

博士論文

トレハロースによる Akt 発現量低下と そのメカニズムに関する研究

広島大学大学院医歯薬保健学研究科
博士課程医歯薬学専攻
生体機能分子動態学研究室
平成 28 年度入学 梅田 香苗
主指導教員 古武 弥一郎

目次

略語	4
第1章 序論	5
第2章 トレハロースが ALP 関連タンパク質の細胞内局在及び発現量に及ぼす影響	
第1節 緒言	10
第2節 トレハロースが TFEB の細胞内局在に及ぼす影響	12
第3節 トレハロースが LC3-II 及び p62 のタンパク質発現量に及ぼす影響	14
第4節 小括	16
第3章 トレハロースが Akt のタンパク質及び mRNA 発現量に及ぼす影響	
第1節 緒言	17
第2節 トレハロースがリン酸化 Akt 及び総 Akt のタンパク質発現量に及ぼす影響	18
第3節 トレハロースが Akt アイソフォームのタンパク質発現に及ぼす影響	20
第4節 トレハロースが Akt アイソフォームの mRNA 発現量に及ぼす影響	22
第5節 小括	24
第4章 トレハロースが細胞内シグナル伝達経路に及ぼす影響の網羅的解析	
第1節 緒言	25
第2節 トレハロースが種々のタンパク質のリン酸化レベルに及ぼす影響	26
第3節 小括	31
第5章 トレハロースが c-Jun/JunB のタンパク質発現量に及ぼす影響	
第1節 緒言	32

第2節	トレハロースがリン酸化 c-Jun 及び総 c-Jun のタンパク質発現量に及ぼす影響.....	34
第3節	トレハロースがリン酸化 JNK 及び総 JNK のタンパク質発現量に及ぼす影響.....	36
第4節	トレハロースがリン酸化 JunB 及び総 JunB のタンパク質発現量に及ぼす影響.....	38
第5節	プロテアソーム阻害剤がトレハロースによる c-Jun/JunB タンパク質発現量低下に及ぼす影響.....	40
第6節	小括.....	42
第6章	トレハロースによる Akt 発現量低下と c-Jun/JunB 発現量低下の関連性の検討	
第1節	緒言.....	43
第2節	プロテアソーム阻害剤がトレハロースによる <i>AKT1</i> mRNA 発現量低下に及ぼす影響.....	44
第3節	c-Jun/JunB 過剰発現がトレハロースによる Akt 発現量低下及び LC3-II 発現量増加に及ぼす影響.....	45
第4節	小括.....	47
第7章	総括及び考察	48
	実験の部.....	52
	引用文献.....	67
	本論文に関連した学会発表.....	73
	謝辞.....	74

略語

ALP, autophagy lysosomal pathway
AP-1, activator protein 1
AMPK, AMP-activated protein kinase
CLEAR, coordinated lysosomal expression and regulation
CMA, chaperon-mediated autophagy
DAPI, 4'6-diamidino-2-phenylindole
DMEM, Dulbecco's modified Esgle's medium
DMSO, dimethyl sulfoxide
HA, human influenza hemagglutinin
JNK, c-Jun N-terminal kinase
LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3
MPP⁺, 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion
mTOR, mammalian target of rapamycin
mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1
D-PBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline
PD, Parkinson's disease
PVDF, polyvinylidene difluoride
qRT-PCR, quantitative real-time reverse transcription PCR
S.D., standard deviation
SDS, sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SLC2A, solute carrier 2A
SQSTM1, sequestosome-1
TBS, tris buffered saline
TFEB, transcription factor EB
ULK1, unc-51-like kinase-1

第1章 序論

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、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 (Parzych and Klionsky, 2014)。

マクロオートファジーの過程において、隔離膜によって取り囲まれた細胞内成分は、オートファゴソームと呼ばれる二重膜構造体に隔離される (Fig. 1)。

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を形成し、オートファゴソームの内容物はリソソーム内加水分解酵素によって大規模に分解される (Fig. 1)。

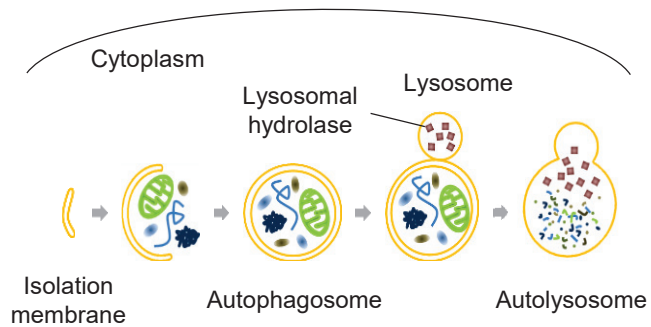


Fig. 1 Schematic diagram of autophagy

ミクロオートファジーにおいて、細胞内成分はオートファゴソームを形成せず、リソソームに直接取り込まれる。また、CMA の過程において、KFERQ 配列を持つタンパク質は、heat-shock 70 kDa protein 8 によって認識され、lysosomal-associated membrane protein type 2A を介して選択的にリソソームに導かれる。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り、本研究におけるオートファジーまたはオートファジー・リソソーム経路 (autophagy-lysosomal pathway: ALP) という記述は、主にマクロオートファジーのことを指す。

近年、ALP の機能異常が様々な疾患の発症につながる可能性が指摘されている。特に、2006 年に、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引き起こすことが報告 (Komatsu *et al.*, 2006; Hara *et al.*, 2006) されて以来、ALP の機能異常が様々な神経変性疾患の発症に関与する証拠が蓄積してきている。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、中脳の黒質におけ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を病理学的特徴とする (de Lau and Breteler, 2006; Kalia and Lang, 2015)。現在までに、PD 患者の死後脳において、オートファジー関連空胞の蓄積や ALP

関連タンパク質の発現量変化が認められること (Anglade *et al.*, 1997; Toulorge *et al.*, 2016; Moors *et al.*, 2017)、ALP 関連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 (Decressac *et al.*, 2013; Arotcarena *et al.*, 2019)。また、PD 患者の約 5%を占める遺伝性 PD の原因遺伝子のいくつかは、ALP 機能に重要な役割を果たすタンパク質をコードしている (Moors *et al.*, 2017; Senkevich and Gan-Or, 2019)。さらに、ドパミン神経選択的オートファジー欠損マウスは、老齢期においてレビー小体様封入体の蓄積や運動機能障害を引き起こすことも明らかになっている (Ahmed *et al.*, 2012; Friedman *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2018)。当研究グループにおいても、PD 関連化学物質である 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) 及びロテノンが低濃度においてリソソーム機能低下を引き起こし、ALP を阻害することを明らかにしてきた (Miyara *et al.*, 2016; Sakamoto *et al.*, 2016)。上記を含む数多くの研究より、ALP 機能を亢進する物質の探索やそのメカニズム解明は PD を含む ALP 関連疾患の治療戦略開発を進める上で重要であると考えられる。

トレハロースは、グルコース 2 分子が α,α -1,1 結合した非還元性二糖類 (Fig. 2) であり、細菌、酵母、菌類、昆虫、無脊椎動物、植物など、自然界に広く存在する (Lee *et al.*, 2018)。これらの生物において、トレハロースは、極限温度、栄養飢餓、浸透圧ストレス、乾燥などの様々な環境ストレスに応答して細胞内に蓄積し、タンパク質や生体膜を保護することが知られている。また、トレハロースは、昆虫の主要な血糖であり、飛翔のエネルギー源として利用されている (Elbein, 1974)。デンプンを用いてトレハロースの大量生産が可能となった現代において、トレハロースはその特徴的な物性から食品や化粧品等に幅広く利用されている (TREHA[®] web; HAYASHIBARA)。ヒトは体内でトレハロースを合成することは出来ないが、食品を通じて少量のトレハロースを日常的に摂取しており、体内に取り込まれたトレハロースの多くは、主に小腸の刷子縁膜に発現するトレハラーゼによってグルコース 2 分子に分解される (Ishihara *et al.*, 1997)。

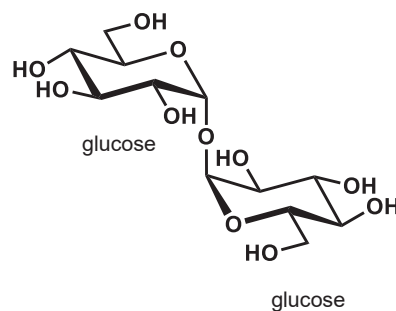


Fig. 2 Structure of trehalose

mammalian target of rapamycin (mTOR) は、オートファジーの開始を制御する主要な因子であり、細胞内の栄養飢餓状態や rapamycin などの ALP 誘導剤は、mTOR の活性低下を介してオートファジーを誘導する。2007 年に Sarkar らは、トレハロースが高濃度 (100 mM) において、mTOR 非依存的に ALP 機能を亢進することを明らかにした (Table 1, Sarkar *et al.*, 2007)。また、単糖 (フルクトースやソルビトールなど) や、還元性多糖

Table 1 Several mechanisms of trehalose-induced ALP activation.

research team	Sarkar et al.	DeBosch et al.	Palmieri et al.
year of publication	2007	2016	2017
journal	J. Biol. Chem.	Sci. Signal.	Nat. Commun.
autophagy	induce	induce	induce
cell species (conc.) (term)	COS-7, HeLa cells (100 mM) (24 h)	Primary Hepatocyte (100 mM) (1 h)	HeLa cells (100 mM) (24 h)
animal species (conc.) (term)	-	WT mice (3 g/kg in gavage) (1~4 h) NAFLD model / WT mice (3% in water) (48 h)	Cln3 ^{Δex7-8} / WT mice (2% in water) (18~24 months)
mechanism	m-TOR-independent	SLC2A inhibition AMPK phosphorylation	p-Akt dephosphorylation TFEB activation

類（マルトースなど）では ALP 機能亢進は引き起こされないことから、トレハロースによる ALP 機能亢進は、単に浸透圧ストレスによるものではなく、非還元性多糖類に特徴的な作用であることが示唆されている（Higuchi *et al.*, 2015; Yoon *et al.*, 2017）。

実際に、トレハロースは ALP 機能亢進を介して神経変性疾患などのモデル動物の疾患症状を緩和することが明らかになりつつある（Hosseinpour-Moghaddam *et al.*, 2018）。例えば、トレハロース（3%飲水 48 時間投与）は、非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスにおける肝臓中脂肪蓄積を抑制することが報告されている（Table 1; DeBosch *et al.*, 2016）。また、トレハロース（2%飲水 18~24 ヶ月投与）は、リソソーム病（若年性セロイドリポフスチン症）モデルマウスにおける脳重量低下を抑制し、生存期間を約 150 日延長させることも報告されている（Table1; Palmieri *et al.*, 2017）。これらの報告において、トレハロースの効果は ALP 機能亢進を介して引き起こされることが示唆されている。細胞を用いた実験系においても、トレハロースは、ハンチントン病関連変異型 huntingtin 及び PD 関連変異型 α -synuclein のオートファジー分解を促進し、その毒性を軽減すること（Sarkar *et al.*, 2007）、MPP⁺及びロテノンによるリソソーム膜破壊及び ALP 機能低下を抑制し、その毒性を軽減すること（Dehay *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2015）などが報告されている。当研究室においても、トレハロースが低濃度 MPP⁺による ALP 機能低下及び細胞死を一部軽減することを明らかにしてきた（Miyara *et al.*, 2016）。

トレハロースによる ALP 機能亢進メカニズムについても、様々な細胞を用いた実験系において研究がなされてきた。AMP-activated protein kinase (AMPK) は、細胞内グルコース濃度低下に伴う AMP/ATP 比の増加に反応して活性化し、ALP の初期段階において重要な役割を担う unc-51-like kinase-1 (ULK1) のリン酸化を介して ALP を誘導することが知られている (Kim *et al.*, 2011)。DeBosch ら (2016) は、トレハロースが、グルコーストランスポーターの一つである solute carrier 2A (SLC2A) を阻害し、細胞内の低グルコース状態を引き起こすことで、AMPK の活性化及び ULK1 のリン酸化を介して ALP 機能亢進を引き起こすことを明らかにした (Table 1)。一方、2009 年に転写因子 transcription factor EB (TFEB) が ALP 関連遺伝子のマスターレギュレーターであることが明らかになり (Sardiello *et al.*, 2009)、Dehay ら (2010) は、トレハロースが TFEB の活性化 (核移行) を介して ALP 機能亢進を引き起こすことを明らかにした。

TFEB は、通常、mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) を始めとする様々なキナーゼによるリン酸化を受け、細胞質に局在している。一方、リソソーム内タンパク質分解活性の低下がシグナルとなり mTORC1 がリソソーム膜から解離 (不活性化) すると、

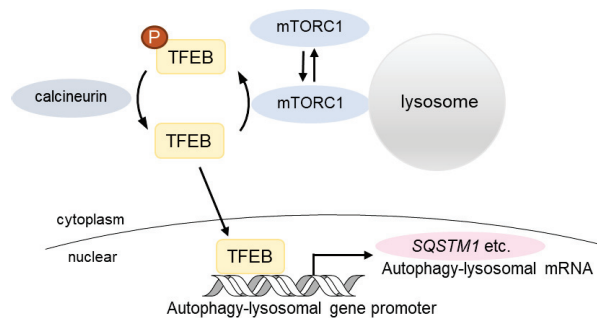


Fig. 3 A regulation of autophagy-lysosomal gene expression.

Calcineurin による脱リン酸化が優位となり TFEB は核に移行する。核に移行した TFEB は、リソソーム遺伝子のプロモーター領域に存在する coordinated lysosomal expression and regulation (CLEAR) 配列に結合し、ALP 関連遺伝子の発現を促進する (Fig. 3, Settembre *et al.*, 2012; Medina *et al.*, 2015; Napolitano and Ballabio, 2016)。Palmieri (2017)

らは近年、Akt もまた TFEB のリン酸化 (Ser 467) を担うことを見出した。また、トレハロースは、リン酸化 Akt 発現量低下を介して TFEB を核に移行させ、ALP 関連遺伝子の発現を促進することを明らかにした (Table 1 and Fig. 4)。

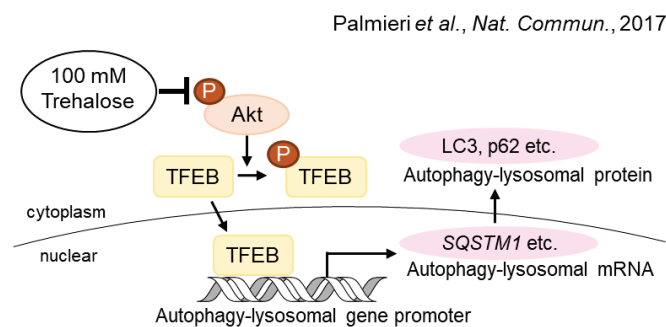


Fig. 4 A mechanism of trehalose-induced ALP activation proposed by Palmieri *et al.*

しかし、トレハロースがリン酸化 Akt 発現量低下を引き起こす詳細なメカニズムについては明らかにされていない。本研究ではトレハロースがリン酸化 Akt 発現量低下を引き起こす上流のメカニズムを解明することを目的とした。

第 2 章

トレハロースが ALP 関連タンパク質の細胞内局在 及び発現量に及ぼす影響

第 1 節 緒言

2007 年にトレハロース (100 mM) が ALP 機能亢進を引き起こすことが報告されて以来、様々な細胞を用いた実験系によってそのメカニズム解明がなされてきた (Sarkar *et al.*, 2007; DeBosch *et al.*, 2016; Palmieri *et al.*, 2017)。

近年、トレハロースによる ALP 機能亢進に TFEB の核移行促進が関与していることが明らかになってきている (Dehay *et al.*, 2010)。TFEB は、ALP 関連遺伝子のマスターレギュレーターであり、通常は mTORC1 を始めとする様々なキナーゼによるリン酸化を受け、細胞質に局在している (Puertollano *et al.*, 2018)。一方、栄養飢餓やリソソームストレス等の条件下においては Calcineurin による脱リン酸化が優位となり、TFEB は核に移行する。その後、TFEB は、ALP 関連遺伝子のプロモーター領域に存在する CLEAR 配列に結合し、ALP 関連遺伝子の発現を促進する (Sardiello *et al.*, 2009; Settembre *et al.*, 2012; Martina *et al.*, 2015; Napolitano and Ballabio, 2016)。

Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) 及び p62 は、ALP 機能において特に重要な役割を果たすタンパク質であり、その発現量は TFEB によって正に制御されること (Settembre *et al.*, 2011)、トレハロースによって増加することが報告されている (Sarkar *et al.*, 2007; Higuchi *et al.*, 2015; Tien *et al.*, 2016; Yoon *et al.*, 2017)。LC3 は細胞質で合成された後、システインプロテアーゼ autophagy-related 4 によって直ちに C 末端を切断され、細胞質型 LC3 (LC3-I) に変換される (Kabeya *et al.*, 2000)。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することでオートファゴソーム膜結合型 LC3 (LC3-II) に変換され、オートファゴソーム形成に必須な役割を果たすことが知られている (Kabeya *et al.*, 2000)。p62/sequestosome-1 (p62) は、LC3 との結合を介してオートファジー選択的に分解されるオートファジー選択的基質である (Bjørkøy *et al.*, 2005; Komatsu and Ichimura, 2010)。また、p62 は、C 末端領域に

ユビキチン結合ドメインを有しており、ポリユビキチン化タンパク質を ALP に誘導する重要なアダプタータンパク質であることが明らかになっている (Komatsu and Ichimura, 2010)。

本章では、本実験系においてもトレハロースが ALP 機能亢進を引き起こすことを確認するために、第 2 節ではトレハロースが TFEB の細胞内局在に及ぼす影響を、第 3 節ではトレハロースが LC3-II 及び p62 のタンパク質発現量に及ぼす影響を評価した。

第2節 トレハロースが TFEB の細胞内局在に及ぼす影響

HeLa 細胞においてトレハロースが TFEB の細胞内局在に及ぼす影響をウェスタンブロット法及び免疫細胞化学染色法により評価した。トレハロース (100 mM) を 24 時間曝露した細胞において、TFEB の発現量は、細胞質画分において 0.31 ± 0.04 -fold of control に低下し、核画分において 1.50 ± 0.23 -fold of control に増加していた (Fig. 5A and B)。また、TFEB は、正常細胞において主に細胞質に局在するが、トレハロースを 24 時間曝露した細胞においては主に核に局在することが免疫細胞化学染色法によっても確認された (Fig. 5C)。

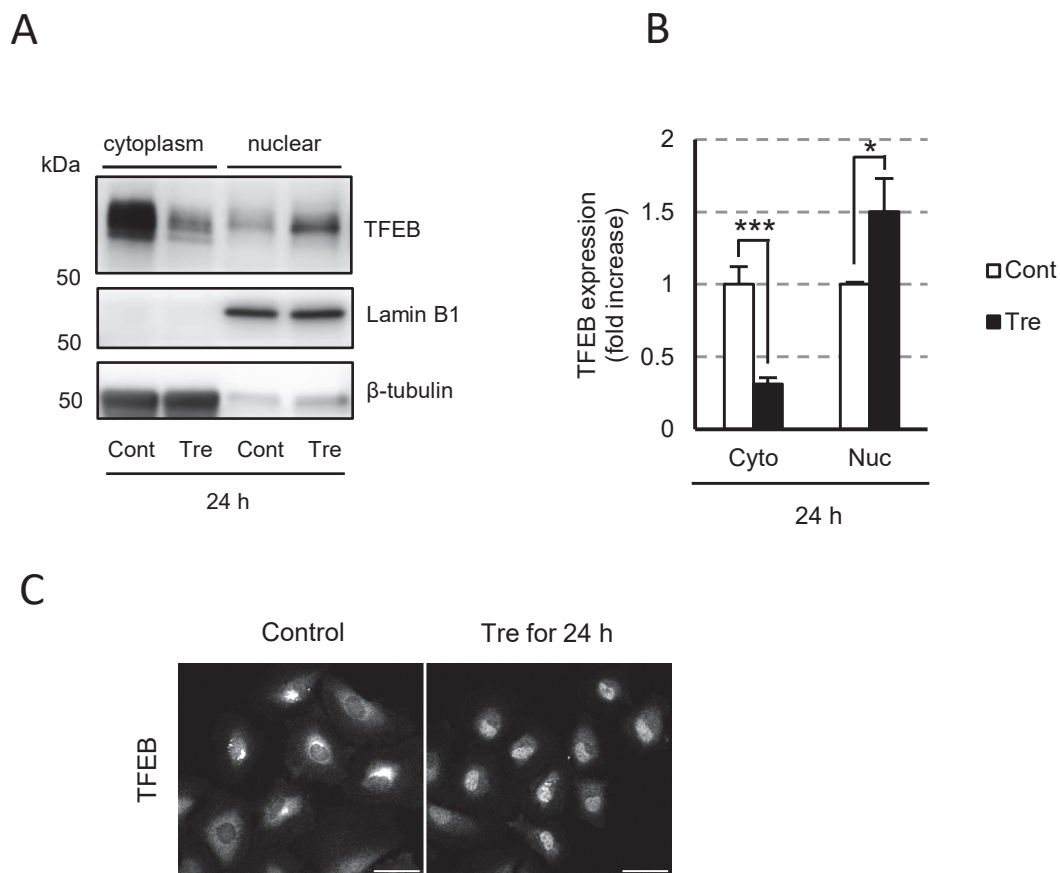


Figure 5. Effect of trehalose on subcellular localization of TFEB. (A) HeLa cells were exposed to 100 mM trehalose for 24 h. Cells were lysed in hypotonic buffer containing 0.5% Nonidet P-40 detergent to prepare for cytoplasmic fraction and remaining nuclear fractions was prepared with high-salt buffer. Equal amounts of protein from each cell fraction lysate were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and TFEB protein was detected by western blot analysis. β -Tubulin was used as the loading control for cytoplasmic fraction and Lamin B1 was used as the loading control for nuclear fraction. (B) The band intensities of TFEB, β -tubulin and Lamin B1 were quantified by densitometric analysis. Data are expressed as mean fold increase of TFEB/ β -tubulin (cytoplasm) and TFEB/Lamin B1 (nuclear) ratio (\pm standard deviation; S.D.) compared with the control. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, vs. control. (C) HeLa cells were exposed to 100 mM trehalose for 24 h. TFEB subcellular localization was evaluated using immunocytochemical staining. Scale bar represents 50 μ m.

第3節 トレハロースが LC3-II 及び p62 のタンパク質発現量に及ぼす影響

HeLa 細胞においてトレハロースが LC3-II 及び p62 のタンパク質発現量に及ぼす影響をウェスタンブロット法により評価した。トレハロース (100 mM) は、24 時間曝露後において、LC3-II 及び p62 のタンパク質発現量増加 (4.84 ± 0.16 -fold of control 及び 1.46 ± 0.34 -fold of control) を引き起こした (Fig. 6A-C)。

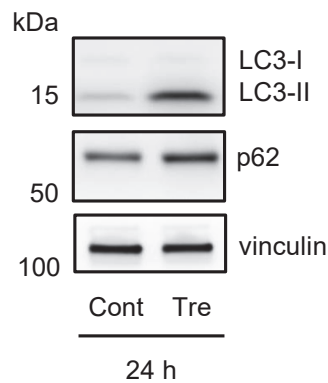
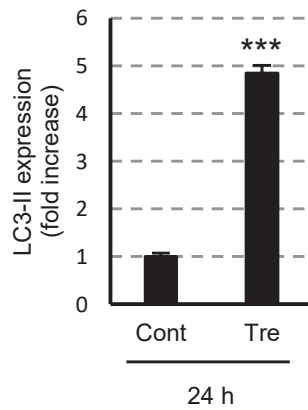
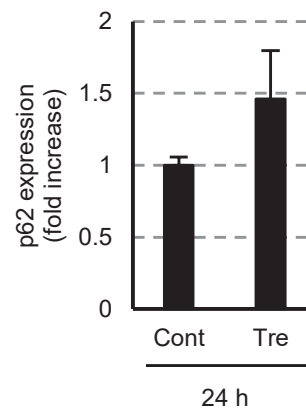
A**B****C**

Figure 6. Effect of trehalose on protein expression levels of LC3-II and p62. (A) HeLa cells were exposed to 100 mM trehalose for 24 h, and lysed in TNE buffer containing 1% Nonidet P-40 detergent. Equal amounts of protein from each cell lysate were separated by SDS-PAGE and LC3 and p62 proteins were detected by western blot analysis. Vinculin was used as the gel-loading control. (B) The band intensities of LC3-II and vinculin were quantified by densitometric analysis. Data are expressed as mean fold increase in LC3-II/vinculin ratio (\pm S.D.) relative to corresponding controls. *** $P < 0.001$ vs. control. (C) The band intensities of p62 and vinculin were quantified by densitometric analysis. Data are expressed as mean fold increase in p62/vinculin ratio (\pm S.D.) relative to corresponding controls.

第4節 小括

トレハロースは、先行研究と同様に、TFEBの核移行促進、LC3-II及びp62のタンパク質発現量増加を引き起こした。本章の結果より、本実験系においても、トレハロースはALP機能亢進を引き起こすことが確認された。

第3章

トレハロースが Akt のタンパク質及び mRNA 発現量 に及ぼす影響

第1節 緒言

近年、TFEB の活性（核移行）は、mTORC1（Ser122/Ser142/Ser211）、extracellular signal-regulated kinase 2（Ser142）、glycogen synthase kinase 3 β （Ser134/Ser138）などの様々なキナーゼによって調節されていることが明らかになってきている（Settembre *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016; Puertollano *et al.*, 2018）。また、protein kinase C β による TFEB の C 末端領域のリン酸化は、TFEB の安定性に関与することが報告されている（Ferron *et al.*, 2013）。近年、Akt もまた、TFEB のリン酸化（Ser467）を担う新たなキナーゼであることが明らかになり、トレハロースは、リン酸化 Akt 発現量低下を介して TFEB の核移行を促進することが報告された（Palmieri *et al.*, 2017）。一方、トレハロースによるリン酸化 Akt 発現量低下の詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。

本章では、トレハロースによるリン酸化 Akt 発現量低下のメカニズムを検討するために、まず、第2節においてトレハロースがリン酸化 Akt 及び総 Akt のタンパク質発現量に及ぼす影響を評価した。また、第2節においてトレハロースが総 Akt タンパク質発現量低下を引き起こすことが明らかになったため、第3節ではトレハロースが Akt アイソフォーム（Akt1、Akt2、Akt3）のタンパク質発現量に及ぼす影響を、第4節ではトレハロースが各 Akt アイソフォームの mRNA 発現量に及ぼす影響を評価した。

第2節 トレハロースがリン酸化 Akt 及び総 Akt のタンパク質

発現量に及ぼす影響

HeLa 細胞においてトレハロースがリン酸化 Akt 及び総 Akt のタンパク質発現量に及ぼす影響をウェスタンブロット法により評価した。総 Akt のタンパク質発現量は、2 種類の抗体 (#9272, Cell Signaling Technology 及び #4691, Cell Signaling Technology) を用いて評価した。トレハロース (100 mM) は、24 時間曝露後においてリン酸化 Akt の発現量低下 (0.87 ± 0.04 -fold of control) を引き起こした (Fig. 5A and B)。このとき、トレハロースは、リン酸化 Akt のみならず総 Akt のタンパク質発現量低下 (0.69 ± 0.04 -fold of control, #9272 及び 0.73 ± 0.07 -fold of control, #4691) を引き起こすことが新たに見出された (Fig. 7A and B)。

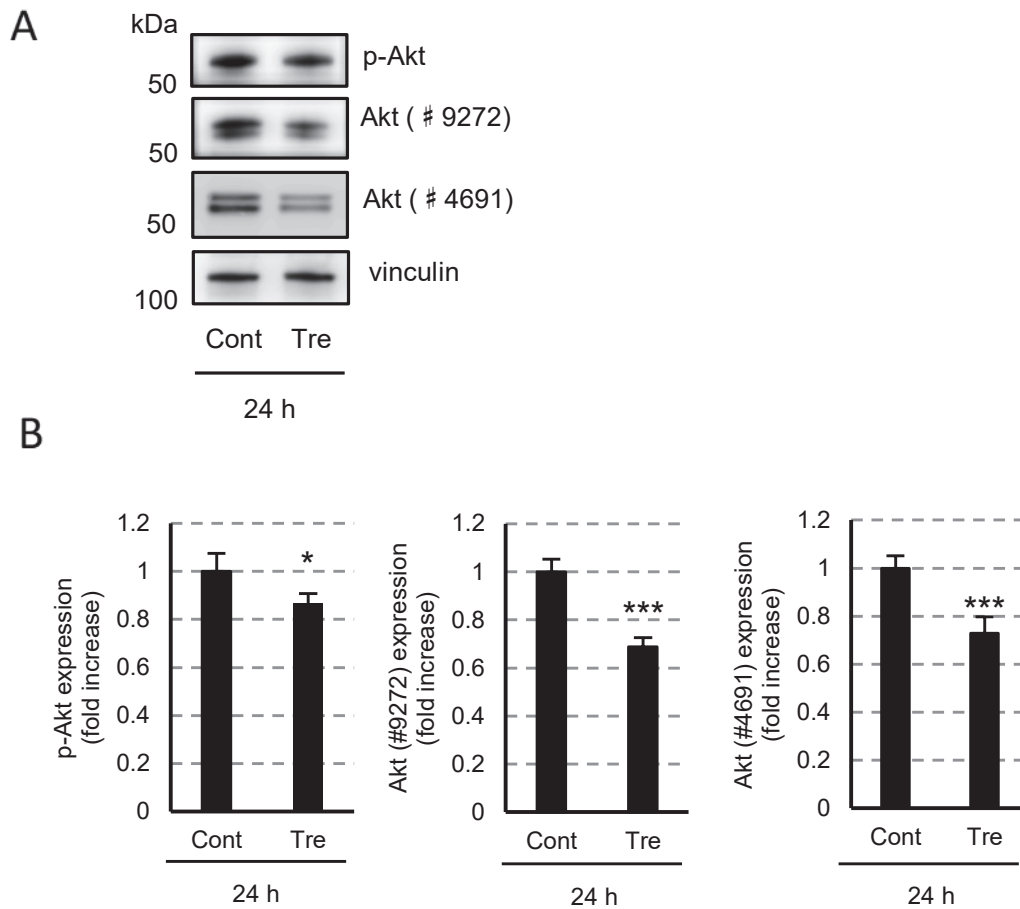


Figure 7. Effect of trehalose on protein expression levels of p-Akt and Akt. (A) HeLa cells were exposed to 100 mM trehalose for 24 h, and lysed in TNE buffer containing 1% Nonidet P-40 detergent. Equal amounts of protein from each cell lysate were separated by SDS-PAGE and p-Akt and Akt proteins were detected by western blot analysis. Vinculin was used as the gel-loading control. (B) The band intensities of p-Akt and Akt were quantified by densitometric analysis. Data are expressed as mean fold increase in p-Akt/vinculin and Akt/vinculin (detected with CST#9272 antibody or with CST#4691 antibody) ratio (\pm S.D.) relative to corresponding controls. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. control.

第3節 トレハロースが Akt アイソフォームのタンパク質発現量に及ぼす影響

HeLa 細胞においてトレハロースが Akt アイソフォーム (Akt1、Akt2、Akt3) のタンパク質発現量に及ぼす影響をウェスタンブロット法により評価した。トレハロース (100 mM) は、24 時間曝露後において全ての Akt アイソフォーム (Akt1、Akt2、Akt3) のタンパク質発現量低下 (Akt1, 0.69 ± 0.06 -fold of control; Akt2, 0.83 ± 0.04 -fold of control; Akt3, 0.74 ± 0.15 -fold of control) を引き起こした (Fig. 8A and B)。

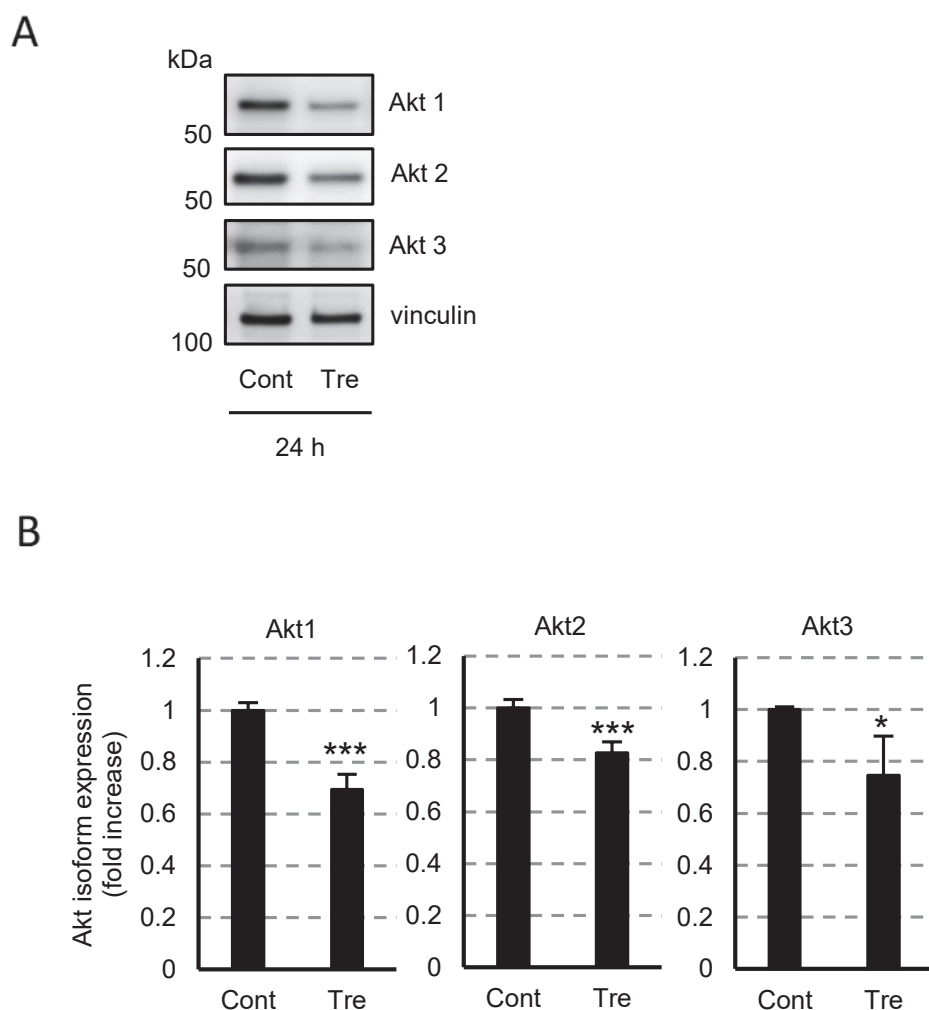


Figure 8. Effect of trehalose on protein expression levels of three Akt isoforms. (A) HeLa cells were exposed to 100 mM trehalose for 24 h, and lysed in TNE buffer containing 1% Nonidet P-40 detergent. Equal amounts of protein from each cell lysate were separated by SDS-PAGE and Akt1, Akt2 and Akt3 proteins were detected by western blot analysis. Vinculin was used as the gel-loading control. (B) The band intensities of Akt1, Akt2 and Akt3 were quantified by densitometric analysis. Data are expressed as mean fold increase in Akt1/vinculin, Akt2/vinculin and Akt3/vinculin ratio (\pm S.D.) relative to corresponding controls. *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ vs. control.

第4節 トレハロースが Akt アイソフォームの mRNA 発現量に及ぼす影響

HeLa 細胞においてトレハロースが Akt アイソフォーム Akt1 (遺伝子名: *AKT1*)、Akt2 (遺伝子名: *AKT2*)、Akt3 (遺伝子名: *AKT3*) の mRNA 発現量に及ぼす影響をリアルタイム PCR 法により評価した。トレハロース (100 mM) は、6 時間曝露後において全ての Akt アイソフォームの mRNA 発現量低下 (*AKT1*, 0.73 ± 0.02 -fold of control; *AKT2*, 0.78 ± 0.07 -fold of control; *AKT3*, 0.61 ± 0.27 -fold of control) を引き起こした (Fig. 9)。トレハロースによる *AKT1* mRNA 発現量低下は、12 時間及び 24 時間曝露後においても認められたが、*AKT2* mRNA 発現量は、トレハロース曝露後 12 時間及び 24 時間においてコントロールと同程度まで回復していた (Fig. 9)。また、*AKT3* mRNA 発現量は、トレハロース曝露後 12 時間においてコントロールと同程度まで回復し、24 時間においては増加することが明らかになった (Fig. 9)。

一方、トレハロースは、6 時間曝露後において p62 (遺伝子名: *sequestosome-1*; *SQSTM1*) の mRNA 発現量増加 (1.35 ± 0.19 -fold of control) を引き起こした (Fig. 9)。また、トレハロースによる *SQSTM1* mRNA 発現量増加は、12 時間及び 24 時間曝露後においても認められた (Fig. 9)。

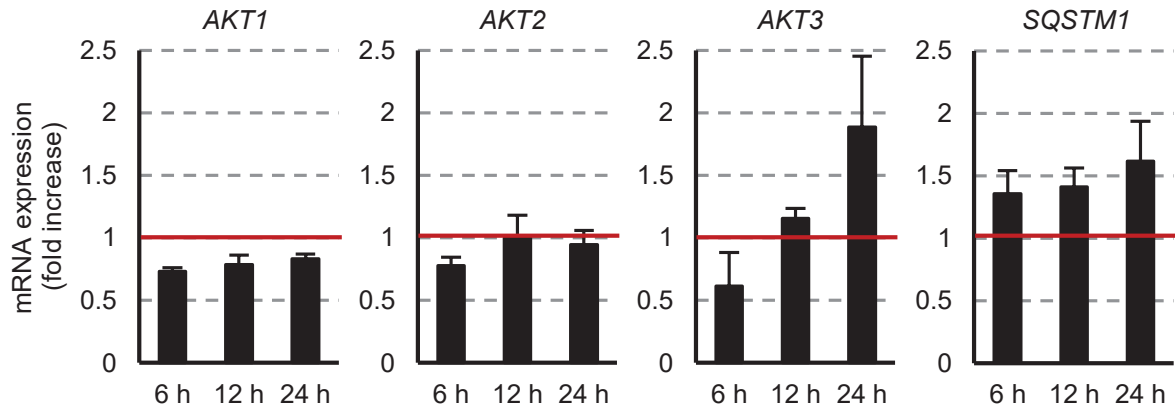


Figure 9. Effect of trehalose on mRNA expression levels of three *AKT* isoforms and *SQSTM1*. HeLa cells were exposed to 100 mM trehalose for 6 h, 12 h and 24 h, and total RNA was extracted. Quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) was performed with PowerUp SYBR Green Master Mix. The mRNA expression levels of three *AKT* isoforms/*RPL13A* and *SQSTM1*/*RPL13A* in trehalose exposed cells were normalized to those in control cells at each time.

第5節 小括

トレハロースは、本実験系においても先行研究 (Palmieri *et al.*, 2017) と同様にリン酸化 Akt の発現量低下を引き起こした。一方、本実験系において、トレハロースはリン酸化 Akt のみならず総 Akt のタンパク質発現量低下を引き起こすことが新たに見出された。また、トレハロースは、曝露後 6 時間において全ての Akt アイソフォームの mRNA 発現量低下を、曝露後 24 時間において全ての Akt アイソフォームのタンパク質発現量低下を引き起こしたことから、*AKT* 遺伝子発現抑制を介して Akt タンパク質発現量低下を引き起こすことが示唆された。なお、TFEB の標的遺伝子の一つである *SQSTM1* の mRNA 発現量は、先行研究 (Palmieri *et al.*, 2017; Yoon *et al.*, 2017) と同様に増加したことから、本研究における mRNA 発現量測定は正確に実施できていると考えられる。

本章の結果より、トレハロースは、*AKT* 遺伝子発現抑制を介して Akt タンパク質発現量低下を引き起こし、このことがリン酸化 Akt 発現量低下に寄与することが示唆された。

第4章

トレハロースが細胞内シグナル伝達経路に及ぼす影響の 網羅的解析

第1節 緒言

第3章において、トレハロースは、*AKT* 遺伝子発現抑制を介して Akt タンパク質発現量低下を引き起こすことが示唆された。従って、トレハロースは *AKT* 遺伝子の発現量調節を担う細胞内シグナル伝達経路及び転写因子の活性低下を引き起こす可能性が考えられる。

本章では、トレハロースによる *AKT* 遺伝子発現量低下のメカニズムを明らかにするために、トレハロースが細胞内シグナル伝達経路に及ぼす影響の網羅的解析を Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit (R&D SYSTEMS) を用いて行った。

本キットは、細胞内シグナル伝達経路に関わる 45 種類のタンパク質のリン酸化レベルを測定することができる。本キットで用いるメンブレンには、各種タンパク質認識抗体がスポットされており、細胞可溶化液中に含まれる各種リン酸化タンパク質をタンパク質認識抗体と Biotin 標識リン酸化部位認識抗体とで挟み、それらのリン酸化レベルを Streptavidin-HRP を用いて化学発光により検出することができる (Fig. 10 and Table 2)。

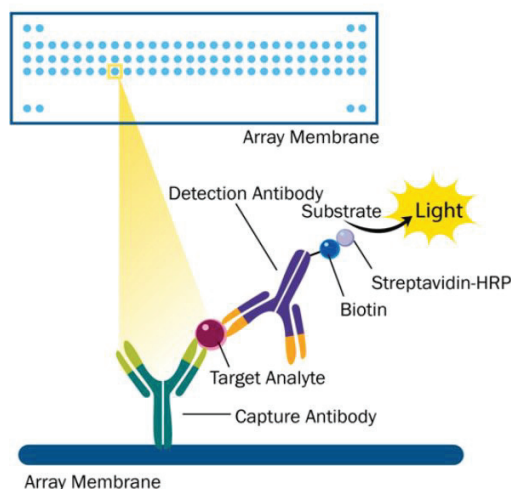


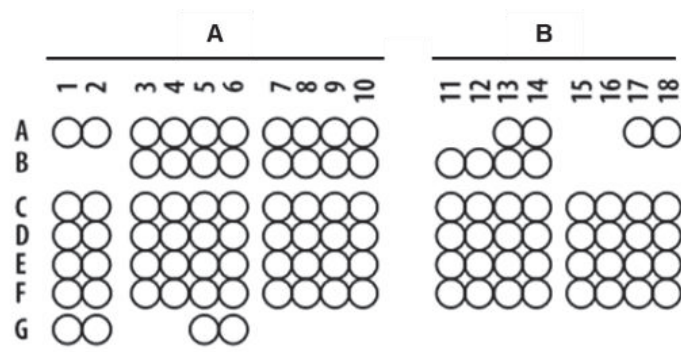
Figure 10. Principle of the assay.

第2節 トレハロースが種々のタンパク質のリン酸化レベルに及ぼす影響

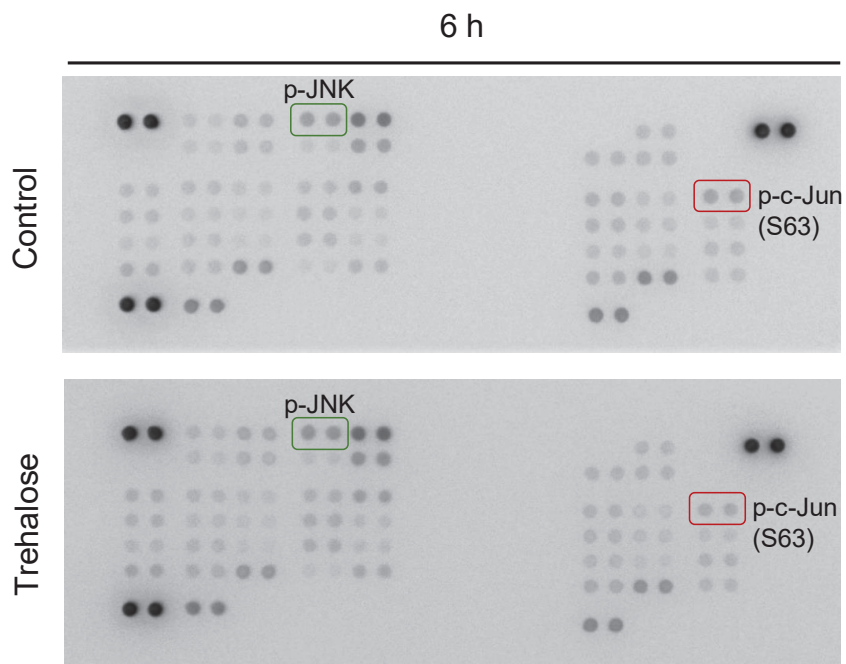
HeLa 細胞においてトレハロースが細胞内シグナル伝達経路に関わる種々のタンパク質のリン酸化レベルに及ぼす影響を Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit (R&D SYSTEMS) を用いて評価した。45 種類のタンパク質認識抗体は、それぞれ Fig. 11A の位置 (A or B, A-G, 1-18) に配置され、該当タンパク質名及びリン酸化領域は Table 2 に示した。

トレハロース (100 mM) は、6 時間曝露後において転写因子複合体 activator protein 1 (AP-1) の構成因子 c-Jun のリン酸化レベル低下 (0.64-fold of control) を引き起こした (Fig. 11B and C)。一方、このとき、c-Jun のリン酸化を担う c-Jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化レベルに変化は認められなかった (Fig. 11B and C)。

A



B



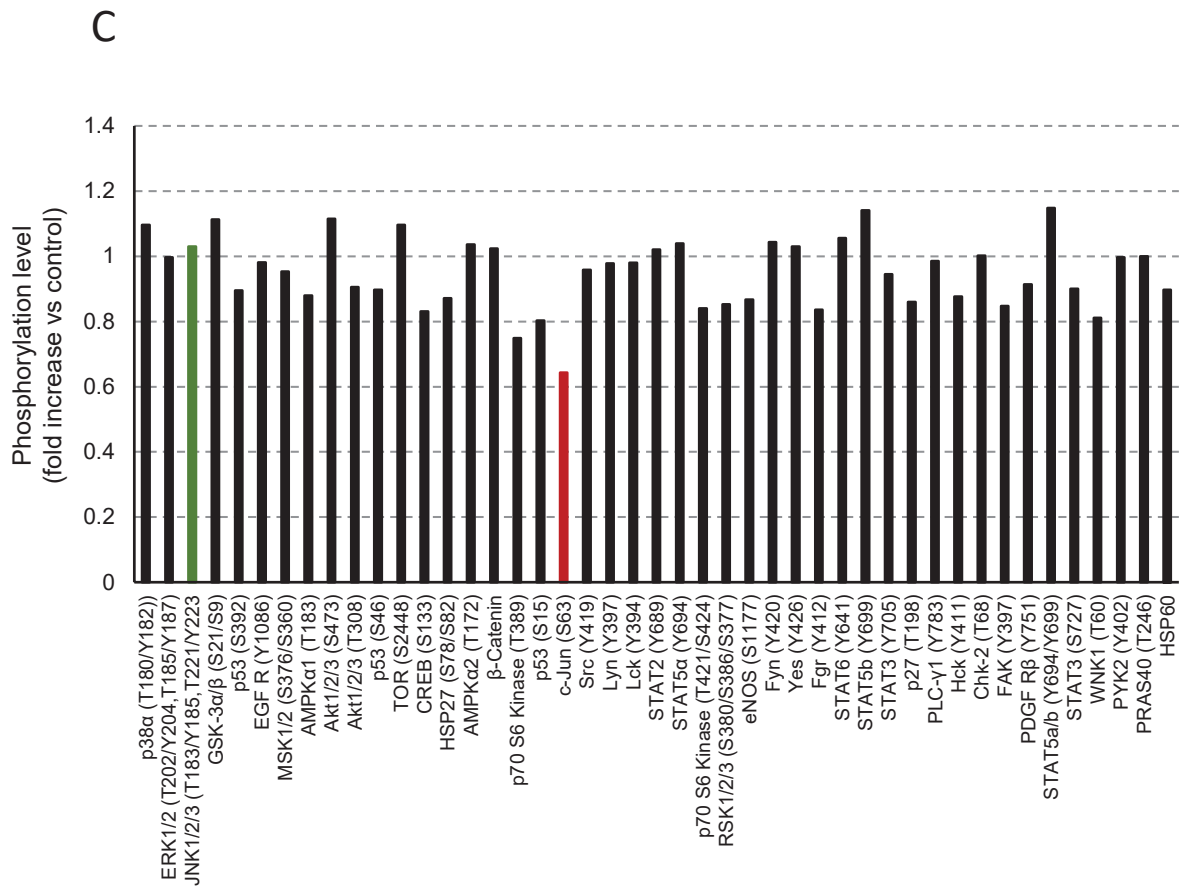


Figure 11. Effect of trehalose on phosphorylation levels of various proteins. (A) Human phospho-kinase array coordinates. (B) HeLa cells were exposed to 100 mM trehalose for 6 h and lysed in lysis buffer. Expression levels of various phosphorylated proteins was assessed using proteome profiler™ human phospho-kinase array kit. (C) The band intensities of phosphorylated proteins were quantified by densitometric analysis and compared with the reference spots in the corners of the membrane. Phosphorylated protein level was compared with that of control.

Table 2. human phospho-kinase array coordinates.

Membrane/Coordinate	Target/Control	Phosphorylation Site	Cell Source/Treatment
A-A1, A2	Reference Spot	—	—
A-A3, A4	p38 α	T180/Y182	MCF-7/UV*
A-A5, A6	ERK1/2	T202/Y204, T185/Y187	HeLa/PMA*
A-A7, A8	JNK pan	T183/Y185, T221/Y223	MCF-7/UV*
A-A9, A10	GSK-3 α/β	S21/S9	MCF-7/rhIGF-I
B-A13, A14	p53	S392	MCF-7/CPT*
B-A17, A18	Reference Spot	—	—
A-B3, B4	MEK1/2	S218/S222, S222/S226	MCF-7/UV*
A-B5, B6	MSK1/2	S376/S360	HeLa/PMA*
A-B7, B8	AMPK α 1	T174	Jurkat/H ₂ O ₂ *
A-B9, B10	Akt	S473	MCF-7/rhIGF-I*
B-B11, B12	Akt	T308	K562/Pervanadate
B-B13, B14	p53	S46	MCF-7/CPT*
A-C1, C2	TOR	S2448	MCF-7/UV*
A-C3, C4	CREB	S133	Jurkat/H ₂ O ₂ *
A-C5, C6	HSP27	S78/S82	HeLa/PMA*
A-C7, C8	AMPK α 2	T172	HepG2/Metformin*
A-C9, C10	β -Catenin	—	HeLa/PMA*
B-C11, C12	p70 S6 Kinase	T389	MCF-7/CPT*
B-C13, C14	p53	S15	MCF-7/CPT*
B-C15, C16	p27	T198	Jurkat/H ₂ O ₂ *
B-C17, C18	Paxillin	Y118	K562/Pervanadate
A-D1, D2	Src	Y419	COLO 205/SFM*
A-D3, D4	Lyn	Y397	Daudi/Pervanadate*
A-D5, D6	Lck	Y394	Jurkat/Pervanadate
A-D7, D8	STAT2	Y689	Daudi/rhIFN- α 2A
A-D9, D10	STAT5a	Y694	U937/PMA + rhIL-4
B-D11, D12	p70 S6 Kinase	T421/S424	MCF-7/UV*
B-D13, D14	RSK1/2/3	S380/S386/S377	HeLa/PMA*
B-D15, D16	p27	T157	K562/Pervanadate
B-D17, D18	PLC γ -1	Y783	Jurkat/H ₂ O ₂ *

(continued)

Membrane/Coordinate	Target/Control	Phosphorylation Site	Cell Source/Treatment
A-E1, E2	Fyn	Y420	Daudi/Pervanadate*
A-E3, E4	Yes	Y426	K562/Pervanadate*
A-E5, E6	Fgr	Y412	K562/Pervanadate
A-E7, E8	STAT3	Y705	LNcap/rhIL-6
A-E9, E10	STAT5b	Y699	Daudi/rhIFN- α 2A*
B-E11, E12	p70 S6 Kinase	T229	MCF-7/CPT*
B-E13, E14	RSK1/2	S221/S227	U937/PMA + rhIL-4
B-E15, E16	c-Jun	S63	HeLa/PMA*
B-E17, E18	Pyk2	Y402	K562/Pervanadate*
A-F1, F2	Hck	Y411	Daudi/Pervanadate
A-F3, F4	Chk-2	T68	HeLa/CPT*
A-F5, F6	FAK	Y397	HepG2/Pervanadate
A-F7, F8	STAT6	Y641	U937/PMA + rhIL-4
A-F9, F10	STAT5a/b	Y694/Y699	Daudi/rhIFN- α 2A
B-F11, F12	STAT1	Y701	Daudi/rhIFN- α 2A
B-F13, F14	STAT4	Y693	NC-37/Pervanadate
B-F15, F16	eNOS	S1177	Jurkat/H ₂ O ₂ *
B-F17, F18	PBS (Negative Control)	—	—
A-G1, G2	Reference Spot	—	—
A-G5, G6	PBS (Negative Control)	—	—

第3節 小括

本章の結果より、トレハロースは、JNK 非依存的に c-Jun のリン酸化レベル低下を引き起こすことが示唆された。現在までに、c-Jun を含む転写因子複合体 AP-1 は、AKT 遺伝子のプロモーター領域に結合し、その発現を正に制御することが報告されている (Atsaves *et al.*, 2015)。従って、トレハロースは AP-1 の活性低下を介して AKT 遺伝子発現量低下を引き起こす可能性が考えられた。

第5章

トレハロースが c-Jun/JunB のタンパク質発現量に及ぼす影響

第1節 緒言

第4章において、トレハロースは、JNK 非依存的に c-Jun のリン酸化レベル低下を引き起こすことが示唆された。c-Jun 及びそのファミリータンパク質である JunB を含む転写因子複合体 AP-1 は、AKT 遺伝子のプロモーター領域に結合し、その発現を正に制御することが報告されている (Fig. 12, Atsaves *et al.*, 2015)。従って、トレハロースは AP-1 の活性低下を介して AKT 遺伝子発現量低下を引き起こす可能性が考えられた。

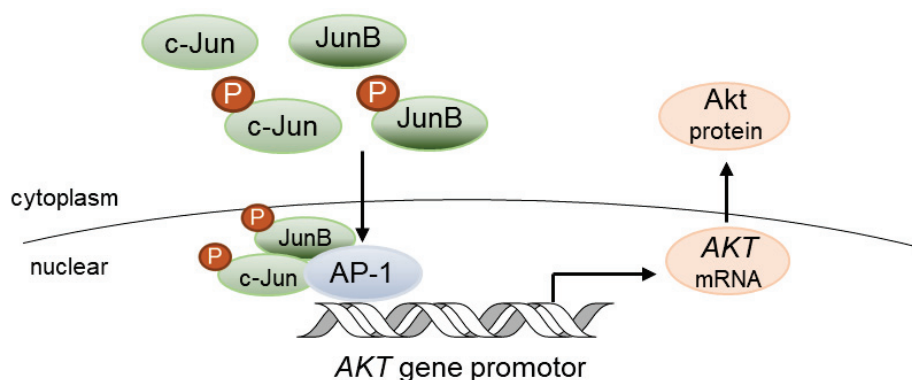


Figure 12. Transcriptional regulation of AKT gene expression by c-Jun and JunB.

本章第2節及び第3節では、トレハロースがリン酸化 c-Jun 及びリン酸化 JNK のタンパク質発現量に及ぼす影響をウェスタンブロット法によっても確認するとともに、トレハロースが総 c-Jun 及び総 JNK のタンパク質発現量に及ぼす影響を評価した。また、第4節では、トレハロースがリン酸化 JunB 及び総 JunB のタンパク質発現量に及ぼす影響を評価した。

一方、c-Jun は、ユビキチン-プロテアソーム系によって分解されることが報告されている (Xia *et al.*, 2007)。本章第2節及び第4節において、トレハロースが曝露後早期 (3

時間) から総 c-Jun 及び総 JunB のタンパク質発現量低下を引き起こすことが明らかになったため、第 5 節では、そのメカニズムを解明するためにプロテアソーム阻害剤がトレハロースによる c-Jun/JunB タンパク質発現量低下に及ぼす影響を評価した。

第2節 トレハロースがリン酸化 c-Jun 及び総 c-Jun のタンパク質 発現量に及ぼす影響

HeLa 細胞においてトレハロースがリン酸化 c-Jun 及び総 c-Jun のタンパク質発現量に及ぼす影響をウェスタンブロット法により評価した。トレハロース (100 mM) は、6 時間曝露後においてリン酸化 c-Jun の発現量低下 (0.53 ± 0.04 -fold of control) を引き起こした (Fig. 13A and B)。また、トレハロースによるリン酸化 c-Jun 発現量低下 (0.69 ± 0.17 -fold of control) は、3 時間曝露後においても認められた (Fig. 13A and B)。さらに、このとき、トレハロースは 3 時間及び 6 時間曝露後において、リン酸化 c-Jun のみならず総 c-Jun のタンパク質発現量低下 (3 h, 0.68 ± 0.11 -fold of control 及び 6 h, 0.69 ± 0.07 -fold of control) を引き起こすことが明らかになった (Fig. 13A and B)。

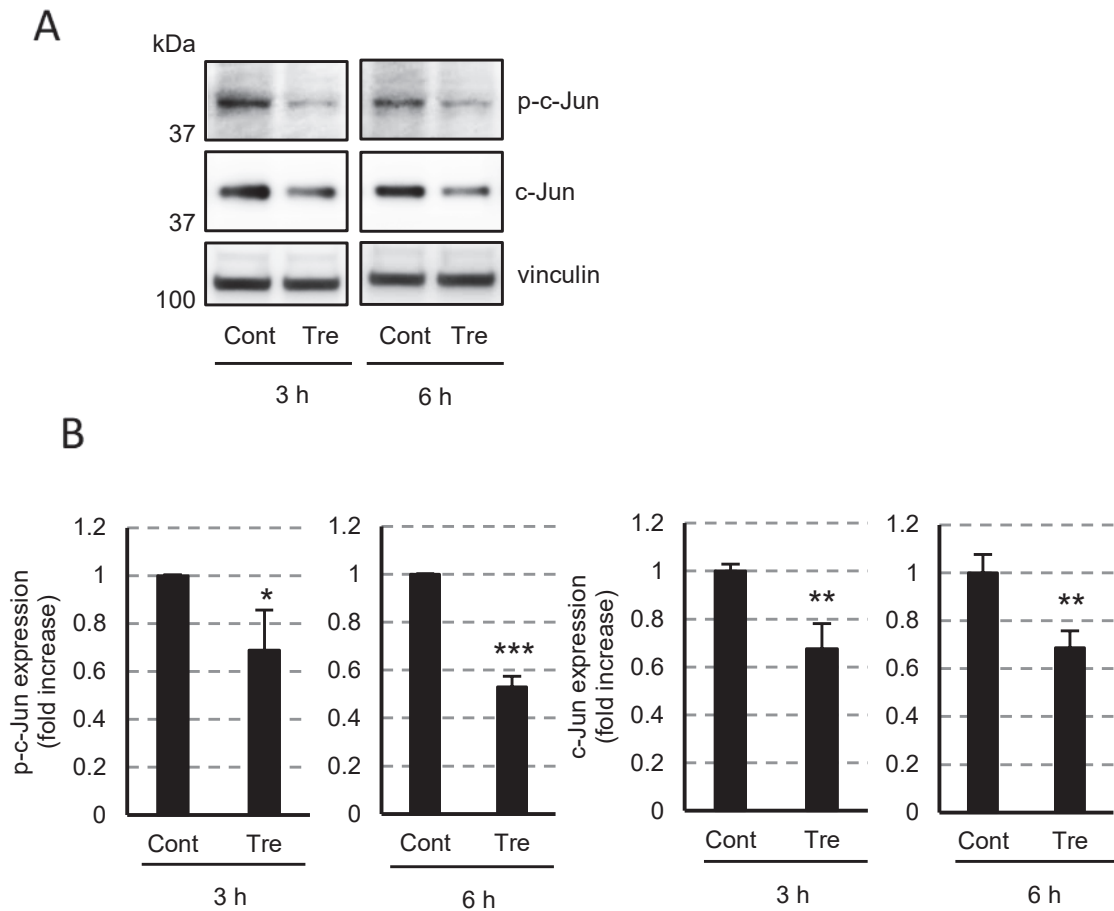


Figure 13. Effect of trehalose on protein expression levels of p-c-Jun and c-Jun.

(A) HeLa cells were exposed to 100 mM trehalose for 3 h and 6 h, and lysed in TNE buffer containing 1% Nonidet P-40 detergent. Equal amounts of protein from each cell lysate were separated by SDS-PAGE and p-c-Jun and c-Jun proteins were detected by western blot analysis. Vinculin was used as the gel-loading control. (B) The band intensities of p-c-Jun and c-Jun were quantified by densitometric analysis. Data are expressed as mean fold increase in p-c-Jun/vinculin and c-Jun/vinculin ratio (\pm S.D.) relative to corresponding controls. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. control.

第3節 トレハロースがリン酸化 JNK 及び総 JNK のタンパク質 発現量に及ぼす影響

HeLa 細胞においてトレハロースがリン酸化 JNK 及び総 JNK のタンパク質発現量に及ぼす影響をウェスタンブロット法により評価した。トレハロース (100 mM) 曝露後 3 時間及び 6 時間においてリン酸化 JNK 及び総 JNK のタンパク質発現量にほとんど変化は認められなかった (Fig. 14A and B)。

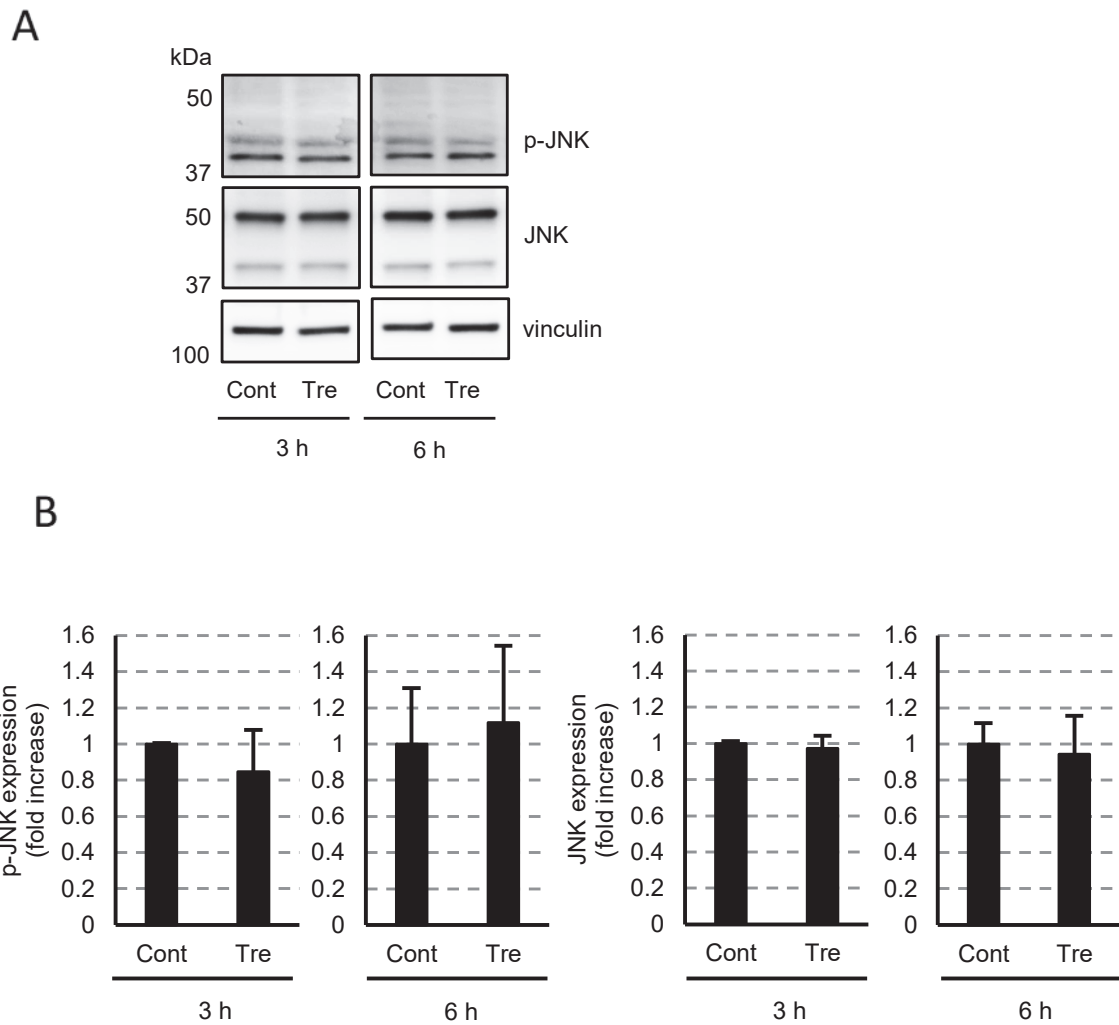


Figure 14. Effect of trehalose on protein expression levels of p-JNK and JNK.

(A) HeLa cells were exposed to 100 mM trehalose for 3 h and 6 h, and lysed in TNE buffer containing 1% Nonidet P-40 detergent. Equal amounts of protein from each cell lysate were separated by SDS-PAGE and p-JNK and JNK proteins were detected by western blot analysis. Vinculin was used as the gel-loading control. (B) The band intensities of p-JNK and JNK were quantified by densitometric analysis. Data are expressed as mean fold increase in p-JNK/vinculin and JNK/vinculin ratio (\pm S.D.) relative to corresponding controls.

第4節 トレハロースがリン酸化 JunB 及び総 JunB のタンパク質 発現量に及ぼす影響

HeLa 細胞においてトレハロースがリン酸化 JunB 及び総 JunB のタンパク質発現量に及ぼす影響をウェスタンブロット法により評価した。トレハロース (100 mM) は、6 時間曝露後においてリン酸化 JunB の発現量低下 (0.74 ± 0.10 -fold of control) を引き起こした (Fig. 15A and B)。また、トレハロースは、3 時間曝露後において総 JunB のタンパク質発現量低下 (0.54 ± 0.06 -fold of control) を引き起こした (Fig. 15A and B)。

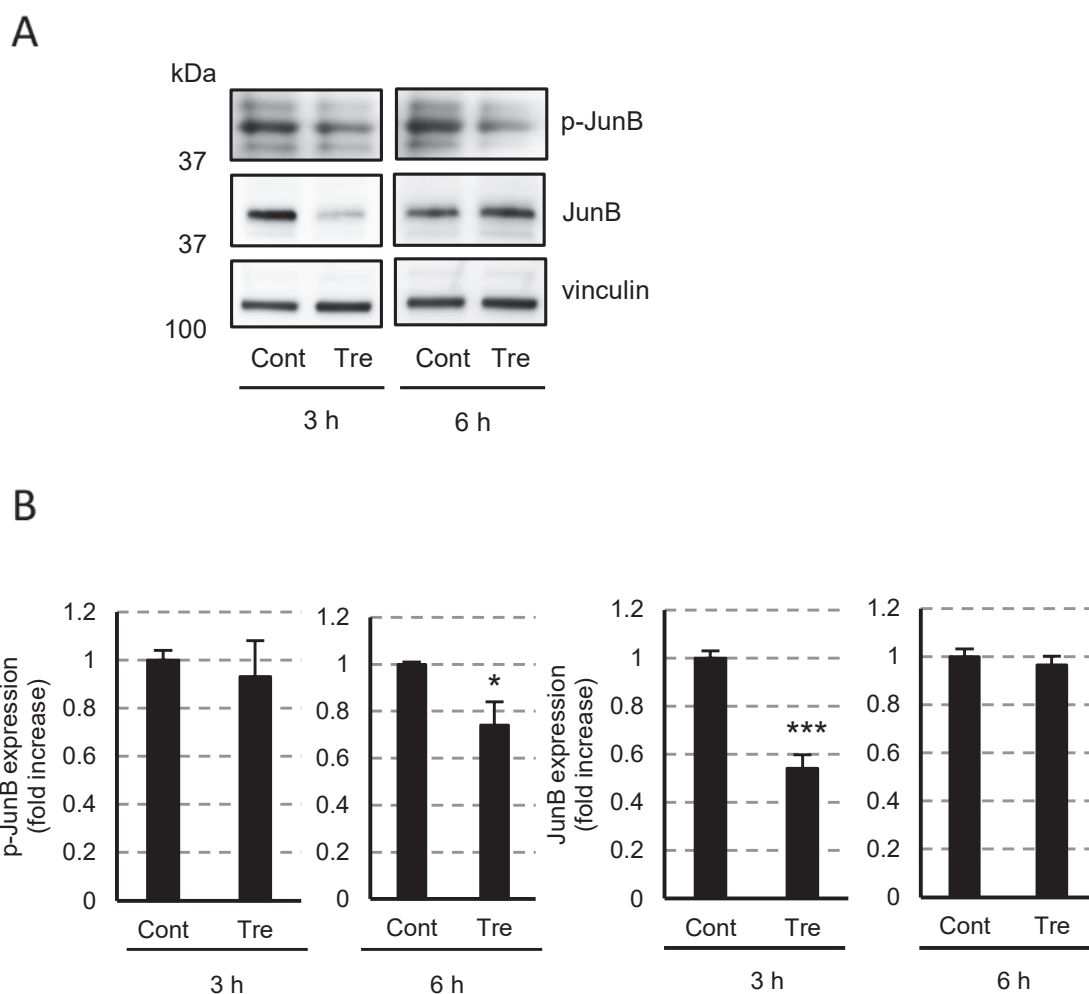


Figure 15. Effect of trehalose on protein expression levels of p-JunB and JunB.

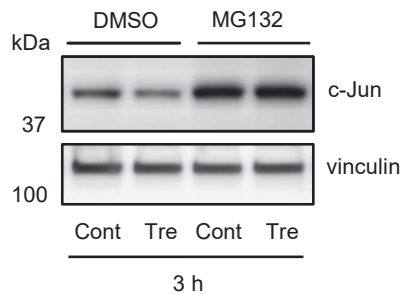
(A) HeLa cells were exposed to 100 mM trehalose for 3 h and 6 h, and lysed in TNE buffer containing 1% Nonidet P-40 detergent. Equal amounts of protein from each cell lysate were separated by SDS-PAGE and p-JunB and JunB proteins were detected by western blot analysis. Vinculin was used as the gel-loading control. (B) The band intensities of p-JunB and JunB were quantified by densitometric analysis. Data are expressed as mean fold increase in p-JunB/vinculin and JunB/vinculin ratio (\pm S.D.) relative to corresponding controls. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. control.

第5節 プロテアソーム阻害剤がトレハロースによる c-Jun/JunB

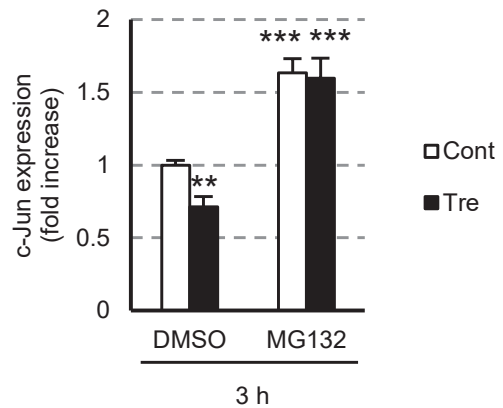
タンパク質発現量低下に及ぼす影響

HeLa 細胞においてプロテアソーム阻害剤 (MG132) がトレハロースによる c-Jun/JunB タンパク質発現量低下に及ぼす影響をウェスタンブロット法により評価した。MG132 存在下において、トレハロース (100 mM) 3 時間曝露による c-Jun タンパク質発現量低下は認められなかった (Fig. 16A and B)。また、JunB においても同様の結果が認められた (Fig. 16C and D)。

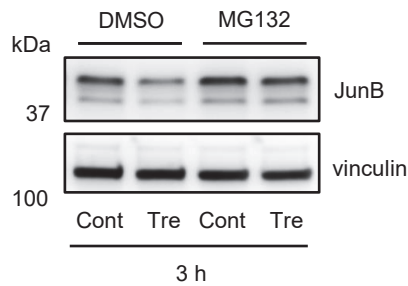
A



B



C



D

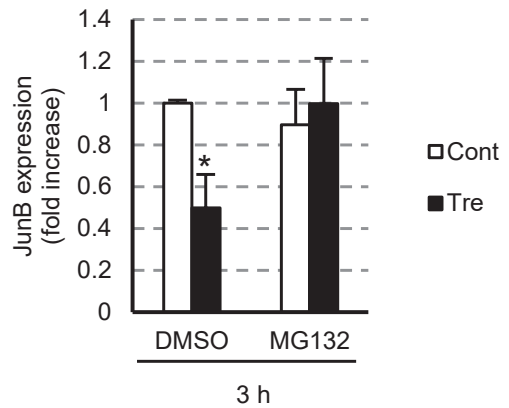


Figure 16. Effect of proteasome inhibitor on trehalose-induced a decrease in c-Jun and JunB protein level.

(A) HeLa cells were exposed to 100 mM trehalose for 3 h with or without 10 μ M MG132, and lysed in TNE buffer containing 1% Nonidet P-40 detergent. Equal amounts of protein from each cell lysate were separated by SDS-PAGE and c-Jun protein was detected by western blot analysis. Vinculin was used as the gel-loading control. (B) The band intensities of c-Jun were quantified by densitometric analysis. Data are expressed as mean fold increase in c-Jun/vinculin ratio (\pm S.D.) relative to corresponding controls. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs. control. (C) HeLa cells were exposed to 100 mM trehalose for 3 h with or without 10 μ M MG132, and lysed in TNE buffer containing 1% Nonidet P-40 detergent. Equal amounts of protein from each cell lysate were separated by SDS-PAGE and JunB proteins were detected by western blot analysis. Vinculin was used as the gel-loading control. (D) The band intensities of JunB were quantified by densitometric analysis. Data are expressed as mean fold increase in JunB/vinculin ratio (\pm S.D.) relative to corresponding controls. $*P < 0.05$ vs. control.

第6節 小括

第4章の結果と一致して、トレハロースは JNK 非依存的にリン酸化 c-Jun タンパク質発現量低下を引き起こすことがウェスタンブロット法によっても確認された。このとき、トレハロースは総 c-Jun 及び総 JunB のタンパク質発現量低下を引き起こすことが新たに見出された。また、トレハロースによる総 c-Jun 及び総 JunB タンパク質発現量低下はプロテアソーム阻害剤存在下において認められなかった。

本章の結果より、トレハロースは、総 c-Jun 及び総 JunB のプロテアソーム分解を促進し、このことがリン酸化 c-Jun 及びリン酸化 JunB のタンパク質発現量低下に寄与することが示唆された (Fig. 17)。

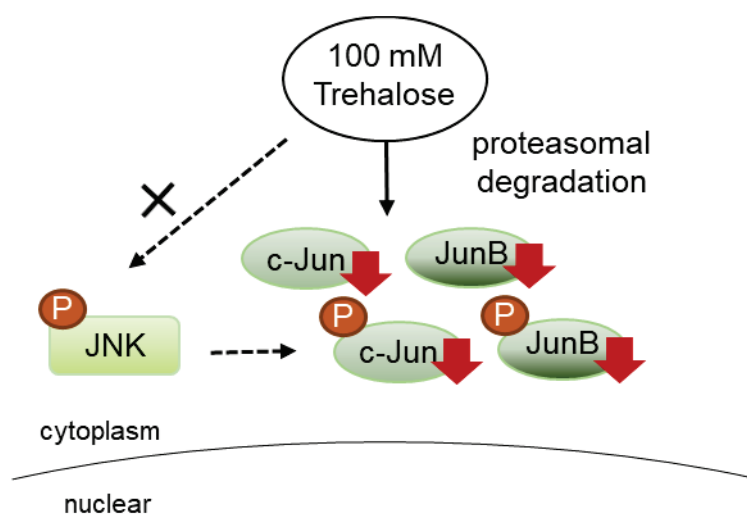


Figure 17. Graphical summary of chapter 5.

第6章

トトレハロースによる Akt 発現量低下と c-Jun/JunB 発現量低下の関連性の検討

第1節 緒言

c-Jun 及び JunB を含む転写因子複合体 AP-1 は、*AKT* 遺伝子のプロモーター領域に結合し、その発現を正に制御することが報告されている (Fig. 10, *Atsaves et al.*, 2015)。第3章において、トトレハロースは *AKT* 遺伝子発現抑制を介して Akt タンパク質発現量低下を引き起こすこと、第5章において、トトレハロースは、総 c-Jun 及び総 JunB のプロテアソーム分解を促進することが明らかになったことから、トトレハロースは AP-1 の活性低下を介して Akt mRNA 及びタンパク質発現量低下を引き起こす可能性が考えられる。

本章では、トトレハロースによる Akt 発現量低下と c-Jun/JunB 発現量低下の関連性を明らかにするために、第2節では、プロテアソーム阻害剤がトトレハロースによる *AKT1* mRNA 発現量低下に及ぼす影響を、第3節では、c-Jun/JunB 過剰発現がトトレハロースによる Akt タンパク質発現量低下及び LC3-II タンパク質発現量増加に及ぼす影響を評価した。

第2節 プロテアソーム阻害剤がトレハロースによる *AKT1* mRNA 発現量低下に及ぼす影響

HeLa 細胞においてプロテアソーム阻害剤 (MG132) がトレハロースによる *AKT1* mRNA 発現量低下に及ぼす影響をリアルタイム PCR 法により評価した。MG132 は、トレハロース (100 mM) 6 時間曝露による *AKT1* mRNA 発現量低下を完全に抑制した (Fig. 18)。

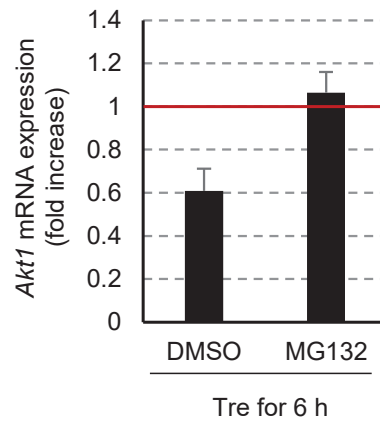


Figure 18. Effect of proteasome inhibitor on trehalose-induced a decrease in *AKT1* mRNA expression level.

HeLa cells were exposed to 100 mM trehalose for 6 h with or without 10 μ M MG132, and total RNA was extracted. qRT-PCR was performed with PowerUp SYBR Green Master Mix. The mRNA expression levels of *AKT1/RPL13A* in trehalose exposed cells were normalized to those in control (without trehalose) cells.

第3節 c-Jun/JunB 過剰発現がトレハロースによる Akt 発現量低下 及び LC3-II 発現量増加に及ぼす影響

HeLa 細胞において c-Jun/JunB 過剰発現がトレハロースによる Akt タンパク質発現量低下及び LC3-II タンパク質発現量増加に及ぼす影響をウェスタンブロット法により評価した。c-Jun/JunB 過剰発現細胞は、トレハロース (100 mM) 24 時間曝露による Akt タンパク質発現量低下及び LC3-II 発現量増加にほとんど影響を及ぼさなかった (Fig. 19A-C)。

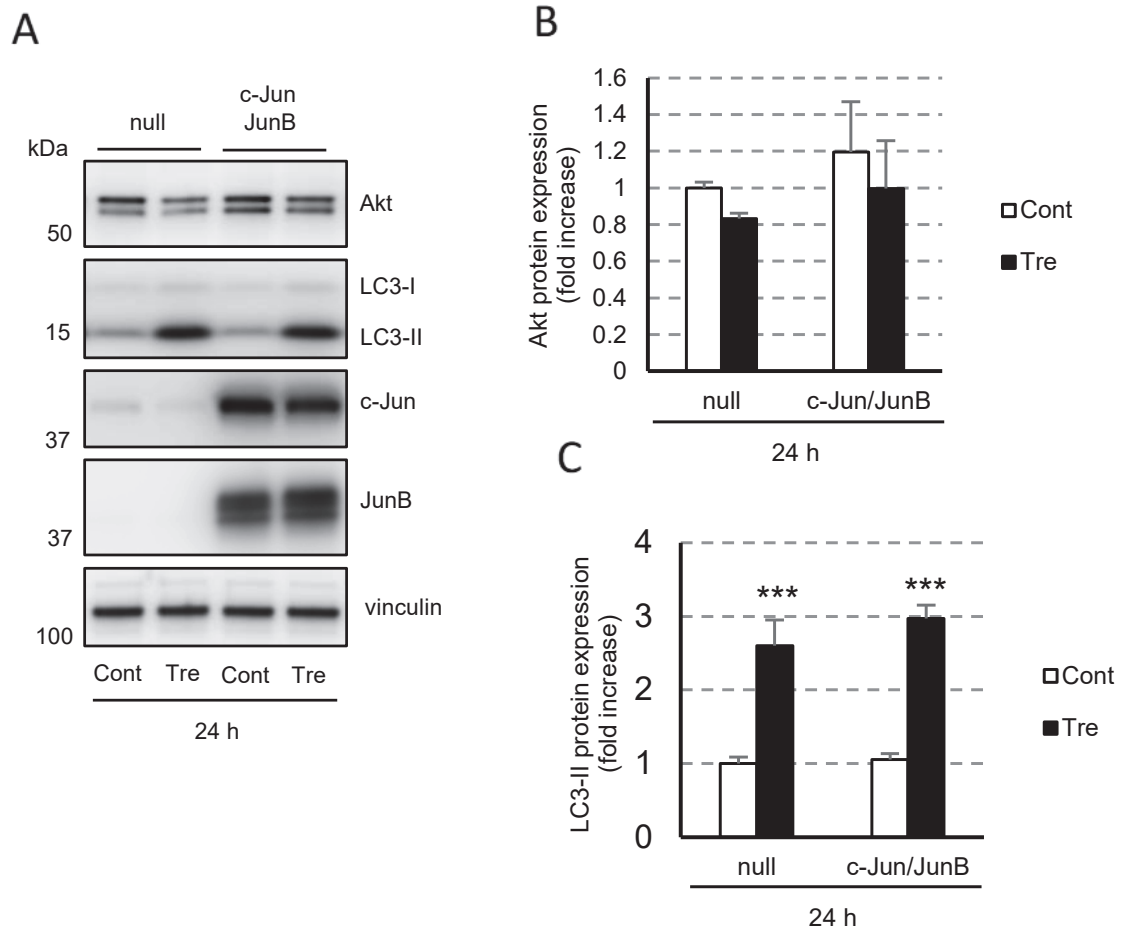


Figure 19. Effect of c-Jun/JunB overexpression on trehalose-induced a decrease in Akt and an increase in LC3-II.

(A) HeLa cells were transfected with c-Jun and JunB. Then 24 h after the transfection, cells were exposed to 100 mM trehalose for 24 h, and lysed in TNE buffer containing 1% Nonidet P-40 detergent. Equal amounts of protein from each cell lysate were separated by SDS-PAGE and Akt and LC3-II protein were detected by western blot analysis. Vinculin was used as the gel-loading control. (B) The band intensities of Akt were quantified by densitometric analysis. Data are expressed as mean fold increase in Akt/vinculin ratio (\pm S.D.) relative to corresponding controls. (C) The band intensities of LC3-II were quantified by densitometric analysis. Data are expressed as mean fold increase in LC3-II/vinculin ratio (\pm S.D.) relative to corresponding controls. *** $P < 0.001$ vs. control

第4節 小括

プロテアソーム阻害剤はトレハロースによる *AKT1* mRNA 発現量低下を完全に抑制したものの、c-Jun/JunB 過剰発現はトレハロースによる Akt タンパク質発現量低下にほとんど影響を及ぼさなかった (Fig. 20)。一方、コントロール細胞において、c-Jun/JunB 過剰発現は Akt タンパク質発現量のわずかな増加 (1.20 ± 0.27 -fold of control) を引き起こすのみであった (Fig. 19A-C)。

本章の結果より、トレハロースによる Akt 発現量低下における c-Jun/JunB 発現量低下の寄与は小さいことが示唆された。また、HeLa 細胞において、*AKT* 遺伝子発現制御における c-Jun/JunB の寄与は小さいことも示唆された。

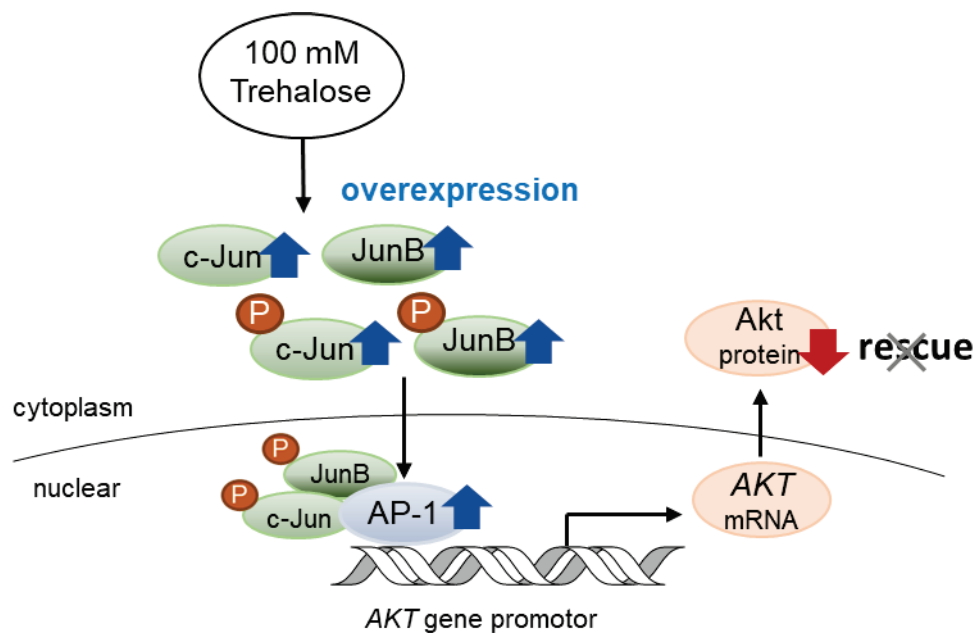


Figure 20. Graphical summary of chapter 6.

第7章

総括及び考察

ALP の異常は神経変性疾患など様々な疾患の発症に関与する可能性が指摘されており、ALP の機能を亢進する物質はこのような疾患の治療薬候補として注目されている。近年、トレハロースが、高濃度において ALP 機能を亢進することが明らかになり、そのメカニズムとして、リン酸化 Akt 発現量低下を介した TFEB の活性化（脱リン酸化及び核移行促進）が報告されている（Palmieri *et al.*, 2017）。しかし、トレハロースが Akt リン酸化レベルの低下を引き起こす詳細なメカニズムは未だ不明である。そこで、本研究では、トレハロースによるリン酸化 Akt 発現量低下のメカニズムを明らかにすることを目的とした。まず、本実験系においてもトレハロースが ALP 機能亢進及びリン酸化 Akt 発現量低下を引き起こすことを確認した（Fig. 5, Fig. 6, and Fig. 7）。このとき、トレハロースは、リン酸化 Akt のみならず総 Akt タンパク質発現量低下を引き起こすことが新たに見出された（Fig. 7）。また、トレハロースは、曝露後 6 時間において全ての Akt アイソフォームの mRNA 発現量低下を、曝露後 24 時間において全ての Akt アイソフォームのタンパク質発現量低下を引き起こしたことから、*AKT* 遺伝子発現抑制を介して総 Akt タンパク質発現量低下を引き起こすことが示唆された（Fig. 8 and Fig. 9）。さらに、本研究では、トレハロースが曝露後早期（3 時間）から転写因子複合体 AP-1 の構成因子 c-Jun 及び JunB のプロテアソーム分解を促進することを明らかにした（Fig. 13, Fig. 15, and Fig. 16）。AP-1 は *AKT* 遺伝子のプロモーター領域に結合し、その発現を正に制御することが報告されている（Atsaves *et al.*, 2015）が、c-Jun/JunB の過剰発現はトレハロースによる Akt 発現量低下を抑制しなかったことから、トレハロースによる Akt 発現量低下における c-Jun/JunB 発現量低下の寄与は小さいことが示唆された（Fig. 19）。

トレハロースは、曝露後 24 時間において全ての Akt アイソフォームのタンパク質発現量低下を引き起こしたものの、*AKT* mRNA 発現量の経時的変化はアイソフォームによって異なっていた（Fig. 9）。トレハロースは、曝露後 6、12、24 時間において *AKT1* mRNA 発現量低下を引き起こしたことから、*AKT1* 遺伝子発現抑制を介して Akt1 タンパク質発現量低下を引き起こすことが示唆された（Fig. 7）。一方、トレハロースは、曝露後 6 時間において *AKT2* mRNA 発現量低下を引き起こしたものの、*AKT2* mRNA 発現

量は曝露後 12 時間及び 24 時間においてコントロールと同程度まで回復していた (Fig. 9)。従って、トレハロースによる Akt2 タンパク質発現量低下には、曝露後早期における AKT2 遺伝子発現抑制に加え、Akt2 タンパク質分解促進が寄与している可能性が考えられる。現在までに、Akt2 を含む各 Akt アイソフォームは主にユビキチン-プロテアソーム系によって分解されることが報告されている (Suizu *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011)。本研究において、トレハロースが Akt タンパク質分解促進を引き起こす可能性を検討するために、プロテアソーム阻害剤 (MG132) がトレハロース 24 時間曝露による Akt タンパク質発現量低下に及ぼす影響の評価を試みたものの、MG132 の細胞毒性が強く、正確な評価を行うことが困難であった。今後、他のプロテアソーム阻害剤や Akt タンパク質分解に関与するユビキチンリガーゼ特異的 small interfering RNA 等を用いることで、トレハロースによる Akt タンパク質発現量低下における Akt タンパク質分解促進の寄与を明らかにする必要がある。また、トレハロースは、曝露後 6 時間において AKT3 mRNA 発現量低下を引き起こしたものの、AKT3 mRNA 発現量は曝露後 12 時間においてコントロールと同程度まで回復し、曝露後 24 時間においては 1.89 ± 0.57 -fold of control に増加していた (Fig. 9)。このとき、コントロール細胞の AKT1、AKT2、AKT3 の mRNA 発現量測定における quantification cycle 値の平均は、それぞれ 28.24、27.00、35.88 であったこと、Akt3 タンパク質発現の検出には高感度の化学発光検出試薬を要したことなどから、HeLa 細胞の総 Akt タンパク質発現量における Akt3 の寄与は小さいことが示唆された。従って、本実験系において、曝露後 24 時間において認められた AKT3 mRNA 発現量増加は、トレハロースによる総 Akt タンパク質発現量低下及び ALP 機能亢進にほとんど影響を及ぼさないことが予想される。

トレハロースは、曝露後早期においてリン酸化 c-Jun 及びリン酸化 JunB の発現量低下を引き起こした (Fig. 13 and Fig. 15)。このとき、トレハロースは、リン酸化 JNK の発現量に影響を及ぼさなかったこと (Fig. 14)、総 c-Jun 及び総 JunB のタンパク質発現量低下を引き起こしたこと (Fig. 13 and Fig. 15) から、総 c-Jun 及び総 JunB タンパク質自体の発現量低下を介して AP-1 活性低下を引き起こす可能性が考えられる。また、c-Jun 及び JunB は、主にユビキチン-プロテアソーム系によって分解されること (Xia *et al.*, 2007; Pérez-Benavente *et al.*, 2013)、トレハロースによる総 c-Jun 及び総 JunB タンパク質発現量低下はプロテアソーム阻害剤存在下において認められなかったことから、トレハロースは総 c-Jun 及び総 JunB のユビキチン化及びプロテアソーム分解を促進することが示唆された。そこで、トレハロースが c-Jun のユビキチン化促進を引き起こすことを証明する

ために、免疫沈降法及びウェスタンブロット法によるユビキチン化 c-Jun の検出を試みたが、内在性ユビキチン化 c-Jun を検出することはできなかった。また、c-Jun 及びユビキチン過剰発現細胞を作製し、c-Jun が主に局在する核画分を用いて免疫沈降及びウェスタンブロットを行ったが、この方法においてもユビキチン化 c-Jun を検出することはできなかった。今後、トレハロースによる c-Jun プロテアソーム分解促進に強く寄与するユビキチンリガーゼを特定し、c-Jun、ユビキチン、ユビキチンリガーゼ過剰発現細胞を作製することで、ユビキチン化 c-Jun の検出が可能になり、トレハロースが c-Jun のユビキチン化に及ぼす影響を明らかにすることができると期待される。また、トレハロースが実際に AP-1 転写活性の低下を引き起こすか否かをレポーターアッセイ等により評価することも重要であると考えられる。

Atsaves ら (2015) は、AP-1 の恒常的活性化を示す未分化リンパ腫キナーゼ陽性未分化大細胞リンパ腫において、c-Jun 及び JunB を含む AP-1 が *AKT* 遺伝子のプロモーター領域に結合し、その発現を正に制御することを報告している。本研究において、c-Jun/JunB 過剰発現は、トレハロースによる Akt タンパク質発現量低下にほとんど影響を及ぼさず、コントロール細胞においても Akt タンパク質発現量のわずかな増加を引き起こすのみであった。AP-1 は、Jun ファミリータンパク質 (c-Jun、JunB、JunD)、Fos ファミリータンパク質 (c-Fos、FosB、Fra-1、Fra-2)、ATF ファミリータンパク質 (ATF2、ATF3、ATF-4、ATF-5、ATF-6B、ATF-7、BATF、BATF2、BATF3、JDP2)、MAF ファミリータンパク質 (c-Maf、MafA、MafB、MafF、MafG、MafK) から構成される二量体を形成して機能することが知られている (Garces de Los Fayos Alonso *et al.*, 2018)。従って、HeLa 細胞において、c-Jun/JunB 過剰発現のみでは AP-1 転写活性にほとんど影響を及ぼさなかった可能性が考えられる。一方、Atsaves ら (2015) は、HEK293T 細胞における JunB 過剰発現は、むしろ *AKT* 遺伝子発現量低下を引き起こすことを報告しており、AP-1 による *AKT* 遺伝子制御には細胞特異性があることを示唆している。従って、HeLa 細胞の Akt 発現量制御において、AP-1 の寄与は小さい可能性も考えられる。今後、トレハロースが AP-1 を構成する種々のファミリータンパク質や *AKT* 遺伝子発現を制御する他の転写因子 (STAT3 等、Atsaves *et al.*, 2015) に及ぼす影響を評価することで、トレハロースによる *AKT* 遺伝子発現量低下の詳細なメカニズムが明らかになると期待される。

本研究では、トレハロースが Akt の mRNA 及びタンパク質の発現量低下を引き起こすことを明らかにした (Fig. 21; right)。また、トレハロースが AP-1 の構成因子 c-Jun/JunB

のプロテアソーム分解を促進することを見出した (Fig.21; left)。AP-1 は *AKT* mRNA の発現を正に制御することが報告されているが (Atsaves *et al.*, 2015)、c-Jun/JunB の過剰発現実験より、トレハロース誘発 Akt 発現量低下における c-Jun/JunB の寄与は小さいことが予想された。従って、*AKT* mRNA 発現量低下には AP-1 を構成する種々のファミリータンパク質の発現量低下や他の転写因子の活性低下が関与する可能性が考えられる。今後、トレハロースによる Akt mRNA 及びタンパク質発現量低下の詳細なメカニズムやその鍵を握る特定の分子が明らかになれば、その分子を標的とした新規 ALP 関連疾患治療薬開発の一助となることが期待される。

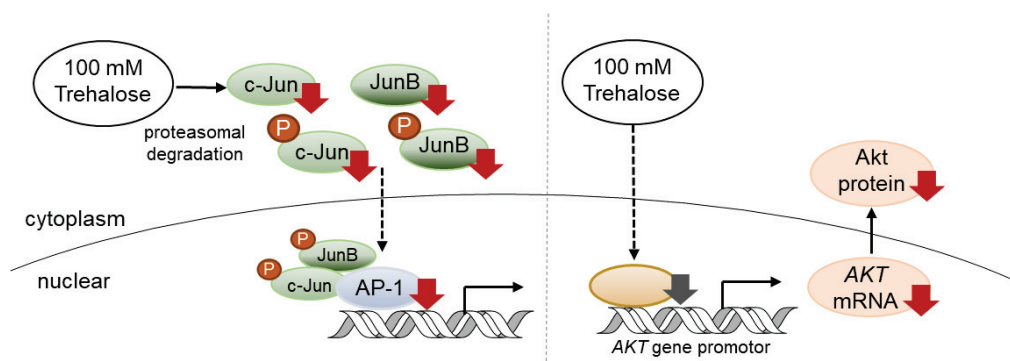


Figure 21. Graphical summary of the present study.

一方、近年、トレハロースが ALP 機能亢進とともに ALP 機能低下を引き起こすことが報告されており、トレハロースによる細胞保護効果は、タンパク質安定化作用や抗炎症作用を含む ALP 非依存的経路によってもたらされる可能性も指摘されている (Tien *et al.*, 2016; Kaizuka *et al.*, 2016; Yoon *et al.*, 2017; Palmieri *et al.*, 2017; Hosseinpour-Moghaddam *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2018)。特に炎症応答において c-Jun の活性化は重要な役割を果たすことが知られているため、本研究において認められた c-Jun/JunB 発現量低下はトレハロースによる抗炎症作用に関与する可能性が考えられる。今後、トレハロースによる c-Jun/JunB 発現量低下がもたらす細胞内影響を明らかにすることは、トレハロースの薬理作用を理解するうえで重要であると考えられる。

実験の部

【試薬・機器】

(1) 細胞培養

Thermo Scientific™ Nunc™ EasYDishes (35 mm) : Thermo Fisher Scientific, 150460

Thermo Scientific™ Nunc™ EasYDishes (60 mm) : Thermo Fisher Scientific, 150462

Thermo Scientific™ BioLite Cell Culture Treated Dishes (100 mm) : Thermo Fisher Scientific, 130182

Thermo Scientific™ Nunc™ EasYDishes (150 mm) : Thermo Fisher Scientific, 150468
96-well microplate : Corning, 353072

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) : Nacalai Tesque, 08456-36

Fetal Bovine Serum (FBS) : Biosera, FB-1285/500

Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Stabilized), Nacalai Tesque, 09367-34

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) (-) : Nacalai Tesque, 14249-24

0.05w/v% Trypsin-0.53 mmol/L EDTA·4Na Solution with Phenol Red : FUJIFILM Wako, 204-16935

LUNA™ Cell Counting Slide : L12001

(2) 薬物曝露

Trehalose Dihydrate : FUJIFILM Wako, 204-18452

MG132 : Peptide Institute, 3175-v

Dimethyl Sulfoxide (DMSO) : FUJIFILM Wako, 043-07216

(3) タンパク質定量

Pierce™ BCA Protein Assay Kit : Thermo Fisher Scientific, 23225

Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set : Thermo Fisher Scientific, 23208

Protein Assay Dye Reagent Concentrate : Bio-Rad, 500-0006

(4) サンプル調製

Tris-HCl : Nacalai Tesque, 35434-05

NaCl : FUJIFILM Wako, 191-01665

EDTA : Nacalai Tesque, 15105-35
Nonidet P-40 : Nacalai Tesque, 23640-94
NaF : Sigma-Aldrich, 450022
Na₃VO₄ : FUJIFILM Wako, 198-09752
Protease Inhibitor Cocktail : Nacalai Tesque, 25955-11
Sodium dodecyl sulfate (SDS) : Nacalai Tesque, 31607-65
Bromophenol blue : Nacalai Tesque, 05808
Glycerol : Nacalai Tesque, 17045-65
2-Mercaptoethanol : Nacalai Tesque, 21938-82

(5) 細胞質/核画分抽出

D-PBS (-) : Nacalai Tesque, 14249-24
0.05w/v% Trypsin-0.53 mmol/L EDTA·4Na Solution with Phenol Red : FUJIFILM Wako, 204-16935
DMEM : Nacalai Tesque, 08456-36
HEPES : Nacalai Tesque, 17514-15
MgCl₂·6H₂O : FUJIFILM Wako, 135-00165
Dithiothreitol (DTT) : Nacalai Tesque, 14128-04
Protease Inhibitor Cocktail : Nacalai Tesque, 25955-11
Nonidet P-40 : Nacalai Tesque, 23640-94

(6) ウェスタンブロット

10 × Tris/Glycine/SDS Buffer : Bio-Rad, 1610772
4-20% Mini-PROTEAN[®] TGX[™] Precast Gels : Bio-Rad, 4561095
4-20% Criterion[™] TGX[™] Precast Gels : Bio-Rad, 5671095
Precision Plus Protein[™] Dual Color Standards : Bio-Rad, 1610394
Precision Plus Protein[™] WesternC[™] Standards : Bio-Rad, 1610385
10 × Tris/Glycine Buffer : Bio-Rad, 1610771
Methanol : Kanto chemical, 25183-80
ClearTrans[®] SP Polyvinylidene Difluoride (PVDF) Membrane, Hydrophobic, 0.2 μm : FUJIFILM Wako, 033-23433

Grade 3MM Chr filter paper for blotting square : GE Healthcare, 3030-909
Blot Absorbent Filter Paper : Bio-Rad, 1704085
Bullet Blocking One : Nacalai Tesque, 13779-01
Tris Buffered Saline (TBS) powder for 5 L of 10[×] : Santa Cruz Biotechnology, sc-362308
10% Tween 20 Solution : Bio-Rad, 161-0781
Can Get Signal[®] Immunoreaction Enhancer Solution : TOYOBO, NKB-101
TFEB antibody (Rabbit) : Cell Signaling Technology, 4240
Lamin B1 (A-11) antibody (Mouse) : Santa Cruz Biotechnology, sc-377000
Anti β -Tubulin, Monoclonal Antibody (Mouse) : FUJIFILM Wako, 014-25041
Anti-LC3 pAb (Rabbit) : MBL, PM036
Anti-p62 (SQSTM1) (Human) mAb (Mouse) : MBL, M162-3
vinculin Antibody (7F9) (Mouse) : Santa Cruz Biotechnology, sc-73614
Phospho-Akt (Ser473) Antibody (Rabbit) : Cell Signaling Technology, 9271
Akt antibody (Rabbit) : Cell Signaling Technology, 9272
Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb : Cell Signaling Technology, 4691
Akt1 (C73H10) Rabbit mAb : Cell Signaling Technology, 2938
Akt2 (D6G4) Rabbit mAb : Cell Signaling Technology, 3063
Akt3 (L47B1) Mouse mAb : Cell Signaling Technology, 8018
Phospho-c-Jun (Ser63) (54B3) Rabbit mAb : Cell Signaling Technology, 2361
c-Jun (60A8) Rabbit mAb : Cell Signaling Technology, 9165
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody (Rabbit) : Cell Signaling Technology,
9251
SAPK/JNK Antibody (Rabbit) : Cell Signaling Technology, 9252
Phospho-JunB (Thr102/Thr104) (D3C6) Rabbit mAb : Cell Signaling Technology, 8053
JunB (C37F9) Rabbit mAb : Cell Signaling Technology, 3753
HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody : Sigma-Aldrich, A9169
HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody : Sigma-Aldrich, A9044
Precision Protein[™] StrepTactin-HRP Conjugate, Bio-Rad, 1610380
Chemi-Lumi One L : Nacalai Tesque, 07880
Chemi-Lumi One Super : Nacalai Tesque, 02230
Chemi-Lumi One Ultra : Nacalai Tesque, 11644

WB Stripping Solution : Nacalai Tesque, 05364-55

(7) 免疫細胞化学染色

Poly-D-lysine-coated 4-well chamber slide : Corning, 354577

D-PBS (-) : Nacalai Tesque, 14249-24

4%-Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution : Nacalai Tesque, 09154-14

Digitonin : FUJIFILM Wako, 043-21376

Blocking One Histo : Nacalai Tesque, 06349-64

Can Get Signal[®] Immunostain Solution A : TOYOBO, NKB-501

Alexa Fluor[®] 555-conjugated goat anti-rabbit IgG : Thermo Fisher Scientific, A21428

TFEB antibody (Rabbit) : Cell Signaling Technology, 4240

4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) : Thermo Fisher Scientific, D1306

ProLong[™] Diamond Antifade Mountant : Thermo Fisher Scientific, P36961

NEO cover glass rectangle No. 1, Matsunami Glass

(8) mRNA 抽出、逆転写反応、リアルタイム PCR

D-PBS (-) : Nacalai Tesque, 14249-24

0.2 mL PCR Tube : NIPPON Genetics, FG-021D

SYBR[™] Green Fast Advanced Cells-to-Ct[™] Kit : Thermo Fisher Scientific, A35380

(Lysis Solution, Stop Solution, DNase I, 2 × Fast Advanced RT Buffer,

20 × Fast Advanced RT Enzyme Mix, PowerUp SYBR Green Master Mix)

Water for Molecular Biology : Merck Millipore, H20MB0501

96-well Piko PCR white plate : Thermo Fisher Scientific, SPL0961

Optical Adhesive Film, for Piko PCR plates : ASF-0020

RPL13A primer Forward/Reverse : Integrated DNA Technologies,

101935479/101935480

AKT1 primer Forward/Reverse : Integrated DNA Technologies, 101116162/101116163

AKT2 primer Forward/Reverse : Hokkaido System Science, 40997004/40997006

AKT3 primer Forward/Reverse : Hokkaido System Science, 40997007/40997008

SQSTM1 primer Forward/Reverse : Hokkaido System Science, 101140625/101140626

(9) タンパク質リン酸化レベルの網羅的解析

Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array Kit : R&D SYSTEMS, ARY003B

Array Buffer 1 : 895477

Array Buffer 2 (5 × Concentrate) : 895478

Array Buffer 3 : 895008

Lysis Buffer 6 : 895561

Wash Buffer Concentrate : 895003

Detection Antibody Cocktail A, Human Phospho-Kinase Array : 894553

Detection Antibody Cocktail B, Human Phospho-Kinase Array : 894554

Streptavidin-HRP : 893019

Chemi Reagent 1 : 894287

Chemi Reagent 2 : 894288

8-Well Multi-dish : 607591

Transparency Overlay Template : 607815

(10) タンパク質発現ベクターの作製及び導入

pcDNA™3.1/Zeo⁽⁺⁾ Mammalian Expression Vector (Thermo Fisher Scientific, V86020)

Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium : Thermo Fisher Scientific, 31985070

Lipofectamine™ LTX Reagent with PLUS™ Reagent : Thermo Fisher Scientific, 15338100

(11) 分析機器

細胞計数 : LUNA™ Automated Cell Counter : Logos Biosystems, L10001

吸光度測定 : Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)

ウェスタンブロット : PowerPac™ HC High-Current Power Supply (Bio-Rad)

ウェスタンブロット : Mini-PROTEAN® Tera Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad)

ウェスタンブロット : Criterion™ Cell (Bio-Rad)

ウェスタンブロット : Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad)

ウェスタンブロット : Criterion™ Blotter (Bio-Rad)

ウェスタンブロット : ImageQuant Las 4000 mini (GE Healthcare)

ウェスタンブロット : ImageQuant TL software (GE Healthcare)

免疫細胞化学染色 : 共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, FV-1000D)

免疫細胞化学染色 : FV10-ASW 4.2 Viewer (Olympus), ImageJ software (NIH)

逆転写反応 : Veriti™ 96-well Thermal cycler (Thermo Fisher Scientific)

リアルタイム PCR : PikoReal 96 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, TCR0096)

【実験方法】

[細胞培養]

HeLa 細胞は、下記の培地を用いて 37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養し、D-PBS (-) 及び 0.05w/v% Trypsin-0.53 mmol/L EDTA·4Na Solution with Phenol Red を用いて継代を行った。細胞数は LUNA™ Cell Counting Slide を用いて計数した。

- ・ 培地 (HeLa 細胞)

組成	容量 (mL)
DMEM	500 mL
FBS	56.2 mL
Penicillin-Streptomycin Mixed Solution (Stabilized)	5.62 mL

[薬物曝露]

細胞は、4,651 cells/197 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ の密度で播種し、一晚培養した。培地を除去し、新鮮培地または 100 mM トレハロース溶液 (培地に溶解) に交換した。MG132 (DMSO を用いて 40 mM に調製) は、培地に 1/4,000 倍量を添加することで最終濃度 10 μM とした。DMSO または MG132 は、トレハロース曝露 1 時間前に処理し、トレハロース曝露とともに再度曝露した。

[サンプル調製]

HeLa 細胞は、100 mm dish に播種し、トレハロースを曝露した。D-PBS (-) 2 mL を用いて 3 回洗浄後、ディッシュを氷上に移し、TNE buffer (1% Nonidet P-40 含有) を 120 μL 添加した。セルスクレーパーを用いて細胞を剥ぎ取り、1.5 mL チューブに回収した。超音波処理 (3 秒 \times 3 回) を行い、4°C で 20 分間ローテーションした。4°C、13,500 rpm で 15 分間遠心し、上清を回収した。この上清を 5 \times sample buffer と 4 : 1 の割合で混合した後、99°C で 5 分間熱処理を行い、ウェスタンブロット用サンプルとした。

• TNE buffer

組成	最終濃度
Nonidet P-40	1%
Tris-HCl (pH 7.4)	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	2 mM
NaF	50 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
Protease inhibitor cocktail	1%

• 5 × sample buffer

組成	最終濃度
SDS	10 %
Tris-HCl (pH 6.8)	250 mM
Bromophenol blue	0.01 %
Glycerol	50 %
2-Mercaptoethanol	12.5 %

[細胞質/核画分抽出]

HeLa 細胞は、100 mm dish 2 枚に播種し、トレハロースを曝露した。ディッシュ 2 枚分の細胞は、継代と同様の操作で 50 mL チューブに回収した。4°C、1,100 rpm で 3 分間遠心後、上清を除去し、D-PBS (-) 1 mL を加え、再度 4°C、1,100 rpm で 3 分間遠心した。上清を除去後、Hypotonic buffer 100 μL を加えてピペッティングし、氷上で 15 分間インキュベートした。10% Nonidet P-40 を 5 μL 加えてボルテックスした後、4°C、10,000 × g で 5 分間遠心し、上清を細胞質画分として回収した。沈殿に、Hypotonic buffer 200 μL を加えてボルテックス後、4°C、10,000 × g で 5 分間遠心した。上清を除去後、High-salt buffer 50 μL を加え、冷水中にて超音波処理 (3 秒 × 3 回) を行った。4°C、12,000 × g で 10 分間遠心し、上清を核画分として回収した。

• Hypotonic buffer

組成	最終濃度
HEPES (pH 7.9)	10 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.5 mM
KCl	10 mM
EDTA	0.1 mM
NaF	1 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
DTT	1 mM
Protease inhibitor cocktail	1%

• High-salt buffer

組成	最終濃度
HEPES (pH 7.9)	20 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.5 mM
NaCl	400 mM
EDTA	0.1 mM
Glycerol	10%
NaF	1 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
DTT	1 mM
Protease inhibitor cocktail	1%

[タンパク質定量]

細胞可溶化液は H₂O を用いて希釈した。また、タンパク質標準溶液は Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set を用いた。細胞可溶化液のタンパク質濃度は、Pierce™ BCA Protein Assay Kit 及び Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer を用いて測定した。また、細胞質画分及び核画分のタンパク質濃度は、Protein Assay Dye Reagent Concentrate 及び Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer を用いて測定した。

[ウェスタンブロット]

ウェスタンブロット用サンプル (2-5 μg) は、4-20% Mini-PROTEAN[®] TGX[™] Precast Gel または 4-20% Criterion[™] TGX[™] Precast Gel にアプライし、Tris/Glycine/SDS Buffer 中にて 200 V (固定) で 40 分間電気泳動した。分離したタンパク質は、4°C の Tris/Glycine Buffer 中にて 30 V (固定) で 16 時間かけて PVDF メンブレンに転写した。メンブレンは、Bullet Blocking One を用いて 5 分間ブロッキングした後、各種一次抗体溶液中にて 4°C で一晩振とうした。メンブレンは、TBS-T を用いて洗浄 (5 分間 \times 3 回) 後、各種二次抗体溶液中にて室温で 1 時間振とうした。メンブレンは、TBS-T を用いて洗浄 (5 分間 \times 3 回) 後、Chemi-Lumi One L、Chemi-Lumi One Super、または Chemi-Lumi One Ultra と反応させ、化学発光は、ImageQuant LAS 4000 mini を用いて検出した。バンドの密度は ImageQuant TL software LAS-4000 を用いて定量した。

• 1 \times Tris/Glycine/SDS Buffer

組成	容量 (mL)
10 \times Tris/Glycine/SDS Buffer	100 mL
H ₂ O	900 mL

• 1 \times Tris/Glycine Buffer

組成	容量 (mL)
10 \times Tris/Glycine Buffer	100 mL
Methanol	75 mL
H ₂ O	825 mL

• 1 \times TBS-T

組成	容量 (L)
10 \times TBS	1 L
10% Tween 20 Solution	0.1 L
H ₂ O	8.9 L

- ・抗体溶液 (Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1/2 で希釈)

一次抗体	二次抗体
TFEB (1:1,000)	Rabbit (1:8,000)
Lamin B1 (1:2,000)	Mouse (1:8,000)
β -Tubulin (1:10,000)	Mouse (1:20,000)
LC3 (1:5,000)	Rabbit (1:8000)
p62/SQSTM1 (1:5,000)	Mouse (1:8,000)
vinculin (1:8,000)	Mouse (1:10,000)
Phospho-Akt Ser473 (1:2,000)	Rabbit (1:8,000)
Akt (1:2,000)	Rabbit (1:8,000)
Akt pan (1:2,000)	Rabbit (1:8,000)
Akt1 (1:2,000)	Rabbit (1:8,000)
Akt2 (1:2,000)	Rabbit (1:8,000)
Akt3 (1:2,000)	Mouse (1:8,000)
Phospho-c-Jun Ser63 (1:1,000)	Rabbit (1:6,000)
c-Jun (1:2,000)	Rabbit (1:8,000)
Phospho-SAPK/JNK Thr183/Tyr185 (1:1,000)	Rabbit (1:6,000)
SAPK/JNK (1:2,000)	Rabbit (1:8,000)
Phospho-JunB Thr102/Thr104 (1:2,000)	Rabbit (1:8,000)
JunB (1:2,000)	Rabbit (1:8,000)

[免疫細胞化学染色]

HeLa 細胞は、poly-D-lysine-coated 4-well chamber slide に播種し、トレハロースを曝露した。細胞は、D-PBS (-) 500 μ L で洗浄した後、4%-Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution 400 μ L を加え、室温で 15 分間固定した。D-PBS (-) 500 μ L で洗浄後、Digitonin (100 μ g/mL) 溶液 400 μ L を加え、室温で 15 分間膜透過処理を行った。Blocking One Histo 8 滴を加え、室温で 15 分間ブロッキングを行った。D-PBS (-) 500 μ L で洗浄後、一次抗体溶液 400 μ L を加え、4°C で一晩浸とうした。D-PBS (-) 500 μ L で洗浄 (5 分間 \times 3 回) 後、二次抗体溶液を加え、遮光下にて室温で 1 時間浸とうした。D-PBS (-) 500 μ L で洗浄 (5 分間 \times 3 回) 後、DAPI (600 nM) 溶液 400 μ L を加え、遮光下にて室温で 5 分間インキュベートした。スライドは、D-PBS (-) 500 μ L で洗浄後、チャンバーを取り外し、

ProLong™ Diamond Antifade Mountant 及び NEO cover glass rectangle No. 1 を用いて封入した。細胞は、共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000D) 下にて観察し、取得した画像は、FV10-ASW 4.2 Viewer 及び ImageJ software を用いて適切に処理を行った。

[mRNA 抽出、逆転写反応、リアルタイム PCR]

・ mRNA 抽出

HeLa 細胞は、1488.4 cells/63.2 μL /well の密度で 96-well microplate に播種し一晩培養後、トレハロースを曝露した。D-PBS (-) 50 μL で洗浄後、Lysis Solution 50 μL を加えて 5 回ピペッティングを行い、室温で 5 分間インキュベートした。Stop Solution 5 μL を加えて 5 回ピペッティングを行い、室温で 2 分間インキュベートした。細胞可溶化液は、0.2 mL PCR Tube に回収し、 -80°C で保存した。

Lysis Solution

組成	1 反応
Lysis Solution	49.5 μL
DNase I	0.5 μL

・ 逆転写反応

上記で回収した細胞可溶化液 15 μL を RT Master Mix 35 μL と混合後、Veriti™ 96-well Thermal cycler を用いて逆転写反応を行い cDNA を作製した。

RT Master Mix

組成	1 反応 35 μL
2 × Fast Advanced RT Buffer	25 μL
20 × Fast Advanced RT Enzyme Mix	2.5 μL
Nuclease-free Water	7.5 μL

逆転写反応条件

反応	段階	サイクル	温度	時間
Reverse transcription	1	1	37°C	30 min
RT inactivation	2	1	95°C	5 min
Hold	3	1	4°C	∞

・リアルタイム PCR

96-well Piko PCR white plate に RT Master Mix を 8 μ L 加えた後、上記で作製した cDNA 溶液を 2 μ L 加えた。Optical Adhesive Film でシールした後、軽くボルテックスし、遠心した。PikoReal 96 Real-Time PCR System を用いて PCR 反応を行った。

RT Master Mix

組成	1 反応 8 μ L
PowerUp SYBR Green Master Mix	5 μ L
10 μ M forward primer	0.2 μ L
10 μ M reverse primer	0.2 μ L
Nuclease-free Water	2.6 μ L

PCR 反応条件

反応	段階	サイクル	温度	時間
UDG activation	1	1	50°C	2 min
<u>Enzyme activation</u>	2	1	95°C	10 min
			95°C	3 sec
PCR	3	40	60°C	30 sec
			60°C	30 sec
	4	1	60°C	30 sec
<u>Dissociation curve</u>	5	1	60°C -95°C	
	6	1	20°C	10 sec

[タンパク質リン酸化レベルの網羅的解析]

HeLa 細胞を 100 mm dish 8 枚に播種し、コントロール用 4 枚とトレハロース曝露用 4 枚として一晩培養した後、トレハロースを曝露し、6 時間後に回収した。回収は、D-PBS (-) 1 mL で 3 回洗浄して氷上に移し、Lysis buffer 100 μ L を添加してセルスクレーパーで細胞を剥ぎ取った。4 枚の dish を合わせて 1 サンプルとするために、1 枚の dish から回収した細胞可溶化液を、洗浄済みの次の dish に移し、1 枚目の細胞可溶化液を用いて細胞を剥ぎ取ることを 4 枚分繰り返す、最終的に 1 本の 1.5 mL チューブに回収した。その後、4°C で 30 分間ローテーションした後、4°C、14,000 \times g で 5 分間遠心し、上清を

回収し、タンパク質定量を行った。次に、8-Well Multi-dish に入れたメンブレン A 及び B に Array Buffer 1 を加え、室温で 1 時間振とうしてブロッキングを行った。回収した細胞可溶化液を Array Buffer 1 を用いて 470 µg/2 mL に調製し、8-Well Multi-dish に入れたメンブレン A 及び B に 1 mL ずつ加え、4°C で一晩振とうした。Wash Buffer を用いて洗浄（10 分間 × 3 回）後、Detection Antibody Cocktail A 及び B（Array Buffer2 及び 3 で希釈）を加え、室温で 2 時間振とうした。Wash Buffer を用いて洗浄（10 分間 × 3 回）後、Streptavidin-HRP（Array Buffer2 及び 3 で希釈）を加え、室温で 30 分間振とうした。Wash Buffer を用いて洗浄（10 分間 × 3 回）後、Chemi Reagent Mix と反応させた。化学発光は、ImageQuant LAS 4000 mini を用いて検出し、スポットの密度は ImageQuant TL software LAS-4000 を用いて定量した。

Chemi Reagent Mix

組成	1 反応 1 mL
Chemi Reagent 1	500 µL
Chemi Reagent 2	500 µL

[タンパク質発現ベクターの作製及び導入]

HeLa 細胞は、 20×10^4 cells/60 mm dish の密度で播種し、一晩培養した。Human (HA)-c-Jun 及び FLAG-JunB 発現用ベクターは、pcDNATM3.1/Zeo⁽⁺⁾ Mammalian Expression Vector を用いて作製した。Opti-MEM 1 mL に pcDNATM3.1/Zeo⁽⁺⁾ Mammalian Expression Vector (2.5 µg) または HA-c-Jun 及び FLAG-JunB 発現用ベクター (各 1.25 µg) を加えた後、LipofectamineTM LTX Reagent 5 µL を加えてボルテックスし、室温で 25 分間インキュベートした。新鮮培地 5 mL に交換後、DNA-Lipofectamine LTX 混合溶液 1 mL を添加し、24 時間培養後、トレハロースを曝露した。

[統計解析]

全てのデータは、平均値 ± 標準偏差 (mean ± S.D.) で示した。統計解析は、Mini-StatMate software (Atoms) を用いて行い、統計学的有意性は one-way ANOVA 及び Tukey test により決定した。

引用文献

- 1 Ahmed, I. *et al.* Development and characterization of a new Parkinson's disease model resulting from impaired autophagy. *J Neurosci* **32**, 16503-16509, doi:10.1523/jneurosci.0209-12.2012 (2012).
- 2 Anglade, P. *et al.* Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* **12**, 25-31 (1997).
- 3 Arotcarena, M. L., Teil, M. and Dehay, B. Autophagy in Synucleinopathy: The Overwhelmed and Defective Machinery. *Cells* **8**, 6, piiE565, doi:10.3390/cells8060565 (2019).
- 4 Atsaves, V. *et al.* Constitutive control of AKT1 gene expression by JUNB/CJUN in ALK+ anaplastic large-cell lymphoma: a novel crosstalk mechanism. *Leukemia* **29**, 2162-2172, doi:10.1038/leu.2015.127 (2015).
- 5 Bjørkøy, G. *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* **21**, 603-614 (2005).
- 6 de Lau, L. M. and Breteler, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* **5**, 525-535, doi:10.1016/S1474-4422(06)70471-9 (2006).
- 7 DeBosch, B. J. *et al.* Trehalose inhibits solute carrier 2A proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis. *Sci Signal* **9**, 416, ra21, doi:10.1126/scisignal.aac5472 (2016).

- 8 Decressac, M. *et al.* TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from α -synuclein toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110**, 1817-1826. doi:10.1073/pnas.1305623110. (2013).
- 9 Dehay, B. *et al.* Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J Neurosci* **30**, 12535-12544, doi:10.1523/jneurosci.1920-10.2010 (2010).
- 10 Elbein, A.D. The metabolism of alpha,alpha-trehalose. *Adv Carbohydr Chem Biochem* **30**, 227-256. Review (1974).
- 11 Ferron, M. *et al.*, A RANKL-PKC β -TFEB signaling cascade is necessary for lysosomal biogenesis in osteoclasts. *Genes Dev* **15**, 955-969. doi:10.1101/gad.213827.113 (2013).
- 12 Friedman, L.G. *et al.* Disrupted autophagy leads to dopaminergic axon and dendrite degeneration and promotes presynaptic accumulation of α -synuclein and LRRK2 in the brain. *J Neurosci* **30**, 7585-7593. doi: 10.1523/jneurosci.5809-11.2012. (2012).
- 13 Garces de Los Fayos Alonso, I. *et al.* The role of activator protein-1 (AP-1) family members in CD30-positive lymphomas. *Cancers (Basal)* **10**, pii: E93. doi: 10.3390/cancers10040093. (2018).
- 14 Hara, T. *et al.* Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885-889, doi:10.1038/nature04724 (2006).
- 15 Higuchi, T., Nishikawa, J. and Inoue, H. Sucrose induces vesicle accumulation and autophagy. *J Cell Biochem* **116**, 609-617, doi:10.1002/jcb.25012 (2015).

- 16 Hosseinpour-Moghaddam, K., Caraglia, M. and Sahebkar, A. Autophagy induction by trehalose: Molecular mechanisms and therapeutic impacts. *J Cell Physiol* **233**, 6524-6543, doi:10.1002/jcp.26583 (2018).
- 17 Ishihara, R. *et al.* Molecular cloning, sequencing and expression of cDNA encoding human trehalase. *Gene* **202**, 69-74, doi:10.1016/s0378-1119 (97) 00455-1 (1997).
- 18 Kabeya, Y. *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* **19**, 5720-5728, doi:10.1093/emboj/19.21.5720 (2000).
- 19 Kaizuka, T. *et al.* An Autophagic Flux Probe that Releases an Internal Control. *Mol Cell* **64**, 835-849, doi:10.1016 / j.molcel.2016.09.037 (2016).
- 20 Kalia, L.V. and Lang, A.E. Parkinson's disease. *Lancet*. **29**, 896-912. doi:10.1016/S0140-6736 (14) 61393-3 (2015).
- 21 Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**, 132-141. doi:10.1038/ncb2152 (2011)
- 22 Komatsu, M. and Ichimura, Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett* **584**, 1374-1378, doi:10.1016/j.febslet.2010.02.017 (2010).
- 23 Komatsu, M. *et al.* Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**, 880-884, doi:10.1038/nature04723 (2006).

- 24 Lee, H. J., Yoon, Y. S. and Lee, S. J. Mechanism of neuroprotection by trehalose: controversy surrounding autophagy induction. *Cell Death Dis* **9**, 712, doi:10.1038/s41419-018-0749-9 (2018).
- 25 Li, Y. *et al.* Protein kinase C controls lysosome biogenesis independently of mTORC1. *Nat Cell Biol* **18**, 1065-1077, doi:10.1038/ncb3407 (2016).
- 26 Medina, D.L. *et al.* A. Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nat Cell Biol* **17**, 288-299 (2015).
- 27 Moors, T. E. *et al.* Therapeutic potential of autophagy-enhancing agents in Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* **12**, 11, doi:10.1186/s13024-017-0154-3 (2017).
- 28 Palmieri, M. *et al.* mTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases. *Nat Commun* **8**, 14338, doi:10.1038/ncomms14338 (2017).
- 29 Parzych, K. R. and Klionsky, D. J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* **20**, 460-473, doi:10.1089/ars.2013.5371 (2014).
- 30 Pérez-Benavente, B. *et al.* GSK3-SCF(FBXW7) targets JunB for degradation in G2 to preserve chromatid cohesion before anaphase. *Oncogene* **32**, 2189-2199, doi:10.1038/onc.2012.235 (2013).
- 31 Puertollano, R., Ferguson, S. M., Brugarolas, J. and Ballabio, A. The complex relationship between TFEB transcription factor phosphorylation and subcellular localization. *EMBO J* **37**, doi:10.15252/embj.201798804 (2018).
- 32 Rocznik-Ferguson, A. *et al.* The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Sci Signal* **5**, ra42,

- doi:10.1126/scisignal.2002790 (2012).
- 33 Sarkar, S.*et al.*, Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem* **282**, 5641-5652, doi:10.1074/jbc.M609532200 (2007).
- 34 Sato, S. *et al.* Loss of autophagy in dopaminergic neurons causes Lewy pathology and motor dysfunction in aged mice. *Sci Rep* **8**, 2813, doi:10.1038/s41598-018-21325-w (2018).
- 35 Senkevich, K. and Gan-Or, Z. Autophagy lysosomal pathway dysfunction in Parkinson's disease; evidence from human genetics. *Parkinsonism Relat Disord*, doi:10.1016/j.parkreldis.2019.11.015 (2019).
- 36 Settembre, C. *et al.* TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* **332**, 1429-1433, doi:10.1126/science.1204592 (2011).
- 37 Settembre, C. *et al.* A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J* **31**, 1095-1108, doi:10.1038/emboj.2012.32 (2012).
- 38 Suizu, F. *et al.* The E3 ligase TTC3 facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt. *Dev Cell* **17**, 800-810, doi:10.1016/j.devcel.2009.09.007 (2009).
- 39 Toulorge, D. *et al.*, Molecular changes in the postmortem parkinsonian brain. *J Neurochem* **139**, 27-58, doi:10.1111/jnc.13696 (2016).
- 40 Wu, Y. T. *et al.*, mTOR complex 2 targets Akt for proteasomal degradation via phosphorylation at the hydrophobic motif. *J Biol Chem* **286**, 14190-14198, doi:10.1074/jbc.M111.219923 (2011).

- 41 Xia, Y. *et al.* MEKK1 mediates the ubiquitination and degradation of c-Jun in response to osmotic stress. *Mol Cell Biol* **27**, 510-517, doi:10.1128/mcb.01355-06 (2007).
- 42 Yoon, Y. S. *et al.* Is trehalose an autophagic inducer? Unraveling the roles of non-reducing disaccharides on autophagic flux and alpha-synuclein aggregation. *Cell Death Dis* **8**, e3091, doi:10.1038/cddis.2017.501 (2017).
- 43 TREHA web; <https://treha.jp/knowledge/about/>
- 44 宮良 政嗣 パーキンソン病関連神経毒MPP⁺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 (博士論文 : 2016)
- 45 坂本 修一朗 低濃度MPP⁺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 (博士論文 : 2017)

本論文に関連した学会発表

- 2019年2月18日（広島市）

第54回広島神経医科学研究会

ポスター発表

「リソソーム機能亢進物質トレハロースによるAkt発現量低下とそのメカニズム検討」

○梅田 香苗^{1,2} 宮良 政嗣^{1,3,4} 渡辺 南海子¹ 太田 茂^{1,5} 古武 弥一郎¹

(¹広島大, ²学振DC, ³岐阜薬大, ⁴学振PD, ⁵和歌山医大)

- 2019年8月31日～9月1日（京都市）

フォーラム2019 衛生薬学・環境トキシコロジー

口頭発表

「トレハロースによるAkt活性低下のメカニズムに関する研究」

梅田 香苗^{1,2}, ○宮良 政嗣^{1,3,4}, 畑宮 駿一¹, 中西 剛³, 太田 茂^{1,5}, 古武 弥一郎¹

(¹広島大, ²学振DC, ³岐阜薬大, ⁴学振PD, ⁵和歌山医大)

- 2020年3月25日～28日（京都市）

日本薬学会第140年会

口頭発表

「トレハロースによるAkt発現量低下とその分子機序の解明」

○梅田 香苗^{1,2}, 宮良 政嗣^{1,3,4}, 畑宮 駿一¹, 古武 弥一郎¹

(¹広島大, ²学振DC, ³岐阜薬大, ⁴学振PD)

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系科学研究科 生体機能分子動態学研究室 古武 弥一郎 教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究において、多くのご助言、ご討論をいただきました 広島大学大学院医系科学研究科 生体機能分子動態学研究室 佐能 正剛 助教に厚く感謝申し上げます。

本研究において、ご指導、ご助言をいただきました広島大学大学院医系科学研究科 太田 茂 名誉教授に厚く感謝申し上げます。

本研究において、終始懇切な直接のご指導並びに多大なるご助言、ご協力を賜りました広島大学大学院医系科学研究科 生体機能分子動態学研究室 宮良 政嗣 客員研究員に厚く感謝申し上げます。

学位（博士）取得にあたり、審査委員として、多くのご助言、ご討論を賜りました広島大学大学院医系科学研究科 松尾 裕彰 教授、森岡 徳光 教授、細井 徹 准教授に厚く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、常に実験環境を整えてくださり、また学生生活を充実したものにしてくださいました広島大学大学院医系科学研究科 生体機能分子動態学研究室の先輩方、後輩の皆様に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、特別研究員 DC-2 として研究奨励金及び研究費をご支援いただき、研究及び生活を支えていただきました日本学術振興会に厚く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、長井記念薬学研究奨励金をご支援頂き、生活を支えていただきました日本薬学会に厚く感謝申し上げます。

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。