

タイトル: ヌクレオソーム局在化によるMLH1遺伝子発現抑制の解析

カテゴリ: エピジェネティクス

キーワード: ヌクレオソーム再構築、ヌクレオソーム局在解析、ヌクレオソームDNA、遺伝子発現抑制、Nucleosome remodeling, Nucleosome localization, Nucleosome DNA

データソース: 自社取得データ

方法:

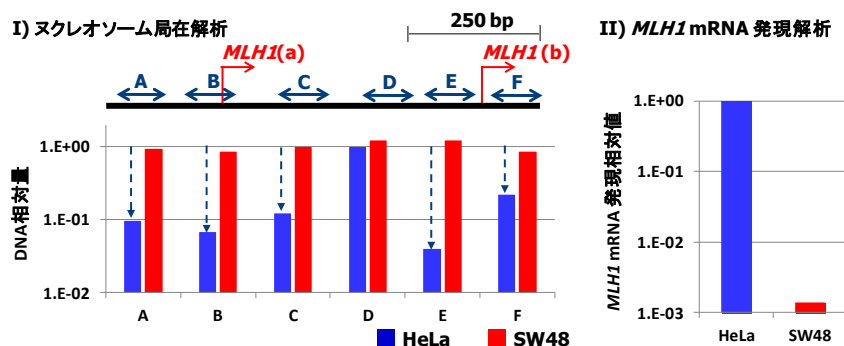
2種類のヒト由来細胞株を用いてMLH1遺伝子上流域のヌクレオソーム局在化と同遺伝子の発現を解析することで、遺伝子上流域におけるヌクレオソームの局在化が遺伝子発現に及ぼす影響を解析した。HeLa細胞およびSW48細胞から、EpiScope® Nucleosome Preparation Kit (製品コード 5333)を用いてヌクレオソームを調製後、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10)を用いて(50 µl溶出) DNAを回収した(ヌクレオソームDNA)。次に、得られたヌクレオソームDNAを鋳型に、SYBR® Premix Ex Taq™ GC (Perfect Real Time) (製品コード RR071A)とThermal Cycler Dice® Real Time System II (製品コード TP900)を使用してリアルタイムPCRを行い、MLH1上流領域のヌクレオソーム局在を解析した。解析に用いたリアルタイムPCR用プライマーは、MLH1遺伝子上流域をTiling状(領域A~F)に検出するように設計した。また、HeLa およびSW48細胞株におけるMLH1遺伝子のmRNA発現量は、NucleoSpin® RNA IIを用いて抽出・精製後したtotal RNAから、PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR037A)によりcDNAを合成後、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time) (製品コード RR081A)によるリアルタイムPCRで解析した。また、発現解析に利用したリアルタイムPCR用プライマーは、Perfect Real Timeサポートシステムにより設計・合成したものを利用した。

結果:

EpiScope® Nucleosome Preparation Kitで調製したヌクレオソームDNA中に含まれるゲノムDNA領域A~Fの相対量を、超音波処理により断片化した精製ゲノムDNA中の各値をコントロール(DNA相対量=1)として表した(下図I)。各ゲノムDNA量は、キットに添付のLINE-1 qPCR Primerにより得られた値で補正した。この結果、ヌクレオソームDNA中に含まれるゲノムDNA領域A~Fの相対量は、SW48細胞では高く、HeLa細胞では低くなった。つまり、SW48細胞ではMLH1遺伝子上流領域にヌクレオソームが密集し(ヘテロクロマチン)、一方、HeLa細胞ではこの領域にヌクレオソームは散在的に存在している(ユークロマチン)ことが示唆された。

一方、SW48におけるMLH1遺伝子mRNA発現量を、HeLaにおけるmRNA発現量の相対値(MLH1 mRNA発現相対値=1)として表したところ(下図II)、HeLa細胞株でMLH1遺伝子mRNA発現量が高いことが確認された。

以上の結果より、MLH1遺伝子mRNA発現は、MLH1遺伝子上流領域におけるヌクレオソーム局在化が一因となり調節されていることが示唆された。



備考: 参考文献、参考製品リンク

http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.asp?unitid=U100006834

http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.asp?unitid=U100006678

http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.asp?unitid=U100006455

http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.asp?unitid=U100006573

http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.asp?unitid=U100005168

http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.asp?unitid=U100005033