

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 准教授

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。本研究では、神経発達期 MeHg 曝露実験系を用いて、①エピゲノム修飾酵素の調節分子メカニズムの解明、②エピジェネティクス変化を介する毒性表現型に関する標的遺伝子の探索、③マウスを用いた成熟後のエピジェネティクス解析、の3点について解析を進めた。これまでの約3年間の成果としては、①エピゲノム修飾酵素の調節分子メカニズムの解明については、1 nM MeHg 曝露 LUHMES 細胞を用いた *in vitro* 神経分化系において、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、MeHg による DNMT1 上昇には DNMT1 メチル化の低下によるタンパク安定化が寄与する可能性を見出した。②エピジェネティクス変化を介する毒性表現型に関する標的遺伝子の探索については、1 nM MeHg 曝露 LUHMES 細胞を用いた *in vitro* 神経分化系において、*NR4A1*、*SYP*、*DLG4* 遺伝子のプロモーター領域の転写抑制のエピゲノム変化が起き神経機能に影響を及ぼしていることを見出した。さらに、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析より、MeHg 曝露による Wnt シグナル経路の抑制ならびに *LRRTM1* 遺伝子発現低下を見出した。③マウスを用いた成熟後のエピジェネティクス解析では、胎生 12~14 日目に MeHg 3 mg/kg を妊娠マウスに曝露し、産まれた仔について 4 ヶ月齢において雌マウスで不安様行動が観察された。それに伴って皮質中のヒストン修飾のうち、転写抑制の修飾である H3K27me3 レベルが MeHg 3 mg/kg 群にて有意に増加した。今後はこれらのマウスの DNA メチル化などの更なるエピゲノム解析が必要である。以上から、神経分化期 MeHg 曝露による神経機能に及ぼす影響に関する新規エピゲノムメカニズムを見出した。

【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】

国立水俣病総合研究センター 基礎研究部

藤村 成剛

【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、奥田安優、駒居和起、中山幸恵、國友福叶

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エピゲノム修飾酵素の調節分子メカニズムの解明、②エピジェネティクス変化を介する毒性表現型に関する標的遺伝子の探索、③マウスを用いた成熟後のエピジェネティクス解析、の3点について検討する。

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解明することである。

II 材料と方法

1. *In vitro* 神経分化期 MeHg 曝露実験

細胞はヒト胎児脳由来不死化細胞の LUHMES 細胞を用いた。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 および RNA-seq、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クエンス法、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、網羅的エピゲノム解析として ATAC-seq を行った。(Fig.1)

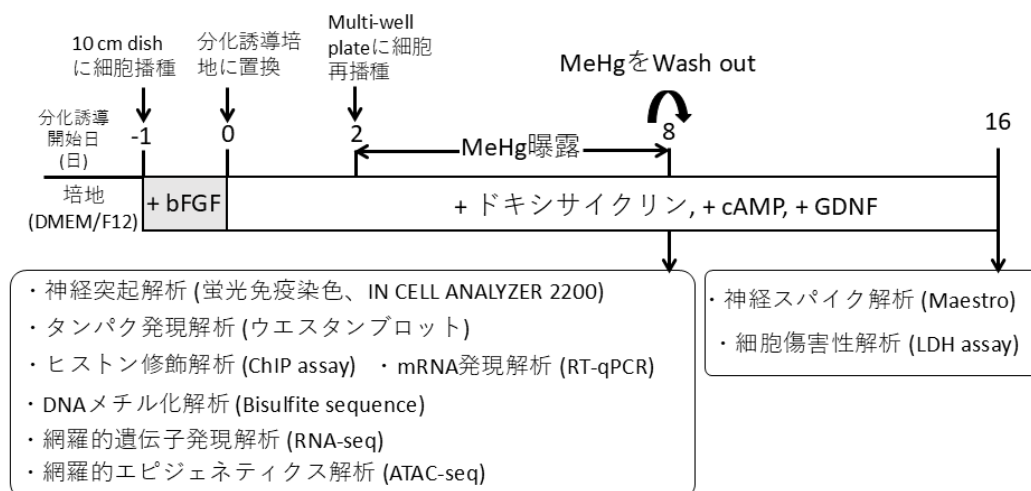


Figure 1. In vitro MeHg曝露条件と解析方法

2. In vivo 胎生期 MeHg 曝露実験

妊娠 C57BL/6N マウスを用いて胎生期 12～14 日目に MeHg 0, 3, 6 mg/kg の用量で一日一回の単回経口投与を行った。分娩後の仔マウスを 4 ヶ月齢まで飼育し、体重測定、Y 字迷路、オープンフィールド試験、およびヒストン修飾解析を行った (Fig. 2)。

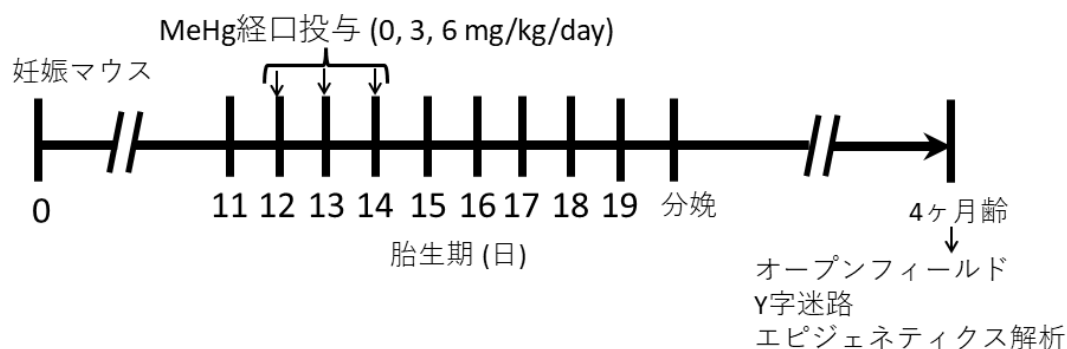


Figure 2. In vivo MeHg曝露条件と解析方法

(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。動物実験においては、岐阜薬科大学および国立水俣病総合研究センターの動物実験委員会の承認の下、適切に遂行した。

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.3A)。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 (Fig.3B and 3C)。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. 3D)。

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。

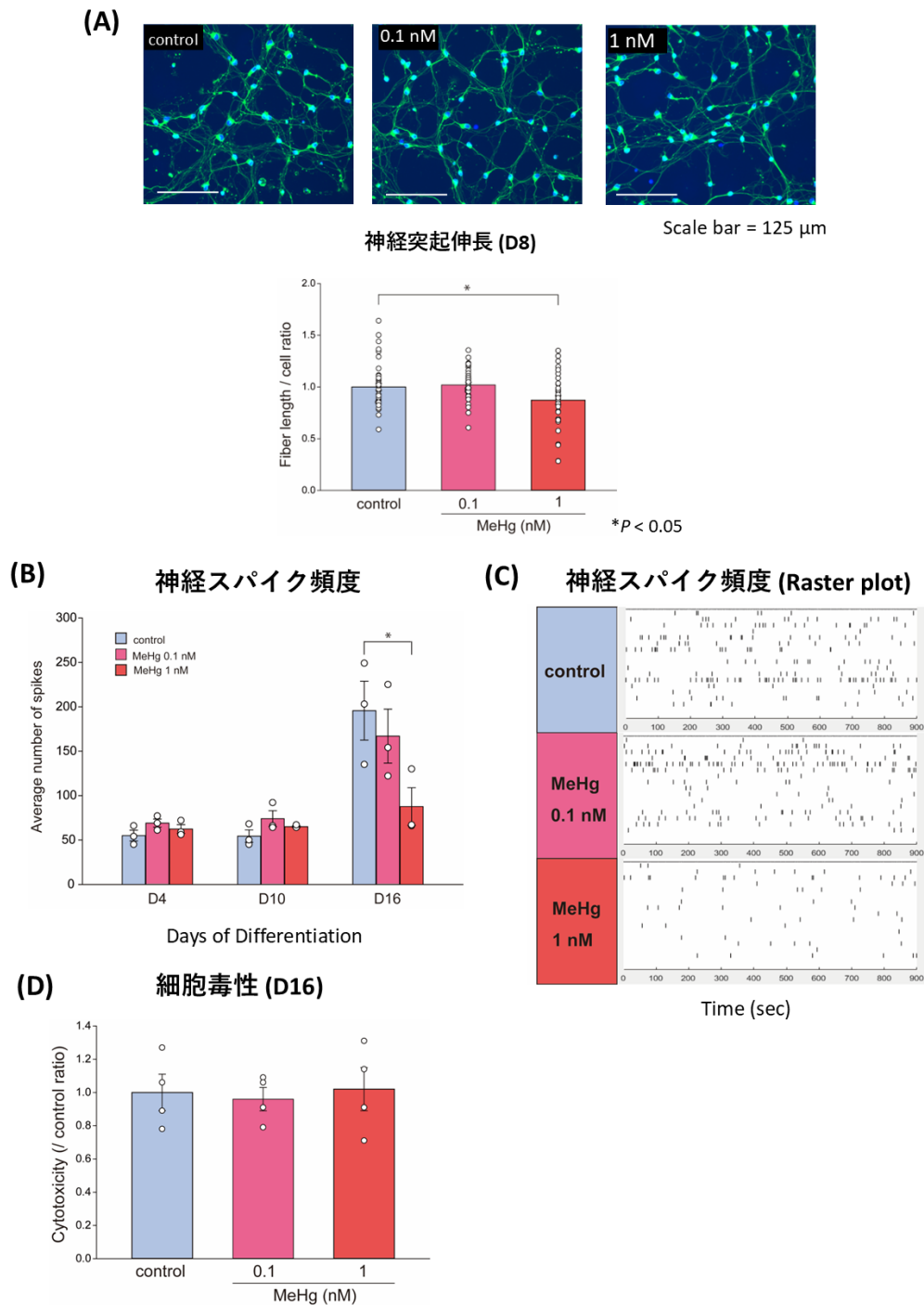


Figure 3. MeHg曝露による神経スパイクと神経突起伸長の変化

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.4)。

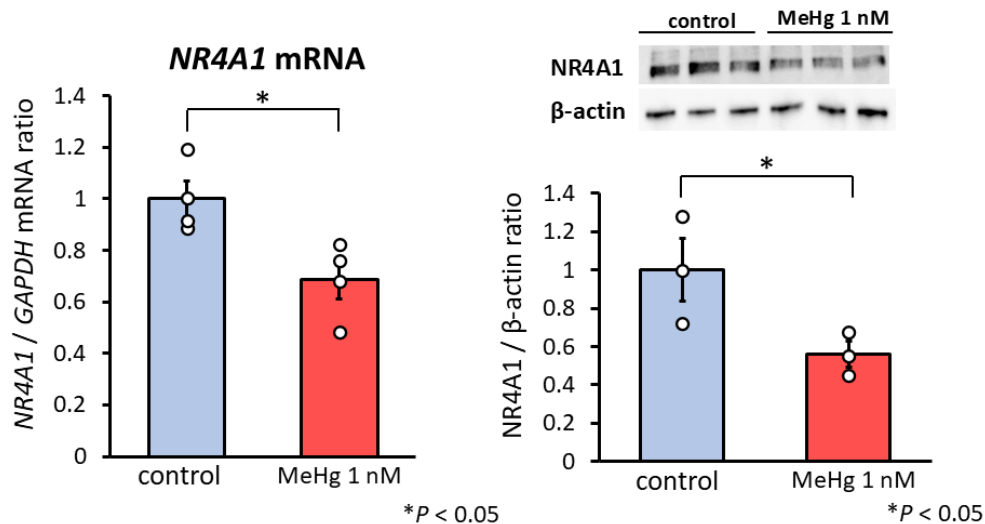


Figure 4. MeHgによる核内受容体NR4A1発現量の変動

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.5)。

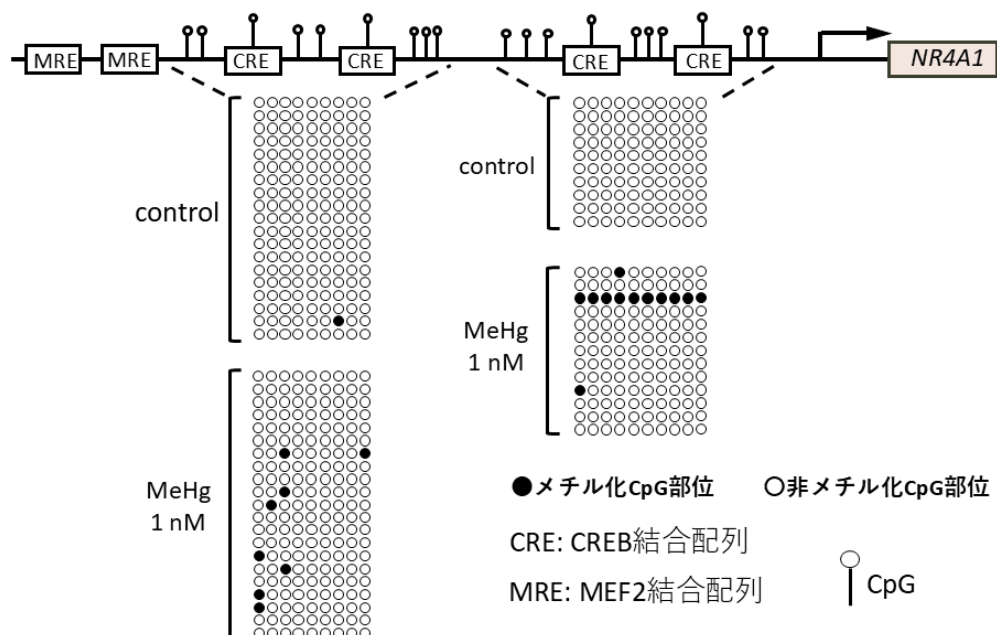


Figure 5. MeHgによるNR4A1遺伝子プロモーターのDNAメチル化の変化

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. 6)。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.6)。

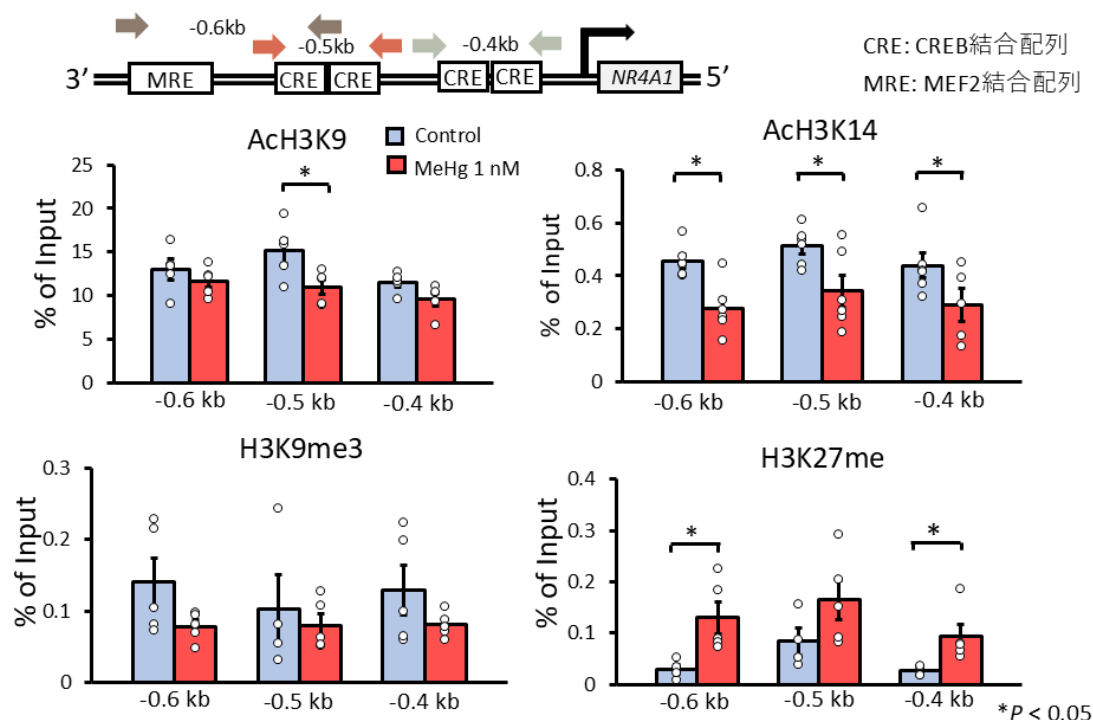


Figure 6. MeHgによる*NR4A1*遺伝子プロモーターのヒストン修飾の変化

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.5) ならびに転写活性化のヒストン修飾レベルの減少 (Fig.6) 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. 7A)。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. 7B)。

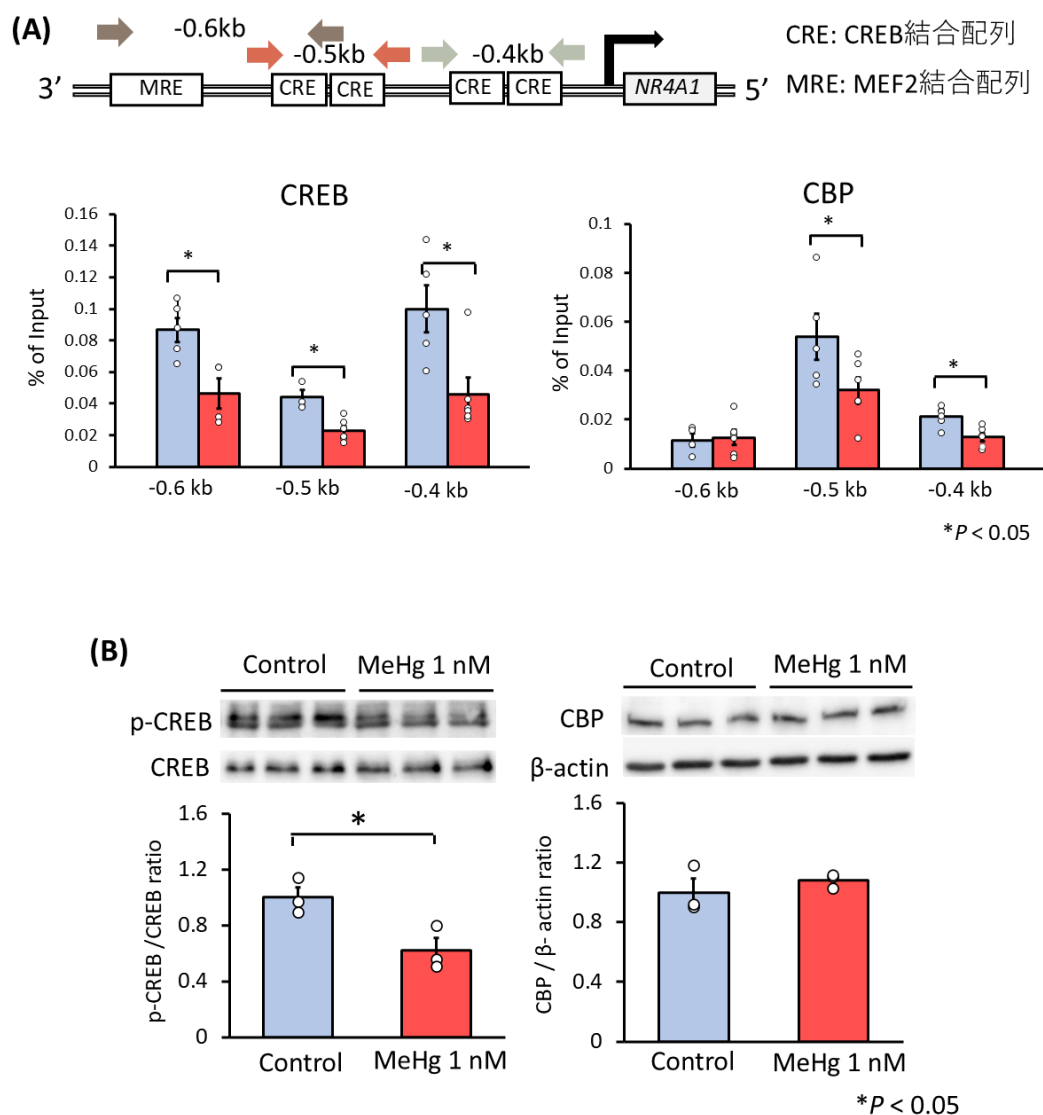


Figure 7. MeHg曝露によるNR4A1遺伝子プロモーターへの転写因子結合量の変化

6. MeHg による SYP、DLG4 発現の変化

これまでに 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 (Fig.3)。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。*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. 8)。

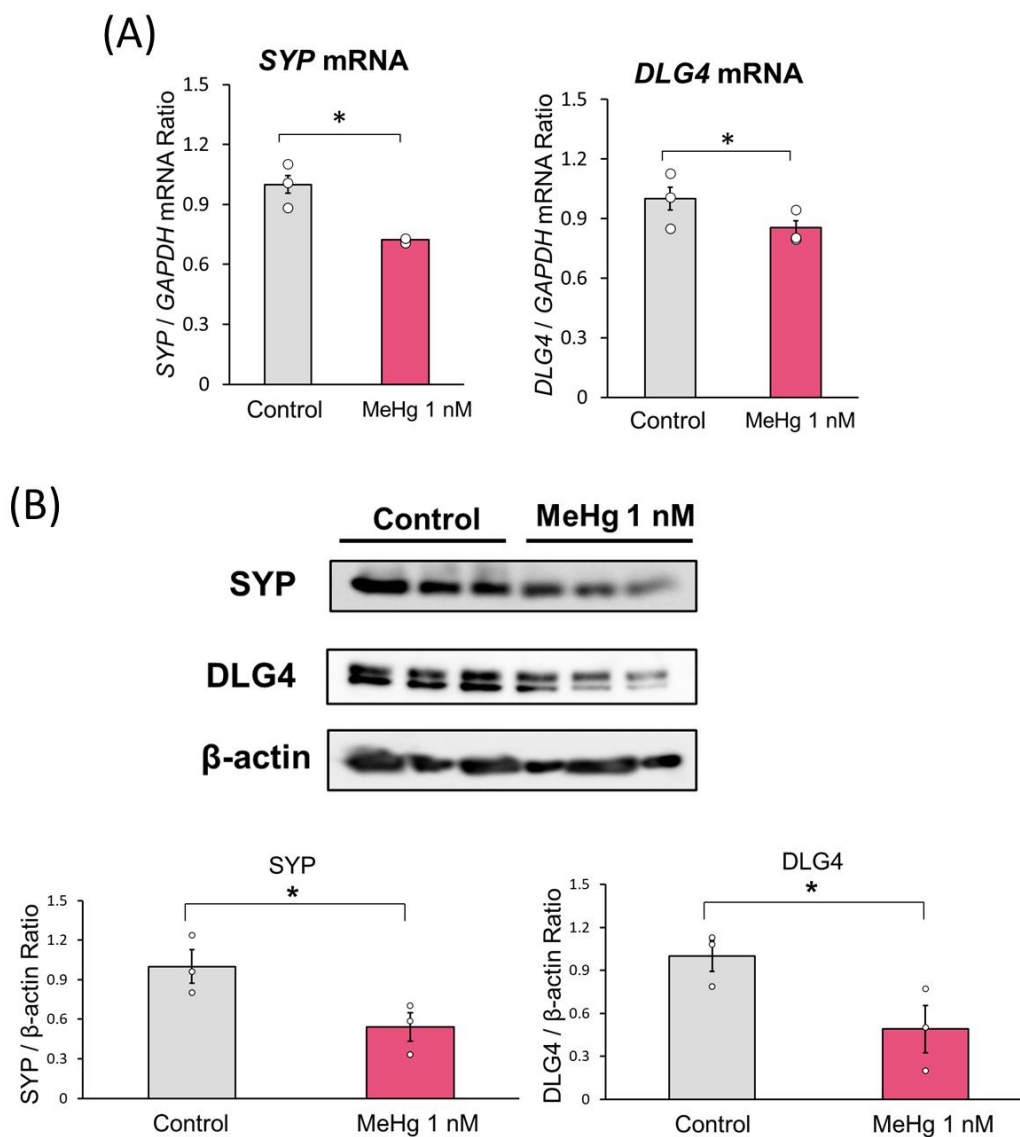


Figure 8. MeHgによるSYP, DLG4レベルの変化

7. 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. 9)。 *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. 10)。

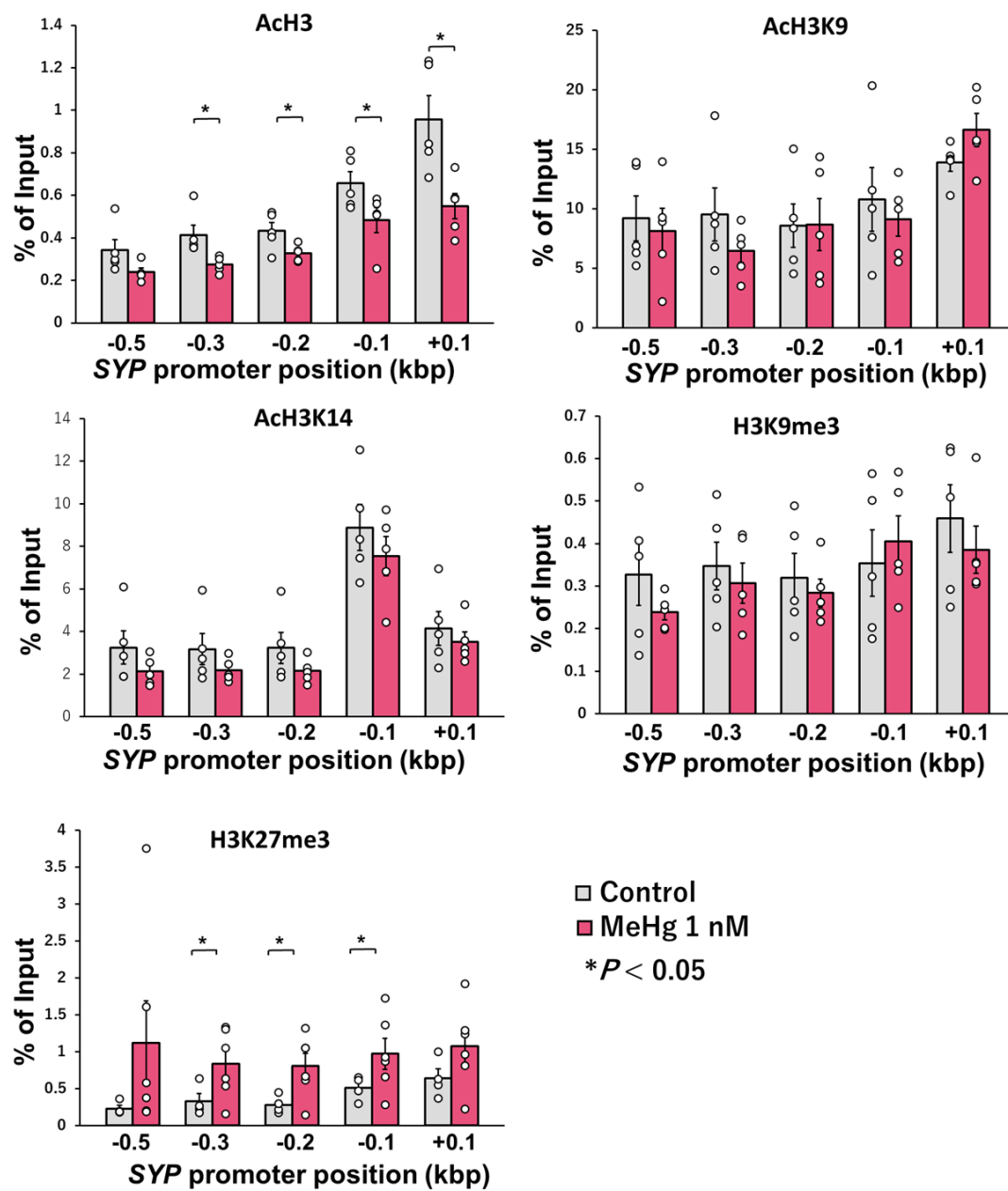
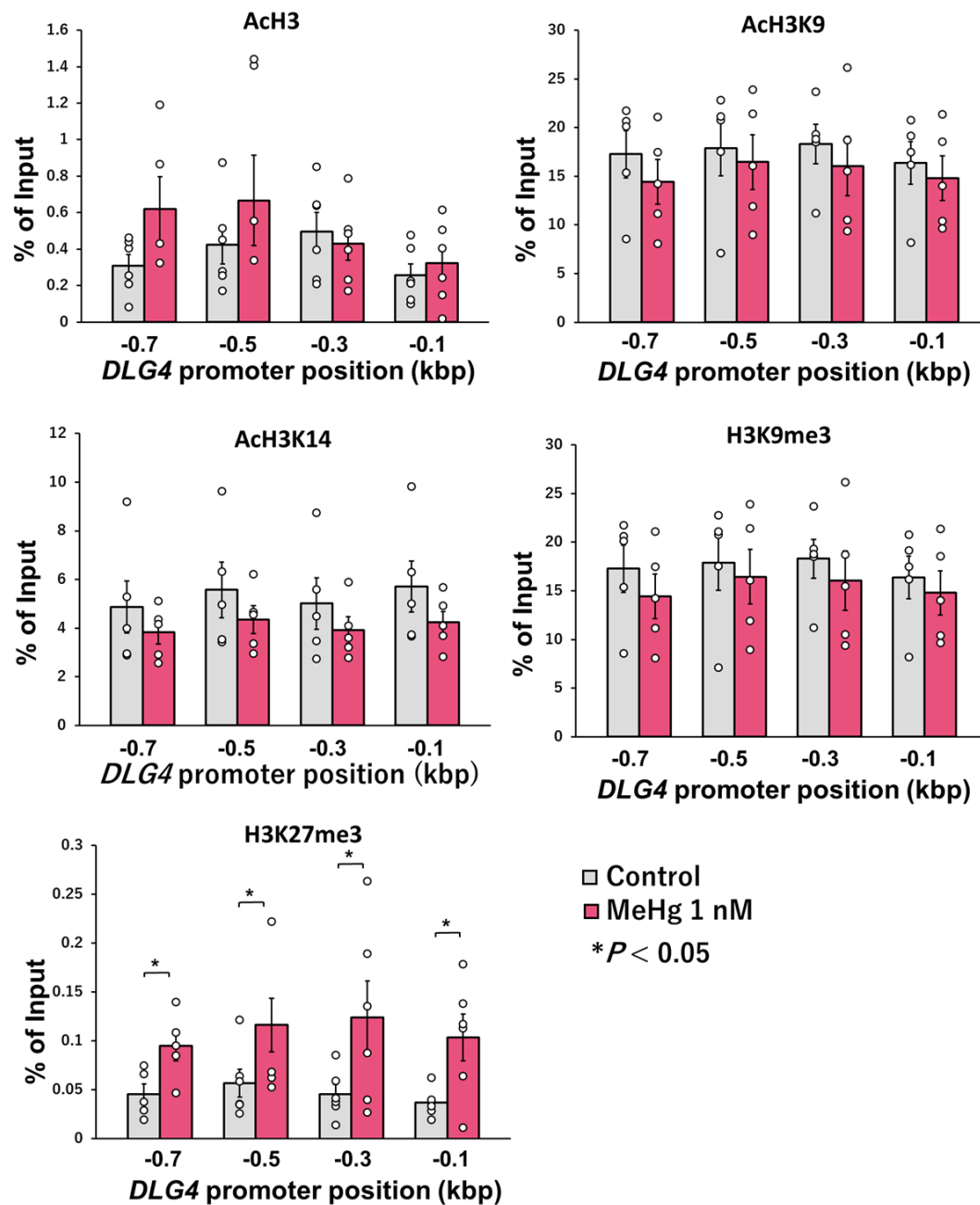


Figure 9. MeHgによるSYP遺伝子のヒストン修飾変化

Figure 10. MeHgによる*DLG4*遺伝子のヒストン修飾変化

8. 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.11)。*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.12)。

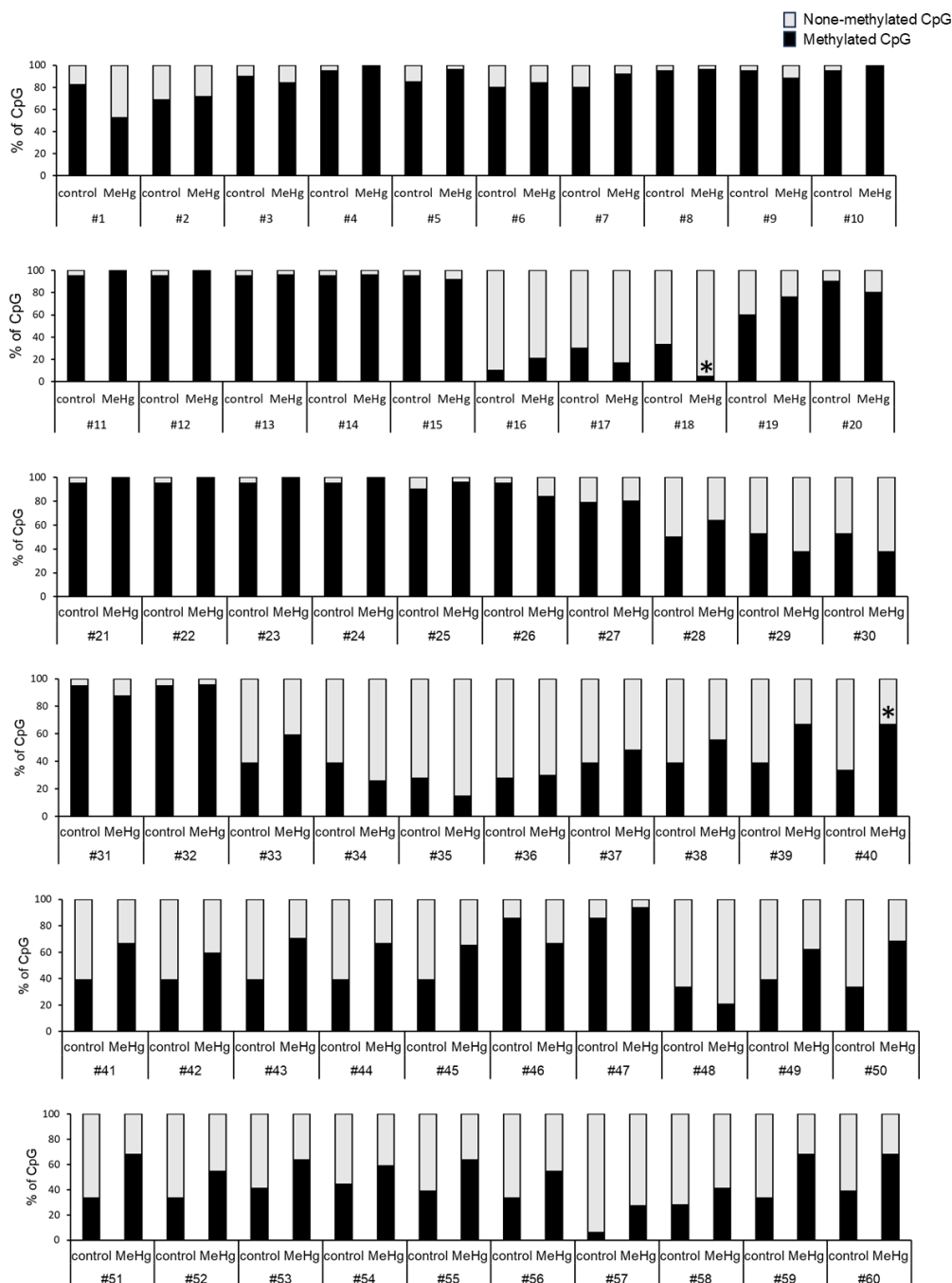


Figure 11. MeHgによる*SYP*遺伝子のDNAメチル化変化

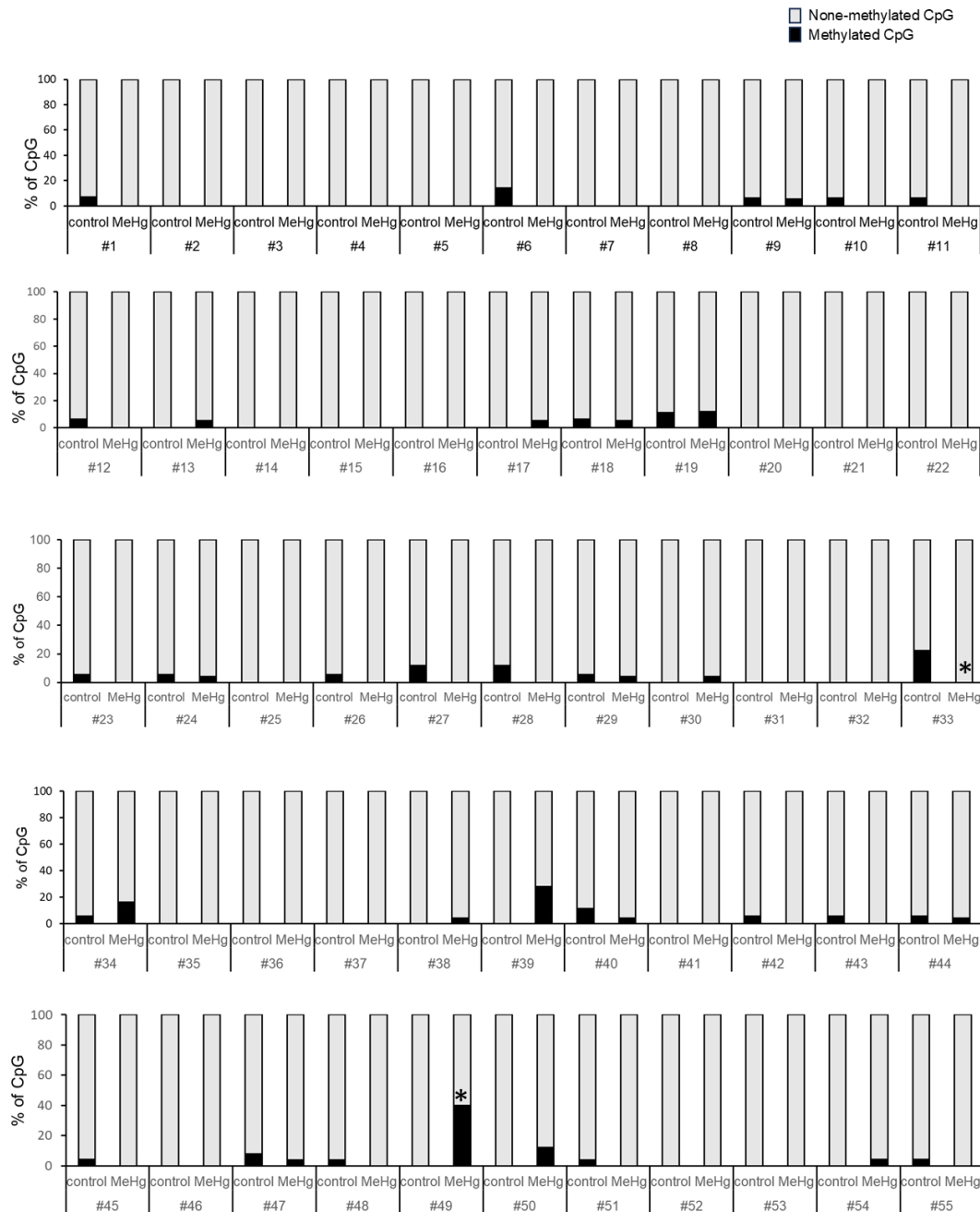


Figure 12. MeHgによる*DLG4*遺伝子のDNAメチル化変化

9. MeHg によって変動する網羅的遺伝子発現解析

RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析より、MeHg 曝露によって 10 個の様々なシグナル経路が活性化されていることを見出した (Fig. 13)。一方、MeHg 曝露によって抑制されたシグナル経路は Wnt シグナル経路であった (Fig. 14)。ならびに *LRRTMI* 遺伝子発現低下を見出した。DEG 解析により MeHg により発現が上昇した遺伝子は 28 個、減少した遺伝子は 4 つ (*MMD2*、*SMO1*、*CER1*、*LRRTMI*) であった (Fig. 15)。また、これらの変動遺伝子のプロモーター領域は ATAC-seq による解析では変化は認められなかった (Data not shown)。RNA-seq により発現量が減少した遺伝子を Real time RT-PCR で解析したところ、*LRRTMI* のみが MeHg により発現が抑制されることが見出された (Fig. 16)。

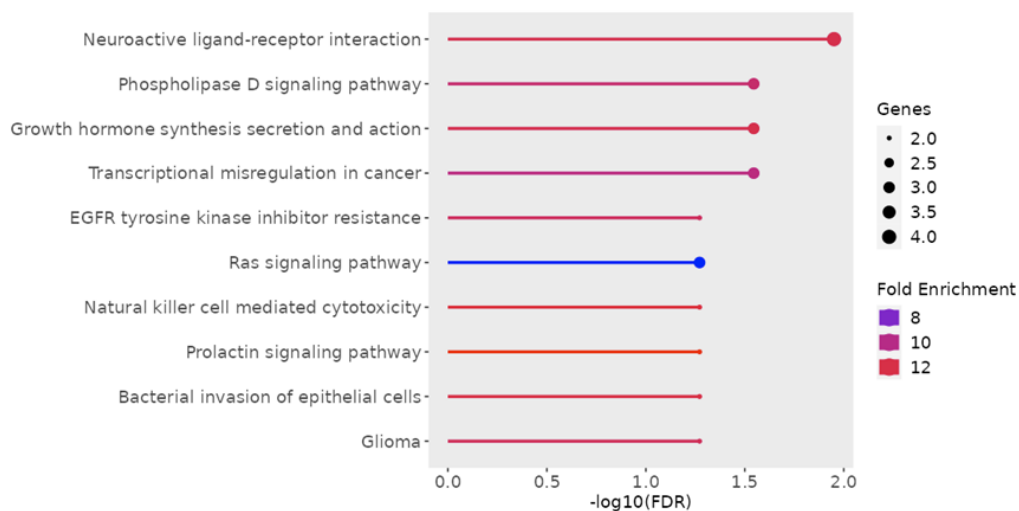


Figure 13. RNA-seq解析からMeHgにより上昇したシグナル経路

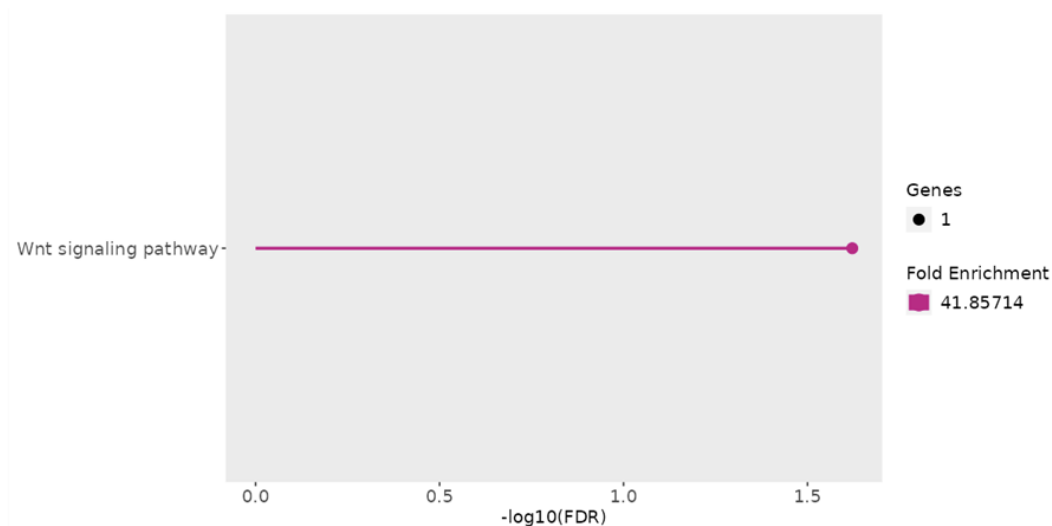
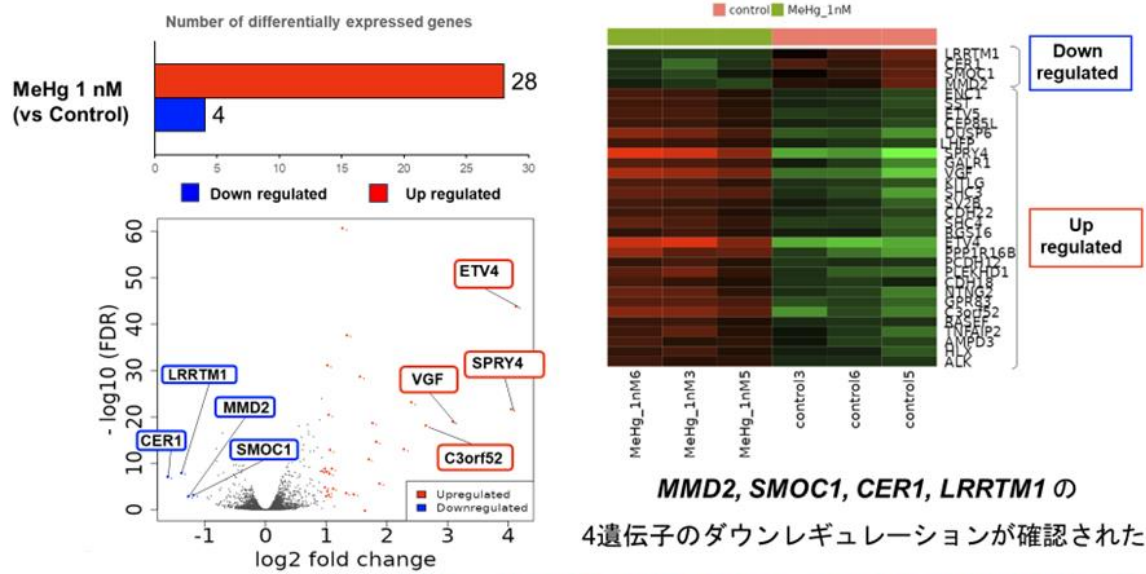


Figure 14. RNA-seq解析からMeHgにより抑制したシグナル経路



ATAC-seqによる変動遺伝子のプロモーター領域におけるMeHgによる変化なし

Figure 15. RNA-seq解析からMeHgにより変動した遺伝子

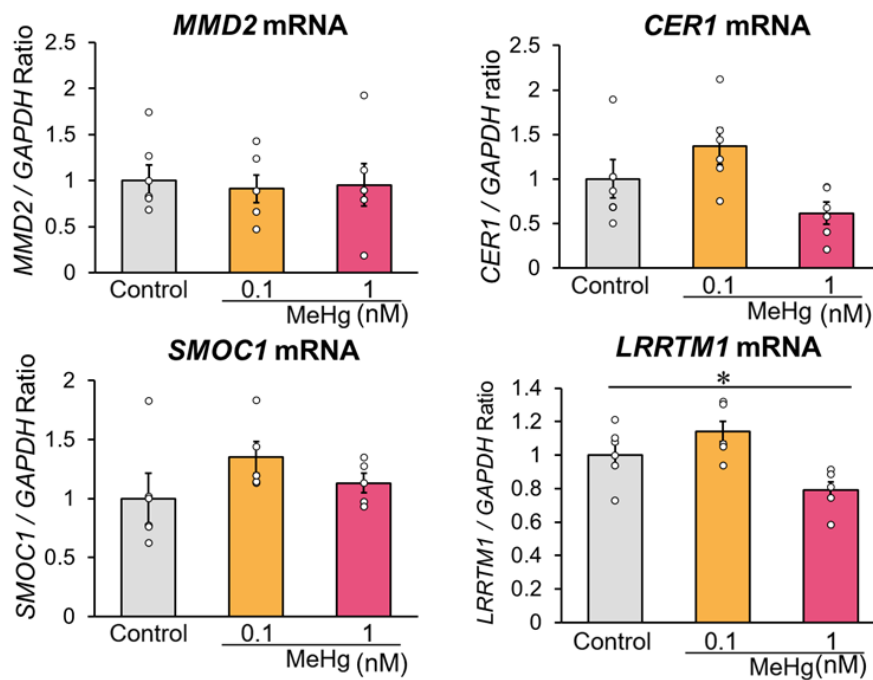


Figure 16. RNA-seq解析にてMeHgにより変動した遺伝子の
Real time RT-PCRでの発現確認

10. 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) 。そこで、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 の影響を検討した (Fig. 17)。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. 18A)。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. 18B)

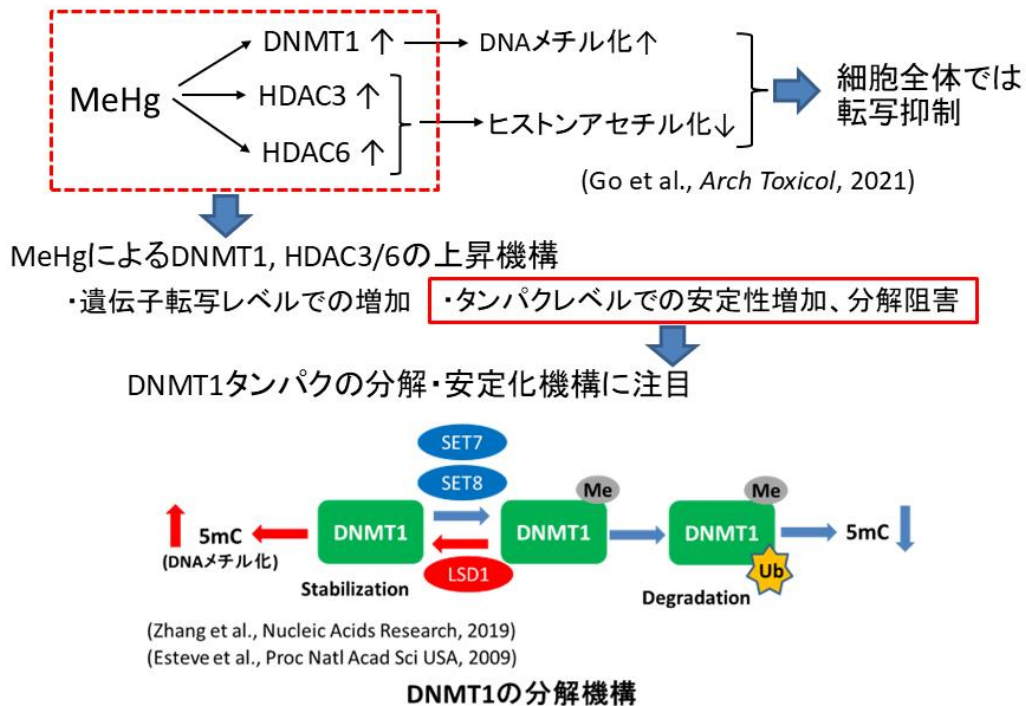


Figure 17 MeHgによるDNMT1上昇とDNMT1安定化機構の考察

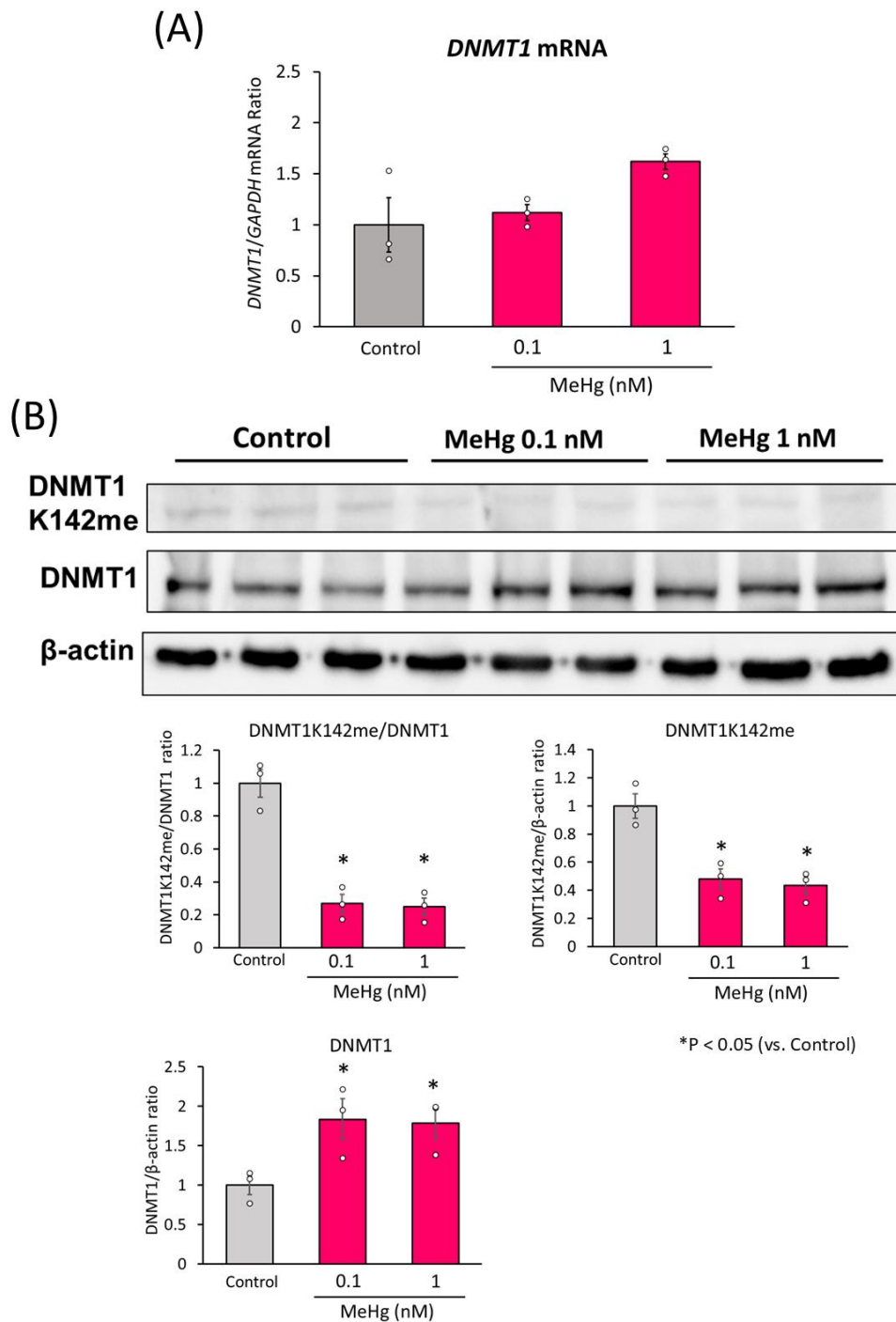


Figure 18. MeHgによるDNMT1 mRNAおよびDNMT1K142meレベルの変化

11. 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.19)。

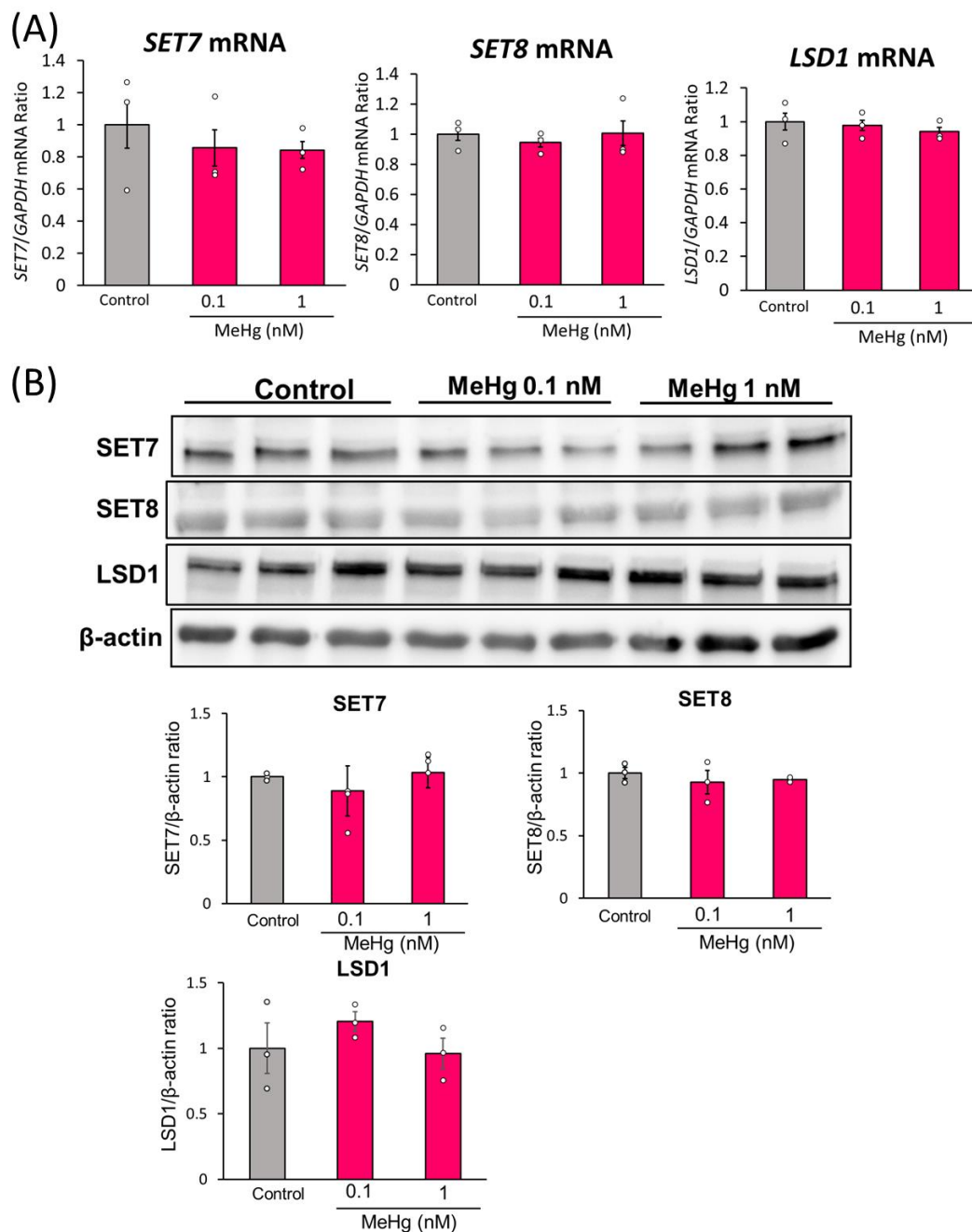


Figure 19. MeHg による SET7、SET8、LSD1 レベルの変化

12. 胎生期 MeHg 曝露による成熟後の高次脳機能への影響

胎生期に MeHg 3、6 mg/kg の用量で曝露したところ、MeHg 6 mg/kg 曝露群では死産および食殺にて仔は生き残らなかった。MeHg 3 mg/kg 曝露群について 4 ヶ月齢において解析を行ったところ、体重には変化がなかった (Fig. 20)。また、皮質、海馬、中脳、小脳ならびに血液中の総水銀量は、MeHg 曝露群および対照群ともに検出限界以下であった (data not shown)。さらに高次脳機能解析では Y 字迷路では変化がなかったものの (Fig. 21)、オープンフィールド試験では雌マウスのみで不安様行動が確認された (Fig. 22)。

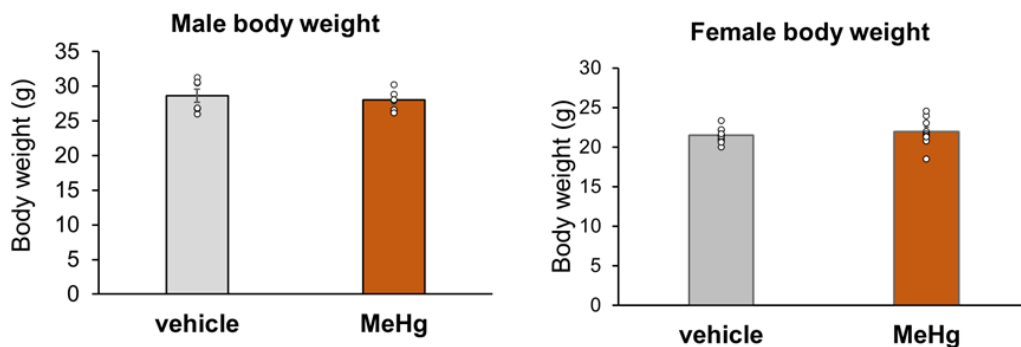


Figure 20. 胎生期MeHg曝露による4ヶ月齢での体重変化

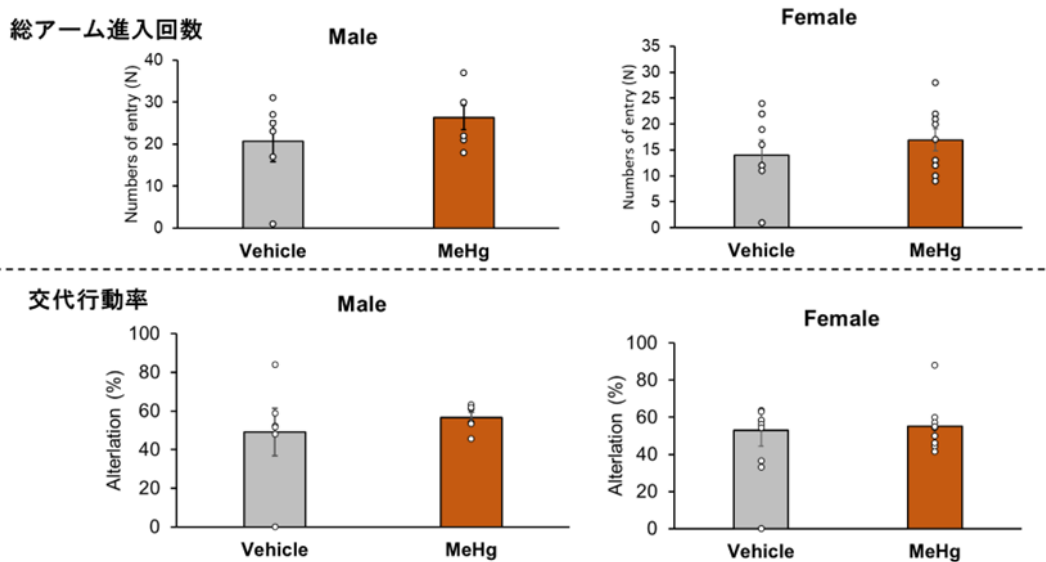


Figure 21. 胎生期MeHg曝露による4ヶ月齢でのY字迷路解析

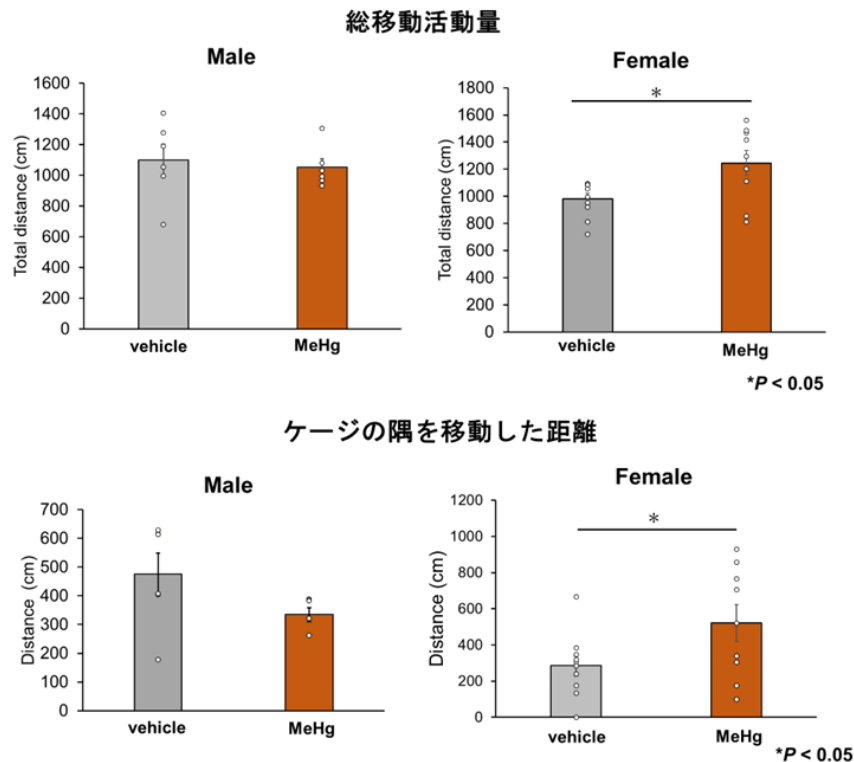


Figure 22. 胎生期MeHg曝露による4ヶ月齢でのオープンフィールド試験解析

13. 胎生期 MeHg 曝露による成熟後のエピジェネティクスへの影響

これまでに、我々は本研究と同じ MeHg 曝露条件の胎仔皮質サンプルにおいて、MeHg 3 mg/kg 曝露群における転写抑制に関する DNA メチル化レベルの上昇、転写活性に関与するアセチル化ヒストン H3 (AcH3) レベルの低下ならびに転写抑制に関与するヒストン H3 リジン 27 トリメチル化 (H3K27me3) の上昇を報告している (Go et al., *Arch Toxicol.* 2021)。そこで、本研究において胎生期 MeHg 3 mg/kg 曝露された 4 ヶ月齢の雌マウスの皮質のヒストン修飾をウエスタンブロット法にて測定した。その結果、AcH3 レベルは MeHg 曝露によって変化は認められなかったが、H3K27me3 レベルは MeHg 曝露群にて有意に上昇した (Fig. 23)。

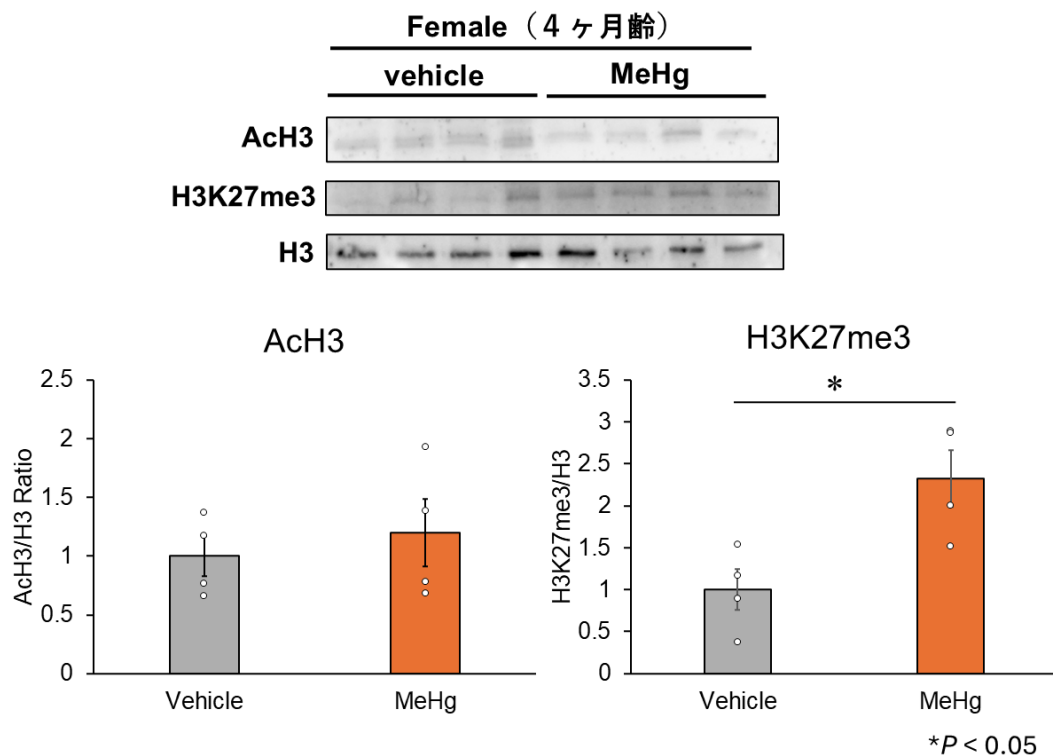


Figure 23. 胎生期MeHg曝露による4ヶ月齢でのヒストン修飾変化

IV 考察

①エピゲノム修飾酵素の調節分子メカニズムの解明については、1 nM MeHg 曝露 LUHMES 細胞を用いた *in vitro* 神経分化系において、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、MeHg による DNMT1 上昇には DNMT1 メチル化の低下によるタンパク安定化が寄与する可能性を見出した。

②エピジェネティクス変化を介する毒性表現型に関する標的遺伝子の探索については、1 nM MeHg 曝露 LUHMES 細胞を用いた *in vitro* 神経分化系において、*NR4A1*、*SYP*、*DLG4* 遺伝子のプロモーター領域の転写抑制のエピゲノム変化が起き神経機能に影響を及ぼしていることを見出した。さらに、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析より、MeHg 曝露による Wnt シグナル経路の抑制ならびに *LRRTM1* 遺伝子発現低下を見出した。

③マウスを用いた成熟後のエピジェネティクス解析では、胎生 12~14 日目に MeHg 3 mg/kg を妊娠マウスに曝露し、産まれた仔について 4 ヶ月齢において雌マウスで不安様行動が観察された。それに伴って皮質中のヒストン修飾のうち、転写抑制の修飾である H3K27me3 レベルが MeHg 3 mg/kg 群にて有意に増加した。今後はこれらのマウスの DNA メチル化などの更なるエピゲノム解析が必要である。

V 結論

神経分化期 MeHg 曝露による神経機能に及ぼす影響に関する新規エピゲノムメカニズムとして、DNMT1 の安定化による DNMT1 上昇機構を見出し、*NR4A1*、*SYP*、*DLG4* などの神経機能に関わる遺伝子の MeHg による転写抑制にプロモーター領域におけるエピゲノム変化が関連することを見出した。

VI 今後の課題

今後は *in vivo* で見出した *LRRTM1* 遺伝子をはじめ、*in vitro* 胎生期 MeHg 曝露系を用いた雌マウスでの MeHg による不安様行動に関連するような標的遺伝子のエピジェネティクス解析を行う必要がある。さらに、皮質中のヒストン修飾のうち、転写抑制の修飾である H3K27me3 レベルが MeHg 3 mg/kg 群にて有意に増加した。今後はこれらのマウスの DNA メチル化などの更なるエピゲノム解析が必要である。今後は DNA メチル化などのさらなるエピジェネティクス解析を行う必要がある。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Kurita H*, Masuda H, Okuda A, Go S, Ohuchi K, Yoshioka H, Fujimura M, Hozumi I, Inden M. Epigenetic alternations in the SYP and DLG4 genes due to low-level methylmercury exposure during neuronal differentiation in vitro. *J Appl Toxicol* 2024 (in press) (*corresponding author)
- 2) 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.
- 3) 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)
- 4) 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. (*equally contributed)
- 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. (*equally contributed)

英文要約 (Abstract)

There is concern about the effects on the fetus of pregnant women consuming seafood with methylmercury (MeHg) bioaccumulation. We have previously shown that exposure to MeHg during neuronal differentiation causes inhibition of neurite outgrowth, and that these changes are mediated by increased DNA methylation via DNA methyltransferase (DNMT) and decreased histone H3 acetylation via the histone deacetylase (HDAC). In this study, using the experimental system of MeHg exposure during neurodevelopment, we analyzed three points: (1) elucidation of the regulatory molecular mechanisms of epigenetic modification enzymes, (2) search for target genes related to toxic phenotypes mediated by epigenetic changes, and (3) epigenetics analysis of post-maturity mice exposed to MeHg during development. The results of this study are as follows: (1) To elucidate the molecular mechanism of regulation of epigenetic modification enzymes, we focused on the mechanism of DNMT1 proteolysis inhibition and stability increase (post-translational modification) in an in vitro neuronal differentiation system using LUHMES cells exposed to 1 nM MeHg. The results of this study revealed the possibility that the reduction of DNMT1 methylation may contribute to the stabilization of DNMT1 in MeHg-induced DNMT1 upregulation. In the search for target genes for toxic phenotypes mediated by epigenetic changes, we found that epigenomic changes in transcriptional repression of promoter regions of *NR4A1*, *SYP*, and *DLG4* genes occurred and affected neuronal functions in an in vitro neuronal differentiation system using LUHMES cells exposed to 1 nM MeHg. We found that epigenetic changes in the promoter regions of *NR4A1*, *SYP*, and *DLG4* genes were associated with neuronal functions. Furthermore, we found that MeHg exposure suppressed the Wnt signaling pathway and down-regulated *LRRTM1* gene expression by comprehensive gene expression analysis using RNA-seq. (3) In the experiment using mice, MeHg 3 mg/kg was exposed to pregnant mice on embryonic days 12-14, and anxiety-like behavior was observed in female mice at the age of 4 months for the pups born. The level of H3K27me3, a transcriptional repression modification among histone modifications in the cortex, was significantly increased in the MeHg 3 mg/kg group. This result is consistent with our previous report of epigenetic changes in fetal cortex under the same experimental conditions. Further epigenomic analysis, such as DNA methylation in these mice, is needed in the future. In summary, we found a novel epigenomic mechanism for the effects of MeHg exposure during neuronal differentiation on neural function.