

## II. ヒストン修飾解析

ヒストン修飾の解析には、クロマチン免疫沈降（ChIP）法が用いられます。解析目的の修飾ヒストン抗体で ChIP を行い、濃縮物をリアルタイム PCR やマイクロアレイで解析します。

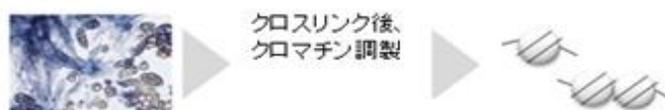
### A. クロマチン免疫沈降（ChIP）

- ◆ヒストン修飾の解析に
- ◆ChIP には高品質の修飾ヒストン抗体を

#### 【1】原理

試料からクロマチンを調製し、超音波または Micrococcal Nuclease で断片化後、各種抗体を用いて免疫沈降を行います。濃縮した産物は、リアルタイム PCR やマイクロアレイにより解析します。

#### 【Step1】クロマチンの調製&断片化

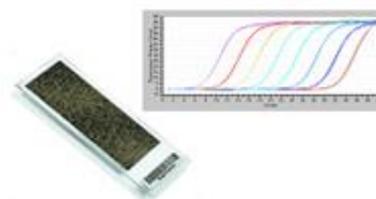


#### 【Step2】クロマチン免疫沈降



#### 【Step3】濃縮産物の解析

リアルタイムPCR  
・EpiScope® Promoter qPCR Array  
・TB Green™ Premix Ex Taq™ GC  
マイクロアレイ/高速シーケンス  
・受託サービス



#### ・各種修飾ヒストン抗体

現在、クロマチン免疫沈降(ChIP: chromatin immunoprecipitation)法を用いた、修飾ヒストンのゲノム上局在解析は、エピジェネティクス研究をすすめる上で必要不可欠な解析手法となっています。ただし、これまで広く利用されてきたポリクローナル抗体を用いたクロマチン免疫沈降では、市販ポリクローナル抗体のロット差に起因し、再現性の良い結果が得られにくいなどの問題点が指摘されてきました。こうした理由から、修飾ヒストンの ChIP 解析には、特異性の高い高品質なモノクローナル抗体の利用が極めて重要です。タカラバイオでは、ChIP 解析に利用可能な\*株式会社モノクローナル抗体研究所製の高品質な抗修飾ヒストンモノクローナル抗体を各種取り扱っています。これら高い特異性を持つモノクローナル抗体を、ChIP 解析など修飾ヒストンの解析に是非ご利用ください。

\* *Cell Struct Funct.* 2008; **33** (1): 61-73.

## • [EpiScope® ChIP Kit \(anti-mouse IgG\)](#)

本製品を用いると、細胞のクロスリンクから DNA 溶出までを最短 1 日で行うことができ、磁気ビーズを使用するため操作が簡単でバックグラウンドも低く抑えられます。また、回収された DNA は精製操作を行わずにリアルタイム PCR 解析に使用可能で、DNA 精製を行う場合は高速シーケンスやマイクロアレイ等の解析にも使用できます。

### 【2】プロトコール

ここでは、EpiScope® ChIP Kit /anti-mouse IgG を用いた実験の流れをご紹介します。操作方法の詳細は、製品説明書をご参照ください。

#### 1 クロマチンの調製

- 1.1 ~ $5 \times 10^6$  個の細胞を終濃度 1% のホルムアルデヒドでクロスリンクする。
- 1.2 **Quenching Solution** を添加し、クロスリンク反応を止める。
- 1.3 遠心して細胞を回収し **Cytoplasmic Lysis Buffer** により細胞を溶解する。
- 1.4 遠心して細胞を回収し **SDS Lysis Buffer** により核を溶解する。
- 1.5 超音波破碎により、クロマチンを 200~800 bp 程度に断片化する。
- 1.6 遠心して不溶性残渣を除き、**Dilution Buffer** で希釈し、分注する。  
(1/10 量を Input 画分として 4°C 保存する。)

#### 2 免疫沈降

- 2.1 クロマチン溶液に抗体と洗浄済みの磁気ビーズ (**Magnosphere™ anti-mouse IgG**) を添加し、4°C で 4 時間以上、ローテーターで攪拌する。
- 2.2 ビーズを洗浄する。

#### 3 DNA の抽出と精製 (Input 画分も同様に処理する)

- 3.1 95°C で 15 分間インキュベートし脱クロスリンクする。
- 3.2 **Proteinase K** 処理と **RNase A** 処理を行う。
- 3.3 後の解析に適した方法で DNA の回収および精製を行う。

#### 4 リアルタイム PCR

Input 画分をコントロールとして、リアルタイム PCR によりターゲット領域の定量を行う (「リアルタイム PCR」の項を参照)。

### 【3】実験例

$6.0 \times 10^6$  個の HeLa 細胞からクロマチンを調製し、修飾ヒストン抗体 **Anti-monomethyl Histone H3(Lys4)**, mouse monoclonal antibody (製品コード MA302A/B)、**Anti-dimethyl Histone H3 (Lys4)**, mouse monoclonal antibody (製品コード MA303A/B)、**Anti-dimethyl Histone H3 (Lys9)**, mouse monoclonal antibody (製品コード MA307A/B) を各  $0.5 \mu\text{g}$ 、ネガティブコントロールとして **Anti-ProS2**, monoclonal (製品コード M200) を  $2 \mu\text{g}$  使用して免疫沈降 (4 時間反応) を行った。ビーズ洗浄後、Chelex resin による DNA 溶出をおこなった。Input クロマチンおよび各抗体による免疫沈降物について、ター

ゲット領域の存在量をリアルタイム PCR で定量し、Input に対するパーセントを求めた。リアルタイム PCR には、ChIP qPCR Primer (GAPDH promoter)、ChIP qPCR Primer (beta-globin promoter) および TB Green™ *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time) (製品コード RR071A/B) を用いた。

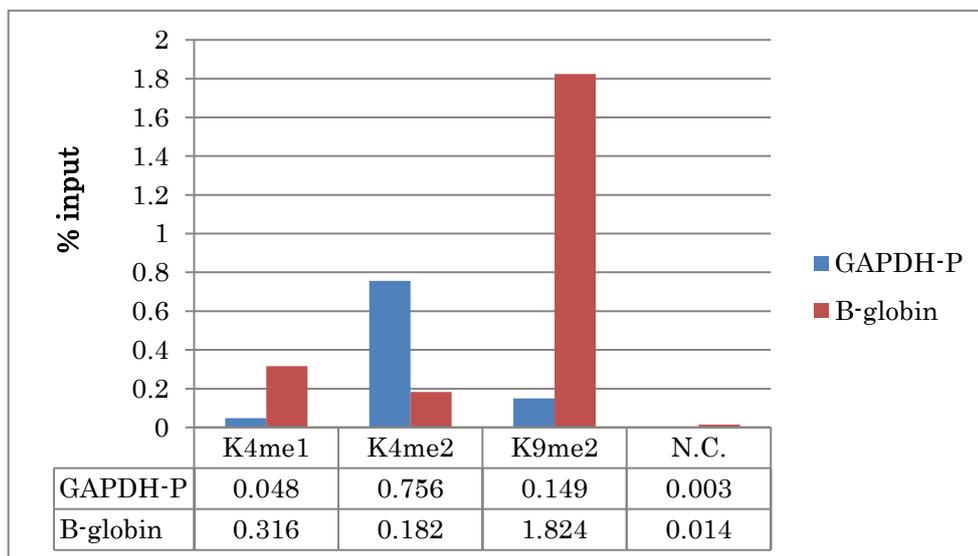


図 1. クロマチン免疫沈降の解析結果

各領域の解析結果を Input% で示した。抗ジメチル化ヒストン H3(Lys9)抗体では、転写抑制されているβグロビンの回収率が高く、抗ジメチル化ヒストン H3 (Lys4)抗体では、転写活性化されている GAPDH の回収率が高くなった。

#### 【4】製品リスト

[EpiScope® ChIP Kit \(anti-mouse IgG\) \(製品コード 5331\)](#)

[Anti-Histone H3, mouse monoclonal antibody \(製品コード MA301A/B\)](#)

[Anti-monomethyl Histone H3 \(Lys4\), mouse monoclonal antibody \(製品コード MA302A/B\)](#)

[Anti-dimethyl Histone H3 \(Lys4\), mouse monoclonal antibody \(製品コード MA303A/B\)](#)

[Anti-trimethyl Histone H3 \(Lys4\), mouse monoclonal antibody \(製品コード MA304A/B\)](#)

[Anti-acetyl Histone H3 \(Lys9\), mouse monoclonal antibody \(製品コード MA305A/B\)](#)

[Anti-monomethyl Histone H3 \(Lys9\), mouse monoclonal antibody \(製品コード MA306A/B\)](#)

[Anti-dimethyl Histone H3 \(Lys9\), mouse monoclonal antibody \(製品コード MA307A/B\)](#)

[Anti-trimethyl Histone H3 \(Lys9\), mouse monoclonal antibody \(製品コード MA308A/B\)](#)

[Anti-acetyl Histone H3 \(Lys27\), mouse monoclonal antibody \(製品コード MA309A/B\)](#)

[Anti-acetyl Histone H3 \(Lys9/27\), mouse monoclonal antibody \(製品コード MA310A/B\)](#)

[Anti-phospho Histone H3 \(Ser10\), mouse monoclonal antibody \(製品コード MA312A/B\)](#)

[TB Green™ \*Premix Ex Taq\*™ GC \(Perfect Real Time\) \(製品コード RR071A/B\)](#)

[Micrococcal Nuclease \(製品コード 2910A\)](#)

## a. リアルタイム PCR

- ◆メチル化 DNA 濃縮や ChIP 後の特定領域の解析に
- ◆GC 含量の高い配列には専用のリアルタイム PCR 試薬を
- ◆癌関連遺伝子の解析は EpiScope® Promoter qPCR Array (Human)で

### 【1】原理

[EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit](#) やクロマチン免疫沈降で目的の DNA 画分を濃縮した後、特定の遺伝子領域の定量をするにはリアルタイム PCR が用いられます。解析結果は、濃縮前 (Input) の量に対する濃縮後のパーセンテージ、または非結合画分と結合画分の割合等で表わされます。

#### ・GC リッチターゲットに適したリアルタイム PCR 試薬

エピジェネティクスの解析では、多くの場合、転写開始点上流域が対象となりますが、この領域には CpG アイランドが存在し、配列の GC 含量が非常に高いことがあります。そのような配列には、GC 含量 60~70%でも精度の高い定量が可能な [TB Green™ Premix Ex Taq™ GC \(Perfect Real Time\)](#)がお勧めです。また、GC 含量が 70%を超える場合には、[MightyAmp™ for Real Time \(TB Green™ Plus\)](#)をお試してください。

#### ・EpiScope® Promoter qPCR Array (Human)

EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit やクロマチン免疫沈降法によりゲノム DNA の目的領域を濃縮した後、DNA メチル化による影響が報告されている遺伝子のゲノム DNA 領域をリアルタイム PCR で定量するためのプライマーセットです。プライマーは、25 種類の遺伝子 (スプライスバリエーションを含む 30 種) をターゲットとし、転写開始点上流付近に設計されています。また、コントロールとして、リピート配列である LINE-1 および DNA メチル化のネガティブコントロールとなる GAPDH 検出用のプライマーも搭載されています。各プライマーセットは、TB Green™ Premix Ex Taq™ GC (Perfect Real Time) で良好に反応することを確認しています。

### 【2】プロトコール

(操作方法の詳細は、各製品の説明書をご参照ください。)

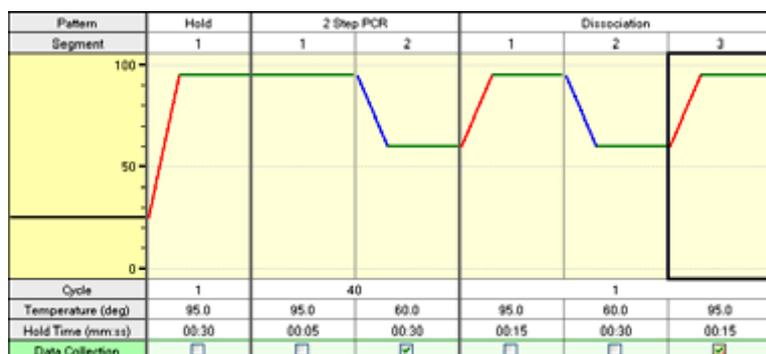
(1) 以下の反応液を調製する

試薬	使用量	最終濃度
TB Green™ Premix Ex Taq™ GC (2×)	12.5 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM *1
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM *1
Template DNA	2.0 μl	*2
滅菌精製水	9.5 μl	*2
Total	25.0 μl	

\*1 最終 primer 濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題がある時は 0.1~1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

\*2 DNA 濃度によって適宜調整可能。濃縮前のゲノム DNA 相当量で、20~100 ng 程度を用いると良い。

(2) 以下のプログラムでリアルタイム PCR を行う



Hold (初期変性)  
 Cycle : 1  
 95°C 30 秒  
 2 Step PCR  
 Cycle : 40  
 95°C 5 秒  
 60°C 30 秒  
 Dissociation

### 【3】 実験例

HeLa S3 細胞、A549 細胞から抽出したゲノム DNA を断片化し、各 1.5 μg を EpiXplore™による DNA メチル化領域の濃縮に用い、最終的にそれぞれ 45 μl の非結合画分 (FT) および結合画分 (EL) の濃縮物を得た。1 反応あたり 1 μl の濃縮物を鋳型として使用し、EpiScope® Promoter qPCR Array (Human) と TB Green™ Premix Ex Taq™ GC (Perfect Real Time)を用いてリアルタイム PCR を行った。

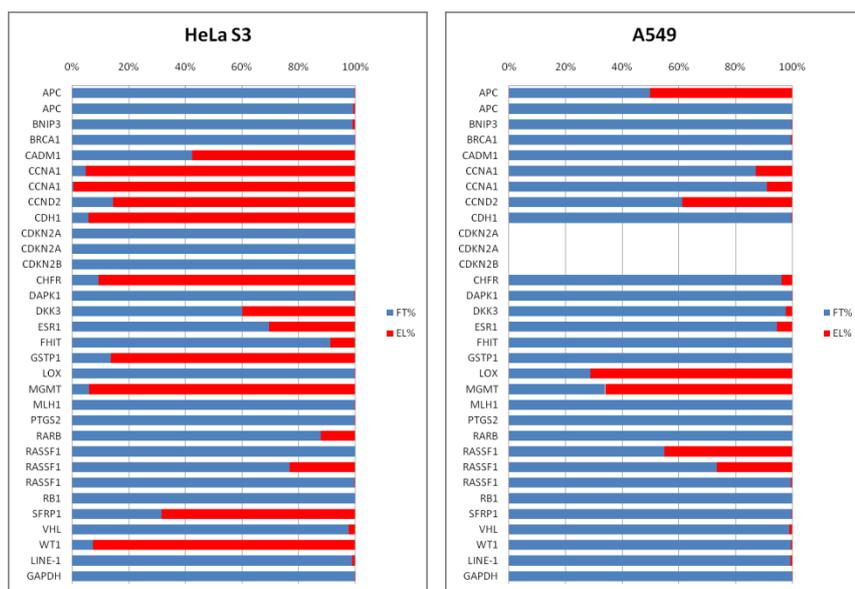


図 2. EpiScope® Promoter qPCR Array (Human)での解析結果

EpiXplore™の非結合画分および結合画分の DNA をリアルタイム PCR で解析し、各画分の定量値をパーセンテージで表した (青 : 非結合画分、赤 : 結合画分)。いくつかの遺伝子において、細胞の種類により濃縮度合いが大きく異なることが確認され、これらの遺伝子の転写開始点上流付近の DNA メチル化状態に違いがあることが示唆された。なお、A549 の CDKN2A と CDKN2B は、非結合画分、結合画分ともに検出されなかった。

### 【4】 製品リスト

[NucleoSpin® Tissue \(製品コード 740952.10/.50/.250\)](#)

[EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit \(製品コード 631963、631962\)](#)

[TB Green™ Premix Ex Taq™ GC \(Perfect Real Time\) \(製品コード RR071A/B\)](#)

[MightyAmp™ for Real Time \(TB Green™ Plus\) \(製品コード R075A/B\)](#)

[EpiScope® Promoter qPCR Array \(Human\) \(製品コード 5301\)](#)

## b. マイクロアレイ解析

- ◆ChIP サンプルの網羅的解析に
- ◆解析受託サービスをご利用ください

### 【受託サービスのご案内】

CpG Island Microarray を用いるマイクロアレイ解析を承っております。  
お気軽にお問い合わせください。

▶<http://catalog.takara-bio.co.jp/jutaku/>

▶[お問い合わせフォームはこちら](#)

## c. 高速シーケンス解析 (ChIP-seq)

- ◆ChIP サンプルの網羅的解析に
- ◆解析受託サービスをご利用ください

### 【受託サービスのご案内】

ChIP サンプルをご提供ください。GAIIX を用いて網羅的にシーケンスを行います。取得した配列は参照ゲノムにマッピングし、リードの集中する箇所をエンリッチ領域として検出、アノテーション情報を付与してリスト化します。コントロールサンプルの解析を加えることで、ターゲット特異的な領域を検出することも可能です。さらに、マッピングの様子は UCSC ゲノムブラウザにて閲覧可能な形式で納品いたします。

転写調節因子、ヒストン修飾やクロマチン構造の解明など様々な目的に応用いただけます。

詳しくは「[クロマチン免疫沈降サンプルの解析 \(ChIP-seq\)](#)」をご覧ください。