

低濃度メチル水銀曝露による神経分化への影響と
分子メカニズムに関する研究

郷 すずな

目次

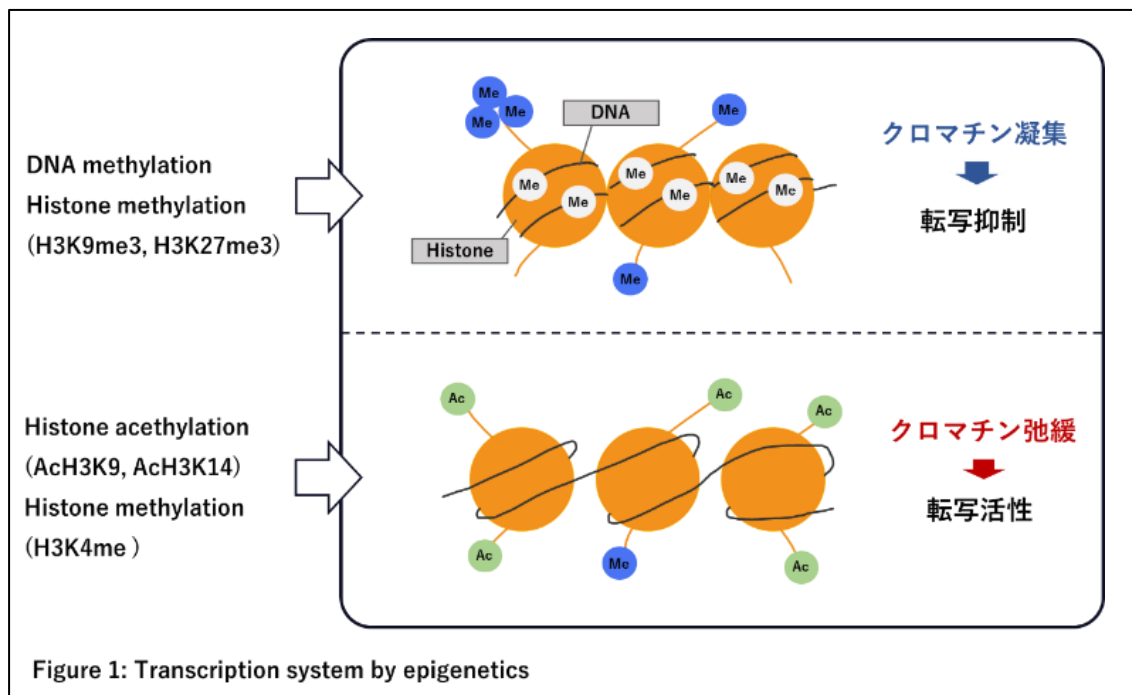
緒論.....	2
第1章 <i>In vivo</i> 実験系および <i>in vitro</i> 実験系を用いた神経分化期 MeHg 曝露による神経突起伸長への影響およびエピゲノム解析.....	6
第1節 緒言.....	6
第2節 実験材料および方法.....	8
第3節 実験成績.....	18
第4節 考察.....	45
第2章 <i>In vitro</i> 実験系を用いた神経分化期 MeHg 曝露による <i>TH</i> のエピゲノム解析.....	49
第1節 緒言.....	49
第2節 実験材料および方法.....	51
第3節 実験成績.....	56
第4節 考察.....	60
第3章 <i>In vitro</i> 実験系における神経分化期 MeHg 曝露による <i>NR4A1</i> のエピゲノムおよび神経スパイク活性解析.....	62
第1節 緒言.....	62
第2節 実験材料および方法.....	64
第3節 実験成績.....	70
第4節 考察.....	80
総括.....	83
謝辞.....	86
引用文献.....	87
略語.....	96

緒論

近年、発達期や胎生期の胎内環境が成人後の疾患発症リスクに関連するとい
う、「Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 説」が提唱されている¹。一例として胎生期の低栄養状態のために低体重で出生した子どもは成人期に
おける生活習慣病の発症リスクが高まるという報告があり、さらにこの影響が
世代を超えて引き継がれる可能性がある²。胎生期の栄養状態に加え、胎内環
境を考える上で、環境化学物質も DOHaD 説におけるリスク因子となる可能性
がある。これまでに胎生期曝露による後発的影響が懸念されている環境化学物
質としてメチル水銀 (methylmercury: MeHg) がある。MeHg は、水俣病の原因物
質であり、中枢神経系を障害する環境化学物質である。現在の日本では、水俣
病を引き起こすような MeHg の高濃度汚染は考えにくい。しかしながら自然界
では依然として微量ではあるが MeHg は存在しており、ヒトへの曝露は食物連
鎖により MeHg が蓄積された魚類の摂取による、日常的な低濃度曝露が大部分
を占める^{3,4}。これまでに、MeHg が胎盤や血液脳関門を容易に通過することが
明らかになっている⁵⁻⁷。また、MeHg の標的となる中枢神経系は、発達段階に
おいて MeHg のみならず、鉛やポリ塩化ビフェニルなどの化学物質に対して成
人期と比較して非常に脆弱であるため⁸、たとえ低濃度であっても、MeHg の曝
露による神経発達に及ぼすリスクがあると考えられる。そのような観点から、
これまでに妊婦の魚介類の摂食と胎児の機能発達障害との関連についてのさま
ざまな疫学研究が行われてきた。過去に行われた代表的な疫学研究として、フ
ェロー島の出生コホート研究とセイシエルの児童発達研究がある。フェロー島
の出生コホート研究では、低濃度の MeHg が小児の神経発達における言語、注
意、記憶の神経行動障害を引き起こす可能性が示された^{9,10}。しかし、セイシエ

ルの児童発達研究では、低濃度の MeHg 曝露と児童の発達との有意な関連は認められなかった¹¹。このように一貫した結論は得られていないが、現在においても MeHg の胎児への影響の懸念から、疫学研究は行われている。日本の東北沿岸部におけるコホート研究では、胎生期における低濃度 MeHg 曝露によって運動発達に影響が生じる可能性が報告された^{12,13}。さらにその懸念から、2005年に厚生労働省から「妊婦への魚介類の摂食と水銀に関する注意事項」が発表され、妊婦にとってどの程度までの MeHg 摂取が胎児に安全であることを示す摂取レベルが定められた¹⁴。また、実験的研究において、急性毒性が認められない低濃度で MeHg が発達中の脳神経系に悪影響を及ぼすことが示されている¹⁵⁻¹⁷。それにもかかわらず、神経細胞の発達に対する低濃度 MeHg の毒性の分子メカニズムについてはほとんど解明されていない。しかし、日常的な環境化学物質曝露を避けて生活することは困難であり、リスク回避のためにその毒性メカニズム解明は急務である。

胎児期の化学物質への曝露が、DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな変化に関係していることを示す証拠が数多く存在する¹⁸。エピジェネティクスとは、DNA 配列に変化を起こさず、細胞分裂を経て伝達される遺伝子の変化やその仕組みである¹⁹。ゲノムのエピジェネティクスの状態をエピゲノムと言う。代表的なエピジェネティクス修飾として DNA メチル化やヒストン修飾などが挙げられる。



DNA メチル化は、DNA の塩基のシトシン (C) とグアニン (G) が並ぶ CG 配列 (CpG 配列) にあるシトシンがメチル化される化学修飾である。遺伝子発現を制御する領域 (プロモーター領域) がメチル化されると、遺伝子発現が抑制される (Figure 1)。ヒストン修飾は、ヒストンのコア領域に含まれない N 末端・C 末端側の領域であるヒストンテールにおけるアセチル化、メチル化などの様々な翻訳後修飾である。これらの修飾はクロマチン構造を変化させ、エピジェネティクスな遺伝子発現制御に関わっている。ヒストンのアセチル化は遺伝子の発現を促進する方向に働く。これはアセチル基がヒストンテールに付加されると、凝集したヌクレオソーム構造が緩み、転写因子がプロモーター領域に結合しやすくなるためである (Figure 1)。一方のメチル化は、遺伝子発現の促進および抑制方向のどちらにも働くことが知られている (Figure 1)²⁰。

生涯において特に、胚発生の時期は大規模なエピゲノムのリプログラミングが行われるため、外因性の環境化学物質の影響を受けやすい^{21,22}。したがって、

神経細胞の発生における MeHg の毒性発現分子メカニズムに，エピゲノム変化が関与している可能性がある．

そこで本研究において，第 1 章では *in vivo* および *in vitro* 実験系を用いて神経分化期における低濃度の MeHg 曝露が神経機能に与える影響，およびその分子メカニズムをエピジェネティクスに焦点をあてて解析した．さらに神経分化期 MeHg 曝露による神経機能障害に関連する遺伝子の探索を行った．第 2 章および第 3 章では探索の結果 MeHg 曝露によって発現減少が認められた TH と NR4A1 のプロモーター領域におけるエピゲノム解析を行った．

第1章 *In vivo* 実験系および *in vitro* 実験系を用いた神経分化期 MeHg 曝露による神経突起伸長への影響およびエピゲノム解析

第1節 緒言

近年、生物濃縮によって MeHg が蓄積した魚介類を摂取することによる胎児への低濃度 MeHg 曝露影響が懸念されている。しかしながら、胎生期 MeHg 曝露影響の毒性メカニズムは解明されていない。

発生過程においては大規模なエピゲノム修飾のリプログラミングが行われ、このリプログラミングは個体発生を正常に完了させるために不可欠である²³。これまでに胎生期における化学物質曝露によってエピゲノム変化が生じることが報告されている²⁴。したがって、MeHg などの化学物質曝露によるエピゲノム変化が神経系に影響する可能性が示唆される。

これまでに、妊娠期から離乳時まで MeHg を母親への経口投与を介して曝露させた仔ラットにおいて、生後 40 日齢の探索行動、認識記憶、空間学習の能力が障害されることが報告されている¹⁷。さらに妊娠 14 日目から 16 日目まで MeHg を経口投与した妊娠マウスの仔において、生後 6 週から 16 週齢において行動試験を行ったところ、空間記憶や作業記憶の能力に影響が認められることも明らかになった²⁵。また、出生前の MeHg 曝露により、仔マウスの *Bdnf* 遺伝子のプロモーター領域における DNA の高メチル化やヒストン H3 トリメチル化を介した発現減少によりうつ病様の行動障害が生じることが報告された²⁶。

本章では、妊娠マウスに急性毒性が認められないが、仔マウスの記憶機能が低下することが報告されている濃度の MeHg を投与し²⁷、神経分化に及ぼす影響についてエピゲノムに着目し検討を行った。エピゲノム解析は代表的なエピ

ゲノム修飾である DNA メチル化とヒストン修飾について解析した。ヒストン修飾については転写活性関連修飾であるアセチル化ヒストン (AcH3) とヒストン H3 の 9 番目リジンのアセチル化 (AcH3K9), ヒストン H3 の 14 番目のリジンのアセチル化 (AcH3K14) と転写抑制関連修飾であるヒストン H3 の 9 番目リジンのトリメチル化 (H3K9me3) およびヒストン H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K27me3) について検討した (Table 1).

Table 1 Histone H3 modifications		
Modification	Amino acid site	Possible function
Acetylation	All	Transcriptional activation
	K9	
	K14	
(Tri-) methylation	K9	Transcriptional repression
	K27	

第2節 実験材料および方法

2-1 薬物および試薬

本実験では、以下の薬物および試薬を用いた。

Tubastatin A は Cayman Chemical, Cell Countinig Kit-8 は DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC., 5-Methylcytosine DNA ELISA kit は Enzo Life Sciences, FD Rapid GolgiStain™ Kit は FD NeuroTechnologies, 10%中性緩衝ホルマリン液 (10% formalin neutral buffer solution), fibronectin solution from human plasma, ウシ血清由来アルブミン (albumin from bovine serum: BSA), くえん酸一水和物 (citric acid monohydrate: $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), くえん酸三ナトリウム二水和物 (trisodium citrate dihydrate: $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$), グリア細胞株由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, human, recombinant, animal-derived-free: rhGDNF), 正常ヤギ血清 (normal goat serum), トリコスタチン A (trichostatin A: TSA), フェニルメチルスルホニルフルオリド (phenylmethylsulfonyl fluoride: PMSF), プロテインアッセイ BCA キット (Protein Assay BCA Kit), ペルオキシ二硫酸アンモニウム (ammonium peroxodisulphate: APS), ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル (polyoxyethylene octylphenyl ether: Triton-X), ワイドビュー™ プレステインたん白質サイズマーカー (WIDE-VIEW™ prestained protein size marker) は FUJIFILM Wako Pure Chemical, ECL™ prime western blotting detection reagent は GE Healthcare UK, advanced DMEM/F12, GlutaMAX™, N-2 supplement (100x) は Life Technologies, Entellen® new は Merck KGaA, 0.25%-trypsin/1 mM-EDTA solution, 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol), 4%-パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (4%-paraformaldehyde phosphate buffer solution), *N,N'*-メチレン

ビスアクリルアミド (*N,N'*-methylene-bisacrylamide: BIS), *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン (*N,N,N',N'* - tetramethylethylenediamine: TEMED), アクリルアミド (acrylamide), エタノール (ethanol), 塩化カリウム (potassium chloride: KCl), 塩化ナトリウム (sodium chloride: NaCl), 塩酸 (hydrochloric acid: HCl), キシレン (xylene), グリシン (glycine), グリセリン (glycerol), グルタルアルデヒド水溶液 (glutaraldehyde, 25% in water), ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide: DMSO), 水酸化ナトリウム (sodium hydroxide: NaOH), スキムミルク (skim milk), スクロース (sucrose), デオキシコール酸ナトリウム (deoxycholic acid sodium salt), トリスヒドロキシメチルアミノメタン (tris hydroxymethyl aminomethane), ノニデット P-40 (Nonidet® P-40: NP-40), パラホルムアルデヒド(粉末) (paraformaldehyde, powder), ブロモフェノールブルー (bromophenol blue: BPB), ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (polyoxyethylene sorbitan monolaurate: Tween), メタノール (methanol), ラウリル硫酸ナトリウム (sodium lauryl sulfate: SDS), りん酸水素二ナトリウム・12水 (di-sodium hydrogenphosphate 12-water: Na₂HPO₄・12H₂O), りん酸二水素カリウム (potassium dihydrogenphosphate: KH₂PO₄)は NACALAI TESQUE, Dneasy Blood & Tissue Kit は QIAGEN, basic fibroblast growth factor: bFGF は ReproCELL, N6,2'-O-dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt: dbcAMP, アプロチニン (aprotinin), ポリ-L-オルニチン溶液 (poly-L-ornithine solution), ロイペプチン (leupeptin)は SIGMA-ALDRICH, doxycycline hyclate, CH₃HgCl (methylmercuric chloride), N-(2-aminophenyl)-4-[1-[2-(3-thienyl)ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl]benzamide: T247 は TOKYO CHEMICAL INDUSTRY, VECTORSHIELD mounting medium は VECTOR LABORATORIES よりそれぞれ購入した。

2-2 実験方法

2-2-1 実験動物

実験を行うにあたり，岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い，許可を受けた上で実施した．妊娠 C57BL/6J マウスは，日本エスエルシー株式会社より購入した．設定温度 24°C，設定湿度 55%，明暗各 12 時間に維持された岐阜薬科大学動物飼育室で飼育した．マウスはディスプレイプラスチック製ケージ (Innocage® Mouse Base, オリエンタル技研工業株式会社) を用い，ディスプレイプラスチック給水びん (Innocage® Mouse Base, オリエンタル技研工業株式会社) にて給水，固形飼料 (CE-2, CREA Japan) を用いて飼育した．

2-2-2 MeHg 投与

胎生 12 日目から 14 日目まで，妊娠マウスに MeHg (CH_3HgCl) 3 mg/kg/day を経口投与した．対照群には，MeHg 投与群と同じスケジュールで滅菌水を経口投与した．胎生 19 日目に開腹し，胎仔を取り出した (第 2 章 第 3 節 Figure 2A)．

2-2-3 細胞培養

ヒト胎児中脳由来不死化細胞 (LUHMES 細胞, ATCC® CRL-2927TM) を用いた．LUHMES 細胞は滅菌水で希釈したポリ-L-オルニチン (50 μg / ml) およびフィブロネクチン (1 μg / mL) でコーティングした dish を用いて，GlutaMAX (1x)，N-2 supplement (1x) および bFGF (40 ng / mL) を含む Advanced DMEM / F12 からなる増殖培地で 37°C，5% CO_2 インキュベーター中で培養した．

2-2-4 神経分化培養

LUHMES 細胞は *v-myc* 遺伝子のテトラサイクリン制御による Tet-off システムにより条件的に不死化されている。神経分化は先行報告に従い 3 段階の手順で行った²⁸。まず分化の準備のために、10 cm dish に細胞を播種し、増殖培地中で 24 時間培養した。次に、GlutaMAX (1x), N-2 supplement (1x), Doxycycline (1 $\mu\text{g} / \text{mL}$), dbcAMP (1 mM), および rhGDNF (2 ng / ml) を含む Advanced DMEM / F12 からなる分化培地に交換することによって分化培養を開始した。この条件下で、*v-myc* は急速にスイッチオフされ、細胞分裂が停止する。そして、2 日間分化培養した LUHMES 細胞をトリプシン処理後、Multi-well plate に播種し、2-6 日間分化培地で培養した (4 日目に培地交換を行った) (第 2 章 第 3 節 Figure 5A).

2-2-5 *In vitro* 実験における MeHg 曝露

2 日間の細胞分化の後、LUHMES 細胞をマルチウェルプレートに播種し、1 nM MeHg (CH_3HgCl) で 6 日間処理した。MeHg 処理終了時に細胞をサンプリングし、さらなる解析を行った。阻害剤を用いた実験では、1 μM 5-Azacytidine, 0.5 nM Trichostatin A, 0.5 nM T247 and 1 nM Tubastatin A を MeHg と同時にそれぞれ処理した (第 2 章 第 3 節 Figure 6).

2-2-6 ゴルジ染色

胎仔脳のゴルジ染色には FD Rapid GolgiStainTM Kit を用い、添付のプロトコールおよび先行報告²⁹に従い染色を行った。胎仔脳を冠状面で半分に切断し、4% パラホルムアルデヒド、2% グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝液に室温暗所で 1 時間浸透させ、固定した。超純水で洗浄後、Kit の付属試薬である A 液および B 液を 1:1 で混合した溶液に室温暗所で 3 週間放置した。その後、Kit の C 液に交換し、4°C 暗所で 1 週間放置した。続いて、C 液によって脳を固定し、リ

トラトーム REM-710 (YAMATO) を用いて -20°C で厚さ $100\ \mu\text{m}$ の切片を作製した。切片を 0.5% ゼラチンコートスライドガラス (FD NeuroTechnologies) に載せ、室温で 48 時間乾燥させた。その後、Kit のプロトコールに従い、遮光下で、染色、脱水、透徹を行った。封入は Entellan® new により行った。撮影は BZ-9000 (KEYENCE) を用いて行った。

2-2-7 Hg 蓄積量の測定

マウス組織を 1 g あたり 5N NaOH 19 mL で溶解後、 60°C で 30 分間インキュベートし、測定の直前に 5N HCl を用いて中和した。LUHMES 細胞は RIPA buffer で溶解した。溶解したサンプルでこれまでの報告と同様に、oxygen combustion-gold amalgamation 法にて測定した³⁰。組織中の Hg 濃度は、組織重量により標準化した。また、溶解した LUHMES 細胞については、タンパク濃度を測定し、Hg 濃度の標準化に使用した。

2-2-8 ELISA 法

組織および LUHMES 細胞からの DNA の抽出精製は DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて、添付のプロトコールに従って行った。DNA 中の 5-methylcytosine (5-mc) 量の測定は 5-Methylcytosine DNA ELISA kit を用いてプロトコールに従い測定した。測定は GloMax®-multi detection system (Promega) を用いた。

2-2-9 タンパク質の抽出

マウス胎仔脳から大脳皮質を分離し、タンパク質の抽出まで -80°C に保存した。タンパク質の抽出には、RIPA buffer [25 mM Tris HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1% デオキシコール酸ナトリウム]を用いた。RIPA buffer を

300 μ L 加え、ホモジナイザー (Pycotron, Microtec) を用いてホモジネート処理した。LUHMES 細胞は細胞分化 8 日目にプレートから細胞を掻き出し、RIPA buffer [25 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.15 M NaCl, 1% NP-40, 0.1% デオキシコール酸ナトリウム, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μ g / mL leupeptin, 2 μ g / mL aprotin] で溶解させた。

2-2-10 ウェスタンブロット法

SDS ポリアクリルアミドゲルを泳動装置にセットし、容器に running buffer (25 mM Tris, 190 mM Glycine, 3.5 mM SDS) を入れ、泳動装置に取り付けたゲルを浸した。SDS ポリアクリルアミドゲルの 1 well 当たり、分子量マーカーを 2 μ L、各タンパク質サンプルを 10 μ g アプライし、200 V、55 分の条件で泳動した。転写膜はメタノールに 1 分間浸し、超純水に 2 分間浸した後、transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) メタノール) に浸した。陽極側から、ろ紙、transfer buffer に浸した転写膜、SDS ポリアクリルアミドゲル、ろ紙の順に組み、100 V、60 分の条件で転写した。転写後、転写膜を 5% スキムミルク又は 5% BSA に浸し、室温で 60 分間ブロッキングを行った。0.1% Tween-TBS で洗浄後、5% スキムミルク又は 5% BSA で 1 次抗体を希釈し、4°Cで一晩反応させた。0.1% Tween-TBS で洗浄後、3% スキムミルク又は 3% BSA で 2 次抗体を希釈して、室温で 30 分間反応させた。0.1% Tween-TBS で洗浄後 ECLTM prime western blotting detection reagent に 5 分間浸した。その後、LAS-3000 UV mini (Fujifilm) または FUSION SOLO S (Vilber Lourmat) を用いて検出した。

1 次抗体には、mouse anti- β -actin antibody (1:2000, Sigma-Aldrich), rabbit anti-Histone H3 antibody (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA USA), rabbit anti-AcH3 (acetyl-histone H3) antibody (1:1000, Cell Signaling Technology), rabbit

anti-AcH3K14 [acetyl-histone H3 (Lys14)] antibody (1:1000, Cell Signaling Technology), rabbit anti-AcH3K9 [acetyl-histone H3 (Lys9)] antibody (1:1000, Cell Signaling Technology), rabbit anti-H3K27me3 [tri-methyl-histone H3 (Lys27)] antibody (1:1000, Cell Signaling Technology), rabbit anti-H3K9me3 [tri-methyl-histone H3 (Lys9)] antibody (1:1000, Cell Signaling Technology), mouse anti-HDAC1 (histone deacetylase 1) antibody (1:1000, Cell Signaling Technology), mouse anti-HDAC2 (histone deacetylase 2) antibody (1:1000, Cell Signaling Technology), mouse anti-HDAC3 (histone deacetylase 3) antibody (1:1000, Cell Signaling Technology), rabbit anti-HDAC4 (histone deacetylase 4) antibody (1:1000, Cell Signaling Technology), rabbit anti-HDAC6 (histone deacetylase 6) antibody (1:1000, Cell Signaling Technology) , mouse anti-DNMT1 (GENETEX, Inc., USA) (1:1000 dilution), rabbit anti-DNMT3A (Cell Signaling Technology) (1:1000 dilution), rabbit anti-DNMT3B (Novus biologicals, LLC, USA) (1:1000 dilution) を用いた. 2次抗体には, goat anti-mouse IgG antibody, peroxidase conjugated, H+L (1:2500, Merck KGaA), goat anti-rabbit IgG antibody, peroxidase conjugated, H+L (1:2500, Merck KGaA) を用いた.

2-2-11 細胞免疫染色

培養した細胞を 1 x PBS で洗浄した後, 4%-パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液を用いて, 室温で 15 分間固定した. その後 1 x PBS で希釈した 0.2% TritonX-100 を用いて, 室温で 10 分間膜透過処理を行った. その後, 1 x PBS で希釈した 2% normal goat serum を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行った. ブロッキング後, 1 x PBS で 1 次抗体を希釈し, 4°Cで一晩反応させた. 翌日, 1 x PBS で洗浄後, 1 x PBS で 2 次抗体を希釈し, 室温で 1 時間反応させた. 再度,

1 x PBS で洗浄し，核染色を室温で 15 分間行った後，1 x PBS で洗浄し，蛍光顕微鏡 (LSM700, ZEISS 又は IN Cell Analyzer 2200, GE Healthcare Life Sciences) で撮影した。

1 次抗体には，mouse anti-TUJ1 (β -tubulin III) antibody (1:2000, Sigma-Aldrich)，2 次抗体は AlexaFluor®488 goat anti-mouse IgG H&L (1:200, Thermo Fisher Scientific)，核染色には DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 1:2000, Thermo Fisher Scientific) を用いた。

2-2-12 Real-time RT-PCR

培養した細胞から PureLink™ RNA Mini Kit を用いて添付のプロトコールに従い total RNA を抽出した。得られた total RNA の濃度を SimpliNano (GE Healthcare Life Sciences) で測定した後，total RNA 1 μ g に対して，ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix を用いて逆転写反応を行い相補的 DNA (以下 cDNA) を生成した。1 サンプル当たり，THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix を 10 μ L，Forward プライマー (10 μ M) を 0.6 μ L，Reverse プライマー (10 μ M) を 0.6 μ L，逆転写で得られた cDNA の 10 倍希釈液を 2 μ L 混合し，滅菌水で 20 μ L にメスアップ後，StepOne Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) で反応を行った。用いたプライマーは Table 2 に示した。反応条件は初期熱変性 (95°C, 60s) の後，熱変性 (95°C, 30s)，伸長反応 (60°C, 30s) を 40 サイクル繰り返した。それぞれの発現レベルを，*GAPDH* を内部標準として比較 CT 法 ($\Delta\Delta$ Ct 法) により解析した。

Table 2 mRNA 発現解析用 PCR プライマー

Gene		Primer sequences (5' to 3')
h-GAPDH	Forward	TGGTGAAGACGCCAGTGGA
h-GAPDH	Reverse	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
h-SOX2	Forward	GAAGGATAAGTACACGCTGCCCG
h-SOX2	Reverse	GCTGGTCATGGAGTTGTACTION
h-OCT4	Forward	GACAGGGGGAGGGGAG
h-OCT4	Reverse	CTCCCTCCAACCAGT
h-SYNI	Forward	CGAGCCGCACACCGACT
h-SYNI	Reverse	AACTTCCATATCCACAGAGAATCCA
h-TUJI	Forward	CGCCCCAGTATGAGGGAGAT
h-TUJI	Reverse	AGTCGCCCACGTAGTTGC
h-TH	Forward	TCATCACCTGGTCACCAAGTT
h-TH	Reverse	GGTCGCCGTGCCTGTACTION
h-NR4A1	Forward	AAGTGAAGGCCGCTGTGCT
h-NR4A1	Reverse	AGGCAGATGTACTIONTGGCGTTTT
h-NURR1	Forward	CGAAACCGAAGAGCCCCACAGGA
h-NURR1	Reverse	GGTCATAGCCGGGTTGGAGTCG
h-DAT	Forward	GAGCCATAGACGGCATCAGAG
h-DAT	Reverse	TGAACTTGTGTAGCTGGAGAAGG
h-DRD2	Forward	GCAGACCACCACCAACTACC
h-DRD2	Reverse	GCTGAATTTCCACTCACCTACC
h-NESTIN	Forward	AACTCCCGGCTGCAAACA
h-NESTIN	Reverse	GCTCAGGACTGGGAGCAAAG
h-PBX1	Forward	TCCTGCGTTCCCGATTTCC
h-PBX1	Reverse	CTAACTCCTCTTTGGCTTCTCAC
h-ATCAY	Forward	GGAATGGCAACGAACTGGA
h-ATCAY	Reverse	CGTGCCGTCCCCAAATAGA
h-DCX	Forward	AGGAAGATCGGAAGCATGGA
h-DCX	Reverse	GTTGACAGACCAGTTGGGATTG
h-CNTN	Forward	GCTCTTTGCACCCAGCATC
h-CNTN	Reverse	ACAGGGAGCCGTCCACTTTG
h-STMN2	Forward	CCCCACGAACTTTAGCTTCTCC
h-STMN2	Reverse	GCACCTCAGTCACAGTCTCGTT
h-NEFM	Forward	GGATATAGAAATCGCTGCGTACA
h-NEFM	Reverse	GAGCTTCCACCTTGGGTTTC

2-2-13 細胞生存率

細胞生存率は Cell Counting Kit-8 (CCK-8) を用いて、添付のプロトコールに従って測定及び解析を行った。

2-2-14 細胞形態解析

神経細胞の形態解析は IN Cell Analyzer 2200 で撮影を行い，得られた細胞画像を IN Cell investigator を用いて解析した．

2-2-15 統計学的解析

実験成績は平均値±SE で示した．統計学的な比較は StatView または IBM SPSS Statistics ver.19 を用いて，2 群間については Student's *t*-test，他群間については分散分析後，Bonferroni/Dunn test により行った．危険率が 5%未満を有意差ありとした．

第3節 実験成績

3-1 胎生期 MeHg 曝露によって大脳皮質における神経突起伸長が抑制された

妊娠マウスに、神経系の発達に重要な時期である胎生期 12 日目から 14 日目に MeHg (3 mg/kg) を 1 日 1 回で経口投与した。この実験条件では、産後 6～16 週目の仔マウスにおいて行動障害や記憶力低下の脳機能障害が報告されている^{25,27}。胎生 19 日目にサンプリングして解析を行った (Figure 2A)。胎仔の体重および脳の重量は、MeHg 曝露による変化はなかった (Figure 2B, C)。大脳皮質における Hg の蓄積量は 1.39 ± 0.04 ng Hg/mg tissue であったが、Vehicle 群では検出されなかった (Table 3)。また、胎生期の大脳皮質では、MeHg 曝露による神経突起長の有意な減少が観察された (Figure 2D)。

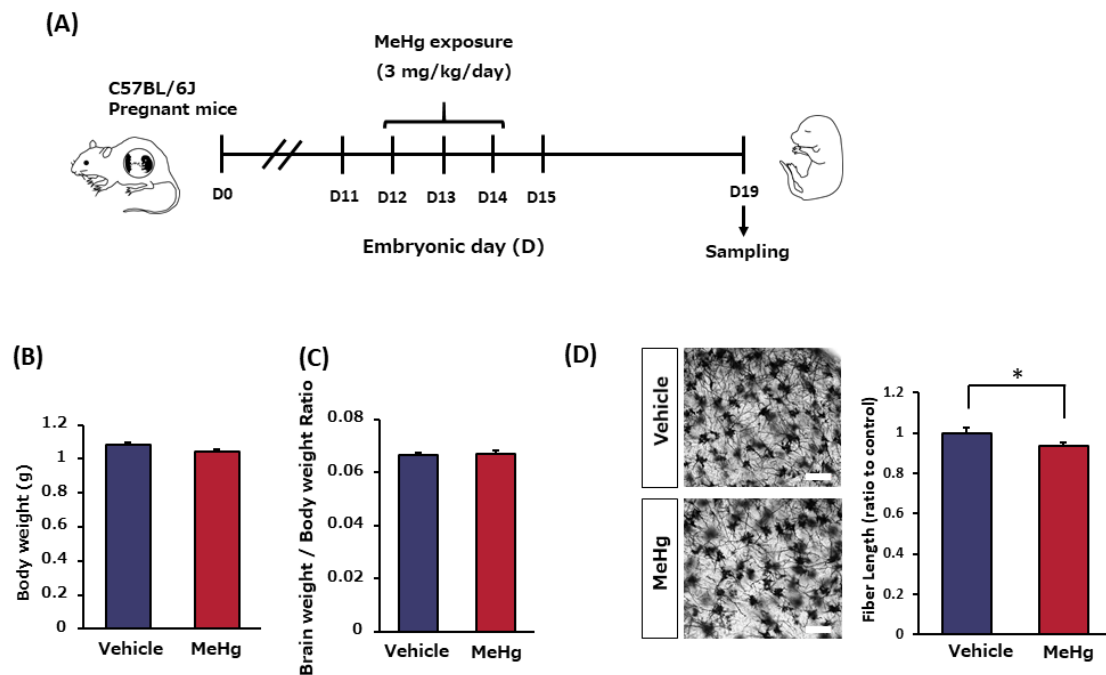


Figure 2. Body weight, brain weight and neuronal fiber length were measured in mice experiment. (A) Schematic diagram for MeHg exposure experiments in an *in vivo* mouse model. Pregnant mice were exposed to MeHg (3 mg/kg/day) once daily from embryonic day 12 to day 14 by oral administration. Mice were sacrificed at embryonic day 19 and brains were dissected for analysis. (B, C) Body weight (Vehicle; n = 68, MeHg; n = 25) and brain weight (Vehicle; n = 27, MeHg; n = 22) of the fetuses were measured at embryonic day 19. (D) Golgi-stained brain sections in cerebral cortex were imaged with an all-in-one microscope. Scale bar = 100 μ m. Fiber length was measured (n = 52/group) using IN Cell Investigator (analysis software for IN Cell Analyzer). All data were normalized to control levels and presented as means \pm standard error. Statistical significance was determined by Student's *t*-test (* $p < 0.05$).

Table 3 Mercury accumulation in the cerebral cortex of mouse fetuses

Experimental group	Hg concentration (ng Hg/mg tissue)
Vehicle	ND
MeHg (3 mg/kg)	1.39 ± 0.04

Data were represented as means ± standard error (n = 3/group). ND = not detected (< 0.01 ng Hg/mg tissue).

3-2 胎生期 MeHg 曝露マウスの大脳皮質において DNA の高メチル化および DNA メチル基転移酵素の発現増加が認められた

神経細胞は、分化過程で化学物質曝露によるエピジェネティックな変化を受けやすいことが知られている³¹。そこで、代表的なエピゲノム修飾である DNA メチル化とヒストン修飾に着目し解析を行った¹⁹。DNA メチル化は、一般的に遺伝子発現のサイレンシングと関連している (Figure 1)。胚発生や細胞分化に必要な DNA メチル化パターンは、維持 DNA メチル基転移酵素である DNMT1 や、*de novo* DNA メチル基転移酵素である DNMT3A および DNMT3B によって維持されている³²。メチル化 DNA (Figure 3A) および DNMT1 の発現量 (Figure 3B, C) は、MeHg 曝露により増加した。DNMT3A と DNMT3B の発現量は、MeHg 曝露によって変化しなかった (Figure 3B, C)。

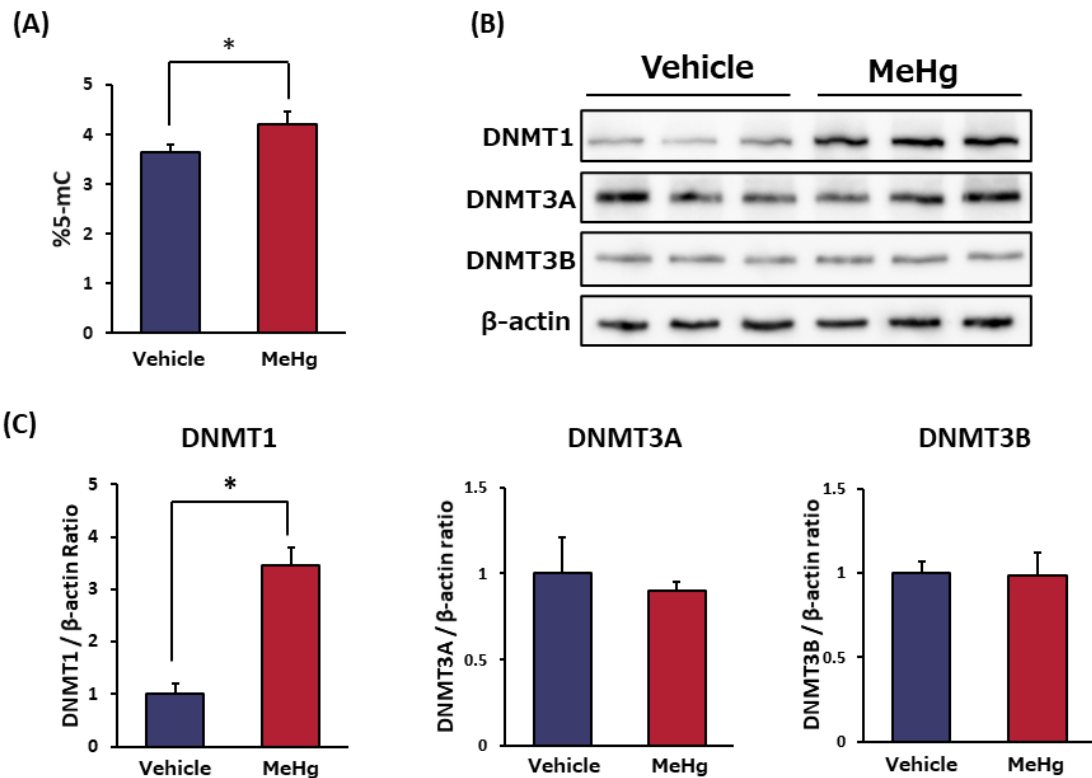


Figure 3. Determination of DNA methylation was performed in mice experiment.

(A) Global DNA methylation in fetal cerebral cortex at embryonic day 19. %5-mC is the percentage of methylated DNA (5-methylcytosine). Each value represents the mean \pm standard error (n = 10/group). (B-C) Protein levels of DNMT1, DNMT3A, DNMT3B and β -actin in the fetal cerebral cortex of 3 individual mice at embryonic day 19. Data were all normalized to vehicle levels and presented as mean \pm standard error (n = 3/group). Statistical significance was determined by Student's *t*-test (**p* < 0.05).

3-3 胎生期 MeHg 曝露マウス的大脑皮質においてアセチル化ヒストンが減少し、ヒストン脱アセチル化酵素が増加した

次に、DNA メチル化以外のエピゲノム修飾としてヒストン修飾変化を検討した。ヒストンの N 末端にあるリジン残基の修飾は、遺伝子発現の制御に関与している (Figure 1, Table 1)¹⁹。胎生期的大脑皮質では、MeHg 曝露後に転写促進に関連する AcH3 と AcH3K14 の減少が観察された (Figure 4A)。そこでヒストンのアセチル化を制御するヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の発現変化を解析した。HDAC はヒストンなどのタンパク質からアセチル基を触媒的に除去する酵素である³³。その結果、MeHg 曝露により HDAC3 と HDAC6 の増加も認められた (Figure 4B)。

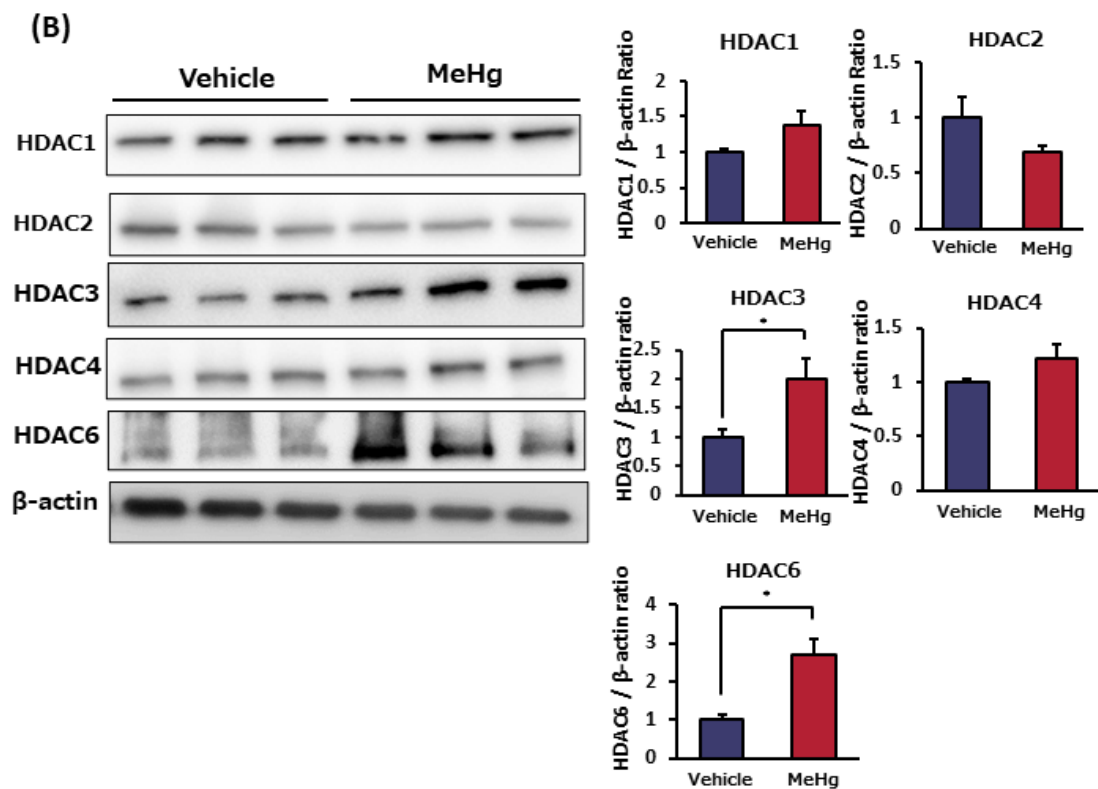
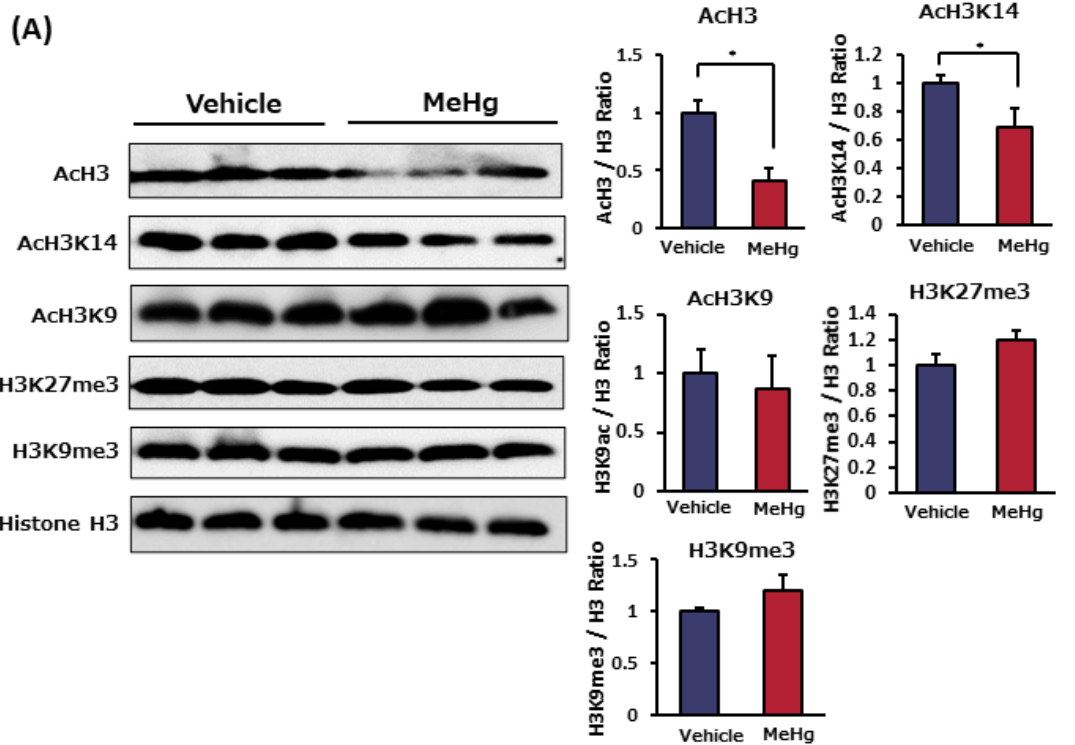


Figure 4. Determination of histone modification was performed in mice experiment.

(A) Protein levels of AcH3, AcH3K14, AcH3K9, H3K9me3, H3K27me3 and Histone H3 in the fetal cerebral cortex of 3 individual mice at embryonic day 19. Data were normalized to control levels and presented as mean \pm standard error (n = 3/group). Statistical significance was determined by Student's *t*-test ($*p < 0.05$: vs control). (B) Protein levels of HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC6 and β -actin in the fetal cerebral cortex of 3 individual mice at embryonic day 19. Data were all normalized to control levels and presented as mean \pm standard error (n = 3/group). Statistical significance was determined by Student's *t*-test ($*p < 0.05$).

3-4 LUHMES 細胞を用いて神経分化系を構築した

既報の分化プロトコールに従い²⁸, LUHMES 細胞を 10 日間分化させた (Figure 5A). 神経細胞へ分化していることを確認するために, 未分化マーカーおよび神経細胞マーカーの発現変化を確認した. その結果, 分化 2 日目で未分化マーカー (*OCT4* と *SOX2*) の発現レベルが有意に低下することが明らかになった (Figure 5B). また, 神経細胞関連マーカー (*TUJI*, *SYNI*) とカテコールアミン関連マーカー (*TH*, *AADC*) の発現量は分化に伴って増加した. *TUJI*, *TH*, *AADC* の発現量は分化 6 日目で最大となり, *SYNI* は分化 8 日目で最大となった (Figure 5C, D). 未分化な LUHMES 細胞と分化 8 日目の LUHMES 細胞を用いて, 免疫細胞染色を行ったところ神経突起伸長などの顕著な形態的变化が認められた (Figure 5E). 以上より, 神経細胞マーカーがすべてピークに達した分化 8 日目以降を成熟神経細胞とした.

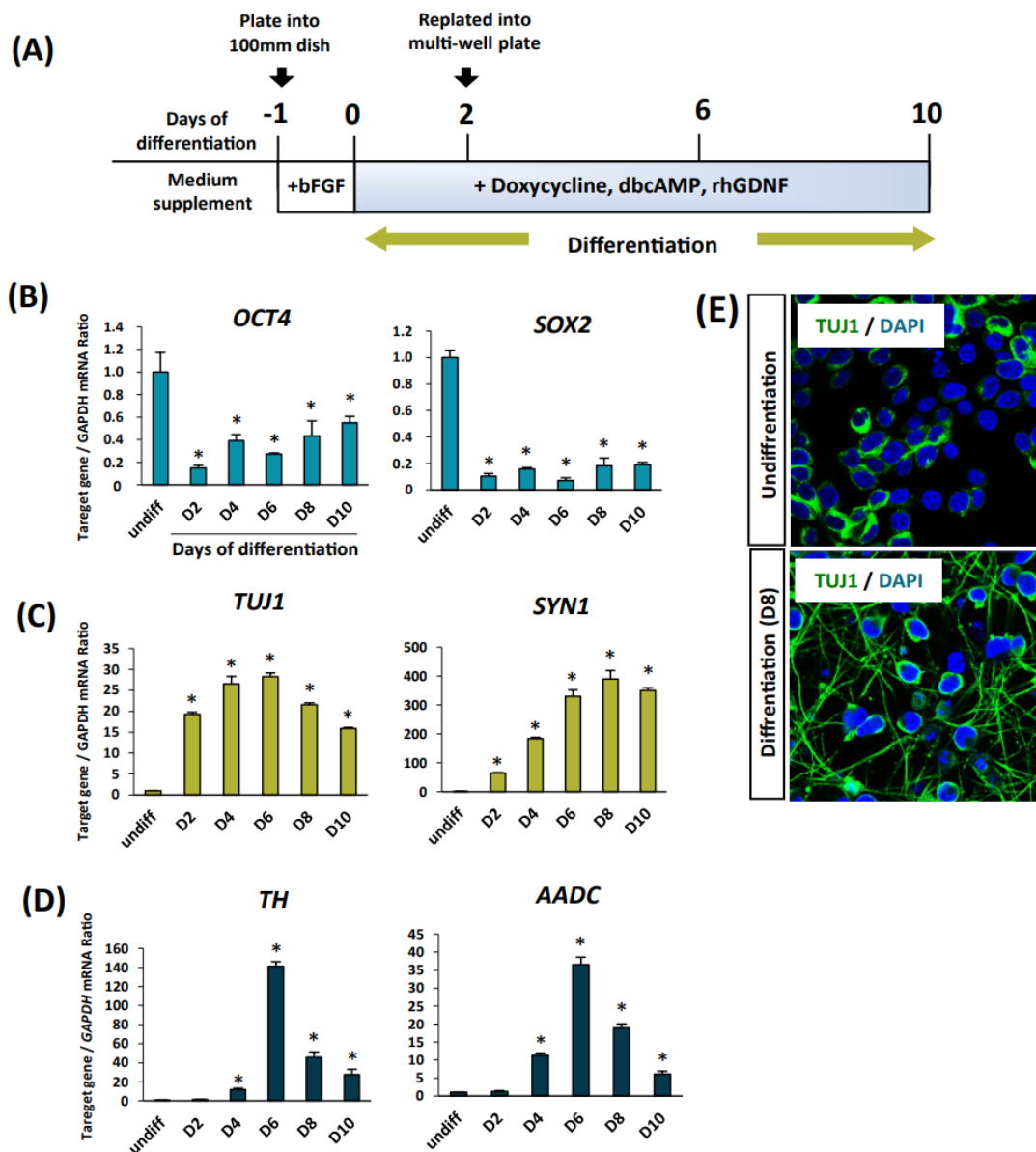


Figure 5. *In vitro* neural differentiation system using LUHMES cells. (A) Schematic diagram of the differentiation procedure for LUHMES cells. (B-D) The mRNA levels of (B) pluripotency markers; *OCT4*, *SOX2*, (C) neuronal markers; *TUJ1*, *SYN1*, (D) catecholamine markers; *TH*, *AADC*, during differentiation were determined by using real time RT-PCR. Data were normalized to undifferentiated mRNA levels and presented as means \pm SE (n = 4/group). Statistical significance was determined by a one-way ANOVA

followed by Bonferroni's post hoc test ($*p < 0.05$: vs. undifferentiated). (E) Immunocytochemistry was performed in undifferentiated and day 8 differentiated LUHMES cells. Images of TUJ1 (Green) and DAPI (Blue) staining are shown.

3-5 神経分化期 MeHg 曝露による細胞生存率の変化

次に、神経細胞分化時の MeHg 曝露による細胞毒性を調べた。MeHg による細胞毒性の実験は、Figure 6A に示すように、分化 2 日目から 6 日間 MeHg に曝露し、分化 3 日目から 8 日目まで 1 日ごとに CCK-8 を用いて解析した。その結果、分化 8 日目においても 1 nM の MeHg 曝露は、細胞生存率に影響しないことが明らかになった (Figure 6B-G)。

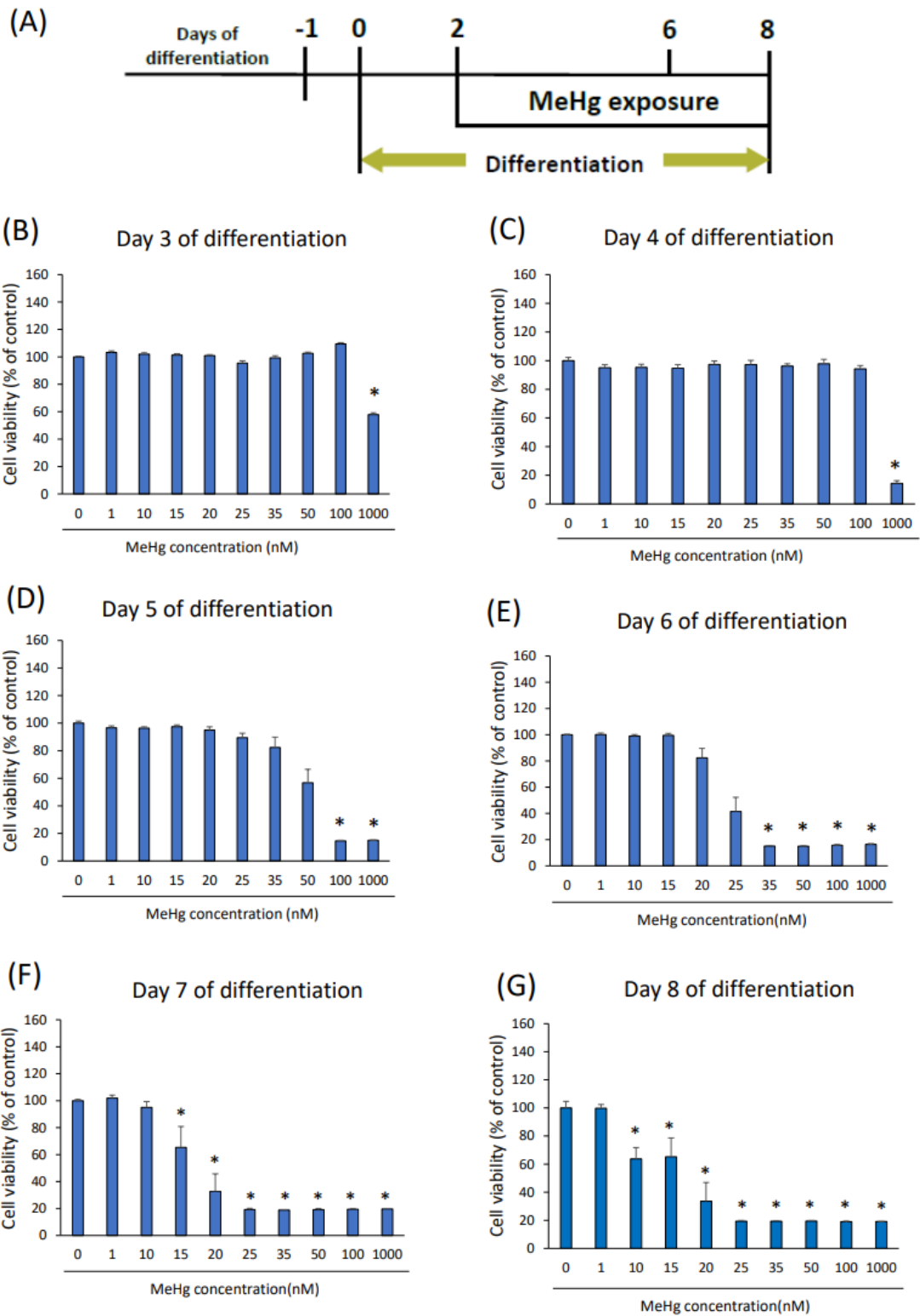


Figure 6. Cell viability by MeHg exposure in an *in vitro* experimental system. (A) Schematic diagram for MeHg exposure experiments. (B-G) LUHMES cells were treated with MeHg at different concentrations for 6 days, and cell viability at each time point was measured. Data were normalized to control levels and presented as means \pm SE (n = 8/group). Statistical significance was determined by a one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test (* $p < 0.05$: vs. control).

3-6 神経分化期 MeHg 曝露による神経突起伸長の抑制

LUHMES 細胞を用いて神経細胞分化の2日目から8日目までの6日間, MeHg (1 nM) に曝露し解析した (Figure 7A). 細胞内 Hg 濃度を測定したところ, MeHg 曝露群では 0.68 ± 0.04 pg Hg/ng protein であり, control 群では Hg 蓄積が検出されなかった (Table 4). また *in vivo* 実験と同様に (第1章結果 3-1), 神経分化時に MeHg を曝露すると, 神経突起伸長が阻害された (Figure 7B).

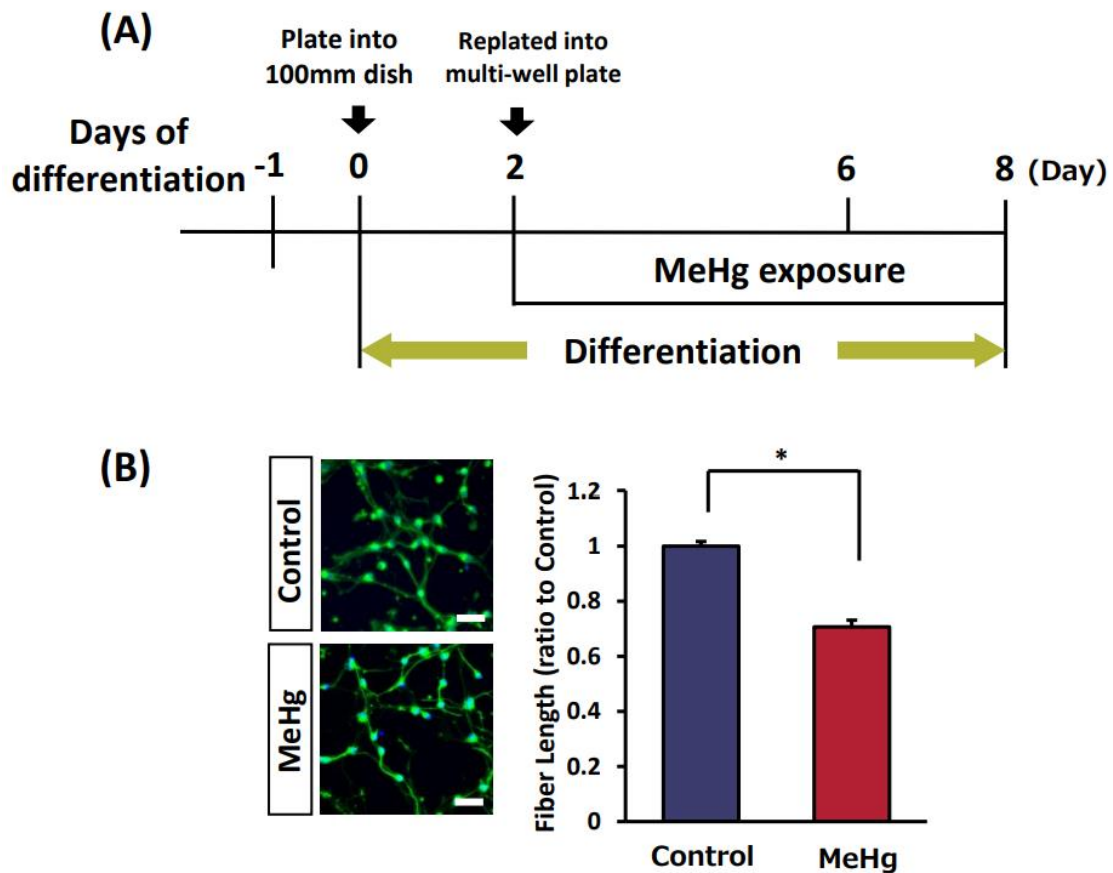


Figure 7. Neuronal fiber length was determined in LUHMES cells exposed to MeHg.

(A) Schematic diagram of MeHg exposure experiments in LUHMES cells. LUHMES cells were exposed to MeHg (1 nM) for 6 days, from day 2 to day 8 of neuronal differentiation. (B) Immunostaining was performed with neuronal-specific β -tubulin III antibody (green) to visualize neuronal processes in day 8 differentiated LUHMES cells exposed to MeHg (1 nM) for 6 days. Following staining, images were captured with an imaging cytometer (IN Cell Analyzer 2200). Scale bar = 50 μ m. Fiber length was measured by using IN Cell investigator (analysis software for IN Cell Analyzer). Data were normalized to control levels and presented as means \pm standard error (n = 36/group). Statistical significance was determined by Student's *t*-test (**p* < 0.05).]

Table 4 Mercury accumulation in LUHMES cells

Experimental group	Hg concentration (pg Hg/ng protein)
Control	ND
MeHg (1 nM)	0.58 ± 0.05

Data were represented as means ± standard error (n = 3/group). ND = not detected (< 0.5 ppb; detection limit of instrument).

3-7 神経分化期 MeHg 曝露によってメチル化 DNA および DNMT が増加した

LUHMES 細胞を用いて、神経分化 2 日目から MeHg 曝露を行い、分化 8 日目に解析を行った。その結果 *in vivo* 実験系の結果 (第 1 章結果 3-2) と一致して、MeHg 曝露によってメチル化 DNA が増加した (Figure 8A)。さらに、MeHg 曝露によって全ての DNMT の発現増加が認められた (Figure 8B, C)。

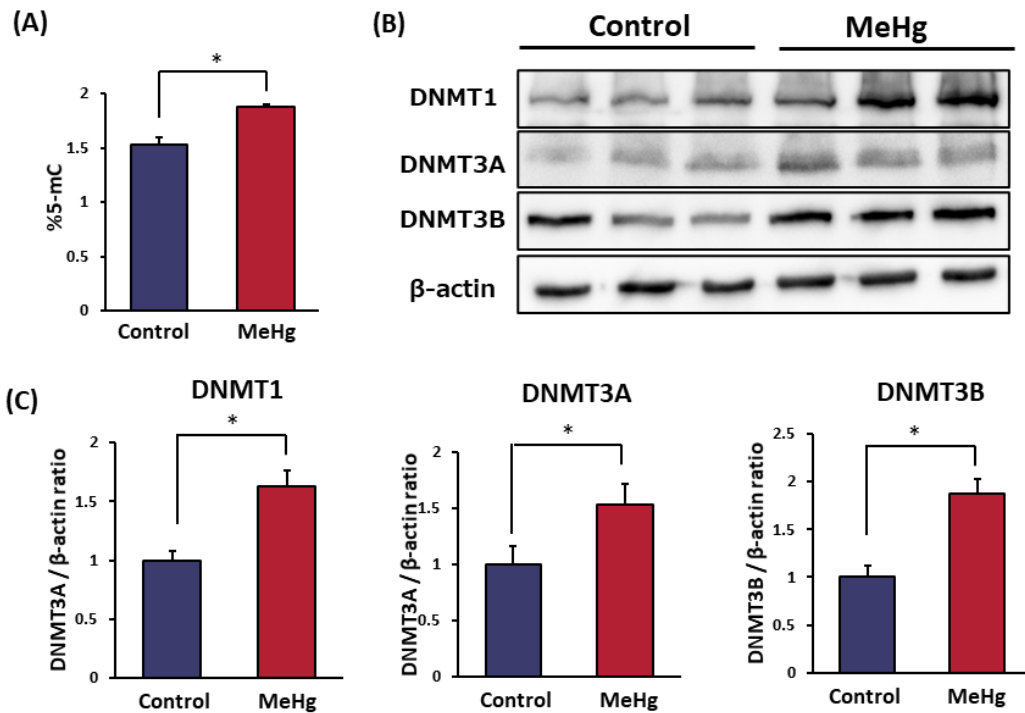


Figure 8. Determination of DNA methylation was performed in LUHMES cells exposed to MeHg. (A) Global DNA methylation in differentiated LUHMES cells after exposure to MeHg (1 nM) for 6 days. %5-mC is the percentage of methylated DNA (5-methylcytosine). Each value represents the mean \pm standard error (n = 4/group). Statistical significance was determined by Student's *t*-test (**p* < 0.05). (B) Protein levels of DNMT1, DNMT3A, DNMT3B and β -actin in differentiated LUHMES cells exposed to MeHg (1 nM) for 6 days. Data were all normalized to control levels and presented as mean \pm standard error (n = 3/group). Statistical significance was determined by Student's *t*-test (**p* < 0.05).

3-8 神経分化期 MeHg 曝露によって AcH3 の減少および HDAC の発現増加が認められた

LUHMES 細胞を用いて、神経分化 2 日目から MeHg 曝露を行い、分化 8 日目に解析を行った。その結果 *in vivo* 実験系の結果 (第 1 章結果 3-2) と一致して、神経分化期 MeHg 曝露によって転写活性関連修飾である AcH3 と AcH3K14 が減少した (Figure 9A)。さらに LUHMES 細胞においてのみ H3K27me3 の増加が認められた (Figure 9A)。そこで、MeHg 曝露による HDAC の発現変化を調べたところ、こちらも *in vivo* 実験系の結果 (第 1 章結果 3-2) と一致して、HDAC3 と HDAC6 の発現増加が認められた (Figure 9B)。

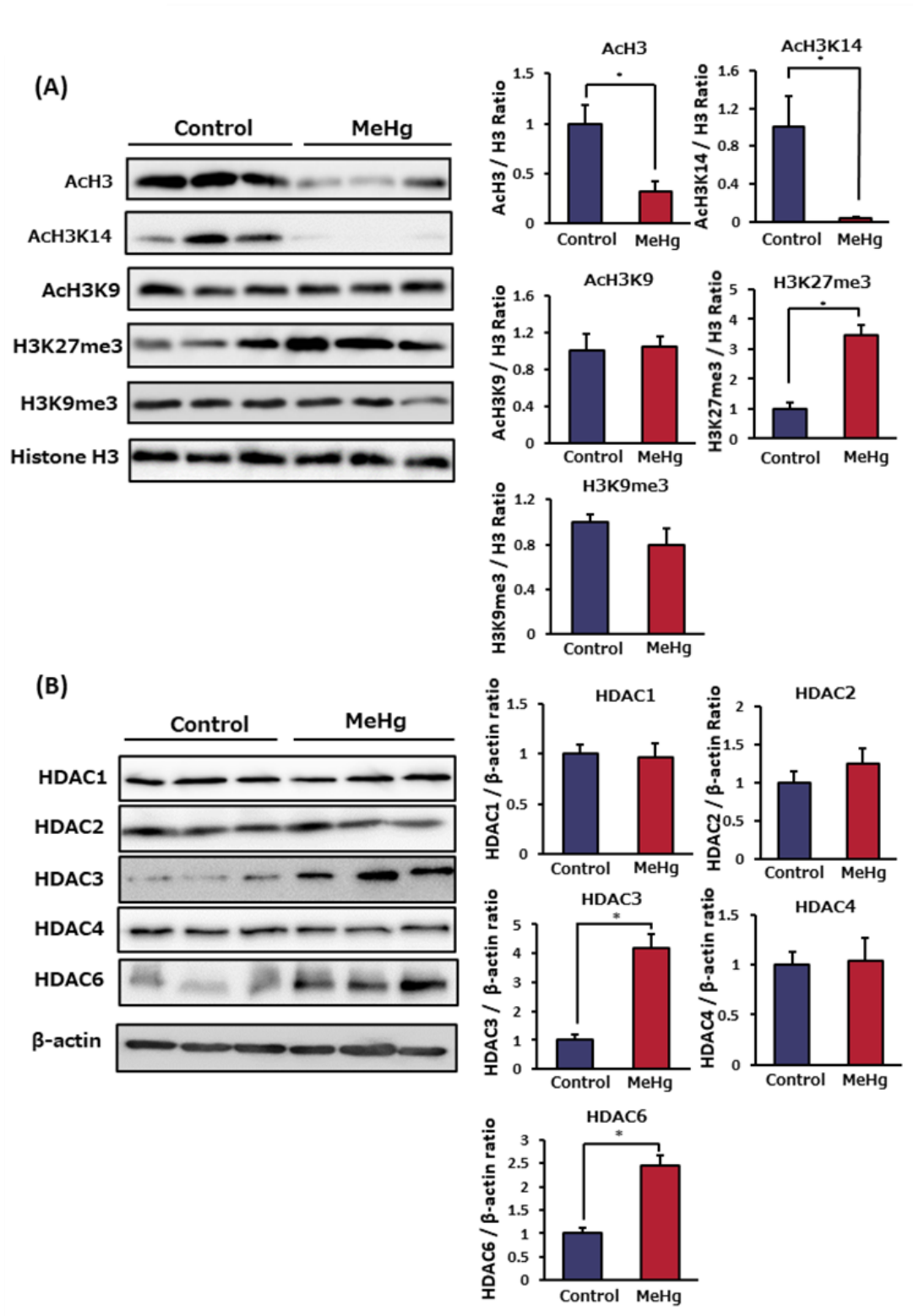


Figure 9. Determination of histone modification was performed in LUHMES cells exposed to MeHg. (A) Protein levels of AcH3, AcH3K14, AcH3K9, H3K9me3, H3K27me3 and Histone H3 in differentiated LUHMES cells exposed to MeHg (1 nM) for 6 days. Data were normalized to control levels and presented as mean \pm standard error (n = 3/group). Statistical significance was determined by Student's *t*-test ($*p < 0.05$: vs control). (B) Protein levels of HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC6 and β -actin in differentiated LUHMES cells exposed to MeHg (1 nM) for 6 days. Data were normalized to control levels and presented as mean \pm standard error (n = 3/group). Statistical significance was determined by Student's *t*-test ($*p < 0.05$).

3-9 MeHg 曝露による神経突起伸長の抑制はエピゲノム変化を介して生じる

MeHg 曝露による神経突起伸長の減少が、HDAC によるヒストン H3 の脱アセチル化と DNMT による DNA メチル化のどちらに起因するかを調べるために、これらの酵素の阻害剤である 5-Aza (5-Azacytidine: a non-selective DNMT inhibitor) および TSA (Trichostatin A: a non-selective HDAC inhibitor), T247 (a selective HDAC3 inhibitor), Tubastatin A (a selective HDAC 6 inhibitor)を用いて検討した。LUHMES 細胞に Figure 11A で示すように、MeHg と HDAC 阻害剤または DNMT 阻害剤を共処置し、神経分化後の神経突起伸長を測定した。この条件において MeHg 曝露によるメチル化 DNA の増加または AcH3 の減少は、5-Aza または TSA 処理によって回復することを確認している (Figure 10)。結果として、HDAC 阻害剤および DNMT 阻害剤はともに、MeHg 曝露による神経突起伸長の減少を抑制した (Figure 11B, C)。

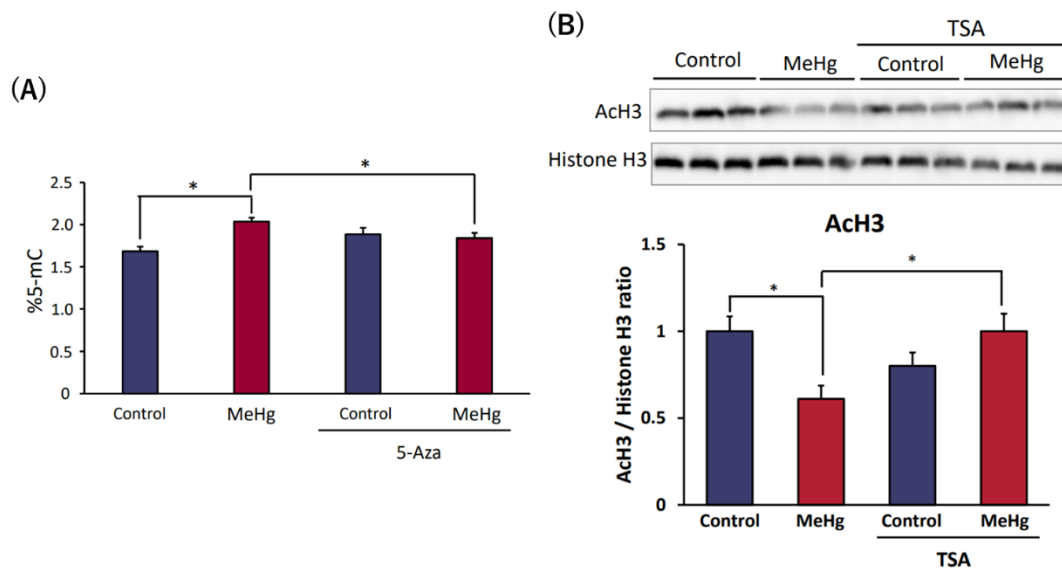


Figure 10. Epigenetic changes induced by inhibitor exposure in LUHMES cells exposed to MeHg. (A) Determination of DNA methylation was performed in LUHMES cells co-treated with MeHg (1 nM) and a DNMT inhibitor 1 μ M 5-Aza (5-Azacytidine) for 6 days. Data were normalized to control levels and presented as means \pm standard error (n = 4-6 /group). Statistical significance was determined by two-way ANOVA, followed by post hoc Bonferroni's test ($*p < 0.05$). (B) Determination of ACh3 was performed in LUHMES cells co-treated with MeHg (1 nM) and an HDAC inhibitor 0.5 nM TSA (Trichostatin A) for 6 days. Data were normalized to control levels and presented as means \pm standard error (n = 4/group). Statistical significance was determined by two-way ANOVA, followed by post hoc Bonferroni's test ($*p < 0.05$).

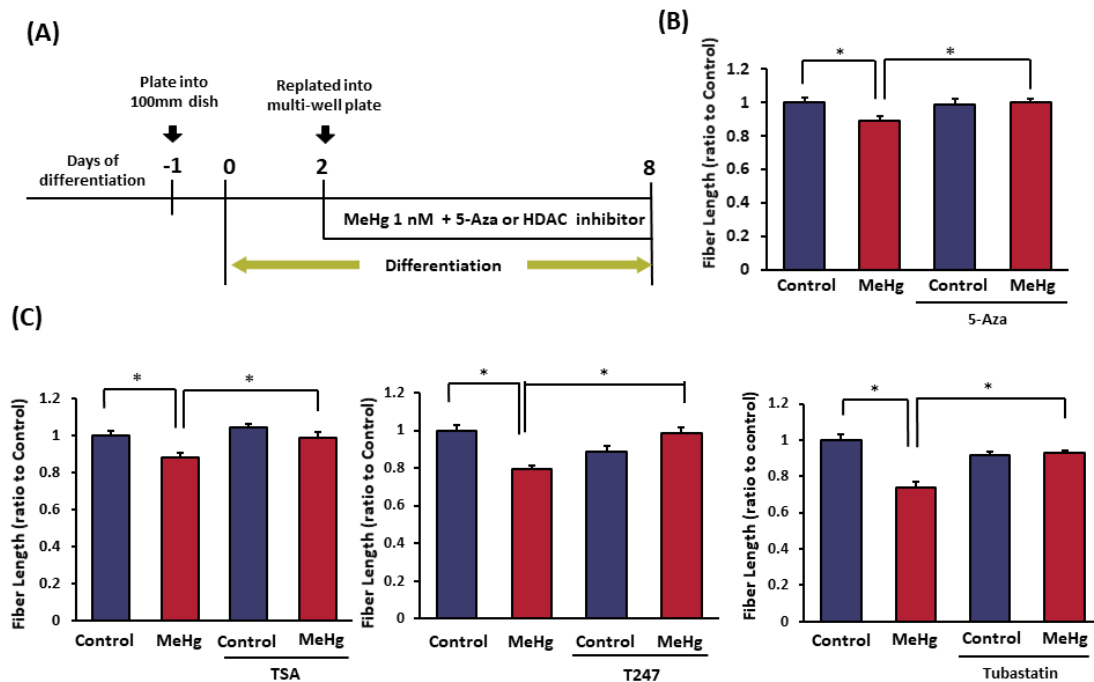


Figure 11. Determination of relationship between neurite extension and epigenetic alteration was performed in LUHMES cells exposed to MeHg. (A) Immunostaining was performed with neuronal-specific β -tubulin III antibody to visualize neuronal processes in differentiated LUHMES cells co-treated with MeHg (1 nM) and a nonselective DNMT inhibitor 5-Aza (5-Azacytidine) (1 μ M), HDAC inhibitors TSA (Trichostatin A) (0.5 nM), T247 (0.5 nM), or Tubastatin A (1 nM) for 6 days. Following staining, the images were captured with an imaging cytometer IN Cell Analyzer 2200. (B-C) Fiber length was measured using IN Cell Investigator. Data were normalized to control levels and presented as means \pm standard error (n = 27/group). Statistical significance was determined by two-way ANOVA, followed by post hoc Bonferroni's test (* p < 0.05).

3-10 MeHg 曝露によって *TH* および *NR4A1* の発現が減少した

これまでの結果より，MeHg 曝露による神経突起伸長抑制にエピゲノム変化が関連することが示唆されたが，実際にエピゲノム変化により発現変動している遺伝子が不明であったため，LUHMES 細胞を用いてリアルタイム RT-PCR により解析を行った．LUHMES 細胞はヒト胎児中脳由来であるため，ドパミン神経分化に関連する遺伝子 (*TH*, *DAT*, *NURR1*, *PBX1*, *DRD2*)，および神経細胞関連遺伝子 (*NESTIN*, *TUJ1*, *SYN1*, *NEFM*, *NR4A1*, *DCX*, *ATCAY*, *CNTN2*, *STMN*) について検討した．その結果，*TH* と *NR4A1* のみ発現減少が認められた (Figure 12)．

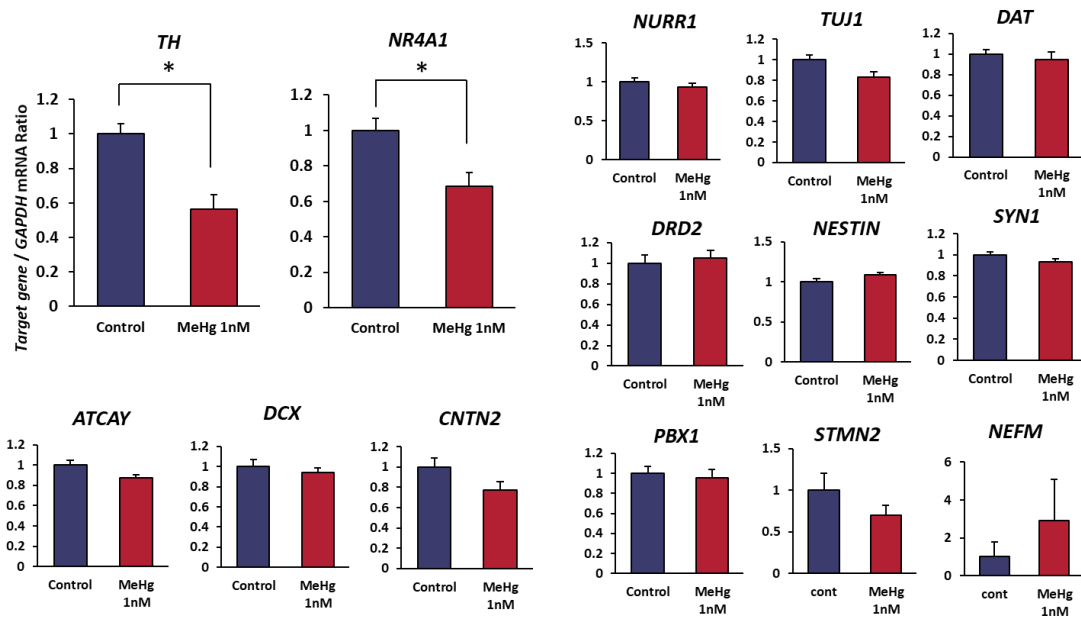


Figure 12. Expression changes of genes related to neural functions by MeHg exposure in LUHMES cells. mRNA levels of various neural function-related genes were determined in day eight differentiated LUHMES cells exposed to MeHg (1nM) for six days. Data were expressed as mean \pm SE ($n = 4/\text{group}$). Statistics were calculated by Student's t -test ($*p < 0.05$; vs. control).

第4節 考察

本章では、胎生期 MeHg 曝露による神経突起伸長への影響とエピゲノム変化について検討した。実験条件は、これまでの研究で仔マウスに組織学的、形態学的な変化や急性毒性は認められず、生後6週から16週齢において行動障害および記憶機能の低下が認められることが報告されている条件で行った²⁷。MeHg 曝露後の胎児の体重および脳重量には有意な変化は見られなかった (Figure 2B, C)。加えて、大脳皮質への Hg 蓄積量は、神経症状の誘発に必要な臨界濃度 10 ng Hg/mg tissue (ppm) 以下であった (Table 3)^{27,34}。In vitro 実験においては、細胞生存率に影響を与えなかった 1 nM を実験濃度として用いた。MeHg 曝露した LUHMES 細胞の細胞内 Hg 濃度は非常に低く、ほぼ検出限界付近であり (Table 4)、これまでの報告と比較しても、低濃度の MeHg 曝露条件であることが示唆される。例えば以前の研究では、10~25 nM の MeHg 曝露によってラット胚神経幹細胞における神経分化阻害が引き起こされることが明らかになった¹⁶。さらに、ヒト ES 細胞において神経分化中に 1~100 nM の MeHg に 23 日間曝露すると、神経突起伸長が阻害されることも報告されている³⁵。しかし、MeHg 曝露によるエピジェネティクスへの影響についての先行報告はほとんどない。胎生期は発達段階であり、神経系が未成熟で化学物質に対して脆弱である。MeHg は胎盤を容易に通過するうえ、胎児は MeHg を体外へ排出することが出来ないため低濃度であっても影響が出る可能性がある³⁶。さらに、胎生期は大規模なエピゲノムのリプログラミングが生じる時期であるため、化学物質により異常が生じる可能性がある^{22,37,38}。そこで本研究では、低濃度の MeHg 曝露による神経機能への影響とエピゲノム変化の関連を調べた。

まず、神経系への影響を調べた。これまでに ES 細胞やヒト神経前駆細胞の神経分化過程における MeHg 曝露により、神経突起伸長が阻害されることが報告

されている^{35,39}。本研究の結果として、これまでの報告と一致して神経分化期 MeHg 曝露による神経突起伸長の抑制が確認した (Figure 2D, 7B)。

次に代表的なエピゲノム修飾である DNA メチル化とヒストン修飾に焦点を当てて解析を行った。DNA メチル化は、DNA のシトシン塩基にメチル基を付加して 5-メチルシトシン (5mC) を形成する過程である。それによって、遺伝子抑制に関与するタンパク質の動員の促進や、転写因子の DNA への結合阻害が生じて遺伝子発現が調節される³²。また DNA は DNMT によってメチル化され、維持される⁴⁰。DNMT1 は、主にメチル化パターンの維持に関連しており、DNMT3A および DNMT3B は、新規の DNA メチル化に関連することが知られている⁴⁰。結果として、神経分化期 MeHg 曝露によって、細胞全体の DNA メチル化レベルが、*in vivo* および *in vitro* 実験系の両方で増加することが明らかになった (Figure 3A, 8A)。これまでも妊娠マウスへの MeHg 曝露により、*Bdnf* 遺伝子のプロモーター領域における DNA の高メチル化が、14 ヶ月齢の仔マウスで認められたなど胎生期 MeHg 曝露による DNA メチル化の変化についての報告がある²⁶。また、MeHg 曝露によって DNMT の増加も認められ、メチル化 DNA の増加が DNMT の増加に起因することが明らかになった (Figure 3, 8)。加えて、DNMT 阻害剤と MeHg を共処置したところ神経突起伸長抑制の改善が認められたため、DNMT の発現増加に伴うメチル化 DNA の増加が神経突起伸長抑制に関連することが示唆された (Figure 10A, 11B)。

また、ヒストン修飾についても検討した。発生過程におけるヒストン修飾の制御は、神経細胞分化に必須であると考えられている⁴¹。したがって、MeHg 曝露によって誘導されるヒストン修飾の変化は、神経細胞の発生に影響を及ぼす可能性がある。ヒストンのアセチル化はヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) および HDAC によって担われる^{20,42}。このアセチル化は、神経機能に

関連する多数の遺伝子の発現を増加させることが知られている⁴³。本研究では、MeHg 曝露により AcH3 のレベルが *in vivo* および *in vitro* 実験系の両方で減少しており、HDAC3 の HDAC6 発現が増加することを示した (Figure 4B, 9B)。

加えて、HDAC3 または HDAC6 の発現増加を介したヒストンアセチル化の低下が MeHg 曝露による神経突起伸長の低下と関連することが明らかになった (Figure 11C)。HDAC3 および HDAC6 の制御は、脳神経およびシナプスの適切な発達に必要であり、HDAC3 および HDAC6 の発現増加が神経発達阻害に関連する可能性がある^{44,45}。しかしながら、MeHg 曝露により HDAC や DNMT が増加する分子機構は明らかにされていない。このメカニズムの解明には、MeHg の親電子性が重要であると考えられる。MeHg は強い親電子性を持っているため、タンパク質のチオール基などの求核性物質と容易に反応することができる。一例として、細胞生存率に影響を与えない低濃度 MeHg 曝露によって、MeHg が Akt や CREB などの転写因子と共有結合し、抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 の遺伝子発現を抑制することが報告されている⁴⁶。さらに CREB は、HAT 活性を持つ CBP に結合するコアクチベーターとして知られている⁴⁷。したがって、MeHg が CREB に直接結合してその機能を阻害し、それによって HAT と HDAC のバランスが乱れている可能性がある⁴⁸。さらに、NGF によって活性化される TrkA 受容体の下流にある CREB/ERK シグナルが神経突起伸長を制御することが報告されており⁴⁹、MeHg の CREB への共有結合による機能阻害も神経突起伸長抑制の要因の 1 つになる可能性がある。

以上より、神経分化期低濃度 MeHg 曝露による神経突起伸長の減少などの神経学的影響は、HDAC の増加を介した AcH3 レベルの減少、DNMT の増加を介したメチル化 DNA の増加など、複数のエピゲノム変化により引き起こされることが示された。しかしながら、実際にエピゲノム変化によって発現変化が認め

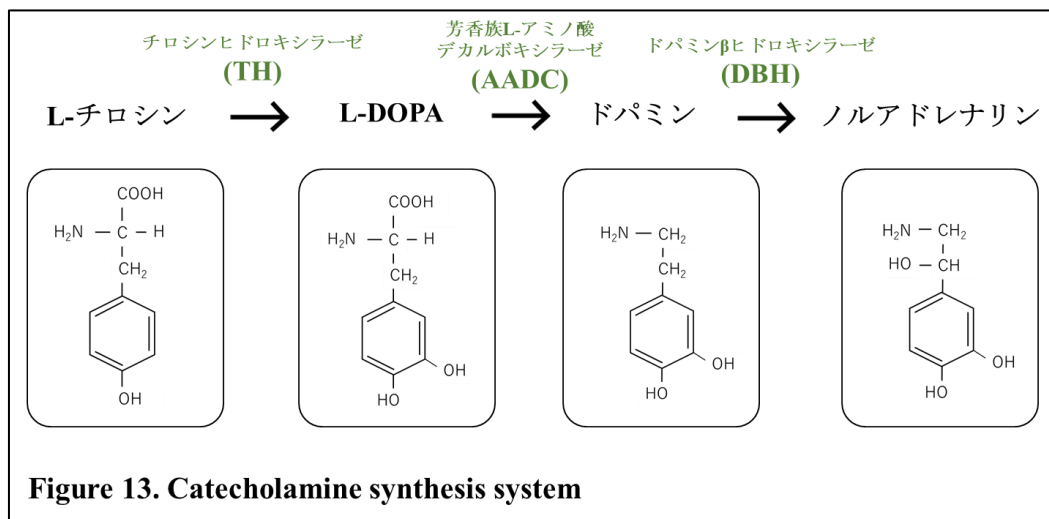
られた遺伝子は明らかになっていない。そこで、まずは候補遺伝子の探索のために、LUHMES細胞を用いて神経機能に関わる遺伝子群に対して mRNA 発現解析を行った。その結果 *TH* と *NR4A1* の発現減少が認められた。

今回得られた結果は、MeHg 曝露が低濃度であっても発達期においては神経機能障害の潜在的な危険因子となる可能性を示唆している。

第2章 *In vitro* 実験系を用いた神経分化期 MeHg 曝露による TH のエピゲノム解析

第1節 緒言

第1章の結果より，神経発達期における MeHg 曝露が *in vivo* および *in vitro* 実験系において同様のエピゲノム変化を介して神経突起伸長を抑制することを見出した⁵⁰。これは化学物質に感受性の高い神経発達期に低濃度 MeHg 曝露を受けることでエピゲノム変化が生じ，成熟後の神経機能に影響を与える可能性を示唆している。また，エピゲノム変化により実際に発現変化が生じている神経関連遺伝子を調べたところ，*TH* と *NR4A1* の発現減少が認められた。そこでまず本章では，第1章で変化が認められた *TH* に焦点を当ててエピゲノム解析を行った。



TH (チロシンヒドロキシラーゼ) は，カテコールアミン生合成の律速酵素であり⁵¹，さらに下流の酵素として AADC と DBH が知られている (Figure 13)。これまでに，胎生期の MeHg 曝露とカテコールアミンについては複数の報告がある。たとえば，妊娠ラットに妊娠7日目から授乳期7日目まで MeHg を投与した結果，生後21日目にドパミンを介した運動活性の有意な低下が認められ

たことが報告された⁵²。また、胎生期 MeHg 曝露ラットにおいては小脳でのノルアドレナリン濃度増加が報告されている⁵³。したがって、カテコールアミンは MeHg 毒性を考える上で重要な標的であることが示唆される。

そこで、LUHMES 細胞を用いた *in vitro* 実験系において神経分化期における MeHg 曝露がカテコールアミン系に与える影響について検討した。

第2節 実験材料および方法

2-1 薬物および試薬

本実験では、以下の薬物および試薬を用いた。

メタノール (Methanol), グリシン (Glycine), N,N'-メチレンビスアクリルアミド (N,N'-Methylene-bisacrylamide : BIS), 塩化ナトリウム (Sodium Chloride : NaCl), トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris hydroxymethyl) aminomethane, ラウリル硫酸ナトリウム (Sodium Lauryl Sulfate : SDS), 塩酸 (Hydrochloric Acid : HCl), 2-メルカプトエタノール (2 - Mercaptoethanol), ブロモフェノールブルー (Bromophenol Blue : BPB), N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (N,N,N',N' - Tetramethylethylenediamine : TEMED), デオキシコール酸ナトリウム (Deoxycholic Acid Sodium Salt), スキムミルク (Skim Milk), ノニデット P-40 (Nonidet® P-40 : NP-40), ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate : Tween), 塩化カリウム (potassium chloride : KCl), リン酸水素二ナトリウム・12水 (di-Sodium Hydrogenphosphate 12-Water : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), リン酸二水素カリウム (Potassium Dihydrogenphosphate : KH_2PO_4), 水酸化ナトリウム (Sodium Hydroxide : NaOH), 0.25%-Trypsin / 1mM-EDTA Solution, EDTA, 塩化リチウム (LiCl), proteinaseK, RNaseA は NACALAI TESQUE, INC., bFGF は ReproCELL Inc., アプロチニン (Aprotinin), ロイペプチン (Leupeptin), N6, 2'-O-Dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt : dbcAMP, ポリ-L-オルニチン溶液 (Poly-L-ornithine solution) は SIGMA-ALDRICH, Co., Doxycycline Hyclate, Methylmercuric Chloride は TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD., THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix,

ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix は TOYOBO CO., LTD., ペルオキシ二硫酸アンモニウム (Ammonium Peroxodisulphate : APS), ウシ血清由来アルブミン (Albumin from Bovine Serum : BSA), フェニルメチルスルホニル=フルオリド (Phenylmethylsulfonyl Fluoride : PMSF), プロテインアッセイ BCA キット (Protein Assay BCA Kit), ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル (Polyoxyethylene Octylphenyl Ether : Triton-X), 正常ヤギ血清 (Normal Goat Serum), 正常ヤギ血清 (Normal Goat Serum), グリア細胞株由来神経栄養因子 (Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor, Human, recombinant, Animal-derived-free : rhGDNF), Fibronectin Solution from Human Plasma は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. よりそれぞれ購入した.

2-2 実験方法

2-2-1 LUHMES 細胞の培養と分化

第 1 章 2-2-3 と 2-2-4 と同様に行った。2 日間の細胞分化の後，細胞をトリプシン処理し，プレコートされた 100 mm ディッシュ (1×10^7 細胞) および 6 ウェルプレート (2×10^6 細胞/ウェル) に再プレーティングした。細胞は分化培地で 6 日間維持した。

2-2-2 Real-time RT-PCR

第 1 章 2-2-12 と同様に行った。使用したプライマーは以下の通り： Aromatic L-amino-acid decarboxylase (*AADC*) (forward: 5'-AGGAAGCCCTGGAGAGAGACA-3'; reverse: 5'-CTTGTTGCAGATAGGACCGACTT-3'), Dopamine beta-hydroxylase (*DBH*) (forward: 5'-CCACAACCCACTGGTGATAGAA-3', reverse: 5'-TGATCCCCGCGTTGAAG-3'), and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) (forward: 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'; reverse: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3') .

2-2-3 ウェスタンブロット法

第 1 章 2-2-10 と同様に行った。細胞分化 8 日目に 1xRIPA buffer で溶かした。1 次抗体には，mouse anti- β -actin antibody (1:2000, Sigma-Aldrich) および rabbit anti-TH antibody (1:1000, Millipore) を使用した。2 次抗体には，goat anti-mouse IgG antibody, peroxidase conjugated, H+L (1:2500, Merck KGaA), goat anti-rabbit IgG antibody, peroxidase conjugated, H+L (1:2500, Merck KGaA) を用いた。

2-2-4 クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイ

ホルムアルデヒド (0.5%) を用いて 10 分間常温で細胞を固定した。細胞ペレットを Cell lysis buffer [0.5 mM PIPES (pH 8.0), 85 mM KCl, 0.5% NP-40, 200 mM PMSF] に再懸濁させた。核ペレットを Nuclei lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 1% SDS, 200 mM PMSF] に約 2.67×10^6 nuclei/mL で再懸濁させた。核溶解液は、抗体とともに 4 °C で一晩インキュベートした。ChIP アッセイでは以下の抗体を用いた : rabbit anti-acetylated histone H3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA USA), rabbit anti-acetylated histone H3 lysine9 (Cell Signaling Technology), rabbit anti-tri-methyl histone H3 lysine9 (Cell Signaling Technology) and rabbit anti-tri-methyl histone H3 lysine27 (Cell Signaling Technology)。核溶解液に 10 μ L の dynabeads を加え、4°C で 3 時間インキュベートし、タンパク質-ビーズ複合体を以下のバッファーで洗浄した : {low salt immune complex wash buffer [0.1% SDS, 0.1% triton-X, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.15M NaCl]; high salt immune complex wash buffer [0.1% SDS, 0.1% Triton-X, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5M NaCl]; LiCl wash buffer [0.1% NP-40, 0.25 M LiCl, 0.01 g/mL deoxycholic acid, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)], TE buffer) を使用した。120 μ L の IP 希釈バッファー [0.01% SDS, 1.1% Triton-X, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl (pH 8.0), 167 mM NaCl] を加えた後、サンプルを 15 分間ボルテックスした。上清を RNaseA (Nacalai) と 0.2 M NaCl とともに 65 °C で一晩インキュベートした。その後、10 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl (pH 6.5), 0.25 mg/mL proteinase K (Nacalai) で 45 °C, 2 時間消化した。ChIP-DNA はフェノールクロロホルム沈殿およびエタノール沈殿で精製し、Real-time RT-PCR で解析した。TH プロモーターの増幅に用いたプライマーは以下の通り : -0.3 kb (forward: 5'-CCCTCCCTGTGTGCTCTCTT-3'; reverse: 5'-TGGAATCTAATTGCCTTCACTCC-

3'), -0.5 kb (forward: 5'-TATGAGACACACGGCCTGGAA-3'; reverse: 5'-GGCACACTTTTAATGAACACCAGA-3'), -2.5 kb (forward: 5'-TTCCCATCGGGCTTCCA-3'; reverse: 5'-CAGGCCAGGAGGAGAGACAT-3').
ChIP-DNA の量は, 全 DNA に対する%として計算した.

2-2-5 統計解析

すべての結果は, 平均値 \pm SE で表した. すべての統計解析は, StatView (Abacus, Baltimore, MD USA) を用いて行った. 危険率が 5%未満を有意差ありとした.

第3節 実験成績

3-1 神経分化期 MeHg 曝露によって TH の発現が減少した

実験は第1章で神経分化期の MeHg 曝露によってカテコールアミン合成系の律速酵素である TH の発現減少が認められた, LUHMES 細胞による *in vitro* 実験系を用いて行った. (Figure 12). これまでに急性毒性のない比較的低濃度の胎生期 MeHg 曝露は, 発達中の脳の全体的な形態的变化ではなく, 神経伝達物質であるカテコールアミン合成に影響する可能性が報告されている^{52,53}. また, *in vitro* の研究においても低濃度の MeHg 曝露がカテコールアミン系を障害する可能性があることが報告されている^{54,55}. そこで TH 以外のカテコールアミン合成系関連遺伝子についても解析を行った. LUHMES 細胞を用いて神経細胞分化の2日目から8日目までの6日間, MeHg (1 nM) に曝露し, AADC と DBH の発現量を測定した (Figure 14A, B). その結果, MeHg 曝露は AADC および DBH の mRNA レベルに影響を与えなかった (Figure 14A). 一方, TH の発現量は, MeHg によってタンパク質レベルでも有意に低下した (Figure 14C).

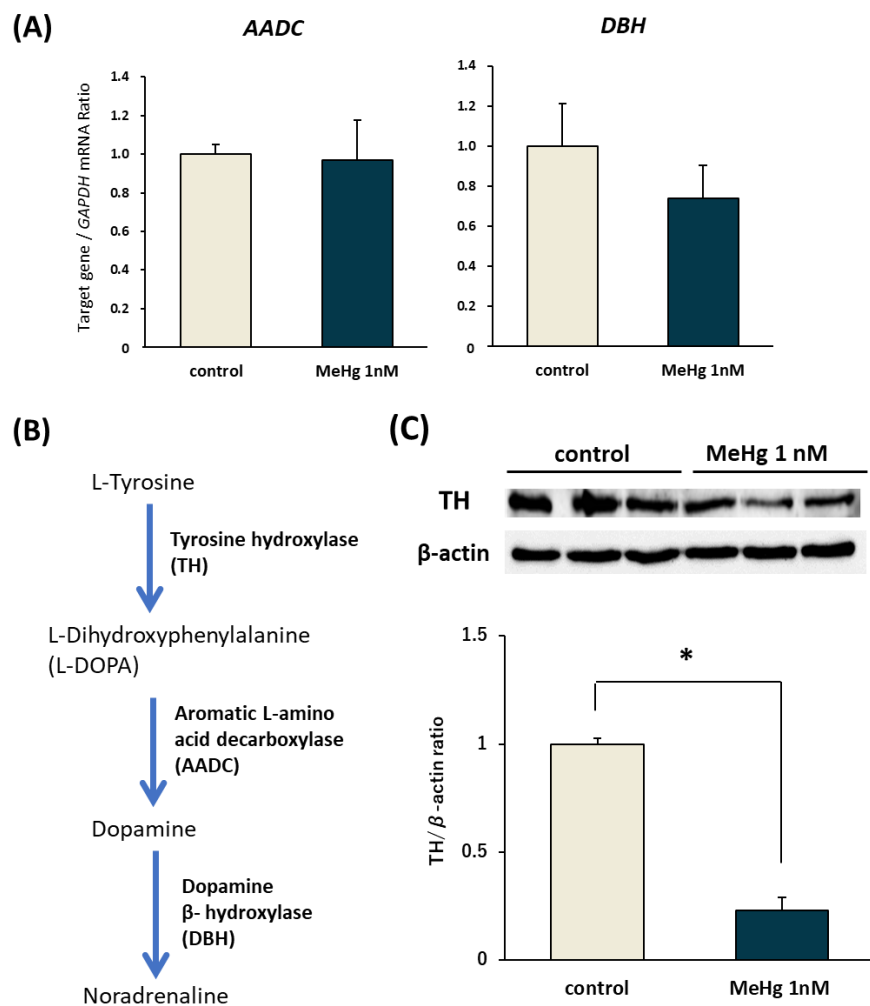


Figure 14. Changes in the expression of TH by MeHg exposure. (A) mRNA levels of *AADC* and *DBH* were determined on day 8 differentiated LUHMES cells exposed to MeHg (1 nM) for 6 days. Data were normalized to control mRNA levels and presented as means \pm SE (n = 4/group). Statistical significance was determined by Student's *t*-test ($*p < 0.05$: vs. control). (B) Pathway of catecholamine synthesis. (C) The protein levels of TH and β -actin were determined in day 8 differentiated LUHMES cells exposed to MeHg (1 nM) for 6 days. Data were normalized to control levels and presented as means \pm SE (n = 3/group). Statistical significance was determined by Student's *t*-test ($*p < 0.05$: vs. control).

3-2 MeHg 曝露によって *TH* のプロモーター領域における H3K27me3 が増加した

MeHg 曝露によって *TH* の発現減少が認められたため、*TH* のプロモーター領域におけるヒストン修飾変化を ChIP assay で解析した。*TH* のプロモーターは、神経細胞の活動によって大きく制御されており、NBRE (NGFI-B response element), BBE (bicoid-type element), AP-1 (AP-1 response element) などのいくつかの転写因子の結合部位がある (Figure 15A)^{56,57}。転写調節に関連する前述の結合領域において、転写促進に関連する AcH3 や AcH3K9, 転写抑制に関連する H3K9 me3 や H3K27 me3 のレベルを調べた。その結果、MeHg 曝露により *TH* のプロモーター領域において、H3K27 me3 が有意に増加することが明らかになった (Figure 15B)。

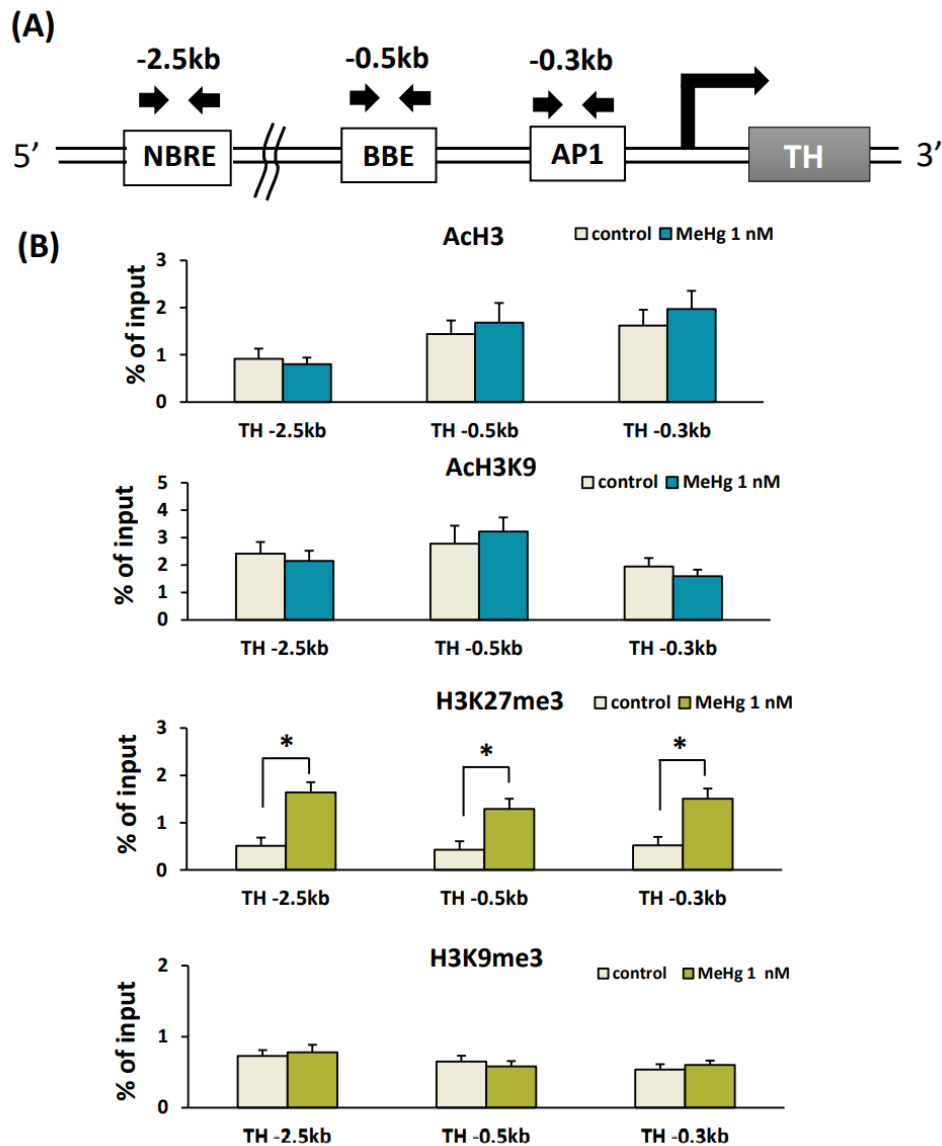


Figure 15. Histone modification changes in the promoter region of *TH* by MeHg exposure. (A) Regulatory elements in the human *TH* promoter (NBRE: NGFI-B response element, BBE: bicoid-type element, AP-1: AP-1 response element) for primer sets. (B) ChIP assays of AcH3, AcH3K9, H3K27 me3, and H3K9 me3 levels at the human *TH* promoter in differentiated LUHMES cells were performed. Data were normalized to control levels and presented as means \pm SE (n = 5/group). Statistical significance was determined by Student's *t*-test (* $p < 0.05$: vs. control).

第4節 考察

本章では MeHg 曝露によって TH の発現減少が認められたため、MeHg 曝露後のカテコールアミン系に関連する遺伝子の発現量を測定した。その結果、MeHg に 6 日間曝露した神経細胞分化の 8 日目に TH 発現がタンパク質レベルでも有意に減少した (Figure 14)。この結果は、先行報告のマウス中脳由来細胞 (MN9D 細胞) において MeHg 曝露後に TH の発現が低下するという報告と一致する⁵⁴。これまでに周産期 MeHg 曝露が子における ADHD の発症率の増加に関連する環境要因の 1 つである可能性が報告されている⁵⁸。また、MeHg への出生前曝露がカテコールアミン系を変化させることが指摘されており、TH の減少がカテコールアミン系の異常を引き起こす可能性がある。ドパミンは ADHD の病態生理に主要な役割を果たしていると考えられているため⁵⁹、MeHg によるカテコールアミン系の異常が ADHD の関係に関与している可能性が考えられる。しかしながら、実際の ADHD 発症については MeHg 単独の曝露のみで起きることは考えにくく、現実には様々な環境要因が関連している可能性があり、その中で MeHg はリスクの 1 つになるかもしれない。

次に、TH の発現減少にエピゲノム変化が関連しているか検討した。メチル化やアセチル化などのヒストン修飾は、クロマチン構造の変化やヒストン修飾因子のプロモーター領域への動員によって遺伝子発現を制御することが知られている¹⁹。MeHg 曝露により、TH 遺伝子プロモーター領域において、転写抑制に関連することが知られている H3K27 me3 が有意に増加した (Figure 15)。これらの結果より、神経分化期に MeHg 曝露されると、TH プロモーター領域で転写抑制に関連するヒストン修飾が増加することにより、TH 発現が低下することが示唆された。MeHg は親電子性の金属であるため、チオールタンパク質などの求核剤と容易に反応する。以前の研究では、細胞生存率に影響を与えない低濃度

の MeHg は、Akt や CREB などの転写因子と共有結合し、抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 の発現を抑制することが示されている⁴⁶。したがって、MeHg は転写因子やヒストン修飾に関わる酵素に結合し、本研究で認められた TH の転写調節の異常が生じた可能性がある。加えてこれまでにマウスを用いた検討において、胎生期 MeHg 曝露が成熟後に H3K27 me3 の増加と AcH3 の減少を伴う *Bdnf* プロモーター領域のクロマチン構造の長期的な抑制状態を誘導することが報告されている⁶⁰。このことから、MeHg 曝露が複数の遺伝子でエピゲノム変化を誘導することが推測される。

本研究より、発達期における低濃度の MeHg 曝露による TH の減少によって神経機能に異常が生じている可能性が示唆された⁶¹。

第3章 *In vitro* 実験系における神経分化期 MeHg 曝露による NR4A1 のエピゲノムおよび神経スパイク活性解析

第1節 緒言

第1章の結果から、低濃度 MeHg の曝露による神経突起伸長の低下は、HDAC の増加による AcH3 の減少、DNMT1 レベルの増加によるメチル化 DNA の増加など、いくつかのエピゲノム変化によって生じることが明らかとなった⁵⁰。また、MeHg 曝露によって TH および NR4A1 が発現減少することが明らかになった (Figure 12)。そこで第2章では、TH の発現減少とエピゲノム変化の関連を調べたところ、MeHg 曝露によって TH のプロモーター領域における転写抑制に関連する H3K27me3 の増加が認められた。

続いて、本章では NR4A1 に焦点を当てて解析を行った。NR4A1 は、orphan nuclear receptors (NR4A1, NR4A2, NR4A3) ファミリーに属し、細胞増殖や炎症、アポトーシスに関与する⁶²。最近の研究によると、NR4A1 は、神経の発達と可塑性、および代謝と免疫機能に関与している^{63,64}。また、PC12 細胞において HDAC 阻害剤 TSA により誘導される神経分化に、AcH3K14 を介して発現増加する NR4A1 が必須であることが報告されている⁶⁵。第1章において、HDAC 阻害剤が神経分化期 MeHg 曝露による神経突起伸長阻害を改善することが明らかになっており、MeHg 曝露による神経突起伸長抑制においても、NR4A1 が関与している可能性がある。またこれまでに、マウス実験により、Nr4a1 が記憶機能と海馬シナプス可塑性の一種である長期増強 (LTP) の持続時間を増加させることが報告されている^{66,67}。さらに Nr4a1 は、海馬におけるスパインやシナプスの密度や分布を調節していることも報告されている⁶⁸。

これらの報告から、NR4A1 が神経の突起伸長や神経スパイク活性などの制御において重要な役割を果たしていることが示唆される。

そこで、LUHMES 細胞を用いて神経細胞分化期 MeHg 曝露による神経スパイク活性解析および NR4A1 のエピゲノム解析を行った。

第2節 実験材料および方法

2-1 実験材料及び試薬

本実験では以下の実験材料及び試薬を用いた。

Matrigel®は CORNING, INC., Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST は DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC., メタノール (Methanol), グリシン (Glycine), N,N' - メチレンビスアクリルアミド (N,N'-Methylene-bisacrylamide : BIS), 塩化ナトリウム (Sodium Chloride : NaCl), トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris hydroxymethyl) aminomethane, ラウリル硫酸ナトリウム (Sodium Lauryl Sulfate : SDS), 塩酸 (Hydrochloric Acid : HCl), 2-メルカプトエタノール (2-Mercaptoethanol), ブロモフェノールブルー (Bromophenol Blue : BPB), N,N,N',N' - テトラメチルエチレンジアミン (N,N,N',N' - Tetramethylethylenediamine : TEMED), デオキシコール酸ナトリウム (Deoxycholic Acid Sodium Salt), スキムミルク (Skim Milk), ノニデット P-40 (Nonidet® P-40 : NP-40), ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate : Tween), 塩化カリウム (potassium chloride : KCl), リン酸水素二ナトリウム・12水 (di-Sodium Hydrogenphosphate 12-Water : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), リン酸二水素カリウム (Potassium Dihydrogenphosphate : KH_2PO_4), 水酸化ナトリウム (Sodium Hydroxide : NaOH), 4% - パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (4%-Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution), 0.25% - Trypsin / 1mM-EDTA Solution, Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA, 塩化リチウム (LiCl), proteinaseK, RNaseA は NACALAI TESQUE, INC., DNeasy Blood &

Tissue Kit, EpiTect Bisulfite Kit は QIAGEN, bFGF は ReproCELL Inc., アプロチニン (Aprotinin), ロイペプチン (Leupeptin), N6, 2'-O-Dibutyryladenine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt : dbcAMP, ポリ-L-オルニチン溶液 (Poly-L-ornithine solution) は SIGMA-ALDRICH, Co., Doxycycline Hyclate, Methylmercuric Chloride は TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD., THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix, ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix, KOD SYBR® qPCR Mix は TOYOBO CO., LTD., ペルオキシ二硫酸アンモニウム (Ammonium Peroxodisulphate : APS), ウシ血清由来アルブミン (Albumin from Bovine Serum : BSA), フェニルメチルスルホニル=フルオリド (Phenylmethylsulfonyl Fluoride : PMSF), プロテインアッセイ BCA キット (Protein Assay BCA Kit), ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル (Polyoxyethylene Octylphenyl Ether : Triton-X), 正常ヤギ血清 (Normal Goat Serum), 正常ヤギ血清 (Normal Goat Serum), グリア細胞株由来神経栄養因子 (Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor, Human, recombinant, Animal-derived-free : rhGDNF), Fibronectin Solution from Human Plasma は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. よりそれぞれ購入した。

2-2 実験方法

2-2-1 LUHMES 細胞培養方法

本研究で使用した LUHMES 細胞の培養および分化のこれらの実験を行うために使用した方法は、前章に記載されている^{28,50}。2日間の細胞分化の後、細胞をトリプシン処理し、プレコートした 100 mm ディッシュ (1×10^7 細胞) および 6 ウェルプレート (2×10^6 細胞/ウェル) に播種した。細胞は、分化用培地にて 6 日間維持した。

2-2-2 MeHg 曝露の実験条件

2 日間の細胞分化の後，細胞をマルチウェルプレートに播種し，1 nM MeHg (CH₃HgCl) で 6 日間処理した．LUHMES 細胞は，神経分化の 2 日目から 16 日目まで，6 日間 MeHg (1 nM) に曝露した．MeHg (1 nM) を 6 日間曝露した分化 8 日目の LUHMES 細胞について，Real-time RT-PCR，ウェスタンブロット法，クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイを実施した．また，MeHg (1 nM) を 6 日間曝露した 16 日目分化 LUHMES 細胞について，神経スパイク活性 (4, 10, 16 日目) および細胞毒性 (16 日目) を測定した．

2-2-3 ウェスタンブロット法

第 1 章 2-2-10 と同様に行った．細胞分化 8 日目に細胞を採取し，1xRIPA buffer で溶解させた．1 次抗体は以下の通り：mouse anti-β-actin antibody (1:2000, Sigma Aldrich) and rabbit anti-NR4A1 antibody (1:1000, invitrogen)．2 次抗体は以下を使用した：goat anti-mouse IgG antibody, peroxidase conjugated, H+L (1:2500, Merck KGaA), goat anti-rabbit IgG antibody, peroxidase conjugated, H+L (1:2500, Merck KGaA)．最後に，メンブレンを ECL prime とインキュベートし，FUSION SOLO S (Vilber Lourmat) を用いて化学発光を検出した．

2-2-4 Real-time RT-PCR

PureLink RNA Mini Kit を用いて RNA を抽出した．ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて，total RNA (1 サンプルあたり 1 μg) を cDNA に逆転写させた．THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix または KOD SYBR® qPCR Mix を用いてリアルタイム RT-PCR 解析を行い，StepOne Real Time PCR System または

QuantStudio 1 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) にて増幅を行った。

リアルタイム RT-PCR 解析に用いたプライマーは以下の通りである: Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1 (*NR4A1*) (forward: 5'-AAGTGAAGGCCGCTGTGCT-3', reverse: 5'-AGGCAGATGTACTTGGCGTTTT-3'), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) (forward: 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'; reverse: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'). サンプル中の *GAPDH* cDNA 量は、すべての PCR 増幅反応の内部コントロールとして使用した。

2-2-5 バイサルファイトシーケンス

DNeasy Blood & Tissue Kit で付属のプロトコールに従って LUHMES 細胞からゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA (300 ng) を EpiTect Bisulfite Kit を用いてバイサルファイト処理した。バイサルファイト変換された DNA は、*NR4A1* の転写開始部位から 620~263bp 上流における 2 領域を PCR で増幅した。そのプライマーを以下に示す: *NR4A1* -620~-434bp (forward: 5'-GGATTCGAGTTCGGTGC GGG-3', reverse: 5'-CGAAAAACCCGAAAAACGA-3'), *NR4A1* -414~-263bp (forward: 5'-GTTTTTCGTCGGAATCGTAT-3', reverse: 5'-CTCCGCCACTAAACTCCCC-3'). PCR 産物を T-Vector pMD20 (Takara Bio Inc., Japan) にクローニングし、各サンプルから複数のクローンを選択してコロニー PCR を行った。ベクターへの挿入を確認するため、サンプルを 2%アガロースゲルで電気泳動した。PCR 産物はイソプロパノール沈殿で精製した。精製したサンプルを用いて、M13 プライマーを使用したサンガー法によるシーケンスに提出した。

2-2-6 クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイ

第 2 章と同様に行った。抗体は以下の通り ; rabbit anti-acetylated histone H3 lysine14 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA USA), rabbit anti-acetylated histone H3 lysine9 (Cell Signaling Technology), rabbit anti-tri-methyl histone H3 lysine9 (Cell Signaling Technology), and rabbit anti-tri-methyl histone H3 lysine27 (Cell Signaling Technology), rabbit anti-CREB (48H2) (Cell Signaling Technology), rabbit anti-CBP (Cell Signaling Technology). *NR4A1* プロモーターの増幅に用いたプライマーは以下の通り: -0.4 kb (forward: 5'-CCCTTGATGGCCAAAGCTC-3'; reverse: 5'-TTTCGTAGCCTCCGCCACT-3'), -0.5 kb (forward: 5'-GATCAAACAATCCGCGCTCCC-3'; reverse: 5'-GTCGAGCTTTGGCCATACAA-3'), -0.6 kb (forward: 5'-CCAGCTGGGACCCGAGTCCG-3'; reverse: 5'-GGGTTCCATTGACGCAGGGA-3'). ChIP-DNA の量は、全 DNA に対する%として計算した。

2-2-7 LDH Assay

細胞毒性は、Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を用いて、製造元のプロトコールに従って測定した。LUHMES 細胞を製造元の指示に従って微小電極アレイに 16 日間分化させた後、各サンプルの培養液 100 μ L を新しい 96 ウェルプレートに移した。Vrioskan LUX (Thermo Fisher Scientific) を用いて、すべてのサンプルの 490 nm における吸光度を測定した。

2-2-8 微小電極アレイ (MEA)

Axion BioSystems 社のプロトコールを使用して、LUHMES 細胞を用いて微小電極アレイ用の分化培養を行った。LUHMES 細胞を Matrigel コートした CytoView MEA 24-well plate (Axion Biosystems) に上記のように (2-2-1) 分化培地

で播種し、3日毎に培地交換を行った。MEA記録は、Maestro MEAシステムおよびAxISソフトウェア(Axion Biosystems)を用いて行った。スパイクの検出は、各電極の推定ノイズの標準偏差の6倍に設定した適応的閾値を用いて実施した。

2-2-9 蛍光免疫染色と神経突起伸長

これらの実験を行うために使用される方法は、前章に記載されている。簡単に述べると、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、2%正常ヤギ血清でブロックし、1次抗体[rabbit anti-TUJ1 antibody (Sigma Aldrich)]と一晩インキュベートした。1次抗体反応後、2次抗体[goat anti-rabbit Alexia 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)]を添加した。核はDAPI(Thermo Fisher Scientific)で染色した。EVOS Auto 2 Imaging System (Invitrogen) または IN Cell Analyzer 2200 imaging system (GE Healthcare Japan Corporation, Japan) を用いてサンプルを画像化した。撮影した画像から IN Cell investigator (GE Healthcare) を用いて、細胞体あたりの神経突起の長さを解析した。

2-2-10 統計解析

すべての結果は、平均値 \pm SEで表した。すべての統計解析はStatView (Abacus, Baltimore, MD USA)を用いて行った。危険率が5%未満を有意差ありとした。

第3節 実験成績

3-1 神経分化期における低濃度 MeHg 曝露によって、神経細胞のスパイク活性が低下した

神経分化期 MeHg 曝露が神経機能に及ぼす影響を検討した。実験系として、LUHMES 細胞を使用し、神経分化を行った。LUHMES 細胞は、神経分化の2日目から6日間、MeHg (1 nM) に曝露した (Figure 16A)。神経分化8日目以降は MeHg を除去した培地で培養を行い、16日間分化培養を行った。

まず神経細胞ネットワークの活動を高感度で測定するために、アレイ上に複数の電子センサーが密集して配置された、MEA を用いて神経回路網の活性を評価した。LUHMES 細胞を MEA プレート上で培養し、スパイクの平均数を分化4日目と10日目、16日目に解析した (Figure 16B)。Figure 16C は、神経スパイク活性をプロットで可視化したものである。その結果、MeHg に分化16日目においては、control 群と比較して MeHg 曝露群において検出されたスパイク数が減少していた。またこのスパイク活性の減少が細胞死によるものでないことを LDH assay によって確認した (Figure 16D)。これらの結果は、低濃度の MeHg に曝露することで、神経細胞のスパイク活性が低下することを示している。

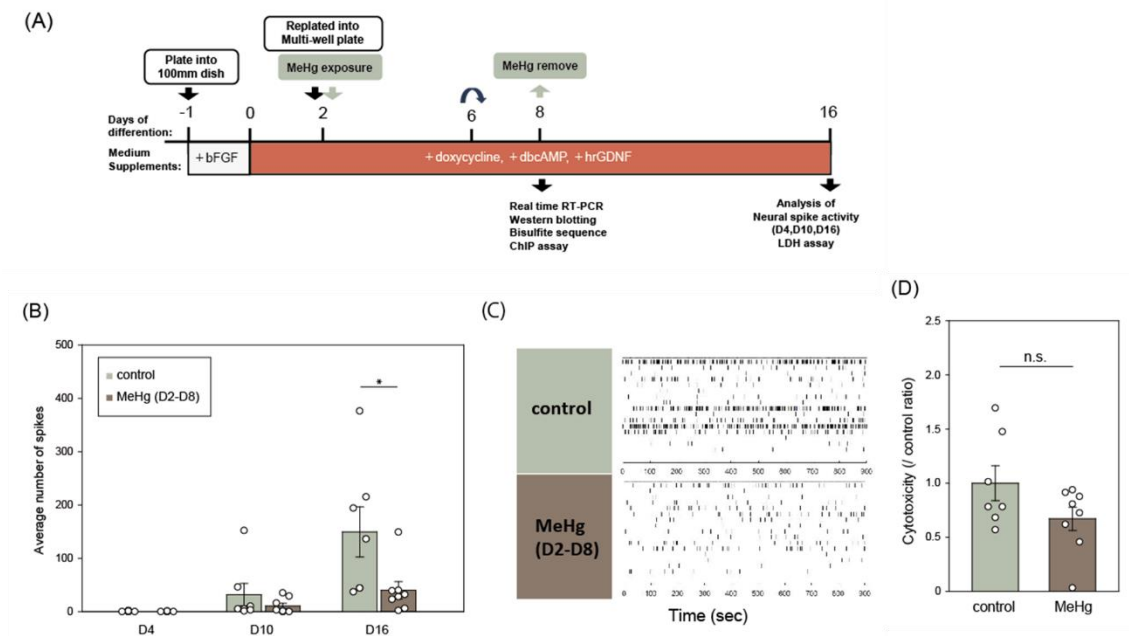


Figure 16. Effects of MeHg exposure on neural spike activity and neurite extension.

(A) Schematic diagram of MeHg exposure experiment of LUHMES cells. LUHMES cells were exposed to MeHg (1 nM) for six days from day two to day eight of neuronal differentiation. Real-time RT-PCR, Western blot, and ChIP assay were performed after six days of exposure to MeHg (1 nM). Neural spike activity (Day 4, 10, and 16) and cytotoxicity were measured on day 16 differentiated LUHMES cells exposed to MeHg (1 nM) for six days. (B) The average number of spikes was analyzed in Neural Metric Tool. Data were expressed as mean \pm SE ($n = 6-8/\text{group}$). Statistics were calculated by Student's t -test ($*p < 0.05$: vs. control). (C) Raster plot representative of neural spiking activity visualized by the Neural Metric Tool. Black ticks indicate individual spikes. (D) Cytotoxicity was measured on day 16 differentiated LUHMES cells exposed to MeHg (1 nM) for six days. Data were expressed as mean \pm SE ($n = 7-8/\text{group}$). Statistics were calculated by Student's t -test ($*p < 0.05$: vs. control).

3-2 神経分化期 MeHg 曝露によって、NR4A1 の発現が低下した

第 1 章で、HDAC 阻害剤が神経分化期 MeHg 曝露による神経突起伸長阻害を改善することを明らかにした⁵⁰。以前の研究では、PC12 細胞において HDAC 阻害剤 TSA により誘導される神経分化に AcH3K14 を介して発現増加する NR4A1 が必須であることが報告されている⁶⁵。第 1 章において NR4A1 の発現減少が認められたため、神経突起伸長抑制に NR4A1 の発現減少が関連する可能性がある。そこで、神経分化期 MeHg 曝露による NR4A1 発現変化についてタンパク質レベルでも解析した。その結果、MeHg 曝露により、mRNA およびタンパク質レベルの両方で NR4A1 の発現が有意に低下することが示された (Figure 17)。

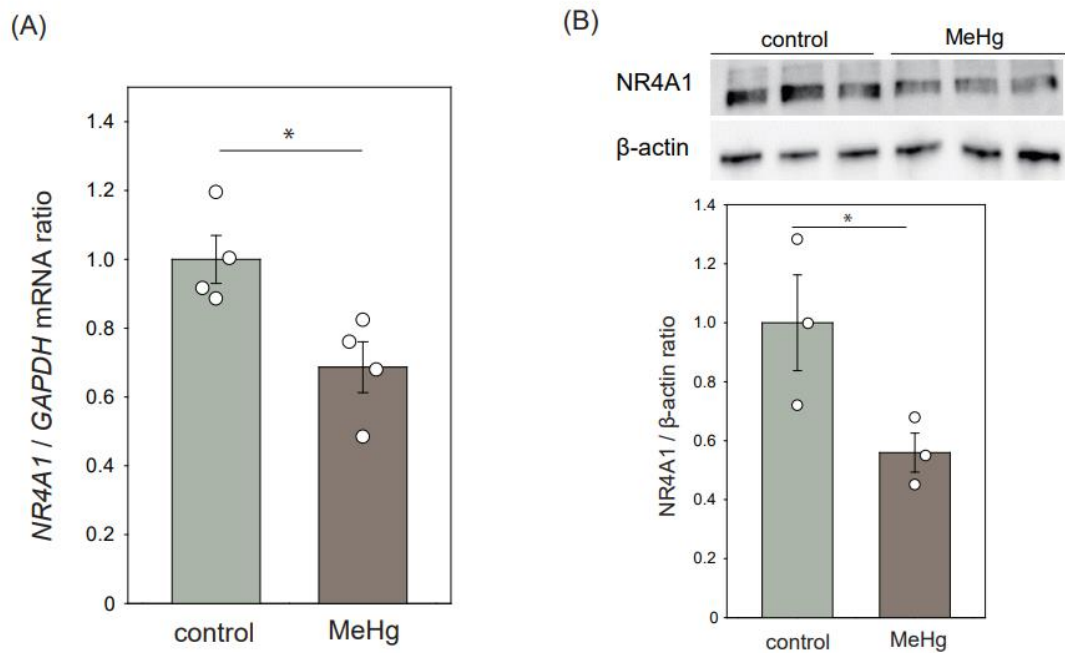


Figure 17. Analysis of expression of NR4A1 by MeHg exposure. (A) mRNA level of *NR4A1* was determined in day eight differentiated LUHMES cells exposed to MeHg (1 nM) for six days. Data were expressed as mean \pm SE (n = 4/group). Statistics were calculated by Student's *t*-test ($*p < 0.05$: vs. control). (B) The protein levels of NR4A1 and β -actin were determined in day eight differentiated LUHMES cells exposed to MeHg (1 nM) for six days. Data were expressed as mean \pm SE (n = 3/group). Statistics were calculated by Student's *t*-test ($*p < 0.05$: vs. control).

3.3 神経分化期 MeHg 曝露によって、*NR4A1* プロモーター上のメチル化 DNA が増加した

MeHg 曝露により *NR4A1* の発現が低下したため、*NR4A1* プロモーター領域における DNA メチル化を測定した。*NR4A1* 遺伝子の発現は、転写因子である cAMP response element-binding protein (CREB) と myocyte enhancer factor-2 (MEF2) を動員する 2 つの別々の DNA 制御領域と関連している⁶⁹。MEF2 regulatory element (MRE) 部位周辺の CpG においては、MeHg 曝露によりメチル化されたシトシンは検出されなかった。そこで、メチル化シトシンが検出された cAMP response element (CRE) 部位での解析結果を示した。Figure 18 は、ヒト *NR4A1* 遺伝子の転写開始点から -514, -494, -344, -322bp の位置にある 4 つの CRE を示したもので、CRE の位置は、*NR4A1* 遺伝子の転写開始点と関連する。*NR4A1* プロモーター領域の DNA メチル化の程度を調べるために、MeHg (1 nM) に 6 日間曝露した分化 8 日目の LUHMES 細胞のゲノム DNA をバイサルファイト修飾し、*NR4A1* プロモーター領域における CpG 領域のシーケンスを行った。その結果 Figure 18 に示すように、MeHg 曝露群では、CpG が control 群と比較して部分的にメチル化されていることが示された。

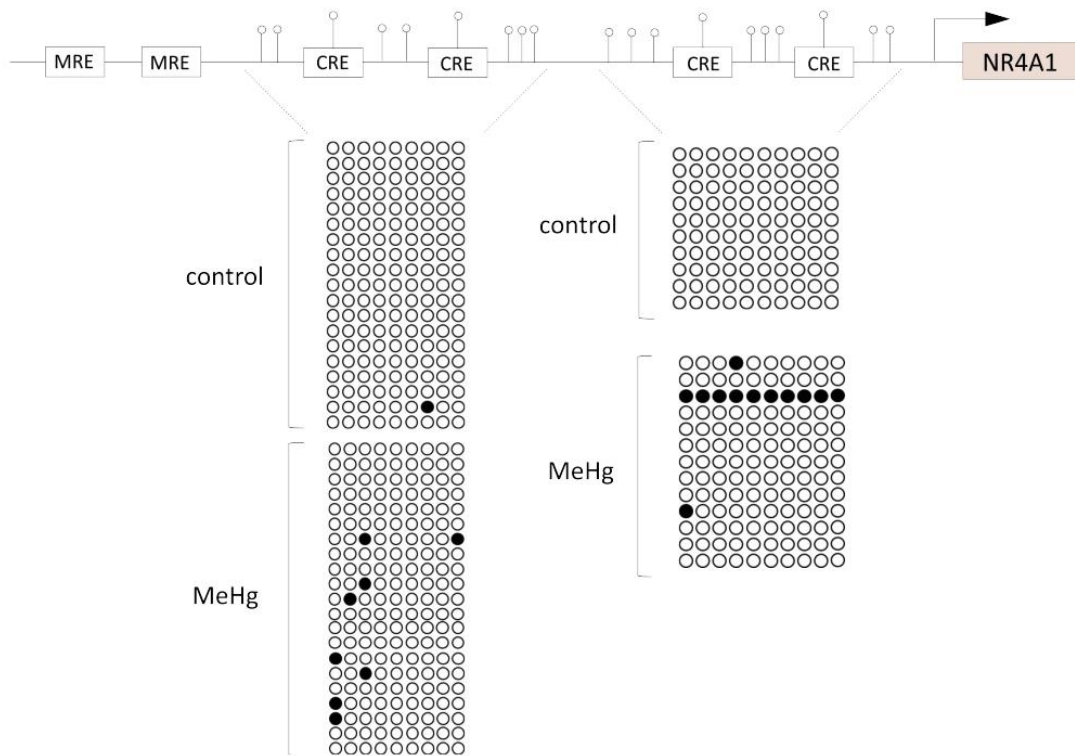


Figure 18. DNA methylation analysis of the *NR4A1* promoter region by MeHg exposure. By extracting genomic DNA from differentiated LUHMES cells, bisulfite sequencing analysis of 9 or 10 CpG sites (around CRE) located upstream of the transcription start site of *NR4A1* was performed; unmethylated (open circles) versus methylated (closed circles). Each row represents the analysis of a single clone.

3.4 神経分化期 MeHg 曝露によって、*NR4A1* のプロモーター領域におけるヒストン修飾が変化した

NR4A1 の発現はプロモーター領域の 2 つの MRE と 4 つの CRE 部位で制御されている⁶⁹。そこで、Figure 19A に示すように、*NR4A1* 遺伝子プロモーターにおけるヒストン修飾変化を、3 つの領域に分けて ChIP アッセイを行った。転写促進に関連する AcH3K9 および AcH3K14、転写抑制に関連する H3K9me3 および H3K27me3 のレベルを検討した。MeHg 曝露により、*NR4A1* プロモーターの H3K9me3 レベルに変化はなかったが、AcH3K14 と AcH3K9 は有意に減少し、H3K27me3 のレベルは有意に増加した (Figure 19B)。

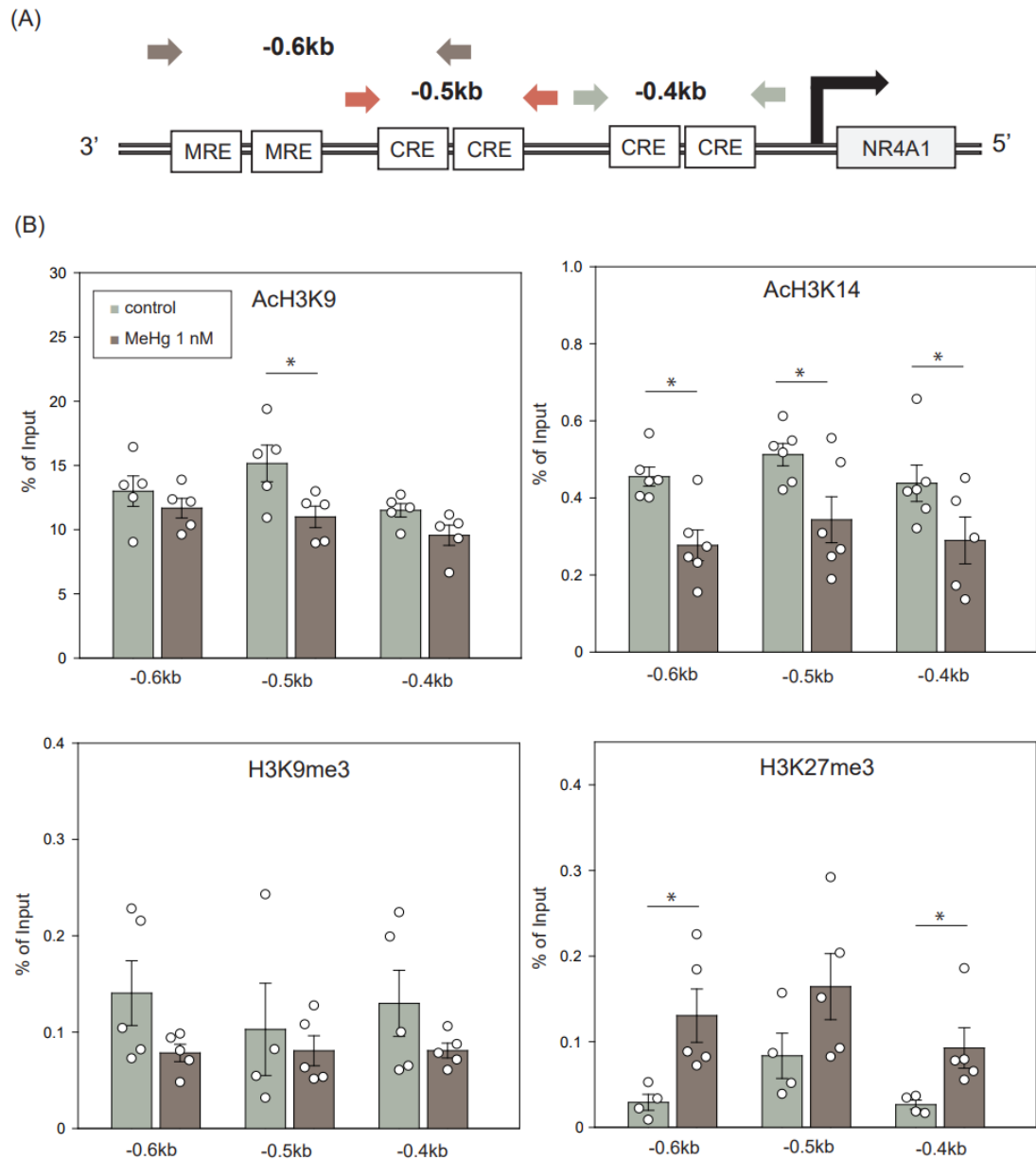


Figure 19. Changes in histone modifications in the *NR4A1* promoter region by MeHg exposure. (A) Regulatory elements in the human *NR4A1* promoter (MRE: MEF2 regulatory element, CRE: cAMP response element) for primer sets. (B) ChIP assays for AcH3K9, AcH3K14, H3K9me3, and H3K27me3 levels in the human *NR4A1* promoter were performed using differentiated LUHMES cells. Data were expressed as mean \pm SE (n = 4-6/group). Statistics were calculated by Student's *t*-test (* $p < 0.05$: vs. control).

3.5 MeHg 曝露によって、*NR4A1* プロモーター領域における CREB と CBP の動員が減少した

MeHg 曝露により *NR4A1* プロモーター領域の AcH3K14 が有意に減少したため、H3K14 のアセチル化を誘導するヒストンアセチラーゼである CREB binding protein (CBP) および CBP と結合してヒストンアセチラーゼ活性を誘導する CREB が CRE 配列に動員されるか検討した。その結果 MeHg 曝露によって *NR4A1* プロモーター領域における CREB と CBP の結合量が減少した (Figure 20B)。また H3K27me3 も有意に増加していたことから、*NR4A1* プロモーター領域への enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) の結合について解析したところ、MeHg 曝露により -0.4kb においてのみ EZH2 の結合量が減少した (Figure 20B)。EZH2 はヒストンメチルトランスフェラーゼであり、H3K27me3 を触媒して遺伝子発現を制御することが知られている⁷⁰。これらの結果より、MeHg 曝露によって、*NR4A1* プロモーター領域の CRE 部位における CREB および CBP の動員が阻害されることが示された。

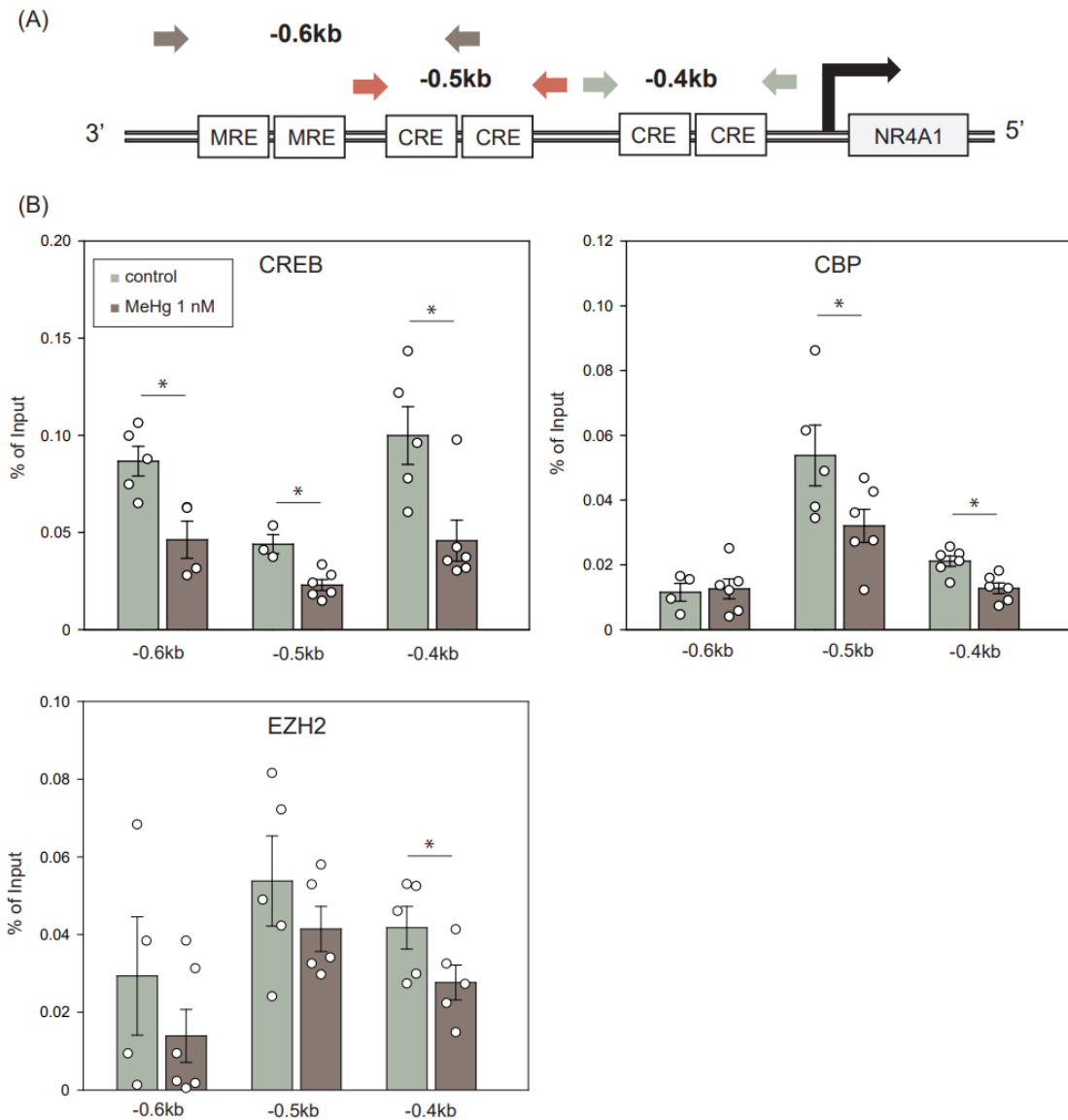


Figure 20. Analysis of transcription factor binding in the promoter region of NR4A1 by MeHg exposure. (A) Regulatory elements in the human *NR4A1* promoter (MRE: MEF2 regulatory element, CRE: cAMP response element) for primer sets. (B) ChIP assays for CREB, CBP, and EZH2 levels in the human NR4A1 promoter were performed using differentiated LUHMES cells. Data were expressed as mean \pm SE (n = 4-6/group). Statistics were calculated by Student's *t*-test (* $p < 0.05$: vs. control).

第4節 考察

本研究により，神経細胞分化期の低濃度 MeHg 曝露が，エピゲノム変化を介して NR4A1 の発現を制御し，神経細胞の機能を阻害することが明らかになった．第1章では，神経細胞分化中の低濃度 MeHg 曝露が神経突起伸長を阻害することを示した⁵⁰．これまでの報告でも MeHg 曝露は，ヒト胚性幹細胞およびヒト神経前駆細胞の神経分化の際に神経突起伸長を阻害することが明らかになっている⁴⁰．本章では，神経機能への影響をさらに検討するため，電気生理学的解析を行いスパイク活動への影響を調べたところ，MeHg 曝露によって神経細胞のスパイクの頻度が低下した (Figure 16B, C)．また第1章で明らかにしたように，HDAC 阻害剤は神経細胞分化の際に MeHg 曝露によって引き起こされる神経突起伸長阻害を改善する．また，HDAC 阻害剤 (TSA) を介した NR4A1 の発現増加が PC12 細胞の神経分化に必須であることを示した報告がある⁶⁵．さらに NR4A1 は，スパインやシナプスの密度や分布を制御する活動誘導型転写プログラムの重要な構成要素であることも知られている⁶⁸．これらの報告から，NR4A1 が神経の突起伸長やスパイク活性などの神経機能の抑制に関与していることが示唆される．予想通り，MeHg 曝露により NR4A1 の発現が低下することが明らかになった (Figure 17)．しかし神経機能における NR4A1 の下流シグナルの詳細なメカニズムは，未だ解明されておらず，いくつかの神経機能に関わる遺伝子の発現を調節する役割を担っていると考えられている．例えば，ラットの海馬の培養細胞で Nr4a1 を過剰発現させると，スパインの重要な細胞骨格成分である F-アクチンの制御に関わる Polo-like kinase 2 や RhoA/Rac1 シグナル経路の遺伝子など多くの遺伝子に発現変化が生じることが報告されている⁶⁸．さらに，PKA-CREB-Nur77-Synapsin1 シグナル伝達経路がフォルスコリン処置による PC12 細胞の神経突起伸長に必須であることも明らかになっている⁷¹．した

がって、本研究では検討できなかったが、今後は *NR4A1* のさらに下流の遺伝子についても解析する必要があると考えられる。

また、MeHg 曝露により *NR4A1* のプロモーター領域で AcH3K14 が減少し、H3K27me3 が増加した (Figure 19)。加えて転写因子の誘導に対する影響も調べた結果、*NR4A1* のプロモーター領域における CREB と CBP の結合量が減少していることが明らかになった (Figure 20)。CBP は HAT であり、クロマチンリモデリングや遺伝子発現の制御に重要な役割を担っており、転写促進に関連するヒストン H3K14 のアセチル化を優先的に触媒する²⁰。これまでの報告では、マウスの行動試験や脳組織を用いた解析により HDAC 阻害剤による記憶とシナプス可塑性の増強には、CREB と CBP の相互作用を介した *NR4A1* の発現が必須であることが示されている^{67,72,73}。したがって、MeHg 曝露による神経スパイク活性の減少にも CREB と CBP の相互作用を介した *NR4A1* の発現減少が関連している可能性が示唆される。また H3K27me3 を触媒する EZH2 についても *NR4A1* のプロモーター領域における結合量を解析した結果、予想に反して減少が認められた。しかし今回検討した領域よりも上流において EZH2 の結合量が増加している可能性も考えられるため、H3K27me3 の増加の分子メカニズムについてはさらなる検討の必要がある。

また MeHg は親電子性であるため、タンパク質のチオール基などの求核剤と容易に反応することができる。以前の報告では、低濃度の MeHg が Akt や CREB などの転写因子と共有結合することで、抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 の遺伝子発現を抑制することが示唆された⁴⁶。CBP は CREB と転写複合体を形成して、HAT 活性により、転写因子が結合しやすいオープンなクロマチン構造を形成する⁷⁴。したがって、MeHg が CREB と共有結合したことにより、プロモーター領域での CREB の結合が阻害され、その結果 CBP の動員も同時に減少した

可能性がある。これらの結果から、MeHgは *NR4A1* プロモーター領域への CREB-CBP 複合体の結合を阻害し、AcH3K14 レベルの減少を介して *NR4A1* の発現を抑制していることが示唆される。

もう一つの代表的なエピゲノム修飾はDNAメチル化であり、これは安定で遺伝性があり、エピゲノム制御の必須要素である¹⁹。MeHg曝露がDNAのメチル化を変化させることは、いくつかの報告で明らかにされている。例えば、*Bdnf* 遺伝子のプロモーター領域では、MeHgへの出生前の曝露により、14ヶ月齢の子マウスでDNAの高メチル化が観察された²⁶。さらに、神経幹細胞をナノモル量のMeHgに曝露すると、グローバルなDNAメチル化レベルが低下することも報告されている⁷⁵。第1章で示した結果においても、MeHg曝露が *in vivo* と *in vitro* の両方の実験系でグローバルなDNAメチル化レベルを増加させることが明らかになった⁵⁰。また以前に、*NR4A1* プロモーターにおけるDNAの高メチル化が *NR4A1* mRNA の発現を低下させることも報告されている⁷⁶。今回の研究では、MeHg曝露により *NR4A1* プロモーター領域におけるメチル化DNAが増加することが示された (Figure 18)。第1章において、神経分化期 MeHg 曝露によって DNMT の発現増加に伴いメチル化 DNA が増加することが明らかになっており⁵⁰、*NR4A1* プロモーター領域におけるメチル化DNAの増加にも、DNMTの発現増加が関与している可能性がある。しかし MeHg 曝露による DNMT の発現増加がどのようなメカニズムで引き起こされるかは明らかになっていないため、今後このメカニズム解明を行う必要がある。

以上のことから、本研究は神経分化期の MeHg 曝露が比較的低濃度であっても神経機能障害を引き起こすこと、この機能障害は *NR4A1* プロモーター領域への CREB -CBP 複合体 の結合阻害を介した *NR4A1* の転写抑制が関連することを明らかにした。

総括

MeHg は知覚障害や運動失調などの様々な神経系障害を引き起こす神経毒である。近年，生物濃縮によって MeHg が蓄積した魚介類を妊婦が摂取することによる胎児への曝露が懸念されている。胎児は発達段階であり，発達中の神経系は化学物質に対して特に脆弱である。また，胎生期は大規模なエピゲノム変化が起こる時期であり，感受性が高いため化学物質によるエピジェネティクス攪乱が起こりやすい。しかし，これまでに神経分化期の MeHg 曝露影響とエピジェネティクスとの関連を示す報告はほとんどない。そこで本研究は妊娠マウスを用いた *in vivo* 実験系と LUHMES 細胞を用いた *in vitro* 実験系によって体系的に神経分化期 MeHg 曝露による神経機能への影響とエピゲノム変化との関連性を検討した。

第 1 章では，*In vivo* 実験系および *in vitro* 実験系を用いて神経分化期 MeHg 曝露による神経突起伸長への影響およびエピゲノム解析を行った。以下に得られた結果をまとめる。

- 1) *in vivo* 実験系および *in vitro* 実験系において神経分化期 MeHg 曝露によって神経突起伸長が抑制された。
- 2) *in vivo* 実験系および *in vitro* 実験系において神経分化期 MeHg 曝露によってメチル化 DNA の増加および DNMT1 の増加が認められた。
- 3) *in vivo* 実験系および *in vitro* 実験系において神経分化期 MeHg 曝露によって AcH3 の減少および HDAC3 および HDAC6 の発現増加が認められた。
- 4) LUHMES 細胞を用いた *in vitro* 実験系において，HDAC 阻害剤を用いてヒストン修飾変化と神経突起伸長の関連を確認したところ，MeHg 曝露による神経突起伸長の抑制に改善が認められた。

以上より胎生期の低濃度 MeHg 曝露が HDAC の発現増加を介したヒストン H3 のアセチル化の減少および DNMT1 の発現増加を介したメチル化 DNA の増加により、神経突起伸長の抑制を引き起こすことを明らかにした。またこれらのエピゲノム変化により発現変動を受ける可能性のある遺伝子として *TH* および *NR4A1* を明らかにした。そこで第 2 章では *TH*、第 3 章では *NR4A1* のエピゲノム解析を行った。

第 2 章では、*in vitro* 実験系を用いて神経分化期 MeHg 曝露による *TH* のエピゲノム変化について解析を行った。以下に得られた結果をまとめる。

- 1) 神経分化期 MeHg 曝露によって *TH* の発現が減少した。
- 2) 神経分化期 MeHg 曝露によって *TH* のプロモーター領域における H3K27me3 が増加した。

以上より、発達期における低濃度の MeHg 曝露によって転写抑制に関連するヒストン修飾である H3K27me3 の増加を伴って、*TH* の減少が生じている可能性が示唆された。

第 3 章では、*in vitro* 実験系において神経分化期 MeHg 曝露による *NR4A1* のエピゲノム変化および神経スパイク活性の解析を行った。以下に得られた結果をまとめる。

- 1) 神経分化期 MeHg 曝露によって、神経細胞のスパイク活性および神経突起伸長が抑制された。
- 2) 神経分化期 MeHg 曝露によって *NR4A1* の発現が減少した。
- 3) 神経分化期 MeHg 曝露によって *NR4A1* のプロモーター領域におけるメチル化 DNA が増加した。

4) 神経分化期 MeHg 曝露によって *NR4A1* のプロモーター領域における AcH3K14 が減少し、CBP および CREB の結合が阻害された。

以上より、神経分化期 MeHg 曝露によって神経シナプス活性が減少し、この機能障害に *NR4A1* プロモーター領域への CREB -CBP 複合体の結合阻害を介した *NR4A1* の転写抑制が関連する可能性があることを明らかにした。

以上の知見より本研究成果は、神経分化期における低濃度 MeHg 曝露が複数のエピゲノム変化を介して神経機能に影響を与えるというエピジェネティックメカニズムの一端を解明した。

謝辞

本稿を終えるにあたり，本研究の機会を賜り，また終始御懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学医療薬剤学大講座薬物治療学研究室特任教授 保住功先生に深甚なる謝意を表します。

本研究に際して終始御懇切なる御指導，ご助言を賜りました薬物治療学研究室教授 位田雅俊先生，講師 栗田尚佳先生並びに薬物治療学研究室諸氏に深謝いたします。

本研究の遂行に当たり，Hgの細胞内蓄積量の測定に関してご指導ご協力を賜りました，国立水俣病総合研究センター基礎研究部 部長 藤村成剛先生に深謝いたします。

本論文の審査にあたり有益なご助言を賜りました岐阜薬科大学生命薬学大講座生化学研究室教授 五十里彰先生，機能分子学大講座薬理学研究室教授 檜井栄一，生命薬学大講座衛生学研究室講師 松丸大輔先生に深謝いたします。

本研究は，JSPS 科研費 19J15480 の助成を受けたものです。

引用文献

1. Silveira, P. P., Portella, A. K., Goldani, M. Z. & Barbieri, M. A. Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD). *J. Pediatr. (Rio. J.)* **83**, 494–504 (2007).
2. Hajj, N. El, Schneider, E., Lehnen, H. & Haaf, T. Epigenetics and life-long consequences of an adverse nutritional and diabetic intrauterine environment. *Reproduction* **148**, R111–R120 (2014).
3. Hong, Y. S., Kim, Y. M. & Lee, K. E. Methylmercury exposure and health effects. *J. Prev. Med. Public Heal.* **45**, 353–363 (2012).
4. Myers, G. J., Davidson, P. W. & Strain, J. J. Nutrient and methyl mercury exposure from consuming fish. *J. Nutr.* **137**, 2805–2808 (2007).
5. Yin, Z. *et al.* The methylmercury-L-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transporter. *J. Neurochem.* **107**, 1083–1090 (2008).
6. Esteban-Vasallo, M. D., Aragonés, N., Pollan, M., López-Abente, G. & Perez-Gomez, B. Mercury, cadmium, and lead levels in human placenta: A systematic review. *Environ. Health Perspect.* **120**, 1369–1377 (2012).
7. Gundacker, C. *et al.* Gene Variants Determine Placental Transfer of Perfluoroalkyl Substances (PFAS), Mercury (Hg) and Lead (Pb), and Birth Outcome: Findings From the UmMuKi Bratislava-Vienna Study. *Front. Genet.* **12**, 1–17 (2021).
8. Grandjean, P. & Landrigan, P. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* **368**, 2167–2178 (2006).
9. Debes, F., Budtz-Jørgensen, E., Weihe, P., White, R. F. & Grandjean, P. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years.

- Neurotoxicol. Teratol.* **28**, 363–375 (2006).
10. Grandjean, P. *et al.* *Cognitive Deficit in 7-Year-Old Children with Prenatal Exposure to Methylmercury.* *Neurotoxicology and Teratology* vol. 19 (1997).
 11. Davidson, P. W. *et al.* Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment: Outcomes at 66 months of age in the Seychelles child development study. *J. Am. Med. Assoc.* **280**, 701–707 (1998).
 12. Tatsuta, N. *et al.* Psychomotor ability in children prenatally exposed to methylmercury: The 18-month follow-up of Tohoku Study of Child Development. *Tohoku J. Exp. Med.* **242**, 1–8 (2017).
 13. Tatsuta, N., Nakai, K., Sakamoto, M., Murata, K. & Satoh, H. Methylmercury exposure and developmental outcomes in Tohoku study of child development at 18 months of age. *Toxics* **6**, (2018).
 14. 乳肉水産食品部会薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会. 妊婦への魚介類の摂食と水銀に関する注意事項.
 15. Onishchenko, N. *et al.* Developmental exposure to methylmercury alters learning and induces depression-like behavior in male mice. *Toxicol. Sci.* **97**, 428–437 (2007).
 16. Tamm, C., Duckworth, J., Hermanson, O. & Ceccatelli, S. High susceptibility of neural stem cells to methylmercury toxicity: Effects on cell survival and neuronal differentiation. *J. Neurochem.* **97**, 69–78 (2006).
 17. Albores-Garcia, D., Acosta-Saavedra, L. C., Hernandez, A. J., Loera, M. J. & Calderón-Aranda, E. S. Early Developmental Low-Dose Methylmercury

- Exposure Alters Learning and Memory in Periadolescent but Not Young Adult Rats. *Biomed Res. Int.* **2016**, (2016).
18. Baccarelli, A. & Bollati, V. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr. Opin. Pediatr.* **21**, 243–251 (2009).
 19. Goldberg, A. D., Allis, C. D. & Bernstein, E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* **128**, 635–638 (2007).
 20. Peterson, C. L. & Laniel, M. A. Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* **14**, R546–R551 (2004).
 21. Li, Y., Tollefsbol, T. O., Li, S. & Chen, M. Prenatal epigenetics diets play protective roles against environmental pollution. *Clin. Epigenetics* **11**, 1–31 (2019).
 22. Knopik, V. S., Marceau, K., Bidwell, L. C. & Rolan, E. Prenatal substance exposure and offspring development: Does DNA methylation play a role? *Neurotoxicol. Teratol.* **71**, 50–63 (2019).
 23. Zeng, Y. & Chen, T. DNA methylation reprogramming during mammalian development. *Genes (Basel)*. **10**, (2019).
 24. Barouki, R. *et al.* Epigenetics as a mechanism linking developmental exposures to long-term toxicity. *Environ. Int.* **114**, 77–86 (2018).
 25. Doré, F. Y. *et al.* Neurobehavioral changes in mice treated with methylmercury at two different stages of fetal development. *Neurotoxicol. Teratol.* **23**, 463–472 (2001).
 26. Ceccatelli, S., Bose, R., Edoff, K., Onishchenko, N. & Spulber, S. Long-lasting neurotoxic effects of exposure to methylmercury during development. *J. Intern. Med.* **273**, 490–497 (2013).

27. Kim, C. Y., Nakai, K., Kasanuma, Y. & Satoh, H. Comparison of neurobehavioral changes in three inbred strains of mice prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicol. Teratol.* **22**, 397–403 (2000).
28. Scholz, D. *et al.* Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line. *J. Neurochem.* **119**, 957–971 (2011).
29. Koyama, Y. & Tohyama, M. A modified and highly sensitive Golgi–Cox method to enable complete and stable impregnation of embryonic neurons. *J. Neurosci. Methods* **209**, 58–61 (2012).
30. Fujimura, M., Usuki, F., Kawamura, M. & Izumo, S. Inhibition of the Rho/ROCK pathway prevents neuronal degeneration in vitro and in vivo following methylmercury exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **250**, 1–9 (2011).
31. del Blanco, B. & Barco, A. Impact of environmental conditions and chemicals on the neuronal epigenome. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **45**, 157–165 (2018).
32. Moore, L. D., Le, T. & Fan, G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* **38**, 23–38 (2013).
33. De Ruijter, A. J. M., Van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. & Van Kuilenburg, A. B. P. Histone deacetylases (HDACs): Characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* **370**, 737–749 (2003).
34. Suzuki, T. & Miyama, T. Department of Public Health , Tohoku University School of Medicine , Sendai , and Department of Public Health ,* Japan Women ’ s College of Physical Education , Tokyo. 379–384 (1975).
35. He, X. *et al.* Effects of methylmercury exposure on neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Toxicol. Lett.* **212**, 1–10 (2012).

36. Suzuki, T., Matsumoto, N., Miyama, T. & Katsunuma, H. Placental transfer of mercuric chloride, phenyl mercury acetate and methyl mercury acetate in mice. *Ind. Health* **5**, 149–155 (1967).
37. Ad, G. D. Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Bone* **23**, 1–7 (2008).
38. Rivkees, S. A. & Wendler, C. C. Long-term consequences of disrupting adenosine signaling during embryonic development. *Mol. Aspects Med.* **55**, 110–117 (2017).
39. Moors, M. *et al.* Human neurospheres as three-dimensional cellular systems for developmental neurotoxicity testing. *Environ. Health Perspect.* **117**, 1131–1138 (2009).
40. He, X. J., Chen, T. & Zhu, J. K. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res.* **21**, 442–465 (2011).
41. Tapias, A. & Wang, Z. Q. Lysine Acetylation and Deacetylation in Brain Development and Neuropathies. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* **15**, 19–36 (2017).
42. Gregoretti, I. V., Lee, Y. M. & Goodson, H. V. Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis. *J. Mol. Biol.* **338**, 17–31 (2004).
43. Cho, Y. & Cavalli, V. HDAC signaling in neuronal development and axon regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **27**, 118–126 (2014).
44. Iaconelli, J., Xuan, L. & Karmacharya, R. HDAC6 modulates signaling pathways relevant to synaptic biology and neuronal differentiation in human stem cell-derived neurons. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).

45. Večeřa, J. *et al.* HDAC1 and HDAC3 underlie dynamic H3K9 acetylation during embryonic neurogenesis and in schizophrenia-like animals. *J. Cell. Physiol.* **233**, 530–548 (2018).
46. Unoki, T. *et al.* Methylmercury, an environmental electrophile capable of activation and disruption of the Akt/CREB/Bcl-2 signal transduction pathway in SH-SY5Y cells. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
47. Sterner, D. E. & Berger, S. L. Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 435–459 (2000).
48. Saha, R. N. & Pahan, K. HATs and HDACs in neurodegeneration: A tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ.* **13**, 539–550 (2006).
49. Chakrabarti, K. *et al.* Critical Role for Kalirin in Nerve Growth Factor Signaling through TrkA. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 5106–5118 (2005).
50. Go, S. *et al.* DNA methyltransferase- and histone deacetylase-mediated epigenetic alterations induced by low-level methylmercury exposure disrupt neuronal development. *Arch. Toxicol.* **95**, (2021).
51. Daubner, S. C., Le, T. & Wang, S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **508**, 1–12 (2011).
52. Giménez-Llort, L. *et al.* Prenatal exposure to methylmercury changes dopamine-modulated motor activity during early ontogeny: age and gender-dependent effects. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **9**, 61–70 (2001).
53. Lindström, H., Luthman, J., Oskarsson, A., Sundberg, J. & Olson, L. Effects of long-term treatment with methyl mercury on the developing rat brain. *Environ. Res.* **56**, 158–169 (1991).
54. Shao, Y. & Chan, H. M. Effects of methylmercury on dopamine release in

- MN9D neuronal cells. *Toxicol. Mech. Methods* **25**, 637–644 (2015).
55. Zimmer, B. *et al.* Sensitivity of dopaminergic neuron differentiation from stem cells to chronic low-dose methylmercury exposure. *Toxicol. Sci.* **121**, 357–367 (2011).
 56. van Heesbeen, H. J., Mesman, S., Veenfliet, J. V. & Smidt, M. P. Epigenetic mechanisms in the development and maintenance of dopaminergic neurons. *Dev.* **140**, 1159–1169 (2013).
 57. Kim, T. E. *et al.* Cloning and cell type-specific regulation of the human tyrosine hydroxylase gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 1123–1131 (2003).
 58. Boucher, O. *et al.* Prenatal methylmercury, postnatal lead exposure, and evidence of attention deficit/hyperactivity disorder among Inuit children in Arctic Québec. *Environ. Health Perspect.* **120**, 1456–1461 (2012).
 59. Del Campo, N., Chamberlain, S. R., Sahakian, B. J. & Robbins, T. W. The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* **69**, e145–e157 (2011).
 60. Onishchenko, N., Karpova, N., Sabri, F., Castrén, E. & Ceccatelli, S. Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury. *J. Neurochem.* **106**, 1378–1387 (2008).
 61. Go, S. *et al.* Methylmercury causes epigenetic suppression of the tyrosine hydroxylase gene in an in vitro neuronal differentiation model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **502**, (2018).
 62. Herring, J. A., Elison, W. S. & Tessem, J. S. Function of Nr4a Orphan Nuclear

- Receptors in Proliferation, Apoptosis and Fuel Utilization Across Tissues. *Cells* vol. 8 (2019).
63. Hawk, J. D. & Abel, T. The role of NR4A transcription factors in memory formation. *Brain Research Bulletin* vol. 85 21–29 (2011).
 64. Zhang, L. *et al.* The orphan nuclear receptor 4A1: A potential new therapeutic target for metabolic diseases. *Journal of Diabetes Research* vol. 2018 (2018).
 65. Tomioka, T. *et al.* 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).
 66. Bridi, M. S., Hawk, J. D., Chatterjee, S., Safe, S. & Abel, T. Pharmacological Activators of the NR4A Nuclear Receptors Enhance LTP in a CREB/CBP-Dependent Manner. *Neuropsychopharmacology* **42**, 1243–1253 (2017).
 67. Hawk, J. D. *et al.* NR4A nuclear receptors support memory enhancement by histone deacetylase inhibitors. *J. Clin. Invest.* **122**, 3593–3602 (2012).
 68. Chen, Y. *et al.* Activity-induced Nr4a1 regulates spine density and distribution pattern of excitatory synapses in pyramidal neurons. *Neuron* **83**, 431–443 (2014).
 69. Lam, B. Y. H. *et al.* CREB-dependent Nur77 induction following depolarization in PC12 cells and neurons is modulated by MEF2 transcription factors. *J. Neurochem.* **112**, 1065–1073 (2010).
 70. Gan, L. *et al.* Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: From biological insights to therapeutic potential. *Biomarker Research* vol. 6 (2018).
 71. Maruoka, H. *et al.* Molecular mechanism of *nur77* gene expression and downstream target genes in the early stage of forskolin-induced differentiation in PC12 cells. *Sci. Rep.* **10**, (2020).

72. Vecsey, C. G. *et al.* Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB: CBP-dependent transcriptional activation. *J. Neurosci.* **27**, 6128–6140 (2007).
73. Volakakis, N. *et al.* NR4A orphan nuclear receptors as mediators of CREB-dependent neuroprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 12317–12322 (2010).
74. Gusterson, R. J., Jazrawi, E., Adcock, I. M. & Latchman, D. S. The transcriptional co-activators CREB-binding protein (CBP) and p300 play a critical role in cardiac hypertrophy that is dependent on their histone acetyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 6838–6847 (2003).
75. Bose, R., Onishchenko, N., Edoff, K., Marie Janson Lang, A. & Ceccatelli, S. Inherited Effects of Low-Dose Exposure to Methylmercury in Neural Stem Cells. (2012) doi:10.1093/toxsci/kfs257.
76. 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).

略語

ADHD: Attention-Deficit Hyperactivity Disorder

AADC: Aromatic L-amino acid decarboxylase

ATCAY: Cerebellar ataxia, cayman type

Bcl-2: B-cell/CLL lymphoma 2

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor

CNTN2: Contactin 2

DAT: D-alanine aminotransferase

DBH: Dopamine beta-hydroxylase

DCX: Neuronal migration protein doublecortin

DNA: Deoxyribonucleic Acid

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

LTP: Long-term potentiation

mRNA: Messenger Ribonucleic Acid

NEFM: Neurofilament medium polypeptide

NGF: Nerve growth factor

NR4A1: Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1

NURR1: Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2

OCT4: organic cation/carnitine transporter4

PBS: Phosphate Buffered Saline

PBX1: Pre-B-cell leukemia transcription factor 1

PCR: Polymerase Chain Reaction

RNA: Ribonucleic Acid

RT-PCR: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

SOX2: SRY (sex determining region Y)-box 2

STMN2: Stathmin-2

SYN1: Synapsin-1

TBS: Tris Buffered Saline

TH: Tyrosine hydroxylase

TrkA: Tropomyosin receptor kinase A