

マウス体細胞、配偶子、野生型および雄性発生胚由来 ES 細胞における *H19* 遺伝子 5' 上流のメチル化の状態

加 藤 博 己^{1,3}、村 上 秀 樹²、川 澄 みゆり²、國 枝 孝 典²、
奥 野 学²、岸 本 学²、相 馬 学²、岩 井 大 悟²、
安 齋 政 幸¹、三 谷 匡¹、松 本 和 也^{1,2,3}、佐 伯 和 弘^{1,2,3}、
細 井 美 彦^{1,2,3}、入 谷 明^{1,2,3}

要 約

哺乳動物において、その発生の途上において重要ないくつかの遺伝子は、ゲノム刷り込みの影響を受ける。本研究では、父親由来のゲノム刷り込みの個体発生に対する影響を検討する第一段階として、マウス雌雄体細胞、精子、卵子、野生型および雄性発生胚由来 ES 細胞における *H19* 遺伝子の 5' 上流に存在する DMR における CpG のメチル化の状態を解析した。その結果、雄性発生胚由来 ES 細胞における DMR の 5' 上流部分の CpG は、精子と同様に高度にメチル化されていた。しかしながら、DMR の 3' 下流部分の CpG は、雄性発生胚由来 ES 細胞において、既にそのメチル化パターンは、雄性配偶子である精子とは異なることが観察された。

緒 言

哺乳動物においては、いくつかの遺伝子はその遺伝子座がどちらの親に由来したのかによって発現が制御される。また、各親由来のゲノムセットは機能的に等価ではない。この各親由来のゲノムセットの機能的な非等価は、各親由来の配偶子特異的なゲノムのエピジェネティックな修飾によってもたらされている。この現象は“Genomic Imprinting”（ゲノム刷り込み）と呼ばれ、これらの刷り込みを受けた遺伝子は、個体発生の中で重要な役割を演じていることが知られている（1）。

胚性幹細胞（ES 細胞）は、胚盤胞期胚の内細胞塊に由来する、多分化能を持つ細胞である。ほ乳類におけるゲノム刷り込みの個体発生に対する影響を研究するための手段として、単一の親由来のゲノムを持つ胚盤胞期胚から作製され、多分化能を持つ ES 細胞は、有効なツールとなる。

父親由来または母親由来のゲノムの持つ役割の非等価性については、マウス単為発生胚や雌性・雄性発生胚およびそれらに由来する ES 細胞等を用いた実験から報告されている（2, 3, 4）。さらに、マウス単為発生胚や雄性発生胚に由来する胚性線維芽細胞を用いた実験において、父親由来のゲノムのみを持つ細胞は、通常の両親性のゲノムを持つ細胞に比較して、細胞周期が短時間で回転し、増殖が速いと同時に継代回数が低い状態でも細胞のガン化が自然に起こる。これに対して、母親由来のゲノムのみを持つ細胞は、増殖が遅く、老化して死滅することが報告されている（5）。

マウス雄性発生胚から ES 細胞を作製し、それをマウス生体の皮下に注入して組織への分化を調べた研究では、通常の両親性の胚に由来する ES 細胞では 3 胚葉性の組織が散見されるのに対して、雄性発生胚由来の ES 細胞ではマウス生体の皮下においてほぼ全てが横紋筋へ分化し、かつ、腫瘍化した。また、同様の雄性発生胚由来の ES 細胞を胚盤胞期胚へ注入することにより、キメラ産子も得られているが、多くのキメラは産後まもなく死亡し、生残した産子においても、骨格異常が顕著であったと報告されて

1. 近畿大学先端技術総合研究所、〒 642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14 - 1

2. 近畿大学生物理工学部遺伝子工学科、〒 649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. 財団法人わかやま産業振興財団、〒 649-6261 和歌山県和歌山市小倉 60

いる (5, 6, 7)。

ES 細胞を胚盤胞期胚から作製するためには、その内細胞塊を数日にわたってフィーダー細胞上で培養し、数回にわたって継代することがおこなわれている。しかし、培養細胞におけるゲノム中の CpG 配列のメチル化に関する最近の研究では、CpG 配列のメチル化パターンは、細胞培養の間に変わることがわかっている (8)。

本研究では、雄性発生胚由来の ES 細胞において、ゲノム中の CpG 配列のメチル化パターンが、ES 細胞株の樹立から継代培養後にいたるまで、よく維持されているかどうかを検討した。材料としては、マウス雌雄体細胞組織、雄性・雌性配偶子、野生型および雄性発生胚由来の ES 細胞を用い、それらから抽出されたゲノム DNA 中の *H19* 遺伝子の 5' 上流のインプリント制御領域である Differentially Methylated Region (DMR) における CpG のメチル化の状態を決定し、得られた結果を比較した。

材 料 と 方 法

マウス 2 倍体雄性発生胚由来 ES 細胞の作製

マウス 2 倍体雄性発生胚由来 ES 細胞は、BDF1 マウス (C57BL/6N x DBA/2N) の未受精卵子を除核し、さらに透明帯の一部を切開し、その後 BDF1 マウスの精子を用いた体外受精によって精子が 2 匹侵入した受精卵から確立された。体外受精後、2 つの雄性前核を持つ受精卵を選択し、mWM 培養液中で 4 ~ 5 日間培養した。マウス 2 倍体雄性発生胚盤胞期胚の内細胞塊 (ICM) を免疫手術によって分離し、分離された ICM をマウス ES 細胞樹立のための定法に従って、不活性処理をおこなったマウス胚性線維芽細胞上で培養を継続した。10 代継代培養をかさねたマウス雄性発生胚由来 ES 細胞を実験に供した。

各種組織・細胞からのゲノム DNA の回収

BDF1 マウスの雌雄尾部組織を雌雄体細胞組織とし、定法に従って、ProteinaseK および SDS を用いて組織 / 細胞を溶解し、Phenol/Chloroform 処理をおこなってタンパク質を除去し、その後エタノール沈殿によってゲノム DNA を回収した。BDF1 マウスの精子については、雄マウスの精巣上体尾部から浮遊精子として回収された精子を凍結し、-80℃で保存されたサンプルより QIAGEN DNeasy®Tissue Kit (#69504) を用いてゲノム DNA を回収した。BDF1 マウスの卵子については、雌マウスの卵巣から GV 期卵子を回収し、0.3%BSA 添加 TCM199 (Earls' salts) 中で 24 時間培養して MII 期となった卵子を -80℃で凍結して保存されたサンプルより、ProteinaseK および SDS を用いて卵子を溶解し、Phenol/Chloroform 処理をおこなってタンパク質を除去し、その後エタノール沈殿によってゲノム DNA を回収した。BDF1 マウス (C57BL/6N x DBA/2N) の野生型 ES 細胞およびマウス雄性発生胚由来 ES 細胞からは、卵子と同様に、ProteinaseK および SDS を用いて細胞を溶解し、Phenol/Chloroform 処理をおこなってタンパク質を除去し、その後エタノール沈殿によってゲノム DNA を回収した。

制限酵素処理

各サンプルから回収されたゲノム DNA 3 μ g を制限酵素 Xho1 (TaKaRa, 1094AH) を用いて 37℃、overnight で処理した。処理後、1 % アガロースゲル (Invitrogen, Ultra Pure Agarose-1000, 10975-035) を用いて電気泳動をおこない、制限酵素によってゲノム DNA が切断されたことを確認した。ゲノム DNA が切断されたことが確認されたサンプルについて、Phenol/Chloroform 処理をおこない、制限酵素を不活性化して除去した。

Bisulfite 処理

制限酵素処理後のゲノム DNA ($3\mu\text{g}/50\mu\text{l DW}$) に $5.5\mu\text{l}$ の 3M NaOH を加え、 37°C で 25 分間培養した。その後、 $30\mu\text{l}$ の 10mM hydroquinone を加え、続いて、 $3.6\text{M sodium hydrogensulfite}$ を $520\mu\text{l}$ 加えて、よく混合した。この溶液の表面を完全に覆うようにミネラルオイルを滴下し、 55°C で 16 時間、遮光して培養した。培養後、上層のミネラルオイルを吸い取らないように注意しながら、下層の bisulfite 反応液を吸い取り、新しい 2ml tube に反応液を移した。反応液の入った tube に Resin (Promega, Wizard PCR Preps DNA Purification System, A2180) 1ml を加えた後、20 秒間よく転倒混和した。プランジャーを外した状態のシリンジをカラムにねじ込み、新しい 2ml tube にカラムを下にして立て、Resin と混合させた反応液をシリンジに加えた。シリンジにプランジャーを装着し、ゆっくり押し、カラムからシリンジを外した後、プランジャーを外し、シリンジをカラムにねじ込み、新しい 2ml tube にカラムを再度セットし、シリンジに 80% 2-Propanol を 2ml 加え、再びプランジャーを装着してゆっくり押し、カラムに含まれる余分な塩を除去した。次に新しい 1.5ml tube にカラムをセットして、室温で、 $10,000\times g$, 20 秒間遠心し、Resin を乾燥させた。そして新しい 1.5ml tube にカラムをセットして 65°C に温めた $50\mu\text{l}$ の DW をカラムに加えて 1 分間培養し、カラムを tube ごと室温で、 $10,000\times g$, 1 分間 遠心して、 1.5ml tube に落ちてきた DNA 溶液を回収した。溶出してきた DNA 溶液に 3M NaOH を $5.5\mu\text{l}$ 加えて 37°C で 20 分間培養した。培養後エタノール沈殿操作をおこなって $20\mu\text{l}$ の TE に溶解し、 -25°C で保存した。

PCR

PCR には Ex Taq Polymerase (Hot start version) (TaKaRa, RR006A) を用いた。PCR のプロトコルは表 1 . および図 1 . のようにおこなった。

表 1 . PCR mixture

DW for plasmid	18.875 μl
10 \times Ex Taq Buffer	2.5 μl
dNTP MIX	2 μl
Primer Forward	0.25 μl
Reverse	0.25 μl
Ex Taq Polymerase (Hot start version)	0.125 μl
DNA sample	1 μl
Total	25 μl

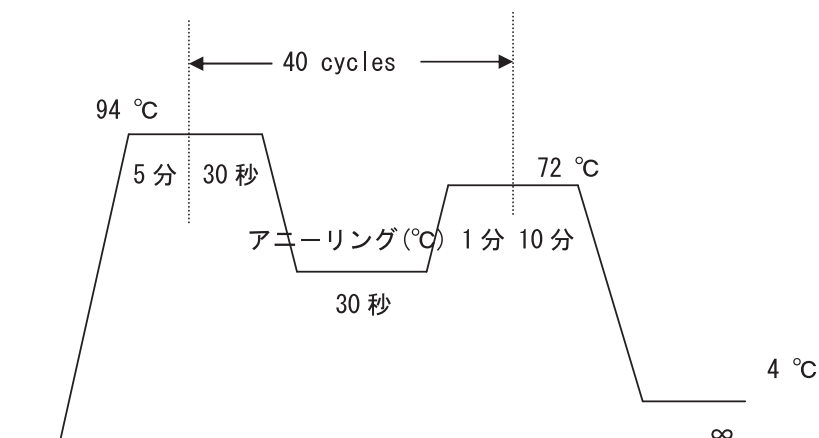


図 1 . PCR サイクル

アニーリング温度は、使用するプライマーの T_m 値に依存して変化させた。また、First PCR をおこなった後、必ず Second PCR で、Semi-nested PCR または Nested PCR をおこない、さらに目的とするバンドを増幅した。PCR で目的とする DNA 断片の増幅がされたか否かの確認のために、2 % アガロース (Invitrogen, Ultra Pure Agarose-1000, 10975-035) in TBE のゲルで電気泳動をおこなった。

使用したプライマーの配列は以下の表 2. に示した。

表 2. Bisulfite 処理後の PCR に使用したプライマーリスト

名称	配列 (5' ———3')
1401F	TTTTGAATTATTATAAGGAA
1805F	TAATAAGGTTGGTTTATTTT
2111F	GTAGTATTATAATGTAGATT
2412F	GGTTGGTTTGTGGTAGATAA
2737F	ATGTTTTAGTGGTTGATATG
3120F	TAGTGTAGTTTATATATTT
1842R	ACAACCCTAATCTTTACACA
2159R	ATCAAATATCCTCATAAATA
2456R	AAACAATACAAAACAAATAA
2775R	CCCCTCCAAAAACACAAATA
3170R	CTAAATAACCCATAAATTTA
3540R	ATTTCTATATCTCCACCTA

以上のプライマーを組み合わせ、*H19* 遺伝子の 5' 上流のインプリント制御領域 (*H19* 遺伝子の転写開始部位から約 -2,000b ~ -4,000b の範囲) を 6 つの部分に分割して PCR をおこなった。

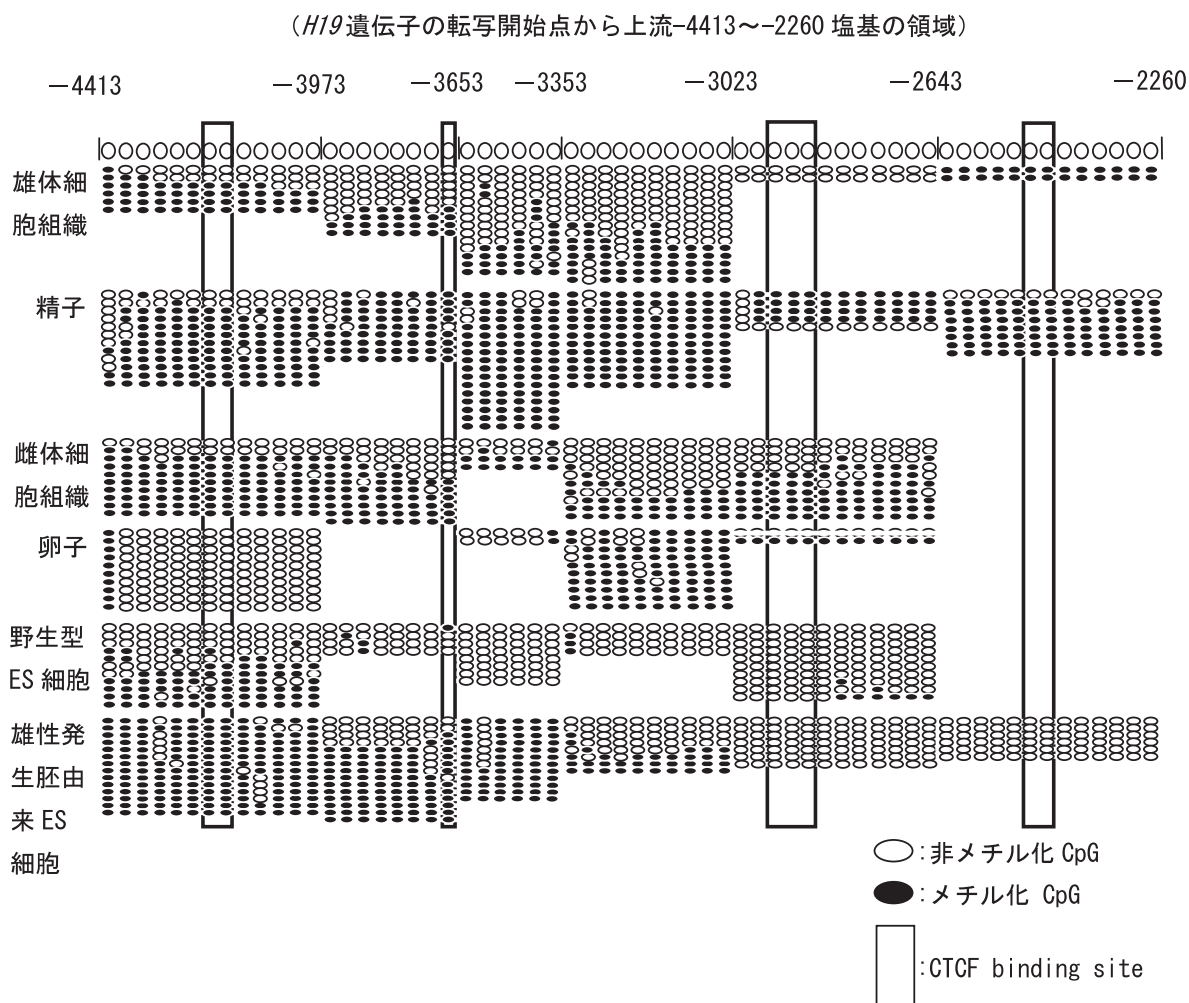
PCR によって増幅された遺伝子断片のクローニング

PCR 後に PCR 反応液を 2 % アガロース in TAE のゲルで電気泳動をおこない、目的とする長さの増幅された遺伝子断片を NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel, 740590) を用いてゲルから回収した。回収された遺伝子断片は pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, A1360) および JM109 コンピテント細胞 (TaKaRa, 9052) を用いて TA クローニングをおこない、90 mm のディッシュに作製した LB プレート上に IPTG および X-gal と混合した後に播種し、37℃、over night で培養して、大腸菌コロニーの blue-white 選択をおこなった。その後、白色を示したコロニーを楊枝の先で突いて 5 ml の加温した LB を含む 14 ml のラウンドチューブ (Falcon, 352057) に入れ、37℃で、over night で振とう培養し、大腸菌を増殖させた。培養後細胞懸濁液を 2 ml を用いてアルカリ法によってプラスミドを回収し、制限酵素処理および 2 % アガロース in TBE のゲルで電気泳動をおこなうことによってインサートを確認した。

遺伝子断片の塩基配列の決定

目的とする長さの遺伝子断片の挿入が確認されたプラスミドを M13 のプライマーと BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, 4337455) を用いて PCR およびエタノール沈殿による精製をおこない、TSR (Applied Biosystems, 401674) に再懸濁して ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。

結 果

図2. *H19* 遺伝子のインプリント制御領域 DMR における CpG 配列のメチル化の状態表3. *H19* 遺伝子 5' 上流のインプリント制御領域 DMR に存在する CpG 配列のメチル化の割合

領域 組織 または細胞	-4413~-3973 13 CpGs, 1 CTCF binding site	-3973~-3653 8 CpGs, 1 CTCF binding site	-3653~-3353 6 CpGs	-3353~-3023 10 CpGs	-3023~-2643 12 CpGs, 1 CTCF binding site	-2643~-2260 13 CpGs, 1 CTCF binding site
雄体細胞組織	53/78 (68) 8/12 (67)	29/72 (40) 4/9 (44)	31/84 (37)	56/150 (37)	0/24 (0) 0/6 (0)	26/26 (100) 4/4 (100)
精子	119/156 (76.2) 20/24 (83)	64/72 (89) 8/9 (89)	96/102 (94.1)	117/120 (97.5)	44/60 (73) 12/15 (80)	89/104 (86) 14/16 (88)
雌体細胞組織	103/130 (79.2) 16/20 (80)	57/88 (65) 6/11 (55)	14/24 (58)	39/100 (39)	75/120 (62.5) 18/30 (60)	ND
卵子	10/130 (7.7) 0/20 (0)	ND	2/12 (17)	89/100 (89.0)	12/24 (50) 3/6 (50)	ND
野生型 ES 細胞	73/143 (51.0) 12/22 (55)	4/32 (13) 1/4 (25)	0/48 (0)	3/40 (8)	8/120 (6.7) 0/30 (0)	ND
雄性発生胚由来 ES 細胞	168/182 (92.3) 28/28 (100)	86/120 (71.7) 12/15 (80)	65/72 (90)	34/80 (43)	0/84 (0) 0/21 (0)	0/78 (0) 0/12 (0)

考 察

DNA のエピジェネティック修飾の一つであるゲノム DNA 中のシトシン残基のメチル化は、遺伝情報の発現制御、特に発現の抑制に重要な役割を担っている。シトシン残基のメチル化は、ゲノム DNA へのメチル化感受性タンパク質の結合および結合阻害に関与し、これが転写因子の転写制御領域への結合等に影響して、時期および組織特異的な遺伝子発現に重要な役割を果たすと考えられている (1)。哺乳動物においては、いくつかの遺伝子はその遺伝子座がどちらの親に由来したのかによって発現が制御される。また、各親由来のゲノムセットは機能的に等価ではない。この各親由来のゲノムセットの機能的な非等価は、各親由来の配偶子特異的なゲノムのエピジェネティックな修飾によってもたらされている。この現象は“Genomic Imprinting” (ゲノムインプリンティング) と呼ばれ、これらのインプリントを受ける遺伝子は、ゲノムの中でクラスターを形成して存在しており、個体発生の中で重要な役割を演じている (1)。

H19 遺伝子は、DNA から mRNA へ転写された後、その情報がタンパク質へ翻訳されない non-coding RNA であり (9)、両親性の胚では母親由来のアレルからのみ発現し、父親由来のアレルからは発現せず、ゲノムインプリンティングの作用を受ける遺伝子である (10, 11)。また、*H19* 遺伝子の発現の制御には、*H19* 遺伝子の転写開始点より 5' 上流の -2 から -4kb 上流に存在する DMR と *H19* 遺伝子の 3' 下流に存在する内胚葉性エンハンサーが深く関与しており (12)、ゲノムインプリンティングに関係する母親または父親由来のアレルの識別にはこの DMR 中のシトシン残基のメチル化が深く関係している (13, 14)。さらに、この *H19* 遺伝子の DMR には、脊椎動物のゲノムにおいて遺伝子のプロモーター領域とエンハンサーとの間において境界を形成し、その遺伝子の発現を調節するジンクフィンガータンパク質である CCCTC-binding factor (CTCF) の結合領域が 4 箇所存在している (15)。これらの CTCF 結合領域中のシトシン残基がメチル化を受けると、CTCF はそこへ結合できず、*H19* 遺伝子の 3' 下流に存在する内胚葉性エンハンサーが *H19* 遺伝子の転写調節領域へ作用して *H19* 遺伝子の転写が促進されるが、CTCF 結合領域中のシトシン残基がメチル化を受けていないと、CTCF はその結合配列へ結合し、*H19* 遺伝子の転写調節領域と *H19* 遺伝子の 3' 下流に存在する内胚葉性エンハンサーの間に境界を形成して、*H19* 遺伝子の転写が抑制され、内胚葉性エンハンサーは更に上流に存在する *Igf2* 遺伝子の転写調節領域に作用してその転写を促進させる (16, 17)。これまでに、マウス雄性発生胚、雌性発生胚およびマウスやヒト ES 細胞における *H19* 遺伝子の DMR 中に存在する CpG のメチル化の状態に関する研究は幾つか報告されているが (18, 19, 20)、全長約 2kb の一部分のみか、メチル化シトシン感受性制限酵素による DNA の切断の有無による検討であり、シトシン残基のメチル化の状態を直接的に検出する Bisulfite 法による全体的な評価はなされていない。本実験においては、このような *H19* 遺伝子の DMR 全体およびその中に存在する CTCF 結合領域のシトシン残基のメチル化の状態を Bisulfite 法によって直接的に解析した。

マウス配偶子において、インプリントを受ける遺伝子の DMR における CpG のメチル化の状態を調べた Lucifero らによる研究では、*H19* 遺伝子の DMR 中の CpG は、減数分裂第 II 分裂中期の卵子ではわずかに 0.6% (2/320) がメチル化していたのに対し、精子の同じ領域では、メチル化 CpG の割合は、97.8% (266/272) と、非常に高率であった (21)。また、マウス ES 細胞を胚様体を形成するように分化させ、その中に胚性生殖細胞が形成されたとする Geijsen らの報告では、*H19* 遺伝子の DMR 中の CpG のメチル化状態は、ES 細胞は低メチル化状態と高メチル化状態の両方のアレルを保有する両親性の状態を保っていたが、胚性生殖細胞においては低メチル化状態へ移行したと報告している (22)。今回の我々の実験においても、精子の *H19* 遺伝子の DMR 中の CpG は、全体として高いメチル化状態を示した (86.2%, 529/614)。卵子においてはおよそ *H19* 遺伝子の DMR 中の CpG は、低いメチル化状態を示したが (42.5%, 113/266)、-3353 ~ -3023 塩基の領域では非常に高いメチル化状態を示していた (89%,

89/100)。この領域には CTCF 結合領域は含まれておらず、直接的に *H19* 遺伝子の発現には関与していない可能性も考えられるが、卵子のゲノム中のこの領域におけるシトシン残基のメチル化が何を意味するのかについては、更なる検討が必要であると考えられる。

今回の我々の実験において、野生型 ES 細胞の *H19* 遺伝子の DMR におけるメチル化 CpG の割合は 23.0% (88/383) と、比較的低かった。一方、雄性発生胚由来 ES 細胞の *H19* 遺伝子の DMR におけるメチル化 CpG の割合は 57.3% (353/616) であり、全体的には雄性配偶子である精子と比較すると低率であり、雌性配偶子である卵子に近い値であった。しかし、雄性発生胚由来 ES 細胞の *H19* 遺伝子の DMR の -4413 ~ -3353 塩基の領域では、非常に高いメチル化状態を示していた (85.2%, 319/374)。これに対して、雄性発生胚由来 ES 細胞の DMR の -3353 ~ -2260 塩基の領域においてはメチル化 CpG の割合は低下していた (-3353 ~ -3023:43%, -3023 ~ -2643:0%, -2643 ~ -2260:0%)。精子においては DMR の上流 -3353 ~ -2260 塩基の間の領域でもメチル化 CpG の割合は 73 ~ 97.5% と高く保たれているため、雄性発生胚由来 ES 細胞におけるこの領域でのメチル化 CpG の割合の低下がどのような理由によるものであり、どのような特性を雄性発生胚由来 ES 細胞にもたらすのかを詳しく検討する必要があると考えられる。また、野生型 ES 細胞においては、DMR の -3973 ~ -2260 塩基の領域で、メチル化 CpG の割合は低下していた (-3973 ~ -3653:13%, -3653 ~ -3353:0%, -3353 ~ -3023:8%, -3023 ~ -2643:6.7%, -2643 ~ -2260:ND)。このため、この *H19* 遺伝子の DMR の 3' 下流におけるメチル化 CpG の割合の低下は、ES 細胞特異的なものなのか、あるいは、細胞培養の間にひき起こされた異常な状態なのかを検討する必要があると考えられた。

謝 辞

本研究の一部は、日本文部科学省による 21 世紀 COE プログラム「食資源動物分子工学研究拠点」および科学技術振興事業団・和歌山県地域結集型共同研究事業「アグリバイオインフォマティクスの高度活用技術の開発」の研究助成によりおこなわれた。

参 考 文 献

1. 田嶋正二 (2004) エピジェネティクス (佐々木裕之編集), pp.7-19 シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社, 東京
2. Nagy A, Sass M, Markkula M. (1989) Systematic non-uniform distribution of parthenogenetic cells in adult chimeras. *Development* 106:321-324.
3. Mann JR, Gadi I, Harbison ML, Abbondanzo SJ, Stewart CL. (1990) Androgenetic mouse embryonic stem cells are pluripotent and cause skeletal defects in chimeras: implications for genetic imprinting. *Cell* 62:251-260.
4. Mann JR, Stewart CL. (1991) Development to term of mouse androgenetic aggregation chimeras. *Development* 113:1325-1333.
5. Hernandez L, Kozlov S, Piras G, Stewart CL. (2003) Paternal and maternal genomes confer opposite effects on proliferation, cell-cycle length, senescence, and tumor formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:13344-13349.
6. Allen ND, Barton SC, Hilton K, Norris ML, Surani MA. (1994) A functional analysis of imprinting in parthenogenetic embryonic stem cells. *Development* 120:1473-1482.

- 7 . Fundele RH, Surani MA. (1994) Experimental embryological analysis of genetic imprinting in mouse development. *Dev. Genet.* 15:515-522.
- 8 . Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout III WM, Biniszkiewicz D, Yanagimachi R, Jaenisch R. (2001) Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 293:95-97.
- 9 . Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM. (1990) The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol. Cell. Biol.* 10:28-36.
10. Brunknow ME, Tilghman SM. (1991) Ectopic expression of the H19 gene in mice causes prenatal lethality. *Genes Dev.* 5:1092-1101.
11. Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM. (1991) Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* 351:153-155.
12. Elson DA, Bartolomei MS. (1997) A 5' Differentially methylated sequence and the 3' -Flanking region are necessary for H19 transgene imprinting. *Mol. Cell. Biol.* 17:309-317.
13. Tremblay KD, Duran KL, Bartolomei MS. (1997) A 5' 2-kilobase-pair region of the imprinted mouse H19 gene exhibits exclusive paternal methylation throughout development. *Mol. Cell. Bio.* 17:4322-4329.
14. Thorvaldsen JL, Duran KL, Bartolomei MS. (1998) Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. *Genes Dev.* 12:3693-3702.
15. Schoenherr CJ, Levorse JM, Tilghman SM. (2003) CTCF maintains differential methylation at the IGF2/H19 locus. *Nat. Genet.* 33:66-69.
16. Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM. (2000) CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 405:486-489.
17. Forne T, Oswald J, Dean W, Saam JR, Bailleul B, Dandolo L, Tilghman SM, Walter J, Reik W. (1997) Loss of the maternal H19 gene induces changes in Igf2 methylation in both cis and trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10243-10248.
18. Sasaki H, Ferguson-Smith AC, Shum ASW, Barton SC, Surani MA. (1995) Temporal and spatial regulation of H19 imprinting in normal and uniparental mouse embryos. *Development* 121:4195-4202.
19. Rugg-Gunn PJ, Ferguson-Smith AC, Pedersen RA. (2005) Epigenetic status of human embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 37:585-587.
20. Sotonaru Y, Katsuzawa Y, Hatada I, Obata Y, Sasaki H, Kono T. (2002) Unregulated expression of the imprinted genes H19 and Igf2r in mouse uniparental fetuses. *J. Biol. Chem.* 277:12474-12478.
21. Lucifero D, Mertineit C, Clarke HJ, Bestor TH, Trasler JM. (2002) Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics* 74:530-538.
22. Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ. (2004) Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 427:148-154.

英文要旨

Methylation of the 5' -upstream region of the *H19*
gene in mouse somatic cell, gametes, wild type and androgenetic ES cells

Hiromi Kato¹, Hideki Murakami², Miyuri Kawasumi², Takanori Kunieda²,
Manabu Okuno², Manabu Kishimoto², Manabu Soma², Daigo Iwai²,
Masayuki Anzai¹, Tasuku Mitani¹, Kazuya Matsumoto^{1,2}, Kazuhiro Saeki^{1,2},
Yoshihiko Hosoi^{1,2} and Akira Iritani^{1,2}

In mammals, there is a phenomenon that is called as “Genomic Imprinting” and these imprinted genes play important roles in the ontogeny. In this study, as the first step to elucidate the role of the paternal genomic imprinting on the ontogeny, we investigate the methylation of CpG sites in the 5' -upstream region of the *H19* gene in mouse male and female somatic cell, sperm, oocyte, wild type embryonic stem cell (ES cell) and androgenetic ES cell. The CpG sites in the 5' -upstream region of DMR of androgenetic ES cell were highly methylated similarly to the spermatozoa. However, the aberrant methylation pattern was already observed in the CpG sites in the 3' -downstream region of DMR of androgenetic ES cell.

1. Institute of Advanced Technology, Kinki University, Wakayama, 642-0017, Japan

2. Department of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Wakayama, 649-6493, Japan