

HiBiT system を利用したクロマチン免疫沈降法のための

1180231 高田拓也

定量的なタンパク質測定手法の開発とゼブラフィッシュ胚への応用

Takuya Takada

HiBiT-based protein quantitation for chromatin immunoprecipitation and its application to zebrafish embryos

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 DNA 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、複合体が適切に回収されているかどうかを調べるのは困難である。そこで HiBiT system と呼ばれる 2 つのルシフェラーゼ断片の相補性を利用した発光定量法を用いて、免疫沈降の効率をモニターする方法を開発した。この方法を利用して、どのペプチドタグを付加すれば、転写因子の ChIP を効率よく行えるかを調べた。まず、5 種類のペプチドタグ FLAG, HA, PA, Ty1, V5 について、それぞれのトライマーと HiBiT タグが付加された Sox3 転写因子をコードする mRNA を調製した。その mRNA を顕微注入したゼブラフィッシュ胚を用いて、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 ChIP を行い、タンパク質-DNA 複合体の回収率を調べた。HiBiT のレポーターアッセイにおける結果から、Sox3 転写因子の回収率は HA タグを用いた場合に高くなることがわかった。また、ChIP で回収した DNA に対して qPCR を行い、Sox3 転写因子が細胞内で結合する DNA と結合しない DNA の存在比を調べた。その結果、HA タグは高い特異性で、また PA タグは架橋時間にかかわらず安定的に Sox3 転写因子のターゲット配列を回収できた。従って、HA および PA タグは ChIP を高効率に行えるペプチドタグであるが、適切な抗体と回収ビーズの組み合わせが必要である。