

201133005A

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

胎児への食品汚染物質曝露による性未成熟の
インプリンティングとその評価法開発

平成23年度総括・分担研究報告書

研究代表者 山田 英之

平成24（2012）年5月

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

胎児への食品汚染物質曝露による性未成熟の
インプリンティングとその評価法開発

平成23年度総括・分担研究報告書

研究代表者 山田 英之

平成24（2012）年5月

目 次

I. 総括研究報告書

胎児への食品汚染物質曝露による性未成熟のインプリンティングとその 評価法開発	1
研究代表者 山田 英之	

II. 分担研究報告書

胎児への食品汚染物質曝露による性未成熟のインプリンティングとその 評価法開発	6
研究代表者／研究分担者 山田 英之	
研究分担者 石井 祐次、武田 知起	

III. 成果の刊行に関する一覧表	18
-------------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括研究報告書

胎児への食品汚染物質曝露による性未成熟のインプリンティングと
その評価法開発

研究代表者 山田 英之 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 教授

研究要旨 既に、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)は胎児期後期から出生直後の一時期にかけて脳下垂体ゴナドトロピンの luteinizing hormone (LH) を低下させ、これを起点として障害を惹起することを明らかにしている。本年度はこの機構につき、脳下垂体での遺伝子発現および脳下垂体制御組織である視床下部での障害の両面から解析した。TCDD 曝露母ラットの胎児脳下垂体をマイクロアレイ解析に付した結果、脳下垂体のヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) が増加することを見いだした。これと符合して、LH β 遺伝子に会合するヒストンの脱アセチル化亢進が観察され、これによって LH β 遺伝子発現が抑制されることが推定された。TCDD 曝露胎児の視床下部についてメタボローム解析を行った結果、多くの組織成分が有意に変動することを明らかにした。変動成分の中には、トリカルボン酸 (TCA) サイクルの種々の成分も含まれ、TCDD は視床下部でのエネルギー生産を抑制することが明らかとなった。事実、胎児視床下部の ATP 含量は TCDD によって低下した。この機構は TCDD が TCA サイクル回転に必須な補酵素である α -リポ酸 (LA) を低下させるためであることも推定できた。既に、LA は TCDD 依存的な脳下垂体ゴナドトロピン抑制を回復させることを明らかにしている (H21 年度の研究)。これらを総合すると、TCDD は LA 抑制を起点として視床下部の活動活性を低下させ、これを介して脳下垂体ゴナドトロピンを障害するものと推定された。TCDD 以外の食品汚染物質としてビスフェノール A やトリブチルスズ等を新たに解析した。これらは TCDD とは異なる機構で胎児精巣のステロイドホルモン合成系を障害することが示唆された。また、Cd での解析から、飲水法による継続投与が障害性検出に有用であることが示唆された。

研究分担者

研究分担者 石井祐次 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 准教授
研究分担者 武田知起 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 助教

合能を有するものが多いが、これに要する濃度は食品汚染物質として体内に摂取される量より遥かに高い場合が多い。従って、ホルモン受容体との結合を介する障害はその可能性を否定はできないが、障害の主因ではないかもしれない。体内の性ホルモンやその受容体の合成は、脳下垂体から分泌される黄体形成ホルモン (luteinizing

A. 研究目的

内分泌攪乱物質はホルモン受容体への結

hormone: LH) 等のゴナドトロピンによって制御される。当研究室では、ダイオキシンの妊娠ラットへの投与によって、胎児脳の LH/FSH 産生と性ステロイドホルモン合成系タンパク質の発現が障害され、これを起点として成長後の交尾能力が低下することを明らかにしている。しかし、ダイオキシンがどのような機構で脳下垂体ゴナドトロピンを低下させるかについては不明である。

これまでの研究では、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) による胎児脳下垂体 LH の低下が、脳下垂体制御組織である視床下部の発育や活動の抑制に基づく可能性を想定して研究を実施した。すなわち、TCDD が視床下部のメタボロームを障害して内分泌を抑制する機構について gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) 法による検証を実施し、推定を支持する成績を得た。また、胎児ゴナドトロピン低下を解消する方策について検討を行い、ビタミン様物質である α -リポ酸 (α -lipoic acid: LA) に優れた障害消去作用があることを見出した。一方、TCDD は脳下垂体の LH/FSH 遺伝子発現に直接的に影響し得ることについても、培養胎児脳下垂体を用いた解析より明らかにしている。

最終年度は、LH 抑制にかかる脳下垂体での機構と視床下部を標的とする機構のそれぞれについての解析研究を行った。脳下垂体を対象とする研究では、LH/FSH 遺伝子発現が TCDD によって抑制される分子機構を解析した。視床下部に関する機構としては、前述の通り、メタボローム障害が間接的に LH/FSH 発現を抑制する機構を既に推定している (H21 年度)。ただ、その研究は GC-MS による解析であったため、極性成分の変動を正確に把握できていない恐れが考えられた。そこで、本年度は ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TOF-MS) 法により、詳細な解析を目

指した。また、TCDD 以外の内分泌攪乱物質についても、胎児ゴナドトロピンおよび生殖腺ステロイド合成系に与える影響を継続して解析した。

B. 研究方法

1. 動物実験

成熟雌ラットを交尾させて妊娠させ、膈内に精子が確認された日を妊娠 0 日目 (GD0) として実験に供した。TCDD 処理実験では、GD15 の妊娠ラットに 1 μ g/kg で投与後、GD20 胎児より試料を調製して種々の解析を行った。動物処理の内容は、結果・考察の項に記載する。全ての動物実験は、本学の動物実験倫理審査委員会の審査を受け、その承認の下に実施した。

2. mRNA およびタンパク質発現量解析

リアルタイム reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法によって mRNA 発現量を分析した。タンパク質の発現状況は Western blotting 法によって解析した。

3. 発現異常を示す遺伝子の網羅的探索

TCDD 曝露母ラットの胎児から脳下垂体を摘出し、mRNA を抽出した。これを逆転写反応によって cDNA に変換してマイクロアレイ解析に付し、遺伝子発現状況を網羅的に調べた。

4. クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay)

TCDD 曝露母ラットの GD20 胎児より脳下垂体ホモジネートを調製し、これをホルムアルデヒドで処理して DNA とクロマチンタンパク質を結合させた。このサンプルを抗アセチル化ヒストン抗体による免疫沈降に付し、沈降した DNA-ヒストン複合体の DNA を鋳型としてリアルタイム RT-PCR を行うことにより、ゴナドトロピン遺伝子に結合するヒストンのアセチル化状況を解析した。

5. 遺伝子のメチル化解析

ゴナドトロピン遺伝子上流のメチル化感受性推定領域 (CpG 領域) につき、メチル

化領域感受性制限酵素法 (MSRE 法)、並びにバイサルファイトシーケンス法によって DNA メチル化の程度を解析した。

6. メタボローム解析

TCDD 曝露母ラット胎児 (GD20) の脳下垂体と視床下部におけるメタボローム変化およびトリカルボン酸サイクル (TCA) 成分の定量はホモジネートの水-methanol 抽出物を UPLC-TOF-MS に付して解析した。メタボローム変動解析は、UPLC-TOF-MS で得られた成績を、既報の多変量解析法で解析して推定した。

7. LA および還元型LAの定量

LA とその還元型 (dihydro-LA: DHLA) は、UPLC-TOF-MS を使用し、バルプロ酸ナトリウムを内標準物質として定量した。

8. その他の方法

細胞内 ATP 濃度は市販のルシフェリン/ルシフェラーゼ系を使用して測定した。有意差の検定は Student *t*-test (2 群間の比較)、ないし Tukey-Kramer法 (3 群以上の比較) によって行った。

C. 結果・考察

1. 脳下垂体ゴナドトロピン遺伝子の発現抑制機構

TCDD による脳下垂体 LH の抑制に寄与する遺伝子変動を見出すため、マイクロアレイ解析を実施した。その結果、多くの遺伝子発現の増減が観察されたが、変動遺伝子数は脳下垂体の方が視床下部より多かった。また、TCDD 曝露胎児の脳下垂体では、ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) の幾つかのアイソフォームの発現が増加することを発見した。これを更に確認するため、HDAC1~11 につき mRNA 変動をリアルタイム RT-PCR 法にて解析したところ、11 種の HDAC のうち 8 種が TCDD によって発現増大することが判明した。増加するもののうち、HDAC1、5 および 7 は LH β 遺伝子の抑制に関わりと推定されていることから、TCDD はヒス

トン-遺伝子の会合を強化して遺伝子転写を抑制する機構が示唆された。そこで、ChIP assay により種々の脳下垂体ホルモン遺伝子と会合するヒストンのアセチル化状況を解析した結果、TCDD は LH β 遺伝子結合性ヒストン特異的にアセチル化を抑制することが見いだされた。また、TCDD によるアセチル化抑制は胎児に特異的であり、母ラットの LH β 遺伝子等に会合するヒストンでは生起しなかった。これは、LH 遺伝子が胎児や初期新生児のみで抑制される事実とよく合致した。

TCDD がゴナドトロピン遺伝子上流域のメチル化を増加させて発現を抑制する可能性も想定された。そこで、LH の α - および β - サブユニット遺伝子のメチル化感受性 CpG 部位につき、メチル化の程度が TCDD によって変化するか否かを解析した。その結果、TCDD の母体曝露は胎児 LH β および α - サブユニット遺伝子上流域のメチル化状況を変化させなかった。これらの成績から、TCDD は HDAC 誘導を介して胎児の LH β 発現を低下させる機構が強く示唆された。この機構を支持して、GD15 に TCDD 投与した妊娠ラットに G16-19 の間、HDAC の阻害剤であるバルプロ酸を与えると、TCDD 単独処理時に認められる胎児 LH β 遺伝子発現の抑制が完全に回復した。また、胎児血清中の LH 量も、TCDD による有意な低下は、バルプロ酸によって正常水準に復帰した。

2. TCDD が脳メタボロームへ及ぼす影響

前述の通り、TCDD による胎児脳下垂体 LH β 遺伝子の発現抑制は、エネルギー生産における必須補酵素である LA によって完全に回復する。LA の生理的役割を考えると、LA が TCDD に拮抗して脳下垂体ゴナドトロピン低下を回復させるのは、TCDD によるエネルギー生産等の中間体代謝系への障害を回復するためとも考えられた。そこで、LA の保護効果機構の解明を目指して、脳下垂体とその制御組織である視床下部を

対象に UPLC-TOF-MS 法によるメタボロミクスを実施した。その結果、TCDD の母体曝露は胎児の両組織のメタボロームプロフィールを顕著に変動させた。しかし、視床下部での変動の方が脳下垂体での変化よりも大きく、視床下部に対する障害がより著しいと推定された。

変動を示すイオンにつき、成分を推定した結果、TCDD は多くの TCA サイクル成分を含む種々の物質の水準を増減させることが判明した。例えば、 α -ケトグルタル酸とオギザロ酢酸は対照群の50倍および5倍にまで増加した。これらの2つの α -ケト酸は LA 要求性ステップの基質ないし直近に位置する成分である。このこととよく符合して、TCDD 処理母に LA を与えると、TCDD による α -ケト酸の蓄積は対照水準ないしそれに近似する水準にまで回復した。TCA サイクルの停滞と一致して、TCDD 曝露胎児の視床下部では ATP 含量も顕著に低下したが、これも LA の補給によって完全に回復した。これらの一連の成果から、TCDD の胎児・脳下垂体ゴナドトロピン抑制には、制御組織である視床下部の活動性低下も寄与すると推定された。前述の通り、本研究では TCDD による LH β 発現低下に脳下垂体 HDAC 誘導が寄与する可能性を推定している。これに関し、絶食処理は脳 HDAC 誘導をもたらすことが報告されており、HDAC 誘導も TCDD によるエネルギー生産障害を起点に発生する可能性が考えられた。

外因性 LA の補給が TCDD による TCA サイクル障害を回復させる事実は、TCDD の作用は内因性 LA を低下させるためとも考え得る。本研究での検討はこの推定をよく支持した。すなわち、TCDD 曝露母ラットの胎児視床下部では、LA およびその還元体であるジヒドロ-LA の両者が有意に低下した。また、これらの低下は外来性 LA の投与によって正常水準ないしそれ以上に回復した。これらのデータを総合す

ると、TCDD は胎児脳下垂体の LA レベルを低下させ、本補酵素が必須な酵素反応を障害して TCA サイクルの停滞と ATP 生産を抑制することが示唆された。

メタボロミクス解析からは、胎児の障害性評価に使用が期待される反応も見いだされた。N-アセチルアスパラギン酸 (N-AcAsp) は、脳神経特異的にアセチル CoA 合成のためのアセチル基供与体として働き、エネルギー生産に利用される。これと関連して、TCDD 母体曝露は胎児・視床下部の N-AcAsp を顕著に増加させた。従って、胎児や新生児の体液中 N-AcAsp をバイオマーカーとして、臨界期脳のエネルギー生産障害、ひいては以後の発達障害や性未成熟を推定できる可能性が示唆された。

3. TCDD 以外の内分泌攪乱物質が胎児脳下垂体-性腺系へ及ぼす影響

今年度はビスフェノール A (BPA)、トリブチルスズ (TBT) およびメチル水銀を新たに解析した。妊娠ラットの処理条件は GD15 での単回経口投与方法とした。その結果、BPA と TBT では胎児精巣の steroidogenic acute-regulatory protein (StAR: ステロイドホルモン合成の律速課程に関わるトランスポーター) の有意な減少が観察された。メチル水銀には効果が観察されなかった。BPA は最高投与量によっても脳下垂体 LH β の発現には影響せず、本物質は性腺ステロイド合成には障害性を有するものの、脳下垂体ゴナドトロピン障害を起点として作用を発現する TCDD とは機構が異なることが示唆された。Cd は以前の検討では、単回投与方法では胎児 StAR を変化させなかった。しかし、Cd の飲水投与実験 (飲水期間: GD1~20) では、1 ppm の低濃度 Cd によって胎児精巣 StAR の発現低下が認められた。このことから、体内貯留性の低いものでも、微量の継続摂取によって性腺ステロイド合成に有害性を与え得ることを明らかにできた。

D. 結論

1. TCDD は胎児期特異的に脳下垂体の HDAC を誘導し、LH β 遺伝子特異的にヒストンの脱アセチル化を亢進して LH β の発現を抑制する。
2. TCDD は脳下垂体制御組織である視床下部のメタボロームを変動させ、TCA サイクルを停滞させて ATP 生産を抑制する。
3. TCDD による TCA サイクル障害は本回路の作動に必須な LA が低下するためである可能性が高い。TCA サイクルの停滞が重要な機構であることは、LA の補給が TCDD によるゴナドトロピン障害を回復させる事実とよく符合する。
4. 上記 1 と 2 の関連性は、エネルギー生産抑制が HDAC 誘導を惹起する研究例

があり、このことと関連すると推定される。

5. N-AcAsp の蓄積は、性未成熟を予測するためのバイオマーカーとして有用である可能性が示唆される。
6. BPA および TBT は TCDD とは異なる機構で胎児精巣のステロイド合成系を障害する。Cd は単回処理法では効果を示さないが、飲水による継続摂取では胎児精巣ステロイド合成系を障害する。従って、体内半減期の短い化学物質の評価では、飲水による長期投与方法での解析が望まれる。

E. 健康危険情報

特に新規な情報はなし。

胎児への食品汚染物質曝露による性未成熟のインプリンティングと その評価法開発

研究代表者 山田 英之 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 教授
研究分担者 石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 准教授
研究分担者 武田 知起 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 助教

研究要旨 これまでの研究により、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)は胎児期後期から出生直後の一時期にかけて脳下垂体ゴナドトロピンの luteinizing hormone (LH) を低下させ、これを起点として障害を惹起することを明らかにしている。本年度はこの機構につき、1) 脳下垂体での遺伝子発現および2) 脳下垂体制御組織である視床下部での障害の2点から解析した。TCDD 曝露母ラットの胎児脳下垂体をマイクロアレイ解析に付した結果、脳下垂体のヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)が増加することを見いだした。これと符合して、LHβ 遺伝子に会合するヒストンの脱アセチル化亢進が観察され、これによって LHβ 遺伝子発現が抑制されることが推定された。TCDD 曝露胎児の視床下部についてメタボローム解析を行った結果、多くの組織成分が有意に変動することを明らかにした。変動成分の中には、トリカルボン酸 (TCA) サイクルの種々の成分も含まれ、TCDD は視床下部でのエネルギー生産を抑制することが明らかとなった。この機構は TCDD が TCA サイクル回転に必須な補酵素である α-リポ酸 (LA) を低下させるためであることも推定できた。既に LA は TCDD 依存的な脳下垂体ゴナドトロピン抑制を回復させることを明らかにしている (H21 年度の研究)。これらを総合すると、TCDD は LA 抑制を起点として視床下部の活動活性を低下させ、これを介して脳下垂体ゴナドトロピンを障害するものと推定された。TCDD 以外の食品汚染物質としてビスフェノール A やトリブチルスズ等を新たに解析した。これらは TCDD とは異なる機構で胎児精巣のステロイドホルモン合成系を障害することが示唆された。また、Cd での解析から、飲水法による継続投与が障害性検出に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

ダイオキシンを初めとする種々の環境汚染物質が生殖や後世代の障害を惹起する可能性が危惧されている。しかし、ヒトや野生生物での障害に関する明確な因果関係や障害の機構は十分に理解されているとは言えない。本研究では、ラットを使用した

基礎研究で内分泌攪乱物質の次世代への悪影響の機構を解明することを目指した。これらを基盤として、障害診断法や対処法の構築に関する有用情報が得られることを期待した。

内分泌攪乱物質はホルモン受容体への結合能を有するものが多いが、これに要する

濃度は食品汚染物質として体内に摂取される量より遥かに高い場合が多い (1)。従って、ホルモン受容体との結合を介する障害はその可能性を否定はできないが、障害の主因ではないかもしれない。体内の性ホルモンやその受容体の合成は、脳下垂体から分泌される黄体形成ホルモン (luteinizing hormone: LH) や卵胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone: FSH) 等のゴナドトロピンによって制御される。当研究室では、ダイオキシンの妊娠ラットへの投与によって、胎児脳のLH/FSH産生と性ステロイドホルモン合成系タンパク質の発現が障害され (2,3)、これを起点として成長後の交尾能力が低下することを明らかにしている (4)。しかし、ダイオキシンがどのような機構で脳下垂体ゴナドトロピンを低下させるかについては不明である。また、胎児期の障害が何故、成長後にまで継続する性未成熟を引き起こすかについても多くが謎のままである。

平成21年度の研究では、最強毒性のダイオキシンである2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を用い、これによる胎児脳下垂体LH/FSHの低下が、脳下垂体制御組織である視床下部の発育や活動の抑制に基づく可能性を想定して研究を実施した。すなわち、TCDDが視床下部のメタボロームを障害して内分泌を抑制する機構について gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) 法による検証を実施し、推定を支持する成績を得た。また、胎児ゴナドトロピン低下を解消する方策について検討を行い、ビタミン様物質である α -リポ酸 (α -lipoic acid: LA) に優れた障害消去作用があることを見出した。

平成22年度の研究では、TCDDによる胎児ゴナドトロピン抑制の時期特異性を詳細に把握すると共に、より精密に毒性発現の機構を解析する目的で、TCDDがLH/FSH遺伝子発現に直接的に影響し得るか否かについて、培養胎児脳下垂体を用いた解析を実施

した。また、一過性の胎児ゴナドトロピン抑制が成長後の交尾能力を減退させる機構を明らかにするため、TCDD曝露母から出生した児の成長後の脳遺伝子発現状況についてマイクロアレイ解析を実施した。

最終年度は、LH抑制にかかる視床下部での機構と脳下垂体での機構を明確にするため、それぞれについての解析研究を行った。脳下垂体を対象とする研究では、LH/FSH遺伝子発現がTCDDによって抑制される分子機構を解析した。視床下部に関する機構としては、前述の通り、メタボローム障害が間接的にLH/FSH発現を抑制する機構を既に推定している (H21年度)。ただ、H21年度の研究はGC-MSによる解析であったため、極性成分の変動を正確に把握できていない恐れが考えられた。そこで、本年度は ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TOF-MS) 法により、詳細な解析を目指した。また、TCDD以外の内分泌攪乱物質についても、胎児ゴナドトロピンおよび生殖腺ステロイド合成系に与える影響を継続して解析した。

B. 研究方法

1. 動物実験

全ての実験にWistar系ラットを購入して使用した。成熟雌ラットを交尾させて妊娠させ、膈内に精子が確認された日を妊娠0日目 (GD0) として実験に供した。TCDD処理実験では、GD15の妊娠ラットに1 μ g/kgで投与後、GD20胎児より試料を調製して種々の解析を行った。動物処理の内容は、結果・考察の項に記載する。全ての動物実験は、本学の動物実験倫理審査委員会の審査を受け、その承認の下に実施した。

2. mRNAおよびタンパク質発現量解析

リアルタイム reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法によって mRNA発現量を分析した (5)。タンパク質の発現状況はWestern blotting法によって解析した (4)。

3. 発現異常を示す遺伝子の網羅的探索

TCDD曝露母ラットの胎児から脳下垂体を摘出し、mRNAを抽出した(6)。これを逆転写反応によってcDNAに変換してマイクロアレイ解析に付し、遺伝子発現状況を網羅的に調べた(6)。得られた成果は、一般公開のため米国生物工学情報センターデータベースに登録した(登録番号: GSE32459; www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)。

4. クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay)

既法(6)の通り、以下に概要を示す方法で解析した。TCDD曝露母ラットのGD20胎児より脳下垂体を単離し(一腹の雄胎児脳下垂体をプール)、0.2% Nonidet P-40その他を含有する10 mM Tri-HCl (pH 8.0)中でホモジナイズし、これをホルムアルデヒドで処理してDNA-クロマチンタンパク質会合体を調製した。このサンプルを抗アセチル化ヒストン抗体による免疫沈降に付し、沈降したDNA-ヒストン複合体のDNAを鋳型としてリアルタイムPCRを行うことにより、ゴナドトロピン遺伝子に結合するヒストンのアセチル化状況を解析した。

5. 遺伝子のメチル化解析

既法(6)の通り、以下に概要を示す方法で解析した。まず、ゴナドトロピン遺伝子上流のメチル化感受性領域(CpG領域)をソフトウェア[Methyl Primer Express® Software v1.0 (Life Technologies)]を用いて推定した。得られた推定CpG部位につき、メチル化領域感受性制限酵素法(MSRE法)(7)、並びにバイサルファイトシーケンス法(8)によってDNAメチル化の程度を解析した。

6. メタボローム解析

TCDD曝露母ラット胎児(GD20)の脳下垂体と視床下部におけるメタボローム変化およびトリカルボン酸サイクル(TCA)成分の定量はホモジネートの水-methanol抽出物をUPLC-TOF-MSに付して解析した(9)。メタボローム変動解析は、UPLC-TOF-MSで得られた成績を、既報の多変量解析法で解析して推定した(5)。

7. LAおよび還元型LAの定量

LAとその還元型(dihydro-LA: DHLA)は、UPLC-TOF-MSを使用した下記の方法で定量した。TCDD曝露妊娠ラット中の胎児(GD20)から視床下部を単離し、内標準のバルプロ酸ナトリウム(300 ng/50 μ l ethanol)を添加後、既報(10)に従ってLA/DHLAを抽出した。遠心エバポレーターを用いて溶媒(水-acetonitrile)を留去後、残差を40%acetonitrile 50 μ lに溶解し、その10 μ lをUPLC-TOF-MSに注入した。UPLCは以下の条件で分析した: 機器、Acquity UPLC - Synapt G2-S TOF-MS (Waters社製); カラム、BEH C18 (1.7 μ m, 2.1 \times 100 mm, Waters); カラム温度、40°C; サンプル温度、4°C; 移動相、0.1% (v/v) 酢酸 (pH4) 中のacetonitrile濃度: 40 to 95% (0-1.9分)、95% (1.9-2.5分)、40%への復帰(ステップワイズ)とこれの維持(4.5分); 流速、0.2 ml/分; TOF-MS条件、メタボローム解析と同じ設定(9); モニターイオンと保持時間、LA: m/z 205.0357 ([M-H]⁻)、2.42分; DHLA: m/z

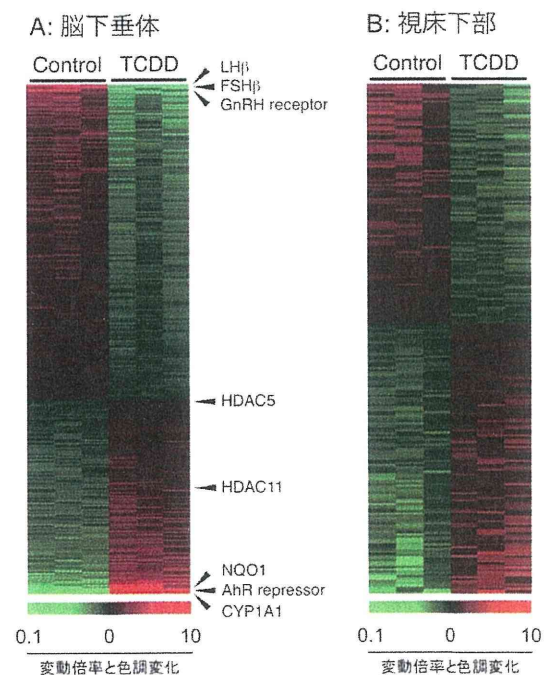


図1. 胎児脳下垂体と視床下部の遺伝子発現に及ぼすTCDDの効果
TCDD処理母ラット(N=3)より胎児を分離し、脳組織での遺伝子発現状況をマイクロアレイ法で解析。NQO, NAD(P)H quinone oxidoreductase; AhR, aryl hydrocarbon receptor (その他の略記は本文参照)。

207.0513 ([M-H]⁺)、2.40 分；バルプロ酸：
m/z 142.0994 ([M-H-Na]⁺)、1.18分。

8. その他の方法

細胞内ATP濃度は市販のルシフェリン／
 ルシフェラーゼ系を使用して測定した
 (Promega社製)。有意差の検定はStudent
t-test (2群間の比較)、ないしTukey-Kramer
 法 (3群以上の比較) によって行った。

C. 結果・考察

1. 脳下垂体ゴナドトロピン遺伝子の発現抑制機構

ゴナドトロピン発現には視床下部から脳
 下垂体へ投射する神経から分泌される
 gonadotropin- releasing hormone (GnRH)の刺
 激が必要である。事実、培養胎児脳下垂体
 にGnRHを添加すると、LHβ等のゴナドトロ
 ピン発現が増加し、この誘導発現はTCDD

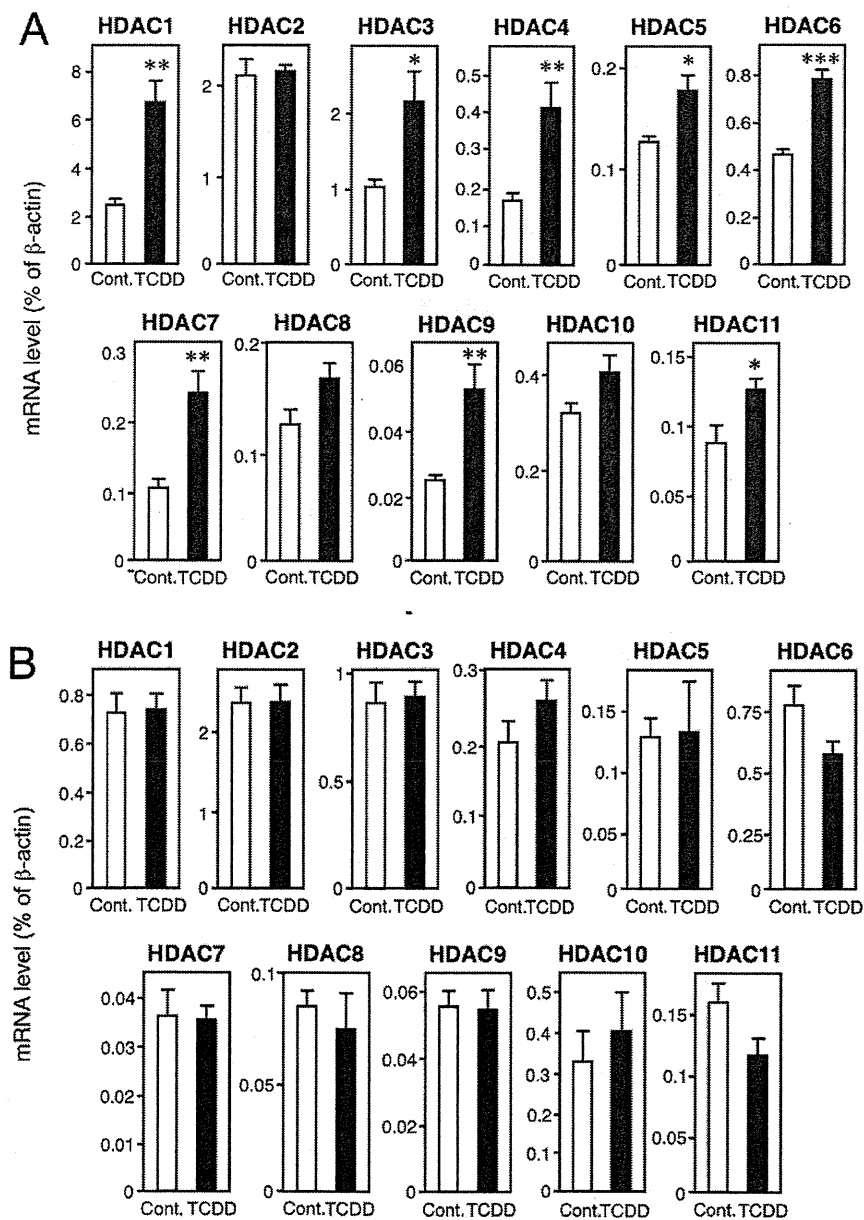


図2. TCDD母体曝露 (GD15) がGD20胎児のHDAC mRNA発現に与える影響
 A: 脳下垂体、B: 視床下部。各バーは平均値 ± S.E.M. (N=6: 各胎児はそれぞれ6匹の
 妊娠母から単離)。* P < 0.05; ** P < 0.01

添加によって有意に抑制された (H22年度報告書参照)。従って、TCDDは胎児脳下垂体のLH発現を直接的に抑制し得るが、この機構は不明である。ただ、胎児のGnRH発現量自体はTCDD曝露によっても変動しないことを確認している。そこで次に、TCDDによる脳下垂体LHの抑制に寄与する遺伝子変動を見い出すため、マイクロアレイ解析を実

施した。その結果 (図1)、多くの遺伝子発現の増減が観察されたが、変動遺伝子数は脳下垂体 (増加、245; 減少、396) の方が視床下部 (増加、116; 減少、104) より多かった。また、TCDD曝露胎児の脳下垂体では、ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC)の幾つかのアイソフォームの発現が増加することを発見した (図1)。

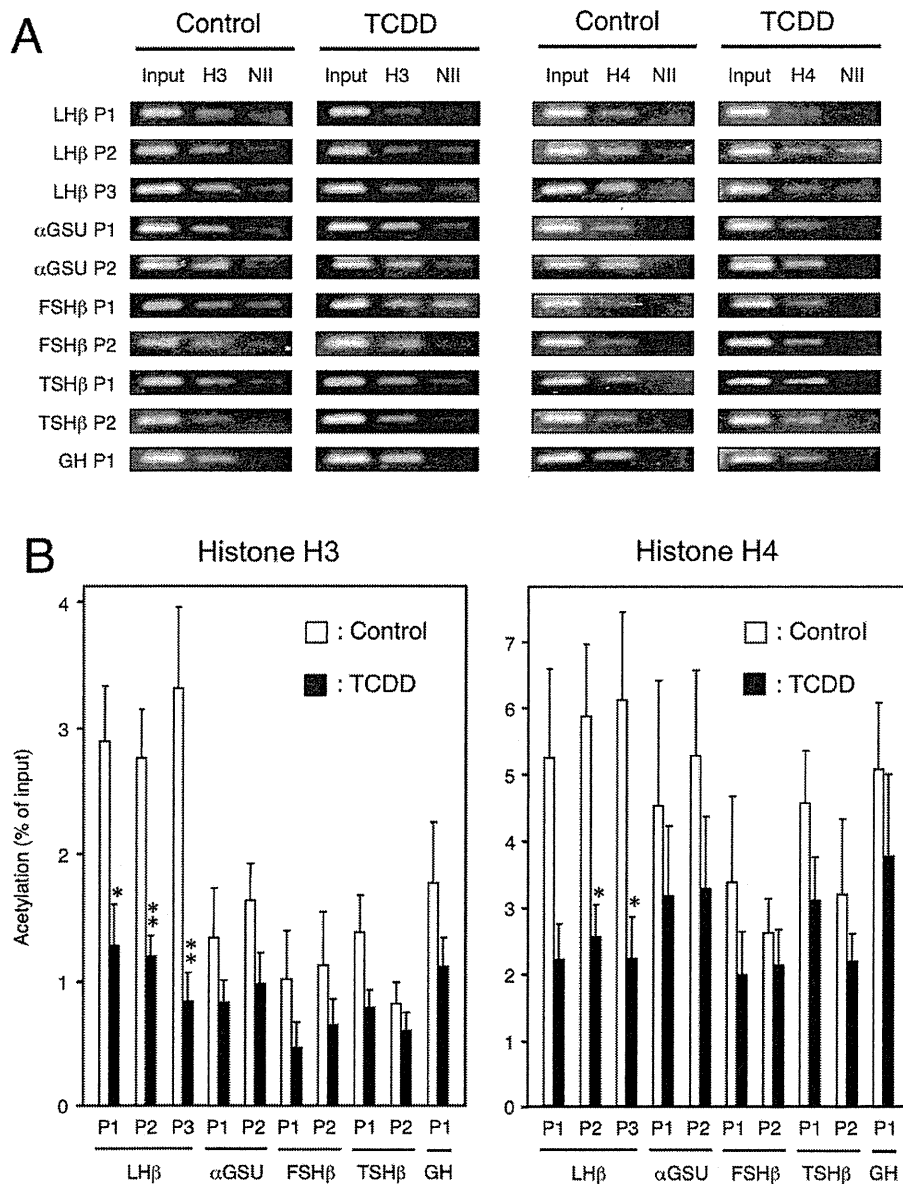


図3. 脳下垂体ホルモン遺伝子と会合するヒストンの脱アセチル化に及ぼすTCDDの影響
ヒストンH3とH4のアセチル化状況をChIP法で解析: GD20胎児の脳下垂体から調製したクロマチンタンパク質-DNA結合体を抗アセチル化ヒストン抗体で免疫沈降後、沈降物のDNAを鋳型として分析対象遺伝子に関するPCR反応を実施。
A: PCR増幅産物のゲル電気泳動パターン: Input, 免疫沈降前のサンプルを鋳型としたPCR増幅; H3およびH4、抗アセチル化ヒストンH3あるいはH4抗体での免疫沈降サンプルを鋳型としたPCR; NII, 未感作血清イムノグロブリンによる免疫沈降物でのPCR。 B: ヒストンのアセチル化状況定量グラフ: 各バーは平均値 ± S.E.M. (N=6, 別腹の母から単離)。* P < 0.05, ** P < 0.01 略記: αGSU, glycoprotein hormone α-subunit; TSH, thyroid-stimulating hormone, GH, growth hormone

これを更に確認するため、HDAC1~11につきmRNA変動をリアルタイムRT-PCR法にて解析したところ、11種のHDACのうち8種がTCDDによって発現増大することが判明した(図2)。増加するもののうち、HDAC1、5および7はLHβ遺伝子の抑制に関わると推定されており(11)、これらがTCDDによって増加する事実は、LHβ遺伝子の抑制と符合すると考えられた。すなわち、TCDDがヒストン-遺伝子の会合を強化して遺伝子転写を抑制する機構が示唆された。そこで、ChIP assayにより種々の脳下垂体ホルモン遺伝子と会合するヒストンのアセチル化状況を解析した結果、TCDDはLHβ遺伝子結合性ヒストン特異的にアセチル化を抑制

することが見いだされ、FSHβやαGSU (LHおよびFSHに共通のα-サブユニット)等では同様の抑制は観察されなかった(図3)。また、TCDDによるアセチル化抑制は胎児に特異的であり、母ラットのLHβ遺伝子等に会合するヒストンでは生起しなかった(成績未掲載)。これは、LH遺伝子が胎児や初期新生児のみで抑制される事実とよく合致した(H22年度報告書参照)。

遺伝子のエピジェネティックな制御機構として、他にDNAのメチル化がある。従って、TCDDはゴナドトロピン遺伝子上流域のメチル化を増加させて発現を抑制する可能性も否定できなかった。そこで、LHのα-およびβ-サブユニット遺伝子のメチル化感受

A αGSU CpG site 1
 -7302...agcagctccagagactgtgcccgcggcgccgcccctccaggaccgcctaaatgagcaagctctgtgfcgc
 agacgaggccggcgccggaggctcctcctcagcagcctggccggctttccaaagagctgagctcaccagacgcgc
 agacctgcagcctgtggaCGCGAaaaattggcgtctgcaccaagaagactctagggaatctggttaagaccactgactcat
 ctgctaaaaatattgcactgttttagagaagac...-6067

LHβ CpG site 1
 -7988...ggacccctgtgtgaaggaggctgaagcctggacctcgggtctaacgttaggggggtgggtgtaacccagct
 gctgtagtgaggagggtitacagcctagactctagaactgaagtggccaaggccgggtctccgagggtccggccCGCGcgt
 gctaggcgggatccgcccctcctccgcccgtggggcggcccccctcctccagaccagccctcccaagcgcgaaac
 ggcagcagccggcgagcagcgggctccgagctgctagcagcgggagggagagccgca...-6867

LHβ CpG site 2
 -5765...cggggtgagtgagacggcaccggcaagccgggggagcctggcagctgcccagtgagtgagtggtgggga
 ccgacgcgcggacagctgtggactgctgtgggCGCGAgggtggaggtgctggggaggtgcccctccgaggtggcagtc
 ctgctgactactctccagacgcgctgcaagcccgaagcgcctggggaggggtggccc...-4587

LHβ CpG site 3
 -996...ccagaatcggagattgccagactggcccagaagcctcgcctgagctgaaaagtaccagcgtCGCG
 GcagccCGCGcagggccatgcacaccgatcgtgcatactgggagccctgctgaccgggagctcaccggaccccc
 gatgcaccggtctgtaggtggaccgcttgcctagtagcgcacccctggggaggccctccaccggaatc...-274

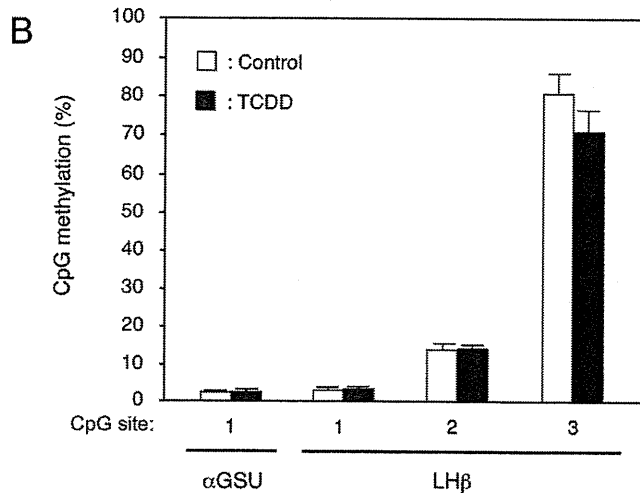


図4. TCDD母体曝露が胎児LH遺伝子のメチル化に及ぼす影響
 A: 解析対象のメチル化感受性部位(CpG部位)の配列と遺伝子上の存在箇所;
 B: メチル化頻度:各バーは平均値±S.E.M.(N=6-7、別腹の母から調製)

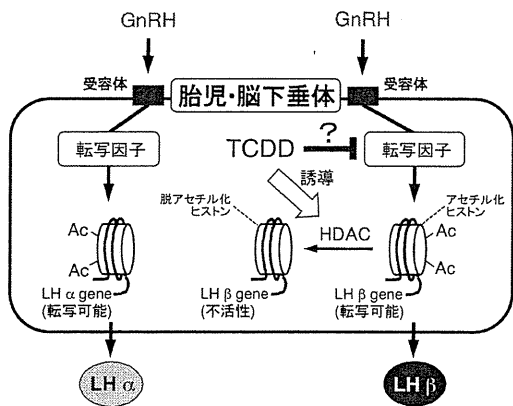


図5. TCDDによる胎児LHβ遺伝子発現の抑制：HDAC誘導を介する機構

性領域（CpG部位：図4A）につき、メチル化の程度がTCDDによって変化するか否かをMSRE法で解析した。その結果、TCDDの母体曝露は胎児LHβおよびαGSU遺伝子上流域のメチル化状況を変化させなかった（図4B）。同様の結果は、バイサルファイトシークエンス法によっても確認された（図未掲載）。これらの成績から、TCDDはHDAC誘導を介して胎児のLHβ発現を低下させる機構が強く示唆された（図5）。この機構を支持して、GD15にTCDD投与した妊娠ラットにG16-19の間、HDACの阻害剤であるバルプロ酸（200 mg/kg/day、経口投与）を与えると、TCDD単独処理時に認められる胎児LHβ遺伝子発現の抑制が完全に回復した（図6）。また、胎児血清中のLH量も、TCDDによる有意な低下は、バルプロ酸によって正常水準に復帰した（図未掲載）。TCDDによるヒストン脱アセチル化がLHβ遺伝子に特異的で、FSHβ遺伝子では認められないことと符合して、バルプロ酸処理でもFSHβ mRNA発現抑制は回復しなかった（図6）。

2. TCDDが脳メタボロームへ及ぼす影響

これまでの本研究での検討により、TCDDによる胎児脳下垂体LHβ遺伝子の発現抑制は、エネルギー生産における必須補酵素であるLAによって完全に回復することを見出ししている（H21年度報告書参照）。LAの生理的役割を考えると、LAがTCDDに拮抗

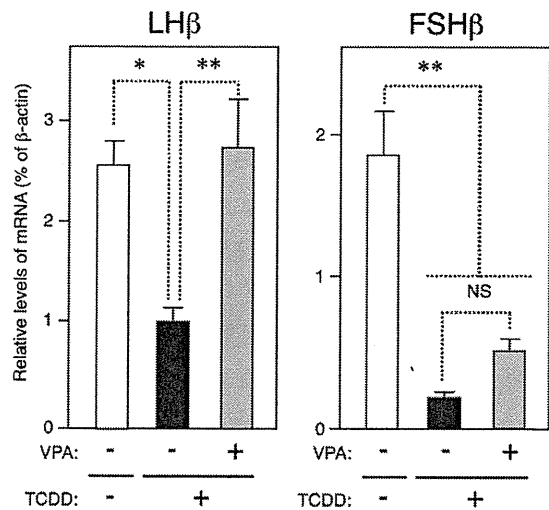


図6. TCDDによる胎児LHβ遺伝子発現抑制のバルプロ酸併用による回復。各バーは平均値 ± S.E.M. (N=5、別腹の母ラットから調製)。* P < 0.05、** P < 0.01

して脳下垂体ゴナドトロピン低下を回復させるのは、TCDDによるエネルギー生産等の中間体代謝系への障害を回復するためとも考えられる。そこで、LAの保護効果機構の解明を目指して、脳下垂体とその制御組織である視床下部を対象にUPLC-TOF-MS法によるメタボロミクスを実施した。その結果、TCDDの母体曝露は胎児の両組織のメタボロームプロファイルを顕著に変動させた（図7A、B）。しかし、視床下部での対照群とTCDD群間のプロット乖離の方が脳下垂体での差よりも大きく、視床下部で変動がより著しいと推定された。このことは、有意な増減を示す生体成分由来イオンの数が視床下部の方が多いことから支持された（図7C、D）。

変動を示すイオンにつき、質量と保持時間情報を公開データベースと照合して成分を推定した結果、TCDDは多くのTCAサイクル成分を含む種々の物質の水準を増減させることが判明した（表1A）。α-ケトグルタル酸とオギザロ酢酸は対照群の50倍および5倍にまで増加した（表1B）。これらの2つのα-ケト酸はLA要求性ステップの基質ないし直近に位置する成分である。このこととよく符合して、TCDD処理母にLAを与えると、TCDDによるα-ケト酸の蓄積は対照

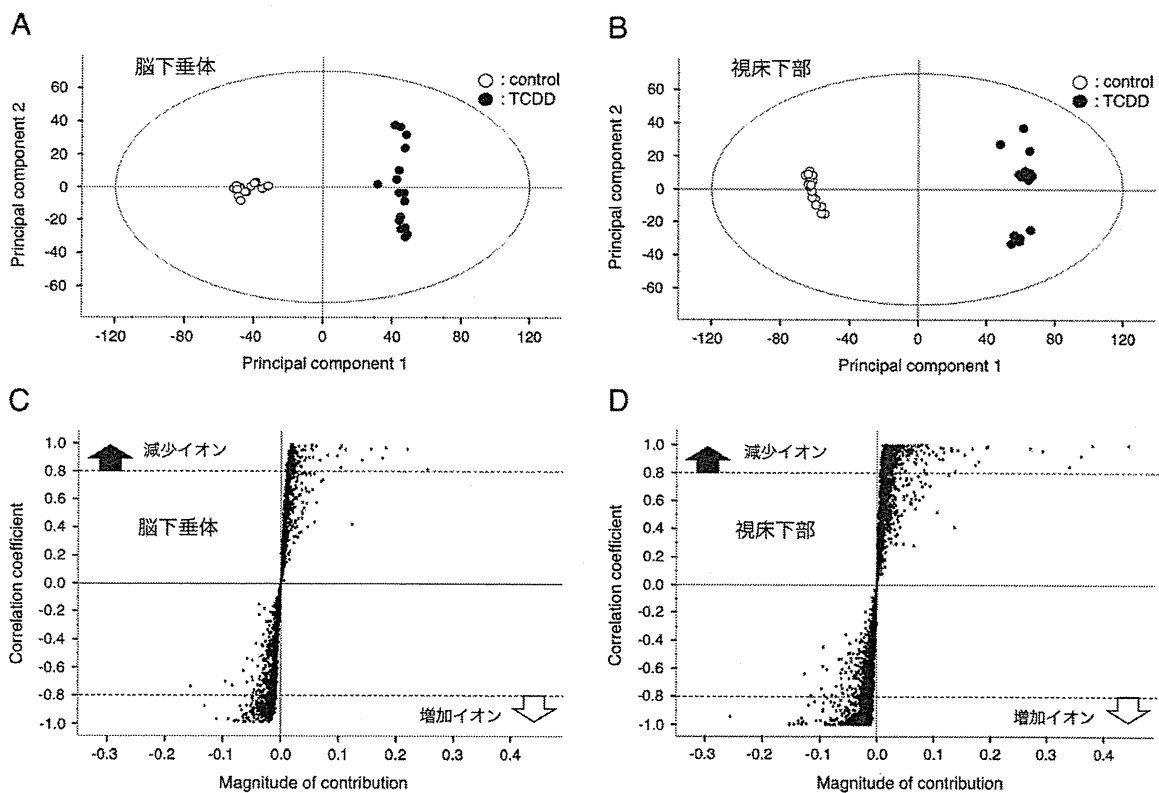


図7. TCDD 母体曝露によって惹起される胎児脳メタボローム変動の主成分分析
胎児脳組織のホモジネートより水-メタノールで組織成分を抽出し、UPLC-TOF-MS で解析。得られたイオン質量と保持時間情報を多変量解析の一手法である主成分分析に付して、群間のプロフィールの違いを推定 (A, B: スコアプロット)。また、TCDD によって有意に変動するイオンを S-プロットで解析 (C, D)。S-プロットでは相関係数 $> +0.8$ ないし < -0.8 の領域に存在するイオンを有意な増減を示すもの推定。

水準ないしそれに近似する水準にまで回復した (表 1 B)。TCAサイクルの停滞と一致して、TCDD曝露胎児の視床下部ではATP含量も顕著に低下したが、これもLAの補給によって完全に回復した (表 1 B)。これらの一連の成果から、TCDDの胎児・脳下垂体ゴナドトロピン抑制には、制御組織である視床下部の活動性低下も寄与すると推定された。前述の通り、TCDDによるLH β 発現低下には脳下垂体HDAC誘導が寄与する可能性が高い。これに関し、絶食処理は脳HDAC誘導をもたらすことが報告されており (12)、HDAC誘導もTCDDによるエネルギー生産障害を起点に発生する可能性が考えられた。

外因性LAの補給がTCDDによるTCAサイクル障害を回復させる事実は、裏を返せば、TCAサイクルの円滑な回転に必要な内因性LAがTCDDによって低下するためとも考え

得る。この可能性は真実であることが実験的に確認された。すなわち、TCDD曝露母ラットの胎児視床下部では、LAおよびその還元体であるジヒドロ-LA (DHHLA)の両者が有意に低下した (図 8)。また、これらの低下は外来性LAの投与によって正常水準ないしそれ以上に回復した (図 8)。これらのデータを総合すると、TCDDは胎児脳下垂体のLAレベルを低下させ、本補酵素が必須な酵素反応を障害してTCAサイクルの停滞とATP生産を抑制することが示唆された (図 9)。すなわち、LAの抑制によってピルビン酸脱水素酵素複合体 (アセチルCoA生産) および α -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体 (スクシニルCoA生産) を抑制し、これによってオキサロ酢酸や α -ケトグルタル酸の蓄積を引き起こすものと推定された (図 9)。

表1. TCDDによって変動する胎児脳下垂体および視床下部成分 (A)、並びに TCDD 依存的な視床下部 TCA サイクル成分/ATP の変動とそれらに及ぼす LA の保護効果 (B)

A: 有意な変動が推定された成分

	増 加		減 少	
	> 2倍	< 2倍	< 1/2	> 1/2
視床下部	Tyrosine Phenylalanine N-Acetylaspartic acid Cortisol <u>Isocitric acid</u> <u>α-Ketoglutaric acid</u> <u>Oxaloacetic acid</u>	4-Sphingenin Sphinganin Taurine Glutathione AMP Uridine	Stearic acid Lactobionic acid Chenodeoxycholic acid Cholic acid 4-Hydroxyretinoic acid Tryptophan Alanine <u>Citric acid</u> <u>cis-Aconitic acid</u> <u>Fumaric acid</u>	Lauric acid Tridecanoic acid Myristic acid Valine Cystamine Pipicollic acid Thymidine Adenosine 7-Dehydrodesmosterol Calcitriol GABA Glutamine Succinic acid
脳下垂体	None	AMP CMP Tryptophan	Glutathione Itaconic acid Ascorbic acid Palmitoleic acid Stearic acid	Uridine Valine Threonine Glutamine Oleic acid Arachidonic acid

B: 視床下部における TCA サイクル成分および ATP の変動

成 分	視床下部含量 (pmol/mg tissue) [% of control]			
	Control	TCDD	LA	TCDD + LA
Citric acid	10.9 ± 1.2 [100]	4.87 ± 0.50* [45]	8.13 ± 0.30 [75]	8.49 ± 0.77† [78]
cis-Aconitic acid	0.209 ± 0.033 [100]	0.098 ± 0.016* [47]	0.170 ± 0.014 [81]	0.164 ± 0.008† [78]
Isocitric acid	1.14 ± 0.12 [100]	11.7 ± 0.7* [1,020]	2.52 ± 0.14 [220]	1.19 ± 0.04† [104]
α-Ketoglutaric acid	0.519 ± 0.094 [100]	26.6 ± 0.4* [5,120]	0.871 ± 0.052 [168]	0.165 ± 0.043† [32]
Succinic acid	64.8 ± 8.3 [100]	38.9 ± 4.3* [60]	60.5 ± 5.1 [93]	56.9 ± 2.1 [87]
Fumaric acid	2.34 ± 0.71 [100]	0.781 ± 0.101* [34]	1.12 ± 0.22 [47]	1.64 ± 0.34† [70]
Malic acid	2.68 ± 0.96 [100]	1.76 ± 0.27 [65]	2.27 ± 0.18 [84]	1.44 ± 0.53 [54]
Oxaloacetic acid	8.69 ± 0.98 [100]	43.3 ± 11.0* [498]	15.0 ± 1.6 [173]	8.08 ± 2.02† [93]
ATP	2.42 ± 0.43 [100]	0.943 ± 0.148* [39]	3.58 ± 0.35* [148]	2.65 ± 0.29† [109]

A: 主成分分析 (図7) によって TCDD による有意な変動が観察されたイオンにつき、質量と保持時間情報を公開データベース[ヒトメタボロームデータベース (<http://www.hmdb.ca>) および京都遺伝子ゲノム百科事典 (KEGG, <http://www.genome.jp/>)]と照合して化合物を推定。TCA サイクル成分には下線を付記。B: 各数値は平均値 ± S.E.M. (N=5、一腹の雄胎児の視床下部をプールして分析; 各サンプルは別腹の母から調製)。* P < 0.05 (対照群との有意差); † P < 0.05 (TCDD 処理群との有意差)

メタボロミクス解析からは、胎児の障害性評価に使用が期待される反応も見いだされた。N-アセチルアスパラギン酸 (N-AcAsp) は、脳神経特異的にアセチル CoA 合成のためのアセチル基供与体として働き、エネルギー生産に利用される (13)。図9に示すように、TCDD母体曝露は胎児・視床下部のN-AcAspを顕著に増加させた。従って、胎児や新生児の体液中N-AcAspをバイオマーカーとして、臨界期脳のエネルギー生産障害、ひいては以後の発達障害や性未成熟を推定できる可能性が浮上した。

3. TCDD以外の内分泌攪乱物質が胎児脳下垂体-性腺系へ及ぼす影響

今年度はビスフェノールA (BPA)、トリブチルスズ (TBT)およびメチル水銀を新たに解析した。妊娠ラットの処理条件はGD15での単回経口投与方法とした。体内貯留性の高

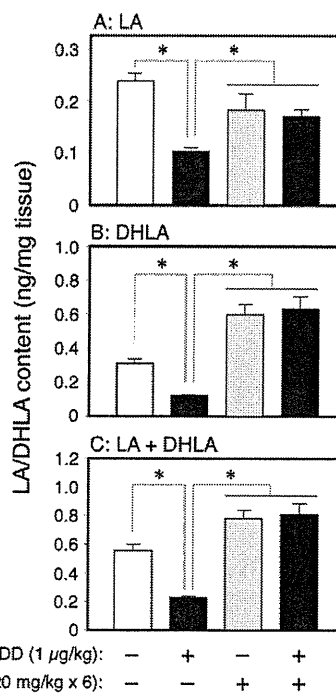


図8. TCDD および外因性 LA が胎児視床下部の LA/DHLA 含量に与える影響
各バーは平均値 ± S.E.M. (N=5、別腹の母から調製)

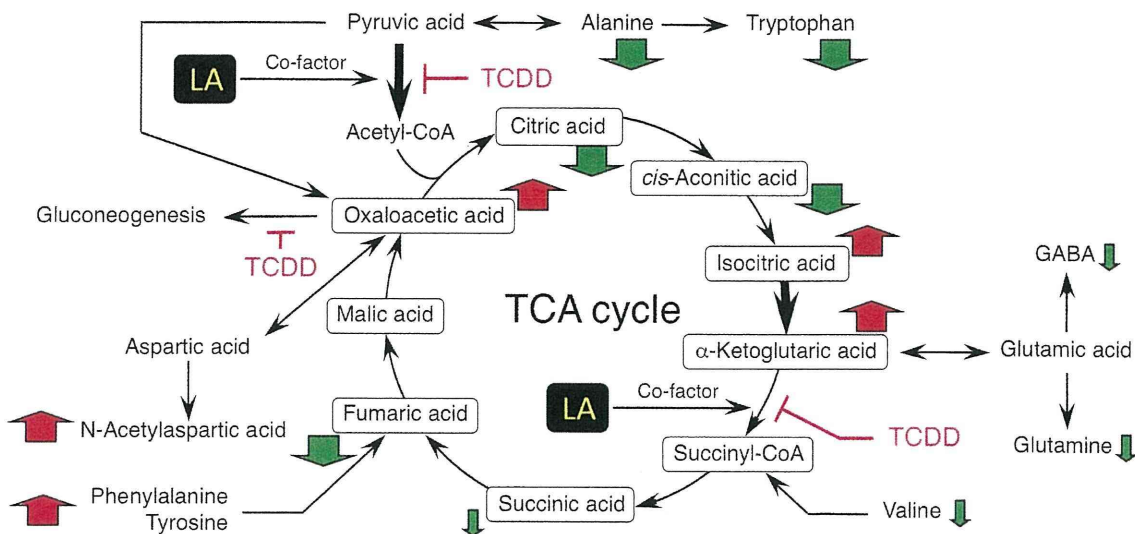


図9. TCDDが胎児・視床下部TCAサイクルおよび関連アミノ酸代謝に及ぼす影響
 太矢印は対照と比べて2倍以上の増加(赤)および1/2以下への減少(緑)を示す成分。
 緑細矢印は顕著ではないが有意な減少を示す成分。黒太矢印はTCAサイクルにおける被
 制御ステップ。

いTCDDは単回投与で障害性を惹起するが、貯留性の低い他の化学物質が同様の条件での解析で良いかどうかには問題もある。そこで、本年度は単回投与方法では既に解析済みのCdを対照として、飲水による継続投与方法での解析も実施した。BPA(4、10および40 μg/kg)、TBT(1、5および10 mg/kg)およびメチル水銀(8 mg/kg)をGD15妊娠ラットに単回経口投与したのち、GD20胎児精巣steroidogenic acute-regulatory protein (StAR:ステロイド合成の律速課程に参与するトランスポーター)のmRNAを観察した。その結果、BPAとTBTの最高用量で有意な減少が観

察された(図10)。メチル水銀には効果が観察されなかった。BPAは最高投与量によっても脳下垂体LHβの発現には影響せず、本物質は性腺ステロイド合成には障害性を有するものの、脳下垂体ゴナドトロピン障害を起点として作用を発現するTCDDとは機構が異なることが示唆された。Cdの飲水投与実験(飲水期間:GD1~20)では、1 ppmの低濃度Cdによって胎児精巣StARの発現低下が認められた(図11)。このことから、体内貯留性の低いものでも、微量の継続摂取によって性腺ステロイド合成に有害性を与え得ることを明らかにできた。TCDD

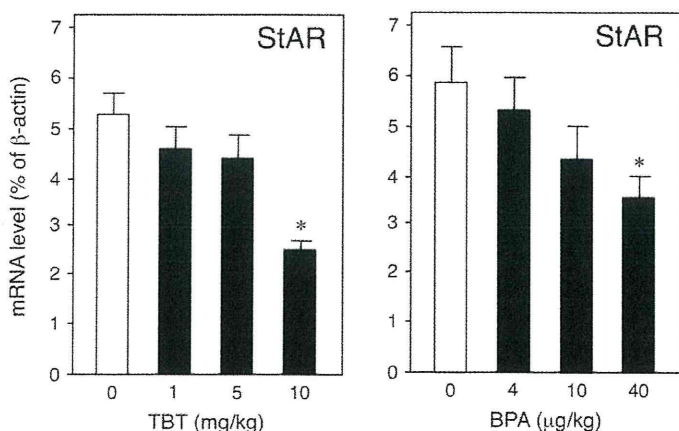


図10. BPAおよびTBTが胎児精巣StARの発現に及ぼす影響
 各バーは平均値 ± S.E.M. (N=5・7:別腹の母ラットから調製)
 * P < 0.05

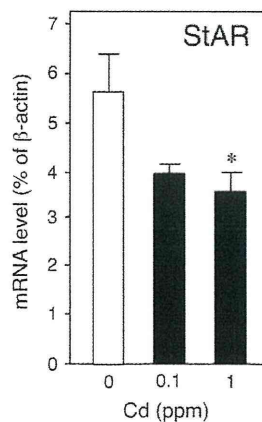


図11. 飲水法で投与したCdが胎児精巣StAR発現に及ぼす影響
 各バーは平均値 ± S.E.M. (N=6)
 * P < 0.05

での研究成果から明らかのように、化学物質が次世代に及ぼす影響は胎児や新生児期の一時期での影響が重大と思われる。従って、体内半減期の短い化学物質の場合、単回処理法ではそのタイミングを外して解析してしまう危険性があり、上記のCdでの成績はこれを実証するものと考えられた。

D. 結論

1. TCDDは胎児期特異的に脳下垂体のHDACを誘導し、LHβ遺伝子特異的にヒストンの脱アセチル化を亢進してLHβの発現を抑制する。
2. TCDDは脳下垂体制御組織である視床下部のメタボロームを変動させ、TCAサイクルを停滞させてATP生産を抑制する。
3. TCDDによるTCAサイクル障害は本回路の作動に必須なLAが低下するためである可能性が高い。TCAサイクルの停滞が重要な機構であることは、LAの補給がTCDDによるゴナドトロピン障害を回復させる事実とよく符合する。
4. 上記1と2の関連性は、エネルギー生産抑制がHDAC誘導を惹起する研究例があり、このことと関連すると推定される。
5. N-AcAspの蓄積は、性未成熟を予見するためのバイオマーカーとして有用である可能性が示唆される。
6. BPAおよびTBTはTCDDとは異なる機構で胎児精巣のステロイド合成系を障害する。Cdは単回処理法では効果を示さないが、飲水による継続摂取では胎児精巣ステロイド合成系を障害する。従って、体内半減期の短い化学物質の評価では、飲水による長期投与方法での解析が望まれる。

E. 研究発表

1. 論文発表

Takeda, T., Fujii, M., Taura, J., Ishii, Y., and Yamada, H. Dioxin silences gonadotropin expression in perinatal pups by inducing histone deacetylases: a new insight into the mechanism for the imprinting of sexual immaturity by dioxin. *J. Biol. Chem.*, 287: 18440-18450 (2012).

2. 学会発表

武田知起 他7名, ダイオキシン胎児期曝露による生殖障害のインプリンティン

グ: gonadotropin-releasing hormone合成攪乱を介する機構. 日本薬学会第132年会 (2012年3月)

古賀貴之 他4名, 2,3,7,8-Tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxinの胎児脳下垂体-性腺系への障害: 視床下部・下垂体メタボロームとエネルギー産生系攪乱を介する機構. フォーラム2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2011年10月, 金沢) (優秀若手研究者賞受賞)

山本 緑 他3名, ダイオキシンが脳幹領域の形態と神経分化に及ぼす影響. フォーラム2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2011年10月, 金沢)

武田知起 他4名, ダイオキシンによる胎児ゴナドトロピン低下による分子機構: エピジェネティック制御に対する影響. フォーラム2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2011年10月, 金沢)

田浦順樹 他8名, 2,3,7,8-TCDDおよび2,3,4,7,8-PeCDFが胎児脳下垂体-生殖腺系に及ぼす影響: 用量依存性と性差. フォーラム2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2011年10月, 金沢)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 参考文献

1. Janosék, J., Hilscherová, K., Bláha, L., and Holoubek, I., Environmental xenobiotics and nuclear receptors - interactions, effects and in vitro assessments. *Toxicol. In Vitro*, 20: 18-37 (2006).
2. Mutoh, J., Taketoh, J., Okamura, K., Kagawa, T., Ishida, T., Ishii, Y., and Yamada, H., Fetal pituitary gonadotropin as an initial target of dioxin in its impairment of cholesterol transportation and steroidogenesis in rats. *Endocrinology*, 147: 927-936 (2006).
3. Taketoh, J., Mutoh, J., Takeda, T., Ogishima, T., Takeda, S., Ishii, Y., Ishida, T., and Yamada, H., Suppression of fetal testicular cytochrome P450 17 by maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: a mechanism involving an initial effect on gonadotropin synthesis in the pituitary. *Life Sci.*, 80: 1259-1267 (2007).
4. Takeda, T., Matsumoto, Y., Koga, T., Mutoh, J., Nishimura, Y., Shimazoe, T., Ishii, Y., Ishida, T., and Yamada, H., Maternal exposure to dioxin disrupts gonadotropin production in fetal rats and imprints defects in sexual behavior. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 929: 1091-1099 (2009).
5. Matsumoto, Y., Ishida, T., Takeda, T., Koga, T., Fujii, M., Ishii, Y., Fujimura, Y., Miura, D., Wariishi, H., and Yamada, H., Maternal exposure to dioxin reduces hypothalamic but not pituitary metabolome in fetal rats: a possible mechanism for a fetus-specific reduction in steroidogenesis. *J. Toxicol. Sci.*, 35: 365-373 (2010).
6. Takeda, T., Fujii, M., Taura, J., Ishii, Y., and Yamada, H. Dioxin silences gonadotropin expression in perinatal pups by inducing histone deacetylases: a new insight into the mechanism for the imprinting of sexual immaturity by

- dioxin. *J. Biol. Chem.*, 287: 18440-18450 (2012).
7. Hashimoto, K., Kokubun, S., Itoi, E., and Roach, H. I., Improved quantification of DNA methylation using methylation-sensitive restriction enzymes and real-time PCR. *Epigenetics*, 2: 86-91 (2007).
 8. Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., and Paul, C.L., A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1827-1831 (1992).
 9. 古賀貴之、ダイオキシンによる胎児・脳下垂体-性腺系障害：エネルギー生産系障害を介する機構およびその回復. 博士論文 (九州大学) (2012).
 10. Cheng, H.T., New, L.S., Neo, A.H., Goh, C.W., Browne, E.R., and Chan, E.C., Distribution study of orally administered lipoic acid in rat brain tissues. *Brain Res.*, 1251:80-86 (2009).
 11. Lim, S., Luo, M., Koh, M., Yang, M., binAbdul Kadir, M.N., Tan, J.H., Ye, Z., Wang, W., and Melamed, P., Distinct mechanisms involving diverse histone deacetylases repress expression of the two gonadotropin β -subunits in immature gonadotropes, and their actions are overcome by gonadotropin-releasing hormone. *Mol. Cell Biol.*, 27: 4105-4120 (2007).
 12. Funato, H., Oda, S., Yokofujita, J., Igarashi, H., and Kuroda, M., Fasting and high-fat diet alter histone deacetylase expression in the medial hypothalamus. *PLoS ONE*, 6: e18950 (2011).
 13. Moffett, J.R., Ross, B., Arun, P., Madhavarao, C.N., and Namboodiri, A.M., N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog. Neurobiol.*, 81: 89-131 (2007).