

Cy5を用いたゲルシフトアッセイ

Keywords : DNA結合因子、ゲルシフトアッセイ (EMSA)、STORMシステム、Typhoon

はじめに

転写因子は、特異的なDNA塩基配列と結合することで遺伝子制御に重要な役割を演じることが知られています。転写因子は少なくとも38クラスに分類され、各クラスに複数の因子が含まれます(1)。大別して、それぞれの特異的なDNA結合モチーフに対し構造的に結合する非制御タイプと活性化が必要な制御タイプが存在します。制御タイプの一例としては、リン酸化によりホモダイマーあるいはヘテロダイマーとなることで結合能を得る転写因子があげられます。どの転写因子が遺伝子制御に関与するかを解明することは、生物の発生や免疫機構などの過程で生じる遺伝子制御の複雑なメカニズムを理解する一助となります。

このようなDNA結合転写因子を検出する強力なツールとして、電気泳動の移動度シフトアッセイ (EMSA: electromobility shift assay、別称ゲルシフトアッセイ) があります(2)。EMSAは転写因子と特異的なDNA配列が結合することで、結合する場合としない場合の電気泳動時の移動度に生じたずれを検出する実験手法です。

EMSAのプロトコルを確立し、免疫システム由来細胞の主要な転写因子制御を決定するため、マウスまたは樹立細胞系 (established cell line) を用いた実験を行いました。特に *in vivo* サンプルを扱う場合、タンパク質濃度の正確な測定が難しく、総タンパク質量に対し目的タンパク質の量が極端に少ないためにゲル添加時のピペッティングエラーが結果に大きく影響するなど、正確なデータを得にくく、制御のしくみを明らかにすることができません。今回は、こうした問題を回避できる内部標準を採用しました。

内部標準としては、NF-YまたはOct(3、5)のように、恒常的に発現する非制御タイプの転写因子を選択する必要があります。また、各転写因子の泳動時の移動度が近似していると、オーバーラップしてしまう可能性があるため、この実験では放射性標識と蛍光標識の転写因子結合オリゴヌクレオチド (以後オリゴとする) を組み合わせて使用しました。

従来、EMSAには放射性物質が使用されていましたが、Fluorescein標識オリゴを用いてバクテリア転写因子の結合性をFluorImagerシステムで分析したというFlickらの報告(4)から、蛍光標識二本鎖オリゴをEMSAに使用する可能性が示唆されま

した。今回の実験では、Fluoresceinと同等の輝度を示す赤色波長の蛍光色素Cy5を用いて、蛍光と放射性物質の検出が可能なマルチパイオイメージャーSTORM830/860によりEMSAを行いました。また、Typhoonバリアブルイメージアナライザーであれば、Cy5をより効率よく励起でき、かつStorage Phosphor Screenによる放射性同位体標識サンプルの検出も可能なので同様の実験が可能です。Typhoonにはマルチカラー解析への応用性もあります。

本報では、Cy5標識二本鎖オリゴを使用して細胞株とリンパ節の未精製核抽出物から複数の転写因子を検出できることを示し、蛍光標識オリゴと放射性標識オリゴを組み合わせることで、同一サンプルから2種類の転写因子を検出できることを実証しました。また、今回の例のように、*in vitro*および*in vivo*サンプルに蛍光標識オリゴを適用することで、内部標準を基準とした標準化データが得られます。放射性標識操作を省略できれば、より迅速かつ安全でコスト効果の高い操作EMSAプロトコルの確立も可能です。

実験プロトコル

EMSAオリゴの作製

NF-B	5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG-3' 3'-TCG ACT CCC CTG AAA GGG TCC-5'
Oct	5'-TGT CGA ATG CAA ATC ACT AGA-3' 3'-ACA GCT TAC GTT TAG TGA TCT-5'
NF-Y	5'-ATT TTT CTG ATT GGT TAA AAG T-3' 3'-TAA AAA GAC TAA CCA ATT TTC A-5'

標準的な方法(6)に従って、250 ngの二本鎖オリゴの5'末端を [^{-32}P] ATPで標識しました。取り込まれなかった [^{-32}P] ATPは精製し、除去しました。また、蛍光サンプルとして市販の5'末端Cy5標識一本鎖オリゴを使用し、下記に従って相補鎖とのアニーリングを行いました。

オリゴのアニーリング

等量の相補性オリゴ溶液 (300 μM) を混合し、ヒートブロックにて95、5分間加熱した後、電源を切って2~3時間放置し室温まで冷却しました。アニーリング後の二本鎖オリゴを水で3 μM に希釈してEMSAストック溶液とし、-20 で保存しました。

核抽出物の調製

細胞懸濁液からの核の抽出は、Schreiberら(7)のプロトコルを改変して行いました。A20細胞(マウスB細胞リンパ腫)、ANA-1(マウスマクロファージ細胞)を使用し、 $5 \sim 15 \times 10^6$ 細胞/サンプル程度の濃度に調製しました。

遠心操作(500×g、5分間)で沈殿した細胞を1.0 mlの氷冷PBSに懸濁し、遠心(10,000×g、30秒間、4 ; 以後の遠心操作も同条件)して、ペレットにしました。400 μlの氷冷したバッファー(10 mM HEPES pH7.9、10 mM KCl、0.1 mM EDTA、0.1 mM EGTA、1 mM DTT、0.5 mM PMSF、30 mM diisopropylfluorophosphate)に細胞ペレットを懸濁し、氷上に20分間放置しました。25 μlの10%(v/v)NP40溶液を加え、サンプルを4 で1分間激しく撹拌しました。遠心操作で沈殿させた核を、氷冷したバッファー(20 mM HEPES pH7.9、0.4 M NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 mM DTT、1 mM PMSF)を含む新しいチューブに沈殿したペレットを注意深く移し、4 で15分間激しく撹拌しました。10分間の遠心操作で核抽出物を清澄化し、転写因子を含む上清を分子量カットオフ値10 kDのフィルターで精製、脱塩操作を行い、最後に100 μl

のEMSAバッファー(25 mM HEPES pH7.9、25 mM KCl、0.05 mM EDTA、0.5 mM DTT、0.5 mM PMSF、5%(v/v)glycerol)で、核タンパク質を再懸濁しました。核から抽出されたタンパク質の濃度は2 mg/ml程度でした。

ゲルシフトアッセイ(EMSA)

核抽出物からそれぞれ一定量のタンパク質を分取し、実験に使用しました(実際の使用量については各図の説明をご参照ください)。核抽出物に0.02ユニット(約1 μg)の二本鎖poly(dI-dC)を加えて30分間室温で反応しました。次にEMSAストック溶液から1 μl(3 fmol)のEMSAオリゴを加え、さらに10分間の反応を行いました。サンプルにはローディングバッファー(90 mM EDTA、30%(v/v)Glycerol)を添加し、5%ポリアクリルアミドゲルと0.25×TBEバッファーを用いて電気泳動(200 V、2時間)しました。

ゲルのスキャンと乾燥

泳動後のゲルのスキャンにはSTORM860システムを使用しました。蛍光標識オリゴの検出には、PMT voltage 1,000 V、ピクセルサイズ 200 μmの設定で行いました。ウェットゲルをス

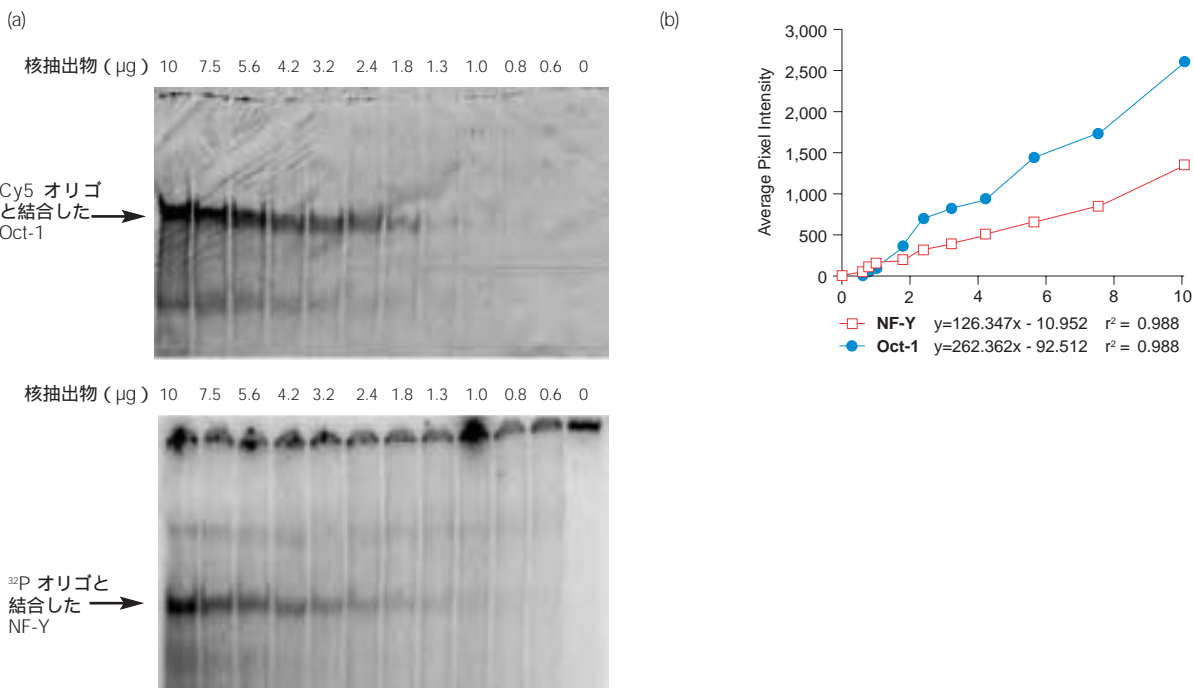


図1. Cy5標識および³²P末端標識オリゴを用いたOctおよびNF-Y転写因子の同時検出

- (a) A20細胞核抽出液にCy5標識Octオリゴおよび³²P標識NF-Yオリゴを同時に添加してEMSAを行いました。電気泳動後にウェットゲルを赤色蛍光モードでスキャンしてCy5を検出してから、乾燥したゲルをStorage Phosphor Screenに露光して³²Pシグナルを検出しました。
- (b) A20細胞EMSAアッセイでのOct-1とNF-Yのバンド強度定量を示します。全データポイントから0 μgサンプルのピクセル平均値を差し引き、A20細胞核抽出物のタンパク質濃度に対して補正後のデータをプロットしました。タンパク質濃度は、0 ~ 10 μgに調製されています。

キャンする場合には片方のガラス板を外し、低蛍光性のラップフィルムで覆いました。スキャン前にゲルを乾燥させる場合には、厚手のWhatmanろ紙を用いて80、40分間の吸引乾燥を行ってから、ガラス板を外さずに前述の設定条件で蛍光検出を行いました。その後、³²Pオリゴ検出のためにStorage Phosphor Screen露光を2時間から一晩行い、ピクセルサイズ200 μmでスキャンしました。

結果

Cy5標識および³²P末端標識オリゴを用いたOctおよびNF-Y転写因子の同時検出

Cy5標識Octオリゴの検出限界を測定し、同時に同一の抽出物から2種類の転写因子を検出する可否を検討するため、段階希釈したA20細胞核抽出物にEMSAオリゴとしてCy5標識Octオリゴと³²P標識NF-Yオリゴを反応させました。いずれのオリゴも特異的な転写因子と結合し、互いに競合しないため、Cy5および³²P標識オリゴを用いれば2種類の複合体を1枚のゲルで同時検出することが可能でした。

Cy5オリゴを用いたウェットゲルでは、1.3 μg以上の核抽出物からOct-1を検出できました(図1a)。また、ImageQuantを用いたOct-1シグナル強度とタンパク質量との直線性が実証されました(図1b)。次にNF-Yシグナル検出のため、ゲルを乾燥させてからStorage Phosphor Screenに露光しました。Oct-1と同様、NF-Yシグナル強度とタンパク質量の間には直線性が得られました(図1b)。蛍光標識オリゴと放射性標識オリゴをあわせて使用することで、OctやNF-Yなどの非制御タイプの転写因子のシグナル強度を用いて制御タイプの転写因子のシグナル強度を標準化できるようになり、タンパク質の比較定量が可能になります。

活性化p65:p50 NF-Yを用いた標準化

同一サンプルから検出される非制御タイプの転写因子を用いて制御タイプの転写因子を標準化できることを証明するために、ANA-1細胞を一本鎖オリゴ1668(10 μM)で刺激した後の経時変化を検出しました。一本鎖オリゴ1668は、p65:p50 NF-Y (以降p65:p50)を誘導することが知られています(8)。刺激した細胞を回収して核を抽出し、20 μgの各サンプルに³²P標識p65:p50オリゴとCy5標識NF-Yオリゴを添加しました。乾燥ゲルからCy5標識NF-Yを検出し、一晩露光したStorage Phosphor Screenから³²P標識p65:p50シグナルを検出しました。図2aから、一本鎖オリゴ1668添加から1時間後をピークにp65:p50のシグナ

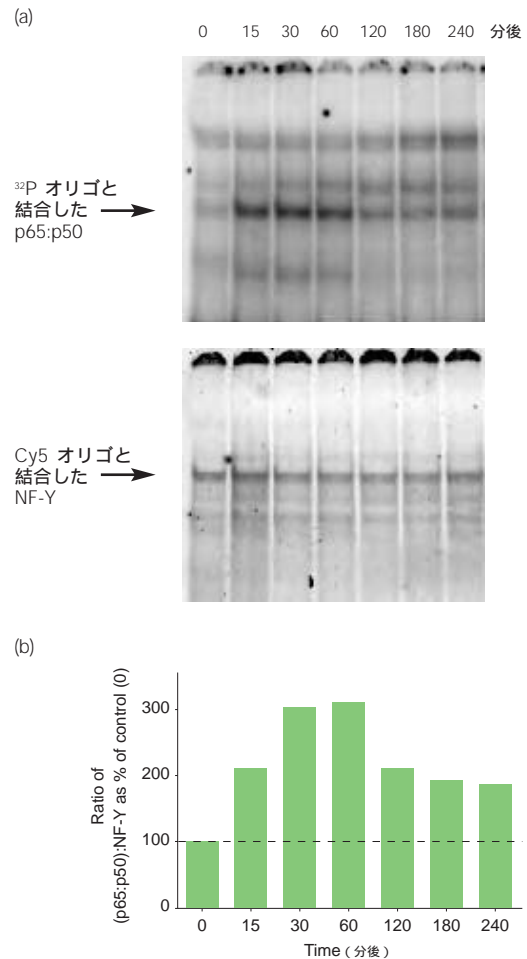


図2. 活性化p65:p50 NF-Yを用いた標準化

さまざまな間隔(0、15、30、60、120、180、240分後)で一本鎖オリゴ1668(10 μM)で刺激したANA-1細胞から核を抽出し、³²P標識NF-YオリゴおよびCy5標識NF-Yオリゴを添加しました。ゲルを乾燥させてCy5を検出し、Storage Phosphor Screenに一晩露光して³²Pを検出しました(a)。コントロール(0分)を100%とし、NF-Yシグナルによりp65:p50シグナルを標準化しました(b)。

Typhoonによる検出では、ゲルを乾燥させずに検出する手法を推奨しています。

ル強度が増加することがわかります。1時間後以降はp65:p50が減少していくのに対し、NF-Yは一定のシグナル強度を維持しています。p65:p50データを標準化するため、p65:p50とNF-Yのバンドのピクセル濃度平均値を算出し、p65:p50の平均値をNF-Yで割り、比率を求めました。コントロール(0分)を100%としたグラフを図2bに示しました。標準化後のデータにおいても、誘導から1時間後にp65:p50のレベルがピークに達することが確認されました。

考察

今回の結果から、Cy5標識二本鎖オリゴを用いて細胞から抽出した核の転写因子を検出できることが実証されました。ただし、よりレベルの低い転写因子を検出するアッセイでは、蛍光検出よりも優れた感度を示す放射性検出のEMSAが適しています。蛍光性EMSAアプリケーションは、十分な発現レベルを持つ転写因子の研究にある程度限定されるものの、放射性EMSAを併用してOctやNF-Yなどの転写因子を内部標準として利用できるため、活性制御を受ける転写因子の定量が可能となります。

参考文献

1. Wingender, E., *et al.* *Nucleic Acids Res* 28 (1), 316-319 (2000).
2. Fried, M. and D.M. Crothers. *Nucl. Acids Res.* 9, 6505 (1981).
3. Kang, S.M., A.C. Tran, M. Grilli, and M.J. Lenardo. *Science* 256, 1452-1456 (1992).
4. Flick, P., H. Xiao, and S. Pickett. *Vistra Application Note* #103 (1995).
5. Ivanov, V., T.J. Fleming, and T.R. Malek. *J Immunol* 153, 2394-406 (1994).
6. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. *Molecular Cloning A Laboratory Manual* 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
7. Schreiber, E., P. Matthias, M.M. Muller, and W. Schaffner. *Nucleic Acids Res* 17, 6419 (1989).
8. Sparwasser T., T. Miethke, G. Lipford, K. Borschert, H. Hacker, K. Heeg, and H. Wagner. *Nature* 386: 336-337 (1997).

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本社 〒169-0073
東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルディング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL : 03-5331-9336 FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com



ISO 9001:2000認証取得

Home Page <http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences>

掲載されている製品の名称、仕様、価格などは、予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。