

メチル水銀曝露による小胞体機能破綻を介した 神経障害機構に関する多角的解析

上原 孝(岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・薬効解析学・教授)

研究要旨

メチル水銀曝露による小胞体ストレス応答が脳皮質の一部で惹起されることを見出した。この応答は神経細胞でのみ観察され、細胞死に先んじて観察されることを初めて明らかにした。
キーワード: メチル水銀, 小胞体ストレス, 小胞体ストレス可視化マウス, 脳皮質

研究者協力者

熊谷嘉人 (筑波大学・医学医療系・環境生物学 教授)、藤村成剛 (環境省国立水俣病総合研究センター・基礎研究部 部長)

I 研究目的

本研究は、メチル水銀曝露による神経障害惹起機構における小胞体機能消失の関与を明らかにすることを目的としている。これまでの培養神経細胞を用いた解析から、メチル水銀によって小胞体ストレスが惹起され、アポトーシス様の細胞死が観察されることを報告してきた。しかしながら、メチル水銀の標的に関する知見は乏しいのが現状である。私たちは、メチル水銀が新生タンパク質の成熟に必須な酵素であるタンパク質ジスルフィド異性化酵素 (PDI) の触媒部位Cys残基に結合することで、その機構を消失させることを示してきた。このことは、メチル水銀曝露によって、小胞体内腔に未成熟変性タンパク質が蓄積し、小胞体ストレス応答を介して細胞死が惹起されることを示唆している。そこで、本年度は、実際にメチル水銀曝露による小胞体ストレス応答がマウス脳内のどの部位で惹起されるのかを小胞体ストレス可視化マウスを用いて詳細に解析することを計画した。

II 研究方法

メチル水銀誘発性神経障害における小胞体ストレス応答の寄与を明らかにするために、小胞体ストレス可視化マウスを用いて検討した。使用したマウスは、金沢医科大学・岩脇らが樹立した ER stress activated indicator (ERAI) 遺伝子を発現させたトランスジェニック (TG) マウスである。実験には、動物を生かしたまま発光観察可能な ERAI-luciferase TG マウス、および、蛍光観察可能な ERAI-venus 遺伝子発現 TG マウスを目的ごとに使用した。メチル水銀は飲水に 30 ppm を含ませ、自由摂取で投与した (1.5 mg/kg/day に相当)。本マウスにおいて、時間・部位特異的な小胞体ストレス応答の有無と各種マーカー発現について特異的抗体を用いた免疫組織染色法から検討した。

(倫理面への配慮)

「岡山大学動物実験規則」(平成20年岡大規則第6号)(岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門 岡山大学動物実験委員会)、および、「岡山大学組換えDNA実験安全管理規則」(平成16年岡大規則第24号)に基づいて申請を行い、許可を得た上で実施した。

III 研究結果

まず初めに、メチル水銀によって小胞体ストレスが惹起し、本システムが*in vivo*で機能するかどうか、マウスにメチル水銀を急性曝露（単回皮下投与）させた影響を検討した。ERAI Tg マウスに 25 mg/kg メチル水銀を単回皮下投与したところ、脳、肝臓、筋肉などいくつかの臓器で小胞体ストレス発生を示すシグナルが検出された。30 ppm メチル水銀をマウスに 8 週間飲水投与すると、水俣病で病変が認められる大脳体性感覚皮質において神経細胞死が観察されることが明らかとなっている。そこで、ERAI Tgマウスに30 ppm メチル水銀を自由飲水投与し、小胞体ストレス応答が観察されるか否か検討した。その結果、大脳皮質体性感覚野では ERAI陽性細胞数が投与 3 週目をピークとして一過性に増加することが判明した。また、聴覚野や視覚野などの大脳皮質領域においても ERAI 発現細胞が検出されたが、体性感覚皮質とは異なる時間依存性を示すことがわかった。興味深いことに、体性感覚野における ERAI 発現細胞種の特異性を試みた結果、ほとんどの ERAI シグナルが神経細胞において観察されることが判明した。

IV 考察

メチル水銀を持続的に曝露させたマウスを用いた解析より、小胞体ストレスによって惹起されるIRE1 α -XBP1 経路（ERAIシグナル）が経時的かつ部位特異的に変化することを初めて明らかにした。また、大脳体性感覚皮質におけるアポトーシス様の細胞死のピークに先んじて、ERAIシグナルが観察されたことから、メチル水銀による細胞死誘導経路に小胞体ストレス応答が関与している可能性が示唆された。以上の成果は本年Archives of Toxicology誌に公表した。

V 結論

ERAI シグナルが観察された体性感覚皮質、聴覚皮質および視覚皮質は水俣病において傷害が認められている領域であるため、小胞体ストレス発生部位はヒト水俣病病変と関連することが推定された。

VI 次年度以降の計画

メチル水銀曝露による小胞体ストレス応答、特にヒトで観察される病態（小脳変性）に類似するような濃度を確定することを目標とする。さらに、小胞体ストレスとの因果関係を明らかにするために、シグナル特異的阻害薬を投与し、神経細胞死が減弱されるか否かを検討する。これにより、メチル水銀の時間依存的な小胞体ストレス応答、さらにその部位特異性を*in vivo*レベルで証明することが可能となる。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Hiraoka H, Nomura R, Takasugi N, Akai R, Iwawaki T, Kumagai Y, Fujimura M, Uehara T. Spatiotemporal analysis of the UPR transition induced by methylmercury in the mouse brain. Arch Toxicol. 2021; Jan 16. doi: 10.1007/s00204-021-02982-9. Online ahead of print.

引用文献

- 1) Hiraoka, H., Nakahara, K., Kaneko, Y., Akiyama, S., Okuda, K., Iwawaki, T., Fujimura, M., Kumagai, Y., Takasugi, N., and Uehara, T. Modulation of unfolded protein response by methylmercury. *Biol. Pharm. Bull.* 2017; 40: 1595-1598.

- 2) Makino, K., Okuda, K., Sugino, E., Nishiya, T., Toyama, T., Iwawaki, T., Fujimura, M., Kumagai, Y., and Uehara, T. Correlation between attenuation of protein disulfide isomerase activity through S-mercuration and neurotoxicity induced by methylmercury. *Neurotox. Res.* 2015; 27: 99-105.

Mechanism of neuropathy via dysfunction in the unfolded protein response by methylmercury exposure

Takashi Uehara

*Department of Medicinal Pharmacology, Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences,
Okayama University*

Keywords: Methylmercury; ER stress; Unfolded protein response; ERAI (ER stress-activated indicator) transgenic mice; Brain, Cerebral cortex

Abstract

Methylmercury (MeHg), an environmental toxicant, induces neuronal cell death and injures a specific area of the brain. MeHg-mediated neurotoxicity is believed to be caused by oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress but the mechanism by which those stresses lead to neuronal loss is unclear. We have analyzed the mechanism of neurotoxicity evoked by methylmercury (MeHg) and succeeded in identifying the protein disulfide isomerase (PDI) as a possible target for MeHg. MeHg covalently bound to the Cys residue in the PDI active site (irreversible oxidative modification), leading to PDI dysfunction. This inhibition by MeHg resulted in the neuronal cell death through endoplasmic reticulum stress. Here, by utilizing the ER stress-activated indicator (ERAI) system, we investigated the signaling alterations in the unfolded protein response (UPR) prior to neuronal apoptosis in the mouse brain. In ERAI (ER stress-activated indicator) transgenic mice exposed to MeHg (25 mg/kg, S.C.), the ERAI signal, which indicates activation of the cytoprotective pathway of the UPR, was detected in the brain. Interestingly, detailed *ex vivo* analysis showed that the ERAI signal was localized predominantly in neurons. Time course analysis of MeHg exposure (30 ppm in drinking water) showed that whereas the ERAI signal was gradually attenuated at the late phase after increasing at the early phase, activation of the apoptotic pathway of the UPR was enhanced in proportion to the exposure time. These results suggest that MeHg induces not only ER stress but also neuronal cell death via a UPR shift. UPR modulation could be a therapeutic target for treating neuropathy caused by electrophiles similar to MeHg.