

論文内容要旨

Histone deacetylase 10 knockout activates
chaperone-mediated autophagy and accelerates
the decomposition of its substrate

(ヒストン脱アセチル化酵素 10 ノックアウトは
シャペロン介在性オートファジーを活性化し、
その基質の分解を促進する)

Biochemical and Biophysical Research
Communications, 2019, in press.

主指導教員：丸山 博文教授
(医系科学研究科 脳神経内科学)

副指導教員：栗栖 薫教授
(医系科学研究科 脳神経外科学)

副指導教員：森野 豊之准教授
(原爆放射線医科学研究所 分子疫学)

大林 瞳

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【目的】

ヒストン脱アセチル化酵素 10 (HDAC10) の基質や機能についてはまだよくわかっていないが、最近 HDAC10 が heat shock cognate protein 70 kDa (HSC70) と結合し、脱アセチル化するといういくつかの報告がされている。HSC70 はオートファジー経路の一つであるシャペロン介在性オートファジー (CMA) において重要な役割を担っている。CMA の障害は一部の神経変性疾患の病因であることが分かっており、CMA を調節する機序の解明はその治療法開発に貢献しうる。そこで我々は HDAC10 が CMA の調節に関わるかどうかを明らかにするため、本研究を行った。

【方法】

我々は CRISPR/Cas9 システムを使って HDAC10 ノックアウト HeLa 細胞を作成し、その CMA 活性を調べた。まず間接的 CMA 活性評価として、CMA 特異的な Lysosome-associated membrane protein 2A (LAMP2A) の発現量をウエスタンブロットと qRT-PCR で調べた。また免疫染色を行い LAMP2A 陽性リソソームの細胞内分布を観察した。次に直接的評価を行うため GAPDH-HaloTag (HT) indicator system を用いて、CMA 基質である GAPDH が細胞質からリソソームに運搬されるのをモニターした。そして GAPDH の分解率を調べるために GAPDH-HT を用いたパルスチェイス実験を行った。

一方マクロオートファジー (MA) の評価を行うために、LC3 turnover assay (autophagic flux の評価) や、強発現させた GFP-LC3 の puncta 数計測 (オートファゴソーム形成を反映する) を行った。

【結果】

我々は 3 種類の HDAC10 ノックアウト細胞株 (HDAC10KO) を樹立し、そのうち HDAC10 エクソン 1 中に両アレル一塩基欠失がみられた株を以下の実験に用いた。

CMA 活性評価について、LAMP2A 発現量はタンパク・mRNA とともに HDAC10KO で増加していた。免疫染色では、野生株 (WT) に比して HDAC10KO で LAMP2A 陽性リソソームが目立って核周囲に集簇していることが確認できた。そして、GAPDH-HT を利用した実験では、HDAC10KO において LAMP2A 陽性リソソームに運搬される GAPDH の量が増加していることが確認され、パルスチェイス実験により HDAC10KO で GAPDH の分解が促進されていることが判明した。これらの結果はいずれも HDAC10KO において CMA が活性化していることを示していた。

一方 MA に関して、LC3 turnover assay では autophagic flux は HDAC10KO でも WT と同等に機能していることが示された。そして GFP-LC3 puncta 数の評価でも、通常培養条件下・

ラマパイシン（mTOR 阻害薬でオートファジーを促進する）投与下いずれにおいても両者に有意な差はなかった。これらの結果から、HDAC10 ノックアウトは MA には影響しないと考えた。

【考察】

HDAC10 がどのように CMA を調節するか、可能性として2つのメカニズムが推察される。一つは HDAC10 ノックアウトによる HSC70 アセチル化が CMA 活性化を促すという仮説である。HSC70 は細胞質内では基質の運搬に、リソソーム膜上・内部では基質の unfolding やリソソーム内への取り込みに関わる、CMA 活性化における重要な要素である。HDAC10 による HSC70 脱アセチル化が CMA のどの段階に機能するのか、さらなる検討が必要である。もう一つは、HDAC10 が AKT 経路に関わり CMA を調整するという仮説である。最近 CMA を活性化するメカニズムとして、飢餓などのストレス条件下ではリソソーム膜上に pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase 1 (PHLPP1) が動員され、AKT を脱リン酸化し、それによって GFAP が脱リン酸化される結果、LAMP2A の重合化が強化されて CMA が活性化することが明らかになった。これまでに HDAC10 は AKT と結合すること、HDAC10 ノックダウンにより AKT 脱リン酸化が促進されることが分かっている。また、HDAC6・10 阻害薬である tubastatin が AKT と PHLPP1 の結合を強くし、AKT リン酸化を抑制するという報告もされている。これらの報告は HDAC10 阻害により PHLPP1-AKT-GFAP 経路を介した CMA 活性化が起こるという仮説を支持している。

【まとめ】

HDAC10 は CMA の調整に関わっており、HDAC10 ノックアウトは CMA を活性化して基質の分解を促進することが明らかになった。

(1981 字)