非RIを利用したEMSAの有効性

上野和美，松川　茂　（福井医科大学　実験実習機器センター）

Kazumi Ueno,Shigeru Matsukawa

Non RI EMSA detection ofER•ERE complex formation using fluoresence labeled Response Element DNA

EMSA (electrophoretic mobility shift assay) is an indispensable tool for investigating the binding ability or fashion of receptor proteins belonging to nuclear superfamily to their corresponding response element DNA sequences. As this assay, which generally employs radio-labeled DNA as a probe for response element, can not be allowed to be performed in the conventional labs, we developed the EMSA method using the fluorescence labeled probe DNA, for which such experiment can be performed without taking any special cares such as disintegration(short life) and contamination of radio-isotope, or irradiation of beta-ray during handling of labeled DNA probe. We also examined the effect of methylation of cytosine residues existing in the probe DNA on estrogen receptor binding to (by EMSA), thermal stability of (by measurement of Tm) and conformation (by comparison of CD spectra) of the target DNA sequence.

はじめに

細胞の分化，成長，活性化は，特異的な遺伝子発現によって正確に制御されており，転写レベルの遺伝子発現の調節は，特に重要な役割を担っていると考えられている。様々な内因性又は外因性シグナルの刺激に応答して遺伝子が発現されるが，応答性遺伝子の上流には様々な形をした応答DNA配列，即ちResponse Elementが存在する。転写因子の多くは，DNAのこのようなResponse Elementに異なった様式で結合することが次第に明らかになってきた。この相互作用の様式や転写因子相互の複雑な関係を解析する方法の１つとしてゲルシフトアッセイが有力な手段となっている。

女性ホルモンEstrogen receptor（ER）とその応答配列との結合をモデル系として，ゲルシフトアッセイの非RI法を検討した。

ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイは，細胞から調製した蛋白抽出液をRIラベルしたプローブDNA断片（ERE）に結合させ，非変性ポリアクリルアミド電気泳動を行うと形成されたDNA蛋白複合体の移動度がFreeのDNA断片より小さくなることをオートラジオグラフィーで確認する方法である。また，DNA蛋白複合体に特異的抗体を添加した場合，その移動度はさらに小さくなり、スーパーシフトする（図１．ここでは，recombinant ERαのEMSAを示す。）普通の実験室でRIの半減期を気にせずに簡単にこのような実験ができれば便利なので，RIを使用せず蛍光ラベルされたプローブDNAを用いてゲルシフトアッセイを行い，そのラベル法及び検出方法を検討したので報告する。

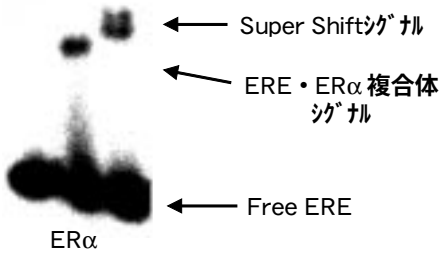

図１．RI（P^{32}）ラベルEREを使用したGel Shift Assay

検討項目

目的として１）Estorogen Receptor結合塩基配列を含む２本の単鎖オリゴDNAを蛍光でラベルし２本鎖を作製する（ERE）。２）蛍光ラベルEREとERαまたはERβの結合をゲルシフトアッセイする。また，ERに対する特異的抗体によるスーパーシフトも検出する。３）DNAシーケンサー又はFluor Imagerでバンドシフトを検出するための条件を検討する。４）DNAのメチル化がERの結合に及ぼす影響を検討する。

```
CTA GCG AGA TAT GGT CAG AGT GAC GAG GAT
          T ATA CCA GTC TCA CTG GCT CTA AGG AAT ATA
```

Estrogen Response Element
Consensus **配列**

（両3' 末端は、蛍光ラベル化のために陥没型にしてある。）

ラベル法

1. Label IT

最初に宝酒造から販売されているLabel IT®を用いたラベル法を検討した。まず，ERα，ERβが認識する塩基を含む２本の単鎖オリゴを混合し，２本鎖としてから，Label ITにより37℃で１時間でラベルし，ゲル濾過精製によりDNAプローブ①を得た。また，同様に

蛍光ラベル用PCR反応条件

100μM ER−U	1.0μl
100μM ER−L	1.0μl
25mM $MgCl_2$	1.2μl
5mM dATP	0.8μl
5mM dCTP	0.8μl
5mM dGTP	0.8μl
2mM dTTP	0.8μl
1mM *dUTP	1.0μl
×5 Reaction Buffer	4.0μl
×8 Thermo Sequenase	1.0μl
H_20	7.6μl
Total	20.0μl

94℃,10sec
↓
94℃,10sec ◀
55℃,10sec　20cycles
72℃,10sec
↓
72℃,5min

UpperとLower単鎖もラベルし精製を行った。次に，ラベルUpperと非ラベルLower②，ラベルUpperとラベルLower③，ラベルLowerと非ラベルUpper④を等量比で混ぜ２本鎖にした。これらのラベルしたEREとERαのゲルシフトアッセイの結果（図２），ERE･ERαの複合体は①＞④＞②＞③の順に薄くなっている。後で述べる酵素法でラベルされたEREに比べると結合効率の著しい低下を認めた。この方法は，ss, dsに関わらずGを特異的に蛍光ラベルするものであり，UpperはLowerよりGが多く，単鎖オリゴをラベルしてから２本鎖にしても，２本鎖にしてからラベルしてもERの結合部分にラベルが入るのでERの結合が阻害されゲルシフトが検出できなくなるものと考えられる。

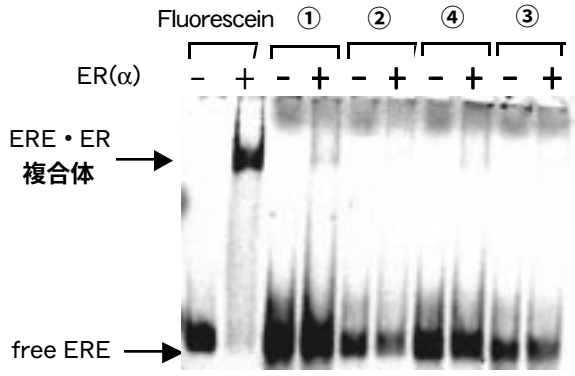

図２.Label IT EREを使用した結果

2-1. DNAシーケンサーによる検出

Texas-Red EREを用いてGel Shift Assayを行う場合は，日立製のDNAシーケンサーを検出器として使用するが，そのままでは検出できなかったので次の様な改良を加えた。１）スペーサの厚みを0.9mmに変更，２）短い特製ガラス板（10cm）を使用，３）外部電源を使用，４）＋，－極泳動槽内のbufferの循環を行う。この改良されたシーケンサーを用い先の条件で実験を行った結果（図３）である。この方法では，検出に時間がかかる（Super Shiftで60min）ために，スーパーシフトのシャープなバンドの検出が難しくなった。

Gel Shift Assay 条件

反応組成

Gel Shift Assay
- 0.48pmol **蛍光ラベル** ERE
- 2.6pmol Estrogen Receptor
- 0.6μg poly(dI-dC)
- 3μg BSA
- 100mM KCl
- 20mM Tris(pH7.5)
- 20% glycerol

Super Shift Assay
＋ 1μg anti ER **抗体**

Total　10μl

反応条件

Estrogen Receptor
＋
antibody ER
室温 10min incubate

その他を加え氷上で
1hrｲﾝｷｭﾍﾞｰﾄ

泳動条件

4% low-ionic-strength polyacrylamide gel(80:1)
low-ionic-strength electrophoresis buffer pH8.0

100V,3hr,15℃泳動結果

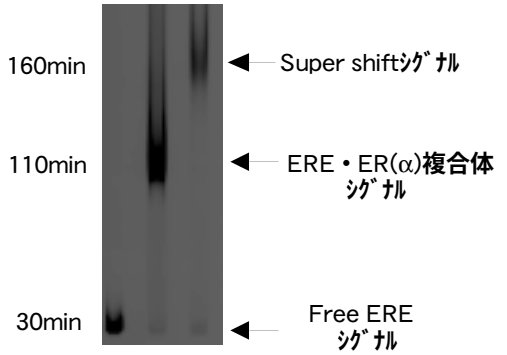

図３.日立DNASequencerによるEstrogen Receptor (α) Gel Shift Assay結果

2-2. Fluor Imagerによる検出

次にミニゲルを使用しFluoresceinでラベルされたEREを用いてゲルシフトを行いFluor Imager（Molecular Dynamics）で検出した結果を示す（図４）。100V，40minの泳動で検出でき，ミニゲルで扱いやすく簡便である。蛍光ラベルしたEREは、RIとは異なった構造になるために、蛋白の認識部位ではなく，蛍光構造部分に蛋白が結合している可能性があり，次の実験を行なった。

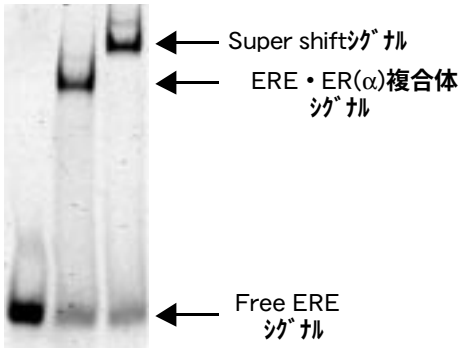

図４.ミニゲルを使用したGel Shift Assay (Fluor Imagerによる)

図５は，ラベルEREに非ラベルEREを濃度を変えて加えゲルシフト行った結果である。非ラベルEREの濃度の上昇に伴い複合体のバンド強度は弱くなり，FreeEREが増加する。この結果は蛍光ラベルEREの蛍光構造がERαやERβ蛋白との結合には関与していないことを示している。

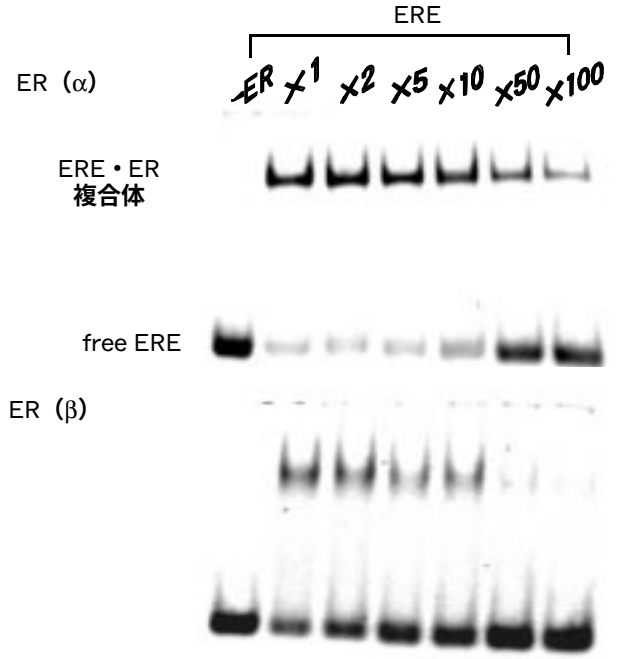

図５ .label EREとnon label EREの競合結果

ERα, ERβの濃度を変えていくと同様にERE・蛋白複合体が減少していくこと（図６）からも蛍光ラベルEREがERα, ERβ蛋白に結合していることが分かる。

次にラベルEREの量を変化させてみた（図７）。ERα, ERβともにERE・蛋白複合体及びFree EREも減少したことからも蛍光ラベルEREがERα, ERβ蛋白に結合していることが分かる。また, ERαはERβよりも蛍光ラベルEREに対して高い親和性をもつことがわかる。

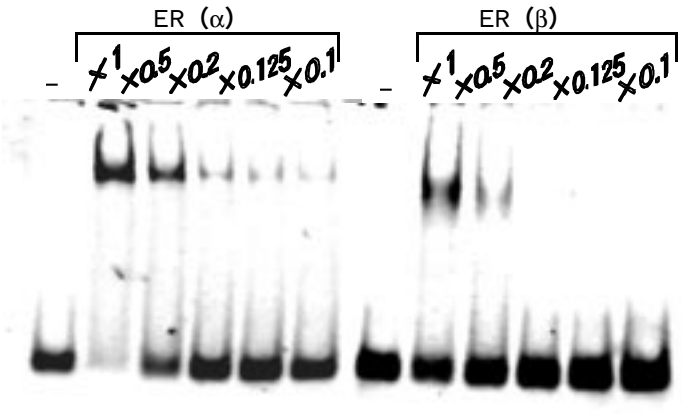

図６ .Estrogen Receptorの濃度変化

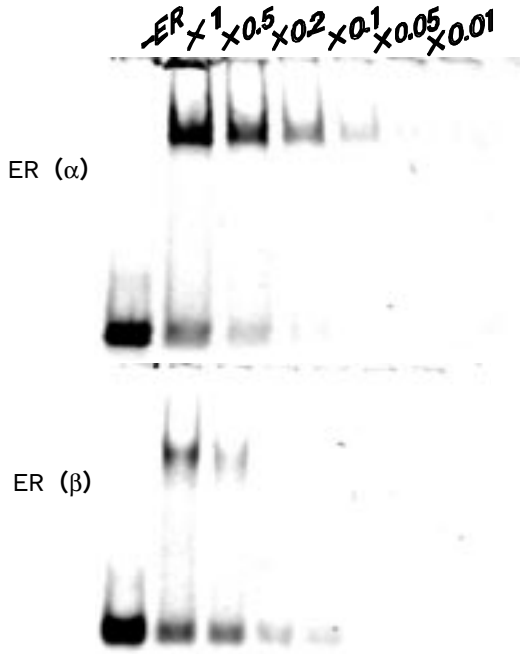

図７ .label EREの量変化

メチル化について

1-1. メチル化EREの作製

ERα，ERβが認識するERE中の塩基のCがメチル化された２本の単鎖オリゴを作製し酵素法により蛍光ラベルを行った。単鎖オリゴを組み合わせることによって図８のような３種の蛍光ラベルEREを作製した。

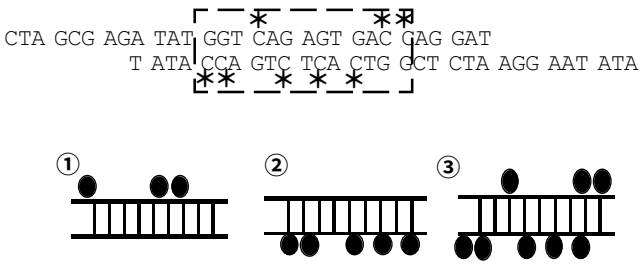

図８．メチル化ERE
（＊●で示したCがメチル化されている。）

この蛍光ラベルEREを使用してGel Shift Assayを行ったところ（図９），Freeとシフトしたバンドの割合は，①②③ともメチル化されていないcontに比べるとシフトのバンドが薄く，①②の違いは少ないが③は①②よりも薄くなっていることからメチル化は受容体蛋白のEREへの結合を抑制すると考えられる。

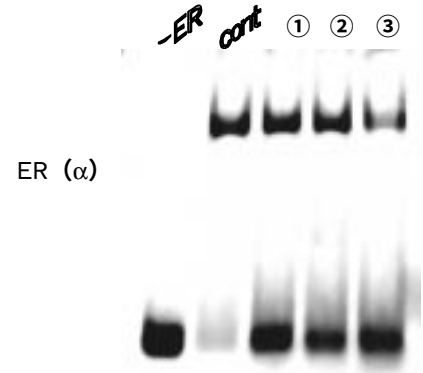

図９.EREのメチル化の影響

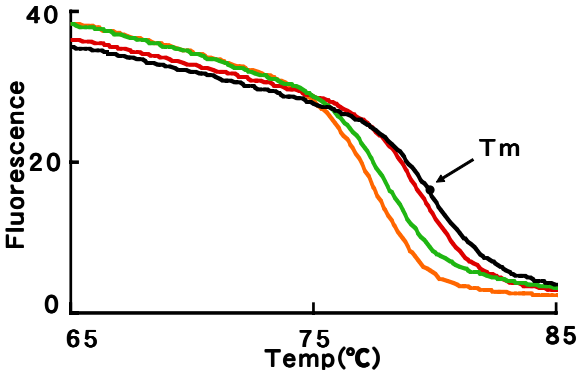

図１０.メチル化EREの Melting Curveの比較

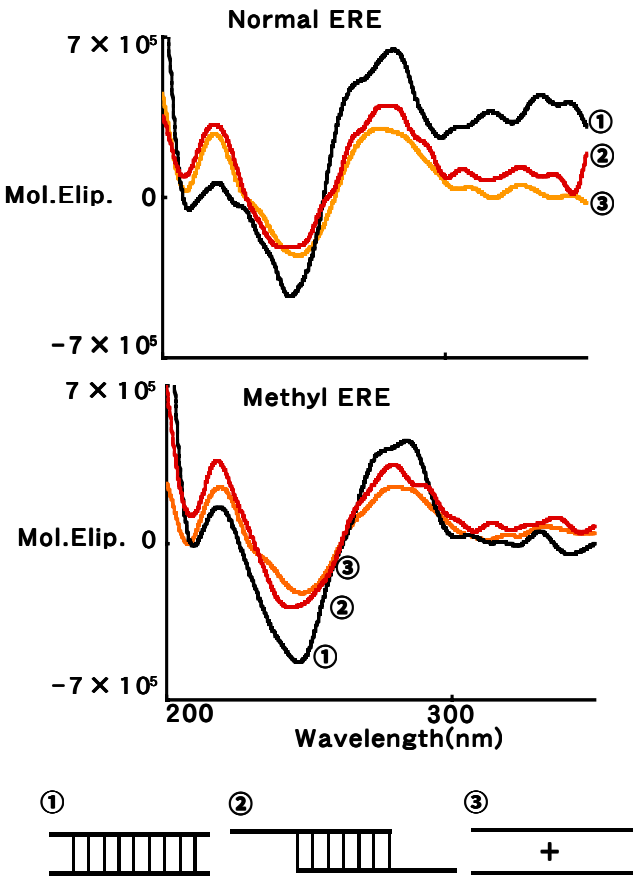

図１１.メチル化EREのＣＤの比較

1-2. メチル化 ERE の Melting Curve の比較

ライトサイクラーを使用して図８で示した３つのメチル化 ERE の Melting Curve を比較したところ（図１０），cont（77℃）<①（78℃）<②（79℃）<③（80℃）とメチル化 C の数が増えるほど Tm 値は上昇するのでdouble strandの安定化にメチル化が影響すると思われる。

1-3. メチル化 ERE の円偏光二色性（CD）の比較

円偏光二色性は，物質に特有の物性であり，その分子の絶対構造に依存してスペクトルを示す。そこで，両鎖のメチル化が立体構造にどのように影響するかをCDによって比較した。①はds, ②は一部ssの測定CD, ③は upper，lower の１本鎖の CD を算術加算平均である。スペクトルは両者でよく似ているがメチル化EREはノーマルなEREに比べて-CD（245nm），+CD（281nm）とも値が低くなっている。また，ds である①が ss である②と異なっていることから，使用した ERE が２本鎖構造をとっていることが判明した。

まとめ

以上より次のような結果を得た。１）蛍光ラベル化方法は、Thermo Sequenase®(Amersham）を使用した酵素法が検討した中でも最適だった。２）蛍光自動 DNA sequencer を Texas Red 標識 ERE を用いた Gel Shift Assay に使用するには，克服すべきいくつかの困難がある。３）蛍光ラベル DNA を用いた Gel Shift Assay は，RI ラベルに比べ安全かつ簡便であるが検討する課題も残っている（蛍光色素の結合の影響、部位特異ラベル化など)。４）メチル化の量が多くなるほどEREとの結合力は弱くなり，double strand の結合力は逆に強くなる。

蛍光ラベル法としては，この他に（１）オリゴ合成時に 5' 末端に導入する方法，（２）オリゴ DNA の 5' 末端に酵素（kinase）導入する方法,（３）オリゴDNA の3'末端にTdT（ターミナルトランスフェラーゼ）により導入する方法がある。（１）の変法として ERE コンセンサス配列の一方の鎖に 15 塩基長位を延長して合成し，その部位に相補的な蛍光標識オリゴを合成し，アニールする方法がある。この方法では延長部のオリゴ配列を一旦決めておくといつも同じ蛍光標識オリゴを用いればよいので，便利でかつ経済的である。しかも，応答配列部への標識蛍光のかさ高さの影響も抑えられる可能性がある。

以上，高感度を維持しつつ，普通の実験室で行えるというメリットを生かし，様々な特異 DNA 結合性タンパクの相互作用様式の解明にも役立てうるのではないかと考える。