

博士論文

メチル水銀による大脳皮質神経細胞脱落における  
小胞体ストレス応答の関与

令和3年3月

平岡 秀樹

岡山大学大学院  
医歯薬学総合研究科  
博士後期課程  
薬科学専攻



# 目次

略語表 .....	6
使用薬物一覧 .....	9
序章 .....	12
第 1 章 .....	18
MeHg による小胞体ストレスを介した細胞死誘導機構.....	18
目的 .....	18
実験方法.....	19
1. 細胞培養.....	19
2. 試薬処理.....	19
3. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) .....	20
4. Hoechst 染色 .....	22
5. Western blotting.....	23
6. 変異型 IRE1 $\alpha$ の構築 .....	25
7. Transfection .....	26
8. 統計処理.....	26
実験結果.....	27
1. MeHg による細胞死惹起.....	27
1-1 MeHg による細胞死惹起の確認.....	27
1-2 MeHg による ER ストレス惹起の確認.....	29
2. 各小胞体ストレスセンサーに対する MeHg の影響.....	30
2-1 PERK 経路に対する MeHg の影響 .....	30
2-2 ATF6 経路に対する MeHg の影響 .....	31
2-3 IRE1 $\alpha$ 経路に対する MeHg の影響.....	32
3. IRE1 $\alpha$ の酵素活性に対する MeHg の影響.....	34
3-1 IRE1 $\alpha$ 変異体におけるリボヌクレアーゼ活性の確認.....	34
3-2 IRE1 $\alpha$ 変異体のリボヌクレアーゼ活性に対する MeHg の影響 .....	35
4. MeHg 誘導性細胞死の抑制.....	36
4-1 MeHg 誘導性細胞死に対する IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の影響 .....	36

4-2 MeHg 誘導性細胞死に対する PERK 経路の影響 .....	38
考察 .....	40
1. MeHg による細胞死惹起.....	40
2. 各小胞体ストレスセンサーに対する MeHg の影響.....	41
3. IRE1 $\alpha$ の酵素活性に対する MeHg の影響.....	42
4. MeHg 誘導性細胞死の抑制.....	44
第 2 章 .....	48
MeHg 誘導性 ER ストレスの組織・細胞特異性 .....	48
目的 .....	48
実験方法.....	49
1. 実験動物.....	49
2. Genotyping.....	49
3. 試薬投与.....	50
4. <i>In vivo</i> および <i>ex vivo</i> イメージング .....	51
5. 蓄積した水銀量測定.....	52
6. 免疫組織染色 .....	53
7. TUNEL 染色 .....	55
8. 統計処理.....	56
実験結果.....	57
1. ERAI Tg マウスによる MeHg 誘導性 ER ストレスの検出.....	57
1-1 MeHg の単回皮下投与による ER ストレス惹起の確認 .....	57
1-2 MeHg により ERAI シグナルの認められた組織の特定 .....	58
1-3 MeHg の反復皮下投与による ER ストレス惹起の確認 .....	60
2. MeHg 亜急性曝露モデルの使用 .....	62
2-1 ERAI-Venus Tg マウスの応答性の確認.....	62
2-2 MeHg の飲水投与による神経病変の確認.....	64
2-3 MeHg 飲水投与による神経細胞死誘導の確認 .....	66
2-4 MeHg 飲水投与による組織内蓄積水銀量の確認 .....	68
2-5 <i>In vitro</i> と <i>in vivo</i> における水銀蓄積量の違い.....	69
3. MeHg 飲水投与モデルにおける ERAI シグナルの検出 .....	70

3-1	大脳皮質体性感覚野における ERAI シグナルの検出 .....	70
3-2	他の大脳皮質領域における ERAI シグナルの検出 .....	72
3-3	大脳皮質以外の脳内領域における ERAI シグナルの検出.....	74
3-4	ERAI シグナル陽性細胞種の特定 .....	76
4.	MeHg 飲水投与による UPR 各経路の活性化の有無 .....	78
4-1	IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の活性化の検討 .....	78
4-2	PERK 経路の活性化の検討 .....	80
4-3	ER ストレス性アポトーシスと MeHg 誘導性神経細胞死との関連 ....	82
考察	.....	84
1.	ERAI Tg マウスによる MeHg 誘導性 ER ストレスの検出.....	84
2.	MeHg 亜急性曝露モデルの使用 .....	85
3.	MeHg 飲水投与モデルにおける ERAI シグナルの検出 .....	86
4.	MeHg 飲水投与による UPR 各経路の活性化の有無 .....	88
終章	.....	91
引用文献	.....	96
参考文献	.....	105
謝辞	.....	106

## 略語表

aaRS	aminoacyl tRNA synthetase
AEBFSF	4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride
ANOVA	analysis of variance
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF4	activation of transcription factor 4
ATF6	activation of transcription factor 6
BCA	bicinchoninic acid
Bcl-2	b-cell leukemia/lymphoma 2
BiP/GRP78	immunoglobulin binding protein/glucose-regulated protein 78
BSA	bovine serum albumin
CA	cornu ammonis
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CHOP	C/EBP homologous protein
Cys	cysteine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
dUTP	deoxyuridine triphosphate
EDTA	ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
eIF2 $\alpha$	eukaryotic initiation factor-2 alpha
EPA	Environmental Protection Agency
ER	endoplasmic reticulum
ERAD	ER-associated degradation
ERAI	ER stress-activated indicator
EtBr	ethidium bromide
FBS	fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
GADD34	growth arrest and DNA damage-inducible protein 34
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	green fluorescence protein
GPx1	glutathione peroxidase 1

GSH	glutathione
HRD1	HMG-CoA reductase degradation enzyme 1
HRP	horseradish peroxidase
Iba1	ionized calcium binding adaptor molecule 1
IgG	immunoglobulin G
IPCS	International Programme on Chemical Safety
IRE1 $\alpha$	inositol requiring enzyme 1 alpha
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KEN	kinase extension nuclease
LAT1	L-type amino acid transporter
LC-MS/MS	liquid chromatograph-mass spectrometry
LUC	luciferase
mAb	monoclonal antibody
MeHg	methylmercury
Mn-SOD	manganese superoxide dismutase
NAC	<i>N</i> -acetyl cysteine
NeuN	neuronal nuclei
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDI	protein disulfide isomerase
PEI max	polyethyleneimine max
PERK	protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PFA	paraformaldehyde
ppm	parts per million
PVDF	polyvinylidene difluoride
RIDD	regulated IRE1-dependent decay
RIPA	radioimmunoprecipitation
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription-PCR
ROS	reactive oxygen species
SEM	standard error of the mean
SDS	sodium dodecyl sulfate
SOD	superoxide dismutase
TBS-T	Tris-buffered saline tween-20

TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TE	Tris-EDTA
Tg	thapsigargin
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Trx	thioredoxin
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
Tween20	polyoxyethylene(20) solbitan monolaurate
UNEP	United Nations Environment Programme
UPR	unfolded protein response
XBP1	X-box binding protein



## 使用薬物一覧

0.05 w/v% Trypsin-EDTA · 4Na solution	富士フィルム和光純薬
2-mercaptoethanol	Merck Millipore
2-propanol	富士フィルム和光純薬
4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride	Sigma Aldrich
6×Loading buffer Triple Dye	ニッポンジーン
Acrylamide	Nacalai Tesque
Anti-ATF6a mouse mAb (73-500)	Bio Academia
Anti-DDIT3 antibody (9C8) (ab11419)	abcam
Anti-eIF2 $\alpha$ (D7D3) Rabbit mAb (5324S)	Cell Signaling
Anti-Human Glial Fibrillary Acidic Protein (M0761)	Dako
Anti-GFP mAb (M048-3)	MBL
Anti-Iba1, Rabbit (019-19741)	富士フィルム和光純薬
Anti-IRE1 $\alpha$ (14C10) Rabbit mAb (3294S)	Cell Signaling
Anti-IRE1 $\alpha$ (phospho S724) Rabbit (ab48187)	abcam
Anti-NeuN Antibody, clone A60 (MAB377)	Sigma Aldrich
Anti-PERK (C33E10) Rabbit mAb (3192S)	Cell Signaling
Anti-Phospho-eIF2 $\alpha$ (Ser51)(D9G8) Rabbit mAb	Cell Signaling
Anti-Phospho-PERK (Thr980)(16F8) Rabbit mAb (3179S)	Cell Signaling
Anti-p-PERK (Thr 981) (sc-32577)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-rabbit IgG antibody	GE Healthcare
	Life Sciences
Anti-Synoviolin (A-21) (sc-130889)	Santa Cruz Biotechnology
Anti- $\beta$ -actin (13E5) Rabbit mAb (HRP Conjugate) (5125S)	Cell Signaling
Axyprep Plasmid Midiprep Kit	Axygen
Axyprep Plasmid Miniprep Kit	Axygen
Bacto™ agar	BD (Becton, Dickinson and Company)
	BD (Becton, Dickinson and Company)
Bacto™ tryptone	BD (Becton, Dickinson and Company)
	BD (Becton, Dickinson and Company)
Bacto™ yeast extract	BD (Becton, Dickinson and Company)
	TaKaRa
BCA protein assay kit	富士フィルム和光純薬
Bromophenol blue	

BSA	Sigma Aldrich
Chloroform	富士フィルム和光純薬
Citrate buffer pH 6.0	Genemed Biotechnologies
D-MEM	富士フィルム和光純薬
D-MEM/Ham's F-12	富士フィルム和光純薬
DMSO	富士フィルム和光純薬
D-Luciferin	住商ファーマインター ナショナル
EDTA	Dojindo
EtBr	富士フィルム和光純薬
Ethanol	富士フィルム和光純薬
Ex Taq	TaKaRa
FBS	Gibco
Glutathione (Reduced form)	富士フィルム和光純薬
Glycerol	富士フィルム和光純薬
GSK2606414	Merck Millipore
HCl	富士フィルム和光純薬
Hoechst33342	Sigma Aldrich
ImmunoStar® LD	富士フィルム和光純薬
<i>In situ</i> Cell Death Detection Kit, TMR red	Sigma Aldrich
Isoflurane Inhalation Solution	Pfizer
KCl	富士フィルム和光純薬
MEM Non-essential Amino Acids Solution (×100)	富士フィルム和光純薬
Methanol	富士フィルム和光純薬
Methylmercury chloride	東京化成
M.O.M. immunodetection kit	VECTOR
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	富士フィルム和光純薬
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	富士フィルム和光純薬
NaCl	富士フィルム和光純薬
NaOH	富士フィルム和光純薬
NP-40	Sigma Aldrich
OPTI-MEM	Gibco
Penicillin-Streptomycin Solution (×100)	富士フィルム和光純薬
PFA	富士フィルム和光純薬
Phenol/Chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)	ニッポンジーン
PhosStop	Roche Diagnostics

Polyethyleneimine “MAX”	Polysciences
Protease Inhibitor	Roche Diagnostics
Proteinase K	Qiagen
Protein assay Dye reagent concentrate	Bio-Rad
PVDF (Immobilon-P)	Merck Millipore
QuickChange Site-Directed Mutagenesis	Agilent Technologies
ReverTra Ace - $\alpha$ - <sup>®</sup>	TOYOBO
rTaq DNA Polymerase	TOYOBO
SDS	富士フィルム和光純薬
Skim milk	雪印乳業
Sodium nitrite	Sigma Aldrich
Tail lysis buffer	Nacalai Tesque
TE (pH 8.0) buffer	ニッポンジーン
Thapsigargin	富士フィルム和光純薬
TRI-reagent <sup>™</sup>	Sigma Aldrich
Triton-X100	MP Biomedicals
Trizma <sup>®</sup> base	Sigma Aldrich
Tween-20	Bio-Rad
VECTASHILD Vibrance Antifade Mounting with DAPI	VECTOR
Xylene	富士フィルム和光純薬

## 序章

水俣病の原因物質として同定されたメチル水銀（MeHg）の脅威は現在も静かに続いている。MeHg は海洋に沈降した無機水銀が微生物による代謝を受けることで産生される有機水銀の 1 種である<sup>1</sup>。海洋へ沈降する水銀の起源としては、火山活動による大気中への水銀放出が挙げられる<sup>2</sup>。加えて、このような自然的要因の約 5 倍もの水銀が人為的要因によって大気中へ放出されていることが明らかとなっている<sup>3</sup>。人為的な水銀排出経路としては、石炭火力発電や金採掘などの産業活動が挙げられる<sup>4</sup>。発展途上国で盛んに行われている金採掘では金の精製時に水銀が使用され、その大気中水銀排出量は人為的要因の約 38 %を占めるとされている<sup>3</sup>。近年の世界規模での調査から、大気中に放出された水銀量は発展途上国のみならず、世界各国で高い値を示すことが明らかとなっている（図 1）<sup>3</sup>。

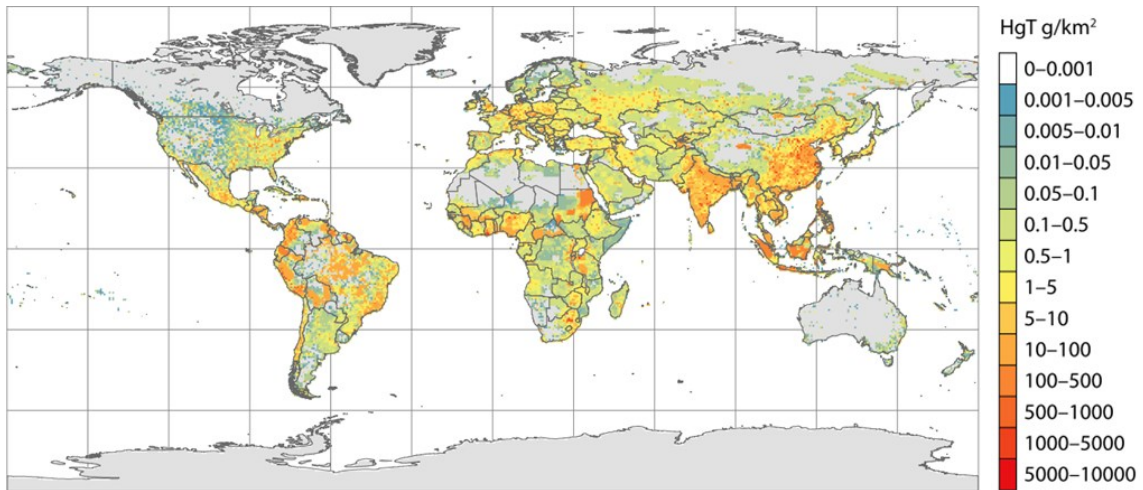


図 1 大気中水銀量の地理的分布

Global Mercury Assessment 2018 (United Nations Environment Programme (UNEP)) より

海洋中で産生された MeHg は生物濃縮を受け、マグロ、イルカおよびクジラなどに高濃度に蓄積することが知られている<sup>5</sup>。我々はこれらの大型海洋生物を食すことで MeHg に曝露している。かつて、MeHg の蓄積した魚介類の摂取によって中枢および末梢神経系の障害（MeHg 中毒：水俣病）が生じたことが本国において大きな社会問題となった。この一件を受けて、世界各国で産業的な水銀使用を制限する「水銀の使用に関する水俣条約」が 2017 年に締結・発行された。

また、2019年にアメリカ食品医薬品局（FDA）およびアメリカ合衆国環境保護庁（EPA）は妊婦や幼児の海洋生物摂取に対して注意喚起を公表しており<sup>6</sup>、MeHgによる健康影響は現在も尚、警戒されている。

MeHg ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) は親電子性を有しており、タンパク質中のシステイン (Cys) 残基チオール基 (チオレートアニオン) と高い親和性を示すことが知られている<sup>7</sup>。MeHg は Cys と複合体を形成し、メチオニンと類似した構造を取ることでメチオニン輸送系を利用し、生体内に吸収される<sup>8</sup>。そのため、無機水銀における消化管からの吸収率が数%であるのに対し、MeHg は約 90 % と極めて高い<sup>9,10</sup>。加えて、MeHg は体内でも比較的安定であるため体外排出が遅く、蓄積による慢性毒性が生じやすいとされている<sup>10</sup>。また、MeHg は血液脳関門を容易に通過するため脳への移行性が高く、小脳顆粒細胞などの特定領域を傷害することが報告されている<sup>11,12</sup>。しかしながら、水俣病の発見から 60 年以上経過した現在においても、MeHg による神経細胞死誘導メカニズムについて統一した見解は得られていない。

MeHg とチオレートアニオンとの共有結合は S-水銀化修飾と呼ばれ、タンパク質の機能変化を引き起こし、生体内恒常性の破綻、すなわち細胞障害に繋がると考えられている (図

2)。S-水銀化修飾に起因した細胞障害機構として、酸化ストレス、

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度増加、グルタミン酸の取り込

み障害、タンパク質合成阻害および微小管障害が関与することが挙げられている<sup>13</sup>。特に、酸化ストレスおよび細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度増加に起因した毒性発現メカニズムが有力であると考えられている。抗酸化物質の一種であるグルタチオン

(GSH) には親電子性の高い化合物や重金属などの生体異物と結合し、生体外への排出を促進する解毒作用がある<sup>14</sup>。MeHg は GSH と容易に反応し、細胞外へ排出されることで解毒されるが、大量の MeHg が生体内に取り込まれた場合には GSH が枯渇し、活性酸素種 (ROS) に対して脆弱になると考えられている<sup>15</sup>。

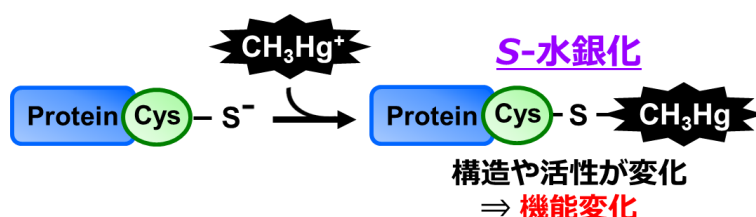


図 2 タンパク質 Cys 残基の S-水銀化

また、抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) が, MeHg による S-水銀化修飾を受け, 酵素活性が低下することで ROS が増加することが示唆されている<sup>16</sup>. 細胞内の Ca<sup>2+</sup>は小胞体 (ER) やミトコンドリアなどの細胞小器官に貯蔵されており, 細胞質中における Ca<sup>2+</sup>は低濃度に保たれている. MeHg は ER 膜上に存在するカルシウムポンプ Ca<sup>2+</sup>-ATPase を S-水銀化することで Ca<sup>2+</sup>の輸送障害を引き起こし, 細胞質内 Ca<sup>2+</sup>濃度を増加させることが示唆されている<sup>17,18</sup>.

S-水銀化に起因した細胞障害機構が種々提唱される中, 当研究室ではこれまでに, 新生タンパク質の成熟化を担う ER 局在ジスルフィド結合異性化酵素 protein disulfide isomerase (PDI) が S-水銀化されることを明らかにしてきた<sup>19</sup>. PDI は S-水銀化を受けることで酵素活性を消失し, ER 内にミスフォールドしたタンパク質の蓄積を引き起こすことが示唆されている. ER は新生タンパク質の品質管理と Ca<sup>2+</sup>の貯蔵を担う細胞小器官であり, 分子シャペロンや種々の酵素によって新生タンパク質の正常な高次構造形成を促進する. しかし, 栄養飢餓や, 低酸素, 酸化ストレス, 虚血, 重金属などのストレスが負荷されると正常な高次構造形成が阻害され, ミスフォールドタンパク質が ER に蓄積する<sup>20</sup>. また, 細胞質への Ca<sup>2+</sup>放出により, ER 局在 Ca<sup>2+</sup>依存性分子シャペロンの活性が低下し, ミスフォールドタンパク質の蓄積が引き起こされることも知られている<sup>21</sup>. このようなミスフォールドタンパク質が ER に蓄積した状態は ER ストレスと呼ばれる. 細胞は ER ストレスに対して, ER ストレス応答 (UPR) と呼ばれる防御機構を備えており, (1) ~ (3) に示したような働きによりミスフォールドタンパク質の蓄積を回避する<sup>22,23</sup>.

- (1) 新規に合成されるタンパク質の翻訳抑制
- (2) 分子シャペロンの転写誘導によるタンパク質のフォールディング促進
- (3) ER 関連分解 (ER-associated degradation : ERAD) によるミスフォールドタンパク質のプロテアソーム依存的な分解促進

UPR は, inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ), activating transcription factor 6 (ATF6), protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) の3つの

膜貫通型タンパク質（ER ストレスセンサー）が ER 内のミスフォールドタンパク質蓄積を感知することで開始する（図 3）. ストレス負荷がない状態ではいずれのストレスセンサータンパク質も ER シャペロン immunoglobulin binding protein/Glucose-regulated protein 78 (BiP/Grp78) とヘテロダイマーを形成し、不活性化状態で存在している. ER ストレスが負荷されると、BiP がミスフォールドタンパク質と結合し、各センサータンパク質のセンサードメインから解離する. この BiP の解離により、各センサータンパク質は活性化する.

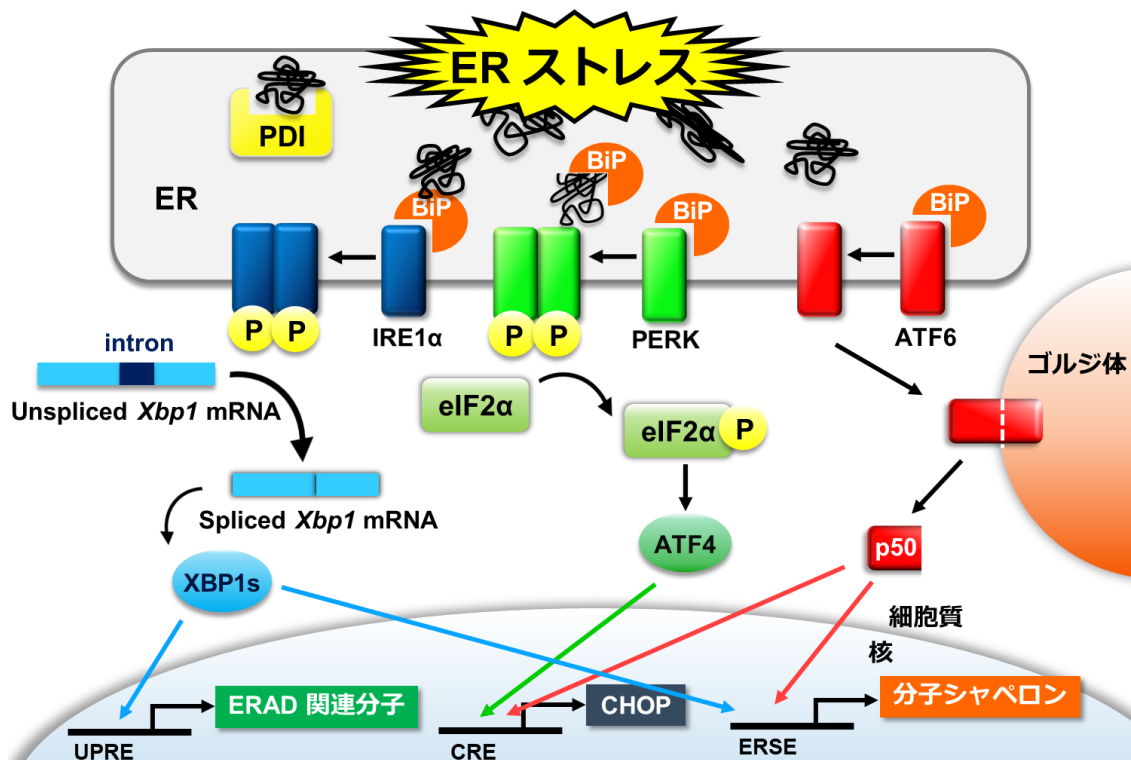


図 3 UPR の概略図

PERK は細胞質側に 2 つのキナーゼ領域を有するタンパク質であり、BiP が解離すると多量体化し、自己リン酸化により活性化する<sup>24,25</sup>. 活性化 PERK はリボソームを構成する翻訳開始因子 eukaryotic translation-initiation factor-2  $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) をリン酸化してタンパク質翻訳を抑制する<sup>26</sup>. この機構は、ER ストレス下においてタンパク質合成を一時的に停止させることにより、ER への負荷を軽減させることが目的と考えられている. また、PERK-eIF2 $\alpha$  系の過剰な活性化は、転写因子 activation of transcription factor 4 (ATF4) の翻訳を促進する. 誘導された ATF4 は C/EBP homologous protein (CHOP) を転写誘導することでアポトーシスを誘起

する<sup>27</sup>.

ATF6 は BiP が解離した後、ER からゴルジ体に移行し、細胞質側の N 末端領域が site-1 protease (S1P) と site-2 protease (S2P) によりプロセッシングを受けることで ER 膜より遊離する<sup>28,29</sup>. 切断された ATF6 の N 末端領域 (p50) は核に移行し、転写因子として分子シャペロンや CHOP などを誘導する.

IRE1 $\alpha$  は細胞質側にセリン/スレオニンキナーゼドメインとリボヌクレアーゼドメインを有するタンパク質である<sup>30,31</sup>. IRE1 $\alpha$  は BiP 解離後、ホモダイマーを形成して自己リン酸化により活性化し<sup>32</sup>, 転写因子 X-box binding protein (XBP1) の mRNA をスプライソソーム非依存的にスプライシングすることで活性型 XBP1 (XBP1s) を産生する<sup>33,34</sup>. XBP1s は BiP や PDI などの ER シャペロン分子の他、ERAD 関連分子を発現誘導することが示唆されている<sup>35</sup>. ERAD は、ER 内腔および ER 膜に存在するミスフォールドタンパク質を細胞質に逆行輸送し、ユビキチン-プロテアソーム依存的に分解する機構である<sup>23</sup>. また、IRE1 $\alpha$  は regulated Ire1-dependent decay (RIDD) と呼ばれる機構の活性化にも関与する. RIDD ではオリゴマーを形成した IRE1 $\alpha$  が、分泌タンパク質や膜タンパク質をコードする mRNA を切断・分解へ導くことで、ER ストレス時に ER への新規合成タンパク質の流入を抑制することが報告されている<sup>36</sup>.

持続的あるいは重度の ER ストレスによって ER の恒常性維持が難しくなると、CHOP を介した抗アポトーシス分子 b-cell leukemia/lymphoma 2 protein (Bcl-2) の発現抑制などによってアポトーシスが誘導されることが知られている<sup>27</sup>. 慢性的な UPR の活性化によるアポトーシス誘導は様々な疾患との関連が報告されており、特にミスフォールドタンパク質の蓄積という共通した特徴を呈することから、神経変性疾患と ER ストレスとの関連に注目が集まっている<sup>37</sup>. 神経変性疾患であるアルツハイマー病、パーキンソン病および筋萎縮性側索硬化症モデルにおいて CHOP の誘導が認められており、神経細胞死に UPR の活性化が関与することが示唆されている<sup>38-40</sup>.

MeHg の曝露によって ER ストレスが惹起されることは他のグループにおいて



も細胞および動物レベルで報告されている<sup>41-44</sup>。また、抗酸化物質 trolox や *N*-acetyl cysteine (NAC) の同時処理または前処理によって、MeHg による ER ストレスマーカーの増加が抑制されたことから、MeHg 誘導性 ER ストレスは酸化ストレスを介して惹起されることが示唆されている<sup>41,43,44</sup>。したがって、MeHg によるアポトーシス誘導には酸化ストレス発生後のイベントである UPR の活性化が関与する可能性がある。しかしながら、生存シグナルと細胞死シグナルの二極性を有する UPR が MeHg 曝露下でどちらを優位に機能させるのかは不明であった。そこで、本研究では MeHg 誘導性神経細胞死における ER ストレスおよび UPR の関与を明らかにすることを目的とし、細胞レベルおよび動物レベルでの検討を行った。

## 第 1 章

### MeHg による小胞体ストレスを介した細胞死誘導機構

#### 目的

当研究室ではこれまでに、ER に局在するジスルフィド結合異性化酵素 PDI が S-水銀化修飾を受けることで酵素活性を消失し、新生タンパク質の成熟化が阻害された結果、ER ストレスが惹起されることを明らかにしてきた。しかし、MeHg 誘導性 ER ストレスに対して UPR は生存へ働くのか、細胞死を誘導するのか、細胞運命がどのように方向付けられるのか明らかにされていなかった。そこで、本研究では 3 つの ER ストレスセンサータンパク質を介した UPR 各経路の活性化および細胞運命決定に MeHg が及ぼす影響について解析した。

## 実験方法

### 1. 細胞培養

徳島大学 先端酵素学研究所 親泊 政一 教授よりご恵与頂いたマウス胎児性線維芽細胞 (MEF) 細胞は, 10 % Fetal bovine serum (FBS) (56 °C, 30 分間非動化处理), 1 % MEM Non-essential Amino Acids Solution, 1 % Penicillin-Streptomycin Solution を含む D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培地を用いて 95 % air-5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C の条件下で培養した.

ATCC より購入したヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞 (ATCC, CRL-2266) は, 10 % FBS (56 °C, 30 分間非動化处理), 1 % Penicillin-Streptomycin Solution を含む D-MEM/Ham's F-12 培地を用いて 95 % air-5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C の条件下で培養した.

金沢医科大学 総合医学研究所 岩脇 隆夫 教授よりご恵与頂いた IRE1 $\alpha$  ノックアウト (KO) マウス胎児性線維芽細胞 MEF 細胞は, 10 % FBS (56 °C, 30 分間非動化处理), 1 % MEM Non-essential Amino Acids Solution, 1 % Penicillin-Streptomycin Solution を含む D-MEM 培地を用いて 95 % air-5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C の条件下で培養した.

### 2. 試薬処理

#### (1) MeHg の調製

Methylmercury Chloride (東京化成, M0589) 25.108 mg を DMSO 1 mL に溶解し, 100 mM stock solution を調製した. 使用する際は 100 mM MeHg stock solution を dimethyl sulfoxide (DMSO) で 10 mM に希釈した後, 使用した.

#### (2) MeHg 処理 (細胞死の検討)

MEF 細胞を翌日に 40-50 % confluent になるように 12-well dish に播種し, 培養した. その後, 終濃度が各濃度になるよう 10 mM MeHg を 50  $\mu$ L のフレッシュな培地に懸濁した後, 培養上清に添加した. コントロール群には, MeHg と等量の DMSO を懸濁した培地を添加した (終濃度 0.03 %).

### (3) MeHg 処理 (ER ストレスの検討)

MEF 細胞を翌日に 70-80 % confluent になるように 6-well dish に播種し、培養した。その後、各濃度になるよう 10 mM MeHg を 50  $\mu$ L のフレッシュな培地に懸濁した後、培養上清に添加した。コントロール群には、MeHg と等量の DMSO を懸濁した培地を添加した (終濃度 0.01 %)。

### (4) ER ストレス誘導薬処理

ER ストレス誘導薬 Thapsigargin (Tg) (富士フィルム和光純薬, 209-17281) 1 mg を DMSO 153.66  $\mu$ L に溶解し、10 mM solution を調製し、使用した。

MEF 細胞を翌日に 70-80 % confluent となるように 6-well dish に播種し、培養した。その後、各濃度になるよう 10 mM Tg を 50  $\mu$ L のフレッシュな培地に懸濁した後、培養上清に添加した。

### (5) NaCl 処理

Sodium Chloride (富士フィルム和光純薬, 191-01665) 2.92 g を滅菌精製水 10 mL に溶解し、5 M solution を調製した。

MEF 細胞を翌日に 70-80 % confluent となるように 24-well dish に播種し、培養した。その後、終濃度 250 mM になるよう 5 M NaCl を直接培養上清に添加した。

### (6) PERK 阻害薬処理

PERK 阻害薬 GSK2606414 (Merck Millipore, 516535) 5 mg を DMSO 1107.56  $\mu$ L に溶解し、10 mM solution を調製した。

MEF 細胞を翌日に 40-50 % confluent となるように 12-well dish に播種し、培養した。その後、各濃度になるよう 10 mM GSK2606414 を 50  $\mu$ L のフレッシュな培地に懸濁した後、培養上清に添加した。

## **3. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)**

### (1) RNA 抽出

MEF 細胞を RNA 抽出時に 70-80 % confluent となるように 6-well dish に播種し、培養した。培地を除去後、氷冷 PBS(-)で wash し、TRI Reagent (Sigma Aldrich,

T9424) を 500  $\mu\text{L}$  加え、室温で 5 分間静置した。クロロホルムを 100  $\mu\text{L}$  加え、激しくボルテックスし (15 秒間)、室温で 3 分間静置した。12,000 $\times g$ , 4  $^{\circ}\text{C}$ , 15 分間遠心分離して水相・中間相・有機相に分け、RNA が含まれる水相のみを新しいチューブに移した。2-Propanol を 250  $\mu\text{L}$  加えて転倒混和した後、室温で 10 分間静置した。12,000 $\times g$ , 4  $^{\circ}\text{C}$ , 10 分間遠心分離し、上清を除去した。75% ethanol を 500  $\mu\text{L}$  加えてボルテックスした後、20,400 $\times g$ , 4  $^{\circ}\text{C}$ , 5 分間遠心分離して上清を除去し、室温で 5 分間風乾した。ペレットが完全に乾く前に適当量の滅菌精製水に溶解させた。

## (2) cDNA 合成

cDNA 合成は ReverTra Ace - $\alpha$ -<sup>®</sup> (TOYOBO, FSK-101F) を使用して行った。氷上の PCR チューブに下記の RNA 希釈液を用意した。

[RNA 希釈液]

Total RNA	x $\mu\text{L}$ (= 0.5 $\mu\text{g}$ )
RNase Free H <sub>2</sub> O	(5.875 - x) $\mu\text{L}$

この RNA に下記の mixture を添加し、慎重に混ぜた。

5 $\times$ RT Buffer	2 $\mu\text{L}$
Deoxynucleotide Mix (10 mM each)	1 $\mu\text{L}$
RNase Inhibitor (10 U/ $\mu\text{L}$ )	0.125 $\mu\text{L}$
Oligo(dT) <sub>20</sub> Primer (25 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
ReverTra Ace	0.5 $\mu\text{L}$
Total	4.125 $\mu\text{L}$

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa) を用いて 42  $^{\circ}\text{C}$  で 20 分間インキュベーションした後、99  $^{\circ}\text{C}$  で 5 分間逆転写酵素を不活化した。その後、4  $^{\circ}\text{C}$  で急冷し反応を停止させた。

## (3) PCR

PCR は EmeraldAmp PCR<sup>®</sup> Master Mix (TaKaRa, RR300A) を用いて行った。以下の試薬を Sample 数分作って分注した。

EmeraldAmp PCR Master Mix	10.0 $\mu$ L
forward primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L
reverse primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L
total	10.8 $\mu$ L

cDNA 1  $\mu$ L と滅菌精製水 8.2  $\mu$ L を入れたチューブに mixture 10.8  $\mu$ L を入れてピペッティングし、スピンドウンした後、Thermal Cycler を用いて PCR を行った。PCR 産物は 6% アクリルアミドゲルに 5  $\mu$ L/lane でアプライし、1 $\times$ TBE Buffer 中、100 V, 400 mA で 60 分間電気泳動した。泳動後、ゲルを 0.5 $\times$ TBE Buffer (EtBr 含有) 中で 20 分間振とうし、Gel DocTM EZ Imager (Bio-Rad) で DNA バンドを検出した。各種 primer とサイクル条件は以下の通りである (表 1)。

表 1. 各種 Primer およびサイクル条件

遺伝子	Primer (F:forward R:reverse)		サイクル条件	産物長
$\beta$ -actin	F	cct gac ggc cag gtc atc	95 $^{\circ}$ C, 2 min (95 $^{\circ}$ C, 1 min / 55 $^{\circ}$ C, 1 min / 72 $^{\circ}$ C, 20 sec.) $\times$ 25	295 bp
	R	gga ctc gtc ata ctc ctg	4 $^{\circ}$ C, $\infty$	
Chop	F	tgc ctt tea cct tgg aga cg	95 $^{\circ}$ C, 2 min (95 $^{\circ}$ C, 1 min / 57 $^{\circ}$ C, 1 min / 72 $^{\circ}$ C, 30 sec.) $\times$ 24	252 bp
	R	cca tag aac tct gac tgg aat ctg g	4 $^{\circ}$ C, $\infty$	
Bip	F	gaa agg atg gtt aat gat gct gag	94 $^{\circ}$ C, 2 min (94 $^{\circ}$ C, 15 sec. / 55 $^{\circ}$ C, 30 sec. / 68 $^{\circ}$ C, 1 min) $\times$ 20	231 bp
	R	gtc ttc aat gtc cgc atc ctg	72 $^{\circ}$ C, 7 min 4 $^{\circ}$ C, $\infty$	
Xbp1	F	tta cga gag aaa act cat ggc c	95 $^{\circ}$ C, 2 min (95 $^{\circ}$ C, 1 min / 55 $^{\circ}$ C, 1 min / 72 $^{\circ}$ C, 20 sec.) $\times$ 30	289 bp (unspliced)
	R	ggg tcc aag ttg tcc aga atg c	72 $^{\circ}$ C, 10 min 4 $^{\circ}$ C, $\infty$	263 bp (spliced)

#### 4. Hoechst 染色

Hoechst 33342 は細胞膜透過性の高い DNA 結合色素であり、細胞の固定化や透過化を行わずに培地への添加によって細胞核の染色を行うことが可能である。MeHg 処理を行った細胞に Hoechst 33342 を終濃度 10  $\mu$ M になるように添加し、

37 °C, 15 分間, 95 % air-5 % CO<sub>2</sub> の条件で培養した. その後, 蛍光顕微鏡 BZ-X810 (Keyence) を用いて細胞観察を行った.

また, Hoechst 染色を行った細胞を, 蛍光顕微鏡下でそれぞれの well からランダムに 3 箇所を選んで撮影し, ImageJ を用いて解析した. 解析結果より, 全細胞数に対する生細胞の割合を算出し (アポトーシスによる核の凝集によって青色蛍光が強くなっているものを死細胞とみなした), グラフ化および統計処理を行った.

## **5. Western blotting**

### (1) 細胞質画分の調製

使用する試薬は以下のように調製した.

PBS :	137 mM NaCl
	2.7 mM KCl
	8.1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O
	1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
NP-40 Lysis buffer :	50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
	150 mM NaCl
	1 v/v% NP-40,
	5 mM EDTA
	1 × Protease Inhibitor
	1 × Phosphatase Inhibitor
4 × SDS sampling buffer :	250 mM Tris-HCl (pH 6.8)
	40 v/v% Glycerol,
	20 v/v% 2-Mercaptoethanol,
	8 w/v% SDS,
	0.02 w/v% Bromophenol Blue
SDS-PAGE Running buffer :	25 mM Tris,
	192 mM Glycine,
	1 w/v% SDS

Transfer buffer	:	25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20 v/v% Methanol
TBS-T	:	137 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 v/v% Tween 20

培地を除去後、氷冷 PBS(-) で wash し、NP-40 Lysis buffer 60-80  $\mu$ L を加え、4 $^{\circ}$ C にて 5 分間静置した。細胞をスクレープし、4 $^{\circ}$ C, 20,400 $\times$ g, 10 分間遠心分離後、その上清を細胞可溶性画分として回収した。そのうち 2  $\mu$ L をタンパク質定量に使用し、また 45  $\mu$ L に 15  $\mu$ L の 4 $\times$ SDS Sampling buffer を加えて 100 $^{\circ}$ C で 5 分間煮沸することで Western blotting 用サンプルとした。細胞可溶性画分のタンパク質量は Bradford 法により測定した。

**【Bradford 法によるタンパク質定量】**

0, 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL の BSA 水溶液および細胞可溶性画分サンプル水溶液各 800  $\mu$ L に対し、200  $\mu$ L の protein assay 試薬 (Bio-Rad, 500-0006) を加え、転倒混和後、595 nm における吸光度を吸光分光光度計 (BECKMAN COULTER) によって測定した。BSA 水溶液の測定値より検量線を作成し、細胞可溶性画分の sample の濃度を算出した。

**(2) SDS-PAGE**

SDS を含むポリアクリルアミドゲルに sample を供し、泳動用緩衝液として SDS-PAGE running buffer を用い、80 V の電圧で 30 分間、130 V で 60 分間電気泳動した。ゲル上のタンパク質は 4 $^{\circ}$ C, 100 V の定電圧で 60 分間、Transfer buffer 中で PVDF 膜 (Merck Millipore, IPVH00010) 上に転写した。この PVDF 膜を Blocking buffer (表 2 参照。希釈溶液はすべて TBS-T (0.1 v/v% Tween20) を使用) を用いて振盪した。その後、Blocking buffer で希釈した各種一次抗体および二次抗体を用いて膜を振盪し、Chemi Doc<sup>TM</sup> MP システム (Bio-Rad) を用いて検出した。



表 2. Western blotting で使用した抗体

抗体	ゲル (%)	Blocking buffer	希釈倍率	2 <sup>nd</sup> Ab 希釈倍率
β-actin	8	5 % milk in TBST	1:50,000	—
PERK	8	5 % BSA in TBST	1:5,000	Rabbit (1:50,000)
p-PERK	8	5 % BSA in TBST	1:5,000	Rabbit (1:50,000)
eIF2α	12	5 % BSA in TBST	1:5,000	Rabbit (1:50,000)
p-eIF2α	12	5 % BSA in TBST	1:5,000	Rabbit (1:50,000)
ATF6	8	5 % milk in TBST	1:5,000	mouse (1:50,000)
IRE1α	8	5 % BSA in TBST	1:5,000	Rabbit (1:50,000)
p-IRE1α	8	5 % BSA in TBST	1:5,000	Rabbit (1:50,000)

## 6. 変異型 IRE1α の構築

宮崎大学 医学部 西頭 英起 教授よりご恵与していただいた IRE1α 発現プラスミド (pcDNA3-hIRE1α-HA ; h=human) を用いて, IRE1α の Kinase extension nuclease (KEN) ドメイン中の Cys を Ser に置換した CS mutant 体 (C931S, C951S) を作製した. 変異体作製には QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, 210519) を用いた.

50 ng の pcDNA3-hIRE1α-HA ベクターに 5 μL の 10 x reaction buffer, 1 μL の dNTP mix, 変異を含む 1 μL の sense および anti-sense プライマー (125 ng), 1.5 μL の Quick solution, 1 μL の 2.5 U/μL Pfu Turbo DNA polymerase を加え, 滅菌精製水で全量を 50 μL とした. PCR 条件は以下に示した条件で行った (表 3).

表 3. サイクル条件

Condition
95°C, 2 min
(95°C, 2 min / 60°C, 10 sec / 68°C, 5 min.)×18
68°C, 5 min
4°C, ∞

プライマーの配列

C931S sense 5'-CTCCCCGACGACTTCGTGTCCTACTTTCACATCTCGC TTC-3'  
anti-sense 5'-GAAGCGAGATGTGAAGTAGGACCACGAAGTCGTCCGGGGAG-3'  
C951S sense 5'-CGGGCCATGGAGCTGTCCAGCCACGAGAGACTCTTC-3'  
anti-sense 5'-GAAGAGTCTCTCGTGGCTGGACAGCTCCATGGCCCCG-3'

40  $\mu$ L の PCR 産物に 1  $\mu$ L の Dpn1 restriction enzyme (10 U/ $\mu$ L) を加え, 転倒混和した後, 37 °C で 5 分間反応させた. 2  $\mu$ L の Dpn1 処理 DNA サンプルを 45  $\mu$ L の XL-Gold ultracompetent cell に加えてトランスフォーメーションを行った.

## **7. Transfection**

IRE1 $\alpha$  KO MEF 細胞をトランスフェクション時に 70-80 % confluent となるように 6-well dish に播種し, 培養した. その後, 2  $\mu$ g の WT-hIRE1 $\alpha$ -HA, C931S-hIRE1 $\alpha$ -HA, C951S-hIRE1 $\alpha$ -HA 発現プラスミド DNA をそれぞれ OPTI-MEM と PEI-MAX の mixture に加え, 室温で 20 分間インキュベーションした. その後, mixture を培地に処理し, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 存在下で培養した. 6 時間インキュベートした後, 37 °C で温めたフレッシュな培地と培地交換し, 18 時間培養した後, 実験に供した.

## **8. 統計処理**

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 8 (GraphPad Software) を使用した. 多重検定の統計的な有意差は one-way analysis of variance (ANOVA) により検定し, 事後検定として Bonferroni 法を用いた. 統計的有意差は \*: $p$ <0.05, \*\*: $p$ <0.01, \*\*\*: $p$ <0.001 で示した.

## 実験結果

### 1. MeHg による細胞死惹起

#### 1-1 MeHg による細胞死惹起の確認

先行研究より、ヒト神経芽細胞種 SH-SY5Y において MeHg による細胞死誘導と ER ストレス惹起が確認されている。本章では、マウス胎児性繊維芽細胞 MEF においても同様に、MeHg による細胞死および ER ストレスが誘導されるか否か検討した。MEF 細胞に各濃度 (0, 1, 2, 3  $\mu$ M) の MeHg を 12, 24 時間処理したのち、Hoechst 染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて位相差観察および蛍光観察を行った。また、Hoechst 染色を行った細胞については細胞生存率を算出し、統計解析を行った。その結果、MeHg 処理 12 時間および 24 時間において、MeHg 処理濃度依存的に有意な細胞生存率の減少が確認された (図 4A-D)。

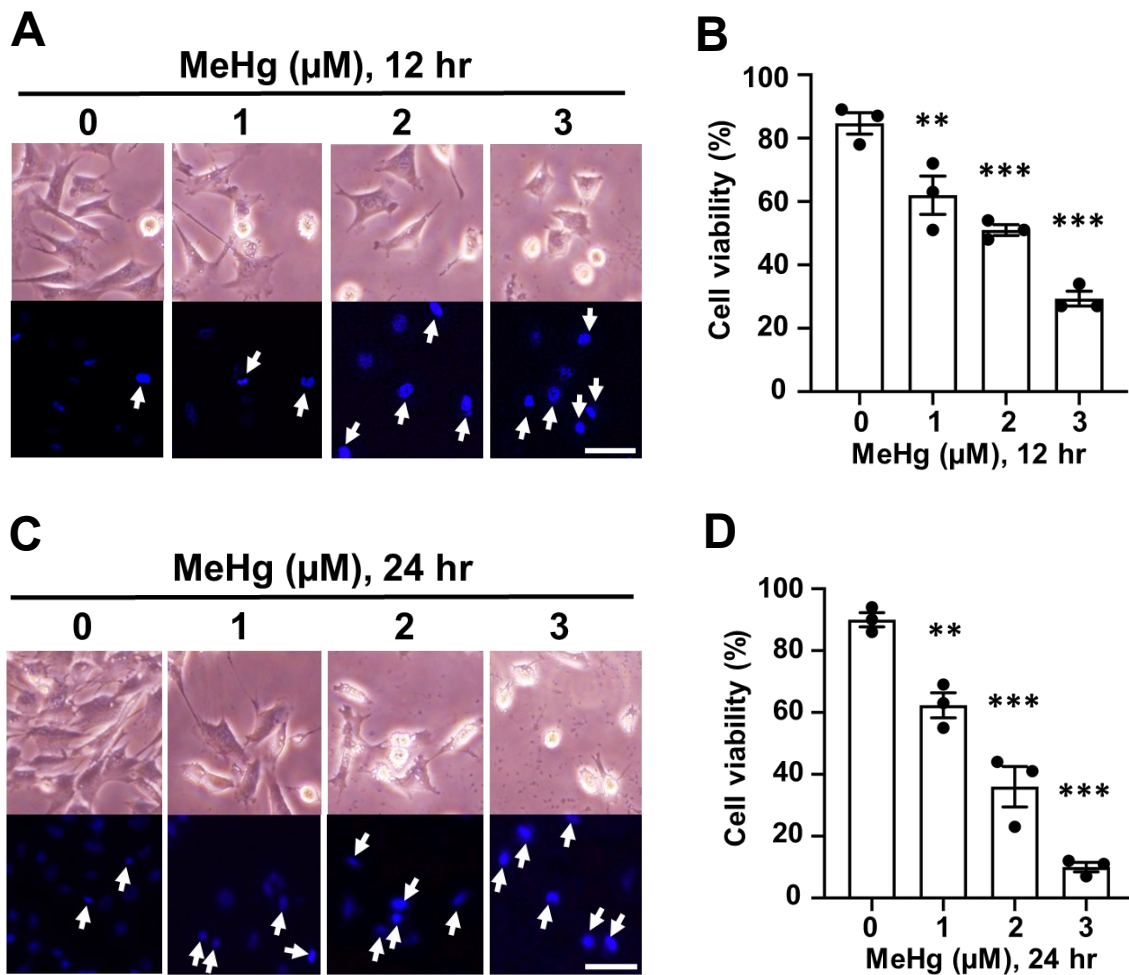


図 4 MeHg 処理による細胞死惹起の確認

- A) MEF 細胞に 1-3  $\mu\text{M}$  MeHg を 12 時間処理した時の明視野細胞観察像と Hoechst 染色像。
- B) MeHg を 12 時間処理した MEF 細胞の細胞生存率について、ImageJ を用いて定量化したもの。
- C) MEF 細胞に 1-3  $\mu\text{M}$  MeHg を 24 時間処理した時の明視野細胞観察像と Hoechst 染色像。
- D) MeHg を 24 時間処理した MEF 細胞の細胞生存率を定量化したもの。
- Hoechst 染色像内の矢印は核の凝集したアポトーシス細胞を示す。各画像のスケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。定量値は平均値 $\pm$ 標準誤差 (SEM) を示す。  
 $n=3$ , \*\*:  $p<0.01$ , \*\*\*:  $p<0.001$  vs 0  $\mu\text{M}$  by one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test.

## 1-2 MeHgによるERストレス惹起の確認

次に、MEF細胞にMeHgを処理することでERストレスが誘導されるか否かを明らかにするために、ERストレスマーカーである*Chop*および*Bip* mRNAレベルをRT-PCR法により解析した。その結果、MeHg処理後3-6時間において、*Chop* mRNAが増加していることが判明した(図5A)。また、MeHg処理3時間において、MeHg処理濃度依存的な*Chop* mRNAの増加が認められた。(図5B)しかしながら、*Bip* mRNAは両条件下において増加しなかった(図5A, B)。

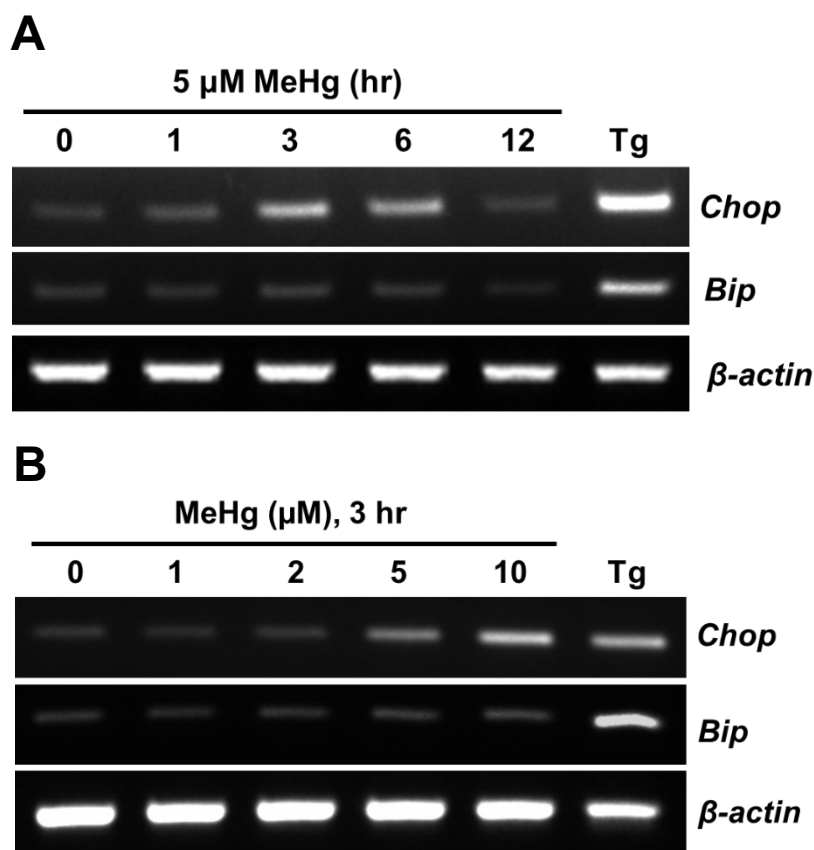


図5 MeHg処理による*Chop*および*Bip* mRNAレベルの変化

A) MEF細胞に終濃度5  $\mu$ M MeHgを処理した時の*Chop*および*Bip* mRNAレベルの経時変化

B) MEF細胞に1-10  $\mu$ M濃度のMeHgを3時間処理した時の*Chop*および*Bip* mRNAレベル変化

ERストレスマーカーのポジティブコントロールとして、MEF細胞に終濃度5  $\mu$ M Tgを3時間処理したサンプルを使用した。

## 2. 各小胞体ストレスセンサーに対する MeHg の影響

### 2-1 PERK 経路に対する MeHg の影響

1-2 の結果より, MEF 細胞においても MeHg 処理によって ER ストレス惹起が認められることが判明した. そこで, 次に MeHg 誘導性 ER ストレスによる各小胞体ストレスセンサー (PERK, ATF6, IRE1 $\alpha$ ) および各経路の活性化について検討した. MEF 細胞に MeHg を処理した際の PERK および eIF2 $\alpha$  の活性化 (リン酸化) を, 特異的抗体を用いた Western blotting 法から検討した. その結果, 終濃度 10  $\mu$ M の MeHg 処理時間依存的な PERK のリン酸化亢進が認められた (図 6A). また, 5-10  $\mu$ M の MeHg を 3 時間処理すると, MeHg 処理濃度依存的に PERK および eIF2 $\alpha$  のリン酸化が増加することも明らかとなった (図 6B).

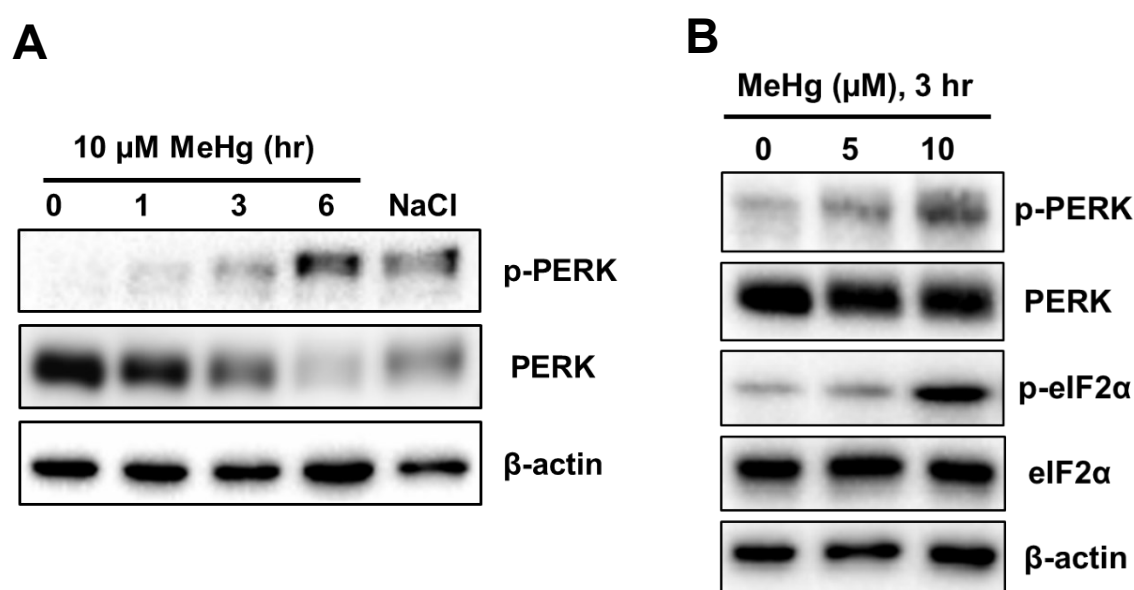


図 6 PERK および eIF2 $\alpha$  のリン酸化に対する MeHg の影響

- A) MEF 細胞に終濃度 10  $\mu$ M の MeHg を処理した時のリン酸化 PERK レベルの時間依存性. リン酸化 PERK のポジティブコントロールとして, 終濃度 250 mM NaCl を 1 時間処理したサンプルを使用した.
- B) MEF 細胞に MeHg を 3 時間処理した時のリン酸化 PERK およびリン酸化 eIF2 $\alpha$  レベルの濃度依存性.

## 2-2 ATF6 経路に対する MeHg の影響

続いて、MeHg によって ATF6 経路が活性化するか否か検討した。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に MeHg を処理し、ATF6 の活性化（限定分解の亢進）を検討した結果、終濃度 4  $\mu$ M の MeHg 処理時間依存的に ATF6 の切断断片である p50 の増加が認められた（図 7）。

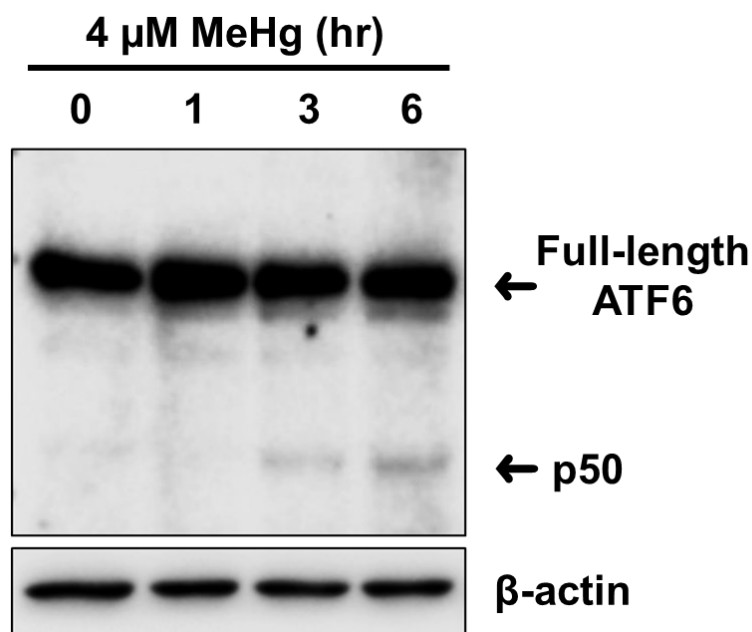


図 7 ATF6 の限定分解に対する MeHg の影響

SH-SY5Y 細胞に終濃度 4  $\mu$ M MeHg を処理した時の切断型 ATF6 レベルの時間依存性。

### 2-3 IRE1 $\alpha$ 経路に対する MeHg の影響

#### (1) IRE1 $\alpha$ のリン酸化の検討

次に, MeHg によって IRE1 $\alpha$  経路が活性化するのか否か検討した. MEF 細胞に MeHg を処理した時のリン酸化 IRE1 $\alpha$  レベルを検討した結果, 終濃度 5  $\mu$ M の MeHg 処理時間依存的にリン酸化 IRE1 $\alpha$  が増加することが判明した(図 8A). また, 0.1-2  $\mu$ M の MeHg を 1 時間処理すると, MeHg 処理濃度依存的に IRE1 $\alpha$  のリン酸化が増加することも明らかとなった(図 8B).

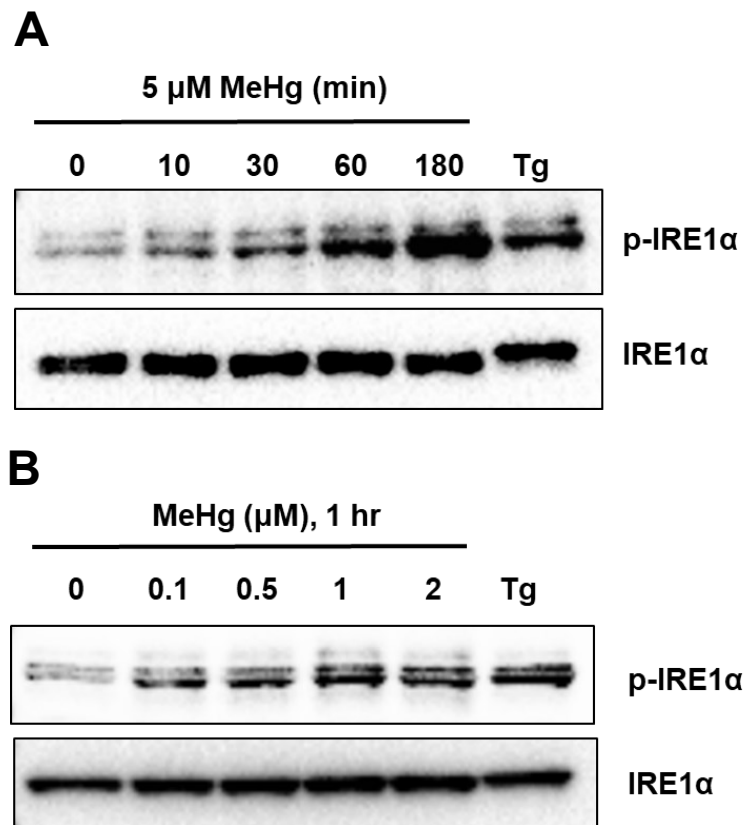


図 8 IRE1 $\alpha$  のリン酸化に対する MeHg の影響

A) MEF 細胞に終濃度 5  $\mu$ M の MeHg を処理した時のリン酸化 IRE1 $\alpha$  レベルの時間依存性.

B) MEF 細胞に MeHg を 1 時間処理した時のリン酸化 IRE1 $\alpha$  レベルの濃度依存性.

リン酸化 IRE1 $\alpha$  のポジティブコントロールとして, 終濃度 10  $\mu$ M Tg を 10 min 処理したサンプルを使用した.



(2) *Xbp1* mRNA のスプライシングの検討

IRE $\alpha$  は細胞質側にキナーゼドメインとリボヌクレアーゼドメインを有し、自己リン酸化により高次構造が変化するとリボヌクレアーゼ活性が上昇する。活性化型リボヌクレアーゼドメインは基質である *Xbp1* mRNA を 2 か所切断し、26 塩基のイントロンを除去する (図 9) <sup>45,46</sup>。

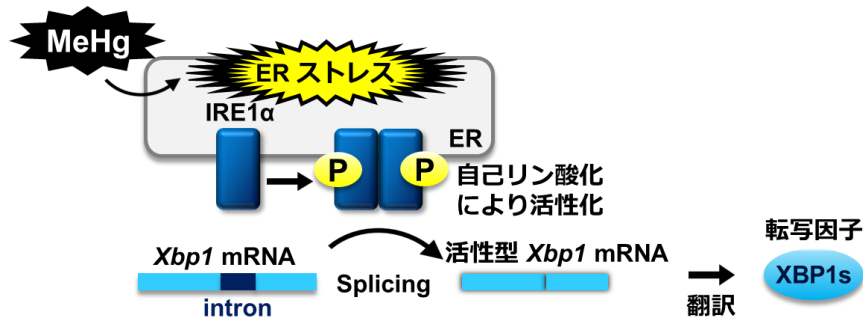


図 9 *Xbp1* mRNA のスプライシングの概略図

スプライソソーム非依存的にスプライシングされた *Xbp1* mRNA は転写因子 XBP1s をコードしており、ERAD 関連タンパク質や ER シャペロン分子を発現させる <sup>33</sup>). そこで、*Xbp1* mRNA スプライシングに対する MeHg の影響を RT-PCR 法により検討した。MEF 細胞に 1-5  $\mu$ M の MeHg を 3 時間処理した結果、*Xbp1* mRNA のスプライシングはほとんど観察されなかった (図 10)。このことから、MeHg は IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の活性化を抑制することが示唆された。

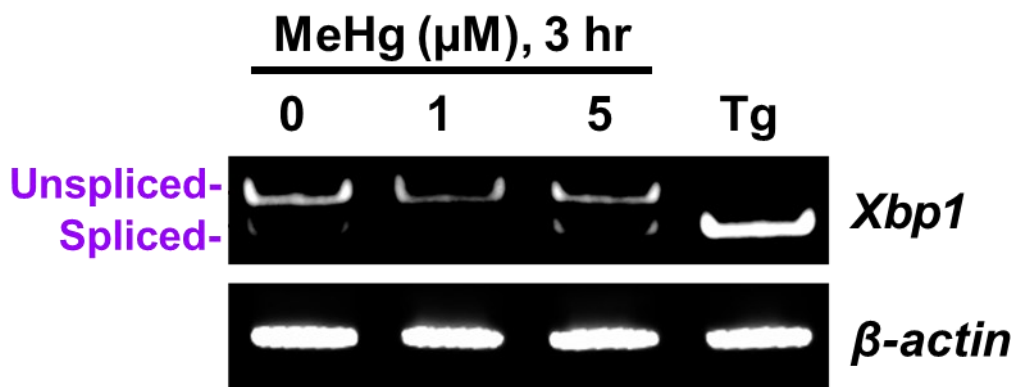


図 10 XBP1 mRNA のスプライシングに対する MeHg の影響

MEF 細胞に終濃度 1-5  $\mu$ M の MeHg を 3 時間処理した時の *Xbp1* mRNA スプライシング量。Xbp1 mRNA スプライシングのポジティブコントロールとして、終濃度 5  $\mu$ M の Tg を 3 時間処理したサンプルを使用した。

### 3. IRE1 $\alpha$ の酵素活性に対する MeHg の影響

#### 3-1 IRE1 $\alpha$ 変異体におけるリボヌクレアーゼ活性の確認

2-3 の結果より, *Xbp1* mRNA スプライシングの過程に S-水銀化を受ける標的タンパク質が存在することが示唆された. IRE1 $\alpha$  がリボヌクレアーゼ活性を示すには細胞質ドメインに含まれる KEN ドメインが重要である(図 11). そのため, KEN ドメインに存在する 2 つの Cys 残基 C931 または C951 が S-水銀化を受けることでリボヌクレアーゼ活性が低下し, *Xbp1* mRNA スプライシングが抑制されるのではないかと推測した. そこで, C931 または C951 を Ser 残基に置換した変異体を発現させることで, MeHg 処理下における *Xbp1* mRNA スプライシングの抑制が改善するか否か検討した.

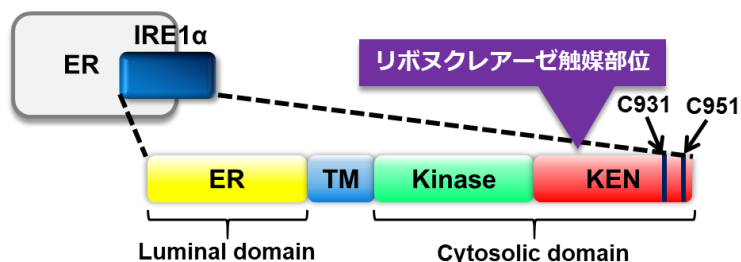


図 11 IRE1 $\alpha$  の構造の模式図

まず, IRE1 $\alpha$  に加えて各変異が RNase 活性に影響を与えないことを確認した. IRE1 $\alpha$  KO MEF 細胞に WT-, C931S-, および C951S-IRE1 $\alpha$  を一過性に発現させた後, 終濃度 5  $\mu$ M の Tg を 3 時間処理した. その後, *Xbp1* mRNA のスプライシング量を検討した結果, C931S-IRE1 $\alpha$  および C951S-IRE1 $\alpha$  は WT-IRE1 $\alpha$  と同程度の spliced *Xbp1* mRNA を産生することがわかった(図 12).

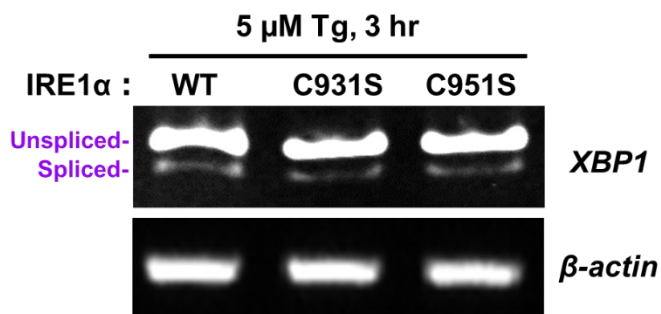


図 12 IRE1 $\alpha$  変異体におけるリボヌクレアーゼ活性の確認

IRE1 $\alpha$  KO MEF 細胞に WT, C931S-, および C951S-IRE1 $\alpha$  変異体を導入し, Tg で ER ストレスを誘起した時の *Xbp1* mRNA スプライシング量.

### 3-2 IRE1 $\alpha$ 変異体のリボヌクレアーゼ活性に対する MeHg の影響

次に, C931S-, および C951S-IRE1 $\alpha$  変異体を発現させることで, MeHg による *Xbp1* mRNA スプライシングの抑制が軽減されるか否か確認した. IRE1 $\alpha$  KO MEF 細胞に WT-, C931S-, および C951S-IRE1 $\alpha$  を一過性に発現させた後, 終濃度 5  $\mu$ M の MeHg を 3 時間処理し, *Xbp1* mRNA スプライシング量を検討した. その結果, WT-IRE1 $\alpha$  発現細胞では減少していた spliced *Xbp1* mRNA が, C931S-IRE1 $\alpha$  発現細胞では顕著に回復することが明らかとなった (図 13). これは, C951S-IRE1 $\alpha$  発現細胞ではほとんど認められなかった.

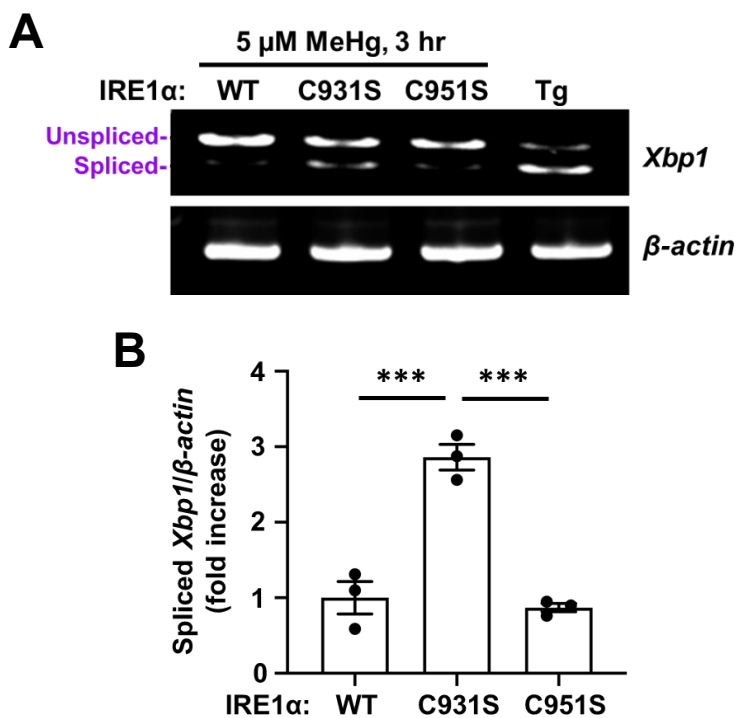


図 13 IRE1 $\alpha$  変異体発現時の *Xbp1* mRNA スプライシングに対する MeHg の影響

A) IRE1 $\alpha$  KO MEF 細胞に WT, C931S-, および C951S-IRE1 $\alpha$  を導入し, 終濃度 5  $\mu$ M MeHg を 3 時間処理した時の *Xbp1* mRNA スプライシングレベル. *Xbp1* mRNA スプライシングのポジティブコントロールとして, 終濃度 5  $\mu$ M の Tg を 3 時間処理したサンプルを使用した.

B) RT-PCR より得られた spliced *Xbp1* および  $\beta$ -actin mRNA のバンドを定量化したもの. 定量値は平均値 $\pm$ SEM を示す.

$n=3$ , \*\*\*:  $p<0.001$  by one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test.

## 4. MeHg 誘導性細胞死の抑制

### 4-1 MeHg 誘導性細胞死に対する IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の影響

3-2の結果より, MeHgはIRE1 $\alpha$ のリボヌクレアーゼ活性を抑制し, *Xbp1* mRNAのスプライシングを低下させることで, IRE1 $\alpha$ 経路の活性化を阻害することが示唆された. IRE1 $\alpha$ 経路の阻害は, BiPやPDIなどの分子シャペロンやERAD関連分子の転写誘導抑制を招くことから, ERストレスに対する細胞死抵抗性の消失が推定される(図14). そこで, MeHg誘導性細胞死がIRE1 $\alpha$ 経路の活性化によって軽減されるか否か検討した.

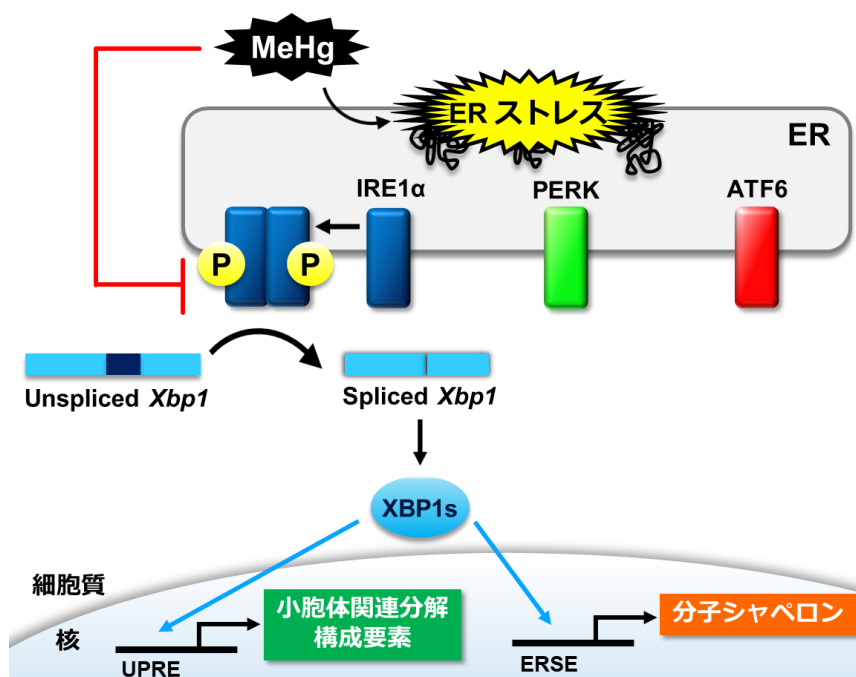


図 14 予想される MeHg と IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の関係性

IRE1 $\alpha$  KO MEF 細胞に WT-, C931S-, および C951S-IRE1 $\alpha$  を一過性に発現させた後, 終濃度 3  $\mu$ M MeHg を 12 時間処理し, Hoechst 染色を行った. 蛍光顕微鏡観察像を ImageJ で解析し, 細胞生存率を算出した. その結果, WT-IRE1 $\alpha$  発現細胞と比較して, C931S-IRE1 $\alpha$  発現細胞では MeHg 誘導性細胞死が抑制されることが明らかとなった(図 15A, B). また, この MeHg 誘導性細胞死の抑制は, C951S-IRE1 $\alpha$  発現細胞では認められなかった. このことから, IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の抑制が MeHg の毒性発現に関与することが示唆された.

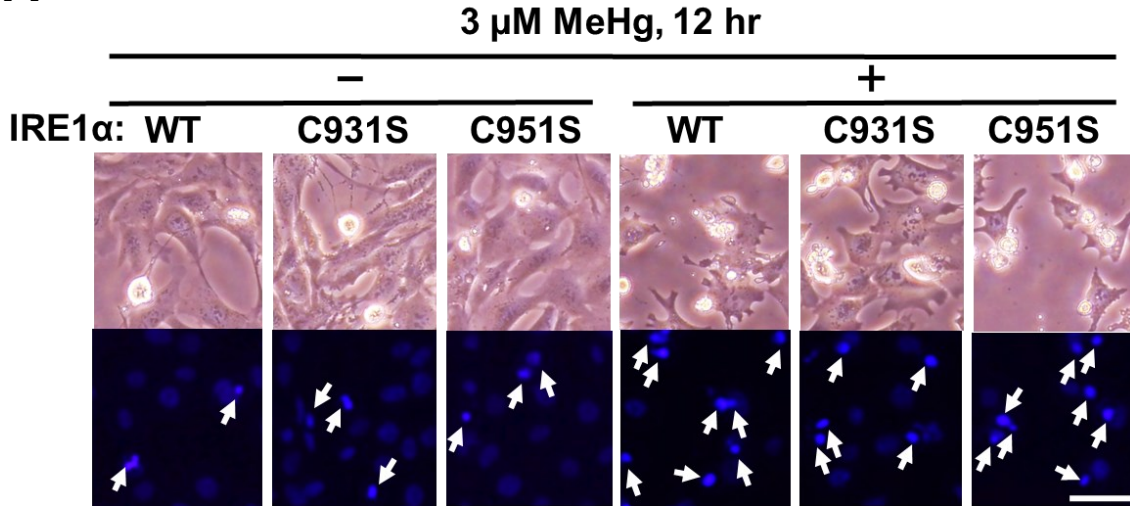
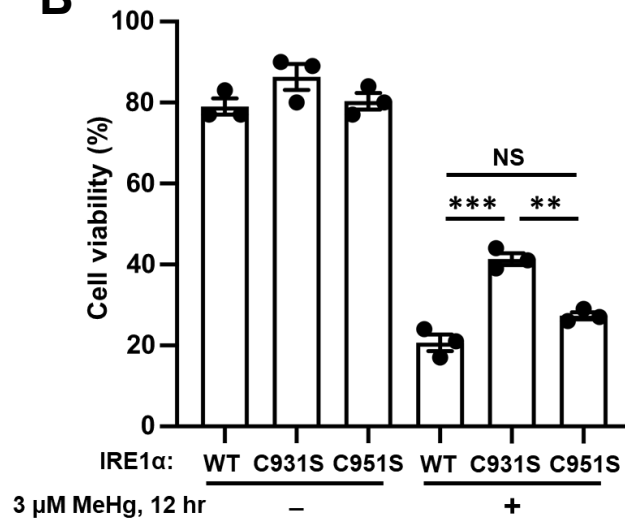
**A****B**

図 15 MeHg 誘導性細胞死に対する IRE1 $\alpha$  変異体発現の影響

A) IRE1 $\alpha$  KO MEF 細胞に WT-, C931S-, C951S-IRE1 $\alpha$  を発現させた後, 終濃度 3  $\mu$ M の MeHg を 12 時間処理した時の明視野観察像と Hoechst 染色像. Hoechst 染色像内の矢印は核の凝集したアポトーシス細胞を示す. スケールバーは 50  $\mu$ m を示す.

B) MeHg を 12 時間処理した各細胞の細胞生存率を定量化したもの. 定量値は平均値 $\pm$ SEM を示す.

$n=3$ , \*\*:  $p<0.01$ , \*\*\*:  $p<0.001$ , by one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test.

NS: not significant.

#### 4-2 MeHg 誘導性細胞死に対する PERK 経路の影響

PERK および ATF6 経路の活性化はアポトーシス誘導因子 CHOP の転写誘導を介して、アポトーシスを惹起する (図 16). そこで, MeHg 誘導性細胞死が PERK 経路の阻害によって緩和されるか否か検討した.

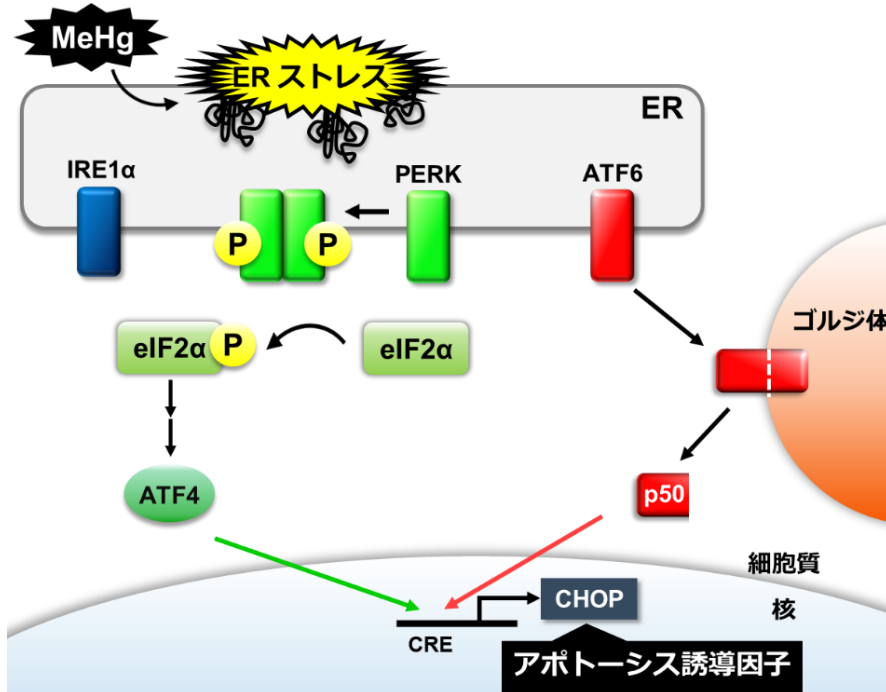


図 16 予想される MeHg と PERK および ATF6 経路の関係性

PERK 阻害薬として, PERK の自己リン酸化を抑制する GSK2606414 を用いた. MEF 細胞に 2-10  $\mu\text{M}$  の GSK2606414 を 1 時間前処理した後, 終濃度 2  $\mu\text{M}$  MeHg を 12 時間処理し, Hoechst 染色を行った. 蛍光顕微鏡観察像を ImageJ で解析し, 細胞生存率を算出した. その結果, MeHg により減少した生存率が, GSK2606414 処理濃度依存的に有意に回復することが判明した (図 17A, B). このことから, PERK 経路を抑制することで MeHg 毒性が軽減されることが示唆された.

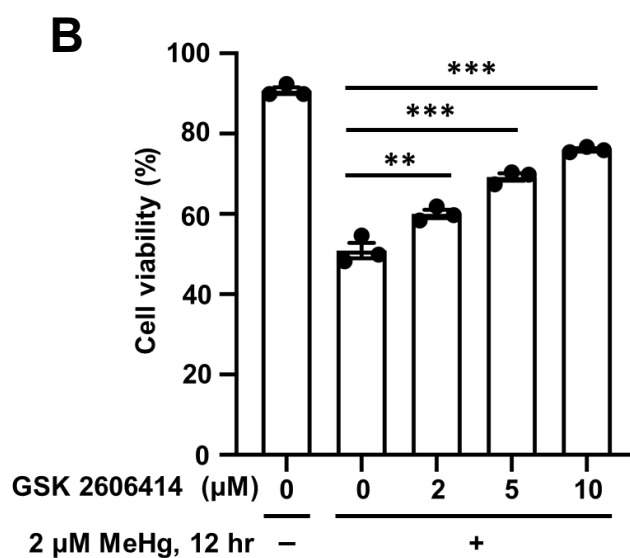
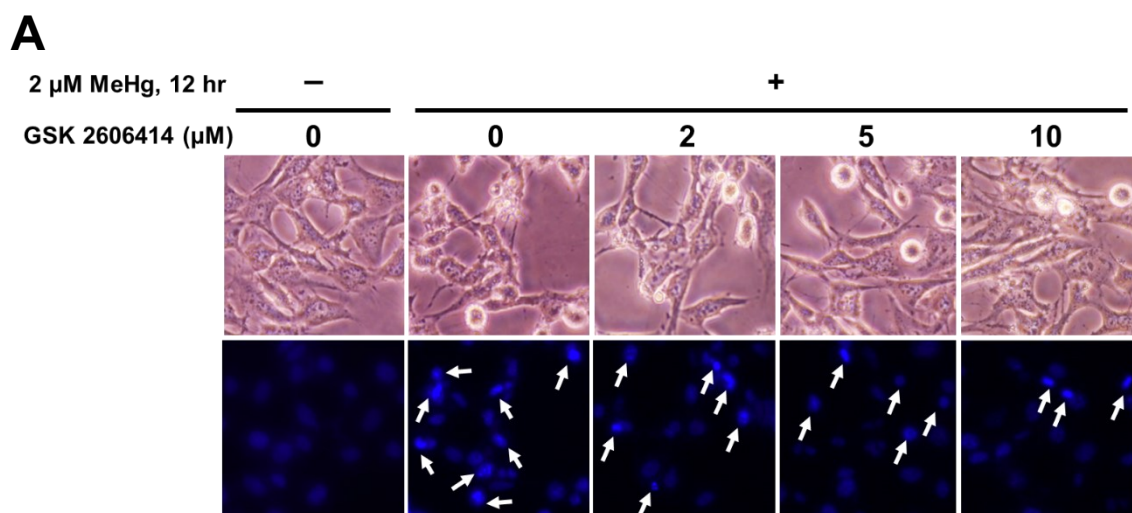


図 17 MeHg 誘導性細胞死に対する PERK 阻害薬の影響

A) MEF 細胞に 0-5  $\mu$ M の PERK 阻害薬 GSK2606414 を 1 時間前処理した後，終濃度 2  $\mu$ M の MeHg を 12 時間処理した時の明視野観察像と Hoechst 染色像。Hoechst 染色像内の矢印は核の凝集したアポトーシス細胞を示す。スケールバーは 50  $\mu$ m を示す。

B) MeHg を 12 時間処理した各細胞の細胞生存率を定量化したもの。定量値は平均値  $\pm$  SEM を示す。

$n=3$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , by one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test.

## 考察

### 1. MeHg による細胞死惹起

MEF 細胞における MeHg 誘導性細胞死および ER ストレス惹起を確認するために、Hoechst 染色および RT-PCR 法による遺伝子発現解析を行った。その結果、MeHg 処理 12 時間および 24 時間において濃度依存的な細胞生存率の減少が確認された (図 4)。また、MeHg 処理 3-6 時間において ER ストレスマーカー *Chop* mRNA の増加が認められた (図 5A)。MeHg 処理 12 時間における *Chop* および *Bip* mRNA の減少は、死細胞が多く観察されたことに起因すると考えられる。MeHg 処理 3 時間においては、MeHg 処理濃度依存的な *Chop* mRNA の増加も確認された (図 5B)。これらの結果から、MEF 細胞においても MeHg 処理によって細胞死誘導および ER ストレス惹起が認められることが判明した。

序章で述べたように、MeHg による毒性発揮には酸化ストレスが関与することが示唆されている<sup>13</sup>。これはマンガン SOD (Mn-SOD)、Glutathione peroxidase 1 (GPx1) および GSH などの抗酸化タンパク質の S-水銀化に起因すると考えられている<sup>15,16,47</sup>。また、MeHg は酸化ストレスを惹起した後、ER ストレスを誘導することで細胞死を誘導することが示唆されている<sup>43,48</sup>。そのため、MeHg による ER ストレス惹起は細胞死が観察される直前に生じる可能性がある。本実験結果では、比較的早期から *Chop* mRNA の増加が認められた (図 5A)。この ER ストレス惹起のタイミングの差は、用いた細胞種、および MeHg の設定濃度などの違いに起因すると考えられる。

MeHg による ER ストレス発生メカニズムとしては、当研究室で明らかにしている PDI の S-水銀化に起因したミスフォールドタンパク質の増加が挙げられる<sup>19</sup>。また、前述のように Mn-SOD1 や GPx1 の S-水銀化に伴う酸化ストレス惹起も ER ストレス発生に関与することが推定される<sup>16,47</sup>。さらに、MeHg は ER 膜上に存在する Ca<sup>2+</sup>-ATPase の阻害による Ca<sup>2+</sup>恒常性異常も ER ストレスの引き金となりうる<sup>17</sup>。加えて、合成された未成熟タンパク質の S-水銀化によって分子内ジスルフィド結合形成が阻害され、ミスフォールドタンパク質が増加することで ER ストレスを惹起する可能性も考えられる。これらの複合的な要因により、MeHg は細胞に ER ストレスを誘導することが推測される (図 18)。



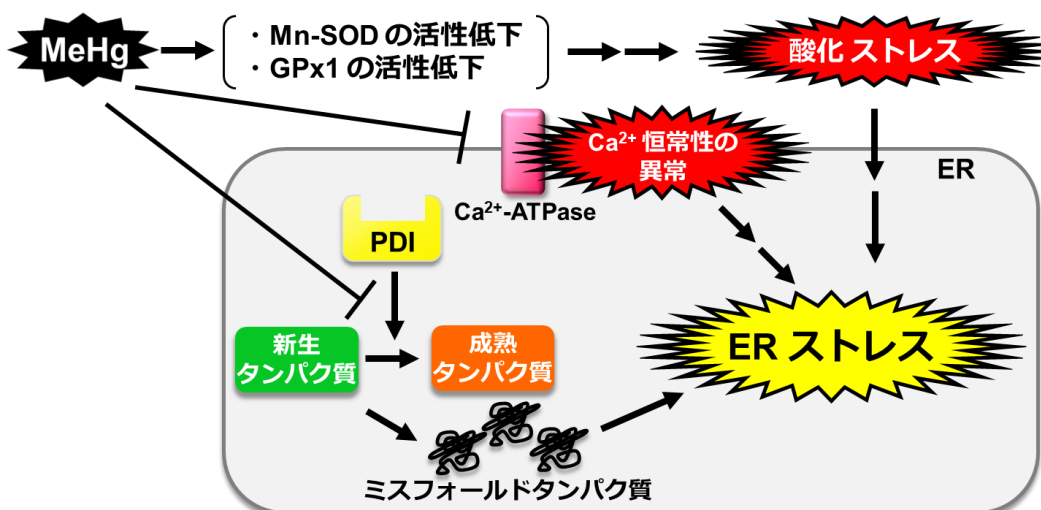


図 18 想定される MeHg による ER ストレス惹起機構

興味深いことに、MeHg 曝露によって *Chop* mRNA は増加したものの、*Bip* mRNA レベルはほとんど変わらなかった (図 5)。序章で述べたように、*Chop* mRNA の誘導には ATF4 および切断型 ATF6 である p50 が関与することが知られている<sup>27</sup>。一方で、*Bip* mRNA の誘導には p50 および XBP1s が関与するとされている<sup>33</sup>。したがって、*Bip* mRNA の転写異常は ATF6 経路または IRE1 $\alpha$  経路に何らかの異常が生じたことを示唆すると考えられる。

## 2. 各小胞体ストレスセンサーに対する MeHg の影響

MeHg による ER ストレス惹起が確認されたため、次に UPR 各経路の活性化を検討した。その結果、MeHg 処理時間および濃度依存的なリン酸化 PERK およびリン酸化 eIF2 $\alpha$  の増加が認められた (図 6)。また、MeHg 処理時間依存的な p50 の増加も認められた (図 7)。これらの結果から、MeHg によって PERK 経路および ATF6 経路が活性化していることが示唆された。本研究では、ATF6 経路の活性化を検討する際、SH-SY5Y 細胞を使用した。その理由としては、ウェスタンブロット解析に用いた抗 ATF6 抗体がマウスに交差性がなかったためである。IRE1 $\alpha$  に関して、MeHg 処理時間および処理濃度依存的な自己リン酸化亢進が認められた (図 8)。しかしながら、IRE1 $\alpha$  のリン酸化が確認された MeHg 処理条件下において、*Xbp1* mRNA のスプライシングはほとんど観察され

なかった (図 10). このことから, MeHg は IRE1 $\alpha$  のリン酸化を亢進させるものの, *Xbp1* mRNA のスプライシングを阻害することで IRE1 $\alpha$  経路の活性化を抑制することが示唆された.

IRE1 $\alpha$  の細胞質部位は N 末端側のキナーゼドメインと, C 末端側の KEN ドメインから構成されている<sup>49</sup>. IRE1 $\alpha$  のリボヌクレアーゼ触媒部位は, 酵母では KEN ドメインにある 4 つの残基 (Y1043, R1056, N1057, H1061) 付近に位置すると考えられている<sup>50</sup>. ヒト IRE1 $\alpha$  の細胞質部位は酵母の IRE1 $\alpha$  と非常に相同性が高く, 酵母と同様に KEN ドメインがリボヌクレアーゼ触媒活性部位であると推定される. IRE1 $\alpha$  は分子内に 15 個の Cys 残基を有しており, このうち, KEN ドメインには 2 つの Cys 残基 (C931, C951) が存在する. 当研究室ではこれまでに, MeHg 同様に親電子物質である一酸化窒素 (NO) によって IRE1 $\alpha$  の C931 および C951 が酸化修飾 (*S*-ニトロシル化) を受け, リボヌクレアーゼ活性が低下することを明らかにしている<sup>51</sup>. このことから, IRE1 $\alpha$  の C931 および C951 が *S*-水銀化を受けることで IRE1 $\alpha$  のリボヌクレアーゼ活性が低下するのではないかと推測した.

### **3. IRE1 $\alpha$ の酵素活性に対する MeHg の影響**

IRE1 $\alpha$  の C931 および C951 をセリン残基に置換した変異体 IRE1 $\alpha$  を発現させ, MeHg 処理下における *Xbp1* mRNA スプライシングレベルを検討した. まず, 各変異を加えることで IRE1 $\alpha$  のリボヌクレアーゼ活性が変化するか否か確認した結果, C931S および C951S 変異体は WT とほとんど変わらない活性を示すことが判明した (図 12). また, MeHg 処理下では C931S-IRE1 $\alpha$  発現細胞のみ, spliced *Xbp1* mRNA レベルの回復が認められた (図 13). つまり, MeHg は IRE1 $\alpha$  の C931 を *S*-水銀化することでリボヌクレアーゼ活性を低下させることが示唆された.

タンパク質 Cys 残基チオール基はジスルフィド結合形成の他, *S*-水銀化やスルフェン酸化, *S*-ニトロシル化などの酸化修飾を受ける. チオール基のスルフェン化は, 脱アセチル化酵素 SIRT6 の脱アセチル化活性を低下させ, 解糖系の促

進に寄与することや<sup>52</sup>, IRE $\alpha$  の ER ストレスに対する応答性をブロックし, 酸化応答の促進に寄与するなど<sup>53</sup>, タンパク質の機能変化を引き起こすことが報告されている. また, 当研究室ではこれまでに PDI が *S*-ニトロシル化を受けることで酵素活性が低下し, ミスフォールドタンパク質の蓄積を誘導することを明らかにしている<sup>54</sup>. 一方, パーキンソン病のリスクファクターでもある Parkin の *S*-ニトロシル化はユビキチンリガーゼ活性を上昇させることで, ミトコンドリアの分解を促進するという報告がある<sup>55</sup>. このようにチオール基への酸化修飾には, 酵素活性を上昇および低下させるものや, 機能変化を惹起するものがある. しかし, *S*-水銀化に関しては, これまで報告されている全ての *S*-水銀化タンパク質で機能および酵素活性が低下することが報告されている<sup>15,16,19,47</sup>. 本研究より, IRE $\alpha$  の *S*-水銀化も酵素活性低下に寄与することが推定された.

NO は, IRE1 $\alpha$  の C931 および C951 を *S*-ニトロシル化することでリボヌクレアーゼ活性を低下させるが, キナーゼ活性には影響を与えないことが示されている<sup>51,56</sup>. 本研究では C931S-IRE1 $\alpha$  変異体を発現させた細胞のみ, MeHg による *Xbp1* mRNA のスプライシング抑制から回復することが判明したため, MeHg 処理下において IRE1 $\alpha$  がリボヌクレアーゼ活性を示すには C931 が重要であることが示唆された. タンパク質の *S*-ニトロシル化は Biotin-switch 法によって生化学的に検出可能であるが<sup>57</sup>, タンパク質の *S*-水銀化を特異的に検出する手法は乏しい. そのため, 実際に IRE1 $\alpha$  の C931 が *S*-水銀化されているか否かは, 本研究において確認できていない. IRE1 $\alpha$  の *S*-水銀化を検出することは, 今後の検討課題の一つである. 加えて, IRE $\alpha$  の C931 および C951 の生理的意義に関してもほとんど報告がないため, その機能を解明することは非常に重要である.

IRE1 $\alpha$  の構造は既に解明されているため<sup>58</sup>, タンパク質構造解析ソフトウェア CueMol2 を用いて, IRE1 $\alpha$  の細胞質ドメインにおける C931 および C951 のチオール基の配置を確認したところ, C931 のチオール基は分子表面に露出し, C951 のチオール基は分子内に埋没していることが判明した (図 19A, B). さらに, IRE1 $\alpha$  細胞質ドメインにおける静電ポテンシャルマップを作製したところ, C931 周辺の電子密度が高いことがわかった (図 19C). 従って, IRE1 $\alpha$  の C931 周辺は MeHg や NO のような親電子性物質が接近しやすい環境である可能性が推定

された。

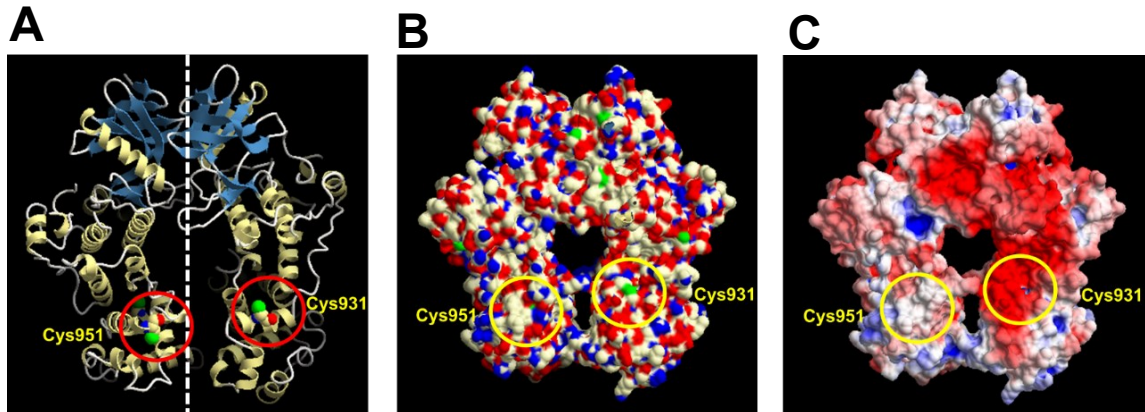


図 19 ホモダイマーを形成する IRE1 $\alpha$  細胞質ドメインの構造

- A) ダイマー化した IRE1 $\alpha$  細胞質ドメインの 3D 画像. 点線は IRE1 $\alpha$  モノマーの境界を示す. 上部青色の領域は膜貫通領域を表す. 赤丸で囲った領域は左から C951, C931 の位置を強調したものであり, 緑色は硫黄原子, 赤色は酸素原子, 青色は窒素原子を表す.
- B) ダイマー化した IRE1 $\alpha$  細胞質ドメインの分子表面を表したもの. 黄丸で囲った領域は左から C951, C931 の位置を強調したもの.
- C) ダイマー化した IRE1 $\alpha$  細胞質ドメインの静電ポテンシャルマップ. 赤色領域は電子密度が高く, 青色領域は電子密度が低い領域を意味する.

#### 4. MeHg 誘導性細胞死の抑制

MeHg 誘導性細胞死に対する IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の影響を検討するために, C931S-, および C951S-IRE1 $\alpha$  変異体を発現させた細胞における細胞生存率を評価した. その結果, C931S-IRE1 $\alpha$  発現細胞において, MeHg 誘導性細胞死が軽減することが判明した (図 15). C931S-IRE1 $\alpha$  発現細胞では MeHg 処理条件下においても, *Xbp1* mRNA スプライシングの亢進が確認されている (図 13). これらの結果から, MeHg 処理条件下においても, *Xbp1* mRNA のスプライシングを亢進させることで MeHg 毒性が軽減されることが示唆された.

本研究では, IRE1 $\alpha$  のリボヌクレアーゼ活性が果たす機能として, *Xbp1* mRNA

のsprayリングに着目したが、IRE1 $\alpha$ にはそのリボヌクレアーゼ活性を活用する RIDD という遺伝子発現制御機構も存在する<sup>36</sup>。RIDD はオリゴマー化した IRE1 $\alpha$  が分泌タンパク質や膜タンパク質をコードする mRNA を細胞質側で切断し、その発現を抑制する機構である。近年、RIDD は mRNA のみならず、miR-17, miR-34a, miR-96, miR-125b などの miRNA も選択的に切断することが報告されている<sup>59</sup>。これらの miRNA はカスパーゼ 2 の発現制御に関わるため、RIDD により切断されるとカスパーゼ経路が活性化し、アポトーシスが誘導されることが示唆されている<sup>60</sup>。このように、RIDD は細胞死を促進する一方で、IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路は細胞生存へと働くため、IRE1 $\alpha$  のリボヌクレアーゼ活性には、ER ストレスに対して細胞の生死を選択するスイッチング機能があると考えられている。しかしながら、そのスイッチングメカニズムは未だ完全には理解されていない。そのため、IRE1 $\alpha$  の C931 および C951 における酸化修飾は IRE1 $\alpha$  の基質特異性を変化させることで RIDD を活性化している可能性も考えられる。今後は MeHg 処理条件下における XBP1s 下流遺伝子の発現量および RIDD の基質となる mRNA または miRNA レベルの変化などについても解析を行う必要がある。

また、ER ストレス下において IRE1 $\alpha$  はキナーゼドメインを介してアダプター分子 TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) と結合し、apoptosis signal-regulating kinase (ASK1) および c-Jun N-terminal kinase (JNK) を活性化させることでアポトーシスを誘導することが報告されている<sup>61</sup>。ストレス応答性 MAPK 経路に属する ASK1 は定常状態では抗酸化タンパク質チオレドキシシン (Trx) と複合体を形成し、不活性化している。一方、酸化ストレス条件下では Trx が酸化されることで ASK1 が遊離し、活性化した ASK1 がアポトーシスを誘導することが知られている<sup>62</sup>。実際、MeHg により増加した ROS は ASK1 の活性化を惹起し、細胞死を誘導することが示唆されている<sup>48</sup>。さらに、興味深いことに XBP1 をノックダウンすると IRE1 $\alpha$ -TRAF2-ASK1 経路が活性化することが報告されている<sup>63</sup>。これらの知見から、MeHg による IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路抑制は ASK1 を介して JNK 経路を活性化し、細胞死を促進することが推定された。

前述の通り、IRE1 $\alpha$  は NO によって C931 および C951 が修飾を受けることが知られている<sup>51,56</sup>。当研究室ではこれまでに、C931S-IRE1 $\alpha$  変異体を発現させる

ことで NO 依存的な細胞死が軽減されることを明らかにしている<sup>51</sup>。この時、非ストレス条件下における IRE1 $\alpha$  KO MEF 細胞と各 IRE1 $\alpha$  を導入した IRE1 $\alpha$  KO MEF 細胞との間で細胞生存率に違いは見受けられなかった。したがって、MeHg に限らず C931 を酸化修飾する化学物質に対し、C931S-IRE1 $\alpha$  を発現することで細胞死抵抗性が付与されることが示唆された。一方、酸化ストレスである亜ヒ酸を処理すると、IRE1 $\alpha$  における C931 とは異なる Cys の酸化修飾を介して、抗酸化ストレス応答が活性化することが報告されている<sup>53</sup>。亜ヒ酸処理下において、リン酸化 IRE1 $\alpha$  および XBP1s の発現増加はほとんど認められなかったことから、IRE1 $\alpha$  はスルフェン酸化されることで、IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の活性化が抑制されることが示唆された。したがって、IRE1 $\alpha$  のリン酸化の有無および酸化修飾部位の違いから、MeHg と酸化ストレスでは IRE1 $\alpha$  の応答性に違いがあることが推定された。

続いて、MeHg 誘導性細胞死に対する PERK 経路の影響を検討するために、PERK 阻害薬 GSK2606414 を用いて細胞生存率を評価した。その結果、GSK2606414 を前処理することで、MeHg 誘導性細胞死が抑制されることが明らかとなった (図 17)。これまでの結果と合わせると、MeHg は細胞に ER ストレスを誘導し、PERK 経路を活性化させることでアポトーシス誘導因子 CHOP の転写誘導を促進し、細胞死を惹起する可能性が推定された。

GSK2606414 は PERK の自己リン酸化を特異的に抑制する化合物であり、膵臓がんを標的とした抗腫瘍薬としての側面を持つ<sup>64</sup>。癌細胞は、腫瘍内の低酸素や低グルコースなどの微小環境に適応するために UPR を活用することが知られており<sup>65</sup>、GSK2606414 は癌細胞の ER ストレスへの適応力を阻害することで細胞死を誘導し、抗腫瘍効果を示す。このように、PERK 阻害薬は癌細胞の生存に対して負に働くことが示されている。本研究では、GSK2606414 処理により MeHg 誘導性細胞死が抑制されたことから、PERK 阻害薬に細胞保護的なポテンシャルがあることが初めて明らかとなった。PERK 阻害薬により MeHg 誘導性細胞死が抑制されるという表現型は得られたが、その分子メカニズムについて詳細を明らかにする必要がある。

UPR において PERK 同様, CHOP の転写誘導を介してアポトーシスを誘導する ATF6 経路についても阻害薬を用いた検討は行ったが, MeHg 誘導性細胞死の抑制傾向は認められなかった. ATF6 阻害薬には不可逆的セリンプロテアーゼ阻害薬 AEBSF (4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonylfluoride) を用いたため, ATF6 の限定分解だけでなく種々のプロテアーゼ活性を抑制し, 細胞毒性が現れたと考えている. 今後は ATF6 のノックダウンなどの他の手法を用いることで ATF6 経路の活性化が MeHg 誘導性細胞死に及ぼす影響について解析する必要がある.

## 第 2 章

### MeHg 誘導性 ER ストレスの組織・細胞特異性

#### 目的

ここまでの検討から、MeHg による神経細胞死惹起には UPR が関与することが示唆された。ここで、MeHg による ER ストレス惹起および UPR の活性化は動物レベルでも認められるのか、また、MeHg 誘導性 ER ストレスに組織・細胞特異性は存在するのか、という疑問が生じた。そこで、これらの課題を解明するために動物レベルでの検討を進めた。

解析には、XBP1 と Luciferase (LUC) または改変型 Green fluorescence protein (GFP) である Venus といった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 20)<sup>66</sup>。定常状態では *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な状態で発現し、速やかに分解される。一方、ER 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 ER ストレス惹起を観察することができる。本マウスを用いて、MeHg 投与による ER ストレス発生部位および IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の活性化状態を評価した。

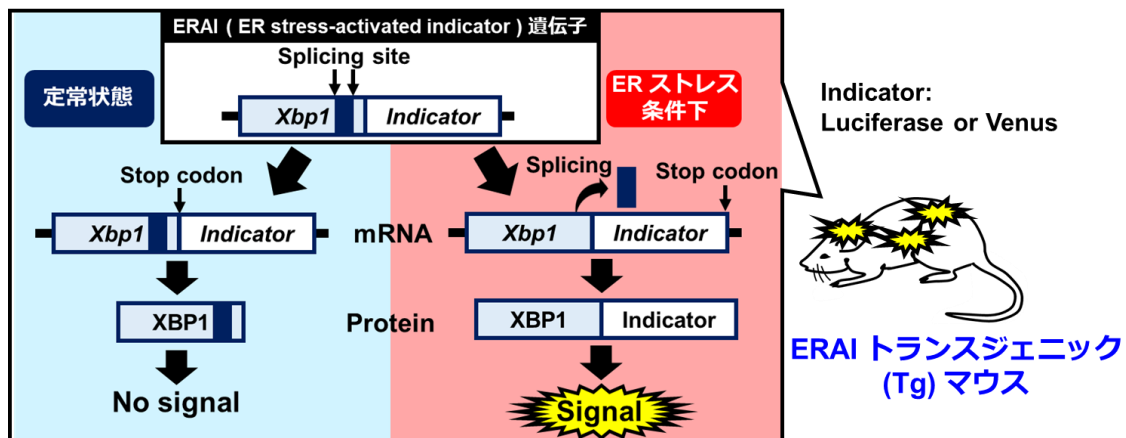


図 20 ERAI Tg マウスの概略図



## 実験方法

### 1. 実験動物

金沢医科大学 総合医学研究所 岩脇 隆夫 教授よりご恵与いただいた雄性 ERAI-LUC Tg マウスおよび雄性 ERAI-Venus Tg マウスを使用した<sup>66,67</sup>. これらのマウスは C57BL/6 を遺伝的バックグラウンドとする.

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,  $23 \pm 3$  °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. ERAI-LUC Tg マウスを用いた動物実験は, 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 基礎研究部 藤村 成剛 部長のご協力の下, 当研究所の動物実験施設においてコンベンショナル条件下,  $23 \pm 2$  °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) で飼育した. 各投与群 5~6 匹ずつ用意し, 飼育および実験期間中, 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の動物実験委員会より承認を得ており (承認番号: 310207), その規定に基づき実施した.

### 2. Genotyping

#### (1) DNA 抽出

雄性 ERAI-Venus Tg マウスと日本クレア社より購入した雌性 C57BL6N/Jc1 マウス (9 週齢) を交配させ, 妊娠・出産させた. 得られた雄性子マウス (3 週齢) の尾の先端を 1mm 程切断し, 回収した. 回収した尾組織を Tail lysis buffer : Proteinase K = 49 : 1 となるように調製した溶解液 400  $\mu$ L に浸し, 55 °C, 4 時間インキュベートした. 溶解液に Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1) を 400  $\mu$ L 加え, ボルテックスした後 (30 分間), 12,000  $\times$ g, 4 °C, 5 分間遠心分離し, DNA が含まれる上清を新しいチューブに移した. 2-Propanol を 300  $\mu$ L 加えてボルテックスした後 (5 分間), 12,000  $\times$ g, 4 °C, 15 分間遠心分離し, 上清を除去した. 70 % ethanol を 1 mL 加えて, 12,000  $\times$ g, 4 °C, 15 分間遠心分離して上清

を除去し、室温で5分間風乾した。ペレットが完全に乾く前に 20  $\mu$ L の TE (pH 8.0) buffer に溶解させた。

## (2) PCR

以下の試薬をサンプル数分調製し、分注した。

ddH <sub>2</sub> O	6.7 $\mu$ L
Forward primer (20 pmol)	0.1 $\mu$ L
Reverse primer (20 pmol)	0.1 $\mu$ L
10 $\times$ Ex Taq buffer	1.0 $\mu$ L
dNTP MIX	1.0 $\mu$ L
Ex Taq	0.1 $\mu$ L
total	9.0 $\mu$ L

上記試薬の混合液に DNA 1  $\mu$ L (1  $\mu$ g) を加え、ピペッティングし、スピンドウンした後、Thermal Cycler を用いて PCR を行った。PCR 産物に 6 $\times$  Loading buffer Triple Dye を 2  $\mu$ L 加えたものを 1.5%アガロースゲル (EtBr 含有) に 10  $\mu$ L/lane でアプライし、1 $\times$ TAE Buffer 中、100 V で 20 分間電気泳動した。泳動後、ChemiDoc Touch イメージングシステム (Bio-Rad) で DNA バンドを検出した。primer とサイクル条件は以下の通りである (表 4)。

表 4. Primer およびサイクル条件

遺伝子	Primer (F:forward R:reverse)		サイクル条件	産物長
ERAI-Venus	F	gaa cca gga gtt aag aga gc	96 $^{\circ}$ C, 3 min (96 $^{\circ}$ C, 15 sec / 58 $^{\circ}$ C, 15 sec / 72 $^{\circ}$ C, 1 min) $\times$ 25 72 $^{\circ}$ C, 10 min $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C, $\infty$	240 bp
	R	gaa cag ctc gcc ctt gc		

PCR 産物の泳動結果より、計 41 匹の雄性 ERAI-Venus Tg マウスが得られた。

## 3. 試薬投与

### (1) MeHg の単回皮下投与

Methylmercury Chloride (東京化成, M0589) 100 mg を DMSO 200  $\mu$ 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、MeHg 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 LD<sub>50</sub> の 0.5 %相当）。

#### (2) MeHg の反復皮下投与

Methylmercury Chloride（東京化成，M0589）100 mg を DMSO 200  $\mu$ 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，MeHg 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 LD<sub>50</sub> 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) MeHg の飲水投与

Methylmercury Chloride（東京化成，M0589）75 mg と還元型 GSH（富士フィルム和光純薬，073-02013）95 mg（MeHg と等モル）を 2 L の milliQ に溶解させ，終濃度 30 ppm MeHg を含む飲水を調製した。調製した飲水は給水ボトルに入れ，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，MeHg 投与群と等量の還元型 GSH を milliQ に溶解させた終濃度 47.5 ppm の飲水を投与した。

### **4. *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。

## 5. 蓄積した水銀量測定

### (1) 臓器重量で補正した蓄積水銀量 (ERAI-Venus Tg マウス)

30 ppm MeHg を飲水投与した ERAI-Venus Tg マウスをイソフルラン (ファイザー) 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、心臓、肝臓、腎臓などの臓器を摘出した。脳組織に関しては、大脳皮質、小脳、海馬、線条体に部位分けした。摘出した臓器に対して臓器重量の 19 倍量となる 5 N の水酸化ナトリウム (NaOH) を添加し、70 °C、30 分間インキュベートする。溶解した臓器は 5 N の塩酸 (HCl) で中和し、MA-2000 (日本インスツルメンツ) による加熱気化法によって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。

### (2) タンパク質量で補正した蓄積水銀量 (ERAI-Venus Tg マウス)

上記 4-(1)と同様に解剖後、大脳皮質を摘出した。摘出した大脳皮質に対して 300  $\mu$ L の Radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer を加え、超音波ホモジナイザー (TAITEC) によって氷上で組織を破碎し、溶解液を調製した。RIPA buffer の組成は以下の通りである。

RIPA buffer :           50 mM Tris-HCl (pH7.5)  
                          150 mM NaCl  
                          1 v/v% Triton-X 100  
                          0.5 w/v% Sodium Deoxycholate  
                          0.1 w/v% SDS  
                          1× Protease Inhibitor

組織溶解液は 20,400 ×g, 4 °C, 10 分間遠心分離した後, 上清を新しい 1.5 mL チューブへ移した. その後, Bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (TaKaRa, T9300A) を用いて, タンパク質量を定量した. 具体的には, BCA Reagent A : BCA Reagent B = 100 : 1 (Total 200 μL) となるように試薬の混合液を調製し, 10 μL の組織溶解液と 96-well plate 上で 37 °C, 30 分間反応させた後, 540 nm の吸光度を測定した. この時, 既知濃度の BSA 溶液から得られた測定値を基に検量線を作成し, 未知試料のタンパク質濃度を算出した. 測定値を基に 1.3 μg/μL となるようにタンパク質濃度を調整し, 組織溶解液 100 μL を MA-2000 に供し, 総水銀量を定量した.

### (3) タンパク質量で補正した蓄積水銀量 (MEF 細胞)

MEF 細胞を翌日に 70 % confluent となるように 12-well dish に播種し, 培養した. その後, 終濃度 1 μM または 5 μM となるように MeHg を 50 μL のフレッシュな培地に懸濁した後, 培養上清に添加した. コントロール群には, MeHg と等量の DMSO を懸濁した培地を添加した (終濃度 0.05%). MeHg 処理から 1 時間または 3 時間経過後に培地を除去し, PBS wash した後, RIPA buffer を用いて細胞溶解液を調製した. 4-(2)と同様に遠心分離した後, BCA protein assay kit によりタンパク質量を測定し, 0.2 μg/μL となるようにタンパク質濃度を調整した. 調製した細胞溶解液 50 μL を MA-2000 に供し, 総水銀量を定量した.

## 6. 免疫組織染色

4-(1)と同様に, 30 ppm MeHg を飲水投与した ERAI-Venus Tg マウスを解剖し, 脳を摘出後, 剃刀で右脳・左脳に分けた. 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。4% PFA 溶液の組成は以下の通りである。

4% PFA 溶液:            4 w/v% PFA  
                             160 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O  
                             42 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O

ホルマリン固定した脳組織はバイオ病理研究所にパラフィン包埋を外注した。ホルマリン固定パラフィン包埋脳組織は回転式マイクロトーム (Leica) を用いて 5 μm のコロナル切片を作製した。得られた脳切片は 100% キシレンで 5 分間 × 2 回インキュベートし、脱パラフィン処理を行った。その後、100%, 90%, 80%, 70% のエタノールでそれぞれ 5 分間インキュベートし、脱キシレン処理を行った。切片は流水で 10 分間洗浄した後、milliQ で親水化した。その後、1×に希釈した Citrate buffer pH 6.0 (Genemed Biotechnologies, 10-0020) に浸し、600 W, 20 分間電子レンジで煮沸し、抗原賦活化処理を行った。30 分間室温にて冷ました後、PBS-Tween (0.1 v/v%) に 10 分間、室温にてインキュベートすることで浸透化処理を行った。PBS で 3 回 wash した後、使用する抗体の動物種に応じて以下のように進めた。

#### (1) マウス由来の一次抗体を用いた免疫組織染色

M.O.M. immunodetection kit (VECTOR, FMK-2201) を用いた。まず、1 サンプル当たり M.O.M. Blocking Reagent 6 μL を 144 μL PBS と混和し、全量切片に添加した。室温で 1 時間インキュベートした後、PBS で 3 回 wash した。次に、M.O.M. Protein Concentrate 12 μL, PBS 138 μL および適切な量の一次抗体を混和し、全量切片に添加した。室温で 30 分間インキュベートした後、PBS で 3 回 wash した。次に、M.O.M. Protein Concentrate 12 μL, PBS 138 μL および M.O.M. Biotinylated Anti-Mouse IgG 0.6 μL を混和し、全量切片に添加した。室温で 10 分間インキュベートした後、PBS で 3 回 wash した。次に Avidin DCS Fluorescein 2.4 μL を 147.6 μL の PBS と混和し、全量切片に添加した。遮光条件下、室温で 5 分間インキュベートした後、PBS で 3 回 wash した。最後に VECTASHILD Vibrance Antifade Mounting with DAPI (VECTOR, H-1800) で切片を封入した。

## (2) ウサギ由来の一次抗体を用いた免疫組織染色

まず、PBS で調製した 5 w/v% BSA を切片に添加し、室温で 1 時間インキュベートした。その後、PBS で調製した 5 w/v% BSA に適切な量の一次抗体を混和し、切片に添加した。室温で 1 時間インキュベートした後、PBS で 3 回 wash した。次に PBS で調製した 5 w/v% BSA に Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific, A-11012) を 200 倍希釈となるように混和し、切片に添加した。遮光条件下、室温で 1 時間インキュベートした後、PBS で 3 回 wash した。最後に VECTASHILD Vibrance Antifade Mounting with DAPI で切片を封入した。

2 重染色は 1 つ目の抗体反応を上述 5-(1)または 5-(2)の方法で実施した後、ブロッキングを行い、上述 5-(1)または 5-(2)の手順に従って 2 つ目の抗体反応を行った。観察領域は Mouse Brain Atlas を参考とし<sup>68</sup>、蛍光顕微鏡 BZ-X810 (Keyence) を用いて大脳皮質各領域の深層部位、線条体、および小脳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。尚、使用したマウスおよびウサギ由来の一次抗体の種類や希釈倍率等は以下の通りである (表 5)。

表 5. 免疫組織染色で使用した抗体

抗体	抗原動物種	希釈倍率
GFP	マウス	1:200
NeuN	マウス	1:200
GFAP	マウス	1:100
CHOP	マウス	1:1,000
Iba1	ウサギ	1:1,000
HRD1	ウサギ	1:500
p-IRE1 $\alpha$	ウサギ	1:1,200
p-PERK	ウサギ	1:2,000

## 7. TUNEL 染色

*In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red (Sigma Aldrich, 12156792910) を用いて TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 染色を行った。具体的には、前述 5-(2)で示したように、ERAI-Venus Tg マウスのホルマリン固定パラフィン包埋脳

切片を脱パラフィン, 親水化, 抗原賦活化, 浸透化, ブロッキングした後, TUNEL 反応液 50  $\mu$ L を添加した. その後, パラフィルムを切片の上に重ね, 37  $^{\circ}$ C, 1 時間湿式遮光チャンバー内でインキュベートした. PBS で 3 回 wash した後, VECTASHILD Vibrance Antifade Mounting with DAPI で切片を封入した.

TUNEL シグナルと他のタンパク質の共染色は, 上述の通り TUNEL 染色を実施した後, 前述 5-(1)の手順に従い抗体反応を行った.

## **8. 統計処理**

定量値は平均値 $\pm$ SEM で示した. 統計解析には GraphPad Prism 8 (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 法または Tukey 法を用いた. 二群間の比較では Student's t-test を用いた. 統計的有意差は \*: $p$ <0.05, \*\*: $p$ <0.01, \*\*\*: $p$ <0.001 で示した.



## 実験結果

### 1. ERAI Tg マウスによる MeHg 誘導性 ER ストレスの検出

#### 1-1 MeHg の単回皮下投与による ER ストレス惹起の確認

まず, ERAI Tg マウスを用いて MeHg 誘導性 ER ストレスが検出可能か否か確認した. 本検討では ER ストレスの生じた組織の予想を立てるため, インジケータとして Luciferase を組み込んだ ERAI-LUC Tg マウスを用いた. 過去に, 25 mg/kg の MeHg を C57BL/6 マウスに皮下投与することで, 脳内で神経障害性の炎症性サイトカインが増加することが報告されている<sup>69</sup>. そこで, 10 週齢の雄性 ERAI-LUC Tg マウスに 25 mg/kg の MeHg を単回皮下投与し, ERAI シグナルの発生の有無を検討した. MeHg の投与 24 時間後に 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 21A). その結果, MeHg 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 (図 21B). このことから, ERAI-LUC Tg マウスを用いることで MeHg 誘導性 ER ストレスを検出可能であることが示唆された.

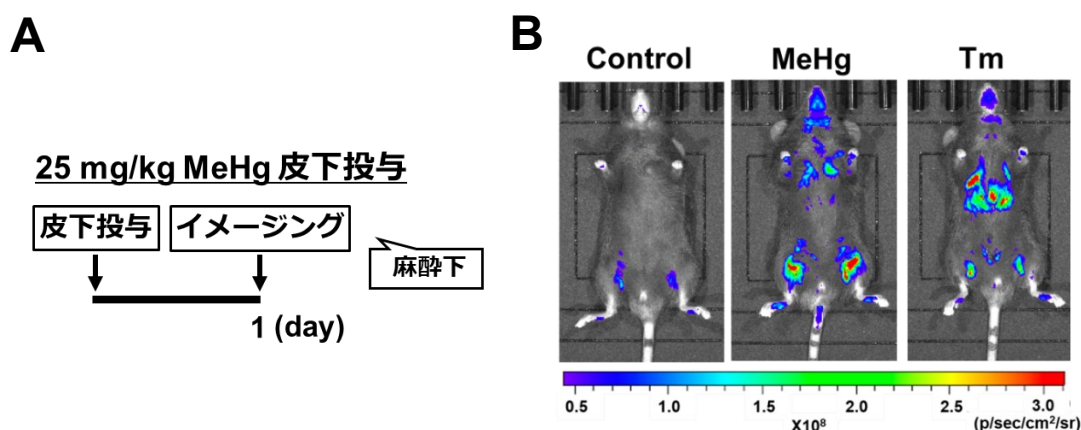


図 21 ERAI-LUC Tg マウスによる MeHg 誘導性 ER ストレスの検出

- A) MeHg 単回皮下投与のタイムコース.
- B) Control (DMSO) および MeHg の単回皮下投与 24 時間後における ERAI シグナルの検出. シグナルは 60 秒間の測定による累積値を示す. ERAI シグナルのポジティブコントロールとして, 終濃度 0.5 mg/kg の Tm (tunicamycin) を腹腔内投与した後, 投与 24 時間後にイメージングに供した.

## 1-2 MeHg により ERAI シグナルの認められた組織の特定

1-1 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 22A)．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 (表 6)．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 (図 22B, C)．これらの結果から，MeHg 誘導性 ER ストレスには組織特異性があることが示唆された．

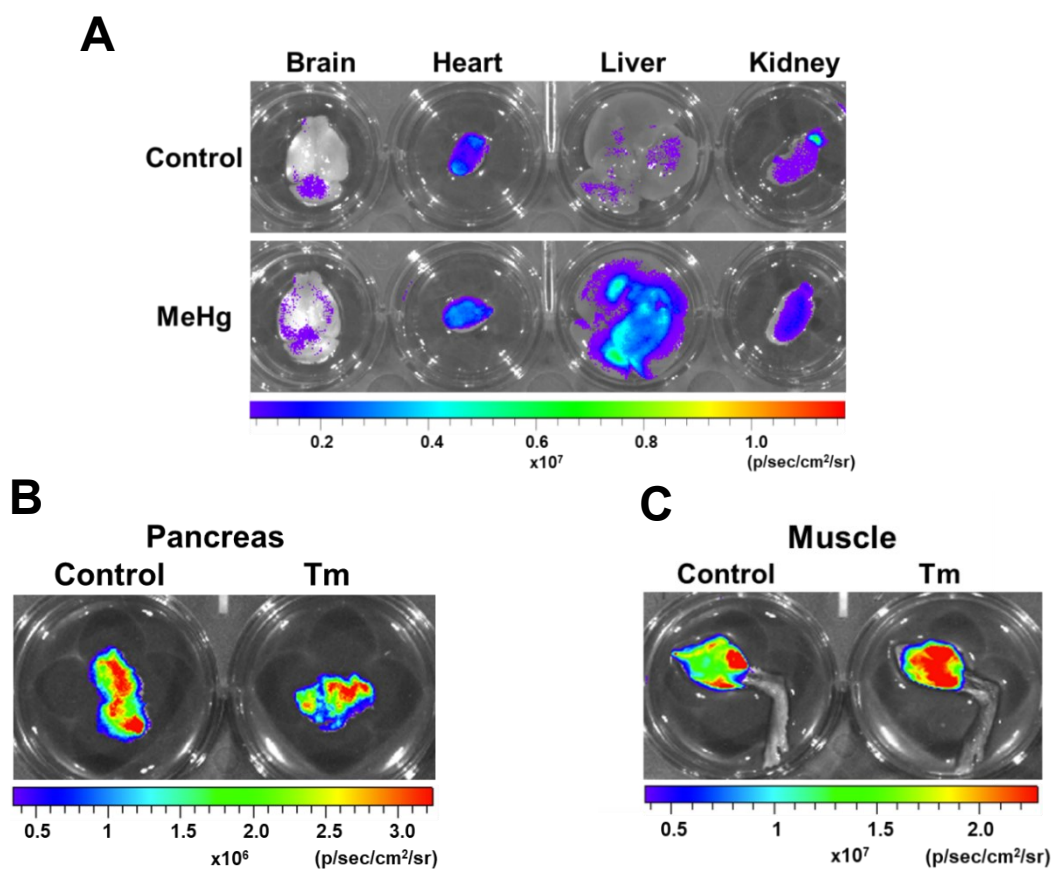


図 22 ERAI シグナルの認められた臓器

A) 25 mg/kg MeHg 単回皮下投与 24 時間後の ERAI-LUC Tg マウスから抽出した脳、心臓、肝臓、および腎臓における ERAI シグナルの検出。

B) 膵臓における生理条件下での ERAI シグナル。

C) 骨格筋における生理条件下での ERAI シグナル。

それぞれの組織におけるシグナルは 60 秒間の測定による累積値を示す。

表 6. 各組織から得られた ERAI シグナルの相対的定量値

	Brain	Heart	Liver	Kidney
Control	1	1	1	1
MeHg	1.298707	1.249087	3.618814	1.38164

### 1-3 MeHgの反復皮下投与によるERストレス惹起の確認

ここまでの検討より、25 mg/kgのMeHg単回皮下投与によって生体内ERストレス惹起が確認された。そこで、次によりマイルドなMeHg曝露条件下でのERストレス惹起を検討した。MeHgによる神経障害性の炎症性サイトカイン増加は10 mg/kgのMeHgの反復皮下投与によっても観察されることが報告されている<sup>70</sup>。そのため、10週齢の雄性ERAI-LUC Tgマウスに10 mg/kgのMeHgを3日間反復皮下投与し、ERAIシグナル発生および増加を評価した(図23A)。その結果、MeHgの反復投与によるERAIシグナルの増加が口辺部において認められた(図23B)。また、同マウスをイソフルラン麻酔下で解剖した後、脳、心臓、肝臓、および腎臓におけるERAIシグナルの有無を検討した。その結果、MeHgの反復投与によって脳、心臓においてERAIシグナルの発生および増加が認められた(図23C)。興味深いことに、本投与条件下では肝臓および腎臓におけるERAIシグナルはほとんど観察されなかった。また、マウス脳内におけるERストレス発生部位の予想を立てるため、同マウスより摘出した脳を coronal 断面で4つに細分化した(図23D)。細分化した脳切片を *ex vivo* においてイメージングに供した結果、MeHgを投与したマウスの大脳皮質、線条体、および小脳と推測される領域においてERAIシグナルの発生が認められた(図23D)。

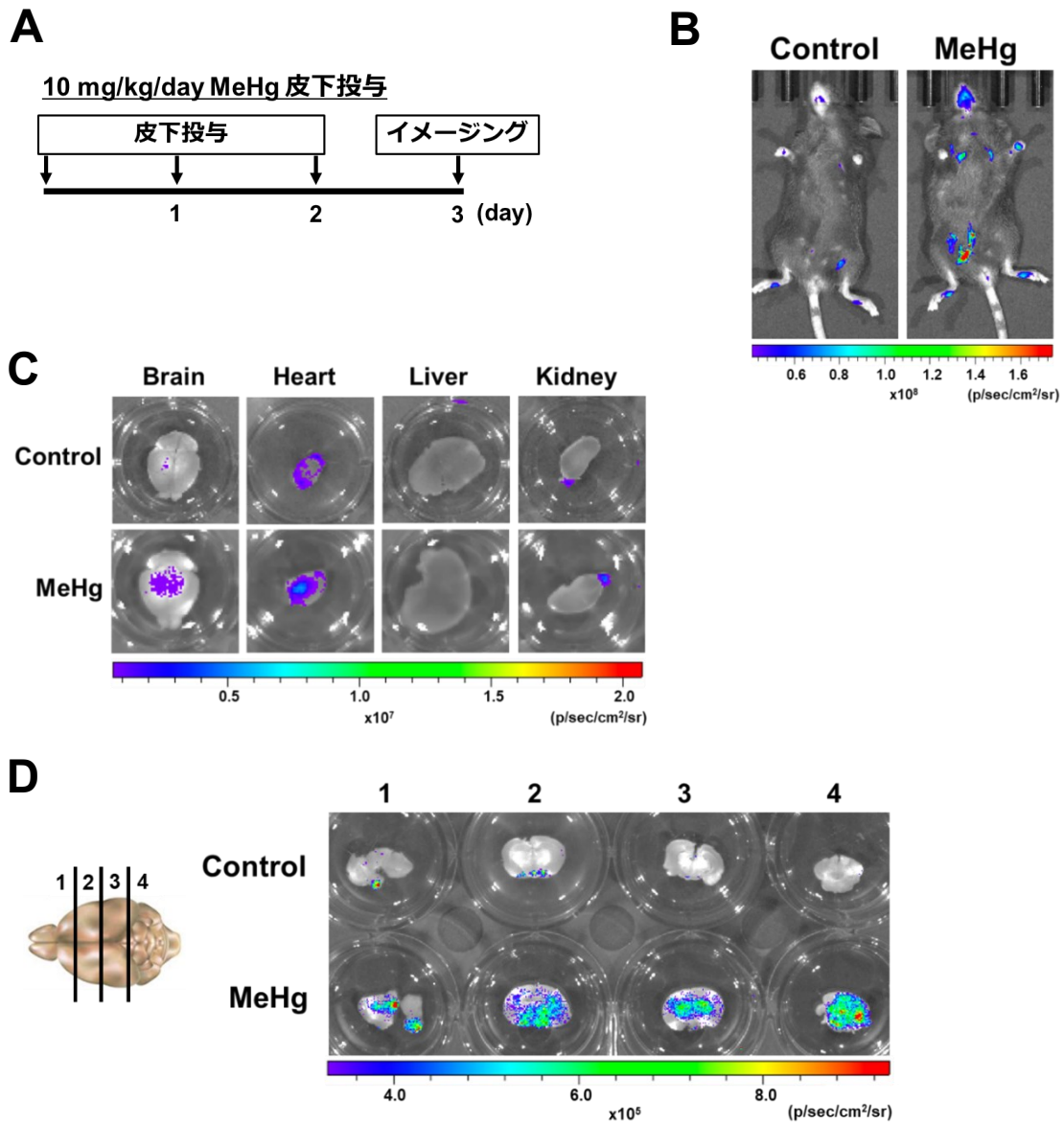


図 23 MeHg の反復投与による ER ストレス惹起

- A) MeHg 反復皮下投与のタイムコース
- B) 10 mg/kg の MeHg を 3 日間反復投与した際の *in vivo* イメージング像.
- C) B のマウスより得られた脳, 心臓, 肝臓, および腎臓における ERAI シグナルの検出.
- D) B のマウスより得られた脳を coronal 断面で 4 分割した際の *ex vivo* イメージング像.

各マウスおよび各組織におけるシグナルは 60 秒間の測定による累積値を示す.

## 2. MeHg 亜急性曝露モデルの使用

ここまでの検討より， ERAI Tg マウスを用いることで生体内 ER ストレス惹起を検出可能であることが判明した．しかしながら， Luciferase の発光反応は酸素供給を必要とするため， ERAI-LUC Tg マウスを解剖し， *ex vivo* で詳細な解析を進めることは困難である（図 24）．

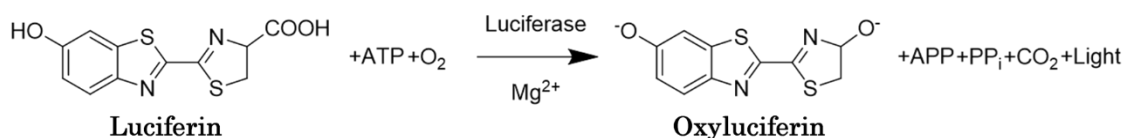


図 24 Luciferase による生物発光の反応式

そのため， 今後の検討ではインジケータとして Venus を組み込んだ ERAI-Venus Tg マウスを使用した．過去の報告から， 30 ppm の MeHg を含む飲水を C57BL/6 マウスに自由摂取させると， 投与 8 週目に大脳皮質において神経病変が認められることが明らかとなっている<sup>71</sup>．そこで， 水俣病病態に類似した神経病変モデルとして 30 ppm MeHg の飲水投与モデルを採用した．本投与条件下では 1 日当たりの MeHg 摂取量は 1.5 mg/kg とされている．

### 2-1 ERAI-Venus Tg マウスの応答性の確認

実験タイムコースは最大投与期間を 6 週間とし， 図 25A のように設定した．コントロール群には GSH 含有飲水を投与開始日から 6 週間自由摂取させた．まず， MeHg 曝露に対して ERAI-Venus Tg マウスが WT の C57BL/6 マウスと同様の応答を示すか否か確認するために体重変化を観察した． WT マウスとして， 7 週齢の雄性マウスをコントロール群と MeHg 投与群の各 8 匹ずつ用意した．また， ERAI-Venus Tg マウスとして， 7 週齢の雄性マウスをコントロール群と MeHg 投与群の各 6 匹ずつ用意した．体重測定の結果， 6 週間の MeHg 投与期間中， ERAI-Venus Tg マウスと WT マウスの体重変化に有意な差は認められなかった（図 25B）．

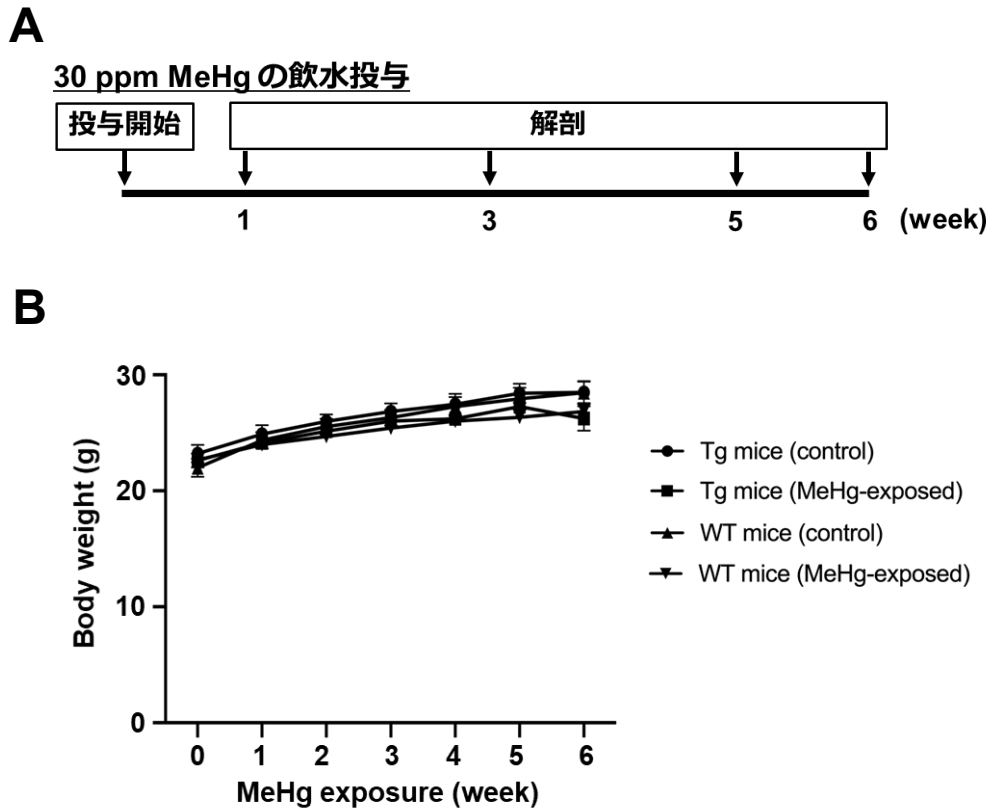


図 25 30 ppm MeHg 飲水投与に対する ERAI-Venus Tg マウスの応答性

A) MeHg 飲水投与のタイムコース.

B) WT マウスと ERAI-Venus Tg マウスの体重変化. 定量値は平均値 $\pm$ SEM を示す.

$n=6-8$ , no significant difference by two-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test.

## 2-2 MeHg の飲水投与による神経病変の確認

MeHg 曝露による神経病理変化として、C57BL/6 マウスに 30 ppm の MeHg を飲水投与することでアストロサイトおよびミクログリアのマーカータンパク質 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) および Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) が大脳皮質において増加することが報告されている<sup>71</sup>。そこで、6 週間 MeHg 曝露させた ERAI-Venus Tg マウスの大脳皮質における GFAP および Iba1 の増加を確認した。MeHg 中毒における主要な症状は体性感覚障害であるため<sup>72,73</sup>、その支配領域である大脳皮質体性感覚野を観察領域として設定した (図 26A)。ERAI-Venus Tg マウスから脳切片を作製し、GFAP および Iba1 に対する特異的抗体を用いて免疫組織染色を行った。その結果、6 週間の MeHg 飲水投与により GFAP および Iba1 を示すシグナルの顕著な増加が認められた (図 26B, C)。これらの結果から、ERAI-Venus Tg マウスは MeHg 曝露によって WT マウスと同様の神経病理変化を示すことが示唆された。



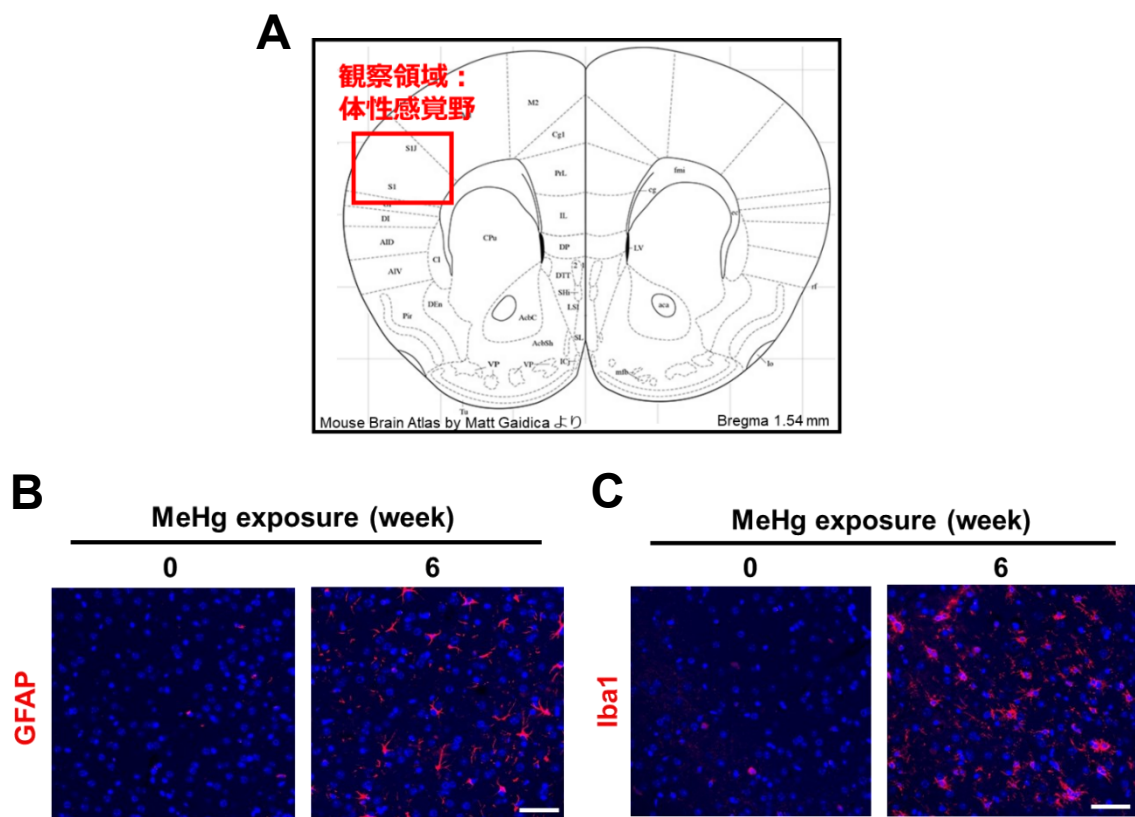


図 26 30 ppm MeHg 飲水投与による神経病変の確認

- A) Mouse Brain Atlas によって設定した免疫組織染色における観察領域（マウス大脳皮質体性感覚野）.
- B) 6週間の30 ppm MeHg 飲水投与による ERAI-Venus Tg マウスの大脳皮質体性感覚野における GFAP の増加.
- C) 6週間の30 ppm MeHg 飲水投与による ERAI-Venus Tg マウスの大脳皮質体性感覚野における Iba1 の増加.

赤色シグナルはそれぞれ GFAP および Iba1, 青色シグナルは 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を示す. スケールバーはそれぞれ 50  $\mu$ m を示す.

### 2-3 MeHg 飲水投与による神経細胞死誘導の確認

続いて、30 ppm MeHg の飲水投与による神経細胞死誘導を確認した。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 MeHg 曝露群とコントロール群との間で NeuN 陽性細胞数に有意な差は認められなかった (図 27A)。次に、TUNEL 染色を行い、MeHg 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確認した。その結果、投与3週目から TUNEL 陽性細胞が現れ始め、投与6週目では有意な増加が認められた (図 27B, C)。これらの結果から、30 ppm MeHg 飲水投与により、本投与期間後期では大脳皮質体性感覚野においてアポトーシスを起こしている細胞が存在することが明らかとなった。

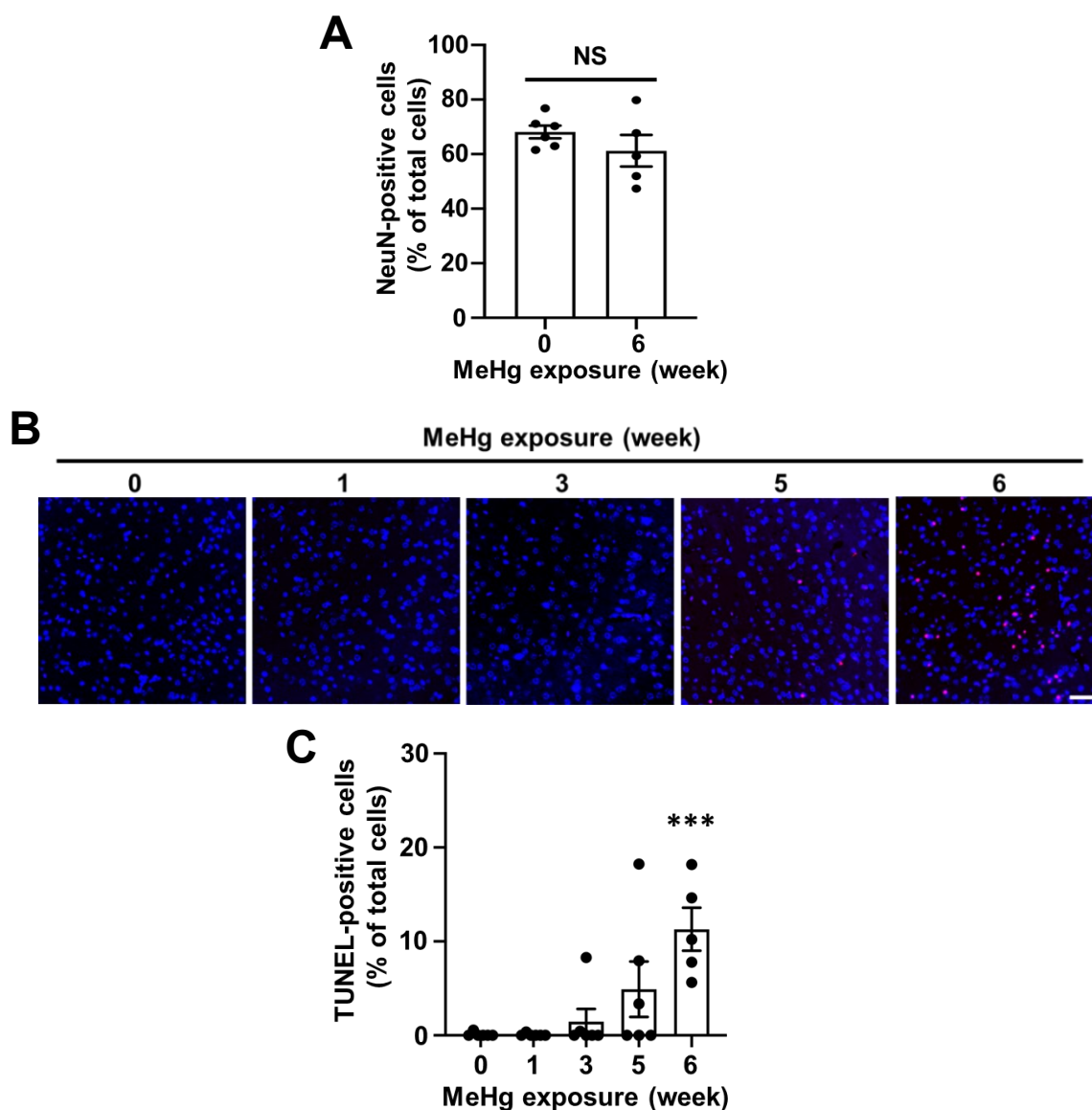


図 27 30 ppm MeHg 飲水投与による細胞死誘導の確認

- A) ERAI-Venus Tg マウスの大脳皮質体性感覚野における NeuN 陽性細胞数について、ImageJ を用いて定量化したもの。定量値は平均値±SEM を示す。  
 $n=5-6$ , no significant difference by Student's *t*-test. NS: nonsignificant.
- B) ERAI-Venus Tg マウスの大脳皮質体性感覚野における TUNEL 陽性細胞数の経時変化。赤色シグナルは TUNEL, 青色シグナルは DAPI を示す。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。
- C) 大脳皮質体性感覚野における TUNEL 陽性細胞数を定量化したもの。定量値は平均値±SEM を示す。  
 $n=5-6$ , \*\*\*:  $p<0.001$  vs 0-week by one-way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test.

## 2-4 MeHg 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 MeHg 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 28A-C）。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（図 28D）。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。

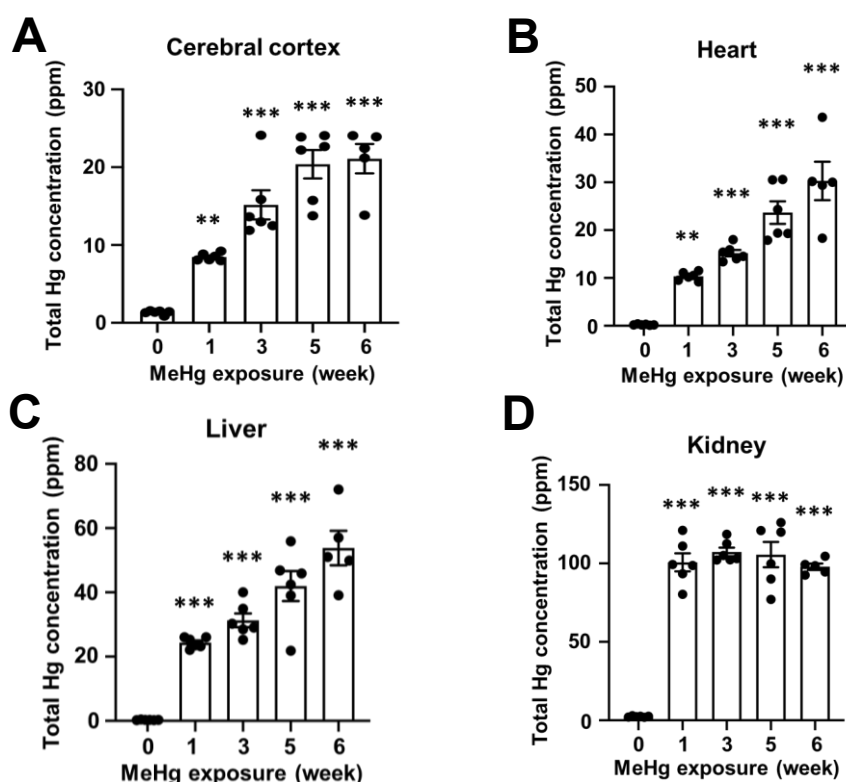


図 28 ERAI-Venus Tg マウスの大脳皮質に含まれる水銀量

- A) 30 ppm MeHg の飲水投与により， ERAI-Venus Tg マウスの大脳皮質中に蓄積した総水銀量（ppm：組織重量 1g 当たりの水銀量（ $\mu\text{g}$ ））。
- B) A) と同じ投与条件下で心臓に蓄積した総水銀量。
- C) A) と同じ投与条件下で肝臓に蓄積した総水銀量。
- D) A) と同じ投与条件下で腎臓に蓄積した総水銀量。
- 定量値は全て平均値 $\pm$ SEM を示す。

$n=5-6$ , \*\*:  $p<0.01$ , \*\*\*:  $p<0.001$  vs 0-week by one-way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test

## 2-5 *In vitro* と *in vivo* における水銀蓄積量の違い

MeHg 飲水投与モデルにおける MeHg 曝露量と、培養細胞を用いた実験系における MeHg 曝露量の違いを明らかにするために、各実験系における水銀蓄積量を測定した。前述 2-1 では組織重量 1 g 当たりの水銀量 ( $\mu\text{g}$ ) で算出したが、本項では培養細胞と比較するためにタンパク質 1 g 当たりの水銀量 (mg) として算出した。組織サンプルは 30 ppm MeHg を飲水投与した ERAI-Venus Tg マウス的大脑皮質を用いた。培養細胞サンプルは 1  $\mu\text{M}$  または 5  $\mu\text{M}$  の MeHg を 3 時間処理した MEF 細胞を用いた。培養細胞における本 MeHg 処理条件は、第 1 章の図 10 における *Xbp1* mRNA スプライシング抑制が認められた条件を採用している。それぞれのサンプルに含まれる水銀量を MA-2000 によって定量した結果、それぞれ最大の水銀量を示したサンプル間で約 10 倍もの差があることが判明した (表 6, 7)。一方で、培養細胞サンプルにおける 1  $\mu\text{M}$  MeHg, 3 時間処理群は、組織サンプルにおける投与 6 週目の MeHg 飲水投与群と近い値を示すことがわかった。

表 7. MeHg 処理した MEF 細胞に蓄積した総水銀量 (mg/g protein)

	Control	MeHg 1 $\mu\text{M}$	MeHg 5 $\mu\text{M}$
MEF	0.09 $\pm$ 0.08	0.26 $\pm$ 0.02*	2.15 $\pm$ 0.08***

$n=3$ , \*:  $p<0.05$ , \*\*\*:  $p<0.001$  vs control by one-way ANOVA with Bonferroni's *post hoc* test

表 8. MeHg 投与した ERAI-Venus Tg マウス的大脑皮質に蓄積した総水銀量 (mg/g protein)

	0-week	1-week	3-week	5-week	6-week
ERAI-Venus Tg mice	0.00 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.02**	0.14 $\pm$ 0.10***	0.20 $\pm$ 0.09***	0.22 $\pm$ 0.11***

$n=5-6$ , \*\*:  $p<0.01$ , \*\*\*:  $p<0.001$  vs 0-week by one-way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test

### 3. MeHg 飲水投与モデルにおける ERAI シグナルの検出

#### 3-1 大脳皮質体性感覚野における ERAI シグナルの検出

過去の細胞レベルおよび動物レベルの研究から、MeHgによってERストレスが誘導されることが明らかになっているものの<sup>19,42,43</sup>、細胞死に至るレベルに達するとERストレスが検出されるのか、ERストレスが惹起された結果、細胞死に至るのかは解明されていない。2-3の検討より、本投与条件下では6週間MeHg投与することで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、MeHg誘導性ERストレスが神経細胞死誘導前に認められるのか否か検討した。30 ppm MeHgを飲水投与した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。

まず、ERAI-Venusを検出可能か否か確認した。全長型の*Xbp1* mRNAを組み込んだERAI遺伝子は内在性XBP1の活性を競合的に阻害することが報告されている<sup>66</sup>。そこで、DNA結合ドメイン(DBD)を欠失させることで核移行しないXBP1 $\Delta$ DBDの遺伝子配列をコードするERAI-Venus Tgマウスを使用した。実際、MeHgの投与3週目の脳切片を用いて、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29A)。ERAI-Venus TgマウスにおいてERAIシグナルが検出可能であることが判明したため、次に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29B, C)。このことから、30 ppm MeHgの飲水投与により大脳皮質体性感覚野においてERストレスが発生していること、およびIRE1 $\alpha$ -XBP1経路が一過性に活性化していることが判明した。

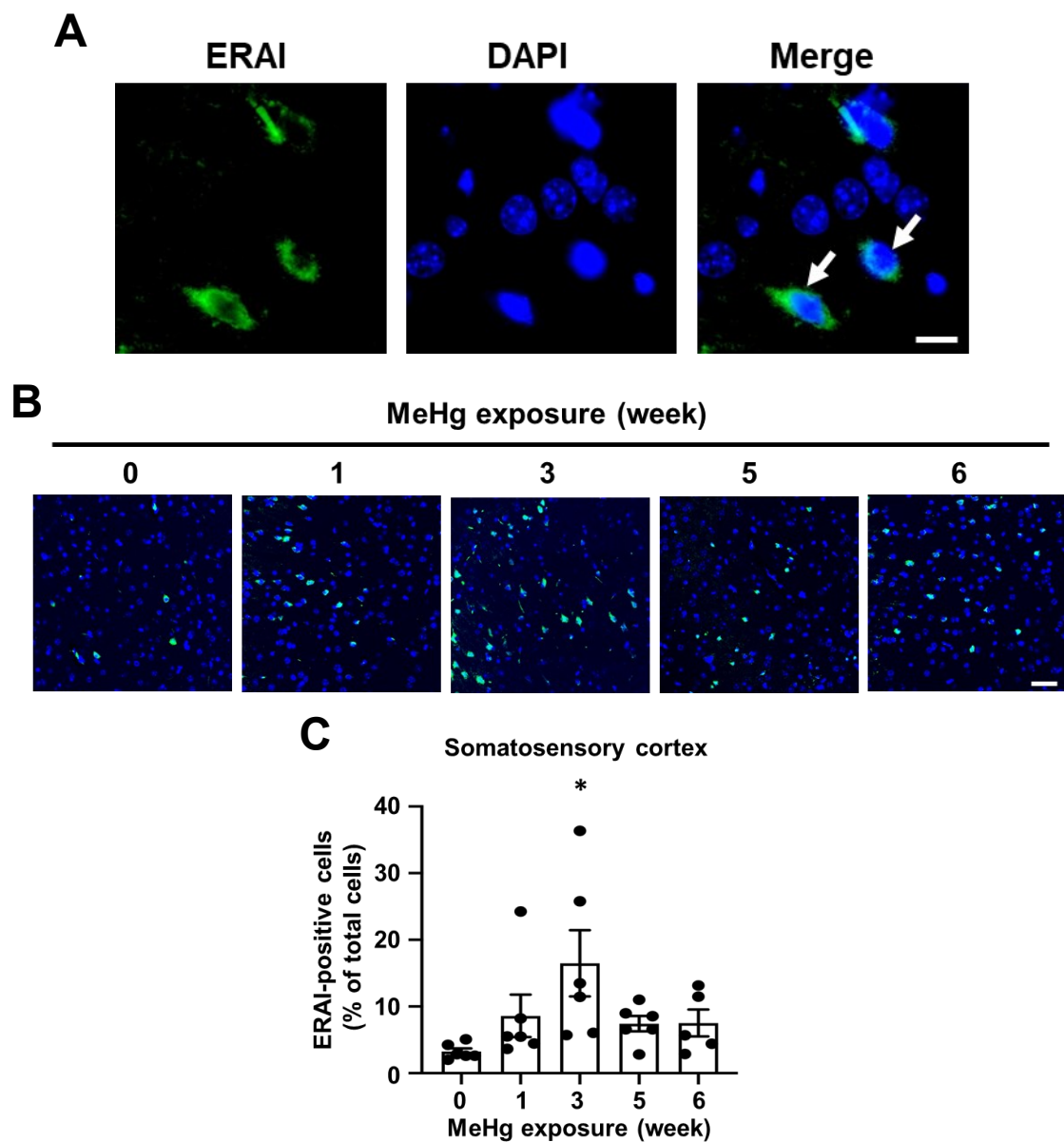


図 29 大脳皮質体性感覚野における MeHg 誘導性 ER ストレスの検出

- A) MeHg 投与 3 週目の大脳皮質体性感覚野において観察された ERAI-Venus の細胞質での発現. 緑色シグナルは ERAI, 青色シグナルは DAPI を示す. 矢印は ERAI を細胞質において発現する細胞を示す. スケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を示す.
- B) MeHg 投与により誘導された ERAI シグナルの経時変化. 緑色シグナルは ERAI, 青色シグナルは DAPI を示す. スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す.
- C) 大脳皮質体性感覚野における ERAI 陽性細胞数を定量化したもの. 定量値は平均値  $\pm$  SEM を示す.

$n=5-6$ , \*:  $p<0.05$  vs 0-week by one-way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test

### 3-2 他的大脑皮質領域における ERAI シグナルの検出

水俣病患者の脳内では、小脳、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<sup>74</sup>。ここまでの検討から、MeHgの飲水投与によって大脳皮質体性感覚野においてERストレス発生が認められることが判明した。そこで、次に体性感覚野以外の大脳皮質領域（視覚野、聴覚野、運動野）におけるERAIシグナル発生を検討した。30 ppm MeHg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MeHg誘導性ER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（図30A, B）。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30C）。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30D）。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30E）。大脳皮質体性感覚野、聴覚野、視覚野、運動野におけるERAI陽性細胞数の経時変化をまとめた結果を図30Fのように示した。以上より、MeHg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ERストレスが発生していることが明らかとなった。また、MeHg誘導性ER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。



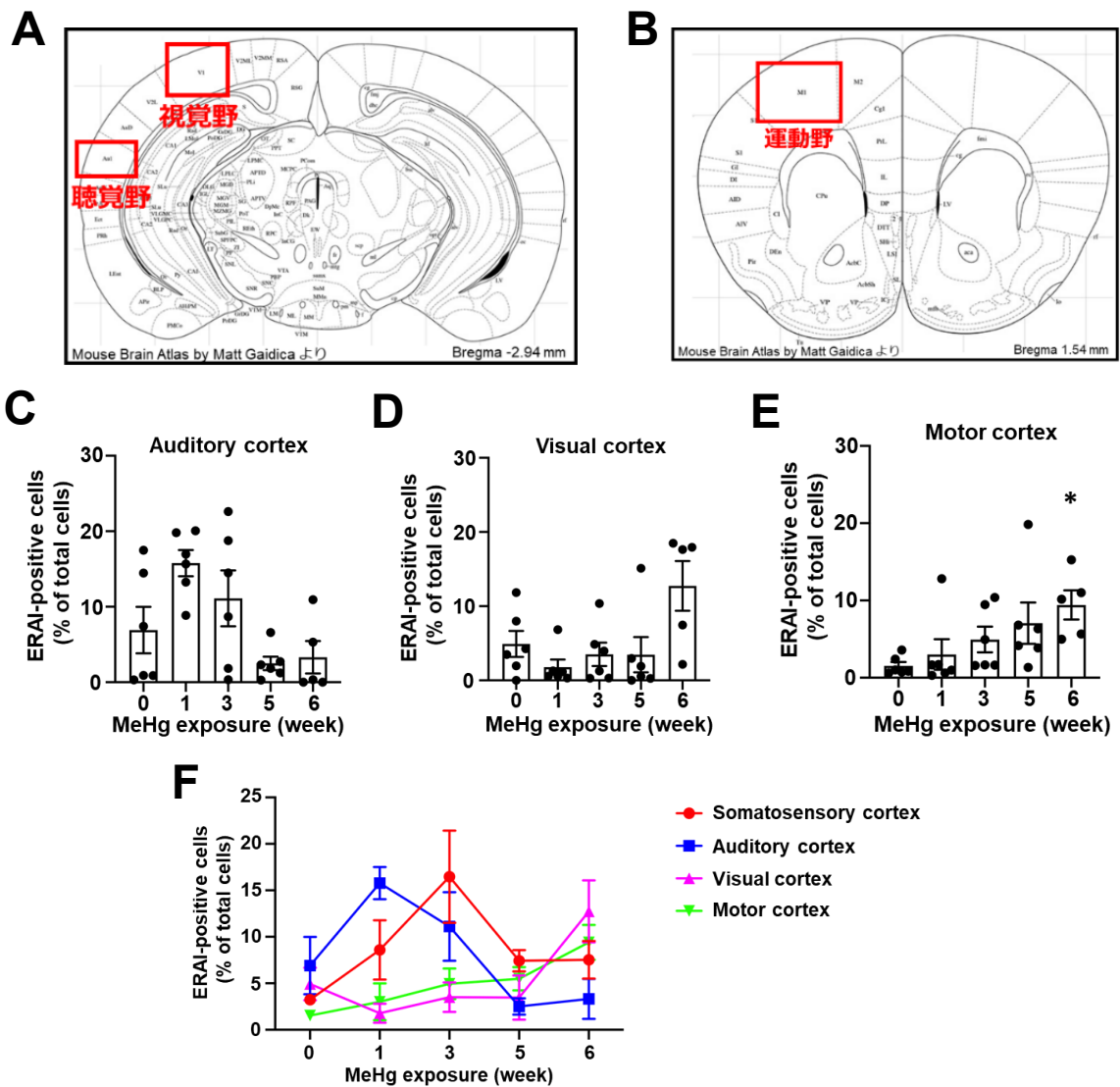


図 30 大脳皮質の各領域における ERAI 陽性細胞数の経時変化

- A) 設定した観察領域 (マウス大脳皮質聴覚野, 視覚野).
- B) 設定した観察領域 (マウス大脳皮質運動野).
- C) 大脳皮質聴覚野における ERAI 陽性細胞数を定量化したもの. 定量値は平均値±SEM を示す.
- D) C) 同様, 大脳皮質視覚野における ERAI 陽性細胞数を定量化したもの.
- E) C) 同様, 大脳皮質運動野における ERAI 陽性細胞数を定量化したもの.  $n=5-6$ , \*:  $p<0.05$  vs 0-week by one-way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test.
- F) 大脳皮質体性感覚野, 聴覚野, 視覚野, 運動野における ERAI 陽性細胞数の経時変化をまとめたもの. 赤色は体性感覚野, 青色は聴覚野, ピンク色は視覚野, 緑色は運動野を示す. 定量値は平均値±SEM を示す.

### 3-3 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，MeHg 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<sup>75</sup>．このように，ヒトとマウスでは MeHg による障害部位が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．30 ppm MeHg 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 MeHg 誘導性 ER 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（図 31A, C）．その結果，MeHg 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 31B）．このことから，大脳皮質と同様にマウスにおける MeHg 障害部位である線条体においても ER ストレスが発生していることが判明した．

また，小脳では MeHg 投与の有無に依らず，多くのプルキンエ細胞および顆粒細胞において ERAI シグナルが認められた（図 31D）．このことから，小脳では生理条件下で ER ストレスが発生していることが判明した．MeHg 曝露による ERAI シグナルの減弱が認められなかったことから，本研究では小脳を解析対象から除外した．

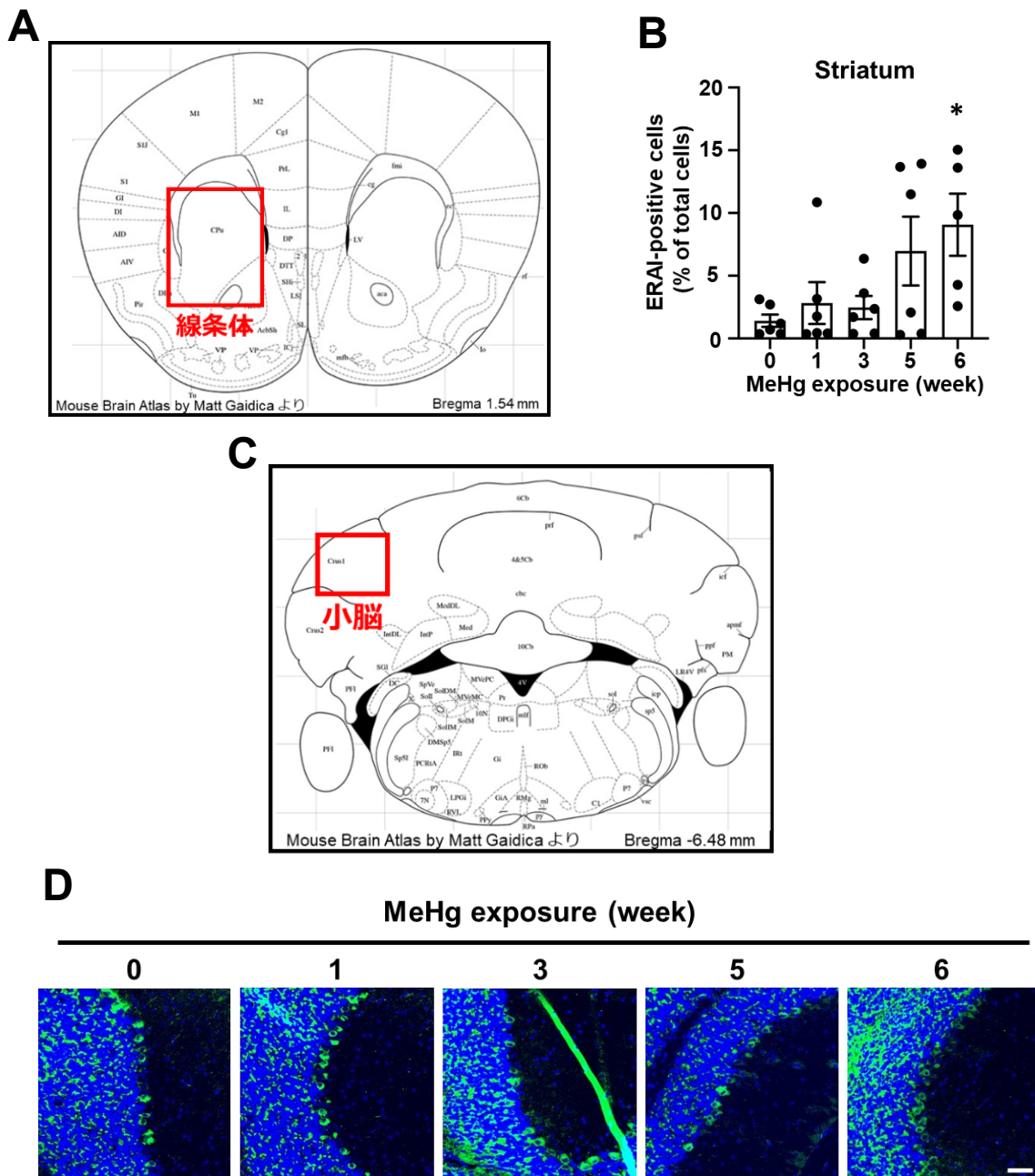


図 31 小脳および線条体における ERAI 陽性細胞数の経時変化

- A) 設定した観察領域 (マウス線条体).
- B) 線条体における ERAI 陽性細胞数を定量化したもの. 定量値は平均値±SEMを示す.  
 $n=5-6$ , \*:  $p<0.05$  vs 0-week by one-way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test.
- C) 設定した観察領域 (マウス小脳).
- D) 小脳における MeHg 誘導性 ERAI シグナルの経時変化. 緑色シグナルは ERAI, 青色シグナルは DAPI を示す. スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す.

### 3-4 ERAI シグナル陽性細胞種の特定

ここまでの検討から、大脳皮質や線条体といった脳内における MeHg 障害部位において ER ストレス発生が認められることが明らかとなった。そこで、次に MeHg 曝露によって ER ストレスが惹起された細胞種の特定を試みた。尚、以後の検討では大脳皮質体性感覚野に焦点を当て、解析を進めた。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 週目の脳切片を使用した。一方、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 Iba1 を用いた検討には、図 26B, C より GFAP および Iba1 の増加が認められた投与 6 週目の脳切片を使用した。GFP 抗体を用いた免疫組織染色により ERAI シグナルを増強し、各種細胞マーカーとの 2 重染色を試みた結果、NeuN 陽性細胞と ERAI 陽性細胞が最も高い一致率を示すことが判明した (図 32A-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 32C, D)。これらの結果より、MeHg 誘導性 ER ストレスはグリア細胞と比較して、神経細胞において生じやすいことが明らかとなった。

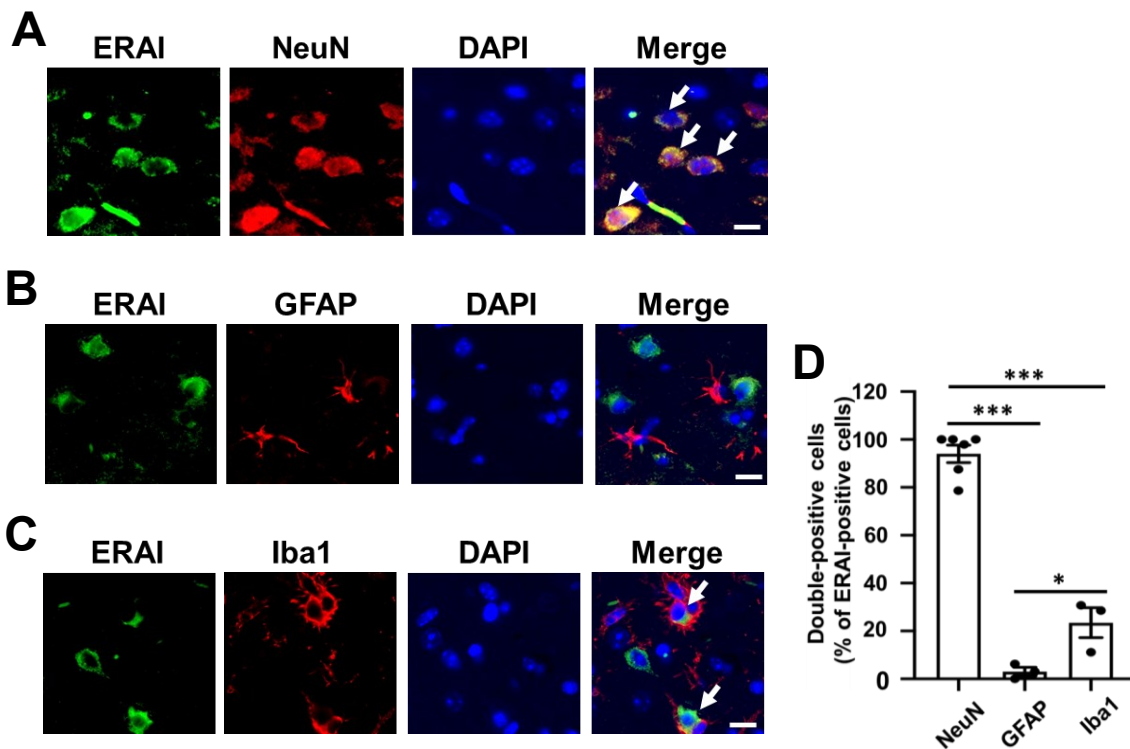


図 32 MeHg 誘導性 ERAI シグナルを示す細胞種の特定

A) MeHg 投与 3 週目の ERAI-Venus Tg マウスの大脳皮質体性感覚野における ERAI シグナルと NeuN の 2 重染色像. 矢印は ERAI と NeuN を共発現する細胞を示す.

B) MeHg 投与 6 週目の ERAI-Venus Tg マウスの大脳皮質体性感覚野における ERAI シグナルと GFAP の 2 重染色像.

C) B) 同様のサンプルにおける ERAI シグナルと Iba1 の 2 重染色像. 矢印は ERAI と Iba1 を共発現する細胞を示す.

各画像において緑色シグナルは ERAI, 赤色シグナルは各細胞種マーカー, 青色は DAPI を示す. スケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を示す.

D) ERAI 陽性細胞のうち, 各細胞種マーカーを発現する細胞を定量化したものの. 定量値は平均値  $\pm$  SEM を示す.

$n=3-6$ , \*:  $p<0.05$ , \*\*\*:  $p<0.001$  by one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* test.

## 4. MeHg 飲水投与による UPR 各経路の活性化の有無

### 4-1 IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の活性化の検討

ここまでの検討から、MeHg の飲水投与によって脳内の領域・細胞特異的に ER ストレスが惹起されることが明らかとなった。そこで、次に MeHg 誘導性 ER ストレスによる UPR 各経路の活性化の有無を検討した。まず、ERAI シグナルの発生を担う IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の活性化について解析するために、リン酸化 IRE1 $\alpha$  レベルの経時変化を確認した。30 ppm MeHg 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 $\alpha$  抗体を用いた免疫組織染色を行い、検討した。その結果、大脳皮質体性感覚野におけるリン酸化 IRE1 $\alpha$  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 33A, B)。

続いて、*Xbp1* mRNA スプライシングの下流経路の活性化を確認するために、E3 ユビキチンリガーゼ HMG-CoA reductase degradation enzyme 1 (HRD1) の発現量を解析した。HRD1 は XBP1s のホモダイマーによって転写誘導される下流遺伝子であり、ERAD の構成要素である<sup>76</sup>。ERAI-Venus Tg マウスの脳切片に対して、HRD1 抗体を用いた免疫組織染色を行った結果、ERAI 陽性細胞と同様に、HRD1 陽性細胞数は投与 3 週目にピークに達し、それ以降はほとんど増減しないことが判明した (図 33C, D)。また、投与 3 週目のサンプルを用いて、HRD1 と神経細胞マーカー NeuN との 2 重染色を試みた結果、HRD1 陽性細胞と NeuN 陽性細胞の一致が認められた (図 33E)。

これらの結果より、MeHg 投与 3 週目において大脳皮質体性感覚野の神経細胞では IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路が活性化していることが示唆された。また、リン酸化 IRE1 $\alpha$  レベルとは対照的に投与 3 週目以降、ERAI および HRD1 レベルが減少および維持されていたことから、IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の活性化は一過性であることが示唆された。

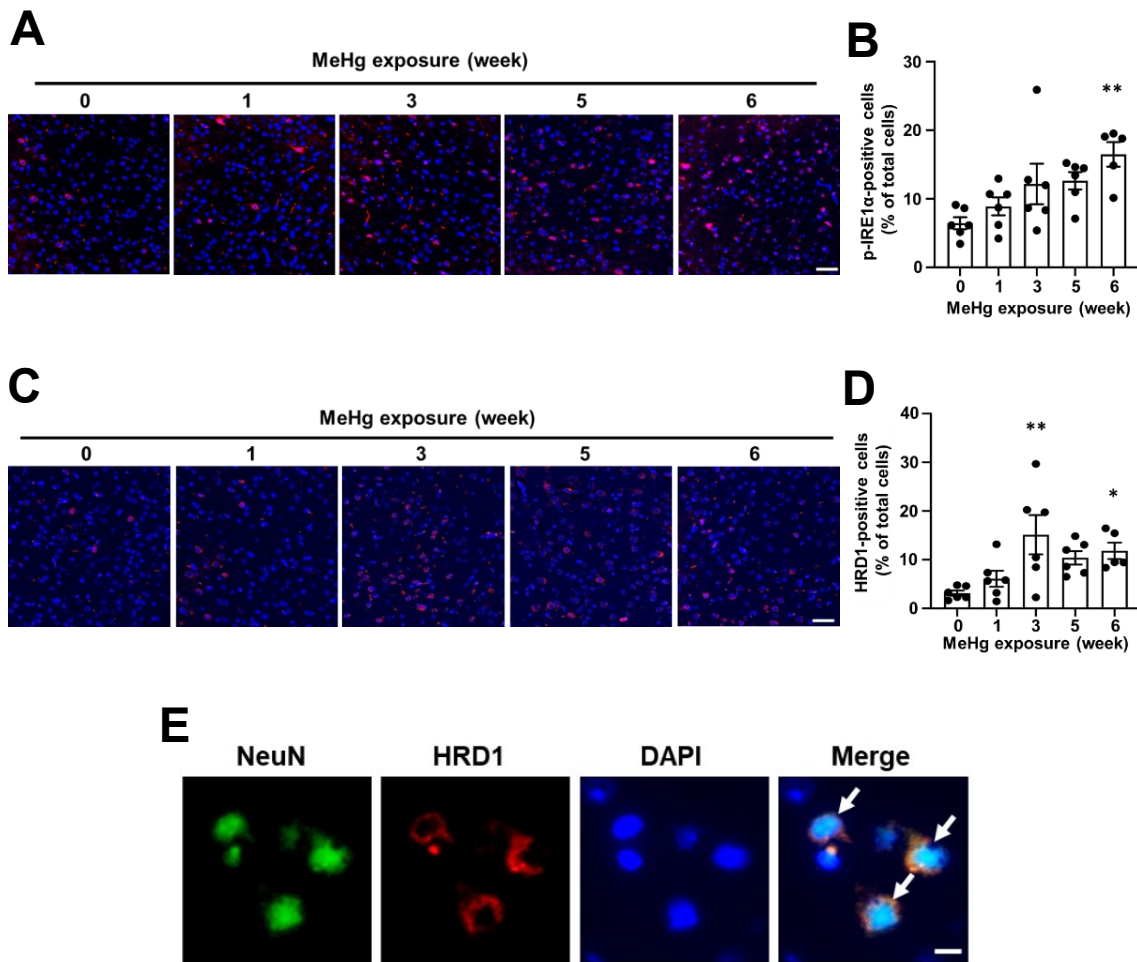


図 33 MeHg 飲水投与による IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の活性制御

A) 大脳皮質体性感覚野におけるリン酸化 IRE1 $\alpha$  レベルの経時変化.

B) リン酸化 IRE1 $\alpha$  陽性細胞数を定量化したもの.

C) 大脳皮質体性感覚野における HRD1 レベルの経時変化.

D) HRD1 陽性細胞数を定量化したもの.

赤色シグナルはそれぞれリン酸化 IRE1 $\alpha$  および HRD1, 青色シグナルは DAPI を示す. スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す. 定量値は平均値  $\pm$  SEM を示す.

$n=5-6$ , \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs 0-week by one-way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test.

E) MeHg 投与 3 週目の大脳皮質体性感覚野における NeuN と HRD1 の 2 重染色像. 緑色シグナルは NeuN, 赤色シグナルは HRD1, 青色シグナルは DAPI を示す. 矢印は NeuN と HRD1 と共発現する細胞を示す. スケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を示す.

#### 4-2 PERK 経路の活性化の検討

続いて、MeHg 飲水投与による PERK 経路の活性化の有無を検討した。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 MeHg 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 34A, B)。

また、PERK 経路および ATF6 経路の両経路の下流に位置する 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 34C, D)。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 34E)。

以上の結果より、大脳皮質体性感覚野の神経細胞では MeHg 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。



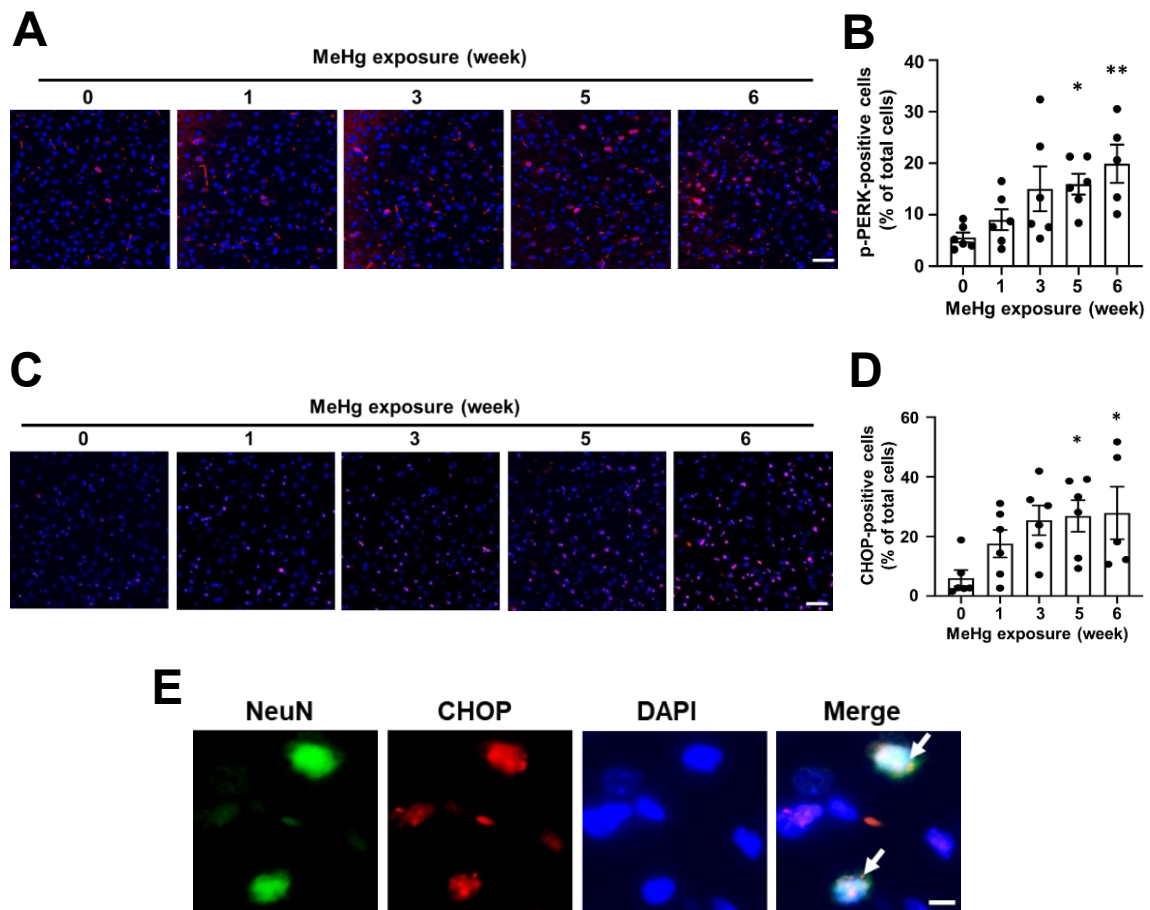


図 34 MeHg 飲水投与による PERK 経路の活性化

A) 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.

B) リン酸化 PERK 陽性細胞数を定量化したもの.

C) 大脳皮質体性感覚野における CHOP レベルの経時変化.

D) CHOP 陽性細胞数を定量化したもの.

赤色シグナルはそれぞれリン酸 PERK および CHOP, 青色シグナルは DAPI を示す. スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す. 定量値は平均値  $\pm$  SEM を示す.

$n=5-6$ , \*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$  vs 0-week by one-way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test.

E) MeHg 投与 6 週目の大脳皮質体性感覚野における NeuN と CHOP の 2 重染色像. 緑色シグナルは NeuN, 赤色シグナルは CHOP, 青色シグナルは DAPI を示す. 矢印は NeuN と CHOP と共発現する細胞を示す. スケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を示す.

### 4-3 ER ストレス性アポトーシスと MeHg 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 ER ストレスの発生と UPR の活性化が認められることが判明した。次に、MeHg 誘導性神経細胞死が ER 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の一致を確認した。MeHg 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 35A)。ここまでの検討から、MeHg 投与 6 週目のサンプルでは IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の活性化が減弱している可能性がある。そこで、TUNEL 陽性細胞における ER 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 35B)。ERAI と TUNEL、または CHOP と TUNEL のシグナルの一致率を表したものが図 35C である。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 陽性細胞は高度に一致することが確認できた (図 35D, ERAI<sup>+</sup> CHOP<sup>+</sup> cells / ERAI<sup>+</sup> cells = 95.5  $\pm$  1.7 % (n=3))。以上の結果より、MeHg によってアポトーシスが誘導された細胞では ER ストレスが生じていることが示唆された。

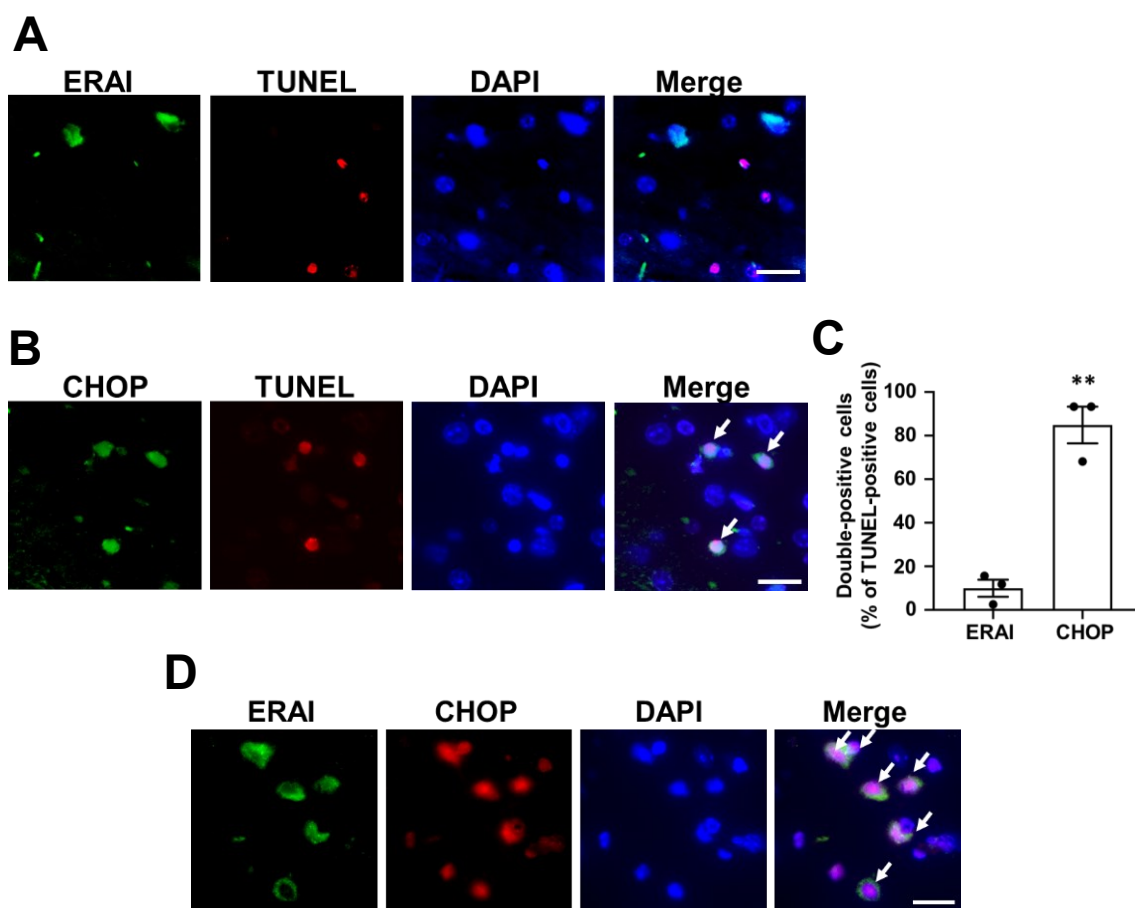


図 35 TUNEL 陽性細胞における ER ストレスの検出

- A) MeHg 投与 6 週目の大脳皮質体性感覚野における ERAI と TUNEL の 2 重染色像。緑色シグナルは ERAI，赤色シグナルは TUNEL，青色シグナルは DAPI を示す。
- B) MeHg 投与 6 週目の大脳皮質体性感覚野における CHOP と TUNEL の 2 重染色像。緑色シグナルは CHOP，赤色シグナルは TUNEL，青色シグナルは DAPI を示す。矢印は CHOP と TUNEL シグナルが共局在する細胞を示す。
- C) TUNEL シグナルと ERAI または CHOP を共発現する細胞数を定量化したものの。定量値は平均値±SEM を示す。  $n=3$ , \*\*:  $p<0.01$  by Student's *t*-test.
- D) MeHg 投与 3 週目の大脳皮質体性感覚野における ERAI と CHOP の 2 重染色像。緑色シグナルは ERAI，赤色シグナルは CHOP，青色シグナルは DAPI を示す。矢印は ERAI と CHOP と共発現する細胞を示す。
- 全ての画像データにおけるスケールバーは 20  $\mu\text{m}$  を示す。

## 考察

### 1. ERAI Tg マウスによる MeHg 誘導性 ER ストレスの検出

MeHg による生体内 ER ストレス惹起を観察するために、ERAI-LUC Tg マウスを用いた *in vivo* イメージングを行った。ERAI-LUC Tg マウスに 25 mg/kg の MeHg を単回皮下投与した結果、口辺部、胸部、腹部および脚部において ERAI シグナルの発生および増加が認められた (図 21B)。このことから、MeHg は生体内においても ER ストレスを惹起すること、および生体内では MeHg によって IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路が活性化していることが示唆された。生体内に取り込まれた MeHg は糞便や尿中より排出されるため、口辺部より得られたシグナルは食糞による MeHg 曝露に起因することが推測される。

MeHg によって ER ストレスの惹起された組織を特定するために各組織を摘出し、*ex vivo* でイメージングを行った結果、脳、心臓、肝臓、腎臓において ERAI シグナルの発生および増加が認められた (図 22A)。これらの臓器は MeHg に対して感受性が高いことが報告されている<sup>10,77,78</sup>。MeHg は GSH 抱合体として胆汁中へ放出された後、腸肝循環することや腎臓の近位尿細管において再吸収されることから、生体内における半減期は長いことが知られている (ヒトの場合、約 70 日)

<sup>10</sup>。また、MeHg は血流を介して組織へ移行するため、血液循環量の多い脳や心臓は高レベルの MeHg に曝露されることが推測される。加えて、MeHg は Cys と結合することでメチオニンと類似した構造を取ることで (図 36)<sup>79</sup>、中性アミノ酸トランスポーター

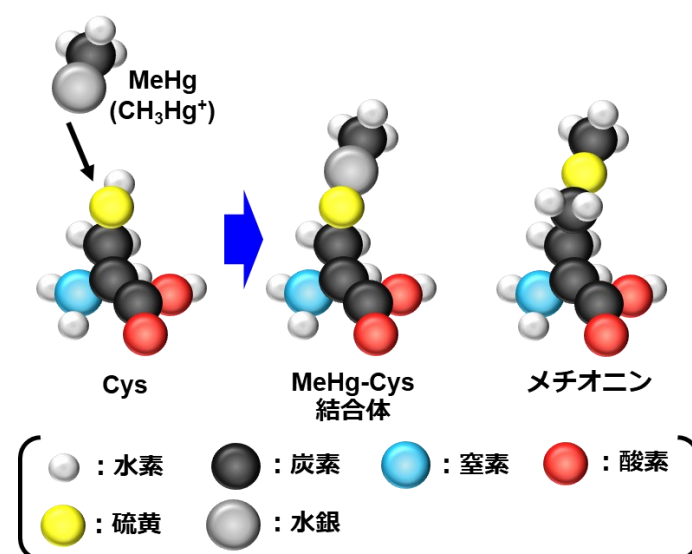


図 36 MeHg-Cys 結合体とメチオニンの類似性

L-type amino acid transporter 1(LAT1) を利用し、血液脳関門を容易に通過することが知られている<sup>8,11</sup>。以上の理由から、脳、心臓、肝臓、腎臓は他の組織に比べて MeHg 曝露量が多いために ERAI シグナルが認められた可能性がある。

一方で、ERAI-LUC Tg マウスに 10 mg/kg の MeHg を反復皮下投与したマウスでは脳および心臓において ERAI シグナルが認められたが、肝臓および腎臓ではほとんど認められなかった (図 23C). 臓器ごとの蓄積水銀量を検討した結果、肝臓および腎臓には脳および心臓よりも顕著に水銀が蓄積していることが判明した (図 28). これらの結果より、脳および心臓は肝臓および腎臓よりも MeHg 感受性が高いことが推定された.

また、膵臓および骨格筋では生理条件下で高い ERAI シグナルが認められた (図 22B,C). 膵臓に存在する  $\beta$  細胞は大量のインスリンの合成・分泌を担うため、常に弱い ER ストレス下にあることが知られている<sup>80</sup>. 加えて、筋組織では筋肉の収縮や筋分化時に筋小胞体から  $\text{Ca}^{2+}$  が放出されることで、ER ストレスが生じることが報告されている<sup>81,82</sup>. そのため、膵臓や骨格筋で観察された ERAI シグナルは生理的な ER ストレス発生を表したことが推定される.

MeHg を反復投与した ERAI-LUC Tg マウスの脳切片を用いて、脳内における ER ストレス発生部位について検討した結果、大脳皮質、線条体、および小脳と推測される部位近傍において ERAI シグナルが認められた (図 23D). MeHg を曝露したマウス脳内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<sup>75</sup>. そのため、MeHg による障害部位近傍では ER ストレスが発生していることが示唆された. MeHg 中毒の代表例である水俣病では、患者脳内において大脳皮質の他、小脳も障害を受けることが知られている<sup>74</sup>. 本研究では、MeHg 投与の有無に依らず、小脳において ER ストレスが発生していることが判明した (図 31D). したがって、小脳では生理的に ER ストレスが生じていることが示唆された.

## **2. MeHg 亜急性曝露モデルの使用**

より詳細な MeHg 誘導性 ER ストレス発生部位を解析するために、ERAI-Venus Tg マウスを用いた. ERAI-Venus Tg マウスは MeHg 曝露時の体重変化や中枢神経病変など、WT の C57BL/6 マウス同様の反応性を示した (図 25B, 26B, C). また、本実験系において 6 週間の MeHg 投与群では、コントロール群と比較し

て NeuN 陽性神経細胞数に有意な減少は認められなかったが、TUNEL 陽性アポトーシス細胞数は有意に増加していた (図 27A, C). 中枢神経系における MeHg 誘導性細胞死は神経細胞選択的に生じるとされており、グリア細胞のアポトーシスに言及した報告はほとんどない。したがって、本研究において観察された TUNEL 陽性細胞は神経細胞であることが推定された。

### 3. MeHg 飲水投与モデルにおける ERAI シグナルの検出

MeHg 曝露によって脳内で ER 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 29-31). MeHg 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 37) <sup>74</sup>. また、MeHg 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 <sup>75</sup>. このようにヒトとマウスでは MeHg による

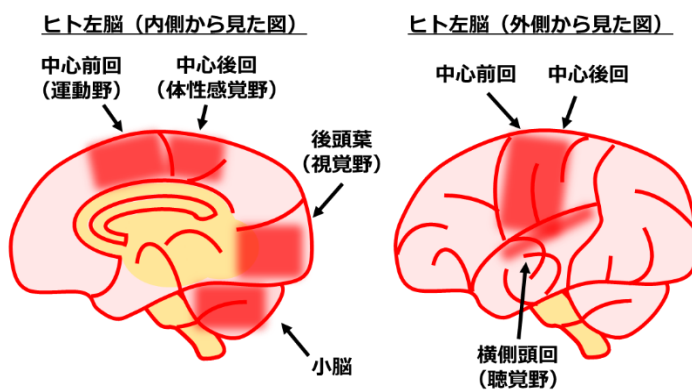


図 37 水俣病患者における神経病変部位

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 MeHg 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 MeHg 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、MeHg による神経病変部位では ER ストレスが生じていることが示唆された。

興味深いことに、MeHg 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 (図 29-31). 中枢神経系における MeHg 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<sup>83</sup>。実際、Mn-SOD1 や GPx1 の mRNA レベルが高い海馬では MeHg 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)。第 1 章で述べたように、MeHg による毒性発揮には酸化ストレス誘導と、それに続く ER ストレス惹起に起因すると考えられているため<sup>43,48</sup>、抗酸化タンパク質の発現量が ER ストレス感受性と関連する可能性は十分にある。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。MeHg 毒性の部位特異性に関する知見はほとんどないため、ER ストレス感受性という観点は新しい切り口となるかもしれない。

MeHg 誘導性 ER ストレスが MeHg による神経病変部位で認められたことから、次に ER 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 32A, D)。MeHg 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<sup>84</sup>。実際、MeHg 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<sup>71,83</sup>。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、MeHg 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<sup>85</sup>、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<sup>86</sup>、神経細胞選択的に酸化ストレスが生じた結果、ER 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<sup>87</sup>、MeHg 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 $\alpha$  の発現量が考えられる。ERAI 遺伝子は IRE1 $\alpha$  による RNase 活性を活用するため、IRE1 $\alpha$  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、海馬 cornu ammonis (CA) 1-3 の錐体細胞および海馬歯状回の顆粒細胞において IRE1 $\alpha$  発現量が高いことが報告されている<sup>88</sup>。以上の酸化ストレス感受性および IRE1 $\alpha$  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。

当研究室ではこれまでに培養細胞を用いた検討から、ヒト由来神経細胞において NO による ER ストレス惹起が認められることを明らかにしている<sup>54</sup>。これは、PDI の S-ニトロシル化によるミスフォールドタンパク質の蓄積に起因すると考えられている。また、農薬の 1 種であるロテノンも細胞および動物レベルで神経細胞に ER ストレスを惹起することが報告されている<sup>89,90</sup>。ロテノンは電子伝達系を阻害することで ROS を増加させる酸化ストレスである<sup>91</sup>。そのため、ロテノンは酸化ストレスを介して ER ストレスを誘導することが示唆されている。これらの知見より、中枢神経系における神経細胞は ER ストレス感受性および酸化ストレス感受性が高いことが推定された。

一方、一部の ERAI 陽性細胞は Iba1 陽性ミクログリア細胞と一致していた (図 32C, D)。アポトーシスを起こした神経細胞はミクログリアによるファゴサイトーシスを受けることが知られており<sup>92</sup>、本実験結果は投与 6 週目のサンプルより得られたことから、アポトーシスを起こした ERAI 陽性神経細胞がミクログリアによる貪食を受けている可能性がある。また、Iba1 の増加した活性化ミクログリアにおいて自発的に ERAI シグナルが誘導された可能性もあるため、今後詳細な解析が必要である。

#### **4. MeHg 飲水投与による UPR 各経路の活性化の有無**

ここまでの検討から、MeHg 毒性が認められる脳領域の神経細胞において ER ストレスが惹起されることが明らかになった。そこで、次に MeHg 誘導性 ER ストレスに対する UPR 各経路の活性化の有無について解析した。MeHg 中毒の主要な症状は体性感覚障害のため<sup>72,73</sup>、以後の解析では大脳皮質体性感覚野に焦点を当てている。

まず、ERAI シグナルの発生を担う IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の活性化を検討した。リン酸化 IRE1 $\alpha$  陽性細胞数の経時変化を検討した結果、弱いながら時間依存的な増加傾向を示し、投与 6 週目には有意差が認められた (図 33B)。本結果より、



本実験タイムコースにおいて IRE1 $\alpha$  の活性化は持続または増加していることが示唆された。続いて、IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の下流因子である HRD1 の陽性細胞数を解析した結果、ERAI 陽性細胞数同様、投与 3 週目にピークに達し、投与 5-6 週目にはそれ以上の増加傾向は認められなかった (図 33D)。本実験タイムコースにおいて大脳皮質中には時間依存的に蓄積水銀量が増加していたことから (図 28A)、IRE1 $\alpha$ -XBP1 下流シグナルは MeHg 曝露量が一定以上に達すると減弱することが示唆された。第一章より、高濃度 MeHg 曝露によって *Xbp1* mRNA のスプライシングが抑制されることを明らかにしている。また、*Xbp1* mRNA スプライシングの抑制が認められる蓄積水銀量と類似した値が投与 6 週目の大脳皮質中において認められることを明らかにしている (表 6, 7)。したがって、投与 5-6 週目の大脳皮質体性感覚野には *Xbp1* mRNA スプライシングの抑制に至る MeHg が蓄積したことで ERAI シグナルおよび HRD1 誘導が減弱したことが推測される。

次に、PERK 経路の活性化について検討した。リン酸化 PERK 陽性細胞数の経時変化を検討した結果、時間依存的な増加傾向を示し、投与 5-6 週目には有意差が認められた (図 34B)。本結果より、PERK 経路は IRE1 $\alpha$  経路同様に、活性化が持続または増加していることが示唆された。続いて、PERK 経路および ATF6 経路の両経路の下流に位置する CHOP の陽性細胞数を解析した結果、リン酸化 PERK 陽性細胞数同様に時間依存的な増加傾向を示し、投与 5-6 週目には有意差が認められた (図 34D)。これらの結果より、MeHg の飲水投与によって PERK 経路の活性化および CHOP の発現が誘導されることが示唆された。UPR では生存シグナルと細胞死シグナルを同時に活性化し、生存シグナルが減弱することで細胞死シグナルが優位となり、アポトーシスが誘導されると考えられている<sup>93</sup>。事実、本研究では MeHg 投与早期からアポトーシス促進因子 CHOP の発現は増加傾向にあった (図 34D)。また、MeHg 誘導性アポトーシスが観察された投与 6 週目において、ERAI 陽性細胞では TUNEL シグナルがほとんど認められない一方で、CHOP 陽性細胞では TUNEL シグナルが多く認められた (図 35A-C)。したがって、生存シグナルに関与する IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の活性化が減弱していた投与 5-6 週目では、細胞死シグナルに関与する PERK 経路が優位となり、CHOP の誘導を介して細胞死を引き起こした可能性がある。

他の研究グループでは、MeHgによる神経細胞死誘導メカニズムとして、ミクログリアの傷害性（活性化）ミクログリアへの変化と、炎症性サイトカインの放出が関与することが示唆されている<sup>94</sup>。本メカニズムにおける神経細胞死には、Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) を介したアポトーシス経路の活性化が関与すると考えられている<sup>69</sup>。ERAI-Venus Tg マウスを用いた検討より、大脳皮質体性感覚野における活性化ミクログリアの増加は投与期間後期に観察されている（図 26C）。また、神経細胞における ER ストレス惹起および UPR の活性化は比較的早期から観察されたものの（図 29, 33, 34）、TUNEL 陽性細胞の増加は投与期間後期に認められている（図 27C）。したがって、MeHg 誘導性神経細胞死には UPR 活性化と TNF $\alpha$  シグナリングによるアポトーシス誘導機構が相加的に働いていることが推測される。

## 終章

本研究より得られた成果を以下に列挙する。

### 【*In vitro*】

1. MeHg 処理によって PERK 経路および ATF6 経路が活性化することが判明した。
2. MeHg 処理によって IRE1 $\alpha$  のリン酸化は亢進するものの、*Xbp1* mRNA のスプライシングはほとんど認められないことが判明した。
3. MeHg は IRE1 $\alpha$  の Cys931 を S-水銀化することでリボヌクレアーゼ活性を低下させることが推定された。
4. C931S-IRE1 $\alpha$  変異体を導入することで MeHg 誘導性細胞死が軽減することが判明した。
5. PERK 阻害薬を前処理することで、MeHg 誘導性細胞死が軽減することが判明した。

### 【*In vivo*】

1. MeHg 誘導性 ER ストレスは神経細胞死発生前に認められることが判明した。
2. MeHg 誘導性 ER ストレスは中枢神経系における MeHg 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）において認められることが判明した。
3. 大脳皮質体性感覚野において，MeHg 誘導性 ER ストレスは神経細胞選択的に認められることが判明した。
4. 大脳皮質体性感覚野において，MeHg 投与中，PERK 経路は時間依存的に活性化するのに対し，IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路は一過性に活性化することが推定された。

以上の結果をまとめたものを図 38 に示す。

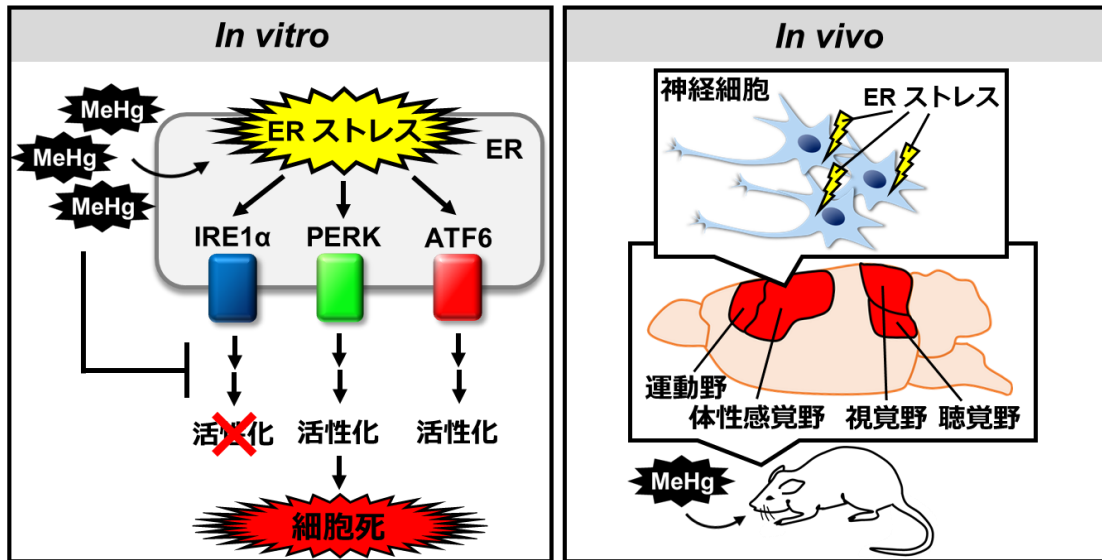


図 38 MeHg による UPR を介した細胞死惹起機構と MeHg 誘導性 ER ストレスの領域・細胞特異性

本研究より，MeHg による神経細胞死誘導には IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の抑制と，PERK 経路の活性化が関与することが推定された．本研究では PERK 阻害薬処理によって MeHg 誘導性細胞死が抑制されることを明らかにしたが，慢性的な MeHg 曝露に対する影響は検討していない．PERK 経路は ER ストレスのみならず，酸化ストレスや低酸素ストレスに対する応答反応（統合的ストレス応答）を示すため，細胞のホメオスタシス維持に重要であることが知られている<sup>26</sup>．そのため，慢性的な MeHg 曝露に対し，持続的に PERK 経路を抑制することは細胞毒性を増悪させることが推測される．したがって，MeHg 毒性軽減には CHOP 阻害薬，IRE1 $\alpha$  活性化薬および IRE1 $\alpha$  酸化修飾阻害薬などの薬物が有効であると考えている．

また，ERAI Tg マウスを用いることで MeHg 障害部位における神経細胞において ER ストレスの発生および UPR の活性化を検出することができた．そのため，本マウスを用いることで MeHg 誘導性 ER ストレスを介した毒性発現メカニズムを時空間的に解析できる可能性を見出した．ERAI Tg マウス（特に ERAI-Venus Tg マウス）を用いるメリットはインジケータの半減期の長さにある．XBP1s の半減期が約 30 分程であるのに対し<sup>95</sup>，ERAI-Venus の蛍光の半減期は約 24 時間であった（データ未表示）．これは Venus（GFP）本来の半減期の長さ

とほとんど一致している<sup>96</sup>。このことから、ERAI-Venus Tg マウスを用いることで、不安定な IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の活性をマクロな時間軸で解析できることが推測される。その一方で、内在性の IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路活性化の正確な時間軸を捉えることは困難であるが、MeHg による組織・領域特異的な毒性発現に関する知見は未だ乏しいため、生体内における部位特異的な UPR 活性化の解析ツールとして ERAI Tg マウスは有用であると考えている。加えて、本研究では神経細胞死が認められる MeHg 曝露量に達すると、ERAI シグナルが減弱する可能性を見出している。したがって、前述の IRE1 $\alpha$  活性化薬や IRE1 $\alpha$  酸化修飾阻害薬の薬効評価においても、本マウスを活用できると期待している。ここで、今後の展望を実現する上で解決しなければならない課題を以下に列挙する。

#### (1) MeHg 誘導性細胞死に対する ATF6 経路活性化の影響

第 1 章の考察で触れたように、ATF6 の活性化抑制に関して阻害薬を用いて検討したものの、MeHg 誘導性細胞死の軽減は認められなかった。本結果は、使用したセリンプロテアーゼ阻害薬の特異性が低く、広範な影響が出たために保護効果が認められなかったと解釈した。したがって、ATF6 経路の活性化抑制が MeHg 毒性に対して保護的に作用するのかは未だ不明であるため、今後詳細を明らかにする必要がある。

#### (2) *In vitro* における低濃度 MeHg 処理下での UPR 活性化の検討

本研究では、培養細胞を用いて比較的高濃度の MeHg 処理による UPR 活性化を検討した。一方、モデル動物を用いた検討では MeHg の飲水投与による神経病変モデルを用いて UPR 活性化を検討した。その結果、*in vitro* と *in vivo* における IRE1 $\alpha$  の応答性に違いが見られることを明らかにした。現時点では、各実験系における MeHg 曝露量の違いに起因すると考察しているが、実際に低濃度 MeHg を培養細胞に曝露させた際の UPR 活性化（特に IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路の活性化）については未だ検討できていない。そのため、こちらに関しても今後の検討が必要な課題であると考えている。加えて、低濃度 MeHg による UPR 各経路の活性化を経時的に解析することで、経路毎の MeHg 感受性の違いの有無を明らかにすることができるかと推測している。

### (3) IRE1 $\alpha$ の S-水銀化の確認

本研究では IRE1 $\alpha$  の S-水銀化の有無について、Spliced *Xbp1* mRNA 量より間接的に評価している。したがって、IRE1 $\alpha$  が MeHg によって S-水銀化を受けることを示す直接的なデータは得られていない。第 1 章の考察でも触れているように、現状 S-水銀化を生化学的に検出する方法は乏しい。そのため、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS) などの分析学的手法を用いて IRE1 $\alpha$  と MeHg の結合を検討する必要がある。しかしながら、IRE1 $\alpha$  は膜タンパク質であり、解析に供する全長型のリコンビナントタンパク質を用意することは難しい。メーカーが提供している細胞質ドメインのみを含むリコンビナント IRE1 $\alpha$  を解析に供する方法もあるが、全長型ではないため生体内での現象を再現できているか否かは疑わしい。したがって、S-水銀化を特異的に検出する手法を確立する必要がある。

### (4) MeHg による *Xbp1* mRNA のスプライシング抑制の *in vivo* での確認

ERAI-Venus Tg マウスを用いた検討より、大脳皮質体性感覚野では ERAI 陽性細胞が一過性に増加したことから、MeHg 投与後期には *Xbp1* mRNA のスプライシングが抑制されている可能性がある。しかしながら、生化学的手法を用いて spliced *Xbp1* mRNA が基底レベルまで低下したことを示すデータは得られていない。実際、MeHg を投与した ERAI-Venus Tg マウスの大脳皮質画分を用いて spliced *Xbp1* mRNA 量を RT-PCR 法によって検討したが、3 週間の MeHg 投与群とコントロールでさえ差が認められなかった。この理由として、無顆粒島皮質、梨状皮質および外側嗅内皮質などの大脳皮質領域では生理条件下で ERAI シグナルが認められたことが挙げられる。マウス脳解剖過程でこれらの大脳皮質領域を分画することは困難であるため、レーザーマイクロダイセクションなどの組織中の特定領域を抽出する手法を用いて解析する必要がある。

### (5) MeHg による UPR 活性化を介した神経細胞死の *in vivo* での証明

ERAI-Venus Tg マウスを用いた検討より、脳内 MeHg 障害部位の神経細胞における ER ストレス発生および UPR 活性化が観察された。しかし、UPR の活性化が MeHg 誘導性神経細胞死を直接誘導することを示すデータは得られていない。そのため、CHOP 阻害薬、IRE1 $\alpha$  活性化薬および XBP1s の遺伝的導入などによ

り, MeHg 誘導性神経細胞死が軽減されること動物レベルで証明する必要がある.

水俣病を始めとする MeHg 中毒の現行の治療法には, キレート剤や抗酸化剤の投与および対症療法がある. キレート剤は血中からの MeHg の除去を目的としている. 抗酸化剤としてはビタミン B などが挙げられており, 血中および脳内の ROS の除去を目的としている. これらは MeHg 毒性の根本的解決を目指すものであるが, 進行中の ER ストレスを軽減できなければ神経細胞死を抑制することは難しいことが推測される. そのため, 上記の治療法に UPR 制御薬を組み合わすことで神経細胞死をより効果的に抑制することができるのではないかと考えている.

## 引用文献

1. Hintelmann, H. Organomercurials. Their formation and pathways in the environment. *Met. Ions Life Sci.* **7**, (2010).
2. Varekamp, J. C. & Buseck, P. R. Mercury emissions from Mount St Helens during September 1980. *Nature* **293**, 555–556 (1981).
3. UNEP. Global Mercury Assessment 2018. 270 (2018).
4. Pacyna, E. G. & Pacyna, J. M. Global emission of mercury from anthropogenic sources in 1995. *Water. Air. Soil Pollut.* **137**, 149–165 (2002).
5. Clarkson, T. W., Magos, L. & Myers, G. J. The Toxicology of Mercury — Current Exposures and Clinical Manifestations. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1731–1737 (2003).
6. FDA and EPA. Eating Fish Advice. (2019).
7. Simpson, R. B. Association Constants of Methylmercury with Sulfhydryl and Other Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 4711–4717 (1961).
8. Yin, Z. Jiang, H. Syversen, T. Rocha, JBT. Farina, M. & Aschner, M. The methylmercury-L-cysteine conjugate is a substrate for the L- type large neutral amino acid transporter, LAT1. *J Neurochem* **107**, 1083–1090 (2008).
9. International Programme on Chemical Safety (IPCS). THE ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 118 Inorganic mercury. *World Health Organization* (1991).
10. IPCS. THE ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 101 Methylmercury. *World Health Organization* (1990).
11. Kerper, L. E., Ballatori, N. & Clarkson, T. W. Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. *Am. J. Physiol.* **262**, R761–R765 (1992).
12. Aschner, M. & Syversen, T. Methylmercury: Recent advances in the understanding of its neurotoxicity. *Ther. Drug Monit.* **27**, 278–283 (2005).
13. Kanda, H., Shinkai, Y. & Kumagai, Y. S-Mercuration of cellular proteins by methylmercury and its toxicological implications. *J. Toxicol. Sci.* **39**, 687–700 (2014).
14. Meister, A. & Anderson, M. E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711–760 (1983).
15. Fonnum, F. & Lock, E. A. The contributions of excitotoxicity, glutathione depletion and DNA repair in chemically induced injury to neurones: Exemplified



- with toxic effects on cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* **88**, 513–531 (2004).
16. Kumagai, Y., Homma-Takeda, S., Shinyashiki, M. & Shimojo, N. Alterations in Superoxide Dismutase Isozymes by Methylmercury. *Appl. Organomet. Chem.* **11**, 635–643 (1997).
  17. Freitas, A. J., Rocha, J. B. T., Wolosker, H. & Souza, D. O. G. Effects of Hg<sup>2+</sup> and CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> on Ca<sup>2+</sup> fluxes in rat brain microsomes. *Brain Res.* **738**, 257–264 (1996).
  18. Chiu, V. C. K., Mouring, D. & Haynes, D. H. Action of mercurials on the active and passive transport properties of sarcoplasmic reticulum. *J. Bioenerg. Biomembr.* **15**, 13–25 (1983).
  19. 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).
  20. Rutkowski, D. T. & Kaufman, R. J. A trip to the ER: Coping with stress. *Trends in Cell Biology* **14**, 20–28 (2004).
  21. Trombetta, E. S. The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology* **13**, 77R – 91R (2003).
  22. Walter, P. & Ron, D. The Unfolded Protein Response : From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* **334**, 1081–1086 (2011).
  23. Smith, M. H., Ploegh, H. L. & Weissman, J. S. Road to ruin: Targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* **334**, 1086–1090 (2011).
  24. Shi, Y., Vattem, K. M., Sood, R., An, J., Liang, J., Stramn, L. & Wek, R. C. Identification and Characterization of Pancreatic Eukaryotic Initiation Factor 2  $\alpha$ -Subunit Kinase, PEK, Involved in Translational Control. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7499–7509 (1998).
  25. Harding, H. P., Zhang, Y. & Ron, D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**, 271–274 (1999).
  26. Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H. & Ron, D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell* **5**, 897–904 (2000).
  27. Forman, M. S., Lee, V. M. Y. & Trojanowski, J. Q. ‘Unfolding’ pathways in neurodegenerative disease. *Trends in Neurosciences* **26**, 407–410 (2003).
  28. Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U. P., Prywes, R., Brown, M. S. & Goldstein, J. L. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the

- same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* **6**, 1355–1364 (2000).
29. Yoshida, H. Matsui, T. Hosokawa, N. Kaufman, R. J. Nagata, K. & Mori, K. A Time-Dependent Phase Shift in the Mammalian Unfolded Protein Response to decrease the load in the ER; these processes are collectively termed the unfolded protein response *Patil. Dev. Cell* **4**, 265–271 (2003).
  30. Tirasophon, W., Welihinda, A. A. & Kaufman, R. J. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* **12**, 1812–1824 (1998).
  31. Wang, X. Z. Harding, H. Zhang, Y. Jolicouer, E. Kuroda, M. & Ron, D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* **17**, 5708–5717 (1998).
  32. Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. & Ron, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2**, 326–332 (2000).
  33. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. & Mori, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881–891 (2001).
  34. Lee, K. Tirasophon, W. Shen, X. Michalak, M. Prywes, R. Okada, T. Yoshida, H. Mori, K. & Kaufman, R. J. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* **16**, 452–466 (2002).
  35. Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T. & Mori, K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins: Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**, 33741–33749 (1998).
  36. Tam, A. B., Koong, A. C. & Niwa, M. Ire1 has distinct catalytic mechanisms for XBP1/HAC1 splicing and RIDD. *Cell Rep.* **9**, 850–858 (2014).
  37. Remondelli, P. & Renna, M. The endoplasmic reticulum unfolded protein response in neurodegenerative disorders and its potential therapeutic significance. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, (2017).
  38. Prasanthi, J. R. P., Larson, T., Schommer, J. & Ghribi, O. Silencing gadd153/chop gene expression protects against alzheimer’s disease-like pathology induced by 27-hydroxycholesterol in rabbit hippocampus. *PLoS One* **6**, (2011).

39. Hashida, K. Kitano, Y. Sudo, H. Awa, Y. Maeda, S. Mori, K. Takahashi, R. Iinuma, M. & Hori, O. ATF6 $\alpha$  Promotes Astroglial Activation and Neuronal Survival in a Chronic Mouse Model of Parkinson's Disease. *PLoS One* **7**, (2012).
40. Nishitoh, H. Kadowaki, H. Nagai, A. Maruyama, T. Yokota, T. Fukutomi, H. Noguchi, T. Matsuzawa, A. Takeda, K. & Ichijo, H. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev.* **22**, 1451–1464 (2008).
41. 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).
42. Zhang, Y. Lu, R. Liu, W. Wu, Y. Qian, H. Zhao, X. Wang, S. & Xing, G. Hormetic effects of acute methylmercury exposure on GRP78 expression in rat brain cortex. *Dose-Response* **11**, 109–120 (2013).
43. Liu, W., Yang, T., Xu, Z., Xu, B. & Deng, Y. Methyl-mercury induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptosis pathways activation in rat cortical neurons. *Free Radic. Res.* **53**, 26–44 (2019).
44. Chung, Y. Yen, C. Tang, F. Lee, K. Liu, S. Wu, C. Hsieh, S. Su, C. Kuo, C. & Chen, Y. Methylmercury exposure induces ROS/Akt inactivation-triggered endoplasmic reticulum stress-regulated neuronal cell apoptosis. *Toxicology* **425**, (2019).
45. Calfon, M. Zeng, H. Urano, F. Till, J. H. Hubbard, S. R. Harding, H. P. Clark, S. G. & Ron, D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA *Nature* **415**, 92-96 (2002).
46. Lu, Y., Liang, F. X. & Wang, X. A Synthetic Biology Approach Identifies the Mammalian UPR RNA Ligase RtcB. *Mol. Cell* **55**, 758–770 (2014).
47. Farina, M. Campos, F. Vendrell, I. Berenguer, J. Barzi, M. Pons, S. & Sunol, C. Probenecol increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. *Toxicol. Sci.* **112**, 416–426 (2009).
48. 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).
49. Manuel, A. Walla, M. D. Dorn, M. T. Tanis, M. E. Piroli, G. & Frizzell, N. Fumarate and oxidative stress synergize to promote stability of C/EBP

- homologous protein in the adipocyte. *Free Radic. Biol. Med.* **148**, 70–82 (2020).
50. Lee, K. P. K. Dey, M. Necluai, D. Cao, C. Dever, T. E. & Sicheri, F. Structure of the Dual Enzyme Ire1 Reveals the Basis for Catalysis and Regulation in Nonconventional RNA Splicing. *Cell* **132**, 89–100 (2008).
  51. Nakato, R. Ohkubo, Y. Konishi, A. Shibata, M. Kaneko, Y. Iwawaki, T. Nakamura, T. Lipton, S. A. & Uehara, T. Regulation of the unfolded protein response via S-nitrosylation of sensors of endoplasmic reticulum stress. *Sci. Rep.* **5**: **14812**, (2015).
  52. Long, D. Wu, H. Tsang, A. W. Poole, L. B. Yoza, B. K. Wang, X. Vachharajani, V. Furdui, C. M. & McCall, C. E. The Oxidative State of Cysteine Thiol 144 Regulates the SIRT6 Glucose Homeostat. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
  53. Hourihan, J. M., Moronetti Mazzeo, L. E., Fernández-Cárdenas, L. P. & Blackwell, T. K. Cysteine Sulfenylation Directs IRE-1 to Activate the SKN-1/Nrf2 Antioxidant Response. *Mol. Cell* **63**, 553–566 (2016).
  54. Uehara, T. Nakamura, T. Yao, D. Shi, Z. Q. Gu, Z. Ma, Y. Masliah, E. Nomura, Y. & Lipton, S. A. S-Nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* **441**, 513–517 (2006).
  55. Ozawa, K. Kamatsubara, A. T. Nishimura, Y. Sawada, T. Kawafune, H. Tsumoto, H. Tsuji, Y. Zhao, J. Kyotani, Y. Tanaka, T. Takahashi, R. & Yoshizumi, M. S-nitrosylation regulates mitochondrial quality control via activation of parkin. *Sci. Rep.* **3**: **2202**, (2013).
  56. Yang, L. Calay, E. S. Fan, J. Arduini, A. Kunz, R. C. Gygi, S. T. Yalchi, A. Fu, S. & Hotamisligli, G. S. S-Nitrosylation links obesity-associated inflammation to endoplasmic reticulum dysfunction. *Science* **349**, 500-506 (2015).
  57. Jaffrey, S. R., Erdjument-bromage, H., Ferris, C. D., Tempst, P. & Snyder, S. H. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat. Cell Biol.* **3**, (2001).
  58. Joshi, A. Newbatt, Y. McAndrew, P. C. Stubbs, M. Burke, R. Richards, M. W. Bhatia, C. Caldwell, J. J. McHardy, T. Collins, I. & Bayliss, R. Molecular mechanisms of human IRE1 activation through dimerization and ligand binding. *Oncotarget* **6**, 13019–13035 (2015).
  59. Upton, J. Wang, L. Han, D. Wang, E. Huskey, N. Lim, L. Truitt, M. McManus, M. Ruggero, D. Goga, A. Papa, F. & Oakes, S. IRE1 $\alpha$  Cleaves Select microRNAs During ER Stress to Derepress Translation of Proapoptotic Caspase-2. *Science* **338**, 818–822 (2012).
  60. Han, D. Lerner, A. G. Walle, L. V. Upton, JP. Xu, W. Hagen, A. B. Ackes, B. J.

- Oakes, S. A. & Papa, F. R. IRE1 $\alpha$  Kinase Activation Modes Control Alternate Endoribonuclease Outputs to Determine Divergent Cell Fates. *Cell* **138**, 562–575 (2009).
61. Nishitoh, H. Matsuzawa, A. Tobiume, K. Saegusa, K. Takeda, K. Inoue, K. Hori, S. Kakizuka, A. & Ichijo, H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* **16**, 1345–1355 (2002).
  62. Ichijo, H. Nishida, E. Irie, K. ten Dijke, P. Saitoh, M. Moriguchi, T. Takagi, M. Matsumoto, K. Miyazono, K. & Gotoh, Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* **275**, 90–94 (1997).
  63. Chen, H. Yang, H. Pan, L. Wang, W. Liu, X. Ren, X. Liu, Y. W. Zhang, Y. Jiang, L. Li, K. Zhnag, B. & Wang, LX. The molecular mechanisms of XBP-1 gene silencing on IRE1 $\alpha$ -TRAF2-ASK1-JNK pathways in oral squamous cell carcinoma under endoplasmic reticulum stress. *Biomed. Pharmacother.* **77**, 108–113 (2016).
  64. Verfaillie, T., Garg, A. D. & Agostinis, P. Targeting ER stress induced apoptosis and inflammation in cancer. *Cancer Letters* **332**, 249–264 (2013).
  65. Fels, D. R. & Koumenis, C. The PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. *Cancer Biology and Therapy* **5**, 723–728 (2006).
  66. Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K. & Miura, M. A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat. Med.* **10**, 98–102 (2004).
  67. 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).
  68. Franklin, K. & Paxinos, G. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact, Third Edition. Elsevier (2019).
  69. Iwai-Shimada, M. Methylmercury induces the expression of TNF- $\alpha$  selectively in the brain of mice. *Sci. Rep.* **6**: **38294**, 1–8 (2016).
  70. Kim, MS. Takahashi, T. Lee, JY. Hwang, GW. & Naganuma, A. Global chemokine expression in methylmercury-treated mice: methylmercury induces brain-specific expression of CCL3 and CCL4. *J. Toxicol. Sci.* **38**, 925–929 (2013).
  71. Fujimura, M., Usuki, F., Sawada, M. & Takashima, A. Methylmercury induces neuropathological changes with tau hyperphosphorylation mainly through the

- activation of the c-Jun-N-terminal kinase pathway in the cerebral cortex, but not in the hippocampus of the mouse brain. *Neurotoxicology* **30**, 1000–1007 (2009).
72. Maruyama, K. Yorifuji, T. Tsuda, T. Seikikawa, T. Nakadaira, H. & Saito, H. Methyl mercury exposure at Niigata, Japan: Results of neurological examinations of 103 adults. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012: 635075**, (2012).
  73. Ninomiya, T. Imamura, K. Kuwabata, M. Kindaichi, M. Suda, M. & Ekino, S. Reappraisal of somatosensory disorders in methylmercury poisoning. *Neurotoxicol. Teratol.* **27**, 643–653 (2005).
  74. Eto, K. Pathology of Minamata Disease\*. *Toxicol. Pathol.* **25**, 614–623 (1997).
  75. 国立水俣病総合研究センター, 平成18年度 国立水俣病総合研究センター年報 第27号 (2006).
  76. Kaneko, M. Yasui, S. Niinuma, Y. Arai, K. Omura, T. Okuma, Y. & Nomura, Y. A different pathway in the endoplasmic reticulum stress-induced expression of human HRD1 and SEL1 genes. *FEBS Lett.* **581**, 5355–5360 (2007).
  77. Guallar, E. Sanz-Gallardo, I. Van't Veer, P. Bode, P. Aro, A. Gomez-Aracena, J. Kark, J. D.Riemersma, R. A. Martin-Moreno, J. M. & Kok, F. J. *MERCURY, FISH OILS, AND THE RISK OF MYOCARDIAL INFARCTION.* *N Engl J Med* **347**, 1747-1754 (2002).
  78. Salonen, J. T. Seppanen. K. Nyyssonen, K. Korpela, H. Kauhanen, J. Kantola, M. Tuomilehto, J. Esterbauer, H. Tatzber, F. & Salonen, R. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in Eastern Finnish men. *Circulation* **91**, 645–655 (1995).
  79. 国立水俣病総合研究センター. 水銀と健康 第5.1版 (2014).
  80. Fonseca, S. G., Gromada, J. & Urano, F. Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta cell death Protein homeostasis in the  $\beta$  cell. *Trends Endocrinol Metab* **22**, 266–274 (2012).
  81. Nakanishi, K., Sudo, T. & Morishima, N. Endoplasmic reticulum stress signaling transmitted by ATF6 mediates apoptosis during muscle development. *J. Cell Biol.* **169**, 555–560 (2005).
  82. Nakanishi, K., Kakiguchi, K., Yonemura, S., Nakano, A. & Morishima, N. Transient  $\text{Ca}^{2+}$  depletion from the endoplasmic reticulum is critical for skeletal myoblast differentiation. *FASEB J.* **29**, 2137–2149 (2015).
  83. Fujimura, M. & Usuki, F. In situ different antioxidative systems contribute to the site-specific methylmercury neurotoxicity in mice. *Toxicology* **392**, 55–63 (2017).

84. Berlin, M., Zalups, R. K. & Fowler, B. A. Mercury. in Handbook on the Toxicology of Metals, Fourth Edition. Elsevier Inc, 1013–1075 (2015).
85. Fujimura, M. & Usuki, F. Site-specific neural hyperactivity via the activation of MAPK and PKA/CREB pathways triggers neuronal degeneration in methylmercury-intoxicated mice. *Toxicol. Lett.* **271**, 66–73 (2017).
86. Bondy, S. C. & LeBel, C. P. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 633–642 (1993).
87. Sagara, J. Miura, K. & Bannai, S. Maintenance of Neuronal Glutathione by Glial Cells. *J. Neurochem.* **61**, 1672–1676 (1993).
88. Miyoshi, K. Katayama, T. Imaizumi, K. Taniguchi, M. Mori, Y. Hitomi, J. Yui, D. Manabe, T. Gomi, F. Yoneda, T. & Toyama, M. Characterization of mouse Irela: cloning, mRNA localization in the brain and functional analysis in a neural cell line. *Mol. Brain Res.* **85**, 68–76 (2000).
89. Goswami, P. Gupta, S. Biswas, J. Joshi, N. Swaenkar, S. Nath, C. & Singh, S. Endoplasmic Reticulum Stress Plays a Key Role in Rotenone-Induced Apoptotic Death of Neurons. *Mol. Neurobiol.* **53**, 285–298 (2016).
90. Goswami, P., Gupta, S., Biswas, J., Sharma, S. & Singh, S. Endoplasmic Reticulum Stress Instigates the Rotenone Induced Oxidative Apoptotic Neuronal Death: a Study in Rat Brain. *Mol. Neurobiol.* **53**, 5384–5400 (2016).
91. Muller, F. L., Liu, Y. & Van Remmen, H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **279**, 49064–49073 (2004).
92. Sierra, A. Encinas, J. M. Deudero, J. J. P. Chancey, J. H. Enikoopov, G. Overstreet-Wadiche, L. S. Tsirka, S. E. & Maletic-Savatic, M. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell.* **7**, 483–495 (2010).
93. Osowski, C. M. & Urano, F. The binary switch between life and death of endoplasmic reticulum-stressed  $\beta$  cells. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **17**, 107–112 (2010).
94. Hoshi, T., Toyama, T., Naganuma, A. & Hwang, G.-W. Methylmercury causes neuronal cell death via M1-microglial activation in organotypic slices prepared from mouse cerebral cortex. *Fundam. Toxicol. Sci.* **6**, 167–170 (2019).
95. Lee, J. Hernandez, M. A. S. Auen, T. Mucka, P. Lee, J. & Ozca, U. PGC-1 $\alpha$  functions as a co-suppressor of XBP1s to regulate glucose metabolism. *Mol. Metab.* **7**, 119–131 (2018).

96. Corish, P. & Tyler-Smith, C. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng.* **12**, 1035–1040 (1999).



## 参考文献

本研究内容は原著論文として、以下のように発表した。

1. Spatiotemporal analysis of the UPR transition induced by methylmercury in the mouse brain

Hiraoka H, Nomura R, Takasugi N, Akai R, Iwawaki T, Kumagai Y, Fujimura M, Uehara T

Arch Toxicol, 2021, doi: 10.1007/s00204-021-02982-9.

\* Reprinted by permission from Springer Nature Customer Service Center GmbH: Springer Nature, Archives of Toxicology, Spatiotemporal analysis of the UPR transition induced by methylmercury in the mouse brain, Hiraoka et al., 2021

2. Modulation of unfolded protein response by methylmercury

Hiraoka H, Nakahara K, Kaneko Y, Akiyama S, Okuda K, Iwawaki T, Fujimura M, Kumagai Y, Takasugi N, Uehara T

Biol Pharm Bull, 40(9), 1595-1598, 2017, doi: 10.1248/bpb.b17-00359.

\* Biological and Pharmaceutical Bulletin の投稿規定に基づきデータを転載

## 謝辞

終わりに臨み、本研究の遂行に際してご指導およびご教鞭を賜りました岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 薬効解析学 上原 孝 教授ならびに 高杉 展正 准教授に心より謝意を表します。

また、本博士論文を審査していただき、有益なご助言を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 分子生物学 垣内 力 教授、生体機能解析学 上田 真史 教授、毒性学 児玉 進 准教授に厚く御礼申し上げます。

さらに、MEF 細胞をご恵与くださいました徳島大学 先端酵素学研究所 生体機能学分野 親泊 政一 教授、IRE1 $\alpha$  KO MEF 細胞および ERAI Tg マウスをご恵与くださいました金沢医科大学 総合医学研究所 生命科学研究領域 細胞医学研究分野 岩脇 隆夫 教授、IRE1 $\alpha$  発現プラスミドをご恵与くださいました宮崎大学 医学部 機能制御学講座 機能生化学分野 西頭 英起 教授、MeHg の飲水投与実験に関してご指導いただきました国立水俣病総合研究センター 基礎研究部 藤村 成剛 部長ならびに本研究の遂行に際してご助言を賜りました筑波大学 医学医療系 環境生物学研究室 熊谷 嘉人 教授に心から感謝申し上げます。

また、研究遂行のご支援を頂きました日本学術振興会に感謝いたします。

最後に、様々なご協力を頂き、多くの時間を共にした薬効解析学教室の皆様方、および秘書の岡本 陽子さん、中井 仁美さん、松本 真里さんには心から感謝申し上げますとともに、今後ますますのご活躍をお祈り申し上げます。

2021年3月1日 平岡 秀樹