

HaloCHIP™ System: Mapping Intracellular Protein:DNA Interactions using HaloTag® Technology



HaloCHIP™ System : HaloTag® テクノロジーによる細胞内タンパク質 : DNA相互作用のマッピング

By Danette D. Hartzell, Jacqui Méndez, Katharine Hoffman, Doug Storts, Marjeta Urh and Keith Wood, Promega Corporation

アブストラクト

HaloCHIP™ Systemは、抗体を使用することなく細胞内タンパク質 : DNA複合体を共有結合により捕捉する新規な方法です。標的とするDNA結合タンパク質をHaloTag® 融合タンパク質として細胞で発現させ、DNAとの間で架橋を形成させます。その後、高特異的な共有結合によりHaloTag® と相互作用するHaloLink™ Resinが融合タンパク質を捕捉します。HaloLink™ Resinでタンパク質 : DNA架橋複合体の間に完全な共有結合が形成されるため、レジンを強く洗浄することにより、非特異的なDNAおよびタンパク質を共免疫沈降法と比較して効果的に除去できます。架橋を切断すると、レジンから精製DNA断片が遊離します。タンパク質 : DNA複合体を単離する際の特異性向上およびバックグラウンド干渉の低減にともなうシグナル/ノイズ比の増加により、この新しい方法はゲノム内のタンパク質結合に生じたわずかな変化を検出することができます。

イントロダクション

クロマチン構造および遺伝子発現の調節は、正常な成長や細胞増殖にとって不可欠です。転写イベントは、特異的なタンパク質 : DNA相互作用により、空間的にも時間的にも厳密に制御されています。現在、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法とDNAマイクロアレイまたはウルトラハイスループット塩基配列解析を組み合わせることで、ゲノム全域でクロマチンのタンパク質結合部位を特定し、トランスクリプトームの特性を検討しようとする取り組みが急速に進んでいます(1,2)。DNAマイクロアレイおよび塩基配列決定の分野が著しく進歩し、新たなテクノロジーが開発されたことにより、タンパク質結合部位をゲノムレベルで検討できるようになりましたが、それより上流のChIP(3,4) プロセスによるDNA断片の捕捉は、依然として煩雑で長時間を要します。ChIP法の目下の問題は、架橋されたエピトープを認識することが証明されている高特異的な抗体の数が少ないこと、共免疫沈降ステップにおける捕捉の効率および特異性が不十分であること、時間を要する多段階の手順を必要とすることなどです。HaloCHIP™ Systemは、これらの諸問題に対処するために設計されたもので、標準的なChIP法に代わる頑健かつ効率的な方法を提供します。

HaloCHIP™ System

HaloCHIP™ Systemでは、HaloTag® というタンパク質タグを使用します。HaloTag® 作用部位は、あらゆるタンパク質と融合させることができ、互換性のある各種リガンドと標的タンパク質との共有結合による相互作用を媒介します。HaloTag® テクノロジー向けに数種類の蛍光リガンドおよび固相リガンドが設計されているので、HaloTag® 融合タンパク質の特性をin vivo、in vitroの両方で検討することができます(5,6)。HaloCHIP™ Systemでは、HaloTag® を融合させたDNA結合タンパク質を一過性または安定的に細胞内で発現させることができます。図1にHaloCHIP™ Systemの概略図を示します。ChIPプロトコル(3)と同様、細胞をホルムアルデヒド処理することにより、タンパク質とDNAの間に共有結合による架橋を形成させた後、細胞を溶解し、超音波処理によりクロマチンを500 ~ 1500 bpに断片化します。その後、HaloCHIP™ System特有の手順として、細胞溶解液中の架橋複合体を共有結合によりHaloLink™ Resin上に直接捕捉した後、強く洗浄し、非特異的なタン

パク質およびDNAを除去します。熱処理によりホルムアルデヒド架橋を切断すると、捕捉されたDNA断片がHaloLink™ Resinから遊離します。DNAはPCR精製キットで精製し、任意の方法で解析することができます。HaloCHIP™ 実験の対照としては、HaloLink™ Resinによる複合体捕捉前の細胞溶解液を対照サンプルとして分取し、HaloCHIP™ Blocking Ligandとインキュベーションしたものを用います。Blocking LigandをHaloTag® タンパク質と結合させると、HaloTag® タンパク質とHaloLink™ の相互作用が阻害されます。この対照を使用することにより、バックグラウンドのDNA結合を最も正確に推定することができます。

HaloCHIP™ SystemにHaloTag® タンパク質を使用する利点

HaloTag® タンパク質およびHaloCHIP™ Systemを用いる利点は、1) 共有結合によりHaloLink™ Resinへ迅速に捕捉できることと、2) 0.75 ~ 1%ホルムアルデヒド処理、細胞溶解処理や弱い超音波処理後も結合活性が保持されることにあります。HaloTag® タンパク質とリガンドの速い結合速度すなわち結合効率は、ビオチン-ストレプトアビジン間の相互作用と同等であり、2 ~ 3時間というわずかな時間に75%以上のHaloTag® タンパク質 : DNA架橋複合体がHaloLink™ Resinに結合します(図2)。この所要時間は、ChIP法の共免疫沈降に要する時間よりはるかに短いものです(4)。

HaloTag® タンパク質とHaloLink™ Resinとの強力な共有結合により、細胞溶解液などの複雑な混合液中のタンパク質 : DNA複合体、あるいは少量の細胞 (2 ~ 4 × 10⁵ 個) から調製された低濃度のタンパク質 : DNA複合体を効率的に捕捉することができます。捕捉後、HaloLink™ ResinとHaloTag® 融合タンパク質 : DNA架橋複合体の間に共有結合が形成されるため、強い洗浄を長時間行うことにより、HaloLink™ Resinに結合した非特異的なタンパク質およびDNAを除去することができます。共有結合の形成は、洗浄ステップ中の解離によるタンパク質 : DNA複合体の損失という問題の解決にもなります。共有結合以外の相互作用により捕捉されている場合には、このような洗浄ステップを実行することはできません。また、HaloCHIP™ Systemを使用した場合、高濃度の界面活性剤や塩を含むバッファーで洗浄しても、サンプルの損失をまねくことはありません。水やTEを使用することもできます。

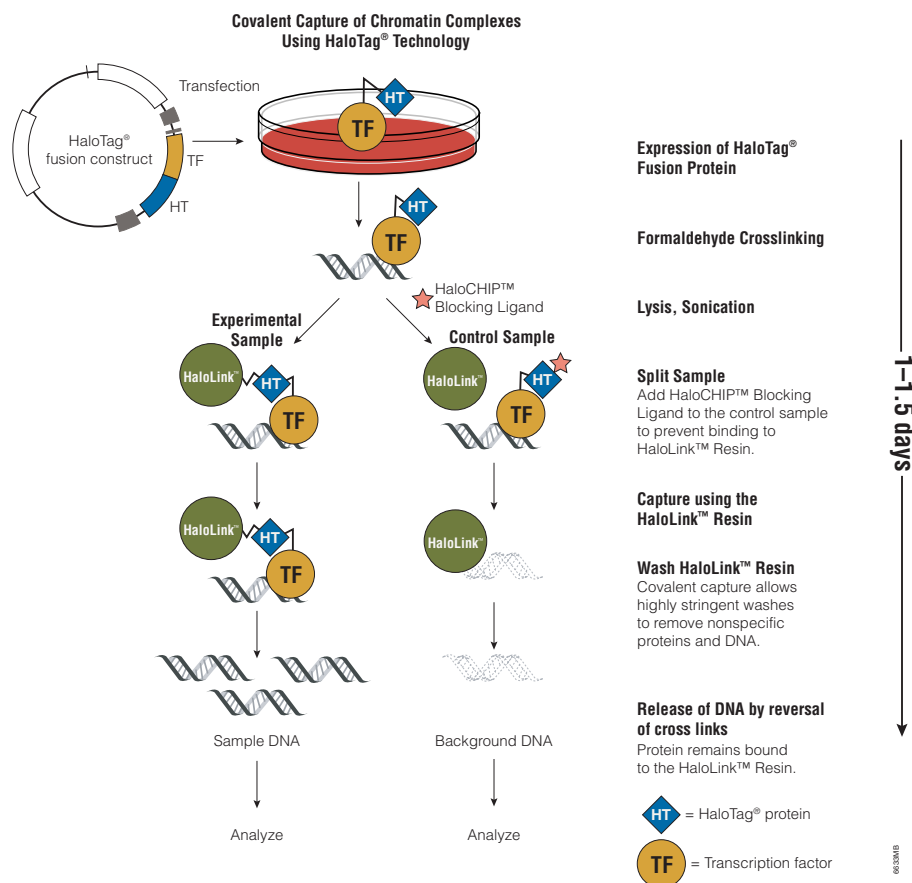


図1 . HaloCHIP™ Systemの概略図

各種転写因子に関する HaloCHIP™ 実験

HaloCHIP™ Systemの特異性および機能を実証するため、p65/NFκBをモデル系として用いることにしました(7)。p65タンパク質の特性は従来のChIPを用いてすでに検討されており、IκB、IL-6、IL-8遺伝子などのプロモーター領域に結合することが確認されています(8,9)。実験のため、完全長ヒトp65タンパク質をpFC8A (HaloTag®) CMV Flexi® Vectorにクローニングし、HeLa細胞でC末端p65-HaloTag® 融合タンパク質として一過性に発現させました。その結果、p65 特異的プロモーターに対する特異的かつ十分な結合 (対照との比較) が、エンドポイントPCRおよびPlexor® qPCR System(10) によるDNA解析により示されました(図3)。バックグラウンドシグナル(図3、パネルA)は、HaloLink™ Resinへの捕捉前に HaloCHIP™ Blocking Ligandとともにインキュベーションした対照サンプルから得られたシグナルです。定量Plexor® データは、対照サンプルのバックグラウンドシグナルに対するサンプルシグナルの比率としてプロットしたものです。HaloCHIP™ Systemは、p53-HaloTag® およびCREB-HaloTag® 融合タンパク質の予想される各プロモーター (p21/WafおよびhCG) に対する結合の検討にも使用されています(11,12)。いずれの系においても、特異的プロモーターが捕捉され、標準的なエンドポイントPCRにより増幅されることが示されました(図4)。これらの実験では、CREBにはJEG-3細胞、p53にはU2OS細胞と異なる細胞を使用したことから、HaloCHIP™ Systemの汎用性を実証されました。

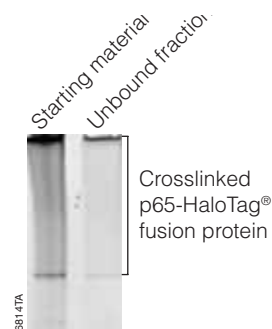


図2 . p65-HaloTag® 融合タンパク質：DNA架橋複合体のHaloLink™ Resinへの捕捉

HeLa細胞 (2×10^6 個) にp65-HaloTag® コンストラクトをトランスフェクションし、0.75%ホルムアルデヒド処理によりDNAとの架橋を形成後、細胞を溶解し、超音波処理した。この出発材料からサンプルを分取後、HaloLink™ Resinとともに室温で2時間インキュベーションした。インキュベーション後、上清 (p65-HaloTag® : DNA架橋複合体のレジン非結合分画) を回収した。出発材料、非結合分画とも蛍光HaloCHIP™ Blocking Ligandで標識し、SDS-PAGEに供した。その後、Typhoon® スキャナーを用いた視覚化により、蛍光を検出した。出発材料であるp65-HaloTag® : DNA架橋複合体の75%以上がHaloLink™ Resinに捕捉された。架橋複合体にはさまざまなサイズが存在するため、両レーンのp65-HaloTag® : DNA架橋複合体ともスミア状に泳動された。

これらの例は、分離したDNA断片の解析に標準的PCR法が使用できることを示しています。また、1回のHaloCHIP™ 実験で回収されるDNA収量が通常10 ngを上回ることから、HaloCHIP™ Systemを用いれば、マイクロアレイ解析、塩基配列決定といった他の下流のアプリケーションを実行することができます。

まとめ

HaloCHIP™ Systemは、細胞内タンパク質 : DNA架橋複合体の新たな捕捉アプローチであり、その後の解析にすぐに使用できるDNA断片を得ることができます。HaloTag® タンパク質を使用する大きな利点は、共有結合が形成されること、捕捉が速やかであること、弱いホルムアルデヒド処理や超音波処理後も活性が保持されることなどです。このため、転写因子特異的な抗体が不要であるほか、捕捉した複合体を長時間洗浄することができます。そのため、HaloCHIP™ Systemを使用することにより、最終的にバックグラウンドが低減され、シグナル/ノイズ比が上昇します。また、HaloCHIP™ Systemは、標準的なChIPより所要時間を2~3日節約することもでき、多様な細胞株を用いた各種DNA結合タンパク質の検討に使用できることが実証されています。HaloCHIP™ Systemは、イメージング(5)、タンパク質 : タンパク質ブルダウン法(6) といった他のあらゆるHaloTag® のアプリケーションを補完しますので、1種類のHaloTag® 融合タンパク質コンストラクトを用いて、DNA結合タンパク質の全ライフサイクルを検討することができます。

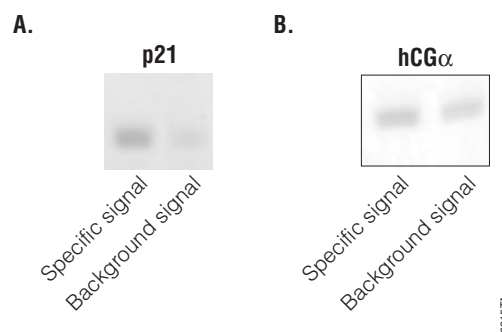


図4 . HaloCHIP™ によるp53およびCREB特異的のプロモーターの捕捉

U2OS細胞にp53-HaloTag® コンストラクトをトランスフェクションし (パネルA)、JEG-3細胞にCREB-HaloTag® コンストラクトをトランスフェクションした (パネルB)。細胞をHaloCHIP™ System Technical Manual, #TM075に記載されているHaloCHIP™ Systemのプロトコルを用いて処理した。パネルA . p53特異的なp21/WafプロモーターのPCR増幅産物が、エチジウムブロマイド染色した2%ゲル上に認められる。パネルB . CREB特異的なhCGプロモーターのPCR増幅産物が、エチジウムブロマイド染色した2%ゲル上に認められる。PCR産物より得られた特異的シグナルおよび対照サンプルからのシグナルを示す。

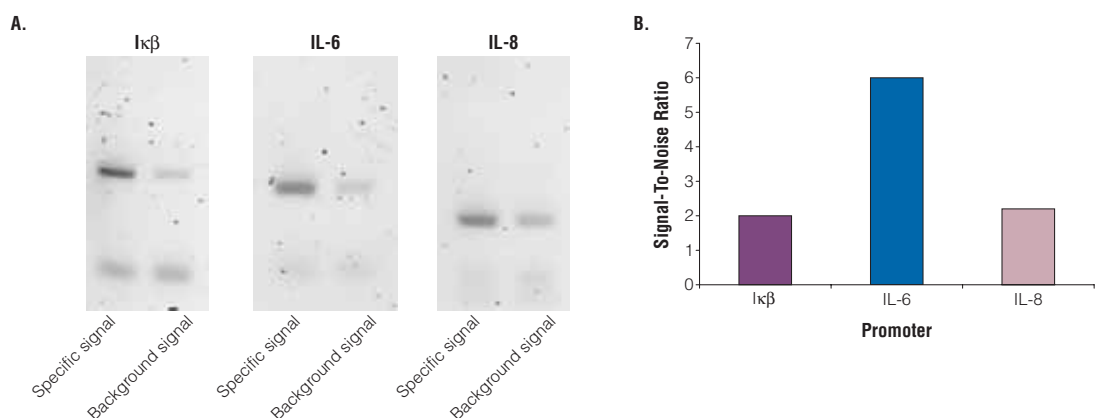


図3 . p65-HaloTag® タンパク質により得られたHaloCHIP™ データの標準的PCRおよび定量PCRによる解析

HeLa細胞 (4×10^5 個) にp65-HaloTag® コンストラクトをトランスフェクションし、ホルムアルデヒド処理によりDNAとの架橋を形成後、HaloCHIP™ System Technical Manual, #TM075に記載されているHaloCHIP™ のプロトコルを用いて処理した。HaloCHIP™ 法により得られたDNA断片をさらに精製し、p65特異的のプロモーター (IkB、IL-6、IL-8など) を増幅後、標準的PCR (33サイクル) またはPlexor® Systemを用いた定量PCRにより解析した。パネルA . PCR産物からの特異的シグナルおよびバックグラウンド/対照シグナルが、エチジウムブロマイド染色した2%アガロースゲル上に認められる。パネルB . 定量Plexor® PCR解析後、各プロモーターのシグナル/ノイズ比を求め、グラフにプロットした。

参考文献

1. Ren, B. *et al.* (2000) *Science* **290**, 2306–9.
2. Johnson, D.S. *et al.* (2007) *Science* **316**, 1497–502.
3. Solomon M.J., Larsen, P.L. and Varshavsky A. (1988) *Cell* **53**, 937–47.
4. Wells, J. and Farnham, P.J. (2002) *Methods* **26**, 48–56.
5. Los, G.V. *et al.* (2005) *Promega Notes* **89**, 2–6.
6. Urh, M. *et al.* (2006) *Promega Notes* **92**, 24–9.
7. Locksley R.M., Killeen N. and Lenardo, M.J. (2001) *Cell* **104**, 487–501.
8. Martone, R. *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12247–52.
9. Nowak, D.E., Tian, B. and Braiser, A. (2005) *BioTechniques* **39**, 715–25.
10. Frackman, S. *et al.* (2006) *Promega Notes* **92**, 10–3.
11. Kaeser, M.D. and Iggo R.D. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 95–100.
12. Jameson, J.L. *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 9879–86.

プロトコル

- ◆ HaloCHIP™ System Technical Manual, #TM075, Promega Corporation
www.promega.com/tbs/tm075/tm075.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
HaloCHIP™ System	20 reactions	G9410	85,000
HaloLink™ Resin	2 ml	G1911	27,000
	5 ml	G1912	58,000
HaloLink™ Magnetic Beads	1 ml	G9311	16,000
HaloTag® pHT2 Vector	20 µg	G8241	48,000
pFC8A (HaloTag®) CMV Flexi® Vector	20 µg	C3631	48,000
pFC8K (HaloTag®) CMV Flexi® Vector	20 µg	C3641	48,000
HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand	30 µl	G1001	75,000
HaloTag® Oregon Green® Ligand	30 µl	G2801	75,000
HaloTag® TMR Ligand	30 µl	G8251	75,000
HaloTag® diAcFAM Ligand	30 µl	G8272	75,000
HaloTag® Coumarin Ligand	30 µl	G8581	75,000
HaloTag® Biotin Ligand	30 µl	G8281	75,000
HaloTag® PEG-Biotin Ligand	30 µl	G8591	75,000
HaloTag® Amine (04) Ligand	5 mg	P6741	95,000
HaloTag® Succinimidyl Ester (04) Ligand	5 mg	P6751	95,000
HaloTag® Thiol (04) Ligand	5 mg	P6761	95,000
HaloTag® Iodoacetamide (04) Ligand	5 mg	P6771	95,000
HaloTag® Succinimidyl Ester (02) Ligand	5 mg	P1691	95,000
HaloTag® Amine (02) Ligand	5 mg	P6711	95,000
HaloTag® Iodoacetamide (02) Ligand	5 mg	P1681	95,000