

## パーキンソン様細胞死における細胞内 Mg イオン動態の 新規な蛍光イメージング技術を利用した解明

岡 浩太郎

慶應義塾大学理工学部

**概要** マグネシウムイオン(Mg<sup>2+</sup>)はカルシウムイオン、カリウムイオン、ナトリウムイオンに次いで生体内に 4 番目に多い陽イオンであり、細胞機能の調節において非常に重要な役割を担っているため、生命活動に必要不可欠である。本研究は細胞内 Mg<sup>2+</sup>動態を詳細に調べることで、細胞内情報伝達物質としての Mg<sup>2+</sup>の新規な役割を明らかにした。我々が独自に開発してきた蛍光 Mg<sup>2+</sup>プローブと種々の細胞内セカンドメッセンジャープローブを併用し、包括的なマルチカラーイメージングを行った。特にエネルギー代謝に関係したミトコンドリア機能と細胞内 Mg<sup>2+</sup>との関係を神経病態と関連付けた。パーキンソン様細胞死を誘導する薬物を培養神経細胞に加え、細胞内 Mg 動員の有無とその機構について明らかにした。また病態と Mg<sup>2+</sup>との関係について明らかにするため、ヒト iPS 細胞由来神経細胞にパーキンソン様細胞死を誘導し、Mg 動員メカニズムと神経死との関係を網羅的に解析し、エネルギー代謝を制御する新規なセカンドメッセンジャーとしての Mg の役割について包括的に明らかにすることを試みた。

PC12 細胞に対してパーキンソン様細胞死を引き起こすことが知られていた MPP<sup>+</sup>(1-methyl-4-phenylpyridium)を、ヒト iPS 細胞から分化誘導させた神経細胞に対して添加したところ、MPP<sup>+</sup>刺激によりミトコンドリアから細胞質中に Mg<sup>2+</sup>を放出することがわかった。またこの放出にはミトコンドリア内膜の膜電位の脱分極を伴っていることが判明した。このことは、PC12 細胞はドーパミントランスポーターを介して細胞内に MPP<sup>+</sup>を取り込み、細胞死を引き起こすという、従来知られていたのと共通なメカニズムでパーキンソン様細胞死を引き起こしたことを示す。また PC12 細胞について MPP<sup>+</sup>添加後 24 時間の間に起きる種々の Mg<sup>2+</sup>チャネル・輸送体の mRNA 変化を調べた。その結果、MPP<sup>+</sup>添加により mRNA 量が急激に減少するもの、細胞死に対応して急速に増加するものなど、様々な変化を示すことがわかった。さらに興味深いのは、これら減少する Mg<sup>2+</sup>チャネル・輸送体を過剰発現させると、MPP<sup>+</sup>による細胞死を大きく緩和できたことである。これらの結果は細胞内 Mg<sup>2+</sup>環境の適切な調整によりパーキンソン様の細胞死を緩和することが可能になるものと期待される。

### 1. 研究目的

#### 1.1 研究の背景

マグネシウムイオン(Mg<sup>2+</sup>)はカルシウムイオン、カリウムイオン、ナトリウムイオンに次いで生体内で 4 番目に多く存在する陽イオンであり、細胞機能の調節において非常に重要な役割を担っているため、生命活動に必要不可欠なイオンである。細胞内の Mg<sup>2+</sup>は免疫細胞である T 細胞ではセカンドメッセンジャーとしての役割<sup>(1)</sup>を果たしていることや、活性酸素種(ROS)に対して保護効果<sup>(2)</sup>を持つことが報告されてきている。細胞内 Mg<sup>2+</sup>の濃度変化は細胞に

影響を与えることから、その動員機構を知ることは重要である。当研究室の先行研究では、ラット海馬神経細胞においてグルタミン酸刺激を与えた際に細胞内 Mg<sup>2+</sup>濃度が上昇すること<sup>(3)</sup>や一酸化窒素シグナル伝達経路がミトコンドリアから細胞質中へのマグネシウムの放出を誘導すること<sup>(4)</sup>を明らかにしてきた。

パーキンソン病はアルツハイマー病の次に頻度の高い神経変性疾患である。α-シヌクレイン封入体のレビー小体によって黒質緻密部のドーパミン作動性神経を損傷することがその原因として知られている<sup>(5)</sup>。しかしながら、細胞

死の詳細については解明されておらず、神経変性の予防または治療をする薬や方法の研究がされてきているものの、いまだ神経保護効果のある薬物の探索が進められている<sup>(6)</sup>。

パーキンソン病モデルとして MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) の代謝物であるパーキンソン病誘導試薬の MPP<sup>+</sup> (1-methyl-4-phenylpyridium) が培養細胞での実験に用いられている。MPP<sup>+</sup>が神経細胞をどのようにして破壊するかは完全には解明されていないが、MPP<sup>+</sup>はドーパミン輸送体により神経細胞内に取り込まれ、ミトコンドリアの電子伝達系に関与している呼吸鎖複合体 I を阻害することにより細胞死を起こすと考えられている<sup>(7,8)</sup>。

ドーパミン作動性神経において、Mg<sup>2+</sup>の濃度変化はパーキンソン病に大きく関わっている可能性がある。パーキンソン病患者の脳においてマグネシウム濃度が減少している<sup>(9)</sup>ことやマグネシウムが  $\alpha$ -シヌクレインの凝集を阻害し、レビー小体の形成を妨げる<sup>(10)</sup>ことが知られている。しかしながら Mg<sup>2+</sup>の挙動とパーキンソン病態との分子レベルでの解明は遅れている。その理由は現在までに細胞内での Mg<sup>2+</sup>の挙動を調べるための適切なツールがなかったことによると考えられる。

## 1.2 本研究の目的

本研究では細胞内 Mg<sup>2+</sup>動態を詳細に調べることにより、細胞内情報伝達物質としての Mg<sup>2+</sup>の新規な役割を明らかにすることを目的とした。具体的には、我々が独自に開発してきた蛍光 Mg<sup>2+</sup>プローブと種々の細胞内セカンドメッセンジャー (Ca イオン、サイクリック GMP およびサイクリック AMP, ATP 等) プローブを併用し、包括的なマルチカラーイメージングを行う。特にエネルギー代謝に関連したミトコンドリア機能と細胞内 Mg<sup>2+</sup>との関係を神経病態と関連付けて明らかにすることを目指した。具体的にはパーキンソン様細胞死を誘導する種々の刺激を培養神経細胞に加え、細胞内 Mg 動員の有無とその機構について明らかにする。また病態と Mg<sup>2+</sup>との関係を調べるため、ヒト iPS 細胞由来神経細胞にパーキンソン様細胞死を誘導し、Mg 動員メカニズムと神経死との関係を網羅的に解析し、エネルギー代謝を制御する新規なセカンドメッセンジャーとしての Mg の役割について包括的に明らかにすることを目的とした。またパーキンソン様の細胞死に関して細胞内 Mg<sup>2+</sup>濃度を

制御することにより細胞死を防ぐかどうかについても検討した。

## 2. 研究方法

ラット培養神経細胞およびヒト iPS より分化誘導したドーパミン神経細胞を用いた細胞内 Mg<sup>2+</sup>動員メカニズムを、マルチカラー蛍光イメージング技術を利用して進めた。我々が進めてきた先行研究から、パーキンソン様の細胞死では、その初期にミトコンドリアから大量の Mg イオンが放出されていることがわかってきた<sup>(11,12)</sup>。同様な Mg<sup>2+</sup>のミトコンドリアからの放出は、グルタミン酸刺激とそれに伴う細胞死<sup>(3)</sup>だけでなく、通常の神経興奮に伴っても Mg 動員が見られること<sup>(4)</sup>も明らかにされてきている。これらのことから神経細胞機能とその不全、ミトコンドリアによるエネルギー代謝等と Mg<sup>2+</sup>との関係を明らかにすることとした。

### 2.1 パーキンソン病神経変性と細胞死における細胞内 Mg 動員の役割の解析

パーキンソン様細胞死のプロセスは、MPP<sup>+</sup>をドーパミン作動性神経細胞に添加することにより真似ることができ、これに伴いミトコンドリア内から Mg<sup>2+</sup>が細胞質に向けて流出することが我々の PC12 を用いた研究<sup>(11)</sup>やラット胎児神経細胞を用いた研究<sup>(12)</sup>からわかってきた。しかしながらその分子機序については十分に理解できていない。そこで従来研究に用いてきたラット海馬神経細胞の他、ヒト iPS 由来ドーパミン神経細胞についてこの細胞死メカニズムを明らかにした。またヒト iPS 細胞から多量のドーパミン作動性神経細胞を誘導する手法について検討を進め、分化誘導したヒト神経細胞を用いて、MPP<sup>+</sup>による神経変性と細胞死との関係を調べた。

### 2.2 エネルギー代謝と関連した細胞内 Mg<sup>2+</sup>動態の解明

現在細胞内 Mg<sup>2+</sup>濃度を調整している種々の Mg<sup>2+</sup>輸送体や Mg<sup>2+</sup>チャネルが知られてきており、それらは細胞膜やミトコンドリア内膜に局在している。そこでこれらイオンチャネルのクローニングを進めると共に、MPP<sup>+</sup>刺激に伴う mRNA 量変化を調べ、それらイオンチャネルのうち主要なものをノックダウンした際の Mg<sup>2+</sup>動態について調べた。また我々が開発したミトコンドリア内の Mg<sup>2+</sup>濃度を選択的に計測することが可能なプローブを利用して、上述の Mg<sup>2+</sup>輸送体が細胞内 Mg<sup>2+</sup>濃度変化に与える影響を調べた。

また細胞のエネルギー状態を評価するために、細胞質での ATP 濃度変化とミトコンドリアに局在する  $Mg^{2+}$  輸送タンパク質との関係も明らかにした。また併せてミトコンドリアエネルギー代謝についてメタボローム解析手法を利用して調べ、 $Mg^{2+}$ によるエネルギー代謝制御の可能性を検討した。

### 3. 研究結果

#### 3.1 パーキンソン病神経変性と細胞死における細胞内 $Mg$ 動員の役割の解析

パーキンソン病態誘導試薬である  $MPP^+$  の刺激により細胞内の  $Mg^{2+}$  濃度がどのように変化するかを観察した。播種してから 14 日以上経過した iPS 細胞由来神経細胞を用いて、 $Mg^{2+}$  感受性色素である Mag-Fura-2 を導入した。共焦点顕微鏡で観察開始から 2 分後に  $100 \mu M$  の  $MPP^+$  を投与し、全体で 40 分間観察した。細胞体ごとの蛍光強度平均値を抽出したのから背景の蛍光強度を引いて、移動平均し、観察開始時の輝度でノーマライズした相対蛍光強度を求めた。ドーパミン作動性神経マーカーである Tyrosine Hydroxylase (TH) による抗体染色の結果と対応付け、全神経細胞中の TH+/TH- の割合、 $MPP^+$  刺激後の応答結果の割合をまとめたところ、細胞集団の内訳が明らかになった (Fig. 1)。 $MPP^+$  で刺激した場合、細胞質中の  $Mg^{2+}$  濃度が上昇した細胞、減少した細胞、変化が見られなかった細胞など多様な応答が見られ、主な応答としては、 $Mg^{2+}$  濃度は上昇した。また、これらの応答の割合は TH+

細胞で  $Mg^{2+}$  濃度は上昇した細胞が 55%、減少した細胞は 31%、変化が見られなかった細胞は 14% であり、TH- 細胞では  $Mg^{2+}$  濃度が上昇した細胞が 58%、減少した細胞は 16%、変化が見られなかった細胞は 26% であることがわかった。TH+ 細胞と TH- 細胞の細胞質中の  $Mg^{2+}$  濃度変化を比較したところ有意な差はなかった。

次に、 $MPP^+$  刺激により細胞質中の  $Mg^{2+}$  濃度が上昇したことがミトコンドリアからの流出が原因であるかを調べるために、 $MPP^+$  の刺激によりミトコンドリア内の  $Mg^{2+}$  濃度がどのように変化するかを観察した。播種してから 14 日以上経過した iPS 細胞由来神経細胞を用いて、ミトコンドリア  $Mg^{2+}$  感受性色素である KMG-301-AM を導入した。共焦点顕微鏡で観察開始から 2 分後に  $100 \mu M$  の  $MPP^+$  を投与し、全体で 40 分間観察した。細胞体ごとの蛍光強度平均値を抽出したのから背景の蛍光強度を引き、移動平均をし、観察開始時の値で規格化して相対蛍光強度を求めることにより、細胞ごとの蛍光強度変化を測定した。ドーパミン作動性神経マーカーである Tyrosine Hydroxylase (TH) による抗体染色の結果と対応付けし、全神経細胞中の TH+/TH- の割合、 $MPP^+$  刺激後の応答結果の割合を調べたところ、 $MPP^+$  に対する感受性の異なる細胞集団の分布が明らかになった (Fig. 2)。 $MPP^+$  で刺激した場合、ミトコンドリア中の  $Mg^{2+}$  濃度が上昇した細胞、減少した細胞などその応答は多様であることがわかり、また主な応答としては  $Mg^{2+}$  濃度の減少が見られた。また、これらの応答の割合は TH+ 細胞で  $Mg^{2+}$  濃度が減少した細胞は 74%、上

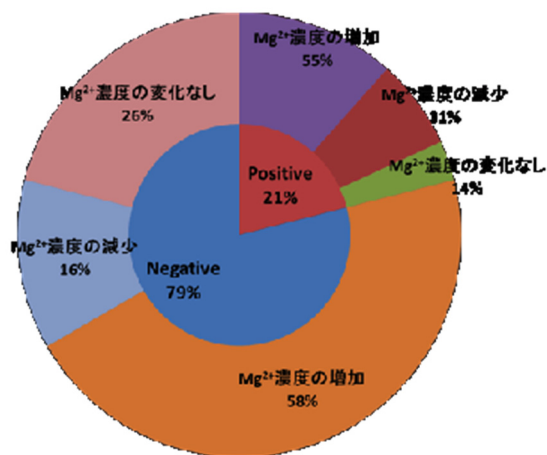


Fig. 1. Intracellular  $Mg^{2+}$  increase by the application of  $MPP^+$

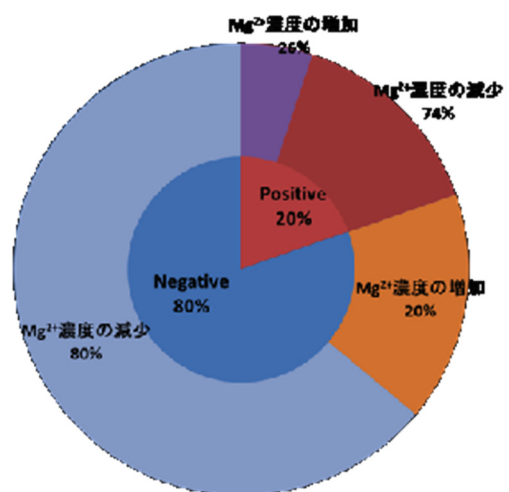


Fig. 2. Mitochondrial  $Mg^{2+}$  increase by the application of  $MPP^+$

昇した細胞は 26%, TH-細胞で  $Mg^{2+}$ 濃度が減少した細胞は 80%, 上昇した細胞は 20%であることがわかった。

今までの我々の研究から  $MPP^+$ はミトコンドリアの電子伝達系の阻害剤として作用することが知られており,  $MPP^+$ で処理した PC12 細胞ではミトコンドリアの膜電位の低下が報告されている<sup>(13)</sup>。ミトコンドリアからの  $Mg^{2+}$ 流出の原因が膜電位の低下により引き起こされたものであるかを調べるために,  $MPP^+$ の刺激によりミトコンドリア内の膜電位がどのように変化するかを観察した。播種してから 14 日以上経過した iPS 細胞由来神経細胞を用いて, ミトコンドリア内膜の膜電位感受性色素である TMRE を導入した。共焦点顕微鏡での観察開始から 2 分後に 100  $\mu M$  の  $MPP^+$ を投与し, 全体で 40 分間観察した。

細胞体ごとの蛍光強度平均値を抽出したのから背景の蛍光強度を引き, 移動平均をし, 観察開始時を 1 とした時の相対蛍光強度を求めることにより細胞ごとの蛍光強度変化を測定した。ドーパミン作動性神経マーカーである Tyrosine Hydroxylase (TH) による抗体染色の結果と対応付け, 全神経細胞中の TH+/TH-の割合,  $MPP^+$ 刺激後の応答結果の割合を円グラフでまとめたところ, 細胞集団の内訳が明らかになった (Fig. 3)。 $MPP^+$ で刺激した場合, ミトコンドリア膜電位が上昇した細胞, 減少した細胞, 上昇後に減少した細胞など応答が多様であることがわかり, その主な応答はミトコンドリア膜電位の減少だった。また, これらの応答の割合は TH+細胞でミトコンドリア膜電位が減少した細胞が 67%, 上昇後に減少した細胞は 33%, TH-細胞でミトコンドリア膜電位が減少した細胞が 57%, 上昇後に減少した細胞は 33%, 上昇した細胞が 10%であることがわかった。TH+細胞と TH-細胞のミトコンドリア膜電位変化を比較したところ有意な差は見られなかった。

以上の結果から, ヒト iPS 細胞由来神経細胞では,  $MPP^+$ 刺激によりミトコンドリアから細胞質中に  $Mg^{2+}$ を放出していることがわかった。またこの放出にはミトコンドリア内膜の膜電位の脱分極を伴った。

### 3. 2 エネルギー代謝と関連した細胞内 $Mg^{2+}$ 動態の解明

PC12 細胞はドーパミントラスポータを介して細胞内に  $MPP^+$ を取り込み, 細胞死を起こすことから, パーキンソン病態を調べるためのモデル系として広く用いられてきてい

る。そこでこの細胞を用いて,  $MPP^+$ 添加後 24 時間の間に起きる種々の  $Mg^{2+}$ チャネル・輸送体の mRNA 変化を調べた (Fig. 4)<sup>(14)</sup>。

細胞は 3 mM の  $MPP^+$ に 24 時間曝すことにより, 約半数が細胞死することがわかった (Fig. 4 右下の図)。また調査した  $Mg^{2+}$ チャネル・輸送体の中, 3 種類に関してはその発現量が著しく減少している (Fig. 4 において青でハッチしたものが), 一方でその発現量が劇的に上昇するものがあることがわかった (Fig. 4 においてピンクでハッチしたものの)。さらにこれら発現量が増加したものを RNAi 法によりノックダウンすると, 細胞死は有意に増加した。さらに興味深いのは, これら  $Mg^{2+}$ チャネル・輸送体を過剰発現させると,  $MPP^+$ による細胞死を大きく緩和できることが明らかとなった (Fig. 5)。これらのことは, 細胞内  $Mg^{2+}$ 環境の適切な調整によりパーキンソン様の細胞死を緩和することが可能になるのではないかと期待される。

また先に 3. 1でも述べたように, ヒト iPS 細胞由来神経細胞では  $MPP^+$ 添加に伴うミトコンドリアからの  $Mg^{2+}$ 放出が起きる。そこでミトコンドリアでのエネルギー代謝と  $Mg^{2+}$ との関係を明らかにすることを試みた。

ミトコンドリア内膜には Mrs2 と呼ばれる  $Mg^{2+}$ 輸送タンパク質がある。このタンパク質をノックダウンすることによりエネルギー代謝がどのような影響を受けるかを, 細胞内 ATP 濃度センサーとメタボロームによる網羅的な解析を併用して調べた。その結果, この輸送タンパク質をノックダウンすることにより, 細胞内 ATP 濃度の減少が見られ, さらにミト

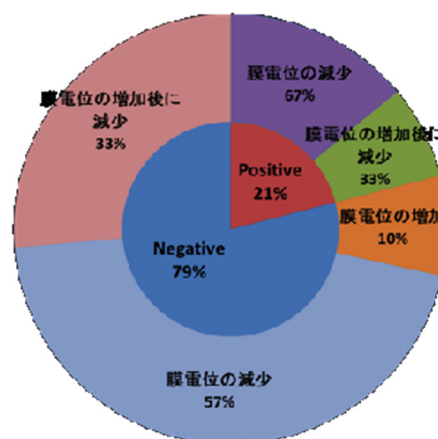
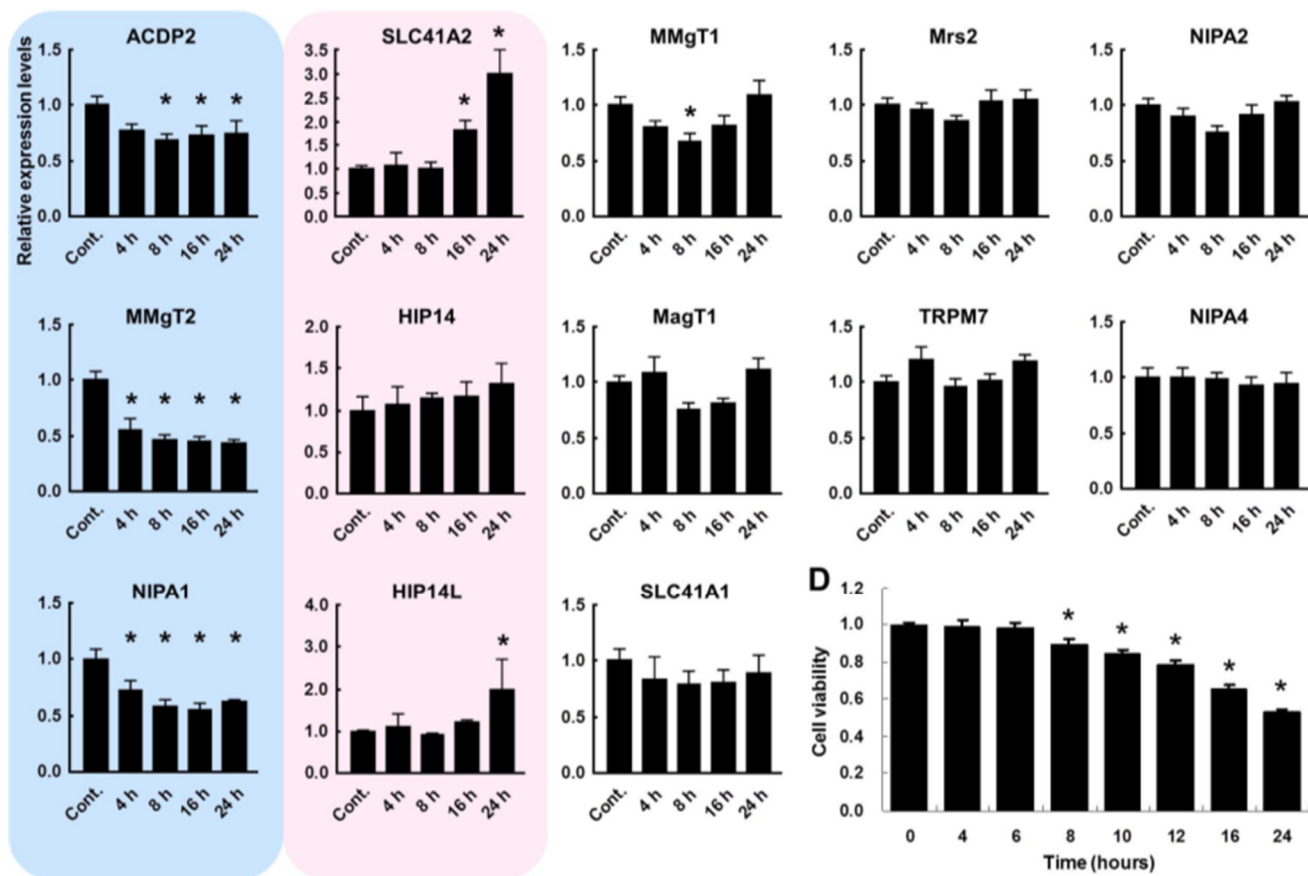
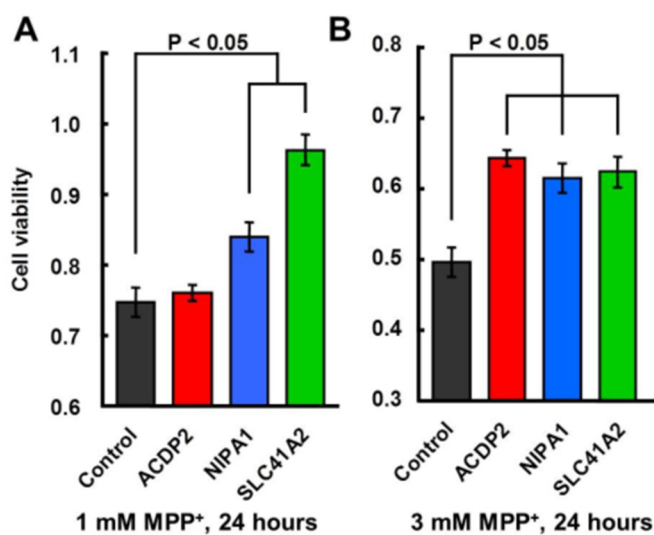


Fig.3. Mitochondrial membrane potential by the application of  $MPP^+$



**Fig. 4.** Expression levels of ACDP2, MMgT2 and NIPA1 were decreased significantly in 4–8 hours after administration of 3 mM MPP<sup>+</sup>



**Fig. 5.** Up-regulation of Mg<sup>2+</sup> transport proteins attenuated the toxicity of MPP<sup>+</sup>

コンドリアは顕著に断片化することがわかった。またメタボローム解析から、好氣的に ATP 産生を行う TCA サイクル

において、著しい中間代謝物の減少が見出した (Fig. 6)<sup>(15)</sup>。



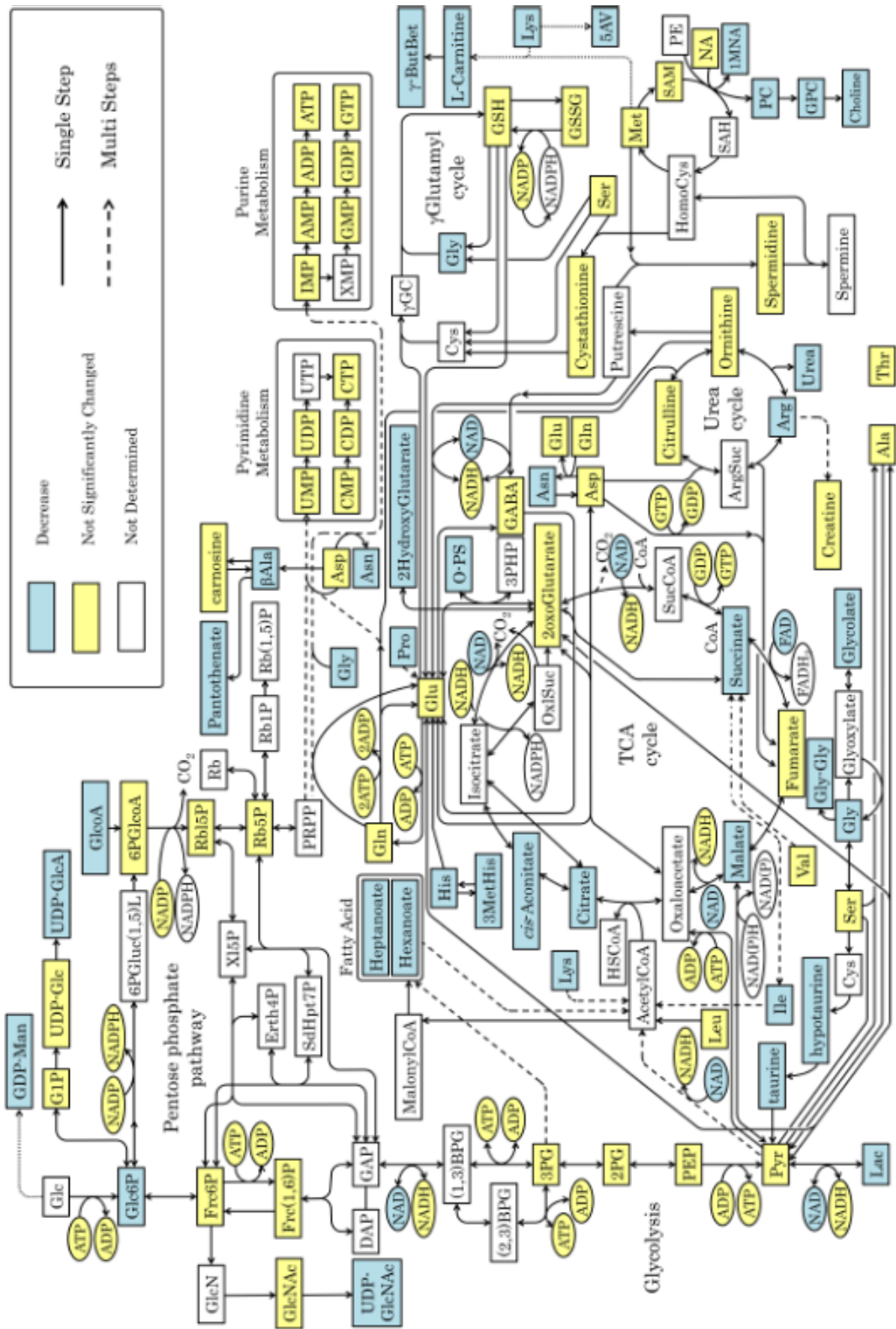


Fig. 6. Mrs2 knock-down modulates metabolism

#### 4. 考察

なぜ、 $Mg^{2+}$ の流入が  $MPP^+$ 添加に伴う細胞死から細胞を保護作用するのだろうか。 $Mg^{2+}$ 流入を抑制した条件では  $MPP^+$ 添加に伴う細胞内の活性酸素種の発生量は多く、細胞質中の ATP 濃度減少率は高い。これらのことは、 $Mg^{2+}$ が活性酸素種の発生を抑制し、ATP 産生を正常に保つことで  $MPP^+$ の毒性から細胞を保護したことを示唆している (Fig. 7)<sup>(14)</sup>。ミトコンドリアの活性酸素発生量はその周囲の  $Mg^{2+}$ 濃度の影響を受けると報告されている<sup>(16)</sup>。

また、ミトコンドリア内の  $Mg^{2+}$ 濃度がクエン酸回路中の酵素の活性に影響を与え、ミトコンドリアの ATP 産生を調節するとの報告もある<sup>(17,18)</sup>。 $MPP^+$ はミトコンドリアの  $Mg^{2+}$ 放出を誘導する一方で、ミトコンドリアは  $Mg^{2+}$ 選択的チャネル  $Mrs2$  を介して周辺の濃度に応じて  $Mg^{2+}$ を取り込んでいる<sup>(19)</sup>。そのため、細胞外から  $Mg^{2+}$ を流入させ、細胞質中の  $Mg^{2+}$ 濃度を上昇させた細胞では、ミトコンドリア内部の  $Mg^{2+}$ 濃度の減少が抑えられ、ATP 産生が維持されたのではないかと考えられる。パーキンソン病のようなミトコンドリア関連病では、ストレスを受けたミトコンドリアは蓄積していた  $Mg^{2+}$ を放出してしまうため、細胞質の濃度に応じた  $Mg^{2+}$ の再取り込みがミトコンドリア内部の  $Mg^{2+}$ 濃度を決め、その活性および病態の進行に影響を与える重要な要素なのではないだろうか。

さらに我々の研究では、過酸化水素やミトコンドリアの脱共役剤である FCCP、ミトコンドリア電子伝達系の阻害剤であるロテノンなどの添加により、NIPA1 や  $MMgT2$  などの発現レベルは減少し、また一方で  $SLC41A2$  のレベルは上昇することを示した<sup>(14)</sup>。これらのことは、ミトコンドリアのエネルギー代謝に  $Mg^{2+}$ が強く関与していることを示唆しており、「エネルギー代謝を制御する新規なセカンドメッセンジャーとしての  $Mg^{2+}$ の役割」が今後さらに注目されるのではないかと考えている。

#### 5. 今後の課題

本研究ではミトコンドリアを中心とした神経細胞内での  $Mg^{2+}$ 濃度変化と、 $Mg^{2+}$ の神経保護作用について述べた。ミトコンドリアはエネルギー生産器官であるが、同時に  $Mg^{2+}$ 貯蔵庫であり、その ATP 産生は  $Mg^{2+}$ 濃度の影響を受ける。ストレス負荷や細胞内シグナルによりミトコンドリア内の  $Mg^{2+}$ 濃度が変化することは、 $Mg^{2+}$ 輸送を通して、細

胞内エネルギー代謝の状況に応じた制御が行われている可能性を示唆している。また、その他の細胞内小器官では細胞質とは異なった  $Mg^{2+}$ 濃度制御が行われていて、細胞機能に重要な役割を果たしている可能性もある。未だ明らかにされていないこのイオンの動態やその役割を詳細に調べていくと、既知の細胞内シグナルだけでは説明できなかった現象を解き明かすことにつながるものと考えている。

また、ミトコンドリア以外の細胞内小器官が  $Mg^{2+}$ 濃度変化にかかわっていたり、細胞内でも部位により濃度変化の様子が異なったりすることはないのだろうか。そのことを調べるために、細胞内の任意の場所に局在させることのできる  $Mg^{2+}$ プローブ、 $KMG-104-AsH$  を開発してきた。このプローブは  $KMG-104$  と、テトラスチンタグ (TCtag) というペプチドタグに選択的に結合するラベル化プローブである  $FlAsH$  の特徴を合わせ持ち、TCtag と結合したときのみ  $Mg^{2+}$ プローブとして機能する<sup>(20)</sup>。そのため、TCtag 付きのタンパク質を細胞内の任意の場所に発現させることで  $Mg^{2+}$ プローブをその場所に局在させることができる。この手法を用いることで、ミトコンドリア以外でも細胞内の特定の場所での  $Mg^{2+}$ 濃度変化を調べることが可能となり、従来同じ2価陽イオンでありながらその役割の解明が強力に

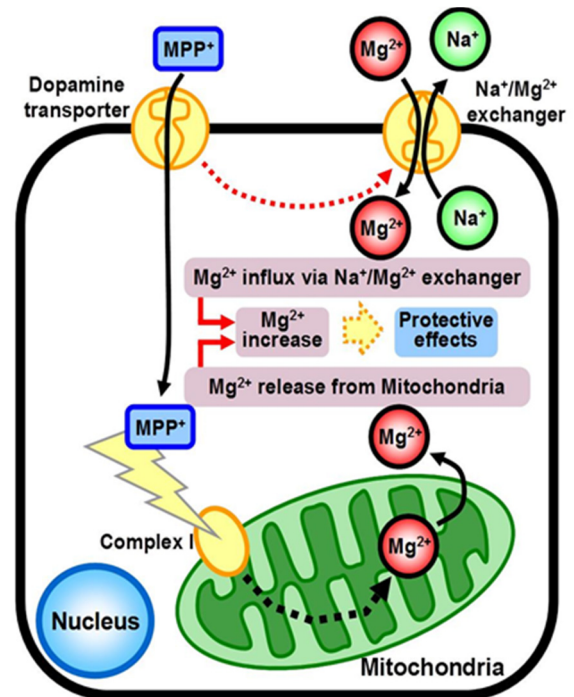


Fig. 7. Mechanism of cell death and  $Mg^{2+}$  mobilization

進められてきたカルシウムイオンにも負けないくらいマグネシウムイオン機能の解明を進めて行きたい。

最後に今回助成いただきました、公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に感謝申し上げます。

## 6. 文献等

1. Li FY, Chaigne-Delalande B, Kanellopoulou C, Davis JC, Matthews HF, Douek DC, Cohen JI, Uzel G, Su HC, Lenardo MJ Li, Second messenger role for  $Mg^{2+}$  revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature* 475, 471-6 (2011).
2. Chen HC, Su LT, González-Pagán O, Overton JD, Runnels LW. A key role for  $Mg^{2+}$  in TRPM7's control of ROS levels during cell stress *Biochem J.* 445, 441-448 (2012).
3. Shindo Y, Fujimoto A, Hotta K, Suzuki K, Oka K. Glutamate-induced calcium increase mediates magnesium release from mitochondria in rat hippocampal neurons. *J Neurosci Res.* 1;88:3125-32 (2010).
4. Yamanaka R, Shindo Y, Hotta K, Suzuki K, Oka K. NO/cGMP/PKG signaling pathway induces magnesium release mediated by mitoKATP channel opening in rat hippocampal neurons. *FEBS Lett.* 19; 587: 2643-8 (2013).
5. de Lau LM, Breteler MM Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5:525–535 (2006).
6. Foltynie T, Kahan J. Parkinson's disease: an update on pathogenesis and treatment. *J Neurol.* 260:1433-40 (2013).
7. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease. *J Neurochem* 54: 823-827 (1990).
8. Schapira AH, Mann VM, Cooper JM, Dexter D, Daniel SE, Jenner P, Clark JB. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 55:2142-5 (1990).
9. Yasui M, Kihira T, Ota K. Calcium, magnesium and aluminum concentrations in Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* ; 13:593-600 (1992).
10. Golts N, Snyder H, Frasier M, Theisler C, Choi P, Wolozin B. Magnesium inhibits spontaneous and iron-induced aggregation of alpha-synuclein. *Biochem J* 277, 16116-23 (2002).
11. Shindo Y, Fujii T, Komatsu H, Citterio D, Hotta K, Suzuki K, Oka K. Newly developed  $Mg^{2+}$ -selective fluorescent probe enables visualization of  $Mg^{2+}$  dynamics in mitochondria. *PLoS One* 6: e23684 (2011).
12. Shindo Y, Yamanaka R, Suzuki K, Hotta K, Oka K. Intracellular magnesium level determines cell viability in the MPP<sup>+</sup> model of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1853: 3182-91 (2015).
13. Selvaraj S, Watt JA, Singh BB. TRPC1 inhibits apoptotic cell degeneration induced by dopaminergic neurotoxin MPTP/MPP<sup>+</sup>. *Cell Calcium.* 46:209-18 (2009).
14. Shindo Y, Yamanaka R, Suzuki K, Hotta K, Oka K. Altered expression of  $Mg^{2+}$  transport proteins during Parkinson's disease-like dopaminergic cell degeneration in PC12 cell. *Biochim Biophys Acta.* 1863(8): 1979-84 (2016).
15. Yamanaka R, Tabata S, Shindo Y, Hotta K, Suzuki K, Soga T, Oka K. Mitochondrial  $Mg^{2+}$  homeostasis decides cellular energy metabolism and vulnerability to stress. *Sci Rep.* 6:30027 (2016).
16. Kowaltowski, AJ, Naia-da-Silva, ES, Castilho, RF, and Vercesi, AE.  $Ca^{2+}$ -stimulated mitochondrial reactive oxygen species generation and permeability transition are inhibited by dibucaine or  $Mg^{2+}$ . *Arch Biochem Biophys* 359: 77-81 (1998).
17. Panov A, Scarpa A.  $Mg^{2+}$  control of respiration in isolated rat liver mitochondria. *Biochemistry* 35: 12849-56 (1996).
18. Rodriguez-Zavala JS, Moreno-Sanchez R. Modulation of oxidative phosphorylation by  $Mg^{2+}$  in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 273: 7850-5 (1998).



19. Kolisek M, Zsurka G, Samaj J, Weghuber J, Schweyen R, Schweigel M. Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic  $Mg^{2+}$  influx system in mitochondria. *EMBO J* 22: 1235-44 (2003).
20. Fujii T, Shindo Y, Hotta K, Citterio D, Nishiyama S, Suzuki K, Oka K. Design and synthesis of a FIAsh-type  $Mg^{2+}$  fluorescent probe for specific protein labeling. *J Am Chem Soc* 136: 2374-81 (2014).

## Study for Intracellular $Mg^{2+}$ Mobilization in Parkinson's Like Cell Death by Using New Fluorescent Imaging Techniques

Kotaro Oka

Faculty of Science and Technology, Keio University

### Summary

$Mg^{2+}$  is an essential cation to maintain cellular functions, and intracellular  $Mg^{2+}$  concentration ( $[Mg^{2+}]_i$ ) is regulated by  $Mg^{2+}$  channels and transporters. Our previous study demonstrated that  $MPP^+$  elicits  $Mg^{2+}$  influx across the cell membrane and  $Mg^{2+}$  mobilization from mitochondria, and the resulting  $[Mg^{2+}]_i$  is an important determinant of the cell viability in  $MPP^+$  model of Parkinson's disease (PD) of PC12 cells. In this study, we also investigate this model in neurons induced from human iPS cells. By using the bio-imaging techniques for visualizing the  $[Mg^{2+}]_i$ , inner mitochondrial  $Mg^{2+}$  concentration ( $[Mg^{2+}]_{mito}$ ), and mitochondrial inner membrane potential, we found that  $MPP^+$  depolarizes mitochondrial inner membrane potential and induces  $Mg^{2+}$  releases from mitochondria to the cytosol. This mechanism is almost same to the  $MPP^+$  model of Parkinson's disease previously reported. Furthermore, we also estimated the mRNA expression levels of  $Mg^{2+}$  transport proteins upon the exposure to  $MPP^+$  in PC12 cells. In thirteen  $Mg^{2+}$  transport proteins examined, mRNA expression level of SLC41A2 was increased and that of ACDP2, NIPA1 and MMgT2 were decreased. Knockdown of SLC41A2, ACDP2 or NIPA1 accelerated the  $MPP^+$ -induced cell degeneration, and overexpression attenuated it. The decrease in the mRNA expression levels of NIPA1 and MMgT2 were also elicited by rotenone,  $H_2O_2$  and FCCP, indicating that mitochondrial dysfunction related to this down-regulation. The increase in that of SLC41A2 was induced by an uncoupler, FCCP, as well as  $MPP^+$ , suggesting that it is an intrinsic protection mechanism against depolarized mitochondrial membrane potential and/or cellular ATP depletion. We also interested in the function of  $Mg^{2+}$  transporter Mrs2 that is localized in mitochondria. The knockdown of Mrs2 reduces the cytosolic level of ATP and also induces fission of mitochondria. Furthermore, comprehensive metabolome analysis reveals that some of the metabolites of TCA cycle decreased. Our results shown here indicate that alteration of  $Mg^{2+}$  transport proteins is implicated in the  $MPP^+$  model of PD, and it affects cell degeneration *via* alternation of energy metabolism.