

p62/SQSTM1 が介在するメチル水銀の脳内代謝と毒性制御機構の解明

主任研究者 清野 正子
北里大学薬学部 公衆衛生学 教授

研究要旨

メチル水銀 (MeHg) は中枢神経系を主な標的とする環境毒性物質であり、その分子機構の解明は水俣病研究の重要課題である。MeHg は細胞内タンパク質のチオール基に共有結合し、変性タンパク質の蓄積や酸化ストレスを引き起こすことが知られている。生体はこれらの障害を防ぐため、ユビキチン・プロテアソーム系やオートファジーなどの分解機構を動員し、恒常性を維持している¹。申請者らは「平成31年～令和3年度 水俣病に関する総合的研究」の助成により、オートファジーレセプター分子 p62/SQSTM1 が MeHg 毒性に対して防御的に働くことを、細胞および個体レベルの解析から明らかにしてきた。具体的には、p62 が MeHg によるユビキチン化タンパク質の分解を促進し、Nrf2 経路を活性化するとともに、細胞内 MeHg 蓄積を抑制することを示した²⁻⁴。また、「令和4年～令和6年度 水俣病に関する総合的研究」の助成により、p62 欠損マウス (p62KO マウス) を用いた *in vivo* 解析により、p62 が臓器内の MeHg 濃度を低下させ、MeHg の全身毒性を軽減することを実証した。さらに、MeHg が脂肪肝を悪化させる新たな毒性リスクを見出し、MeHg 毒性の多面的側面を明らかにした。

一方で、MeHg の主要標的臓器である脳における p62 の役割および脳内 MeHg 代謝機構は依然として不明な点が多い。本研究では、これまでの成果と知見を基盤として、p62 を介した脳内メチル水銀代謝機構および神経毒性制御メカニズムの解明を目的とする。

本研究では実験計画①として、p62 欠損マウス脳の各部位 (大脳新皮質、海馬、中脳、間脳、小脳) における MeHg 蓄積量および組織障害の分布を解析し、p62 が介在する MeHg 毒性関連遺伝子 X を同定する。実験計画②として、p62 欠損マウスから単離したミクログリアを用いて、MeHg 代謝動態および p62 依存的な MeHg 毒性関連遺伝子 Y の同定を行い、MeHg による神経細胞障害の分子基盤の解明を目指す。

キーワード : MeHg, p62, Brain mercury distribution, Microglia

研究分担者 : 中村亮介、高根沢康一

所属施設名 : 北里大学薬学部公衆衛生学教室、武蔵野大学薬学部

I 研究目的

水俣病の原因物質として知られる MeHg は、細胞内タンパク質のチオール基に共有結合し、構造変性を引き起こすことでユビキチン化タンパク質の蓄積、酸化ストレスの増加、細胞機能障害を誘導することが知られている。生体はこれらの障害に対抗するため、ユビキチン・プロテアソーム系およびオートファジーによるタンパク質分解機構を動員し、細胞内恒常性を維持してい

る。これらの分解システムの中で、オートファジーレセプター分子 p62/SQSTM1 (以下 p62) は、ユビキチン化タンパク質を認識・輸送し、同時に細胞内ストレス応答経路 (特に Nrf2 経路) の制御にも関与する多機能分子として注目されている⁵。

申請者らはこれまでに、p62 が MeHg 毒性の緩和に寄与する分子であることを、培養細胞およびマウスを用いた解析から明らかにしてきた。具体的には、p62 が MeHg によるユビキチン化タンパク質の分解を促進し、Nrf2 経路を活性化させるとともに、細胞内水銀の過剰蓄積を抑制することを見出した^{6,4}。さらに、p62 欠損マウス (p62KO マウス) では野生型マウスに比べて脳内の水銀濃度が有意に高いことを確認し、p62 が MeHg の体内動態と毒性制御に関与することを実証した。また、近年の研究では MeHg が脂肪肝を悪化させることも報告されており^{7,8}、MeHg 毒性の全身的影響と代謝経路の理解が求められている。

一方で、p62 は多くの臓器で発現しており、特に MeHg の主要標的臓器である脳における p62 の機能的意義は十分に解明されていない。脳内では、神経細胞 (ニューロン) だけでなく、免疫担当細胞であるミクログリアが障害応答や炎症制御に重要な役割を果たすことが知られているが⁹、これらの細胞において p62 がどのように MeHg 代謝および毒性発現を制御しているかは不明である。また、脳は大脳新皮質、海馬、中脳、間脳、小脳など多様な構造と機能を持つが、脳部位ごとの MeHg 蓄積動態や p62 発現の違いを包括的に解析した研究例は極めて限られている。

そこで本研究では、p62 を介した脳内メチル水銀代謝機構および神経毒性制御メカニズムの解明を最終目標とする。まず、p62KO マウスおよび野生型マウスを用いて、脳の各部位 (大脳新皮質、海馬、中脳、間脳、小脳) における水銀蓄積量、オートファジー関連分子および p62 の発現レベルを定量的に比較し、p62 が介在する障害部位およびその分子背景を明らかにする。次に、p62KO マウス由来の神経系細胞 (ニューロンおよびミクログリア) を単離培養し、水銀代謝能および MeHg に対する感受性の差異を解析することで、p62 が細胞種特異的に MeHg 毒性をどのように制御しているかを検討する。さらに、これらの解析結果を踏まえ、p62KO マウス脳での網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq) を実施し、p62 依存的に発現変動する MeHg 毒性関連遺伝子 X および Y を同定する。これらの候補分子について、培養細胞系を用いた過剰発現・ノックダウン実験により機能的検証を行うことで、MeHg 神経毒性における新規防御経路または障害シグナル伝達経路を明らかにする。

本研究により、p62 を介した脳内 MeHg 代謝の分子基盤が明確化されることで、MeHg による神経毒性発現機構の理解が大きく進むと期待される。さらに、p62 が制御するオートファジーや炎症応答を標的とした新たな毒性緩和戦略の構築にもつながる可能性があり、MeHg による神経障害の予防・治療法開発に資する重要な知見を提供するものとなる。

II 材料と方法

1. ウェスタンブロット法

マウスから単離した脳の各部位を RIPA Buffer (20 mM Tris pH7.4, 0.1% SDS, 1% Na deoxycholate, 1% NP 40, and protease/phosphatase inhibitor cocktail) で超音波処理した。Bicinchoninic Acid (BCA) 法によるタンパク質定量後、総タンパク質を SDS-PAGE にて分離後、Poly vinylidene difluoride 膜に転写した。抗 p62 抗体 (Medical and Biological Laboratories) を 4°C over night で転倒混和した。

Horseradish peroxidase (HRP) 標識 2 次抗体を室温で 1 時間反応させ、化学発光を Amersham Imager 680 を用いて検出した。同膜を用いて、HRP 結合抗 GAPDH 抗体 (Fujifilm) を室温で 1 時間反応後、同様に化学発光により検出を行った。

2. 水銀分析法

RIPA Buffer で可溶化したマウス脳の各部位を、加熱気化水銀測定装置 (MA3 Solo, Nippon Instruments Corporation) を用いて水銀量を測定した。可溶化サンプルの一部については、Bicinchoninic acid (BCA) 法によりタンパク質濃度を定量し、得られた水銀量をタンパク質量で補正した。

3. マウスの飼育とメチル水銀の経口投与

雄性 p62 欠損 (p62KO) マウスと雌性マウスを交配し、p62KO 仔マウスを得た。得られたマウスは、購入した野生型マウスと同一条件で飼育した。飼料には CE-2 (γ 線照射済、株式会社日本クレア) を用い、滅菌水を自由摂取させ、床敷にはペパークリーン (日本エスエルシー株式会社) を使用した。100 mg/mL 塩化メチル水銀溶液 10 μ L に生理食塩水 990 μ L を加えて希釈し、最終濃度 1 mg/mL のメチル水銀 (MeHg) 溶液を調整した。MeHg は胃ゾンデを用いて経口投与し、投与前に測定した体重に基づいて、いずれのマウスも体重 25 g あたり 250 μ L の投与量 (10 mg/kg 体重) となるように調製した。

4. マウスの脳摘出

MeHg 投与後 1 日後 (単回経口投与) あるいは 7 日後 (反復経口投与) のマウスにイソフルラン (動物用イソフルラン; マイラン製薬株式会社) を用いて麻酔処理を行った。頸椎脱臼により安楽死させ、マウス脳を摘出した。摘出した脳は、次項の「5. マウス脳の sectioning」に従い各部位に単離後 1.5 mL チューブに入れて液体窒素で凍結させた後、-80°C で保存した。各脳部位は、RIPA バッファー中で超音波処理により可溶化した後、残渣を遠心除去してタンパク質解析に用いた。

5. マウス脳の sectioning

マウスの脳は、氷上に置いたステンレストレーの上で冷却しながら解剖を行った。ニードル部分を軽く曲げたステンレスプローブを用い、以下の手順で各部位を分離した。まず、脳梁をプローブで切断して左右の大脳半球を外側に開き、大脳半球を切り離した。次に、大脳半球から海馬を慎重に剥離して採取し、続いて大脳新皮質を分離した。その後、小脳を切り離し、残存した皮質下構造のうち中脳を採取した。最終的に残った組織を間脳として回収した。

6. マウス脳からのミクログリアの単離

摘出したマウス脳を PBS で洗浄後、パパイインおよび DNaseI 溶液に浸した。脳をハサミで粉碎し、37°C で 20 分間水浴にて加温した。ピペットで懸濁後 100 μ m のセルストレイナーで残渣を取り除いた。30% Percoll を加え攪拌し、1,000 g でミクログリアを含む細胞画分を沈殿させた。続いて、塩化アンモニウムを含む溶液で赤血球を溶解後、1,000 g で遠心し、11 μ m のナイロンメッシュを用いてミクログリア画分を単離した¹⁰。

(倫理面への配慮)

本研究は、哺乳類培養細胞への遺伝子導入等、遺伝子組換え DNA 実験が含まれる。それらの実験に際し、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律 (カルタへ

ナ法) 」(平成15年法律第97号)と研究開発等に係わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令(平成16年文部科学省・環境省令第1号)に従い実施する。さらに、これらに基づく、北里大学における遺伝子組換え実験の実施に際し遵守すべき安全確保に関する基準「北里大学遺伝子組換え実験安全管理規程」(平成20年4月改正)を遵守し、実験を行う。

動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」および「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(環境省)」を尊厳するとともに、「動物実験等の実施に関する基本指針(文部科学省)」および日本学術会議が策定した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に従うものであり、北里大学動物実験委員会の承認(承認番号21-26)および遺伝子組換え動物使実験の承認(承認番号4840)を受けている。

また、本研究は人を対象とした研究ではないため、人権の保護への対応が必要な研究には該当しない。また、個人情報を伴うアンケート調査・インタビュー調査・行動調査(個人履歴・映像を含む)、提供を受けた試料の使用、ヒト遺伝子解析研究には該当しない。

Ⅲ 研究結果

1. マウスの脳内における p62 発現

野生型マウスに 10 mg/kg のメチル水銀を単回経口投与し、24 時間後に脳の各部位(大脳新皮質、海馬、中脳、間脳、小脳)を摘出した。各部位における p62 の発現を解析した。p62 発現をウェスタンブロット法により解析したところ、大脳新皮質、海馬、中脳、間脳において高い発現が認められ、これらの部位ではほぼ同程度のレベルだった。一方、小脳では、それらに比べて発現レベルが低い傾向だった (Fig. 1)。

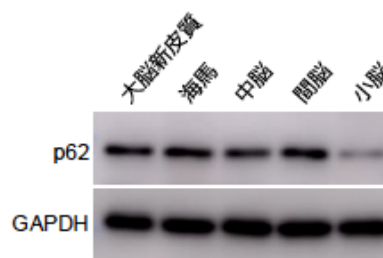


Fig. 1 野生型マウス脳各部位におけるp62発現

2. メチル水銀単回経口投与における野生型マウス脳内の水銀蓄積

野生型マウス (C57BL/6J) に 10 mg/kg メチル水銀を単回経口投与し、脳の各部位における水銀濃度を測定した。その結果、いずれの脳部位においても大きな水銀濃度の差異は認められなかった (Fig. 2)。これら脳の各部位における p62 の発現をウェスタンブロット法により調べたところ、メチル水銀投与群いくつかの個体の海馬において、高分子量 (200 kDa 付近) に p62 のバンドが認められた (Fig. 3)。その他の脳部位ではこの高分子量に p62 のバンドは認められなかった。

我々は、「令和 4 年～令和 6 年度水俣病に関する総合的研究」の助成を受けて実施した研究において、p62KO マウスを用いた *in vivo* 解析により、p62KO マウスでは脳内水銀濃度が増加傾向を示し、メチル水銀に対する感受性が高いことをこれまでに明らかにしている。本年度は、p62KO マウスにおける脳内の水銀代謝を詳細に明らかにすることを目的として、p62KO マウスにメチル水銀を単回経口投与し、脳の各部位における水銀濃度を同系統 (C57BL/6J) の同週齢野生型マウスと比較した。その結果、p62KO マウスのいずれの脳部位においても統計的有意差は認められなかったものの、野生型マウスに比べて高い傾向を示した。平均値では、大脳新皮質 1.15 倍、海馬 1.16 倍、中脳 1.25 倍、間脳 1.20 倍、小脳 1.21 倍だった (Fig. 4)。一方、腎臓における水銀濃度は脳より高値を示し、野生型マウスとの間に明確な差は認められなかった。

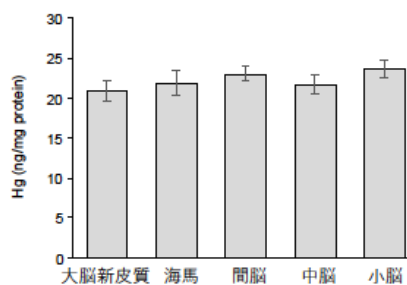


Fig. 2 単回経口投与後の野生型マウス脳各部位の水銀濃度

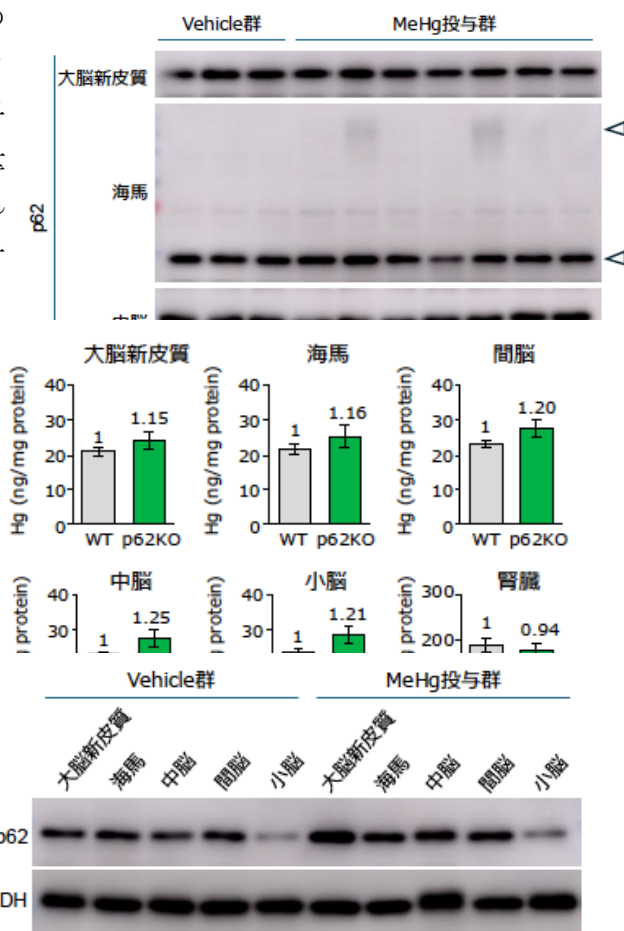


Fig. 5 反復経口投与後の野生型マウス脳各部位におけるp62発現

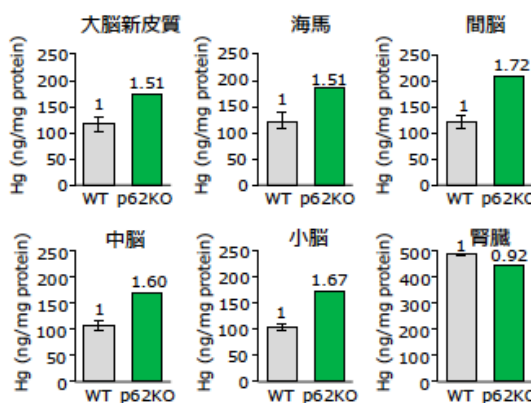


Fig. 6 反復経口投与後の野生型マウス脳各部位の水銀濃度

3. メチル水銀反復経口投与におけるマウスの脳内の p62 発現

野生型マウスに 10 mg/kg/day のメチル水銀を 7 日間反復経口投与し、投与終了後に脳の各部位（大脳新皮質、海馬、中脳、間脳、小脳）を摘出した。

各部位における p62 の発現をウエスタンブロット法により解析した。その結果、いずれの部位においてもコントロールと比較して、単回投与時にはほとんど変化が認められなかった p62 の発現が増加傾向を示した。特に大脳新皮質において顕著な発現増加が認められた (Fig. 5)。

4. メチル水銀反復経口投与における p62KO マウス脳内の水銀蓄積

p62KO マウス、野生型マウスに 10 mg/kg/day のメチル水銀を 7 日間反復経口投与し、脳各部位における水銀濃度を測定した。p62KO マウスのいずれの脳部位においても野生型マウスに比べて高い値を示し、N = 1 のデータではあるが、大脳新皮質 1.51 倍、海馬 1.51 倍、中脳 1.60 倍、間脳 1.72 倍、小脳 1.67 倍だった (Fig. 6)。一方、腎臓における水銀濃度は 0.92 倍だった。

IV 考察

令和 4 年～令和 6 年度 水俣病に関する総合的研究の研究課題（p62/SQSTM1 欠損 *in vitro* および *in vivo* モデル系を用いたメチル水銀毒性防御機構の解析）において、p62KO マウスを作製し、p62KO 細胞と同様にメチル水銀に対する感受性が高いことを明らかにした。したがって、p62 は *in vitro* において MeHg 毒性から生体を防御する重要な因子であることが示唆された。また、メチル水銀単回投与後の臓器内水銀濃度の測定により、p62KO マウスの複数の臓器において野生型マウスより水銀濃度が高いことを示した。しかし、p62 が生体におけるメチル水銀曝露においてどのような機能を持つのか、特に脳内のメチル水銀代謝に対する p62 の機能については不明である。脳の構造は極めて複雑であり、脳の部位ごとに存在する神経系細胞の密度や種類が異なる。p62 の脳内の発現分布についても大脳と小脳における発現解析のみである。したがって、メチル水銀曝露における p62KO マウス脳内における水銀の蓄積部位、そして障害部位を特定することはメチル水銀毒性に対する p62 の脳内における機能を明らかにするためには極めて重要であり、脳内における p62 の寄与を理解する上で不可欠である。そこで、本研究課題では、引き続き p62KO マウスを用いた *in vivo* 解析を進め、p62 を介した脳内メチル水銀代謝機構および神経毒性制御メカニズムの解明を最終目標とする。

本年度は、マウス脳を大脳新皮質、海馬、中脳、間脳、小脳の各部位に分離する手法を習得し、分離した脳の各部位における p62 の発現レベルについて抗 p62 抗体を用いたウエスタンブロット法により調べた。その結果、大脳新皮質、海馬、中脳、間脳ではほぼ同レベルの p62 発現が認められた。一方、小脳ではそれらの発現と比較して低かった (Fig. 1)。本結果から、p62 は脳内で部位特異的に発現しており、特に神経活動の高い大脳新皮質や海馬、中脳、間脳で高発現していることが示唆された。これらの領域では酸化ストレスやタンパク質代謝負荷が高く、p62 依存的なオートファジー経路が恒常的に活性化している可能性がある。一方、小脳では p62 発現が低く、平常状態ではオートファジー経路の関与が相対的に少ないと推察された。今後、小脳における p62 の低発現がオートファジー活性低下によるものか、転写レベルの抑制によるものかを検証するため、LC3 や NRF2 など他の関連因子の発現解析が必要である。

野生型マウスにメチル水銀を単回経口投与し、24 時間後に脳を各部位に分離して水銀蓄積量を測定した結果、いずれの部位においてもほぼ同程度の水銀濃度が検出された (Fig. 2)。このメチ

ル水銀単回投与群における p62 発現はコントロール群と有意な変化は認められず (Fig. 3)、メチル水銀曝露による誘導応答が十分に生じていない可能性が考えられた。そこで、野生型マウスにメチル水銀を7日間反復経口投与し、脳を各部位に分離して p62 発現を検証した。その結果、いずれの部位においてもコントロールと比較して、p62 の発現が増加傾向を示し、特に大脳新皮質において顕著な発現増加が認められた (Fig. 4)。この脳の各部位における水銀濃度は単回投与と比較して 6~7 倍高値を示した (Fig. 5)。これらの結果から、p62 発現は曝露の累積性や時間依存性を有する防御応答の一端であることが推察された。

V 結論

本研究では、p62KO マウスを用いた解析により、p62 が脳内メチル水銀 (MeHg) 代謝および毒性応答に関与する可能性を検討した。野生型マウスに 10 mg/kg メチル水銀を単回経口投与後、脳部位別 (大脳新皮質、海馬、中脳、間脳、小脳) の水銀濃度及び p62 発現を比較した。メチル水銀単回投与群の脳部位別の水銀濃度は、どの脳部位もほとんど同様であった。メチル水銀単回投与群の p62 発現は、Vehicle 群 (大脳新皮質、海馬、中脳、間脳でそれぞれ多く、小脳で少ない) とほとんど同様であったが、一部の個体の海馬において高分子量側に p62 の複合体と思われるバンドが認められた。

野生型マウスに 10 mg/kg/day のメチル水銀を反復経口投与 (7日間) し、脳部位別の水銀濃度及び p62 発現を比較した。メチル水銀反復投与群の脳部位別の水銀濃度は、どの脳部位もほとんど同様であった。メチル水銀反復投与群の p62 発現は、どの脳部位も Vehicle 群に比べて上昇したが、とくに大脳新皮質における上昇が顕著であった。

メチル水銀の単回及び反復投与実験を野生型マウスと p62KO マウスで比較したところ、どの脳部位においても p62KO マウスの水銀濃度が野生型に比べ上昇する傾向がみられ、その傾向は反復投与実験でより顕著であった。以上の結果から、p62 が脳内水銀の蓄積に一定の調節的役割を果たす可能性が示唆された。

VI 今後の課題

本研究により、p62 が脳内メチル水銀代謝および毒性応答に関与する可能性が示されたが、その分子機構の詳細は依然として未解明である。今後は、反復経口投与モデルを用い、p62KO マウスの脳における水銀蓄積動態と、NRF2 やオートファジー関連分子の発現変動を包括的に解析する必要がある。また、p62 依存的に発現変動する MeHg 応答関連遺伝子を同定するため、RNA-seq を実施し、新規防御関連因子 (仮称: MeHg 毒性関連遺伝子 X) の探索を進める予定である。さらに、p62KO マウスの脳内障害部位を明らかにするため、Iba1 などの炎症マーカーの発現や免疫染色を行うことが重要である。

加えて、p62 欠損による脳の影響を明確化するため、p62KO マウス由来ミクログリアを用い、メチル水銀に対する感受性および炎症応答を野生型マウス由来細胞と比較検討する。さらに、ミクログリアにおける MeHg 応答性遺伝子 (仮称: MeHg 毒性関連遺伝子 Y) の同定と機能解析を進めることで、p62 を介したメチル水銀神経毒性防御機構の分子ネットワークと細胞種特異的制

御機構の全体像を明らかにすることが期待される。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

1) 日本毒性学会 2025 :演題タイトル「p62/SQSTM1 を基軸としたメチル水銀毒性に対する防御機構の解析」にて、「令和4年～令和6年度 水俣病に関する総合的研究」の成果および、本研究の成果の一部を発表した。

引用文献

1. Li, Y., Li, S. & Wu, H. Ubiquitination-proteasome system (UPS) and autophagy two main protein degradation machineries in response to cell stress. *Cells* **11**, 851 (2022).
2. Takanezawa, Y. *et al.* Protective function of the SQSTM1/p62-NEDD4 complex against methylmercury toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **609**, 134–140 (2022).
3. Takanezawa, Y., Nakamura, R., Ohshiro, Y., Uraguchi, S. & Kiyono, M. Proteasome and p62/SQSTM1 are involved in methylmercury toxicity mitigation in mouse embryonic fibroblast cells. *The Journal of Toxicological Sciences* **48**, 355–361 (2023).
4. Takanezawa, Y. *et al.* The predominant role of p62/SQSTM1 over NBR1 in methylmercury-induced cytotoxicity and cellular defense. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 151461 (2025).
5. Hou, Y., Liu, L., Zhao, T., Guo, Y. & Shi, J. The multifaceted role of SQSTM1/p62 in disc degeneration: A master regulator of cellular stress responses. *Biochemistry and Biophysics Reports* **44**, 102222 (2025).
6. Takanezawa, Y. *et al.* Sequestosome1/p62 protects mouse embryonic fibroblasts against low-dose methylmercury-induced cytotoxicity and is involved in clearance of ubiquitinated proteins. *Scientific reports* **7**, 1–11 (2017).
7. Tinant, G. *et al.* Dietary methylmercury and fatty acids affect the lipid metabolism of adipose tissue and liver in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* **263**, 106673 (2023).
8. Maqbool, F. *et al.* Biochemical evidence on the potential role of methyl mercury in hepatic glucose metabolism through inflammatory signaling and free radical pathways. *J of Cellular Biochemistry* **120**, 16195–16205 (2019).
9. Xu, L., He, D. & Bai, Y. Microglia-Mediated Inflammation and Neurodegenerative Disease. *Mol Neurobiol* **53**, 6709–6715 (2016).
10. Ito, N. *et al.* Kososan, a Kampo medicine, prevents a social avoidance behavior and attenuates neuroinflammation in socially defeated mice. *J Neuroinflammation* **14**, 98 (2017).

英文サマリー

In this study, we investigated the potential involvement of p62 in the metabolism and toxicological response to methylmercury (MeHg) in the brain using p62 knockout (KO) mice. Following a single oral administration of 10 mg/kg MeHg to wild-type (WT) mice, we compared mercury concentrations and p62 expression across various brain regions (cerebral cortex, hippocampus, mesencephalon,

diencephalon, and cerebellum). Mercury concentrations in the single-dose group were largely uniform across all examined brain regions. While p62 expression in this group generally mirrored that of the vehicle group (higher in the cerebral cortex, hippocampus, mesencephalon, and diencephalon, and lower in the cerebellum), bands likely representing high-molecular-weight p62 complexes were observed in the hippocampus of some mice. In a repeated oral administration study (10 mg/kg/day for 7 days) in WT mice, mercury concentrations remained consistent throughout the brain. However, p62 expression in the repeated-dose group increased globally compared to the vehicle group, with the most pronounced elevation observed in the cerebral cortex. A comparison of single and repeated MeHg administration between WT and p62KO mice revealed that mercury concentrations in p62KO mice tended to be higher than those in WT mice across all brain regions. In conclusion, our findings demonstrate that p62 expression is induced by repeated MeHg exposure, particularly in the cerebral cortex, and that its absence leads to increased mercury accumulation in the brain. These findings suggest that p62 plays a critical regulatory role in managing MeHg levels and may contribute to the brain's defense mechanisms against MeHg-induced toxicity.