

## マウス初期胚及び始原生殖細胞における 能動的 DNA 脱メチル化制御

守田昂太郎<sup>1</sup>、畑中勇輝<sup>2</sup>、天野朋子<sup>1,2</sup>、松本和也<sup>1,2</sup>

### 要旨

哺乳動物の生殖細胞サイクルでは、受精直後の初期胚と始原生殖細胞 (primordial germ cell、PGC) において分化能を獲得するために重要な核のリプログラミングが二度引き起こされる。核のリプログラミングはヒストンや DNA のエピジェネティック修飾の変化を伴うクロマチンリモデリングに起因し、直接的な制御因子としてヒストンや DNA を標的としたメチル化やアセチル化酵素が数多く同定されている。また、受精直後の初期胚の雄性ゲノムや PGC のゲノムでは、5-メチルシトシン (5-methylcytosine、5mC) のレベルの低下が能動的に起こることが認められている。現在、能動的に DNA を脱メチル化する酵素は同定されていないものの、能動的 DNA 脱メチル化機構の解明に向けて新たな局面が最近見られた。例えば、ten-eleven translocation (TET) ファミリータンパク質は 5mC を酸化して 5-ヒドロキシメチルシトシン (5-hydroxymethylcytosine、5hmC) へ変換する機能を持つことや、activation-induced deaminase (AID) 及び apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptides (APOBEC) は 5mC をチミンへ変換する機能を持つことが明らかになった。これらのタンパク質は、間接的に DNA の脱メチル化を制御することがマウス初期胚及び PGC において明らかにされている。さらに、多能性を持つ ES 細胞では、AID や TET1 は *Oct4* (*Pou5f1* としても知られている) と *Nanog* におけるプロモーター領域の DNA 脱メチル化に関与することが報告されている。こうした能動的 DNA 脱メチル化機構の解明は、多能性に関わる遺伝子の発現機構をより明確にし、再生医療の進歩に貢献する。そこで本稿では、マウス初期胚と PGC における能動的 DNA 脱メチル化制御について概説する。

キーワード：初期胚、始原生殖細胞、エピジェネティクス、能動的 DNA 脱メチル化、ヒストン修飾

### 1. 結論

一般的に遺伝子のプロモーター領域内または近傍には、シトシンとグアニンが豊富な CpG 領域が存在していることが多く、転写が抑制されている遺伝子では、CpG 領域のシトシンがメチル化されて 5mC になっている<sup>(1)</sup>。受精直後の初期胚及び PGC では、ゲノムワイドな DNA 脱メチル化が生じ、5mC はシトシンへ変換される。この脱メチル化は、酵素が関与して起こる能動的 DNA 脱メチル化と受動的 DNA 脱メチル化に分類される。

受精直後の初期胚において、雄性ゲノムでは能動的 DNA 脱メチル化が起こり、雌性ゲノムでは受動的 DNA 脱メチル化が起こるが、この能動的 DNA 脱メチル化において詳しい分子機構は明らかになっていない<sup>(2)</sup> (図 1)。ところが最近、初期胚において、TET3 は 5mC を酸化し、5hmC へ変換することで雄性ゲノムの能動的 DNA 脱メチル化に関与していることが明らかになり<sup>(3)</sup>、TET ファミリータンパク質に関する知見が数多く報告されてきている。一方、雌性前核に局在する PGC7 (STELLA、DAPPA3 としても知られている) は TET3 による 5mC の酸化から雌性ゲノムを保護していることが明らかになっている<sup>(4,5)</sup>。

PGC のゲノムにおいても能動的 DNA 脱メチル化の重要性が示唆されている。例えば、マウスの PGC で

は、受精の日を0日目とした胚の日齢である胎生8.5日齢(E8.5)からE11.5にかけて生殖腺へ移動する間、DNAのメチル化レベルがゲノムワイドに低下する<sup>(6)</sup>(図1)。近年、TETファミリータンパク質及びAID、APOBECがPGCのゲノムにおける能動的DNA脱メチル化に関与していることが明らかになり<sup>(7,8)</sup>、TET1やAIDをノックダウンしたマウスES細胞では、多能性に関与する遺伝子*Oct4*及び*Nanog*の発現レベルが低下する<sup>(9,10)</sup>。このことから、能動的DNA脱メチル化は多能性の獲得維持に密接に関わっているといえる。以上のように、能動的DNA脱メチル化機構の解明はリプログラミングによる多能性獲得において分子機構の解明に繋がり、これらの知見をiPS細胞の作出効率の改善に応用させることで、再生医療の進歩に貢献することが期待されている<sup>(11)</sup>。

そこで本稿では、能動的DNA脱メチル化に関与しているTETファミリータンパク質及びAID、APOBECの知見を中心に紹介し、今後の研究の方向性について論ずる。

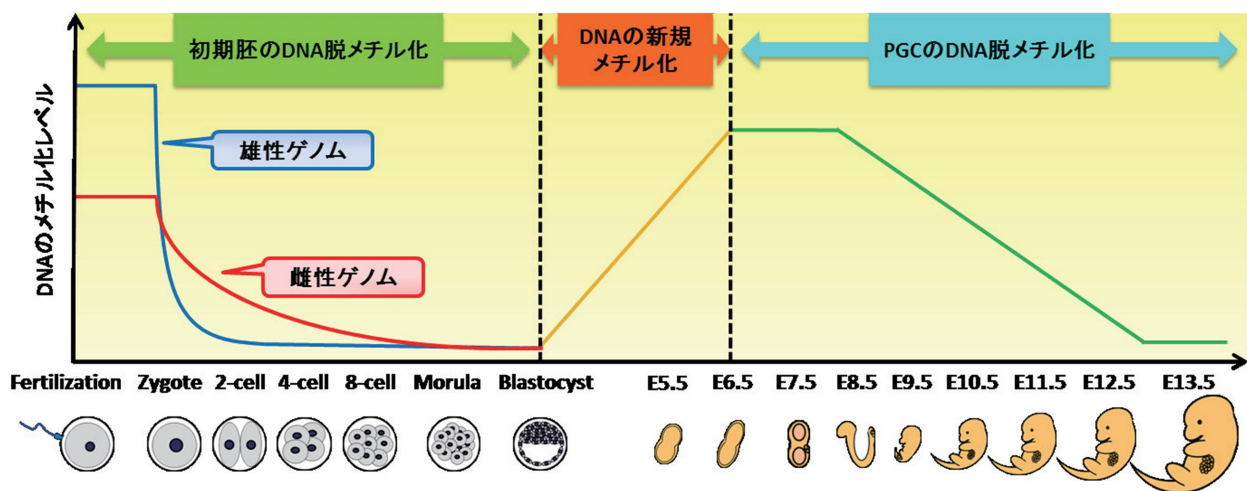


図1 生殖細胞サイクルにおけるメチル化レベル

受精直後、男性ゲノムは能動的DNA脱メチル化により2-cellまでにメチル化レベルは著しく低下し(青色)、女性ゲノムでは受動的DNA脱メチル化によりメチル化レベルが低下する(赤色)。PGCはE8.5付近からメチル化レベルが低下し始める(緑色)。

## 2. TET3の初期胚における能動的DNA脱メチル化への関与

最近、TETファミリータンパク質であるTET1、TET2及びTET3はDNAの能動的DNA脱メチル化に直接関与していることが明らかになっている。TETファミリータンパク質は多くの細胞で発現しているが、そのうち、ES細胞ではTET1及びTET2の発現が強く、TET3の発現が弱いことが観察されている<sup>(10)</sup>。さらに、ES細胞においてTET1及びTET2をノックダウンさせると、ゲノム全体の5mCのレベルが上昇し、5hmCのレベルが低下することが認められている<sup>(12)</sup>。したがって、これらの結果からES細胞ではTET1及びTET2が能動的DNA脱メチル化機構にとって重要な因子として機能していることが示されている。

受精直後のマウス初期胚及び卵子ではTET3が発現しており(図2,4)、MII期卵の*Tet3*をノックアウトさせると、前核期であるpronuclear stage 3(PN3)の男性前核において5mCのレベルが低下し、5mCから5hmCへの変換が抑制される<sup>(13,14)</sup>。これらのことから、TET3の働きは初期胚における男性ゲノムの能動的DNA脱メチル化に重要であると考えられる。さらに、5mCは5hmCへ変換された後、塩基修復に関与するbase excision repair(BER)機構によってシトシンに修復される<sup>(15)</sup>。一方、受動的DNA脱メチル化が起こる女性ゲノムにおいて、PGC7はN末端を介してH3K9me2と結合し、TET3による酸化から5mCを保護していることが明らかになった<sup>(4,5,16)</sup>。このことから、女性ゲノムには能動的DNA脱メチル化に対する

防御機構が存在していると考えられている<sup>(4,5,16)</sup>。実際に、PGC7をノックアウトした胚は、雌性前核でもTET3の局在が認められ、雌性ゲノムのメチル化レベルが著しく低下する<sup>(4,5,14,16)</sup>。また、PGC7は未受精卵の細胞質に蓄積されており、受精後に雄性及び雌性前核へ移動して<sup>(17)</sup>、雄性のインプリント遺伝子 *H19*、*Rasgrfl* 及び雌性のインプリント遺伝子 *Peg1*、*Peg3*、*Peg10* や一部のレトロトランスポゾンに脱メチル化から保護していることが明らかになっている<sup>(4,5,16)</sup> (図2)。

このように、初期胚ではTET3の作用とPGC7の作用が雄性ゲノムにおける能動的DNA脱メチル化と雌性ゲノムにおける受動的DNA脱メチル化に重要な働きをしている。

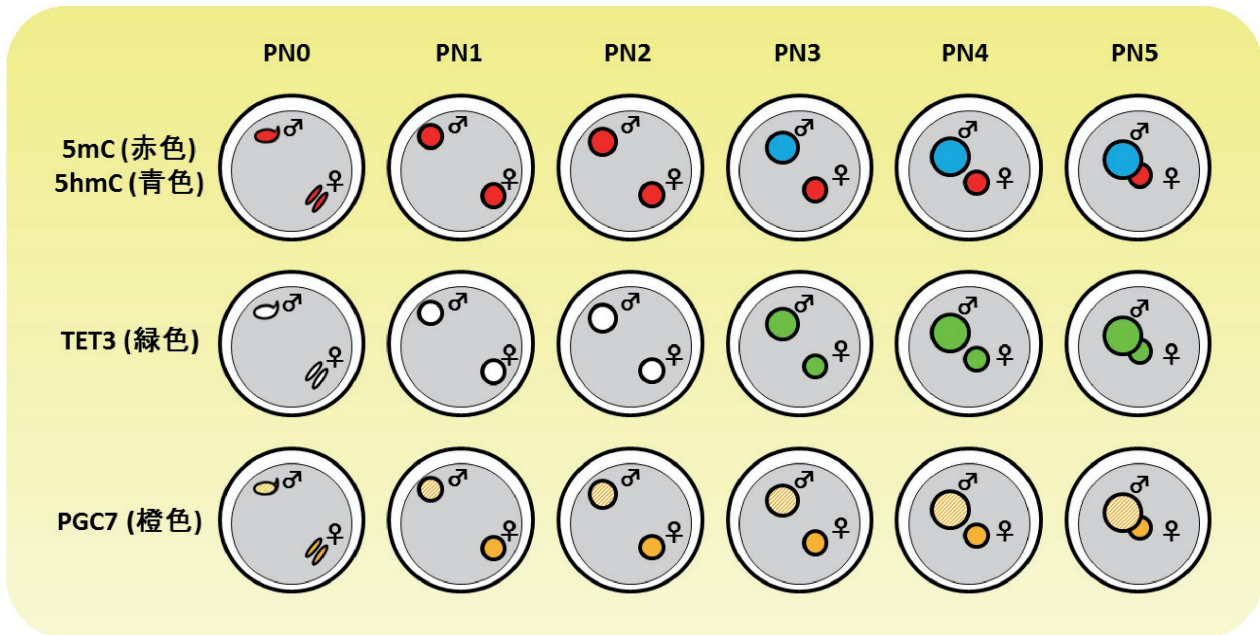


図2 前核期の5mCと5hmCの関係及びTET3とPGC7の局在

PN3の雄性ゲノムでは5mC (赤色) のレベルが著しく低下し、5hmC (青色) のレベルが上昇する (上段)。また、同じ時期にTET3 (緑色) が雄性前核及び雌性前核で局在している (中段)。PGC7 (橙色) は受精後、雄性前核及び雌性前核に局在しているが、雄性ゲノム (橙色の斜線) においてゲノムワイドなDNA脱メチル化ではなく、インプリント遺伝子や一部のレトロトランスポゾンに能動的DNA脱メチル化から保護している (下段)。

### 3. 初期胚の能動的DNA脱メチル化に関与するTETファミリー以外のタンパク質

雄性ゲノムの能動的DNA脱メチル化には、TET3の他にも様々なタンパク質の関与が明らかになっている。例えば、Elongator複合体の構成要素である *elongator acetyltransferase complex subunit 3* (*Elp3*) のラジカルS-adenosylmethionine (SAM) ドメインを欠損させると、PN5で雄性ゲノムの能動的DNA脱メチル化に支障が生じることが示されている<sup>(18)</sup>。また、DNAメチル基転移酵素 (DNA methyltransferase, DNMT) のメチル基供与体であるSAMに対し、ラジカルSAMスーパーファミリーは特異的に結合する作用があるため、このドメインはDNA脱メチル化機構に重要であると考えられている<sup>(19)</sup>。

メチル化を受けたシトシンの修復にはBER機構が重要であることは前節で述べたが、初期胚において、BER機構に関与するタンパク質PARPまたはAPE1の阻害により高メチル化状態を維持していることが示されている<sup>(20)</sup>。また、雌性前核のPGC7を欠損させると雄性前核と同様に雌性前核でBER機構が働くことが明らかになっている<sup>(20)</sup>。さらに、セリンがリン酸化されたヒストン $\gamma$ H2A.Xは、PN3の雄性ゲノムにおいてPARP-1と共局在し、DNAメチル化剤メチルメタンサルフォネートで処理すると、 $\gamma$ H2A.XとPARP-1

のシグナルが強くなる<sup>(21)</sup>。これらのことから、 $\gamma$ H2A.X は BER 機構と共に塩基修復に関与していることが示唆されている<sup>(21)</sup>。また、*growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha* (*Gadd45a*) が発現すると、BER 機構よりも規模の大きい DNA 損傷を修復することで知られている nucleotide excision repair (NER) 機構が働くことが示されており、NER 機構によりメチル化シトシンが除去されることで能動的 DNA 脱メチル化が起きる<sup>(22)</sup>。実際に、*Gadd45a* をノックダウンまたは NER 阻害剤で処理すると、rRNA をコードする rDNA のプロモーター領域が高メチル化状態になることが示されている<sup>(22,23)</sup>。

最近、マウスの神経上皮細胞で発現する *hairy and enhancer of split 5* (*Hes5*) の CpG 領域は *glial cells missing homolog 1/2* (*Gcm1/2*) の発現により E8.0 から E8.5 で能動的 DNA 脱メチル化を受けることが明らかになった<sup>(24)</sup>。*Hes5* の発現は、多くの臓器の発生やメンテナンスに必要な Notch シグナリングを引き起こす<sup>(24)</sup>。そのため、*Gcm1/2* が関与する能動的 DNA 脱メチル化は前核期胚におけるリプログラミングに直接関係しないが、Notch シグナルの活性による個体発生に重要であると考えられる。

しかしながら、様々な能動的 DNA 脱メチル化に関与するタンパク質が同定されている一方で、上記で挙げた *Elp3*、*Gcm1/2*、及び  $\gamma$ H2A.X などに関与した能動的 DNA 脱メチル化機構の詳細は明らかにされていない<sup>(25)</sup>。今後、これらの能動的 DNA 脱メチル化に関与する遺伝子の機能解析の進展が期待される。

#### 4. PGC におけるゲノムの能動的 DNA 脱メチル化

初期胚の能動的 DNA 脱メチル化において、TET3 は 5mC を 5hmC へ変換するが、PGC では TET3 の発現が認められず、TET1 及び TET2 が E11.5 で発現している<sup>(20)</sup> (図 4)。さらに、ゲノムの能動的 DNA 脱メチル化において、E13.5 までに AID 及び APOBEC が機能することが知られている<sup>(8, 26)</sup>。また、*Aid* 欠損マウス E13.5 の PGC では、野生型と比較してゲノム全体のメチル化レベルが高いことが示されている<sup>(26)</sup>。興味深いことに、PGC におけるゲノムの遺伝子間領域や、*deleted in azoospermia-like* (*Dazl*)、*H19*、*Lit1* 遺伝子の CpG 領域において、*Aid* の欠損がメチル化レベルに及ぼす影響は E13.5 の雌雄 PGC で異なることが明らかになった<sup>(26)</sup>。そのため、PGC のゲノムにおける能動的 DNA 脱メチル化機構には性差があると考えられる。AID 及び APOBEC は 5mC を脱アミノ化してチミンを付加する機能と、TET1 及び TET2 により変換された 5hmC をさらに 5-ヒドロキシメチルウラシル (5-hydroxymethyluracil, 5hmU) へ変換する機能を果たし、このチミンや 5hmU は BER 機構によりシトシンへ変換されることが明らかになっている<sup>(20)</sup> (図 3)。しかし、AID は E12.5 でわずかしか検出されず<sup>(20)</sup>、*Aid* をノックアウトした場合、PGC では E13.5 までゲノムワイドな脱メチル化が緩やかに起こることが明らかになっている<sup>(26)</sup>。

PGC におけるゲノムの能動的 DNA 脱メチル化が 5mC の脱アミノ化に起因していることは上記で述べたが、脱アミノ化に依存しないゲノムの能動的 DNA 脱メチル化機構も存在していると考えられている<sup>(8)</sup>。PGC では、5hmC はさらに TET1 及び TET2 により 5-ホルミルシトシン (5-formylcytosine, 5fC) へ変換され、5fC は TET1 及び TET2 により 5-カルボキシルシトシン (5-carboxylcytosine, 5caC) へ変換されることが明らかになっており、これらの 5hmC、5fC、5caC は BER 機構の塩基修復を受けてシトシンに戻る<sup>(8)</sup> (図 3)。しかし、5caC 以降はどのような酵素が関与してシトシンに戻るのかは明らかになっていない。

このように、PGC におけるゲノムの能動的 DNA 脱メチル化機構を解明するためには、TET ファミリータンパク質や AID 及び APOBEC の未知なる機能が働いているのか、他に別のタンパク質が関与しているのかを明らかにしていくことが重要と考えられる。

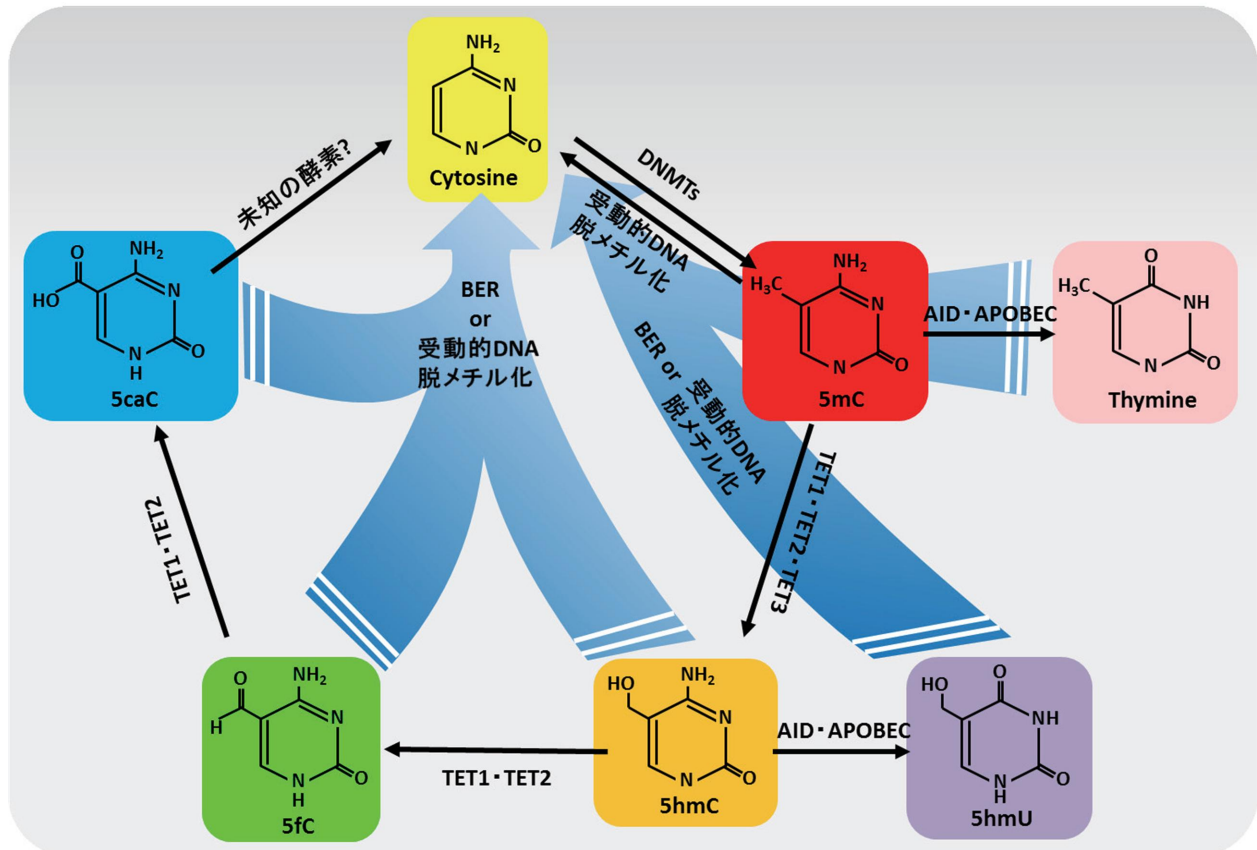


図3 能動的 DNA 脱メチル化の反応経路

5mC は TET1、TET2 及び TET3 によって 5hmC に変換される。5hmC はさらに TET1 及び TET2 によって 5fC、5caC へ変換され、それぞれの塩基は BER 機構または受動的 DNA 脱メチル化によってシトシンへ戻る。また、AID 及び APOBEC の脱アミノ化により、5mC はチミンへ変換され、5hmC は 5hmU へ変換される。さらに、チミンと 5hmU は BER 機構または受動的 DNA 脱メチル化によって、最終的にシトシンへ変換される。

## 5. DNA のメチル化とヒストン修飾の関係

一般的に、真核生物はヒストン修飾に伴い、ユークロマチン及びヘテロクロマチン構造を取り、マウスのゲノムにおいて、ユークロマチン構造ではメチル化修飾を受けた H3K4、H3K36 が多く、ヘテロクロマチン構造ではメチル化修飾を受けた H3K9、H3K27、H4K20 が多い<sup>(27)</sup>。また、H3K9、H3K27、H4K20 がメチル化されたヘテロクロマチンにおいて、DNA の CpG 領域は高メチル化状態であることが明らかになっている<sup>(27)</sup>。

多能性を持つ ES 細胞内において、DNA がヘテロクロマチン構造をとる時は CpG 領域に 5mC が多く、ユークロマチンをとる時は、CpG 領域に 5hmC が多いことが示されている<sup>(28)</sup>。CpG 領域に 5mC が多い場合、その近傍のヒストン修飾は転写的に抑制のマークである H3K9me1/2 が豊富に存在し、methyl-CpG binding domain-containing protein (MECP2) は DNMT と複合体を形成して CpG 領域に結合している<sup>(28)</sup>。CpG 領域に 5hmC が多い場合、その近傍のヒストン修飾は転写的に活性のマークである H3K4me3 が豊富に存在し、TET1 が CpG 領域に結合して DNMT や MECP2 の CpG 領域への結合を抑制している<sup>(28)</sup>。しかし、CpG 領域に 5hmC が多い場合でも、H3K4me3 と H3K27me3 が豊富な領域では、TET1 が CpG 領域に結合することでリクルートされる polycomb repressive complex 2 (PRC2) により、転写的に不活性状態となる<sup>(28)</sup>。そのほか、ES 細胞内の多能性に関与する遺伝子 *Tcl1*、*Tcfcp2l1*、*Zfp57*、*Nanog* のプロモーター領域の近傍

では、*Jmjd1a* 及び *Jmjd2c* 遺伝子により H3K9me2 と H3K9me3 は脱メチル化され、これらの多能性に関する遺伝子の発現は維持されていることが示されている<sup>(29,30)</sup>。

これらのヒストン修飾は PGC 形成過程においてもダイナミックに変化することが明らかになってきている。マウスの PGC では E7.75 から E8.75 において、G2 停止が起こり、E7.75 から H3K9me2 のレベルが低下するが、E8.25 付近から H3K27me3 のレベルは上昇する<sup>(31)</sup>。H3K9 をジメチル化することにおいて、GLP と G9a は複合体を形成し、H3K9 のヒストンメチル基転移酵素の活性に働くが、GLP は E7.5 から E7.75 の PGC において発現レベルが低下し、E9.0 付近では、G9a の発現レベルも低下していることが免疫組織化学的解析の結果から示されている<sup>(31)</sup> (図 4)。

以上のように、生殖細胞サイクルにおいてヒストンのメチル化と DNA のメチル化は何らかの関与があることが示唆される。しかしながら、その詳細な分子機構が未だ明らかになっておらず、ヒストン修飾に関する研究は今後も必要である。

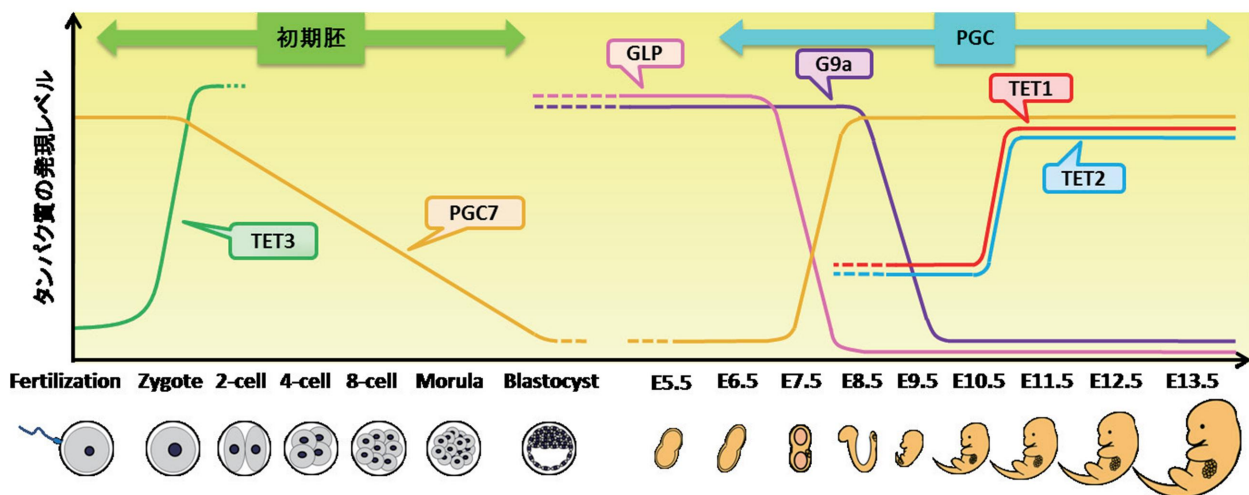


図 4 生殖細胞サイクルにおける能動的及び受動的 DNA 脱メチル化に関与する主要因子の発現レベルの推移

受精直後の雄性及び雌性前核では TET3 (緑色) 及び PGC7 (橙色) が発現している。PGC7 は 2-cell 付近から発現レベルが低下し、胚盤胞期にはほとんど発現しなくなるが、PGC において E7.25 付近で再び発現し始める。GLP (桃色) は E7.5 から発現レベルが低下し、G9a (紫色) は E9.0 で発現レベルが低下する。TET1 (赤色) 及び TET2 (青色) は E11.5 で発現レベルが上昇する。

## 6. 結論

以上のように、TET ファミリーや AID、APOBEC の他にも能動的 DNA 脱メチル化に関与しているタンパク質は徐々に明らかになっている。しかしながら、初期胚では、TET3 の他に能動的 DNA 脱メチル化に関与する因子が同定されているものの、詳細な機能が明らかにされていない因子が多い。PGC においても、TET1 及び TET2 が主として能動的 DNA 脱メチル化に関与しているのか、AID や APOBEC の他に能動的 DNA 脱メチル化に関与する因子が存在しているのか明らかにされていないため、今後も研究は必要である。前節では、ヒストンのメチル化によるクロマチンリモデリングと DNA のメチル化の関係を紹介したが、最近になって、本稿で挙げた PGC7 がヒストン修飾に結合してクロマチンリモデリングを制御することで能動的 DNA 脱メチル化をブロックする機構が明らかになってきた<sup>(5)</sup>。そのため、DNA の脱メチル化機構を解明していくために、ヒストン修飾やクロマチンリモデリングを制御する因子の探索も今後の重要な課題と考えられる。

## 参考文献

1. Ilya P. Ioshikhes and Michael Q. Zang. (2000) Large-scale human promoter mapping using CpG islands. *Nature genetics* 26, 61-63.
2. Khursheed Iqbal, Seung-Gi Jin, Gerd P. Pfeifer, and Piroska E. Szabó. (2011) Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *PNAS* 108, 3642-3647.
3. Mitinori Saitou, Saya Kagiwada and Kazuki Kurimoto. (2012) Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development* 139, 15-31.
4. Toshinobu Nakamura, Yoshikazu Arai, Hiroki Umehara, Masaaki Masuhara, Tohru Kimura, Hisaaki Taniguchi, Toshihiro Sekimoto, Masahito Ikawa, Yoshihiro Yoneda, Masaru Okabe, Satoshi Tanaka, Kunio Shiota and Toru Nakano. (2007) PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nature cell biology* 9, 64-71.
5. Toshinobu Nakamura, Yu-Jung Liu, Hiroyuki Nakashima, Hiroki Umehara, Kimiko Inoue, Shogo Matoba, Makoto Tachibana, Atsuo Ogura, Yoichi Shinkai and Toru Nakano. (2012) PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature* 486, 415-419.
6. Petra Hajkova, Sylvia Erhardt, Natasha Lane, Thomas Haaf, Osman El-Maarri, Wolf Reik, Jörn Walter and M. Azim Surani. (2002) Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mechanisms of Development* 117, 15-23.
7. Marta Teperek-Tkacz, Vincent Pasque, George Gentsch and Anne C Ferguson-Smith. (2011) Epigenetic reprogramming: is deamination key to active DNA demethylation? *Reproduction* 142, 621-632
8. Jamie A. Hackett, Jan J. Zyllicz and M. Azim Surani. (2012) Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline. *Trends in Genetics* 28, 164-174.
9. Nidhi Bhutani, Jennifer J. Brady, Mara Damian, Alessandra Sacco, Sréphanie Y. Corbel and Helen M. Blau. (2010) Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* 463, 1042-1048.
10. Shinsuke Ito, Ana C. D'Alessio, Olena V. Taranova, Kwonoh Hong, Lawrence C. Sowers and Yi Zhang. (2010) Role of tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466, 1129-1133
11. Suhua Feng, Steven E. Jacobsen and Wolf Reik. (2010) Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 330, 622-627.
12. Gabriella Ficiz, Miguel R. Branco, Stefanie Seisenberger, Fátima Santos, Felix Krueger, Timothy A. Hore, C. Joana Marques, Simon Andrews and Wolf Reik. (2011) Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* 473, 398-402.
13. Tian-Peng Gu, Fan Guo, Hui Yang, Hai-Ping Wu, Gui-Fang Xu, Wei Liu, Zhi-Guo Xie, Linyu Shi, Xinyi He, Seung-gi Jin, Khursheed Iqbal, Yujiang Geno Shi, Zixin Deng, Piroska E. Szabó, Gerd P. Pfeifer, Jinsong Li and Guo-Liang Xu. (2011) The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* 477, 606-610.
14. Mark Wossidlo, Toshinobu Nakamura, Konstantin Lepikhov, C. Joana Marques, Valeri Zakhartchenko, Michele Boiani, Julia Arand, Toru Nakano, Wolf Reik and Jörn Walter. (2011) 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nature communications* 2, 241-248.
15. Nidhi Bhutani, David M. Burns, and Helen M. Blau. (2011) DNA demethylation dynamics. *Cell* 146, 866-872.
16. Piroska E. Szabó, and Gerd P. Pfeifer. (2012) H3K9me2 attracts PGC7 in the zygote to prevent Tet3-mediated

- oxidation of 5-methylcytosine. *Journal of Molecular Cell Biology* 4, 427-429.
17. Mary Gehring, Wolf Reik and Steven Henikoff. (2009) DNA demethylation by DNA repair. *Trends in Genetics* 25, 82-90.
  18. Yuki Okada, Kazuo Yamagata, Kwonho Hong, Teruhiko Wakayama and Yi Zhang. (2010) A role for the elongator complex in zygotic paternal genome demethylation. *Nature* 463, 554-558.
  19. Perry A. Frey, Adrian D. Hegeman, and Frank J. Ruzicka. (2008) The radical SAM superfamily. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 43, 63-88.
  20. Petra Hajkova, Sean J. Jeffries, Caroline Lee, Nigel Miller, Stephen P. Jackson and M. Azim Surani. (2010) Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. *Science* 329, 78-82.
  21. Mark Wossidlo, Julia Arand, Vittorio Sebastiano, Konstantin Lepikhov, Michele Boiani, Richard Reinhardt, Hans Schöler and Jörn Walter. (2010) Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. *The EMBO Journal* 29, 1877-1888.
  22. Guillermo Barreto, Andrea Schäfer, Joachim Marhold, Dirk Stach, Suresh K. Swaminathan, Vikas Handa, Gabi Döderlein, Nicole Maltry, Wei Wu, Frank Lyko and Christof Niehrs. (2007) Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445, 671-675.
  23. Kerstin-Maike Schmitz, Nina Schmitt, Urs Hoffmann-Rohrer, Andrea Schäfer, Ingrid Grummt and Christine Mayer. (2009) TAF12 recruits Gadd45a and the nucleotide excision repair complex to the promoter of rRNA genes leading to active DNA demethylation. *Molecular Cell* 33, 344-353.
  24. Seiji Hitoshi, Yugo Ishino, Akhilesh Kumar, Salma Jasmine, Kenji F Tanaka, Takeshi Kondo, Shigeaki Kato, Toshihiko Hosoya, Yoshiki Hotta and Kazuhiro Ikenaka. (2011) Mammalian Gcm genes induce Hes5 expression by active demethylation and induce neural stem cells. *Nature neuroscience* 14, 957-964.
  25. Jun-Yu Ma, Xing-Wei Liang, Heide Schatten and Qing-Yuan Sun. (2012) Active DNA demethylation in mammalian preimplantation embryos: new insights and new perspectives. *Molecular Human Reproduction* 18, 333-340.
  26. Christian Popp, Wendy Dean, Suhua Feng, Shawn J. Cokus, Simon Andrews, Matteo Pellegrini, Steven E. Jacobsen and Wolf Reik. (2010) Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463, 1101-1105.
  27. Jörg Fuchs, Dmitri Demidov, Andreas Houben and Ingo Schubert. (2006) Chromosomal histone modification patterns – from conservation to diversity. *Trends in Plant Science* 11, 199-208.
  28. Miguel R. Branco, Gabriella Ficz and Wolf Reik. (2012) Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nature Reviews Genetics* 13, 7-13
  29. Yui-Han Loh, Weiwei Zhang, Xi Chen, Joshy George, and Huck-Hui Ng. (2007) Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *GENES & DEVELOPMENT* 21, 2545–2557.
  30. Mareike Albert and Antoine HFM Peters. (2009) Genetic and epigenetic control of early mouse development. *Current Opinion in Genetics & Development* 19, 113–121.
  31. Yoshiyuki Seki, Masashi Yamaji, Yukihiro Yabuta, Mitsue Sano, Mayo Shigeta, Yasuhisa Matsui, Yumiko Saga, Makoto Tachibana, Yoichi Shinkai and Mitunori Saitou. (2007) Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development* 134, 2627-2638.



## Regulation of active DNA demethylation in early mouse embryos and primordial germ cells

Kohtaro Morita<sup>1</sup>, Yuki Hatanaka<sup>2</sup>, Tomoko Amano<sup>1,2</sup> and Kazuya Matsumoto<sup>1,2</sup>

Early embryos and primordial germ cells (PGCs) undergo extensive epigenetic reprogramming in mammals. In these cells, methyltransferases and acetyltransferases have been identified and their activities are involved in the epigenetic reprogramming by mediating the histone modifications and DNA methylation, except for DNA demethylase. Recent reports have indicated mechanisms of active DNA demethylation. One of mechanism are that *Ten-eleven translocation 3 (Tet3)*, which is intensely expressed in oocytes and zygotes, regulates the active DNA demethylation by global conversion of 5-methylcytosine (5mC) to 5-hydroxymethylcytosine (5hmC). In addition, activation-induced deaminase (AID) and apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptides (APOBEC) are involved in active DNA demethylation during PGCs development by converting 5mC to thymine. Furthermore, AID is required for induction of *Oct4/Pou5f1* and *Nanog* expression in mouse embryonic stem cells (ESCs), and TET1 has an important role in mouse ESCs through maintaining the expression of *Nanog*. Thus, clarifying the mechanisms of active DNA demethylation leads to understanding the reprogramming toward pluripotency and totipotency. Here, we will review mechanisms of active DNA demethylation during preimplantation embryos and PGC development.

Keywords: active DNA demethylation, early embryos, epigenetics, histone modification, primordial germ cells

---

<sup>1</sup> Department of Biology Oriented Science and Technology, Kinki University, <sup>2</sup> Graduate School of Biology Oriented Science and Technology, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan