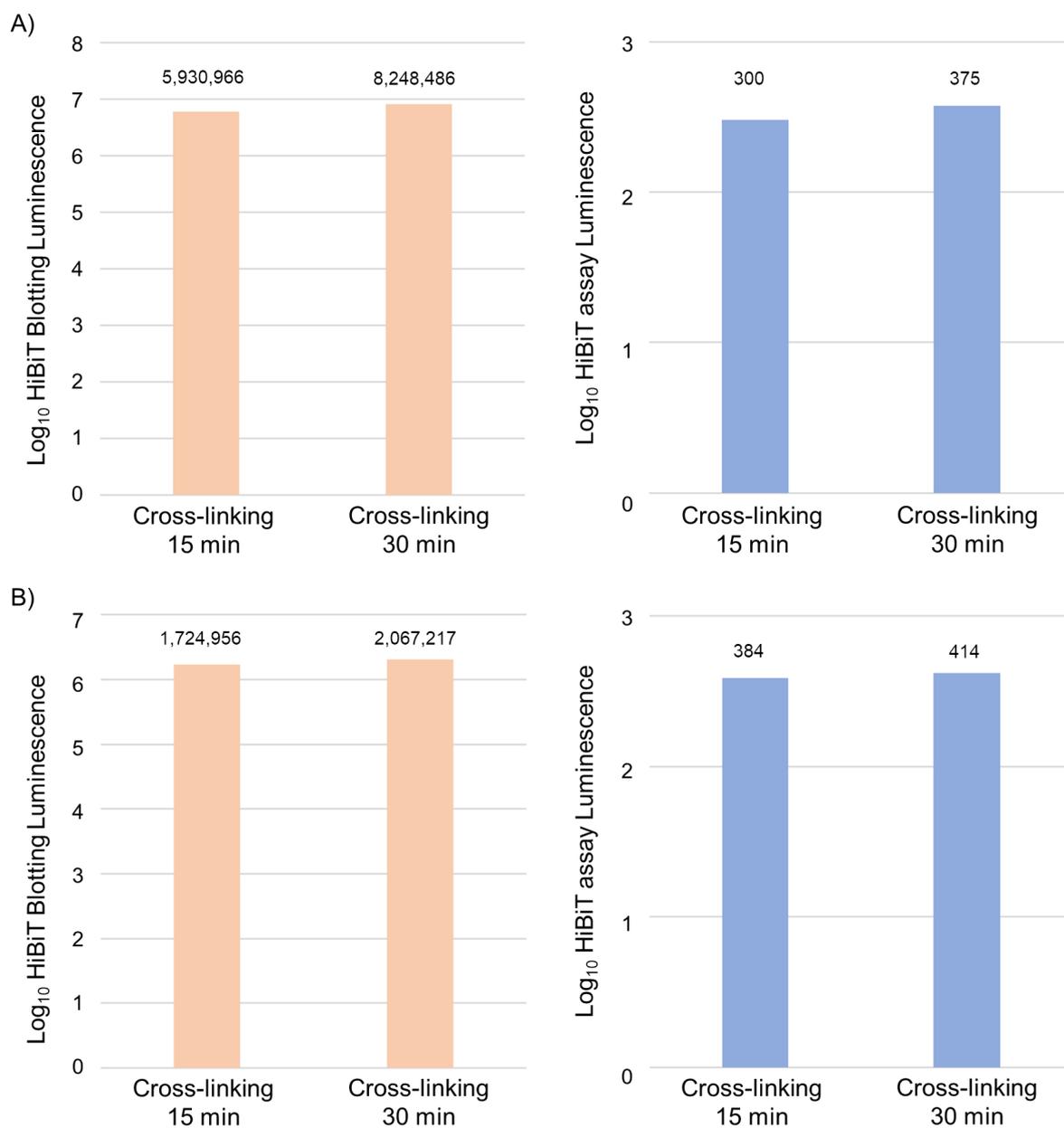


図 2. HiBiT アッセイと HiBiT ブロットティングで測定したクロマチン免疫沈降される前のインプットと免疫沈降された溶出液の比較

オレンジ色のグラフは HiBiT ブロットティングの発光量を表し、青色のグラフは HiBiT アッセイのグラフを表している。A) Sox3-HAx3-HiBiT を含んだクロマチン免疫沈降される前のインプットを HiBiT ブロットティング(左)と HiBiT アッセイ(右)で測定した。B) Sox3-HAx3-HiBiT を含んだクロマチン免疫沈降された後の溶出液を HiBiT ブロットティング(左)と HiBiT アッセイ(右)で測定した。脱クロスリンク処理は、60°Cで 4.5 時間インキュベートした。

HiBiT アッセイに脱クロスリンク処理が与える影響の検討

クロマチン免疫沈降によって回収された転写因子特異的な DNA 断片を PCR などで解析するためには、タンパク質とジスルフィド結合している DNA を解除するため脱クロスリンク処理が必要である。一般的に脱クロスリンク処理では、SDS や DTT を含む溶出液を 60°C で 4 時間以上加熱することでクロスリンクを解除するが、温度を高くすることで HiBiT アッセイに与える影響は分かっていない。そこで、脱クロスリンク処理の温度と時間の検討するために、固定時間ごとに HiBiT アッセイを行った。

本実験では、Sox3-PAx3-HiBiT mRNA に変更して α -PA 抗体と ProteinG 磁気ビーズを用いてクロマチン免疫沈降を行った。免疫沈降前の固定時間が異なる 2 つのサンプルより、免疫沈降前のインプットと免疫沈降後の溶出液に脱クロスリンク処理を行った。脱クロスリンク処理には、それぞれの固定時間ごとに 95°C で 15 分あるいは 30 分間インキュベートする条件と 60°C で 4 時間あるいは 6 時間インキュベートする条件の計 4 条件を行った。脱クロスリンク後に HiBiT アッセイでそれぞれの Sox3-PAx3-HiBiT の量を測定した(図 3)。この実験における、HiBiT アッセイの蛍光量は、SDS 濃度を一定にしていることからインプットと溶出液の希釈率が異なるため、Sox3-PAx3-HiBiT の直接的な存在量とは異なる。

固定時間の違いによる HiBiT アッセイの発光量の差が小さく、どの条件下でも脱クロスリンク処理が行われていると考えられる。インプットと溶出液の両方において、60°C で 6 時間の条件で脱クロスリンク処理することで、HiBiT アッセイで検出できる Sox3-Pax3-HiBiT が最大となることが分かった。溶出液の比較では 95°C で 30 分間の条件が 60°C で 6 時間の条件に次いで効率的であると考えられるが、高温による DNA の二本鎖の解離が考えられるため、DNA が二本鎖状体であることが求められる実験には不適切と考えられる。また、60°C で 6 時間の条件など長時間の脱クロスリンク処理をする場合において、HiBiT アッセイで検出するタンパク質の安定性は考慮する必要がある。本実験は比較的安定性の高い Sox3-PAx3-HiBiT を使用しているため 60°C で 6 時間の条件が最適であったが、不安定な転写因子を扱う場合は脱クロマチン処理の至適化がさらに必要になる可能性がある。

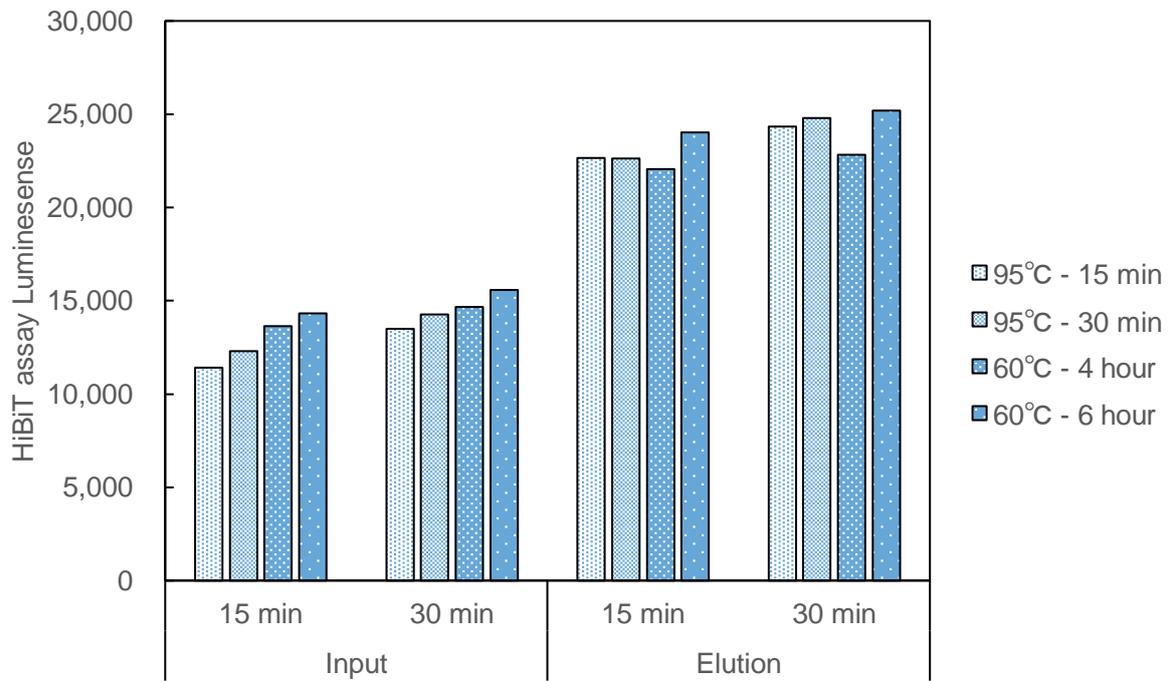


図 3. HiBiT アッセイで測定した脱クロスリンク処理条件が異なるクロマチン免疫沈降前のインプットと免疫沈降後の溶出液の比較

Sox3-HAx3-HiBiT を含んだクロマチン免疫沈降される前のインプットと免疫沈降後の溶出液を HiBiT アッセイで測定した。

クロマチン免疫沈降法で回収した DNA の qPCR を用いた定量による固定時間の検討

転写因子が特異的に結合する DNA 領域を決定するために次世代シーケンサーを用いることが一般的だが、解析には DNA 断片を効率的かつ特異的に回収しなければならない。固定時間を長くすることで転写因子と特異的な DNA を多く回収することが可能となるが、非特異的な領域の回収が増えることや脱クロスリンク処理で DNA との架橋をはずすことが出来なくなることが難点となる。そこで、Sox3-HAx3-HiBiT と Sox3-PAx3-HiBiT を用いて、固定時間を 15 分あるいは 30 分間の条件でそれぞれに特異的なモノクローナル抗体でクロマチン免疫沈降法を行い(表 2)、どちらの固定条件で効率的かつ特異的な結果になるかを調べるため、インプットと溶出液を qPCR で解析した。

qPCR による定量には Sox3 転写因子が特異的に結合することが知られているゲノム領域 2 点とそうではない 2 点を用いた。結合が知られている領域は *hesx1*, *cyp26a* の上流に位置する 2 点で、そうではない領域は *cyp26a*, *bactin2* の上流の 2 点である。*cyp26a1* は Sox3 転写因子の結合領域より更に上流の領域を用い、特異的に働く領域を *cyp26a 1-1*、そうではない領域を *cyp26a 1-3* とした(図 4A)[6]。それぞれの領域に対し、qPCR を用いて免疫沈降前のインプットと免疫沈降後の溶出したサンプルを測定した。回収率を算出するためにインプットは 5 桁の希釈系列を作製し、回収率は%インプットとして求めた。

得られたデータより、すべての条件において、結合する領域はしていないものより多く回収されていることが分かった(図 4B)。多く回収されているほど回収率が高く、非結合領域との差が大きいほど特異的であるといえる。そこで結合するポジティブ領域 2 点の平均値と結合しないネガティブ領域 2 点の DNA 濃度の平均値から比率を出し、それを ChIP 濃縮度とした。この ChIP 濃縮度をすべての条件で算出し、それぞれの条件での ChIP 濃縮度を比較した(図 4C)。

HA タグでは、両方のモノクローナル抗体で 30 分より 15 分間固定処理した方が特異的な DNA 断片の回収率は減少するが、ChIP 濃縮度が高くなることが分かった。また PA タグでは、架橋時間にかかわらず、安定した特異性を示すことが分かった。これらより、固定時間が 15 分の条件で ChIP 濃縮度が高くなる場合があることから、以降の実験では固定時間を 15 分とした。

Epitope tags	Monoclonal antibody			Beads type
	Supplier	Clone	Species	
HAx3	Roche	3F10	Rat	α -rat IgG
	Wako	4B2	Mouse	α -mouse IgG
PAx3	Wako	NZ-1	Rat	Protein G

表 2. 各エピトープタグの回収条件

各エピトープタグに対して用いたモノクローナル抗体のクローンと回収のための磁気ビーズの表。固定時間はそれぞれの条件で 15 分と 30 分を比較した。

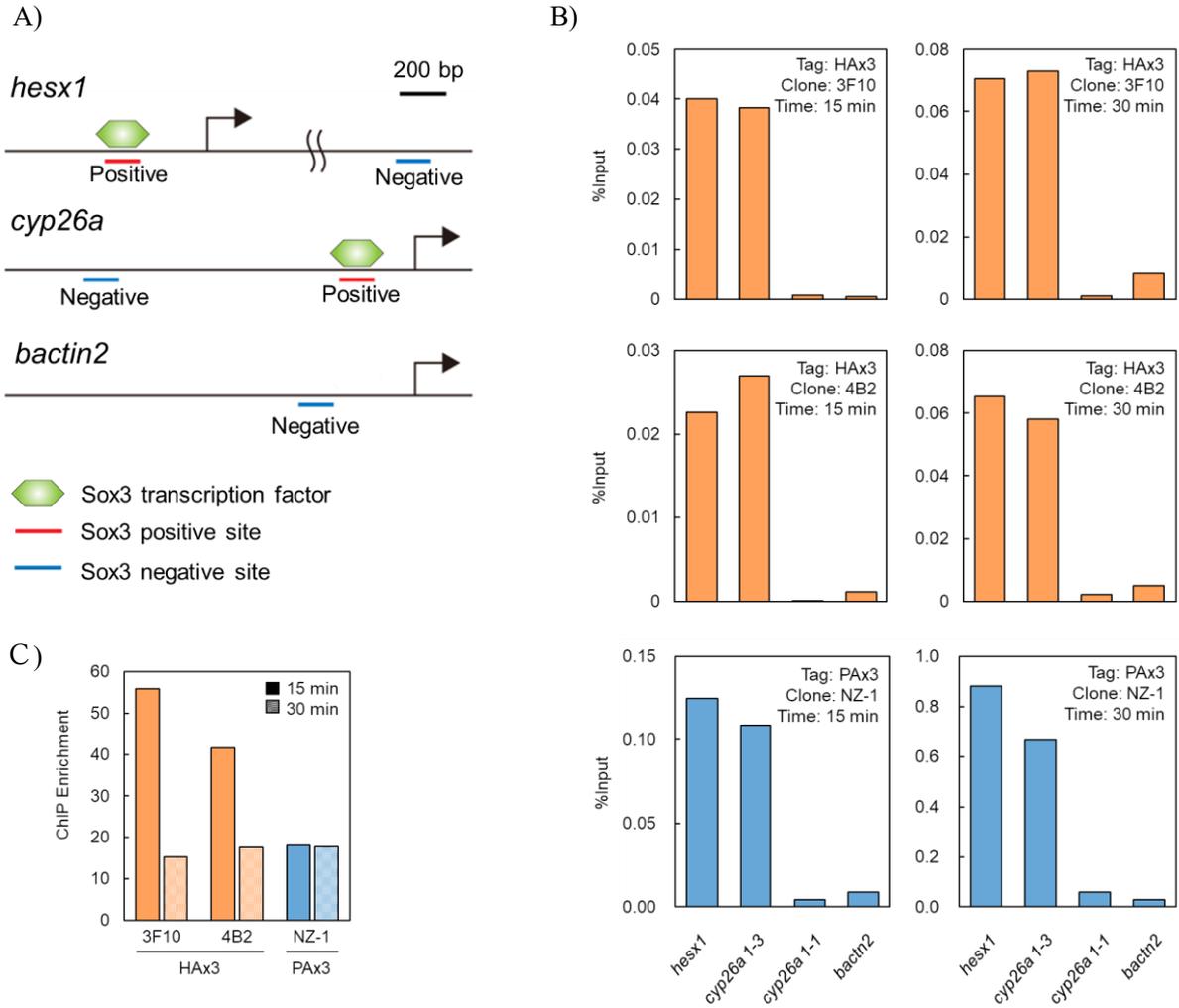


図4. qPCR を用いた特異性の算出方法とそのグラフ

A) qPCR で増幅した領域の模式図。Sox3 転写因子が特異的に結合する領域を赤色、そうではない領域を青色で表した。cyp26a のポジティブ領域のプライマーは cyp26a 1-1、ネガティブ領域は cyp26a 1-3 である。B) qPCR を用いて定量した各条件のグラフ。黄色のバーは HAx3 タグを表し、青色のバーは PAx3 タグを表す。グラフのバーは左から、hesx1、cyp26a 1-1、cyp26a 1-3、bactin2 である。C) 縦軸を ChIP 濃縮度、横軸を各エピトープタグ配列のモノクローナル抗体とし、色が濃いグラフは架橋時間が 15 分、薄いグラフは 30 分を示す。

少量の DNA 断片において定量的な結果を得るための qPCR の至適化

ChIP 濃縮度によるエピトープタグの比較を行うために、低濃度まで定量的に DNA 断片を定量する必要がある。これまでの実験において、ポジティブ領域とネガティブ領域の両方で、低濃度領域での検量線に振れがあることや、ネガティブ領域の回収量に差があることで ChIP 濃縮度に大きく影響することがあった。そこで、低濃度の DNA 断片を定量的に測定できる qPCR の試薬の選択を行った。

正確な検量線を引くために、qPCR 試薬の選択を行った。比較には 3 種類の qPCR の試薬を用い、それぞれで Sox3-HAx3-HiBiT と Sox3-PAx3-HiBiT のクロマチン免疫沈降法される前のインプットを使用して検量線を引いた(表 3、図 5)。この検量線を引ける範囲が広く、より決定係数が低いものが正確な検量線を引ける qPCR 試薬となる。また、免疫沈降後の溶出液を用いてネガティブ領域 2 点が安定に計測できるか確認した。計測にはロシュ・ダイアグノスティックス社のリアルタイム PCR 装置 LightCycler® 96 System を使用した。

Product name	Supplier	Polymerase	Dye
KOD SYBR® qPCR Mix	TOYOBO	KOD DNA polymerase	SYBR® Green I
HOT FIREPol® SolisGreen qPCR Mix	Solis BioDyne	HOT FIREPol® DNA Polymerase	SolisGreen
BrightGreen MasterMix	Applied Biological Materials	Hotstart Taq polymerase	BrightGreen

表 3. 比較検討した qPCR マスターミックス。使用した試薬の製品名、供給元、ポリメラーゼの種類、検出に使われる蛍光色素の種類を表にした。

まず、KOD SYBR® qPCR Mix は検量線の傾きがどの条件でも比較的に一致しており、サンプルの DNA 濃度によらず安定的に定量できることが分かった。DNA 濃度が 4.E-03%以下になると他の qPCR 試薬に比べ Cq 値が低くなっている。このことから、免疫沈降後の溶出液を用いた計測で、検量線内に入らず、正確に定量するのが難しくなっている。次に HOT FIREPol® SolisGreen qPCR Mix は使用した qPCR 試薬の中で検量線の決定係数の平均が一番高く、DNA 濃度が低くても測定できていることから、定量的に計測が出来ることが分かった。ネガティブ領域の Cq 値も検量線の範囲内に収まっており、同条件におけるサンプル間の Cq 値の差が小さいことから、ネガティブ領域の正確な計測も可能である。最後に BrightGreen MasterMix だが、SolisGreen qPCR Mix には少し届かないものの検量線の傾きが安定して高かったが、他の qPCR 試薬より各サンプル間の傾きの差が大きく、遺伝子領域ごとの効率が大きく異なることが考えられる。また、溶出液の計測では同条件におけるサンプル間の Cq 値の差が大きく、DNA 濃度が低い範囲において正確な定量に不向きであることが分かった。

これらの結果から、使用した qPCR 試薬の中で最も定量的に DNA 濃度を計測できると考えられる HOT FIREPol® SolisGreen qPCR Mix を以降の実験で使用する。また、免疫沈降された溶出

液の計測において、DNA 濃度が低すぎることから計測不可なサンプルがあったため、以降の実験では計測不可を減らすためネガティブ領域のサンプルを 2 倍量使用する。

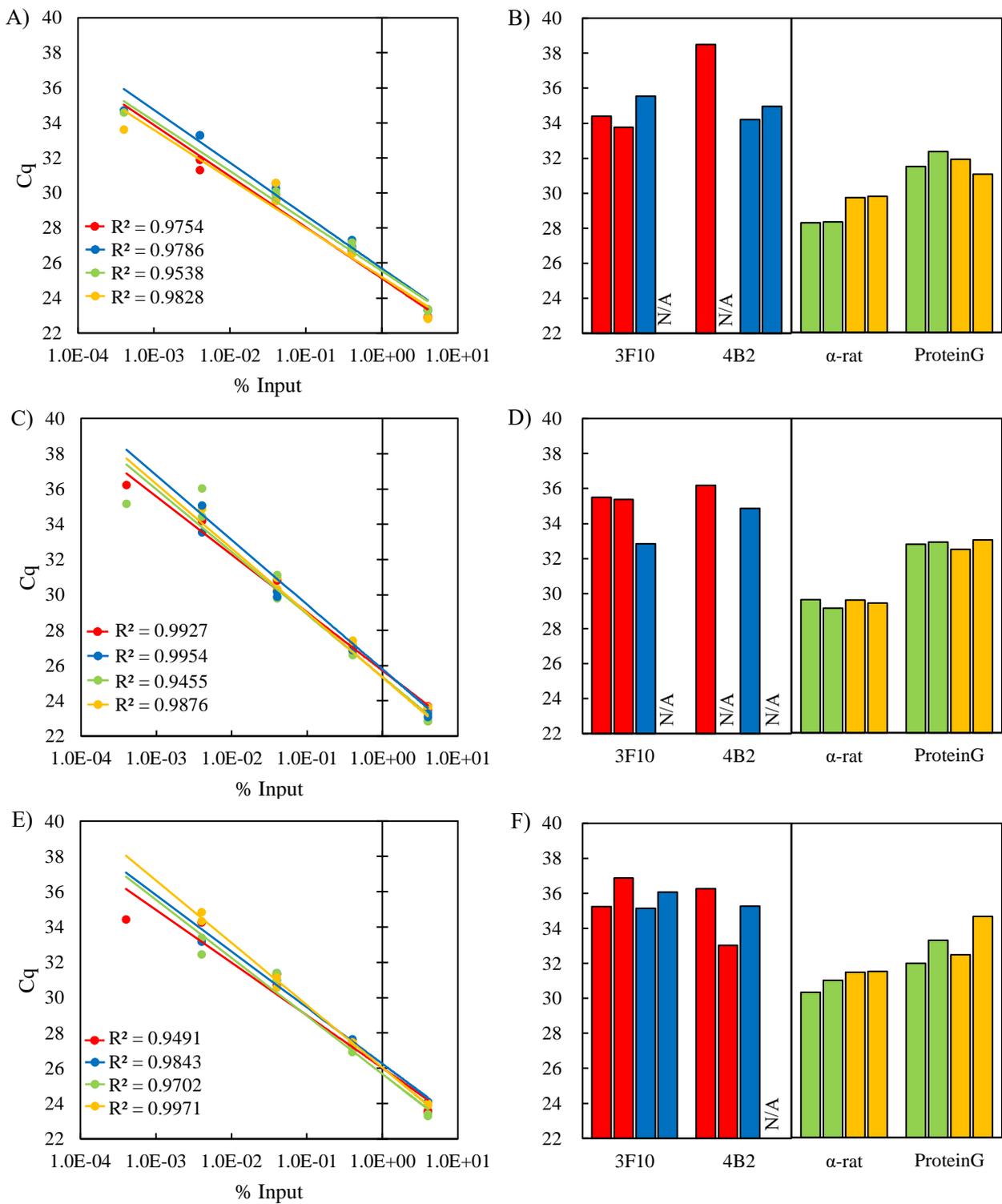


図5. 検量線とネガティブ領域を用いた qPCR 試薬の比較。

グラフの色は使用したエピトープタグとプライマーの遺伝子領域によって区別しており、赤は HAX3 タグの *cyp26a*、青は HAX3 タグの *bactin2*、緑は PA x 3 タグの *cyp26a*、黄は PA x 3 タグの *bactin2* 領域を表している。A, C, E) 順に KOD、Solis Green、Bright Green で計測した検量線を示

しており、縦軸は Cq 値で、横軸は %Input を対数表記した。それぞれの決定係数(R^2)をグラフの左下に表記している。B, D, F) 免疫沈降された溶出液を使用した抗体あるいは磁気ビーズの違いごとに比較した。横軸に使用した抗体あるいは磁気ビーズを示した。qPCR で計測できなかった部分は N/A で表記した。

固定液の選択による HiBiT アッセイと qPCR の影響

これまでの実験ではパラホルムアルデヒド粉末から調製し、冷凍保存した 1%ホルムアルデヒド溶液を使用していたが、それ以外にホルマリンから 1%ホルムアルデヒド溶液を調製する手法がある。そこでいくつかの調整法を用いて、どの固定液がクロマチン免疫沈降法の効率を高くすることが出来るのか、HiBiT アッセイと qPCR を用いて回収率と特異性の比較をした。使用した mRNA は固定時間の变化で変化が小さかった Sox3-PAx3-HiBiT を用いた。

固定液の検討は、パラホルムアルデヒド粉末から調製し、冷凍保存した 1%ホルムアルデヒド溶液、調製して冷凍保存はしない溶液、メタノールを含んだホルムアルデヒド溶液から調製したものの、最後にホルムアルデヒド溶液から調製したものの 4 つの条件でクロマチン免疫沈降法を行った。

HiBiT アッセイを行った結果、どの条件でも大きな回収率の変化は見られず、Sox3-DNA 複合体の回収率が 50%以上と高くなることが分かった(図 6A)。しかし、調製して冷凍保存はしない溶液とホルムアルデヒド溶液から調製した 1%ホルムアルデヒド溶液は他の条件に比べ誤差範囲が広く、安定的な比較実験には不向きな可能性がある。次に qPCR を行った結果、回収された DNA で %Input を比較すると、メタノールを含んだ 37%ホルムアルデヒド水溶液から調製した固定液を使うと効率的に回収できていることが分かった(図 6C)。非特異的 DNA 断片を比較するとほとんど誤差はなく、標準誤差の範囲内で変化している。ChIP 濃縮度を比較すると、ホルムアルデヒド溶液から調製した固定液を使うと特異的に回収できることが分かった(図 6B)。この結果から、以降の実験では固定液は安定性が高いパラホルムアルデヒド粉末から調製し、冷凍保存した 1%ホルムアルデヒド溶液あるいはメタノールを含んだ 37%ホルムアルデヒド水溶液から調製した固定液を使用する。この回収率と濃縮度の高さはメタノールを含むホルムアルデヒド水溶液中に存在するモノマーの量がほかに比べ、多いからだと考えている。

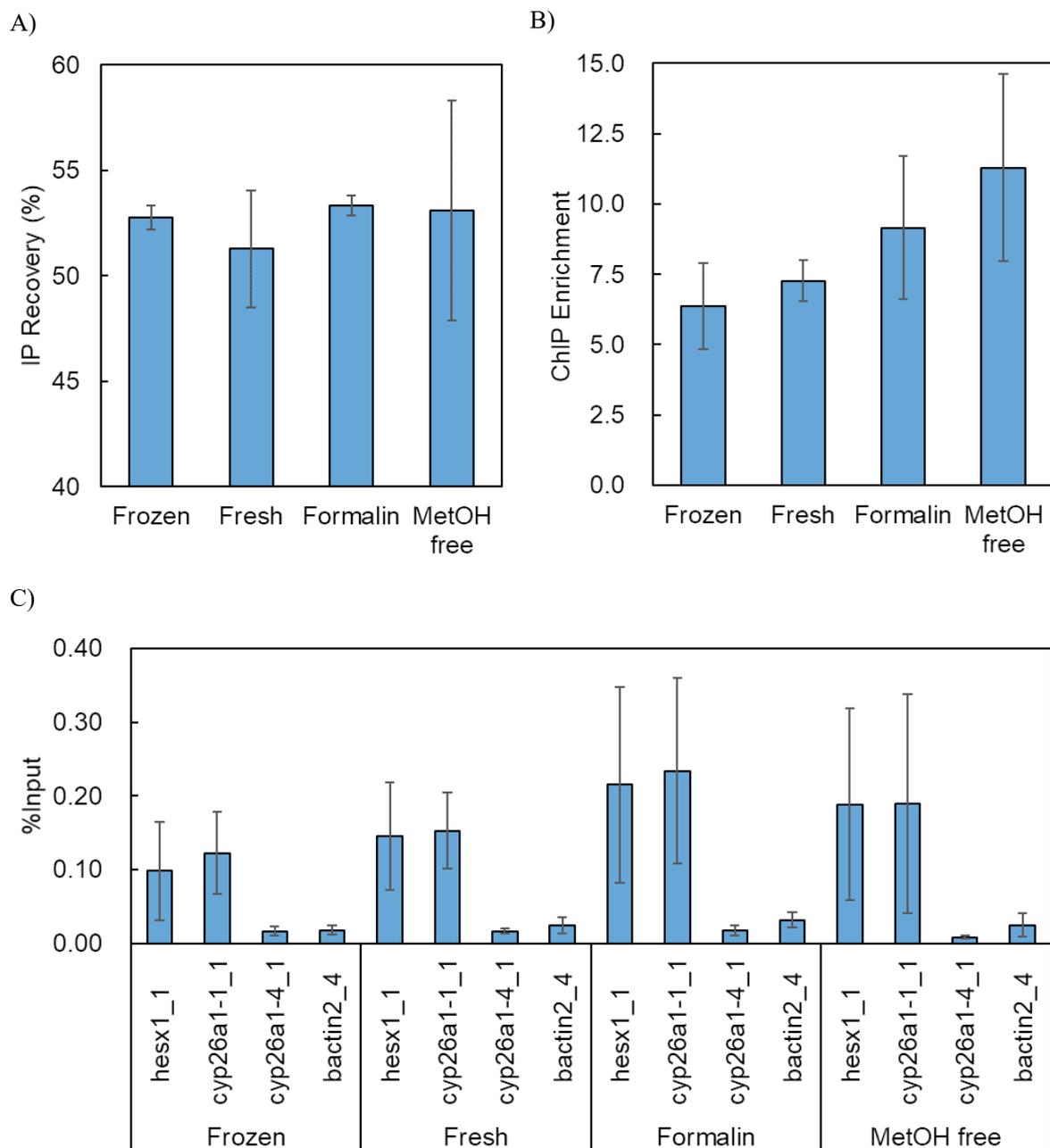


図6. 固定液の違いによる Sox3-DNA の回収率と ChIP 濃縮度の比較

グラフのバーは左から、パラホルムアルデヒド粉末から調整し、冷凍保存したホルムアルデヒド溶液(Frozen)、メタノールを含んだホルムアルデヒド溶液から調整した溶液(Formalin)、ホルムアルデヒド溶液から調整した溶液(MetOH free)である(n=2)。A)HiBiT アッセイを用いた Sox3-DNA 複合体の回収率の比較。B)qPCR を用いた回収した DNA 断片の ChIP 濃縮度(n=2)。C) qPCR を用いた回収した DNA 断片の回収率(n=2)。

付加するエピトープタグが多量体化することによる Sox3 タンパク質の安定性の影響

エピトープタグを利用したクロマチン免疫沈降法を評価するためには、まずエピトープタグの付加数がタンパク質発現に与える影響を調べる必要がある。エピトープタグの種類によっては付加がタンパク質の立体構造に影響を及ぼし、安定性を変化させ見かけ上の回収量を向上あるいは低下させる可能性が考えられる。そのためクロマチン免疫沈降法でエピトープタグの付加数の違いによる回収率を比較する場合には、それぞれの付加数ごとに目的のタンパク質の発現量を調整する必要がある。本実験では Sox3 タンパク質に FLAG、HA タグの単量体と三量体および V5、PA、Ty1 タグの単量体、二量体、三量体をそれぞれ付加させ、ゼブラフィッシュ胚の 70%エピボリ一段階の発現量をクロマチン免疫沈降法のインプットを使用して、近赤外蛍光スキャナー Odyssey CLx を用いた定量的ウェスタンブロット法で調べた。固定液にはメタノールを含んだホルムアルデヒド溶液から調製したものを使用した。

安定性の検討には 2 種類の方法を使用した。1 つ目は、エピトープタグの付加数が異なる mRNA をそれぞれにインジェクション溶液を作成しゼブラフィッシュ胚の 1 細胞期にインジェクションする方法である。一般的に用いられる比較方法で単一のバンドを正確に比較することが出来るが、インジェクション量の差を大きく反映するため他のバンドと比較する場合に正規化する必要がある。本実験では GFP mRNA をインジェクション溶液に混合し正規化に用いた。2 つ目は、同一のエピトープタグで付加数が異なる mRNA を同一のインジェクション溶液に混合しゼブラフィッシュ胚の 1 細胞期にインジェクションする方法である。この場合、インジェクションによる人為的な量の差を考えなくてよいが、ウェスタンブロットのバンドが近づくことと、過剰発現によるゼブラフィッシュ胚への影響からインジェクションできる mRNA の量が少なくなり正確に比較できないことである。これらの方法を用いて、双方のデメリットを相殺するようにエピトープタグが付加した Sox3 タンパク質のそれぞれの発現量を比較した。

まず、それぞれのタグが付加した Sox3 mRNA を別々にインジェクションした。それぞれのタグ付き Sox3 mRNA を 10pg、GFP mRNA を 50pg ずつゼブラフィッシュ胚の 1 細胞期にインジェクションし 70%エピボリ一段階での発現量を、タグ付き Sox3 は抗 Sox3 抗体で、GFP は抗 GFP 抗体を用いて定量的ウェスタンブロット法で計測した。タグ付き Sox3 タンパク質と GFP タンパク質をそれぞれの検量線で定量し、タグ付き Sox3 タンパク質のシグナル値を GFP タンパク質のシグナル値で定量した。その結果、HA タグ以外でタグの付加数が増えるほどタグ付き Sox3 タンパク質の安定性が上昇することが分かった(図 7A, B)。その増加傾向は比較的一致しており、Sox3 タンパク質は C 末端にペプチドを付加数が増えるほど、一定まで比例するように安定化することが考えられる。HA タグについては酵母における先行研究で、HA 配列内にカスパーゼ切断部位を含んでいることで安定性が下がる可能性や[15]、HA タグを付加する際のスペーサー配列が安定性に影響を与える可能性が報告されている[16]。同様のことがゼブラフィッシュにおいても起こっていると考えられる。

この発現量の差を参考に同一のエピトープタグで付加数が異なる mRNA を同一のインジェクション溶液に混合した。2 種類のタグ付き Sox3 をインジェクションする FLAG タグは 1 embryo あたり、単量体を 7.5pg と三量体を 2.5pg となるように mRNA を混合しインジェクション溶液をした。安定性の低い HA タグは単量体を 7.5pg と三量体を FLAG タグの 5 倍にあたる 12.5pg を混

合した。3種類混合する V5 タグ、PA タグ、Ty1 タグは単量体が 5pg、二量体が 3pg、三量体が 2pg となるようにそれぞれ混合した。それぞれの溶液をゼブラフィッシュ胚の 1 細胞期にインジェクションし、インプット溶液を 70%エピポリ一段階に作成し Odyssey で定量した。その結果、タグ付き Sox3 タンパク質のバンド間の距離が近いことから正確な定量はできなかったが、GFP タンパク質で正規化したスコアはタグ間で差があるものの、同一のタグでは大きな差が見られなかった(図 7A, C)。HA タグでは発現量が少なくバンドを正確にとらえることが出来ず、mRNA を過剰に加えたことで切断が活性化され、両方のタグ付き Sox3 タンパク質がほとんど確認できなくなったと考えられる。V5 タグでは、バンド間の距離が非常に狭く、バンドが重なり定量的でないと判断したため、定量および正規化はしていない。これらの正規化したスコアを mRNA のインジェクション量あたりのスコアを算出し FLAG タグの三量体を基準としたグラフを作成した(図 7D)。これより、FLAG タグと PA タグのスコアはどちらの手法でも一致したが、Ty1 タグは二量体の傾向が異なることが分かった。この実験内でタグ付き Sox3 のバンドに定量や正規化に問題がないことから、それぞれのタグ付き mRNA をインジェクションした実験内でサンプル調整の誤差が反映されたと考えられる。これにより分解される HA タグを除く本実験に用いたタグは Sox3 に付加することで安定化に働くことが分かり、同一の付加数であればタグ間で大きな発現量の差が見られないことも分かった。

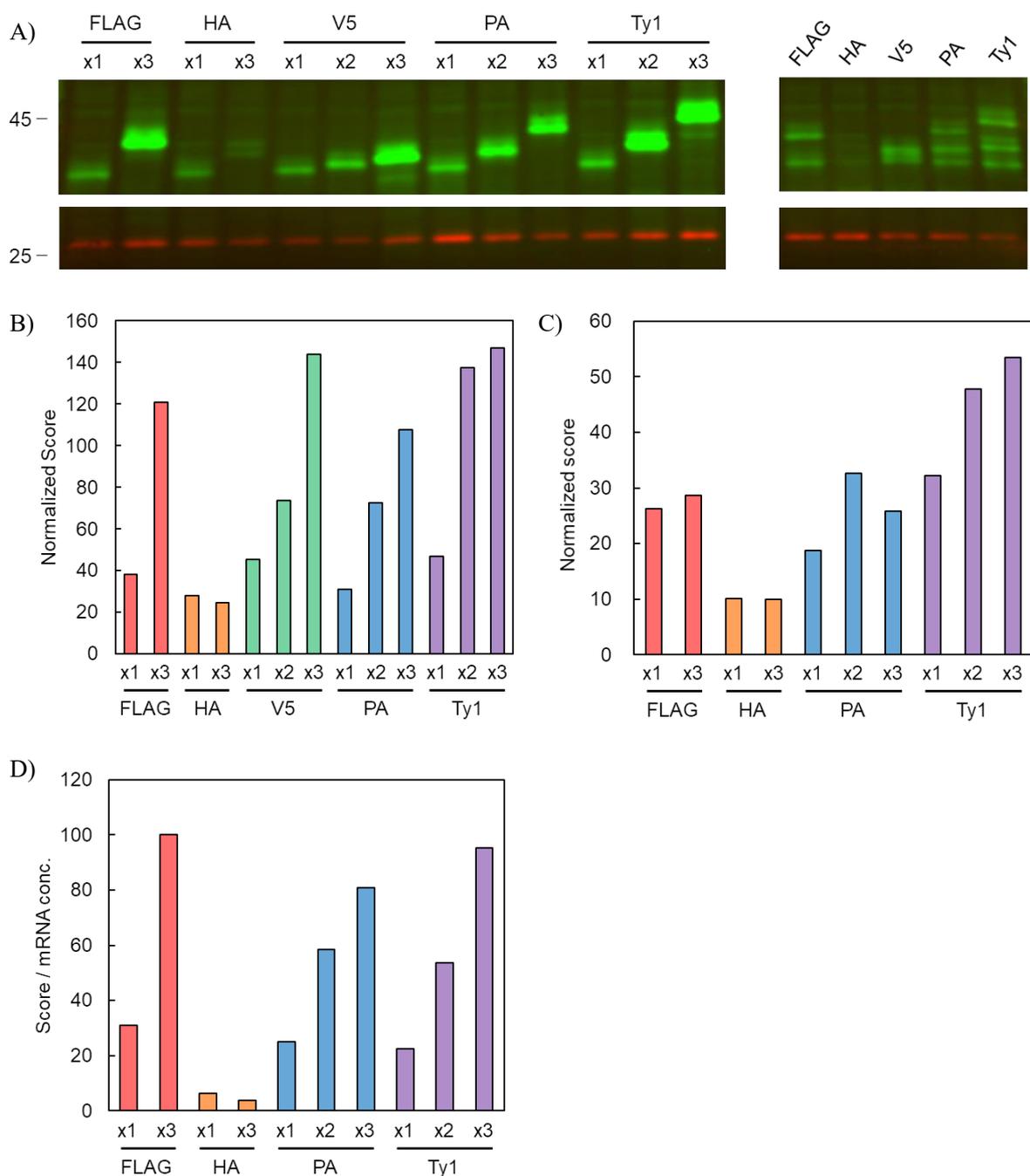


図7. 蛍光ウェスタンブロットを用いた多量体化による安定性の比較

A) 蛍光ウェスタンブロットで撮影したタグ付き Sox3 と GFP のイメージ。緑色はタグ付き Sox3、赤色は GFP を表している。B) それぞれのタグが付加した Sox3 を別々にインジェクションし正規化しグラフに表した。縦軸の標準化スコアには Sox3-PAx3-HiBiT を 100 とした。C) それぞれのタグが付加した Sox3 をタグごとにインジェクションし正規化しグラフに表した。標準化スコアはグラフ B と同じである。C) タグが付加した Sox3 をタグごとにインジェクションした標準化スコアをインジェクションした mRNA 量で補正したグラフ。縦軸は Sox3-FLAGx3-HiBiT を 100 とした。

多量体化によるタグ付け Sox3-DNA 複合体の回収率の変化

多量体化による Sox3 タンパク質の安定性の変化を元にクロマチン免疫沈降法のインプットのタグ付け Sox3-DNA 複合体がほぼ同じになるように、インジェクションする mRNA 量を調節し、FLAG タグと PA タグについて多量体化したときの複合体の回収率を調べた。タンパク質の回収率の測定には HiBiT アッセイと HiBiT ブロット、Odyssey Clx を利用した定量的ウェスタンブロット法を用いた。固定液はメタノールを含んだホルムアルデヒド溶液から調製したものを使用した。HiBiT アッセイでは回収に用いる抗体 2 種類とし、これ以外は 1 種類とした。また、PA タグが付加された Sox3-DNA 複合体に対しては抗 Sox3 抗体で回収し、タグを付加することで回収がどの程度効率化するかを調べるための比較対象とした。

HiBiT アッセイより、クロマチン免疫沈降法のインプット量を全て揃えようとしたが、FLAGx3 の安定性が高く、他のタグ付き Sox3 タンパク質よりも多くなってしまった(図 8A)。結果としては、多量体化することで回収率が上昇することが分かった(図 8D)。これはエピトープタグを並列に連続して並べることで見かけ上の抗体との親和性が上昇することが一因だと考えられる。PAx2 タグと PA x 3 タグを比較したときに大きな回収率の差は見られなかった。また、抗 Sox3 抗体との比較では、抗 Sox3 抗体の回収率が 30%程度(グラフは?)だったのに対して、多量体化したエピトープタグを付加した Sox3-DNA 複合体は 50%を超える回収率であるので、多量体化したエピトープタグで効率的に目的のタンパク質を回収することが出来ると考えられる。

HiBiT ブロットより、HiBiT アッセイと同様に FLAGx3 タグのインプット量が多くなっていたことから、測定法の違いによる増減ではないと確認できた(図 8B)。回収率は多量体化することで上昇したものの、HiBiT アッセイに比べて少なくなった(図 8E)。Odyssey で定量した結果は HiBiT ブロットの傾向とほぼ同様であった(図 8C, F)。それぞれの結果より、エピトープタグの付加数が増加することで回収される Sox3-DNA 複合体は多くなった。それぞれの測定手法でタンパク量に違いが生じるのは SDS-PAGE によるタンパク質の長さごとの分離や転写によるロスが考えられるが断定できない。

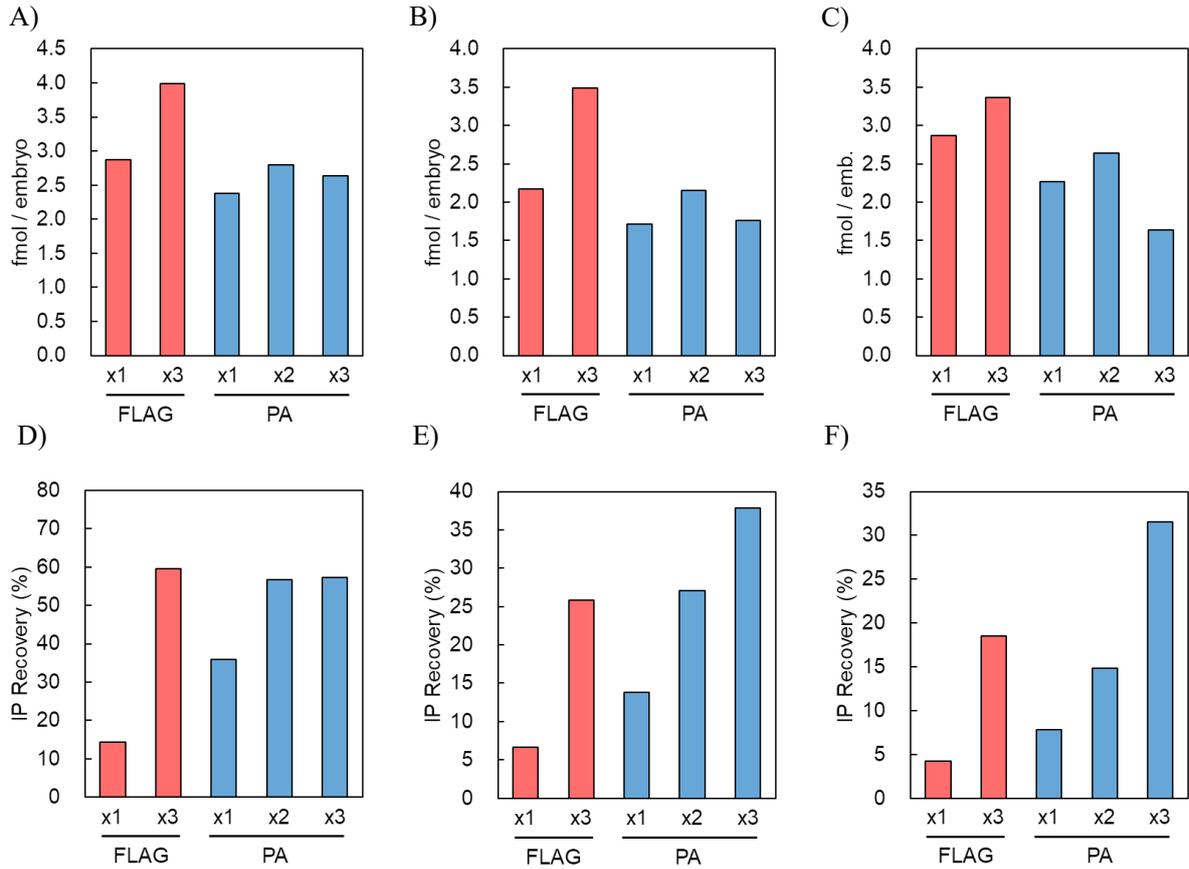


図 8. 多量体化による発現量と回収率の変化

A) HiBiT アッセイを用いたときのインプット溶液中のタグ付き Sox3 タンパク質量。B) HiBiT プロットを用いたときのインプット溶液中のタグ付き Sox3 タンパク質量。C) ウェスタンブロット法を用いたときのインプット溶液中のタグ付き Sox3 タンパク質量。D) HiBiT アッセイを用いたときのタグ付き Sox3 タンパク質の回収率。E) HiBiT プロットを用いたときのタグ付き Sox3 タンパク質の回収率。F) ウェスタンブロット法を用いたときのタグ付き Sox3 タンパク質の回収率。

qPCR を用いた多量体化したタグ付け Sox3-DNA 複合体の回収率と ChIP 濃縮度の変化

クロマチン免疫沈降法によって回収された DNA 断片に対して、Sox3 転写因子が特異的に結合する DNA 領域の回収が多量体化によってより効率的に行われているか qPCR を用いて調べた。多量体の効果を検証するためエピトープタグは FLAG タグと PA タグを使用し、FLAG タグは単量体と三量体、PA タグは単量体と二量体、三量体を用い、回収のための抗体は抗 FLAG タグを 2 種類と抗 PA タグは 1 種類とし、タグ付けの効果を検証するため抗 Sox3 抗体を用いた。固定液はパラホルムアルデヒド粉末から調製し、冷凍保存した 1%ホルムアルデヒド溶液を使用した。検出に使用するプライマーは、定量性を再検証したものに變更し、Sox3 転写因子に特異的に結合することが知られている *hesx1* と *cyp26a* の領域とその上流と下流に位置するプライマーを用いた(図 9A)。

qPCR の結果より、FLAG タグを使用した場合はどちらの抗体でも多量体化することで回収率が上昇し、抗 Sox3 抗体の条件より多くの特異的な DNA 断片を回収できた(図 9B)。PA タグでは二量体の状態で一番回収率が優れていたが、抗 Sox3 抗体との回収率の差は大きくなかった(図 9C)。また、比較のための抗 Sox3 抗体を用いた条件でプライマーの条件によって回収率が異なり、*hesx1* では二量体が高く、*cyp26a* では単量体が高かった。これらの回収率の差は溶出液に含まれるタグ付け Sox3-DNA 複合体の量の差が一つの要因だと考えられるが、溶出液に含まれる複合体の差のみで説明することは難しく、他の要因の影響を受けていると考えられる。

ChIP 濃縮度では、*hesx1* 領域において FLAG タグと PA タグの両方で付加数が増加すると ChIP 濃縮度が増加するという結果が得られたが、*cyp26a* 領域では付加数が増加すると ChIP 濃縮度が低下するというデータが得られた(図 9D)。これは付加数が増加することによって回収されるネガティブ領域の DNA 断片が増加したからである。増加した要因の一つはエピトープタグの付加による Sox3 タンパク質の構造的な変化であると考えられるが、他の要因も関係している可能性もある。また、付加数が少ない場合におけるネガティブ領域の DNA 断片の回収が微量であるからネガティブ領域が正確に定量できていないこともこのような結果となった要因の一つとして考えられる。

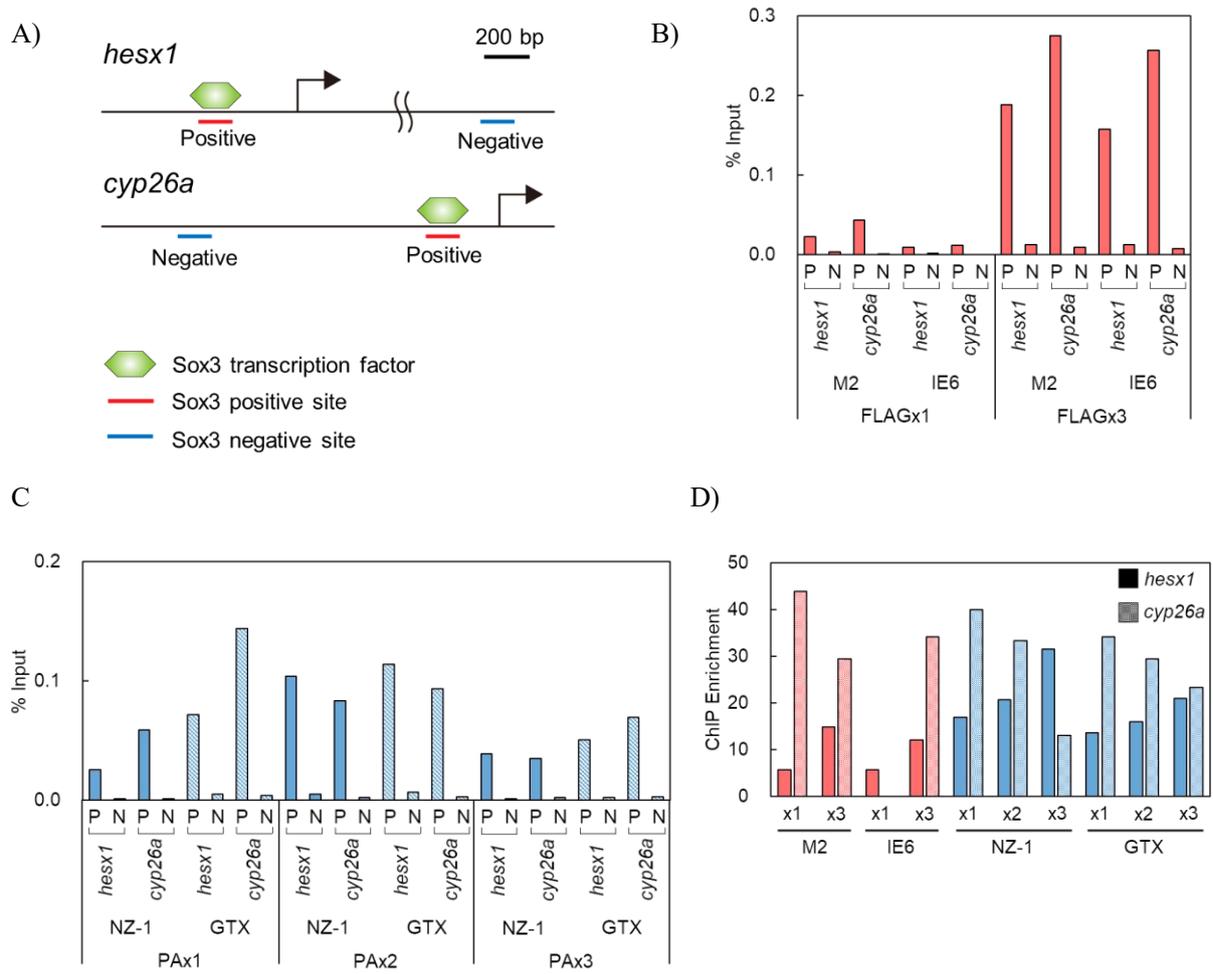


図9. qPCRを用いた多量体化によるDNA断片の回収率とChIP濃縮度

A) qPCRで増幅した領域の模式図。Sox3転写因子が特異的に結合する領域を赤色、そうではない領域を青色で表した。B) qPCRを用いて各条件のFLAGタグを定量したグラフ。C) qPCRを用いて各条件のPAタグを定量したグラフ。色の薄いバーは抗Sox3抗体を用いたときの条件を示す。D) 各条件より算出したChIP濃縮度のグラフ。色が濃いグラフは*hesx1*、薄いグラフは*cyp26a*を示す。

高効率なクロマチン免疫沈降法のためのエピトープタグの解析

どのエピトープタグを Sox3 転写因子に付加することでクロマチン免疫沈降法を高効率に行うことが出来るのか、FLAG, HA, V5, PA, Ty1 タグの 5 種類の三量体を用いて評価した。評価において、クロマチン免疫沈降法の手順は至適化の段階と同じ方法で行ったが、回収に用いるエピトープタグに特異的なモノクローナル抗体あるいは回収のための磁気ビーズを数種類用いることで、同じタグの中でも最も効率的な条件を探索した。固定液はパラホルムアルデヒド粉末から調製し、冷凍保存した 1%ホルムアルデヒド溶液を使用した。それぞれの詳細な組み合わせは表にまとめた(表 4)。Ty1 に対して 1 つの組み合わせでのみ解析を行っているのは、実験の再現性を検証するため同じ条件を 2 つ行ったからである。2 つのデータに差が無かったことから一方のデータは掲載していない。これらの条件で、クロマチン免疫沈降前のインプット、免疫沈降後の溶出液に対して HiBiT アッセイで回収率を算出した。

HiBiT アッセイの結果より、インプット溶液において HAx3 タグが付加した Sox3 量が少なることは以前の実験と同様であった(図 10A)。さらに、エピトープタグの種類と抗体クローンの組み合わせに関わらず、Sox3-DNA 複合体の回収率が 50%前後となり高くなることが分かった(図 10B)。また、同じ抗体を使用した場合でも、回収のための磁気ビーズが変わると回収率に影響することが分かった。

これら 2 つの結果より、エピトープタグの違いによる回収率の差は大きくないと考えることが出来るが、一方でタグの選択より回収に用いる抗体や磁気ビーズの選択が効率的なクロマチン免疫沈降法には重要であると考えられる。その中でも Ty1x3 タグと V5x3 タグは選択する抗体によっては回収率が高くなることから、Sox3 において効率的なクロマチン免疫沈降を期待できる。

Tag	Monoclonal Antibody			Beads type
	Supplier	Clone	Species	
FLAGx3	Sigma	M2	Mouse	α -mouse IgG
	MBL	FLA-1	Mouse	α -mouse IgG
	Wako	IE6	Mouse	α -mouse IgG
	Wako	IE6	Mouse	Protein G
	BioLegend	L5	Rat	α -rat IgG
	BioLegend	L5	Rat	Protein G
HAx3	Roche	3F10	Rat	α -rat IgG
	Roche	3F10	Rat	Protein G
	Wako	4B2	Mouse	α -mouse IgG
	Wako	4B2	Mouse	Protein G
V5x3	Sigma	V5-10	Mouse	α -mouse IgG
	Wako	6F5	Mouse	α -mouse IgG
PAx3	Wako	NZ-1	Rat	α -rat IgG
	Wako	NZ-1	Rat	Protein G
Ty1x3	Sigma	BB2	Mouse	α -mouse IgG

表 4. 各エピトープタグに対して用いた抗体のクローンと回収のための磁気ビーズの表
Ty1 タグを除く各エピトープタグに対して、モノクローナル抗体のクローンと回収のための磁気ビーズを複数通り準備した。

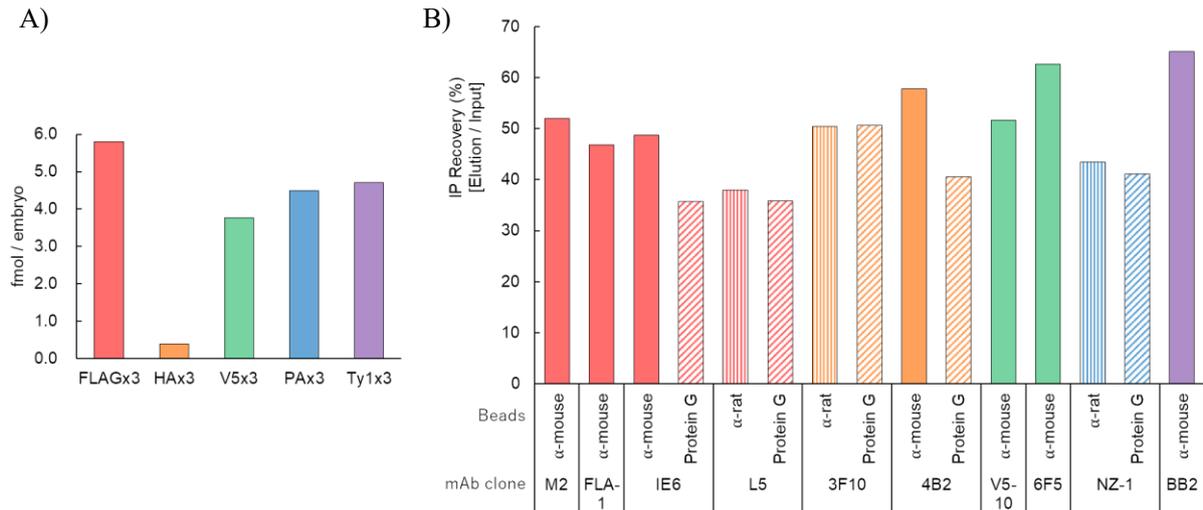


図 10. HiBiT アッセイにおける各エピトープタグの発現量と回収率

A) インプット溶液に含まれる各タグ付き Sox3 タンパク質の量のグラフ。縦軸は 1 エンブリオ当たりのタグ付き Sox3 のタンパク質量を示す。B) それぞれの条件でのタグ付き Sox3 の回収率のグラフ。バーの様子は回収の使用した磁気ビーズの違いを示す。

qPCR を用いたクロマチン免疫沈降で回収した DNA の定量によるエピトープタグの評価

FLAG、HA、V5、PA、Ty1 タグの三量体を付加した Sox3 転写因子を用いて、回収のための抗体と磁気ビーズを複数通り用意し、最も効率的なクロマチン免疫沈降法の条件を探索した。固定にはパラホルムアルデヒド粉末から調製し、冷凍保存した 1%ホルムアルデヒド溶液を使用し、各条件でクロマチン免疫沈降によって回収された DNA について、Sox3 転写因子が特異的に結合することが知られているゲノム領域であるポジティブ領域の 2 点と結合しないネガティブ領域の 2 点を qPCR で定量した。各条件の比較には、回収されるポジティブ領域の回収量と ChIP 濃縮度を用いた。

得られたデータより、ほぼすべての条件において、結合するポジティブ領域は結合しないネガティブ領域より多く回収されていることが分かった(図 11A)。全てのタグを比較したとき、FLAG タグに対して M2 抗体と α -mouse IgG ビーズを用いた条件でポジティブ領域をもっと多く回収できた。他の FLAG タグや V5、Ty1 タグでもポジティブ領域を多く回収することが出来た。HA タグでは回収できた Sox3-DNA 複合体が少ないことからネガティブ領域の DNA 断片が少なく定量できなかった。PA x3 タグに対して NZ-1 抗体と α -rat IgG 磁気ビーズを用いたとき、ネガティブ領域が多く回収されてしまうことが分かった。これらの qPCR のデータよりそれぞれの条件と DNA 領域の組み合わせで ChIP 濃縮度を算出したところ、どのエピトープタグでも抗体と磁気ビーズを適切に組み合わせることで濃縮度が高くなることが分かった(図 11B)。 *hesx1* と *cyp26a* のそれぞれで条件ごとに ChIP 濃縮度が違うのはネガティブ領域の回収量が影響していると考えられる。

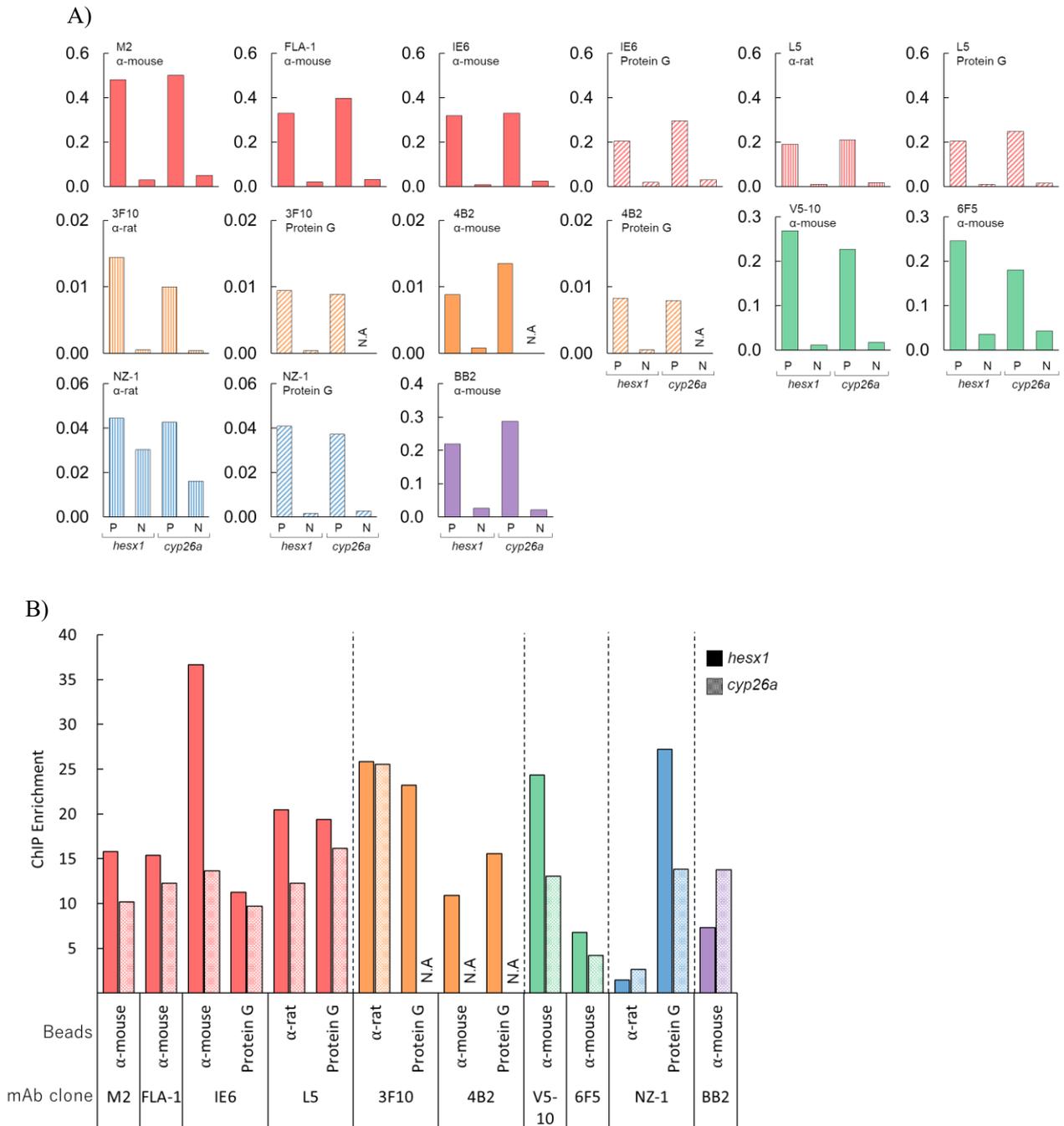


図 11. qPCR を用いて定量した各条件の%Input と ChIP 濃縮度

A) qPCR を用いて定量した各条件の%Input をエピトープタグと条件ごとに並べた。グラフのバーは左から、*hesx1* のポジティブとネガティブ領域、*cyp26a* のポジティブ領域とネガティブ領域を示す。各条件に使用した回収のための抗体と時期ビーズは各グラフの上部に示す。B)条件ごとに算出した ChIP 濃縮度のグラフ。縦軸は ChIP 濃縮度を表し、横軸を各条件とした。濃いグラフは *hesx1* の濃縮度で薄いグラフは *cyp26a* の濃縮度を表す。

第4章 考察

HiBiT system を利用したクロマチン免疫沈降法のための定量的なタンパク質測定手法の開発

クロマチン免疫沈降法において、HiBiT タグを目的の転写因子に付加する手法は、その途中のプロセスを追跡することで各ステップの効率化に関わる要因を理解し、最終的な至適化を図ることに大きく役立つことが分かった。HiBiT system を利用することで従来用いられている ELISA や Western blot などのタンパク質測定手法より簡便で迅速に目的の転写因子の溶液中における存在量を調べられる。また、抗体を用いてタンパク質量を測定するときは抗体を介して間接的に測定するのに対し、HiBiT アッセイではタンパク質そのものの量を測ることが出来る。したがって、HiBiT アッセイはタンパク質が直接的に反映されるため、より安定的かつ定量的に測定することが可能である。そのためには HiBiT アッセイの発光量が低下しないように、クロマチン免疫沈降されたサンプル中の SDS 濃度を低くすることが重要である。また、SDS による発光量の低下を抑えるために Triton X-100 を加えるのが有効であることも分かった。

エピトープタグを利用したクロマチン免疫沈降法の至適化

クロマチン免疫沈降法の操作において、固定条件やエピトープタグの付加数の変化が最終的な結果に影響を与えることが分かった。初めに固定時間について、固定時間が長くなることによってエピトープタグの抗体に認識されるペプチドに影響を与え回収率が低下すると考えられたが、HA タグにおいては変化が見られなかった。qPCR での変化から見ても固定時間を長くすることで Sox3 が結合するポジティブ領域が多く回収されており、特定の DNA 断片を回収するには有効である。今回の主要な実験では回収量よりもネガティブ領域の回収量が少なく、ChIP 濃縮度が高くなる固定時間である 15 分を選択した。次にエピトープタグの多量体化の効果に関しては、タグ付き Sox3-DNA 複合体の回収率が多量体化することで高くなることが分かった。比較のために使用した抗 Sox3 抗体よりも多く回収することができたことは、エピトープタグを使用した手法によって効率的に免疫沈降を行えることを示している。qPCR によるポジティブ領域とネガティブ領域の定量では、多量体化によって *hesx1* 領域の ChIP 濃縮度は上昇したが、*cyp26a* 領域では低下した。これについては決定的な理由が分かっておらず、他のプライマーや Sox3 が結合する領域での比較を含めて、さらなる実験が必要であると考えられる。

クロマチン免疫沈降法のための効率的な三量体エピトープタグの決定

HiBiT アッセイの結果より、どの条件下でも Sox3 タンパク質の回収率が高くなることが分かった。これは三量体のエピトープタグを付加することで抗体との見かけ上の親和性が高くなったからであると考えられる。また qPCR を用いて特異的な DNA 断片を増幅することで算出した ChIP 濃縮度の結果より、どのエピトープタグを選択しても正しい抗エピトープタグ抗体と時期ビーズを選択することで効率的にクロマチン免疫沈降を行えることが分かった。また、濃縮度は抗体に大きく依存すると思っていたが、回収に用いる磁気ビーズも影響を及ぼすことが分かった。ただ

し、それは磁気ビーズの変更と特異性の影響に相関がないことから、磁気ビーズと抗体の組み合わせが抗体の立体構造に影響を与え、親和性と特異性が変化するためと考えられる。

第5章 材料と方法

エピトープが付加された Sox3 転写因子をコードするプラスミドの作成

タグ付けされた Sox3 タンパク質をコードする mRNA を作成するために、pCS2 ベクターを基本として、CMV エンハンサー・プロモーターの後方にゼブラフィッシュ Sox3 転写因子、エピトープタグ、TEV プロテアーゼ認識部位、ビオチンタグ、HiBiT タグをコードする DNA 配列を順に並べた[12]。また、各タグの間には隣り合うタグが影響しないようにグリシンなどのアミノ酸を1つまたは2つ並べた。作成にあたって、プラスミドを増幅させるために E.coli JM109 を用い、精製は NucleoBond Xtra Midi(Takara)を使用し、トランスフェクショングレードプラスミド精製プロトコールで行った。

mRNA の作成

精製したタグ付き Sox3 をコードするプラスミドを制限酵素 NotI で切断された線上の DNA を鋳型とし、mMessage mMachine SP6 キット (Ambion) を用いて in vitro で転写した。転写された mRNA を RNA Clean & Concentrator-25 の標準プロトコールを用いて精製した。精製した mRNA は -80°C で保存した。

インジェクション

ゼブラフィッシュ TL 系の自然交配によって得られた胚の 1 細胞期に顕微注入を行った後、0.03%Red sea salt 溶液中、28°C で飼育した。顕微注入した溶液については、タグ付けされた Sox3 mRNA の濃度は実験によって 2.5 ~12.5 ng / μ l の間で調整し、確認と発現量を均一化するために蛍光タンパク質である Venus をコードする Venus mRNA(50ng/ μ l)と混合した。この混合液を約 1nl 顕微注入した。Sox3 mRNA 濃度は各実験に記載している。記載が無い場合は 10 ng / μ l で使用した。インジェクション後 6 時間、50% Epibory の段階で、蛍光顕微鏡を用いて蛍光タンパク質 Venus の蛍光強度でインジェクションの成否を評価した。

クロマチン免疫沈降法

クロマチン免疫沈降法は発表された論文[14]を元に、少し変更を加えて行った。70-80%E のゼブラフィッシュ胚にプロネースを用いて酵素的に脱コリオン処理し、室温で 15 分あるいは 30 分の 1%ホルムアルデヒド中で架橋処理を行った。各免疫沈降実験について、各エピトープの固定時間ごとに 130 個の架橋された胚をプロテアーゼ阻害剤が含まれた細胞溶液緩衝液中(10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40)で懸濁し、氷上で 15 分間静置した。遠心分離し核を収集し、プロテアーゼ阻害剤(Complete protease inhibitor cocktail)を含んだ核溶解緩衝液(0.25% SDS, 2.5mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH7.5)に 1 embryo/ μ l になるよう再懸濁し、氷上で 15 分静置した。次に DNA Shearing システム M220(Covaris)を用いて 7°C で 5 分間、超音波処理を行った。10 embryo 分をインプットコントロールにした。超音波処理した細胞の上清を ChIP 希釈緩衝液 (250mM NaCl, 1.65% Triton X-100, 0.165% DOC, 50mM Tris-HCl pH7.5)で 2.5 倍希釈した。希釈した溶液を、各抗体が予め結合された IgG あるいは ProteinG Dynabeads (Invitrogen)と 4°C で 14 時間混

合した。混合量は溶液 60 embryo あたり抗体-ビーズ複合体を含んだ溶液を 20 μ l 加えた。抗体-ビーズ複合体はビーズを含んだ溶液 20 μ l に対して 1 μ g の抗体を混合させた。抗体-ビーズ複合体を含んだ希釈溶液を 14 時間混合後に上清を取り除き、磁気ビーズを氷で冷やした RIPA 緩衝液 (50mM HEPES pH7.6, 1mM EDTA, 0.7% DOC, 1% Triton X-100, 0.5M LiCl) で 4 回洗浄後、チューブを変え TBS(20mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl) で 1 回洗浄した。上清は-30°C で保存した。結合した複合体をビーズから 60 μ l の ChIP 溶出緩衝液(50mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA, 0.25% SDS, 25mM DTT)に移動させ、溶出緩衝液中で 60°C、6 時間脱架橋処理した。溶出した DNA を RNaseA で処理し、proteinase K で処理、ChIP DNA Clean & Concentrator -25 (Zymo Research)を用いて精製した。DNA の溶出は、インプット溶液では 10 μ l を ChIP 溶出緩衝液 40 μ l に希釈して行い、溶出緩衝液 50 μ l を用いて行った。

HiBiT アッセイ

クロマチン免疫沈降法によって得られたタンパク抽出液を BSA が 0.01%、Triton X-100 が 0.1%、SDS が 0.001%になるように PBS を用いて希釈し、希釈液 20 μ l に対して同量の NanoGlo HiBiT アッセイ Reagent(Promega)を標準プロトコールに沿って添加し、混合液を室温で 10 分間振盪した。その後、Mithras LB940(Berthold)を用いて、1 秒間の露光時間で発光量を測定した。HiBiT タグの量は、同じエピトープタグ付き GST タンパク質 (GST-FLAGx3-HiBiT) を使用して作成した標準曲線をもとに計算した。

HiBiT ブロットニング

クロマチン免疫沈降法によって得られたタンパク質抽出液 (10 embryo 相当量) を 10%SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、ニトロセルロース膜に転写した。タンパク質が転写されたメンブレンを TBST(20mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween20)で 30 分間振盪した後、LgBiT タンパク質 (Promega) を含む Nano-Glo HiBiT ブロットニング試薬で置換した。4°C で一晩浸透後に室温へ戻し、基質であるフリマジンを追加し、5 分間振盪した。CCD カメラ (Fusion、Vilber Lourmat) を備えた化学発光イメージャーを使用して、ブロットを画像化した。画像の解析には Image Studio(LI-COR Biosciences)を用いた。

蛍光ウェスタンブロット

クロマチン免疫沈降法によって得られたタンパク質抽出液 (10 embryo 相当量) を 10%SDS-ポリアクリルアミドゲルで分離し、ニトロセルロース膜に転写した。タンパク質が転写されたメンブレンをメンブレン 1 cm²あたり 1 ml の Odyssey / TBS ブロッキングバッファーに浸し、1 時間室温で振盪した。Odyssey / TBS ブロッキングバッファーは Odyssey ブロッキングバッファーと TBS を投了混合したものである。振盪後に TBST で 1 回洗浄し、TBST で 5 分間振盪する。振盪後に TBST を除き、目的のタンパク質およびエピトープタグに特異的な 1 次抗体を含んだ Can Get Signal 1(TOYOBO)をメンブレン 1 cm²あたり 1 ml になるように加え、室温で 2 時間振盪する。各抗体の濃度は抗 Sox3 抗体(GeneTex GTX129235)が 0.5 μ g / ml、抗 GFP 抗体(Wako mFX75)が 0.4 μ g / ml である。振盪後に TBST で 1 回洗浄し、4 回 TBST で 5 分間振盪する。振盪後に

TBST を除き、目的の 1 次抗体に特異的な 2 次抗体を含んだ Odyssey / TBS ブロッキングバッファをメンブレン 1 cm²あたり 1 ml になるように加え、アルミホイルで容器を覆い室温で 1 時間振盪する。各抗体の濃度は、Sox3 に対して抗ラビット IgG 抗体(LI-COR IR Dye 800)が 0.2 μg/ml、GFP に対して抗マウス IgG 抗体(LI-COR IR Dye 680)が 0.1 μg/ml である。振盪後に TBST で 1 回洗浄し、3 回 TBST で 5 分間振盪したのち、TBS で 5 分間振盪する。その後、Odyssey Clx でメンブレンをスキャンし画像化した。画像の解析には Image Studio(LI-COR Biosciences)を用いた。

ChIP-qPCR

クロマチン免疫沈降法によって回収し精製した DNA を TE で 2 倍希釈し、1 ウェルあたり 2 μl(2 embryo 相当)とした。ただし、ネガティブ領域に関して、DNA 断片量が少ないことから 4 μl(4 embryo 相当)としている。また、定量のための%Input の検量線にはインプット溶液から精製した DNA を使用し、4~0.0004%までの 5 段階の 10 倍希釈を用いた。各ウェルに対して、表 5 のプライマーをフォワードとリバースがそれぞれ 200 nM になるように加え、qPCR ミックスには KOD SYBR qPCR Mix(TOYOBO)、HOT FIREPol® SolisGreen qPCR Mix(Solis BioDyne)あるいは BrightGreen MasterMix(Applied Biological Materials)を使用した。記載がない場合は HOT FIREPol® SolisGreen qPCR Mix を使用した。qPCR 反応には LightCycler 96(Roche)を用いて行い、KOD SYBR qPCR Mix の場合、サイクル数は 40 で、各サイクルは初期変性が 98°C で 2 分、変性が 98°C で 10 秒、アニーリングが 60°C で 10 秒、伸長反応が 68°C で 30 秒である。SolisGreen qPCR Mix の場合は、サイクル数は 40 で、各サイクルは初期変性が 95°C で 10 分、変性が 95°C で 10 秒、アニーリングが 60°C で 20 秒、伸長反応が 72°C で 20 秒である。BrightGreen MasterMix の場合は、サイクル数は 40 で、各サイクルは初期変性が 95°C で 10 分、変性が 95°C で 15 秒、アニーリングが 60°C で 10 秒、伸長反応が 72°C で 30 秒である。

クロマチン免疫沈降法で回収した DNA の qPCR を用いた定量による固定時間の検討

hesx1_1	F, TAAAAGCAGCCAAGCAGCCAAC	R, ATGCTCGGCTTCACAAAAGCAC
cyp26a1_1-1	F, CTCAGGATTGTCTGCCTTCTACAG	R, CGGCTCCAAACTCTCAACCATTTG
cyp26a1_1-3	F, TGAGCTGACCTGAGTTTGAACC	R, ACCCGTGCCACAGATATTATGC
bactin2_2	F, CGCCATGGCCTTGTTCTTTAAC	R, CGCGTGCACATTGCTACACTTG

固定液の選択による HiBiT アッセイと qPCR の影響

hesx1_1	F, TAAAAGCAGCCAAGCAGCCAAC	R, ATGCTCGGCTTCACAAAAGCAC
cyp26a1_1-1	F, CTCAGGATTGTCTGCCTTCTACAG	R, CGGCTCCAAACTCTCAACCATTTG
cyp26a1_1-4	F, TGAAGTTCAGAGTTGCATTGCTC	R, GTTTTCCCTCGTAAGAGTCGTG
bactin2_4	F, TATGGCTAGAGCCGGGTATGTG	R, CGTGTGGAGGAGCTCAAAGTG

qPCR を用いた多量体化したタグ付け Sox3-DNA 複合体の回収率と ChIP 濃縮度の変化

qPCR を用いたクロマチン免疫沈降で回収した DNA の定量によるエピトープタグの評価

hesx1_1	F, TAAAAGCAGCCAAGCAGCCAAC	R, ATGCTCGGCTTCACAAAAGCAC
hesx1_dow1	F, GATGATTCCTCAGGCCTTCAGAT	R, AAGTTCGCCAGCAGTCCTAATG
cyp26a1_1-1	F, CTCAGGATTGTCTGCCTTCTACAG	R, CGGCTCCAAACTCTCAACCATTG
cyp26a1_1-4	F, TGAACTTCAGAGTTGCATTGCTC	R, GTTTTCCCTCGTAAGAGTCGTG

表 5. qPCR に使用したプライマー配列の一覧

6章 謝辞

本研究は高知工科大学分子発生制御学研究室、蒲池雄介教授の御指導の下で行いました。蒲池先生には本研究を進めるにあたり、数々の御指導、御鞭撻を賜りましたこと、ここに厚く御礼申し上げます。

7 章 参考文献

1. Spencer VA, Sun JM, Li L, Davie JR. Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods*. 2003. 31(1):67-75
2. Kidder BL, Hu G, Zhao K. ChIP-Seq: technical considerations for obtaining high-quality data. *Nat Immunol*. 2011. 12(10):918-22.
3. Wardle FC, Tan H. A CHIP on the shoulder? Chromatin immunoprecipitation and validation strategies for ChIP antibodies. *F1000Res*. 2015. 4: 235.
4. Savic D, Partridge EC, Newberry KM, Smith SB, Meadows SK, Roberts BS, Mackiewicz M, Mendenhall EM, Myers RM. CETCh-seq: CRISPR epitope tagging ChIP-seq of DNA-binding proteins. *Genome Res*. 2015. 25(10):1581-9.
5. Einhauer, A. & Jungbauer, A. The FLAGTM peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J Biochem. Biophys. Methods* 49, 455-465 (2001).
6. Hopp, T. P. et al. A short polypeptide marker sequence use ful for recombinant protein identification and purification. *Bio/Technology* 6, 1204-1210 (1988).
7. Field, J. et al. Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol. Cell. Biol*. 8, 2159-2165 (1988).
8. Southern, J. a, Young, D. F., Heaney, F., Baumgartner, W. K. & Randall, R. E. Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. *J Gen. Virol*. 72, 1551- 1557 (1991).
9. Fujii, Y. et al. PA tag: A versatile protein tagging system using a super high affinity antibody against a dodecapeptide derived from human podoplanin. *Protein Expr. Purif*. 95, 240-247 (2014).
10. Bastin, P., Bagherzadeh, A., Matthews, K. R. & Gull, K. A novel epitope tag system to study protein targeting and organelle biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 77, 235-239 (1996).
11. Dixon AS, Schwinn MK, Hall MP, Zimmerman K, Otto P, Lubben TH, Butler BL, Binkowski BF, Machleidt T, Kirkland TA, Wood MG, Eggers CT, Encell LP, Wood KV. NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. *ACS Chem Biol*. 2016. 11(2):400-408.
12. Ranawakage, D.C., Takada, T. & Kamachi, Y. HiBiT-qIP, HiBiT-based quantitative immunoprecipitation, facilitates the determination of antibody affinity under immunoprecipitation conditions. *Sci Rep* 9, 6895 (2019).
13. Okuda Y, Ogura E, Kondoh H, Kamachi Y. B1 SOX Coordinate Cell Specification with Patterning and Morphogenesis in the Early Zebrafish Embryo. *PLoS Genet*. 2010. 6(5):e1000936.
14. Wardle FC, Odom DT, Bell GW, Yuan B, Danford TW, Wiellette EL, Herbolsheimer E, Sive HL, Young RA, Smith JC. Zebrafish promoter microarrays identify actively transcribed embryonic genes. *Genome Biol*. 2006.7(8):R71.
15. Schembri, L., Dalibart, R., Tomasello, F. et al. The HA tag is cleaved and loses immunoreactivity during apoptosis. *Nat Methods* 4, 107–108 (2007).

16. Saiz-Baggetto S, Méndez E, Quilis I, Igual JC, Baño MC (2017) Chimeric proteins tagged with specific 3xHA cassettes may present instability and functional problems. PLoS ONE 12(8): e0183067.