

Dnmt3b と、DNA 複製時に新たに作られる DNA 鎖にメチル基を付加する維持メチル化酵素 Dnmt1 がある。また、Dnmt3a や Dnmt3b と相同性を示すもののメチル化活性を持たない Dnmt3L は、Dnmt3a や Dnmt3b と相互作用しメチル化活性を促進する³⁾。

C. ヒストン修飾

ゲノム DNA は、H2A, H2B, H3, H4 からなるヒストン八量体に巻き付きヌクレオソームを構成する。ヌクレオソームがビーズ状につながり、他の蛋白とともに DNA-蛋白複合体、すなわちクロマチンを形成している。クロマチン構造の主体となるヒストンは様々な化学修飾を受け、これらの修飾パターンが遺伝子発現に影響を及ぼす(ヒストンコード説)(Fig. 1B)⁴⁾。特に遺伝子発現に関連する修飾としてメチル化やアセチル化がよく知られており、ヒストンテール(ヒストンの N 末端 30~35 アミノ酸で立体構造に乏しい領域)がこれらの修飾を受けるとクロマチン構造に影響を与える。H3, H4 のアセチル化と H3 の 4 番目のリシン(H3K4)のメチル化は、クロマチン構造を緩めて(ユークロマチン)遺伝子転写の活性化に関与する。一方、H3, H4 の脱アセチル化、H3 の 9 番目や 27 番目のリシン(H3K9, H3K27)のメチル化はクロマチンを凝縮させ(ヘテロクロマチン)遺伝子転写を抑制する。DNA メチル化とヒストン修飾は、互いに密接に関連して、あるいは独立して遺伝子発現を抑制している。

II. エピジェネティクス解析方法

エピジェネティクス解析方法は目的によって様々な方法があるが、ここでは代表的な解析法の概要について説明する。

A. DNA メチル化解析法

メチル化感受性サザンプロットは、制限酵素認識配列中の CpG 配列がメチル化されていると制限酵素が DNA を切断できなくなる現象を利用した方法で、古典的な解析方法である。具体的には、メチル化の有無に関係なく切断できる制限酵素(*Bam*HI や *Eco*RI など)とメチル化感受性制限酵素(*Not*I など)でゲノム DNA を二重切断してサザンプロットを行う。メチル化されているとメチル化感受性制限酵素で切断されないため、非メチル化より大きな DNA 断片が検出される(Fig. 2A)。

現在最もよく使われている解析方法は、DNA をバイサルファイト処理したのち PCR で増幅し、メ

チル化状態を解析する方法である。DNA を重亜硫酸ナトリウム(sodium bisulfite)で処理すると、非メチル化シトシンはウラシルに変換されるが、メチル化シトシンは変換されずシトシンのまま残る(Fig. 2B)。つまり、同じ塩基配列であってもメチル化 DNA と非メチル化 DNA では、バイサルファイト処理をすると異なる塩基配列になってしまう。この原理を利用して、メチル化 DNA と非メチル化 DNA それぞれの配列に特異的なプライマーセットを用いて PCR を行い、PCR 産物の有無でメチル化状態を判定するのが Methylation-specific PCR(MSP)である(Fig. 2B)。一方、メチル化 DNA と非メチル化 DNA の両方を区別せずに増幅するプライマーセットで PCR を行い、PCR 産物をクローニングしたのちシーケンスを行うのが、バイサルファイト・シーケンス法である。メチル化シトシンはシトシンのまま、非メチル化シトシンはチミンとしてシーケンスされるので、PCR 産物内の一つ一つの CpG 配列のメチル化状態を解析できる(Fig. 2B)。また、メチル化 DNA と非メチル化 DNA の両方を区別せずに増幅した PCR 産物を制限酵素で切断する方法を combined bisulfite restriction analysis(COBRA 法)という。この場合、認識配列の中に CpG 配列を含む制限酵素を使用する。メチル化 DNA では CG がそのまま残っているため制限酵素によって切断されるが、非メチル DNA では TG に変換されており切断されないのである(Fig. 2B)。

B. ヒストン修飾解析法

in vivo におけるヒストン修飾の唯一の解析法はクロマチン免疫沈降法(Chromatin Immunoprecipitation: ChIP)である。ChIP 法は、ヒストン修飾に対する特異的抗体でクロマチンを免疫沈降し、目的の修飾を受けたヒストンに巻き付いている DNA を回収する方法である(Fig. 3)。回収した DNA(ChIP-DNA)を PCR で増幅することにより、個別のゲノム領域のヒストンが目的の修飾を受けているかどうかを解析する。また、ChIP-DNA を増幅、蛍光標識し、マイクロアレイ(chip)にハイブリダイズしてゲノム網羅的に解析する方法が ChIP on chip で、ChIP-DNA を次世代シーケンサーを用いて大量シーケンスし、得られた配列をゲノムにマッピングすることにより網羅的に解析する方法が ChIP-Seq である。発生段階や細胞、組織ごとに異なるエピジェネティックな修飾をゲノム網羅的に解析するには欠かせない技術である。

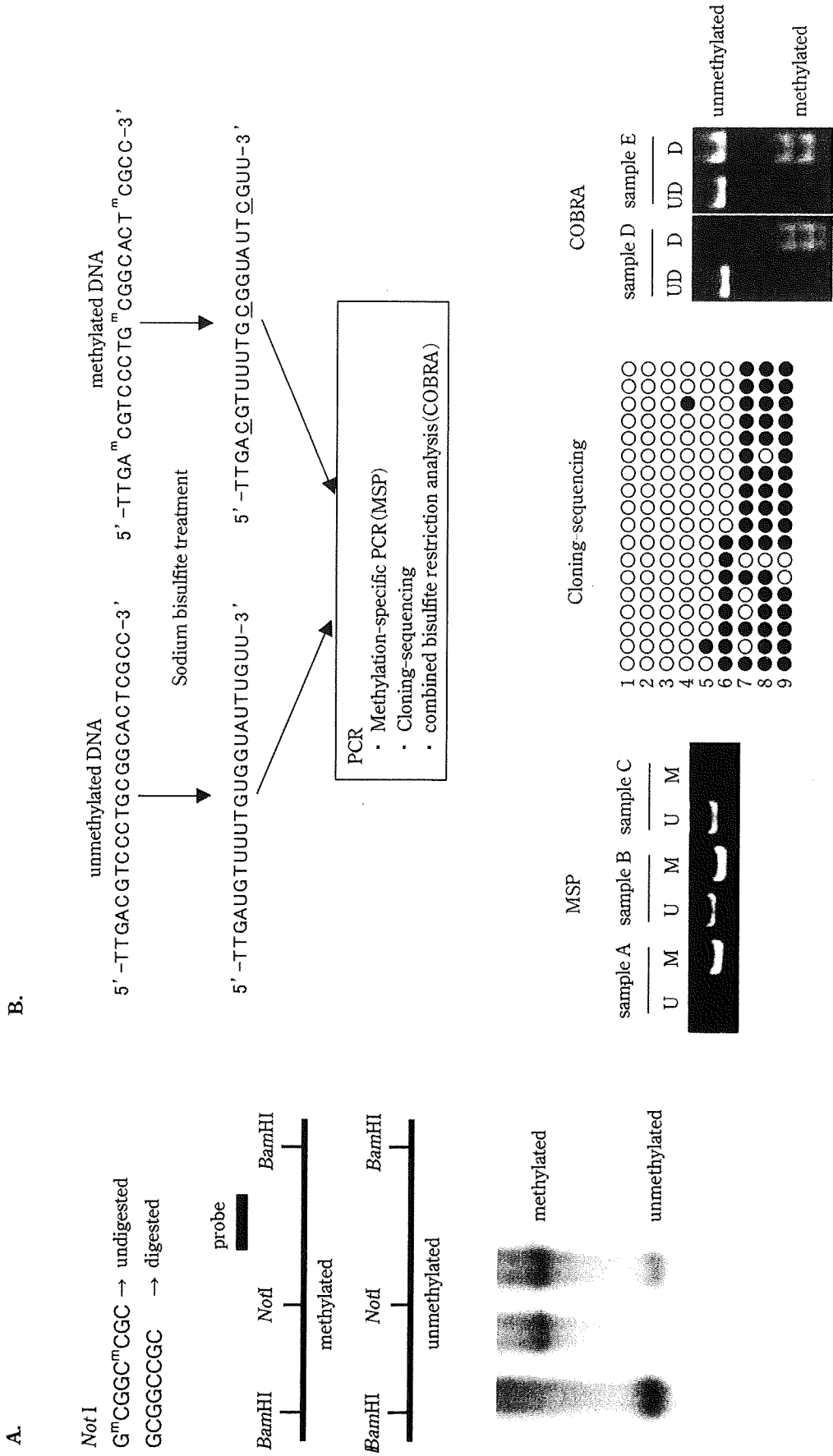


Figure 2 Analytic methods for DNA methylation.
 (A) Methylation-sensitive Southern blot. ^mC: 5-methylcytosine.
 (B) PCR methods with sodium bisulfite-treated DNA. U: primer set for unmethylated DNA, M: primer set for methylated DNA, open circle: unmethylated CpG site, black circle: unmethylated CpG site, UD: undigested by restriction enzyme, D: digested by restriction enzyme. Each sequenced clone is indicated by Arabic numerals. See text for details.

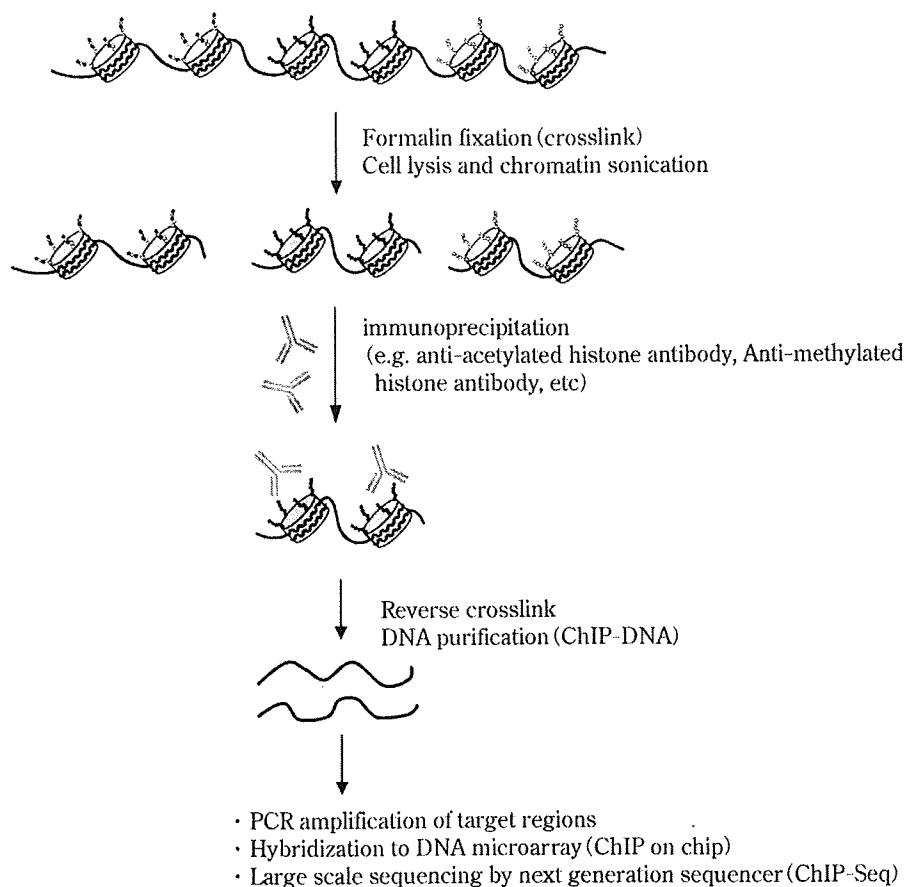


Figure 3 Analytic method for histone modifications.
Principle of chromatin immunoprecipitation (ChIP).

III. エピジェネティクスと疾患

A. 癌のエピジェネティクス

癌におけるエピジェネティックな異常としては、ゲノム全体の低メチル化と遺伝子プロモーター領域に存在する CpG アイランドの高メチル化があげられる。

ゲノム全体の低メチル化は、*Alu* や *LINE* など CpG 配列を多く含む繰り返し配列の低メチル化が主な原因である。この低メチル化は染色体の不安定性を惹き起こし、リンパ腫の発生を促進すると報告されている⁵⁾。また、メチル化によって抑制されていたレトロトランスポゾンが活性化し、レトロトランスポジションが増加することによりゲノム不安定性が惹起される可能性がある。さらに、*MAGE* や *IGF2* などの特定の癌遺伝子の CpG アイランドが低メチル化状態となり、これらの遺伝子発現が増加する⁶⁾。

一方、癌抑制遺伝子のプロモーター CpG アイラ

ンドが高メチル化すると、遺伝子発現が抑制(不活化)される。現在までに、癌で高メチル化によって不活化される遺伝子が数多く報告されている。プロモーター CpG アイランドの高メチル化は、欠失、変異に次ぐ遺伝子不活化機構と認知されており、癌抑制遺伝子の two-hit は欠失、変異だけでなく高メチル化も加えた3つのファクターのうちの2つの組み合わせで生じている。

DNA メチル化とヒストン修飾は、互いに協調、あるいは独立して遺伝子発現を抑制している。メチル CpG 結合蛋白(MBD 蛋白)が高メチル化されたプロモーター CpG アイランドを認識して結合し、HDAC やヒストンメチル化酵素がリクルートされることにより、プロモーター領域がヘテロクロマチン化し転写が抑制される。**Fig. 4** は DNA 修復遺伝子 *MGMT* の例である。*MGMT* の発現が抑制されている癌ではメチル化したプロモーター領域に MBD 蛋白の1つである MeCP2 が結合し、H3K9 がメチル化されている⁷⁾⁸⁾。しかし、遺伝子によっては脱アセ

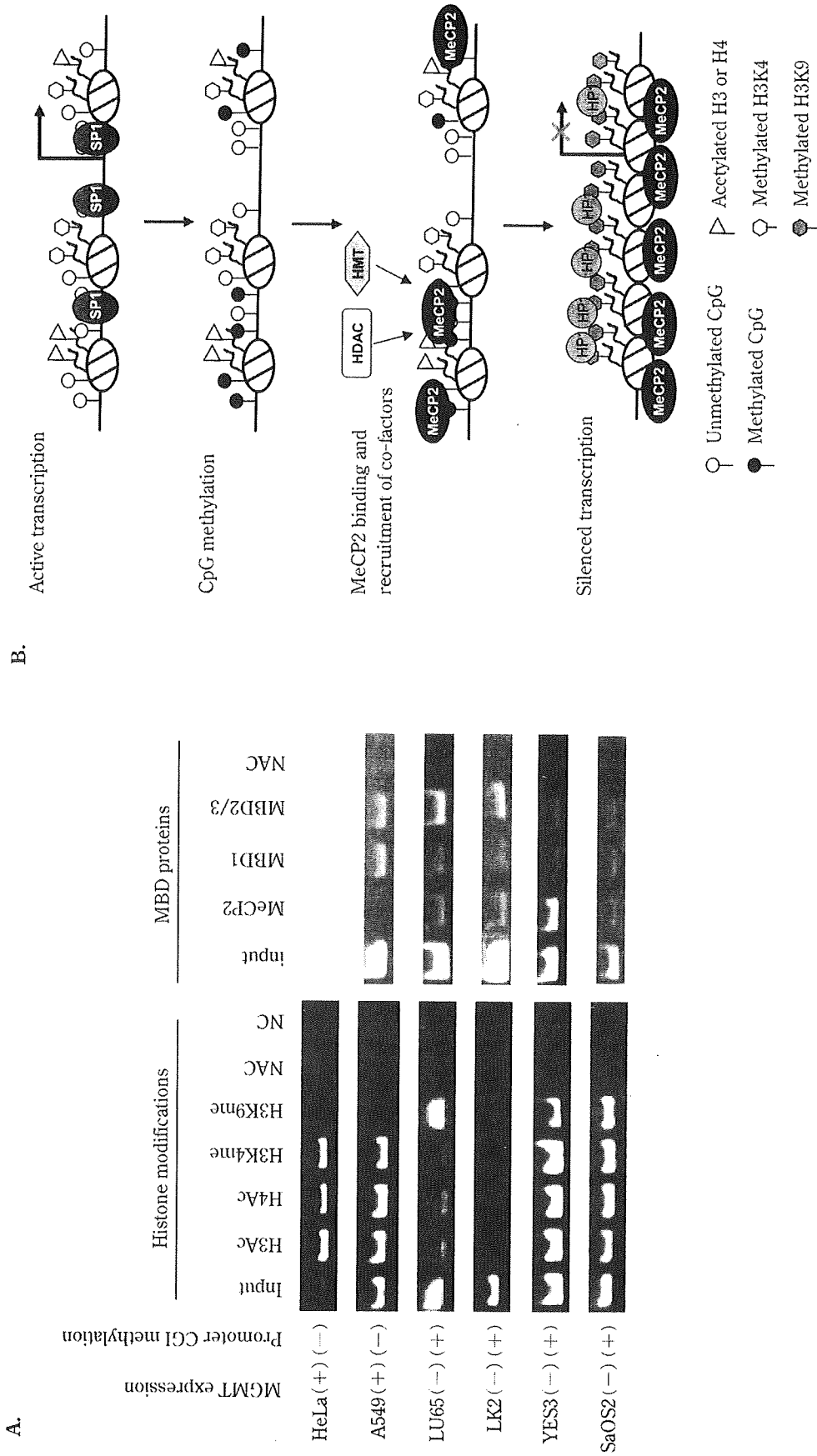


Figure 4 Epigenetic modification of *MGMT* gene in cancer.

(A) Histone modification and MBD binding were investigated by ChIP. Methylation of H3K9 and MeCP2 binding are completely associated with *MGMT* silencing and DNA methylation. Binding of MBDs in HeLa cell were not investigated. NAC: no antibody control, NC: negative control.

(B) A silencing model of *MGMT*. In the transcriptionally active state, CpGs are not methylated. Nucleosomes are distributed sparsely and irregularly, with acetylated histones and methylated H3K4, forming open chromatin. Thus, transcriptional factors are accessible to their target sequences. To silence transcription, CpGs are probably methylated first. Then, MeCP2 binds to the CpG island, forming a complex with HDAC (s) and/or histone methyltransferase (HMT). These interactions would tightly compact and regularly array the nucleosomes leading to inaccessible heterochromatin and inactive transcription.

メチル化単独,あるいは H3K27 メチル化単独で抑制されている場合もある。また,癌細胞の DNA メチル化が幹細胞の H3K27 のメチル化に起因することが示唆されている⁹⁾¹⁰⁾。多分化能の維持している幹細胞では,細胞分化に関わる遺伝子のプロモーターが H3K27 と H3K4 のメチル化という相反する修飾を受けている (bi-valent 修飾)。癌の前駆細胞では, bi-valent に修飾されている遺伝子において H3K27 が優位となり,癌細胞では DNA メチル化によって遺伝子発現の抑制が固定化されるというモデルが考えられている。

一方, DNA メチル化を臨床応用する試みがなされている。解析方法で述べたように,バイサルファイト処理した DNA を PCR で増幅することにより,比較的簡便かつ高感度にメチル化を検出できる。このため,唾液,喀痰,尿,便,気管支肺胞洗浄液,生検組織などの臨床検体を用いて,癌に特異性の高いメチル化を検出した報告が数多く見られる。メチル化検出の臨床的意義としては,癌の診断および高リスクグループの発見,薬剤の効果や予後予測が考えられる。また,治療面では, DNA メチル化酵素 (DNMT) 阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤が注目されている。DNMT 阻害剤は,癌抑制遺伝子のメチル化したプロモーター領域を脱メチル化し,遺伝子発現を誘導する。5-azacytidine (VidazaTM) と 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine, DacogenTM) が米国食品医薬品局 (FDA) の承認を受けており,骨髄異形成症候群に対して良好な結果を得ている¹¹⁾。また, HDAC 阻害剤は,脱アセチル化したプロモーター領域をアセチル化し,やはり癌抑制遺伝子の発現を誘導する。Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), MS-275, FK228 などが臨床試験されている¹²⁾。

B. ゲノム刷り込みと関連疾患

ゲノム刷り込みは,エピジェネティクスの代表的現象で,一对の対立遺伝子のうち,一方の親由来の遺伝子のみが発現する。つまり,父由来アレルが発現し母由来アレルは発現しない (父性発現) か,逆に,母由来アレルが発現し父由来アレルは発現しない (母性発現)。このような刷り込み遺伝子の存在は,母由来と父由来のゲノムは等価ではない事を示す。刷り込み遺伝子の発現パターンが親由来によって異なる原因として DNA のメチル化がある。父由来と母由来の二つのアレル間で DNA メチル化が異なる

特定の DNA 領域をメチル化可変領域 (differentially methylated region: DMR) と呼ぶが,配偶子形成過程で確立されるものと受精後に確立される 2 種類がある。前者は精子と卵の形成過程において互いに異なるメチル化状態となり,このメチル化の違いは,受精後も体細胞において維持される。また,多くの刷り込み遺伝子は,単独で存在するのではなく,複数が集団をなして存在し,刷り込みドメインを形成している。刷り込みドメイン内に存在し配偶子形成過程で確立される DMR が,近傍の刷り込み遺伝子群をドメインレベルで制御する (刷り込み制御領域 [imprinted control region: ICR])。ICR の DNA メチル化が親由来で異なる事が,遺伝子発現に差を生じさせる原因なのである。ICR の DNA メチル化に異常が生じるとドメインレベルでの制御が破綻し,遺伝子発現パターンが大きく変わってしまうため, Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS), Silver-Russell 症候群 (SRS), Prader-Willi 症候群や Angelman 症候群等に代表される刷り込み関連疾患が発症する。

BWS は,新生時期の過成長,巨舌,臍ヘルニアを三主徴とし,その他に,新生児期の低血糖,耳垂の線状溝・耳輪後縁の小窩,腹腔内臓腫大,腎奇形,片側肥大,口蓋裂などの症状を呈する。また,約 10% の患児に Wilms 腫瘍,肝芽種,横紋筋肉腫など胎児性腫瘍が発症する。原因は, 11 番染色体短腕 15.5 領域 (11p15.5) に存在する刷り込みドメインの破綻である。11p15.5 には, *KIP2/LIT1* と *IGF2/H19* の二つの刷り込みドメインが隣接して存在し (Fig. 5A), 各ドメインはそれぞれの ICR により独立して刷り込みが制御されている¹³⁾。

KIP2/LIT1 ドメイン内の主要な刷り込み遺伝子は,母性発現する *p57^{KIP2} (KIP2)* と父性発現する *LIT1* である (Fig. 5B)。*KIP2* はサイクリン依存性キナーゼ (CDK) インヒビターで,負の細胞増殖因子である。また,腫瘍抑制遺伝子としても知られている。本ドメインの ICR は, *LIT1* 上流にある *KvDMR1 (DMR-LIT1)*, 母性メチル化,父性非メチル化) で,非メチル化 *KvDMR1* から転写される non-coding RNA *LIT1* がシスに周囲の刷り込み遺伝子の発現を抑制すると考えられている。約半数の BWS では母性アレル *KvDMR1* が脱メチル化している。この脱メチル化によって母性アレルが父性アレルと同じエピジェノタイプとなるため,母性アレルからの *KIP2* 発現が抑制される。また,低頻度ながら母性アレル *KIP2* の

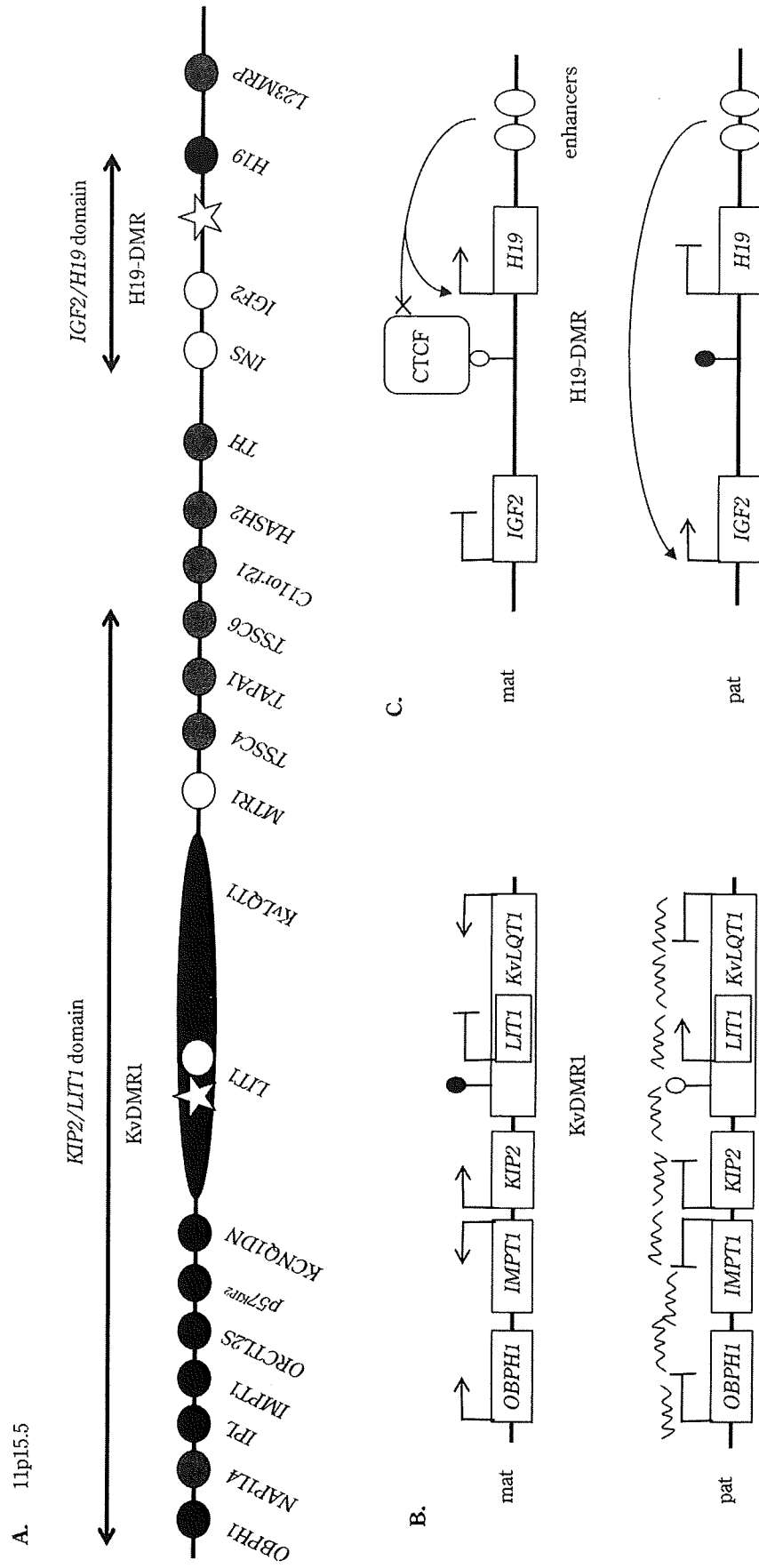


Figure 5 A map of BWS locus, 11p15.5, and regulation mechanisms of imprinting.
 (A) A genetic map of the imprinted region at 11p15, including two different imprinted domains, *KIP2/LIT1* and *IGF2/HI9*. Open oval: paternally expressed gene, black oval: maternally expressed gene, gray oval: biallelically expressed gene. ICR of each domain is indicated by an asterisk.
 (B) Regulation mechanism of *KIP2/LIT1*-imprinted domain. Wavy line: transcript of non-coding *LIT1* RNA.
 (C) Regulation mechanism of *IGF2/HI9*-imprinted domain. Open lollipop: unmethylated ICR, black lollipop: methylated ICR. See text for details.

点変異も認められる。*KIP2* の発現抑制や変異により、細胞増殖の抑制がきかなくなるため BWS の症状が出現すると考えられる。

一方、*IGF2/H19* ドメイン内の重要な刷り込み遺伝子は父性発現する *IGF2* と母性発現する *H19* である (Fig. 5C)。*IGF2* は細胞増殖因子で、*H19* は non-coding RNA である。本ドメインの ICR は、*H19* の上流 2-5kb にある H19-DMR (母性非メチル化、父性メチル化) である。母性アレルの非メチル化 H19-DMR では、CTCF が結合してインスレーターとして働く。つまり、*H19* 下流のエンハンサーをブロックして、*IGF2* への作用を阻害し *H19* に作用させる。一方、父性アレルはメチル化により CTCF 結合が阻害されるため、エンハンサーは *IGF2* に作用する。また、メチル化は *H19* プロモーター領域におよび、*H19* の発現は抑制される。結果的に、*H19* は母性発現、*IGF2* は父性発現を示す。BWS では、母性アレルの H19-DMR が高メチル化されるために CTCF の結合が阻害され、*IGF2* が発現 (loss of imprinting: LOI) するようになる。結果的に *IGF2* が両アレルから発現することで過剰発現となり、細胞増殖が促進され BWS が発症する。*H19-DMR* 高メチル化や父性 UPD の場合、Wilms 腫瘍のリスクが高くなり、KvDMR1 脱メチル化では Wilms 腫瘍以外のリスクが高くなる¹⁴⁾。

SRS は、子宮内発育遅延、低身長、身体左右非対称、性発育の異常を特徴とする症候群である。約 1/3 の症例で H19-DMR が低メチル化状態であることが明らかとなった。過成長を示す BWS と逆のパターンであり、遺伝子発現も *H19* の両アレル発現と *IGF2* の発現減少を示す¹⁵⁾。さらに、11p15.5 の *KIP2/LIT1* ドメインの母由来重複を示す SRS 症例も報告された¹⁶⁾。この症例では、重複によって *KIP2* の過剰発現が生じていると考えられる。

C. その他の疾患とエピジェネティクス

近年、癌や刷り込み関連疾患以外の様々な疾患とエピジェネティックな異常の関連性を示唆する報告が相次いでいる。精神疾患領域では、マウスのストレス脆弱性と海馬のグルココルチコイドレセプター遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化が関連することや、双極性障害の患者における *PPIEL* 遺伝子の低メチル化が報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。糖尿病のモデルラットでは、膵 β 細胞の機能と development に重要な遺伝子 *Pdx1* の発現が、胎仔期から成体にお

いてヒストン脱アセチル化、H3K4 脱メチル化、H3K9 メチル化、DNA メチル化によって低下していた¹⁹⁾。また、免疫時には抗原提示細胞において *IL-10* が HDAC11 によって抑制され、免疫寛容時にはこの抑制がはずれることも報告された²⁰⁾。

IV. 結 語

エピジェネティクスの概略、代表的な解析方法、疾患との関わりについて解説した。エピジェネティクスは現在最もホットな研究分野であり、基礎的なメカニズムから臨床応用まで様々な領域で研究が進展している。近い将来、様々な疾患の研究が進展し、予防、診断、治療に応用されることが期待される。

なお、当研究室では、無償で BWS の遺伝子解析を行っているので、希望される場合はご連絡いただきたい。

文 献

- 1) Yoshiura K, Kinoshita A, Ishida T, et al. A single nucleotide polymorphism in the ABCC11 gene is the determinant of the human earwax type. *Nature Genet* 2006; 38: 324-33.
- 2) 佐々木裕之 編. エピジェネティクス. シュプリンガー・フェアラーク東京; 2004. p.3-6.
- 3) Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, et al. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem* 2004; 279: 27816-23.
- 4) Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403: 41-5.
- 5) Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 2003; 300: 489-92.
- 6) Cui H, Onyango P, Brandenburg S, et al. Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. *Cancer Res* 2002; 62: 6442-6.
- 7) Nakagawachi T, Soejima H, Urano T, et al. Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene* 2003; 22: 8835-44.
- 8) Zhao W, Soejima H, Higashimoto K, et al. The essential role of histone H3 Lys9 methylation and MeCP2 binding in MGMT silencing with poor DNA methyla-

- tion of the promoter CpG island. *J Biochem (Tokyo)* 2005; 137: 431-40.
- 9) Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, et al. A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet* 2007; 39: 237-42.
 - 10) Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, et al. Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet* 2007; 39: 157-8.
 - 11) Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2429-40.
 - 12) Kelly WK, O'Connor OA, Krug LM, et al. Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3923-31.
 - 13) Weksberg R, Shuman C, Smith AC. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2005; 137C: 12-23.
 - 14) Weksberg R, Nishikawa J, Caluseriu O, et al. Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. *Hum Mol Genet* 2001; 26: 2989-3000.
 - 15) Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, et al. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet* 2005; 37: 1003-7.
 - 16) Schönherr N, Meyer E, Roos A, et al. The centromeric 11p15 imprinting centre is also involved in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 2007; 44: 59-63.
 - 17) Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 2004; 7: 847-54.
 - 18) Kuratomi G, Iwamoto K, Bundo M, et al. Aberrant DNA methylation associated with bipolar disorder identified from discordant monozygotic twins. *Mol Psychiatry* 2008; 13: 429-41.
 - 19) Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, et al. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J Clin Invest* 2008; 118: 2316-24.
 - 20) Villagra, Cheng F, Wang HW, et al. The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nat Immunol* 2008; 10: 92-100.

Beckwith-Wiedemann 症候群

東元 健* (ひがしもとけん)

副島英伸* (そえじまひでのぶ)

*佐賀大学医学部分子生命科学講座分子遺伝学・エピジェネティクス分野

要旨

Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) は、過成長、巨舌、臍ヘルニアを 3 主徴とする過成長症候群の一つであり、胎児性腫瘍発生の危険性を伴う。責任遺伝子座は 11 番染色体短腕 15.5 領域 (11p15.5) であり、本領域に存在する刷り込み遺伝子の異常が原因と考えられている。本稿では、BWS の臨床学的病態、ゲノム刷り込みの機序、分子生物学的発症メカニズム、発症原因別の頻度、生殖補助医療との関連、およびクリニカルマネージメントについて解説する。

Key words : Beckwith-Wiedemann 症候群, ゲノム刷り込み, 刷り込み遺伝子, DNA メチル化

I Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) の概要

BWS は、新生児期の過成長、巨舌、臍ヘルニアを 3 主徴とし、その他に、新生児期の低血糖、耳垂の線状溝・耳輪後縁の小窩、腹腔内臓器腫大、腎奇形、片側肥大、口蓋裂などの症状を呈する。また、約 10% の患児に Wilms 腫瘍、肝芽腫、横紋筋肉腫など胎児性腫瘍が発生する。表 1 に示すようにいくつかの診断基準がある¹⁾。また、症状は成長とともに緩和され、成人では健常人とほぼ変わらない程度になる。BWS の大部分は孤発例で、家族例 (15%) では常染色体優性遺伝形式をとり、母由来の異常が子に受け継がれた時のみ発症する²⁾。

原因は、11 番染色体短腕 15.5 領域 (11p15.5) に存在する成長関連遺伝子の異常である。これらの遺伝子は親由来によって発現パターンが異なるゲノム刷り込み遺伝子であり、ゲノム刷り込み機構が破綻した場合にその発現パターンが大きく変化し発症する。

II ゲノム刷り込みの機序

通常、両親から受け継いだ一对の対立遺伝子 (アレル) は、メンデルの法則に従い母由来、父由来に関係なく同じ発現状態を示す。つまり、発現する場合は両親由来の対立遺伝子がともに発現し、発現しない場合はともに発現しない (図 1-a)。一方、刷り込み遺伝子は、その親由来によって発現パターンが異なっている (図 1-b)。つまり、父由来アレルが発現し母由来アレルは発現しない (父性発現) か、逆に、母由来アレルが発現し父由来アレルは発現しない (母性発現)³⁾。このような刷り込み遺伝子の存在は、母由来と父由来のゲノムは等価ではないことを示す。刷り込み遺伝子の多くは、胎盤形成や個体発生に重要であり、その異常は先天性疾患や癌の発症にかかわっていることが知られている⁴⁾。

刷り込み遺伝子の発現パターンが親由来によって異なる原因として DNA のメチル化があげられる。DNA メチル化とは、シトシンとグアニンが連続している CpG 配列のシトシンにメチル基 (CH₃) が付加された状態のことを指す。父由来と母由来の 2 つのアレル間で DNA

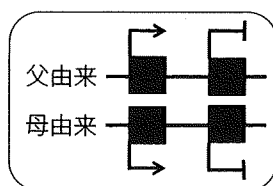
連絡先 : * 〒 849-8501 佐賀県佐賀市鍋島 5-1-1

表1 BWSの代表的診断基準

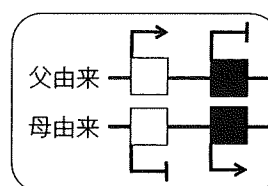
	Elliott ら (1994)	DeBaun & Tucker (1998)	Weksberg ら (2001)
主症状	<ul style="list-style-type: none"> ・腹壁欠損 ・巨舌 ・90 パーセントイルを超える過成長 	<ul style="list-style-type: none"> ・巨舌 ・出生児体重 90 パーセントイル超 ・生後 1 カ月以内の低血糖 ・耳垂の線状溝・耳輪後縁の小窩 ・腹壁欠損 (臍帯ヘルニア, 腹直筋解離, 臍ヘルニア) 	<ul style="list-style-type: none"> ・巨舌 ・巨大児 ・片側肥大 ・耳垂の線状溝・耳輪後縁の小窩 ・腹壁欠損 (臍帯ヘルニア, 腹直筋解離, 臍ヘルニア) ・胎児性腫瘍
副症状	<ul style="list-style-type: none"> ・耳垂の線状溝・耳輪後縁の小窩 ・顔面の火焰状母斑 ・低血糖 ・腎腫大 ・片側肥大 	なし	<ul style="list-style-type: none"> ・新生児期低血糖 ・腹腔内臓器腫大 ・腎奇形
診断	主症状 3 つ または 主症状 2 つと副症状 3 つ以上	主症状 2 つ以上	主症状 3 つ以上 または 主症状 2 つと副症状 1 つ以上

(Rump P et al, 2005¹⁾)

a メンデルの法則に従う遺伝子の発現様式



b 刷り込み遺伝子の発現様式



c 発生過程とICRのDMR形成

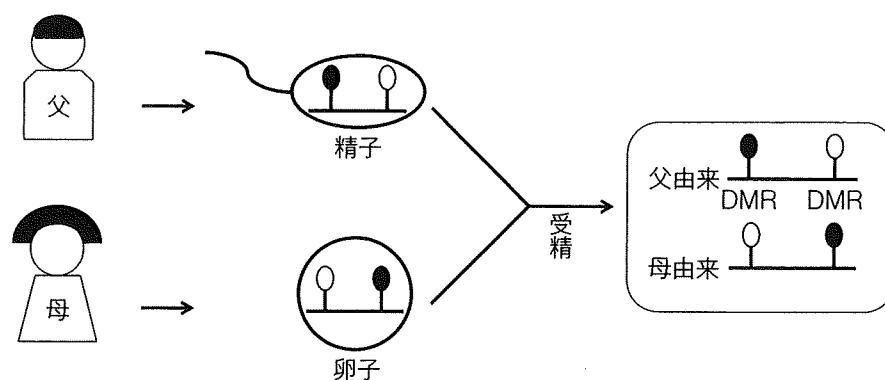


図1 メンデルの法則に従う遺伝子と刷り込み遺伝子との違い

- a : メンデルの法則に従う遺伝子の発現様式. 灰色四角は遺伝子, 矢印は転写を示す.
- b : 刷り込み遺伝子の発現様式. 白四角は父性発現, 黒四角は母性発現する刷り込み遺伝子を示す.
- c : 発生過程とICRのDMR形成. ICRにおいて, 精子と卵子に異なるDNAメチル化が生ずる. 受精後, このDNAメチル化はそのまま子の体細胞に引き継がれ, DMRを形成する. 黒丸はDNAメチル化領域, 白丸はDNA非メチル化領域を示す.

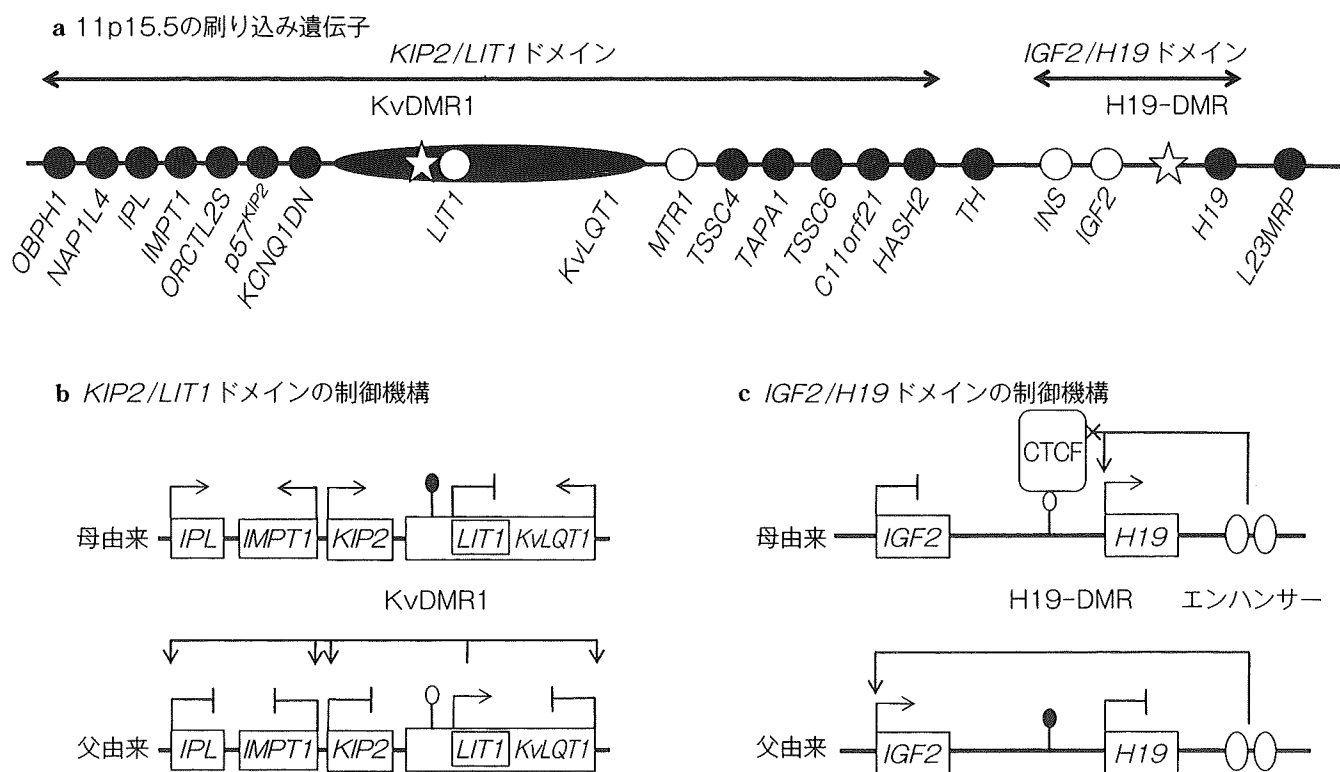


図2 BWSの責任遺伝子座11p15.5と刷り込み制御機構

- a : 11p15.5の刷り込み遺伝子。制御単位によって、KIP2/LIT1ドメイン、IGF2/H19ドメインの2つに分かれる。それぞれのICRは、KvDMR1とH19-DMRである。黒は母性発現、白は父性発現する刷り込み遺伝子、灰色はメンデルの法則に従う遺伝子である。星印は、KvDMR1とH19-DMRを示す。
- b : KIP2/LIT1ドメインの制御機構。詳細は本文参照。
- c : IGF2/H19ドメインの制御機構。詳細は本文参照。

メチル化が異なる特定のDNA領域をメチル化可変領域 (differentially methylated region : DMR) とよび、配偶子形成過程で確立されるものと受精後に確立される2種類がある。前者は精子と卵子の形成過程において互いに異なるメチル化状態となり、このメチル化の違いは、受精後も体細胞において維持される (図1-c)⁵⁾。また、多くの刷り込み遺伝子は単独で存在するのではなく、複数が集団をなして存在し刷り込みドメインを形成している。刷り込みドメイン内に存在し配偶子形成過程で確立されるDMRが、近傍の刷り込み遺伝子群をドメインレベルで制御する (刷り込み制御領域, imprinted control region : ICR)。ICRのDNAメチル化が親由来で異なることが、遺伝子発現に差を生じさせる原因なのである⁶⁾。

III 11p15.5領域の刷り込み遺伝子の制御機構

11p15.5に存在する刷り込み遺伝子を図2-aに示す。黒で示す遺伝子は母性発現を、白で示す遺伝子は父性発現を示す刷り込み遺伝子である。これらの刷り込み遺伝子は、発現制御メカニズムの違いから2つのドメインに分かれ、それぞれKIP2/LIT1ドメイン、IGF2/H19ドメインとよばれている。各ドメインはそれぞれ一つずつICRをもつ。KIP2/LIT1ドメインのICRは、KvLQT1のイントロンに存在するKvDMR1である (図2-a)。

KvDMR1は、母由来アレルでDNAメチル化、父由来アレルでDNA非メチル化を示す。

表2 日本と欧米のBWS発症原因別頻度

発症原因	日本 (%)	欧米 (%)
母由来 KvDMR1 のメチル化喪失	15/47 (32)	164/375 (44)
母由来 H19-DMR の高メチル化	0/47 (0)	40/428 (9)
父性片親性ダイソミー	7/47 (15)	69/428 (16)
p57 ^{KIP2} の変異	4/47 (9)	24/531 (5)
染色体異常	6/47 (13)	2/97 (2)
不明	15/47 (32)	71/278 (25)

(Sasaki K et al, 2007⁹⁾)

KvDMR1 はプロモーター活性をもち、*KvLQT1* と逆向きに *LIT1* を転写させる。母由来アレルの KvDMR1 はメチル化されているため、プロモーター活性が消失して母由来アレルの *LIT1* は発現せず、父由来アレルのみ発現する (父性発現)。 *LIT1* 転写物はタンパクに翻訳されない non-coding RNA で、父由来染色体上でシスに作用し、周辺の刷り込み遺伝子の父由来発現を抑制する。このため、刷り込み遺伝子は母性発現を示す (図 2-b)⁷⁾。

一方、*IGF2/H19* ドメインの ICR は、*H19* の上流 2~5 kb にある H19-DMR である (図 2-a)。 *H19* も *LIT1* と同様に non-coding RNA であるが、*KIP2/LIT1* ドメインとは異なり、刷り込み遺伝子の制御にはかかわっていない。 H19-DMR は、父由来アレルが DNA メチル化を受け、母由来アレルは DNA 非メチル化である (図 2-c)。 また、*H19* の下流には、*H19* と *IGF2* の両方のプロモーターに働き、転写を活性化させるエンハンサーが存在する。 H19-DMR には CTCF 結合領域が 6 カ所あり、非メチル化の母由来 H19-DMR のみに CTCF タンパクが結合して、インシュレーターとして機能する。エンハンサーはインシュレーターという障壁によって *IGF2* プロモーターに作用できないため、母由来アレルでは *IGF2* の転写を活性化できない。しかし、インシュレーター下流の *H19* には作用し転写を活性化する。一方、父由来 H19-DMR にはメチル化のため CTCF が結合できず、インシュレーター活性を示さない。

この場合、エンハンサーは *IGF2* に作用し、転写を活性化する。 H19-DMR のメチル化は *H19* プロモーターまで及ぶため、父由来 *H19* は発現が抑制される。結果的に、*IGF2* は父性発現、*H19* は母性発現を示す (図 2-c)²⁾。

IV BWS の分子生物学的発症機構

BWS でみられる異常を表 2 に示す⁸⁾。

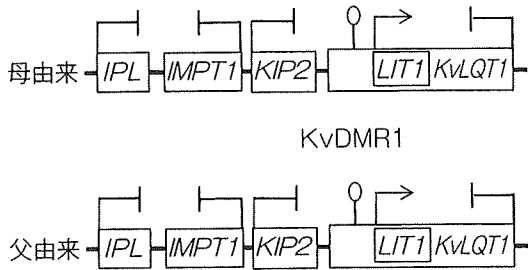
1. *KIP2/LIT1* ドメインにおける KvDMR1 のメチル化喪失

p57^{KIP2} (*KIP2*) は、CDK インヒビターであり、細胞周期を負に制御することから、このドメインにおける BWS 発症の中心的な役割を担うと考えられている。母由来 KvDMR1 のメチル化が喪失すると、母由来アレルが父型の制御を受ける。つまり、母由来アレルでも *LIT1* が発現し周辺の刷り込み遺伝子を抑制するのである。この結果、*KIP2* の発現低下を生じる (図 3-a)。増殖抑制因子である *KIP2* の転写が抑制されるため、増殖が過剰に活性化される。また、*KIP2* の機能を喪失するような遺伝子変異を示す例でも細胞増殖が過剰になる (図 3-c)⁷⁾。

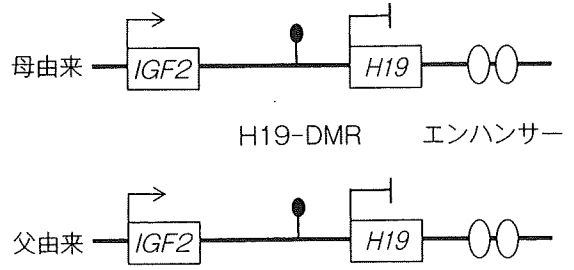
2. *IGF2/H19* ドメインにおける H19-DMR の高メチル化

IGF2 はインスリン様成長因子である。一方、*H19* は腫瘍抑制遺伝子として働くことが知られている。母由来 H19-DMR が高メチル化になると、母由来アレルが父型の制御を受ける。つまり、*IGF2* は両アレル発現を示し、*H19* は

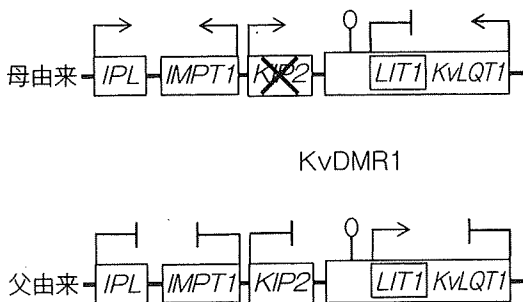
a 母由来KvDMR1のメチル化喪失



b 母由来H19-DMRの高メチル化



c $p57^{KIP2}$ の変異



d 父性片親性ダイソミー

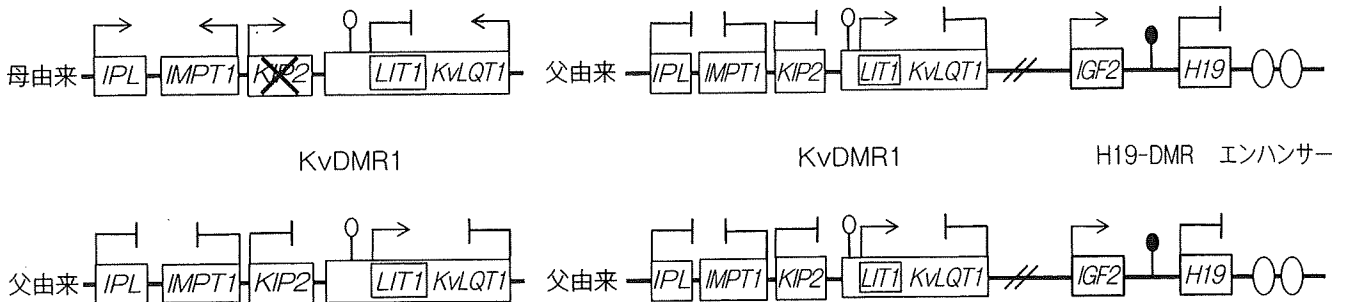


図3 BWSの分子生物学的発症機序

- a : 母由来 KvDMR1 のメチル化喪失. 母由来 KvDMR1 のメチル化喪失によって, 母由来遺伝子の発現様式が父由来遺伝子と同様となる.
- b : 母由来 H19-DMR の高メチル化. 母由来 H19-DMR の高メチル化によって, 母由来遺伝子の発現様式が父由来遺伝子と同様になる.
- c : $KIP2$ の変異. 変異が母由来の場合, 機能喪失した遺伝子が発現するため発症する.
- d : 父性片親性ダイソミー. $KIP2/LIT1$ ドメイン, $IGF2/H19$ ドメインともに父由来である.

両アレルとも転写されない(図3-b). この $IGF2$ の過剰発現は BWS の過成長を生じさせる²⁾.

3. 父性片親性ダイソミー (父性 UPD)

父性 UPD では, 11p15 領域が父由来アレルのみで構成され, 母由来アレルはない. ダイソミーを示す領域は, $KIP2/LIT1$ ドメインと $IGF2/H19$ ドメインの両方を含んでいる. そのため, $IGF2$ の過剰発現と $KIP2$ の発現低下が生じる(図3-d)²⁾. BWS 患児では, 正常細胞と父性 UPD 細胞とのモザイクとなっており, 組織によってモザイク率が異なる.

4. その他の異常

a. 重複と逆位・転座

重複によって 11p の部分トリソミーとなる. 重複領域は父由来であるため $IGF2$ の過剰発現が生じると考えられる. 逆位・転座は母由来である²⁾.

b. $LIT1$ 転写領域を含んだ微小欠失

KvDMR1 と $LIT1$ 転写領域を完全に含む微小欠失 (~250 kb) を示す症例が 1 例報告されている⁹⁾. 欠失領域に $KIP2$ は含まれていないが, 欠失を母から受け継ぐと $KIP2$ の発現が減少し発症する.

c. H19-DMR の微小欠失

いくつかの CTCF 結合部位が欠失するよう

な H19-DMR の微小欠失 (1~2 kb) も報告されている。この欠失が母由来である場合、母由来 H19-DMR の残存している CTCF 結合部位が高メチル化し、IGF2 の両アレル発現と H19 の発現低下を生じる。欠失によって CTCF 結合部位どうしの間隔が変化することにより高メチルを生じると示唆されているが、そのメカニズムは不明である¹⁰⁾。

d. 11p15.5 領域以外の ICR のメチル化異常

KvDMR1 のメチル化喪失を示す BWS 症例の約 20%において、他の領域に存在する複数の ICR (正常では母由来メチル化を示す) にメチル化の低下や喪失が見つかった。この中には、いくつかの臨床症状が BWS と共通する一過性新生児糖尿病の原因である刷り込み遺伝子 *PLAGL1* の ICR などが含まれており、そのメカニズムは不明だが興味深い¹¹⁾。

V 生殖補助医療 (ART) と BWS

近年、生殖補助医療によって生まれた子における刷り込み関連疾患の頻度が高くなるという報告があり、注目されている。米国での通常妊娠における BWS 出生頻度は 0.8%であるが、ART の場合は約 6 倍の 4.6%と高い。ART によって生まれた BWS 患者では、母由来 KvDMR1 のメチル化喪失、母由来 H19-DMR の高メチル化が報告され、ART に関連する手技が ICR のメチル化に影響を及ぼすことが推測されている¹²⁾。

VI 本邦における BWS 症例解析

当研究室で本邦 BWS 47 例を解析した (表 2)⁸⁾。欧米症例と比較すると、本邦例では、母由来 H19-DMR の高メチル化の頻度が低く、染色体異常を示す頻度が高かった。このことは、発症の原因となるメチル化異常や染色体異常の

起こりやすさが人種により異なる可能性を示唆する。しかし、欧米に比べると解析数が少ないため現在も本邦例の解析を行っている。

VII BWS のクリニカルマネージメント

1. 巨舌

過度の巨舌は、幼児期の食物摂取や呼吸の障害となる。また、下顎骨の成長が過剰に促進され咬合不正を引き起こす。さらに、発音障害の原因にもなる。このため舌縮小術を行う。舌縮小術は、美容や発音障害を緩和し、青年期の顎縮小術の必要性をなくす効果がある²⁾。

2. 胎児性腫瘍

BWS 患者は、思春期までに胎児性腫瘍を発症するリスクが高い。父性 UPD や H19-DMR の高メチル化は腫瘍発症リスクが高く、とくに Wilms 腫瘍を発症しやすい。一方、KvDMR1 のメチル化喪失では Wilms 腫瘍以外の腫瘍のリスクが高い。腹部の超音波検診やアルファフェトプロテイン (AFP) の血清レベルを定期的に測定することが推奨されている²⁾。

おわりに

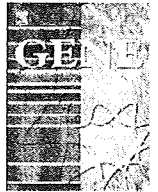
BWS では原因を特定できない患者が約 3 割を占める。ほとんどが末梢血の解析であり、病変部位を直接解析していないためとも考えられるが、未知の原因がある可能性も示唆される。さらなる症例の解析と、未知の原因の同定、刷り込みの分子制御メカニズムを明らかにすることが重要である。なお、当研究室では、無償で BWS の遺伝子解析を行っているので、希望される場合はご連絡いただきたい。

文献

- 1) Rump P et al : Tumor risk in Beckwith-Wiedemann syndrome : A review and meta-analysis. *Am J Med Genet* 2005 ; 136A : 95-104
- 2) Weksberg R, Shuman C, Smith AC : Beckwith-

- Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2005 ; 137C : 12-23
- 3) Giannoukakis N et al : Parental genomic imprinting of the human *IGF2* gene. *Nat Genet* 1993 ; 4 : 98-101
 - 4) Sekita Y et al : Role of retrotransposon-derived imprinted gene, *Rtl1*, in the feto-maternal interface of mouse placenta. *Nat Genet* 2008 ; 40 : 243-248
 - 5) Miyoshi N et al : The continuing quest to comprehend genomic imprinting. *Cytogenet Genome Res* 2006 ; 113 : 6-11
 - 6) Lewis A, Reik W : How imprinting centers work. *Cytogenet Genome Res* 2006 ; 113 : 81-89
 - 7) Higashimoto K et al : Imprinting disruption of the *CDKN1C/KCNQ1OT1* domain : The molecular mechanisms causing Beckwith-Wiedemann syndrome and cancer. *Cytogenet Genome Res* 2006 ; 113 : 306-312
 - 8) Sasaki K et al : Japanese and North American/European patients with Beckwith-Wiedemann syndrome have different frequencies of some epigenetic and genetic alterations. *Eur J Hum Genet* 2007 ; 15 : 1205-1210
 - 9) Niemitz EL et al : Microdeletion of *LIT1* in familial Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Hum Genet* 2004 ; 75 : 844-849
 - 10) Sparago A et al : Mechanisms causing imprinting defects in familial Beckwith-Wiedemann syndrome with Wilms' tumour. *Hum Mol Genet* 2007 ; 16 : 254-264
 - 11) Blik J et al : Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including *PLAGL1* and *GNAS* loci in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2009 ; 17 : 611-619
 - 12) DeBaun MR et al : Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of *LIT1* and *H19*. *Am J Hum Genet* 2003 ; 72 : 156-160

⊙ ⊙ ⊙



Developmentally dynamic changes of DNA methylation in the mouse *Snurf/Snrpn* gene

Kazumi Miyazaki^a, Christophe K. Mapendano^b, Tomokazu Fuchigami^c, Shinji Kondo^a, Tohru Ohta^d, Akira Kinoshita^b, Kazuhiro Tsukamoto^c, Ko-ichiro Yoshiura^b, Norio Niikawa^b, Tatsuya Kishino^{a,*}

^a Division of Functional Genomics, Center for Frontier Life Sciences, Nagasaki University, Sakamoto 1-12-4, Nagasaki 852-8523, Japan

^b Department of Human Genetics, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki, 852-8523, Japan

^c Department of Pharmacotherapeutics, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki, 852-8523, Japan

^d Research Institute of Personalized Health Sciences, Health Sciences University of Hokkaido, Hokkaido, 061-0293, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 August 2008

Received in revised form 9 November 2008

Accepted 16 November 2008

Available online 27 November 2008

Received by T. Sekiya

Keywords:

Imprinting

Snrpn

DNA methylation

DMR

Enhancer

ABSTRACT

The mouse *Snurf/Snrpn* gene has two differentially methylated regions (DMRs), the maternally methylated region at the 5' end (DMR1) and the paternally methylated region at the 3' end (DMR2). DMR1, a region that includes the *Snrpn* promoter and the entire intron 1, has been thought to be a germline DMR, which inherits the parental-specific methylation profile from the gametes. DMR1 is not only associated with imprinted *Snrpn* expression, but implicated in imprinting control of other genes in the region. We have now characterized the highly conserved activator sequence (CAS) in the *Snrpn* intron 1 among human and rodents and demonstrate that the mouse CAS is not a germline DMR but shows developmentally dynamic changes of DNA methylation and has methylation-sensitive enhancer activity. The tissue-specific methylation of the mouse CAS and its methylation-sensitive enhancer activity may control tissue-specific expression of IC transcripts, resulting in the establishment and/or maintenance of imprinting in the *Snrpn* locus.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Genomic imprinting is an important mechanism of gene regulation, which causes genetic nonequivalence in expression between maternal and paternal genomes in mammals. Such parent-of-origin specific gene regulation is caused by epigenetic modifications, which initially occur during gametogenesis without any nucleic acids changes (Surani, 1998; Tilghman, 1999). Epigenetic modifications in gametes continue to differentiate alleles of parental origin even after zygote formation, so that one parentally-derived allele eventually becomes preferentially expressed. One of the epigenetic modifications in imprinting is DNA methylation. DNA methylation can be stably inherited in somatic cells and reset in gametes. In the imprinted loci, differentially methylated regions (DMRs) between the maternal and paternal alleles are often found and associated with parent-allele-specific expression. For some imprinted loci, DMRs are gamete-derived methylated regions (germline DMRs), where DNA methylation in the gamete is maintained throughout

development in all somatic lineages. However, there exist secondary DMRs, which are acquired during development and associated with primary imprints in the gamete (Constancia et al. 1998). Although the primary DMRs are essential for establishment and maintenance of imprinting, which are associated with the imprinting center (IC) (Bourc'his et al. 2001; Hata et al. 2002), it is unknown whether the secondary DMRs directly control the imprinted expression or exist only as the consequence of an epigenetic event.

The mouse chromosome 7C is a large imprinted domain orthologous to the Prader-Willi syndrome (PWS)/Angelman syndrome (AS) critical region at human chromosome 15q11-q13. The imprinted domain 7C contains paternally expressed genes, *Snurf/Snrpn* (hereafter termed *Snrpn*), *Ndn*, *Magel2*, *Mkrn3* and C/D-box small nucleolar RNAs (snoRNAs), and the maternally expressed gene, *Ube3a* (Nicholls and Knepper, 2001). Imprinted expression within this large domain is coordinated by a bipartite cis-acting IC located upstream from the *Snrpn* gene. In the large imprinted domain, several DMRs have been identified. One of them is in the *Snrpn* locus, which has two DMRs (Fig. 1A), the 5' end methylated on the maternal allele (DMR1) and the 3' end methylated on the paternal allele (DMR2) (Shemer et al. 1997; Gabriel et al. 1998). DMR1 is a ~6 kb region containing the 5' end of the *Snrpn* gene and the entire *Snrpn* intron 1 (Fig. 1A). DMR2 is a 3.5-kb region spanning exons 7–10. Both DMR1 and DMR2 are thought as germline DMRs, which inherit the parental-specific methylation profile from the

Abbreviations: AS, Angelman syndrome; CAS, conserved activator sequence; ChIP, Chromatin immunoprecipitation; DHS, nuclease hypersensitive sites; DMR, differentially methylated region; IC, imprinting center; PWS, Prader-Willi syndrome; SMP, *Snrpn* minimal promoter; UPD, uniparental disomy.

* Corresponding author. Fax: +81 95 819 7178.

E-mail address: kishino@nagasaki-u.ac.jp (T. Kishino).

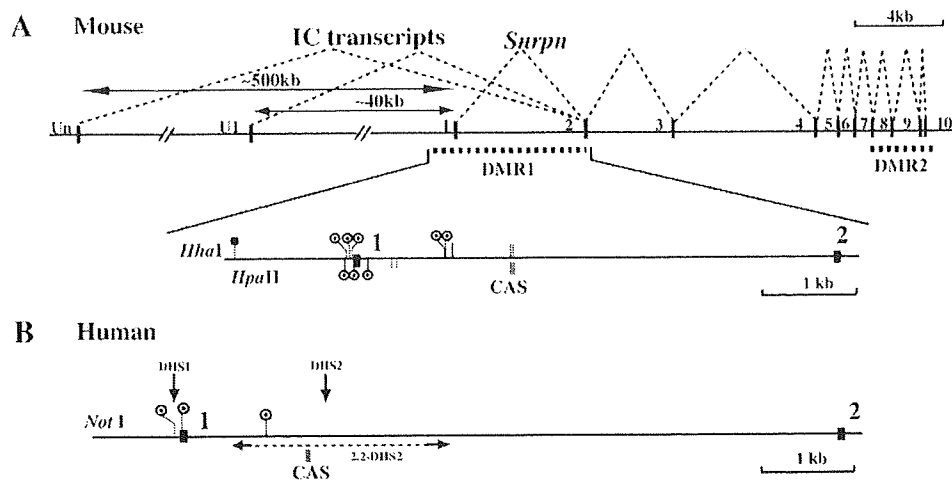


Fig. 1. Genomic organization and the DNA methylation pattern of the mouse (A) and human (B) *Snrpn/Snrpn* locus. Black and gray boxes indicate exons and the CAS region. (A) IC transcripts overlap with *Snrpn* except exon 1. Spliced exons except U exons in IC transcripts are omitted. Short vertical lines above and below the horizontal line indicate 8 *HhaI* and 5 *HpaII* sites in DMR1, respectively (GenBank accession. no. AC167813). (B) Short vertical lines above the horizontal line indicate 3 *NotI* sites in DMR1. Solid and dotted circles indicate biallelically methylated sites and maternal allele-specific methylated sites (Shemer et al. 1997; Lucifero et al. 2002; Glenn et al. 1996). The *Bss*III site is described as two *HhaI* sites with dotted circles.

gamete (Shemer et al. 1997). Since DMR1 contains the IC, the methylation status of DMR1 is not only associated with paternal-allele-specific expression of *Snrpn* but may be implicated in imprinting control of other genes in the region.

In the human *SNRPN* locus, parental origin-specific nuclease hypersensitive sites (DHSs) have been identified (Schweizer et al. 1999; Rodríguez-Jato et al. 2005). One of the paternal origin-specific DHSs is DHS1 in the *SNRPN* promoter and the other is DHS2 in *SNRPN* intron 1, roughly 1.5 kb downstream of the transcription initiation site (Fig. 1B). Differential methylation of the CpG island flanking DHS1 is well characterized as a maternal allele-specific DMR in the *SNRPN* promoter. The CpG island associated with DHS2 was reported to show maternal allele-specific methylation in lymphoblastoid cell lines (Rodríguez-Jato et al. 2005), and to be distinct and separate from the CpG rich region in intron 1, 0.9 kb downstream of the transcription initiation site, which was previously described as a DMR in fetal tissues (Fig. 1B) (Glenn et al. 1996). Interestingly, an intronic 2.2-kb fragment (2.2-DHS2) associated with DHS2 was found to enhance the activity of the *SNRPN* promoters (Rodríguez-Jato et al. 2005). The especially highly conserved sequence (CAS) in 2.2-DHS2 among human and rodent was identified to have enhancer activity in human (Fig. 1B). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis revealed that the CAS showed paternal chromatin-specific interaction with transcription factors (Rodríguez-Jato et al. 2005). These data suggest that the CAS may play a critical role in activating the paternally expressed imprinted genes in the domain. It remains unknown whether such an allele-specific interaction with transcription factors depends on allele-specific DNA methylation in the CAS and how imprinted transcripts in the *SNRPN* locus can be controlled by the enhancer activity of the CAS.

To investigate further functions of the CAS in the imprinting domain, we analyzed the methylation status of the mouse CAS and a methylation effect on the enhancer activity of the CAS. Our results show that the *Snrpn* promoter region in DMR1 is a germline DMR as previously reported (Shemer et al. 1997), whereas the mouse CAS is a secondary DMR, which is acquired in a tissue-specific manner during development and has the methylation-sensitive activator function.

2. Materials and methods

2.1. Tissues and cells used

All procedures in mice were performed with approval from the Nagasaki University Institutional Animal Care and Use Committee. F1

hybrid mice were obtained by mating C57BL/6 females with PWK males (C57BL/6×PWK), and vice versa (PWK×C57BL/6). Methods of primary cultures of cortical neurons, glial cells and embryonic fibroblasts were described elsewhere (Yamasaki et al. 2005). Oocytes and sperm collections were performed as described elsewhere (Mapendano et al. 2006; Yoshida et al. 1995).

2.2. DNA extraction from gametes, cells and tissues

To prepare oocyte DNA, about 400 pooled oocytes were resuspended in 160 μ L of 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 2 μ g of λ DNA, and 40 μ g of proteinase K and incubated for 3 h at 55°C, then extracted with phenol-chloroform and precipitated with ethanol. Blastocyst DNA was prepared from about 10–15 blastocysts with the same procedure. Sperm DNA was isolated by the two-digestion method as described (Yoshida et al. 1995). DNA from other embryos, tissues and human blood was extracted as described elsewhere (Yamasaki et al. 2005).

2.3. Sodium bisulfite treatment and sequencing

Sodium bisulfite treatment was carried out using EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research, Orange, CA). PCRs were carried out using bisulfite-treated DNA and each primer set. The following primer pairs were used for amplification: *Snrpn*-outsideF/*Snrpn*-outsideR for DMR1 (Lucifero et al. 2002); mCAS-F/mCAS-R for the mouse CAS; hCAS-F/hCAS-R for the human CAS. Primer sequences are as follows: mCAS-F 5'-TGGGGAGGGTTTATTGTTT-3'; mCAS-R 5'-ATAACATCCTAAATTTTAT CAAAATCAT-3'; hCAS-F 5'-TTGGGAAT-TAGGTTTTGGAAGGTT-3'; hCAS-R 5'-ACCTACCCCTCCCCACTAAC-3'. The amplification protocol was as follows: denaturation at 94°C for 6 min, followed by 40 cycles at 94°C for 1 min, 55°C for 2 min, 72°C for 2 min, and final elongation at 72°C for 10 min. PCR products were ligated into PCR2.1 vector by TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) and sequenced on ABI PRISM Model3100.

2.4. Reporter gene construction, methylation, and reporter gene transfection assay

The *Snrpn* promoter regions and the CAS were amplified with following primers: *Snrpn*L-F/*Snrpn*L-R for the *Snrpn* promoter; SMP-F/SMP-R for the SMP; U1-F/U1-R for the U1 promoter; mCASL-F/mCASL-R for the CAS. Primer sequences are as follows. *Snrpn*L-F 5'-

AAGCCCTGTCTCTAAAACCAAC-3', SnrpnL-R 5'-CTTCCTCGCTCCATTGC-GTTG-3', SMP-F 5'-CGAGCTCAAATGTGCGCATGTGCAGCC-3', SMP-R 5'-GCTCGAGCTTCTCGCTCCATTGCGTTG-3', U1-F 5'-CGAGCTCATT-CATCAAAATGAAAATCAATA-3', U1-R 5'-CCGCTCGAGCTTGGTTGCTG-CATTGCTTG-3', mCASL-F 5'-AGATCTAAGGGGCTGTCGTCATGTC-3', mCASL-R 5'-AGATCTGTATACGCCATGCTCGCC-3'.

PCR products were directly ligated into PCR2.1 vector by TOPO TA Cloning Kit, followed by *SacI*/*XhoI* double digestion for the *Snrpn* promoter, SMP and the U1 promoter, and by *BglII* digestion for the CAS. The *SacI*/*XhoI* digested products were cloned into the *SacI*/*XhoI* sites upstream of the firefly luciferase gene and the *BglII* digested product was into the *Bam*HI site downstream of the firefly luciferase gene of pGL4.10 (Promega, Madison, WI). *In vitro* methylation of the constructs, plasmids (10 µg) were incubated for 1 h at 37°C in the presence or absence (control, mock) of *HhaI* and *SssI* methylase (New England BioLabs, Beverly, MA). Plasmids were transfected into Neuro2a cells, using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). The pGL4.70, encoding the renilla luciferase gene (Promega) was cotransfected as an internal control for transfection efficiency. Transfected cells were harvested after 24 h and used for measuring firefly and renilla luciferase activities in Dual-Luciferase Assay system (Promega). Reporter activity was normalized by calculating the ratio of firefly to renilla values. For each construct, the average and standard error of the means were calculated in 6 independent transfections.

3. Results and discussion

3.1. The mouse CAS shows developmental stage-specific methylation and maternal allele-specific methylation in the brain

It has been confirmed by many experiments that maternal allele-specific DNA methylation of the *Snrpn* promoter region in DMR1 originates from the egg and is maintained throughout development

(Shemer et al. 1997). However, the methylation pattern of the *Snrpn* intron 1 in DMR1 has not been precisely analyzed except in several recognition sites of methylation-sensitive restriction enzymes, *Bss*HII and *HhaI* (Fig. 1A) (Shemer et al. 1997; Gabriel et al. 1998). We first performed methylation analysis of the *Snrpn* promoter region and the mouse CAS in the *Snrpn* intron 1, which is located ~1.8 kb downstream of the *Snrpn* transcription initiation site. Parental origin of the alleles was identified by polymorphic sites in F1 hybrids between C57BL/6 and PWK strains (divergent strains of *Mus musculus*). Allele-specific methylation of 16 CpGs in the promoter and 7 CpGs in the CAS was examined using polymorphisms in PCR products of bisulfite-modified DNA. Sequencing of clones from the PCR products revealed maternal allele-specific methylation of the promoter region in the gametes and somatic tissues (data not shown) as previously reported (Shemer et al. 1997), whereas the CAS showed a different methylation pattern depending on tissues (Fig. 2). In oocytes and sperm, all 7 CpGs in the CAS were not methylated (Fig. 2A). In blastocysts, the maternal allele was slightly methylated, and completely methylated in the whole embryo at embryonic day (E) 9.5. In contrast, the paternal allele was not methylated in blastocysts and the whole embryos at E9.5, and moderately methylated in the embryonic liver and muscle at E15. In the embryonic brain, the paternal allele was almost unmethylated. In the adult brain, the CAS was not methylated on the paternal allele, while in the adult liver, muscle, kidney, and blood, they were biallelically methylated (Fig. 2B). These data indicate that the CAS is a secondary DMR, which is acquired in a tissue-specific manner during development. These results do not conflict with the previous methylation profile of DMR1, reported by Shemer et al. (1997). They detected differential methylation of the *HhaI* site in the CAS in ES cells and brains. In their Southern blot, the CAS is exclusively unmethylated in androgenetic ES cells, while in the parthenogenetic ES cells, the CAS is not completely methylated, although they concluded the maternal allele-specific methylation. The reason why the CAS in parthenogenetic ES cells showed almost methylated might be that the maternal

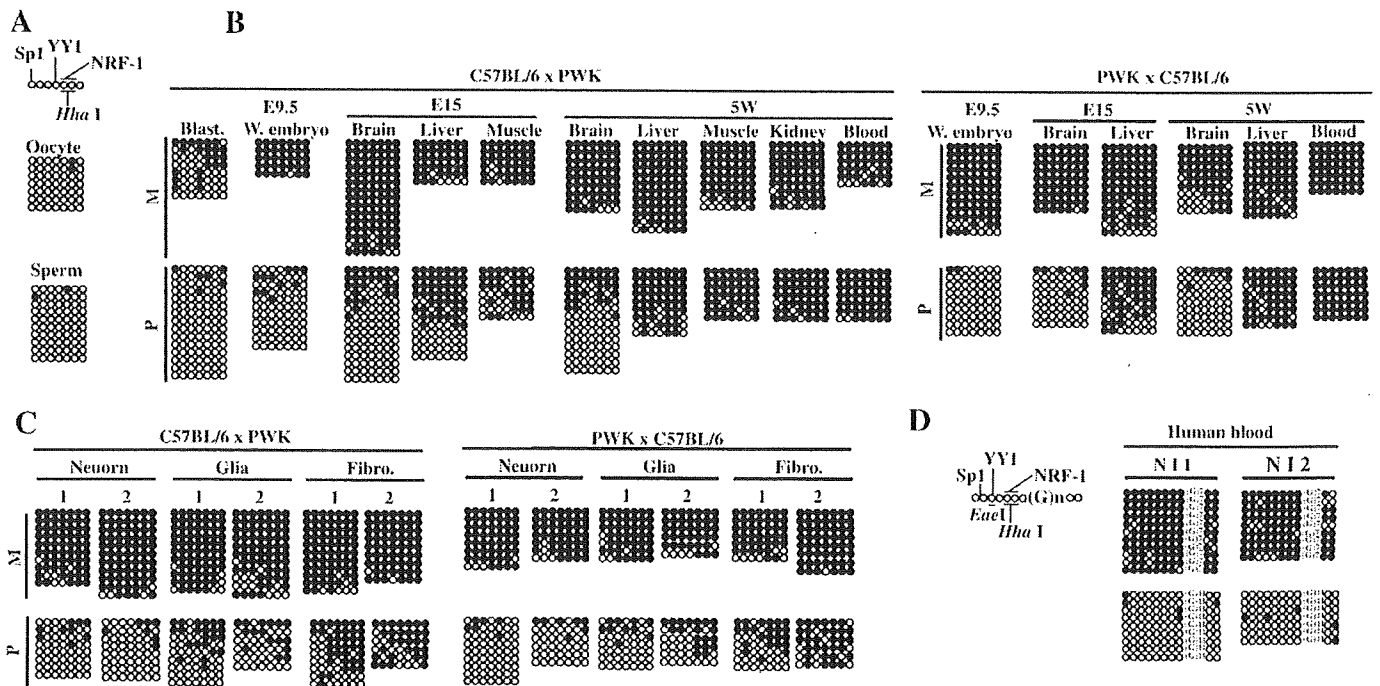


Fig. 2. Methylation of CpG dinucleotides in the CAS in gametes, tissues and culture cells in mice (A, B, C) and in human lymphocytes (D). Each row of dots represents the series of CpGs in an individual sequence molecule, in which methylated CpGs are shown as solid circles and unmethylated CpG as open circles. (A) Mouse oocytes and sperm. The properties of the mouse CAS are displayed at the top of the figure. (B) Embryonic and adult tissues of F1 hybrid mice. Blast.: Blastocyst, W.embryo: Whole embryo, M: maternal allele, P: paternal allele. (C) Culture cells. Two independent sets (1, 2) of each type of culture cells were used for methylation analysis in the CAS. Fibro.: embryonic fibroblasts. (D) Human peripheral blood from normal individuals (NI1 and NI2). The properties of the human CAS are displayed at the left of the figure.

allele in the CAS tends to rapidly acquire DNA methylation after the genome-wide demethylation, even if the parthenogenetic ES cells keep their multipotency during *in vitro* culture.

3.2. Allele-specific methylation of the mouse CAS is not neuron-specific in culture cells

In the embryonic and adult brains, most clones from the paternal alleles at the mouse CAS were not methylated but small numbers of clones were methylated, especially in the F1 hybrid (C57BL/6×PWK) brain. To know the cell origin of the methylated clones, we analyzed the methylation status in cultured neurons, glial cells and embryonic fibroblasts, which were separately cultured from embryonic tissues at E15.5 (Yamasaki et al. 2005). Prior to the analysis, we confirmed by immunostaining with the brain precursor, neuronal and glial makers that over 95% of the two cultured cell types were postmitotic neurons and astrocytes, respectively (data not shown). In neurons and glial cells, most clones from the paternal allele were not methylated, but more methylated clones were detected in glial cells than in neurons, while in the embryonic fibroblasts, many but not all of the paternal clones were methylated (Fig. 2C). We could not detect distinct differences in the methylation profile between cultured neurons and glial cells, as we previously reported in *Igf2r* DMR2 (Yamasaki et al. 2005). Although we could not completely deny the possibility that the tissue-specific methylation profile might not be stably established during *in vitro* differentiation in the embryonic cell culture, these data suggest that the paternal allele escapes methylation during neurogenesis and gliogenesis.

3.3. The human CAS shows allele-specific methylation in the normal lymphocyte

The methylation pattern of the human CAS has previously been reported using genomic DNA from the cell lines derived from uniparental disomy (UPD) patients of PWS and AS (Rodríguez-Jato et al. 2005). Because our bisulfite methylation analysis revealed that the CAS is biallelically methylated in most adult tissues including the lymphocytes in mice, we tried to confirm the methylation status of the human CAS in the normal lymphocyte. A G-nucleotide number polymorphism (Gn; n = 7,11) was used to differentiate parental alleles in two normal individuals. We could not identify the parental origin of

the alleles because no parental DNA was available, however, the human CAS showed allele-specific methylation in the human peripheral blood lymphocyte (Fig. 2D). We also examined allele-specific methylation in tissues of seven fetuses, but failed to prove it because we could not find any polymorphic sites flanking the CAS in the samples. Although based on a limited number of samples, our data about allele-specific methylation in the normal lymphocyte, in addition to the previous report about the maternal allele-specific methylation in the cell line of UPD patients, strongly suggests that the human CAS is a DMR in differentiated tissues.

3.4. The mouse CAS has a methylation-sensitive activator function

The human CAS was reported not only to activate the *SNRPN* promoter, but also the heterologous promoters in transient expression assays (Rodríguez-Jato et al. 2005). To see if the mouse CAS also has such a promoter activating function, transient expression assays were performed in mouse neuroblastoma Neuro2a cells (Fig. 3). The entire 80 bp of the mouse CAS was inserted to luciferase reporter constructs that include a 754-bp segment of the *Snrpn* promoter (from positions -679 to +75) or a 159-bp segment of the *Snrpn* minimal promoter (SMP) (from positions -84 to +75) (Hershko et al. 1999). Constructs in which the mouse CAS was cloned downstream from the mouse *Snrpn* promoter or the SMP showed approximately 3.5-fold increase in reporter activity, compared with control constructs lacking the mouse CAS. Similar results were obtained independent of orientation and position of the CAS in Neuro2a (data not shown).

Since the mouse CAS shows the tissue-specific and developmental stage-specific methylation, an effect of methylation on the promoter activation function was examined. The methylation effect on two *HhaI* sites in the mouse CAS was analyzed in the constructs with the *Snrpn* upstream promoter U1 (Fig. 1A), because the U1 promoter sequence has no *HhaI* sites. The U1 promoter region was cloned into a luciferase reporter construct that included the CAS positioned downstream of the reporter in the forward orientation. Transient expression assays revealed that the U1 promoter was activated by the CAS relative to a construct lacking the CAS (5.5 fold). *In vitro* methylation by *HhaI* methylase prior to transfection of Neuro2a cells activated the U1 promoter activity to a less extent (2 fold) than no methylation in the CAS. *In vitro* methylation of the five CpGs within the U1 promoter and seven CpGs within the CAS by *SssI* methylase resulted in a complete

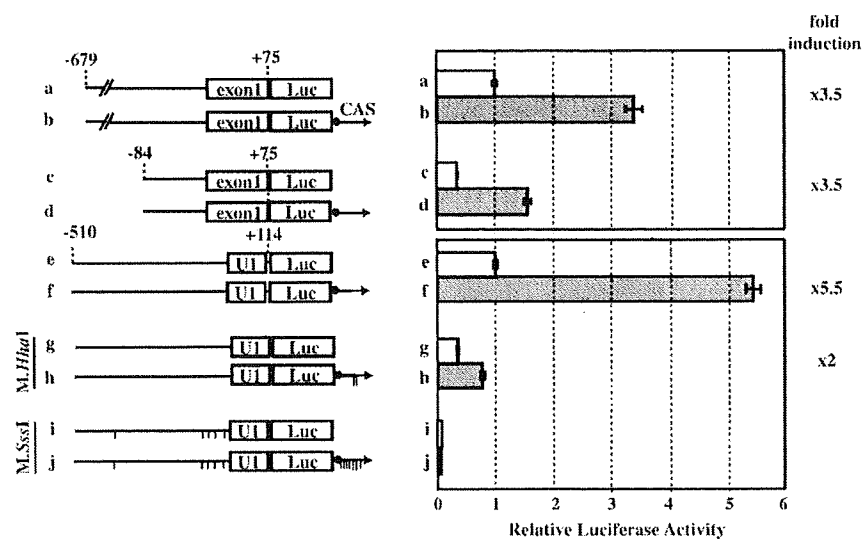


Fig. 3. Methylation-sensitive enhancer activity of the mouse CAS. Reporter constructs with the *Snrpn* promoter (a, b), the *Snrpn* minimal promoter (c, d), and the U1 promoter (e, f, g, h, i, j) lacking or carrying the mouse CAS (arrow) were assayed by transient expression assays. In the constructs (g, h, i, j), *in vitro* methylation with *HhaI* (g, h) or *SssI* (i, j) methylases was performed. Short vertical lines below the lines and arrows (h, i, j) indicate methylated CpGs. The constructs containing the *Snrpn* promoters (a), or the U1 promoter (e) without the CAS are arbitrarily assigned the value 1. The fold increase induced by the CAS or *in vitro* methylated CAS is indicated on the right.

shut-off of the promoter activity. These data indicate that the mouse CAS has the promoter activation function and its activity depends partially on the methylation status of the *Hhal* sites in the CAS.

In the human and rodent CAS, potential binding sites for transcription factors Sp1, YY1, and NRF-1 are highly conserved (Rodríguez-Jato et al. 2005). It is reasonable in our study that methylation of the two *Hhal* sites at the NRF-1 binding sequence directly decreased the enhancer activity because of methylation-sensitive binding of NRF-1 (Smith et al. 2004), however the fact that the CAS with methylated NRF-1 binding site still have enhancer activity suggests other factors including Sp1 and YY1 may coordinately constitute the enhancer complex at the paternal CAS.

In addition to the methylation-sensitive enhancer activity, the evidence that the mouse CAS is not methylated in oocytes and not methylated on the paternal allele in the brain, correlates with tissue-specific expression of IC transcripts, which initiate in U exons (Un) that are distributed in a 500-kb region upstream of *Snrpn* and overlap with *Snrpn* exons except exon 1 (Fig. 1A). In mice, IC transcripts are exclusively expressed in the ovary and brain, especially in oocytes and neurons (Mapendano et al. 2006), where the CAS is unmethylated and differentially methylated, respectively (Fig. 2A, C). The function of IC transcripts remains unknown, but the tissue-specific methylation of the mouse CAS and its methylation-sensitive enhancer activity may control tissue-specific expression of IC transcripts, resulting in the establishment of imprinting in oocytes (Mapendano et al. 2006) and neuron-specific imprinting of *Ube3a* in the brain, possibly by the antisense *Ube3a* transcript as a part of IC transcripts.

On the other hand, in human, there is no simple correlation of expression level of the IC transcripts and the CAS methylation. IC transcripts are expressed in some tissues including adult heart, brain, and ovary, but not in blood (Dittrich et al. 1996), where the CAS is differentially methylated (Fig. 2D) and associated with allele-specific histone modifications and interactions with multiple regulatory proteins (Rodríguez-Jato et al. 2005). Such difference in DNA methylation in the CAS and expression of IC transcripts between human and mouse may support divergency of imprinting mechanism among species (Johnstone et al. 2006). The targeted replacement of the mouse PWS-IC with the equivalent human region in mice failed to maintain methylation on the maternal allele in somatic tissues and to protect the upstream genes (*Ndn* and *Mkrn3*) during *de novo* methylation in early embryogenesis (Johnstone et al. 2006). They suggested that the factors responsible for postzygotic maintenance of the imprint have diverged between human and mouse. Because their targeted PWS-IC region contains the CAS, where methylation is postzygotically acquired in mice, methylation status of the substituted CAS might be altered in oocyte and/or in early embryogenesis, resulting in failure of maintenance of imprinting. It is still controversial in human whether the methylation imprint at the *SNRPN* promoter region is established in ovulated oocyte or during/after fertilization (El-Maarri et al. 2001; Geuns et al. 2003), however the timing of DNA methylation acquisition at the substituted CAS in the targeted mouse will clarify the basic difference in imprinting machinery among human and rodents.

In conclusion, we have demonstrated that the *Snrpn* intron 1, which was previously thought to be a part of a germline DMR in mouse, shows developmentally dynamic changes of DNA methylation in mouse, and has

the methylation-sensitive enhancer activity. The tissue-specific methylation of the mouse CAS and its methylation-sensitive enhancer activity may control tissue-specific expression of IC transcripts, resulting in the establishment and/or maintenance of imprinting in the *Snrpn* locus.

Acknowledgements

T.K. was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) and that on Priority Areas from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. T.K. and M.K. were supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from Nagasaki University, Japan.

References

- Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, R., Bestor, T.H., 2001. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294, 2536–2539.
- Constancia, M., Pickard, B., Kelsey, G., Reik, W., 1998. Imprinting mechanisms. *Genome Res.* 8, 881–900.
- Dittrich, B., et al., 1996. Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the *SNRPN* gene. *Nat. Genet.* 14, 163–170.
- El-Maarri, O., et al., 2001. Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization. *Nat. Genet.* 27, 341–344.
- Gabriel, J.M., Gray, T.A., Stubbs, L., Saitoh, S., Ohta, T., Nicholls, R.D., 1998. Structure and function correlations at the imprinted mouse *Snrpn* locus. *Mamm. Genome.* 9, 788–793.
- Geuns, E., De Rycke, M., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., 2003. Methylation imprints of the imprint control region of the *SNRPN*-gene in human gametes and preimplantation embryos. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2873–2879.
- Glenn, C.C., et al., 1996. Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human *SNRPN* gene. *Am. J. Hum. Genet.* 58, 335–346.
- Hata, K., Okano, M., Lei, H., Li, E., 2002. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of *de novo* DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, 129, 1983–1993.
- Hershko, A., Razin, A., Shemer, R., 1999. Imprinted methylation and its effect on expression of the mouse *Zfp127* gene. *Gene*, 234, 323–327.
- Johnstone, A., DuBose, A.J., Futtner, C.R., Elmore, M.D., Brannan, C.I., Resnick, J.L., 2006. A human imprinting centre demonstrates conserved acquisition but diverged maintenance of imprinting in a mouse model for Angelman syndrome imprinting defects. *Hum. Mol. Genet.* 15, 393–404.
- Lucifero, D., Mertineit, C., Clarke, H.J., Bestor, T.H., Trasler, J.M., 2002. Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics* 79, 530–538.
- Mapendano, C.K., et al., 2006. Expression of the *Snrnf-Snrpn* IC transcript in the oocyte and its putative role in the imprinting establishment of the mouse 7C imprinting domain. *J. Hum. Genet.* 51, 236–243.
- Nicholls, R.D., Knepper, J.L., 2001. Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2, 153–175.
- Rodríguez-Jato, S., Nicholls, R.D., Driscoll, D.J., Yang, T.P., 2005. Characterization of cis- and trans-acting elements in the imprinted human *SNURF-SNRPN* locus. *Nucleic Acids Res.* 33, 4740–4753.
- Schweizer, J., Zynger, D., Francke, U., 1999. In vivo nuclease hypersensitivity studies reveal multiple sites of parental origin-dependent differential chromatin conformation in the 150 kb *SNRPN* transcription unit. *Hum. Mol. Genet.* 8, 555–566.
- Shemer, R., Birger, Y., Riggs, A.D., Razin, A., 1997. Structure of the imprinted mouse *Snrpn* gene and establishment of its parental-specific methylation pattern. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 10267–10272.
- Smith, K.T., Coffee, B., Reines, D., 2004. Occupancy and synergistic activation of the *FMR1* promoter by Nr1 and Sp1 in vivo. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1611–1621.
- Surani, M.A., 1998. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. *Cell* 93, 309–312.
- Tilghman, S.M., 1999. The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell* 96, 185–193.
- Yamasaki, Y., et al., 2005. Neuron-specific relaxation of *Igf2r* imprinting is associated with neuron-specific histone modifications and lack of its antisense transcript *Air*. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2511–2520.
- Yoshida, K., et al., 1995. The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen. *Forensic Sci. Int.* 72, 25–33.