

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・学術研究院医歯薬学域・薬効解析学 教授

研究要旨

今年度は、小胞体ストレス応答可視化マウスを用いて、高濃度メチル水銀飲水投与によって小胞体ストレス応答が速やかに大脳皮質、線条体で惹起されることを明らかにした。本濃度では投与後数週間で生存率低下を認めたが、ヒトでの神経障害が顕著な小脳での明確な変化は認められなかった。

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、大脳皮質

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ストレス応答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、本シグナル系におけるメチル水銀の標的に関する知見はほとんど報告されていない。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。

一方、初年度の検討から、個体生存には影響を及ぼさない低濃度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、大脳皮質体性感覚野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。この成果は 2021 年に Archives of Toxicology 誌に公表した。

この結果を受けて、個体死を伴うような高濃度のメチル水銀曝露による小胞体ストレス応答が小脳でも惹起されるか、また、低濃度と比較して ERAI シグナル発生にどのような違いがあるのかを明らかにすることを目的とした。

II 材料と方法

1. 動物

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。本マウスは、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。

2. メチル水銀投与

メチル水銀は飲水に各濃度含ませ、自由摂取で投与した。

3. 小胞体ストレス応答検出

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

1. まず初めに、高濃度メチル水銀投与の至適濃度を決定するために、種々の濃度のメチル水銀を投与し、投与後 3 週間程度で個体死が起こるか否かを検討した。その結果、雄性マウスでは 50 ppm メチル水銀含有飲水投与によって、3 週目より有意な個体数の減少が観察され、5 週で約半数が死亡した。一方、雌性マウスでは同濃度曝露によって全個体が死に至った。そこで、30 ppm で投与したところ、2 週目以降で個体数減少が観察され、3 週ではほとんどが死滅した。そこで、オスでは 50 ppm, メスでは 30 ppm 投与を高濃度とし、それぞれの期間曝露し、生存している個体を用いて解析に供した。
2. 各マウスの体重推移を測定した。その結果、オスでは投与 4 週目より、メスでは 3 週目より有意な体重減少が観察された。
3. メチル水銀投与によるマウスの神経症状の有無を後肢進展から求めた。その結果、オス・メス共に投与 2 週目より、有意に進展の頻度が増加することが明らかとなった。
4. 次に、各部位における水銀量を測定した。予想通り、高濃度曝露によって投与 1 週目より著明な水銀の蓄積が脳皮質、線条体、小脳で認められた。
5. 小胞体ストレスシグナル (ERAI) 発生に関しては、水俣病で病変が認められる大脳体性感覚野と線条体において強いシグナルが観察された。一方、小脳に関しては、定常状態より ERAI シグナルがすでに観察されており、高濃度のメチル水銀を曝露しても、その

強度は変化しなかった。

IV 考察

メチル水銀を持続的に高濃度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) が低濃度と比較して、強力で早期に、かつ、低濃度時と同部位で変化することを証明した。一方、高濃度曝露によって明らかな神経症状を呈したマウスにおいては、小脳での小胞体ストレス応答の変化は認められなかった。定常状態において、小胞体ストレス応答が観察される部位として、膵臓が知られている。膵臓はタンパク質合成が盛んであり、ミスフォールドしたタンパク質が常に蓄積される傾向にあるため、シャペロン誘導が必須と予想され、そのために小胞体ストレス応答系が利用されていることが示唆されている。マウスの場合、小脳において、なぜ小胞体ストレス応答が惹起されているのかは不明であるが、細胞死との因果関係を明らかにするためには、特異的阻害薬を用いた解析が必要であると思われる。

V 結論

高濃度メチル水銀投与による小胞体ストレスシグナルアッセイ系を構築した。本システムを用いて、高濃度による影響を観察したところ、低濃度よりも早い段階 (投与 1 週後) で強力な小胞体ストレス応答が大脳皮質と線条体で惹起されることが認められた。一方、小脳での明確なシグナルの増強は認められなかった。

VI 次年度の課題

本年度は高濃度メチル水銀曝露による小胞体ストレス応答と、ヒトで病変が観察される小脳に着目して解析を進めた。残念ながら、小脳での変化は認められなかったものの、低濃度メチル水銀曝露で観察された大脳皮質や線条体でのストレス応答はより強力なシグナルとして検出することができた。この成果に関しては、例数を増やし、来年度中にジャーナルに投稿する予定である。

一方で、本年の発表会ならびに書面で指摘されたコメント、低濃度曝露における大脳皮質各部位 (体性感覚野、運動野、視覚野、聴覚野) において特異的に小胞体ストレス応答が観察されている。水俣病患者においてメチル水銀微量曝露によって、数年後から諸症状が現れる例もあるとの指摘を頂いた。そこで、小胞体ストレスが発生している特異的部位に着目し、1) シグナル特異的阻害薬を投与した際の神経細胞死の有無について、2) さらに、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq によって、部位特異的な小胞体ストレス (特に、転写因子 XBP1) 依存的な遺伝子発現について網羅的に検討する。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証明することが可能となる。

本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.* 95(4) 1241-1250, 2021. doi: 10.1007/s00204-021-02982-9.

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.

英文要約 (Abstract)

Mechanism of neuropathy via dysfunction in the unfolded protein response by high concentrations of 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.

On the other hand, high concentrations of MeHg (50 ppm and 30 ppm in drinking water for male and female mice, respectively) significantly evoked potent ERAI signal after 1 day. However, exposure of high concentrations of MeHg did not enhance ERAI signal in cerebellum. As MeHg exposure does not result in the neuropathy in mice cerebellum, we suspect that the unfolded protein response induced by ER stress may not be involved in this event. We will investigate further study to demonstrate the relationship between ER stress and MeHg-induced neuronal death in mice.