

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

主任研究者 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

メチル水銀をマウスに投与した際に観察される小胞体ストレス応答と神経細胞死・神経障害との関係を明らかにするために、小胞体ストレス応答可視化 (ERAI) トランスジェニック (Tg) マウスを用いて解析した。本マウスは小胞体ストレス応答を時空間的にモニタリングできる特徴を有していることから、*in vivo* でのメチル水銀毒性解析を進めたところ、極めて優れたモデル動物であることを確認した。3年間に渡る検討の結果、メチル水銀によって、1) 大脳皮質や線条体で小胞体ストレスが惹起されること、2) 小胞体ストレスセンサータンパク質である IRE1 α や PERK を介した小胞体ストレス応答 (unfolded protein response: UPR) が活性化すること、3) 細胞保護に関わる IRE1 α 経路と細胞死誘導に関わる PERK 経路の活性化はそれぞれ一過的、持続的であること、を見出した。さらに、4) メチル水銀投与による小胞体ストレスは TUNEL 陽性細胞 (アポトーシス様細胞死) の出現に先んじて惹起されること、5) 小胞体ストレスを軽減するケミカルシャペロンである 4-フェニル酪酸 (4-PBA) はメチル水銀誘発性の神経細胞死や神経障害を有意に抑制すること、を証明することができた。

これらの成果から、メチル水銀投与依存的に小胞体ストレスが惹起され、それによって活性化される小胞体ストレス応答シグナルが細胞死を誘導していることが強く示唆された。また、小胞体ストレス軽減薬である 4-PBA がメチル水銀毒性を顕著に抑制したことから、水俣病に対する有効な治療戦略の可能性を示すに至った。

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、神経細胞死、治療戦略

I 研究目的

水俣病の原因物質として同定されたメチル水銀 (methylmercury) は環境中に存在する神経毒性物質である。メチル水銀は火山活動や石炭火力発電などにより大気中に放出された水銀が海洋に沈降した後、微生物による代謝を受けることで生成される。生じたメチル水銀は生物濃縮を受け、マグロなどの大型食用魚類に蓄積する。そのため、これらの魚類を摂取することで我々はメチル水銀に曝露される。

メチル水銀は親電子性を有するため、タンパク質システイン残基チオール基などの求核性の高い部位と結合し (S-水銀化)、分子の機能変化を引き起こすことが知られている。当研究室ではこれまでに、小胞体 (endoplasmic reticulum: ER) 局在タンパク質である protein disulfide isomerase (PDI) が S-水銀化によって酵素活性を消失し、新生タンパク質の成熟が阻害されることで小胞体ストレスが惹起されることを明らかにしている¹。しかし、メチル

水銀による小胞体ストレス惹起と神経細胞死の関連性は未だ明らかになっていない。加えて、*in vivo* におけるメチル水銀誘発性小胞体ストレスの時間依存性や組織・細胞種特異性に関しても未解明のままであった。

小胞体ストレスが発生すると、細胞は protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), activating transcription factor 6 (ATF6), inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) の3つの小胞体ストレスセンサータンパク質を介して小胞体ストレス応答 (unfolded protein response: UPR) を活性化し、恒常性維持を図る (図 1)。軽度の小胞体ストレス下では、UPR は新規タンパク質の翻訳抑制、分子シャペロンや ER-associated degradation

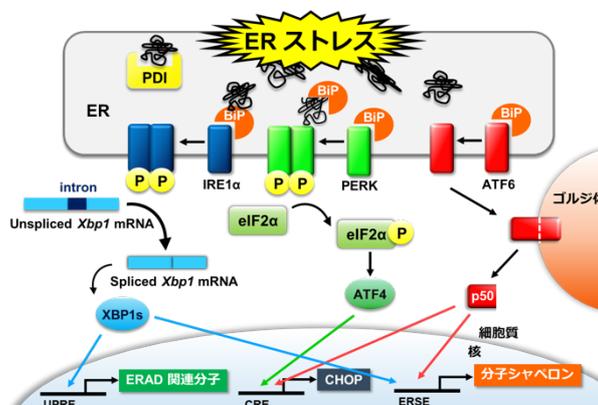


図 1. 小胞体ストレス応答機構

(ERAD) 関連タンパク質の転写促進などを惹起することで、小胞体ストレスを軽減する。一方、持続的あるいは重度の小胞体ストレス下では、C/EBP homologous protein (CHOP) などのアポトーシス促進因子を誘導することで細胞死シグナルを活性化する。

そこで、本研究では マウスにおけるメチル水銀誘導性神経細胞死における小胞体ストレス応答の関与を明らかにし、その成果を基にした治療戦略の可能性を探ることを目的とした。

II 材料と方法

1. 実験動物

本研究では 岩脇隆夫教授 (金沢医科大学 総合医学研究所) よりご恵与頂いた雄性 ER stress-activated indicator (ERAI)-Venus /LUC Tg マウスを使用した^{2,3}。本マウスは C57BL/6 を遺伝的バックグラウンドとしている。

ERAI-LUC Tg マウスは金沢医科大学総合医学研究所の動物実験施設においてコンベンショナル環境下、23 \pm 3 $^{\circ}$ C、湿度 50 \pm 10%、明暗周期 12 時間 (午前 8 時～午後 8 時まで照明下) で飼育した。飼育および実験期間中、食餌や飲水は自由に行わせた。本研究は、金沢医科大学の動物実験委員会より承認を得ており (承認番号: 2017-51)、その規定に基づき実施した。

ERAI-Venus Tg マウスは国立水俣病総合研究センター動物実験施設において飼育した。飼育条件は、コンベンショナル条件下、室温 23 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度 50 \pm 5%、明暗周期 12 時間 (午前 6 時～午後 6 時まで照明下) である。飼育および実験期間中の食餌や飲水は自由に行わせた。ERAI-Venus Tg マウスを用いた動物実験は国立水俣病総合研究センター動物実験委員会より承認を得ており (承認番号: 310207 及び 030423)、当センターの規定に基づき実施した。

2. ジェノタイプピング

雄性 ERAI-Venus/LUC Tg マウスと雌性 C57BL6N/Jc1 マウス (9 週齢、日本クレア株式会社より購入) を交配させ、妊娠・出産させた。得られた雄性マウス (3 週齢) の尾の先端を

1 mm 程切断し、採取した。採取した尾組織から DNA を抽出し、PCR 法により ERAI-Venus/LUC が発現した雄性マウスを選定した。

3. 薬物投与

1) メチル水銀単回皮下投与

塩化メチル水銀（東京化成, M0589）100 mg を DMSO 200 μ L で溶解した後（500 mg/mL），生理食塩水で 100 倍希釈し，10 週齢の雄性 ERAI-LUC Tg マウスに終濃度 25 mg/kg となるように皮下投与した。コントロール群には，メチル水銀と等量の DMSO を懸濁した生理食塩水を投与した（DMSO のマウス経皮吸収 LD₅₀ の 0.5 %相当）。

2) メチル水銀反復皮下投与

塩化メチル水銀（東京化成, M0589）100 mg を DMSO 200 μ L で溶解した後（500 mg/mL），生理食塩水で 500 倍希釈し，10 週齢の雄性 ERAI-LUC Tg マウスに終濃度 10 mg/kg/day となるように皮下投与した。コントロール群には，メチル水銀と等量の DMSO を懸濁した生理食塩水を投与した（DMSO のマウス経皮吸収 LD₅₀ の 0.04 %相当）。

3) Tunicamycin の単回腹腔内投与

Tunicamycin（Sigma Aldrich, T7765）5 mg を DMSO 1 mL で溶解した後（5 mg/mL），生理食塩水で 100 倍希釈し，10 週齢の雄性 ERAI-LUC Tg マウスに終濃度 0.5 mg/kg となるように腹腔内投与した。

4) メチル水銀飲水投与

塩化メチル水銀と等モル量の還元型 GSH を milli Q 水に溶解させ，終濃度 30 あるいは 50 ppm のメチル水銀含有飲水を調製した。これを給水ボトルに入れ，7 週齢の雄性 ERAI-Venus Tg マウスに自由摂取させた。コントロール群には，メチル水銀投与群と等量の還元型 GSH を milli Q 水に溶解させたものを投与した。

5) 4-Phenylbutyric acid（4-PBA）の腹腔内投与

4-PBA（東京化成, P0643）120 mg を生理食塩水 10 mL に添加し，4-PBA と同モル量の水酸化ナトリウムを加え溶解させた（pH 7.4）。7 週齢の雄性 ERAI-Venus Tg マウスに終濃度 120 mg/kg/day となるように腹腔内投与を行った。コントロール群には生理食塩水を投与した。

4. 後肢伸長反応の観察

メチル水銀を飲水投与したマウスを飼育ケージから取り出し，マウスの尾を持ち上げ 10 秒間吊るした。週に 1 度，マウスを吊るした際の後肢の伸展状態を観察し，その所見から以下に示すスコアを定義することでメチル水銀曝露による神経障害を評価した。

後肢伸長反応の所見スコア

Score	後肢の状態
3	後肢が自由に動いている（異常は見られない）
2	後肢が自由に動いているが，その頻度が減少する
1	後肢の運動がほとんど見られない
0	後肢が完全に交差する（後肢交叉）

5. 組織中総水銀量の測定

メチル水銀を飲水投与した ERAI-Venus/LUC Tg マウスをイソフルラン麻酔下で開胸し、心採血により屠殺した。生理食塩水で十分に灌流した後、脳を摘出した。脳組織に関しては大脳皮質、小脳、海馬、線条体に部位分けを行った。各組織に対して組織重量の 19 倍量となる 5N 水酸化ナトリウム (NaOH) を添加し、70°C に設定したアルミブロック恒温槽で 30 分間静置した。溶解した組織を 5N 塩酸 (HCl) で中和し、MA-2000 (日本インスツルメンツ) を用いた加熱気化法により総水銀量を測定した。この時、既知濃度の水銀含有溶液から得られた測定値を基に検量線を作成し、未知試料の水銀量を算出した。

6. *In vivo* および *ex vivo* イメージング

発光基質 D-Luciferin (住商ファーマインターナショナル, XLF-1) 1 g を生理食塩水 67 mL で溶解した後 (15 mg/mL), ERAI-LUC Tg マウスに終濃度 0.15 mg/kg となるように腹腔内投与した。投与 5 分後、イソフルランを満たした麻酔チャンバーにマウスを移し、さらに 5 分間静置した。D-Luciferin 投与から合計 10 分経過した後、IVIS Lumina XRMS Series III (Perkin Elmer) を用いて解析した。

麻酔下での全身イメージング後、マウスを開胸し、心採血により屠殺した。その後、脳、心臓、肝臓、腎臓、膵臓および筋肉などの組織を外科的に取り出した。取り出した臓器は PBS で軽く wash した後、PBS で終濃度 0.3 mg/mL に調製した D-Luciferin 溶液に浸し、IVIS Lumina XRMS Series III を用いて解析した。*In vivo* および *ex vivo* イメージングのどちらにおいても 1 サンプル当たり 60 秒間測定し、累積した発光シグナルを検出した。

7. 免疫組織染色

1) パラフィン包埋脳切片の作製

メチル水銀を飲水投与した ERAI-Venus Tg マウスを解剖し、脳を摘出した。摘出後、剃刀を用いて脳を右脳と左脳に分け、左脳を 4% パラホルムアルデヒド (PFA) 溶液に浸し固定化を行った。その後、パラフィン包埋脳組織サンプルに関しては、株式会社バイオ病理研究所に作製を依頼した。回転式マイクロトーム (Leica) を用い、パラフィン包埋脳組織から 5 μ m のコロナル脳切片を作製した。

2) 組織染色

1) で作製した脳切片を 100% キシレンに浸し (5 分間 \times 2 回)、脱パラフィン処理を行った。その後、100%, 90%, 80%, 70% エタノールにそれぞれ 5 分間浸し脱キシレン処理を行った。脱キシレン処理を行った切片を流水で 10 分間洗浄した後、milliQ 水で親水化処理を行った。その後、調製した pH 6.0 citrate buffer に浸し、600W の電子レンジで 20 分間煮沸することで抗原賦活化処理を行った。30 分間室温にて放冷した後、PBS-Tween 20 (0.1 v/v%) に 10 分間浸すことで浸透化処理を行った。PBS で 3 回洗浄した後、Blocking solution 150 μ L を切片に添加した。室温で 1 時間静置した後、PBS で 3 回洗浄した。次に、Primary antibody solution 150 μ L を切片に添加し、室温で 30 分間静置した後 PBS で 3 回洗浄した。続いて、Secondary antibody solution 150 μ L を切片に添加し、室温で 10 分間静置した後 PBS で 3 回洗浄した。その後、Fluorescein Avidin DCS solution 150 μ L を切片に添加し、遮光条件下、室温で 5 分間静置した。PBS で 3 回洗浄した後、ProLongTM Gold antifade reagent with DAPI で

切片の封入を行った。観察領域は Mouse Brain Atlas を参考とし、蛍光顕微鏡 ECLIPSE Ti (Nikon) を用いて大脳皮質体性感覚領域の深層部位および線条体についてランダムに撮影した。撮影した画像は Image J を用いて定量解析を行った。

8. TUNEL 染色

アポトーシスの過程で生じる断片化 DNA を特異的に標識し、可視化する TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 染色を用い、アポトーシス細胞の検出を行った。TUNEL 染色には *In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red を使用し、製品のプロトコルに従って実施した。まず、ERAI-Venus Tg マウスのパラフィン包埋脳切片を脱パラフィン、脱キシレン、親水化、抗原賦活化、浸透化、ブロッキング処理を行った。その後、TUNEL 反応液 50 μ L を添加し、切片の上にパラフィルムを重ね、37°C の湿式遮光チャンバー内で 1 時間静置した。PBS で 3 回洗浄した後、ProLongTM Gold antifade reagent with DAPI で切片の封入を行った。

9. 統計解析

定量値は平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で示した。統計解析には GraphPad Prism 9 (GraphPad Software) を使用した。多重検定の統計的な有意差は One-way ANOVA または Two-way ANOVA により検定し、事後検定として Dunnett 法, Tukey 法または Bonferroni 法を用いた。また、スコアを用いた評価における統計的な有意差は Mann-Whitney 法により検定した。統計的な有意差は * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ で示した。

(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), 「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), 「金沢医科大学動物実験指針(平成 23 年 1 月)」及び「国立水俣病総合研究センター動物実験規程」(令和 3 年国水研発第 2107011 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. メチル水銀の単回皮下投与による小胞体ストレス惹起の確認

解析には、XBP1 と Luciferase (LUC) または改変型 Green fluorescence protein (GFP) である Venus インジケーターとの融合タンパク質をコードする ER stress-activated indicator (ERAI) 遺伝子を全身に発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを用いた(図 2)。定

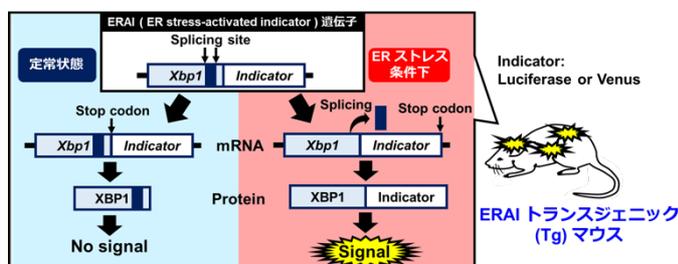


図 2. 小胞体ストレスを検出可能な ERAI Tg マウス

常状態では *Xbp1* mRNA のスプライシングが生じないため、ERAI 遺伝子はイントロンを含む不活性化状態で発現し、速やかに分解される。一方、小胞体ストレス下では *Xbp1* mRNA

のスプライシングが生じ、フレームシフトが発生した結果、インジケーターとの融合タンパク質が発現する。このインジケーターのシグナルを検出することで生体内小胞体ストレス惹起を観察することができる^{2,3}。本マウスを用いて、メチル水銀投与による小胞体ストレス発生部位および IRE1 α -XBP1 経路の活性化状態を評価した。

まず、小胞体ストレスの生じた組織の予想を立てるため、インジケーターとして Luciferase を組み込んだ ERAI-LUC Tg マウスを用いた。10 週齢の雄性 ERAI-LUC Tg マウスに 25 mg/kg のメチル水銀を単回皮下投与し、ERAI シグナルの発生の有無を生存下で検討した。メチル水銀の投与 24 時間後に基質である D-Luciferin を投与し、IVIS イメージングシステムによって発光シグナルを検出した (図 3)。その結果、メチル水銀投与により、口辺部、胸部、腹部、脚部において ERAI シグナルの発生および増加が認められた。このことから、ERAI-LUC Tg マウスを用いることでメチル水銀誘導性小胞体ストレスシグナルが検出可能であることが示唆された。

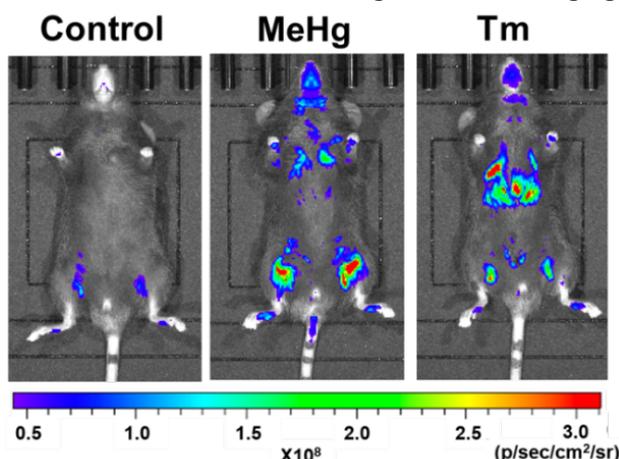


図 3. マウス全身でのメチル水銀誘発性小胞体ストレス Tm : ツニカマイシン小胞体ストレス誘導薬)

2. メチル水銀誘発性 ERAI シグナル発生組織の特定

1 において解析したマウスをイソフルラン麻酔下で開胸し、心採血によって屠殺した。その後、脳、心臓、肝臓、腎臓、膵臓、および骨格筋などの組織を摘出し、D-Luciferin 溶液に浸した状態でイメージングを行った。その結果、脳、心臓、肝臓、および腎臓において ERAI シグナルの増加が認められた (図 4)。また、それぞれの増加率は 1.3 倍、1.2 倍、3.6 倍、および 1.4 倍であった。一方、膵臓や骨格筋などの組織ではコントロール群においても顕著な ERAI シグナルが認められた。これらの結果から、メチル水銀誘導性小胞体ストレスには組織特異性があることが示唆された。

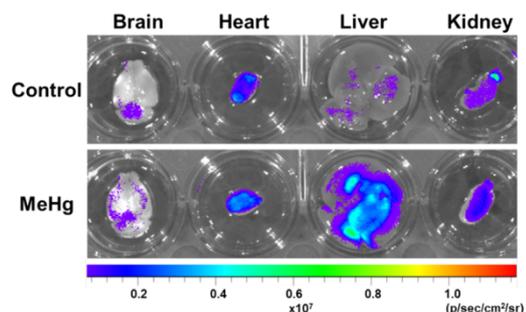


図 4. メチル水銀による小胞体ストレス発生臓器

3. メチル水銀飲水投与による神経細胞死誘導の確認

メチル水銀曝露に対して本実験で使用する ERAI Tg マウスが野生型マウス (WT マウス) と同様の応答性を示すのか確認した。比較的低濃度の 30 ppm メチル水銀含有飲水を投与開始日から自由摂取させ、コントロール群には GSH 含有飲水を投与した。まず初めに、マウスの生存率について解析した結果、ERAI Tg マウスと WT マウスの生存率変化に有意な差は認められなかった。さらに、ERAI Tg マウスと WT マウスの体重変化について検討した。その結果、両マウスともにメチル水銀投与開始から 4 週間後に有意な体重減少が観察されたが、ERAI Tg マウスと WT マウスとの間で差は認められなかった。

続いて、メチル水銀飲水投与による神経細胞死に関して調べた。ERAI-Venus Tg マウスの脳切片に対し、神経細胞マーカーである Neuronal nuclei (NeuN) に対する特異的抗体を用いて免疫組織染色を行った。大脳皮質体性感覚野を観察した結果、6週間のメチル水銀曝露群と対照群との間で NeuN 陽性細胞数に差は認められなかった。

次に、TUNEL 染色を行い、メチル水銀曝露によってアポトーシスを起こしている細胞が存在するの否か検討した。その結果、投与3週目から TUNEL 陽性細胞が出現し、投与6週目では有意な増加が認められた(図5)。これらの結果から、30 ppm メチル水銀飲水投与により、投与期間後期において大脳皮質体性感覚野でアポトーシス惹起細胞が出現することが明らかとなった。

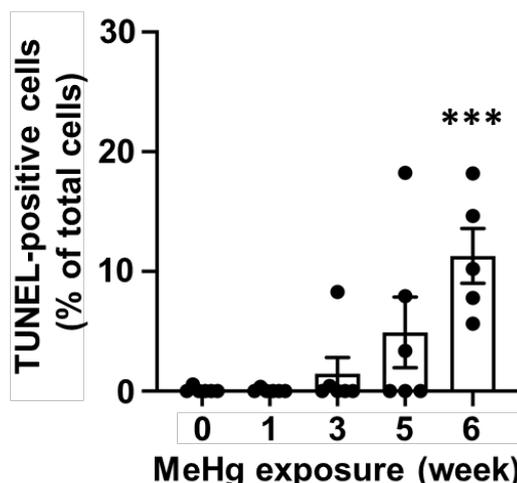


図5. 30 ppm メチル水銀による神経細胞死惹起

4. メチル水銀飲水投与による組織内蓄積水銀量の確認

本投与条件下において ERAI-Venus Tg マウスの組織中に蓄積した水銀量を測定した。30 ppm メチル水銀を飲水投与した ERAI-Venus Tg マウスから大脳皮質、心臓、肝臓、および腎臓を摘出し、MA-2000 によって総水銀量を定量した。その結果、大脳皮質、心臓、および肝臓では投与6週目まで時間依存的に蓄積水銀量が増加していることが判明した(図6)。また、腎臓においては投与1週目から蓄積量がピークに達することが明らかとなった。これらの結果から、臓器によって蓄積水銀量が大きく異なることが判明した。

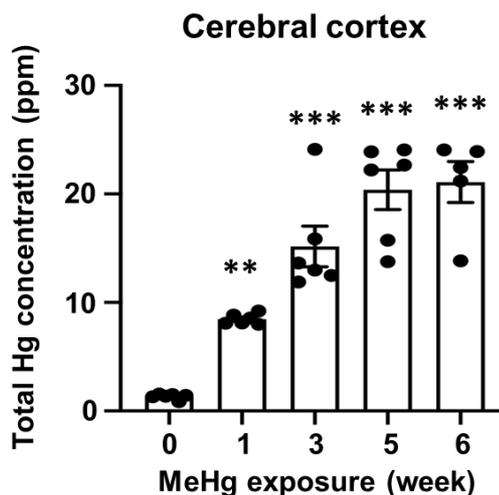


図6. メチル水銀投与による大脳皮質蓄積水銀量

5. メチル水銀飲水投与モデルにおける ERAI シグナルの検出

1) 大脳皮質体性感覚野における ERAI シグナルの検出

これまでの細胞レベルおよび動物レベルの研究から、メチル水銀によって小胞体ストレスが誘導されることが明らかになってきているものの、細胞死に至るレベルに達すると小胞体ストレスが検出されるのか、小胞

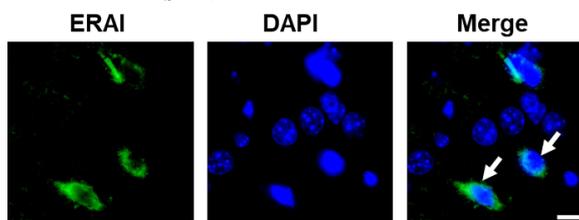


図7. メチル水銀投与3週目における ERAI シグナル産生 ERAI:小胞体ストレスマーカー

体ストレスが惹起された後、細胞死に至るのかは解明されていない。本投与条件下では6週間、30 ppm メチル水銀を投与することで脳内においてアポトーシスが認められることが判明した。そこで、本投与条件下において、メチル水銀誘導性小胞体ストレスがどの時点から発生するのか検討した。30 ppm メチル水銀を飲水投与させた ERAI-Venus Tg マウスの脳切片に対して、Venus を認識する GFP 抗体を用いた免疫組織染色を行い、増強された ERAI シグナルを観察した。メチル水銀投与3週目の大脳皮質体性感覚野を観察した結果、細胞質において ERAI シグナルが認められた (図7)。そこで詳細な ERAI 陽性細胞数の経時変化を解析した。その結果、ERAI 陽性細胞数は投与3週目をピークとして一過性に増加した後、投与6週目にかけて減少することが明らかとなった (図8)。このことから、30 ppm メチル水銀の飲水投与により大脳皮質体性感覚野において小胞体ストレスが発生していること、および IRE1 α -XBP1 経路が一過性に活性化していることが判明した。

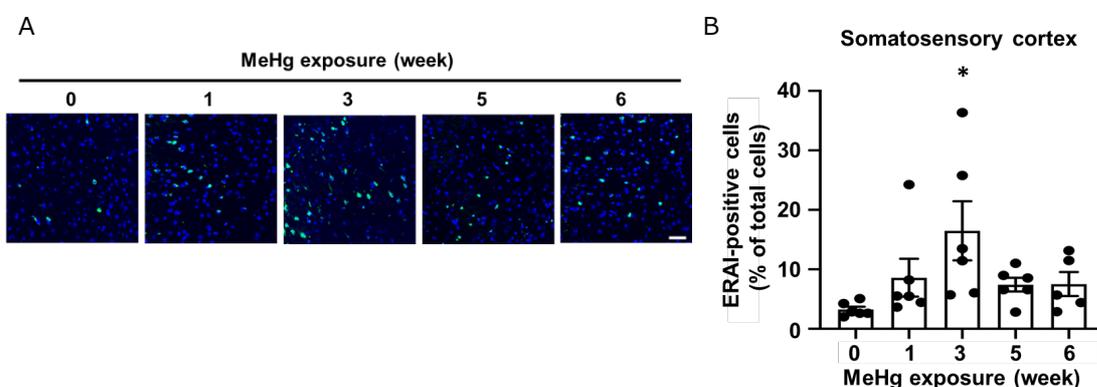


図8. メチル水銀投与による ERAI シグナルの経時変化 A:免疫組織染色像, B:定量化図

2) 大脳皮質領域における ERAI シグナルの検出

水俣病患者の脳内では、小脳や大脳皮質 (体性感覚野, 視覚野, 運動野, 聴覚野) が障害されることが報告されている。そこで、次に体性感覚野以外の大脳皮質領域 (視覚野,

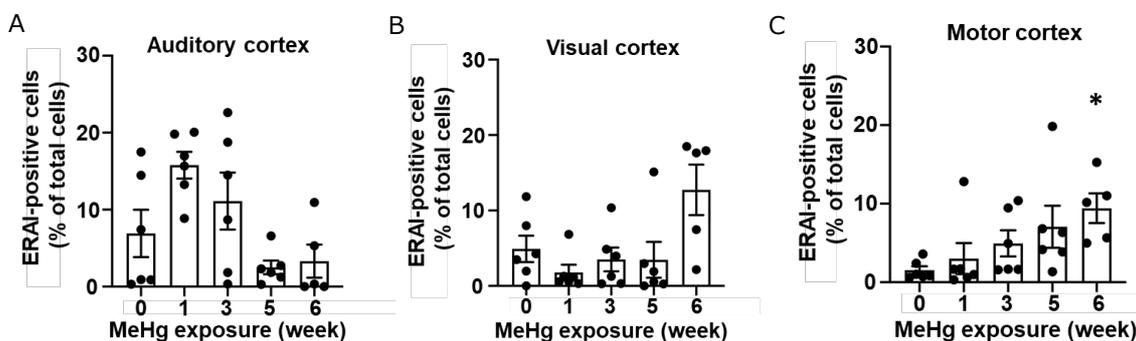


図9. メチル水銀による大脳皮質各部位における ERAI シグナル変化 A: 聴覚野, B: 視覚野, C: 運動野
聴覚野, 運動野) における ERAI シグナル発生を検討した。30 ppm メチル水銀を飲水投与した ERAI-Venus Tg マウスの脳切片を用いて、免疫組織化学的手法により ERAI シグナルを増強し、各脳内領域におけるメチル水銀誘導性小胞体ストレスの発生を確認した。各観察領

域は Mouse Brain Atlas を参考にして設定した。その結果、聴覚野では ERAI 陽性細胞数が投与 1 週目をピークとして一過性に増加した後、投与 6 週目にかけて基底レベル以下まで減少傾向を示すことが判明した (図 9A)。一方、視覚野では投与 6 週目のみで ERAI 陽性細胞数の増加傾向が認められた (図 9B)。また、運動野では投与 6 週目まで ERAI 陽性細胞数の時間依存的な増加傾向が認められた (図 9C)。

以上より、メチル水銀によって障害されることが報告されている大脳皮質体性感覚野、聴覚野、視覚野、運動野において小胞体ストレスが発生していることが明らかとなった。また、メチル水銀誘導性小胞体ストレスに対する感受性は領域によって異なることが示唆された。

3) 大脳皮質以外の脳内領域における ERAI シグナルの検出

前述の通り、水俣病患者では小脳および大脳皮質が障害されることが報告されている。一方で、メチル水銀を曝露したマウスでは大脳皮質と線条体が障害されることが報告されている。このように、ヒトとマウスではメチル水銀による障害部位が一部異なることが知られている。そこで、次に線条体および小脳における ERAI シグナル発生を検討した。その結果、メチル水銀の飲水投与によって線条体における ERAI 陽性細胞数は投与 6 週目まで時間依存的な増加傾向を示すことが判明した

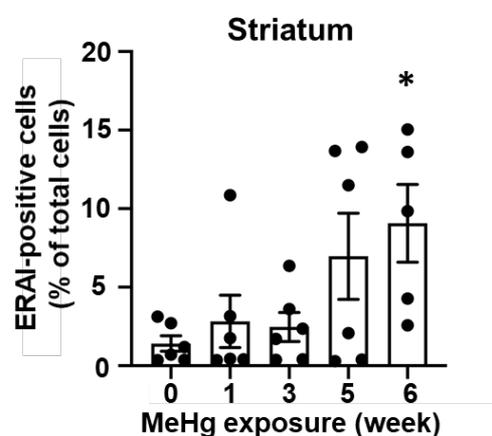


図 10. 線条体における ERAI シグナル変化

(図 10)。このことから、大脳皮質と同様にマウスにおけるメチル水銀障害部位である線条体においても小胞体ストレスが発生していることが判明した。

一方、小脳ではメチル水銀投与の有無に関わらず、プルキンエ細胞および顆粒細胞では定常状態でも ERAI シグナルが観察された (図 11)。このことから、小脳では生理条件下で既に小胞体ストレスが発生していることが判明した。また、メチル水銀曝露によって ERAI シグナルの減弱が認められなかった。

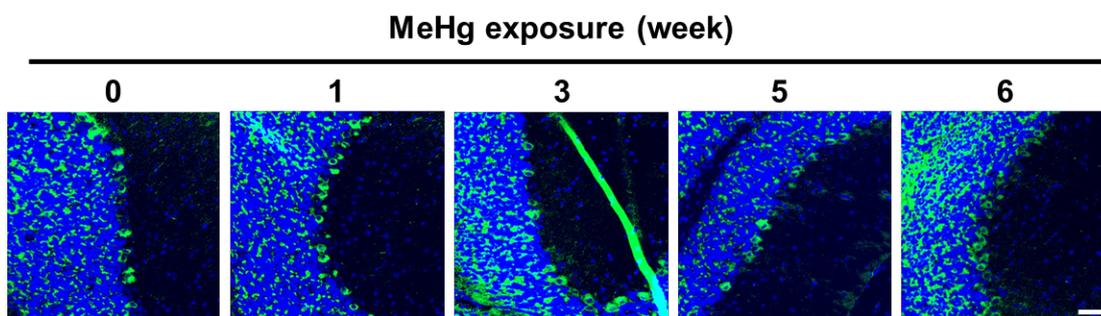


図 11. メチル水銀投与マウスにおける小脳での ERAI シグナル変化 緑: ERAI シグナル, 青: 核

4) ERAI シグナル陽性細胞種の特定

ここまでの検討から、大脳皮質や線条体におけるメチル水銀障害部位において小胞体ストレス発生が認められることが明らかとなった。次に、メチル水銀曝露によって小胞体ストレスが惹起された細胞種の特異性を試みた。ERAI-Venus Tg マウスの脳切片に対し、神経細胞、アストロサイトおよびミクログリアをそれぞれ特異的に認識する抗体を用いて免疫組織染色を行い、ERAI シグナルを示す細胞種を調べた。神経細胞マーカーである NeuN を用いた検討には、最も多くの ERAI 陽性細胞数を示した投与 3 週目の脳切片を、アストロサイトマーカーである GFAP やミクログリアマーカーである Iba 1 を用いた研究には投与 6 週目の脳切片を、それぞれ使用した。その結果、ERAI 陽性細胞は NeuN 陽性細胞と最も高い一致を示すことが判明した (図 12A, D)。また、弱いながら Iba1 陽性細胞にも ERAI シグナルを示す細胞が存在することがわかった (図 12C, D)。以上より、メチル水銀誘導性小胞体ストレスのほとんどは神経細胞において生じていることが明らかとなった。

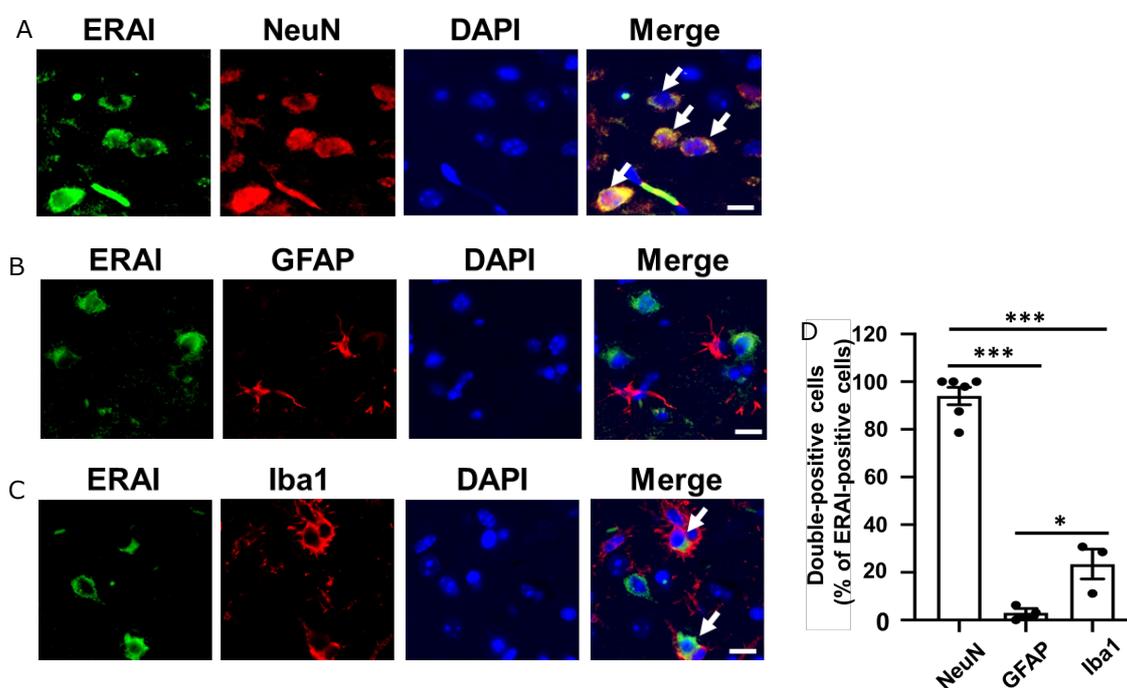


図 12. メチル水銀投誘発性 ERAI シグナルの局在

NeuN : 神経細胞マーカー, GFAP : アストロサイトマーカー, Iba1 : ミクログリアマーカー

6. メチル水銀飲水投与による UPR 各経路の活性化の有無

1) IRE1 α -XBP1 経路の活性化の検討

ここまでの検討から、メチル水銀の飲水投与によって脳内領域の主に神経細胞において、細胞特異的に小胞体ストレスが惹起されることが示唆された。そこで、次にメチル水銀誘導性小胞体ストレスによる UPR の活性化について検討した。まず、ERAI シグナルの発生を担う IRE1 α -XBP1 経路の活性化について解析するために、リン酸化 IRE1 α レベルの経時変化を確認した。30 ppm メチル水銀を飲水投与した ERAI-Venus Tg マウスの脳切片に対して、リン酸化 IRE1 α 抗体を用いた免疫組織染色を行い、検討した。その結果、大脳皮

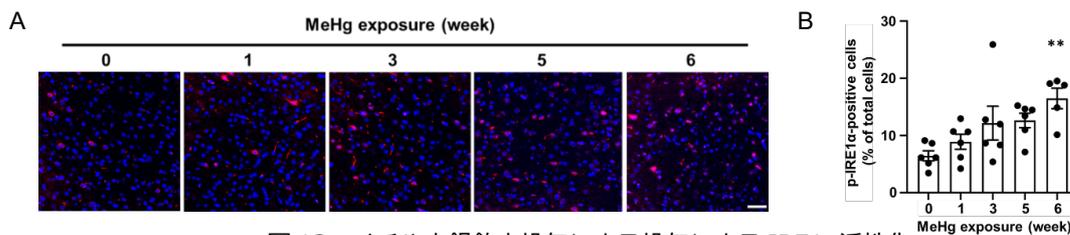


図 13. メチル水銀飲水投与による投与による IRE1α活性化
A:リン酸化 IRE1α抗体による染色像, B:経時変化定量図

質体性感覚野におけるリン酸化 IRE1α 陽性細胞数は投与 6 週目まで時間依存的な増加傾向を示すことが判明した (図 13)。

2) PERK 経路の活性化の検討

続いて、メチル水銀飲水投与による PERK 経路の活性化について検討した。まず、大脳皮質体性感覚野におけるリン酸化 PERK レベルの経時変化について解析した。30 ppm メチル水銀を飲水投与した ERAI-Venus Tg マウスの脳切片に対して、リン酸化 PERK 抗体を用いた免疫組織染色を行った結果、リン酸化 PERK 陽性細胞数は投与 6 週目まで時間依存的な増加傾向を示すことが判明した (図 14A)。また、PERK 経路および ATF6 経路の下流に位置

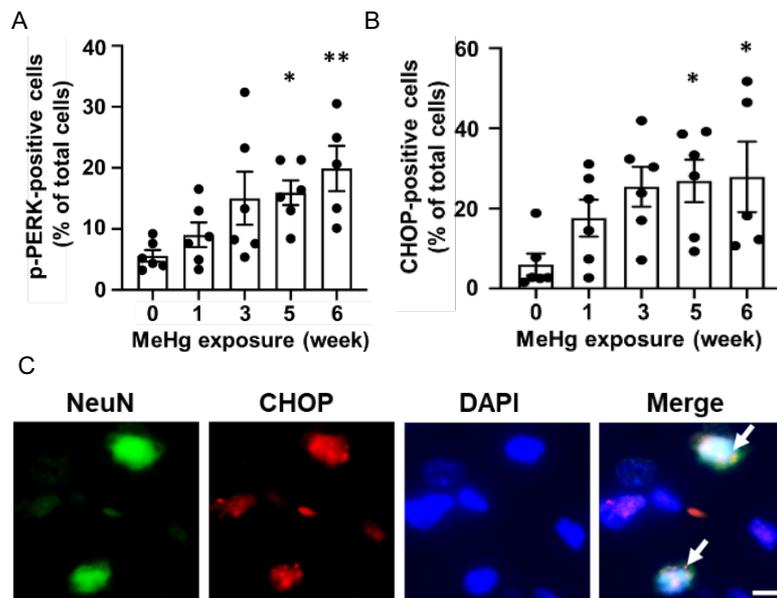


図 14. メチル水銀による PERK 経路活性化
A:リン酸化 PERK レベル変化, B: CHOP 発現変化, C: 神経細胞におけるメチル水銀誘導性 CHOP 発現

する CHOP の経時的発現変化を解析した。CHOP 抗体を用いた免疫組織染色の結果、リン酸化 PERK 同様、CHOP 陽性細胞数も投与 6 週目まで時間依存的な増加傾向を示した (図 14B)。加えて、投与 6 週目のサンプルを用いて、CHOP と神経細胞マーカー NeuN との 2 重染色を試みた結果、CHOP 陽性細胞と NeuN 陽性細胞の一致が認められた (図 14C)。

以上より、大脳皮質体性感覚野の神経細胞ではメチル水銀投与によって PERK 経路が活性化し、活性化された細胞は時間依存的に増加することが判明した。

3) 小胞体ストレス性アポトーシスとメチル水銀誘導性神経細胞死との関連

ここまでの検討から、ERAI-Venus Tg マウスの大脳皮質体性感覚野の神経細胞では小胞体ストレスの発生とそれに続く小胞体ストレス応答の活性化が認められることが判明し

た. 次に, メチル水銀誘導性神経細胞死が小胞体ストレス発生と関連するの否か検討した. まず, ERAI シグナルと TUNEL シグナルを示す細胞が一致するの否か検討した. メチル水銀投与 6 週目の ERAI-Venus Tg マウスの脳切片を用いて TUNEL 染色を行った後, 免疫組織染色によって ERAI シグナルを増強した. その結果, ERAI 陽性細胞と TUNEL 陽性細胞の一致はほとんど認められなかった (図 15A). 図 8B で示したように, メチル水銀投与 6 週目のサンプルでは IRE1 α -XBP1 経路の活性化が既に減弱している可能性が考えられた. そこで, TUNEL 陽性細胞における小胞体ストレス発生を確認するために, 投与 6 週目に顕著なシグナル増加が認められた CHOP と TUNEL シグナルとの共局在を検討した. その結果, CHOP 陽性細胞と TUNEL 陽性細胞はほとんど一致することが明らかとなった (図 15B). また, ERAI 陽性細胞と CHOP 陽性細胞が一致することを確認するために, 投与 3 週目の脳切片を用いて 2 重染色を行った結果, ERAI 陽性細胞と CHOP 陽性細胞はほぼ一致することが確認できた (図 15C). 以上の結果より, メチル水銀によってアポトーシスが誘導された細胞では小胞体ストレスが生じていることが示唆された.

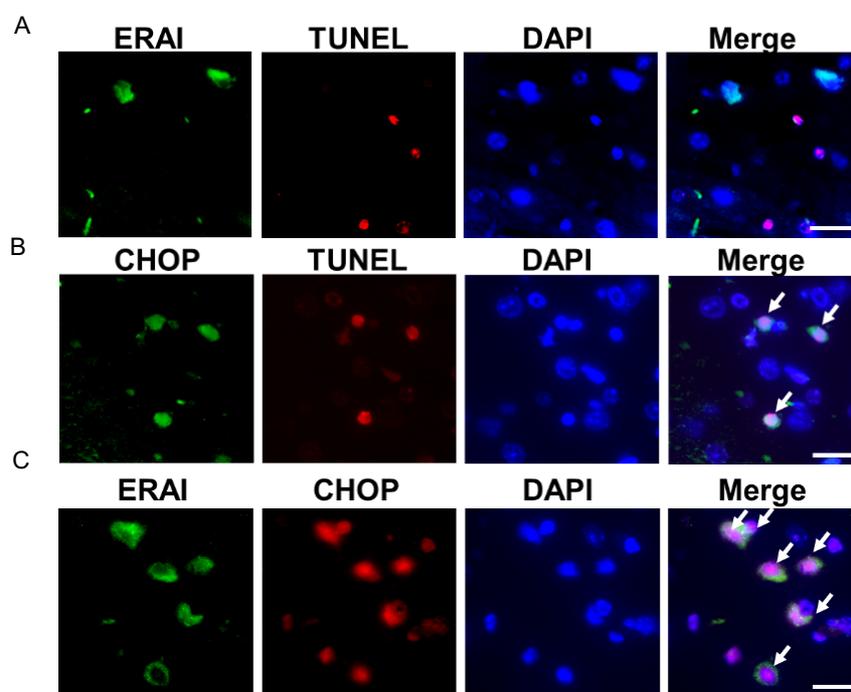


図 15. メチル水銀による TUNEL 陽性細胞における小胞体ストレスの検出
 ERAI : 小胞体シグナル, CHOP : UPR マーカー, TUNEL : アポトーシスマーカー

7. 小胞体ストレス阻害薬投与によるメチル水銀誘導性神経細胞死への影響

これまでに得られた結果から, 比較的低濃度である 30 ppm メチル水銀の飲水投与により小胞体ストレスが惹起され, UPR (IRE1 α -XBP1 経路, PERK 経路) の活性変化を介してアポトーシスが誘導されることが示唆された. そこで, メチル水銀曝露による小胞体ストレス惹起および UPR の活性変化がメチル水銀誘導性神経細胞死に寄与するの否かを検証するために, メチル水銀を飲水投与した ERAI-Venus Tg マウスに小胞体ストレス発生阻害薬を投与し, その効果を薬理的に検討した. 阻害薬として, ケミカルシャペロンの一種で

ある 4-PBA を使用した (図 16). ケミカルシャペロンとは, タンパク質高次構造の形成や安定化に関わる低分子化合物の総称である. その中でも 4-PBA はタンパク質凝集を抑制することで小胞体ストレスを軽減させる効果がある. また, 神経細胞において小胞体ストレスを惹起することが報告されているロテノンを投与したマウスに 4-PBA を腹腔内投与することで神経細胞死を抑制することも報告されている. メチル水銀曝露による小胞体ストレスを細胞レベルで抑制することが近年明らかになっているが, 動物レベルで検討した事例はこれまでにない. そこで, 比較的高濃度の 50 ppm メチル水銀を飲水投与したマウスに 4-PBA を投与した際の小胞体ストレス惹起, UPR の活性変化およびメチル水銀誘導性神経細胞死に対する効果について検討した.

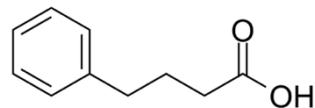


図 16. 4-PBA の構造

1) 4-PBA 投与による組織内蓄積水銀量への影響

実験のタイムコースは最大投与期間を 5 週間とした. 50 ppm メチル水銀含有飲水を投与開始日から 5 週間自由摂取させ, 阻害薬投与群には 120 mg/kg/day の 4-PBA を腹腔内投与した. 対照群には生理食塩水を腹腔内投与した. まず初めに, 4-PBA 投与によって組織内蓄積水銀量に変化が見られるか否か解析を行った. 本投与条件下において, ERAI-Venus Tg マウスの大脳皮質および線条体に蓄積した水銀量を MA-2000 により測定した. その結果, コントロール群および 4-PBA 投与群の間で蓄積水銀量に有意な差は認められなかった (図 17B, C).

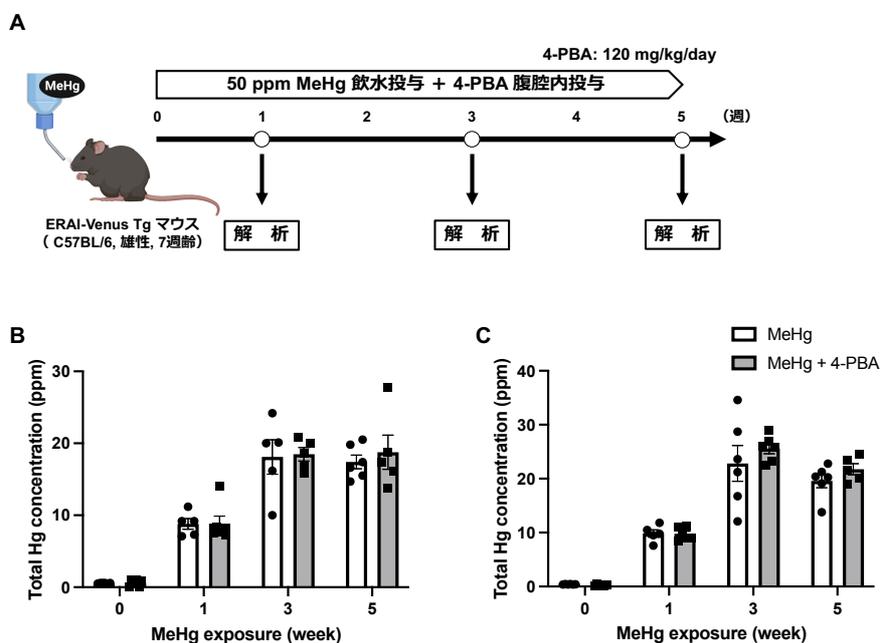


図 17. 4-PBA 投与による組織内水銀蓄積量の変化

A: メチル水銀飲水投与および 4-PBA 腹腔内投与のタイムコース, B: 大脳皮質における水銀蓄積量変化, C)線条体における水銀蓄積量変化

2) メチル水銀誘導性小胞体ストレスに対する 4-PBA の効果

続いて、4-PBA がマウス脳内においてメチル水銀誘導性小胞体ストレスを抑制するか否か検討した。50 ppm メチル水銀を飲水投与させた ERAI-Venus Tg マウスの脳切片を用いて、GFP 抗体を用いた免疫組織染色により ERAI シグナルを検出した。その結果、大脳皮質体性感覚野および線条体において、メチル水銀曝露により増加した ERAI 陽性細胞数が 4-PBA を投与することによってどちらも有意に減少することが明らかとなった (図 18B, D)。これらの結果から、4-PBA はマウス脳内においてメチル水銀曝露による小胞体ストレス惹起を抑制することが示唆された。

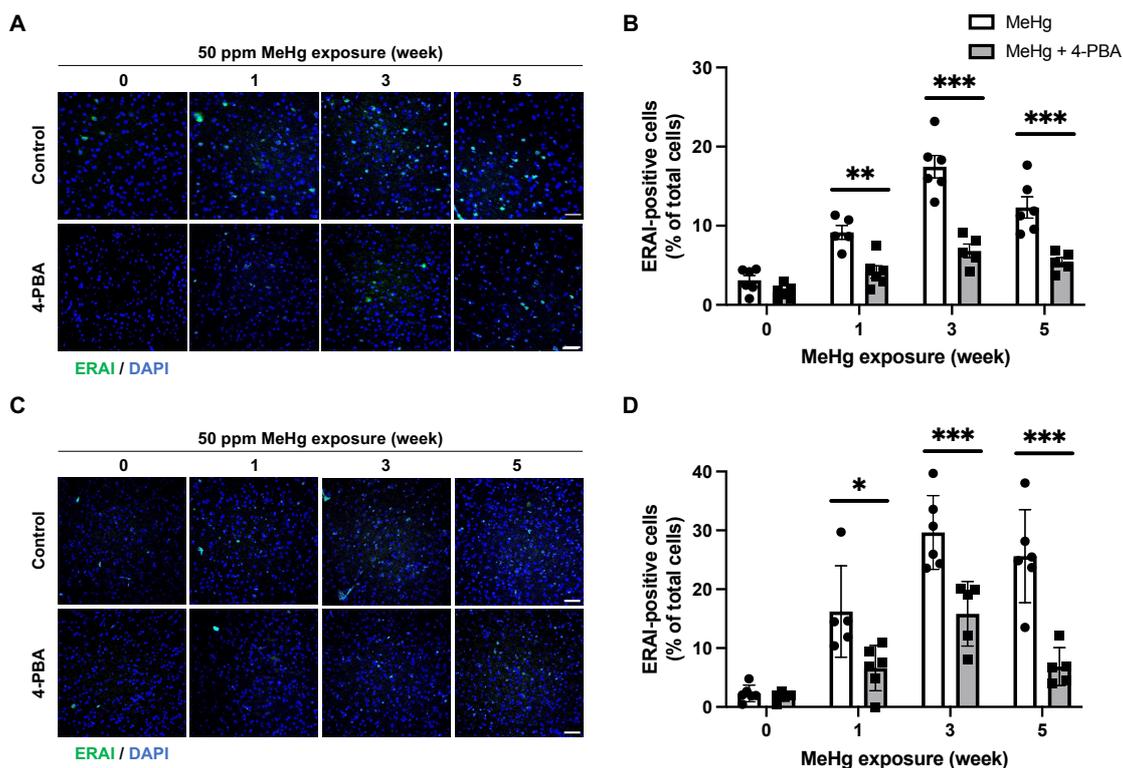


図 18. 4-PBA 投与によるメチル水銀誘導性小胞体ストレス惹起への影響

A: 大脳皮質体性感覚野における ERAI シグナルの経時変化. 緑色: ERAI 青色: DAPI, B: 大脳皮質体性感覚野における ERAI 陽性細胞数の定量化, C: 線条体における ERAI シグナルの経時変化. 緑色: ERAI 青色: DAPI, D: 線条体における ERAI 陽性細胞数の定量化

3) メチル水銀飲水投与による UPR 活性変化に対する 4-PBA の効果

4-PBA を投与することによりメチル水銀誘導性小胞体ストレスが軽減されたことから、次に UPR 各経路の活性化に対する 4-PBA 投与の影響について検討した。まず初めに、IRE1 α -XBP1 経路の活性変化について IRE1 α のリン酸化および IRE1 α -XBP1 経路の下流因子である HRD1 の陽性細胞数を免疫組織染色により検討した。その結果、50 ppm メチル水銀を飲水投与した際に増加した大脳皮質体性感覚野の p-IRE1 α および HRD1 陽性細胞数

が 4-PBA を投与することにより減少することが明らかとなった。これらの結果は線条体においても同様に観察されており、4-PBA の投与によってメチル水銀誘導性小胞体ストレス惹起が抑制されたことで、メチル水銀曝露による IRE1 α -XBP1 経路の活性化が抑制されることが示唆された。

続いて、メチル水銀曝露による PERK 経路の活性変化に対する 4-PBA の影響について解析するため、PERK のリン酸化および PERK 経路および ATF6 経路の下流因子である CHOP の陽性細胞数を免疫組織染色により検討した。その結果、50 ppm メチル水銀を飲水投与により大脳皮質体性感覚野の p-PERK および CHOP 陽性細胞数が増加したのに対し、4-PBA を投与することで p-PERK および CHOP 陽性細胞数の増加は抑制されることが明らかとなった。これらの結果は線条体においても同様に観察されており、これらの結果から、4-PBA がメチル水銀誘導性小胞体ストレス惹起を抑制することにより、下流シグナルの IRE1 α -XBP1 経路および PERK 経路シグナルを減弱することが示唆された。

4) メチル水銀誘導性細胞死に対する 4-PBA の効果

以上の結果から、4-PBA の投与によってメチル水銀曝露による小胞体ストレス惹起および UPR の活性化が抑制することが示唆された。特に、PERK 経路の活性化を 4-PBA が抑制したことから、CHOP を介したアポトーシス誘導を 4-PBA が軽減できることが予想された。そこで、メチル水銀誘導性細胞死に対する 4-PBA の効果について検討を行った。50 ppm メチル水銀の飲水投与による細胞死誘導について TUNEL 染色により確認した。その

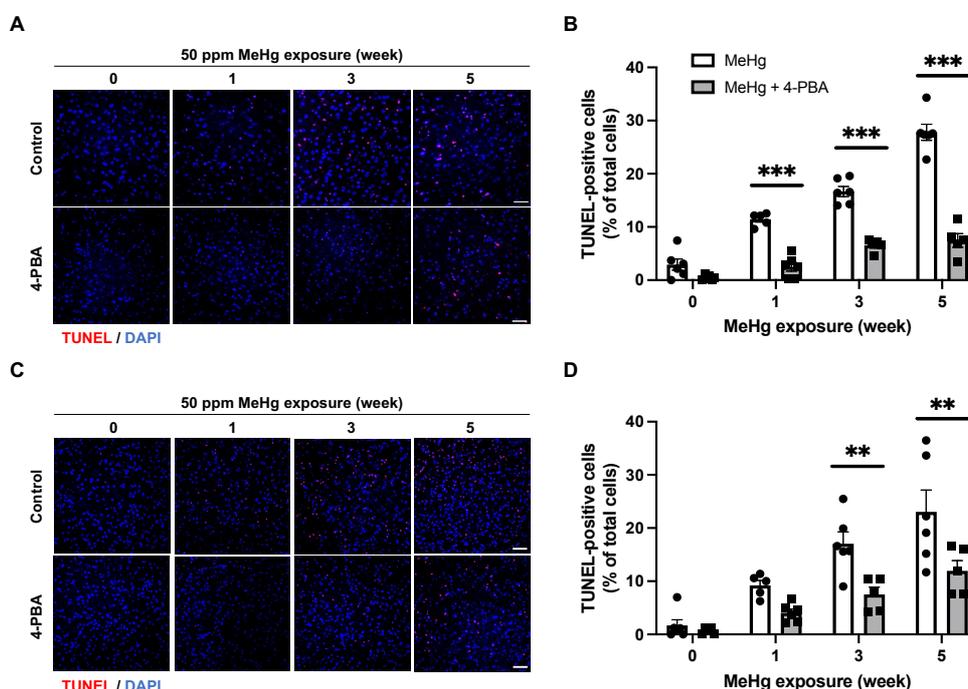


図 19. メチル水銀誘導性細胞死に対する 4-PBA 投与の影響

A : 大脳皮質体性感覚野における TUNEL 陽性細胞数の経時変化。赤色 : TUNEL, 青色 : DAPI, B : 大脳皮質体性感覚野における TUNEL 陽性細胞数の定量化, C : 線条体における TUNEL 陽性細胞数の経時変化。赤色 : TUNEL, 青色 : DAPI, D : 線条体における TUNEL 陽性細胞数の定量化

結果，大脳皮質体性感覚野および線条体で増加した TUNEL 陽性細胞数が 4-PBA 投与により抑制されることが明らかとなった（図 19）．以上の結果から，4-PBA を投与することにより，大脳皮質体性感覚野および線条体におけるメチル水銀誘導性細胞死が抑制されることが示唆された．

5) メチル水銀曝露による神経症状に対する 4-PBA の効果

4-PBA を投与することによりメチル水銀誘導性細胞死が抑制されたことから，高濃度メチル水銀曝露による神経症状に対して 4-PBA が回復効果を示すのか否か検討した．メチル水銀中毒による神経症状の一つである運動機能障害について，後肢伸長反応変化を解析した．その結果，4-PBA の投与により 50 ppm メチル水銀曝露による後肢伸長反応の抑制が有意に回復することが明らかとなった（図 20）．これらの結果から，メチル水銀曝露による神経細胞死誘導メカニズムに小胞体ストレス惹起および UPR の活性変化が重要であることが示唆された．

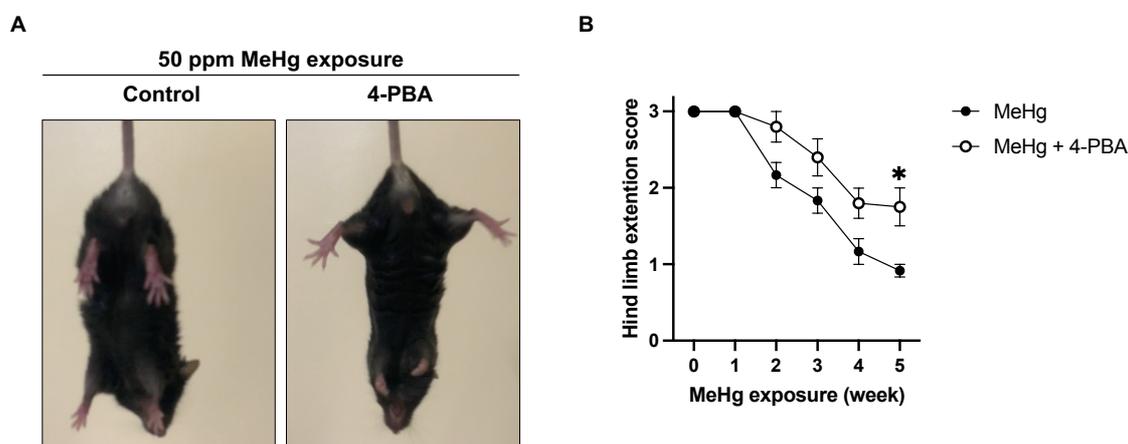


図 20. メチル水銀曝露によるマウス神経症状の確認

A : メチル水銀飲水投与 5 週目における ERAI-Venus Tg マウスの後肢伸長反応変化, B : ERAI-Venus Tg マウスの後肢伸長反応変化

IV 考察

1) メチル水銀飲水投与モデルにおける ERAI シグナルの検出

メチル水銀曝露によって脳内で小胞体ストレスが惹起される領域を明らかにするために，ERAI-Venus Tg マウスを用いて検討を進めた結果，大脳皮質体性感覚野，聴覚野，視覚野，運動野，および線条体において ERAI 陽性細胞数の増加が認められた（図 8-10）．メチル水銀中毒の代表例である水俣病では脳内において，小脳，後頭葉（大脳皮質視覚野），中心後回（大脳皮質体性感覚野），中心前回（大脳皮質運動野）および横側頭回（大脳皮質聴覚野）における神経細胞の脱落が認められている（図 21）．また，メチル水銀を曝露したマウスでは大脳皮質および線条体において神経病変が生じることが報告されている．このようにヒトとマウスではメチル水銀による障害部位が異なるものの，本研究より ERAI 陽性細胞数の増加が観察された脳領域はメチル水銀による障害部位と一致することが判明した．一方で，

障害部位以外の脳領域ではメチル水銀曝露による ERAI 陽性細胞数の増加は認められなかった。したがって、メチル水銀による神経病変部位での小胞体ストレスの関与が示唆された (図 22)。

興味深いことに、メチル水銀曝露による ERAI 陽性細胞数変動のピークは各脳領域で異なっていることが判明した。中枢神経系におけるメチル水銀毒性に関して、領域特異性が生じる要因として Mn-SOD1 や GPx1 などの抗酸化タンパク質発現量の違いが指摘されている。実際、Mn-SOD1 や GPx1 の mRNA レベルが高い海馬ではメチル水銀曝露による ERAI 陽性細胞数の増加は認められなかった (データ未表示)。メチル水銀による毒性発揮には酸化ストレス誘導と、それに続く小胞体ストレス惹起に起因すると考えられているため、抗酸化タンパク質の発現量が小胞体ストレス感受性と関連する

可能性は十分にある^{4,5}。したがって、大脳皮質各領域および線条体においても抗酸化タンパク質発現量が異なることで、ERAI 陽性細胞数のピークに違いが生じた可能性がある。メチル水銀毒性の部位特異性に関する知見はほとんどないため、小胞体ストレス感受性という観点は新しい切り口となり得る。

メチル水銀誘導性小胞体ストレスがメチル水銀による神経病変部位で認められたことから、次に小胞体ストレスが惹起された細胞種の特異性を試みた。免疫組織染色を用いた 2 重染色により検討した結果、ERAI 陽性細胞は NeuN 陽性神経細胞と高い一致率を示すことが明らかとなった (図 15)。メチル水銀による神経毒性は顆粒細胞のような小さな細胞において生じやすいことが示唆されている。実際、メチル水銀を曝露させたマウスでは顆粒細胞の多い大脳皮質深層 (IV 層) 付近において、神経病変および抗酸化タンパク質の低発現が認められている。本研究においても、ERAI 陽性細胞が観察された大脳皮質領域は体性感覚野、聴覚野、視覚野および運動野全てにおいて深層付近であった。また、メチル水銀は神経細胞の過剰な活性化による興奮毒性を引き起こすことが報告されており、過剰に活性化した神経細胞は酸化ストレスを引き起こすことから、神経細胞選択的に酸化ストレスが生じた結果、小胞体ストレスが惹起されたことが推定される。また、酸化ストレス感受性という観点において、GSH の発現量の違いも神経細胞選択的に障害を誘導する要因として挙げられる。グリア細胞と比較して神経細胞では GSH の発現量が低いため、メチル水銀誘導性酸化ストレスに対して感受性が高いことが推定される。さらに、神経細胞に優先的な ERAI シグナル発生要因として IRE1 α の発現量が考えられる。ERAI 遺伝子は IRE1 α による RNase 活性を活用するため、IRE1 α の発現量が高ければシグナル強度も強くなる。実際、大脳皮質の神経細胞、

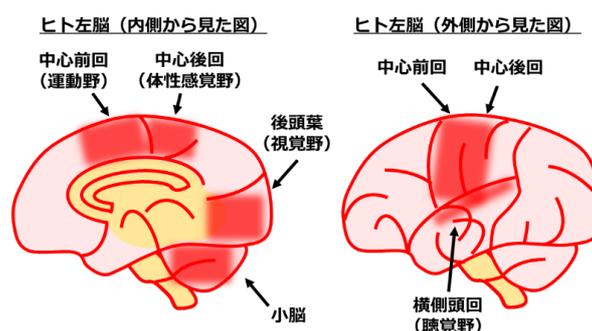


図 21. 水俣病患者における神経病変部位

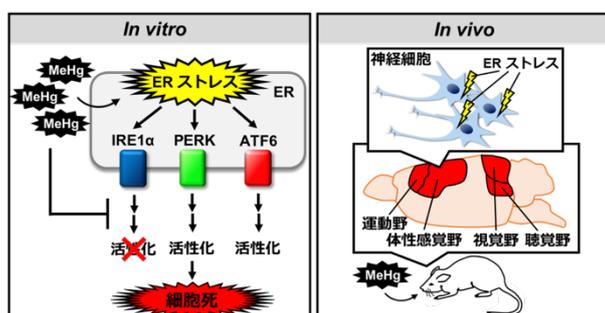


図 22. メチル水銀による UPR を介した細胞死惹起機構とマウス脳内での影響部位

海馬 CA1-3 の錐体細胞および海馬歯状回の顆粒細胞において IRE1 α 発現量が高いことが報告されている。以上の酸化ストレス感受性および IRE1 α 発現量という観点から、大脳皮質の神経細胞において ERAI シグナルが選択的に誘導されたことが推測される。

2) 4-PBA 投与によるメチル水銀誘導性神経細胞死への効果

本実験で使用した 4-PBA は化学シャペロンと呼ばれる低分子化合物であり、タンパク質凝集の抑制を介して小胞体ストレスを軽減する作用がある。4-PBA によってメチル水銀誘導性小胞体ストレス惹起を介した UPR の活性化を抑制することが細胞レベルで認められているが、マウス脳内におけるメチル水銀誘導性小胞体ストレス惹起を 4-PBA が抑制できるかについては不明であった。今回、過去の報告を基に ERAI-Venus Tg マウスに 4-PBA を投与した結果、大脳皮質体性感覚野および線条体における ERAI 陽性細胞数の増加を有意に抑制することが判明した (図 18)。さらに、メチル水銀誘導性小胞体ストレス惹起が抑制されたことにより、IRE1 α -XBP1 経路および PERK 経路の活性化が抑制されることも明らかとなった。また、細胞死シグナルに関わる PERK 経路の活性化が抑制されたことから、TUNEL 染色によりメチル水銀誘導性神経細胞死に対する 4-PBA の効果について検討した。その結果、4-PBA 投与により TUNEL 陽性細胞数の増加を抑制することが明らかとなり (図 19)、比較的高濃度のメチル水銀曝露によって惹起された神経症状の悪化を回復させることが判明した (図 20)。

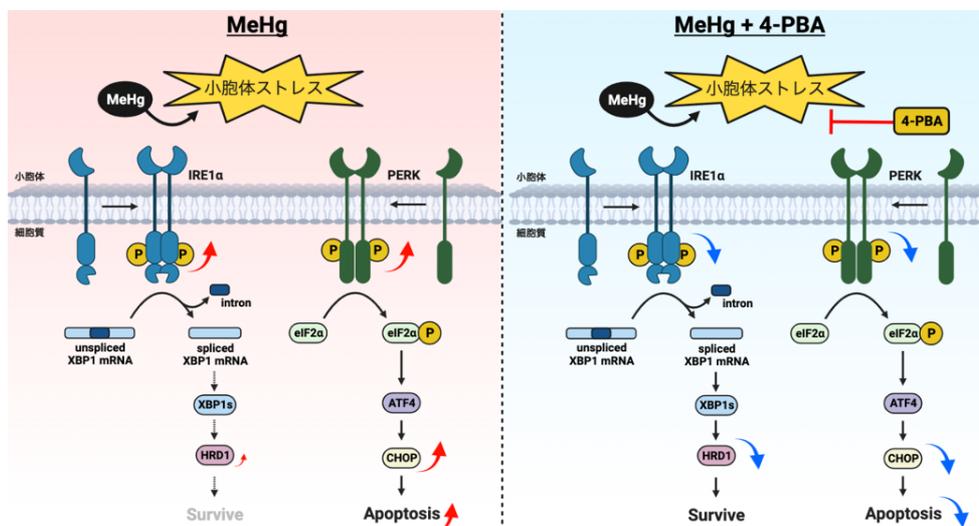


図 23. メチル水銀による UPR を介した神経細胞死誘導機構と 4-PBA の効果

以上の結果より、メチル水銀による神経細胞死誘導メカニズムとして、小胞体ストレス惹起および UPR の活性変化が重要であることが強く示唆された (図 23)。

V 結論

1. メチル水銀誘導性小胞体ストレスは神経細胞死発生前に認められた。
2. メチル水銀誘導性小胞体ストレスは中枢神経系におけるメチル水銀障害部位（大脳皮質体性感覚野，聴覚野，視覚野，運動野，線条体）において認められた。
3. 大脳皮質体性感覚野において，メチル水銀誘導性小胞体ストレスは神経細胞選択的に認められた。
4. 大脳皮質体性感覚野において，メチル水銀は IRE1 α -XBP1 経路を一過性に，PERK 経路を時間依存的に活性化することがわかった。
5. 小胞体ストレス抑制効果を有するケミカルシャペロン 4-PBA は高濃度メチル水銀投与による小胞体ストレス惹起ならびに UPR 活性化に対して抑制効果を示した。
6. さらに，4-PBA は高濃度メチル水銀投与による神経細胞死と神経症状に対しても有意に改善効果を示すことがわかった。

VI 今後の課題

本研究ではメチル水銀誘導性小胞体ストレス惹起を抑制することで UPR の活性化およびメチル水銀誘導性神経細胞死が抑制されることを明らかにしたが，4-PBA の作用ならびに UPR 活性化制御の神経細胞死に直接及ぼす影響については不十分な点が残されている。今後，解決しなければならない3つの課題を以下に示す。

1) 4-PBA に関する therapeutic time window の検討

本件は遂行すべき最も重要な課題である。今回の研究では，4-PBA と高濃度メチル水銀を同時に投与し，5週に渡ってその影響を検討した。4-PBA の神経細胞死抑制効果ならびに神経症状軽減作用に関しては既に述べた通りであり，非常に有効であることがわかった。この成果は，メチル水銀による小胞体ストレスが神経細胞死を惹起するという結果を支持するものである。そこで，4-PBA に関する治療戦略を成立させるために，therapeutic time window を検討しなければならない。メチル水銀曝露後，何日（週）からの投与でも抑制効果を発揮するのかを明らかにする必要がある。この実験を行うことで，環境行政推進に対する寄与に大きく貢献できると推定される。

2) 4-PBA 投与による脳内移行性の検討

本研究では 4-PBA を投与することによりメチル水銀誘導性小胞体ストレス惹起が抑制されることなどを明らかにしたが，投与された 4-PBA が脳内へと移行しメチル水銀誘導性小胞体ストレス惹起の抑制効果を示すのかについては十分な検討ができていない。過去の報告では，4-PBA の投与濃度依存的にロテノン誘導性神経細胞死を抑制することが判明しており，4-PBA が脳内へと移行し効果を発揮していることが予想されるが，液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS/MS）を用いて脳組織に含まれる 4-PBA の検出を行うことでより詳細に検討する必要がある。

3) メチル水銀曝露による UPR 活性化を介した神経細胞死誘導メカニズムの解明

ERAI-Venus Tg マウスを用いたこれまでの検討および本実験から，メチル水銀障害部位において小胞体ストレス惹起および UPR の活性化が観察された。しかしながら，UPR の活性化がメチル水銀誘導性神経細胞死を直接誘導することを示すような結果は得られていない。

本研究ではアポトーシス誘導因子である CHOP の誘導とメチル水銀誘導性神経細胞死について検討を行った。今後は、CHOP ノックアウトマウスでは、メチル水銀誘導性神経細胞死が軽減できるのかについて実証する必要がある。

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*. 2021 Apr;95(4):1241-1250. doi: 10.1007/s00204-021-02982-9. Epub 2021 Jan 16.
- 2) Nomura R, Takasugi N, Hiraoka H, Iijima Y, Iwawaki T, Kumagai Y, Fujimura M, **Uehara T***. Alterations in UPR Signaling by Methylmercury Trigger Neuronal Cell Death in the Mouse Brain. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 6;23(23):15412. doi: 10.3390/ijms232315412.
- 3) Nomura R, Takasugi N, Iijima Y, Iwawaki T, Kumagai Y, Fujimura M, **Uehara T***. Significant Reduction in Methylmercury-Induced Neuronal Cell Death by 4-Phenylbutyrate in Mouse Brain. *In preparation*

引用文献

- 1) Makino, K. Okuda, K. Sugino, E. Nishiya, T. Toyama, T. Iwawaki, T. Fujimura, M. Kumagai, Y. & Uehara, T. Correlation Between Attenuation of Protein Disulfide Isomerase Activity Through S-Mercuration and Neurotoxicity Induced by Methylmercury. *Neurotox. Res.* 27, 99–105 (2014).
- 2) Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K. & Miura, M. A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat. Med.* 10, 98–102 (2004).
- 3) Iwawaki, T., Akai, R., Yamanaka, S. & Kohno, K. Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16657–16662 (2009).
- 4) Usuki F., Fujita E. & Sasagawa N. Methylmercury activates ASK1/JNK signaling pathways, leading to apoptosis due to both mitochondria- and endoplasmic reticulum (ER)-generated processes in myogenic cell lines. *Neurotoxicology* 29, 22–30 (2008).
- 5) Hiraoka H., Nakahara K., Kaneko Y., Akiyama S., Okuda K., Iwawaki T., Fujimura M., Kumagai Y., Takasugi N., Uehara T. Modulation of unfolded protein response by methylmercury. *Biol. Pharm. Bull.* 40, 1595–1598 (2017).

英文要約 (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. Here, by utilizing the ER stress-activated indicator (ERAI) system, we investigated the signaling alterations in the unfolded protein response (UPR) before neuronal apoptosis in the mouse brain. These results suggest that this model reflects MeHg poisoning and is useful for evaluating site- and cell type-specific toxicity of MeHg.

The induction of ER stress by MeHg exposure is thought to be involved in neuronal cell death. However, it was unclear how MeHg affected the UPR, which is responsible for both “cell survival” and “cell death” functions. We exposed MeHg to ERAI-Venus mice using the ERAI system and observed neurological symptoms and ER stress. MeHg injures several regions of the cerebral cortex, such as the somatosensory cortex, auditory cortex, visual cortex, and motor cortex. However, few reports have shown the difference in MeHg susceptibility between these regions. Thus, we assessed the temporal change in the ERAI fluorescence signal in each region. Interestingly, the strongest fluorescence signals followed the order of the auditory cortex, somatosensory cortex, and visual cortex or motor cortex, suggesting that these areas exhibit differential sensitivity to MeHg-induced ER stress. Consistent with several previous reports indicating that MeHg damages the striatum in mice, we revealed that the number of ERAI-positive cells was increased in the striatum at the late phase of MeHg exposure. These results indicate that MeHg-induced ER stress occurs in several regions of the brain but those regions have differential susceptibility. Then, we found that cytoprotective signaling by the IRE1 α -XBP1 pathway and the activation of apoptotic signaling by the PERK pathway was differentially activated in the regions where MeHg-induced injury has been reported (cerebral cortex and striatum). The IRE1 α -XBP1 pathway peaked at 3 weeks of MeHg exposure and then decayed. In contrast, a time-dependent activation of the PERK pathway was observed. These results suggest that MeHg accumulation in the mouse brain shifts the UPR signaling from cell survival to cell death, resulting in neuronal apoptosis. Indeed, an increase in apoptotic cells was observed in the mouse brain during the late phase of MeHg exposure. We have shown that the ERAI signal was observed predominantly in NeuN-positive neurons in the somatosensory cortex, suggesting that MeHg-mediated ER stress induction and alterations in UPR signaling are involved in neuronal cell death. From these observations, we consider that UPR modulation could be a therapeutic target for treating neuropathy caused by electrophiles similar to MeHg. Finally, we attempted to demonstrate the relationship between MeHg-induced ER stress and neuronal cell death *in vivo*. Administration of 4-phenylbutyrate (4-PBA), a chemical chaperone that reduces ER stress, significantly suppressed MeHg-induced ERAI signal, UPR activation, neuronal cell death and neuropathy indicating that treatment with 4-PBA might be an effective therapeutic strategy for Minamata disease.

In conclusion, through this study, it is elucidated that the ER stress response induced by MeHg is deeply involved in the induction of neuronal cell death. Eliminating ER stress would be a valuable insight into treatment strategies for Minamata disease.