



## 精製 DNA 結合蛋白質を利用した遺伝子座特異的 ChIP 法の開発

大阪大学 微生物病研究所 感染症学免疫学融合プログラム推進室 ゲノム生化学研究グループ  
藤井 穂高 准教授 藤田 敏次 助教

### 【お客様からのコメント】

精製DNA結合蛋白質を利用した遺伝子座特異的ChIP法の開発を目指し、3xFLAGタグ付きLexA蛋白質の大腸菌での発現・精製を試みましたが、発現がみられませんでした。そこでProCubeのカイコ発現系を利用したところ、発現・精製ともに良好な結果が得られ、本方法論を開発することができました。

ゲノム機能の分子機構の解明には、細胞内において解析対象とするゲノム領域に結合している分子を網羅的に同定することが理想的です。大阪大学微生物病研究所・藤井准教授の研究室では、細胞から解析対象とするゲノム領域を遺伝子座特異的に単離し、当該ゲノム領域に結合している分子を網羅的に同定する方法として、遺伝子座特異的ChIP法(iChIP法・enChIP法)を開発しました。

iChIP法は、解析対象とするゲノム領域に細菌LexA蛋白質が結合する塩基配列を挿入し、3xFLAGタグ付きLexA蛋白質(3xFNLDD)を発現させた後、免疫沈降を行うことで、解析対象ゲノム領域を単離・解析する方法です。今回、細胞内での3xFNLDDの発現を必要としないiChIP法を開発しました(図1)。まず、ProCubeを利用してDockタグ付き3xFNLDD(r3xFNLDD-D)を精製蛋白質として用意しました(図2A)。次に、Pax5遺伝子プロモーター領域にLexA結合塩基配列を挿入したニワトリDT40細胞からクロマチンを調製し、r3xFNLDD-Dを利用したアフィニティー精製を行うことで、Pax5遺伝子プロモーター領域を高効率で単離することに成功しました(図2B)。転写途中のPax5 mRNAも一緒に単離・検出できたことから、ゲノム上に存在する分子の結合を維持したまま、解析対象ゲノム領域を単離・解析できることも判明しました(図3)。今後、本方法論によって、ゲノム機能解析がより迅速に進むことが期待されます。

参考文献 Hoshino and Fujii (2009) J Biosci Bioeng, 108(5):446-9  
Fujita and Fujii (2013) Biochem Biophys Res Commun, 439(1):132-6  
Fujita et al., (2013) Sci Rep, 3:3171  
Fujita and Fujii (2014) BMC Mol Biol, 15(1):26

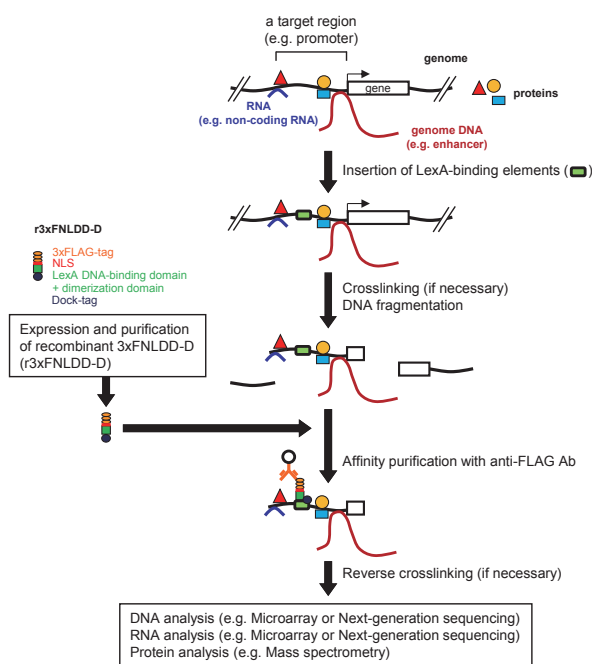


図1 r3xFNLDD-Dを利用したiChIP法による特定ゲノム領域の単離および解析

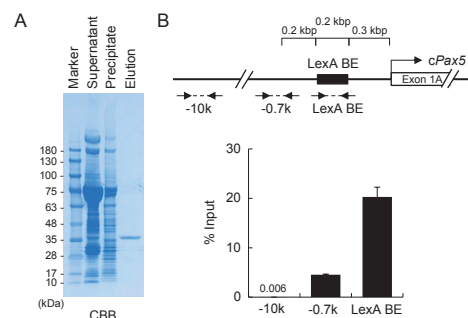


図2 r3xFNLDD-Dの精製およびそれを利用したPax5遺伝子プロモーター領域の単離

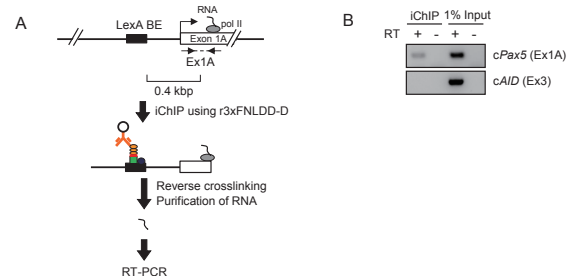


図3 本方法論によるPax5 mRNAの単離および検出

本事例で掲載している図表は藤田助教よりご提供いただいております。