

# 博士論文

パーキンソン病関連神経毒 MPP<sup>+</sup>による  
リソソーム機能低下を介したオートファジー阻害

広島大学大学院医歯薬保健学研究科  
医歯薬学専攻 薬学専門プログラム  
生体機能分子動態学研究室  
平成 24 年度入学 宮良 政嗣  
主指導教員 太田 茂

## 前書き

本博士論文は、現在、学術誌に投稿中である以下の論文の内容である。

Masatsugu Miyara, Yaichiro Kotake, Seigo Sanoh & Shigeru Ohta. Mild MPP<sup>+</sup> exposure impairs autophagic degradation through a novel lysosomal acidity-independent mechanism. (submitted).

## 目次

略語	5
第1章 序論	6
第2章 低濃度 MPP <sup>+</sup> 誘発パーキンソン病モデル細胞の作製	
第1節 緒言	11
第2節 低濃度 MPP <sup>+</sup> が SH-SY5Y 細胞の生存率に及ぼす影響	12
第3節 小括	14
第3章 低濃度及び高濃度 MPP <sup>+</sup> がオートファジーに及ぼす影響	
第1節 緒言	15
第2節 低濃度 MPP <sup>+</sup> がオートファゴソームマーカータンパク質 LC3 の発現 パターン及び細胞内局在に及ぼす影響	17
第3節 低濃度及び高濃度 MPP <sup>+</sup> が LC3-II ターンオーバーに及ぼす影響	20
第4節 低濃度及び高濃度 MPP <sup>+</sup> がオートファジー選択的基質 p62/SQSTM1 タンパク質発現量に及ぼす影響	25
第5節 小括	28
第4章 低濃度及び高濃度 MPP <sup>+</sup> がリソソーム機能に及ぼす影響	
第1節 緒言	29
第2節 低濃度及び高濃度 MPP <sup>+</sup> がリソソーム内酸性度及び密度に及ぼす影 響	30
第3節 低濃度 MPP <sup>+</sup> がリソソーム内加水分解酵素の活性に及ぼす影響	33
第4節 小括	35
第5章 リソソーム生合成促進物質が低濃度及び高濃度 MPP <sup>+</sup> 誘発細胞死 及びオートファジー阻害に及ぼす影響	
第1節 緒言	36
第2節 トレハロースが低濃度及び高濃度 MPP <sup>+</sup> 誘発細胞死及びオートファ ゴソーム蓄積に及ぼす影響	37
第3節 トレハロースが低濃度及び高濃度 MPP <sup>+</sup> 誘発 p62/SQSTM1 タンパク 質蓄積に及ぼす影響	38

第4節	ラパマイシンが低濃度及び高濃度 MPP <sup>+</sup> 誘発細胞死及びオートファ ゴソーム蓄積に及ぼす影響.....	44
第5節	ラパマイシンが低濃度及び高濃度 MPP <sup>+</sup> 誘発 p62/SQSTM1 タンパク 質蓄積に及ぼす影響.....	49
第6節	小括.....	51
第6章	総括及び考察.....	52
第7章	実験方法.....	57
参考文献	.....	51
謝辞	.....	70

## 略語

CMA: chaperon-mediated autophagy

LAMP1: lysosome membrane-associated protein 1

LC3: microtubule-associated protein 1 light chain 3

MPP<sup>+</sup>: 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion

MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

PD: Parkinson's disease

TFEB: transcription factor EB

V-ATPase: vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase

mTOR: mammalian target of rapamycin

p62/SQSTM1: p62/sequestosome-1

## 第1章 序論

パーキンソン病 (Parkinson's disease: PD) は、アルツハイマー病に次いで2番目に頻度の高い神経変性疾患であり、安静時振戦、動作緩慢、筋固縮、姿勢保持障害を4大症状とする。また、病理学的特徴として、中脳の黒質に存在するドパミン神経の選択的脱落及び残存神経細胞におけるレビー小体と呼ばれるタンパク質凝集体の蓄積が認められる<sup>1)</sup>。通常、ドパミンは黒質のドパミン神経で合成され線条体に輸送されるが、この黒質線条体系の破綻が種々の運動機能障害を引き起こすと考えられる。PDは、60歳以上人口の約1%が発症する<sup>2)</sup>とされているが、残存するドパミン神経細胞が約20%以下にならないと疾患症状が現れないことから、潜在的な患者数はさらに多いと考えられる。また、高齢化社会に伴い、患者数は今後も増加すると予想される。現在のPD治療方法はドパミンを補充する対症療法が主流であるが、ドパミン神経細胞死を止める根本的方法是は未だ発見されておらず、重要な課題となっている。

PDの原因は、遺伝性と孤発性に分類される。遺伝性PDの原因遺伝子はいくつか同定されてきたものの<sup>3)</sup>、そのような例はまれ(PD患者の約5%)であり、多くは孤発性PDであることが知られている。孤発性PDの原因は、遺伝的素因と環境要因との複雑な相互作用によるものであると考えられているが、その詳細は未だ不明である。

まれな遺伝性PD関連タンパク質の特性及び機能を調べることは孤発性PD発症メカニズムの解明において重要な手掛かりとなる。遺伝性PDの原因遺伝子として初めて同定された $\alpha$ -シヌクレインはレビー小体の主要構成成分でもあり、PD関連遺伝子変異による構造や翻訳後修飾の変化及び過剰発現等によって高い凝集性を示す。また、 $\alpha$ -シヌクレイン過剰発現モデル動物がPD様症状を示すことも明らかになり、 $\alpha$ -シヌクレインを始めとするタンパク質の凝集促進は、孤発性PD発症においても重要な役割を果たしている可能性が考えられる<sup>4)</sup>。

一方、タンパク質の凝集促進は、細胞内タンパク質分解機構の異常によっても引き起こされる可能性が考えられる。ユビキチン-プロテアソーム系は、ユビキチンを分解の目印としてユビキチン化タンパク質を選択的にプロテアソームで分解する細胞内タンパク質分解機構の1つである。 $\alpha$ -シヌクレインに続いて同定されてきたいくつかの遺伝性PD原因遺伝子産物のうち、Parkin及びUCH-L1は、それぞれユビキチン転移酵素及びユビキチン加水分解酵素としての機能を有している。また、ユビキチンはレビー小体

の構成成分でもある。このような知見は、ユビキチン-プロテアソーム系の異常が PD 発症に関与している可能性を示している。実際に、Parkin の遺伝性 PD 関連変異体はユビキチン転移活性が低下しており、基質タンパク質の蓄積及び凝集を引き起こすことが示唆されている。

一方、ユビキチン-プロテアソーム系とともに、オートファジーという現象がタンパク質分解に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた<sup>5)</sup>。オートファジーは自食作用とも呼ばれるリソソームを介した大規模な細胞内分解機構であり、ユビキチン-プロテアソーム系で分解できないタンパク質凝集体や障害を受けた細胞小器官を分解することができる。オートファジーは、マクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジー (chaperon-mediated autophagy: CMA) に区別されるが、一般的にオートファジーと呼ばれるのはマクロオートファジーのことである。マクロオートファジーにおいて、細胞内成分はまず、隔離膜によって隔離され、オートファゴソームと呼ばれる二重膜構造

体を形成する。その後、オートファゴソームは、リソソームと融合してオートリソソームとなり、リソソーム内加水分解酵素によって内容物が分解される (Fig. 1)。ミクロオートファジーは、オート

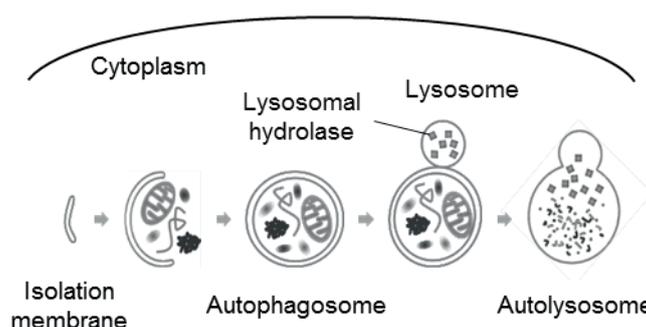


Fig. 1. Schematic diagram of autophagy.

ファゴソームを形成せず、細胞内成分がリソソームに直接隔離される。CMA は、heat-shock cognate 70 (Hsc70) によって KFERQ 配列を持つタンパク質が特異的に認識され、lysosomal-associated membrane protein type 2A (LAMP2A) を介して選択的にリソソームに導かれる。

近年、脳特異的オートファジー欠損マウスが神経変性疾患特有のタンパク質凝集体蓄積を伴う神経細胞死及び神経変性疾患様症状を示すことが明らかになり、オートファジー機能異常と PD を始めとする神経変性疾患との関係が強く示唆された<sup>6,7)</sup>。また、肝臓特異的オートファジー欠損マウスがポリユビキチン化タンパク質の顕著な蓄積を示すことから、ユビキチンはプロテアソームだけでなくオートファジーの目印としても機能する可能性が示され、上記脳特異的オートファジー欠損マウスの脳内において認められるタンパク質凝集体もユビキチン陽性であることが報告されている。以上より、PD に

におけるユビキチン陽性タンパク質凝集体の蓄積は、ユビキチン-プロテアソーム系の異常のみならず、オートファジー異常によっても引き起こされる可能性が考えられる。現在までに、遺伝性及び神経毒 PD モデルを用いた多くの研究によって、PD 発症におけるオートファジーの関与が支持されてきた<sup>8,9)</sup>。

タンパク質凝集体の形成機構も明らかになりつつある。p62/sequestosome-1 (p62/SQSTM1) は、オートファジーに必須のタンパク質である microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) との結合を介して、オートファジー特異的に分解されるタンパク質である。また、N 末端側にタンパク質凝集体に関与する PB1 と呼ばれる領域を含んでいるため高い凝集性を有しており、PD におけるタンパク質凝集体の構成成分であることも報告されている。オートファジー欠損によって出現するタンパク質凝集体は、p62/SQSTM1 を同時に欠損させると形成されなくなること及び LC3 結合領域を欠損させた p62/SQSTM1 変異体を発現させた細胞では、タンパク質凝集体の形成が認められることから、p62/SQSTM1 は凝集体形成において重要な役割を果たしていることが示されている。さらに、p62/SQSTM1 は C 末端側に存在するユビキチン結合領域と LC3 との結合を介して、ポリユビキチン化タンパク質を選択的にオートファジー経路に誘導する重要なアダプタータンパク質であることも明らかになってきた。以上の知見より、PD におけるタンパク質凝集体は、細胞内に蓄積したユビキチン化タンパク質が p62/SQSTM1 を介して凝集体を形成したものである可能性も考えられる。

遺伝性 PD モデルとともに、神経毒 PD モデルも PD 研究に貢献してきた。様々な神経毒 PD モデル<sup>10-14)</sup>の中でも、1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) の活性代謝物である 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>)<sup>2,15)</sup> (Fig. 2) を用いて作製される PD モデル細胞は、ドパミン神経細胞死の詳細なメカニズム解明において最も広く用いられている。MPTP は合成麻薬製造の際に生成した副生成物であり、ヒトに対

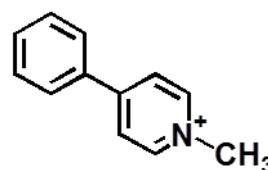


Fig. 2. Structure of MPP<sup>+</sup>.

して PD 様症状を引き起こすことが初めて報告された神経毒性物質である。MPTP は血液脳関門を通過して脳内に入り、グリア細胞の monoamine oxidase type B (MAO-B) によって酸化され、1-methyl-4-phenyl-5,6-dihydropyridinium (MPDP<sup>+</sup>) となり、非酵素的に MPP<sup>+</sup>に変換される。MPP<sup>+</sup>は、ドパミントランスポーターを介して選択的にドパミン神経に取り込まれ、電位依存的にミトコンドリアに濃縮され、呼吸鎖複合体 I を阻害する。その結果、ATP 量の減少や活性酸素の産生を引き起こし、ドパミン神経細胞死を引き起

こすと考えられている。しかし、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I 阻害は MPP<sup>+</sup>によって引き起こされるドパミン神経細胞死に必要でないことを示唆する報告も存在することから、その他のメカニズムが存在していると考えられる。その1つとしてオートファジー異常が考えられる。現在までに、このモデルにおけるオートファゴソームの蓄積が数グループによって報告されているが<sup>9,16-19</sup>、提唱されている原因は、オートファゴソーム生成促進<sup>16,17</sup>またはオートファゴソーム分解抑制<sup>18,19</sup>の2つに分かれている (Table 1)。これらの報告から、MPP<sup>+</sup>がオートファジーに及ぼす影響は、曝露条件や細胞の種類によって異なる可能性が考えられる。

Result	Exposure condition	Cell	Reference
Increased autophagosome synthesis	2.5 mM MPP <sup>+</sup> for 24 h	SH-SY5Y	1
	20 μM MPP <sup>+</sup> for 16 h	Cortical neuron	2
Decreased autophagosome degradation	250 μM MPP <sup>+</sup> for 24 h	BE-M17	3
	50 μM MPP <sup>+</sup> for 36 h	MN9D	4
	1 mM MPP <sup>+</sup> for 36 h	SH-SY5Y	4

1: Zhu et al. (2007) *J. Pathol.* **170**, 75-89. 2: Wong et al. (2011) *Nat. Cell Biol.* **13**, 568-579. 3: Dehay et al. (2010) *J. Neurosci.* **30**, 12535-12544. 4: Lim et al. (2011) *Autophagy* **7**, 50-60.

**Table 1.** Different effects of MPP<sup>+</sup> on the autophagic process depending on exposure condition and/or cell type.

MPP<sup>+</sup>細胞モデルと共に、MPTP マウスモデルも数多く研究されており、投与方法の異なる様々なモデルマウス作製方法が確立されている (Table 2)。従来、MPTP マウスモデルは、急性または亜急性投与によって作製され、これらのモデルは、緩徐進行性ドパミン神経細胞死及びタンパク質凝集体蓄積を除く様々なPDの特徴を再現できることが報告されている<sup>20</sup>。一方、MPTP 慢性マウスモデル作製方法も徐々に確立され、これらのモデルは、緩徐性ドパミン神経細胞死及びタンパク質凝集体の蓄積を再現できることが報告されてきた<sup>20-26</sup>。

既存の報告では、MPP<sup>+</sup>細胞モデルを用いたオートファジー研究のほとんどは、24時間以内に顕著な細胞内変化を誘導するために高濃度 MPP<sup>+</sup>による過激な曝露条件を用いている (Table 1)。また、それぞれ

model	MPTP administration protocol
acute	20 mg/kg/2 h, 4 times in a day
sub-acute	30 mg/kg/day for 5 days
chronic	25 mg/kg/3.5 day for 5 weeks (+ 250 mg probenecid/kg)

**Table 2.** Administration protocols for MPTP mouse models.

異なる細胞を用いて MPP<sup>+</sup>がオートファジーに及ぼす影響を示しているが (Table 1)、MPP<sup>+</sup>の感受性は細胞によって大きく異なる。緩徐進行性である PD の特徴を考慮すると、低濃度 MPP<sup>+</sup>を用いた PD モデル細胞は、PD 発症におけるオートファジー機能異常メカニズムを解明するためのより良いモデルとなることが期待される。そこで、本研究では、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において、低濃度 MPP<sup>+</sup> (10 及び 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>, 48 時間曝露) がオートファジーに及ぼす影響を明らかにすると共に、高濃度 MPP<sup>+</sup> (2.5 及び 5 mM MPP<sup>+</sup>, 24 時間曝露) によるオートファジー異常とは異なるメカニズムの特定を目指した。

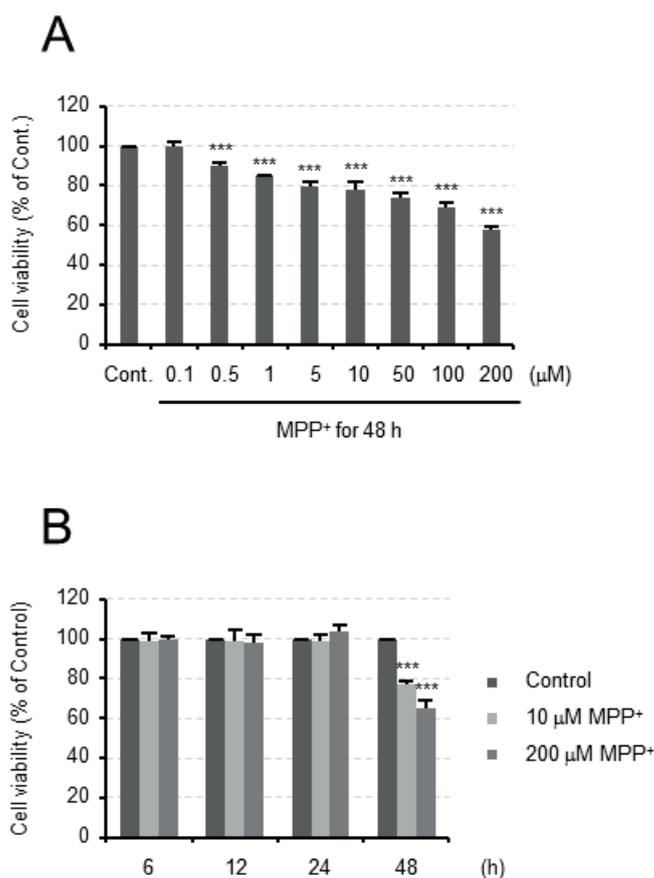
## 第2章 低濃度 MPP<sup>+</sup>誘発パーキンソン病モデル細胞の作製

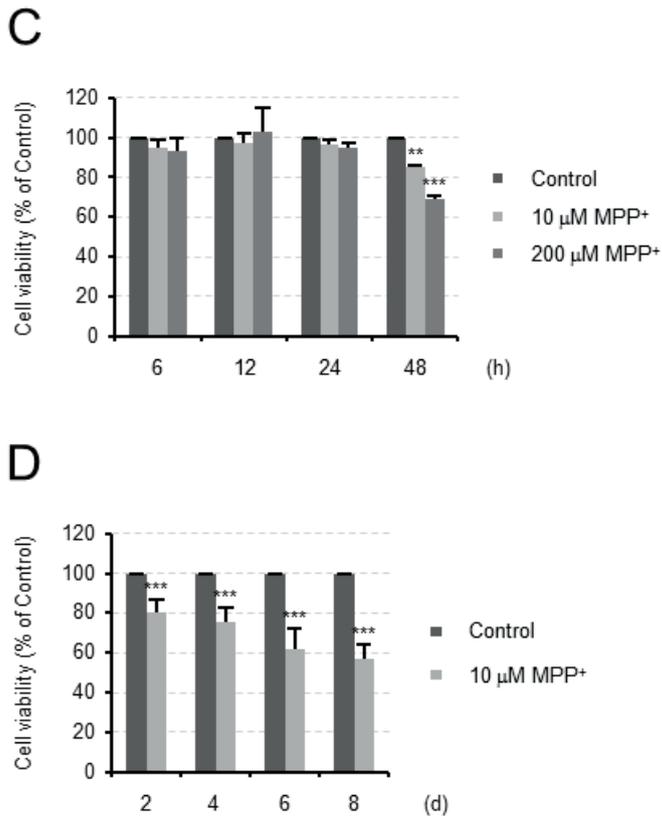
### 第1節 緒言

SH-SY5Y 細胞において、高濃度 MPP<sup>+</sup> (500  $\mu$ M~5 mM) による様々な毒性が数多く報告されているものの、低濃度 MPP<sup>+</sup>による毒性はほとんど研究されていない。本章では、低濃度 MPP<sup>+</sup>誘発 PD モデル細胞を作製するために、SH-SY5Y 細胞に低濃度 MPP<sup>+</sup> (0.1~200  $\mu$ M) を 48 時間曝露し、まず、細胞生存率に及ぼす影響を評価した。

## 第2節 低濃度 MPP<sup>+</sup>が SH-SY5Y 細胞の生存率に及ぼす影響

低濃度 MPP<sup>+</sup>が細胞生存率に及ぼす影響を WST-1 法により評価した。低濃度 MPP<sup>+</sup>は、濃度依存的に細胞死を引き起こし、0.5  $\mu\text{M}$  以上の濃度においては有意差が認められた (Fig. 3A)。この結果に基づき、低濃度 MPP<sup>+</sup>がオートファジーに及ぼす影響を評価するための曝露条件を、10  $\mu\text{M}$  (viability: 80%  $\pm$  2% of control) 及び 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> (viability: 58%  $\pm$  2% of control) 48 時間曝露に決定した。また、10 及び 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>は、曝露後 24 時間以内において細胞生存率に影響を及ぼさなかったが、48 時間から有意な細胞死を引き起こした (Fig. 3B)。この結果は、WST-1 法と異なる原理に基づいた calcein-AM 法を用いても再現が得られた (Fig. 3C)。さらに、10  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>を 8 日間曝露すると、初めの 2 日間において細胞生存率は 80.0%  $\pm$  6.8% of control に低下し、6 日目から 8 日目においても細胞死は徐々に進行した (from 61.8%  $\pm$  10.4% to 56.8%  $\pm$  7.6% of control; Fig. 3D)。





**Figure 3.** Effect of low MPP<sup>+</sup> concentrations on the viability of SH-SY5Y cells.

(A) SH-SY5Y cells were exposed to low concentrations (0.1–200 μM) of MPP<sup>+</sup> for 48 h, and cell viability was measured using WST-1 assay. Data expressed as mean percent (±SD) of control of three independent experiments. \*\*\* $P < 0.001$  vs. control. (B and C) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200 μM MPP<sup>+</sup>, and cell viability was measured using WST-1 assay (B) and calcein-AM assay (C) at several time points (6, 12, 24, and 48 h). Data expressed as mean percent (±SD) of control of three independent experiments. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  vs. control (48 h). (D) SH-SY5Y cells were exposed to 10 μM MPP<sup>+</sup> and cell viability measured using WST-1 assay at several time points (2, 4, 6, and 8 d). Data expressed as mean percent (±SD) of control of three independent experiments. \*\*\* $P < 0.001$  vs. control.

### 第3節 小括

本章の結果より、低濃度 MPP<sup>+</sup> (10 及び 200  $\mu$ M) は、緩徐進行性の細胞死を引き起こすことが示された。一方、高濃度 MPP<sup>+</sup> (2.5 及び 5 mM) は、既存の報告と同様、24 時間以内に 40%~80%まで細胞生存率を低下させた (e.g. 第 5 章, Fig. 10B, 0 mM trehalose treatment groups, and Fig. 12B, 0  $\mu$ M rapamycin treatment groups)。

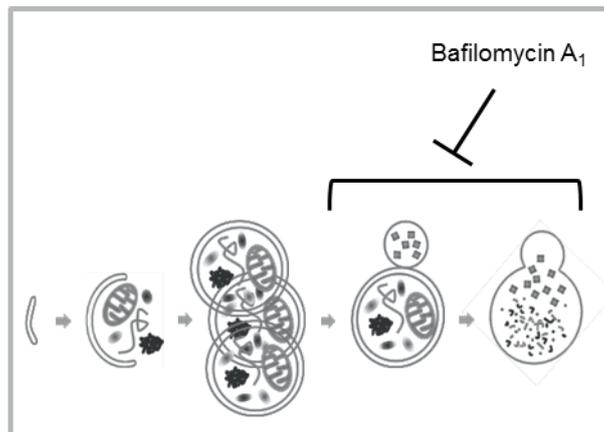
### 第3章 低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>がオートファジーに及ぼす影響

#### 第1節 緒言

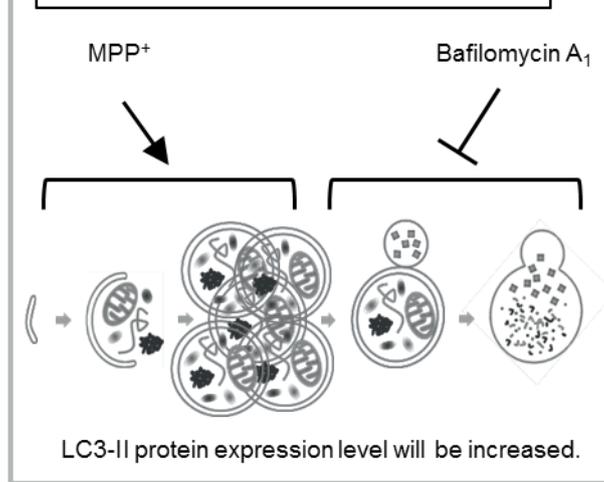
本章では、まず、第2節において、低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>がオートファジーに及ぼす影響をオートファゴソームマーカータンパク質 microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-II の発現パターン及び細胞内局在を指標にして評価した<sup>28-30)</sup>。LC3 は合成後、システインプロテアーゼ autophagy-related 4 によって直ちに C 末端を切除され、細胞質型 LC3 である LC3-I に変換される<sup>28)</sup>。オートファジーの過程において、LC3-I は、ホスファチジルエタノールアミンと共有結合し、オートファゴソーム膜結合型である LC3-II に変換される<sup>28)</sup>。

オートファゴソームの増加は、オートファゴソーム生成促進または分解抑制のどちらかを示していると考えられる。現在までに、その両者を区別する方法としていくつかのオートファジーフラックスアッセイが確立されている<sup>30,31)</sup>。本章第3節では、その中から、まず、LC3-II ターンオーバーアッセイ (Fig. 4) を行った。SH-SY5Y 細胞に 10 及び 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>を 48 時間曝露した後、報告されている方法<sup>30-33)</sup>に従って最後の 4 時間において 400 nM bafilomycin A<sub>1</sub> を併用曝露した。bafilomycin A<sub>1</sub> は、vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) 特異的阻害剤であり、リソソームの酸性化を阻害することによって、オートファゴソーム分解を抑制する。もし、MPP<sup>+</sup>がオートファゴソームの生成を促進していた場合、bafilomycin A<sub>1</sub> によってオートファゴソーム分解は完全に阻害されているので、bafilomycin A<sub>1</sub> 存在下において、LC3-II タンパク質発現はさらに増加することが予想される<sup>30-32)</sup> (Fig. 4A)。一方、MPP<sup>+</sup>がオートファゴソームの分解を抑制していた場合、すでに bafilomycin A<sub>1</sub> によってオートファゴソーム分解は完全に阻害されているので、LC3-II の量に変化は認められないことが予想される<sup>30-32)</sup> (Fig. 4B)。

本章第4節では、低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>がオートファジー選択的基質 p62/SQSTM1<sup>34-37)</sup> の分解に及ぼす影響を調べることによって、LC3-II ターンオーバーアッセイの結果を再評価した。



**A. Increased autophagosome synthesis**



**B. Decreased autophagosome degradation**

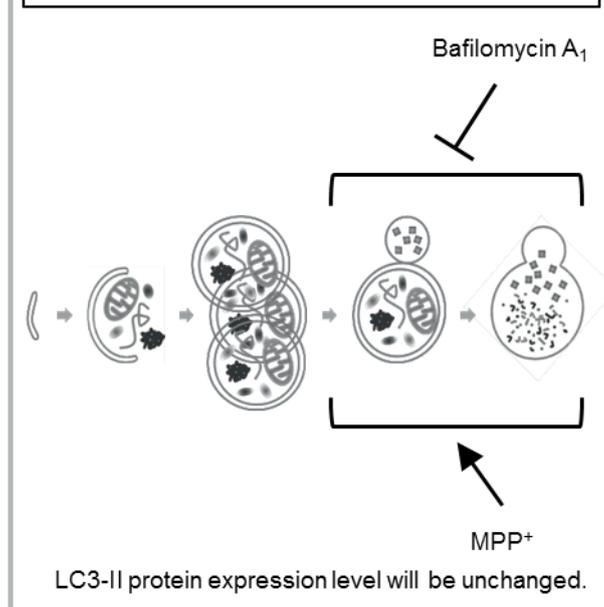
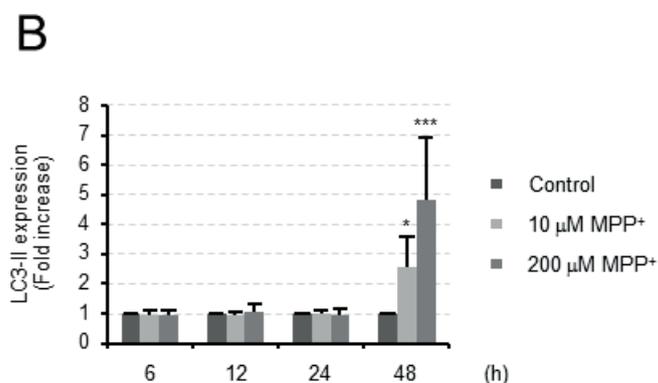
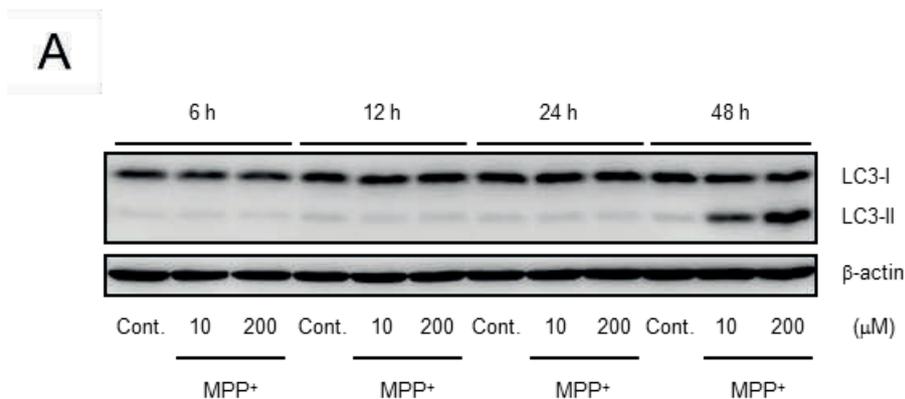
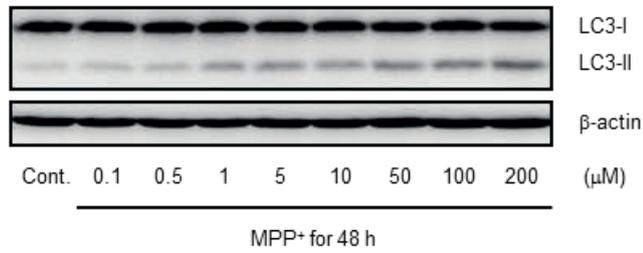
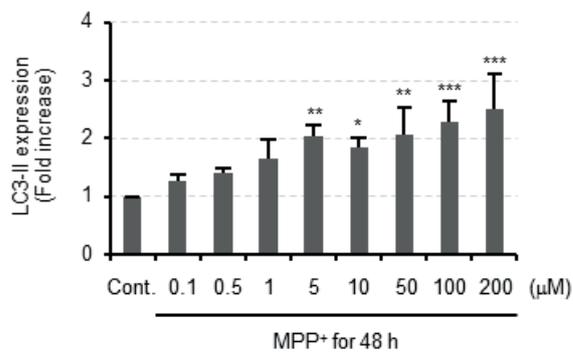
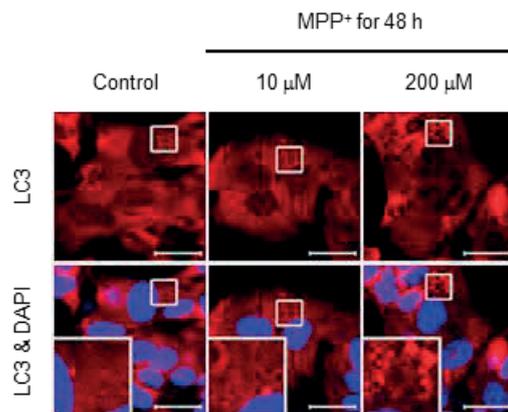


Fig. 4. Schematic diagram of LC3-II turnover assay.

## 第2節 低濃度 MPP<sup>+</sup>がオートファゴソームマーカータンパク質 LC3 の発現パターン及び細胞内局在に及ぼす影響

10 及び 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>を曝露した細胞における LC3-II タンパク質発現量をウェスタンブロット法にて評価した。LC3-II 発現量は、10 及び 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> 48 時間曝露によって、それぞれ、 $2.6 \pm 1.0\text{-fold}$  及び  $4.9 \pm 2.1\text{-fold of control}$  に増加していた (Fig. 5A and B)。また、細胞生存率の結果と同様に、両濃度とも、曝露後 24 時間以内においては LC3-II タンパク質発現量に影響を及ぼさなかった (Fig. 5A and B)。LC3-II タンパク質発現の増加傾向は、10  $\mu\text{M}$  以下の濃度においても認められた (Fig. 5C and D)。オートファゴソームの増加は、免疫細胞化学染色法を用いた LC3 陽性ドット状染色像の増加を確認することによってさらに評価した。10 及び 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>を曝露した細胞において、濃度依存的な LC3 陽性ドットの増加が認められた (Fig. 5E)。以上の結果より、低濃度 MPP<sup>+</sup>は細胞死が引き起こされる時間と同時期において、オートファゴソームの蓄積を引き起こすことが明らかになった。



**C****D****E**

**Figure 5.** Effect of mild MPP<sup>+</sup> exposure on the number of autophagosomes in SH-SY5Y cells. (A) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> and lysed in TNE buffer containing 1% Nonidet P-40 detergent at several time points (6, 12, 24, and 48 h). Equal amounts of protein from each cell lysate were separated by SDS-PAGE and LC3 protein was detected by

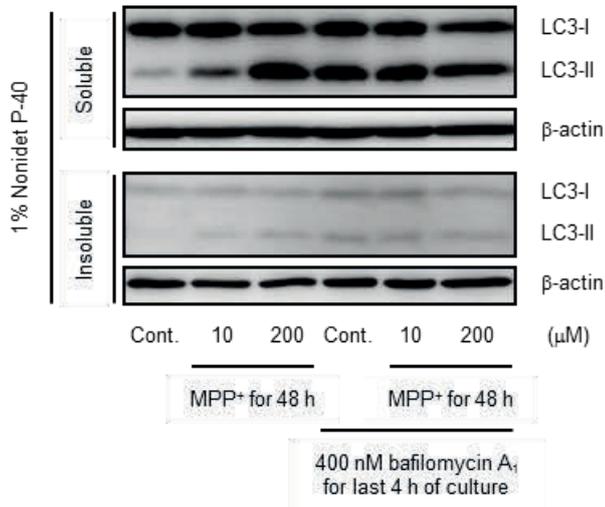
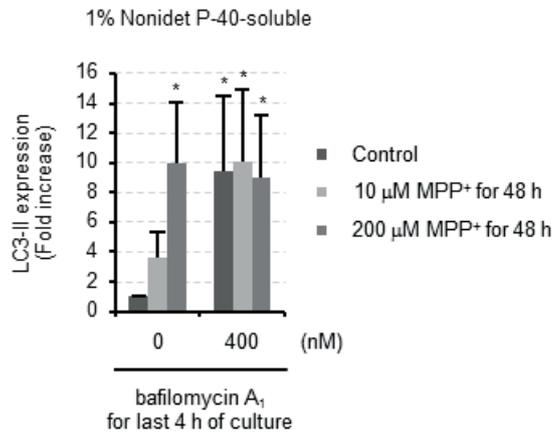
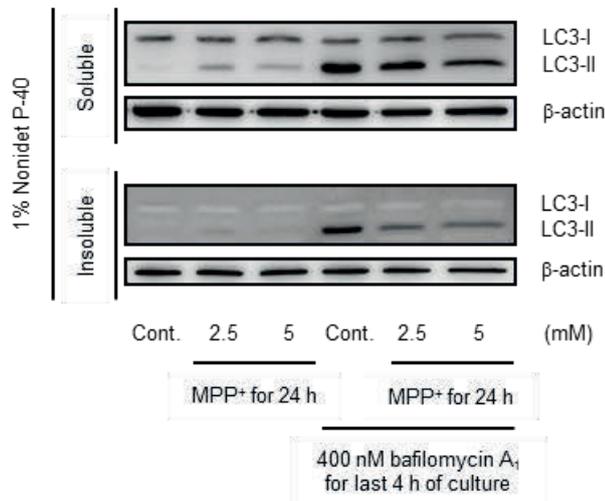
western blot.  $\beta$ -Actin was used as the gel-loading control. **(B)** The band intensities of LC3-II and  $\beta$ -actin were quantified by densitometric analysis. Data expressed as mean fold increase in LC3-II/ $\beta$ -actin ratio ( $\pm$ SD) relative to corresponding controls of seven independent experiments.  $*P < 0.05$  and  $***P < 0.001$  vs. control (48 h). **(C)** SH-SY5Y cells were exposed to low concentrations (0.1–200  $\mu$ M) of MPP<sup>+</sup> for 48 h, lysed in TNE buffer containing 1% Nonidet P-40, and prepared for western blot analysis as described in **(A)**. **(D)** Band intensities of LC3-II and  $\beta$ -actin quantified by densitometric analysis and expressed as in **(B)** except data are from four independent experiments.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , and  $***P < 0.001$  vs. control. **(E)** SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> for 48 h and LC3 protein immunostaining patterns (red) evaluated. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar represents 20  $\mu$ m.

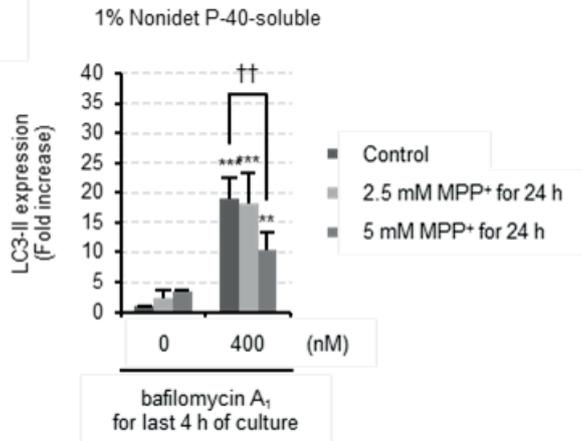
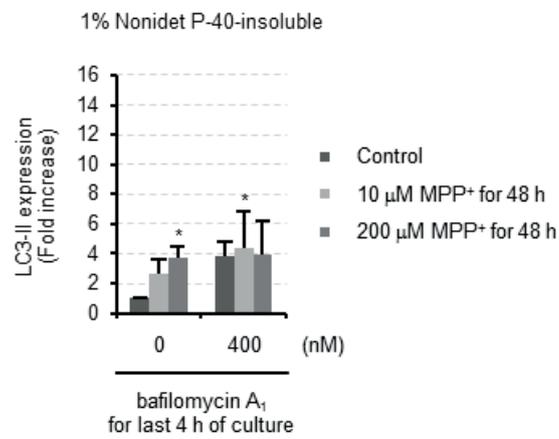
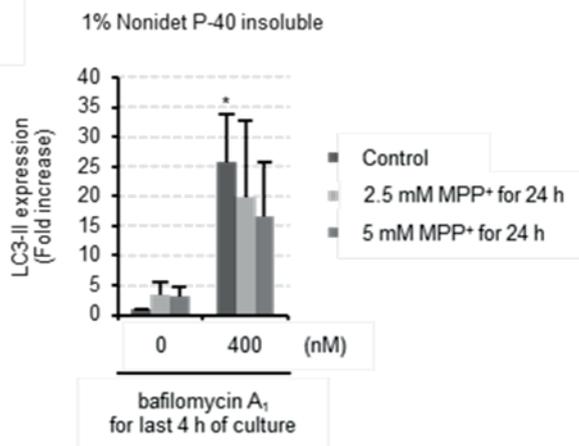
### 第3節 低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>が LC3-II ターンオーバーに及ぼす影響

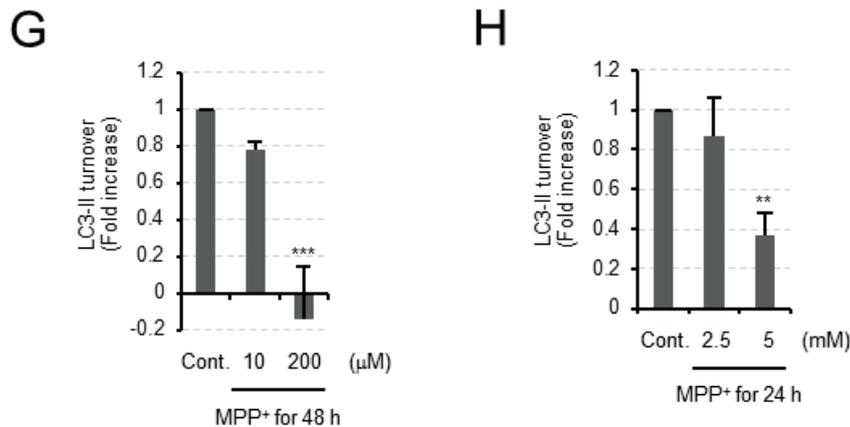
10 及び 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>は、bafilomycin A<sub>1</sub> 非存在下において LC3-II タンパク質発現量の増加を引き起こしたが、bafilomycin A<sub>1</sub> 存在下においてはその増加を引き起こさなかった (Fig. 6A, detergent-soluble LC3-II, and Fig. 6B)。また、2.5 及び 5 mM MPP<sup>+</sup>は、bafilomycin A<sub>1</sub> 非存在下において LC3-II タンパク質発現量の増加を引き起こしたが (Fig. 6C, detergent-soluble fraction, and Fig. 6D)、bafilomycin A<sub>1</sub> 存在下においてはその量を減少させた (from  $19.1 \pm 3.5$ -fold of control in bafilomycin A<sub>1</sub> alone to  $18.1 \pm 5.3$ -fold of control at 2.5 mM MPP<sup>+</sup> and to  $10.4 \pm 3.0$ -fold of control at 5 mM MPP<sup>+</sup>; Fig. 6C, detergent-soluble fraction, and Fig. 6D)。この結果より、高濃度 MPP<sup>+</sup>は、オートファゴソーム分解抑制に加え定常的オートファジーの阻害を引き起こしている可能性が考えられる。

bafilomycin A<sub>1</sub> 存在下において過剰に蓄積したオートファゴソームが、界面活性剤 (1% Nonidet P-40) 不溶性型に変化した可能性を検討するために、1% Nonidet P-40 不溶性画分における LC3-II タンパク質発現量を評価した。低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>は bafilomycin A<sub>1</sub> 存在下において不溶性 LC3-II タンパク質発現量の増加を引き起こしていなかった (Fig. 6A, detergent-insoluble fraction, and Fig. 6E and Fig. 6C, detergent-insoluble fraction, and Fig. 6F)。

MPP<sup>+</sup>曝露期間の最後の 4 時間における LC3-II ターンオーバーを、bafilomycin A<sub>1</sub> 存在下における LC3-II バンド強度と bafilomycin A<sub>1</sub> 非存在下における LC3-II バンド強度との差を算出することによって評価した<sup>19,38)</sup>。LC3-II ターンオーバーは、10  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>によって  $0.8 \pm 0.1\%$  of control に減少し、200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>によって完全に阻害されていた (Fig. 6G)。一方、2.5 及び 5 mM MPP<sup>+</sup>による LC3-II ターンオーバーの抑制効果は、部分的であった ( $0.9 \pm 0.2$ -fold of control at 2.5 mM and  $0.4 \pm 0.1$ -fold of control at 5 mM; Fig. 6H)。

**A****B****C**

**D****E****F**

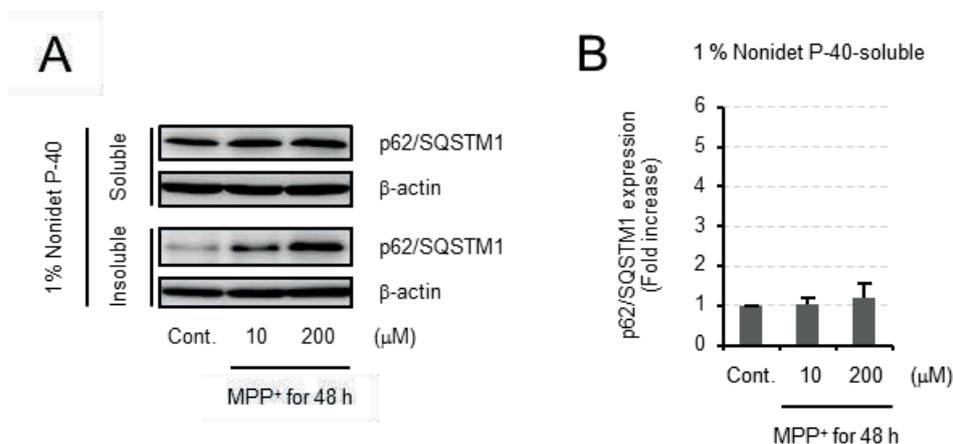


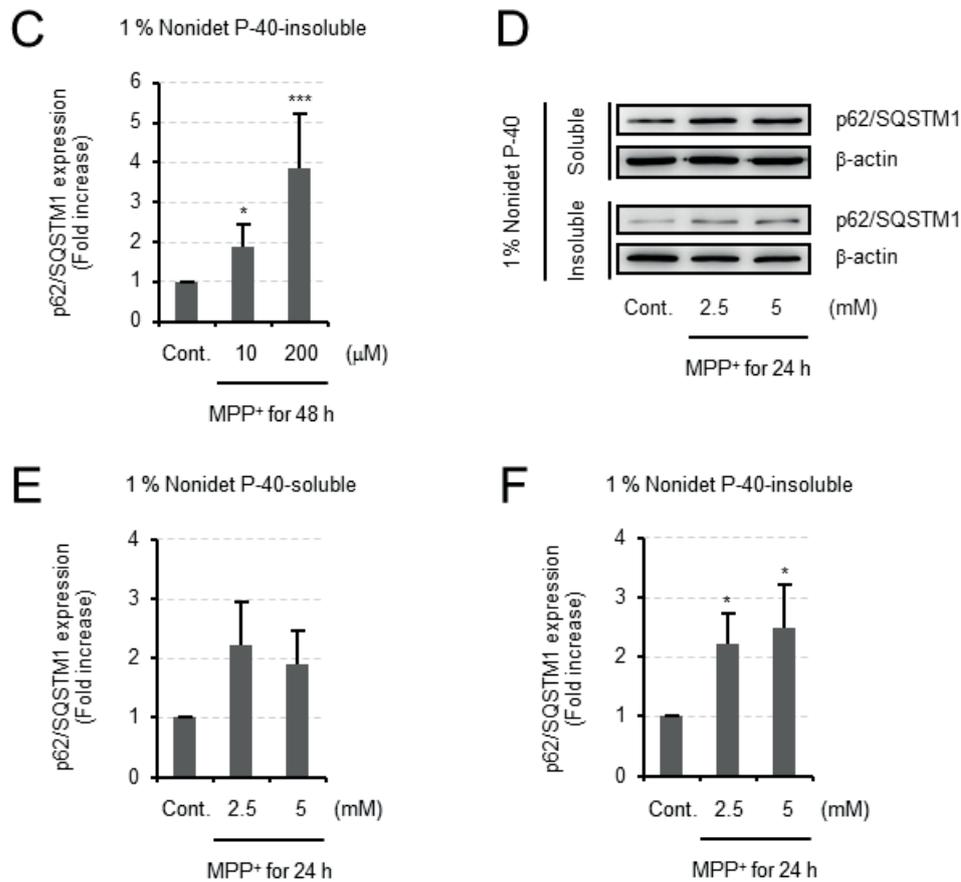
**Figure 6.** Effect of mild and acute MPP<sup>+</sup> exposure on LC3-II turnover in SH-SY5Y cells. **(A)** SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200 μM MPP<sup>+</sup> for 48 h with or without 400 nM bafilomycin A<sub>1</sub> for the last 4 h of culture and lysed in TNE buffer containing 1% Nonidet P-40 to obtain the detergent-soluble fraction. The remaining pellets were further lysed in TNE buffer containing 2% SDS to obtain the detergent-insoluble fraction. Equal amounts of protein from each cell lysate sample were separated by SDS-PAGE and LC3 protein detected by western blot analysis. The same volumes of corresponding detergent-soluble and -insoluble samples were loaded. β-Actin was used as the loading control. **(B)** The band intensities of 1% Nonidet P-40-soluble LC3-II and β-actin quantified by densitometric analysis. Data expressed as mean fold increase in LC3-II/β-actin ratio (±SD) compared with control (0 nM bafilomycin A<sub>1</sub>) for four independent experiments. \**P* < 0.05 vs. control (0 nM bafilomycin A<sub>1</sub>). **(C)** SH-SY5Y cells were exposed to 2.5 and 5 mM MPP<sup>+</sup> for 24 h with or without 400 nM bafilomycin A<sub>1</sub> for the last 4 h of culture and detergent-soluble and -insoluble fractions prepared for western blots as described. **(D)** The band intensities of 1% Nonidet P-40-soluble LC3-II and β-actin quantified by densitometric analysis. Data expressed as mean fold increase in LC3-II/β-actin ratio (±SD) compared with control (0 nM bafilomycin A<sub>1</sub>) for three independent experiments. \*\**P* < 0.01 and \*\*\**P* < 0.001 vs. control (0 nM bafilomycin A<sub>1</sub>). ††*P* < 0.01 vs. control (400 nM bafilomycin A<sub>1</sub>). **(E)** The band intensities of 1% Nonidet P-40-insoluble LC3-II and β-actin quantified by densitometric analysis. Data expressed as in **(B)** for four independent experiments. \**P* < 0.05 vs. control (0 nM bafilomycin A<sub>1</sub>). **(F)** The band intensities of 1% Nonidet P-40-insoluble LC3-II and β-actin quantified by densitometric analysis and expressed as in **(D)** for three independent experiments. \**P* < 0.05 vs. control (0 nM bafilomycin A<sub>1</sub>). **(G)** LC3-II

turnover during the last 4 h of culture calculated by subtracting the band intensities of 1% Nonidet P-40-soluble LC3-II in bafilomycin A<sub>1</sub>-untreated groups from that of the corresponding bafilomycin A<sub>1</sub>-treated groups. Data expressed as mean fold increase ( $\pm$ SD) compared with control for four independent experiments. \*\*\* $P < 0.001$  vs. control. **(H)** LC3-II turnover during the last 4 h of culture calculated as described **(G)** and expressed as the mean fold increase ( $\pm$ SD) compared with control for three independent experiments. \*\* $P < 0.01$  vs. control.

#### 第4節 低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>がオートファジー選択的基質 p62/SQSTM1 タンパク質発現量に及ぼす影響

LC3-II ターンオーバーアッセイ (第3節) の結果より、低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>はオートファゴソームの分解を抑制し、p62/SQSTM1 タンパク質の細胞内蓄積を引き起こすことが予想された。しかし、10 及び 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>は、1% Nonidet P-40 可溶性画分において p62/SQSTM1 タンパク質の蓄積を引き起こさなかった (Fig. 7A and B)。p62/SQSTM1 タンパク質は、N 末端側に存在する PB1 ドメインを介して自己またはヘテロオリゴマーを形成することが報告されている<sup>35-39</sup>。従って、過剰に蓄積した p62/SQSTM1 タンパク質は 1% Nonidet P-40 不溶性凝集体に変化している可能性が考えられる<sup>30</sup>。実際に、界面活性剤不溶性画分における p62/SQSTM1 の蓄積はいくつかの研究において認められている<sup>19,37</sup>。10 及び 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>は、1% Nonidet P-40 不溶性 p62/SQSTM1 タンパク質発現量を、それぞれ、 $1.9 \pm 0.6$ -fold of control 及び  $3.9 \pm 1.4$ -fold of control に増加させた (Fig. 7A and C)。一方、2.5 及び 5 mM MPP<sup>+</sup>は、1% Nonidet P-40 可溶性 p62/SQSTM1 タンパク質発現量をそれぞれ  $2.2 \pm 0.7$ -fold of control 及び  $1.9 \pm 0.6$ -fold of control に、1% Nonidet P-40 不溶性画分 p62/SQSTM1 タンパク質発現量をそれぞれ  $2.2 \pm 0.5$ -fold of control 及び  $2.5 \pm 0.8$ -fold of control に増加させた (Fig. 7D-F)。





**Figure 7.** Effect of mild and acute MPP<sup>+</sup> exposure on degradation of p62/SQSTM1 in SH-SY5Y cells.

(A) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200 μM MPP<sup>+</sup> and the detergent-soluble and -insoluble fractions prepared as described for western blot analysis. β-Actin was used as the loading control. (B) The band intensities of 1% Nonidet P-40-soluble p62/SQSTM1 and β-actin quantified by densitometric analysis. Data expressed as mean fold increase of p62/SQSTM1/β-actin ratio (±SD) compared with control for 10 independent experiments. (C) The band intensities of 1% Nonidet P-40-insoluble LC3-II and β-actin quantified by densitometric analysis and expressed as mean fold increase of p62/SQSTM1/β-actin ratio (±SD) compared with control for 10 independent experiments. \**P* < 0.05 and \*\*\**P* < 0.001 vs. control. (D) SH-SY5Y cells were exposed to 2.5 and 5 mM MPP<sup>+</sup> for 24 h and detergent-soluble and -insoluble lysates prepared for western blot analysis as described. β-Actin was used as the loading control. (E) The band intensities of 1% Nonidet P-40-soluble p62/SQSTM1 and β-actin

quantified by densitometric analysis and expressed as mean fold increase in p62/SQSTM1/ $\beta$ -actin ratio ( $\pm$ SD) compared with control for three independent experiments. **(F)** The band intensities of 1% Nonidet P-40-insoluble p62/SQSTM1 and  $\beta$ -actin quantified by densitometric analysis and expressed as mean fold increase in p62/SQSTM1/ $\beta$ -actin ratio ( $\pm$ SD) compared with control for three independent experiments. \* $P < 0.05$  vs. control.

## 第5節 小括

以下に本章の結果をまとめた (Table 3)。低濃度 MPP<sup>+</sup>は、bafilomycin A<sub>1</sub> 存在下において LC3-II タンパク質発現量の増加を引き起こさなかったことから、主にオートファゴソムの分解を抑制することによってオートファジーフラックスを阻害することが示された。また、オートファジーフラックスの低下を反映して、p62/SQSTM1 タンパク質の蓄積及び不溶化を引き起こした。一方、高濃度 MPP<sup>+</sup> (特に 5 mM) は、bafilomycin A<sub>1</sub> 存在下において LC3-II タンパク質発現量の低下を引き起こしたことから、オートファゴソム生成の抑制を引き起こした可能性が考えられる。しかし、高濃度 MPP<sup>+</sup>の作用がオートファゴソム生成抑制作用のみであれば、bafilomycin A<sub>1</sub> 非存在下においても LC3-II タンパク質発現量の減少が認められるはずである。高濃度 MPP<sup>+</sup>は、bafilomycin A<sub>1</sub> 非存在下において LC3-II 発現量の増加を引き起こしたことから、オートファゴソム生成の抑制に加えてオートファゴソム分解抑制を同時に引き起こしている可能性が考えられる。例えば、低濃度 MPP<sup>+</sup> (200 μM) は、bafilomycin A<sub>1</sub> 単独曝露時に引き起こされる量と同程度まで LC3-II タンパク質の蓄積を引き起こしたが、高濃度 MPP<sup>+</sup> (5 mM) 曝露によって蓄積した LC3-II タンパク質量は、bafilomycin A<sub>1</sub> 単独曝露と比較するとわずかであった。これは、高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露では、オートファゴソム分解抑制と同時にオートファゴソム生成抑制も引き起こされていると考えたと説明ができる。オートファジーフラックスの低下を反映して、高濃度 MPP<sup>+</sup>も p62/SQSTM1 タンパク質の蓄積を引き起こした。しかし、低濃度 MPP<sup>+</sup>と異なり、高濃度 MPP<sup>+</sup>は界面活性剤可溶性及び不溶性画分の両方において p62/SQSTM1 の蓄積を引き起こした。このような p62/SQSTM1 タンパク質の溶解性の違いは、オートファジーフラックスの阻害様式の違いに由来する可能性が考えられる。これに関しては第6章にて考察を行った。

model (exposure time)	dose	LC3-II protein expression		p62/SQSTM1 protein expression	
		bafilomycin (-)	bafilomycin (+)	detergent-soluble	detergent-insoluble
mild model (48 h)	10 μM	↗	→	→	↗
	200 μM	↑	→	→	↑
acute model (24 h)	2.5 mM	↗	→	↗	↗
	5 mM	↗	↘	↗	↗

Table 3. Effect of low- and high-dose MPP<sup>+</sup> on autophagic flux.

## 第4章 低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>がリソソーム機能に及ぼす影響

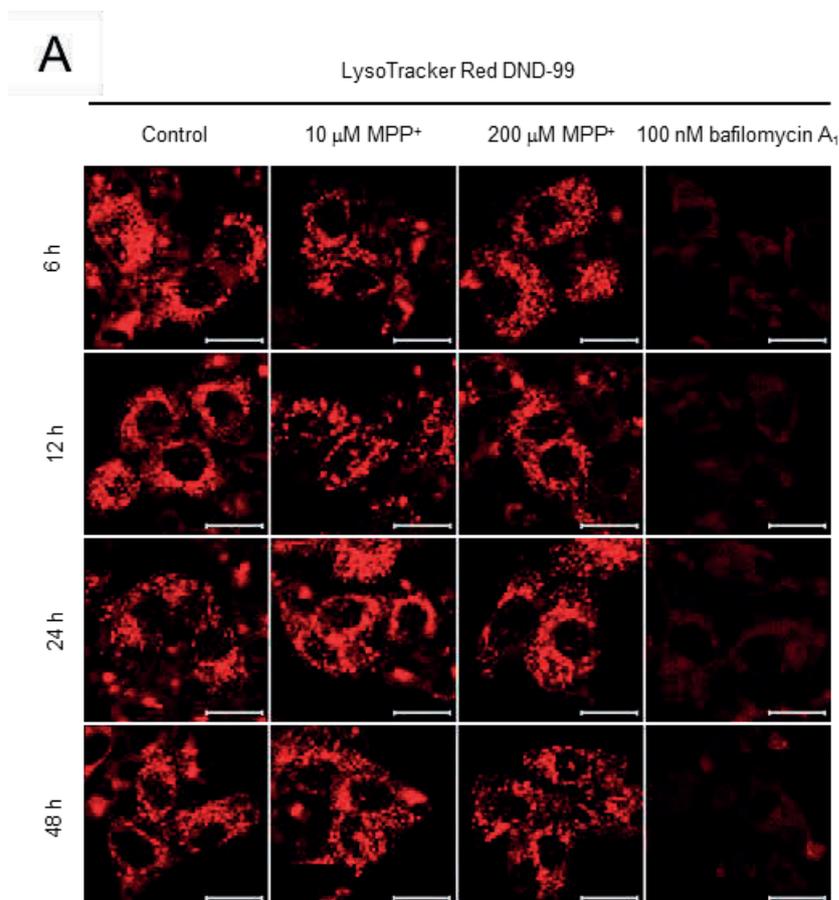
### 第1節 緒言

リソソーム内加水分解酵素は、オートファゴソームの分解において重要な役割を果たしている<sup>5,40)</sup>。実際に、リソソーム内加水分解酵素の活性は、リソソーム内酸性度に依存しており<sup>40)</sup>、bafilomycin A<sub>1</sub>、chloroquine、ammonium chloride などのリソソーム酸性化阻害剤は、オートファゴソームの分解を抑制する<sup>30-32)</sup>。また、近年、リソソームが PD 発症において重要なオルガネラであることが示唆されてきており<sup>40-42)</sup>、MPP<sup>+</sup>によるオートファゴソーム分解抑制にもリソソーム内酸性度の低下が関与している可能性が考えられる。そこで、本章第2節では、MPP<sup>+</sup>がリソソーム内酸性度に及ぼす影響を酸性オルガネラマーカーである LysoTracker Red DND-99 試薬を用いて評価した。また、MPP<sup>+</sup>がリソソーム密度に及ぼす影響をリソソーム膜タンパク質 lysosome membrane-associated protein 1 (LAMP1) に対する免疫細胞化学染色によって評価した<sup>30)</sup>。

一方、リソソーム内加水分解酵素の活性は、leupeptin、pepstatin A、E64d などのようにリソソーム内酸性度に依存しないメカニズムによっても阻害される<sup>30,31)</sup>。カテプシン D は、PD との関係が示唆されているリソソーム内アスパラギン酸プロテアーゼの一つである<sup>18,41-48)</sup>。本章第3節では、10 及び 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>がカテプシン D の活性に及ぼす影響を市販のキットを用いて評価した。

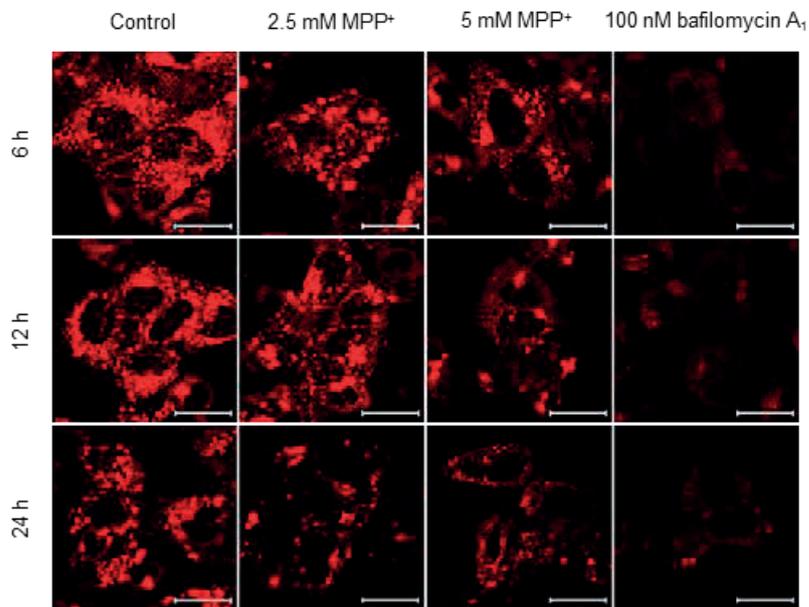
## 第2節 低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>がリソソーム内酸性度及び密度に及ぼす影響

リソソーム内酸性度は、陽性対照である bafilomycin A<sub>1</sub> によって劇的に減少したが、10 及び 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> 48 時間曝露によってほとんど変化は認められなかった (Fig. 8A)。一方、2.5 及び 5 mM MPP<sup>+</sup> は、曝露後 6 時間から、LysoTracker Red DND-99 陽性リソソーム数の減少を引き起こした (Fig. 8B)。リソソーム内酸性度の結果と同様に、10 及び 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> は曝露後 48 時間においてリソソームの密度に影響を及ぼさなかった (Fig. 8C)。一方、2.5 及び 5 mM MPP<sup>+</sup> は、曝露後 24 時間においてリソソーム密度の減少を引き起こした (Fig. 8D)。bafilomycin A<sub>1</sub> は、顕著にリソソーム数の増加を引き起こした (Fig. 8C and D)。

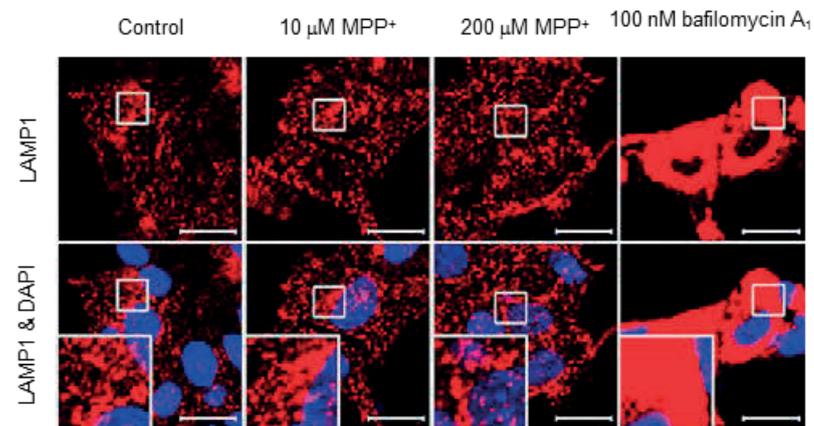


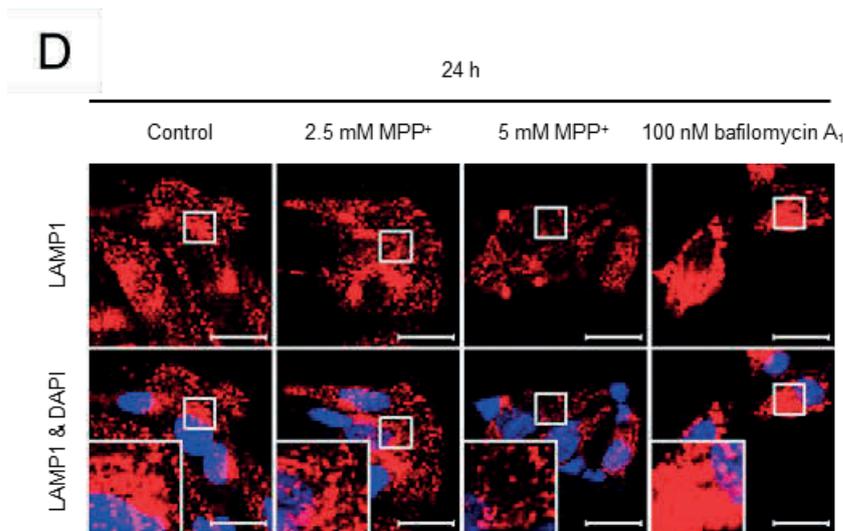
**B**

LysoTracker Red DND-99

**C**

48 h





**Figure 8.** Effect of mild and acute MPP<sup>+</sup> exposure on lysosomal acidity and density in SH-SY5Y cells.

(A) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>, and lysosomal acidity was evaluated using LysoTracker Red DND-99 at several time points (6, 12, 24, and 48 h). Bafilomycin A<sub>1</sub> (100 nM) was used as a positive control for lysosomal alkalization. Scale bar represents 20  $\mu$ m.

(B) SH-SY5Y cells were exposed to 2.5 and 5 mM MPP<sup>+</sup>, and lysosomal acidity was evaluated using LysoTracker Red DND-99 at several time points (6, 12, and 24 h). Bafilomycin A<sub>1</sub> (100 nM) was used as a positive control for lysosomal alkalization. Scale bar represents 20  $\mu$ m.

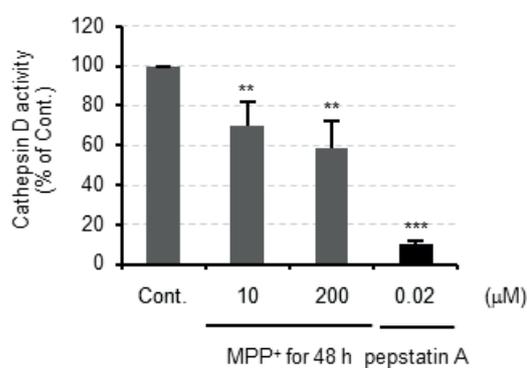
(C) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> for 48 h, and lysosomal density was evaluated using immunocytochemical staining of LAMP1 (red). Nuclei counterstained by DAPI (blue). Scale bar represents 20  $\mu$ m.

(D) SH-SY5Y cells were exposed to 2.5 and 5 mM MPP<sup>+</sup> for 24 h, and lysosomal density was evaluated using immunocytochemical staining for LAMP1 (red). Nuclei counterstained using DAPI (blue). Scale bar represents 20  $\mu$ m.

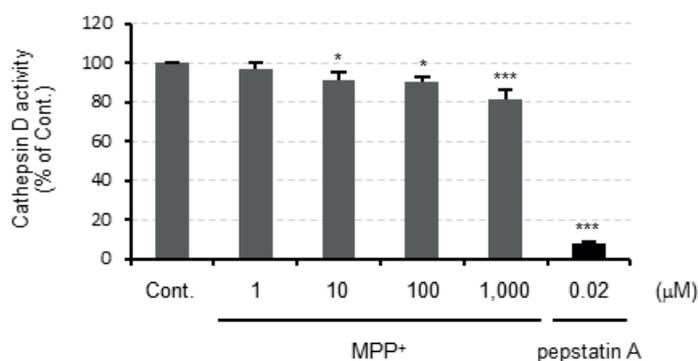
### 第3節 低濃度 MPP<sup>+</sup>がリソソーム内加水分解酵素の活性に及ぼす影響

10 及び 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>は、カテプシン D 活性をそれぞれ、70%  $\pm$  12% of control 及び 58  $\pm$  14% of control に低下させた (Fig. 9A)。この影響が MPP<sup>+</sup>とカテプシン D の直接的な作用によるものであるか否かを調べるために、コントロール細胞から抽出した正常なカテプシン D に様々な濃度の MPP<sup>+</sup>を直接曝露し、カテプシン D 活性を測定した。MPP<sup>+</sup>の直接曝露は、カテプシン D 活性を濃度依存的に減少させた (Fig. 9B)。しかし、その作用は、1,000  $\mu\text{M}$  においても、細胞に 10  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>を曝露した時に引き起こされた活性低下の程度には及ばなかった (Fig. 9B)。また、コントロール細胞から抽出したカテプシン D にアスパラギン酸プロテアーゼ特異的阻害剤である pepstatin A を曝露するとカテプシン D 活性は劇的に減少したことから、このアッセイが成立していることが確認された (Fig. 9A and B)。

A



B



**Figure 9.** Effect of mild MPP<sup>+</sup> exposure on cathepsin D activity in SH-SY5Y cells. **(A)** SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> for 48 h and cathepsin D activity measured using an assay kit. Pepstatin A (0.02  $\mu$ M) was used to confirm the accuracy of this assay. Data expressed as mean percent ( $\pm$ SD) of control for three independent experiments. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  vs. control. **(B)** Extract from control cells including intact cathepsin D was incubated with several concentrations of MPP<sup>+</sup> (1, 10, 100, and 1,000  $\mu$ M) and cathepsin D activity measured as described. Pepstatin A was used to confirm the accuracy of this assay. Data expressed as mean percent ( $\pm$ SD) of control for three independent experiments. \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$  vs. control.

## 第4節 小括

以下に本章の結果をまとめた (Table 4)。低濃度 MPP<sup>+</sup>は、LysoTracker Red DND-99 陽性リソソームの数にほとんど変化を及ぼさなかったことからリソソーム内酸性度の低下を引き起こさないことが示唆された。一方、低濃度 MPP<sup>+</sup>は、代表的なリソソーム内加水分解酵素であるカテプシン D 活性の低下を引き起こした。また、濃度域は異なったものの、カテプシン D 活性はコントロール細胞から抽出した正常なカテプシン D に MPP<sup>+</sup>を曝露しても引き起こされたことから、少なくとも一部は MPP<sup>+</sup>の直接的な作用が阻害メカニズムに関与している可能性が考えられる。一方、高濃度 MPP<sup>+</sup>は、LysoTracker Red DND-99 陽性リソソームの数を減少させた。この結果は、リソソーム内酸性度の低下もしくはリソソーム密度の低下のどちらか示していると考えられたため、リソソーム膜に多く発現しているタンパク質である LAMP1 に対する抗体を用いて免疫細胞化学染色を行った。高濃度 MPP<sup>+</sup>は LAMP1 陽性ドット状染色像の数を低下させたことから、リソソーム密度の低下を引き起こしていることが示唆された。本章の結果より、低濃度 MPP<sup>+</sup>は高濃度 MPP<sup>+</sup>と異なるメカニズムを介してリソソーム機能低下を引き起こす可能性が示された。低濃度 MPP<sup>+</sup>は、リソソーム密度低下を引き起こすような過激なダメージではなく、リソソーム内加水分解酵素のマイルドな活性低下を介してオートファゴソーム分解抑制を引き起こす可能性が考えられる。

model (exposure time)	dose	Lysosomal acidity	Lysosomal density	cathepsin D activity
mild model (48 h)	10 $\mu$ M	→	→	↘
	200 $\mu$ M	→	→	↘
acute model (24 h)	2.5 mM	↘	↘	—
	5 mM	↘	↘	—

Table 4. Effect of low- and high-dose MPP<sup>+</sup> on lysosomal function.

## 第 5 章 リソソーム生合成促進物質が低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>誘発 細胞死及びオートファジー阻害に及ぼす影響

### 第 1 節 緒言

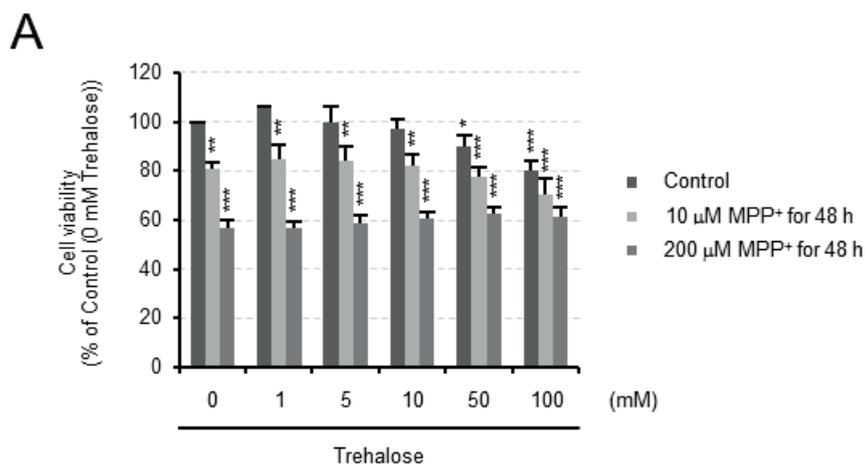
低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>は、リソソーム機能低下を介してオートファゴソームの分解を阻害することが示唆されたが、この現象が細胞死に関与しているか否かは不明である。近年、mammalian target of rapamycin (mTOR) 非依存的オートファジー誘導物質として知られているトレハロース<sup>49)</sup>がリソソーム生合成促進作用を有することが明らかになった<sup>18)</sup>。そこで、本章第 2 及び第 3 節では、トレハロースを用いてオートファゴソーム分解抑制と細胞死との関係を調べた。

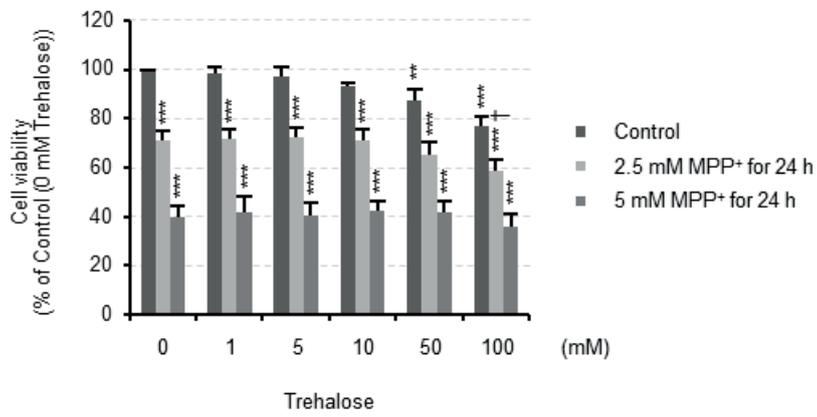
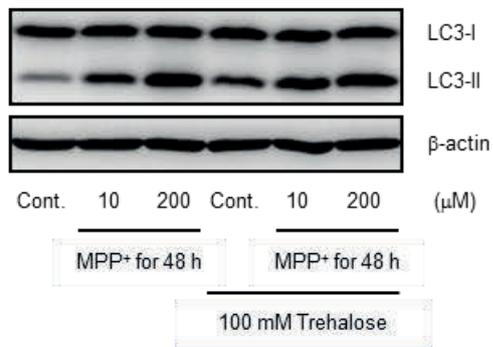
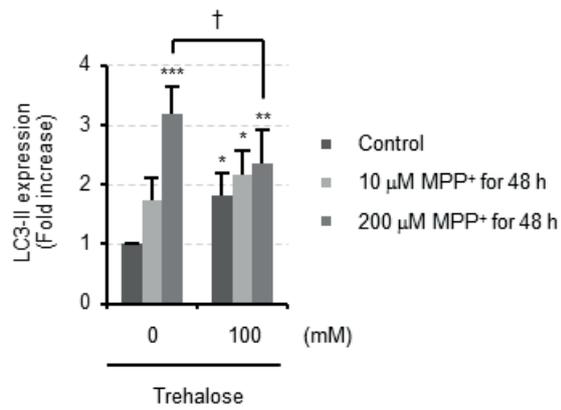
また、mTOR 依存的オートファジー誘導物質であるラパマイシン<sup>50,51)</sup>も同様にリソソーム生合成促進作用を有することが報告されている<sup>18,52)</sup>ため、本章第 4 及び第 5 節では、ラパマイシンを用いてトレハロースと同様の検討を行った。

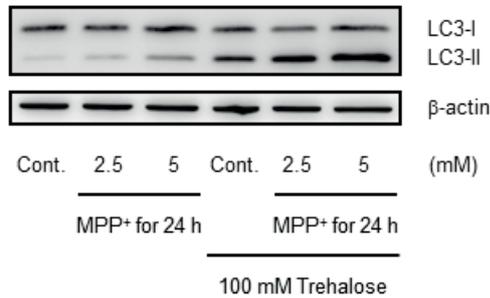
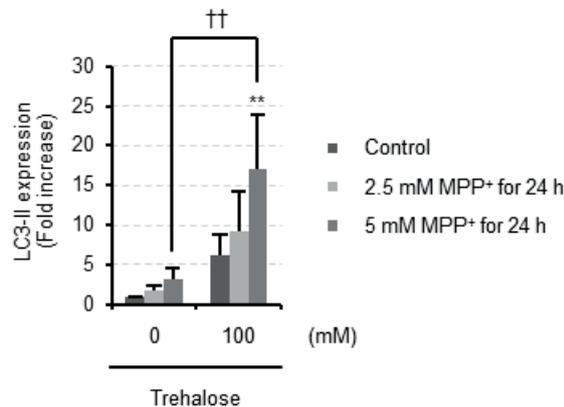
## 第2節 トレハロースが低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>誘発細胞死及びオートファゴソーム蓄積に及ぼす影響

様々な濃度のトレハロースを MPP<sup>+</sup>曝露の1時間前から同時曝露した。トレハロースは、200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>誘発細胞死をわずかではあるが濃度依存的に抑制した (e.g. 100 mM trehalose increased cell viability from 56.6%  $\pm$  3.3% to 61.4%  $\pm$  4.1% of control; Fig. 10A)。しかし、トレハロースは、10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>誘発細胞死を促進した (Fig. 10A)。また、トレハロースは、2.5 mM MPP<sup>+</sup>誘発細胞死を促進し、5 mM MPP<sup>+</sup>誘発細胞死には影響を及ぼさなかった (Fig. 10B)。

トレハロースが実際にオートファゴソーム蓄積を改善しているか否か評価するために、100 mM トレハロースを MPP<sup>+</sup>曝露の1時間前から同時曝露し、LC3-II タンパク質発現量を測定した。100 mM トレハロースは、200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>曝露によって増加した LC3-II タンパク質発現量を減少させた (from 3.2  $\pm$  0.5-fold to 2.4  $\pm$  0.6-fold of control; Fig. 10C and B)。しかし、100 mM トレハロースは、10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>誘発 LC3-II タンパク質発現量の増加をさらに促進した (Fig. 10C and D)。また、100 mM トレハロースは、2.5 及び 5 mM MPP<sup>+</sup>誘発 LC3-II タンパク質発現量の増加も促進した (Fig. 10E and F)。



**B****C****D**

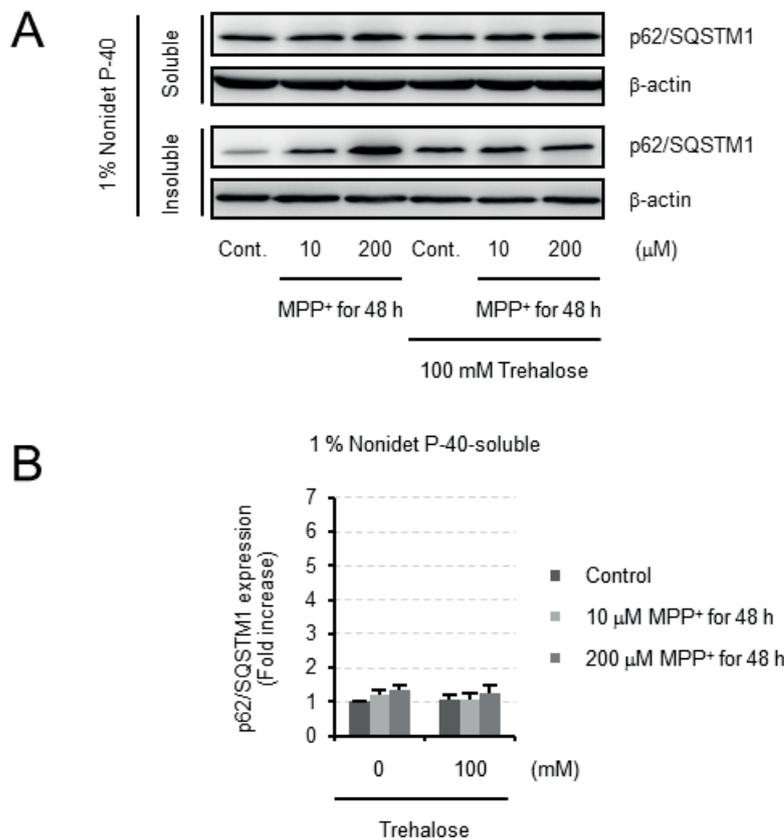
**E****F**

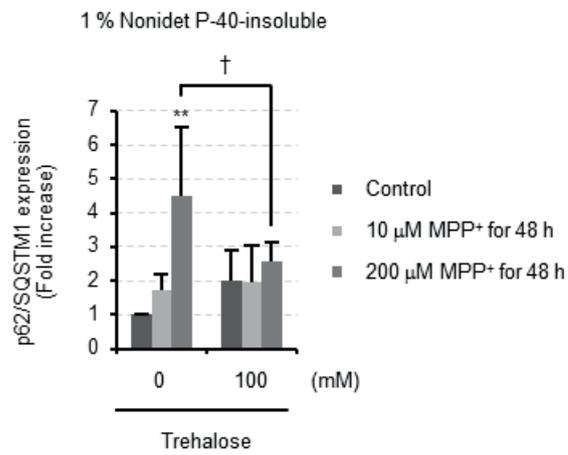
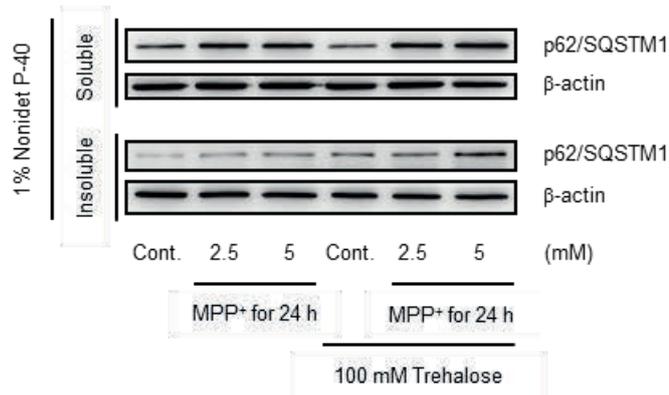
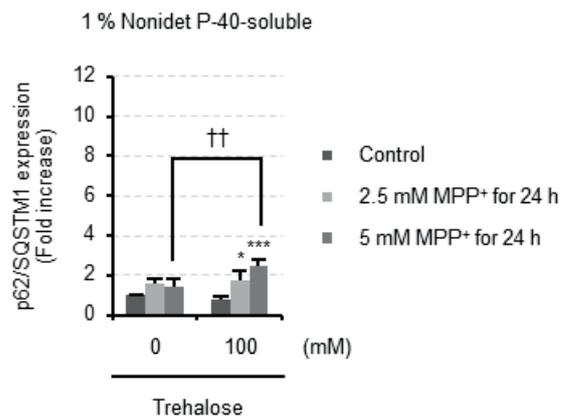
**Figure 10.** Effect of trehalose on mild and acute MPP<sup>+</sup> exposure-induced cell death and accumulation of autophagosomes in SH-SY5Y cells. **(A)** SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> for 48 h with or without 1 h trehalose pretreatment (1–100 mM) and cell viability measured using WST-1 assay. Data expressed as mean percent ( $\pm$ SD) of control (0 mM trehalose) for three independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, and \*\*\* $P$  < 0.001 vs. control (0 mM trehalose). **(B)** SH-SY5Y cells were exposed to 2.5 and 5 mM MPP<sup>+</sup> for 24 h with or without 1 h trehalose pretreatment (1–100 mM) and cell viability measured using WST-1 assay. Data expressed as mean percent ( $\pm$ SD) of control (0 mM trehalose) for three independent experiments. \*\* $P$  < 0.01 and \*\*\* $P$  < 0.001 vs. control (0 mM trehalose).  $\dagger P$  < 0.05 vs. 2.5 mM MPP<sup>+</sup> for 24 h (0 mM trehalose). **(C)** SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> for 48 h with or without 1 h trehalose pretreatment (100 mM), lysed in TNE buffer containing 1% Nonidet P-40, separated by SDS-PAGE, and LC3 protein detected by western blot analysis.  $\beta$ -Actin was used as a loading control. **(D)** The band intensities of LC3-II and  $\beta$ -actin were quantified by densitometric analysis and expressed as mean fold increase in LC3-II/ $\beta$ -actin ratio ( $\pm$ SD) compared with control (0 mM trehalose) for three independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, and \*\*\* $P$  < 0.001 vs. control (0 mM trehalose).  $\dagger P$  < 0.05

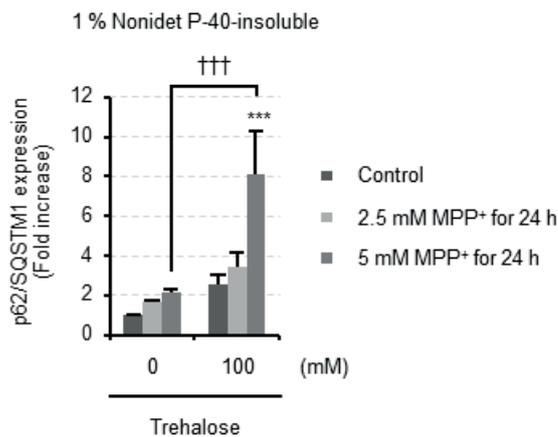
vs. 200  $\mu\text{M}$   $\text{MPP}^+$  for 48 h (0 mM trehalose). (E) SH-SY5Y cells were exposed to 2.5 and 5 mM  $\text{MPP}^+$  for 24 h with or without 1 h trehalose pretreatment (100 mM) and examined by western blot as described in (C). (F) The band intensities of LC3-II and  $\beta$ -actin quantified by densitometric analysis and expressed as mean fold increase in LC3-II/ $\beta$ -actin ratio ( $\pm\text{SD}$ ) compared with control (0 mM trehalose) for three independent experiments.  $**P < 0.01$  vs. control (0 mM trehalose).  $^{\dagger\dagger}P < 0.01$  vs. 5 mM  $\text{MPP}^+$  for 24 h (0 mM trehalose).

### 第3節 トレハロースが低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>誘発 p62/SQSTM1 タンパク質蓄積に及ぼす影響

トレハロースが MPP<sup>+</sup>誘発オートファジーフラックスの低下に及ぼす影響を p62/SQSTM1 タンパク質発現量の変化によって評価した。100 mM トレハロースは、200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>誘発 1% Nonidet P-40 不溶性 p62/SQSTM1 タンパク質蓄積を有意に抑制した (from  $4.5 \pm 2.0$ -fold to  $2.6 \pm 0.6$ -fold of control; Fig. 11A, insoluble, and Fig. 11C)。しかし、100 mM トレハロースは、10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>誘発 1% Nonidet P-40 不溶性 p62/SQSTM1 タンパク質蓄積に対しては効果を示さなかった (Fig. 11A, insoluble, Fig. 11C)。一方、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露条件下において、100 mM トレハロースは 1% Nonidet P-40 可溶性 p62/SQSTM1 タンパク質発現量に影響を及ぼさなかった (Fig. 11A, soluble, and Fig. 11B)。また、100 mM トレハロースは、2.5 及び 5 mM MPP<sup>+</sup>誘発 1% Nonidet P-40 可溶性及び不溶性 p62/SQSTM1 タンパク質の蓄積をさらに促進した (Fig. 11D-F)。



**C****D****E**

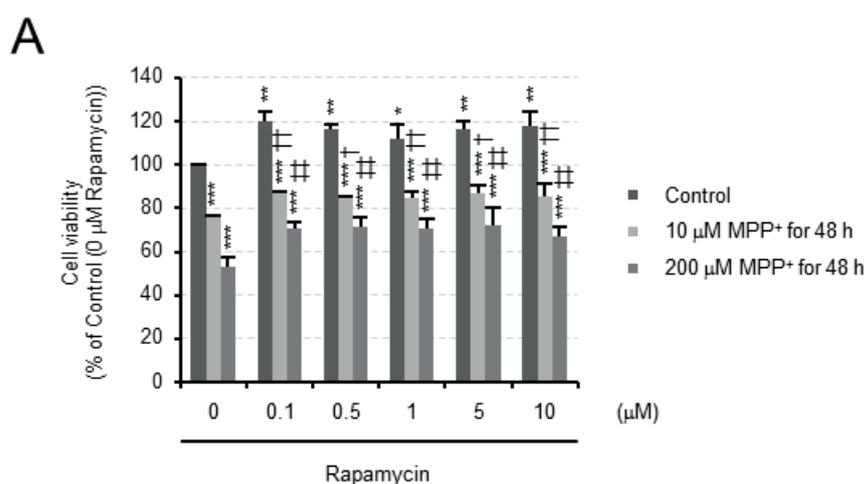
**F**

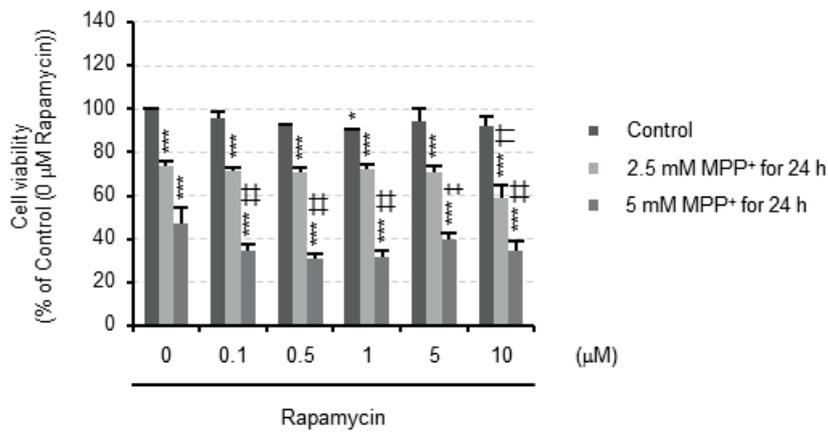
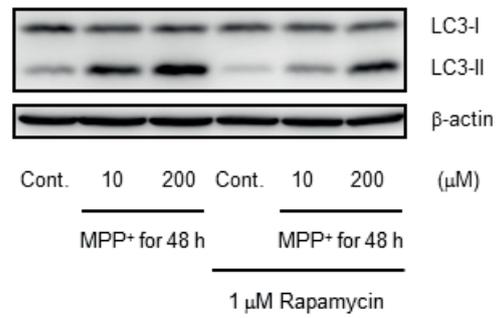
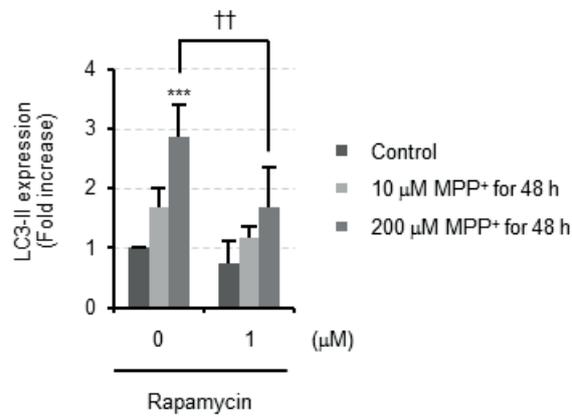
**Figure 11.** Effect of trehalose on mild and acute MPP<sup>+</sup> exposure-induced accumulation of p62/SQSTM1 in SH-SY5Y cells. (A) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> for 48 h with or without 1 h trehalose pretreatment (100 mM) and prepared for western blot detection of p62/SQSTM1 protein as described. (B) The band intensities of 1% Nonidet P-40-soluble p62/SQSTM1 and  $\beta$ -actin quantified by densitometric analysis and expressed as mean fold increase in p62/SQSTM1/ $\beta$ -actin ratio ( $\pm$ SD) compared with control (0 mM trehalose) for four independent experiments. (C) The band intensities of 1% Nonidet P-40-insoluble p62/SQSTM1 and  $\beta$ -actin quantified by densitometric analysis and expressed as mean fold increase in p62/SQSTM1/ $\beta$ -actin ratio ( $\pm$ SD) compared with control (0 mM trehalose) for four independent experiments. \*\* $P$  < 0.01 vs. control.  $^{\dagger}P$  < 0.05 vs. 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> for 48 h (0 mM trehalose). (D) SH-SY5Y cells were exposed to 2.5 and 5 mM MPP<sup>+</sup> for 24 h with or without 1 h trehalose pretreatment (100 mM) and prepared for western blot analysis of detergent-soluble and -insoluble fractions as described. (E) The band intensities of 1% Nonidet P-40-soluble p62/SQSTM1 and  $\beta$ -actin quantified by densitometric analysis and expressed as mean fold increase in p62/SQSTM1/ $\beta$ -actin ratio ( $\pm$ SD) compared with control (0 mM trehalose) for three independent experiments. \* $P$  < 0.05 and \*\*\* $P$  < 0.001 vs. control.  $^{\dagger\dagger}P$  < 0.01 vs. 5 mM MPP<sup>+</sup> for 24 h (0 mM trehalose). (F) The band intensities of 1% Nonidet P-40-insoluble p62/SQSTM1 and  $\beta$ -actin quantified by densitometric analysis and expressed as mean fold increase of p62/SQSTM1/ $\beta$ -actin ratio ( $\pm$ SD) compared with control (0 mM trehalose) for three independent experiments. \*\*\* $P$  < 0.001 vs. control.  $^{\dagger\dagger\dagger}P$  < 0.001 vs. 5 mM MPP<sup>+</sup> for 24 h (0 mM trehalose).

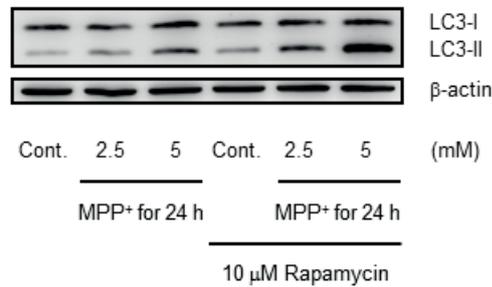
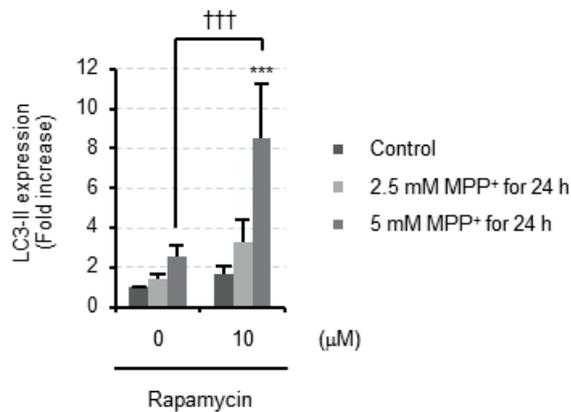
#### 第4節 ラパマイシンが低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>誘発細胞死及びオートファゴソーム蓄積に及ぼす影響

様々な濃度のラパマイシンを MPP<sup>+</sup>曝露の1時間前から同時曝露した。ラパマイシンは、いずれの濃度においても10及び200 µM MPP<sup>+</sup>誘発細胞死を有意に抑制した (e.g. 1 µM rapamycin increased cell viability from 76.0 ± 0.9% to 85.1% ± 3.0% of control at 10 µM MPP<sup>+</sup> and from 53.0% ± 4.8% to 70.8% ± 4.0% of control at 200 µM MPP<sup>+</sup>; Fig. 12A)。一方、ラパマイシンは、2.5及び5 mM MPP<sup>+</sup>誘発細胞死を促進した (Fig. 12B)。

ラパマイシンが実際にオートファゴソーム蓄積を改善しているか否か評価するために、1及び10 µM ラパマイシンを MPP<sup>+</sup>曝露の1時間前から同時曝露し、LC3-IIタンパク質発現量を測定した。1 µM ラパマイシンは低濃度 MPP<sup>+</sup>誘発 LC3-IIタンパク質発現量の増加を抑制した (from 1.7 ± 0.3-fold to 1.2 ± 0.2-fold of control at 10 µM MPP<sup>+</sup> and from 2.9 ± 0.5-fold to 1.7 ± 0.7-fold of control at 200 µM MPP<sup>+</sup>; Fig. 12C and D)。一方、10 µM ラパマイシンは、2.5及び5 mM MPP<sup>+</sup>誘発 LC3-IIタンパク質発現量の増加をさらに促進した (Fig. 12E and F)。



**B****C****D**

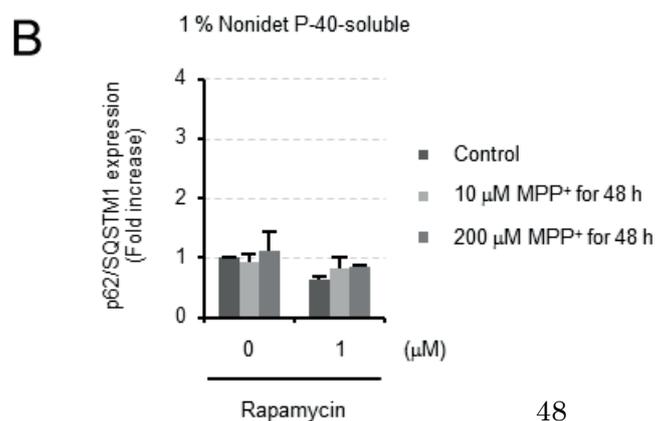
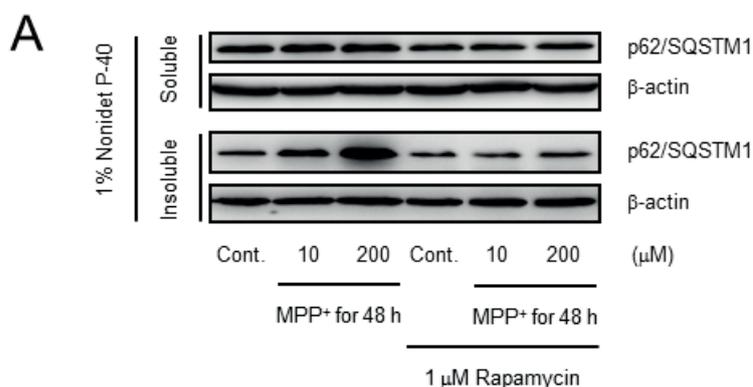
**E****F**

**Figure 12.** Effect of rapamycin on mild and acute MPP<sup>+</sup> exposure-induced cell death and accumulation of autophagosomes in SH-SY5Y cells. **(A)** SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> for 48 h with or without 1 h rapamycin pretreatment (0.1–10  $\mu\text{M}$ ), and cell viability was measured using WST-1 assay. Data expressed as mean percent ( $\pm\text{SD}$ ) of control (0  $\mu\text{M}$  rapamycin) for three independent experiments.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , and  $***P < 0.001$  vs. control (0  $\mu\text{M}$  rapamycin).  $^\dagger P < 0.05$  and  $^\dagger^\dagger P < 0.01$  vs. 10  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> for 48 h (0  $\mu\text{M}$  rapamycin).  $^\ddagger P < 0.01$  vs. 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> for 48 h (0  $\mu\text{M}$  rapamycin). **(B)** SH-SY5Y cells were exposed to 2.5 and 5 mM MPP<sup>+</sup> for 24 h with or without 1 h rapamycin pretreatment (0.1–10  $\mu\text{M}$ ), and cell viability measured using WST-1 assay. Data expressed as mean percent ( $\pm\text{SD}$ ) of control (0  $\mu\text{M}$  rapamycin) for three independent experiments.  $*P < 0.05$  and  $***P < 0.001$  vs. control (0  $\mu\text{M}$  rapamycin).  $^\dagger^\dagger P < 0.01$  vs. 2.5 mM MPP<sup>+</sup> for 24 h (0  $\mu\text{M}$  rapamycin).  $^\ddagger P < 0.05$  and  $^\ddagger^\ddagger P < 0.01$  vs. 5 mM MPP<sup>+</sup> for 24 h (0  $\mu\text{M}$  rapamycin). **(C)** SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> for 48 h with or without 1 h rapamycin pretreatment (1  $\mu\text{M}$ ) and the detergent-soluble fraction prepared for western blot detection of LC3 protein as described. **(D)** The band

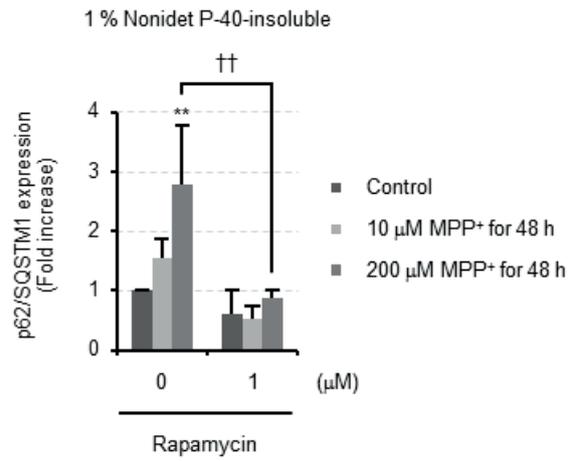
intensities of LC3-II and  $\beta$ -actin were quantified by densitometric analysis and expressed as mean fold increase in LC3-II/ $\beta$ -actin ratio ( $\pm$ SD) compared with control (0  $\mu$ M rapamycin) for three independent experiments.  $***P < 0.001$  vs. control (0  $\mu$ M rapamycin).  $^{\dagger\dagger}P < 0.01$  vs. 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> for 48 h (0  $\mu$ M rapamycin). (E) SH-SY5Y cells were exposed to 2.5 and 5 mM MPP<sup>+</sup> for 24 h with or without 1 h rapamycin pretreatment (10  $\mu$ M) and prepared for western blot detection of LC3 as described. (F) The band intensities of LC3-II and  $\beta$ -actin quantified by densitometric analysis and expressed as mean fold increase in LC3-II/ $\beta$ -actin ratio ( $\pm$ SD) compared with control (0  $\mu$ M rapamycin) for three independent experiments.  $***P < 0.001$  vs. control (0  $\mu$ M rapamycin).  $^{\dagger\dagger\dagger}P < 0.001$  vs. 5 mM MPP<sup>+</sup> for 24 h (0  $\mu$ M rapamycin).

## 第5節 ラパマイシンが低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>誘発 p62/SQSTM1 タンパク質蓄積に及ぼす影響

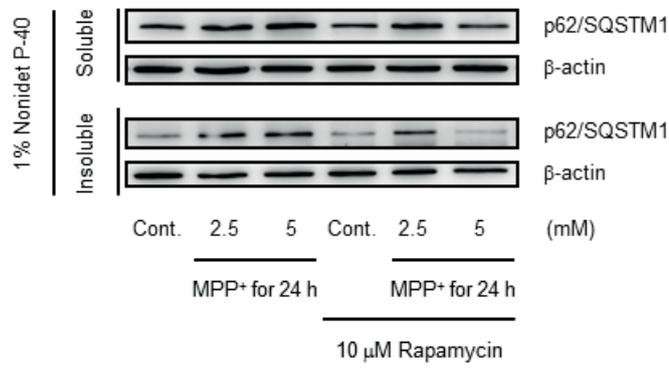
ラパマイシンが MPP<sup>+</sup>誘発オートファジーフラックスの低下に及ぼす影響を p62/SQSTM1 タンパク質発現量の変化によって評価した。1  $\mu\text{M}$  ラパマイシンは、低濃度 MPP<sup>+</sup>誘発 1% Nonidet P-40 不溶性 p62/SQSTM1 タンパク質蓄積を抑制した (from  $1.6 \pm 0.3$ -fold to  $0.5 \pm 0.2$ -fold of control at 10  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> and from  $2.8 \pm 1.0$ -fold to  $0.9 \pm 0.2$ -fold of control at 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>; Fig. 13A, insoluble, and Fig. 13C)。一方、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露条件下において、1  $\mu\text{M}$  ラパマイシンは、1% Nonidet P-40 可溶性 p62/SQSTM1 タンパク質発現量にほとんど変化を及ぼさなかった (Fig. 13A, soluble and B)。また、10  $\mu\text{M}$  ラパマイシンは、5 mM MPP<sup>+</sup>誘発 1% Nonidet P-40 可溶性及び不溶性 p62/SQSTM1 タンパク質発現量の増加を抑制した (from  $1.5 \pm 0.6$ -fold to  $0.6 \pm 0.2$ -fold of control in the 1% Nonidet P-40-soluble fraction and from  $3.1 \pm 0.5$ -fold to  $1.2 \pm 0.5$ -fold of control in the insoluble fraction; Fig. 13D-F)。しかし、10  $\mu\text{M}$  ラパマイシンは、2.5 mM MPP<sup>+</sup>誘発 1% Nonidet P-40 可溶性及び不溶性 p62/SQSTM1 タンパク質発現量の増加に影響を及ぼさなかった (Fig. 13D-F)。



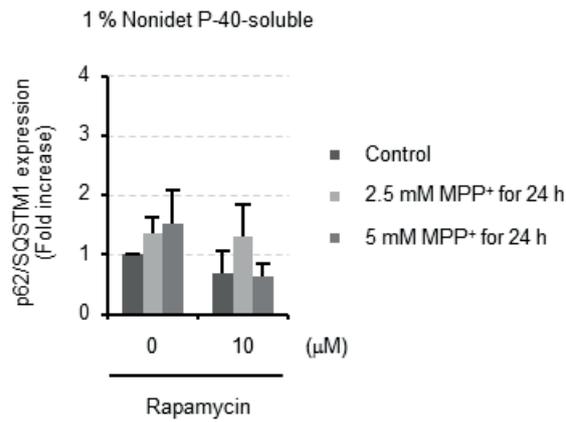
C

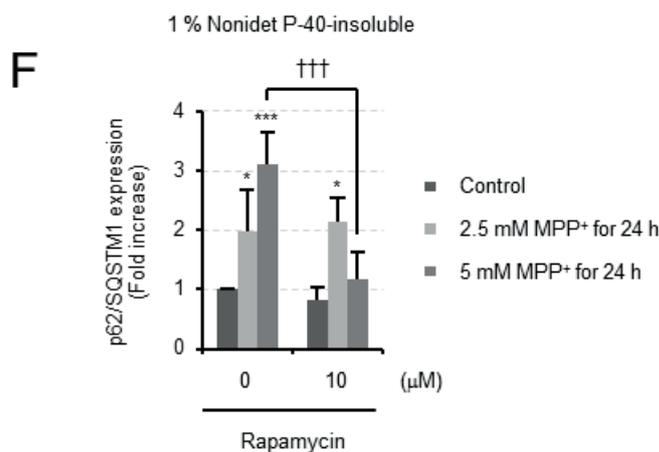


D



E





**Figure 13.** Effect of rapamycin on mild and acute MPP<sup>+</sup> exposure-induced accumulation of p62/SQSTM1 in SH-SY5Y cells. (A) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200 μM MPP<sup>+</sup> for 48 h with or without 1 h rapamycin pretreatment (1 μM) and detergent-soluble and -insoluble fractions of p62/SQSTM1 protein prepared for western blot analysis as described. (B) The band intensities of 1% Nonidet P-40-soluble p62/SQSTM1 and β-actin quantified by densitometric analysis and expressed as mean fold increase in p62/SQSTM1/β-actin ratio (±SD) compared with control (0 μM rapamycin) for three independent experiments. (C) The band intensities of 1% Nonidet P-40-insoluble p62/SQSTM1 and β-actin quantified by densitometric analysis and expressed as mean fold increase in p62/SQSTM1/β-actin ratio (±SD) compared with control (0 μM rapamycin) for three independent experiments. \*\**P* < 0.01 vs. control (0 μM rapamycin). ††*P* < 0.05 vs. 200 μM MPP<sup>+</sup> for 48 h (0 μM rapamycin). (D) SH-SY5Y cells were exposed to 2.5 and 5 mM MPP<sup>+</sup> for 24 h with or without 1 h rapamycin pretreatment (10 μM) and detergent-soluble and -insoluble p62/SQSTM1 protein fractions prepared for western blot analysis as described. (E) The band intensities of 1% Nonidet P-40-soluble p62/SQSTM1 and β-actin quantified by densitometric analysis and expressed as mean fold increase in p62/SQSTM1/β-actin ratio (±SD) compared with control (0 μM rapamycin) for three independent experiments. (F) The band intensities of 1% Nonidet P-40-insoluble p62/SQSTM1 and β-actin quantified by densitometric analysis and expressed as mean fold increase in p62/SQSTM1/β-actin ratio (±SD) compared with control (0 μM rapamycin) for three independent experiments. \**P* < 0.05 and \*\*\**P* < 0.001 vs. control (0 μM rapamycin). †††*P* < 0.001 vs. 5 mM MPP<sup>+</sup> for 24 h (0 μM rapamycin).

## 第6節 小括

リソソーム生合成促進作用を有することが報告されているトレハロースは、200  $\mu\text{M}$   $\text{MPP}^+$ 誘発細胞死をわずかに抑制した。また、同条件下において、LC3-II および界面活性剤不溶性 p62/SQSTM1 蓄積の抑制も認められたことから、リソソーム機能低下を介したオートファジー阻害が細胞死に関与していた可能性が考えられる。しかし、トレハロースは、10  $\mu\text{M}$   $\text{MPP}^+$ 誘発細胞死及びオートファジー阻害に対して効果を示さなかった。また、高濃度  $\text{MPP}^+$ 毒性に対しても同様に効果を示さなかった。これらの結果は、トレハロースのリソソーム生合成促進作用はオートファジーフラックスが高度に阻害された場合にのみ効果として現れる可能性を示している。

一方、もう一つのリソソーム生合成促進物質であるラパマイシンは、200  $\mu\text{M}$   $\text{MPP}^+$ だけでなく 10  $\mu\text{M}$   $\text{MPP}^+$ 誘発細胞死及びオートファジー阻害に対しても効果を示した。しかし、高濃度  $\text{MPP}^+$ 毒性に対しては、トレハロースと同様に効果を示さなかった。

本章の結果より、リソソーム生合成促進物質は低濃度  $\text{MPP}^+$ 誘発オートファジー阻害及び細胞死を部分的に抑制できることが示された。一方、リソソーム生合成促進物質は、高濃度  $\text{MPP}^+$ 誘発オートファジー阻害及び細胞死に対してむしろ増悪効果を示すことが明らかになった。本章にて明らかになったリソソーム生合成促進物質の作用の違い及びトレハロースとラパマイシンの特徴に関して、第6章にて考察を行った。

## 第6章 総括及び考察

本研究では、PD 発症におけるオートファジー機能低下の関与及びそのメカニズムの解明を目指して、まず、低濃度 MPP<sup>+</sup>誘発 PD モデル細胞の作製を行った。従来の報告よりも低濃度の MPP<sup>+</sup> (10  $\mu$ M) は、曝露後、徐々に細胞死を引き起こし、その程度は曝露期間後期になるにつれてさらに緩やかになった。このような細胞死の特徴は、MPTP 慢性マウスモデルにおけるドパミン神経脱落パターン<sup>53)</sup>と類似していることから、低濃度 MPP<sup>+</sup>誘発 PD モデル細胞は、MPTP 慢性マウスモデルにおけるドパミン神経の異常をより反映していることが期待される。また、このような細胞死において、細胞死の根本的原因は曝露期間初期に起こり、曝露期間後期においては二次的影響や代償機構が関与していると考えられる。従って、本研究において評価を行った 48 時間という曝露期間は、細胞死の根本的原因が起こり始める時間である可能性が考えられる。本研究では、低濃度 MPP<sup>+</sup>がオートファジーに及ぼす影響を明らかにし、高濃度 MPP<sup>+</sup>とは異なる新たなメカニズムを提示した。

MPP<sup>+</sup>は、幅広い濃度域及び曝露時間においてオートファジーフラックスの低下を引き起こしたが、その原因は曝露条件に依存して異なっていた。低濃度 MPP<sup>+</sup>は、主にオートファゴソームの分解を抑制し、オートファゴソーム及び界面活性剤 (1% Nonidet P-40) 不溶性 p62/SQSTM1 タンパク質の蓄積を引き起こした (Fig. 6A and B and Fig. 7A-C)。現在までに、MPP<sup>+</sup>を曝露したドパミン作動性神経細胞株 MN9D において p62/SQSTM1 と LC3-II の結合促進が認められている<sup>19)</sup>ことから、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によって蓄積した界面活性剤不溶性 p62/SQSTM1 タンパク質は、オートファゴソームに隔離されている可能性が考えられる。従って、本研究結果は、未分解のオートファゴソームによって隔離された p62/SQSTM1 タンパク質は界面活性剤不溶性である凝集体型に変化する傾向があることを示唆している。この仮説は、MPTP 慢性マウスモデルの脳内における封入体の出現<sup>22-26)</sup>にも関与している可能性が考えられる。また、この仮説は、界面活性剤不溶性であるレビー小体が未分解のオートファゴソームに由来するという仮説<sup>18,42)</sup>を支持している。実際に、p62/SQSTM1<sup>54)</sup>及び LC3<sup>18,55)</sup>タンパク質はレビー小体の構成成分であることが報告されている。

一方、高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるオートファゴソーム蓄積は、bafilomycin A<sub>1</sub> 曝露による蓄積と比較するとわずかであった (Fig. 6C and D)。この結果より、オートファジーの

機能はほとんど正常であるように思われた。しかし、LC3-II ターンオーバーアッセイの結果より、高濃度 MPP<sup>+</sup>は、オートファゴソーム分解抑制に加えて、定常的オートファジーの抑制を引き起こしていることが示唆された (Fig. 6C and D)。一方、2.5 mM MPP<sup>+</sup>を曝露した SH-SY5Y 細胞におけるオートファゴソーム生成促進が既に報告されている<sup>16)</sup>。この相違は、以前の報告で証明されている<sup>56)</sup>ように、LC3-II ターンオーバーを評価した期間によるものである可能性が考えられる。本研究において、MPP<sup>+</sup>曝露期間の最後の 4 時間における LC3-II ターンオーバーを評価したが、Zhu らは MPP<sup>+</sup>曝露期間全てにおける LC3-II ターンオーバーを評価している<sup>16)</sup>。従って、高濃度 MPP<sup>+</sup>は曝露後初期においてオートファゴソーム生成促進を引き起こし、後期においては定常的オートファジーの抑制が主要になるのではないかと考えられる。実際、2.5 mM MPP<sup>+</sup>を曝露した SK-N-SH 細胞の最後の 2 時間における LC3-II ターンオーバーを評価した他のグループの報告においても、本研究と同様、定常的オートファジーの低下を示す結果が示されている<sup>27)</sup>。一方、高濃度 MPP<sup>+</sup>は、低濃度 MPP<sup>+</sup>と異なり、界面活性剤可溶性及び不溶性両方の画分において p62/SQSTM1 タンパク質の蓄積を引き起こした (Fig. 7D-F)。高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によって定常的オートファジーが低下していることを考えると、界面活性剤可溶性画分において増加した p62/SQSTM1 タンパク質は、オートファゴソームに隔離されておらず、24 時間以内に不溶性凝集体を形成できなかったものである可能性が考えられる。

本研究では、さらに、低濃度 MPP<sup>+</sup>と高濃度 MPP<sup>+</sup>とでリソソーム障害のメカニズムに違いがあることを明らかにした。低濃度 MPP<sup>+</sup>は、リソソームの酸性度及び密度に影響することなく (Fig. 8A and C)、カテプシン D 活性低下を引き起こした (Fig. 9A)。現在までに、カテプシン D 欠損マウスの脳内においてオートファゴソームの蓄積及び LC3-II タンパク質発現の増加が認められている<sup>57,58)</sup>ことから、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるカテプシン D 活性の低下はオートファゴソーム分解抑制に寄与していることが考えられる。また、MPTP 慢性マウスモデルの脳内において認められているオートファゴソーム<sup>59)</sup>及びリポフスチン含有リソソーム<sup>22)</sup>の蓄積は、カテプシン D 欠損マウスの脳内においても認められている<sup>57,58)</sup>ことから、これらの現象にカテプシン D 活性低下が関与している可能性も考えられる。

現在までに、MPP<sup>+</sup>は、V-ATPase 及びモノアミントランスポーターを介してクロマフィン小胞及びシナプス小胞に取り込まれ、約 100 倍に濃縮されることが報告されている<sup>60)</sup>。このことから、MPP<sup>+</sup>は、V-ATPase やリソソーム膜トランスポーター等を介してリ

ソソームにも濃縮される可能性が考えられる。従って、(10  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>を曝露した細胞において認められたカテプシン D 活性と同程度まで活性低下を引き起こすのに 1,000  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>が必要であったが; Fig. 9B) 低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるカテプシン D 活性低下に MPP<sup>+</sup>とカテプシン D の直接的な結合が関与している可能性が考えられる。

一方、高濃度 MPP<sup>+</sup>はリソソーム密度の減少を引き起こした (Fig. 8B and D) 。同様の結果が 250  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>を曝露した BE-M17 細胞において報告されており、その原因として、リソソームの膜透過性上昇や構造的ダメージの関与が示唆されている<sup>18)</sup>。従って、高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるリソソーム機能低下の主な原因はリソソーム膜破壊等の過激なリダメージによるものである可能性が考えられる。尚、250  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>は、BE-M17 細胞において 24 時間以内に細胞死を引き起こしている<sup>18)</sup>ことから、この細胞は SH-SY5Y 細胞よりも MPP<sup>+</sup>に対する感受性が高いと考えられる。

本研究内容に直接関与する結果ではないが、bafilomycin A<sub>1</sub> はリソソームの密度を顕著に増加させた (Fig. 8C and D) 。現在までに、リソソームストレスによってリソソーム生合成が促進されること<sup>61-63)</sup>、また、障害を受けたリソソームはオートファジーによって除去されること<sup>64,65)</sup>が報告されている。従って、bafilomycin A<sub>1</sub> によって引き起こされたリソソーム密度の増加は、リソソーム生合成促進と障害を受けたリソソームの分解抑制の両作用によって引き起こされたと考えられる。

リソソーム生合成促進物質の効果は、MPP<sup>+</sup>曝露条件に依存して顕著に異なっていた。トレハロースは、200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>誘発オートファジー機能低下 (Figs. 10C and D and 11A-C) 及び細胞死 (Fig. 10A) をわずかではあるが抑制したことから、両者が関連していたことが示唆された。しかし、トレハロースは、10  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>誘発オートファジー機能低下及び細胞死に対して効果を示さなかった (Figs. 10A and C, and D and 11A-C) 。トレハロースは、コントロール細胞において LC3-II タンパク質発現量の増加を引き起こしたことから、リソソーム生合成促進作用以上に強くオートファゴソーム生成促進を引き起こした可能性が考えられる。トレハロースのリソソーム生合成促進作用は、オートファジーフラックスが完全に阻害されている場合において効果的である可能性が考えられる。

一方、トレハロースは、高濃度 MPP<sup>+</sup>誘発オートファジー機能低下及び細胞死に対して全く効果を示さず、むしろ、MPP<sup>+</sup>誘発オートファゴソーム蓄積を促進した (Fig. 10E and F) 。この結果は、リソソーム機能が低下したまま過剰にオートファゴソーム生成が促進された可能性を示唆している。従って、トレハロースは、高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるリソソームの構造的ダメージを 24 時間以内に修復出来ない可能性が考えられる。さ

らに、トレハロースは、高濃度 MPP<sup>+</sup>誘発界面活性剤可溶性及び不溶性 p62/SQSTM1 タンパク質の蓄積を促進した (Fig. 11D-F)。トレハロースは、オートファジー及びリソソーム生合成を制御する主要な転写因子である transcription factor EB (TFEB) の活性化を引き起こすことが報告されている<sup>18,66</sup>。また、p62/SQSTM1 遺伝子発現は、TFEB 過剰発現によって有意に増加する<sup>67</sup>ことから、トレハロースは p62/SQSTM1 の mRNA 及びタンパク質発現を増加させ、オートファゴソームへの隔離を促進している可能性が考えられる。このような過程が、トレハロースによる高濃度 MPP<sup>+</sup>誘発界面活性剤可溶性及び不溶性 p62/SQSTM1 タンパク質蓄積の促進に関与している可能性が考えられる。

ラパマイシンは、コントロール細胞において、LC3-II タンパク質発現量の減少及び細胞生存率の増加を引き起こした。このことから、ラパマイシンは、オートファゴソーム生成促進作用以上に強くリソソーム生合成を促進しており、通常の細胞培養時に起こるリソソームダメージから細胞を保護した可能性が示唆された。また、ラパマイシンは、200  $\mu$ M だけでなく 10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>誘発オートファジー機能低下及び細胞死に対しても効果を示したことから (Fig. 12A, C, and D and 13A-C)、オートファジーフラックス低下の程度に関係なくリソソーム機能を改善できることが示唆された。一方、ラパマイシンは、5 mM MPP<sup>+</sup>誘発界面活性剤可溶性及び不溶性 p62/SQSTM1 タンパク質蓄積を抑制した (Fig. 13D-F)。ラパマイシンは、LC3 タンパク質の脱リン酸化を介して迅速にオートファゴソーム生成を促進することが報告されている<sup>68</sup>)のに対し、トレハロースは、オートファジー関連遺伝子の転写促進を介してオートファゴソーム生成を促進する可能性が示唆されている<sup>18,66,67,69</sup>。従って、ラパマイシンによるオートファゴソーム生成促進作用は、トレハロースよりも早い作用である可能性が考えられる。ラパマイシンは、オートファジーが正常に機能していると考えられる高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露期間の初期において、p62/SQSTM1 タンパク質の分解を促進している可能性が考えられる。しかし、ラパマイシンが 2.5 mM MPP<sup>+</sup>誘発 p62/SQSTM1 タンパク質蓄積を改善できなかった理由は現時点において不明である (Fig. 13D-F)。

本研究では、MPP<sup>+</sup>の曝露条件によってオートファジー機能低下のメカニズムに違いがあることを明らかにした。また、低濃度 MPP<sup>+</sup>がリソソーム内酸性度に依存しない新規のメカニズムによってオートファジーを阻害することを示し、持続的かつ弱いリソソームダメージが PD 発症メカニズムの根底にある可能性を提示した。現在知られている数少ないリソソーム生合成促進物質であるトレハロース及びラパマイシンは、低濃度 MPP<sup>+</sup>誘発オートファジー機能低下及び細胞死に対して部分的に効果的であったものの、

その効果ははっきりとしたものではなかった (Figs. 10-13)。また、他のグループの研究においてもこれらの化合物が MPP<sup>+</sup>誘発細胞死に対して効果を示さないことが報告されている<sup>27)</sup>。神経変性疾患の根本的治療法開発において、オートファジー機能の強化は強力な治療戦略の一つである<sup>70,71)</sup>が、より選択的かつ強力な化合物の開発が必要であるように思われる。以上より、低濃度 MPP<sup>+</sup>誘発 PD モデル細胞は、PD 発症におけるリソソーム機能低下の詳細なメカニズム解析や新規オートファジー分解促進薬の開発において有用なツールとなることが期待される (Table 5)。

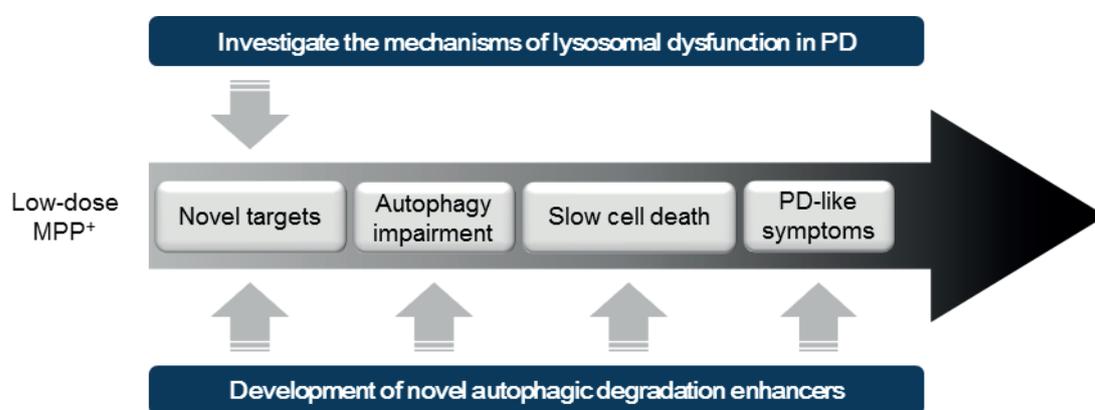


Table 5. Strategy for future development.

## 第7章 実験方法

### Chemicals

MPP<sup>+</sup> iodide (D048) and D-(+)-trehalose dihydrate (T9531) were purchased from Sigma-Aldrich, bafilomycin A<sub>1</sub> (BVT-0252) from Biovotica, and rapamycin (R-5000) from LC laboratories.

### Cell culture

The human neuroblastoma cell line SH-SY5Y (American Type Culture Collection ATCC, CRL-2266) was cultured in DMEM (Nissui, 05919) supplemented with 5% FBS (Biosera, FB-1061), 5% horse serum (Gibco, 16050-122), 0.58 mg/mL L-glutamine (Sigma-Aldrich, G8540), 2 mg/mL NaHCO<sub>3</sub> (Kanto Chemical, 37116-00), 100 units/mL penicillin (Meiji Seika Pharma), and 100 µg/mL streptomycin (Meiji Seika Pharma) at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator, as previously described.<sup>72,73)</sup> Cell culture medium was changed every 2 days, and cells were passaged when they reached approximately 80% confluence. Cells were seeded at a density of  $5.30 \times 10^4$  cells/176 µL/cm<sup>2</sup> and incubated overnight at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. The cell culture medium was changed just before MPP<sup>+</sup> exposure in all experiments.

### Long-term MPP<sup>+</sup> exposure

Long-term MPP<sup>+</sup> exposure was performed according to previously described methods<sup>74,75)</sup> with minor modifications. Briefly, SH-SY5Y cells were seeded in 9-cm dishes (Thermo Scientific, 150350), incubated overnight at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator, and exposed to 10 µM MPP<sup>+</sup>. Cells were passaged while maintaining the cell density ratio of 10 µM MPP<sup>+</sup>-exposed cells to control cells and incubated in fresh cell culture medium containing 10 µM MPP<sup>+</sup> every 48 h. For cell viability measurements, cells were seeded in a 96-well microplate (BD Biosciences, 353072) with fresh cell culture medium containing 10 µM MPP<sup>+</sup> and incubated for 48 h at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator.

## Cell viability assay

Cell viability was evaluated by the water-soluble tetrazolium salt (WST)-1 assay, which is based on the cleavage of WST-1 to formazan by mitochondrial dehydrogenase in viable cells, according to previously described methods<sup>72,73)</sup> with minor modifications. SH-SY5Y cells were seeded in a 96-well microplate, incubated overnight at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator, and exposed to several concentrations of MPP<sup>+</sup> for different time periods. After MPP<sup>+</sup> exposure, the cell culture medium was replaced by WST-1 reagent [5 mM 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-1, Dojindo, W201) and 0.2 mM 1-methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate (Dojindo, M003) in PBS without calcium and magnesium (PBS(-)) containing 8 g/L NaCl (Wako, 191-01665), 0.2 g/L KCl (Nacalai Tesque, 28538-75), 2.88 mg/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (Nacalai Tesque, 31722-45), and 0.2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Nacalai Tesque, 28721-55)] diluted 1:12 in cell culture medium. After incubation for 2 h at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator, the absorbance of the converted dye was measured at 415 nm using a microplate spectrophotometer (Thermo Scientific, MultiSkan Go).

Cell viability was also evaluated by calcein-acetoxymethyl (AM) assay, which is based on the cleavage of calcein-AM to calcein by cytosolic esterases in viable cells. The manufacturer's protocol was adapted to a 96-well microplate format to enable high-throughput analysis. SH-SY5Y cells were seeded in a 96-well black microplate (PerkinElmer, 6005660), incubated overnight, and exposed to 10 or 200 μM MPP<sup>+</sup> for different time periods. After MPP<sup>+</sup> exposure, cells were washed with PBS(-), incubated with 2 μM calcein-AM (Dojindo, C396) in PBS(-) for 15 min at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator, and the fluorescence of converted dye measured at Ex/Em = 490/515 nm using a multimode plate reader (PerkinElmer, EnSpire). Measurement height was optimized, and fluorescence intensities from 100 point/well were averaged at each well.

## Protein extraction and western blotting

Protein extraction and western blot analysis were performed according to previously described methods<sup>72,73,75-77)</sup> with minor modifications. SH-SY5Y cells were seeded in 6-cm dishes (Thermo Scientific, 150288), and incubated overnight at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. Cells were exposed to MPP<sup>+</sup> as indicated, washed with PBS(-), scraped off the dishes,

and suspended in PBS(-). Cell suspensions were centrifuged at 10,000 rpm for 5 min at 4°C, and the pellets lysed in 100 µL TNE buffer containing 1% Nonidet P-40 [20 mM Tris (Nacalai Tesque, 35434-05) hydrochloride (Tris-HCl, pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA (Nacalai Tesque, 15105-35), 1% Nonidet P-40 (Nacalai Tesque, 23640-94), 50 mM NaF (Sigma-Aldrich, 450022), 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Wako, 198-09752), and 1% protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque, 25955-11)]. Cell lysates were sonicated on ice, rotated for 20 min at 4°C, and centrifuged at 13,500 rpm for 15 min. The supernatants were collected as 1% Nonidet P-40-soluble fractions. The pellets were further lysed in 50 µL TNE buffer containing 2% SDS [20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2% SDS (Nacalai Tesque, 31607-65), 50 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, and 1% protease inhibitor cocktail], sonicated on ice, rotated for 20 min at room temperature (RT), and collected as 1% Nonidet P-40-insoluble fractions. Subsequently, 1% Nonidet P-40-soluble and -insoluble cell lysates were mixed with 1/5 volume of 5 × SDS sample buffer [250 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.01% Bromophenol blue (Nacalai Chemicals, 05808), 50% glycerol (Nacalai Tesque, 17045-65), 10% SDS, and 12.5% 2-mercaptoethanol (Nacalai Tesque, 21938-82)], respectively, and heated at 99°C for 5 min. Total protein in 1% Nonidet P-40-soluble cell lysates was quantified using a bicinchoninic acid Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, 23227). Equivalent amounts of total protein (5–15 µg) from each sample were separated by SDS-PAGE and blotted onto PVDF membranes (Bio-Rad, 162-0177). For experiments measuring both 1% Nonidet P-40-soluble and -insoluble fractions from the same culture, equal volumes of sample were loaded per lane. Membranes were blocked with 5% skim milk (Morinaga Milk) in TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl) plus 0.1% polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20, Nacalai Tesque, 35624-15) (TBST) for 1 h at RT. Membranes were probed with rabbit anti-LC3 antibody (1:4,000, MBL, PM036), mouse anti-p62/SQSTM1 antibody (1:4,000, MBL, M162-3), or mouse anti-β-actin antibody (1:20,000, Sigma-Aldrich, A5441) diluted in 5% skim milk for 1 h at RT or overnight at 4°C. Membranes were washed three times with TBST and incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:8,000, Sigma-Aldrich, A9169) or HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody (1:8,000 or 1:40,000, Sigma-Aldrich, A9044) for 1 h at RT. Immunolabeled membranes were washed three times with TBST and incubated with Chemi-Lumi One L (Nacalai Tesque, 07880-70) or Chemi-Lumi One Ultra (Nacalai Tesque, 11644-40). Chemiluminescence signals were detected using a luminescent image analyzer (GE Healthcare,

ImageQuant LAS 4000), and band intensities quantified by densitometric analysis using ImageQuant TL software (GE Healthcare).

### Immunocytochemistry

Immunocytochemical staining was performed according to previously described methods<sup>75,78)</sup> with minor modifications. SH-SY5Y cells were seeded in poly-D-lysine-coated four-well chamber slides (BD Biosciences, 354577) and incubated overnight at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. Cells were exposed to MPP<sup>+</sup> as indicated, washed with PBS(-), and fixed with 4% paraformaldehyde (Wako, 162-16065) in PBS(-) for 15 min at 37°C. Fixed cells were washed with PBS(-), permeabilized with 100 µg/mL digitonin (Wako, 043-21376) in PBS(-) for 15 min at RT, blocked with 3% BSA (Nakalai Tesque, 01863-48) in PBS(-) containing 0.1 % Tween 20 (PBST) for 30 min, and incubated with a rabbit anti-LC3 antibody (1:800, MBL, PM036) or rabbit anti-LAMP1 antibody (1:200, Cell Signaling, 9091) diluted in 1% BSA in PBST overnight at 4°C. Labeled cells were then washed three times with PBST, incubated with Alexa Fluor 555-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:800, Life Technologies, A31629) diluted in PBST with 1% BSA for 1 h at RT in the dark, washed three times with PBST, incubated with 600 nM DAPI (Life Technologies, D1306) in PBS(-) for 5 min at RT in the dark, washed two times in PBS(-), and mounted in Prolong Diamond antifade reagent (Life Technologies, P36961). After incubation overnight, slides were observed under a confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss, LSM5 PASCAL). Images were processed using ZEN 2012 software (Carl Zeiss, black edition), and whole image contrast adjusted using ImageJ software (NIH).

### LysoTracker Red DND-99 staining

LysoTracker Red DND-99 staining was performed according to the manufacturer's instructions. SH-SY5Y cells were seeded in advanced tissue culture-treated four-chamber CELLview 3.5-cm glass-bottom dishes (Greiner Bio-One, 627975) and incubated overnight at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. Cells were exposed to MPP<sup>+</sup>, washed with DMEM/nutrient mixture F-12 Ham without phenol red (DMEM/F12, Sigma-Aldrich, D6434), and incubated with 200 nM LysoTracker Red DND-99 (Life Technologies, L7528) in DMEM/F12 for 30 min at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. Labeled cells were washed

with DMEM/F12, placed in DMEM/F12, and observed under confocal laser scanning microscope. Images were processed using ZEN 2012 software and whole image contrast adjusted using ImageJ.

### Cathepsin D activity assay

Cathepsin D activity was measured using the SensoLyte 520 Cathepsin D Assay Kit (AnaSpec, AS-72170) according to the manufacturer's instructions. The assay is based on the increase in fluorescence intensity when the FRET substrate is cleaved by active cathepsin D. SH-SY5Y cells were seeded in 6-cm dishes, incubated overnight at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator, and exposed to 10 or 200 μM MPP<sup>+</sup> for 48 h. Cells were scraped off the dishes, suspended in PBS(-), and centrifuged at 500 × *g* for 5 min. Pellets were lysed in 50 μL assay buffer containing DTT [1M DTT (Component F) diluted 1:200 in assay buffer (Component D)]. Cell suspensions were rotated for 10 min at 4°C, and centrifuged at 2,500 × *g* for 10 min. The supernatants were used as cell extracts. Total protein in cell extract samples was quantified using the Bradford Assay (Bio-Rad, 500-0006), and 0.25 μg/50 μL of protein from each sample diluted in assay buffer containing DTT was added to a nonbinding surface (NBS)-treated 96-well black microplate (Corning, 3650). When evaluating the direct effect of MPP<sup>+</sup> on cathepsin D activity, 0.25 μg/40 μL of control cell extract was directly exposed to 10 μL of MPP<sup>+</sup> (1–1,000 μM) and added to an NBS-treated 96-well black microplate. The plate was preincubated for 10 min at 37°C, and 50 μL of cathepsin D substrate solution [cathepsin D substrate (Component A) diluted 1:100 in assay buffer containing DTT] was added to each well. The plate was shaken gently for 30 s, and fluorescence intensity was measured at Ex/Em = 490 nm/520 nm at 5-min intervals for 90 min at 37°C using a multimode plate reader (PerkinElmer, EnSpire). Fluorescence intensity at 30 min (when linearity was obtained) was defined as the activity of cathepsin D.

### Statistics

Data are expressed as mean ± SD from at least three independent experiments. Significant differences between multiple independent groups were determined by one-way analysis of variance followed by Newman–Keuls post hoc test using Mini-StatMate software (Atoms). A value of *P* < 0.05 was considered statistically significant.

## 参考文献

1. Dauer W, Przedborski S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**, 889–909
2. de Lau LM, Breteler MM. (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **5**, 525–535.
3. Lin MK, Farrer MJ. (2014) Genetics and genomics of Parkinson's disease. *Genome Med.* **6**, 48
4. Cook C, Stetler C, Petrucelli L. (2012) Disruption of protein quality control in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2**, a009423
5. Mizushima N, Komatsu M. (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728–741
6. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**, 880–884
7. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885–859
8. Zhang H, Duan C, Yang H. (2015) Defective autophagy in Parkinson's disease: lessons from genetics. *Mol. Neurobiol.* **51**, 89–104
9. Dagda RK, Das Banerjee T, Janda E. (2013) How Parkinsonian toxins dysregulate the autophagy machinery. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 22163–22189
10. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* **219**, 979–980
11. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* **3**, 1301–1306
12. McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, Di Monte DA. (2002) Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat.

*Neurobiol. Dis.* **10**, 119–127

13. Kotake Y, Tasaki Y, Makino Y, Ohta S, Hirobe M. (1995) 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline as a parkinsonism-inducing agent: a novel endogenous amine in mouse brain and parkinsonian CSF. *J. Neurochem.* **65**, 2633–2638
14. Goldman SM. (2014) Environmental toxins and Parkinson's disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **54**, 141–164
15. Kotake Y, Ohta S. (2003) MPP<sup>+</sup> analogs acting on mitochondria and inducing neuro-degeneration. *Curr. Med. Chem.* **10**, 2507–2516
16. Zhu JH, Horbinski C, Guo F, Watkins S, Uchiyama Y, Chu CT. (2007) Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *Am. J. Pathol.* **170**, 75–86
17. Wong AS, Lee RH, Cheung AY, Yeung PK, Chung SK, Cheung ZH, Ip NY. (2011) Cdk5-mediated phosphorylation of endophilin B1 is required for induced autophagy in models of Parkinson's disease. *Nat. Cell Biol.* **13**, 568–579
18. Dehay B, Bové J, Rodríguez-Muela N, Perier C, Recasens A, Boya P, Vila M. (2010) Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **30**, 12535–12544
19. Lim J, Kim HW, Youdim MB, Rhyu IJ, Choe KM, Oh YJ. (2011) Binding preference of p62 towards LC3-II during dopaminergic neurotoxin-induced impairment of autophagic flux. *Autophagy* **7**, 51–60
20. Meredith GE, Rademacher DJ. (2011) MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update. *J. Parkinsons Dis.* **1**, 19–33
21. Petroske E, Meredith GE, Callen S, Totterdell S, Lau YS. (2001) Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment. *Neuroscience* **106**, 589–601
22. Meredith GE, Totterdell S, Petroske E, Santa Cruz K, Callison RC Jr, Lau YS. (2002) Lysosomal malfunction accompanies alpha-synuclein aggregation in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res.* **956**, 156–165
23. Meredith GE, Totterdell S, Potashkin JA, Surmeier DJ. (2008) Modeling PD pathogenesis in mice: advantages of a chronic MPTP protocol. *Parkinsonism Relat. Disord.* **14**, Suppl. 2, S112–S115
24. Korecka JA, Eggers R, Swaab DF, Bossers K, Verhaagen J. (2013) Modeling early

- Parkinson's disease pathology with chronic low dose MPTP treatment. *Restor. Neurol. Neurosci.* **31**, 155–167
25. Fornai F, Schlüter OM, Lenzi P, Gesi M, Ruffoli R, Ferrucci M, Lazzeri G, Busceti CL, Pontarelli F, Battaglia G, et al. (2005) Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 3413–3418
  26. Gibrat C, Saint-Pierre M, Bousquet M, Lévesque D, Rouillard C, Cicchetti F. (2009) Differences between subacute and chronic MPTP mice models: investigation of dopaminergic neuronal degeneration and alpha-synuclein inclusions. *J. Neurochem.* **109**, 1469–1482
  27. Garcia-Garcia A, Anandhan A, Burns M, Chen H, Zhou Y, Franco R. (2013) Impairment of Atg5-dependent autophagic flux promotes paraquat- and MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis but not rotenone or 6-hydroxydopamine toxicity. *Toxicol. Sci.* **136**, 166–182
  28. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* **19**, 5720–5728
  29. Mizushima N, Yoshimori T. (2007) How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542–545
  30. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, et al. (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**, 445–544
  31. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. (2010) Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313–326
  32. Sarkar S, Ravikumar B, Rubinsztein DC. (2009) Autophagic clearance of aggregate-prone proteins associated with neurodegeneration. *Methods Enzymol.* **453**, 83–110
  33. Klionsky DJ, Elazar Z, Seglen PO, Rubinsztein DC. (2008) Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy* **4**, 849–850
  34. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T. (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* **171**, 603–614
  35. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of

- ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**, 24131–24145
36. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, et al. (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* **131**, 1149–1163
  37. Komatsu M, Ichimura Y. (2010) Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett.* **584**, 1374–1378
  38. Gamerding M, Hajieva P, Kaya AM, Wolfrum U, Hartl FU, Behl C. (2009) Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J.* **28**, 889–901
  39. Lamark T, Perander M, Outzen H, Kristiansen K, Øvervatn A, Michaelsen E, Bjørkøy G, Johansen T. (2003) Interaction codes within the family of mammalian Phox and Bem1p domain-containing proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 34568–34581
  40. Appelqvist H, Wäster P, Kågedal K, Öllinger K. (2013) The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *J. Mol. Cell Biol.* **5**, 214–226
  41. Schneider L, Zhang J. (2010) Lysosomal function in macromolecular homeostasis and bioenergetics in Parkinson's disease. *Mol. Neurodegener.* **5**, 14
  42. Dehay B, Martinez-Vicente M, Caldwell GA, Caldwell KA, Yue Z, Cookson MR, Klein C, Vila M, Bezdard E. (2013) Lysosomal impairment in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **28**, 725–732
  43. Benes P, Vetvicka V, Fusek M. (2008) Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **68**, 12–28
  44. Qiao L, Hamamichi S, Caldwell KA, Caldwell GA, Yacoubian TA, Wilson S, Xie ZL, Speake LD, Parks R, Crabtree D, et al. (2008) Lysosomal enzyme cathepsin D protects against alpha-synuclein aggregation and toxicity. *Mol. Brain* **1**, 17
  45. Cullen V, Lindfors M, Ng J, Paetau A, Swinton E, Kolodziej P, Boston H, Saftig P, Woulfe J, Feany MB, et al. (2009) Cathepsin D expression level affects alpha-synuclein processing, aggregation, and toxicity in vivo. *Mol. Brain* **2**, 5
  46. Sevlever D, Jiang P, Yen SH. (2008) Cathepsin D is the main lysosomal enzyme involved in the degradation of alpha-synuclein and generation of its carboxy-terminally truncated species. *Biochemistry* **47**, 9678–9687
  47. Crabtree D, Dodson M, Ouyang X, Boyer-Guittaut M, Liang Q, Ballestas ME, Fineberg

- N, Zhang J. (2014) Over-expression of an inactive mutant cathepsin D increases endogenous alpha-synuclein and cathepsin B activity in SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* **128**, 950–961
48. Chu Y, Dodiya H, Aebischer P, Olanow CW, Kordower JH. (2009) Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiol. Dis.* **35**, 385–398
49. Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. (2007) Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* **282**, 5641–5652
50. Noda T, Ohsumi Y. (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* **273**, 3963–3966
51. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. (2010) mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* **584**, 1287–1295
52. Demarchi F, Bertoli C, Copetti T, Tanida I, Brancolini C, Eskelinen EL, Schneider C. (2006) Calpain is required for macroautophagy in mammalian cells. *J. Cell. Biol.* **175**, 595–605
53. Bezard E, Dovero S, Bioulac B, Gross CE. (1997) Kinetics of nigral degeneration in a chronic model of MPTP-treated mice. *Neurosci. Lett.* **234**, 47–50
54. Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, Kleinert R, Prinz M, Aguzzi A, Denk H. (2002) p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am. J. Pathol.* **160**, 255–263
55. Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. (2011) Alteration of autophagosomal proteins (LC3, GABARAP and GATE-16) in Lewy body disease. *Neurobiol. Dis.* **43**, 690–697
56. Sarkar S, Korolchuk V, Renna M, Winslow A, Rubinsztein DC. (2009) Methodological considerations for assessing autophagy modulators: a study with calcium phosphate precipitates. *Autophagy* **5**, 307–313
57. Koike M, Nakanishi H, Saftig P, Ezaki J, Isahara K, Ohsawa Y, Schulz-Schaeffer W, Watanabe T, Waguri S, Kametaka S, et al. (2000) Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons. *J. Neurosci.* **20**, 6898–6906
58. Koike M, Shibata M, Waguri S, Yoshimura K, Tanida I, Kominami E, Gotow T, Peters C, von Figura K, Mizushima N, et al. (2005) Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am. J. Pathol.*

167, 1713–1728

59. Meredith GE, Totterdell S, Beales M, Meshul CK. (2009) Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **219**, 334–340
60. Moriyama Y, Amakatsu K, Futai M. (1993) Uptake of the neurotoxin, 4-methylphenylpyridinium, into chromaffin granules and synaptic vesicles: a proton gradient drives its uptake through monoamine transporter. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 271–277
61. Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS, et al. (2009) A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* **325**, 473–477
62. Settembre C, Zoncu R, Medina DL, Vetrini F, Erdin S, Erdin S, Huynh T, Ferron M, Karsenty G, Vellard MC, et al. (2012) A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* **31**, 1095–1108
63. Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A. (2013) Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 283–296
64. Hung YH, Chen LM, Yang JY, Yang WY. (2013) Spatiotemporally controlled induction of autophagy-mediated lysosome turnover. *Nat. Commun.* **4**, 2111
65. Maejima I, Takahashi A, Omori H, Kimura T, Takabatake Y, Saitoh T, Yamamoto A, Hamasaki M, Noda T, Isaka Y, Yoshimori T. (2013) Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J.* **32**, 2336–2347
66. Porter K, Nallathambi J, Lin Y, Liton PB. (2013) Lysosomal basification and decreased autophagic flux in oxidatively stressed trabecular meshwork cells: implications for glaucoma pathogenesis. *Autophagy* **9**, 581–594
67. Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, Erdin SU, Huynh T, Medina D, Colella P, et al. (2011) TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* **332**, 1429–1433
68. Cherra SJ 3rd, Kulich SM, Uechi G, Balasubramani M, Mountzouris J, Day BW, Chu CT. (2010) Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J. Cell Biol.* **190**, 533–539
69. Castillo K, Nassif M, Valenzuela V, Rojas F, Matus S, Mercado G, Court FA, van Zundert B, Hetz C. (2013) Trehalose delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by

enhancing autophagy in motoneurons. *Autophagy* **9**, 1308–1320

70. Emanuele E. (2014) Can trehalose prevent neurodegeneration? Insights from experimental studies. *Curr. Drug Targets* **15**, 551–557
71. Bové J, Martínez-Vicente M, Vila M. (2011) Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 437–452
72. Isomura M, Kotake Y, Masuda K, Miyara M, Okuda K, Samizo S, Sanoh S, Hosoi T, Ozawa K, Ohta S. (2013) Tributyltin-induced endoplasmic reticulum stress and its Ca(2+)-mediated mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **272**, 137–146
73. Contu VR, Kotake Y, Toyama T, Okuda K, Miyara M, Sakamoto S, Samizo S, Sanoh S, Kumagai Y, Ohta S. (2014) Endogenous neurotoxic dopamine derivative covalently binds to Parkinson's disease-associated ubiquitin C-terminal hydrolase L1 and alters its structure and function. *J. Neurochem.* **130**, 826–838
74. Betarbet R, Canet-Aviles RM, Sherer TB, Mastroberardino PG, McLendon C, Kim JH, Lund S, Na HM, Taylor G, Bence NF, et al. (2006) Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. *Neurobiol. Dis.* **22**, 404–420
75. Kohta R, Kotake Y, Hosoya T, Hiramatsu T, Otsubo Y, Koyama H, Hirokane Y, Yokoyama Y, Ikeshoji H, Oofusa K, et al. (2010) 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline binds with tubulin beta, a substrate of parkin, and reduces its polyubiquitination. *J. Neurochem.* **114**, 1291–1301
76. Nakatsu Y, Kotake Y, Takishita T, Ohta S. (2009) Long-term exposure to endogenous levels of tributyltin decreases GluR2 expression and increases neuronal vulnerability to glutamate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **240**, 292–298
77. Nakatsu Y, Kotake Y, Takai N, Ohta S. (2010) Involvement of autophagy via mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition in tributyltin-induced neuronal cell death. *J. Toxicol. Sci.* **35**, 245–251
78. Ishida K, Kotake Y, Miyara M, Aoki K, Sanoh S, Kanda Y, Ohta S. (2013) Involvement of decreased glutamate receptor subunit GluR2 expression in lead-induced neuronal cell death. *J. Toxicol. Sci.* **38**, 513–521
79. 廣兼 裕司 パーキンソン病関連神経毒 MPP<sup>+</sup>による Parkin 活性阻害と基質タンパク質 tubulin の蓄積 (修士論文)

80. 宮良 政嗣 パーキンソン病関連神経毒 MPP<sup>+</sup>低濃度曝露によるオートファジー誘導 (修士論文)

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご指導を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究院生体機能分子動態学研究室 太田 茂 教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、多くの直接のご指導、ご助言をいただきました広島大学大学院医歯薬保健学研究院生体機能分子動態学研究室 古武 弥一郎 准教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、多くのご助言、ご討論をいただきました広島大学大学院医歯薬保健学研究院生体機能分子動態学研究室 佐能 正剛 助教に深く感謝いたします。

学位（博士）取得にあたり、主査として、多くのご助言、ご討論をいただきました広島大学大学院医歯薬保健学研究院治療薬効学研究室 小澤 孝一郎 教授に深く感謝いたします。

学位（博士）取得にあたり、審査委員として、多くのご助言、ご討論をいただきました広島大学大学院医歯薬保健学研究院核酸分析化学研究室 紙谷 浩之 教授、薬効解析科学研究室 森岡 徳光 准教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、常に実験環境を整えてくださり、多くのご助言、ご討論をしていただきました広島大学大学院医歯薬保健学研究科生体機能分子動態学研究室の諸先輩方、同級生、後輩の皆様に深く感謝いたします。

最後に、学生生活を支え、見守ってくれた家族に深く感謝いたします。