

## 低濃度メチル水銀による神経分化に関わるエピゲノム標的因子の探索

主任研究者 栗田 尚佳

所属研究機関 岐阜薬科大学

薬物治療学研究室 講師

### 研究要旨

妊婦がメチル水銀 (MeHg) が生物濃縮された魚介類を摂取することによる、胎児への影響が懸念されている。我々はこれまでに神経分化期 MeHg 曝露が神経突起伸長の抑制を引き起こし、その変化に DNA メチル化転移酵素の DNMT を介した DNA メチル化上昇、ならびにヒストン脱アセチル化酵素の HDAC を介したヒストン H3 アセチル化減少が関与することを明らかにしている。本年度では、神経分化期 MeHg 曝露が神経突起伸長などの表現型に影響を及ぼす関連遺伝子のエピゲノム解析を行った。ヒト胎児脳由来不死化細胞 (LUHMES 細胞) を用いて神経分化誘導を行い、神経分化 2 日目から 8 日目まで MeHg (0.1, 1 nM) を 6 日間曝露した。分化 8 日目において、神経突起伸長を IN CELL ANALYZER によって解析し、分化 4、10、16 日目において、神経スパイク頻度を MAESTRO により測定した。分化 8 日目において、遺伝子発現量はリアルタイム RT-PCR 法、タンパク発現量は Western blot 法で解析した。DNA メチル化はバイサルファイトシーケンス法、ヒストン修飾および転写因子のプロモーター領域への結合量は、クロマチン免疫沈降法で解析した。MeHg (1 nM) 曝露群において、神経突起伸長と神経スパイク頻度は有意に減少した。したがって、MeHg (1 nM) 群に注目し、神経突起伸長やシナプス形成に関わる遺伝子として、*NR4A1* を検討した結果、MeHg (1 nM) 曝露によって遺伝子発現量、タンパク発現量ともに有意に減少した。次に、*NR4A1* の遺伝子プロモーター領域のエピジェネティクス変化を検討したところ、上流 -0.4 ~ -0.5 kb の CREB 結合配列 (CRE) における DNA メチル化レベルが MeHg 曝露により上昇していた。さらに、*NR4A1* 遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾を検討したところ、MeHg 曝露により、ヒストン H3 リジン 14 のアセチル化およびヒストン H3 リジン 9 のアセチル化レベルの減少が確認された。さらに、これらのプロモーター領域の CREB および CBP の結合量も MeHg による減少が確認された。LUHMES 細胞において低濃度 MeHg による神経突起伸長抑制に関連する遺伝子として、*NR4A1* を見出した。さらに、MeHg 曝露による *NR4A1* 遺伝子発現量減少には、遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化の上昇、ヒストンアセチル化減少などの、転写抑制に働くエピゲノム変化が関与することが示唆された。

#### 【研究協力者】

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 衛生化学分野

安孫子ユミ

#### 【研究参加者】

## I 研究目的

現在、メチル水銀 (MeHg)は、魚介類摂取を介した、妊婦・胎児への日常的な低濃度曝露影響が懸念されている。これまでに申請者は、生涯のうち発達期に、特に顕著な変化が認められるエピジェネティクスに注目し、低濃度 MeHg 曝露による神経分化影響とエピゲノム攪乱を見出してきた (Go et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; Go et al., *Arch Toxicol.* 2021)。本研究は、これまでの知見を基に、低濃度 MeHg 曝露によるエピジェネティクスメカニズムをさらに詳細に解明するために、①低濃度 MeHg 曝露による直接的な作用点、② MeHg のエピゲノム変化を介する下流遺伝子群の解析の2点について検討する。エピジェネティクス解析は主に遺伝子転写メカニズム解析が中心になる。ヒトとマウス間では遺伝子プロモーターにおける、転写因子結合部位が大幅に違うことが多々あるため、正確なエピゲノムメカニズムの理解には、ヒトの実験モデルが必要になる。

本研究の目的は、低濃度 MeHg 曝露による神経分化への影響と、そのメカニズムをエピジェネティクスに注目し、ヒト *in vitro* 神経分化系を用いて詳細に解明することである。本年度は、②MeHg のエピゲノム変化を介する下流遺伝子の解析について、NR4A1 に注目して解析を行った。

## II 材料と方法

LUHMES 細胞の神経誘導は、basic fibroblast growth factor (bFGF)、ドキシサイクリン、cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)、glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)を含む分化誘導培地で8日間培養した。MeHg 0.1, 1 nM 曝露を分化誘導2日目から8日目まで行った。分化8日目において MeHg 曝露による神経突起伸長について TUJ1 で蛍光免疫染色後に、IN CELL ANALYZER 2200 により網羅的に形態を評価し、分化16日目においては

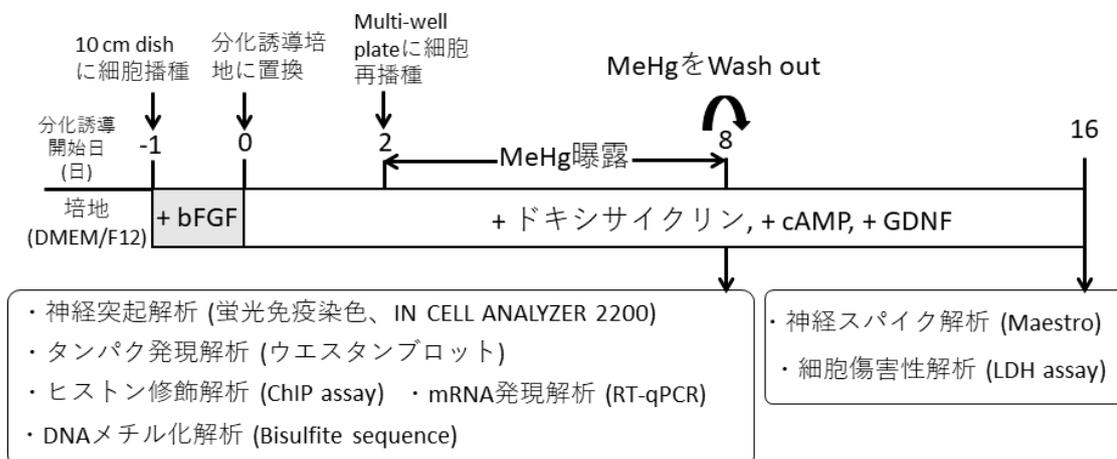


Figure 1. MeHg曝露条件と解析方法

神経スパイク頻度を Maestro MEA system、細胞毒性を LDH assay で解析した。さらに分化 8 日目において、遺伝子発現量を Real time RT-PCR、タンパク発現量をウエスタンブロット法、DNA メチル化をバイサルファイトシーケンス法、ヒストン修飾ならびに遺伝子プロモーター領域における転写因子結合量をクロマチン免疫沈降法で解析した。(Fig.1)

(倫理面への配慮)

本研究において臨床検体を用いる研究およびヒトを対象とする研究内容は含まれない。

### III 研究結果

1. MeHg 曝露による神経スパイク活性と神経突起伸長の変化 MeHg 曝露後分化 8 日目において、MeHg 1 nM 群において、有意な神経突起伸長抑制が確認された (Fig.2A)。また、神経スパイク活性は分化後 16 日目において、MeHg 1 nM 群において有意な抑制が認められた

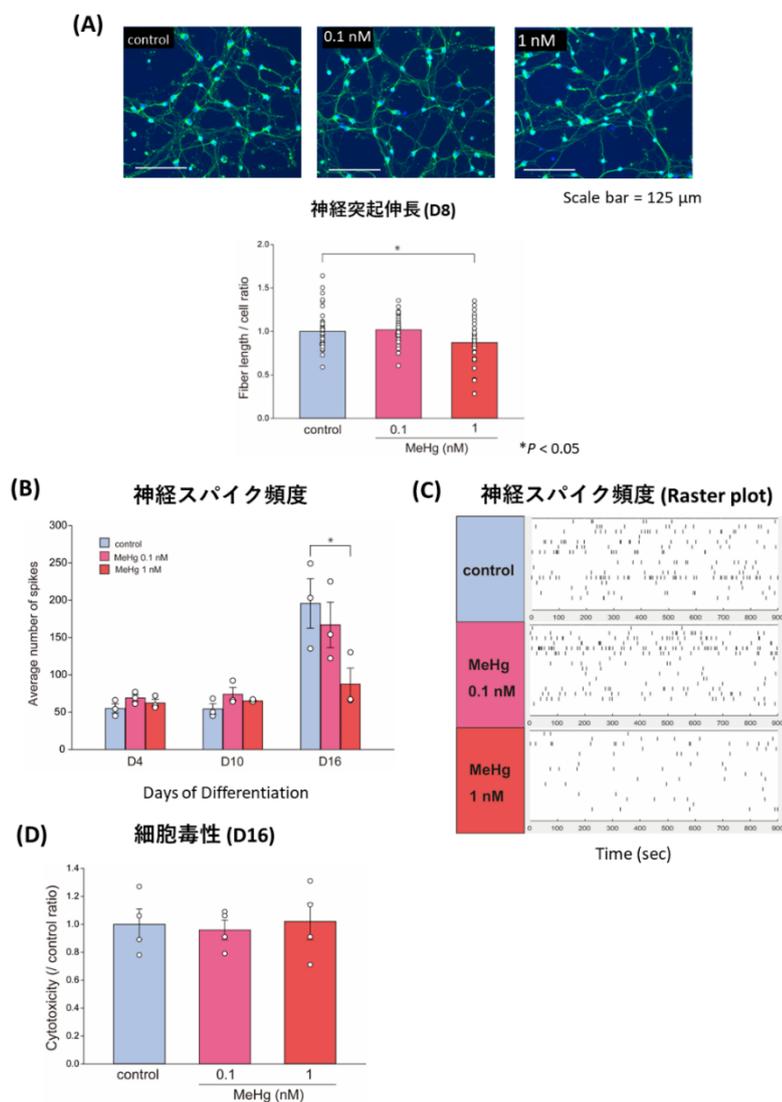


Figure 2. MeHg 曝露による神経スパイクと神経突起伸長の変化

(Fig.2B and 2C)。また、分化後 16 日目において MeHg による細胞毒性は確認されなかった (Fig.2D)。以降の解析は、神経機能への影響が観察された MeHg 1 nM に絞って解析を行った。

## 2. MeHg による核内受容体 NR4A1 発現量の変動

神経シナプスネットワークや神経突起伸長に関わる遺伝子として、オーファン核内受容体である Nuclear Receptor 4A1 (NR4A1) に注目した。MeHg 1 nM 曝露による発現変化を解析したところ、mRNA レベルならびにタンパクレベル共に MeHg 曝露により有意な減少を確認した (Fig.3)。

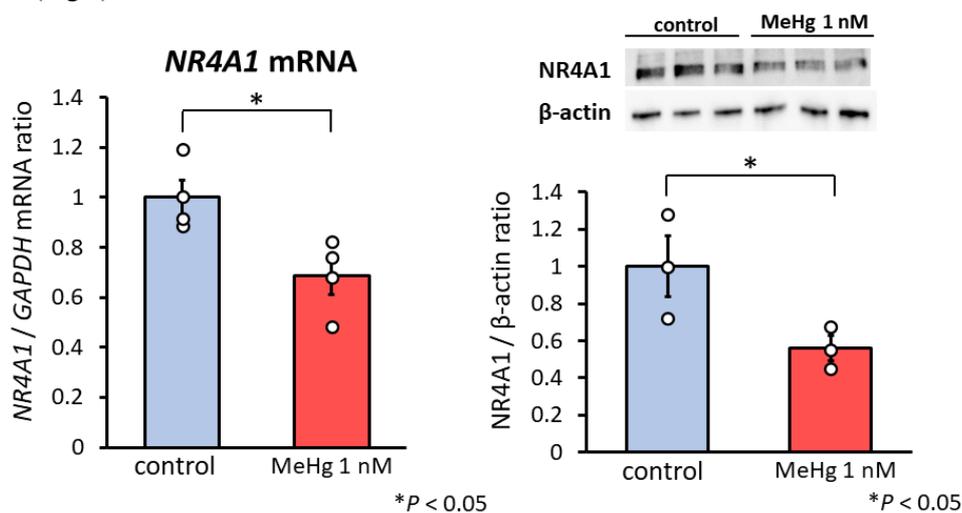


Figure 3. MeHgによる核内受容体NR4A1発現量の変動

## 3. MeHg 曝露による NR4A1 遺伝子プロモーターの DNA メチル化の変化

MeHg 1 nM で発現が抑制された NR4A1 の遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化につ

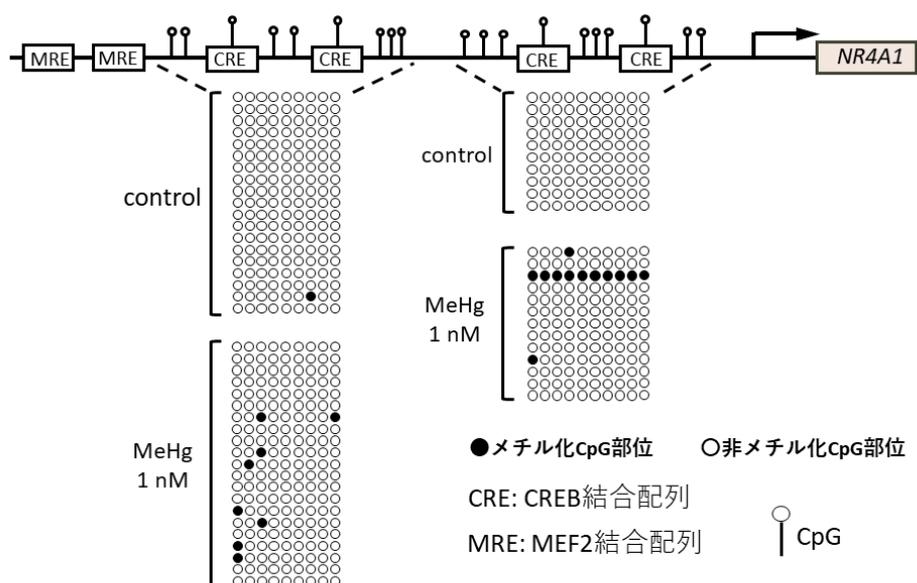


Figure 4. MeHgによるNR4A1遺伝子プロモーターのDNAメチル化の変化

いてバイサルファイトシーケンス法を用いて解析を行った。その結果、転写因子の CREB の結合サイトである CRE 周辺の DNA メチル化の上昇が、MeHg 1 nM 曝露群において観察された (Fig.4)。

#### 4. MeHg 曝露による NR4A1 遺伝子プロモーターのヒストン修飾の変化

MeHg 1 nM で発現が抑制された NR4A1 の遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾についてクロマチン免疫沈降法を用いて解析を行った。転写活性化のヒストン修飾であるヒストン H3K9 アセチル化ならびにヒストン H3K14 アセチル化のレベルが MeHg 曝露により有意に減少した (Fig. 5)。一方、転写抑制のヒストン修飾のうち、ヒストン H3K9me3 レベルは MeHg による変化はなく、ヒストン H3K27me3 レベルは MeHg 曝露により上昇した (Fig.5)。

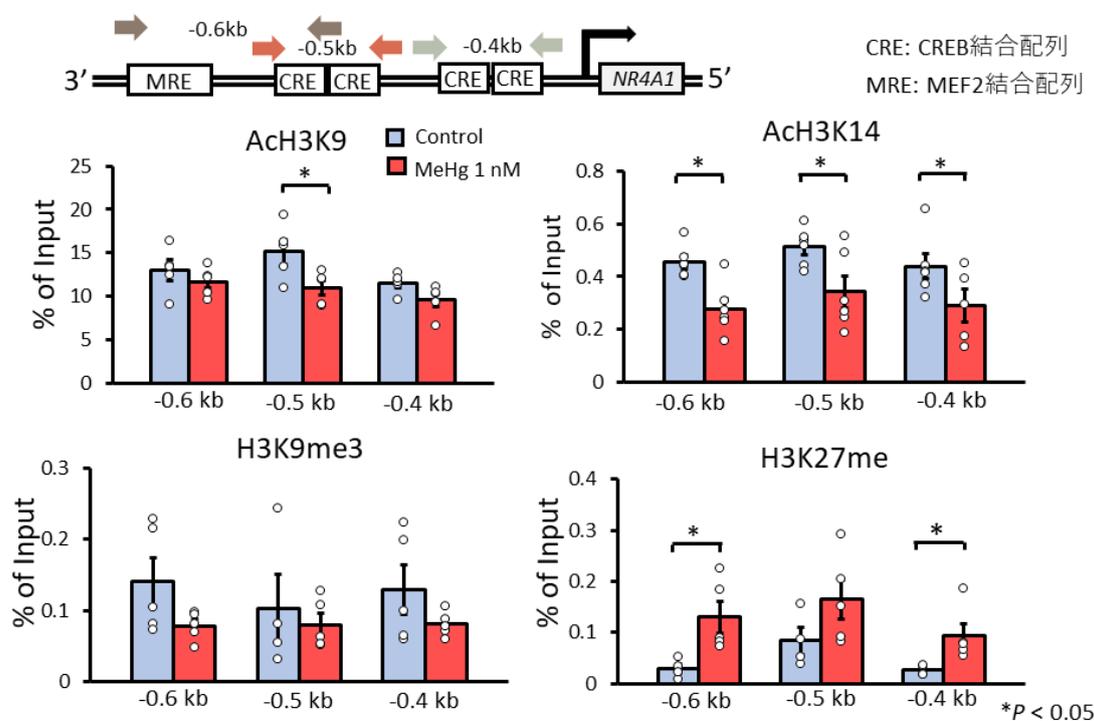
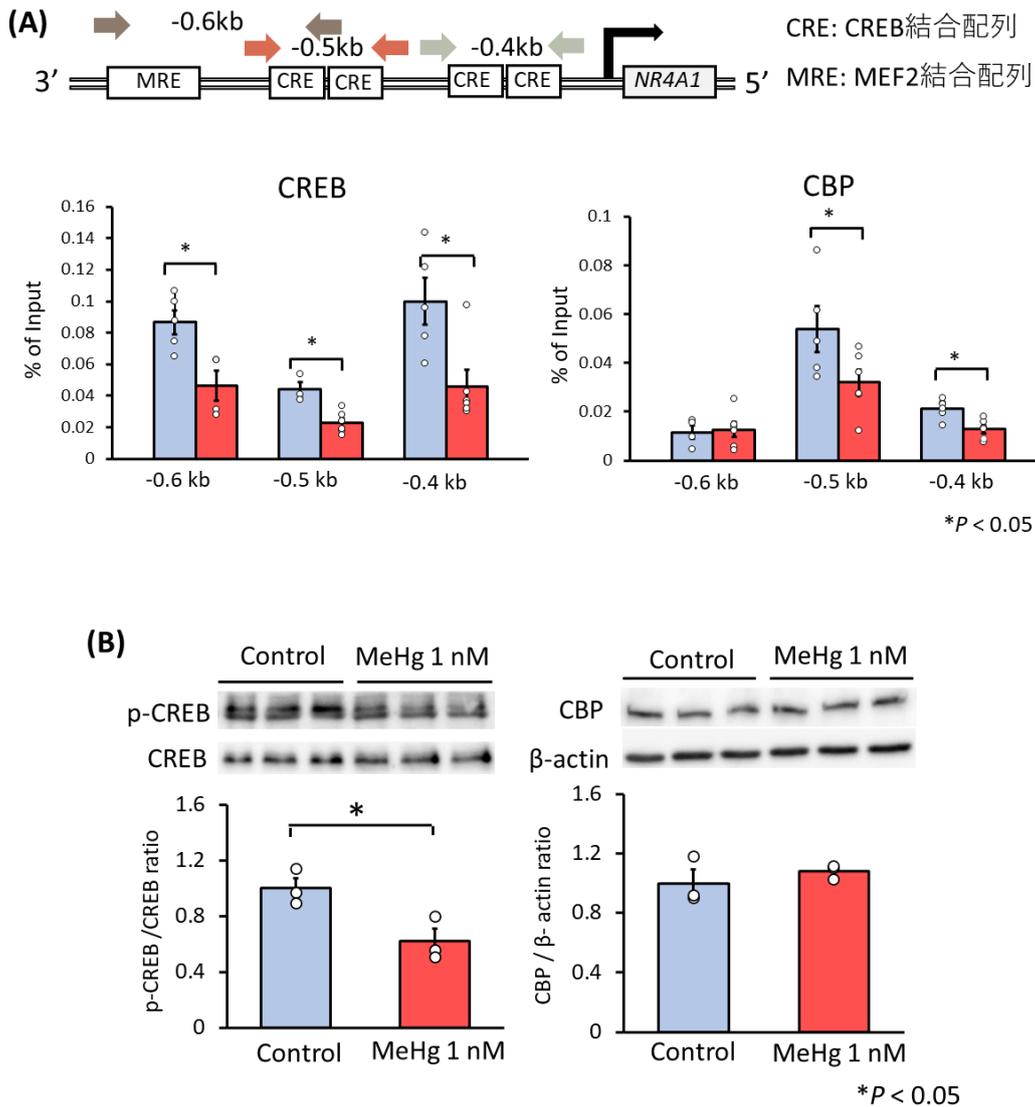


Figure 5. MeHgによるNR4A1遺伝子プロモーターのヒストン修飾の変化

#### 5. MeHg 曝露による NR4A1 遺伝子プロモーターへの転写因子結合量の変化

NR4A1 遺伝子プロモーター領域において、MeHg 曝露による DNA メチル化の上昇 (Fig.3) ならびに転写活性化のヒストン修飾レベルの減少 (Fig.4) が確認されたため、NR4A1 遺伝子プロモーターは転写を負に制御するエピゲノム状態であると考えられる。そこで、NR4A1 遺伝子プロモーターにおける転写因子結合量をクロマチン免疫沈降法にて解析を行った。すると、NR4A1 プロモーター領域の CREB 結合配列 (CRE) への CREB および CBP の結合量が、MeHg 曝露により有意に減少した (Fig. 6A)。細胞全体における CREB のリン酸化は



**Figure 6. MeHg曝露によるNR4A1遺伝子プロモーターへの転写因子結合量の変化**

MeHg 曝露により減少し、CBP 発現量は MeHg 曝露により変化は認められなかった (Fig. 6B)。

#### IV 考察

本年度の研究成果において、MeHg 1 nM 曝露がこれまでに我々が報告してきた神経突起伸長抑制に加えて、神経スパイク活性の抑制を引き起こすことが新たに確認された (Fig. 1A-1C)。その時は MeHg 曝露による細胞毒性は認められなかった (Fig. 1D) ので、神経スパイク活性の抑制は MeHg 曝露による細胞毒性に起因するものではないと考えられる。

これらの神経機能で変化が認められた MeHg 1 nM に絞って、以降の解析を進めた。これらの神経機能に関わる標的遺伝子として、NR4A1 に注目した。これまでに、NR4A1 に関しては、HDAC 阻害剤処置により発現増加、神経突起伸長促進、記憶機能やシナプス可塑性を

増強する (Vecsey et al., *J Neurosci.* 2007; Chen et al., *Neuron.* 2019; Tomioka et al., *Neurosci Res.* 2014)、DNMT1 阻害により発現が増加する (Chen et al., *Oncotarget.* 2016) などのエピジェネティクスを介した発現制御が報告されている。本解析において、MeHg 曝露により NR4A1 発現量は mRNA レベルとタンパクレベルともに有意に減少した (Fig. 2)。次に、この NR4A1 の MeHg 曝露による発現量減少に、エピジェネティクス変化が関わっているかを調べるために、プロモーター領域の DNA メチル化とヒストン修飾の解析を行った。NR4A1 遺伝子プロモーター領域の転写因子の CREB が結合する CRE において、MeHg 曝露による DNA メチル化の上昇 (Fig. 4)、ならびに転写活性化のヒストン修飾であるヒストン H3K9 アセチル化ならびにヒストン H3K14 アセチル化のレベルが MeHg 曝露により有意に減少した (Fig. 5)。一方、転写抑制のヒストン修飾のうち、ヒストン H3K9me3 レベルは MeHg による変化はなく、ヒストン H3K27me3 レベルは MeHg 曝露により上昇した (Fig. 5)。

以上の結果から、NR4A1 遺伝子プロモーターは転写を負に制御するエピゲノム状態であると考えられる。そこで、NR4A1 遺伝子プロモーターにおける転写因子結合量をクロマチン免疫沈降法にて解析を行った。すると、NR4A1 プロモーター領域の CREB 結合配列 (CRE) への CREB および CBP の結合量が、MeHg 曝露により有意に減少した (Fig. 6A)。細胞全体における CREB のリン酸化は MeHg 曝露により減少し、CBP 発現量は MeHg 曝露により変化は認められなかった (Fig. 6B)。

以上より、低濃度 MeHg による神経突起伸長抑制に関連する遺伝子として、NR4A1 を見出した。さらに、MeHg 曝露による NR4A1 遺伝子発現量減少には、遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化の上昇、ヒストンアセチル化減少などの、転写抑制に働くエピゲノム変化が関与することが示唆された (Fig. 7)。本年度の成果は、学術雑誌 *Toxicology Letters* に報告した (Go et al., *Toxicol Lett.* 2023)。

## V 結論

低濃度 MeHg による神経突起伸長抑制に関連する遺伝子として、NR4A1 を見出し、その MeHg 曝露による NR4A1 遺伝子発現量減少には、遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化の上昇、ヒストンアセチル化減少などの、転写抑制に働くエピゲノム変化が関与することが示唆された。

## VI 今後の課題

本年度は、標的遺伝子の 1 つとして NR4A1 を見出し、そのエピジェネティクス変化を介した発現制御のメカニズムを明らかにした。今後は、個々の下流遺伝子の探索のみならず、ゲノムワイドな網羅的エピゲノム解析を行い、分子ネットワーク単位としてのエピゲノム変化を捉える必要がある。また、MeHg の直接的な標的候補を探索する足掛かりとして、DNMT1、HDAC3、HDAC6 の MeHg による増加のメカニズムを解明しようとしているが、現在、DNMT1 の分解機構に注目し、解析中である。

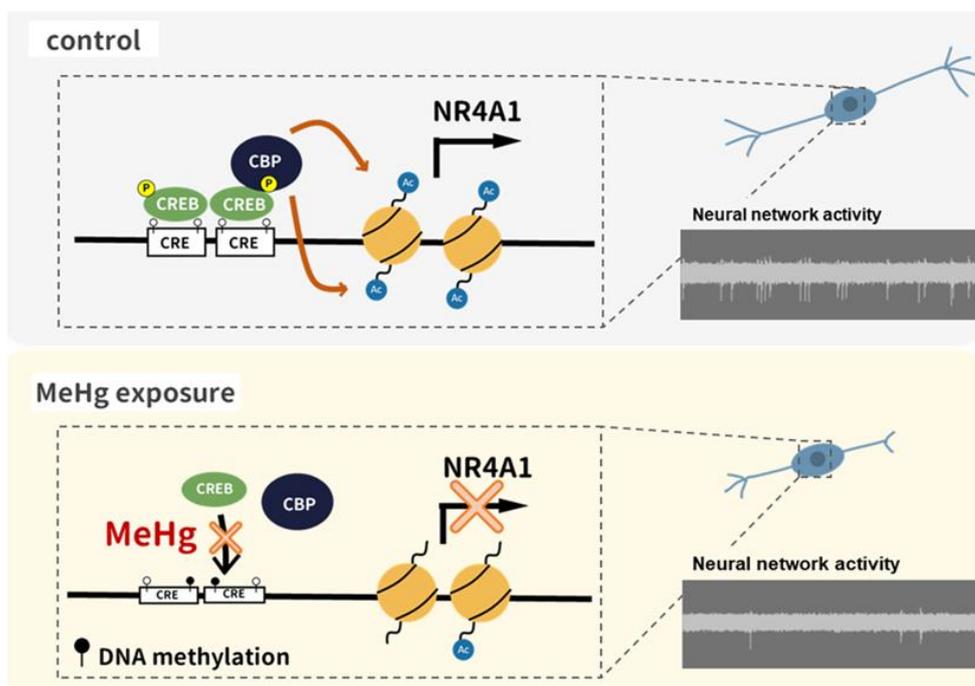


Figure 7. 本年度の成果のまとめ

本研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Go S, Masuda H, Tsuru M, Inden M, Hozumi I, Kurita H. Exposure to a low concentration of methylmercury in neural differentiation downregulates NR4A1 expression with altered epigenetic modifications and inhibits neuronal spike activity in vitro. *Toxicol Lett* 374: 68-76 2023.
- 2) Go S\*, Kurita H\*, Hatano M, Matsumoto K, Nogawa H, Fujimura M, Inden M, Hozumi I. DNA methyltransferase- and histone deacetylase-mediated epigenetic alterations induced by low-level methylmercury exposure disrupt neuronal development. *Arch Toxicol* 95: 1227–1239 2021. (\*equally contributed)
- 3) Go S\*, Kurita H\*, Matsumoto K, Hatano M, Inden M, Hozumi I. Methylmercury causes epigenetic suppression of the tyrosine hydroxylase gene in an in vitro neuronal differentiation model. *Biochem Biophys Res Commun.* 502(4) 435-441 2018. (\*equally contributed)

引用文献

- 1) Go S, Kurita H, Hatano M, Matsumoto K, Nogawa H, Fujimura M, Inden M, Hozumi I. DNA methyltransferase- and histone deacetylase-mediated epigenetic alterations induced by low-level methylmercury exposure disrupt neuronal development. *Arch Toxicol* 95: 1227–1239 2021.
- 2) Go S, Kurita H, Matsumoto K, Hatano M, Inden M, Hozumi I. Methylmercury causes epigenetic suppression of the tyrosine hydroxylase gene in an in vitro neuronal differentiation model. *Biochem*

*Biophys Res Commun.* 502(4) 435-441 2018.

3). Vecsey, C.G., Hawk, J.D., Lattal, K.M., Stein, J.M., Fabian, S.A., Attner, M.A., Cabrera, S.M., McDonough, C.B., Brindle, P.K., Abel, T., Wood, M.A. Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB: CBP-dependent transcriptional activation. *J. Neurosci.* 27, 6128–6140 2007.

4). Chen, Y., Wang, Y., Ertürk, A., Kallop, D., Jiang, Z., Weimer, R.M., Kaminker, J., Sheng, M. Activity-induced Nr4a1 regulates spine density and distribution pattern of excitatory synapses in pyramidal neurons. *Neuron* 83, 431–443 2014.

5). Tomioka, T., Maruoka, H., Kawa, H., Yamazoe, R., Fujiki, D., Shimoke, K., Ikeuchi, T. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces neurite outgrowth in PC12 cells via the epigenetically regulated expression of the *nur77* gene. *Neurosci. Res.* 88, 39–48 2014.

6). Chen, Y.T., Liao, J.W., Tsai, Y.C., Tsai, F.J. Inhibition of DNA methyltransferase 1 increases nuclear receptor subfamily 4 group A member 1 expression and decreases blood glucose in type 2 diabetes. *Oncotarget* 7, 39162–39170 2016.

7) Go S, Masuda H, Tsuru M, Inden M, Hozumi I, Kurita H. Exposure to a low concentration of methylmercury in neural differentiation downregulates NR4A1 expression with altered epigenetic modifications and inhibits neuronal spike activity in vitro. *Toxicol Lett* 374: 68-76 2023.

#### 英文要約 (Abstract)

Methylmercury (MeHg) is a well-known developmental neurotoxin. Our previous research showed that the inhibition of neurite extension by exposure to a low level of MeHg (1 nM) was attributed to the decrease of acetylation of histone H3 and the increase of DNA methylation. However, the target molecules responsible for the neurological dysfunctions caused by MeHg exposure have not been identified. This study focused on a nuclear receptor subfamily 4 group A member 1 (NR4A1), which is reported to be related to synaptic plasticity and neurite extension. LUHMES cells, which are derived from human fetal brain, were treated with 0.1 and 1 nM MeHg beginning at two days of differentiation and continued for 6 consecutive days. The present study showed that exposure to a 1 nM MeHg during neural differentiation inhibited neuronal spike activity and neurite extension. Furthermore, MeHg exposure increased DNA methylation, and altered histone modifications for transcriptional repression in the *NR4A1* promoter region to decrease the levels of *NR4A1* expression. In addition, MeHg exposure inhibited the mobilization of cAMP response element-binding protein (CREB) and CREB binding protein (CBP) in the *NR4A1* promoter region. These results suggest that MeHg inhibits the recruitment of the CREB-CBP complex to the *NR4A1* promoter region and impairs neuronal functions associated with *NR4A1* repression via a decrease in acetylation of histone H3 lysine 14 levels. Conclusively, this study demonstrated that MeHg exposure during neuronal differentiation could induce neurological dysfunctions even at a low concentration *in vitro*. These dysfunctions could be associated with the

transcriptional repression of NR4A1 by the dissociation of CREB and CBP from the *NR4A1* promoter region due to the alterations of epigenetic modifications.