

高度に定量的な蛍光ウェスタンブロット法の開発とエタノールがヒストン修飾に与える影響
への応用

1225103 是永 修平

Development of truly quantitative western blotting and its application to an analysis of the
effect of ethanol on histone modifications

Shuhei Korenaga

Western Blot 法はタンパク質混合物から特定のタンパク質を検出する手法として広く使用されてきた。近年、Western Blot 法を定量的に行うことが広がってきたが、定量性を担保するための十分な方法がとられている場合は少ない。そこで、本研究ではターゲットタンパク質とレファレンスタンパク質の両方に対して検量線を作成することによって、より定量的に Western Blot を行う方法を提案する。

本実験では、ゼブラフィッシュ胚からタンパク質溶液を調製し、タンパク質を SDS-PAGE で分離後、Western Blot 法で検出した。今回、検出方法には複数の標的タンパク質を同時に検出できる二色蛍光 Western Blot 法を用いた。まず、どのレファレンスタンパク質が定量性に優れるかを調べるため、総タンパク質の染色およびハウスキーピングタンパク質の α チューブリン、 β アクチンとヒストン H3 を比較した。その結果、 α チューブリンと β アクチンは 5 つの胚に相当するタンパク質量からシグナル値が頭打ちになった。また、ヒストン H3 は抗体の製品やロット番号の違いで異なる結果が得られたが、いずれも直線性を示す範囲は限られていた。一方で総タンパク質の染色は幅広いタンパク質量の範囲で直線性が見られた上、サンプル間の結果に変動があまり見られなかった。以上の結果は、免疫染色シグナルの直線性は抗体の特徴に依存すること、またレファレンスタンパク質としては総タンパク質の染色がハウスキーピングタンパク質より優れているということを示す。

以下のヒストン修飾の検出に関する実験では、レファレンスタンパク質には総タンパク質の染色を用い、標準化の方法は次のように行った。まず初めに、総タンパク質について検量線を作成し、そこから各サンプルの実測値を検量線に基づいた相対値に変換した後、標準化のための指数を算出した。次に測定ターゲットタンパク質であるヒストン修飾についても検量線を作成し、各サンプルの実測値を検量線に基づいた相対値に変換した。この相対値を総タンパク質から算出された指数で割った値を標準化された最終的なデータとした。

このように至適化した定量的 Western Blot 法を用いて、ゼブラフィッシュ胚においてエタノールがヒストン H3 の化学修飾に与える影響を調べた。Shield 期から 3 時間あるいは 6 時間エタノールに曝露した胚のヒストン H3 K4 のトリメチル化修飾 (H3 K4me3)、K27 のアセチル化修飾 (H3 K27ac) とトリメチル化修飾 (H3 K27me3) の変化を調べた。この結果、H3 K4me3、K27ac、K27me3 の全てで 3 時間のエタノール曝露では修飾量に大きな変化は見られなかったが、6 時間の曝露では修飾されたヒストンが増加する傾向にあった。これらの修飾に関しては同じタンパク質サンプルと同じ手法を用いた実験を数回行ったが、結果に大きな違いは現れず Western Blot 法の高い再現性が見られた。これらの結果から、2 つの検量線を用いる標準化によって高度に定量的な Western Blot 法を行うことができることがわかった。