

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。初年度において、MeHg 曝露により発現低下を見出しているオーファン受容体の NR4A1 について、プロモーター領域におけるエピゲノム変化を報告した。

本年度は、LUHMES 細胞について MeHg 曝露による DNMT1 のタンパク分解阻害・安定性上昇 (翻訳後修飾)の機構に注目し、その安定化に DNMT1 メチル化の低下の可能性を見出した。また、神経伝達に関わる遺伝子である *SYP* 及び *DLG4* では MeHg によって遺伝子発現量、タンパク発現量ともに減少した。次に、ヒストン修飾を検討したところ、*SYP* 遺伝子ではヒストン H3 アセチル化の減少とヒストン H3K27 トリメチル化の上昇が確認され、*DLG4* 遺伝子ではヒストン H3K27 トリメチル化の上昇が確認された。DNA メチル化については両遺伝子ともに MeHg により変動がある CpG は確認できたが、全体として変動はなかった。以上より、LUHMES 細胞において神経分化期の低濃度 MeHg 曝露が神経伝達に関連した遺伝子である *SYP* 及び *DLG4* のエピゲノム変化を介して、その発現を変化させることが示唆された。

【キーワード】 メチル水銀、神経発達、エピジェネティクス

【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】

岐阜薬科大学 薬物治療学研究室
位田雅俊、大内一輝、増田 遥、水流瑞貴、奥田安優、駒居和起

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、②MeHg 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。初年度において、MeHg 曝露により発現低下を見出しているオーファン受容体の *NR4A1* について、プロモーター領域におけるエピゲノム変化を報告した (Go et al., *Toxicol Lett.* 2023)。

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、DNMT1 の安定化に寄与する DNMT1 メチル化の修飾機構に及ぼす MeHg の影響 (Fig.1) 、ならびに MeHg のエピゲノム変化を介する下流遺伝子の解析について、*SYP*、*DLG4* に注目して解析を行った。

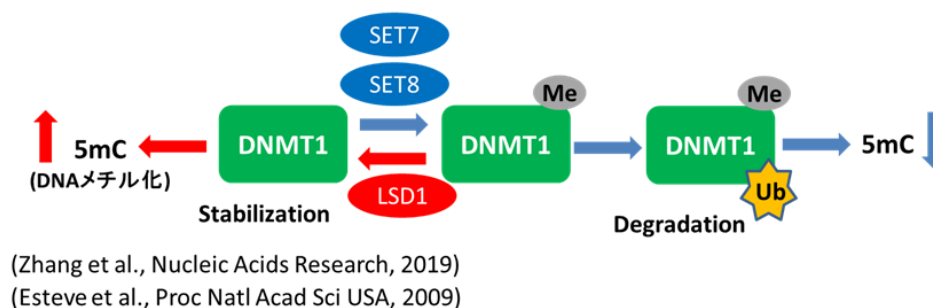


Figure 1. DNMT1の分解・安定化機構

II 材料と方法

1. 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、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、ヒストン修飾をクロマチン免疫沈降法で解析した。(Fig.2)

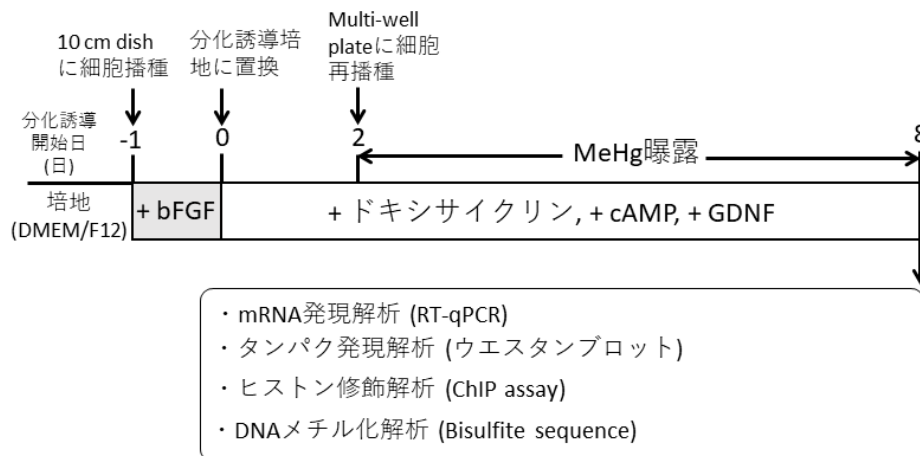


Figure 2. MeHg曝露条件と解析方法

(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 による DNMT1K142me の変化

我々はこれまでに MeHg 曝露により DNMT1 のタンパクレベルでの上昇を報告している (Go et al., *Arch Toxicol.* 2021) が、今回は DNMT1 の遺伝子レベルでの発現を解析したが、MeHg による有意な変化は認められなかった (Fig. 3A)。次に、DNMT1 の安定化に関わる DNMT1 の K142 のメチル化を解析したところ、MeHg により有意な減少が認められた (Fig. 3B)

2. MeHg による SET7、SET8、LSD1 発現の変化 DNMT1 のメチル化を担う酵素である SET7 および SET8 と、DNMT1 の脱メチル化を担う LSD1 について、発現量を確認したところ、MeHg による mRNA レベル、タンパクレベルともに有意な変動は認められなかった (Fig.4)。

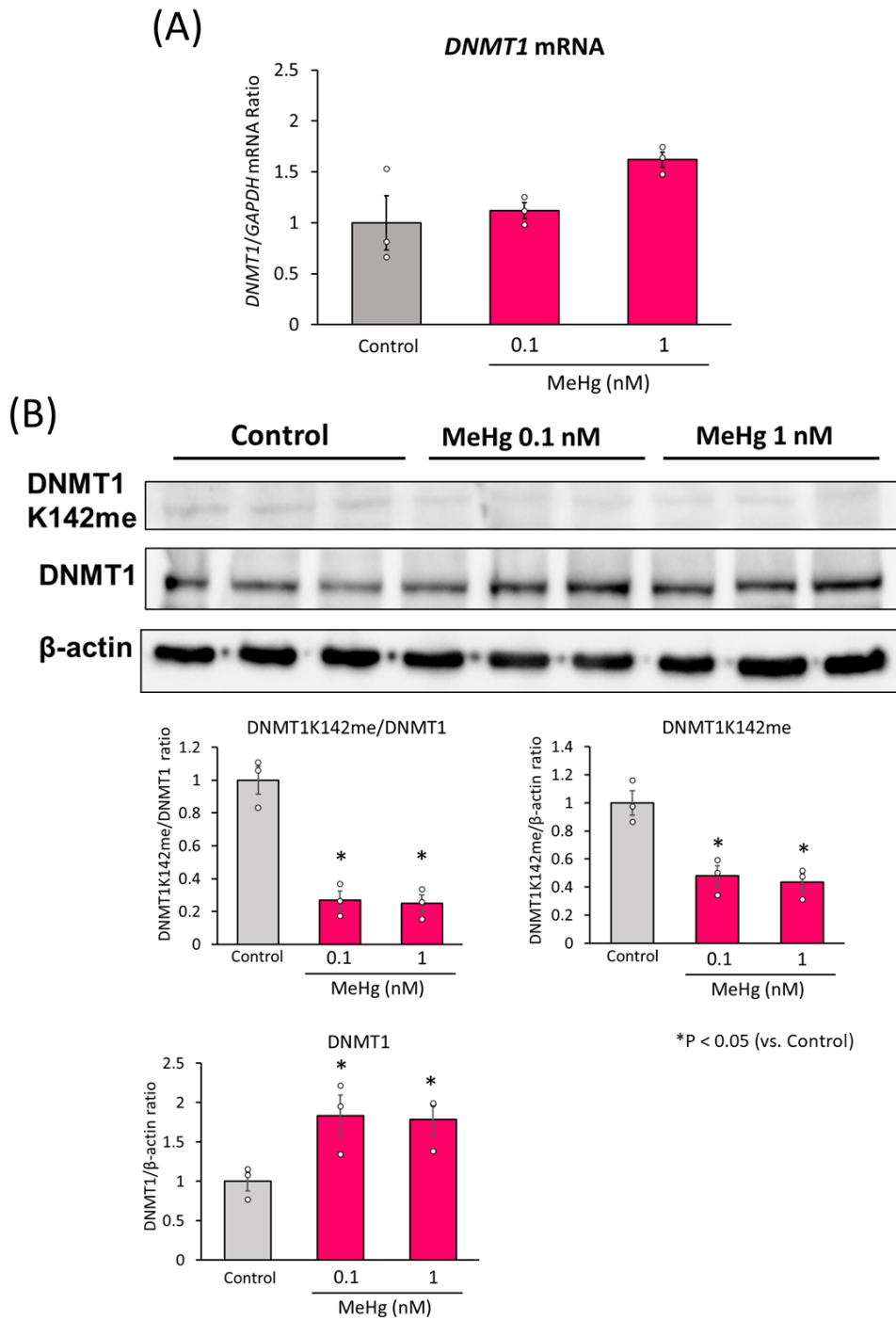


Figure 3. MeHgによるDNMT1 mRNAおよびDNMT1K142meレベルの変化

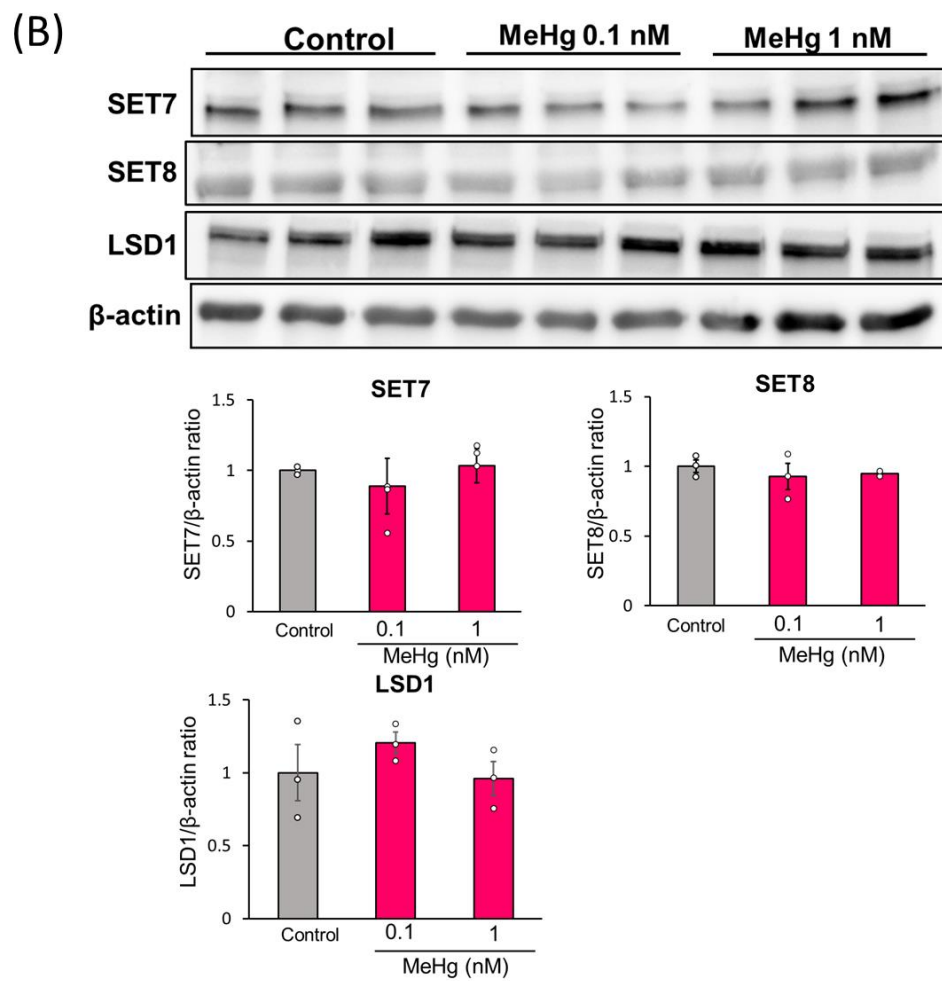
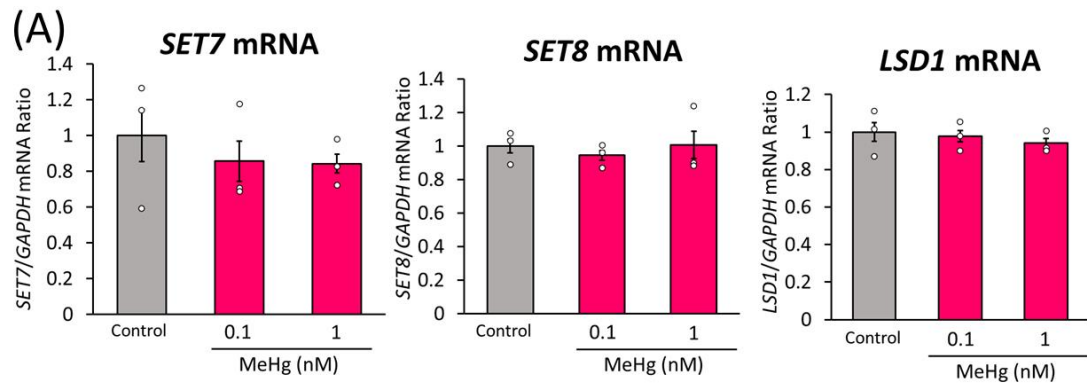


Figure 4. MeHgによるSET7, SET8, LSD1 レベルの変化

3. MeHg による SYP、DLG4 発現の変化

これまでに我々は、MeHg による神経スパイク活性の有意な低下を見出している (Go et al., *Toxicol Lett.* 2023)。そこで神経ネットワークに関わる遺伝子の *SYP* および *DLG4* について MeHg による変動を検討した。MeHg の濃度は先行報告で見出している神経突起伸長と神経スパイク活性に有意な低下が認められた MeHg 1 nM に注目して解析を行った (Go et al., *Toxicol Lett.* 2023)。*SYP*、*DLG4* の両遺伝子ともに、mRNA レベルとタンパク発現レベルの MeHg による有意な発現減少を確認した (Fig. 5)。

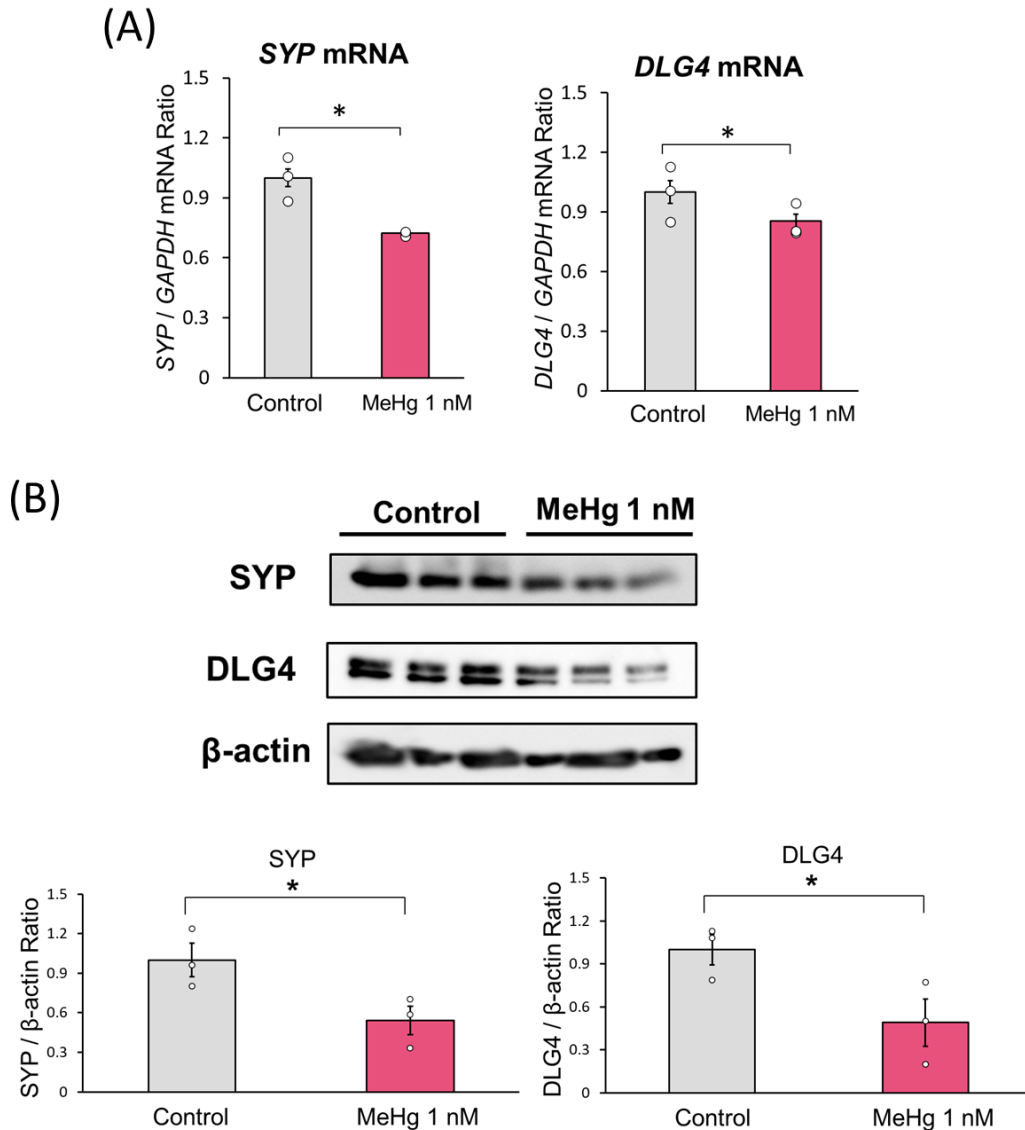


Figure 5. MeHgによるSYP, DLG4レベルの変化

4. MeHg による *SYP* および *DLG4* 遺伝子プロモーターのヒストン修飾の変化

SYP 遺伝子プロモーターのヒストン修飾変化を解析したところ、MeHg による転写活性の指標であるヒストン H3 アセチル化の減少と転写抑制の指標であるヒストン H3K27 トリメチル化の上昇が確認された (Fig. 6)。*DLG4* 遺伝子プロモーターでは転写抑制の指標であるヒストン H3K27 トリメチル化の上昇が確認された (Fig. 7)。

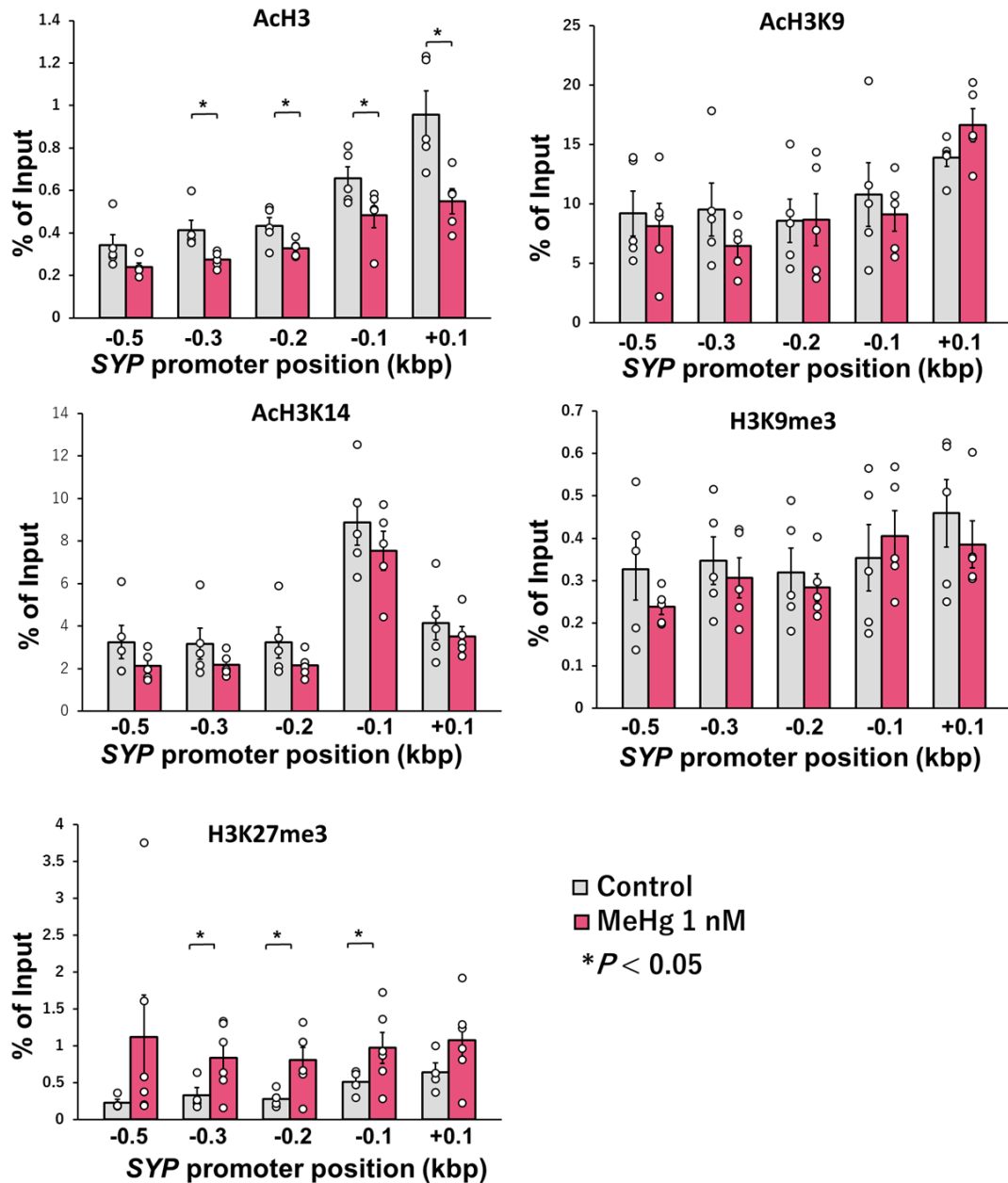


Figure 6. MeHgによる*SYP*遺伝子のヒストン修飾変化

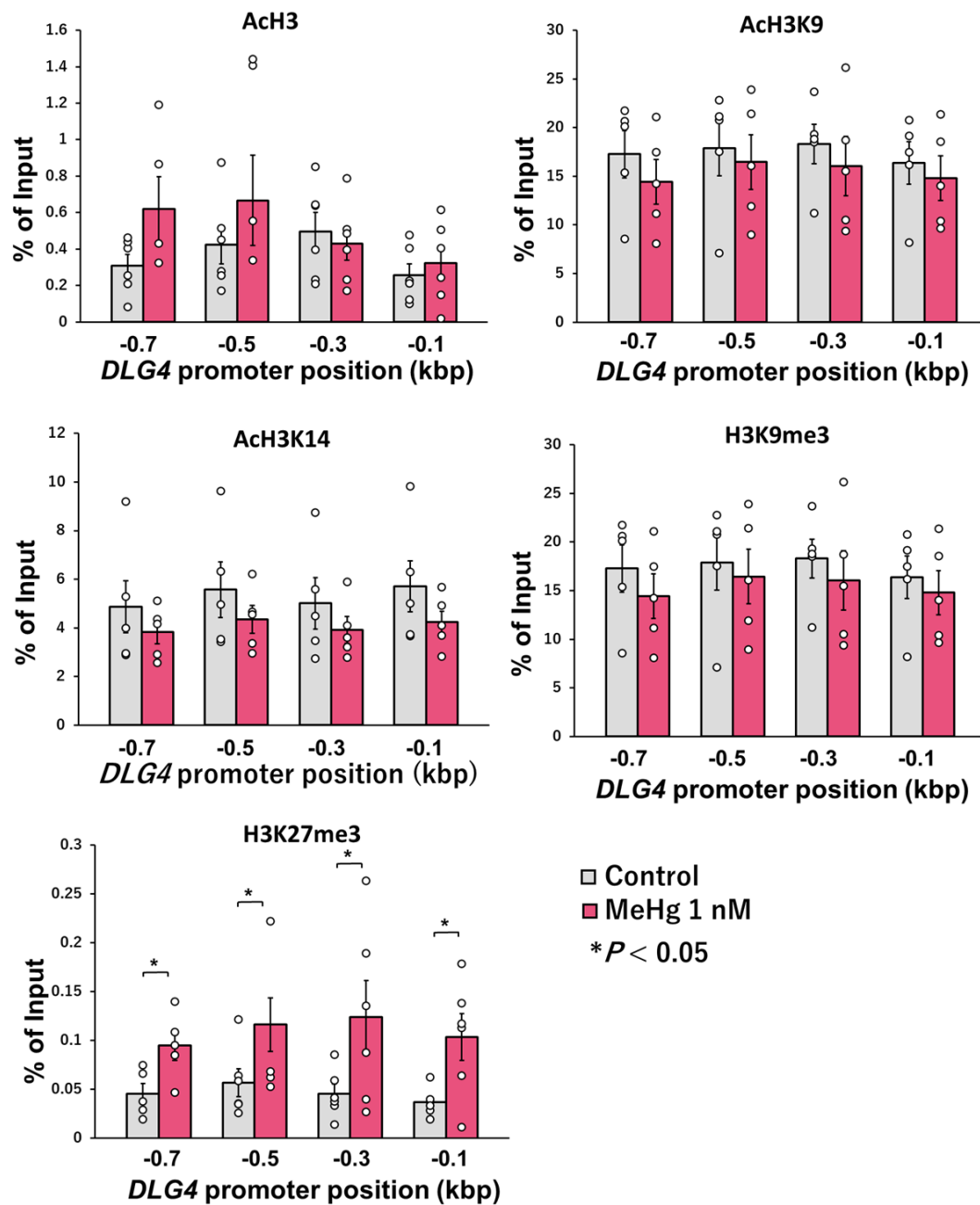


Figure 7. MeHgによる*DLG4*遺伝子のヒストン修飾変化

5. MeHgによる*SYP*および*DLG4*遺伝子プロモーターのDNAメチル化の変化

SYP 遺伝子プロモーターのDNAメチル化を解析したところ、今回解析対象のプロモーター領域の上流から18番目のCpGにおいてMeHgによる低メチル化、40番目のCpGにおいてMeHgによる高メチル化が確認された (Fig.8)。*DLG4* 遺伝子プロモーターのDNAメチル化についても同様な解析を行ったところ、プロモーター領域の上流から33番目のCpGにおいてMeHgによる低メチル化、49番目のCpGにおいてMeHgによる高メチル化が確認された

(Fig.9)。今回解析したプロモーター領域全体における DNA メチル化レベルの変化については、両遺伝子ともに MeHg による有意な変動は認められなかった (Fig.10)。

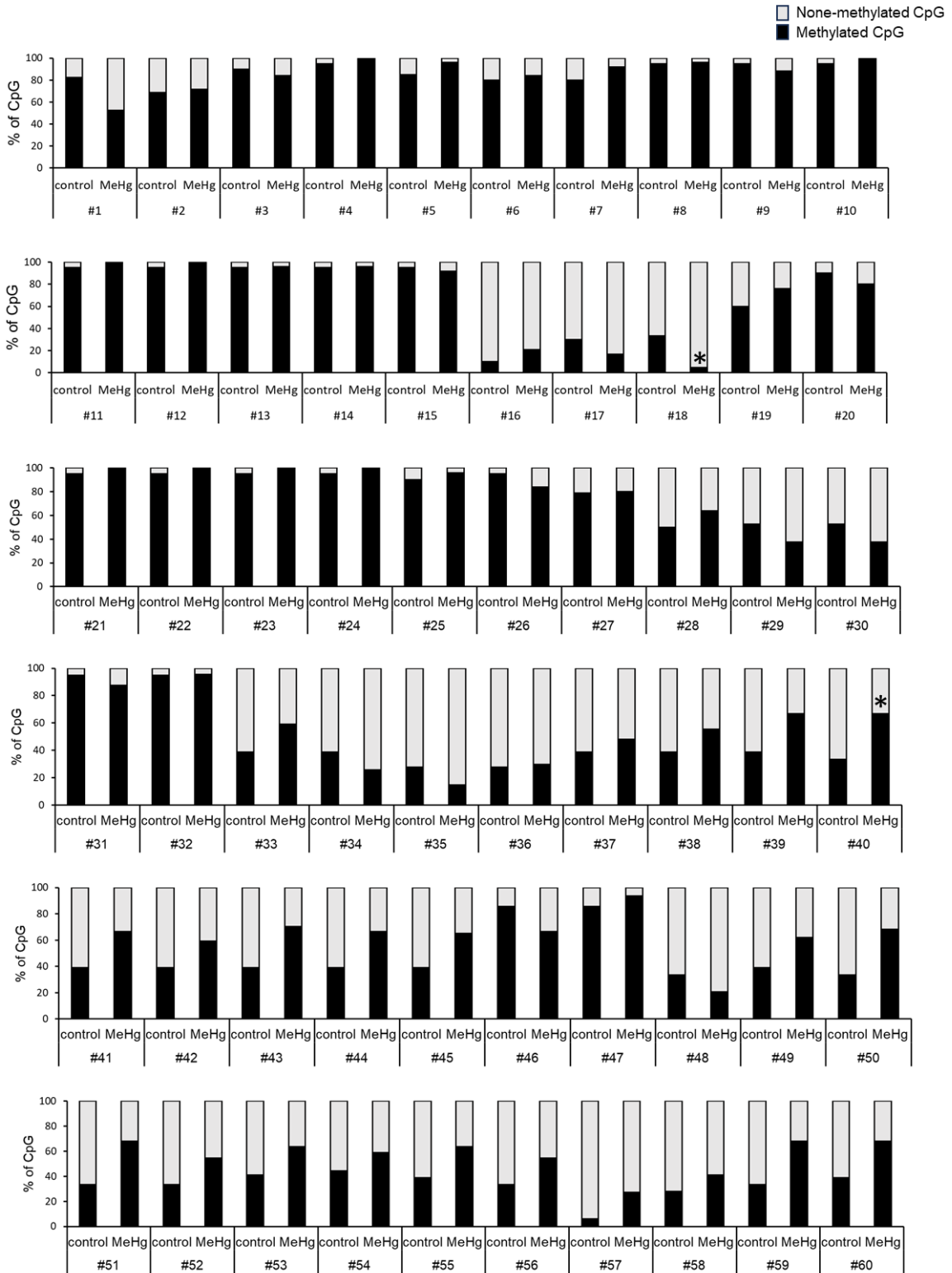


Figure 8. MeHgによるSYP遺伝子のDNAメチル化変化

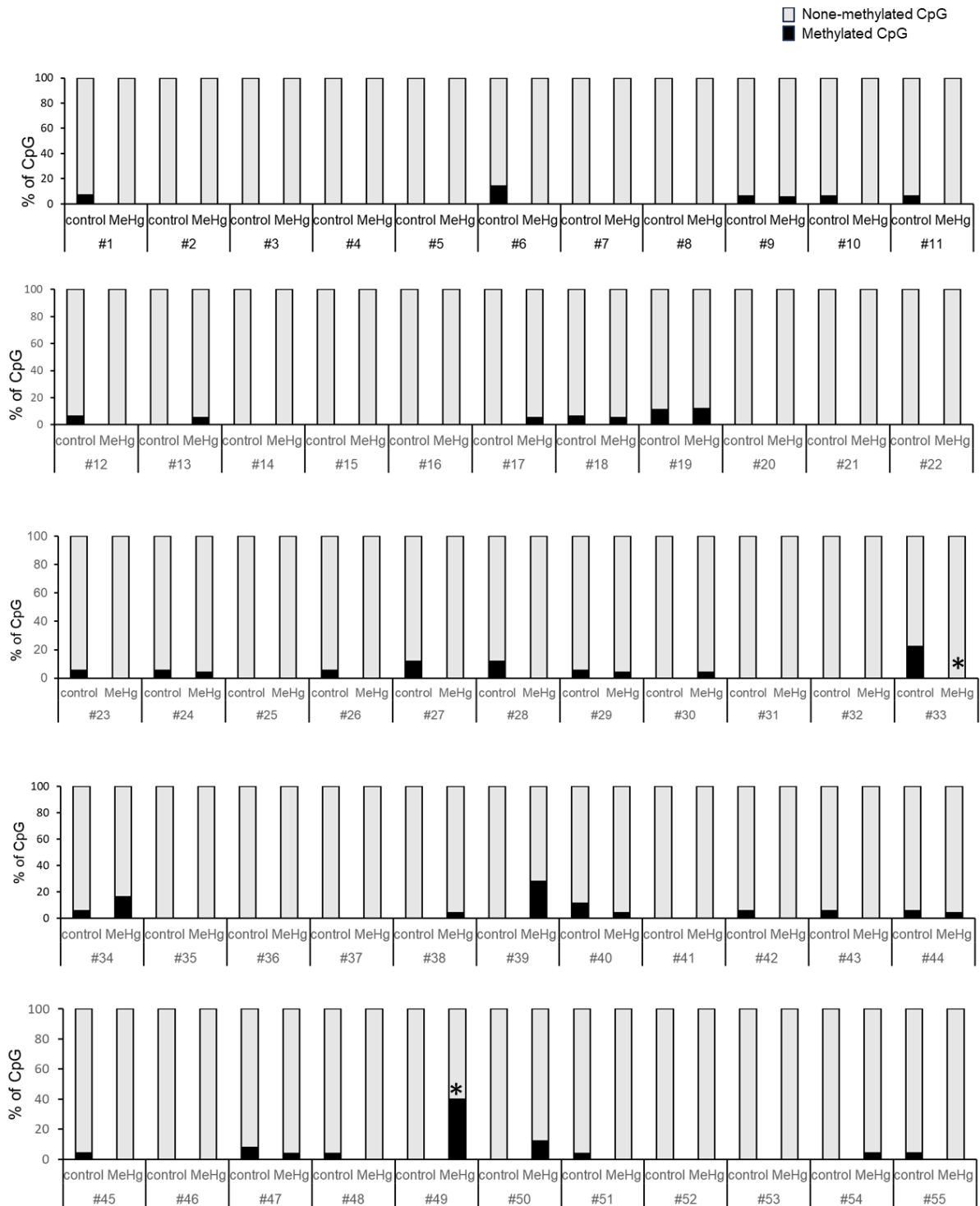


Figure 9. MeHgによるDLG4遺伝子のDNAメチル化変化

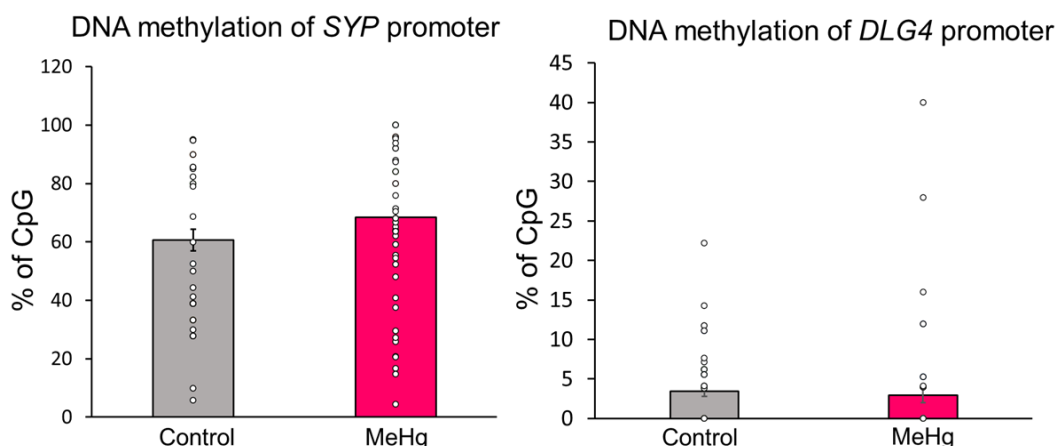


Figure 10. MeHgによるSYP遺伝子とDLG4遺伝子の全体のDNAメチル化変化

IV 考察

今回は DNMT1 の分解・安定機構に注目した (Fig.2)。DNMT1 のメチル化は自身の分解を促進することから、DNMT1K142me を測定したところ、MeHg によりそのレベルは低下した。一方、DNMT1 のメチル化を付加する酵素である SET7, SET8 および脱メチル化酵素である LSD1 の発現量は MeHg による変化は認められなかった (Fig.3)。以上より、DNMT1K142me の低下が DNMT1 の MeHg による安定化に関与する可能性が考えられる。また、SET7, SET8, LSD1 発現量自体には変化が認められなかったことから (Fig.4)、これらの酵素活性自体が MeHg により攪乱されている可能性が考えられる。

一方、神経ネットワークに関連する *SYP* および *DLG4* の遺伝子のエピジェネティクス解析を行った。*SYP* および *DLG4* の遺伝子の mRNA およびタンパクレベルの発現量は MeHg により減少した (Fig. 5)。続いて、両遺伝子のプロモーター領域のエピジェネティクス修飾を解析した。*SYP* 遺伝子ではヒストン H3 アセチル化の減少とヒストン H3K27 トリメチル化の上昇が確認され (Fig.6)、*DLG4* 遺伝子ではヒストン H3K27 トリメチル化の上昇が確認された (Fig.7)。MeHg により転写抑制の修飾変化を引き起こすことを確認した。DNA メチル化については両遺伝子ともに MeHg により変動がある CpG は確認できた (Fig.8, 9)が、全体として変動はなかった (Fig.10)。以上より、LUHMES 細胞において神経分化期の低濃度 MeHg 曝露が神経伝達に関連した遺伝子である *SYP* 及び *DLG4* のエピゲノム変化を介して、その発現を変化させることが示唆された。

V 結論

本年度は以下の2点について明らかにした。

- ① MeHg は DNMT1K142 のメチル化を減少させることで DNMT1 の安定化させ、DNA メチル化上昇を引き起こす可能性が示唆された。
- ② MeHg 曝露が神経伝達に関連した遺伝子である *SYP* 及び *DLG4* のエピゲノム変化を介して、その発現を変化させることが示唆された。

VI今後の課題

これまでに幾つかの遺伝子についてのエピジェネティクス変化を解析してきたが、ゲノムワイドなエピジェネティクス解析が必要である。そのために、RNA-seq および網羅的エピジェネティクス解析である Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC)-seq の大規模データを組み合わせた統合解析を行う予定である。また、マウスを用いた個体レベルでの解析が神経発達期の MeHg の影響を解析する上で必要である。そのため、妊娠マウスへの MeHg 曝露実験を行い、次世代における高次脳機能への影響とそのエピジェネティクス解析を行う予定である。

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, 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)

英文要約 (Abstract)

Methylmercury (MeHg) is a well-known developmental neurotoxin. We have previously shown that exposure to MeHg during neuronal differentiation causes suppression of neurite outgrowth, which is

mediated by increased DNA methylation via the DNA methyltransferase (DNMT) and decreased histone H3 acetylation via the histone deacetylase (HDAC). In the first year, we reported epigenetic changes in the promoter region of *NR4A1*, an orphan receptor whose expression we have found to be decreased by MeHg exposure.

In the second year, we focused on the mechanism of inhibition of proteolysis and increase in stability (post-translational modification) of DNMT1 by MeHg exposure in LUHMES cells and found the possibility that reduced DNMT1 methylation is responsible for its stabilization. In addition, both mRNA and protein expression levels were decreased by MeHg in *SYP* and *DLG4*, genes involved in neurotransmission. Next, we examined histone modifications and found a decrease in histone H3 acetylation and an increase in histone H3K27 trimethylation in the *SYP* gene and an increase in histone H3K27 trimethylation in the *DLG4* gene. Although DNA methylation level was changed at certain CpGs in both genes by MeHg exposure, there was no alteration overall DNA methylation. These results suggested that exposure to low concentrations of MeHg during neuronal differentiation in LUHMES cells alters the expression of *SYP* and *DLG4*, genes related to neurotransmission, via epigenetic changes.