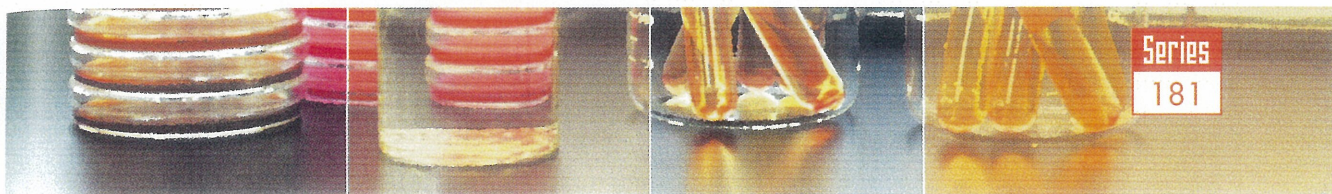


ChIP-on-chip のためのクロマチン IP のコツ

直江吉則, 秋山かおり, 谷内一郎



はじめに

クロマチン免疫沈降法 (chromatin immunoprecipitation: ChIP) の開発により DNA-タンパク質相互作用研究が大きく変わった。従来では DNA-タンパク質相互作用の検出はゲルシフト法 (electrophoretic mobility shift assay: EMSA) が主流であり、無細胞系で特定の DNA に対するタンパク質の結合を調べていたが、ChIP 法により細胞内で DNA-タンパク質相互作用を調べることが可能となった。細胞内で DNA-タンパク質相互作用を検出するインパクトは、ChIP 法によりクロマチン構造の変化と遺伝子発現の関係の理解が飛躍的に進歩したことから理解していただけると思う。このような背景から、近年、DNA-タンパク質の相互作用を調べた論文投稿の際、EMSA 法ではなく ChIP 法を用いた解析が要求されるようになり、ChIP 法は多くの研究室で行なわれるようになった。

さらに DNA チップ (chip) 技術の進歩により、ヒトやマウスといった高等動物においても全ゲノム配列をカバーする、いわゆるタイリングアレイチップが実用化され、この2つの技術を組合わせた ChIP-on-chip 法を用いることで転写因子の標的遺伝子を網羅的にスク

リーニングすることが可能となった^{1)~3)}。

ところが ChIP 法および ChIP-on-chip 法は免疫沈降によって得られた少量の DNA を PCR 法によって増幅することから、非特異的な DNA の混入により大きなノイズが生じる。ChIP 法および ChIP-on-chip 法は実験に多くのステップがあり、さらに免疫沈降に用いるビーズに対する DNA の非特異的結合等により、多くの研究者がこれらによって生じるノイズに苦しめられている。言い換えれば、「いかにノイズを減らすか」が ChIP 法および ChIP-on-chip 法の成功へのカギといえる。

われわれは「いかにノイズを減らすか」という点について検討を行い、① Dynabeads を用いて免疫沈降すること、② あらかじめ抗体と Dynabeads を結合させておくこと、および ③ 可溶分画と抗体-ビーズを反応させる buffer の塩濃度を高めること、が有効である知見を得た。実際に、われわれは改良した条件で ChIP-on-chip 法を行い、ThPOK 遺伝子座に Runx 転写因結合領域を同定し、新たなサイレンサー領域を見出した⁴⁾。今回、われわれが行っている改良 ChIP 法および Agilent 社のタイリングアレイを用いた ChIP-on-chip 法を紹介する。

Tips of chromatin immunoprecipitation for ChIP-on-chip

Yoshinori Naoe/Kaori Akiyama/Tchiro Taniuchi: Laboratory for Transcriptional Regulation RCAI RIKEN (理化学研究所 RCAI 免疫転写制御研究チーム) E-mail: naoepenn@gmail.com

原理

ChIP-on-chip法はクロマチン免疫沈降法とマイクロアレイ実験を組み合わせることにより、細胞内で転写因子が結合しているDNA領域を網羅的に同定する実験方法である(図1)。細胞にホルムアルデヒドを加えることによりタンパク質-DNA間にクロスリンクを形成させ、転写因子がDNAに結合した状態で固定することができる。次に超音波処理を行い、クロマチンを断片化することにより可溶化する。可溶化分画に目的の転写因子の抗体を加え、免疫沈降を行う。この沈降産物を脱クロスリンクすることにより転写因子-DNA間のクロスリンクが解除され、転写因子が結合していたDNAを得ることができる。免疫沈降で得られたDNAおよび免疫沈降前のDNAにリンカーをつけ、そのリンカーに対するプライマーを用いてPCRでDNAを増幅する。それらDNAをCy3およびCy5でラベルし、遺伝子領域をカバーするタイリングアレイにハイブリダイゼーションをすることにより、転写因子が細胞内で結合していた領域が明らかになる。

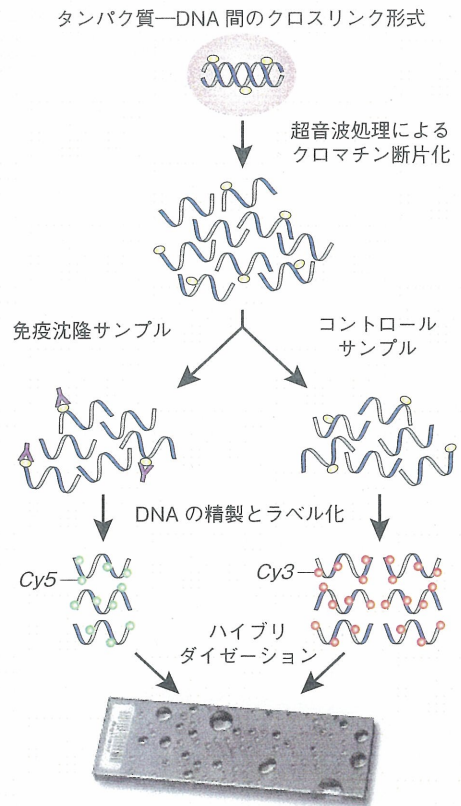


図1 ChIP-on-chip法の原理

準備

1 細胞

1×10^7 個*

2 使用機器

- 超音波破碎機 Microson XL-2000 (MISONIX社)
- ローテーター

3 試薬

- ホルムアルデヒドによるクロスリンク形成
 - ・ Fixing solution : 50 mM HEPES (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 11%ホルムアルデヒド
 - ・ 1.5 M グリシン
- 細胞溶解
 - ・ Lysis buffer1 (LB1) : 50 mM HEPES (pH 7.5), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10%グリセロール, 0.5% NP-40, 0.25% Triton X-100

* 細胞は多いほど安定した結果が得られる。抗体の力価および標的の転写因子にもよるが、経験上少なくとも 1×10^6 個は必要

- ・ Lysis buffer2 (LB2) : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA
- ・ Lysis buffer3 (LB3) : 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.1 % Sodium deoxycholele, 0.5 % N-lauroylsarcosine
- ・ N-lauroylsarcosine (SIGMA 社, 61743)
- ・ プロテアーゼ阻害剤 Complete (Roche 社, 1697498)
- 抗体のマグネチックビーズへの結合
 - ・ Block Solution : 0.5 % BSA PBS (-)
 - ・ Dynabeads M-280 ヒツジ抗ウサギIg または抗マウスIg
- 洗浄, 溶出および脱クロスリンク
 - ・ Low salt buffer : 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1 % SDS, 1 % Triton X-100
 - ・ High salt buffer : 20mM Tris-HCl (pH 8.0), 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1 % SDS, 1 % Triton X-100
 - ・ RIPA buffer : 50mM HEPES (pH 7.6), 500 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 0.7 % Sodium deoxycholele
 - ・ Elution buffer : 50 mM Tris-HCl (pH8.0), 10 mM EDTA, 1 % SDS
- DNA断片末端の平滑化およびリンカーの結合
 - ・ T4 DNA ポリメラーゼ (Takara 社, 2040A)
 - ・ T4 DNA リガーゼ (Takara 社, 2011A)
 - ・ リンカー
 - JW102 : 5' -GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC-3'
 - JW103 : 5' -GAATTCAGATC-3'
 - 250 μ L 1 M Tris-HCl (pH8.0) buffer に 375 μ L 40 μ M JW102 および JW103 を加え, 100 μ L に分注する. それらを 95 $^{\circ}$ C 5分, 70 $^{\circ}$ C 1分インキュベート, さらに1分間に0.4 $^{\circ}$ C下げ4 $^{\circ}$ Cまでインキュベートし, アニールリングさせる. -20 $^{\circ}$ C 保存.
 - ・ Quiagen mini Elute Kit (Quiagen 社)
- ラベル化
 - ・ CGH Labeling Kit (Invitrogen 社, 18095-011)
 - ・ Cy5-dUTP および Cy3-dUTP (PE/ABI 社, NEL579 および NEL578)
- ハイブリダイゼーション
 - ・ Mouse Cot-1 DNA (Invitrogen 社, 18840-016)
 - ・ Agilent Blocking Agent (10X)
 - ・ Agilent Hybridization Buffer (2X)
- タイリングアレイ (chip)
 - ・ Human promoter array, Mouse promoter array 等 (Agilent 社)

プロトコール

以下の操作で記載がない限り反応は4℃または氷上で行う。

1 抗体—Dynabeads の準備

- 200 μ L の Dynabeads^{※1,2} を 1.5 mM のマイクロチューブに加える。
- 1 mL の PBS (-) で 2 回洗浄後、250 μ L Blocking solution および目的の転写因子に対する抗体^{※3} およびコントロール抗体 (ネガティブコントロール) を加え、ローテーターを用いて終夜混和する。

2 ホルムアルデヒドによる細胞固定

- 細胞を PBS (-) で 2 回洗浄後、4.5 mL PBS (-) に懸濁する。
- 0.5 mL Fixing solution を加え室温で 10 分間インキュベートする^{※4}。
- 0.5 mL 1.5 M グリシンを加え転倒混和し、PBS (-) で 2 回洗浄する。

3 細胞の溶解と超音波処理によるクロマチンの断片化

- 固定した細胞に 5 mL LB1 (プロテアーゼ阻害剤含有) を加え、10 分間混和する。1,350 \times g, 5 分間遠心。
- 5 mL LB2 (プロテアーゼ阻害剤含有) を加え、室温で 10 分間混和する。1,350 \times g, 5 分間遠心。
- 300 μ L LB3 (プロテアーゼ阻害剤含有) を加え^{※5}、超音波処理を行う^{※6}。
- 30 μ L 10% Triton X-100 を加え 20,000 \times g, 10 分間遠心。
- 上清を取り、15 μ L を input, 150 μ L を normal Ig (ネガティブコントロール) および IP 用に分ける。

※1 用いる抗体に合わせてヒツジ抗ウサギ Ig ビーズまたは抗マウス Ig ビーズを使う。

※2 Dynabeads を用いることによりノイズを減らすことが可能となった (図2)。

※3 抗体によるが目安として 10 μ g からはじめ、結果に応じて抗体量を加減する。

※4 インキュベーション時間が長くなると超音波によるクロマチンの断片化が難しくなる。

※5 LB3 の塩濃度を 300 mM にすることでノイズを減らすことが可能となった (図2)。うまくいかない場合はこの塩濃度を変えてみるとよい (100 mM ~ 400 mM)。

※6 断片が ChIP 法の場合 200bp ~ 400bp, ChIP-on-chip 法の場合 200bp ~ 600bp になるように超音波破砕機の条件を設定する (図3)。

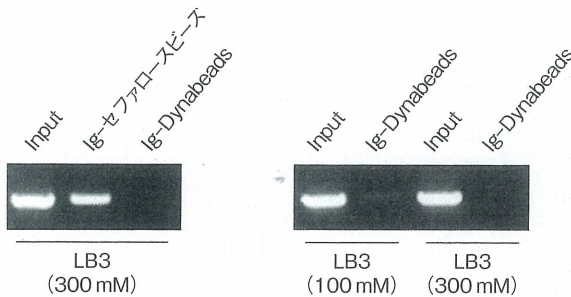


図2 ビーズおよびLB3 bufferの塩濃度の検討

ウサギ Ig を protein G-セファロースビーズおよび抗ウサギ Ig-Dynabeads に結合させ、可溶化したクロマチン分画とインキュベートし、セファロースビーズと Dynabeads への DNA の非特異的結合 (ノイズ) を検討した。Dynabeads では明らかにノイズが減少した。さらに LB3 buffer の塩濃度を検討した。LB3 (300 mM) buffer で明らかにノイズが減少した。

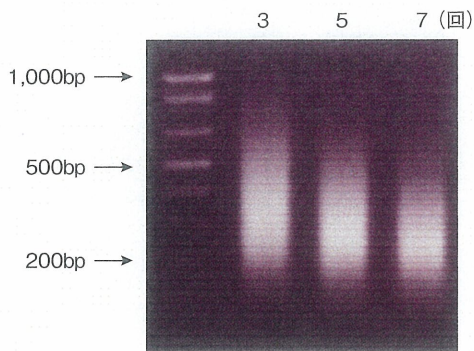


図3 クロマチン断片化の検討

マウス胸腺細胞 1×10^7 個を Fixing solution で 10 分間固定後、クロマチンを可溶化、出力 7、10 秒間、超音波処理回数を 3、5 および 7 回行いクロマチンの断片化の程度を調べた。超音波処理 5 回で DNA が 200bp ~ 600bp、超音波処理 7 回で DNA が 200bp ~ 400bp に断片化された

- ⑥ あらかじめ抗体を結合させた Dynabeads を PBS (-) で 3 回洗浄後、超音波処理した上清を加えローテーターを用いて終夜混和する。

4 ビーズの洗浄、溶出および脱クロスリンク

- ① 1 mL low salt buffer で 1 回、1 mL high salt buffer で 2 回および 1 mL RIPA buffer で 5 回ビーズを洗浄する。
- ② 1 mL TE, 50 mM NaCl buffer で 1 回洗浄する。
- ③ 210 μ L Elution buffer を加え 65 $^{\circ}$ C、15 分間インキュベートする (2 分おきにボルテックスで混和する)。
- ④ 室温で 16,000 \times g、15 分遠心し、200 μ L 上清を取り、65 $^{\circ}$ C、終夜インキュベートし脱クロスリンクする。

5 細胞のタンパク質および RNA の分解

- ① 脱クロスリンク後、200 μ L TE buffer および 8 μ L 10 mg/mL RNase A を加え 55 $^{\circ}$ C、2 時間インキュベートし、RNA を分解する。
- ② 2 μ L 20 mg/mL プロテアーゼ K を加え 55 $^{\circ}$ C、2 時間インキュベートし、タンパク質を分解する。
- ③ 400 μ L フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコールを加えボルテックス、室温で 16,000 \times g、5 分遠心し、400 μ L 上清を取る。
- ④ 2 μ L エタチンメイト、40 μ L 3 M 酢酸ナトリウム、400 μ L イソプロパノールを加え DNA を沈殿させる^{*7}。
- ⑤ 500 μ L 70% エタノールで一度洗い、得られた DNA を 15 μ L MilliQ 水に溶解する^{*8}。
- ⑥ ChIP-on-chip 法を行う場合は input DNA を 200 ng/13 μ L の濃度に希釈する^{*9}。

^{*7} イソプロパノール沈殿の方がエタノール沈殿よりきれいな沈殿が得られる。

^{*8} ChIP 法の場合、ここで得られた DNA を目的の領域を増幅するプライマーを用いて PCR を行う。ChIP-on-chip 法の場合も、既存の転写因子結合領域が判明している場合は、ここで目的の DNA が得られたかどうか、PCR で確認することが望ましい。

^{*9} Input DNA のみ希釈し、免疫沈降で得られた DNA およびコントロール抗体で得られた DNA は希釈しない。

これ以降は ChIP-on-chip 法を行うための操作

6 DNA 末端の平滑化およびリンカー結合

- ① ChIP 法で得られた input, コントロールおよび免疫沈降 DNA 13 μ L に 2.5 μ L 10 \times T4 ポリメラーゼ buffer, 2.5 μ L 0.1 % BSA および 1.7 μ L dNTPs を加え 70 $^{\circ}$ C, 5 分間インキュベートする.
- ② 37 $^{\circ}$ C に移し, 1 μ L T4 DNA ポリメラーゼを加え 37 $^{\circ}$ C, 5 分間インキュベートし, DNA 末端の平滑化を行う. その後, Qiagen mini Elute Kit で DNA を精製し, 16 μ L MilliQ 水で 2 回溶出する.
- ③ 30 μ L 溶出液に 5 μ L 10 \times T4 リガーゼ buffer, 6.7 μ L リンカー, 1 μ L T4 DNA リガーゼおよび 7.3 μ L MilliQ 水を加え 16 $^{\circ}$ C, 終夜インキュベートしライゲーションする.
- ④ Qiagen mini Elute Kit で DNA を精製し, 11 μ L MilliQ 水で 2 回溶出する.

7 PCR による DNA 増幅およびラベリング

- ① oJW102 を用いて PCR を行う (14 サイクル).
- ② PCR 産物を MilliQ 水で 10 倍に希釈する *10.
- ③ oJW102 を用いて PCR を行う (24 サイクル).
- ④ PCR 産物を Qiagen QIAquick PCR Purification Kit で DNA を精製, DNA 濃度を測定する.
- ⑤ 0.2 mL PCR チューブに 2 μ g PCR 産物, 35 μ L 2.5 \times random primer solution および total 75 μ L になるように MilliQ 水を加え, 95 $^{\circ}$ C, 5 分間インキュベート, その後急冷する.
- ⑥ 8.2 μ L 10 \times dUTP nucleotide mix, 1.5 μ L Cy5-dUTP (免疫沈降 DNA) または Cy3-dUTP (input DNA), 1.5 μ L Klenow および 1.8 μ L MilliQ 水を加え, 37 $^{\circ}$ C, 3 時間インキュベートし, DNA 断片を蛍光ラベルする.
- ⑦ Invitrogen CGH kit を用いて精製する.
- ⑧ 色素の取り込みを Nanodrop を用いて確認する (Cy3 : 3.5 pmol/ μ L, Cy-5 : 2.5 pmol/ μ L)

8 ハイブリダイゼーション

- ① Cy5 および Cy3 ラベルされた DNA それぞれ 5 μ g を合わせ, MilliQ 水を加え 150 μ L にする. 50 μ L Mouse Cot-1 DNA, 50 μ L Agilent Blocking Agent および 250 μ L Agilent Hybridization Buffer を加え 95 $^{\circ}$ C, 3 分間インキュベートする.
- ② 37 $^{\circ}$ C インキュベーターに移し 30 分間インキュベートする.
- ③ 17,900 \times g, 1 分間遠心し, 490 μ L 上清を取り, タイリングアレイ (chip) にハイブリダイゼーションする.

*10 目的の DNA が増えているかどうか, ここでも PCR で確認する (転写因子が結合すると考えられる, 少なくとも 2 カ所の領域).

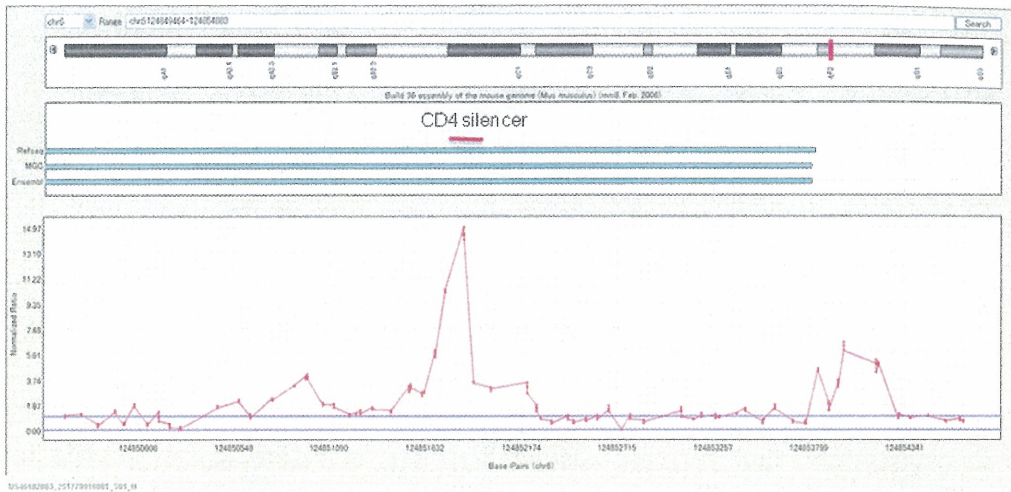


図4 Runx 転写因子複合体のCD4 サイレンサーへの結合

Runx 転写因子 β ユニット CDB β 抗体を用い、胸腺 CD8SP 細胞での Runx 転写因子の標的遺伝子を探索した。CD4 遺伝子座中の CD4 サイレンサー領域にピークがみられ、胸腺 CD8SP 細胞において Runx 転写因子複合体の CD4 サイレンサーへの結合が ChIP-on-chip 法でも確認された

実験例

マウス胸腺細胞 (CD8 シングルポジティブ細胞) に Runx 転写因子の β ユニット CBF β に対する抗体を用いて ChIP-on-chip 法を行った。CD4 遺伝子座で CD4 サイレンサー領域にピークが検出され、Runx 転写因子複合体が CD4 サイレンサーに結合することが確認できた (図4)。

おわりに

2000年に報告されたChIP-on-chip法は当初、酵母をターゲットにすることしかできなかったが、マイクロアレイの高密度化により、この数年の間にヒトおよびマウス等の哺乳類のサンプルを用い、転写因子の標的遺伝子の大規模検索に成功するまでに進歩した。さらにChIP法と次世代シーケンサーを組合わせたChIP-sequence法を用いた解析が欧米のいくつかの研究室から報告されている⁵⁾⁶⁾。このようにChIP法で得られたDNAを検出および解析する方法は著しく進歩しているが、最も肝心のChIP法は数社がキット化したものを販売しているだけで、DNAの非特異的結合等

により生じるノイズに未だ多くの研究者が苦しめられている。われわれはChIP法のいくつかのステップを改良することにより、これらノイズの低下に努めている。われわれの方法がノイズに苦しめられている研究者の助けになることを期待する。

文献

- 1) Lee, T. I. et al. : Cell, 125 : 301-313, 2006
- 2) Boyer, L. A. et al. : Nature, 441 : 349-353, 2006
- 3) Bernstein, B. E. et al. : Cell, 125 : 315-326, 2006
- 4) Setoguchi, R. et al. : Science, 319 : 822-825, 2008
- 5) Robertson, G. et al. : Nature Methods, 4 : 651-657, 2007
- 6) Barski, A. et al. : Cell, 129 : 823-837, 2007

● 筆頭著者プロフィール ●

直江吉則：1992年、東京理科大学大学院薬学研究所修了(修士課程)、'92年、藤沢薬品工業株式会社開発研究所入社。'99年、薬学博士(京都大学)、2001~'03年、ペンシルバニア大学客員研究員(Debu Chakravarti lab)、『04年、藤沢薬品工業株式会社退社、『04年より現職。ウェットな実験とドライな実験を用い、リンパ球の分化プログラムを転写制御の側面から研究している。