別記様式第 6 号（第 16 条第 3 項，第 25 条第 3 項関係）

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

博士の専攻分野の名称	博士（　医学　）	氏名	大林　瞳
学 位 授 与 の 条 件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		

論　文　題　目

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）

論文審査担当者

主　　査　　　教授　　今泉　和則　　　　　　　　印

審査委員　　　教授　　川上　秀史

審査委員　　　教授　　酒井　規雄

〔論文審査の結果の要旨〕

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なされている。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との関連性が指摘されており、CMA を調節する機序の解明はその治療法開発に貢献できる可能性がある。そこで 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。

方法としては CRISPR/Cas9 システムを使って HDAC10 ノックアウト HeLa 細胞を作製し、その CMA 活性およびマクロオートファジー（MA）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 で確認した。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状況をモニターした。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。MA 活性評価を行うために、LC3 turnover assay や、強発現させた GFP-LC3 の puncta 数計測を行った。

結果は以下のようにまとめられる。CRISPR/Cas9 システムを用いて 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された。さらに 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。GFP-LC3 puncta 数の評価でも、通常培養条件下・ラマパイシン投与下いずれにおいても両者に有意な差は認めなかった。これらの結果から、HDAC10 のノックアウトは MA には影響しないと考えた。

以上の結果から、HDAC10 は CMA の調節に関わっており、HDAC10 ノックアウトは MA 活性に影響を与えることなく、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。本論文は HDAC10 が CMA 調節に関わることを初めて指摘したものであり、HDAC10 の機能抑制が CMA 障害に起因する神経変性疾患の治療に有用である可能性を見出したと考えられ高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。