

# 博士論文

## 低濃度 MPP<sup>+</sup>によるグルコース飢餓を介した オートファジー機構の異常

広島大学 大学院医歯薬保健学研究科 薬科学専攻

医療薬剤学研究室

平成 25 年度入学 坂本 修一朗

主指導教員 高野 幹久

## 目次

略語	4
第1章 序論	7
第2章 低濃度及び高濃度 MPP <sup>+</sup> 曝露による細胞死の比較	13
第1節 緒言	13
第2節 低濃度及び高濃度 MPP <sup>+</sup> 曝露による細胞生存率の経時変化	13
第3節 細胞密度が低濃度及び高濃度 MPP <sup>+</sup> 曝露による細胞死へ及ぼす影響	13
第4節 考察	15
第3章 低濃度及び高濃度 MPP <sup>+</sup> 曝露が細胞のグルコース消費へ及ぼす影響	16
第1節 緒言	16
第2節 低濃度及び高濃度 MPP <sup>+</sup> 曝露が解糖系活性へ及ぼす影響	17
第3節 グルコース添加が低濃度及び高濃度 MPP <sup>+</sup> 曝露による細胞死へ及ぼす影響	18
第4節 考察	21
第4章 低濃度 MPP <sup>+</sup> 曝露によるグルコース飢餓がオートファゴソーム分解阻害へ及ぼす影響	25
第1節 緒言	25
第2節 低濃度 MPP <sup>+</sup> による LC3-II 発現量の経時変化	28
第3節 グルコース添加が低濃度 MPP <sup>+</sup> 曝露による LC3-II の増加へ及ぼす影響	28
第4節 グルコース添加が低濃度 MPP <sup>+</sup> 曝露による p62 の増加へ及ぼす影響	28

第5節	考察	32
<b>第5章</b>	<b>低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露がオートファジー誘導へ及ぼす影響</b>	<b>33</b>
第1節	緒言	33
第2節	低濃度 MPP <sup>+</sup> 曝露がグルコース飢餓によるオートファジー誘導シグナルへ及ぼす影響	37
第3節	低濃度 MPP <sup>+</sup> 曝露が LC3-II ターンオーバーへ及ぼす影響	37
第4節	低濃度 MPP <sup>+</sup> 曝露が Atg12-Atg5-Atg16L1 複合体へ及ぼす影響	38
第5節	考察	43
<b>第6章</b>	<b>オートファジー誘導の抑制が低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死へ及ぼす影響</b>	<b>45</b>
第1節	緒言	45
第2節	Atg5 ノックダウンが低濃度 MPP <sup>+</sup> 曝露による細胞死へ及ぼす影響	46
第3節	3-MA が低濃度 MPP <sup>+</sup> 曝露による細胞死へ及ぼす影響	46
第4節	考察	51
<b>第7章</b>	<b>総括</b>	<b>53</b>
<b>第8章</b>	<b>実験方法</b>	<b>55</b>
	<b>参考文献</b>	<b>62</b>
	<b>謝辞</b>	<b>73</b>

## 略語

3-MA: 3-methyladenine

$\alpha$ -KGDH:  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase

ACC: acetyl-CoA carboxylase

AMP : adenosine monophosphate

AMPK: AMP-activated protein kinase

ATG: autophagy-related protein

ATP: adenosine triphosphate

CMA: chaperone-mediated autophagy

BCA: bicinchoninic acid

BSA: bovine serum albumin

CoA: coenzyme A

DAnergic: dopaminergic

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

DBS: deep brain stimulation

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DPP-4: dipeptidyl peptidase-4

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

ERK: extracellular signal regulated protein kinases

GLP-1: glucagon-like peptide 1

HRP: horseradish peroxidase

Hsc70: heat shock cognate 70 kDa protein

IGF-1: insulin like growth factor 1

JNK: c-Jun N-terminal kinase

LAMP 2A: lysosomal-associated membrane protein type 2A

LB: Lewy body

LC3: microtubule-associated protein 1 light chain 3

LIR: LC3-interacting region

MPDP<sup>+</sup>: 1-methyl-4-phenyl-5,6-dihydropyridinium

MPP<sup>+</sup>: 1-methyl-4-phenylpyridinium

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

mTOR: mammalian target of rapamycin

NP-40: Nonidet P-40

p38 MAPK: mitogen-activated protein kinase

PAGE: poly-acrylamide gel electrophoresis

PB1: phox and Bem 1

PBS: phosphate buffered saline

PD: Parkinson's disease

PI: phosphatidylinositol

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

PI3P: phosphatidylinositol 3-phosphate

PINK1: phosphatase and tensin homolog (PTEN) -induced putative kinase 1

PVDF: polyvinylidene difluoride

S.D.: standard deviation

SDS: sodium dodecyl sulfate

siRNA: small interfering ribonucleic acid

SNpc: substantia nigra pars compacta

TBS: tris buffered saline

TCA: tricarboxylic acid

UBA: ubiquitin-associated

UCHL1: ubiquitin C-terminal hydrolase-L1

ULK1: Unc-51-like kinase

UPS: ubiquitin-proteasome system

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

Vps: vacuolar protein sorting protein

WST-1: water-soluble tetrazolium -1

## 第1章 序論

パーキンソン病 (PD) は 1817 年に、James Parkinson により発見された神経変性疾患であり、その 4 大主症状として振戦、無動、筋固縮、姿勢反射障害が挙げられる。また、その症状の進行は緩やかであり、発症から末期に至るまで 15~20 年ほどかかる。病理学的特徴としては中脳黒質 (SNpc) に存在するドパミン神経選択的な変性・脱落やレビー小体と呼ばれる異常タンパク質凝集体の脳内蓄積が挙げられる。

現在の治療法はドパミン補充療法が主流である。しかしながら、これは対症療法に過ぎず、根本的な治療法は確立されていない。この原因として、PD 発症メカニズムが未だに解明されていないことが挙げられる。PD は 60 歳以上人口の約 1% が発症している。さらに、85 歳以上人口では約 5% まで増加するため、加齢に伴い発症する疾患であると考えられる (de Lau and Breteler, 2006; Wood-Kaczmar et al., 2006)。社会の高齢化に伴い、今後も患者数の増加が予想されるため、PD の発症メカニズム解明及び根治療法の確立は急務である。

PD は家族性と孤発性の 2 種類に大別できる。家族性 PD は遺伝子異常が原因で発症するものであり、これまでに約 20 種類の PD 関連遺伝子が同定されている (Kalineri et al., 2016)。これらの遺伝子はミトコンドリア品質管理、タンパク質分解、メンブレントラフィックに関わるものが多く、家族性 PD の発症メカニズムの理解は進みつつある (Table 1)。しかし、家族性 PD の患者数は全 PD 患者数の 5% 程度に過ぎず、大部分は孤発性であると考えられている。孤発性 PD は、疾患感受性遺伝子、加齢、環境因子などが関与する多因子疾患であると考えられている。 $\alpha$ -シヌクレインは PD 関連遺伝子である SNCA にコードされているタンパク質であり、家族性・孤発性 PD どちらにおいても認められるレビー小体の主たる構成成分でもある。このことから家族性 PD と孤発性 PD の発症メカニズムには共通点があると考えられるが、孤発性 PD の発症メカニズムはまだ不明な点が多い。

**Table 1. Summary of PD genes**

	Gene	Functions	LB
Park1/4	SNCA	Membrane trafficking	+
Park2	Parkin	Mitochondria, UPS, E3-ligase	±
Park3	Unknown	Unknown	+
Park5	UCHL1	Ubiquitin hydrolase	?
Park6	PINK1	Mitochondria, kinase	+
Park7	DJ-1	Mitochondria, oxidative stress	±
Park8	LRRK2	Membrane trafficking, kinase	±
Park9	ATP13A2	Lysosome	?
Park10	Unknown	Unknown	?
Park11	GIGYF6	IGF-1 signaling	?
Park12	Unknown	Unknown	?
Park13	HTRA 2 /OMI	Mitochondria, protease	?
Park14	PLA2G6	Phospholipid enzyme	+
Park15	FBXO7	UPS, E3-ligase	+
Park16	Rab7L1	Membrane trafficking	

(Hatano et al., 2009, Table 1 を改変)



孤発性 PD に関する研究では、MPTP やロテノンを始めとする神経毒が頻用されている。MPTP は合成麻薬生成の際の副生成物であり、ヒトに投与することで PD 様症状を惹起することが初めて報告された化学物質である。さらにその際、黒質ドパミン神経の脱落、レビー小体陽性など、病理学的にも PD と酷似した特徴が認められたことも報告されている (Davis et al., 1979)。MPTP は PD 様モデル動物の作製に頻用されている。これまでに、MPTP 投与により作製された PD 様モデル動物を用いることで、深部脳刺激法 (DBS) の原理が解明された (Bergman et al., 1990)。また、PD 症状の緩和作用を持つ化合物の探索にも用いられており、PD の治療法の開発に関する研究に大きく貢献している。

一方で MPTP は、PD におけるミトコンドリア機能異常と黒質ドパミン神経変性の関係の解明にも貢献してきた (Cleeter et al., 1992)。このことから、MPTP によるドパミン神経細胞死のメカニズム解明は、孤発性 PD 発症メカニズム解明の一助となることが期待できる。MPTP は生体内に取り込まれた後、血液脳関門を通過し、グリア細胞に取り込まれる。グリア細胞内でモノアミン酸化酵素 B によって MPDP<sup>+</sup> となり、その後、非酵素的に MPP<sup>+</sup> へ変換される。MPP<sup>+</sup> はグリア細胞から放出され、ドパミントランスポーターを介してドパミン神経へ取り込まれる。その後、MPP<sup>+</sup> はミトコンドリア呼吸鎖複合体 I を阻害することで細胞傷害性を発揮すると考えられている (Cleeter et al., 1992, Dauer and Przedborski, 2003)。しかしながら、MPTP による細胞障害メカニズムの全容は未だ不明である。

MPTP 投与により PD 様モデル動物を作製する際には、マウス (C57BL6) が汎用されている。これまでに様々な MPTP 投与方法が考案されており (Meredith et al., 2011)、急性投与、亜急性投与、慢性投与モデルの 3 種類に大別できる (Table 2)。また、MPTP により惹起される症状はその投与計画により異なる。急性投与モデルでは、40%程度の中脳黒質ドパミン神経がネクローシス様の細胞死により脱落する (Jackson-Lewis, 1995)。運動機能の低下は認められるが、残存する神経細胞に異常タンパク質凝集物は認められない。亜急性投与モデルは、急性投与モデルと比較して脱落する中脳黒質ドパミン神経の割合が少

ないが、アポトーシス様の細胞死が認められる (Tatton and Kish, 1997)。急性投与モデル同様、亜急性投与モデルにおいても異常タンパク質凝集体は認められない。急性・亜急性投与モデルではドパミン神経の脱落が認められるが、MPTP 投与終了後、ドパミン神経数の回復が認められる (Petroske et al., 2001)。慢性投与モデルとしては、ミニポンプを用いた持続投与と probenecid 併用 (MPTP/p) の 2 種類が挙げられる。ミニポンプ投与では 75% 程度の中脳黒質ドパミン神経が脱落する。さらに、残存するドパミン神経には、レビー小体の主たる構成成分である  $\alpha$ -シヌクレインの凝集体が認められる。MPTP/p 投与は、投与終了直後で 50% 程度の中脳黒質ドパミン神経が脱落する。さらに、投与終了後 3 週間では、70% 程度が脱落する。MPTP/p 投与モデルでは、初期段階はアポトーシス様細胞死が認められる。しかし、その後ネクローシス様の細胞死も認められる (Novikova et al., 2006; Meredith et al., 2009)。残存する神経細胞には  $\alpha$ -シヌクレインの凝集体が認められる。MPTP/p 投与では、投与終了後 6 ヶ月以内ではドパミン神経の脱落状態が維持されている (Petroske et al., 2001)。Probenecid は腎臓及び脳内からの MPP<sup>+</sup>排泄を阻害すると考えられており、MPTP と併用することで慢性的なドパミン神経細胞死を誘導すると考えられている。一方で、probenecid は、それ自体が細胞内 ATP レベルを低下させる効果を有している (Alvarez-Fischer et al., 2013)。MPTP (MPP<sup>+</sup>) はミトコンドリア呼吸鎖阻害により細胞内 ATP レベルを低下させるが、probenecid はこの細胞内 ATP の低下を促進することで細胞死を引き起こすという報告もなされている (Alvarez-Fischer et al., 2013)。このように、現状では probenecid が PD モデルマウスの作製に及ぼす影響の全容は不明である。しかし、MPTP/p 投与 (慢性投与モデル) による PD モデル動物作製では慢性進行性の細胞死、 $\alpha$ -シヌクレイン凝集体などが認められるため、急性・亜急性投与モデルより実際の PD の病態を再現できている可能性が高いと考えられる。

**Table 2. Summary of the protocol for MPTP mouse model**

Model	Administration	Time to greatest DAergic cell loss	DAergic cell loss in SNpc (%)	Protein inclusions
Acute*	20~30 mg/ kg/ 2hr 4 times in a day	12 hr	40%	×
Sub- chronic*	15~30 mg/ kg/ day for 5 days	12 hr	24~40%	×
Chronic (mini- pumps)	46 mg/ kg/ day for 28 days	21 days	75~80%	○
Chronic* (MPTP/p)	25 mg/ kg/ 3.5 days for 5 weeks + probenecid (250 mg/ kg/ day)	3 weeks post treatment	50% post- treatment (70% 3 weeks post- treatment)	○

\*腹腔内投与により作製

(Meredith et al., 2011, Table 1 を改変)

MPTP はドパミントランスポーターによって細胞に取り込まれないため、培養細胞を用いた PD 研究では MPP<sup>+</sup>が使用されている。MPP<sup>+</sup>を用いた研究も広くおこなわれており、ミトコンドリア呼吸阻害、細胞内 ATP の低下、カルシウム恒常性の破綻、酸化ストレス、アポトーシスなど、多くの毒性の仮説が提唱されてきた (Schmidt and Ferger, 2001; Dauer and Przedborski, 2003)。しかしながら、これら仮説の多くは高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露により 24 時

間以内に誘導される急性細胞死から提唱されている。前述の通り、PD で認められる細胞死は慢性進行性であると考えられている。さらに、MPTP においても、急性投与モデルよりも慢性投与モデルの方が適切なモデルであると考えられる。これらのことから、高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による急性細胞死は実際の病態を正確に反映できていない可能性が考えられる。我々のグループでは、より正確な病態の反映を目指し、従来よりも緩やかな細胞死を誘発する低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露モデルを確立した (Miyara et al., 2016)。しかしながら、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露モデルによる細胞死メカニズムの全容は不明である。そこで本研究では低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死メカニズムのさらなる解明を目的とした。

## 第2章 低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死の比較

### 第1節 緒言

以前の報告で、我々は 10、200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup>の 48 時間曝露を低濃度 MPP<sup>+</sup>モデル、2.5、5 mM MPP<sup>+</sup>の 24 時間曝露を高濃度 MPP<sup>+</sup>モデルと定義し、比較をおこなった。その結果、どちらのモデルにおいてもオートファゴソーム（細胞内成分分解機構オートファジーの過程で認められる構造物）の分解抑制が認められたが、その抑制メカニズムは異なることを示した (Miyara et al., 2016)。しかしながら、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死メカニズムは不明な点が多い。本章では、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による毒性のさらなる特徴を見出すために、低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞生存率への影響を WST-1 法により比較した。

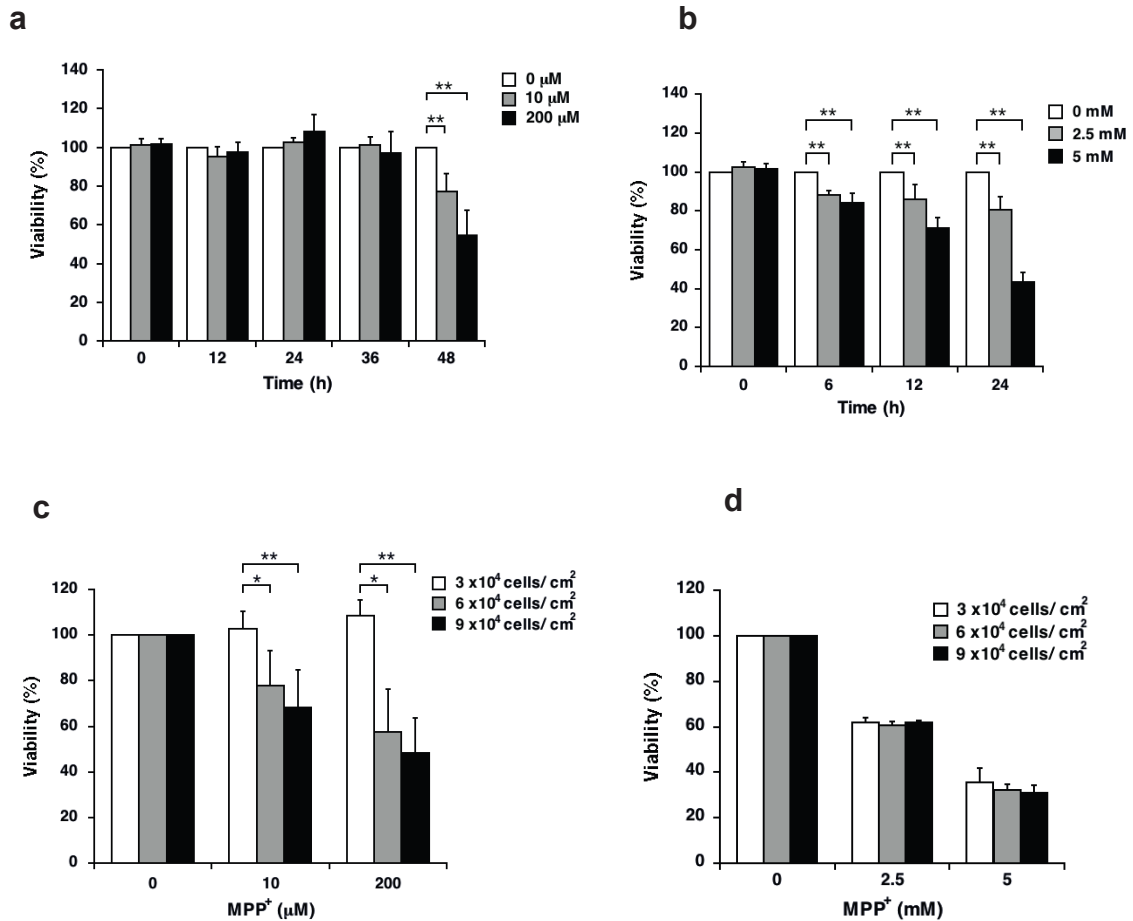
### 第2節 低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞生存率の経時変化

初めに、低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞生存率の経時変化を確認した。その結果、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露において、曝露後 36 時間以内では細胞死が認められず、曝露後 48 時間で初めて有意な細胞死が認められた (Fig. 1a)。一方で、高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露においては曝露後 6 時間から既に有意な細胞死が認められた (Fig. 1b)。

### 第3節 細胞密度が低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死へ及ぼす影響

我々は低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による毒性のさらなる特徴を探索した。培地量は一定にし、播種する細胞の密度のみを変更した結果、我々は低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 48 時間における細胞死が細胞密度依存的に促進されることを見出した。本研究では、通常、播種する細胞の密度を  $6.04 \times 10^4$  cells/well と定めている。この密度よりも低い  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種した群では、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 48 時間における細胞死が認められなかった (Fig. 1c)。しかし高濃度

MPP<sup>+</sup>曝露では、同様に細胞密度の調節をおこなっても、24 時間後における細胞死に変化は認められなかった (Fig. 1d)。



**Figure 1.** The difference of toxic effect between mild and acute MPP<sup>+</sup> exposure.

(a, b) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200 μM MPP<sup>+</sup> up to 48 h or 2.5 and 5 mM MPP<sup>+</sup> up to 24 h, and cell viability was determined using a WST-1 assay at various time points. (c, d) The various densities of SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200 μM MPP<sup>+</sup> for 48 h or 2.5 and 5 mM MPP<sup>+</sup> for 24 h, and cell viability was determined using a WST-1 assay. Data are expressed as the mean ± standard deviation (S.D.) from at least three independent experiments. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01.

## 第4節 考察

細胞生存率の観点から2種類のMPP<sup>+</sup>曝露モデルを比較した結果、低濃度MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死は、高濃度MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死と異なるメカニズムで誘導されている可能性が示唆された。低濃度MPP<sup>+</sup>曝露では細胞密度依存的な細胞死の促進が認められたことから、細胞間相互作用または細胞外環境要因がその毒性に関与する可能性が考えられる。播種する細胞の密度を高くすることで、それに伴い細胞死が認められる時間が早まった (data not shown)。一方で、細胞密度を低くした際には、曝露後48時間で細胞死が認められなかった。以上の結果から、低濃度MPP<sup>+</sup>の毒性には培地中の特定の成分が関与しており、細胞密度が高くなることでその成分の培地中含量が低下した結果、細胞死が促進されると推察できる。この仮説を検証するために、次章では低濃度MPP<sup>+</sup>の毒性と培地中成分の関係について調べた。

## 第3章 低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露が細胞のグルコース消費へ及ぼす影響

### 第1節 緒言

低濃度 MPP<sup>+</sup>モデルでは曝露後 48 時間で初めて細胞死が認められた。また、同モデルにおいて細胞密度依存的な細胞死の促進が認められた。以上のことから、低濃度 MPP<sup>+</sup>による細胞死には培地中の特定の成分が関与しており、曝露後 48 時間にその成分が枯渇することで細胞死が引き起こされるという仮説を立てた。低濃度 MPP<sup>+</sup>では曝露後 36 時間以内に細胞死が認められなかったため、曝露後 36 時間で MPP<sup>+</sup>を含む新鮮な培地に交換することによる細胞死への影響を評価した。その結果、培地交換をおこなうことで低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死が完全に抑制された (data not shown)。このことから、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死には特定の培地中成分の枯渇が関与することが示唆された。

細胞の ATP 産生は酸化的リン酸化と解糖系でおこなわれている。好気条件下では主にミトコンドリアによる酸化的リン酸化を介して ATP が産生される。MPP<sup>+</sup>はドパミントランスポーターを介してドパミン神経選択的に取り込まれ、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I を阻害するため (Cleeter et al., 1992)、その結果、酸化的リン酸化による ATP 産生も抑制される。初代培養神経細胞へ MPP<sup>+</sup>曝露するとクレアチンリン酸と細胞内 ATP が低下する一方で、乳酸の増加とグルコース消費が増加することが報告されている (Marini and Nowak, 2000)。これは、MPP<sup>+</sup>曝露により酸化的リン酸化が抑制された結果、解糖系による ATP 産生が代償的に亢進されていることを示唆している。以上のことから、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露においても解糖系を介したグルコース消費が促進されており、グルコース飢餓に陥っている可能性が考えられる。そこで本章では MPP<sup>+</sup>曝露による細胞のグルコース消費への影響を確



認した。更に、グルコース消費と MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死の関係についても評価をおこなった。

## 第 2 節 低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露が解糖系活性へ及ぼす影響

細胞のグルコース消費を確認するために、MPP<sup>+</sup>曝露による培地中グルコース量の経時変化を市販の測定キットを用いて評価した。その結果、200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>曝露群では 24 時間後から培地中グルコース量の有意な減少が認められ、10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>曝露群においては 36 時間後から有意な減少が認められた。さらに、細胞死が認められる、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 48 時間においては 10、200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>の両曝露群で培地中グルコースがほとんど枯渇していた (Fig. 2a)。一方で、高濃度 MPP<sup>+</sup>において曝露後 24 時間以内に有意な培地中グルコース量の減少は認められず、さらに細胞死が認められた 6 時間においても培地中のグルコースは十分に残存していた (Fig. 2b)。

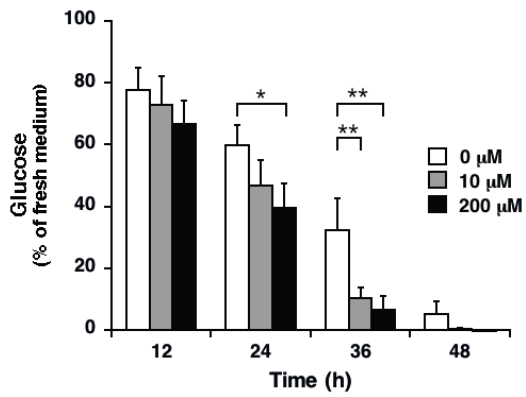
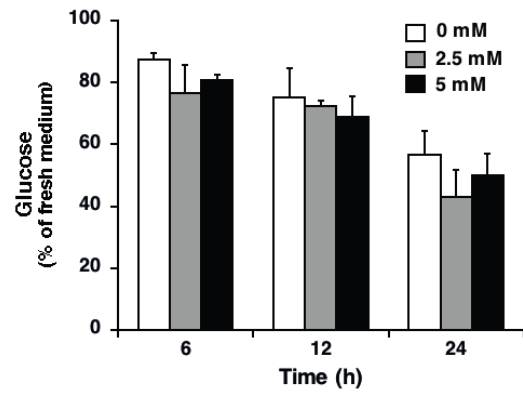
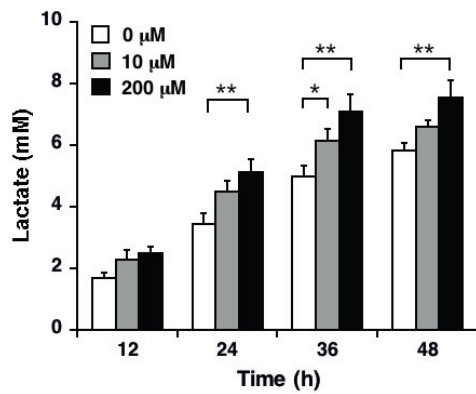
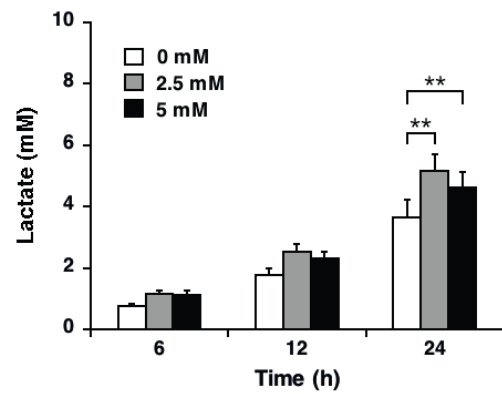
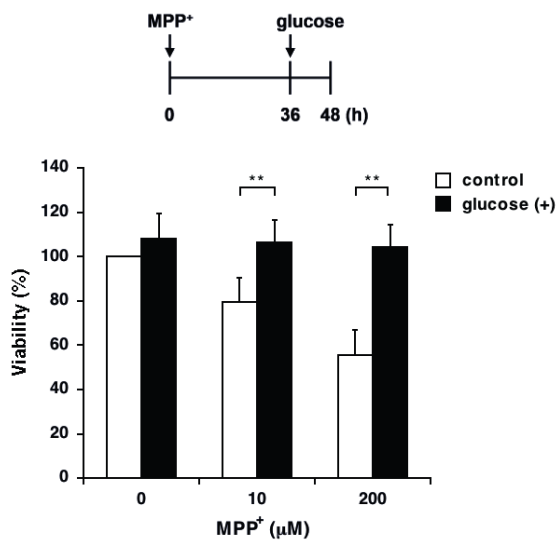
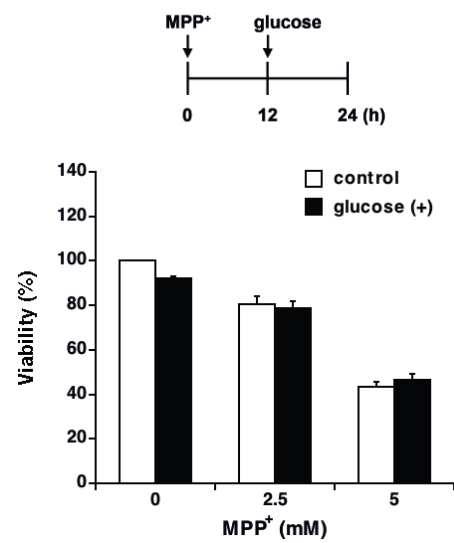
低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露により培地中のグルコース量が有意に減少したことから、解糖系が亢進している可能性が考えられる。グルコースが解糖系により代謝された結果、ピルビン酸が産生される。その後、ピルビン酸はアセチル CoA となり TCA 回路で利用されるが、一部のピルビン酸は乳酸脱水素酵素により乳酸へとされ、細胞外へ放出される。したがって、培地中に存在するグルコース・乳酸量の変化を確認することで解糖系が亢進されているか否かを評価することができる。そこで次に、MPP<sup>+</sup>曝露による培地中乳酸量の経時変化を市販のキットを用いて測定した。その結果、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露において、200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>曝露群では 24 時間後から培地中乳酸量の有意な増加が認められ、10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>曝露群では 36 時間後から有意な増加が認められた (Fig. 2c)。この結果から、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露では、培地中グルコースの減少に伴い、培地中乳酸量が増加していることが明らかとなった。また、高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露においても 24 時間後に培地中乳酸量の有意な増加が認められた (Fig. 2d)。

しかしながら、高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露においては、24 時間以内に培地中グルコース量の有意な減少は認められていなかった。

### 第 3 節 グルコース添加が低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死へ及ぼす

#### 影響

低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露において培地中グルコースの有意な減少が認められたため、MPP<sup>+</sup>曝露途中にグルコースを添加することで細胞死が抑制されるか否かを検討した。低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 36 時間で MPP<sup>+</sup>を含む新鮮な培地に交換することで細胞死が完全に抑制されたため、グルコースの添加も低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 36 時間でおこなうことにした。また、新鮮な培地に含まれるグルコースは約 5.5 mM であるため、グルコースの添加は終濃度が 5.5 mM となるようおこなった。その結果、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死はグルコースを添加することで完全に抑制された (Fig. 2e)。低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露において、グルコース添加後 12 時間で細胞生存率を測定したため、高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露においても細胞生存率を測定する 12 時間前にグルコースの添加をおこなった。しかしながら、高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露においてはグルコース添加による細胞死の有意な抑制は認められなかった (Fig. 2f)。

**a****b****c****d****e****f**

**Figure 2. The difference of energy metabolism between the cells exposed to mild or acute MPP<sup>+</sup>.**

(a, b) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> up to 48 h or 2.5 and 5 mM MPP<sup>+</sup> up to 24 h, and the amount of glucose in the culture medium was measured using a commercial assay kit at several time points. (c, d) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> up to 48 h or 2.5 and 5 mM MPP<sup>+</sup> up to 24 h, and the amount of extracellular lactate was measured using a commercial assay kit at several time points. (e, f) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> for 48 h with 5.5 mM glucose for the last 12 h or 2.5 and 5 mM MPP<sup>+</sup> for 24 h with 5.5 mM glucose for the last 12 h. Cell viability was determined by a WST-1 assay. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. from at least three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

## 第4節 考察

MPP<sup>+</sup>はドパミン神経特異的に取り込まれ、ミトコンドリア複合体Iを阻害することで酸化的リン酸化を抑制する (Cleeter et al., 1992)。また、

種々の培養細胞において、グルコース含有量を増加した培地で培養することで MPP<sup>+</sup>曝露による細胞内 ATP の低下、及び細胞死が軽減されることが報告されている (Chalmers-Rodman et al., 1999; González-Polo et al., 2003; Mazzio et al., 2003; Williams et al., 2007)。我々は今回、MPP<sup>+</sup>の低濃度曝露ではグルコース飢餓による細胞死が誘導されるが、高濃度曝露ではグルコース飢餓非依存的なメカニズムで細胞死が誘導されることを明らかにした。低濃度 MPP<sup>+</sup>では、グルコース添加を曝露後 36 時間でおこなったにも関わらず、曝露後 48 時間における細胞死は完全に抑制されていた。このことからグルコース飢餓は、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死の初期段階で認められる現象であると推察できる。

また、我々は以前、10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>曝露後 48 時間で  $\alpha$ -シヌクレインが細胞内に凝集・蓄積していることを報告した (Miyara et al., 2016)。Fornai らは、ミニポンプを用いた MPTP 慢性投与により作製した PD 様モデルマウスの脳内においてグルコースの消費が促進されていること、さらに  $\alpha$ -シヌクレインの凝集体が認められることを報告している (Fornai et al., 2005)。以上の共通点から低濃度 MPP<sup>+</sup>モデルは、MPTP 慢性投与モデルのマウス脳内で起きる現象を再現していることが期待できる。

PD 関連遺伝子の1つである Parkin は、常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソニズムの患者において種々の遺伝子変異が報告されている。Parkin に変異を加えられたショウジョウバエの幼生や Parkin を欠損させた培養細胞では、ミトコンドリア呼吸が阻害され、解糖系が亢進することが報告されている (Zhang et al., 2011; Vincent et al., 2012)。また、Parkin は  $\alpha$ -シヌクレインの分解に関与すると考えられており、Parkin 遺伝子の変異及び欠損は  $\alpha$ -シヌクレインの凝集を引き起こすことが報告されている (Chung et al., 2001; Shimura et al.,

2001)。同様の報告は Parkin 以外の PD 関連遺伝子である PINK1、DJ-1 においてもなされている。PINK1 または DJ-1 のノックアウトにより解糖系が亢進される (Yao et al., 2011; Requejo-Aguilar et al., 2014 and 2015; Agnihotri et al., 2016)。また、これら 2 つの遺伝子も  $\alpha$ -シヌクレインの凝集に関与することが報告されている (Batelli et al., 2008; Liu et al., 2009)。Parkin、PINK1、DJ-1 はミトコンドリア品質管理に関わる遺伝子である。以上のことから、低濃度 MPP<sup>+</sup>モデルは、ミトコンドリア品質管理に関わる PD 関連遺伝子の異常が細胞へ及ぼす影響を再現している可能性が考えられる。

低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露、MPTP 慢性投与、または特定の PD 関連遺伝子の異常により、解糖系が亢進される。しかしながら、実際の PD 患者の脳内では解糖系の促進は認められず、グルコース利用能が低下していると考えられている (Borghammer, 2012; Dunn et al., 2013)。PD において、運動機能の低下が認められる段階では、既に黒質ドパミン神経が半分程度まで減少していることが知られている。このことから、PD 患者の脳内において解糖系の亢進が認められない理由として以下の 2 つの可能性が考えられる。

1. 解糖系の亢進は運動機能の低下が認められるよりも早い段階でのみ起きている。

PD が発症していると診断される際には、既に運動機能の低下が認められている。解糖系の活性化は運動機能の低下が認められるよりも早い段階でのみ認められ、その後、症状が進行するとグルコース利用能が低下する可能性が考えられる。

2. 実験結果の判断が適切でない。

PD 患者の脳内では残存する神経細胞が少ないために、解糖系が活性化しているにも関わらず、グルコース利用能が低下しているかのような結果が得られている可能性がある。

現状では、PD 患者の脳内におけるグルコース代謝異常の全容は不明である。一方で、糖

尿治療薬である GLP-1 受容体アゴニストや DPP-4 阻害剤は、PD に対する治療効果を持つという報告があり、実際、GLP-1 受容体アゴニストに関する治験が Phase II 試験まで進められている (Athauda and Foltynie, 2016)。一方で、GLP-1 受容体アゴニストの神経保護メカニズムは明らかとなっていない。GLP-1 受容体アゴニストや DPP-4 阻害剤は細胞のグルコース取り込みを促進するため、細胞のグルコース飢餓を解消することで細胞保護効果をもたらしている可能性がある。更に、Bellucci らは、マウス中脳神経細胞の初代培養において、グルコース飢餓が  $\alpha$ -シヌクレインの凝集を誘発することを報告しており (Bellucci et al., 2008)、PD におけるレビー小体形成にグルコース飢餓が関与する可能性が考えられる。以上のことから、PD 患者の脳内ではそのメカニズムは不明であるが、グルコース飢餓に陥っている可能性がある。また、そのグルコース飢餓が、レビー小体形成を伴うドパミン神経脱落に関与することが推察できる。

高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露群では、24 時間以内に培地中グルコース量の有意な減少が認められなかった。しかし、高濃度 MPP<sup>+</sup>では曝露後 6 時間で既に細胞死が認められ、その後、時間依存的に細胞死が進行していた。高濃度 MPP<sup>+</sup>によりグルコース消費が促進されなかった場合、生細胞が減少しているために、曝露後 24 時間における培地中グルコース量はコントロール群と比べて高く維持されるはずである。しかしながら、高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による培地中グルコース量の減少の抑制は認められなかった。この結果は、高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露においてもグルコース消費が促進されている可能性を示唆している。一方で、高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 6 時間では培地中グルコースが約 80% 残存しているにも関わらず細胞死が認められた。また、MPP<sup>+</sup>曝露途中にグルコースを添加しても細胞死の抑制が認められなかった。以上の結果から、高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露は低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露と同様に細胞のグルコース消費を促進するが、グルコース飢餓とは異なる現象が原因で細胞死が誘導されていると推察できる。

高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露において、24 時間以内に培地中グルコースの有意な減少は認められなかったにも関わらず、培地中乳酸量は曝露後 24 時間で有意に増加していた。TCA 回路に関わ

る酵素である $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素 ( $\alpha$ -KGDH) の活性は、MPP<sup>+</sup>濃度依存的に阻害されることが報告されている (Mizuno et al., 1987; Mcnaught et al., 1995)。高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露では $\alpha$ -KGDH が強力に阻害され、TCA 回路が働かなくなった結果、乳酸が蓄積していると推察できる。



## 第4章 低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるグルコース飢餓がオートファゴソーム分解阻害へ及ぼす影響

### 第1節 緒言

細胞内では、タンパク質が絶えず合成・分解されている。細胞内のタンパク質分解機構として、ユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) とオートファジーが挙げられる。UPS は、不要となったタンパク質へユビキチンを付加し、ポリユビキチン化されたタンパク質をプロテアソームにより分解する機構である。PD 関連遺伝子である Parkin、UCHL-1 は UPS の進行に関わる。さらに、レビー小体にユビキチンが含まれていることが報告されており (Kuzuhara et al., 1988; Kuusisto et al., 2003)、UPS の異常は PD 発症に関与すると考えられている。

一方で、オートファジーの異常と PD 発症の関係も近年着目されてきている。オートファジーは不要となったタンパク質や細胞質オルガネラを、リソソームを介して分解する機構である (Mizushima et al., 2011)。オートファジーは、マクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジー (CMA)、ミクロオートファジーの3種類に分別される。これら3つの中で、マクロオートファジーが最も主要な機構であると考えられており、一般的にオートファジーと呼ばれるものはマクロオートファジーのことを指す。本研究においても、今後、オートファジーとだけ表記しているものはマクロオートファジーを意味する。マクロオートファジーでは、まず細胞質に隔離膜という脂質二重膜が出現する。隔離膜は細胞質成分を取り囲むことでオートファゴソームを形成する。その後、オートファゴソームはリソソームと融合し、オートリソソームとなる。その結果、リソソームに含まれていた加水分解酵素が隔離された細胞質成分を分解する (Fig. 3)。マクロオートファジーは非選択的な細胞質成分の分解機構であると考えられてきた。しかし近年、不良ミトコンドリアを選択的に分解する

マイトファジーや、細胞内へ侵入してきた細菌を標的とするゼノファジーなど、高い選択性をもったマクロオートファジーも報告されている (Klionsky et al., 2016)。このことからマクロオートファジーは細胞内の恒常性維持において重要な役割を担っていると考えられる。CMA はオートファゴソーム形成を介さないオートファジーである。Hsc70 シャペロンタンパク質が KFERQ 様モチーフを持つタンパク質選択的にその高次構造をほどく。高次構造をほどかれたタンパク質は、リソソーム膜上に存在する LAMP2A を介してリソソームに取り込まれる (Tasset and Cuervo, 2016)。ミクロオートファジーもまた、オートファゴソーム形成を介さない分解機構であり、リソソーム膜が内側へと陥入されることで細胞質に存在する小分子を直接取り込む。

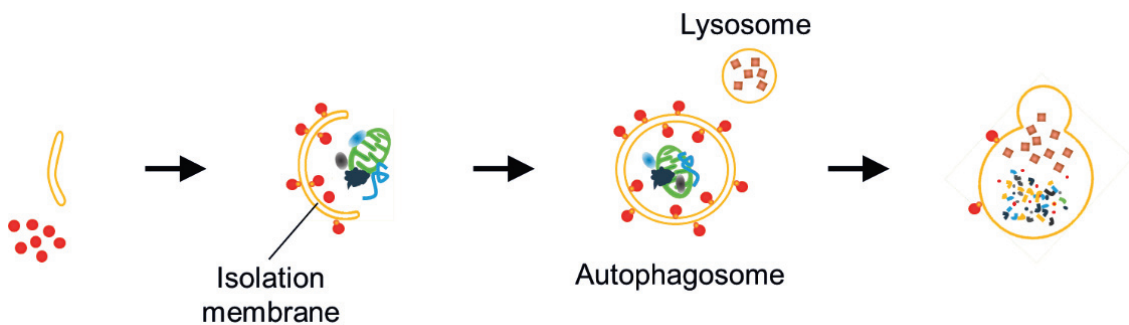


Figure 3. Scheme of autophagic degradation machinery

これまでに PD 患者の脳内でオートファゴソームの蓄積が認められている (Anglade et al., 1997)。さらに、脳特異的オートファジー欠損マウスでは、脳内にタンパク質凝集体が蓄積すること、神経細胞死及び神経変性疾患様症状が認められることが報告されている (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006)。これらのことから、オートファジーの異常と PD 発症には密接な関係があると考えられる。しかしながら、オートファジーの異常の詳細を *in*

*vivo* で確認する手法が確立されていないために、オートファジー異常と PD 発症の関係は不明な点が多い。

これまでに、細胞への MPP<sup>+</sup>曝露がオートファゴソームの細胞内蓄積を誘発することを複数のグループが報告している。しかしながら、その蓄積の原因としてオートファジー誘導を主張しているグループ (Zhu et al., 2007 and 2012; Wong et al., 2011; Rodríguez-Blanco et al., 2012; Nopparat et al., 2014) と、オートファゴソームの分解阻害を主張しているグループがあり (Dehay et al., 2010; Lim et al., 2011)、オートファゴソームが細胞内に蓄積する原因は解明されていない。この矛盾は MPP<sup>+</sup>によるオートファジーへの影響が、曝露条件や細胞種によって異なることが原因である可能性が考えられる。そこで以前、我々のグループは、低濃度 MPP<sup>+</sup>がオートファジー機構へ及ぼす影響を調べた。その結果、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 48 時間においてオートファゴソーム分解阻害によりオートファゴソームが細胞内に蓄積することを明らかにした (Miyara et al., 2016)。

Atg8 としても知られる LC3 は、オートファジーの進行に必須のタンパク質である。LC3 は C 末端のアルギニン残基をシステインプロテアーゼである Atg4 によって切断されることで細胞質型の LC3-I となる (Kirisako et al., 2000; Kabeya et al., 2004)。その後、Atg7 と Atg3 を介してホスファチジルエタノールアミンと結合し LC3-II となる (Ichimura et al., 2000)。LC3-II は Atg5-Atg12-Atg16L1 複合体により隔離膜へと付加される (Mizushima et al., 2003; Matsushita et al., 2007)。LC3-II はオートファゴソーム上にのみ局在するため、LC3-II はオートファゴソームマーカーと見なされている (Kabeya et al., 2000)。

p62/sequestosome-1 (p62) はオートファジー選択的に分解される基質である。p62 は LIR モチーフと UBA ドメインを有する。UBA ドメインを介してユビキチン化されたタンパク質やオルガネラなどと結合し、LIR モチーフを介して LC3 と結合することで、特定の物質を選択的にオートファゴソームへ運び分解を促す (He and Klionsky, 2009)。

我々の以前の報告では、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 48 時間でオートファゴソーム分解が阻害さ

れた結果、LC3-II と p62 が細胞内に蓄積することを見出している (Miyara et al., 2016)。本章では、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるグルコース飢餓が LC3-II、p62 の細胞内蓄積に關与するか否かを調べることで、オートファゴソーム分解阻害への影響を評価した。

## 第 2 節 低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による LC3-II 発現量の経時変化

低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露により認められるオートファゴソームの蓄積にグルコース飢餓が關与する場合、オートファゴソームの蓄積はグルコース飢餓と同時、あるいはそれ以降に認められると考えられる。そこで、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるオートファゴソームの蓄積が認められる時間を知るために、オートファゴソームマーカーである LC3-II の細胞内発現量の経時変化をウェスタンブロットにより確認した。その結果、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 36 時間以内では LC3-II 発現量の変化は認められず、48 時間から有意な増加が認められた (Fig. 4a)。

## 第 3 節 グルコース添加が低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による LC3-II の増加へ及ぼす影響

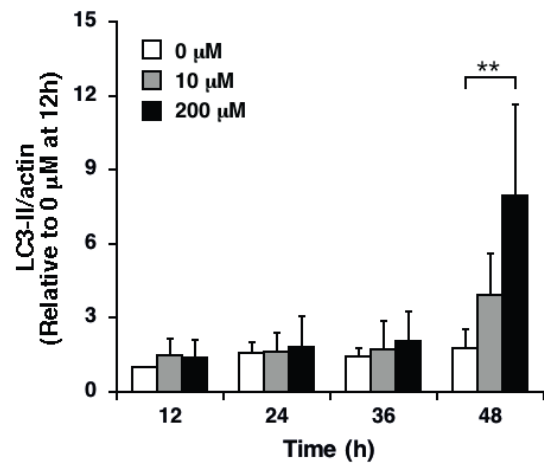
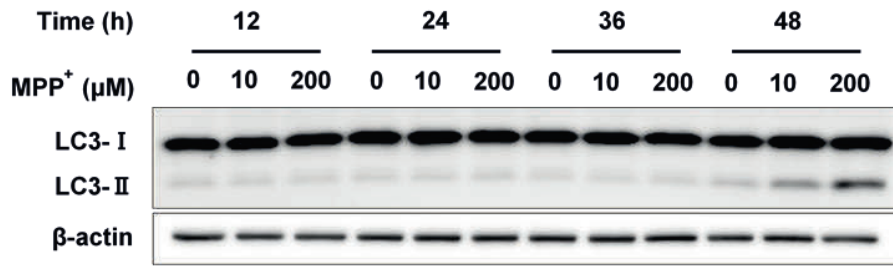
低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 36 時間で終濃度が 5.5 mM となるようにグルコースを添加し、その 12 時間後にタンパク質回収をおこなった。ウェスタンブロットの結果、低濃度 MPP<sup>+</sup>単独曝露で認められた LC3-II 発現の増加は、グルコースを添加することで有意に抑制された (Fig. 4b)。

## 第 4 節 グルコース添加が低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による p62 の増加へ及ぼす影響

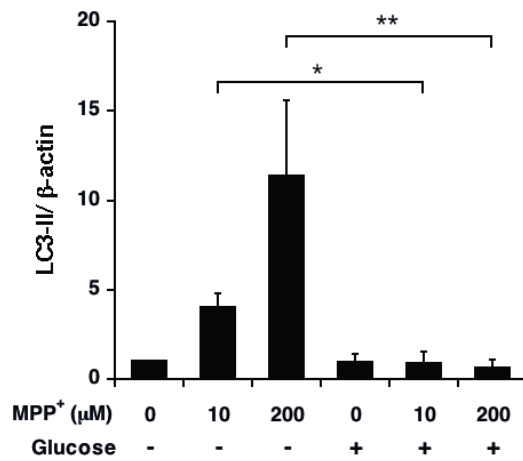
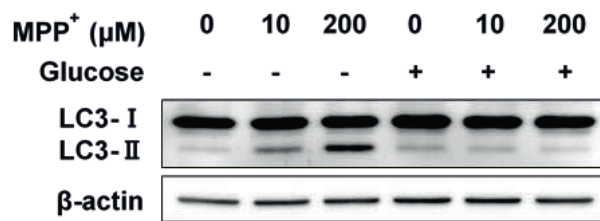
p62 においても LC3-II と同様の検討をおこなった。p62 は N 末端側に PB1 ドメインを含むため、高い凝集性を有する。そのため、細胞内で過剰に蓄積した p62 は凝集し、Triton X-100 や NP-40 といった界面活性剤では可溶化できなくなることがある (Fujita et al., 2011; Lim et al., 2011)。我々も以前、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 48 時間における p62 の増加が、

1% NP-40 含有バッファー可溶性画分では認められず、1% NP-40 含有バッファー不溶性画分において認められることを報告した (Miyara et al., 2016)。そこで本研究においても 1% NP-40 含有バッファー不溶性画分に含まれる p62 の変化について検討をおこなった。ウェスタンブロットの結果、低濃度 MPP<sup>+</sup> 単独曝露で認められた 1% NP-40 含有バッファー不溶性画分における p62 発現の増加が、グルコース添加により有意に抑制された。一方で、1% NP-40 含有バッファー可溶性画分では、グルコース添加により MPP<sup>+</sup> の濃度依存的な若干の増加傾向が認められたが、有意な変化ではなかった (Fig. 4c)。

a



b



C

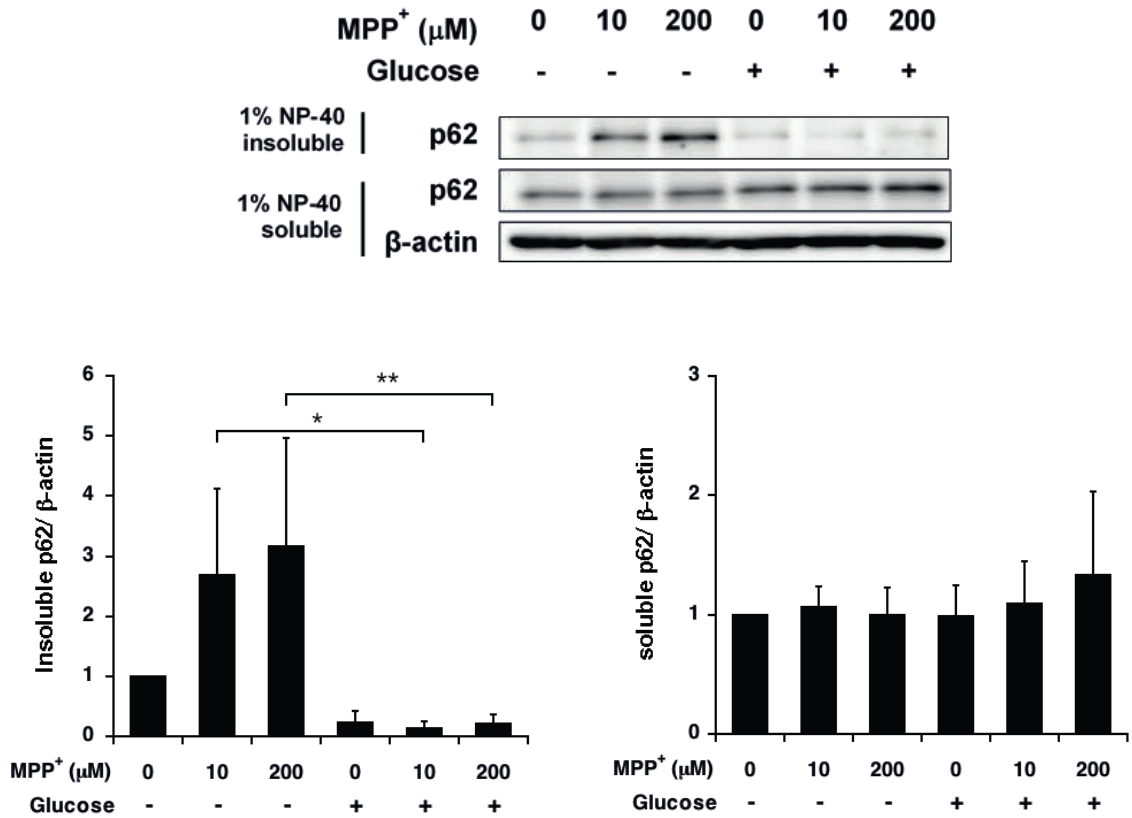


Figure 4. Influence of glucose supplementation on mild MPP<sup>+</sup> exposure-induced autophagosome accumulation.

(a) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200 μM MPP<sup>+</sup> up to 48 h, and the level of LC3-II expression was detected by western blotting at several time points. (b) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200 μM MPP<sup>+</sup> for 48 h with or without 5.5 mM glucose for the last 12 h, and the level of LC3-II expression was detected by western blotting. (c) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200 μM MPP<sup>+</sup> for 48 h with or without 5.5 mM glucose for the last 12 h, and the level of p62 expression was detected by western blotting. Data are expressed as the mean ± S.D. from at least three independent experiments. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01.

## 第5節 考察

異常タンパク質の凝集体からなるレビー小体は、PD またはレビー小体型認知症患者の脳内で認められる。また、PD 患者の脳内において、LC3 と p62 がレビー小体に含まれていることが報告されており (Zatloukal et al., 2002; Kuusisto et al., 2003; Higashi et al., 2011; Tanji et al., 2011)、オートファジー異常がレビー小体の形成に関与する可能性がある。

今回、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露途中にグルコースを添加することで、LC3-II と 1% NP-40 含有バッファー不溶性画分の p62 の増加が抑制された。これらの結果から、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるグルコース飢餓がオートファゴソームの蓄積を誘発することが示唆された。我々のグループは以前、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるオートファゴソームの蓄積がリソソームの酸性化阻害によるものではないことを報告している (Miyara et al., 2016)。またその際、リソソームに含まれる加水分解酵素の 1 種であるカテプシン D の活性低下を示した。一方で、カテプシン D 活性低下のメカニズムは不明である。タンパク質合成の際におこなわれる転写・翻訳は ATP 依存的な過程である。低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露により酸化的リン酸化が阻害された条件下でグルコース飢餓に陥った結果、細胞内 ATP レベルが低下し、カテプシン D の転写・翻訳が抑制されている可能性が考えられる。今後、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露時におけるカテプシン D のタンパク質や mRNA の細胞内発現量の変化を確認することで、オートファゴソーム分解阻害のより詳細なメカニズム解明に繋がることが期待できる。



## 第5章 低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露がオートファジー誘導へ及ぼす影響

### 第1節 緒言

オートファジーは飢餓を始めとした様々なストレスにより誘導される。飢餓によるオートファジー誘導は、細胞質成分を分解し再利用することでエネルギーを得ることを目的としている。実際、アミノ酸や成長因子などの飢餓はオートファジー誘導のための有効な手段として汎用されている (Cuervo and Macian, 2012)。mTOR はオートファジーの重要な制御因子である。通常、mTOR はリン酸化されて活性化状態を保っており、隔離膜の形成の初期段階に関与する Atg1 /ULK1 (ULK 1) 複合体を負に制御している。特定のストレスによりオートファジーが誘導される際、ストレスによって異なるシグナル伝達が認められるが、それらは最終的に mTOR の脱リン酸化 (不活性化) へと収束する (Sengupta et al., 2010)。その結果、mTOR によって制御されていた ULK1 複合体が活性化し、オートファジーが誘導される。グルコース飢餓もまたオートファジーを誘導することが報告されているため (Moruno et al., 2012)、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によりオートファジーが誘導されている可能性が考えられる。そこで本章では、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるグルコース飢餓がオートファジーを誘導しているか否かを検討することを目的とした。

また、オートファジー誘導を確認するために以下の3種類の実験をおこなった。

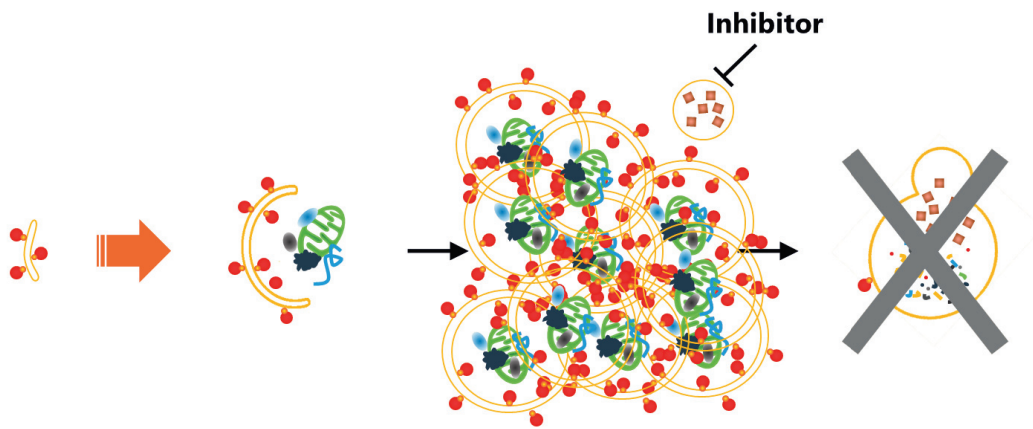
#### 1. グルコース飢餓によるオートファジー誘導シグナルの確認

細胞がグルコース飢餓に陥ると細胞内の AMP/ATP の比率が上昇する。その結果、AMPK がリン酸化され、活性化する。その後mTOR の脱リン酸化が起こり、オートファジーが誘導される (Moruno et al., 2012)。そこで、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による AMPK 及び mTOR のリン酸化レベルの変化をウェスタンブロット解析により確認することで、オートファジーが誘導されているか否かを評価した。

## 2. LC3-II ターンオーバーの評価

LC3-II の増加はオートファゴソームの増加を示唆している。オートファゴソーム増加の原因としては、「オートファジー誘導」、「オートファゴソームの分解阻害」の2種類が挙げられる。しかしながら、LC3-II の発現量を確認するだけでは、どちらが原因であるのかを判別することは不可能である。LC3-II 増加の原因を特定するための手法としては、LC3-II ターンオーバーの評価が頻用されている。この評価には、リソソームの活性を阻害する化合物、またはオートファゴソームとリソソームの融合を阻害する化合物を用いる。このようなオートファゴソーム分解阻害剤を、オートファゴソームの分解を完全に阻害する濃度で用いる。オートファゴソーム分解阻害剤単独曝露と、LC3-II 増加を誘発する物質の併用曝露による LC3-II の変化をウェスタンブロット解析により確認することで、オートファゴソームが誘導されているか否かを判別することができる。オートファジーが誘導されている場合、オートファゴソーム分解阻害剤併用曝露により、オートファゴソーム分解阻害剤単独曝露よりも LC3-II が増加する。一方で、オートファゴソーム分解が阻害されている場合、オートファゴソーム分解阻害剤単独曝露と比べ、併用曝露でオートファゴソームの増加が認められない (Fig. 5)。そこで、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による LC3-II ターンオーバーへの影響を評価することにより、オートファジーが誘導されているか否かを評価した。

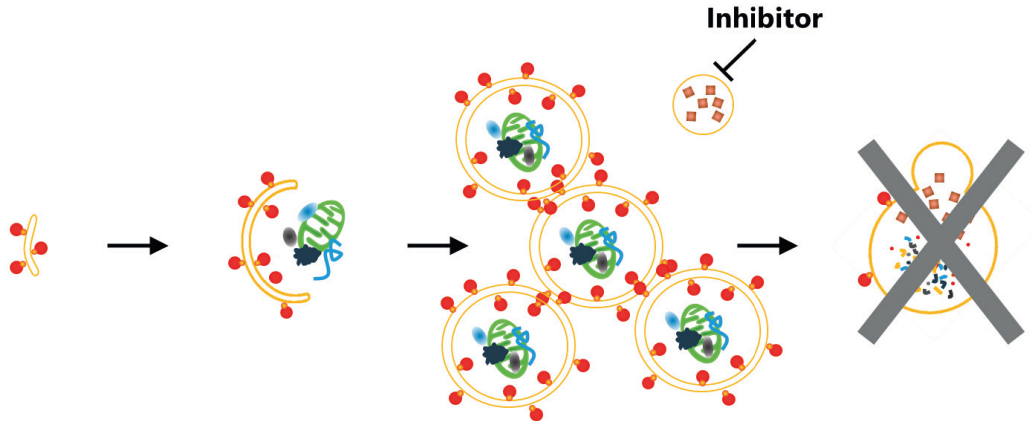
### Induction of autophagy



#### Western blot analysis

Treatment	-	+	-	+
Inhibitor	-	-	+	+
LC3-I	■	■	■	■
LC3-II	—	—	■	■

### Impaired autophagosome induction



#### Western blot analysis

Treatment	-	+	-	+
Inhibitor	-	-	+	+
LC3-I	■	■	■	■
LC3-II	—	—	■	■

Figure 5. Scheme of LC3-II turnover assay

### 3. Atg12-Atg5-Atg16L1 複合体数の計測

Atg12-Atg5-Atg16L1 複合体は LC3-II を隔離膜へ付加する役割を担っている (Fig. 6)。LC3-II を付加する際、この複合体は隔離膜上に局在するが、隔離膜が閉じ、オートファゴソームが形成されると離脱する (Mizushima et al., 2003; Matsushita et al., 2007)。オートファジーが誘導された際、オートファゴソームの形成が促進されるため、Atg12-Atg5-Atg16L1 複合体の隔離膜上への局在も促進される。Atg12、Atg5、Atg16L1 のいずれかに対する抗体を用いた免疫染色で確認されるドット状構造は Atg12-Atg5-Atg16L1 複合体を意味する。LC3-II と異なり、この複合体はオートファゴソームが形成されると膜状から離脱するため、オートファジーが誘導されている場合のみ増加が認められる (Li et al., 2013)。そこで、低濃度 MPP<sup>+</sup> 曝露による Atg12-Atg5-Atg16L1 複合体の増加を確認することにより、オートファジーが誘導されているか否かを評価した。

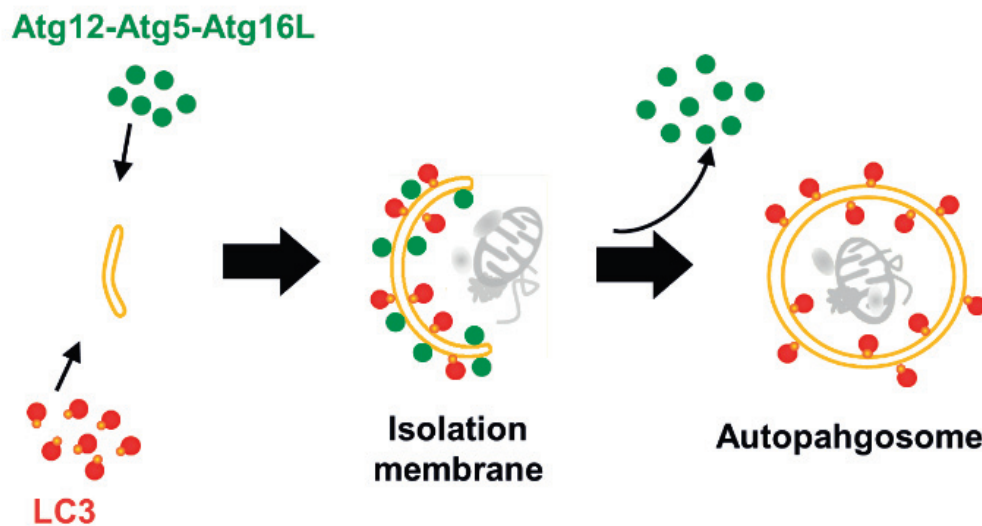


Figure 6. Scheme of conjugation of LC3-II to isolation membrane

## 第 2 節 低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露がグルコース飢餓によるオートファジー誘導シグナ

### ルへ及ぼす影響

低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露 48 時間後における AMPK と mTOR のリン酸化レベルをウェスタンブロットにより確認した。その結果、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露により AMPK のリン酸化レベルが上昇し、AMPK の下流に位置するタンパク質、アセチルコリンカルボキシラーゼ (ACC) のリン酸化レベルの上昇も同時に認められた。また、mTOR は低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露により脱リン酸化されていることが明らかとなり、mTOR の下流に位置する p70 S6 キナーゼ (p70 S6K) の脱リン酸化も認められた。更に、これらの変化は MPP<sup>+</sup>曝露後 36 時間でグルコースを添加することで抑制された (Fig. 7a)。

次に、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による AMPK 及び mTOR の活性の経時変化をウェスタンブロットにより確認した。その結果、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 12 時間で既に AMPK、ACC のリン酸化レベルが上昇し、その後も時間依存的に上昇し続けていた。また、mTOR 及び p70 S6K の脱リン酸化は低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 36 時間から認められた (Fig. 7b)。

## 第 3 節 低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露が LC3-II ターンオーバーへ及ぼす影響

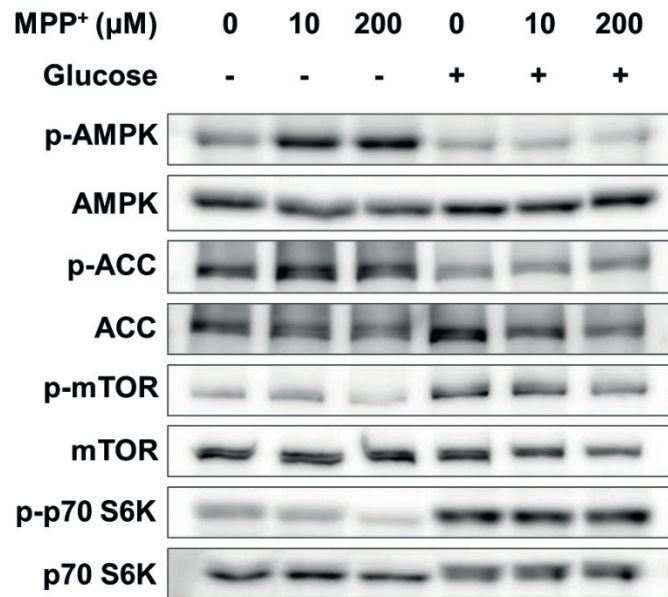
LC3-II のターンオーバーを評価することで、低濃度 MPP<sup>+</sup>によりオートファジーが誘導されているか否かを検討した。また、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 24、36、48 時間における LC3-II ターンオーバーを評価することで、オートファジーが誘導される時間も調べた。今回、オートファゴソーム分解阻害のために Bafilomycin A<sub>1</sub> (Baf) を用いた。Baf は V-ATPase の阻害剤であり、リソソーム内の酸性化を阻害することでオートファゴソームの分解を抑制する。我々の以前の報告では、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露中の最後の 4 時間のみ 400 nM Baf を併用曝露した (Miyara et al., 2016)。しかし、予備実験の結果、200 nM Baf によりオートファゴソーム分解が完全に阻害されることが示唆された (data not shown)。そこで本研究では、Baf

の終濃度を 200 nM に変更し、MPP<sup>+</sup>曝露中の最後の 4 時間のみ併用曝露することで LC3-II ターンオーバーの評価をおこなった。ウェスタンブロットの結果、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 24 時間においては、Baf 存在下・非存在下のどちらにおいても LC3-II の増加傾向は認められなかった (Fig. 7c)。低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 36 時間において、Baf 非存在下では LC3-II の増加傾向は認められなかったが、Baf 存在下では LC3-II の有意な増加が認められた (Fig. 7d)。低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 48 時間においては、Baf 非存在下で LC3-II の増加傾向が認められたが、Baf 存在下ではその増加傾向が認められなかった (Fig. 7e)。

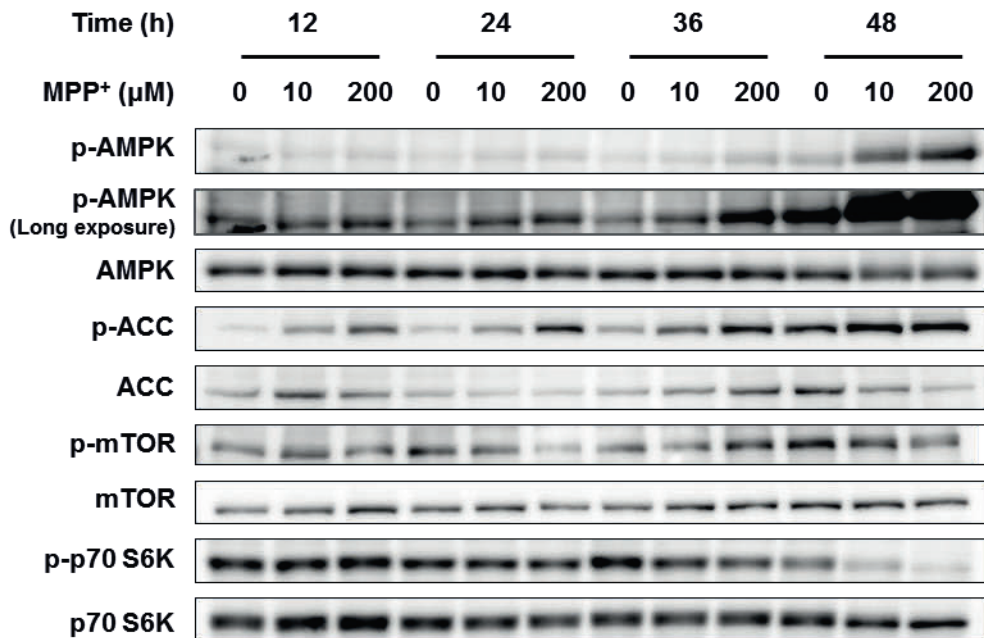
#### 第 4 節 低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露が Atg12-Atg5-Atg16L1 複合体へ及ぼす影響

Atg12-Atg5-Atg16L1 複合体の増加を確認するために、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 24、36、48 時間において抗 Atg16L 抗体を用いた免疫染色をおこなった。抗 Atg16L 抗体陽性のドット状構造は Atg12-Atg5-Atg16L1 複合体を意味する。そこで、抗 Atg16L 抗体陽性のドット状構造と細胞の核の数を計測することで 1 細胞あたりの Atg12-Atg5-Atg16L1 複合体の数を算出した。その結果、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 24 時間では抗 Atg16L 抗体陽性のドット状構造の増加は認められなかった (Fig. 7f)。低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 36、48 時間では、抗 Atg16L 抗体陽性のドット状構造の有意な増加が認められた (Fig. 7g, h)。

a

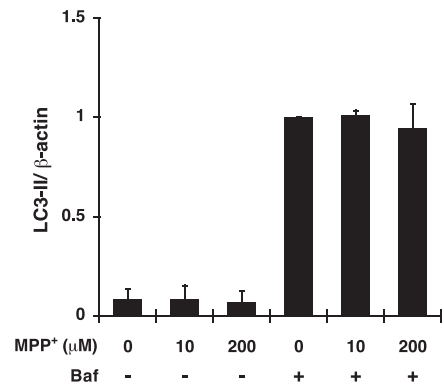
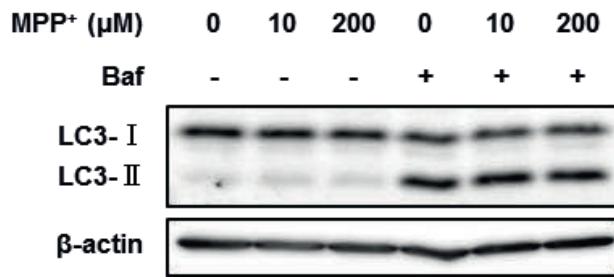


b

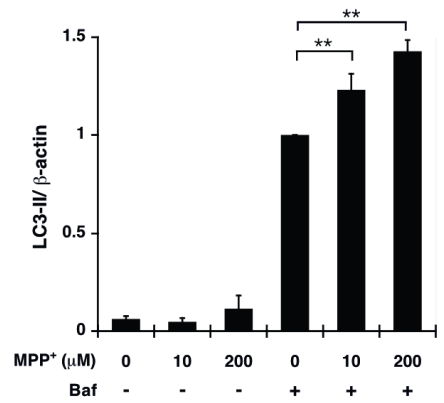
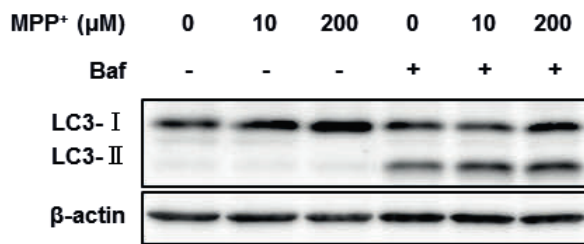




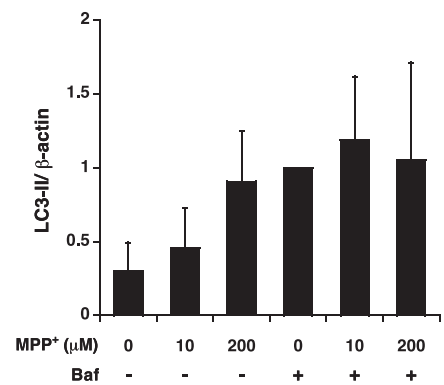
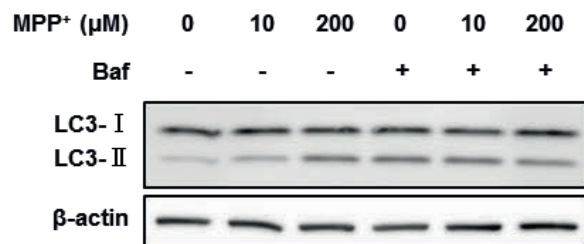
**c**



**d**

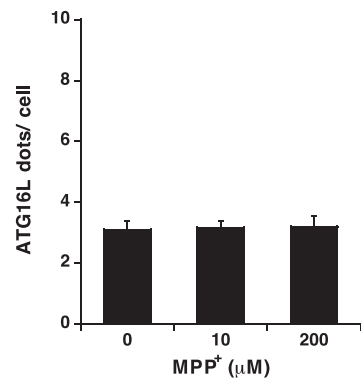
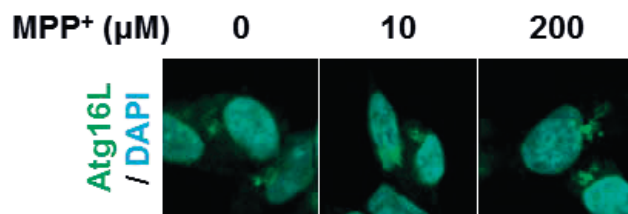


**e**

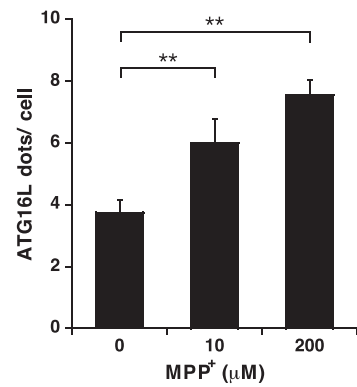
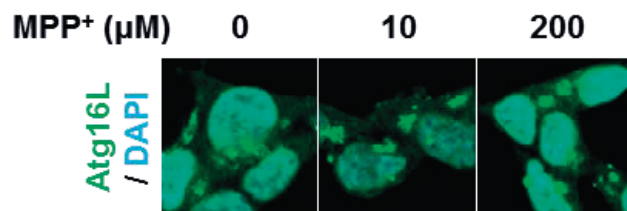




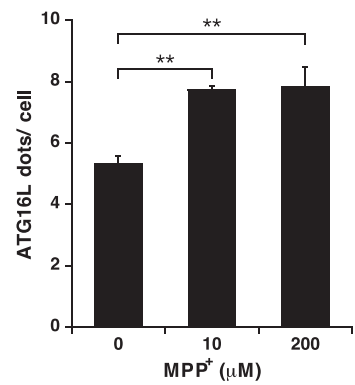
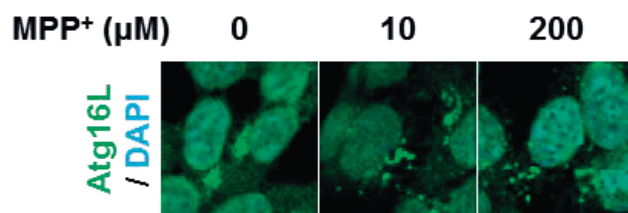
f



g



h



**Figure 7. Time-dependent changes in autophagic induction by mild MPP<sup>+</sup> exposure.**

(a) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> for 48 h with or without 5.5 mM glucose for the last 12 h. The phosphorylation levels of various proteins were estimated by western blotting. (b) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> up to 48 h. Time-dependent changes of the phosphorylation levels of various proteins were estimated by western blotting. Long exposed bands of p-AMPK were suitably detected for the groups that were exposed to MPP<sup>+</sup> for 12 and 24 h. (c, d, e) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> for 24 h (c), 36 h (d) or 48 h (e) with or without 200 nM Baf for last 4 h, and the level of LC3-II turnover was estimated by western blotting at various time points. (f, g, h) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> for 24 h (f), 36 h (g) or 48 h (h), and immunostained by anti-Atg16L antibody. The number of Atg16L positive puncta per cell was evaluated at various time points. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. from at least three independent experiments. \*\* $p < 0.01$ .

## 第5節 考察

低濃度 MPP<sup>+</sup>によりオートファジーが誘導されているか否かを、3種類の方法を用いて検討した。その結果、全ての方法において低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 36 時間ではオートファジーが誘導されていることが示唆された。低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 48 時間においても、グルコース飢餓によるオートファジー誘導シグナルの変化、Atg12-Atg5-Atg16L1 複合体数の計測からはオートファジー誘導を示唆する結果が得られた。しかしながら、LC3-II ターンオーバーの評価では、オートファジーは誘導されておらず、オートファゴソームの分解が阻害されているだけであることを示唆する結果が得られた。オートファジー誘導シグナルの経時変化を確認した際、MPP<sup>+</sup>非曝露群においても 36 時間後から 48 時間後の間でシグナルの変化が確認された (Fig. 7b)。さらに Atg12-Atg5-Atg16L1 複合体の評価においても、MPP<sup>+</sup>非曝露群で時間依存的な複合体の増加が認められた (Fig. 7f, g, h)。これらの結果は、MPP<sup>+</sup>非曝露群においても、48 時間培養するだけでオートファジーが誘導されることを示唆している。LC3-II ターンオーバーの評価は、MPP<sup>+</sup>非曝露群と MPP<sup>+</sup>曝露群の相対比較によるものであるため、オートファジーの誘導を正確に評価できていなかった可能性が考えられる。以上ことから、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 48 時間においてもオートファジーは誘導され続けていると推察できる。また、グルコース添加により、オートファジー誘導シグナルの変化が抑制されたことから、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるグルコース飢餓がオートファジーを誘導していると考えられる。

LC3-II のターンオーバーを評価した際、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 36 時間において、Baf 非存在下では LC3-II の増加が認められなかったにも関わらず、Baf 存在下では LC3-II の有意な増加が認められた。複数の他グループからも、SH-SY5Y へ飢餓ストレスを与えるだけでは LC3-II の増加はほとんど認められず、リソソーム阻害剤等を併用することで LC3-II の増加が確認できたことが報告されている (Michiorri et al., 2010; Castino et al., 2011)。細胞にストレスがかかっていない状態でも、基底レベルでのオートファジーは常におこなわれてお

り、細胞内の恒常性を維持している。神経細胞は、他の細胞と比べて基底レベルでのオートファジーの活性が強く、飢餓ストレスによりオートファジーが誘導されても、オートファゴソームが直ちに分解されるため、LC3-II の増加を検出することが困難になっていると考えられている (Klionsky et al., 2016)。そのため、低濃度 MPP<sup>+</sup> 単独では、曝露後 36 時間でオートファジーが誘導されているにも関わらず、LC3-II の増加が認められなかったと推察できる。

本章では、低濃度 MPP<sup>+</sup> 曝露後 36 時間からグルコース飢餓によりオートファジーが誘導されること、更に曝露後 48 時間においても誘導され続けていることが示唆された。一方で、MPP<sup>+</sup> 非曝露群においても 48 時間培養するだけでオートファジーが誘導されてしまうことも認められた。今後、この問題を回避するために実験中の細胞培養条件を改善する必要がある。

## 第6章 オートファジー誘導の抑制が低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死へ及ぼす影響

### 第1節 緒言

前章で、低濃度 MPP<sup>+</sup>により曝露後 36 時間からオートファジーが誘導されることが示唆された。オートファジー誘導が細胞死よりも早い時間で認められたため、オートファジー誘導が低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死へ関与する可能性が考えられる。そこで本章では、オートファジー誘導を抑制することが低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死へ与える影響を評価した。

また、今回、オートファジー誘導の抑制には以下の 2 種類の方法を用いた。

#### 1、siRNA による Atg5 ノックダウン

前述の通り、Atg12-Atg5-Atg16L1 複合体は隔離膜へ LC3-II を付加する役割を担っている。LC3-II は隔離膜の伸長に関わる重要な因子であることが報告されている (Matsushita et al., 2007)。そのため、Atg12-Atg5-Atg16L1 複合体による隔離膜への LC3-II 付加を阻害することでオートファジー誘導も抑制することができる。実際、Atg5 ノックアウトマウスではオートファジー誘導が認められなくなることが報告されている (Mizushima et al., 2001; Hara et al., 2006)。また、Atg5 ノックダウンも同様にオートファジー誘導を抑制することが知られている (Yang et al., 2013)。そこで本研究では siRNA を用いた Atg5 ノックダウンによりオートファジー誘導の抑制を試みた。

#### 2、3-メチルアデニン (3-MA) を用いた隔離膜合成阻害

PI3P はオートファゴソームの膜に含まれる必須の構成成分である (Obara et al., 2008)。オートファジーの際、クラス III PI3K である Vps34 は Atg14L、Beclin1、Vps15 と複合体を形成し、PI をリン酸化して PI3P を作り出す。3-MA はこの PI3K の阻害剤であり、オー

トファジー誘導を抑制する際に頻用されている (Blommaert et al., 1997)。そこで本研究においても、3-MA を用いることでオートファジー誘導の抑制を試みた。

## 第 2 節 Atg5 ノックダウンが低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死へ及ぼす影響

今回、Atg5 に対する 2 種類の siRNA (siAtg5-1, siAtg5-2) を用いて検証した。まず初めに、Atg5 ノックダウンによりオートファジー誘導が抑制されているか否かをウェスタンブロットにより確認した。その結果、2 種類の siAtg5 をそれぞれトランスフェクションした細胞どちらにおいても、Atg5 の細胞内発現量の減少が認められた。さらに、どちらの Atg5 ノックダウン細胞においても低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 48 時間における LC3-II の増加が認められなかった (Fig. 8a)。このことから Atg5 ノックダウンによりオートファジー誘導が抑制されていることが示唆された。

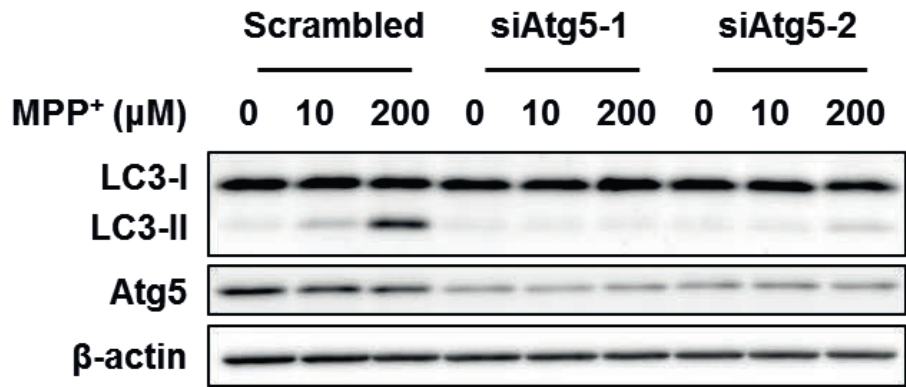
次に、Atg5 ノックダウン細胞に低濃度 MPP<sup>+</sup>を 48 時間曝露した際の細胞生存率を WST-1 法により評価した。その結果、siAtg5-1 をトランスフェクションした細胞においては、10, 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>どちらの曝露群においても有意な細胞死の抑制が認められた。一方で、siAtg5-2 をトランスフェクションした細胞において、細胞死の有意な抑制が認められたのは 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>曝露群のみであった。10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>曝露群では、有意ではないが細胞死の抑制傾向が認められた (Fig. 8b)。

## 第 3 節 3-MA が低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死へ及ぼす影響

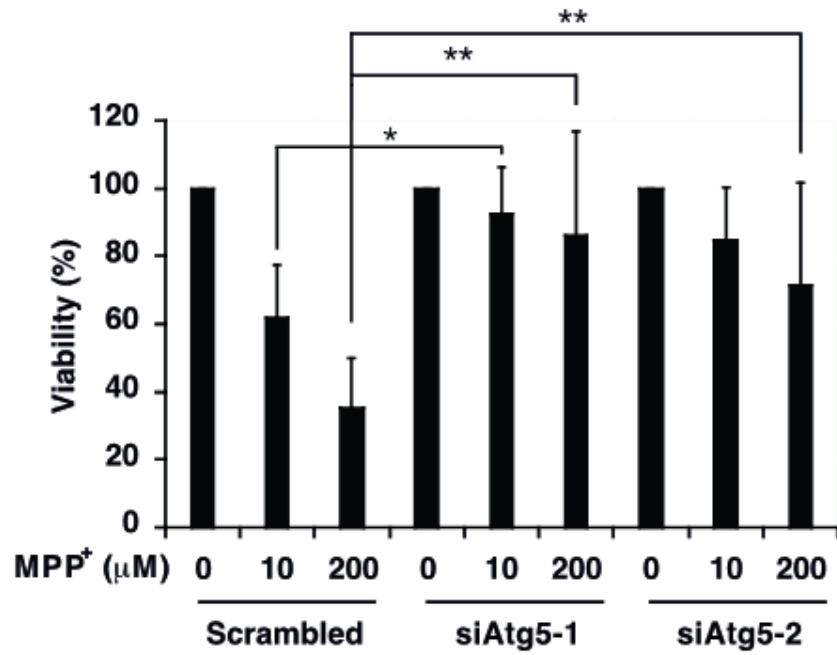
オートファジー誘導を抑制する際、3-MA は高濃度 (mM オーダー) で使用される。しかしながら、高濃度の 3-MA 曝露において PI3K 以外のリン酸化酵素への影響といったオートファジー誘導抑制以外の効果も報告されている (Caro et al., 1988; Xue et al, 2002; Wu et al., 2010)。そこでオートファジー誘導抑制以外の効果を最小限に抑えるために、3-MA を低濃

度 MPP<sup>+</sup>曝露途中で添加することにした。また、オートファジー誘導は低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 36 時間から認められたため、それよりも早い曝露後 24 時間から 3-MA を添加した。MPP<sup>+</sup>曝露後 24 時間から 3-MA を終濃度 5 mM となるように添加し、その後 24 時間培養した。その後、Atg5 ノックダウンと同様にオートファジー誘導の抑制をウェスタンブロットで、細胞生存率への影響を WST-1 法により評価した。ウェスタンブロットの結果、3-MA 添加により低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 48 時間における LC3-II の増加が認められなかったことから、オートファジー誘導抑制が示唆された (Fig. 8c)。また、WST-1 法の結果、3-MA を添加することで低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 48 時間における細胞死が有意に抑制された (Fig. 8d)。

a

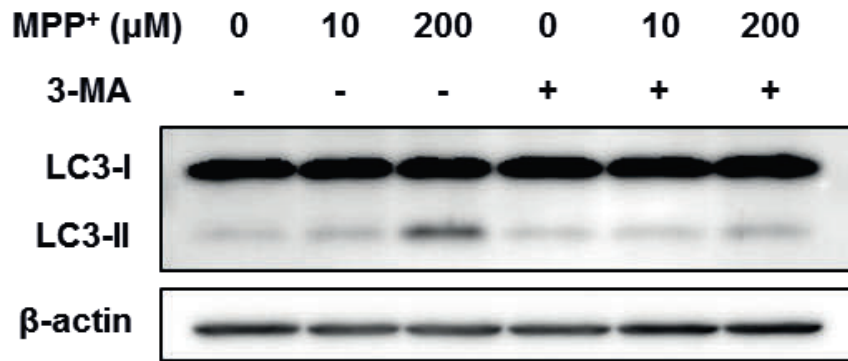


b

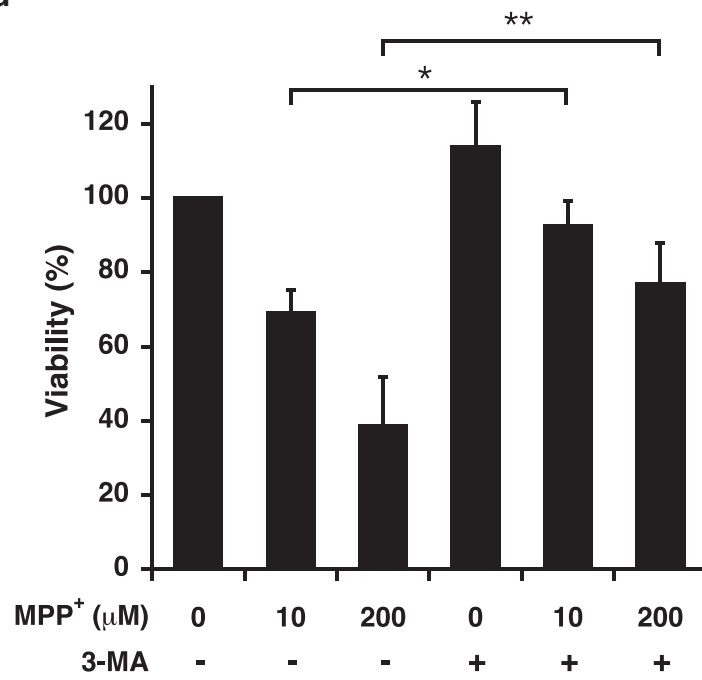




c



d



**Figure 8. Influence of autophagy inhibition on the toxicity of mild MPP<sup>+</sup> exposure.**

(a) SH-SY5Y cells were transfected with siAtg5 or scrambled control siRNA for 24 h, and then exposed to 10 and 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> for 48 h. LC3-II and Atg5 expression levels were analyzed by western blotting. (b) SH-SY5Y cells were transfected with siAtg5 or scrambled control siRNA for 24 h, and then exposed to 10 and 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> for 48 h. Cell viability was determined by a WST-1 assay. (c) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> for 48 h with or without 3-MA for the last 24 h, and the level of LC3-II expression was analyzed by western blotting. (d) SH-SY5Y cells were exposed to 10 and 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> for 48 h with or without 3-MA for the last 24 h, and cell viability was determined by a WST-1 assay. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. from at least three independent experiments. \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01.

## 第4節 考察

Atg5 ノックダウン、3-MA 添加のどちらにおいても、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 48 時間におけるオートファジー誘導と細胞死の抑制が認められた。このことから、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死にオートファジー誘導が関与することが示唆された。3-MA 添加においては、オートファジー誘導以外の影響が関与している可能性を完全に除外することはできていない。しかし、Atg5 ノックダウンによる結果と同様の傾向が認められたことから、3-MA 添加による細胞死の抑制はオートファジー誘導抑制による寄与が大きいと推察できる。

成熟した神経細胞は細胞分裂を停止するため、タンパク質凝集体を分裂により除去することができない。そのため、オートファジーや UPS を介したタンパク質品質管理は、神経細胞の生存において重要な役割を担うと考えられている (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007)。実際に、脳特異的オートファジー欠損マウスでは、タンパク質凝集体の脳内蓄積、神経細胞死及び神経変性疾患様症状が認められることが報告されている (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006)。しかしながら今回、我々はオートファジー誘導の抑制が低濃度 MPP<sup>+</sup>による細胞死を緩和することを見出した。低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露後 48 時間では、オートファジー誘導だけでなくオートファゴソームの分解阻害も併発している。オートファゴソーム分解が阻害されている条件下でオートファジーが誘導されることにより、オートファゴソームの蓄積が促進されていると推察できる。Chen らは、アルツハイマー病モデルマウスを絶食状態にすると、神経細胞でオートファジーが誘導されることを報告している。しかし、アミロイド  $\beta$  がオートファジーによって分解されずに細胞内で蓄積し、細胞死が起こることも報告している (Chen et al., 2015)。このことから、神経細胞では、飢餓によりオートファジーが誘導されるが、オートファゴソーム分解能の低下も併発する可能性が考えらる。また、オートファジーフラックスが滞った結果、不要なタンパク質の蓄積がストレスになり、細胞死が誘導されると推察できる。

Zhu らは、我々とは異なる MPP<sup>+</sup>慢性曝露モデルを確立し、我々と同様に MPP<sup>+</sup>がオートファジーを誘導することを報告している (Zhu et al., 2012)。また、その誘導メカニズムは ERK を介したものであり、このオートファジー誘導を阻害することで MPP<sup>+</sup>慢性曝露による細胞死が抑制されることを報告している。グルコース飢餓を介したオートファジー誘導経路は複数報告されている。その 1 つとして、活性酸素種の増加による p38MAPK、JNK または ERK を介したオートファジー誘導経路がある (Moruno et al., 2012)。今回、我々の低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露モデルにおいて ERK の活性化は確認していないが、ERK が活性化されている可能性は考えられる。一方で、Zhu らはオートファゴソームの分解阻害に関する評価はおこなっていないため、彼らの慢性曝露モデルにおいてもオートファゴソームの分解阻害が起きている可能性は考えられる。以上のことから、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露ではオートファジー誘導とオートファゴソーム分解が併発しており、このオートファジー異常が細胞死を誘発すると考えられる。

## 第7章 総括

PD 患者の脳内では慢性進行性の神経細胞死が起きていると考えられるが、その詳細なメカニズムは不明である。神経毒 MPP<sup>+</sup>は細胞レベルの PD 研究で汎用されている。しかし、多くの研究では高濃度 MPP<sup>+</sup>短期間曝露による急性細胞死を評価しているために、実際の PD の病態を正確に反映していない可能性が考えられる。我々のグループでは、より正確な病態の反映を目指し、MPP<sup>+</sup>を従来よりも低濃度で曝露することで緩やかな細胞死を誘導するモデルを確立した。そこで本研究では、この低濃度 MPP<sup>+</sup>モデルによる細胞死メカニズムの解明を目指した。

第2,3章では低濃度及び高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死の比較をおこなった。その結果、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露による細胞死は、グルコース飢餓が原因で誘導されることを示した。また、この細胞死メカニズムは高濃度 MPP<sup>+</sup>曝露とは異なることも示した。

さらに低濃度 MPP<sup>+</sup>モデルでは、MPTP 慢性投与と PD 関連遺伝子の異常において共通して認められる、解糖系の亢進と  $\alpha$ -シヌクレインの凝集体形成が認められた。このことから、低濃度 MPP<sup>+</sup>モデルは、従来の高濃度 MPP<sup>+</sup>モデルよりも正確に病態を反映していることが期待できる。

第4,5,6章では低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるグルコース飢餓とオートファジー異常の関係について調べた。その結果、我々が以前報告した、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるオートファゴソーム分解阻害は、グルコース飢餓が原因で誘導されていることが明らかとなった。さらに、低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露によるグルコース飢餓はオートファジーも誘導することを示した。これまでに MPP<sup>+</sup>曝露によるオートファジー誘導、オートファゴソーム分解阻害のいずれかを示す報告は存在した。一方で、本研究では低濃度 MPP<sup>+</sup>曝露により、これら2つが併発して

いることを示した。また、これら 2 つが併発することで細胞死が誘導される可能性が考えられる。

以上、本研究では、低濃度MPP<sup>+</sup>による細胞死メカニズムが高濃度MPP<sup>+</sup>曝露とは異なること、その細胞死はグルコース飢餓により誘導されることを明らかにした。更に、低濃度MPP<sup>+</sup>はグルコース飢餓を介してオートファジー機構に異常をもたらすことも明らかにした。今後、臨床で認められる「グルコース代謝異常」と「オートファジーの異常」の関係が明らかになり、PDにおける神経細胞死メカニズムの解明に繋がることが期待できる。

## 第 8 章 実験材料及び方法

### 試薬

MPP<sup>+</sup> iodide、3-メチルアデニン は Sigma-Aldrich より購入した。D-(+)-グルコース は Wako より購入した。Bafilomycin A<sub>1</sub> は Cayman Chemical より購入した。

### リン酸緩衝液 (PBS (-)) の調製

ダルベッコ PBS (-) 粉末 (Nissui) を手順書に従って超純水に溶かし、121°C で 20 分間オートクレーブ処理した。

### 10 × トリス緩衝生理食塩水 (TBS)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Wako) 24.2 g、塩化ナトリウム (Wako, NaCl) 80 g を 900 mL の超純水に溶かした。希塩酸を用いて pH を 7.6 に調整した後、超純水で 1 L までメスアップした。使用する際には 1 × TBS となるように超純水で希釈した。

### 細胞培養

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y は American Type Culture Collection より購入した (CRL-2266)。培地は、ダルベッコ変法イーグル培地②粉末 (Nissui) を手順書に従って超純水に溶かし、121°C で 20 分間オートクレーブした後に、0.854 g/L L-グルタミン (Sigma-Aldrich)、5% ウシ胎児血清 (Biosera)、5% ウマ血清 (Gibco)、0.2% 炭酸水素ナトリウム (Kanto Chemical) を添加したもの (DMEM) を用いた。

細胞培養は DMEM を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下でおこなった。100 mm または 150

mm 細胞培養ディッシュ (Thermo Fisher Scientific) で培養し、培地交換を 2 日に 1 度おこなった。また、細胞が 80%コンフルエントに達した際に継代をおこない、継代回数が 12 回程度になるまで培養を続けた。実験に用いる際には、 $6.04 \times 10^4$  cells/174  $\mu$ L/cm<sup>2</sup> となるように細胞を播種し、37°Cで 12~14 時間培養した。その後、MPP<sup>+</sup>を含む新鮮な培地に交換することで MPP<sup>+</sup>曝露をおこなった。

### 細胞生存率測定

細胞生存率は WST-1 法により評価した。96 ウェルマルチプレート (BD Biosciences) へ SH-SY5Y を播種し、37°Cで 12~14 時間培養した。MPP<sup>+</sup>曝露後に培地を全量除去し、WST-1 溶液 [5 mM 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (Dojindo)、0.2 mM 1-methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate (Dojindo)] と DMEM を 1:11 で希釈したものを 50  $\mu$ L/ well で加えた。37°Cで 1 時間インキュベーションした後、MultiSkan Go microplate spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて 415 nm の吸光度を測定した。

### 培地中グルコース量測定

培地中グルコース量の測定には Glucose colorimetric/fluorometric assay kit (Bio Vision) を用いた。手順書に従い、以下の方法で実施した。24 ウェルマルチプレート (BD Biosciences) へ SH-SY5Y を播種し、37°Cで 12~14 時間培養した。MPP<sup>+</sup>曝露後に培地を全量回収し、400  $\times$  g、4°Cで 5 分間遠心後、その上清を回収した。96 ウェルプレート (WATSON) に上清 50  $\mu$ L と反応液 50  $\mu$ L を加え、マルチモードプレートリーダー (PerkinElmer, Enspire) を用いて 37°Cで 570 nm の吸光度を 5 分おきに計 40 分間測定した。測定結果としては、測定開始 30 分後のデータを解析して用いた。



## 培地中乳酸量測定

培地中乳酸量には glycolysis cell-based assay kit (Cayman chemical) を用いた。手順書に従い、以下の方法で実施した。SH-SY5Y を 96 ウェルマルチプレートへ播種し、37°Cで 12~14 時間培養した。MPP<sup>+</sup>曝露後に培地を全量回収し、400 × g、4°Cで 5 分間遠心後、その上清を回収した。96 ウェルプレートに上清 5 μL、測定バッファー50 μL、反応バッファー45 μL を加え、オービタルシェーカー (Eppendorf, Thermomixer comfort) を用いて 600 rpm、25°Cで 30 分間振盪した。その後、490 nm の吸光度を測定した。

## 細胞タンパク質回収

SH-SY5Y を 60 mm 細胞培養ディッシュ (Thermo Fisher Scientific) へ播種し、37°Cで 12~14 時間培養した。MPP<sup>+</sup>曝露後、ディッシュを氷上へ移し、培地を全て除去した。氷冷した PBS (-) 1 mL で 3 回洗浄した後、1% NP-40 含有 TNE バッファー [20 mM Tris-HCl, pH=7.4, 150 mM NaCl, 2mM EDTA (Nacalai Tesque), 1% NP-40 (Nacalai Tesque), 1 mM sodium fluoride (Sigma-Aldrich), 1 mM sodium orthovanadate (Wako), 1% protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque)] を 100 μL 加え、セルスクレイパーで細胞を回収した。氷上で超音波により細胞を破碎後、4°Cで 30 分間ローテーションをおこなった。22,000 × g、4°Cで 20 分間遠心後、上清を 1% NP-40 可溶性画分として回収した。その後、沈渣へ 2% SDS 含有 TNE バッファー [20 mM Tris-HCl, pH=7.4, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, 2% SDS (Nacalai Tesque), 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 1% protease inhibitor cocktail] 100 μL を加えた。氷上で超音波により沈渣を破碎し、室温で 30 分間ローテーションをおこなった。卓上遠心機で軽く遠心した後、上清を 1% NP-40 不溶性画分として回収した。

## タンパク質定量及び変性処理

タンパク質定量には Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。96 ウェルプレートへ、PBS (-)を用いて種々の濃度に調製したウシ血清アルブミン (Nacalai Tesque, BSA)、またはサンプルを 5  $\mu$ L/ well で加えた。ピシニコニン酸 : 硫酸銅水溶液 = 50 : 1 で調製した混合液を 200  $\mu$ L/ well で加えた後、37°Cで 30 分間インキュベーションした。その後、562 nm の吸光度を測定した。サンプル中のタンパク質濃度を 200 ng/ 150  $\mu$ L となるように PBS (-)で調製し、4  $\times$  SDS サンプルバッファー [250 mM Tris-HCl, pH=6.8, 0.04% Bromophenol blue (Nacalai Tesque), 40% glycerol (Nacalai Tesque), 8% SDS and 20% 2-mercaptoethanol (Nacalai Tesque)] を 50  $\mu$ L 加えた。95°Cで 5 分間加熱した後、氷上で 3 分間静置し、ウェスタンブロット用サンプルとした。また、実験に用いるまでは-80°Cで保存した。

## ウェスタンブロット解析

ポリアクリルアミドゲルへ各サンプルを等量 (5~20  $\mu$ g) ロードした。その後、ミニプロテイン®Tetra セル (Bio-Rad) を用いて SDS-PAGE をおこない、トランスブロット Turbo (Bio-Rad) を用いて PVDF メンブレン (GE Healthcare) へ転写した。転写終了後、PVDF メンブレンを、TBS で希釈した 0.1% Tween 20 (Nacalai Tesque, TBS-T) へ 1 度浸けた。PVDF メンブレンを TBS-T で調製した 5% スキムミルク (Morinaga Milk) へ浸け、室温で 1 時間振盪した。その後、PVDF メンブレンを一次抗体希釈液へ浸け、4°C over night または室温で 2 時間振盪した。PVDF メンブレンを TBS-T で室温、5 分間振盪を 3 回おこなった後、二次抗体希釈液へ浸し、室温で 1 時間振盪した。TBS-T で室温、5 分間振盪を 3 回おこなった後、Chemi-Lumi One L (Nacalai Tesque) または Chemi-Lumi One Ultra (Nacalai Tesque) と反応させた。発光の検出は luminescent image analyzer (GE Healthcare,

ImageQuant LAS 4000)を用いておこなった。検出されたバンドの定量化は Image J を用いておこなった。

#### 一次抗体

- ・抗 $\beta$ -actin 抗体 (Sigma-Aldrich, A5441): 5%スキムミルクで 20,000 倍希釈
- ・抗 ACC 抗体 (Cell Signaling, #3662): Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO, CGS1)で 1,000 倍希釈
- ・抗 AMPK $\alpha$  抗体 (Cell Signaling, #2532): CGS1 で 1,000 倍希釈
- ・抗 phospho-ACC (Ser79) 抗体 (Cell signaling, #3661): CGS1 で 1,000 倍希釈
- ・抗 phospho-AMPK $\alpha$  (Thr172) 抗体 (Cell Signaling, #2535): 5%スキムミルクで 1,000~2,000 倍希釈
- ・抗 Atg5 抗体 (MBL, PM050): CGS1 で 1,000 倍希釈
- ・抗 LC3 抗体 (MBL, PM036): 5%スキムミルクで 1,000~2,000 倍希釈
- ・抗 mTOR 抗体 (Cell Signaling, #2972): CGS1 で 1,000 倍希釈
- ・抗 phospho-mTOR (Ser2448) 抗体 (Cell signaling, #5536): CGS1 で 1,000 倍希釈
- ・抗 p62/ SQSTM1 抗体 (MBL, M162-3): 5%スキムミルクで 1,000~2,000 倍希釈
- ・抗 p70 S6K 抗体 (R&D Systems, AF8962): 5%スキムミルクで 1,000~2,000 倍希釈
- ・抗 phospho-p70 S6K (T421/S424) 抗体 (R&D Systems, AF8965): 5%スキムミルクで 1,000~2,000 倍希釈

#### 二次抗体

二次抗体は CGS2 で 10 倍希釈したものを 4°Cで保存し、使用する際に TBS-T を用いて 20,000 倍まで希釈して用いた。

- ・HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG 抗体 (Sigma-Aldrich, A9169)

・ HRP-conjugated anti-mouse IgG 抗体 (Sigma-Aldrich, A9044)

## 細胞免疫染色

SH-SY5Y をポリ D リジンコート 4 ウェルチャンバースライド (BD Biosciences) へ播種し、37°Cで 12~14 時間培養した。MPP<sup>+</sup>曝露後、培地を全量除去し、37°Cに温めた PBS (-) を 1 mL/well 加えて 1 回洗浄した。37°Cに温めた、PBS (-)で調製した 4%パラホルムアルデヒド (Wako) を 1 mL/well 加え、37°Cで 10 分間静置した。4%パラホルムアルデヒドを除去し、PBS (-)で調製した 0.1% triton X-100 (Sigma-Aldrich, PBS-Tx) を 1 mL/ well 加え、室温で 15 分間静置を 2 回おこなった。PBS-Tx で調製した 3% BSA を 1 mL/ well 加え、室温で 1 時間静置した。3% BSA を全量除去した後、3% BSA で 300 倍希釈した抗 Atg16L 抗体 (MBL, PM040) を 200  $\mu$ L/ well 加え、室温で 2 時間静置した。抗体希釈液を全量除去し、PBS-Tx を 200  $\mu$ L/ well 加えて室温、5 分間静置を 3 回おこなった。3% BSA で 500 倍希釈した Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Life Technologies, A11008) を 200  $\mu$ L/ well 加え、室温遮光条件下で 1 時間静置した。また、Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG は、14,000  $\times$  g、4°Cで 20 分間遠心した後に希釈をおこなった。抗体希釈液を全量除去した後、PBS (-)を 200  $\mu$ L/ well 加えて室温遮光条件下、5 分間静置を 3 回おこなった。PBS (-)で調製した 600 nM DAPI (Life Technologies) を 200  $\mu$ L/ well 加えて室温遮光条件下、5 分間静置した。DAPI を全量除去し、PBS (-)を 200  $\mu$ L/ well 加えて 2 回洗浄した。上部のチャンバーを取り外し、Prolong Diamond antifade reagent (Life Technologies) を適量滴下した後、カバーガラスを乗せて封入した。遮光下で 12 時間以上静置した後、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, FV1000-D IX81) を用いて観察をおこなった。取得した画像は Image J を用いて解析をおこなった。1 処理群あたり、10 視野以上、計 100 細胞以上、解析をおこなった。なお、本実験では PBS (-)を使用前に 0.45  $\mu$ m フィルターを用いて濾過をおこなった。

## RNAi 干渉

siAtg5-1 (s18158)、siAtg5-2 (s18160)、Scrambled control siRNA (AM4611) は Ambion から購入し、Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, RNAiMAX)を用いてトランスフェクションをおこなった。

SH-SY5Y を  $1.0 \times 10^6$  cells/ well となるよう 6 ウェルマルチプレートへ播種し、24 時間培養した。siRNA と opti-MEM (Invitrogen)、RNAiMAX と Opti-MEM をそれぞれ Table 3 の割合で混和し、室温で 5 分間静置した。その後、2 つの混和液を混ぜ、室温で 20 分間静置した。6 マルチウェルプレートの培地を 2 mL/ well となるよう交換し、siRNA と RNAiMAX の混合液を加え、トランスフェクションをおこなった。トランスフェクション後 24 時間で適当なマルチウェルプレートへ細胞を再播種し、実験をおこなった。

**Table 3. Amount of transfection Reagents**

siRNA (nM)	Opti-MEM for siRNA ( $\mu$ L)	RNAiMAX ( $\mu$ L)	Opti-MEM for RNAiMAX ( $\mu$ L)
10	250	5	250

## 統計解析

各実験のデータは平均値  $\pm$  標準偏差 (mean  $\pm$  S.D.) で示した。Tukey-Kramer method によって多重比較をおこない、 $p < 0.05$  である場合、有意な差があると見なした。

## 参考文献

- Agnihotri, S. *et al.* PINK1 is a negative regulator of growth and the warburg effect in glioblastoma. *Cancer Res.* **76**, 4708–4719 (2016).
- Alvarez-Fischer, D. *et al.* Probenecid potentiates MPTP/MPP(+) toxicity by interference with cellular energy metabolism. *J. Neurochem.* **127**, 782–92 (2013).
- Anglade, P. *et al.* Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol. Histopathol.* **12**, 25–31 (1997).
- Athauda, D. & Foltynie, T. The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: Mechanisms of action. *Drug Discov. Today* **21**, 802–818 (2016).
- Batelli, S. *et al.* DJ-1 modulates  $\alpha$ -synuclein aggregation state in a cellular model of oxidative stress: Relevance for Parkinson's Disease and involvement of HSP70. *PLoS One* **3**, (2008).
- Bellucci, A. *et al.* Alpha-synuclein aggregation and cell death triggered by energy deprivation and dopamine overload are counteracted by D2/D3 receptor activation. *J. Neurochem.* **106**, 560–577 (2008).
- Bergman, H., Wichmann, T. & DeLong, M. R. Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science.* **249**, 1436–8 (1990).

- Blommaart, E. F., Krause, U., Schellens, J. P., Vreeling-Sindelárová, H. & Meijer, a J. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **243**, 240–246 (1997).
- Borghammer, P. Perfusion and metabolism imaging studies In Parkinson' s disease. *Dan. Med. J.* **59**, B4466 (2012).
- Caro, L. H., Plomp, P. J., Wolvetang, E. J., Kerkhof, C. & Meijer, A. J. 3-Methyladenine, an inhibitor of autophagy, has multiple effects on metabolism. *Eur. J. Biochem.* **175**, 325–329 (1988).
- Castino, R., Fiorentino, I., Cagnin, M., Giovia, A. & Isidoro, C. Chelation of lysosomal iron protects dopaminergic SH-SY5Y neuroblastoma cells from hydrogen peroxide toxicity by precluding autophagy and Akt dephosphorylation. *Toxicol. Sci.* **123**, 523–541 (2011).
- Chalmers-redman, R. M. E., Fraser, A. D. M., Carlile, G. W., Pong, A. & Tatton, W. G. Glucose Protection from MPP+ -Induced Apoptosis Depends on Mitochondrial Membrane Potential and ATP Synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 440–447 (1999).
- Chen, X., Kondo, K., Motoki, K., Homma, H. & Okazawa, H. Fasting activates macroautophagy in neurons of Alzheimer's disease mouse model but is insufficient to degrade amyloid-beta. *Sci. Rep.* **5**, 12115 (2015).

- Chung, K. K. *et al.* Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat.Med.* **7**, 1144–1150 (2001).
- Cleeter MW., Cooper JM., Schapira AH. Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *J.Neurochem.* **58**, 786–789 (1992)
- Cuervo, A. M. & Macian, F. Autophagy, nutrition and immunology. *Mol. Aspects Med.* **33**, 2–13 (2012).
- Dauer, W. & Przedborski, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**, 889–909 (2003).
- Davis, G. C. *et al.* Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* **1**, 249–254 (1979).
- de Lau, L. M. & Breteler, M. M. Epidemiology of parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **5**, 525–535 (2006).
- Dehay, B. *et al.* Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **30**, 12535–44 (2010).
- Dunn, L. *et al.* Dysregulation of glucose metabolism is an early event in sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* **35**, 1111–5 (2013).



- Fornai, F. *et al.* Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3413–3418 (2005).
- González-Polo, R. A., Soler, G., Alonso, J. C., Rodríguez-Martín, A. & Fuentes, J. M. MPP(+) causes inhibition of cellular energy supply in cerebellar granule cells. *Neurotoxicology* **24**, 219–225 (2003).
- Hara, T. *et al.* Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885–889 (2006).
- Hatano, T., Kubo, S. I., Sato, S. & Hattori, N. Pathogenesis of familial Parkinson's disease: New insights based on monogenic forms of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **111**, 1075–1093 (2009).
- He, C. & Klionsky, D. J. Regulation Mechanisms and Signalling Pathways of Autophagy. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 67–93 (2009).
- Higashi, S. *et al.* Localization of MAP1-LC3 in vulnerable neurons and Lewy bodies in brains of patients with dementia with Lewy bodies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **70**, 264–280 (2011).
- Ichimura, Y. *et al.* A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**, 488–492 (2000).

- Jackson-Lewis, V., Jakowec, M., Burke, R. E. & Przedborski, S. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration* **4**, 257–269 (1995).
- Kabeya, Y. *et al.* LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* **117**, 2805–2812 (2004).
- Kabeya, Y. *et al.* LC3, a mammalian homolog of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* **19**, 5720–5728 (2000).
- Kalinderi, K., Bostantjopoulou, S. & Fidani, L. The genetic background of Parkinson's disease: Current progress and future prospects. *Acta Neurol. Scand.* 314–326 (2016).
- Kirisako, T. *et al.* The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.* **151**, 263–275 (2000).
- Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**, 1–222 (2016).
- Komatsu, M. *et al.* Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**, 880–884 (2006).
- Kuusisto, E., Parkkinen, L. & Alafuzoff, I. Morphogenesis of Lewy bodies: dissimilar incorporation of alpha-synuclein, ubiquitin, and p62. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 1241–1253 (2003).

- Kuzuhara, S., Mori, H., Izumiyama, N., Yoshimura, M. & Ihara, Y. Lewy bodies are ubiquitinated. *Acta Neuropathol.* **75**, 345–353 (1988).
- Li, M. *et al.* Suppression of lysosome function induces autophagy via a feedback down-regulation of MTOR complex 1 (MTORC1) activity. *J. Biol. Chem.* **288**, 35769–35780 (2013).
- Lim, J. *et al.* Binding preference of p62 towards LC3-II during dopaminergic neurotoxin-induced impairment of autophagic flux. *Autophagy* **7**, 51–60 (2011).
- Liu, W. *et al.* PINK1 defect causes mitochondrial dysfunction, proteasomal deficit and alpha-synuclein aggregation in cell culture models of Parkinson's disease. *PLoS One* **4**, e4597 (2009).
- Marini, A. M. & Nowak, T. S. Metabolic effects of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) in primary neuron cultures. *J. Neurosci. Res.* **62**, 814–820 (2000).
- Martinez-Vicente, M. & Cuervo, A. M. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol.* **6**, 352–361 (2007).
- Matsushita, M. *et al.* Structure of Atg5 · Atg16, a complex essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**, 6763–6772 (2007).
- Mazzio, E. & Soliman, K. F. a. D-(+)-glucose rescue against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity through anaerobic glycolysis in neuroblastoma cells. *Brain Res.* **962**, 48–60 (2003).

- McNaught, K. S. *et al.* Inhibition of alpha-ketoglutarate dehydrogenase by isoquinoline derivatives structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Neuroreport* **6**, 1105–1108 (1995).
- Meredith, G. E., Totterdell, S., Beales, M. & Meshul, C. K. Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **219**, 334–340 (2009).
- Meredith, G. E. & Rademacher, D. J. MPTP mouse models of Parkinson's disease: An update. *J. Parkinsons. Dis.* **1**, 19–33 (2011).
- Michiorri, S. *et al.* The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy. *Cell Death Differ.* **17**, 962–974 (2010).
- Miyara, M., Kotake, Y., Tokunaga, W., Sanoh, S. & Ohta, S. Mild MPP + exposure impairs autophagic degradation through a novel lysosomal acidity-independent mechanism. *J. Neurochem.* **139**, 294–308 (2016).
- Mizuno, Y., Saitoh, T. & Sone, N. Inhibition of mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **143**, 971–976 (1987).
- Mizushima, N. *et al.* Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* **116**, 1679–1688 (2003).

- Mizushima, N. *et al.* Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* **152**, 657–667 (2001).
- Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 107–132 (2011).
- Moruno, F., Pérez-Jiménez, E. & Knecht, E. Regulation of Autophagy by Glucose in Mammalian Cells. *Cells* **1**, 372–395 (2012).
- Nopparat, C., Porter, J. E., Ebadi, M. & Govitrapong, P. 1-Methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death via autophagy through a Bcl-2/Beclin 1 complex-dependent pathway. *Neurochem. Res.* **39**, 225–232 (2014).
- Novikova, L., Garris, B. L., Garris, D. R. & Lau, Y. S. Early signs of neuronal apoptosis in the substantia nigra pars compacta of the progressive neurodegenerative mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine/probenecid model of Parkinson's disease. *Neuroscience* **140**, 67–76 (2006).
- Obara, K., Noda, T., Niimi, K. & Ohsumi, Y. Transport of phosphatidylinositol 3-phosphate into the vacuole via autophagic membranes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to Cells* **13**, 537–547 (2008).
- Petroske, E., Meredith, G. E., Callen, S., Totterdell, S. & Lau, Y. S. Mouse model of Parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment. *Neuroscience* **106**, 589–601 (2001).

- Requejo-Aguilar, R. *et al.* PINK1 deficiency sustains cell proliferation by reprogramming glucose metabolism through HIF1. *Nat. Commun.* **5**, 4514 (2014).
- Requejo-Aguilar, R. *et al.* DJ1 represses glycolysis and cell proliferation by transcriptionally up-regulating pink1. *Biochem. J.* **467**, 303–310 (2015).
- Rodríguez-Blanco, J. *et al.* Cooperative action of JNK and AKT/mTOR in 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced autophagy of neuronal PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* **90**, 1850–1860 (2012).
- Schmidt, N. & Ferger, B. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* **108**, 1263–1282 (2001).
- Sengupta, S., Peterson, T. R. & Sabatini, D. M. Regulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress. *Mol. Cell* **40**, 310–322 (2010).
- Shimura, H. *et al.* Ubiquitination of a New Form of alpha-Synuclein by Parkin from Human Brain : Implications for Parkinson ' s Disease. **293**, 263–270 (2001).
- Tanji, K., Mori, F., Kakita, A., Takahashi, H. & Wakabayashi, K. Alteration of autophagosomal proteins (LC3, GABARAP and GATE-16) in Lewy body disease. *Neurobiol. Dis.* **43**, 690–697 (2011).
- Tasset, I. & Cuervo, A. M. Role of chaperone-mediated autophagy in metabolism. *FEBS J.* **283**, 2403–2413 (2016).
- Tatton, N. a & Kish, S. J. In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using

- terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience* **77**, 1037–1048 (1997).
- Vincent, A. *et al.* Parkin-induced defects in neurophysiology and locomotion are generated by metabolic dysfunction and not oxidative stress. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1760–1769 (2012).
- Williams, Z. R., Goodman, C. B. & Soliman, K. F. A. Anaerobic glycolysis protection against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) toxicity in C6 glioma cells. *Neurochem. Res.* **32**, 1071–1080 (2007).
- Wong, A. S. L. *et al.* Cdk5-mediated phosphorylation of endophilin B1 is required for induced autophagy in models of Parkinson's disease. *Nat. Cell Biol.* **13**, 568–579 (2011).
- Wood-Kaczmar, a, Gandhi, S. & Wood, N. W. Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *Trends Mol. Med.* **12**, 521–8 (2006).
- Wu, Y. T. *et al.* Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **285**, 10850–10861 (2010).
- Xue, L., Borutaite, V. & Tolkovsky, A. M. Inhibition of mitochondrial permeability transition and release of cytochrome c by anti-apoptotic nucleoside analogues. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 441–449 (2002).

- Yang, Y.-P. *et al.* Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol. Sin.* **345**, 625–635 (2013).
- Yao, Z. *et al.* Cell metabolism affects selective vulnerability in PINK1-associated Parkinson's disease. *J. Cell Sci.* **124**, 4194–202 (2011).
- Zatloukal, K. *et al.* p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am. J. Pathol.* **160**, 255–263 (2002).
- Zhang, C. *et al.* Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16259–64 (2011).
- Zhu, J. H. *et al.* Impaired mitochondrial biogenesis contributes to depletion of functional mitochondria in chronic MPP<sup>+</sup> toxicity: dual roles for ERK1/2. *Cell Death Dis.* **3**, e312 (2012).
- Zhu, J.-H. *et al.* Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *Am. J. Pathol.* **170**, 75–86 (2007).



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、最適な実験環境を与えていただきました 広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 医療薬剤学研究室 高野 幹久 教授に心から御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、幅広い見地・経験から御指導、御鞭撻をいただきました 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 太田 茂 教授に深謝致します。

そして、本研究を進めるにあたり、御懇篤なる直接の御指導並びに多大なるご助言をいただきました 広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 古武 弥一郎 准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、貴重なご助言、ご援助を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 佐能 正剛 助教、宮良 政嗣 博士に深く感謝し、御礼申し上げます。

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 教授に深く感謝致します。

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 生理化学研究室 樋木 修 教授、同研究院 薬効解析科学研究室 森岡 徳光 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、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後輩の皆様に心から感謝申し上げます。

最後に、博士課程までの進学を快く認めてくださり、このような勉強する環境を与え、支  
えてくれた家族に感謝致します。