

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

1225104 高田 拓也

Development of HiBiT-based quantitative immunoprecipitation and its application to

optimization of epitope tag-based chromatin immunoprecipitation

Takada Takuya

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。